



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Π.Μ.Σ. ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

**«Βοτανική και γεωγραφική διαφοροποίηση φρέσκου χυμού πορτοκαλιού
με βάση τις πτητικές ενώσεις, τα φλαβονοειδή και τις συμβατικές
φυσικοχημικές παραμέτρους του με τη βοήθεια της Χημειομετρίας»**



**ΜΑΡΙΑ Β. ΒΑΒΟΥΡΑ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2019

«Η έγκριση της Διατριβής Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης από το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει την αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα (Ν. 5543/1932, άρθρο 202)».

*Στους γονείς μου,
Βασίλη και Ευδοξία*

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα Μεταπτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων, στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη Χημεία και Τεχνολογία Τροφίμων κατά την περίοδο 2013-2015.

Ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Μιχαήλ Κοντομηνά για την επιλογή του θέματος και για την πολύτιμη καθοδήγησή του όχι μόνο κατά τη διεξαγωγή της έρευνας αλλά και καθ' όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Ευχαριστώ, επίσης την επίκουρη καθηγήτρια Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Αναστασία Μπαδέκα για την αμέριστη βοήθειά της κατά τη διεξαγωγή του πειραματικού μέρους της διατριβής αλλά και για την γενικότερη καθοδήγηση και εκπαίδευση που μου παρείχε.

Επίσης, ευχαριστώ το μέλος της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, αναπληρωτή καθηγητή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Γεώργιο Πατακιούτα για το χρόνο που αφιέρωσε στη μελέτη της διατριβής και για τις εύστοχες παρατηρήσεις του.

Ευχαριστώ τον μεταδιδάκτορα κ. Ιωάννη Καραμπάγια για τη διεξαγωγή της στατιστικής ανάλυσης της παρούσας διατριβής αλλά και για την βοήθεια του κατά την ανάπτυξη των αναλυτικών μεθόδων της πειραματικής διαδικασίας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τη διδάκτορα κ. Ιωάννα Κοσμά και όλα τα μέλη του εργαστηρίου Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων για την εποικοδομητική συνεργασία τους.

Οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στο Δωδεκανησιακό Ίδρυμα Υποτροφιών που με τίμησε με τη χορήγηση υποτροφίας.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά όσους με στήριξαν και με ενθάρρυναν κατά τη διεξαγωγή του πειραματικού μέρους καθώς και κατά την εκπόνηση της παρούσας διατριβής.

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στα πλαίσια του Προγράμματος «ΝΕΑ ΓΝΩΣΗ», της περιφέρειας Ηπείρου με τίτλο: «Προσδιορισμός Αυθεντικότητας Επιλεγμένων Ηπειρωτικών Προϊόντων», ΕΣΠΑ 2007-2013, στο διάστημα 2013-2015.

Περιεχόμενα

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
II. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	3
1. Ιστορική αναδρομή στην καλλιέργεια του πορτοκαλιού.....	3
2. Παγκόσμια και Ευρωπαϊκή παραγωγή πορτοκαλιού.....	4
3. Ποικιλίες πορτοκαλιού	6
3.1 Τα κοινά πορτοκάλια.....	7
3.2 Τα ομφαλοφόρα.....	8
3.3 Τα αιματόσαρκα ή σαγκουίνια	9
3.4 Τα γλυκόχυμα.....	9
4. Μορφολογία του καρπού	9
5. Διατροφική σύσταση και θρεπτική αξία του πορτοκαλιού.....	10
5.1 Μακρο-θρεπτικά συστατικά	11
5.2 Μικρο-θρεπτικά συστατικά	13
6. Πτητικά συστατικά πορτοκαλιού.....	15
6.1 Κατηγορίες πτητικών συστατικών	16
6.1.1 ΤΕΡΠΕΝΙΑ	16
6.1.2 ΑΛΔΕΪΔΕΣ	21
6.1.3 ΑΛΚΟΟΛΕΣ.....	23
6.1.4 ΚΕΤΟΝΕΣ.....	25
6.1.5 ΕΣΤΕΡΕΣ	25
6.1.6 ΕΝΩΣΕΙΣ ΜΕ ΘΕΙΟ Ή ΑΖΩΤΟ	26
6.1.7 ΟΞΕΑ	27
6.2 Τεχνικές απομόνωσης και προσδιορισμού πτητικών συστατικών.....	27
7.1 Κατηγορίες φλαβονοειδών.....	31
7.1.1 ΦΛΑΒΑΝΟΝΕΣ	31
7.1.2 ΦΛΑΒΟΝΟΛΕΣ	31
7.1.3 ΑΝΘΟΚΥΑΝΙΝΕΣ.....	33
7.2 Τεχνικές απομόνωσης και προσδιορισμού φαινολικών ενώσεων	33
8 Ανασκόπηση της βιβλιογραφίας επί της αυθεντικότητας χυμού εσπεριδοειδών.....	36
III. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΕΡΕΥΝΑΣ	38

IV. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	39
1. Δείγματα και επεξεργασία δειγμάτων.....	39
1.1 Συλλογή δειγμάτων πορτοκαλιών	39
1.2 Παρασκευή και αποθήκευση χυμού πορτοκαλιών	39
2. Μέθοδοι προσδιορισμού φυσικοχημικών παραμέτρων πορτοκαλοχυμού	40
2.1 Προσδιορισμός pH	40
2.2 Προσδιορισμός ηλεκτρικής αγωγιμότητας.....	40
2.3 Προσδιορισμός ολικά διαλυμένων στερεών.....	40
2.4 Προσδιορισμός ογκομετρούμενης οξύτητας.....	40
3. Προσδιορισμός πτητικών συστατικών με συνδυασμό Μικροεκχύλισης Στερεάς Φάσης Υπερκείμενου Χώρου / Αέριας Χρωματογραφίας / Φασματοσκοπίας Μαζών (HS-SPME/GC-MS).....	41
3.1 Προετοιμασία δειγμάτων και συνθήκες Μικροεκχύλισης Στερεάς Φάσης Υπερκείμενου Χώρου.....	41
3.2 Συνθήκες λειτουργίας Αέριου Χρωματογράφου/Φασματογράφου Μαζών (GC/MS).....	42
3.3 Ταυτοποίηση και ημι-ποσοτικός προσδιορισμός πτητικών συστατικών	43
4. Απομόνωση και ποσοτικός προσδιορισμός φλαβονοειδών πορτοκαλοχυμού με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)	43
4.1 Προετοιμασία δειγμάτων.....	43
4.2 Οργανολογία HPLC - Συνθήκες ανάλυσης	44
4.3 Ταυτοποίηση και ποσοτικός προσδιορισμός.....	45
5. Στατιστική Ανάλυση	45
5.1 Πολυπαραμετρική Ανάλυση Διακύμανσης (MANOVA)	45
5.2. Γραμμική Διαχωριστική Ανάλυση ή Διακριτική Ανάλυση (LDA).....	49
V. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	51
1. Διαφοροποίηση της γεωγραφικής προέλευσης του πορτοκαλοχυμού	51
1.1 Συμβατικές φυσικοχημικές παράμετροι φρέσκου πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης	51
1.2 Διαφοροποίηση της γεωγραφικής προέλευσης φρέσκου πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν με βάση τις συμβατικές φυσικοχημικές παραμέτρους	54
1.3 Γραμμική διαχωριστική ανάλυση για τις 5 διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές του φρέσκου πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν με βάση τις 4 στατιστικά σημαντικές συμβατικές φυσικοχημικές παραμέτρους	55
1.4 Φλαβονοειδή φρέσκου πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης	59

1.5 Διαφοροποίηση της γεωγραφικής προέλευσης φρέσκου πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν με βάση τα φλαβονοειδή	62
1.6 Γραμμική διαχωριστική ανάλυση για τις 5 διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές του φρέσκου πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν με βάση τα 2 στατιστικά σημαντικά φλαβονοειδή.....	63
1.7 Πτητικές ενώσεις φρέσκου πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης	67
1.8 Διαφοροποίηση της γεωγραφικής προέλευσης ελληνικού πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν με βάση τις πτητικές ενώσεις.....	70
1.9 Γραμμική διαχωριστική ανάλυση για τις 5 διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές του φρέσκου πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν με βάση τις 23 στατιστικά σημαντικές πτητικές ενώσεις	73
1.10 Διαφοροποίηση της γεωγραφικής προέλευσης φρέσκου πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν με βάση τον συνδυασμό συμβατικών φυσικοχημικών παραμέτρων, φλαβονοειδών και πτητικών ενώσεων	76
1.11 Γραμμική διαχωριστική ανάλυση για τις 5 διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές του φρέσκου πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν με βάση των συνδυασμό των 29 στατιστικά σημαντικών παραμέτρων	76
2. Διαφοροποίηση της βοτανικής προέλευσης του πορτοκαλοχυμού	81
2.1 Συμβατικές φυσικοχημικές παράμετροι φρέσκου πορτοκαλοχυμού σύμφωνα με τη βοτανική του προέλευση.....	81
2.2 Διαφοροποίηση της βοτανικής προέλευσης φρέσκου πορτοκαλοχυμού με βάση τις συμβατικές φυσικοχημικές παραμέτρους	85
2.3 Γραμμική διαχωριστική ανάλυση για τις 7 διαφορετικές ποικιλίες του φρέσκου πορτοκαλοχυμού με βάση τις 3 στατιστικά σημαντικές συμβατικές φυσικοχημικές παραμέτρους	86
2.4 Φλαβονοειδή φρέσκου πορτοκαλοχυμού σύμφωνα με τη βοτανική του προέλευση	90
2.5 Διαφοροποίηση της βοτανικής προέλευσης φρέσκου πορτοκαλοχυμού με βάση τα φλαβονοειδή.....	95
2.6. Γραμμική διαχωριστική ανάλυση για τις 7 διαφορετικές ποικιλίες του φρέσκου πορτοκαλοχυμού με βάση τα στατιστικά σημαντικά φλαβονοειδή.....	96
2.7 Πτητικές ενώσεις φρέσκου πορτοκαλοχυμού σύμφωνα με τη βοτανική του προέλευση.....	100
2.8 Διαφοροποίηση της βοτανικής προέλευσης φρέσκου πορτοκαλοχυμού με βάση τις πτητικές ενώσεις	104
2.9 Γραμμική διαχωριστική ανάλυση για τις 7 διαφορετικές ποικιλίες του φρέσκου πορτοκαλοχυμού με βάση τις 51 στατιστικά σημαντικές πτητικές ενώσεις.....	106
2.10 Διαφοροποίηση της βοτανικής προέλευσης φρέσκου πορτοκαλοχυμού με βάση το συνδυασμό συμβατικών φυσικοχημικών παραμέτρων, φλαβονοειδών και πτητικών ενώσεων	110
2.11 Γραμμική διαχωριστική ανάλυση για τις 7 διαφορετικές ποικιλίες του φρέσκου πορτοκαλοχυμού με βάση το συνδυασμό των 58 στατιστικά σημαντικών παραμέτρων	110

VI. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	115
VII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	117
VIII. ABSTRACT	119
IX. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	121

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το πορτοκάλι αποτελεί μέγιστη ασπίδα υγείας εναντίον των διαφόρων ιώσεων. Τα πορτοκάλια βρίσκονται σχεδόν παντού μιας και η καλλιέργειά τους δεν είναι τόσο απαιτητική αν και δεν ευδοκιμούν σε κρύο περιβάλλον. Στις περιοχές της Μεσογείου ο καρπός διατίθεται από νωρίς το χειμώνα μέχρι και τα μέσα της άνοιξης, η παγκοσμιοποίηση όμως τα φέρνει στη διεθνή αγορά όλες τις εποχές του χρόνου. Επίσης, με τη βοήθεια της τεχνολογίας δίνει χυμούς που το κάνουν προϊόν πιο προσφιλές και προσιτό.

Η Ευρωπαϊκή Ένωση εισήγαγε το 1992 με τους κανονισμούς 2081/92 και 2082/92 τους όρους Προστατευόμενη Ονομασία προέλευσης (Π.Ο.Π), Προστατευόμενη Γεωγραφική Ένδειξη (Π.Γ.Ε) και Ειδικά Παραδοσιακά Προϊόντα Εγγυημένα (Ε.Π.Π.Ε) ώστε να ενθαρρύνει την παραγωγή τροφίμων και να προσδώσει πρόσθετη αξία σε προϊόντα τα οποία παράγονται από συγκεκριμένη πρώτη ύλη, με συγκεκριμένο τρόπο επεξεργασίας, πληρούν συγκεκριμένα εδαφικά κριτήρια και έχουν ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και συγκεκριμένη σύνθεση. Το 2006 με στόχο τη βελτίωση του πλαισίου προστασίας των γεωγραφικών ενδείξεων και των ονομασιών προέλευσης οι παραπάνω κανονισμοί αντικαταστάθηκαν από τους 509/06 και 510/06, χωρίς ωστόσο να μεταβληθεί το πεδίο εφαρμογής τους.

Αυτά τα προϊόντα απολαμβάνουν υψηλότερη τιμή στις εγχώριες και διεθνείς αγορές. Παράλληλα, η αγοραστική συμπεριφορά των καταναλωτών εστιάζει στην αναζήτηση τροφίμων με σημαντικά ποιοτικά χαρακτηριστικά και τα κριτήρια επιλογής τους αφορούν όλο και περισσότερο στη γεωγραφική προέλευση του προϊόντος. Επομένως, ο έλεγχος της ποιότητας και της αυθεντικότητας, συμπεριλαμβανομένου του προσδιορισμού της γεωγραφικής και βοτανικής προέλευσης, γίνεται όλο και περισσότερο επιτακτικός, δεδομένου ότι καταβάλλεται προσπάθεια παγκοσμίως να εισαχθούν στην αγορά νέα προϊόντα με μοναδικά χαρακτηριστικά.

Στα πλαίσια αυτά, καταβάλλεται μία γενική προσπάθεια να καθοριστούν περισσότερο ασφαλή κριτήρια που περιλαμβάνουν φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, σάκχαρα, πτητικά συστατικά, φλαβονοειδή και άλλα φαινολικά συστατικά, οργανικά οξέα, ανόργανα συστατικά κλπ. για τον καθορισμό της βοτανικής και γεωγραφικής

προέλευσης του χυμού εσπεριδοειδών. Η γνώση της ακριβούς σύστασης των διαφόρων ποικιλιών εσπεριδοειδών και των προϊόντων τους, όπως οι χυμοί, συμβάλλει στη βελτίωση της ποιότητας και των βιολογικών ιδιοτήτων αυτών των προϊόντων και στην καλύτερη κατανόηση της απήχυσής τους στους καταναλωτές.

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε με σκοπό να διαφοροποιήσει ποικιλίες πορτοκαλιών που καλλιεργούνται σε διάφορες περιοχές της ελληνικής επικράτειας βάσει των φλαβονοειδών, των πτητικών συστατικών που συνεισφέρουν στο άρωμα και στη γεύση του χυμού πορτοκαλιού και των συμβατικών φυσικοχημικών παραμέτρων του.

II. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Ιστορική αναδρομή στην καλλιέργεια του πορτοκαλιού

Η ιστορία των εσπεριδοειδών, στα οποία ανήκει το πορτοκάλι αρχίζει από τα αρχαία χρόνια και σύμφωνα με τη μυθολογία είχε χαρακτηριστεί σύμβολο της γονιμότητας και της ευτυχισμένης συζυγικής ζωής, φράσεις που διατηρούνται μέχρι σήμερα.

Το δέντρο της πορτοκαλιάς (*Citrus sinensis*) ήρθε από την Κίνα ή την Ινδία (καλλιεργούνταν από το 4000 π.Χ.) από τις οποίες το πήραν οι Πορτογάλοι, εξ΄ου και το όνομά της, το 14-15αι. μ.Χ. Στην Ελλάδα ήρθε το 1925 και πιο συγκεκριμένα από τον Άγγλο Σίδνεϋ Μέρλιν από τον οποίο προέρχεται το όνομα της γνωστής ποικιλίας. Στη διαδρομή της κατέληξε στην Κέρκυρα όπου καλλιεργήθηκε για πρώτη φορά για εμπορικούς σκοπούς. Από εκεί στα χρόνια του μεσοπολέμου κατέληξε στην Αργολίδα όπου και αφήνει μέχρι σήμερα χαρακτηριστικό στίγμα, μιας και αποτελεί το 58% της ελληνικής παραγωγής του πορτοκαλιού.

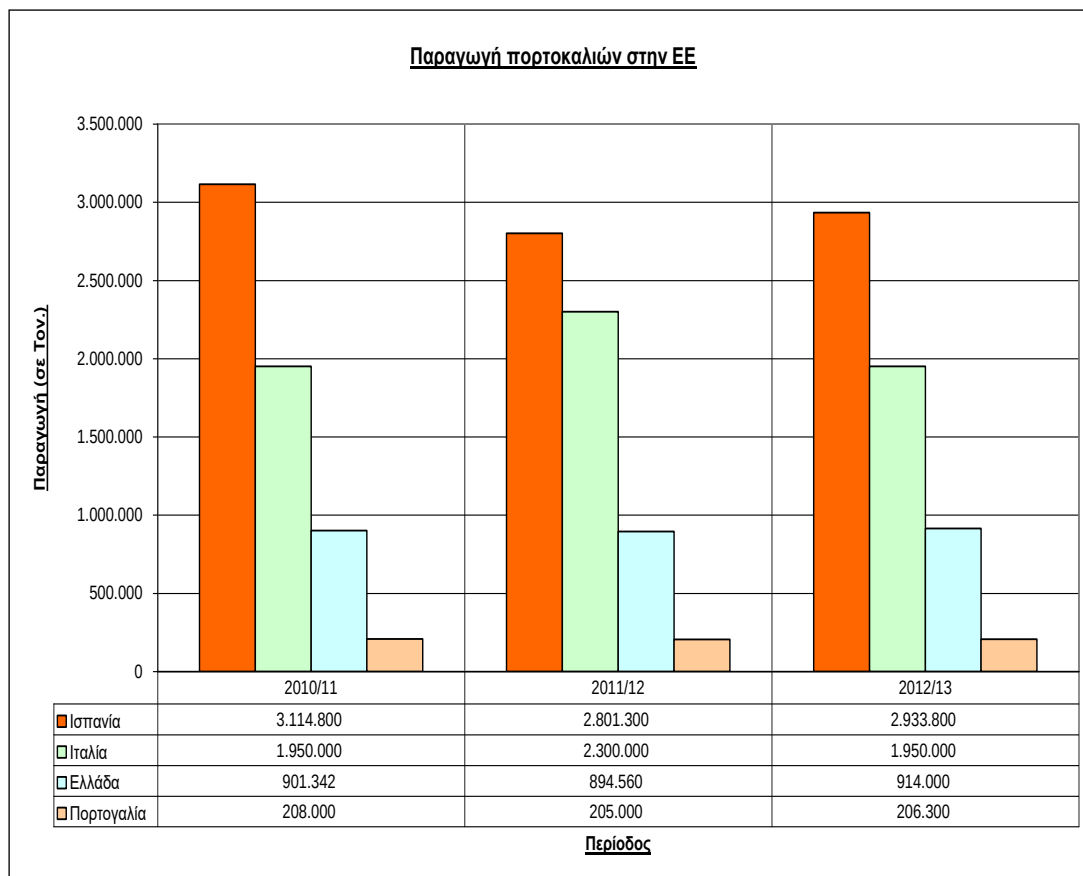
Για τον παραπάνω λόγο, σε αυτή την αναδρομή θα επικεντρωθούμε στην πορτοκαλιά της Αργολίδας. Όλα ξεκίνησαν από τον π. Μιχαήλ Καββαδά όταν μετά τη χειροτόνηση του στον ιερό ναό της Κοιμήσεως της Θεοτόκου του ομώνυμου χωριού Αργολικού μαζί με τις πνευματικές του ασχολίες αποφάσισε να αφιερωθεί και στην πορτοκαλλιέργεια. Σύντομα η πεδιάδα γέμισε από τα χαρακτηριστικά φύλλα, άνθη και καρπούς αυτού του πολύτιμου δέντρου.

Στην Ελλάδα υπάρχουν οι πλέον κατάλληλες εδαφοκλιματολογικές συνθήκες για την καλλιέργεια της πορτοκαλιάς και όχι μόνο, αλλά και των άλλων καρποφόρων δέντρων όπως η ελιά και το αμπέλι. Η πορτοκαλιά καλλιεργείται σήμερα συστηματικά κυρίως στην Ήπειρο, τη δυτική Ελλάδα, την Πελοπόννησο και την Κρήτη.

2. Παγκόσμια και Ευρωπαϊκή παραγωγή πορτοκαλιού

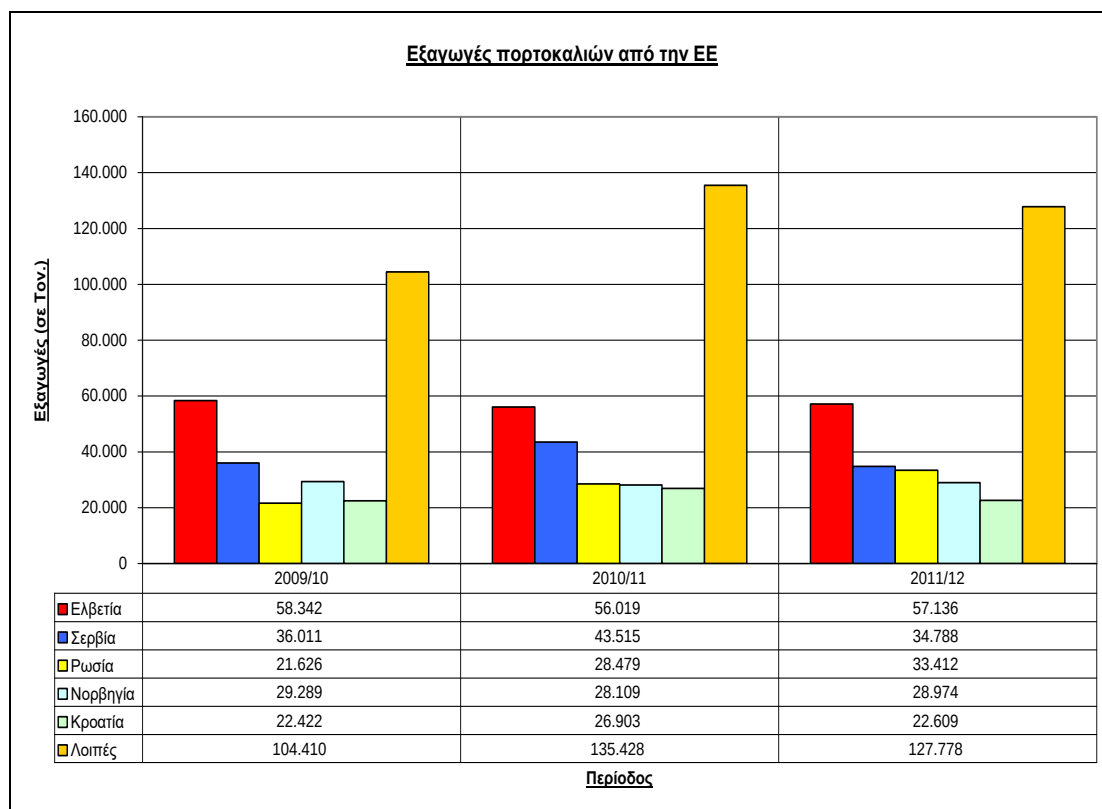
Τα εσπεριδοειδή και ειδικότερα το πορτοκάλι αποτελούν ένα διατροφικό δυναμίτη υγείας με συνέπεια να τα φέρνουν ίσως στην πρώτη θέση σε αυτό τον τομέα από όλα τα άλλα φρούτα. Έτσι στη συνέχεια θα δοθούν στοιχεία της αγοράς των πορτοκαλιών, αλλά και του χυμού ανά τον κόσμο και την ΕΕ.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, οι πορτοκαλιές δεν έχουν ιδιαίτερες καλλιεργητικές απαιτήσεις, αν και προτιμούν τα εύκρατα κλίματα όπως αυτά που προσφέρει η λεκάνη της Μεσογείου. Οι χώρες της ΕΕ που παράγουν πορτοκάλια είναι η Ισπανία (50%), η Ιταλία (30%) με το υπόλοιπο 20% να διαμοιράζεται στην Ελλάδα, την Πορτογαλία και την Κύπρο κατά φθίνουσα σειρά, όπως φαίνεται στο Σχήμα 1.

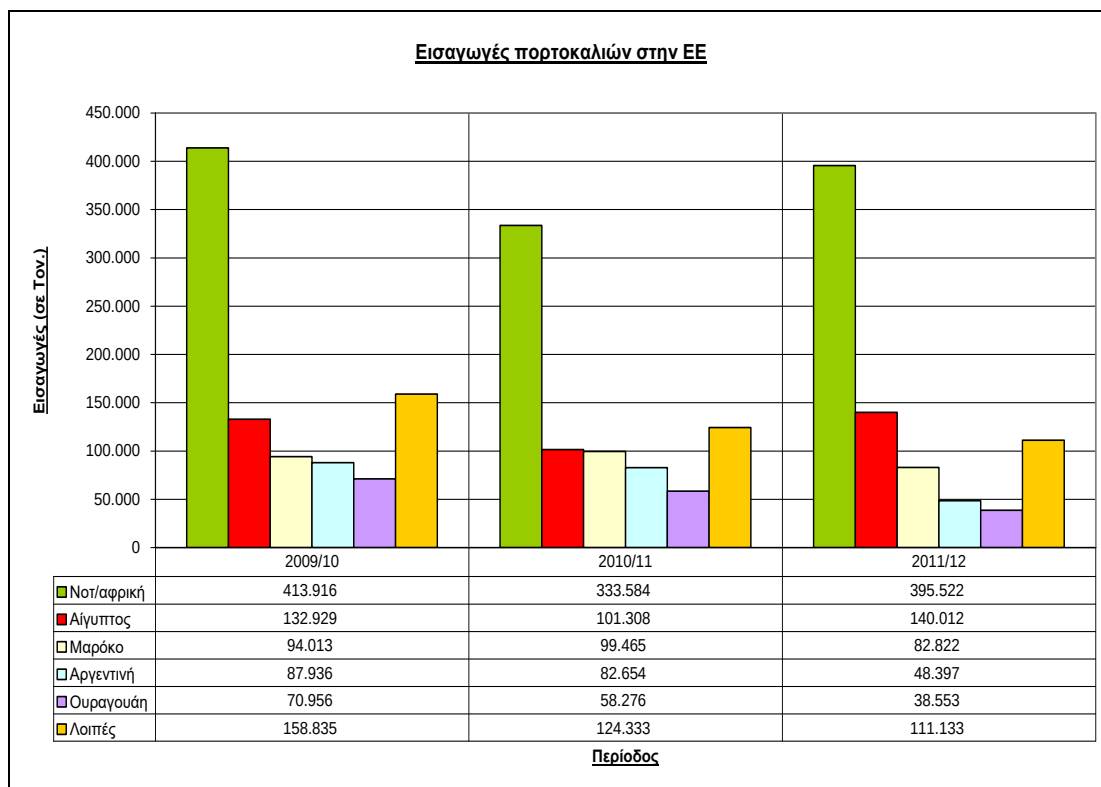


Σχήμα 1. Εξελίξεις στην αγορά των Εσπεριδοειδών στην Ευρωπαϊκή Ένωση και Διεθνώς, ΠΑΣΕΓΕΣ, 2014).

Όπως είναι λογικό για κάθε προϊόν γίνονται εισαγωγές και εξαγωγές. Αρχικά διακρίνονται οι εξαγωγές από τις ευρωπαϊκές χώρες της Μεσογείου προς τις βορειότερες, γεγονός που διευκολύνεται από το ενδοκοινοτικό εμπόριο. Όμως, ένας από τους στρατηγικούς πυλώνες των εξαγωγών είναι η αγορά της Ρωσίας. Στα ακόλουθα Σχήματα 2 και 3 φαίνονται οι ευρωπαϊκές εξαγωγές και εισαγωγές.



Σχήμα 2. Εξελίξεις στην αγορά των Εσπεριδοειδών στην Ευρωπαϊκή Ένωση και Διεθνώς, ΠΑΣΕΓΕΣ, 2014).



Σχήμα 3. Εξελίξεις στην αγορά των Εσπεριδοειδών στην Ευρωπαϊκή Ένωση και Διεθνώς, ΠΑΣΕΓΕΣ, 2014).

Η κατανάλωση των πορτοκαλιών στην ΕΕ ανέρχεται στα 5,2 εκατομμύρια τόνους ανά έτος γεγονός που αναλογεί σε 10 κιλά κατά μέσο όρο ανά κεφαλή, που όμως μπορεί να διπλασιαστεί στις χώρες παραγωγής.

Όσον αφορά στο χυμό πορτοκαλιών είναι μικρή η παραγωγή του στην ΕΕ μιας και το πορτοκάλι καταναλώνεται κυρίως νωπό. Έτσι παρατηρούνται μεγάλες εισαγωγές χυμού από άλλες χώρες, με κυριότερη την Βραζιλία (85%). Από την άλλη, σημαντικές εξαγωγές παρατηρούνται προς Σαουδική Αραβία, Ελβετία και Αλγερία. Πρέπει να σημειωθεί ότι ο χυμός πορτοκαλιού ανταγωνίζεται ικανοποιητικά άλλα μη αλκοολούχα ποτά, όπως τα αεριούχα αναψυκτικά.

Στον παγκόσμιο χάρτη τώρα, τη μερίδα του λέοντος στην παραγωγή χυμού πορτοκαλιού κατέχει η Βραζιλία με 17,8 εκ. τόνους επί του συνόλου των 51,8 τόνων. Ακολουθεί η ΗΠΑ με 6,7 εκ. τόνους. Άλλες χώρες με σημαντική δραστηριότητα στην παραγωγή χυμού είναι η Κίνα, το Μεξικό, η Αίγυπτος και η Ν. Αφρική.

3. Ποικιλίες πορτοκαλιού

Υπάρχουν πάνω από 150 ποικιλίες πορτοκαλιών. Αυτές διακρίνονται σε τέσσερις κύριες ομάδες: τα κοινά, τα ομφαλοφόρα, τα αιματόσαρκα και τα γλυκόχυμα.

3.1 Τα κοινά πορτοκάλια

Η συγκομιδή τους ξεκινά 1 με 2 μήνες αργότερα από εκείνη των ομφαλοφόρων. Έχουν μικρό έως μεσαίο μέγεθος, ξανθή σάρκα, υπόξινη γεύση και αρκετά κουκούτσια, για αυτό είναι κατάλληλα κυρίως για χυμό.

Οι πιο συνηθισμένες ποικιλίες αυτών των πορτοκαλιών είναι τα:

- ***Βαλέντσια***

Είναι η πιο όψιμη ποικιλία με την παραγωγή τους να ξεκινά τον Απρίλιο και να εκτείνεται μέχρι το Σεπτέμβριο, αν και είναι πιθανή η καρποφορία τους σε δροσερά κλίματα έως και τον Νοέμβριο δηλαδή σε μια εποχή που άλλα μόλις καρποφορούν.

Έχουν μικρό έως μεσαίο σφαιρικό σχήμα με χοντρή φλούδα και ελάχιστα κουκούτσια. Τους καλοκαιρινούς μήνες καταναλώνονται κυρίως σε χυμούς παρέχοντας δροσερή και κάπως υπόξινη γεύση.

- ***Σαλουστιάνα***

Ωριμάζουν από τα τέλη Νοεμβρίου και μετά. Είναι μέσου έως μεγάλου μεγέθους με σχετικά λεπτή φλούδα και τις περισσότερες φορές χωρίς κουκούτσια. Παρουσιάζουν γλυκιά γεύση δίνοντας μια καλή επιλογή για χυμούς. Δεν καλλιεργούνται πολύ στην Ελλάδα.

- ***Κοινά ελληνικά***

Υπάρχουν μια σειρά από ντόπιες ποικιλίες που παράγονται σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας από όπου παίρνουν και το όνομά τους, όπως τα κοινά Άρτας, Χίου, Σπάρτης, Ρόδου κ.ά. Επίσης, χαρακτηριστικές είναι διάφορες Κρητικές ποικιλίες όπως τα σουλτανί του Φόδελε, μυρωδάτο του Τυμπακίου, και περιοχών των Χανίων (κοινό, λαϊνσάτο).

- ***Γιάφα***

Πατρίδα της είναι η Παλαιστίνη. Ονομάζεται και Shamouti. Είναι γνωστή στην ευρωπαϊκή αγορά με το όνομα Jaffa και εκτιμάται ιδιαίτερα στις αγορές της Αγγλίας. Κατά την περίοδο της ανθοφορίας είναι ευαίσθητη στην υψηλή θερμοκρασία και την

ξηρασία, για αυτό η εμπορική της καλλιέργεια έχει περιοριστεί στις ανατολικές μεσογειακές περιοχές λόγω των ευνοϊκών κλιματολογικών συνθηκών. Είναι μια από τις κυριότερες ποικιλίες πορτοκαλιάς που καλλιεργούνται στην Κύπρο. Ο καρπός της έχει μέτριο έως μεγάλο μέγεθος και σχήμα ωοειδές. Ο φλοιός είναι παχύς, σκληρός και η σάρκα συνεκτική, γλυκιά, χυμώδης και αρωματική.

3.2 Τα ομφαλοφόρα

Το χαρακτηριστικό αυτών των πορτοκαλιών είναι ένα πτυχωτό εξόγκωμα στο αντίθετο μέρος του κοτσανιού που ονομάζεται ομφαλός εξ' ου και το όνομα. Η σάρκα τους κόβεται εύκολα, δεν έχουν κουκούτσια, είναι χοντρόφλουδα και μεγάλα σε μέγεθος. Η χρήση τους κατά κύριο λόγο είναι επιτραπέζια. Οι πιο συνηθισμένες ποικιλίες είναι τα:

- ***Washington Navel***

Είναι τα γνωστά Μέρλιν και αποτελούν την συνηθέστερη καλλιέργεια πορτοκαλιάς στην Ελλάδα. Η συγκομιδή γίνεται από το Νοέμβριο έως το Μάρτιο, και το κύριο χαρακτηριστικό τους είναι το έντονο πορτοκαλί χρώμα αλλά και το μέγεθός τους. Η σάρκα έχει ιδιαίτερο άρωμα, κάπως υπόξινη γεύση, ιδιαίτερα στην πρώιμη εποχή, είναι τραγανή με ιδιαίτερα πορτοκαλί χρωματισμό, ενώ δε βγάζουν αρκετό χυμό όταν στυφτούν.

- ***Navelina***

Είναι όπως άλλωστε και τα άλλα ομφαλοφόρα μεγάλα σε μέγεθος και σφαιρικά (ίσως και λίγο ωοειδή), με λεία φλούδα και μικρό ομφαλό. Η καρποφορία τους γίνεται πρώιμα από τα μέσα δηλαδή του Οκτωβρίου και σε αυτή μάλιστα την εποχή να έχουν πρασινωπό ακόμη χρώμα, ενώ μπορούν να καταναλωθούν. Μάλιστα για να είναι πιο ελκυστικά στους πιο απαιτητικούς καταναλωτές γίνεται αποπρασινισμός με ψεκασμό αιθυλενίου.

- ***New Hall***

Είναι τα πρώτα πορτοκάλια της εσοδείας και κάνουν την εμφάνισή τους στην αγορά αρχές Οκτωβρίου. Προέρχονται από την navelina, είναι μεγάλα σε μέγεθος και

έχουν ωοειδές σχήμα. Προσφέρουν γλυκιά και ευχάριστη γεύση δημιουργώντας ιδανική επιτραπέζια λύση.

- **ΠΟΠ πορτοκάλια Μάλεμε Χανίων**

Ιδιαίτερη μνεία πρέπει να δοθεί στα μοναδικά ΠΟΠ πορτοκάλια της Ελλάδος αυτά του Μάλεμε Χανίων. Είναι ζουμερά, αρωματικά και γλυκά. Είναι διασταύρωση των ομφαλοφόρων ποικιλιών Washington Navel, Navelina, New Hall, Lane Late και συνεπώς έχουν κάποια κοινά χαρακτηριστικά με κάθε μία από αυτές τις ποικιλίες. Φέρουν μπλε ετικέτα με το κίτρινο σήμα MALEME και Protected Designation of Origin.

3.3 Τα αιματόσαρκα ή σαγκουίνια

Αυτά αποτελούνται από 3 παραλλαγές: τα Γουρίτσης, Moro και Tarocco. Το κυριότερο χαρακτηριστικό τους είναι το κόκκινο χρώμα στη σάρκα και στο φλοιό που οφείλεται στην πλούσια περιεκτικότητα σε ανθοκυανίνες που το αποκτούν συνήθως μέχρι τον Ιανουάριο. Έχουν σχετικά μικρό μέγεθος που συνήθως μοιάζει με τα κοινά. Οι καρποί είναι ωοειδείς και λεπτόφλουδοι, ενώ προσφέρουν γεύση, ευχυμία και άρωμα πληρότητας. Συνήθως δεν έχουν σπόρους. Τα πρώτα φέρουν και ομφαλό.

3.4 Τα γλυκόχυμα

Ονομάζονται και ντόλτσο (dolce). Είναι μικρά σε μέγεθος και λεπτόφλουδα. Το σχήμα είναι σφαιρικό. Η σάρκα είναι υποκίτρινη. Όπως λέει και το όνομά τους φέρουν γλυκιά γεύση (πιθανότατα αδιάφορη) λόγω χαμηλής περιεκτικότητας σε κιτρικό οξύ (χαμηλή οξύτητα) και είναι πλούσια σε χυμό.

4. Μορφολογία του καρπού

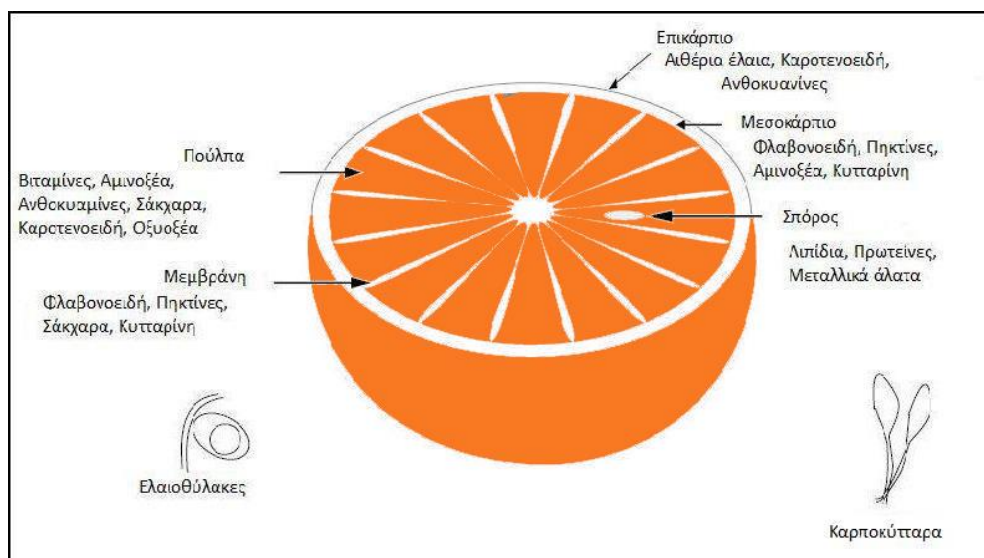
Το πορτοκάλι αποτελείται από δύο διακριτά τμήματα. Το περικάρπιο και το ενδοκάρπιο.

Το περικάρπιο είναι ο φλοιός του πορτοκαλιού και διακρίνεται σε επικάρπιο (flavedo) και μεσοκάρπιο (albedo). Στο επικάρπιο βρίσκονται οι χρωμοπλάστες και

οι ελαιοθύλακες. Οι πρώτοι που περιέχουν διαλυτές χρωστικές ουσίες όπως τα καροτενοειδή που είναι εν μέρει υπεύθυνες για το χρώμα του χυμού και οι ελαιοθύλακες περιέχουν αιθέρια έλαια τα οποία περνούν στο χυμό κατά το στύψιμο. Το μεσοκάρπιο έχει λευκό χρώμα και σπογγώδη μορφή και αποτελείται από υδατάνθρακες, ένζυμα, πηκτίνες, φλαβονοειδή και ίνες. Όλα τα ανωτέρω συστατικά του περικάρπιου επηρεάζουν έμμεσα την ποιότητα του πορτοκαλοχυμού, πολλές φορές και αρνητικά.

Το ενδοκάρπιο αποτελεί το κύριο και εδώδιμο μέρος του καρπού. Συνίσταται σε επιμέρους τμήματα και τον πυρήνα. Τα επιμέρους τμήματα διαχωρίζονται από τριχοειδείς μεμβράνες και στο εσωτερικό τους βρίσκονται οι κύστεις του χυμού, καθώς και σπόροι. Οι σπόροι βρίσκονται κοντά στον πυρήνα και ο αριθμός τους διαφέρει ανάλογα με την ποικιλία. Στο κέντρο του καρπού είναι ο σπογγώδης πυρήνας που έχει σύσταση παρόμοια με αυτή του μεσοκαρπίου. Κατά την έντονη εξαγωγή του χυμού ο πυρήνας, οι μεμβράνες και το μεσοκάρπιο προσθέτουν πούλπα στον παραγόμενο χυμό.

Τα τμήματα αυτά φαίνονται στη σχηματική παράσταση (Σχ. 4) της δομής του πορτοκαλιού που ακολουθεί.



Σχήμα 4. Δομή του πορτοκαλιού.

5. Διατροφική σύσταση και θρεπτική αξία του πορτοκαλιού

Ο χυμός πορτοκαλιού αποτελεί ένα σύνθετο χημικό μίγμα με τις επιμέρους ενώσεις να προέρχονται από διαφορετικά τμήματα λόγω της μορφολογίας του

φρούτου. Ο χυμός ελευθερώνεται κατά τη διάρκεια της χυμοποίησης από τους καρπούς του πορτοκαλιού με αποτέλεσμα όλες οι χημικές ενώσεις να βρεθούν ελεύθερες και να μπορούν να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους. Το έλαιο του επικαρπίου αναμειγνύεται με το χυμό κατά τη διάρκεια της εξαγωγής του. Ο χυμός στις κύστες του ενδοκαρπίου περιέχει και αυτός ένα ποσό ελαίου, το οποίο είναι ελαφρώς διαφορετικό στη σύνθεση από αυτό των ελαιοθυλάκων του επικαρπίου. Τα συνολικά επίπεδα ελαίου και η σύνθεση των πτητικών ουσιών του διαμορφώνουν την τελική γεύση και το άρωμα του χυμού.

Η εξαγωγή χυμού με τη χρήση οικιακών συσκευών αποτελεί τον ηπιότερο τρόπο χυμοποίησης και περιέχει συνήθως μικρότερα επίπεδα ελαίου φλούδας. Όσον αφορά τη βιομηχανική χυμοποίηση, ο τύπος εμπορικού εξαγωγέα και η μηχανική πίεση που ασκείται, είναι εκείνες οι παράμετροι που καθορίζουν τα σχετικά επίπεδα του εγγενούς ελαίου του χυμού και του ελαίου της φλούδας.

Θα μπορούσαμε να πούμε ότι το πορτοκάλι είναι ένας ζωντανός οργανισμός με βάση τα άπμπολλα θρεπτικά συστατικά που περιέχει και ειδικότερα 170 φυτοχημικά που σε μεγάλο ποσοστό αντικαθιστούν τις βλαβερές επιπτώσεις της χοληστερόλης και 60 φλαβονοειδή. Όλα αυτά περνάνε στο χυμό κατά την παραγωγή του, μερικά όμως εκ των οποίων καταστρέφονται κατά τη διαδικασία παραγωγής του. Η σύσταση του χυμού εξαρτάται πρώτον από τα χαρακτηριστικά του πορτοκαλιού όπως η μορφολογία, η ωρίμανση και η ποικιλία και κατά δεύτερον από τις καλλιεργητικές συνθήκες (έδαφος, καιρός, άρδευση, λιπάσματα). Έτσι εκτός του νερού, τα σάκχαρα, οι αζωτούχες ενώσεις, οι λιπαρές ουσίες, τα οργανικά οξέα είναι τα μακρο-θρεπτικά συστατικά, ενώ οι ουσίες που συντελούν στη μεγάλη θρεπτική αξία του χυμού πορτοκαλιού είναι τα φαινολικά συστατικά, όπως τα φλαβονοειδή, οι βιταμίνες και τα ανόργανα συστατικά, δηλαδή τα μικρο-θρεπτικά συστατικά.

5.1 Μακρο-θρεπτικά συστατικά

i. Το νερό

Όπως είναι γνωστό όλα τα φρούτα περιέχουν μεγάλο ποσοστό νερού. Ιδιαίτερα όμως ο χυμός του πορτοκαλιού περιέχει έως και 88% νερό. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η περιεκτικότητα του χυμού σε νερό συντελεί στη σταθερότητά του και τη σωστή κατανομή των θρεπτικών συστατικών, ενώ παίζει ρόλο στις θερμικές επεξεργασίες.

ii. Τα σάκχαρα

Τα σάκχαρα αποτελούν ένα πολύ σημαντικό μέρος του χυμού πορτοκαλιού που κυμαίνεται από 5-15%. Προφανώς επηρεάζονται από όλους τους προαναφερθέντες παράγοντες που χαρακτηρίζουν την ποιότητα του χυμού. Τα κυριότερα από αυτά είναι η σακχαρόζη (50%), η γλυκόζη (24%) και η φρουκτόζη (26%). Υπάρχουν όμως σε μικρότερες ποσότητες και κυρίως ύστερα από θερμική επεξεργασία ανάγοντα σάκχαρα, γλυκοζίτες (όπως η εσπεριδίνη), μικρές ποσότητες αμύλου, πηκτίνες και κυτταρίνη με τις δυο τελευταίες να αποτελούν τον κύριο εκπρόσωπο των φυτικών ινών που βοηθούν στην πέψη και έχουν αντικαρκινική δράση.

iii. Οι αζωτούχες ενώσεις

Οι αζωτούχες ενώσεις αποτελούν το 5-10% επί του στερεού υπολείμματος του χυμού ή 0,7%. Αυτές είναι πρωτεΐνες, πεπτίδια, αμινοξέα, φωσφατίδια και ένζυμα. Τα τελευταία ειδικά, σχετίζονται με την αλλοίωση των συστατικών του χυμού κατά τις συνθήκες της επεξεργασίας. Τέτοια είναι η υπεροξειδάση, η πηκτινестεράση και η φωσφατάση. Η οξειδάση της γλυκόζης σχετίζεται με την υποβάθμιση της γεύσης στην παραγωγή του χυμού

iv. Οι λιπαρές ύλες

Η περιεκτικότητα σε λιπαρές ύλες είναι πολύ μικρή (0,2%) που εδώ διαφοροποιείται από τα αιθέρια έλαια. Διακρίνονται στις ουδέτερες όπως τα τριγλυκερίδια, πολικές λιπαρές ύλες όπως η λεκιθίνη και η ακέτυλο-φωσφατίδιλο-αιθυλαιμίνη και γενικότερα ως παράγωγα ενώσεων με πρωτεΐνες και υδατάνθρακες. Επίσης, υπάρχουν λιπαρές ουσίες μακράς αλυσίδας όπως αλκοόλες και στερόλες.

v. Τα οργανικά οξέα

Το κυριότερο οξύ των εσπεριδοειδών είναι το κιτρικό οξύ, το οποίο απαντά κυρίως στο χυμό τους, ενώ τα μηλικό, μηλονικό και οξαλικό βρίσκονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στο φλοιό. Σημαντικοί παράγοντες που καθορίζουν την ποσότητα του οξέος στους καρπούς των εσπεριδοειδών είναι το είδος τους, η ποικιλία και η τοποθεσία.

Στα πορτοκάλια, αν και η συγκέντρωση του κιτρικού οξέος αυξάνεται ταχέως στους νεαρούς καρπούς, κατά τα τελευταία στάδια της ανάπτυξής τους μειώνεται. Ο χυμός των πορτοκαλιών περιέχει 1-1.3% κιτρικό οξύ, μπορεί όμως η ποσότητα αυτή να ποικίλλει και από 0.5-1.3%. Το δεύτερο σε ποσότητα οξύ, στο χυμό αυτών των καρπών είναι το μηλικό οξύ. Στα πορτοκάλια η συγκέντρωσή του κυμαίνεται από 1.4-1.8 mg/mL χυμού. Η οξύτητα των εσπεριδοειδών γενικότερα μειώνεται κατά την ωρίμανσή τους. Επειδή το κιτρικό οξύ βρίσκεται σε πολύ μεγαλύτερη συγκέντρωση από όλα τα άλλα μαζί, η οξύτητα του χυμού πορτοκαλιού εκφράζεται σαν να οφείλεται μόνο στο κιτρικό οξύ. Τα γλυκόχυμα πορτοκάλια όπως αυτά της ποικιλίας ντόλτσο, περιέχουν ελάχιστες ποσότητες οξέων, επομένως σε αυτό οφείλεται και η γλυκιά γεύση τους.

5.2 Μικρο-θρεπτικά συστατικά

Η θρεπτική αξία των τροφίμων έχει ταυτιστεί με την ποσότητα και την ποιότητα των μικροθρεπτικών συστατικών, δηλαδή των βιταμινών και των ανόργανων συστατικών των λεγόμενων και ως μέταλλα και ιχνοστοιχεία. Στη συνέχεια δίνονται τα σημαντικότερα από αυτά. Τα φλαβονοειδή επειδή αποτελούν αντικείμενο της παρούσας διατριβής θα αναφερθούν εκτενέστερα σε επόμενη ενότητα.

i. Βιταμίνες

Βιταμίνη C

Το πορτοκάλι ταυτίζεται με τη βιταμίνη C. Αυτά τα δύο είναι γνωστά συνδυασμένα και αποτελούν την ασπίδα κατά του κρυολογήματος. Σε ένα πορτοκάλι περιέχονται 50-80 mg, σχεδόν το 100% της συνιστώμενης ημερήσιας πρόσληψης. Πέραν όμως αυτής της ωφέλειας, είναι σχεδόν άγνωστη η δράση της ως ισχυρό αντιοξειδωτικό με προστασία στα καρδιαγγειακά και την πρόληψη πολλών μορφών του καρκίνου. Επίσης βοηθάει στην απορρόφηση του σιδήρου.

Βιταμίνη A

Είναι μια πολύ σημαντική βιταμίνη με κύρια δραστηριότητα την καλή λειτουργία της όρασης και του επιθηλιακού ιστού. Στο πορτοκάλι βρίσκεται με τη μορφή της

προβιταμίνης β-καροτένιο από το οποίο παίρνει το πορτοκαλί χρώμα. Περιέχονται 71 mg σε ένα μέτριο πορτοκάλι.

Φολικό οξύ

Αυτή η βιταμίνη του συμπλέγματος Β συμμετέχει στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, στη σύνθεση αμινοξέων και πρωτεϊνών και στη λειτουργία του νευρικού συστήματος. Βοηθά στην αναγέννηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και γι' αυτό η έλλειψή του προκαλεί μεγαλοβλαστική αναιμία. Στο πορτοκάλι περιέχεται σε ποσότητα 50 mg.

Παντοθενικό οξύ

Είναι άλλη μια βιταμίνη του συμπλέγματος Β και το συστατικό του συνένζυμου Α και της ακυλ-μεταφορικής πρωτεΐνης. Το συνένζυμο Α είναι συμπαράγοντας των ενζύμων που παίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των μακροθρεπτικών συστατικών. Απαιτείται επίσης για την σύνθεση χοληστερόλης, στεροειδών ορμονών, ακετυλοχολίνης και πορφυρινών. Η δράση του είναι ποικίλη και ξεκινάει με την υγεία μαλλιών και νυχιών, αντιμετώπιση της ακμής και μπορεί να δράσει μέχρι και την οστεαρθρίτιδα, αλλά και τη νόσο Αλτσχάϊμερ. Ένα μέτριο πορτοκάλι περιέχει 0,6 mg.

Βιοτίνη

Άλλη μια βιταμίνη του συμπλέγματος Β. Ένα πορτοκάλι περιέχει 100% της συνιστώμενης ημερήσιας πρόσληψης (0,25 mg). Όπως και η προηγούμενη βιταμίνη συμμετέχει ως συνένζυμο ενωμένο με ειδικές πρωτεΐνες και δρα ως ρυθμιστής στο μεταβολισμό. Πρακτικά βοηθά στη ροή της γλυκόζης στο αίμα.

ii. Ανόργανα συστατικά

Το πιο σημαντικό μέταλλο του πορτοκαλιού είναι το κάλιο (181 mg/100 g) ενώ περιέχει σχεδόν μηδενική ποσότητα νατρίου γεγονός που βοηθά στην υπέρταση. Αυτά τα δύο (ηλεκτρολύτες) συμμετέχουν στη διατήρηση της οξεοβασικής ισορροπίας στα υγρά του σώματος. Το πορτοκάλι παρέχει σημαντικές ποσότητες ασβεστίου και φωσφόρου που είναι τα κύρια συστατικά των οστών και των δοντιών. Σε μικρότερες αλλά σημαντικές ποσότητες περιέχει σελήνιο, ιώδιο και ψευδάργυρο.

Το σελήνιο είναι ένα ιχνοστοιχείο που έχει πολύ σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Το ιώδιο είναι άκρως απαραίτητο για τη σύνθεση των ορμονών του θυρεοειδούς αδένος. Ο ψευδάργυρος συμμετέχει στις διαδικασίες του μεταβολισμού, στη σύνθεση νουκλεϊνικών οξέων και πρωτεϊνών, στην ανάπτυξη και την καλή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος.

6. Πτητικά συστατικά πορτοκαλιού

Οι ουσίες που συνεισφέρουν στο άρωμα είναι πτητικές ενώσεις που γίνονται αντιληπτές από τους υποδοχείς οσμής της ρινικής κοιλότητας. Οι ουσίες αυτές φτάνουν στους υποδοχείς είτε διαμέσου της μύτης κατά την εισπνοή, είτε μέσω του λαιμού και αφού έχουν απελευθερωθεί από τη διαδικασία της μάσησης (Belitz et al., 2009).

Μία ένωση μπορεί να συνεισφέρει θετικά στο άρωμα ή/και τη γεύση (flavor) ενός τροφίμου, ενώ σε κάποιο άλλο να προκαλεί δυσάρεστο άρωμα ή γεύση ή και τα δύο. Παρόλο που η ποσότητα των πτητικών ενώσεων που βρίσκονται στα τρόφιμα είναι αρκετά μικρή (περίπου 10-15 mg/kg), ο αριθμός τους είναι μεγάλος. Τα τρόφιμα που παρασκευάζονται μόνο με θερμική επεξεργασία ή και σε συνδυασμό με κάποια διαδικασία ζύμωσης (π.χ. μύρα, κακάο ή τσάι, κλπ.) περιέχουν περισσότερες από 800 πτητικές ενώσεις. Επίσης, μεγάλη ποικιλία ενώσεων βρίσκεται στα φρούτα και τα κηπευτικά. (Belitz et al., 2009).

Από όλες τις πτητικές ενώσεις μόνο ένας περιορισμένος αριθμός έχει επίδραση στο άρωμα. Η χαμηλότερη συγκέντρωση μίας ένωσης που όμως είναι επαρκής για την αναγνώριση της οσμής ονομάζεται «κατώφλι αναγνώρισης». Το «κατώφλι ανίχνευσης» είναι χαμηλότερο και είναι η συγκέντρωση στην οποία είναι ανιχνεύσιμη η ένωση, αλλά δε μπορεί ακόμη να αναγνωριστεί σαφώς η μυρωδιά της.

Ως ενώσεις αρώματος θεωρούνται κυρίως οι ενώσεις που βρίσκονται στα τρόφιμα πάνω από το όριο αναγνώρισης της οσμής ή/και της γεύσης. Ενώσεις με συγκεντρώσεις χαμηλότερες από το όριο αυτό μπορούν να συνεισφέρουν στην οσμή ή/και τη γεύση μόνο όταν μίγματα αυτών ξεπερνούν τα όρια αναγνώρισης. Από τις ενώσεις αρώματος ιδιαίτερη σημασία δίνεται σε αυτές που παρέχουν το χαρακτηριστικό άρωμα του τροφίμου (key odorants). Παραδείγματος χάριν, για το χυμό πορτοκαλιού είναι το λεμονένιο, για το λεμόνι η κιτράλη (νεράλη/γερανιαλή) και για το γκρέιπφρουτ η νοοκατόνη (nootkatone).

Το άρωμα και η γεύση των φρούτων και των κηπευτικών είναι αποτέλεσμα σχηματισμού δευτερογενών μεταβολιτών κατά την κανονική ανάπτυξη και ωρίμανση τους, κυρίως με πρόδρομες ενώσεις λιπαρά οξέα ή αμινοξέα (Reineccius, 2006). Το φρέσκο και διακριτό άρωμα του πορτοκαλιού είναι αποτέλεσμα ενός φυσικού συνδυασμού πτητικών ενώσεων σε ένα ισορροπημένο σύστημα που περιλαμβάνει σάκχαρα, οργανικά οξέα και φαινολικές ενώσεις.

6.1 Κατηγορίες πτητικών συστατικών

Το άρωμα του χυμού πορτοκαλιού περιέχει περισσότερα από 200 συστατικά που ανήκουν σε πολύ ετερογενείς ομάδες (Kelebek et al., 2011). Σημαντικά συνεισφέρουν στο άρωμα και τη γεύση του χυμού ενώσεις που ανήκουν στις κατηγορίες ενώσεων: τερπένια, αλδεΐδες, αλκοόλες, εστέρες και κετόνες.

Ο μηχανικά συμπιεσμένος χυμός από πορτοκάλι περιέχει πιο υψηλά επίπεδα ορισμένων αλδεϋδών (οκτανάλη, εννεανάλη και δεκανάλη) και τερπενίων (κυρίως λεμονένιο, μυρκένιο και λιναλοόλη) από ότι ο στυμμένος με το χέρι φρέσκος χυμός (Moshonas et al., 1994). Οι διαφορές στο άρωμα και τη γεύση του φρεσκοστυμμένου με το χέρι χυμού από αυτές του εμπορικά διαθέσιμου μπορούν να αποδοθούν στη διαφορετική μηχανική καταπόνηση και κατ' επέκταση στα διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης πτητικών ενώσεων, ιδιαίτερα των τερπενίων.

Επισημαίνεται η προέλευση και η ιδιαίτερη συνεισφορά στο άρωμα του χυμού για τις πιο σημαντικές από αυτές. Η παρούσα εργασία εστιάζει στο φρεσκοστυμμένο με το χέρι χυμό, αλλά γίνεται και συγκριτική συσχέτιση κάποιων ενώσεων με τους θερμικά επεξεργασμένους χυμούς. Οι κατηγορίες χημικών ενώσεων στις οποίες εντάσσονται οι αρωματικά ενεργές για το χυμό πορτοκαλιού ενώσεις είναι οι ακόλουθες:

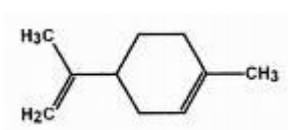
6.1.1 ΤΕΡΠΕΝΙΑ

Τα τερπένια έχουν μεγάλη ποικιλία αρωμάτων και τα «κατώφλια ανίχνευσης» της οσμής τους διαφέρουν και αυτά σημαντικά. Τα εναντιομερή και στερεοϊσομερή διαφέρουν συνήθως στο άρωμά τους. Τα χημικώς τροποποιημένα τερπένια χρησιμοποιούνται για τις αρωματικές τους ιδιότητες (οσμή ευκαλύπτου, γεύση κανέλας γαρύφαλλου, τζίντζερ), αλλά και για τις φαρμακευτικές τους λειτουργίες (αντινεοπλασματικά, αντιβακτηριακά) (Reineccius, 2006).

Τα τερπένια επικρατούν στα έλαια των εσπεριδοειδών, με κυρίαρχο το λεμονένιο, ένα μονοτερπένιο που συναντάται σε ποσοστό πάνω από 90%. Τα τερπένια έχουν κυρίαρχη συνεισφορά στο αρωματικό προφίλ του πορτοκαλιού και βρίσκονται κατά 95% περίπου στη φλούδα του φρούτου. Εκτός από το λεμονένιο στο πορτοκάλι συναντώνται συνήθως και τα β-μυρκένιο, α-πινένιο, βαλενσένιο, π-κυμένιο και σαμπινένιο.

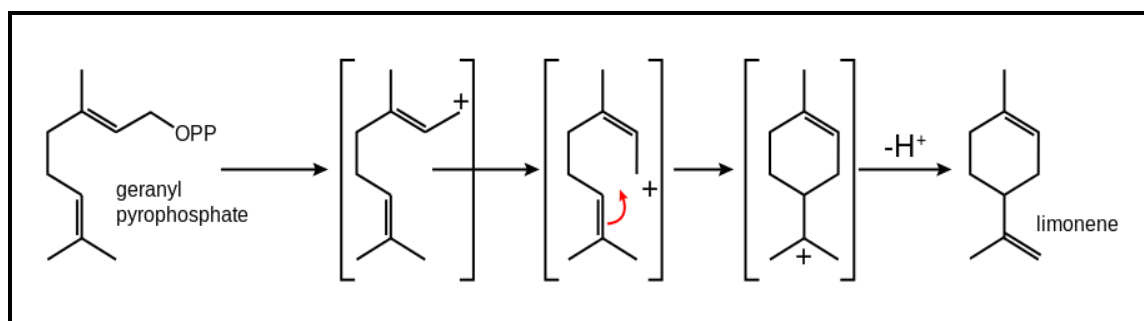
Τα πιο χαρακτηριστικά για το άρωμα του πορτοκαλιού τερπένια υδρογονανθράκων:

- ΛΕΜΟΝΕΝΙΟ



Το λεμονένιο απαντάται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση από τα άλλα τερπένια στο χυμό πορτοκαλιού. Η συγκέντρωσή του στους επεξεργασμένους χυμούς είναι πολύ μεγαλύτερη από ό,τι στους χειροποίητα φρεσκοστυμμένους. Αυτό συμβαίνει γιατί το λεμονένιο περιέχεται στους ελαιοθύκαλες στο εξωτερικό τμήμα του φλοιού, το επικάρπιο (flavedo) και απελευθερώνεται καλύτερα με τη μηχανική πίεση. Αποτελεί ένα από τα κύρια αρωματικά συστατικά του πορτοκαλιού με χαρακτηριστικό άρωμα εσπεριδοειδούς ή και μέντας και σε αυτό οφείλεται η πικρή γεύση του. Έχει παρατηρηθεί ότι στα ομφαλοφόρα πορτοκάλια η συγκέντρωσή του είναι μεγαλύτερη.

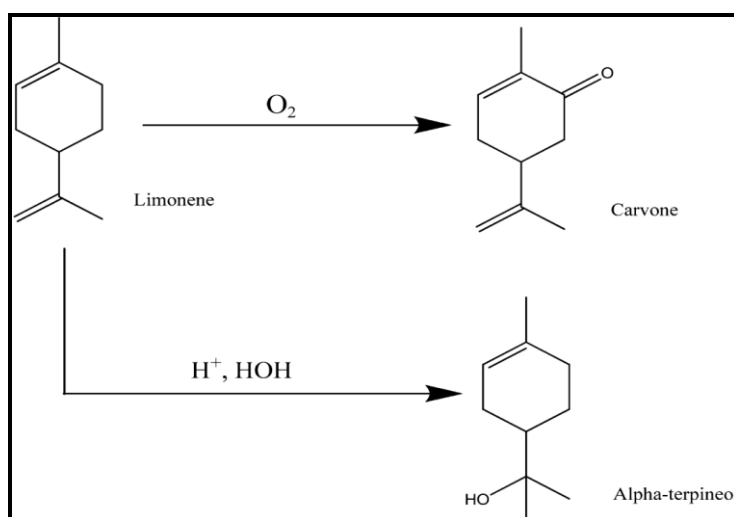
Το λεμονένιο βιοσυντίθεται από το πυροφωσφορικό γερανύλιο, μέσω κυκλοποίησης ενός καρβονικού άλατος ή του ισοδυνάμου του, όπως φαίνεται στο Σχήμα. 5. Το τελικό στάδιο περιλαμβάνει την απώλεια ενός πρωτονίου από το κατιόν προς σχηματισμό του αλκενίου.



Σχήμα 5. Βιοσύνθεση του λεμονένιου (en.wikipedia.org).

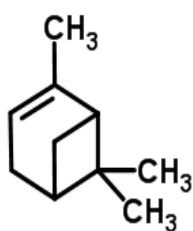
Σύμφωνα με τους Ruiz Perez–Cacho και Ruseff (2008) αρκετές βιβλιογραφικές αναφορές σχετίζουν τη μεγάλη περιεκτικότητα του χυμού σε λεμονένιο με μία

αρνητική αίσθηση στο στόμα που αναφέρεται ως «κάψιμο φλούδας» (peel burn), καθώς και με ενώσεις με ανεπιθύμητο άρωμα και γεύση (off-flavors). Στο χυμό πορτοκαλιού, ανάλογα με την οξύτητα και με την περιεκτικότητα του σε οξυγόνο, το λεμονένιο μετατρέπεται κατά την αποθήκευση του χυμού εν μέρει, σε α-τερπινεόλη και καρβόνη, αντίστοιχα. Οι ενώσεις αυτές θεωρούνται δείκτες υποβάθμισης του αρώματος και της γεύσης του χυμού πορτοκαλιού και η παρουσία τους σε μεγάλες ποσότητες θεωρείται ένδειξη παλαιότητας του χυμού (Proctor & Kenyon, 1949). Καθώς αυτά τα συστατικά προέρχονται από τη χημική αποικοδόμηση του λεμονένιου και αυξάνονται κατά την αποθήκευση του χυμού θεωρούνται ως οι «ενώσεις κλειδιά» για τον καθορισμό της ποιότητας του αρώματος στον χυμό πορτοκαλιού (Jian et al., 2009). Οι πορείες σχηματισμού της α-τερπινεόλης και της καρβόνης από το λεμονένιο παρουσιάζονται στο Σχήμα 6.

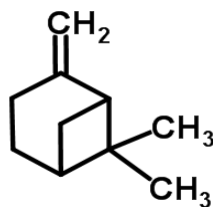


Σχήμα 6. Πορείες σχηματισμού καρβόνης και α-τερπινεόλης από το λεμονένιο (Jian et al., 2009).

- ΠΙΝΕΝΙΟ

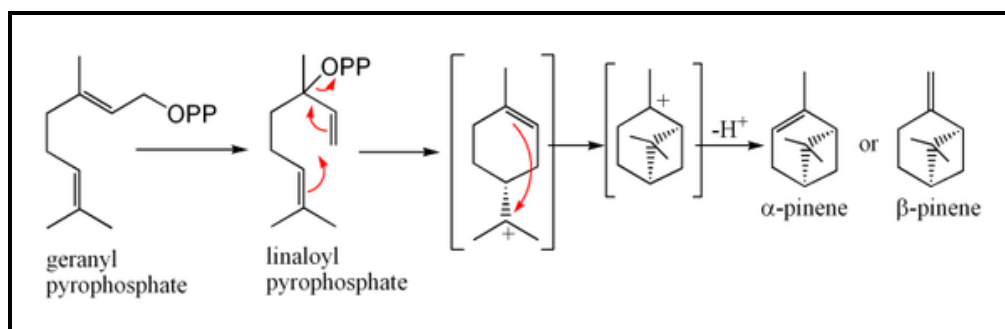


α -πινένιο



β -πινένιο

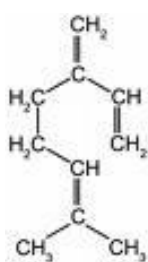
Τα α-πινένιο και το β-πινένιο είναι ισομερείς μορφές του πινενίου παράγονται και τα δύο από το πυροφωσφορικό γερανύλιο, μέσω κυκλοποίησης του πυροφωσφορικού λιναλοϋλίου, ακολουθούμενης από απώλεια πρωτονίου (Σχήμα 7).



Σχήμα 7. Βιοσύνθεση του πινενίου (en.wikipedia.org).

Το α-πινένιο είναι ένα τερπένιο ευρέως διαδεδομένο στη φύση και απαντάται στο αιθέριο έλαιο του δεντρολίβανου και διαφόρων ειδών κωνοφόρων δέντρων, κυρίως του πεύκου και απωθεί τα έντομα. Στο χυμό πορτοκαλιού η περιεκτικότητά του είναι ανάλογη της περιεκτικότητας του αιθέριου ελαίου στη φλούδα. Έχει θετική συνεισφορά στο άρωμα του χυμού με χαρακτηριστική οσμή πεύκου/ρετσινιού (Ruiz Perez–Cacho et al., 2008).

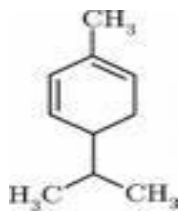
- ΜΥΡΚΕΝΙΟ



Το μυρκένιο ή β-μυρκένιο είναι ένα μονοτερπένιο που είναι σημαντικό συστατικό του αιθέριου ελαίου πολλών φυτών, όπως η κάνναβη, το άγριο θυμάρι, ο μαϊντανός, το κάρδαμο και ο λυκίσκος. Παράγεται κυρίως συνθετικά από το φυτό myrcia (ανήκει στην ίδια οικογένεια φυτών με τη μυρτιά), από την οποία παίρνει το όνομά του. Επίσης, μπορεί να συντεθεί για εμπορική χρήση από την πυρόλυση του β-πινενίου και χρησιμοποιείται ευρέως στην αρωματοποίηση.

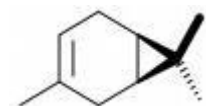
Στο χυμό πορτοκαλιού είναι το πιο άφθονο τερπένιο μετά το λεμονένιο και συνεισφέρει στο αρωματικό προφίλ του με πράσινες νότες, αφού έχει άρωμα χορταριού. Παρόλο που βρίσκεται σε σημαντικά μικρότερες ποσότητες στο χυμό από το λεμονένιο, έχει μεγαλύτερη συνεισφορά στο άρωμά του (Ruiz Perez–Cacho et al., 2008).

- **α-ΦΑΙΛΑΝΔΡΕΝΙΟ**



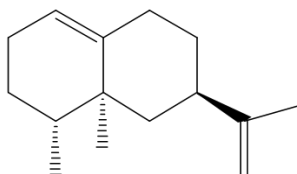
Το α-φαιλανδρένιο αποτελεί συστατικό των αιθέριου ελαίου του ευκαλύπτου και των εσπεριδοειδών. Έχει ευχάριστο άρωμα εσπεριδοειδών με νότες πιπεριού.

- **δ-3-KAPENIO**



Το δέλτα-3-καρένιο βρίσκεται στο ρετσίνι των δέντρων με περιεκτικότητα που κυμαίνεται μέχρι και 42% και έχει έντονη γλυκιά μυρωδιά.

- **ΒΑΛΕΝΤΣΕΝΙΟ**

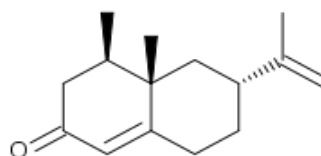


Το βαλεντσένιο είναι αρωματικό συστατικό των εσπεριδοειδών και οφείλει το όνομά του στην ποικιλία πορτοκαλιών Βαλέντσια.

βαλεντσένιο

Είναι η πρόδρομη ένωση της νοοκατόνης, του βασικού συστατικού του αιθέριου ελαίου του

γκρέιπφρουτ.



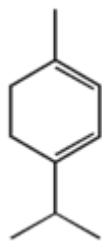
νοοκατόνη

- **ΣΑΜΠΙΝΕΝΙΟ**

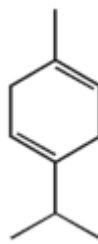


Το σαμπινένιο έχει απομονωθεί από τα αιθέρια έλαια διαφόρων φυτών. Είναι μία από τις χημικές ενώσεις που συμβάλλουν στο άρωμα του μαύρου πιπεριού και αποτελεί σημαντικό συστατικό των σπόρων του καρότου. Επίσης, εμφανίζεται σε χαμηλή συγκέντρωση στο τεϊόδεντρο.

- ΤΕΡΠΙΝΕΝΙΟ



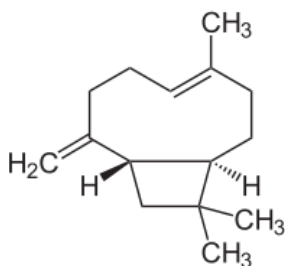
α-τερπινένιο



γ-τερπινένιο

Το ισομερή αυτά του τερπινένιου έχουν απομονωθεί από διάφορες φυσικές πηγές. Το α-τερπινένιο εκτός από τα εσπεριδοειδή υπάρχει στα έλαια του κάρδαμου και της μαντζουράνας και έχει χαρακτηριστική οσμή εσπεριδοειδούς. Μπορεί να σχηματιστεί από τον ισομερισμό του λεμονένιου.

- ΚΑΡΥΟΦΥΛΛΕΝΙΟ



Το καρυοφυλλένιο είναι φυσικό δικυκλικό σεσκιτερπένιο που υπάρχει σε πολλά αιθέρια έλαια, ειδικότερα της κανέλας, του γαρίφαλου, της κάνναβης και του δενδρολίβανου. Ο δακτύλιος κυκλοβουτανίου που περιέχει είναι σπάνιος στη φύση. Έχει οσμή παρόμοια με αυτή του μαύρου πιπεριού. Είναι εγκεκριμένο από τον Αμερικανικό

Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) ως πρόσθετο τροφίμων.

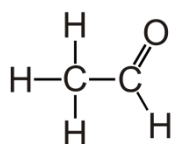
Το α-καρυοφυλλένιο που ονομάζεται και α-χουμουλένιο απαντά στα αιθέρια έλαια του φυτού λυκίσκου. Βρίσκεται συχνά στη φύση ως μίγμα με το β-καρυοφυλλένιο. Συμβάλλει στο άρωμα του κόλιανδρου και της κάνναβης.

6.1.2 ΑΛΔΕΥΔΕΣ

Οι αλδεϋδες είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που σχηματίζονται κατά τη διαδικασία αναπνοής του φυτού και κατά την ωρίμανση των πορτοκαλιών. Συμβάλλουν σημαντικά στο άρωμα του πορτοκαλιού και η συγκέντρωσή τους αυξάνεται με την ωρίμανση του φρούτου (Kelebek & Selli, 2011). Κάποιες αλδεϋδες προσδίδουν φρουτώδες άρωμα στο φρεσκοστυμμένο χυμό πορτοκαλιού, ενώ άλλες μεταλλικό.

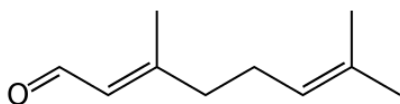
Κάποιες αλδεΐδες όπως η **ακεταλδεΐδη**, η **(Z)-εξ-3-ενάλη**, η **νεράλη** και η **γερανιάλη** υπάρχουν σε υψηλά επίπεδα σε φρεσκοστυμμένους χυμούς, αλλά σε πολύ μικρά έως μηδενικά επίπεδα σε επεξεργασμένους χυμούς. Η ποιότητα του αρώματος του χυμού πορτοκαλιού που γίνεται αντιληπτή από τον άνθρωπο προέρχεται σε σημαντικό βαθμό από ποσότητες αυτών των αλδεϊδών. Ακόρεστα λιπαρά οξέα με μεγάλες αλυσίδες είναι πρόδρομοι αρκετών δύσοσμων ενώσεων, όπως τα αλκ-2,4-διενάλια, αλκ-2,6-διενάλια και οι αλειφατικές κορεσμένες αλδεΐδες (εξανάλη, οκτανάλη, δεκανάλη). Έχει αποδειχθεί ότι οι συγκεντρώσεις όλων αυτών των αλδεϊδών αυξάνονται όταν ο χυμός που πορτοκαλιού θερμαίνεται (Rouseff et al., 2001). Στη συνέχεια αναφέρονται ενδεικτικά κάποιες από τις αλδεΐδες που έχουν σημαντική συνεισφορά στο άρωμα του χυμού του πορτοκαλιού.

- ΑΚΕΤΑΛΔΕΪΔΗ

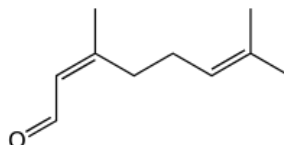


Η ακεταλδεΐδη έχει φρουτώδη οσμή και εμφανίζεται σε ώριμα φρούτα, στον καφέ και στο φρέσκο ψωμί.

- ΚΙΤΡΑΛΗ



γερανιάλη



νεράλη

Εμφανίζεται στα αιθέρια έλαια του πορτοκαλιού, του λεμονιού, του λεμονόχορτου, του μοσχολέμονου και της αγριοκανέλας. Είναι μια από τις κύριες χαρακτηριστικές ‘αρωματικές’ ενώσεις στην οικογένεια των εσπεριδοειδών μετά από το λεμονένιο. Οι ενώσεις γερανιάλη (α-κιτράλη) και νεράλη (β-κιτράλη) είναι ισομερείς. Η γερανιάλη έχει έντονη μυρωδιά λεμονιού, ενώ η νεράλη έχει την ίδια αλλά μικρότερης έντασης οσμή και είναι πιο γλυκιά.. Τα δύο αυτά ισομερή βρίσκονται συνήθως σε αναλογία 3:2 αντίστοιχα.. Είναι αρκετά ασταθή και η συγκέντρωσή τους μειώνεται με τη θερμική επεξεργασία του χυμού.

- ΕΞΑΝΑΛΗ



Η εξανάλη παράγεται στα φρούτα και τα κηπευτικά διαμέσου της πορείας της λιποξυγενάσης (LOX). Προσδίδει νότες «πράσινου», «χόρτου», ή «μέντας» και είναι γνωστή ως «green leaf volatile» (νότες πράσινου φύλλου). Έχει θετική συσχέτιση με τη γλυκύτητα και την ωρίμανση των φρούτων, ωστόσο σε μεγάλες συγκεντρώσεις και σε θερμικώς επεξεργασμένα προϊόντα φρούτων και κηπευτικών μπορεί να προσδώσει δυσάρεστη γεύση.

- ΔΕΚΑΝΑΛΗ



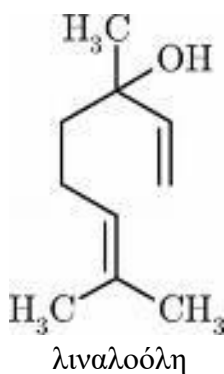
Αποτελεί σημαντικό συστατικό του αιθέριου ελαίου των εσπεριδοειδών μαζί με την οκτανάλη και τη νεράλη. Επίσης είναι σημαντικό αρωματικό συστατικό του μαύρου σιταριού. Η δεκανάλη μπορεί να παραχθεί από την οξείδωση της δεκανόλης.

6.1.3 ΑΛΚΟΟΛΕΣ

Οι σημαντικότερες τερπενικές αλκοόλες που συμβάλλουν στο αρωματικό προφίλ του χυμού πορτοκαλιού είναι: λιναλοόλη, α-τερπινεόλη και τερπινεν-4-όλη. Επίσης, έχουν ανιχνευθεί στο χυμό και οι μεθανόλη, αιθανόλη, προπανόλη, ισοβουτανόλη, βουτανόλη, ισοπεντανόλη, πεντανόλη, εξανόλη, 3-εξενόλη, επτανόλη, μέθυλο-επτενόλη, οκτανόλη, δεκανόλη, δωδεκανόλη, νερόλη και γερανιόλη.

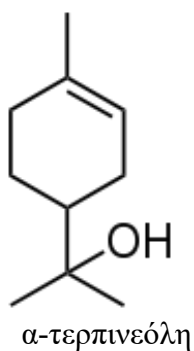
Λόγω του όξινου περιβάλλοντος του χυμού ($\text{pH} \approx 3,8$) τα τερπένια υδρογονανθράκων υφίστανται μια σειρά από οξειδωτικές υδρολύσεις και αντιδράσεις αφυδάτωσης που παράγουν αλκοόλες π.χ. τερπινέν-4-όλη, α-τερπινεόλη, και β-τερπινεόλη και άλλα προϊόντα π.χ. κυμένιο ή τερπινολένιο (Ruiz Perez-Cacho et al., 2008). Υπερβολικές συγκεντρώσεις αυτών των τερπενικών αλκοολών μπορεί να υποβαθμίσουν το σύνολο των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του χυμού.

- ΛΙΝΑΛΟΟΛΗ



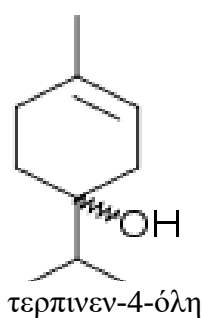
Η λιναλοόλη είναι από τις πιο “αρωματικές” τερπενικές αλκοόλες και προσδίδει ένα διακριτικό και γλυκό «λουλουδένιο» άρωμα. Η λιναλοόλη υπάρχει στον φρεσκοστυμμένο χυμό, αλλά σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στον επεξεργασμένο και συμπυκνωμένο χυμό. Η λιναλοόλη στο όξινο περιβάλλον του χυμού μετατρέπεται σε α-τερπινεόλη, 1,8-κινεόλη, γερανιόλη, νερόλη και τερπινεν-4-όλη.

- α-ΤΕΡΠΙΝΕΟΛΗ



Η α-τερπινεόλη μπορεί να σχηματιστεί από την όξινη υδρόλυση της λιναλοόλης, αλλά και του λεμονένιου. Παρόλο που η λιναλοόλη περιέχεται σε μικρότερο ποσοστό στους χυμούς από το λεμονένιο, είναι περισσότερο δραστική και σχηματίζει περισσότερη α-τερπινεόλη (Ruiz Perez-Cacho et al., 2008). Η α-τερπινεόλη θεωρείται ως ένας δείκτης για τους θερμικά καταπονημένους χυμούς πορτοκαλιού.

- ΤΕΡΠΙΝΕΝ-4-ΟΛΗ



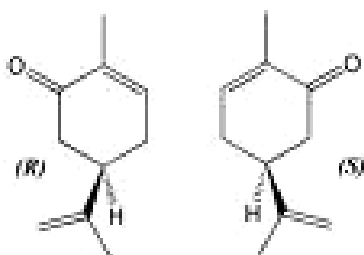
Η τερπινεν-4-όλη έχει πικάντικο και γήινο (χωματένιο) άρωμα. Οι Bazemore et al. (2003) ανέφεραν πως το άρωμα της τερπινεν-4-όλης που χαρακτηρίστηκε ως μεταλλικό και μπαγιάτικο, ήταν ισχυρότερο σε έντονα θερμικά καταπονημένους χυμούς παρά σε χυμούς ήπιας θερμικής επεξεργασίας.

6.1.4 KETONES

Στο χυμό πορτοκαλιού οι πιο κοινά παρατηρούμενες κετόνες είναι οι: **γερανιόνη**, **2-εξανόνη**, **οκτανόνη**, **δεκανόνη**, καθώς και μικρότερες ποσότητες των: καρβόνη ακετόνη, εννεανόνη, βουτυραλδεΐδη, εξανόνη, επτανόνη, μέθυλο-επτανόνη, και δωδεκανόνη.

Η **καρβόνη** είναι μια κετόνη που παράγεται από την οξείδωση του λεμονένιου, όπως έχει ήδη αναφερθεί. Μπορεί να βρεθεί σε δυο εναντιομερείς μορφές: S(+)-καρβόνη, η οποία μυρίζει σαν κύμινο και την κατοπτρική της, την R(-)-καρβόνη που μυρίζει σαν μέντα. Υποβαθμίζει το άρωμα του χυμού του πορτοκαλιού και η συγκέντρωσή της αυξάνεται σαν αποτέλεσμα θερμικής καταπόνησης και αποθήκευσης. Ανάλογα με τις συνθήκες αντίδρασης, η αφυδρογονωμένη καρβόνη παράγει είτε καρβεόλη, είτε υδρόξυ-καρβόνη, που αποτελούν επίσης ενώσεις γεύσης.

Έχει παρατηρηθεί ότι σε επεξεργασμένους χυμούς συνεισφέρει ισχυρά στο



R(-)- και S(+)- καρβόνη

αρωματικό προφίλ τους η αλειφατική κετόνη **1,3-οκτενόνη** που προκύπτει από οξείδωση των λιπιδίων και το άρωμά της έχει χαρακτηριστεί ως μεταλλικό και παρόμοιο με αυτό του μανιταριού (Ruiz Perez-Cacho et al., 2008). Επίσης, ως ισχυρά αρωματικά συστατικά σε

επεξεργασμένους χυμούς έχουν αναφερθεί η **β-ιονόνη** και η **β-δαμασκηνόνη**.

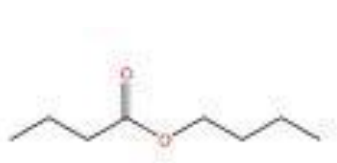
Σύμφωνα με τους Hinterholzer και Schieberle (1998) η β-ιονόνη συνεισφέρει σημαντικά στο άρωμα φρεσκοστυμμένων χυμών από πορτοκάλια της ποικιλίας Βαλέντσια. Το άρωμα της περιγράφεται ως γλυκό, «λουλουδένιο», που θυμίζει βατόμουρο και έχει ιδιαίτερα χαμηλό κατώφλι αντίληψης. Το άρωμα της β-δαμασκηνόνης περιγράφεται παρόμοιο με αυτό του μήλου και «λουλουδένιο» και συνεισφέρει στο 19% των ανθοκυαμινικών συστατικών σε φρέσκους χυμούς πορτοκαλιού που έχουν αναλυθεί με αέρια χρωματογραφία (Mahattanatawee et al., 2005). Αυτά τα νορεσοπρενοειδή μπορούν να παραχθούν από τη νεοξανθίνη.

6.1.5 ESTERES

Μόνο ένα μικρό μέρος του ελαίου του πορτοκαλιού αποτελείται από εστέρες. Ο πιο σημαντικός για το άρωμα του πορτοκαλιού είναι ο **βουτυρικός αιθυλεστέρας**.

Άλλοι εστέρες σε σημαντικές ποσότητες, είναι οι **οξικός αιθυλεστέρας, βουτυρικός γερανυλεστέρας, οξικός γερανυλεστέρας και καπρυλικός αιθυλεστέρας.**

Όταν το φρούτο υπόκειται σε μηχανική πίεση κατά το στύψιμο, πολλοί εστέρες υδρολύονται ταχύτατα από υδρολάσες, και επομένως μειώνεται η συγκέντρωσή τους. Επίσης έχει παρατηρηθεί μείωσή τους μετά από θερμική επεξεργασία του χυμού. Οι εστέρες προσδίδουν έντονο φρουτώδες άρωμα που συχνά λείπει από χυμούς οι οποίοι έχουν υποστεί θερμική επεξεργασία.



Ο βουτυρικός αιθυλεστέρας ή βουτυλεστέρας

συνεισφέρει σημαντικά στην επιθυμητή γεύση των διαφόρων προϊόντων πορτοκαλιού, καθώς έχει ευχάριστο άρωμα και γεύση. Είναι προϊόν συμπίκνωσης του βουτυρικού οξέος και της βουτανόλης. Σε επεξεργασμένους χυμούς εμφανίζεται σε χαμηλότερα επίπεδα. Χρησιμοποιείται στη βιομηχανία για να προσδώσει γλυκά-φρουτώδη αρώματα, παρόμοια με το άρωμα του ανανά. Εμφανίζεται σε πολλά είδη φρούτων, όπως μήλο, αχλάδι, φράουλα, μπανάνα και μούρα.

6.1.6 ΕΝΩΣΕΙΣ ΜΕ ΘΕΙΟ Ή ΑΖΩΤΟ

Οι ενώσεις που περιέχουν θείο συνεισφέρουν ισχυρά στο άρωμα του χυμού, παρόλο που η παρουσία τους είναι σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, και αυτό γιατί έχουν πολύ χαμηλό «κατώφλι» αντίληψης. Σχηματίζονται στα φρούτα και τα κηπευτικά μέσω μίας ποικιλίας ενζυμικών ή/και βιοχημικών αντιδράσεων. Επειδή βρίσκονται σε επίπεδα κοντά ή κάτω από τα όρια αντίληψης πολλών οργάνων αέριας χρωματογραφίας δύσκολα μετρώνται και για αυτό συχνά παραβλέπονται (Ruiz Perez–Cacho et al., 2008). Οι τεταρτοταγείς θειόλες είναι σημαντικές ενώσεις αρώματος, που σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις έχουν οσμή φρούτου, καθώς αυξάνεται όμως η συγκέντρωσή τους μυρίζουν ως ούρα γάτας και για αυτό ονομάζονται «catty odorants» (Belitz et al., 2009).

Σημαντική είναι η συνεισφορά των θειούχων ενώσεων και στους θερμικά επεξεργασμένους χυμούς στους οποίους βρίσκονται σε μεγαλύτερες ποσότητες και θεωρούνται εν δυνάμει off-flavors, ανάλογα με την συγκέντρωσή τους και με το

περιβάλλον του χυμού. Προέρχονται από θερμικά υποκινούμενες αντιδράσεις που περιέχουν αμινοξέα, όπως η μεθειονίνη, κατά την αποικοδόμηση Strecker. Οι Ruiz Perez–Cacho et al. (2007) ανίχνευσαν σε κονσερβοποιημένους χυμούς πορτοκαλιού 8 θειούχες ενώσεις τις οποίες χαρακτήρισαν ως off-flavors: μεθανοθειόλη, διμεθυλοσουλφίδιο, 3-μερκαπτο-2-βουτανόνη, 2-μεθυλο-3-φουρανθόλη, μεθειονάλη, 4-μερκαπτο-4-μεθυλ-2-πεντανόνη, διμεθυλο-τρισουλφίδιο και 1-p-μενθεν-8-θειόλη.

Αζωτούχες ενώσεις, όπως πρωτεΐνες, πεπτίδια, αμινοξέα και φωσφατίδια βρίσκονται κυρίως στα σκληρά τμήματα του πορτοκαλιού (επικάρπιο, μεσοκάρπιο, πυρήνας, μεμβράνες) και είναι υπεύθυνες για δύσοσμες ενώσεις που προκύπτουν κυρίως από την αντίδραση Maillard κατά την θερμική επεξεργασία του χυμού. Γενικά, έχουν ταυτοποιηθεί στα θερμικά επεξεργασμένα τρόφιμα πληθώρα ετεροκυκλικών αζωτούχων ενώσεων που προκύπτουν από την αντίδραση Maillard, με κύριες τις πυραζίνες, πυρρόλες και πυριδίνες.

6.1.7 ΟΞΕΑ

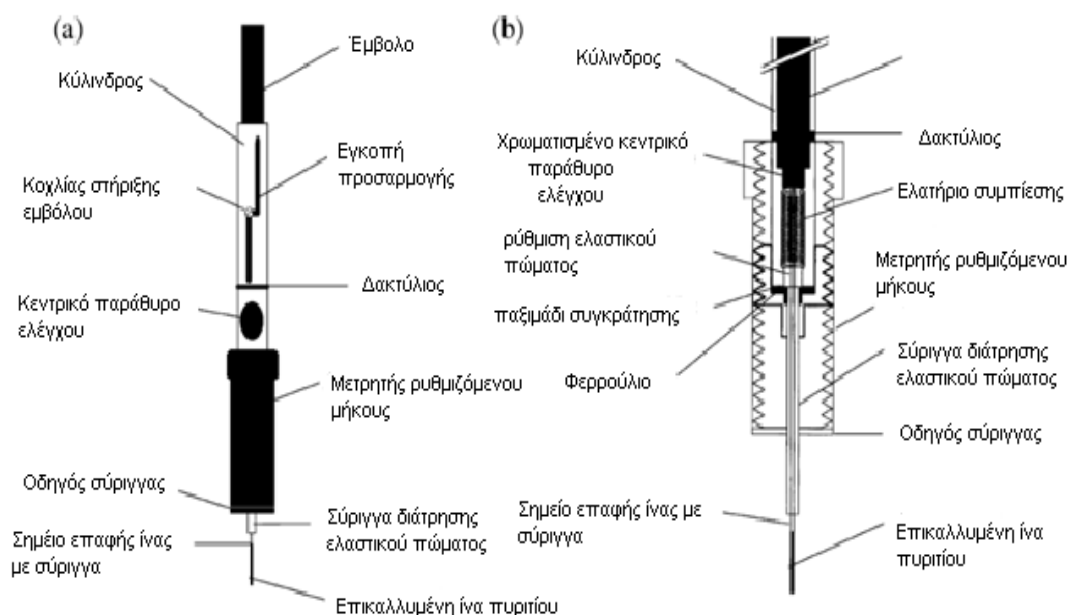
Οι Kelebek και Selli (2011) ποσοτικοποίησαν σε φρεσκοστυμμένο χυμό πορτοκαλιού της τουρκικής ποικιλίας Dortyol, 8 οξέα συνολικής περιεκτικότητας 378,7 ppb, με το δεκαεξανικό οξύ να είναι το πιο άφθονο, ίσο με 196 ppb. Αυτή η κατηγορία ενώσεων δεν φαίνεται να συνεισφέρει στο συνολικό άρωμα του χυμού, λόγω των υψηλών τιμών «κατωφλίου» ανίχνευσης.

Οι Ruiz Perez–Cacho και Ruseff (2008) αναφέρουν ότι προσδιορίζονται λίγα οξέα ως αρωματικά ενεργά στον θερμικά επεξεργασμένο χυμό πορτοκαλιού, παρόλο που η συνεισφορά τους στο αρωματικό προφίλ του χυμού είναι ελάχιστη. Θεωρείται ότι σχηματίζονται από την οξείδωση των λιπαρών οξέων ή από μικροβιακή αλλοίωση.

6.2 Τεχνικές απομόνωσης και προσδιορισμού πτητικών συστατικών

Μία σύγχρονη μέθοδος απομόνωσης πτητικών ενώσεων από τα τρόφιμα αποτελεί η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (SPME) υπερκείμενου χώρου (Headspace-HS), όπου πραγματοποιείται προσρόφηση των πτητικών ενώσεων σε μία στατική φάση/πολυμερική ίνα, ενώ η ταυτοποίηση και ο ποσοτικός ή ημι-ποσοτικός προσδιορισμός των ενώσεων πραγματοποιείται συνήθως με αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών (GC-MS).

Η SPME αποτελείται από μία ίνα πυριτίου επιστρωμένη με μια στατική πολυμερική φάση και συνδέεται με έναν υποδοχέα ώστε να προστατεύεται κατά τη μεταφορά της από το δείγμα στον εισαγωγέα του οργάνου. Στη στατική φάση γίνεται η προσρόφηση/απορρόφηση των προς ανάλυση ουσιών. Στο Σχήμα 8 διακρίνονται τα κύρια μέρη της συσκευής μικροεκχύλισης στερεής φάσης.



Σχήμα 8. Συσκευή SPME: (a) Υποδοχέας SPME (b) Ίνα SPME (Mester et al., 2001), (Απόδοση στα Ελληνικά, Καραμπάγιας, 2014).

Προκειμένου να επιτευχθεί η βέλτιστη απομόνωση των πτητικών συστατικών των τροφίμων πρέπει να εξασφαλιστεί η αποτελεσματική εκχύλιση. Η αποτελεσματικότητα της τεχνικής SPME επηρεάζεται από την επίστρωση των ινών και τις συνθήκες εκχύλισης. Αυτές αφορούν στην ποσότητα του δείγματος, την ανάδευση, το χρόνο, τη θερμοκρασία εκχύλισης και την προσθήκη ή όχι χλωριούχου νατρίου.

Η διαδικασία SPME μπορεί να διεξαχθεί με τρεις συνήθεις τρόπους: 1) την άμεση εκχύλιση, 2) την εκχύλιση υπερκείμενου χώρου (HS) και 3) την εκχύλιση με προστασία μεμβράνης. Στη HS-SPME οι ίνες εκτίθενται στο χώρο πάνω από το υγρό ή στερεό δείγμα. Τα πλεονεκτήματα είναι η προστασία της ίνας από τις μη πτητικές ουσίες του δείγματος, όπως τα σάκχαρα στην περίπτωση του χυμού και η δυνατότητα ρύθμισης των συνθηκών της εκχύλισης όπως το pH, χωρίς να επηρεάζεται η ίνα. Στην περίπτωση των υδατικών δειγμάτων, οι πτητικές και μη πολικές ενώσεις

εκχυλίζονται ταχύτερα από τις ημι-πτητικές και πολικές. Επιπλέον, η αύξηση της θερμοκρασίας του δείγματος και η αποτελεσματικότητα της ανάδευσης μπορεί να μειώσουν τον χρόνο εκχύλισης (Merkle et al., 2015).

Η SPME είναι μια απλή και ευαίσθητη μέθοδος, τα δείγματα δε χρήζουν ιδιαίτερης προετοιμασίας, δε γίνεται χρήση οργανικών διαλυτών και έχει μεγάλο εύρος ανίχνευσης. Επιπλέον, μπορεί εύκολα να συνδυασθεί με διάφορα αναλυτικά όργανα π.χ., GC, GC-MS, HPLC, LC-MS και GC-Olfactometry.

Η πλέον ευρέως διαδεδομένη μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση των συστατικών που συμβάλλουν στο άρωμα του πορτοκαλοχυμού είναι η αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μάζας (GC-MS). Η αέρια χρωματογραφία περιλαμβάνει τις μεθόδους διαχωρισμού που βασίζονται στη κατανομή των πτητικών ουσιών μεταξύ της κινητής φάσης του αερίου και της στατικής φάσης της στήλης. Καθώς το μεγαλύτερο ποσοστό των συστατικών των αρωμάτων είναι πτητικά, οι τεχνικές της αέριας χρωματογραφίας συνιστώνται για το διαχωρισμό και την ποσοτικοποίηση τους. Η αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ταυτοποίηση και τον ημι-ποσοτικό προσδιορισμό των οργανικών συστατικών λόγω της ευαισθησίας, τη υψηλής επιλεκτικότητας και της ευελιξίας που παρουσιάζει.

Διαφορετικοί τύποι ινών έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση χυμών εσπεριδοειδών με HS-SPME, αλλά η ίνα με τα τρία συστατικά επίστρωσης: DVB/CAR/PDMS (Divinylbenzene /Carboxen/ Polydimethylsiloxane) είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη, λόγω της ικανότητάς της να προσροφά μεγαλύτερο αριθμό πτητικών οργανικών ενώσεων (VOCs) από άλλες ίνες (Gonzalez-Mas et al., 2011, Merkle et al., 2015).

7. Φλαβονοειδή πορτοκαλιού

Τα φλαβονοειδή είναι η κυριότερη και πολυπληθέστερη κατηγορία πολυφαινολικών ενώσεων και μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερα από 5000 φλαβονοειδή (Gattuso et al., 2007). Οι πολυφαινόλες διακρίνονται σε φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα, ταννίνες, στιλβένια και λιγνάνες. Τα φλαβονοειδή ανάλογα με τη χημική δομή τους κατατάσσονται σε: ανθοκυανίνες, φλαβόνες, ισοφλαβόνες, φλαβανόνες, φλαβονόλες και φλαβανόλες (ή κατεχίνες). (Erlund, 2004, Ignat et al., 2011).

Τα φλαβονοειδή έχουν υψηλό δυναμικό οξειδοαναγωγής που τους επιτρέπει να δρουν ως αναγωγικοί παράγοντες και δότες υδρογόνου και σε αυτό οφείλεται η ιδιαίτερα ισχυρή αντιοξειδωτική τους δράση. Το υψηλό φαινολικό περιεχόμενο των φρούτων και κηπευτικών έχει συσχετιστεί με εμφάνιση ισχυρότερης αντιοξειδωτικής ικανότητας (Fang et al., 2009). Η συχνή κατανάλωσή τους έχει συσχετιστεί με τη μείωση της συχνότητας εμφάνισης ασθενειών όπως ο καρκίνος και η καρδιακή νόσος (Beecher, 2003; Cook & Samman, 1996). Τα ευεργετικά για την υγεία οφέλη τους συνίστανται ακόμη στην καταπολέμηση διαφόρων φλεγμονών, αλλά και αλλεργιών καθώς και στο ότι δρουν ως αντισπασμωδικά, διουρητικά, τονωτικά του κυκλοφορικού αλλά και καρδιοδιεγερτικά. Επιπλέον, χρησιμοποιούνται και ως φάρμακα ενάντια σε ασθένειες όπως το AIDS, το έλκος, η βακτηριακή μόλυνση οι μεταλλαξιογενέσεις και οι νευρικές δυσλειτουργίες. Υπάρχει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον για την μελέτη των φλαβονοειδών στο στάδιο της προληπτικής ιατρικής που μπορεί να προωθηθεί μέσω της κατανάλωσης φρούτων και κηπευτικών ώστε να βελτιώνεται η δημόσια υγεία μέσω της διατροφής (Ignat et al., 2011). Επίσης, τα φλαβονοειδή είναι τα πιο συχνά φυτοχημικά, τα οποία συνήθως βοηθούν στην προστασία του φυτού από το υπεριώδες φως, τα παράσιτα, τα φυτοφάγα, τους παθογόνους οργανισμούς και τον οξειδωτικό κυτταρικό τραυματισμό (Cook & Samman, 1996).

Τα φλαβονοειδή απαντώνται σε φρούτα, κηπευτικά, βότανα και σε άλλες φυσικές τροφές. Είναι ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους, αποτελούμενες από δεκαπέντε άτομα άνθρακα, διατεταγμένα σε διαμόρφωση $C_6-C_3-C_6$. Ουσιαστικά, η δομή αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους, οι οποίοι ενώνονται με μία γέφυρα τριών ατόμων άνθρακα, συνήθως με τη μορφή ενός οξυγονωμένου ετεροκυκλικού δακτυλίου. Τα φλαβονοειδή εμφανίζονται κυρίως ως γλυκοζίτες, δηλαδή με μία ή περισσότερες ομάδες σακχάρου να είναι συνδεδεμένες με τις φαινολικές τους ομάδες (Murota & Terao, 2003).

Οι παραλλαγές στις θέσεις υποκατάστασης του ετεροκυκλικού δακτυλίου μπορεί να περιλαμβάνουν οξυγόνωση, αλκυλίωση, γλυκοζυλίωση, ακυλίωση και σουλφόνωση και έχουν ως αποτέλεσμα τις κύριες κατηγορίες φλαβονοειδών, εκ των οποίων οι φλαβόνες και οι φλαβονόλες είναι οι πιο διαδεδομένες. Οι υποκαταστάσεις στους δύο αρωματικούς δακτυλίους δημιουργούν διαφορετικές ενώσεις σε κάθε κατηγορία φλαβονοειδών (Pietta, 2000).

7.1 Κατηγορίες φλαβονοειδών

7.1.1 ΦΛΑΒΑΝΟΝΕΣ

Οι φλαβανόνες χαρακτηρίζονται από την παρουσία κορεσμένης αλυσίδας με τρία άτομα άνθρακα και ενός ατόμου οξυγόνου στο C₄. Εν γένει γλυκοζυλιώνονται με δισακχαρίτη στο C₇. Οι φλαβανόνες υπάρχουν σε υψηλές συγκεντρώσεις στα εσπεριδοειδή αλλά και στις τομάτες και σε ορισμένα αρωματικά φυτά όπως η μέντα. Οι κύριες αγλυκόνες μορφές τους είναι η ναριγκενίνη στα γκρέιφρουτ, η εσπεριτίνη στα πορτοκάλια και η εριοδικτυόλη στα λεμόνια (Ignat et al., 2011). Η φαινολική σύνθεση του χυμού εσπεριδοειδών περιλαμβάνει φλαβανόνες (κύρια ομάδα), φλαβόνες και φλαβονόλες. Αυτά τα φλαβονοειδή, που βρίσκονται σε διάφορα μέρη του καρπού των εσπεριδοειδών, συνήθως εμφανίζονται ως γλυκοζίτες (Abad Garcia et al., 2012a).

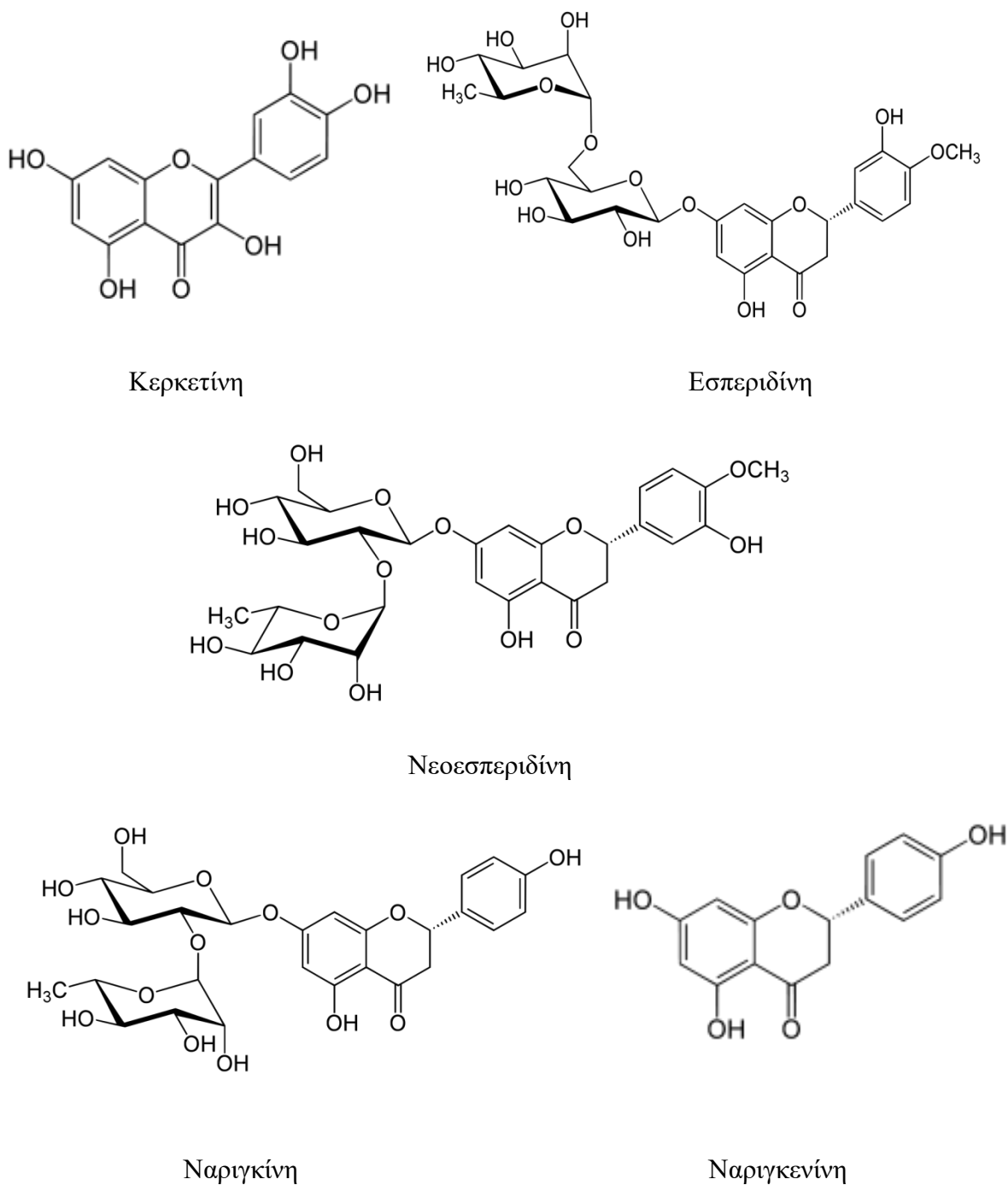
Η **εσπεριδίνη** και η **νεοεσπεριδίνη** είναι γλυκοζίτες φλαβανόνης, ισομερείς ενώσεις και βρίσκονται κυρίως στα εσπεριδοειδή εξ' ου και το όνομά τους. Η αγλυκόνη μορφή τους ονομάζεται εσπεριτίνη. Η εσπεριδίνη είναι γνωστή και ως βιταμίνη P και απομονώθηκε αρχικά από το λευκό σπογγώδες τμήμα του εσωτερικού φλοιού των εσπεριδοειδών (μεσοκάρπιο-albedo) και είναι το κύριο φλαβονοειδές στα πορτοκάλια και στα μανταρίνια.

Η **ναριγκίνη** είναι επίσης, γλυκοζίτης φλαβανόνης και εμφανίζεται κυρίως στα εσπεριδοειδή, ειδικά στα γκρέιφρουτ, όπου η είναι υπεύθυνη για την πικρή γεύση του φρούτου. Στην εμπορική παραγωγή χυμού γκρέιφρουτ, το ένζυμο ναριγκινάση χρησιμοποιείται για την αποπίκραση του χυμού. Μια διαδικασία που στηρίζεται στην ενζυμική υδρόλυση της ναριγκίνης στην αγλυκόνη **ναριγκενίνη** που δεν είναι πικρή, αλλά σχεδόν άγευστη (Ribeiro et al., 2008). Στον άνθρωπο η ναριγκίνη μεταβολίζεται σε ναριγκενίνη από τη ναργκινάση που υπάρχει στο έντερο.

7.1.2 ΦΛΑΒΟΝΟΛΕΣ

Οι φλαβονόλες είναι μια κατηγορία φλαβονοειδών που απαντάται συχνά σε πολλά φρούτα και λαχανικά και το περιεχόμενό τους ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό, ανάλογα με τους περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως οι συνθήκες καλλιέργειας, το κλίμα, και η αποθήκευση (Caridi et al., 2007). Η **κερκετίνη** είναι η πιο κοινή φλαβονόλη, αλλά οι υψηλότερες συγκεντρώσεις της έχουν βρεθεί στο κρεμμύδι. Η κερκετίνη

εμφανίζεται στα φυτά με πολλές διαφορετικές γλυκοζιτικές μορφές (Σχήμα 9) (Erlund, 2004).



Σχήμα 9. Δομές φλαβονοειδών που προσδιορίστηκαν στην παρούσα μελέτη.

7.1.3 ANΘΟΚΥΑΝΙΝΕΣ

Οι ανθοκυανίνες είναι υδατοδιαλυτές κετονοειδείς χρωστικές ουσίες που το χρώμα τους διαφέρει ανάλογα με το pH και μπορεί να είναι κόκκινο, μοβ ή μπλε. Εμφανίζονται σε όλους τους φυτικούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένων των φύλλων, των στελεχών, των ριζών, των λουλουδιών και των φρούτων. Οι βασικές δομές τους ονομάζονται ανθοκυανιδίνες. Όταν οι ανθοκυανιδίνες απομονώνονται με τη γλυκοζιτική τους μορφή (συνδεδεμένη με ένα τμήμα σακχάρου) μετατρέπονται σε ανθοκυανίνες. Έξι ανθοκυανιδίνες εμφανίζονται συχνότερα στα φυτά: πελαργονιδίνη, κυανιδίνη, πεονιδίνη, δελφινιδίνη, πετουουνιδίνη και μαλβιδίνη (Ignat et al., 2011).

Οι ανθοκυανίνες διαθέτουν ισχυρές βιολογικές λειτουργίες, όπως αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές ιδιότητες και χρησιμοποιούνται στην παρασκευή φαρμάκων. Επίσης, η υψηλή διαλυτότητά τους στο νερό επιτρέπει την εύκολη ενσωμάτωσή τους στα υδατικά συστήματα των τροφίμων και για αυτό μπορούν να θεωρηθούν πιθανά υποκατάστατα των απαγορευμένων χρωστικών στα τρόφιμα, παρέχοντας ταυτόχρονα πρόσθετα οφέλη στον καταναλωτή.

7.2 Τεχνικές απομόνωσης και προσδιορισμού φαινολικών ενώσεων

Η εκχύλιση είναι ένα πολύ σημαντικό βήμα στην απομόνωση, τον προσδιορισμό και τη μετέπειτα χρήση των φαινολικών ενώσεων και για αυτό δεν υπάρχει μόνο μία τυπική μέθοδος εκχύλισης. Η εκχύλιση με διαλύτη όμως, είναι από τις πιο συνηθισμένες τεχνικές για την απομόνωση φαινολικών ενώσεων.

Ένας μεγάλος αριθμός βιβλιογραφικών αναφορών επικεντρώνεται στην απομόνωση και ανάλυση πολυφαινολών από φρούτα, κηπευτικά, βότανα, μέλι, κρασί, καφέ, τσάι, χυμούς κ.ά. Οι φαινολικές ενώσεις έχουν εκχυλιστεί με άλεση, ξήρανση ή λυοφιλίωση φρούτων, κηπευτικών και βοτάνων ή και μόνο με απλή εμβάπτιση φρέσκων φυτών σε διαλύτη (Merken & Beecher, 2000). Αυτές οι τεχνικές συνεπάγονται την ταυτόχρονη εκχύλιση μη-φαινολικών ουσιών, όπως σάκχαρα, οργανικά οξέα και πρωτεΐνες, που απαιτούν και τη συνεπακόλουθη εφαρμογή διαδικασιών καθαρισμού (για παράδειγμα, εκχύλιση σε στερεά φάση, SPE). Η εκχύλιση με διαλύτη, ως συνάρτηση του προς εκχύλιση υποστρώματος μπορεί να είναι εκχύλιση υγρού-υγρού ή και εκχύλιση στερεού-υγρού.

- Εκχύλιση υγρού-υγρού

Η εκχύλιση υγρού-υγρού είναι μία διαδικασία μεταφοράς μάζας στην οποία ένα διάλυμα-υπόστρωμα που αρχικά περιέχει μία ή περισσότερες διαλυμένες ουσίες αναμιγνύεται επιμελώς με ένα μη αναμίξιμο ή σχεδόν μη αναμίξιμο υγρό (διαλύτης). Ο διαλύτης εμφανίζει συγγένεια ή εκλεκτικότητα προς ένα ή περισσότερα από τα συστατικά του υποστρώματος και έχει διαφορετική πυκνότητα. Από αυτή την επαφή προκύπτουν δύο φάσεις: το εκχύλισμα, το οποίο είναι το πλούσιο σε διαλύτη διάλυμα που περιέχει την επιθυμητή εκχυλισμένη διαλυμένη ουσία, και το ραφινारισμένο, δηλ. το υπολειμματικό διάλυμα τροφοδοσίας που περιέχει λίγη εναπομείνσα διαλυμένη ουσία. Η εκχύλιση αυτού του είδους θεωρείται πολύ χρηστική και αποτελεσματική αν επιλεγεί ο κατάλληλος διαλύτης εκχύλισης. Για τον διαχωρισμό των φαινολικών ενώσεων χρησιμοποιείται συχνά η εκχύλιση υγρού-υγρού με βιομηχανικά υγρά παραπροϊόντα, όπως αυτά που προκύπτουν από τη βιομηχανία ποτών και αναψυκτικών (Ignat et al., 2011).

- Εκχύλιση στερεού-υγρού

Η εκχύλιση στερεού-υγρού ή έκπλυση μπορεί να οριστεί ως ένα φαινόμενο μεταφοράς μάζας στο οποίο τα στερεά που περιέχονται σε ένα στερεό υπόστρωμα μεταφέρονται σε ένα διαλύτη που έρχεται σε επαφή. Πρόκειται για μία διαδικασία που χρησιμοποιείται εκτεταμένα για την ανάκτηση πολλών σημαντικών συστατικών τροφίμων: σακχαρόζη από ζαχαροκάλαμο, λιπίδια ή πρωτεΐνες από ελαιώδεις σπόρους, φυτοχημικά και άλλες και πολυφαινολικές ενώσεις από φυτά, φρούτα, κηπευτικά κλπ. (Ignat et al., 2011).

Η απόδοση της εκχύλισης είναι συνάρτηση των συνθηκών διεργασίας. Αρκετοί παράγοντες επηρεάζουν τη συγκέντρωση των επιθυμητών συστατικών στο εκχύλισμα, όπως η θερμοκρασία, η αναλογία υποστρώματος-διαλύτη, η ταχύτητα ροής/ανάδευσης, το μέγεθος των σωματιδίων και ο χρόνος επαφής. Οι συνήθεις μέθοδοι εκχύλισης με διαλύτη είναι εκείνες που χρησιμοποιούν οξινισμένη μεθανόλη ή αιθανόλη ως εκχυλιστικά. Από αυτές τις μεθόδους, η εκχύλιση με μεθανόλη είναι η πλέον αποτελεσματική. Έχει βρεθεί ότι στην εκχύλιση ανθοκυανινών από πολτό σταφυλιών, η εκχύλιση με μεθανόλη είναι 20% πιο αποτελεσματική από εκείνη με αιθανόλη και 73% πιο αποτελεσματική από την εκχύλιση με νερό (Castaneda-Ovando et al., 2009) ωστόσο, στη βιομηχανία τροφίμων προτιμάται η αιθανόλη λόγω της τοξικότητας της μεθανόλης.

Υπάρχει όλο και αυξανόμενο ενδιαφέρον για τον προσδιορισμό των πολυφαινολών και των διαφόρων κατηγοριών τους με εξαιρετικά ευαίσθητες και επιλεκτικές αναλυτικές μεθόδους. Παρά το μεγάλο αριθμό σχετικών μελετών, ο διαχωρισμός και η ποσοτικοποίηση των διαφόρων πολυφαινολικών ενώσεων παραμένει δύσκολο έργο, ιδιαίτερα ο ταυτόχρονος προσδιορισμός πολυφαινολικών ενώσεων από διαφορετικές ομάδες (Ignat et al., 2011). Για τον προσδιορισμό και την ποσοτικοποίηση των ενώσεων αυτών έχουν αναπτυχθεί φασματοφωτομετρικές μέθοδοι και τεχνικές.

Μεταξύ των διαφόρων χρωματογραφικών μεθόδων για τον διαχωρισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των πολυφαινολών στα φρούτα, προτιμάται η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Οι χρωματογραφικές συνθήκες της HPLC περιλαμβάνουν τη χρήση σχεδόν αποκλειστικά στήλης C₁₈ ανεστραμμένης φάσης (ενδείκνυται για ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους), ανιχνευτή ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) ή συστοιχίας πολλαπλών δυνόδων (DAD) και ένα δυαδικό σύστημα διαλυτών έκλουσης που περιέχει οξινισμένο νερό και πολικό οργανικό διαλύτη. Η HPLC ανεστραμμένης φάσης (RP) έχει καταστεί κυρίαρχο αναλυτικό εργαλείο για τον διαχωρισμό και τον προσδιορισμό πολυφαινολών με διαφορετικά συστήματα ανίχνευσης, όπως ανιχνευτή συστοιχίας διόδων (DAD) και φασματομετρία μάζας.

Οι Abad-García et al. (2012a) προσδιόρισαν το φαινολικό περιεχόμενο εσπεριδοειδών με HPLC-DAD και στήλη C₁₈ ανεστραμμένης φάσης, ενώ οι Belajona & Suhaj (2004) προσδιόρισαν τα φλαβονοειδή ναριγκίνη, εσπεριδίνη, νεοεσπεριδίνη και κερκετίνη σε χυμούς εσπεριδοειδών του εμπορίου με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης χρησιμοποιώντας στήλη C₆ φαινυλικής φάσης και ανιχνευτή συστοιχίας διόδων. Η απομόνωση των ενώσεων έγινε με εκχυλιστικό μέσο μεθανόλη σε συσκευή ανακίνησης. Η μέθοδος έδωσε σχετικά καλά αποτελέσματα. Οι φλαβανόνες ναριγκίνη, εσπεριδίνη και νεοεσπεριδίνη αναγνωρίστηκαν ως κύριοι δείκτες του χυμού των εσπεριδοειδών.

8 Ανασκόπηση της βιβλιογραφίας επί της αυθεντικότητας χυμού εσπεριδοειδών

Διάφορες τεχνικές ανάλυσης έχουν εφαρμοστεί για τον διαχωρισμό και την ποσοτικοποίηση των χημικών συστατικών του πορτοκαλιού, για σκοπούς χαρακτηρισμού, βοηθώντας στην ποιότητα του προϊόντος και τον έλεγχο της αυθεντικότητας του.

Σύμφωνα με τους Luykx and van Ruth (2008) για τη διαφοροποίηση της βοτανικής και γεωγραφικής προέλευσης των τροφίμων χρησιμοποιούνται ενόργανες τεχνικές όπως: Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC), Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης/Φασματοσκοπία μαζών (LC/MS), Αέρια Χρωματογραφία (GC), Αέρια Χρωματογραφία/Φασματοσκοπία μαζών (GC/MS), Φασματοσκοπία Μαζών Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος (ICP/MS), Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR), Φασματοσκοπία Υπερύθρου (FTIR), Φασματοσκοπία Φθορισμού, Φασματοσκοπία λόγου Ισοτόπων (IRMS) κ.ά.

Οι Bilbao et al. (2007) προσδιόρισαν τα φλαβονοειδή σε κοινό εκχύλισμα εσπεριδοειδών που περιείχε γλυκό πορτοκάλι, μανταρίνι, γκρέιπφρουτ και περγαμόντο με χρήση LC-DAD και LC-MS. Οι Abad-Garcia et al. (2012a) συνέθεσαν το φαινολικό προφίλ σε 83 φρέσκους χυμούς εσπεριδοειδών από γλυκό πορτοκάλι, μανταρίνι, λεμόνι και γκρέιπφρουτ 18 ποικιλιών που καλλιεργούνται στην Ισπανία. Οι φαινολικές ενώσεις προσδιορίστηκαν με HPLC-DAD-MS/MS και με χρήση χημειομετρίας διαφοροποιήθηκαν ανάλογα με το είδος των εσπεριδοειδών. Ενώ σε νεότερη μελέτη τους προσδιόρισαν το πολυφαινολικό περιεχόμενο στους αντίστοιχους χυμούς εσπεριδοειδών με HPLC-DAD 49 πολυφαινολών συνολικά, προκειμένου να εντοπιστούν πιθανοί δείκτες και να αναπτυχθούν μοντέλα ταξινόμησης και συσχέτισης για την εξακρίβωση της γνησιότητας των χυμών εσπεριδοειδών και την ανίχνευση νοθείας (Abad-Garcia et al., 2014).

Οι Anagnostopoulou & Kefalas (2011) προσδιόρισαν την περιεκτικότητα βιοφλαβονοειδών σε φρέσκο χυμό πέντε ειδών εσπεριδοειδών (ξινό πορτοκάλι, σαγκουίνι, μανταρίνι, λεμόνι, γκρέιπφρουτ) που καλλιεργούνται στην Ελλάδα με την μέθοδο HPLC-UV-vis-DAD-MS-(+ESI). Οι Goulas & Manganaris (2012) μελέτησαν το φυτοχημικό και φυσικοχημικό προφίλ των πιο σημαντικών ποικιλιών εσπεριδοειδών που καλλιεργούνται στην Κύπρο καθώς και τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες, προσδιορίζοντας και τα φαινολικά συστατικά τους με HPLC.

Οι Nikolaou et al. (2017) μελέτησαν το φρέσκο χυμό πορτοκαλιού της ποικιλίας Μέρλιν από τέσσερις περιοχές της Ελλάδας και από 2 περιόδους συγκομιδής με σκοπό τη γεωγραφική τους διαφοροποίηση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο συνδυασμός οργανικών οξέων, σακχάρων και φυσικοχημικών παραμέτρων έδωσε συνολικό ποσοστό ορθής κατάταξης 82,0%.

Οι Saidani Tounsi et al. (2011) μελέτησαν χυμούς από τέσσερα είδη εσπεριδοειδών της Τυνησίας (μανταρίνι, λεμόνι, πικρό και αιματόσαρκο πορτοκάλι) ως προς την αντιοξειδωτική τους ικανότητα και τις ποιοτικές παραμέτρους, συμπεριλαμβανομένων των πτητικών συστατικών με GC-FID και των φαινολικών ενώσεων με HPLC-UV/Vis. Η ανάλυση GC/MS του αρώματος του χυμού έδειξε την κυριαρχία του λεμονένιου στο μανταρίνι (69,59%), στο πικρό πορτοκάλι (48,85%) και στο αιματόσαρκο πορτοκάλι (57,65%), ενώ στο λεμόνι κυριαρχία του καμφένιου (89,05%). Ορισμένες πτητικές ενώσεις βρέθηκαν σε όλα τα δείγματα, όπως μυρκένιο, α-τερπινένιο, βαλεντσένιο, κιτρονελλόλη, νερόλη, γερανιόλη, οξικό ευγενένιο και β-ιονόνη. Ανιχνεύθηκαν συνολικά εικοσιοκτώ φαινολικές ενώσεις, συμπεριλαμβανομένων 13 φαινολικών οξέων. Σε όλους τους χυμούς που αναλύθηκαν το σύνολο των φαινολικών οξέων είχε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση και κυμάνθηκε από 86,4% στο χυμό πικρού πορτοκαλιού έως 73,13% στο χυμό μανταρινιού. Το κύριο φαινολικό συστατικό ήταν το φερουλικό οξύ στο πικρό (20,42%) και στο αιματόσαρκο πορτοκάλι (21,39%), το βανιλικό οξύ στο μανταρίνι (24,05%) και το συριγγικό οξύ (47,98%) στο λεμόνι.

Αντίστοιχα, οι Gonzalez-Mas et al. (2011) ανέλυσαν τα πτητικά συστατικά τεσσάρων ειδών εσπεριδοειδών (πορτοκάλι της ποικιλίας Powell Navel, μανταρίνι των ποικιλιών Clemenules και Fortune, γκρέιπφρουτ Chandler). Πάνω από εκατό ενώσεις προέκυψαν μετά από ανάλυση με HS-SPME-GC-MS, συμπεριλαμβανομένων 27 εστέρων, 23 αλδεϋδών, 21 αλκοολών, 13 μονοτερπενίων υδρογονανθράκων, 10 κετονών, 5 υδρογονάνθρακων σεσκιτερπενίου, 4 μονοτερπενικών κυκλικών αιθέρων, 4 φουρανίων και 2 αρωματικών υδρογονανθράκων. Οι διαφορές στο πτητικό προφίλ μεταξύ των χυμών αυτών των ποικιλιών ήταν ουσιαστικά ποσοτικές και μόνο λίγες ενώσεις βρέθηκαν αποκλειστικά σε μία ποικιλία, κυρίως στο γκρέιπφρουτ. Ωστόσο, το πτητικό προφίλ ήταν ικανό να διαφοροποιήσει και τις τέσσερις ποικιλίες και αποκάλυψε περίπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους, συμπεριλαμβανομένης της συμμετοχής στην ίδια βιοσυνθετική οδό.

III. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΕΡΕΥΝΑΣ

Το αντικείμενο της παρούσας έρευνας ήταν η γεωγραφική και βοτανική διαφοροποίηση φρέσκου-ανεπεξέργαστου χυμού πορτοκαλιού. Για τη γεωγραφική διαφοροποίηση συλλέχθηκαν δείγματα της ποικιλίας Μέρλιν από διαφορετικές περιοχές της Ελληνικής επικράτειας: Χανιά, Μεσσηνία, Άρτα, Αργολίδα, Αιτωλοακαρνανία, ενώ για τη διαφοροποίηση της βοτανικής προέλευσης συλλέχθηκαν δείγματα από τις ποικιλίες: Μέρλιν, κοινό Χίου, κοινό Ρόδου, κοινό Άρτας, Γιάφα, Βαλέντσια και Ναβαλίνα.

Για τον σκοπό αυτόν προσδιορίστηκαν οι συμβατικές φυσικοχημικές παράμετροι, τα φλαβονοειδή και τα πτητικά συστατικά του χυμού με χρήση ενόργανης χημικής ανάλυσης και διαφοροποιήθηκαν με τη βοήθεια χημειομετρίας.

IV. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Δείγματα και επεξεργασία δειγμάτων

1.1 Συλλογή δειγμάτων πορτοκαλιών

Για τη διεξαγωγή της παρούσας έρευνας συλλέχθηκαν συνολικά 92 δείγματα πορτοκαλιών από 7 ποικιλίες: Μέρλιν, Βαλέντσια, Ναβαλίνα, Γιάφα, ντόπιο Χίου, κοινό Άρτας και κοινό Ρόδου και από 5 διαφορετικές περιοχές: Μεσσηνία, Άρτα, Αργολίδα, Αιτωλοακαρνανία, Χανιά. Η συλλογή των δειγμάτων έγινε τα έτη 2012-2013 και 2013-2014 στην αρχή της περιόδου συγκομιδής κάθε ποικιλίας. Τα πορτοκάλια συλλέχθηκαν σε στάδιο εμπορικής ωρίμανσης, με βάση την ομοιομορφία μεγέθους του καρπού και το εξωτερικό τους χρώμα. Τα πορτοκάλια αγοράστηκαν ή προσφέρθηκαν από τοπικούς παραγωγούς ή αγροτικούς συνεταιρισμούς. Έγινε προσπάθεια να συλλεγούν κατά το δυνατόν δείγματα από κάθε ποικιλία και από κάθε περιοχή και τις 2 χρονιές.

1.2 Παρασκευή και αποθήκευση χυμού πορτοκαλιών

Τα πορτοκάλια μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο Χημείας Τροφίμων μέσα σε λίγες ώρες από τη συγκομιδή τους και όπου αυτό δεν ήταν δυνατό διατηρήθηκαν υπό ψύξη μέχρι να μεταφερθούν στο εργαστήριο. Ακολούθως, τα πορτοκάλια πλύθηκαν για να απομακρυνθούν τυχόν χώμα και άλλοι ρύποι από την επιφάνειά τους και στύφθηκαν με προσοχή σε οικιακό αποχυμωτή. Ο χυμός με την πούλπα του, έχοντας απομακρύνει όμως τα κουκούτσια, μοιράστηκε σε πλαστικά πωματιζόμενα δοχεία των 50 ml και αποθηκεύτηκε στους -18 °C μέχρι την επεξεργασία του για τις επί μέρους αναλύσεις.

2. Μέθοδοι προσδιορισμού φυσικοχημικών παραμέτρων πορτοκαλοχυμού

2.1 Προσδιορισμός pH

Το pH μετρήθηκε χρησιμοποιώντας πεχάμετρο τύπου Delta OHM, μοντέλο HD 3456.2 (Padova, Italy) με ακρίβεια 0.001 μονάδων. Το ηλεκτρόδιο του πεχάμετρου τοποθετήθηκε απευθείας στον πορτοκαλοχυμό και καταγράφηκε η τιμή pH σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Όλες οι μετρήσεις έγιναν εις τριπλούν.

2.2 Προσδιορισμός ηλεκτρικής αγωγιμότητας

Η μέτρηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας έγινε απευθείας στο χυμό πορτοκαλιού με χρήση αγωγιμόμετρου Delta OHM, μοντέλο HD 3456.2 (Padova, Italy) με ακρίβεια 0.5%. Οι μετρήσεις έγιναν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, εις τριπλούν και το αποτέλεσμα εκφράστηκε σε mS/cm. Η ηλεκτρική αγωγιμότητα είναι μια ιδιότητα που ποσοτικοποιεί την αντίσταση ενός υλικού στη ροή ηλεκτρικού ρεύματος υποδηλώνοντας την παρουσία φορτισμένων ενώσεων, όπως οργανικών οξέων, ελεύθερων αμινοξέων, πρωτεϊνών κλπ.

2.3 Προσδιορισμός ολικά διαλυμένων στερεών

Τα ολικά διαλυμένα στερεά (TDS) μετρήθηκαν ταυτόχρονα με την αγωγιμότητα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Χρησιμοποιήθηκε αγωγιμόμετρο Delta OHM, μοντέλο HD 3456.2 (Padova, Italy) και το αποτέλεσμα εκφράστηκε σε χιλιοστόγραμμα ανά λίτρο (mg/L). Να επισημανθεί ότι η συγκέντρωση διαλυμένων ιονισμένων στερεών σχετίζεται άμεσα με την ηλεκτρική αγωγιμότητα ($TDS = k_e EC$, k_e παράγοντας συσχέτισης). Οι μετρήσεις έγιναν εις τριπλούν.

2.4 Προσδιορισμός ογκομετρούμενης οξύτητας

Για την ογκομετρούμενη οξύτητα (TA) χρησιμοποιήθηκαν 10 mL πορτοκαλοχυμού αραιωμένα με 75 ml απεσταγμένο νερό απαλλαγμένο από διοξείδιο του άνθρακα. Στη συνέχεια προστέθηκαν 3-4 σταγόνες δείκτη φαινολοφθαλεΐνης και τιτλοδοτήθηκαν με διάλυμα NaOH 0.1 M. Η ογκομέτρηση συνεχίστηκε έως ότου

σχηματιστεί ελαφρώς πορτοκαλί χρώμα. Όλες οι μετρήσεις έγιναν εις τριπλούν. Το αποτέλεσμα εκφράστηκε σε g κιτρικού οξέος / L χυμού, καθώς 1 mL NaOH 0.1 M αντιστοιχεί σε 0.0064 g κιτρικού οξέος.

3. Προσδιορισμός πτητικών συστατικών με συνδυασμό Μικροεκχύλισης Στερεάς Φάσης Υπερκείμενου Χώρου / Αέριας Χρωματογραφίας / Φασματοσκοπίας Μαζών (HS-SPME/GC-MS)

3.1 Προετοιμασία δειγμάτων και συνθήκες Μικροεκχύλισης Στερεάς Φάσης Υπερκείμενου Χώρου

Οι πτητικές ενώσεις του χυμού πορτοκαλιού απομονώθηκαν με την τεχνική της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης υπερκείμενου χώρου (Headspace Solid Phase Microextraction, HS-SPME) και ταυτοποιήθηκαν με αέρια χρωματογραφία/φασματοσκοπία μαζών (GC-MS). Χρησιμοποιήθηκε η ίνα Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS, της Supelco, Bellefonte, PA, USA) 50/30 μ m. Πριν από τη χρήση η ίνα εγκλιματίστηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Σε γυάλινο φιαλίδιο των 20 mL προστέθηκαν 5 mL χυμού, 1 g NaCl, 30 μ L εσωτερικού προτύπου 4-methyl-2-pentanone συγκέντρωσης 0.24 mg/L (Sigma–Aldrich) και ένα μαγνητάκι (PTFE-coated magnetic stirrer, διαμέτρου 10mm, Semadeni, Ostermundigen-Bern, Switzerland). Το φιαλίδιο σφραγίστηκε αεροστεγώς με ελαστικό πώμα (septum) επικαλυμμένο με πολύ-τετραφθορο-αιθυλένιο (PTFE/silicon septa), ενσωματωμένο σε μεταλλικό καπάκι. Τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο θερμοστατούμενο στους 45°C, με ταυτόχρονη ανάδευση στις 700 στροφές/λεπτό καθ'όλη τη διάρκεια της εκχύλισης των πτητικών συστατικών.

Ελέγχοντας τις παραμέτρους που επηρεάζουν την εκχύλιση [χρόνος εξισορρόπησης δείγματος - υπερκείμενου χώρου (5/10/15 min), χρόνος δειγματοληψίας (10/15/20/25 min), θερμοκρασία εκχύλισης (40/45/50 °C), χωρητικότητα φιαλιδίου (10/20 mL), όγκος δείγματος (5/10 mL), είδος επίστρωσης της ίνας (50/30 μ m DVB/CAR/PDMS, 75 μ m CAR/PDMS), προσθήκη ή μη άλατος (NaCl)], οι βέλτιστες συνθήκες βρέθηκαν να είναι:

- χρόνος εξισορρόπησης 5 min
- χρόνος δειγματοληψίας/έκθεσης της ίνας 15 min

- όγκος δείγματος 5 mL
- όγκος φιαλιδίου 20 mL
- θερμοστατούμενο υδατόλουτρο 45 °C
- προσθήκη άλατος 1 g NaCl
- ίνα 50/30 μm DVB/CAR/PDMS

Τα δείγματα που αναλύθηκαν, προετοιμάζονταν αυθημερόν και κάθε ανάλυση πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν. Ο χρόνος που απαιτείται για να έλθει το σύστημα (χυμός/υπερκεείμενος χώρος/ίνα) σε ισορροπία πρέπει να είναι τέτοιος ώστε να έχει επιτευχθεί ομοιόμορφη θερμοκρασία για να μπορέσουν και οι λιγότερο πτητικές ενώσεις του χυμού να απελευθερωθούν στον υπερκεείμενο χώρο και να προσροφηθούν στην ίνα. Αν η ίνα εκτεθεί στον υπερκεείμενο χώρο πριν το σύστημα εξισορροπήσει, είναι δυνατό να επέλθει κορεσμός της από τις περισσότερες πτητικές ενώσεις και το αποτέλεσμα της ανάλυσης να μην είναι αντιπροσωπευτικό του δείγματος. Μετά την έκθεση της ίνας στον υπερκεείμενο χώρο ακολουθεί η εισαγωγή της στον αέριο χρωματογράφο/φασματογράφο μαζών.

3.2 Συνθήκες λειτουργίας Αέριου Χρωματογράφου/Φασματογράφου Μαζών (GC/MS)

Χρησιμοποιήθηκε ο αέριος χρωματογράφος Agilent 7890A series, με ανιχνευτή μαζών Agilent 5975C και στήλη DB-5MS (60 m × 0.320 mm i.d. × 1 μm film thickness, J & W Scientific, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

Οι συνθήκες λειτουργίας του αέριου χρωματογράφου/φασματογράφου μαζών ήταν οι ακόλουθες:

- Θερμοκρασία εισαγωγέα: 260 °C
- Θερμοκρασία γραμμής μεταφοράς (transfer line): 270 °C
- Φέρον αέριο: ήλιο (He) με ταχύτητα ροής 1.5 mL/min
- Θερμοκρασιακό πρόγραμμα: 40 °C για 2min, άνοδος της θερμοκρασίας με ρυθμό 10 °C/min μέχρι τους 170 °C, εν συνεχεία μέχρι τους 185 °C με ρυθμό 2 °C/min και τέλος μέχρι τους 240 °C με ρυθμό 5 °C/min και παραμονή για 2min
- Split ratio 2:1

- Θερμοκρασία πηγής: 230 °C
- Θερμοκρασία τετραπόλου: 150 °C
- Εύρος μαζών σάρωσης: $m/z = 30-350$
- Ενέργεια ιονισμού 70 eV

3.3 Ταυτοποίηση και ημι-ποσοτικός προσδιορισμός πτητικών συστατικών

Η ταυτοποίηση των πτητικών συστατικών πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της βιβλιοθήκης φασμάτων μαζών Wiley 7, NIST 2005 (National Institute of Standards and Technology) (J.Wiley & Sons Ltd., West Sussex, England). Για τον προσδιορισμό των δεικτών Kovats, χρησιμοποιήθηκε πρότυπο διάλυμα αλκανίων C₈-C₂₀ (Supelco, Bellefonte, PA, USA) καθώς και διάλυμα αλκανίων C₅-C₇ που παρασκευάστηκε σε εξάνιο. Οι υπολογισμοί των δεικτών Kovats έγιναν για ενώσεις που εκλύονται ανάμεσα στο πεντάνιο και το εικοσάνιο. Η ημι-ποσοτικοποίηση των πτητικών ενώσεων του χυμού πορτοκαλιού επιτεύχθηκε με σύγκριση της απόκρισης του χρωματογράφου για το εσωτερικό πρότυπο με εκείνη κάθε πτητικής ένωσης.

4. Απομόνωση και ποσοτικός προσδιορισμός φλαβονοειδών πορτοκαλοχυμού με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

4.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Εξετάζοντας τις συνθήκες επεξεργασίας του χυμού για την καλύτερη απομόνωση και ανίχνευση των φλαβονοειδών έγιναν οι εξής δοκιμές:

- Ποσότητα χυμού: 5 και 10 mL
- Εκχυλιστικό μέσο: HCl 0,1M (10, 20, 30 mL), νερό (10, 20 mL), μεθανόλη 10, 20 mL, διάλυμα μεθανόλης-νερού σε διαφορετικές αναλογίες από 80/20 έως 50/50 % v/v (20, 30 mL), 1% CH₃COOH σε μεθανόλη και 10% w/v ασκορβικό οξύ. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε και σκέτος, ανεπεξέργαστος χυμός χωρίς τη χρήση κάποιου εκχυλιστικού μέσου.

- ο Διαδικασία εκχύλισης: φυγόκεντρος (10°C, 8000rpm, 15min), συσκευή ανακίνησης (750rpm, 15min) και συσκευή υπερήχων για 5, 10, 15 min, σε συνδυασμό με παγόλουτρο για να μειωθεί η θερμοκρασία εκχύλισης (από περίπου 55°C σε 30°C)
- ο Διαλύτες βαθμωτής έκλουσης: 2% CH₃COOH και ακετονιτρίλιο ή CH₃OH και 0.01M H₃PO₄/CH₃OH 80/20 v/v

Συγκρίνοντας την εικόνα των χρωματογραφημάτων για κάθε ανωτέρω συνδυασμό η καταλληλότερη μεταχείριση του δείγματος για τη βέλτιστη απομόνωση των φλαβονοειδών του χυμού βρέθηκε να είναι η ακόλουθη. Σε 10 mL χυμού προστέθηκαν 20 mL μεθανόλης (αραίωση 1:3). Το δείγμα τοποθετήθηκε στους υπερήχους (Hielscher, UP200Ht) για 10 λεπτά, με ισχύ 10W. Εν συνεχεία διηθήθηκε για να απομακρυνθεί η πούλπα και φιλτραρίστηκε (Millex-LCR (PTFE) 0.45 μm). Ακολούθησε ανάλυση με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) και ανιχνευτή συστοιχίας πολλαπλών δυνόδων (DAD). Τα προς ανάλυση δείγματα προετοιμάζονταν αυθημερόν και κάθε δείγμα αναλύθηκε εις τριπλούν.

4.2 Οργανολογία HPLC - Συνθήκες ανάλυσης

Στον υγρό χρωματογράφο (Agilent, model 1100 series, Agilent Co., USA) εισήχθηκαν 20 μL του μεθανολικού εκχυλίσματος του δείγματος και πραγματοποιήθηκε βαθμωτή έκλουση με ροή 1 mL/min και διαλύτες οξικό οξύ 2% v/v σε νερό HPLC και ακετονιτρίλιο (Merck). Το πρόγραμμα έκλουσης που εφαρμόστηκε είχε ως εξής:

A (Οξικό οξύ, %)	B (Ακετονιτρίλιο, %)	Χρόνος (min)
80	20	0-2
90	10	2-20
70	30	20-30
60	40	30-31
90	10	31-40

Όλες οι προς μελέτη φαινολικές ενώσεις: εσπεριδίνη, νεοεσπεριδίνη, κερκετίνη, ναριγκίνη και ναριγκενίνη ανιχνεύθηκαν στα 280nm.

Ο διαχωρισμός των φλαβονοειδών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τη στήλη Eclipse XDB-C₁₈ ανεστραμμένης φάσης (150 mm x 4.5 mm εσωτερική διάμετρος, 5

μm μέγεθος πόρων, Merck). Πριν από κάθε νέο δείγμα η στήλη εκλουόταν (90% A - 10% B) για 10 λεπτά.

4.3 Ταυτοποίηση και ποσοτικός προσδιορισμός

Η ταυτοποίηση των φλαβονοειδών που μελετήθηκαν, πραγματοποιήθηκε συγκρίνοντας τους χρόνους κατακράτησης κάθε κορυφής με εκείνους των αντίστοιχων προτύπων ενώσεων που αγοράστηκαν από την Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

Η ποσοτικοποίηση των φλαβονοειδών έγινε κατασκευάζοντας καμπύλες αναφοράς για διαφορετικές συγκεντρώσεις της κάθε πρότυπης ένωσης, από 1 έως 1000 mg/L.

5. Στατιστική Ανάλυση

5.1 Πολυπαραμετρική Ανάλυση Διακύμανσης (MANOVA)

Η διακριτική ανάλυση είναι μία πολυπαραμετρική στατιστική διαδικασία η οποία επιτρέπει στον ερευνητή να διακρίνει ομάδες οι οποίες διαφέρουν μεταξύ τους, συνδυάζοντας πληροφορίες οι οποίες προέρχονται από δύο ή περισσότερες μεταβλητές. Για να πραγματοποιηθεί η διακριτική ανάλυση, θα πρέπει πρώτα να πραγματοποιηθεί μονοπαραμετρική ή πολυπαραμετρική ανάλυση η οποία θα καθορίσει αρχικά το πλήθος των μεταβλητών οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διάκριση ή την ταξινόμηση των ζητούμενων ομάδων. Αυτό μπορεί να γίνει μέσω πχ. πολυπαραμετρικής ανάλυσης διακύμανσης (Multivariate Analysis of Variance, MANOVA).

Η πολυπαραμετρική ανάλυση διακύμανσης δημιουργεί μια νέα εξαρτημένη μεταβλητή με βάση το γραμμικό συνδυασμό όλων των εξαρτημένων μεταβλητών του μοντέλου, η οποία μεγιστοποιεί κατά το δυνατόν τις διαφορές των μέσων όρων μεταξύ των ομάδων- επιπέδων της ανεξάρτητης μεταβλητής. Έτσι, η MANOVA πραγματοποιεί ελέγχους των διαφορών των μέσων όρων σε δύο επίπεδα:

1) Το πολυπαραμετρικό επίπεδο (multivariate tests), όπου εξετάζεται η επίδραση της ανεξάρτητης μεταβλητής πάνω στο γραμμικό συνδυασμό όλων των εξαρτημένων μεταβλητών, συγχρόνως.

2) Το μονοπαραμετρικό επίπεδο (univariate tests ή between-subjects effects), όπου εξετάζεται η επίδραση της ανεξάρτητης μεταβλητής πάνω σε καθεμιά εξαρτημένη μεταβλητή χωριστά.

Πολυπαραμετρικό επίπεδο

Για τη νέα μεταβλητή που δημιουργείται με βάση το γραμμικό συνδυασμό των εξαρτημένων μεταβλητών ισχύει, όπως και στην μονοπαραμετρική ανάλυση διακύμανσης (Analysis of Variance, ANOVA), ο επιμερισμός της ολικής διασποράς σε διασπορά μεταξύ των ομάδων και διασπορά εντός των ομάδων. Οι τιμές αυτές όμως δεν προκύπτουν από μεμονωμένα αθροίσματα τετραγώνων των αποκλίσεων αλλά από μήτρες αθροισμάτων τετραγώνων και γινομένων (sum of square and products matrices, S).

Πρόκειται για πίνακες που είναι τετράγωνοι και συμμετρικοί ως προς τη διαγώνιο. Η διαγώνιος περιλαμβάνει το άθροισμα των τετραγώνων των αποκλίσεων κάθε εξαρτημένης μεταβλητής ξεχωριστά, ενώ τα φαντία εκτός διαγωνίου περιέχουν τα γινόμενα των αθροισμάτων των τετραγώνων των εξαρτημένων μεταβλητών, ανά δύο. Από κάθε τέτοια μήτρα προκύπτει μία ορίζουσα (determinant), η οποία αντιστοιχεί στα μέσα τετράγωνα των αποκλίσεων, της μονοπαραμετρικής ANOVA.

Χρησιμοποιούνται διάφορα κριτήρια για να μελετηθούν οι κύριες επιδράσεις και η αλληλεπίδραση των ανεξάρτητων μεταβλητών στο πολυπαραμετρικό επίπεδο. Για τον έλεγχο της στατιστικής τους σημαντικότητας χρησιμοποιείται η F -κατανομή. Τα πιο διαδεδομένα (αυτά που υπολογίζει και το SPSS) είναι τα εξής:

- Το κριτήριο Wilks' Lambda (Λ ή U). Είναι ο πιο διαδεδομένος δείκτης, δηλ. αυτός που χρησιμοποιείται στην πλειονότητα των ερευνών. Χρησιμοποιείται όταν οι συγκρινόμενες ομάδες που δημιουργούνται με βάση τις τιμές-επίπεδα της ανεξάρτητης μεταβλητής είναι περισσότερες από δύο. Δίνεται από τον εξής τύπο (1). Από το δείκτη Λ μπορούμε να έχουμε μια γρήγορη εκτίμηση για το μέγεθος της επίδρασης (effect size, δείκτης η^2), ως εξής: $\eta^2 = 1 - \Lambda$. Άρα, όσο μικρότερος ο δείκτης Wilks' Λ , τόσο μεγαλύτερες οι διαφορές μεταξύ των ομάδων.

- Το κριτήριο Pillai's Trace. Γνωστό και ως Pillai-Bartlett's Trace. Ο δείκτης αυτός αντιστοιχεί ουσιαστικά στη διασπορά μεταξύ των συνδυαστικών ομάδων

(S.M.O.). Αναφέρεται στη βιβλιογραφία ως ο πλέον σταθερός πολυπαραμετρικός δείκτης σε περίπτωση που οι συγκρινόμενες ομάδες είναι ανισοπληθείς και μερικές φορές προτείνεται για τον λόγο αυτό (Παυλόπουλος, 2008).

Έστω $X_1, X_2, \dots, X_p$, οι p σημαντικές μεταβλητές που θα χρησιμοποιηθούν στη διακριτική ανάλυση. Τότε η πρώτη διακριτική συνάρτηση ορίζεται από τη σχέση:

$$Z_1 = w_{11}X_1 + w_{12}X_2 + \dots + w_{1p}X_p$$

όπου w_{ij} είναι η στάθμιση της j μεταβλητής στην i διαχωριστική συνάρτηση. Τα w_{ij} εκτιμούνται έτσι ώστε να μεγιστοποιείται η ποσότητα

$$\lambda_1 = \frac{SS_{\text{between_group of } Z_1}}{SS_{\text{within_group of } Z_1}} \quad (1)$$

η οποία ονομάζεται Wilk's Lambda (between: δια-ομαδική διασπορά, within: ενδο-ομαδική διασπορά).

Ακολούθως δημιουργείται η δεύτερη διακριτική συνάρτηση:

$$Z_2 = w_{21}X_1 + w_{22}X_2 + \dots + w_{2p}X_p$$

Με αντίστοιχη μεγιστοποίηση της ποσότητας:

$$\lambda_2 = \frac{SS_{\text{between_group of } Z_2}}{SS_{\text{within_group of } Z_2}}$$

λαμβάνοντας στην περίπτωση όμως αυτή τον περιορισμό ότι τα αντίστοιχα βάρη για τις συναρτήσεις Z_1 και Z_2 θα πρέπει να είναι ασυσχέτιστα.

Η παραπάνω διαδικασία συνεχίζεται, μέχρις ότου καθοριστούν, όλες οι δυνατές διακριτικές συναρτήσεις.

Το πλήθος των διαχωριστικών συναρτήσεων που απαιτούνται ώστε να διαχωριστούν όσο το δυνατόν καλύτερα οι ομάδες προκύπτει από τη σημαντικότητα της εξής στατιστικής συνάρτησης:

$$X^2 = [n - 1 - (p + G) / 2] \sum_{k=1}^K \ln(1 + \lambda_k) \quad (2)$$

όπου λ_k είναι η ιδιοτιμή της k διαχωριστικής συνάρτησης, n το μέγεθος του δείγματος, p το πλήθος των αρχικών μεταβλητών και G το πλήθος των ομάδων. Μία σημαντική τιμή του συγκεκριμένου στατιστικού, σημαίνει ότι υπάρχει τουλάχιστον μία σημαντική διαχωριστική συνάρτηση. Για τις υπόλοιπες διαχωριστικές

συναρτήσεις υπολογίζεται πάλι το στατιστικό (2), για $k = 2, \dots, r$ μέχρι που κάποιο X^2 να μην προκύψει σημαντικό. Γενικά, για να εξετάσουμε αν η r διαχωριστική συνάρτηση είναι σημαντική, χρησιμοποιούμε το στατιστικό:

$$X^2 = [n - 1 - (p + G) / 2] \sum_{k=r}^K \ln(1 + \lambda_k)$$

το οποίο έχει $(p - r + 1)(G - r)$ βαθμούς ελευθερίας.

Κατάταξη παρατηρήσεων

Από τη στιγμή που έχουν προκύψει οι διακριτικές συναρτήσεις, το επόμενο ερώτημα είναι με ποιον τρόπο γίνεται η κατάταξη και γενικά ο διαχωρισμός των ομάδων. Για την κατάταξη των περιπτώσεων χρησιμοποιείται κυρίως η στατιστική θεωρία λήψης αποφάσεων.

Κατατάσσουμε μία παρατήρηση στον πληθυσμό π_j αν η ποσότητα

$$\ln p_j - 1/2(\mathbf{x} - \boldsymbol{\mu}_j)' \boldsymbol{\Sigma}^{-1}(\mathbf{x} - \boldsymbol{\mu}_j)$$

είναι μέγιστη για κάθε j . Ή σε μία πιο απλή μορφή, αν η ποσότητα

$$d_j = \boldsymbol{\mu}_j' \boldsymbol{\Sigma}^{-1} \mathbf{x} - 1/2 \boldsymbol{\mu}_j' \boldsymbol{\Sigma}^{-1} \boldsymbol{\mu}_j + \ln p_j$$

είναι μέγιστη για κάθε j . $\boldsymbol{\mu}$ είναι το διάνυσμα των μέσων τιμών της πολυδιάστατης κανονικής κατανομής και $\boldsymbol{\Sigma}$ ο πίνακας διακυμάνσεων-συνδιακυμάνσεων.

Ο όρος $\boldsymbol{\mu}_j' \boldsymbol{\Sigma}^{-1}$ περιέχει τους συντελεστές της διακριτικής συνάρτησης (συντελεστές Fisher). Έτσι, το d_j είναι το σκορ που έδωσε η διακριτική συνάρτηση για την παρατήρηση x στην ομάδα j .

Η σχέση (2) μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια στον καθορισμό των περιοχών-ομάδων διαχωρισμού. Έτσι, ο κανόνας είναι: Τοποθετούμε την παρατήρηση x στην ομάδα π_j , αν $d_{ji} > \ln(\frac{p_i}{p_j})$ για κάθε $i \neq j$ όπου

$$d_{ji} = (\boldsymbol{\mu}_j - \boldsymbol{\mu}_i)' \boldsymbol{\Sigma}^{-1} \mathbf{x} - 1/2(\boldsymbol{\mu}_j - \boldsymbol{\mu}_i)' \boldsymbol{\Sigma}^{-1}(\boldsymbol{\mu}_j + \boldsymbol{\mu}_i)$$

Εξωτερική επικύρωση συνάρτησης διάκρισης

Για την επικύρωση των αποτελεσμάτων και του ορθού διαχωρισμού, χρησιμοποιείται η U-μέθοδος ή μέθοδος της ενδοεπικύρωσης. Η μέθοδος αυτή, συχνά αναφέρεται και ως διασταυρούμενη επικύρωση (cross validation) και συνίσταται στην ταξινόμηση της κάθε παρατήρησης σε μία ομάδα με βάση τη συνάρτηση διάκρισης, η οποία δημιουργείται από όλες τις υπόλοιπες παρατηρήσεις.

Η μέθοδος της ενδοεπικύρωσης είναι περισσότερο «απαισιόδοξη» μέθοδος υπολογισμών ορθής κατάταξης (Field, 2009), εξαιτίας του γεγονότος ότι υπολογίζει τα ποσοστά αποκλείοντας σε κάθε επανάληψη μία παρατήρηση. Δημιουργεί έτσι μία διαχωριστική συνάρτηση και στη συνέχεια με βάση τον διαχωρισμό που δημιουργήθηκε, κατατάσσει την παρατήρηση που αποκλείστηκε. Αυτό γίνεται για όλες τις παρατηρήσεις του δείγματος οδηγώντας έτσι σε πιο αξιόπιστο διαχωρισμό.

5.2. Γραμμική Διαχωριστική Ανάλυση ή Διακριτική Ανάλυση (LDA)

Η γραμμική διαχωριστική ανάλυση ή διακριτική ανάλυση (Linear Discriminant Analysis, LDA), είναι απλά μια επέκταση της MANOVA και επιτρέπει να καθοριστούν όχι μόνο οι μεταβλητές οι οποίες δίνουν καλύτερες διακρίσεις ομάδων, αλλά και ποιες ομάδες είναι διαφορετικές και ποιες όχι. Η LDA χρησιμοποιεί διακριτές συναρτήσεις για να καθορίσει ποια ομάδα θα αντιστοιχεί σε κάθε ένα από τα στοιχεία των δεδομένων. Αυτό γίνεται με χρήση μιας τεχνικής ενδοεπικύρωσης, όπου οι διαχωριστικές συναρτήσεις υπολογίζονται αποκλείοντας μια παρατήρηση (παράμετρο-μεταβλητή) από το σύνολο των δεδομένων και στη συνέχεια χρησιμοποιεί τις συναρτήσεις αυτές για να κατατάξει τη παράμετρο αυτή σε μια ομάδα. Αυτό επαναλαμβάνεται με κάθε μια από τις παραμέτρους-μεταβλητές των δεδομένων και καταγράφονται ποιές κατατάξεις έγιναν σωστά και ποιές λάθος. Όταν ολοκληρωθεί η ανάλυση, επιστρέφει το ποσοστό της ορθής κατάταξης-ταξινόμησης των δειγμάτων για κάθε ομάδα.

Το μαθηματικό μοντέλο στο οποίο βασίζεται η στατιστική ανάλυση LDA σε n -επιλεγμένες μεταβλητές αποτελείται από (i) γραμμικές διαχωριστικές συναρτήσεις της μορφής:

$$F_i = (c_{i1}v_1 + c_{i2}v_2 + \dots + c_{in}v_n),$$

όπου $v_1 \dots v_n$ είναι οι τιμές κάθε μίας μεταβλητής που εξετάστηκε και $c_{i1}, c_{i2}, \dots, c_{in}$ είναι οι συντελεστές συσχέτισης της διαφοροποίησης που επιτυγχάνεται από τις παραπάνω μεταβλητές.

Για τον υπολογισμό των συντελεστών-φορτίσεων στις διαχωριστικές συναρτήσεις χρησιμοποιούνται οι συντελεστές Fisher, ενώ ο υπολογισμός των πιθανοτήτων σωστής κατάταξης γίνεται με βάση το μέγεθος των ομάδων, εφόσον ο αριθμός των δειγμάτων από κάθε περιοχή δεν είναι ο ίδιος. Επιπλέον, για τον έλεγχο της ομοιογένειας των διακυμάνσεων χρησιμοποιείται ο στατιστικός έλεγχος M του Box, (Box's M) βασική προϋπόθεση για να έχουμε αξιόπιστα αποτελέσματα κυρίως στην περίπτωση που τα δείγματα είναι άνισα (ο αριθμός των δειγμάτων από κάθε περιοχή ή ποικιλία δεν είναι ο ίδιος) (Field, 2009). Το SPSS δίνει το κριτήριο Box's M για τον έλεγχο της πολυπαραμετρικής ομοιογένειας. Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων ήταν το SPSS, v.22.0 (IBM, 2013).

V. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Διαφοροποίηση της γεωγραφικής προέλευσης του πορτοκαλοχυμού

1.1 Συμβατικές φυσικοχημικές παράμετροι φρέσκου πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης

Στον Πίνακα 1 δίνονται οι μέσες τιμές $\pm$ τυπική απόκλιση των συμβατικών φυσικοχημικών παραμέτρων του φρέσκου πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης.

Πίνακας 1. Συμβατικές φυσικοχημικές παράμετροι φρέσκου πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης.

Δείγμα	Ηλεκτρική αγωγιμότητα (mS/cm)	Ολικά διαλυμένα στερεά (mg/L)	pH	Οξύτητα (g/L)
Μεσσηνία 1	2,41	1205	3,27	11,38
Μεσσηνία 2	1,95	975	3,22	8,54
Μεσσηνία 3	1,59	796	3,33	6,53
Μεσσηνία 4	1,99	1000	3,36	8,50
Μεσσηνία 5	2,46	1230	3,44	6,91
Μεσσηνία 6	2,04	1016	3,22	8,88
Μεσσηνία 7	2,00	1000	3,24	7,78
Μεσσηνία 8	2,56	1278	3,39	6,55
Μεσσηνία 9	2,36	1186	3,33	7,94
Μέση τιμή ±Τυπική απόκλιση (N=9)	2,15 ^a 0,32	1076 ^{a,b} 157	3,31 ^a 0,08	8,11 ^b 1,50
Αργολίδα 1	1,48	741	3,67	7,03
Αργολίδα 2	1,67	834	3,69	8,62
Αργολίδα 3	0,69	346	3,76	9,00
Αργολίδα 4	1,66	828	3,74	8,95
Αργολίδα 5	0,87	422	3,80	7,80
Αργολίδα 6	1,33	662	3,89	6,43
Αργολίδα 7	2,14	1067	3,59	7,32
Αργολίδα 8	2,01	1019	3,55	5,74
Αργολίδα 9	1,83	917	3,51	6,24
Μέση τιμή ±Τυπική απόκλιση (N=9)	1,52 ^a 0,49	760 ^a 248	3,69 ^b 0,12	7,46 ^{a,b} 1,21
Χανιά 1	1,36	679	3,58	4,32
Χανιά 2	1,36	674	3,34	5,76
Χανιά 3	1,64	818	3,48	6,96
Χανιά 4	1,96	968	3,34	7,73
Χανιά 5	2,05	1007	3,32	9,22

Χανιά 6	2,6	1298	3,39	6,82
Χανιά 7	2,89	1432	3,47	2,69
Χανιά 8	1,24	614	3,26	7,58
Μέση τιμή ±Τυπική απόκλιση (N=8)	1,89^a	936^{a,b}	3,40^a	6,38^{a,b}
Αιτωλ/νία 1	1,62	822	3,28	4,61
Αιτωλ/νία 2	1,48	738	3,30	7,10
Αιτωλ/νία 3	3,11	1588	3,38	11,47
Αιτωλ/νία 4	3,37	1687	3,73	6,94
Αιτωλ/νία 5	2,60	1313	3,74	6,13
Αιτωλ/νία 6	1,96	981	3,57	6,53
Αιτωλ/νία 7	2,22	1115	3,55	6,62
Αιτωλ/νία 8	1,94	940	3,47	7,97
Αιτωλ/νία 9	1,71	866	3,59	6,72
Μέση τιμή ±Τυπική απόκλιση (N=9)	2,22^a	1117^c	3,51^{a,b}	7,12^{a,b}
Άρτα 1	1,87	933	3,24	8,88
Άρτα 2	1,89	940	3,56	6,10
Άρτα 3	1,75	879	3,62	5,47
Άρτα 4	1,56	783	3,49	5,14
Άρτα 5	2,07	1035	3,66	5,62
Άρτα 6	1,96	972	3,96	3,17
Άρτα 7	2,46	1246	3,97	4,27
Άρτα 8	1,92	952	3,53	6,19
Άρτα 9	2,05	1023	3,81	4,94
Μέση τιμή ±Τυπική απόκλιση (N=9)	1,95^a	974^{a,b}	3,65^b	5,53^a

a,b,c... διαφορετικοί εκθέτες σε κάθε στήλη δηλώνουν ότι υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$), N: Αριθμός δειγμάτων.

Είναι αξιοσημείωτο, ότι όλες οι συμβατικές φυσικοχημικές παράμετροι εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των δειγμάτων χυμού διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης (Ενότητα 1.2).

Πιο συγκεκριμένα, η ηλεκτρική αγωγιμότητα κυμάνθηκε από $1,52 \pm 0,49$ mS/cm (δείγματα Αργολίδας) έως $2,22 \pm 0,67$ mS/cm (δείγματα Αιτωλοακαρνανίας). Αντίστοιχα, τα ολικά διαλυμένα στερεά κυμάνθηκαν μεταξύ 760 ± 248 mg/L (δείγματα Αργολίδας) και 1117 ± 341 mg/L (δείγματα Αιτωλοακαρνανίας). Ακολούθως, το pH κυμάνθηκε μεταξύ $3,31 \pm 0,08$ (δείγματα Μεσσηνίας) και $3,69 \pm 0,12$ (δείγματα Αργολίδας). Τέλος, η οξύτητα κυμάνθηκε από $5,53 \pm 1,57$ g/L (δείγματα Άρτας) έως $8,11 \pm 1,50$ g/L (δείγματα Μεσσηνίας).

Σε μια προηγούμενη μελέτη, η ηλεκτρική αγωγιμότητα δειγμάτων φρέσκου πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν από τις περιοχές της Μεσσηνίας, Άρτας, Ρόδου και Χανίων κυμάνθηκε μεταξύ 1,69 mS/cm (δείγματα Μεσσηνίας)-2,89 mS/cm (δείγματα Ρόδου) (Nikolaou et al., 2017), τα οποία ήταν σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας. Αντίστοιχα, τα ολικά διαλυμένα στερεά κυμάνθηκαν μεταξύ 796-1425 mg/L (δείγματα Μεσσηνίας), 783-1246 mg/L (δείγματα Άρτας), 1071-1262 mg/L (δείγματα Ρόδου) και 614-1432 mg/L (δείγματα Χανίων). Σε γενικές γραμμές, τα ολικά διαλυμένα στερεά στην εργασία των Nikolaou et al.(2017), παρουσίασαν μεγαλύτερες διακυμάνσεις σε σχέση με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας.

Ακολούθως, το pH κυμάνθηκε μεταξύ 3,18-3,44 (δείγματα Μεσσηνίας), 3,24-3,97 (δείγματα Άρτας), 3,26-3,72 (δείγματα Ρόδου) και 3,26-3,58 (δείγματα Χανίων) (Nikolaou et al., 2017). Οι τιμές αυτές βρίσκονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας.

Τέλος, η οξύτητα κυμάνθηκε μεταξύ 6,53-12,17 g/L (δείγματα Μεσσηνίας), 3,18-8,88 g/L (δείγματα Άρτας), 3,60-11,59 g/L (δείγματα Ρόδου) και 4,32-9,22 g/L (δείγματα Χανίων) (Nikolaou et al., 2017). Οι τιμές αυτές βρίσκονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας.

Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να επισημάνουμε δυο σημαντικά στοιχεία: 1) Η παρούσα μελέτη είναι μόλις η 2^η σε Πανελλαδικό επίπεδο που ασχολείται με τον γεωγραφικό διαχωρισμό φρέσκου πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν με βάση συγκεκριμένες συμβατικές φυσικοχημικές παραμέτρους και τη χρήση χημειομετρίας και 2) Τοποθετώντας λέξεις-κλειδιά, όπως για παράδειγμα ‘‘physicochemical parameters of Merlin orange juice’’, στη μηχανή αναζήτησης Google, δεν βρέθηκαν κάποια περαιτέρω δεδομένα.

Με βάση τα ανωτέρω, η παρούσα μελέτη συνεισφέρει, μεταξύ άλλων, και στη δημιουργία βάσης δεδομένων που αφορούν τις συμβατικές φυσικοχημικές παραμέτρους του φρέσκου χυμού της ποικιλίας Μέρλιν από διαφορετικές γεωγραφικές ζώνες.

1.2 Διαφοροποίηση της γεωγραφικής προέλευσης φρέσκου πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν με βάση τις συμβατικές φυσικοχημικές παραμέτρους

Στην αρχή της στατιστικής επεξεργασίας των δεδομένων πραγματοποιήθηκε πολυπαραμετρική ανάλυση διακύμανσης (MANOVA) προκειμένου να καθοριστούν οι συμβατικές φυσικοχημικές παράμετροι που είναι σημαντικές στη διαφοροποίηση του πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν με βάση τη γεωγραφική του προέλευση. Ως εξαρτημένες μεταβλητές χρησιμοποιήθηκαν οι 5 γεωγραφικές περιοχές ήτοι Μεσσηνία (Messinia), Αργολίδα (Argolida), Χανιά (Hania), Αιτωλοακαρνανία (Aitoloakarnania), Άρτα (Arta) και το σύνολο των συμβατικών φυσικοχημικών παραμέτρων όπως ηλεκτρική αγωγιμότητα (electrical conductivity), ολικά διαλυμένα στερεά (total dissolved solids), ενεργός οξύτητα (pH) και οξύτητα (acidity), ως οι ανεξάρτητες μεταβλητές.

Η ανάλυση είναι σημαντική, όπως φανερώνουν οι δείκτες Pillai's Trace=1,034 ($F=3,401$, $p=0.000<0.05$) και Wilks' Lambda=0,246 ($F=4,021$, $p=0.000<0.05$), γεγονός που καταδεικνύει ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική πολυπαραμετρική επίδραση της γεωγραφικής προέλευσης του πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν, στις τιμές των διαφόρων συμβατικών του φυσικοχημικών παραμέτρων. Όλες οι συμβατικές φυσικοχημικές παράμετροι που προσδιορίστηκαν βρέθηκαν σημαντικές στον προσδιορισμό των διαφορών μεταξύ των 5 περιοχών στο επίπεδο σημαντικότητας 5%. Ακολούθως, στον Πίνακα 2 δίνονται οι αντίστοιχες τιμές της διαχωριστικής συνάρτησης F, των βαθμών ελευθερίας (df-βε) και της πιθανότητας ορθής κατάταξης (p).

Πίνακας 2. Στατιστικά σημαντικές φυσικοχημικές παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν για τη διαφοροποίηση της γεωγραφικής προέλευσης φρέσκου πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν.

Συμβατικές φυσικοχημικές παράμετροι	Wilks' Lambda	F	df1	df2	P
Ηλεκτρική αγωγιμότητα	0,773	2,866	4	39	0,036
Ολικά διαλυμένα στερεά	0,772	2,876	4	39	0,035
pH	0,500	9,754	4	39	0,000
Οξύτητα	0,752	3,217	4	39	0,022

df: βαθμοί ελευθερίας (βε)

1.3 Γραμμική διαχωριστική ανάλυση για τις 5 διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές του φρέσκου πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν με βάση τις 4 στατιστικά σημαντικές συμβατικές φυσικοχημικές παραμέτρους

Στη συνέχεια της ανάλυσης, οι 4 σημαντικές συμβατικές φυσικοχημικές παράμετροι χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να διαπιστωθεί αν μπορούν να διαφοροποιήσουν την γεωγραφική προέλευση του πορτοκαλοχυμού από τις 5 διαφορετικές περιοχές. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε η γραμμική διακριτική ανάλυση. Για τον υπολογισμό των συντελεστών-φορτίσεων στις διαχωριστικές συναρτήσεις χρησιμοποιήθηκαν οι συντελεστές Fisher, ενώ ο υπολογισμός των πιθανοτήτων σωστής κατάταξης έγινε με βάση το μέγεθος των ομάδων. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι της αντικατάστασης και της ενδοεπικύρωσης, για τον υπολογισμό των ποσοστών ορθής κατάταξης.

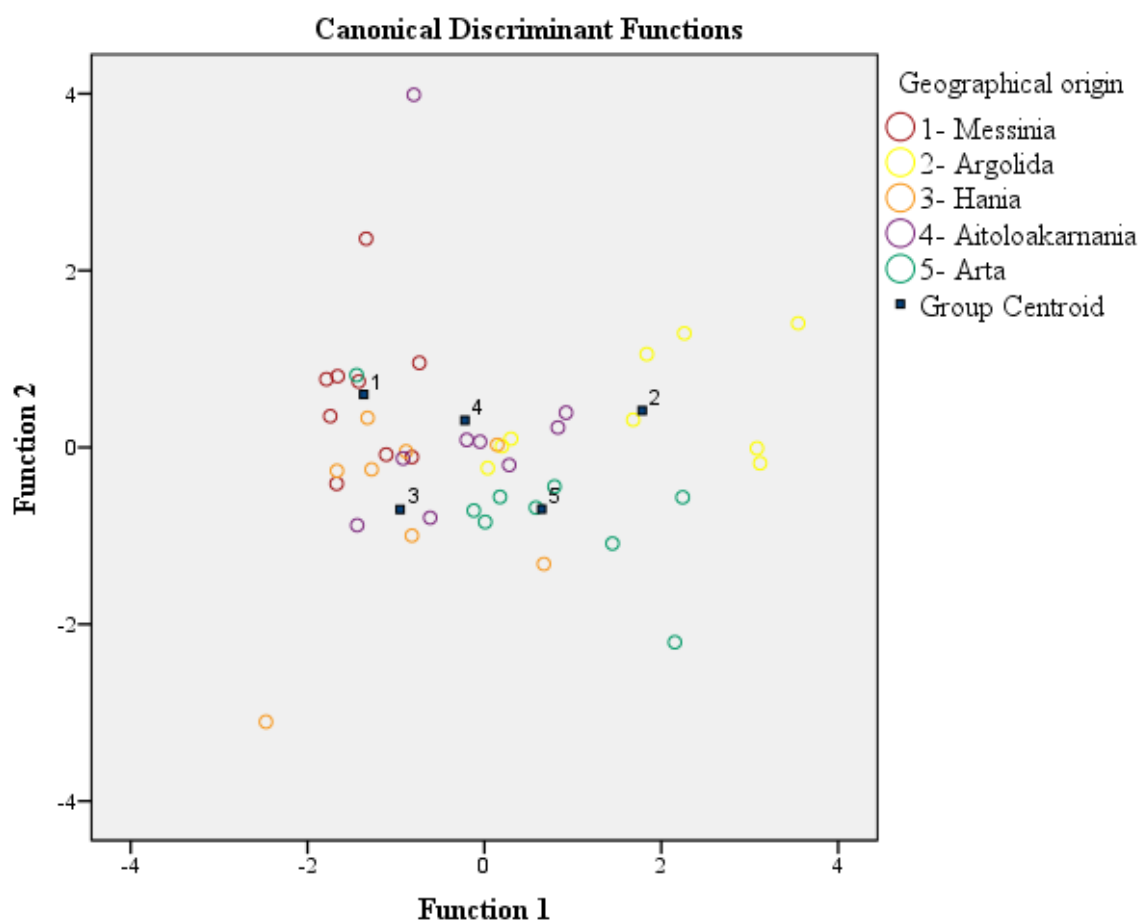
Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δημιουργούνται 2 στατιστικά σημαντικές διαχωριστικές συναρτήσεις: Wilks' Lambda=0,246 με $X^2=53,926$, βε=16 με $p=0.000 < 0.05$ για την 1^η και Wilks' Lambda=0,606 με $X^2=19,285$, βε=9 με $p=0.023 < 0.05$, για τη 2^η αντίστοιχα). Μία σημαντική τιμή του στατιστικού Wilks' Lambda φανερώνει ότι η διαχωριστική συνάρτηση είναι βασική στον διαχωρισμό των ζητούμενων ομάδων. Η πρώτη διαχωριστική συνάρτηση με κανονική συσχέτιση (canonical correlation) 0,77 και ιδιοτιμή (eigenvalue) 1,459 ερμηνεύει το 71,8% της

συνολικής διασποράς, ενώ η δεύτερη διαχωριστική συνάρτηση με κανονική συσχέτιση 0,513 και ιδιοτιμή 0,358 ερμηνεύει το 17,6% της συνολικής διασποράς. Και οι δυο μαζί ερμηνεύουν το 89,4% της συνολικής διακύμανσης ποσοστό αρκετά ικανοποιητικό. Στο Σχήμα 10 μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι φαίνεται να διαχωρίζονται σχετικά ικανοποιητικά οι χυμοί από την Αργολίδα, και την Άρτα.

Στο Σχήμα 10 φαίνονται επίσης και οι μέσες τιμές των κέντρων των ομάδων (group centroids) των 2 στατιστικά σημαντικών διαχωριστικών συναρτήσεων που αφορούν τις 5 γεωγραφικές περιοχές που εξετάστηκαν. Κάθε centroid έχει δύο αριθμούς οι οποίοι αντιπροσωπεύουν τις συντεταγμένες και παρέχουν πληροφορίες για το διακριτικό αποτέλεσμα κάθε ομάδας. Η τετμημένη είναι η πρώτη διαχωριστική συνάρτηση και η τεταγμένη είναι η δεύτερη. Οι τιμές αυτές είναι: (-1,365/0,599), (1,784/0,416), (-0,953/-0,702), (-0,221/0,306), (0,648/-0,698) για τις περιοχές της Μεσσηνίας, Αργολίδας, Χανίων, Αιτωλοακαρνανίας και Άρτας, αντίστοιχα.

Η πρώτη διαχωριστική συνάρτηση διαχωρίζει την περιοχή της Αργολίδας και της Άρτας από τις υπόλοιπες περιοχές, ενώ η δεύτερη διαχωριστική συνάρτηση μπορούμε να πούμε ότι διαχωρίζει την Μεσσηνία από τις υπόλοιπες περιοχές.

Ο Πίνακας 3 δίνει τα αποτελέσματα των κατατάξεων χρησιμοποιώντας τόσο την μέθοδο της αντικατάστασης, όσο και τη μέθοδο της ενδοεπικύρωσης. Παρατηρούμε ότι το 65,9% του συνόλου των παρατηρήσεων κατατάχθηκαν σωστά, ποσοστό οριακά ικανοποιητικό χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της αντικατάστασης, ενώ το ποσοστό αυτό μειώνεται στο 54,5%, όταν χρησιμοποιηθεί η μέθοδος της ενδοεπικύρωσης, χαμηλό ποσοστό για τη συγκεκριμένη μέθοδο.



Σχήμα 10. Διαφοροποίηση της γεωγραφικής προέλευσης φρέσκου πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν με βάση τις 4 συμβατικές φυσικοχημικές παραμέτρους και χρήση της διακριτικής ανάλυσης.

Πίνακας 3. Ποσοστά ορθής κατάταξης (correct classification) φρέσκου πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν με βάση τις συμβατικές φυσικοχημικές παραμέτρους.

Classification Results^{a,b,c}

Στατιστική τεχνική		Γεωγραφική προέλευση (Geographical origin)	Predicted Group Membership					Αριθμός δειγμάτων
			Messinia	Argolida	Hania	Aitoloakarnania	Arta	
Original ^a	Count	Messinia	7	0	1	1	0	9
		Argolida	0	6	0	3	0	9
		Hania	1	0	5	1	1	8
		Aitoloakarnania	0	0	3	4	2	9
		Arta	1	0	1	0	7	9
	%	Messinia	77,8	,0	11,1	11,1	,0	100,0
		Argolida	,0	66,7	,0	33,3	,0	100,0
		Hania	12,5	,0	62,5	12,5	12,5	100,0
		Aitoloakarnania	,0	,0	33,3	44,4	22,2	100,0
		Arta	11,1	,0	11,1	,0	77,8	100,0
Cross-validated ^{b,c}	Count	Messinia	6	0	2	1	0	9
		Argolida	0	6	0	3	0	9
		Hania	2	0	4	1	1	8
		Aitoloakarnania	1	0	3	1	4	9
		Arta	1	0	1	0	7	9
	%	Messinia	66,7	,0	22,2	11,1	,0	100,0
		Argolida	,0	66,7	,0	33,3	,0	100,0
		Hania	25,0	,0	50,0	12,5	12,5	100,0
		Aitoloakarnania	11,1	,0	33,3	11,1	44,4	100,0
		Arta	11,1	,0	11,1	,0	77,8	100,0

a. 65,9% of original grouped cases correctly classified (Μέθοδος Αντικατάστασης).

b. Cross validation is done only for those cases in the analysis. In cross validation, each case is classified by the functions derived from all cases other than that case.

c. 54,5% of cross-validated grouped cases correctly classified (Μέθοδος διασταυρούμενης επικύρωσης).

Παρατηρούμε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό ορθής κατάταξης παρουσιάζουν τα δείγματα χυμού της Άρτας (77,8%) και στη συνέχεια ακολουθούν εκείνα της Μεσσηνίας και της Αργολίδας (66,7%). Τα δείγματα χυμού από τη περιοχή των Χανίων και της Αιτωλοακαρνανίας δεν κατατάχτηκαν επιτυχώς (ποσοστά ορθής κατάταξης 50% και 11,1%, αντίστοιχα).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Kosma et al., 2016; Gatzias et al., 2018) οι συμβατικές φυσικοχημικές παράμετροι αναφέρονται περισσότερο στην ποιότητα και τις νομικές προδιαγραφές των τροφίμων και συνεπώς δεν ενδείκνυνται για σκοπούς διαφοροποίησης καθώς από μόνες τους δίνουν μη ικανοποιητικά ποσοστά ορθής κατάταξης.

1.4 Φλαβονοειδή φρέσκου πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης

Στον Πίνακα 4 δίνονται οι μέσες τιμές $\pm$ τυπική απόκλιση των φλαβονοειδών του φρέσκου πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης.

Πίνακας 4. Περιεκτικότητα 5 φλαβονοειδών (mg/L) φρέσκου πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης.

Δείγμα	Ναριγκίνη (mg/L)	Εσπεριδίνη (mg/L)	Νεοεσπεριδίνη (mg/L)	Κερκετίνη (mg/L)	Ναριγκενίνη (mg/L)
Μεσσηνία 1	δπ	278,05	δπ	21,81	δπ
Μεσσηνία 2	δπ	215,05	δπ	14,72	δπ
Μεσσηνία 3	δπ	243,31	δπ	14,96	δπ
Μεσσηνία 4	δπ	154,95	δπ	11,73	δπ
Μεσσηνία 5	δπ	204,50	δπ	10,97	δπ
Μεσσηνία 6	δπ	251,74	δπ	11,49	δπ
Μεσσηνία 7	δπ	248,09	δπ	12,48	δπ
Μεσσηνία 8	δπ	230,92	δπ	12,55	δπ
Μεσσηνία 9	δπ	180,35	δπ	9,32	δπ
Μέση τιμή $\pm$Τυπική απόκλιση (N=9)	δπ	222,99 ^c	δπ	13,34 ^b	δπ
Αργολίδα 1	δπ	79,29	δπ	6,70	δπ
Αργολίδα 2	δπ	106,59	δπ	12,71	δπ
Αργολίδα 3	δπ	99,55	δπ	11,68	δπ
Αργολίδα 4	δπ	87,60	δπ	6,30	δπ
Αργολίδα 5	δπ	50,32	δπ	4,33	δπ
Αργολίδα 6	δπ	56,42	δπ	4,61	δπ
Αργολίδα 7	δπ	150,64	δπ	16,57	δπ
Αργολίδα 8	δπ	100,11	δπ	10,27	δπ
Αργολίδα 9	δπ	93,03	δπ	9,88	δπ
Μέση τιμή $\pm$Τυπική απόκλιση (N=9)	δπ	91,51 ^a	δπ	9,23 ^{a,b}	δπ
Χανιά 1	δπ	99,26	δπ	6,22	δπ
Χανιά 2	δπ	134,19	δπ	6,98	δπ

Χανιά 3	δπ	96,38	δπ	5,54	δπ
Χανιά 4	δπ	113,94	δπ	8,60	δπ
Χανιά 5	δπ	94,67	δπ	6,58	δπ
Χανιά 6	δπ	141,66	δπ	8,46	δπ
Χανιά 7	δπ	116,10	δπ	5,34	δπ
Χανιά 8	δπ	187,48	δπ	7,11	δπ
Μέση τιμή ±Τυπική απόκλιση (N=8)	δπ	122,96 ^{a,b}	δπ	6,85 ^a	δπ
Αιτωλ/νία 1	δπ	192,81	δπ	16,44	δπ
Αιτωλ/νία 2	δπ	190,11	δπ	18,22	δπ
Αιτωλ/νία 3	δπ	296,06	δπ	28,63	δπ
Αιτωλ/νία 4	δπ	168,71	δπ	15,18	δπ
Αιτωλ/νία 5	δπ	137,49	δπ	10,51	δπ
Αιτωλ/νία 6	δπ	115,40	δπ	5,64	δπ
Αιτωλ/νία 7	δπ	142,85	δπ	8,11	δπ
Αιτωλ/νία 8	δπ	80,95	δπ	5,68	δπ
Αιτωλ/νία 9	δπ	187,10	δπ	8,76	δπ
Μέση τιμή ±Τυπική απόκλιση (N=9)	δπ	167,94 ^{b,c}	δπ	13,01 ^b	δπ
Άρτα 1	δπ	109,76	δπ	6,58	δπ
Άρτα 2	δπ	97,45	δπ	8,66	δπ
Άρτα 3	δπ	89,56	δπ	7,46	δπ
Άρτα 4	δπ	102,68	δπ	7,95	δπ
Άρτα 5	δπ	276,80	δπ	15,63	δπ
Άρτα 6	δπ	233,71	δπ	10,92	δπ
Άρτα 7	δπ	166,21	δπ	12,67	δπ
Άρτα 8	δπ	178,05	δπ	10,53	δπ
Άρτα 9	δπ	149,86	δπ	9,49	δπ
Μέση τιμή ±Τυπική απόκλιση (N=9)	δπ	156,01 ^{a,b}	δπ	9,98 ^{a,b}	δπ
	δπ	65,27	δπ	2,83	δπ

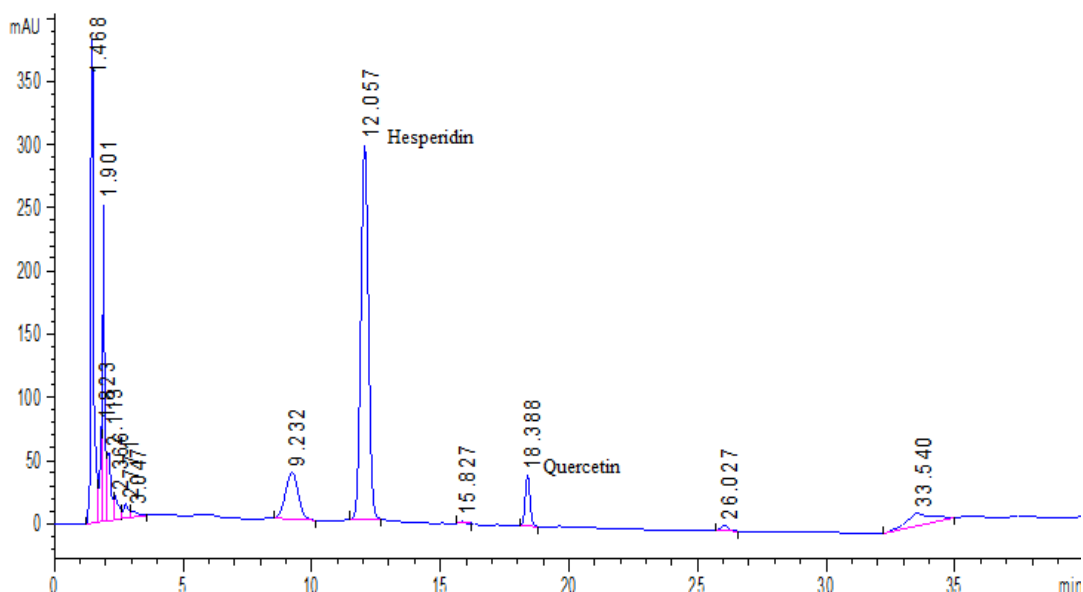
a,b,c... διαφορετικοί εκθέτες σε κάθε στήλη δηλώνουν ότι υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$), δπ: δεν προσδιορίστηκε, N: αριθμός δειγμάτων.

Οι συντελεστές συσχέτισης (R^2), η σχετική τυπική απόκλιση (RSD), το όριο ανίχνευσης (LOD), το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) και το ποσοστό ανάκτησης κάθε πρότυπης ένωσης παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 5).

Πίνακας 5. Αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου για τον προσδιορισμό των φλαβονοειδών στο φρέσκο πορτοκαλοχυμό της ποικιλίας Μέρλιν.

Πρότυπη Ένωση	Ανάκτηση %	R^2	RSD %	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
Εσπεριδίνη	97	0,9950	6,26	1,09	3,59
Νεοεσπεριδίνη	105	0,9997	5,00	2,42	7,98
Κερκετίνη	75	0,9978	10,05	2,09	6,88
Ναριγκίνη	102	0,9981	6,50	1,51	4,97
Ναριγκενίνη	93	0,9984	6,82	0,79	2,64

Θα πρέπει να επισημάνουμε ότι σε όλα τα δείγματα φρέσκου πορτοκαλοχυμού που εξετάστηκαν δεν προσδιορίστηκε η ναριγκίνη, η νεοεσπεριδίνη και η ναριγκενίνη. Η εσπεριδίνη και η κερκετίνη ήταν οι κυρίαρχες ενώσεις και προσδιορίστηκαν σε όλα τα δείγματα. Είναι χαρακτηριστικό ότι η ποσότητα τους μεταβλήθηκε στατιστικά σημαντικά ($p < 0,05$) με βάση τη γεωγραφική προέλευση του πορτοκαλοχυμού. Στο Σχήμα 11 φαίνεται ένα τυπικό χρωματογράφημα πορτοκαλοχυμού από την περιοχή της Άρτας.



Σχήμα 11. Τυπικό χρωματογράφημα φρέσκου πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν από την Άρτα με επισημασμένες τις φλαβονοειδείς ενώσεις ως δείκτες της γεωγραφικής προέλευσης.

Τα δείγματα πορτοκαλοχυμού από τη Μεσσηνία εμφάνισαν τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα (mg/L) σε εσπεριδίνη ($222,99 \pm 38,43$ mg/L) ακολουθούμενα από εκείνα της Αιτωλοακαρνανίας ($167,94 \pm 61,01$ mg/L), της Άρτας ($156,01 \pm 65,27$ mg/L), των Χανίων ($122,96 \pm 31,25$ mg/L) και της Αργολίδας ($91,51 \pm 29,50$ mg/L).

Αντίστοιχα, τα δείγματα πορτοκαλοχυμού από τη Μεσσηνία εμφάνισαν τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα (mg/L) σε κερκετίνη ($13,34 \pm 3,63$ mg/L) ακολουθούμενα από εκείνα της Αιτωλοακαρνανίας ($13,01 \pm 7,45$ mg/L), της Άρτας ($9,98 \pm 2,83$ mg/L), της Αργολίδας ($9,23 \pm 4,09$ mg/L) και των Χανίων ($6,85 \pm 1,21$ mg/L).

Οι Careri et al.(1999) ανέφεραν υψηλότερες τιμές ναριγκίνης ($26,00 \pm 3,00$ mg/L) και εσπεριδίνης (730 ± 30 mg/L) σε εμπορικά δείγματα Ιταλικού πορτοκαλοχυμού. Ωστόσο, τα επίπεδα κερκετίνης ($13,40 \pm 1,50$ mg/L) που ανέφεραν οι εν λόγω

συγγραφείς βρίσκονται σε άριστη συμφωνία με τα αποτελέσματα των δειγμάτων πορτοκαλοχυμού από τη Μεσσηνία και την Αιτωλοακαρνανία (Πίνακας 4).

Ο φρεσκοστυμμένος πορτοκαλοχυμός που παρασκευάστηκε από εμπορικά δείγματα πορτοκαλιών διαθέσιμων στα σουπερμάρκετ της Θεσσαλονίκης, είχε μεταβαλλόμενη περιεκτικότητα σε εσπεριδίνη και κυμάνθηκε μεταξύ 53,80-735,30 mg/L, με μέση τιμή τα $246,60 \pm 201,30$ mg/L (Kanaze et al., 2003). Οι τιμές αυτές μπορούμε να πούμε ότι βρίσκονται σε γενική συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, όσον αφορά, τις παρατηρούμενες αυξομειώσεις. Ωστόσο, οι συγγραφείς αυτοί ανέφεραν και την παρουσία της ναριγκίνης σε 1 μόνο δείγμα πορτοκαλοχυμού (από σύνολο 10 δειγμάτων που αναλύθηκαν) σε περιεκτικότητα 2,3 mg/L.

Επιπροσθέτως, η περιεκτικότητα (mg/L) σε ναριγκίνη, εσπεριδίνη, νεοεσπεριδίνη και κερκετίνη σε δείγματα φρεσκοστυμμένου πορτοκαλοχυμού από τη Σλοβακία ήταν υψηλότερη. Οι αντίστοιχες τιμές (μέση τιμή±σχετική τυπική απόκλιση) ήταν: $2,00 \pm 6,50$, $92,70 \pm 6,50$, $7,00 \pm 5,03$ και $23,00 \pm 4,72$ (Belahová & Suhaj, 2004).

Τέλος, η περιεκτικότητα σε εσπεριδίνη σε δείγματα πορτοκαλοχυμού (*Citrus sinensis*) από τη Κορσική κυμάνθηκε μεταξύ $257,3 \pm 3,0$ - $552,0 \pm 3,0$ mg/L (Dhuique-Mayer et al., 2005). Οι τιμές αυτές είναι υψηλότερες από τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας

Όπως στη περίπτωση των συμβατικών φυσικοχημικών παραμέτρων, έτσι και στη περίπτωση των φλαβονοειδών δεν υπάρχουν δεδομένα σε Πανελλαδικό επίπεδο, αλλά και στο Διεθνές, για την περιεκτικότητα αυτών σε φρέσκο χυμό πορτοκαλιού της ποικιλίας Μέρλιν από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές.

1.5 Διαφοροποίηση της γεωγραφικής προέλευσης φρέσκου πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν με βάση τα φλαβονοειδή

Σε μια δεύτερη προσπάθεια διαφοροποίησης της γεωγραφικής προέλευσης του φρέσκου πορτοκαλοχυμού, ως εξαρτημένες μεταβλητές χρησιμοποιήθηκαν οι 5 γεωγραφικές περιοχές και το σύνολο των φλαβονοειδών όπως ναριγκίνη (naringin), εσπεριδίνη (hesperidin), νεοεσπεριδίνη (neoesperidin), κερκετίνη (quercetin) και ναριγκενίνη (naringenin), ως οι ανεξάρτητες μεταβλητές.

Η ανάλυση είναι σημαντική, όπως φανερώνουν οι δείκτες Pillai's Trace=0,762 ($F=6,002$, $p=0.000<0.05$) και Wilks' Lambda=0,348 ($F=6,597$, $p=0.000<0.05$), γεγονός που καταδεικνύει ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική πολυπαραμετρική επίδραση στην περιοχή προέλευσης του πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν, των διαφόρων φαινολικών συστατικών. Οι ενώσεις που βρέθηκαν σημαντικές στον προσδιορισμό των διαφορών μεταξύ των 5 περιοχών στο επίπεδο σημαντικότητας 5% δίνονται στον ακόλουθο Πίνακα 6. Στον ίδιο Πίνακα παρουσιάζονται οι αντίστοιχες τιμές της διαχωριστικής συνάρτησης F, οι βαθμοί ελευθερίας (df, βε) και της πιθανότητας ορθής κατάταξης (p).

Πίνακας 6. Στατιστικά σημαντικά φλαβονοειδή που χρησιμοποιήθηκαν για την διαφοροποίηση της γεωγραφικής προέλευσης φρέσκου πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν.

Φαινολικές ενώσεις	Wilks' Lambda	F	df1	df2	p
Ναριγκίνη	.a				
Εσπεριδίνη	0,506	9,529	4	39	0,000
Νεοεσπεριδίνη	.a				
Κερκετίνη	0,750	3,253	4	39	0,021
Ναριγκενίνη	.a				

a. Δεν χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση λόγω σταθερής τιμής σε όλο τον πληθυσμό των δειγμάτων (μηδενική τιμή) (Cannot be computed because this variable is a constant).

1.6 Γραμμική διαχωριστική ανάλυση για τις 5 διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές του φρέσκου πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν με βάση τα 2 στατιστικά σημαντικά φλαβονοειδή

Στη συνέχεια της ανάλυσης, τα 2 σημαντικά φλαβονοειδή χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να διαπιστωθεί αν μπορούν να διαφοροποιήσουν την γεωγραφική προέλευση του πορτοκαλοχυμού από τις 5 διαφορετικές περιοχές.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δημιουργούνται 2 στατιστικά σημαντικές διαχωριστικές συναρτήσεις: Wilks' Lambda=0,348 με $X^2=41,661$, βε=8 με $p=0.000<0.05$ για την 1^η και Wilks' Lambda=0,806 με $X^2=8,5355$, βε=3 με $p=0.036<0.05$, για την 2^η, αντίστοιχα. Όπως στην περίπτωση της στατιστικής ανάλυσης των

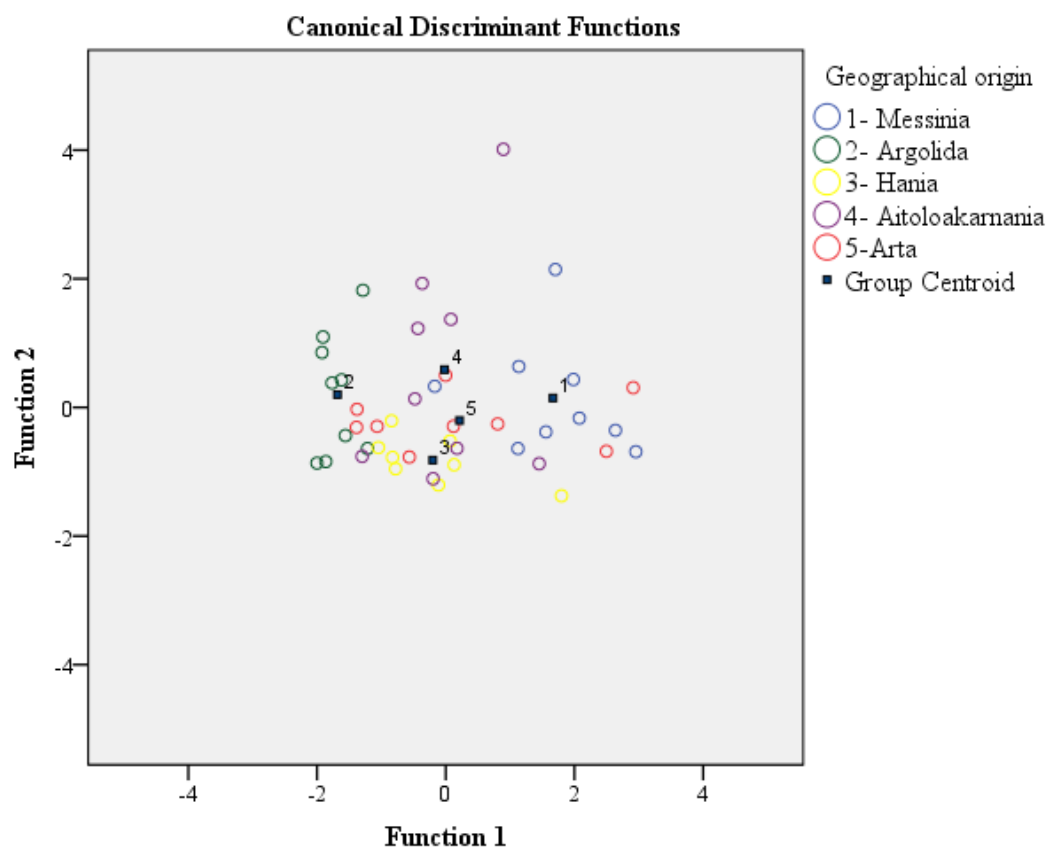
συμβατικών φυσικοχημικών παραμέτρων μια σημαντική τιμή του στατιστικού Wilks' Lambda φανερώνει ότι η διαχωριστική συνάρτηση είναι βασική στον διαχωρισμό των ζητούμενων ομάδων.

Η πρώτη διαχωριστική συνάρτηση με κανονική συσχέτιση 0,753 και ιδιοτιμή 1,313 ερμηνεύει το 84,5% της συνολικής διασποράς, ενώ η δεύτερη διαχωριστική συνάρτηση με κανονική συσχέτιση 0,441 και ιδιοτιμή 0,241 ερμηνεύει το 15,5% της συνολικής διασποράς. Και οι δυο μαζί ερμηνεύουν το 100% της συνολικής διακύμανσης που είναι άριστο ποσοστό. Στο Σχήμα 12 μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι φαίνεται να διαχωρίζονται σχετικά οι χυμοί από την Μεσσηνία και την Αργολίδα.

Αντίστοιχα, οι μέσες τιμές των κέντρων των ομάδων (group centroids) των 2 στατιστικά σημαντικών διαχωριστικών συναρτήσεων που αφορούν τις 5 γεωγραφικές περιοχές που εξετάστηκαν είναι: (1,666/0,146), (-1,683/0,199), (-0,202/-0,820), (-0,019/0,588), (0,215/-0,204) για τις περιοχές της Μεσσηνίας, Αργολίδας, Χανίων, Αιτωλοακαρνανίας και Άρτας, αντίστοιχα.

Η πρώτη διαχωριστική συνάρτηση διαχωρίζει την περιοχή της Μεσσηνίας από τις υπόλοιπες περιοχές, ενώ η δεύτερη διαχωριστική συνάρτηση μπορούμε να πούμε ότι διαχωρίζει την Αργολίδα από τις υπόλοιπες περιοχές.

Ο Πίνακας 7 δίνει τα αποτελέσματα των κατατάξεων χρησιμοποιώντας τόσο την μέθοδο της αντικατάστασης, όσο και τη μέθοδο της ενδοεπικύρωσης. Παρατηρούμε ότι το 68,2% του συνόλου των παρατηρήσεων κατατάχθηκαν σωστά, ποσοστό σχετικά ικανοποιητικό χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της αντικατάστασης, ενώ το ποσοστό αυτό μειώνεται στο 56,8%, όταν χρησιμοποιηθεί η μέθοδος της ενδοεπικύρωσης, χαμηλό ποσοστό για τη συγκεκριμένη μέθοδο.



Σχήμα 12. Διαφοροποίηση της γεωγραφικής προέλευσης φρέσκου πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν με βάση τα 2 φλαβονοειδή και χρήση της διακριτικής ανάλυσης .

Πίνακας 7. Ποσοστά ορθής κατάταξης φρέσκου πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν με βάση τα φλαβονοειδή.

Classification Results ^{a,b,c}								
Στατιστική τεχνική		Γεωγραφική προέλευση (Geographical origin)	Predicted Group Membership					Αριθμός δειγμάτων
			Messinia	Argolida	Hania	Aitoloakarnania	Arta	
Original ^a	Count	Messinia	8	0	0	1	0	9
		Argolida	0	9	0	0	0	9
		Hania	1	0	6	0	1	8
		Aitoloakarnania	1	1	2	5	0	9
		Arta	2	3	1	1	2	9
	%	Messinia	88,9	,0	,0	11,1	,0	100,0
		Argolida	,0	100,0	,0	,0	,0	100,0
		Hania	12,5	,0	75,0	,0	12,5	100,0
		Aitoloakarnania	11,1	11,1	22,2	55,6	,0	100,0
		Arta	22,2	33,3	11,1	11,1	22,2	100,0
Cross-validated ^{b,c}	Count	Messinia	7	0	0	1	1	9
		Argolida	0	7	1	1	0	9
		Hania	1	1	5	0	1	8
		Aitoloakarnania	2	1	2	4	0	9
		Arta	2	3	1	1	2	9
	%	Messinia	77,8	,0	,0	11,1	11,1	100,0
		Argolida	,0	77,8	11,1	11,1	,0	100,0
		Hania	12,5	12,5	62,5	,0	12,5	100,0
		Aitoloakarnania	22,2	11,1	22,2	44,4	,0	100,0
		Arta	22,2	33,3	11,1	11,1	22,2	100,0

a. 68,2% of original grouped cases correctly classified.

b. Cross validation is done only for those cases in the analysis. In cross validation, each case is classified by the functions derived from all cases other than that case.

c. 56,8% of cross-validated grouped cases correctly classified.

Παρατηρούμε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό ορθής κατάταξης παρουσιάζουν τα δείγματα χυμού της Μεσσηνίας και Αργολίδας (77,8%) και στη συνέχεια ακολουθούν εκείνα των Χανίων (62,5%). Τα δείγματα χυμού από τη περιοχή της Αιτωλοακαρνανίας και της Άρτας δεν κατατάχτηκαν επιτυχώς (ποσοστά ορθής κατάταξης 44,4% και 22,2%, αντίστοιχα).

1.7 Πτητικές ενώσεις φρέσκου πορτοκαλογυμού της ποικιλίας Μέρλιν διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης

Στον Πίνακα 8 δίνονται οι μέσες τιμές $\pm$ τυπική απόκλιση των πτητικών ενώσεων του φρέσκου πορτοκαλογυμού της ποικιλίας Μέρλιν σύμφωνα με τη γεωγραφική του προέλευση.

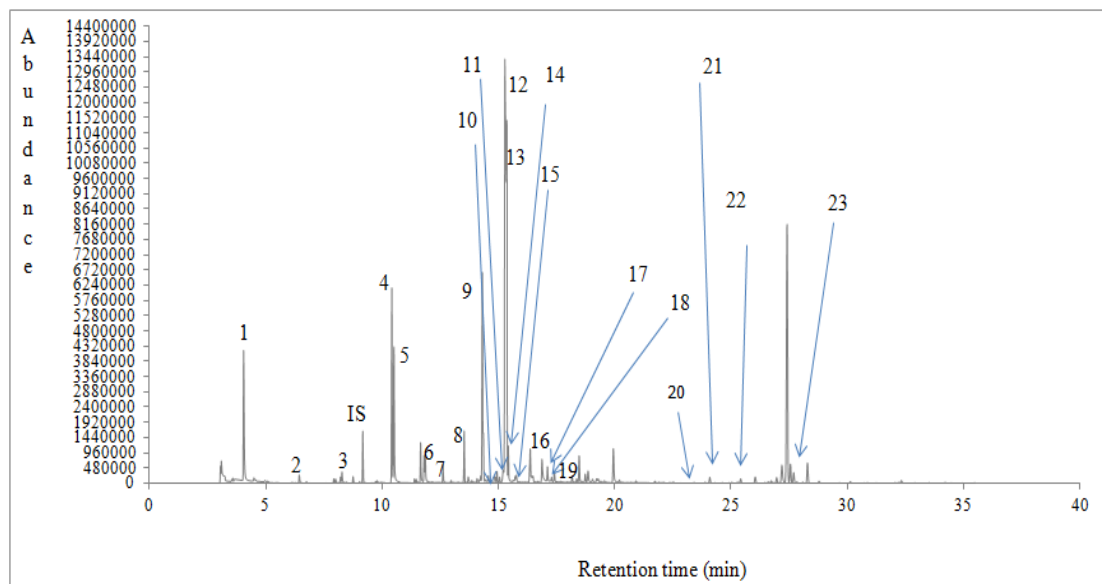
Πίνακας 8. Ημιοποτικός προσδιορισμός πτητικών ενώσεων (mg/L) φρέσκου πορτοκαλογυμού της ποικιλίας Μέρλιν διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης.

Χρόνος κατακράτησης (min)	Πτητικές ενώσεις (mg/L)	RI _{exp}	RI _{lit}	Μεσησινία Μέση τιμή ($\pm$ τυπική απόκλιση)	Αργολίδα Μέση τιμή ($\pm$ τυπική απόκλιση)	Χανιά Μέση τιμή ($\pm$ τυπική απόκλιση)	Αιτωλοακαρνανία Μέση τιμή ($\pm$ τυπική απόκλιση)	Άρτα Μέση τιμή ($\pm$ τυπική απόκλιση)
Αλδεΰδες								
8,28	πεντανάλη	706	695	0,08(0,02)	0,06(0,01)	0,04(0,02)	δπ	0,06(0,05)
10,52	εξανάλη	809	804	0,81(0,19)	1,00(0,28)	0,39(0,16)	0,51(0,26)	0,61(0,41)
12,62	επτανάλη	911	903	0,11(0,03)	0,09(0,02)	0,09(0,04)	δπ	0,08(0,06)
14,57	οκτανάλη	1014	1005	0,07(0,05)	δπ	0,05(0,01)	1,68(3,07)	0,05(0,02)
18,58	δεκανάλη	1217	1206	δπ	δπ	δπ	1,29(2,52)	δπ
20,92	περιλνυλική αλδεΰδη	1313	1309	0,06(0,02)	0,04(0,01)	0,03(0,01)	0,13(0,17)	0,03(0,02)
	ΣΥΝΟΛΟ			1,23(0,31)	1,19(0,32)	0,60(0,23)	3,61(6,02)	0,83(0,55)
Αλκοόλες								
4,05	αιθανόλη	<600	<600	0,50(0,27)	0,98(0,58)	0,62(0,33)	1,36(0,73)	0,62(0,35)
11,70	3-εξεν-1-όλη (Z)	864	855	0,15(0,08)	0,17(0,06)	0,14(0,11)	0,09(0,09)	0,14(0,12)
11,82	2-εξεν-1-όλη (E)	872	872	0,05(0,04)	0,15(0,09)	0,05(0,02)	δπ	0,08(0,04)
11,87	εξανόλη	874	876	0,12(0,06)	0,21(0,16)	0,09(0,05)	0,06(0,10)	0,10(0,10)
15,73	οκτανόλη	1077	1070	0,41(0,31)	δπ	0,13(0,04)	0,79(1,11)	0,08(0,06)
	ΣΥΝΟΛΟ			1,23(0,76)	1,51(0,89)	1,03(0,59)	2,30(2,03)	1,02(0,67)
Εστέρες								
6,45	αιθυλεστέρας του οξικού οξέος	613	612	δπ	δπ	δπ	0,13(0,13)	δπ
10,42	αιθυλεστέρας του βουτανικού οξέος	805	802	0,35(0,23)	0,75(0,59)	0,45(0,18)	0,77(0,22)	0,49(0,31)

16,89	3-υδροξυ-εξανικός αιθυλεστέρας	1137	1128	δπ	δπ	0,11(0,06)	δπ	δπ
18,17	αιθυλεστέρας του οκτανικού οξέος	1200	1198	δπ	δπ	0,05(0,01)	0,07(0,04)	δπ
	ΣΥΝΟΛΟ			0,39(0,26)	0,75(0,59)	0,61(0,25)	0,97(0,39)	0,49(0,31)
Τερπενοειδή								
13,54	α-πινένιο	959	936	0,32(0,13)	0,26(0,09)	0,14(0,05)	1,09(1,48)	0,22(0,14)
14,32	β-μυρκενίο	1000	989	1,78(0,86)	1,84(0,55)	1,02(0,33)	3,91(4,12)	1,36(0,83)
14,88	φαλανδρένιο	1031	1010	0,05(0,05)	δπ	δπ	0,23(0,31)	0,03(0,03)
14,94	δ-3-καρένιο	1034	1020	0,06(0,03)	0,07(0,02)	δπ	δπ	0,04(0,02)
15,07	α-τερπινένιο	1041	1023	0,07(0,03)	δπ	δπ	0,17(0,24)	0,04(0,01)
15,19	παρα-κυμόλιο	1049	1034	0,68(1,55)	0,09(0,02)	δπ	δπ	δπ
15,29	DL-λεμονένιο	1055	1039	21,09(6,06)	10,68(2,26)	12,78(5,00)	14,99(12,12)	11,46(8,46)
15,44	σαμπνένιο	1062	-	0,33(0,11)	0,37(0,11)	0,18(0,09)	0,93(1,07)	0,24(0,13)
15,77	γ-τερπινένιο	1080	1065	0,10(0,08)	0,12(0,03)	δπ	0,31(0,50)	0,08(0,02)
16,39	λίναλοόλη	1112	1103	0,73(0,43)	0,65(0,22)	0,42(0,13)	2,68(3,78)	0,52(0,25)
17,42	cis-παρα-μενθα- 2,8-διεν-1-όλη	1163	1149	0,10(0,09)	δπ	0,06(0,01)	δπ	0,06(0,04)
18,48	4-τερπινεόλη	1213	1185	0,40(0,13)	0,37(0,21)	0,28(0,12)	1,30(1,94)	0,26(0,13)
18,74	α-τερπινεόλη	1224	1191	0,12(0,06)	0,15(0,11)	δπ	0,53(0,79)	0,10(0,18)
19,95	δ-καρβόνη	1275	1243	0,40(0,18)	0,22(0,13)	0,22(0,06)	0,19(0,14)	0,26(0,20)
23,89	α-κοπαένιο	1416	1390	δπ	δπ	0,02(0,02)	δπ	0,03(0,03)
24,09	β-ελεμένιο	1423	1445	0,03(0,03)	0,06(0,03)	δπ	δπ	0,04(0,05)
25,41	καρυοφυλλένιο	1468	1451	0,03(0,02)	δπ	δπ	δπ	0,03(0,02)
27,19	β-σελινένιο	1530	1490	0,18(0,26)	0,14(0,09)	0,07(0,05)	0,20(0,21)	0,12(0,13)
27,41	βαλεντσένιο	1538	1493	1,27(1,09)	1,85(1,17)	1,36(0,57)	1,77(1,86)	1,50(1,34)
27,55	α-σελινένιο	1543	1505	0,07(0,06)	0,12(0,08)	0,07(0,04)	0,12(0,14)	0,10(0,11)
27,70	λεδένιο	1548	1511	0,04(0,03)	δπ	δπ	δπ	δπ
27,84	δ-καδινένιο	1553	1536	δπ	0,09(0,06)	0,03(0,02)	0,13(0,21)	0,03(0,03)
28,29	α-πανασινσένιο	1569	1577	0,07(0,06)	0,10(0,08)	0,07(0,04)	0,09(0,11)	0,10(0,12)
	ΣΥΝΟΛΟ			28,02(11,31)	17,18(5,26)	16,72(6,53)	28,64(29,02)	16,62(12,89)
	Ολικά πτητικά (mg/L)			30,68(8,06)	20,63(4,77)	17,19(4,86)	35,52(35,53)	18,95(10,38)

δπ: δεν προσδιορίστηκε (not identified). Κάθε δείγμα αναλύθηκε εις διπλούν (n=2). RI_{exp}: Δείκτες κατακράτησης των ενώσεων του δείγματος με βάση τους χρόνους πρότυπου μίγματος αλκανίων. RI_{lit}: Δείκτες κατακράτησης της βάσης δεδομένων Willey NIST MS 2007.

Τριάντα οκτώ πτητικά συστατικά προσδιορίστηκαν και ημι-ποσοτικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο του εσωτερικού προτύπου, τα οποία ταξινομούνται αλφαβητικά σε 4 κατηγορίες: i) αλδεΐδες, ii) αλκοόλες, iii) εστέρες και iv) τερπενοειδή. Στο Σχήμα 13 φαίνεται ένα τυπικό χρωματογράφημα πορτοκαλοχυμού από την περιοχή της Άρτας.



Σχήμα 13. Τυπικό χρωματογράφημα φρέσκου πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν από την Άρτα με επισημασμένες τις πτητικές ενώσεις ως δείκτες της γεωγραφικής προέλευσης. 1: αιθανόλη, 2: οξικός αιθυλεστέρας, 3: πεντανάλ, 4: αιθυλεστέρας του βουτανικού οξέος, 5: εξανάλ, 6: (E)-2-εξεν-1-όλη, 7: επτανάλ, 8: α-πινένιο, 9: β-μυρκενίο, 10: φαιλανδρένιο, 11: δ-3-καρένιο, 12: α-τερπινένιο, 13: DL-λεμονένιο, 14: σαμπινένιο, 15: οκτανόλη, 16: λιναλοόλη, 17: 3-υδροξυ-εξανικός αιθυλεστέρας, 18: (cis)-παρα-μενθα-2,8-διεν-1-όλη, 19: οκτανικός αιθυλεστέρας, 20: α-κοπαένιο, 21: β-ελεμένιο, 22: καρνοφυλλένιο, 23: λεδένιο. IS: εσωτερικό πρότυπο (4-μεθυλ-2-πεντανόνη).

Είναι εμφανές ότι τα τερπενοειδή ήταν οι κυρίαρχες ενώσεις αρώματος του φρέσκου πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν. Προκύπτει λοιπόν το συμπέρασμα ότι το άρωμα του πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν οφείλεται κυρίως στη συνεργιστική επίδραση τερπενοειδών, αλδευδών, αλκοολών και εστέρων και φυσικά η περιεκτικότητά τους μεταβάλλεται στατιστικά σημαντικά με βάση τη γεωγραφική του προέλευση.

Πράγματι, η ποσότητα των ενώσεων αυτών μεταβλήθηκε στατιστικά ($p < 0,05$) σημαντικά μεταξύ των διαφορετικών περιοχών. Το πλουσιότερο άρωμα το είχαν οι χυμοί από την Αιτωλοακαρνανία ($35,52 \pm 35,53$ mg/L) ακολουθούμενοι από εκείνους της Μεσσηνίας ($30,68 \pm 8,06$ mg/L), Αργολίδας ($20,63 \pm 4,77$ mg/L), Άρτας ($18,95 \pm 10,38$ mg/L) και Χανίων ($17,19 \pm 4,86$ mg/L) (Πίνακας 8).

Ο σχηματισμός (βιοχημικό μονοπάτι) και ο χαρακτήρας αρώματος των ενώσεων αυτών έχουν αναφερθεί εκτεταμένα στο θεωρητικό μέρος της μεταπτυχιακής διατριβής. Αυτό που είναι επίσης σημαντικό να αναφερθεί είναι ότι οι ενώσεις που προσδιορίστηκαν μπορούν να χαρακτηριστούν ως ισχυροί δείκτες του αρώματος των εσπεριδοειδών και ειδικά του πορτοκαλιού ή του χυμού αυτού (Proctor & Kenyon, 1949; Moschonas et al., 1994; Ruiz Perez-Cacho et al., 2008; Jian et al., 2009; Kelebek & Selli, 2011).

Πιο συγκεκριμένα, οι ενώσεις παρα-κυμόλιο, εξανάλη, επτανάλη, οκτανάλη, αιθανόλη, καρυοφυλλένιο, βαλεντσένιο, α-κοπαένιο, α-τερπινεόλη, λεμονένιο, αιθυλεστέρας του δεκανικού οξέος και πολλές ακόμη βρέθηκαν σε δείγματα πορτοκαλοχυμού από την Βαλένθια της Ισπανίας σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας (González-Mas et al., 2011).

Επιπροσθέτως, οι πτητικές ενώσεις sabinene, beta-myrcene, gamma-terpinene, alpha-copaene, para-mentha-2,8-dien-9-ol (E), linalool, octanal, delta-cadinene, beta-selinene, carvone και πολλές άλλες βρέθηκαν σε δείγματα πορτοκαλοχυμού από την Ανατολική Τουρκία (Kelebek & Selli, 2011) σε συμφωνία με τα αποτελέσματα μας.

1.8 Διαφοροποίηση της γεωγραφικής προέλευσης ελληνικού πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν με βάση τις πτητικές ενώσεις

Σε μια περαιτέρω προσπάθεια βελτίωσης του ποσοστού ορθής κατάταξης των δειγμάτων φρέσκου πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν με βάση την γεωγραφική τους προέλευση, ως εξαρτημένες μεταβλητές χρησιμοποιήθηκαν οι 5 γεωγραφικές περιοχές και το σύνολο των πτητικών ενώσεων όπως: αιθανόλη (αιθυλική αλκοόλη), πεντανάλη, αιθυλεστέρας του βουτανικού οξέος, εξανάλη, (E)-2-εξεν-1-όλη, επτανάλη, α-πινένιο, β-μυρκένιο, φαιλανδρένιο, δ-3-καρένιο, α-τερπινένιο, λεμονένιο, σαμπινένιο, οκτανόλη, λιναλοόλη, 3-υδροξυ-εξανικός αιθυλεστέρας, (cis)-παρα-μενθα-2,8-διεν-1-όλη, αιθυλεστέρας του οκτανικού οξέος, β-ελεμένιο, καρυοφυλλένιο, λεδένιο, α-κοπαένιο, αιθυλεστέρας του οξικού οξέος, 3-εξεν-1-όλη, εξανόλη, οκτανάλη, παρα-κυμόλιο, γ-τερπινένιο, 4-τερπινεόλη, δ-καρβόνη,

περιλλυλική αλδεΰδη, β-σελινένιο, βαλεντσένιο, α-σελινένιο, δ-καδινένιο, α-πανασινσένιο και δεκανάλη ως οι ανεξάρτητες μεταβλητές.

Η ανάλυση είναι σημαντική, όπως φανερώνουν οι δείκτες Pillai's Trace=3,819 ($F=2,775$, $p=0.005<0.05$) και Wilks' Lambda=0,00 ($F=4,922$, $p=0.003<0.05$), γεγονός που καταδεικνύει ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική πολυπαραμετρική επίδραση των διαφόρων πτητικών ενώσεων στην περιοχή προέλευσης του πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν. Οι πτητικές ενώσεις που βρέθηκαν σημαντικές στον προσδιορισμό των διαφορών μεταξύ των 5 περιοχών στο επίπεδο σημαντικότητας 5% δίνονται στον Πίνακα 9. Στον ίδιο πίνακα παρουσιάζονται οι αντίστοιχες τιμές της διαχωριστικής συνάρτησης F, οι βαθμοί ελευθερίας (df, βε) και της πιθανότητας ορθής κατάταξης (p).

Πίνακας 9. Στατιστικά σημαντικές πτητικές ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την διαφοροποίηση της γεωγραφικής προέλευσης φρέσκου πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν.

Πτητικές ενώσεις	Wilks' Lambda	F	df1	df2	p
αιθανόλη	0,677	4,649	4	39	0,004
πεντανάλη	0,458	11,556	4	39	0,000
αιθυλεστέρας του βουτανικού οξέος	0,787	2,642	4	39	0,048
εξανάλη	0,591	6,737	4	39	0,000
(E)-2-εξεν-1-όλη	0,471	10,962	4	39	0,000
επτανάλη	0,429	12,989	4	39	0,000
α-πινένιο	0,770	2,912	4	39	0,034
β-μυρκένιο	0,771	2,902	4	39	0,034
φαιλανδρένιο	0,709	4,008	4	39	0,008
δ-3-καρένιο	0,298	23,017	4	39	0,000
α-τερπινένιο	0,730	3,614	4	39	0,013
DL-λεμονένιο	0,782	2,715	4	39	0,044
σαμπινένιο	0,750	3,254	4	39	0,021
οκτανόλη	0,740	3,423	4	39	0,017
λιναλοόλη	0,785	2,678	4	39	0,046
3-υδροξυ-εξανικός	0,271	26,272	4	39	0,000
αιθυλεστέρας (cis)-παρα-μενθα-2,8-διεν-1- όλη	0,534	8,516	4	39	0,000
αιθυλεστέρας του οκτανικού οξέος	0,376	16,169	4	39	0,000
β-ελεμένιο	0,593	6,687	4	39	0,000
καρυοφυλλένιο	0,430	12,928	4	39	0,000
λεδένιο	0,430	12,900	4	39	0,000
α-κοπαένιο	0,574	7,247	4	39	0,000
αιθυλεστέρας του οξικού οξέος	0,532	8,591	4	39	0,000

1.9 Γραμμική διαχωριστική ανάλυση για τις 5 διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές του φρέσκου πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν με βάση τις 23 στατιστικά σημαντικές πτητικές ενώσεις

Στη συνέχεια της ανάλυσης, οι 23 σημαντικές πτητικές ενώσεις χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να διαπιστωθεί αν μπορούν να διαφοροποιήσουν τη γεωγραφική προέλευση του πορτοκαλοχυμού από τις 5 διαφορετικές περιοχές.

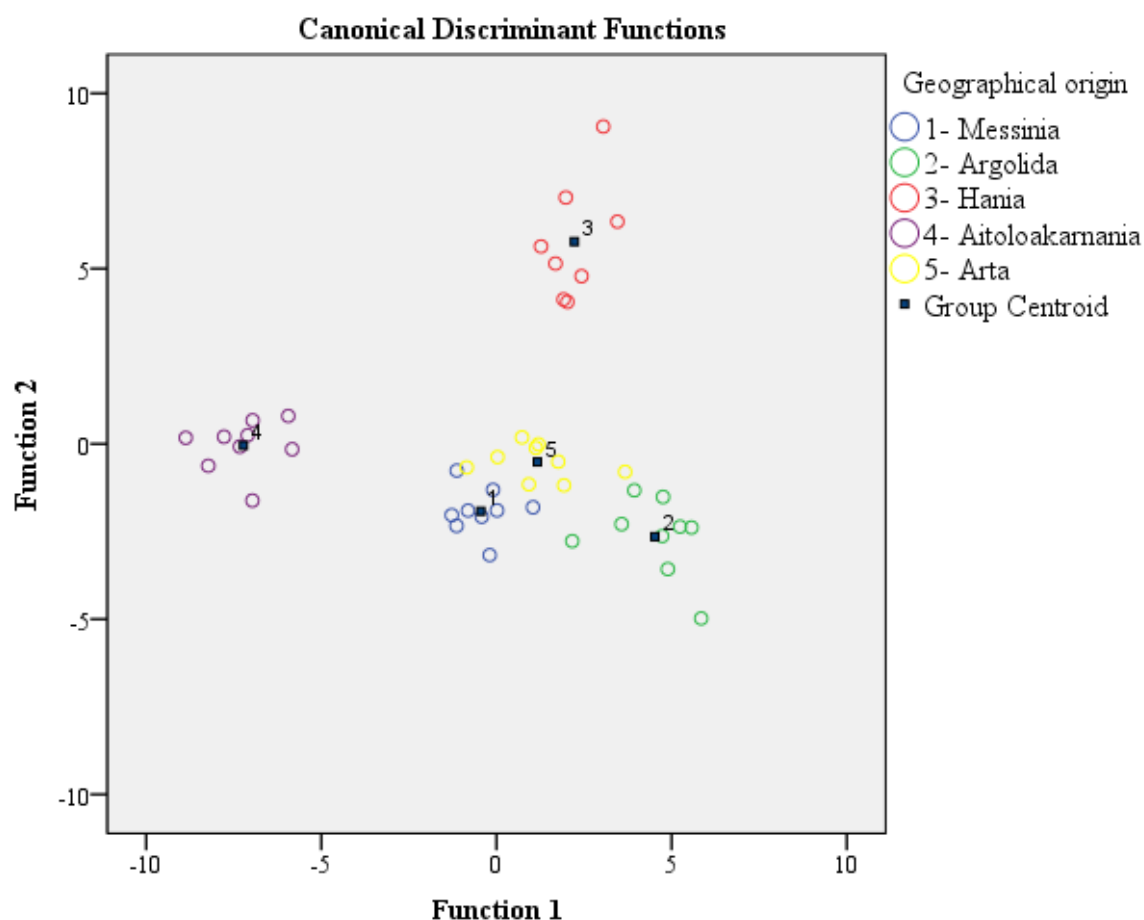
Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δημιουργούνται 4 στατιστικά σημαντικές διαχωριστικές συναρτήσεις: Wilks' Lambda=0,000 με $X^2=253,006$, $\beta=92$ με $p=0,000 < 0,05$ για την 1^η, Wilks' Lambda=0,003 με $X^2=167,403$, $\beta=66$ με $p=0,000 < 0,05$, για την 2^η, Wilks' Lambda=0,032 με $X^2=99,599$, $\beta=42$ με $p=0,000 < 0,05$, για την 3^η και Wilks' Lambda=0,224 με $X^2=43,412$, $\beta=20$ με $p=0,002 < 0,05$ για την 4^η, αντίστοιχα. Όπως και στην περίπτωση της στατιστικής ανάλυσης των προηγούμενων παραμέτρων/δεδομένων, μια σημαντική τιμή του στατιστικού Wilks' Lambda φανερώνει ότι η διαχωριστική συνάρτηση είναι βασική στον διαχωρισμό των ζητούμενων ομάδων.

Η πρώτη διαχωριστική συνάρτηση με κανονική συσχέτιση 0,974 και ιδιοτιμή 18,140 ερμηνεύει το 49,1% της συνολικής διασποράς, η δεύτερη διαχωριστική συνάρτηση με κανονική συσχέτιση 0,951 και ιδιοτιμή 9,362 ερμηνεύει το 25,4% της συνολικής διασποράς. Ακολούθως, η 3^η διαχωριστική συνάρτηση με κανονική συσχέτιση 0,925 και ιδιοτιμή 5,941 ερμηνεύει το 16,1% της συνολικής διασποράς. Τέλος, η 4^η διαχωριστική συνάρτηση με κανονική συσχέτιση 0,881 και ιδιοτιμή 3,468 ερμηνεύει το 9,4% της συνολικής διασποράς. Όλες μαζί ερμηνεύουν το 100% της συνολικής διακύμανσης που είναι άριστο ποσοστό. Στο Σχήμα 14 μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι φαίνεται να διαχωρίζονται σχετικά καθαρά οι χυμοί από την Αργολίδα, τα Χανιά και την Αιτωλοακαρνανία.

Αντίστοιχα, οι μέσες τιμές των κέντρων των ομάδων (group centroids) των 2 στατιστικά σημαντικών διαχωριστικών συναρτήσεων (και οι οποίες φαίνονται στο δισδιάστατο γράφημα) που αφορούν τις 5 γεωγραφικές περιοχές που εξετάστηκαν είναι: (-0,446/-1,923), (4,523/-2,648), (2,225/5,770), (-7,224/-0,043), (1,169/-0,515) για τις περιοχές της Μεσσηνίας, Αργολίδας, Χανίων, Αιτωλοακαρνανίας και Άρτας, αντίστοιχα.

Η πρώτη διαχωριστική συνάρτηση διαχωρίζει την περιοχή της Αργολίδας και των Χανίων από τις υπόλοιπες περιοχές, ενώ η δεύτερη διαχωριστική συνάρτηση μπορούμε να πούμε ότι διαχωρίζει την Αιτωλοακαρνανία από τις υπόλοιπες περιοχές.

Ο Πίνακας 10 δίνει τα αποτελέσματα των κατατάξεων χρησιμοποιώντας τόσο την μέθοδο της αντικατάστασης, όσο και τη μέθοδο της ενδοεπικύρωσης. Παρατηρούμε ότι το 100% του συνόλου των παρατηρήσεων κατατάχθηκαν σωστά, ποσοστό που είναι άριστο χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της αντικατάστασης, ενώ το ποσοστό αυτό μειώνεται στο 75%, όταν χρησιμοποιηθεί η μέθοδος της ενδοεπικύρωσης, αρκετά ικανοποιητικό ποσοστό για τη συγκεκριμένη μέθοδο.



Σχήμα 14. Διαφοροποίηση της γεωγραφικής προέλευσης φρέσκου πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν με βάση τις 23 πτητικές ενώσεις και χρήση της διακριτικής ανάλυσης.

Πίνακας 10. Ποσοστά ορθής κατάταξης φρέσκου πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν με βάση τις πτητικές ενώσεις.

Classification Results ^{ab,c}								
Στατιστική τεχνική		Γεωγραφική προέλευση (Geographical origin)	Predicted Group Membership					Αριθμός δειγμάτων
			Messinia	Argolida	Hania	Aitoloakarnania	Arta	
Original ^a	Count	Messinia	9	0	0	0	0	9
		Argolida	0	9	0	0	0	9
		Hania	0	0	8	0	0	8
		Aitoloakarnania	0	0	0	9	0	9
		Arta	0	0	0	0	9	9
	%	Messinia	100,0	,0	,0	,0	,0	100,0
		Argolida	,0	100,0	,0	,0	,0	100,0
		Hania	,0	,0	100,0	,0	,0	100,0
		Aitoloakarnania	,0	,0	,0	100,0	,0	100,0
		Arta	,0	,0	,0	,0	100,0	100,0
Cross-validated ^{b,c}	Count	Messinia	7	0	0	0	2	9
		Argolida	0	7	0	0	2	9
		Hania	0	0	7	0	1	8
		Aitoloakarnania	3	0	1	5	0	9
		Arta	2	0	0	0	7	9
	%	Messinia	77,8	,0	,0	,0	22,2	100,0
		Argolida	,0	77,8	,0	,0	22,2	100,0
		Hania	,0	,0	87,5	,0	12,5	100,0
		Aitoloakarnania	33,3	,0	11,1	55,6	,0	100,0
		Arta	22,2	,0	,0	,0	77,8	100,0

a. 100,0% of original grouped cases correctly classified.

b. Cross validation is done only for those cases in the analysis. In cross validation, each case is classified by the functions derived from all cases other than that case.

c. 75,0% of cross-validated grouped cases correctly classified.

Παρατηρούμε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό ορθής κατάταξης παρουσιάζουν τα δείγματα χυμού από την περιοχή των Χανίων (87,5%), της Μεσσηνίας, Αργολίδας και Άρτας (77,8%). Τα δείγματα χυμού από τη περιοχή της Αιτωλοακαρνανίας δεν κατατάχτηκαν επιτυχώς (ποσοστό ορθής κατάταξης 55,6%).

1.10 Διαφοροποίηση της γεωγραφικής προέλευσης φρέσκου πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν με βάση τον συνδυασμό συμβατικών φυσιολογικών παραμέτρων, φλαβονοειδών και πτητικών ενώσεων

Σε μια προσπάθεια να εξεταστεί εάν ο συνδυασμός των προσδιορισμένων φυσιολογικών παραμέτρων/σταθερών θα μπορούσε να βελτιώσει το ποσοστό ορθής κατάταξης των δειγμάτων φρέσκου πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν σύμφωνα με τη γεωγραφική τους προέλευση, ως εξαρτημένες μεταβλητές χρησιμοποιήθηκαν οι 5 γεωγραφικές περιοχές και ως ανεξάρτητες μεταβλητές οι 4 συμβατικές φυσιολογικές παράμετροι, τα 2 φλαβονοειδή και οι 23 πτητικές ενώσεις. Σε αυτή την περίπτωση ο πληθυσμός των ανεξάρτητων μεταβλητών αυξήθηκε σημαντικά (29).

Η ανάλυση είναι σημαντική, όπως φανερώνουν οι δείκτες Pillai's Trace=3,886 ($F=3,492$, $p=0.003<0.05$) και Wilks' Lambda=0,000 ($F=5,618$ $p=0.012<0.05$), γεγονός που καταδεικνύει ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική πολυπαραμετρική επίδραση των διαφόρων συμβατικών φυσιολογικών παραμέτρων, φαινολικών και πτητικών ενώσεων στην περιοχή προέλευσης του πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν.

1.11 Γραμμική διαχωριστική ανάλυση για τις 5 διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές του φρέσκου πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν με βάση των συνδυασμό των 29 στατιστικά σημαντικών παραμέτρων

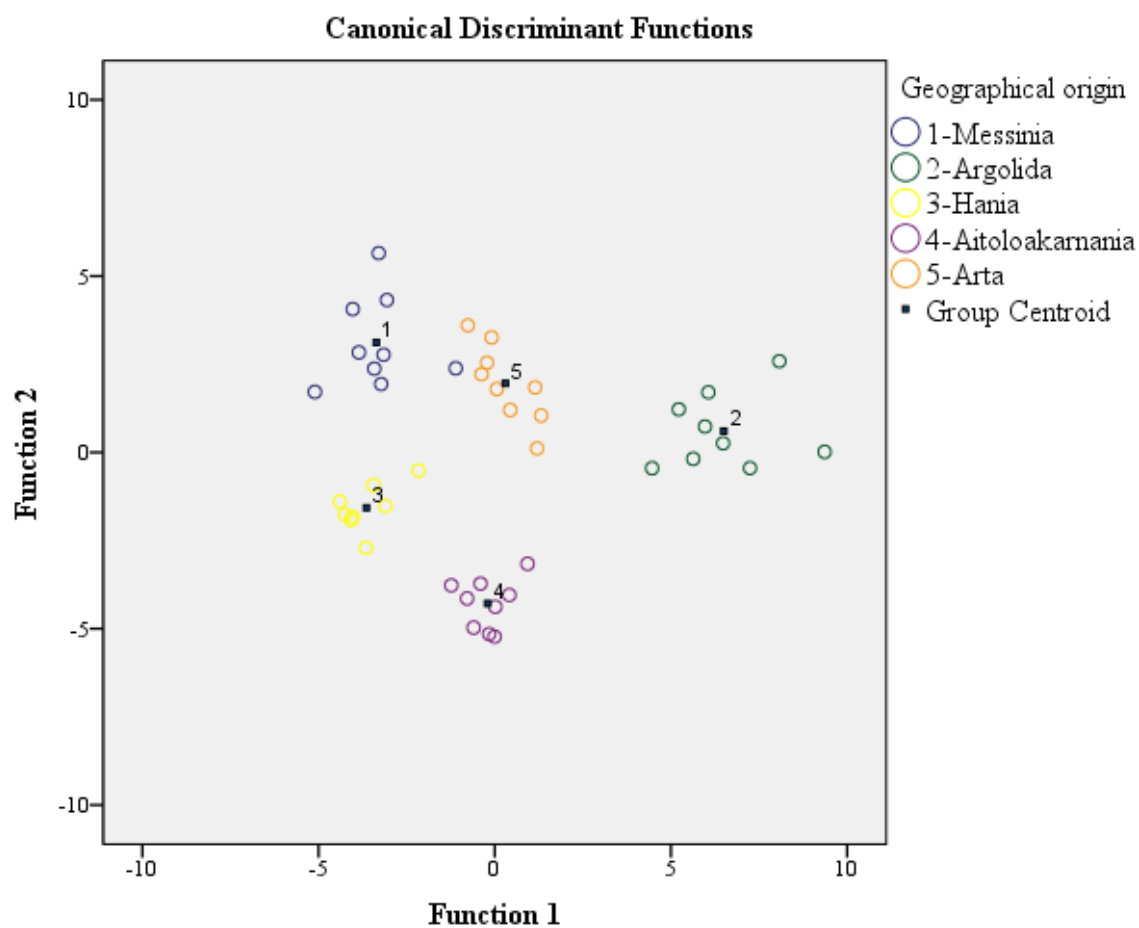
Στη συνέχεια της ανάλυσης, οι 29 στατιστικά σημαντικές μεταβλητές χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να διαπιστωθεί αν μπορούν να διαφοροποιήσουν την γεωγραφική προέλευση του πορτοκαλοχυμού από τις 5 διαφορετικές περιοχές. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δημιουργούνται 4 στατιστικά σημαντικές διαχωριστικές συναρτήσεις: Wilks' Lambda=0,001 με $X^2=236,259$, $\beta=64$ με $p=0,000<0,05$ για την πρώτη, Wilks' Lambda=0,011 με $X^2=145,932$, $\beta=45$ με $p=0,000<0,05$, για τη δεύτερη, Wilks' Lambda=0,100 με $X^2=74,686$, $\beta=28$ με $p=0,000<0,05$, για την 3^η και Wilks' Lambda=0,499 με $X^2=22,584$, $\beta=13$ με $p=0,047<0,05$ για την 4^η, αντίστοιχα. Όπως σε όλες τις περιπτώσεις της στατιστικής ανάλυσης των προηγούμενων παραμέτρων, μια σημαντική τιμή του στατιστικού Wilks' Lambda φανερώνει ότι η διαχωριστική συνάρτηση είναι βασική στον διαχωρισμό των ζητούμενων ομάδων.

Η 1^η διαχωριστική συνάρτηση με κανονική συσχέτιση 0,968 και ιδιοτιμή 15,108 ερμηνεύει το 53,9% της συνολικής διασποράς. Αντίστοιχα, η 2^η διαχωριστική συνάρτηση με κανονική συσχέτιση 0,943 και ιδιοτιμή 7,955 ερμηνεύει το 28,4% της συνολικής διασποράς. Ακολούθως, η 3^η διαχωριστική συνάρτηση με κανονική συσχέτιση 0,894 και ιδιοτιμή 3,969 ερμηνεύει το 14,2% της συνολικής διασποράς. Τέλος, η 4^η διαχωριστική συνάρτηση με κανονική συσχέτιση 0,708 και ιδιοτιμή 1,004 ερμηνεύει το 3,6% της συνολικής διασποράς. Όλες μαζί ερμηνεύουν το 100% της συνολικής διακύμανσης που είναι άριστο ποσοστό. Στο Σχήμα 15 μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι φαίνεται να διαχωρίζονται πάρα πολύ ευδιάκριτα οι χυμοί από όλες τις περιοχές.

Αντίστοιχα, οι μέσες τιμές των κέντρων των ομάδων (group centroids) των 2 στατιστικά σημαντικών διαχωριστικών συναρτήσεων (και οι οποίες φαίνονται στο δισδιάστατο γράφημα) που αφορούν τις 5 γεωγραφικές περιοχές που εξετάστηκαν είναι: (-3,361/3,118), (6,500/0,605), (-3,641/-1,571), (-0,204/-4,284), (0,301/1,958) για τις περιοχές της Μεσσηνίας, Αργολίδας, Χανίων, Αιτωλοακαρνανίας και Άρτας, αντίστοιχα.

Η πρώτη διαχωριστική συνάρτηση διαχωρίζει την περιοχή της Αργολίδας από τις υπόλοιπες περιοχές, ενώ η δεύτερη διαχωριστική συνάρτηση μπορούμε να πούμε ότι διαχωρίζει την Μεσσηνία και τα Χανιά από τις υπόλοιπες περιοχές.

Ο Πίνακας 11 δίνει τα αποτελέσματα των κατατάξεων χρησιμοποιώντας τόσο την μέθοδο της αντικατάστασης, όσο και τη μέθοδο της ενδοεπικύρωσης. Παρατηρούμε ότι το 100% του συνόλου των παρατηρήσεων κατατάχθηκαν σωστά, ποσοστό που είναι άριστο χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της αντικατάστασης, ενώ το ποσοστό αυτό μειώνεται στο 88,6%, όταν χρησιμοποιηθεί η μέθοδος της ενδοεπικύρωσης, πάρα πολύ ικανοποιητικό ποσοστό για τη συγκεκριμένη μέθοδο.



Σχήμα 15. Διαφοροποίηση της γεωγραφικής προέλευσης φρέσκου πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν με βάση τον συνδυασμό συμβατικών φυσικοχημικών παραμέτρων, флаβονοειδών και πτητικών ενώσεων, με χρήση της διακριτικής ανάλυσης.

Πίνακας 11. Ποσοστά ορθής κατάταξης φρέσκου πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν με βάση τις συμβατικές φυσικοχημικές παραμέτρους, τα φλαβονοειδή και τις πτητικές ενώσεις.

Classification Results ^{a,b,c}								
Στατιστική τεχνική		Γεωγραφική προέλευση (Geographical origin)	Predicted Group Membership					Αριθμός δειγμάτων
			Messinia	Argolida	Hania	Aitolokarnania	Arta	
Original ^a	Count	Messinia	9	0	0	0	0	9
		Argolida	0	9	0	0	0	9
		Hania	0	0	8	0	0	8
		Aitolokarnania	0	0	0	9	0	9
		Arta	0	0	0	0	9	9
	%	Messinia	100,0	,0	,0	,0	,0	100,0
		Argolida	,0	100,0	,0	,0	,0	100,0
		Hania	,0	,0	100,0	,0	,0	100,0
		Aitolokarnania	,0	,0	,0	100,0	,0	100,0
		Arta	,0	,0	,0	,0	100,0	100,0
Cross-validated ^{b,c}	Count	Messinia	7	0	0	0	2	9
		Argolida	0	9	0	0	0	9
		Hania	0	0	6	1	1	8
		Aitolokarnania	0	0	0	9	0	9
		Arta	1	0	0	0	8	9
	%	Messinia	77,8	,0	,0	,0	22,2	100,0
		Argolida	,0	100,0	,0	,0	,0	100,0
		Hania	,0	,0	75,0	12,5	12,5	100,0
		Aitolokarnania	,0	,0	,0	100,0	,0	100,0
		Arta	11,1	,0	,0	,0	88,9	100,0

a. 100.0% of original grouped cases correctly classified.

b. Cross validation is done only for those cases in the analysis. In cross validation, each case is classified by the functions derived from all cases other than that case.

c. 88.6% of cross-validated grouped cases correctly classified.

Παρατηρούμε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό ορθής κατάταξης παρουσιάζουν τα δείγματα χυμού από την περιοχή της Αργολίδας και της Αιτωλοακαρνανίας (100%) και στη συνέχεια ακολουθούν εκείνα της Άρτας (88,9%), Μεσσηνίας (77,8%) και Χανίων (75%).

Σαν γενικό συμπέρασμα, σε όλες τι περιπτώσεις, τα αποτελέσματα του συνδυασμού των συμβατικών φυσικοχημικών παραμέτρων, των φλαβονοειδών και των πτητικών ενώσεων, οδήγησαν σε αξιόπιστο γεωγραφικό διαχωρισμό των δειγμάτων φρέσκου πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν.

Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης έδειξαν ότι ο συνδυασμός των συμβατικών φυσικοχημικών παραμέτρων, των φλαβονοειδών και των πτητικών συστατικών ήταν το πιο αποτελεσματικό εργαλείο για την διαφοροποίηση της γεωγραφικής προέλευσης του φρέσκου χυμού πορτοκαλιού της ποικιλίας Μέρλιν, σε σχέση με τη μεμονωμένη χρήση των συμβατικών φυσικοχημικών παραμέτρων (ποσοστό ορθής πρόβλεψης 54,5%) ή των φλαβονοειδών (ποσοστό ορθής πρόβλεψης 56,8%) ή των πτητικών ενώσεων (ποσοστό ορθής πρόβλεψης 75%).

Οι διαχωριστικές συναρτήσεις που δημιουργήθηκαν έδωσαν υψηλότερη ιδιοτιμή και ως εκ τούτου υψηλότερο ποσοστό διαχωρισμού (ποσοστό ορθής πρόβλεψης 88,6%). Προτείνεται λοιπόν η συνδυαστική χρήση πολλαπλών παραμέτρων για την επισημάνση της γεωγραφικής ένδειξης του φρέσκου πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν, όπως έχει δείξει η πρόσφατη βιβλιογραφία που ασχολείται με την ανάδειξη της ταυτότητας διαφόρων εθνικών προϊόντων (Karabagias et al., 2014; Kosma et al., 2016; Nikolaou et al., 2017; Gatzias et al., 2018).

2. Διαφοροποίηση της βοτανικής προέλευσης του πορτοκαλοχυμού

2.1 Συμβατικές φυσικοχημικές παράμετροι φρέσκου πορτοκαλοχυμού σύμφωνα με τη βοτανική του προέλευση

Στον Πίνακα 12 δίνονται οι μέσες τιμές $\pm$ τυπική απόκλιση των συμβατικών φυσικοχημικών παραμέτρων του φρέσκου πορτοκαλοχυμού από διαφορετικές ποικιλίες.

Πίνακας 12. Συμβατικές φυσικοχημικές παράμετροι φρέσκου πορτοκαλοχυμού από διαφορετικές ποικιλίες.

Ποικιλία	Ηλεκτρική αγωγιμότητα (mS/cm)	Ολικά διαλυμένα στερεά (mg/L)	pH	Οξύτητα (g/L)
Κοινό Χίου 1	2,72	1365	3,40	15,84
Κοινό Χίου 2	2,23	1112	3,41	15,89
Κοινό Χίου 3	1,86	655	3,16	19,68
Κοινό Χίου 4	2,45	1227	3,38	8,93
Κοινό Χίου 5	3,23	1620	3,46	11,18
Κοινό Χίου 6	2,67	1342	3,44	10,42
Κοινό Χίου 7	3,28	1646	3,43	11,33
Κοινό Χίου 8	2,89	1432	3,50	8,26
Μέση τιμή $\pm$Τυπική απόκλιση (N=8)	2,67 ^a 0,48	1300 ^b 317	3,40 ^a 0,10	12,69 ^b 4,00
Γιάφα 1	1,63	812	3,44	5,86
Γιάφα 2	1,59	805	3,31	6,86
Γιάφα 3	2,03	1019	3,28	8,88
Γιάφα 4	1,68	837	3,23	9,60
Γιάφα 5	1,88	940	3,32	7,49
Γιάφα 6	2,46	1227	3,48	7,39
Γιάφα 7	2,08	1042	3,28	8,66
Γιάφα 8	1,91	980	3,25	11,26
Μέση τιμή $\pm$Τυπική απόκλιση (N=8)	1,91 ^{a,b} 0,29	958 ^{a,b} 143	3,32 ^a 0,09	8,25 ^a 1,71
Κοινό Ρόδου 1	1,06	529	3,30	9,05
Κοινό Ρόδου 2	1,17	584	5,53	0,58

Κοινό Ρόδου 3	1,18	584	3,06	8,90
Κοινό Ρόδου 4	1,26	626	3,21	7,49
Κοινό Ρόδου 5	1,16	576	3,24	11,34
Κοινό Ρόδου 6	2,45	1227	3,06	14,28
Κοινό Ρόδου 7	2,33	1170	3,42	7,44
Κοινό Ρόδου 8	2,76	1384	3,15	9,29
Μέση τιμή ±Τυπική απόκλιση (N=8)	1,67 ^a 0,71	835 ^a 358	3,50 ^a 0,83	8,55 ^a 3,92
Κοινό Άρτας 1	1,92	956	3,14	10,13
Κοινό Άρτας 2	1,98	994	3,27	9,89
Κοινό Άρτας 3	1,96	981	3,35	8,26
Κοινό Άρτας 4	2,04	1013	3,23	9,46
Κοινό Άρτας 5	3,13	1566	3,51	7,63
Κοινό Άρτας 6	2,21	1115	3,54	7,78
Κοινό Άρτας 7	2,93	1464	3,85	5,52
Κοινό Άρτας 8	2,05	1023	3,50	6,43
Μέση τιμή ±Τυπική απόκλιση (N=8)	2,28 ^{a,b} 0,48	1139 ^{a,b} 238	3,42 ^a 0,22	8,14 ^a 1,64
Βαλέντσια 1	2,44	1221	3,75	6,86
Βαλέντσια 2	1,64	821	3,49	6,72
Βαλέντσια 3	2,08	1032	3,64	6,05
Βαλέντσια 4	2,16	1080	3,69	5,38
Βαλέντσια 5	3,45	1723	3,94	4,66
Βαλέντσια 6	3,15	1376	3,88	5,11
Βαλέντσια 7	2,44	1221	3,72	5,59
Βαλέντσια 8	2,37	1179	3,68	5,21
Μέση τιμή ±Τυπική απόκλιση (N=8)	2,47 ^b 0,58	1207 ^{a,b} 265	3,72 ^a 0,14	5,70 ^a 0,78
Ναβαλίνα 1	1,72	863	3,83	8,18
Ναβαλίνα 2	2,51	1253	3,75	5,57
Ναβαλίνα 3	1,64	818	3,74	10,66
Ναβαλίνα 4	1,86	911	3,85	11,47
Ναβαλίνα 5	2,07	1029	3,75	4,85
Ναβαλίνα 6	1,90	946	3,54	5,62

Ναβαλίνα 7	2,21	1106	4,00	4,13
Ναβαλίνα 8	2,14	1074	3,57	5,76
	2,01 ^{a,b}	1000 ^{a,b}	3,75 ^a	7,03 ^a
Μέση τιμή ±Τυπική απόκλιση (N=8)	0,28	144	0,15	2,76
Μέρλιν 1	1,36	679	3,58	4,32
Μέρλιν 2	1,36	674	3,34	5,76
Μέρλιν 3	1,64	818	3,48	6,96
Μέρλιν 4	1,96	968	3,34	7,73
Μέρλιν 5	2,05	1007	3,32	9,22
Μέρλιν 6	2,60	1298	3,39	6,82
Μέρλιν 7	2,89	1432	3,47	2,69
Μέρλιν 8	1,24	614	3,26	7,58
Μέση τιμή ±Τυπική απόκλιση (N=8)	1,89 ^{a,b}	936 ^{a,b}	3,40 ^a	6,38 ^a
	0,61	301	0,10	2,07

a,b... διαφορετικοί εκθέτες σε κάθε στήλη δηλώνουν ότι υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (p<0.05), N: Αριθμός δειγμάτων.

Πιο συγκεκριμένα, η ηλεκτρική αγωγιμότητα κυμάνθηκε μεταξύ 1,67±0,71 mS/cm (δείγματα της ποικιλίας Κοινό Ρόδου) και 2,67±0,48 mS/cm (δείγματα της ποικιλίας Κοινό Χίου). Αντίστοιχα, τα ολικά διαλυμένα στερεά κυμάνθηκαν από 835±358 mg/L (δείγματα της ποικιλίας Κοινό Ρόδου) έως 1300±317 mg/L (δείγματα της ποικιλίας Κοινό Χίου). Ακολουθώς, το pH κυμάνθηκε μεταξύ 3,32±0,09 (δείγματα της ποικιλίας Γιάφα) έως 3,75±0,15 (δείγματα της ποικιλίας Ναβαλίνα). Τέλος, η οξύτητα κυμάνθηκε μεταξύ 5,70±0,78 g/L (δείγματα της ποικιλίας Βαλέντσια) έως 12,69±4,00 g/L (δείγματα της ποικιλίας Κοινό Χίου). Ο πιο “όξιнос” πορτοκαλοχυμός ήταν αυτός της ποικιλίας Κοινό Χίου, ενώ ο λιγότερο “όξιнос” εκείνος της ποικιλίας Βαλέντσια.

Είναι χαρακτηριστικό, ότι 3 από τις 4 συμβατικές φυσικοχημικές παραμέτρους μεταβλήθηκαν στατιστικά σημαντικά (p<0,05) σύμφωνα με τη βοτανική προέλευση του φρέσκου πορτοκαλοχυμού (Ενότητα 2.2).

Σε μια προηγούμενη μελέτη με στόχο την ανάδειξη των ισοτοπικών και χημικών δεικτών πορτοκαλιών από τις ποικιλίες Tarocco και Navelina καλλιεργούμενες είτε συμβατικά είτε βιολογικά στις περιοχές της Σικελίας και Καλαβρίας για μια περίοδο

2 ετών, οι Camin et al. (2011) ανέφεραν ότι το pH κυμάνθηκε από $3,6\pm 0,1$ για την ποικιλία Tarocco εσοδείας 2006 (συμβατική και βιολογική καλλιέργεια). Οι αντίστοιχες τιμές για την εσοδεία 2007 ήταν $3,5\pm 0,2$ για την βιολογική καλλιέργεια και $3,4\pm 0,2$ για τη συμβατική καλλιέργεια. Οι τιμές αυτές βρίσκονται σε συμφωνία με τα παρόντα αποτελέσματα και ιδιαίτερα με εκείνα των ποικιλιών Κοινό Χίου, Γιάφα και Μέρλιν.

Ακολούθως, οι αντίστοιχες τιμές για την οξύτητα (% κιτρικό οξύ) της ποικιλίας Tarocco εσοδείας 2006 (συμβατική και βιολογική καλλιέργεια) ήταν $1,2\pm 0,2$ (ή $12\pm 2\%$). Οι αντίστοιχες τιμές για την εσοδεία 2007 ήταν $12\pm 2\%$ για την βιολογική καλλιέργεια και $13\pm 2\%$ για τη συμβατική καλλιέργεια (Camin et al., 2011). Οι τιμές αυτές είναι υψηλότερες από τις ποικιλίες που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία. Μπορούμε να πούμε όμως ότι βρίσκονται σε γενική συμφωνία με τα αποτελέσματα που αφορούν την ποικιλία Κοινό Χίου.

Επιπροσθέτως, το pH κυμάνθηκε από $3,4\pm 0,3$ για την ποικιλία Navelina εσοδείας 2007 (συμβατική και βιολογική καλλιέργεια). Οι τιμές αυτές είναι χαμηλότερες σε σχέση με τα παρόντα αποτελέσματα που αφορούν την ποικιλία Ναβαλίνα και βρίσκονται πιο κοντά στην ποικιλία Μέρλιν. Οι αντίστοιχες τιμές για την οξύτητα ήταν $13\pm 3\%$ (Camin et al., 2011). Οι τιμές αυτές βρίσκονται σε μερική συμφωνία με τα παρόντα αποτελέσματα. Μπορούμε να πούμε ότι βρίσκονται σε γενική συμφωνία με τα αποτελέσματα οξύτητας της ποικιλίας Κοινό Χίου.

Φρεσκοστυμμένος πορτοκαλοχυμός της ποικιλίας Navelina από διαφορετικές περιοχές της Ισπανίας είχε επίπεδα κιτρικού οξέος μεταξύ 9,52-14,02 g/L (Saavedra et al., 2001). Οι τιμές αυτές είναι γενικά υψηλότερες από τις αντίστοιχες της παρούσας εργασίας (Πίνακας 12). Τα επίπεδα κιτρικού οξέος στην ποικιλία *Citrus aurantium* (ξινή ποικιλία) από την περιοχή Antalya της Τουρκίας ήταν αρκετά υψηλότερες (μέση τιμή ίση με 48.79 g/L) (Karadeniz, 2004) από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας.

Οι Kelebek et al. (2009) ανέφεραν ότι τα επίπεδα (μέση τιμή) του κιτρικού οξέος στην Τούρκικη ποικιλία Kozan ήταν 12,66 g/L. Η τιμή αυτή βρίσκεται σε άριστη συμφωνία με τα αποτελέσματα της μέσης τιμής οξύτητας της ποικιλίας Κοινό Χίου. Τέλος, οι Nour et al. (2010) ανέφεραν ως μέση τιμή κιτρικού οξέος τα 13,92 g/L για πορτοκαλοχυμό παρασκευασμένο από τη γλυκιά ποικιλία (*Citrus sinensis*) στην

περιοχή της Ρουμανίας. Η τιμή αυτή είναι υψηλότερη από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας.

Τέλος, είναι χαρακτηριστικό, ότι οι παραπάνω έρευνες δεν ανέφεραν μετρήσεις που αφορούν την ηλεκτρική αγωγιμότητα και τα ολικά διαλυμένα στερεά και από όσο γνωρίζουμε δεν υπάρχει κάποια αντίστοιχη εργασία στη βιβλιογραφία.

2.2 Διαφοροποίηση της βοτανικής προέλευσης φρέσκου πορτοκαλοχυμού με βάση τις συμβατικές φυσικοχημικές παραμέτρους

Στην αρχή της στατιστικής επεξεργασίας των δεδομένων πραγματοποιήθηκε πολυπαραμετρική ανάλυση διακύμανσης (MANOVA) προκειμένου να καθοριστούν οι συμβατικές φυσικοχημικές παράμετροι που είναι σημαντικές στη διάκριση των δειγμάτων πορτοκαλοχυμού σύμφωνα με τη βοτανική τους προέλευση. Ως εξαρτημένες μεταβλητές χρησιμοποιήθηκαν οι 7 ποικιλίες φρέσκου πορτοκαλοχυμού ήτοι Κοινό Χίου (Koino Chiou), Γιάφα (Yafa), Κοινό Ρόδου (Koino Rhodes), Κοινό Άρτας (Koino Artas), Βαλέντσια (Valencia), Ναβαλίνα (Navalina), Μέρλιν (Merlin), και το σύνολο των συμβατικών φυσικοχημικών παραμέτρων όπως ηλεκτρική αγωγιμότητα, ολικά διαλυμένα στερεά, pH και οξύτητα, ως οι ανεξάρτητες μεταβλητές.

Η ανάλυση είναι σημαντική, όπως φανερώνουν οι δείκτες Pillai's Trace=1,027 ($F=2,821$, $p=0.000<0.05$) και Wilks' Lambda=0,257 ($F=3,212$, $p=0.000<0.05$), γεγονός που καταδεικνύει ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική πολυπαραμετρική επίδραση στην των συμβατικών φυσικοχημικών παραμέτρων στην ποικιλία του φρέσκου πορτοκαλοχυμού. Οι συμβατικές φυσικοχημικές παράμετροι που βρέθηκαν σημαντικές στον προσδιορισμό των διαφορών μεταξύ των 7 ποικιλιών πορτοκαλοχυμού στο επίπεδο σημαντικότητας 5% δίνονται στον Πίνακα 13. Ακολουθώντας στον Πίνακα 13 δίνονται οι αντίστοιχες τιμές της διαχωριστικής συνάρτησης F, οι βαθμοί ελευθερίας (df-βε) και η πιθανότητα ορθής κατάταξης (p). Θα πρέπει να κρατήσουμε κατά νου εφεξής, ότι μια σημαντική τιμή του στατιστικού Wilks' Lambda φανερώνει ότι η διαχωριστική συνάρτηση είναι βασική στο διαχωρισμό των ζητούμενων ομάδων.

Πίνακας 13. Στατιστικά σημαντικές φυσικοχημικές παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν για τη διαφοροποίηση της βοτανικής προέλευσης φρέσκου πορτοκαλοχυμού.

Συμβατικές φυσικοχημικές παράμετροι	Wilks' Lambda	F	df1	df2	p
Ηλεκτρική αγωγιμότητα	0,679	3,852	6	49	0,003
Ολικά διαλυμένα στερεά	0,721	3,159	6	49	0,011
pH*	0,805	1,981	6	49	0,086
Οξύτητα	0,582	5,872	6	49	0,000

df: βαθμοί ελευθερίας (βε). * $p > 0.05$.

2.3 Γραμμική διαχωριστική ανάλυση για τις 7 διαφορετικές ποικιλίες του φρέσκου πορτοκαλοχυμού με βάση τις 3 στατιστικά σημαντικές συμβατικές φυσικοχημικές παραμέτρους

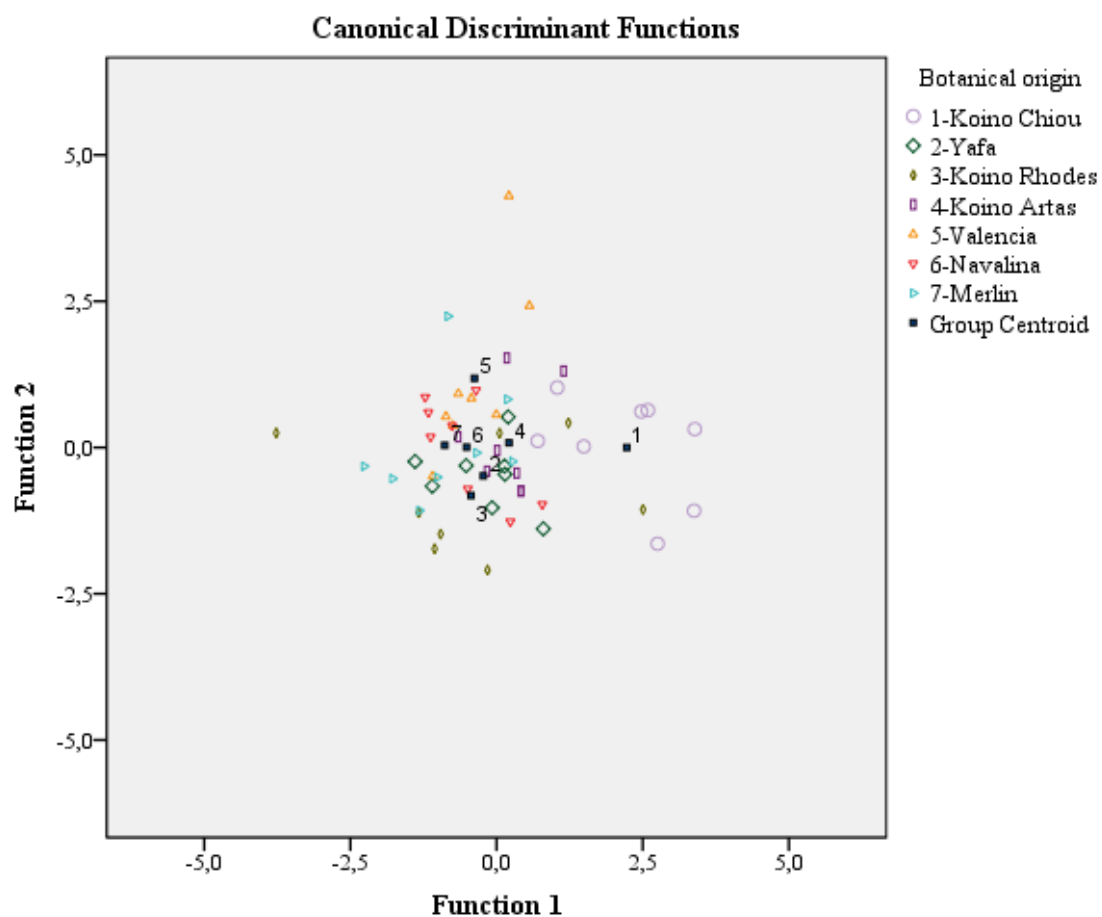
Στη συνέχεια της ανάλυσης, οι 3 σημαντικές συμβατικές φυσικοχημικές παράμετροι χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να διαπιστωθεί αν μπορούν να διαφοροποιήσουν την ποικιλία του φρέσκου πορτοκαλοχυμού. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε η γραμμική διαχωριστική ανάλυση. Και σε αυτή την περίπτωση, για τον υπολογισμό των συντελεστών-φορτίσεων στις διαχωριστικές συναρτήσεις χρησιμοποιήθηκαν οι συντελεστές Fisher, ενώ ο υπολογισμός των πιθανοτήτων σωστής κατάταξης έγινε με βάση το μέγεθος των ομάδων. Ομοίως, χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι της αντικατάστασης και της ενδοεπικύρωσης, για τον υπολογισμό των ποσοστών ορθής κατάταξης.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δημιουργούνται 3 διαχωριστικές συναρτήσεις. Ωστόσο, μόνο η 1η είναι στατιστικά σημαντική: Wilks' Lambda=0,345 με $X^2=53,171$, $\beta_e=18$ με $p=0.000 < 0.05$. Οι άλλες 2 έχουν τα εξής ποιοτικά δεδομένα: Wilks' Lambda=0,708 με $X^2=17,246$, $\beta_e=10$ με $p=0.069 > 0.05$ (2η διαχωριστική συνάρτηση) και Wilks' Lambda=0,976 με $X^2=1,211$, $\beta_e=4$ με $p=0.876 > 0.05$ (3η διαχωριστική συνάρτηση).

Μία σημαντική τιμή του στατιστικού Wilks' Lambda φανερώνει ότι η διαχωριστική συνάρτηση που δημιουργείται είναι βασική στον διαχωρισμό των ζητούμενων ομάδων. Συνεπώς, η πρώτη διαχωριστική συνάρτηση με κανονική συσχέτιση 0,716 και ιδιοτιμή 1,051 ερμηνεύει το 72,3% της συνολικής διασποράς, ενώ η δεύτερη διαχωριστική συνάρτηση με κανονική συσχέτιση 0,524 και ιδιοτιμή 0,378 ερμηνεύει το 26% της συνολικής διασποράς. Τέλος, η 3^η διαχωριστική συνάρτηση με κανονική συσχέτιση 0,155 και ιδιοτιμή 0,025 ερμηνεύει το 1,7% της συνολικής διασποράς. Όλες μαζί ερμηνεύουν το 100% της συνολικής διακύμανσης. Παρόλα αυτά, στο Σχήμα 16 μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι δεν διαφοροποιούνται επιτυχώς οι ποικιλίες του φρέσκου πορτοκαλοχυμού με βάση τις συμβατικές φυσικοχημικές παραμέτρους. Η πρώτη διαχωριστική συνάρτηση μπορούμε να πούμε, με επιφύλαξη, ότι διαχωρίζει μόνο την ποικιλία Κοινό Χίου από τις άλλες.

Στο Σχήμα 16 φαίνονται οι μέσες τιμές των κέντρων των ομάδων της 1^{ης} στατιστικά σημαντικής και της 2^{ης} μη στατιστικά σημαντικής διαχωριστικής συνάρτησης. Οι τιμές αυτές είναι: (2,227/-0,001), (-0,227/-0,485), (-0,436/-0,821), (0,213/0,080), (-0,378/1,183), (-0,513/0,005) και (-0,886,0,038) για τις ποικιλίες Κοινό Χίου, Γιάφα, Κοινό Ρόδου, Κοινό Άρτας, Βαλέντσια, Ναβαλίνα και Μέρλιν, αντίστοιχα.

Ο Πίνακας 14 δίνει τα αποτελέσματα των κατατάξεων χρησιμοποιώντας τόσο την μέθοδο της αντικατάστασης, όσο και τη μέθοδο της ενδοεπικύρωσης. Παρατηρούμε ότι μόλις το 41,1% του συνόλου των παρατηρήσεων κατατάχθηκαν σωστά, ποσοστό μη ικανοποιητικό χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της αντικατάστασης, ενώ το ποσοστό αυτό μειώνεται ακόμα περισσότερο στο πολύ φτωχό 32,1% όταν χρησιμοποιηθεί η μέθοδος της ενδοεπικύρωσης.



Σχήμα 16. Διαφοροποίηση της βοτανικής προέλευσης φρέσκου πορτοκαλοχυμού με βάση τις 3 συμβατικές φυσικοχημικές παραμέτρους και χρήση της διακριτικής ανάλυσης.

Πίνακας 14. Ποσοστά ορθής κατάταξης φρέσκου πορτοκαλοχυμού από διαφορετικές ποικιλίες με βάση τις συμβατικές φυσικοχημικές παραμέτρους.

Classification Results^{a, b, c}

Στατιστική τεχνική		Βοτανική προέλευση	Predicted Group Membership							Αριθμός δειγμάτων
			Κοινό Χίου	Γιάφα	Κοινό Ρόδου	Κοινό Άρτας	Βαλέντσια	Ναβαλίνα	Μέρλιν	
Original ^a		Κοινό Χίου	6	0	0	2	0	0	0	8
		Γιάφα	0	3	2	1	0	1	1	8
		Κοινό Ρόδου	1	0	4	2	0	0	1	8
	Count	Κοινό Άρτας	0	4	0	2	1	1	0	8
		Βαλέντσια	0	0	0	1	4	0	3	8
		Ναβαλίνα	0	1	2	0	2	1	2	8
		Μέρλιν	0	0	1	2	1	1	3	8
		Κοινό Χίου	75,0	,0	,0	25,0	,0	,0	,0	100,0
		Γιάφα	,0	37,5	25,0	12,5	,0	12,5	12,5	100,0
		Κοινό Ρόδου	12,5	,0	50,0	25,0	,0	,0	12,5	100,0
	%	Κοινό Άρτας	,0	50,0	,0	25,0	12,5	12,5	,0	100,0
		Βαλέντσια	,0	,0	,0	12,5	50,0	,0	37,5	100,0
		Ναβαλίνα	,0	12,5	25,0	,0	25,0	12,5	25,0	100,0
		Μέρλιν	,0	,0	12,5	25,0	12,5	12,5	37,5	100,0
Cross- validated ^{b,c}		Κοινό Χίου	5	0	0	2	1	0	0	8
		Γιάφα	0	1	3	2	0	1	1	8
		Κοινό Ρόδου	1	0	4	2	0	0	1	8
	Count	Κοινό Άρτας	0	4	0	1	2	1	0	8
		Βαλέντσια	0	0	0	1	4	0	3	8
		Ναβαλίνα	0	1	2	0	2	0	3	8
		Μέρλιν	0	0	1	2	1	1	3	8
		Κοινό Χίου	62,5	,0	,0	25,0	12,5	,0	,0	100,0
		Γιάφα	,0	12,5	37,5	25,0	,0	12,5	12,5	100,0
		Κοινό Ρόδου	12,5	,0	50,0	25,0	,0	,0	12,5	100,0
	%	Κοινό Άρτας	,0	50,0	,0	12,5	25,0	12,5	,0	100,0
		Βαλέντσια	,0	,0	,0	12,5	50,0	,0	37,5	100,0
		Ναβαλίνα	,0	12,5	25,0	,0	25,0	,0	37,5	100,0
		Μέρλιν	,0	,0	12,5	25,0	12,5	12,5	37,5	100,0

^a 41,1% of original grouped cases correctly classified.

^b Cross validation is done only for those cases in the analysis. In cross validation, each case is classified by the functions derived from all cases other than that case.

^c 32,1% of cross-validated grouped cases correctly classified.

Παρατηρούμε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό ορθής κατάταξης παρουσιάζουν τα δείγματα χυμού της ποικιλίας Κοινό Χίου (67,5%) και στη συνέχεια ακολουθούν

εκείνα των ποικιλιών Κοινό Ρόδου και Βαλέντσια (50%). Τα δείγματα χυμού από τις ποικιλίες Γιάφα, Κοινό Άρτας, Ναβαλίνα και Μέρλιν δεν κατατάχθηκαν σωστά (ποσοστά ορθής κατάταξης 12,5%, 12,5%, 0% και 37,5% αντίστοιχα).

Το συνολικό ποσοστό ορθής κατάταξης (32,1%) θεωρείται πολύ χαμηλό. Συνεπώς, οι συμβατικές φυσικοχημικές παράμετροι που μελετήθηκαν δεν μπόρεσαν να δώσουν αξιόπιστα αποτελέσματα όσον αφορά τη διαφοροποίηση του φρέσκου πορτοκαλοχυμού σύμφωνα με τη βοτανική του προέλευση. Ωστόσο, μπορούν να αποτελέσουν ποιοτικούς δείκτες για μελλοντικές έρευνες.

2.4 Φλαβονοειδή φρέσκου πορτοκαλοχυμού σύμφωνα με τη βοτανική του προέλευση

Στον Πίνακα 15 δίνονται οι μέσες τιμές $\pm$ τυπική απόκλιση των φλαβονοειδών των δειγμάτων του φρέσκου πορτοκαλοχυμού από διαφορετικές ποικιλίες.

Πίνακας 15. Περιεκτικότητα 5 φλαβονοειδών (mg/L) φρέσκου πορτοκαλοχυμού από διαφορετικές ποικιλίες.

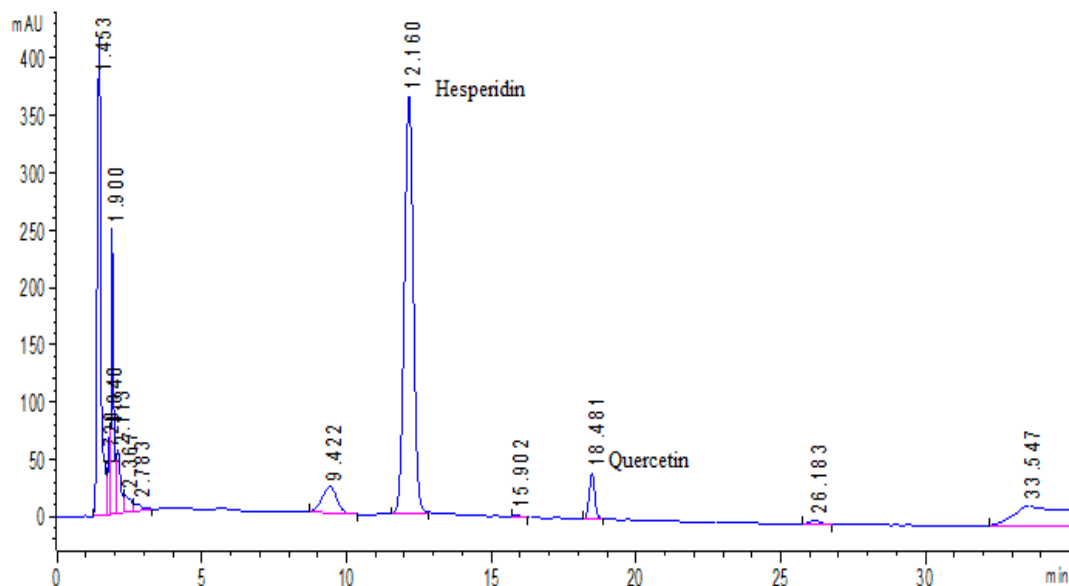
Δείγμα	Ναριγκίνη (mg/L)	Εσπεριδίνη (mg/L)	Νεοεσπεριδίνη (mg/L)	Κερκετίνη (mg/L)	Ναριγκενίνη (mg/L)
Κοινό Χίου 1	δπ	91,96	δπ	8,24	δπ
Κοινό Χίου 2	δπ	107,81	δπ	8,83	δπ
Κοινό Χίου 3	δπ	155,68	δπ	10,73	δπ
Κοινό Χίου 4	δπ	136,73	δπ	7,95	δπ
Κοινό Χίου 5	δπ	283,55	δπ	11,65	δπ
Κοινό Χίου 6	δπ	272,29	δπ	13,07	δπ
Κοινό Χίου 7	δπ	220,13	δπ	11,03	δπ
Κοινό Χίου 8	δπ	226,48	δπ	12,84	δπ
Μέση τιμή	δπ	186,83 ^{a,b}	δπ ^a	10,54 ^{b,c}	δπ ^a
$\pm$Τυπική	δπ	73,74	δπ	2,00	δπ
απόκλιση (N=8)					
Γιάφα 1	δπ	529,66	6,97	19,30	0,21
Γιάφα 2	δπ	491,84	5,06	20,39	0,28
Γιάφα 3	δπ	430,64	6,91	19,79	0,28
Γιάφα 4	δπ	285,51	4,04	12,23	δπ
Γιάφα 5	δπ	360,99	5,66	16,79	0,33
Γιάφα 6	δπ	476,09	5,93	19,01	0,65

Γιάφα 7	δπ	474,26	6,78	11,90	0,27
Γιάφα 8	δπ	433,22	6,16	17,57	0,15
Μέση τιμή	δπ	435,28 ^c	5,94 ^c	17,13 ^d	0,27 ^b
±Τυπική απόκλιση (N=8)	δπ	78,62	1,01	3,33	0,19
Κοινό Ρόδου 1	δπ	217,61	δπ	10,89	δπ
Κοινό Ρόδου 2	δπ	279,56	5,27	17,18	0,68
Κοινό Ρόδου 3	δπ	228,41	8,29	11,28	δπ
Κοινό Ρόδου 4	δπ	207,65	2,95	10,44	δπ
Κοινό Ρόδου 5	δπ	211,69	4,24	9,19	δπ
Κοινό Ρόδου 6	δπ	286,85	δπ	15,91	δπ
Κοινό Ρόδου 7	δπ	323,84	2,55	16,00	0,27
Κοινό Ρόδου 8	δπ	283,36	1,81	14,482	0,18
Μέση τιμή	δπ	254,87 ^b	3,14 ^b	13,17 ^{c,d}	0,14 ^{a,b}
±Τυπική απόκλιση (N=8)	δπ	43,72	2,78	3,06	0,24
Κοινό Άρτας 1	δπ	145,62	2,78	7,77	δπ
Κοινό Άρτας 2	δπ	118,46	3,14	7,52	δπ
Κοινό Άρτας 3	δπ	130,37	δπ	10,01	δπ
Κοινό Άρτας 4	δπ	89,75	δπ	6,46	δπ
Κοινό Άρτας 5	δπ	171,89	δπ	7,38	δπ
Κοινό Άρτας 6	δπ	180,19	δπ	8,20	δπ
Κοινό Άρτας 7	δπ	168,04	δπ	6,17	δπ
Κοινό Άρτας 8	δπ	138,56	δπ	6,56	δπ
Μέση τιμή	δπ	142,86 ^a	0,74 ^a	7,51 ^{a,b}	δπ ^a
±Τυπική απόκλιση (N=8)	δπ	30,40	1,37	1,23	δπ
Βαλέντσια 1	δπ	228,15	δπ	9,45	δπ
Βαλέντσια 2	δπ	104,73	δπ	3,87	δπ
Βαλέντσια 3	δπ	83,39	δπ	3,06	δπ
Βαλέντσια 4	δπ	231,76	δπ	4,33	δπ
Βαλέντσια 5	δπ	208,99	δπ	9,46	δπ
Βαλέντσια 6	δπ	84,75	δπ	4,26	δπ
Βαλέντσια 7	δπ	200,58	δπ	7,87	δπ
Βαλέντσια 8	δπ	156,45	δπ	5,78	δπ
Μέση τιμή	δπ	162,35 ^{a,b}	δπ ^a	6,01 ^a	δπ ^a
±Τυπική	δπ	63,69	δπ	2,58	δπ

απόκλιση (N=8)					
Ναβαλίνα 1	δπ	128,48	δπ	10,47	δπ
Ναβαλίνα 2	δπ	178,99	δπ	9,21	δπ
Ναβαλίνα 3	δπ	98,96	δπ	7,66	δπ
Ναβαλίνα 4	δπ	114,91	δπ	9,94	δπ
Ναβαλίνα 5	δπ	145,53	δπ	7,03	δπ
Ναβαλίνα 6	δπ	188,48	δπ	9,67	δπ
Ναβαλίνα 7	δπ	145,89	δπ	5,36	δπ
Ναβαλίνα 8	δπ	363,36	δπ	20,60	δπ
Μέση τιμή	δπ	170,58 ^{a,b}	δπ ^a	9,99 ^{a,b,c}	δπ ^a
±Τυπική απόκλιση (N=8)	δπ	83,49	δπ	4,61	δπ
Μέρλιν 1	δπ	99,26	δπ	6,22	δπ
Μέρλιν 2	δπ	134,19	δπ	6,98	δπ
Μέρλιν 3	δπ	96,38	δπ	5,53	δπ
Μέρλιν 4	δπ	113,94	δπ	8,60	δπ
Μέρλιν 5	δπ	94,67	δπ	6,58	δπ
Μέρλιν 6	δπ	141,66	δπ	8,46	δπ
Μέρλιν 7	δπ	116,10	δπ	5,34	δπ
Μέρλιν 8	δπ	187,48	δπ	7,10	δπ
Μέση τιμή	δπ	122,96 ^a	δπ ^a	6,85 ^{a,b}	δπ ^a
±Τυπική απόκλιση (N=8)	δπ	31,25	δπ	1,21	δπ

a,b,c... διαφορετικοί εκθέτες σε κάθε στήλη δηλώνουν ότι υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$), δπ: δεν προσδιορίστηκε. N: αριθμός δειγμάτων.

Είναι χαρακτηριστικό ότι σε όλες τις ποικιλίες φρέσκου πορτοκαλοχυμού που εξετάστηκαν δεν προσδιορίστηκε η ναριγκίνη, ενώ η νεοεσπεριδίνη και η ναριγκενίνη προσδιορίστηκαν σε μικρές ποσότητες ($1,40 \pm 2,45$ και $0,06 \pm 0,15$ mg/L, αντίστοιχα). Στο Σχήμα 17 φαίνεται ένα τυπικό χρωματογράφημα πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Γιάφα.



Σχήμα 17. Τυπικό χρωματογράφημα φρέσκου πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Γιάφα με επισημασμένα τα δύο φλαβονοειδή με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση που χρησιμοποιούνται ως δείκτες της βοτανικής προέλευσης.

Η εσπεριδίνη και η κερκετίνη ήταν οι κυρίαρχες ενώσεις και προσδιορίστηκαν σε όλα τα δείγματα. Τα δείγματα πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Γιάφα εμφάνισαν τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα (mg/L) σε εσπεριδίνη ($435,28 \pm 78,62$ mg/L) ακολουθούμενα από εκείνα των ποικιλιών Κοινό Ρόδου ($254,87 \pm 43,72$ mg/L), Κοινό Χίου ($186,83 \pm 73,74$ mg/L), Ναβαλίνα ($170,58 \pm 83,49$ mg/L), Βαλέντσια ($162,35 \pm 63,69$ mg/L), Κοινό Άρτας ($142,86 \pm 30,40$ mg/L) και Μέρλιν ($122,96 \pm 31,25$ mg/L).

Αντίστοιχα, τα δείγματα πορτοκαλοχυμού που εμφάνισαν τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα (mg/L) σε κερκετίνη ήταν αυτά της ποικιλίας Γιάφα ($17,13 \pm 3,33$) ακολουθούμενα από εκείνα των ποικιλιών Κοινό Ρόδου ($13,17 \pm 3,06$ mg/L), Κοινό Χίου ($10,54 \pm 2,00$ mg/L), Ναβαλίνα ($9,99 \pm 4,61$ mg/L), Κοινό Άρτας ($7,51 \pm 1,23$ mg/L), Μέρλιν ($6,85 \pm 1,21$ mg/L) και Βαλέντσια ($6,01 \pm 2,58$ mg/L).

Σε μια παρόμοια μελέτη του φαινολικού περιεχομένου 6 ποικιλιών πορτοκαλοχυμού (Pera, Natal, Valência, Hamlin, Baia και Lima) από την Βραζιλία η περιεκτικότητα σε εσπεριδίνη στα δείγματα πορτοκαλοχυμού μεταβλήθηκε στατιστικά σημαντικά ($p < 0,05$) σύμφωνα με τη βοτανική προέλευση του πορτοκαλοχυμού, σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας. Πιο συγκεκριμένα, το εύρος τιμών (mg/L) είχε ως εξής: Pera 133-399 mg/L, Natal 104-295 mg/L, Valência 194-321 mg/L, Hamlin 253-537 mg/L, Baia 265-427 mg/L, και

Lima 111-223 mg/L (Pupin et al., 1998). Οι τιμές αυτές βρίσκονται σε γενική συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας.

Οι Belajona και Suhaj (2004) μελέτησαν εμπορικά δείγματα πορτοκαλοχυμού από την περιοχή της Σλοβακίας και ανέφεραν τιμές ναριγκίνης, εσπεριδίνης, νεοεσπεριδίνης και κερκετίνης οι οποίες κυμάνθηκαν ως εξής: $2,40 \pm 2,50$ - $7,00 \pm 5,73$ mg/L, $44,5 \pm 2,11$ - $56,10 \pm 2,97$ mg/L, $5,30 \pm 6,56$ - $11,50 \pm 6,35$ mg/L, $5,30 \pm 3,25$ - $7,10 \pm 3,28$, αντίστοιχα. Οι τιμές περιεκτικότητας της εσπεριδίνης είναι σαφώς χαμηλότερες από τις αντίστοιχες της παρούσας έρευνας, ωστόσο, οι τιμές περιεκτικότητας της κερκετίνης βρίσκονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα μας.

Σε μια πιο εκτεταμένη μελέτη του φαινολικού περιεχομένου 8 ποικιλιών πορτοκαλοχυμού (Salustiana, Hamlin, Shamouti (Jaffa), Pera, Valencia, Maltaise, Sanguinelli, και Cara-cara) από την περιοχή της Μεσογείου η περιεκτικότητα σε εσπεριδίνη στα δείγματα πορτοκαλοχυμού μεταβλήθηκε στατιστικά σημαντικά ($p < 0,05$) σύμφωνα με τη βοτανική προέλευση του πορτοκαλοχυμού. Πιο συγκεκριμένα, οι μέσες τιμές $\pm$ τυπική απόκλιση της εσπεριδίνης ήταν: Salustiana 373 ± 1 mg/L, Hamlin 317 ± 5 mg/L, Maltaise 400 ± 1 mg/L, Shamouti 552 ± 3 mg/L, Sanguinelli 537 ± 6 mg/L, Valencia 257 ± 3 mg/L, Pera 502 ± 3 mg/L, και Cara-cara 363 ± 4 mg/L (Dhuique-Mayer et al., 2005). Οι τιμές αυτές είναι γενικά υψηλότερες από τις αντίστοιχες της παρούσας έρευνας.

Οι Theodoridis et al. (2006) μελέτησαν το φαινολικό περιεχόμενο φρέσκου πορτοκαλοχυμού από γλυκιές ποικιλίες και ανέφεραν τιμές περιεκτικότητας σε ναριγκίνη μεταξύ $69,41 \pm 7,64$ - $75,36 \pm 8,30$ mg/kg. Επιπροσθέτως, η κερκετίνη βρέθηκε σε τιμές κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου. Οι τιμές της ναριγκίνης είναι πολύ υψηλότερες από τις αντίστοιχες της παρούσας μελέτης.

Οι Cano et al. (2008) μελέτησαν διαφορετικές ποικιλίες Navel (Fukumoto, Lanelate, Navelate, Navelina, Navel Foyos, Newhall και Powell), κοινά πορτοκάλια (Salustiana και Valencia Late) και αιματόχρωμα (Sanguinelli) από την περιοχή Βαλένθια της Ισπανίας και ανέφεραν τις εξής τιμές (μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση) (mg/kg) για τα επίπεδα εσπεριδίνης: Fukumoto 666 ± 20 mg/kg, Lanelate 609 ± 7 mg/kg, Navelate 648 ± 3 mg/kg, Navelina 758 ± 14 mg/kg, Navel Foyos 693 ± 27 mg/kg, Newhall 1047 ± 55 mg/kg, και Powell 747 ± 46 mg/kg. Τα επίπεδα εσπεριδίνης στα δείγματα του κοινού πορτοκαλοχυμού ήταν: Salustiana 732 ± 11 mg/kg και Valencialate 577 ± 19 mg/kg. Η περιεκτικότητα σε εσπεριδίνη στα αιματόχρωμα δείγματα πορτοκαλοχυμού ήταν της τάξης των 481 ± 18 mg/kg. Σε όλες τις

περιπτώσεις οι τιμές σε εσπεριδίνη που ανέφεραν οι Cano et al. (2008) για τις μελετηθείσες ποικιλίες πορτοκαλοχυμού, ήταν υψηλότερες σε σχέση με τα αποτελέσματα τις παρούσας έρευνας.

Όπως στην περίπτωση των συμβατικών φυσικοχημικών παραμέτρων, έτσι και στη περίπτωση των φλαβονοειδών υπάρχουν περιορισμένα δεδομένα, σε Πανελλαδικό επίπεδο (Theodoridis et al., 2006), από ερευνητικές εργασίες που μελετούν εγχώριες ποικιλίες πορτοκαλιών/πορτοκαλοχυμού ή και ασχολούνται με την ταυτόχρονη μελέτη των ποικιλιών πορτοκαλοχυμού της παρούσας εργασίας.

2.5 Διαφοροποίηση της βοτανικής προέλευσης φρέσκου πορτοκαλοχυμού με βάση τα φλαβονοειδή

Σε μια δεύτερη προσπάθεια διαφοροποίησης της βοτανικής προέλευσης του φρέσκου πορτοκαλοχυμού, ως εξαρτημένες μεταβλητές χρησιμοποιήθηκαν οι 7 ποικιλίες πορτοκαλοχυμού και το σύνολο των φλαβονοειδών όπως ναριγκίνη (naringin), εσπεριδίνη (hesperidin), νεοεσπεριδίνη (neoesperidin), κερκετίνη (quercetin) και ναριγκενίνη (naringenin), ως οι ανεξάρτητες μεταβλητές.

Η ανάλυση είναι σημαντική, όπως φανερώνουν οι δείκτες Pillai's Trace=1,355 ($F=4,186$, $p=0.000<0.05$) και Wilks' Lambda=0,078 ($F=7,259$, $p=0.000<0.05$), γεγονός που καταδεικνύει ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική πολυπαραμετρική επίδραση των φαινολικών συστατικών, στην ποικιλία του φρέσκου πορτοκαλοχυμού. Οι φαινολικές ενώσεις που βρέθηκαν σημαντικές στον προσδιορισμό των διαφορών μεταξύ των 7 ποικιλιών πορτοκαλοχυμού, στο επίπεδο σημαντικότητας 5%, δίνονται στον ακόλουθο πίνακα. Επίσης, στον Πίνακα 16 παρουσιάζονται οι αντίστοιχες τιμές της διαχωριστικής συνάρτησης F, οι βαθμοί ελευθερίας (df, βε) και η πιθανότητα ορθής κατάταξης (p).

Πίνακας 16. Στατιστικά σημαντικά φλαβονοειδή που χρησιμοποιήθηκαν για τη διαφοροποίηση της βοτανικής προέλευσης φρέσκου πορτοκαλοχυμού από διαφορετικές ποικιλίες.

Φαινολικές ενώσεις	Wilks' Lambda	F	df1	df2	p
Ναριγκίνη	. ^a				
Εσπεριδίνη	0,251	24,412	6	49	0,000
Νεοεσπεριδίνη	0,226	27,953	6	49	0,000
Κερκετίνη	0,343	15,669	6	49	0,000

Ναριγκενίνη	0,540	6,962	6	49	0,000
-------------	-------	-------	---	----	-------

a. Δεν χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση λόγω σταθερής τιμής σε όλο τον πληθυσμό των δειγμάτων (μηδενική τιμή) (Cannot be computed because this variable is a constant).

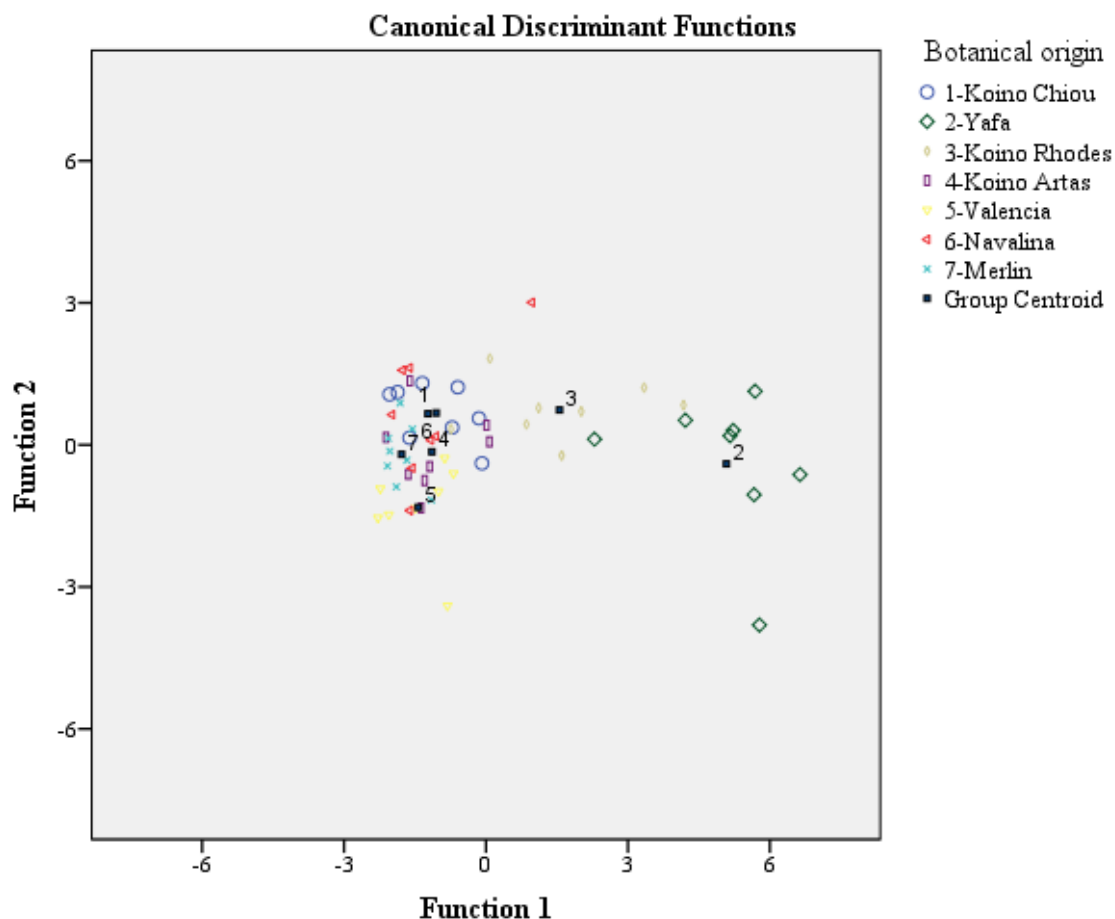
2.6. Γραμμική διαχωριστική ανάλυση για τις 7 διαφορετικές ποικιλίες του φρέσκου πορτοκαλοχυμού με βάση τα στατιστικά σημαντικά φλαβονοειδή

Στη συνέχεια της ανάλυσης, τα 4 σημαντικά φλαβονοειδή χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να διαπιστωθεί αν μπορούν να διαφοροποιήσουν τη βοτανική προέλευση του φρέσκου πορτοκαλοχυμού από τις 7 διαφορετικές ποικιλίες.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δημιουργούνται 4 διαχωριστικές συναρτήσεις: Wilks' Lambda=0,078 με $X^2=126,261$, $\beta=24$ με $p=0.000 < 0.05$ για την 1^η, Wilks' Lambda=0,554 με $X^2=29,208$, $\beta=15$ με $p=0.015 < 0.05$ για την 2^η, Wilks' Lambda=0,861 με $X^2=7,383$, $\beta=8$ με $p=0.496 > 0.05$ για την 3^η και Wilks' Lambda=0,992 με $X^2=0,404$, $\beta=3$ με $p=0.939 > 0.05$ για την 4^η. Όπως είναι εμφανές, μόνο 2 στατιστικά σημαντικές συναρτήσεις δημιουργήθηκαν.

Η 1^η διαχωριστική συνάρτηση με κανονική συσχέτιση 0,927 και ιδιοτιμή 6,104 ερμηνεύει το 89,5% της συνολικής διασποράς, ενώ η 2^η διαχωριστική συνάρτηση με κανονική συσχέτιση 0,597 και ιδιοτιμή 0,554 ερμηνεύει το 8,1% της συνολικής διασποράς. Ακολούθως, η 3^η διαχωριστική συνάρτηση με κανονική συσχέτιση 0,363 και ιδιοτιμή 0,151 ερμηνεύει το 2,2% της συνολικής διασποράς. Τέλος, η 4^η διαχωριστική συνάρτηση με κανονική συσχέτιση μόλις 0,09% και ιδιοτιμή 0,008 ερμηνεύει το 0,1% της συνολικής διασποράς. Όλες μαζί ερμηνεύουν το 100% της συνολικής διακύμανσης. Στο Σχήμα 18 μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι δεν διαχωρίζονται ευκρινώς οι χυμοί σύμφωνα με τη βοτανική τους προέλευση. Ωστόσο, η πρώτη διαχωριστική συνάρτηση διαχωρίζει αρκετά ικανοποιητικά την ποικιλία Γιάφα από όλες τις υπόλοιπες.

Αντίστοιχα, οι μέσες τιμές των κέντρων των ομάδων (group centroids) των 2 στατιστικά σημαντικών διαχωριστικών συναρτήσεων που αφορούν τις 7 διαφορετικές ποικιλίες που εξετάστηκαν είναι: (-1,052/0,674), (5,082/-0,402), (1,553/0,737), (-1,143/-0,147), (-1,431/-1,320), (-1,226/0,657) και (-1,784,-0,200) για τις ποικιλίες Κοινό Χίου, Γιάφα, Κοινό Ρόδου, Κοινό Άρτας, Βαλέντσια, Ναβαλίνα και Μέρλιν, αντίστοιχα.



Σχήμα 18. Διαφοροποίηση της βοτανικής προέλευσης φρέσκου πορτοκαλοχυμού με βάση τα 4 φλαβονοειδή και χρήση της διακριτικής ανάλυσης.

Ο Πίνακας 17 δίνει τα αποτελέσματα των κατατάξεων χρησιμοποιώντας τόσο την μέθοδο της αντικατάστασης, όσο και τη μέθοδο της ενδοεπικύρωσης. Παρατηρούμε ότι το 58,9% του συνόλου των παρατηρήσεων κατατάχθηκαν σωστά, ποσοστό μη ικανοποιητικό χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της αντικατάστασης, ενώ το ποσοστό αυτό μειώνεται ακόμα περισσότερο στο 44,6%, όταν χρησιμοποιηθεί η μέθοδος της ενδοεπικύρωσης, πολύ χαμηλό ποσοστό για τη συγκεκριμένη μέθοδο.

Πίνακας 17. Ποσοστά ορθής κατάταξης φρέσκου πορτοκαλοχυμού από διαφορετικές ποικιλίες με βάση τα φλαβονοειδή.

Classification Results^{a, b, c}

Στατιστική τεχνική		Βοτανική προέλευση	Predicted Group Membership							Αριθμός δειγμάτων
			Κοινό Χίου	Γιάφα	Κοινό Ρόδου	Κοινό Άρτας	Βαλέντσια	Ναβαλίνα	Μέρλιν	
Original ^a	Count	Κοινό Χίου	4	0	0	0	0	2	2	8
		Γιάφα	0	7	1	0	0	0	0	8
		Κοινό Ρόδου	2	1	5	0	0	0	0	8
		Κοινό Άρτας	0	0	0	3	2	1	2	8
		Βαλέντσια	1	0	0	0	6	0	1	8
		Ναβαλίνα	2	0	0	0	1	3	2	8
		Μέρλιν	0	0	0	0	1	2	5	8
		Κοινό Χίου	50,0	,0	,0	,0	,0	25,0	25,0	100,0
	%	Γιάφα	,0	87,5	12,5	,0	,0	,0	,0	100,0
		Κοινό Ρόδου	25,0	12,5	62,5	,0	,0	,0	,0	100,0
		Κοινό Άρτας	,0	,0	,0	37,5	25,0	12,5	25,0	100,0
		Βαλέντσια	12,5	,0	,0	,0	75,0	,0	12,5	100,0
		Ναβαλίνα	25,0	,0	,0	,0	12,5	37,5	25,0	100,0
		Μέρλιν	,0	,0	,0	,0	12,5	25,0	62,5	100,0
		Κοινό Χίου	3	0	0	0	0	3	2	8
		Γιάφα	0	7	1	0	0	0	0	8
		Κοινό Ρόδου	2	2	4	0	0	0	0	8
Cross-validated ^b	Count	Κοινό Άρτας	0	0	1	1	3	1	2	8
		Βαλέντσια	2	0	0	0	4	0	2	8
		Ναβαλίνα	3	0	1	0	1	1	2	8
		Μέρλιν	0	0	0	0	1	2	5	8
		Κοινό Χίου	37,5	,0	,0	,0	,0	37,5	25,0	100,0
		Γιάφα	,0	87,5	12,5	,0	,0	,0	,0	100,0
	%	Κοινό Ρόδου	25,0	25,0	50,0	,0	,0	,0	,0	100,0
		Κοινό Άρτας	,0	,0	12,5	12,5	37,5	12,5	25,0	100,0
		Βαλέντσια	25,0	,0	,0	,0	50,0	,0	25,0	100,0
		Ναβαλίνα	37,5	,0	12,5	,0	12,5	12,5	25,0	100,0
		Μέρλιν	,0	,0	,0	,0	12,5	25,0	62,5	100,0
		Κοινό Χίου	37,5	,0	,0	,0	,0	37,5	25,0	100,0

a. 58.9% of original grouped cases correctly classified.

b. Cross validation is done only for those cases in the analysis. In cross validation, each case is classified by the functions derived from all cases other than that case.

c. 44.6% of cross-validated grouped cases correctly classified.

Παρατηρούμε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό ορθής κατάταξης παρουσιάζουν τα δείγματα χυμού της ποικιλίας Γιάφα (87,5%) και στη συνέχεια ακολουθούν εκείνα των ποικιλιών Μέρλιν (62,5%), Κοινό Ρόδου (50%), Βαλέντσια (50%), Κοινό Χίου (37,5%), Κοινό Άρτας (12,5%) και Ναβαλίνα (12,5%).

Σαν γενικό συμπέρασμα μπορούμε να πούμε ότι τα 4 φλαβονοειδή που προσδιορίστηκαν διαφοροποιούν την ποικιλία Γιάφα από όλες τις υπόλοιπες. Ωστόσο, το συνολικό ποσοστό ορθής κατάταξης θεωρείται μη ικανοποιητικό.

2.7 Πτητικές ενώσεις φρέσκου πορτοκαλοχυμού σύμφωνα με τη βοτανική του προέλευση

Στον Πίνακα 18 δίνονται οι μέσες τιμές $\pm$ τυπική απόκλιση των πτητικών ενώσεων του φρέσκου πορτοκαλοχυμού από διαφορετικές ποικιλίες.

Πίνακας 18. Ημιοποιοτικός προσδιορισμός πτητικών ενώσεων (mg/L) φρέσκου πορτοκαλοχυμού από διαφορετικές ποικιλίες.

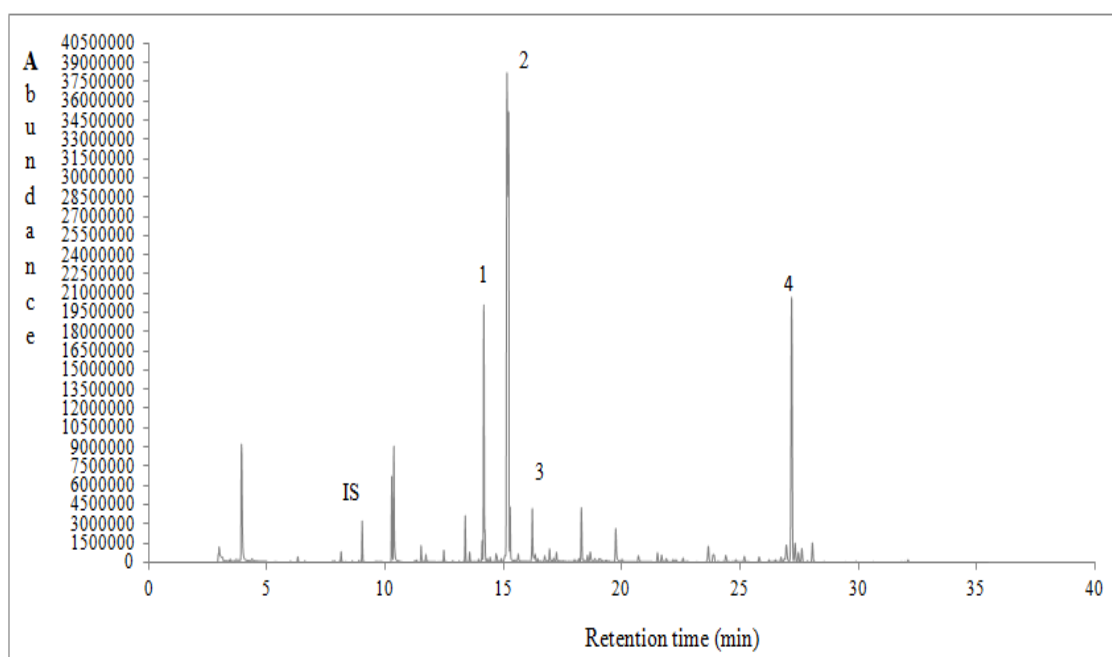
Χρόνος κατακράτησης (min)	Πτητικές ενώσεις (mg/L)	RI _{exp}	RI _{lit}	Κοινό Χίου Μέση τιμή ($\pm$ τυπική απόκλιση)	Γιάφρα Μέση τιμή ($\pm$ τυπική απόκλιση)	Κοινό Ρόδου Μέση τιμή ($\pm$ τυπική απόκλιση)	Κονό Άρτας Μέση τιμή ($\pm$ τυπική απόκλιση)	Βαλέντσια Μέση τιμή ($\pm$ τυπική απόκλιση)	Ναβαλίνα Μέση τιμή ($\pm$ τυπική απόκλιση)	Μέρλιν Μέση τιμή ($\pm$ τυπική απόκλιση)
Αλδεΐδες										
8,28	πεντανάλη	706	695	0,03(0,01)	0,08(0,02)	0,06(0,03)	0,06(0,02)	δπ	0,05(0,03)	0,04(0,02)
10,52	εξανάλη	809	804	0,38(0,10)	0,91(0,25)	0,53(0,22)	0,53(0,20)	0,28(0,23)	0,64(0,31)	0,39(0,16)
12,62	επτανάλη	911	903	0,05(0,02)	0,11(0,02)	0,05(0,03)	0,07(0,02)	0,04(0,02)	0,11(0,11)	0,09(0,04)
14,57	οκτανάλη	1014	1005	0,55(0,58)	δπ	δπ	δπ	δπ	0,42(0,57)	0,05(0,01)
16,32	εννεανάλη	1109	1106	0,16(0,18)	δπ	δπ	δπ	δπ	δπ	δπ
18,58	δεκανάλη	1217	1206	0,39(0,41)	δπ	δπ	δπ	δπ	δπ	δπ
20,92	περιλινυλική αλδεΐδη ΣΥΝΟΛΟ	1313	1309	0,09(0,05) 1,65(1,35)	0,07(0,04) 1,17(0,33)	0,19(0,30) 0,83(0,58)	0,08(0,04) 0,74(0,28)	δπ 0,32(0,25)	δπ 1,22(1,02)	0,03(0,01) 0,60(0,24)
Αλκοόλες										
4,05	αιθανόλη	<600	<600	1,73(0,32)	0,98(0,39)	0,64(0,33)	1,02(0,29)	0,47(0,30)	0,90(0,47)	0,63(0,33)
7,81	1-πεντεν-3-όλη	682	686	δπ	0,02(0,002)	δπ	δπ	δπ	δπ	δπ
11,70	3-εξεν-1-όλη (Z)	864	855	0,07(0,02)	0,15(0,09)	0,46(0,20)	0,31(0,27)	0,26(0,11)	0,14(0,06)	0,21(0,12)
11,82	2-εξεν-1-όλη (E)	872	872	0,09(0,06)	0,30(0,21)	0,07(0,08)	0,06(0,06)	δπ	0,10(0,06)	0,05(0,02)
11,87	εξανόλη	874	876	0,11(0,08)	0,36(0,21)	0,16(0,18)	0,18(0,09)	0,22(0,11)	0,18(0,07)	0,09(0,05)
15,73	οκτανόλη ΣΥΝΟΛΟ	1077	1070	δπ 2,00(0,48)	δπ 1,81(0,92)	0,18(0,22) 1,51(1,01)	0,19(0,13) 1,76(0,84)	0,18(0,12) 1,13(0,63)	0,33(0,45) 1,65(1,11)	0,13(0,04) 1,09(0,56)
Εστέρες										
6,45	αιθυλεστέρας του οξικού οξέος	613	612	0,24(0,08)	0,08(0,04)	δπ	δπ	δπ	δπ	δπ
10,42	αιθυλεστέρας του βουτανικού οξέος	805	802	1,07(0,41)	0,57(0,43)	0,09(0,09)	0,34(0,24)	0,18(0,20)	0,31(0,12)	0,45(0,18)
11,27	2-βουτενικός αιθυλεστέρας	845	844	0,05(0,02)	δπ	δπ	δπ	δπ	δπ	δπ
14,22	εξάνικός αιθυλεστέρας	996	996	δπ	δπ	δπ	δπ	0,04(0,07)	δπ	δπ
14,51	οξικός εστέρας της 2-έξεν-1-	1011	1016	δπ	0,07(0,07)	δπ	δπ	δπ	δπ	δπ

16,89	όλης 3-υδροξυ- εξανικός αιθυλεστέρας	1137	1128	δπ	δπ	δπ	0,12(0,11)	δπ	0,11(0,06)
18,17	οκτανικός αιθυλεστέρας	1200	1198	δπ	δπ	δπ	0,05(0,02)	δπ	0,05(0,01)
23,19	δεκανικός αιθυλεστέρας	1392	1393	δπ	δπ	δπ	δπ	δπ	δπ
	ΣΥΝΟΛΟ			1,51(0,56)	0,72(0,54)	0,09(0,09)	0,51(0,37)	0,22(0,27)	0,31(0,12)
7,89	Κετόνες 2-πεντανόνη	687	686	0,0013(0,0035)	0,03(0,01)	δπ	δπ	δπ	δπ
	ΣΥΝΟΛΟ			0,0013(0,0035)	0,03(0,01)	δπ	δπ	δπ	δπ
13,54	Τερπενοειδή α-πινένιο	959	936	0,44(0,28)	0,31(0,18)	0,41(0,36)	0,31(0,14)	0,10(0,07)	0,34(0,23)
14,32	β-μυρκενίο	1000	986	2,10(1,01)	1,59(0,78)	1,95(1,31)	1,76(0,58)	0,57(0,43)	1,58(0,77)
14,33	β-πινενίο	1001	989	0,01(0,03)	0,08(0,04)	δπ	δπ	δπ	0,04(0,02)
14,88	φαλανδρόνιο	1031	1010	0,10(0,06)	δπ	δπ	δπ	δπ	δπ
14,94	δ-3-καρένιο	1034	1020	0,05(0,06)	δπ	δπ	δπ	δπ	δπ
15,07	α-τερπινένιο	1041	1023	0,11(0,06)	δπ	δπ	δπ	δπ	δπ
15,19	παρα-κυμένιο	1049	1034	0,68(1,55)	0,09(0,02)	δπ	δπ	δπ	δπ
15,29	DL-λεμονένιο	1055	1039	11,66(3,84)	8,11(3,21)	8,93(5,27)	8,30(1,94)	4,08(1,84)	10,65(4,30)
15,44	σμπινένιο	1062	-	0,51(0,26)	0,32(0,21)	0,45(0,34)	0,38(0,14)	0,14(0,10)	0,40(0,27)
15,77	γ-τερπινένιο	1080	1065	0,91(0,85)	0,10(0,08)	0,14(0,11)	0,13(0,06)	δπ	0,15(0,11)
16,39	λιναλοόλη	1112	1103	2,31(2,14)	0,68(0,53)	1,61(1,11)	1,31(0,40)	0,61(0,56)	1,06(1,01)
17,42	cis-παρα-μενθα-2,8-διεν-1- όλη	1163	1149	δπ	0,09(0,03)	0,08(0,06)	0,09(0,03)	0,04(0,02)	δπ
18,48	4-τερπινεόλη	1213	1185	1,71(0,80)	0,47(0,27)	0,55(0,41)	0,79(0,32)	0,25(0,32)	0,74(0,68)
18,56	β-φενγυλ-αλκοόλη	1216	-	δπ	0,09(0,05)	δπ	0,27(0,36)	δπ	δπ
18,74	α-τερπινεόλη	1224	1191	0,82(0,77)	δπ	0,16(0,11)	δπ	0,07(0,06)	0,37(0,49)
18,88	διυδρο-καρβόνη	1230	-	δπ	0,07(0,03)	δπ	δπ	δπ	δπ
19,05	trans-παρα-μενθα-6,8-διεν-2- όλη	1237	1243	0,08(0,08)	δπ	0,06(0,03)	δπ	δπ	δπ
19,95	δ-καρβόνη	1275	1243	0,14(0,06)	0,37(0,20)	0,27(0,15)	0,31(0,14)	0,09(0,09)	0,22(0,12)
21,70	καρβονύλ-οξικός εστέρας	1340	1337	0,05(0,04)	δπ	δπ	δπ	δπ	δπ
23,89	α-κοπαένιο	1416	1390	0,08(0,05)	δπ	δπ	0,13(0,11)	δπ	0,04(0,02)
24,09	β-ελεμένιο	1423	1445	0,10(0,06)	0,07(0,08)	δπ	δπ	δπ	0,05(0,04)
25,41	καρυοφυλλένιο	1468	1451	0,08(0,03)	δπ	δπ	δπ	δπ	0,05(0,03)
27,19	β-σελινένιο	1530	1490	0,20(0,07)	δπ	δπ	δπ	0,04(0,03)	0,11(0,08)
27,20	γ-σελινένιο	1533	-	δπ	δπ	δπ	δπ	δπ	δπ
27,41	βαλεντσένιο	1538	1493	2,49(0,85)	2,08(0,98)	0,55(0,37)	1,78(1,39)	0,39(0,40)	1,36(1,00)
27,55	α-σελινένιο	1543	1505	0,17(0,06)	0,13(0,06)	0,05(0,03)	0,13(0,11)	0,03(0,03)	0,09(0,07)

27,70	λεδένιο	1548	1511	0,04(0,03)	δπ	δπ	δπ	δπ	δπ
27,84	δ-καδινένιο	1553	1536	0,06(0,04)	δπ	0,09(0,10)	0,10(0,09)	δπ	0,03(0,02)
28,29	α-πανασινένιο	1569	1577	0,16(0,06)	0,12(0,06)	0,04(0,02)	0,13(0,12)	0,03(0,02)	0,07(0,04)
	ΣΥΝΟΛΟ			25,06(13,15)	14,77(6,81)	15,36(9,78)	15,92(5,93)	6,44(3,97)	16,72(6,53)
8,16	Υδρογονάνθρακες	700	700	δπ	δπ	δπ	δπ	0,09(0,04)	δπ
16,46	επτάνιο	1116	1118	δπ	δπ	δπ	0,05(0,03)	δπ	δπ
	(E)-4,8-διμεθυλ-1,3,7- νονατριένιο								
	ΣΥΝΟΛΟ			δπ	δπ	δπ	0,05(0,03)	0,09(0,04)	δπ
	Ολικά πτητικά (mg/L)			30,23(15,53)	18,50(8,61)	17,79(11,46)	18,98(7,48)	8,20(5,16)	20,81(11,82)

δπ: δεν προσδιορίστηκε (not identified). Κάθε δείγμα αναλύθηκε εις διπλούν (n=2). RI_{exp}: Δείκτες κατακράτησης των ενώσεων του δείγματος με βάση τους χρόνους πρότυπου μίγματος αλκανίων. RI_{lit}: Δείκτες κατακράτησης της βάσης δεδομένων Willey NIST MS 2007.

Πενήντα τρία πτητικά συστατικά προσδιορίστηκαν και ημι-ποσοτικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο του εσωτερικού προτύπου, τα οποία ταξινομούνται αλφαβητικά σε 6 κατηγορίες: i) αλδεΐδες, ii) αλκοόλες, iii) εστέρες, iv) κετόνες, v) τερπενοειδή και vi) υδρογονάνθρακες. Στο Σχήμα 19 φαίνεται ένα τυπικό χρωματογράφημα φρέσκου πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Κοινό Άρτας με επισημασμένες κάποιες επιλεγμένες πτητικές ενώσεις που μπορούν να θεωρηθούν ως “δείκτες” της βοτανικής προέλευσης. Οι πτητικές ενώσεις αυτές έχουν χαρακτηριστεί, γενικά, ως δείκτες του αρωματικού προφίλ των εσπεριδοειδών (González-Mas et al., 2011).



Σχήμα 19. Τυπικό χρωματογράφημα φρέσκου πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Κοινό Άρτας με επισημασμένες κάποιες επιλεγμένες ενώσεις ως δείκτες της βοτανικής προέλευσης. 1: β-μυρκενίο, 2: DL-λεμονένιο, 3: λιναλοόλη, 4: βαλεντσένιο. IS: Εσωτερικό πρότυπο (4-μεθυλ-2-πεντανόνη).

Είναι αξιοσημείωτο ότι τα τερπενοειδή ήταν οι κυρίαρχες ενώσεις αρώματος του φρέσκου πορτοκαλοχυμού σε όλες τις ποικιλίες. Επιπροσθέτως, η ποσότητα των πτητικών ενώσεων που προσδιορίστηκαν μεταβλήθηκε στατιστικά σημαντικά ($p < 0,05$) μεταξύ των διαφορετικών ποικιλιών. Το πλουσιότερο άρωμα το είχαν οι χυμοί της ποικιλίας Κοινό Χίου ($30,23 \pm 15,53$ mg/L), ακολουθούμενοι από εκείνους της Ναβαλίνα ($20,81 \pm 11,82$ mg/L), Μέρλιν ($19,02 \pm 7,58$ mg/L), Κοινό Άρτας ($18,98 \pm 7,48$ mg/L), Γιάφα ($18,50 \pm 8,61$ mg/L), Κοινό Ρόδου ($17,79 \pm 11,46$ mg/L) και Βαλέντσια ($8,20 \pm 5,16$ mg/L) (Πίνακας 18).

Η πτητική ένωση DL-λεμονένιο βρέθηκε σε υψηλότερη ποσότητα στο πορτοκαλοχυμό της ποικιλίας Μέρλιν. Αντίστοιχα, οι πτητικές ενώσεις λιναλοόλη, 4-τερπινεόλη, βαλεντσένιο και β-μυρκένιο βρέθηκαν σε μεγαλύτερη ποσότητα στην ποικιλία Κοινό Χίου και θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως ενώσεις “δείκτες” της βοτανικής του προέλευσης (Kelebek & Selli, 2011). Ανάλογες αυξομειώσεις ($p < 0,05$) μεταξύ των διαφορετικών ποικιλιών παρατηρήθηκαν για πολλές πτητικές ενώσεις (Πίνακας 19)

Οι πτητικές ενώσεις παρα-κυμόλιο, εξανάλη, επτανάλη, οκτανάλη, αιθανόλη, καρυοφυλλένιο, βαλεντσένιο, α-κοπαένιο, α-τερπινεόλη, λεμονένιο, αιθυλεστέρας του δεκανικού οξέος και πολλές ακόμη βρέθηκαν σε δείγματα πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Powell Navel Late από την Βαλένθια της Ισπανίας σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας (González-Mas et al., 2011).

Επιπροσθέτως, οι πτητικές ενώσεις σαμπινένιο, β-μυρκένιο, γ-τερπινένιο, α-κοπαένιο, παρα-μενθα-2,8-διεν-1-όλη (E), λιναλοόλη, οκτανάλη, δ-καδινένιο, β-σελινένιο, καρβόνη και πολλές άλλες βρέθηκαν σε δείγματα πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Dortyol από την Ανατολική Τουρκία (Kelebek & Selli, 2011) σε συμφωνία με τα αποτελέσματα μας.

2.8 Διαφοροποίηση της βοτανικής προέλευσης φρέσκου πορτοκαλοχυμού με βάση τις πτητικές ενώσεις

Δεδομένου ότι οι συμβατικές φυσικοχημικές παράμετροι και οι φαινολικές ενώσεις έδωσαν χαμηλά ποσοστά ορθής κατάταξης των δειγμάτων φρέσκου πορτοκαλοχυμού σύμφωνα με τη βοτανική του προέλευση, έγινε μια περαιτέρω προσπάθεια βελτίωσης του ποσοστού ορθής κατάταξης των δειγμάτων φρέσκου πορτοκαλοχυμού με χρήση των δεδομένων των πτητικών συστατικών. Ως εξαρτημένες μεταβλητές χρησιμοποιήθηκαν οι 7 ποικιλίες του πορτοκαλοχυμού και ως ανεξάρτητες μεταβλητές οι πτητικές ενώσεις του Πίνακα 19.

Η ανάλυση είναι σημαντική, όπως φανερώνουν οι δείκτες Pillai's Trace=5,934 ($F=10,999$, $p=0,005 < 0,05$) και Wilks' Lambda=0,00 ($F=56,191$, $p=0,000 < 0,05$), γεγονός που καταδεικνύει ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική πολυπαραμετρική επίδραση των πτητικών ενώσεων στην ποικιλία του φρέσκου πορτοκαλοχυμού. Οι πτητικές ενώσεις που βρέθηκαν σημαντικές στον προσδιορισμό των διαφορών μεταξύ των 7 ποικιλιών στο επίπεδο σημαντικότητας 5% δίνονται στον Πίνακα 19. Επίσης,

δίνονται οι αντίστοιχες τιμές της διαχωριστικής συνάρτησης F, οι βαθμοί ελευθερίας (df, βε) και της πιθανότητας ορθής κατάταξης (*p*).

Πίνακας 19. Στατιστικά σημαντικές πτητικές ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την διαφοροποίηση της βοτανικής προέλευσης του φρέσκου πορτοκαλοχυμού.

Πτητικές ενώσεις	Wilks' Lambda	F	df1	df2	<i>p</i>
αιθανόλη	0,423	11,146	6	49	0,000
αιθυλεστέρας του οξικού οξέος	0,119	60,204	6	49	0,000
1-πεντεν-3-όλη	0,018	438,865	6	49	0000
2-πεντανόνη	0,078	96,151	6	49	0,000
πεντανάλη	0,318	17,519	6	49	0,000
αιθυλεστέρας του βουτανικού οξέος	0,414	11,560	6	49	0,000
εξανάλη	0,530	7,242	6	49	0,000
2-βουτενικός αιθυλεστέρας	0,193	34,178	6	49	0,000
3-εξεν-1-όλη, (Z)	0,634	4,721	6	49	0,001
2-εξεν-1-όλη, (E)	0,511	7,802	6	49	0,000
εξανόλη	0,670	4,029	6	49	0,002
επτανάλη	0,740	2,871	6	49	0,018
α-πινένιο	0,745	2,795	6	49	0,020
β-μυρκενίο	0,700	3,501	6	49	0,006
οξικός εστέρας της 2-εξέν-1-όλης	0,477	8,955	6	49	0,000
β-πινένιο	0,250	24,537	6	49	0,000
οκτανάλη	0,635	4,692	6	49	0,001
α-φαλανδρένιο	0,261	23,104	6	49	0,000
δ-3-καρένιο	0,482	8,775	6	49	0,000
α-τερπινένιο	0,306	18,490	6	49	0,000
DL- λεμονένιο	0,647	4,452	6	49	0,001
σαμπινένιο	0,728	3,053	6	49	0,013
γ-τερπινένιο	0,525	7,403	6	49	0,000
λιναλοόλη	0,716	3,237	6	49	0,009
cis-παρα-μενθα-2,8-διεν-1-όλη	0,340	15,871	6	49	0,000
νονανάλη	0,563	6,351	6	49	0,000
αιθυλεστέρας του οκτανικού οξέος	0,095	78,050	6	49	0,000
4-τερπινεόλη	0,483	8,754	6	49	0,000
φαινεθύλ-αλκοόλη	0,644	4,516	6	49	0,001

δεκανάλη	0,532	7,182	6	49	0,000
α-τερπινεόλη	0,574	6,053	6	49	0,000
διυδροκαρβόνη	0,155	44,608	6	49	0,000
trans-παρα-μενθα-6,8-διεν-2-όλη	0,464	9,446	6	49	0,000
δ-καρβόνη	0,637	4,649	6	49	0,001
περιλλυλική αλδεϋδη	0,761	2,561	6	49	0,031
καρβονύλ-οξικός εστέρας	0,418	11,357	6	49	0,000
αιθυλεστέρας του δεκανικού οξέος	0,199	32,783	6	49	0,000
α-κοπαένιο	0,479	8,895	6	49	0,000
β-ελεμένιο	0,462	9,501	6	49	0,000
καρυοφυλλένιο	0,228	27,600	6	49	0,000
β-σελινένιο	0,227	27,838	6	49	0,000
βαλεντσένιο	0,561	6,391	6	49	0,000
α-σελινένιο	0,629	4,822	6	49	0,001
δ-καδινένιο	0,591	5,648	6	49	0,000
α-πανασινσένιο	0,633	4,730	6	49	0,001
οκτανόλη	0,754	2,667	6	49	0,026
(E)-4,8-διμεθυλ-1,3,7-νονατριένιο	0,284	20,549	6	49	0,000
3-υδροξυ-εξανικός αιθυλεστέρας	0,415	11,513	6	49	0,000
αιθυλεστέρας του εξανικού οξέος	0,759	2,589	6	49	0,029
επτάνιο	0,188	35,189	6	49	0,000
γ-σελινένιο	0,368	14,046	6	49	0,000

2.9 Γραμμική διαχωριστική ανάλυση για τις 7 διαφορετικές ποικιλίες του φρέσκου πορτοκαλοχυμού με βάση τις 51 στατιστικά σημαντικές πτητικές ενώσεις

Στη συνέχεια της ανάλυσης, οι 51 σημαντικές πτητικές ενώσεις χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να διαπιστωθεί αν μπορούν να διαφοροποιήσουν τη βοτανική προέλευση του φρέσκου πορτοκαλοχυμού από τις 7 διαφορετικές ποικιλίες.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δημιουργούνται 6 στατιστικά σημαντικές διαχωριστικές συναρτήσεις: Wilks' Lambda=0,000 με $X^2=814,732$, βε=240 με $p=0,000 < 0,05$ για την 1^η, Wilks' Lambda=0,000 με $X^2=580,458$, βε=195 με $p=0,000 < 0,05$, για την 2^η, Wilks' Lambda=0,000 με $X^2=391,108$, βε=152 με $p=0,000 < 0,05$, για την 3^η, Wilks' Lambda=0,000 με $X^2=271,883$, βε=111 με

$p=0,000<0,05$ για την 4^η, Wilks' Lambda=0,006 με $X^2=160,630$, $\beta_e=72$ με $p=0,000<0,05$ για την 5^η και Wilks' Lambda=0,103 με $X^2=71,739$, $\beta_e=35$ με $p=0,000<0,05$ για την 6^η, αντίστοιχα. Όλες οι διαχωριστικές συναρτήσεις είναι βασικές στον διαχωρισμό των ζητούμενων ομάδων.

Η 1^η διαχωριστική συνάρτηση με κανονική συσχέτιση 1,000 και ιδιοτιμή 1697,131 ερμηνεύει το 77% της συνολικής διασποράς, ενώ η 2^η διαχωριστική συνάρτηση με κανονική συσχέτιση 0,999 και ιδιοτιμή 406,927 ερμηνεύει το 18,5% της συνολικής διασποράς. Ακολούθως, η 3^η διαχωριστική συνάρτηση με κανονική συσχέτιση 0,989 και ιδιοτιμή 43,032 ερμηνεύει το 2% της συνολικής διασποράς. Η 4^η διαχωριστική συνάρτηση με κανονική συσχέτιση 0,985 και ιδιοτιμή 33,188 ερμηνεύει το 1,5% της συνολικής διασποράς. Η 5^η διαχωριστική συνάρτηση με κανονική συσχέτιση 0,970 και ιδιοτιμή 15,809 ερμηνεύει το 0,7% της συνολικής διασποράς. Τέλος, η 6^η διαχωριστική συνάρτηση με κανονική συσχέτιση 0,947 και ιδιοτιμή 8,752 ερμηνεύει το 0,4% της συνολικής διασποράς. Όλες μαζί ερμηνεύουν το 100% της συνολικής διακύμανσης που είναι άριστο ποσοστό.

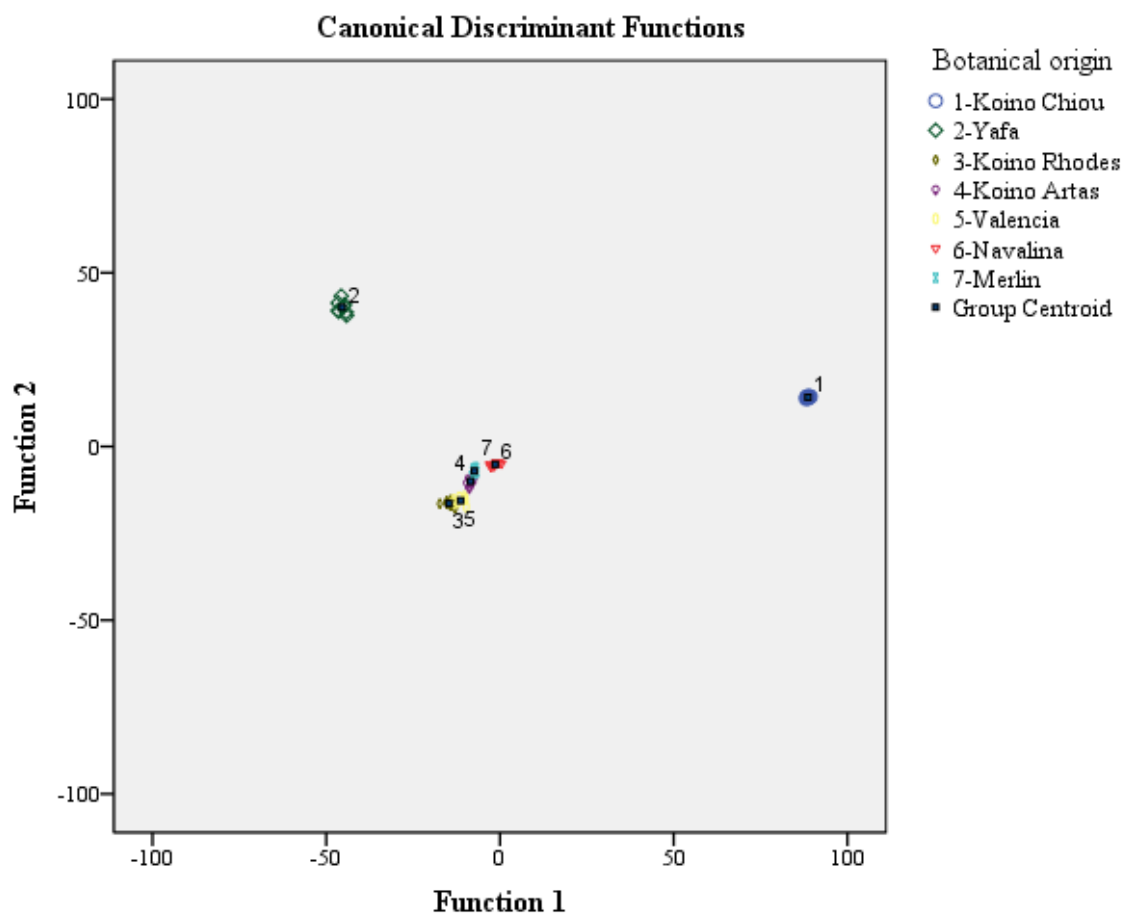
Θα πρέπει να τονίσουμε ότι όλες οι διαχωριστικές συναρτήσεις που δημιουργήθηκαν έδωσαν σχεδόν άριστη κανονική συσχέτιση (0,947-1,000). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι οι πτητικές ενώσεις αποτελούν ισχυρό εργαλείο για τη διαφοροποίηση της βοτανικής προέλευσης του φρέσκου πορτοκαλοχυμού.

Στο Σχήμα 20 μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι φαίνεται να διαχωρίζονται σχετικά καθαρά οι χυμοί από τις ποικιλίες που μελετήθηκαν. Αντίστοιχα, οι μέσες τιμές των κέντρων των ομάδων (group centroids) των 6 στατιστικά σημαντικών διαχωριστικών συναρτήσεων (και οι οποίες φαίνονται στο δισδιάστατο γράφημα) που αφορούν τις 7 ποικιλίες πορτοκαλοχυμού που εξετάστηκαν είναι: (88,657/14,173), (-45,417/40,035), (-14,697/-16,412), (-8,462/-10,016), (-11,339/-15,583), (-1,380/-5,137), (-7,362/-7,060) για τις ποικιλίες Κοινό Χίου, Γιάφα, Κοινό Ρόδου, Κοινό Άρτας, Βαλέντσια, Ναβαλίνα και Μέρλιν, αντίστοιχα.

Η πρώτη διαχωριστική συνάρτηση διαχωρίζει την ποικιλία Κοινό Χίου, ενώ η δεύτερη διαχωριστική συνάρτηση μπορούμε να πούμε ότι διαχωρίζει την ποικιλία Γιάφα από τις υπόλοιπες.

Ο Πίνακας 20 δίνει τα αποτελέσματα των κατατάξεων χρησιμοποιώντας τόσο την μέθοδο της αντικατάστασης, όσο και τη μέθοδο της ενδοεπικύρωσης. Παρατηρούμε ότι το 100% του συνόλου των παρατηρήσεων κατατάχθηκαν σωστά, ποσοστό που είναι άριστο χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της αντικατάστασης, ενώ το ποσοστό αυτό

μειώνεται στο 83,9%, όταν χρησιμοποιηθεί η μέθοδος της ενδοεπικύρωσης, αρκετά ικανοποιητικό ποσοστό για τη συγκεκριμένη μέθοδο.



Σχήμα 20. Διαφοροποίηση της βοτανικής προέλευσης φρέσκου πορτοκαλοχυμού με βάση τις 51 πτητικές ενώσεις και χρήση της διακριτικής ανάλυσης.

Πίνακας 20. Ποσοστά ορθής κατάταξης φρέσκου πορτοκαλοχυμού σύμφωνα με τη βοτανική του προέλευση με βάση τις 51 πτητικές ενώσεις.

Classification Results ^{a, b, c}									
Στατιστική τεχνική		Βοτανική προέλευση	Predicted Group Membership						Αριθμός δειγμάτων
			Κοινό Χίου	Γιάφα	Κοινό Ρόδου	Κοινό Άρτας	Βαλέντσια	Ναβαλίνα	
Original ^a	Count	Κοινό Χίου	8	0	0	0	0	0	8
		Γιάφα	0	8	0	0	0	0	8
		Κοινό Ρόδου	0	0	8	0	0	0	8
		Κοινό Άρτας	0	0	0	8	0	0	8
		Βαλέντσια	0	0	0	0	8	0	8
			0	0	0	0	8	0	8

Cross-validated ^b		Ναβαλίνα	0	0	0	0	0	8	0	8
		Μέρλιν	0	0	0	0	0	0	8	8
		Κοινό Χίου	100,0	,0	,0	,0	,0	,0	,0	100,0
		Γιάφα	,0	100,0	,0	,0	,0	,0	,0	100,0
	%	Κοινό								
		Ρόδου	,0	,0	100,0	,0	,0	,0	,0	100,0
		Κοινό								
		Άρτας	,0	,0	,0	100,0	,0	,0	,0	100,0
	Count	Βαλέντσια	,0	,0	,0	,0	100,0	,0	,0	100,0
		Ναβαλίνα	,0	,0	,0	,0	,0	100,0	,0	100,0
		Μέρλιν	,0	,0	,0	,0	,0	,0	100,0	100,0
		Κοινό Χίου	8	0	0	0	0	0	0	8
		Γιάφα	0	8	0	0	0	0	0	8
		Κοινό								
		Ρόδου	0	0	6	0	2	0	0	8
		Κοινό								
		Άρτας	0	0	0	5	1	1	1	8
		Βαλέντσια	0	0	0	1	7	0	0	8
		Ναβαλίνα	0	0	2	0	0	5	1	8
		Μέρλιν	0	0	0	0	0	0	8	8
		Κοινό Χίου	100,0	,0	,0	,0	,0	,0	,0	100,0
		Γιάφα	,0	100,0	,0	,0	,0	,0	,0	100,0
	%	Κοινό								
		Ρόδου	,0	,0	75,0	,0	25,0	,0	,0	100,0
		Κοινό								
		Άρτας	,0	,0	,0	62,5	12,5	12,5	12,5	100,0
		Βαλέντσια	,0	,0	,0	12,5	87,5	,0	,0	100,0
		Ναβαλίνα	,0	,0	25,0	,0	,0	62,5	12,5	100,0
		Μέρλιν	,0	,0	,0	,0	,0	,0	100,0	100,0

a. 100% of original grouped cases correctly classified.

b. Cross validation is done only for those cases in the analysis. In cross validation, each case is classified by the functions derived from all cases other than that case.

c. 83.9% of cross-validated grouped cases correctly classified.

Παρατηρούμε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό ορθής κατάταξης παρουσιάζουν τα δείγματα χυμού από τις ποικιλίες Κοινό Χίου, Γιάφα και Μέρλιν (100%), ενώ στη συνέχεια ακολουθούν εκείνες των Βαλέντσια (87,5%), Κοινό Ρόδου (75%), Κοινό Άρτας και Ναβαλίνα (62,5%).

2.10 Διαφοροποίηση της βοτανικής προέλευσης φρέσκου πορτοκαλοχυμού με βάση το συνδυασμό συμβατικών φυσικοχημικών παραμέτρων, φλαβονοειδών και πτητικών ενώσεων

Σε μια προσπάθεια να εξεταστεί εάν ο συνδυασμός των προσδιορισμένων φυσικοχημικών παραμέτρων/σταθερών θα μπορούσε να βελτιώσει το ποσοστό ορθής κατάταξης των δειγμάτων φρέσκου πορτοκαλοχυμού σύμφωνα με τη βοτανική τους προέλευση, ως εξαρτημένες μεταβλητές χρησιμοποιήθηκαν οι 7 ποικιλίες πορτοκαλοχυμού και ως ανεξάρτητες μεταβλητές οι 3 συμβατικές φυσικοχημικές παράμετροι, τα 4 φλαβονοειδή και οι 51 πτητικές ενώσεις. Σε αυτή την περίπτωση ο πληθυσμός των ανεξάρτητων μεταβλητών αυξήθηκε αρκετά (58).

Η ανάλυση είναι σημαντική, όπως φανερώνουν οι δείκτες Pillai's Trace=5,919 ($F=8,903$, $p=0.000<0.05$) και Wilks' Lambda=0,000 ($F=64,145$, $p=0.000<0.05$), γεγονός που καταδεικνύει ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική πολυπαραμετρική επίδραση των διαφόρων συμβατικών φυσικοχημικών παραμέτρων, φλαβονοειδών και πτητικών ενώσεων στη βοτανική προέλευση του φρέσκου πορτοκαλοχυμού.

2.11 Γραμμική διαχωριστική ανάλυση για τις 7 διαφορετικές ποικιλίες του φρέσκου πορτοκαλοχυμού με βάση το συνδυασμό των 58 στατιστικά σημαντικών παραμέτρων

Στη συνέχεια της ανάλυσης, οι 58 στατιστικά σημαντικές μεταβλητές χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να διαπιστωθεί αν μπορούν να διαφοροποιήσουν τη βοτανική προέλευση του πορτοκαλοχυμού από τις 7 διαφορετικές ποικιλίες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δημιουργούνται 6 στατιστικά σημαντικές διαχωριστικές συναρτήσεις: Wilks' Lambda=0,000 με $X^2=807,021$, $\beta=264$ με $p=0,000<0,05$ για την 1^η, Wilks' Lambda=0,000 με $X^2=565,654$, $\beta=215$ με $p=0,000<0,05$, για την 2^η, Wilks' Lambda=0,000 με $X^2=390,865$, $\beta=168$ με $p=0,000<0,05$, για την 3^η, Wilks' Lambda=0,00 με $X^2=261,639$, $\beta=123$ με $p=0,000<0,05$ για την 4^η, Wilks' Lambda=0,007 με $X^2=144,465$, $\beta=80$ με $p=0,000<0,05$ για την 5^η και Wilks' Lambda=0,156 με $X^2=54,721$, $\beta=39$ με $p=0,049<0,05$ για την 6^η, αντίστοιχα.

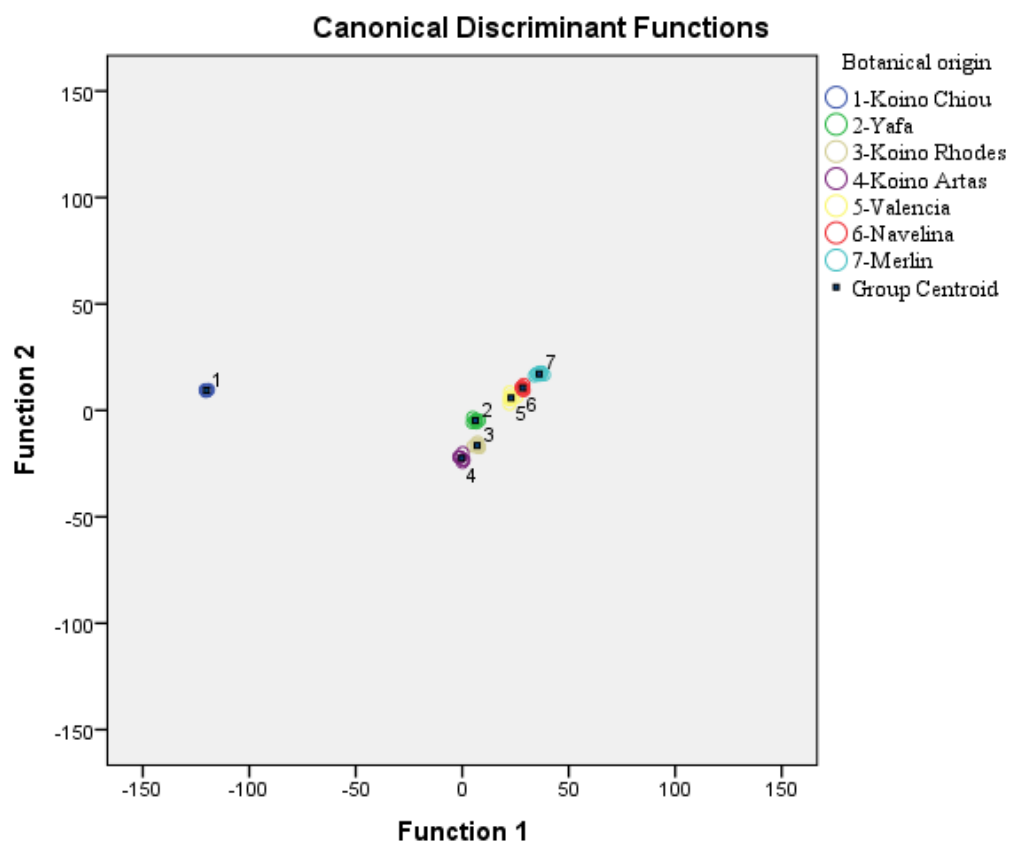
Η 1^η διαχωριστική συνάρτηση με κανονική συσχέτιση 1,000 και ιδιοτιμή 3574,744 ερμηνεύει το 87,1% της συνολικής διασποράς. Αντίστοιχα, η 2^η διαχωριστική

συνάρτηση με κανονική συσχέτιση 0,999 και ιδιοτιμή 373,290 ερμηνεύει το 9,1% της συνολικής διασποράς. Ακολούθως, η 3^η διαχωριστική συνάρτηση με κανονική συσχέτιση 0,994 και ιδιοτιμή 78,882 ερμηνεύει το 1,9% της συνολικής διασποράς. Αντίστοιχα, η 4^η διαχωριστική συνάρτηση με κανονική συσχέτιση 0,991 και ιδιοτιμή 52,091 ερμηνεύει το 1,3% της συνολικής διασποράς. Η 5^η διαχωριστική συνάρτηση με κανονική συσχέτιση 0,976 και ιδιοτιμή 19,951 ερμηνεύει το 0,5% της συνολικής διακύμανσης. Τέλος, η 6^η διαχωριστική συνάρτηση με κανονική συσχέτιση 0,918 και ιδιοτιμή 5,391 ερμηνεύει το 0,1% της συνολικής διασποράς. Όλες μαζί ερμηνεύουν το 100% της συνολικής διακύμανσης που είναι άριστο ποσοστό.

Αντίστοιχα, οι μέσες τιμές των κέντρων των ομάδων (group centroids) των 2 στατιστικά σημαντικών διαχωριστικών συναρτήσεων (και οι οποίες φαίνονται στο δισδιάστατο γράφημα) που αφορούν τις 7 ποικιλίες πορτοκαλοχυμού που εξετάστηκαν είναι: (116,474/18,497), (-87,505/32,734), (-10,872/-13,821), (-14,441/-15,574), (-9,046/-13,457), (13,850/6,370), (-8,461/-14,749) για τις ποικιλίες Κοινό Χίου, Γιάφα, Κοινό Ρόδου, Κοινό Άρατς, Βαλέντσια, Ναβαλίνα και Μέρλιν, αντίστοιχα.

Στο Σχήμα 21 μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι φαίνεται να διαχωρίζονται πάρα πολύ ευδιάκριτα οι χυμοί από τις ποικιλίες Κοινό Χίου, Βαλέντσια, Ναβαλίνα και Μέρλιν. Η πρώτη διαχωριστική συνάρτηση διαχωρίζει τις ποικιλίες Βαλέντσια, Ναβαλίνα και Μέρλιν από τις υπόλοιπες, ενώ η δεύτερη διαχωριστική συνάρτηση μπορούμε να πούμε ότι διαχωρίζει πλήρως την ποικιλία Κοινό Χίου από τις υπόλοιπες ποικιλίες.

Ο Πίνακας 21 δίνει τα αποτελέσματα των κατατάξεων χρησιμοποιώντας τόσο την μέθοδο της αντικατάστασης, όσο και τη μέθοδο της ενδοεπικύρωσης. Παρατηρούμε ότι το 100% του συνόλου των παρατηρήσεων κατατάχθηκαν σωστά, ποσοστό που είναι άριστο χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της αντικατάστασης, ενώ το ποσοστό αυτό μειώνεται στο 89,3%, όταν χρησιμοποιηθεί η μέθοδος της ενδοεπικύρωσης, πάρα πολύ ικανοποιητικό ποσοστό για τη συγκεκριμένη μέθοδο.



Σχήμα 21. Διαφοροποίηση της βοτανικής προέλευσης φρέσκου πορτοκαλοχυμού με βάση το συνδυασμό συμβατικών φυσικοχημικών παραμέτρων, φαινολικών και πτητικών ενώσεων, με χρήση της διακριτικής ανάλυσης.

Πίνακας 21. Ποσοστά ορθής κατάταξης φρέσκου πορτοκαλοχυμού της ποικιλίας Μέρλιν με βάση τις συμβατικές φυσικοχημικές παραμέτρους, τις φαινολικές και πτητικές ενώσεις.

Classification Results ^{a,b,c}									
Στατιστική τεχνική		Βοτανική προέλευση (Botanical origin)	Predicted Group Membership						Αριθμός δειγμάτων
			Κοινό Χίου (Koino Chiou)	Γιάφα (Yafa)	Κοινό Ρόδου (Koino Rhodes)	Κοινό Άρτας (Koino Artas)	Βαλέντσια (Valencia)	Ναβαλίνα (Navelina)	Μέρλιν (Merlin)
Original ^a	Count	Koino Chiou	8	0	0	0	0	0	8
		Yafa	0	8	0	0	0	0	8
		Koino Rhodes	0	0	8	0	0	0	8
		Koino Artas	0	0	0	8	0	0	8
		Valencia	0	0	0	0	8	0	8
		Navelina	0	0	0	0	0	8	8
		Merlin	0	0	0	0	0	0	8
		Koino Chiou	100,0	,0	,0	,0	,0	,0	100,0
		Yafa	,0	100,0	,0	,0	,0	,0	100,0
	%	Koino Rhodes	,0	,0	100,0	,0	,0	,0	100,0
		Koino Artas	,0	,0	,0	100,0	,0	,0	100,0
		Valencia	,0	,0	,0	,0	100,0	,0	100,0
		Navelina	,0	,0	,0	,0	,0	100,0	100,0
		Merlin	,0	,0	,0	,0	,0	,0	100,0
		Koino Chiou	7	1	0	0	0	0	8
		Yafa	0	8	0	0	0	0	8
Cross-validated ^{b,c}	Count	Koino Rhodes	0	0	6	2	0	0	8
		Koino Artas	0	0	1	7	0	0	8
		Valencia	0	0	1	0	7	0	8
		Navelina	0	0	0	0	0	7	8
		Merlin	0	0	0	0	0	0	8
		Koino Chiou	85,7	14,3	,0	,0	,0	,0	100,0
		Yafa	,0	100,0	,0	,0	,0	,0	100,0
	%	Koino Chiou	85,7	14,3	,0	,0	,0	,0	100,0
		Yafa	,0	100,0	,0	,0	,0	,0	100,0
		Koino Rhodes	0	0	6	2	0	0	8

Koino									
Rhodes	,0	,0	75,0	25,0	,0	,0	,0	100,0	
Koino Artas	,0	,0	12,5	87,5	,0	,0	,0	100,0	
Valencia	,0	,0	12,5	,0	87,5	,0	,0	100,0	
Navelina	,0	,0	,0	,0	,0	87,5	12,5	100,0	
Merlin	,0	,0	,0	,0	,0	,0	100,0	100,0	

a. 100,0% of original grouped cases correctly classified.

b. Cross validation is done only for those cases in the analysis. In cross validation, each case is classified by the functions derived from all cases other than that case.

c. 89,3% of cross-validated grouped cases correctly classified.

Παρατηρούμε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό ορθής κατάταξης παρουσιάζουν τα δείγματα χυμού από τις ποικιλίες Γιάφα και Μέρλιν (100%) και στη συνέχεια ακολουθούν εκείνα των Κοινό Άρτας, Βαλέντσια και Ναβαλίνα (87,5%), Κοινό Χίου (85,7%) και Κοινό Ρόδου (75%).

Σαν γενικό συμπέρασμα, σε όλες τις περιπτώσεις, τα αποτελέσματα του συνδυασμού των συμβατικών φυσικοχημικών παραμέτρων, των φλαβονοειδών και των πτητικών ενώσεων, οδήγησαν σε αξιόπιστο βοτανικό διαχωρισμό των δειγμάτων φρέσκου πορτοκαλοχυμού που μελετήθηκαν.

Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης όπως και στην περίπτωση του γεωγραφικού διαχωρισμού, έδειξαν ότι ο συνδυασμός των συμβατικών φυσικοχημικών παραμέτρων, φλαβονοειδών και πτητικών συστατικών ήταν το πιο αποτελεσματικό εργαλείο για την διαφοροποίηση της βοτανικής προέλευσης του φρέσκου χυμού πορτοκαλιού από τις ποικιλίες Κοινό Χίου, Γιάφα, Κοινό Ρόδου, Κοινό Άρτας, Βαλέντσια, Ναβαλίνα και Μέρλιν, σε σχέση με τη μεμονωμένη χρήση των συμβατικών φυσικοχημικών παραμέτρων (ποσοστό ορθής πρόβλεψης 31,1%) ή των φλαβονοειδών (ποσοστό ορθής πρόβλεψης 42,1%) ή των πτητικών ενώσεων (ποσοστό ορθής πρόβλεψης 83,9%).

Και σε αυτή την περίπτωση, οι διαχωριστικές συναρτήσεις που δημιουργήθηκαν έδωσαν υψηλότερη ιδιοτιμή και ως εκ τούτου υψηλότερο διαχωριστικό σκορ (ποσοστό ορθής πρόβλεψης 89,3%). Προτείνεται λοιπόν η συνδυαστική χρήση πολλαπλών φυσικοχημικών παραμέτρων για την επισημάνση της βοτανικής προέλευσης του φρέσκου πορτοκαλοχυμού από ελληνικές ποικιλίες. Ωστόσο, και τα πτητικά συστατικά μεμονωμένα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες της βοτανικής προέλευσης του φρέσκου πορτοκαλοχυμού από ελληνικές ποικιλίες, πράγμα που συνεπάγεται τη μείωση του εργαστηριακού κόστους και χρόνου των αναλύσεων.

VI. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα γενικά συμπεράσματα που μπορούν να εξαχθούν από την παρούσα έρευνα είναι τα εξής:

- Ο συνδυασμός των συμβατικών φυσικοχημικών παραμέτρων, φλαβονοειδών και πτητικών συστατικών και στις δύο περιπτώσεις (γεωγραφική/βοτανική διαφοροποίηση) έδωσε τα υψηλότερα ποσοστά ορθής κατάταξης (88,6% και 89,3%, αντίστοιχα).
- Η διαφοροποίηση της βοτανικής προέλευσης φρέσκου πορτοκαλοχυμού με βάση τα πτητικά συστατικά ήταν πιο επιτυχής διαδικασία σε σχέση με τη διαφοροποίηση της γεωγραφικής προέλευσης (ποσοστά ορθής κατάταξης 83,9% και 75%, αντίστοιχα).
- Τα πτητικά συστατικά δύναται να αποτελέσουν δείκτες κυρίως της βοτανικής και λιγότερο της γεωγραφικής προέλευσης του φρέσκου πορτοκαλοχυμού.
- Οι συμβατικές φυσικοχημικές παράμετροι δεν έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα όσον αφορά τη διαφοροποίηση της γεωγραφικής και βοτανικής προέλευσης του φρέσκου πορτοκαλοχυμού, αποτελούν όμως δείκτες της ποιότητάς του.
- Το ίδιο ισχύει και για τα φλαβονοειδή, παρότι δεν ανήκουν στα βασικά ποιοτικά χαρακτηριστικά του χυμού.
- Τα αποτελέσματα της έρευνας μπορούν να συνεισφέρουν στη δημιουργία βάσης δεδομένων των συμβατικών φυσικοχημικών παραμέτρων του φρέσκου χυμού όλων των ποικιλιών που μελετήθηκαν όπως και για την ποικιλία Μέρλιν διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης.
- Προτείνεται η συνδυαστική χρήση πολλαπλών φυσικοχημικών παραμέτρων για τη διαφοροποίηση της βοτανικής και γεωγραφικής ένδειξης του φρέσκου πορτοκαλοχυμού.

VII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η πιθανή διαφοροποίηση φρέσκου-ανεπεξεργαστου χυμού πορτοκαλιού ανάλογα με τη γεωγραφική και βοτανική προέλευσή του, με βάση τις συμβατικές φυσικοχημικές παραμέτρους του, τις φαινολικές και τις πτητικές ενώσεις με τη βοήθεια της Χημειομετρίας.

Για το σκοπό αυτό συλλέχθηκαν ενενήντα δύο δείγματα κατά τις περιόδους συγκομιδής 2012-2013 και 2013-2014. Για τη διαφοροποίηση της γεωγραφικής προέλευσης της ποικιλίας Μέρλιν συλλέχθηκαν δείγματα από 5 διαφορετικές περιοχές, ενώ για τη διαφοροποίηση της βοτανικής προέλευσης συλλέχθηκαν δείγματα από 7 διαφορετικές ποικιλίες.

Η ανάλυση των φλαβονοειδών πραγματοποιήθηκε με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC). Η ανάλυση των πτητικών ενώσεων διεξήχθη με την τεχνική Μικροεκχύλισης Στερεάς Φάσης Υπερκείμενου Χώρου (HS-SPME) σε συνδυασμό με Αέρια Χρωματογραφία/ Φασματοσκοπία Μαζών.

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με χρήση πολυπαραμετρικής ανάλυσης διακύμανσης (MANOVA) και γραμμικής διαχωριστικής ανάλυσης (LDA). Με βάση τις 29 συνολικά στατιστικά σημαντικές φυσικοχημικές σταθερές, είναι δυνατή η διαφοροποίηση των 5 περιοχών της ποικιλίας Μέρλιν με σωστή πρόβλεψη 100% χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της αντικατάστασης και 88,6% χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της ενδοεπικύρωσης. Η βοτανική διαφοροποίηση με βάση τις 58 συνολικά στατιστικά σημαντικές φυσικοχημικές σταθερές επιτυγχάνεται με σωστή πρόβλεψη 100% με τη μέθοδο της αντικατάστασης και 89,3% με τη μέθοδο της ενδοεπικύρωσης, ποσοστά πολύ ικανοποιητικά.

VIII. ABSTRACT

The present study focused on the possibility of differentiation of fresh-unprocessed orange juice according to its geographical and botanical origin, based on its conventional physicochemical parameters, phenolic and volatile compounds, using chemometrics.

For this purpose, ninety two samples were collected during the harvest periods 2012-2013 and 2013-2014. To differentiate the geographical origin of the Merlin variety, samples from 5 different regions were collected, while samples from 7 different varieties were collected for the differentiation of botanical origin.

The analysis of flavonoids was carried out by HPLC (High Performance Liquid Chromatography). The analysis of volatile compounds was carried out by the technique of Solid Phase Microextraction (HS-SPME) in combination with Gas Chromatography / Mass Spectroscopy.

Statistical data analysis by MANOVA and Linear Discriminant Analysis (LDA), using 29 statistically significant physicochemical constants, showed that it is possible to differentiate the 5 regions of Merlin juice with a 100% correct prediction rate using the original method and 88.6% using the cross-validation method. The botanical differentiation based on 58 statistically significant physicochemical constants was achieved with a 100% correct prediction using the original method and 89.3%, using the cross-validation method. The achieved rates were very satisfactory.

IX. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abad-García B., Berrueta L.A., Lopez-Marquez D.M., Crespo-Ferrer I., Gallo B., Vicente F. (2007). Optimization and validation of a methodology based on solvent extraction and liquid chromatography for the simultaneous determination of several polyphenolic families in fruit juices. *Journal of Chromatography A*, 1154: 87–96.
2. Abad-García B., Berrueta L. A., Garmon-Lobato S., Gallo B., Vicente F. (2009). A general analytical strategy for the characterization of phenolic compounds in fruit juices by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216: 5398-5415.
3. Abad-García B., Berrueta L.A., Garmón-Lobato S., Urkaregi A., Gallo B., Vicente F.(2012a). Chemometric Characterization of Fruit Juices from Spanish Cultivars According to Their Phenolic Compound Contents: I. Citrus Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 3635–3644.
4. Abad-García B., Garmón-Lobato S., Berrueta L.A., Gallo B., Vicente F. (2012b). On line characterization of 58 phenolic compounds in Citrus fruit juices from Spanish cultivars by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection coupled to electrospray ionization triple quadrupole mass spectrometry. *Talanta*, 99: 213–224.
5. Abad-García B., Garmon-Lobato S., Sanchez-Ilarduya M.B., Berrueta L.A., Gallo B., Vicente F., Alonso-Salces R.M. (2014). Polyphenolic contents in Citrus fruit juices: authenticity Assessment European. *Food and Research Technology*, 238: 803–818.
6. Anagnostopoulou M.A. and Kefalas P. (2012). Bioflavonoid profile of citrus juices from Greece. *Biomedical Chromatography*, 26: 1252–1268.
7. Arena E., Guarrera N., Campisi S., Nicolosi Asmundo C. (2006). Comparison of odour active compounds detected by gas-chromatography–olfactometry between hand-squeezed juices from different orange varieties. *Food Chemistry*, 98: 59–63.
8. Bai J., Baldwin E.A., McCollum G., Plotto A., Manthey J.A., Widmer W.W., Luzzio G. and Cameron R. (2016). Changes in Volatile and Non-Volatile Flavor Chemicals of “Valencia” Orange Juice over the Harvest Seasons. *Foods*, 5(1): 4.
9. Bazemore R., Rouseff R., Naim M. (2003). Linalool in orange juice: Origin and thermal stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(1): 196–199.

10. Beecher G. R. (2003). Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrences and intake. *American Society for Nutrition and Sciences*, 3248-3254.
11. Belajova E., Suhaj M. (2004). Determination of phenolic constituents in citrus juices: Method of high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 86: 339–343.
12. Belitz H.-D., Grosch W., Schieberle P. (2009). *Food Chemistry*. (4th ed.), Springer, Verlag Berlin Heidelberg, pp.: 340-341.
13. Bilbao M.L.M., Andres-Lacueva C., Jauregui O., Lamuela-Raventos R.M. (2007). Determination of flavonoids in a Citrus fruit extract by LC–DAD and LC–MS. *Food Chemistry*, 101: 1742–1747.
14. Camin F., Perini M., Bontempo L., Fabroni S., Faedi W., Magnani S., Baruzzi G., Bonoli M., Tabilio M.R., Musmeci S., Rossmann A., Kelly S.D., Rapisarda P. (2011). Potential isotopic and chemical markers for characterizing orange fruits. *Food Chemistry*, 125: 1072-1082.
15. Cano A., Medina A., Bermejo A. (2008). Bioactive compounds in different citrus varieties. Discrimination among cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21: 377–381.
16. Caridi D., Trenerry V. C., Rochfort S., Duong S., Laughher D., & Jones R. (2007). Profiling and quantifying quercetin glucosides in onion (*Allium cepa* L.) varieties using capillary zone electrophoresis and high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 105: 691–699.
17. Carer M., Elviri L., Mangia A. (1999). Validation of a liquid chromatography ion spray mass spectrometry method for the analysis of flavanones, flavones and flavonols. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 13: 2399–2405.
18. Castaneda-Ovando A., de Lourdes Pacheco-Hernandez, Paez E., Rodriguez J.A., Galan-Vidal C.A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113: 859–871.
19. Cerdán-Calero M., Izquierdo L., Sentandreu E.(2013). Valencia Late orange juice preserved by pulp reduction and high pressure homogenization: Sensory quality and gas chromatography-mass spectrometry analysis of volatiles. *LWT - Food Science and Technology*, 51: 476-483.
20. Charve J., Chen C., Hegemanb A.D., Reineccius G.A. (2011). Evaluation of instrumental methods for the untargeted analysis of chemical stimuli of orange juice flavor. *Flavour and Fragrance Journal*, 26: 429–440.
21. Chunfeng D., Zheng S., Dapeng W, Yafeng G. (2011). Recent developments in solid-phase microextraction for on-site sampling and sample preparation. *Trends in Analytical Chemistry*, 30 (10).

22. Cook N. C., & Samman S. (1996). Flavonoids—chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutritional Biochemistry*, 7: 66–76.
23. Dhuique-Mayer C., Caris-Veyrat C., Ollitrault P., Curk F., Amiot M. (2005). Varietal and interspecific influence on micronutrient contents in Citrus from the Mediterranean area. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 2140–2145.
24. Dugo P., Lo Presti M., Ohman M., Fazio A., Dugo G., Mondello L. (2005). Determination of flavonoids in citrus juices by micro-HPLC-ESI/MS. *Journal of Separation Science*, 28: 1149–1156.
25. Erlund I. (2004). Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*, 24(10): 851-874.
26. Fang Z., Zhang Y., Lu Y., Mab G., Chen J., Liu D., et al. (2009). Phenolic compounds and antioxidant capacities of bayberry juices. *Food Chemistry*, 113: 884–888.
27. Field A. (2009). *Discovering Statistics using SPSS*. (3rd ed.), Sage Publications Ltd., London, p.:384.
28. Gardana C., Nalin F., Simonetti P. (2008). Evaluation of Flavonoids and Furanocoumarins from Citrus bergamia (Bergamot) Juice and Identification of New Compounds. *Molecules*, 13: 2220-2228.
29. Gattuso G., Barreca D., Gargiulli C., Leuzzi U., Caristi C. (2007). Flavonoid Composition of Citrus Juices (Review). *Molecules*, 12: 1641-1673.
30. Gatzias I., Karabagias I., Kontakos S., Kontominas M., Badeka, A. (2018). Characterization and differentiation of sheep's milk from Greek breeds based on physicochemical parameters, fatty acid composition and volatile profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(10): 3935-3942.
31. Gonzalez-Mas M.C., Rambla J.L., Alamar M.C., Gutierrez A., Granell A. (2011) Comparative Analysis of the Volatile Fraction of Fruit Juice from Different Citrus Species. *PLoS ONE*. 6(7): e22016.
32. Goulas V., Manganaris G.A. (2012) Exploring the phytochemical content and the antioxidant potential of Citrus fruits grown in Cyprus. *Food Chemistry*, 131: 39–47.
33. Hinterholzer A., Schieberle, P. (1998). Identification of the most odour active volatiles in fresh, hand-extracted juice of Valencia late oranges by odour dilution techniques. *Flavour and Fragrance Journal*, 13(1): 49–55.

34. Ignat I., Volf I., Popa V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables (review). *Food Chemistry*, 126: 1821-1835.
35. Jian P., Haixiang W., Huiming X., Yi Y., Qingmei Z. (2009). Effect of ultra high hydrostatic pressure on concentrations of limonene, α -terpineol and carvone in Navel orange juice. *Journal of Food Process Engineering*, 34(2011): 728–745.
36. Jelen H.H., Majchera M., Dziadas M. (2012). Microextraction techniques in the analysis of food flavor compounds: A review. *Analytica Chimica Acta*, 738: 13–etermination of diosmin, hesperidin, and naringin in different Citrus fruit juices and pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 33: 243–249.
37. Kanaze F.I., Gabrieli C., Kokkalou E., Georgarakis M., Niopas I. (2003). Simultaneous reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the determination of diosmin, hesperidin, and naringin in different Citrus fruit juices and pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 33: 243–249.
38. Karabagias I.K., Badeka A., Kontakos S., Karabournioti S., Kontominas M.G. (2014). Characterization and classification of *Thymus capitatus* (L.) honey according to geographical origin based on volatile compounds, physicochemical parameters and chemometrics. *Food Research International*, 55: 363-372.
39. Karadeniz E. (2004). Main organic acids and distribution of authentic citrus juices in Turkey. *Journal of Agriculture and Forestry*, 28: 267-271.
40. Kelebek H., Canbas A., Selli S. (2008). Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of blood orange juices obtained from cvs. Moro and Sanguinello (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) grown in Turkey. *Food Chemistry*, 107: 1710–1716.
41. Kelebek H., Selli S., Canbas A., Cabaroglu T. (2009). HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan. *Microchemical Journal*, 91: 187–192.
42. Kelebek H., Selli S. (2011). Determination of volatile, phenolic, organic acid and sugar components in a Turkish cv. Dortyol (*Citrus sinensis* L. Osbeck) orange juice. *Society of Chemical Industry, Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91: 1855-1862.
43. Kosma I., Vavoura M., Kontakos S., Karabagias I.K., Kontominas M., Kiritsakis A., Badeka A. (2016). Characterization and classification of extra virgin olive oil from five less known Greek olive cultivars. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 93(6): 837-848.

44. Liu Y., Heying E., Tanumihardjo S. (2012). History, Global Distribution, and Nutritional Importance of Citrus Fruits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Institute of Food Technologists, 11: 530-545.
45. Luykx D.M.A.M, & van Ruth S.M. (2008). An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products. *Food Chemistry*, 107: 897-911.
46. Mahattanatawee K., Rouseff R., Valim M. F., Naim M. (2005). Identification and aroma impact of norisoprenoids in orange juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(2): 393–397.
47. Merken H.M. and Beecher G.R. (2000). Measurement of Food Flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography: A Review. *Journal of. Agricultural and Food Chemistry*, 48 (3).
48. Merkle S., Kleeberg K.K. and Fritsche J. (2015). Recent Developments and Applications of Solid Phase Microextraction (SPME) in Food and Environmental Analysis (Review). *Chromatography*, 2: 293-381.
49. Mirhosseini H., Salmah Y., Nazimah S.A.H, Tan C.P. (2007). Solid-phase microextraction for headspace analysis of key volatile compounds in orange beverage emulsion. *Food Chemistry*, 105: 1659–1670.
50. Mester Z., Sturgeon R., & Pawliszyn J. (2001). Solid phase microextraction as a tool for trace element speciation (review). *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 56:233-260.
51. Moshonas M.G., Shaw P.E. (1994). Quantitative determination of 46 volatile constituents in fresh, unpasteurized orange juice using dynamic headspace gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(7): 1525–1528.
52. Murota K., Terao J. (2003). Antioxidative flavonoid quercetin: Implication of its intestinal absorption and metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 417(1): 12-7 .
53. Nikolaou C., Karabagias I.K., Gatzias I., Kontakos S., Badeka A., Kontominas M.G. (2017). Differentiation of Fresh Greek Orange Juice of the Merlin Cultivar According to Geographical Origin Based on the Combination of Organic Acid and Sugar Content as well as Physicochemical Parameters Using Chemometrics. *Food Analytical Methods*, 10: 2217–2228.
54. Nour V, Trandafir I, Ionica ME (2010). HPLC Analysis in citrus juices under reversed phase conditions. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 38(1): 44-48.
55. Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63: 1035–1042.

56. Proctor B. E., Kenyon E. M. (1949). Objective evaluation of odor deterioration in orange oil. *Food Technology*, 3: 387–392.
57. Pupin A.M., Dennis M.J., Toledo M.C.F. (1998). Flavanone glycosides in Brazilian orange juice. *Food Chemistry*, 61: 275–280.
58. Reineccius G. (2006). *Flavor Chemistry and Technology*. (2nd ed.), Taylor and Francis. Boca Raton, pp.: 73-74.
59. Ribeiro I.A., Ribeiro M.H.L. (2008). Naringin and naringenin determination and control in grapefruit juice by a validated HPLC method. *Food Control*, 19: 432–438.
60. Rouseff R., Bazemore R., Goodner K., Naim M., (2001). GC-Olfactometry with Solid Phase Microextraction of Aroma Volatiles from Heated and Unheated Orange Juice. *Headspace Analysis of Foods and Flavors*, 488:101-112.
61. Ruiz Perez-Cacho P., Mahattanatawee K., Smoot J.M., Rouseff R. (2007) Identification of sulfur volatiles in canned orange juices lacking orange flavor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(14): 5761–5767.
62. Ruiz Perez-Cacho P., Rouseff R. (2008). Processing and Storage Effects on Orange Juice Aroma: A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 9785–9796.
63. Saavedra L, Ruperez FJ, Barbas C (2001). Capillary electrophoresis for evaluating orange juice authenticity: a study on Spanish oranges. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 9-13.
64. Saidani Tounsi M., Wannes W.A., Ouerghemmi I., Jegham S., Njima Y.B., Hamdaoui G., Zemnib H., Marzouka B. (2011). Juice components and antioxidant capacity of four Tunisian Citrus varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91: 142–151.
65. Selli S., Kelebek H. (2011). Aromatic profile and odour-activity value of blood orange juices obtained from Moro and Sanguinello (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Industrial Crops and Products*, 33: 727-733.
66. Theodoridis G., Lasáková M., Skeríková V., Tegou A., Giantsiou N., Jandera P. (2006). Molecular imprinting of natural flavonoid antioxidants: application in solid-phase extraction for the sample pretreatment of natural products prior to HPLC analysis. *Journal of Separation Science*, 29: 2310–2321.
67. Tripoli E. , La Guardia M., Giammanco S., Di Majo D., Giammanco M. (2007). Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties (review). *Food Chemistry*, 104: 466–479.

68. Topuz A., Topakci M., Canakci M., Akinci I., Ozdemir F. (2005). Physical and nutritional properties of four orange varieties. *Journal of Food Engineering*, 66: 519–523.
69. Καραμπάγιας Ι. (2014). Διαφοροποίηση της Γεωγραφικής και Βοτανικής Προέλευσης Ελληνικών δειγμάτων Μελιού με τη βοήθεια ενόργανης χημικής και Στατιστικής Ανάλυσης. Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
70. ΠΑΣΕΓΕΣ (2014). Εξελίξεις στην αγορά των Εσπεριδοειδών στην Ευρωπαϊκή Ένωση και Διεθνώς. Έγγραφο εργασίας.
71. Παυλόπουλος Β. (2008). Μοντέλα Ανάλυσης Διακύμανσης. Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Φιλοσοφίας, Παιδαγωγικής, Ψυχολογίας, Τομέας Ψυχολογίας, σελ.: 27-28.
72. <https://argolikivivliothiki.gr/2012/01/04/kavathas/>
73. <https://argolikivivliothiki.gr/2012/01/16/orange/>
74. en.wikipedia.org