



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
& ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

Διδακτορική Διατριβή

Διαφοροποίηση κελυφωτών φιστικιών (*Pistacia vera*) ποικιλίας Αιγίνης
και ελαίων τους με φασματοσκοπικές και χημειομετρικές μεθόδους

Λυδία Χ. Βαλάση

Επιβλέπων Καθηγητής:

Χρήστος Παππάς, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Χρήστος Παππάς, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Νικόλαος Στοφόρος, Καθηγητής ΓΠΑ

Πέτρος Ταραντίλης, Καθηγητής ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ
2022**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
& ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

Διδακτορική Διατριβή

Διαφοροποίηση κελυφωτών φιστικιών (*Pistacia vera*) ποικιλίας Αιγίνης
και ελαίων τους με φασματοσκοπικές και χημειομετρικές μεθόδους

Differentiation of pistachios (*Pistacia vera*) of Aegina variety
and their oils with spectroscopic and chemometric methods

Λυδία Χ. Βαλάση

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Χρήστος Παππάς, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Νικόλαος Στοφόρος, Καθηγητής ΓΠΑ

Πέτρος Ταραντίλης, Καθηγητής ΓΠΑ

Αναστάσιος Οικονόμου, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Γεώργιος Παπαδόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Ευστάθιος Πανάγου, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Αντωνία Χίου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Χαροκόπειου Πανεπιστημίου

Διαφοροποίηση κελυφωτών φιστικιών (*Pistacia vera*) ποικιλίας Αιγίνης και ελαίων τους με φασματοσκοπικές και χημειομετρικές μεθόδους

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Γενικής Χημείας

Περίληψη

Η ποιότητα των τροφίμων απασχολεί ολοένα και περισσότερο τους καταναλωτές. Επομένως, απαιτούνται ακριβείς, ταχείες, χαμηλού κόστους και μη επιβαρυντικές για το περιβαλλοντικό αποτύπωμα μέθοδοι οι οποίες να διαφοροποιούν ένα τρόφιμο ανάλογα με τα ποιοτικά του χαρακτηριστικά. Οι κλιματικές αλλαγές διαδραματίζουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στον αγροδιατροφικό κλάδο, καθότι η σύνθεση και η ποιότητα ενός τροφίμου δεν είναι σταθερές κάθε έτος συγκομιδής, αλλά μεταβάλλονται ανάλογα με τις κλιματικές συνθήκες.

Οι όροι «τροφή» και «τρόφιμο» χρησιμοποιούνται ιδιαίτερα προκειμένου να δηλώσουν όλες εκείνες τις ουσίες που καταναλώνονται από τον άνθρωπο προκειμένου να του εξασφαλίσουν ενέργεια αλλά και δομικό υλικό, είτε για την ανάπτυξη είτε ακόμη και για επιδιόρθωση βιολογικής φθοράς απαραίτητων οργάνων. Οι έννοιες «τροφή» και «τρόφιμο» δεν είναι απόλυτα ταυτόσημες. Το σύνολο της τροφής για τον άνθρωπο εξασφαλίζεται από τα προϊόντα της γεωργίας, κτηνοτροφίας, αλιείας, κ.λπ. Τα προϊόντα αυτά συνηθέστερα υφίστανται διάφορες κατεργασίες (οικιακές, βιοτεχνικές ή βιομηχανικές μετατροπές) για διάφορους λόγους π.χ. συντήρησης, αποθήκευσης, μεταφοράς ή και διαχείρισης, πριν αυτά μετατραπούν σε τροφές άμεσης κατανάλωσης. Συνεπώς στην έννοια τρόφιμο μπορεί να υπεισέρχεται η έννοια της επεξεργασίας. Τα τρόφιμα διακρίνονται κυρίως σε δύο κύριες κατηγορίες. Στα «φυτικής προέλευσης», που διακρίνονται επιμέρους ανάλογα του είδους τους ή της ανατομίας τους (καρποί, φύλλα, κόνδυλοι κ.λπ.) και στα «ζωικής προέλευσης», που διακρίνονται επιμέρους ανάλογα της ταξινόμησής τους (ψάρια, πουλερικά κ.λπ.), ή με βάση τους εδώδιμους ιστούς και προϊόντα (σukώτι, μύες, αυγά, γάλα κ.λπ.).

Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκαν χημειομετρικά μοντέλα διαφοροποίησης των κελυφωτών φιστικιών (*Pistacia vera*, ποικιλία Αιγίνης) ανάλογα με έτος συγκομιδής τους (2017, 2018) και, επομένως, ανάλογα με ποιοτικά τους χαρακτηριστικά, με χρήση φασματοσκοπικών τεχνικών και φυσικοχημικών παραμέτρων των εκχυλισθέντων ελαίων. Επιπλέον, εξετάστηκε η μυκητολογική ποιότητα και σταθερότητα του νωπού κελυφωτού φιστικιού σε συσκευασία κενού και αέρα για χρονικό διάστημα τριών μηνών και σε θερμοκρασία 4°C.

Από τη σύγκριση του συνόλου των δειγμάτων (15 δείγματα έτους συγκομιδής 2017 και 30 δείγματα έτους συγκομιδής 2018) προέκυψαν προσεγγιστικά αποτελέσματα. Πιο αξιόπιστα αποτελέσματα διαφοροποίησης ανάμεσα στα δύο έτη συγκομιδής δόθηκαν με νέα σύγκριση που έγινε για 11 από τα υπάρχοντα δείγματα έτους συγκομιδής 2017 και 11 από τα υπάρχοντα δείγματα έτους συγκομιδής 2018, των οποίων η γεωγραφική περιοχή, ο παραγωγός και οι καλλιεργητικές φροντίδες ήταν ίδιες και τα δύο έτη.

Διεξήχθη φασματοσκοπική μελέτη FTIR της ψίχας κελυφωτών φιστικιών με δύο τεχνικές. Για όλες τις ομάδες δειγμάτων που συγκρίθηκαν, η τεχνική δισκίου KBr-δείγματος έδειξε στατιστική διαφοροποίηση με 100% ποσοστό σωστής ταξινόμησης, στην οποία το έτος 2018 παρουσίασε αυξημένη σχετική ένταση στο εύρος 1720-1800 cm^{-1} . Με την τεχνική DRIFTS, και με σύγκριση των 15(2017)-30(2018) δειγμάτων υπήρξε σημαντική διαφοροποίηση με ποσοστό σωστής ταξινόμησης 73,3%. Το έτος

2018 παρουσίασε χαμηλότερη σχετική ένταση στο εύρος 3200-3600 cm^{-1} συγκριτικά με το έτος 2017. Σε σύγκριση 11 δειγμάτων έτους 2017 και 11 δειγμάτων έτους 2018 παρατηρήθηκε χαμηλό ποσοστό διαφοροποίησης σε τιμή 28%. Η διαφορά μεταξύ των δύο τεχνικών πιθανώς οφείλεται στο πλήθος παραγόντων που αν δε διευθετηθούν κατάλληλα επιδρούν αρνητικά στην υφή του φάσματος (τεχνική DRIFTS), ενώ αντίθετα, η αραίωση της ψίχας με KBr (τεχνική δισκίου) ελαχιστοποιεί τις αρνητικές επιπτώσεις κατοπτρικής ανάκλασης.

Τα φιστικέλαια που παραλήφθηκαν από τα κελυφωτά φιστίκια με την τεχνική Soxhlet αξιολογήθηκαν σε επίπεδο ποιότητας βάσει των θεσμοθετημένων ορίων για το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο, δεδομένης της έλλειψης νομοθετημένων ορίων για το φιστικέλαιο. Σε σχέση με το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο, η αντιοξειδωτική ικανότητα βρέθηκε μεγαλύτερη (δοκιμές DPPH και ABTS), τα επίπεδα πολικών φαινολών μέσω της δοκιμής Folin-Ciocalteu χαμηλότερα και οι τιμές k και Δk στα όρια υψηλής ποιότητας. Ως προς την ελεύθερη οξύτητα και το ποσοστό των ελεύθερων λιπαρών οξέων, τα φιστικέλαια ήταν κατάλληλα προς βρώση, ευάλωτα, όμως, σε οξείδωση και ποιοτική υποβάθμιση. Τα δείγματα του 2017 βρίσκονταν σε πρωταρχικό στάδιο οξείδωσης.

Συγκρίνοντας τα 15 δείγματα του 2017 με τα 30 δείγματα του 2018 ως προς την απόδοση σε φιστικέλαιο, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των ετών, με 71,1% ποσοστό σωστής ταξινόμησης. Το ποσοστό αυτό μειώθηκε στο 59,1% όταν συγκρίθηκαν 11 δείγματα από κάθε έτος, που θεωρείται αδυναμία ταξινόμησης.

Η δοκιμή ABTS παρέχει μια εκτίμηση για το σύνολο των αντιοξειδωτικών συστατικών (λιπόφιλα και υδρόφιλα), γι' αυτό έδωσε υψηλότερες τιμές από την DPPH. Η δοκιμή ABTS στο σύνολο των δειγμάτων πέτυχε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση για τα δύο έτη είτε μέσω ισοδύναμων Trolox (71,1% ποσοστό σωστής ταξινόμησης) είτε μέσω ποσοστού παρεμποδιστικής δράσης (68,9% ποσοστό σωστής ταξινόμησης), ενώ για τα επιμέρους 11 δείγματα τα ποσοστά σωστής ταξινόμησης έπεσαν σε 54,5% και 45,5% αντίστοιχα, και δεν επιτεύχθηκε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση. Η δοκιμή DPPH χαρακτηρίζεται από εκλεκτικότητα ως προς τα λιπόφιλα αντιοξειδωτικά συστατικά, και δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση ούτε μέσω των ισοδύναμων Trolox ούτε μέσω ποσοστού παρεμποδιστικής δράσης (65,1% και 62,2% στο σύνολο δειγμάτων, 33,3% και 22,7% στα άμεσα συγκρίσιμα).

Προσδιορίστηκαν οι πολικές φαινόλες με τη δοκιμή Folin-Ciocalteu, σύμφωνα με τις οποίες τα φιστικέλαια δε διαφοροποιήθηκαν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των δύο ετών συγκομιδής (ποσοστά σωστής ταξινόμησης: 67,4% για τα 15(2017)-30(2018), 50% για τα 11(2017)-11(2018)).

Η φασματοσκοπική τεχνική UV-Vis χρησιμοποιήθηκε για να αξιολογηθεί η οξειδωτική κατάσταση των φιστικελαίων μέσω των δεικτών k_{232} , k_{268} , k_{270} , k_{274} και Δk . Ανεξαρτήτως του έτους συγκομιδής, η υψηλή ποιότητα των φιστικελαίων αποδείχθηκε λόγω της μηδενικής τιμής του δείκτη Δk . Είτε για το σύνολο των δειγμάτων είτε για την εκτίμηση διαφοράς στα άμεσα συγκρίσιμα δείγματα, αποδείχθηκε ότι τα φιστικέλαια του έτους συγκομιδής 2017 βρίσκονταν σε πρωταρχικό ή ενδιάμεσο στάδιο οξείδωσης. Αυτό έγινε εμφανές από την αυξημένη τιμή του δείκτη k_{232} το 2017 σε σχέση με το 2018. Το ποσοστό σωστής ταξινόμησης μέσω του δείκτη k_{232} ανήλθε στο 100%. Βάσει των δεικτών k_{268} , k_{270} και k_{274} τα φιστικέλαια δε διαφοροποιήθηκαν μεταξύ των διαδοχικών ετών συγκομιδής. Κατά τη σύγκριση των 15(2017)-30(2018) τα ποσοστά σωστής ταξινόμησης ανήλθαν σε 63,3%, 59,1% και 68%, και κατά τη

σύγκριση των 11(2017)-11(2018) τα ποσοστά σωστής ταξινόμησης ανήλθαν σε 63,6%, 59,1% και 68,2%, για κάθε δείκτη αντίστοιχα.

Όσον αφορά στην ελεύθερη οξύτητα και στο ποσοστό των ελεύθερων λιπαρών οξέων, ενώ τα 15(2017)-30(2018) δείγματα διαφοροποιήθηκαν με ποσοστό σωστής ταξινόμησης 69,8%, τα 11(2017)-11(2018) δείγματα δε διαφοροποιήθηκαν στατιστικά σημαντικά δίνοντας ποσοστό σωστής ταξινόμησης 63,6%.

Η ανάλυση των τοκοφερολών (α -, β -, γ -, δ -) των φιστικελαίων επιβεβαίωσε την υπάρχουσα βιβλιογραφία για την επικράτηση της γ -τοκοφερόλης συνεκλουόμενης με τη β -τοκοτριενόλη από τη μία και τη μειωμένη περιεκτικότητα της β -τοκοφερόλης από την άλλη πλευρά. Ανεξάρτητα από τον πληθυσμό των δειγμάτων που συγκρίθηκαν, δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση για το άθροισμα τοκοφερολών και β -τοκοτριενόλης (64,4% και 59,1% ποσοστά σωστής ταξινόμησης για τα 15(2017)-30(2018) και για τα 11(2017)-11(2018) δείγματα, αντίστοιχα).

Η φασματοσκοπία FTIR-ATR έδειξε ότι το έτος 2017 η ένταση μεταξύ 1400-1500 cm^{-1} και 2800-3040 cm^{-1} του φάσματος των φιστικελαίων ήταν αυξημένη συγκριτικά με το έτος 2018, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η συγκομιδή 2017 έδωσε φιστικέλαια με μικρότερη περιεκτικότητα ακόρεστων λιπαρών οξέων. Η διαφοροποίηση ήταν πλήρης (ποσοστό ταξινόμησης 100%) και σημαντική στατιστικά.

Η φασματοσκοπία Raman έδειξε ότι τα φιστικέλαια δε διαφοροποιήθηκαν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των διαδοχικών ετών συγκομιδής. Το ποσοστό σωστής ταξινόμησης για το σύνολο των φιστικελαίων ήταν 20% και για τα φιστικέλαια ταυτόσημων συνθηκών καλλιέργειας 9,1%.

Η διαφοροποίηση βάσει της ανάλυσης των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων με GC-MS αποδείχθηκε στατιστικά σημαντική και για το σύνολο των δειγμάτων (73,3% ποσοστό σωστής ταξινόμησης) και για τα άμεσα συγκρίσιμα δείγματα (72,2% ποσοστό σωστής ταξινόμησης). Το παλμιτικό, το στεατικό, το λινελαϊκό, το μπεχενικό και το παλμιτελαϊκό οξύ έπαιξαν το σημαντικότερο ρόλο στη διαφοροποίηση των δύο καλλιεργητικών περιόδων.

Η αξιολόγηση των πτητικών συστατικών των φιστικελαίων με SPME-GC-MS οδήγησε σε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση από έτος σε έτος (73,3% και 90% ποσοστά σωστής ταξινόμησης για τα 15(2017)-30(2018) και για τα 11(2017)-11(2018) δείγματα, αντίστοιχα).

Συμπερασματικά, το έτος συγκομιδής 2018 υπερείχε σε ποιότητα σε σχέση με το έτος 2017. Αυτό αποδίδεται, κατά κύριο λόγο, στα υψηλότερα επίπεδα βροχόπτωσης του έτους 2018 που πιθανότατα επηρέασαν τη χημική σύσταση του καρπού. Επιτυχής διαφοροποίηση των δύο διαδοχικών ετών από στατιστικά σημαντική σκοπιά, επιτεύχθηκε για την ψίχα κελυφωτών φιστικιών με το χημειομετρικό μοντέλο της τεχνικής δισκίου KBr-δείγματος. Για τα φιστικέλαια μέσω του δείκτη k_{232} και μέσω των χημειομετρικών μοντέλων FTIR-ATR και GC-MS (μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων και πτητικά συστατικά).

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι η φασματοσκοπία FTIR (τεχνική δισκίου, τεχνική ATR), η φασματοσκοπία UV-Vis (δείκτης k_{232}), η GC-MS (μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων και πτητικά συστατικά) συνδυασμένες με χημειομετρικές μεθόδους υπερτερούν στη διαφοροποίηση των κελυφωτών φιστικιών ποικιλίας Αιγίνης και των ελαίων τους ως προς την ποιότητά τους. Όμως, οι φασματοσκοπικές τεχνικές έχουν τα πλεονεκτήματα, σε σχέση με τις χρωματογραφικές, της απλότητας, της ταχύτητας, του οικονομικού κόστους ανάλυσης και της μη επιβάρυνσης του περιβαλλοντικού αποτυπώματος.

Ακολούθησε μυκητολογική διερεύνηση του νωπού κελυφωτού φιστικιού δεδομένης της αυξανόμενης κατανάλωσης και επέκτασης της αγοράς φρέσκων

προϊόντων και της μεγαλύτερης επικινδυνότητας για αλλοίωση που εμφανίζει συγκριτικά με το αποξηραμένο λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε υγρασία (40-50% w/w). Το νωπό κελυφωτό φιστίκι μελετήθηκε ως προς τις ζύμες και τους μύκητες για τρεις μήνες, σε συσκευασία κενού και αέρα υπό θερμοκρασία 4°C, και αποδείχθηκε ότι η συσκευασία αέρα αύξησε τον πληθυσμό των ζυμών και των μυκήτων σε αντίθεση με τη συσκευασία κενού που μείωσε τους αντίστοιχους πληθυσμούς. Οι μύκητες του γένους *Aspergillus*, *Cladosporium* και *Penicillium* επικράτησαν σε ποσοστά 40%, 15% και 10% των δειγμάτων, αντίστοιχα.

Επιστημονική περιοχή: Αναλυτική Χημεία

Λέξεις κλειδιά: *Pistacia vera*, κελυφωτά φιστίκια, φιστικέλαιο, έτος συγκομιδής, ποιότητα, FTIR, δισκία, DRIFTS, αντιοξειδωτική ικανότητα, DPPH, ABTS, Folin-Ciocalteu, UV-Vis, τοκοφερόλες, ATR, Raman, GC-MS, FAMES, SPME, PLS-DA, νωπό κελυφωτό φιστίκι, συσκευασία, μύκητες, ζύμες

Differentiation of pistachios (*Pistacia vera*) of Aegina variety and their oils with spectroscopic and chemometric methods

*Department of Food Science & Human Nutrition
Laboratory of General Chemistry*

Abstract

Food quality is an increasing concern for consumers. Therefore, accurate, fast, low-cost and non-aggravating for the environmental footprint methods are required to differentiate food according to its quality characteristics. Climate change plays a particularly important role in the agri-food sector, as the composition and the quality of food are not constant each year of harvest, but vary according to climatic conditions.

The terms "feed" and "food" are used particularly to denote all those substances consumed by human in order to provide him with energy and a building material, either for the development or even for the repair of necessary organs' biological damage. The terms "feed" and "food" are not exactly identical. The total amount of feed for human is provided by agricultural products, livestock, fisheries, etc. These products often undergo various treatments (household, craft or industrial conversions) for various reasons e.g. preservation, storage, transport or even management, before they are converted into feed of immediate consumption. Therefore the concept of food includes the concept of processing. Foods are mainly divided into two basic categories. Those "of plant origin", which are distinguished according to their species or anatomy (fruits, leaves, tubers, etc.) and those "of animal origin", which are distinguished according to their classification (fish, poultry, etc.), or on the basis of edible tissues and products (liver, muscle, eggs, milk, etc.).

In the present study, chemometric models for differentiation of pistachios (*Pistacia vera*, Aegina variety) were developed depending on their year of harvest (2017, 2018) and, therefore, depending on their quality characteristics, using spectroscopic techniques and physicochemical parameters of the extracted pistachio oils. In addition, the fungal quality and stability of fresh pistachio in vacuum and air packaging for a period of three months and at a temperature of 4°C were examined.

The comparison of the total samples (15 samples of the 2017 harvest year and 30 samples of the 2018 harvest year) gave approximate results. More reliable results of differentiation between the two harvest years were given by a new comparison made for 11 of the existing samples of the 2017 harvest year and 11 of the existing samples of the 2018 harvest year, whose geographical area, producer and cultivation cares were the same for both years.

FTIR spectroscopic study of powdered pistachio kernels was performed using two techniques. For all groups of samples compared, the KBr-sample disk technique showed statistical differentiation with 100% percentage of correct classification, in which the year 2018 showed increased relative intensity in the range 1720-1800 cm⁻¹. Using the DRIFTS technique and the comparison of 15(2017)-30(2018) samples, there was a significant differentiation with a 73.3% percentage of correct classification. The 2018 year showed a lower relative intensity in the range 3200-3600 cm⁻¹ compared to the 2017 year. In comparison of 11 samples of the 2017 year and 11 samples of the 2018 year, a low percentage of differentiation was observed at a value of 28%. The difference between the two techniques is probably due to the number of factors that if not properly addressed have a negative effect on the texture of the spectrum (DRIFTS

technique), while, on the contrary, diluting powdered pistachio kernel with KBr (disk technique) minimizes the negative effects of specular reflection.

The pistachio oils obtained from the pistachios with the Soxhlet technique were evaluated at a quality level based on the established limits for extra virgin olive oil, given the lack of regulated limits for pistachio oil. Compared to extra virgin olive oil, the antioxidant capacity was found to be higher (DPPH and ABTS assays), the levels of polar phenols through the Folin-Ciocalteu assay were lower and the k and Δk values were fluctuating between high quality ranges. In terms of the free acidity and the percentage of free fatty acids, pistachio oils were suitable for eating, but vulnerable to oxidation and quality degradation. The 2017 samples were in the primary stage of oxidation.

Comparing the 15 samples of 2017 with the 30 samples of 2018 in terms of yield in pistachio oil, a statistically significant difference was observed between the years, with 71.1% percentage of correct classification. This percentage decreased to 59.1% when 11 samples from each year were compared, which is considered a failure of classification.

The ABTS assay provides an estimation for total antioxidants (lipophilic and hydrophilic), which is the reason it gave higher values than DPPH assay. The ABTS assay in total samples achieved a statistically significant difference for the two years either through Trolox equivalents (71.1% percentage of correct classification) or through percentage of scavenging activity (68.9% percentage of correct classification), while for the individual 11 samples the percentages of correct classification fell to 54.5% and 45.5% respectively, and no statistically significant differentiation was achieved. The DPPH assay was characterized by selectivity for lipophilic antioxidants, and showed no statistically significant differentiation either through Trolox equivalents or through scavenging activity rates (65.1% and 62.2% in the total samples, 33.3% and 22.7% in directly comparable samples, respectively).

The content of polar phenols was determined by the Folin-Ciocalteu assay, according to which the pistachio oils did not differ statistically significantly between the two years of harvest (percentages of correct classification: 67.4% for 15(2017)-30(2018), 50% for 11(2017)-11(2018)).

The UV-Vis spectroscopic technique was used to evaluate the oxidative state of the pistachio oils using the indicators k_{232} , k_{268} , k_{270} , k_{274} and Δk . Regardless of the year of harvest, the quality of the pistachio oils proved to be high due to the zero value of the Δk index. Either for the total samples or for the difference estimation in the directly comparable samples, it turned out that the pistachio oils of the 2017 harvest year were in primary or intermediate stage of oxidation. This was evident from the increased value of the k_{232} index in 2017 compared to 2018. The percentage of correct classification through the k_{232} index reached 100%. Based on the indicators k_{268} , k_{270} and k_{274} the pistachio oils did not differ between the successive harvest years. When comparing 15(2017)-30(2018) the percentages of correct classification reached 63.3%, 59.1% and 68%, and when comparing 11(2017)-11(2018) the percentages of correct classification reached 63.6%, 59.1% and 68.2%, for each index respectively.

Regarding the free acidity and the percentage of free fatty acids, while the 15(2017)-30(2018) samples differed with a percentage of correct classification of 69.8%, the 11(2017)-11(2018) samples did not differ statistically significant giving a percentage of correct classification of 63.6%.

Analysis of tocopherols (α -, β -, γ -, δ -) of pistachio oils confirmed, on the one hand, the existing literature on the prevalence of γ -tocopherol co-eluting with β -tocotrienol and on the other hand, the reduced content of β -tocopherol. Regardless of

the population of the samples compared, there was no statistically significant difference for the sum of tocopherols and β -tocotrienol (64.4% and 59.1% percentages of correct classification for 15(2017)-30(2018) and 11(2017)-11(2018) samples, respectively).

The FTIR-ATR spectroscopy showed that in 2017 the intensity between 1400-1500 cm^{-1} and 2800-3040 cm^{-1} of pistachio oils spectrum was increased compared to the 2018 year, leading to the conclusion that the 2017 harvest yielded pistachio oils with a lower unsaturated fatty acids' content. The differentiation was complete (100% classification rate) and statistically significant.

The Raman spectroscopy showed that pistachio oils did not differ statistically significant between the successive harvest years. The percentage of correct classification for all pistachio oils was 20% and for pistachio oils of identical cultivation conditions was 9.1%.

The differentiation based on the analysis of the fatty acid methyl esters by GC-MS proved to be statistically significant for both the total amount of samples (73.3% percentage of correct classification) and the directly comparable samples (72.2% percentage of correct classification). Palmitic, stearic, linoleic, behenic and palmitoleic acids played the most important role in differentiating the two growing seasons.

The evaluation of the volatile components of pistachio oils with SPME-GC-MS led to statistically significant differentiation from year to year (73.3% and 90% percentages of correct classification for 15(2017)-30(2018) and for 11(2017)-11(2018) samples, respectively).

In conclusion, the 2018 year of harvest was superior in quality compared to the 2017 year. This is mainly attributed to the higher levels of rainfall in 2018 that most likely affected the chemical composition of the fruit. Successful differentiation of the two consecutive years, from a statistically significant point of view, was achieved for the powdered pistachio kernel with the chemometric model of the KBr-sample disk technique. For pistachio oils through the k_{232} index and through the chemometric models FTIR-ATR and GC-MS (fatty acid methyl esters and volatile components).

The findings of the present study showed that the FTIR spectroscopy (disk technique, ATR technique), the UV-Vis spectroscopy (index k_{232}), the GC-MS (fatty acid methyl esters and volatile components) combined with chemometric methods prevail in the differentiation of pistachios (*Pistacia vera*) of Aegina variety and their oils in terms of their quality. However, spectroscopic techniques have the advantages of simplicity, speed, economic cost of analysis and non-aggravating effect on the environmental footprint, in comparison to chromatographic techniques.

A mycological examination of the fresh pistachio kernel followed given the increasing consumption and expansion of the fresh products' market and the greater risk of fresh pistachio kernel's spoilage compared to the dried one, due to its high moisture content (40-50% w/w). Fresh pistachio was studied for yeast and fungi for three months in vacuum and air packaging at 4°C, and it was shown that air packaging increased the population of yeasts and fungi in contrast to vacuum packaging which reduced the respective populations. The *Aspergillus*, *Cladosporium* and *Penicillium* fungi prevailed in 40%, 15% and 10% of the samples, respectively.

Scientific field: Analytical Chemistry

Keywords: *Pistacia vera*, pistachios, pistachio oil, year of harvest, quality, FTIR, disk, DRIFTS, antioxidant capacity, DPPH, ABTS, Folin-Ciocalteu, UV-Vis, tocopherols, ATR, Raman, GC-MS, FAMES, SPME, PLS-DA, fresh pistachio, packaging, fungi, yeasts

*«Δεν υπάρχει πεδίο άπαρτο γι' αυτόν
που εργάζεται με ψυχή,
ούτε πεδίο σίγουρο γι' αυτόν
που εργάζεται χωρίς ψυχή»*

Μέγας Αλέξανδρος

Ευχαριστίες

Η αναζήτηση της γνώσης και της αλήθειας είναι ένας επίπονος αγώνας στον οποίο δεν υπάρχουν προδιαγεγραμμένοι δρόμοι και βήματα που μπορεί κάποιος να ακολουθήσει. Και πράγματι αυτά τα χρόνια εκπόνησης του διδακτορικού, ήρθα αντιμέτωπη με το επιστημονικό άγνωστο. Έκανα λάθη. Υπήρξαν ανατροπές και πισωγυρίσματα. Έγιναν θυσίες, μικρές και συχνότατα μεγαλύτερες· καθημερινές εσωτερικές μάχες να μην εγκαταλείψω την προσπάθεια. Ωστόσο, οτιδήποτε συνέβη με ενδυνάμωσε και με έκανε να εξελιχθώ. Μου φανέρωσε επιστημονικούς τομείς και απέκτησα εμπειρίες που ούτε καν είχα διανοηθεί. Με οτιδήποτε συνέβη έμαθα, βελτιώθηκα, έγινα πιο δυνατή, ένιωσα ενθουσιασμένη και περήφανη για τον εαυτό μου, έκανα διασυνδέσεις, εδραίωσα σχέσεις ζωής με τους δασκάλους μου. Ήταν χρόνια γεμάτα πλήρωση και προσωπική ανάπτυξη. Και όλα αυτά μέχρι που ολοκληρώθηκε το διδακτορικό μου - που για εμάς τους «δρομείς αντοχής» σημαίνει πολύ περισσότερο από έναν τίτλο. Αυτός ο τερματισμός μοιάζει περισσότερο με αφετηρία. Δεν είναι το τέλος που σηματοδοτεί το ερευνητικό μονοπάτι μου, αλλά αποκρυσταλλώνει το περιεχόμενο της επιστημονικής μου αποσκευής. Το πόσο αφοσιωμένη ήμουν, πόσο βαθιά αγάπησα τη δουλειά μου, πόσο γενναία υπήρξα να επανασχεδιάζω στρατηγικά νέα επιστημονική πορεία, πόσο τυχερή αισθανόμουν να κάνω αυτό που ονειρευόμουν. Και τελικά η απελευθέρωση που παρέχει η επιστήμη· η συνειδητοποίηση ότι το να υποθέτεις την αλήθεια, να υποθέτεις την απάντηση πριν θέσεις την ερώτηση, σε οδηγεί στο πουθενά.

Η σελίδα των ευχαριστιών προς όλους εκείνους που στήριξαν την προσπάθειά μου έχει γραφτεί δεκάδες φορές στο μυαλό μου ως το καρδιακό αποτύπωμα ολοκλήρωσης της διδακτορικής μου διατριβής. Χωρίς τη συνδρομή των ανθρώπων που στάθηκαν στωικά στο πλάι μου αυτά τα χρόνια, θα ήταν εξαιρετικά δύσκολο να φτάσω ως εδώ. Το ευχαριστήριο αυτό σημείωμα εκφράζει ένα ελάχιστο μέρος της ευγνωμοσύνης που αισθάνομαι για εκείνους.

Το πρώτο ευχαριστώ το οφείλω στον επιβλέποντά μου, Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Χρήστο Παππά του Εργαστηρίου Γενικής Χημείας του ΓΠΑ. Τον ευχαριστώ θερμά για τη διαρκή επιστημονική καθοδήγηση σε κάθε πτυχή της πολυετούς πλέον συνεργασίας μας, για τις πολύτιμες ευκαιρίες που μου πρόσφερε στους τομείς της έρευνας και της διδασκαλίας, για την ελευθερία και το σεβασμό που επέδειξε στις

ερευνητικές επιλογές μου, για την αμέριστη στήριξή του όταν η υγεία των γονιών μου βρισκόταν σε άμεσο κίνδυνο. Η καλή μας συνεργασία αποτέλεσε τη βάση για την εκπλήρωση των επιστημονικών στόχων του παρόντος εγχειρήματος. Η σχέση που αναπτύχθηκε μεταξύ μας δημιούργησε συνδέσμους που θα αντέξουν στο χρόνο και δεν περιορίζονται σε μια επαγγελματική σχέση.

Οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Καθηγητή του Εργαστηρίου Γενικής Χημείας του ΓΠΑ και Κοσμήτορα της Σχολής Επιστημών Τροφίμων & Διατροφής κ. Πέτρο Ταραντίλη. Για όλες τις φορές που με ενθάρρυνε να συνεχίσω, να διατηρήσω υψηλά το ηθικό μου, να αναθερμάνω το ενδιαφέρον και τον ενθουσιασμό μου, και κυρίως για όλες τις φορές που, υπό τη διακριτική εποπτεία του, επηρέασε καθοριστικά τον τρόπο αντιμετώπισης των διαφόρων προβλημάτων που αναπόφευκτα προέκυψαν. Μού συμπαραστάθηκε πολύπλευρα σε κάθε βήμα της πορείας μου. Ήταν και συνεχίζει να είναι μέντοράς μου, όχι μόνο από ακαδημαϊκή σκοπιά.

Έμπνευση και σεβασμός. Δύο λέξεις που συνοδεύουν τον Καθηγητή κ. Νικόλαο Στοφόρο του Εργαστηρίου Μηχανικής και Επεξεργασίας Τροφίμων του ΓΠΑ. Τον ευχαριστώ για τη σχολαστική επιμέλεια με την οποία «έσκυψε» πάνω στην ερευνητική μου εργασία και διότι, έπειτα από όλα αυτά τα χρόνια συναναστροφής μαζί του, έχει επηρεάσει καθοριστικά την ερευνητική μου αντίληψη.

Ιδιαίτερος θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Αναστάσιο Οικονόμου του Τμήματος Χημείας του ΕΚΠΑ για την τιμή που μου έκανε να συμμετέχει στην κρίση της διδακτορικής διατριβής, όπως και για τη στήριξή του και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε από τα πρώτα μου κιόλας βήματα επαφής με την έρευνα, στο πλαίσιο της πτυχιακής μου εργασίας στο Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ.

Η βοήθειά του Αναπληρωτή Καθηγητή του Εργαστηρίου Βελτίωσης Φυτών & Γεωργικού Πειραματισμού και Διευθυντή του Ινστιτούτου Σχεδιασμού και Ανάλυσης Πειραμάτων του ΓΠΑ κ. Γεώργιου Παπαδόπουλου στη στατιστική ανάλυση ήταν πολύτιμη και διέυρνε το γνωστικό μου πεδίο. Τον ευχαριστώ για το απλόχερο «μοίρασμα» της εξειδικευμένης γνώσης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ευστάθιο Πανάγου του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του ΓΠΑ για τις γόνιμες συμβουλές του και τις εύστοχες υποδείξεις του.

Ακόμη ευχαριστώ την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα Αντωνία Χίου του Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας - Διατροφής της Σχολής Επιστημών Υγείας και

Αγωγής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου η οποία με τιμά με την παρουσία της στην επταμελή εξεταστική επιτροπή.

ΔΑΣΚΑΛΟΣ οδοδείκτης και εμπνευστής, ο Καθηγητής κ. Σταύρος Γιαννιώτης του «παλαιού» Εργαστηρίου Μηχανικής Τροφίμων, Επεξεργασίας & Συντήρησης Γεωργικών Προϊόντων του ΓΠΑ. Τον ευχαριστώ από καρδιάς για την επιστημονική και ηθική στήριξη που γενναιόδωρα μου παρείχε και μου παρέχει, σα δεύτερος πατέρας μου.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην Καθηγήτρια κα Βιολέτα Κωνσταντίνου-Κόκοτου, Διευθύντρια του Εργαστηρίου Γενικής Χημείας του ΓΠΑ, για την παραχώρηση απαραίτητων αναλωσίμων για τη διεξαγωγή της έρευνάς μου, αλλά και για τη συνεργασία μας στα πλαίσια παροχής επικουρικού διδακτικού έργου σε Τμήματα του ΓΠΑ, έξι εξάμηνα των Ακαδημαϊκών ετών 2017-2020.

Ιδιαίτερη ευγνωμοσύνη οφείλω στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα Ιωάννα Μαντάλα του Εργαστηρίου Μηχανικής και Επεξεργασίας Τροφίμων του ΓΠΑ για την προτροπή και την ευκαιρία που μου έδωσε στα πλαίσια συνεργασίας των εργαστηρίων μας.

Μια σχέση που βασίζεται στον αμοιβαίο σεβασμό χτίστηκε με την Επίκουρη Καθηγήτρια κα Μαρούλα Κόκοτου του Εργαστηρίου Γενικής Χημείας του ΓΠΑ, την οποία ευχαριστώ θερμά.

Επίσης, ευχαριστώ τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Χριστόφορο Κόκοτο του Τμήματος Χημείας του ΕΚΠΑ για την εμπειρία που μοιράστηκε μαζί μου σε ερευνητικές προσπάθειες που δυστυχώς δεν αποτυπώθηκαν στην παρούσα διατριβή.

Η συμβολή της διδάκτορος, κας Γεωργιάδου Μαρίας του Εργαστηρίου Μηχανικής και Επεξεργασίας Τροφίμων του ΓΠΑ ήταν πολύτιμη. Την ευχαριστώ για τον πολύτιμο χρόνο που μου αφιέρωσε. Πλέον η επαφή μας έχει φτάσει σε επίπεδο πολύπλευρης συνεργασίας μεταξύ των εργαζόμενων γυναικών εντός του πανεπιστημιακού χώρου.

Η ολοκλήρωση των μικροβιολογικών αναλύσεων δε θα ήταν πραγματοποιήσιμη χωρίς το διδάκτορα και Βοηθό Ερευνητή κ. Παντελή Νατσκούλη του Ινστιτούτου Τεχνολογίας Αγροτικών Προϊόντων στον Ελληνικό Γεωργικό Οργανισμό (ΕΛΓΟ) «Δήμητρα». Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για την ανιδιοτελή συνεργασία μας.

Δε θα μπορούσα να ξεχάσω τους έμπειρους του εργαστηρίου Γενικής Χημείας ΓΠΑ: τα μέλη ΕΔΙΠ κα Δήμητρα Δαφερέρα, κα Αναστασία Μίχου, κα Κωνσταντίνα

Αστρακά, κ. Εμμανουήλ Μπούζα, κ. Χαράλαμπο Κανάκη και τον κ. Γεώργιο Κόσσυφα, μέλος ΕΤΕΠ, οι οποίοι έδιναν λύση σε τεχνικά αδιέξοδα και διαχειρίστηκαν με υπομονή και κατανόηση την επίλυσή τους.

Για τη θετική τους διάθεση και για όσες στιγμές αγόγγυστα αντιμετώπιζαν τις γραφειοκρατικές δυστοκίες, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Προϊσταμένη κα Θέλξη Χατζηαντωνίου και τη Διοικητική Υπάλληλο της Γραμματείας Π.Μ.Σ. κα Δώρα Κομματά από τη Γραμματεία του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου ΓΠΑ.

Μέσω της συμμετοχής μου στον 1^ο Διαγωνισμό Επιχειρηματικής Ιδέας του γραφείου Καινοτομίας, Επιχειρηματικότητας & Μεταφοράς Τεχνολογίας ΕΛΚΕ του ΓΠΑ (InnovInAgri), η Διοικητική Υπάλληλος κα Αφροδίτη Αναγνώστη του Τμήματος Αγροτικής Οικονομίας & Ανάπτυξης ΓΠΑ μού έδωσε την ευκαιρία να διαπιστώσω τη μαγεία της σύνδεσης έρευνας και βιομηχανίας. Στα πλαίσια της διεξαγωγής επιχειρηματικού σχεδίου, το θέμα «Αξιοποίηση παραπροϊόντων βιομηχανιών και καρπών δευτερεύουσας ποιότητας από την ελληνική γη με σκοπό την παρασκευή βιολειτουργικών αλεύρων» απέσπασε το 1^ο βραβείο.

Πηγή ανταλλαγής ιδεών και στιγμών χαλάρωσης στα διαλείμματα ανάκτησης δυνάμεων ήταν η διδάκτορας και μεταδιδακτορική ερευνήτρια Παναγιώτα Ρεβέλου, ο διδάκτορας και μεταδιδακτορικός ερευνητής Γιώργος Δανέζης, η διδάκτορας και μεταδιδακτορική ερευνήτρια Ελένη Κακούρη, η υποψήφια διδάκτορας Νεφέλη Σωτηροπούλου, η υποψήφια διδάκτορας Ελευθερία Καπαράκου, ο υποψήφιος διδάκτορας Ξαγοράρης Μαρίνος.

Θερμά, επίσης, ευχαριστώ τον υποψήφιο διδάκτορα Παναγιώτη Λουκόπουλο του Εργαστηρίου Μηχανικής και Επεξεργασίας Τροφίμων του ΓΠΑ για την άριστη συνεργασία που είχαμε στις ερευνητικές μας εργασίες καθώς και τη μοιρασιά των επαγγελματικών μας ανησυχιών. Για όλα όσα περάσαμε μαζί στις κοινές μας αναζητήσεις ευχαριστώ τον υποψήφιο διδάκτορα Στέλιο Χατζηδάκη του Εργαστηρίου Μηχανικής και Επεξεργασίας Τροφίμων του ΓΠΑ. Για όλες τις διορατικές κουβέντες του που με έκαναν να τον αισθάνομαι σα δεύτερο αδελφό.

Η καθημερινότητα στο εργαστήριο θα ήταν πολύ άχρωμη χωρίς τις συνεργάτιδες μου, Δήμητρα Αρβανιτάκη και Αγγελική Μητροπούλου. Τις ευχαριστώ θερμά για τις στιγμές και τις αγωνίες που μοιραστήκαμε στα πλαίσια των μεταπτυχιακών τους εργασιών και συνεχίζουμε να μοιραζόμαστε μαζί πλέον ως φίλες. Το ταξίδι θα ήταν ανιαρό χωρίς την Ευαγγελία Ζαφείρη, την Ιωάννα Θάνου και τον

Ανδρέα Πέππα, με τους οποίους εργαστήκαμε υπεύθυνα στα πλαίσια διεκπεραίωσης των μεταπτυχιακών και προπτυχιακών τους υποχρεώσεων και οι οποίοι εμπλούτισαν την επαγγελματική μου εμπειρία.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φοιτητές των διαφόρων εργαστηρίων του ΓΠΑ με τους οποίους συνεργάστηκα αυτά τα χρόνια. Το Νικόλαο Αγαλόπουλο, το Θανάση Μπίζο, τη Δέσποινα Καπαμά, τη Μίνα Αντωνοπούλου, τη Δέσποινα Κολοβού και την Ελένη Γαλάνη.

Δε θα ήθελα να παραλείψω από τις ευχαριστίες τούς υπεύθυνους ασφάλειας των πυλών του ΓΠΑ, οι οποίοι παρέμειναν άγρυπνοι φρουροί τις ώρες και τις μέρες που ο ερευνητικός ενθουσιασμός και το πείσμα γίνονταν ανυπότακτα σε ωράριο.

Η παραπάνω προσπάθεια δε θα μπορούσε να υλοποιηθεί χωρίς τους συνεργάτες μου, φιστικοπαραγωγούς, οι οποίοι μού παραχώρησαν τα δείγματα κελυφωτών φιστικιών.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στους δικούς μου ανθρώπους, που κατονομάζω στην ψυχή μου, για την αμέριστη πρακτική και ηθική συμπαράσταση.

Δήλωση έργου

Θα πρέπει να επισημανθεί ότι η παρούσα διδακτορική διατριβή υλοποιήθηκε στο πλαίσιο της «1^{ης} Προκήρυξης Υποτροφιών ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ για Υποψηφίους Διδάκτορες» με αριθ. πρωτ. 185494/Ι2/3-11-2016, μετά την επιτυχή μου συμμετοχή στους δικαιούχους των Δράσεων ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ.

Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της.

Περιεχόμενα

Περίληψη	I
Abstract	V
Ευχαριστίες	IX
Δήλωση έργου	XIV
Περιεχόμενα	XV
Κατάλογος σχημάτων	XIX
Κατάλογος πινάκων	XXVII
Κατάλογος συντημήσεων	XXX
Εισαγωγή	1
Μέρος Α: Θεωρητικό μέρος	4
A.1. Φιστικά και κελυφωτό φιστίκι	4
A.1.1. Ιστορικά στοιχεία	4
A.1.2. Παραγωγή σε παγκόσμιο και εγχώριο επίπεδο	5
A.1.3. Χαρακτηριστικά	9
A.1.3.1. Μορφολογία	9
A.1.3.2. Ανάπτυξη φιστικιάς	9
A.1.3.3. Χρήση	10
A.1.4. Σύσταση και θρεπτική αξία	11
A.1.4.1. Περιεκτικότητα σε λιπίδια	13
A.1.4.2. Περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες	15
A.1.4.3. Περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες και φυτικές ίνες	15
A.1.4.4. Περιεκτικότητα σε βιταμίνες και ιχνοστοιχεία	15
A.1.4.5. Περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά	17
A.1.5. Συμβολή στην ανθρώπινη υγεία	17
A.1.6. Φασματοσκοπικές τεχνικές - Φυσικοχημικοί παράμετροι	19
A.1.6.1. Υπέρυθρη φασματοσκοπία με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform InfraRed, FTIR, spectroscopy	19
A.1.6.1.1. Τεχνική διάχυτης ανάκλασης υπέρυθρης φασματοσκοπίας μετασχηματισμού Fourier (Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform, DRIFTS)	20
A.1.6.1.2. Τεχνική δισκίου KBr-δείγματος	20
A.1.6.1.3. Τεχνική εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (Attenuated Total Reflection, ATR)	20
A.1.6.2. Φασματοσκοπία Raman	21
A.1.6.3. Φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UltraViolet-Visible, UV-Vis)	21
A.1.6.4. Εκτίμηση ελεύθερης οξύτητας και ποσοστού ελεύθερων λιπαρών οξέων	22
A.1.6.5. Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας	23
A.1.6.5.1. Δοκιμή DPPH	24
A.1.6.5.2. Δοκιμή ABTS	24
A.1.6.6. Εκτίμηση πολικών φαινολών με τη δοκιμή Folin-Ciocalteu	24
A.1.6.7. Ανάλυση τοκοφερολών με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) συζευγμένη με φθορισμομετρικό ανιχνευτή (FLuorescence Detector, FLD)	24
A.1.6.8. Αεριοχρωματογραφική ανάλυση (Gas Chromatography, GC) συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry, MS)	26
A.1.6.8.1. Προσδιορισμός λιπαρών οξέων	26

A.1.6.8.2. Προσδιορισμός πτητικών συστατικών με την τεχνική μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (head space-solid phase microextraction, HS-SPME)	29
A.1.6.9. Διερεύνηση μυκητολογικής ποιότητας και σταθερότητας	30
A.1.6.9.1. Καταμέτρηση μυκήτων	32
A.1.6.9.2. Απομόνωση μυκήτων	33
A.1.6.9.3. Ταυτοποίηση μυκήτων	33
A.1.7. Στατιστική επεξεργασία	34
Σκοπός	40
Μέρος Β: Πειραματικό μέρος	41
B.1. Δειγματοληψία-Επεξεργασία δειγμάτων-Κωδικοποίηση-Προσδιορισμός υγρασίας -Κλιματικές συνθήκες	41
B.1.1. Δειγματοληψία-Επεξεργασία δειγμάτων-Κωδικοποίηση	41
B.1.2. Προσδιορισμός της υγρασίας	45
B.1.3. Κλιματικές συνθήκες	45
B.2. Φασματοσκοπική μελέτη της ψίχας με χρήση της φασματοσκοπίας FTIR - Ανάπτυξη χημειομετρικού μοντέλου διαφοροποίησης των δειγμάτων ανάλογα με το έτος συγκομιδής	47
B.2.1. Πειραματική διαδικασία	47
B.2.1.1. Τεχνική δισκίου KBr-δείγματος	47
B.2.1.2. Τεχνική DRIFTS	48
B.2.1.3. Επεξεργασία φασμάτων FTIR	48
B.2.2. Αποτελέσματα-Συζήτηση	53
B.2.2.1. Φασματοσκοπική μελέτη της ψίχας κελυφωτού φιστικιού	53
B.2.2.2. Σύγκριση 15 δειγμάτων 2017 και 30 δειγμάτων 2018	56
B.2.2.2.1. Τεχνική δισκίου	56
B.2.2.2.2. Τεχνική DRIFTS	60
B.2.2.3. Σύγκριση 11 δειγμάτων 2017 και 11 δειγμάτων 2018	63
B.2.2.3.1. Τεχνική δισκίου	63
B.2.2.3.2. Τεχνική DRIFTS	67
B.2.3. Συμπεράσματα	69
B.3. Παραλαβή φιστικελαιίου - Ανάπτυξη χημειομετρικού μοντέλου διαφοροποίησης των δειγμάτων με βάση την απόδοση σε φιστικέλαιο και ανάλογα με το έτος συγκομιδής	71
B.3.1. Πειραματική διαδικασία	71
B.3.2. Αποτελέσματα-Συζήτηση	74
B.3.2.1. Σύγκριση 15 δειγμάτων 2017 και 30 δειγμάτων 2018	77
B.3.2.2. Σύγκριση 11 δειγμάτων 2017 και 11 δειγμάτων 2018	77
B.3.3. Συμπεράσματα	78
B.4. Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας φιστικελαιίου - Ανάπτυξη χημειομετρικών μοντέλων διαφοροποίησης των δειγμάτων ανάλογα με τη δοκιμή (DPPH, ABTS) και με το έτος συγκομιδής	79
B.4.1. Δοκιμή DPPH	79
B.4.1.1. Πειραματική διαδικασία	79
B.4.1.2. Αποτελέσματα-Συζήτηση	80
B.4.1.2.1. Σύγκριση 15 δειγμάτων 2017 και 30 δειγμάτων 2018	83
B.4.1.2.2. Σύγκριση 11 δειγμάτων 2017 και 11 δειγμάτων 2018	83
B.4.2. Δοκιμή ABTS	84
B.4.2.1. Πειραματική διαδικασία	84
B.4.2.2. Αποτελέσματα-Συζήτηση	85

B.4.2.2.1. Σύγκριση 15 δειγμάτων 2017 και 30 δειγμάτων 2018	88
B.4.2.2.2. Σύγκριση 11 δειγμάτων 2017 και 11 δειγμάτων 2018	88
B.4.3. Συμπεράσματα	89
B.5. Προσδιορισμός πολικών φαινολών με τη δοκιμή Folin-Ciocalteu - Ανάπτυξη χημειομετρικού μοντέλου διαφοροποίησης των δειγμάτων ανάλογα με το έτος συγκομιδής	91
B.5.1. Πειραματική διαδικασία	91
B.5.2. Αποτελέσματα-Συζήτηση	92
B.5.2.1. Σύγκριση 15 δειγμάτων 2017 και 30 δειγμάτων 2018	95
B.5.2.2. Σύγκριση 11 δειγμάτων 2017 και 11 δειγμάτων 2018	95
B.5.3. Συμπεράσματα	96
B.6. Φασματοσκοπική μελέτη με την τεχνική UV-Vis - Ανάπτυξη χημειομετρικών μοντέλων διαφοροποίησης των δειγμάτων ανάλογα με τις τιμές των δεικτών k , Δk και με το έτος συγκομιδής	97
B.6.1. Πειραματική διαδικασία	97
B.6.2. Αποτελέσματα-Συζήτηση	98
B.6.2.1. Σύγκριση 15 δειγμάτων 2017 και 30 δειγμάτων 2018	101
B.6.2.2. Σύγκριση 11 δειγμάτων 2017 και 11 δειγμάτων 2018	102
B.6.3. Συμπεράσματα	103
B.7. Προσδιορισμός της ελεύθερης οξύτητας και του ποσοστού ελεύθερων λιπαρών οξέων - Ανάπτυξη χημειομετρικού μοντέλου διαφοροποίησης των δειγμάτων ανάλογα με το έτος συγκομιδής	104
B.7.1. Πειραματική διαδικασία	104
B.7.2. Αποτελέσματα-Συζήτηση	105
B.7.2.1. Σύγκριση 15 δειγμάτων 2017 και 30 δειγμάτων 2018	108
B.7.2.2. Σύγκριση 11 δειγμάτων 2017 και 11 δειγμάτων 2018	109
B.7.3. Συμπεράσματα	109
B.8. Ανάλυση τοκοφερολών με HPLC-FLD - Ανάπτυξη χημειομετρικού μοντέλου ανάλογα με το έτος συγκομιδής	111
B.8.1. Πειραματική διαδικασία	111
B.8.2. Αποτελέσματα-Συζήτηση	112
B.8.2.1. Σύγκριση 15 δειγμάτων 2017 και 30 δειγμάτων 2018	118
B.8.2.2. Σύγκριση 11 δειγμάτων 2017 και 11 δειγμάτων 2018	118
B.8.3. Συμπεράσματα	119
B.9. Φασματοσκοπική μελέτη φιστικελαίου με την τεχνική ATR - Ανάπτυξη χημειομετρικού μοντέλου ανάλογα με το έτος συγκομιδής	120
B.9.1. Πειραματική διαδικασία	120
B.9.2. Αποτελέσματα-Συζήτηση	121
B.9.2.1. Σύγκριση 15 δειγμάτων 2017 και 30 δειγμάτων 2018	124
B.9.2.2. Σύγκριση 11 δειγμάτων 2017 και 11 δειγμάτων 2018	127
B.9.3. Συμπεράσματα	131
B.10. Φασματοσκοπική μελέτη φιστικελαίου με φασματοσκοπία Raman - Ανάπτυξη χημειομετρικού μοντέλου ανάλογα με το έτος συγκομιδής	132
B.10.1. Πειραματική διαδικασία	132
B.10.2. Αποτελέσματα-Συζήτηση	133
B.10.2.1. Σύγκριση 15 δειγμάτων 2017 και 30 δειγμάτων 2018	134
B.10.2.2. Σύγκριση 11 δειγμάτων 2017 και 11 δειγμάτων 2018	137
B.10.3. Συμπεράσματα	140

B.11. Ανάλυση μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων (fatty acids methyl esters, FAMES) φιστικελαίου με χρήση του GC-MS - Ανάπτυξη χημειομετρικού μοντέλου ανάλογα με το έτος συγκομιδής	141
B.11.1. Πειραματική διαδικασία	141
B.11.2. Αποτελέσματα-Συζήτηση	142
B.11.2.1. Σύγκριση 15 δειγμάτων 2017 και 30 δειγμάτων 2018	147
B.11.2.2. Σύγκριση 11 δειγμάτων 2017 και 11 δειγμάτων 2018	153
B.11.3. Συμπεράσματα	158
B.12. Προσδιορισμός πτητικών συστατικών με SPME	159
B.12.1. Πειραματική διαδικασία	159
B.12.2. Αποτελέσματα-Συζήτηση	161
B.12.2.1. Σύγκριση 15 δειγμάτων 2017 και 30 δειγμάτων 2018	171
B.12.2.2. Σύγκριση 11 δειγμάτων 2017 και 11 δειγμάτων 2018	175
B.12.3. Συμπεράσματα	179
B.13. Διερεύνηση μυκητολογικής ποιότητας και σταθερότητας νωπού κελυφωτού φιστικιού (<i>Pistacia vera</i>) υπό συσκευασία κενού και αέρα για διάστημα τριών μηνών	180
B.13.1. Πειραματική διαδικασία	180
B.13.1.1. Καταμέτρηση	180
B.13.1.2. Απομόνωση και Ταυτοποίηση	181
B.13.2. Αποτελέσματα-Συζήτηση	182
B.13.2.1. Καταμέτρηση	182
B.13.2.2. Ταυτοποίηση	184
B.13.3. Συμπεράσματα	185
B.14. Γενικά συμπεράσματα	186
B.15. Επόμενες ερευνητικές προτάσεις	190
Βιβλιογραφία	191
Διεθνής	191
Ελληνική	215
Πίνακας χημικών ενώσεων	217
Επιστημονικές δημοσιεύσεις που προέκυψαν από τη διδακτορική διατριβή	248

Κατάλογος σχημάτων

Αριθμός	Περιεχόμενα	Σελίδα
Μέρος Α: Θεωρητικό μέρος		
A.1.2.1	Παραγωγή καρπών (σε τόνους) σε παγκόσμιο επίπεδο το χρονικό διάστημα 2011-2021	5
A.1.2.2	Παραγωγή καρπών (σε τόνους) σε παγκόσμιο επίπεδο το χρονικό διάστημα 2020-2021	6
A.1.2.3	Παγκόσμια εκτιμώμενη κατανάλωση ξηρών καρπών (σε τόνους) για το έτος 2019	6
A.1.2.4	Παραγωγή κελυφωτών φιστικιών σε διεθνές επίπεδο το χρονικό διάστημα 1961-2019	7
A.1.2.5	Παραγωγή κελυφωτών φιστικιών σε εγχώριο επίπεδο το χρονικό διάστημα 1961-2019	7
A.1.2.6	Μερίδιο παραγωγής κελυφωτών φιστικιών ανά ήπειρο το χρονικό διάστημα 1961-2019	8
A.1.2.7	Οι κορυφαίες φιστικοπαραγωγικές χώρες του κόσμου το χρονικό διάστημα 1961-2019	8
A.1.3.1.1	Χαρακτηριστικά καρπού κελυφωτού φιστικιού	9
A.1.6.7.1	Χημική δομή τοκοφερολών και τοκοτριενολών	25
A.1.6.8.1.1	Σχηματική απεικόνιση αεριοχρωματογράφου	28
A.1.6.8.2.1	Συσκευή δειγματοληψίας μέσω τεχνικής HS-SPME	30
A.1.6.9.1	Δομή μύκητα: Α) χωρίς septa και Β) με septa	31
Μέρος Β: Πειραματικό μέρος		
B.1.1.1	Κοκκομέτρηση δείγματος που προηγουμένως έχει αλεσθεί	44
B.2.1.3.1	Ενδεικτικό ανεπεξέργαστο φάσμα (1 ^η επανάληψη)	49
B.2.1.3.2	Ενδεικτικό ανεπεξέργαστο φάσμα (2 ^η επανάληψη)	49
B.2.1.3.3	Ενδεικτικό ανεπεξέργαστο φάσμα (3 ^η επανάληψη)	50
B.2.1.3.4	Εξομάλυνση (automatic smooth) της 1 ^{ης} επανάληψης	50
B.2.1.3.5	Εξομάλυνση (automatic smooth) της 2 ^{ης} επανάληψης	50
B.2.1.3.6	Εξομάλυνση (automatic smooth) της 3 ^{ης} επανάληψης	51
B.2.1.3.7	Διόρθωση της βασικής γραμμής (automatic baseline correct) της 1 ^{ης} επανάληψης	51

B.2.1.3.8	Διόρθωση της βασικής γραμμής (automatic baseline correct) της 2 ^{ης} επανάληψης	51
B.2.1.3.9	Διόρθωση της βασικής γραμμής (automatic baseline correct) της 3 ^{ης} επανάληψης	52
B.2.1.3.10	Μέσο φάσμα των τριών επαναλήψεων από τα φάσματα μετά τη διόρθωση της βασικής γραμμής	52
B.2.1.3.11	Μετασχηματισμός του μέσου φάσματος με τον αλγόριθμο Kubelka-Munk	52
B.2.1.3.12	Κανονικοποίηση της κλίμακας απορρόφησης	53
B.2.2.1.1	Αντιπροσωπευτικά φάσματα FTIR κοκκομετρημένης ψίχας κελυφωτού φιστικιού με την τεχνική δισκίων από τα έτη συγκομιδής 2017 και 2018, προερχόμενα από τον ίδιο παραγωγό	54
B.2.2.1.2	Αντιπροσωπευτικά φάσματα FTIR κοκκομετρημένης ψίχας κελυφωτού φιστικιού με την τεχνική DRIFTS από τα έτη συγκομιδής 2017 και 2018, προερχόμενα από τον ίδιο παραγωγό	55
B.2.2.2.1.1	PLS-DA 2D scores plot για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική δισκίου σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	57
B.2.2.2.1.2	Γράφημα επεξηγηματικής διακύμανσης για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική δισκίου σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	57
B.2.2.2.1.3	PLS-DA διασταυρούμενη επικύρωση (cross-validation) για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική δισκίου σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	58
B.2.2.2.1.4	PLS-DA permutation test για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική δισκίου σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	59
B.2.2.2.1.5	T-test για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική δισκίου σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	59
B.2.2.2.2.1	PLS-DA 2D scores plot για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική DRIFTS σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	60
B.2.2.2.2.2	Γράφημα επεξηγηματικής διακύμανσης για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική DRIFTS σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	61

B.2.2.2.2.3	PLS-DA διασταυρούμενη επικύρωση (cross-validation) για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική DRIFTs σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	61
B.2.2.2.2.4	PLS-DA permutation test για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική DRIFTs σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	62
B.2.2.2.2.5	T-test για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική DRIFTs σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	63
B.2.2.3.1.1	PLS-DA 2D scores plot για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική δισκίου σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	64
B.2.2.3.1.2	Γράφημα επεξηγηματικής διακύμανσης για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική δισκίου σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	64
B.2.2.3.1.3	PLS-DA διασταυρούμενη επικύρωση (cross-validation) για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική δισκίου σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	65
B.2.2.3.1.4	PLS-DA permutation test για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική δισκίου σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	66
B.2.2.3.1.5	T-test για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική δισκίου σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	66
B.2.2.3.2.1	PLS-DA 2D scores plot για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική DRIFTs σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	67
B.2.2.3.2.2	Γράφημα επεξηγηματικής διακύμανσης για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική DRIFTs σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	68
B.2.2.3.2.3	PLS-DA διασταυρούμενη επικύρωση (cross-validation) για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική DRIFTs σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	68
B.2.2.3.2.4	PLS-DA permutation test για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική DRIFTs σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	69
B.3.1.1	Συσκευή ημισυνεχούς εκχύλισης Soxhlet	72
B.3.1.2	Κοκκομετρημένο δείγμα πριν την εκχύλιση του ελαίου	73
B.3.1.3	Περιστροφικός εξατμιστήρας κενού	73
B.3.1.4	Στερεό υπόλειμμα δείγματος μετά την εκχύλιση του ελαίου	73

B.4.1.1.1	Καμπύλη βαθμονόμησης διαλυμάτων Trolox για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη δοκιμή DPPH	80
B.4.2.1.1	Καμπύλη βαθμονόμησης διαλυμάτων Trolox για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη δοκιμή ABTS	85
B.4.3.1	Σύγκριση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δοκιμών DPPH και ABTS	90
B.4.3.2	Σύγκριση του ποσοστού παρεμποδιστικής δράσης των δοκιμών DPPH και ABTS	90
B.4.3.3	Γενική δομή φλαβονοειδών	90
B.5.1.1	Καμπύλη βαθμονόμησης πρότυπων διαλυμάτων γαλλικού οξέος για τον προσδιορισμό των πολικών φαινολών με τη δοκιμή Folin-Ciocalteu	92
B.7.1.1	Αντίδραση KHP με NaOH	104
B.7.2.1	Σχηματισμός των τριγλυκεριδίων	108
B.8.2.1	Καμπύλη βαθμονόμησης α-τοκοφερόλης	113
B.8.2.2	Καμπύλη βαθμονόμησης β-τοκοφερόλης	113
B.8.2.3	Καμπύλη βαθμονόμησης γ-τοκοφερόλης	114
B.8.2.4	Καμπύλη βαθμονόμησης δ-τοκοφερόλης	114
B.8.2.5	Χρωματογραφήματα HPLC-FLD ενός μείγματος πρότυπου διαλύματος τοκοφερολών (Α) και ενός δείγματος φιστικελαίου (Β)	115
B.9.2.1	Αντιπροσωπευτικά φάσματα FTIR-ATR δειγμάτων φιστικελαίου ίδιας προέλευσης, αλλά από διαφορετικά έτη συγκομιδής, 2017 (Α) και 2018 (Β)	121
B.9.2.1.1	PLS-DA 2D scores plot για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική ATR σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	124
B.9.2.1.2	Γράφημα επεξηγηματικής διακύμανσης για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική ATR σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	125
B.9.2.1.3	PLS-DA διασταυρούμενη επικύρωση (cross-validation) για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική ATR σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	125
B.9.2.1.4	PLS-DA permutation test για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική ATR σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	126

B.9.2.1.5	T-test για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική ATR σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	127
B.9.2.2.1	PLS-DA 2D scores plot για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική ATR σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	128
B.9.2.2.2	Γράφημα επεξηγηματικής διακύμανσης για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική ATR σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	128
B.9.2.2.3	PLS-DA διασταυρούμενη επικύρωση (cross-validation) για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική ATR σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	129
B.9.2.2.4	PLS-DA permutation test για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική ATR σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	130
B.9.2.2.5	T-test για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική ATR σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	131
B.10.2.1	Αντιπροσωπευτικά φάσματα Raman δειγμάτων φιστικελαιίου προερχόμενα από τον ίδιο παραγωγό, αλλά από διαφορετικά έτη συγκομιδής, 2017 (A) και 2018 (B)	133
B.10.2.1.1	PLS-DA 2D scores plot για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική Raman σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	135
B.10.2.1.2	Γράφημα επεξηγηματικής διακύμανσης για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική Raman σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	135
B.10.2.1.3	PLS-DA διασταυρούμενη επικύρωση (cross-validation) για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική Raman σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	136
B.10.2.1.4	T-test για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική Raman σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	137
B.10.2.2.1	PLS-DA 2D scores plot για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική Raman σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	138
B.10.2.2.2	Γράφημα επεξηγηματικής διακύμανσης για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική Raman σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	138

B.10.2.2.3	PLS-DA διασταυρούμενη επικύρωση (cross-validation) για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική Raman σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	139
B.10.2.2.4	T-test για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική Raman σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	140
B.11.2.1	Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα των FAMES του φιστικελαίου	143
B.11.2.1.1	PLS-DA 2D scores plot για το μοντέλο διάκρισης των λιπαρών οξέων σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	149
B.11.2.1.2	Γράφημα επεξηγηματικής διακύμανσης για το μοντέλο διάκρισης των λιπαρών οξέων σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	149
B.11.2.1.3	PLS-DA διασταυρούμενη επικύρωση (cross-validation) για το μοντέλο διάκρισης των λιπαρών οξέων σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	150
B.11.2.1.4	PLS-DA permutation test για το μοντέλο διάκρισης των λιπαρών οξέων σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	151
B.11.2.1.5	T-test για το μοντέλο διάκρισης των λιπαρών οξέων σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	152
B.11.2.1.6	PLS-DA χαρακτηριστικά σπουδαιότητας για το μοντέλο διάκρισης των λιπαρών οξέων σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	152
B.11.2.2.1	PLS-DA 2D scores plot για το μοντέλο διάκρισης των λιπαρών οξέων σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	154
B.11.2.2.2	Γράφημα επεξηγηματικής διακύμανσης για το μοντέλο διάκρισης των λιπαρών οξέων σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	154
B.11.2.2.3	PLS-DA διασταυρούμενη επικύρωση (cross-validation) για το μοντέλο διάκρισης των λιπαρών οξέων σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	155
B.11.2.2.4	PLS-DA permutation test για το μοντέλο διάκρισης των λιπαρών οξέων σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	156
B.11.2.2.5	T-test για το μοντέλο διάκρισης των λιπαρών οξέων σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	157
B.11.2.2.6	PLS-DA χαρακτηριστικά σπουδαιότητας για το μοντέλο διάκρισης των λιπαρών οξέων σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	157

B.12.2.1	Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του φιστικελαίου	162
B.12.2.1.1	PLS-DA 2D scores plot για το μοντέλο διάκρισης των πτητικών συστατικών σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	171
B.12.2.1.2	Γράφημα επεξηγηματικής διακύμανσης για το μοντέλο διάκρισης των πτητικών συστατικών σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	172
B.12.2.1.3	PLS-DA διασταυρούμενη επικύρωση (cross-validation) για το μοντέλο διάκρισης των πτητικών συστατικών σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	172
B.12.2.1.4	PLS-DA permutation test για το μοντέλο διάκρισης των πτητικών συστατικών σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	173
B.12.2.1.5	T-test για το μοντέλο διάκρισης των πτητικών συστατικών σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	174
B.12.2.1.6	PLS-DA χαρακτηριστικά σπουδαιότητας για το μοντέλο διάκρισης των πτητικών συστατικών σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	174
B.12.2.2.1	PLS-DA 2D scores plot για το μοντέλο διάκρισης των πτητικών συστατικών σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	175
B.12.2.2.2	Γράφημα επεξηγηματικής διακύμανσης για το μοντέλο διάκρισης των πτητικών συστατικών σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	176
B.12.2.2.3	PLS-DA διασταυρούμενη επικύρωση (cross-validation) για το μοντέλο διάκρισης των πτητικών συστατικών σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	176
B.12.2.2.4	PLS-DA permutation test για το μοντέλο διάκρισης των πτητικών συστατικών σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	177
B.12.2.2.5	T-test για το μοντέλο διάκρισης των πτητικών συστατικών σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	178
B.12.2.2.6	PLS-DA χαρακτηριστικά σπουδαιότητας για το μοντέλο διάκρισης των πτητικών συστατικών σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	178
B.13.2.1.1	Τρυβλία με την τεχνική επίστρωσης Direct Plating	183
B.13.2.1.2	Μεταβολή του πληθυσμού των ζυμών και μυκήτων με την τεχνική Direct Plating κατά τη συσκευασία νωπού κελυφωτού φιστικιού σε συσκευασία κενού και αέρα για χρονικό διάστημα τριών μηνών	183

B.13.2.1.3	Μεταβολή του πληθυσμού των ζυμών και μυκήτων με την τεχνική Dilution Plating κατά τη συσκευασία νωπού κελυφωτού φιστικιού σε συσκευασία κενού και αέρα για χρονικό διάστημα τριών μηνών	184
------------	---	-----

Κατάλογος πινάκων

Αριθμός	Περιεχόμενα	Σελίδα
Μέρος Α: Θεωρητικό μέρος		
A.1.4.1	Διατροφική αξία (περιεκτικότητα ανά 100 g αποξηραμένης ψίχας) κελυφωτών φιστικιών	12
A.1.6.9.1	Ενδεικτικός διαχωρισμός και ταξινόμηση μυκήτων	32
Μέρος Β: Πειραματικό μέρος		
B.1.1.1	Κωδικοποίηση δειγμάτων κελυφωτών φιστικιών	43
B.1.3.1	Μέση μηνιαία θερμοκρασία για δύο διαδοχικά έτη συγκομιδής σύμφωνα με τους πλησιέστερους στις καλλιεργητικές περιοχές μετεωρολογικούς σταθμούς	45
B.1.3.2	Μέσο μηνιαίο ύψος νετού για δύο διαδοχικά έτη συγκομιδής σύμφωνα με τους πλησιέστερους στις καλλιεργητικές περιοχές μετεωρολογικούς σταθμούς	46
B.2.2.1.1	Απόδοση των κορυφών του φάσματος κοκκομετρημένης ψίχας κελυφωτού φιστικιού	55
B.2.2.2.1.1	PLS-DA απόδοση μοντέλου διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική δισκίου σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	58
B.2.2.2.2.1	PLS-DA απόδοση μοντέλου διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική DRIFTS σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	62
B.2.2.3.1.1	PLS-DA απόδοση μοντέλου διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική δισκίου σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	65
B.2.2.3.2.1	PLS-DA απόδοση μοντέλου διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική DRIFTS σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	69
B.3.2.1	Απόδοση σε φιστικέλαιο (g ελαίου/100 g ξηρού δείγματος) των κελυφωτών φιστικιών ποικιλίας «Αιγίνης» προερχόμενων από δύο διαδοχικά έτη συγκομιδής (2017, 2018)	74
B.4.1.2.1	Η αντιοξειδωτική ικανότητα και η παρεμποδιστική δράση των φιστικελαίων προσδιορισμένες με τη δοκιμή DPPH	81

B.4.2.2.1	Η αντιοξειδωτική ικανότητα και το ποσοστό παρεμποδιστικής δράσης των φιστικελαίων προσδιορισμένα με τη δοκιμή ABTS	86
B.5.2.1	Πολικές φαινόλες φιστικελαίων σύμφωνα με τη δοκιμή Folin-Ciocalteau	93
B.6.2.1	Δείκτες ποιότητας k και Δk των δειγμάτων φιστικελαίου έναντι των αντίστοιχων τιμών του εξαιρετικού παρθένου ελαιόλαδου	99
B.7.2.1	Τιμές ελεύθερης οξύτητας και ελεύθερων λιπαρών οξέων των δειγμάτων φιστικελαίου έναντι των αντίστοιχων τιμών του εξαιρετικού παρθένου ελαιόλαδου	106
B.8.2.1	Περιεκτικότητα δειγμάτων φιστικελαίου σε τοκοφερόλες ($\times 10^2$ $\mu\text{g/mL}$ φιστικελαίου)	116
B.9.2.1	Απόδοση των κορυφών των FTIR-ATR φασμάτων δειγμάτων φιστικελαίου	122
B.9.2.1.1	PLS-DA απόδοση μοντέλου διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική ATR σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	126
B.9.2.2.1	PLS-DA απόδοση μοντέλου διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική ATR σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	129
B.10.2.1	Απόδοση των κορυφών του Raman φάσματος φιστικελαίου	133
B.10.2.1.1	PLS-DA απόδοση μοντέλου διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική Raman σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	136
B.10.2.2.1	PLS-DA απόδοση μοντέλου διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική Raman σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	139
B.11.2.1	Σύνθεση λιπαρών οξέων (g λιπαρού οξέος/100 g ολικών λιπαρών οξέων) φιστικελαίων	144
B.11.2.2	Περιεχόμενο φιστικελαίων σε κορεσμένα, ακόρεστα και μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (g λιπαρών οξέων/100 g ολικών λιπαρών οξέων)	146
B.11.2.1.1	PLS-DA απόδοση μοντέλου διάκρισης των λιπαρών οξέων σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	150
B.11.2.2.1	PLS-DA απόδοση μοντέλου διάκρισης των λιπαρών οξέων σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	155

B.12.2.1	Σύνθεση πτητικών συστατικών (%) των φιστικελαίων για το έτος συγκομιδής 2017	163
B.12.2.2	Σύνθεση πτητικών συστατικών (%) των φιστικελαίων για το έτος συγκομιδής 2018 (μέρος 1)	165
B.12.2.3	Σύνθεση πτητικών συστατικών (%) των φιστικελαίων για το έτος συγκομιδής 2018 (μέρος 2)	167
B.12.2.4	Σύγκριση του μέσου όρου των πτητικών συστατικών (%) των φιστικελαίων για τα δύο έτη συγκομιδής	169
B.12.2.1.1	PLS-DA απόδοση μοντέλου διάκρισης πτητικών συστατικών σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	173
B.12.2.2.1	PLS-DA απόδοση μοντέλου διάκρισης πτητικών συστατικών σύμφωνα με το έτος συγκομιδής	177

Κατάλογος συντμήσεων

Σύντμηση	Ξένη ονομασία	Ελληνική ονομασία
APCI	atmospheric pressure chemical ionization	χημικός ιοντισμός υπό ατμοσφαιρική πίεση
ATR	attenuated total reflection	εξασθενημένη ολική ανάκλαση
a_w	water activity	ενεργότητα ύδατος
CAR	carboxen	καρβοξένιο
CYA	Czapek yeast extract agar	θρεπτικό υπόστρωμα αγαρόζης εκχυλίσματος ζυμών Czapek
DRBC agar	dichloran rose bengal chloramphenicol agar	άγαρ με διχλωράνιο, ροδόχρουν της Βεγγάλης και χλωραμφενικόλη
DRIFTs	diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy	διάχυτη ανάκλαση υπέρυθρης φασματοσκοπίας μετασχηματισμού Fourier
DTGS	deuterated triglycine sulfate	δευτεριωμένη θειϊκή τριγλυκίνη
DVB	divinylbenzene	διβινυλοβενζόλιο
ES	external standard	εξωτερικό πρότυπο
ESI	electrospray ionization	ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό
FAMEs	fatty acids methyl esters	μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων
FDA	food and drug administration	οργανισμός τροφίμων και φαρμάκων των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής
FLD	fluorescence detector	φθορισμομετρικός ανιχνευτής
FTIR spectroscopy	Fourier transform infrared spectroscopy	υπέρυθρη φασματοσκοπία με μετασχηματισμό Fourier
G25N	glycerol 25% nitrate agar	νιτρικό άγαρ με 25% γλυκερίνη
GAE	gallic acid equivalents	ισοδύναμα γαλλικού οξέος
GC	gas chromatography	αέρια χρωματογραφία
HDL	high density lipoprotein	λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας
HPLC	high pressure (performance) liquid chromatography	υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (απόδοσης)

HS-SPME	head space-solid phase microextraction	μικροεκχύλιση στερεάς φάσης
IQR	interquartile range	διατεταρτημοριακό εύρος
IR	infrared	υπέρυθρο
IS	internal standard	εσωτερικό πρότυπο
KHP	potassium hydrogen phthalate	όξινο φθαλικό κάλιο
KRI	Kovats retention index/indices	δείκτης/ες συγκράτησης Kovats
LDL	low density lipoprotein	λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας
LOD	limit of detection	όριο ανίχνευσης
LOO cross validation	leave-one-out cross validation	διασταυρούμενη επικύρωση με την τεχνική leave-one-out
LOQ	limit of quantification	όριο ποσοτικοποίησης
MEA	malt extract agar	άγαρ εκχυλίσματος βύνης
MS	mass spectrometry	φασματομετρία μάζας/μαζών
NIST	National Institute of Standards and Technology	Εθνικό Ινστιτούτο Προτύπων και Τεχνολογίας
NP-HPLC	normal phase-HPLC	HPLC κανονικής φάσης
PC	principal components	κύριες συνιστώσες
PDMS	polydimethylsiloxane	πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο
PLS-DA	partial least squares-discriminant analysis	διακριτική ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων
RP-HPLC	reversed phase-HPLC	HPLC αντίστροφης φάσης
RT	retention time	χρόνος συγκράτησης
TPC	total phenolic content	ολικό φαινολικό περιεχόμενο
UV-Vis	ultraviolet-visible	υπεριώδες-ορατό
VIP	Variables Importance in the Projection	σημαντικότητα μεταβλητών στην πρόβλεψη
ΦΑ	-	φιστίκι σε συσκευασία με αέρα
ΦΚ	-	φιστίκι σε συσκευασία υπό κενό

Εισαγωγή

Τα κελυφωτά φιστίκια (*Pistacia vera*) αποτελούν μέρος της διατροφής μας και έχουν μακρά ιστορία αποδοχής και χρήσης από διαφορετικούς πληθυσμούς σε όλο τον κόσμο (Mandalari et al., 2022). Το θρεπτικό προφίλ και οι βιοδραστικές ιδιότητες των κελυφωτών φιστικιών συμβάλλουν σε διατροφή υψηλής ποιότητας και επιδημιολογικές και κλινικές μελέτες έχουν αποδείξει την ευεργετική επίδραση της κατανάλωσής τους στην ανθρώπινη υγεία (Hernández-Alonso, Bulló, & Salas-Salvadó, 2016· Terzo et al., 2020). Ειδικότερα τα κελυφωτά φιστίκια ποικιλίας Αιγίνης ανήκουν στα εμβληματικά για την ελληνική χώρα προϊόντα. Ωστόσο παρατηρείται έλλειψη σε επιστημονικές έρευνες για τη συγκεκριμένη ποικιλία. Δεν υπάρχουν μελέτες που να εστιάζουν στη γεωγραφική διαφοροποίηση κελυφωτών φιστικιών ή φιστικελαίων ποικιλίας Αιγίνης, ούτε μελέτες που να διερευνούν τη διαφοροποίηση κελυφωτών φιστικιών ή φιστικελαίων ποικιλίας Αιγίνης βάσει καλλιεργητικών συνθηκών. Επιπρόσθετα, δεν υπάρχουν δημοσιευμένες εργασίες στη διεθνή βιβλιογραφία που να αφορούν τη διαφοροποίησή τους ανάλογα με το έτος συγκομιδής, συνεπώς και ανάλογα με την ποιότητά τους, καθώς επίσης για το ποιοτικό προφίλ του φιστικελαίου που εξάγεται και τη διαφοροποίησή του ανάλογα με το έτος συγκομιδής των φιστικιών από τα οποία προέρχεται.

Υπάρχει επιστημονική συναίνεση ότι η ποιότητα και κατ'επέκταση τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά ενός τροφίμου μεταβάλλονται λόγω κλιματικών αλλαγών. Η αναγκαιότητα για κατανάλωση τροφίμων υψηλής ποιότητας οδήγησε στην προσπάθεια ανάπτυξης χημειομετρικών μοντέλων διαφοροποίησης των κελυφωτών φιστικιών (*Pistacia vera*), ποικιλία Αιγίνης, και των φιστικελαίων τους βάσει δύο διαδοχικών ετών συγκομιδής και επομένως βάσει της ποιότητά τους, με τη χρήση γρήγορων αναλυτικών τεχνικών.

Υπό αυτό το πρίσμα πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπική μελέτη της ψίχας κελυφωτών φιστικιών ποικιλίας Αιγίνης με χρήση δύο τεχνικών (διάχυτης ανάκλασης υπέρυθρης φασματοσκοπίας μετασχηματισμού Fourier (DRIFTS) και δισκίου KBr-δείγματος) της υπέρυθρης φασματοσκοπίας μετασχηματισμού Fourier (FTIR).

Διαφορές στην περιεκτικότητα του καρπού σε φιστικέλαιο σχετίζονται με κλιματικούς παράγοντες (Minioti & Georgiou, 2010· Yu, Wang, Zhan, & Huang, 2017). Σύμφωνα με μελέτη των Arena, Campisi, Fallico και Maccarone (2007) ενδέχεται το θερμό κλίμα να σχετίζεται με μεγαλύτερη ελαιοπεριεκτικότητα στο

συγκεκριμένο ξηρό καρπό σε σχέση με το πιο ψυχρό κλίμα. Στην παρούσα μελέτη παραλήφθηκαν τα φιστικέλαια από τα αντίστοιχα δείγματα μέσω τεχνικής Soxhlet και συγκρίθηκαν οι αντίστοιχες αποδόσεις των δύο ετών συγκομιδής.

Το φιστικέλαιο έχει υψηλή περιεκτικότητα σε λιπιδικό περιεχόμενο, το οποίο αποτελείται από τριακυλογλυκερόλες που φέρουν κυρίως μονο- και πολυ-ακόρεστα λιπαρά οξέα καθώς και μικρότερες ποσότητες κορεσμένων λιπαρών οξέων (Bailey & Stein, 2020). Η χημική σύνθεση του φιστικελαίου καθορίζει την ποιότητα και μπορεί να επηρεαστεί από διάφορους παράγοντες όπως τις κλιματικές συνθήκες (Minioti & Georgiou, 2010· Fallico, Ballistreri, Arena, & Tokuzoğlu, 2011· Yu et al., 2017). Κατά τους μήνες καρποφορίας και ανάπτυξης του καρπού, η μείωση της θερμοκρασίας και η αύξηση της βροχόπτωσης ενδέχεται να προκαλεί αύξηση της ακορεστότητας των λιπιδίων (Neidleman, 1987· Zhang et al., 2020). Επομένως, είναι καίριος ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων του εκχυλισθέντος φιστικελαίου μέσω αεριοχρωματογραφικής ανάλυσης.

Από τις κλιματικές συνθήκες (θερμοκρασία, ποσοστό βροχόπτωσης) έχει βρεθεί ότι επηρεάζεται και η παραγωγή πτητικών συστατικών (Magan & Evans, 2000· Şahan & Bozkurt, 2019). Επομένως, κρίνεται απαραίτητος και ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός του πτητικού κλάσματος των φιστικελαίων.

Τυχόν διαφορές από χρονιά σε χρονιά συγκομιδής μπορεί να αποδοθούν και στη συνολική περιεκτικότητα των τοκοφερολών, γι' αυτό πραγματοποιήθηκε η αντίστοιχη ανάλυση.

Στα πλαίσια αξιοποίησης ταχείων, οικονομικών και φιλικών προς το περιβάλλον τεχνικών, πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπική μελέτη του φιστικελαίου με χρήση της φασματοσκοπίας Raman και της τεχνικής εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (ATR) της φασματοσκοπίας FTIR. Δημοσιευμένες μελέτες έχουν αποδείξει ότι η φασματοσκοπία FTIR μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μια ακριβής προσέγγιση για τη διάκριση των οίνων, ανάλογα με το έτος συγκομιδής των σταφυλιών (Geană, Ciucure, Apetrei, & Artem, 2019· Pérez-Ràfols, Subirats, Serrano, & Díaz-Cruz, 2019). Αντίστοιχα, η φασματοσκοπία Raman μπορεί να παρέχει χρήσιμες ποιοτικές και ποσοτικές πληροφορίες για τη χημική σύνθεση των ελαίων. Επιτρέπει τον προσδιορισμό της συνολικής ακορεστότητας των ελαίων, του περιεχομένου των ελεύθερων λιπαρών οξέων (Muik, Lendl, Molina-Díaz, & Ayora-Cañada, 2003· El-Abassy, Donfack, & Materny, 2009), τη διάκριση και ταξινόμηση των ελαίων (Yang, Irudayaraj, & Paradkar, 2005) που σχετίζονται με κλιματικές συνθήκες.

Για την πρόβλεψη των δεικτών ποιότητας του φιστικελαίου δεν έχει καθοριστεί επίσημο πρωτόκολλο από τον τρέχοντα Codex Alimentarius on Fats and Oils. Είναι υπό μελέτη η ενσωμάτωση προτύπων για τα έλαια καρπών που προέρχονται από ψυχρή έκθλιψη (Madawala, Kochhar, & Dutta, 2012). Στην παρούσα μελέτη εκτιμήθηκαν ορισμένοι βασικοί δείκτες ποιότητας των φιστικελαίων συγκρινόμενοι με τα νομοθετημένα πρότυπα του εξαιρετικού παρθένου ελαιόλαδου.

Λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε βιοδραστικές ενώσεις, το φιστικέλαιο αντιπροσωπεύει μια πλούσια πηγή αντιοξειδωτικών (Liu, Blumberg, & Chen, 2014), η συγκέντρωση των οποίων μελετήθηκε με τις δοκιμές DPPH, ABTS και Folin-Ciocalteu. Ωστόσο, μπορεί να παρατηρηθεί μεγάλη μεταβλητότητα στα αποτελέσματα που εξαρτάται και από περιβαλλοντικούς παράγοντες και από τους διάφορους τρόπους μέτρησης της αντιοξειδωτικής δράσης και των φαινολικών συστατικών (Bolling, McKay, & Blumberg, 2010).

Πληροφορίες για την ποιότητα των φιστικελαίων αναφορικά με την οξειδωτική τους κατάσταση δόθηκαν μέσω της απορρόφησης UV-Vis (δείκτες k στα 232, 268, 270 και 274 nm καθώς και του Δk) που προσδιορίζει αλλαγές στη δομή των λιπαρών οξέων (Houshia et al., 2014· Martelo-Vidal & Vázquez, 2014· Rodrigues, Dias, Veloso, Pereira, & Peres, 2016· Conceição et al., 2019· Uncu & Ozen, 2019).

Επιπρόσθετα προσδιορίστηκαν και η ελεύθερη οξύτητα, ως δείκτης βρωσιμότητας των φιστικελαίων, και το ποσοστό ελεύθερων λιπαρών οξέων, ως δείκτης ευαλλοίωτων σε οξείδωση και ποιοτικά υποβαθμισμένων φιστικελαίων.

Τέλος, δεδομένης της αυξανόμενης ζήτησης του ναπού κελυφωτού φιστικιού και της ανησυχίας που εγείρεται για τη μικροβιολογική του ασφάλεια διερευνήθηκε η μυκητολογική ποιότητα και σταθερότητά του σε συσκευασία κενού και αέρα για χρονικό διάστημα τριών μηνών.

Μέρος Α: Θεωρητικό μέρος

A.1. Φιστικιά και κελυφωτό φιστίκι

A.1.1. Ιστορικά στοιχεία

Το όνομα φιστίκι προέρχεται κατά μία εκδοχή από τη λέξη *pista-pistak* της αρχαίας Αβεστικής-ινδοευρωπαϊκής περσικής γλώσσας (Hormaza & Wunsch, 2007), ενώ κατά μία άλλη εκδοχή από την Αραβική λέξη *fustuq* (*frastuca* στη Σικελία ή φουστουκιά στην Κύπρο, *fistuk* στην Τουρκία) (Ποντίκης, 1996). Η φιστικιά ανήκει στην οικογένεια των Ανακαρδιοειδών (*Anacardiaceae* family) όπου ανήκουν και το μάνγκο, τα κάσιους, το μαστιχόδεντρο, στο γένος Πιστακία (*Pistacia* genus), το οποίο περιλαμβάνει περισσότερα από 11 είδη (*Pistacia* species) που χαρακτηρίζονται από κάποια κοινά μορφολογικά γνωρίσματα. Τα περισσότερα από αυτά τα είδη χρησιμοποιούνται ως ρίζωμα (υποκείμενο φιστικιάς) για το καλλιεργούμενο είδος *Pistacia vera*, το οποίο είναι ευρέως διαδεδομένο λόγω των υψηλής διατροφικής αξίας βρώσιμων καρπών του. Στην Ελλάδα συναντώνται γηγενώς τέσσερα είδη: *P. atlantica*, *P. lentiscus*, *P. palaestina* και *P. terebinthus*, ενώ το είδος *P. vera* εισήχθη από τις χώρες της Ανατολικής Μεσογείου (Κεντρική και Δυτική Ασία) με την άνοδο της Ρωμαϊκής Αυτοκρατορίας. Το είδος *P. atlantica* έχει περιορισμένη κατανομή στη Ρόδο και σε άλλα γειτονικά νησιά, τα είδη *P. lentiscus* και *P. terebinthus* κατανέμονται ευρέως σε παράκτιες περιοχές της Ελλάδας, το είδος *P. palaestina* παρουσιάζει μειωμένη κατανομή σε Κρήτη και Χίο (Zakynthinos & Rouskas, 2001).

Ο πρώτος εμπορικός φιστικεώνας στην Ελλάδα ιδρύθηκε γύρω στο 1860 από το Δημήτριο Παυλίδη στο Ψυχικό Αττικής. Μέχρι τα τέλη του 19ου αιώνα είχαν εμφανιστεί φυτείες σε όλη την περιοχή της Αττικής. Στη διάδοση της καλλιέργειας συνέβαλαν οι γεωπόνοι Ορφανίδης, Γεννάδιος, Χατζηνικολάου καθώς και οι δημοσιεύσεις του καθηγητή Π. Αναγνωστόπουλου (Zakynthinos & Rouskas, 2001). Στην Αίγινα ο πρώτος οργανωμένος φιστικεώνας αναπτύχθηκε από το Νικόλαο Περόγλου (Μανουηλίδου Χιτζανίδου, 2013). Στη Φθιώτιδα εγκαταστάθηκε ο πρώτος φιστικεώνας το 1951, οπότε άρχισε η ζήτηση και η διάδοση έξω από την Αττική και τη Μεγαρίδα (Κορινθία, Εύβοια, Κυκλάδες, Κρήτη, Χαλκιδική κ.α.). Η παραγωγή στην Ελλάδα ξεπέρασε τους 1000 τόνους το 1968 και από τότε παρουσιάζει ραγδαία αύξηση, με την είσοδο σε καρποφορία ολοένα και νέων κτημάτων (Ποντίκης, 1996).

Η ποικιλία «Αιγίνης» είναι η μόνη θηλυκή εμπορική ποικιλία της Ελλάδας που καλύπτει το 99% όλων των εμπορικών φιστικεώνων. Υπάρχει και η θηλυκή ποικιλία

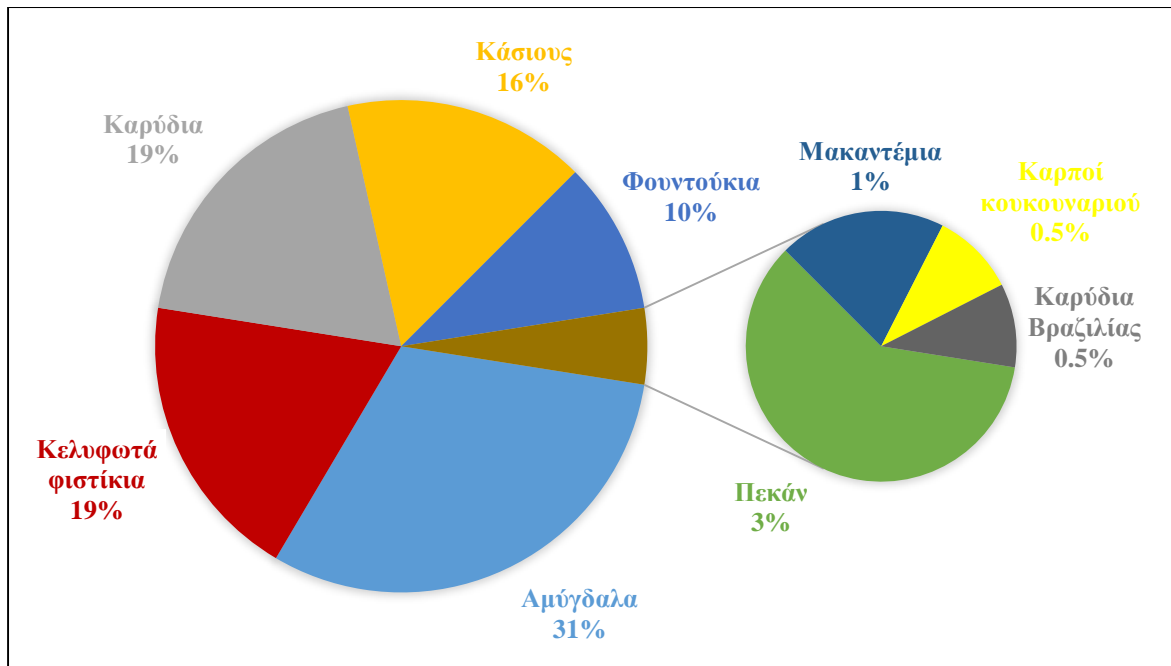
κελυφωτών φιστικιών «Ποντικής», αλλά δεν καλλιεργείται σε περισσότερο από το 1% της συνολικής έκτασης κελυφωτών φιστικιών. Η ποικιλία «Αιγίνης» παρατηρείται σε τρεις παραλλαγές, με τις ονομασίες Νυχάτο (ή Κινεζάκι), Φουντουκάτο και Κιλαράτο, με την τελευταία να έχει επιλεγεί ως αυτή που διανέμεται από τα φυτώρια στους Έλληνες καλλιεργητές (Zakynthinos & Rouskas, 2001).

A.1.2. Παραγωγή σε παγκόσμιο και εγχώριο επίπεδο

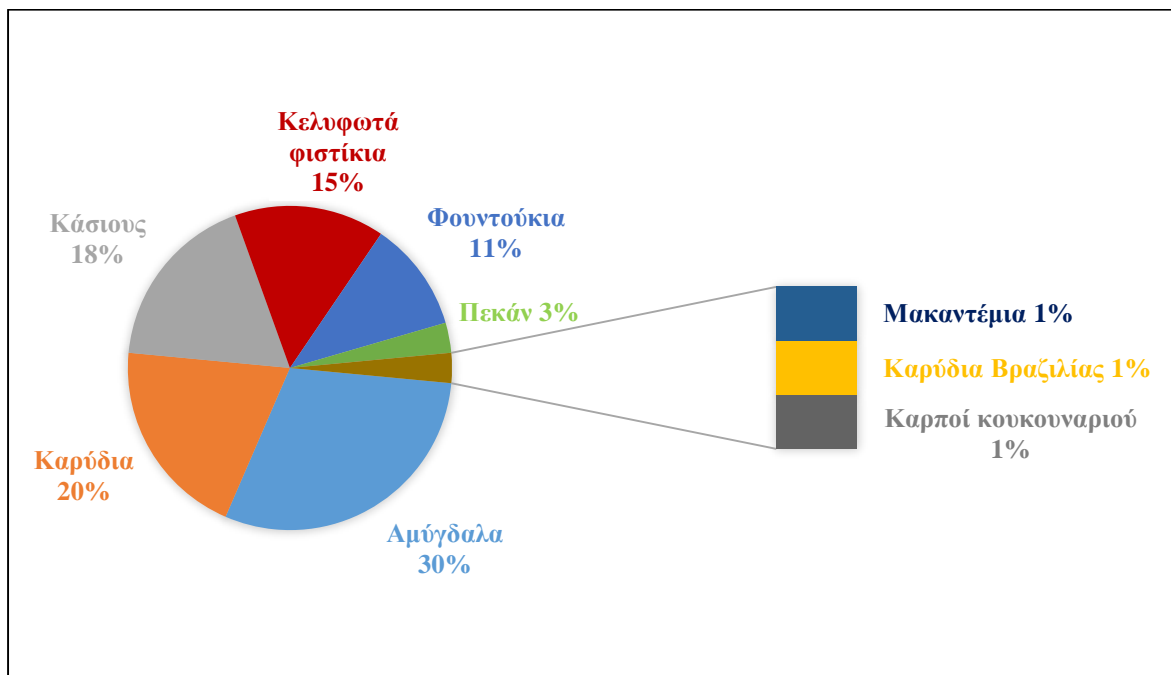
Τα κελυφωτά φιστίκια (pistachios) είναι από τα πλέον διαδεδομένα είδη ξηρών καρπών, όχι μόνο σε ελληνικό αλλά και σε διεθνές επίπεδο (Σχήμα A.1.2.1). Συγκεκριμένα, την καλλιεργητική περίοδο 2020-2021, τα αμύγδαλα (almonds) κάλυψαν το 31% της παγκόσμιας έκτασης καλλιέργειας των ξηρών καρπών και ακολούθησαν τα καρύδια (walnuts) (19%), τα κελυφωτά φιστίκια (19%), τα κάσιους (cashews) (16%) και τα φουντούκια (hazelnuts) (10%). Οι καρποί πεκάν (pecans), τα μακαντέμια (macadamias), οι καρποί κουκουναριού (pine nuts) και τα καρύδια Βραζιλίας (Brazil nuts) αντιστοιχούσαν στο υπόλοιπο 5% (Σχήμα A.1.2.2). Ως προς την κατανάλωσή τους, το έτος 2019 τα αμύγδαλα και τα καρύδια αντιστοιχούσαν στο μισό της συνολικής εκτιμώμενης κατανάλωσης ξηρών καρπών παγκοσμίως (30% και 20%, αντίστοιχα), ακολουθούμενα από τα κάσιους και τα κελυφωτά φιστίκια, που αντιπροσώπευαν το 18% και 15%, αντίστοιχα (Σχήμα A.1.2.3).



Σχήμα A.1.2.1. Παραγωγή καρπών (σε τόνους) σε παγκόσμιο επίπεδο το χρονικό διάστημα 2011-2021 (INC, 28 Ιουνίου 2021).



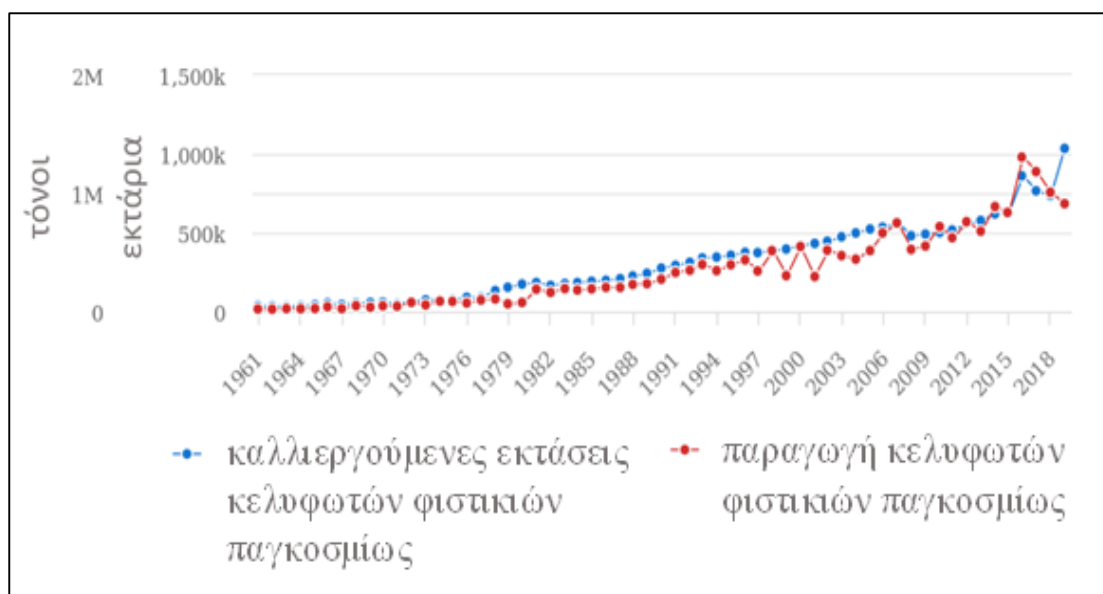
Σχήμα Α.1.2.2. Παραγωγή καρπών (σε τόνους) σε παγκόσμιο επίπεδο το χρονικό διάστημα 2020-2021 (INC, 28 Ιουνίου 2021).



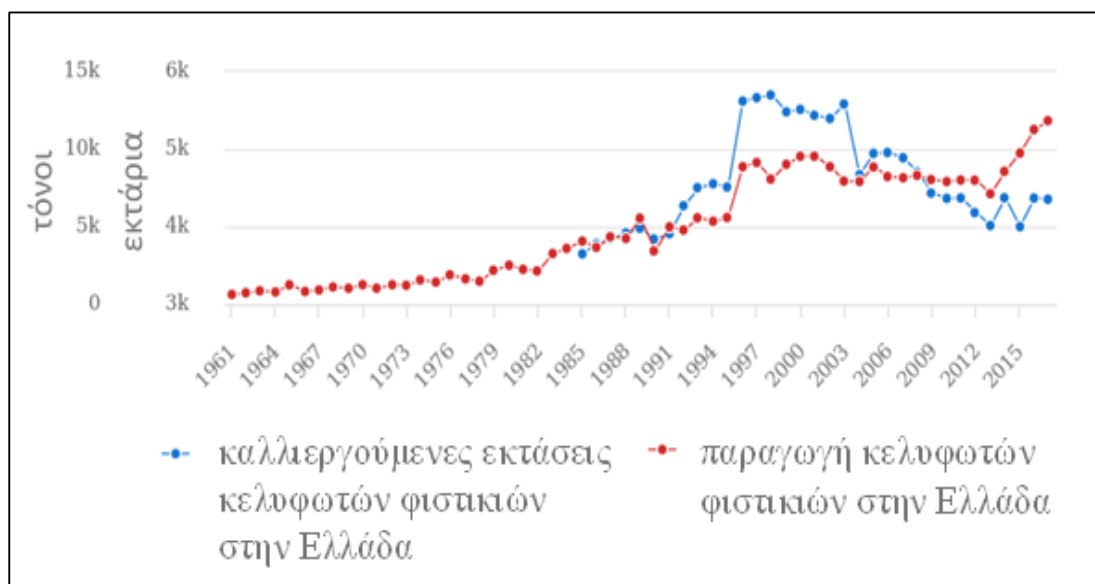
Σχήμα Α.1.2.3. Παγκόσμια εκτιμώμενη κατανάλωση ξηρών καρπών (σε τόνους) για το έτος 2019 (INC, 28 Ιουνίου 2021).

Στα Σχήματα Α.1.2.4 και Α.1.2.5 απεικονίζεται η παγκόσμια και εγχώρια παραγωγή κελυφωτών φιστικιών για το χρονικό διάστημα 1961-2019. Την περίοδο

2020-2021 η παγκόσμια παραγωγή κελυφωτών φιστικιών ανήλθε σε πάνω από 1.000.000 μετρικούς τόνους (μέτρηση μαζί με το κέλυφος), το υψηλότερο ποσό της τελευταίας δεκαετίας, αντιπροσωπεύοντας μία αύξηση ύψους 54% από το προηγούμενο έτος και μία αύξηση ύψους 68% σε σχέση με το μέσο όρο των προηγούμενων 10 ετών (INC, 2021).

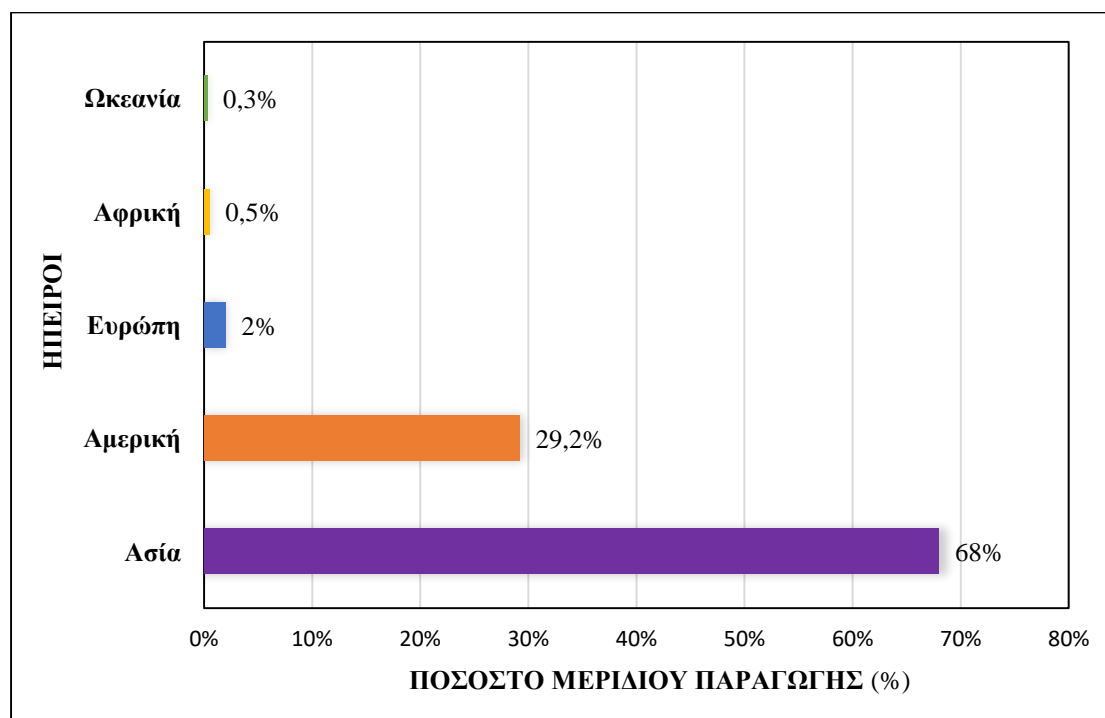


Σχήμα Α.1.2.4. Παραγωγή κελυφωτών φιστικιών σε διεθνές επίπεδο το χρονικό διάστημα 1961-2019 (FAOSTAT, 28 Ιουνίου 2021).

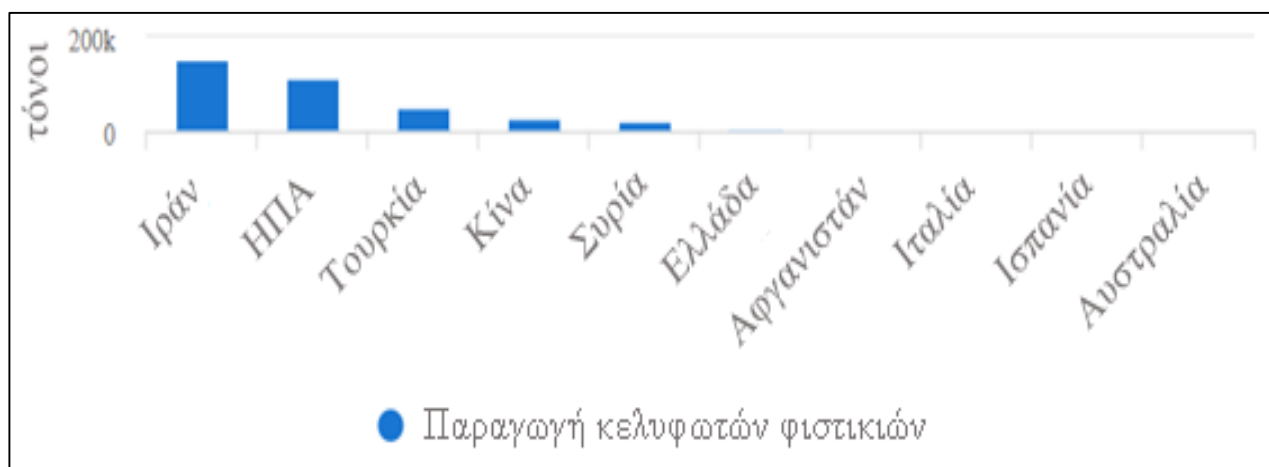


Σχήμα Α.1.2.5. Παραγωγή κελυφωτών φιστικιών σε εγχώριο επίπεδο το χρονικό διάστημα 1961-2019 (FAOSTAT, 28 Ιουνίου 2021).

Από το 1961 έως το 2019 το μεγαλύτερο μέρος της παραγωγής ανήκει στην Ασία. Ακολουθούν η Αμερική, η Ευρώπη, η Αφρική και η Ωκεανία (Σχήμα Α.1.2.6). Μεταξύ των χωρών της Ασίας, η χώρα με τη μεγαλύτερη παραγωγή είναι το Ιράν. Όσον αφορά στις ευρωπαϊκές χώρες αυτές με τη μεγαλύτερη παραγωγή είναι η Ελλάδα, η Ιταλία και η Ισπανία (Σχήμα Α.1.2.7).



Σχήμα Α.1.2.6. Μερίδιο παραγωγής κελυφωτών φιστικιών ανά ήπειρο το χρονικό διάστημα 1961-2019 (FAOSTAT, 28 Ιουνίου 2021).

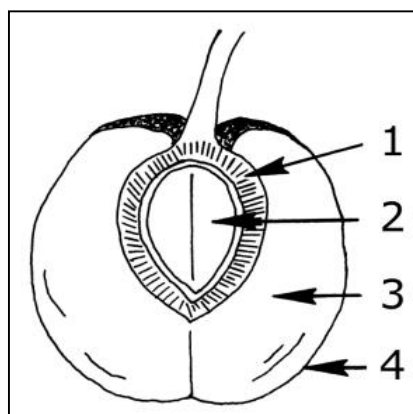


Σχήμα Α.1.2.7. Οι κορυφαίες φιστικοπαραγωγικές χώρες του κόσμου το χρονικό διάστημα 1961-2019 (FAOSTAT, 28 Ιουνίου 2021).

A.1.3. Χαρακτηριστικά

A.1.3.1. Μορφολογία

Τα χαρακτηριστικά του καρπού του κελυφωτού φιστικιού απεικονίζονται στο Σχήμα A.1.3.1.1. Ένα εξωκάρπιο και ένα σαρκώδες μεσοκάρπιο περιβάλλουν το σκληρό, αλλά σχετικά λεπτό, ενδοκάρπιο που περικλείει το βρώσιμο σπόρο (Ferguson, Polito, & Kallsen, 2005).



Σχήμα A.1.3.1.1. Χαρακτηριστικά καρπού κελυφωτού φιστικιού [1: ενδοκάρπιο ή κέλυφος, 2: σπέρμα ή πυρήνας ή βρώσιμος σπόρος, 3: μεσοκάρπιο, 4: εξωκάρπιο ή περικάρπιο ή φλοιός] (Ferguson et al., 2005).

A.1.3.2. Ανάπτυξη φιστικιάς

Η φιστικιά παρουσιάζει το φαινόμενο της παρενιαυτοφορίας, κατά το οποίο το δέντρο τη μία χρονιά παράγει σοδειά μεγαλύτερη του μέσου όρου παραγωγής, ενώ την αμέσως επόμενη χρονιά λιγότερη (Zakynthinos & Rouskas, 2001). Η βλάστηση αρχίζει να αναπτύσσεται στα αρσενικά δένδρα από τις αρχές Μαρτίου και στα θηλυκά από τα τέλη Μαρτίου και ολοκληρώνεται στα τέλη Απριλίου με μέσα Μαΐου. Από μέσα Ιουνίου το κέλυφος γίνεται σκληρό και αρχίζει να αναπτύσσεται λόγω διεύρυνσης του πυρήνα και φτάνει το τελικό του μέγεθος στα μέσα Αυγούστου. Οι θερινοί μήνες (Ιούνιος – Ιούλιος – Αύγουστος) είναι και οι πλέον κρίσιμοι για την ανάπτυξη του πυρήνα του φιστικιού (Γεωργιάδου, 2009). Η ωρίμανση των φιστικιών διαρκεί 25 περίπου ημέρες, κατά τις οποίες ο πυρήνας του φιστικιού παίρνει το οριστικό του μέγεθος, ενώ ο φλοιός του αρχίζει να μαλακώνει και το χρώμα του από πράσινο γίνεται κιτρινωπό ή χαρακτηριστικά βιολετί. Συγχρόνως ο φλοιός αρχίζει να σκάζει από τη βάση του και να ξεκολλάει από το κέλυφος. Καθώς η ωρίμανση των φιστικιών

προχωρεί, οι ιστοί που συνδέουν τα δύο ημικελύφη του κελύφους χαλαρώνουν, οπότε και τα περισσότερα από τα φιστίκια ανοίγουν στην άκρη τους και αποκαλύπτεται ο πυρήνας (Georgiadou, Dimou, & Yanniotis, 2012). Τα φιστίκια συλλέγονται από τα μέσα Σεπτεμβρίου έως τα μέσα Οκτωβρίου (Harris, 2013). Τα στάδια που ακολουθούν τη συγκομιδή των κελυφωτών φιστικιών περιλαμβάνουν συνήθως την αποφλοιώση, το πλύσιμο, την ξήρανση ή το ψήσιμο, τη συσκευασία και την αποθήκευση (Tsantili, Konstantinidis, Christopoulos, & Roussos, 2011). Συνήθως τα αποξηραμένα φιστίκια φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου για περίοδο μικρότερη από μία εβδομάδα έως έξι μήνες και σπάνια αποθηκεύονται για περισσότερο από έξι μήνες (Lee, Metz, Giovanni, & Bruhn, 2011).

Τα κελυφωτά φιστίκια μπορούν να καλλιεργηθούν με επιτυχία σε πολλούς τύπους εδάφους, λόγω της καλής προσαρμοστικότητας του φυτού. Ωστόσο, η φιστίκια προτιμά τα σχετικά βαθιά, καλά αποστραγγισμένα και αμμοπηλώδη εδάφη. Σε περιοχές με ρηχά, σκληρά και μη καλά αποστραγγισμένα εδάφη, το μέγεθος των δένδρων και η παραγωγικότητα είναι περιορισμένα. Νόστιμα φιστίκια παράγονται σε εδάφη ασβεστώδη (μέσης περιεκτικότητας έως 50%) (Ferguson et al., 2005).

A.1.3.3. Χρήση

Τα κελυφωτά φιστίκια εκτιμώνται σε όλον τον κόσμο τόσο για τα ιδιαίτερα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά (πράσινο χρώμα, έντονο άρωμα και γεύση) όσο και για τη δυνατότητα αξιοποίησης του καρπού στο σύνολό του. Ο πυρήνας των κελυφωτών φιστικιών καταναλώνεται νωπός, αποξηραμένος είτε στον ήλιο είτε σε ξηραντήριο ή ψημένος, είτε ως σνακ είτε ως πρώτη ύλη για την παρασκευή διάφορων προϊόντων είτε ως συστατικό της βιομηχανίας ζαχαροπλαστικής (Catalán et al., 2016· Salvador, Ojeda-Amador, & Fregarane, 2019). Το περικάρπιό τους αναμειγνύεται με τύρφη και το τελικό προϊόν είτε διατίθεται ως προϊόν κομποστοποίησης είτε χρησιμοποιείται ως ζωοτροφή (Çelik & Demireg, 2015). Ωστόσο, τα περικάρπια αποτελούν μια οικονομικά αποδοτική πηγή, πλούσια σε φαινολικές ενώσεις, λιπαρά οξέα και πολυσακχαρίτες με τεκμηριωμένες αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Rajaei, Barzegar, Mobarez, Sahari, & Esfahani, 2010· Grace et al., 2016· Chaharbaghi, Khodaiyan, & Hosseini, 2017). Ως εκ τούτου, η χρήση τους ως πηγή βιοδραστικών ενώσεων μπορεί να οδηγήσει σε μια ολοκληρωμένη και κυκλική διαχείριση της φιστικοκαλλιέργειας (Arjeh, Akhavan, Barzegar, & Carbonell-Barrachina, 2020). Το

κέλυφός τους μπορεί να αξιοποιηθεί για την παρασκευή ενεργού άνθρακα (Fallico, Ballistreri, Arena, & Tokuşođlu, 2011).

Μπορεί να γίνει και η παραλαβή του ελαίου του φιστικιού. Για την παραλαβή του φιστικελαίου μπορούν να χρησιμοποιηθούν και καρποί χαμηλότερης ποιότητας (που δεν πληρούν τα βέλτιστα τυπικά μορφολογικά χαρακτηριστικά) αυξάνοντας την εμπορική αξία του προϊόντος. Το φιστικέλαιο είναι κατάλληλο για χρήση στη μαγειρική. Είναι μια πολύ καλή επιλογή αντικατάστασης του βούτυρου και της μαργαρίνης. Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του το καθιστούν αναπόσπαστο κομμάτι της γκουρμέ κουζίνας.

Εκτός των χρήσεών του στη μαγειρική, το φιστικέλαιο χρησιμοποιείται και στη βιομηχανία των καλλυντικών. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται στην παραγωγή σαπουνιών, κρεμών, σαμπουάν και πολλών άλλων καλλυντικών λόγω των ευεργετικών ιδιοτήτων του σε μαλλιά και δέρμα που οφείλονται στη χημική του σύσταση. Τέλος, η υψηλή περιεκτικότητά του σε βιοενεργά συστατικά επιτρέπει την απομόνωση ενεργών συστατικών με αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση με σκοπό τη χρήση τους σε φαρμακευτικά προϊόντα (Catalán et al., 2016).

Το απολιπασμένο στερεό υπόλειμμα που απομένει μετά την εξαγωγή του φιστικελαίου, περιέχει βιοδραστικές ενώσεις που παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον. Οι χημικές αυτές ενώσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φυσική πηγή φυτοχημικών αντιοξειδωτικών συστατικών για λειτουργικά τρόφιμα καθώς και συμπληρώματα διατροφής (Salvador et al., 2019).

A.1.4. Σύσταση και θρεπτική αξία

Τα κελυφωτά φιστίκια έχουν χαρακτηριστεί ως υπερτροφή και όχι άδικα, καθώς σε μικρή ποσότητα δίνουν πληθώρα ευεργετικών συστατικών. Έχουν ισορροπημένη σύνθεση, που χαρακτηρίζεται από χαμηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες, περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες άνω του 20% w/w, και περιεκτικότητα λιπιδίων περίπου 50% w/w. Περιέχουν μια αξιοσημείωτη ποσότητα βιοενεργών αντιοξειδωτικών συστατικών, όπως φλαβονοειδή, στιλβένια, τοκοφερόλες, καροτενοειδή, χλωροφύλλες (Fallico et al., 2011· Bullo, Juanola-Falgarona, Hernandez-Alonso, & Salas-Salvado, 2015· Martínez et al., 2016).

Συγκριτικά με άλλους ξηρούς καρπούς, τα κελυφωτά φιστίκια έχουν υψηλότερα επίπεδα εδώδιμων ινών, φυτοστερολών, γ-τοκοφερόλης, βιταμίνης K και

καροτενοειδών (Mahmoudi, Norian, Katirae, Rajohi-Alamoti, & Emami, 2014). Είναι ο μοναδικός ξηρός καρπός που περιέχει σημαντική ποσότητα λουτεΐνης και ζεαξανθίνης (Fogacci et al., 2019). Η θρεπτική τους αξία παρουσιάζεται στον Πίνακα Α.1.4.1.

Οι χημικοί τύποι όλων των ενώσεων που αναφέρονται στην παρούσα διατριβή βρίσκονται προς το τέλος της διατριβής, στον Πίνακα χημικών ενώσεων.

Πίνακας Α.1.4.1. Διατροφική αξία (περιεκτικότητα ανά 100 g αποξηραμένης ψίχας) κελυφωτών φιστικιών (USDA, 2017).

Συστατικό	
Υδωρ	1,85 g
Πρωτεΐνες	21,05 g
Λίπη	45,82 g
Υδατάνθρακες	28,28 g
Εδώδιμες ίνες	10,3 g
Σάκχαρα	7,74 g
Μεταλλικά στοιχεία	
Ασβέστιο (Ca)	107 mg
Σίδηρος (Fe)	4,03 mg
Μαγνήσιο (Mg)	109 mg
Φώσφορος (P)	469 mg
Κάλιο (K)	1007 mg
Νάτριο (Na)	6 mg
Ψευδάργυρος (Zn)	2,34 mg
Βιταμίνες	
Βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ)	3,0 mg
Βιταμίνη B ₁ (θειαμίνη)	0,695 mg
Βιταμίνη B ₂ (ριβοφλαβίνη)	0,234 mg
Βιταμίνη B ₃ (νιασίνη)	1,373 mg
Βιταμίνη B ₆ (πυριδοξίνη)	1,122 mg
Βιταμίνη B ₉ (φολικό οξύ)	51 µg
Βιταμίνη A (ρετινόλη)	13 µg
Βιταμίνη E (ισομερές α-τοκοφερόλης)	2,17 mg

Βιταμίνη Κ (φυλλοκινόνη)	13,2 μg
Βασικές Κατηγορίες Λιπών	
Λιπαρά οξέα, κορεσμένα	5,645 g
Λιπαρά οξέα, μονοακόρεστα	24,534 g
Λιπαρά οξέα, πολυακόρεστα	13,346 g
Λιπαρά οξέα, trans	0,000 g
Χοληστερόλη	0 mg
Θερμίδες	572 kcal

A.1.4.1. Περιεκτικότητα σε λιπίδια

Τα κελυφωτά φιστίκια περιέχουν περίπου 50-60% w/w έλαιο. Οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν τη συνολική σύνθεση των λιπαρών οξέων είναι η ποικιλία, το γεωγραφικό πλάτος, οι κλιματικές συνθήκες και το στάδιο ωρίμανσης του καρπού κατά τη συγκομιδή (Fallico et al., 2011). Τα λιπίδια του φιστικελαίου κατατάσσονται με βάση την πολικότητα σε ουδέτερα (ελεύθερα λιπαρά οξέα, εστέρες, στερόλες, εστέρες στερολών, μονο-, δι- και τρι-γλυκερίδια, καροτένια, τοκοφερόλες) και πολικά (γλυκεροφωσφολιπίδια, γλυκερογλυκολιπίδια, σφιγγοφωσφολιπίδια, σφιγγογλυκολιπίδια), ενώ με βάση το πλήθος των μοριακών ειδών που αποδίδουν με την υδρόλυσή τους κατατάσσονται σε απλά (ελεύθερα λιπαρά οξέα, στερόλες, καροτένια, τοκοφερόλες) και σύνθετα (αιθερογλυκερίδια, μονο-, δι- και τρι-γλυκερίδια, γλυκολιπίδια, εστέρες) (Fahy, Cotter, Sud, & Subramaniam, 2011).

Μεταξύ των ελαίων από ξηρούς καρπούς, το φιστικέλαιο διαθέτει την υψηλότερη συγκέντρωση πολικών λιπιδίων, που συμβάλλουν στην αντιοξειδωτική του ικανότητα. Το κύριο φωσφολιπίδιο είναι η (R)-φωσφατιδυλοχολίνη, ακολουθούμενη από τη φωσφατιδυλοσερίνη και φωσφατιδυλινοσιτόλη σε ποσοστό 45%, 40% και 20%, αντίστοιχα (Fallico et al., 2011).

Ωστόσο, τα επικρατέστερα λιπιδικά συστατικά είναι τα τριγλυκερίδια (εστέρες της γλυκερόλης με λιπαρά οξέα) αποτελώντας περισσότερο από το 90% της συνολικής περιεκτικότητας σε γλυκερολιπίδια (Fallico et al., 2011). Το φιστικέλαιο είναι πλούσιο σε μονο- και πολυ-ακόρεστα λιπαρά οξέα σε περιεκτικότητα 56%-77% και 10%-31%, αντίστοιχα (Gong & Pegg, 2015· Bullo et al., 2015). Το ελαϊκό, το λινελαϊκό και το παλμιτικό οξύ κυριαρχούν σε σχέση με τα άλλα λιπαρά οξέα αντιπροσωπεύοντας περισσότερο από το 95% της συνολικής περιεκτικότητας σε λιπαρά οξέα (Fallico et al.,

2011). Το λινελαϊκό οξύ συγκεκριμένα δεν μπορεί να συντεθεί από το ανθρώπινο σώμα (Nagy & Tiuca, 2017). Το μυριστικό, το παλμιτελαϊκό, το στεατικό και το αραχιδικό οξύ υπάρχουν σε μικρές συγκεντρώσεις. Επιπλέον, έχουν βρεθεί ίχνη μαργαρικού, μπεχενικού και γονδοϊκού οξέος. Αυτά τα οξέα δεν υπερβαίνουν το 0,5%. Η αναλογία μεταξύ ακόρεστων και κορεσμένων λιπαρών οξέων είναι περίπου 6,5 και η αναλογία μεταξύ ελαϊκού και λινελαϊκού οξέος είναι περίπου 4,5. Αυτά τα δεδομένα, καθώς και η κατανομή των λιπαρών οξέων, δείχνουν ότι το φιστικέλαιο είναι παρόμοιο με το ελαιόλαδο (Fallico et al., 2011).

Το φιστικέλαιο έχει περίπου 100-280 mg φυτοστερολών/100 g ψίχας, εκ των οποίων το 85% έχει αναφερθεί ότι είναι β-σιτοστερόλη. Η δ5-αβεναστερόλη και η καμπεστερόλη αντιπροσωπεύουν μαζί περίπου το 12% της συνολικής περιεκτικότητας σε στερόλες. Έχουν βρεθεί και άλλες δευτερεύουσες φυτοστερόλες, όπως η στιγμαστερόλη, η κλεροστερόλη, η καμπεστανόλη, η β-σιτοστανόλη, η δ5,24-στιγμασταδιενόλη, η δ7-στιγμαστενόλη, η δ7-αβεναστερόλη και η ποριφεραστα-7,25-διενόλη. Αθροιστικά, αυτές οι δευτερεύουσες στερόλες κυμαίνονται από 1 έως 3%. Η παρουσία των φυτοστερολών είναι σημαντική λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης και της ικανότητάς τους να μειώνουν τη χοληστερόλη τόσο στο πλάσμα όσο και στις χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες έχοντας θετική επίδραση στην καρδιαγγειακή νόσο (Fallico et al., 2011· Tsantili et al., 2011).

Οι τοκοφερόλες μαζί με τις τοκοτριενόλες είναι δραστικά ισοδύναμες της βιταμίνης E. Το κύριο ισομερές τοκοφερόλης στο φιστικέλαιο είναι η γ-τοκοφερόλη, η πιο διαδεδομένη μορφή βιταμίνης E (Juhaimi, Ozcan, Ghafoor, Babiker, & Hussain, 2018). Η συγκέντρωση των τοκοφερολών στο φιστικέλαιο κυμαίνεται από 8 έως 50 mg συνολικών τοκοφερολών/100 g ψίχας. Η γ-τοκοφερόλη έχει περιεκτικότητα μεγαλύτερη από 90% της συνολικής περιεκτικότητας σε τοκοφερόλες, ακολουθούμενη από την α-τοκοφερόλη (<5% των συνολικών τοκοφερολών) και τη δ-τοκοφερόλη (≈2% του συνόλου). Η γ-τοκοφερόλη έχει υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση σε σύγκριση με την α-τοκοφερόλη, προστατεύοντας καλύτερα το λιπιδικό κλάσμα του φιστικελαίου από την οξείδωση.

Από τα έλαια των ξηρών καρπών, το φιστικέλαιο είναι το μοναδικό που περιέχει α- και β-χλωροφύλλη με επικράτηση της α-μορφής. Η υψηλότερη περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη παρατηρείται στο άγουρο φιστίκι, ενώ με την ωρίμανση το επίπεδο μειώνεται, όπως και για τη λουτεΐνη. Η λουτεΐνη είναι το κύριο καροτενοειδές στο φιστίκι. Υπάρχει, επίσης, και β-καροτένιο αλλά σε μικρή συγκέντρωση (<2 mg/kg

ψίχας). Το υψηλό επίπεδο χλωροφυλλών και η παρουσία λουτεΐνης συμβάλλουν στην αντιοξειδωτική δράση του κελυφωτού φιστικιού (Fallico et al., 2011).

A.1.4.2. Περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες

Τα κελυφωτά φιστίκια αποτελούν καλή πηγή φυτικής πρωτεΐνης που αποτελεί περίπου το 20% του βάρους τους (Bullo et al., 2015). Οι σφαιρίνες είναι οι κύριες πρωτεΐνες στα κελυφωτά φιστίκια ($\approx 66\%$ του συνόλου των πρωτεϊνών). Η αλβουμίνη είναι δεύτερη κατά προτεραιότητα έναντι των σφαιρινών, συνεισφέροντας στο 25% των συνολικών πρωτεϊνών, ακολουθούμενη από τις γλουτελίνες (7,3%) και τις προλαμίνες (2%). Όλα τα απαραίτητα αμινοξέα υπάρχουν στα κελυφωτά φιστίκια με τη λυσίνη να υπάρχει σε υψηλό επίπεδο (Kashaninejad & Tabil, 2011). Σημαντικό ρόλο κατέχει το αμινοξύ αργινίνη που αποτελεί πρόδρομη μορφή μορίων που ελέγχουν παθολογικές καταστάσεις, όπως είναι η υπέρταση, οι καρδιαγγειακές νόσοι και οι νευροεκφυλιστικές διαταραχές (Bullo et al., 2015). Κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι η μερική αντικατάσταση των υδατανθράκων από φυτικές πρωτεΐνες μπορεί να βοηθήσει στη μείωση των επιπέδων της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας ή αλλιώς της «κακής» χοληστερόλης (low density lipoprotein, LDL) (Dreher, 2012).

A.1.4.3. Περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες και φυτικές ίνες

Γενικά, η περιεκτικότητα των κελυφωτών φιστικιών σε υδατάνθρακες χαρακτηρίζεται χαμηλή έως μέτρια. Ωστόσο, η περιεκτικότητα σε φυτικές ίνες είναι σε υψηλά επίπεδα (8%-12%). Έρευνες έχουν αποδείξει ότι η πρόσληψη φυτικών ινών έχει αντίστροφη συσχέτιση με την αύξηση του βάρους, το διαβήτη, τις καρδιαγγειακές νόσους και με κάποια είδη καρκίνων. Επιπροσθέτως, λόγω του χαμηλού γλυκαιμικού τους δείκτη τα κελυφωτά φιστίκια συμβάλλουν στη διατήρηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα σε χαμηλά επίπεδα (Bullo et al., 2015).

A.1.4.4. Περιεκτικότητα σε βιταμίνες και ιχνοστοιχεία

Τα κελυφωτά φιστίκια έχουν υψηλές ποσότητες βιταμινών A, E (κυρίως γ-τοκοφερόλη), C, B (εκτός της B₁₂) και K (USDA, 2017). Συγκεκριμένα, οι τοκοφερόλες θεωρούνται σημαντικές βιολειτουργικές ενώσεις και σχετίζονται με οφέλη για την υγεία, όπως επιβεβαιώνεται από κλινικά στοιχεία (Servili & Montedoro, 2002). Λόγω της μη πολικής φύσης τους, η παρουσία τους σε έλαια είναι αναμενόμενη

(Ojeda-Amador, Fregarane, & Desamparados, 2018). Με βάση τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των Ηνωμένων Πολιτειών (Food and Drug Administration, FDA) είναι πηγή τουλάχιστον 15 διαφορετικών μικροθρεπτικών συστατικών (FDA, 2016).

Είναι πλούσια σε κάλιο (K). Χαμηλά επίπεδα K επηρεάζουν αρνητικά τον καρδιακό ρυθμό, και προκαλούν πολλές δομικές και λειτουργικές μεταβολές σε διάφορα όργανα, ειδικά στους σκελετικούς μύες (Ghaseminasab-Parizi, Ahmadi, & Mazloomi, 2015).

Επίσης, είναι πλούσια σε φώσφορο (P) που βοηθά στη διάσπαση του κρέατος και άλλων πρωτεϊνών σε αμινοξέα και είναι απαραίτητος για την παραγωγή ορμονών. Η ανεπάρκεια P μπορεί να προκαλέσει δυσανεξία στη γλυκόζη και ασυνήθιστα χαμηλό επίπεδο P στον ορό (υποφωσφαταιμία), με αποτέλεσμα απώλεια όρεξης, αναιμία, μυϊκή αδυναμία, πόνο στα οστά, ραχίτιδα (σε παιδιά), οστεομαλακία (σε ενήλικες), αυξημένη ευαισθησία σε λοιμώξεις, μούδιασμα και μυρμηγκιασμα στα άκρα και δυσκολία στο περπάτημα (Ghaseminasab-Parizi, Ahmadi, & Mazloomi, 2015).

Επιπλέον, τα κελυφωτά φιστίκια είναι πλούσια σε μαγνήσιο (Mg) που βοηθά στην πρόληψη της οστεοπόρωσης και των ασθενειών του νευρικού και του ανοσοποιητικού συστήματος. Το Mg εμπλέκεται σε περισσότερες από 300 βασικές μεταβολικές αντιδράσεις και παίζει ουσιαστικό ρόλο σε ένα ευρύ φάσμα σημαντικών βιολογικών αντιδράσεων. Τα κλινικά συμπτώματα της ανεπάρκειάς του είναι η υποκαλιαιμία, οι καρδιακές δυσαρρυθμίες και το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου (Ghaseminasab-Parizi, Ahmadi, & Mazloomi, 2015).

Το ασβέστιο (Ca) που περιέχουν κατέχει σημαντική λειτουργία στο ανθρώπινο σώμα ως δομικό στοιχείο, καθώς και στην κυτταρική σηματοδότηση, στη μεσολάβηση της συστολής και χαλάρωσης των αιμοφόρων αγγείων, στη μετάδοση νευρικών παλμών, στη συστολή των μυών και στην έκκριση ορμονών, όπως η ινσουλίνη (Ghaseminasab-Parizi, Ahmadi, & Mazloomi, 2015).

Τα κελυφωτά φιστίκια είναι πλούσια και σε σίδηρο (Fe). Ο Fe είναι ένα βασικό συστατικό των πρωτεϊνών που μεταφέρουν οξυγόνο και έχει σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό μεταβολισμό. Είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των κυττάρων. Η ανεπαρκής πρόσληψη Fe στη διατροφή οδηγεί σε φλεγμονώδη αναιμία ή αναιμία χρόνιας νόσου (Ghaseminasab-Parizi, Ahmadi, & Mazloomi, 2015).

A.1.4.5. Περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά

Τα κελυφωτά φιστίκια έχουν καταταχθεί στα πρώτα 50 τρόφιμα με το υψηλότερο αντιοξειδωτικό δυναμικό αποτελώντας πλούσια πηγή φυτικών φαινολικών συστατικών (Halvorsen et al., 2006). Η μεγάλη μεταβλητότητα που παρατηρείται στην ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των φαινολικών συστατικών των κελυφωτών φιστικιών εξαρτάται από περιβαλλοντικούς παράγοντες, την ποικιλία, την ανάπτυξη, τη συγκομιδή, την ωρίμανση, την επεξεργασία, τη δειγματοληψία και από τις αναλυτικές μεθόδους.

Τα κύρια φαινολικά συστατικά των κελυφωτών φιστικιών είναι:

- A) τα φαινολικά οξέα (υδροξυβενζοϊκά, υδροξυκιναμωμικά), όπως το γαλλικό, το πρωτοκατεχουϊκό, το καφεϊκό, το φερουλικό, το σιναπικό, το χλωρογενικό, το πικουμαρικό, το βανιλικό και το συριγγικό (Martínez et al., 2016· Sonmezdag, Kelebek, & Selli, 2017)
- B) οι φλαβονόλες, όπως η κατεχίνη, η καμφερόλη, η κερκετίνη (Martínez et al., 2016· Juhaimi et al., 2018)
- Γ) οι φλαβονόνες, όπως η ναριγγενίνη, η εριοδικτυόλη (Martínez et al., 2016· Sonmezdag et al., 2017)
- Δ) οι ισοφλαβόνες, όπως η νταϊντζεΐνη και η γενιστεΐνη (Gentile et al., 2007· Fallico et al., 2011)
- Ε) οι φλαβόνες, όπως η λουτεολίνη και η απιγενίνη (Sonmezdag et al., 2017)
- ΣΤ) οι ανθοκυανιδίνες, όπως ο 3-Ο-γαλακτοζίτης της κυανιδίνης και ο 3-Ο-γλυκοζίτης της κυανιδίνης (Fallico et al., 2011· Martínez et al., 2016)
- Z) οι απλές φαινόλες, όπως η ρεσορκινόλη και η φλορογλουκινόλη
- Η) τα στιλβένια, όπως η φυτοαλεξίνη ρεσβερατρόλη ή αλλιώς 3,5,4'-τριυδροξυστιλβένιο (Gentile et al., 2007· Fallico et al., 2011).

A.1.5. Συμβολή στην ανθρώπινη υγεία

Από πληθώρα ερευνών αποδεικνύεται η ωφέλιμη δράση των κελυφωτών φιστικιών στην ανθρώπινη υγεία. Είναι γνωστά για την αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινική και καρδιοπροστατευτική τους δράση. Επιπρόσθετα, οι αντιμικροβιακές, αντι-ισχαιμικές και ανοσορρυθμιστικές τους ιδιότητες έχουν προσελκύσει την προσοχή των ερευνητών (Rajaei et al., 2010· Fallico et al., 2011).

Τα κελυφωτά φιστίκια αποτελούν φυσική πηγή βιταμίνης Β₆, η οποία μειώνει τα επίπεδα της ομοκυστεΐνης που σχετίζεται με την εμφάνιση αθηρωματικών πλακών και αρτηριοσκλήρυνσης, και λιπαρών οξέων, που συμβάλλουν στη μείωση του κινδύνου καρδιαγγειακών παθήσεων μέσω της βελτίωσης της σύστασης των λιποπρωτεϊνών (Κουτελιδάκης, 2015). Δρουν προστατευτικά εναντίον παθήσεων που οφείλονται στην ύπαρξη μεγάλης συγκέντρωσης ελεύθερων ριζών, όπως είναι οι καρδιαγγειακές νόσοι και ο καρκίνος, αλλά συμβάλλουν και στη μείωση της LDL, ενώ δεν επηρεάζουν σημαντικά τη λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας ή αλλιώς «καλή» χοληστερόλη (high density lipoprotein, HDL) (Tomaino et al., 2010· Dreher, 2012· Ghaseminasab-Parizi et al., 2015). Τον Ιούλιο του 2003, ο FDA ενέκρινε τον πρώτο ισχυρισμό υγείας για τη μείωση του κινδύνου καρδιακών παθήσεων (Salvador et al., 2019).

Η βιταμίνη Β₆ που περιέχουν τα κελυφωτά φιστίκια βοηθάει το σώμα να παράγει αιμοσφαιρίνη, ένα πολύ σημαντικό συστατικό στο αίμα και είναι ιδιαίτερα ευεργετική για όσους είναι επιρρεπείς σε αναιμία (Farhan Aslam, Majeed, Aslam, & Irfan, 2017). Επίσης, είναι μια καλή πηγή αργινίνης, η οποία είναι πρόδρομος του ενδογενούς αγγειοδιασταλτικού μονοξειδίου του αζώτου και βελτιώνει την ελαστικότητα των αρτηριών, μειώνοντας τον κίνδυνο για πιθανούς θανατηφόρους θρόμβους στο αίμα (Fogacci et al., 2019). Επιπλέον, η υψηλή συγκέντρωση Κ που περιέχουν, σε σχέση με άλλους καρπούς, βοηθά τον οργανισμό μειώνοντας τα επίπεδα της κορτιζόλης στο αίμα, της ορμόνης που σχετίζεται με το στρες (Fan et al., 2019).

Τα καροτενοειδή λουτεΐνη και ζεαξανθίνη των κελυφωτών φιστικιών έχουν ευεργετική επίδραση στα μάτια. Συγκεκριμένα, έχουν την ιδιότητα να απορροφούν την ακτινοβολία που καθημερινά δέχεται ο οφθαλμός, συμβάλλοντας στην πρόληψη της γεροντικής εκφύλισης της ωχράς κηλίδας, επιτρέποντας στον οφθαλμό να φιλτράρει τις επιβλαβείς ακτινοβολίες μικρού κύματος, περιορίζοντας άλλες αρνητικές επιδράσεις στον αμφιβληστροειδή χιτώνα (Abdel-Aal, Akhtar, Zaheer, & Ali, 2013).

Η κατανάλωση κελυφωτών φιστικιών, που έχουν χαμηλό γλυκαιμικό δείκτη, μαζί με γεύματα υψηλού γλυκαιμικού δείκτη μειώνει σημαντικά (20-30%) τη μεταγευματική απόκριση γλυκόζης (Dreher, 2012).

Η κατανάλωση κελυφωτών φιστικιών συνδέεται με την καλύτερη διαχείριση του σωματικού βάρους. Επειδή είναι πλούσια σε φυτικές ίνες συγκριτικά με άλλα ισοθερμιδικά σνακ, αποδίδουν το αίσθημα του κορεσμού για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (Li et al., 2010).

Η βιταμίνη B₆ των κελυφωτών φιστικιών απαιτείται από το σώμα για να απορροφήσει τα αμινοξέα. Η βιταμίνη B₆ είναι, επίσης, σημαντική επειδή δημιουργεί μυελίνη, το περίβλημα που περιβάλλει τις νευρικές ίνες. Αυτό βοηθά τα νεύρα να επικοινωνούν πιο γρήγορα και πιο αποτελεσματικά (Calderón-Ospina & Nava-Mesa, 2019). Το λινελαϊκό οξύ, που είναι ο πρόδρομος άλλων ω-6 λιπαρών οξέων, μειώνει το οξειδωτικό στρες και λειτουργεί ως νευροπροστατευτικό (Nagy & Tiuca, 2017).

A.1.6. Φασματοσκοπικές τεχνικές - Φυσικοχημικοί παράμετροι

A.1.6.1. Υπέρυθρη φασματοσκοπία με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform InfraRed, FTIR, spectroscopy)

Η φασματοσκοπία FTIR έχει αναδειχθεί ως μία πολλά υποσχόμενη αναλυτική μέθοδος τόσο σε ερευνητική όσο και σε βιομηχανική κλίμακα. Πέρα από το ότι είναι φιλική προς το περιβάλλον, η υψηλή ανταγωνιστικότητά της έγκειται στην ταχύτητα ανάλυσης, το χαμηλό κόστος και την ευκολία προετοιμασίας του δείγματος. Μπορεί να εφαρμοστεί σε αναλύσεις ρουτίνας και επίσημους ελέγχους ποιότητας (Sujka, Koczóń, Ceglińska, Reder, & Ciemniowska-Żytkiewicz, 2017· Mendes & Duarte, 2021).

Το φάσμα υπέρυθρης (infrared, IR) ακτινοβολίας, που προκύπτει από τη φασματοσκοπία FTIR, περιλαμβάνει πληροφορίες σχετικά με τις λειτουργικές ομάδες των χημικών ενώσεων στη σύνθετη μήτρα των τροφών. Τα φάσματα αποτελούν πολύπλοκα σύνολα δεδομένων (χημειομετρικά δεδομένα, chemometrics data) και απαιτείται ανάλυση πολλαπλών μεταβλητών για τη διερεύνηση αυτών των σύνθετων συνόλων δεδομένων (Szymańska, Saccenti, Smilde, & Westerhuis, 2011). Η φασματοσκοπία FTIR συνδυασμένη με χημειομετρικά εργαλεία έχει εφαρμοστεί συχνά σε γαλακτοκομικά προϊόντα, μέλι, καφέ, ξηρούς καρπούς, άλευρα, έλαια, κέικ και νιφάδες, κρέας και αλκοολούχα ποτά (Sujka et al., 2017· Mendes & Duarte, 2021). Δημοσιευμένες μελέτες έχουν αποδείξει ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως μια ακριβής και οικονομική προσέγγιση για τη διάκριση των οίνων, ανάλογα με την ποικιλία και το έτος συγκομιδής των σταφυλιών (Geană, Ciucure, Apetrei, & Artem, 2019· Pérez-Ràfols, Subirats, Serrano, & Díaz-Cruz, 2019).

A.1.6.1.1. Τεχνική διάχυτης ανάκλασης υπέρυθρης φασματοσκοπίας μετασχηματισμού Fourier (Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform, DRIFTs)

Η διάχυτη ανάκλαση υπέρυθρης φασματοσκοπίας μετασχηματισμού Fourier εφαρμόζεται για την ανάλυση σκόνης και στερεών με τραχιά επιφάνεια. Η τεχνική βασίζεται στη διασπορά ακτινοβολίας εντός του δείγματος. Το δείγμα τοποθετείται σε μια επίπεδη επιφάνεια και σε αυτό κατευθύνεται ακτινοβολία IR. Το προσπίπτον φως μπορεί να οδηγήσει σε μία μόνο ανάκλαση από την επιφάνεια (κατοπτρική ανάκλαση, specular reflection) ή μπορεί να ανακλάται πολλαπλασιαστικά προκαλώντας διασκορπισμένο ή αλλιώς διάχυτο φως (διάχυτη σκέδαση, diffuse scattered light). Τα όργανα της τεχνικής DRIFTs έχουν σχεδιαστεί ώστε να απορρίπτουν την ακτινοβολία από κατοπτρική ανάκλαση και να συλλέγουν όσο το δυνατόν περισσότερο το διάχυτο ανακλώμενο φως το οποίο μετρείται από τον ανιχνευτή (Fuller & Griffiths, 1978· Reh, 2001· Larkin, 2011).

A.1.6.1.2. Τεχνική δισκίου KBr-δείγματος

Η τεχνική δημιουργίας δισκίου KBr-δείγματος περιλαμβάνει την ανάμειξη δείγματος με μη απορροφητική μήτρα KBr, μεταφορά του μείγματος σε καλούπι και χρήση υδραυλικής πρέσας για τη δημιουργία του δισκίου. Μέσω αυτής της τεχνικής η προσπίπτουσα ακτινοβολία IR εισχωρεί βαθύτερα στο δείγμα και έτσι, το διάχυτο φως, που εισέρχεται στον ανιχνευτή, αυξάνεται (Dent, 1996).

A.1.6.1.3. Τεχνική εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (Attenuated Total Reflection, ATR)

Στην τεχνική ATR, το δείγμα τοποθετείται πάνω σε έναν κρύσταλλο και ακτινοβολία IR κατευθύνεται προς αυτό υπό συγκεκριμένη γωνία. Πραγματοποιείται εσωτερική ανάκλαση (internal reflection) στη διεπιφάνεια κρυστάλλου-δείγματος και ο ανιχνευτής μετρά τη συνολική ανακλώμενη ενέργεια από την επιφάνεια του δείγματος σε επαφή με τον κρύσταλλο (Carlsson & Wiles, 1970).

A.1.6.2. Φασματοσκοπία Raman

Η φασματοσκοπία Raman είναι συμπληρωματική της φασματοσκοπίας FTIR. Συμβάλλει στον εντοπισμό των λειτουργικών ομάδων και της «σκελετική δομής» ενώσεων που υπάρχουν σε σύνθετες μήτρες (Uncu & Ozen, 2019). Όπως και η φασματοσκοπία FTIR, μπορεί να παρέχει χρήσιμες ποιοτικές και ποσοτικές πληροφορίες για τη χημική σύνθεση των ελαίων. Επιτρέπει το γρήγορο προσδιορισμό της συνολικής ακορεστότητας των ελαίων, του περιεχομένου των ελεύθερων λιπαρών οξέων (Muik, Lendl, Molina-Díaz, & Ayora-Cañada, 2003· El-Abassy, Donfack, & Materny, 2009), τη διάκριση και ταξινόμηση των ελαίων (Yang, Irudayaraj, & Paradkar, 2005), την ανίχνευση της νοθείας του ελαιολάδου με άλλα έλαια χαμηλότερης αξίας (Baeten et al., 2005· Uncu & Ozen, 2019) και τα στάδια ωρίμανσης των πυρηνελαίων (Lopez-Sanchez, Ayora-Cañada, & Molina-Díaz, 2010). Πρόκειται για μια γρήγορη, απλή, φιλική προς το περιβάλλον, με ακρίβεια μετρήσεων και οικονομική αναλυτική τεχνική με ευρεία εφαρμογή (π.χ. γάλα, κρασί) (Mazurek, Szostak, Czaja, & Zachwieja, 2015· Teixeira dos Santos et al., 2018).

A.1.6.3. Φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UltraViolet-Visible, UV-Vis)

Η απορρόφηση UV-Vis προσδιορίζει αλλαγές στη δομή των λιπαρών οξέων και η αξιολόγησή της δίνει πληροφορίες για την ποιότητα των ελαίων. Η δομή των λιπαρών οξέων μπορεί να αλλάξει λόγω οξειδωσης που προκαλείται από κακές γεωργικές πρακτικές, ακατάλληλο χρόνο συγκομιδής και δυσμενείς συνθήκες αποθήκευσης. Ο σχηματισμός ενώσεων οξειδωσης στα έλαια παρεμποδίζεται από τα φυσικά τους συντηρητικά που έχουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση και αποτρέπουν ή μειώνουν την κυτταρική βλάβη, που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες. Η χαμηλή απορρόφηση στην περιοχή UV-Vis είναι ενδεικτική υψηλής ποιότητας ελαίου, ενώ τα παλαιά, εξευγενισμένα και γενικά κακής ποιότητας έλαια παρουσιάζουν μεγαλύτερο επίπεδο απορρόφησης σε αυτήν την περιοχή, υποδηλώνοντας υψηλό βαθμό οξειδωσης.

Η απορρόφηση στα 232 nm προκαλείται από υδροξυπεροξειδία (πρωτογενές στάδιο οξειδωσης) και συζυγή διένια (ενδιάμεσο στάδιο οξειδωσης). Η απορρόφηση στα 270 nm προκαλείται από καρβονυλικές ενώσεις (δευτερογενές στάδιο οξειδωσης) και συζυγή τριένια (τεχνολογικές επεξεργασίες). Στα έλαια τα υδροξυπεροξειδία προκύπτουν λόγω της προσθήκης ατόμου οξυγόνου στη θέση του διπλού δεσμού των

λινελαϊκών οξέων. Ο διπλός δεσμός προκαλεί το σχηματισμό συζυγιακών συστημάτων διενίων μεταξύ των ατόμων άνθρακα. Αυτό το είδος συζυγιακών συστημάτων παρουσιάζει μια μέγιστη απορρόφηση στα 232 nm. Σε προχωρημένες καταστάσεις οξείδωσης, παράγονται οξυγονούχα προϊόντα με δύο συζυγιακούς διπλούς δεσμούς. Η μέγιστη απορρόφηση σε αυτή την περίπτωση κυμαίνεται μεταξύ 260-280 nm. Σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό αρ. 2568/91 (Παράρτημα ΙΧ του Κανονισμού), που σχετίζεται με τα ευρωπαϊκά πρότυπα ποιότητας ελαίου, επιβάλλεται η εξέταση των απορροφήσεων στα 232, 268, 270 και 274 nm. Οι τιμές k και Δk , που προκύπτουν από τις απορροφήσεις αυτές, είναι γρήγοροι δείκτες αξιολόγησης της ποιότητας του ελαίου που κάνουν διάκριση μεταξύ ελαίου υψηλής και κακής ποιότητας και συσχετίζονται και με πιθανή νοθεία (Houshia et al., 2014).

A.1.6.4. Εκτίμηση ελεύθερης οξύτητας και ποσοστού ελεύθερων λιπαρών οξέων

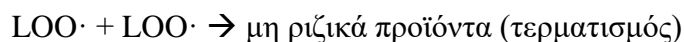
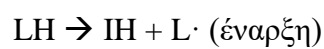
Η τιμή ελεύθερης οξύτητας είναι το μέτρο προσδιορισμού του αριθμού των καρβοξυλομάδων ενός οξέος. Εκφράζεται ως mg ελαϊκού οξέος/g ελαίου και χρησιμοποιείται ως δείκτης για τη βρωσιμότητα του ελαίου. Τα έλαια υψηλής ποιότητας εμφανίζουν πολύ χαμηλή τιμή ελεύθερης οξύτητας. Σύμφωνα με τον Codex Alimentarius on Fats and Oils, η ελεύθερη οξύτητα του ελαίου που είναι κατάλληλο προς βρώση δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 4 mg ελαϊκού οξέος/g ελαίου.

Η υδρόλυση του ελαίου έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ελεύθερων λιπαρών οξέων και υπολειμμάτων γλυκερόλης. Είναι γνωστό ότι τα ελεύθερα λιπαρά οξέα είναι πιο ευαίσθητα στην οξείδωση των λιπιδίων σε σύγκριση με τα λιπαρά οξέα των τριγλυκεριδίων. Τα έλαια που είναι ευάλωτα σε οξείδωση και ποιοτική υποβάθμιση εμφανίζουν πολύ υψηλό ποσοστό ελεύθερων λιπαρών οξέων. Το ποσοστό ελεύθερων λιπαρών οξέων έχει αναφερθεί ότι παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στο άρωμα και τη γεύση. Είναι δείκτης ενεργότητας της λιπάσης και δείκτης φρεσκάδας, χρόνου αποθήκευσης και σταθερότητας πολλών τροφών πλούσιων σε λιπαρά με ανώτατο όριο μικρότερο από 0,35% για το ελαιόλαδο (El-Abassy, Donfack, Materny, 2009· Otemuyiwa & Adewusi, 2013· Houshia et al., 2014).

A.1.6.5. Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας

Η οξείδωση είναι μια ριζική αλυσιδωτή αντίδραση του μοριακού οξυγόνου με οργανικές ενώσεις. Το μοριακό οξυγόνο είναι ιδιαίτερης φύσης, συμπεριφερόμενο ως διπλή ρίζα, έχοντας δύο αδέσμευτα ηλεκτρόνια στη θεμελιώδη κατάστασή του και θεωρείται ότι βρίσκεται σε διεγερμένη κατάσταση. Η οξείδωση των λιπιδίων σχετίζεται με έναν αλυσιδωτό μηχανισμό, όπου μπορεί να περιγραφεί με τους όρους: έναρξη, διάδοση, τερματισμός.

Κατά την έναρξη, υπό την παρουσία εκκινητών (I), τα ακόρεστα λιπίδια (LH) χάνουν ένα υδρογόνο για να σχηματιστεί η ελεύθερη ρίζα του λιπαρού οξέος (L·). Στη διάδοση, η ρίζα των ακόρεστων λιπιδίων (L·) αντιδρά πολύ γρήγορα με το μοριακό οξυγόνο με αποτέλεσμα να σχηματισθούν ελεύθερες ρίζες LOO·. Ακολουθεί μεταφορά υδρογόνου και σχηματισμός υδροϋπεροξειδίων. Στον τερματισμό της οξείδωσης, οι ρίζες LOO· συσσωρεύονται. Σε σχετικά υψηλά επίπεδα, οι ρίζες LOO· αντιδρούν μεταξύ τους ώστε να σχηματισθούν μη-ριζικά προϊόντα από την αντίδραση τερματισμού (Frankel, 2005).



Τα αντιοξειδωτικά είναι ενώσεις που αντιδρούν με τις επιβλαβείς ελεύθερες ρίζες και τις καταστέλλουν, λειτουργούν, δηλαδή, ως παράγοντες αναγωγής τερματίζοντας το σχηματισμό τους (Rajaei et al., 2010).

Σύμφωνα με τους Kim, Lee, Lee και Lee (2002), τους Roginsky και Lissi (2005) και τους Floegel, Kim, Chung, Koo και Chun (2011), και το DPPH· και το ABTS·⁺ έχουν την ικανότητα να δέχονται ηλεκτρόνια και H· από τις αντιοξειδωτικές ενώσεις που υπάρχουν στα δείγματα, ενώ οι Huang, Ou και Prior (2005) υποστηρίζουν ότι η αντίδραση με το DPPH· στην πραγματικότητα αποτελείται από μια γρήγορη διαδικασία μεταφοράς ηλεκτρονίων στο DPPH·.

A.1.6.5.1. Δοκιμή DPPH

Το ιώδες διάλυμα DPPH· αποχρωματίζεται παρουσία λιπόφιλων αντιοξειδωτικών ενώσεων (Kim et al., 2002· Floegel, Kim, Chung, Koo, Chun, 2011).

A.1.6.5.2. Δοκιμή ABTS

Το ριζικό κατιόν $ABTS^{\cdot+}$ παράγεται με οξείδωση του $ABTS^{2-}$ με $K_2S_2O_8$. Το $ABTS^{\cdot+}$ είναι ελεύθερα διαλυτό τόσο σε οργανικούς όσο και σε υδατικούς διαλύτες, επομένως, χρησιμοποιείται για τον έλεγχο τόσο των υδρόφιλων όσο και των λιπόφιλων αντιοξειδωτικών συστατικών, παρουσιάζοντας ευρύτερη εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των τροφίμων. Παρουσία λιπόφιλων και υδρόφιλων αντιοξειδωτικών ουσιών το έντονο γαλαζοπράσινο χρώμα του διαλύματος $ABTS^{\cdot+}$ αποχρωματίζεται (Kim et al., 2002· Roginsky & Lissi, 2005· Floegel et al., 2011).

A.1.6.6. Εκτίμηση πολικών φαινολών με τη δοκιμή Folin-Ciocalteu

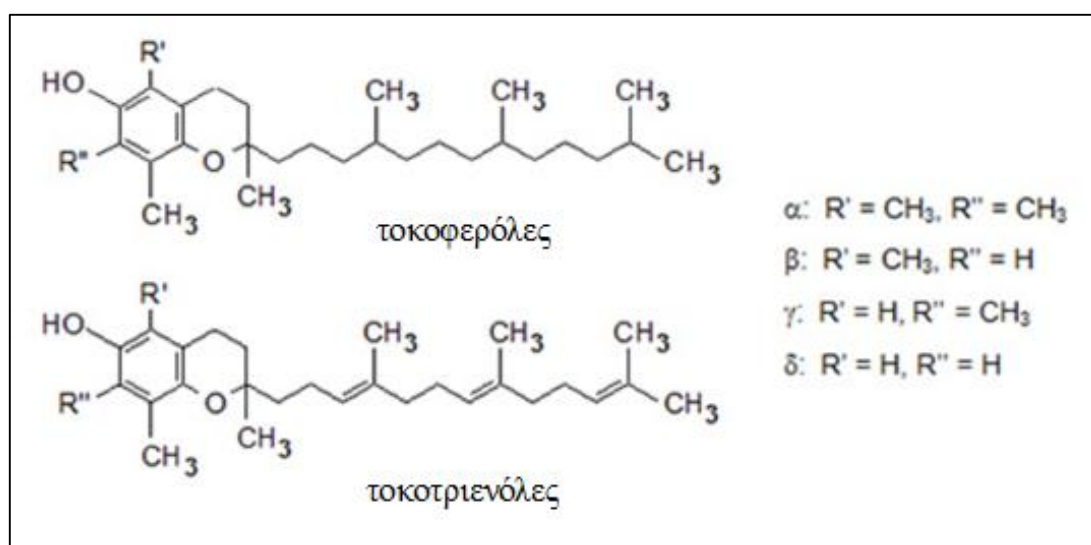
Η δοκιμή Folin-Ciocalteu χρησιμοποιείται ως μία ταχεία μέθοδος για την αξιολόγηση των φαινολικών συστατικών. Το κλάσμα των πολικών φαινολών του ελαίου παραλαμβάνεται με εκχύλιση διαλύματος ελαίου σε εξάνιο με υδρομεθανολικό διάλυμα, ακολουθεί η απομάκρυνση του διαλύτη από την υδατική φάση και τέλος, ο φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός των πολικών φαινολών έπειτα από αντίδραση με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu στα 725 nm.

A.1.6.7. Ανάλυση τοκοφερολών με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) συζευγμένη με φθορισμομετρικό ανιχνευτή (FLuorescence Detector, FLD)

Οι τοκοφερόλες και οι τοκοτριενόλες, συλλογικά γνωστές ως τοκόλες, είναι λιποδιαλυτές ενώσεις. Αποτελούνται από έναν πολικό δακτύλιο χρωμανόλης και μια υδρόφοβη πλευρική αλυσίδα 16 ανθράκων συνδεδεμένη στο δακτύλιο μέσω του ατόμου C-2. Οι τοκοφερόλες έχουν κορεσμένες πλευρικές αλυσίδες φυτυλίου, ενώ οι τοκοτριενόλες έχουν πλευρικές αλυσίδες ισοπρενυλίου με τρεις διπλούς δεσμούς. Τόσο οι τοκοφερόλες όσο και οι τοκοτριενόλες εμφανίζονται ως τέσσερα ισομερή της βιταμίνης E (α, β-, γ- και δ-) που διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τον αριθμό και τη θέση των μεθυλικών ομάδων στο δακτύλιο της χρωμανόλης (Σχήμα A.1.6.7.1).

Οι τοκοφερόλες οξειδώνονται όταν θερμαίνονται, υπό την επίδραση φωτός και σε αλκαλικές συνθήκες. Στα τρόφιμα βρίσκονται στην εστεροποιημένη μορφή τους και είναι σταθερές στην οξείδωση. Φθορίζουν, παρουσιάζοντας απορρόφηση στα 290-300 nm και εκπέμπουν στα 325-330 nm. Στην παρούσα μελέτη, αναλύθηκαν με υγρή χρωματογραφία κανονικής φάσης (normal phase-high pressure liquid chromatography, NP-HPLC) (συνδυασμό πολικής στατικής φάσης και άπολης κινητής φάσης) και φθορισμομετρικό ανιχνευτή. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί και η φασματομετρία μαζών με, κατά προτίμηση, το χημικό ιοντισμό υπό ατμοσφαιρική πίεση (atmospheric pressure chemical ionization, APCI) έναντι του ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (electrospray ionization, ESI).

Αν αναλύονταν με υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (reversed phase-high pressure liquid chromatography, RP-HPLC) (συνδυασμό άπολης στατικής φάσης και πολικής κινητής φάσης) συνιστάται πρωτίστως αλκαλική υδρόλυση για την απομάκρυνση λιπιδίων. Για να αποφευχθεί η οξείδωση των τοκοφερολών που μπορεί να προκύψει από την αλκαλική υδρόλυση, προστίθενται αντιοξειδωτικά (ασκορβικό οξύ) στο μείγμα σαπωνοποίησης και το οξυγόνο απομακρύνεται. Μετά τη σαπωνοποίηση, οι τοκοφερόλες εκχυλίζονται συνήθως με μείγματα διαλυτών (εξάνιο και οξικό αιθυλεστέρα, επτάνιο και οξικό αιθυλεστέρα ή εξάνιο και αιθανόλη (EtOH)). Η αέρια χρωματογραφία θα μπορούσε, επίσης, να χρησιμοποιηθεί για τη χημική ανάλυση των τοκοφερολών, αλλά χρειάζεται παραγωγοποίησή τους και περιλαμβάνει τον κίνδυνο αποσύνθεσης λόγω υψηλών θερμοκρασιών (Lu, Yang, Li, & Sun, 2014).



Σχήμα Α.1.6.7.1. Χημική δομή τοκοφερολών και τοκοτριενολών (Lu et al., 2014).

A.1.6.8. Αεριοχρωματογραφική ανάλυση (Gas Chromatography, GC) συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry, MS)

A.1.6.8.1. Προσδιορισμός λιπαρών οξέων

Τα λιπαρά οξέα μπορεί να υπάρξουν στη φύση σε ελεύθερη (μη εστεροποιημένη μορφή), αλλά συχνότερα εμφανίζονται ως εστέρες ενωμένοι σε γλυκερόλη, χοληστερόλη ή αλειφατικές αλκοόλες μακριάς αλυσίδας και ως αμίδια ενωμένα σε σφιγγολιπίδια. Η διαδικασία της ανάλυσης των λιπαρών οξέων ξεκινά με μεθυλεστεροποίηση, δηλαδή μετατροπή των συστατικών των λιπαρών οξέων των λιπιδίων σε απλά και ευκολο-διαχειριζόμενα πτητικά παράγωγα, όπως είναι οι μεθυλεστέρες. Κατά τη μεθυλίωση μετατρέπονται, δηλαδή, οι εστέρες της γλυκερόλης με λιπαρά οξέα (τριγλυκερίδια) σε μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων. Η μεθυλίωση μπορεί να γίνει είτε παρουσία οξέος είτε παρουσία βάσης.

Σε όξινο περιβάλλον, υπάρχει ο κίνδυνος παρουσία νερού, που είναι ισχυρός δότης πρωτονίου, να μην μπορέσει να γίνει ικανοποιητικά η μεθυλίωση και η αντίδραση να μετατοπίζεται διαρκώς προς τα αριστερά.

Σε βασικό περιβάλλον, η διαδικασία είναι πιο απλή και πολύ πιο γρήγορη. Τα τριγλυκερίδια και τα φωσφολιπίδια, μετεστεροποιούνται πολύ γρήγορα και λαμβάνονται ποσοτικά οι μεθυλεστέρες, σε θερμοκρασία δωματίου, σε άνυδρη μεθανόλη (MeOH) παρουσία ενός βασικού καταλύτη, συνήθως KOH. Με τη χρήση βασικού καταλύτη, δεν απελευθερώνονται αλδεΐδες από τα φωσφολιπίδια σε αντίθεση με την εφαρμογή όξινων συνθηκών. Αυτό αποτελεί ένα ακόμα πλεονέκτημα της βασικής κατάλυσης λόγω απλοποίησης της ερμηνείας του αέριου χρωματογραφήματος. Αν αντικαταστήσουμε τη MeOH με νερό (H₂O), θα πραγματοποιηθεί υδρόλυση και θα προκύψει ελεύθερο λιπαρό οξύ. Όμως, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα δεν εστεροποιούνται υπό αλκαλικές συνθήκες. Επομένως, πρέπει οπωσδήποτε να αποφευχθεί η παρουσία νερού ώστε να παρεμποδιστεί η ανεπιθύμητη και μη αναστρέψιμη παράπλευρη αντίδραση της υδρόλυσης.

Ο διαχωρισμός των λιπαρών οξέων γίνεται σε μια στατική φάση (μη πτητική) η οποία είναι τοποθετημένη πάνω σε ένα αδρανές υλικό. Οι αλληλεπιδράσεις της στατικής φάσης με τα λιπαρά οξέα του δείγματος είναι αποτέλεσμα φυσικής προσρόφησης που επηρεάζει την ταχύτητά τους μέσα στη στήλη, καθώς αυτά μεταφέρονται από το φέρον αέριο (συνήθως χρησιμοποιείται αργό, άζωτο ή ήλιο).

Το δείγμα εγχέεται με μικροσύριγγα στην αρχή μιας χρωματογραφικής στήλης μέσα από κατάλληλο στόμιο εισαγωγής, που φράσσεται με θερμοανθεκτικό ελαστικό διάφραγμα σιλικόνης (septum), το οποίο δρα ως βαλβίδα που επιτρέπει την είσοδο του δείγματος, αλλά όχι την έξοδο αυτού και του φέροντος αερίου (Χατζηιωάννου & Κουμπάρη, 2014). Το δείγμα εισέρχεται από το στόμιο εισόδου στο χώρο ταχείας εξάτμισης, που βρίσκεται στην κεφαλή της στήλης. Η θερμοκρασία του χώρου αυτού είναι συνήθως 50°C πάνω από το σημείο βρασμού του λιγότερο πτητικού συστατικού του δείγματος (Skoog, Holler, & Crouch, 2007). Για την επίτευξη καλών διαχωρισμών πρέπει:

- Η εισαγωγή του δείγματος να είναι ακαριαία. Η βραδεία εισαγωγή οδηγεί σε διεύρυνση των κορυφών.
- Ο όγκος του δείγματος να είναι όσο το δυνατόν μικρότερος, διότι η διαχωριστική ικανότητα ελαττώνεται όταν η ποσότητα του δείγματος αυξάνεται.
- Ο χώρος εισαγωγής του δείγματος να θερμαίνεται υψηλότερα από τη θερμοκρασία της στήλης, ώστε να επιτυγχάνεται άμεση εξαέρωση του δείγματος και παραλαβή των ατμών από το φέρον αέριο.

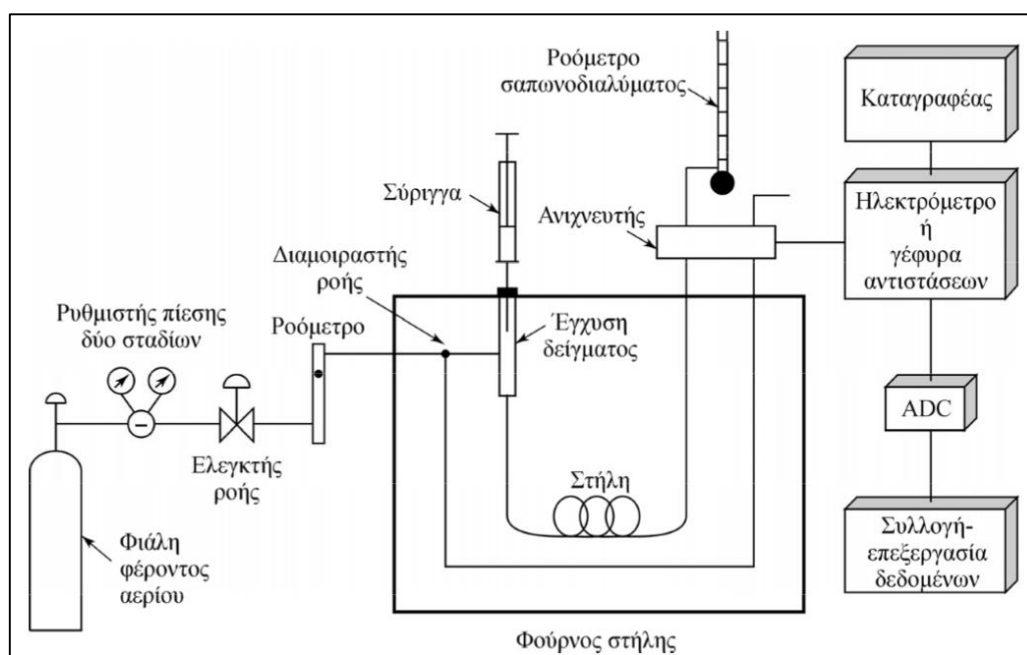
Η θερμοκρασία της στήλης είναι μια σημαντική παράμετρος που πρέπει να ελέγχεται με ακρίβεια, αν απαιτούνται αναπαραγώγιμα αποτελέσματα. Για το λόγο αυτό, η στήλη τοποθετείται σε ένα θερμοστατούμενο κλίβανο. Για δείγματα με συστατικά των οποίων τα σημεία βρασμού καλύπτουν ευρεία περιοχή τιμών, συχνά απαιτείται προγραμματισμός θερμοκρασίας, κατά τον οποίο η θερμοκρασία της στήλης αυξάνει συνεχώς ή σε βήματα κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού με βάση προκαθορισμένο πρόγραμμα. Όταν η θερμοκρασία της στήλης διατηρείται σταθερή σε όλη τη διάρκεια της χρωματογράφησης (ισόθερμη αέρια χρωματογραφία) είναι δύσκολο να επιτευχθεί πλήρης διαχωρισμός και ανίχνευση των συστατικών ενός δείγματος όταν αυτά είναι πολυάριθμα ή τα σημεία ζέσεώς τους και οι πολικότητές τους καλύπτουν ευρείες περιοχές. Αυτά τα μειονεκτήματα της ισόθερμης λειτουργίας της στήλης αίρονται με τη θερμοπρογραμματιζόμενη αέρια χρωματογραφία.

Η έκλυση πραγματοποιείται με ροή χημικά αδρανούς αερίου, το οποίο αποτελεί την κινητή φάση. Η κινητή φάση δεν αλληλεπιδρά με τα μόρια του αναλύτη, αλλά ο μόνος της ρόλος είναι η μεταφορά του αναλύτη κατά μήκος της στήλης. Στην παρούσα μελέτη, ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε αέριο ήλιο, παρά το υψηλό του

κόστος, επειδή έχει μεγάλη θερμική αγωγιμότητα και μικρή πυκνότητα, που επιτρέπει τη χρήση μεγαλύτερων ταχυτήτων ροής αερίου με αντίστοιχη μείωση του χρόνου ανάλυσης.

Με τον ανιχνευτή γίνεται φανερή η παρουσία καθενός από τα συστατικά του μείγματος τα οποία εξέρχονται από τη στήλη. Το σήμα που προέρχεται από τον ανιχνευτή είναι πολύ ασθενές και πρέπει να ενισχυθεί πριν από την καταγραφή του. Ο μόνος περιορισμός κατά την επιλογή του βαθμού ενισχύσεως είναι ότι η τιμή του λόγου S/N πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 2 (Χατζηωάννου & Κουμπάρη, 2014).

Ο αέριος χρωματογράφος χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των συστατικών και όχι για την ταυτοποίηση τους. Όταν, όμως, συνδυαστεί με το φασματοφωτόμετρο μαζών γίνεται ισχυρότατο μέσο ταυτοποίησης πολύπλοκων δειγμάτων. Κατά την ποσοτική ανάλυση, το εμβαδόν της κάθε κορυφής του χρωματογραφήματος σχετίζεται με τη συγκέντρωση του αντίστοιχου συστατικού μέσα στο δείγμα. Έτσι, προσδιορίζεται η ποσοστιαία αναλογία των συστατικών του δείγματος και η συγκέντρωση των συστατικών του δείγματος είτε μέσω της μεθόδου εσωτερικού προτύπου (internal standard, IS) είτε μέσω της μεθόδου εξωτερικού προτύπου (external standard, ES) (Skoog, 2007). Η οργανολογία του αεριοχρωματογράφου απεικονίζεται στο Σχήμα A.1.6.8.1.1.

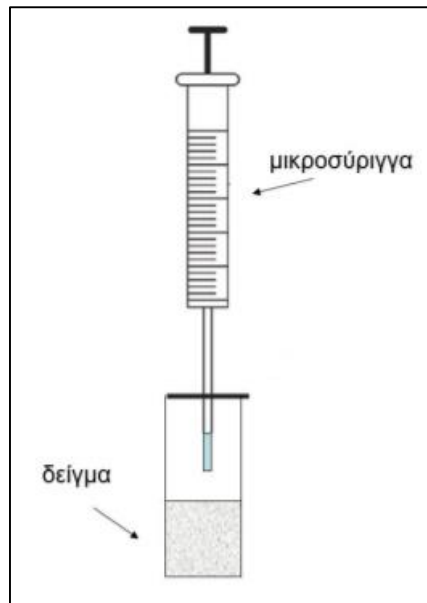


Σχήμα A.1.6.8.1.1. Σχηματική απεικόνιση αεριοχρωματογράφου (Skoog, 2007).

A.1.6.8.2. Προσδιορισμός πτητικών συστατικών με την τεχνική μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (head space-solid phase microextraction, HS-SPME)

Η SPME προτείνεται ως μια κατάλληλη τεχνική για τον προσδιορισμό πτητικών συστατικών με υψηλή ακρίβεια. Είναι φιλική προς το περιβάλλον, ευαίσθητη, επιλεκτική, εφαρμόζεται σε δείγματα μικρής ποσότητας και μπορεί να αυτοματοποιηθεί (Dorota et al., 2021). Υπάρχει μια σύγχυση μεταξύ της έννοιας των πτητικών συστατικών (volatile compounds), των συστατικών αρώματος (aroma compounds) και των αρωματικών συστατικών (aromatic compounds). Από τη μία ως συστατικά αρώματος χαρακτηρίζονται οι πτητικές ενώσεις οι οποίες γίνονται αντιληπτές από τους υποδοχείς οσμής του οσφρητικού οργάνου. Δε συνεισφέρουν όλες οι πτητικές ουσίες στο άρωμα ενός τροφίμου. Από την άλλη αρωματικά συστατικά είναι εκείνα που περιέχουν τουλάχιστον έναν επίπεδο συζυγιακό δακτύλιο με $3n+2$ ($n=0,1,2..$) π-ηλεκτρόνια (Belitz, Grosch, & Schieberle, 2009). Η περιεκτικότητα των πτητικών συστατικών εξαρτάται από τις διάφορες τεχνικές παραλαβής του ελαίου, ενώ η ποσότητά τους μπορεί να ποικίλει ανάλογα με την ποικιλία του δένδρου της φιστικιάς (Ojeda-Amador, Fregarane, & Salvador, 2020).

Για την παραλαβή των πτητικών ενώσεων από ένα δείγμα ελαίου, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η τεχνική SPME. Χρησιμοποιείται μια ειδική συσκευή δειγματοληψίας (μικροσύριγγα) (Σχήμα A.1.6.8.2.1). Σε πρώτο στάδιο, μια ίνα, επικαλυμμένη με κατάλληλο προσροφητικό υλικό, εκτίθεται στην αέρια φάση του φιαλιδίου που περιέχει το δείγμα και απορροφά τα πτητικά συστατικά. Σε δεύτερο στάδιο, με το πέρας του απαραίτητου χρόνου αποκατάστασης της ισορροπίας, η ίνα μεταφέρεται στον εισαγωγέα του αέριου χρωματογράφου για εκρόφιση, διαχωρισμό και ποσοτικοποίηση. Για την ταυτοποίηση των πτητικών συστατικών εφαρμόζεται η φασματομετρία μαζών.



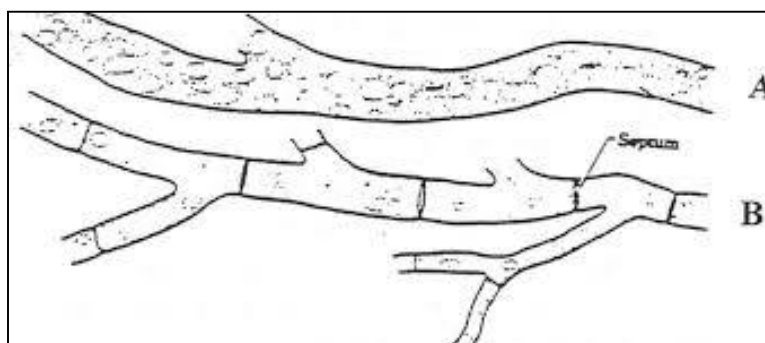
Σχήμα Α.1.6.8.2.1. Συσκευή δειγματοληψίας μέσω τεχνικής HS-SPME (Σαμανίδου, 2015).

Α.1.6.9. Διερεύνηση μυκητολογικής ποιότητας και σταθερότητας

Τα τρόφιμα αποτελούν ένα εξαιρετικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών οι οποίοι τα αλλοιώνουν και τα καθιστούν μη αποδεκτά από τον καταναλωτή ή ακόμα και επικίνδυνα για την υγεία του. Οι μικροοργανισμοί απαιτούν ειδικές συνθήκες για την ανάπτυξή τους όσον αφορά στην ενεργότητα ύδατος (a_w), στο pH, στη θερμοκρασία, στην ύπαρξη ή όχι οξυγόνου, στην επάρκεια σε θρεπτικά συστατικά και στην ύπαρξη συντηρητικών. Ως τρόφιμα χαμηλής υγρασίας μπορούν να οριστούν εκείνα με $a_w < 0,85$. Ορισμένα από αυτά τα τρόφιμα περιλαμβάνουν ξηρούς καρπούς (αράπικα φιστίκια, αμύγδαλα, κελυφωτά φιστίκια), δημητριακά, σοκολάτα, τροφή για κατοικίδια και γάλα σε σκόνη. Ως γενικός κανόνας μπορεί να τεθεί ότι η δράση των μικροοργανισμών αναστέλλεται όταν $a_w < 0,65$. Η περιοχή αυτή θεωρείται το κριτήριο μικροβιακής σταθερότητας ενός τροφίμου (Scott, Clavero, & Troller, 2001).

Τα φιστίκια είναι ένα καρπός που ευνοεί την ανάπτυξη μυκήτων και ζυμών (Brar & Danyluk, 2018). Μερικοί από τους μύκητες που μπορούν να αναπτυχθούν στα φιστίκια φέρουν την ικανότητα παραγωγής τοξινών (όπως μερικά είδη του γένους *Aspergillus*) οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν ηπατικά προβλήματα με οξείες δηλητηριάσεις, τερατογεννέσεις και καρκίνο (Campbell, Molyneux, & Schatzki, 2003· Kumar, Mahato, Kamle, Mohanta, & Kang, 2017).

Οι μύκητες αποτελούνται από το σώμα ή αλλιώς θαλλό (thallus) που αποτελείται από τα νημάτια ή αλλιώς υφές (hyphae). Οι υφές αναπτύσσονται προς διαφορετικές κατευθύνσεις και δημιουργούν το μικκύλιο. Πολλοί μύκητες μεταξύ των κυττάρων τους περιέχουν μια δομή, ένα εγκάρσιο τοίχωμα που καλείται σέπτο (septum) και διαχωρίζει τα κύτταρα μεταξύ τους (Σχήμα A.1.6.9.1). Ο διαχωρισμός αυτός των κυττάρων παρατηρείται με οπτικό μικροσκόπιο και αποτελεί ταξινομικό κριτήριο των μυκήτων.



Σχήμα A.1.6.9.1. Δομή μύκητα: A) χωρίς septa και B) με septa (Ζερβάκης, 2014).

Οι μύκητες μπορούν να αναπαραχθούν εγγενώς και αγενώς. Η εγγενής αναπαραγωγή βασίζεται στη σύντηξη δύο πυρήνων και ακολουθεί η μειωτική διαίρεση. Η αγενής αναπαραγωγή πραγματοποιείται με απλή διαίρεση ενός μονοκύτταρου μικροοργανισμού και παραγωγή σπορίων. Τα σπόρια παράγονται είτε στις κορυφές των υφών, είτε σε πλάγιες διακλαδώσεις των υφών (κονιδιοφόροι), είτε σε σύνθετες καρποφορίες. Τα σπόρια που φύονται σε κονιδιοφόρους ονομάζονται κονίδια (Ζερβάκης, 2014).

Οι μύκητες ταξινομούνται ξεκινώντας από το βασίλειο και καταλήγοντας στο υποείδος (Πίνακας A.1.6.9.1). Οι μύκητες ως βασίλειο έχουν χωριστεί σε υποβασιλεία εκ των οποίων είναι οι Ζυγομύκητες, οι Ασκομύκητες και οι Βασιδιομύκητες. Οι Ζυγομύκητες χαρακτηρίζονται από ταχεία ανάπτυξη, τα μικκύλια δε φέρουν septa και τα σπόρια παράγονται μέσα στα σποριαγγειοσπόρια. Οι Ασκομύκητες ξεχωρίζουν από το γεγονός ότι τα μικκύλιά τους φέρουν septa και τα σπόρια τους παράγονται μέσα σε ασκούς (ασκοσπόρια). Οι Βασιδιομύκητες περιλαμβάνουν τα μανιτάρια και μερικούς παθογόνους για τα φυτά μύκητες (Μπαλατσούρας, 2006).

Πίνακας Α.1.6.9.1. Ενδεικτικός διαχωρισμός και ταξινόμηση μυκήτων (Pitt & Hocking, 2009).

Βασίλειο (Kingdom)	Μύκητες		
Υπο-Βασίλειο (Sub-Kingdom)	Ζυγομύκητες (Zygomycota)	Ασκομύκητες (Ascomycota)	Βασιδιομύκητες (Ascomycota)
Κλάση (Class)	Zygomycetes	Plectomycetes	Wallemiomycetes
Τάξη (Order)	Mucorales	Eurotiales	Wallemiales
Οικογένεια (Family)	Mucoraceae	Trichocomaceae	Wallemialaceae
Γένος (Genus)	Rhizopus	<i>Eurotium</i>	<i>Wallemia</i>
Είδος (Species)	stolonifer	<i>chevalieri</i>	<i>sebi</i>
Υπο-Είδος (Variety)		<i>intermedius</i>	

A.1.6.9.1. Καταμέτρηση μυκήτων

Η καταμέτρηση των αποικιών των μυκήτων γίνεται σε υποστρώματα και μπορούν να εφαρμοστούν δύο τεχνικές: η τεχνική της απευθείας επίστρωσης του τροφίμου (Direct Plating) και η τεχνική της επίστρωσης κατόπιν διάλυσης του τροφίμου (Dilution Plating). Το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται εξαρτάται από το προς εξέταση τρόφιμο. Σύμφωνα με τους Pitt και Hocking (2009) για νοπούς ξηρούς καρπούς προτείνεται το υπόστρωμα DRBC (Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol agar).

Στην τεχνική Direct Plating τοποθετείται στο υπόστρωμα συγκεκριμένος αριθμός κόκκων ή καρπών ανάλογα με το μέγεθός τους και επωάζονται για 5-7 μέρες σε θερμοκρασία 25°C.

Στην τεχνική Dilution Plating, που είναι κατάλληλη για την ανάλυση υγρών ή στερεών τροφίμων, γίνεται ομογενοποίηση του δείγματος με τη χρήση ειδικής συσκευής (Stomacher), που βοηθάει στη διασπορά και αποκόλληση των μικροοργανισμών από το τρόφιμο. Συγκεκριμένα, το προς ανάλυση δείγμα του τροφίμου τοποθετείται μέσα σε ειδική σακούλα ομογενοποίησης και διαλύεται σε αναλογία 1:10 με αποστειρωμένο ισοτονικό διάλυμα (Ringer). Ακολουθεί η ομογενοποίηση και έπειτα το δείγμα αραιώνεται σε κατάλληλες δεκαδικές αραιώσεις και αφού επιστρωθεί σε κατάλληλα μικροβιολογικά υποστρώματα επωάζεται για 5-7 μέρες σε θερμοκρασία 25°C (Pitt & Hocking, 2009).

A.1.6.9.2. Απομόνωση μυκήτων

Η απομόνωση αποσκοπεί στην παραλαβή μιας και μόνο αποικίας, χωρίς πρόσμιξη ή επιμόλυνση από άλλο μύκητα ή ζύμη. Η απομόνωση πραγματοποιείται με την παραλαβή μίας αποικίας ή σπορίων αυτής από το τρυβλίο ανάπτυξης με μικροβιολογικό κρίκο ή βελόνα και την εναπόθεση σε καινούριο τρυβλίο (Pitt & Hocking, 2009).

A.1.6.9.3. Ταυτοποίηση μυκήτων

Οι απομονωμένες αποικίες μυκήτων επιστρώνονται σε τρία διαφορετικά υποστρώματα, CYA (Czapek yeast extract agar), MEA (malt extract agar) και G25N (glycerol 25% nitrate agar) σε θερμοκρασίες που ορίζονται από το εκάστοτε πρωτόκολλο. Κατά την επίστρωση σε κάθε υπόστρωμα εναποτίθενται τρεις σταγόνες από το εναιώρημα των κονιδίων του μύκητα σε ίσες αποστάσεις σχηματίζοντας ένα ισόπλευρο τρίγωνο. Τα υποστρώματα επωάζονται για 7 μέρες σε επιλεγμένες θερμοκρασίες και έπειτα παρατηρούνται τα μακροσκοπικά (διάμετρος, χρώμα αποικίας και κονιδίων) και μικροσκοπικά χαρακτηριστικά με τη βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου. Βάσει αυτών των παρατηρήσεων και με τη χρήση ειδικής κλείδας ταξινόμησης, συμπεραίνεται το γένος ή το είδος του μύκητα.

Οι παραπάνω διαδικασίες πρέπει να γίνονται υπό ασηπτικές συνθήκες, δηλαδή πρέπει να γίνεται καθαρισμός της επιφάνειας εργασίας και του θαλάμου νηματικής ροής (Laminar Flow) με αλκοόλη, καθαρότητας 70%, παρουσία λύχνου Bunsen με φλόγα ώστε να αποφευχθεί οποιαδήποτε επιμόλυνση.

A.1.7. Στατιστική επεξεργασία

Αρχικά συσχετίστηκαν οι ανεξάρτητες μεταβλητές (αποτελέσματα διάφορων αναλύσεων) με το έτος συγκομιδής (εξαρτημένη μεταβλητή). Η διακριτική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το IBM SPSS Statistics 22 (ver. 8.0.0.245) και το λογισμικό MetaboAnalyst 5.0.

Σε περίπτωση που η χημική ανάλυση έδινε χημειομετρικά δεδομένα (μεγάλο πλήθος ανεξάρτητων μεταβλητών) χρησιμοποιήθηκε το MetaboAnalyst. Σε περίπτωση που η χημική ανάλυση έδινε μόνο μια στήλη δεδομένων (μία ανεξάρτητη μεταβλητή) χρησιμοποιήθηκε το SPSS. Επιλέχθηκε ο συγκεκριμένος τρόπος εργασίας επειδή στην περίπτωση της μίας ανεξάρτητης μεταβλητής το MetaboAnalyst δεν παρουσίαζε το ποσοστό ταξινόμησης των δειγμάτων βάσει του έτους συγκομιδής. Ωστόσο, το ποσοστό απαιτούνταν να παρουσιαστεί, γι' αυτό στην περίπτωση της μίας ανεξάρτητης μεταβλητής η στατιστική επεξεργασία έγινε με το SPSS.

Στα δεδομένα των οποίων η στατιστική επεξεργασία έγινε με SPSS δεν παρουσιάζονται γραφήματα. Όταν η εξαρτημένη μεταβλητή έχει δύο κατηγορίες (στην παρούσα μελέτη δύο έτη συγκομιδής-2017 και 2018), τότε ο τύπος που χρησιμοποιείται είναι ανάλυση διάκρισης δύο ομάδων (two-group discriminant analysis). Εάν η εξαρτημένη μεταβλητή έχει τρεις ή περισσότερες από τρεις κατηγορίες, τότε ο τύπος που χρησιμοποιείται είναι η ανάλυση πολλαπλών διακρίσεων (multiple discriminant analysis). Έτσι, στην two-group discriminant analysis, μπορεί να εξαχθεί μόνο μία διακριτική συνάρτηση (discriminant function) ενώ στη multiple discriminant analysis, μπορεί να υπολογιστούν περισσότερες από μία discriminant functions (Statistics Solutions, 2021). Όταν στο SPSS εκτελείται two-group discriminant analysis δεν παρέχεται γράφημα ταξινόμησης των δειγμάτων βάσει του έτους συγκομιδής.

Τα δείγματα της παρούσας μελέτης κατατάσσονται σε δύο ομάδες, δύο διαδοχικά έτη συγκομιδής (2017 και 2018). Μηδενική υπόθεση ορίστηκε η υπόθεση ότι αυτές οι δύο ομάδες δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά. Όλες οι συγκρίσεις πραγματοποιήθηκαν σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95% (95% confidence level), δηλαδή σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$. Τιμή $\alpha=0,05=1/20$ σημαίνει ότι η πιθανότητα σφάλματος τύπου I (να απορριφθεί η μηδενική υπόθεση, ενώ ισχύει) είναι μία στις 20 φορές. Η τιμή p-value εκφράζει την πιθανότητα το παρατηρούμενο στατιστικό αποτέλεσμα να προέκυψε καθαρά και μόνο από τύχη. Επομένως, όταν $p\text{-value}\leq 0,05$

τότε για $\alpha=0,05$ η μηδενική υπόθεση απορρίπτεται, υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση και κάτι πέρα από την τύχη δίνει το παρατηρούμενο αποτέλεσμα. Όταν $p\text{-value}>0,05$ τότε η μηδενική υπόθεση για $\alpha=0,05$ δεν απορρίπτεται, οι δύο ομάδες δειγμάτων δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά και τα παρατηρούμενα αποτελέσματα μπορούν να εξηγηθούν μόνο από τύχη.

Στην περίπτωση όπου έπρεπε να εξαχθούν πληροφορίες από χημειομετρικά δεδομένα, τα δεδομένα υπέστησαν φιλτράρισμα ώστε να μειωθούν σε αριθμό και να αυξηθεί η ισχύς των μοντέλων που αναπτύχθηκαν. Το φιλτράρισμα έγινε βάσει του διατεταρτημοριακού εύρους (interquartile range, IQR) που αντιπροσωπεύει το διάστημα από το 25^ο εκατοστημόριο και το 75^ο εκατοστημόριο της κατανομής των δεδομένων. Το 25^ο και το 75^ο εκατοστημόριο είναι τα επίπεδα κάτω από τα οποία περιλαμβάνονται, αντιστοίχως, το 25% και το 75% των παρατηρήσεων στα σύνολα δεδομένων. Με άλλα λόγια, το διατεταρτημοριακό εύρος δεν περιλαμβάνει το 25% των χαμηλότερων και το 25% των υψηλότερων δεδομένων, ή αλλιώς, περιλαμβάνει το 50% των κεντρικών τιμών της κατανομής των δεδομένων. Έτσι, ανιχνεύτηκαν ποιες τιμές ανεξάρτητων μεταβλητών δεν έδιναν πληροφορίες για τα δείγματα, δε θα χρησιμοποιούν στη μοντελοποίηση, εμπόδιζαν τη συμμετρική κατανομή των δεδομένων, αναγνωρίστηκαν ως ακραίες τιμές (outliers) ή ως θόρυβος. Αριθμός ανεξάρτητων μεταβλητών μικρότερος από 250 υποβλήθηκε σε φιλτράρισμα δεδομένων 5%, μεταξύ 250-500 και 500-1000 έως 10% και 25% φιλτράρισμα, αντίστοιχα, ενώ για πάνω από 1000 μεταβλητές τα δεδομένα φιλτραρίστηκαν σε ποσοστό 40% (Hackstadt & Hess, 2009).

Μετά την αφαίρεση των μη πληροφοριακών δεδομένων, στο υπόλοιπο 95%, 90%, 75% ή 60% των δεδομένων, κατ' αντιστοιχία, ή στο σύνολο των δεδομένων εάν αυτά δεν ανήκαν σε χημειομετρικά δεδομένα, εφαρμόστηκε τεστ κανονικότητας με SPSS προκειμένου να γίνει δεκτή ή να απορριφθεί η υπόθεση ότι κάθε ομάδα δειγμάτων ακολουθεί την κανονική κατανομή. Τα τεστ κανονικότητας Kolmogorov-Smirnov και Shapiro-Wilk αξιολόγησαν εάν οι ομάδες δειγμάτων προέρχονταν από κανονική κατανομή ($p\text{-value}>0,05$), με το αποτέλεσμα του Shapiro-Wilk τεστ να παρουσιάζει υψηλότερη εγκυρότητα ως πιο εξειδικευμένο στον έλεγχο κανονικότητας.

Εάν τα δεδομένα δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή, ακολουθούσε κατάλληλη κανονικοποίηση για την καλύτερη διάκριση των διαφορών μεταξύ των δειγμάτων και για να καθοριστούν οι τιμές καμπυλότητας (skewness) και κύρτωσης (kurtosis) στα αποδεκτά επίπεδα. Διαφορετικές μέθοδοι προεπεξεργασίας των

δεδομένων, όπως κεντράρισμα (centering), αυτόματη κλιμάκωση (autoscaling), κλιμάκωση Pareto (Pareto scaling), λογαριθμικός μετασχηματισμός (log transformation) και μετατροπή κυβικής ρίζας (cube root transformation), συνδυάστηκαν ώστε τα δεδομένα να ακολουθούν κανονική κατανομή (normal distribution), να είναι πιο συγκρίσιμα μεταξύ τους και να τονιστούν οι διαφορές τους. Κάθε μέθοδος προεπεξεργασίας έχει τα δικά της πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Η επιλογή της μεθόδου προεπεξεργασίας εξαρτάται από το ερώτημα που πρέπει να απαντηθεί, τις ιδιότητες του συνόλου δεδομένων και την επιλεγμένη μέθοδο ανάλυσης δεδομένων.

Με το κεντράρισμα (centering), από την τιμή κάθε ανεξάρτητης μεταβλητής αφαιρείται ο μέσος όρος αυτής της ανεξάρτητης μεταβλητής ($x'_{ij} = x_{ij} - \bar{x}_i$) ώστε να επικεντρωθεί το ερευνητικό ερώτημα στις διαφορές και όχι στις ομοιότητες των δεδομένων.

Με την αυτόματη κλιμάκωση (autoscaling), από την τιμή κάθε ανεξάρτητης μεταβλητής αφαιρείται ο μέσος όρος αυτής της ανεξάρτητης μεταβλητής και το αποτέλεσμα διαιρείται με την τυπική απόκλιση της ανεξάρτητης μεταβλητής ($x'_{ij} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_i}{s_i}$) ώστε να γίνουν όλες οι μεταβλητές ισοδύναμες σε σημαντικότητα και έπειτα να συγκριθούν.

Με την κλιμάκωση Pareto (Pareto scaling), από την τιμή κάθε ανεξάρτητης μεταβλητής αφαιρείται ο μέσος όρος αυτής της ανεξάρτητης μεταβλητής και το αποτέλεσμα διαιρείται με τη ρίζα της τυπικής απόκλισης της ανεξάρτητης μεταβλητής ($x'_{ij} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_i}{\sqrt{s_i}}$) ώστε να μειωθεί η σχετική σημασία των μεγάλων τιμών, αλλά να διατηρηθεί η δομή των δεδομένων μερικώς άθικτη. Σε σχέση με την αυτόματη κλιμάκωση, τα δεδομένα παραμένουν πιο κοντά στις τιμές των αρχικών μετρήσεων.

Με το λογαριθμικό μετασχηματισμό (log transformation), η τιμή κάθε ανεξάρτητης μεταβλητής λογαριθμείται και από το αποτέλεσμα που προκύπτει για κάθε ανεξάρτητη μεταβλητή αφαιρείται ο μέσος όρος της λογαριθμικής ανεξάρτητης μεταβλητής ($x'_{ij} = \log(x_{ij})$ και $x''_{ij} = x'_{ij} - \bar{x}'_i$) ώστε να μειωθεί η ετεροσκεδαστικότητα, δηλαδή η μεταβλητότητα μεταξύ των δεδομένων (Van den Berg, Hoefsloot, Westerhuis, Smilde, & van der Werf, 2006).

Με τη μετατροπή κυβικής ρίζας (cube root transformation), η τιμή κάθε ανεξάρτητης μεταβλητής μετατρέπεται στην κυβική της ρίζα ($x'_{ij} = \sqrt[3]{x_{ij}}$). Πρόκειται

για έναν ισχυρό μετασχηματισμό, ασθενέστερο ωστόσο από το λογαριθμικό, με ουσιαστική επίδραση στο σχήμα της κατανομής. Χρησιμοποιείται, επίσης, για τη μείωση της κλίσης (skewness) και έχει το πλεονέκτημα ότι μπορεί να εφαρμοστεί σε μηδενικές και αρνητικές τιμές (Cox, 2007).

Όταν επιβεβαιωνόταν το τεστ κανονικότητας, το Levene's test χρησιμοποιούταν για την αξιολόγηση της ισότητας των διακυμάνσεων. Το Levene's test πραγματοποιεί έλεγχο της μηδενικής υπόθεσης, αν οι διακυμάνσεις μεταξύ των ομάδων δοκιμής είναι ίσες (ομοιογένεια διακυμάνσεων ή ομοσκεδαστικότητα). Σχετικά με την ομοσκεδαστικότητα, εάν $p\text{-value} \leq 0,05$, οι διαφορές στις διακυμάνσεις των δειγμάτων ήταν απίθανο να έχουν προκύψει από τυχαία δειγματοληψία. Επομένως, οι διακυμάνσεις των ομάδων δοκιμής διέφεραν στατιστικά σημαντικά.

Πριν τη δημιουργία του μοντέλου, ο έλεγχος της ισότητας του μέσου όρου των ομάδων χρησιμοποιώντας το SPSS μέτρησε τη δυνατότητα κάθε ανεξάρτητης μεταβλητής να διακρίνει τα δεδομένα μεταξύ δύο ετών συγκομιδής. Για τις ανεξάρτητες μεταβλητές, πραγματοποιήθηκε t-test χρησιμοποιώντας το έτος συγκομιδής ως μεταβλητή ομαδοποίησης. Εάν $p\text{-value} > 0,05$, η μεταβλητή απορριπτόταν, επειδή δε συνέβαλε στο μοντέλο. Η τιμή Wilks' lambda ήταν ένα άλλο μέτρο της δυνατότητας μιας μεταβλητής να κάνει διακρίσεις χρησιμοποιώντας το έτος συγκομιδής ως μεταβλητή ομαδοποίησης. Μικρότερες τιμές Wilks' lambda έδειχναν ότι η μεταβλητή συνέβαλε περισσότερο στη διάκριση μεταξύ ομάδων και είχε ως αποτέλεσμα ένα ισχυρό μοντέλο διάκρισης με όλες τις σημαντικές μεταβλητές σε αυτό.

Για τη μοντελοποίηση των χημειομετρικών δεδομένων εφαρμόστηκε διακριτική ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA) η οποία χρησιμοποίησε τεχνικές παλινδρόμησης πολλών μεταβλητών για να εξαγάγει μέσω γραμμικού συνδυασμού των αρχικών ανεξάρτητων μεταβλητών τις πληροφορίες που θα μπορούσαν να προβλέψουν την εξαρτημένη μεταβλητή. Κάθε μοντέλο παλινδρόμησης PLS δημιουργήθηκε από διαφορετικό αριθμό κύριων συνιστωσών (principal components, PC). Κάθε PC καθόριζε τη σχέση μεταξύ της εξαρτημένης μεταβλητής και των ανεξάρτητων μεταβλητών. Ο αριθμός των PC που εξηγούσε μεγαλύτερο ποσοστό μεταβλητότητας επιλέχθηκε για τη δημιουργία του μοντέλου.

Σχετικά με τη διακριτική συνάρτηση, ο πίνακας ιδιοτιμών (Eigenvalues) του SPSS παρείχε πληροφορίες σχετικά με τη σχετική αποτελεσματικότητά της. Η τιμή κανονικής συσχέτισης (canonical correlation value) και η τιμή Wilks' lambda ήταν

μέτρα του πόσο καλά η διακριτική συνάρτηση διαχώριζε τα δεδομένα σε ομάδες. Υψηλές τιμές κανονικής συσχέτισης και μικρές τιμές Wilks' lambda υποδήλωναν μεγάλη διακριτική ικανότητα της συνάρτησης. Το chi-square έλεγξε την υπόθεση ότι η συνάρτηση ήταν ίση μεταξύ των ομάδων. Χαμηλή συσχέτιση μεταξύ των δύο ετών συγκομιδής είχε ως αποτέλεσμα υψηλές τιμές chi-square. Τιμή p-value \leq 0,05 έδειξε ότι η διακριτική συνάρτηση μπορούσε να διαχωρίσει επιτυχώς τα δεδομένα σε δύο ομάδες.

Για την επικύρωση των προγνωστικών μοντέλων PLS, πραγματοποιήθηκε διασταυρούμενη επικύρωση (cross-validation) και δοκιμή μετάθεσης ή δοκιμή τυχαιοποίησης (permutation tests). Και οι δύο τύποι στατιστικών δοκιμών αξιολόγησαν τη σημασία της διάκρισης.

Ως τρόπος διασταυρούμενης επικύρωσης επιλέχθηκε ο leave-one-out (LOO cross validation) επειδή ενδείκνυται σε περιπτώσεις με αριθμό δειγμάτων <100. Γινόταν ένας επαναυπολογισμός του μοντέλου, που δημιουργούταν αφαιρώντας ένα τη φορά δείγμα από το σύνολο των δειγμάτων εκπαίδευσης του μοντέλου (training set), και υπολογιζόταν ο δείκτης Q^2 ως μέτρο ορθής επικύρωσης του μοντέλου εκφράζοντας την αθροιστική συνεισφορά των επιλεγμένων PC στην προβλεπτική ικανότητα (predictive quality) του μοντέλου. Δηλαδή, η διασταυρούμενη επικύρωση δοκίμασε την ικανότητα του μοντέλου να προβλέπει ένα νέο ανεξάρτητο σύνολο δεδομένων προκειμένου να επισημάνει προβλήματα όπως υπερπροσαρμογή (overfitting) ή μεροληψία επιλογής (selection bias). Η ποιότητα, σταθερότητα, αξιοπιστία και η προβλεπτική ικανότητα του μοντέλου επιβεβαιώθηκαν με τιμή $Q^2 > 0,5$. Σημαντικός δείκτης ήταν και ο R^2 που αποτελούσε μέτρο της επεξηγηματικής ισχύος του μοντέλου. Τιμές $R^2 > 0,9$ αποδείκνυαν ότι ο επιλεγμένος αριθμός PC ήταν ικανοποιητικός για την επεξηγηματική ισχύ και καλή προσαρμογή του μοντέλου.

Δεδομένου ότι η PLS-DA τείνει σε υπερπροσαρμογή, το μοντέλο πρέπει να επικυρωθεί για να κατανοηθεί εάν ο διαχωρισμός είναι στατιστικά σημαντικός ή οφείλεται σε τυχαίο θόρυβο. Αυτό γίνεται χρησιμοποιώντας τη δοκιμή μετάθεσης ή δοκιμή τυχαιοποίησης (permutation test) (Pesarin & Salmaso, 2010). Ένα permutation test δημιουργεί την κατανομή δειγματοληψίας (κατανομή μετάθεσης) μέσω νέας δειγματοληψίας των παρατηρούμενων δεδομένων. Συγκεκριμένα, μετατίθενται τα παρατηρούμενα δεδομένα (π.χ. εκχωρώντας διαφορετικές τιμές αποτελεσμάτων σε κάθε παρατήρηση μεταξύ του συνόλου των πραγματικά παρατηρούμενων αποτελεσμάτων) (Leeper). Σε κάθε μετάθεση χρησιμοποιείται ο βέλτιστος αριθμός PC που καθορίστηκαν προηγουμένως με βάση τα πρωτότυπα παρατηρούμενα

αποτελέσματα. Στα permutation tests του MetaboAnalyst ο κόκκινος επισημασμένος δείκτης αντιπροσωπεύει το αρχικό δείγμα. Εάν υπήρχε σημαντική διαφοροποίηση ($p\text{-value} < 0,05$) όσο πιο δεξιά από την κατανομή ήταν ο κόκκινος δείκτης, τόσο πιο σημαντικός από στατιστική άποψη ήταν ο διαχωρισμός μεταξύ των δύο ομάδων (Barberini et al., 2016).

Σκοπός

Οι απαιτήσεις των καταναλωτών εστιάζουν όλο και περισσότερο στην ποιότητα των τροφίμων και συνεπώς την ανάγκη κατάλληλων και γρήγορων αναλυτικών τεχνικών για την αξιολόγησή της. Η ποιότητα και κατά συνέπεια τα χημικά χαρακτηριστικά ενός τρόφιμου δεν είναι σταθερά κάθε έτος συγκομιδής, αλλά μπορεί να επηρεαστούν από τις κλιματικές συνθήκες. Τα κελυφωτά φιστίκια (*Pistacia vera*), είναι προϊόντα υψηλής ποιότητας και θρεπτικής αξίας και το φιστικέλαιο είναι πλούσια πηγή ακόρεστων λιπαρών οξέων. Ωστόσο δεν υπάρχουν δημοσιευμένες εργασίες στη διεθνή βιβλιογραφία που να αφορούν τη διαφοροποίηση των κελυφωτών φιστικιών (*Pistacia vera*), ποικιλία Αιγίνης, ανάλογα με το έτος συγκομιδής, συνεπώς και ανάλογα με την ποιότητά τους, καθώς επίσης για το ποιοτικό προφίλ του φιστικελαίου που εξάγεται και τη διαφοροποίησή του ανάλογα με το έτος συγκομιδής των φιστικιών από τα οποία προέρχεται.

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής μελέτης ήταν η ανάπτυξη χημειομετρικών μοντέλων διαφοροποίησης των κελυφωτών φιστικιών (*Pistacia vera*), ποικιλία Αιγίνης, και των φιστικελαίων τους βάσει του έτους συγκομιδής τους (2017, 2018) και επομένως ανάλογα με την ποιότητά τους, η εκτίμηση της ποιότητας του εκχυλισθέντος φιστικελαίου και επιπλέον, η μυκητολογική ποιότητα και σταθερότητα του νωπού κελυφωτού φιστικιού.

Για την επίτευξη του σκοπού:

- Πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπική μελέτη με χρήση της υπέρυθρης φασματοσκοπίας μετασχηματισμού Fourier (FTIR) τόσο της ψίχας όσο και του εκχυλισθέντος ελαίου και με φασματοσκοπία Raman του φιστικελαίου.
- Πραγματοποιήθηκαν φυσικοχημικές αναλύσεις των εκχυλισθέντων ελαίων. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η απόδοση σε έλαιο των δειγμάτων, η αντιοξειδωτική τους ικανότητα, προσδιορίστηκαν ποσοτικά τα ολικά φαινολικά συστατικά, οι δείκτες k και Δk, η ελεύθερη οξύτητα, η περιεκτικότητα σε τοκοφερόλες. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των μεθυλεστέρων και του πτητικού κλάσματος. Διερευνήθηκε η μυκητολογική ποιότητα και σταθερότητα του νωπού κελυφωτού φιστικιού σε συσκευασία κενού και αέρα για χρονικό διάστημα τριών μηνών και σε θερμοκρασία 4°C.

Μέρος Β: Πειραματικό μέρος

Οι φυσικοχημικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν άμεσα - σε διάστημα ενός μήνα από την παραλαβή των δειγμάτων. Οι χημικοί τύποι όλων των ενώσεων που αναφέρονται στην παρούσα διατριβή βρίσκονται προς το τέλος της διατριβής, στον Πίνακα χημικών ενώσεων.

B.1. Δειγματοληψία-Επεξεργασία δειγμάτων-Κωδικοποίηση-Προσδιορισμός υγρασίας-Κλιματικές συνθήκες

Στο παρόν κεφάλαιο παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά των δειγμάτων των κελυφωτών φιστικιών ποικιλίας Αιγίνης καθώς και οι διαδικασίες που ακολούθησαν την παραλαβή τους, ώστε αυτά να είναι διαχειρίσιμα προς ανάλυση. Παράλληλα παρατίθενται οι κλιματικές συνθήκες των ετών συγκομιδής των δειγμάτων, τους καθοριστικούς για την ανάπτυξη του καρπού μήνες.

B.1.1. Δειγματοληψία-Επεξεργασία δειγμάτων-Κωδικοποίηση

Συλλέχθηκαν 45 δείγματα αποξηραμένων (είτε στον ήλιο είτε μηχανικά) κελυφωτών φιστικιών ποικιλίας «Αιγίνης» από δύο διαδοχικά έτη συγκομιδής (15 δείγματα από το έτος 2017 και 30 δείγματα από το έτος 2018) και από διάφορες περιοχές της Ελλάδας (Αίγινα, Μέγαρα, Φθιώτιδα, Τροιζήνα, Εύβοια, Βόλος, Θήβα, Αυλώνας) (Πίνακας B.1.1.1). Από το σύνολο των δειγμάτων, η προέλευση (φιστικοπαραγωγός, συντεταγμένες χωραφιού, καλλιεργητικές συνθήκες) 11 δειγμάτων του 2017 (A-1 έως A-11) ταυτίζεται με την προέλευση 11 δειγμάτων του 2018 (B-1 έως B-11). Για αυτά τα δείγματα μπορούν να εξαχθούν τυπικά αποτελέσματα κατά τη σύγκριση των δύο ετών συγκομιδής, ενώ για το σύνολο των δειγμάτων (15 δείγματα του 2017 συγκρινόμενα με 30 δείγματα του 2018) μπορούν να εξαχθούν προσεγγιστικά αποτελέσματα (Prolla et al., 2010). Η ομοιογένεια της συνδιακύμανσης, που διερευνάται μέσω του Box's Test of Equality of Covariance Matrices του SPSS, εξασφαλίστηκε από το γεγονός ότι ο λόγος των δύο ομάδων (2017, n=11 και 2018, n=11) ήταν ίσος ή μικρότερος από 1,5 (Stevens, 1996).

Σε όλα τα δείγματα αφαιρέθηκε το κέλυφος και παραλήφθηκε η ψίχα (πυρήνας). Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε μπλέντερ με μεταλλικές λεπίδες κοπής και δοχείο από ανοξείδωτο ατσάλι (Izzy) για την κονιορτοποίησή τους. Ακολούθησε

κοκκομέτρηση των δειγμάτων κατά την οποία τοποθετήθηκε κόσκινο μεγέθους 500 μm κάτω από κόσκινο μεγέθους 800 μm , περάστηκε η κονιορτοποιημένη ψίχα από το κόσκινο των 800 μm και λήφθηκε η σκόνη φιστικιού που έμεινε στο ενδιάμεσο των δύο κόσκινων με μέγεθος κόκκων 500-800 μm (Σχήμα B.1.1.1).

Το στάδιο αυτό ήταν ιδιαίτερα σημαντικό, διότι εξασφάλισε αυξημένη επιφάνεια δείγματος και άριστη ομογενοποίηση ώστε να επιτευχθεί μέγιστη απόδοση κατά τη διαδικασία των εκχυλίσεων και η αναλυτική ποσότητα δοκιμής να έχει την ίδια συγκέντρωση με το αρχικό δείγμα. Επιπρόσθετα, το μέγεθος των κόκκων έπρεπε να είναι μικρό για τη φασματοσκοπική ανάλυση FTIR που ακολούθησε. Αντίθετα, θα παρατηρούνταν σκέδαση της ακτινοβολίας με αποτέλεσμα την αύξηση του θορύβου και μείωση του ποσού της ακτινοβολίας που θα διεισδούσε μέσα στο δείγμα και κατ' επέκταση μείωση της έντασης των απορροφήσεων. Δεν επιλέχθηκε μέγεθος κόκκων <500 μm καθαρά για τεχνικούς λόγους. Λόγω μεγάλης ελαιοπεριεκτικότητας του καρπού του φιστικιού, τα μικρότερης διαμέτρου κόσκινα έφραζαν. Μετά την προκατεργασία τους, τα κοκκομετρημένα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε ερμητικά σφραγισμένους περιέκτες τροφίμων στην κατάψυξη (-20°C), προστατευμένα από το φως, για την αποφυγή της υποβάθμισης του τροφίμου.

Η διαφοροποίηση των δειγμάτων μεταξύ τους βασίστηκε στο έτος συγκομιδής (2017, 2018) και η σύγκριση επιτυγχάνεται αφενός μεταξύ των 15 δειγμάτων του 2017 και των 30 δειγμάτων του 2018 και αφετέρου μεταξύ των 11 δειγμάτων του 2017 και των 11 δειγμάτων του 2018, τα οποία προέρχονται από το ίδιο χωράφι στο οποίο ανεξαρτήτως έτους συγκομιδής εφαρμόστηκαν οι ίδιες καλλιεργητικές φροντίδες από τους ίδιους φιστικοπαραγωγούς.

Πίνακας Β.1.1.1. Κωδικοποίηση δειγμάτων κελυφωτών φιστικιών.

Κωδικοποίηση	Προέλευση	Τρόπος ξήρανσης
A ¹ -1	Φάρος Αίγινας	Μηχανική
A-2	Βωβού Αίγινας	Μηχανική
A-3	Λεύκη Αίγινας	Μηχανική
A-4	Λεύκη Αίγινας	Φυσική
A-5	Βαρέα Μεγάρων	Μηχανική
A-6	Λάκκα Μεγάρων	Φυσική
A-7	Λιακοτά Μεγάρων	Μηχανική
A-8	Μενδενίτσα Φθιώτιδας	Μηχανική
A-9	Μόδι Φθιώτιδας	Μηχανική
A-10	Μώλος Φθιώτιδας	Μηχανική
A-11	Τροιζήνα	Φυσική
A-12	Φάρος Αίγινας	Φυσική
A-13	Βωβού Αίγινας	Φυσική
A-14	Αίγινα Αίγινας	Φυσική
A-15	Ρέμα Μεγάρων	Μηχανική
B ² -1	Φάρος Αίγινας	Μηχανική
B-2	Βωβού Αίγινας	Μηχανική
B-3	Λεύκη Αίγινας	Μηχανική
B-4	Λεύκη Αίγινας	Φυσική
B-5	Βαρέα Μεγάρων	Μηχανική
B-6	Λάκκα Μεγάρων	Φυσική
B-7	Λιακοτά Μεγάρων	Μηχανική
B-8	Μενδενίτσα Φθιώτιδας	Μηχανική
B-9	Μόδι Φθιώτιδας	Μηχανική
B-10	Μώλος Φθιώτιδας	Μηχανική
B-11	Τροιζήνα	Φυσική
B-12	Περιβόλα Αίγινας	Μηχανική
B-13	Κυψέλη Αίγινας	Μηχανική
B-14	Κυψέλη Αίγινας	Φυσική
B-15	Σουβάλα Αίγινας	Φυσική

B-16	Λιβάδι Αίγινας	Φυσική
B-17	Καβουρόπετρα Αίγινας	Φυσική
B-18	Ασώματοι Αίγινας	Φυσική
B-19	Κουλινάρι Αίγινας	Φυσική
B-20	Καστανιώτισσα Ιστιαίας	Μηχανική
B-21	Καστανιώτισσα Ιστιαίας	Μηχανική
B-22	Βαθύ Αυλίδας	Μηχανική
B-23	Λάκκα Μεγάρων	Μηχανική
B-24	Μέγαρα	Μηχανική
B-25	Μάκρη Φθιώτιδας	Μηχανική
B-26	Μάκρη Φθιώτιδας	Μηχανική
B-27	Λαδικού Φθιώτιδας	Μηχανική
B-28	Στεφανοβίκειο Βόλου	Φυσική
B-29	Θήβα	Μηχανική
B-30	Αυλώνας Ωρωπού	Μηχανική

¹A: έτος συγκομιδής 2017, ²B: έτος συγκομιδής 2018.



Σχήμα Β.1.1.1. Κοκκομέτρηση δείγματος που προηγουμένως έχει αλεσθεί.

B.1.2. Προσδιορισμός της υγρασίας

Σύμφωνα με την επίσημη μέθοδο AOAC 925.40, περίπου 2 g από κάθε κοκκομετρημένο δείγμα φιστικιού τοποθετήθηκαν σε κεραμικό πιάτο, στο φούρνο (102°C) για ξήρανση μέχρι σταθερού βάρους. Η διαφορά βάρους πριν και μετά την ξήρανση χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της περιεκτικότητας σε υγρασία των πυρήνων. Το επίπεδο υγρασίας μετρήθηκε σε κάθε δείγμα και βρέθηκε ότι κυμαινόταν μεταξύ 5-7% w/w. Η ξήρανση των ξηρών καρπών από τους φιστικοπαραγωγούς σε επίπεδα υγρασίας κάτω του 11% w/w είναι σημαντική τόσο για την ασφάλεια όσο και για τη γεύση. Ως ασφαλές επίπεδο υγρασίας ορίζεται το επίπεδο που δεν υποστηρίζει την ανάπτυξη μυκήτων και για τα κελυφωτά φιστικά κυμαίνεται μεταξύ 2,2 με 8,2% w/w σε θερμοκρασία 21°C (Kader, Heintz, Labavitch, & Rae, 1982).

B.1.3. Κλιματικές συνθήκες

Στους Πίνακες B.1.3.1 και B.1.3.2 αναγράφονται οι κλιματικές συνθήκες των δύο ετών συγκομιδής για τους καιρίους για την ανάπτυξη του βρώσιμου σπόρου μήνες. Οι μετεωρολογικοί σταθμοί, υπεύθυνοι για τα κλιματικά δελτία, για κάθε περιοχή καλλιέργειας επιλέχθηκαν με βάση την πλησιέστερη απόσταση μεταξύ του υπάρχοντος μετεωρολογικού σταθμού και της περιοχής καλλιέργειας. Για την Αίγινα και την Τροιζήνα το κλιματικό δελτίο εξήχθη από το μετεωρολογικό σταθμό στο Ελληνικό, για τα Μέγαρα, τη Φθιώτιδα, τη Θήβα και τον Αυλώνα από το μετεωρολογικό σταθμό της Ελευσίνας, για την Εύβοια από το μετεωρολογικό σταθμό της Σκύρου, ενώ για το Βόλο από το μετεωρολογικό σταθμό της Αγχιάλου. Τα μετεωρολογικά δεδομένα από τα δύο έτη συγκομιδής για τους μήνες Ιούνιο, Ιούλιο και Αύγουστο, έδειξαν ότι το 2018 σε σχέση με το 2017 η μέση θερμοκρασία ελαφρά μειώθηκε και ο μέσος ρυθμός βροχής αυξήθηκε.

Πίνακας B.1.3.1. Μέση μηνιαία θερμοκρασία για δύο διαδοχικά έτη συγκομιδής σύμφωνα με τους πλησιέστερους στις καλλιεργητικές περιοχές μετεωρολογικούς σταθμούς (Μιχελαράκη, 2017, 2018).

	2017				2018			
	Ιούνιος	Ιούλιος	Αύγουστος	Μέσος όρος	Ιούνιος	Ιούλιος	Αύγουστος	Μέσος όρος
Ελληνικό	26,1	29,5	29,8	28,5	26,7	28,7	29,0	28,1
Ελευσίνα	27,0	29,5	30,3	28,9	26,8	28,7	29,1	28,2
Σκύρος	25,0	26,5	26,0	25,8	24,6	27,2	26,4	26,1
Αγχιάλος	25,8	27,6	28,3	27,2	25,8	27,8	26,7	26,8

Πίνακας Β.1.3.2. Μέσο μηνιαίο ύψος υετού για δύο διαδοχικά έτη συγκομιδής σύμφωνα με τους πλησιέστερους στις καλλιεργητικές περιοχές μετεωρολογικούς σταθμούς (Μιγελαράκη, 2017, 2018).

	2017				2018			
	Ιούνιος	Ιούλιος	Αύγουστος	Μέσος όρος	Ιούνιος	Ιούλιος	Αύγουστος	Μέσος όρος
Ελληνικό	45	4	0	16	32	55	5	31
Ελευσίνα	39	4	0	14	63	55	9	42
Σκόρος	7	41	5	18	63	7	9	26
Αγχίαλος	22	56	16	31	139	42	18	66

B.2. Φασματοσκοπική μελέτη της ψίχας με χρήση της φασματοσκοπίας FTIR - Ανάπτυξη χημειομετρικού μοντέλου διαφοροποίησης των δειγμάτων ανάλογα με το έτος συγκομιδής

Στο παρόν κεφάλαιο περιγράφεται η φασματοσκοπική μελέτη της ψίχας των κελυφωτών φιστικιών ποικιλίας Αιγίνης. Τα φάσματα λήφθηκαν με δύο τεχνικές της φασματοσκοπίας FTIR (τεχνική δισκίου KBr-δείγματος και τεχνική DRIFTS). Η επεξεργασία των φασμάτων έγινε και για τις δύο τεχνικές με ίδιο τρόπο και ακολούθησε απόδοση των κορυφών των φασμάτων. Στη συνέχεια, αναλύονται τα αποτελέσματα από το συνδυασμό των φασματοσκοπικών δεδομένων και της χημειομετρίας με σκοπό την ανάπτυξη χημειομετρικού μοντέλου για τη διαφοροποίηση των δειγμάτων ανάλογα με το έτος συγκομιδής τους. Η σύγκριση των δειγμάτων μεταξύ τους επιτυγχάνεται αφενός μεταξύ των 15 δειγμάτων του 2017 και των 30 δειγμάτων του 2018 και αφετέρου μεταξύ των 11 δειγμάτων του 2017 και των 11 δειγμάτων του 2018, που είναι άμεσα συγκρίσιμα.

B.2.1. Πειραματική διαδικασία

Η καταγραφή των FTIR φασμάτων πραγματοποιήθηκε με δύο τεχνικές. Το KBr που χρησιμοποιήθηκε θερμάνθηκε σε θερμοκρασία περίπου 500°C μέχρι σταθερού βάρους με σκοπό την απομάκρυνση της υγρασίας.

B.2.1.1. Τεχνική δισκίου KBr-δείγματος

Η δημιουργία ενός δισκίου KBr-δείγματος περιλάμβανε ανάμειξη και ομογενοποίηση 200 mg KBr απαλλαγμένου από υγρασία και 5 mg κοκκομετρημένης ψίχας κελυφωτού φιστικιού. Το μείγμα KBr-δείγματος τοποθετούνταν σε καλούπι διαμέτρου 13 mm και με υδραυλική πρέσα υπό πίεση 180 bar για 5 min σχηματιζόταν ένα διαυγές δισκίο. Χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο Thermo Nicolet 6700 FTIR (Thermo Electron Corporation, Madison, WI, USA), εξοπλισμένο με ανιχνευτή δευτεριωμένης θειϊκής τριγλυκίνης (deuterated triglycine sulfate, DTGS). Η καταγραφή των φασμάτων πραγματοποιήθηκε με χρήση ειδικού υποδοχέα για δισκία, διαχωριστική ικανότητα 4 cm^{-1} , 100 σαρώσεις και ταχύτητα του κινούμενου καθρέφτη του συμβολομέτρου 0,3165 mm/s. Για κάθε δείγμα παρασκευάστηκαν τρία δισκία και καταγράφηκε το φάσμα κάθε δισκίου. Κάθε φάσμα της τριπλέτας προερχόταν από

διαφορετικό μέρος του ίδιου δείγματος (υπο-δείγμα). Πριν από κάθε δείγμα η καταγραφή του φάσματος υποβάθρου γινόταν με δισκίο KBr βαθμού καθαρότητας FTIR (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) το οποίο δεν απορροφά στο επιλεγμένο εύρος κυματαριθμών.

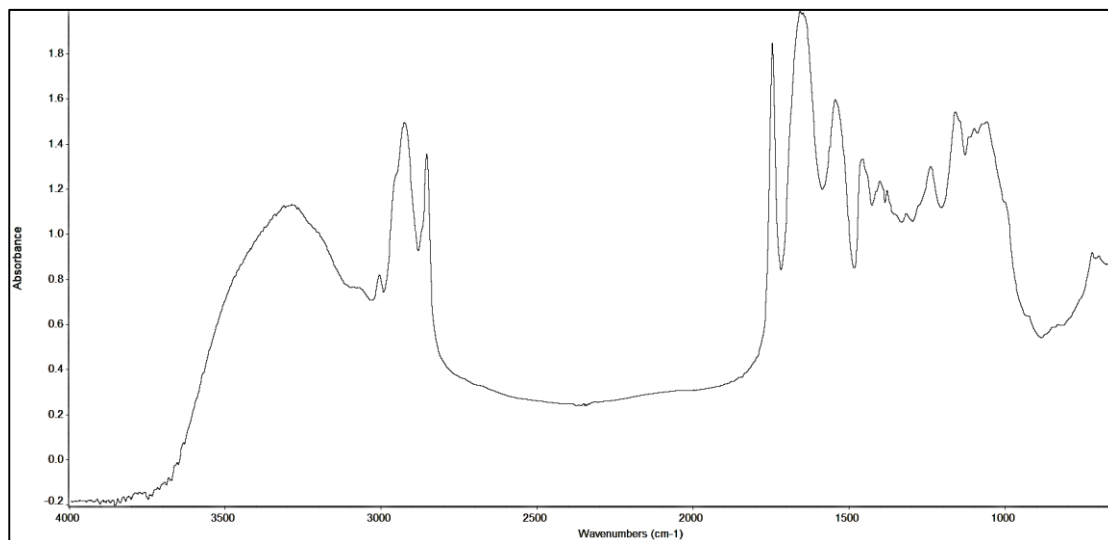
B.2.1.2. Τεχνική DRIFTs

Για τη λήψη του φάσματος με την τεχνική DRIFTs επιλέχθηκε μια τυχαία ποσότητα κοκκομετρημένης ψίχας φιστικιού. Για κάθε δείγμα κελυφωτού φιστικιού λήφθηκαν τρία φάσματα. Κάθε φάσμα της τριπλέτας προερχόταν από διαφορετικό υπο-δείγμα. Χρησιμοποιήθηκε το προαναφερόμενο φασματοφωτόμετρο με τις ίδιες παραμέτρους (διαχωριστική ικανότητα, αριθμό σαρώσεων και ταχύτητα καθρέφτη) αλλά χρησιμοποιώντας ως υποδοχέα ένα μικροκύπελλο DRIFTs Spectra Tech (Spectra-Tech Inc., Stamford, CT, USA) (διάμετρο 3 mm, ύψος 2 mm). Φάσμα υποβάθρου λαμβανόταν πριν από την καταγραφή φάσματος κάθε δείγματος χρησιμοποιώντας KBr βαθμού καθαρότητας FTIR (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) ως μη απορροφητική σκόνη μήτρας. Μετά από κάθε λήψη του φάσματος το μικροκύπελλο καθαριζόταν με ακετόνη και ξηραινόταν.

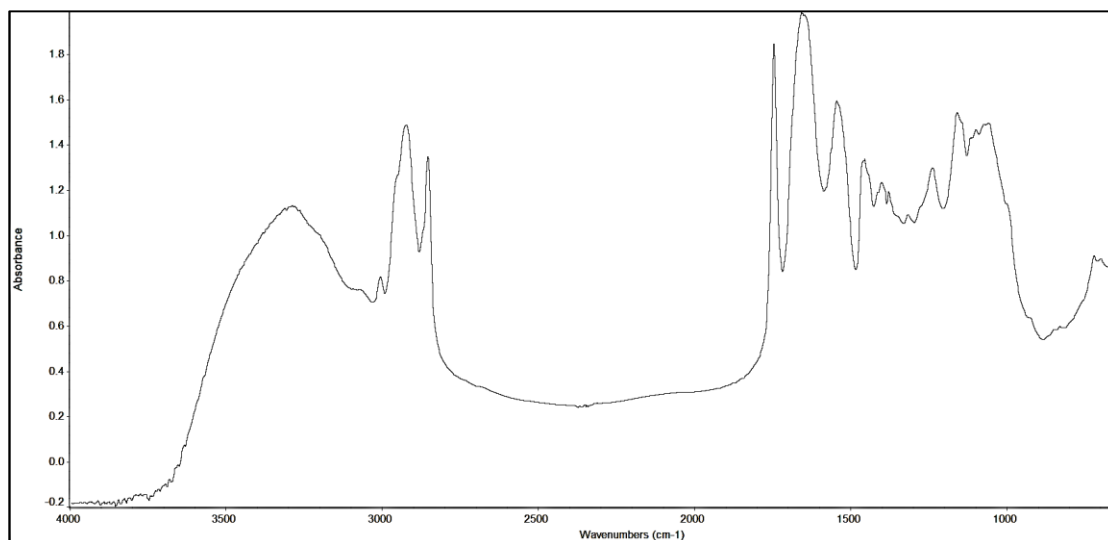
B.2.1.3. Επεξεργασία φασμάτων FTIR

Για την επεξεργασία των φασμάτων χρησιμοποιήθηκε ειδικό λογισμικό OMNIC 8.2.0.387 (Thermo Fisher Scientific Inc., Madison, WI, USA). Τα φάσματα, τόσο των δισκίων όσο και της τεχνικής DRIFTs, εξομαλύνθηκαν (automatic smooth) χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο Savitsky-Golay (πέντε κινούμενων σημείων με χρήση πολυώνυμου δεύτερου βαθμού) και η γραμμή βάσης διορθώθηκε χρησιμοποιώντας τη συνάρτηση αυτόματης διόρθωσης βασικής γραμμής (automatic baseline correct) (πολυώνυμο δεύτερου βαθμού, 20 επαναλήψεις). Στη συνέχεια, από τις τρεις επαναλήψεις για κάθε δείγμα υπολογίστηκε το μέσο φάσμα του και μετασχηματίστηκε με τον αλγόριθμο Kubelka-Munk. Η μετατροπή Kubelka-Munk αντιστάθμισε μερικά από τα ακόλουθα ανεπιθύμητα χαρακτηριστικά του ακατέργαστου φάσματος: οι ζώνες χαμηλής έντασης ήταν αυξημένες σε σχέση με τις έντονες ζώνες απορρόφησης και οι ζώνες ισχυρής έντασης εμφάνιζαν ευρεία και στρογγυλά σχήματα κορυφής. Τέλος, η κλίμακα απορρόφησης φασμάτων κανονικοποιήθηκε. Κάθε στάδιο της επεξεργασίας των φασμάτων FTIR παρουσιάζεται για ένα ενδεικτικό δείγμα στα Σχήματα B.2.1.3.1

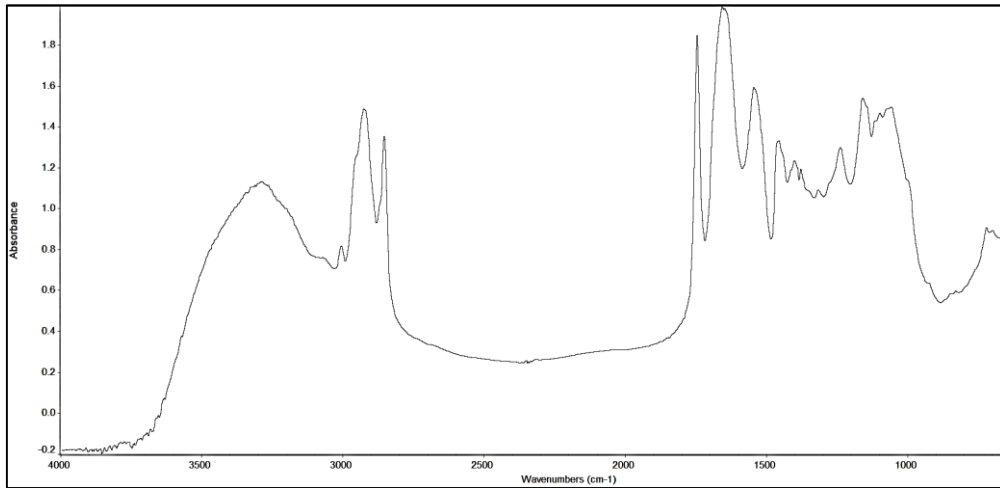
- B.2.1.3.12. Το τελικό φάσμα του Σχήματος B.2.1.3.12, που προέρχεται από δείγμα με χρήση της τεχνικής δισκίου, αποθηκεύτηκε ως αρχείο .csv για τη δημιουργία συνόλου δεδομένων από όλα τα δείγματα για τη μετέπειτα χρήση της διακριτικής ανάλυσης.



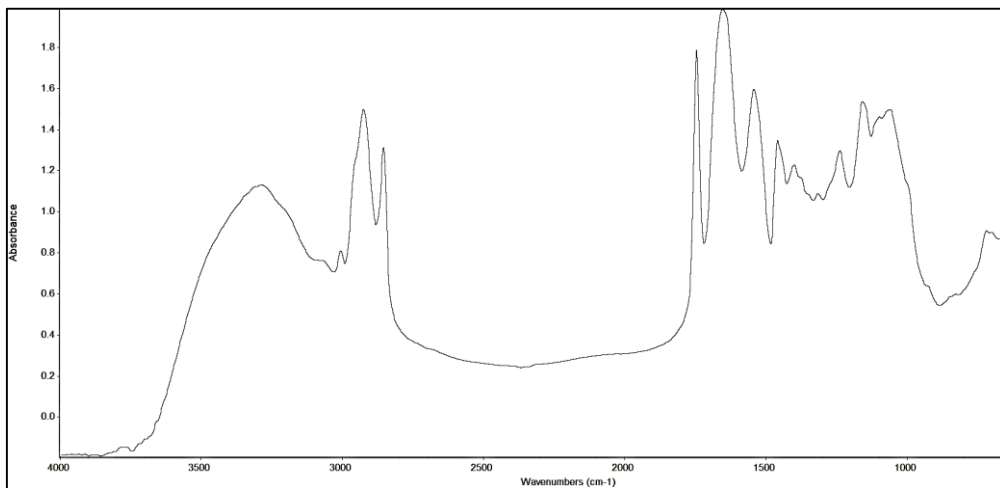
Σχήμα B.2.1.3.1. Ενδεικτικό ανεπεξέργαστο φάσμα (1^η επανάληψη).



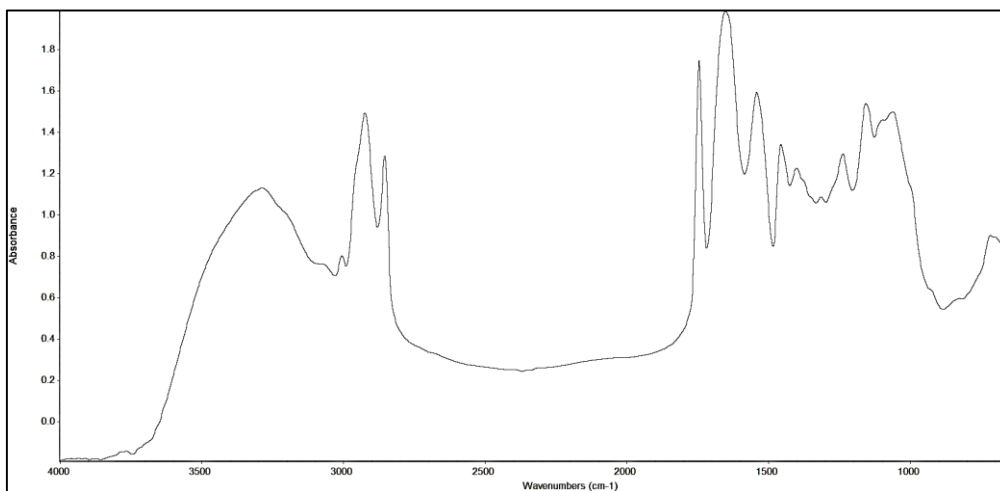
Σχήμα B.2.1.3.2. Ενδεικτικό ανεπεξέργαστο φάσμα (2^η επανάληψη).



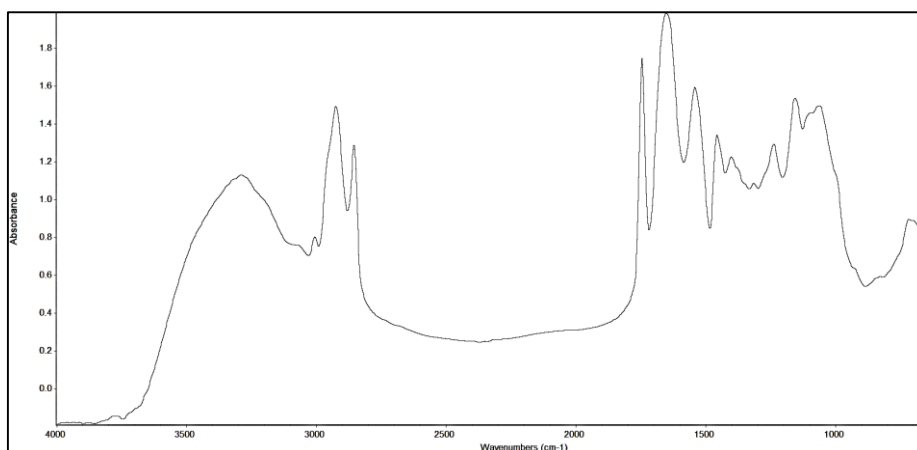
Σχήμα Β.2.1.3.3. Ενδεικτικό ανεπεξέργαστο φάσμα (3^η επανάληψη).



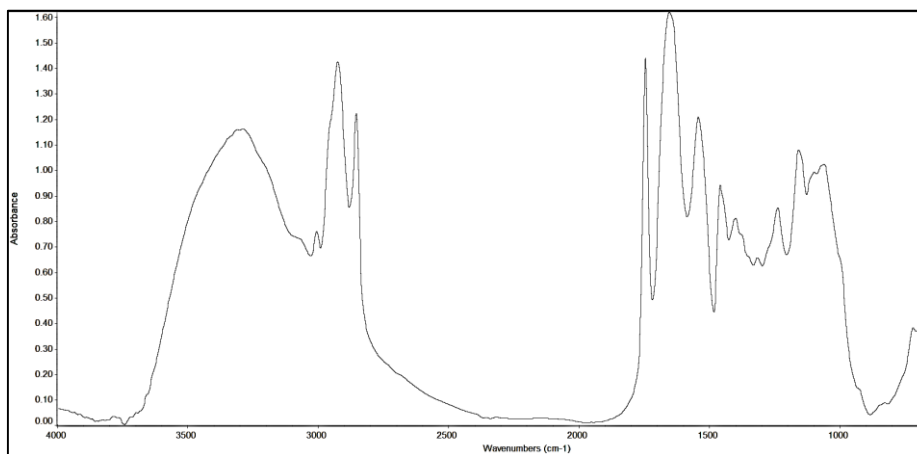
Σχήμα Β.2.1.3.4. Εξομάλυνση (automatic smooth) της 1^{ης} επανάληψης.



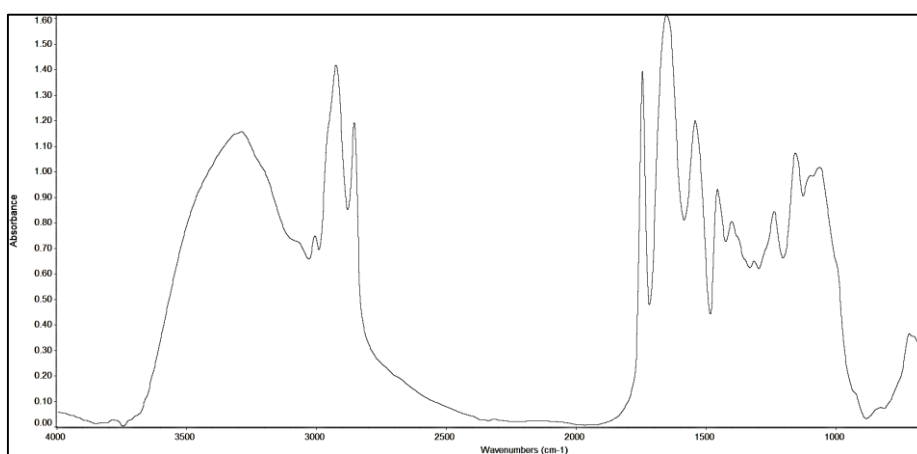
Σχήμα Β.2.1.3.5. Εξομάλυνση (automatic smooth) της 2^{ης} επανάληψης.



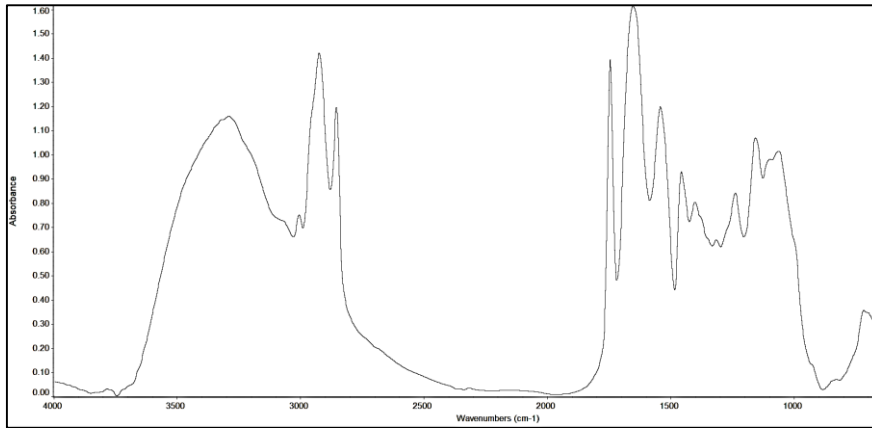
Σχήμα Β.2.1.3.6. Εξομάλυνση (automatic smooth) της 3^{ης} επανάληψης.



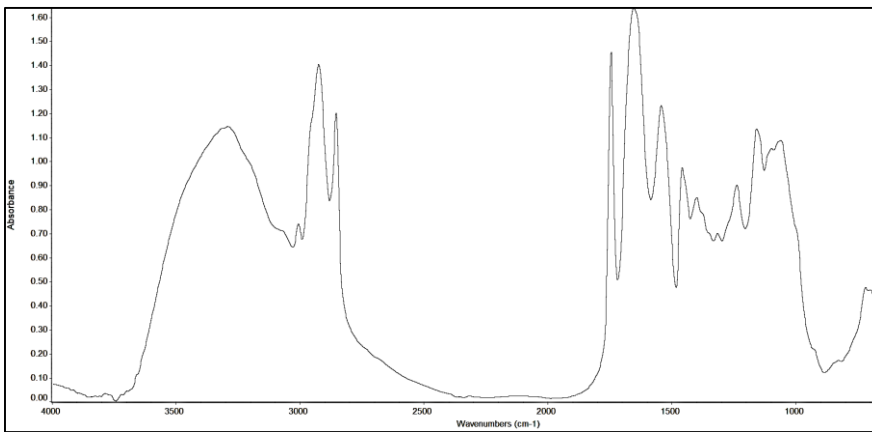
Σχήμα Β.2.1.3.7. Διόρθωση της βασικής γραμμής (automatic baseline correct) της 1^{ης} επανάληψης.



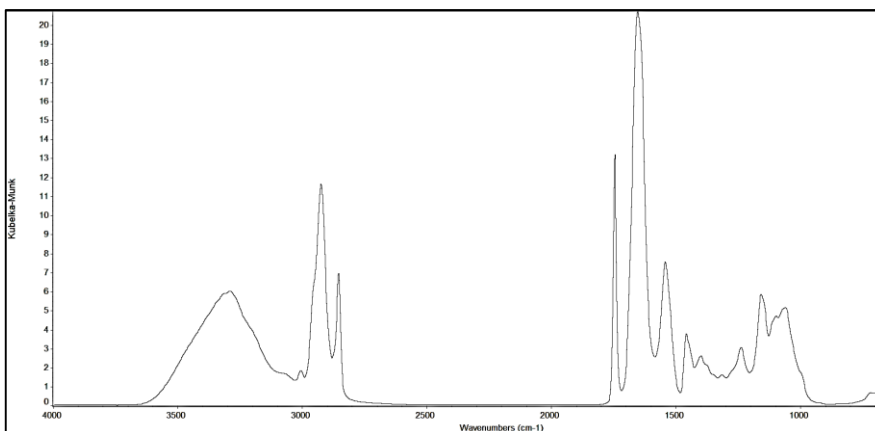
Σχήμα Β.2.1.3.8. Διόρθωση της βασικής γραμμής (automatic baseline correct) της 2^{ης} επανάληψης.



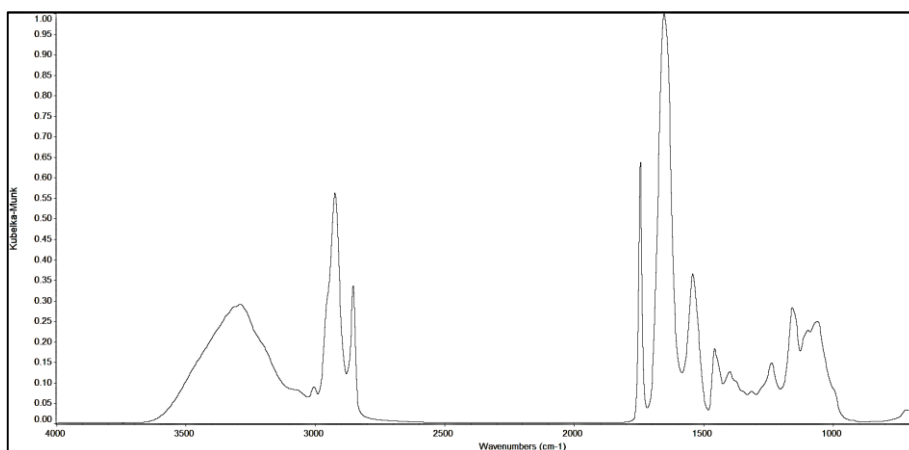
Σχήμα Β.2.1.3.9. Διόρθωση της βασικής γραμμής (automatic baseline correct) της 3^{ης} επανάληψης.



Σχήμα Β.2.1.3.10. Μέσο φάσμα των τριών επαναλήψεων από τα φάσματα μετά τη διόρθωση της βασικής γραμμής.



Σχήμα Β.2.1.3.11. Μετασχηματισμός του μέσου φάσματος με τον αλγόριθμο Kubelka-Munk.



Σχήμα Β.2.1.3.12. Κανονικοποίηση της κλίμακας απορρόφησης.

Η στατιστική ανάλυση με σκοπό την ανάπτυξη χημειομετρικού μοντέλου διαφοροποίησης των φιστικιών σε σχέση με το έτος συγκομιδής (2017, 2018) πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό MetaboAnalyst 5.0 και την τεχνική διασταυρούμενης επικύρωσης (όπως αυτή περιγράφεται στο κεφάλαιο Α.1.7).

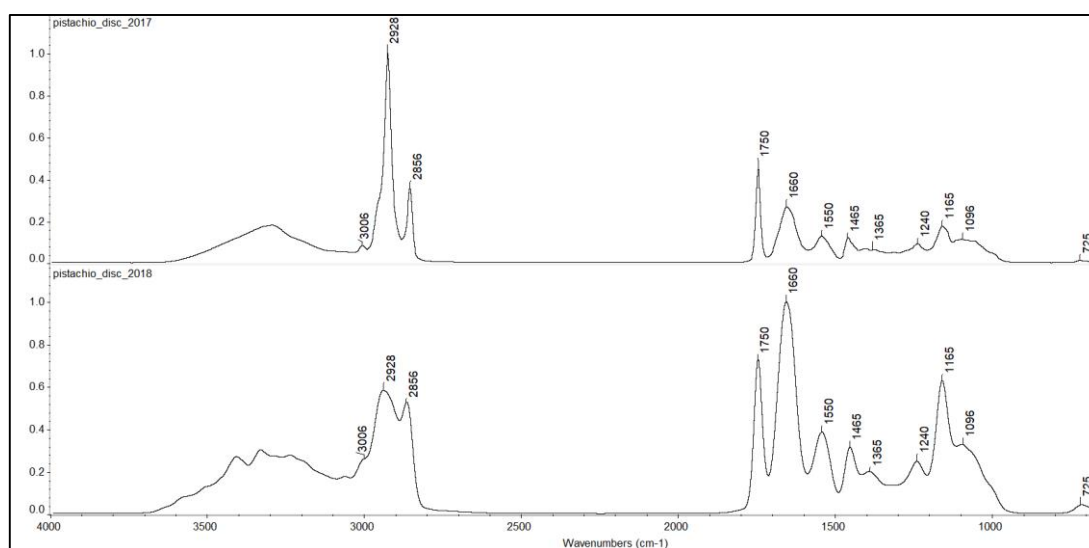
Β.2.2. Αποτελέσματα-Συζήτηση

Β.2.2.1. Φασματοσκοπική μελέτη της ψίχας κελυφωτού φιστικιού

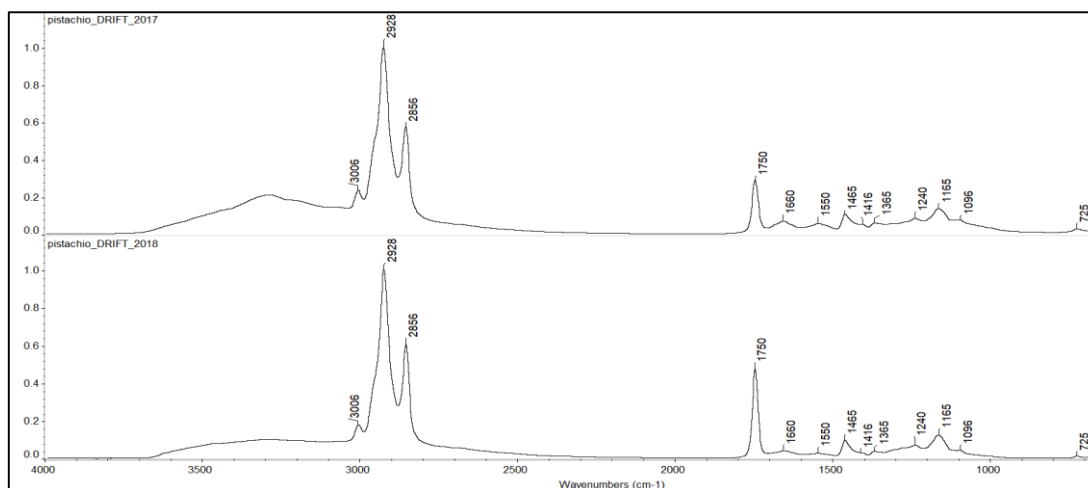
Κατά την προετοιμασία των δισκίων προέκυψαν διάφορα προβλήματα λόγω των λιπαρών συστατικών, τόσο στην ομογενοποίηση του δείγματος με KBr όσο και στην επιλογή της κατάλληλης πίεσης και του χρόνου εφαρμογής αυτής της πίεσης. Ένα μέρος των λιπαρών συστατικών εξαγόταν από το δείγμα, αλλά το απορροφούσε το KBr. Επομένως, το φάσμα που καταγράφηκε αφορούσε όλα τα συστατικά του δείγματος.

Στα Σχήματα Β.2.2.1.1 και Β.2.2.1.2 παρατίθενται αντιπροσωπευτικά FTIR φάσματα. Προερχόμενα από τον ίδιο παραγωγό, αλλά συγκομισμένα το 2017 και το 2018, από τη φασματοσκοπία FTIR με τις τεχνικές δισκίου και DRIFT, αντίστοιχα, και στον Πίνακα Β.2.2.1.1 φαίνονται οι πιο χαρακτηριστικές κορυφές των FTIR φασμάτων και οι αποδόσεις τους. Οι ζώνες απορρόφησης που παρατηρούνται μεταξύ 2750-3600 cm^{-1} και οι δονήσεις παραμόρφωσης του εύρους 1300-1500 cm^{-1} οφείλονται κατά βάση στην περιεκτικότητα σε λιπίδια. Κατά τη σύγκριση των 11 δειγμάτων του 2017 με τα 11 δείγματα του 2018, η οποία δίνει άμεσα συγκρίσιμα αποτελέσματα, παρατηρήθηκε ότι μεταξύ των ετών συγκομιδής 2017 και 2018, η συσχέτιση των υψών και των

εμβαδών αυτών των κορυφών άλλαξε. Η περιεκτικότητα σε έλαιο συνδέεται με τη χρονιά συγκομιδής (Minioti & Georgiou, 2010· Yu, Wang, Zhan, & Huang, 2017). Αντίστοιχα, η περιοχή φάσματος μεταξύ 1500-1700 cm^{-1} είναι, κυρίως, πρωτεϊνική με τις κορυφές στα 1660 και 1550 cm^{-1} να οφείλονται στους τύπους δόνησης των αμιδίων I και II, αντίστοιχα. Η φασματική αυτή περιοχή σχετίζεται με τη δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών. Το πρωτεϊνικό περιεχόμενο εξαρτάται από την περίοδο συγκομιδής, τη θερμοκρασία και το ρυθμό βροχοπτώσεων (Esmailpour & Shakerardekani, 2018· Alae-Carew et al., 2020· Manners, Varela-Ortega, & van Etten, 2020). Οι κυματαριθμοί από 900 έως 1300 cm^{-1} αναφέρονται, κυρίως, ως δονήσεις δακτυλίου ολιγο- και πολυσακχαριτών, ενώ οι ζώνες απορρόφησης μεταξύ 600 και 900 cm^{-1} γενικά προκύπτουν από δονήσεις αρωματικών δακτυλίων (Kaya-Celiker, 2012· Kaya-Celiker, Mallikarjunan, & Kaaya, 2015).



Σχήμα B.2.2.1.1. Αντιπροσωπευτικά φάσματα FTIR κοκκομετρημένης ψίχας κελυφωτού φιστικιού με την τεχνική δισκίων από τα έτη συγκομιδής 2017 και 2018, προερχόμενα από τον ίδιο παραγωγό.



Σχήμα Β.2.2.1.2. Αντιπροσωπευτικά φάσματα FTIR κοκκομετρημένης ψίχας κελυφωτού φιστικιού με την τεχνική DRIFTs από τα έτη συγκομιδής 2017 και 2018, προερχόμενα από τον ίδιο παραγωγό.

Πίνακας Β.2.2.1.1. Απόδοση των κορυφών του φάσματος κοκκομετρημένης ψίχας κελυφωτού φιστικιού (Kaya-Celiker, 2012; Kaya-Celiker et al., 2015).

Κυματριθμός (cm ⁻¹)	Λειτουργική ομάδα	Συντομογραφία	Τύπος δόνησης
3200-3600	O-H	ν(O-H)	τάσης
	N-H της αμιδικής ομάδας	ν(N-H)	τάσης
3006	cis =C-H	ν(=C-H)	τάσης
2928	C-H of -CH ₂ -	ν _{as} (CH ₂)	τάσης (ασύμμετρη)
2856	C-H of -CH ₂ -	ν _s (CH ₂)	τάσης (συμμετρική)
1750	C=O of esters	ν(C=O)	τάσης
1660	C=O, C-N της πρωτοταγούς αμιδικής ομάδας	ν(C=O), ν(C-N)	τάσης
1550	N-H, C-O της δευτεροταγούς αμιδικής ομάδας	δ(N-H), δ(C-O)	κάμψης
	C-C, C-N της δευτεροταγούς αμιδικής ομάδας	ν(C-C), ν(C-N)	τάσης

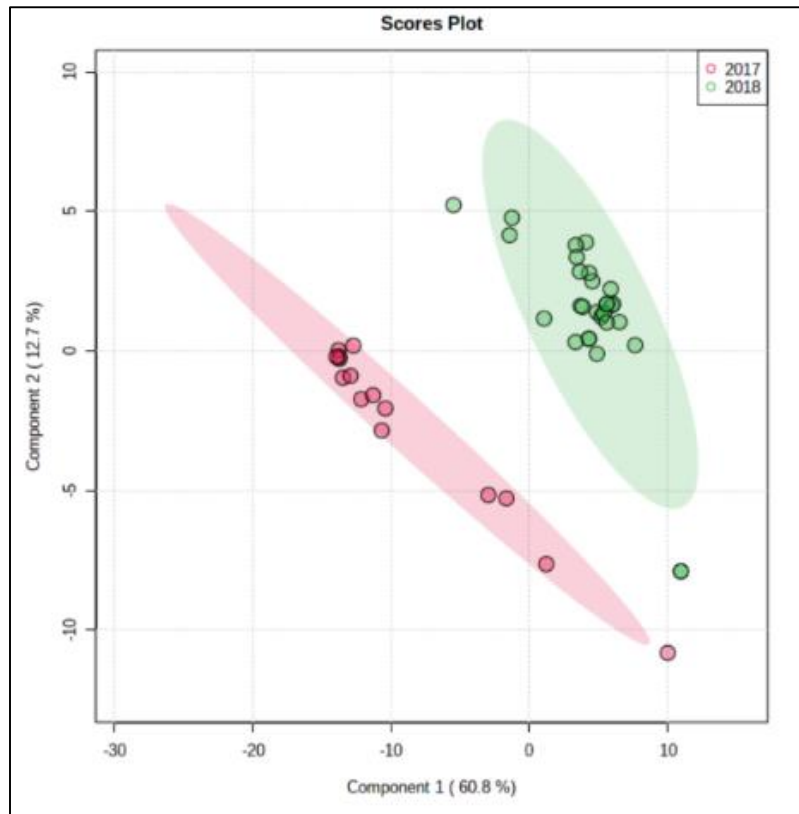
1465	C-H of -CH ₂ -	$\delta_s(\text{C-H})$	κάμψης (ψαλιδοειδής)
1416	cis =C-H	$\rho(=\text{C-H})$	κάμψης (αιώρησης)
1365	C-H of -CH ₃	$\delta_s(\text{C-H})$	κάμψης (συμμετρική)
1240	C-O των εστέρων των τριγλυκεριδίων	$\nu_{\text{as}}(\text{C-O})$	τάσης (ασύμμετρη)
	C-H of -CH ₃	$\delta_s(\text{C-H})$	κάμψης (συμμετρική)
1165	C-O	$\nu_{\text{as}}(\text{C-O})$	τάσης (ασύμμετρη)
	-CH ₂ -	$\delta(\text{CH}_2)$	κάμψης
1096	C-O	$\nu(\text{C-O})$	τάσης
725	αρωματικός δακτύλιος	-	παραμόρφωση

Λόγω του μεγάλου όγκου και της συνθετότητας των φασματικών δεδομένων, ήταν υποχρεωτική η χρήση χημειομετρικής ανάλυσης που, δυνητικά, επιτρέπει την εξαγωγή σχετικών πληροφοριών και την ανάπτυξη χημειομετρικών μοντέλων (Mendes & Duarte, 2021).

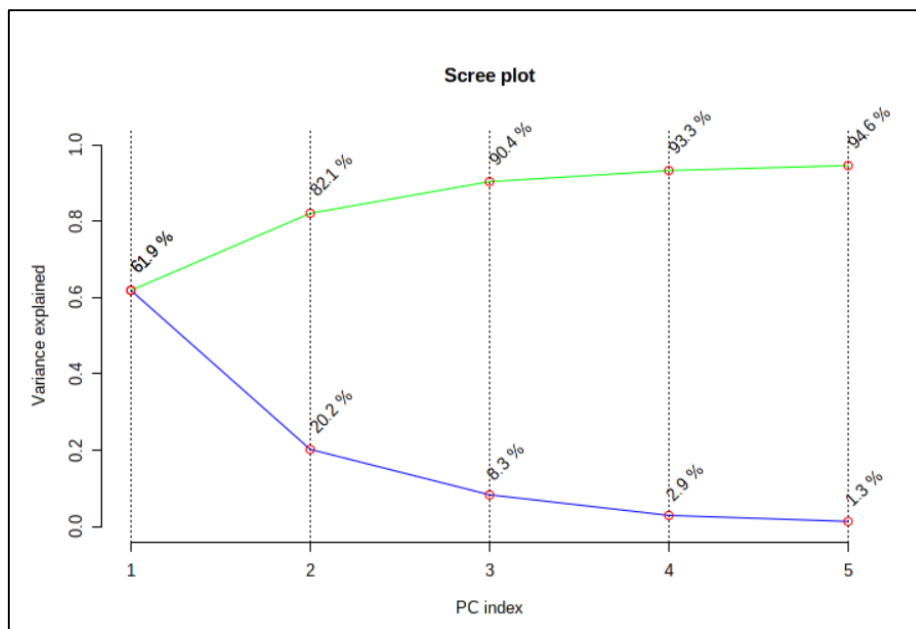
B.2.2.2. Σύγκριση 15 δειγμάτων 2017 και 30 δειγμάτων 2018

B.2.2.2.1. Τεχνική δισκίου

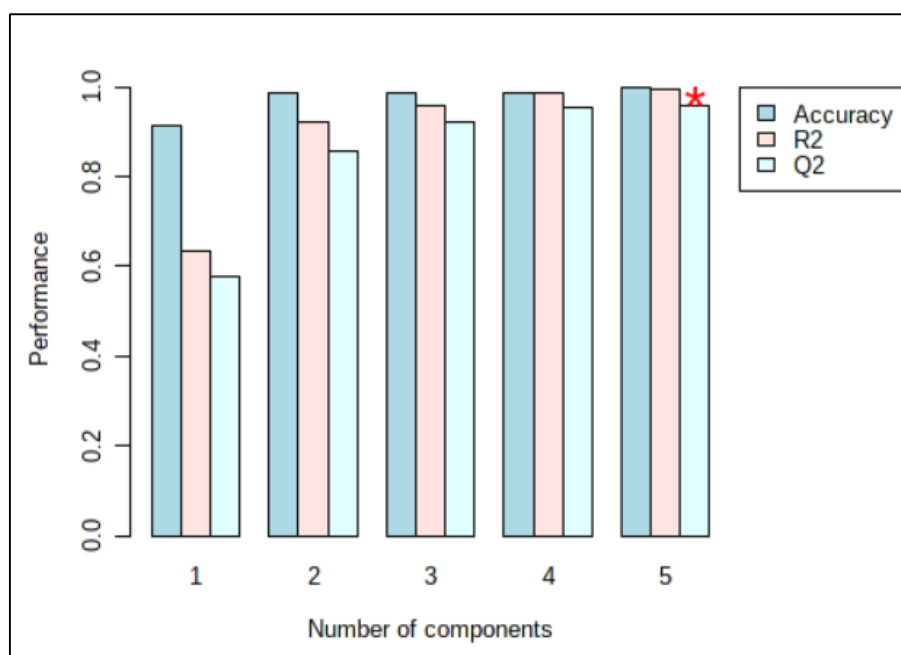
Έπειτα από το IQR φιλτράρισμα, τα φασματοσκοπικά δεδομένα που είχαν ληφθεί ως .csv αρχεία υπέστησαν μετατροπή κυβικής ρίζας και κλιμάκωση Pareto, με σκοπό που περιγράφεται στο κεφάλαιο A.1.7. Κατά την PLS-DA χρησιμοποιήθηκε όλο το εύρος των κυματαριθμών (400-4000 cm^{-1}), δηλαδή ολόκληρο το φάσμα FTIR, και αποδείχθηκε σαφής διάκριση των δειγμάτων σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (Σχήμα B.2.2.2.1.1). Δημιουργήθηκαν πέντε PC που συνείσφεραν ικανοποιητικά στην επεξήγηση της εξαρτημένης και των ανεξάρτητων μεταβλητών ($R^2=0,99371$) (Σχήμα B.2.2.2.1.2). Η ικανοποιητική τιμή του Q^2 ($Q^2=0,95811$) επικύρωσε την αξιοπιστία του χημειομετρικού μοντέλου που δημιουργήθηκε (Σχήμα B.2.2.2.1.3 και Πίνακας B.2.2.2.1.1).



Σχήμα B.2.2.2.1.1. PLS-DA 2D scores plot για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική δισκίου σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).



Σχήμα B.2.2.2.1.2. Γράφημα επεξηγηματικής διακύμανσης για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική δισκίου σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).

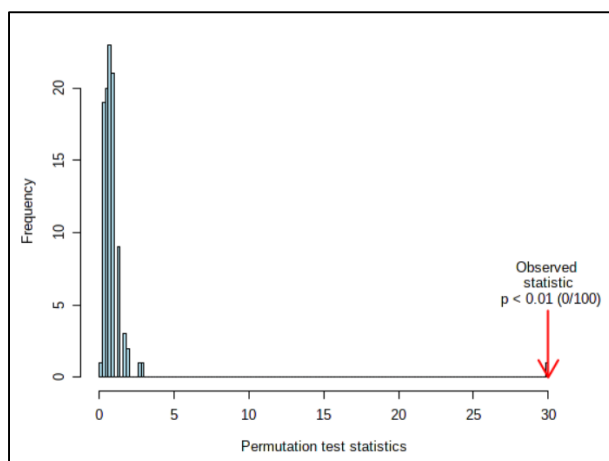


Σχήμα B.2.2.2.1.3. PLS-DA διασταυρούμενη επικύρωση (cross-validation) για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική δισκίου σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).

Πίνακας B.2.2.2.1.1. PLS-DA απόδοση μοντέλου διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική δισκίου σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).

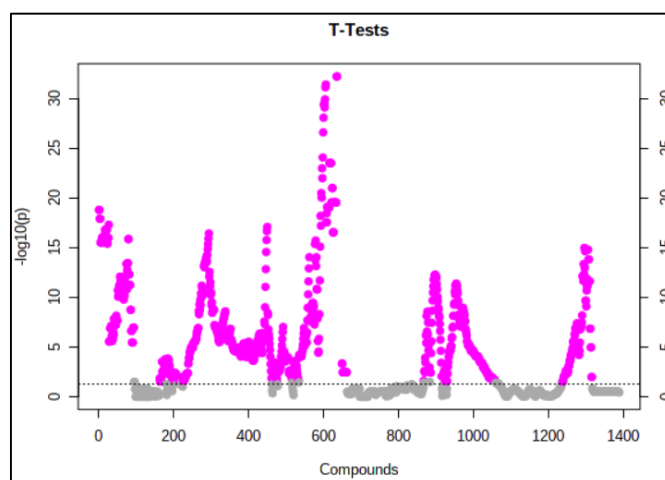
Μέτρηση	1 PC	2 PC	3 PC	4 PC	5 PC
Ακρίβεια (accuracy)	0,91333	0,98667	0,98667	0,98667	1,00000
R²	0,63338	0,92337	0,95763	0,98836	0,99371
Q²	0,57760	0,85760	0,92146	0,95276	0,95811

Η στατιστική σημασία του μοντέλου PLS-DA αξιολογήθηκε με permutation test (Σχήμα B.2.2.2.1.4). Δεδομένου ότι ο δείκτης με το κόκκινο χρώμα ήταν εντελώς δεξιά, ήταν εμφανές ότι ο διαχωρισμός των δειγμάτων σε δύο ομάδες ήταν σημαντικός από στατιστική πλευρά και δεν οφειλόταν σε θόρυβο (Barberini et al., 2016).



Σχήμα B.2.2.2.1.4. PLS-DA permutation test για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική δισκίου σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst)· (permutation numbers: 100).

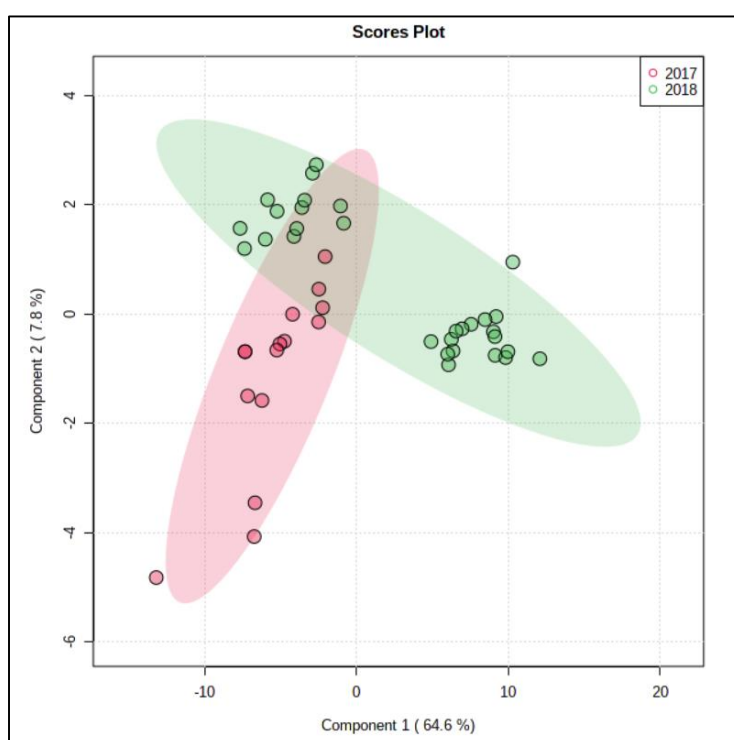
Τα δεδομένα από τα δύο διαδοχικά έτη συγκομιδής συγκρίθηκαν χρησιμοποιώντας t-test, το οποίο έδειξε ότι σχεδόν ολόκληρο το φάσμα έπαιξε σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση. Υπήρξε πλήρης διάκριση μεταξύ των δύο ετών συγκομιδής. Οι στατιστικά σημαντικοί για τη διάκριση κυματαριθμοί παρουσιάστηκαν με ροζ χρώμα (Σχήμα B.2.2.2.1.5). Οι κυματαριθμοί με τη μεγαλύτερη σημασία στην πρόβλεψη (Variables Importance in the Projection, VIP), που συνείσφεραν περισσότερο στη διαφοροποίηση, βρίσκονταν πιο ψηλά στην κλίμακα του άξονα y του Σχήματος B.2.2.2.1.5 και ήταν οι κυματαριθμοί 1720-1800 cm^{-1} , που το 2018 παρουσίασαν αυξημένη σχετική ένταση.



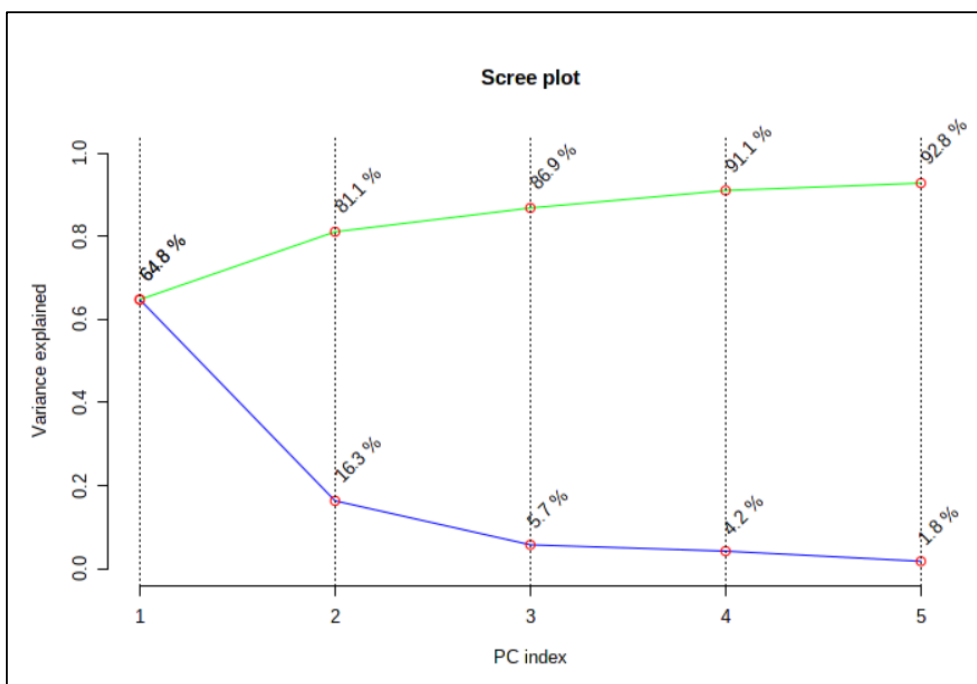
Σχήμα B.2.2.2.1.5. T-test για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική δισκίου σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).

B.2.2.2.2. Τεχνική DRIFTS

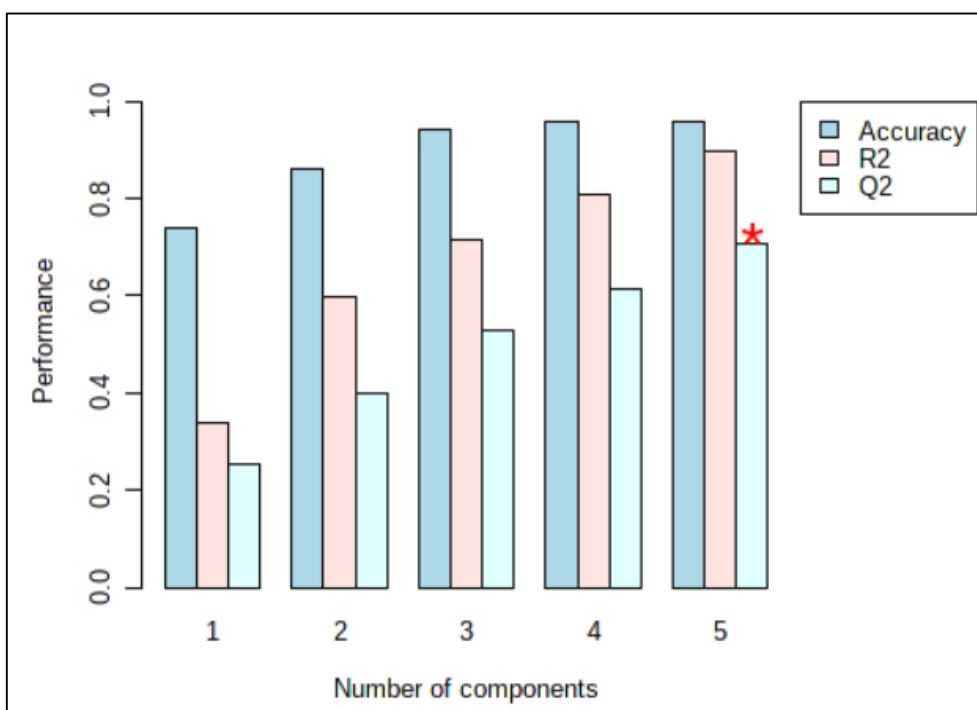
Η PLS-DA σε ολόκληρο το εύρος κυματαριθμών ($400-4000\text{ cm}^{-1}$) του φάσματος των δειγμάτων με την τεχνική DRIFTS, μετά το IQR φιλτράρισμα, τη μετατροπή κυβικής ρίζας και την κλιμάκωση Pareto, που έγιναν στα φασματοσκοπικά δεδομένα μορφής .csv με σκοπό που περιγράφεται στο κεφάλαιο A.1.7, έδειξε ότι τα δείγματα μπορούν να διαχωριστούν μεταξύ των δύο ετών συγκομιδής αλλά όχι με σαφή τρόπο (Σχήμα B.2.2.2.1). Όπως φαίνεται στα Σχήματα B.2.2.2.2 και B.2.2.2.3, πέντε PC οδήγησαν στις υψηλότερες τιμές R^2 και Q^2 , που περιγράφονται λεπτομερώς στον Πίνακα B.2.2.2.1.



Σχήμα B.2.2.2.1. PLS-DA 2D scores plot για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική DRIFTS σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).



Σχήμα B.2.2.2.2.2. Γράφημα επεξηγηματικής διακύμανσης για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική DRIFTs σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).

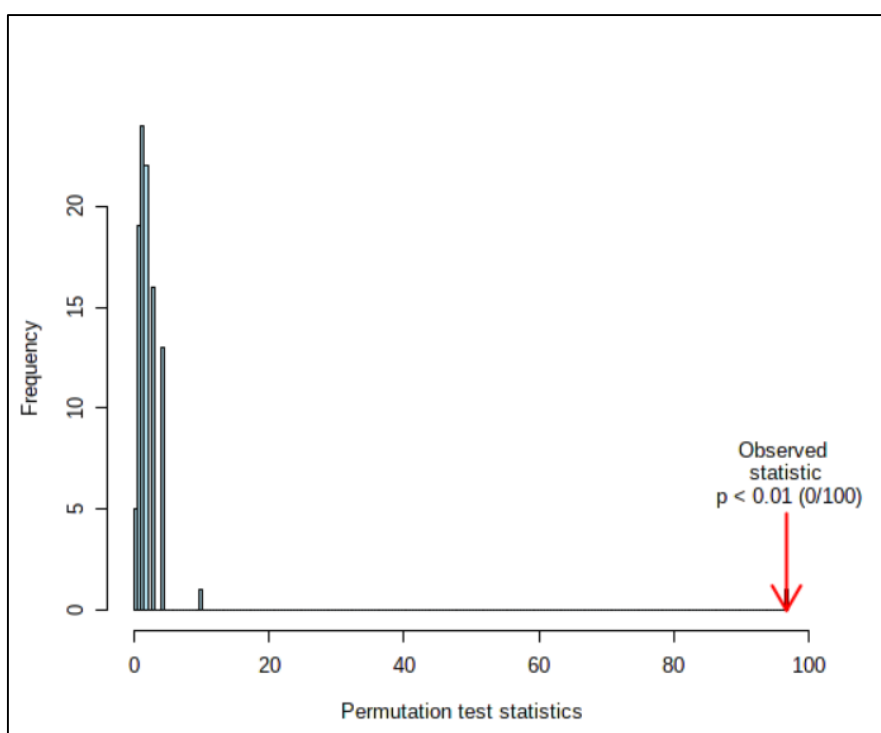


Σχήμα B.2.2.2.2.3. PLS-DA διασταυρούμενη επικύρωση (cross-validation) για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική DRIFTs σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).

Πίνακας B.2.2.2.1. PLS-DA απόδοση μοντέλου διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική DRIFTS σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).

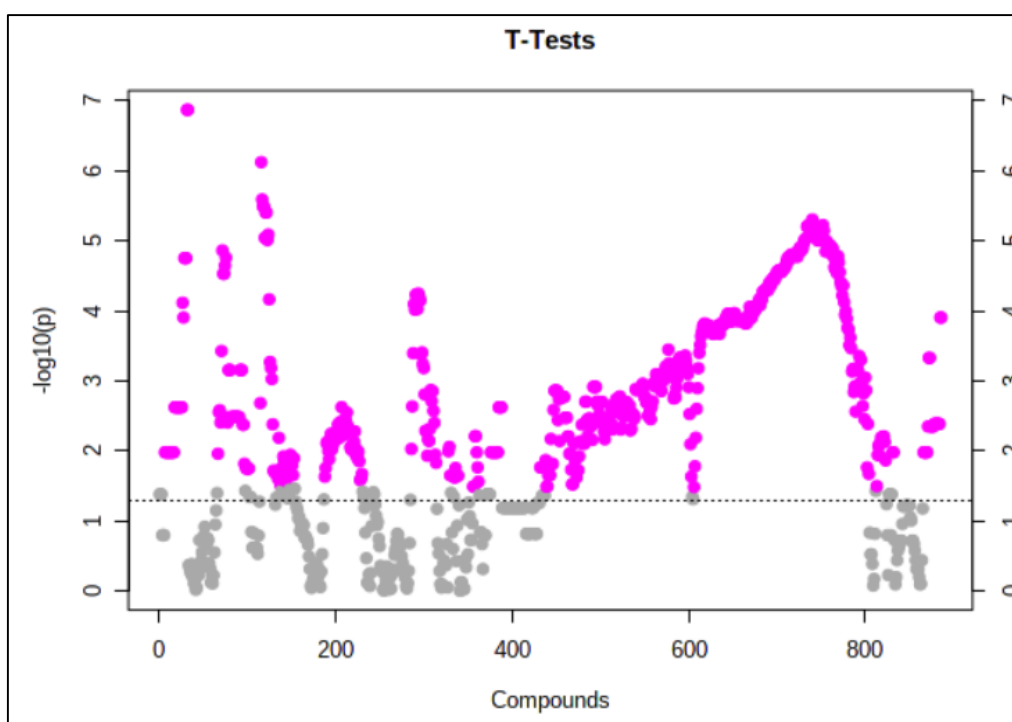
Μέτρηση	1 PC	2 PC	3 PC	4 PC	5 PC
Ακρίβεια (accuracy)	0,74000	0,86000	0,94000	0,96000	0,96000
R ²	0,33925	0,59596	0,71551	0,80694	0,89692
Q ²	0,25439	0,3994	0,52773	0,61368	0,70648

Για να δοθεί ένα μέτρο της στατιστικής σημασίας της ταξινόμησης (p-value), πραγματοποιήθηκαν permutation tests. Η p-value που παρατηρήθηκε στο Σχήμα B.2.2.2.2.4 ήταν μικρότερη από 0,05 ενισχύοντας το συμπέρασμα ότι υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των φασμάτων DRIFTS από έτος σε έτος που δεν οφειλόταν σε θόρυβο.



Σχήμα B.2.2.2.4. PLS-DA permutation test για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική DRIFTS σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst)· (permutation numbers: 100).

Τα δεδομένα από τα δύο διαδοχικά έτη συγκομιδής συγκρίθηκαν χρησιμοποιώντας t-test (Σχήμα B.2.2.2.5), το οποίο έδειξε ότι σχεδόν ολόκληρο το φάσμα έπαιξε σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση. Η διάκριση μεταξύ των δύο ετών συγκομιδής ήταν σε ποσοστό 73,3%. Οι στατιστικά σημαντικοί για τη διάκριση κυματαριθμοί εμφανίστηκαν με ροζ χρώμα και οι κυματαριθμοί κατατάχθηκαν χρησιμοποιώντας τα VIP scores με $p\text{-value} \leq 0,05$. Η περιοχή $3200\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ συνείφερε περισσότερο στη διαφοροποίηση με το έτος 2018 να παρουσιάζει χαμηλότερες τιμές στη συγκεκριμένη περιοχή.



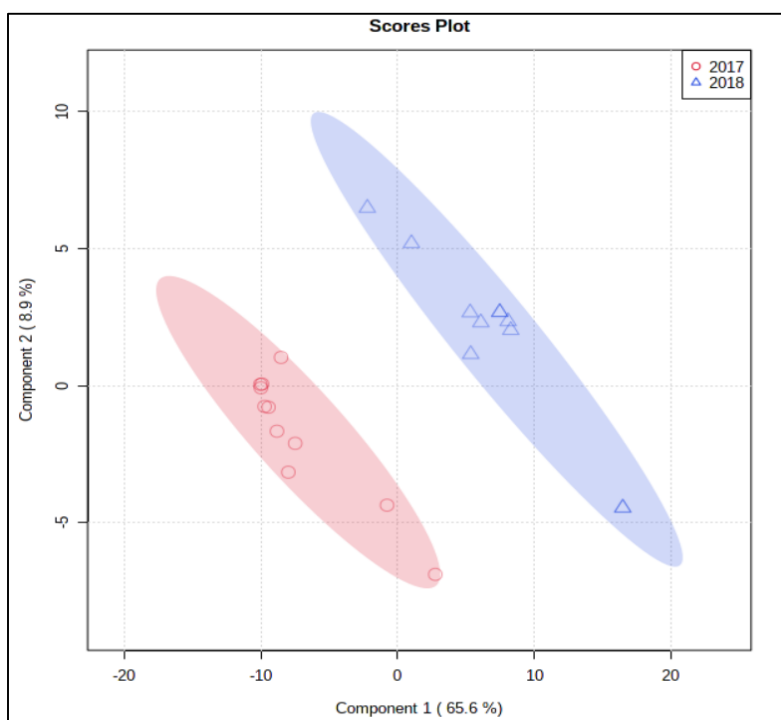
Σχήμα B.2.2.2.5. T-test για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική DRIFTS σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).

B.2.2.3. Σύγκριση 11 δειγμάτων 2017 και 11 δειγμάτων 2018

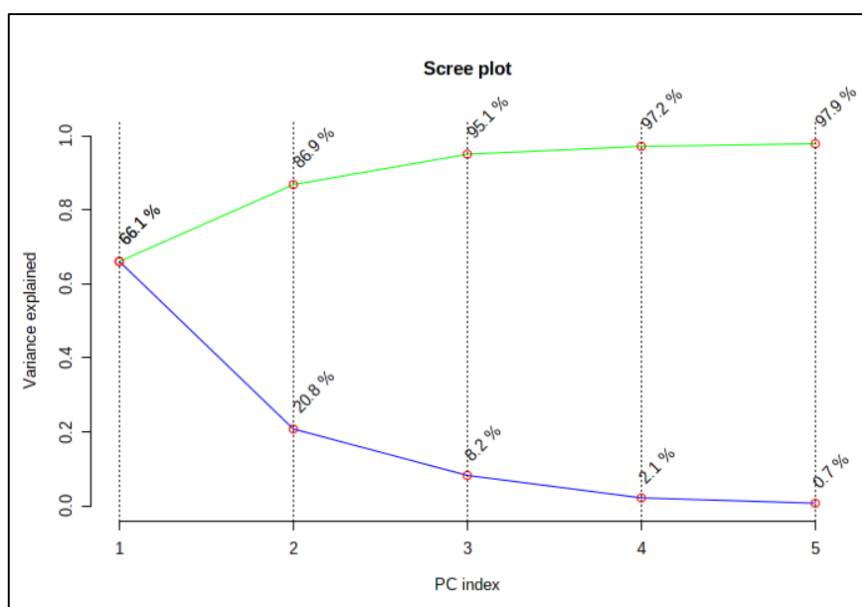
B.2.2.3.1. Τεχνική δισκίου

Η ανάλυση PLS-DA σε ολόκληρο το εύρος κυματαριθμών ($400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$), ακολουθούμενη από φιλτράρισμα IQR, μετατροπή κυβικής ρίζας και κλιμάκωση Pareto, που έγιναν στα φασματοσκοπικά δεδομένα μορφής .csv με σκοπό που περιγράφεται στο κεφάλαιο A.1.7, απέδειξε μια σαφή διάκριση των δειγμάτων σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (Σχήμα B.2.2.3.1.1). Πέντε PC ήταν ο βέλτιστος αριθμός για την ταξινόμηση, που αντιπροσώπευε όσο το δυνατόν μεγαλύτερο ποσοστό

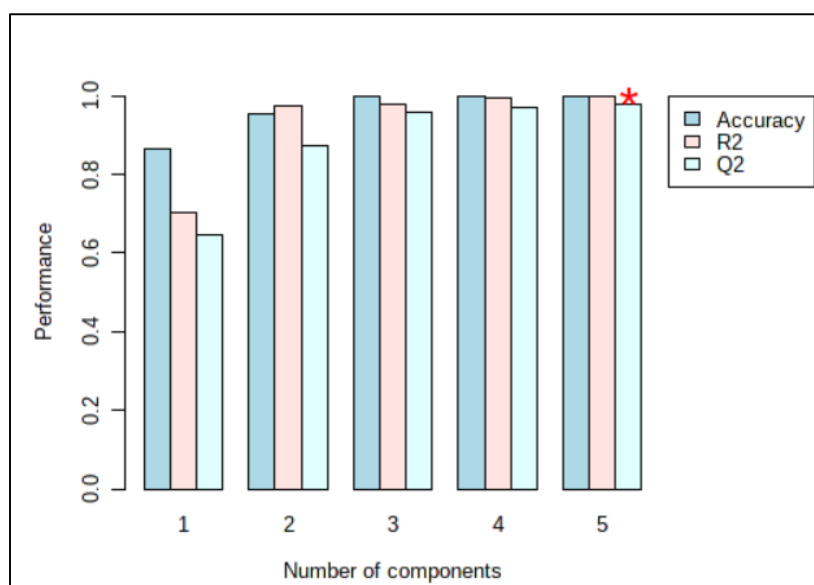
παραλλακτικότητας (Σχήμα B.2.2.3.1.2), ενώ υψηλές τιμές R^2 και Q^2 είχαν ήδη δοθεί από τρεις PC (Σχήμα B.2.2.3.1.3 και Πίνακας B.2.2.3.1.1).



Σχήμα B.2.2.3.1.1. PLS-DA 2D scores plot για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική δισκίου σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).



Σχήμα B.2.2.3.1.2. Γράφημα επεξηγηματικής διακύμανσης για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική δισκίου σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).

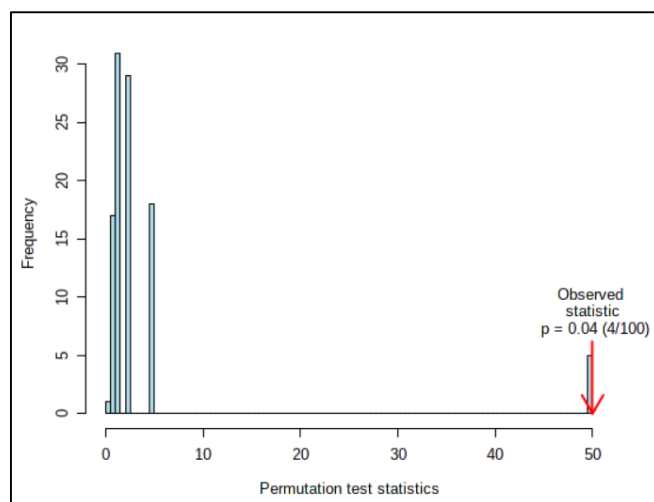


Σχήμα B.2.2.3.1.3. PLS-DA διασταυρούμενη επικύρωση (cross-validation) για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική δισκίου σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).

Πίνακας B.2.2.3.1.1. PLS-DA απόδοση μοντέλου διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική δισκίου σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).

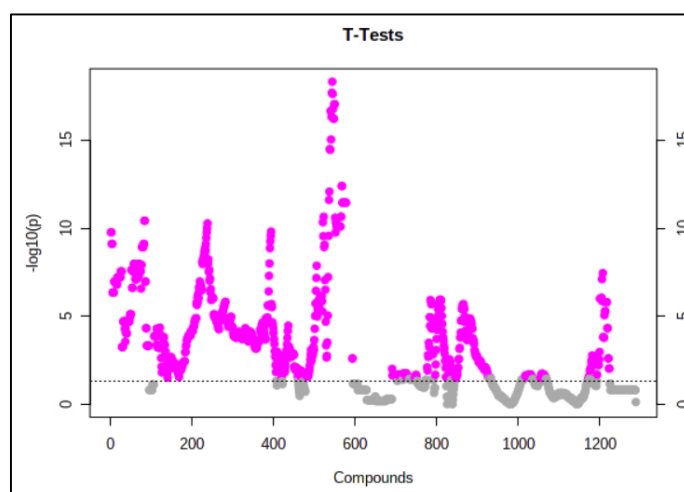
Μέτρηση	1 PC	2 PC	3 PC	4 PC	5 PC
Ακρίβεια (accuracy)	0,86364	0,95455	1,00000	1,00000	1,00000
R²	0,70340	0,97518	0,97764	0,99418	0,99705
Q²	0,64544	0,87179	0,95853	0,96901	0,97719

Η στατιστική σημασία του μοντέλου PLS-DA αξιολογήθηκε με permutation test (Σχήμα B.2.2.3.1.4). Δεδομένου ότι ο δείκτης με το κόκκινο χρώμα ήταν εντελώς δεξιά, ήταν εμφανές ότι ο διαχωρισμός των δειγμάτων σε δύο ομάδες ήταν στατιστικά σημαντικός (Barberini et al., 2016).



Σχήμα B.2.2.3.1.4. PLS-DA permutation test για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική δισκίου σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst)· (permutation numbers: 100).

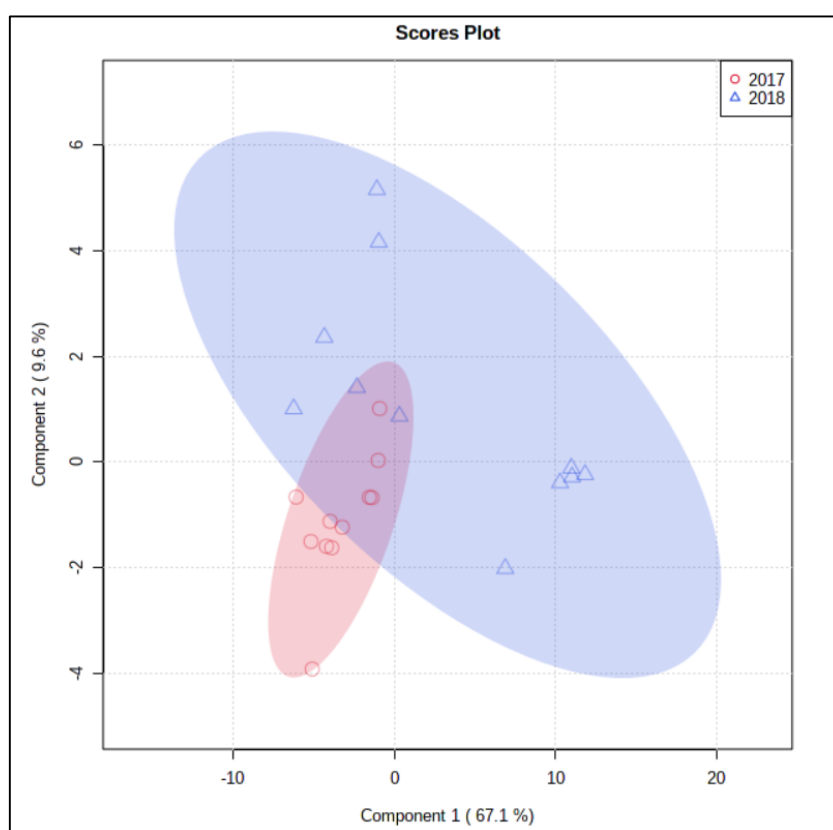
Τα δεδομένα από τα δύο διαδοχικά έτη συγκομιδής συγκρίθηκαν χρησιμοποιώντας t-test (Σχήμα B.2.2.3.1.5), το οποίο έδειξε ότι σχεδόν ολόκληρο το φάσμα έπαιξε σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση. Υπήρξε πλήρης διάκριση μεταξύ των δύο ετών συγκομιδής. Οι στατιστικά σημαντικοί για τη διάκριση κυματαριθμοί παρουσιάστηκαν με ροζ χρώμα. Το εύρος $1720-1800\text{ cm}^{-1}$, συμπεριλαμβανομένης της κορυφής στα 1750 cm^{-1} , είχε τις μεταβλητές με τα υψηλότερα VIP scores που συνείσφεραν περισσότερο στη διαφοροποίηση. Η σχετική ένταση των αντίστοιχων κυματαριθμών παρουσιάστηκε υψηλή για το 2018 συγκριτικά με το 2017.



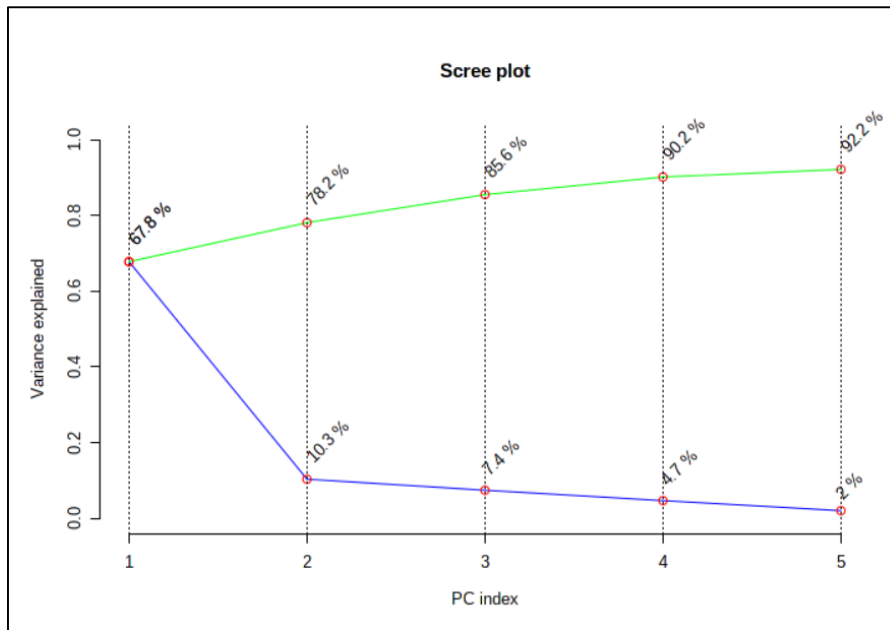
Σχήμα B.2.2.3.1.5. T-test για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική δισκίου σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).

B.2.2.3.2. Τεχνική DRIFTS

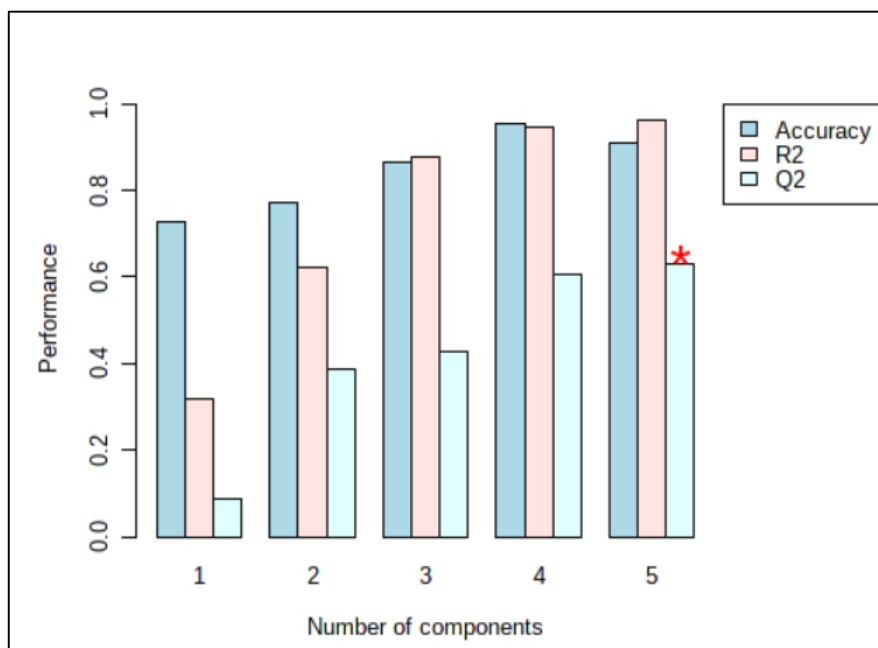
Τα φασματοσκοπικά δεδομένα, που είχαν ληφθεί ως .csv αρχεία, υπέστησαν IQR φιλτράρισμα, μετατροπή κυβικής ρίζας και κλιμάκωση Pareto με σκοπό που περιγράφεται στο κεφάλαιο A.1.7. Έπειτα, εφαρμόστηκε PLS-DA σε ολόκληρο το εύρος κυματαριθμών ($400-4000\text{ cm}^{-1}$) του φάσματος των δειγμάτων με την τεχνική DRIFTS. Τα δείγματα δεν μπόρεσαν να διαχωριστούν πλήρως μεταξύ των δύο ετών συγκομιδής ($p\text{-value}>0,05$) (Σχήμα B.2.2.3.2.1). Όπως φαίνεται στο Σχήμα B.2.2.3.2.2, πέντε PC οδήγησαν στις υψηλότερες τιμές R^2 και Q^2 (Σχήμα B.2.2.3.2.3), που περιγράφονται λεπτομερώς στον Πίνακα B.2.2.3.2.1.



Σχήμα B.2.2.3.2.1. PLS-DA 2D scores plot για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική DRIFTS σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).



Σχήμα B.2.2.3.2.2. Γράφημα επεξηγηματικής διακύμανσης για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική DRIFTs σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).

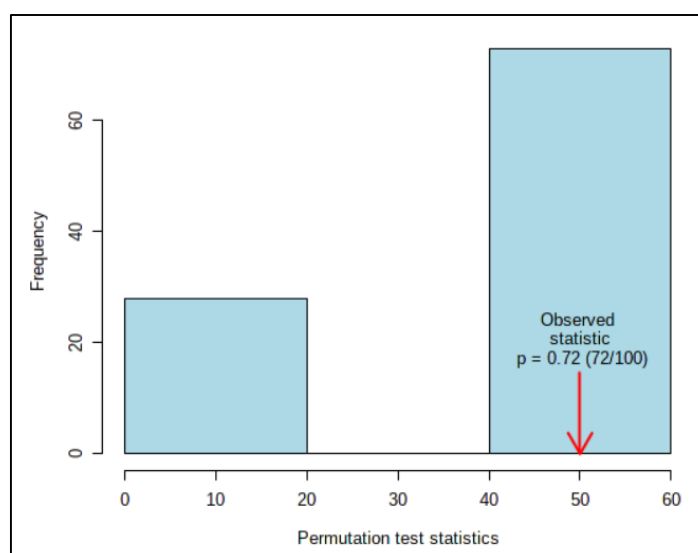


Σχήμα B.2.2.3.2.3. PLS-DA διασταυρούμενη επικύρωση (cross-validation) για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική DRIFTs σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).

Πίνακας B.2.2.3.2.1. PLS-DA απόδοση μοντέλου διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική DRIFTs σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).

Μέτρηση	1 PC	2 PC	3 PC	4 PC	5 PC
Ακρίβεια (accuracy)	0,72727	0,77273	0,86364	0,95455	0,90909
R²	0,31949	0,62254	0,87641	0,94666	0,96266
Q²	0,085499	0,38841	0,42874	0,60433	0,63152

Η p-value που παρατηρήθηκε στο Σχήμα B.2.2.3.2.4 ήταν υψηλότερη από 0,05 ενισχύοντας το συμπέρασμα του Σχήματος B.2.2.3.2.1 ότι δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των φασμάτων DRIFTs από έτος σε έτος. Το ποσοστό σωστής ταξινόμησης ήταν 28% μεταξύ των δύο ετών συγκομιδής.



Σχήμα B.2.2.3.2.4. PLS-DA permutation test για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική DRIFTs σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst)· (permutation numbers: 100).

B.2.3. Συμπεράσματα

Η αξιολόγηση της απόδοσης των μοντέλων PLS-DA που αναπτύχθηκαν βασισμένα σε δύο διαφορετικές τεχνικές FTIR (DRIFTs και δισκία) επιτεύχθηκε με τους συντελεστές R² και Q² ως στατιστικό μέτρο της προσαρμογής του μοντέλου. Αναφερόμενοι στην τεχνική των δισκίων, τόσο η σύγκριση των 15 δειγμάτων του 2017 με τα 30 δείγματα του 2018 όσο και η σύγκριση των 11 δειγμάτων του 2017 με τα 11

δείγματα του 2018 έδειξαν σαφή (100%) διάκριση ($p\text{-value}<0,05$) μεταξύ φυσικιών από τα δύο διαφορετικά έτη συγκομιδής. Αναφερόμενοι στην τεχνική DRIFTs, η σύγκριση των 15 δειγμάτων του 2017 με τα 30 δείγματα του 2018 έδειξε διάκριση ($p\text{-value}<0,05$) σε ποσοστό 73,3%, ενώ για τη σύγκριση των 11 δειγμάτων του 2017 με τα 11 δείγματα του 2018 το ποσοστό σωστής ταξινόμησης των δειγμάτων μεταξύ των δύο διαφορετικών ετών συγκομιδής ήταν 28% ($p\text{-value}>0,05$).

Συγκεκριμένα, για τα 11 δείγματα του 2017 και τα 11 δείγματα του 2018, τα φάσματα με την τεχνική δισκίων σε συνδυασμό με τη χρήση του χημειομετρικού εργαλείου PLS-DA έδειξαν μια σαφή τάση διάκρισης ($p\text{-value}<0,05$) μεταξύ φυσικιών από τα δύο διαφορετικά έτη με $R^2=0,99705$ και $Q^2=0,97719$. Από τα αποτελέσματα αυτού του μοντέλου συμπεραίνεται ότι η περιοχή $1720\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ είχε την υψηλότερη συμβολή σε αυτήν την ταξινόμηση. Αντίθετα, το μοντέλο PLS-DA από τα φάσματα DRIFTs δεν μπόρεσε να προβλέψει το έτος συγκομιδής από το σύνολο των ανεξάρτητων μεταβλητών ($p\text{-value}>0,05$) με $R^2=0,96266$ και $Q^2=0,63152$ (Valasi & Pappas, 2021).

Η τεχνική DRIFTs παρουσιάζει μειονεκτήματα καθώς η ένταση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας που διασκορπίζεται, όταν η ακτινοβολία προσπίπτει στο δείγμα, εξαρτάται από το δείκτη διάθλασης, την κατανομή και το μέγεθος των σωματιδίων, την πυκνότητα και την ομοιογένεια του δείγματος (Sun, 2008). Για απόκτηση υψηλότερης ποιότητας φάσματος πρέπει το δείγμα να είναι καλά ομογενοποιημένο, το μέγεθος των σωματιδίων του να είναι μικρό και ομοιόμορφο, ώστε να καταγράφεται φάσμα με λεπτότερη υφή, και η τοποθέτηση του δείγματος στον υποδοχέα να μην είναι υπερβολικά συμπαγής ώστε να μεγιστοποιείται η διείδυση της δέσμης IR (Lercher & Jentys, 2007).

Από την άλλη πλευρά, στην τεχνική των δισκίων το δείγμα αραιώθηκε με KBr το οποίο ενισχύει τη συμβολή του διάχυτου φωτός και ελαχιστοποιεί την κατοπτρική ανάκλαση. Η κατοπτρική ανάκλαση προκαλεί αλλαγές στην ένταση, το σχήμα και, σε ορισμένες περιπτώσεις, αναστροφές των ζωνών (ζώνες Reststrahlen). Το μείγμα KBr-δείγματος ελαχιστοποιεί τις αρνητικές επιπτώσεις της κατοπτρικής ανάκλασης. Γενικά, το KBr είναι πολύ υγροσκοπικό και αν δεν έχει ξηραθεί καλά μπορεί να οδηγήσει σε απορροφήσεις στα 3440 (δόνηση τάσης OH), 1630 (δόνηση κάμψης OH) και 560 cm^{-1} (παλλόμενη δόνηση κάμψης OH) που επηρεάζουν την ερμηνεία αυτών των φασματικών περιοχών. Κατά την παρασκευή δισκίου η υπερβολική πίεση μαζί με την παρουσία νερού μπορούν να αλλάξουν την κρυσταλλικότητα του KBr (Larkin, 2011).

B.3. Παραλαβή φιστικελαίου - Ανάπτυξη χημειομετρικού μοντέλου διαφοροποίησης των δειγμάτων με βάση την απόδοση σε φιστικέλαιο και ανάλογα με το έτος συγκομιδής

Στο παρόν κεφάλαιο περιγράφεται ο πειραματικός τρόπος παραλαβής των φιστικελαίων από τα αντίστοιχα δείγματα των κελυφωτών φιστικιών ποικιλίας Αιγίνης και υπολογίζεται η ελαιοπεριεκτικότητα κάθε δείγματος. Ακολουθεί σύγκριση των 15(2017)-30(2018) και των 11(2017)-11(2018) δειγμάτων με σκοπό την ανάπτυξη χημειομετρικού μοντέλου για τη διαφοροποίηση της απόδοσης σε φιστικέλαιο ανάλογα με το έτος συγκομιδής.

B.3.1. Πειραματική διαδικασία

Για την παραλαβή του φιστικελαίου χρησιμοποιήθηκε η τεχνική Soxhlet και ο πετρελαϊκός αιθέρας ως διαλύτης εκχύλισης. Η επιλογή του συγκεκριμένου οργανικού διαλύτη βασίστηκε στο ότι έχει κατάλληλη πολικότητα και διαθέτει μεγάλη εκλεκτικότητα για τα λιπίδια, διαθέτει πολύ μικρή εκλεκτικότητα για άλλες πολικότερες ενώσεις, διεισδύει εύκολα στο δείγμα, είναι πτητικός ώστε να απομακρύνεται εύκολα με εξάτμιση, είναι οικονομικός και δεν είναι ούτε τοξικός ούτε υγροσκοπικός.

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας των ολικών λιπιδίων στον πυρήνα των κελυφωτών φιστικιών προσδιορίστηκε με ημισυνεχή εκχύλιση με πετρελαϊκό αιθέρα σε συσκευή Soxhlet (Σχήμα B.3.1.1), σύμφωνα με την επίσημη μέθοδο AOAC 948.22. Σύμφωνα με την παραπάνω μέθοδο, μια ποσότητα 3-4 g από το κάθε κοκκομετρημένο δείγμα (Σχήμα B.3.1.2), μεταφέρθηκε σε φυσίγγιο εκχύλισης (καρτούσα) σε αναλυτικό ζυγό (Kern PCB). Στη συνέχεια, η καρτούσα με το δείγμα τοποθετήθηκε στον εκχυλιστήρα της συσκευής Soxhlet, ο οποίος προσαρμόστηκε σε προζυγισμένη γυάλινη φιάλη, η οποία περιείχε 250-300 mL πετρελαϊκό αιθέρα. Το δείγμα εκχυλίστηκε για 6 h. Μετά την παραλαβή του ελαίου, ο διαλύτης εκχύλισης απομακρύνθηκε σε περιστρεφόμενο εξατμιστήρα κενού, συνδεδεμένο με υδατόλουτρο, (Laborota 400 efficient, Link Lab, Heidolph) σε θερμοκρασία 35°C (Σχήμα B.3.1.3). Με χρήση αερίου αζώτου απομακρύνθηκαν τυχόν υπολείμματα διαλύτη.

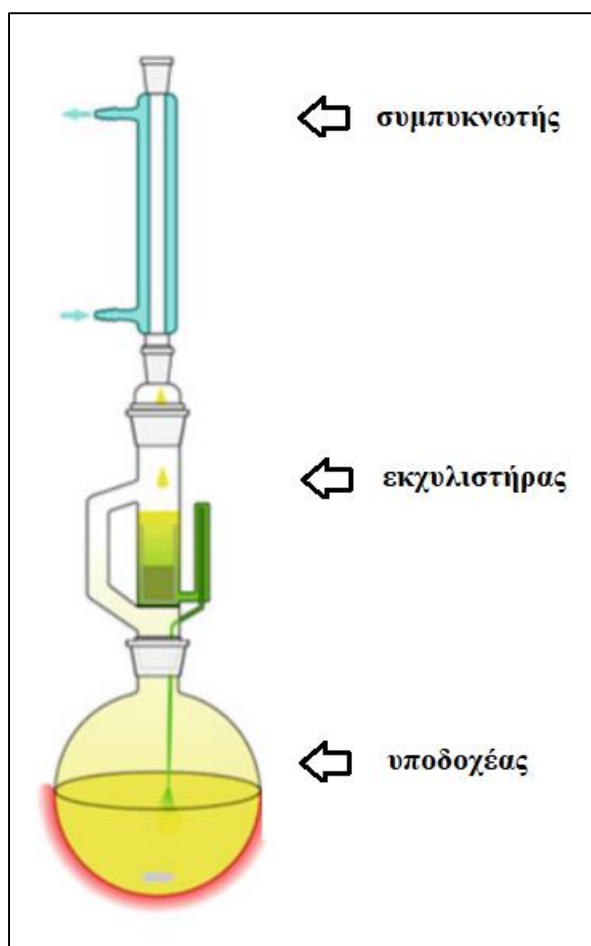
Η εκατοστιαία περιεκτικότητα σε έλαιο υπολογίστηκε με απευθείας ζύγιση του ελαίου μετά την εξάτμιση (Εξίσωση B.3.1.1). Πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις για κάθε δείγμα και υπολογίστηκαν η μέση τιμή της εκατοστιαίας περιεκτικότητας σε έλαιο και η τυπική απόκλιση. Τόσο το φυσικέλαιο όσο και το απολιπασμένο στερεό κάθε δείγματος (Σχήμα B.3.1.4) αποθηκεύτηκαν σε ψύξη (-20°C) και στο σκοτάδι, έτσι ώστε να παραμείνουν σταθερά τα οργανοληπτικά και χημικά χαρακτηριστικά (Rowshan, Bahmanzadegan, & Saharkhiz, 2013· Catalán et al., 2016).

$$\% \text{ φιστικελαίου} = \frac{M_1 - M_0}{M_2} \times 100 \text{ (Εξίσωση B.3.1.1)}$$

M_2 (g): η μάζα του αρχικού δείγματος

M_1 (g): η μάζα της φιάλης μετά την εκχύλιση με το δείγμα

M_0 (g): η μάζα φιάλης



Σχήμα B.3.1.1. Συσκευή ημισυνεχούς εκχύλισης Soxhlet (Kasiri & Safapour, 2013).



Σχήμα Β.3.1.2. Κοκκομετρημένο δείγμα πριν την εκχύλιση του ελαίου.



Σχήμα Β.3.1.3. Περιτροφικός εξατμιστήρας κενού.



Σχήμα Β.3.1.4. Στερεό υπόλειμμα δείγματος μετά την εκχύλιση του ελαίου.

Η στατιστική ανάλυση με σκοπό την ανάπτυξη χημειομετρικού μοντέλου διαφοροποίησης της απόδοσης των φιστικελαίων σε σχέση με το έτος συγκομιδής (2017, 2018) πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό SPSS και την τεχνική διασταυρούμενης επικύρωσης (όπως αυτή περιγράφεται στο κεφάλαιο Α.1.7).

B.3.2. Αποτελέσματα-Συζήτηση

Στον Πίνακα Β.3.2.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της απόδοσης σε φιστικέλαιο.

Πίνακας Β.3.2.1. Απόδοση σε φιστικέλαιο (g ελαίου/100 g ξηρού δείγματος) των κελυφωτών φιστικιών ποικιλίας «Αιγίνης» προερχόμενων από δύο διαδοχικά έτη συγκομιδής (2017, 2018).

Αριθμητική κωδικοποίηση	Απόδοση σε έλαιο (% w/w)
Έτος συγκομιδής 2017	
A ¹ -1	62,6±1,3 ³
A-2	62,5±3,3
A-3	61,2±2,2
A-4	61,5±1,7
A-5	60,1±3,0
A-6	60,2±0,3
A-7	64,1±2,2
A-8	64,8±2,4
A-9	62,5±10,7
A-10	60,0±1,1
A-11	59,7±4,4
A-12	63,5±4,4
A-13	68,2±5,1
A-14	66,7±1,0
A-15	60,3±1,9
Έτος συγκομιδής 2018	
B ² -1	63,2±2,5
B-2	57,5±6,8

B-3	60,0±5,9
B-4	57,7±5,3
B-5	61,5±4,8
B-6	62,4±1,1
B-7	60,7±6,4
B-8	61,2±9,2
B-9	60,3±5,5
B-10	59,0±2,9
B-11	64,8±18,4
B-12	60,9±4,9
B-13	62,2±1,8
B-14	61,9±0,8
B-15	57,4±9,0
B-16	60,4±1,6
B-17	63,3±2,0
B-18	62,0±0,6
B-19	59,9±9,3
B-20	58,4±3,0
B-21	59,7±2,6
B-22	59,3±4,3
B-23	59,9±0,2
B-24	60,1±3,1
B-25	55,6±7,1
B-26	53,8±11,9
B-27	52,5±7,2
B-28	58,1±6,8
B-29	57,1±3,6
B-30	55,7±2,0

¹A: έτος συγκομιδής 2017, ²B: έτος συγκομιδής 2018, ³Μέσος όρος±τυπική απόκλιση από τρεις μετρήσεις για κάθε δείγμα.

Η ελαιοπεριεκτικότητα είναι ένας παράγοντας που καθορίζει την ποιότητα του φυστικού καθώς στο έλαιο περιέχονται μονοακόρεστα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα

και λιποδιαλυτές βιταμίνες, ευεργετικά σε συγκεκριμένες ποσότητες για τον ανθρώπινο οργανισμό. Τυχόν μικρές διαφορές απόδοσης λιπιδικού περιεχομένου μπορούν να αποδοθούν σε διαφορές που σχετίζονται με την ποικιλία, τις καλλιεργητικές συνθήκες, το χρόνο συγκομιδής, κλιματικούς και γεωγραφικούς παράγοντες. Η χημική σύνθεση του φιστικελαίου μπορεί να επηρεαστεί από διάφορους παράγοντες όπως την ποικιλία, τις κλιματικές και αγρονομικές συνθήκες, την καλλιεργητική περίοδο και τις γεωργικές πρακτικές (Minioti & Georgiou, 2010· Yu et al., 2017). Υπάρχουν περιορισμένα στοιχεία στη βιβλιογραφία για το προφίλ ποιότητας του φιστικελαίου της κύριας ελληνικής ποικιλίας φιστικιών, «Αιγίνης».

Σύμφωνα με τους Arena, Campisi, Fallico και Maccarone (2007), σε μελέτη όπου προσδιορίστηκε η περιεκτικότητα σε ολικό έλαιο κελυφωτών φιστικιών από δυο περιοχές της Ιταλίας, από ελληνικά δείγματα καθώς και από φιστίκια που προέρχονταν από το Ιράν και την Τουρκία, ο μέσος όρος ολικού ελαίου στα ελληνικά φιστίκια ήταν 55,4% w/w. Οι Arena et al. (2007) υπολόγισαν ότι τα φιστίκια από το Ιράν είχαν τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε έλαιο της τάξης του 58% w/w, ενώ τα φιστίκια που προέρχονταν από δυο διαφορετικές περιοχές της Σικελίας εμφάνισαν διαφορά της τάξης του 7,6% w/w μεταξύ τους, με εκείνο που προερχόταν από νοτιότερη περιοχή να έχει τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι ίσως το θερμό κλίμα να σχετίζεται με την ελαιοπεριεκτικότητα στο συγκεκριμένο ξηρό καρπό. Μια ακόμη μελέτη των Satil, Azcan και Baser (2003), που αφορά κελυφωτά φιστίκια από την Τουρκία προερχόμενα από δυο ποικιλίες της γειτονικής χώρας, έδειξε ελαιοπεριεκτικότητα που κυμάνθηκε από 57% έως 62% w/w ανάλογα με την ποικιλία. Επιπλέον, βρέθηκε μέση τιμή ελαιοπεριεκτικότητας δειγμάτων κελυφωτών φιστικιών (*Pistacia vera* L.) καλλιεργημένων στην Τουρκία $59,7 \pm 1,8\%$ w/w που αντιστοιχούν σε πέντε διαφορετικές ποικιλίες (Yildiz, Gürcan, & Özdemir, 1998). Συμπεραίνουμε, λοιπόν, ότι η περιεκτικότητα σε έλαιο φιστικιών από την Ελλάδα δεν έχει σημαντικές διαφορές από αυτήν των φιστικιών της γειτονικής Τουρκίας. Συγκρίνοντας με τη μελέτη της Georgiadou et al. (2015), όπου μετρήθηκε η περιεκτικότητα σε έλαιο ίδιας ποικιλίας φιστικιών και βρέθηκε ότι κυμαίνεται μεταξύ 57,5% έως 62% w/w, τα αποτελέσματα συμπίπτουν με την παρούσα μελέτη. Τα αποτελέσματα φαίνεται να συμφωνούν και με τη μελέτη της ομάδας Martínez et al. (2016) όπου η μέση περιεκτικότητα λιπιδικού περιεχομένου των κελυφωτών φιστικιών κυμαινόταν γύρω στο 50% w/w.

Σύμφωνα με τους Bullo et al. (2015) τα κελυφωτά φιστίκια έχουν μικρότερο ποσοστό ολικού λιπιδικού περιεχομένου (45,4% w/w) σε σχέση με τα καρύδια των οποίων το έλαιο κυμαίνεται στο 65,2% w/w. Οι καρποί πεκάν και τα macadamia κυμαίνονται σε ποσοστά ολικού λίπους άνω του 70% w/w όταν αυτά είναι ωμά, τα φουντούκια στο 60,8% w/w, ενώ τα αμύγδαλα 49,9% w/w. Ωστόσο, σε σύγκριση με μια μελέτη των Vukajlonić et al. (2019) με έλαια που προέρχονται από διαφορετικούς ξηρούς καρπούς, τα φιστίκια φάνηκαν να έχουν υψηλότερη περιεκτικότητα σε έλαιο από τα καρύδια (60,5% w/w), τα φουντούκια (56,2% w/w) και τα αμύγδαλα (45,4% w/w).

B.3.2.1. Σύγκριση 15 δειγμάτων 2017 και 30 δειγμάτων 2018

Για το έτος συγκομιδής 2017 το ποσοστό φιστικελαίου κυμάνθηκε μεταξύ 59,7-68,2% w/w με μέση τιμή 62,5% w/w. Για το έτος συγκομιδής 2018 το ποσοστό φιστικελαίου κυμάνθηκε μεταξύ 52,5-64,8% w/w με μέση τιμή 59,6% w/w. Το t-test με SPSS έδειξε ότι τα 15 δείγματα φιστικελαίου του 2017 διέφεραν στατιστικά σημαντικά ($p\text{-value} \leq 0,05$) από τα 30 δείγματα φιστικελαίου του 2018. Η χαμηλή τιμή κανονικής συσχέτισης (canonical correlation=0,466) και η ανεβασμένη τιμή Wilks' lambda (Wilks' lambda=0,783) υποδήλωναν χαμηλή διακριτική ικανότητα της συνάρτησης. Η τιμή chi-square ήταν 10,384 που υποδήλωνε χαμηλή συσχέτιση των δύο ετών συγκομιδής. Το ποσοστό σωστής ταξινόμησης των δειγμάτων διασταυρούμενης επικύρωσης ήταν 71,1%.

B.3.2.2. Σύγκριση 11 δειγμάτων 2017 και 11 δειγμάτων 2018

Για το έτος συγκομιδής 2017 το ποσοστό φιστικελαίου κυμάνθηκε μεταξύ 59,7-64,8% w/w με μέση τιμή 61,7% w/w. Για το έτος συγκομιδής 2018 το ποσοστό φιστικελαίου κυμάνθηκε μεταξύ 57,5-64,8% w/w με μέση τιμή 60,8% w/w. Το t-test έδειξε ότι τα 11 δείγματα φιστικελαίου του 2017 δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά ($p\text{-value} > 0,05$) από τα 11 δείγματα φιστικελαίου του 2018. Η χαμηλή τιμή κανονικής συσχέτισης (canonical correlation=0,250) και η υψηλή τιμή Wilks' lambda (Wilks' lambda=0,937) υποδήλωναν κακή διακριτική ικανότητα της συνάρτησης. Η τιμή chi-square ήταν 1,261 και επειδή ήταν χαμηλή υποδήλωνε υψηλή συσχέτιση των δύο ετών συγκομιδής. Το ποσοστό σωστής ταξινόμησης των δειγμάτων διασταυρούμενης επικύρωσης ήταν 59,1%.

B.3.3. Συμπεράσματα

Αναφερόμενοι στη σύγκριση των 15 δειγμάτων του 2017 με τα 30 δείγματα του 2018 υπήρξε διαφοροποίηση ($p\text{-value} \leq 0,05$) στην περιεκτικότητα του φιστικελαίου μεταξύ των δύο ετών συγκομιδής. Ωστόσο η διακριτική ικανότητα της συνάρτησης ήταν χαμηλή. Εξίσου χαμηλό ήταν και το ποσοστό σωστής ταξινόμησης των δειγμάτων (71,1%). Συγκρίνοντας τα 11 δείγματα του 2017 με τα 11 δείγματα του 2018 φάνηκε υψηλή συσχέτιση των δύο ετών συγκομιδής και αδυναμία διαφοροποίησης ($p\text{-value} > 0,05$) των φιστικελαίων. Η ικανότητα της συνάρτησης διάκρισης μπορεί να χαρακτηριστεί ως χαμηλή.

B.4. Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας φιστικελαίου - Ανάπτυξη χημειομετρικών μοντέλων διαφοροποίησης των δειγμάτων ανάλογα με τη δοκιμή (DPPH, ABTS) και με το έτος συγκομιδής

Στο παρόν κεφάλαιο περιγράφεται ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας των φιστικελαίων μέσω δύο δοκιμών (DPPH και ABTS). Για κάθε δοκιμή ξεχωριστά αναλύεται η πειραματική πορεία και ακολουθεί σύγκριση των 15(2017)-30(2018) και των 11(2017)-11(2018) δειγμάτων με σκοπό την ανάπτυξη χημειομετρικών μοντέλων για τη διαφοροποίηση των φιστικελαίων βάσει της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας και ανάλογα με το έτος συγκομιδής τους.

B.4.1. Δοκιμή DPPH

B.4.1.1. Πειραματική διαδικασία

Η αντιοξειδωτική ικανότητα του φιστικελαίου με τη δοκιμή DPPH προσδιορίστηκε σύμφωνα με τους Minioti και Georgiou (2010) με μερικές τροποποιήσεις χρησιμοποιώντας ένα φασματοφωτόμετρο JASCO V-550 (JASCO Corporation, Tokyo, Japan). Εν συντομία, αναμείχθηκαν 100 μL φιστικελαίου με 4 mL διαλύματος εργασίας DPPH \cdot ($8,1 \times 10^{-5}$ M DPPH \cdot σε οξικό αιθυλεστέρα). Το μείγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε έντονα για λίγα δευτερόλεπτα και διατηρήθηκε σε σκοτεινό μέρος για 30 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Οι απορροφήσεις μετρήθηκαν στα 515 nm έναντι του τυφλού (100 μL οξικού αιθυλεστέρα αντί για φιστικέλαιο). Τα αντιοξειδωτικά συστατικά του φιστικελαίου ανάγουν τη ρίζα DPPH, με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του μοβ διαλύματος DPPH \cdot . Οι μετρήσεις εκτελέστηκαν εις τριπλούν.

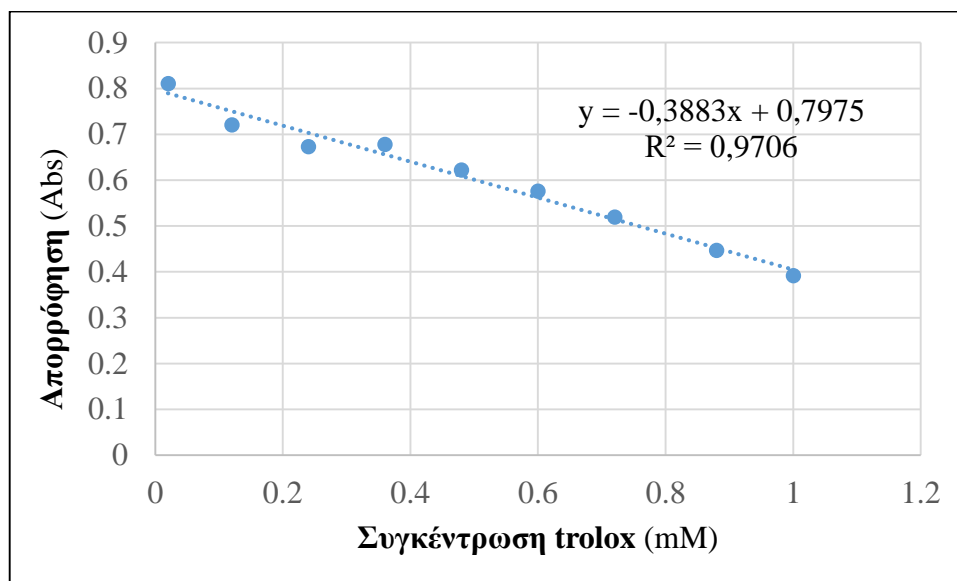
Το ποσοστό παρεμποδιστικής δράσης υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας την Εξίσωση B.4.1.1.1:

$$\% \text{ παρεμποδιστικής δράσης} = \frac{A_{515 \text{ τυφλό}} - A_{515 \text{ δείγμα}}}{A_{515 \text{ τυφλό}}} \times 100 \text{ (Εξίσωση B.4.1.1.1)}$$

Η αντιοξειδωτική ικανότητα εκφράστηκε σε ισοδύναμα Trolox (mmol/L) ανά mL φιστικελαίου και υπολογίστηκε για κάθε δείγμα σε τριπλέτα από την καμπύλη

βαθμονόμησης (Σχήμα B.4.1.1.1) που κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας το Trolox ως εξωτερικό πρότυπο. Η εξίσωση της καμπύλης βαθμονόμησης Trolox που χρησιμοποιήθηκε για να μετασχηματιστούν οι απορροφήσεις σε ισοδύναμα Trolox ήταν η Εξίσωση B.4.1.1.2.

$$A_{\text{DPPH}} = [(-0,388) \times \text{Ισοδύναμα Trolox}] + 0,797, R^2=0,971 \text{ (Εξίσωση B.4.1.1.2)}$$



Σχήμα B.4.1.1.1. Καμπύλη βαθμονόμησης διαλυμάτων Trolox για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη δοκιμή DPPH.

Η στατιστική ανάλυση με σκοπό την ανάπτυξη χημειομετρικού μοντέλου διαφοροποίησης των φιστικελαίων σε σχέση με το έτος συγκομιδής (2017, 2018) πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό SPSS και την τεχνική διασταυρούμενης επικύρωσης (όπως αυτή περιγράφεται στο κεφάλαιο B.7).

B.4.1.2. Αποτελέσματα-Συζήτηση

Ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση των τριών επαναλήψεων της αντιοξειδωτικής ικανότητας και το ποσοστό της παρεμποδιστικής δράσης των δειγμάτων φιστικελαίου, σύμφωνα με τη δοκιμή DPPH, φαίνονται στον Πίνακα B.4.1.2.1.

Πίνακας Β.4.1.2.1. Η αντιοξειδωτική ικανότητα και η παρεμποδιστική δράση των φιστικελαίων προσδιορισμένες με τη δοκιμή DPPH.

Αριθμητική κωδικοποίηση	Αντιοξειδωτική ικανότητα (mM ισοδύναμων Trolox ανά mL φιστικελαίου)	Παρεμποδιστική δράση (%)
Έτος συγκομιδής 2017		
A ¹ -1	6,45±0,71 ³	41,8±2,9
A-2	6,35±0,69	44,3±2,7
A-3	5,62±0,78	41,4±3,1
A-4	3,82±2,02	34,9±4,9
A-5	5,95±0,43	39,7±1,8
A-6	3,21±1,44	28,8±3,1
A-7	6,70±1,45	39,0±3,6
A-8	3,59±1,59	31,5±4,4
A-9	6,45±0,27	39,4±1,2
A-10	4,96±0,54	37,1±2,2
A-11	4,68±0,80	35,3±3,3
A-12	6,05±0,37	37,7±1,6
A-13	3,11±0,54	32,2±2,1
A-14	3,17±1,27	32,4±4,9
A-15	5,36±1,27	37,8±5,1
Έτος συγκομιδής 2018		
B ² -1	6,49±1,14	40,4±4,8
B-2	1,99±0,61	40,5±2,0
B-3	8,44±0,68	47,9±2,9
B-4	4,83±1,35	34,1±1,7
B-5	0,28±0,13	32,0±2,3
B-6	6,47±0,97	24,1±5,2
B-7	5,34±0,21	35,5±0,9
B-8	6,04±1,32	40,3±5,5
B-9	0,10±0,00	31,9±1,3
B-10	5,84±1,33	38,8±5,5
B-11	7,65±1,51	44,1±5,7

B-12	2,12±1,21	39,3±4,0
B-13	7,92±0,87	38,0±4,3
B-14	7,10±0,50	42,7±2,1
B-15	5,86±0,27	40,2±1,1
B-16	5,30±0,44	34,8±1,9
B-17	7,47±0,57	38,4±2,7
B-18	6,70±1,23	41,4±5,2
B-19	5,69±0,04	36,2±0,2
B-20	5,51±0,48	36,8±2,0
B-21	3,80±0,38	29,0±1,6
B-22	6,67±0,94	40,3±4,0
B-23	7,35±0,98	38,5±4,6
B-24	7,45±0,96	43,2±4,2
B-25	1,35±0,29	36,6±1,0
B-26	1,40±0,99	36,5±3,3
B-27	5,82±1,06	36,1±4,6
B-28	10,28±0,57	52,3±2,7
B-29	7,34±1,33	43,0±5,7
B-30	8,43±0,24	45,6±1,7

¹A: έτος συγκομιδής 2017, ²B: έτος συγκομιδής 2018, ³Μέσος όρος±τυπική απόκλιση από τρεις μετρήσεις για κάθε δείγμα.

Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας του συνόλου των δειγμάτων μέσω της δοκιμής DPPH έδωσε για το έτος συγκομιδής 2017 μέσο όρο 5,03 mM ισοδύναμων Trolox ανά mL φιστικελαίου που αντιστοιχεί σε 5590 mM ισοδύναμων Trolox ανά kg φιστικελαίου και για το έτος συγκομιδής 2018 κατά μέσο όρο 5,57 mM ισοδύναμων Trolox ανά mL φιστικελαίου που αντιστοιχεί σε 6188 mM ισοδύναμων Trolox ανά kg φιστικελαίου. Για το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο, η αντιοξειδωτική ικανότητα προσδιοριζόμενη από τη δοκιμή DPPH κυμάνθηκε μεταξύ 77 και 177 mM γαλλικού οξέος ανά kg φιστικελαίου (Minioti & Georgiou, 2010).

B.4.1.2.1. Σύγκριση 15 δειγμάτων 2017 και 30 δειγμάτων 2018

Η αντιοξειδωτική ικανότητα, όπως προσδιορίστηκε με τη δοκιμή DPPH, κυμαινόταν μεταξύ 3,11-6,70 mM με μέση τιμή $5,03 \pm 1,30$ mM ισοδύναμων Trolox ανά mL φιστικελαίου και μεταξύ 0,10-10,28 mM με μέση τιμή $5,57 \pm 2,56$ mM ισοδύναμων Trolox ανά mL φιστικελαίου, για τα δείγματα του 2017 και του 2018, αντίστοιχα. Το ποσοστό παρεμποδιστικής δράσης κυμάνθηκε μεταξύ 28,8%-44,3% και 24,1%-52,3% για τα δείγματα του 2017 και του 2018, με μέσους όρους $36,9 \pm 4,3\%$ και $38,6 \pm 5,6\%$, αντίστοιχα.

Το Levene's test εξέτασε την ισότητα των μέσων όρων 2017 και 2018 για την αντιοξειδωτική ικανότητα και το ποσοστό παρεμποδιστικής δράσης. $P\text{-value} > 0.05$ απέδειξε ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα (Wilks' lambda=0,984) και το ποσοστό παρεμποδιστικής δράσης (Wilks' lambda=0,975) δε διέφεραν μεταξύ των δύο ετών συγκομιδής. Τα δείγματα ταξινομήθηκαν ορθά κατά 65,1%, σύμφωνα με την αντιοξειδωτική ικανότητα και κατά 62,2%, σύμφωνα με την παρεμποδιστική δράση.

B.4.1.2.2. Σύγκριση 11 δειγμάτων 2017 και 11 δειγμάτων 2018

Η αντιοξειδωτική ικανότητα, όπως προσδιορίστηκε με τη δοκιμή DPPH, κυμαινόταν μεταξύ 3,21-6,45 mM με μέση τιμή $5,25 \pm 1,27$ mM ισοδύναμων Trolox ανά mL φιστικελαίου και μεταξύ 0,10-8,44 mM με μέση τιμή $4,86 \pm 2,83$ mM ισοδύναμων Trolox ανά mL φιστικελαίου, για τα δείγματα του 2017 και του 2018, αντίστοιχα. Το ποσοστό παρεμποδιστικής δράσης κυμάνθηκε μεταξύ 28,8%-44,3% και 24,1%-47,9% για τα δείγματα του 2017 και του 2018, με μέσους όρους $37,6 \pm 4,6\%$ και $37,2 \pm 6,6\%$, αντίστοιχα.

Το Levene's test εξέτασε την ισότητα των μέσων όρων 2017 και 2018 για την αντιοξειδωτική ικανότητα και το ποσοστό παρεμποδιστικής δράσης. $P\text{-value} > 0.05$ απέδειξε ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα (Wilks' lambda=0,998) και το ποσοστό παρεμποδιστικής δράσης (Wilks' lambda=0,999) δε διέφεραν μεταξύ των δύο ετών συγκομιδής. Τα δείγματα ταξινομήθηκαν ορθά κατά 33,3%, σύμφωνα με την αντιοξειδωτική ικανότητα και κατά 22,7%, σύμφωνα με την παρεμποδιστική δράση.

B.4.2. Δοκιμή ABTS

B.4.2.1. Πειραματική διαδικασία

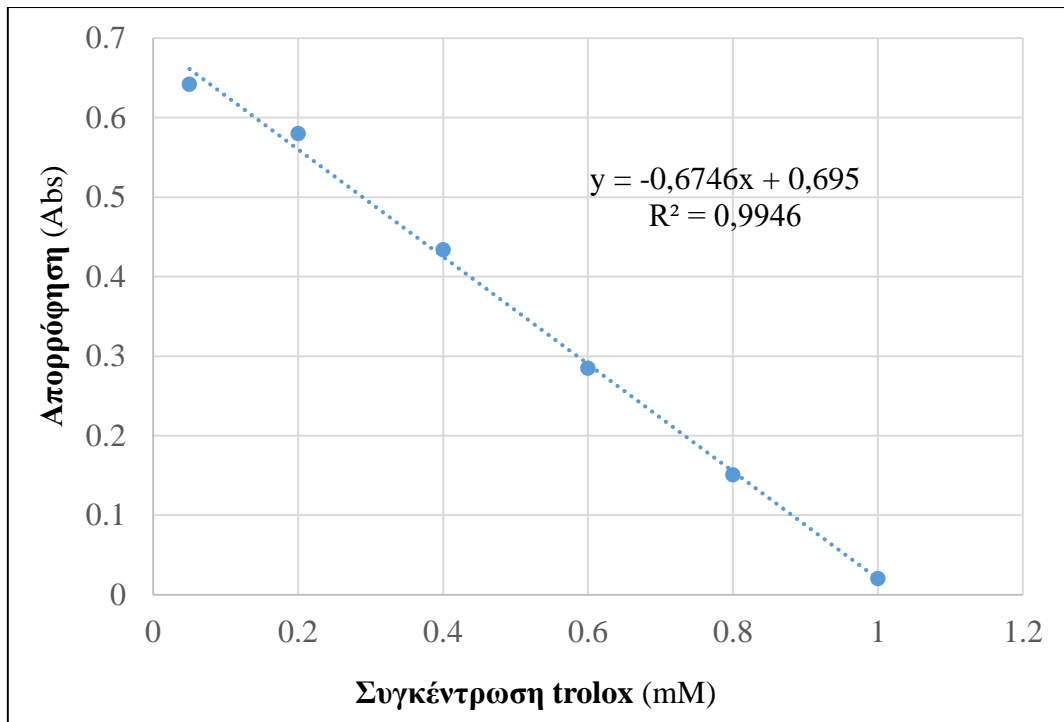
Η δοκιμή ABTS τροποποιήθηκε ελαφρώς, βασισμένη στις μεθόδους των Rajaei et al. (2010) και Torres-Martínez et al. (2017), χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο Agilent 8453. Συγκεκριμένα, 96 mg ABTS αραιώθηκαν με απιονισμένο H₂O σε ογκομετρική φιάλη των 25 mL και προστέθηκαν 440 μL διαλύματος K₂S₂O₈ (0,14 M σε απιονισμένο H₂O). Το μείγμα διατηρήθηκε για 18 h, προστατευμένο από φως, σε θερμοκρασία δωματίου για σταθεροποίηση της οξειδωσης ABTS^{·+}. Πριν από περαιτέρω χρήση, το διάλυμα ABTS^{·+} αραιώθηκε με EtOH, έως ότου η απορρόφηση αποκτήσει τιμή 0,7±0,005 (διάλυμα εργασίας). Η αντιοξειδωτική ικανότητα αξιολογήθηκε υπολογίζοντας την παρεμποδιστική δράση 100 μL φιστικελαιίου, αναμειγμένο με 2 mL διάλυμα εργασίας ABTS^{·+}, ακολουθούμενο από ανακίνηση και επώαση στο σκοτάδι, για 6 min σε θερμοκρασία δωματίου. Η μείωση της απορρόφησης μετρήθηκε στη συνέχεια στα 734 nm έναντι ενός τυφλού διαλύματος (100 μL EtOH). Όλες οι μετρήσεις έγιναν εις τριπλούν.

Το ποσοστό παρεμποδιστικής δράσης υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας την Εξίσωση B.4.2.1.1:

$$\% \text{ παρεμποδιστικής δράσης} = \frac{A_{734 \text{ τυφλό}} - A_{734 \text{ δείγμα}}}{A_{734 \text{ τυφλό}}} \times 100 \text{ (Εξίσωση B.4.2.1.1)}$$

Η αντιοξειδωτική ικανότητα εκφράστηκε σε ισοδύναμα Trolox (mmol/L) ανά mL φιστικελαιίου και υπολογίστηκε για κάθε δείγμα εις τριπλούν από την καμπύλη βαθμονόμησης (Σχήμα B.4.2.1.1) που κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας το Trolox ως εξωτερικό πρότυπο. Η εξίσωση της καμπύλης βαθμονόμησης Trolox που χρησιμοποιήθηκε για να μετασχηματιστούν οι απορροφήσεις σε ισοδύναμα Trolox ήταν η Εξίσωση B.4.2.1.2.

$$A_{\text{ABTS}} = [(-0,675) \times \text{Ισοδύναμα Trolox}] + 0,695, R^2=0,995 \text{ (Εξίσωση B.4.2.1.2)}$$



Σχήμα B.4.2.1.1. Καμπύλη βαθμονόμησης διαλυμάτων Trolox για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη δοκιμή ABTS.

Η στατιστική ανάλυση με σκοπό την ανάπτυξη χημειομετρικού μοντέλου διαφοροποίησης των φιστικελαίων σε σχέση με το έτος συγκομιδής (2017, 2018) πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό SPSS και την τεχνική διασταυρούμενης επικύρωσης (όπως αυτή περιγράφεται στο κεφάλαιο A.1.7).

B.4.2.2. Αποτελέσματα-Συζήτηση

Ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση των τριών επαναλήψεων της αντιοξειδωτικής ικανότητας και το ποσοστό παρεμποδιστικής δράσης των δειγμάτων φιστικελαίου, σύμφωνα με τη δοκιμή ABTS, φαίνονται στον Πίνακα B.4.2.2.1.

Πίνακας Β.4.2.2.1. Η αντιοξειδωτική ικανότητα και το ποσοστό παρεμποδιστικής δράσης των φιστικελαίων προσδιορισμένα με τη δοκιμή ABTS.

Αριθμητική κωδικοποίηση	Αντιοξειδωτική ικανότητα (mM ισοδύναμων Trolox ανά mL φιστικελαίου)	Παρεμποδιστική δράση (%)
Έτος συγκομιδής 2017		
A ¹ -1	8,63±0,54 ³	82,9±5,5
A-2	8,60±1,44	85,0±1,3
A-3	7,44±2,01	74,7±8,8
A-4	5,46±2,67	48,5±2,8
A-5	9,32±0,35	90,0±3,6
A-6	9,44±0,27	90,8±2,9
A-7	5,02±1,36	42,5±3,6
A-8	10,02±0,08	97,3±0,8
A-9	9,02±0,86	88,7±7,6
A-10	7,85±0,80	73,3±8,7
A-11	8,73±0,65	81,9±7,4
A-12	7,10±1,95	68,1±6,0
A-13	9,45±0,26	91,8±2,5
A-14	4,92±0,10	45,3±0,2
A-15	9,01±0,19	85,2±2,1
Έτος συγκομιδής 2018		
B ² -1	8,58±0,80	84,0±7,4
B-2	7,99±1,37	74,9±4,4
B-3	8,61±0,24	82,1±2,6
B-4	8,38±0,35	77,1±4,2
B-5	9,61±0,54	92,0±6,3
B-6	8,58±1,10	81,6±2,2
B-7	8,76±0,82	80,7±0,7
B-8	6,78±0,12	61,8±1,3
B-9	9,22±0,42	87,0±5,0
B-10	9,80±0,13	94,0±1,5
B-11	8,47±0,54	77,2±6,7

B-12	9,63±0,50	82,3±7,0
B-13	8,23±1,39	76,3±1,6
B-14	8,91±0,33	83,7±3,9
B-15	9,46±0,59	90,3±6,8
B-16	7,71±0,68	66,4±8,9
B-17	8,27±1,45	75,9±1,5
B-18	8,72±0,26	86,1±2,3
B-19	7,96±1,99	73,6±1,2
B-20	7,07±0,13	64,4±1,4
B-21	9,49±0,45	91,1±4,9
B-22	9,22±0,63	88,1±6,9
B-23	8,98±0,71	85,8±7,6
B-24	9,63±0,50	94,2±4,4
B-25	9,83±0,40	94,1±5,0
B-26	8,28±1,18	74,2±1,7
B-27	10,00±0,06	96,6±0,7
B-28	9,95±0,16	96,3±1,6
B-29	9,87±0,06	95,4±0,6
B-30	9,16±1,01	88,2±2,2

¹A: έτος συγκομιδής 2017, ²B: έτος συγκομιδής 2018, ³Μέσος όρος±τυπική απόκλιση από τρεις μετρήσεις για κάθε δείγμα.

Βάσει των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης, ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας του συνόλου των δειγμάτων μέσω της δοκιμής ABTS έδωσε για το έτος συγκομιδής 2017 μέσο όρο 8,00 mM ισοδύναμων Trolox ανά mL φιστικελαίου που αντιστοιχεί σε 8890 mM ισοδύναμων Trolox ανά kg φιστικελαίου και για το έτος συγκομιδής 2018 κατά μέσο όρο 8,84 mM ισοδύναμων Trolox ανά mL φιστικελαίου που αντιστοιχεί σε 9820 mM ισοδύναμων Trolox ανά kg φιστικελαίου. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολικών εκχυλισμάτων του εξαιρετικού παρθένου ελαιόλαδου προσδιοριζόμενη από τη δοκιμή ABTS κυμάνθηκε μεταξύ 17,9 και 36,4 ισοδύναμων Trolox (Loizzo, Di Lecce, Boselli, Menichini, & Frega, 2012).

B.4.2.2.1. Σύγκριση 15 δειγμάτων 2017 και 30 δειγμάτων 2018

Η αντιοξειδωτική ικανότητα, όπως προσδιορίστηκε με τη δοκιμή ABTS, κυμαινόταν μεταξύ 4,92-10,02 mM με μέση τιμή $8,00 \pm 1,68$ mM ισοδύναμων Trolox ανά mL φιστικελαίου και μεταξύ 6,78-10,00 mM με μέση τιμή $8,84 \pm 0,84$ mM ισοδύναμων Trolox ανά mL φιστικελαίου, για τα δείγματα του 2017 και του 2018, αντίστοιχα. Το ποσοστό παρεμποδιστικής δράσης κυμάνθηκε μεταξύ 42,5%-97,3% και 61,8%-96,6% για τα δείγματα του 2017 και του 2018, με μέσους όρους $76,4 \pm 17,8\%$ και $83,2 \pm 9,6\%$, αντίστοιχα.

Το Levene's test εξέτασε την ισότητα των μέσων όρων 2017 και 2018 για την αντιοξειδωτική ικανότητα και το ποσοστό παρεμποδιστικής δράσης. $P\text{-value} < 0.05$ απέδειξε ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα (Wilks' lambda=0,895) και το ποσοστό παρεμποδιστικής δράσης (Wilks' lambda=0,939) διέφεραν μεταξύ των δύο ετών συγκομιδής. Ωστόσο, οι υψηλές τιμές Wilks' lambda έδειξαν ότι η διακριτική ικανότητα της συνάρτησης ήταν χαμηλή. Από τα δεδομένα διασταυρούμενης επικύρωσης, το 71,1% της αντιοξειδωτικής ικανότητας και το 68,9% του ποσοστού παρεμποδιστικής δράσης ταξινομήθηκαν σωστά.

B.4.2.2.2. Σύγκριση 11 δειγμάτων 2017 και 11 δειγμάτων 2018

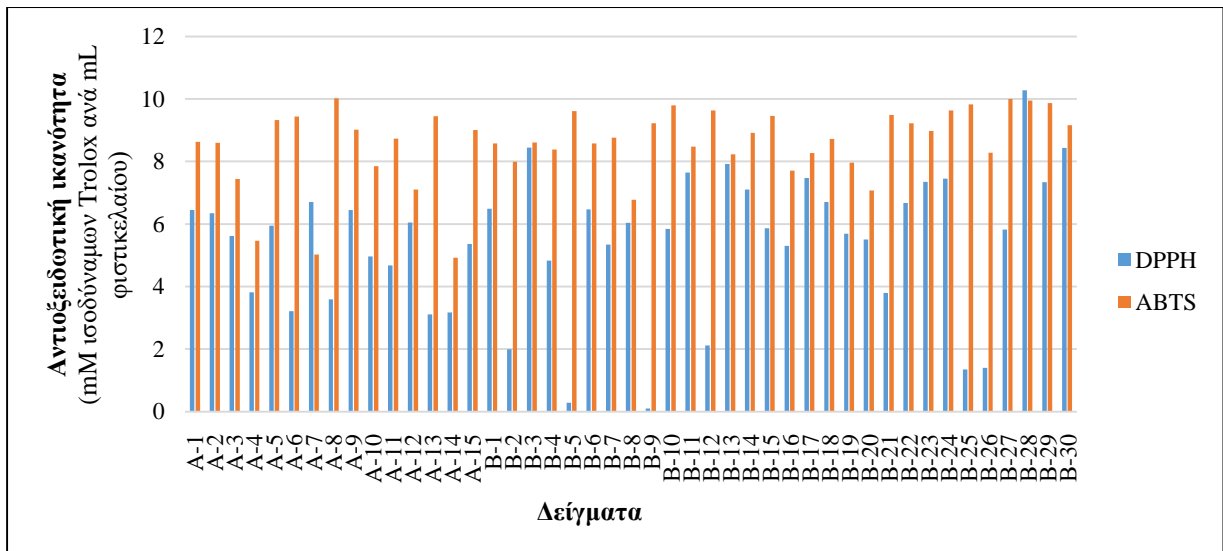
Η αντιοξειδωτική ικανότητα, όπως προσδιορίστηκε με τη δοκιμή ABTS, κυμαινόταν μεταξύ 5,02-10,02 mM με μέση τιμή $8,14 \pm 1,60$ mM ισοδύναμων Trolox ανά mL φιστικελαίου και μεταξύ 6,78-9,80 mM με μέση τιμή $8,62 \pm 0,81$ mM ισοδύναμων Trolox ανά mL φιστικελαίου, για τα δείγματα του 2017 και του 2018, αντίστοιχα. Το ποσοστό παρεμποδιστικής δράσης κυμάνθηκε μεταξύ 42,5%-97,3% και 61,8%-94,0% για τα δείγματα του 2017 και του 2018, με μέσους όρους $77,8 \pm 17,4\%$ και $81,1 \pm 8,8\%$, αντίστοιχα.

Το Levene's test εξέτασε την ισότητα των μέσων όρων 2017 και 2018 για την αντιοξειδωτική ικανότητα και το ποσοστό παρεμποδιστικής δράσης. $P\text{-value} > 0.05$ απέδειξε ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα (Wilks' lambda=0,963) και το ποσοστό παρεμποδιστικής δράσης (Wilks' lambda=0,984) δε διέφεραν μεταξύ των δύο ετών συγκομιδής. Από τα δεδομένα διασταυρούμενης επικύρωσης, το 54,5% της αντιοξειδωτικής ικανότητας και το 45,5% του ποσοστού παρεμποδιστικής δράσης ταξινομήθηκαν σωστά.

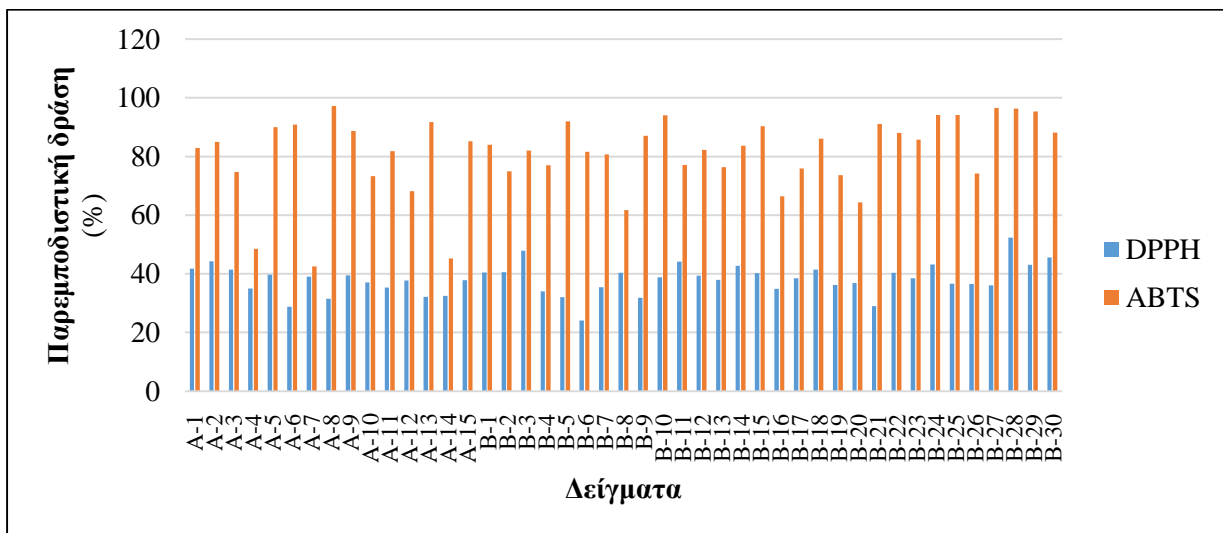
B.4.3. Συμπεράσματα

Αναφερόμενοι στις δοκιμές DPPH και ABTS προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας και του ποσοστού της παρεμποδιστικής δράσης, τόσο η σύγκριση των 15 δειγμάτων του 2017 με τα 30 δείγματα του 2018 όσο και η σύγκριση των 11 δειγμάτων του 2017 με τα 11 δείγματα του 2018 έδειξαν αδυναμία διαφοροποίησης ($p\text{-value}>0,05$) των φιστικελαίων μεταξύ των δύο ετών συγκομιδής, με εξαίρεση τη δοκιμή ABTS για τα 15 δείγματα του 2017 σε σχέση με τα 30 δείγματα του 2018 ($p\text{-value}\leq 0,05$). Ωστόσο, και σ' αυτή την περίπτωση οι υψηλές τιμές Wilks' lambda έδειχναν ότι η μεταβλητή δεν προσέφερε ένα αρκετά ισχυρό μοντέλο διάκρισης. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τα σχετικά χαμηλά ποσοστά σωστής ταξινόμησης των δεδομένων διασταυρούμενης επικύρωσης (71,1% των δειγμάτων με βάση την αντιοξειδωτική ικανότητα και 68,9% με βάση το ποσοστό της παρεμποδιστικής δράσης).

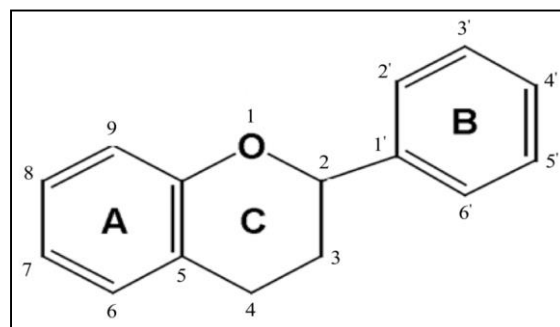
Τα αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής ικανότητας του φιστικελαίου, και για τις δύο δοκιμές, διέφεραν σημαντικά σε σχέση με τα αποτελέσματα της βιβλιογραφίας για το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο. Το φιστικέλαιο παρουσίασε μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο. Επιπρόσθετα, τα αποτελέσματα από τη δοκιμή ABTS βρέθηκαν σταθερά υψηλότερα από αυτά του DPPH (με εξαίρεση το δείγμα B-28 για την αντιοξειδωτική ικανότητα) και στα δύο έτη συγκομιδής (Σχήματα B.4.3.1 και B.4.3.2). Αυτό οφειλόταν στο ότι το DPPH· είναι πιο επιλεκτικό από το ABTS⁺⁺ σε υδρόφοβα συστήματα (Kim et al., 2002· Floegel et al., 2011). Σε αντίθεση με το ABTS⁺⁺, το DPPH· δεν αντιδρά με φλαβονοειδή, τα οποία δε φέρουν υδροξυλομάδα στον Β αρωματικό δακτύλιο (Σχήμα B.4.3.3), και με αρωματικά οξέα που περιέχουν μόνο μια υδροξυλομάδα (Roginsky & Lissi, 2005). Σε συμφωνία έρχονται και τα αποτελέσματα των Christodouleas, Fotakis, Nikokavoura, Papadopoulos και Calokerinos (2014), κατά τη σύγκριση των αποτελεσμάτων της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τις δοκιμές DPPH και ABTS, όπου στα έλαια εμφανίστηκαν υψηλότερες τιμές στη δοκιμή ABTS σε σύγκριση με τη δοκιμή DPPH.



Σχήμα B.4.3.1. Σύγκριση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δοκιμών DPPH και ABTS.



Σχήμα B.4.3.2. Σύγκριση του ποσοστού παρεμποδιστικής δράσης των δοκιμών DPPH και ABTS.



Σχήμα B.4.3.3. Γενική δομή φλαβονοειδών.

B.5. Προσδιορισμός πολικών φαινολών με τη δοκιμή Folin-Ciocalteu - Ανάπτυξη χημειομετρικού μοντέλου διαφοροποίησης των δειγμάτων ανάλογα με το έτος συγκομιδής

Στο παρόν κεφάλαιο περιγράφεται ο προσδιορισμός των πολικών φαινολών των φιστικελαίων μέσω της δοκιμής Folin-Ciocalteu. Την πειραματική πορεία ακολουθεί η σύγκριση των 15(2017)-30(2018) και των 11(2017)-11(2018) δειγμάτων με σκοπό την ανάπτυξη χημειομετρικού μοντέλου για τη διαφοροποίηση των φιστικελαίων βάσει των πολικών φαινολών τους και ανάλογα με το έτος συγκομιδής τους.

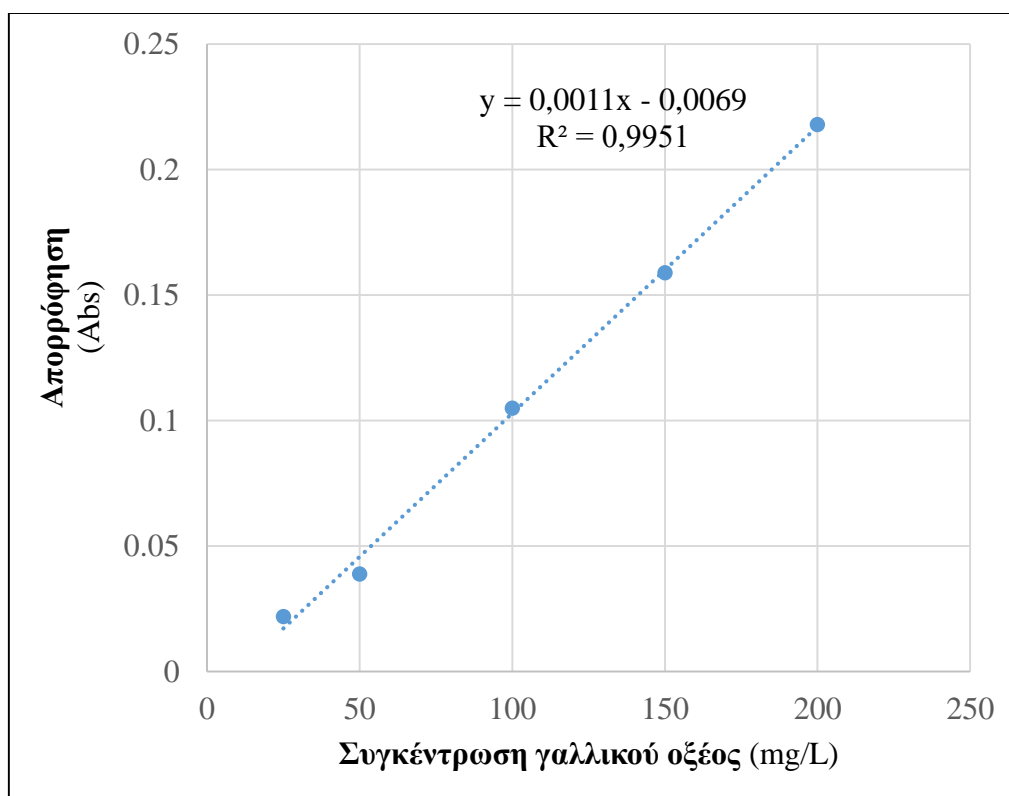
B.5.1. Πειραματική διαδικασία

Σε διαχωριστική χοάνη προστέθηκαν 0,5 mL φιστικελαίου και 2,5 mL εξανίου. Ακολούθησαν τρεις διαδοχικές εκχυλίσσεις με διάλυμα $\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$ 8:2 v/v (1 mL/φορά x 3 φορές = 3 mL υδρομεθανολικού διαλύματος). Κάθε φορά γινόταν έντονη ανακίνηση για 2 min σε Vortex. Έπειτα, απομονώθηκε η πολική φάση (κάτω φάση), ενώ απομακρύνθηκε η οργανική στοιβάδα (άνω φάση). Ακολούθησε ο χρωματομετρικός προσδιορισμός των πολικών φαινολών. Συγκεκριμένα, μεταφέρθηκαν 50 μL του παραπάνω υδρομεθανολικού εκχυλίσματος σε ογκομετρική φιάλη των 5 mL. Προστέθηκαν 2,5 mL απιονισμένου νερού και 0,25 mL αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu και αναδεύτηκαν ισχυρά με χρήση της συσκευής Vortex. Ακριβώς 3 min μετά, προστέθηκαν 0,5 mL κορεσμένου διαλύματος Na_2CO_3 (20% m/v). Το μείγμα αναδεύτηκε σε Vortex και συμπληρώθηκε με απιονισμένο H_2O μέχρι τη χαραγή. Μετά από παραμονή στο σκοτάδι για 2 h καταγράφηκε με φασματοφωτόμετρο (TECAN, Infinite M200PRO) η απορρόφηση στα 725 nm με χρήση ειδικών κυψελίδων (Corning UV 96 flat transparent microplate). Ο μηδενισμός της απορρόφησης έγινε με απιονισμένο H_2O . Εκτελέστηκαν τρεις προσδιορισμοί για κάθε δείγμα και λήφθηκε ο μέσος όρος (Ojeda-Amador et al., 2018).

Η καμπύλη βαθμονόμησης (Σχήμα B.5.1.1) κατασκευάστηκε με χρήση πρότυπων διαλυμάτων γαλλικού οξέος (Εξίσωση B.5.1.1). Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε μείγμα $\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$ 8:2 v/v. Στη συνέχεια, ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως και με τα δείγματα. Το περιεχόμενο των πολικών φαινολών των φιστικελαίων προσδιορίστηκε από την καμπύλη βαθμονόμησης. Αρχικά, οι πολικές

φαινόλες υπολογίστηκαν σε mg γαλλικού οξέος ανά L φιστικελαίου και στη συνέχεια, σε ισοδύναμα mg γαλλικού οξέος (gallic acid equivalents, GAE) ανά kg φιστικελαίου.

$$A_{\text{Folin-Ciocalteu}} = (0,0011 \times \text{GAE}) - 0,0069, R^2=0,9951 \text{ (Εξίσωση B.5.1.1)}$$



Σχήμα B.5.1.1. Καμπύλη βαθμονόμησης πρότυπων διαλυμάτων γαλλικού οξέος για τον προσδιορισμό των πολικών φαινολών με τη δοκιμή Folin-Ciocalteau.

Η στατιστική ανάλυση με σκοπό την ανάπτυξη χημειομετρικού μοντέλου διαφοροποίησης των φιστικελαίων σε σχέση με το έτος συγκομιδής (2017, 2018) πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό SPSS και την τεχνική διασταυρούμενης επικύρωσης (όπως αυτή περιγράφεται στο κεφάλαιο A.1.7).

B.5.2. Αποτελέσματα-Συζήτηση

Ο μέσος όρος των πολικών φαινολών των δειγμάτων φιστικελαίου, όπως μετρήθηκε με τη δοκιμή Folin-Ciocalteu, φαίνεται στον Πίνακα B.5.2.1.

Πίνακας Β.5.2.1. Πολικές φαινόλες φιστικελαίων σύμφωνα με τη δοκιμή Folin-Ciocalteu.

Αριθμητική κωδικοποίηση	Περιεχόμενο πολικών φαινολών (ισοδύναμα mg γαλλικού οξέος ανά kg φιστικελαίου)
Έτος συγκομιδής 2017	
A ¹ -1	40,68±1,17 ³
A-2	21,80±1,10
A-3	24,89±1,04
A-4	51,52±1,12
A-5	25,52±1,17
A-6	60,11±1,14
A-7	38,85±1,08
A-8	13,87±1,17
A-9	36,92±1,12
A-10	15,94±1,07
A-11	15,28±1,10
A-12	20,56±1,03
A-13	18,77±1,18
A-14	19,08±1,07
A-15	24,61±1,07
Έτος συγκομιδής 2018	
B ² -1	38,58±1,15
B-2	22,46±1,13
B-3	26,76±1,31
B-4	50,40±1,35
B-5	24,61±1,50
B-6	57,92±1,30
B-7	39,65±1,56
B-8	12,79±1,43
B-9	13,86±1,25
B-10	17,09±1,25
B-11	16,01±1,15

B-12	19,41±1,23
B-13	21,38±1,24
B-14	19,23±1,61
B-15	36,43±1,43
B-16	20,03±1,31
B-17	49,32±3,00
B-18	20,31±1,20
B-19	14,52±1,21
B-20	11,71±1,25
B-21	18,16±1,62
B-22	35,35±1,24
B-23	23,53±1,24
B-24	25,68±1,10
B-25	14,94±1,20
B-26	15,28±1,33
B-27	48,25±1,38
B-28	37,50±1,26
B-29	34,28±1,23
B-30	14,94±1,59

¹A: έτος συγκομιδής 2017, ²B: έτος συγκομιδής 2018, ³Μέσος όρος±τυπική απόκλιση από τρεις μετρήσεις για κάθε δείγμα.

Σύμφωνα με δημοσιευμένα αποτελέσματα έχει βρεθεί υψηλό ολικό φαινολικό περιεχόμενο (total phenolic content, TPC) στον πυρήνα των κελυφωτών φιστικιών (6023-9550 mg γαλλικού οξέος/kg ξηρού δείγματος) (Kornsteiner, Wagner, & Elmadfa, 2006· Martínez et al., 2016). Ο προσδιορισμός TPC σε έλαια χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu είναι μια απλή και χαμηλού κόστους μέθοδος. Οι Reboredo-Rodríguez et al. (2016) επιβεβαίωσαν ότι είναι μια κατάλληλη μέθοδος, ικανή να εγγυηθεί το σωστό ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό της φαινολικής περιεκτικότητας των εξαιρετικών παρθένων ελαιόλαδων. Από τους Ajal et al. (2021) υπολογίστηκαν 116-373 mg γαλλικού οξέος/kg ελαιόλαδου της Κορωνέικης ποικιλίας, ενώ οι Tanılğana, Özcanb και Ünver (2007) υπολόγισαν 22,5-97,1 mg γαλλικού οξέος/kg ελαιόλαδου από διάφορες τούρκικες ποικιλίες. Οι Sena-Moreno et al. (2015) ανέφεραν τιμή TPC για το παρθένο φιστικέλαιο Λάρνακας 25 mg

καφεϊκού οξέος/kg φιστικελαίου. Παρόμοιες καταγραφές έχουν γίνει και για άλλα παρθένα έλαια σπόρων, όπως σόγια, ηλιάνθο, κραμβέλαιο, καλαμπόκι και κολοκύθα (10-30 mg καφεϊκού οξέος/kg ελαίου) (Siger, Nogala-Kalucka, & Lampart-Szczapa, 2008). Ανάλογες τιμές TPC (≈ 60 mg/kg φιστικελαίου) παρατηρήθηκαν και σε παρθένα φιστικέλαια που μελετήθηκαν από τους Saber-Tehrani, Givianrad, Aberoomand-Azar, Waqif-Husain και Jafari Mohammadi (2013). Στην παρούσα μελέτη, όπως αναμενόταν λόγω της σχετικά υψηλής διαλυτότητάς τους στο H₂O, παρατηρήθηκαν χαμηλές συγκεντρώσεις πολικών φαινολών στο φιστικέλαιο. Σε μελέτη των Ojeda-Amador et al. (2018) για οκτώ διαφορετικές ποικιλίες φιστικιού, το περιεχόμενο των πολικών φαινολών των παρθένων φιστικελαίων ήταν εξίσου χαμηλό (16-23 mg γαλλικού οξέος/kg φιστικελαίου). Τα αποτελέσματα συμφωνούν και με εκείνα των Salvador, Ojeda-Amador και Fregarane (2020) όπου το περιεχόμενο των πολικών φαινολών κυμαινόταν μεταξύ 16 και 58 mg γαλλικού οξέος/kg φιστικελαίου.

B.5.2.1. Σύγκριση 15 δειγμάτων 2017 και 30 δειγμάτων 2018

Το περιεχόμενο σε πολικές φαινόλες, όπως προσδιορίστηκε από τη δοκιμή Folin-Ciocalteu, κυμαινόταν μεταξύ 13,87-60,11 ισοδύναμων mg γαλλικού οξέος/kg φιστικελαίου με μέσο όρο $28,56 \pm 13,97$ ισοδύναμων mg γαλλικού οξέος/kg φιστικελαίου και 11,71-57,92 με μέσο όρο $26,68 \pm 12,92$ ισοδύναμων mg γαλλικού οξέος/kg φιστικελαίου, για τα δείγματα του 2017 και του 2018, αντίστοιχα.

Το Levene's test εξέτασε την ισότητα των μέσων όρων 2017 και 2018 για το περιεχόμενο σε πολικές φαινόλες. Το p -value > 0.05 απέδειξε ότι οι πολικές φαινόλες (Wilks' lambda = 0,994) δε διέφεραν μεταξύ των δύο ετών συγκομιδής. Από τα δεδομένα διασταυρούμενης επικύρωσης, το 67,4% των δειγμάτων ταξινομήθηκε σωστά.

B.5.2.2. Σύγκριση 11 δειγμάτων 2017 και 11 δειγμάτων 2018

Το περιεχόμενο σε πολικές φαινόλες, όπως προσδιορίστηκε από τη δοκιμή Folin-Ciocalteu, κυμαινόταν μεταξύ 13,87-60,11 ισοδύναμων mg γαλλικού οξέος/kg φιστικελαίου με μέσο όρο $31,40 \pm 15,42$ ισοδύναμων mg γαλλικού οξέος/kg φιστικελαίου και 12,79-57,92 με μέσο όρο $29,10 \pm 15,39$ ισοδύναμων mg γαλλικού οξέος/kg φιστικελαίου, για τα δείγματα του 2017 και του 2018, αντίστοιχα.

Το Levene's test εξέτασε την ισότητα των μέσων όρων 2017 και 2018 για το περιεχόμενο σε πολικές φαινόλες. Το $p\text{-value} > 0,05$ απέδειξε ότι οι πολικές φαινόλες (Wilks' $\lambda = 0,994$) δε διέφεραν μεταξύ των δύο ετών συγκομιδής. Από τα δεδομένα της διασταυρούμενης επικύρωσης, το 50% των δειγμάτων ταξινομήθηκε σωστά.

B.5.3. Συμπεράσματα

Η περιεκτικότητα των πολικών φαινολών του φιστικελαίου βρέθηκε σε χαμηλά επίπεδα. Τα αποτελέσματα της δοκιμής Folín-Ciocalteu έδειξαν στατιστικά ότι τα δείγματα των δύο ετών δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερα υψηλό ποσοστό διαχωρισμού ($p\text{-value} > 0,05$) είτε με σύγκριση των 15 με τα 30 δείγματα (67,4% ποσοστό επιτυχούς διαχωρισμού) είτε για τα 11 με τα 11 δείγματα φιστικελαίων (50% ποσοστό επιτυχούς διαχωρισμού).

B.6. Φασματοσκοπική μελέτη με την τεχνική UV-Vis - Ανάπτυξη χημειομετρικών μοντέλων διαφοροποίησης των δειγμάτων ανάλογα με τις τιμές των δεικτών k, Δk και με το έτος συγκομιδής

Στο παρόν κεφάλαιο περιγράφεται η φασματοσκοπική μελέτη των φιστικελαίων με την τεχνική UV-Vis. Την πειραματική πορεία προσδιορισμού των δεικτών k_{232} , k_{268} , k_{270} , k_{274} και Δk ακολουθεί η σύγκριση των 15(2017)-30(2018) και των 11(2017)-11(2018) δειγμάτων. Σκοπός είναι αφενός η διερεύνηση της ποιότητας των φιστικελαίων αναφορικά με την οξειδωτική τους κατάσταση και αφετέρου η ανάπτυξη χημειομετρικών μοντέλων για τη διαφοροποίηση των φιστικελαίων βάσει των παραπάνω δεικτών και ανάλογα με το έτος συγκομιδής τους.

B.6.1. Πειραματική διαδικασία

Το φασματοφωτόμετρο Agilent Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies, Mississauga, Canada) και ορθογώνιες χαλαζιακές κυψελίδες με οπτικό μήκος 1 cm χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με την ΕΟΚ αριθ. 2568/91 (Παράρτημα ΙΧ του κανονισμού). Συγκεκριμένα, 0,1 g φιστικελαίου ζυγίστηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL, αραιώθηκαν μέχρι τη χαραγή με κυκλοεξάνιο και ομογενοποιήθηκαν σε Vortex. Το προκύπτον διάλυμα (10 g/L) ήταν απόλυτα διαυγές. Εάν υπήρχε θολερότητα, διηθήθηκε μέσω διηθητικού χαρτιού. Όλες οι μετρήσεις έγιναν σε κυψελίδες, με το διαλύτη ως τυφλό διάλυμα. Μετρήθηκαν οι απορροφήσεις στα 232, 268, 270 και 274 nm εις τριπλούν, και ο μέσος όρος χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των τιμών k και Δk. Η τιμή k υπολογίστηκε σύμφωνα με την Εξίσωση B.6.1.1, ενώ η τιμή Δk με χρήση της Εξίσωσης B.6.1.2.

$$k = \frac{A}{C \times s} \text{ (Εξίσωση B.6.1.1)}$$

A: απορρόφηση σε συγκεκριμένο μήκος κύματος

C (g/L): συγκέντρωση

s (cm): πάχος κυψελίδας

$$\Delta k = k_{270} - \frac{k_{268} + k_{274}}{2} \text{ (Εξίσωση B.6.1.2)}$$

Η στατιστική ανάλυση με σκοπό την ανάπτυξη χημειομετρικού μοντέλου διαφοροποίησης των φιστικελαίων σε σχέση με το έτος συγκομιδής (2017, 2018) πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό SPSS και την τεχνική διασταυρούμενης επικύρωσης (όπως αυτή περιγράφεται στο κεφάλαιο A.1.7).

B.6.2. Αποτελέσματα-Συζήτηση

Οι δείκτες ποιότητας που σχετίζονται με τις τιμές k_{232} , k_{268} , k_{270} , k_{274} και Δk εμφανίζονται στον Πίνακα B.6.2.1. Το Ευρωπαϊκό Πρότυπο Ποιότητας του Κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 2568/91 της Επιτροπής (Παράρτημα ΙΧ) έχει ορίσει τις τυπικές τιμές για το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο, όπως περιγράφονται στον Πίνακα B.6.2.1. Λαμβάνοντας υπόψη ότι δεν έχει καθοριστεί ένα επίσημο πρωτόκολλο από τον τρέχοντα Codex Alimentarius on Fats and Oils για την πρόβλεψη των δεικτών ποιότητας του φιστικελαίου ή άλλων ελαίων από καρπούς, τα υπάρχοντα όρια χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση των δειγμάτων φιστικελαίου. Ωστόσο, είναι υπό μελέτη η ενσωμάτωση προτύπων για τα έλαια καρπών (καρύδια, φουντούκια, αβοκάντο) που προέρχονται από ψυχρή έκθλιψη (Madawala, Kochhar, & Dutta, 2012), πόσο μάλλον για το έλαιο από κελυφωτά φιστίκια που είναι βραβευμένο ως ειδικό λάδι λόγω των ευεργετικών επιδράσεών του στην ανθρώπινη υγεία (Ojeda-Amador et al., 2018).

Πίνακας Β.6.2.1. Δείκτες ποιότητας k και Δk των δειγμάτων φιστικελαίου έναντι των αντίστοιχων τιμών του εξαιρετικού παρθένου ελαιόλαδου.

Αριθμητική κωδικοποίηση	k_{232}	k_{268}	k_{270}	k_{274}	Δk
Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο	$\leq 2,50$	$\leq 0,22$	$\leq 0,22$	$\leq 0,22$	$\leq 0,01$
Έτος συγκομιδής 2017					
A ¹ -1	0,129±0,044 ³	0,015±0,009	0,015±0,009	0,015±0,009	0,000
A-2	0,146±0,022	0,010±0,007	0,011±0,008	0,011±0,007	0,000
A-3	0,172±0,021	0,020±0,004	0,020±0,004	0,021±0,004	0,000
A-4	0,164±0,015	0,010±0,002	0,011±0,002	0,011±0,002	0,000
A-5	0,156±0,005	0,013±0,002	0,013±0,002	0,014±0,002	0,000
A-6	0,132±0,028	0,014±0,002	0,014±0,002	0,015±0,002	0,000
A-7	0,173±0,047	0,027±0,002	0,027±0,008	0,027±0,010	0,000
A-8	0,159±0,014	0,018±0,002	0,019±0,005	0,019±0,006	0,000
A-9	0,142±0,021	0,009±0,003	0,009±0,003	0,009±0,003	0,000
A-10	0,157±0,004	0,013±0,003	0,013±0,003	0,013±0,003	0,000
A-11	0,173±0,010	0,025±0,007	0,025±0,007	0,025±0,007	0,000
A-12	0,126±0,036	0,009±0,003	0,009±0,004	0,010±0,003	0,000
A-13	0,148±0,011	0,011±0,008	0,011±0,008	0,011±0,008	0,000
A-14	0,145±0,014	0,017±0,008	0,018±0,007	0,018±0,007	0,000
A-15	0,166±0,008	0,020±0,004	0,020±0,004	0,021±0,004	0,000
Έτος συγκομιδής 2018					
B ² -1	0,071±0,047	0,011±0,002	0,011±0,002	0,012±0,002	0,000
B-2	0,052±0,029	0,007±0,004	0,008±0,007	0,008±0,001	0,000
B-3	0,068±0,022	0,011±0,003	0,012±0,002	0,012±0,001	0,000
B-4	0,056±0,010	0,012±0,004	0,012±0,004	0,013±0,007	0,000
B-5	0,073±0,009	0,015±0,005	0,015±0,003	0,016±0,001	0,000
B-6	0,070±0,025	0,011±0,003	0,011±0,004	0,011±0,003	0,000
B-7	0,069±0,024	0,014±0,002	0,014±0,009	0,014±0,003	0,000
B-8	0,054±0,017	0,009±0,003	0,009±0,003	0,009±0,003	0,000

B-9	0,053±0,021	0,010±0,001	0,011±0,002	0,011±0,006	0,000
B-10	0,070±0,007	0,012±0,006	0,012±0,006	0,013±0,008	0,000
B-11	0,072±0,011	0,017±0,005	0,017±0,005	0,018±0,004	0,000
B-12	0,070±0,013	0,011±0,003	0,011±0,004	0,012±0,007	0,000
B-13	0,075±0,004	0,016±0,007	0,016±0,008	0,016±0,004	0,000
B-14	0,069±0,045	0,011±0,003	0,011±0,005	0,011±0,007	0,000
B-15	0,073±0,003	0,014±0,004	0,014±0,007	0,014±0,001	0,000
B-16	0,059±0,004	0,020±0,001	0,020±0,009	0,020±0,006	0,000
B-17	0,071±0,023	0,011±0,006	0,011±0,002	0,012±0,001	0,000
B-18	0,053±0,009	0,008±0,003	0,008±0,004	0,008±0,003	0,000
B-19	0,074±0,015	0,015±0,008	0,015±0,008	0,016±0,007	0,000
B-20	0,068±0,020	0,012±0,005	0,012±0,004	0,012±0,008	0,000
B-21	0,070±0,009	0,013±0,002	0,014±0,007	0,014±0,008	0,000
B-22	0,075±0,004	0,019±0,008	0,019±0,004	0,018±0,000	0,000
B-23	0,054±0,022	0,011±0,008	0,012±0,005	0,012±0,003	0,000
B-24	0,072±0,035	0,014±0,009	0,014±0,000	0,015±0,002	0,000
B-25	0,072±0,037	0,013±0,003	0,014±0,003	0,014±0,007	0,000
B-26	0,053±0,017	0,011±0,003	0,011±0,007	0,011±0,006	0,000
B-27	0,068±0,029	0,012±0,002	0,012±0,008	0,012±0,003	0,000
B-28	0,070±0,016	0,012±0,010	0,012±0,011	0,013±0,010	0,000
B-29	0,070±0,014	0,010±0,007	0,010±0,008	0,011±0,002	0,000
B-30	0,053±0,018	0,010±0,001	0,010±0,003	0,010±0,005	0,000

¹A: έτος συγκομιδής 2017, ²B: έτος συγκομιδής 2018, ³Μέσος όρος±τυπική απόκλιση από τρεις μετρήσεις για κάθε δείγμα.

Από τον Πίνακα Β.6.2.1. προκύπτει ότι όλες οι τιμές των δεικτών k και Δk ήταν μικρότερες από τα θεσμοθετημένα όρια για το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο.

Παρατηρήθηκε μια τάση μείωσης στο δείκτη k₂₃₂ από το 2017 στο 2018 που υποδηλώνει ότι τα δείγματα του 2017 βρίσκονταν στο πρωταρχικό στάδιο οξείδωσης (σχηματισμός υδροξυπεροξειδίων). Όσον αφορά στις τιμές του δείκτη k₂₇₀ δεν παρουσιάστηκαν σημαντικές διαφορές. Αυτό σημαίνει ότι στα φιστικέλαια του 2017 δεν εμφανίστηκαν δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης (αλδεΐδες, κετόνες).

B.6.2.1. Σύγκριση 15 δειγμάτων 2017 και 30 δειγμάτων 2018

Ο μέσος όρος για k_{232} , k_{268} , k_{270} και k_{274} , αντίστοιχα, για κάθε έτος συγκομιδής ήταν $0,15\pm 0,02$ (2017), $0,07\pm 0,01$ (2018), $0,02\pm 0,01$ (2017), $0,01\pm 0,00$ (2018), $0,02\pm 0,01$ (2017), $0,01\pm 0,00$ (2018), $0,02\pm 0,01$ (2017) και $0,01\pm 0,00$ (2018). Το Δκ ήταν 0,000 για όλα τα δείγματα, ανεξάρτητα από το έτος συγκομιδής ή την προέλευση.

Το Levene's test εξέτασε την ισότητα των μέσων όρων 2017 και 2018 για το δείκτη k_{232} . Το p -value < 0,05 απέδειξε ότι ο δείκτης k_{232} διέφερε μεταξύ των δύο ετών συγκομιδής. Η υψηλή τιμή κανονικής συσχέτισης (canonical correlation=0,966) και η χαμηλή τιμή Wilks' lambda (Wilks' lambda=0,067) υποδήλωναν υψηλή διακριτική ικανότητα της συνάρτησης. Η τιμή chi-square ήταν 114,654 που υποδήλωνε χαμηλή συσχέτιση των δύο ετών συγκομιδής. Το ποσοστό σωστής ταξινόμησης των δειγμάτων διασταυρούμενης επικύρωσης ήταν 100%.

Το Levene's test εξέτασε την ισότητα των μέσων όρων 2017 και 2018 για το δείκτη k_{268} . Το p -value > 0,05 απέδειξε ότι ο δείκτης k_{268} δε διέφερε μεταξύ των δύο ετών συγκομιδής. Η χαμηλή τιμή κανονικής συσχέτισης (canonical correlation=0,416) και η υψηλή τιμή Wilks' lambda (Wilks' lambda=0,826) υποδήλωναν χαμηλή διακριτική ικανότητα της συνάρτησης. Η τιμή chi-square ήταν 3,675 που υποδήλωνε συσχέτιση των δύο ετών συγκομιδής. Το ποσοστό σωστής ταξινόμησης των δειγμάτων διασταυρούμενης επικύρωσης ήταν 63,3%.

Το Levene's test εξέτασε την ισότητα των μέσων όρων 2017 και 2018 για το δείκτη k_{270} . Το p -value > 0,05 απέδειξε ότι ο δείκτης k_{270} δε διέφερε μεταξύ των δύο ετών συγκομιδής. Η χαμηλή τιμή κανονικής συσχέτισης (canonical correlation=0,428) και η υψηλή τιμή Wilks' lambda (Wilks' lambda=0,816) υποδήλωναν χαμηλή διακριτική ικανότητα της συνάρτησης. Η τιμή chi-square ήταν 3,910 που υποδήλωνε συσχέτιση των δύο ετών συγκομιδής. Το ποσοστό σωστής ταξινόμησης των δειγμάτων διασταυρούμενης επικύρωσης ήταν 59,1%.

Το Levene's test εξέτασε την ισότητα των μέσων όρων 2017 και 2018 για το δείκτη k_{274} . Το p -value > 0,05 απέδειξε ότι ο δείκτης k_{274} δε διέφερε μεταξύ των δύο ετών συγκομιδής. Η χαμηλή τιμή κανονικής συσχέτισης (canonical correlation=0,406) και η υψηλή τιμή Wilks' lambda (Wilks' lambda=0,835) υποδήλωναν χαμηλή διακριτική ικανότητα της συνάρτησης. Η τιμή chi-square ήταν 3,465 που υποδήλωνε συσχέτιση των δύο ετών συγκομιδής. Το ποσοστό σωστής ταξινόμησης των δειγμάτων διασταυρούμενης επικύρωσης ήταν 68%.

B.6.2.2. Σύγκριση 11 δειγμάτων 2017 και 11 δειγμάτων 2018

Ο μέσος όρος για k_{232} , k_{268} , k_{270} και k_{274} , αντίστοιχα, για κάθε έτος συγκομιδής ήταν $0,15\pm 0,02$ (2017), $0,06\pm 0,01$ (2018), $0,02\pm 0,01$ (2017), $0,01\pm 0,00$ (2018), $0,02\pm 0,01$ (2017), $0,01\pm 0,00$ (2018), $0,02\pm 0,01$ (2017) και $0,01\pm 0,00$ (2018). Το Δκ ήταν 0,000 για όλα τα δείγματα, ανεξάρτητα από το έτος συγκομιδής ή την προέλευση.

Το Levene's test εξέτασε την ισότητα των μέσων όρων 2017 και 2018 για το δείκτη k_{232} . Το $p\text{-value}<0,05$ απέδειξε ότι ο δείκτης k_{232} διέφερε μεταξύ των δύο ετών συγκομιδής. Η υψηλή τιμή κανονικής συσχέτισης (canonical correlation=0,968) και η χαμηλή τιμή Wilks' lambda (Wilks' lambda=0,063) υποδήλωναν υψηλή διακριτική ικανότητα της συνάρτησης. Η τιμή chi-square ήταν 53,864 που υποδήλωνε χαμηλή συσχέτιση των δύο ετών συγκομιδής. Το ποσοστό σωστής ταξινόμησης των δειγμάτων διασταυρούμενης επικύρωσης ήταν 100%.

Το Levene's test εξέτασε την ισότητα των μέσων όρων 2017 και 2018 για το δείκτη k_{268} . Το $p\text{-value}>0,05$ απέδειξε ότι ο δείκτης k_{268} δε διέφερε μεταξύ των δύο ετών συγκομιδής. Η χαμηλή τιμή κανονικής συσχέτισης (canonical correlation=0,414) και η υψηλή τιμή Wilks' lambda (Wilks' lambda=0,828) υποδήλωναν χαμηλή διακριτική ικανότητα της συνάρτησης. Η τιμή chi-square ήταν 3,675 που υποδήλωνε συσχέτιση των δύο ετών συγκομιδής. Το ποσοστό σωστής ταξινόμησης των δειγμάτων διασταυρούμενης επικύρωσης ήταν 63,6%.

Το Levene's test εξέτασε την ισότητα των μέσων όρων 2017 και 2018 για το δείκτη k_{270} . Το $p\text{-value}>0,05$ απέδειξε ότι ο δείκτης k_{270} δε διέφερε μεταξύ των δύο ετών συγκομιδής. Η χαμηλή τιμή κανονικής συσχέτισης (canonical correlation=0,426) και η υψηλή τιμή Wilks' lambda (Wilks' lambda=0,818) υποδήλωναν χαμηλή διακριτική ικανότητα της συνάρτησης. Η τιμή chi-square ήταν 3,907 που υποδήλωνε συσχέτιση των δύο ετών συγκομιδής. Το ποσοστό σωστής ταξινόμησης των δειγμάτων διασταυρούμενης επικύρωσης ήταν 59,1%.

Το Levene's test εξέτασε την ισότητα των μέσων όρων 2017 και 2018 για το δείκτη k_{274} . Το $p\text{-value}>0,05$ απέδειξε ότι ο δείκτης k_{274} δε διέφερε μεταξύ των δύο ετών συγκομιδής. Η χαμηλή τιμή κανονικής συσχέτισης (canonical correlation=0,404) και η υψηλή τιμή Wilks' lambda (Wilks' lambda=0,837) υποδήλωναν χαμηλή διακριτική ικανότητα της συνάρτησης. Η τιμή chi-square ήταν 3,472 που υποδήλωνε συσχέτιση των δύο ετών συγκομιδής. Το ποσοστό σωστής ταξινόμησης των δειγμάτων διασταυρούμενης επικύρωσης ήταν 68,2%.

B.6.3. Συμπεράσματα

Ο προσδιορισμός των δεικτών k στα 232, 268, 270 και 274 nm καθώς και του Δk έδωσε σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τις συνθήκες συντήρησης, την αξιολόγηση της οξειδωτικής κατάστασης και τελικά την ποιότητα των δειγμάτων (Martelo-Vidal & Vázquez, 2014· Rodrigues, Dias, Veloso, Pereira, & Peres, 2016· Conceição et al., 2019· Uncu & Ozen, 2019). Όλες οι τιμές k και Δk κυμαίνονταν στα όρια υψηλής ποιότητας σύμφωνα με την κείμενη νομοθεσία για το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο. Στους δείκτες k_{268} , k_{270} , k_{274} δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ετών συγκομιδής, σε αντίθεση με το δείκτη k_{232} που εμφάνισε μια τάση μείωσης από το 2017 στο 2018, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα δείγματα του 2017 βρίσκονταν στο πρωταρχικό στάδιο οξείδωσης.

Συγκεκριμένα, κατά τη σύγκριση των 15 δειγμάτων του 2017 με τα 30 δείγματα του 2018 φάνηκε αδυναμία διαφοροποίησης (p -value>0,05) των φιστικελαιών μεταξύ των δύο ετών συγκομιδής βάσει των δεικτών k_{268} (ποσοστό σωστής ταξινόμησης 63,3%), k_{270} (ποσοστό σωστής ταξινόμησης 59,1%) και k_{274} (ποσοστό σωστής ταξινόμησης 68%). Αντίθετα, ο δείκτης k_{232} οδήγησε σε πλήρη διαφοροποίηση (100%) των δειγμάτων από έτος σε έτος (p -value<0,05). Αντίστοιχα, η σύγκριση των 11 δειγμάτων του 2017 με τα 11 δείγματα του 2018 έδειξε αδυναμία διαφοροποίησης των φιστικελαιών για τους δείκτες k_{268} (ποσοστό σωστής ταξινόμησης 63,6%), k_{270} (ποσοστό σωστής ταξινόμησης 59,1%) και k_{274} (ποσοστό σωστής ταξινόμησης 68,2%), ενώ ο δείκτης k_{232} διαφοροποίησε πλήρως (100%) τα δείγματα των δύο ετών συγκομιδής.

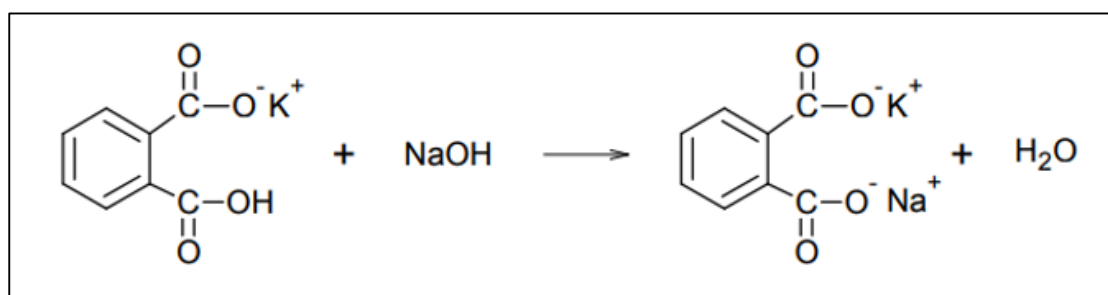
B.7. Προσδιορισμός της ελεύθερης οξύτητας και του ποσοστού ελεύθερων λιπαρών οξέων - Ανάπτυξη χημειομετρικού μοντέλου διαφοροποίησης των δειγμάτων ανάλογα με το έτος συγκομιδής

Στο παρόν κεφάλαιο περιγράφεται ο προσδιορισμός της ελεύθερης οξύτητας και του ποσοστού των ελεύθερων λιπαρών οξέων των φιστικελαίων. Την πειραματική διαδικασία ακολουθεί η σύγκριση των 15(2017)-30(2018) και των 11(2017)-11(2018) δειγμάτων. Σκοπός είναι αφενός η αξιολόγηση της βρωσιμότητας και της πιθανότητας αλλοίωσης των φιστικελαίων και αφετέρου η ανάπτυξη χημειομετρικού μοντέλου για τη διαφοροποίηση των φιστικελαίων ανάλογα με το έτος συγκομιδής τους.

B.7.1. Πειραματική διαδικασία

Η ελεύθερη οξύτητα και το ποσοστό των ελεύθερων λιπαρών οξέων προσδιορίστηκαν από τριπλέτα μετρήσεων για κάθε δείγμα, σύμφωνα με τους Otemuyiwa και Adewusi (2013).

Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε όξινο φθαλικό κάλιο (potassium hydrogen phthalate, KHP) για να προσδιοριστεί μέσω τιτλοδότησης με ακρίβεια η συγκέντρωση του NaOH που χρησιμοποιήθηκε έπειτα στην τιτλοδότηση του δείγματος φιστικελαίου. Ζυγίστηκαν 0,7-0,9 g KHP και ξηράθηκαν για 2 h σε θερμοκρασία 110°C. Αφού αφέθηκαν σε ξηραντήριο για 30 min, μεταφέρθηκαν σε κωνική φιάλη των 250 mL και προστέθηκαν 100 mL απιονισμένο H₂O και 4 σταγόνες δείκτη φαινολοφθαλεΐνης. Στη συνέχεια, παρασκευάστηκε διάλυμα NaOH 0,1 M και τιτλοδοτήθηκε μέχρι την εμφάνιση απαλού ροζ χρώματος για 30 s. Έγιναν τρεις ογκομετρήσεις και υπολογίστηκε ο μέσος όρος της συγκέντρωσης του διαλύματος του NaOH. Η χημική αντίδραση που έλαβε χώρα φαίνεται στο Σχήμα B.7.1.1.



Σχήμα B.7.1.1. Αντίδραση KHP με NaOH.

Στη συνέχεια, 1 g φιστικελαίου διαλυμένου σε 5 mL EtOH ογκομετρήθηκε με το διάλυμα NaOH 0,1 M, παρουσία φαινολοφθαλεΐνης, και το τελικό σημείο καθορίστηκε από το ροζ-πορτοκαλί χρώμα που επέμενε για τουλάχιστον 15 s. Η τιμή της ελεύθερης οξύτητας εκφράστηκε ως ελαϊκό οξύ, σύμφωνα με την Εξίσωση B.7.1.1 (Janporn et al., 2015).

$$\text{Ελεύθερη οξύτητα (mg ελαϊκού οξέος/g ελαίου)} = \frac{56 \times C \times V}{m} \text{ (Εξίσωση B.7.1.1)}$$

C (M): συγκέντρωση του διαλύματος NaOH

V (mL): όγκος του διαλύματος NaOH στο τελικό σημείο

m (g): μάζα φιστικελαίου

Το ποσοστό των ελεύθερων λιπαρών οξέων του φιστικελαίου υπολογίστηκε από την Εξίσωση B.7.1.2 (Janporn et al., 2015).

$$\% \text{ ελεύθερων λιπαρών οξέων} = 0,503 \times \text{ελεύθερη οξύτητα (Εξίσωση B.7.1.2)}$$

Η στατιστική ανάλυση με σκοπό την ανάπτυξη χημειομετρικού μοντέλου διαφοροποίησης των φιστικελαίων σε σχέση με το έτος συγκομιδής (2017, 2018) πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό SPSS και την τεχνική διασταυρούμενης επικύρωσης (όπως αυτή περιγράφεται στο κεφάλαιο B.7).

B.7.2. Αποτελέσματα-Συζήτηση

Ο μέσος όρος των τιμών της ελεύθερης οξύτητας και του ποσοστού των ελεύθερων λιπαρών οξέων των δειγμάτων φιστικελαίου φαίνονται στον Πίνακα B.7.2.1. Από τον Πίνακα B.7.2.1 φαίνεται ότι όλα τα δείγματα φιστικελαίου έχουν τιμή ελεύθερης οξύτητας μικρότερη του ορίου για το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο εκτός από ένα δείγμα του 2017 (No A-12) και ένα του 2018 (No B-16). Αντιθέτως, το ποσοστό των λιπαρών οξέων είναι πάνω από το αντίστοιχο όριο για όλα τα δείγματα εκτός από ένα δείγμα του 2017 (No A-15) και ένα του 2018 (No B-25).

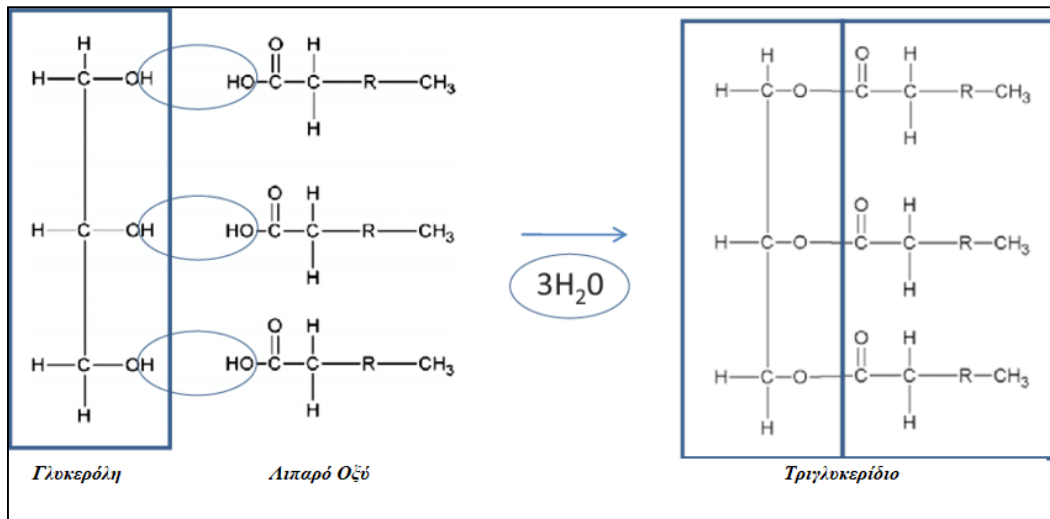
Πίνακας Β.7.2.1. Τιμές ελεύθερης οξύτητας και ελεύθερων λιπαρών οξέων των δειγμάτων φιστικελαίου έναντι των αντίστοιχων τιμών του εξαιρετικού παρθένου ελαιόλαδου.

Αριθμητική κωδικοποίηση	Ελεύθερη οξύτητα (mg ελαϊκού οξέος/g ελαίου)	Ποσοστό ελεύθερων λιπαρών οξέων (%)
Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο	≤4,00	≤0,35
Έτος συγκομιδής 2017		
A ¹ -1	3,19±0,33 ³	1,6±0,2
A-2	2,25±0,00	1,1±0,0
A-3	1,68±0,02	0,8±0,0
A-4	3,37±0,00	1,7±0,0
A-5	1,69±0,00	0,9±0,0
A-6	1,10±0,00	0,6±0,0
A-7	2,51±0,34	1,3±0,2
A-8	1,69±0,00	0,9±0,0
A-9	1,12±0,00	0,6±0,0
A-10	1,10±0,00	0,6±0,0
A-11	1,68±0,02	0,8±0,0
A-12	6,62±0,00	3,3±0,0
A-13	1,68±0,02	0,8±0,0
A-14	1,68±0,02	0,8±0,0
A-15	0,53±0,00	0,3±0,0
Έτος συγκομιδής 2018		
B ² -1	0,99±0,16	0,5±0,1
B-2	0,98±0,16	0,5±0,1
B-3	1,09±0,01	0,6±0,0
B-4	1,36±0,27	0,7±0,1
B-5	1,00±0,16	0,5±0,1
B-6	1,08±0,02	0,5±0,0
B-7	0,82±0,28	0,4±0,1
B-8	1,00±0,16	0,5±0,1

B-9	0,81±0,02	0,4±0,0
B-10	0,90±0,15	0,5±0,1
B-11	0,98±0,16	0,5±0,1
B-12	0,82±0,01	0,4±0,0
B-13	0,81±0,27	0,4±0,1
B-14	1,17±0,17	0,6±0,1
B-15	0,99±0,15	0,5±0,1
B-16	8,12±0,19	4,1±0,1
B-17	0,81±0,01	0,4±0,0
B-18	1,28±0,16	0,6±0,1
B-19	1,00±0,17	0,5±0,1
B-20	1,08±0,02	0,5±0,0
B-21	0,80±0,25	0,4±0,1
B-22	0,71±0,61	0,4±0,3
B-23	0,98±0,15	0,5±0,1
B-24	1,01±0,16	0,5±0,1
B-25	0,63±0,16	0,3±0,1
B-26	1,01±0,16	0,5±0,1
B-27	0,91±0,16	0,5±0,1
B-28	0,82±0,00	0,4±0,0
B-29	0,82±0,01	0,4±0,0
B-30	0,91±0,17	0,5±0,1

¹A: έτος συγκομιδής 2017, ²B: έτος συγκομιδής 2018, ³Μέσος όρος±τυπική απόκλιση από τρεις μετρήσεις για κάθε δείγμα.

Τα κελυφωτά φιστίκια περιέχουν υψηλό ποσοστό ελαίου, εκ του οποίου το 80% αντιστοιχεί σε ακόρεστα λιπαρά οξέα (Khatib & Vaya 2010). Κατά βάση τα λιπαρά οξέα δε βρίσκονται με την ελεύθερη μορφή τους, αλλά με τη μορφή τριγλυκεριδίων, δηλαδή ένα μόριο γλυκερόλης ενώνεται με τρία άτομα λιπαρών οξέων με εστερικούς δεσμούς (Σχήμα Β.7.2.1).



Σχήμα Β.7.2.1. Σχηματισμός των τριγλυκεριδίων.

Η ύπαρξη ελεύθερων λιπαρών οξέων ευνοεί την οξείδωση του φιστικελαίου, όπως και την υδρόλυση των εστερικών δεσμών, δηλαδή η αντίθετη πορεία του Σχήματος Β.7.2.1, που πραγματοποιείται παρουσία νερού. Το ποσοστό των ελεύθερων λιπαρών οξέων στο φιστικέλαιο βρέθηκε να είναι αρκετά μεγάλο σε σύγκριση με την βιβλιογραφία. Σε άλλες μελέτες, το ποσοστό των ελεύθερων λιπαρών οξέων των φιστικελαίων κυμαινόταν από 0,03% έως 0,36% (Ozturk, Sagdic, Yalcin, Capar, & Asyali, 2016· Rabadán, Pardo, Gómez, & Álvarez-Ortí, 2018· Yahyavi, Alizadeh-Khaledabad, & Azadmard-Damirch, 2019).

B.7.2.1. Σύγκριση 15 δειγμάτων 2017 και 30 δειγμάτων 2018

Όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα Β.7.2.1, η ελεύθερη οξύτητα κυμάνθηκε από 0,53 έως 6,62 και από 0,63 έως 8,12 mg ελαϊκού οξέος/g ελαίου για το 2017 και το 2018, αντίστοιχα. Ο μέσος όρος ($1,19 \pm 1,32$ mg ελαϊκού οξέος/g ελαίου) του 2018 παρουσίασε χαμηλότερες τιμές από το μέσο όρο ελεύθερης οξύτητας ($2,12 \pm 1,46$ mg ελαϊκού οξέος/g ελαίου) του 2017. Το ποσοστό ελεύθερων λιπαρών οξέων κυμάνθηκε από 0,3% έως 3,3% και από 0,3% έως 4,1% για το 2017 και το 2018, αντίστοιχα. Ομοίως, ο μέσος όρος των ελεύθερων λιπαρών οξέων ($0,6 \pm 0,7$) του 2018 ήταν χαμηλότερος από το μέσο όρο ($1,1 \pm 0,7$) του 2017, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η συγκομιδή 2018, από την πλευρά αυτή, παρουσίασε καλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα.

Το Levene's test εξέτασε τη μηδενική υπόθεση ότι η ελεύθερη οξύτητα της συγκομιδής 2017 και 2018 ήταν ίσες. Τα αποτελέσματα ($p\text{-value}<0,05$) απέρριψαν τη μηδενική υπόθεση και έδειξαν ότι η ελεύθερη οξύτητα διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ των δύο ετών συγκομιδής. Ωστόσο η διακριτική ικανότητα της συνάρτησης ήταν χαμηλή. Από τα δεδομένα διασταυρούμενης επικύρωσης βρέθηκε ποσοστό σωστής ταξινόμησης ελεύθερης οξύτητας 69,8% (Wilks' lambda=0,88). Δεδομένου ότι το ποσοστό των ελεύθερων λιπαρών οξέων προκύπτει από πολλαπλασιασμό της ελεύθερης οξύτητας με ένα σταθερό όρο ($0,503 \times$ ελεύθερη οξύτητα), οι σχέσεις δεν αλλάζουν μεταξύ τους και επομένως, δεν έχει νόημα η ανάπτυξη χημειομετρικού μοντέλου και με το ποσοστό των ελεύθερων λιπαρών οξέων.

B.7.2.2. Σύγκριση 11 δειγμάτων 2017 και 11 δειγμάτων 2018

Όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα B.7.2.1, η ελεύθερη οξύτητα κυμάνθηκε από 1,10 έως 3,37 και από 0,81 έως 1,36 mg ελαϊκού οξέος/g ελαίου για το 2017 και το 2018, αντίστοιχα. Ο μέσος όρος ($1,00\pm 0,15$ mg ελαϊκού οξέος/g ελαίου) του 2018 παρουσίασε χαμηλότερες τιμές από το μέσο όρο ελεύθερης οξύτητας ($1,94\pm 0,80$ mg ελαϊκού οξέος/g ελαίου) του 2017. Το ποσοστό ελεύθερων λιπαρών οξέων κυμάνθηκε από 0,6% έως 1,7% και από 0,4% έως 0,7% για το 2017 και το 2018, αντίστοιχα. Ομοίως, ο μέσος όρος της περιεκτικότητας των ελεύθερων λιπαρών οξέων ($0,5\pm 0,1$) του 2018 ήταν χαμηλότερος από το μέσο όρο ($1,0\pm 0,4$) του 2017, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η συγκομιδή 2018, με βάση την περιεκτικότητα των ελεύθερων λιπαρών οξέων, παρουσίασε καλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα.

Το Levene's test εξέτασε τη μηδενική υπόθεση ότι η ελεύθερη οξύτητα της συγκομιδής 2017 και 2018 ήταν ίσες. Τα αποτελέσματα ($p\text{-value}>0,05$) επιβεβαίωσαν τη μηδενική υπόθεση και έδειξαν ότι η ελεύθερη οξύτητα δε διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ των δύο ετών. Από τα δεδομένα διασταυρούμενης επικύρωσης φάνηκε ένα ποσοστό σωστής ταξινόμησης ελεύθερης οξύτητας στο 63,6% (Wilks' lambda=0,877). Η ανάπτυξη χημειομετρικού μοντέλου και με το ποσοστό των ελεύθερων λιπαρών οξέων κρίθηκε άσκοπη βάσει της προαναφερόμενης αιτιολόγησης.

B.7.3. Συμπεράσματα

Τα δείγματα φιστικελαίου παρουσίασαν υψηλό ποσοστό ελεύθερων λιπαρών οξέων, δεδομένου ότι το ανώτατο όριο για το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο ορίζεται

<0,35%. Αυτό σημαίνει ότι είναι ευάλωτα σε οξείδωση και ποιοτική υποβάθμιση, όμως, ήταν κατάλληλα προς βρώση διότι δεν υπερέβησαν τα 4 mg ελαϊκού οξέος/g ελαίου (ελεύθερη οξύτητα ως μέτρο του αριθμού των ομάδων καρβοξυλικού οξέος). Αναφερόμενοι στη σύγκριση των 15 δειγμάτων του 2017 με τα 30 δείγματα του 2018 υπήρξε διαφοροποίηση ($p\text{-value}\leq 0,05$) στην ελεύθερη οξύτητα και επομένως, στο ποσοστό των ελεύθερων λιπαρών οξέων μεταξύ των δύο ετών. Ωστόσο η διακριτική ικανότητα των συναρτήσεων ήταν χαμηλή. Χαμηλά ήταν και τα ποσοστά σωστής ταξινόμησης των δειγμάτων διασταυρούμενης επικύρωσης. Συγκρίνοντας τα 11 δείγματα του 2017 με τα 11 του 2018 αποδείχθηκε αδυναμία διαφοροποίησης των φιστικελαίων.

B.8. Ανάλυση τοκοφερολών με HPLC-FLD - Ανάπτυξη χημειομετρικού μοντέλου ανάλογα με το έτος συγκομιδής

Στο παρόν κεφάλαιο περιγράφεται η ανάλυση τοκοφερολών των φιστικελαίων με χρήση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης συζευγμένης με φθορισμομετρικό ανιχνευτή. Μετά την πειραματική διαδικασία και την παρουσίαση των αποτελεσμάτων γίνεται σύγκριση των 15(2017)-30(2018) και των 11(2017)-11(2018) δειγμάτων. Σκοπός είναι η ανάπτυξη χημειομετρικού μοντέλου για τη διαφοροποίηση των φιστικελαίων βάσει της συνολικής περιεκτικότητας τοκοφερολών ανάλογα με το έτος συγκομιδής τους.

B.8.1. Πειραματική διαδικασία

Η χρωματογραφική ανάλυση πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας το ES ISO 9936:2012 «Animal and vegetable fats and oils-Determination of tocopherol and tocotrienol contents by high-performance liquid chromatography» σε αναλυτική μονάδα HPLC εξοπλισμένη με αντλία JASCO PU 980, με βρόχο έγχυσης 100 μL , ανιχνευτή φθορισμού JASCO FP920 (Co. Ltd., Tokyo, Japan), με φίλτρο διέγερσης στα 295 nm και μήκος κύματος εκπομπής στα 330 nm, που υποστηρίζεται από το λογισμικό Clarity Lite (DataApex, Praga, Czech Republic) για την επεξεργασία των δεδομένων, και πολική στήλη LiChrosorb Silica-60 (4,6 \times 250 mm, μέγεθος σωματιδίων 5 μm , Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Η κινητή φάση αποτελούνταν από τετραϋδροφουράνιο/επτάνιο (4:96 v/v) με ρυθμό ροής 1 mL/min και ο όγκος έγχυσης ήταν 10 μL . Το σύστημα λειτουργούσε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τα πρότυπα των τοκοφερολών (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) είχαν καθαρότητα $\geq 98\%$. Στα δείγματα οι τοκοφερόλες ταυτοποιήθηκαν με χρωματογραφικές συγκρίσεις των χρόνων συγκράτησης των αναλυτών με τα πρότυπα διαλύματα και ποσοτικοποιήθηκαν με τις αντίστοιχες καμπύλες βαθμονόμησης. Τα αποτελέσματα ελήφθησαν από τριπλέτες μετρήσεων και υπολογίστηκαν οι μέσες τιμές και οι αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις.

Τα πρότυπα διαλύματα των τεσσάρων τοκοφερολών, για την κατασκευή των αντίστοιχων καμπυλών βαθμονόμησης, παρασκευάστηκαν με διαλύτη επτάνιο και αποθηκεύτηκαν στο σκοτάδι σε θερμοκρασία -20°C . Οι ανακτήσεις αξιολογήθηκαν με την προσθήκη γνωστών ποσοτήτων ($C_{\text{standard added}}$) ισομερών α -τοκοφερόλης (α -T), β -τοκοφερόλης (β -T), γ -τοκοφερόλης (γ -T), και δ -τοκοφερόλης (δ -T) στα δείγματα

φιστικελαίου (C_{sample}). Οι ποσότητες που προστέθηκαν ήταν χαμηλής, μεσαίας και υψηλής περιεκτικότητας σε τοκοφερόλη. Η ανάκτηση υπολογίστηκε, βάσει του ES ISO 9936:2012, με την Εξίσωση B.8.1.1, όπου $C_{\text{spiked sample}}$ η συγκέντρωση που μετρήθηκε πειραματικά (Thompson, 2008).

$$\% \text{ ανάκτησης} = \frac{C_{\text{spiked sample}}}{C_{\text{sample}} + C_{\text{standard added}}} \times 100 \text{ (Εξίσωση B.8.1.1)}$$

Τέλος, προσδιορίστηκαν το όριο ανίχνευσης (limit of detection, LOD) και το όριο ποσοτικοποίησης (limit of quantification, LOQ) σύμφωνα με τις Εξισώσεις B.8.1.2 και B.8.1.3, αντίστοιχα (Spínola, Mendes, Câmara, & Castilho, 2012).

$$\text{LOD} = \frac{3,3 \times \sigma}{s} \text{ (Εξίσωση B.8.1.2)}$$

σ : τυπικό σφάλμα

s : κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times \sigma}{s} \text{ (Εξίσωση B.8.1.3)}$$

Η στατιστική ανάλυση με σκοπό την ανάπτυξη χημειομετρικού μοντέλου διαφοροποίησης των φιστικελαίων σε σχέση με το έτος συγκομιδής (2017, 2018) πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό SPSS και την τεχνική διασταυρούμενης επικύρωσης (όπως αυτή περιγράφεται στο κεφάλαιο A.1.7).

B.8.2. Αποτελέσματα-Συζήτηση

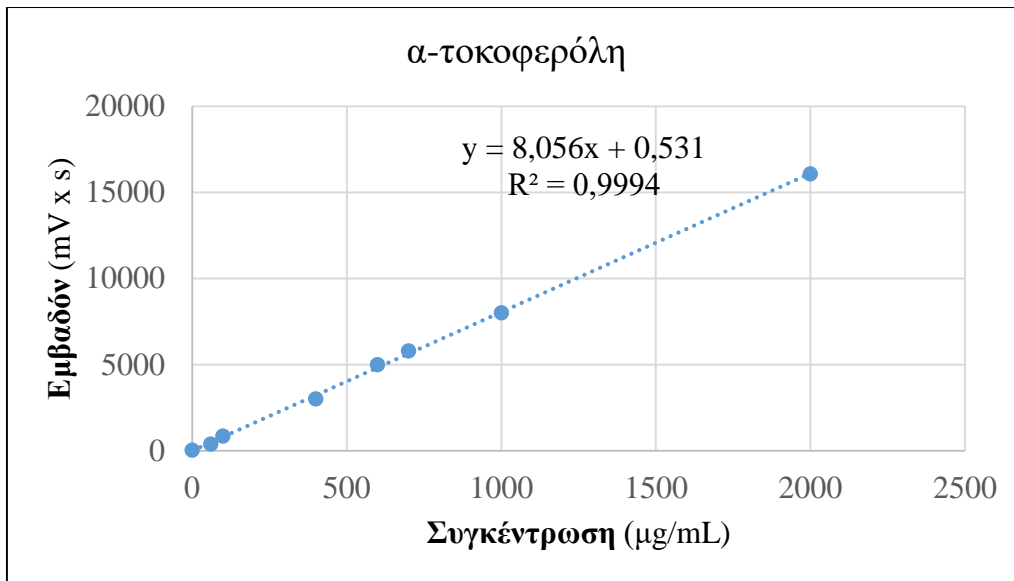
Το LOD βρέθηκε 0,15 $\mu\text{g/mL}$ και το LOQ 0,45 $\mu\text{g/mL}$ για τις α -, β -, γ - και δ -τοκοφερόλες. Οι καμπύλες βαθμονόμησης των τοκοφερολών (Σχήματα B.8.2.1-B.8.2.4) που χρησιμοποιήθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό των τοκοφερολών περιγράφονται από τις Εξισώσεις B.8.2.1-B.8.2.4, όπου C ($\mu\text{g/mL}$): συγκέντρωση.

$$\text{Εμβαδόν (mV x s)} = 8,056 \times C_{\alpha\text{-T}} + 0,5310, R^2=0,999 \text{ (Εξίσωση B.8.2.1)}$$

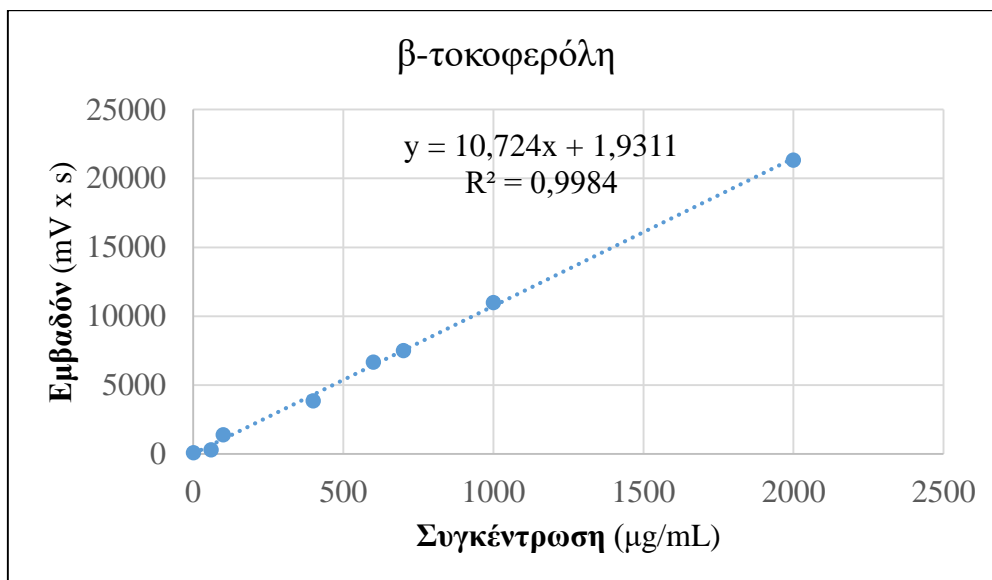
$$\text{Εμβαδόν (mV x s)} = 10,724 \times C_{\beta\text{-T}} + 1,9311, R^2=0,998 \text{ (Εξίσωση B.8.2.2)}$$

$$\text{Εμβαδόν (mV x s)} = 13,786 \times C_{\gamma\text{-T}} + 2,5428, R^2=0,978 \text{ (Εξίσωση B.8.2.3)}$$

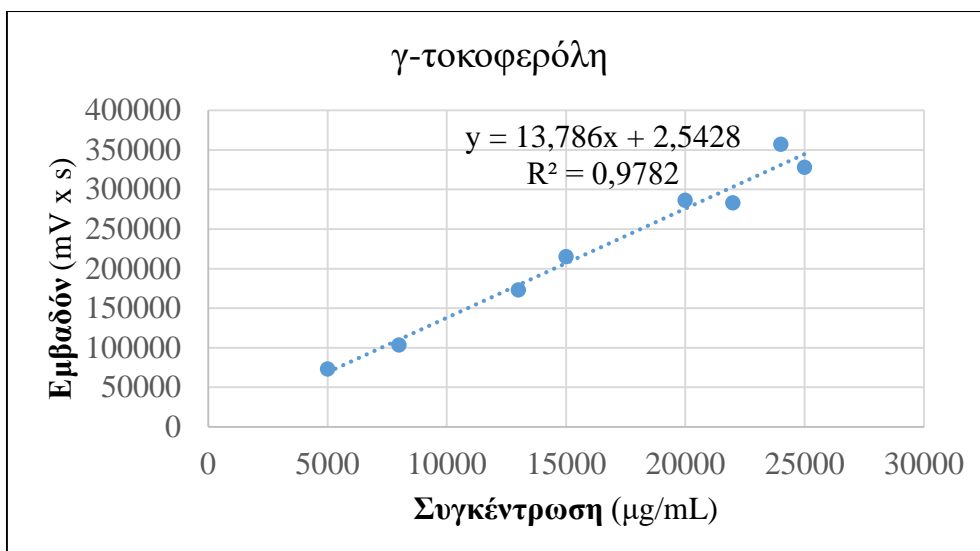
$$\text{Εμβαδόν (mV x s)} = 14,617 \times C_{\delta\text{-T}} + 2,1461, R^2=0,997 \text{ (Εξίσωση B.8.2.4)}$$



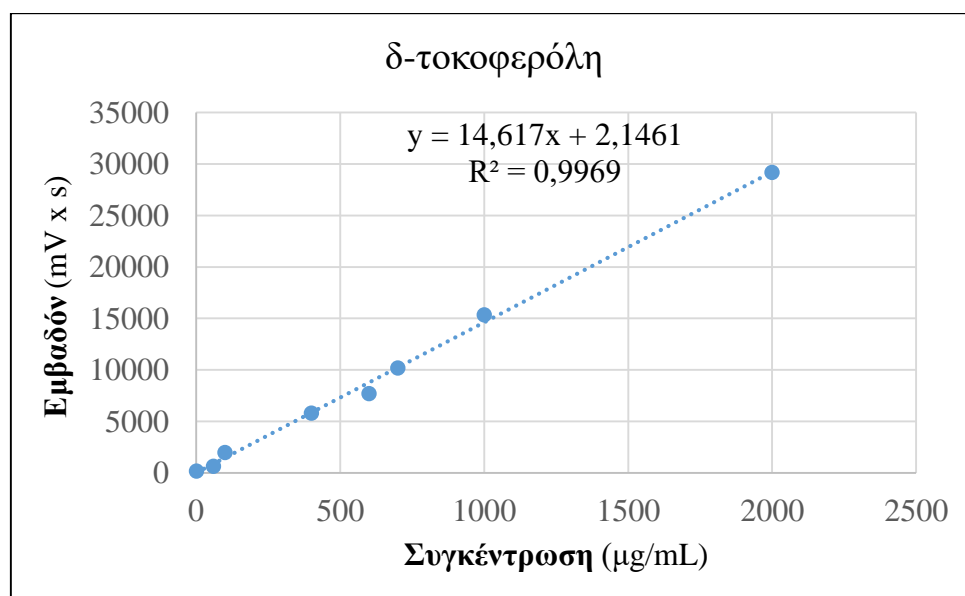
Σχήμα Β.8.2.1. Καμπύλη βαθμονόμησης α-τοκοφερόλης.



Σχήμα Β.8.2.2. Καμπύλη βαθμονόμησης β-τοκοφερόλης.



Σχήμα Β.8.2.3. Καμπύλη βαθμονόμησης γ-τοκοφερόλης.



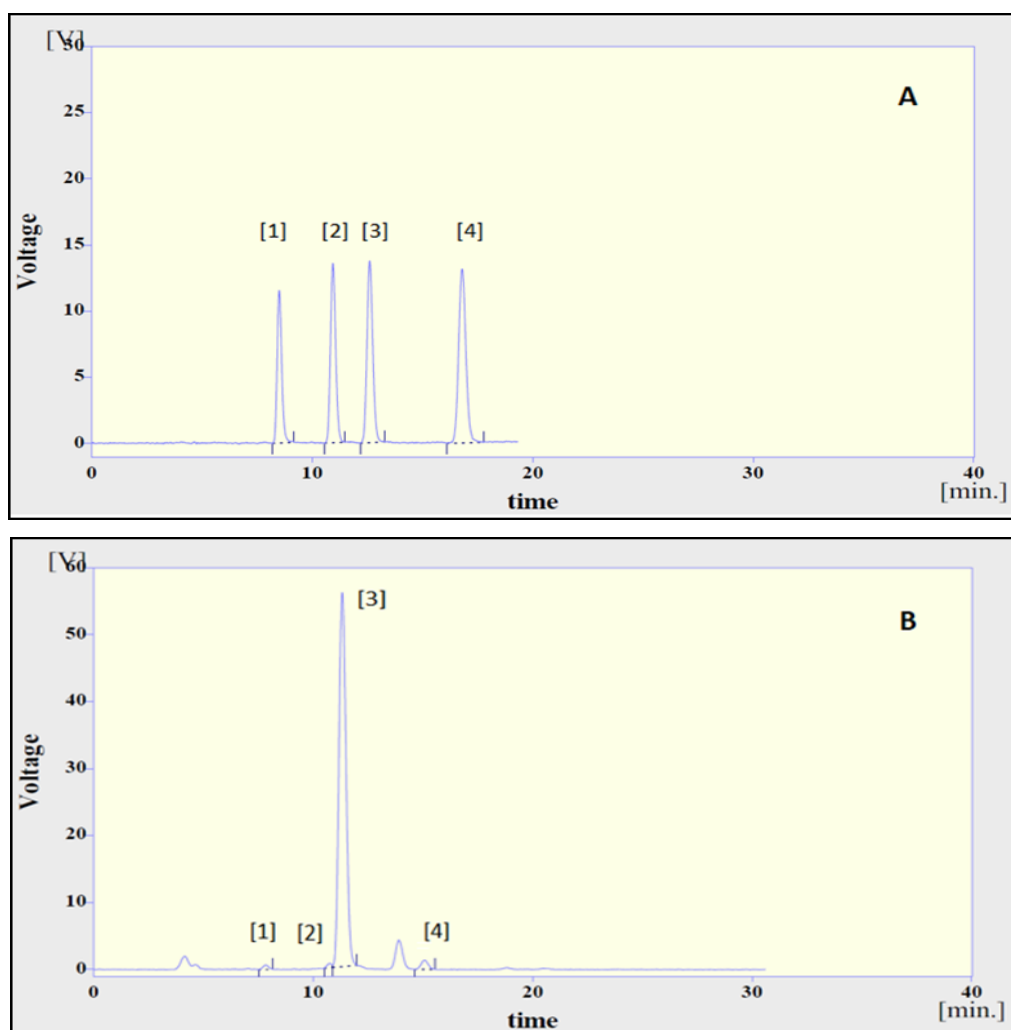
Σχήμα Β.8.2.4. Καμπύλη βαθμονόμησης δ-τοκοφερόλης.

Η ποσότητα των ισομερών τοκοφερολών που προστέθηκε στα δείγματα, ανακτήθηκε κατά 98,5%, 77,9%, 47,4% και 110,4% για τις α-T, β-T, γ-T, και δ-T, αντίστοιχα.

Το Σχήμα Β.8.2.5 απεικονίζει το διαχωρισμό των ισομερών τοκοφερολών, όπως προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο HPLC-FLD. Οι χρόνοι συγκράτησης για τις α-, β-, γ- και δ-τοκοφερόλες ήταν 8, 11, 12 και 16 min. Ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση της συγκέντρωσης κάθε τοκοφερόλης από την τριπλέτα μετρήσεων για κάθε

δείγμα φιστικελαίου παρουσιάζεται στον Πίνακα Β.8.2.1. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η γ -τοκοφερόλη συνεκλύεται με τη β -τοκοτριενόλη και ως αποτέλεσμα η υπολογισμένη περιεκτικότητα της γ -τοκοφερόλης περιλαμβάνει και τα δύο ισομερή. Τα αποτελέσματα ελήφθησαν και διορθώθηκαν με βάση την ανάκτηση.

Τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η κύρια μορφή σε όλα τα δείγματα ήταν η γ -τοκοφερόλη (συνεκλούομενη με τη β -τοκοτριενόλη), ενώ η περιεκτικότητα σε β -τοκοφερόλη ήταν περιορισμένη. Αυτά τα αποτελέσματα συμφωνούν με τους Martínez et al. (2016).



Σχήμα Β.8.2.5. Χρωματογραφήματα HPLC-FLD ενός μείγματος πρότυπου διαλύματος τοκοφερολών (A) και ενός δείγματος φιστικελαίου (B). Κορυφές: 1 (α -τοκοφερόλη), 2 (β -τοκοφερόλη), 3 (γ -τοκοφερόλη και β -τοκοτριενόλη), 4 (δ -τοκοφερόλη).

Πίνακας Β.8.2.1. Περιεκτικότητα δειγμάτων φιστικελαίου σε τοκοφερόλες ($\times 10^2$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ φιστικελαίου).

Αριθμητική κωδικοποίηση	Συγκέντρωση ($\times 10^2$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ φιστικελαίου)			
	α -T	β -T	γ -T ³	δ -T
Έτος συγκομιδής 2017				
A ¹ -1	1,32 \pm 0,10 ⁴	1,14 \pm 0,19	202,72 \pm 12,77	1,73 \pm 0,13
A-2	0,99 \pm 0,05	0,63 \pm 0,09	191,13 \pm 4,38	1,57 \pm 0,02
A-3	3,12 \pm 0,29	1,13 \pm 0,46	235,06 \pm 7,77	2,11 \pm 0,07
A-4	2,13 \pm 0,12	1,10 \pm 0,10	210,49 \pm 18,33	1,77 \pm 0,14
A-5	1,53 \pm 0,16	1,06 \pm 0,04	174,01 \pm 6,78	1,37 \pm 0,09
A-6	1,24 \pm 0,07	0,38 \pm 0,03	173,29 \pm 5,46	1,06 \pm 0,09
A-7	1,71 \pm 0,27	0,98 \pm 0,12	170,07 \pm 12,59	1,78 \pm 0,00
A-8	1,32 \pm 0,18	0,83 \pm 0,31	134,59 \pm 4,15	0,84 \pm 0,22
A-9	1,80 \pm 0,13	0,33 \pm 0,20	199,49 \pm 7,96	1,60 \pm 0,06
A-10	3,37 \pm 0,44	0,55 \pm 0,15	231,93 \pm 9,84	1,17 \pm 0,19
A-11	1,87 \pm 0,17	0,48 \pm 0,07	199,88 \pm 6,87	1,58 \pm 0,12
A-12	1,57 \pm 0,16	1,07 \pm 0,24	186,77 \pm 3,65	1,79 \pm 0,04
A-13	1,73 \pm 0,15	0,39 \pm 0,05	222,09 \pm 10,95	1,59 \pm 0,05
A-14	1,86 \pm 0,30	0,45 \pm 0,24	187,09 \pm 3,09	1,80 \pm 0,15
A-15	0,59 \pm 0,17	0,97 \pm 0,17	173,56 \pm 11,78	1,41 \pm 0,11
Έτος συγκομιδής 2018				
B ² -1	2,83 \pm 0,20	1,26 \pm 0,11	201,78 \pm 9,48	1,89 \pm 0,22
B-2	2,78 \pm 0,35	0,87 \pm 0,15	204,80 \pm 2,12	2,31 \pm 0,28
B-3	3,22 \pm 0,67	0,77 \pm 0,07	195,44 \pm 5,02	1,97 \pm 0,04
B-4	1,72 \pm 0,14	1,33 \pm 0,03	152,10 \pm 2,14	1,73 \pm 0,13
B-5	2,93 \pm 0,12	0,66 \pm 0,07	160,22 \pm 2,28	1,41 \pm 0,17
B-6	1,98 \pm 0,20	1,75 \pm 0,21	191,41 \pm 7,90	2,17 \pm 0,31
B-7	2,26 \pm 0,41	0,45 \pm 0,00	156,43 \pm 1,80	1,33 \pm 0,04
B-8	4,15 \pm 0,04	0,78 \pm 0,07	185,36 \pm 11,25	1,50 \pm 0,04
B-9	2,11 \pm 0,19	1,82 \pm 0,21	164,57 \pm 23,70	1,96 \pm 0,74
B-10	3,28 \pm 0,07	0,62 \pm 0,02	157,49 \pm 5,24	1,20 \pm 0,12
B-11	1,56 \pm 0,22	1,07 \pm 0,32	97,56 \pm 8,15	1,58 \pm 0,03
B-12	2,29 \pm 0,06	1,25 \pm 0,06	193,13 \pm 5,12	2,01 \pm 0,14
B-13	1,59 \pm 0,08	0,86 \pm 0,11	184,07 \pm 9,59	1,81 \pm 0,01
B-14	4,10 \pm 0,08	1,68 \pm 0,11	223,82 \pm 2,45	2,20 \pm 0,09
B-15	1,73 \pm 0,02	0,65 \pm 0,12	157,93 \pm 4,27	1,79 \pm 0,03
B-16	2,15 \pm 0,20	0,83 \pm 0,11	213,88 \pm 3,55	2,12 \pm 0,04
B-17	0,53 \pm 0,03	1,01 \pm 0,28	114,45 \pm 39,60	1,43 \pm 0,43
B-18	2,56 \pm 0,17	1,79 \pm 0,34	196,23 \pm 2,86	1,99 \pm 0,10
B-19	1,88 \pm 0,25	0,96 \pm 0,08	203,79 \pm 2,77	2,13 \pm 0,08
B-20	4,39 \pm 0,15	1,79 \pm 0,11	216,32 \pm 7,47	1,88 \pm 0,07

B-21	3,07±0,28	2,25±0,14	174,04±4,57	1,79±0,11
B-22	3,51±0,22	1,37±0,16	178,60±6,09	1,73±0,13
B-23	0,70±0,11	1,11±0,08	119,08±4,32	1,29±0,03
B-24	2,23±0,48	1,58±0,16	203,53±5,74	1,96±0,24
B-25	1,47±0,13	1,96±0,06	169,36±7,54	1,79±0,10
B-26	2,47±0,43	0,71±0,09	158,31±14,51	1,46±0,32
B-27	4,20±0,07	2,22±0,65	170,70±2,42	1,90±0,02
B-28	5,90±0,22	1,56±0,37	225,78±5,51	1,99±0,05
B-29	1,98±0,19	0,70±0,02	157,50±4,63	1,59±0,05
B-30	2,58±0,11	-	216,02±3,06	1,98±1,12

¹A: έτος συγκομιδής 2017, ²B: έτος συγκομιδής 2018, ³γ-T συνεκλουόμενη με τη β-τοκοτριενόλη, ⁴Μέσος όρος±τυπική απόκλιση από τρεις μετρήσεις για κάθε δείγμα.

Σύμφωνα με τον Πίνακα Β.8.2.1, ο μέσος όρος της α-τοκοφερόλης το 2017 ήταν 174 µg/mL που ισοδυναμεί με 193 mg/kg και το 2018 ήταν 261 µg/mL που ισοδυναμεί με 290 mg/kg. Ο μέσος όρος της β-τοκοφερόλης το 2017 ήταν 77 µg/mL που ισοδυναμεί με 90 mg/kg και το 2018 ήταν 123 µg/mL που ισοδυναμεί με 137 mg/kg. Ο μέσος όρος της γ-τοκοφερόλης συνεκλουόμενη με τη β-τοκοτριενόλη το 2017 ήταν 19281 µg/mL που ισοδυναμεί με 21420 mg/kg και το 2018 ήταν 17812 µg/mL που ισοδυναμεί με 19790 mg/kg. Ο μέσος όρος της δ-τοκοφερόλης το 2017 ήταν 154 µg/mL που ισοδυναμεί με 171 mg/kg και το 2018 ήταν 180 µg/mL που ισοδυναμεί με 200 mg/kg.

Συγκριτικά με άλλες μελέτες, στην αραχίδα μετρήθηκαν 130 mg α-τοκοφερόλης/kg ελαίου, 210 mg γ-τοκοφερόλης/kg ελαίου και 20 mg δ-τοκοφερόλης/kg ελαίου (Rizvi et al., 2014). Σε ελαιόλαδο, μετρήθηκαν 256,07 mg/kg ελαίου, 2,08 mg/kg ελαίου, 5,29 mg/kg ελαίου και 0,45 mg/kg ελαίου για την α-, β-, γ-συνεκλουόμενη με τη β-τοκοτριενόλη και δ-τοκοφερόλη, αντίστοιχα (Cunha, Amaral, Fernandes, & Oliveira, 2006). Ωστόσο, οι Beldean-Galea, Horga και Coman (2010) οδηγήθηκαν σε υψηλότερες περιεκτικότητες (530 mg α-τοκοφερόλης/kg ελαίου, 48,5 mg γ-τοκοφερόλης/kg ελαίου και 825 mg δ-τοκοφερόλης/kg ελαίου). Σε έλαιο από καρύδια, σύμφωνα με τους Bonvehí, Coll και Rius (2000), η περιεκτικότητα της α-τοκοφερόλης κυμαινόταν μεταξύ 12-15 µg/mL και της δ-τοκοφερόλης μεταξύ 61-72 µg/mL, ενώ σύμφωνα με τους Amaral, Casal, Oliveira και Seabra (2005), η περιεκτικότητα για τις α-, β-, γ-, δ-τοκοφερόλες βρέθηκε 9,99 µg/mL, 0,72 µg/mL, 190,05 µg/mL και 8,37 µg/mL, αντίστοιχα. Συγκρίνοντας πάλι με έλαιο από καρύδια, μετρήθηκαν 28,3 mg α-τοκοφερόλης/kg ελαίου, 127,6 mg γ-τοκοφερόλης/kg ελαίου

και 22,8 mg δ-τοκοφερόλης/kg ελαίου (Beldean-Galea et al., 2010). Τέλος, το έλαιο από φουντούκια εκτιμήθηκε ότι περιείχε 425-478 μg/mL και 14-17 μg/mL α- και δ-τοκοφερόλης κατ' αντιστοιχία (Bonvehi et al., 2000).

B.8.2.1. Σύγκριση 15 δειγμάτων 2017 και 30 δειγμάτων 2018

Το 2017 η συγκέντρωση τοκοφερολών στα φιστικέλαια, εκφρασμένη επί 10^2 μg/mL φιστικελαίου, κυμαινόταν από 0,59 έως 3,37 για την α-τοκοφερόλη, 0,33 έως 1,14 για τη β-τοκοφερόλη, 134,59 έως 235,06 για τη γ-τοκοφερόλη συνεκλούμενη με τη β-τοκοτριενόλη και 0,84 έως 2,11 για τη δ-τοκοφερόλη.

Το 2018 η συγκέντρωση τοκοφερολών στα φιστικέλαια, εκφρασμένη επί 10^2 μg/mL φιστικελαίου, κυμαινόταν από 0,53 έως 5,90 για την α-τοκοφερόλη, μη ανιχνεύσιμο έως 2,25 για τη β-τοκοφερόλη, 97,56 έως 225,78 για τη γ-τοκοφερόλη συνεκλούμενη με τη β-τοκοτριενόλη και 1,20 έως 2,31 για τη δ-τοκοφερόλη.

Ο μέσος όρος κάθε έτους συγκομιδής ήταν $1,74 \pm 0,72$ (2017), $2,61 \pm 1,15$ (2018), $0,77 \pm 0,31$ (2017), $1,23 \pm 0,52$ (2018), $192,81 \pm 26,41$ (2017), $178,12 \pm 32,01$ (2018), $1,54 \pm 0,33$ (2017) και $1,80 \pm 0,29$ (2018) εκφρασμένος επί 10^2 μg/mL φιστικελαίου για την α-τοκοφερόλη, τη β-τοκοφερόλη, τη γ-τοκοφερόλη συνεκλούμενη με τη β-τοκοτριενόλη και τη δ-τοκοφερόλη, αντίστοιχα. Ο μέσος όρος ($\times 10^2$ μg/mL φιστικελαίου) του αθροίσματος των παραπάνω ήταν $196,87 \pm 27,07$ για τη συγκομιδή 2017 και $183,71 \pm 33,01$ για το 2018.

Τα δείγματα φιστικελαίου δεν μπόρεσαν να διακριθούν μεταξύ των ετών συγκομιδής σύμφωνα με τη συνολική τους περιεκτικότητα σε τοκοφερόλες και β-τοκοτριενόλη. Το Levene's test μεταξύ 2017 και 2018 παρουσίασε p-value > 0,05 (Wilks' lambda = 0,960) και ποσοστό διασταυρούμενης επικύρωσης 64,4%.

B.8.2.2. Σύγκριση 11 δειγμάτων 2017 και 11 δειγμάτων 2018

Το 2017 η συγκέντρωση τοκοφερολών στα φιστικέλαια, εκφρασμένη επί 10^2 μg/mL φιστικελαίου, κυμαινόταν από 0,99 έως 3,37 για την α-τοκοφερόλη, 0,33 έως 1,14 για τη β-τοκοφερόλη, 134,59 έως 235,06 για τη γ-τοκοφερόλη συνεκλούμενη με τη β-τοκοτριενόλη και 0,84 έως 2,11 για τη δ-τοκοφερόλη.

Το 2018 η συγκέντρωση τοκοφερολών στα φιστικέλαια, εκφρασμένη επί 10^2 μg/mL φιστικελαίου, κυμαινόταν από 1,56 έως 4,15 για την α-τοκοφερόλη, 0,45 έως

1,82 για τη β-τοκοφερόλη, 97,56 έως 204,80 για τη γ-τοκοφερόλη συνεκλούμενη με τη β-τοκοτριενόλη και 1,20 έως 2,31 για τη δ-τοκοφερόλη.

Ο μέσος όρος κάθε έτους συγκομιδής ήταν $1,85 \pm 0,76$ (2017), $2,62 \pm 0,78$ (2018), $0,78 \pm 0,32$ (2017), $1,03 \pm 0,46$ (2018), $192,97 \pm 29,09$ (2017), $169,74 \pm 30,98$ (2018), $1,51 \pm 0,37$ (2017) και $1,73 \pm 0,36$ (2018) εκφρασμένος επί 10^2 $\mu\text{g/mL}$ φιστικελαίου για την α-τοκοφερόλη, τη β-τοκοφερόλη, τη γ-τοκοφερόλη συνεκλούμενη με τη β-τοκοτριενόλη και τη δ-τοκοφερόλη, αντίστοιχα. Ο μέσος όρος ($\times 10^2$ $\mu\text{g/mL}$ φιστικελαίου) του αθροίσματος των παραπάνω ήταν $197,11 \pm 29,91$ για τη συγκομιδή 2017 και $175,13 \pm 31,62$ για το 2018.

Τα δείγματα φιστικελαίου δεν μπόρεσαν να διακριθούν μεταξύ των ετών συγκομιδής σύμφωνα με τη συνολική τους περιεκτικότητα σε τοκοφερόλες και β-τοκοτριενόλη. Το Levene's test μεταξύ 2017 και 2018 παρουσίασε $p\text{-value} > 0,05$ (Wilks' lambda=0,877) και ποσοστό διασταυρούμενης επικύρωσης 59,1%.

B.8.3. Συμπεράσματα

Το άθροισμα όλων των τοκοφερολών και της β-τοκοτριενόλης για το φιστικέλαιο βρέθηκε κατά πολύ υψηλότερο σε σχέση με μελέτες ως προς το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο. Τόσο για τα 15 δείγματα του 2017 με τα 30 δείγματα του 2018 όσο και για τα 11 δείγματα του 2017 με τα 11 του 2018 ο διαχωρισμός μεταξύ των δύο ετών συγκομιδής βάσει της συνολικής περιεκτικότητας σε τοκοφερόλες και β-τοκοτριενόλη βρέθηκε, στατιστικά, μη σημαντικός ($p\text{-value} > 0,05$). Τα ποσοστά σωστής ταξινόμησης ήταν 64,4% και 59,1% κατά τη σύγκριση των δειγμάτων 15(2017)-30(2018) και 11(2017)-11(2018), αντίστοιχα.

B.9. Φασματοσκοπική μελέτη φιστικελαίου με την τεχνική ATR - Ανάπτυξη χημειομετρικού μοντέλου ανάλογα με το έτος συγκομιδής

Στο παρόν κεφάλαιο περιγράφεται η φασματοσκοπική μελέτη των φιστικελαίων με την τεχνική ATR της φασματοσκοπίας FTIR. Τα φάσματα επεξεργάστηκαν και ακολούθησε απόδοση των κορυφών τους. Στη συνέχεια, αναλύονται τα αποτελέσματα από το συνδυασμό των φασματοσκοπικών δεδομένων και της χημειομετρίας με σκοπό την ανάπτυξη χημειομετρικού μοντέλου για τη διαφοροποίηση των δειγμάτων ανάλογα με το έτος συγκομιδής τους. Η σύγκριση των δειγμάτων μεταξύ τους επιτυγχάνεται αφενός μεταξύ των 15 δειγμάτων του 2017 και των 30 δειγμάτων του 2018 και αφετέρου μεταξύ των 11 δειγμάτων του 2017 και των 11 δειγμάτων του 2018, που είναι άμεσα συγκρίσιμα.

B.9.1. Πειραματική διαδικασία

Τα φάσματα των δειγμάτων φιστικελαίου καταγράφηκαν εις τριπλούν (τρία διαφορετικά υποδείγματα για κάθε δείγμα) σε φασματοφωτόμετρο Thermo Nicolet 6700 FTIR (Thermo Electron Corporation, Madison, WI, USA) εξοπλισμένο με ανιχνευτή DTGS. Τα φάσματα λήφθηκαν με την τεχνική ATR με οριζόντιο υποδοχέα ATR από την Spectra-Tech Inc. (Stamford, CT, USA). Ο υποδοχέας αυτός ήταν εξοπλισμένος με κρύσταλλο ZnSe-ATR τραπεζοειδούς σχήματος (800×10×4 mm). Η γωνία πρόσπτωσης της δέσμης της υπέρυθρης ακτινοβολίας ήταν 45°. Για την καταγραφή του φάσματος, 200 μL φιστικελαίου τοποθετήθηκαν στον κρύσταλλο ATR και τα φάσματα καταγράφηκαν με διαχωριστική ικανότητα 4 cm^{-1} , 100 σαρώσεις και η ταχύτητα του κινούμενου καθρέφτη του συμβολόμετρου ήταν 0,6329 mm/s. Το φάσμα υποβάθρου ελήφθη χρησιμοποιώντας μόνον τον κρύσταλλο ATR, πριν από την καταγραφή του φάσματος κάθε δείγματος.

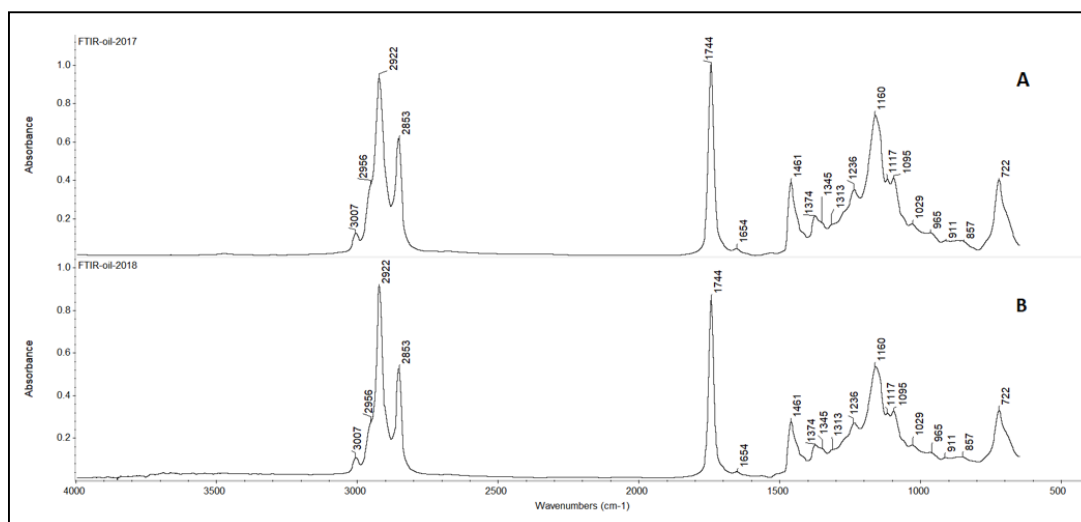
Τα φάσματα εξομαλύνθηκαν χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο Savitsky-Golay (πέντε κινούμενων σημείων με χρήση πολυώνυμου δεύτερου βαθμού) και η βασική γραμμή διορθώθηκε χρησιμοποιώντας τη συνάρτηση αυτόματης διόρθωσης βασικής γραμμής (πολυώνυμο δεύτερου βαθμού, 20 επαναλήψεις). Στη συνέχεια, υπολογίστηκε και κανονικοποιήθηκε (απορρόφηση 0-1) το μέσο φάσμα κάθε δείγματος από την τριπλέτα των υποδειγμάτων. Κάθε μέσο φάσμα εξήχθη και αποθηκεύτηκε ως αρχείο

.csv για χρήση του στη διακριτική ανάλυση. Η συλλογή και επεξεργασία των φασματικών δεδομένων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το OMNIC ver. Λογισμικό 8.2.0.387 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

Η στατιστική ανάλυση με σκοπό την ανάπτυξη χημειομετρικού μοντέλου διαφοροποίησης των φιστικιών σε σχέση με το έτος συγκομιδής (2017, 2018) πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό MetaboAnalyst 5.0 και την τεχνική διασταυρούμενης επικύρωσης (όπως αυτή περιγράφεται στο κεφάλαιο A.1.7).

B.9.2. Αποτελέσματα-Συζήτηση

Το Σχήμα B.9.2.1 απεικονίζει δύο αντιπροσωπευτικά φάσματα FTIR-ATR. Τα φάσματα που παρουσιάζονται, αφορούν δείγματα του ίδιου παραγωγού αλλά διαφορετικού έτους συγκομιδής (2017, 2018). Και τα δύο φάσματα είναι οπτικά παρόμοια και, ως εκ τούτου, είναι απαραίτητη η χρήση διακριτικής ανάλυσης για τη διερεύνηση της διαφοροποίησής τους. Κάθε κορυφή αντιστοιχεί σε έναν συγκεκριμένο κυματαριθμό που αποδίδεται σε συγκεκριμένες δονήσεις και χημικές δομές συστατικών του φιστικελαίου (Πίνακας B.9.2.1).



Σχήμα B.9.2.1. Αντιπροσωπευτικά φάσματα FTIR-ATR δειγμάτων φιστικελαίου ίδιας προέλευσης, αλλά από διαφορετικά έτη συγκομιδής, 2017 (A) και 2018 (B).

Πίνακας Β.9.2.1. Απόδοση των κορυφών των FTIR-ATR φασμάτων δειγμάτων φιστικελαίου.

Κοματαριθμός (cm^{-1})	Λειτουργική ομάδα	Συνομογραφία	Αναφορά
3007	C-H εντός επιπέδου συμμετρική δόνηση τάσης του =C-H	$\nu_s(=C-H)$	(Gericke & Hühnerfuss, 1995· Schulz & Baranska, 2007· Rohman & Che Man, 2010· Luna, Silva, Ferré, Boqué, 2013· Uncu, Ozen, & Tokatli, 2019)
2956	C-H ασύμμετρη δόνηση τάσης του -CH ₃	$\nu_{as}(CH_3)$	(Rohman & Che Man, 2010· Dymińska et al., 2017· Uncu et al., 2019)
2922	C-H εντός επιπέδου ασύμμετρη δόνηση τάσης του -CH ₂ -	$\nu_{as}(CH_2)$	(Gericke & Hühnerfuss, 1995· Christy & Egeberg, 2006· Moros, Roth, Garrigues, & Guardia, 2009· Rohman & Che Man, 2010· Gurdeniz, Ozen, & Tokatli, 2010· Luna et al., 2013· Uncu et al., 2019)
2853	C-H εντός επιπέδου συμμετρική δόνηση τάσης του -CH ₂ -	$\nu_s(CH_2)$	(Gericke & Hühnerfuss, 1995· Christy & Egeberg, 2006· Rohman & Che Man, 2010· Dymińska et al., 2017· Uncu et al., 2019)
1744	C=O εντός επιπέδου δόνηση τάσης	$\nu(C=O)$	(Moros et al., 2009· Gurdeniz et al., 2010· Rohman & Che Man, 2010· Luna et al., 2013· Uncu et al., 2019)
1654	>C=C< εντός επιπέδου δόνηση τάσης (cis-ολεφίνες)	$\nu(C=C)$	(Schulz & Baranska, 2007· Uncu et al., 2019)
1461	C-H εντός επιπέδου δόνηση κάμψης του -CH ₂ - (ψαλιδοειδής)	$\delta_s(CH_2)$	(Gericke & Hühnerfuss, 1995· Christy & Egeberg, 2006· Schulz & Baranska, 2007· Gutiérrez, Quiñones-Segura, Sanchez-Reinoso, Díaz, & Abril, 2017· Uncu et al., 2019)
1374	C-H εντός επιπέδου συμμετρική δόνηση κάμψης του -CH ₃	$\delta(CH_3)$	(Christy & Egeberg, 2006· Rohman & Che Man, 2010· Luna et al.,

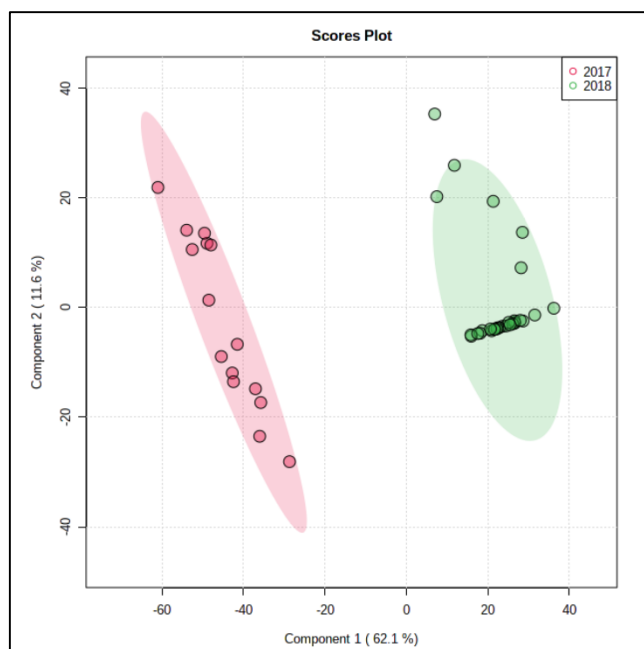
			2013· Dymińska et al., 2017)
1345, 1313	-CH ₂ - εκτός επιπέδου δόνηση κάμψης (σειση)	$\omega(\text{CH}_2)$	(Rohman & Che Man, 2010· Dymińska et al., 2017)
1236, 1160, 1117	C-O ασύμμετρη δόνηση τάσης	$\nu_{\text{as}}(\text{C-O})$	(Christy & Egeberg, 2006· Rohman & Che Man, 2010· Luna et al., 2013· Dymińska et al., 2017· Gutiérrez et al., 2017· Uncu & Ozen, 2019· Uncu et al., 2019)
1095, 1029	C-C εντός επιπέδου δόνηση τάσης	$\nu(\text{C-C})$	(Christy & Egeberg, 2006· Dymińska et al., 2017· Gutiérrez et al., 2017)
965	C-H εντός επιπέδου δόνηση κάμψης (ψαλιδοειδής)	$\delta_s(\text{C=C=C})$	(Rohman & Che Man, 2010· Dymińska et al., 2017)
911, 857	-CH ₂ - εκτός επιπέδου δόνηση	$\gamma(\text{CH}_2)$	(Rohman & Che Man, 2010· Dymińska et al., 2017)
722	-CH=CH- δόνηση τάσης (cis-ολεφίνες)	$\nu(\text{C=C})$	(Moros et al., 2009· Rohman & Che Man, 2010· Uncu et al., 2019)
	εκτός επιπέδου δόνηση	$\gamma(\text{C=C})$	(Dymińska et al., 2017)
	εντός επιπέδου δόνηση κάμψης του -CH ₂ - (αιώρηση)	$\rho(\text{CH}_2)$	(Farber et al., 2019)

Το φιστικέλαιο περιέχει κυρίως τριγλυκερίδια, τα οποία αποτελούνται από ένα μόριο γλυκερόλης εστεροποιημένης με τρία λιπαρά οξέα. Τα λιπαρά οξέα απορροφούν στην ίδια φασματική περιοχή (722-3007 cm⁻¹) με τις φαινόλες, τις τοκοφερόλες και τις στερόλες (Rosenkrantz, 1948· Gericke & Hühnerfuss, 1995· Ahmed, Daun, & Przybylski, 2005· Rohman & Che Man, 2010· Uncu et al., 2019). Οι κορυφές στα 2922 και 2853 cm⁻¹ οφείλονται στην ασύμμετρη και συμμετρική δόνηση των δεσμών C-H της μη αρωματικής ομάδας μεθυλενίου. Οι κορυφές ήταν ψηλές και σχετικά πλατειές. Αυτό οφείλεται, αφενός, στο μεγάλο αριθμό ομάδων μεθυλενίου στο λιπαρό οξύ (τουλάχιστον 12) και αφετέρου στην υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά οξέα των φιστικελαιών. Οι δονήσεις τάσης C-H των τερματικών μεθυλικών ομάδων -CH₃ ήταν αισθητά ασθενέστερες σε σχέση με εκείνες των πιο πολλών -CH₂- ομάδων. Ο ασθενής δεξιός ώμος στην ισχυρή ζώνη 2922 cm⁻¹ πιθανώς αντιπροσωπεύει τις ασθενέστερες συμμετρικές δονήσεις τάσης C-H του -CH₃, $\nu_s(-\text{CH}_3)$, οι οποίες αναμενόταν να εμφανιστούν στα περίπου 2875 cm⁻¹ (Kamnev et al., 2021). Δύο άλλες σημαντικές

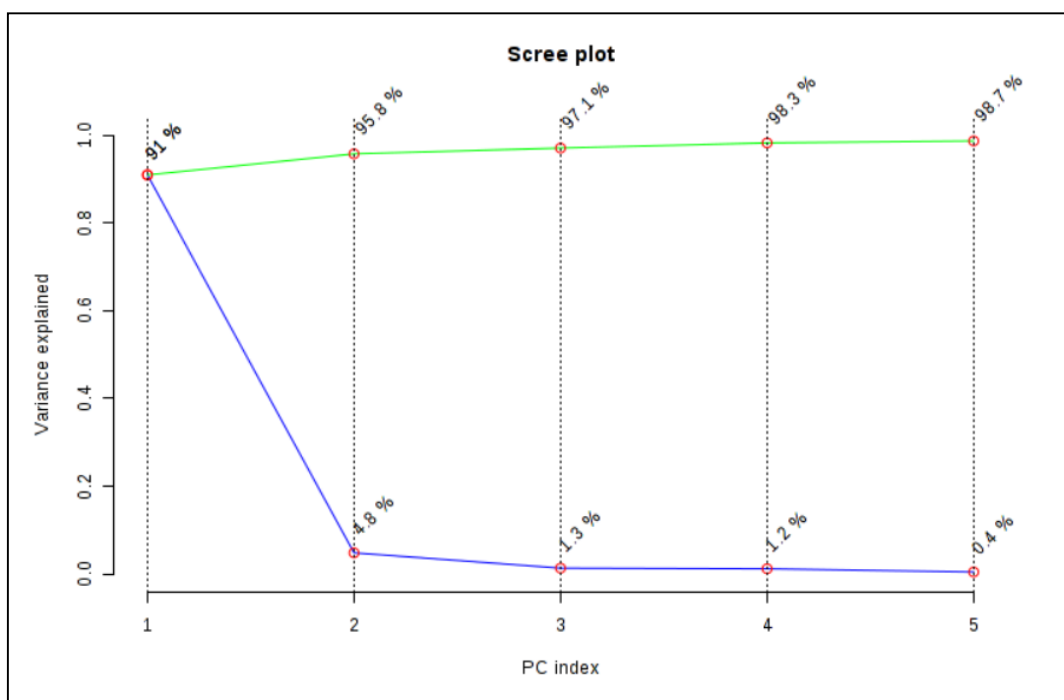
κορυφές εμφανίζονται στα 1744 και 1160 cm^{-1} , οι οποίες συσχετίζονται με τη δόνηση τάσης του καρβονυλίου (C=O) των εστερικών δεσμών, και με την ασύμμετρη δόνηση τάση των δεσμών C-O των εστέρων, αντίστοιχα (Unecu et al., 2019). Η ένταση των κορυφών στα 1236, 1160 και 1117 cm^{-1} εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ημερομηνία συγκομιδής. Σύμφωνα με μια μελέτη ελαιολάδου από τους Lopez-Sanchez et al. (2010), αυτές οι κορυφές παρατηρούνται πιο έντονες στην αρχή και μειώνονται με την ωρίμανση του ελαιολάδου.

B.9.2.1. Σύγκριση 15 δειγμάτων 2017 και 30 δειγμάτων 2018

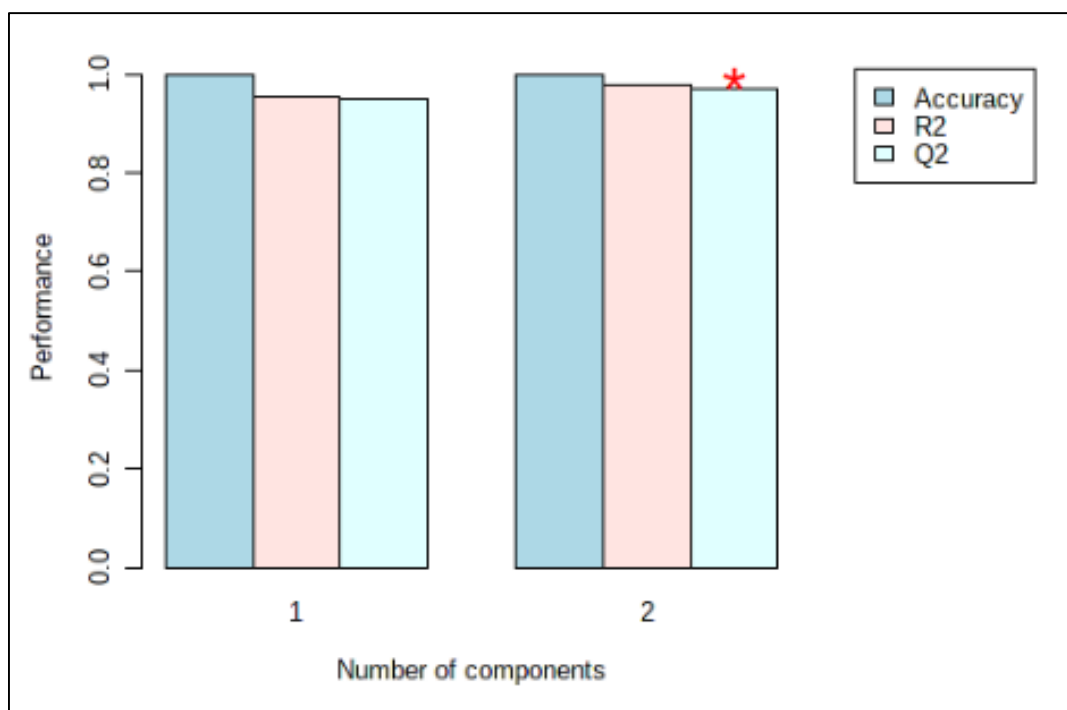
Έπειτα από το IQR φιλτράρισμα, τα φασματοσκοπικά δεδομένα, που είχαν ληφθεί ως .csv αρχεία, υπέστησαν λογαριθμικό μετασχηματισμό και αυτόματη κλιμάκωση, με σκοπό που περιγράφεται στο κεφάλαιο A.1.7. Χρησιμοποιήθηκε όλο το εύρος των κυματαριθμών (400-4000 cm^{-1}), δηλαδή ολόκληρο το φάσμα FTIR-ATR, και αποδείχθηκε σαφής διάκριση των δειγμάτων σύμφωνα με το έτος συγκομιδής τους (Σχήμα B.9.2.1.1). Στο Σχήμα B.9.2.1.2 αποκαλύπτεται ότι η μεγαλύτερη επίδραση στη διακύμανση των φασμάτων φιστικελαίου σχετιζόταν με δύο PC ($R^2=0,992$). Η ικανοποιητική τιμή του Q^2 ($Q^2=0,987$) υποδήλωνε υψηλή προγνωστική ακρίβεια του χημειομετρικού μοντέλου που αναπτύχθηκε (Σχήμα B.9.2.1.3 και Πίνακας B.9.2.1.1).



Σχήμα B.9.2.1.1. PLS-DA 2D scores plot για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική ATR σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).



Σχήμα B.9.2.1.2. Γράφημα εξηγηματικής διακύμανσης για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική ATR σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).

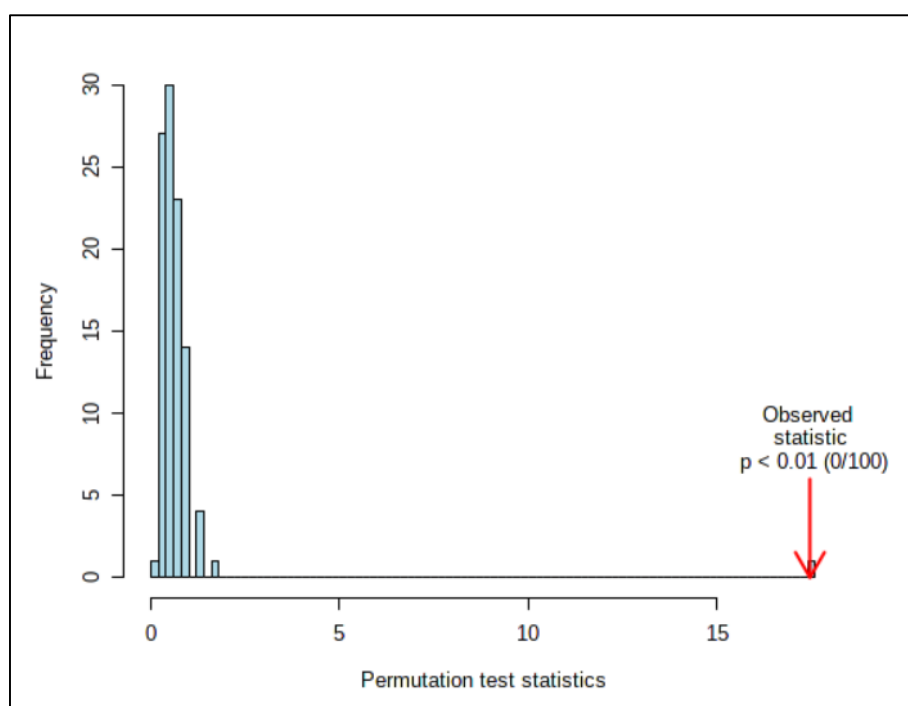


Σχήμα B.9.2.1.3. PLS-DA διασταυρούμενη επικύρωση (cross-validation) για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική ATR σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).

Πίνακας B.9.2.1.1. PLS-DA απόδοση μοντέλου διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική ATR σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).

Μέτρηση	1 PC	2 PC
Ακρίβεια (accuracy)	1,00000	1,00000
R ²	0,97758	0,99243
Q ²	0,97135	0,98733

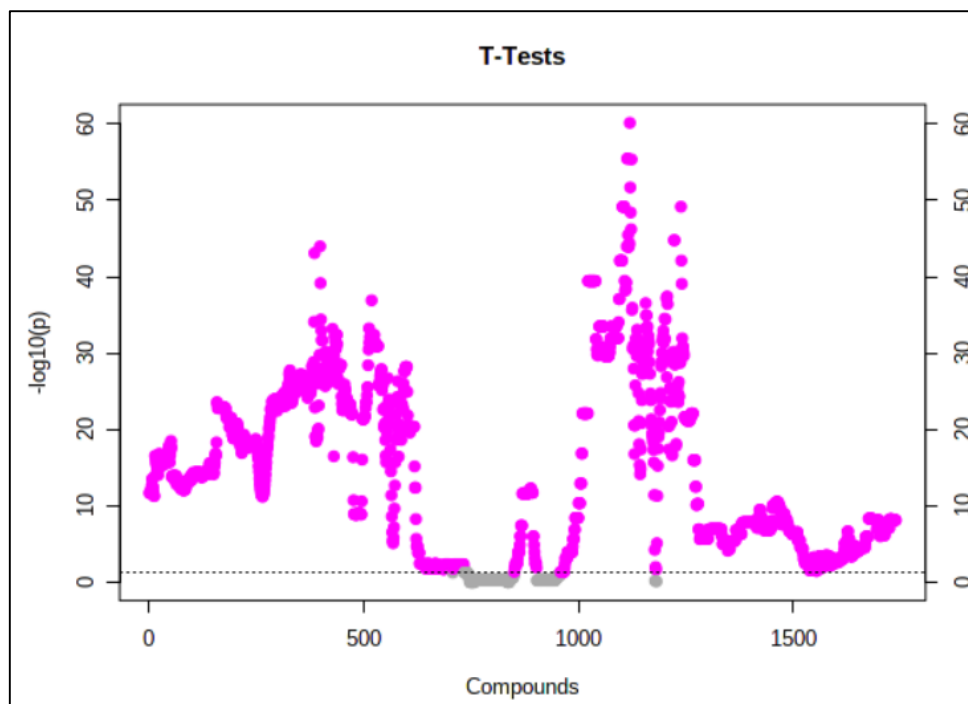
Η στατιστική σημασία του μοντέλου PLS-DA αξιολογήθηκε με permutation test (Σχήμα B.9.2.1.4). Δεδομένου ότι ο δείκτης με το κόκκινο χρώμα βρέθηκε εντελώς δεξιά, ήταν εμφανές ότι ο διαχωρισμός των δειγμάτων σε δύο ομάδες ήταν σημαντικός από στατιστική πλευρά (Barberini et al., 2016).



Σχήμα B.9.2.1.4. PLS-DA permutation test για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική ATR σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst)· (permutation numbers: 100).

Τα δεδομένα από τα δύο διαδοχικά έτη συγκομιδής συγκρίθηκαν χρησιμοποιώντας t-test, το οποίο έδειξε ότι σχεδόν ολόκληρο το φάσμα έπαιξε σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση. Υπήρξε πλήρης διάκριση μεταξύ των δύο ετών

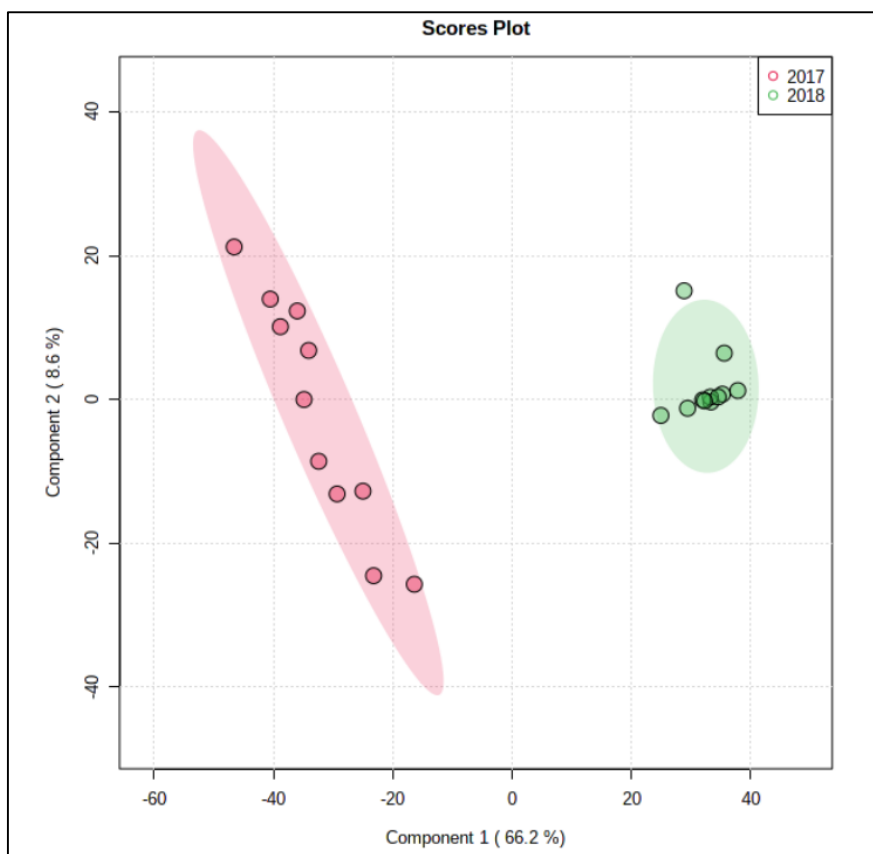
συγκομιδής. Οι στατιστικά σημαντικοί για τη διάκριση κυματαριθμοί εμφανίστηκαν με ροζ χρώμα (Σχήμα B.9.2.1.5). Οι κυματαριθμοί με τα υψηλότερα VIP scores που συνείσφεραν περισσότερο στη διαφοροποίηση ήταν οι περιοχές 2800-3040 και 1400-1500 cm^{-1} , που εμφάνισαν μικρότερη σχετική ένταση το 2018 σε σχέση με το 2017.



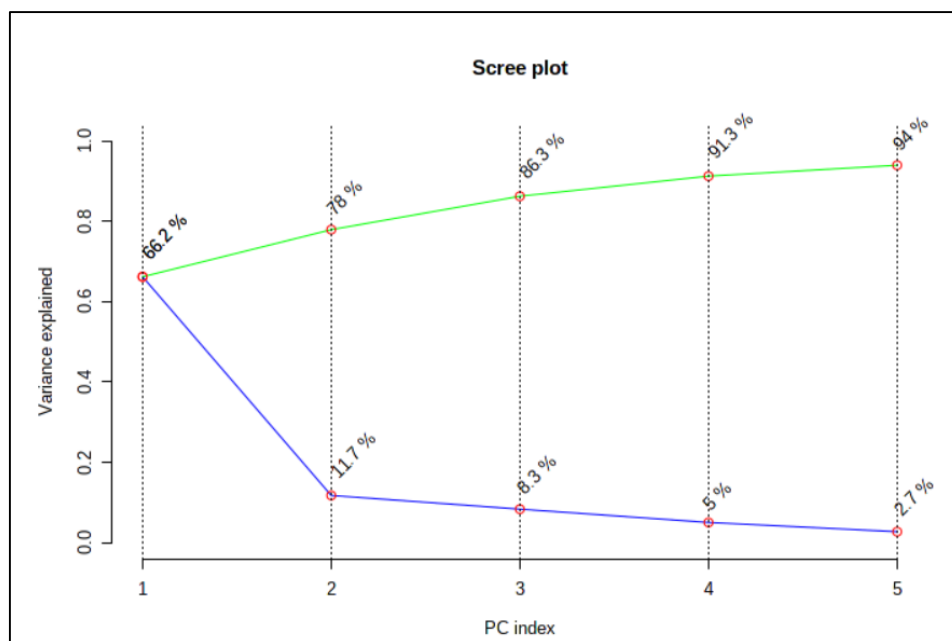
Σχήμα B.9.2.1.5. T-test για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική ATR σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).

B.9.2.2. Σύγκριση 11 δειγμάτων 2017 και 11 δειγμάτων 2018

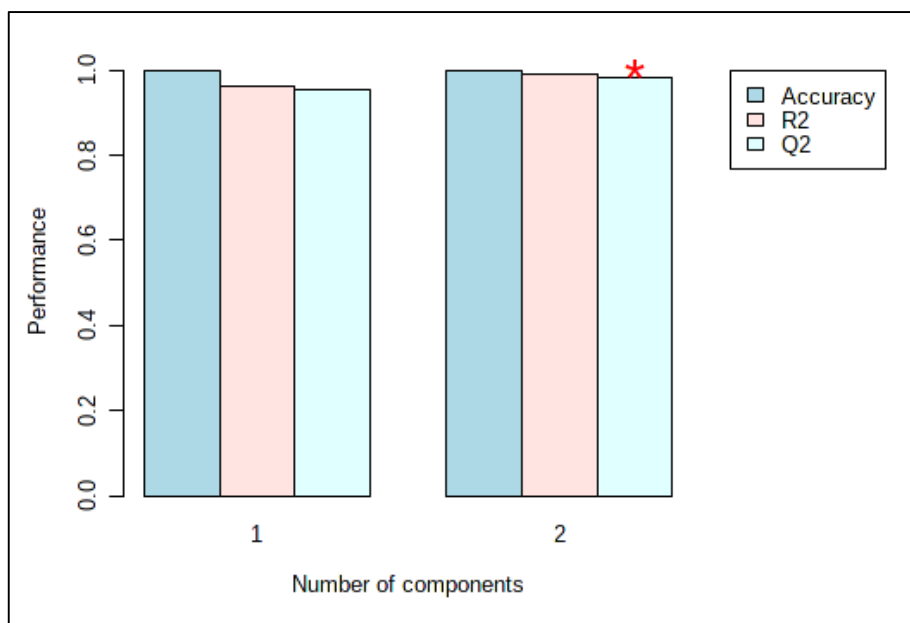
Μετά από το IQR φιλτράρισμα, τα φασματοσκοπικά δεδομένα, που είχαν ληφθεί ως .csv αρχεία, υπέστησαν λογαριθμικό μετασχηματισμό και αυτόματη κλιμάκωση, με σκοπό που περιγράφεται στο κεφάλαιο A.1.7. Χρησιμοποιήθηκε όλο το εύρος των κυματαριθμών ($400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$), δηλαδή ολόκληρο το φάσμα FTIR-ATR, και αποδείχθηκε σαφής διάκριση των δειγμάτων σύμφωνα με το έτος συγκομιδής τους (Σχήμα B.9.2.2.1). Στο Σχήμα B.9.2.2.2 αποκαλύπτεται ότι η μεγαλύτερη επίδραση στη διακύμανση των φασμάτων φιστικελαίου σχετιζόταν με δύο PC ($R^2=0,988$). Η ικανοποιητική τιμή του Q^2 ($Q^2=0,980$) υποδήλωνε υψηλή προγνωστική ακρίβεια του χημειομετρικού μοντέλου που αναπτύχθηκε (Σχήμα B.9.2.2.3 και Πίνακας B.9.2.2.1).



Σχήμα Β.9.2.2.1. PLS-DA 2D scores plot για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική ATR σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).



Σχήμα Β.9.2.2.2. Γράφημα επεξηγηματικής διακύμανσης για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική ATR σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).

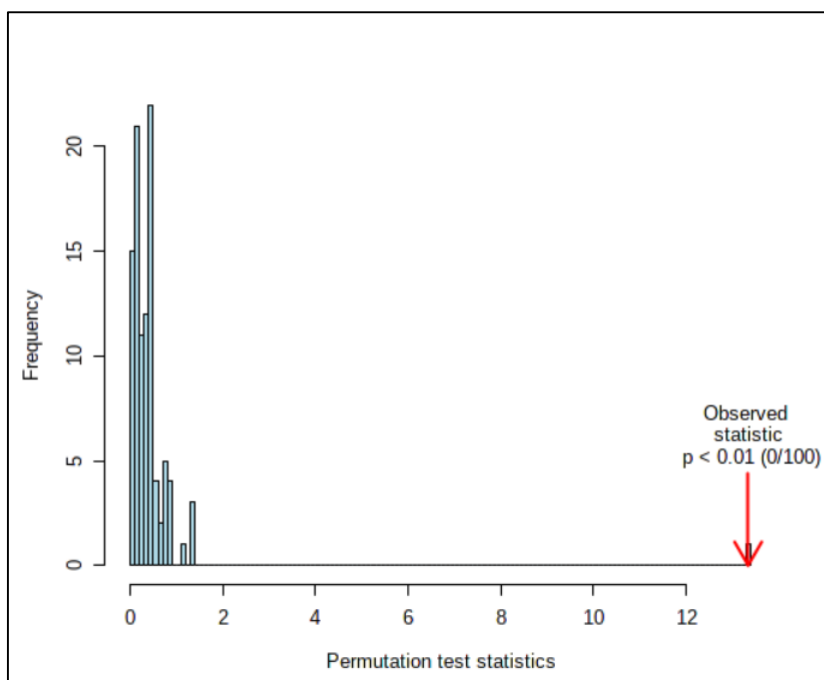


Σχήμα B.9.2.2.3. PLS-DA διασταυρούμενη επικύρωση (cross-validation) για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική ATR σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).

Πίνακας B.9.2.2.1. PLS-DA απόδοση μοντέλου διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική ATR σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).

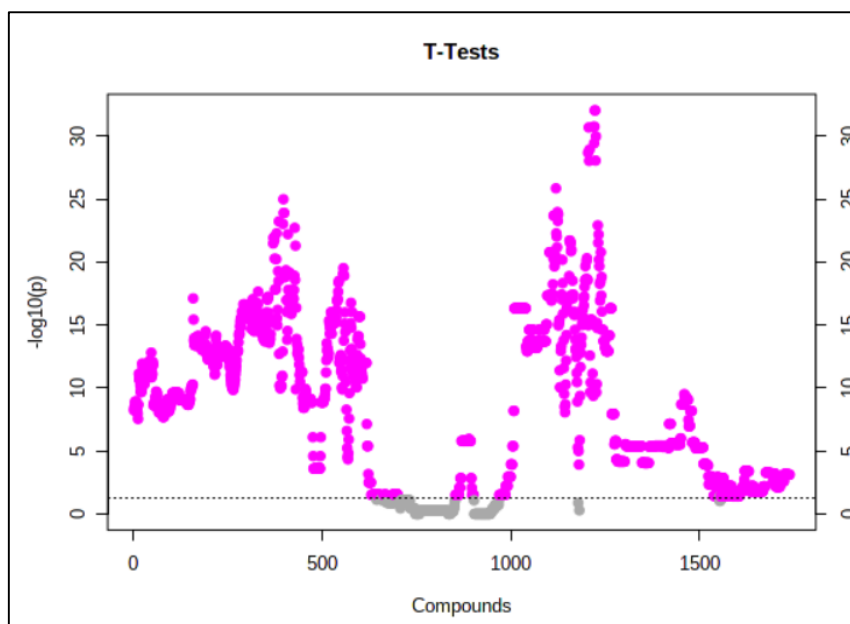
Μέτρηση	1 PC	2 PC
Ακρίβεια (accuracy)	1,00000	1,00000
R ²	0,96397	0,98800
Q ²	0,95235	0,98000

Η στατιστική σημασία του μοντέλου PLS-DA αξιολογήθηκε με permutation test (Σχήμα B.9.2.2.4). Δεδομένου ότι ο δείκτης με το κόκκινο χρώμα βρέθηκε εντελώς δεξιά, ήταν εμφανές ότι ο διαχωρισμός των δειγμάτων σε δύο ομάδες ήταν σημαντικός από στατιστική πλευρά (Barberini et al., 2016).



Σχήμα B.9.2.2.4. PLS-DA permutation test για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική ATR σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst)· (permutation numbers: 100).

Τα δεδομένα από τα δύο διαδοχικά έτη συγκομιδής (2017, 2018) συγκρίθηκαν χρησιμοποιώντας t-test, το οποίο έδειξε ότι σχεδόν ολόκληρο το φάσμα έπαιξε σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση. Υπήρξε πλήρης διάκριση μεταξύ των δύο ετών συγκομιδής. Οι στατιστικά σημαντικοί για τη διάκριση κυματαριθμοί εμφανίστηκαν με ροζ χρώμα (Σχήμα B.9.2.2.5). Οι κυματαριθμοί 2800-3040 και 1400-1500 cm^{-1} βρίσκονταν πιο ψηλά στην κλίμακα του άξονα y του Σχήματος B.9.2.2.5 και συνείσφεραν περισσότερο στη διαφοροποίηση. Το έτος 2018 οι σχετικές εντάσεις αυτών των περιοχών παρουσιάστηκαν μειωμένες.



Σχήμα B.9.2.2.5. T-test για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική ATR σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).

B.9.3. Συμπεράσματα

Η σύγκριση των 15 δειγμάτων του 2017 με τα 30 δείγματα του 2018 έδειξε σαφή διάκριση ($p\text{-value} < 0,05$) μεταξύ φιστικελαίων από τα δύο διαφορετικά έτη συγκομιδής με την τεχνική FTIR-ATR (Valasi, Arvanitaki, Mitropoulou, Georgiadou, & Pappas, 2020). Για τα 11 δείγματα του 2017 και τα 11 δείγματα του 2018, τα φάσματα σε συνδυασμό με τη χρήση του χημειομετρικού εργαλείου PLS-DA έδειξαν μια σαφή τάση διάκρισης ($p\text{-value} < 0,05$) μεταξύ φιστικελαίων από τα δύο διαφορετικά έτη με $R^2=0,988$ και $Q^2=0,980$. Η διάκριση μεταξύ των δύο ετών συγκομιδής ήταν πλήρης. Οι κυματαριθμοί που συνείσφεραν περισσότερο στη διαφοροποίηση ήταν οι περιοχές $2800\text{-}3040$ και $1400\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$, που εμφάνισαν μικρότερη σχετική ένταση το 2018 σε σχέση με το 2017. Στις περιοχές αυτές αποδίδονται κυρίως οι δονήσεις C-H. Το ότι η σχετική ένταση των κορυφών αυτών το 2018 ήταν μικρότερη από του 2017 οδηγεί στην παρατήρηση ότι ενδεχομένως το 2018 ήταν ένα έτος με μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ακόρεστα λιπαρά οξέα, άρα υπερείχε σε ποιότητα.

B.10. Φασματοσκοπική μελέτη φιστικελαίου με φασματοσκοπία Raman - Ανάπτυξη χημειομετρικού μοντέλου ανάλογα με το έτος συγκομιδής

Στο παρόν κεφάλαιο περιγράφεται η φασματοσκοπική μελέτη των φιστικελαίων με την τεχνική Raman, συμπληρωματική της φασματοσκοπίας FTIR. Τα φάσματα επεξεργάστηκαν και ακολούθησε απόδοση των κορυφών τους. Στη συνέχεια, αναλύονται τα αποτελέσματα από το συνδυασμό των φασματοσκοπικών δεδομένων και της χημειομετρίας με σκοπό την ανάπτυξη χημειομετρικού μοντέλου για τη διαφοροποίηση των δειγμάτων ανάλογα με το έτος συγκομιδής τους. Η σύγκριση των δειγμάτων μεταξύ τους επιτυγχάνεται αφενός μεταξύ των 15 δειγμάτων του 2017 και των 30 δειγμάτων του 2018 και αφετέρου μεταξύ των 11 δειγμάτων του 2017 και των 11 δειγμάτων του 2018, που είναι άμεσα συγκρίσιμα.

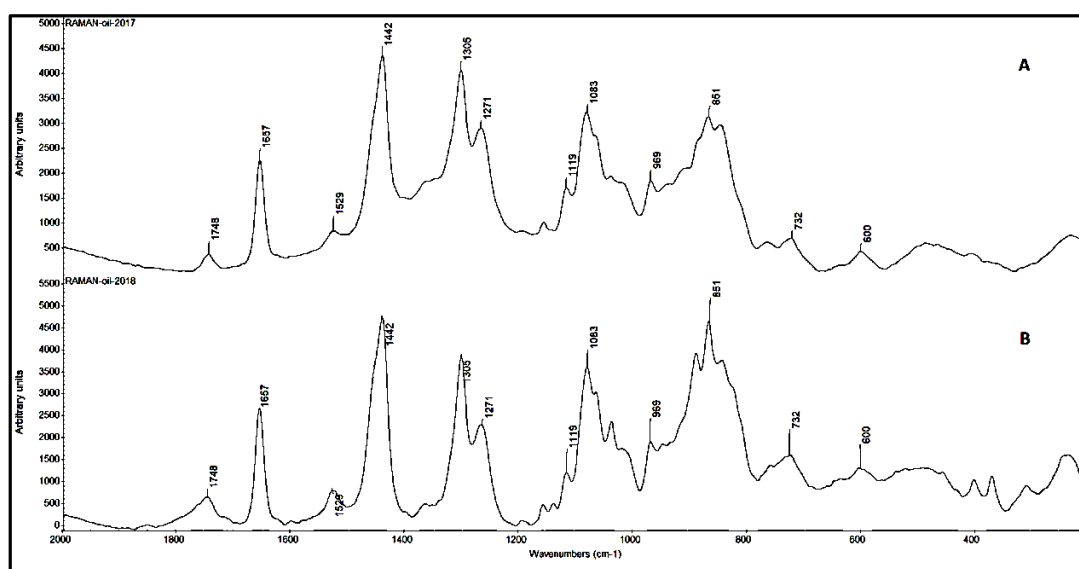
B.10.1. Πειραματική διαδικασία

Όλα τα δεδομένα Raman συλλέχθηκαν με φασματόμετρο Raman LabWrench Advantage 785 NIR (Midland, Ontario, Canada). Το μήκος κύματος διέγερσης στα 785 nm δημιουργήθηκε με λέιζερ διόδου (80 mW η προσπίπτουσα ισχύς στο δείγμα). Τα φάσματα Raman καταγράφηκαν με το πρόγραμμα NuSpec, διαχωριστική ανάλυση 4 cm^{-1} και εύρος κυματαριθμών $200\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$, περιοχή που περιέχει τις δονήσεις τάσης και κάμψης των C-C, C=C, C-O και C=O, καθώς και τις δονήσεις κάμψης C-H. Τα φάσματα Raman λήφθηκαν απευθείας από τα δείγματα φιστικελαίου σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Κάθε λήψη του φάσματος περιλάμβανε 10 μέσες συσσωρεύσεις σήματος (10 averaged signal accumulations), καθεμία από τις οποίες είχε πραγματικό χρόνο έκθεσης 10 s για τη βελτίωση της σχέσης σήματος-θορύβου και κάθε δείγμα αναλύθηκε εις τριπλούν (τρία φάσματα Raman για κάθε δείγμα, ένα για κάθε υπο-δείγμα). Τα φάσματα Raman υποβλήθηκαν στην ίδια επεξεργασία όπως και τα φάσματα FTIR, χρησιμοποιώντας το ίδιο λογισμικό.

Η στατιστική ανάλυση με σκοπό την ανάπτυξη χημειομετρικού μοντέλου διαφοροποίησης των φιστικιών σε σχέση με το έτος συγκομιδής (2017, 2018) πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό MetaboAnalyst 5.0 και την τεχνική διασταυρούμενης επικύρωσης (όπως αυτή περιγράφεται στο κεφάλαιο B.7).

B.10.2. Αποτελέσματα-Συζήτηση

Το Σχήμα B.10.2.1 απεικονίζει δύο αντιπροσωπευτικά φάσματα Raman δειγμάτων φιστικελαίου προερχόμενα από τον ίδιο παραγωγό, αλλά από διαφορετικό χρόνο συγκομιδής (2017, 2018). Τα δύο φάσματα έδειξαν παρόμοια κατανομή τόσο χαρακτηριστικών κορυφών όσο και εντάσεων από έτος σε έτος. Έτσι, μόνο η πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση μπορούσε να αποδείξει με βεβαιότητα εάν τα δείγματα παρουσίαζαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ετών συγκομιδής. Η απόδοση των σημαντικότερων κορυφών του φάσματος παρουσιάζεται στον Πίνακα B.10.2.1.



Σχήμα B.10.2.1. Αντιπροσωπευτικά φάσματα Raman δειγμάτων φιστικελαίου προερχόμενα από τον ίδιο παραγωγό, αλλά από διαφορετικά έτη συγκομιδής, 2017 (A) και 2018 (B).

Πίνακας B.10.2.1. Απόδοση των κορυφών του Raman φάσματος φιστικελαίου.

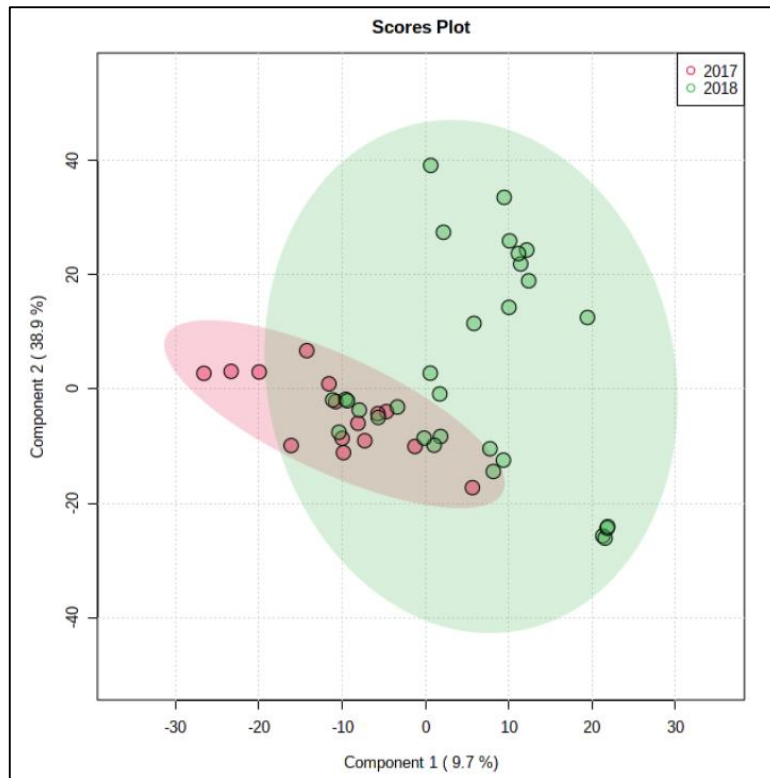
Κυματιριθμός (cm ⁻¹)	Λειτουργική ομάδα	Συντομογραφία	Αναφορά
1748	C=O εντός επιπέδου δόνηση τάσης (εστέρες τριγλυκεριδίων)	$\nu(\text{C}=\text{O})$	(Schulz & Baranska, 2007· Vaskova & Buckova, 2017· Portarena et al., 2019· Liu, Chen, Shi, Yang, & Han, 2020)
1657, 1529	>C=C< εντός επιπέδου δόνηση τάσης (cis-ολεφίνες)	$\nu(\text{C}=\text{C})$	(Carmona, Lafont, Jiménez-Sanchidrián, & Ruiz, 2014· Vaskova & Buckova, 2017· Liu et al., 2020)
1442	C-H εντός επιπέδου δόνηση κάμψης του -CH ₂ - (ψαλιδοειδής)	$\delta_s(\text{CH}_2)$	(Carmona et al., 2014· Vaskova & Buckova, 2017· Liu et al., 2020)

1305	C-H εκτός επιπέδου δόνηση κάμψης του -CH ₂ - (συστροφή)	τ(CH ₂)	(Carmona et al., 2014)
1271	C-H εκτός επιπέδου δόνηση κάμψης του -CH ₂ - (σειση)	ω(CH ₂)	(Schulz & Baranska, 2007)
1119, 1083	C-O δόνηση τάσης (εστέρες)	ν(C-O)	(Jentzsch & Ciobotă, 2014· Liu et al., 2020)
	C-C εντός επιπέδου δόνηση τάσης (εστέρες)	ν(C-C)	(Czamara et al., 2014· Portarena et al., 2019)
969	C-H εντός επιπέδου δόνηση κάμψης (ψαλιδοειδής) (trans-ολεφίνες)	δ _s (H-C=C-H)	(Ali, Nawaz, Saleem, Nurjis, & Ahmed, 2016· Liu et al., 2020)
851	C-H εντός επιπέδου δόνηση κάμψης του -CH ₂ - (ψαλιδοειδής)	δ _s (CH ₂)	(Czamara et al., 2014)
	C-C εντός επιπέδου δόνηση τάσης	ν(C-C)	(Jentzsch & Ciobotă, 2014· Liu et al., 2020)
732	=C-H εκτός επιπέδου δόνηση κάμψης (cis-ολεφίνες)	γ(C=C)	(Dymińska et al., 2017· Liu et al., 2020)
600	C-H εντός επιπέδου δόνηση κάμψης του -CH ₂ - (αιώρηση)	ρ(CH ₂)	(Ali et al., 2016)
	C-C εκτός επιπέδου δόνηση κάμψης	γ(C-C-C)	

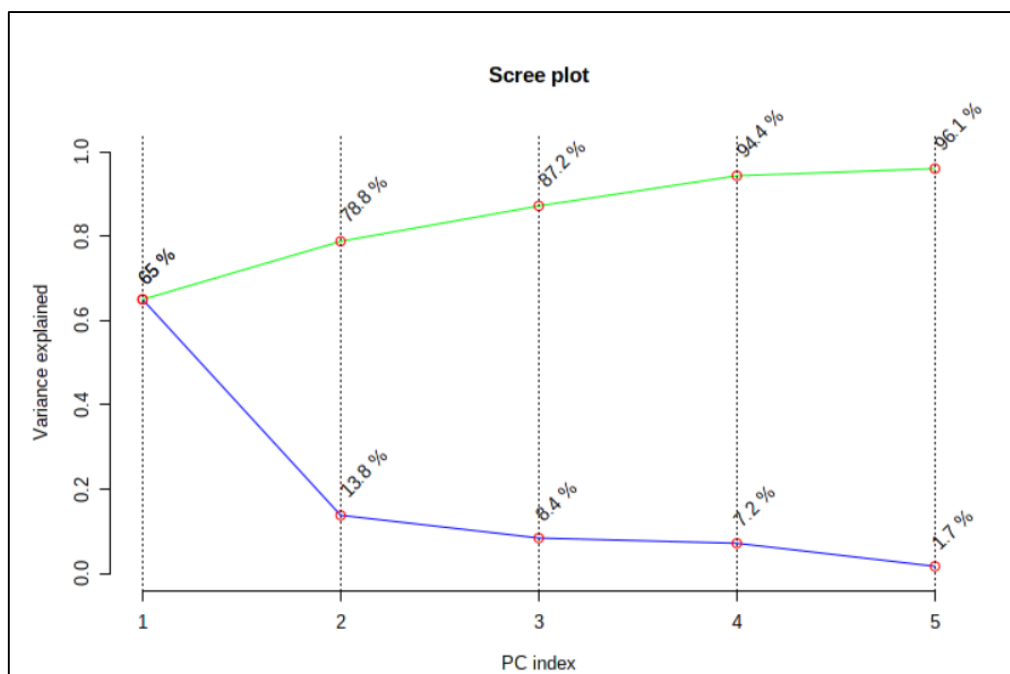
Όπως απεικονίζεται στον Πίνακα B.10.2.1, η χαρακτηριστική κορυφή των cis-διπλών δεσμών (C=C) είναι μια οξεία κορυφή στα 1657 cm⁻¹. Επίσης, οξείες και πλατιές κορυφές υπάρχουν στα 1442 και 1305 cm⁻¹, οι οποίες αντιπροσωπεύουν τη δόνηση κάμψης (ψαλιδοειδής, εντός του επιπέδου) και τη δόνηση κάμψης (συστροφή, εκτός του επιπέδου), των δεσμών CH του -CH₂-, αντίστοιχα.

B.10.2.1. Σύγκριση 15 δειγμάτων 2017 και 30 δειγμάτων 2018

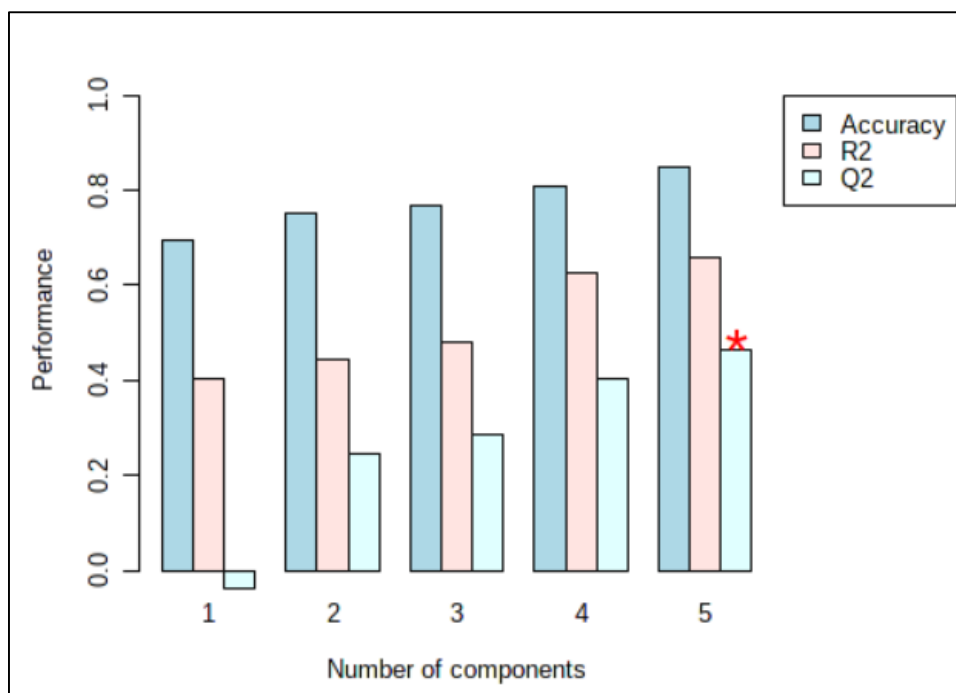
Έπειτα από το IQR φιλτράρισμα, τα φασματοσκοπικά δεδομένα, που είχαν ληφθεί ως .csv αρχεία, υπέστησαν λογαριθμικό μετασχηματισμό και αυτόματη κλιμάκωση, με σκοπό που περιγράφεται στο κεφάλαιο A.1.7. Χρησιμοποιήθηκε όλο το εύρος των κυματαριθμών (200-2000 cm⁻¹), δηλαδή ολόκληρο το φάσμα Raman, και αποδείχθηκε αδυναμία διάκρισης των δειγμάτων σύμφωνα με το έτος συγκομιδής τους (Σχήμα B.10.2.1.1). Στο Σχήμα B.10.2.1.2 αποκαλύπτεται ότι η μεγαλύτερη επίδραση στη διακύμανση των φασμάτων φιστικελαίου σχετιζόταν με πέντε PC (R²=0,65896). Η μη ικανοποιητική τιμή του Q² (Q²=0,46518) υποδήλωνε χαμηλή προγνωστική ακρίβεια του χημειομετρικού μοντέλου που δημιουργήθηκε (Σχήμα B.10.2.1.3 και Πίνακας B.10.2.1.1).



Σχήμα B.10.2.1.1. PLS-DA 2D scores plot για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική Raman σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).



Σχήμα B.10.2.1.2. Γράφημα επεξηγηματικής διακύμανσης για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική Raman σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).

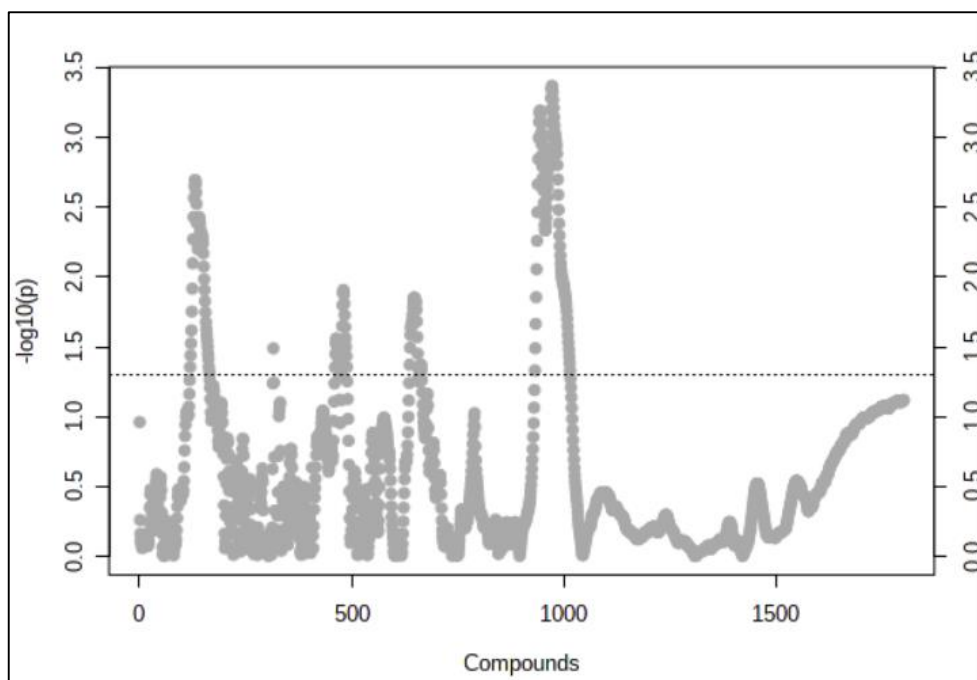


Σχήμα B.10.2.1.3. PLS-DA διασταυρούμενη επικύρωση (cross-validation) για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική Raman σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).

Πίνακας B.10.2.1.1. PLS-DA απόδοση μοντέλου διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική Raman σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).

Μέτρηση	1 PC	2 PC	3 PC	4 PC	5 PC
Ακρίβεια (accuracy)	0,69333	0,75333	0,76667	0,80667	0,84667
R²	0,40445	0,44453	0,47972	0,62550	0,65896
Q²	-0,038654	0,24663	0,28473	0,40257	0,46518

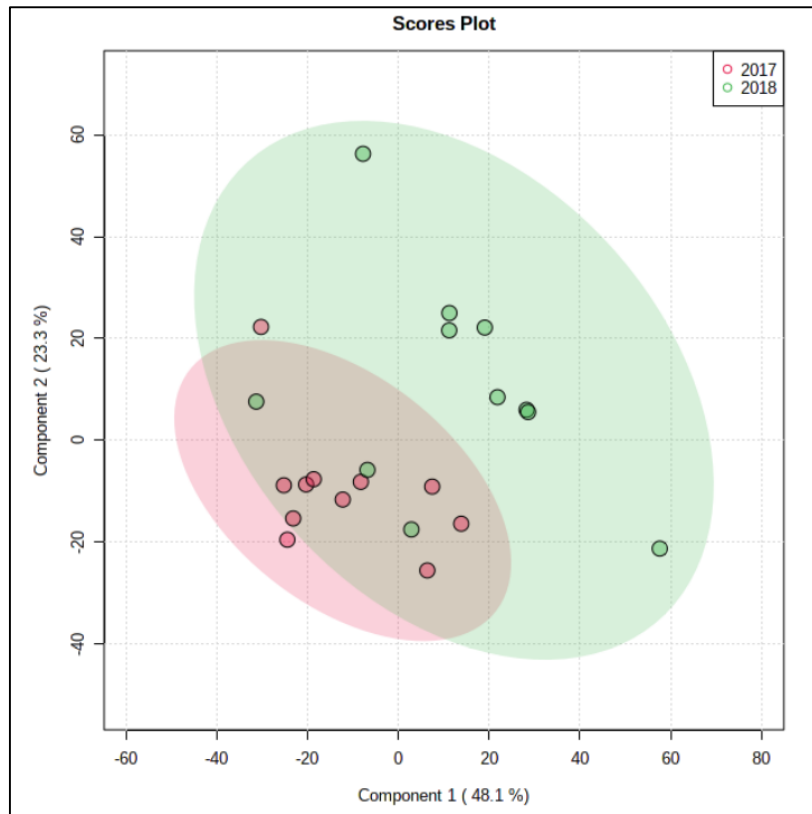
Τα δεδομένα από τα δύο διαδοχικά έτη συγκομιδής συγκρίθηκαν χρησιμοποιώντας t-test, το οποίο έδειξε ότι κανένας κυματαριθμός δεν έπαιξε σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση (Σχήμα B.10.2.1.4). Το ποσοστό σωστής ταξινόμησης των δειγμάτων ήταν χαμηλό (20%).



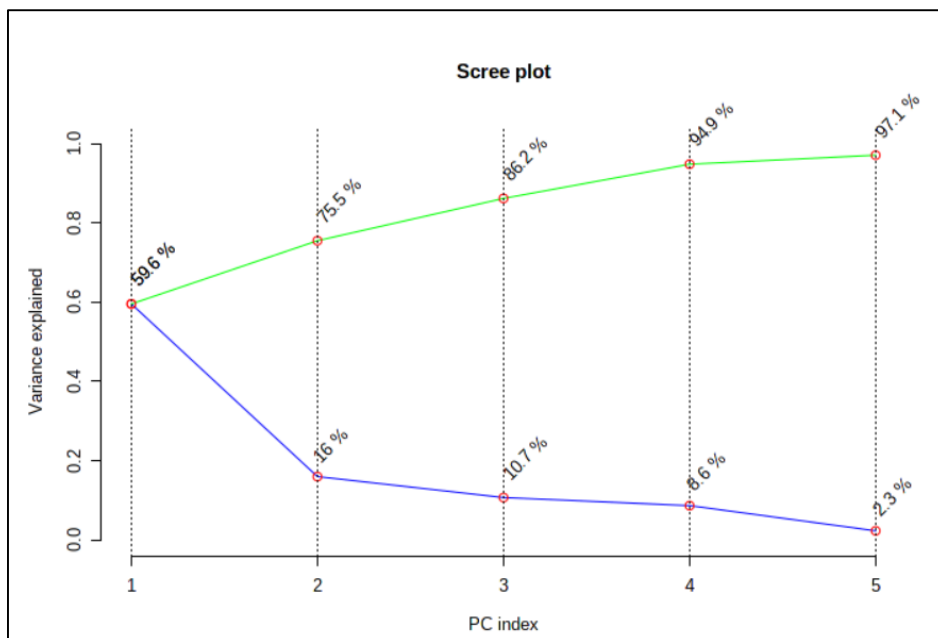
Σχήμα B.10.2.1.4. T-test για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική Raman σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).

B.10.2.2. Σύγκριση 11 δειγμάτων 2017 και 11 δειγμάτων 2018

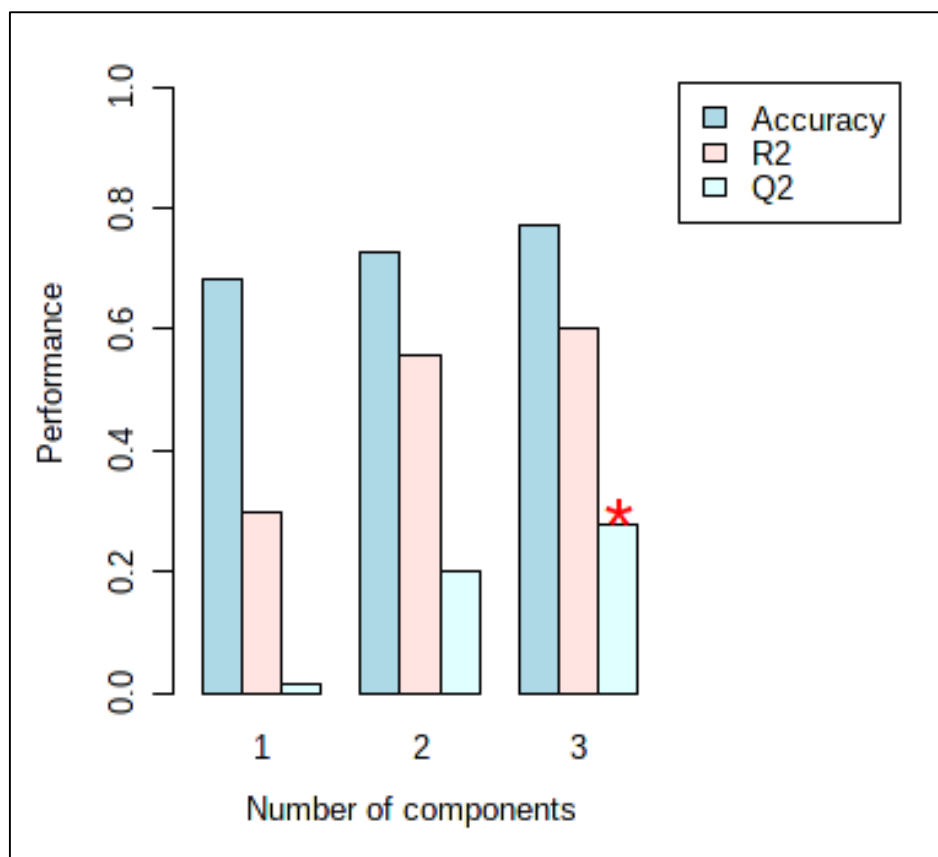
Έπειτα από το IQR φιλτράρισμα, τα φασματοσκοπικά δεδομένα, που είχαν ληφθεί ως .csv αρχεία, υπέστησαν λογαριθμικό μετασχηματισμό και αυτόματη κλιμάκωση, με σκοπό που περιγράφεται στο κεφάλαιο A.1.7. Χρησιμοποιήθηκε όλο το εύρος των κυματαριθμών ($200-2000\text{ cm}^{-1}$), δηλαδή ολόκληρο το φάσμα Raman, και αποδείχθηκε αδυναμία διάκρισης των δειγμάτων σύμφωνα με το έτος συγκομιδής τους (Σχήμα B.10.2.2.1). Στο Σχήμα B.10.2.2.2 αποκαλύπτεται ότι η μεγαλύτερη επίδραση στη διακύμανση των φασμάτων φιστικελαίου σχετιζόταν με τρεις PC ($R^2=0,60161$). Η μη ικανοποιητική τιμή του Q^2 ($Q^2=0,34999$) υποδήλωνε χαμηλή προγνωστική ακρίβεια του χημειομετρικού μοντέλου που δημιουργήθηκε (Σχήμα B.10.2.2.3 και Πίνακας B.10.2.2.1).



Σχήμα B.10.2.2.1. PLS-DA 2D scores plot για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική Raman σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).



Σχήμα B.10.2.2.2. Γράφημα επεξηγηματικής διακύμανσης για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική Raman σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).

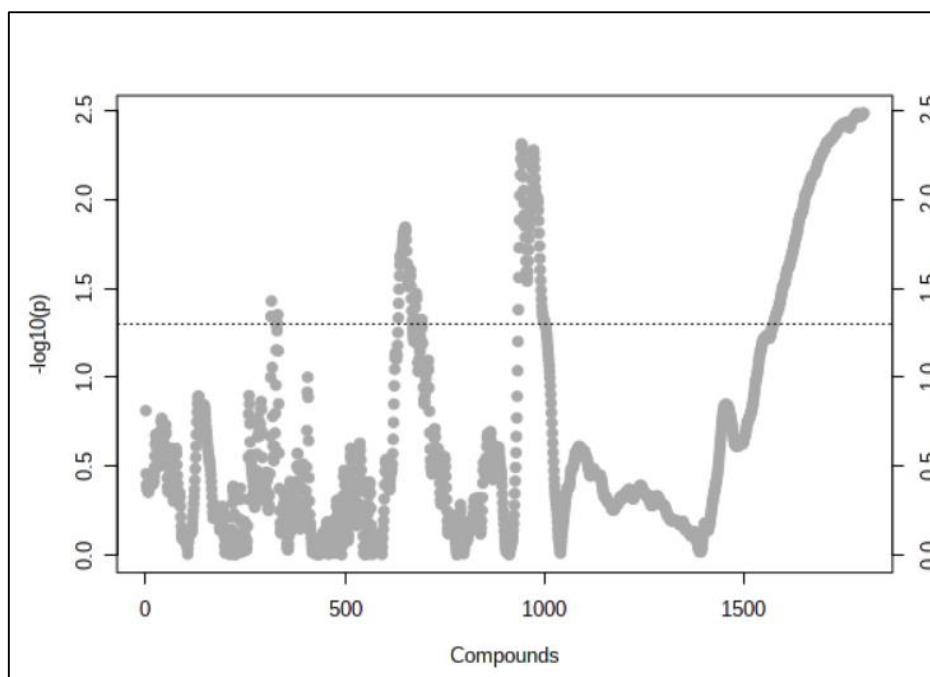


Σχήμα B.10.2.2.3. PLS-DA διασταυρούμενη επικύρωση (cross-validation) για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική Raman σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).

Πίνακας B.10.2.2.1. PLS-DA απόδοση μοντέλου διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική Raman σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).

Μέτρηση	1 PC	2 PC	3 PC
Ακρίβεια (accuracy)	0,68182	0,72727	0,77273
R²	0,2985	0,55647	0,60161
Q²	0,014642	0,22343	0,34999

Τα δεδομένα από τα δύο διαδοχικά έτη συγκομιδής συγκρίθηκαν χρησιμοποιώντας t-test, το οποίο έδειξε ότι κανένας κυματαριθμός δεν έπαιξε σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση (Σχήμα B.10.2.2.4). Το ποσοστό σωστής ταξινόμησης των δειγμάτων ήταν χαμηλό (9,1%).



Σχήμα B.10.2.2.4. T-test για το μοντέλο διάκρισης των φασμάτων με την τεχνική Raman σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).

B.10.3. Συμπεράσματα

Τόσο η σύγκριση των 15 δειγμάτων του 2017 με τα 30 δείγματα του 2018 όσο και η σύγκριση των 11 δειγμάτων του 2017 με τα 11 δείγματα του 2018 έδειξαν αδυναμία διάκρισης ($p\text{-value} > 0,05$) μεταξύ των φιστικελαίων από τα δύο διαφορετικά έτη συγκομιδής. Η σύγκριση των φασμάτων FTIR-ATR και Raman των δειγμάτων φιστικελαίου δείχνει ότι οι κυματαριθμοί ορισμένων χαρακτηριστικών κορυφών βρέθηκαν παρόμοιοι, ενώ οι εντάσεις διέφεραν σημαντικά. Για τους ίδιους τύπους δόνησης, αυτές οι διαφορές οφείλονται στο γεγονός ότι η φασματοσκοπία υπέρυθρου βασίζεται στην απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας, ενώ η φασματοσκοπία Raman στη μη ελαστική σκέδαση ακτινοβολίας, σύμφωνα με το φαινόμενο Raman. Για παράδειγμα, οι κορυφές στα $1654\text{-}1657$ και 1442 cm^{-1} , οι οποίες αποδίδονται στους *cis*-διπλούς δεσμούς των ακόρεστων λιπαρών οξέων και στις δονήσεις κάμψης των δεσμών C-H της ομάδας μεθυλενίου, αντίστοιχα, εμφανίστηκαν ασθενείς στο IR, αλλά ισχυρότερες στα φάσματα Raman. Αντίθετα, το σήμα Raman στα 732 cm^{-1} ήταν αρκετά ασθενές, αλλά η αντίστοιχη κορυφή υπέρυθρης απορρόφησης (722 cm^{-1}) ήταν ισχυρή. Σε κρυσταλλικά δείγματα, αυτή η κορυφή χωρίζεται στα δύο (π.χ. 720 και 730 cm^{-1}), ενώ σε μη κρυσταλλικά δείγματα, όπως δείγματα φιστικελαίου, παρατηρείται μία ενδιάμεση κορυφή (Farber et al., 2019).

B.11. Ανάλυση μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων (fatty acids methyl esters, FAMES) φιστικελαίου με χρήση του GC-MS - Ανάπτυξη χημειομετρικού μοντέλου ανάλογα με το έτος συγκομιδής

Στο παρόν κεφάλαιο περιγράφεται η ανάλυση των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων των φιστικελαίων με χρήση της αεριοχρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μαζών. Σε κάθε δείγμα τα λιπαρά οξέα ταυτοποιήθηκαν, ποσοτικοποιήθηκαν και προσδιορίστηκε η συνολική ακορεστότητα. Ακολουθεί σύγκριση των 15(2017)-30(2018) και των 11(2017)-11(2018) δειγμάτων με σκοπό την ανάπτυξη χημειομετρικού μοντέλου για τη διαφοροποίηση των φιστικελαίων ανάλογα με το έτος συγκομιδής.

B.11.1. Πειραματική διαδικασία

Τα λιπαρά οξέα μετατράπηκαν σε FAMES σύμφωνα με τη μέθοδο AFNOR (1984) που τροποποιήθηκε ως εξής: Σε μια ογκομετρική φιάλη των 10 mL, προστέθηκαν 1,12 g KOH, αραιώθηκαν μέχρι τη χαραγή με MeOH και αναδεύθηκαν με Vortex (Grant, 35 kHz) μέχρι την πλήρη ομογενοποίηση του διαλύματος KOH/MeOH (2,00 M). Σε φιαλίδιο προστέθηκαν 100 μ L φιστικέλαιο, 200 μ L διαλύματος KOH/MeOH και 1 mL εξάνιου, αναδεύτηκαν και αφήθηκαν σε ηρεμία μέχρι διαχωρισμού της πολικής και της μη πολικής φάσης. Η πολική φάση (κάτω στιβάδα) περιείχε γλυκερόλη προερχόμενη από τα τριγλυκερίδια του φιστικελαίου, ενώ η μη πολική φάση (άνω στιβάδα) περιλάμβανε τα FAMES του φιστικελαίου μαζί με εξάνιο. Σε φιαλίδιο συλλέχθηκαν με πιπέτα 200 μ L από την άνω στιβάδα και προστέθηκαν 775 μ L εξάνιο. Μια ποσότητα MgSO₄ προστέθηκε στο φιαλίδιο για να απορροφήσει οποιοδήποτε ίχνος υγρασίας και το μείγμα διηθήθηκε μέσω μη πολικού φίλτρου 0,20 μ m (Xtra PTFE 20/13 Chromafil). Ο δεκανοϊκός μεθυλεστέρας (Sigma-Aldrich, Steinhein, Germany) χρησιμοποιήθηκε ως IS για ποσοτικοποίηση.

Για την αεριοχρωματογραφική μελέτη χρησιμοποιήθηκε σύστημα Trace GC ULTRA (Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA) εξοπλισμένο με ανιχνευτή μαζών (DSQ II), τριχοειδή στήλη χαμηλής πολικότητας Trace GOLD TG-5MS (30 m, 0,25 mm ID, 0,25 μ m πάχος φιλμ) με στατική φάση 5% διφαινύλιο/95% διμεθυλοπολυσιλοξάνιο και αέριο ήλιο, ως φέρον αέριο, με ρυθμό ροής 1 mL/min υπό σταθερή πίεση. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε λειτουργία διαμοιρασμού (split

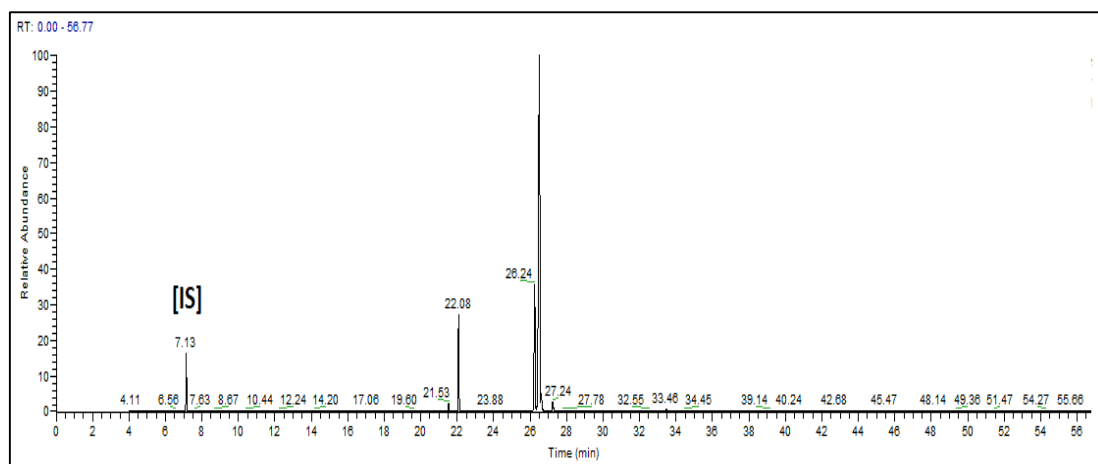
mode) (1:50) με όγκο ένεσης 1 μL . Η θερμοκρασία του κλιβάνου προγραμματίστηκε ως εξής: 110°C έως 205°C με ρυθμό 4,0 °C/min, 205°C έως 210°C με ρυθμό 1,0 °C/min, 210°C έως 212°C με ρυθμό 0,5 °C/min, 212°C έως 250°C με ρυθμό 4,0 °C/min, στη συνέχεια διατηρήθηκε σταθερή σε θερμοκρασία 250°C για 15 min. Η θερμοκρασία στο σημείο έγχυσης και στον ανιχνευτή (γραμμική μεταφοράς MS) ήταν 240°C.

Η ποιοτική ανάλυση επιτεύχθηκε μέσω σύγκρισης (του χρόνου συγκράτησης και των ιοντικών θραυσμάτων) των δεδομένων του φάσματος μαζών κάθε λιπαρού οξέος του δείγματος με τα φάσματα μάζας που ελήφθησαν από τις βιβλιοθήκες μαζών του GC-MS: XCalibur και NIST (National Institute of Standards and Technology). Η ποσοτικοποίηση των λιπαρών οξέων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας δεκανοϊκό μεθυλεστέρα ως IS. Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν τρεις μετρήσεις και υπολογίστηκε η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση αυτών.

Η στατιστική ανάλυση με σκοπό την ανάπτυξη χημειομετρικού μοντέλου διαφοροποίησης των φιστικιών σε σχέση με το έτος συγκομιδής (2017, 2018) πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό MetaboAnalyst 5.0 και την τεχνική διασταυρούμενης επικύρωσης (όπως αυτή περιγράφεται στο κεφάλαιο B.7).

B.11.2. Αποτελέσματα-Συζήτηση

Ένα αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα των FAMES του φιστικελαίου παρουσιάζεται στο Σχήμα B.11.2.1. Η έκλυση των κυριότερων λιπαρών οξέων φιστικελαίου γίνεται από τα περισσότερο προς τα λιγότερο πολικά από τη στιγμή που η στήλη GC-MS είναι μη πολική και συγκρατεί περισσότερο τις μη πολικές ενώσεις. Η σύνθεση των φιστικελαίων σε λιπαρά οξέα που ελήφθη από την ανάλυση GC-MS των FAMES (εκφρασμένη σε g λιπαρού οξέος/100 g ολικών λιπαρών οξέων) παρουσιάζεται στους Πίνακες B.11.2.1 και B.11.2.2.



Σχήμα Β.11.2.1. Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα των FAMES του φιστικελαίου. Κορυφές των λιπαρών οξέων με αυξανόμενο χρόνο συγκράτησης (retention time, RT): 1, Μυριστικό (RT≈20,08 min)· 2, Παλμιτελαϊκό (RT≈24,67 min)· 3, Παλμιτικό (RT≈25,20 min)· 4, Δεκαεπτενοϊκό (RT≈27,53 min)· 5, Μαργαρικό (RT≈28,24 min)· 6, Λινελαϊκό (RT≈30,69 min)· 7, Ελαϊκό (RT≈30,95 min)· 8, Στεατικό (RT≈31,89 min)· 9, Γονδοϊκό (RT≈38,31 min)· 10, Αραχιδικό (RT≈39,08 min)· 11, Μπεχενικό (RT≈43,38 min)· 12, Λιγνοκηρικό (RT≈48,58 min).

Πίνακας Β.11.2.1. Σύνθεση λιπαρών οξέων (g λιπαρού οξέος/100 g ολικών λιπαρών οξέων) φιστικελαίων.

Αριθμητική κωδικοποίηση	Μυριστικό (14:0)	Παλμιτελαϊκό (16:1)	Παλμιτικό (16:0)	Δεκαεπτενοϊκό (17:1)	Μαργαρίκο (17:0)	Λινελαϊκό (18:2)	Ελαϊκό (18:1)	Στεατικό (18:0)	Γονδοϊκό (20:1)	Αραχιδικό (20:0)	Μπεχενικό (22:0)	Λιγνοκηρικό (24:0)
Έτος συγκομιδής 2017												
A ¹ -1	0,1±0,0 ³	0,8±0,2	12,2±0,3	0,0±0,0	0,0±0,0	14,2±1,4	71,1±2,0	1,2±0,1	0,2±0,0	0,1±0,1	0,0±0,0	0,0±0,0
A-2	0,1±0,0	0,7±0,1	10,5±1,7	0,1±0,0	0,0±0,0	13,6±0,3	73,7±1,9	1,1±0,1	0,1±0,1	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
A-3	0,1±0,0	1,0±0,1	11,8±1,2	0,1±0,0	0,0±0,0	15,1±0,1	70,2±0,9	1,3±0,0	0,2±0,0	0,1±0,0	0,1±0,1	0,0±0,0
A-4	0,1±0,0	1,0±0,3	10,3±1,9	0,1±0,0	0,1±0,0	11,6±8,2	74,5±1,7	1,7±0,1	0,5±0,2	0,1±0,1	0,1±0,1	0,0±0,0
A-5	0,1±0,0	0,9±0,1	12,8±0,7	0,1±0,0	0,1±0,0	12,8±0,1	71,2±0,6	1,8±0,1	0,2±0,0	0,1±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
A-6	0,1±0,0	0,8±0,3	14,2±4,0	0,1±0,0	0,1±0,0	10,9±0,2	72,1±4,4	1,5±0,4	0,2±0,1	0,1±0,1	0,0±0,0	0,0±0,0
A-7	0,1±0,0	1,1±0,1	13,4±0,8	0,1±0,0	0,0±0,0	13,4±0,8	70,6±1,7	1,2±0,0	0,2±0,0	0,1±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
A-8	0,1±0,0	0,9±0,1	12,6±0,8	0,1±0,0	0,0±0,0	14,1±0,5	70,6±0,3	1,4±0,1	0,2±0,0	0,1±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
A-9	0,1±0,0	0,9±0,0	12,2±0,6	0,1±0,0	0,1±0,0	14,3±0,4	70,5±1,2	1,5±0,2	0,3±0,1	0,1±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
A-10	0,1±0,0	1,1±0,1	14,0±0,5	0,1±0,0	0,1±0,0	12,0±0,1	71,3±0,5	1,3±0,1	0,1±0,0	0,1±0,1	0,0±0,0	0,0±0,0
A-11	0,1±0,0	1,0±0,0	11,9±1,0	0,1±0,0	0,0±0,0	13,7±0,7	71,3±0,3	1,8±0,2	0,1±0,1	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
A-12	0,1±0,0	0,8±0,1	11,2±0,5	0,1±0,0	0,0±0,0	14,4±0,4	71,7±0,1	1,4±0,1	0,2±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0	0,0±0,0
A-13	0,1±0,0	0,8±0,0	11,3±0,1	0,1±0,0	0,1±0,0	15,8±0,2	70,4±0,3	1,1±0,1	0,2±0,0	0,1±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
A-14	0,1±0,0	0,9±0,1	13,3±1,4	0,1±0,0	0,1±0,0	13,4±3,2	70,6±2,4	1,2±0,4	0,2±0,1	0,1±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
A-15	0,1±0,0	0,7±0,2	10,9±0,7	0,1±0,0	0,0±0,0	16,0±0,4	70,6±0,3	1,4±0,1	0,2±0,1	0,1±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Έτος συγκομιδής 2018												
B ² -1	0,1±0,0	0,8±0,0	10,1±0,2	0,1±0,0	0,1±0,0	20,6±0,0	66,9±0,1	1,0±0,0	0,2±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0	0,0±0,0
B-2	0,1±0,0	0,6±0,0	9,8±0,2	0,1±0,0	0,0±0,0	16,0±0,4	72,1±0,5	1,0±0,0	0,2±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0	0,0±0,0
B-3	0,1±0,0	0,8±0,1	10,5±1,5	0,1±0,1	0,1±0,0	19,0±0,5	68,1±1,6	0,9±0,0	0,2±0,1	0,1±0,1	0,1±0,1	0,0±0,0
B-4	0,1±0,0	0,9±0,1	10,8±0,5	0,0±0,0	0,0±0,0	17,7±0,3	69,3±0,1	1,1±0,2	0,1±0,0	0,1±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
B-5	0,1±0,1	1,0±0,1	11,4±0,3	0,1±0,1	0,0±0,0	16,2±0,1	69,8±0,7	1,1±0,4	0,2±0,0	0,1±0,0	0,1±0,1	0,0±0,0
B-6	0,1±0,0	0,6±0,0	10,2±0,1	0,0±0,0	0,0±0,0	16,6±0,0	70,6±0,2	1,4±0,1	0,3±0,1	0,1±0,0	0,1±0,1	0,0±0,0
B-7	0,1±0,0	0,9±0,1	11,0±0,4	0,1±0,0	0,1±0,0	15,6±0,1	71,1±0,5	1,0±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0	0,0±0,0
B-8	0,0±0,0	0,7±0,2	10,7±1,6	0,0±0,0	0,0±0,0	12,5±0,1	74,4±1,8	1,4±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0	0,0±0,0

B-9	0,1±0,0	1,0±0,1	11,1±0,6	0,0±0,0	0,0±0,0	13,8±0,1	72,5±0,6	1,3±0,1	0,1±0,0	0,1±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
B-10	0,1±0,0	0,7±0,2	11,3±2,2	0,1±0,0	0,0±0,0	10,6±0,9	75,6±3,4	1,4±0,1	0,1±0,1	0,1±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
B-11	0,1±0,0	0,8±0,0	11,0±0,3	0,1±0,0	0,1±0,0	13,5±0,7	72,7±0,3	1,3±0,1	0,2±0,1	0,2±0,0	0,0±0,1	0,0±0,0
B-12	0,1±0,0	0,5±0,4	10,3±0,2	0,1±0,0	0,0±0,0	20,3±0,2	67,4±1,4	1,0±0,1	0,2±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0	0,0±0,0
B-13	0,0±0,0	0,7±0,0	9,9±0,1	0,0±0,0	0,0±0,0	20,6±0,1	67,1±0,1	1,2±0,0	0,3±0,0	0,1±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
B-14	0,1±0,0	0,7±0,0	9,6±0,1	0,0±0,0	0,1±0,0	16,7±0,0	71,4±0,0	1,2±0,0	0,2±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0	0,0±0,0
B-15	0,1±0,0	0,7±0,0	9,9±0,4	0,0±0,0	0,0±0,0	16,1±0,1	71,7±0,2	1,1±0,1	0,2±0,1	0,1±0,0	0,1±0,0	0,0±0,0
B-16	0,1±0,0	0,8±0,1	10,8±1,3	0,1±0,0	0,1±0,0	19,7±3,5	67,3±10,2	0,9±0,1	0,1±0,0	0,1±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
B-17	0,1±0,0	0,7±0,0	10,2±0,5	0,0±0,0	0,0±0,0	20,6±0,7	67,0±0,6	1,0±0,1	0,2±0,1	0,1±0,1	0,0±0,0	0,0±0,0
B-18	0,1±0,0	0,7±0,1	10,3±0,3	0,0±0,0	0,0±0,0	18,0±0,1	69,2±0,3	1,2±0,2	0,2±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0	0,0±0,0
B-19	0,1±0,0	0,8±0,1	9,9±0,6	0,1±0,0	0,0±0,0	13,7±0,1	73,8±0,5	1,5±0,1	0,1±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0	0,0±0,0
B-20	0,1±0,0	0,9±0,0	10,5±0,1	0,0±0,0	0,0±0,0	13,9±0,1	73,1±0,1	1,2±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0	0,0±0,0
B-21	0,1±0,0	0,9±0,0	10,7±0,4	0,0±0,0	0,0±0,0	13,7±0,1	72,9±0,3	1,3±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0
B-22	0,1±0,0	0,8±0,0	10,6±0,2	0,0±0,0	0,0±0,0	16,2±0,2	70,7±0,3	1,4±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
B-23	0,1±0,0	0,7±0,1	10,4±0,2	0,1±0,0	0,0±0,0	16,0±0,3	71,0±0,2	1,3±0,0	0,3±0,0	0,1±0,0	0,1±0,1	0,0±0,0
B-24	0,1±0,1	0,8±0,0	10,2±0,1	0,0±0,0	0,0±0,0	17,6±0,1	69,7±0,2	1,2±0,0	0,2±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0	0,0±0,0
B-25	0,1±0,0	0,7±0,1	9,2±2,3	0,1±0,0	0,0±0,0	12,0±1,3	76,3±4,2	1,4±0,2	0,2±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0	0,0±0,0
B-26	0,0±0,0	0,8±0,0	9,8±1,4	0,1±0,0	0,0±0,0	14,8±0,1	72,7±1,7	1,6±0,3	0,2±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0	0,0±0,0
B-27	0,1±0,1	1,1±0,0	11,6±0,4	0,1±0,0	0,0±0,0	15,3±0,8	70,3±0,4	1,3±0,2	0,2±0,1	0,1±0,0	0,1±0,0	0,0±0,0
B-28	0,1±0,0	0,9±0,0	11,0±0,5	0,0±0,0	0,1±0,0	18,3±0,3	67,9±0,2	1,4±0,1	0,2±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0	0,0±0,0
B-29	0,1±0,0	0,6±0,4	10,9±1,5	0,0±0,0	0,0±0,0	13,4±1,2	73,2±2,7	1,6±0,3	0,2±0,0	0,1±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
B-30	0,1±0,0	0,7±0,0	9,8±0,2	0,0±0,0	0,0±0,0	13,4±0,0	74,1±0,3	1,7±0,1	0,2±0,0	0,1±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0

¹A: έτος συγκομιδής 2017, ²B: έτος συγκομιδής 2018, ³Μέσος όρος±τυπική απόκλιση από τρεις μετρήσεις για κάθε δείγμα.

Πίνακας Β.11.2.2. Περιεχόμενο φιστικελαίων σε κορεσμένα, ακόρεστα και μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (g λιπαρών οξέων/100 g ολικών λιπαρών οξέων).

Αριθμητική κωδικοποίηση	% Κορεσμένων (SFA)	% Ακόρεστων (UFA)	% Μονοακόρεστων (MUFA)	UFA/SFA	Ελαϊκό/Λινελαϊκό
Έτος συγκομιδής 2017					
A ¹ -1	13,6	86,3	72,1	6,4	5,0
A-2	11,7	88,2	74,6	7,5	5,4
A-3	13,4	86,6	71,5	6,5	4,7
A-4	12,4	87,7	76,1	7,1	6,4
A-5	14,9	85,2	72,4	5,7	5,6
A-6	16,0	84,1	73,2	5,3	6,6
A-7	14,8	85,4	72,0	5,8	5,3
A-8	14,2	85,9	71,8	6,1	5,0
A-9	14,0	86,1	71,8	6,2	4,9
A-10	15,6	84,6	72,6	5,4	5,9
A-11	13,8	86,2	72,5	6,3	5,2
A-12	12,9	87,2	72,8	6,8	5,0
A-13	12,7	87,3	71,5	6,9	4,5
A-14	14,8	85,2	71,8	5,8	5,3
A-15	12,5	87,6	71,6	7,0	4,4
Έτος συγκομιδής 2018					
B ² -1	11,5	88,6	68,0	7,7	3,3
B-2	11,1	89,0	73,0	8,0	4,5
B-3	11,8	88,2	69,2	7,5	3,6
B-4	12,1	88,0	70,3	7,3	3,9
B-5	12,8	87,3	71,1	6,8	4,3
B-6	11,9	88,1	71,5	7,4	4,3
B-7	12,4	87,8	72,2	7,1	4,6
B-8	12,3	87,7	75,2	7,1	6,0
B-9	12,6	87,4	73,6	6,9	5,3
B-10	12,9	87,1	76,5	6,8	7,1
B-11	12,7	87,3	73,8	6,9	5,4
B-12	11,6	88,5	68,2	7,6	3,3
B-13	11,2	88,7	68,1	7,9	3,3
B-14	11,2	89,0	72,3	8,0	4,3
B-15	11,3	88,7	72,6	7,9	4,5
B-16	12,0	88,0	68,3	7,3	3,4
B-17	11,4	88,5	67,9	7,8	3,3
B-18	11,8	88,1	70,1	7,5	3,8
B-19	11,7	88,5	74,8	7,6	5,4
B-20	12,0	88,0	74,1	7,3	5,3
B-21	12,4	87,6	73,9	7,1	5,3
B-22	12,2	87,8	71,6	7,2	4,4
B-23	12,0	88,1	72,1	7,3	4,4
B-24	11,7	88,3	70,7	7,6	4,0
B-25	10,9	89,3	77,3	8,2	6,4
B-26	11,6	88,6	73,8	7,6	4,9

B-27	13,2	87,0	71,7	6,6	4,6
B-28	12,8	87,3	69,0	6,8	3,7
B-29	12,7	87,4	74,0	6,9	5,5
B-30	11,7	88,4	75,0	7,6	5,5

¹A: έτος συγκομιδής 2017, ²B: έτος συγκομιδής 2018.

Το ελαιϊκό και το λινελαϊκό οξύ ανήκουν στα ακόρεστα λιπαρά οξέα, είναι σημαντικά από θρεπτική άποψη και βρίσκονται σε υψηλά επίπεδα στο φιστικέλαιο καθιστώντας το σταθερό στις οξειδωτικές αλλοιώσεις. Το ελαιϊκό οξύ είναι το κύριο λιπαρό οξύ που βρίσκεται επίσης στο ελαιόλαδο, τον κρόκο και το κραμβέλαιο, μεταξύ των οποίων το ελαιόλαδο έχει την υψηλότερη περιεκτικότητα σε ελαιϊκό οξύ (81,5%). Το λινελαϊκό οξύ είναι το κυρίαρχο λιπαρό οξύ που βρίσκεται στο καλαμπόκι και το έλαιο σόγιας. Επιπλέον, το αραβοσιτέλαιο έχει την υψηλότερη περιεκτικότητα σε λινελαϊκό οξύ (58,4%) (Liu et al., 2018).

Όσον αφορά στην ακορεστότητα, η κατανομή των λιπαρών οξέων στο φιστικέλαιο και στο ελαιόλαδο είναι παρόμοια (Arena et al., 2007). Εκτός από το λάδι καρύδας, το ελαιόλαδο, ο κρόκος, η κράμβη, το καλαμπόκι και η σόγια περιέχουν μεγάλες ποσότητες ακόρεστων λιπαρών οξέων (83,5-95,3%). Το κραμβέλαιο έχει την υψηλότερη περιεκτικότητα σε ακόρεστα λιπαρά οξέα (95,3%) και τη χαμηλότερη περιεκτικότητα σε κορεσμένα (4,7%). Αντιθέτως, το λάδι καρύδας έχει τα λιγότερα ακόρεστα (7,1%) και πολυακόρεστα (1,3%) και το υψηλότερο περιεχόμενο σε κορεσμένα λιπαρά οξέα (92,9%) (Liu et al., 2018).

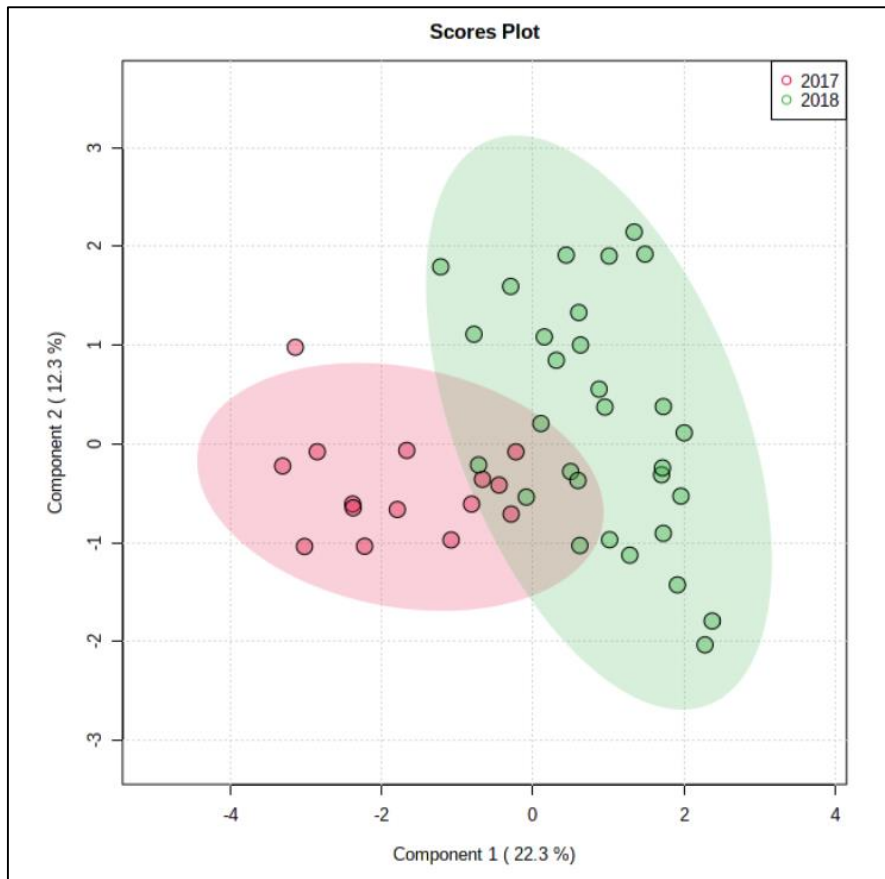
B.11.2.1. Σύγκριση 15 δειγμάτων 2017 και 30 δειγμάτων 2018

Τα κυριότερα λιπαρά οξέα που βρέθηκαν στα δείγματα φιστικελαίου ήταν το ελαιϊκό (71,4±1,2% για το 2017 και 71,0±2,7% για το 2018), λινελαϊκό (13,7±1,4% για το 2017 και 16,1±2,7% για το 2018) και παλμιτικό (12,2±1,2% για το 2017 και 10,5±0,6% για το 2018). Παρατηρήθηκε ότι η περιεκτικότητα σε ελαιϊκό οξύ ήταν η ίδια και στις δύο περιόδους καλλιέργειας, η περιεκτικότητα σε λινελαϊκό οξύ αυξήθηκε ελαφρώς, ενώ η περιεκτικότητα σε παλμιτικό παρουσίασε μικρή μείωση. Η περιεκτικότητα σε στεατικό οξύ βρέθηκε να είναι 1,4±0,2% για το 2017 και 1,2±0,2% για το 2018, παρουσιάζοντας επίσης μικρή μείωση. Η περιεκτικότητα σε άλλα λιπαρά οξέα ήταν <1,0%. Σε ένα δείγμα του 2018 εντοπίστηκε το λιγνοκηρικό οξύ σε ίχνη. Αυτά τα αποτελέσματα είναι σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Agar, Kaşka, & Kafkas, 1995· Satil et al., 2003· Ozturk, Sagdic, Yalcin, Capar, & Asyali, 2016).

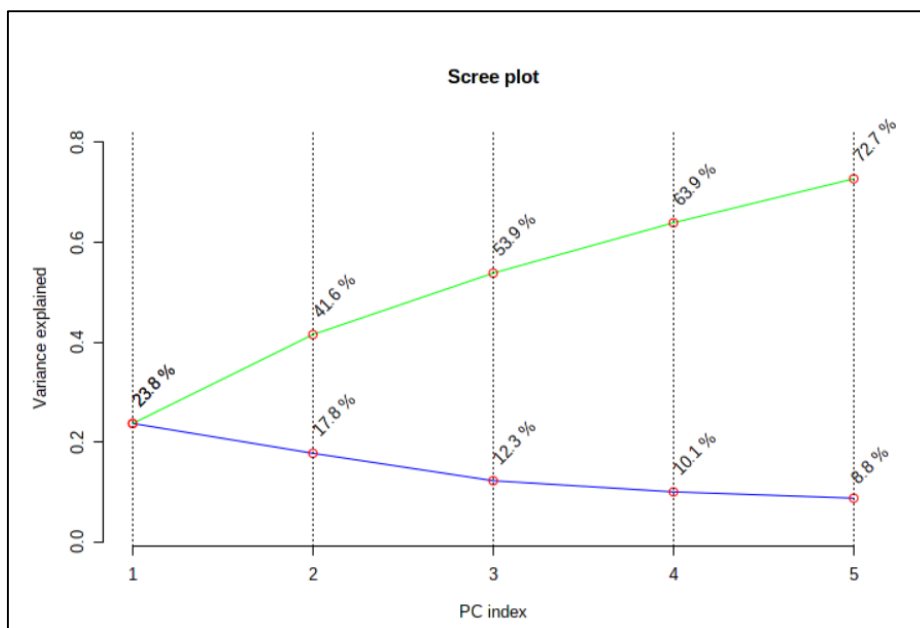
Το ελαϊκό οξύ ήταν το κυρίαρχο λιπαρό οξύ σε όλα τα δείγματα και μαζί με το λινελαϊκό οξύ αποτελούσαν το 85% και 87,1% του συνόλου των λιπαρών οξέων των ετών 2017 και 2018, αντίστοιχα. Αυτά τα αποτελέσματα παρουσιάζουν μεγάλες ομοιότητες με εκείνα των Luh, Wong και El-Shimi (1981), Yildiz et al. (1998) και Okay (2002).

Το συνολικό περιεχόμενο ακόρεστων λιπαρών οξέων βρέθηκε να είναι 86,2% και 88,1% για τα έτη 2017 και 2018, αντίστοιχα. Αυτά τα ευρήματα ήταν παρόμοια με αυτά των Kamangar, Farrohi και Mehran (1975), που μελέτησαν τα ιρανικά κελυφωτά φιστίκια (88%). Στην παρούσα μελέτη, τα κορεσμένα, τα ακόρεστα, τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα βρέθηκαν στο 13,8%, 86,2%, 72,6% και 12,0%, 88,1%, 72,0% των ολικών λιπαρών οξέων για τη συγκομιδή 2017 και 2018, αντίστοιχα (Πίνακας B.11.2.2). Αυτά τα ευρήματα συμφωνούν με αυτά των Maskan και Karatas (1999). Δεδομένου του ελαφρώς υψηλότερου ποσοστού των ακόρεστων λιπαρών οξέων κατά τη συγκομιδή του 2018, εκτιμήθηκε ότι η συγκομιδή του 2018 ήταν ανώτερη σε θρεπτική αξία σε σύγκριση με του 2017.

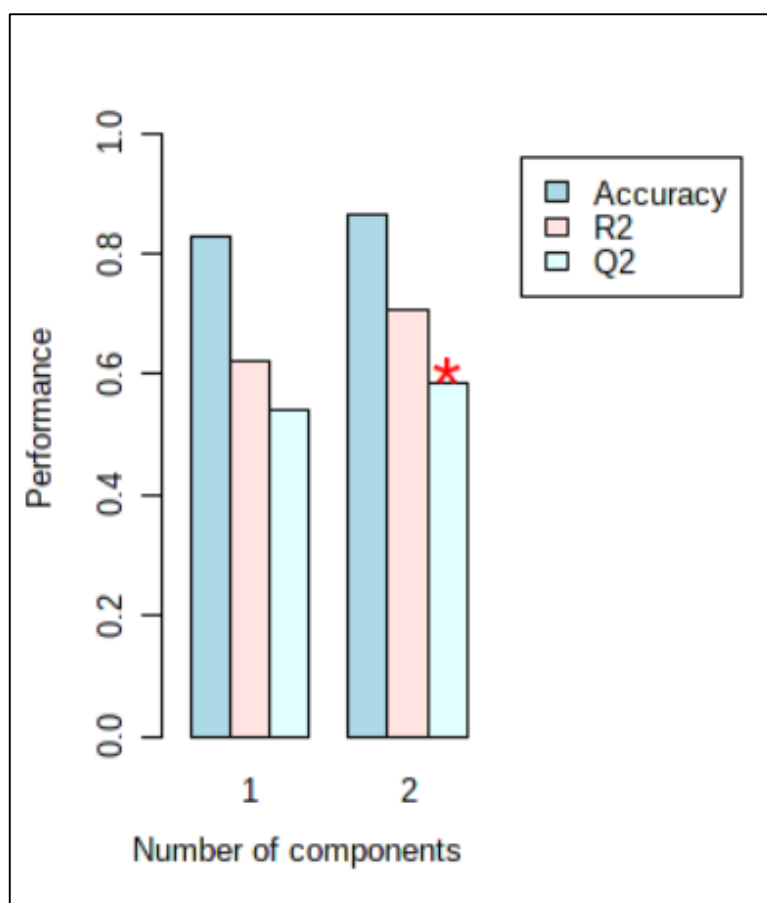
Τα χρωματογραφικά δεδομένα υπέστησαν λογαριθμικό μετασχηματισμό και αυτόματη κλιμάκωση, με σκοπό που περιγράφεται στο κεφάλαιο A.1.7. Χρησιμοποιήθηκαν όλα τα λιπαρά οξέα και αποδείχθηκε διάκριση των δειγμάτων σύμφωνα με το έτος συγκομιδής τους σε ποσοστό σωστής ταξινόμησης 73,3% (Σχήμα B.11.2.1.1). Στο Σχήμα B.11.2.1.2 αποκαλύπτεται ότι η μεγαλύτερη επίδραση στη διακύμανση των χρωματογραφημάτων φιστικελαίου σχετιζόταν με δύο PC ($R^2=0,70720$). Η τιμή του Q^2 ($Q^2=0,58408$) υποδήλωνε χαμηλή προγνωστική ακρίβεια του μοντέλου που δημιουργήθηκε (Σχήμα B.11.2.1.3 και Πίνακας B.11.2.1.1).



Σχήμα B.11.2.1.1. PLS-DA 2D scores plot για το μοντέλο διάκρισης των λιπαρών οξέων σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).



Σχήμα B.11.2.1.2. Γράφημα επεξηγηματικής διακύμανσης για το μοντέλο διάκρισης των λιπαρών οξέων σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).

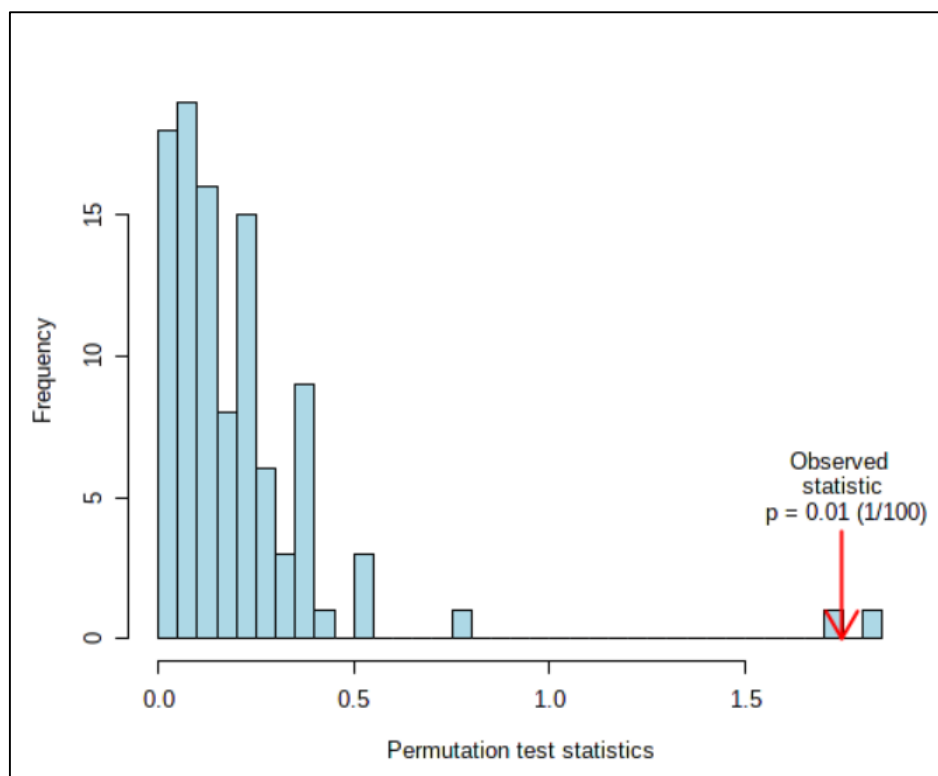


Σχήμα B.11.2.1.3. PLS-DA διασταυρούμενη επικύρωση (cross-validation) για το μοντέλο διάκρισης των λιπαρών οξέων σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).

Πίνακας B.11.2.1.1. PLS-DA απόδοση μοντέλου διάκρισης των λιπαρών οξέων σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).

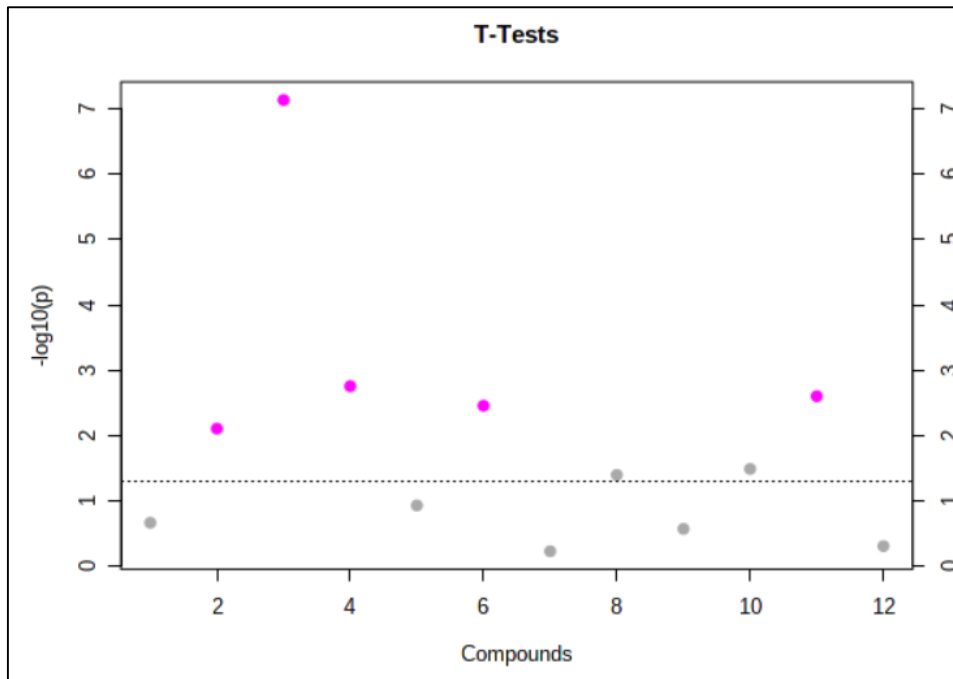
Μέτρηση	1 PC	2 PC
Ακρίβεια (accuracy)	0,82667	0,86667
R²	0,62020	0,70720
Q²	0,53998	0,58408

Η στατιστική σημασία του μοντέλου PLS-DA αξιολογήθηκε με permutation test (Σχήμα B.11.2.1.4). Ο διαχωρισμός των δειγμάτων σε δύο ομάδες ήταν σημαντικός από στατιστική πλευρά ($p\text{-value} < 0,05$) (Barberini et al., 2016).

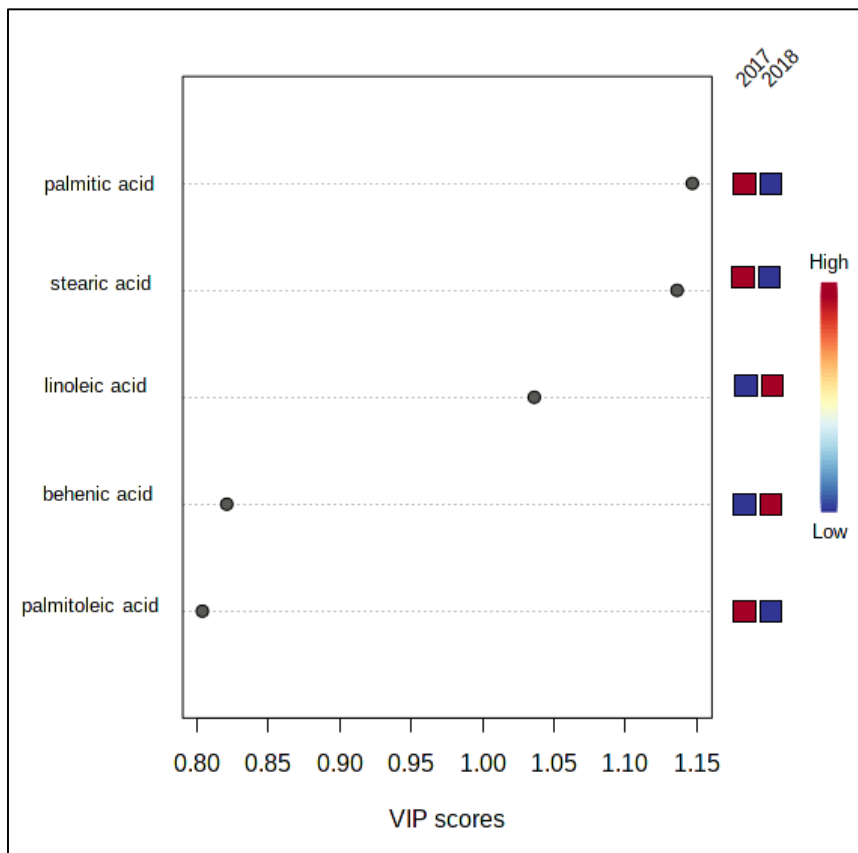


Σχήμα B.11.2.1.4. PLS-DA permutation test για το μοντέλο διάκρισης των λιπαρών οξέων σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst)· (permutation numbers: 100).

Τα δεδομένα από τα δύο διαδοχικά έτη συγκομιδής συγκρίθηκαν χρησιμοποιώντας t-test, το οποίο έδειξε ότι πέντε από τα συνολικά λιπαρά οξέα ήταν στατιστικά σημαντικά για τη διάκριση μεταξύ της συγκομιδής 2017 και 2018 (Σχήμα B.11.2.1.5). Το παλμιτικό οξύ ακολουθούμενο από στεατικό, λινελαϊκό, μπεχενικό και παλμιτελαϊκό έπαιξαν τον πιο σημαντικό ρόλο ($p\text{-value} < 0,05$ και μικρή τιμή Wilks' lambda). Τα λιπαρά οξέα με τα υψηλότερα VIP scores που συνείσφεραν περισσότερο στη διαφοροποίηση (υψηλότερο συντελεστή στη διακριτική συνάρτηση) παρουσιάζονται στο Σχήμα B.11.2.1.6 όπου τα χρωματιστά τετράγωνα δείχνουν τη σχετική ένταση του αντίστοιχου λιπαρού οξέος για κάθε ομάδα.



Σχήμα B.11.2.1.5. T-test για το μοντέλο διάκρισης των λιπαρών οξέων σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).



Σχήμα B.11.2.1.6. PLS-DA χαρακτηριστικά σπουδαιότητας για το μοντέλο διάκρισης των λιπαρών οξέων σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).

B.11.2.2. Σύγκριση 11 δειγμάτων 2017 και 11 δειγμάτων 2018

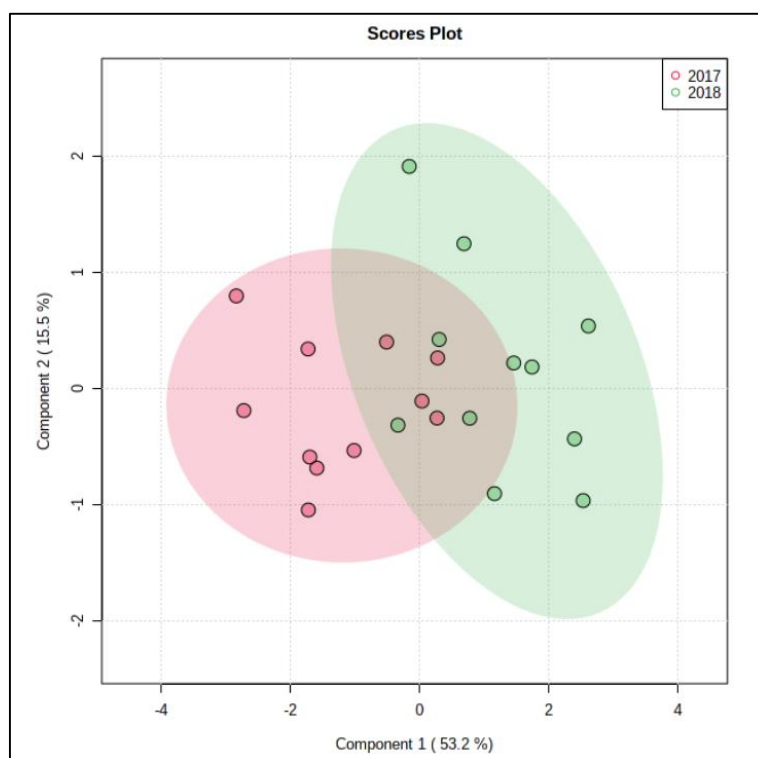
Τα κυριότερα λιπαρά οξέα που βρέθηκαν στα δείγματα φιστικελαίου ήταν το ελαϊκό ($71,6 \pm 1,4\%$ για το 2017 και $71,2 \pm 2,6\%$ για το 2018), λινελαϊκό ($13,2 \pm 1,3\%$ για το 2017 και $15,6 \pm 2,9\%$ για το 2018) και παλμιτικό ($12,4 \pm 1,3\%$ για το 2017 και $10,7 \pm 0,5\%$ για το 2018). Παρατηρήθηκε ότι η περιεκτικότητα σε ελαϊκό οξύ ήταν η ίδια και στις δύο περιόδους καλλιέργειας, η περιεκτικότητα σε λινελαϊκό οξύ αυξήθηκε ελαφρώς, ενώ η περιεκτικότητα σε παλμιτικό παρουσίασε μικρή μείωση. Η περιεκτικότητα σε στεατικό οξύ βρέθηκε να είναι $1,4 \pm 0,2\%$ για το 2017 και $1,2 \pm 0,2\%$ για το 2018, παρουσιάζοντας επίσης μικρή μείωση. Η περιεκτικότητα σε άλλα λιπαρά οξέα ήταν $<1,0\%$. Αυτά τα αποτελέσματα είναι σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Agar et al., 1995· Satil et al., 2003· Ozturk et al., 2016).

Το ελαϊκό οξύ ήταν το κυρίαρχο λιπαρό οξύ σε όλα τα δείγματα και μαζί με το λινελαϊκό οξύ αποτελούσαν το $84,8\%$ και $86,8\%$ του συνόλου των λιπαρών οξέων των ετών 2017 και 2018, αντίστοιχα. Αυτά τα αποτελέσματα παρουσιάζουν μεγάλες ομοιότητες με εκείνα των Luh et al. (1981), Yildiz et al. (1998) και Okay (2002).

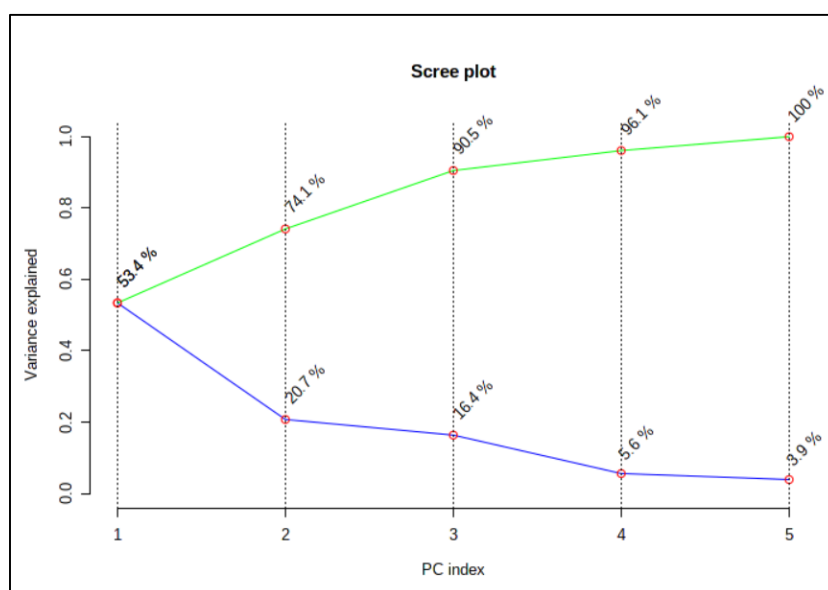
Το συνολικό περιεχόμενο ακόρεστων λιπαρών οξέων βρέθηκε να είναι 86% και $87,9\%$ για τα έτη 2017 και 2018, αντίστοιχα. Αυτά τα ευρήματα ήταν παρόμοια με αυτά των Kamangar et al. (1975), που μελέτησαν τα ιρανικά κελυφωτά φιστίκια (88%). Στην παρούσα μελέτη, τα κορεσμένα, τα ακόρεστα, τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα βρέθηκαν στο 14% , 86% , $72,8\%$ και $12,2\%$, $87,9\%$, $72,2\%$ των ολικών λιπαρών οξέων για τη συγκομιδή 2017 και 2018, αντίστοιχα (Πίνακας B.11.2.2). Αυτά τα ευρήματα συμφώνησαν με αυτά των Maskan και Karatas (1999). Δεδομένου του ελαφρώς υψηλότερου ποσοστού των ακόρεστων λιπαρών οξέων κατά τη συγκομιδή του 2018, εκτιμήθηκε ότι η συγκομιδή του 2018 ήταν ανώτερη σε θρεπτική αξία σε σύγκριση με του 2017.

Τα χρωματογραφικά δεδομένα υπέστησαν λογαριθμικό μετασχηματισμό και αυτόματη κλιμάκωση, με σκοπό που περιγράφεται στο κεφάλαιο A.1.7. Χρησιμοποιήθηκαν όλα τα λιπαρά οξέα και αποδείχθηκε διάκριση των δειγμάτων σύμφωνα με το έτος συγκομιδής τους σε ποσοστό σωστής ταξινόμησης $72,2\%$ (Σχήμα B.11.2.2.1). Στο Σχήμα B.11.2.2.2 αποκαλύπτεται ότι η μεγαλύτερη επίδραση στη διακύμανση των χρωματογραφημάτων φιστικελαίου σχετιζόταν με μία PC ($R^2=0,619$).

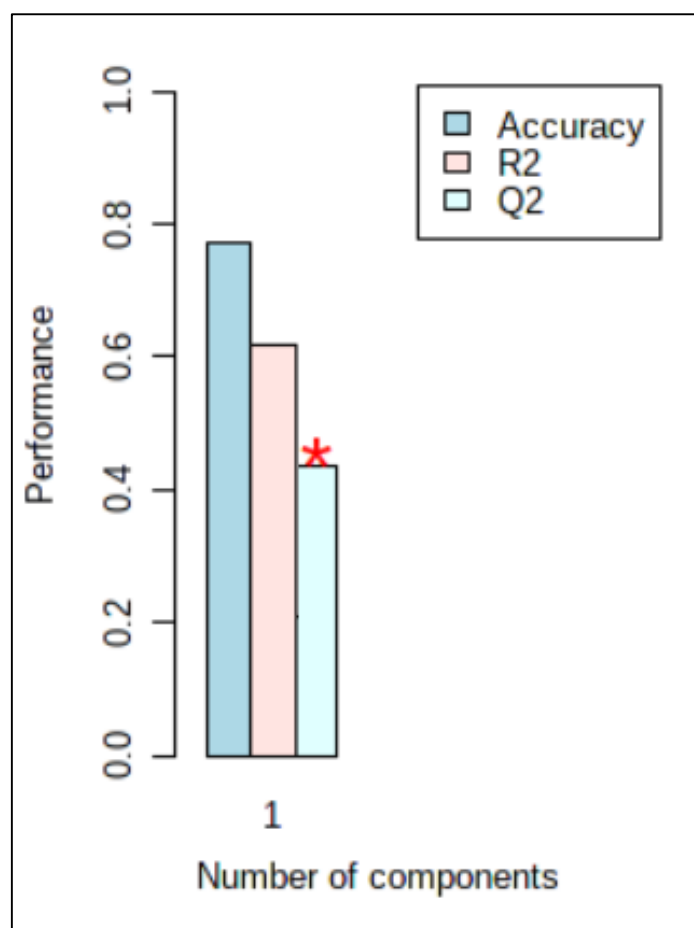
Η τιμή του Q^2 ($Q^2=0,411$) υποδήλωνε χαμηλή προγνωστική ακρίβεια του μοντέλου που δημιουργήθηκε (Σχήμα B.11.2.2.3 και Πίνακας B.11.2.2.1).



Σχήμα B.11.2.2.1. PLS-DA 2D scores plot για το μοντέλο διάκρισης των λιπαρών οξέων σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).



Σχήμα B.11.2.2.2. Γράφημα επεξηγηματικής διακύμανσης για το μοντέλο διάκρισης των λιπαρών οξέων σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).

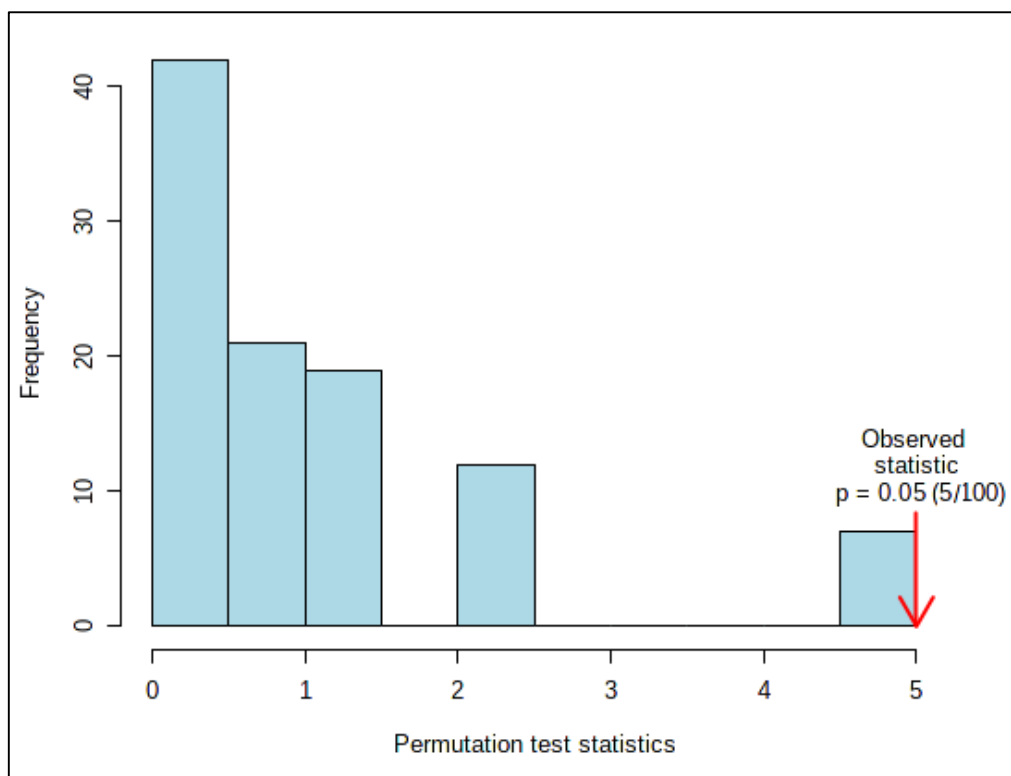


Σχήμα B.11.2.2.3. PLS-DA διασταυρούμενη επικύρωση (cross-validation) για το μοντέλο διάκρισης των λιπαρών οξέων σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).

Πίνακας B.11.2.2.1. PLS-DA απόδοση μοντέλου διάκρισης των λιπαρών οξέων σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).

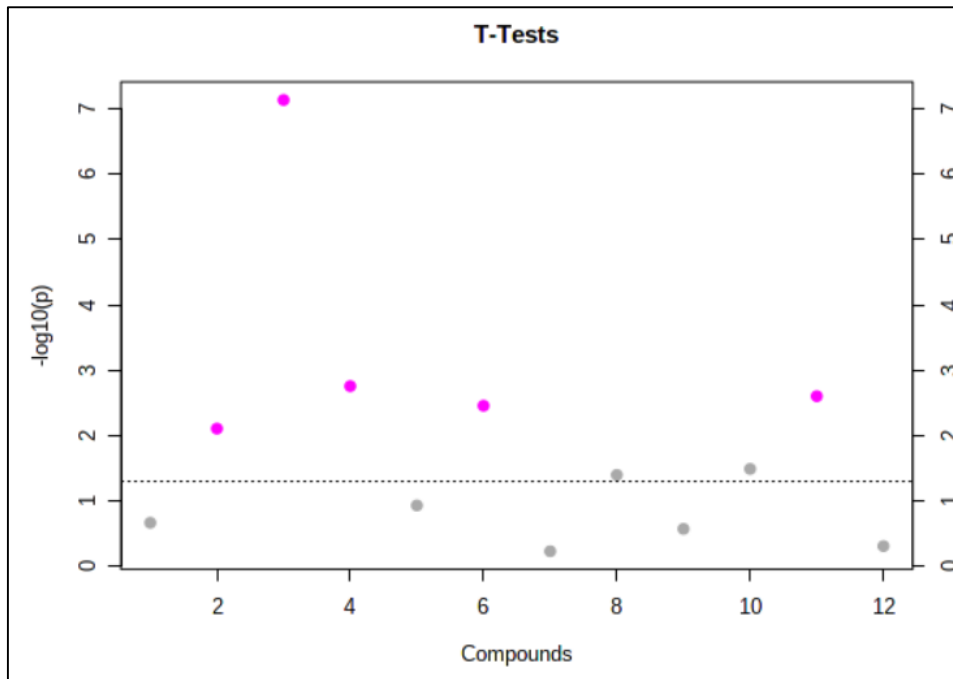
Μέτρηση	1 PC
Ακρίβεια (accuracy)	0,77273
R ²	0,6190
Q ²	0,4110

Η στατιστική σημασία του μοντέλου PLS-DA αξιολογήθηκε με permutation test (Σχήμα B.11.2.2.4). Δεδομένου ότι ο δείκτης με το κόκκινο χρώμα τοποθετήθηκε εντελώς δεξιά, ήταν εμφανές ότι ο διαχωρισμός των δειγμάτων σε δύο ομάδες ήταν σημαντικός από στατιστική πλευρά ($p\text{-value} \leq 0,05$) (Barberini et al., 2016).

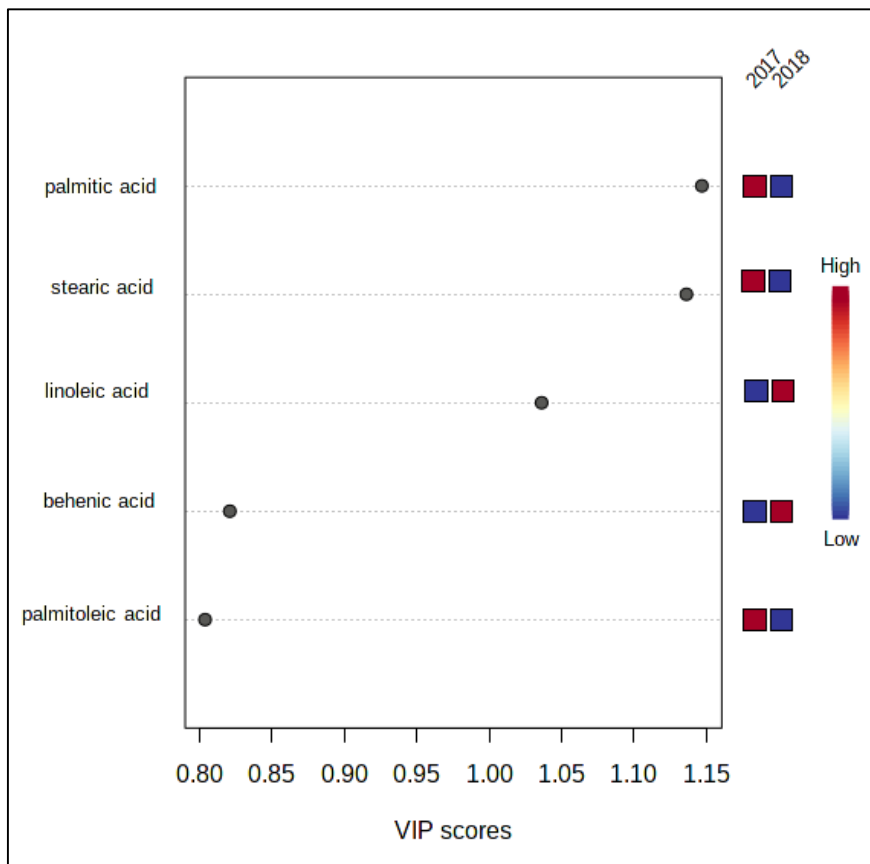


Σχήμα B.11.2.2.4. PLS-DA permutation test για το μοντέλο διάκρισης των λιπαρών οξέων σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst)· (permutation numbers: 100).

Τα δεδομένα από τα δύο διαδοχικά έτη συγκομιδής συγκρίθηκαν χρησιμοποιώντας t-test, το οποίο έδειξε ότι πέντε από τα συνολικά λιπαρά οξέα ήταν στατιστικά σημαντικά για τη διάκριση μεταξύ της συγκομιδής 2017 και 2018 (Σχήμα B.11.2.2.5). Το παλμιτικό οξύ ακολουθούμενο από στεατικό, λινελαϊκό, μπεχενικό και παλμιτελαϊκό έπαιξαν τον πιο σημαντικό ρόλο ($p\text{-value} < 0,05$ και μικρή τιμή Wilks' lambda). Τα λιπαρά οξέα με τα υψηλότερα VIP scores που συνείσφεραν περισσότερο στη διαφοροποίηση (υψηλότερο συντελεστή στη διακριτική συνάρτηση) παρουσιάζονται στο Σχήμα B.11.2.2.6 όπου τα χρωματιστά τετράγωνα δείχνουν τη σχετική ένταση του αντίστοιχου λιπαρού οξέος για κάθε ομάδα.



Σχήμα B.11.2.2.5. T-test για το μοντέλο διάκρισης των λιπαρών οξέων σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).



Σχήμα B.11.2.2.6. PLS-DA χαρακτηριστικά σπουδαιότητας για το μοντέλο διάκρισης των λιπαρών οξέων σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).

B.11.3. Συμπεράσματα

Τόσο η σύγκριση των 15 δειγμάτων του 2017 με τα 30 δείγματα του 2018 όσο και η σύγκριση των 11 δειγμάτων του 2017 με τα 11 δείγματα του 2018 έδειξαν σημαντική από στατιστική πλευρά διάκριση (p -value $<0,05$), με ποσοστό σωστής ταξινόμησης 73,3% και 72,2% αντίστοιχα, μεταξύ των λιπαρών οξέων από τα δύο διαφορετικά έτη συγκομιδής. Συγκεκριμένα, για τα 11 δείγματα του 2017 και τα 11 δείγματα του 2018, τα χρωματογραφήματα των FAMES έδειξαν τάση διάκρισης (p -value $<0,05$) με $R^2=0,619$ και $Q^2=0,411$, τιμές που υποδηλώνουν χαμηλή προγνωστική ακρίβεια για το μοντέλο GC-MS που δημιουργήθηκε (Valasi, Kokotou, & Pappas, 2021). Από τα αποτελέσματα αυτού του μοντέλου προκύπτει ότι το παλμιτικό οξύ ακολουθούμενο από στεατικό, λινελαϊκό, μπεχενικό και παλμιτελαϊκό είχαν την υψηλότερη συμβολή σε αυτήν την ταξινόμηση. Από αυτά τα λινελαϊκό και μπεχενικό παρουσιάστηκαν αυξημένα το 2018, ενώ οι περιεκτικότητες των υπόλοιπων μειώθηκαν. Παρατηρήθηκε αύξηση της ακορεστότητας των φιστικελαιών από το 2017 προς το 2018. Η συλλογή μετεωρολογικών δεδομένων από τα δύο έτη συγκομιδής για τους μήνες Ιούνιο, Ιούλιο και Αύγουστο, οι περιβαλλοντικές συνθήκες των οποίων είναι κρίσιμες για την καρποφορία και την ανάπτυξη του φιστικιού, έδειξαν ότι το 2018 σε σχέση με το 2017 η μέση θερμοκρασία ελαφρά μειώθηκε και ο μέσος ρυθμός βροχής αυξήθηκε (Πίνακες B.1.3.1 και B.1.3.2) (Μιχελάρκη, 2017, 2018). Αυτό ενδέχεται να προκάλεσε αύξηση της ακορεστότητας των λιπιδίων, η οποία ήταν σύμφωνη με αντίστοιχες μελέτες (Neidleman, 1987· Zhang et al., 2020).

B.12. Προσδιορισμός πτητικών συστατικών με SPME

Στο παρόν κεφάλαιο περιγράφεται η ανάλυση των πτητικών συστατικών των φιστικελαίων με χρήση της τεχνικής μικροεκχύλισης στερεάς φάσης της αεριοχρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μαζών. Σε κάθε δείγμα οι πτητικές ενώσεις προσδιορίστηκαν ποιοτικά και ποσοτικά. Ακολουθεί σύγκριση του ποσοστού του μέσου όρου των 15(2017)-30(2018) και των 11(2017)-11(2018) δειγμάτων με σκοπό την ανάπτυξη χημειομετρικού μοντέλου για τη διαφοροποίηση των φιστικελαίων ανάλογα με το έτος συγκομιδής.

B.12.1. Πειραματική διαδικασία

Για την απομόνωση πτητικών συστατικών από τα φιστικέλαια χρησιμοποιήθηκε η τεχνική HS-SPME σύμφωνα με τους Ojeda-Amador et al. (2018). Για κάθε δείγμα, 1 g φιστικελαίου και 50 μ L δεκανοϊκού μεθυλεστέρα (1 mg/mL σε εξάνιο) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) ως IS ζυγίστηκαν σε βιδωτό γυάλινο περιέκτη όγκου 15 mL ($22,7 \times 86$ mm), που έκλεινε ερμητικά με διάφραγμα PTFE/σιλικόνης, μέσα στο οποίο τοποθετήθηκε και μαγνητική ράβδος ανάδευσης. Το IS επιλέχθηκε μετά από έλεγχο της απουσίας του στο πτητικό κλάσμα του φιστικελαίου και αφού διαπιστώθηκε ότι ο χρόνος συγκράτησής του δεν αντιστοιχούσε σε αυτόν άλλων πτητικών συστατικών. Ο περιέκτης αφέθηκε 5 min σε θερμοκρασία 50°C σε θερμοστατούμενο υδατόλουτρο για εξισορρόπηση. Στη συνέχεια, μια τριφασική ίνα διβινυλοβενζολίου/ καρβοξενίου/ πολυδιμεθυλοσιλοξάνιου (divinylbenzene/ carboxen/ polydimethylsiloxane - DVB/ CAR/ PDMS) 50/30 μ m (Supelco, Bellefonte, PA, USA) εκτέθηκε στον εξισορροπημένο χώρο κεφαλής του περιέκτη για 30 min σε θερμοκρασία 50°C υπό συνεχή ανάδευση. Πριν από τη χρήση της, η ίνα αφέθηκε στο σημείο έγχυσης του GC σε θερμοκρασία 250°C για 30 min για απομάκρυνση τυχόν πτητικών ρύπων (fiber conditioning). Μετά τη δειγματοληψία, η ίνα τραβήχτηκε εντός της μικροσύριγγας και εισήχθη αμέσως στο σημείο έγχυσης του GC όπου αφέθηκε για 3 min για θερμική εκρόφιση με θερμοκρασία εισόδου 250°C και γραμμή μεταφοράς του εγχυτήρα (injector liner) διαμέτρου 0,8 mm (SGE International Pty Ltd., Ringwood, Australia). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε λειτουργία διαμοιρασμού αρχικά 1:1 και μετά από 1 min γινόταν 1:20. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε τρεις φορές για κάθε δείγμα, ενώ πριν από κάθε δείγμα αναλύοταν ένα δείγμα ελέγχου (blank sample). Για τον υπολογισμό των δεικτών συγκράτησης (Kovats retention indices,

KRI) αναλύθηκε ένα διάλυμα μιας σειράς ομόλογων αλκανίων (C7-C24) (Supelco, Bellefonte, PA, USA) σε ίδιες συνθήκες. Για το διαχωρισμό των πτητικών συστατικών, χρησιμοποιήθηκε αέριος χρωματογράφος Trace GC ULTRA (Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA) συζευγμένος με φασματοόμετρο μαζών (DSQ II). Ο διαχωρισμός των ενώσεων διεξήχθη σε μια μη πολική στήλη Trace TR-5MS (30 m, 0,25 mm ID, 0,25 μm πάχος φιλμ, Thermo Fisher Scientific, USA) με στατική φάση 5% φαινυλοπολυσιλφαινυλενο-σιλοξάνιο. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε ήλιο με ρυθμό ροής 1,0 mL/min υπό σταθερή πίεση. Το πρόγραμμα ανάλυσης διήρκεσε 40,50 min. Η θερμοκρασία του φούρνου του GC ξεκίνησε από τους 40°C και διατηρήθηκε για 5 min σε αυτή τη θερμοκρασία. Στη συνέχεια προγραμματίστηκε να αυξηθεί από τους 40°C έως τους 150°C με ρυθμό 4 °C/min χωρίς να παραμείνει σε αυτή τη θερμοκρασία. Ακολούθως αυξήθηκε στους 260°C με ρυθμό 20 °C/min και παρέμεινε σε αυτή τη θερμοκρασία για 2,50 min. Σχετικά με τη γραμμή μεταφοράς MS, η θερμοκρασία της πηγής ιόντων και του συστήματος σύζευξης (interface) ήταν 200 και 260°C, αντίστοιχα, με εύρος μάζας από 35 έως 400 amu και ενέργεια ιονισμού ορισμένη στα 70 eV.

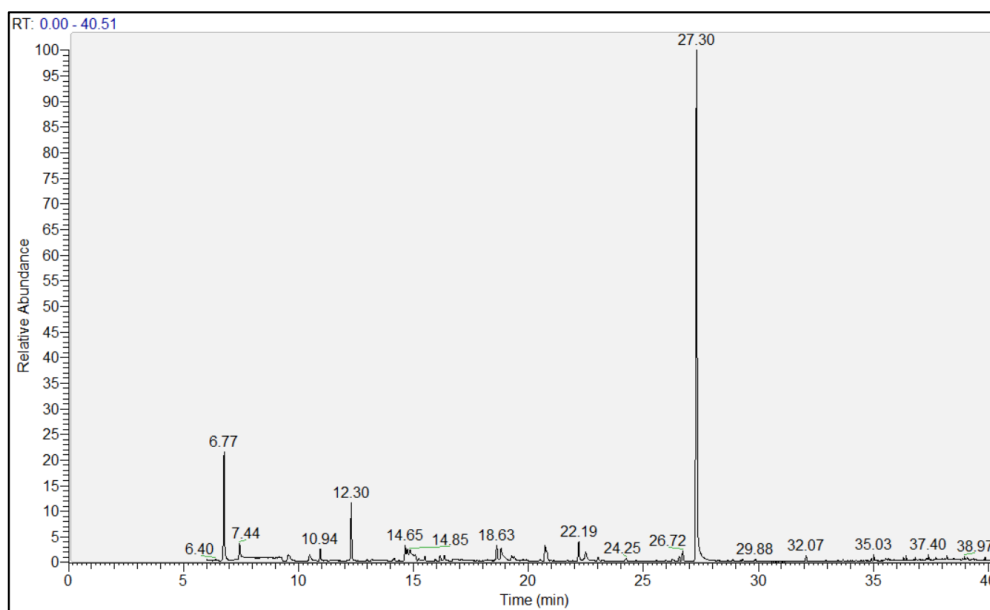
Τα πτητικά συστατικά ταυτοποιήθηκαν στο λογισμικό XCalibur με σύγκριση των φασμάτων μαζών και των KRI των δειγμάτων με: α) εκείνα των εσωτερικών ή εμπορικά διαθέσιμων βιβλιοθηκών [Wiley 275, NBS 75K, NIST (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, έκδοση δεδομένων NIST 05, έκδοση λογισμικού 2.0d), Adams (Adams, 2007)] και β) τα KRI των ομόλογων αλκανίων (C7-C24). Η τέλεια αντιστοίχιση του πειραματικού με το βιβλιογραφικό KRI έδινε τιμή R.Match 999. Οι κορυφές που δεν αντιστοιχίζονταν κατέληγαν σε τιμή μηδέν. Γενικά, τιμή 900 ή μεγαλύτερη αποτελούσε μια εξαιρετική αντιστοιχία, 800-900 ένα καλό ταίριασμα, 700-800 ένα ικανοποιητικό ταίριασμα, ενώ λιγότερο από 600 ήταν μια πολύ κακή αντιστοίχιση. Δεν κατασκευάστηκαν πρότυπες καμπύλες για κάθε μία από τις ποσοτικοποιημένες πτητικές ενώσεις. Ωστόσο, οι πτητικές ενώσεις προσδιορίστηκαν ημιποσοτικά σε σχέση με το IS και εκφράστηκαν σε ποσοστό επί του συνόλου των πτητικών συστατικών.

B.12.2. Αποτελέσματα-Συζήτηση

Τα πτητικά συστατικά του φιστικελαίου μπορεί να διαφέρουν από έρευνα σε έρευνα καθώς μπορεί να μην έχει ακολουθηθεί η ίδια διαδικασία, όπως ο τρόπος παραλαβής του ελαίου και των πτητικών συστατικών, καθώς και ο τρόπος επεξεργασίας του αρχικού δείγματος. Ενδέχεται, λοιπόν, να παρατηρηθούν διαφορές μεταξύ των πτητικών ενώσεων, τόσο στην ύπαρξη όσο και στην ποσότητα. Η χρήση της τεχνικής Soxhlet για την παραλαβή του φιστικελαίου αυξάνει μεν την απόδοση σε έλαιο μειώνοντας, ωστόσο, κάποια χαρακτηριστικά του πτητικού προφίλ του ελαίου λόγω υψηλών θερμοκρασιών (Gong & Peng, 2015· Rabadán et al., 2018). Σε μελέτη των Rodríguez-Bencomo et al. (2015) ήταν εμφανής η επίδραση της θερμικής επεξεργασίας. Η θερμική επεξεργασία είχε ως αποτέλεσμα τη μεταβολή της περιεκτικότητας κάποιων πτητικών, όπως αύξηση της περιεκτικότητας της εξανάλης, του D-λιμονένιου, της π-κυμεν-8-όλης και της βενζαλδεΐδης, ενώ υπήρξε και παραγωγή νέων πτητικών ενώσεων με βάση την πυραζίνη.

Ένα αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του φιστικελαίου παρουσιάζεται στο Σχήμα B.12.2.1. Η έκλουση έγινε από τα περισσότερα προς τα λιγότερα πολικά από τη στιγμή που η στήλη GC-MS ήταν μη πολική και συγκρατεί περισσότερο τα μη πολικά πτητικά συστατικά. Η σύνθεση των φιστικελαίων σε πτητικά συστατικά (εκφρασμένη σε ποσοστό ολικών πτητικών συστατικών) παρουσιάζεται στον Πίνακα B.12.2.1 για το 2017 και στους Πίνακες B.12.2.2 και B.12.2.3 για το 2018. Η σύγκριση του μέσου όρου για κάθε πτητικό συστατικό μεταξύ των δύο ετών συγκομιδής παρουσιάζεται στον Πίνακα B.12.2.4.

Η παραγωγή πτητικών συστατικών επηρεάζεται από τη σύνθεση των θρεπτικών συστατικών του καρπού, τη διαθεσιμότητα νερού, τις καλλιεργητικές φροντίδες πριν, κατά τη διάρκεια και μετά τη συγκομιδή, τις κλιματικές συνθήκες (θερμοκρασία, ποσοστό βροχόπτωσης) και την ηλικία της καλλιέργειας (Magan & Evans, 2000· Şahan & Bozkurt, 2019). Έχει μελετηθεί η χημική σύσταση πτητικών κλασμάτων των αιθερίων ελαίων που προέρχονται από διάφορα μέρη του δέντρου της φιστικιάς (*Pistacia vera* L.) και βρέθηκε, ως κύριο συστατικό, το α-πινένιο (Duru et al., 2003· Ozel, Gogus, Hamilton, & Lewis, 2004· Dragull, Beck, & Merrill, 2010).



Σχήμα Β.12.2.1. Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του φιστικελαίου.

Το πτητικό προφίλ του φιστικελαίου αποτελείται κατά κύριο λόγο από τερπενοειδείς ενώσεις. Πρόκειται για μικρά οργανικά λιπόφιλα μόρια που εμφανίζουν τεράστια ποικιλομορφία ως προς τη δομή τους. Άλλα είναι μη τερπενοειδείς υδρογονάνθρακες, άλλα περιέχουν άτομα οξυγόνου, άλλα είναι μόρια ανοιχτής αλυσίδας και άλλα περιλαμβάνουν δακτυλίους (McMurry, 1998). Τα τερπενοειδή συμβάλλουν στη θερμοανθεκτικότητα του φυτού, στην αντίσταση κατά των μικροβίων και των εντόμων και στην προστασία από το φωτοοξειδωτικό στρες.

Σε μελέτη των Rodríguez-Bencomo et al. (2015) τα κύρια συστατικά των αιθέριων ελαίων, βρέθηκαν να είναι το α -πινένιο και το D-λιμονένιο σε ποσοστά 35-40% επί του εμβαδού του χρωματογραφήματος. Οι Georgiadou et al. (2015) βρήκαν υψηλή περιεκτικότητα EtOH. Στην ερευνητική εργασία των Sonmezdag et al. (2017) το κύριο πτητικό συστατικό ήταν το μυρκένιο, ενώ ακολουθούσε το α -πινένιο και το D-λιμονένιο. Στην παρούσα ερευνητική μελέτη, όπου χρησιμοποιήθηκε Soxhlet ως τεχνική παραλαβής του φιστικελαίου, τα κύρια πτητικά συστατικά βρέθηκαν να είναι το δεκάνιο, η εννεανάλη και η (E)-2-δεκενάλη. Η εννεανάλη έχει βρεθεί σε έλαιο κελυφωτών φιστικιών από διάφορες περιοχές, όπως Καλιφόρνια (Ling, Yang, Li, & Wang, 2015), Γαλλία, Αυστρία (Bail, Stuebiger, Unterweger, Buchbauer, & Krist, 2009). Όσο για την (E)-2-δεκενάλη πρόκειται για το πτητικό συστατικό του φιστικελαίου που ευθύνεται για τη λιπαρή οσμή (Acree & Arn, 2004).

Πίνακας Β.12.2.1. Σύνθεση πτητικών συστατικών (%) των φυσικελαίων για το έτος συγκομιδής 2017.

Δείγματα Πτητικά	A ¹ -1	A-2	A-3	A-4	A-5	A-6	A-7	A-8	A-9	A-10	A-11	A-12	A-13	A-14	A-15
Αλκοόλη της διακετόνης	5,7±0,0 ²	8,0±0,6	1,5±0,6	6,7±2,2	6,8±1,7	6,8±0,0	1,5±0,9	3,3±2,1	3,5±0,6	8,0±1,2	4,1±0,6	1,5±0,1	6,7±2,5	2,5±0,0	12,1±4,4
ο-Ξυλένιο	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,9±2,8	-	9,8±0,8	-	-
Στυρένιο	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,5±0,5	-
Εννεάνιο	-	-	-	-	-	-	-	6,8±2,4	6,3±0,8	-	14,4±3,7	-	-	-	-
α-Πινένιο	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,3±2,4	-
Καμφένιο	-	-	4,7±1,5	-	2,8±0,6	-	16,7±0,5	-	-	5,3±0,2	-	16,6±0,1	10,8±1,6	21,9±1,2	-
β-Πινένιο	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,3±0,9	-
Οκτανάλη	-	-	-	-	-	7,1±0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	2,3±0,5
β-Μυρκενίο	-	-	9,3±1,7	4,6±1,3	2,2±0,7	-	14,1±2,8	-	-	-	-	14,0±0,1	-	32,5±3,4	-
Δεκανίο	44,2±1,3	-	6,6±1,2	65,2±3,6	12,2±3,4	-	9,2±3,6	42,2±0,4	53,3±5,3	29,8±2,4	65,5±1,7	9,0±0,0	62,3±3,9	-	6,7±1,7
π-Κυμένιο	-	-	6,9±0,4	-	-	1,0±0,6	17,8±5,4	-	-	-	-	17,7±0,3	-	17,3±0,7	-
D-Λιμονένιο	-	-	2,5±1,3	-	1,0±0,8	0,4±0,4	7,5±0,8	-	-	-	-	7,4±0,5	-	8,0±0,6	-
γ-Τερπινένιο	-	-	-	-	-	-	2,4±0,2	-	-	-	-	2,3±0,1	-	1,5±0,3	-
α-Τερπινολένιο	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3±0,0	-
Λιναλοόλη	-	3,4±1,2	11,0±0,2	1,7±0,6	1,0±0,0	3,5±0,7	3,8±1,6	1,2±0,9	-	0,6±0,4	5,3±2,3	3,7±0,1	1,3±0,5	4,3±1,4	18,9±2,5
Εντακάνιο	44,7±3,6	-	-	2,7±0,7	0,6±0,3	-	-	1,2±2,3	2,7±0,4	1,0±0,8	-	-	1,7±0,7	-	-
Εννεανάλη	-	26,9±2,1	15,9±2,3	6,6±2,1	21,3±0,8	24,6±1,7	6,6±2,4	10,5±0,4	8,9±2,4	15,7±4,6	-	6,4±0,2	3,7±0,8	1,7±0,1	16,3±1,3
Καμφορά	-	-	2,2±0,0	1,3±0,2	-	-	2,5±0,6	-	-	-	-	2,4±0,1	-	-	-
(E)-2-Εννενάλη	-	4,0±0,9	-	-	3,1±0,4	3,6±0,3	1,1±1,7	2,3±1,8	1,7±1,2	2,9±0,8	-	1,0±0,0	-	-	-
Τερπινεν-4-όλη	-	-	1,8±0,8	-	-	-	0,5±0,2	-	-	-	-	0,4±0,0	-	0,4±0,0	1,2±0,4
Δωδεκάνιο	3,0±0,3	0,6±0,2	0,9±0,1	2,4±0,0	0,5±0,3	0,8±0,0	0,5±0,0	1,9±0,7	1,2±0,4	1,0±0,5	1,6±0,4	0,5±0,1	1,5±0,1	-	-
Δεκανάλη	-	2,2±1,7	2,0±0,2	-	1,6±0,5	1,7±0,4	0,6±0,3	1,5±0,3	0,9±0,2	1,6±0,8	-	0,7±0,0	-	-	1,2±0,8
Πουλεγόνη	-	0,3±0,0	1,5±0,6	0,4±0,0	-	-	1,1±0,7	0,4±0,2	-	-	0,3±0,0	1,2±0,1	-	0,4±0,0	1,1±0,0
Οξική λιναλοόλη	-	1,7±0,4	3,7±0,4	1,0±0,8	0,3±0,0	0,5±0,2	1,4±0,5	0,7±0,1	-	-	1,1±0,9	1,4±0,2	0,6±0,0	0,8±0,3	4,5±0,6

(E)-2-Δεκενάλη	-	25,2±2,6	13,1±3,1	2,7±1,4	21,5±3,5	26,0±0,8	5,4±0,0	12,3±2,2	9,2±0,0	16,1±4,1	-	5,5±0,2	-	-	23,4±1,1
Οξικός βορνυλεστέρας	-	0,3±0,1	2,3±0,4	0,3±0,0	-	-	0,7±0,1	-	-	-	0,5±0,1	0,8±0,1	0,6±0,2	0,4±0,0	1,9±0,9
Δεκατριάνιο	1,7±0,1	-	0,9±0,3	2,0±0,9	0,6±0,3	-	-	2,5±0,9	1,0±0,1	0,9±0,6	1,1±0,3	-	0,7±0,3	-	-
(E,E)-2,4- Δεκαδιενάλη	-	3,8±0,5	-	-	5,0±0,4	-	1,3±0,8	1,4±1,0	2,1±0,7	1,3±0,5	-	1,5±0,3	-	-	3,4±0,7
(E)-2-Εντεκενάλη	-	23,0±2,3	12,5±2,4	1,5±0,5	19,2±3,3	23,3±4,5	5,0±2,3	10,6±1,4	8,6±2,5	15,2±3,2	-	5,1±0,1	-	-	6,9±0,8
Δεκατετράνιο	0,7±0,2	0,8±0,3	0,9±0,3	0,9±0,6	0,5±0,2	0,7±0,4	0,4±0,0	1,4±0,3	0,7±0,4	0,6±0,4	0,4±0,2	0,9±0,1	0,3±0,1	-	-

¹Α: έτος συγκομιδής 2017, ²Μέσος όρος±τυπική απόκλιση από τρεις μετρήσεις για κάθε δείγμα.

Πίνακας Β.12.2.2. Σύνθεση πτητικών συστατικών (%) των φυσικελαίων για το έτος συγκομιδής 2018 (μέρος 1).

Δείγματα Πτητικά	B ¹ -1	B-2	B-3	B-4	B-5	B-6	B-7	B-8	B-9	B-10	B-11	B-12	B-13	B-14	B-15
Αλκοόλη της διακετόνης	-	6,4±2,4	5,7±1,8	-	-	-	-	-	-	-	-	5,7±0,6	-	-	23,7±1,7
ο-Ξυλένιο	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Στυρένιο	-	-	-	-	-	-	-	-	19,7±2,8	-	-	-	-	-	-
Εννεάνιο	-	-	7,9±1,7	14,4±4,1	20,5±0,3	9,0±2,8	3,7±2,1	-	-	13,4±0,9	-	8,2±1,2	16,2±4,6	11,2±3,1	-
α-Πινένιο	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30,7±2,5
Καμφένιο	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14,8±5,6	-	-	-	11,7±3,4
β-Πινένιο	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Οκτανάλη	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,5±0,5	-	-	-	4,1±0,6
β-Μυρκενίο	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,2±3,0	-	-	-	-
Δεκανίο	54,7±7,3 ²	70,6±0,9	70,8±2,6	72,3±5,8	68,8±6,8	39,3±4,1	9,8±2,4	89,5±1,8	53,1±1,9	78,8±8,9	-	76,6±4,4	83,1±5,2	33,6±2,4	-
π-Κυμένιο	-	7,6±0,6	6,5±2,0	2,7±1,1	7,2±2,4	-	-	-	-	2,0±0,3	9,0±2,6	2,2±0,6	-	-	5,9±0,0
D-Λιμονένιο	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,2±1,9	-	-	-	3,3±1,2
γ-Τερπινένιο	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Τερπινολένιο	2,8±0,5	2,4±1,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Λιναλοόλη	-	-	-	1,4±0,3	0,6±0,3	-	-	6,1±2,6	-	-	0,7±0,5	-	-	40,5±3,0	-
Εντακάνιο	-	3,3±0,7	3,0±1,8	-	2,0±1,0	1,8±0,9	0,7±0,3	-	1,9±0,6	2,9±1,0	-	3,9±2,1	-	2,5±0,1	-
Εννεανάλη	13,1±0,7	3,0±1,4	3,2±0,9	6,0±1,9	-	13,7±2,7	24,2±2,6	-	7,0±2,5	1,4±0,4	15,7±1,7	-	-	8,8±1,7	11,9±4,2
Καμφορά	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,2±0,8	-	-	-	-
(E)-2-Εννενάλη	1,8±0,1	-	-	-	-	2,5±1,1	4,3±1,5	-	1,2±0,9	-	2,6±1,7	-	-	-	-
Τερπινεν-4-όλη	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Δωδεκάνιο	1,3±0,0	2,8±0,9	1,4±0,4	1,6±0,5	0,6±0,2	1,3±0,6	1,2±0,9	2,0±0,8	0,8±0,3	0,8±0,5	1,0±0,4	2,1±1,3	-	1,4±0,7	1,4±0,3
Δεκανάλη	0,8±0,3	-	-	-	-	1,1±0,3	1,7±0,5	-	0,7±0,4	-	1,3±0,8	-	-	1,0±0,3	-
Πουλεγόνη	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6±0,0	-	-	-	-
Οξική λιναλοόλη	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6±0,0	-	-	-	-

(E)-2-Δεκενάλη	12,2±2,6	2,4±1,5	0,8±0,3	-	-	14,7±2,5	24,6±1,6	-	7,3±2,9	-	15,4±1,1	-	-	-	3,4±2,1
Οξικός βορνυλεστέρας	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4±0,1	-	-	-	-
Δεκατριάνιο	0,7±0,2	1,1±0,7	0,6±0,2	1,2±0,6	0,4±0,1	1,0±0,5	1,1±0,7	1,4±0,6	0,6±0,0	0,5±0,1	0,9±0,3	0,9±0,5	0,8±0,4	0,7±0,2	1,0±0,3
(E,E)-2,4- Δεκαδιενάλη	3,1±1,0	-	-	-	-	2,0±0,9	4,9±2,5	-	0,6±0,2	-	2,3±0,6	-	-	-	-
(E)-2-Εντεκενάλη	9,2±0,9	-	-	-	-	12,7±3,4	23,0±0,8	-	6,8±1,5	-	14,5±0,9	-	-	-	3,1±0,8
Δεκατετράνιο	0,3±0,1	0,4±0,0	0,2±0,0	0,4±0,0	-	0,7±0,0	0,9±0,2	1,1±0,7	0,3±0,1	0,2±0,0	0,4±0,0	0,5±0,0	-	0,3±0,0	-

¹Α: έτος συγκομιδής 2018, ²Μέσος όρος±τυπική απόκλιση από τρεις μετρήσεις για κάθε δείγμα.

Πίνακας Β.12.2.3. Σύνθεση πτητικών συστατικών (%) των φυσικελαίων για το έτος συγκομιδής 2018 (μέρος 2).

Δείγματα Πτητικά	B ¹ -16	B-17	B-18	B-19	B-20	B-21	B-22	B-23	B-24	B-25	B-26	B-27	B-28	B-29	B-30
Αλκοόλη της διακετόνης	-	-	-	27,8±3,3	9,6±2,4	-	-	-	-	3,7±1,7	-	-	-	-	23,9±2,7
ο-Ξυλένιο	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Στυρένιο	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Εννεάνιο	6,9±0,7 ²	-	13,3±3,8	-	-	16,8±4,1	16,8±2,0	9,8±0,4	17,4±5,9	14,0±2,8	22,7±3,9	9,6±2,4	8,2±1,8	19,8±4,3	-
α-Πινένιο	-	-	-	21,1±0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Καμφένιο	-	-	-	13,1±2,4	-	-	-	-	-	5,9±1,3	-	-	-	-	-
β-Πινένιο	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Οκτανάλη	-	-	-	4,5±1,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-Μυρκένιο	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Δεκανίο	44,9±4,8	90,1±4,7	82,7±4,6	-	77,1±6,2	49,5±2,8	49,5±3,6	45,0±2,4	73,5±2,7	53,6±7,1	73,4±4,5	45,2±5,7	47,8±1,5	53,2±2,6	67,1±1,9
π-Κυμένιο	-	-	-	7,9±0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Λιμονένιο	-	-	-	4,5±2,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
γ-Τερπινένιο	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Τερπινολένιο	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Λιναλοόλη	-	6,2±2,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Εντακάνιο	2,7±0,2	-	-	-	4,7±0,8	3,9±0,7	3,9±1,7	2,1±0,0	-	2,9±0,2	2,6±0,6	1,9±0,9	1,9±0,7	1,7±0,8	3,8±1,5
Εννεανάλη	13,3±2,3	-	-	12,9±0,5	-	19,2±3,4	19,2±2,8	11,7±0,2	6,0±0,4	5,4±2,3	-	10,4±2,8	10,8±3,1	6,6±3,3	-
Καμφορά	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(E)-2-Εννενάλη	2,9±0,6	-	-	-	-	-	-	2,4±0,8	-	-	-	2,5±1,1	2,7±0,6	1,3±0,1	-
Τερπινεν-4-όλη	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Δωδεκάνιο	1,4±0,5	2,0±1,2	1,1±0,3	1,7±0,4	2,5±0,3	2,2±0,3	2,2±0,0	1,1±0,2	1,4±0,5	1,0±0,1	1,0±0,9	1,2±0,5	1,1±0,4	0,7±0,0	2,5±1,0
Δεκανάλη	1,6±0,9	-	-	2,3±0,0	-	2,3±1,2	2,3±	1,3±0,7	-	0,9±0,7	-	1,4±0,7	1,5±0,9	0,8±0,2	-
Πουλεγόνη	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Οξική λιναλοόλη	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(E)-2-Δεκενάλη	12,4±1,3	-	1,7±0,1	4,2±0,1	-	4,4±0,9	4,4±2,0	12,0±1,3	-	5,6±0,3	-	12,3±2,9	11,9±1,7	7,1±1,6	-
Οξικός βορνυλεστεράς	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Δεκατριάνιο	1,1±0,0	1,2±0,3	0,9±0,3	-	3,2±0,4	1,2±0,0	1,2±0,6	1,3±0,4	1,3±0,2	0,6±0,1	0,3±0,1	1,1±0,6	1,3±0,2	0,7±0,3	1,9±0,8
(E,E)-2,4- Δεκαδιενάλη	1,4±	-	-	-	-	-	-	2,3±1,1	-	0,5±0,2	-	2,3±1,2	1,8±	1,3±0,8	-
(E)-2-Εντεκενάλη	10,6±0,4	-	-	-	-	-	-	10,3±0,1	-	5,5±2,4	-	11,3±0,4	10,6±2,8	6,7±2,4	-
Δεκατετράνιο	0,9±0,2	0,5±0,0	0,4±0,0	-	2,9±0,7	0,4±0,1	0,4±0,1	0,8±0,0	0,5±0,1	0,4±0,0	-	0,8±0,0	0,7±0,1	0,3±0,0	0,8±

¹Α: έτος συγκομιδής 2018, ²Μέσος όρος±τυπική απόκλιση από τρεις μετρήσεις για κάθε δείγμα.

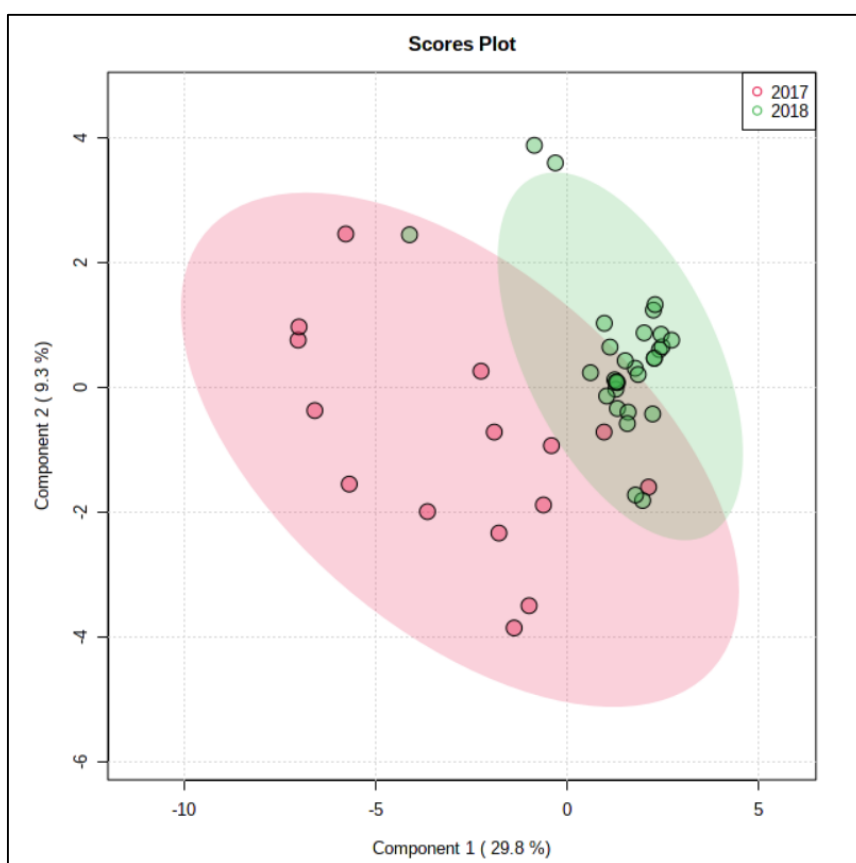
Πίνακας Β.12.2.4. Σύγκριση του μέσου όρου των πτητικών συστατικών (%) των φιστικελαίων για τα δύο έτη συγκομιδής.

Πτητικά συστατικά	KRI (βιβλιογραφία)	Αναφορά	Μέσος όρος (%)			
			Σύγκριση 15 δειγμάτων 2017 και 30 δειγμάτων 2018		Σύγκριση 11 δειγμάτων 2017 και 11 δειγμάτων 2018	
			2017	2018	2017	2018
Αλκοόλες						
Τερπινεν-4-όλη	1177	(Adams, 2007)	0,3	0,0	0,2	0,0
Υδρογονάνθρακες						
Εννεάνιο	900	(Adams, 2007)	1,8	8,7	2,5	6,3
Δεκάνιο	1000	(Adams, 2007· Georgiadou et al., 2015)	27,1	55,1	29,8	55,3
Εντεκάνιο	1100	(Georgiadou et al., 2015)	3,6	1,8	4,8	1,4
Δωδεκάνιο	1200	(Adams, 2007)	1,1	1,4	1,3	1,3
Δεκατριάνιο	1300	(Adams, 2007· Georgiadou et al., 2015)	0,8	1,0	1,0	0,9
Δεκατετράνιο	1400	(Adams, 2007· Georgiadou et al., 2015)	0,6	0,5	0,7	0,4
Παράγωγα βενζολίου						
ο-Ξυλένιο	887	(Rodríguez-Bencomo et al., 2015)	1,0	0,0	0,5	0,0
Στυρένιο	893	(Adams, 2007· Bail et al., 2009)	0,1	0,7	0,0	1,8
Κυκλικά μονοτερπένια						
π-Κυμένιο	1022	(Adams, 2007· Bail et al., 2009· Hojjati, Calín-Sánchez, Razavi, & Carbonell-Barrachina, 2012· Georgiadou et al., 2015· Rodríguez-Bencomo et al., 2015)	4,0	1,7	2,3	3,2
D-Λιμονένιο	1030	(Adams, 2007· Tsokou, Georgopoulou, Melliou, Magiatis, & Tsitsa, 2007· Bail et al., 2009· Hojjati et al., 2012· Georgiadou et al., 2015· Ling et al., 2015· Rodríguez-Bencomo et al., 2015· Ojeda-Amador et al., 2018· Sonmezdag et al., 2017)	1,8	0,4	1,0	0,4
α-Τερπινολένιο	1088	(Adams, 2007· Tsokou et al., 2007· Hojjati et al., 2012· Georgiadou et al., 2015· Ling et al., 2015· Rodríguez-Bencomo et al., 2015· Ojeda-Amador et al., 2018· Sonmezdag et al., 2017)	0,0	0,2	0,0	0,5
Μονοτερπένια						
α-Πινένιο	937	(Adams, 2007· Tsokou et al., 2007· Hojjati et al., 2012· Georgiadou et al., 2015· Ling et al., 2015· Rodríguez-Bencomo et al., 2015· Ojeda-Amador et al., 2018· Sonmezdag et al., 2017)	0,4	1,7	0,0	0,0
Καμφένιο	952	(Adams, 2007· Tsokou et al., 2007· Hojjati et al., 2012· Georgiadou et al., 2015· Rodríguez-Bencomo et al., 2015)	5,3	1,5	2,7	1,3

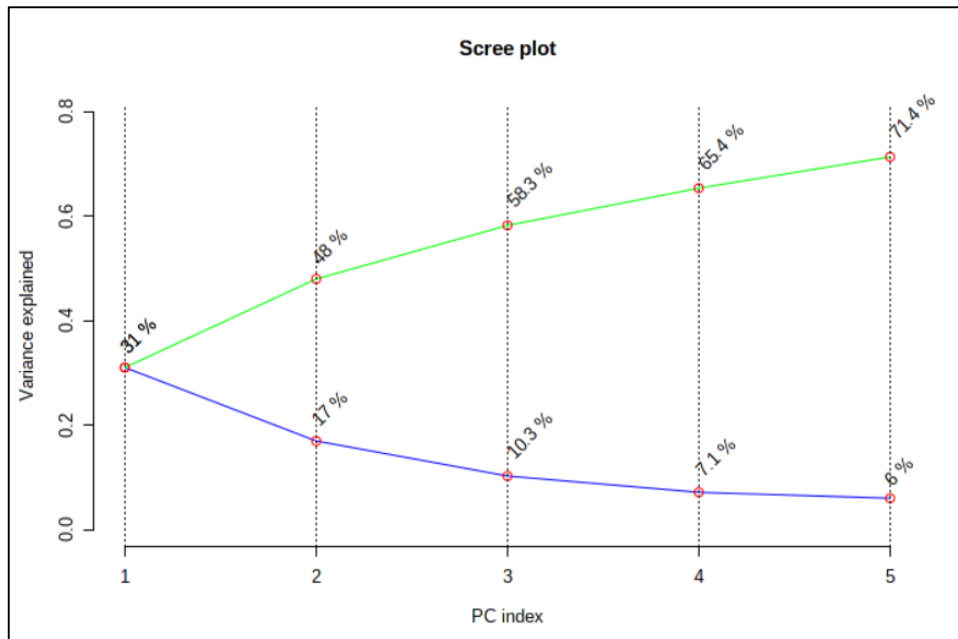
β-Πινένιο	979	(Adams, 2007· Tsokou et al., 2007· Bail et al., 2009· Hojjati et al., 2012· Georgiadou et al., 2015· Ling et al., 2015· Rodríguez-Bencomo et al., 2015· Ojeda-Amador et al., 2018· Sonmezdag et al., 2017)	0,1	0,0	0,0	0,0
γ-Τερπινένιο	1060	(Adams, 2007· Tsokou et al., 2007· Hojjati et al., 2012· Georgiadou et al., 2015)	0,4	0,0	0,2	0,0
Πουλεγόνη	1237	(Adams, 2007)	0,4	0,0	0,4	0,1
Άκυκλα μονοτερπένια						
β-Μυρκένιο	991	(Adams, 2007· Tsokou et al., 2007· Hojjati et al., 2012· Georgiadou et al., 2015· Ling et al., 2015· Sonmezdag et al., 2017)	5,1	0,3	2,7	0,7
Οξυγονομένα μονοτερπένια						
Λιναλοόλη	1099	(Tsokou et al., 2007· Georgiadou et al., 2015)	4,0	1,9	2,8	0,8
Οξική λιναλοόλη	1257	(Adams, 2007)	1,2	0,0	0,9	0,1
Αλδεΐδες						
Οκτανάλη	998	(Adams, 2007)	0,6	0,5	0,6	0,6
Εννεανάλη	1104	(Adams, 2007· Tsokou et al., 2007· Hojjati et al., 2012· Georgiadou et al., 2015· Ling et al., 2015· Sonmezdag et al., 2017)	11,0	7,4	12,5	7,9
(E)-2-Εννενάλη	1162	(Adams, 2007)	1,3	0,8	1,7	1,1
Δεκανάλη	1206	(Adams, 2007)	0,9	0,7	1,1	0,5
(E)-2-Δεκενάλη	1263	(Adams, 2007)	10,7	5,2	12,0	7,0
(E,E)-2,4-Δεκαδιενάλη	1317	(Adams, 2007)	1,3	0,7	1,3	1,2
(E)-2-Εντεκενάλη	1367	(Adams, 2007)	8,7	4,1	10,8	6,0
Κετόνες						
Αλκοόλη της διακετόνης	838	(Adams, 2007)	5,2	3,5	5,1	1,1
Καμφορά	1142	(Adams, 2007)	0,6	0,0	0,5	0,1
Εστέρες						
Οξικός βορνυλεστέρας	1285	(Adams, 2007· Tsokou et al., 2007· Georgiadou et al., 2015· Sonmezdag et al., 2017)	0,5	0,0	0,4	0,0

B.12.2.1. Σύγκριση 15 δειγμάτων 2017 και 30 δειγμάτων 2018

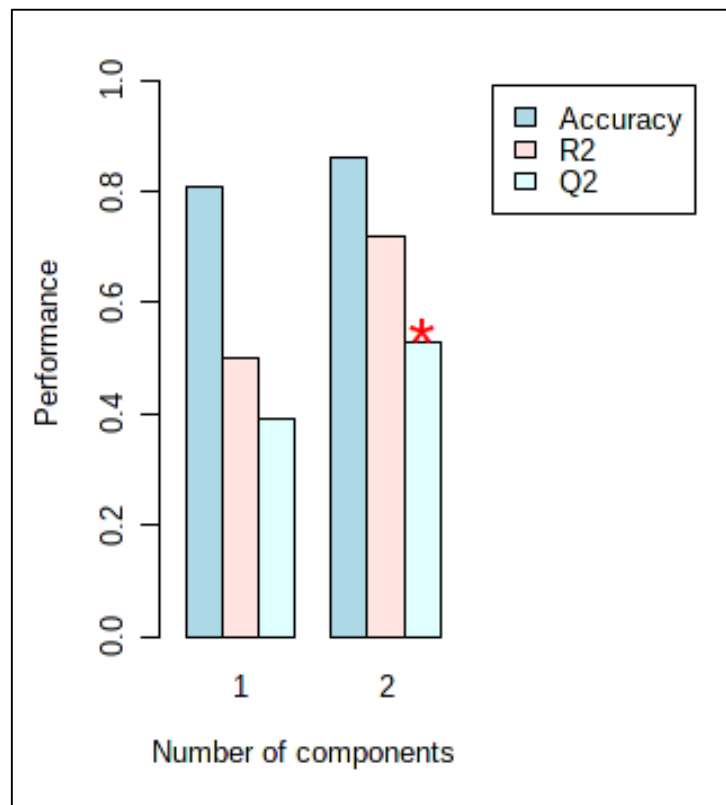
Τα χρωματογραφικά δεδομένα υπέστησαν λογαριθμικό μετασχηματισμό και αυτόματη κλιμάκωση, με σκοπό που περιγράφεται στο κεφάλαιο A.1.7. Χρησιμοποιήθηκαν όλα τα πτητικά συστατικά και αποδείχθηκε διάκριση των δειγμάτων σύμφωνα με το έτος συγκομιδής τους (73,3% ποσοστό σωστής ταξινόμησης) (Σχήμα B.12.2.1.1). Στο Σχήμα B.12.2.1.2 αποκαλύπτεται ότι η μεγαλύτερη επίδραση στη διακύμανση των χρωματογραφημάτων φιστικελαίου σχετιζόταν με δύο PC ($R^2=0,71759$). Η τιμή του Q^2 ($Q^2=0,53012$) υποδήλωνε χαμηλή προγνωστική ακρίβεια του μοντέλου που δημιουργήθηκε (Σχήμα B.12.2.1.3 και Πίνακας B.12.2.1.1).



Σχήμα B.12.2.1.1. PLS-DA 2D scores plot για το μοντέλο διάκρισης των πτητικών συστατικών σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).



Σχήμα B.12.2.1.2. Γράφημα επεξηγηματικής διακύμανσης για το μοντέλο διάκρισης των πτητικών συστατικών σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).

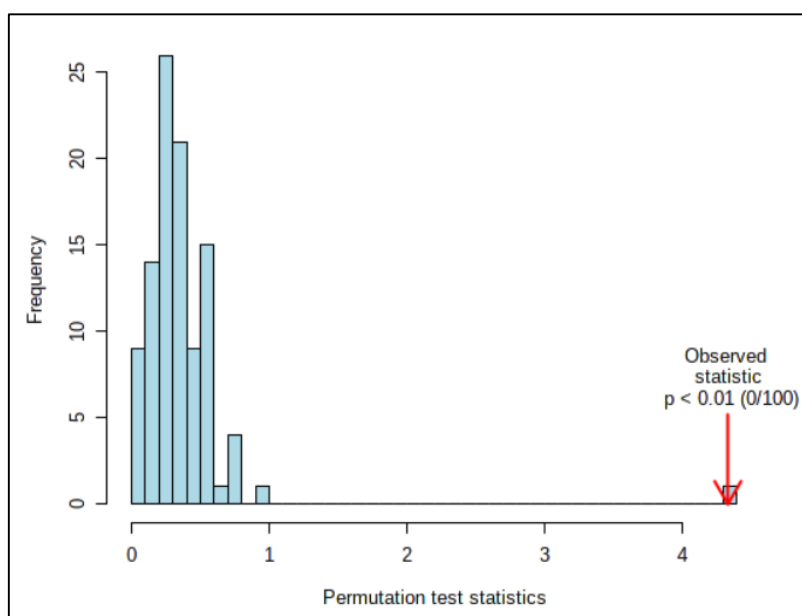


Σχήμα B.12.2.1.3. PLS-DA διασταυρούμενη επικύρωση (cross-validation) για το μοντέλο διάκρισης των πτητικών συστατικών σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).

Πίνακας B.12.2.1.1. PLS-DA απόδοση μοντέλου διάκρισης πτητικών συστατικών σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).

Μέτρηση	1 PC	2 PC
Ακρίβεια (accuracy)	0,80667	0,86000
R ²	0,50225	0,71759
Q ²	0,39214	0,53012

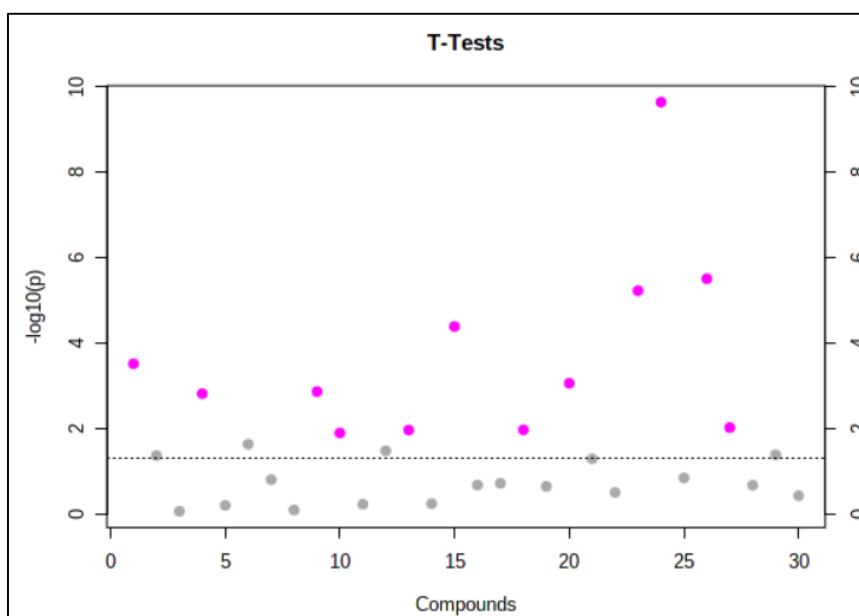
Η στατιστική σημασία του μοντέλου PLS-DA αξιολογήθηκε με permutation test (Σχήμα B.12.2.1.4). Ο διαχωρισμός των δειγμάτων σε δύο ομάδες ήταν σημαντικός από στατιστική πλευρά (p-value<0,05) (Barberini et al., 2016).



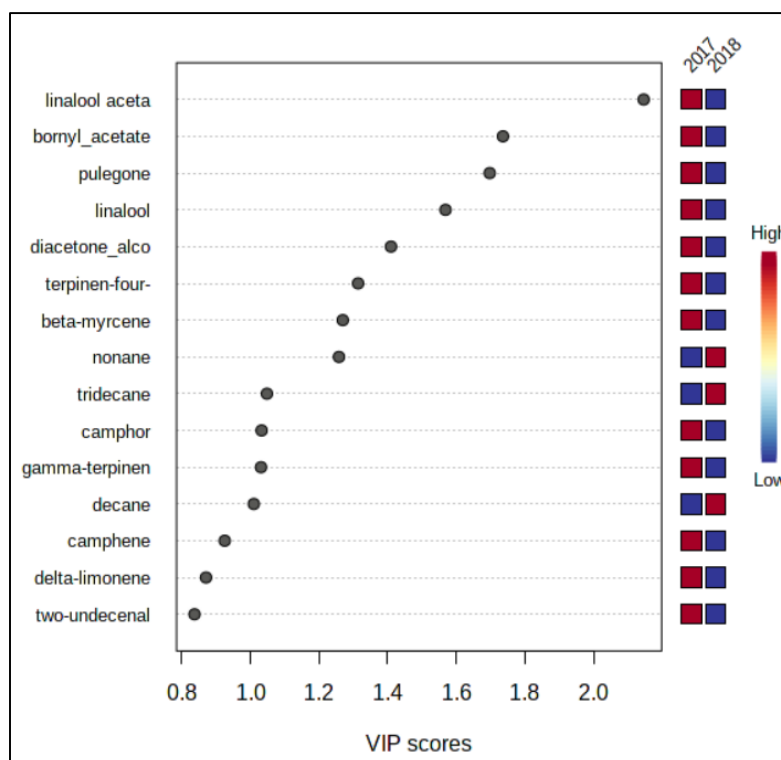
Σχήμα B.12.2.1.4. PLS-DA permutation test για το μοντέλο διάκρισης των πτητικών συστατικών σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst)· (permutation numbers: 100).

Τα δεδομένα από τα δύο διαδοχικά έτη συγκομιδής συγκρίθηκαν χρησιμοποιώντας t-test, το οποίο έδειξε ότι 12 από τα 30 πτητικά συστατικά ήταν στατιστικά σημαντικά για τη διάκριση μεταξύ της συγκομιδής 2017 και 2018 (Σχήμα B.12.2.1.5). Τα πτητικά συστατικά με τα υψηλότερα VIP scores που συνέισφεραν περισσότερο στη διαφοροποίηση (υψηλότερο συντελεστή στη διακριτική συνάρτηση)

παρουσιάζονται στο Σχήμα B.12.2.1.6 όπου τα χρωματιστά τετράγωνα δείχνουν τη σχετική ένταση του αντίστοιχου πτητικού συστατικού για κάθε ομάδα.



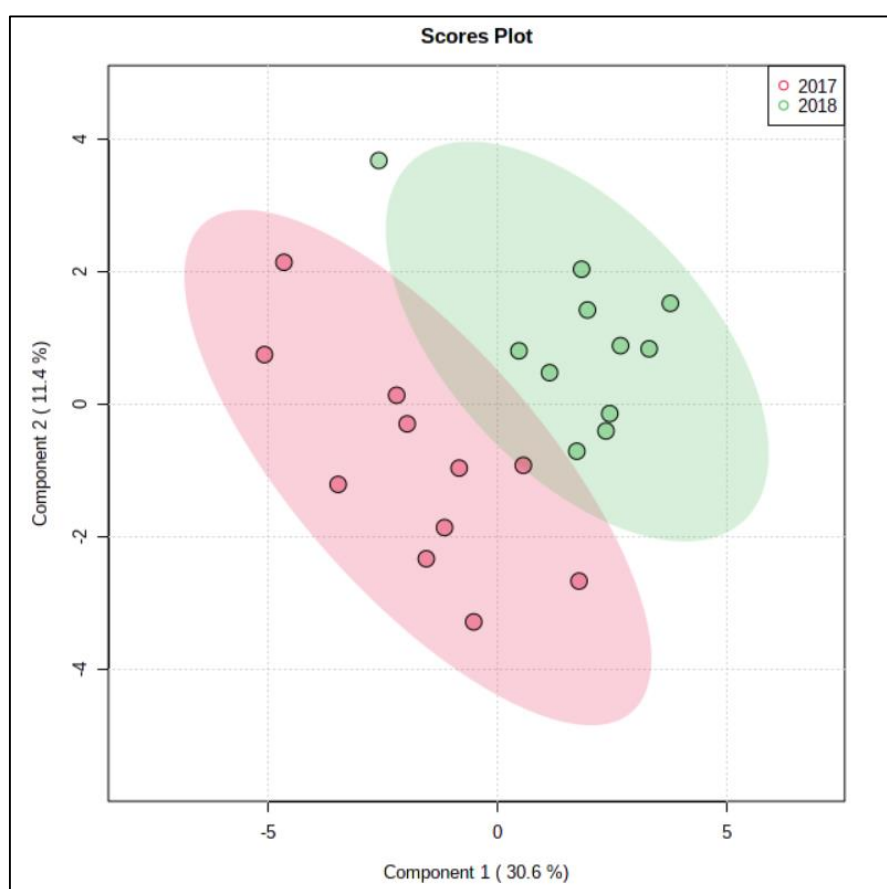
Σχήμα B.12.2.1.5. T-test για το μοντέλο διάκρισης των πτητικών συστατικών σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).



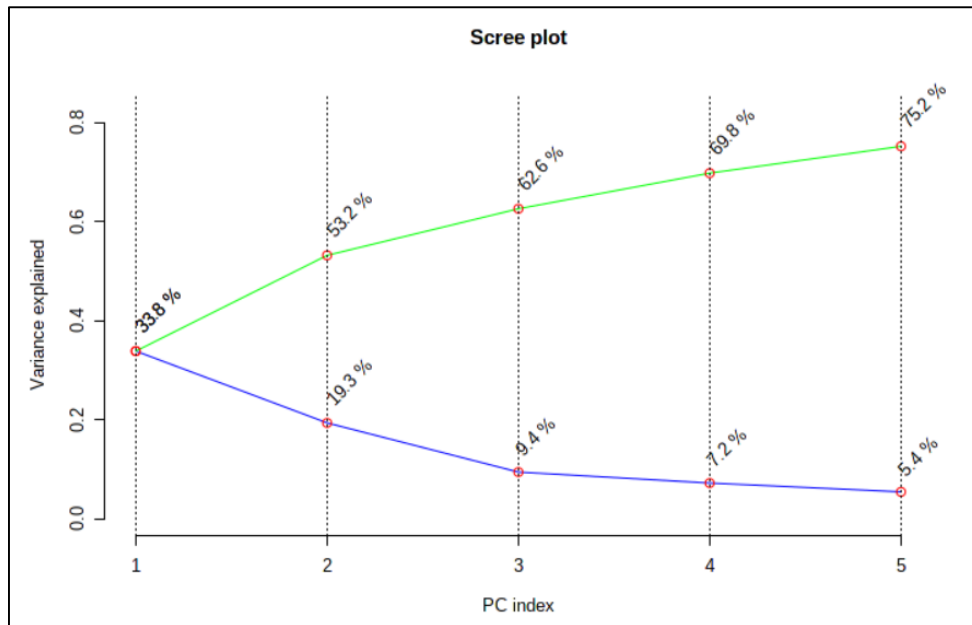
Σχήμα B.12.2.1.6. PLS-DA χαρακτηριστικά σπουδαιότητας για το μοντέλο διάκρισης των πτητικών συστατικών σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).

B.12.2.2. Σύγκριση 11 δειγμάτων 2017 και 11 δειγμάτων 2018

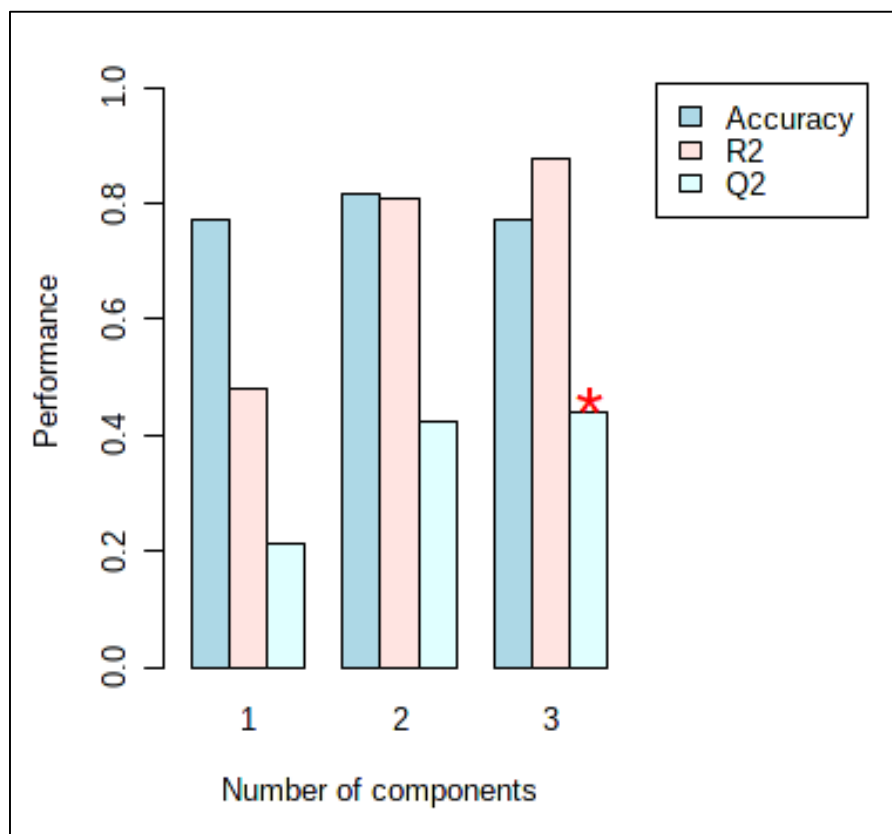
Τα χρωματογραφικά δεδομένα υπέστησαν λογαριθμικό μετασχηματισμό και αυτόματη κλιμάκωση, με σκοπό που περιγράφεται στο κεφάλαιο A.1.7. Χρησιμοποιήθηκαν όλα τα πτητικά συστατικά και αποδείχθηκε διάκριση των δειγμάτων σύμφωνα με το έτος συγκομιδής τους (90% ποσοστό σωστής ταξινόμησης) (Σχήμα B.12.2.2.1). Στο Σχήμα B.12.2.2.2 αποκαλύπτεται ότι η μεγαλύτερη επίδραση στη διακύμανση των χρωματογραφημάτων φιστικελαίου σχετιζόταν με τρεις PC ($R^2=0,87702$). Η τιμή του Q^2 ($Q^2=0,43986$) υποδήλωνε χαμηλή προγνωστική ακρίβεια του μοντέλου που δημιουργήθηκε (Σχήμα B.12.2.2.3 και Πίνακας B.12.2.2.1).



Σχήμα B.12.2.2.1. PLS-DA 2D scores plot για το μοντέλο διάκρισης των πτητικών συστατικών σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).



Σχήμα B.12.2.2.2. Γράφημα επεξηγηματικής διακύμανσης για το μοντέλο διάκρισης των πτητικών συστατικών σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).

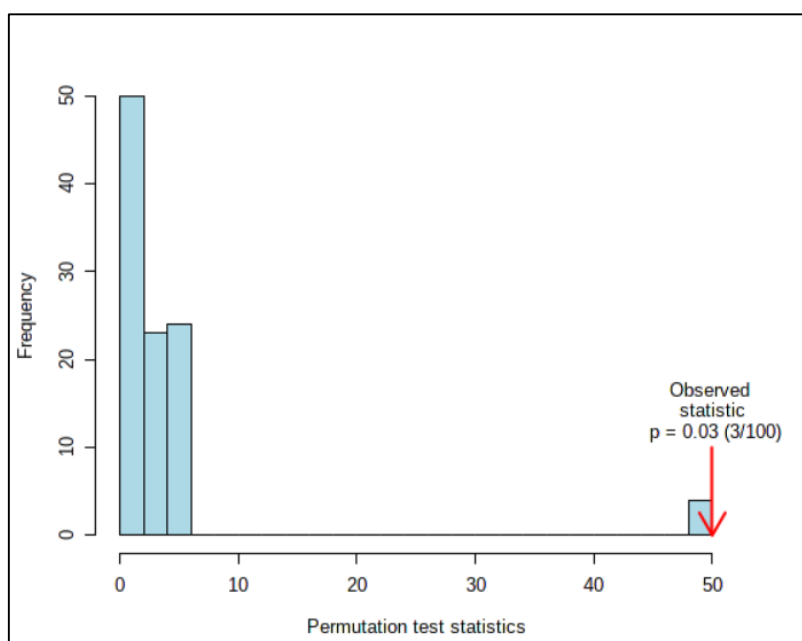


Σχήμα B.12.2.2.3. PLS-DA διασταυρούμενη επικύρωση (cross-validation) για το μοντέλο διάκρισης των πτητικών συστατικών σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).

Πίνακας B.12.2.2.1. PLS-DA απόδοση μοντέλου διάκρισης πτητικών συστατικών σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).

Μέτρηση	1 PC	2 PC	3 PC
Ακρίβεια (accuracy)	0,77273	0,81818	0,77273
R ²	0,47817	0,80773	0,87702
Q ²	0,21262	0,42411	0,43986

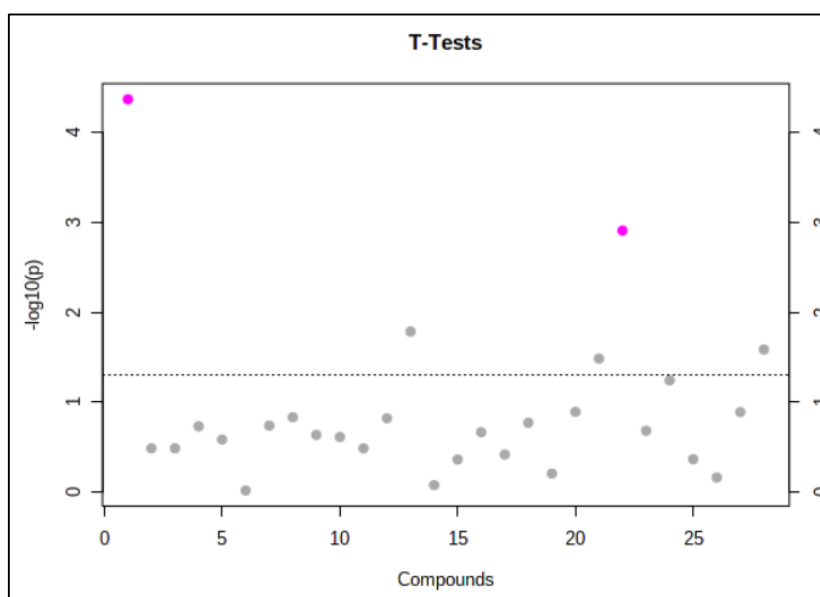
Η στατιστική σημασία του μοντέλου PLS-DA αξιολογήθηκε με permutation test (Σχήμα B.12.2.2.4). Ο διαχωρισμός των δειγμάτων σε δύο ομάδες ήταν σημαντικός από στατιστική πλευρά (p-value<0,05) (Barberini et al., 2016).



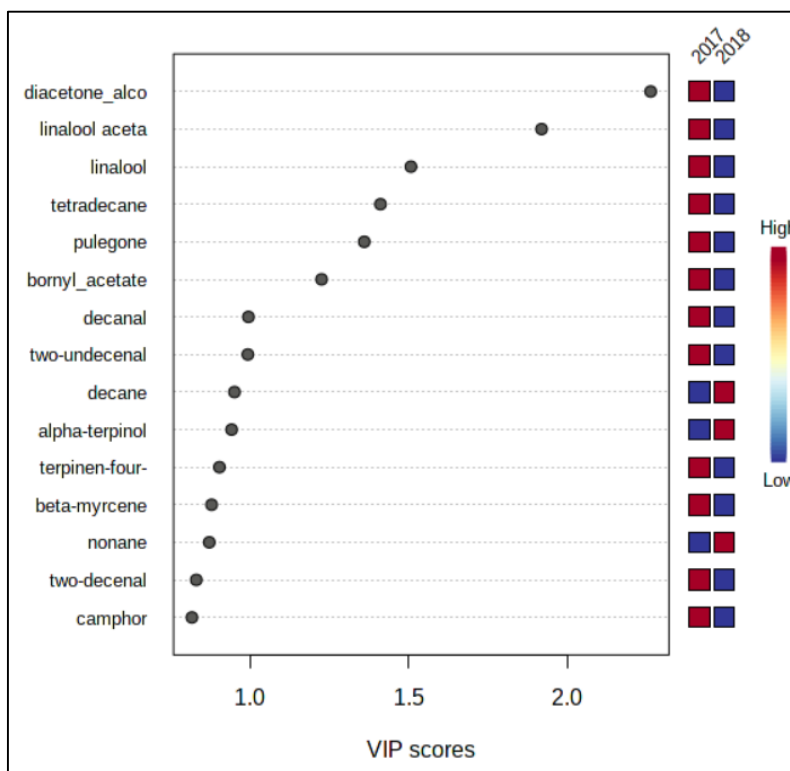
Σχήμα B.12.2.2.4. PLS-DA permutation test για το μοντέλο διάκρισης των πτητικών συστατικών σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst)· (permutation numbers: 100).

Τα δεδομένα από τα δύο διαδοχικά έτη συγκομιδής συγκρίθηκαν χρησιμοποιώντας t-test, το οποίο έδειξε ότι δύο από τα 30 πτητικά συστατικά ήταν στατιστικά σημαντικά για τη διάκριση μεταξύ της συγκομιδής 2017 και 2018 (Σχήμα B.12.2.2.5). Τα πτητικά συστατικά με τα υψηλότερα VIP scores που συνείσφεραν περισσότερο στη διαφοροποίηση (υψηλότερο συντελεστή στη διακριτική συνάρτηση)

παρουσιάζονται στο Σχήμα B.12.2.2.6 όπου τα χρωματιστά τετράγωνα δείχνουν τη σχετική ένταση του αντίστοιχου πτητικού συστατικού για κάθε ομάδα.



Σχήμα B.12.2.2.5. T-test για το μοντέλο διάκρισης των πτητικών συστατικών σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).



Σχήμα B.12.2.2.6. PLS-DA χαρακτηριστικά σπουδαιότητας για το μοντέλο διάκρισης των πτητικών συστατικών σύμφωνα με το έτος συγκομιδής (MetaboAnalyst).

B.12.3. Συμπεράσματα

Παρατηρήθηκε ότι, ενώ αναμένονταν τα τερπενοειδή ως κύρια πτητικά συστατικά, η περιεκτικότητά τους επηρεάστηκε αρνητικά λόγω των υψηλών θερμοκρασιών της τεχνικής Soxhlet ως τεχνικής παραλαβής του ελαίου. Η σύγκριση των 15 δειγμάτων του 2017 με τα 30 δείγματα του 2018 έδειξε διάκριση σημαντική από στατιστική πλευρά ($p\text{-value}<0,05$) μεταξύ των πτητικών συστατικών από τα δύο διαφορετικά έτη συγκομιδής με ποσοστό σωστής ταξινόμησης 73,3%. Κατ'αντιστοιχία, κατά την αξιολόγηση μέσω permutation tests του μοντέλου που δημιουργήθηκε από τη σύγκριση των 11 δειγμάτων του 2017 με τα 11 δείγματα του 2018 υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση με ποσοστό σωστής ταξινόμησης των δειγμάτων 90%.

B.13. Διερεύνηση μυκητολογικής ποιότητας και σταθερότητας νωπού κελυφωτού φιστικιού (*Pistacia vera*) υπό συσκευασία κενού και αέρα για διάστημα τριών μηνών

Η ζήτηση του νωπού κελυφωτού φιστικιού ολοένα και περισσότερο αυξάνεται. Για το λόγο αυτό η μικροβιολογική μελέτη αφορά το νωπό κελυφωτό φιστίκι και όχι το αποξηραμένο. Η ανησυχία για τη μικροβιολογική ασφάλεια επικεντρώνεται στη νωπή πρώτη ύλη καθώς μετά την απομάκρυνση της υγρασίας, σε τελικό επίπεδο υγρασίας 5-7% w/w σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, το κελυφωτό φιστίκι είναι μικροβιολογικά σταθερό (Fruits & Vegetables, 2021). Αρχικά, αναλύεται το πειραματικό σκέλος και στη συνέχεια, καταγράφονται τα αποτελέσματα σε κάθε στάδιο (καταμέτρηση, απομόνωση και ταυτοποίηση).

B.13.1. Πειραματική διαδικασία

Νωπά αποκελυφωμένα κελυφωτά φιστίκια από την περιοχή της Φθιώτιδας διαχωρίστηκαν σε επτά ίσες ποσότητες των 50 g. Η πρώτη ποσότητα χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση σε χρόνο μηδέν ($t=0$ μήνες), τρεις εξ αυτών τοποθετήθηκαν σε συσκευασία με αέρα (φιστίκι σε αέρα, ΦΑ) και τρεις σε συσκευασία κενού (φιστίκι υπό κενό, ΦΚ), σε θερμοκρασία 4°C. Οι συσκευασμένες ποσότητες μελετήθηκαν για τα χρονικά διαστήματα ενός, δύο και τριών μηνών.

B.13.1.1. Καταμέτρηση

Για την καταμέτρηση ζυγίστηκαν 31,7 g σκόνης υποστρώματος DRBC, διαλύθηκαν με θέρμανση σε 1000 mL απιονισμένο H₂O, αποστειρώθηκαν (121°C για 15 min) και τέλος, το υπόστρωμα επιστρώθηκε σε τρυβλία.

Για την τεχνική Direct Plating, τοποθετήθηκαν 3-5 πυρήνες σε κάθε τρυβλίο και τα τρυβλία επώαστηκαν σε θερμοκρασία 25°C για 7 μέρες.

Για την τεχνική Dilution Plating, 20 g πυρήνων αραιώθηκαν μέχρι τα 200 g με αποστειρωμένο ισοτονικό διάλυμα Ringer και ακολούθησε ομογενοποίηση σε συσκευή Stomacher για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου. Δημιουργήθηκαν τρεις δεκαδικές αραιώσεις (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) από τις οποίες ελήφθη όγκος εναιωρήματος 0,1 mL για επίστρωση σε τρυβλία.

Και για τις δύο τεχνικές έγιναν διπλές επαναλήψεις (E_1 και E_2), οι διαδικασίες επαναλήφθηκαν μηνιαία και για κάθε συσκευασία (κενού ή αέρα). Αφού έγινε η επώαση των τρυβλίων, καταμετρήθηκαν οι αποικίες των ζυμών και των μυκήτων που είχαν αναπτύξει αποικία ή μικκύλιο. Για να ποσοτικοποιηθούν τα αποτελέσματα της τεχνικής Dilution Plating χρησιμοποιήθηκε η Εξίσωση B.13.1.1.1.

$$N = \frac{C_1 + C_2}{n_1 + \frac{n_2}{10}} \cdot \frac{1}{V_1} \cdot \frac{1}{d_1} \quad (\text{Εξίσωση B.13.1.1.1})$$

C_1 : το συνολικό άθροισμα των αποικιών στα n_1 τρυβλία της αραιώσης d_1

C_2 : το συνολικό άθροισμα των αποικιών στα n_2 τρυβλία της επόμενης αραιώσης

V_1 (mL): ο όγκος του «εμβολιασμού»

B.13.1.2. Απομόνωση και Ταυτοποίηση

Για την ταυτοποίηση των μυκήτων χρησιμοποιήθηκαν τα τρυβλία της τεχνικής Direct Plating και η απομόνωση των μυκήτων πραγματοποιήθηκε σε μικροβιολογικό υπόστρωμα MEA. Ειδικότερα, ζυγίστηκαν 50 g σκόνης υποστρώματος MEA, διαλύθηκαν με θέρμανση σε 1000 mL απιονισμένο H_2O , αποστειρώθηκαν και ακολούθησε επίστρωση σε τρυβλία. Για τη λήψη δείγματος του μύκητα χρησιμοποιήθηκε μικροβιολογικός κρίκος, ο οποίος αρχικά αποστειρώθηκε σε πυρακτωμένη φλόγα, στη συνέχεια κρύωσε και λήφθηκε μια ποσότητα μύκητα η οποία τοποθετήθηκε στο κέντρο του τρυβλίου με το υπόστρωμα MEA. Τα τρυβλία επώαστηκαν σε θερμοκρασία $25^\circ C$ για 7 μέρες. Σε περίπτωση επιμόλυνσης κάποιου δείγματος, έγινε προσπάθεια εκ νέου απομόνωσης του μύκητα. Μετά την απομόνωση, καθαρά δείγματα αποικιών ή κονιδίων μυκήτων αποθηκεύτηκαν σε φιαλίδια erpendorf, που περιείχαν αποστειρωμένο υδατικό διάλυμα γλυκερόλης (30% ως κρυοπροστατευτικό), σε θερμοκρασία $4^\circ C$.

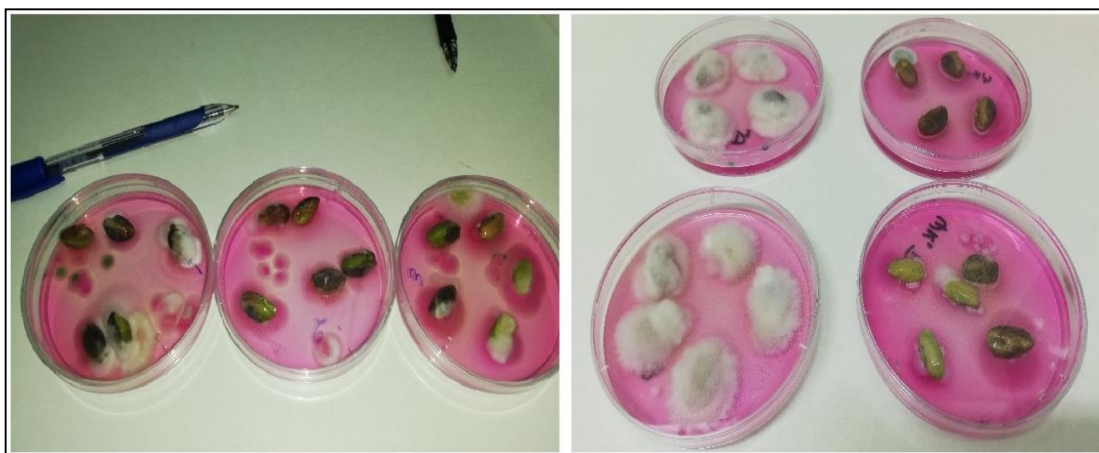
Για την ταυτοποίησή τους χρησιμοποιήθηκαν ειδικά υποστρώματα (CYA, MEA, G25N) τα οποία επώαστηκαν σε καθορισμένες θερμοκρασίες. Συγκεκριμένα, από τα φιαλίδια erpendorf λήφθηκε ποσότητα εναιωρήματος 10 μL με πιπέτα, η οποία τοποθετήθηκε σε τρία σημεία στην επιφάνεια του υποστρώματος σχηματίζοντας ισόπλευρο τρίγωνο. Τα τρυβλία επώαστηκαν για το υπόστρωμα CYA σε θερμοκρασίες $5^\circ C$, $25^\circ C$ και $37^\circ C$ για 7 ημέρες, ενώ για τα υποστρώματα MEA και G25N σε θερμοκρασία $25^\circ C$, για το ίδιο χρονικό διάστημα. Ακολούθησε μακροσκοπική και μικροσκοπική παρατήρηση. Συγκεκριμένα, τα μακροσκοπικά χαρακτηριστικά που

διερευνήθηκαν ήταν το μέγεθος της αποικίας των μυκήτων (σε mm), τα χρώματα της αποικίας, των κονιδίων και του μικυλίου, η ύπαρξη εκκριμάτων από τους μύκητες, η όψη του τρυβλίου όταν αυτό ήταν ανεστραμμένο και η ύπαρξη ουσιών που άλλαξαν το χρώμα του υποστρώματος. Για τη μικροσκοπική παρατήρηση του μύκητα λήφθηκε, με τη βοήθεια μικροβιολογικού κρίκου, μια μικρή ποσότητα από το μύκητα που είχε αναπτυχθεί στο υπόστρωμα MEA και τοποθετήθηκε σε αντικειμενοφόρο πλάκα, όπου διαλύθηκε σε μια σταγόνα EtOH 70% v/v. Προστέθηκε η χρωστική ευκαριωτικών κυττάρων lactofuchsin. Στο οπτικό μικροσκόπιο παρατηρήθηκαν το σχήμα των κονιδίων και σπορίων, η ύπαρξη ή μη septa και η παρουσία ασκοσπορίων. Η ταυτοποίηση των μυκήτων έγινε σε επίπεδο γένους με τη χρήση κλειδών (Pitt & Hocking, 2009).

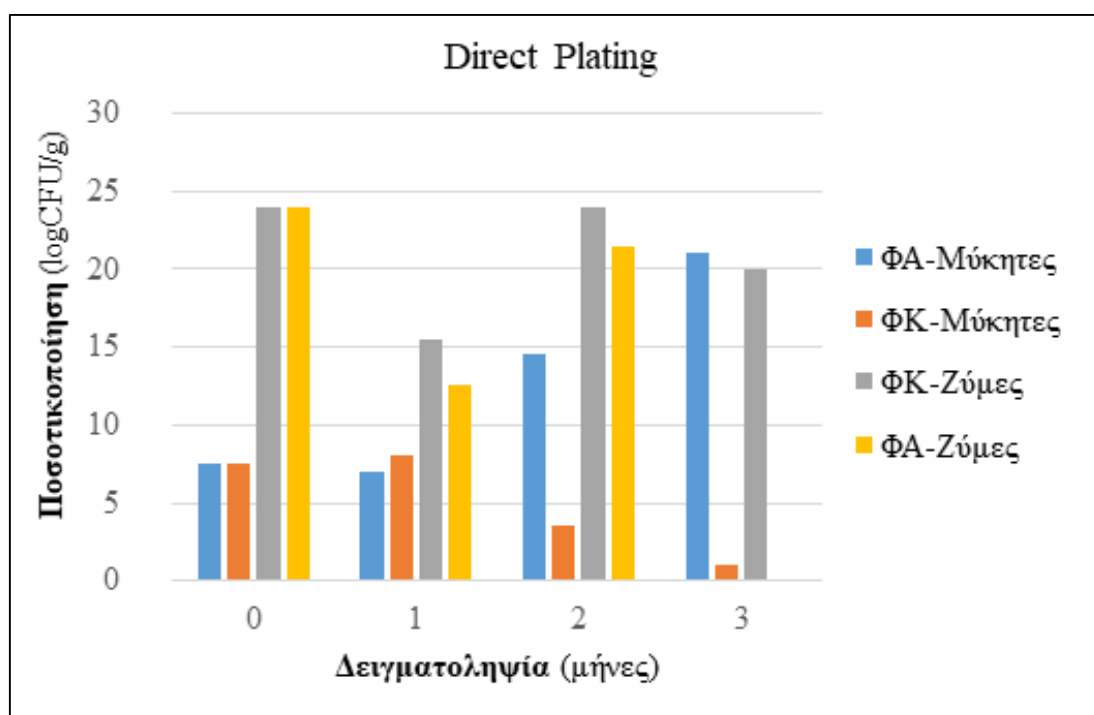
B.13.2. Αποτελέσματα-Συζήτηση

B.13.2.1. Καταμέτρηση

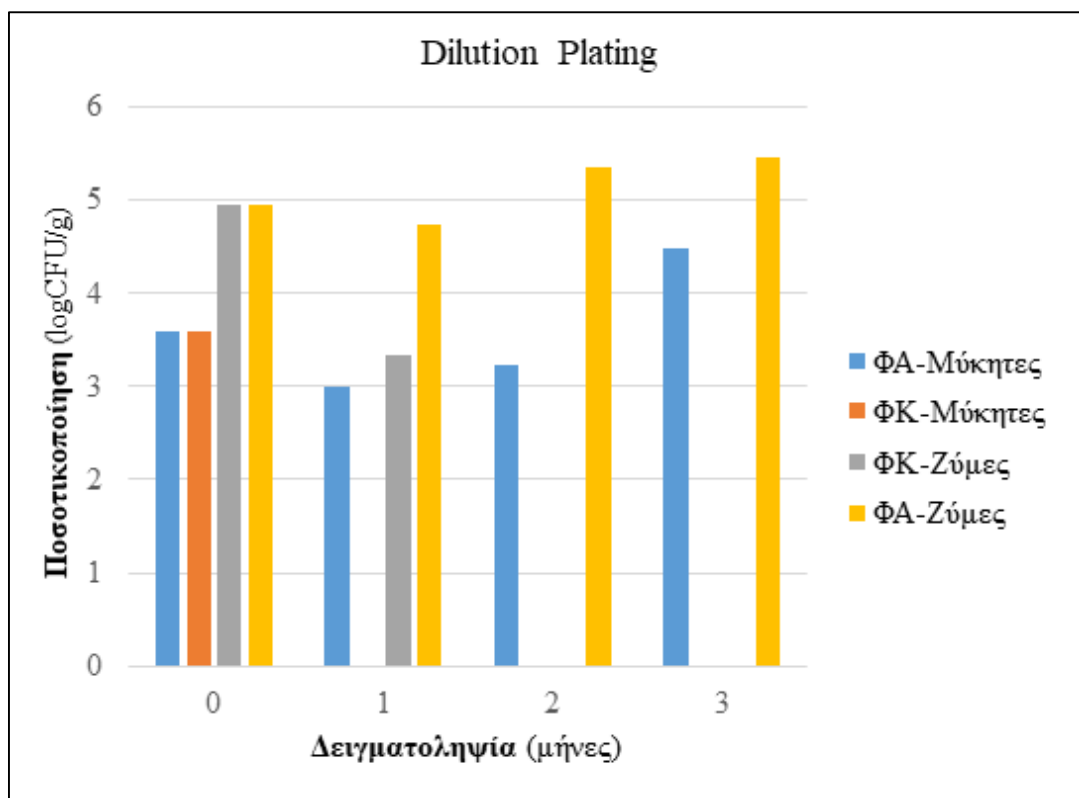
Με την τεχνική Direct Plating (Σχήματα B.13.2.1.1 και B.13.2.1.2) στη συσκευασία κενού υπήρξε μείωση του πληθυσμού των μυκήτων, ενώ ο πληθυσμός των ζυμών μειώθηκε πιο αργά. Αντίθετα, η συσκευασία σε αέρα έδειξε ραγδαία αύξηση των μυκήτων, ενώ αξιοσημείωτη είναι η πορεία των ζυμών, καθώς στον τρίτο μήνα δειγματοληψίας δεν εμφανίστηκαν καθόλου αποικίες. Με την τεχνική Dilution Plating (Σχήμα B.13.2.1.3) φάνηκε ότι η επίδραση της συσκευασίας κενού ήταν κατασταλτική τόσο για τους μύκητες όσο και για τις ζύμες. Συγκεκριμένα, ο πληθυσμός των ζυμών κατά την έναρξη της συσκευασίας ($t = 0$ μήνες) ήταν $4,96 \log \text{CFU/g}$ και παρουσίασε σταδιακή μείωση κατά τη διάρκεια της συντήρησης, με αποτέλεσμα να μην απαριθμούνται ζύμες μετά από το δεύτερο μήνα. Αντίστοιχη ήταν και η μεταβολή του πληθυσμού των μυκήτων, ο πληθυσμός των οποίων ήταν $3,60 \log \text{CFU/g}$ στην έναρξη της συντήρησης, ενώ δεν απαριθμήθηκαν μύκητες μετά από 30 ημέρες συντήρησης. Αντίθετα, στον αέρα ήταν εμφανής η αύξηση τόσο των μυκήτων όσο και των ζυμών. Συγκεκριμένα, ο πληθυσμός των ζυμών κατά την έναρξη της συσκευασίας ($t = 0$ μήνες) ήταν $4,96 \log \text{CFU/g}$ και παρουσίασε σταδιακή αύξηση κατά τη διάρκεια της συντήρησης, με αποτέλεσμα τον τρίτο μήνα να απαριθμούνται ζύμες σε ποσότητα $5,47 \log \text{CFU/g}$. Αντίστοιχη ήταν και η μεταβολή του πληθυσμού των μυκήτων, ο πληθυσμός των οποίων ήταν $3,60 \log \text{CFU/g}$ στην έναρξη της συντήρησης και $4,48 \log \text{CFU/g}$ μετά από τρεις μήνες συντήρησης.



Σχήμα B.13.2.1.1. Τρυβλία με την τεχνική επίστρωσης Direct Plating. Αριστερά: δειγματοληψία $t=0$ μήνες, Δεξιά: δειγματοληψία $t=3$ μήνες, αριστερή στήλη: ΦΑ και δεξιά στήλη: ΦΚ.



Σχήμα B.13.2.1.2. Μεταβολή του πληθυσμού των ζυμών και μυκήτων με την τεχνική Direct Plating κατά τη συσκευασία νωπού κελυφωτού φιστικιού σε συσκευασία κενού και αέρα για χρονικό διάστημα τριών μηνών, όπου ΦΑ: φιστίκι σε συσκευασία αέρα και ΦΚ: φιστίκι σε συσκευασία υπό κενό.



Σχήμα B.13.2.1.3. Μεταβολή του πληθυσμού των ζυμών και μυκήτων με την τεχνική Dilution Plating κατά τη συσκευασία νοπού κελυφωτού φιστικιού σε συσκευασία κενού και αέρα για χρονικό διάστημα τριών μηνών, όπου ΦΑ: φιστίκι σε συσκευασία αέρα και ΦΚ: φιστίκι σε συσκευασία υπό κενό.

B.13.2.2. Ταυτοποίηση

Συνολικά απομονώθηκαν 24 δείγματα μυκήτων και τρεις ζύμες στις οποίες δεν πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση. Κυριάρχησαν μύκητες του γένους *Aspergillus* (40%), ενώ σημαντική ήταν η παρουσία μυκήτων του γένους *Cladosporium* (15%) και *Penicillium* (10%). Άξια αναφοράς ήταν η εύρεση του μύκητα του γένους *Eurotium*, το οποίο είναι μορφή της εγγενούς αναπαραγωγής του *Aspergillus* (Μπαλατσούρας, 2006).

Σε έρευνα του Tavakolipour (2013), η μέση περιεκτικότητα σε υγρασία των νοπών κελυφωτών φιστικιών βρέθηκε να είναι 47% w/w (w.b.). Αυτή η υψηλή περιεκτικότητα σε υγρασία, 40-50% w/w (w.b.), συμβάλλει στην ευαισθησία τους σε μόλυνση. Οι ζύμες και οι μύκητες ανήκουν στους μικροβιολογικούς παράγοντες ποιοτικής υποβάθμισής τους. Μερικά γένη μυκήτων (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*) έχουν την ικανότητα παραγωγής μυκοτοξινών οι οποίες

μπορούν να προκαλέσουν σοβαρά προβλήματα υγείας (Marín & Ramos, 2016). Το πρώτο στάδιο της επιμόλυνσης μπορεί να είναι στον αγρό, καθώς το περικάρπιο αποχωρίζεται από τον καρπό και έτσι το φιστίκι είναι ευαίσθητο σε μόλυνση από τον αέρα ή από προσβολή εντόμων (Brar & Danyluk, 2018). Επιπρόσθετα, μπορεί να γίνει επιμόλυνση όταν ο καρπός πέσει το έδαφος ή αν δεν τηρούνται σωστές αγρονομικές συνθήκες (Marín & Ramos, 2016). Η γνώση της μυκητοχλωρίδας μπορεί να βοηθήσει στην ταχύτερη καταπολέμηση των παθογόνων μυκήτων ή στην καλύτερη επεξεργασία των φιστικιών, προκειμένου το προϊόν να είναι καταρχάς ασφαλές και δευτερευόντως να διατηρεί τα ποιοτικά του χαρακτηριστικά.

B.13.3. Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι με τη συσκευασία κενού υπήρχε μια συνεχής μείωση των ζυμών και των μυκήτων. Αυτό ήταν αναμενόμενο καθώς οι μύκητες είναι αερόβιοι μικροοργανισμοί, δηλαδή απαιτούν οξυγόνο για να αναπτυχθούν. Αντίθετα, οι ζύμες είναι προαιρετικά αερόβιοι μικροοργανισμοί και μπορούν να αναπτυχθούν και σε συνθήκες περιορισμένης διαθεσιμότητας οξυγόνου. Αυτό φάνηκε και στην τεχνική Direct Plating στη συσκευασία υπό κενό, καθώς οι αποικίες των ζυμών παρουσίασαν μη αμελητέα ανάπτυξη (σταθεροποίηση), ενώ οι αποικίες των μυκήτων μειώθηκαν. Σε αντιδιαστολή με τη συσκευασία κενού, η συσκευασία αέρα ευνόησε τις ζύμες και τους μύκητες, διατηρώντας υψηλά και αυξάνοντας τα επίπεδά τους.

Από τις απομονώσεις σε επίπεδο γένους βρέθηκαν ότι οι μύκητες του γένους *Aspergillus* κυριάρχησαν με ποσοστό 40%. Επιπλέον, το 15% ανήκε στο γένος *Cladosporium*, ενώ βρέθηκαν και μύκητες του γένους *Penicillium* σε ποσοστό 10%. Από τα υπόλοιπα απομονωμένα δείγματα ταυτοποιήθηκαν οι μύκητες *Alternaria*, *Fusarium* και *Geotrichum* αντιπροσωπεύοντας αθροιστικά το υπόλοιπο 35% των απομονωμένων δειγμάτων. Πολλοί από τους παραπάνω έχουν απομονωθεί από ξηρούς καρπούς μαζί με τα γένη των μυκήτων, *Rhizopus* spp. και *Trichoderma* spp. (Bayman, Baker, & Mahoney, 2002· Brar & Danyluk, 2018).

B.14. Γενικά συμπεράσματα

Ο αγροδιατροφικός κλάδος είναι ένας από τους πλέον ευάλωτους στην κλιματική αλλαγή τομείς, αφού εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις κλιματικές παραμέτρους. Η ποιότητα και τα χημικά χαρακτηριστικά ενός τροφίμου επηρεάζονται και μεταβάλλονται συναρτήσει των καιρικών συνθηκών.

Στην παρούσα εργασία, διερευνήθηκε η αλληλεπίδραση της ποιότητας και των χημικών χαρακτηριστικών των κελυφωτών φιστικιών (*Pistacia vera*) και φιστικελαίων της ελληνικής ποικιλίας «Αιγίνης» με το έτος συγκομιδής και μελετήθηκε η δυνατότητα ανάπτυξης χημειομετρικών μοντέλων διάκρισης των κελυφωτών φιστικιών και φιστικελαίων ανάλογα με το έτος συγκομιδής, βασισμένων σε ταχεία, φιλικά προς το περιβάλλον και χαμηλού κόστους εργαλεία.

Για το σύνολο των δειγμάτων (15 δείγματα του 2017 συγκρινόμενα με 30 δείγματα του 2018) εξήχθησαν προσεγγιστικά αποτελέσματα, ενώ τυπικά αποτελέσματα για τη διαφοροποίηση των δύο ετών συγκομιδής εξήχθησαν με σύγκριση των 11 δειγμάτων του 2017 με τα 11 δείγματα του 2018, των οποίων η γεωγραφική περιοχή, ο παραγωγός και οι συνθήκες καλλιέργειας συνέπιπταν από έτος σε έτος.

Κατά τη φασματοσκοπική μελέτη της ψίχας των κελυφωτών φιστικιών με τη φασματοσκοπία FTIR και την τεχνική δισκίου KBr-δείγματος υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση με 100% ποσοστό σωστής ταξινόμησης. Το έτος 2018 παρουσίασε αυξημένη σχετική ένταση στο εύρος 1720-1800 cm^{-1} . Κατά τη μελέτη της ψίχας των κελυφωτών φιστικιών με την τεχνική DRIFTS υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση με ποσοστό σωστής ταξινόμησης 73,3% για τη σύγκριση των 15 δειγμάτων του 2017 με τα 30 δείγματα του 2018. Το έτος 2018 παρουσίασε χαμηλότερη σχετική ένταση στο εύρος 3200-3600 cm^{-1} συγκριτικά με το έτος 2017. Ωστόσο, η σύγκριση των 11 δειγμάτων του 2017 με τα 11 δείγματα του 2018 δεν ήταν στατιστικά σημαντική με αναμενόμενα χαμηλό ποσοστό διαφοροποίησης (28%). Η διαφορά που παρουσιάζεται μεταξύ των δύο τεχνικών πιθανότατα οφείλεται στο ότι η τεχνική DRIFTS εξαρτάται από πλήθος παραγόντων που αν δε διευθετηθούν κατάλληλα επιδρούν αρνητικά στην υφή του φάσματος FTIR. Αντίθετα, η αραιώση της ψίχας με KBr κατά την τεχνική των δισκίων ελαχιστοποιεί τις αρνητικές επιπτώσεις της κατοπτρικής ανάκλασης.

Αναφορικά με το χαρακτηρισμό της ποιότητας του φιστικελαίου, και μέσω της δοκιμής DPPH και με τη δοκιμή ABTS, παρουσιάστηκε μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο. Η περιεκτικότητά του σε πολικές φαινόλες βρέθηκε σε χαμηλά επίπεδα. Όλες οι τιμές k και Δk κυμαίνονταν στα όρια υψηλής ποιότητας σύμφωνα με την κείμενη νομοθεσία για το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο. Ωστόσο, τα δείγματα του 2017 βρίσκονταν στο πρωταρχικό στάδιο οξείδωσης. Όσον αφορά στην ελεύθερη οξύτητα και στο ποσοστό των ελευθέρων λιπαρών οξέων, τα φιστικέλαια ήταν κατάλληλα προς βρώση, αλλά εύαλτα σε οξείδωση και ποιοτική υποβάθμιση.

Η απόδοση σε φιστικέλαιο κυμάνθηκε σε αναμενόμενα επίπεδα, συμπίπτοντας με άλλες μελέτες περιεκτικότητας, και για την ευρύτερη σύγκριση των 15 δειγμάτων του 2017 με τα 30 δείγματα του 2018 παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των δύο ετών συγκομιδής με 71,1% ποσοστό σωστής ταξινόμησης. Η σύγκριση, όμως, των 11 δειγμάτων του 2017 με τα 11 δείγματα του 2018 έδειξε αδυναμία διαφοροποίησης με 59,1% ποσοστό σωστής ταξινόμησης.

Σχετικά με τον προσδιορισμό αντιοξειδωτικής ικανότητας των φιστικελαίων σύμφωνα με τη δοκιμή DPPH, εξετάζοντας την αντιοξειδωτική ικανότητα είτε μέσω ισοδύναμων Trolox είτε μέσω ποσοστού παρεμποδιστικής δράσης δεν παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση ούτε για το σύνολο των δειγμάτων (65,1% και 62,2% ποσοστά σωστής ταξινόμησης, αντίστοιχα) ούτε για τα άμεσα συγκρίσιμα δείγματα (33,3% και 22,7% ποσοστά σωστής ταξινόμησης). Σχετικά με τον προσδιορισμό αντιοξειδωτικής ικανότητας των φιστικελαίων σύμφωνα με τη δοκιμή ABTS, εξετάζοντας την αντιοξειδωτική ικανότητα είτε μέσω ισοδύναμων Trolox είτε μέσω ποσοστού παρεμποδιστικής δράσης παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση για το σύνολο των δειγμάτων (71,1% και 68,9% ποσοστά σωστής ταξινόμησης, αντίστοιχα), ενώ για τα άμεσα συγκρίσιμα δείγματα όχι (54,5% και 45,5% ποσοστά σωστής ταξινόμησης). Ανεξαρτήτως του έτους συγκομιδής, η αντιοξειδωτική ικανότητα με τη δοκιμή ABTS έδωσε υψηλότερα αποτελέσματα από τη δοκιμή DPPH, διότι η τελευταία εμφανίζει εκλεκτικότητα ως προς τα λιπόφιλα αντιοξειδωτικά συστατικά.

Ο προσδιορισμός περιεχομένου πολικών φαινολών με τη δοκιμή Folin-Ciocalteu έδειξε ότι τα δείγματα δε διαφοροποιήθηκαν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των δύο ετών συγκομιδής (ποσοστά σωστής ταξινόμησης: 67,4% για τα 15 δείγματα του 2017 και τα 30 δείγματα του 2018, 50% για τα 11 δείγματα του 2017 και τα 11

δείγματα του 2018). Το περιεχόμενο των φιστικελαίων σε πολικές φαινόλες ήταν χαμηλό, όπως επιβεβαιώθηκε και από δημοσιευμένα αποτελέσματα σε παρθένα φιστικέλαια διάφορων ποικιλιών κελυφωτών φιστικιών.

Η ποιότητα των φιστικελαίων, αναφορικά με τις συνθήκες συντήρησης και την οξειδωτική τους κατάσταση, αξιολογήθηκε μέσω της φασματοσκοπικής τεχνικής UV-Vis. Οι δείκτες k_{268} , k_{270} , k_{274} δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ετών συγκομιδής με ποσοστά σωστής ταξινόμησης 63,3%, 59,1% και 68%, αντίστοιχα, για τη σύγκριση των 15 δειγμάτων του 2017 με τα 30 δείγματα του 2018 και 63,6%, 59,1% και 68,2%, αντίστοιχα, για τη σύγκριση των 11 δειγμάτων του 2017 με τα 11 δείγματα του 2018. Σε αντιδιαστολή, ο δείκτης k_{232} διαφοροποιήθηκε σημαντικά (100% ποσοστό σωστής ταξινόμησης) εμφανίζοντας μια τάση μείωσης από το 2017 στο 2018, για οποιαδήποτε σύγκριση δειγμάτων. Τα δείγματα του 2017 βρίσκονταν σε πρωταρχικό/ενδιάμεσο στάδιο οξείδωσης. Η μηδενική τιμή του δείκτη Δk απέδειξε την υψηλή ποιότητα των φιστικελαίων ανεξάρτητα από το έτος συγκομιδής.

Η ελεύθερη οξύτητα και το ποσοστό των ελεύθερων λιπαρών οξέων, από στατιστική σκοπιά, για το σύνολο των δειγμάτων το 2017 διαφοροποιήθηκε από το 2018 με ποσοστό σωστής ταξινόμησης 69,8%, αλλά για τα άμεσα συγκρίσιμα δείγματα το χαμηλό ποσοστό σωστής ταξινόμησης (63,6%) επιβεβαίωσε μη στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση.

Η συνολική περιεκτικότητα σε τοκοφερόλες (α -, β -, γ -, δ -) και β -τοκοτριενόλη δε διαφοροποίησε τα δύο έτη συγκομιδής μεταξύ τους (64,4% και 59,1% ποσοστά σωστής ταξινόμησης για τα 15(2017)-30(2018) και για τα 11(2017)-11(2018) δείγματα, αντίστοιχα). Κυρίαρχη ήταν η γ -τοκοφερόλη συνεκλουόμενη με τη β -τοκοτριενόλη, ενώ η περιεκτικότητα των φιστικελαίων σε β -τοκοφερόλη ήταν περιορισμένη.

Κατά τη μελέτη των φιστικελαίων με τη φασματοσκοπία FTIR-ATR, ανεξαρτήτως συγκρινόμενου πληθυσμού, τα δείγματα διαφοροποιήθηκαν στατιστικά σημαντικά (100% ποσοστό σωστής ταξινόμησης). Οι περιοχές 2800-3040 και 1400-1500 cm^{-1} εμφάνισαν μικρότερη σχετική ένταση το 2018 σε σχέση με το 2017, υποδηλώνοντας ότι το 2018 ήταν ένα έτος με μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ακόρεστα λιπαρά οξέα, άρα υπερείχε σε ποιότητα.

Ο διαχωρισμός από έτος σε έτος βάσει της φασματοσκοπικής μελέτης Raman βρέθηκε στατιστικά μη σημαντικός με χαμηλό ποσοστό σωστής ταξινόμησης των

φιστικελαίων (20% για το σύνολο των δειγμάτων και 9,1% για τα άμεσα συγκρίσιμα δείγματα).

Η ανάλυση των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων με χρήση του GC-MS έδωσε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση του παλμιτικού, στεατικού, λινελαϊκού, μπεχενικού και παλμιτελαϊκού οξέος μεταξύ των δύο ετών συγκομιδής με ποσοστά σωστής ταξινόμησης 73,3% για τα 15 δείγματα του 2017 σε σχέση με τα 30 δείγματα του 2018 και 72,2% για τα 11 δείγματα του 2017 σε σχέση με τα 11 δείγματα του 2018.

Με χρήση της τεχνικής SPME έγινε ο προσδιορισμός των πτητικών συστατικών των φιστικελαίων, ο οποίος έδειξε διαφοροποίηση των δύο καλλιεργητικών ετών με ποσοστά σωστής ταξινόμησης 73,3% και 90% για τα 15(2017)-30(2018) και 11(2017)-11(2018) δείγματα, αντίστοιχα.

Από τα μοντέλα που αναπτύχθηκαν, εκείνα που ταξινόμησαν τα δείγματα μεταξύ δύο διαδοχικών ετών συγκομιδής ήταν μέσω:

- 1) της τεχνικής δισκίου KBr-δείγματος κατά τη φασματοσκοπική μελέτη της ψίχας με χρήση της φασματοσκοπίας FTIR
- 2) του δείκτη k_{232} κατά τη φασματοσκοπική μελέτη του φιστικελαίου με την τεχνική UV-Vis
- 3) της φασματοσκοπίας FTIR-ATR κατά τη φασματοσκοπική μελέτη του φιστικελαίου
- 4) της ανάλυσης των FAMES του φιστικελαίου κατά την αεριοχρωματογραφική μελέτη με GC-MS
- 5) του προσδιορισμού των πτητικών συστατικών κατά την αεριοχρωματογραφική μελέτη με SPME

Τα πλεονεκτήματα των μοντέλων 1), 2) και 3) είναι η αξιοπιστία, η απλότητα, η ταχύτητα, η φιλικότητα προς το περιβάλλον και το χαμηλό κόστος. Τα χημειομετρικά μοντέλα 4) και 5) είναι αξιόπιστα και φιλικά προς το περιβάλλον.

Τα αποτελέσματα της μυκητολογικής διερεύνησης του νωπού κελυφωτού φιστικιού σε διάστημα τριών μηνών έδειξαν ότι με τη συσκευασία κενού υπήρχε μια συνεχή μείωση των ζυμών και των μυκήτων. Σε αντίθεση, η συσκευασία αέρα οδήγησε σε αύξηση τα επίπεδα των ζυμών και των μυκήτων. Κυριάρχησαν οι μύκητες του γένους *Aspergillus* (40%), *Cladosporium* (15%) και *Penicillium* (10%).

B.15. Επόμενες ερευνητικές προτάσεις

Σε πρώτη φάση, η αποτελεσματικότητα των αναλύσεων της παρούσας μελέτης στη διάκριση των δύο ετών συγκομιδής θα μπορούσε να διασταυρωθεί και από ένα μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων. Επιπρόσθετα, λαμβάνοντας υπόψιν τα συμπεράσματα της συγκεκριμένης έρευνας, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η περίπτωση να:

- συγκριθούν τα χημικά χαρακτηριστικά του φιστικιού και του φιστικελαίου με άλλες ποικιλίες
- διερευνηθούν ποιοτικές και ποσοτικές διαφορές στα χημικά χαρακτηριστικά των φιστικιών και φιστικελαίων ποικιλίας «Αιγίνης» από διαφορετικά γεωγραφικά διαμερίσματα της Ελλάδας (γεωγραφική διαφοροποίηση)
- βρεθεί γρήγορο αναλυτικό εργαλείο προσδιορισμού της αυθεντικότητας κελυφωτών φιστικιών και φιστικελαίων στα πλαίσια καταπολέμησης ζητημάτων νοθείας από φιστίκια άλλης ποικιλίας ή από άλλα φυτικής προέλευσης έλαια
- διερευνηθούν ποιοτικές και ποσοτικές διαφορές μεταξύ διαφορετικών ετών συγκομιδής στα φαινολικά συστατικά εκχυλισμάτων κελυφωτών φιστικιών
- μελετηθούν εκχυλίσματα περικαρπίου της ποικιλίας «Αιγίνης» από διαφορετικές γεωγραφικές ζώνες καλλιέργειας στην ελληνική επικράτεια
- γίνει ποσοτική ανάλυση των φαινολικών συστατικών εκχυλισμάτων περικαρπίου

Βιβλιογραφία

Διεθνής

Abdel-Aal, E.-S., Akhtar, H., Zaheer, K., & Ali, R. (2013). Dietary sources of lutein and zeaxanthin carotenoids and their role in eye health. *Nutrients*, 5(4), 1169-1185. Doi:10.3390/nu5041169.

Acree, T. & Arn, H. (2004). *Flavornet*. Retrieved from <http://www.flavornet.org>. Accessed on 27/01/2022

Adams, R. P. (2007). Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (4th ed.). Carol Stream, IL, USA: Allured Publishing Corporation.

Agar, I. T., Kaşka, N., & Kafkas, S. (1995). Effect of different ecologies on the fat content and fatty acid composition of different *Pistacia vera* varieties grown in different parts of Turkey. *Acta Horticulturae*, 419, 411-415. Doi:10.17660/actahortic.1995.419.68.

Ahmed, M. K., Daun, J. K., & Przybylski, R. (2005). FT-IR based methodology for quantitation of total tocopherols, tocotrienols and plastochromanol-8 in vegetable oils. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18(5), 359-364. Doi:10.1016/j.jfca.2003.12.008.

Ajal, A., Chaji, S., Moussafir, S., Nejjari, R., Soulaymani, A., & Bajoub, A. (2021). Virgin Olive Oil Phenolic Compounds: Insights on Their Occurrence, Health-Promoting Properties and Bioavailability. In M. Akram (Ed.). *Olive Oil-New Perspectives and Applications*. London, UK: IntechOpen. Doi:10.5772/intechopen.98581.

Alae-Carew, C., Nicoleau, S., Bird, F. A., Hawkins, P., Tuomisto, H. L., Haines, A., Dangour, A. D., & Scheelbeek, P. F. D. (2020). The impact of environmental changes on the yield and nutritional quality of fruits, nuts and seeds: A systematic review. *Environmental Research Letters*, 15, 023002. Doi:10.1088/1748-9326/ab5cc0.

Ali, H., Nawaz, H., Saleem, M., Nurjis, F., & Ahmed, M. (2016). Qualitative analysis of desi ghee, edible oils, and spreads using Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, *47*, 706-711. Doi:10.1002/jrs.4891.

Amaral, J. S., Casal, S., Oliveira, B. P. P., & Seabra, R. M. (2005). Development and evaluation of a normal phase liquid chromatographic method for the determination of tocopherols and tocotrienols in walnuts. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, *28*(5), 785-795. Doi:10.1081/jlc-200048920.

AOAC 925.40 - Loss on drying (moisture) in nuts and nut products. (1925). In W., Horwitz (Ed.). *Official Methods of Analysis of AOAC International* (17th ed.). USA: AOAC International

AOAC 948.22 - Fat (crude) in nuts and nut products. Gravimetric methods. (1948). In W., Horwitz (Ed.). *Official Methods of Analysis of AOAC International* (17th ed.). USA: AOAC International

Arena, E., Campisi, S., Fallico, B., & Maccarone, E. (2007). Distribution of fatty acids and phytosterols as a criterion to discriminate geographic origin of pistachio seeds. *Food Chemistry*, *104*, 403-408. Doi:10.1016/j.foodchem.2006.09.029.

Arjeh, E., Akhavan, H. R., Barzegar, M., & Carbonell-Barrachina, A. A (2020). Bio-active compounds and functional properties of pistachio hull: A review. *Trends in Food Science & Technology*, *97*, 55-64. Doi:10.1016/j.tifs.2019.12.031.

Baeten, V., Pierna, J. A. F., Dardenne, P., Meurens, M., García-González, D. L., & Aparicio-Ruiz, R. (2005). Detection of the presence of hazelnut oil in olive oil by FT-Raman and FT-MIR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 6201-6206. Doi:10.1021/jf050595n.

Bail, S., Stuebiger, G., Unterweger, H., Buchbauer, G., & Krist, S. (2009). Characterization of volatile compounds and triacylglycerol profiles of nut oils using

SPME-GC-MS and MALDI-TOF-MS. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111(2), 170-182. Doi:10.1002/ejlt.200800007.

Bailey, H. M., & Stein, H. H. (2020). Raw and roasted pistachio nuts (*Pistacia vera* L.) are “good” sources of protein based on their digestible indispensable amino acid score as determined in pigs. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100, 3878-3885. Doi:10.1002/jsfa.10429.

Barberini, L., Noto, A., Saba, L., Palmas, F., Fanos, V., Dessì, A., Zavattoni, M., Fattuoni, C., & Mussap, M. (2016). Multivariate data validation for investigating primary HCMV infection in pregnancy. *Data in Brief*, 9, 220-230. Doi:10.1016/j.dib.2016.08.050.

Bayman, P., Baker, L. J., & Mahoney, E. N. (2002). *Aspergillus* on tree nuts: Incidence and associations. *Mycopathologia*, 155(3), 161-169. Doi:10.1023/a:1020419226146.

Beldean-Galea, M., Horga, C., & Coman, M. (2010). Separation and determination of tocopherols in vegetable oils by solid phase extraction on porous polymers SPE cartridges and capillary gas chromatography analysis. *Open Chemistry*, 8(5). Doi:10.2478/s11532-010-0087-y.

Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). *Food Chemistry* (4th ed.). Berlin, Germany: Springer-Verlag.

Bolling, B. W., McKay, D. L., & Blumberg, J. B. (2010). The phytochemical composition and antioxidant actions of tree nuts. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 19(1), 117-123.

Bonvehi, J. S., Coll, F. V., & Rius, I. A. (2000). Liquid chromatographic determination of tocopherols and tocotrienols in vegetable oils, formulated preparations, and biscuits. *Journal of AOAC International*, 83(3), 627-634. Doi:10.1093/jaoac/83.3.627.

Brar, P. K., & Danyluk, M. D. (2018). Nuts and grains: Microbiology and preharvest contamination risks. *Microbiology Spectrum*, 6(2), 105-121. Doi:10.1128/microbiolspec.pfs-0023-2018.

Bullo, M., Juanola-Falgarona, M., Hernandez-Alonso, P., & Salas-Salvado, J. (2015). Nutrition attributes and health effects of pistachio nuts. *British Journal of Nutrition*, 113(S2), S79-S93. Doi:10.1017/s0007114514003250.

Calderón-Ospina, C. A., & Nava-Mesa, M. O. (2019). B vitamins in the nervous system: Current knowledge of the biochemical modes of action and synergies of thiamine, pyridoxine, and cobalamin. *CNS Neuroscience & Therapeutics*. 1-9. Doi: 10.1111/cns.13207.

Campbell, B. C., Molyneux, R. J., & Schatzki, T. F. (2003). Current research on reducing pre- and post-harvest aflatoxin contamination of U.S. almond, pistachio, and walnut. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, 22(2-3), 225-266. Doi:10.1081/txr-120024093.

Carlsson, D. J., & Wiles, D. M. (1970). Surface studies by attenuated total reflection spectroscopy. I. Corona treatment of polypropylene. *Canadian Journal of Chemistry*, 48(15), 2397-2406. Doi:10.1139/v70-401.

Carmona, M., Lafont, F., Jiménez-Sanchidrián, C., & Ruiz, J. (2014). Raman spectroscopy study of edible oils and determination of the oxidative stability at frying temperatures. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116, 1451-1456. Doi:10.1002/ejlt.201400127.

Catalán, L., Alvarez-Ortí, M., Pardo-Giménez, A., Gómez, R., Rabadán, A., & Pardo, J. E. (2016). Pistachio oil: A review on its chemical composition, extraction systems, and uses. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119(5), 1600126. Doi:10.1002/ejlt.201600126.

Çelik, İ., & Demirer, G. N. (2015). Biogas production from pistachio (*Pistacia vera* L.) processing waste. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(4), 767-772. Doi:10.1016/j.bcab.2015.10.009.

Chaharbaghi, E., Khodaiyan, F., & Hosseini, S. S. (2017). Optimization of pectin extraction from pistachio green hull as a new source. *Carbohydrate Polymers*, 173, 107-113. Doi:10.1016/j.carbpol.2017.05.047.

Christodouleas, D. C., Fotakis, C., Nikokavoura, A., Papadopoulos, K., & Calokerinos, A. C. (2014). Modified DPPH and ABTS assays to assess the antioxidant profile of untreated oils. *Food Analytical Methods*, 8(5), 1294-1302. Doi:10.1007/s12161-014-0005-6.

Christy, A. A., & Egeberg, P. K. (2006). Quantitative determination of saturated and unsaturated fatty acids in edible oils by infrared spectroscopy and chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 82(1-2), 130-136. Doi:10.1016/j.chemolab.2005.06.019.

Conceição, J. N., Marangoni, B. S., Michels, F. S., Oliveira, I. P., Passos, W. E., Trindade, M. A. G., Oliveira, S. L., & Caires, A. R. L. (2019). Evaluation of molecular spectroscopy for predicting oxidative degradation of biodiesel and vegetable oil: Correlation analysis between acid value and UV-Vis absorbance and fluorescence. *Fuel Processing Technology*, 183, 1-7. Doi:10.1016/j.fuproc.2018.10.022.

Cox, N. J. (2007, July 25). *Transformations: An introduction*. Retrieved from <http://fmwww.bc.edu/repec/bocode/t/transint.html>. Accessed on 27/01/2022

Cunha, S. C., Amaral, J. S., Fernandes, J. O., & Oliveira, M. B. P. P. (2006). Quantification of tocopherols and tocotrienols in Portuguese olive oils using HPLC with three different detection systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(9), 3351-3356. Doi:10.1021/jf053102n.

- Czamara, K., Majzner, K., Pacia, M., Kochan, K., Kaczor, A., & Baranska, M. (2014). Raman spectroscopy of lipids: A review. *Journal of Raman Spectroscopy*, *46*, 4-20. Doi:10.1002/jrs.4607.
- Dent, G. (1996). Preparation of samples for IR spectroscopy as KBr disks. *Internet Journal of Vibrational Spectroscopy*, *1*, 1-2.
- Dorota, D., Rupert, M., Wołosiak, R., Bzducha-Wróbel, A., Scibisz, I., & Matuszewska-Janica, A. (2021). Volatiles as markers of bioactive components found in Croatian extra virgin olive oils. *LWT*, *139*, 110532. Doi:10.1016/j.lwt.2020.110532.
- Dragull, K., Beck, J. J., & Merrill, G. B. (2010). Essential oil yield and composition of *Pistacia vera* “Kerman” fruits, peduncles and leaves grown in California. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *90*, 664-668. Doi:10.1002/jsfa.3865.
- Dreher, M. L. (2012). Pistachio nuts: Composition and potential health benefits. *Nutrition Reviews*, *70*(4), 234-240. Doi:10.1111/j.1753-4887.2011.00467.x.
- Duru, M. E., Cakir, A., Kordali, S., Zengin, H., Harmandar, M., Izumi, S., & Hirata, T. (2003). Chemical composition and antifungal properties of essential oils of three *Pistacia* species. *Fitoterapia*, *74*(1-2), 170-176. Doi:10.1016/s0367-326x(02)00318-0.
- Dymińska, L., Calik, M., Albegar, A. M. M., Zając, A., Kostyń, K., Lorenc, J., & Hanuza, J. (2017). Quantitative determination of the iodine values of unsaturated plant oils using infrared and Raman spectroscopy methods. *International Journal of Food Properties*, *20*, 2003-2015. Doi:10.1080/10942912.2016.1230744.
- El-Abassy, R. M., Donfack, P., & Materny, A. (2009). Rapid determination of free fatty acid in extra virgin olive oil by Raman spectroscopy and multivariate analysis. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *86*(6), 507-511. Doi:10.1007/s11746-009-1389-0.

ES ISO 9936:2012 - Animal and vegetable fats and oils-Determination of tocopherol and tocotrienol contents by high-performance liquid chromatography. (2012). Ethiopia: Ethiopian Standards Agency

Esmailpour, A., & Shakerardekani, A. (2018). Effects of early harvest times on nut quality and physiological characteristics of pistachio (*Pistacia vera*) trees. *Fruits*, 73, 110-117. Doi:10.17660/th2018/73.2.3.

Fahy, E., Cotter, D., Sud, M., & Subramaniam, S. (2011). Lipid classification, structures and tools. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1811(11), 637-647. Doi:10.1016/j.bbalip.2011.06.009.

Fallico, B., Ballistreri, G., Arena, E., & Tokuşoğlu, Ö. (2011). Nut Bioactives: Phytochemicals and Lipid-Based Components of Almonds, Hazelnuts, Peanuts, Pistachios, and Walnuts. In Taylor & Francis Group (Eds.). *Fruit and Cereal Bioactives: Sources, Chemistry, and Applications* (pp. 198-201). USA: CRC Press.

Fan, L., Zhuang, Y., Wang, Y., Liu, X., Liu, D., Xiang, B., He, M., Zhang, Z., Li, Y., Wang, Y., Zhy, X., & Ye, H. (2019). Association of hypokalemia with cortisol and ACTH levels in Cushing's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1-7. Doi:10.1111/nyas.14205.

FAOSTAT. (2021, June 28). *Crops: Visualize Data*. Retrieved from <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>. Accessed on 27/01/2022

Farber, C., Li, J., Hager, E., Chemelewski, R., Mullet, J., Rogachev, A. Y., & Kourouski, D. (2019). Complementarity of Raman and infrared spectroscopy for structural characterization of plant epicuticular waxes. *ACS Omega*, 4, 3700-3707. Doi:10.1021/acsomega.8b03675.

Farhan Aslam, M., Majeed, S., Aslam, S., & Irfan, J. A. (2017). Vitamins: Key role players in boosting up immune response-a mini review. *Vitamins & Minerals*, 06(01). Doi:10.4172/2376-1318.1000153.

FDA (Food and Drug Administration). (2016). Food labeling: Revision of the nutrition and supplement facts labels. Silver Spring, USA: FDA.

Ferguson, L., Polito, V., & Kallsen, C. (2005). The pistachio tree: Botany and physiology and factors that affect yield. In L. Ferguson (Ed.). *Pistachio production manual* (pp. 31-39). USA: University of California Inc.

Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I., & Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(7), 1043-1048. Doi:10.1016/j.jfca.2011.01.008.

Fogacci, F., Cicero, A. F. G., Derosa, G., Rizzo, M., Veronesi, M., & Borghi, C. (2019). Effect of pistachio on brachial artery diameter and flow-mediated dilatation: A systematic review and meta-analysis of randomized, controlled-feeding clinical studies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(2), 328-335. Doi:10.1080/10408398.2017.1368007.

Frankel, E. N. (2005). *Lipid Oxidation*. Davis, California, USA: Woodhead.

Fruits & Vegetables (2021). *Pistachio nut, Pistachia vera/Anacardiaceae*. Retrieved from <https://www.frutas-hortalizas.com/Fruits/Postharvest-Pistachio-nut.html>. Accessed on 27/01/2022

Fuller, M. P., & Griffiths, P. R. (1978). Diffuse reflectance measurements by infrared Fourier transform spectrometry. *Analytical Chemistry*, 50(13), 1906-1910. Doi:10.1021/ac50035a045.

Geană, E. I., Ciucure, C. T., Apetrei, C., & Artem, V. (2019). Application of spectroscopic UV-Vis and FT-IR screening techniques coupled with multivariate statistical analysis for red wine authentication: Varietal and vintage year discrimination. *Molecules*, 24(22), 4166. Doi:10.3390/molecules24224166.

Gentile, C., Tesoriere, L., Butera, D., Fazzari, M., Monastero, M., Allegra, M., & Livrea, M. A. (2007). Antioxidant activity of Sicilian pistachio (*Pistacia vera* L. var. Bronte) nut extract and its bioactive components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(3), 643-648. Doi:10.1021/jf062533i.

Georgiadou, M., Dimou, A., & Yanniotis, S. (2012). Aflatoxin contamination in pistachio nuts: A farm to storage study. *Food Control*, 26, 580-586. Doi:10.1016/j.foodcont.2012.02.014.

Georgiadou, M., Gardeli, C., Komaitis, M., Tsitsigiannis, D. I., Paplomatas, E. J., Sotirakoglou, K., & Yanniotis, S. (2015). Volatile profiles of healthy and aflatoxin contaminated pistachios. *Food Research International*, 74, 89-96. Doi:10.1016/j.foodres.2015.03.021.

Gericke, A., & Hühnerfuss, H. (1995). Investigation of Z- and E-unsaturated fatty acids, fatty acid esters, and fatty alcohols at the air/water interface by infrared spectroscopy. *Langmuir*, 11(1), 225-230. Doi:10.1021/la00001a039.

Ghaseminasab-Parizi, M., Ahmadi, A., & Mazloomi, S. M. (2015). A review on pistachio: Its composition and benefits regarding the prevention or treatment of diseases. *Journal of Occupational Health and Epidemiology*, 4(1), 57-69. Doi:10.18869/acadpub.johe.4.1.57.

Gong, Y., & Pegg, R. B. (2015). Tree nut oils: Properties and processing for use in food. In G. Talbot (Ed.). *Specialty Oils and Fats in Food and Nutrition Properties, Processing and Applications* (1st chapter, pp. 65-86). Sawston, UK: Woodhead Publishing.

Grace, M. H., Esposito, D., Timmers, M. A., Xiong, J., Yousef, G., Komarnytsky, S., & Lila, M. A. (2016). Chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory properties of pistachio hull extracts. *Food Chemistry*, 210, 85-95. Doi:10.1016/j.foodchem.2016.04.088.

Gurdeniz, G., Ozen, B., & Tokatli, F. (2010). Comparison of fatty acid profiles and mid infrared spectral data for classification of olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *112*, 218-226. Doi:10.1002/ejlt.200800229.

Gutiérrez, L. F., Quiñones-Segura, Y., Sanchez-Reinoso, Z., Díaz, D. L., & Abril, J. I. (2017). Physicochemical properties of oils extracted from γ -irradiated Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds. *Food Chemistry*, *237*, 581-587. Doi:10.1016/j.foodchem.2017.05.148.

Hackstadt, A. J., & Hess, A. M. (2009). Filtering for increased power for microarray data analysis. *BMC Bioinformatics*, *10*(1), 11. Doi:10.1186/1471-2105-10-11.

Halvorsen, B. L., Carlsen, M. H., Phillips, K. M., Bohn, S. K., Holte, K., Jacobs, D. R. Jr., & Blomhoff, R. (2006). Content of redox-active compounds (ie, antioxidants) in foods consumed in the United States. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *84*(1), 95-135. Doi:10.1093/ajcn/84.1.95.

Harris, L. J. (2013). Improving the safety and quality of nuts. In L. Harris (Ed.), *Food Science, Technology and Nutrition* (1st ed., pp. 351). Cambridge, UK: Woodhead Publishing.

Hernández-Alonso, P., Bulló, M., & Salas-Salvadó, J. (2016). Pistachios for health: What do we know about this multifaceted nut?. *Nutrition Today*, *51*, 133-138.

Hojjati, M., Calín-Sánchez, Á., Razavi, S. H., & Carbonell-Barrachina, Á. A. (2012). Effect of roasting on colour and volatile composition of pistachios (*Pistacia vera* L.). *International Journal of Food Science & Technology*, *48*(2), 437-443. Doi:10.1111/j.1365-2621.2012.03206.x.

Hormaza, J. I., & Wünsch, A. (2007). Pistachio. In C. Kole (Ed.). *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants book series: Fruits and Nuts* (GENMAPP, volume 4, pp. 243-251). Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Houshia, O. J., Zaid, O., Shqair, H., Zaid, M., Fashafsheh, N., & Bzoor, R. (2014). Effect of olive oil adulteration on peroxide value, delta-K and on the acidity Nabali-Baladi olive oil quality. *Advances in Life Sciences*, 4(5), 235-244.

Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841-1856. Doi:10.1021/jf030723c.

INC (International Nut & Dried Fruit Council). (2021). Nuts & Dried Fruits Statistical Yearbook 2020/2021. Retrieved from <https://www.nutfruit.org/industry/statistics>. Accessed on 27/01/2022

Janporn, S., Ho, C. T., Chavasit, V., Pan, M. H., Chittrakorn, S., Ruttarattanamongkol, K., & Weerawatanakorn, M. (2015). Physicochemical properties of Terminalia catappa seed oil as a novel dietary lipid source. *Journal of Food and Drug Analysis*, 23(2), 201-209. Doi:10.1016/j.jfda.2014.06.007.

Jentzsch, P. V., & Ciobotă, V. (2014). Raman spectroscopy as an analytical tool for analysis of vegetable and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 29, 287-295. Doi:10.1002/ffj.3203.

Juhaimi, F. A., Ozcan, M. M., Ghafoor, K., Babiker, E. E., & Hussain, S. (2018). Comparison of cold-pressing and soxhlet extraction systems for bioactive compounds, antioxidant properties, polyphenols, fatty acids and tocopherols in eight nut oils. *Journal of Food Science and Technology*, 55(8), 3163-3173. Doi:10.1007/s13197-018-3244-5.

Kader, A. A., Heintz, C. M., Labavitch, J. M., & Rae, H. L. (1982). Studies related to the description and evaluation of pistachio nut quality [Genotype, production area, maturity, moisture content, degree of shell staining, and storage]. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 107(5), 812-816.

Kamangar, T., Farrohi, F., & Mehran, M. (1975). Characteristics of pistachio kernel oils from Iranian cultivars. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 52, 512-513. Doi:10.1007/bf02640742.

Kamnev, A. A., Dyatlova, Y. A., Kenzhegulov, O. A., Vladimirova, A. A., Mamchenkova, P. V., & Tugarova, A. V. (2021). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic analyses of microbiological samples and biogenic selenium nanoparticles of microbial origin: Sample preparation effects. *Molecules*, 26, 1146. Doi:10.3390/molecules26041146.

Kashaninejad, M., & Tabil, L. G. (2011). Pistachio (*Pistacia vera* L.). In E. M. Yahia (Ed.). *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits* (4th volume, pp. 218-246). Cambridge, UK: Woodhead Publishing.

Kasiri, M. B., & Safapour, S. (2013). Natural Dyes and Antimicrobials for Textiles. In E., Lichtfouse, J., Schwarzbauer, D., Robert (Eds.). *Green Materials for Energy, Products and Depollution (Environmental Chemistry for a Sustainable World)*, (2014th ed., pp. 229-286). Germany: Springer. Doi:10.1007/978-94-007-6836-9_6.

Kaya-Celiker, H. (2012). Mid-infrared spectral characterization of aflatoxin contamination in peanuts. Blacksburg, Virginia, USA.

Kaya-Celiker, H., Mallikarjunan, P. K., & Kaaya, A. (2015). Mid-infrared spectroscopy for discrimination and classification of *Aspergillus* spp. contamination in peanuts. *Food Control*, 52, 103-111. Doi:10.1016/j.foodcont.2014.12.013.

Khatib, S., & Vaya, J. (2010). Fig, Carob, Pistachio, and Health. In R. R. Watson & V. R. Preedy (Ed.). *Bioactive Foods in Promoting Health* (1st ed., pp. 245-263). Massachusetts, USA: Academic Press. Doi:10.1016/b978-0-12-374628-3.00017-7.

Kim, D. O., Lee, K. W., Lee, H. J., & Lee, C. Y. (2002). Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(13), 3713-3717. Doi:10.1021/jf020071c.

Kornsteiner, M., Wagner, K. H., & Elmadfa, I. (2006). Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. *Food Chemistry*, 98(2), 381-387. Doi:10.1016/j.foodchem.2005.07.033.

Kumar, P., Mahato, D. K., Kamle, M., Mohanta, T. K., & Kang, S. G. (2017). Aflatoxins: A global concern for food safety, human health and their management. *Frontiers in Microbiology*, 7(2170). Doi:10.3389/fmicb.2016.02170.

Larkin, P. (2011). Instrumentation and Sampling Methods. In P. Larkin (Ed.). *Infrared and Raman Spectroscopy: Principles and Spectral Interpretation* (pp. 27-54). Amsterdam, Netherlands: Elsevier.

Lee, L. E., Metz, D., Giovanni, M., & Bruhn, C. M. (2011). Consumer knowledge and handling of tree nuts: Food safety implications. *Food Protection Trends*, 31(1), 18-27.

Leeper, T. J. *Permutation tests*. Retrieved from <https://thomasleeper.com/Rcourse/Tutorials/permutationtests.html>. Accessed on 28/01/2022

Lercher, J. A., & Jentys, A. (2007). Introduction to Zeolite Science and Practice. In E. M. Flanigen, J. C. Jansen, H. Bekkum (Eds.). *Studies in Surface Science and Catalysis*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier.

Li, Z., Song, R., Nguyen, C., Zerlin, A., Karp, H., Naowamondhol, K., Thames, G., Gao, K., Li, L., Tseng, C.-H., Henning, S. M., & Heber, D. (2010). Pistachio nuts reduce triglycerides and body weight by comparison to refined carbohydrate snack in obese subjects on a 12-week weight loss program. *Journal of the American College of Nutrition*, 29(3), 198-203. Doi:10.1080/07315724.2010.10719834.

Ling, B., Yang, X., Li, R., & Wang, S. (2015). Physicochemical properties, volatile compounds, and oxidative stability of cold pressed kernel oils from raw and roasted pistachio (*Pistacia vera* L. Var Kerman). *European Journal of Lipid Science and Technology*, 118(9), 1368-1379. Doi:10.1002/ejlt.201500336.

Liu, H., Chen, Y., Shi, C., Yang, X., & Han, D. (2020). FT-IR and Raman spectroscopy data fusion with chemometrics for simultaneous determination of chemical quality indices of edible oils during thermal oxidation. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, *119*, 1-7. Doi:10.1016/j.lwt.2019.108906.

Liu, X., Hoshino, N., Wang, S., Masui, E., Chen, J., & Zhang, H. (2018). A novel evaluation index for predicting the degradation rate of frying oils based on their fatty acid composition. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *120*, 1-6. Doi:10.1002/ejlt.201700528.

Liu, Y., Blumberg, J. B., & Chen, C.-Y. O. (2014). Quantification and bioaccessibility of California pistachio bioactives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(7), 1550-1556. Doi:10.1021/jf4046864.

Loizzo, M. R., Di Lecce, G., Boselli, E., Menichini, F., & Frega, N. G. (2012). Radical scavenging, total antioxidant capacity, and antiproliferative activity of phenolic extracts from extra virgin olive oil by cultivar “Frantoio”. *International Journal of Food Properties*, *15*(6), 1345-1357. Doi:10.1080/10942912.2010.522291.

Lopez-Sanchez, M., Ayora-Cañada, M. J., & Molina-Díaz, A. (2010). Olive fruit growth and ripening as seen by vibrational spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*, 82-87. Doi:10.1021/jf902509f.

Lu, D., Yang, Y., Li, Y., & Sun, C. (2014). Analysis of tocopherols and tocotrienols in pharmaceuticals and foods: A critical review. *Current Pharmaceutical Analysis*, *11*(1), 66-78. Doi:10.2174/1573412910666140630170055.

Luh, B. S., Wong, W. S., & El-Shimi, N. E. (1981). Effect of processing on some chemical constituents of pistachio nuts. *Journal of Food Quality*, *5*, 33-41. Doi:10.1111/j.1745-4557.1982.tb00954.x.

Luna, A. S., da Silva, A. P., Ferré, J., & Boqué, R. (2013). Classification of edible oils and modelling of their physico-chemical properties by chemometric methods using

mid-IR spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *100*, 109-114. Doi:10.1016/j.saa.2012.06.034.

Madawala, S. R. P., Kochhar, S. P., & Dutta, P. C. (2012). Lipid components and oxidative status of selected specialty oils. *Grasas y Aceites*, *63*(2), 143-151. Doi:10.3989/gya.083811.

Magan, N., & Evans, P. (2000). Volatiles as an indicator of fungal activity and differentiation between species, and the potential use of electronic nose technology for early detection of grain spoilage. *Journal of Stored Products Research*, *36*(4), 319-340. Doi:10.1016/s0022-474x(99)00057-0.

Mahmoudi, R., Norian, R., Katiraei, F., Pajohi-Alamoti, M. R., & Emami, S. J. (2014). Occurrence of aflatoxin B1 in pistachio nuts during various preparing processes: Tracing from Iran. *Journal of Materials Research*, *1*, 1-5.

Mandalari, G., Barreca, D., Gervasi, T., Roussel, M. A., Klein, B., Feeney, M. J., & Carughi, A. (2022). Pistachio nuts (*Pistacia vera* L.): Production, nutrients, bioactives and novel health effects. *Plants*, *11*(1), 18. Doi:10.3390/plants11010018.

Manners, R., Varela-Ortega, C., & van Etten, J. (2020). Protein-rich legume and pseudo-cereal crop suitability under present and future European climates. *European Journal of Agronomy*, *113*, 125974. Doi:10.1016/j.eja.2019.125974.

Marín, S., & Ramos, A. J. (2016). Molds and mycotoxins in nuts. In P. Kotzekidou (Ed.). *Food Hygiene and Toxicology in Ready-to-Eat Foods* (1st ed., pp. 295-312). Massachusetts, USA: Academic Press. Doi:10.1016/b978-0-12-801916-0.00017-0.

Martelo-Vidal, M. J., & Vázquez, M. (2014). Evaluation of ultraviolet, visible, and near infrared spectroscopy for the analysis of wine compounds. *Czech Journal of Food Sciences*, *32*(1), 37-47. Doi:10.17221/167/2013-cjfs.

Martínez, M. L., Fabani, M. P., Baroni, M. V., Huaman, R. N. M., Ighani, M., Maestri, D. M., Wunderlin, D., Tapia, A., & Feresin, G. E. (2016). Argentinian pistachio oil and

flour: A potential novel approach of pistachio nut utilization. *Journal of Food Science and Technology*, 53(5), 2260-2269. Doi:10.1007/s13197-016-2184-1.

Maskan, M., & Karatas, S. (1999). Storage stability of whole-split pistachio nuts (*Pistachia vera* L.) at various conditions. *Food Chemistry*, 66, 227-233. Doi:10.1016/s0308-8146(99)00055-2.

Mazurek, S., Szostak, R., Czaja, T., & Zachwieja, A. (2015). Analysis of milk by FT-Raman spectroscopy. *Talanta*, 138, 285-289. Doi:10.1016/j.talanta.2015.03.024.

McMurry, J. (1998). *Fundamentals of organic chemistry* (4th ed.). Pacific Grove, CA, USA: Brooks/Cole Publishing Company.

Mendes, E., & Duarte, N. (2021). Mid-infrared spectroscopy as a valuable tool to tackle food analysis: A literature review on coffee, dairies, honey, olive oil and wine. *Foods*, 10, 477. Doi:10.3390/foods10020477.

Minioti, K. S., & Georgiou, C. A. (2010). Comparison of different tests used in mapping the Greek virgin olive oil production for the determination of its total antioxidant capacity. *Grasas Y Aceites*, 61, 45-51.

Moros, J., Roth, M., Garrigues, S., & Guardia, M. (2009). Preliminary studies about thermal degradation of edible oils through attenuated total reflectance mid-infrared spectrometry. *Food Chemistry*, 114(4), 1529-1536. Doi:10.1016/j.foodchem.2008.11.040.

Muik, B., Lendl, B., Molina-Díaz, A., & Ayora-Cañada, M. J. (2003). Direct, reagent free determination of free fatty acid content in olive oil and olives by Fourier transform Raman spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 487(2), 211-220. Doi:10.1016/s0003-2670(03)00560-9.

Nagy, K., & Tiuca, I. D. (2017). Importance of Fatty Acids in Physiopathology of Human Body. In A. Catala (Ed.). *Fatty Acids* (pp. 3-22). London, UK: IntechOpen.

Neidleman, S. L. (1987). Effects of temperature on lipid unsaturation. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, 5, 245-268. Doi:10.1080/02648725.1987.10647839.

Ojeda-Amador, R. M., Fregapane, G., & Desamparados, S. M. (2018). Composition and properties of virgin pistachio oils and their by-products from different cultivars. *Food Chemistry*, 240, 123-130. Doi:10.1016/j.foodchem.2017.07.087.

Ojeda-Amador, R. M., Fregapane, G., & Salvador, M. D. (2020). Influence of cultivar and technological conditions on the volatile profile of virgin pistachio oils. *Food Chemistry*, 311, 125957. Doi:10.1016/j.foodchem.2019.125957.

Okay, Y. (2002). The comparison of some pistachio cultivars regarding their fat, fatty acids and protein content. *Gartenbauwissenschaft*, 67, 107-113.

Otemuyiwa, I. O., & Adewusi, S. R. A. (2013). Fatty acid, carotenoid and tocopherol content of some fast foods from a Nigerian eatery. *Journal of Food and Nutrition Research*, 1(5), 82-86.

Ozel, M. Z., Gogus, F., Hamilton, J. F., & Lewis, A. C. (2004). The essential oil of *Pistacia vera* L. at various temperatures of direct thermal desorption using comprehensive gas chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry. *Chromatographia*, 60(1-2). Doi:10.1365/s10337-004-0332-7.

Ozturk, I., Sagdic, O., Yalcin, H., Capar, T. D., & Asyali, M. H. (2016). The effects of packaging type on the quality characteristics of fresh raw pistachios (*Pistacia vera* L.) during the storage. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 65, 457-463. Doi:10.1016/j.lwt.2015.08.046.

Pérez-Ráfols, C., Subirats, X., Serrano, N., & Díaz-Cruz, J. M. (2019). New discrimination tools for harvest year and varieties of white wines based on hydrophilic interaction liquid chromatography with amperometric detection. *Talanta*, 201, 104-110. Doi:10.1016/j.talanta.2019.03.099.

- Pesarin, F., & Salmaso, L. (2010). *Permutation tests for complex data: Theory, applications and software*. Chichester, UK: Wiley. Doi:10.1002/9780470689516.
- Pitt, J., & Hocking, A. (2009). *Fungi and Food Spoilage*. New York, NY: Springer.
- Portarena, S., Anselmi, C., Zadra, C., Farinelli, D., Famiani, F., Baldacchini, C., & Brugnoli, E. (2019). Cultivar discrimination, fatty acid profile and carotenoid characterization of monovarietal olive oils by Raman spectroscopy at a single glance. *Food Control*, 6, 137-145. Doi:10.1016/j.foodcont.2018.09.011.
- Prolla, I. R. D., Barbosa, R. G., Veeck, A. P. L., Augusti, P. R., da Silva, L. P., Ribeiro, N. D., & Emanuelli, T. (2010). Cultivar, harvest year, and storage conditions affecting nutritional quality of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30, 96-102. Doi:10.1590/s0101-20612010000500016.
- Rabadán, A., Pardo, J. E., Gómez, R., & Álvarez-Ortí, M. (2018). Influence of temperature in the extraction of nut oils by means of screw pressing. *LWT*, 93, 354-361. Doi:10.1016/j.lwt.2018.03.061.
- Rajaei, A., Barzegar, M., Mobarez, A. M., Sahari, M. A., & Esfahani, Z. H. (2010). Antioxidant, anti-microbial and antimutagenicity activities of pistachio (*Pistachia vera*) green hull extract. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 107-112. Doi:10.1016/j.fct.2009.09.023.
- Reboredo-Rodríguez, P., Valli, E., Bendini, A., Di Lecce, G., Simal-Gándara, J., & Gallina Toschi, T. (2016). A widely used spectrophotometric assay to quantify olive oil biophenols according to the health claim (EU Reg. 432/2012). *European Journal of Lipid Science and Technology*, 118(10), 1593-1599. Doi:10.1002/ejlt.201500313.
- Reh, C. (2001). In-line and off-line FTIR measurements. In E. Kress-Rogers, C. J. B. Brimelow (Eds.). *Instrumentation and sensors for the food industry* (2nd ed., pp. 213-232). Sawston, UK: Woodhead publishing in food science and technology.

- Rizvi, S., Raza, S. T., Ahmed, F., Ahmad, A., Abbas, S., & Mahdi, F. (2014). The role of vitamin E in human health and some diseases. *Sultan Qaboos University Medical Journal*, *14*(2), 157-165.
- Rodríguez, N., Dias, L. G., Veloso, A. C. A., Pereira, J. A., & Peres, A. M. (2016). Monitoring olive oils quality and oxidative resistance during storage using an electronic tongue. *LWT*, *73*, 683-692. Doi:10.1016/j.lwt.2016.07.002.
- Rodríguez-Bencomo, J. J., Kelebek, H., Sonmezdag, A. S., Rodríguez-Alcalá, L. M., Fontecha, J., & Selli, S. (2015). Characterization of the aroma-active, phenolic, and lipid profiles of the pistachio (*Pistacia vera* L.) nut as affected by the single and double roasting process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*(35), 7830-7839. Doi:10.1021/acs.jafc.5b02576.
- Roginsky, V., & Lissi, E. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, *92*(2), 235-254. Doi:10.1016/j.foodchem.2004.08.004.
- Rohman, A., & Che Man, Y. B. (2010). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for analysis of extra virgin olive oil adulterated with palm oil. *Food Research International*, *43*, 886-892. Doi:10.1016/j.foodres.2009.12.006.
- Rosenkrantz, H. (1948). Infra-red absorption spectra of tocopherols and related structure. *Journal of Biological Chemistry*, *173*(2), 439-447.
- Rowshan, V., Bahmanzadegan, A., & Saharkhiz, M. J. (2013). Influence of storage conditions on the essential oil composition of *Thymus daenensis* Celak. *Industrial Crops and Products*, *49*, 97-101. Doi:10.1016/j.indcrop.2013.04.029.
- Saber-Tehrani, M., Givianrad, M. H., Aberoomand-Azar, P., Waqif-Husain, S., & Jafari Mohammadi, S. A. (2013). Chemical composition of Iran's *Pistacia atlantica* cold-pressed oil. *Journal of Chemistry*, *2013*, 1-6. Doi:10.1155/2013/126106.

Şahan, A., & Bozkurt, H. (2019). Effects of harvesting time and irrigation on aroma active compounds and quality parameters of pistachio. *Scientia Horticulturae*, 108905. Doi:10.1016/j.scienta.2019.108905.

Salvador, M. D., Ojeda-Amador, R. M., & Fregapane, G. (2019). Virgin Pistachio (*Pistachia vera* L.) Oil. In M. F. Ramadan (Ed.). *Fruit Oils: Chemistry and Functionality* (pp. 181-197). Switzerland: Springer.

Salvador, M. D., Ojeda-Amador, R. M., & Fregapane, G. (2020). Pistachio nut, its virgin oil, and their antioxidant and bioactive activities. *Pathology*, 309-320. Doi:10.1016/b978-0-12-815972-9.00030-5.

Satil, F., Azcan, N., & Baser, K. H. S. (2003). Fatty acid composition of pistachio nuts in Turkey. *Chemistry of Natural Compounds*, 39, 322-324. Doi:10.1023/b:conc.0000003408.63300.b5.

Scott, V. N., Clavero, R. S., & Troller, J. A. (2001). Measurement of water activity (aw), acidity, and brix. In F. P. Downes & K. Ito (Eds.). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (4th ed., pp. 649-657). Washington, USA: American Public Health Association.

Schulz, H., & Baranska, M. (2007). Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 43, 13-25. Doi:10.1016/j.vibspec.2006.06.001.

Sena-Moreno, E., Pardo, J. E., Catalán, L., Gómez, R., Pardo-Giménez, A., & Alvarez-Ortí, M. (2015). Drying temperature and extraction method influence physicochemical and sensory characteristics of pistachio oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117(5), 684-691. Doi:10.1002/ejlt.201400366.

Servili, M., & Montedoro, G. (2002). Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104, 602-613. Doi:10.1002/1438-9312(200210)104:9/10<602::AID-EJLT602>3.0.CO;2-X.

Siger, A., Nogala-Kalucka, M., & Lampart-Szczapa, E. (2008). The content and antioxidant activity of phenolic compounds in cold-pressed plant oils. *Journal of Food Lipids*, 15(2), 137-149. Doi:10.1111/j.1745-4522.2007.00107.x.

Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2007). *Principles of Instrumental Analysis* (6th ed.). Belmont, Canada, USA: Thomson Higher Education.

Sonmezdag, A. S., Kelebek, H., & Selli, S. (2017). Pistachio oil (*Pistacia vera* L. cv. Uzun): characterization of key odorants in a representative aromatic extract by GC-MS-olfactometry and phenolic profile by LC-ESI-MS/MS. *Food Chemistry*, 240, 24-31. Doi:10.1016/j.foodchem.2017.07.086.

Spínola, V., Mendes, B., Câmara, J. S., & Castilho, P. C. (2012). An improved and fast UHPLC-PDA methodology for determination of *L*-ascorbic and dehydroascorbic acids in fruits and vegetables. Evaluation of degradation rate during storage. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403(4), 1049-1058. Doi:10.1007/s00216-011-5668-x.

Statistics Solutions (2021). *Discriminant Analysis*. Retrieved from <https://www.statisticssolutions.com/discriminant-analysis/>. Accessed on 28/01/2022

Stevens, P. J. (1996). *Applied Multivariate Statistics for the Social Sciences* (3rd ed.). Mahwah, NJ, USA: Lawrence Erlbaum.

Sujka, K., Koczoń, P., Ceglińska, A., Reder, M., & Ciemnińska-Żytkiewicz, H. (2017). The application of FT-IR spectroscopy for quality control of flours obtained from polish producers. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 4315678. Doi:10.1155/2017/4315678.

Sun, D. W. (2008). *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*. Massachusetts, USA: Academic Press.

Szymańska, E., Saccenti, E., Smilde, A. K., & Westerhuis, J. A. (2011). Double-check: Validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies. *Metabolomics*, 8(S1), 3-16. Doi:10.1007/s11306-011-0330-3.

Tanılgana, K., Özcanb, M. M., & Ünver, A. (2007). Physical and chemical characteristics of five Turkish olive (*Olea europea* L.) varieties and their oils. *Grasas y Aceites*, 58(2), 142-147.

Tavakolipour, H. (2013). Postharvest operations of pistachio nuts. *Journal of Food Science and Technology*, 52(2), 1124-1130. Doi:10.1007/s13197-013-1096-6.

Teixeira dos Santos, C. A., Páscoa, R. N. M. J., Porto, P. A. L. S., Cerdeira, A. L., González-Sáiz, J. M., Pizarro, C., & Lopes, J. A. (2018). Raman spectroscopy for wine analyses: A comparison with near and mid infrared spectroscopy. *Talanta*, 186, 306-314. Doi:10.1016/j.talanta.2018.04.075.

Terzo, S., Mulè, F., Caldara, G. F., Baldassano, S., Puleio, R., Vitale, M., Cassata, G., Ferrantelli, V., & Amato, A. (2020). Pistachio consumption alleviates inflammation and improves gut microbiota composition in mice fed a high-fat diet. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1), 365. Doi:10.3390/ijms21010365.

Thompson, M. (2008, September 19). *The estimation and use of recovery factors*. The Royal Society of Chemistry. Retrieved from https://www.rsc.org/images/recovery-factors-technical-brief-21A_tcm18-214880.pdf. Accessed on 28/01/2022

Tomaino, A., Martorana, M., Arcoraci, T., Monteleone, D., Giovinazzo, C., & Saija, A. (2010). Antioxidant activity and phenolic profile of pistachio (*Pistacia vera* L., variety Bronte) seeds and skins. *Biochimie*, 92(9), 1115-1122. Doi:10.1016/j.biochi.2010.03.027.

Torres-Martínez, R., García-Rodríguez, Y. M., Ríos-Chávez, P., Saavedra-Molina, A., López-Meza, J. E., Ochoa-Zarzosa, A., & Garciglia, R. S. (2017). Antioxidant activity of the essential oil and its major terpenes of *Satureja macrostema* (Moc. And Sessé ex Benth.) Briq. *Pharmacognosy Magazine*, 13, 875-880.

Tsantili, E., Konstantinidis, K., Christopoulos, M. V., & Roussos, P. A. (2011). Total phenolics and flavonoids and total antioxidant capacity in pistachio (*Pistachia vera* L.)

nuts in relation to cultivars and storage conditions. *Scientia Horticulturae*, 129, 694-701. Doi:10.1016/j.scienta.2011.05.020.

Tsokou, A., Georgopoulou, K., Melliou, E., Magiatis, P., & Tsitsa, E. (2007). Composition and enantiomeric analysis of the essential oil of the fruits and the leaves of *Pistacia vera* from Greece. *Molecules*, 12(6), 1233-1239. Doi:10.3390/12061233.

Uncu, O., & Ozen, B. (2019). A comparative study of mid-infrared, UV-Visible and fluorescence spectroscopy in combination with chemometrics for the detection of adulteration of fresh olive oils with old olive oils. *Food Control*, 105, 209-218. Doi:10.1016/j.foodcont.2019.06.013.

Uncu, O., Ozen, B., & Tokatli, F. (2019). Use of FTIR and UV-visible spectroscopy in determination of chemical characteristics of olive oils. *Talanta*, 201, 65-73. Doi:10.1016/j.talanta.2019.03.116.

USDA (United States Department of Agriculture) ARS National Nutrient Database for Standard Reference. (2017). Retrieved from <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/?query=pistachio>. Accessed on 28/01/2022

Valasi, L., Arvanitaki, D., Mitropoulou, A., Georgiadou, M., & Pappas, C. S. (2020). Study of the quality parameters and the antioxidant capacity for the FTIR-chemometric differentiation of *Pistacia Vera* oils. *Molecules*, 25, 1614. Doi:10.3390/molecules25071614.

Valasi, L., Kokotou, M. G., & Pappas C. S. (2021). GC-MS, FTIR and Raman spectroscopic analysis of fatty acids of *Pistacia vera* (Greek variety “Aegina”) oils from two consecutive harvest periods and chemometric differentiation of oils quality. *Food Research International*, 148, 110590. Doi:10.1016/j.foodres.2021.110590.

Valasi, L., & Pappas C. S. (2021). Chemometric differentiation of pistachios (*Pistacia vera*, Greek ‘Aegina’ variety) from two different harvest years using FTIR spectroscopy and DRIFTS and disk techniques. *AppliedChem*, 1(1), 62-74. Doi:10.3390/appliedchem1010006.

Van den Berg, R. A., Hoefsloot, H. C. J., Westerhuis, J. A., Smilde, A. K., & van der Werf, M. J. (2006). Centering, scaling, and transformations: Improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics*, 7(1), 142. Doi:10.1186/1471-2164-7-142.

Vaskova, H., & Buckova, M. (2017). Multivariate study of Raman spectral data of edible oils. *MATEC Web of Conferences*, 125, 1-4. Doi:10.1051/mateconf/201712502022.

Vukajlović, F. N., Predojević, D. Z., Miljković, K. O., Tanasković, S. T., Gvozdenc, S. M., Perišić, V. M., Grbović, F. J., & Pešić, S. B. (2019). Life history of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) on dried fruits and nuts: Effects of macronutrients and secondary metabolites on immature stages. *Journal of Stored Products Research*, 83, 243-253. Doi:10.1016/j.jspr.2019.07.007.

Yahyavi, F., Alizadeh-Khaledabad, M., & Azadmard-Damirchi, S. (2019). Oil quality of pistachios (*Pistacia vera* L.) grown in East Azarbaijan, Iran. *NFS Journal*, 18, 12-18. Doi:10.1016/j.nfs.2019.11.001.

Yang, H., Irudayaraj, J., & Paradkar, M. M. (2005). Discriminant analysis of edible oils and fats by FTIR, FT-NIR and FT-Raman spectroscopy. *Food Chemistry*, 93, 25-32. Doi:10.1016/j.foodchem.2004.08.039.

Yıldız, M., Gürcan, S. T., & Özdemir, M. (1998). Oil composition of pistachio nuts (*Pistacia vera* L.) from Turkey. *Lipid-Fett*, 100(3), 84-86. Doi:10.1002/(sici)1521-4133(199803)100:3<84::aid-lipi84>3.0.co;2-6.

Yu, J., Wang, H., Zhan, J., & Huang, W. (2017). Review of recent UV-Vis and infrared spectroscopy researches on wine detection and discrimination. *Applied Spectroscopy*, 53(1), 65-86. Doi:10.1080/05704928.2017.1352511.

Zakynthinos, G., & Rouskas, D. (2001). Wild and cultivated *Pistacia* species in Greece. In S. Padulosi & A. Hadj-Hassan (Eds.). *Project on Underutilized Mediterranean*

Species. Pistacia: towards a comprehensive documentation of distribution and use of its genetic diversity in Central & West Asia, North Africa and Mediterranean Europe (pp. 88-90). Report of a Workshop, 14-17 December 1998, Irbid, Jordan. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), Rome, Italy. Retrieved from https://www.biodiversityinternational.org/fileadmin/user_upload/online_library/publications/pdfs/784.pdf. Accessed on 28/01/2022

Zhang, Z., Jin, H., Suo, J., Yu, W., Zhou, M., Dai, W., Song, L., Hu, Y., & Wu, J. (2020). Effect of temperature and humidity on oil quality of harvested *Torreya grandis* cv. *Merrillii* nuts during the after-ripening stage. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 1-15. Doi:10.3389/fpls.2020.573681.

Ελληνική

Γεωργιάδου, Μ. (2009). Μελέτη του προβλήματος των αφλατοξινών. Μεταπτυχιακή μελέτη, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Ζερβάκης, Γ. (2014). *Εισαγωγή στη Μυκητολογία*. Αθήνα, Ελλάδα: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Κουτελιδάκης, Α. (2015). *Λειτουργικά Τρόφιμα ο ρόλος τους στην προαγωγή της υγείας*. Αθήνα, Ελλάδα: Ζήτη.

Μανουηλίδου Χιτζανίδου, Α. (2013). Η πορεία της φιστικιάς από την Ασία στην Αίγινα. *Αρχαιολογική Εφημερίς*, τομ. 152, σελ. 47-52.

Μιχαλάκη, Μ. (2017). *Περισσότερα Κλιματικά Δελτία. Εθνική Μετεωρολογική Υπηρεσία*. Retrieved from <http://www.emy.gr/emv/el/climatology/climatology>. Accessed on 28/01/2022

Μιχαλάκη, Μ. (2018). *Περισσότερα Κλιματικά Δελτία. Εθνική Μετεωρολογική Υπηρεσία*. Retrieved from <http://www.emy.gr/emv/el/climatology/climatology>. Accessed on 28/01/2022

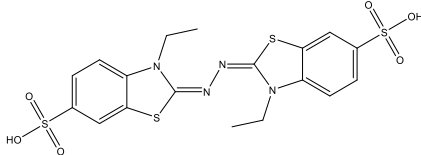
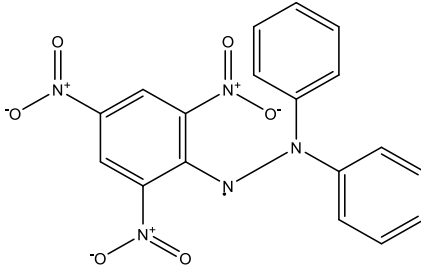
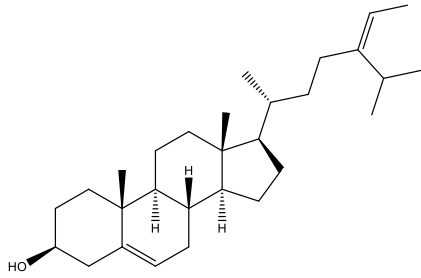
Μπαλατσούρας, Γ. (2006). Μικροβιολογία Τροφίμων. Αθήνα, Ελλάδα: Έμβρυο.

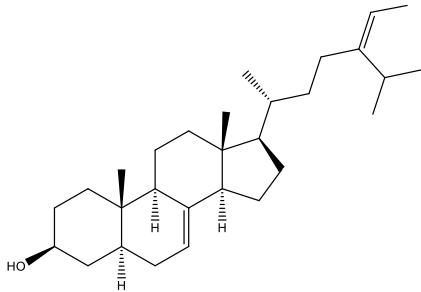
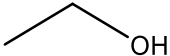
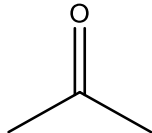
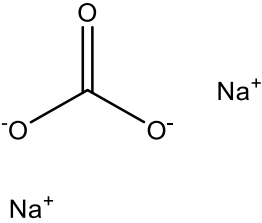
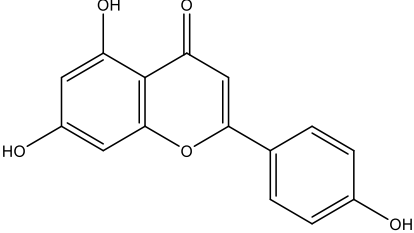
Ποντίκης, Κ. (1996). Ειδική Δενδροκομία-Ακρόδρυα, πυρηνόκαρπα, λοιπά καρποφόρα. Αθήνα, Ελλάδα: Σταμούλης

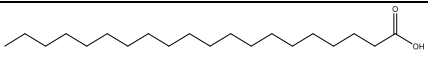
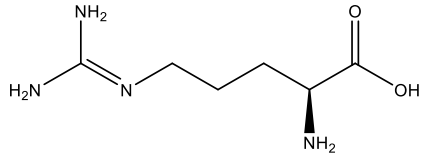
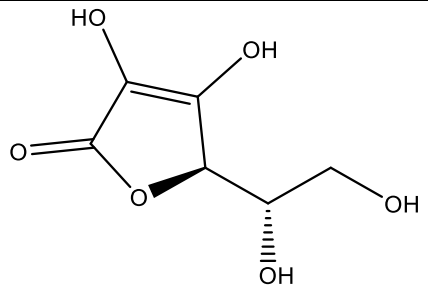
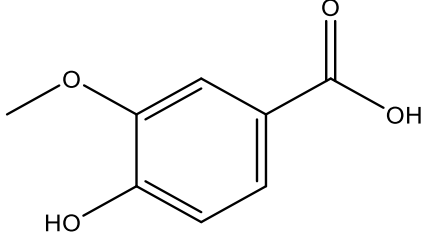
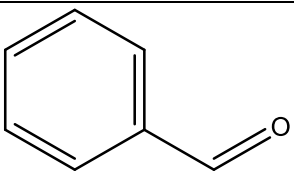
Σαμανίδου, Β. (2015). Τεχνικές Προκατεργασίας Βιολογικών Δειγμάτων. Στο Γ., Θεοδωρίδης, Σ., Γηρούση, Γ., Ζαχαριάδης, Α., Ζώτου, & Β., Σαμανίδου (Ed.). *Βιοαναλυτική χημεία* (1-18). Αθήνα, Ελλάδα: Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών.

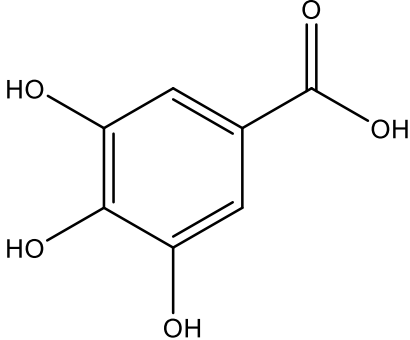
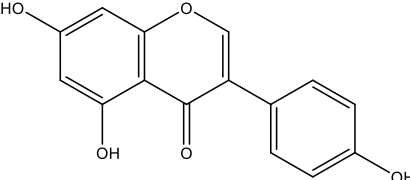
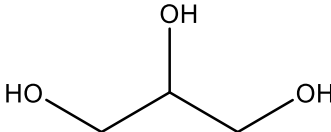
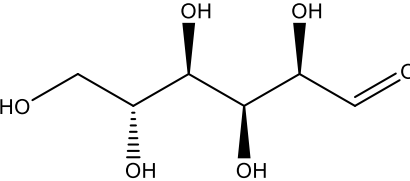
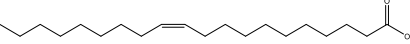
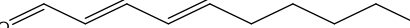
Χατζιωάννου, Π. Θ., & Κουμπάρη, Α. Μ. (2014). *Ενόργανη Ανάλυση*. Αθήνα, Ελλάδα: Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

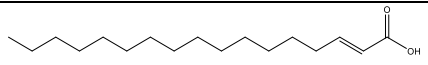
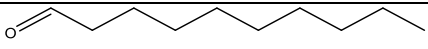
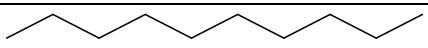
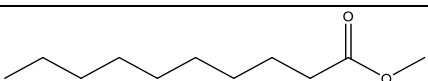
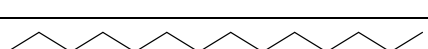
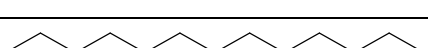
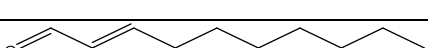
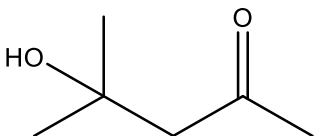
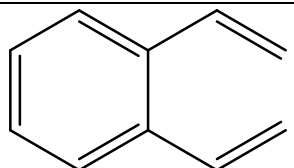
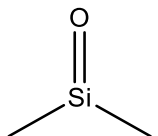
Πίνακας χημικών ενώσεων

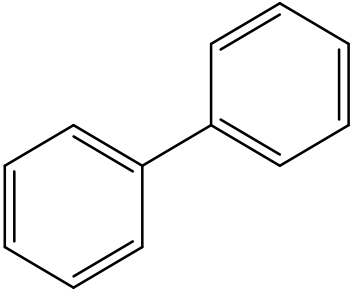
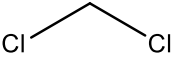
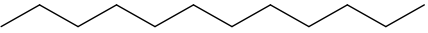
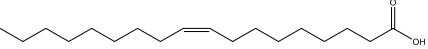
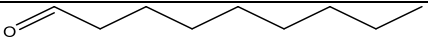
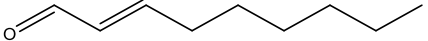

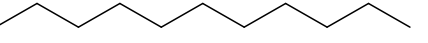
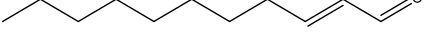
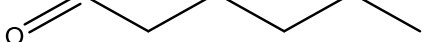

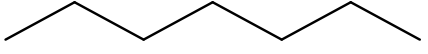
Εμπειρική ονομασία	Αγγλική ονομασία	Αγγλική ονομασία κατά IUPAC	Συντακτικός Τύπος
ABTS (συντομογραφία)	ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)	
DPPH (συντομογραφία)	DPPH	2,2-diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl)hydrazin-1-yl	
δ5-αβεναστερόλη	δ5-avenasterol	(3 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i> ,13 <i>R</i> ,14 <i>S</i> ,17 <i>R</i>)-10,13-dimethyl-17-[(<i>Z</i> ,2 <i>R</i>)-5-propan-2-ylhept-5-en-2-yl]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1 <i>H</i> -cyclopenta[<i>a</i>]phenanthren-3-ol	

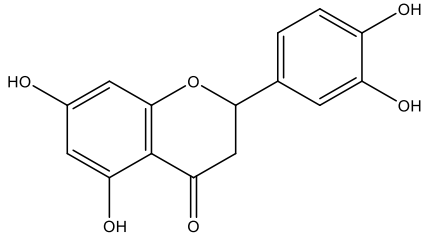
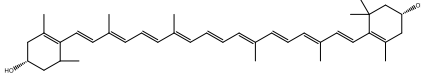
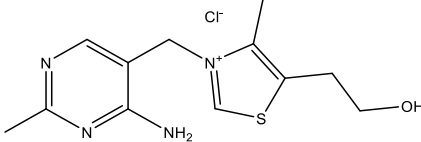
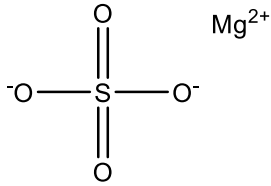
δ7-αβεναστερόλη	δ7-avenasterol	(3 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,9 <i>R</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>R</i> ,14 <i>R</i> ,17 <i>R</i>)-10,13-dimethyl-17-[(<i>Z</i> ,2 <i>R</i>)-5-propan-2-ylhept-5-en-2-yl]-2,3,4,5,6,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1 <i>H</i> -cyclopenta[<i>a</i>]phenanthren-3-ol	
αιθανόλη	ethanol	ethanol	
ακετόνη	acetone	propan-2-one	
ανθρακικό νάτριο	sodium carbonate	sodium carbonate	
απιγενίνη	apigenin	5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4 <i>H</i> -chromen-4-one	

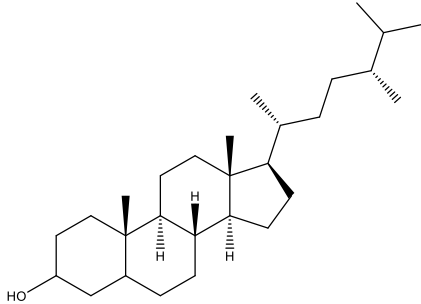
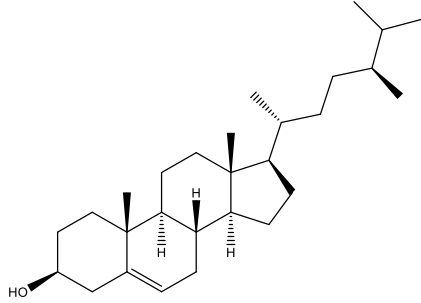
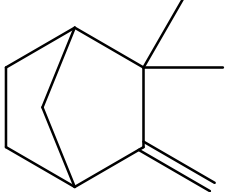
αραχιδικό οξύ	arachidic acid	icosanoic acid	
αργινίνη	arginine	(2 <i>S</i>)-2-amino-5-(diaminomethylideneamino)pentanoic acid	
ασκορβικό οξύ	ascorbic acid	(2 <i>R</i>)-2-[(1 <i>S</i>)-1,2-dihydroxyethyl]-3,4-dihydroxy-2H-furan-5-one	
βανιλικό οξύ	vanillic acid	4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid	
βενζαλδεΐδη	benzaldehyde	benzaldehyde	

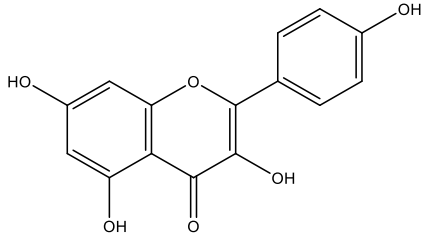
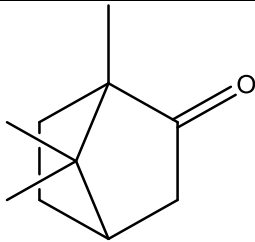
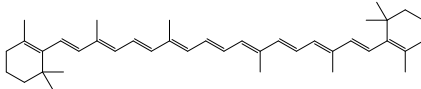
γαλλικό οξύ	gallic acid	3,4,5-trihydroxybenzoic acid	
γενιστεΐνη	genistein	5,7-dihydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)chromen-4-one	
γλυκερόλη	glycerol	propane-1,2,3-triol	
γλυκόζη	glucose	(3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-6-(hydroxymethyl)oxane-2,3,4,5-tetrol	
γονδοϊκό οξύ	gondoic acid	(<i>Z</i>)-icos-11-enoic acid	
(<i>E,E</i>)-2,4-δεκαδιενάλη	(<i>E,E</i>)-2,4-decadienal	(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-deca-2,4-dienal	

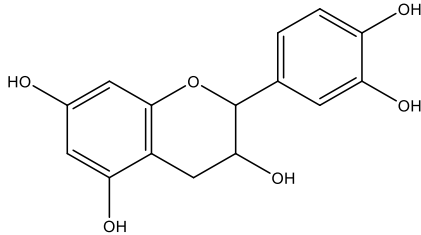
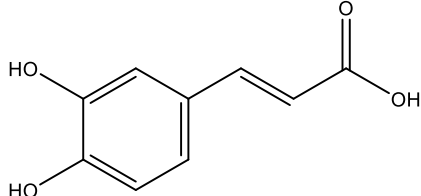
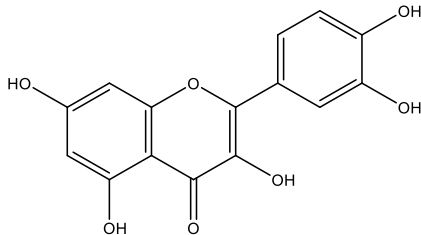
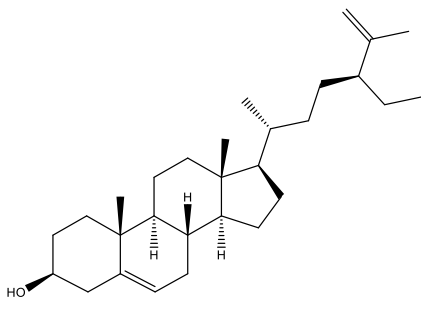
δεκαεπτενοϊκό οξύ	heptadecenoic acid	(Z)-heptadec-10-enoic acid	
δεκανάλη	decanal	decanal	
δεκάνιο	decane	decane	
δεκανοϊκός μεθυλεστέρας	methyl decanoate	methyl decanoate	
δεκατετράνιο	tetradecane	tetradecane	
δεκατριάνιο	tridecane	tridecane	
(E)-2-δεκενάλη	(E)-2-decenal	(E)-dec-2-enal	
αλκοόλη της διακετόνης	diacetone alcohol	4-hydroxy-4-methylpentan-2-one	
διβινυλοβενζόλιο	divinylbenzene	1,2-bis(ethenyl)benzene	
διμεθυλοπολυσιλοξάνιο	dimethyloxosilane	dimethyl(oxo)silane	

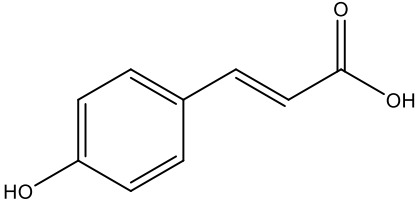
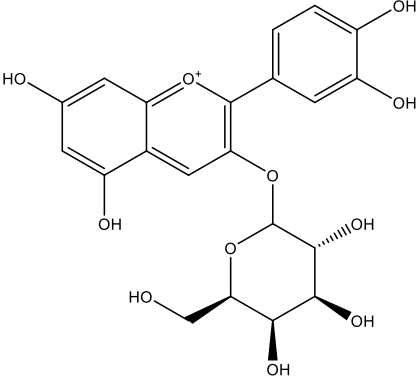
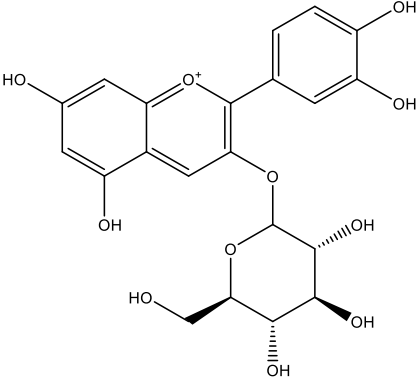
διφαινύλιο	biphenyl	1,1'-biphenyl	
διχλωρομεθάνιο	dichloromethane	dichloromethane	
δωδεκάνιο	dodecane	dodecane	
ελαϊκό οξύ	oleic acid	(Z)-octadec-9-enoic acid	
εννεανάλη	nonanal	nonanal	
(E)-2-εννενάλη	(E)-2-Nonenal	(E)-non-2-enal	
εννεάνιο	nonane	nonane	
εντεκάνιο	undecane	undecane	
(E)-2-εντεκενάλη	(E)-2-undecenal	(E)-undec-2-enal	
εξανάλη	hexanal	hexanal	
εξάνιο	hexane	hexane	
επτάνιο	heptane	heptane	

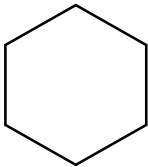
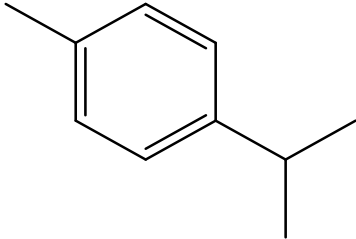
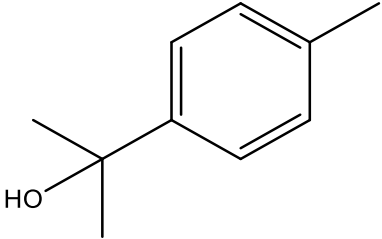
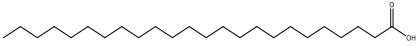
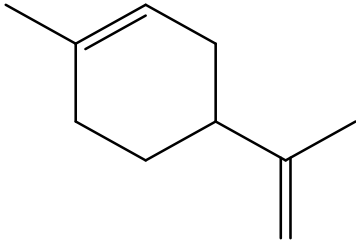
εριοδικτυόλη	eriodictyol	(2 <i>S</i>)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-2,3-dihydrochromen-4-one	
ζεαξανθίνη	zeaxanthin	(1 <i>R</i>)-4-[(1 <i>E</i> ,3 <i>E</i> ,5 <i>E</i> ,7 <i>E</i> ,9 <i>E</i> ,11 <i>E</i> ,13 <i>E</i> ,15 <i>E</i> ,17 <i>E</i>)-18-[(4 <i>R</i>)-4-hydroxy-2,6,6-trimethylcyclohexen-1-yl]-3,7,12,16-tetramethyloctadeca-1,3,5,7,9,11,13,15,17-nonaenyl]-3,5,5-trimethylcyclohex-3-en-1-ol	
θειαμίνη	thiamine	2-[3-[(4-amino-2-methylpyrimidin-5-yl)methyl]-4-methyl-1,3-thiazol-3-ium-5-yl]ethanol	
θειϊκό μαγνήσιο	magnesium sulfate	magnesium sulfate	

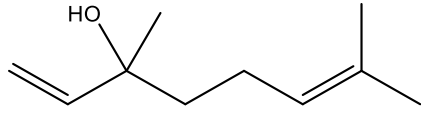
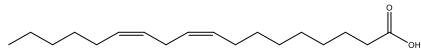
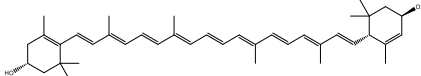
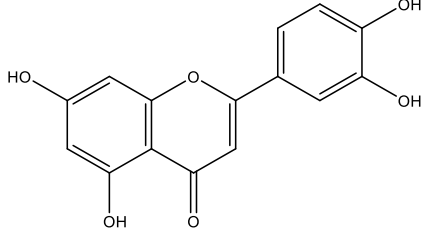
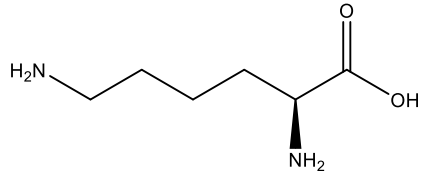
καμπεστανόλη	campestanol	(3 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>R</i> ,14 <i>S</i> ,17 <i>R</i>)-17-[(2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-5,6-dimethylheptan-2-yl]-10,13-dimethyl-2,3,4,5,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-tetradecahydro-1 <i>H</i> -cyclopenta[<i>a</i>]phenanthren-3-ol	
καμπεστερόλη	campesterol	(3 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i> ,13 <i>R</i> ,14 <i>S</i> ,17 <i>R</i>)-17-[(2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-5,6-dimethylheptan-2-yl]-10,13-dimethyl-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1 <i>H</i> -cyclopenta[<i>a</i>]phenanthren-3-ol	
καμφένιο	camphene	2,2-dimethyl-3-methylidenebicyclo[2.2.1]heptane	

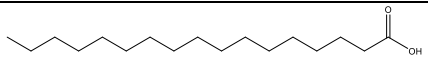
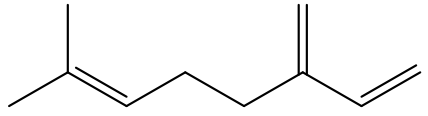

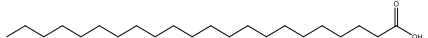
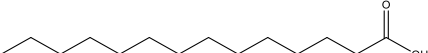
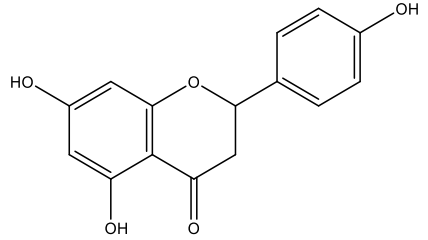
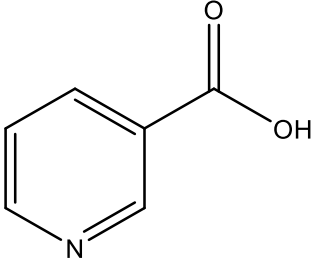
καμφερόλη	kaempferol	3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chromen-4-one	
καμφορά	camphor	1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-one	
β-καροτένιο	β-carotene	1,3,3-trimethyl-2-[(1 <i>E</i> ,3 <i>E</i> ,5 <i>E</i> ,7 <i>E</i> ,9 <i>E</i> ,11 <i>E</i> ,13 <i>E</i> ,15 <i>E</i> ,17 <i>E</i>)-3,7,12,16-tetramethyl-18-(2,6,6-trimethylcyclohexen-1-yl)octadeca-1,3,5,7,9,11,13,15,17-nonaenyl]cyclohexene	

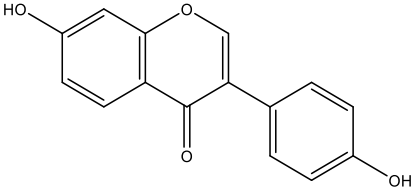
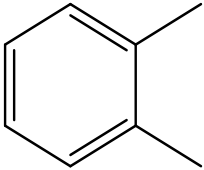
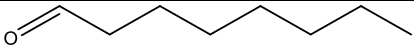
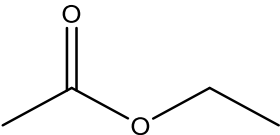
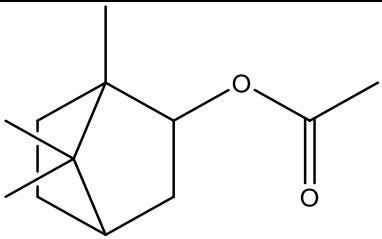
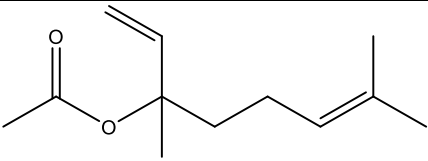
κατεχίνη	catechin	(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2 <i>H</i> -chromene-3,5,7-triol	
καφεϊκό οξύ	caffeic acid	(<i>E</i>)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)prop-2-enoic acid	
κερκετίνη	quercetin	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxychromen-4-one	
κλεροστερόλη	clerosterol	(3 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i> ,13 <i>R</i> ,14 <i>S</i> ,17 <i>R</i>)-17-[(2 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-5-ethyl-6-methylhept-6-en-2-yl]-10,13-dimethyl-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1 <i>H</i> -cyclopenta[<i>a</i>]phenanthren-3-ol	

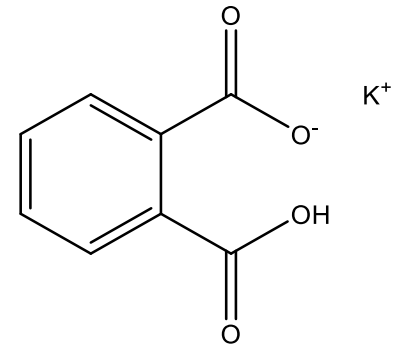
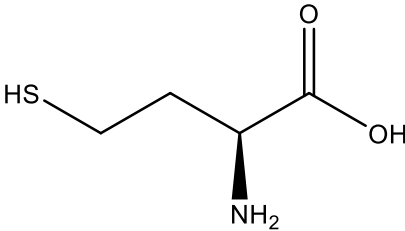
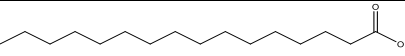
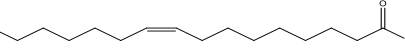
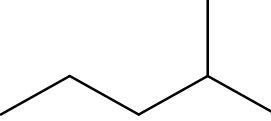
π-κουμαρικό οξύ	p-coumaric acid	<i>(E)</i> -3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoic acid	
3-O-γαλακτοζίτης της κυανιδίνης	cyanidin 3-O-galactoside	<i>(2S,3R,4S,5R,6R)</i> -2-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxychromenylium-3-yl]oxy-6-(hydroxymethyl)oxane-3,4,5-triol	
3-O-γλυκοζίτης της κυανιδίνης	cyanidin 3-O-glucoside	<i>(2S,5S)</i> -2-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxychromenylium-3-yl]oxy-6-(hydroxymethyl)oxane-3,4,5-triol	

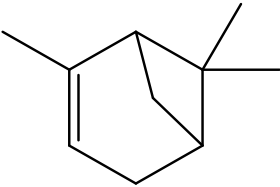
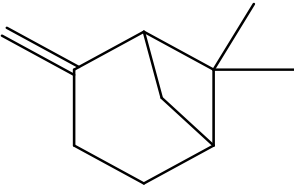
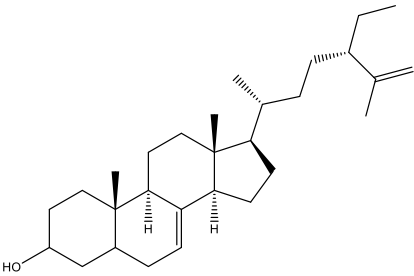
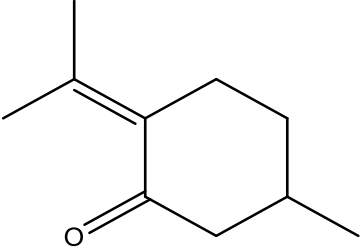
κυκλοεξάνιο	cyclohexane	cyclohexane	
π-κυμένιο	p-cymene	1-methyl-4-propan-2-ylbenzene	
π-κυμεν-8-όλη	p-cymen-8-ol	2-(4-methylphenyl)propan-2-ol	
λιγνοκηρικό οξύ	lignoceric acid	tetracosanoic acid	
D-λιμονένιο	D-limonene	(4 <i>R</i>)-1-methyl-4-prop-1-en-2-ylcyclohexene	

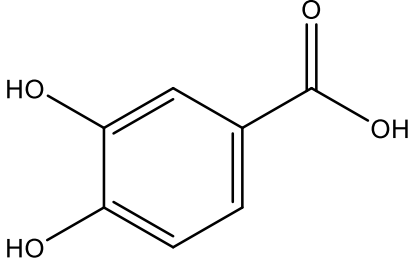
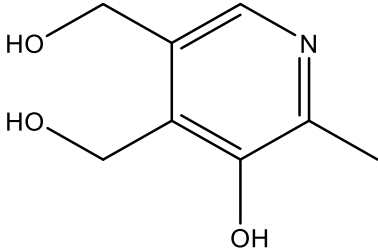
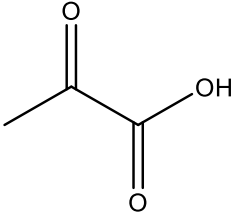
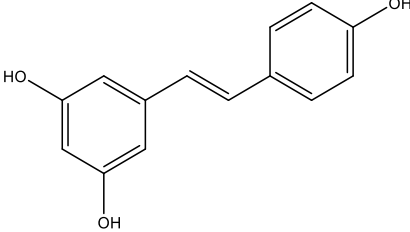
λιναλοόλη	linalool	3,7-dimethylocta-1,6-dien-3-ol	
λινελαϊκό οξύ	linoleic acid	(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoic acid	
λουτεΐνη	lutein	(1R)-4-[(1E,3E,5E,7E,9E,11E,13E,15E,17E)-18-[(1R,4R)-4-hydroxy-2,6,6-trimethylcyclohex-2-en-1-yl]-3,7,12,16-tetramethyloctadeca-1,3,5,7,9,11,13,15,17-nonaenyl]-3,5,5-trimethylcyclohex-3-en-1-ol	
λουτεολίνη	luteolin	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxychromen-4-one	
λυσίνη	lysine	(2S)-2,6-diaminohexanoic acid	

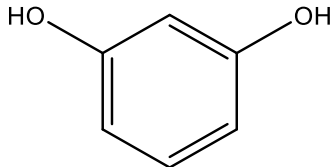
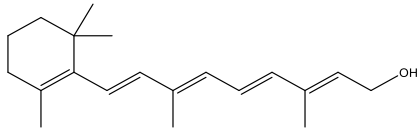
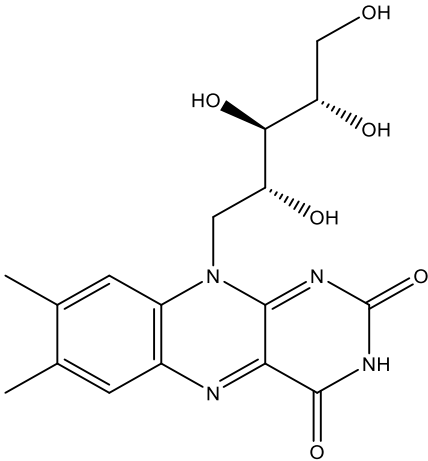
μαργαρικό οξύ	margaric acid	heptadecanoic acid	
β-μυρκενίο	β-myrcene	7-methyl-3-methylideneocta-1,6-diene	
μεθανόλη	methanol	methanol	
μπεχενικό οξύ	behenic acid	docosanoic acid	
μυριστικό οξύ	myristic acid	tetradecanoic acid	
ναριγγενίνη	naringenin	5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-2,3-dihydrochromen-4-one	
νιασίνη	niacin	pyridine-3-carboxylic acid	

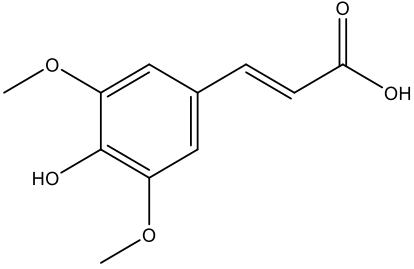
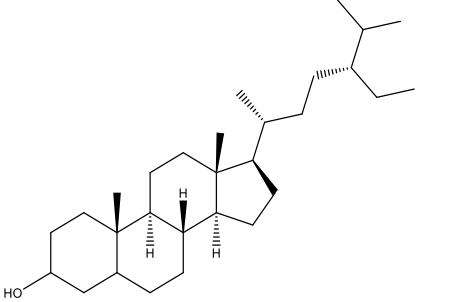
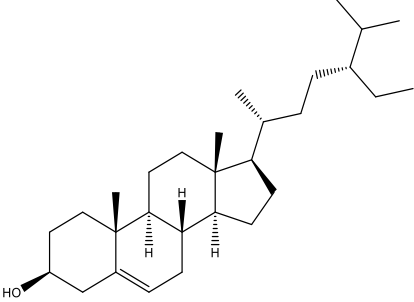
νταϊντζεΐνη	daidzein	7-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)chromen-4-one	
ο-ξυλένιο	o-xylene	1,2-xylene	
οκτανάλη	octanal	octanal	
οξικός αιθυλεστέρας	ethyl acetate	ethyl acetate	
οξικός βορνυλεστέρας	bornyl acetate	(1,7,7-trimethyl-2-bicyclo[2.2.1]heptanyl) acetate	
οξική λιναλοόλη	linalool acetate	3,7-dimethylocta-1,6-dien-3-yl acetate	

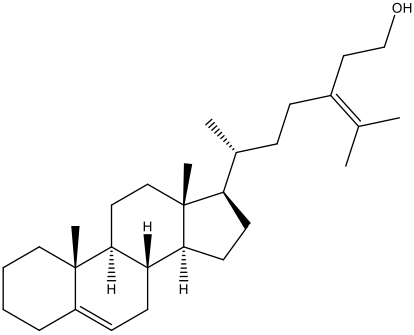
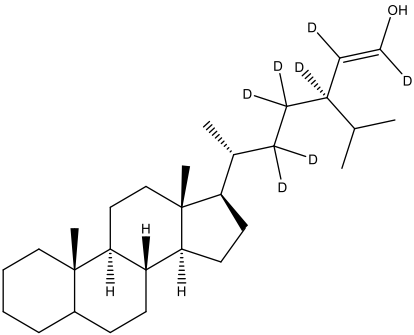
όξινο φθαλικό κάλιο	potassium phthalate	hydrogen potassium 2-carboxybenzoate	
ομοκυστεΐνη	homocysteine	(2 <i>S</i>)-2-amino-4-sulfanylbutanoic acid	
παλμιτικό οξύ	palmitic acid	hexadecanoic acid	
παλμιτελαϊκό οξύ	palmitoleic acid	(<i>Z</i>)-hexadec-9-enoic acid	
πετρελαϊκός αιθέρας	petroleum ether	2-methylpentane	

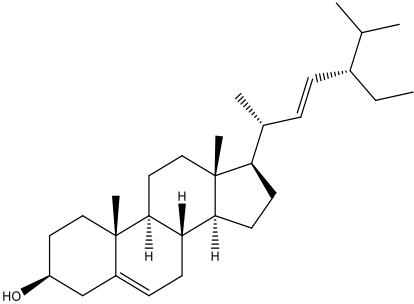
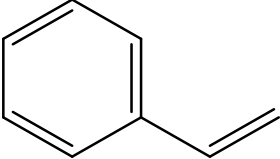
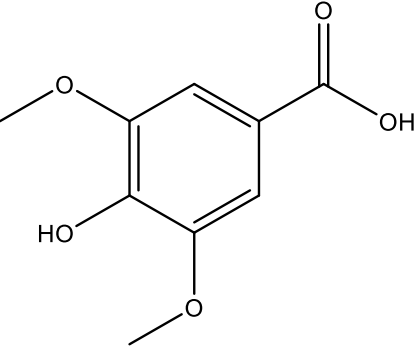
α-πινένιο	α-pinene	2,6,6-trimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-ene	
β-πινένιο	β-pinene	6,6-dimethyl-2-methylidenebicyclo[3.1.1]heptane	
ποριφεραστα-7,25-διενόλη	poriferasta-7,25-dienol	(3 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-6-[(9 <i>R</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>R</i> ,14 <i>R</i> ,17 <i>R</i>)-10,13-dimethyl-2,3,4,5,6,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1 <i>H</i> -cyclopenta[<i>a</i>]phenanthren-17-yl]-3-prop-1-en-2-ylheptan-1-ol	
πουλεγόνη	pulegone	(5 <i>R</i>)-5-methyl-2-propan-2-ylidenecyclohexan-1-one	

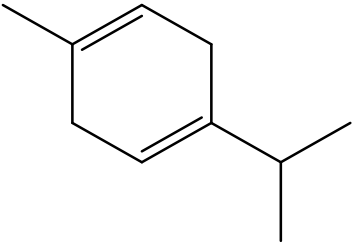
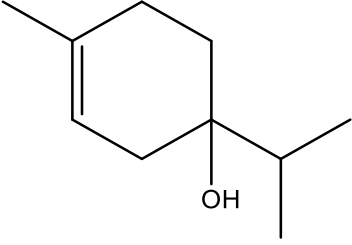
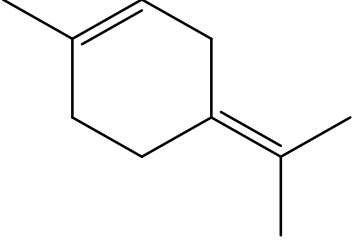
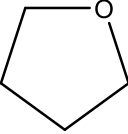
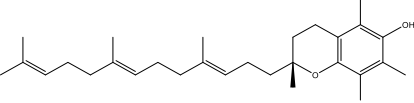
πρωτοκατεχουϊκό οξύ	protocatechuic acid	3,4-dihydroxybenzoic acid	
πυριδοξίνη	pyridoxine	4,5-bis(hydroxymethyl)-2-methylpyridin-3-ol	
πυροσταφυλικό οξύ	pyruvic acid	2-oxopropanoic acid	
ρεσβερατρόλη	resveratrol	5-[(<i>E</i>)-2-(4-hydroxyphenyl)ethenyl]benzene-1,3-diol	

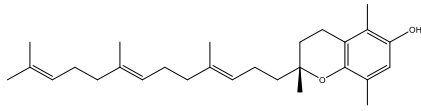
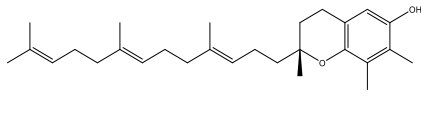
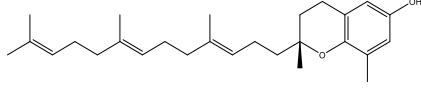
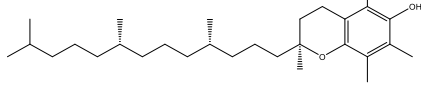
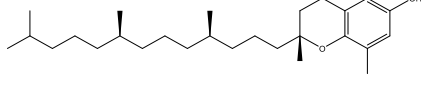
ρεσορκινόλη	resorcinol	benzene-1,3-diol	
ρετινόλη	retinol	(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,6 <i>E</i> ,8 <i>E</i>)-3,7-dimethyl-9-(2,6,6-trimethylcyclohexen-1-yl)nona-2,4,6,8-tetraen-1-ol	
ριβοφλαβίνη	riboflavin	7,8-dimethyl-10-[(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl]benzo[<i>g</i>]pteridine-2,4-dione	

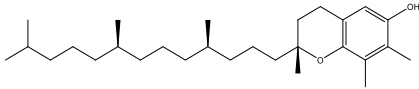
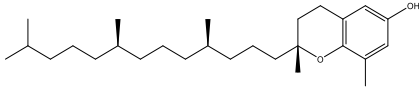
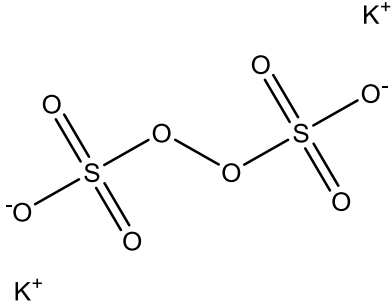
<p>σιναιπικό οξύ</p>	<p>sinapic acid</p>	<p>(<i>E</i>)-3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)prop-2-enoic acid</p>	
<p>β-σιτοστανόλη</p>	<p>β-sitostanol</p>	<p>(<i>8R,9S,10S,13R,14S,17R</i>)-17-[(<i>2R,5R</i>)-5-ethyl-6-methylheptan-2-yl]-10,13-dimethyl-2,3,4,5,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-tetradecahydro-1<i>H</i>-cyclopenta[<i>a</i>]phenanthren-3-ol</p>	
<p>β-σιτοστερόλη</p>	<p>β-sitosterol</p>	<p>(<i>3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R</i>)-17-[(<i>2R,5R</i>)-5-ethyl-6-methylheptan-2-yl]-10,13-dimethyl-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1<i>H</i>-cyclopenta[<i>a</i>]phenanthren-3-ol</p>	

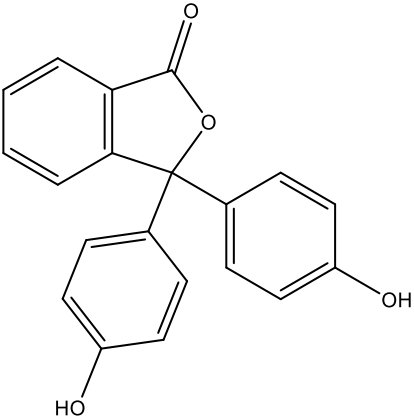
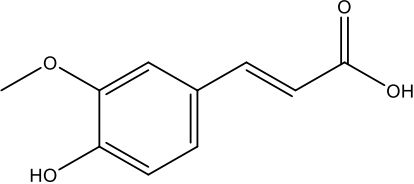
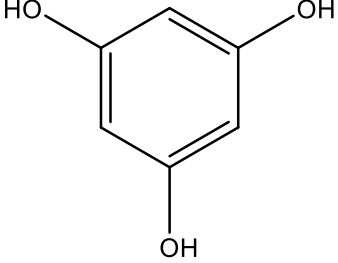
<p>δ5,24-στιγμασταδιενόλη</p>	<p>δ5,24-stigmastadienol</p>	<p>(6<i>R</i>)-6-[(8<i>S</i>,9<i>S</i>,10<i>R</i>,13<i>R</i>,14<i>S</i>,17<i>R</i>)-10,13-dimethyl-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1<i>H</i>-cyclopenta[<i>a</i>]phenanthren-17-yl]-3-propan-2-ylideneheptan-1-ol</p>	
<p>δ7-στιγμαστενόλη</p>	<p>δ7-stigmastenol</p>	<p>(3<i>R</i>,6<i>R</i>)-1,2,3,4,4,5,5-heptadeuterio-6-[(8<i>R</i>,9<i>S</i>,10<i>S</i>,13<i>R</i>,14<i>S</i>,17<i>R</i>)-10,13-dimethyl-2,3,4,5,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-tetradecahydro-1<i>H</i>-cyclopenta[<i>a</i>]phenanthren-17-yl]-3-propan-2-ylhept-1-en-1-ol</p>	

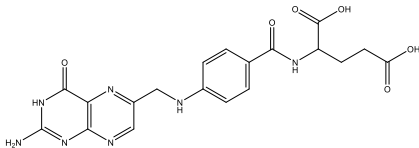
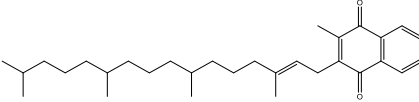
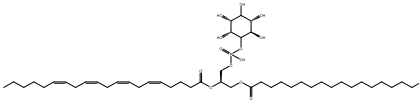
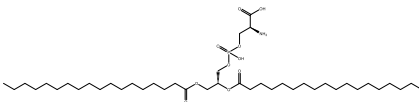
στιγμαστερόλη	stigmasterol	(3 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i> ,13 <i>R</i> ,14 <i>S</i> ,17 <i>R</i>)-17-[(<i>E</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-5-ethyl-6-methylhept-3-en-2-yl]-10,13-dimethyl-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1 <i>H</i> -cyclopenta[<i>a</i>]phenanthren-3-ol	
στυρένιο	styrene	styrene	
συριγγικό οξύ	syringic acid	4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoic acid	

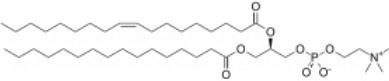
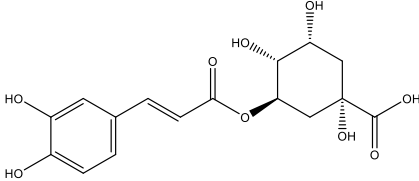
γ-τερπινένιο	γ-terpinene	1-methyl-4-propan-2-ylcyclohexa-1,4-diene	
τερπινεν-4-όλη	terpinen-4-ol	4-methyl-1-propan-2-ylcyclohex-3-en-1-ol	
α-τερπινολένιο	α-terpinolene	1-methyl-4-propan-2-ylidenecyclohexene	
τετραϋδροφουράνιο	tetrahydrofuran	oxolane	
α-τοκοτριενόλη	α-tocotrienol	(2R)-2,5,7,8-tetramethyl-2-[(3E,7E)-4,8,12-trimethyltrideca-	

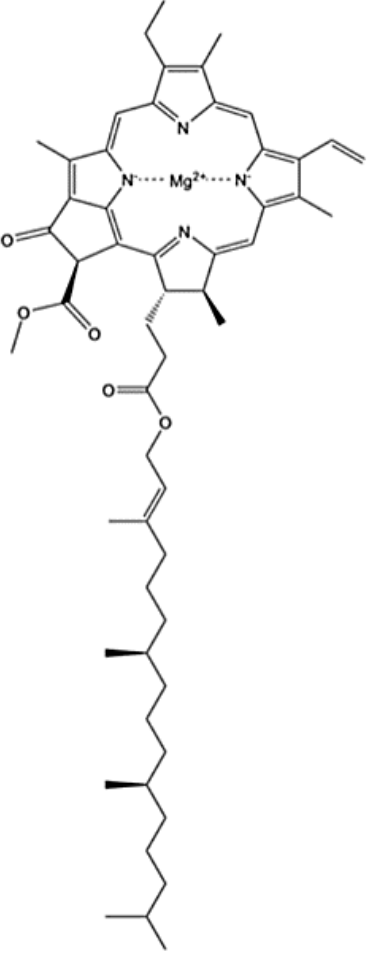
		3,7,11-trienyl]-3,4-dihydrochromen-6-ol	
β-τοκοτριενόλη	β-tocotrienol	(2 <i>R</i>)-2,5,8-trimethyl-2-[(3 <i>E</i> ,7 <i>E</i>)-4,8,12-trimethyltrideca-3,7,11-trienyl]-3,4-dihydrochromen-6-ol	
γ-τοκοτριενόλη	γ-tocotrienol	(2 <i>R</i>)-2,7,8-trimethyl-2-[(3 <i>E</i> ,7 <i>E</i>)-4,8,12-trimethyltrideca-3,7,11-trienyl]-3,4-dihydrochromen-6-ol	
δ-τοκοτριενόλη	δ-tocotrienol	(2 <i>R</i>)-2,8-dimethyl-2-[(3 <i>E</i> ,7 <i>E</i>)-4,8,12-trimethyltrideca-3,7,11-trienyl]-3,4-dihydrochromen-6-ol	
α-τοκοφερόλη	α-tocopherol	(2 <i>S</i>)-2,5,7,8-tetramethyl-2-[(4 <i>S</i> ,8 <i>S</i>)-4,8,12-trimethyltridecyl]-3,4-dihydrochromen-6-ol	
β-τοκοφερόλη	β-tocopherol	(2 <i>R</i>)-2,5,8-trimethyl-2-[(4 <i>R</i> ,8 <i>R</i>)-4,8,12-trimethyltridecyl]-3,4-dihydrochromen-6-ol	

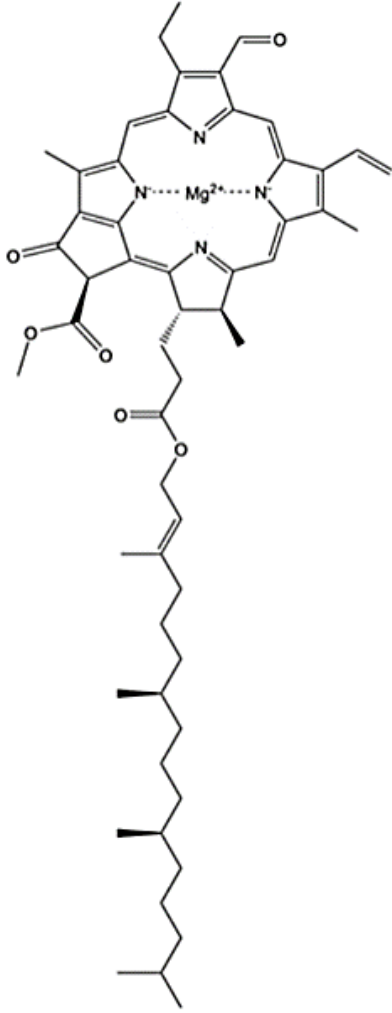
<p>γ-τοκοφερόλη</p>	<p>γ-tocopherol</p>	<p>(2<i>R</i>)-2,7,8-trimethyl-2-[(4<i>R</i>,8<i>R</i>)-4,8,12-trimethyltridecyl]-3,4-dihydrochromen-6-ol</p>	
<p>δ-τοκοφερόλη</p>	<p>δ-tocopherol</p>	<p>(2<i>R</i>)-2,8-dimethyl-2-[(4<i>R</i>,8<i>R</i>)-4,8,12-trimethyltridecyl]-3,4-dihydrochromen-6-ol</p>	
<p>υπερθειικό κάλιο</p>	<p>potassium persulfate</p>	<p>dipotassium sulfonatoxy sulfate</p>	

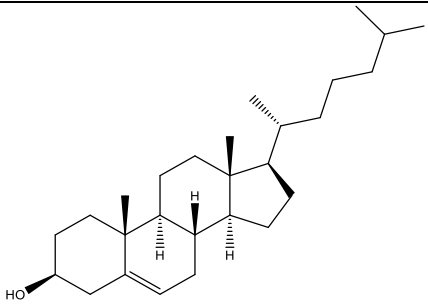
φαινολοφθαλεΐνη	phenolphthalein	3,3-bis(4-hydroxyphenyl)-2-benzofuran-1-one	
φερουλικό οξύ	ferulic acid	<i>(E)</i> -3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)prop-2-enoic acid	
φλορογλουκινόλη	phloroglucinol	benzene-1,3,5-triol	

φολικό οξύ	folic acid	(2 <i>S</i>)-2-[[4-[(2-amino-4-oxo-3H-pteridin-6-yl)methylamino]benzoyl]amino]pentanedioic acid	
φυλλοκινόνη	phylloquinone	2-methyl-3-[(<i>E</i>)-3,7,11,15-tetramethylhexadec-2-enyl]naphthalene-1,4-dione	
φωσφατιδυλινοσιτόλη	phosphatidylinositol	[(2 <i>R</i>)-1-[hydroxy-[(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-2,3,4,5,6-pentahydroxycyclohexyl]oxyphosphoryl]oxy-3-octadecanoyloxypropan-2-yl] (5 <i>Z</i> ,8 <i>Z</i> ,11 <i>Z</i> ,14 <i>Z</i>)-icosa-5,8,11,14-tetraenoate	
φωσφατιδυλοσερίνη	phosphatidylserine	(2 <i>S</i>)-2-amino-3-[[[(2 <i>R</i>)-2,3-di(octadecanoyloxy)propoxy]-hydroxyphosphoryl]oxypropanoic acid	

(R)-φωσφατιδυλοχολίνη	(R)-phosphatidylcholine	<i>(R)</i> -1-Oleoyl-2-almityl-phosphatidylcholine	
χλωρογενικό οξύ	chlorogenic acid	<i>(1S,3R,4R,5R)</i> -3-[(<i>E</i>)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)prop-2-enoyl]oxy-1,4,5-trihydroxycyclohexane-1-carboxylic acid	

<p>α-χλωροφύλλη</p>	<p>α-chlorophyll</p>	<p>magnesium methyl (3<i>R</i>,21<i>S</i>,22<i>S</i>)-16-ethenyl-11-ethyl-12,17,21,26-tetramethyl-4-oxo-22-[3-oxo-3-[(<i>E</i>,7<i>R</i>,11<i>R</i>)-3,7,11,15-tetramethylhexadec-2-enoxy]propyl]-23,25-diaza-7,24-diazanidahexacyclo[18.2.1.1^{5,8}.1^{10,13}.1^{15,18}.0^{2,6}]hexacos-1,5,8(26),9,11,13(25),14,16,18,20(23)-decaene-3-carboxylate</p>	
---------------------	----------------------	--	--

<p>β-χλωροφύλλη</p>	<p>β-chlorophyll</p>	<p>Magnesium of methyl (3<i>R</i>,21<i>S</i>,22<i>S</i>)-16-ethenyl-11-ethyl- 12-formyl-17,21,26-trimethyl-4- oxo-22-[3-oxo-3-[(<i>E</i>,7<i>R</i>,11<i>R</i>)- 3,7,11,15-tetramethylhexadec-2- enoxy]propyl]-23,25-diaza-7,24- diazanidahexacyclo[18.2.1.1^{5,8}.1^{10,1} 3.1^{15,18}.0^{2,6}]hexacosa- 1,5,8(26),9,11,13(25),14,16,18,20(2 3)-decaene-3-carboxylate</p>	
---------------------	----------------------	--	--

<p>χοληστερόλη</p>	<p>cholesterol</p>	<p>(3<i>S</i>,8<i>S</i>,9<i>S</i>,10<i>R</i>,13<i>R</i>,14<i>S</i>,17<i>R</i>)-10,13-dimethyl-17-[(2<i>R</i>)-6-methylheptan-2-yl]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1<i>H</i>-cyclopenta[<i>a</i>]phenanthren-3-ol</p>	
--------------------	--------------------	---	---

Επιστημονικές δημοσιεύσεις που προέκυψαν από τη διδακτορική διατριβή

1. Valasi, L., & Pappas C. S. (2021). Chemometric differentiation of pistachios (*Pistacia vera*, Greek ‘Aegina’ variety) from two different harvest years using FTIR spectroscopy and DRIFTS and disk techniques. *AppliedChem*, 1(1), 62-74. Doi:10.3390/appliedchem1010006.
2. Valasi, L., Kokotou, M. G., & Pappas C. S. (2021). GC-MS, FTIR and Raman spectroscopic analysis of fatty acids of *Pistacia vera* (Greek variety “Aegina”) oils from two consecutive harvest periods and chemometric differentiation of oils quality. *Food Research International*, 148, 110590. Doi:10.1016/j.foodres.2021.110590.
3. Valasi, L., Arvanitaki, D., Mitropoulou, A., Georgiadou, M., & Pappas, C. S. (2020). Study of the quality parameters and the antioxidant capacity for the FTIR-chemometric differentiation of *Pistacia Vera* oils. *Molecules*, 25, 1614. Doi:10.3390/molecules25071614.

Article

Study of the Quality Parameters and the Antioxidant Capacity for the FTIR-Chemometric Differentiation of *Pistacia Vera* Oils

Lydia Valasi ¹, Dimitra Arvanitaki ¹, Angeliki Mitropoulou ¹, Maria Georgiadou ² and Christos S. Pappas ^{1,*}

¹ Laboratory of Chemistry, Department of Food Science & Human Nutrition, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, 11855 Athens, Greece; lydia.valasi@aau.gr (L.V.); dimitrarvntk@gmail.com (D.A.); aggelikimitropoulou8@gmail.com (A.M.)

² Laboratory of Food Process Engineering, Department of Food Science & Human Nutrition, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, 11855 Athens, Greece; m.georgiadou@aau.gr

* Correspondence: chrispap@aau.gr; Tel.: +30-2105294262

Academic Editors: Severina Pacifico and Simona Piccolella

Received: 29 February 2020; Accepted: 30 March 2020; Published: 1 April 2020



Abstract: The aim of this work was to characterize the pistachio oil of the Greek variety, “Aegina”, evaluate its various quality indices, and investigate the potential use of FTIR as a tool to discriminate different oil qualities. For this purpose, the antioxidant capacity, the tocopherol content and the oxidation and degradation of fatty acids, as described by k , Δk , R -values, and free acidity were evaluated using 45 samples from eight different areas of production and two subsequent years of harvesting. The antioxidant capacity was estimated using 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid diammonium salt (ABTS) and 2,2-diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl)hydrazine (DPPH) assays, and the tocopherol content was quantified through HPLC analysis. FTIR spectra were recorded for all samples and multivariate analysis was applied. The results showed significant differences between the oil samples of different harvesting years, which were successfully discriminated by a representative FTIR spectral region based on R -value, total antioxidant capacity, and scavenging capacity, through ABTS. A similar approach could not be confirmed for the other quality parameters, such as the free acidity and the tocopherol content. This research highlighted the possibility of developing a simple, rapid, economic, and environment friendly method for the discrimination of pistachio oils according to their quality profile, through FTIR spectroscopy and multivariate analysis.

Keywords: *Pistacia vera*; antioxidant; quality; tocopherol; FTIR; discriminant analysis

1. Introduction

Pistacia, a genus of the *Anacardiaceae* family, includes at least eleven species, among them *Pistacia vera* L. is the only edible commercial species [1]. The pistachio nut is an important agricultural commodity for a number of countries. Iran, United States, Turkey, Syria, Greece, Italy, and Spain are the main pistachio producers [2]. Pistachio nut can be considered to be a functional food, and has recently been ranked among the first 50 food products with the highest antioxidant potential [3]. The Dietary Guidelines recommend that consuming nuts (almonds, hazelnuts, walnuts, pistachios, pecans, and peanuts) as a part of a daily diet has a beneficial effect on human health [4].

The increasing consumption and demand for novel edible oils has led to a market expansion for the plant-derived oils, which receive particular attention due to their attractive sensory characteristics and their high nutritional properties [5]. The pistachio (*Pistacia vera* L.) oil content ranges from 50% to

60% (dry weight) in kernels, depending mainly on the cultivar, crop year, and geographic location. Even though no specific standards for pistachio oil have been set by the Codex Alimentarius on Fats and Oils, it is claimed to be a niche product [6,7]. It has gained attention due to its special organoleptic characteristics [8] and its richness in some nutrients and health promoting compounds that exhibit high antioxidant capacity [9,10].

The most abundant components in pistachio oil are the fatty acids profiled as (mono- and poly-unsaturated, saturated, and as esters of triglycerides) [5]. The structure of fatty acids might change due to oxidation caused by bad agricultural practices, inappropriate harvesting time, and storage conditions, which can be detected by ultraviolet-visible (UV-Vis) spectroscopic measurements. Absorbencies at 232, 268, 270, and 274 nm are correlated with the state of oxidation, through the detection of secondary oxidation compounds, and possible adulteration with refined oils. Delta (Δ) k and R -value, resulting from the k_{232} , k_{268} , k_{270} , and k_{274} values, are quick indicators of quality assessment of pistachio oil discriminating between high and poor quality oil and are correlated with possible adulteration [11]. Furthermore, the hydrolysis of the oil results in the formation of free fatty acid (FFA) and glycerol residues, indicating that higher quality oils exhibit very low FFA percentage and acidity [12]. As a result, free acidity is claimed to be an early indicator of the potential storage stability of the product. Additionally, it should be mentioned that the formation of oxidized compounds in pistachio oil is blocked by its own natural preservatives that carry out an important antioxidant activity. Pistachio oil contains numerous phenolic compounds that increase its shelf life, and prevent or reduce the damage to cells, caused by free radicals. The evaluation of the total antioxidant capacity is certainly a very useful property of the pistachio oil, ensuring the preservation of the most important health benefits and sensory characteristics. Additionally, tocopherols' content is associated with health benefits, as confirmed by clinical evidence [13]. Tocopherols are the main antioxidant components that are equally active to vitamin E, thus, are considered to be important biofunctional compounds of the human diet. Due to their non-polar nature, their presence in oils is profound [7]. The major tocopherol isomer in pistachio oil is γ -tocopherol, the most prevalent form of vitamin E [14].

Published works have shown that Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy combined with statistical methods for the discrimination of wines, according to the variety and vintage year, can be used as a rapid, accurate, simple, environment friendly, and economical approach [15,16]. The chemical composition of pistachio oil might be influenced by several factors like variety, climatic and agronomic conditions (weather, soil), the growing season, and agricultural practices [17,18]. Very limited data are available in the literature for the quality profile of the pistachio oil that is extracted from the main Greek pistachio variety, "Aegina".

The present work focused on the characterization of the pistachio oil of the variety "Aegina", evaluated various quality indices, and investigated the potential use of FTIR as a tool to discriminate different oil qualities.

2. Results and Discussion

All pistachio oil samples were stored in a freezer ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), in order to maintain their initial quality until analysis. Storage at low temperatures prevents from increasing or reducing the concentrations of oil components and helps to maintain the oil's primary quality [19].

2.1. Oil Extraction

The oil yield ranged between 59.7%–68.2% w/w , with an average of $62.5 \pm 2.6\%$ w/w for the samples of 2017 and between 52.5%–64.8% w/w for the samples of 2018, with a mean value of $59.6 \pm 2.8\%$ w/w , respectively. No statistically significant differences were observed in the oil yield between the samples obtained in the two years.

2.2. Evaluation of Antioxidant Capacity

Total antioxidant capacity (TAC) and scavenging capacity of the analyzed pistachio oil samples, as measured by the DPPH and ABTS assays are shown in Table 1.

Table 1. Total antioxidant capacity (mM Trolox equivalents per mL pistachio oil) (TAC) and scavenging capacity (%) of pistachio oils of different regions, as determined through the 2,2-diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl)hydrazine (DPPH) and 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid diammonium salt (ABTS) assays.

Samples No	Origin	Year of Harvest	TAC		Scavenging Capacity	
			DPPH	ABTS	DPPH	ABTS
1	AEGINA	2017	6.05	7.10	37.69	68.14
2	AEGINA	2017	6.45	8.63	41.76	82.85
3	AEGINA	2017	6.35	8.60	44.29	84.95
4	AEGINA	2017	3.11	9.45	32.17	91.79
5	AEGINA	2017	3.17	4.92	32.44	45.28
6	AEGINA	2017	5.62	7.44	41.44	74.74
7	AEGINA	2017	3.82	5.46	34.94	48.50
8	MEGARA	2017	5.95	9.32	39.68	90.03
9	MEGARA	2017	5.36	9.01	37.82	85.15
10	MEGARA	2017	3.21	9.44	28.75	90.84
11	MEGARA	2017	6.70	5.02	39.02	42.53
12	PHTHIOTIS	2017	3.59	10.02	31.51	97.25
13	PHTHIOTIS	2017	6.45	9.02	39.42	88.70
14	PHTHIOTIS	2017	4.96	7.85	37.07	73.33
15	TRIZINA	2017	4.68	8.73	35.33	81.85
16	AEGINA	2018	2.12	9.63	39.30	82.26
17	AEGINA	2018	7.92	8.23	37.97	76.33
18	AEGINA	2018	7.10	8.91	42.70	83.65
19	AEGINA	2018	6.49	8.58	40.40	84.02
20	AEGINA	2018	1.99	7.99	40.52	74.89
21	AEGINA	2018	8.44	8.61	47.87	82.05
22	AEGINA	2018	4.83	8.38	34.05	77.05
23	AEGINA	2018	5.86	9.46	40.19	90.34
24	AEGINA	2018	5.30	7.71	34.84	66.41
25	AEGINA	2018	7.47	8.27	38.43	75.91
26	AEGINA	2018	6.70	8.72	41.40	86.10
27	AEGINA	2018	5.69	7.96	36.21	73.62
28	EVI A	2018	5.51	7.07	36.83	64.38
29	EVI A	2018	3.80	9.49	28.96	91.06
30	EVI A	2018	6.67	9.22	40.32	88.08
31	MEGARA	2018	0.28	9.61	32.01	91.97
32	MEGARA	2018	6.47	8.58	24.12	81.59
33	MEGARA	2018	7.35	8.98	38.53	85.76
34	MEGARA	2018	5.34	8.76	35.45	80.68
35	MEGARA	2018	7.45	9.63	43.20	94.15
36	TRIZINA	2018	7.65	8.47	44.10	77.16
37	PHTHIOTIS	2018	5.84	9.80	38.83	93.99
38	PHTHIOTIS	2018	6.04	6.78	40.30	61.75
39	PHTHIOTIS	2018	0.10	9.22	31.87	87.01
40	PHTHIOTIS	2018	1.35	9.83	36.60	94.10
41	PHTHIOTIS	2018	1.40	8.28	36.50	74.18
42	PHTHIOTIS	2018	5.82	10.00	36.09	96.60
43	VOLOS	2018	10.28	9.95	52.29	96.31
44	THIVA	2018	7.34	9.87	43.04	95.39
45	AVLONAS	2018	8.43	9.16	45.60	88.19

The Trolox calibration curve equations used for transforming absorbance inhibition values (AI) to Trolox equivalents (TE, mM) for the DPPH and ABTS assays, were Equations (1) and (2), respectively.

$$AI_{DPPH} = (-0.388) \times TE + 0.797, R^2 = 0.971 \quad (1)$$

$$AI_{ABTS} = (-0.675) \times TE + 0.695, R^2 = 0.995 \quad (2)$$

Antioxidant capacity, as determined by the DPPH assay, ranged between 3.11–6.70 mM with a mean TAC value of 5.03 ± 1.3 mM, and between 0.10–10 with a mean TAC value of 5.57 ± 2.56 mM, for the samples of 2017 and 2018, respectively. Following this, the scavenging capacity ranged between 28.75%–44.29% and 28.96%–52.29% for the samples of 2017 and 2018, with mean values of $36.89 \pm 4.33\%$ and $38.62 \pm 5.55\%$, respectively.

TAC values, as determined by the ABTS assay, ranged between 4.92–10.02 mM and 7.07–10.00 mM for the samples of 2017 and 2018, respectively, resulting in mean TAC values of 8.00 ± 1.68 mM and 8.84 ± 0.84 mM. The scavenging capacity, as measured by the ABTS assay, ranged between 42.53%–97.25%, with an average of $76.39 \pm 17.75\%$ for the 2017 samples and between 61.75%–96.6% for the 2018 samples, with a mean value of $83.17 \pm 9.56\%$.

Concerning mean TAC and mean scavenging capacity values, results from the ABTS assay were significantly and consistently higher than those from DPPH in both years of harvest. This was due to the applicability of DPPH to hydrophobic systems. Specifically, DPPH was discolored in the presence of compounds that were capable of either transferring an electron or donating hydrogen (lipophilic components). On the other hand, ABTS was freely soluble in both organic and aqueous solvents, thus, it could be used to screen both hydrophilic and lipophilic antioxidants, exhibiting a better estimation of the overall antioxidant capacity of the foods [20,21]. Consequently, the results that were obtained from the ABTS assay were only considered for further statistical analysis. TAC and scavenging capacity, as estimated by ABTS were statistically different between 2017 and 2018. The differences were statistically significant.

2.3. UV-Vis Spectroscopic Assessment

The quality indices associated with the k_{232} , k_{268} , k_{270} , k_{274} , Δk , and R values were evaluated in 45 pistachio oil samples and the results are displayed in Table 2. The European Quality Standard of Commission Regulation (EEC) No 2568/91 (Annex IX of the Regulation) has set the standard values for extra virgin olive oil (EVOO), as described in Table 2. Considering that an official protocol to predict the quality indicators of the pistachio oil or other nut oils based on the Δk and R-value has not been established, the existing limits were used for the evaluation of pistachio oil samples.

The quality of the oil was assessed by the UV-Vis absorption screening, which identifies changes in the structure of fatty acids due to oxidation. A low absorption in this region is indicative of high-quality oil, whereas old, refined, and generally poor-quality oils show a greater level of absorption in this region, implying high degree of oxidation. The absorbance at 232 nm is caused by hydroperoxides (primary stage of oxidation) and conjugated dienes (intermediate stage of oxidation). The absorbance at 270 nm was caused by carbonylic compounds (secondary stage of oxidation) and conjugated trienes (technological treatments). In the oils, due to oxygen fixation in linolenic and linoleic acids' double bond position, hydroperoxides arise. The double bond provokes the formation of conjugate diene systems between the carbon atoms. This kind of conjugate systems presents a maximum absorption at 232 nm. During more advanced oxidation states, the products are generated with conjugate diene systems of carbon–oxygen. The maximum absorption in this case ranges between 260–280 nm [11].

Table 2. Ultraviolet–visible (UV–Vis) spectroscopy, acid values (AV), and free fatty acid (FFA) of pistachio oil samples against the extra virgin olive oil (EVOO) corresponding values.

Samples No	k ₂₃₂	k ₂₆₈	k ₂₇₀	k ₂₇₄	Δk	R	AV ¹ (as oleic acid)	% FFA ¹
EVOO	≤2.50	≤0.22	≤0.22	≤0.22	≤0.01	≤11.36	≤4.000	≤0.350
1	0.126	0.009	0.009	0.010	0.000	14.073	6.615 ± 0.000	3.327 ± 0.000
2	0.129	0.015	0.015	0.015	0.000	8.547	3.186 ± 0.325	1.603 ± 0.163
3	0.146	0.010	0.011	0.011	0.000	13.759	2.249 ± 0.000	1.131 ± 0.000
4	0.148	0.011	0.011	0.011	0.000	13.550	1.676 ± 0.019	0.843 ± 0.010
5	0.145	0.017	0.018	0.018	0.000	8.155	1.676 ± 0.019	0.843 ± 0.010
6	0.172	0.020	0.020	0.021	0.000	8.430	1.676 ± 0.019	0.843 ± 0.010
7	0.164	0.010	0.011	0.011	0.000	15.537	3.373 ± 0.000	1.697 ± 0.000
8	0.156	0.013	0.013	0.014	0.000	11.672	1.687 ± 0.000	0.848 ± 0.000
9	0.166	0.020	0.020	0.021	0.000	8.308	0.532 ± 0.001	0.268 ± 0.000
10	0.132	0.014	0.014	0.015	0.000	9.277	1.102 ± 0.000	0.555 ± 0.000
11	0.173	0.027	0.027	0.027	0.000	12.281	2.509 ± 0.336	1.262 ± 0.169
12	0.159	0.018	0.019	0.019	0.000	8.550	1.687 ± 0.000	0.848 ± 0.000
13	0.142	0.009	0.009	0.009	0.000	15.987	1.124 ± 0.000	0.566 ± 0.000
14	0.157	0.013	0.013	0.013	0.000	11.996	1.102 ± 0.000	0.555 ± 0.000
15	0.173	0.025	0.025	0.025	0.000	6.854	1.676 ± 0.019	0.843 ± 0.010
16	0.070	0.011	0.011	0.012	0.000	6.190	0.821 ± 0.007	0.413 ± 0.003
17	0.075	0.016	0.016	0.016	0.000	4.699	0.805 ± 0.269	0.405 ± 0.135
18	0.069	0.011	0.011	0.011	0.000	6.248	1.171 ± 0.166	0.589 ± 0.083
19	0.071	0.011	0.011	0.012	0.000	6.179	0.994 ± 0.161	0.500 ± 0.081
20	0.052	0.007	0.008	0.008	0.000	6.806	0.982 ± 0.164	0.494 ± 0.082
21	0.068	0.011	0.012	0.012	0.000	5.842	1.087 ± 0.009	0.547 ± 0.004
22	0.056	0.012	0.012	0.013	0.000	4.524	1.362 ± 0.270	0.685 ± 0.136
23	0.073	0.014	0.014	0.014	0.000	5.254	0.989 ± 0.148	0.498 ± 0.074
24	0.059	0.020	0.020	0.020	0.000	2.879	8.116 ± 0.191	4.082 ± 0.096
25	0.071	0.011	0.011	0.012	0.000	6.202	0.807 ± 0.014	0.406 ± 0.007
26	0.053	0.008	0.008	0.008	0.000	6.933	1.279 ± 0.163	0.643 ± 0.082
27	0.074	0.015	0.015	0.016	0.000	4.831	0.995 ± 0.166	0.500 ± 0.083
28	0.068	0.012	0.012	0.012	0.000	5.647	1.079 ± 0.015	0.543 ± 0.008
29	0.070	0.013	0.014	0.014	0.000	5.197	0.800 ± 0.251	0.402 ± 0.126
30	0.075	0.019	0.019	0.018	0.000	4.067	0.709 ± 0.614	0.357 ± 0.309
31	0.073	0.015	0.015	0.016	0.000	4.865	1.004 ± 0.156	0.505 ± 0.078
32	0.070	0.011	0.011	0.011	0.000	6.431	1.078 ± 0.023	0.542 ± 0.011
33	0.054	0.011	0.012	0.012	0.000	4.666	0.978 ± 0.151	0.492 ± 0.076
34	0.069	0.014	0.014	0.014	0.000	4.871	0.819 ± 0.277	0.412 ± 0.139
35	0.072	0.014	0.014	0.015	0.000	5.050	1.007 ± 0.157	0.506 ± 0.079
36	0.072	0.017	0.017	0.018	0.000	4.228	0.982 ± 0.161	0.494 ± 0.081
37	0.070	0.012	0.012	0.013	0.000	5.764	0.898 ± 0.151	0.452 ± 0.076
38	0.054	0.009	0.009	0.009	0.000	6.118	1.004 ± 0.157	0.505 ± 0.079
39	0.053	0.010	0.011	0.011	0.000	5.009	0.808 ± 0.016	0.406 ± 0.008
40	0.072	0.013	0.014	0.014	0.000	5.316	0.632 ± 0.155	0.318 ± 0.078
41	0.053	0.011	0.011	0.011	0.000	4.969	1.009 ± 0.160	0.507 ± 0.080
42	0.068	0.012	0.012	0.012	0.000	5.690	0.913 ± 0.164	0.459 ± 0.083
43	0.070	0.012	0.012	0.013	0.000	5.771	0.821 ± 0.004	0.413 ± 0.002
44	0.070	0.010	0.010	0.011	0.000	6.848	0.821 ± 0.007	0.413 ± 0.003
45	0.053	0.010	0.010	0.010	0.000	5.476	0.911 ± 0.166	0.458 ± 0.083

¹ mean ± SD (n = 3).

The mean k values for each harvesting year were 0.15 ± 0.02 (2017), 0.07 ± 0.01 (2018), 0.01 ± 0.01 (2017), 0.01 ± 0.00 (2018), 0.02 ± 0.01 (2017), 0.01 ± 0.00 (2018), 0.02 ± 0.01 (2017), and 0.01 ± 0.00 (2018) for k₂₃₂, k₂₆₈, k₂₇₀, and k₂₇₄, respectively. Δk was 0.00 ± 0.00 for all samples, regardless of the year of harvest or the origin. The mean R-values were 11.13 ± 3.00 and 5.42 ± 0.91, for the samples of 2017 and 2018, respectively.

There were no significant differences between the years of harvest, based on k and Δk , as all measurements ranged into the high-quality limits. As for the R -value, the 2017 samples were systematically higher than 2018 samples. Specifically, 82% of the samples, which mostly originated from 2018 harvest complied with the EVOO standard, except for the R -value of the remaining 18% of the total samples, which belonged to the 2017 harvest (samples 1, 3, 4, 7, 8, 11, 13, and 14).

2.4. Acid (AV) and FFA Values

AV value is a measure of the number of carboxylic acid groups. It is used as an indicator for edibility of oil and is expressed in milligrams per gram. However, FFA are expressed as a percentage of oleic acid. According to the Codex Standard for Edible Fats and Oils, acid value of oil suitable for edible purposes should not exceed 4 mg/g.

FFA has been reported to play a very important role in the aroma and flavor. FFA also contributes to the organoleptic quality of foods, when present in adequate concentration. FFA content is an index of lipase activity and an indicator of freshness, storage time, and stability of many fat-rich foods. It is well-known that FFAs are more susceptible to lipid oxidation, leading to rancidity and production of off-odor, compared to intact fatty acids in triglycerides. It is considered to be an early indicator of the storage stability of the oil [22], with a supreme limit that is less than 0.35% [11].

As presented in Table 2, the AV ranged from 0.53 to 6.61 and from 0.63 to 8.12 mg/g for 2017 and 2018, respectively. The mean AV (1.19 ± 1.32 mg/g oil) of 2018 exhibited lower values than the mean AV (2.12 ± 1.46 mg/g oil) of 2017. The FFA content ranged from 0.27% to 3.33% and from 0.32% to 4.08% for 2017 and 2018, respectively. Similarly, the mean FFA ($0.60 \pm 0.66\%$) of 2018 was lower than the mean FFA (1.07 ± 0.73) of 2017, leading to the conclusion that the 2018 harvesting exhibited a superior antioxidant capacity. Based on the standard for edible oils, only two samples (No. 1 and No. 24) from the area of Aegina showed values out of the acceptable levels of AV, whereas only two samples (No. 9 and No. 40) exhibited acceptable levels of FFA content.

2.5. Tocopherol Analysis

The limit of detection (LOD) for tocopherol analysis was 0.15 $\mu\text{g/mL}$. The tocopherol calibration curves used for the qualitative separation of samples were (Equations (3)–(6)):

$$\text{Area (mV} \times \text{s)} = 8.0556 \times C_{\alpha\text{-T}} (\mu\text{g/mL}) + 0.531, R^2 = 0.999 \quad (3)$$

$$\text{Area (mV} \times \text{s)} = 10.724 \times C_{\beta\text{-T}} (\mu\text{g/mL}) + 1.9311, R^2 = 0.998 \quad (4)$$

$$\text{Area (mV} \times \text{s)} = 13.786 \times C_{\gamma\text{-T}} (\mu\text{g/mL}) + 2.5428, R^2 = 0.978 \quad (5)$$

$$\text{Area (mV} \times \text{s)} = 14.617 \times C_{\delta\text{-T}} (\mu\text{g/mL}) + 2.1461, R^2 = 0.997 \quad (6)$$

As for recovery evaluation, the amount of vitamin E isomers added to the samples corresponded to 98.47%, 77.86%, 47.44%, and 110.37% (Equation (14)) of the expected α -T, β -T, γ -T, and δ -T, and the intraday analytical precision was 3.08%, 5.99%, 4.89%, and 2.75% (Equation (15)), respectively.

Figure 1 illustrates the separation of the most important vitamin E isomers, as determined with the HPLC method, using fluorescence detection. The retention times for the α -, β -, γ -, and δ -tocopherols were 8, 10, 12, and 16 min, approximately. The concentration of each tocopherol for all 45 pistachio oil samples is presented in Table 3. The results were obtained and corrected on the basis of recovery and repeatability of the method, as determined by the coefficient of variation (CV). The tocopherol contents of pistachio oils expressed as $10^2 \mu\text{g/mL}$ pistachio oil, ranged from 0.53 (No. 25) to 5.90 (No. 43), 0.33 (No. 13) to 2.25 (No. 29), 97.56 (No. 36) to 235.06 (No. 6), and 0.84 (No. 12) to 2.31 (No. 20) for α -, β -, γ -, and δ -tocopherol, respectively. The above minimum and maximum values corresponded to 13.25–147.50, 8.25–56.25, 2439.00–5876.50, and 21.00–57.75 mg/kg of pistachio oil for α -, β -, γ -, and δ -tocopherol, respectively. It is important to mention that γ -tocopherol is coeluted with β -tocotrienol, as a result, the calculated content of γ -tocopherol includes both isomers. The data indicate that the

main form in all samples was γ -tocopherol (by coelution with β -tocotrienol), whereas the β -tocopherol content was limited. These results are in agreement with Martinez et al. (2016) [23]. The minimum and maximum values of each tocopherol presented in the samples were compared to the standard for vegetable oils provided by the Codex Alimentarius Commission on Fats and Oils (Table 4). With regards to pistachio oils, the quantity of α - and δ -tocopherol, as measured in the present work for the variety "Aegina", ranges within the limits that have been set by the standard. However, no values were described for the β -tocopherol and β -tocotrienol, in contrast to the present study.

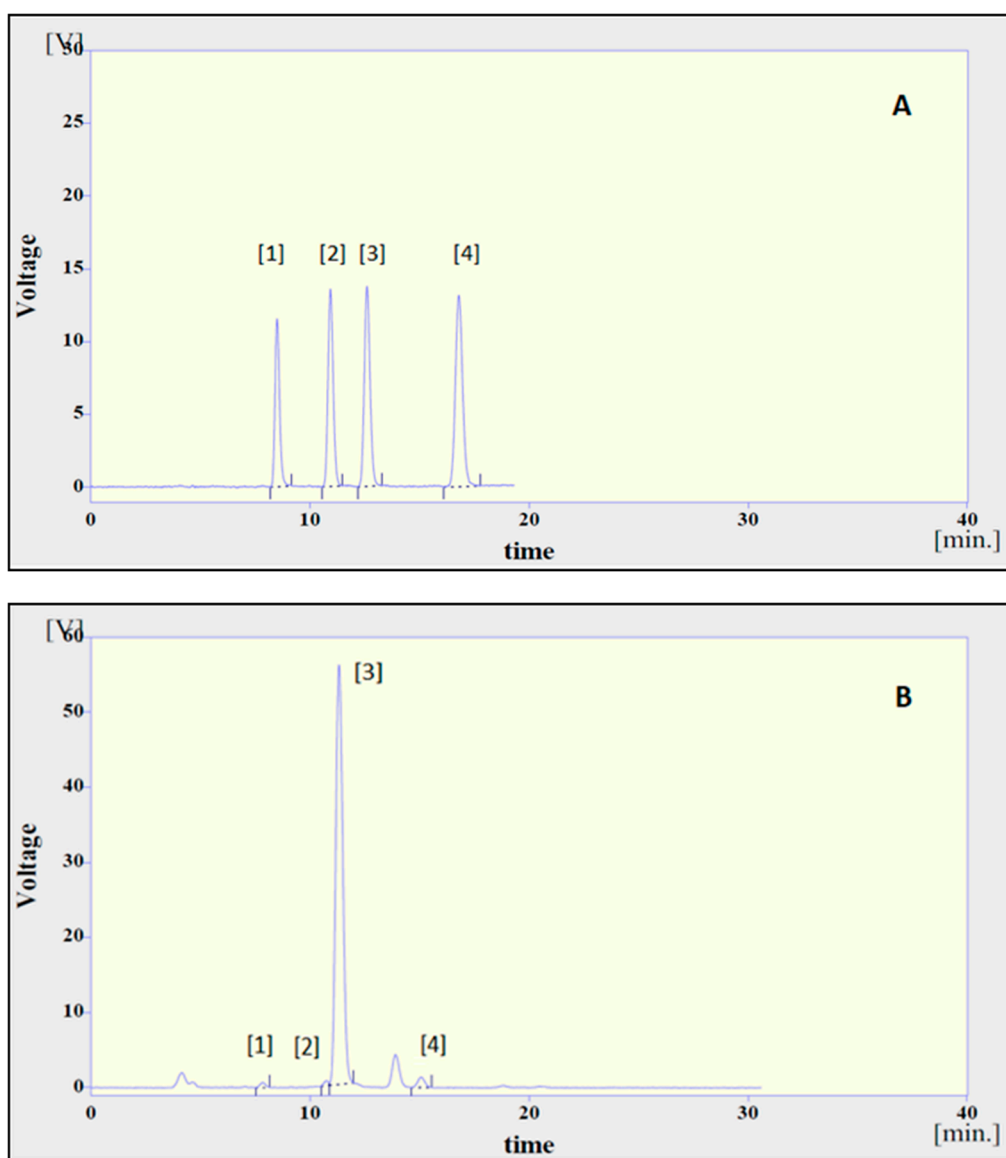


Figure 1. Chromatogram of a working standard mixture (A) and of a pistachio oil sample (B), determined through high performance liquid chromatography (HPLC)-fluorescence. Peaks: 1, α -tocopherol; 2, β -tocopherol; 3, γ -tocopherol, and β -tocotrienol; 4, δ -tocopherol.

Table 3. Tocopherol (T) content ($\times 10^2$ $\mu\text{g/mL}$ pistachio oil) obtained by Soxhlet extraction and repeatability assessment.

Samples No	Concentration ¹				Repeatability (CV %, $n = 3$)			
	α -T	β -T	γ -T ²	δ -T	α -T	β -T	γ -T	δ -T
1	1.57 \pm 0.16	1.07 \pm 0.24	186.77 \pm 3.65	1.79 \pm 0.04	10.52	22.26	1.95	2.13
2	1.32 \pm 0.10	1.14 \pm 0.19	202.72 \pm 12.77	1.73 \pm 0.13	7.45	16.60	6.30	7.35
3	0.99 \pm 0.05	0.63 \pm 0.09	191.13 \pm 4.38	1.57 \pm 0.02	4.94	13.88	2.29	1.62
4	1.73 \pm 0.15	0.39 \pm 0.05	222.09 \pm 10.95	1.59 \pm 0.05	8.54	12.38	4.93	3.09
5	1.86 \pm 0.30	0.45 \pm 0.24	187.09 \pm 3.09	1.80 \pm 0.15	16.21	52.60	1.65	8.10
6	3.12 \pm 0.29	1.13 \pm 0.46	235.06 \pm 7.77	2.11 \pm 0.07	9.27	40.99	3.31	3.42
7	2.13 \pm 0.12	1.10 \pm 0.10	210.49 \pm 18.33	1.77 \pm 0.14	5.86	8.88	8.71	7.83
8	1.53 \pm 0.16	1.06 \pm 0.04	174.01 \pm 6.78	1.37 \pm 0.09	10.31	4.14	3.89	6.62
9	0.59 \pm 0.17	0.97 \pm 0.17	173.56 \pm 11.78	1.41 \pm 0.11	29.47	17.01	6.79	8.17
10	1.24 \pm 0.07	0.38 \pm 0.03	173.29 \pm 5.46	1.06 \pm 0.09	5.72	7.18	3.15	8.38
11	1.71 \pm 0.27	0.98 \pm 0.12	170.07 \pm 12.59	1.78	15.60	12.51	7.41	0.10
12	1.32 \pm 0.18	0.83 \pm 0.31	134.59 \pm 4.15	0.84 \pm 0.22	13.46	37.48	3.08	26.52
13	1.80 \pm 0.13	0.33 \pm 0.20	199.49 \pm 7.96	1.60 \pm 0.06	7.49	60.45	3.99	3.48
14	3.37 \pm 0.44	0.55 \pm 0.15	231.93 \pm 9.84	1.17 \pm 0.19	12.96	26.87	4.24	16.08
15	1.87 \pm 0.17	0.48 \pm 0.07	199.88 \pm 6.87	1.58 \pm 0.12	9.16	14.98	3.44	7.35
16	2.29 \pm 0.06	1.25 \pm 0.06	193.13 \pm 5.12	2.01 \pm 0.14	2.75	4.69	2.65	7.11
17	1.59 \pm 0.08	0.86 \pm 0.11	184.07 \pm 9.59	1.81 \pm 0.01	5.20	13.06	5.21	0.39
18	4.10 \pm 0.08	1.68 \pm 0.11	223.82 \pm 2.45	2.20 \pm 0.09	2.04	6.45	1.09	4.24
19	2.83 \pm 0.20	1.26 \pm 0.11	201.78 \pm 9.48	1.89 \pm 0.22	7.16	8.61	4.70	11.67
20	2.78 \pm 0.35	0.87 \pm 0.15	204.80 \pm 2.12	2.31 \pm 0.28	12.65	17.70	1.04	12.12
21	3.22 \pm 0.67	0.77 \pm 0.07	195.44 \pm 5.02	1.97 \pm 0.04	20.91	8.57	2.57	1.91
22	1.72 \pm 0.14	1.33 \pm 0.03	152.10 \pm 2.14	1.73 \pm 0.13	8.33	2.01	1.41	7.36
23	1.73 \pm 0.02	0.65 \pm 0.12	157.93 \pm 4.27	1.79 \pm 0.03	1.04	18.85	2.70	1.79
24	2.15 \pm 0.20	0.83 \pm 0.11	213.88 \pm 3.55	2.12 \pm 0.04	9.29	13.35	1.66	1.99
25	0.53 \pm 0.03	1.01 \pm 0.28	114.45 \pm 39.60	1.43 \pm 0.43	6.62	27.72	34.60	30.02
26	2.56 \pm 0.17	1.79 \pm 0.34	196.23 \pm 2.86	1.99 \pm 0.10	6.73	19.18	1.46	5.07
27	1.88 \pm 0.25	0.96 \pm 0.08	203.79 \pm 2.77	2.13 \pm 0.08	13.14	8.17	1.36	3.78
28	4.39 \pm 0.15	1.79 \pm 0.11	216.32 \pm 7.47	1.88 \pm 0.07	3.35	6.38	3.45	3.52
29	3.07 \pm 0.28	2.25 \pm 0.14	174.04 \pm 4.57	1.79 \pm 0.11	9.03	6.40	2.63	6.02
30	3.51 \pm 0.22	1.37 \pm 0.16	178.60 \pm 6.09	1.73 \pm 0.13	6.36	11.48	3.41	7.28
31	2.93 \pm 0.12	0.66 \pm 0.07	160.22 \pm 2.28	1.41 \pm 0.17	4.15	11.13	1.42	12.27
32	1.98 \pm 0.20	1.75 \pm 0.21	191.41 \pm 7.90	2.17 \pm 0.31	10.17	12.13	4.13	14.22
33	0.70 \pm 0.11	1.11 \pm 0.08	119.08 \pm 4.32	1.29 \pm 0.03	15.51	7.03	3.62	2.64
34	2.26 \pm 0.41	0.45 \pm 0.00	156.43 \pm 1.80	1.33 \pm 0.04	18.36	0.56	1.15	3.26
35	2.23 \pm 0.48	1.58 \pm 0.16	203.53 \pm 5.74	1.96 \pm 0.24	21.50	9.91	2.82	12.24
36	1.56 \pm 0.22	1.07 \pm 0.32	97.56 \pm 8.15	1.58 \pm 0.03	14.41	30.46	8.36	2.11
37	3.28 \pm 0.07	0.62 \pm 0.02	157.49 \pm 5.24	1.20 \pm 0.12	2.22	3.61	3.33	10.15
38	4.15 \pm 0.04	0.78 \pm 0.07	185.36 \pm 11.25	1.50 \pm 0.04	1.03	9.21	6.07	2.41
39	2.11 \pm 0.19	1.82 \pm 0.21	164.57 \pm 23.70	1.96 \pm 0.74	9.01	11.51	14.40	37.91
40	1.47 \pm 0.13	1.96 \pm 0.06	169.36 \pm 7.54	1.79 \pm 0.10	8.67	3.24	4.45	5.86
41	2.47 \pm 0.43	0.71 \pm 0.09	158.31 \pm 14.51	1.46 \pm 0.32	17.35	12.85	9.16	21.66
42	4.20 \pm 0.07	2.22 \pm 0.65	170.70 \pm 2.42	1.90 \pm 0.02	1.68	29.47	1.42	1.20
43	5.90 \pm 0.22	1.56 \pm 0.37	225.78 \pm 5.51	1.99 \pm 0.05	3.69	23.81	2.44	2.76
44	1.98 \pm 0.19	0.70 \pm 0.02	157.50 \pm 4.63	1.59 \pm 0.05	9.69	2.29	2.94	2.99
45	2.58 \pm 0.11	ND ³	216.02 \pm 3.06	1.98 \pm 1.12	4.47	-	1.42	56.55

¹ expressed as mean \pm SD; ² γ -T is co-eluted with β -tocotrienol; ³ ND = Not Detected.

Table 4. Limits (min–max) of tocopherol content (mg/kg dried sample) for different vegetable oils, according to the Codex Alimentarius Commission on Fats and Oils Standard.

Oils	α -T	β -T	γ -T	δ -T	Total
almond	20–545	ND ¹ –10	5–104	ND–5	20–600
hazelnut	100–420	6–12	18–194	ND–10	200–600
walnut	ND–170	ND–110	120–400	ND–60	309–455
pistachio	10–330	ND	0–100	ND–50	100–600
flax/linseed	2–20	ND	100–712	3–14	150–905
avocado	50–450	ND	10–20	ND–10	50–450

¹ ND = Not Detected.

The mean values of each harvesting year were 1.74 ± 0.72 (2017), 2.60 ± 1.15 (2018), 0.77 ± 0.31 (2017), 1.19 ± 0.55 (2018), 192.81 ± 26.41 (2017), 178.12 ± 32.01 (2018), 1.55 ± 0.33 (2017), and 1.80 ± 0.29 (2018), expressed as $10^2 \mu\text{g/mL}$ pistachio oil for α -, β -, γ -, and δ -tocopherol, respectively. The aforementioned values corresponded to a total tocopherol content of 196.87 for the 2017 harvest and 183.71 for 2018 (expressed as $10^2 \mu\text{g/mL}$ pistachio oil).

2.6. FTIR Spectroscopy Study

Figure 2 shows two representative FTIR spectra of a pistachio oil sample with its basic peaks marked. The presented spectra depict samples of common origin but of different harvesting year. It is interesting to note that both spectra are optically very similar and, thus, the use of discriminant analysis is necessary. Each peak corresponds to a certain wavenumber that is attributed to specific vibrations and chemical structures of components from pistachio oil (Table 5).

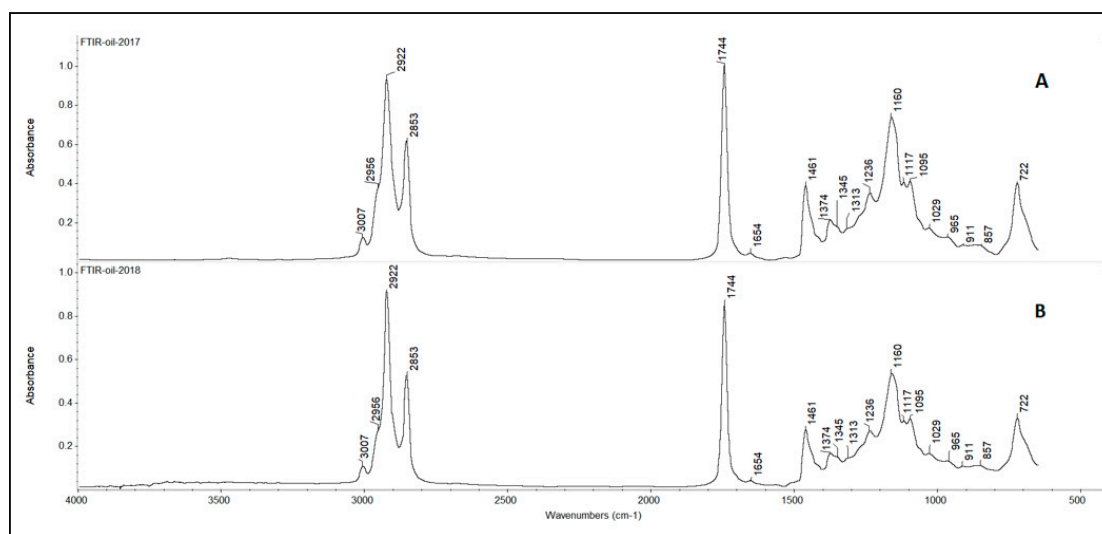
**Figure 2.** Representative FTIR spectra of pistachio oil samples from the same origin, but from different years of harvest, 2017 (A) and 2018 (B).

Table 5. Peak correspondence of the pistachio oil FTIR spectra.

Wavenumber (cm ⁻¹)	Function Group	Abbreviations	Reference
3007	C-H symmetric stretching vibration of -CH ₃	v _s (CH ₃)	[24–26]
2956	C-H asymmetric stretching vibration of -CH ₃	v _{as} (CH ₃)	[27]
2922	C-H asymmetric stretching vibration of -CH ₂ -	v _{as} (CH ₂)	[24–26,28–30]
2853	C-H symmetric stretching vibration of -CH ₂ -	v _s (CH ₂)	[24,26–28,30]
1744	C=O stretching vibration	v(C=O)	[24,25,28,29]
1654	>C=C< cis-olefinic stretching vibration	v(C=C)	[24]
1461	C-H in-plane bending vibration of -CH ₂ - (scissoring)	δ _s (CH ₂)	[24,26,30,31]
1374	C-H symmetric bending vibration of -CH ₃	δ(CH ₃)	[25,27,28,30]
1345, 1313	-CH ₂ - out-of-plane bending vibration (wagging)	ω(CH ₂)	[27]
1236, 1160, 1117	C-O asymmetric stretching vibration	v _{as} (C-O)	[25,27,28,30,31]
1095, 1029	in-phase-C-C stretching vibration	γ(C-C)	[27,30]
965	C-H in-plane bending vibration (scissoring)	δ _s (C=C=C)	[27,28]
911, 857	-CH ₂ - plane vibration	γ(CH ₂)	[27,28]
722	-CH=CH- cis-stretching vibration	v(C=C)	[24,28,29]

Pistachios are rich in lipids (48%–63%), with a balanced content of mono- (56%–77%) and poly-unsaturated (10%–31%) fatty acids, protein (18%–22%), and dietary fibers (8%–12%). Moreover, they present a high content of bioactive compounds, such as tocopherols, phytosterols, and phenolic compounds [32]. Main lipid acids absorb in the same spectral region (3007–772 cm⁻¹) as phenols, tocopherols, and sterols [24,26,28,33,34].

2.7. Statistical Analysis

In case the number of samples for each test group exceeded 30, Levene's test (*t*-test) was applied without testing whether the data were normally distributed or not. Additionally, a normality test was applied in order to accept or reject the null hypothesis that each test group was statistically different from a normal distribution. Kolmogorov–Smirnov's and Shapiro–Wilk's normality tests evaluated if the groups followed normal distribution (*p*-value > 0.05), with the Shapiro–Wilk's result exhibiting higher validity, as it comes from a more conservative test. If the data did not follow a normal distribution, the appropriate normalization was made to fix the skewness and kurtosis values, at the accepted levels.

When the normality test was confirmed, Levene's test was used to assess the equality of variances. Levene's test checked the null hypothesis that the test group variances were equal (homogeneity of variance or homoscedasticity). If the resulting *p*-value of Levene's test was less than the required significance level (typically 0.05), the obtained differences in sample variances were unlikely to have occurred, based on random sampling from a population with equal variances, so the test group were significantly different.

MetaboAnalyst checked data integrity and continued on to data filtering. The purpose of the data filtering was to identify and remove variables that were unlikely to be of use when modeling the data. This step is strongly recommended for datasets with a large number of variables, many of which are from baseline noises. Based on the total number of variables, 10% of data were filtered, logarithmically transformed, and auto-scaled (mean-centered and divided by the SD of each variable).

The total number of samples (45 pistachio oil samples) was differentiated according to their year of harvest.

2.7.1. Discrimination Based on Antioxidant Capacity

Levene's test of SPSS was used to assess the equality of ABTS variances for two years of harvest, 2017 and 2018. Levene's test tested the null hypothesis that the ABTS variances of 2017 and 2018 were equal. *P*-value less than 0.05 rejected the null hypothesis and proved that the TAC (Wilks' Lambda = 0.895) and the scavenging capacity (Wilks' Lambda = 0.939) of ABTS were different in 2017 and 2018. From cross-validated grouped cases, 71.10% were classified correctly according to their antioxidant capacity and year of harvest.

2.7.2. Discrimination Based on R-Value Study

Based on R-values, 86.70% of cross-validated grouped cases were correctly classified to their year of harvest and the P -value (<0.001) proved the accuracy and robustness of the forecasting model, using SPSS. Therefore, the R-value of the samples was exploited to classify the samples according to the year of production (Wilks' Lambda = 0.315).

2.7.3. Discrimination Based on Acid Value and Free Fatty Acid

Levene's test examined the null hypothesis that the AV of 2017 and 2018 harvest were equal and the same assumption was made for the FFA content. The results (p -value > 0.05) failed to reject the null hypothesis and indicated that AV and FFA were not significantly different between the two years of harvest. Discrimination analysis displayed a percentage of correct classification at 71.10% (cross-validated grouped cases).

2.7.4. Discrimination Based on the Tocopherol Analysis

SPSS could not discriminate between the years of harvest of the 45 pistachio oil samples, according to their total tocopherol content. Levene's test for equality of variances between the 2017 and 2018 harvest exhibited a p -value > 0.05 and a 61.40% cross-validation level.

2.7.5. Discrimination Based on FTIR Spectroscopy Study

The spectral regions 3030–2795 and 1805–650 cm^{-1} were selected for the discriminant analysis, i.e., the regions where the peaks were observed (Figure 2). Applying the principal component analysis, the initial set of variables was reduced to a number of hidden variables of principal components (PC). The scree plot (Figure 3) revealed that the greatest impact on the variance of the analysed spectra for the pistachio oil samples was related to the first two principal components. Figures 4 and 5 present the score and loading plot for the principal components (PC) in the principal components analysis (PCA) model. The pistachio oil samples were clearly classified into two groups (2017 and 2018 harvest year). As depicted in Figure 6, MetaboAnalyst could correctly classify 100% of the cross-validated grouped cases, according to their chemical composition and year of harvest with $R^2 = 0.992$ and $Q^2 = 0.987$, which indicate a high predictive accuracy. P -values less than 0.05 proved that the FTIR method could be used as an accurate rapid screening tool for the differentiation of pistachio oils by their year of harvest.

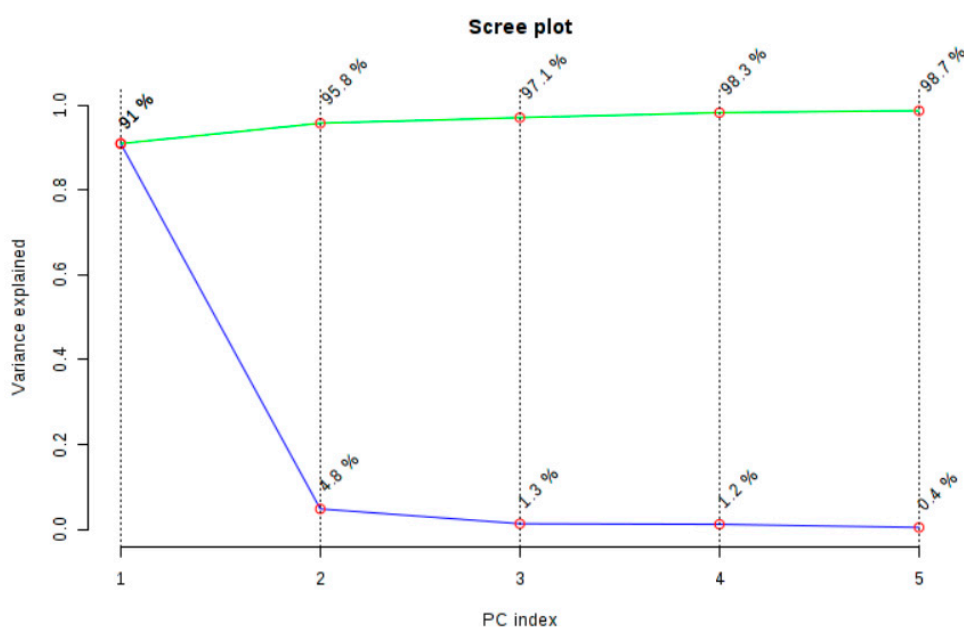


Figure 3. Plot of explained variance for principal components analysis (PCA) of the FTIR spectra.

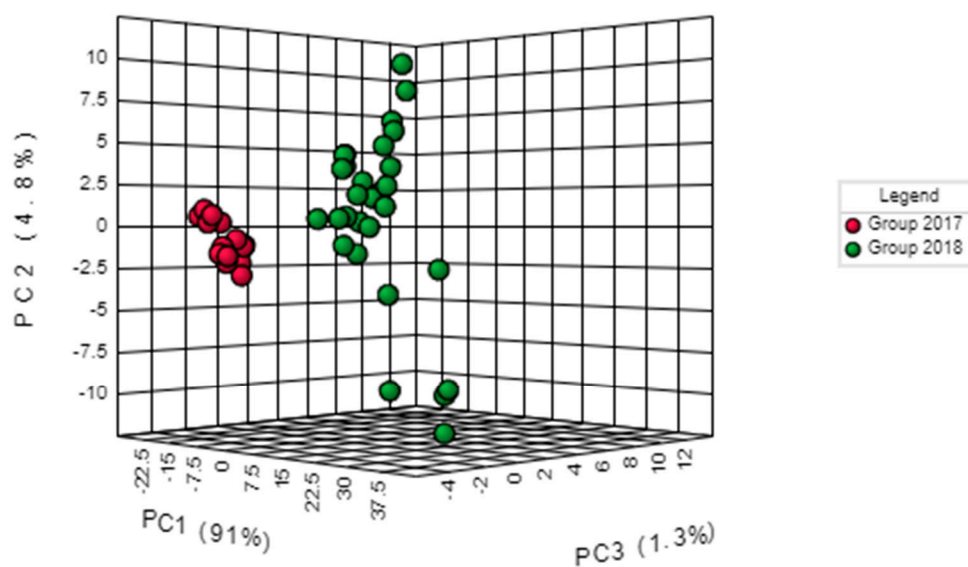


Figure 4. 3D Score plot of principal components analysis (PCA).

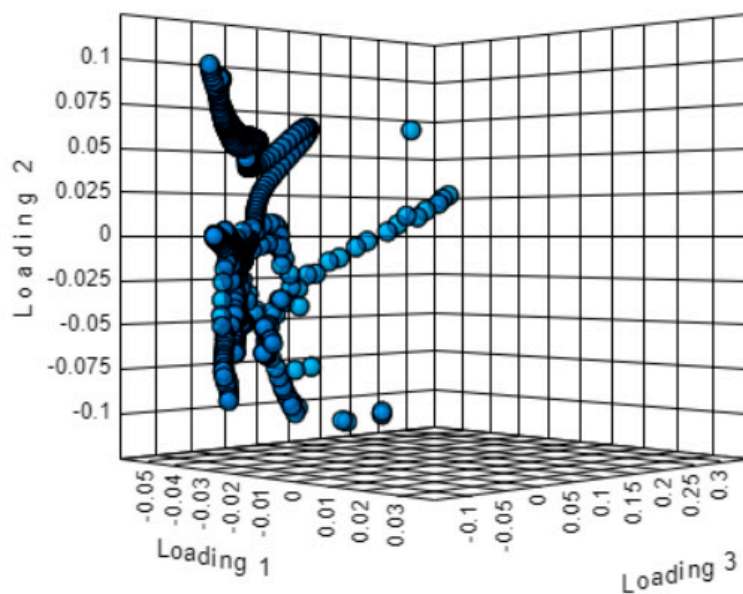


Figure 5. 3D loading plot of principal components analysis (PCA).



Figure 6. Orthogonal Partial Least Squares–Discrimination (orthoPLS–DA) using MetaboAnalyst.

2.7.6. Statistical Models Comparison

The evaluation of the total antioxidant capacity of pistachio oil samples through an ABTS assay showed that TAC and their scavenging capacity could be statistically differentiated, among the years of harvesting, as was also observed with the results based on R-value. It is worth noticing that in the case of AV, FFA, and HPLC-fluorescence analysis, there were no statistically significant differences between 2017 and 2018, at a 95% confidence level. However, FTIR spectroscopy combined with the statistical methods represent an appropriate rapid technique to discriminate pistachio oils of different quality, based on their antioxidant profile.

3. Materials and Methods

3.1. Samples

A total of 45 pistachio samples of the Greek variety ‘Aegina’ were provided by pistachio farmers from eight different regions of Greece (Aegina, Megara, Phthiotis, Evia, Volos, Trizina, Thiva, and Avlona) during the 2017 and 2018 harvest seasons. Due to alternate bearing, the number of samples of 2017 was less than the succeeding year. The pistachios were sound and had the typical characteristics of the variety. They were dried under the sun or mechanically at moisture level 5%–7%, after dehulling at farm level. In the laboratory, each sample was shelled and finely ground in an IKA M 20 (IKA, Königswinter, Germany) laboratory mill, at a maximum rotational speed 20,000 rpm, followed by particle size separation using sieves ($500\ \mu\text{m} < \text{size} < 800\ \mu\text{m}$). After preparation, all samples were put in sealed bags, protected from light, and stored in the freezer ($-20\ ^\circ\text{C}$) until analysis.

3.2. Reagents

Petroleum ether, 2,2-diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl)hydrazine (DPPH), 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid diammonium salt (ABTS), potassium persulfate ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$),

potassium hydrogen phthalate (KHP), sodium hydroxide pellets (NaOH), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox), ethyl acetate, tetrahydrofuran (THF), n-heptane, cyclohexane 99.8%, methanol (MeOH), and ethanol (EtOH) were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). (+)- α -, (+)- β -, (+)- γ -, and (+)- δ -tocopherol standards of 99.99% purity were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Distilled water and phenolphthalein indicator solution were also used. All compounds and solvents were of analytical grade.

3.3. Oil Extraction

Pistachio oil was extracted from 4 g of kernel flour with 250 mL of petroleum ether in a Soxhlet apparatus for 6 h, according to the AOAC Official Method 948.22. After evaporation of the solvent under reduced pressure, the oil was weighed to measure the lipids' mass and was kept in a freezer ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) to maintain its initial quality, until analysis. The extraction was carried out in triplicates and the mean value with the standard deviation was calculated.

3.4. Evaluation of the Antioxidant Capacity

3.4.1. DPPH Assay

DPPH radical-scavenging capacity was determined according to Miniotti and Georgiou (2010) [17], with some modifications using a JASCO V-550 spectrophotometer (JASCO Corporation, Tokyo, Japan). Briefly, 100 μL of pistachio oil were mixed with 4 mL of DPPH working solution (8.1×10^{-5} M working solution of the DPPH radical in ethyl acetate). The reaction mixture was vigorously stirred for a few seconds and kept in a dark place for 30 min, at room temperature. Absorbencies were measured at 515 nm against a blank (100 μL of ethyl acetate instead of pistachio oil). Pistachio oil antioxidants scavenged the DPPH radical, resulting in decolorization of its purple solution. Analyses were performed in triplicates. The scavenging capacity was calculated using Equation (7):

$$\text{Scavenging capacity} = [(A_{515} \text{ of control} - A_{515} \text{ of sample})/A_{515} \text{ of control}] \times 100 \quad (7)$$

A calibration curve (0.08–1 mM) was constructed using Trolox as the external standard and the obtained values were expressed as mmol/L of Trolox equivalents per mL of oil.

3.4.2. ABTS Assay

The ABTS assay was slightly modified, based on the methods of Rajaei et al. (2010) [35] and Torres-Martinez et al. (2017) [36], using an Agilent 8453 spectrophotometer. In brief, 96 mg of ABTS with distilled water were diluted in a 25 mL volumetric flask and 440 μL of $\text{K}_2\text{O}_8\text{S}_2$ solution (0.14 M in distilled water) were added. The mixture was maintained for 18 h, protected by light, at room temperature for stabilization of the ABTS oxidation. Prior to further use, the ABTS^+ solution was diluted with EtOH, at an absorbance value of 0.7 ± 0.005 (working solution). Antioxidant capacity was evaluated by measuring the scavenging effect of 100 μL of pistachio oil, mixed with 2 mL of ABTS^+ working solution, followed by shaking and incubation in the dark, for 6 min at room temperature. The decrease in absorbance was then measured at 734 nm against a control solution (100 μL of EtOH). All measurements were performed in triplicates. The scavenging capacity was calculated using Equation (8):

$$\text{Scavenging capacity} = [(A_{734} \text{ of control} - A_{734} \text{ of sample})/A_{734} \text{ of control}] \times 100 \quad (8)$$

Trolox was used as a reference compound for the calibration curve with a concentration range of 0.05–1 mM and a total antioxidant capacity, expressed as mmol/L of Trolox equivalents per mL of oil, was calculated and reported as mean \pm SD.

3.5. Quality Assessment of Pistachio Oil

3.5.1. UV–Vis Assessment

The Agilent Cary 60 UV–Vis spectrophotometer (Agilent Technologies, Mississauga, ON, Canada) and rectangular quartz cuvettes with an optical length of 1 cm were used according to EEC No 2568/91 (Annex IX of the Regulation). Pistachio oil samples (45 in total) were diluted in cyclohexane. A total of 0.1 g of pistachio oil was weighed accurately into a 10 mL graduated flask, filled up to the mark with the solvent, and homogenized. The resulting solution (10 g/L) was perfectly clear. If opalescence or turbidity was present, it was filtered through the paper. All samples were measured in cuvettes, running a solvent blank as a reference. Absorption measurements for purity determination were made at 232, 268, 270, and 274 nm in triplicates, and the average was used for the determination of pistachio oil purity. K values were calculated according to Equation (9):

$$k = A/(C \times s) \quad (9)$$

where A is the absorbance at the specified nanometer; C is the concentration in grams per liter; and s is the cuvette thickness in centimeter. Delta (Δ) k and R-value were evaluated using Equations (10) and (11):

$$\text{Delta } (\Delta) k = k_{270} - [(k_{268} + k_{274})/2] \quad (10)$$

$$\text{R-value was calculated} = k_{232}/k_{270} \quad (11)$$

3.5.2. Determination of AV and FFA

The AV and FFA content were determined in triplicates, according to Otemuyiwa and Adewusi (2013) [22]. In brief, titration of pistachio oil (1 g) dissolved in 5 mL EtOH was applied, using a 0.1 M NaOH solution as the standard reagent to a phenolphthalein endpoint (when the addition of a single drop of alkali produces a slight but definite color change that persists for at least 15 s). The AV value was expressed as oleic acid, according to Equation (12). All determinations were performed in triplicates. The acid value was calculated according to Equation (13):

$$\text{AV} = (56 \times C \times V)/m \quad (12)$$

where V is the titration volume (mL) of the standard volumetric NaOH solution used; C is the concentration (M) of the standard volumetric NaOH solution used; and m is the mass (g) of the pistachio oil sample. The percentage of FFAs in the pistachio oil was calculated using Equation (13):

$$\% \text{ FFA} = 0.503 \times \text{AV} \quad (13)$$

Then, the AV and FFA mean values and the corresponding SDs were calculated.

3.6. Tocopherol Analysis

3.6.1. Apparatus and Chromatographic Conditions

The chromatographic analysis was carried out in an analytical HPLC unit equipped with a JASCO PU 980 pump, with a 100 μ L injection loop, a JASCO FP920 fluorescence detector (Co. Ltd., Tokyo, Japan) supported by Clarity Lite software (DataApex, Prague, Czech Republic) for data processing, and an ODS Hypersyl column (4.6 \times 250 mm, 5 μ m particle size, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

The determination of the α -, β -, γ -, and δ -tocopherol (T) content using HPLC, followed the ISO 9936:2006 standard. The mobile phase consisted of the THF/n-heptane (4:96 v/v) at a flow rate of 1.0 mL/min and the injection volume was 10 μ L. The effluent was detected in a fluorescence detector, with an excitation filter at 295 nm and an emission wavelength at 330 nm. The system was operated at

ambient temperatures. The tocopherol compounds were identified by chromatographic comparisons of the retention times of the analytes in a standard solution and quantified by the respective calibration curves. The results were obtained from triple measurements, and the mean values and corresponding SDs were calculated.

3.6.2. Standard Solutions

Stock standard solutions, α -T (96.53 $\mu\text{g/mL}$), β -T (85.74 $\mu\text{g/mL}$), γ -T (87.40 $\mu\text{g/mL}$), and δ -T (81.14 $\mu\text{g/mL}$) in n-heptane were prepared and stored in the dark at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Combined working standard mixtures, with concentrations in the expected sample ranges, were prepared daily from the stock standard solutions, by diluting appropriate volumes of stock solutions with n-heptane. Then, a calibration curve for each tocopherol was constructed.

3.6.3. Validation Method

Calibration and linearity: Calibration curves were prepared using standard solution of vitamin E isomers at nine concentrations (C), ranging from 0.15–20 $\mu\text{g/mL}$.

Recovery: Extraction recoveries were evaluated by adding known amounts of isomers (+)- α -T, (+)- β -T, (+)- γ -T, and (+)- δ -T to the pistachio oil samples. The amounts added were of low, medium and high tocopherol content (0.2, 10 and 20 $\mu\text{g/mL}$). Recovery was calculated by Equation (14):

$$\text{Recovery} = (\text{C of spiked sample}/(\text{C of sample} + \text{C of standard added})) \times 100 \quad (14)$$

Analytical precision: Interday precision was determined by analyzing two concentrations (15 and 20 $\mu\text{g/mL}$) of standard vitamin E isomers in three replicates on three different days. The following equation was used:

$$\text{Precision, \%} = (\text{SD}/\text{Mean C}) \times 100 \quad (15)$$

The repeatability of the tocopherols' measurements in pistachio oil was calculated by Equation (15).

3.7. FTIR Spectra Recording

The FTIR spectra of the pistachio oil samples were recorded in triplicates on a Thermo Nicolet 6700 FTIR spectrophotometer (Thermo Electron Corporation, Madison, WI, USA) equipped with a deuterated triglycine sulfate (DTGS) detector. The spectra were in an attenuated total reflection (ATR) mode with a Horizontal ATR accessory from Spectra-Tech Inc. (Stamford, CT, USA). The accessory was equipped with a ZnSe-ATR crystal of a trapezoid shape (800 \times 10 \times 4 mm). The crystal provided an angle of incidence of 45° and was enclosed in a stainless-steel cuvette. For spectra recording, an aliquot of 200 μL of pistachio oil or tocopherol standard mixture was poured on the ATR crystal and allowed to dry, forming a uniform film. Spectra were recorded with a resolution of 4 cm^{-1} and 100 scans. The speed of the interferometer moving mirror was 0.6329 mm/s. Background spectrum was collected using only ATR crystal, prior to spectrum recording of each sample.

FTIR spectra were smoothed using the Savitsky–Golay algorithm (5-point moving second-degree polynomial) and the baseline was corrected using the 'automatic baseline correct function' (second-degree polynomial, twenty iterations). Then, the average spectrum of each sample was measured and normalized (absorbance maximum value of 1). Each average spectrum was extracted and saved as a csv file for their use in discriminant analysis. Spectral data collection and processing was carried out using the OMNIC ver. 8.2.0.387 software (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

3.8. Statistical Analysis

Discriminant analysis was performed using IBM SPSS Statistics 22 (ver. 8.0.0.245) (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and the MetaboAnalyst 4.0 software (McGill University, Montreal, QC, Canada) for a comprehensive and integrative data analysis.

4. Conclusions

The results of this work showed that the pistachio oil samples of the variety “Aegina” were within the limits set by the specific standards in terms of high quality. The oil yields of the samples from the two harvest seasons (2017, 2018) were found to be similar, while statistically significant differences were evident for the antioxidant capacity and the R-value between pistachio oil samples, from different years of harvesting. These differences might be attributed to agroclimatic factors, such as different agricultural practices, average temperature, and rainfall from year to year. The FTIR spectroscopy succeeded to classify pistachio oil samples according to the differences which are related to quality parameters, particularly described by the antioxidant capacity, and the R-value. The developed method is fast, accurate, non-destructive, with no excessive sample preparation, and has the additional advantage of not requiring the use of large quantities of solvents, being especially suitable for the screening of large number of samples. Furthermore, the present results provide evidence that the FTIR method could be a promising discriminating tool against fraud related to plant-derived oils, through the use of quality parameters as indicators.

Author Contributions: Conceptualization, C.S.P., L.V., and M.G.; methodology, C.S.P and M.G.; formal analysis, L.V., D.A., and A.M.; investigation, L.V., D.A., and A.M.; data curation, L.V., D.A., and A.M.; writing—original draft preparation, L.V. and M.G.; writing—review and editing, L.V., M.G., and C.S.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: This research work was supported by the Hellenic Foundation for Research and Innovation (HFRI) and the General Secretariat for Research and Technology (GSRT), under the HFRI PhD Fellowship grant (GA. no. 1313).



Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Gentile, C.; Tesoriere, L.; Butera, D.; Fazzari, M.; Monastero, M.; Allegra, M.; Livrea, M.A. Antioxidant Activity of Sicilian Pistachio (*Pistacia vera* L. Var. Bronte) Nut Extract and Its Bioactive Components. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 643–648. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Rodríguez-Bencomo, J.J.; Kelebek, S.; Ahmet, S.S.; Rodríguez-Alcalá, L.M.; Fontecha, J.; Selli, S. Characterization of the Aroma-Active, Phenolic, and Lipid Profiles of the Pistachio (*Pistacia vera* L.) Nut as Affected by the Single and Double Roasting Process. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 7830–7839.
3. Halvorsen, B.L.; Carlsen, M.H.; Phillips, K.M.; Bøhn, S.K.; Holte, K.; Jacobs, D.R., Jr.; Blomhoff, R. Content of redox-active compounds (ie, antioxidants) in foods consumed in the United States. *Am. J. Clin. Nutr.* **2006**, *84*, 95–135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. John, J.A.; Shahidi, F. Phenolic compounds and antioxidant activity of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*). *J. Funct. Foods* **2010**, *2*, 196–209. [[CrossRef](#)]
5. Desamparados, S.; Ojeda-Amador, R.; Fregapane, G. Virgin Pistachio (*Pistachia vera* L.) Oil. In *Fruit Oils: Chemistry and Functionality*; Ramadan, M., Ed.; Springer: Cham, Switzerland, 2019; p. 183.

6. Tsantili, E.; Takidelli, C.; Christopoulos, M.V.; Lambrinea, E.; Rouskas, D.; Roussos, P.A. Physical, compositional and sensory differences in nuts among pistachio (*Pistachia vera* L.) varieties. *Sci. Hortic.* **2010**, *125*, 562–568. [[CrossRef](#)]
7. Ojeda-Amador, R.M.; Fregapane, G.; Desamparados, S.M. Composition and properties of virgin pistachio oils and their by-products from different cultivars. *Food Chem.* **2018**, *240*, 123–130. [[CrossRef](#)]
8. Aceña, L.; Vera, L.; Guasch, J.; Busto, O.; Mestres, M. Comparative study of two extraction techniques to obtain representative aroma extracts for being analysed by gas chromatography-olfactometry: Application to roasted pistachio aroma. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 7781–7787. [[CrossRef](#)]
9. Kay, C.D.; Gebauer, S.K.; West, S.G.; Kris-Etherton, P.M. Pistachios Increase Serum Antioxidants and Lower Serum Oxidized-LDL in Hypercholesterolemic Adults. *J. Nutr.* **2010**, *140*, 1093–1098. [[CrossRef](#)]
10. Martorana, M.; Arcoraci, T.; Rizza, L.; Cristani, M.; Bonina, F.P.; Saija, A.; Trombetta, D.; Tomaino, A. In vitro antioxidant and in vivo photoprotective effect of pistachio (*Pistacia vera* L., variety Bronte) seed and skin extracts. *Fitoterapia* **2013**, *85*, 41–48. [[CrossRef](#)]
11. Houshia, O.J.; Zaid, O.; Shqair, H.; Zaid, M.; Fashafsheh, N.; Bzoor, R. Effect of Olive Oil Adulteration on Peroxide Value, Delta-K and on the Acidity Nabali-Baladi Olive Oil Quality. *Adv. Life Sci.* **2014**, *4*, 235–244.
12. El-Abassy, R.M.; Donfack, P.; Materny, A. Rapid Determination of Free Fatty Acid in Extra Virgin Olive Oil by Raman Spectroscopy and Multivariate Analysis. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2009**, *86*, 507–511. [[CrossRef](#)]
13. Servili, M.; Montedoro, G. Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2002**, *104*, 602–613. [[CrossRef](#)]
14. Juhaimi, F.A.; Ozcan, M.M.; Ghafoor, K.; Babiker, E.E.; Hussain, S. Comparison of cold-pressing and soxhlet extraction systems for bioactive compounds, antioxidant properties, polyphenols, fatty acids and tocopherols in eight nut oils. *J. Food Sci. Technol.* **2018**, *55*, 3163–3173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Geana, E.I.; Ciucure, C.T.; Apetrei, C.; Artem, V. Application of Spectroscopic UV-Vis and FT-IR Screening Techniques Coupled with Multivariate Statistical Analysis for Red Wine Authentication: Varietal and Vintage Year Discrimination. *Molecules* **2019**, *24*, 4166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Pérez-Ràfols, C.; Subirats, X.; Serrano, N.; Díaz-Cruz, J.M. New discrimination tools for harvest year and varieties of white wines based on hydrophilic interaction liquid chromatography with amperometric detection. *Talanta* **2019**, *201*, 104–110. [[CrossRef](#)]
17. Minioti, K.S.; Georgiou, C.A. Comparison of different tests used in mapping the Greek virgin olive oil production for the determination of its total antioxidant capacity. *Grasas Y Aceites* **2010**, *61*, 45–51.
18. Yu, J.; Wang, H.; Zhan, J.; Huang, W. Review of recent UV-Vis and infrared spectroscopy researches on wine detection and discrimination. *Appl. Spectrosc.* **2017**, *53*, 65–86. [[CrossRef](#)]
19. Rowshan, V.; Bahmanzadegan, A.; Saharkhiz, M.J. Influence of storage conditions on the essential oil composition of *Thymus daenensis* Celak. *Ind. Crop. Prod.* **2013**, *49*, 97–101. [[CrossRef](#)]
20. Kim, D.O.; Lee, K.W.; Lee, H.J.; Lee, C.Y. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3713–3717. [[CrossRef](#)]
21. Floegel, A.; Kim, D.O.; Chung, S.J.; Koo, S.I.; Chun, O.K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *J. Food Compos. Anal.* **2011**, *24*, 1043–1048. [[CrossRef](#)]
22. Otemuyiwa, I.O.; Adewusi, S.R.A. Fatty Acid, Carotenoid and Tocopherol Content of Some Fast Foods from a Nigerian Eatery. *Food Nutr. Res.* **2013**, *1*, 82–86.
23. Martínez, M.L.; Fabani, M.P.; Baroni, M.V.; Huaman, R.N.M.; Ighani, M.; Maestri, D.M.; Wunderlin, D.; Tapia, A.; Feresin, G.E. Argentinian pistachio oil and flour: A potential novel approach of pistachio nut utilization. *J. Food Sci. Technol.* **2016**, *53*, 2260–2269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Uncu, O.; Ozen, B.; Tokatli, F. Use of FTIR and UV-visible spectroscopy in determination of chemical characteristics of olive oils. *Talanta* **2019**, *201*, 65–73. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Luna, A.S.; Silva, A.P.; Ferré, J.; Boqué, R. Classification of edible oils and modeling of their physico-chemical properties by chemometric methods using mid-IR spectroscopy. *Spectrochim. Acta A* **2013**, *100*, 109–114. [[CrossRef](#)]
26. Gericke, A.; Hühnerfuss, H. Investigation of Z- and E-Unsaturated Fatty Acids, Fatty Acid Esters, and Fatty Alcohols at the Air/Water Interface by Infrared Spectroscopy. *Langmuir* **1995**, *11*, 225–230. [[CrossRef](#)]

27. Dymińska, L.; Calik, M.; Albegar, A.M.M.; Zając, A.; Kostyń, K.; Lorenc, J.; Hanuza, J. Quantitative determination of the iodine values of unsaturated plant oils using infrared and Raman spectroscopy methods. *Int. J. Food Prop.* **2017**, *20*, 2003–2015. [[CrossRef](#)]
28. Rohman, A.; CheMan, Y.B. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for analysis of extra virgin olive oil adulterated with palm oil. *Food Res. Int.* **2010**, *43*, 886–892. [[CrossRef](#)]
29. Moros, J.; Roth, M.; Garrigues, S.; Guardia, M. Preliminary studies about thermal degradation of edible oils through attenuated total reflectance mid-infrared spectrometry. *Food Chem.* **2009**, *114*, 1529–1536. [[CrossRef](#)]
30. Christy, A.A.; Egeberg, P.K. Quantitative determination of saturated and unsaturated fatty acids in edible oils by infrared spectroscopy and chemometrics. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2006**, *82*, 130–136. [[CrossRef](#)]
31. Gutiérrez, L.F.; Quiñones-Segura, Y.; Sanchez-Reinoso, Z.; Leonardo, D.D.; Abril, J.I. Physicochemical properties of oils extracted from γ -irradiated Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds. *Food Chem.* **2017**, *237*, 581–587.
32. Bullo, M.; Juanola-Falgarona, M.; Hernandez-Alonso, P.; Salas-Salvado, J. Nutrition attributes and health effects of pistachio nuts. *Br. J. Nutr.* **2015**, *113*, 879–893. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Ahmed, M.K.; Daun, J.K.; Przybylski, R. FT-IR based methodology for quantitation of total tocopherols, tocotrienols and plastochromanol-8 in vegetable oils. *J. Food Compos. Anal.* **2005**, *18*, 359–364. [[CrossRef](#)]
34. Rosenkrantz, H. Infra-red absorption spectra of tocopherols and related structure. *J. Biol. Chem.* **1948**, *173*, 439–447. [[PubMed](#)]
35. Rajaei, A.; Barzegar, M.; Mobarez, A.M.; Sahari, M.A.; Esfahani, Z.H. Antioxidant, anti-microbial and antimutagenicity activities of pistachio (*Pistachia vera*) green hull extract. *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48*, 107–112. [[CrossRef](#)]
36. Torres-Martínez, R.; García-Rodríguez, Y.M.; Ríos-Chávez, P.; Saavedra-Molina, A.; López-Meza, J.E.; Ochoa-Zarzosa, A.; Garciglia, R.S. Antioxidant Activity of the Essential Oil and its Major Terpenes of *Satureja macrostema* (Moc. and Sessé ex Benth.) Briq. *Pharm. Mag.* **2018**, *13*, 875–880.

Sample Availability: Samples of the compounds are available from the authors.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



GC-MS, FTIR and Raman spectroscopic analysis of fatty acids of *Pistacia vera* (Greek variety “Aegina”) oils from two consecutive harvest periods and chemometric differentiation of oils quality

Lydia Valasi, Maroula G. Kokotou, Christos S. Pappas*

Laboratory of Chemistry, Department of Food Science & Human Nutrition, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, 11855, Greece

ARTICLE INFO

Keywords:

Pistachio oil
FAMES
UFAs
Gas Chromatography-Mass Spectrometry
Infrared spectroscopy
Raman
Discriminant analysis

ABSTRACT

Pistacia vera oil is a rich source of unsaturated fatty acids, whose presence is associated with high quality and nutritional value. According to the literature, fatty acid oil composition is not constant every harvest year, but varies mainly depending on climate conditions. Therefore, the knowledge of oil composition in fatty acids is necessary to assess both its quality and its nutritional value.

Twenty-two samples (11 samples from the harvest year 2017 and 11 samples from 2018) of the Greek variety “Aegina” were collected from four different Greek regions, from producers following the same cultivation and post-harvest cares. Extraction oil yields were found to be similar (61.7% w/w, 2017; 60.8% w/w, 2018). A reduction of the saturated fatty acids content was determined in 2018 (mean values 12.2% w/w against 13.8% w/w in 2017) by Gas Chromatography-Mass Spectrometry, accompanied by an increase of the unsaturated ones (mean values 87.9% w/w against 86.2% w/w in 2017). These results indicate that the harvest year 2018 may be considered superior to 2017 in terms of quality and nutritional value and may be correlated with an increased mean rain rate in 2018 and a slight decrease of the mean temperature. Fourier transform infrared (FTIR) and Raman spectroscopic studies of the oils were also performed. Three chemometric models were developed for the two consecutive harvest years of pistachio oil and the discrimination was based on GC-MS analysis, FTIR and Raman spectroscopic data combined with cross-validation techniques and comparison among them. The most successful chemometric model was that based on FTIR spectroscopy, which has the advantage of speed, simplicity and economy. Such a chemometric model may help in estimating the quality of *Pistacia vera* oils.

1. Introduction

Greece is among the leading countries that produces pistachio nuts (*Pistacia vera*), an agricultural product of great importance, which is exported as well as being largely consumed. Pistachio nuts are known as carriers of nutritious elements with a high oil content characterized by the abundance of unsaturated fatty acids (UFAs) and the presence of an array of bioactive phytochemicals with putative health-promoting actions, including phenols, flavonoids, proanthocyanidins, stilbenes, phytosterols and carotenoids (Ballistreri, Arena, & Fallico, 2011). Pistachio nuts are a rich source of fatty acids, such as oleic, linoleic, linolenic, palmitic, palmitoleic and stearic, which are essential for the human diet. A diet very rich in UFAs may reduce the concentration of cholesterol in blood and prevent cardiovascular diseases. Pistachio nuts also contain considerable amounts of protein, minerals (Ca, Mg, K, P, Cu

etc.) and vitamins (A, B1, B2, B6, etc.) (Küçüköner & Yurt, 2003). As most recently shown, chronic intake of pistachio prevents obesity-associated chronic inflammation and improves gut microbiota composition in high-fat diet mice (Terzo et al., 2020).

The oil content of pistachio nut is generally more than 55.0% (w/w) and it is used in food, cosmetic and pharmaceutical industries. Different varieties and different agroclimatic factors result in statistically significant differences in the fatty acid contents (Küçüköner & Yurt, 2003; Mahmoodabadi, Panahi, Agharahimi, & Salajegheh, 2012; Satil, Azcan, & Baser, 2003). The unsaturated fatty acid content greatly affects the nutritional value of pistachio oil, making it susceptible to auto-oxidation, influencing negatively or positively its flavour and colour (Yildiz, Gürçan, & Ozdemir, 1998). Several studies have been conducted in order to characterize pistachio nuts of different geographic origins and the composition of pistachio oil cultivated in Greece is known to a

* Corresponding author.

E-mail address: chrisspap@aua.gr (C.S. Pappas).

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110590>

Received 24 March 2021; Received in revised form 20 June 2021; Accepted 2 July 2021

Available online 6 July 2021

0963-9969/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Table 1

The oil yield of two consecutive harvest seasons (2017, 2018) pistachio (*Pistacia vera*, variety "Aegina") samples (g oil/100 g dried sample)^a.

Samples No	Geographical Origin	Harvest 2017	Harvest 2018
1-A ^b /1-B ^c	AEGINA	62.6 ± 1.3	63.2 ± 2.5
2-A/2-B	AEGINA	62.5 ± 3.3	57.5 ± 6.8
3-A/3-B	AEGINA	61.2 ± 2.2	60.0 ± 5.9
4-A/4-B	AEGINA	61.5 ± 1.7	57.7 ± 5.3
5-A/5-B	MEGARA	60.1 ± 3.0	61.5 ± 4.8
6-A/6-B	MEGARA	60.2 ± 0.3	62.4 ± 1.1
7-A/7-B	MEGARA	64.1 ± 2.2	60.7 ± 6.4
8-A/8-B	PHTHIOTIS	64.8 ± 2.4	61.2 ± 9.2
9-A/9-B	PHTHIOTIS	62.5 ± 10.7	60.3 ± 5.5
10-A/10-B	PHTHIOTIS	60.0 ± 1.1	59.0 ± 2.9
11-A/10-B	TRIZINA	59.7 ± 4.4	64.8 ± 18.4
Mean		61.7	60.8

^a mean ± Standard Deviation (SD) (n = 3); ^bharvest 2017; ^charvest 2018

certain extent. However, research on pistachio oil from the Greek variety "Aegina" and its composition of fatty acids in relation to the year of harvest is limited (Arena, Campisi, Fallico, & Maccarone, 2007).

Fatty acids (FAs) are carboxylic acids with either saturated or unsaturated aliphatic chains, which may contain a different number of double bonds at different positions. Although fatty acids may be present in their free fatty acid (FFA) forms, they most often exist in esterified forms, such as triacylglycerols and phospholipids. The total FAs include FFAs and bound FAs.

Various analytical tools, including Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry (GC–MS) or Flame Ionization Detector (GC–FID), and Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry (LC–MS), have been used to perform fatty acid analyses. Compared to GC–FID, GC–MS can provide more structural information. Moreover, GC–MS employs well-established databases for fatty acids' identification with higher efficiency and better selectivity compared to GC–FID. Therefore, GC–MS is the most frequently used method for fatty acid analysis (Chiu & Kuo, 2020).

Fourier transform infrared (FTIR) and Raman spectroscopy contribute to the identification of functional groups as well as the "skeletal structure" of the compounds present in composite matrices. The use of the above techniques has significantly contributed to the study of vegetable oils as well as the detection of adulteration of olive oil with other lower-value oils (Uncu & Ozen, 2019). Both spectroscopic techniques are rapid, accurate, simple, non-destructive for the samples, environmentally friendly, and economical.

The economic importance of vegetable oils and the demands of consumers imply the need for appropriate rapid analytical techniques to evaluate their quality (Uncu & Ozen, 2019; Jentzsch & Ciobotă, 2014). Chemical models for the differentiation of oils, depending on their chemical composition of fatty acids, should be robust, simple, accurate, fast and economical. Infrared and Raman spectroscopy have already been applied (e.g. for wine, milk, etc.) having all the advantages mentioned above. However, GC–MS technique, which is mostly used to give an insight of fatty acids oils' composition, is neither fast nor economical.

The purpose of this work was: 1) the study of the fatty acids in oils, obtained from two consecutive years of pistachio (*Pistacia vera*) harvest (Greek variety "Aegina"), using three different analysis techniques (GC–MS, FTIR, Raman) and 2) the development of the oil's differentiation chemometric models, depending on the year of harvest and the quality, as well as a comparison of chemometric models with each other.

2. Materials and methods

2.1. Samples

Twenty-two *Pistacia vera* samples of the Greek variety "Aegina" from production and marketing of pistachios Greek regions (Aegina, Megara,

Phthiotis, Trizina) were harvested during two consecutive years (2017, 11 samples and 2018, 11 samples), by the same producers (Table 1). Each producer followed the same cultivation and post-harvest care in both seasons. All samples were dried by producers using mechanical or sun drying. The dried pistachios contained 5–7% w/w moisture, measured for each used sample according to the AOAC Official Method 925.40 (Georgiadou et al., 2015), and presented the typical standards of the edible variety. Each sample was peeled, finely ground in a laboratory mill at 20,000 rpm (IKA M 20, Königswinter, Germany), sieved at a particle size between 500 and 800 µm and the pistachio kernel flour was kept in the freezer (-20 °C).

2.2. Reagents

Petroleum ether, hexane (purity 99%), potassium hydroxide (KOH), methanol (MeOH), and magnesium sulfate (MgSO₄) were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) and methyl decanoate (purity 99.5%) was purchase from Merck (Darmstadt, Germany). All chemicals and reagents used in this study were of analytical grade.

2.3. Oil extraction

According to the AOAC Official Method 948.22, approximately 4 g of pistachio kernel flour were mixed with 250 mL petroleum ether in a Soxhlet apparatus for 6 h at 50 °C and the extraction of the pistachio oil was completed after evaporation of the solvent at 35 °C under reduced pressure (Laborota 400 efficient, Link Lab, Heidolph). The previous procedure was repeated in triplicate, using a different portion of the sample each time, and the mean and standard deviation of oil yield were calculated. Pistachio oils were stored in freezing conditions (-20 °C).

2.4. Fatty acids methyl esters (FAMES) analysis using GC–MS

2.4.1. Alkali-Catalyzed transesterification

Fatty acids were converted to FAMES according to the AFNOR method (1984) modified as follows: Into a 10 mL volumetric flask, 1.12 g KOH were added and diluted to volume with MeOH and stirred (Grant, 35 kHz) until complete homogenization of the KOH/MeOH solution (2.00 M). 100 µL of pistachio oil, 200 µL of the KOH/MeOH solution and 1 mL of hexane were added in a sealed cap vial, vortexed and kept until separation of the polar and non-polar phases. The polar phase (lower layer) contained glycerol derived from the triglycerides of pistachio oil, while the non-polar phase (upper layer) included the FAMES of pistachio oil together with hexane. In a sealed cap vial, 200 µL from the upper layer were carefully collected with a pipette and 775 µL hexane were added. A quantity of MgSO₄ was added to the vial to absorb any trace of moisture and the mixture was filtered through a non-polar 0.20 µm filter (Xtra PTFE 20/13 Chromafil). Methyl decanoate was used as an internal standard for quantification purpose.

2.4.2. GC–MS analysis

A Thermo Scientific system (Trace GC ULTRA) equipped with a mass detector (DSQ II) and a Trace GOLD TG-5MS low polarity capillary column (30 m, 0.25 mm ID, 0.25 µm film thickness) with a stationary phase made of 5% diphenyl/95% dimethyl polysiloxane were used with helium as the carrier gas with a flow rate of 1 mL/min under constant pressure. Analysis was conducted in split mode (1:50) with an injection volume of 1 µL. The GC oven temperature was programmed as follows: 110 °C to 205 °C at a rate of 4.0 °C/min, 205 °C to 210 °C; 1.0 °C/min, 210 °C to 212 °C; 0.5 °C/min, 212 °C to 250 °C ; 4.0 °C/min, then kept constant at 250 °C for 15 min. The injector and detector (MS transfer line) temperatures were at 240 °C.

Qualitative analysis was achieved through comparison (retention time and ion fragments) of the mass spectrum data of each fatty acid in the sample with the mass spectra obtained from GC–MS Libraries: XCalibur library search software and NIST Mass Spectral Library. The

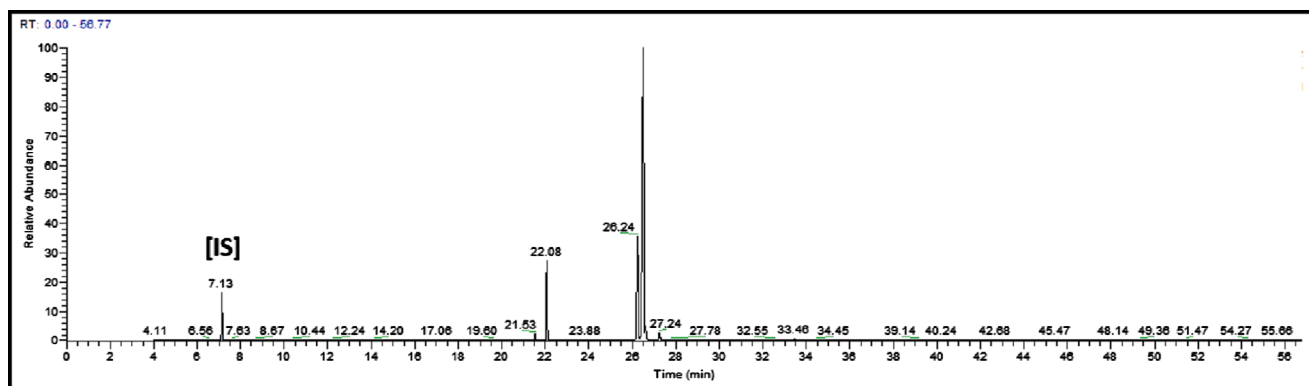


Fig. 1. Representative chromatogram of pistachio (*Pistacia vera*, variety "Aegina") oil FAMES. Peaks of fatty acids as eluted: 1, Myristic (RT ~ 20.08 min); 2, Palmitoleic (RT ~ 24.67 min); 3, Palmitic (RT ~ 25.20 min); 4, Heptadecenoic (RT ~ 27.53 min); 5, Margaric (RT ~ 28.24 min); 6, Linoleic (RT ~ 30.69 min); 7, Oleic (RT ~ 30.95 min); 8, Stearic (RT ~ 31.89 min); 9, Gondoic (RT ~ 38.31 min); 10, Arachidic (RT ~ 39.08 min); 11, Behenic (RT ~ 43.38 min).

quantification of fatty acids was performed using methyl decanoate as the internal standard in triplicate and the mean and standard deviation were measured.

2.5. FTIR spectra recording

A Thermo Nicolet 6700 FTIR spectrophotometer (Thermo Electron Corporation, Madison, WI, USA) equipped with a deuterated triglycine sulfate (DTGS) detector was used to obtain a total of three replicate spectra (three different sub-samples) from each sample. A Spectra-Tech Inc. horizontal ATR accessory (Stamford, CT, USA) with a trapezoid ZnSe-ATR crystal (45° angle of incidence) was employed for spectral recording from 400 to 4000 cm^{-1} at a resolution of 4 cm^{-1} and 100 scans. The speed of the interferometer moving mirror was 0.6329 mm/s. The ATR crystal provided a background spectrum, which was subtracted from each sample spectrum. Each spectrum was manipulated using the corresponding functions of the software (OMNIC ver. 8.2.0.387; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) that came with the spectrophotometer, as follows: Each spectrum was "automatically smoothed", using the Savitzky-Golay algorithm (2nd order, 5-point window), baseline corrected using the "automatic baseline correction" (2nd order polynomial fit), averaged spectrum of each example triplet spectra was calculated, and the averaged spectra were normalized (absorbance from 0 to 1).

2.6. Raman spectra recording

All the Raman data were collected by a Raman spectrometer from a LabWrench (Midland, Ontario, Canada) Advantage 785 NIR model. The excitation wavelength of 785 nm was generated by a diode laser (80 mW power at sample). The Raman signal was recorded with the NuSpec program over the wavenumber range 200–2000 cm^{-1} , the region containing the C–C, C = C, C–O, and C = O stretches and bends as well as the C–H bends at a resolution of 3–5 cm^{-1} . Raman spectra were obtained directly from the pistachio oil samples at ambient temperature. The sample was oriented with the surface perpendicular to the incident radiation. Every measurement consisted of 10 averaged signal accumulations each with an actual exposure time of 10 s to improve the signal-to-noise ratio, and each sample was analysed in triplicate (three Raman spectra for separate sub-samples). The Raman spectra were processed as the FTIR spectra, using the same software.

2.7. Statistical analysis

Discriminant analysis was performed using IBM SPSS Statistics 22 (ver. 8.0.0.245) and MetaboAnalyst 5.0 software for integrative data analysis.

3. Results and discussion

The storage of samples in the freezer maintains the initial chemical characteristics of the pistachio oils and does not allow degradation of the more important content. The temperature of $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ prevents chemical alterations to happen (Rowshan, Bahmanzadegan, & Saharkhiz, 2013).

3.1. Oil extraction

The oil content determines the quality of pistachio nut, as the oil contains unsaturated (monounsaturated and polyunsaturated) FAs, which in specific amounts are beneficial to human health. The oil yield using the Soxhlet extraction method is presented in Table 1. The oil yield of the 2017 growing season fluctuated between 59.7 and 64.8 g oil/100 g dried sample (% w/w) and the mean was found to be 61.7% w/w. For the 2018 growing season, the oil yield ranged from 57.5 to 64.8% w/w with a mean value of 60.8% w/w. Considering the averages and the corresponding standard deviations, the differences are not significant. The 22 samples, 11 of each of the two consecutive growing seasons, came from the same growers, underwent the same growing care and were dried in the same way by each grower. Therefore, the small differences of the oil yield are more due to the variety, the cultivation care followed by each producer, the harvesting time, and climatic and geographical factors.

These results were in line with the study of Arena et al. (2007), where the oil yield of Greek pistachios was found to be 55.4% w/w. In addition, the average oil yield of Turkey pistachio samples was found to be 59.7% w/w (Yildiz et al., 1998). Another study by Satil et al. (2003) on pistachio nuts from Turkey showed an oil yield ranging from 57.0 to 62.0% w/w. Martínez et al. (2016) concluded to an average oil yield of around 50.0% w/w.

Pistachios have lower percentage of total oil content than walnuts, whose oil content is 65.2% w/w according to Bulló, Juanola-Falgarona, Hernández-Alonso, and Salas-Salvadó (2015). The percentages of total oil of raw pecan peanuts and macadamia are higher than 70.0% w/w, while those of hazelnuts and almonds are 60.8% w/w and 49.9% w/w approximately, respectively. However, compared to a study by Vukajlović et al. (2019) with oils derived from different nuts, pistachios seemed to have higher oil content than walnuts (60.5% w/w), hazelnuts (56.2% w/w) and almonds (45.4% w/w).

3.2. FAMES analysis using GC–MS

A representative chromatograph of pistachio oil FAMES is presented in Fig. 1. The fatty acid composition of pistachio oils obtained from the GC–MS analysis of the FAMES (expressed as g of fatty acid/100 g total fatty acids (%)) is presented in Tables 2 and 3.

Table 2
Fatty acid composition (g of fatty acid/100 g total fatty acids) of pistachio (*Pistacia vera*, variety “Aegina”) oils.

Samples No	Myristic (14:0)	Palmitoleic (16:1)	Palmitic (16:0)	Heptadecenoic (17:1)	Margaric (17:0)	Linoleic (18:2)	Oleic (18:1)	Stearic (18:0)	Gondoic (20:1)	Arachidic (20:0)	Behenic (22:0)	Tricosylic (23:0)	Lignoceric (24:0)
1-A	0.1 ± 0.0	0.8 ± 0.2	12.2 ± 0.3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	14.2 ± 1.4	71.1 ± 2.0	1.2 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
2-A	0.1 ± 0.0	0.7 ± 0.1	10.5 ± 1.7	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	13.6 ± 0.3	73.7 ± 1.9	1.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
3-A	0.1 ± 0.0	1.0 ± 0.1	11.8 ± 1.2	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	15.1 ± 0.1	70.2 ± 0.9	1.3 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
4-A	0.1 ± 0.0	1.0 ± 0.3	10.3 ± 1.9	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	11.6 ± 8.2	74.5 ± 1.7	1.7 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
5-A	0.1 ± 0.0	0.9 ± 0.1	12.8 ± 0.7	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	12.8 ± 0.1	71.2 ± 0.6	1.8 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
6-A	0.1 ± 0.0	0.8 ± 0.3	14.2 ± 4.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	10.9 ± 0.2	72.1 ± 4.4	1.5 ± 0.4	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
7-A	0.1 ± 0.0	0.8 ± 0.1	11.2 ± 0.5	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	14.4 ± 0.4	71.7 ± 0.1	1.4 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
8-A	0.1 ± 0.0	0.9 ± 0.1	12.6 ± 0.8	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	14.1 ± 0.5	70.6 ± 0.3	1.4 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
9-A	0.1 ± 0.0	0.9 ± 0.0	12.2 ± 0.6	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	14.3 ± 0.4	70.5 ± 1.2	1.5 ± 0.2	0.3 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
10-A	0.1 ± 0.0	1.1 ± 0.1	14.0 ± 0.5	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	12.0 ± 0.1	71.3 ± 0.5	1.3 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
11-A	0.1 ± 0.0	1.0 ± 0.0	11.9 ± 1.0	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	13.7 ± 0.7	71.3 ± 0.3	1.8 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Mean ± SD^a	0.1 ± 0.0	0.9 ± 0.1	12.2 ± 1.2	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	13.3 ± 1.3	71.7 ± 1.3	1.4 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Mean ± SE^b	0.1 ± 0.0	0.9 ± 0.0	12.2 ± 0.4	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	13.3 ± 0.4	71.7 ± 0.4	1.4 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
1-B	0.1 ± 0.0	0.8 ± 0.0	10.1 ± 0.2	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	20.6 ± 0.0	66.9 ± 0.1	1.0 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
2-B	0.1 ± 0.0	0.6 ± 0.0	9.8 ± 0.2	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	16.0 ± 0.4	72.1 ± 0.5	1.0 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
3-B	0.1 ± 0.0	0.8 ± 0.1	10.5 ± 1.5	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.0	19.0 ± 0.5	68.1 ± 1.6	0.9 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
4-B	0.1 ± 0.0	0.9 ± 0.1	10.8 ± 0.5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	17.7 ± 0.3	69.3 ± 0.1	1.1 ± 0.2	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
5-B	0.1 ± 0.1	1.0 ± 0.1	11.3 ± 0.3	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	16.2 ± 0.1	69.8 ± 0.7	1.1 ± 0.4	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
6-B	0.1 ± 0.0	0.6 ± 0.0	10.2 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	16.6 ± 0.0	70.6 ± 0.2	1.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
7-B	0.1 ± 0.0	0.9 ± 0.1	11.0 ± 0.4	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	15.6 ± 0.1	71.1 ± 0.5	1.0 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
8-B	0.0 ± 0.0	0.7 ± 0.2	10.7 ± 1.6	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	12.5 ± 0.1	74.4 ± 1.8	1.4 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
9-B	0.1 ± 0.0	1.0 ± 0.1	11.1 ± 0.6	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	13.8 ± 0.1	72.5 ± 0.6	1.3 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
10-B	0.1 ± 0.0	0.7 ± 0.2	11.3 ± 2.2	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	10.6 ± 0.9	75.6 ± 3.4	1.4 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
11-B	0.1 ± 0.0	0.8 ± 0.0	11.0 ± 0.3	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	13.5 ± 0.7	72.7 ± 0.3	1.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.0 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Mean ± SD	0.1 ± 0.0	0.8 ± 0.1	10.7 ± 0.5	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	15.7 ± 2.9	71.2 ± 2.6	1.2 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Mean ± SE	0.1 ± 0.0	0.8 ± 0.0	10.7 ± 0.2	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	15.7 ± 0.9	71.2 ± 0.8	1.2 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

^a SD = Standard Deviation (n = 11); ^bSE = Standard Error (n = 11)

Table 3

Content of pistachio (*Pistacia vera*, variety “Aegina”) oils in saturated, unsaturated, and monounsaturated fatty acids (g of fatty acid/100 g total fatty acids).

Samples No	Saturated (SFA) ^c	Unsaturated (UFA) ^d	Monounsaturated (MUFA) ^e
1-A	13.6	86.4	72.2
2-A	11.7	88.3	74.7
3-A	13.4	86.6	71.6
4-A	12.3	87.7	76.0
5-A	14.8	85.2	72.4
6-A	16.0	84.0	73.2
7-A	12.8	87.2	72.8
8-A	14.2	85.8	71.7
9-A	13.9	86.1	71.8
10-A	15.5	84.5	72.6
11-A	13.9	86.1	72.4
Mean^a	13.8	86.2	72.8
1-B	11.4	88.6	68.0
2-B	11.0	89.0	73.0
3-B	11.8	88.2	69.2
4-B	12.0	88.0	70.3
5-B	12.8	87.2	71.0
6-B	11.8	88.2	71.6
7-B	12.3	87.7	72.1
8-B	12.3	87.8	75.3
9-B	12.6	87.4	73.6
10-B	12.9	87.1	76.5
11-B	12.7	87.3	73.8
Mean^b	12.2	87.9	72.2

^a mean (n = 11) of the 2017 eleven samples; ^bmean (n = 11) of the 2018 eleven samples; ^cSFA consist of myristic, palmitic, margaric, stearic, arachidic, behenic, tricosylic and lignoceric acids; ^dUFA consist of palmitoleic, heptadecenoic, linoleic, oleic and gondoic acids; ^eMUFA consist of palmitoleic, heptadecenoic, oleic and gondoic acids.

The major fatty acids found in the pistachio oil samples were oleic (71.7 ± 1.3% for 2017 and 71.2 ± 2.6% for 2018), linoleic (13.3 ± 1.3% for 2017 and 15.7 ± 2.9% for 2018) and palmitic (12.2 ± 1.2% for 2017 and 10.7 ± 0.5% for 2018). We observed that the oleic acid content of the oils was the same in both growing seasons, the linoleic acid content increased slightly, while the palmitic content presented a small decrease. The stearic acid content was found to be 1.4 ± 0.2% for 2017 and 1.2 ± 0.2% for 2018, also showing a small decrease. The content of

other fatty acids was <1.0%. Tricosylic and lignoceric acids, in one sample of 2018, were identified in trace amounts. Furthermore, in six samples from harvest 2017 behenic acid was not detected. These results are in accordance with literature (Satil et al., 2003; Ozturk, Sagdic, Yalcin, Capar, & Asyali, 2016; Agar, Kaşka, & Kafkas, 1995).

The oleic acid was the dominant fatty acid in all samples and together with linoleic acid constituted 85.9 ± 1.4% of the total fatty acids. These results present great similarities with those of Yildiz et al. (1998), Okay (2002) and Luh, Wong, and El-Shimi (1981). Oleic acid is the main fatty acid found in olive, safflower, and rapeseed oils. Olive oil has the highest oleic acid content (81.5%). Linoleic acid is the predominant fatty acid found in corn and soybean oils. In addition, corn oil has the highest linoleic acid content (58.4%) (Liu et al., 2018).

The total UFAs content was found to be 86.2% and 87.9% for the years 2017 and 2018, respectively. These findings are similar to those of Kamangar, Farrohi, and Mehran (1975), who studied the Iranian pistachio nuts (88.0%). Oleic and linoleic acid, belonging to UFAs, are important from a nutritional point of view. Their high levels make pistachio nut oil more stable to oxidative alterations. In the present study, the SFAs, UFAs, monounsaturated fatty acids (MUFAs) were found at 13.8%, 86.2%, 72.8% and 12.2%, 87.9%, 72.2% of the total fatty acids for 2017 and 2018 harvest, respectively (Table 3). These findings agree with those of Maskan and Karatas (1999). Given the fact of the slightly higher percentage of UFAs in 2018 harvest, it is assumed that the harvest of 2018 was superior in nutritional value compared to 2017.

Collection of meteorological data from the two years for the months of June, July and August, the environmental conditions of which are crucial for the fruiting and the growth of the pistachio tree, showed that the average temperature (T) and the mean rain rate (RR) were T = 28.70 °C, RR = 15.33 mm and T = 28.17 °C, RR = 36.50 mm for 2017 and 2018, respectively (Table S1) (Michelaraki, 2017, 2018). Reduced T and increased RR (2018 harvest) caused an increase in lipid unsaturation, which is in accordance with many reported studies in plants (Neidleman, 1987; Zhang et al., 2020).

The distribution of pistachio oil and olive oil fatty acids is similar (Arena et al., 2007). Except from coconut oil, the olive, safflower, rapeseed, corn, and soybean oils contain large amounts of UFAs (83.5–95.3%). Rapeseed oil has the highest content of UFAs (95.3%) and the lowest content of SFAs (4.7%). On the contrary, coconut oil has the

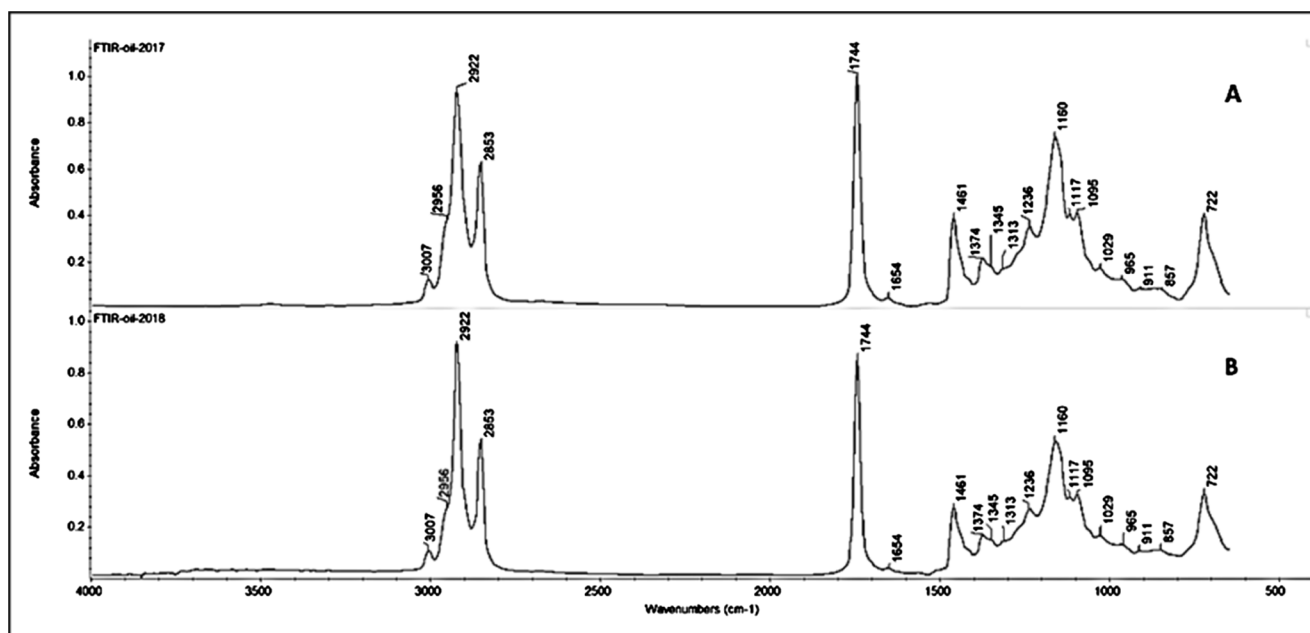


Fig. 2. Representative FTIR spectra of pistachio (*Pistacia vera*, variety “Aegina”) oil samples from the same producer, but from different years of harvest, 2017 (A) and 2018 (B).

Table 4
Peak correspondence of pistachio (*Pistacia vera*, variety “Aegina”) oil FTIR spectra.

Wavenumber (cm ⁻¹)	Function Group	Abbreviation	Reference
3007	C-H symmetric in-plane stretching vibration of = C-H (olefinic double bonds of unsaturated fatty acids)	$\nu_s (=C-H)$	[Schulz & Baranska, 2007; Rohman & Che Man, 2010; Uncu et al., 2019]
2956	C-H asymmetric in-plane stretching vibration of -CH ₃	$\nu_{as}(CH_3)$	[Rohman & Che Man, 2010; Uncu et al., 2019]
2922	C-H asymmetric in-plane stretching vibration of -CH ₂ -	$\nu_{as}(CH_2)$	[Rohman & Che Man, 2010; Uncu et al., 2019; Gurdeniz, Ozen, & Tokatli, 2010]
2853	C-H symmetric in-plane stretching vibration of -CH ₂ -	$\nu_s(CH_2)$	[Rohman & Che Man, 2010; Uncu et al., 2019; Dymińska, Calik, Albegar, Zajac, Kostyń, Lorenc, & Hanuza, 2017]
1744	C = O in-plane stretching vibration	$\nu(C = O)$	[Gurdeniz et al., 2010]
1654	>C = C < cis-olefinic in-plane stretching vibration	$\nu(C = C)$	[Schulz & Baranska, 2007]
1461	C-H in-plane bending vibration of -CH ₂ - (scissoring)	$\delta_s(CH_2)$	[Schulz & Baranska, 2007; Uncu et al., 2019; Gutiérrez, Quiñones-Segura, Sanchez-Reinoso, Diaz, & Abril, 2017]
1374	C-H symmetric in-plane bending vibration of -CH ₃ (mono-, di-, tri-glycerides)	$\delta(CH_3)$	[Dymińska et al., 2017]
1345, 1313	-CH ₂ - out-of-plane bending vibration (wagging)	$\omega(CH_2)$	[Rohman & Che Man, 2010]
1236, 1160, 1117	C-O stretching vibration (esters)	$\nu(C-O)$	[Uncu & Ozen, 2019; Rohman & Che Man, 2010; Uncu et al., 2019; Dymińska et al., 2017]
1095, 1029	in-plane-C-C stretching vibration	$\nu(C-C)$	[Dymińska et al., 2017; Gutiérrez et al., 2017]
965	C-H in-plane bending vibration (scissoring) (<i>trans</i> -olefins)	$\delta_s(C = C = C)$	[Rohman & Che Man, 2010]
911, 857	-CH ₂ - out-of-plane vibration	$\gamma(CH_2)$	[Rohman & Che Man, 2010]
722	out-of-plane vibration	$\gamma(C = C)$	[Dymińska et al., 2017]
	in-plane bending vibration of -CH ₂ - (rocking)	$\rho(CH_2)$	[Farber et al., 2019]

lowest polyunsaturated fatty acids (PUFAs, 1.3%) and UFAs (7.1%) contents, and the highest SFAs (92.9%) content (Liu et al., 2018).

3.3. Spectroscopic study

The infrared (IR) and Raman spectroscopies are complementary techniques and can provide useful qualitative and quantitative information on the chemical composition of edible oils. These two techniques of analysis allow the quick determination of the total unsaturation of oils, the content of FFAs (El-Abassy, Donfack, & Materny, 2009; Muik, Lendl, Molina-Díaz, & Ayora-Cañada, 2003), the distinction and the classification of oils (Yang, Irudayaraj, & Paradkar, 2005), the detection

of oil adulteration (Baeten et al., 2005), and the stages of ripening of the kernels of the oils (López-Sánchez, Ayora-Cañada, & Molina-Díaz, 2010).

3.3.1. Ftir spectroscopic study

Two representative FTIR spectra of two pistachio oil samples (same producer, different harvesting years) are depicted in Fig. 2 and the interpretation of each vibration is summarized in Table 4.

Pistachio oil mostly contains triglycerides, which consist of one molecule of glycerol esterified with three FAs. The peaks at 2922 and 2853 cm⁻¹ are due to the asymmetric and symmetric stretching vibration of the C-H bonds of the non-aromatic methylene group. We noticed that the peaks were high and relatively wide. On the one hand, this is mainly due to the high number of methylene groups on the fatty acid (at least 12) and on the other hand due to the high content of fatty acids in pistachio oils. The stretching C-H vibrations of the terminal methyl groups -CH₃ are noticeably weaker than those of the more abundant -CH₂- groups. The weak right-hand shoulder at the strong 2922 cm⁻¹ band probably represents the weaker symmetric stretching C-H vibrations in -CH₃, $\nu_s(-CH_3)$, which is expected to appear at around ~ 2875 cm⁻¹ (Kamnev et al., 2021). Two other important peaks appear at 1744 and 1160 cm⁻¹, which are correlated to the stretching vibration of the carbonyl (C = O) of the ester bonds, and to the asymmetric stretching vibration of the C-O ester bonds, respectively (Uncu, Ozen, & Tokatli, 2019). The spectral intensity of the peaks at 1236, 1160 and 1117 cm⁻¹ are strongly dependent on the date of harvest. According to an olive oil study by López-Sánchez et al. (2010), these peaks are observed more intense at the beginning and decrease with the ripening of the olive oil.

3.3.2. Raman spectroscopic study

Two representative Raman spectra of pistachio oil samples from the same origin but of two consecutive years of harvest and the correspondence of their most important spectrum peaks are presented in Fig. 3 and Table 5, respectively.

As depicted in Table 5, the characteristic peak of *cis*-double bonds (C = C) is an acute peak at 1657 cm⁻¹. Also, significant, sharp, and wide peaks are present at 1442 and 1305 cm⁻¹, which represent the scissor bending vibration (in-plane) and the twisting bending vibration (out-of-plane), of the bonds C-H of -CH₂-, respectively.

The comparison of the FTIR and Raman spectra of the pistachio oil samples shows that the wavenumbers of some characteristic peaks were found to be similar, while the intensities differed significantly. For the same vibration modes, these differences can be explained by different physical rules, which FTIR and Raman spectroscopies are based upon. For example, the peaks at 1654–1657 and 1442 cm⁻¹, which are attributed to the *cis*-double bonds of UFAs and the bending vibrations of the C-H bonds of the methylene group, respectively, appeared weak in the IR, but were stronger in the Raman spectra. In contrast, the Raman scatter signal at 732 cm⁻¹ was quite weak, but the corresponding infrared absorption peak (722 cm⁻¹) was strong. In crystalline samples this peak is split in two (e.g. 720 and 730 cm⁻¹), while in non-crystalline samples, such as pistachio oil samples, a single intermediate peak is observed (Farber et al., 2019).

3.4. Multivariate statistical analysis

The differentiation of pistachio oils according to the year of harvest of pistachios and therefore according to the quality (2017, 2018) was carried out using multivariate statistical analysis. The independent variables (fatty acid content for GC-MS and peak intensities for FTIR and Raman) and the dependent variable (harvest year) were initially determined.

The independent variables were datasets containing large number of variables (chemometrics data). For this kind of datasets data filter is strongly recommended. These variables were filtered by the software, allowing a reduction in the number of data sets and a corresponding

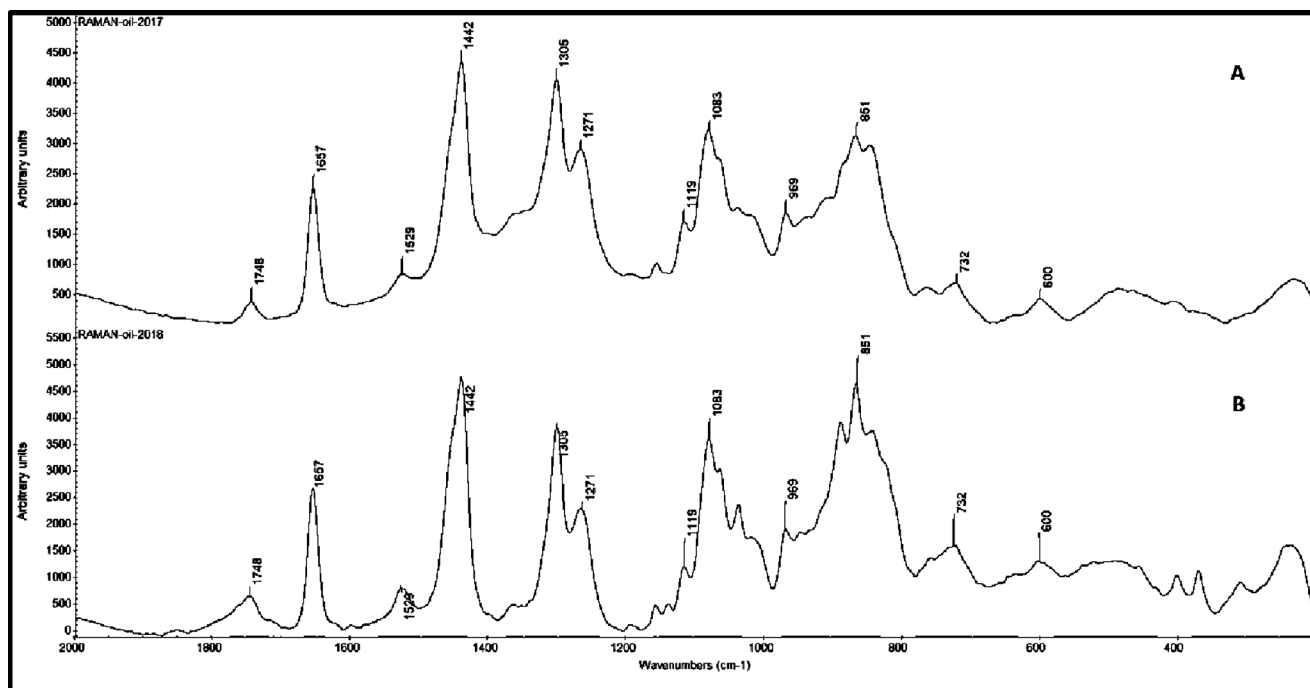


Fig. 3. Representative Raman spectra of pistachio (*Pistacia vera*, variety "Aegina") oil samples from the same producer but from different years of harvest, 2017 (A) and 2018 (B).

increase in the power of the Partial Least Squares (PLS) regression models that were developed. The interquartile range (IQR) filter of MetaboAnalyst was used to detect independent variables' values, which were non-informative, prevented a symmetric data distribution and were identified as outliers. Independent variables <250 were subjected to 5% filtering, while those between 250 and 500 and 500–1000 to 10% and 25% filtering, respectively (Hackstadt & Hess, 2009).

After the removal of the non-informative variables, the remaining 95% of GC–MS fatty acids content, 90% of FTIR and 75% of Raman intensities were normalized by MetaboAnalyst software. The samples normalization allowed the better discrimination of differences among the samples; data logarithmic transformation and auto scaling (mean-centering and dividing by the SD of each variable) were two different approaches that were combined to make the individual features follow a normal distribution and be more comparable.

Then, three PLS regression models were developed based on: 1) the qualitative and quantitative composition of the oils, as determined by GC–MS, 2) the FTIR spectra, and 3) the Raman spectra. PLS method used multivariate regression techniques to extract via linear combination of original independent variables the information that could predict the dependent variable. Each PLS regression model generated different number of latent factors. Each latent factor determined the relationship between the dependent variable and the independent variables. The latent factor, which had more variance explained, was chosen for the model generation.

For each model, the test of equality of group means using SPSS measured each independent variable's potential to discriminate data between two years of harvest, before the model was created. For independent variables, *t*-test was performed using the year of harvest as the grouping variable. If the significance value (S.V.) was greater than 0.05, the variable was rejected, because it did not contribute to the model. Wilks' lambda was another measure of a variable's potential to discriminate using the year of harvest as the grouping variable. Smaller values of Wilks' lambda indicated that the variable was better at discriminating between groups and resulted in an accurate and correct function, which represented a robust discriminant model with all the significant variables in it.

As for the canonical discriminant function, the eigenvalues table of SPSS provided information about its relative efficacy. The canonical correlation value measured the extent of association between the discriminant scores and the groups. Wilks' lambda was also a measure of how well the function separated cases into groups. Higher values of canonical correlation and smaller values of Wilks' lambda indicated greater discriminatory ability of the function. The associated chi-square statistic tested the hypothesis that the function was equal across the groups. Low correlation between the two years of harvest resulted in high values for chi-square. The small significance value indicated that the discriminant function could successfully separate the two groups.

For validation of the three predictive PLS models, cross-validation using SPSS and permutation tests using MetaboAnalyst were performed. Both types of test statistics assessed the significance of class discrimination. Cross-validation tested the model's ability to predict a new independent dataset in order to flag problems like overfitting or selection bias. The permutation tests of MetaboAnalyst software (Figs. 4, 6, 8) presented the distribution derived from the permuted samples. The black highlighted pointer represented the original sample. The further to the right of the distribution was the black highlighted pointer, the more significant from a statistical point of view was the separation between the two groups (Barberini et al., 2016).

3.4.1. Discrimination based on GC–MS analysis

Applying the Orthogonal Partial Least Squares-Discrimination Analysis (orthoPLS-DA), the model used one latent factor to explain the variances of the independent (cumulative X variance) and the dependent (cumulative Y variance) variables. The test of equality of group means together with the Variable Importance in the Projection (VIP) table, which exhibits the importance of each variable in the projection, proved that five from the total fatty acids were statistically significant for the discrimination between 2017 and 2018 harvest. *T*-tests showed that palmitic acid followed by stearic, linoleic, behenic and palmitoleic played the most important role, S.V. < 0.05 and small value of Wilks' lambda (Table 6). The canonical discriminant function (S.V. < 0.05) indicated that the discriminant function separated the two groups of harvesting year. From the original group cases, 86.4% were

Table 5

Peak correspondence of pistachio (*Pistacia vera*, variety "Aegina") oil Raman spectra.

Wavenumber (cm ⁻¹)	Function Group	Abbreviation	Reference
1748	C = O in-plane stretching vibration (esters of triglycerides)	v(C = O)	[Schulz & Baranska, 2007; Vaskova & Buckova, 2017; Liu, Chen, Shi, Yang, & Han, 2020; Portarena et al., 2019]
1657, 1529	>C = C < cis-olefinic in-plane stretching vibration (carotenoids in extra virgin oils)	v(C = C)	[Vaskova & Buckova, 2017; Liu et al., 2020; Carmona, Lafont, Jiménez-Sanchidrián, & Ruiz, 2014]
1442	C-H in-plane bending vibration of -CH ₂ - (scissoring)	δ _s (CH ₂)	[Vaskova & Buckova, 2017; Liu et al., 2020; Carmona et al., 2014]
1305	C-H out-of-plane bending vibration of -CH ₂ - (twisting)	τ(CH ₂)	[Carmona et al., 2014]
1271	C-H out-of-plane bending vibration of -CH ₂ - (wagging)	ω(CH ₂)	[Schulz & Baranska, 2007]
1119, 1083	C-O stretching vibration (esters) C-C in-plane stretching vibration (esters)	ν(C-O) ν(C-C)	[Jentzsch & Ciobotă, 2014; Liu et al., 2020] [Portarena et al., 2019; Czamara, Majzner, Pacia, Kochan, Kaczor, & Baranska, 2014]
969	C-H in-plane bending vibration (scissoring) (<i>trans</i> -olefins)	δ _s (H-C = C-H)	[Liu et al., 2020; Ali, Nawaz, Saleem, Nurjis, & Ahmed, 2016]
851	C-H in-plane bending vibration of -CH ₂ - (scissoring) C-C in-plane stretching vibration	δ _s (CH ₂) ν(C-C)	[Czamara et al., 2014] [Jentzsch & Ciobotă, 2014; Liu et al., 2020]
732	=C-H out-of-plane bending vibration (<i>cis</i> -olefins)	γ(C = C)	[Dymińska et al., 2017; Liu et al., 2020]
600	C-H in-plane bending vibration of -CH ₂ - (rocking) C-C out-of-plane bending vibration	ρ(CH ₂) γ(C-C-C)	[Ali et al., 2016]

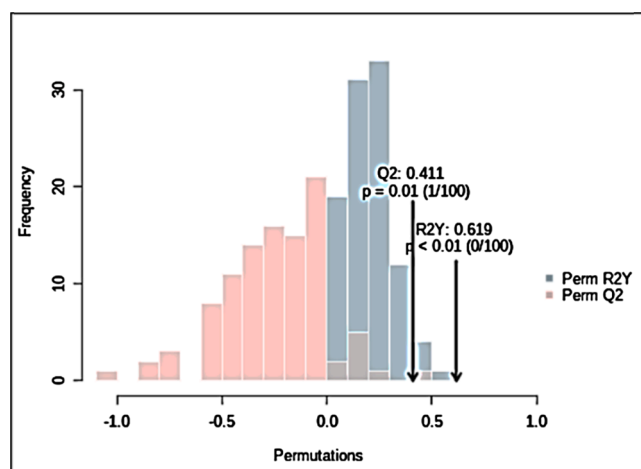


Fig. 4. Orthogonal Partial Least Squares - Discriminant Analysis (orthoPLS-DA) permutation test for the discrimination model of GC-MS fatty acids using the year of harvest as grouping variable (MetaboAnalyst); (permutation numbers:100; $p < 0.01$).

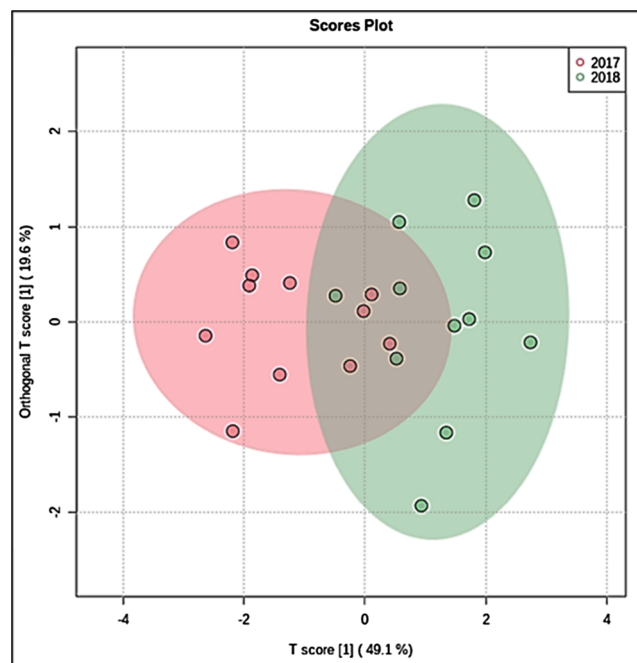


Fig. 5. Orthogonal Partial Least Squares-Discrimination (orthoPLS-DA) for the discrimination model of GC-MS fatty acids using the year of harvest as grouping variable (MetaboAnalyst).

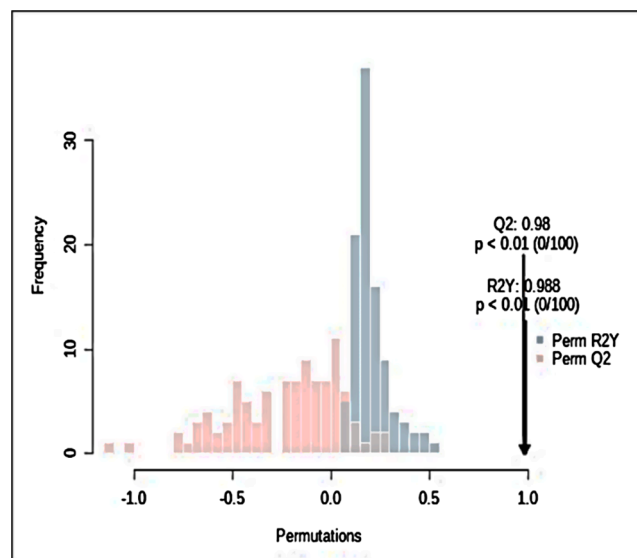


Fig. 6. Orthogonal Partial Least Squares - Discriminant Analysis (orthoPLS-DA) permutation for the discrimination model of FTIR variables using the year of harvest as grouping variable (MetaboAnalyst) (permutation numbers:100; $p < 0.01$).

classified correctly, while from the cross-validated ones, 72.7% with $R^2 = 0.619$ and $Q^2 = 0.411$ (Figs. 4 and 5).

3.4.2. Discrimination based on FTIR spectroscopic study

FTIR and Raman spectral data showed a similar distribution of characteristic peaks from year to year. It was observed that the spectra of the samples showed visually significant similarities with peaks in all major spectral regions. Thus, only multivariate statistical analysis can prove with certainty whether the samples show statistically significant differences between the two years of harvest.

The function created by the total spectral region 400–4000 cm⁻¹

Table 6
Performance of t-test for Equality of Means.

Fatty Acids		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
tetradecanoic acid	Equal variances assumed	16.244	0.001	0.947	20	0.355	0.00909	0.00960	-0.01092	0.02911
	Equal variances not assumed			0.947	12.337	0.362	0.00909	0.00960	-0.01175	0.02993
palmitoleic acid ^a	Equal variances assumed	0.400	0.534	2.184	20	0.041	0.10545	0.04828	0.00475	0.20616
	Equal variances not assumed			2.184	19.396	.041 ^a	0.10545	0.04828	0.00455	0.20636
palmitic acid ^a	Equal variances assumed	4.096	0.057	3.587	20	0.002	1.46273	0.40782	0.61203	2.31343
	Equal variances not assumed			3.587	13.297	.003 ^a	1.46273	0.40782	0.58368	2.34177
heptadecenoic acid	Equal variances assumed	7.120	0.015	-0.149	20	0.883	-0.00091	0.00608	-0.01360	0.01178
	Equal variances not assumed			-0.149	14.961	0.883	-0.00091	0.00608	-0.01388	0.01206
margaric acid	Equal variances assumed	0.131	0.721	-0.714	20	0.484	-0.00364	0.00509	-0.01426	0.00699
	Equal variances not assumed			-0.714	19.505	0.484	-0.00364	0.00509	-0.01428	0.00701
linoleic acid ^a	Equal variances assumed	3.923	0.062	-2.404	20	0.026	-2.32000	0.96526	-4.33349	-0.30651
	Equal variances not assumed			-2.404	14.047	.031 ^a	-2.32000	0.96526	-4.38962	-0.25038
oleic acid	Equal variances assumed	4.617	0.044	0.544	20	0.592	0.48273	0.88710	-1.36773	2.33319
	Equal variances not assumed			0.544	14.823	0.594	0.48273	0.88710	-1.41005	2.37551
stearic acid ^a	Equal variances assumed	0.166	0.688	3.062	20	0.006	0.27545	0.08996	0.08781	0.46310
	Equal variances not assumed			3.062	19.160	.006 ^a	0.27545	0.08996	0.08728	0.46363
gondoic acid	Equal variances assumed	1.508	0.234	1.325	20	0.200	0.04909	0.03704	-0.02818	0.12636
	Equal variances not assumed			1.325	14.583	0.205	0.04909	0.03704	-0.03006	0.12824
araxidic acid	Equal variances assumed	0.029	0.868	-1.866	20	0.077	-0.02455	0.01316	-0.05199	0.00290
	Equal variances not assumed			-1.866	19.892	0.077	-0.02455	0.01316	-0.05200	0.00291
behenic acid ^a	Equal variances assumed	1.761	0.199	-2.196	20	0.040	-0.03182	0.01449	-0.06204	-0.00160
	Equal variances not assumed			-2.196	17.335	.042 ^a	-0.03182	0.01449	-0.06234	-0.00129
tricosanoic acid	Equal variances assumed	4.938	0.038	-1.000	20	0.329	-0.00182	0.00182	-0.00561	0.00197
	Equal variances not assumed			-1.000	10.000	0.341	-0.00182	0.00182	-0.00587	0.00223
tetracosanoic acid	Equal variances assumed	4.938	0.038	-1.000	20	0.329	-0.00091	0.00091	-0.00281	0.00099
	Equal variances not assumed			-1.000	10.000	0.341	-0.00091	0.00091	-0.00293	0.00112

^a Fatty acids which played the most important role for the discrimination between the two years of harvest, S.V. < 0.05.

showed great discriminatory ability (Wilks' lambda = 0.002) between 2017 and 2018 harvests' samples. The Classification Function Coefficients table indicated how strongly (higher magnitudes) the discriminating variables effected the score. The wavenumbers at 2922, 2853, 1744, 1654 and 722 cm⁻¹ had the greatest impact on the discriminant score. From cross-validated grouped cases, 100.0% were classified correctly according to their FTIR variables and year of harvest (Figs. 6 and 7). The values of R² = 0.988 and Q² = 0.980, demonstrated in Fig. 6, indicated a high predictive accuracy.

3.4.3. Discrimination based on Raman spectroscopic study

The whole spectra range was selected for orthoPLS-DA. The 22 pistachio oil samples were not sufficiently classified into two groups (2017 and 2018 harvest year) (Fig. 8). The S.V. greater than 0.05 showed that the discrimination was not successful. Furthermore, the bad predictive accuracy of the discrimination model was demonstrated through the R² = 0.644 and Q² = 0.270 values (Fig. 9). The results indicate that only the 59.1% of original and cross-validated group cases were correctly classified.

From the above statistical analysis, it appears that the proposed chemometric models of differentiation of pistachio oils, which come from two consecutive harvest periods (2017, 2018), based on cross-

validation and: a) GC-MS analysis and b) in FTIR spectroscopy are equivalent, but FTIR spectroscopy is faster, cheaper, more environmentally friendly and does not require specialized personnel. The corresponding chemometric model based on Raman spectroscopy is considered unsuccessful.

4. Conclusions

The fatty acid composition of *Pistacia vera* (Greek variety "Aegina") oils for two consecutive harvest years (2017, 2018) was analyzed by GC-MS, FTIR and Raman techniques. Twenty-two samples (2017, 11 samples and 2018, 11 samples) originated from four different pistachios production and marketing Greek regions, namely Aegina, Megara, Phthiotis and Trizina, were collected. The producers followed the same cultivation and post-harvest cares in both seasons. The extracted oil mean yield was found to be similar for the two growing seasons (61.7 and 60.8 g/100 g dried sample for 2017 and 2018, respectively). The oil analysis performed by GC-MS showed that the SFAs content, in all samples, reduced in 2018, with the mean value decreasing from 13.8% (2017) to 12.2% w/w (2018). On the contrary, the content of UFAs was found to increase in all samples in 2018, with the mean value varying from 86.2% (2017) to 87.2% w/w (2018). Regarding the MUFAs

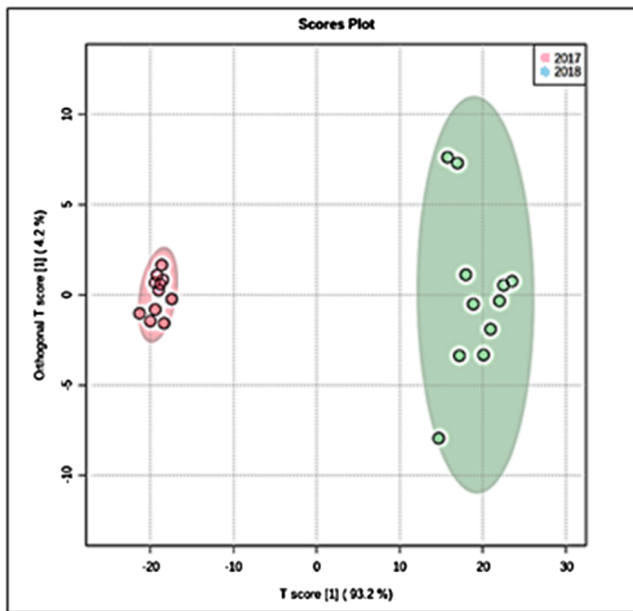


Fig. 7. Orthogonal Partial Least Squares-Discrimination (orthoPLS-DA) for the discrimination model of FTIR variables using the year of harvest as grouping variable (MetaboAnalyst).

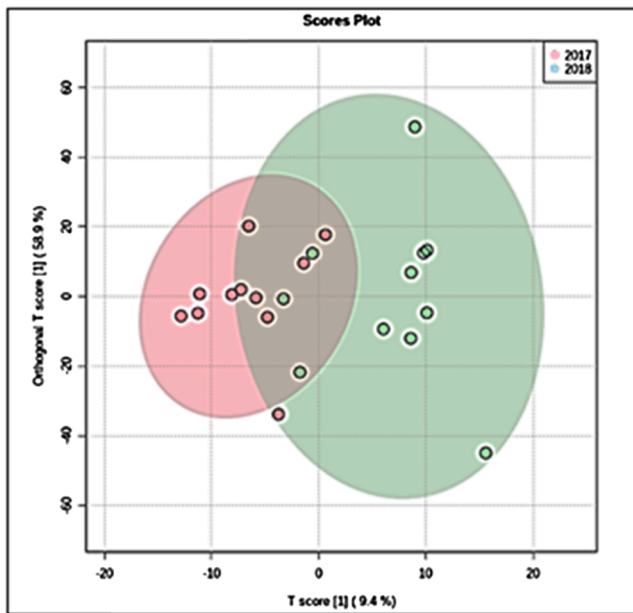


Fig. 8. Orthogonal Partial Least Squares-Discrimination (orthoPLS-DA) for the discrimination model of Raman variables using the year of harvest as grouping variable (MetaboAnalyst).

content, the slight decrease is not systematic in each sample and therefore no safe conclusions can be drawn. The quality superiority of 2018 harvest year was proven due to the higher content of unsaturated fatty acids compared to 2017.

Three chemometric models were also developed, in order to discriminate the oils of the two growing seasons, and therefore according to their quality, based on GC-MS, FTIR and Raman data combined with cross-validation techniques. The Raman chemometric model was unsuccessful (S.V. greater than 0.05). The differentiation chemometric model based on FTIR spectroscopy and cross-validation technique was found to be more successful (100.0% successful

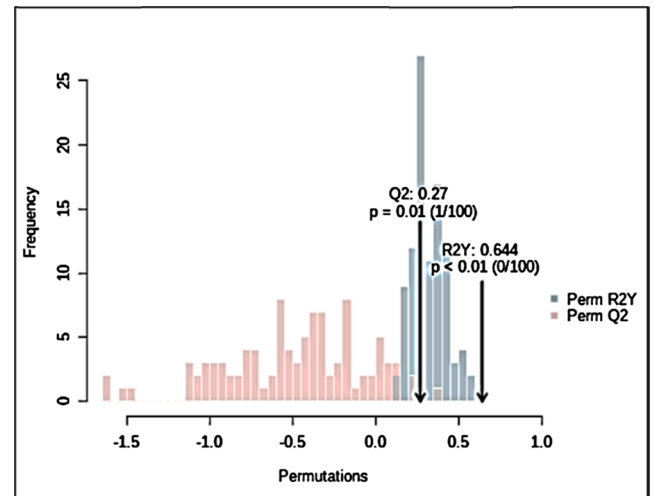


Fig. 9. Orthogonal Partial Least Squares - Discriminant Analysis (orthoPLS-DA) permutation for the discrimination model of Raman variables using the year of harvest as grouping variable (MetaboAnalyst) (permutation numbers:100; $p < 0.01$).

discrimination; $R^2 = 0.988$; $Q^2 = 0.980$) than the corresponding of GC-MS (72.3% successful discrimination; $R^2 = 0.619$; $Q^2 = 0.411$). Furthermore, FTIR spectroscopic technique is fast, more economical, environmentally friendly, and does not require special staff.

CRediT authorship contribution statement

Lydia Valasi: Conceptualization, Software, Formal analysis, Investigation, Resources, Writing – original draft. **Maroula G. Kokotou:** Validation, Formal analysis, Investigation, Writing – review & editing. **Christos S. Pappas:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Supervision.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This research work was supported by the Hellenic Foundation for Research and Innovation (HFRI) and the General Secretariat for Research and Technology (GSRT), under the HFRI PhD Fellowship grant (GA. no. 1313). The authors have no conflict of interest to declare.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110590>.

References

- Agar, T., Kaşka, N., & Kafkas, S. (1995). Effect of different ecologies on the fat content and fatty acid composition of different *Pistacia vera* varieties grown in different parts of Turkey. *Acta Horticulturae*, 419, 411–415.
- Ali, H., Nawaz, H., Saleem, M., Nurjis, F., & Ahmed, M. (2016). Qualitative analysis of desi ghee, edible oils, and spreads using Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, 47, 706–711. <https://doi.org/10.1002/jrs.4891>.
- Arena, E., Campisi, S., Fallico, B., & Maccarone, E. (2007). Distribution of fatty acids and phytosterols as a criterion to discriminate geographic origin of pistachio seeds. *Food Chemistry*, 104, 403–408. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.029>.
- Baeten, V., Pierna, J. A. F., Dardenne, P., Meurens, M., García-González, D. L., & Aparicio-Ruiz, R. (2005). Detection of the presence of hazelnut oil in olive oil by FT-

- Raman and FT-MIR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 6201–6206. <https://doi.org/10.1021/jf050595n>.
- Ballistreri, G., Arena, E., & Fallico, B. (2011). Pistachios as a source of health-promoting substances. *Acta Horticulturae*, 912, 837–842. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2011.912.126>.
- Barberini, L., Noto, A., Saba, L., Palmas, F., Fanos, V., Dessi, A., et al. (2016). Multivariate data validation for investigating primary HCMV infection in pregnancy. *Data in Brief*, 9, 220–230. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2016.08.050>.
- Bulló, M., Juanola-Falgarona, M., Hernández-Alonso, P., & Salas-Salvadó, J. (2015). Nutrition attributes and health effects of pistachio nuts. *British Journal of Nutrition*, 113, S79–S93. <https://doi.org/10.1017/s0007114514003250>.
- Carmona, M., Lafont, F., Jiménez-Sanchidrián, C., & Ruiz, J. (2014). Raman spectroscopy study of edible oils and determination of the oxidative stability at frying temperatures. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116, 1451–1456. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201400127>.
- Chiu, H. H., & Kuo, C. H. (2020). Gas chromatography-mass spectrometry-based analytical strategies for fatty acid analysis in biological samples. *Journal of Food and Drug Analysis*, 28, 60–73. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2019.10.003>.
- Czamara, K., Majzner, K., Pacia, M., Kochan, K., Kaczor, A., & Baranska, M. (2014). Raman spectroscopy of lipids: a review. *Journal of Raman Spectroscopy*, 46, 4–20. <https://doi.org/10.1002/jrs.4607>.
- Dymińska, L., Calik, M., Albegar, A.M.M., Zajac, A., Kostyń, K., Lorenc, J., & Hanuza, J. (2017). Quantitative determination of the iodine values of unsaturated plant oils using infrared and Raman spectroscopy methods. *International Journal of Food Properties*, 20, 2003–2015. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1230744>.
- El-Abassy, R. M., Donfack, P., & Materny, A. (2009). Rapid determination of free fatty acid in extra virgin olive oil by raman spectroscopy and multivariate analysis. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86, 507–511. <https://doi.org/10.1007/s11746-009-1389-0>.
- Farber, C., Li, J., Hager, E., Chemelewski, R., Mullet, J., Rogachev, A. Y., et al. (2019). Complementarity of Raman and infrared spectroscopy for structural characterization of plant epicuticular waxes. *ACS Omega*, 4, 3700–3707. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b03675>.
- Georgiadou, M., Gardeli, C., Komaitis, M., Tsitsigiannis, D. I., Paplomatas, E. J., Sotirakoglou, K., et al. (2015). Volatile profiles of healthy and aflatoxin contaminated pistachios. *Food Research International*, 74, 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.03.021>.
- Gurdeniz, G., Ozen, B., & Tokatli, F. (2010). Comparison of fatty acid profiles and mid infrared spectral data for classification of olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112, 218–226. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200800229>.
- Gutiérrez, L. F., Quiñones-Segura, Y., Sanchez-Reinoso, Z., Díaz, D. L., & Abril, J. I. (2017). Physicochemical properties of oils extracted from γ -irradiated *Sacha Inchi* (*Plukenetia volubilis* L.) seeds. *Food Chemistry*, 237, 581–587. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.148>.
- Hackstadt, A. J., & Hess, A. M. (2009). Filtering for increased power for microarray data analysis. *BMC Bioinformatics*, 10, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-11>.
- Jentzsch, P. V., & Ciobotă, V. (2014). Raman spectroscopy as an analytical tool for analysis of vegetable and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 29, 287–295. <https://doi.org/10.1002/ffj.3203>.
- Kamangar, T., Farrohi, F., & Mehran, M. (1975). Characteristics of pistachio kernel oils from Iranian cultivars. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 52, 512–513. <https://doi.org/10.1007/bf02640742>.
- Kamnev, A. A., Dyatlova, Y. A., Kenzhegulov, O. A., Vladimirova, A. A., Mamchenkova, P. V., & Tugarova, A. V. (2021). Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopic analyses of microbiological samples and biogenic selenium nanoparticles of microbial origin: Sample preparation effects. *Molecules*, 26, 1146. <https://doi.org/10.3390/molecules26041146>.
- Küçüköner, E., & Yurt, B. (2003). Some chemical characteristics of *Pistacia vera* varieties produced in Turkey. *European Food Research and Technology*, 217, 308–310. <https://doi.org/10.1007/s00217-003-0763-7>.
- Liu, H., Chen, Y., Shi, C., Yang, X., & Han, D. (2020). FT-IR and Raman spectroscopy data fusion with chemometrics for simultaneous determination of chemical quality indices of edible oils during thermal oxidation. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 119, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108906>.
- Liu, X., Hoshino, N., Wang, S., Masui, E., Chen, J., & Zhang, H. (2018). A novel evaluation index for predicting the degradation rate of frying oils based on their fatty acid composition. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 120, 1–6. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201700528>.
- López-Sánchez, M., Ayora-Cañada, M. J., & Molina-Díaz, A. (2010). Olive fruit growth and ripening as seen by vibrational spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 82–87. <https://doi.org/10.1021/jf902509f>.
- Luh, B. S., Wong, W. S., & El-Shimi, N. E. (1981). Effect of processing on some chemical constituents of pistachio nuts. *Journal of Food Quality*, 5, 33–41. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.1982.tb00954.x>.
- Mahmoodabadi, S.K., Panahi, B., Agharahimi, J., & Salajegheh, F. (2012). Determination of compounds existing in fruits of three pistachio (*Pistacia vera* L.) cultivars in kerman province. *Journal of Biological & Environmental Sciences*, 6, 81–86. Retrieved from <https://dergipark.org.tr/tr/pub/jbes/issue/38002/438803>. Accessed March 17, 2021.
- Martínez, M. L., Fabiani, M. P., Baroni, M. V., Huaman, R. N. M., Ighani, M., Maestri, D. M., et al. (2016). Argentinian pistachio oil and flour: A potential novel approach of pistachio nut utilization. *Journal of Food Science and Technology*, 53, 2260–2269. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2184-1>.
- Maskan, M., & Karataş, Ş. (1999). Storage stability of whole-split pistachio nuts (*Pistacia vera* L.) at various conditions. *Food Chemistry*, 66, 227–233. [https://doi.org/10.1016/s0308-8146\(99\)00055-2](https://doi.org/10.1016/s0308-8146(99)00055-2).
- Michelaraki, M. (2017). More Climatic Bulletin. Hellenic National Meteorological Service. Retrieved from <http://www.emy.gr/emyl/climatology/climatology>. Accessed March 17, 2021.
- Michelaraki, M. (2018). More Climatic Bulletin. Hellenic National Meteorological Service. Retrieved from <http://www.emy.gr/emyl/climatology/climatology>. Accessed March 17, 2021.
- Muik, B., Lendl, B., Molina-Díaz, A., & Ayora-Cañada, M. J. (2003). Direct, reagent-free determination of free fatty acid content in olive oil and olives by Fourier transform Raman spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 487, 211–220. [https://doi.org/10.1016/s0003-2670\(03\)00560-9](https://doi.org/10.1016/s0003-2670(03)00560-9).
- Neidleman, S. L. (1987). Effects of temperature on lipid unsaturation. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, 5, 245–268. <https://doi.org/10.1080/02648725.1987.10647839>.
- Okay, Y. (2002). The comparison of some pistachio cultivars regarding their fat, fatty acids and protein content. *Gartenbauwissenschaft*, 67, 107–113. Retrieved from http://www.pubhort.org/ejhs/2002/file_3705.pdf. Accessed March 17, 2021.
- Ozturk, I., Sagdic, O., Yalcin, H., Capar, T. D., & Asyali, M. H. (2016). The effects of packaging type on the quality characteristics of fresh raw pistachios (*Pistacia vera* L.) during the storage. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 65, 457–463. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.046>.
- Portarena, S., Anselmi, C., Zadra, C., Farinelli, D., Famiani, F., Baldacchini, C., et al. (2019). Cultivar discrimination, fatty acid profile and carotenoid characterization of monovarietal olive oils by Raman spectroscopy at a single glance. *Food Control*, 6, 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.09.011>.
- Rohman, A., & Che Man, Y. B. (2010). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for analysis of extra virgin olive oil adulterated with palm oil. *Food Research International*, 43, 886–892. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.12.006>.
- Rowshan, V., Bahmanzadegan, A., & Saharkhiz, M. J. (2013). Influence of storage conditions on the essential oil composition of *Thymus daenensis* Celak. *Industrial Crops and Products*, 49, 97–101. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.04.029>.
- Satıl, F., Azcan, N., & Baser, K. H. C. (2003). Fatty acid composition of pistachio nuts in Turkey. *Chemistry of Natural Compounds*, 39, 322–324. <https://doi.org/10.1023/b:conc.0000003408.63300.b5>.
- Schulz, H., & Baranska, M. (2007). Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 43, 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2006.06.001>.
- Terzo, S., Mulè, F., Caldara, G. F., Baldassano, S., Puleio, R., Vitale, M., et al. (2020). Pistachio consumption alleviates inflammation and improves gut microbiota composition in mice fed a high-fat diet. *International Journal of Molecular Science*, 21, 365. <https://doi.org/10.3390/ijms21010365>.
- Uncu, O., & Ozen, B. (2019). A comparative study of mid-infrared, UV-Visible and fluorescence spectroscopy in combination with chemometrics for the detection of adulteration of fresh olive oils with old olive oils. *Food Control*, 105, 209–218. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.06.013>.
- Uncu, O., Ozen, B., & Tokatli, F. (2019). Use of FTIR and UV-visible spectroscopy in determination of chemical characteristics of olive oils. *Talanta*, 201, 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.03.116>.
- Vaskova, H., & Buckova, M. (2017). Multivariate study of Raman spectral data of edible oils. *MATEC Web of Conferences*, 125, 1–4. <https://doi.org/10.1051/mateconf/201712502022>.
- Vukajlović, F. N., Predojević, D. Z., Miljković, K. O., Tanasković, S. T., Gvozdenac, S. M., Perišić, V. M., et al. (2019). Life history of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) on dried fruits and nuts: Effects of macronutrients and secondary metabolites on immature stages. *Journal of Stored Products Research*, 83, 243–253. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2019.07.007>.
- Yang, H., Irudayaraj, J., & Paradkar, M. M. (2005). Discriminant analysis of edible oils and fats by FTIR, FT-NIR and FT-Raman spectroscopy. *Food Chemistry*, 93, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.039>.
- Yildiz, M., Gürçan, G. S., & Ozdemir, M. (1998). Oil composition of pistachio nuts (*Pistacia vera* L.) from Turkey. *Fett/Lipid*, 100, 84–86. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1521-4133\(199803\)100:3<84::aid-lipi84>3.0.co;2-b](https://doi.org/10.1002/(sici)1521-4133(199803)100:3<84::aid-lipi84>3.0.co;2-b).
- Zhang, Z., Jin, H., Suo, J., Yu, W., Zhou, M., Dai, W., Song, L., Hu, Y., & Wu, J. (2020). Effect of temperature and humidity on oil quality of harvested *Torreya grandis* cv. Merrillii nuts during the after-ripening stage. *Frontiers in Plant Science*, 11, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.573681>.



Article

Chemometric Differentiation of Pistachios (*Pistacia vera*, Greek 'Aegina' Variety) from Two Different Harvest Years Using FTIR Spectroscopy and DRIFTS and Disk Techniques

Lydia Valasi and Christos S. Pappas *

Laboratory of Chemistry, Department of Food Science & Human Nutrition, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, 11855 Athens, Greece; lydia.valasi@aau.gr

* Correspondence: chrispapp@aau.gr; Tel.: +30-210-5294262

Abstract: Food quality is a topic of utmost importance as more and more emphasis is placed on quality rather than quantity of products. Previous studies have pointed out the interaction of quality with the harvest year. In this study, 22 *Pistacia vera* (Greek 'Aegina' variety) samples (11 from 2017 and 11 from 2018) were differentiated using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and (a) diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFTS) and (b) KBr/sample disk techniques. In both years, the pistachios trees' growing followed standard cultivation methods and similar agronomic conditions. Two chemometric models were developed using partial least squares-discrimination analysis (PLS-DA). DRIFTS proved unable to statistically differentiate the samples ($R^2 = 0.96266$, $Q^2 = 0.63152$). On the contrary, the disk technique completely differentiated the pistachio samples ($R^2 = 0.99705$, $Q^2 = 0.97719$). The 1720–1800 cm^{-1} region mostly contributed to the discrimination. The disk-FTIR chemometric model is fast, robust, economical, and environmentally friendly for determining pistachio matrix quality.

Keywords: pistachios; quality; harvest years; FTIR; DRIFTS; KBr disk; PLS-DA



Citation: Valasi, L.; Pappas, C.S. Chemometric Differentiation of Pistachios (*Pistacia vera*, Greek 'Aegina' Variety) from Two Different Harvest Years Using FTIR Spectroscopy and DRIFTS and Disk Techniques. *AppliedChem* **2021**, *1*, 62–74. <https://doi.org/10.3390/appliedchem1010006>

Academic Editor:
Alessandra Biancolillo

Received: 12 August 2021
Accepted: 30 August 2021
Published: 2 September 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Pistachios (*Pistacia vera*) are valued all over the world and have been described as superfoods for their special organoleptic characteristics (color, intense aroma, and taste), their ability to provide a multitude of beneficial ingredients in small quantities, and the possibility of valorizing the nut as a whole. Pistachio kernels are consumed fresh and dried in the sun or mechanically either as a snack, as a raw material to produce various products, or as a confectionery industry ingredient [1,2]. Their composition is characterized by low carbohydrate content, protein content above 20% *w/w*, and lipid content around 50% *w/w*. They contain a significant number of bioactive antioxidants, such as flavonoids, stilbenes, tocopherols, carotenoids, and chlorophylls [3,4]. In comparison to other nuts, pistachios have higher levels of lutein, zeaxanthin, γ -tocopherol, vitamin K, dietary fibers, phytosterols, and carotenoids [5,6]. Numerous studies prove the beneficial effect of pistachios to human health. They are known for their antioxidant, anti-inflammatory, anti-cancer, and cardioprotective action. In addition, their antimicrobial, anti-ischemic, and immunoregulatory properties have attracted the attention of many researchers [3,7].

In recent years, the pursuit of food quality has been a crucial goal for the food industry and consumers [8]. Several instrumental analytical methodologies have been broadly applied to address quality issues. The majority of these are not suitable for everyday or extensive analyses since they require time-consuming sample preparation and specialized laboratory staff. In recent years, researchers have focused on the application of methods that provide a whole molecular fingerprint of the food matrix, such as spectroscopic (infrared (IR), Raman, nuclear magnetic resonance (NMR)) and chromatographic tech-

niques (gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS)) [9].

In particular, Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy has emerged as a promising analytical tool both on industrial and research scales. Its high competitiveness lies in its speed of analysis, low cost, and convenience of sample preparation [9]. FTIR spectroscopy has been applied to nuts, flours, oils, cakes and flakes, meat, and spirit beverages [10]. The IR spectrum includes information about functional groups of the chemical compounds in the complex matrix of food matrices, such as pistachios. Diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFTS) and KBr/sample disk spectroscopy are two FTIR sampling techniques that became very popular in a very short duration, since they offer a short analysis time and minor sample preparation [11,12].

Typically, in the DRIFTS technique, the sample may be a powder or a rough surface solid through which the radiation is scattered. Infrared light is directed to a sample cup and can lead to a single reflection from the surface (specular reflection) or be reflected multiple times causing diffuse scattered light over a large area. DRIFTS accessories are designed to reject the radiation of specular reflection and to collect by a mirror as much as possible from the diffuse scattered light, subsequently measured by the detector [11,13]. The KBr/sample disk technique involves dilution of the sample in KBr, transportation of a mixture amount in a die, and the use of a hydraulic press to form a disk. By this technique, the diffuse scattered light is increased as the incident light more deeply penetrates the sample [14].

Studies with chemometrics data, such as FTIR, result in complex multivariate datasets, so that multivariate data analysis is required to investigate these complex datasets [15]. FTIR spectroscopy associated with different chemometric tools has been frequently applied to dairy products, honey, coffee, olive oil, and wine [9]. One of the most used methods for development of multivariate discrimination models is partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) [16]. PLS-DA can identify which explanatory variables significantly contribute to the construction of PLS components and, consequently, have a high explanatory power on the response variable [17].

The food quality and, consequently, the chemical characteristics of food matrices can be affected by the year of harvest [18]. In the present study, DRIFT and KBr disk spectra of pistachio samples of the Greek 'Aegina' variety from two consecutive years of harvest were acquired, aiming to: (a) accurately estimate whether pistachios could be classified in two classes due to year-to-year variability and (b) compare which spectroscopic technique gives the best obtained PLS-DA model ascertained through R^2 and Q^2 indicators.

2. Materials and Methods

2.1. Pistachio Samples

A total of 22 *Pistacia vera* samples of the 'Aegina' variety equally obtained from 2 consecutive years of harvest were provided directly from pistachio producers across Greece (Aegina, Megara, Phthiotis, Trizina). The origin conditions (pistachio farmers, field coordinates, cultivation care, post-harvest way of drying) of the 11 samples derived from 2017 harvest year were the same with those of the 11 samples from 2018 harvest year. All samples were unshelled, and the kernels were subjected to pulverization with a food processor equipped with metal cutting blade and stainless steel container (Izzy, Greece), followed by particle size separation to obtain ground samples (pistachio kernel flours) of 500–800 μm . Prior to further analysis, the samples were stored in re-closable plastic bags in the dark and refrigerated ($-20\text{ }^\circ\text{C}$) conditions as a way of avoiding degradation and improving oxidation stability.

2.2. Moisture Content Measurement

According to the AOAC Official Method 925.40, approximately 2 g from each pistachio kernel flour was placed in a ceramic cup and dried in an oven ($102\text{ }^\circ\text{C}$) until constant weight. The moisture content was calculated based on the weight difference before and after drying.

2.3. DRIFTS Sample Analysis

A randomly selected quantity from pistachio kernel flour was placed on a flat surface where infrared radiation was directed to obtain DRIFT spectrum. For each sample, three spectra were collected. Each spectrum of the triplet came from a different part of the same sample (sub-sample). A Thermo Nicolet 6700 FTIR spectrophotometer (Thermo Electron Corporation, Madison, WI, USA) was used, equipped with a deuterated triglycine sulfate (DTGS) detector using a DRIFT Spectra Tech microcup accessory (Spectra-Tech Inc., Stamford, CT, USA) (3 mm diameter, 2 mm height). The spectra were collected as absorbance from 100 scans through the wavenumber region of 400–4000 cm^{-1} . The speed of the interferometer moving mirror was 0.3165 mm/s. A background spectrum was collected using FTIR grade KBr as a non-absorbing matrix powder (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), prior to spectrum recording of each sample. After each measurement, microcup was cleaned with acetone and dried.

2.4. KBr Disk Sample Analysis

A KBr disk sample preparation involved thorough mixing of 200 mg dried KBr powder and 5 mg ground pistachio kernel flour. The mixture was transferred into a 13 mm die and formed a clear disk when pressed under high pressure using a 2- to 8-ton bench top hydraulic press. The spectra were recorded with the above spectrophotometer using an accessory appropriate for disk measurements. Measurements' conditions (scans, wavenumber region, and mirror speed) were previously described. Background measurements were made against pure KBr disk which had no absorptions over the entire absorbance range. Triplicate KBr/sub-samples disks were made for each sample, and the spectrum of each one was recorded.

2.5. FTIR Data Processing

The FTIR data were processed using the Omnic 8.2.0.387 software (Thermo Fisher Scientific Inc., Madison, WI, USA). Both the DRIFT and disk spectra were smoothed using the Savitsky-Golay algorithm (5-point moving second-degree polynomial), and the baseline was corrected using the 'automatic baseline correct function' (second-degree polynomial, 20 iterations). Then, the average spectra of each sample were calculated and converted into Kubelka-Munk units. The Kubelka-Munk conversion compensated for some of the following undesirable effects: low intensity bands were increased relative to intense bands, and strong intensity bands had broader, rounder peak shapes. Finally, spectra absorbance scale was normalized.

2.6. Discriminant Analysis

Classification of the year of harvest was based on DRIFT and disk spectra of pistachio kernel flours. The 650–4000 cm^{-1} spectral region was used. Before the development of the discriminant analysis, the homogeneity of the covariance matrices was ensured since the ratio of the two groups (2017, $n = 11$ and 2018, $n = 11$) was equal to or less than 1.5 [19]. Two chemometric models were developed using the partial least square-discriminant analysis (PLS-DA) statistical technique. One was based on the DRIFTS data and another on disk spectra. Each chemometric model was examined using cross-validation and permutation tests. According to Field (2009), the classification ability of the samples is assessed with greater reliability through cross-validation [20]. The statistical analysis was performed using MetaboAnalyst 5.0 software.

3. Results

3.1. Moisture Content Measurement

The pistachios were dried by the pistachio growers either in the sun or mechanically. The moisture level was found to be between 5 and 7% wet basis (w.b.) for all samples. Drying nuts at moisture levels below 11% w.b. is important for both safety and taste. A

safe level of moisture is defined as a level that does not support the growth of fungi, and for shelled pistachios, this ranges between 2.2 and 8.2% w.b. at 21 °C [21].

3.2. FTIR Analysis

Table 1 presents the most characteristic peaks of the pistachio kernel flours' DRIFT and disk spectra attributed to the respective modes of vibration. Figures 1 and 2 display the representative spectra of pistachio kernel flours using the DRIFTS and disk technique, respectively, from two harvest years. The peaks at 3006, 2928, and 2856 cm^{-1} and the deformation vibrations in the range 1300–1500 cm^{-1} generally arose from lipid content [12,22]. It was observed that between the 2017 and 2018 harvests, the correlation of these peaks' heights or areas changed. In a recent study, it was found that the oil content is associated with the year of harvest. Therefore, the differences in the respective spectral region are related to the different oil contents [23]. Accordingly, the spectrum range 1500–1700 cm^{-1} was defined as proteinic with peaks at 1660 and 1550 cm^{-1} attributed to the amide I and amide II vibration modes, respectively. The region of amides I and II is associated with the secondary structure of proteins and the protein content. The protein content depends on the harvest period, the temperature, and the rain rate [24–26], a fact which is confirmed in the present study. The spectral region from 1300 to 900 cm^{-1} was connected to oligo and polysaccharides' ring vibrations, while absorption bands between 900 and 600 cm^{-1} were generally caused by aromatic ring vibrations [12,22].

Table 1. Peak interpretation of pistachio kernel flours' (*Pistacia vera*, variety 'Aegina') diffuse reflectance infrared Fourier transform (DRIFT) and disk spectra [12,22].

Wavenumbers (cm^{-1})	Functional Groups	Abbreviations	Vibration Modes
3200–3600	O-H	$\nu(\text{O-H})$	stretching
	N-H of the amide group	$\nu(\text{N-H})$	stretching
3006	cis=C-H	$\nu(=\text{C-H})$	stretching
2928	C-H of -CH ₂ -	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$	stretching (asymmetric)
2856	C-H of -CH ₂ -	$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$	stretching (symmetric)
1750	C=O of esters	$\nu(\text{C=O})$	stretching
1660	C=O, C-N of the amide I	$\nu(\text{C=O}), \nu(\text{C-N})$	stretching
1550	N-H, C-O of the amide II	$\delta(\text{N-H}), \delta(\text{C-O})$	bending
	C-C, C-N of the amide II	$\nu(\text{C-C}), \nu(\text{C-N})$	stretching
1465	C-H of -CH ₂ -	$\delta_{\text{s}}(\text{C-H})$	bending (scissoring)
1416	cis =C-H	$\rho(=\text{C-H})$	bending (rocking)
1365	C-H of -CH ₃	$\delta_{\text{s}}(\text{C-H})$	bending (symmetric)
1240	C-O of esters of triglycerides	$\nu_{\text{as}}(\text{C-O})$	stretching (asymmetric)
	C-H of -CH ₃	$\delta_{\text{s}}(\text{C-H})$	bending (symmetric)
1165	C-O	$\nu_{\text{as}}(\text{C-O})$	stretching (asymmetric)
	-CH ₂ -	$\delta(\text{CH}_2)$	bending
1096	C-O	$\nu(\text{C-O})$	stretching
725	aromatic ring	-	deformation

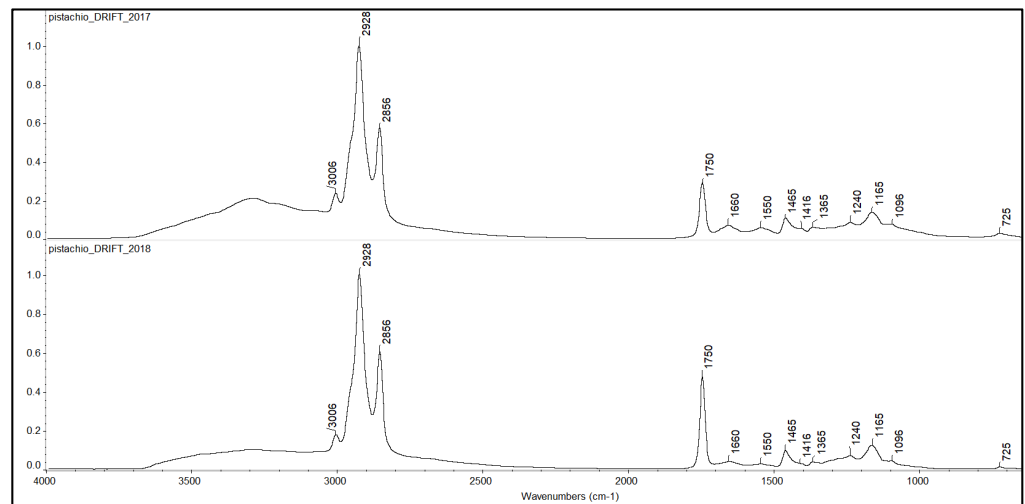


Figure 1. Representative diffuse reflectance infrared Fourier transform (DRIFT) spectra of pistachio kernel flours from the same producer, but from two harvest years.

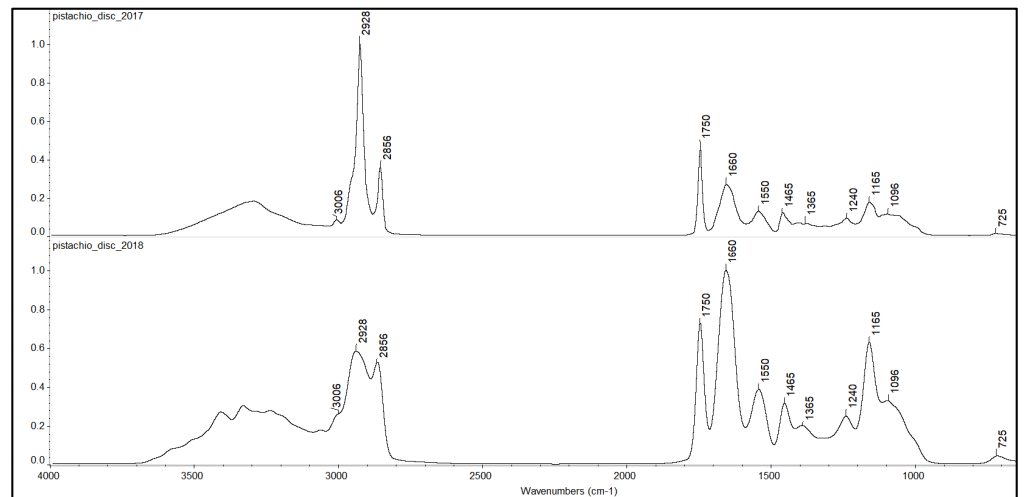


Figure 2. Representative disk spectra of pistachio kernel flours from the same producer, but from two harvest years.

From the large and complex FTIR datasets, important features of the samples and relevant information for the creation of models could only be extracted with chemometric analysis [9].

3.3. Multivariate Statistical Analysis

Using either DRIFTS or the disk technique, due to the impossibility of the optical comparability between the collected spectra from year to year, it was necessary to conduct multivariate statistical analysis to investigate whether samples differed in a statistically significant manner and could be classified according to the year of harvest.

Preprocessing steps of FTIR data followed to diminish the effect that unrelated factors had on the intensity of absorbance peaks [12]. A first filtering was based on the interquartile range (IQR), which represented the 25th percentile and the 75th percentile of data distribution. Thus, 25% of the lowest and 25% of the highest data were not included in the model construction. Thereafter, as the number of independent variables (FTIR wavenumbers) ranged between 500 and 1000, 25% of data that were unlikely to be of use when modeling the data were filtered [27]. The remaining 75% of the source data were normalized to bring them all to the same baseline, so as to be able to compare data of different scales. Additionally, normalization inconsistencies between data were smoothed out, improving

the effectiveness and the performance of the algorithms. Hence, the cube root transformation was applied. Subsequently, data Pareto scaling was useful and necessary. The data were mean centered and divided by the square root of the standard deviation of each independent variable.

After data manipulation, PLS modeling was developed to transform the raw data into a new set of data by extracting a set of latent variables (latent factors or principal components) that had the optimal spectral information and thus the best predictive power. The number of principal components was decided automatically when the predicted residual error sum of squares (PRESS) values reached a minimum or levelled off. Adding more factors resulted in over-fitted calibration models. The resulting variable importance in the projection (VIP) scores of the developed PLS models indicated which wavenumbers were more active for the discrimination, in other words mainly changing as intensity changed between the consecutive years [12]. In accordance, t-tests proved to which independent variables the statistically significant difference was mainly due.

PLS approaches were tested by using the 'leave one out' cross-validation method to show how well the developed PLS models performed by quantifying each calibration sample as if it were a validation one. In this way, a recalculation of the model was made. This method is indicated in cases with a number of samples less than 100. The performance of the final PLS models was compared in terms of the R^2 parameter known as the 'goodness of fit' or explained variation and the Q^2 parameter termed as 'goodness of prediction' or predicted variation. The R^2 and Q^2 values, which indicate the model fit and predictability, respectively, range between 0 and 1. The R^2 index is a measure of the explanatory power of the main components of the model. A PLS-DA model with a high value of R^2 is regarded as providing a good fit to the data and proves that the selected number of main components is sufficient for the explanatory power of the model. The Q^2 index is calculated as a measure of the correct validation of the model by expressing the cumulative contribution of the selected principal components in the predictive quality of the model. A Q^2 value from 0.5 to 0.9 indicates good predictability, stability, and reliability of the model, while one greater than 0.9 is considered to indicate excellent predictability, stability, and reliability. A large discrepancy between Q^2 and R^2 values indicates a non-objective model, dependent on the presence of the specific dataset that created it [28,29]. Furthermore, model performance was tested by conducting permutation tests. Permutation tests assumed that there was no difference among the two groups that were formed based on the year of harvest, so the labels of the samples were randomly permuted, and a new classification model was calculated [30,31].

3.3.1. DRIFTS Discriminant Analysis

Applying the PLS-DA on the entire DRIFT spectrum of samples indicated that pistachio kernel flours could not be completely separated between the two years of harvest (p -value > 0.05) (Figure 3). As shown in Figure 4, five principal components resulted in higher values of R^2 and Q^2 , described in detail in Table 2.

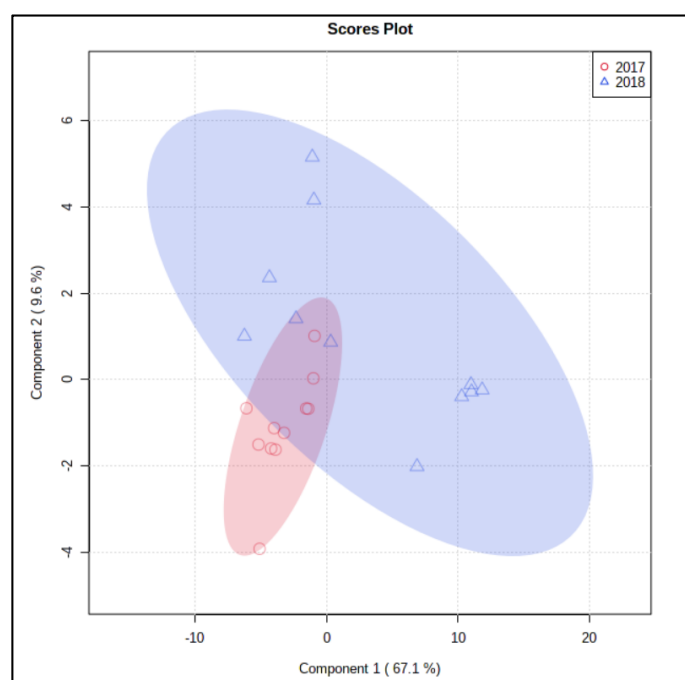


Figure 3. Partial least squares-discrimination analysis (PLS-DA) 2D scores plot for the discrimination model of DRIFT spectra according to the year of harvest (MetaboAnalyst).

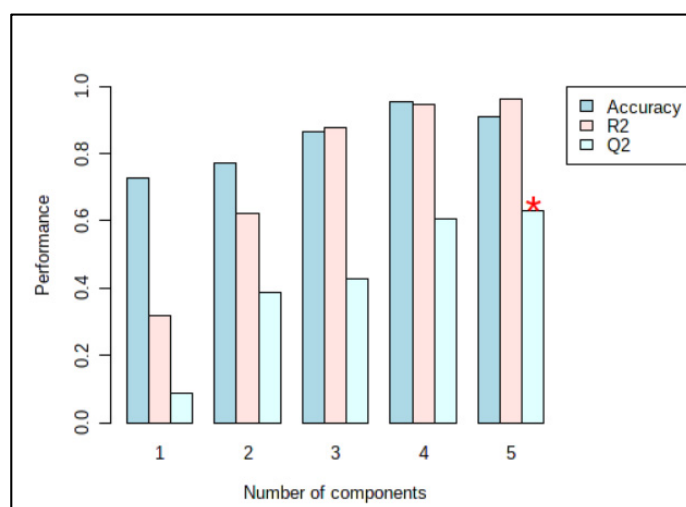


Figure 4. PLS-DA cross-validation for the discrimination model of DRIFT spectra according to the year of harvest (MetaboAnalyst). Red asterisk shows the optimal value of Q^2 .

Table 2. PLS-DA model performance according to the year of harvest for DRIFT spectra (MetaboAnalyst).

Measure	1 PC	2 PC	3 PC	4 PC	5 PC
Accuracy	0.72727	0.77273	0.86364	0.95455	0.90909
R^2	0.31949	0.62254	0.87641	0.94666	0.96266
Q^2	0.085499	0.38841	0.42874	0.60433	0.63152

To give a measure of the classification's statistical significance (p -value), permutation tests were conducted [32]. The observed p -value of Figure 5 was higher than 0.05, reinforcing the conclusion of Figure 3 that there was no statistically significant difference between DRIFT spectra from year to year.

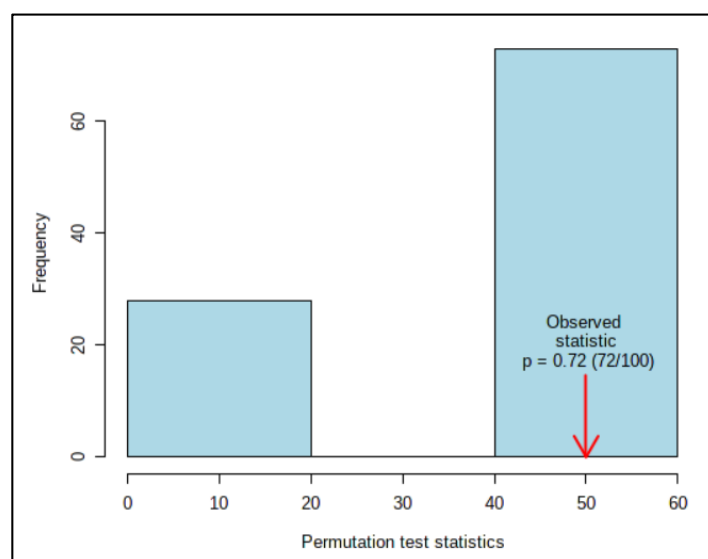


Figure 5. PLS-DA permutation test for the discrimination model of DRIFT spectra according to the year of harvest (MetaboAnalyst) (permutation numbers:100).

3.3.2. Disks Discriminant Analysis

PLS-DA analysis of the total wavenumber range proved a clear sample distinction according to the year of harvest (Figure 6). Five principal components were the optimal number for classification, accounting for as much of the variation explained as possible, while high R^2 and Q^2 values were already given by the three principal components (Figure 7 and Table 3).

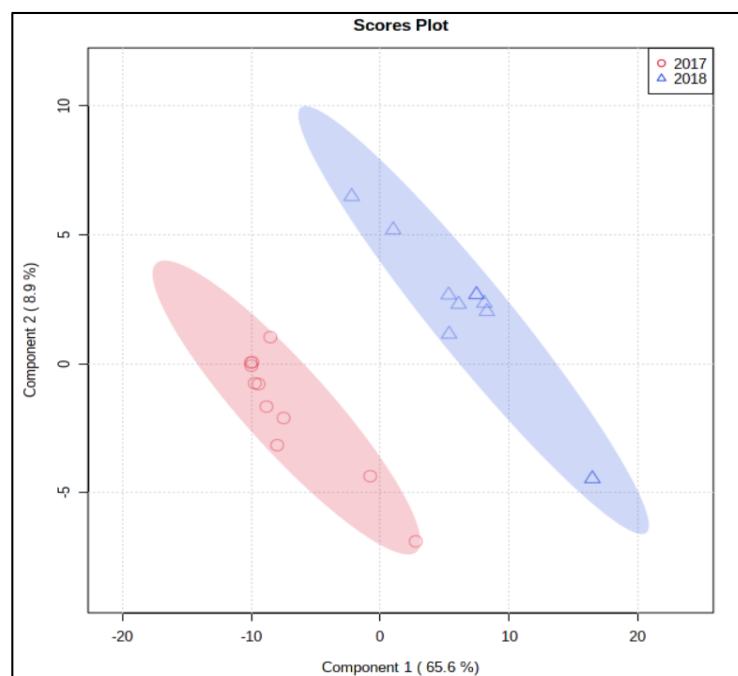


Figure 6. PLS-DA 2D scores plot for the discrimination model of disk spectra according to the year of harvest (MetaboAnalyst).

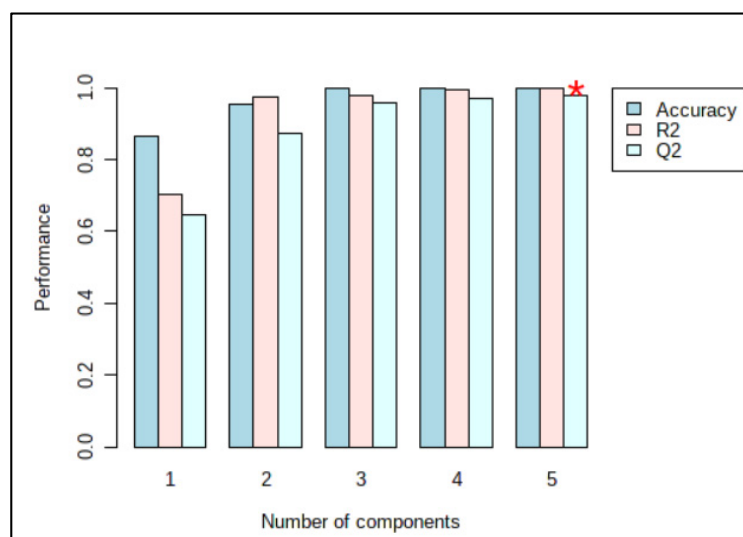


Figure 7. PLS-DA cross-validation for the discrimination model of disk spectra according to the year of harvest (MetaboAnalyst). In this Figure, the optimal Q^2 value is highlighted with the use of a red asterisk.

Table 3. PLS-DA model performance according to the year of harvest for disks spectra (MetaboAnalyst).

Measure	1 PC	2 PC	3 PC	4 PC	5 PC
Accuracy	0.86364	0.95455	1.0	1.0	1.0
R ²	0.70340	0.97518	0.97764	0.99418	0.99705
Q ²	0.64544	0.87179	0.95853	0.96901	0.97719

The statistical significance of the obtained PLS-DA model was evaluated with permutation testing (Figure 8). A separation between the two groups significant from a statistical point of view (p -value < 0.05) was evident when the indicator with the red mark was completely to the right [33].

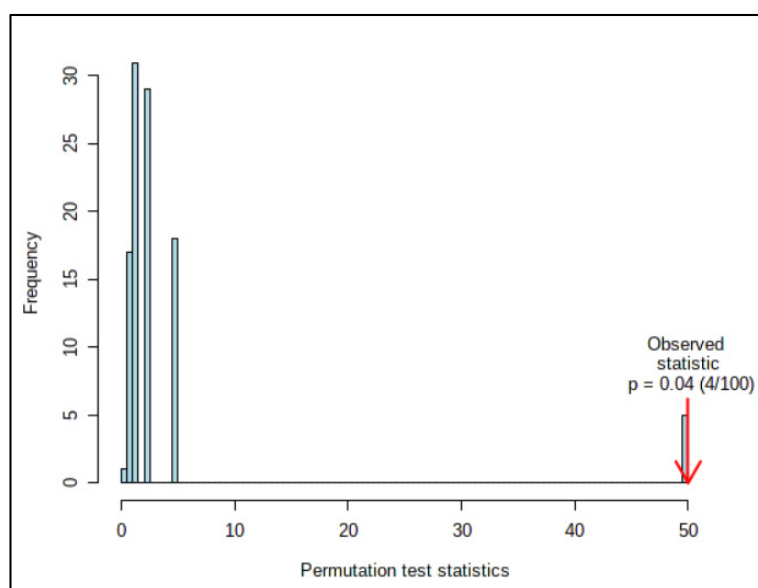


Figure 8. PLS-DA permutation test for the discrimination model of disk spectra according to the year of harvest (MetaboAnalyst) (permutation numbers:100).

PLS-DA ranked the independent variables using the VIP scores at $p = 0.05$ (Figure 9). For evaluation of year-to-year variability, data from the two consecutive harvests were compared using a t -test (Figure 10), which showed that almost the entire spectrum played an important role in the identification of differences between the two classes. Statistically significant wavenumbers to the discrimination are shown with a pink color. The absorbance range of $1720\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$, with the peak at 1750 cm^{-1} included, had the most contributory VIP variables in the discrimination having the highest VIP scores. The colored boxes on the right of Figure 9 indicate the relative intensity of the corresponding wavenumber in each group under study.

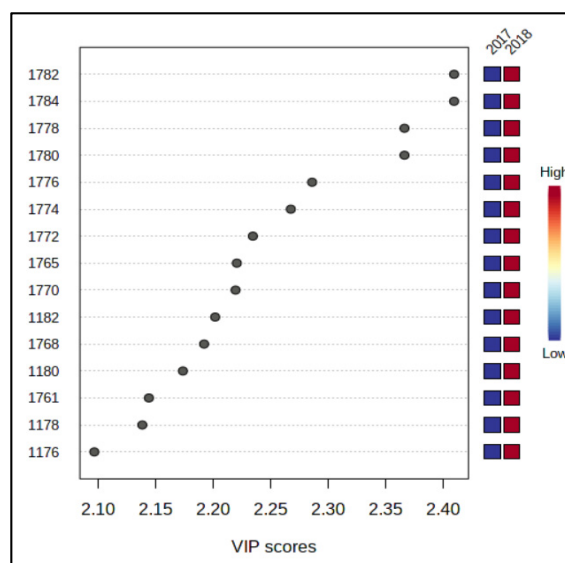


Figure 9. PLS-DA importance features of disk spectra according to the year of harvest (MetaboAnalyst).

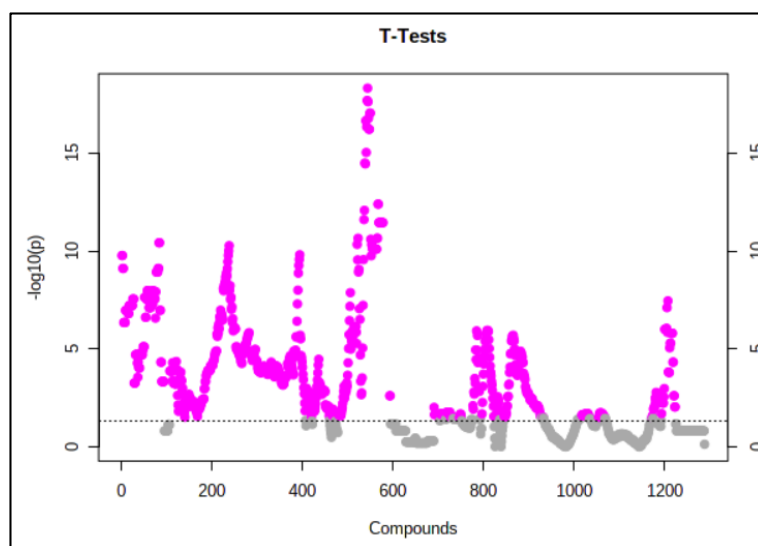


Figure 10. t -test of disk spectra according to the year of harvest (MetaboAnalyst).

4. Discussion

Food quality is an issue of increasingly high concern to society and to all stakeholders involved in food production. In this sense, one of the products in which quality labels are mostly useful are pistachios. Food quality is inextricably linked to the chemical profile of food, which can be affected by several factors including the year of harvest [18]. A recent study related to pistachio oils identified statistically significant differences in terms

of quality and nutritional value between crops of two consecutive years of harvest. This year-to-year differentiation of pistachio oils was possibly attributed to environmental factors [23].

In light of these results, a further investigation was carried out, not for pistachio oils but for pistachio samples of the Greek 'Aegina' variety collected from four different Greek regions. It was difficult to obtain standard results for pistachios cultivated in different locations and with different agricultural practices [18]. To overcome this problem, each sample of the 2017 harvest year (11 samples in total) was derived from the same farmer and the same field with each corresponding sample of the 2018 harvest season (11 samples in total).

FTIR spectroscopy is quick, environmentally friendly, and not complex and can be applied in routine analysis and official pistachio quality control [9,10]. FTIR spectra were obtained for each sample in triplicate using DRIFTS and the disks technique. The performance assessment of PLS-DA models obtained with two different types of FTIR analysis (DRIFTS and disks) was achieved with coefficients R^2 and Q^2 as a statistical measure of the model fitting. The disk acquired spectra in combination with the use of chemometric tools such as PLS-DA showed a clear tendency of discrimination (p -value < 0.05) between pistachios from the two different years with $R^2 = 0.99705$ and $Q^2 = 0.97719$. From the results of this model, it could be stated that the $1720\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ region had the highest contribution to this classification. However, the constructed PLS-DA model using the DRIFT spectra could not predict the year of harvest from the set of independent variables (p -value > 0.05) with $R^2 = 0.96266$ and $Q^2 = 0.63152$.

The DRIFTS quantitative spectral analysis is difficult, as the intensity of the light scattered is strongly dependent on the refractive index, particle size, density, and homogeneity of the sample [34]. In order to obtain a high-quality DRIFT spectrum, the sample must be well homogenized, its particle size must be small and uniform so that a spectrum with narrower bandwidths and more accurate zones of intensity is received, and the placement of the sample on a flat surface for measurement must not be excessively compact to maximize IR beam penetration [35].

On the other hand, in the disk technique, the sample was diluted with KBr, which enhances the contribution of the scattered light and minimizes the specular reflection. The specular reflection causes changes in band intensity, shape, and, in some cases, band inversions (Reststrahlen bands). The KBr/sample mixture minimizes the negative effects of specular reflection. Generally, KBr is very hygroscopic, and if it is not well dried, it may result in bands at 3440 (OH stretch), 1630 (OH bend), and 560 cm^{-1} (OH wag) that affect the ability to interpret these spectral regions. During disk construction, excessive pressure along with the presence of water can change the hydration state and crystallinity [11]. In the current study, the complete drying of KBr was achieved, which made it possible to cope with this issue.

5. Conclusions

In conclusion, the disk-FTIR is a highly sensitive spectroscopic technique that allowed the collection of spectra from pulverized pistachio samples with minimal sample preparation. Results showed a complete discrimination between pistachios from the two different years of harvest. The proposed disk-FTIR spectroscopic chemometric model is fast, accurate, economical, and environmentally friendly.

Author Contributions: Conceptualization, L.V. and C.S.P.; methodology, L.V. and C.S.P.; software, L.V.; validation, L.V. and C.S.P.; formal analysis, L.V.; investigation, L.V. and C.S.P.; resources, L.V. and C.S.P.; data curation, L.V. and C.S.P.; writing—original draft preparation, L.V. and C.S.P.; writing—review and editing, L.V. and C.S.P.; visualization, L.V. and C.S.P.; supervision, C.S.P.; project administration, L.V. and C.S.P. Both authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Acknowledgments: This research work was supported by the Hellenic Foundation for Research and Innovation (HFRI) and the General Secretariat for Research and Technology (GSRT), under the HFRI PhD Fellowship grant (GA. no. 1313).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Catalán, L.; Alvarez-Ortí, M.; Pardo-Giménez, A.; Gómez, R.; Rabadán, A.; Pardo, J.E. Pistachio oil: A review on its chemical composition, extraction systems, and uses. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2016**, *119*, 1600126. [[CrossRef](#)]
2. Salvador, M.D.; Ojeda-Amador, R.M.; Fregapane, G. Virgin Pistachio (*Pistachia vera* L.) Oil. In *Fruit Oils: Chemistry and Functionality*, 1st ed.; Ramadan, M.F., Ed.; Springer: Cham, Switzerland, 2019; pp. 181–197.
3. Fallico, B.; Ballistreri, G.; Arena, E.; Tokuşoğlu, Ö. Nut Bioactives: Phytochemicals and Lipid Based Components of Almonds, Hazelnuts, Peanuts, Pistachios, and Walnuts. In *Fruit and Cereal Bioactives: Sources, Chemistry, and Applications*; Tokusoglu, Ö., Hall III, C.A., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2011; pp. 198–201.
4. Martínez, M.L.; Fabani, M.P.; Baroni, M.V.; Huaman, R.N.M.; Ighani, M.; Maestri, D.M.; Wunderlin, D.; Tapia, A.; Feresin, G.E. Argentinian pistachio oil and flour: A potential novel approach of pistachio nut utilization. *J. Food Sci. Technol.* **2016**, *53*, 2260–2269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Mahmoudi, R.; Norian, R.; Katirae, F.; Pajohi-Alamoti, M.R.; Emami, S.J. Occurrence of aflatoxin B1 in pistachio nuts during various preparing processes: Tracing from Iran. *J. Mycol. Res.* **2014**, *1*, 1–5.
6. Fogacci, F.; Cicero, A.F.G.; Derosa, G.; Rizzo, M.; Veronesi, M.; Borghi, C. Effect of pistachio on brachial artery diameter and flow-mediated dilatation: A systematic review and meta-analysis of randomized, controlled-feeding clinical studies. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2019**, *59*, 328–335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Rajaei, A.; Barzegar, M.; Mobarez, A.M.; Sahari, M.A.; Esfahani, Z.H. Antioxidant, anti-microbial and antimutagenicity activities of pistachio (*Pistachia vera*) green hull extract. *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48*, 107–112. [[CrossRef](#)]
8. Pérez-Ràfols, C.; Subirats, X.; Serrano, N.; Díaz-Cruz, J.M. New discrimination tools for harvest year and varieties of white wines based on hydrophilic interaction liquid chromatography with amperometric detection. *Talanta* **2019**, *201*, 104–110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Mendes, E.; Duarte, N. Mid-Infrared Spectroscopy as a Valuable Tool to Tackle Food Analysis: A Literature Review on Coffee, Dairies, Honey, Olive Oil and Wine. *Foods* **2021**, *10*, 477. [[CrossRef](#)]
10. Sujka, K.; Koczoń, P.; Ceglińska, A.; Reder, M.; Ciemniowska-Żytkiewicz, H. The Application of FT-IR Spectroscopy for Quality Control of Flours Obtained from Polish Producers. *J. Anal. Methods Chem.* **2017**, *2017*, 4315678. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Larkin, P. Instrumentation and Sampling Methods. In *Infrared and Raman Spectroscopy: Principles and Spectral Interpretation*; Larkin, P., Ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2011; pp. 27–54.
12. Kaya-Celiker, H. Mid-Infrared Spectral Characterization of Aflatoxin Contamination in Peanuts. Ph.D. Thesis, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA, USA, 2012.
13. Reh, C. In-line and off-line FTIR measurements. In *Instrumentation and Sensors for the Food Industry*, 2nd ed.; Kress-Rogers, E., Brimelow, C.J.B., Eds.; Woodhead Publishing in Food Science and Technology: Sawston, UK, 2001; pp. 213–232.
14. Dent, G. Preparation of Samples for IR Spectroscopy as KBr Disks. *IJVS* **1996**, *1*, 1–2.
15. Szymańska, E.; Saccenti, E.; Smilde, A.K.; Westerhuis, J.A. Double-check: Validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies. *Metabolomics* **2012**, *8*, 3–16. [[CrossRef](#)]
16. Barker, M.; Rayens, W. Partial least squares for discrimination. *J. Chemom.* **2003**, *17*, 166–173. [[CrossRef](#)]
17. Bastien, P.; Vinzi, V.E.; Tenenhaus, M. PLS generalised linear regression. *Comput. Stat. Data Anal.* **2005**, *48*, 17–46. [[CrossRef](#)]
18. Prolla, I.R.D.; Barbosa, R.G.; Veeck, A.P.L.; Augusti, P.R.; da Silva, L.P.; Ribeiro, N.D.; Emanuelli, T. Cultivar, harvest year, and storage conditions affecting nutritional quality of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Ciênc. Tecnol. Aliment. Camp.* **2010**, *30*, 96–102. [[CrossRef](#)]
19. Stevens, P.J. *Applied Multivariate Statistics for the Social Sciences*, 3rd ed.; Lawrence Erlbaum: Mahwah, NJ, USA, 1996.
20. Field, A. *Discovering Statistics Using SPSS*, 3rd ed.; Sage Publications Ltd.: London, UK, 2009.
21. Kader, A.A.; Heintz, C.M.; Labavitch, J.M.; Rae, H.L. Studies related to the description and evaluation of pistachio nut quality [Genotype, production area, maturity, moisture content, degree of shell staining, and storage]. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **1982**, *107*, 812–816.
22. Kaya-Celiker, H.; Mallikarjunan, P.K.; Kaaya, A. Mid-infrared spectroscopy for discrimination and classification of *Aspergillus* spp. contamination in peanuts. *Food Control* **2015**, *52*, 103–111. [[CrossRef](#)]

23. Valasi, L.; Kokotou, M.G.; Pappas, C.S. GC-MS, FTIR and Raman spectroscopic analysis of fatty acids of *Pistacia vera* (Greek variety "Aegina") oils from two consecutive harvest periods and chemometric differentiation of oils quality. *Food Res. Int.* **2021**, *148*, 110590. [CrossRef]
24. Esmailpour, A.; Shakerdekani, A. Effects of early harvest times on nut quality and physiological characteristics of pistachio (*Pistacia vera*) trees. *Fruits* **2018**, *73*, 110–117. [CrossRef]
25. Alae-Carew, C.; Nicoleau, S.; Bird, F.A.; Hawkins, P.; Tuomisto, H.L.; Haines, A.; Dangour, A.D.; Scheelbeek, P.F.D. The impact of environmental changes on the yield and nutritional quality of fruits, nuts and seeds: A systematic review. *Environ. Res. Lett.* **2020**, *15*, 023002. [CrossRef] [PubMed]
26. Manners, R.; Varela-Ortega, C.; van Etten, J. Protein-rich legume and pseudo-cereal crop suitability under present and future European climates. *Eur. J. Agron.* **2020**, *113*, 125974. [CrossRef]
27. Hackstadt, A.J.; Hess, A.M. Filtering for increased power for microarray data analysis. *BMC Bioinform.* **2009**, *10*, 11. [CrossRef] [PubMed]
28. Lee, B.-J.; Zhou, Y.; Lee, J.S.; Shin, B.K.; Seo, J.-A.; Lee, D.; Kim, Y.-S.; Choi, H.-K. Discrimination and prediction of the origin of Chinese and Korean soybeans using Fourier transform infrared spectrometry (FT-IR) with multivariate statistical analysis. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0196315. [CrossRef] [PubMed]
29. XLStat 2020. Available online: <https://www.xlstat.com> (accessed on 2 August 2021).
30. Lindgren, F.; Hansen, B. Model validation by permutation tests: Applications to variable selection. *J. Chemom.* **1996**, *10*, 521–532. [CrossRef]
31. Westerhuis, J.A.; van Velzen, E.J.J.; Hoefsloot, H.C.J.; Smilde, A.K. Discriminant Q^2 (DQ^2) for improved discrimination in PLS-DA models. *Metabolomics* **2008**, *4*, 293–296. [CrossRef]
32. Pesarin, F.; Salmaso, L. *Permutation Tests for Complex Data: Theory, Applications and Software*; Wiley: Chichester, UK, 2010. [CrossRef]
33. Barberini, L.; Noto, A.; Saba, L.; Palmas, F.; Fanos, V.; Dessì, A.; Zavattoni, M.; Fattuoni, C.; Mussap, M. Multivariate data validation for investigating primary HCMV infection in pregnancy. *Data Brief* **2016**, *9*, 220–230. [CrossRef]
34. Sun, D.W. *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2008.
35. Lercher, J.A.; Jentys, A. Infrared and Raman Spectroscopy for Characterizing Zeolites. In *Introduction to Zeolite Science and Practice*, 3rd ed.; Čejka, J., van Bekkum, H., Corma, A., Schüth, F., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2007; Volume 168, pp. 435–476. [CrossRef]