

ALEKSANDAR D. NEDELJKOVIĆ
JELENA B. MIOČINOVIĆ
MIRA M. RADOVANOVIĆ
PREDRAG D. PUĐA

Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni
 fakultet, Institut za prehrambenu tehnolo-
 giju i biohemiju, Beograd, Srbija

PREGLEDNI RAD

UDK: 637.13/.14 : 543.4

MOGUĆNOSTI PRIMENE RAMAN SPEKTROSKOPIJE U ISPITIVANJU MLEKA I PROIZVODA OD MLEKA

UVOD

Raman spektroskopija je vibraciona spektroskopska tehnika koja se zasniva na neelastičnom rasejanju svetlosti. Ova ne-destruktivna, bezkontaktna tehnika daje brojne kvalitativne i kvantitativne informacije o različitim uzorcima i našla je primenu u mnogim oblastima istraživanja. U kombinaciji sa optičkim mikroskopom idealna je za ispitivanje heterogenih sistema. Od početka primene, ograničenja ove tehnike tiču se problema sa fluorescencijom, koji su se razvojem instrumentalnih rešenja danas značajno smanjili. Zahvaljujući prednostima koje pruža (vrlo slab signal vode, rad sa koncentrovanim rastvorima, širok opseg tipova uzoraka i dr.), Raman spektroskopija ima vrlo veliki potencijal za primenu u ispitivanju mleka i proizvoda od mleka.

Ključne reči: Raman spektroskopija • talasna dužina • mlečna mast • proteini

Interakcija elektromagnetnog zračenja i molekula je u osnovi brojnih spektroskopskih tehnika koje se baziraju na procesima apsorpcije, emisije i rasejanja zračenja. Raman spektroskopija je vibraciona spektroskopska tehnika koja se zasniva na fenomenu neelastičnog rasejanja zračenja usled međusobnog delovanja sa uzorkom. Prilikom interakcije upadnog zračenja i molekula dolazi do razmene energije a njena količina odgovara unutrašnjim vibracionim prelazima koji su specifični za pojedine hemijske veze.

Tehnike ispitivanja zasnovane na Ramanovom rasejanju daju podatke o vibracionom otisku molekula te se stoga ova tehnika može koristiti za hemijske karakterizacije, ispitivanje molekularne strukture, međumolekularne interakcije, opisivanje okruženja oko pojedinih atoma u molekulu i dr. Zahvaljujući fenomenima koji su osnova ove tehnike, primenjiva je za ispitivanje velikog broja supstanci i materijala. S tim u vezi, od nedavno, ova tehnika je našla primenu i u analizi hrane, s obzirom na to da omogućava dobijanje relevantnih informacija o sastavu različitih vrsta uzoraka uključujući tečnosti, gasove i čvrste materijale. Informacije dobijene ovom tehnikom se baziraju na vrlo specifičnim spektrima karakterističnim za uzorak koji se ispituje. Rezultati dobijeni tehnikama Raman spektroskopije se najčešće usled složenosti dalje obrađuju primenom statističkih metoda kao što je analiza glavnih komponenti (*eng. principal component analysis, PCA*) i regresija metodom delimičnih-najmanjih kvadrata (*engl. partial least squares regression, PLS*).

Najveća prednost korišćenja ove tehnike u analizi hrane je vrlo slabo rasejanje vode koje ne ometa signale ostalih ispitivanih komponenta, zatim nesmetano ispitivanje koncentrovanih

uzoraka, minimalna priprema uzorka (ili nije potrebna) kao i mogućnost prenosa signala na veće udaljenosti.

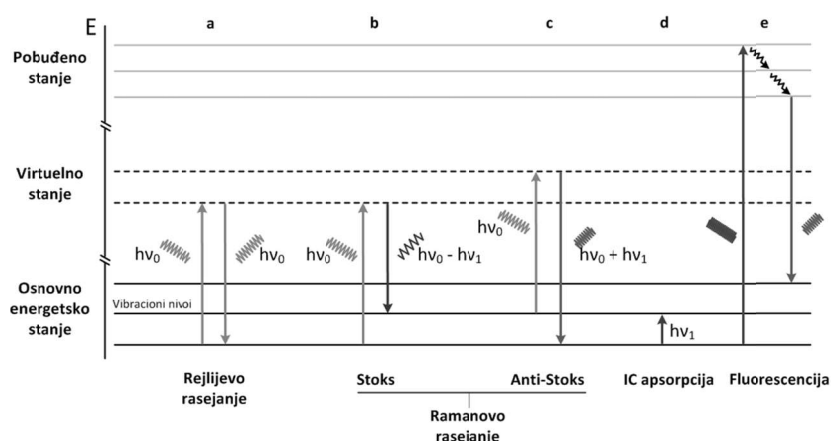
U ovom radu izložene su osnovne informacije o Raman mikrospektroskopiji i principima same tehnike, kao i mogućim problemima i poboljšanjima prilikom njene primene u analizi hrane (npr. odabir lasera, problem fluorescencije itd.). U drugom delu rada su prikazani rezultati dosadašnjih istraživanja zasnovanih na primeni Raman spektroskopije u ispitivanju mleka i proizvoda od mleka.

OSNOVI PRINCIPI TEHNIKE RAMAN SPEKTROSKOPIJE

Pri procesu transmisije (prolaza) elektromagnetnog zračenja kroz materiju, jedan vrlo mali deo zraka se rasejava u svim pravcima (Skoog, 2007). U kvantnoj mehanici rasejanje se opisuje kao pobuđivanje molekula do **virtuelnog stanja**, koje je niže energije od elektronskog prelaza, uz skoro istovremeni (za manje od 10^{-14} sekundi) povratak na niži elektronski nivo i reemitovanje fotona (Skoog, 2007; Smith and Dent, 2005). U toku ovog procesa, najveći deo fotona se rasejava elastično tzv. Rejljevo rasejanje (slika 1a), pri čemu oni imaju istu energiju (frekvenciju i talasnu dužinu) kao i upadni fotoni, odnosno ne dolazi do razmene energije. Međutim, mali deo zračenja (jedan od 10^6 - 10^8 fotona; Smith and Dent, 2005) se rasejava sa frekvencijama različitim, najčešće nižim, od frekvencija upadnih fotona pri čemu se odvija razmena energije. Proces u toku kojeg dolazi do ovog tzv. neelastičnog rasejanja naziva se **Ramanovo rasejanje** odn. **Ramanov efekat**.

U zavisnosti od početnog stanja molekula ova promena može biti ka višem (**Stoksovo** rasejanje, slika 1b) ili nižem vibracionom nivou (**Anti-Stoksovo** rasejanje, slika 1c). Na sob-

Adresa autora:
 Aleksandar Nedeljković, Univerzitet u Beogradu,
 Poljoprivredni fakultet, Nemanjina 6, 11080 Zemun
 - Beograd
 tel: +381 11 2615-315 / lok 117
 e-mail: a.nedeljkovic@agrif.bg.ac.rs



Slika 1. ODNOS INFRACRVENE APSORPCIJE, REJLIJEVOG I RAMANOVOG RASEJANJA I FLUORESCENCIJE

Figure 1. THE RELATIONSHIPS BETWEEN INFRARED ABSORPTION, RAYLEIGH AND RAMAN SCATTERING AND FLUORESCENCE

noj temperaturi najveći broj molekula se nalazi u osnovnom stanju (1b), dok je broj molekula u pobuđenim vibracionim stanjima mali (1c). Stoga je intenzitet Stoksovog rasejanja znatno veći od anti-Stoksovog, pa se zato, iako nose istu frekvencijsku informaciju, i više posmatra u Ramanovoj spektroskopiji.

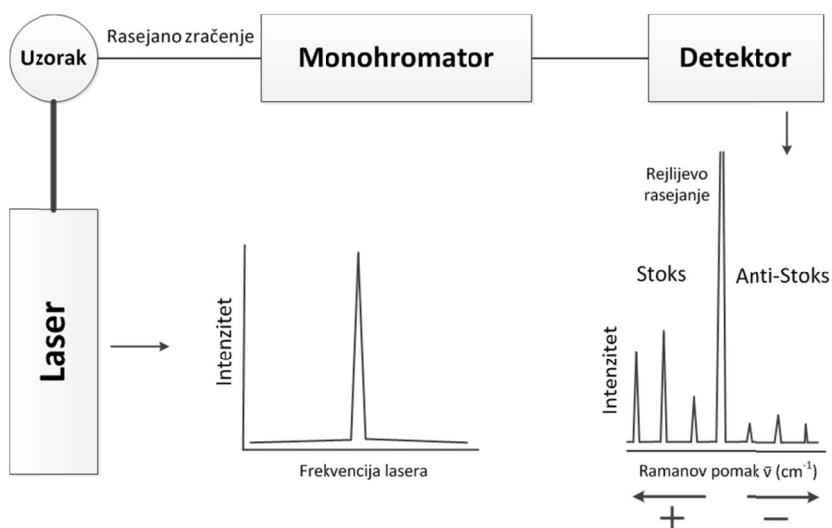
Ramanov spektar (slika 2) se prikazuje kao intenzitet rasejanja (broj detektovanih rasejanih fotona) u odnosu na **promenu** njihove talasne dužine u talasnim brojevima. Ova promena se naziva **Ramanov pomak**. Na osnovu toga moguće je korišćenje različitih izvora zračenja uz konstantno dobijanje iste razlike. Tako će na primer pomak od 1600 cm^{-1} biti prisutan uvek bez obzira na talasnu dužinu izvora zračenja. Numerički, Ramanov pomak u talasnim brojevima (cm^{-1}) se izračunava pomoću jednačine:

$$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda_u} - \frac{1}{\lambda_r}$$

gde su λ_u i λ_r talasne dužine (u cm) upadnog i rasejanog fotona.

Raman spektroskopija se kao i infracrvena (IC) spektroskopija zasniva na finim vibracionim promenama, koje odgovaraju različitim istežućim i savijajućim vibracijama pojedinih hemijskih veza u molekulu. Međutim, i pored ove sličnosti, Raman i IC spektri istog uzorka nisu identični, i zato su ove dve tehnike komplementarne. Da bi došlo do IC apsorpcije, neophodno je da se u toku vibracije menja trajni dipolni momenat, dok Raman rasejanje zavisi od promene polarizabilnosti funkcionalnih grupa u toku vibracije (Skoog 2007; Smith and Dent, 2005; McCreery, 2005). Zato, polarne grupe kao što su C=O, N-H i O-H imaju izražene IC, dok nepolarne grupe kao C=C, C-C and S-S imaju izražene Raman signale. Voda je polarni molekul i jako apsorbuje IC zračenje. Nasuprot tome, daje vrlo slab Raman signal i predstavlja neznanat problem u Raman spektroskopiji. Kao rezultat toga, ova tehnika se smatra veoma pogodnom za *in vivo* i *in situ* istraživanja bioloških sistema, uključujući i hranu (Li-Chan, 2010).

Raman spektroskopija je i kvalitativna i kvantitativna tehnika (Skoog, 2007; Smith and Dent, 2005; McCreery, 2005). Pre svega, opšti spektralni profil (pozicije traka i njihovi intenziteti) daju jedinstveni hemijski otisak prsta koji se može koristiti za identifikaciju

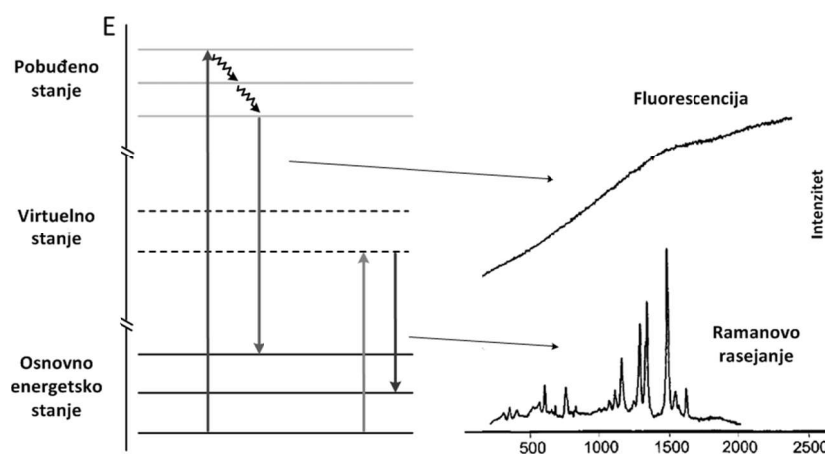


Slika 2. DIJAGRAM RAMANOVE SPEKTROSKOPIJE I UPROŠĆENI RAMANOV SPEKTAR. Zračenje lasera se usmerava na uzorak. Ramanovo rasejanje se uobičajeno meri pod uglom od 90° ili 180° kako bi se izbeglo transmitovano zračenje izvora. centralna linija na spektru predstavlja intenzitet elastično rasejane svetlosti (Rejljevo rasejanje) i predstavlja 0 cm^{-1} . Levo od ove linije (pozitivan pomak) se nalazi stoks deo spektra, dok je desno (negativan pomak) anti-stoks pomak. ova dva dela spektra su simetrična, ali je intenzitet signala kod anti-stoks pomaka manji.

Figure 2. RAMAN SPECTROSCOPY DIAGRAM WITH SIMPLIFIED RAMAN SPECTRUM. Laser radiation is pointed on sample. To avoid transmitted radiation, it is better to measure scattering in 90° or 180° configuration. middle band, at 0 cm^{-1} corresponds to elastic scattering (rayleigh scattering). bands to the left are stokes (positive shift) and to the right - anti-stokes (negative shift). These two spectrum parts are symmetrical, but anti-stokes peak intensities are lower.

molekula. Često je dobijeni spektar vrlo kompleksan, ali postoje obimne biblioteke spektara na osnovu kojih se može lako ostvariti hemijska identifikacija. Pored određivanja prisustva pojedinih molekula ovom tehnikom mogu se dobiti i suptilnije informacije o kristalnoj strukturi, polimorfim oblicima, interakcijama na granicama faza, strukturi proteina i vodoničnom vezivanju. S druge strane, intenzitet traka je direktno proporcionalan koncentraciji (Skoog, 2007). Zbog toga je moguće sprovesti jednostavnu kalibracionu proceduru u cilju determinacije odnosa intenziteta trake i koncentracije što dalje omogućuje rutinsko određivanje nepoznate koncentracije. Vrlo je pogodna za analizu uzoraka koji sadrže vodu (rastvori i biološke materijale: tkiva, ćelije, hranu). Kao što je pomenuto, molekul vode ima minimalno Raman rasejanje i daje vrlo jednostavan spektar, sa nekoliko manjih pikova koji se minimalno preklapaju sa pikovima ostalih prisutnih supstanci.

S obzirom na to da je Raman rasejanje fenomen vrlo niskog intenziteta, u cilju dobijanja merljivih signala, sa dovoljno dobrim odnosom signal/šum, neophodno je osloniti se na izvore vrlo intenzivnog zračenja. Zbog toga se, kao izvor zračenja u Ramanovoj spektroskopiji koriste laseri. Vrlo je bitno odabrati laser dovoljne energije ("dovoljno plav") koji može da dovede ispitivani molekul do virtuelnog stanja, ali ne toliko velike energije da izazove fluorescenciju. Fluorescencija je pojava pri kojoj materija reemituje zračenje veće talasne dužine od onog kojem je izložena i obuhvata elektronski prelaz (slika 1e). Pojava fluorescencije predstavlja jedan od najvećih problem u Ramanovoj spektroskopiji jer čak i najslabija može u potpunosti da zakloni Ramanov signal i onemogućiti dobijanje adekvatnih rezultata merenja (slika 3) (McCreery, 2005). Ovo je jedan od osnovnih razloga zbog kojih je Raman spektroskopija do 90-tih godina prošlog veka bila vrlo malo korišćena tehnika. Međutim, primena instrumentalnih rešenja kao što su korišćenje lasera veće talasne dužine (iz bliske IC oblasti - Nd-YAG laser (engl. *Neodymium-doped yttrium aluminum garnet*-Neodimijum-dopirani itrijum-aluminijum-granat) uz kombinovanje sa FT (Furijeova transformacija) uređajima i CCD detektorima (engl. *charge coupled device*) omogućilo je da se problem fluorescencije u većini analiza uspešno



Slika 3. ENERGETSKI DIJAGRAM I SPEKTAR FLUORESCENCIJE U POREĐENJU SA RAMANOVIM RASEJANJEM (FLUORESCENCIJA U POTPUNOSTI ZAKLANJA RAMANOV SPEKTAR)

Figure 3. COMPARISON OF ENERGY DIAGRAMS AND SPECTRA OF FLORESCENCE AND RAMAN SCATTERING (FLUORESCENCE COMPLETELY COVERS RAMAN SPECTRUM)

prevaziđe, a da se istovremeno detektuje zadovoljavajući intenzitet Ramanovog rasejanja (Li-Chan, 1996; Keller, 1993).

MOGUĆNOST PRIMENE RAMAN SPEKTROSKOPIJE U PROUČAVANJU MLEKA I PROIZVODA OD MLEKA

Brzo određivanje sadržaja masti u mleku

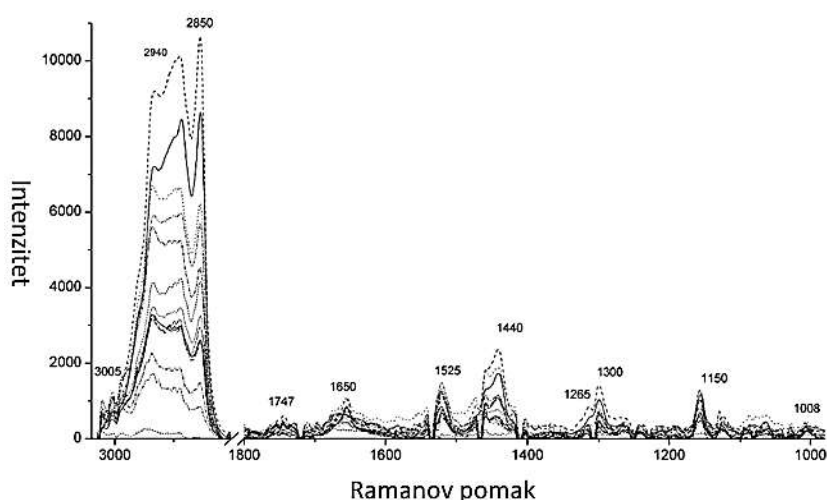
El-Abassy et al. (2011) su demonstrirali mogućnost primene Raman spektroskopije kao brze metode za direktno određivanje sadržaja masti u mleku. U njihovom radu je korišćeno 13 uzoraka homogenizovanog mleka sa različitim sadržajem masti (0,3-4,0%). Priprema uzorka je veoma jednostavna i obuhvatila je samo transfer uzorka u posudu za snimanje. Kao izvor zračenja upotrebljen je argon-jonski laser ($\lambda = 514,5$ nm, 20 mW) koji je fokusiran na uzorak mikroskopom (50x). Raman signal je prikupljan pod uglom od 180° . Spektralni opseg je bio podeljen na dva dela $800-1800$ cm^{-1} i $2500-3100$ cm^{-1} . Vreme snimanja za svaki spektralni deo je bio samo 30 s, i u toku ovog vremena snimljeno je po pet spektara (5x6 s) u cilju dobijanja zadovoljavajućeg odnosa signala i šuma i prosečnih rezultata. Dobijeni spektralni podaci su obrađeni hemometrijskim metodama odnosno (PLS, partial least square regression - regresija metodom delimič-

nih-najmanjih kvadrata) u cilju dobijanja modela za određivanje sadržaja masti u mleku.

Autori su ustanovili da spektar sa najvećim intenzitetom pikova odgovarao je uzorku sa najvećim sadržajem masti (4,0 %) i obrnuto, uzorak sa 0,3 % masti imao je spektar sa najmanjim intenzitetom pikova (slika 4). S obzirom na to da je u svim uzorcima sadržaj proteina i ugljenih hidrata bio konstantan, varijacije u intenzitetima Raman traka su mogle biti pripisane isključivo varijacijama sadržaja masti u uzorcima. Najupadljiviji pikovi su se nalazili na 1650 cm^{-1} (C=C cis istežanje RHC=CHR), 1440 cm^{-1} (C-H ukrštanje- CH_2), 1265 cm^{-1} (C-H cis savijanje R-HC=CH-R), 1300 cm^{-1} (C-H uvrtnje- CH_2), i 1747 cm^{-1} (C-O istežanje RC-OOR)(Yang and Irudayaraj, 2001; Yang et al., 2005; Baeten et al., 1998).

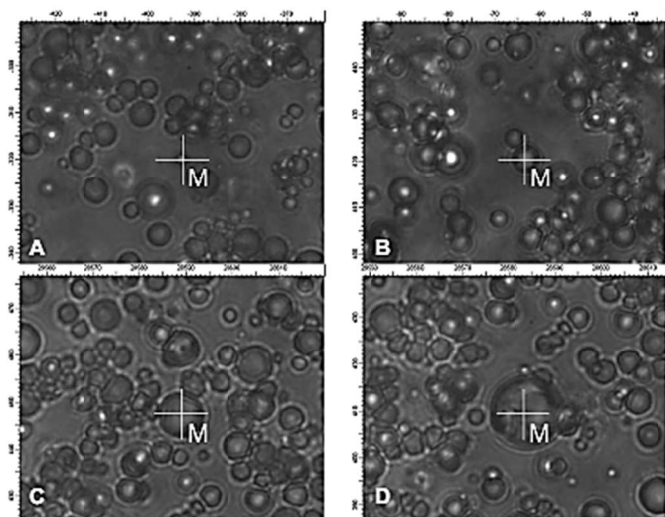
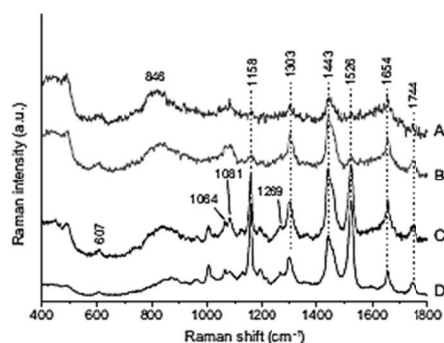
U drugom delu spektra su se javili pikovi oko 2850 and 2940 cm^{-1} karakteristični za simetrične i asimetrične C-H vibracije kod CH_2 i CH_3 grupa su, dok se pik na 3005 cm^{-1} pripisuje simetričnom ukrštanju C-H (Yang and Irudayaraj, 2001; Baeten et al., 1996).

Navedeni rezultati su pokazali da se sadržaj masti u mleku može uspešno odrediti na osnovu podataka dobijenih Raman spektroskopijom koji se potom obrađuju odgovarajućom statističkom metodom (PLS). Prednost ove metode je odsustvo složene pripreme uzorka kao i kratko vreme trajanja analize. Usled toga, smatra se da teh



Slika 4. RAMAN SPEKTRI UZORAKA MLEKA SA RAZLIČITIM SADRŽAJEM MASTI (EL-ABASSY ET AL., 2011)

Figure 4. RAMAN SPECTRA OF MILK SAMPLES WITH DIFFERENT FAT CONTENT



Slika 5. RAMAN SPEKTRI I ODGOVARAJUĆI MIKROGRAFI MASNIH GLOBULA RAZLIČITE VELIČINE (MLEKO DŽERZEJSKE RASE): A–1 μ M; B–5 μ M; C–9 μ M; D–15 μ M

Figure 5. RAMAN SPECTRA AND ASSOCIATED MICROGRAPHS OF DIFFERENT SIZES MILK FAT GLOBULES (JERSEY MILK): A–1 μ M; B–5 μ M; C–9 μ M; D–15 μ M

nika Raman spektroskopije ima velikog potencijala posebno za in-line analizu sadržaja mlečne masti tokom procesa proizvodnje.

Nedestruktivno određivanje prisustva melamina u mleku u prahu

Melamin je jedinjenje koje se koristi u proizvodnji plastike, ali se relativno često koristi u cilju falsifikovanja sadržaja azota u namirnicama odavajući lažni utisak većeg sadržaja proteina. Za određivanje melamina uobičajeno je korišćene tehnika kao što su ELISA (Garber, 2008) i hromatografija (HPLC) (Ehling, 2007; Inoue, 1985; Muniz-Valencia, 2008) koje zahtevaju relativno dug proces pripreme uzorka.

Okazaki et al., (2009) su ispitivali mogućnost primene Raman spektroskopije u cilju određivanja prisustva melamina u mleku u prahu. U svom istraživanju su dodavali različite količine melamina (10%, 3%, 1%, 0,3%, i 0,1%) u komercijalne uzorke mleka u prahu i takve uzorke ispitivali Raman spektroskopijom. Sama priprema uzorka je obuhvatila formiranje peleta (8 mm) koji su potom izlagani zračenju lasera ($\lambda = 785$ nm, 80 mW) tokom 50 s (5 s x 10 spektara).

Prisustvo melamina u mleku u prahu je vrlo lako identifikovano jednostavnim poređenjem spektara uzoraka i čistog melamina. Za kontrolu prisustva melamina ustanovljeno je da je najpodesniji deo spektra oko 676 cm^{-1} , a ustanovljena granica detekcije je iznosila oko 1 % (w/w). Na osnovu rezultata istraživanja smatra se da je Raman spektroskopija vrlo korisna i jednostavna metoda za detektovanje melamina u mleku u prahu bez ikakvog prethodnog hemijskog tretmana uzorka. Jedna od osnovnih prednosti metoda se ogleda u odsustvu složene pripreme kao npr. ekstrakcije melamina iz uzorka, pri čemu je smanjen rizik od moguće greške koja bi nastala tokom ekstrakcije ili usled interakcije sa dodatim reagensima.

Određivanje sastava masnih globula

Gallier et al., (2011) su primenili konfokalnu Raman mikrospektroskopiju za analizu sastava globula mlečne masti različite veličine (1-15 μ m dijametar) i porekla (Džerzi i Frizijska rasa). Neposredno nakon muže, sirovo mleko dve rase je sakupljeno a potom centrifugiranjem odvojena mlečna mast u vidu pavlake (20%). Dobijena

pavlačka je razblažena 10x fosfatnim puferom zbog lakšeg pronalaženja pojedinačnih masnih globula, a za imobilizaciju uzorka vršeno je dodavanje rastvora agaroze (čiji spektar nije davao nijedan karakterističan pik). Dobijanje spektralnih podataka je vršeno pomoću konfokalnog Raman mikrospektroskopa, opremljenog sa diodnim laserom ($\lambda=532$ nm, 5 mW). Upotreba mikroskopa je omogućila dubinsko profilisanje i dobru rezoluciju čime su uspešno prikupljeni spektri iz centara globula mlečne masti različite veličine (Slika 5).

Rezultati istraživanja su pokazali da sastav globula mlečne masti veoma varira u zavisnosti od veličine globula, tako da se sa povećanjem prečnika globula povećava sadržaj karotenoida dok nivo nezasićenosti se smanjuje. Sadržaja karotenoida takođe varira u zavisnosti od porekla mleka odnosno rase muznih životinja. Pored toga, autori su ustanovili da je sadržaj triglicerida u malim globulama masti ($1\mu\text{m}$) bio ispod nivoa detekcije, dok je s druge strane ustanovljen značajno prisustvo fosfolipida i holesterola (trake pri 607 i oko 846 cm^{-1}) (Bresson et al., 2005), koji predstavljaju značajne komponente membrane masnih globula. Na osnovu ovih rezultata, autori su zaključili da specifični sastav malih masnih globula utiče na specifičnost njihovih nutritivnih i tehnoloških svojstava u poređenju sa velikim masnim globulama.

Na osnovu iznetog, možemo zaključiti da se Raman spektroskopija može uspešno koristiti za dobijanje informacija o satavu i strukturi membrane masnih globula.

Ispitivanje nastajanja gelova β -laktoglobulina

Ikeda and Li-Chan (2004) su, primenom Raman spektroskopije, ispitali molekularne strukturne promene proteina koje se dešavaju tokom formiranja dve vrste gelova β -laktoglobulina (β -lg) delovanjem toplote (fini i partikularni). Naime, autori su 15% rastvora β -lg (w/v), različitih pH vrednosti, termički tretirali režimom $80^\circ\text{C}/60$ min., a potom dobijene gelove analizirali Raman spektroskopom ($\lambda=785$ nm, 50 mW).

Analizom dobijenih spektara ustanovljeno je da je termički indukovano nastajanje gela praćeno poremećajima u sekundarnoj strukturi proteina i povećanjem jačine vodoničnog vezi-

vanja tirozina. Prilikom formiranja finijeg gela intenzitet trake od oko 760 cm^{-1} se povećao (traka povezana sa vibracijom veza u triptofanu) (Howell and Li-Chan, 1996; Ogawa et al., 1999), dok je pri nastajanju partikularnog gela proces tekao suprotno. Intenzivna traka na 1345 cm^{-1} , pripisana CH savijajućim vibracijama (Nonaka et al., 1993), sugerisala je na značajan doprinos hidrofobnih interakcija pri nastajanju partikularnog gela. Kod ovog tipa gela sekundarna struktura je bila bolje očuvana, obzirom na to da je kod finog gela uočeno veće narušavanje α -heliksa, dok je najveći deo β -nabrane strukture u oba slučaja ostao netaknut.

Primenom Raman spektroskopije bilo je moguće ustanoviti razlike između dva tipa termički indukovanih gelova β -lg. Ustanovljene su promene sekundarne strukture kao i tipovi veza koje prevladavaju u njima.

ZAKLJUČAK

Raman spektroskopija je tehnika koja se zasniva na rasejanju zračenja pri kome se foton koji reaguje sa uzorkom rasejava uz promenu talasne dužine. Ova promena je osnova kako kvalitativne tako i kvantitativne primene ove vrlo moćne tehnike.

Poslednjih godina, interesovanje za korišćenje ove tehnike u mnogim disciplinama, uključujući i nauku o hrani, značajno se povećava pre svega usled jednostavnosti pripreme ispitivanog uzorka kao i širine dobijenih informacija o sastavu, strukturi molekula, rasporedu komponentata i dr. Primenom Raman mikro/spektroskopije mogu se dobiti kvalitativne i kvantitativne informacije o velikom broju komponentata hrane uključujući makro (proteine, lipide, ugljene hidrate i vodu) i minorne komponente (pigmente, sintetičke boje).

Mogućnosti primene Raman spektroskopije u ispitivanju mleka i proizvoda od mleka su brojne i obuhvataju kvalitativne i kvantitativne analize makro (proteina, lipida, ugljenih hidrata i dr.) i minornih komponenti. Takođe, poslednjih godina vrše se brojna ispitivanja na mogućnosti primene ove tehnike u analizi mikrobiološkog kvaliteta prehrambenih proizvoda.

Ipak, upotreba ove tehnike u analizi hrane, uključujući proizvode od mleka, je još uvek nedovoljno istražena oblast, posebno na našem području, a može imati značaja kako u rutin-

skim analizama kontrole kvaliteta proizvoda tako i u naučno istraživačkim studijama.

ZAHVALNICA

Rad je nastao kao deo istraživanja u okviru FP7 projekta AREA 316004 koje finansira EU, autori se takođe zahvaljuju Ministarstvu prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije za finansiranje istraživanja u okviru nacionalnog projekta III-46009.

LITERATURA

- Baeten, V., Hourant, P., Morales, M.T., Aparicio, R. (1998): Oil and Fat Classification by FT-Raman Spectroscopy, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2638-2646.
- Baeten, V., Meurens, M., Morales, M.T., Aparicio, R. (1996): Detection of Virgin Olive Oil Adulteration by Fourier Transform Raman Spectroscopy, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 2225-2230.
- Bresson, S., El Marssi, M., Khelifa, B. (2005): Raman spectroscopy investigation of various saturated monoacid triglycerides, *Chemistry and Physics of Lipids*, 134, 119-129.
- El-Abassy, R.M., Eravuchira, P.J., Donfack, P., von der Kammer, B., Materny, A. (2011): Fast determination of milk fat content using Raman spectroscopy, *Vibrational Spectroscopy*, 56, 3-8.
- Ehling S., Tefera S., Ho I.P. (2007): High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous detection of the adulteration of cereal flours with melamine and related triazine by-products ammeline, ammeline, and cyanuric acid, *Food Additives and Contaminants* 24, 1319-1325.
- Howell, N., Li-Chan, E. (1996): Elucidation of interactions of lysozyme with whey proteins by Raman spectroscopy, *International Journal of Food Science & Technology*, 31, 439-451.
- Gallier, S., Gordon, K.C., Jiménez-Flores, R., Everett, D.W. (2011): Composition of bovine milk fat globules by confocal Raman microscopy, *International Dairy Journal*, 21, 402-412.
- Garber, E.A. (2008): Detection of melamine using commercial enzyme-linked immunosorbent assay technology, *Journal of Food Protection*, 71, 590-594.
- Ikeda, S., Li-Chan, E.C.Y. (2004): Raman spectroscopy of heat-induced fine-stranded and particulate β -lactoglobulin gels, *Food Hydrocolloids*, 18, 489-498.
- Inoue, T., Ishiwata, H., Yoshihira, K., Tanimura, A. (1985): High-performance liquid chromatographic determination of melamine extracted from cups made of melamine resin, *Journal of Chromatography* 346, 450-452.
- Li-Chan, E.C.Y. (1996): The Applications of Raman spectroscopy in food science. *Trends in Food Science & Technology*, 7, 361-370.
- Li-Chan, E., Chalmers, J.M., Griffiths, P. (2010): Applications of Vibrational Spectroscopy in Food Science, Volume 1, J. Wiley, Chichester, West Sussex, England.
- Keller, S., Lochte, T., Dippel, B., Schrader, B. (1993): Quality control of food with near-infrared-excited Raman spectroscopy, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 346, 863-867.
- McCreery, R.L. (2005): Raman Spectroscopy for Chemical Analysis, J. Wiley, Canada.

- Muniz-Valencia, R., Ceballos-Magana, S.G., Rosales-Martinez, D., Gonzalo-Lumbreras, R., Santos-Montes, A., Cubedo-Fernandez-Trapiella, A., Izquierdo-Hornillos, R.C. (2008): Method development and validation for melamine and its derivatives in rice concentrates by liquid chromatography. Application to animal feed samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392, 523-531.
- Nonaka, M., Li-Chan, E., Nakai, S. (1993): Raman spectroscopic study of thermally induced gelation of whey proteins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 1176-1181.
- OGAWA, M., NAKAMURA, S., HORIMOTO, Y., AN, H., TSUCHIYA, T., NAKAI, S. (1999): Raman spectroscopic study of changes in fish actomyosin during setting, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3309-3318.
- Okazaki, S., Hiramatsu, M., Gonmori, K., Suzuki, O., Tu, A. (2009): Rapid nondestructive screening for melamine in dried milk by Raman spectroscopy, *Forensic Toxicology*, 27, 94-97.
- Skoog, D.A., Crouch, S.R., Holler, J.F. (2007): Principles of instrumental analysis, Thomson Brooks/Cole Belmont, CA.
- Smith, E., Dent, G. (2005): Modern Raman spectroscopy: a practical approach, J. Wiley, Chichester, West Sussex, England.
- Yang, H., Irudayaraj, J. (2001): Comparison of Near-Infrared, Fourier Transform-Infrared, and Fourier Transform-Raman Methods for Determining Olive Pomace Oil Adulteration in Extra Virgin Olive Oil, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78, 889-895.
- 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.

SUMMARY

APPLICATION POSSIBILITIES OF RAMAN SPECTROSCOPY IN THE INVESTIGATION OF MILK AND DAIRY PRODUCTS

Aleksandar D. Nedeljković, Jelena B. Miočinović, Mira M. Radovanović, Predrag D. Pudja

University of Belgrade, Faculty of Agriculture, Belgrade, Serbia

Raman spectroscopy is a vibrational spectroscopic technique based on inelastic light scattering. This non-destructive, non-contact technique provides a number of qualitative and quantitative information about the different samples and has been applied in many fields of research. In combination with an optical microscope this method is ideal for testing of heterogeneous systems. The limitations of this technique include problems with fluorescence, but nowadays they are significantly reduced with developed instrumental solutions. Thanks to the numerous advantages (very weak signal lead, working with concentrated solutions, a wide range of sample types, etc.), Raman spectroscopy has great potential for application in the examination of milk and milk products.

Key words: Raman spectroscopy • wavelenght • milk fat • protein