

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ

ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ (NMR)



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΩΝ ΖΩΩΝ
ΜΕ ΤΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ
ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ ^1H ΚΑΙ ^{31}P NMR**

ΗΛΙΑΣ ΤΣΟΛΑΚΟΥΔΗΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ ΣΠΥΡΟΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ, ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2022

UNIVERSITY OF CRETE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

NMR SPECTROSCOPY LABORATORY



MASTER OF SCIENCE THESIS

**NMR-BASED METABOLOMICS OF MILK FROM DIFFERENT
PRODUCTION ANIMALS USING ^1H AND ^{31}P NMR SPECTROSCOPY**

ILIAS TSOLAKOUDIS

THESIS SUPERVISOR: APOSTOLOS SPYROS

HERAKLION, DECEMBER 2022

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Σπύρος Απόστολος, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, ΠΚ (Επιβλέπων)
2. Θεοδορίδης Γεώργιος, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, ΑΠΘ
3. Χατζιωάννου Αναστασία Χρυσοβαλάντου, Επίκουρη καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, ΠΚ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πρωτίστως, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Απόστολο Σπύρο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην ανάθεση της παρούσας μελέτης για την διεκπεραίωση της μεταπτυχιακής μου εργασίας. Ακόμη, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για τις πολύτιμες γνώσεις και την βοήθεια που μου πρόσφερε αυτά τα χρόνια μου υπήρξα μέλος της ερευνητικής του ομάδας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής μου, και συγκεκριμένα τον κ. Γεώργιο Θεοδωρίδη και την κ. Αναστασία Χρυσοβαλάντου Χατζηγιάννου, που δέχτηκαν να κρίνουν την παρούσα μεταπτυχιακή εργασία. Στην συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Πανεπιστήμιο Κρήτης για την υλικοτεχνική υποδομή που μου παρείχε, καθώς και το πρόγραμμα FoodOmicsGR για την παροχή των δειγμάτων γάλακτος που αναλύθηκαν σε αυτή την μελέτη.

Φυσικά δεν θα μπορούσα να παραλείψω και τα μέλη του ίδιου του εργαστηρίου που με βοήθησαν στην προσαρμογή του νέου περιβάλλοντος και στην εκμάθηση των νέων τεχνικών ανάλυσης. Συγκεκριμένα, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην Δρ. Ευαγγελία Ράλλη, την Δρ. Έφη Μανωλοπούλου και τον Γιώργο Κανακαράκη που ήταν παρόντες στα πρώτα μου βήματα σε αυτό το εργαστήριο και επιλύαν ότι πρόβλημα αντιμετώπιζα, καθώς επίσης και τον Μιχάλη Καλογεράκη, την Ιωάννα Μισύρη, τον Νίκο Χατζάκη, την Αριστούλα Βεϊσάκη και την Μύρια Αντωνίου για την άψογη συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα που πρόσφεραν στην ομάδα.

Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου που ήταν δίπλα μου και μου παρείχαν τόσο ηθική όσο και οικονομική υποστήριξη όλα αυτά τα χρόνια που λείπω από κοντά τους, καθώς επίσης και τους φίλους μου που ανέχτηκαν τις παραξενιές μου και παρέμειναν πλάι μου.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Ηλίας Τσολακούδης

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Επώνυμο	Τσολακούδης
Όνομα	Ηλίας
Ημερομηνία γέννησης	14/02/1997
Τόπος γέννησης	Καλαμαριά, Θεσσαλονίκη

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΣ

Διεύθυνση κατοικίας	Πόντου 24
Πόλη	Θεσσαλονίκη
T.K.	55131
Κινητό τηλέφωνο	+30 6982158588
e-mail	ilias1914@gmail.com

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ

- **2015-2019:** Πτυχίο Χημείας, Τμήμα Χημείας της σχολής Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Κρήτης
Βαθμός πτυχίου: 7.68/10.0 (Λίαν Καλώς)
Διπλωματική εργασία: «*Επίδραση διαλυτών ψεκασμού στα φάσματα μάζας πρωτεϊνών κατά την εκρόφηση τους με ιοντισμό υπερηχητικής εκνέφωσης*»
Επιβλέπων καθηγητής: Σπύρος Περγαντής
- **11/2019-01/2020:** Συμμετοχή στο πρόγραμμα ανταλλαγής φοιτητών στο πλαίσιο της πρακτικής άσκησης (Erasmus+) στο Πανεπιστήμιο του Γρατζ (Karl-Franzens-Universität Graz) της Αυστρίας στον τομέα της Αναλυτικής Χημείας για την Υγεία και το Περιβάλλον
- **2019:** Υποψήφιος για μεταπτυχιακό δίπλωμα ειδίκευσης στην Αναλυτική Χημεία στο Τμήμα Χημείας της σχολής Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Κρήτης
Μεταπτυχιακή εργασία: «*Μεταβολομική ανάλυση γάλακτος διαφόρων θηλαστικών παραγωγής με τη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού 1H και ^{31}P NMR*»
Επιβλέπων καθηγητής: Απόστολος Σπύρος

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- **07/2019-09/2019:** Πρακτική άσκηση στο πλαίσιο της προαιρετικής επιλογής των φοιτητών του Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Κρήτης στο οиноποιείο IDAIA ως αναλυτικός χημικός στο εργαστήριο της επιχείρησης
- **11/2019-01/2020:** Συμμετοχή στο πρόγραμμα ανταλλαγής φοιτητών στο πλαίσιο της πρακτικής άσκησης (Erasmus+) στο Πανεπιστήμιο του Γρατζ (Karl-Franzens-Universität Graz) της Αυστρίας στον τομέα της Αναλυτικής Χημείας για την Υγεία και το Περιβάλλον, ως αναλυτικός ερευνητής

ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- **2016-2017:** Βοηθός προπτυχιακού εργαστηρίου Οργανικής ΙΙ, κατά το εαρινό εξάμηνο του ακαδημαϊκού έτους 2016 – 2017, με καθήκοντα τη συμμετοχή στη γενική προετοιμασία του εργαστηρίου για την ομαλή διεξαγωγή των εργαστηριακών ασκήσεων, όντας προπτυχιακός
- **2016-2018:** Συμμετοχή στην ομάδα επίδειξης πειραμάτων του Τμήματος Χημείας σε κοινό στον Άγιο Νικόλαο, Λασιθίου Κρήτης τα έτη 2016 – 2017 και 2017 – 2018
- **2020:** Μεταπτυχιακός βοηθός στα προπτυχιακά εργαστήρια εαρινού και χειμερινού εργαστηρίου της Φυσικοχημείας ΙΙ και Φυσικοχημείας Ι αντίστοιχα, με ενεργή συμμετοχή στην πραγματοποίηση των πειραμάτων και την εκμάθηση του θεωρητικού υποβάθρου απευθείας σε φοιτητές του τμήματος

ΙΚΑΝΟΤΗΤΕΣ

Δεξιότητες σε Η/Υ: Γνώσεις προγραμμάτων υπολογιστών (Επεξεργασία Word, Excel, δημιουργία και επεξεργασία παρουσιάσεων μέσω PowerPoint) Top Spin 3.1, 4.1.1 Statistica, Simca, Origin, ChemoMX, ChemDraw

Χειρισμός οργάνων: Χρήση Φασματομέτρων NMR της εταιρείας Bruker (DPX-300MHz, AvanceIII-500MHz και NEO Solid State-400MHz)

Γλώσσες: Ελληνικά (μητρική γλώσσα)

Αγγλικά (Πιστοποιητικό Cambridge B1, Michigan B1, Edexcel Level 4, Michigan ECPE C2)

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

I. Tsolakoudis, G. Theodoridis, A. Spyros “Targeted Metabolomic Analysis of Milk Samples of Different Animal Origin using NMR Spectroscopy” FoodOmics/ΔΕΘ-Helexpo 12th September 2022, Thessaloniki, Greece

I. Tsolakoudis, G. Theodoridis, E. Ralli, A. Spyros “Metabolomic Analysis of Milk Samples with Different Animal Origin using NMR Spectroscopy” 1st Symposium of Postgraduate Students, 24th-25th March 2022, Athens, Greece

CURRICULUM VITAE

Ilias Tsolakoudis

PERSONAL DATA

Surname: Tsolakoudis
Name: Ilias
Birth date: 14/02/1997
Place of birth: Kalamaria, Thessaloniki

CONTACT INFORMATION

Home address: Pontou 24, 55131
City: Thessaloniki
Number: +30 6982158588
e-mail: ilias1914@gmail.com

EDUCATION

- **2015-2019:** B. Sc. in Chemistry, Department of Chemistry, University of Crete, Heraklion Crete, Greece
- **11/2019-01/2020:** Participation in the student exchange programme with Erasmus+ at the University of Graz (Karl-Franzens-Universität Graz) in Austria in the field of Analytical Chemistry for Health and Environment
- **2019:** M. Sc. student in Chemistry, Department of Chemistry, University of Crete, Heraklion Crete, Greece
M. Sc. Thesis: *«NMR-based metabolomics of production milk from different mammal species using ^1H και ^{31}P NMR spectroscopy»*
Supervisor: Apostolos Spyros, Assistant professor

PROFESSIONAL EXPERIENCE

- **07/2019-09/2019:** Internship in the context of the optional selection of students of the Department of Chemistry, University of Crete at the IDAIA winery as an analytical chemist in the company's laboratory

- **11/2019-01/2020:** Participation in the student exchange programme with Erasmus+ at the University of Graz (Karl-Franzens-Universität Graz) in Austria in the field of Analytical Chemistry for Health and Environment as analytical researcher

TEACHING EXPERIENCE

- **2016-2017:** Lab assistant in undergraduate Organic Chemistry II Laboratory as an undergraduate student
- **2016-2018:** Participation in the demonstration team of experiments of the Department of Chemistry to the public in Agios Nikolaos, Lasithi, Crete
- **2020:** Lab assistant in undergraduate Physical Chemistry I and II Laboratories as a postgraduate student

SKILLS AND TECHNIQUES

Digital skills: Knowledge of computer programs (Word editing, Excel, creating and editing presentations through PowerPoint) Top Spin 3.1, 4.1.1 Statistica, Simca, Origin, ChemoMX, ChemDraw

Instrument handling: Use of NMR Spectrometers by Bruker (DPX-300MHz, AvanceIII-500MHz and NEO-400MHz)

Languages: Greek (mother language)

English (Cambridge B1, Michigan B1, Edexcel Level 4, Michigan ECPE C2)

PARTICIPATION IN CONFERENCES

I. Tsolakoudis, G. Theodoridis, A. Spyros “Targeted Metabolomic Analysis of Milk Samples of Different Animal Origin using NMR Spectroscopy” FoodOmics/ΔΕΘ-Helexpo 12th September 2022, Thessaloniki, Greece

I. Tsolakoudis, G. Theodoridis, E. Ralli, A. Spyros “Metabolomic Analysis of Milk Samples with Different Animal Origin using NMR Spectroscopy” 1st Symposium of Postgraduate Students, 24th-25th March 2022, Athens, Greece

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία επικεντρώνεται στην ανάλυση των συστατικών του γάλακτος διαφορετικής ζωικής προέλευσης, καθώς και διαφορετικού μήνα άμελξης του αντίστοιχου γαλακτοπαραγωγού ζώου με την χρήση της Φασματοσκοπίας NMR και της χημειομετρίας. Για τον σκοπό αυτό μελετήθηκε ένας μεγάλος αριθμός δειγμάτων από γάλατα διαφορετικής ζωικής προέλευσης, που προέρχονταν από ελληνικές φάρμες της βόρειας Ελλάδας. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν δείγματα γάλακτος από αγελάδα, πρόβατο, κατσίκι, βουβάλι και γάιδαρο με διαφορετικούς μήνες δειγματοληψίας που κυμαίνονταν από πέντε μήνες (Μάρτιο με Ιούλιο για τα αγελαδινά) έως δύο μήνες (Ιούνιο με Ιούλιο για τα γαϊδουρίσια).

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για αυτή την ανάλυση περιελάμβανε την εκχύλιση των δειγμάτων γάλακτος με δύο διαφορετικούς διαλύτες για την απομόνωση των πολικών (σάκχαρα, οργανικά οξέα μικρού μοριακού βάρους και αμινοξέα) και άπολων (λιπαρά όπως τριγλυκερίδια, διγλυκερίδια και λινολενικό) μεταβολιτών τους. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε επιτυχώς η ταυτοποίηση των συστατικών του γάλακτος από αυτά τα δύο εκχυλίσματα, καθώς και ο ποσοτικός προσδιορισμός της σύστασής του για κάθε είδος ζώου ξεχωριστά και διερευνήθηκαν οι μεταβολές που παρατηρούνται συναρτήσει του μήνα που πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία. Στην συνέχεια, εφαρμόστηκαν τεχνικές στοχευμένης και μη στοχευμένης μεταβολομικής ανάλυσης με δεδομένα εισόδου το μεταβολικό προφίλ των δειγμάτων και τα φάσματα ^1H και ^{31}P NMR που ελήφθησαν αντίστοιχα, σε συνδυασμό με κατάλληλες πολυπαραμετρικές στατιστικές μεθόδους ανάλυσης. Με βάση αυτές τις μεθόδους αναπτύχθηκαν διάφορα στατιστικά αναλυτικά μοντέλα που δείχθηκε ότι μπορούν να διαχωρίσουν με αξιοσημείωτη επιτυχία τα δείγματα γάλακτος βάσει της ζωικής τους προέλευσης (αγελάδα, πρόβατο, κατσίκι, βουβάλι και γάιδαρος) και με μικρότερη ακρίβεια τον μήνα δειγματοληψίας, ενώ ταυτόχρονα προσδιορίστηκαν οι μεταβολίτες που συνεισφέρουν σημαντικά σε αυτούς τους διαχωρισμούς.

Λέξεις κλειδιά: Φασματοσκοπία NMR, ελληνικά γάλατα, ζωική προέλευση, περίοδος δειγματοληψίας, μεταβολομική ανάλυση

ABSTRACT

This M.Sc. thesis focuses on the compositional analysis of milks of different animal origin, as well as different milking period using MMR spectroscopy and chemometrics. Towards this purpose, a large number of milk samples obtained from different animal species and originated from commercial farms in northern Greece, were studied. Specifically, the milk samples were collected from cow, sheep, goat, buffalo and donkey species with the different milk production period ranging between five (March to July for cows) and two months (June to July for donkeys).

The experimental protocol used for milk analysis involved the extraction of polar (sugars, low molecular weight organic acids and amino acids) and non-polar metabolites (fat such as triglycerides, diglycerides and linolenic) using two different solvents. This was followed by, the successful identification of milk metabolites present in these two extracts, as well as their quantification based on their NMR spectra. The analytical compositional data set obtained for the 91 samples analyzed was used to examine milk composition variations according to animal origin and milking period. Following that, the techniques of targeted (metabolite profile) and untargeted (bucketed ^1H and ^{31}P NMR spectra) metabolomics were applied to the milk samples datasets obtained using suitable multivariate statistical analysis methods. The metabolomics analysis led to the development of various models that can successfully differentiate milk samples according to their animal origin (cow, sheep, goat, buffalo and donkey) and the period of milk collection, while the metabolites that are statistically significant for the discrimination of the different milk categories were also identified.

Key words: NMR Spectroscopy, Greek milk, animal origin, milking period, metabolomic analysis

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 - Εισαγωγή

1.1 Γάλα	1
1.2 Επεξεργασία νοπού γάλακτος	2
1.3 Τα οφέλη των συστατικών του γάλακτος στην υγεία	3
1.4 Γάλα εμπορικά διαθέσιμο	6
1.5 Χημειομετρία και μεταβολομική ανάλυση	7
1.6 Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA)	9
1.7 Μέθοδος Μερικών Ελάχιστων Τετραγώνων (PLS) και Ορθογωνικών Μερικών Ελάχιστων Τετραγώνων (OPLS)	9
1.8 Ανάλυση Διακριτότητας DA	10
1.9 Ανάλυση Διακριτότητας Μερικών Ελάχιστων Τετραγώνων (PLS-DA) και Ορθογωνικών Μερικών Ελάχιστων Τετραγώνων (OPLS-DA)	10
1.10 Τεχνικές ανάλυσης τροφίμων	11
1.11 Μεταβολομική ανάλυση σε τρόφιμα με φασματοσκοπία NMR	12
1.12 Μεταβολομική ανάλυση, βάσεις δεδομένων και τεχνικές νοθείας στο γάλα	14
1.13 Μεταβολομική ανάλυση του γάλακτος με άλλες τεχνικές	15
1.14 Μεταβολομική ανάλυση του ελληνικού γάλακτος	17

ΣΚΟΠΟΣ	19
---------------	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – Πειραματικό μέρος

2.1 Αντιδραστήρια και πρότυπες ενώσεις	20
2.2 Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος και εσωτερικού προτύπου για ^{31}P NMR	20
2.3 Δείγματα γάλακτος	20
2.4 Πειραματική διαδικασία και πρωτόκολλο NMR	21
2.5 Μονοδιάστατα (1D) φάσματα NMR	22
2.6 Δισδιάστατα (2D) φάσματα NMR	23
2.7 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των ενώσεων του πολικού και άπολου εκχυλίσματος	24
2.8 Υπολογισμός της περιεκτικότητας των λιπαρών οξέων του άπολου εκχυλίσματος των δειγμάτων γάλακτος	26
2.9 Μεταβολομική ανάλυση	27

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – Ποιοτικός προσδιορισμός των φασμάτων ^1H και ^{31}P NMR	
3.1 Ταυτοποίηση μεταβολιτών του υδατικού εκχυλίσματος των δειγμάτων γάλακτος	29
3.2 Ταυτοποίηση μεταβολιτών του άπολου εκχυλίσματος των δειγμάτων γάλακτος	35
3.3 Ποιοτική σύγκριση των φασμάτων ^1H και ^{31}P NMR για τα διάφορα είδη γάλακτος	38
3.4 Πίνακες χημικών μετατοπίσεων και δομές μεταβολιτών του γάλακτος	42
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 – Ποσοτικός προσδιορισμός των φασμάτων ^1H και ^{31}P NMR	
4.1 Ποσοτικός προσδιορισμός των μεταβολιτών του υδατικού εκχυλίσματος	49
4.2 Ποσοτικός προσδιορισμός των μεταβολιτών του άπολου εκχυλίσματος	59
ΚΕΦΑΛΑΙΑ 5 - Μεταβολομική ανάλυση ως προς την ζωική προέλευση του γάλακτος	
5.1 Στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση ως προς το είδος του γαλακτοπαραγωγού ζώου	67
5.2 Μη στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση ως προς το είδος του γαλακτοπαραγωγού ζώου	76
ΚΕΦΑΛΑΙΑ 6 - Μεταβολομική ανάλυση ως προς τον μήνα δειγματοληψίας και τον παραγωγό	
6.1 Στατιστική ανάλυση ANOVA	81
6.2 Ποσοτική ανάλυση της σύστασης του γάλακτος συναρτήσει του μήνα δειγματοληψίας και της προέλευσης (παραγωγός)	82
6.3 Στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση ως προς τον μήνα δειγματοληψίας	93
6.4 Μη στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση ως προς τον μήνα δειγματοληψίας	98
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	101
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	104
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	109

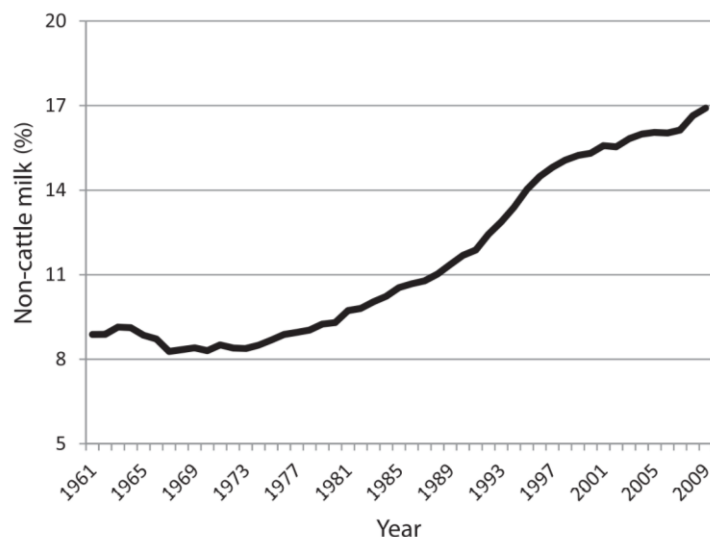
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 - Εισαγωγή

1.1 Γάλα

Το γάλα είναι μη ομοιογενές μείγμα διαφόρων οργανικών και μη ενώσεων και αποτελείται από νερό, λιπίδια, υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, βιταμίνες, μέταλλα και διάφορους μεταβολίτες μικρού μοριακού βάρους. Εκκρίνεται από τους μαστικούς αδένες των θηλαστικών, συμπεριλαμβανόμενου και του ανθρώπινου είδους, και προορίζεται για την διατροφή των νεογνών και των βρεφών για μια ισορροπημένη και υγιή ανάπτυξη. Αποτελεί την πιο πλήρη φυσική τροφή και η θρεπτική του αξία είναι μεγάλη, αφού συνδυάζει τα τρία βασικά θρεπτικά συστατικά (υδατάνθρακες, λίπος και πρωτεΐνες) με τις απαραίτητες βιταμίνες και ιχνοστοιχεία που χρειάζεται ο οργανισμός.

Χρησιμοποιείται σε πληθώρα προϊόντα ως βασικό συστατικό όπως είναι το γιαούρτι, το τυρί και το παγωτό, ενώ η διατροφική του αξία εξαρτάται άμεσα από την σύσταση του. Υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τη σύνθεση και την ποιότητα του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων. Κύριο ρόλο αποτελεί η ζωική προέλευση του γάλακτος όπως για παράδειγμα αν προέρχεται από αγελάδα ή κατσίκα. Πιο συγκεκριμένα, τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα θηλαστικά για την εμπορική εκμετάλλευση του αποτελούν η αγελάδα, το κατσίκι, το βουβάλι και το πρόβατο, ενώ έχουν παρατηρηθεί στην αγορά και γάλατα από γαϊδούρι, καμήλα και άλογο σε ορισμένες χώρες. Στην **Εικόνα 1.1.1** δίνεται διάγραμμα που δείχνει την ποσοστιαία παραγωγή του γάλακτος από τα υπόλοιπα θηλαστικά ζώα πέρα των βοοειδών ανά έτος, με πρώτη χρονιά καταγραφής να είναι το 1961 [1]. Παρατηρείται ότι από το 1973 και έπειτα άρχισε αργά και σταθερά η παραγωγή γάλακτος προερχόμενα από άλλα είδη που παλιότερα δεν εκμεταλλευόντουσαν τόσο και σε περίοδο 50 χρόνων φαίνεται να διπλασιάζεται.

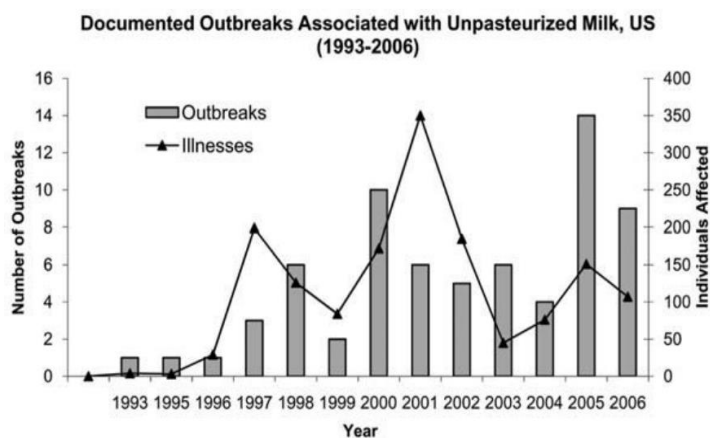
Άλλοι παράγοντες είναι η εποχή δειγματοληψίας του γάλακτος και πιο συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί ότι το γάλα αναλόγως την εποχή που θα συλλεχθεί παρουσιάζει ορισμένες διακυμάνσεις στη σύστασή του ακόμη και σε βασικά του συστατικά. Πιο συγκεκριμένα, η ύπαρξη βλάστησης [2] ή ακόμα και η περίοδος που τα γαλακτοπαραγωγά ζώα κυοφορούν μπορούν να επηρεάσουν την παραγωγή του. Επιπλέον μικρότερο αλλά εξίσου σημαντικό ρόλο έχουν και οι περιβαλλοντικές συνθήκες του γεωγραφικού τόπου εκτροφής του γαλακτοπαραγωγού ζώου, καθώς και η επεξεργασία που δέχεται το γάλα πριν γίνει διαθέσιμο προς τον καταναλωτή [3].



Εικόνα 1.1.1. Διάγραμμα ποσοστιαίας απεικόνισης ετήσιας παραγωγής γάλακτος προερχόμενο από μη βοοειδή θηλαστικά [1].

1.2 Επεξεργασία νωπού γάλακτος

Η κατανάλωση νωπού γάλακτος επιφέρει ορισμένους κινδύνους στην υγεία του ανθρώπου λόγω της παρουσίας διαφόρων τύπων παθογόνων μικροοργανισμών που προέρχονται είτε από το ζώο, είτε από τον παραγωγό, είτε ακόμα και από το περιβάλλον γενικότερα [4]. Στην **Εικόνα 1.2.1** φαίνεται από το διάγραμμα ότι ο μέσος όρος των επιβεβαιωμένων κρουσμάτων γενικά από την κατανάλωση μη επεξεργασμένου γάλακτος αυξήθηκε από το 2000 και μετά στην Αμερική [5]. Ωστόσο, αν και αυτή η αύξηση μπορεί να οφείλεται και στην ευκολότερη ανίχνευση των λοιμώξεων μέσω της εξέλιξης της τεχνολογίας, παραμένει ένα συνεχώς αυξανόμενο πρόβλημα για την δημόσια υγεία.



Εικόνα 1.2.1. Διάγραμμα απεικόνισης αναφερόμενων εστιών νόσου για τις οποίες υπάρχει κάποια υποψία ή έχουν επιβεβαιωθεί και σχετίζονται με την κατανάλωση μη παστεριωμένου γάλακτος [5].

Για αυτό τον λόγο το γάλα, προτού γίνει διαθέσιμο στους καταναλωτές, περνά από μια είδους επεξεργασία προκειμένου να είναι ασφαλές προς κατανάλωση. Πιο συγκεκριμένα, οι βιομηχανίες προχωρούν στον καθαρισμό του γάλακτος μέσω διήθησης, ομογενοποίησης και κυρίως της θερμικής του επεξεργασίας για την απαλλαγή του από παθογόνους και αλλοιογόνους μικροοργανισμούς αλλά και την αύξηση της διάρκειας ζωής του προϊόντος, χωρίς να αλλάζει σημαντικά η θρεπτική του αξία[6].

Αναλόγως, λοιπόν, με την θερμική επεξεργασία που θα υποβληθεί, το γάλα διαχωρίζεται σε παστεριωμένο και μακράς διάρκειας. Για την παστερίωση του εφαρμόζονται διάφορες τεχνικές με δύο να είναι οι κυριότερες. Η πρώτη είναι η εφαρμογή χαμηλής θερμοκρασίας (63°C) για μεγάλο χρονικό διάστημα (30 λεπτά), ενώ η δεύτερη είναι η εφαρμογή υψηλής θερμοκρασίας (72°C) για βραχύ χρονικό διάστημα (15 δευτερόλεπτα) [7]. Με αυτήν διαδικασία όλοι οι μύκητες και η πλειοψηφία των αλλοιογόνων βακτηρίων θανατώνονται, και πολλά ενδογενή ένζυμα μετουσιώνονται [4]. Ωστόσο, το παστεριωμένο γάλα έχει περιορισμένη διάρκεια ζωής, για αυτό είναι αναγκαία η ταχεία ψύξη του σε χαμηλές θερμοκρασίες που δεν υπερβαίνουν τους 6°C κατά τη διακίνησή του και μέχρι την κατανάλωσή του. Στην περίπτωση του γάλακτος μακράς διάρκειας υφίσταται θερμική επεξεργασία είτε με την κλασική μέθοδο αποστείρωσης, που είναι θέρμανση στους 115-125°C για 20-30 λεπτά ή με την μέθοδο της υπερ-υψηλής θέρμανσης (Ultra High Temperature - UHT). Θέρμανσης δηλαδή του γάλακτος στους 135°C για 1 τουλάχιστον δευτερόλεπτο και έχει ως σκοπό την καταστροφή όλων των υπολειπομένων μικροοργανισμών. Στην **Εικόνα 1.2.2** δίνεται σε πίνακάκι οι διάφορες τεχνικές που ακολουθούνται για την παστερίωση του γάλακτος.

Temperature	Time	Pasteurization Type
63°C (145°F)*	30 minutes	Vat Pasteurization
72°C (161°F)*	15 seconds	High temperature short time Pasteurization (HTST)
89°C (191°F)	1.0 second	Higher-Heat Shorter Time (HHST)
90°C (194°F)	0.5 seconds	Higher-Heat Shorter Time (HHST)
94°C (201°F)	0.1 seconds	Higher-Heat Shorter Time (HHST)
96°C (204°F)	0.05 seconds	Higher-Heat Shorter Time (HHST)
100°C (212°F)	0.01 seconds	Higher-Heat Shorter Time (HHST)
138°C (280°F)	2.0 seconds	Ultra Pasteurization (UP)

Εικόνα 1.2.2. Διάφορες τεχνικές θερμικής επεξεργασίας του γάλακτος [7]

1.3 Τα οφέλη των συστατικών του γάλακτος στην υγεία

Τα οφέλη του γάλακτος για τον ανθρώπινο οργανισμό και ιδιαίτερα για τους πρώτους μήνες της ζωής του είναι πολλά. Η ύπαρξη αλλά και η περιεκτικότητα ορισμένων μεταβολιτών

συνεισφέρουν στην υγεία του ατόμου κάθε ένας και με διαφορετικό τρόπο. Έχει παρατηρηθεί και μελετηθεί, ότι η κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων σχετίζεται με τον μειωμένο κίνδυνο καρδιαγγειακών παθήσεων και διάφορων ειδών καρκίνου, με ελάχιστες μόνο αναφορές σε ανεπιθύμητα αποτελέσματα [8].

Γενικά τα λιπαρά οξέα είναι τα πιο μεταβλητά συστατικά του γάλακτος, αφού σχετίζεται άμεσα με την προέλευσή του γαλακτοπαραγωγού ζώου, την φυλή του, τον γονότυπο του, την διατροφική του συνήθεια αλλά και την εποχή που συλλέγεται το γάλα. Υπάρχουν επίσης ενδείξεις ότι τα λιπαρά οξέα μέσης αλυσίδας έχουν ευεργετικά αποτελέσματα σε ηλικιωμένους ενήλικες με νευρολογικές και μεταβολικές διαταραχές [9]. Ομοίως, τα ακόρεστα λιπαρά οξέα μπορούν να αντιδράσουν με ελεύθερες ρίζες ή δευτερογενή προϊόντα υπεροξειδωσής που προκαλούν οξειδωτικό στρες και είναι επιβλαβή για τις πρωτεΐνες και το DNA στα κύτταρα καταστέλλοντας την ανάπτυξη καρκίνου, όπως είναι το ελαϊκό οξύ [10]. Ακόμη, δίαιτες με υψηλές ποσότητες μονοακόρεστων λιπαρών οξέων μειώνουν τόσο τις συγκεντρώσεις χοληστερόλης όσο και της τριακυλογλυκερόλης. Η αντικατάσταση των κορεσμένων λιπαρών οξέων με *cis*-ακόρεστα λιπαρά οξέα μειώνει τον κίνδυνο για στεφανιαία νόσο [11].

Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα που είναι σημαντικά για τον άνθρωπο αλλά δεν μπορούν να συντεθούν στον οργανισμό του και μοναδική πηγή πρόσληψής τους είναι τα τρόφιμα, και για αυτό χαρακτηρίζονται ως απαραίτητα, είναι το λινελαϊκό (C18:2, ω -6) και το λινολενικό οξύ (C18:3, ω -3). Αποτελούν σημαντικό συστατικό μέρος για τα φωσφολιπίδια και συμμετέχουν στον κύκλο εργασιών και το μεταβολισμό του σώματος [12]. Ακόμη μπορούν να μειώσουν την περιεκτικότητα χοληστερόλης στο αίμα. Στην περίπτωση που το ανθρώπινο σώμα στερηθεί αυτά τα οξέα, θα επηρεαστεί ο μεταβολισμός του οργανισμού και θα προκληθεί καθυστέρηση στην ανάπτυξή του, τραυματισμός του δέρματος, καθώς και διάφορες ασθένειες στα αιμοφόρα αγγεία, τα σπλάχνα, το νευρικό σύστημα και την όραση.

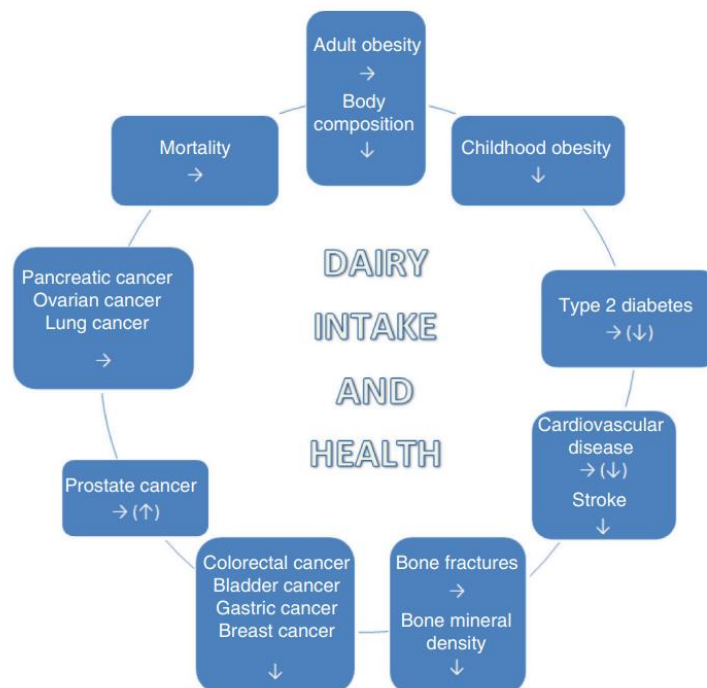
Η γνώση της επίδρασης του συζευγμένου λινελαϊκού οξέος (CLA) στο μεταβολισμό και η αναφερόμενη αντιπολλαπλασιαστική και αντικαρκινική δράση του για διάφορους τύπους καρκινικών κυττάρων το καθιστά έναν ενδιαφέροντα και πιθανό θεραπευτικό παράγοντα για την θεραπεία του καρκίνου. Ακόμη, έχει παρατηρηθεί ότι τα ισομερή του CLA και συγκεκριμένα το *cis*-9, *trans*-11 και το *trans*-10, *cis*-12 έχουν διαφορετικές ιδιότητες με το πρώτο να είναι αντιφλεγμονώδες, ενώ το δεύτερο να είναι υπεύθυνο για την παρεμπόδιση σύνθεσης λιπώδη ιστού από τα λιποκύτταρα [13].

Τα φωσφολιπίδια, αν και βρίσκονται σε μικρό ποσοστό στο γάλα, είναι δομικά συστατικά των μεμβρανών, έχουν λειτουργικούς ρόλους σε μια σειρά αντιδράσεων, επηρεάζουν τα ένζυμα στην επιφάνεια των σφαιριδίων, βοηθούν στη σταθεροποίηση των γαλακτωμάτων, στην

αλληλεπίδραση των κυττάρων μεταξύ τους, στον πολλαπλασιασμό, την ανοσολογική αναγνώριση, την διαμεμβρανική σηματοδότηση και λειτουργούν ως υποδοχείς για ορισμένες ορμόνες [10]. Επιπλέον, παίζουν σημαντικό ρόλο στην πέψη, την απορρόφηση και την μεταφορά των λιπιδίων βοηθώντας στον καλύτερο μεταβολισμό των τριγλυκεριδίων. Θεωρούνται σημαντικοί προμηθευτές ενέργειας και συνεισφέρουν στην ανάπτυξη του εγκεφάλου των νεογνών. Τέλος, το βουτυρικό οξύ είναι ένας γνωστός διαμορφωτής της γονιδιακής λειτουργίας και μπορεί επίσης να διαδραματίσει ρόλο στην πρόληψη του καρκίνου, ενώ το κιτρικό οξύ είναι ένα εξαιρετικά άφθονο συστατικό του γάλακτος και επηρεάζει την επεξεργασία του, τα γευστικά χαρακτηριστικά και τη ρευστότητα του. Παίζει επίσης κεντρικό ρόλο ως ενδιάμεσο στο μεταβολισμό της κυτταρικής ενέργειας και στον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος [14].

Όσον αφορά τα υδατοδιαλυτά συστατικά του γάλακτος, η χολίνη αποτελεί σημαντικό δομικό συστατικό στο σχηματισμό των φωσφολιπιδίων και την μεταφορά γενικά των λιπιδίων και παίζει σημαντικό ρόλο σε διάφορες μεταβολικές διεργασίες. Ωστόσο, η βιοσύνθεση του από τον ανθρώπινο οργανισμό είναι ανεπαρκής για να καλύψει τις σωματικές του ανάγκες [15]. Η καρνιτίνη είναι απαραίτητη για τον καταβολισμό των λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας. Ως εκ τούτου, η ανεπάρκεια καρνιτίνης μπορεί σε ακραίες περιπτώσεις να οδηγήσει σε βρεφική θνησιμότητα [16]. Η κρεατίνη και η φωσφοκρεατίνη παίζουν ζωτικό ρόλο στη λειτουργία του εγκεφάλου, τη νεφρική λειτουργία και το μεταβολισμό των πρωτεϊνών. Τα βρέφη με ανεπάρκεια σε αυτούς τους δύο μεταβολίτες μπορεί να αναπτύξουν μια σταθερή σειρά νευρολογικών συμπτωμάτων, συμπεριλαμβανομένης της καθυστέρησης της ομιλίας, της νοητικής υστέρησης και της επιληψίας [17].

Η λακτόζη είναι ένας δισακχαρίτης και αποτελεί το κύριο σάκχαρο που υπάρχει στο γάλα. Παίζει το σημαντικό βιολογικό ρόλο του ωσμωτικού ρυθμιστή κατά τη διάρκεια της γαλουχίας, με αποτέλεσμα γενικά να υφίσταται μόνο μικρές διακυμάνσεις της περιεκτικότητας του στο γάλα [18]. Πέρα της λακτόζης, σε αυτό περιέχονται ακόμη και άλλοι ολιγοσακχαρίτες που συνεισφέρουν στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος και στην ανάπτυξη του εγκεφάλου στα νεογνά [19]. Τέλος, το γάλα αποτελεί καλή πηγή για υδατοδιαλυτές βιταμίνες και ως εκ τούτου περιέχει ένα ευρύ φάσμα πρωτεϊνών με βιολογικές δραστηριότητες που κυμαίνονται από αντιμικροβιακές έως εκείνες που διευκολύνουν την απορρόφηση θρεπτικών ουσιών [10]. Στην **Εικόνα 1.3.1** παρουσιάζονται συνοπτικά μερικές από τις θετικές επιδράσεις των γαλακτοκομικών προϊόντων στην ανθρώπινη υγεία.



Εικόνα 1.3.1. Συνολική επίδραση-συσχέτιση των γαλακτοκομικών προϊόντων στην υγεία του ανθρώπου. ↓ Θετική επίδραση; ↑ Αρνητική επίδραση; → Καμία επίδραση [8]

1.4 Γάλα εμπορικά διαθέσιμο

Η κατανάλωση του αγελαδινού γάλακτος είναι ευρέως διαδεδομένη στην παγκόσμια αγορά λόγω της διαθεσιμότητάς του και της θρεπτικής αξίας που προσφέρει. Αντίστοιχης ίσως και μεγαλύτερης θρεπτικής αξίας αποτελούν και γάλατα διαφορετικής ζωικής προέλευσης όπως είναι το κατσικίσιο, το βουβαλίσιο και το γαϊδουρινό.

Σε σύγκριση με το αγελαδινό γάλα, το κατσικίσιο είναι πιο ωφέλιμο για την ανθρώπινο οργανισμό λόγω των πεπτικών, θεραπευτικών και διατροφικών χαρακτηριστικών του. Το κατσικίσιο γάλα και τα παράγωγα γαλακτοκομικά προϊόντα του συμβάλουν στην υγιή διατροφή του ανθρώπου, καθώς είναι πλούσια σε τριακυλογλυκερόλες μεσαίας αλυσίδας, οι οποίες θεωρούνται γρήγορη πηγή ενέργειας και δεν αποθηκεύονται ως σωματικό λίπος. Πολλά ακόμη οφέλη για την υγεία μπορούν να συσχετιστούν με την κατανάλωση του, καθώς αντιπροσωπεύει πηγή πρωτεϊνών υψηλής ποιότητας και χαρακτηρίζεται από υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας. Η παραγωγή κατσικίσιου γάλακτος οδήγησε σε προϊόντα που είναι εμπλουτισμένα σε κορεσμένα λιπαρά οξέα αλλά έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε λινολενικό (ω-3) και λινελαϊκό οξύ (ω-6) και γενικότερα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα [20]. Ακόμη για την περίπτωση των βρεφών θεωρείται πιο εύπεπτο και ευεργετικό

από το αγελαδινό, λόγω της χαμηλής περιεκτικότητάς του σε α_{s1} καζεΐνης, η οποία αποτελεί σύνηθες αλλεργιογόνο [13].

Αντίστοιχα, το γάλα βοοειδούς προέλευσης είναι σημαντικής διατροφικής αξίας τόσο για την βρεφική όσο και για την ενήλικη ζωή, λόγω της μεγάλης περιεκτικότητάς του σε λακτόζη και λιπίδια.

Τέλος, έρευνες έχουν δείξει ότι το γάλα γαϊδουρινής προέλευσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί επιτυχώς ως συμπλήρωμα του ανθρώπινου γάλακτος για τα νεογνά που έχουν είτε την έλλειψη του μητρικού, είτε κάποια αλλεργική αντίδραση πρωτεΐνης από το αντίστοιχο αγελαδινής προέλευσης [21]. Αυτό συμβαίνει διότι χαρακτηρίζεται από χαμηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και λίπη αλλά είναι πλούσιο σε λακτόζη, χαρακτηριστικά που έχει και το μητρικό γάλα [22]. Αξιοσημείωτη είναι η αντιοξειδωτική του δράση, ενώ συνεισφέρει σημαντικά στην βελτίωση της υγείας του ανθρώπου από πληθώρα ασθενειών [11], [23].

1.5 Χημειομετρία και μεταβολομική ανάλυση

Η χημειομετρία είναι ένας κλάδος της επιστήμης που εξάγει χρήσιμες πληροφορίες από μεγάλα σύνολα χημικών και βιοχημικών δεδομένων χρησιμοποιώντας διαφορετικές μαθηματικές και στατιστικές μεθόδους [24]. Στην εφαρμοσμένη χημεία, η χρήση της χημειομετρίας έχει εξαπλωθεί και αναγνωριστεί καλά από το 1960-1970 [25], αλλά στις επιστήμες και συγκεκριμένα την τεχνολογία τροφίμων η εφαρμογή της χημειομετρίας είναι κάπως νέα. Γενικά η χημειομετρία μπορεί να διαιρεθεί σε μεθόδους βαθμονόμησης, ταξινόμησης και διερεύνησης. Η εφαρμογή της χημειομετρίας στα τρόφιμα έχει μεγάλη χρησιμότητα στην αξιολόγηση της νοθείας και της γεωγραφικής προέλευσης τους, καθώς μπορούν να παρατηρηθούν διαχωρισμοί αλλά και να εντοπιστούν λόγοι κάποιας πιθανής ομαδοποίησης.

Η μεταβολομική ανάλυση είναι μια μέθοδος η οποία χρησιμοποιεί στατιστικά μοντέλα πολλών μεταβλητών (πολυπαραμετρικά) για να εξάγει τον μέγιστο δυνατό όγκο χρήσιμης πληροφορίας από ένα μεγάλο δείγμα πειραματικών δεδομένων. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για να συσχετίσει και να συγκρίνει με διαφορετικούς τρόπους αναλυτικά φασματοσκοπικά δεδομένα, που προέρχονται από την φασματοσκοπία μαζών και τη φασματοσκοπία NMR, από έναν μεγάλο αριθμό δειγμάτων [26]. Βοηθάει στην ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των χημικών ενώσεων, συνήθως μικρού μοριακού βάρους, που ανιχνεύονται σε ένα δείγμα και έχει την δυνατότητα να επηρεάσει την πρωτογενή (παραγωγό) και την δευτερογενή (βιομηχανία) παραγωγή καθώς και τους καταναλωτές [27]. Για αυτό τον λόγο αποτελεί μία καλά καθιερωμένη και συνεχώς εξελισσόμενη τεχνική ανάλυσης που

εφαρμόζεται σε διάφορους τομείς έρευνας συμπεριλαμβανομένου της ιατρικής, της φαρμακολογίας, των τροφίμων και της διατροφολογίας [3]. Στόχος της αποτελεί η κατηγοριοποίηση των δειγμάτων ή και η μεταξύ τους διάκριση, όσων αφορά είτε την γεωγραφική τους είτε την ζωική τους προέλευσης και την λήψη κατάλληλων πληροφοριών, όσων αφορά την σύσταση των μεταβολιτών τους, για την ενημέρωση των αντίστοιχων βάσεων δεδομένων. Τέλος, ένας ακόμη σημαντικός στόχος αποτελεί η δυνατότητα πρόβλεψης και συγκεκριμένα ο προσδιορισμός αγνώστων δειγμάτων μέσω της δημιουργίας αντίστοιχων πολυπαραμετρικών μοντέλων βαθμονόμησης.

Η μεταβολομική μπορεί να χωριστεί σε στοχευμένη και σε μη στοχευμένη με διαφορετική χρησιμότητα να έχει η κάθε μία. Στην στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση προεπιλέγονται συγκεκριμένοι στόχοι-μεταβολίτες, προκειμένου να μελετηθεί η επίδρασή τους στο προς ανάλυση δείγμα. Όσον αφορά στην Φασματοσκοπία NMR πραγματοποιείται η ανίχνευση, η ταυτοποίηση και η ποσοτικοποίηση του μέγιστου δυνατού αριθμού μεταβολιτών σε ένα ευρύ σύνολο δειγμάτων. Έπειτα, οι συγκεντρώσεις αυτές χρησιμοποιούνται ως δεδομένα εισόδου για την δημιουργία στατιστικών μοντέλων με σκοπό την ταξινόμηση των δειγμάτων σε ομάδες και την μελέτη της επίδρασης του κάθε μεταβολίτη σε αυτόν τον διαχωρισμό. Αντιθέτως, στην μη στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση ως δεδομένα εισόδου χρησιμοποιούνται μοτίβα μεταβολιτών ή μεταβολικά αποτυπώματα, όπως είναι πλήρη φάσματα NMR. Η κύρια διαφορά αυτής της ανάλυσης είναι ότι δεν απαιτείται η ταυτοποίηση και η ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών, το οποίο είναι ιδιαίτερα χρήσιμο σε περιπτώσεις που υπάρχουν πολλές άγνωστες χημικές ενώσεις ή που η ποσοτικοποίησή τους είναι δύσκολη λόγω αλληλοεπικάλυψης κορυφών.

Η χρήση της μεταβολομικής ανάλυσης για την αντιμετώπιση σύνθετων ζητημάτων που σχετίζονται με την απάτη των τροφίμων και την “ταυτότητα” των τροφίμων, συμπεριλαμβανομένης της γεωγραφικής προέλευσης και της ωριμότητας σε ορισμένα τρόφιμα, έχει αυξηθεί σημαντικά τις τελευταίες δεκαετίες [28]. Πλέον είναι απαραίτητο να καθιερωθούν μέθοδοι αξιολόγησης της ποιότητας και της γνησιότητας των τροφίμων και στην προκείμενη περίπτωση του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων. Αυτό αποσκοπεί στην προστασία του καταναλωτή από διαφόρων ειδών απάτες που μπορούν ακόμη και να θέσουν σε κίνδυνο την υγεία του [26].

Στην παρούσα εργασία οι πολυπαραμετρικές στατιστικές μέθοδοι ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη των δειγμάτων γάλακτος από διαφορετικά είδη ζώου και διαφορετικό μήνα συλλογής τους είναι η Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA), η μέθοδος Ορθογωνικών Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Orthogonal

Partial Least Squares, OPLS) και η Ανάλυση Διακριτότητας Ορθογωνικών Μερικών Τετραγώνων (Orthogonal Partial Least Squares – Discriminant Analysis, OPLS-DA).\

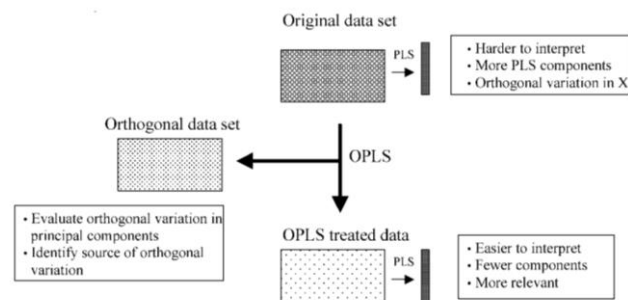
1.6 Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA)

Η Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA) είναι ένα μαθηματικό εργαλείο που στοχεύει στην αναπαράσταση της διακύμανσης που υπάρχει στο σύνολο των δεδομένων χρησιμοποιώντας ένα μικρό αριθμό παραγόντων [24]. Είναι μία από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους για την διερεύνηση διαφορετικών κατηγοριών ή ομάδων, καθώς εξάγει την μέγιστη δυνατή χρήσιμη πληροφορία από τον μεγάλο όγκο δεδομένων. Για να γίνει αυτό, η μέθοδος υπολογίζει νέες μεταβλητές, που ονομάζονται Κύριες Συνιστώσες (PC), οι οποίες προκύπτουν ως γραμμικοί συνδυασμοί των αρχικών μεταβλητών που διατηρούν κάποια συσχέτιση μεταξύ τους. Αυτές οι Κύριες Συνιστώσες (PC) είναι ορθογώνιοι μεταξύ τους και διατηρούν όσο το δυνατόν περισσότερες διακυμάνσεις από το αρχικό σύνολο δεδομένων, με τρόπο που ο οi μεταβλητές του PC1 εξηγεί περισσότερο την παραλλαγή δεδομένων από το PC2 και το PC2 εξηγεί περισσότερο την παραλλαγή δεδομένων από την επόμενη. Ωστόσο, εάν ο αριθμός των δεδομένων και των δειγμάτων είναι αρκετά μεγάλος και τα δεδομένα είναι αρκετά περίπλοκα, όπως είναι δηλαδή τα φάσματα NMR, το μοντέλο PCA αποτελεί βέλτιστο εργαλείο. Έτσι, το PCA είναι μια μη εποπτευόμενη μέθοδος και κατά συνέπεια χρησιμοποιείται ως διερευνητικό εργαλείο για τον προσδιορισμό του τρόπου με τον οποίο τα δείγματα σχετίζονται ή διαφέρουν μεταξύ τους [26]. Για αυτό τον λόγο η χρήση PCA σε μελέτες χημείας τροφίμων έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια, επειδή τα αντίστοιχα αποτελέσματα είναι εύκολο να ερμηνευθούν και να συζητηθούν.

1.7 Μέθοδος Μερικών Ελάχιστων Τετραγώνων (PLS) και Ορθογωνικών Μερικών Ελάχιστων Τετραγώνων (OPLS)

Τα μοντέλα Μερικών Ελάχιστων Τετραγώνων (PLS) και Ορθογωνικών Μερικών Ελάχιστων Τετραγώνων (OPLS) είναι δημοφιλείς μέθοδοι για πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση στη μεταβολομική [26], [29]. Η μέθοδος Μερικών Ελάχιστων Τετραγώνων (PLS) είναι μία από τις κύριες μεθόδους για την ανάλυση πολυμεταβλητών δεδομένων και αναπτύχθηκε από τον Herman Wold και τους συνεργάτες του την περίοδο 1975-1982 [30]. Στην τεχνική ανάλυσης αυτή επιδιώκεται μια ποσοτική σχέση μεταξύ των μεταβλητών των πειραματικών δεδομένων (των ανεξάρτητων δηλαδή μεταβλητών X) και μιας σειράς άλλων συνεχών εξαρτημένων μεταβλητών Y. Πολυμεταβλητή βαθμονόμηση, ταξινόμηση και διακριτική ανάλυση είναι μερικοί τομείς όπου το μοντέλο PLS θεωρείται χρήσιμο εργαλείο.

Αντιθέτως, η μέθοδος Ορθογωνικών Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (OPLS) αποτελεί μια πιο σύγχρονη ανακάλυψη, αφού αναπτύχθηκε από τους Trygg και Wold το 2001 [30], [31]. Σκοπός της είναι να βελτιώσει την ερμηνεία των μοντέλων PLS και να μειώσει την περιπλοκότητα τους αφαιρώντας την συστηματική διακύμανση των ανεξάρτητων μεταβλητών X που είναι ορθογωνική ως προς τις εξαρτημένες μεταβλητές Y. Με αυτόν τον τρόπο το PLS γίνεται πιο εύκολο στην ερμηνεία και την κατανόησή του με την προβλεπτική του ικανότητα να παραμένει σταθερή. Στην **Εικόνα 1.9.1** δίνεται συνοπτικά η απεικόνιση της αρχής λειτουργίας της μεθόδου OPLS.



Εικόνα 1.7.1. Περιληπτική απεικόνιση της λειτουργίας της μεθόδου Ορθογωνικών Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (OPLS) [31]

1.8 Ανάλυση Διακριτότητας DA

Η Ανάλυση Διακριτότητας είναι μία πολυπαραμετρική στατιστική τεχνική ανάλυσης μεταβλητών, η οποία χαρακτηρίζεται από μια ισχυρή διακριτική ικανότητα κατηγοριοποίησης των πειραματικών δεδομένων σε μια σειρά ανεξάρτητων μεταβλητών. Πιο συγκεκριμένα, καταφέρνει και διακρίνει τα δεδομένα σε προκαθορισμένες ομάδες, παραβλέποντας παράλληλα τις διακυμάνσεις που συμβαίνουν εντός αυτών. Το πλεονέκτημα που φέρει αυτή η μέθοδος είναι ότι τα αντίστοιχα μοντέλα που φέρουν αυτή την τεχνική μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοντέλα πρόβλεψης και ταξινόμησης ακόμη και άγνωστων δειγμάτων, εφόσον ικανοποιούνται οι κατάλληλες προϋποθέσεις.

1.9 Ανάλυση Διακριτότητας Μερικών Ελάχιστων Τετραγώνων (PLS-DA) και Ορθογωνικών Μερικών Ελάχιστων Τετραγώνων (OPLS-DA)

Για προβλήματα ταξινόμησης ή διάκρισης οι μέθοδοι Μερικών Ελάχιστων Τετραγώνων (PLS) και Ορθογωνικών Μερικών Ελάχιστων Τετραγώνων (OPLS) συνδυάζονται με αυτή της Ανάλυσης Διακριτότητας (DA), ώστε να βελτιωθεί ο διαχωρισμός των υπό μελέτη δειγμάτων σε διάφορες κατηγορίες [32].

Η μέθοδος PLS έχει χρησιμοποιηθεί κυρίως στο πεδίο της πολυμεταβλητής βαθμονόμησης όπου οι αντίστοιχες μεταβλητές Y είναι συνεχείς (αριθμητικές), ενώ στην μέθοδο PLS-DA η μεταβλητή Y είναι μία “τεχνική” μεταβλητή που λαμβάνει διακριτές τιμές και καθορίζει την ταξινόμηση των ομάδων στο αντίστοιχο μοντέλο.

Ωστόσο, καθώς το PLS-DA εξηγεί τις διαφορές των ιδιοτήτων μεταξύ των ομάδων ταξινόμησης, η ερμηνεία γίνεται σταδιακά πιο περίπλοκη καθώς αυξάνεται ο αριθμός των ομάδων αυτών. Το κύριο όφελος του μοντέλου OPLS-DA σε σύγκριση με το PLS-DA έγκειται στην ικανότητα του να διαχωρίζει την συστηματική διακύμανση των ανεξάρτητων μεταβλητών X που είναι ορθογωνική ως προς τις εξαρτημένες μεταβλητές Y, όπως ακριβώς αναφέρθηκε παραπάνω, κάνοντας ευκολότερη την ερμηνεία και την κατανόηση του μοντέλου.

1.10 Τεχνικές ανάλυσης τροφίμων

Η μεταβολομική είναι πλέον μια καθιερωμένη αλλά συνεχώς εξελισσόμενη μέθοδος ανάλυσης που εφαρμόζεται ευρέως σε διάφορους τομείς έρευνας, συμπεριλαμβανομένης της ιατρικής, της περιβαλλοντικής επιστήμης, της γεωργίας, των καλλιεργειών και των βιοεπισημών [33]. Χρησιμοποιεί κυρίως είτε φασματοσκοπικές είτε φασματομετρικές τεχνικές για την ποιοτική και ποσοτική μέτρηση ενός ευρέος φάσματος μικρών μεταβολιτών χαμηλού μοριακού βάρους ή συγκεκριμένων μεταβολιτών σε ένα βιολογικό δείγμα.

Τα τελευταία χρόνια η εφαρμογή της στον τομέα της γαλακτοκομικής επιστήμης έχει αυξηθεί σημαντικά με την αναφορά σημαντικών ενώσεων και παραγόντων που σχετίζονται με την υγεία των ζώων, την παραγωγή, τον έλεγχο της ταυτότητας του γάλακτος και των ιδιοτήτων του. Ορισμένες χρήσιμες τεχνικές που έχουν καθιερωθεί για την ανάλυση γαλακτοκομικών προϊόντων είναι αυτής της φασματοσκοπίας NMR, της υγρής χρωματογραφίας απλής και υψηλής απόδοσης συζευγμένες με φασματοσκοπία μάζας (LC-MS και HPLC-MS αντίστοιχα) και της αέριας χρωματογραφίας επίσης συζευγμένη με φασματοσκοπία μάζας (GC-MS) [9].

Η εφαρμογή της φασματοσκοπίας NMR για την ανάλυση του γάλακτος χρονολογείται ήδη από τη δεκαετία του 1950, όταν οι Odeblad και Westin μπόρεσαν να αναγνωρίσουν τρία ξεχωριστά "συστατικά" στο σήμα συντονισμού ^1H NMR [27]. Το NMR παραμένει το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο αναλυτικό εργαλείο στη μεταβολομική ανάλυση του γάλακτος. Συχνά επιλέγεται για την αξιοπιστία και τη χρησιμότητά του σε απόλυτη ποσοτικοποίηση. Είναι ταχεία, επιλεκτική και μη καταστρεπτική τεχνική, επιτρέπει τη χημική ταυτοποίηση δευτερευόντων συστατικών ακόμη και σε έντονα επικαλυπτόμενες φασματικές περιοχές και επιτρέπει την ποσοτικοποίηση των ενδιαφερόμενων ουσιών ταυτόχρονα σε ένα μόνο πείραμα, σε αντίθεση με τις κλασικές αναλυτικές μεθόδους [14]. Τέλος, το δυναμικό του NMR δεν είναι

μόνο να μετρά τα κύρια σήματα από τους κύριους μεταβολίτες, αλλά και να το κάνει χωρίς την επίδραση φασματικών τεχνουργημάτων και ασυνεπειών όπως ο ηλεκτρικός θόρυβος, οι διαφορές πλάτους αιχμής και η τροποποίηση της χημικής μετατόπισης.

Για αυτούς τους λόγους αναγνωρίζεται ευρέως ως ένα σημαντικό εργαλείο για την ανάλυση τροφίμων, καθώς επιτρέπουν την ποιοτική και την ποσοτική ανάλυση υγρών και στερεών δειγμάτων τροφίμων. Οι μεθοδολογίες NMR μπορεί να είναι χρήσιμες για τον χαρακτηρισμό των τροφίμων από την άποψη της ποιότητας και της αυθεντικότητάς τους, επιτρέποντας επίσης τον εντοπισμό απομιμήσεων, είτε χρησιμοποιώντας στοχευμένη είτε μη στοχευμένη ανάλυση σύμφωνα με συγκεκριμένες εφαρμογές. Ωστόσο, το NMR χαρακτηρίζεται από χαμηλή ευαισθησία και περιορίζεται στη μέτρηση ουσιών σε μικρογραμμομοριακές έως χιλιοστομορίων συγκεντρώσεων. Αντιθέτως, οι τεχνικές που χρησιμοποιούν φασματοσκοπία μάζας (MS) μπορούν να εντοπίσουν μεταβολίτες σε νανομοριακή συγκέντρωση, επιτρέποντας την ανίχνευση πολύ μεγαλύτερου αριθμού μεταβολιτών [26].

1.11 Μεταβολομική ανάλυση σε τρόφιμα με φασματοσκοπία NMR

Η φασματοσκοπία NMR αποτελεί ένα καλά καθιερωμένο εργαλείο για ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών που σχετίζονται με την μεταβολομική ανάλυση συστατικών σε τρόφιμα και ποτά (αλκοολούχα και μη). Το γεγονός ότι σαν τεχνική είναι γρήγορη, επανάληψη και κυρίως επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση πολλών μεταβολιτών την καθιστά ιδανική για τον έλεγχο της ποιότητας και της ταυτότητας των τροφίμων.

Η τεχνική αυτή έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς στην ανάλυση διαφόρων σπόρων καφέ και την διαφοροποίησή τους βάση της ποικιλίας και των διαφορετικών περιοχών παραγωγής [34]. Ακόμη, μέσω πολυμεταβλητής στατιστικής ανάλυσης ταυτοποιήθηκαν συγκεκριμένοι μεταβολίτες που σχετίζονται με τον καλής ποιότητας καφέ και μερικοί εξ αυτών είναι η υψηλή ποσότητα σουκρόζης σε συνδυασμό με την χαμηλή συγκέντρωση χολίνης, γ-αμινοβουτυρικού, κιτρικού και οξικού οξέος, καθώς και λιπαρών οξέων. Τέλος, λόγω της καλής ποιότητας και της μεγάλης τιμής στο εμπόριο των σπόρων καφέ της ποικιλίας *Coffea arabica L.* (Arabica), πραγματοποιήθηκε πολυστατιστική ανάλυση για την εύρεση τυχόν αναμειξέων με άλλη χαμηλότερης ποιότητας [35]. Πιο σύνηθες ποικιλία που χρησιμοποιείται για τέτοιου είδους απάτη είναι η *Coffea canephora Pierre* (Robusta) και παρατηρήθηκε ότι η ποικιλία Arabica χαρακτηρίζεται από υψηλή συγκέντρωση σακχαρόζης, κιτρικού και μηλικού οξέος, ενώ η ποικιλία Robusta από υψηλή περιεκτικότητα σε καφεΐνη, χολίνη και καφεοϋλικά οξέα.

Ένα άλλο προϊόν που ο καταναλωτής μπορεί να πέσει θύμα απάτης είναι το μπαχαρικό σαφράν (κρόκος), το οποίο προέρχεται από συγκεκριμένο είδος λουλουδιού που είναι το

Crocus sativus L. Εξαιτίας της μεγάλης του τιμής και της δυσκολίας στην παραγωγή του πραγματοποιούνται συχνά νοθείες, για αυτό τον λόγο η χρήση της φασματοσκοπία NMR προέκυψε ως χρήσιμη μέθοδος για τον προσδιορισμό ενός προφίλ με φυτικούς μεταβολίτες με σκοπό την εύκολη ταξινόμηση του δείγματος και τον προσδιορισμός των χαρακτηριστικών που εισάγουν διακρίσεις [36]. Από μια άλλη μελέτη παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στις αρωματικές και ανωμερικές περιοχές των φάσματα ^1H NMR για αμιγείς νοθείες φυτών, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταυτοποίηση της γνησιότητας του μπαχαρικού [37].

Η φασματοσκοπία NMR έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς και στην ανάλυση αλκοολούχων και μη αλκοολούχων ποτών για την ταυτοποίηση της γνησιότητάς τους. Συγκεκριμένα, αρκετές γνωστές ετικέτες οίνων μεγάλης χρηματικής αξίας με μοναδικότητα στην ποικιλία του σταφυλιού και τον τόπο παραγωγής του, προστατεύονται από την νομοθεσία με τις ενδείξεις ΠΟΠ (Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης) και ΠΓΕ (Προστατευόμενης Γεωγραφικής Ένδειξης). Για αυτό τον λόγο η λήψη ομοπυρηνικών και ετεροπυρηνικών φασμάτων NMR, καθώς και η εφαρμογή μεταβολομικής στατιστικής ανάλυσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάδειξη της αυθεντικότητας των οίνων [38]. Με παρόμοιο τρόπο πραγματοποιείται και η ανάλυση του μεταβολικού προφίλ διαφόρων μη αλκοολούχων ποτών, όπως είναι οι χυμοί φρούτων, μέσω της χημειομετρίας και την ανάπτυξη κατάλληλων στατιστικών μοντέλων [39]. Επιπλέον, έχει αναπτυχθεί σε μια κοινή προσπάθεια της Bruker BioSpin GmbH και της SGF International e.V. συγκεκριμένη μέθοδος για την ανάλυση χυμών φρούτων, που έχει εισαχθεί πρόσφατα με την ονομασία SGF Profiling™. Το σύστημα αυτό είναι πλήρως αυτοματοποιημένο όσον αφορά τη μεταφορά δειγμάτων, την μέτρηση και την ανάλυση δεδομένων, αφού έχει ρυθμιστεί σε Φασματόμετρο NMR Avance 400 έγχυσης ροής [40], [41]. Έτσι επιτρέπεται η εύρεση το μεταβολικού προφίλ των χυμών και η επίδραση συγκεκριμένων μεταβολιτών στην ποιότητα του, ενώ παράλληλα επιτρέπει τον έλεγχο της αναλογίας ζάχαρης (γλυκόζης/φρουκτόζης) [42].

Τέλος, μεταβολομική μελέτη με την εφαρμογή της φασματοσκοπίας NMR έχει επιτευχθεί επίσης σε ξύδι και μέλι με την χρήση στατιστικών μοντέλων. Πιο συγκεκριμένα, μπόρεσε και έγινε έλεγχος της νοθείας γνωστής μάρκας ιταλικού ξυδιού [43], καθώς και διαχωρισμός του ξυδιού βάση την προέλευσή του (μήλο, οίνο ρύζι κ.λ.π) [44]. Αντίστοιχα, προσδιορίστηκε μεγάλος αριθμός υδατανθράκων αυθεντικού ελληνικού μέλι από μονό-, δι-, τρισακχαριτών και των ταυτομερή τους μέσω πειραμάτων ^{13}C NMR [45], ενώ σε άλλη έρευνα δημιουργήθηκε μεταβολικό προφίλ για έλεγχο της γεωγραφικής [46] και βοτανικής προέλευσης του [47].

1.12 Μεταβολομική ανάλυση, βάσεις δεδομένων και τεχνικές νοθείας στο γάλα

Τα τελευταία χρόνια η εφαρμογή της μεταβολομικής στον τομέα της ανάλυσης των τροφίμων έχει αυξηθεί σημαντικά και ιδιαίτερα στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Συγκεκριμένα, η μεταβολομική ανάλυση του γάλακτος με την χρήση της φασματοσκοπίας NMR αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο [48], αφού επιτρέπει τη συστηματική μελέτη της συσχέτισης των μεταβολιτών του γάλακτος με διάφορα σημαντικά χαρακτηριστικά του, καθώς και την επίδραση που μπορεί να έχει στην υγεία του ανθρώπου.

Αρκετές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην ανάλυση των μεταβολιτών του γάλακτος [49], προκειμένου να δημιουργηθούν πρωτόκολλα ελέγχου της αυθεντικότητας ορισμένων προϊόντων του όσον αφορά την ζωική αλλά και την γεωγραφική προέλευση του. Μια άμεση εφαρμογή που μπορούν να έχουν αυτές οι έρευνες είναι ο έλεγχος συγκεκριμένων τυριών που φέρουν τις ειδικές ταμπέλες ΠΟΠ (Προστατευμένη Ονομασία Προέλευσης) και ΠΓΕ (Προστατευμένη Γεωγραφική Ένδειξη) [50]. Ακόμη, έχουν γίνει έρευνες προκειμένου να εντοπιστούν διαφορές στο μεταβολικό προφίλ του γάλακτος ανάμεσα σε δύο φυλές του ίδιου είδους ζώου [51] αλλά και από ζώα που βρίσκονται σε διαφορετικές φάρμες [52]. Μια άλλη εφαρμογή που μπορεί να έχουν αυτές οι έρευνες και σχετίζεται άμεσα με την υγεία του ανθρώπου είναι ο εντοπισμός των μεταβολιτών που σχετίζονται με ασθένειες όπως είναι για παράδειγμα ο πυρετός του γάλακτος [53] ή η ύπαρξη ποσότητας σωματικών κυττάρων, όπου και χρησιμοποιείται αυτό ως ένδειξη μόλυνσης [54]. Τέλος, έχουν γίνει έρευνες ακόμη και στο μητρικό γάλα, όπου αναλύθηκαν οι υδατάνθρακες που υπάρχουν σε αυτό παρουσιάζοντας τα αντίστοιχα πολυστατιστικά μοντέλα [55], καθώς και πως μπορεί να επηρεάσει η γεωγραφική περιοχή στο μεταβολικό προφίλ του γάλακτος [56].

Μέχρι σήμερα πάνω από δύο χιλιάδες μεταβολίτες έχουν εντοπιστεί στο γάλα και μια μελέτη ορόσημο από τον Foroutan και τους συνεργάτες του, οδήγησε στην ανάπτυξη της βάσης δεδομένων σύνθεσης γάλακτος (MCDB) [57]. Μία ελεύθερα διαθέσιμη ηλεκτρονική βάση δεδομένων που περιέχει λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τους μεταβολίτες μικρών μορίων που βρίσκονται στο αγελαδινό γάλα. Οι πλατφόρμες αυτού του είδους θα βασίζονται στη δημιουργία βάσεων δεδομένων γενικά για τα τρόφιμα με ευρέως διαδεδομένα πειραματικά πρωτόκολλα και θα συγκρίνονται με άλλες αναλυτικές τεχνικές και πλατφόρμες. Προκειμένου να δημιουργηθεί μια ολοκληρωμένη βάση δεδομένων για τα τρόφιμα με την φασματοσκοπία NMR, είναι απαραίτητο να μελετηθεί ολόκληρο το φάσμα NMR του τροφίμου με την αντίστοιχη ανάθεση των κορυφών του. Με αυτόν τον τρόπο, θα ληφθεί υπόψη η συμβολή και η επίδραση των διαφόρων συστατικών σε αυτό. Η υψηλή απόδοση της φασματοσκοπίας NMR

επιτρέπει στον αναλυτή να μετρήσει γρήγορα τον μεγάλο αριθμό δειγμάτων που απαιτούνται για τη συμπλήρωση μιας ολοκληρωμένης βάσης δεδομένων.

Απώτερος στόχος της μεταβολομικής στο γάλα είναι η σύσταση μοντέλων για να δημιουργηθούν συγκεκριμένα προφίλ μεταβολιτών που να σχετίζεται με διάφορους παράγοντες, όπως είναι η ζωική προέλευση του ζώου, ο γεωγραφικό τόπο εκτροφής του αλλά και γενικότερα η συγκεκριμένη διατροφή που ακολουθεί. Αυτού του είδους οι μελέτες αποτελούν υψηλής οικονομικής σημασίας για τους παραγωγούς και του καταναλωτές αποτρέποντας τεχνικές εξαπάτησης. Οι πιο «παραδοσιακές» απάτες που συναντώνται στο γάλα περιλαμβάνουν την ανάμειξη δύο διαφορετικών ειδών γάλακτος, την προσθήκη νερού για αύξηση της ποσότητας προϊόντος, την προσθήκη λακτόζης, καθώς και επαναχρησιμοποίηση παλαιού γάλακτος. Πιο πρόσφατα, άλλα ζητήματα αφορούσαν την προσθήκη ενώσεων που περιέχουν άζωτο (όπως η μελαμίνη και το δικυανδιαμίδιο) για την τεχνητή αύξηση της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη. Τέλος, αυτού του είδους οι μελέτες είναι σημαντικές για την καλύτερη κατανόηση των γαλακτοκομικών προϊόντων, καθώς και της επιστήμης των ζώων μέσω της μεταβολικής δραστηριότητας των μαστικών αδένων τους, της σύνθεσης του γάλακτος και της ποιότητας του.

1.13 Μεταβολομική ανάλυση του γάλακτος με άλλες τεχνικές

Πέρα από την φασματοσκοπία NMR έχουν χρησιμοποιηθεί και άλλες τεχνικές για την ανάλυση δειγμάτων γάλακτος διαφορετικής ζωικής προέλευσης ή και εποχή δειγματοληψίας μελετώντας το προφίλ των μεταβολιτών τους για την καλύτερη κατανόηση της σύστασης του γάλακτος. Μια από τις τεχνικές αυτές είναι και η υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματοσκοπία μάζας (LC-MS), όπου με την τεχνική της μη στοχευμένης ανάλυσης και της ανάπτυξης πολυστατιστικών μοντέλων έχει χρησιμοποιηθεί για την μελέτη του μεταβολικού προφίλ του γάλακτος διαφορετικής ζωικής προέλευσης. Πιο συγκεκριμένα, λήφθηκε γάλα από δύο είδη αγελάδας (κινέζικη Holstein και Jersey), βουβάλι, κατσίκα, καμήλα και άλογο με συνολικά 119 διαφορετικούς μεταβολίτες να ανιχνεύονται. Τα στατιστικά μοντέλα OPLS-DA καταφέρνουν και διαχωρίζουν την κινέζικη Holstein αγελάδα τόσο από τα άλλα είδη ζώων όσο και από την άλλη φυλή (Jersey) ικανοποιητικά με τους αντίστοιχους μεταβολίτες που συνεισφέρουν σε αυτούς τους διαχωρισμούς να σημειώνονται [33].

Αντίστοιχα, μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική στην ανάλυση τροφίμων αποτελεί η αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (GC-MS). Σε μια έρευνα χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση δειγμάτων γάλακτος διαφορετικής ζωικής προέλευσης (αλογίσιου, γαϊδουριού, μητρικό και σκόνης για νεογνά) για την μελέτη των χαρακτηριστικών

σύνθεσης τους, καθώς και τον σχηματισμό του πολικού μεταβολικού προφίλ του μέσω της μη στοχευμένης μεταβολομικής ανάλυσης. Από αυτήν την έρευνα ανιχνεύτηκαν 62 διαφορετικοί μεταβολίτες, μερικοί από τους οποίους χρησιμοποιήθηκαν ως ενδεικτικοί μεταβολίτες διαφοροποίησης των δειγμάτων ανάλογα την προέλευση του γάλακτος. Ακόμη παρατηρήθηκαν μεταβολές των πρωτεϊνών και ορισμένων λιπαρών του γαϊδουρίσιου γάλακτος για διαφορετική περίοδο δειγματοληψίας μέσω στατιστικών μοντέλων OPLS [58]. Σε άλλη μελέτη χρησιμοποιήθηκε η παραπάνω τεχνική για την ανάλυση των λιπαρών από δύο διαφορετικά είδη αιγυπτιακού γάλακτος (το βουβαλίσιο και το κατσικίσιο) με διαφορετική περίοδο δειγματοληψίας. Σκοπός αυτής της έρευνας είναι η μελέτη των βιοενεργών λιπιδίων που συμμετέχουν στην ειδική σηματοδότηση για την ρύθμιση και διατήρηση των λειτουργιών του οργανισμού, επιτρέποντας στα κύτταρα να ανταποκρίνονται κατάλληλα. Μερικά από τα λιπίδια αυτά είναι τα μονογλυκερίδια, τα διγλυκερίδια και τα τριγλυκερίδια που συσχετίζονται με ευεργετικά λιπαρά οξέα, καθώς και το συζευγμένο λινελαϊκό οξύ (CLA) και τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Απώτερος σκοπός είναι η αντιμετώπιση διαφόρων χρόνιων ασθενειών με την κατανάλωση γάλακτος προερχόμενο από αυτά τα δύο είδη, λόγω ότι είναι πλούσια σε αυτά τα λιπίδια [59].

Μια άλλη αρκετά παρόμοια τεχνική που έχει χρησιμοποιηθεί είναι η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) για την μελέτη της παρουσίας πρωτεϊνών στο γαϊδουρινό γάλα ικανών να αναστέλλουν την ανάπτυξη συγκεκριμένων παθογόνων βακτηρίων μετά την προσθήκη του ενζύμου πεψίνη. Σκοπός αυτής της έρευνας είναι να αποδείξει ότι η αντιμικροβιολογική δράση του γαϊδουρινού γάλακτος δεν οφείλεται μόνο στην λυσοζύμη αλλά και σε άλλα συστατικά του διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στην βελτίωση του αμυντικού συστήματος του ξενιστή των νεογέννητων και των μικρών βρέφη που είτε δεν μπορούν να τραφούν με ανθρώπινο γάλα είτε είναι αλλεργικοί σε άλλου είδους γάλατα [23]. Ακόμη σε μια άλλη παρόμοια μελέτη, λόγω της μεγάλης σημασίας του γαϊδουρινού γάλακτος για τα νεογνά, έχει χρησιμοποιηθεί και gel ηλεκτροφόρησης (SDS-PAGE) για την ανάπτυξη συγκεκριμένου προφίλ για ένα είδος γαϊδάρου και πως αυτό διαφοροποιείται ανάλογα την εποχή άμελης [22]. Επιπλέον πραγματοποιήθηκε απομόνωση και ποσοτικοποίηση της λακτοφερίνης, μιας πρωτεΐνης που μπορεί να λειτουργήσει ως αντιφλεγμονώδες συστατικό σε τοπικά σημεία φλεγμονής του αναπνευστικού και του γαστρεντερικού σωλήνα, ενισχύοντας έτσι επιπλέον την σημαντικότητα του γαϊδουρινού γάλακτος [21].

Τέλος χρησιμοποιήθηκε και η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας εξαιρετικά υψηλής απόδοσης συζευγμένη με τετραπολική φασματομετρία μάζας χρόνου πτήσης (UHPLC-QToF-MS) για διαφορετικές περιόδους άμελης για το αγελαδινό γάλα [60]. Συνολικά βρέθηκαν 93

κορυφές στα φάσματα μάζας κατιόντων και ανιόντων, οι 92 από τις οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση, όπου παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στις συγκεντρώσεις πολλών μεταβολιτών.

1.14 Μεταβολομική ανάλυση του ελληνικού γάλακτος

Η ανάλυση του ελληνικού γάλακτος δεν είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη στον χώρο της έρευνας. Ωστόσο, έχουν γίνει αρκετές μελέτες που αφορούν την σύσταση του γάλακτος και πως αυτή επηρεάζεται από διάφορες παράγοντες. Το ελληνικό αιγοπρόβειο γάλα εκτός από την υψηλή βιολογική αξία έχει και ιδιαίτερα οικονομικό ενδιαφέρον στην βιομηχανία, καθώς αποτελεί την πρώτη ύλη για την παραγωγή αποκλειστικά ελληνικών προϊόντων προστατευμένα από την ταμπέλα ΠΟΠ (Προστατευμένη Ονομασία Προέλευσης). Για αυτό τον λόγο αναλύθηκαν γάλατα προερχόμενα από διάφορες φυλές προβάτων (Καραγκούνικο, Μπούτσικο και Χίου) μέσω της τεχνικής της υγρής χρωματογραφίας συζευγμένη με διπλό φασματοόμετρο μάζας (LC-MS/MS), του MALDI-TOF MS αλλά και της ηλεκτροφόρησης. Αυτό πραγματοποιήθηκε προκειμένου να γίνει η σε βάθος διερεύνηση και ο χαρακτηρισμός του γάλακτος προερχόμενο από ελληνικές φυλές προβάτων [61], η ανάπτυξη των αντίστοιχων μεταβολικών προφίλ τους για τον έλεγχο από νοθείες αλλά και πως επιδρά ο γεωγραφικός τόπος και η διατροφική συνήθεια των ζώων στην σύσταση του [62].

Επιπλέον, ορισμένες μελέτες επικεντρώθηκαν στην ανάλυση των πιο δημοφιλών ελληνικών φυλών προβάτων (Καραγκούνικο και Χίου) και συγκεκριμένα στην αξιολόγηση του μεταβολικού προφίλ των λιπαρών του γάλακτος και της θρεπτικής αξίας του νοπού γάλακτος μέσω της τεχνικής της αέριας χρωματογραφίας (GC) [63] και της υγρής χρωματογραφίας συζευγμένη με διπλή φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS) [64]. Μέσω παρόμοιων ερευνών στην ανάπτυξη των μεταβολικών προφίλ ελληνικών φυλών αιγών και την μελέτη διαφόρων παραγόντων που επηρεάζουν την σύσταση του γάλακτος, μπορούν να εξαχθούν χρήσιμες πληροφορίες για τους παραγωγούς, προκειμένου βελτιστοποιηθούν τα χαρακτηριστικά του γάλακτος προς όφελος της ανθρώπινης υγείας. Πάνω σε αυτό το θέμα της “τεχνητής” βελτιστοποίησης του γάλακτος έχει μελετηθεί η επίδραση που μπορεί να έχει η διατροφή του ζώου στην σύσταση των λιπαρών του γάλακτος. Ορισμένοι παραδοσιακοί τρόποι εκτροφής είναι η χρήση φύλλων ελιάς και στέμφυλα σταφυλιών [65], ενώ οι πιο κλασσικοί αποτελούν τα βοσκοτόπια και συμπληρωματικές διατηρημένες ζωοτροφές, όπως το σανό [2], [66]. Από αυτούς τους τύπους διατροφής παρατηρήθηκε ότι τα φύλλα ελιάς, τα στέμφυλα σταφυλιών και τα βοσκοτόπια περιέχουν υψηλή περιεκτικότητα σε λινολενικό και λινελαϊκό οξύ, το οποίο οδηγεί στην ύπαρξη μεγάλης συγκέντρωσης CLA στο γάλα. Ακόμη, θετική επίδραση στην

αύξηση της περιεκτικότητας των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και την αντίστοιχη μείωση των κορεσμένων λιπαρών έχει ο κατσίγαρος (crude olive cake). Ο κατσίγαρος αποτελεί παραπροϊόν από την παραγωγή και επεξεργασία του ελαιόλαδου και από το να πεταχτεί στα απόβλητα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέρος της διατροφής των διάφορων ειδών προβάτων [67], [68].

Τέλος, έχουν χρησιμοποιηθεί ακόμη και η τεχνική της φασματοσκοπίας φθορισμού [69] και αυτή της ανάλυσης της αλληλουχίας του DNA σε ελληνικά γάλατα [70]. Πιο συγκεκριμένα, η τεχνική του φθορισμού πραγματοποιήθηκε για τον διαχωρισμό του ελληνικού γάλακτος από αυτό άλλων χωρών και την επίδραση του από τον τόπο εκτροφής των γαλακτοπαραγωγών ζώων, ενώ για την δεύτερη τεχνική αναλύθηκαν θραύσματα DNA αυτόχθονων ελληνικών αιγών, για την ανίχνευση της μεταβλητότητας των γονιδίων τους.

ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας είναι η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση γάλακτος διαφορετικής ζωικής προέλευσης, καθώς και για διαφορετικούς μήνες άμελης του αντίστοιχου γαλακτοπαραγωγού ζώου με την χρήση της φασματοσκοπίας NMR και της χημειομετρίας. Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για αυτή την ανάλυση είναι η φασματοσκοπία NMR με ιστορικό πληθώραν εφαρμογών στην τεχνολογία τροφίμων. Ωστόσο, η μελέτη του ελληνικού γάλακτος διαφορετικής ζωικής προέλευσης και πόσο μάλλον η διακύμανση της σύστασής του ανάλογα την εποχή που θα γίνει η άμελη του ζώου δεν έχει ιδιαίτερα ακόμα αναπτυχθεί με αυτήν την τεχνική.

Μέσω αυτής της έρευνας μπορεί να δημιουργηθεί ένα συγκεκριμένο προφίλ για την σύσταση των διαφορετικών ειδών ελληνικού γάλακτος και να γίνει καλύτερη κατανόηση του ρόλου των μεταβολιτών του στην υγεία του ανθρώπου. Επιπρόσθετα, μπορούν να αναπτυχθούν ορισμένα πρωτόκολλα ελέγχου της ασφάλειας και της γνησιότητας του γάλακτος, που αποσκοπούν στην προστασία της υγείας του καταναλωτή από ανεπιθύμητες πρακτικές και μεθόδους. Τέλος, με την περαιτέρω ανάλυση και κατανόηση της επίδρασης των εξωτερικών παραγόντων στην σύσταση του, μπορούν οι πληροφορίες αυτές να χρησιμοποιηθούν κατευθείαν από τους παραγωγούς για να ακολουθήσουν διαφορετικές στρατηγικές διατροφής. Με αυτόν τον τρόπο θα μπορεί να γίνει επιλεκτική αύξηση συγκεκριμένων λιπαρών οξέων και άλλων μεταβολιτών που έχει παρατηρηθεί ότι συμβάλουν στην υγεία του ανθρώπου, χωρίς ταυτόχρονα να μειώνεται η ποιότητα των γαλακτοκομικών προϊόντων.

Σε αυτή την έρευνα αναλύθηκε και μελετήθηκε ένας μεγάλος αριθμός δειγμάτων ελληνικού γάλακτος (91) που προέρχεται από πέντε διαφορετικά είδη θηλαστικών που εκτρέφονται για εμπορικούς σκοπούς στην Βόρεια Ελλάδα (αγελαδινό, πρόβειο, βουβαλίσιο, γίδινο και γαΐδουρινό) με διάφορους μήνες δειγματοληψίας για κάθε είδος. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε λήψη του φάσματος ^1H NMR των πολικών και άπολων εκχυλίσεων και ^{31}P NMR των πολικών μόνο εκχυλίσεων του γάλακτος και ακολούθησε η ποιοτική και ποσοτική τους ανάλυση. Ακόμη πραγματοποιήθηκε και η χημειομετρική ανάλυση των μεταβολομικών φασματικών δεδομένων με την τεχνική της στοχευμένης και μη στοχευμένης ανάλυσης με την βοήθεια πολυπαραμετρικών στατιστικών μοντέλων και τα αποτελέσματα να παρουσιάζονται αναλυτικότερα στην συνέχεια.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – Πειραματικό μέρος

2.1 Αντιδραστήρια και πρότυπες ενώσεις

Για την παρασκευή των δειγμάτων γάλακτος χρησιμοποιήθηκαν διχλωρομεθάνιο (CH_2Cl_2) από την εταιρία Fluka και υπερκάθαρο νερό, ενώ για την λήψη των φασμάτων με την φασματοσκοπία NMR αλλά και την ποσοτική περαιτέρω ανάλυσή τους καταναλώθηκαν δευτεριωμένοι διαλύτες με εσωτερικό πρότυπο και ρυθμιστικό διάλυμα. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε δευτεριωμένο νερό (D_2O) περιεκτικότητας 99.9% σε δευτέριο με εσωτερικό πρότυπο τριμεθυλο-σιλυλο-προπιονικό-2,2,3,3- d_4 οξύ (TMSP- d_4) περιεκτικότητας 0.05% της εταιρίας Deutero και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου 100mM για $\text{pH}=7.4$. Ακόμη, χρησιμοποιήθηκε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3) καθαρότητας 99.8% σε δευτέριο με εσωτερικό πρότυπο τετραμεθυλοσιλάνιο TMS περιεκτικότητας 0.03% της εταιρίας Chembiotin. Τέλος, για την λήψη φασμάτων ^{31}P NMR προστέθηκε εσωτερικό πρότυπο μεθυλοφωσφορικού οξέος (MPA) συγκέντρωσης 0.18M.

2.2 Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος και εσωτερικού προτύπου για ^{31}P NMR

Για την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού νατρίου 100mM για $\text{pH}=7.4$ ζυγίστηκαν 1.44gr Na_2HPO_4 , 0.26gr NaH_2PO_4 , 0.0098gr NaN_3 και 0.0086gr TMSP. Έπειτα πραγματοποιήθηκε η διάλυσή τους σε μία ογκομετρική φιάλη των 50ml απευθείας με δευτεριωμένο νερό (D_2O) καθαρότητας 99.9% σε δευτέριο και εσωτερικό πρότυπο TMSP- d_4 περιεκτικότητας 0.05%. Για την παρασκευή του εσωτερικού προτύπου φωσφόρου συγκέντρωσης 0.18M διαλύθηκαν 86.5gr MPA σε μία ογκομετρική φιάλη των 5ml σε υπερκάθαρο νερό.

2.3 Δείγματα γάλακτος

Συνολικά 91 δείγματα γάλακτος συλλέχθηκαν από 5 διαφορετικά είδη θηλαστικών από την Βόρεια Ελλάδα με διαφορετική περίοδο δειγματοληψίας και καταψύχθηκαν στους -18°C μέχρι την ανάλυσή τους. Πιο συγκεκριμένα, 50 αγελαδινά γάλατα συλλέχθηκαν από 10 διαφορετικούς παραγωγούς σε περίοδο πέντε μηνών (Μάρτιο μέχρι Ιούλιο), 20 πρόβεια γάλατα συλλέχθηκαν από 7 παραγωγούς για περίοδο δύο μηνών (Μάιος και Ιούνιος) και 2 παραγωγούς για περίοδο τριών μηνών (Μάιο μέχρι Ιούλιο). Ακόμη, συλλέχθηκαν από 3 παραγωγούς για περίοδο δύο μηνών (Μάιος κα Ιούνιος) 6 γίδινα γάλατα, από 4 παραγωγούς για περίοδο τριών μηνών (Μάιο μέχρι Ιούλιο) 12 βουβαλίσια και τέλος, από 1 παραγωγό για τον μήνα Ιούνιο και 1 παραγωγό για τους μήνες Μάιο και Ιούνιο 3 γαϊδουρινά γάλατα. Στον παρακάτω πίνακα δίνονται αναλυτικά όλες οι πληροφορίες σχετικά με τα δείγματα που μελετήθηκαν.

Πίνακας 2.3.1. Αναλυτικός πίνακας με τις πληροφορίες των συνολικών δειγμάτων που αναλύθηκαν

Φάρμα	Είδος	Δείγμα Μαρτίου	Δείγμα Απριλίου	Δείγμα Μαΐου	Δείγμα Ιουνίου	Δείγμα Ιουλίου
ΤΣΙΛΙΚΟΥΔΗΣ	Αγελαδινό	C.1.3	C.1.4	C.1.5	C.1.6	C.1.7
ΓΕΡΕΜΠΑΚΑΝΗΣ	Αγελαδινό	C.2.3	C.2.4	C.2.5	C.2.6	C.2.7
ΔΑΣΙΛΑΣ	Αγελαδινό	C.3.3	C.3.4	C.3.5	C.3.6	C.3.7
ΜΙΡΙΓΙΑ	Αγελαδινό	C.4.3	C.4.4	C.4.5	C.4.6	C.4.7
ΧΑΡΑΛΑΜΠΙΔΗΣ	Αγελαδινό	C.5.3	C.5.4	C.5.5	C.5.6	C.5.7
ΛΑΣΚΑΡΙΝΗΣ	Αγελαδινό	C.6.3	C.6.4	C.6.5	C.6.6	C.6.7
ΔΡΑΚΟΣ	Αγελαδινό	C.7.3	C.7.4	C.7.5	C.7.6	C.7.7
ΣΒΕΝΤΖΙΔΗΣ	Αγελαδινό	C.8.3	C.8.4	C.8.5	C.8.6	C.8.7
ΤΡΕΝΤΙΔΗΣ	Αγελαδινό	C.9.3	C.9.4	C.9.5	C.9.6	C.9.7
ΜΠΙΑΝΤΟΤΑΚΗ	Αγελαδινό	C.10.3	C.10.4	C.10.5	C.10.6	C.10.7
ΑΝΘΟΠΟΥΛΟΣ	Πρόβειο Lacaune	-	-	S.P.1.5	S.P.1.6	-
ΙΩΑΝΝΙΔΗΣ	Πρόβειο Lacaune	-	-	S.P.2.5	S.P.2.6	-
ΓΑΤΣΙΟΥ	Πρόβειο Lacaune	-	-	S.P.3.5	S.P.3.6	-
ΓΑΖΕΤΗΣ	Πρόβειο Lacaune	-	-	S.P.4.5	S.P.4.6	-
ΚΑΡΑΤΖΙΚΑΣ	Πρόβειο Χίου	-	-	S.P.5.5	S.P.5.6	-
ΠΑΣΧΟΥ	Πρόβειο Χίου	-	-	S.P.6.5	S.P.6.6	-
ΜΠΟΥΝΤΩΛΑΣ	Πρόβειο Χίου	-	-	S.P.7.5	S.P.7.6	-
ΜΠΟΤΑΪΤΗΣ	Γίδινο	-	-	G.8.5	G.8.6	-
ΚΥΡΙΑΚΟΣ	Γίδινο	-	-	G.9.5	G.9.6	-
ΔΑΛΛΑΣ	Γίδινο	-	-	G.10.5	G.10.6	-
ΓΚΑΝΤΟΥΝΑΣ	Πρόβειο Lacaune	-	-	S.E.1.5	S.E.1.6	S.E.1.7
ΜΗΛΙΩΝΗΣ	Πρόβειο Lacaune	-	-	S.E.2.5	S.E.2.6	S.E.2.7
ΑΝΔΡΕΑΔΗΣ	Βουβαλίσιο	-	-	B.1.5	B.1.6	B.1.7
ΛΑΙΝΑΣ	Βουβαλίσιο	-	-	B.2.5	B.2.6	B.2.7
ΓΙΑΝΤΣΙΔΗ	Βουβαλίσιο	-	-	B.3.5	B.3.6	B.3.7
ΔΗΜΗΤΡΙΟΥ	Βουβαλίσιο	-	-	B.4.5	B.4.6	B.4.7
ΜΠΟΥΓΙΑΣ	Όνου	-	-	-	D.1.6	-
ΠΑΠΛΙΑΚΑΣ	Όνου	-	-	-	D.2.6	D.2.7

2.4 Πειραματική διαδικασία και πρωτόκολλο NMR

Αρχικά τα δείγματα γάλακτος που επρόκειτο να αναλυθούν μεταφέρθηκαν στο ψυγείο από την προηγούμενη μέρα για να ξεπαγώσουν σταδιακά (15 ώρες περίπου). Την επόμενη μέρα αφήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για μισή ώρα περίπου και ύστερα ποσότητα δείγματος 500ml τοποθετήθηκε σε προζυγισμένο erpendorf και στην συνέχεια εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο δύο διαφορετικών εκχυλίσεων. Για την πρώτη εκχύλιση στο erpendorf προστέθηκε 1ml διχλωρομεθάνιο (CH_2Cl_2), το μείγμα ανακινήθηκε για περίπου 20

δευτερόλεπτα στο vortex, αφέθηκε για 2 λεπτά στους υπέρηχους και στην συνέχεια φυγοκεντρήθηκε για 20 λεπτά στις 11.000rpm. Η διαδικασία επαναλήφθηκε δύο φορές ακόμη. Στην συνέχεια, η άπολη φάση των τριών εκχυλίσεων συλλέχθηκε σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη. Έπειτα, στο υπερκείμενο προστέθηκε 1ml υπερκάθαρου νερού, ανακινήθηκε για περίπου 20 δευτερόλεπτα στο vortex, αφέθηκε για 2 λεπτά στους υπέρηχους και φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στις 14.000rpm. Τέλος, το πολικό εκχύλισμα συλλέχθηκε σε άλλη προζυγισμένη φιάλη. Η εκχύλιση με υπερκάθαρο νερό πραγματοποιήθηκε επίσης άλλες δύο φορές με το εκχύλισμα να συλλέγεται ομοίως στην ίδια σφαιρική φιάλη.

Έπειτα, η φιάλη με το συλλεχθέν άπολο εκχύλισμα τοποθετήθηκε σε αντλία κενού με ελάχιστη πίεση κάτω από 2mbar, ενώ η φιάλη που περιείχε το πολικό εκχύλισμα τοποθετήθηκε σε λυοφιλιωτή Telstar freeze-dryer λειτουργικής θερμοκρασίας -50°C με μέγιστο κενό 0,05mbar. Τα εκχυλίσματα αυτά αφήνονταν για περίπου 17 ώρες προκειμένου να απομακρυνθούν πλήρως οι διαλύτες. Στην συνέχεια, τα στερεά υπολείμματα του άπολου και πολικού εκχυλίσματος ζυγίστηκαν και προστέθηκαν σε αυτά 700μl CDCl_3 -TMS και D_2O -TMSP αντίστοιχα. Οι φιάλες τοποθετήθηκαν στους υπέρηχους για 5 λεπτά προκειμένου να διαλυθεί το ίζημα τελείως. Ο διαλύτης D_2O περιείχε ακόμη και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών προκειμένου να διατηρηθεί το pH και οι συνθήκες των δειγμάτων σταθερές και να μην επηρεαστούν οι μετρήσεις. Έπειτα οι ποσότητες αυτές τοποθετούνταν σε NMR tubes για την λήψη φασμάτων, ενώ σε δείγματα που υπήρχαν υπολείμματα στερεών γίνονταν διήθηση με υαλοβάμβακα για την απομάκρυνσή τους. Ελήφθησαν φάσματα ^1H NMR 1D και 2D (^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC) σε φασματοόμετρο Bruker NEO 400MHz στους 298.0 K.

Τέλος, προστέθηκαν 10μl MPA απευθείας στα δείγματα των 700μl με D_2O -TSP και ρυθμιστικό, προκειμένου να ληφθούν τα αντίστοιχα φάσματα ^{31}P NMR 1D των πολικών εκχυλισμάτων.

2.5 Μονοδιάστατα (1D) φάσματα NMR

Τα φάσματα ^1H NMR των δειγμάτων γάλακτος που περιείχαν το D_2O λήφθηκαν με την ακολουθία παλμών zgpg, προκειμένου να εξαιρεθεί η κορυφή του νερού. Για κάθε φάσμα λήφθηκαν 128 σαρώσεις και 8 ψευδοσαρώσεις. Η χρονική διάρκεια του παλμού 90° ήταν 8μsec, ο χρόνος καθυστέρησης ανάμεσα στις σαρώσεις 2sec και ο χρόνος καταγραφής του σήματος 2.6sec. Το μέγεθος της FID είναι 32k data points και το εύρος του φάσματος 16ppm. Μετά τον μετασχηματισμό Fourier έγινε διόρθωση φάσης μηδενικής και της πρώτης τάξης και ακολούθησε διόρθωση της γραμμής βάσης του φάσματος (baseline correction). Όλες οι χημικές

μετατοπίσεις των σημάτων ^1H NMR αναφέρονται στην κλίμακα δ έχοντας την πρότυπη ουσία (TMS) σε χημική μετατόπιση δ 0.0ppm.

Αντιθέτως, τα φάσματα ^1H NMR των δειγμάτων που περιείχαν το CDCl_3 λήφθηκαν με ακολουθία παλμών zg30. Σε όλα τα φάσματα πραγματοποιήθηκαν 128 σαρώσεις και 8 ψευδοσαρώσεις. Η χρονική διάρκεια του παλμού 90° ήταν 8μsec, ο χρόνος καθυστέρησης ανάμεσα στις σαρώσεις 5sec και ο χρόνος καταγραφής του σήματος 2.8sec. Το μέγεθος της FID είναι 32k data points και το εύρος του φάσματος 15ppm. Μετά τον μετασχηματισμό Fourier έγινε διόρθωση φάσης μηδενικής και της πρώτης τάξης και ακολούθησε διόρθωση της γραμμής βάσης του φάσματος (baseline correction). Όλες οι χημικές μετατοπίσεις των σημάτων ^1H NMR αναφέρονται στην κλίμακα δ έχοντας την πρότυπη ουσία (TSP) σε χημική μετατόπιση δ 0.0ppm.

Τέλος, τα φάσματα ^{31}P NMR των δειγμάτων που περιείχαν το D_2O λήφθηκαν με την ακολουθία παλμών zgig30, που αφορά τον πυρήνα του ^{31}P . Για κάθε φάσμα λήφθηκαν 512 σαρώσεις και 4 ψευδοσαρώσεις. Η χρονική διάρκεια του παλμού 90° ήταν 8μsec, ο χρόνος καθυστέρησης ανάμεσα στις σαρώσεις 3sec και ο χρόνος καταγραφής του σήματος 2.5sec. Το μέγεθος της FID είναι 65k data points και το εύρος του φάσματος 82ppm. Μετά τον μετασχηματισμό Fourier έγινε διόρθωση φάσης μηδενικής και της πρώτης τάξης και ακολούθησε διόρθωση της γραμμής βάσης του φάσματος (baseline correction). Όλες οι χημικές μετατοπίσεις των σημάτων ^1H NMR αναφέρονται στην κλίμακα δ έχοντας την πρότυπη ουσία (MPA) σε χημική μετατόπιση δ 22.9ppm.

2.6 Δισδιάστατα (2D) φάσματα NMR

Τα ομοπυρηνικά φάσματα ^1H - ^1H g-COSY λήφθηκαν με την ακολουθία παλμών cosygprqf για την εξάλειψη της υπολειμματικής κορυφής του νερού στον διαλύτη D_2O και cosygprf για τον διαλύτη CDCl_3 . Για κάθε δισδιάστατο φάσμα λήφθηκαν 128 σαρώσεις (για τον διαλύτη D_2O) και 64 σαρώσεις (για τον διαλύτη CDCl_3) με 16 ψευδοσαρώσεις για τον κάθε διαλύτη. Η χρονική διάρκεια του παλμού 90° ήταν 8μsec, ο χρόνος καθυστέρησης ανάμεσα στις σαρώσεις 2sec και ο χρόνος καταγραφής του σήματος 0.16sec με increments 3μsec στην δεύτερη διάσταση. Το μέγεθος της FID είναι 2k data points x 128 increments και το εύρος του φάσματος 16x16ppm. Τέλος, ακολουθεί ο μετασχηματισμός Fourier στο φάσμα και όλες οι χημικές μετατοπίσεις των σημάτων ^1H NMR αναφέρονται στην κλίμακα δ έχοντας την πρότυπη ουσία (TMS) και TSP σε χημική μετατόπιση δ 0.0ppm.

Τα ετεροπυρηνικά φάσματα ^1H - ^{13}C g-HSQC λήφθηκαν με την ακολουθία παλμών hsqcedetgprisp2.3 και για τους δύο διαλύτες. Για τον διαλύτη του D_2O σε κάθε φάσμα

πραγματοποιήθηκαν 160 σαρώσεις και 16 ψευδοσαρώσεις. Η χρονική διάρκεια του παλμού 90° ήταν 8μsec, ο χρόνος καθυστέρησης ανάμεσα στις σαρώσεις 1.5sec και ο χρόνος καταγραφής του σήματος 0.21sec με increments 3μsec στην δεύτερη διάσταση. Το μέγεθος της FID είναι 2k data points x 128 increments και το εύρος του φάσματος 12x180ppm. Αντίστοιχα, για τον διαλύτη του CDCl_3 λήφθηκαν 80 σαρώσεις και 16 ψευδοσαρώσεις. Η χρονική διάρκεια του παλμού 90° ήταν 8μsec, ο χρόνος καθυστέρησης ανάμεσα στις σαρώσεις 1.5sec και ο χρόνος καταγραφής του σήματος 0.16sec με increments 3μsec στην δεύτερη διάσταση. Το μέγεθος της FID είναι 2k data points x 128 increments και το εύρος του φάσματος 16x165ppm.

Τέλος, τα ετεροπυρηνικά φάσματα ^1H - ^{13}C g-HMBC λήφθηκαν με την ακολουθία παλμών hmbcgrlpndqf και για τους δύο διαλύτες. Ωστόσο λήφθηκαν διαφορετικές σαρώσεις για τον κάθε διαλύτη και συγκεκριμένα για το D_2O πραγματοποιήθηκαν 204 σαρώσεις με 16 ψευδοσαρώσεις. Η χρονική διάρκεια του παλμού 90° ήταν 8μsec, ο χρόνος καθυστέρησης ανάμεσα στις σαρώσεις 1.5sec και ο χρόνος καταγραφής του σήματος 0.21sec με increments 3μsec στην δεύτερη διάσταση. Το μέγεθος της FID είναι 2k data points x 128 increments και το εύρος του φάσματος 12x240ppm. Αντίστοιχα για το CDCl_3 λήφθηκαν μόνο 108 σαρώσεις με αντίστοιχα 16 ψευδοσαρώσεις. Η χρονική διάρκεια του παλμού 90° ήταν 8μsec, ο χρόνος καθυστέρησης ανάμεσα στις σαρώσεις 1.5sec και ο χρόνος καταγραφής του σήματος 0.16sec με increments 3μsec στην δεύτερη διάσταση. Το μέγεθος της FID είναι 2k data points x 128 increments και το εύρος του φάσματος 16x220ppm.

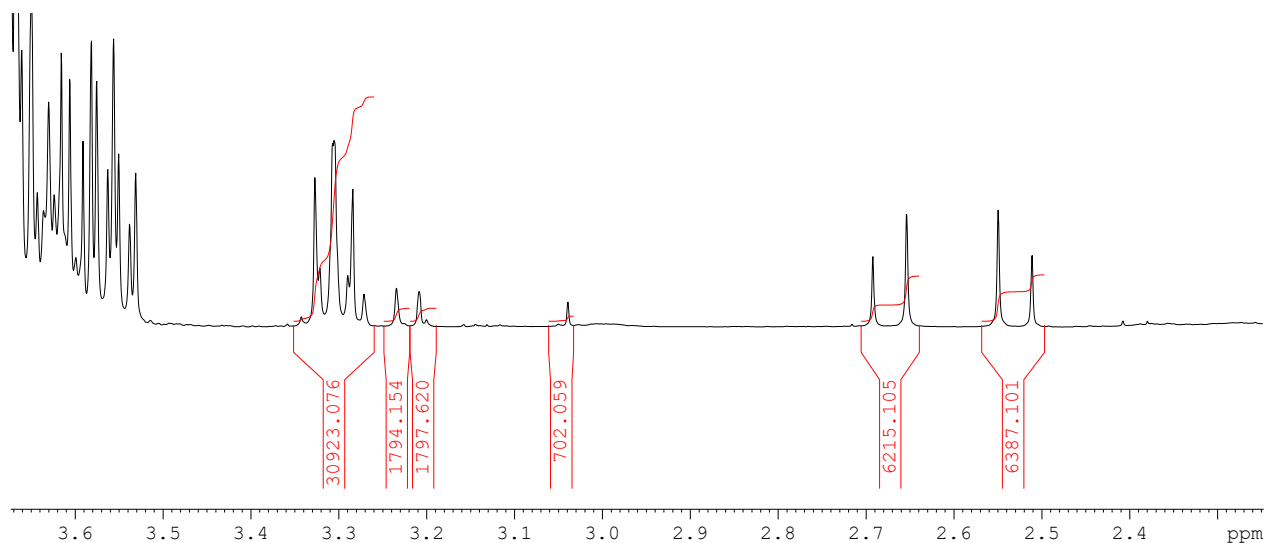
2.7 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των ενώσεων του πολικού και άπολου εκχυλίσματος

Η ταυτοποίηση των περισσότερων ενώσεων που βρέθηκαν στα 1D και τα 2D φάσματα ^1H NMR έγινε με την σύγκριση των αντίστοιχων κορυφών από την βιβλιογραφία από προηγούμενες αντίστοιχες μελέτες. Ακόμη, για ορισμένες ενώσεις χρησιμοποιήθηκαν και μερικές βάσεις δεδομένων, που διαθέτουν τα αντίστοιχα 1D και 2D φάσματα τους ^1H NMR, για την διευκόλυνση της ταυτοποίησής τους. Οι μελέτες που χρησιμοποιήθηκαν για αυτήν την ποιοτική ανάλυση των φασμάτων είναι σημειωμένες στον αντίστοιχο πίνακα του επόμενου κεφαλαίου που έχει συνοπτικά τους συνολικούς μεταβολίτες κάθε εκχύλισης, ενώ οι αντίστοιχες πλατφόρμες είναι η Human metabolome Database (HMDB), η Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRB) και η Spectral Database for Organic Compounds (SDBS) και είναι δωρεάν διαθέσιμες για το κοινό.

Μετά τον ποιοτικό ακολούθησε ο ποσοτικός προσδιορισμός των μεταβολιτών αυτών ολοκληρώνοντας τις κορυφές τους στα φάσματα ^1H NMR για κάθε δείγμα ξεχωριστά. Ο λόγος

ήταν για να εντοπιστούν τυχόν διαφορές στην σύσταση των διαφορετικών δειγμάτων γάλακτος που αναλύθηκαν. Πρωτίστως, για την σωστή ολοκλήρωση των κορυφών έγινε διόρθωση της φάσης και το εσωτερικό πρότυπο τέθηκε στα 0ppm. Έπειτα μέσω του λογισμικού TopSpin 4.1.1 της εταιρίας Bruker πραγματοποιήθηκε η ολοκλήρωση επιλεγμένων κορυφών, οι τιμές περάστηκαν σε excel και διαιρέθηκαν ανάλογα με τον αριθμό των πρωτονίων που συνεισφέρουν σε κάθε κορυφή προκειμένου να υπολογιστεί η ακριβής συγκέντρωσή τους. Το εσωτερικό πρότυπο που χρησιμοποιήθηκε για τα πολικά εκχυλίσματα είναι η ένωση TMSP-d₄ και υπήρχε σε γνωστή συγκέντρωση στον δευτεριωμένο διαλύτη D₂O. Η ολοκλήρωσή της αντιστοιχούσε σε 18284.4nmol πρωτονίων, ποσότητα που διαιρούμενη με τον συνολικό αριθμό των πρωτονίων που συνεισφέρουν στην κορυφή (9) δίνει την μοριακή συγκέντρωσή της στο δείγμα. Ομοίως πραγματοποιήθηκε και η ολοκλήρωση των φασμάτων ³¹P NMR με την διαφορά ότι δεν έγινε καλιμπράρισμα του εσωτερικού προτύπου αλλά μόνο η ολοκλήρωσή του που αντιστοιχούσε σε 1801.67045nmol.

Για τα άπολα εκχυλίσματα ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία επεξεργασίας των φασμάτων ¹H NMR αλλά ως κορυφή αναφοράς για την ολοκλήρωση των υπολοίπων χρησιμοποιήθηκε η κορυφή στα 1.25ppm που αντιστοιχεί στα πρωτόνια της ανθρακικής αλυσίδας (-CH₂). Αυτό διότι στα λιπαρά υπολογίζεται κατευθείαν η % περιεκτικότητά τους στα δείγματα με τις αντίστοιχες αριθμητικές εξισώσεις να δίνονται στην επόμενη ενότητα. Στην **Εικόνα 2.7.1** απεικονίζεται ως παράδειγμα κομμάτι ενός φάσματος ¹H NMR για το πολικό εκχύλισμα αγελαδινού γάλακτος για τον μήνα του Απριλίου που έχει ολοκληρωθεί με την κορυφή του εσωτερικών προτύπων να είναι στα 0ppm.



Εικόνα 2.7.1. Φάσμα ¹H NMR (περιοχή 2.3-3.6ppm) του δείγματος C.10.4 που έχει ολοκληρωθεί με την χρήση του λογισμικού TopSpin 4.1.1 και με κορυφή αναφοράς το εσωτερικό πρότυπο TMSP-d₄ στα 0ppm.

2.8 Υπολογισμός της περιεκτικότητας των λιπαρών οξέων του άπολου εκχυλίσματος των δειγμάτων γάλακτος

Από τα άπολα εκχυλίσματα του γάλακτος υπολογίστηκε η % περιεκτικότητα των λιπαρών οξέων που υπάρχουν στο εκχύλισμα με την μορφή της γλυκερόλης. Ωστόσο, από το φάσμα ^1H NMR ορισμένες κορυφές αποτελούνται από την συνεισφορά των πρωτονίων διαφόρων ενώσεων. Επομένως, ο άμεσος προσδιορισμός των λιπαρών μέσω αυτών δεν είναι δυνατός. Αντιθέτως, υπάρχουν μερικές άλλες κορυφές που αντιστοιχούν σε μία μόνο χημική ένωση, από όπου και μπορεί να ξεκινήσει ο υπολογισμός των συγκεντρώσεων όλων των μεταβολιτών.

Για αυτό τον λόγο από τις κορυφές του λινολενικού, του βουτυρικού, του καπρολεϊκού και του CLA μπορούν να υπολογιστούν άμεσα οι συγκεντρώσεις τους από τις παρακάτω σχέσεις:

$$[\text{Λινολενικό (LN)}] = \left(\frac{E}{E+F+I} \right) \times 100\%$$

$$[\text{Βουτυρικό}] = \left(\frac{I}{E+F+I} \right) \times 100\%$$

$$[\text{Καπρολεϊκό}] = \left(\frac{H}{B/2} \right) \times 100\%$$

$$[\text{CLA}] = \left(\frac{G}{B/2} \right) \times 100\%$$

όπου το E αντιστοιχεί στα μεθύλια του λινολενικού, το I στα μεθύλια του βουτυρικού και το F στα συνολικό άθροισμα των μεθυλίων στο εκχύλισμα. Το H τα πρωτόνια του καπρολεϊκού, G το πρωτόνιο του CLA και B τα πρωτόνια γενικά των λιπαρών στην β θέση ως προς το καρβοξύλιο.

Έπειτα από τον προσδιορισμό αυτών των ενώσεων μπορούν να υπολογιστούν και οι υπόλοιποι μεταβολίτες από τις παρακάτω σχέσεις:

$$[\text{Λινελαϊκό (LO)}] = \left(\frac{A-4 \times \frac{E}{3}}{B} \right) \times 100\%$$

$$[\text{Κορεσμένα}] = \left(\frac{F}{E+F+I} - [\text{CLA}] - [\text{LN}] - [\text{LO}] \right) \times 100\%$$

$$[\text{Ολεϊκό}] = \left\{ \frac{C - (4 \times G) - (2 \times H) - \left(4 \times \frac{E}{3} \right) - \left[4 \times \frac{A - 4 \times \left(\frac{E}{3} \right)}{2} \right]}{B/2} \right\} \times 0.25 \times 100\%$$

όπου A και C να είναι τα πρωτόνια ανάμεσα και δίπλα σε διπλό δεσμό, αντίστοιχα.

Για τον υπολογισμό αυτών των ενώσεων λήφθηκε υπόψιν η συνεισφορά των πρωτονίων κάθε λιπαρού οξέος στα ολοκληρώματα των κορυφών A, B και C. Συγκεκριμένα, στην κορυφή A συνεισφέρουν τα πρωτόνια του λινολενικού και λινελαϊκού και ο προσδιορισμός του λινελαϊκού γίνεται με την αφαίρεση της συνεισφοράς του λινολενικού. Αφού το λινελαϊκό συνεισφέρει στο ολοκλήρωμα της κορυφής A με δύο πρωτόνια, ενώ το λινολενικό με τέσσερα,

αφαιρείται από το συνολικό ολοκλήρωμα αυτό που αντιστοιχεί στο λινολενικό. Για τον υπολογισμό των κορεσμένων λιπαρών οξέων αφαιρέθηκε από το συνολικό ολοκλήρωμα της κορυφής F η συνεισφορά των πρωτονίων των ακόρεστων λιπαρών. Τέλος, για τον υπολογισμό του ολεϊκού αφαιρέθηκαν από το ολοκλήρωμα C οι ποσότητες των πρωτονίων των ακόρεστων οξέων (CLA, καπρολεϊκό, λινολενικό και λινελαϊκό) και στην συνέχεια διαιρέθηκε με την ποσότητα όλων των λιπαρών.

2.9 Μεταβολομική ανάλυση

Στην συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποιήθηκε τόσο στοχευμένη όσο και μη στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση, με δεδομένα εισόδου να αποτελούν οι ολοκληρώσεις συγκεκριμένων κορυφών στα φάσματα ^1H NMR και μοτίβα μεταβολιτών (δηλαδή το πλήρες φάσμα ^1H NMR), αντίστοιχα.

Πιο συγκεκριμένα, για την στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό SIMCA 13.0.2 της εταιρίας Umetrics για την σύσταση πολυπαραμετρικών μοντέλων PCA, OPLS-DA. Ως δεδομένα εισόδου χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις των ενώσεων που υπολογίστηκαν μέσω της ποσοτικοποίησης των κορυφών που έχουν ταυτοποιηθεί στα αντίστοιχα φάσματα. Έγινε μετατροπή των μεταβλητών σε κλίμακα Unit Variance (UV), η οποία διαιρεί τις τιμές κάθε μεταβλητής με την τυπική της απόκλιση. Με την μέθοδο αυτή υπολογίζεται η επίδραση κάθε μεταβλητής ξεχωριστά, αφού συσχετίζεται με την στατιστική της σημαντικότητα, οδηγώντας στην δημιουργία χημειομετρικών μοντέλων που δεν επηρεάζονται από τις μεγάλες αριθμητικές τιμές άλλων μεταβλητών. Η μέθοδος αυτή είναι η βέλτιστη για την ανάδειξη σημαντικών διακυμάνσεων των μεταβολιτών του γάλακτος.

Για την μη στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το ίδιο λογισμικό με δεδομένα εισόδου αυτή την φορά να αποτελούν ολόκληρα φάσματα ^1H και ^{31}P NMR χωρισμένα σε υποπεριοχές (buckets) πλάτους 0.02ppm, ενώ στην περίπτωση των φασμάτων ^{31}P παραλήφθηκε η περιοχή 1.5-3ppm του φάσματος. Στην συνέχεια. Τα δεδομένα αυτά αποθηκεύτηκαν σε μορφή excel και εισήχθησαν στο λογισμικό SIMCA 13.0.2 για την ανάλυσή τους με την χρήση πολυπαραμετρικών στατιστικών μοντέλων ανάλυσης. Ακολούθησε μετατροπή των μεταβλητών σε κλίμακα Pareto, η οποία είναι πιο κατάλληλη για φασματικά δεδομένα καθώς διαιρεί τις τιμές κάθε μεταβλητής με την τετραγωνική ρίζα της τυπικής απόκλισης κάθε μίας για την μείωση του θορύβου στα φάσματα. Με αυτόν τον τρόπο οι μεγάλες κορυφές μειώνονται περισσότερο από ότι οι μικρές με αποτέλεσμα να θεωρεί σημαντικό όλο το φάσμα. Τέλος, κάθε ποσοτικοποιημένος μεταβολίτης αντιστοιχεί σε μία

ανεξάρτητη μεταβλητή και όσες μεταβλητές παρουσίαζαν ασύμμετρη κατανομή τιμών ταυτοποιήθηκαν μέσω του λογισμικού SIMCA και κανονικοποιήθηκαν με λογαριθμικό μετασχηματισμό (log transformation).

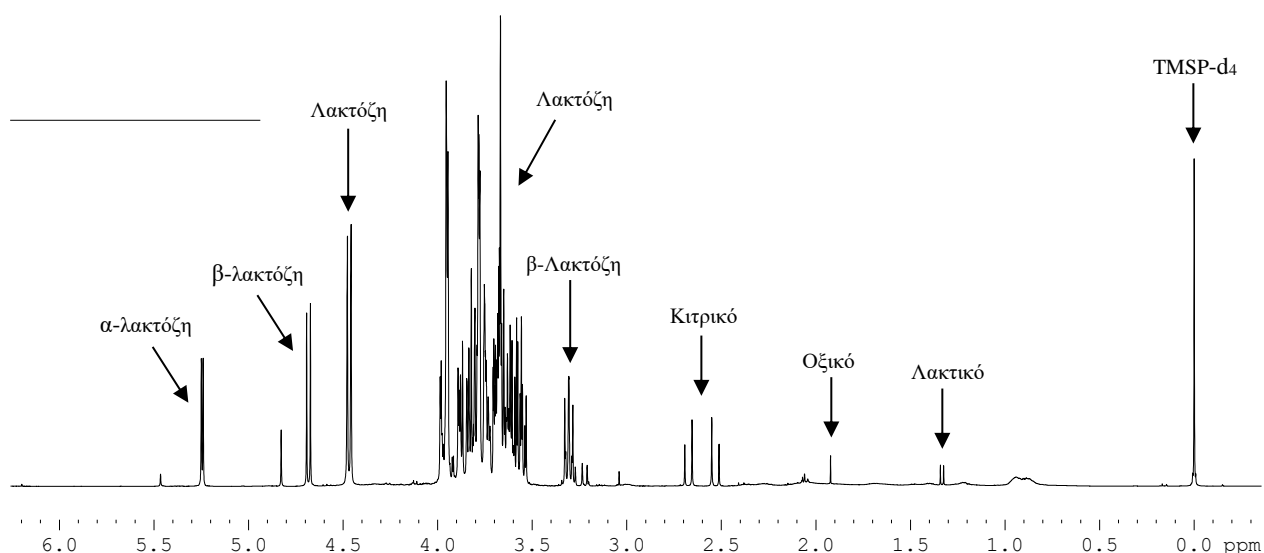
Οι μέθοδοι των OPLS-DA και OPLS εφαρμόστηκαν μέσω των δύο τεχνικών για να μελετηθεί η ικανότητα των αντίστοιχων μοντέλων να προβλέψουν την ζωική προέλευση του γάλακτος, την περίοδο άμελξης αλλά και τον παραγωγό από τον οποίο προέρχονται βάση του μεταβολικού προφίλ των μεταβολιτών του.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – Ποιοτική ανάλυση φασμάτων ^1H και ^{31}P NMR

Σε αυτό το κεφάλαιο παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ποιοτική ανάλυση των 1D και 2D φασμάτων NMR τόσο για το ^1H όσο και για τον ^{31}P . Για τον ποιοτικό προσδιορισμό έγινε η αντιστοίχιση των κορυφών στις ανάλογες χημικές ενώσεις με την βοήθεια προηγούμενων ερευνών αλλά και από πλατφόρμες που είναι δωρεάν διαθέσιμες στο διαδίκτυο και αναφέρθηκαν στο κεφάλαιο 2. Οι περισσότερες κορυφές που ταυτοποιήθηκαν στα φάσματα είναι παρόμοιες για όλα τα δείγματα, ενώ οι ενώσεις που ανιχνεύονται σε μερικά μόνο είδη αναφέρονται ξεχωριστά. Ακόμη, παρουσιάζονται συνοπτικά σε πίνακες οι μεταβολίτες που ταυτοποιήθηκαν στα πολικά και άπολα εκχυλίσματα του πρωτοκόλλου, οι χημικές μετατοπίσεις τους, καθώς και τα πρωτόνια που αντιστοιχούν στις κορυφές των φασμάτων ^1H NMR. Τέλος, δίνονται σε εικόνες οι δομές των χημικών ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στο γάλα με σημειωμένα τα πρωτόνια τους για την εύκολη ανάθεσή τους στους πίνακες.

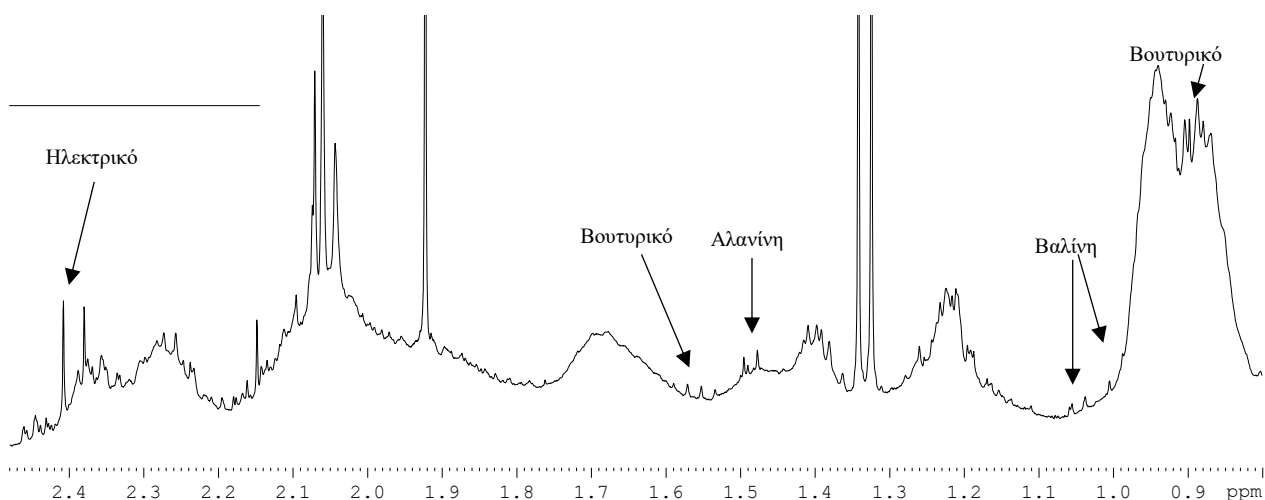
3.1 Ταυτοποίηση μεταβολιτών του υδατικού εκχυλίσματος των δειγμάτων γάλακτος

Στο φάσμα ^1H NMR της **Εικόνας 3.1.1** διακρίνεται το συνολικό φάσμα του πολικού εκχυλίσματος του αγελαδινού γάλακτος για το μήνα του Απριλίου. Από μια πρώτη ματιά διακρίνονται οι κορυφές της λακτόζης που κυριαρχούν στα 3.5-4ppm, οι διπλές κορυφές στα 4.48ppm και 5.24ppm που αντιστοιχούν στην λακτόζη και την α-λακτόζη αντίστοιχα και τέλος η τριπλή και η διπλή κορυφή στα 3.31 και 4.68 που αντιστοιχούν στην β-λακτόζη. Ακόμη, ξεκινώντας από τα δεξιά του φάσματος διακρίνονται κατά σειρά η διπλή κορυφή του λακτικού (δ 1.33), η απλή του οξικού (δ 1.92) και οι δύο διπλές κορυφές του κιτρικού (δ 2.53 και 2.68).

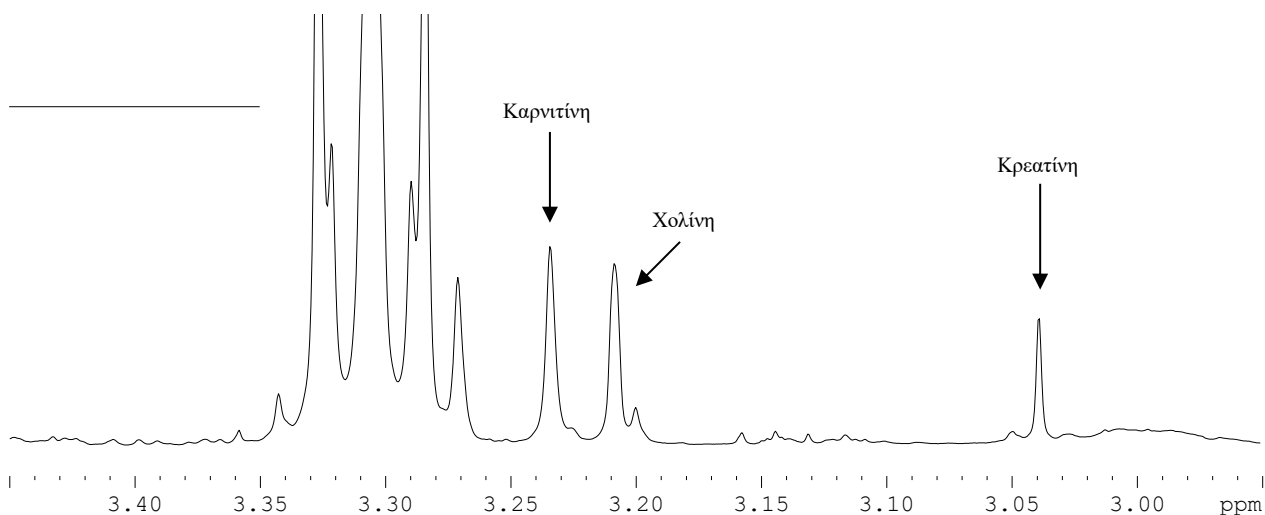


Εικόνα 3.1.1. Περιοχή φάσματος ^1H NMR (0-6ppm) δείγματος γάλακτος (C.10.4) αγελαδινής προέλευσης του πολικού εκχυλίσματος σε διαλύτη D_2O -TMSP- d_4 και λειτουργική συχνότητα 400MHz, με επισημασμένους τους κύριους μεταβολίτες.

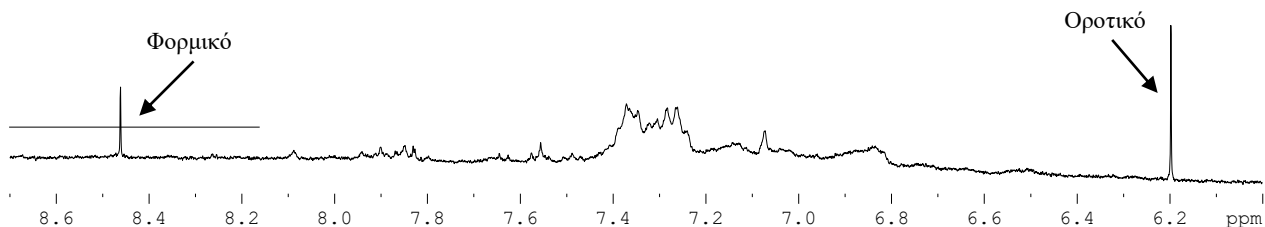
Για τις υπόλοιπες κορυφές του φάσματος έγινε η μεγέθυνσή του για καλύτερη ανάγνωση και ξεκινώντας από τα δεξιά, όπως απεικονίζεται και από την **Εικόνα 3.1.2** διακρίνονται επιπλέον η τριπλή και τετραπλή κορυφή του βουτυρικού (δ 0.90 και 1.56 αντίστοιχα), οι δύο διπλές κορυφές της βαλίνης (δ 0.99 και 1.05), όπου φαίνονται καλύτερα στα γάλατα γίδινης προέλευσης, η διπλή κορυφή της αλανίνης (δ 1.48) και η απλή κορυφή του ηλεκτρικού (δ 2.41). Ακόμη, στην **Εικόνα 3.1.3** είναι ξεκάθαρες και ευδιάκριτες οι απλές κορυφές της κρεατίνης (δ 3.04), της χολίνης (δ 3.21) και της καρνιτίνης (δ 3.23). Τέλος, στην **Εικόνα 3.1.4** παρουσιάζεται η περιοχή των αρωματικών στην οποία εμφανίζονται οι απλές κορυφές του οροτικού (δ 6.20) και του φορμικού (δ 8.46), ενώ ενδιάμεσα υπάρχουν διάφορες άλλες ενώσεις που είναι πιο ευδιάκριτες στα πρόβεια και γίδινα δείγματα και θα αναφερθούν λεπτομερώς σε επόμενη παράγραφο.



Εικόνα 3.1.2. Περιοχή φάσματος ^1H NMR (0.8-2.5ppm) δείγματος γάλακτος (C.10.4) αγελαδινής προέλευσης του πολικού εκχυλίσματος σε διαλύτη D_2O -TMSP- d_4 και λειτουργική συχνότητα 400MHz, με επισημασμένους τους κύριους μεταβολίτες.



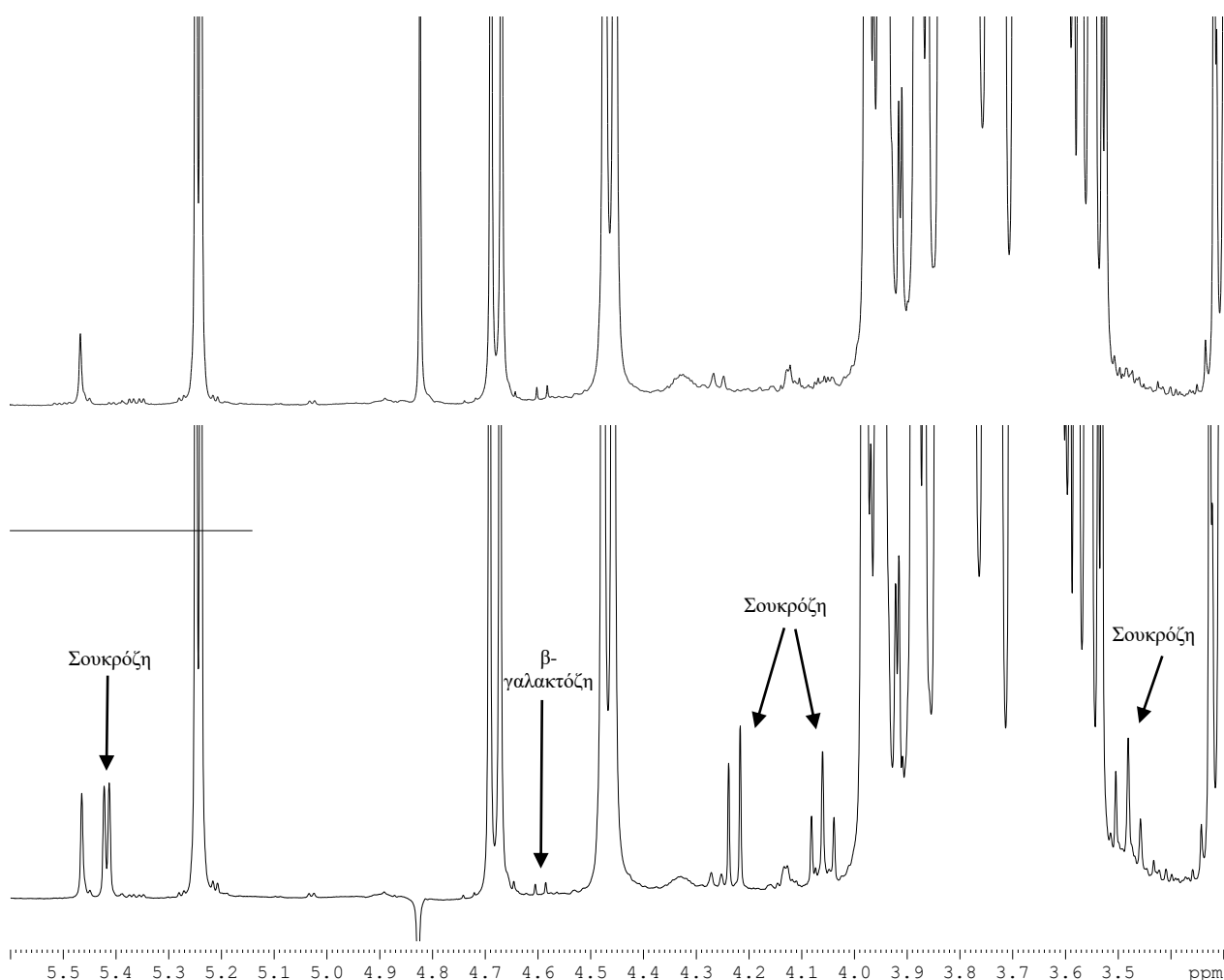
Εικόνα 3.1.3. Περιοχή φάσματος ^1H NMR (3.0-3.4ppm) δείγματος γάλακτος (C.10.4) αγελαδινής προέλευσης του πολικού εκχυλίσματος σε διαλύτη D_2O -TMSP- d_4 και λειτουργική συχνότητα 400MHz, με επισημασμένους τους κύριους μεταβολίτες.



Εικόνα 3.1.4. Περιοχή του φάσματος ^1H NMR (6.2-8.6ppm) δείγματος γάλακτος (C.10.4) αγελαδινής προέλευσης του πολικού εκχυλίσματος σε διαλύτη D_2O -TMSP- d_4 και λειτουργική συχνότητα 400MHz, με επισημασμένους τους κύριους μεταβολίτες.

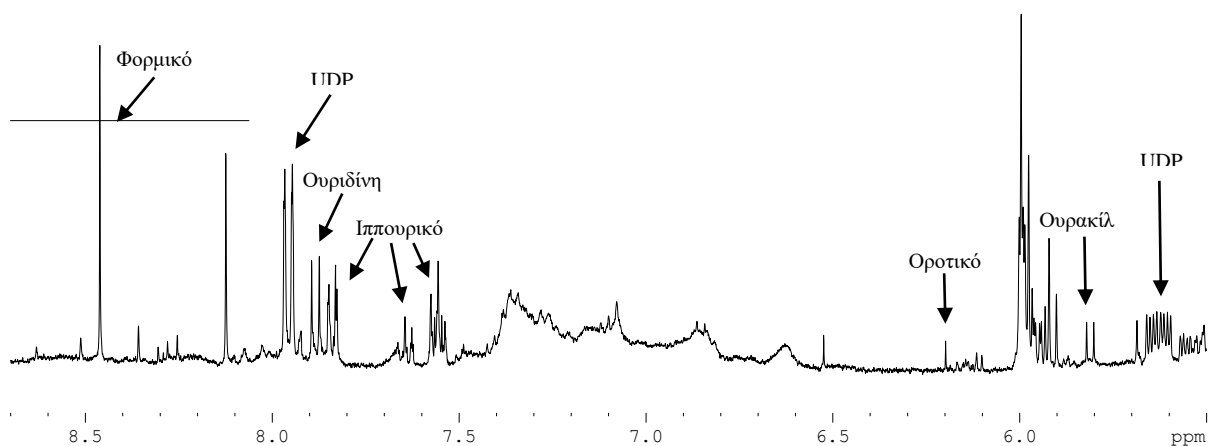
Ωστόσο, σε ένα μόνο δείγμα και συγκεκριμένα στα αγελαδινά συγκεκριμένου παραγωγού (C.5) παρατηρήθηκε σύμφωνα και με το φάσμα της **Εικόνας 3.1.5** η ύπαρξη των κορυφών της σουκρόζης (δ 3.48, 4.06 και 4.23) για όλους τους μήνες που έγινε η δειγματοληψία. Το συγκεκριμένο φάσμα αντιστοιχεί στο δείγμα του Ιουλίου (C.5.7, κάτω), ενώ μαζί του παρατίθεται συγκριτικά και το φάσμα αγελαδινού δείγματος άλλου παραγωγού (C.3.7, πάνω). Ακόμη, επισημαίνεται και η διπλή κορυφή της β -γαλακτόζης (δ 4.59).

Από την βιβλιογραφία έχει παρατηρηθεί με την χρήση της φασματοσκοπίας NMR ότι η ανίχνευση της σουκρόζης αποτελεί πιθανή ένδειξη νοθείας αγελαδινών και πρόβειων δειγμάτων γάλακτος με γάλα σόγιας [71].

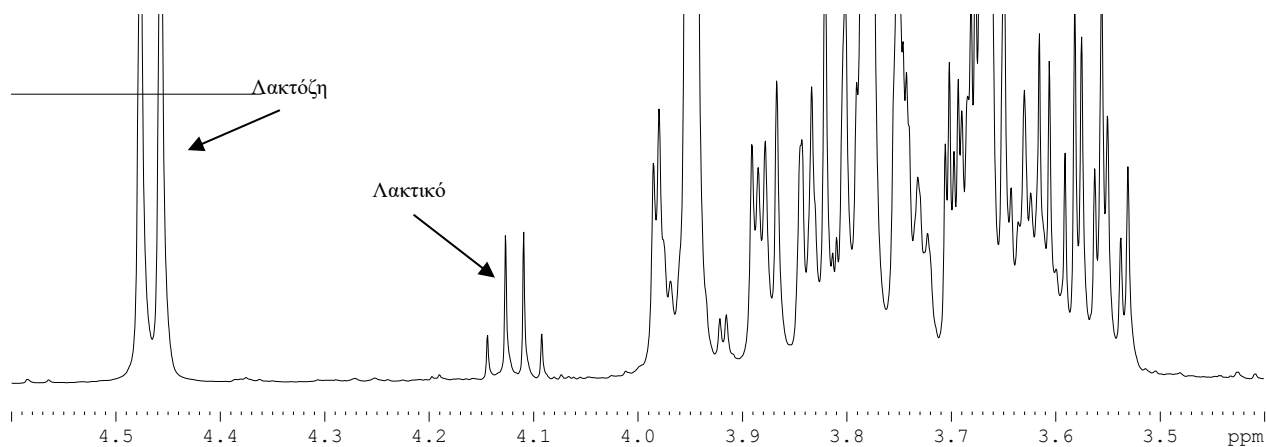


Εικόνα 3.1.5. Περιοχή φάσματος ^1H NMR (3.5-5.5ppm) δειγμάτων γάλακτος διαφορετικών παραγωγών (C.3.7 πάνω και C.5.7 κάτω) αγελαδινής προέλευσης του πολικού εκχυλίσματος σε διαλύτη $\text{D}_2\text{O-TMSP-d}_4$ και λειτουργική συχνότητα 400MHz, με επισημασμένους τους κύριους μεταβολίτες.

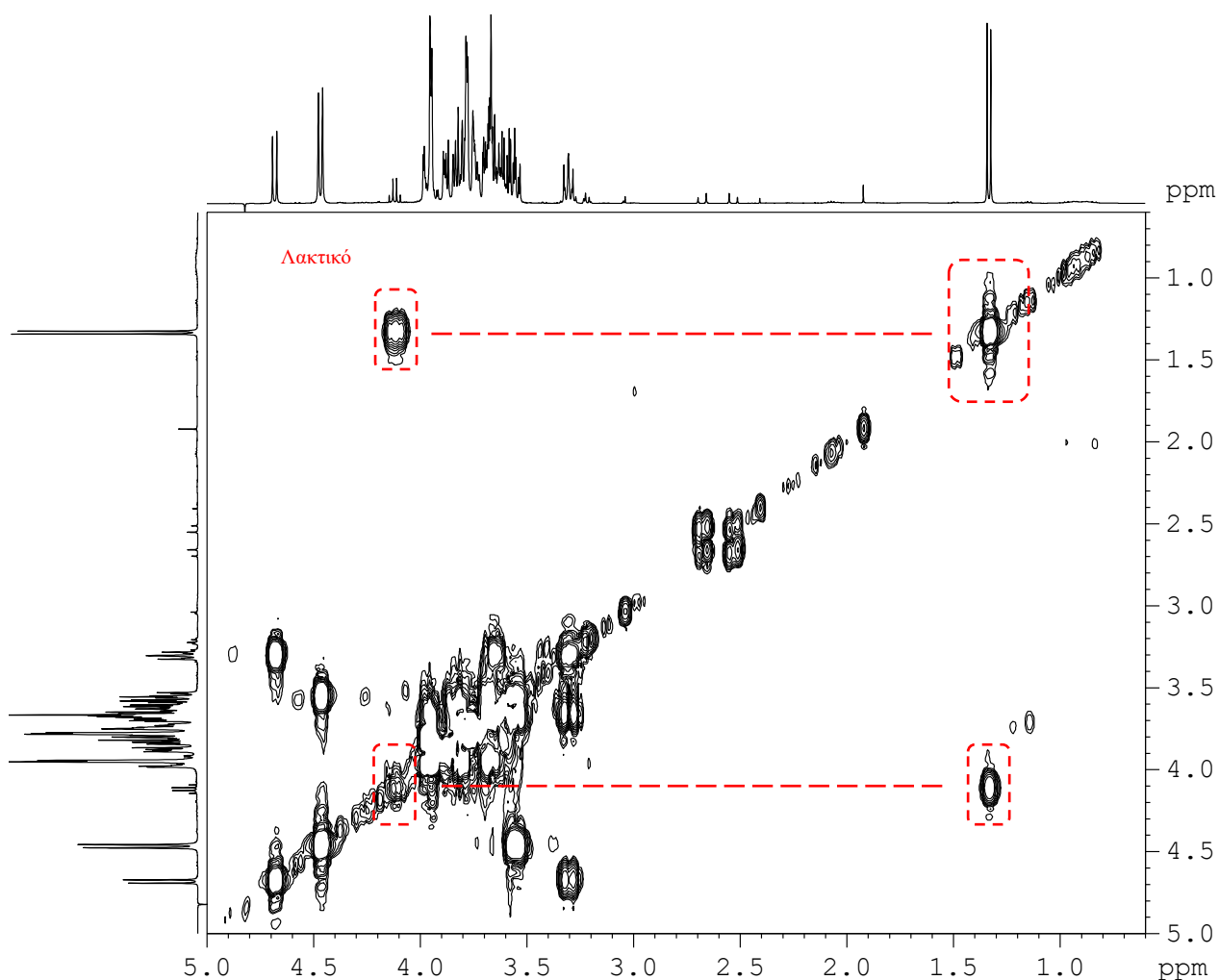
Στην **Εικόνα 3.1.6** παρουσιάζεται η αρωματική περιοχή του φάσματος της πολικής εκχύλισης του γάλακτος γίδινης προέλευσης για τον μήνα Μάιο, όπου και ανιχνεύονται η διπλή κορυφή της ουρακίλης (δ 5.81), οι πολλαπλές του ιππουρικού (δ 7.56, 7.64 και 7.84), οι διπλές κορυφές της ουριδίνης (δ 7.88) και της UDP (δ 7.96), καθώς και οι πολλαπλές της τελευταίας (δ 5.6), η οποία παρουσιάζεται και στο αντίστοιχο φάσμα ^{31}P . Ακόμη, στο συγκεκριμένο δείγμα λόγω της υψηλής συγκέντρωσης του λακτικού, γίνεται εμφανής και η τετραπλή κορυφή του στα 4.12ppm, η οποία εξακριβώθηκε και με την βοήθεια του 2D φάσματος ^1H NMR. Στην **Εικόνα 3.1.7** παρουσιάζεται το ίδιο 1D φάσμα ^1H NMR με προηγουμένως αλλά με μεγέθυνση στην περιοχή 3.5-4.5ppm, ενώ στην **Εικόνα 3.1.8** παρουσιάζεται το αντίστοιχο 2D φάσμα με επισημασμένες τις κορυφές του λακτικού.



Εικόνα 3.1.6. Περιοχή φάσματος ^1H NMR (5.5-8.5ppm) δείγματος γάλακτος (G.10.5) γίδινης προέλευσης του πολικού εκχυλίσματος σε διαλύτη D_2O -TMSP- d_4 και λειτουργική συχνότητα 400MHz, με επισημασμένους τους κύριους μεταβολίτες.



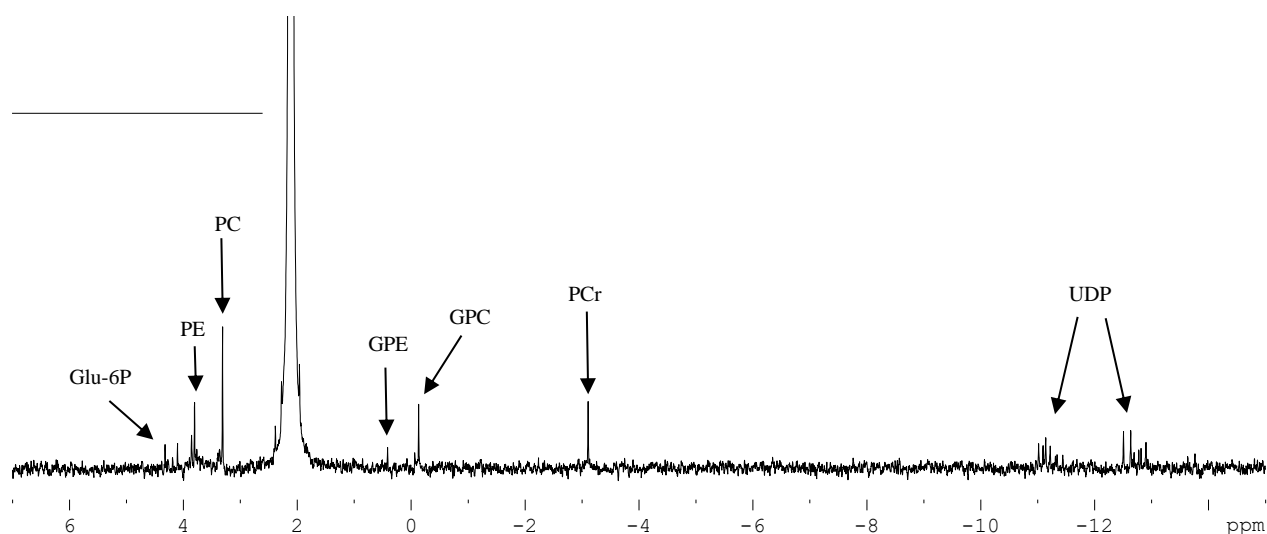
Εικόνα 3.1.7. Περιοχή φάσματος ^1H NMR (3.5-4.5ppm) δείγματος γάλακτος (G.10.5) γίδινης προέλευσης του πολικού εκχυλίσματος σε διαλύτη D_2O -TMSP- d_4 και λειτουργική συχνότητα 400MHz, με επισημασμένους τους κύριους μεταβολίτες.



Εικόνα 3.1.8. Περιοχή φάσματος 2D ^1H NMR (1-5ppm) δείγματος γάλακτος (G.10.5) γίδινης προέλευσης του πολικού εκχυλίσματος σε διαλύτη D_2O -TMS- d_4 και λειτουργική συχνότητα 400MHz, με επισημασμένες τις κορυφές του λακτικού.

Λόγω της αδυναμίας της ανίχνευσης ορισμένων μεταβολιτών, όπως η φωσφοχολίνη και η φωσφοκρεατίνη, στα 1D και 2D φάσματα ^1H NMR εξαιτίας της ύπαρξης των πολλών κορυφών της λακτόζης (3.5-4ppm), ελήφθησαν και φάσματα ^{31}P NMR. Ομοίως, έγινε και η ταυτοποίηση των κορυφών που ανιχνεύτηκαν και όπως παρουσιάζεται στο δείγμα γάλακτος γίδινης προέλευσης για τον μήνα του Ιουνίου στην **Εικόνα 3.1.7**, διακρίνονται με την σειρά από δεξιά προς τα αριστερά οι πολλαπλές κορυφές της UDP με δ 12.60 και 11.10, η κορυφή της φωσφοκρεατίνης (PCr) με δ -3.10, της γλυκεροφωσφορυλοχολίνης (GPC) με δ -0.13, της γλυκεροφωσφορυλοαιθανολανίμης (GPE) με δ 0.42, της φωσφορυλοχολίνης (PC) με δ 3.31, της φωσφορυλοαιθανολανίμης (PE) με δ 3.81 και της 6-φωσφορικής γλυκόζης (Glu-6P) με δ 4.32. Η μεγάλη κορυφή στα 2.12ppm αντιστοιχεί στην ύπαρξη παραγώγων των φωσφορικών

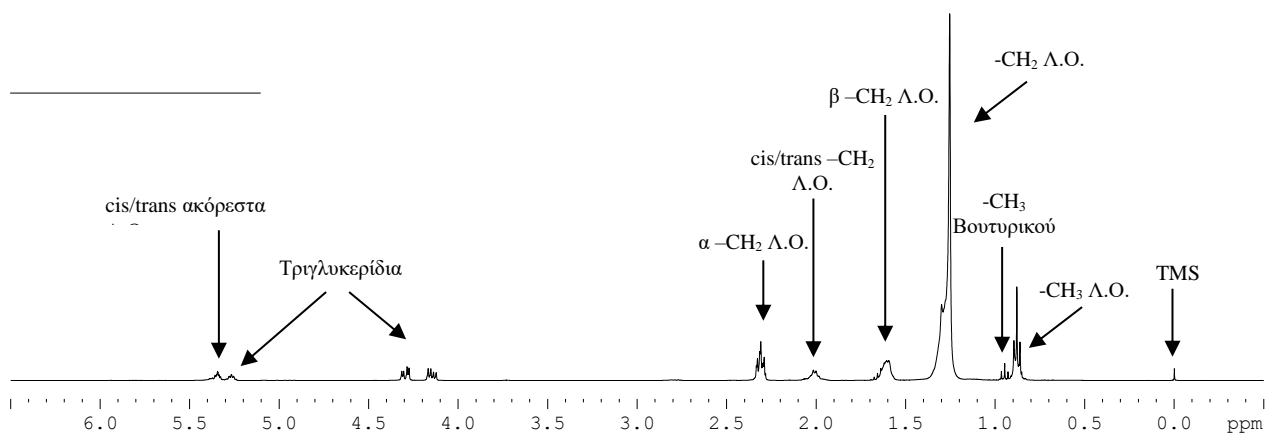
σακχάρων, όπως είναι η 1-φωσφορική λακτόζη και 1-φωσφορική γαλακτόζη. Οι κορυφές του UDP αντιστοιχούν ενδεχομένως σε μίξη της UDP-γλυκόζης και UDP-γαλακτόζης [72].



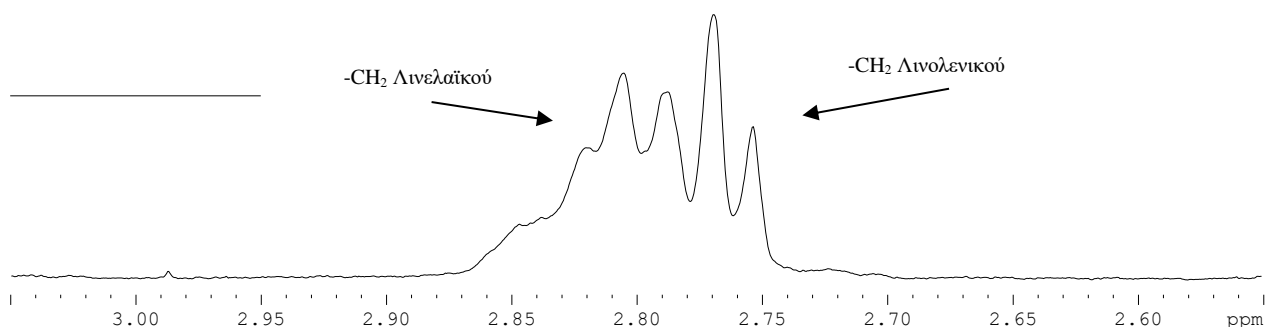
Εικόνα 3.1.9. Περιοχή του φάσματος ³¹P NMR (-14 έως 7ppm) δείγματος γάλακτος (G.10.6) γίδινης προέλευσης του πολικού εκχυλίσματος σε διαλύτη D₂O-TMSP-d₄-MPA, πρότυπη ουσία MPA και λειτουργική συχνότητα 400MHz, με επισημασμένους τους κύριους μεταβολίτες.

3.2 Ταυτοποίηση μεταβολιτών του άπολου εκχυλίσματος των δειγμάτων γάλακτος

Στο φάσμα ¹H NMR της **Εικόνας 3.2.1** διακρίνεται το αντίστοιχο συνολικό φάσμα του άπολου εκχυλίσματος του αγελαδινού γάλακτος για τον μήνα Απρίλιο με τις κύριες κορυφές να είναι σημειωμένες. Πιο συγκεκριμένα, διακρίνονται στο φάσμα η τριπλή κορυφή των μεθυλίων (δ 0.88) και η φαρδιά κορυφή των ενδιάμεσων πρωτονίων (δ 1.25) των λιπαρών οξέων, ενώ ενδιάμεσα φαίνεται η τριπλή κορυφή του μεθυλίου του βουτυρικού (δ 0.95).. Μετακινούμενοι πιο αριστερά στο φάσμα διακρίνονται οι πολλαπλές κορυφές των πρωτονίων που είναι σε β και σε α θέση ως προς το καρβονύλιο των λιπαρών οξέων (δ 1.61 και 2.31 αντίστοιχα). Ακόμη, διακρίνονται και οι πολλαπλές κορυφές των πρωτονίων των ακόρεστων cis-trans λιπαρών, που βρίσκονται δίπλα σε διπλό δεσμό (δ 2.00) αλλά και ανάμεσα στον διπλό δεσμό (δ 5.34). Τέλος, έχουμε τις αντίστοιχες πολλαπλές κορυφές των πρωτονίων των τριγλυκεριδίων, ενώ στην **Εικόνα 3.2.2** και ύστερα από μεγέθυνση του φάσματος φαίνονται οι κορυφές του λινολενικού και λινελαϊκού οξέος (δ 2.77 και 2.81 αντίστοιχα) [20].

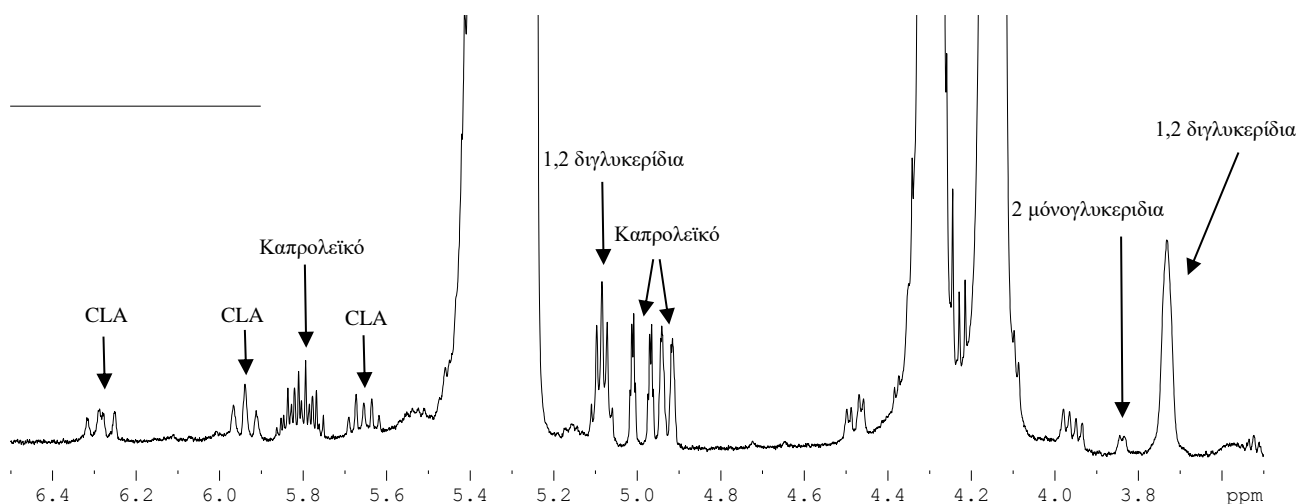


Εικόνα 3.2.1. Περιοχή φάσματος ^1H NMR (0-6.5ppm) δείγματος γάλακτος (C.10.4) αγελαδινής προέλευσης του άπολου εκχυλίσματος σε διαλύτη CDCl_3 -TMS και λειτουργική συχνότητα 400MHz, με τους κύριους μεταβολίτες να είναι επισημασμένοι.

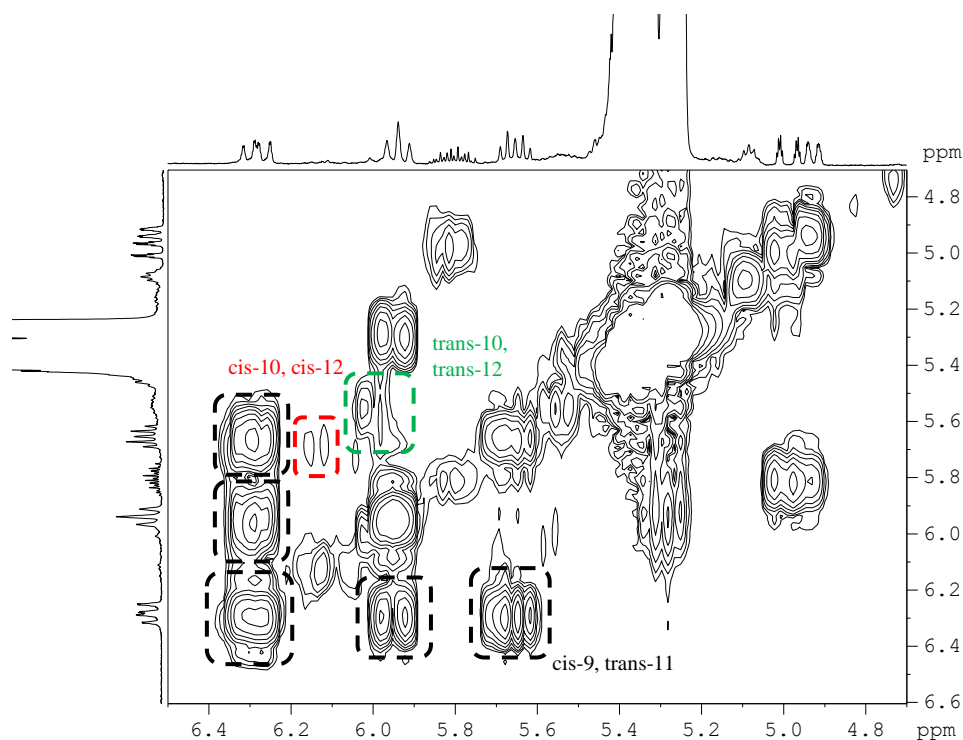


Εικόνα 3.2.2. Περιοχή φάσματος ^1H NMR (2.6-3.0ppm) δείγματος γάλακτος (C.10.4) αγελαδινής προέλευσης του άπολου εκχυλίσματος σε διαλύτη CDCl_3 -TMS και λειτουργική συχνότητα 400MHz, με τους κύριους μεταβολίτες να είναι επισημασμένοι.

Ύστερα από μεγέθυνση του φάσματος σε λίγο μεγαλύτερα ppm διακρίνονται καλύτερα, όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 3.2.3**, οι κορυφές των 1,2-διγλυκεριδίων (δ 3.72 5.08) και 2-μονογλυκεριδίων (δ 3.84) αλλά και αυτές των πρωτονίων του καπρολεϊκού (δ 4.93, 4.99 και 5.80) και του συζευγμένου λινολεϊκού οξέος (δ 5.28, 5.65 και 5.94). Για την περίπτωση του συζευγμένου λινολεϊκού οξέος χρησιμοποιήθηκαν και φάσματα 2D HSQC προκειμένου να εξακριβωθεί και ποιο ισομερές της ένωσης κυριαρχεί και όπως φαίνεται και από την **Εικόνα 3.2.4** το ισομερές που κυριαρχεί είναι το cis-9, trans 11 (γνωστό και ως ρουμενικό οξύ) [20], [73]. Ακόμη από το δισδιάστατο φάσμα υπάρχει ένδειξη ύπαρξης άλλων ισομερών, τα οποία βρίσκονται σε πολύ μικρή ποσότητα και είναι το trans-10, trans-12 και το cis-10, cis-12.



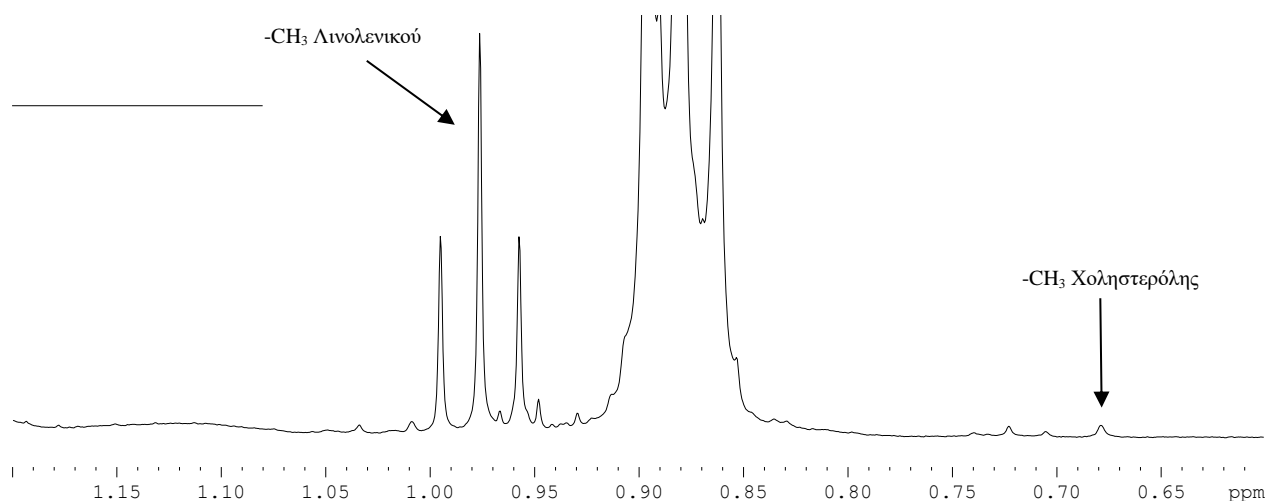
Εικόνα 3.2.3. Περιοχή φάσματος ^1H NMR (3.6-6.4ppm) δείγματος γάλακτος (C.10.4) αγελαδινής προέλευσης του άπολου εκχυλίσματος σε διαλύτη CDCl_3 -TMS και λειτουργική συχνότητα 400MHz, με τους κύριους μεταβολίτες να είναι επισημασμένοι.



Εικόνα 3.2.4. Περιοχή φάσματος ^1H NMR 2D (4.8-6.4ppm) δείγματος γάλακτος (S.P.5.5) πρόβειας προέλευσης του άπολου εκχυλίσματος σε διαλύτη CDCl_3 -TMS και λειτουργική συχνότητα 400MHz, με τα ισομερή του CLA να είναι επισημασμένα.

Τέλος, στα δείγματα μόνο της γαϊδουρινής προέλευσης και συγκεκριμένα από την **Εικόνα 3.2.5**, που αντιστοιχεί σε δείγμα γαϊδουρινού γάλακτος του μήνα του Ιουλίου, παρατηρείται η ανίχνευση της τριπλής κορυφής του λινολενικού οξέος (δ 0.98), λόγω της εξαιρετικά χαμηλής

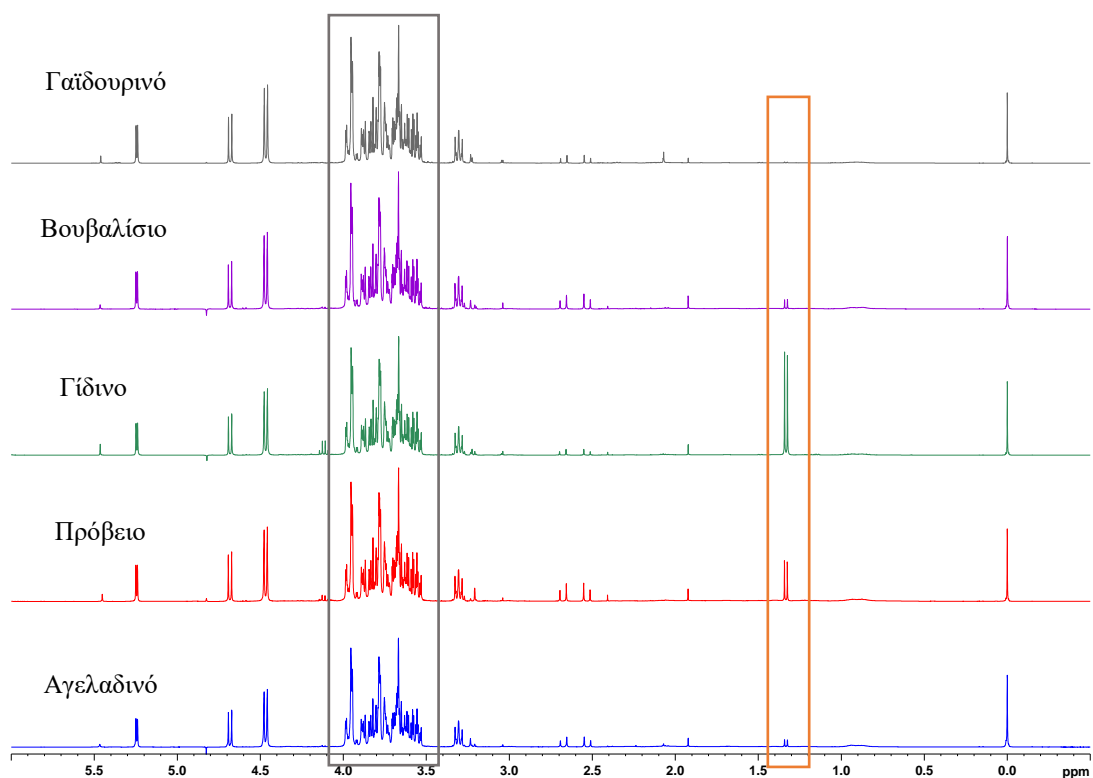
έντασης της τριπλής κορυφής του βουτυρικού (δ 0.95). Ακόμη επισημαίνεται και η κορυφή της χοληστερόλης που ανιχνεύτηκε στα διάφορα είδη γάλακτος.



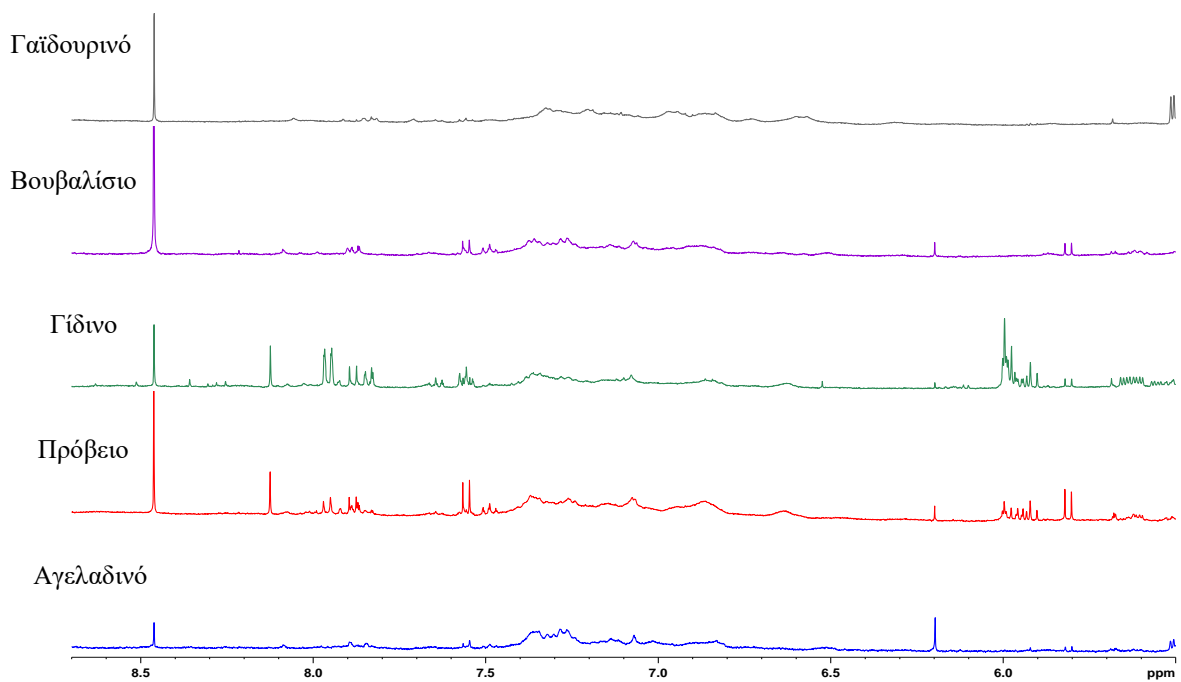
Εικόνα 3.2.5. Περιοχή φάσματος ^1H NMR (0.65-1.15ppm) δείγματος γάλακτος (D.2.7) γαϊδουρινής προέλευσης του άπολου εκχυλίσματος σε διαλύτη CDCl_3 -TMS και λειτουργική συχνότητα 400MHz, με τους κύριους μεταβολίτες να είναι επισημασμένοι.

3.3 Ποιοτική σύγκριση των φασμάτων ^1H και ^{31}P NMR για τα διάφορα είδη γάλακτος

Σε αυτή την ενότητα θα μελετηθούν τα φάσματα που ελήφθησαν για τα διάφορα είδη γάλακτος, με σκοπό να διαπιστωθούν διαφορές μεταξύ τους, που ενδεχομένως φαίνονται απευθείας από τα φάσματα. Στην **Εικόνα 3.3.1** παρουσιάζεται ενδεικτικά ένα αντιπροσωπευτικό φάσμα ^1H NMR για κάθε είδος γάλακτος (αγελαδινό, πρόβειο, γίδινο, βουβαλίσιο και γαϊδουρινό) από το πολικό εκχύλισμα των δειγμάτων τους, με τα φάσματα να παρατίθενται με την ίδια κάθετη κλίμακα. Σε αυτή την εικόνα διαπιστώνεται η κυριαρχία των κορυφών της λακτόζης με την μόνη διαφορά να είναι στην συγκέντρωσή της ανάλογα την ζωική προέλευση. Συγκεκριμένα, φαίνεται και από τη γκρι επισήμανση ότι η περιεκτικότητα της λακτόζης στο αγελαδινό γάλα είναι μικρότερη από τα υπόλοιπα είδη. Ακόμη, αισθητή διαφορά αναλόγως την προέλευση του γάλακτος παρουσιάζει και το λακτικό οξύ, το οποίο φαίνεται στα πρόβεια και γίδινα δείγματα γάλακτος να περιέχεται σε αρκετή ποσότητα, ενώ στα γαϊδουρινά να πλησιάζει στο μηδέν. Επίσης, όσον αφορά την αρωματική περιοχή των αντίστοιχων φασμάτων, τα πρόβεια και τα γίδινα γάλατα παρουσίασαν αρκετούς μεταβολίτες με αρωματικό χαρακτήρα που εμφανίζουν κορυφές σε αυτή την περιοχή, ενώ τα γαϊδουρινά δείγματα εμφανίζουν ελάχιστα σήματα.

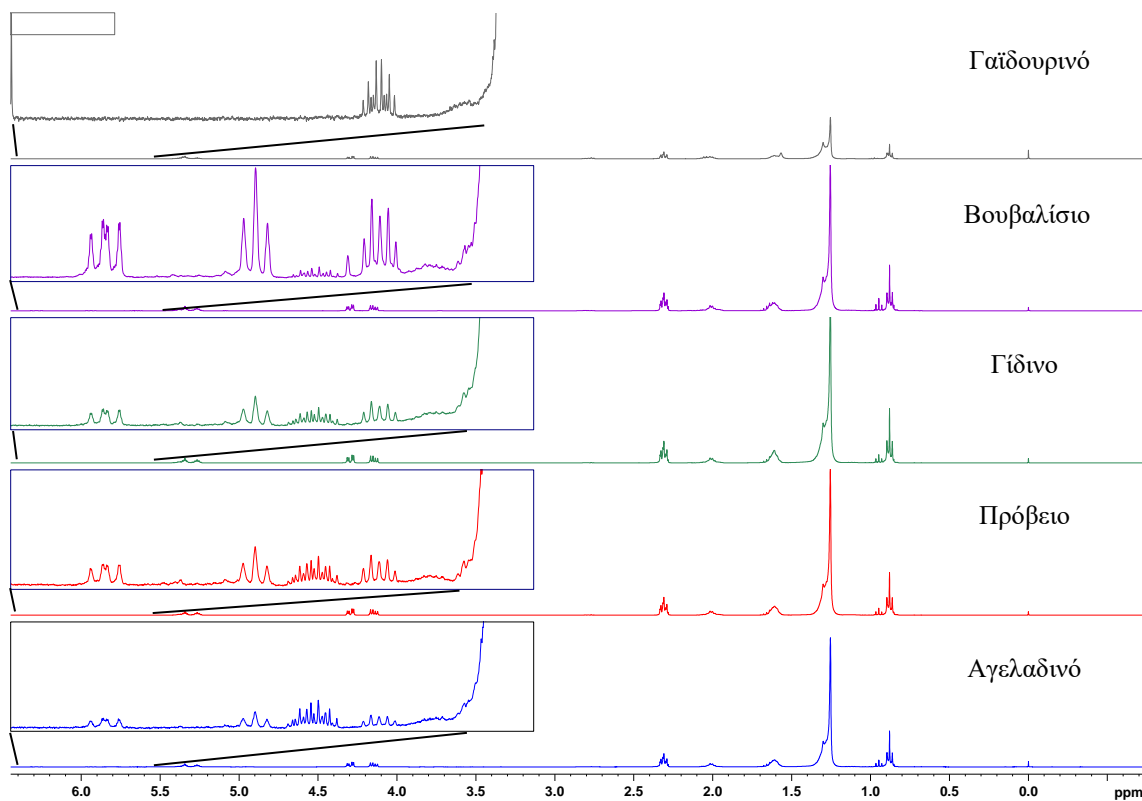


Εικόνα 3.3.1. Σύγκριση φασμάτων ^1H NMR (-0.5-6ppm) του πολικού εκχυλίσματος του αγελαδινού (C.5.7), πρόβειο (S.P.4.5), γίδινο (G.10.5), βουβαλίσιο (B.2.6) και γαϊδουρινού (D.1.6) δειγμάτων γάλακτος σε διαλύτη D_2O -TMSP- d_4 και λειτουργική συχνότητα 400MHz. Επισημαίνονται με γκρι οι κορυφές της λακτόζης και με κόκκινο η κορυφή του λακτικού.



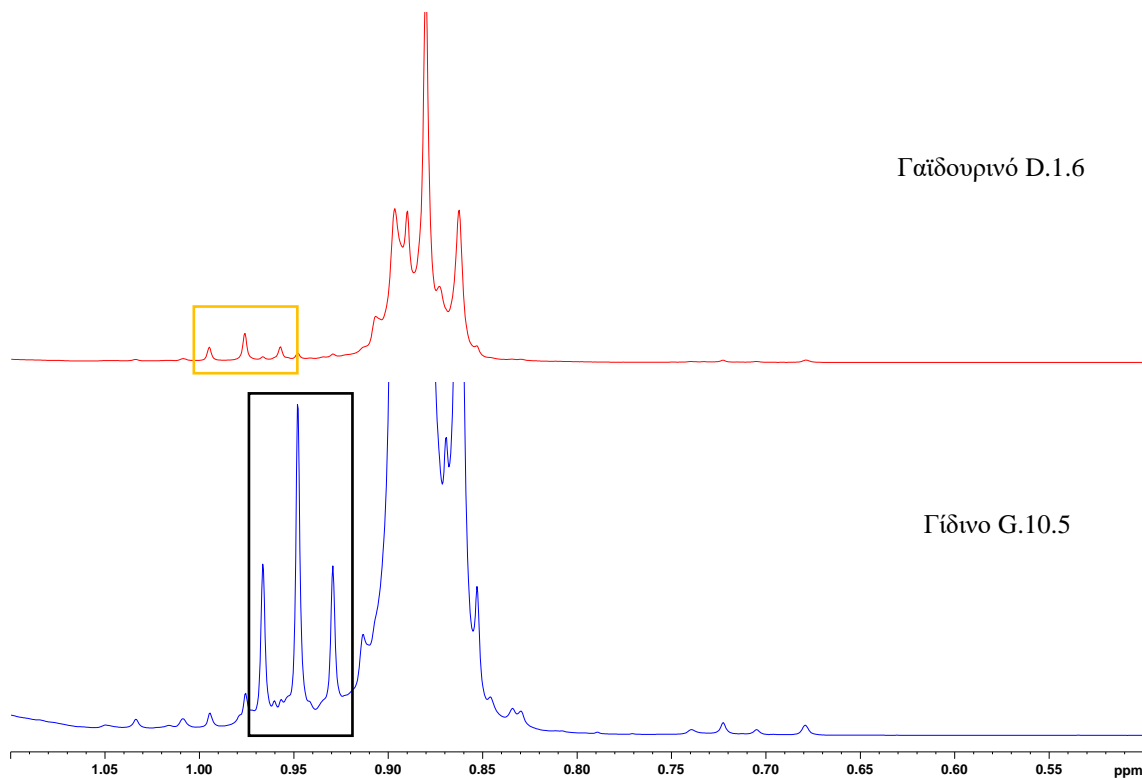
Εικόνα 3.3.2. Σύγκριση φασμάτων ^1H NMR (5.5-8.7ppm) του πολικού εκχυλίσματος του αγελαδινού (C.5.7), πρόβειο (S.P.4.5), γίδινο (G.10.5), βουβαλίσιο (B.2.6) και γαϊδουρινού (D.1.6) δειγμάτων γάλακτος σε διαλύτη D_2O -TMSP- d_4 και λειτουργική συχνότητα 400MHz.

Ομοίως, στην περίπτωση των άπολων εκχυλισμάτων των αντίστοιχων δειγμάτων γάλακτος διαφορετικής ζωικής προέλευσης δεν διακρίνονται αισθητές διαφορές μεταξύ των φασμάτων ^1H NMR, παρά μόνο στην συγκέντρωση συγκεκριμένων μεταβολιτών. Οι μόνες ποιοτικές διαφορές που μπορούν να παρατηρηθούν και να σχολιαστούν είναι η έλλειψη του CLA και η μικρή περιεκτικότητα του βουτυρικού οξέος στα δείγματα του γαϊδουρινού γάλακτος. Στην **Εικόνα 3.3.3** παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό φάσμα ^1H NMR για κάθε είδος γάλακτος (αγελαδινό, πρόβειο, γίδινο, βουβαλίσιο και γαϊδουρινό) από το άπολο εκχύλισμα των δειγμάτων τους, με τα φάσματα να παρατίθενται με την ίδια κάθετη κλίμακα. Σε μεγέθυνση παρουσιάζεται η περιοχή εμφάνισης των κορυφών του CLA (5.5-6.5ppm), όπου φαίνεται το βουβαλίσιο γάλα να περιέχει την μεγαλύτερη ποσότητα και το γαϊδουρινό να μην περιέχει καθόλου το συγκεκριμένο λιπαρό οξύ. Στην **Εικόνα 3.3.4** δίνονται σε μεγέθυνση η περιοχή της κορυφής του βουτυρικού στα φάσματα ^1H NMR του γίδινου (ως ενδεικτικό) και του γαϊδουρινού δείγματος γάλακτος της **Εικόνας 3.3.3**. Από αυτή την εικόνα διακρίνεται στο δείγμα του γάλακτος όνου η πολύ χαμηλή συγκέντρωση του βουτυρικού και η μεγάλη περιεκτικότητα του σε λινολενικό οξύ, χαρακτηρίζοντας και ξεχωρίζοντας έτσι το γαϊδουρινό από τα υπόλοιπα είδη γάλακτος.



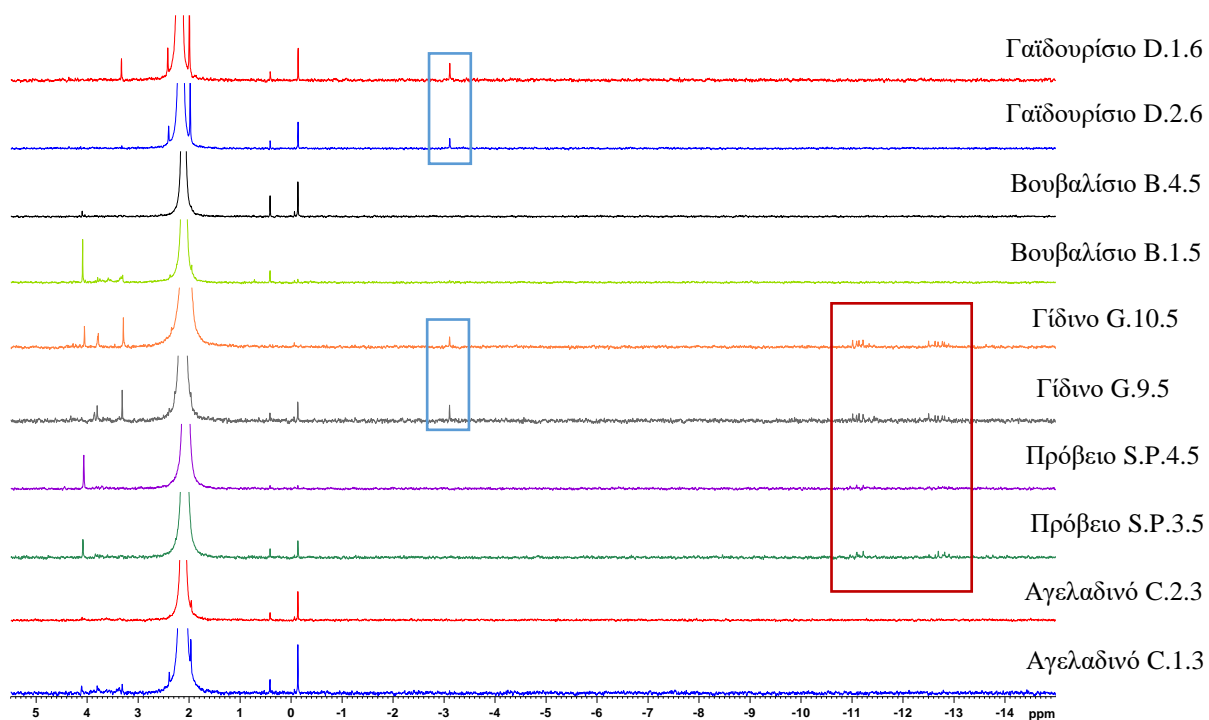
Εικόνα 3.3.3. Σύγκριση φασμάτων ^1H NMR (5.5-8.7ppm) του άπολου εκχυλίσματος του αγελαδινού (C.5.7), πρόβειο (S.P.4.5), γίδινου (G.10.5), βουβαλίσιο (B.2.6) και γαϊδουρινού (D.1.6) δειγμάτων

γάλακτος σε διαλύτη $\text{CDCl}_3\text{-TMS}$ και λειτουργική συχνότητα 400MHz Επισημαίνεται σε μεγέθυνση η περιοχή 5.5-6.5ppm, που περιέχονται οι κορυφές του CLA.



Εικόνα 3.3.4. Σύγκριση φασμάτων ^1H NMR (0.5-1.1ppm) του άπολου εκχύλισματος του γίδινου (G.10.5) και γαϊδουρινού (D.1.6) δειγμάτων γάλακτος σε διαλύτη $\text{CDCl}_3\text{-TMS}$ και λειτουργική συχνότητα 400MHz Επισημαίνονται με μαύρο και με κίτρινο η τριπλή κορυφή του βουτυρικού και του λινολενικού οξέος, αντίστοιχα.

Στην **Εικόνα 3.3.5** παρουσιάζονται τα φάσματα ^{31}P NMR που λήφθηκαν από το πολικό εκχύλισμα των διαθέσιμων δειγμάτων γάλακτος διαφορετικής ζωικής προέλευσης (τα φάσματα παρατίθενται με την ίδια κάθετη κλίμακα). Στα φάσματα αυτά διακρίνονται επισημασμένες με κόκκινο οι κορυφές της UDP, οι οποίες είναι παρούσες μόνο στα πρόβεια και τα γίδινα γάλατα, και όχι στα υπόλοιπα είδη. Ακόμη, διακρίνεται αποκλειστικά στα φάσματα των γίδινων και γαϊδουρινών δειγμάτων γάλακτος παρουσία φωσφοκρεατίνης (PCr, επισήμανση με μπλε). Τέλος, τα φωσφολιπίδια GPC και GPE ταυτοποιήθηκαν σχεδόν σε όλα τα είδη γάλακτος, με λίγες μόνο εξαιρέσεις.



Εικόνα 3.3.5. Σύγκριση φασμάτων ^{31}P NMR (-15-5.5ppm) του πολικού εκχυλίσματος των αγελαδινών (C.1.3, C.2.3), πρόβειων (S.P.3.5, S.P.4.5), γίδινων (G.9.5, G.10.5), βουβαλίσιων (B.1.5, B.4.5) και γαϊδουρινών (D.2.6, D.1.6) δειγμάτων γάλακτος σε διαλύτη D_2O -TMSP- d_4 -MPA και λειτουργική συχνότητα 400MHz. Επισημαίνονται με κόκκινο οι κορυφές της UDP και με μπλε οι κορυφές της PCr.

3.4 Πίνακες χημικών μετατοπίσεων και δομές μεταβολιτών του γάλακτος

Σε αυτή την ενότητα παρουσιάζονται σε πίνακες συνοπτικά οι χημικές ενώσεις των πολικών και άπολων εκχυλίσεων των δειγμάτων γάλακτος με τις χημικές τους μετατοπίσεις σε ^1H , ^{13}C και ^{31}P . Σε ορισμένες ενώσεις δεν έχει γίνει ανάθεση στον ^{13}C , διότι βρίσκονται σε πολύ μικρή ποσότητα και δεν φαίνονταν στα αντίστοιχα HSQC και HMBC 2D φάσματα. Για τις αντίστοιχες αναθέσεις έχει γίνει σύγκριση με την ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία.

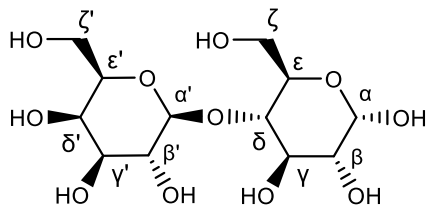
Έπειτα δίνονται και οι δομές των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στα δύο εκχυλίσματα για την εύκολη ανάθεσή τους στις αντίστοιχες κορυφές. Τα οξέα του υδατικού εκχυλίσματος παρουσιάζονται με την πρωτονιωμένη τους μορφή, ενώ τα λιπαρά οξέα δεν είναι ελεύθερα αλλά εστεροποιημένα με γλυκερόλη σε τριγλυκερίδια, διγλυκερίδια και μονογλυκερίδια.

Πίνακας 3.4.1. Χημικές μετατοπίσεις ^1H , ^{13}C και ^{31}P NMR των μεταβολιτών του γάλακτος σε διαλύτη D_2O -TMSP.

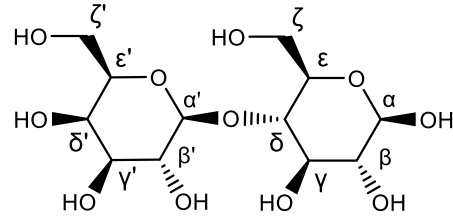
Ένωση	Ανάθεση		^1H ppm	^{13}C ppm	^{31}P ppm
Αλανίνη	β	$-\text{CH}_3$	1.48		
Βαλίνη	γ	$-\text{CH}_3$	0.99		
Βαλίνη	γ'	$-\text{CH}_3$	1.05		
Βουτυρικό	γ	$-\text{CH}_3$	0.90		
Βουτυρικό	β	$-\text{CH}_2$	1.56		
Βουτυρικό	α	$-\text{CH}_2$	2.16		
β -γαλακτόζη	α	$-\text{CH}$	4.59		
Ηλεκτρικό	α	$-\text{CH}_2$	2.41	37.21	
Ιππουρικό	β, δ	$-\text{CH}$	7.56		
Ιππουρικό	γ	$-\text{CH}$	7.64		
Ιππουρικό	α, ϵ	$-\text{CH}$	7.84		
Ιστιδίνη	β	$-\text{CH}$	7.07		
Καρνιτίνη	$\delta, \delta', \delta''$	$-\text{CH}_3$	3.23	57.2	
Κιτρικό	α, α'	$-\text{CH}_2$	2.53/2.68	48.2	
Κρεατίνη	β	$-\text{CH}_3$	3.04	39.62	
Λακτικό	β	$-\text{CH}_3$	1.33	22.99	
Λακτικό	α	$-\text{CH}$	4.12	71.37	
Λακτόζη	α'	$-\text{CH}$	4.48	106.0	
β -λακτόζη	β	$-\text{CH}$	3.31	76.7	
β -λακτόζη	α	$-\text{CH}$	4.68	98.6	
α -λακτόζη	α	$-\text{CH}$	5.24	94.5	
Οξικό	α	$-\text{CH}_3$	1.92	26.1	
Οροτικό	α	$-\text{CH}$	6.20	103.8	
Ουρακίλη	α	$-\text{CH}$	5.81		
Ουρακίλη	β	$-\text{CH}$	7.56		
Ουριδίνη	β	$-\text{CH}$	7.88		
Σουκρόζη	δ	$-\text{CH}$	3.48		
Σουκρόζη	β'	$-\text{CH}$	4.06		
Σουκρόζη	γ'	$-\text{CH}$	4.23		
Τυραμίνη	α, β	$-\text{CH}$	6.90		
Τυραμίνη	γ, δ	$-\text{CH}$	7.21		
Φορμικό	α	$-\text{CH}$	8.46		
Χολίνη	$\gamma, \gamma', \gamma''$	$-\text{CH}_3$	3.21	56.9	
Glu-6P					4.32
PE					3.80
PC					3.31
GPE					0.42
GPC					-0.12
PCr					3.11
UDP1					-11.22
UDP2					-12.70

Βιβλιογραφία: [74], [75], [76], [77]

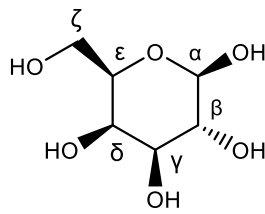
Σάκχαρα



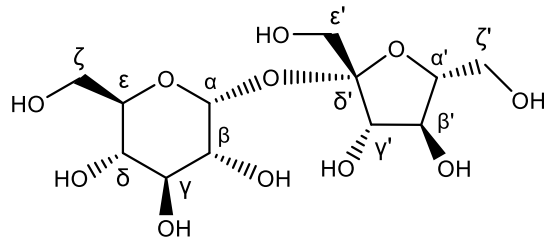
α-λακτόζη



β-λακτόζη

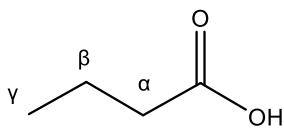


β-γαλακτόζη

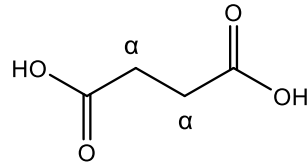


Σουκρόζη

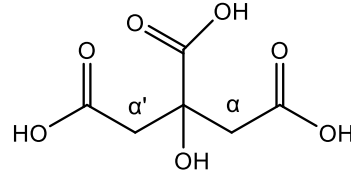
Οργανικά οξέα



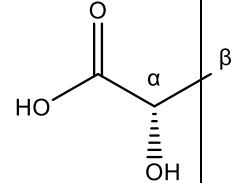
Βουτυρικό οξύ



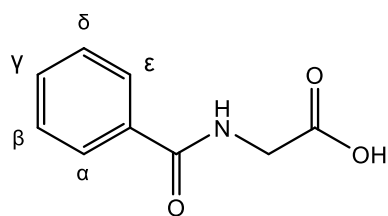
Ηλεκτρικό οξύ



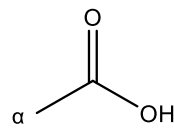
Κιτρικό οξύ



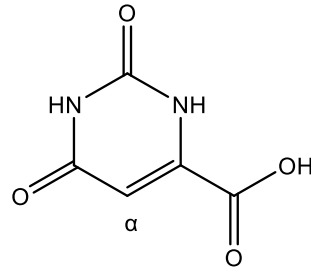
Λακτικό οξύ



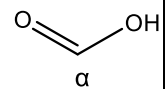
Ιππουρικό οξύ



Οξικό οξύ

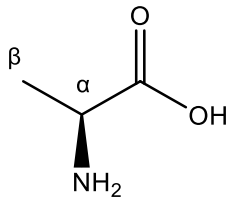


Οροτικό οξύ

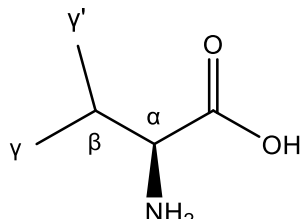


Φορμικό οξύ

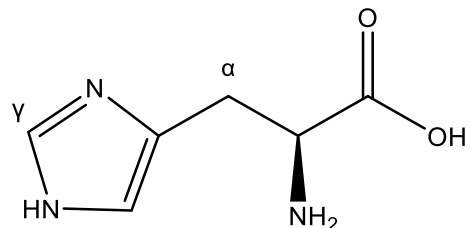
Αμινοξέα



Αλανίνη

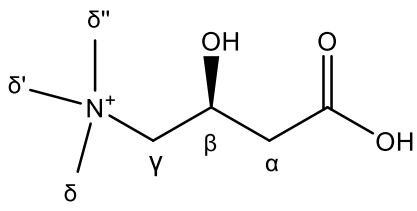


Βαλίνη

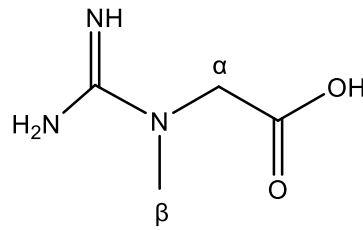


Ιστιδίνη

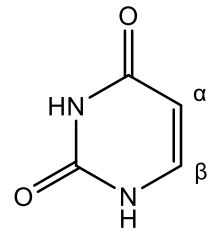
Αζωτούχες ενώσεις



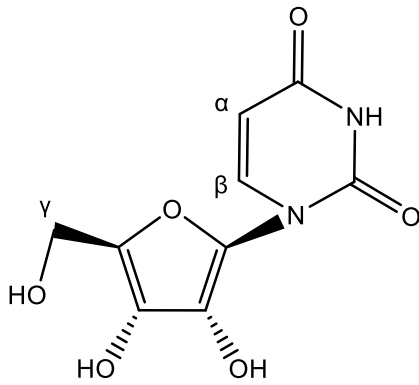
Καρνιτίνη



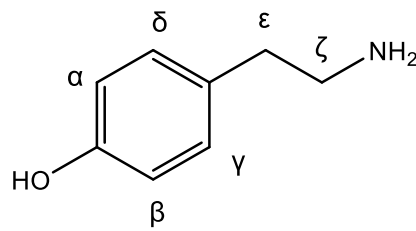
Κρεατίνη



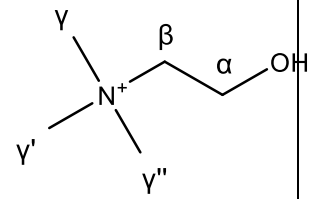
Ουρακίλη



Ουριδίνη

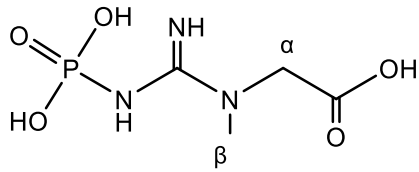


Τυραμίνη

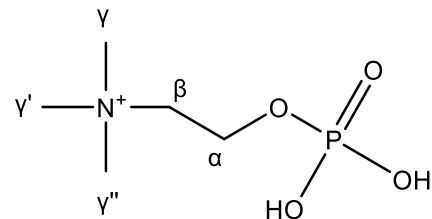


Χολίνη

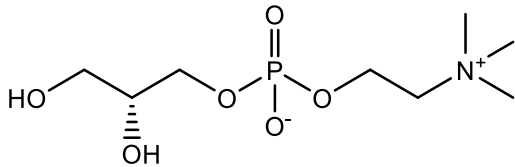
Φωσφορικές ενώσεις



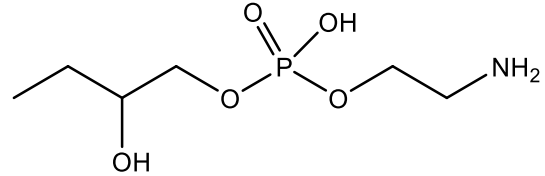
Φωσφοκρεατίνη



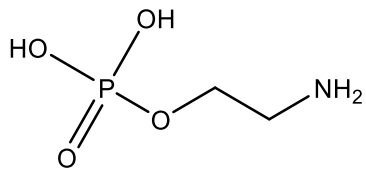
Φωσφορυλοχολίνη



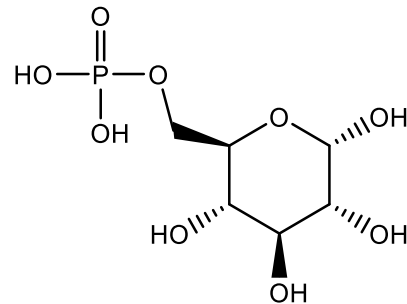
Γλυκεροφωσφορυλοχολίνη



Γλυκεροφωσφορυσερίνη



Φωσφορυσερίνη



6 φωσφορική γλυκόζη

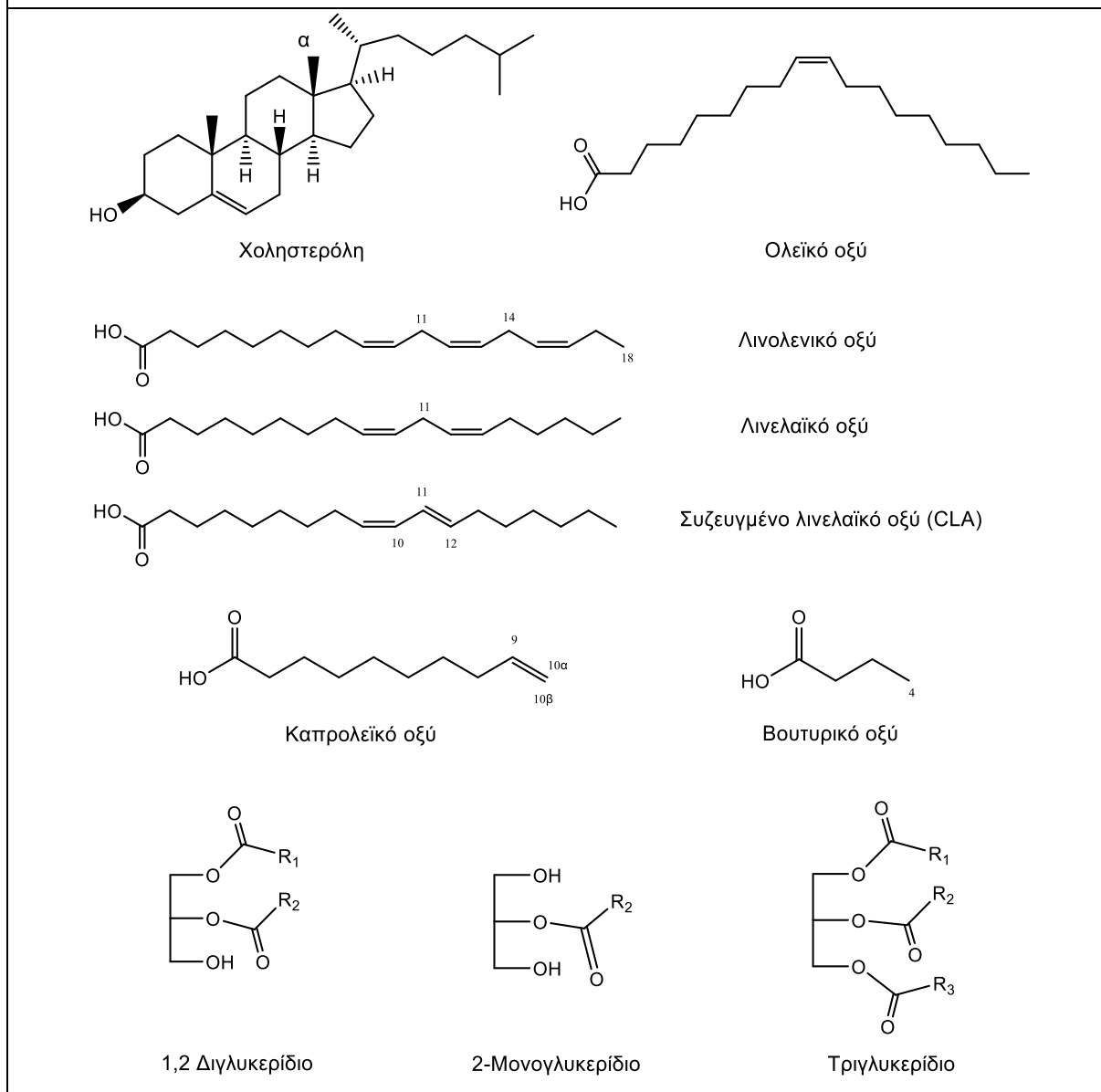
Εικόνα 3.4.1. Δομές χημικών ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν και μετρήθηκαν στα φάσματα ^1H και ^{31}P NMR του πολικού εκχυλίσματος.

Πίνακας 3.4.2. Μετατοπίσεις των χημικών ενώσεων του γάλακτος σε διαλύτη CDCl₃-TMS.

Ένωση	Ανάθεση		¹ H ppm	
Χοληστερόλη	α	-CH ₃	0.68	
Λ.Ο. εκτός του βουτυρικού		-CH ₃	0.88	F
Βουτυρικό	H4	-CH ₃	0.95	I
Λινολενικό (LO)	H18	-CH ₃	0.98	E
Λ.Ο.		-(CH ₂) _n -	1.25	
Λ.Ο.	H3	-O-CO-CH ₂ -CH ₂ -	1.61	B
trans ακόρεστα Λ.Ο.		-CH ₂ -CH=CH-	2.00	C
cis ακόρεστα Λ.Ο.		-CH ₂ -CH=CH-	2.03	C
Λ.Ο.	H2	-O-CO-CH ₂ -CH ₂ -	2.31	D
Λινελαϊκό (LN)	H11	=CH-CH ₂ -CH=	2.77	A
Λινολενικό (LO)	H11, H14	=CH-CH ₂ -CH=	2.81	A
1,2-διγλυκερίδια		HO-CH ₂ -CH ₂ -	3.72	
2-μονογλυκερίδια		HO-CH ₂ -CH ₂ -	3.84	
Τριγλυκερίδια		-CH ₂ -O-CO-	4.14	
Τριγλυκερίδια		-CH ₂ -O-CO-	4.30	
Καπρολεϊκό	H10α	-CH=CH ₂	4.93	H
Καπρολεϊκό	H10β	-CH=CH ₂	4.99	H
1,2-διγλυκερίδια		-CH-O-CO-	5.08	
Τριγλυκερίδια		-CH-O-CO-	5.26	
cis ακόρεστα Λ.Ο.		-CH=CH-	5.34	
trans ακόρεστα Λ.Ο.		-CH=CH-	5.37	
Συζευγμένο Λινελαϊκό (CLA)	H12	-CH=	5.65	
Καπρολεϊκό	H9	-CH=CH ₂ -	5.80	
Συζευγμένο Λινελαϊκό (CLA)	H10	-CH=	5.94	
Συζευγμένο Λινελαϊκό (CLA)	H11	-CH=	5.28	G

Βιβλιογραφία που χρησιμοποιήθηκε για την ανάθεση των κορυφών: [20], [73], [78], [79]

Λιπαρά οξέα



Εικόνα 3.4.2. Δομές χημικών ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν και μετρήθηκαν στα φάσματα ^1H NMR του άπολου εκχυλίσματος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 – Ποσοτική ανάλυση των μεταβολιτών του γάλακτος

Για την ποσοτική ανάλυση των δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε η ολοκλήρωση των αντίστοιχων κορυφών των φασμάτων ^1H και ^{31}P NMR για το πολικό αλλά και το άπολο εκχύλισμα μέσω του λογισμικού TopSpin 4.1.1 (Bruker) και συνεπώς η άμεση ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών του γάλακτος. Έπειτα, υπολογίστηκαν σε πίνακες η διάμεση τιμή του κάθε μεταβολίτη ως προς την ζωική προέλευσή του γάλακτος ή τον μήνα δειγματοληψίας του, παρουσιάζοντας ταυτόχρονα την μέγιστη και ελάχιστη τιμή τους. Σκοπός αυτής της ανάλυσης ήταν να παρατηρηθούν διαφορές που φέρουν τα διάφορα είδη γάλακτος ως προς την σύστασή τους επηρεαζόμενα από διάφορους παράγοντες (είδος και εποχή) και να εξακριβωθούν ορισμένα πρώτα χρήσιμα συμπεράσματα.

4.1 Ποσοτικός προσδιορισμός των μεταβολιτών του υδατικού εκχυλίσματος

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των φασμάτων των υδατικών εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε με την χρήση του λογισμικού TopSpin 4.1.1 (Bruker), όπου επιλέχθηκαν και ολοκληρώθηκαν οι ταυτοποιημένες κορυφές. Έπειτα, τα ολοκληρώματα αυτά κανονικοποιήθηκαν, σύμφωνα με τον αριθμό των πρωτονίων που συνεισφέρουν σε κάθε μία, προκειμένου να ποσοτικοποιηθούν οι ενώσεις που αποτελούν την σύσταση των δειγμάτων. Ως πρότυπο για ολοκλήρωση των φασμάτων ^1H NMR χρησιμοποιήθηκε η κορυφή του εσωτερικού προτύπου TMS- d_4 , το οποίο προστέθηκε στο δείγμα μαζί με τον δευτεριωμένο διαλύτη (700 μl , 0.05%) και το ολοκλήρωμα της αντιστοιχούσε σε 18284.4nmol. Στα φάσματα ^{31}P NMR των ίδιων εκχυλισμάτων, ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε το MPA με το ολοκλήρωμα της κορυφής του να αντιστοιχεί σε 1801.67045nmol. Οι ολοκληρώσεις όλων των φασμάτων ^1H και ^{31}P NMR για όλα τα δείγματα γάλακτος παρέχονται συγκεντρωμένα και αναλυτικά σε πίνακες στο παράρτημα I.

Προκειμένου να γίνουν αντιληπτές οι πιθανές διαφορές των δειγμάτων γάλακτος ως προς τους πολικούς μεταβολίτες τους, υπολογίστηκε η διάμεση τιμή για κάθε έναν από αυτούς μέσω του excel για κάθε είδος γαλακτοπαραγωγού ζώου ξεχωριστά (αγελάδα, πρόβατο, γίδινο, βουβάλι και γάιδαρος). Έπειτα, υπολογίστηκε αντίστοιχα η διάμεση τιμή των μεταβολιτών ανά είδος γάλακτος για τους διαφορετικούς μήνες που πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία. Ακολουθούν πίνακες στους οποίους παρουσιάζονται η διάμεση, η μέγιστη και η ελάχιστη τιμή του κάθε μεταβολίτη ανάλογα τον παράγοντα σύγκρισης (ζωική προέλευση ή μήνας δειγματοληψίας), με εξαίρεση την διακύμανση του γαϊδουρινού γάλακτος ανά τους μήνες λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων του.

Πίνακας 4.1.1. Διάμεση, μέγιστη και ελάχιστη τιμή των μεταβολιτών του υδατικού εκχυλίσματος των δειγμάτων γάλακτος από τα φάσματα ^1H και ^{31}P NMR ως προς την ζωική προέλευση του γαλακτοπαραγωγού ζώου υπολογισμένα σε $\mu\text{mol/gr}$.

Ένωση	Αγελαδινό			Πρόβειο			Γίδινο		
	Διάμεση τιμή	Μέγιστη	Ελάχιστη	Διάμεση τιμή	Μέγιστη	Ελάχιστη	Διάμεση τιμή	Μέγιστη	Ελάχιστη
Οξικό	0.48	0.94	0.12	0.77	3.77	0.52	0.41	1.08	0.33
Αλανίνη	0.02	0.05	0.00	0.03	0.19	0.00	0.06	0.07	0.00
Βαλίνη	0.02	0.07	0.00	0.08	0.22	0.04	0.13	0.18	0.05
Γαλακτικό	0.18	6.78	0.00	4.19	21.87	0.13	0.83	20.81	0.34
Ηλεκτρικό	0.02	0.13	0.00	0.21	0.77	0.07	0.10	0.26	0.08
Κιτρικό	6.88	11.51	0.82	9.02	16.49	5.31	5.84	6.84	2.55
Κρεατίνη	0.57	1.01	0.00	0.47	0.74	0.39	0.81	1.52	0.64
Χολίνη	1.20	2.25	0.01	1.58	3.27	0.91	0.48	0.95	0.37
Καρνιτίνη	2.30	4.80	0.11	2.78	6.63	0.34	2.85	4.60	2.00
β -λακτόζη	61.18	108.95	3.54	64.24	130.10	52.92	64.64	107.89	58.62
Λακτόζη	117.75	210.16	6.51	122.29	252.24	99.92	122.94	210.18	113.55
α -λακτόζη	43.74	77.90	0.00	46.58	94.26	38.81	46.71	79.52	42.77
β -γαλακτόζη	0.21	0.70	0.00	0.44	1.58	0.16	0.07	0.18	0.05
Σουκρόζη	0.00	3.85	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Οροτικό	0.19	0.39	0.01	0.03	0.58	0.00	0.02	0.04	0.01
Φορμικό	0.09	0.48	0.05	0.38	0.75	0.22	0.21	0.81	0.15
Ιστιδίνη	0.06	0.12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Ουρακίλη	0.00	0.03	0.00	0.12	0.32	0.00	0.01	0.04	0.00
Φουμαρικό	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	0.01	0.0002
Ιππουρικό	0.03	0.07	0.00	0.03	0.09	0.00	0.12	0.28	0.03
Ουριδίνη	0.00	0.07	0.00	0.13	0.36	0.02	0.22	0.42	0.15
Τυραμίνη	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	0.02	0.03	0.00
PCr	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.12	0.17	0.08
GPC	0.28	0.62	0.00	0.25	0.64	0.00	0.11	0.20	0.00
GPE	0.06	0.15	0.00	0.09	0.17	0.00	0.05	0.06	0.00
PC	0.00	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00	0.24	0.29	0.17
PE	0.00	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.09	0.16	0.03
Glu-6P	0.00	0.24	0.00	0.12	0.42	0.00	0.00	0.16	0.00
UDP1	0.00	0.00	0.00	0.37	0.74	0.00	0.52	0.80	0.35
UDP2	0.00	0.00	0.00	0.26	0.67	0.00	0.56	0.67	0.33

Ένωση	Βουβαλίσιο			Όνου		
	Διάμεση τιμή	Μέγιστη	Ελάχιστη	Διάμεση τιμή	Μέγιστη	Ελάχιστη
Οξικό	1.09	1.68	0.53	0.66	0.67	0.58
Αλανίνη	0.04	0.08	0.02	0.12	0.16	0.10
Βαλίνη	0.00	0.00	0.00	0.10	0.17	0.10
Γαλακτικό	0.75	2.06	0.06	0.00	0.00	0.00
Ηλεκτρικό	0.11	0.63	0.04	0.03	0.03	0.03
Κιτρικό	7.07	11.00	5.32	4.58	7.50	3.93
Κρεατίνη	0.96	2.03	0.54	0.77	1.03	0.58
Χολίνη	1.74	2.65	0.79	0.12	0.15	0.03
Καρνιτίνη	3.67	7.59	1.27	2.45	3.93	2.13
β -λακτόζη	74.83	136.56	56.62	85.01	86.63	79.75
Λακτόζη	146.51	268.78	110.26	168.88	176.76	159.77
α -λακτόζη	54.56	100.36	42.09	63.80	66.53	60.02

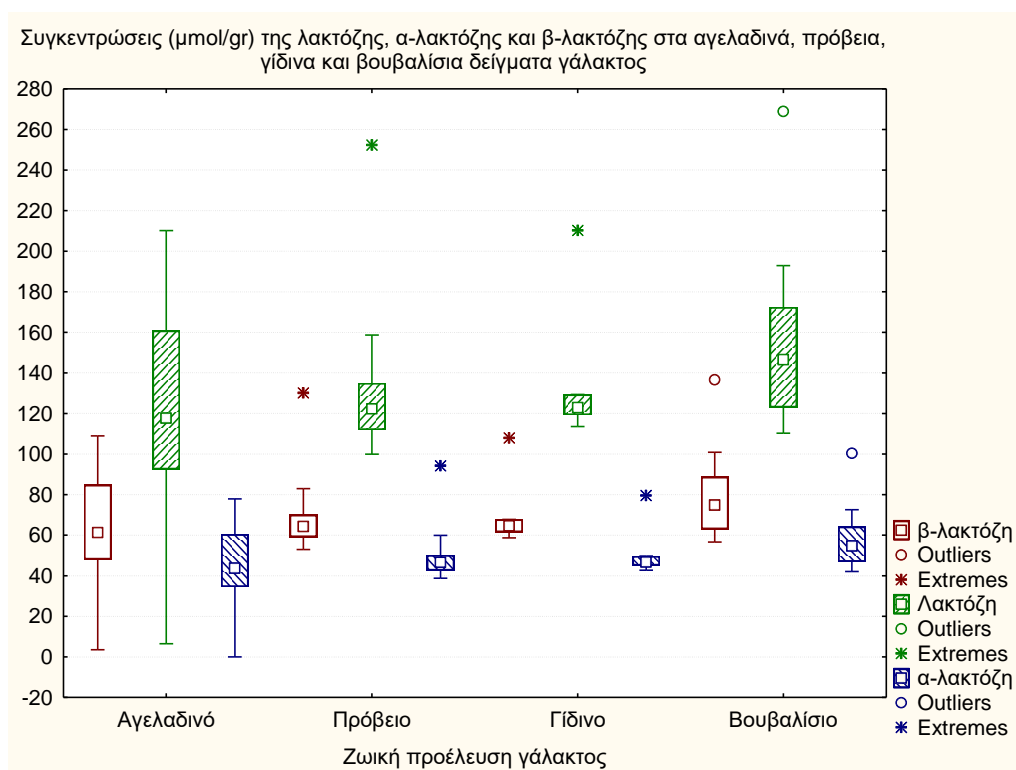
β-γαλακτόζη	0.29	0.92	0.20	0.02	0.02	0.00
Σουκρόζη	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Οροτικό	0.05	0.13	0.03	0.00	0.00	0.00
Φορμικό	0.66	1.27	0.46	0.46	0.58	0.35
Ιστιδίνη	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Ουρακίλη	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00
Φουμαρικό	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
Ιππουρικό	0.03	0.16	0.00	0.00	0.00	0.00
Ουριδίνη	0.00	0.04	0.00	0.01	0.02	0.00
Τυραμίνη	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
PCr	0.00	0.05	0.00	0.18	0.38	0.12
GPC	0.28	0.59	0.00	0.37	0.62	0.30
GPE	0.15	0.33	0.00	0.12	0.23	0.06
PC	0.00	0.10	0.00	0.03	0.39	0.00
PE	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00
Glu-6P	0.15	0.53	0.00	0.00	0.00	0.00
UDP1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
UDP2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Γενικά, η διαδικασία που λαμβάνει χώρα κατά την παραγωγή του γάλακτος στους μαστικούς αδένες των θηλαστικών είναι περίπλοκη, καθώς οι μεταβολίτες του γάλακτος μπορεί να έχουν διαφορετικές πηγές προέλευσης και συντίθενται από πολλαπλούς τύπους κυττάρων. Επομένως, η ζωική προέλευση του γάλακτος επηρεάζει άμεσα την σύστασή του σύμφωνα και με την έρευνα που πραγματοποίησαν οι J. McManaman και ο M. Neville [80]. Σε αυτή την εργασία μελετήθηκε η φυσιολογία της παραγωγής του γάλακτος και ο τρόπος μεταφοράς διάφορων μεταβολιτών σε αυτό, προκειμένου να κατανοηθεί και ο τρόπος μεταφοράς ορισμένων φαρμάκων ή τοξικών ουσιών.

Από τις παραπάνω τιμές διακρίνονται μικρές αλλά σημαντικές διαφορές στα διάφορα είδη γάλακτος, μερικά από τα οποία τονίζονται ιδιαίτερα. Παρατηρήθηκε ότι η ποσότητα της λακτόζης στο γάλα είναι μεγαλύτερη στο γαϊδουρινό και το βουβαλίσιο, ενώ στα άλλα είδη είναι σχετικά παρόμοια, με το αγελαδινό να περιέχει την μικρότερη ποσότητα. Ο L. Li [11] και ο H. Guo [22] με τους συνεργάτες τους με την χρήση ηλεκτροφόρησης και άλλων τεχνικών μελέτησαν την σύσταση του γαϊδουρινού γάλακτος και συμπέραναν ότι το γαϊδουρινό γάλα μοιάζει περισσότερο με το ανθρώπινο (μητρικού) από ότι με αυτό των ζώων (αγελάδας). Αυτό συμβαίνει, διότι περιέχει παρόμοιες με το μητρικό γάλα ποσότητες από τα απαραίτητα αμινοξέα, λιπαρά οξέα, καθώς και λακτόζη, που είναι απαραίτητα για την ισορροπημένη ανάπτυξη των νεογνών.

Στο **Σχήμα 4.1.1** απεικονίζεται η διακύμανση στις συγκεντρώσεις της λακτόζης, της α- και της β- λακτόζης ανάλογα με την ζωική προέλευση του γάλακτος. Σε αυτό το σχήμα παραλείπονται οι συγκεντρώσεις στα γαϊδουρινά δείγματα γάλακτος όνου, λόγω του μικρού

διαθέσιμου αριθμού δειγμάτων τους. Επιπλέον, το γαϊδουρινό γάλα εμφανίζει μεγαλύτερη περιεκτικότητα και σε PCr και GPC. Γενικότερα, τα αμινοξέα αλανίνη, βαλίνη και ιστιδίνη φαίνεται να περιέχονται σε μικρή περιεκτικότητα στα γάλατα, με την μεγαλύτερη ποσότητα σε αλανίνη και βαλίνη να ανευρίσκεται στα γίδινα και τα γαϊδουρινά. Αντίθετα η κρεατίνη έχει παρόμοια συγκέντρωση σε όλων των ειδών τα γάλατα με αυτό του βουβαλίσσιου να περιέχει την μεγαλύτερη. Ακόμη, το βουβαλίσιο γάλα παρατηρείται να έχει τις μεγαλύτερες ποσότητες σε οξικό, κιτρικό, χολίνη, καρνιτίνη, φορμικό και GPE, ενώ το πρόβειο και το γίδινο γάλα χαρακτηρίζονται από την περιεκτικότητά τους σε UDP. Τέλος, ποσότητα τυραμίνης και PE παρατηρείται ότι ανιχνεύεται μόνο στο γίδινο γάλα.



Σχήμα 4.1.1. Διάγραμμα boxplot της συγκέντρωσης (μmol/gr) της λακτόζης, της α-λακτόζης και της β-λακτόζης στα αγελαδινά, τα πρόβεια, τα γίδινα και τα βουβαλίσια δείγματα γάλακτος.

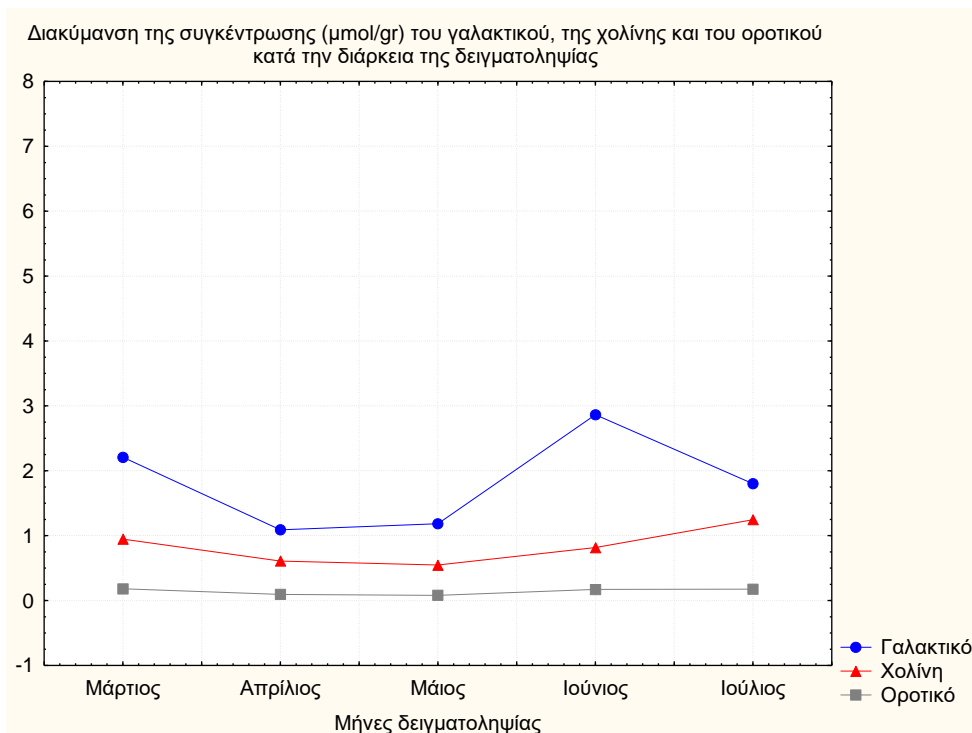
Πίνακας 4.1.2. Διάμεση, μέγιστη και ελάχιστη τιμή των μεταβολιτών του υδατικού εκχυλίσματος των αγελαδινών δειγμάτων γάλακτος από τα φάσματα ¹H και ³¹P NMR για όλους τους μήνες δειγματοληψίας υπολογισμένα σε μmol/gr.

Αγελαδινό γάλα									
Ένωση	Μάρτιος			Απρίλιος			Μάιος		
	Διάμεση τιμή	Μέγιστη	Ελάχιστη	Διάμεση τιμή	Μέγιστη	Ελάχιστη	Διάμεση τιμή	Μέγιστη	Ελάχιστη
Οξικό	0.34	0.80	0.12	0.49	0.68	0.18	0.45	0.93	0.27
Αλανίνη	0.03	0.05	0.00	0.02	0.05	0.01	0.02	0.04	0.00
Βαλίνη	0.02	0.07	0.00	0.02	0.05	0.00	0.01	0.02	0.00
Γαλακτικό	0.14	2.21	0.01	0.27	3.11	0.07	0.08	1.18	0.00
Ηλεκτρικό	0.03	0.09	0.00	0.03	0.07	0.01	0.02	0.06	0.01
Κιτρικό	6.66	10.35	0.82	6.74	11.51	3.42	5.53	8.23	2.74
Κρεατίνη	0.56	0.92	0.04	0.51	0.96	0.00	0.40	0.65	0.16
Χολίνη	1.08	1.94	0.10	1.12	1.44	0.46	0.66	1.26	0.22
Καρνιτίνη	1.92	3.92	0.11	1.79	4.20	1.06	1.91	2.86	0.69
β-λακτόζη	63.41	93.47	3.54	59.49	101.58	25.72	45.72	65.69	17.12
Λακτόζη	114.53	172.79	6.51	113.44	194.22	49.34	87.95	125.96	32.50
α-λακτόζη	45.50	67.27	2.56	42.07	71.96	18.10	32.84	46.69	0.00
β-γαλακτόζη	0.19	0.36	0.00	0.18	0.39	0.08	0.12	0.27	0.05
Σουκρόζη	0.00	0.27	0.00	0.00	3.13	0.00	0.00	3.38	0.00
Οροτικό	0.20	0.34	0.01	0.17	0.31	0.07	0.16	0.27	0.05
Φορμικό	0.12	0.48	0.06	0.07	0.09	0.05	0.09	0.13	0.05
Ιστιδίνη	0.06	0.11	0.00	0.06	0.12	0.05	0.05	0.07	0.00
Ουρακίλη	0.00 ⁻¹	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00
Φουμαρικό	0.00	0.01	0.00	0.00	0.005	0.00	0.00	0.01	0.00
Ιππουρικό	0.03	0.06	0.00	0.03	0.07	0.00	0.01	0.07	0.00
Ουριδίνη	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00	0.00
Τυραμίνη	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
PCr	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00	0.08	0.00
GPC	0.25	0.62	0.00	0.19	0.37	0.00	0.26	0.43	0.05
GPE	0.06	0.13	0.00	0.05	0.09	0.00	0.03	0.15	0.00
PC	0.00	0.13	0.00	0.00	0.06	0.00	0.00	0.08	0.00
PE	0.00	0.07	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.05	0.00
Glu-6P	0.00	0.20	0.00	0.03	0.24	0.00	0.00	0.00	0.00
UDP1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
UDP2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Ένωση	Ιούνιος			Ιούλιος		
	Διάμεση τιμή	Μέγιστη	Ελάχιστη	Διάμεση τιμή	Μέγιστη	Ελάχιστη
Οξικό	0.53	0.87	0.36	0.47	0.94	0.37
Αλανίνη	0.01	0.03	0.00	0.03	0.04	0.00
Βαλίνη	0.01	0.06	0.00	0.00	0.03	0.00
Γαλακτικό	0.10	6.78	0.04	0.26	4.91	0.04
Ηλεκτρικό	0.02	0.13	0.02	0.03	0.11	0.02
Κιτρικό	7.23	10.39	5.39	8.40	10.19	5.44
Κρεατίνη	0.62	1.01	0.40	0.65	0.85	0.40
Χολίνη	1.22	1.98	0.44	1.46	2.25	0.64
Καρνιτίνη	2.79	4.80	1.54	2.84	3.99	2.11
β-λακτόζη	68.10	108.95	44.94	78.51	89.82	42.73
Λακτόζη	129.36	210.16	84.33	150.04	172.82	82.25
α-λακτόζη	48.46	77.90	31.58	56.44	64.72	30.72
β-γαλακτόζη	0.27	0.42	0.10	0.33	0.70	0.18
Σουκρόζη	0.00	3.55	0.00	0.00	3.85	0.00
Οροτικό	0.21	0.39	0.13	0.22	0.34	0.11

Φορμικό	0.13	0.18	0.08	0.09	0.12	0.06
Ιστιδίνη	0.08	0.11	0.00	0.00	0.08	0.00
Ουρακίλη	0.00	0.03	0.00	0.00	0.03	0.00
Φουμαρικό	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
Ιππουρικό	0.04	0.05	0.00	0.04	0.06	0.00
Ουριδίνη	0.00	0.07	0.00	0.00	0.04	0.00
Τυραμίνη	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
PCr	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
GPC	0.35	0.40	0.19	0.37	0.59	0.26
GPE	0.08	0.09	0.02	0.08	0.09	0.04
PC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
PE	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Glu-6P	0.00	0.08	0.00	0.00	0.09	0.00
UDP1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
UDP2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Γενικότερα, η ύπαρξη αρκετών δειγμάτων αγελαδινού γάλακτος και για πολλούς διαφορετικούς μήνες βοήθησε στην καλύτερη μελέτη της διακύμανσης της σύστασής του ανάλογα τον μήνα δειγματοληψίας. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι οι περισσότεροι μεταβολίτες παρουσιάζουν μικρές αυξομειώσεις κατά την διάρκεια της δειγματοληψίας με τον μήνα Μάιο να αποτελεί τον μήνα με τη μέγιστη μείωση. Οι μεταβολίτες που παρουσίασαν αυτή την μείωση είναι το γαλακτικό, το κιτρικό, η χολίνη, η λακτόζη, η γαλακτόζη, το οροτικό και η GPE. Στο **Σχήμα 4.1.2** δίνεται ενδεικτικά η διακύμανση του γαλακτικού, της χολίνης και του οροτικού κατά την διάρκεια που πραγματοποιείται η δειγματοληψία. Η καρνιτίνη παρουσιάζει τους καλοκαιρινούς μήνες (Ιούνιο και Ιούλιο) μέγιστη περιεκτικότητα, ενώ για τα αμινοξέα αλανίνη και βαλίνη δεν παρατηρείται να αλλάζει σημαντικά η συγκέντρωσή τους στο γάλα με το πέρας των μηνών. Τέλος, η ουρακίλη, το φουμαρικό, η ουριδίνη, η τυραμίνη, η PCr, η PC και η PE βρίσκονται σε μηδενική ποσότητα στα αγελαδινά δείγματα ανεξαρτήτου εποχής.



Σχήμα 4.1.2: Διάγραμμα μελέτης της διακύμανσης της συγκέντρωσης (μmol/gr) του γαλακτικού, της χολίνης και του οροτικού στα αγελαδινά δείγματα κατά την διάρκεια της δειγματοληψίας.

Πίνακας 4.1.3. Διάμεση, μέγιστη και ελάχιστη τιμή των μεταβολιτών του υδατικού εκχυλίσματος των πρόβειων δειγμάτων γάλακτος από τα φάσματα ^1H και ^{31}P NMR για όλους τους μήνες δειγματοληψίας υπολογισμένα σε μmol/gr.

Ένωση	Πρόβειο γάλα								
	Μάιος			Ιούνιος			Ιούλιος		
	Διάμεση τιμή	Μέγιστη	Ελάχιστη	Διάμεση τιμή	Μέγιστη	Ελάχιστη	Διάμεση τιμή	Μέγιστη	Ελάχιστη
Οξικό	0.97	1.35	0.58	0.65	0.82	0.52	2.31	3.77	0.86
Αλανίνη	0.05	0.19	0.04	0.00	0.06	0.00	0.01	0.03	0.00
Βαλίνη	0.08	0.22	0.05	0.08	0.12	0.04	0.08	0.11	0.05
Γαλακτικό	3.00	8.80	0.13	5.03	21.45	0.43	11.20	21.87	0.52
Ηλεκτρικό	0.24	0.56	0.09	0.15	0.77	0.08	0.14	0.22	0.07
Κιτρικό	9.20	16.49	7.02	8.41	11.41	6.96	8.72	12.12	5.31
Κρεατίνη	0.51	0.74	0.42	0.43	0.58	0.39	0.50	0.53	0.46
Χολίνη	2.34	3.27	0.91	1.22	2.17	1.05	1.09	1.14	1.04
Καρνιτίνη	2.14	6.63	0.34	2.87	4.30	1.75	4.41	5.72	3.10
β-λακτόζη	65.00	130.10	57.51	59.44	82.92	52.92	70.61	81.95	59.28
Λακτόζη	123.36	252.24	110.80	112.24	157.99	99.92	135.52	158.66	112.38
α-λακτόζη	46.72	94.26	42.53	42.65	59.89	38.81	51.50	59.81	43.20
β-γαλακτόζη	0.58	1.58	0.20	0.35	0.94	0.16	0.66	1.07	0.25
Σουκρόζη	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Οροτικό	0.03	0.58	0.02	0.02	0.04	0.00	0.03	0.04	0.03
Φορμικό	0.37	0.75	0.22	0.34	0.43	0.29	0.61	0.67	0.57
Ιστιδίνη	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Ουρακίλη	0.16	0.32	0.05	0.08	0.17	0.01	0.06	0.11	0.00
Φουμαρικό	0.00	0.002	0.00	0.00	0.01	0.00	0.001	0.002	0.00
Ιππουρικό	0.05	0.09	0.00	0.00	0.07	0.00	0.04	0.09	0.00

Ουριδίνη	0.18	0.36	0.07	0.13	0.30	0.02	0.18	0.28	0.09
Τυραμίνη	0.00	0.03	0.00	0.02	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00
PCr	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
GPC	0.24	0.51	0.00	0.17	0.62	0.00	0.52	0.64	0.39
GPE	0.07	0.17	0.00	0.09	0.12	0.00	0.15	0.16	0.14
PC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
PE	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Glu-6P	0.18	0.40	0.00	0.13	0.42	0.00	0.03	0.05	0.00
UDP1	0.44	0.74	0.28	0.21	0.67	0.00	0.20	0.41	0.00
UDP2	0.35	0.67	0.00	0.00	0.50	0.00	0.15	0.29	0.00

Στο πρόβειο γάλα παρατηρήθηκε ότι το οξικό, το φορμικό, η καρνιτίνη, η βαλίνη, το γαλακτικό, το κιτρικό και η GPE αυξήθηκαν κατά την διάρκεια της δειγματοληψίας, με μια απότομη αύξηση των τριών πρώτων μεταβολιτών τον μήνα Ιούλιο. Αντίθετη διακύμανση παρατηρήθηκε για την αλανίνη, την κρεατίνη, την χολίνη, την λακτόζη, την γαλακτόζη, την ουρακίλη, το ιππουρικό, την ουριδίνη, την UDP1 και την Glu-6P που μειώθηκαν για την ίδια περίοδο. Τέλος, ελάχιστη ποσότητα τυραμίνης σημειώθηκε μόνο τον μήνα Ιούνιο, ενώ παρατηρήθηκε ότι υπήρχε μηδενική ποσότητα PCr, PC, και PE για όλους τους μήνες.

Πίνακας 4.1.4. Διάμεση, μέγιστη και ελάχιστη τιμή των μεταβολιτών του υδατικού εκχυλίσματος των γίδινων δειγμάτων γάλακτος από τα φάσματα ^1H και ^{31}P NMR για όλους τους μήνες δειγματοληψίας υπολογισμένα σε $\mu\text{mol}/\text{gr}$.

Ένωση	Γίδινο γάλα					
	Μάιος			Ιούνιος		
	Διάμεση τιμή	Μέγιστη	Ελάχιστη	Διάμεση τιμή	Μέγιστη	Ελάχιστη
Οξικό	0.41	1.08	0.33	0.42	0.75	0.39
Αλανίνη	0.05	0.06	0.00	0.06	0.07	0.06
Βαλίνη	0.13	0.14	0.05	0.12	0.18	0.08
Γαλακτικό	2.95	20.81	1.03	0.46	0.62	0.34
Ηλεκτρικό	0.11	0.26	0.08	0.10	0.14	0.08
Κιτρικό	6.04	6.09	2.55	5.63	6.84	4.70
Κρεατίνη	0.80	0.82	0.64	0.82	1.52	0.78
Χολίνη	0.44	0.95	0.37	0.49	0.52	0.46
Καρνιτίνη	2.56	3.09	2.00	3.07	4.60	2.64
β -λακτόζη	61.50	67.80	58.62	64.80	107.89	64.48
Λακτόζη	119.23	129.38	113.55	123.13	210.18	122.75
α -λακτόζη	45.13	49.73	42.77	47.15	79.52	46.26
β -γαλακτόζη	0.08	0.18	0.06	0.05	0.10	0.05
Σουκρόζη	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Οροτικό	0.02	0.02	0.01	0.02	0.04	0.02
Φορμικό	0.18	0.19	0.15	0.40	0.81	0.24
Ιστιδίνη	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Ουρακίλη	0.02	0.04	0.00	0.00	0.03	0.00
Φουμαρικό	0.004	0.01	0.002	0.01	0.01	0.01
Ιππουρικό	0.11	0.12	0.09	0.21	0.28	0.03
Ουριδίνη	0.22	0.42	0.15	0.22	0.27	0.20
Τυραμίνη	0.02	0.02	0.00	0.02	0.03	0.00
PCr	0.15	0.17	0.08	0.10	0.14	0.10

GPC	0.10	0.12	0.00	0.17	0.20	0.10
GPE	0.04	0.06	0.00	0.05	0.06	0.03
PC	0.23	0.29	0.18	0.25	0.26	0.17
PE	0.07	0.16	0.03	0.09	0.12	0.09
Glu-6P	0.00	0.16	0.00	0.00	0.04	0.00
UDP1	0.62	0.63	0.39	0.43	0.80	0.35
UDP2	0.39	0.60	0.33	0.58	0.67	0.55

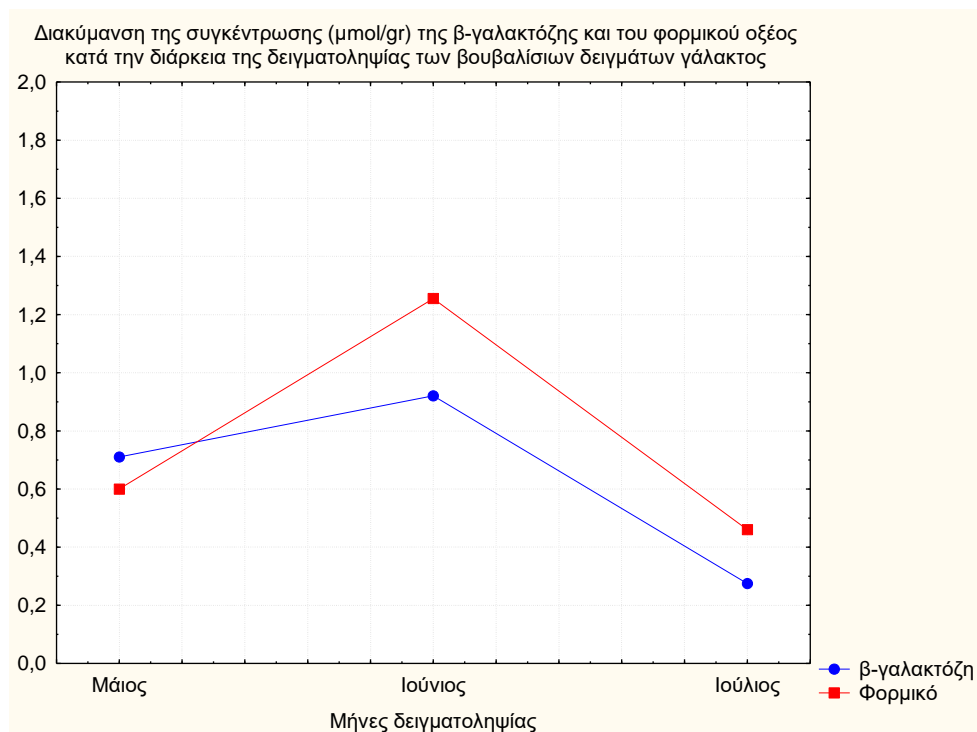
Στα γίδινα δείγματα ο αριθμός των δειγμάτων ήταν σαφώς λιγότερος από τα προηγούμενα είδη που προαναφέρθηκαν με τους μήνες δειγματοληψίας να φτάνουν τους δύο. Ωστόσο, παρατηρήθηκαν ορισμένες διακυμάνσεις στην σύσταση και συγκεκριμένα το γαλακτικό μειώνεται απότομα από τον έναν στον άλλον μήνα, ενώ το κιτρικό, η λακτόζη, η γαλακτόζη και η φωσφοκρεατίνη μειώνονται ομαλά. Αντιθέτως, το φορμικό και το ιππουρικό παρουσίασαν αισθητή αύξηση σε αυτούς τους δύο μήνες δειγματοληψίας, ενώ η χολίνη και η καρνιτίνη ομαλή αύξηση. Σημαντικό να αναφερθεί είναι το γεγονός ότι παρατηρήθηκε η UDP2 να αυξάνεται, ενώ η UDP1 να μειώνεται από τον Μάιο στον Ιούνιο. Τέλος, οι υπόλοιποι μεταβολίτες του γάλακτος παρατηρείται να παραμένουν σε σταθερές συγκεντρώσεις.

Πίνακας 4.1.5. Διάμεση, μέγιστη και ελάχιστη τιμή των μεταβολιτών του υδατικού εκχυλίσματος των βουβαλίσσιων δειγμάτων γάλακτος από τα φάσματα ^1H και ^{31}P NMR για όλους τους μήνες δειγματοληψίας υπολογισμένα σε $\mu\text{mol/gr}$.

Βουβαλίσσιο γάλα									
Ένωση	Μάιος			Ιούνιος			Ιούλιος		
	Διάμεση τιμή	Μέγιστη	Ελάχιστη	Διάμεση τιμή	Μέγιστη	Ελάχιστη	Διάμεση τιμή	Μέγιστη	Ελάχιστη
Οξικό	1.52	1.68	0.73	1.29	1.59	0.53	0.66	1.00	0.55
Αλανίνη	0.05	0.08	0.04	0.03	0.04	0.02	0.06	0.07	0.03
Βαλίνη	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Γαλακτικό	0.91	2.06	0.11	0.97	1.63	0.10	0.20	0.84	0.06
Ηλεκτρικό	0.25	0.52	0.05	0.19	0.63	0.05	0.07	0.10	0.04
Κιτρικό	7.91	11.00	5.65	6.16	9.06	5.35	7.76	8.20	5.32
Κρεατίνη	1.15	2.03	0.78	0.74	1.63	0.63	1.11	1.20	0.54
Χολίνη	2.27	2.65	1.76	1.41	1.95	0.79	1.61	2.08	1.14
Καρνιτίνη	3.56	7.59	1.27	3.08	6.85	2.10	4.46	5.50	3.17
β-λακτόζη	81.75	136.56	62.91	60.52	100.88	56.62	80.97	85.36	64.72
Λακτόζη	157.89	268.78	123.05	118.22	192.87	110.26	158.22	167.04	125.52
α-λακτόζη	59.10	100.36	47.78	44.90	72.58	42.09	59.02	61.86	46.80
β-γαλακτόζη	0.27	0.71	0.20	0.71	0.92	0.21	0.28	0.30	0.24
Σουκρόζη	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Οροτικό	0.07	0.13	0.03	0.05	0.09	0.03	0.05	0.07	0.04
Φορμικό	0.57	0.99	0.47	1.10	1.27	0.80	0.53	0.72	0.46
Ιστιδίνη	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Ουρακίλη	0.00	0.07	0.00	0.00	0.08	0.00	0.00	0.02	0.00
Φουμαρικό	0.00	0.00	0.00	0.00	0.002	0.00	0.002	0.01	0.00
Ιππουρικό	0.04	0.16	0.02	0.01	0.03	0.00	0.03	0.10	0.01
Οουριδίνη	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00
Τυραμίνη	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
PCr	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.05	0.00

GPC	0.02	0.52	0.00	0.17	0.50	0.00	0.40	0.59	0.25
GPE	0.08	0.33	0.00	0.12	0.19	0.00	0.16	0.23	0.09
PC	0.00	0.06	0.00	0.04	0.10	0.00	0.00	0.08	0.00
PE	0.00	0.07	0.00	0.02	0.08	0.00	0.02	0.08	0.00
Glu-6P	0.39	0.52	0.07	0.23	0.53	0.00	0.00	0.13	0.00
UDP1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
UDP2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Στα βουβαλίσια δείγματα γάλακτος το οξικό παρατηρείται να μειώνεται αισθητά κατά την διάρκεια της δειγματοληψίας, ενώ η β-γαλακτόζη, το φορμικό και το γαλακτικό να παρουσιάζουν αύξηση τον Ιούνιο με τον τελευταίο μεταβολίτη να μειώνεται απότομα τον επόμενο μήνα. Στο **Σχήμα 4.1.3** παρατίθεται ενδεικτικό διάγραμμα απεικόνισης της διακύμανσης των συγκεντρώσεων της β-γαλακτόζης και του φορμικού κατά την διάρκεια των μηνών δειγματοληψίας. Η αλανίνη, το κιτρικό, η κρεατίνη, η χολίνη, η καρνιτίνη, η λακτόζη και το ιππουρικό παρουσιάζουν μια μείωση τον Ιούνιο, ενώ αντιθέτως το φορμικό παρουσιάζει αύξηση τον αντίστοιχο μήνα. Αντίστοιχα, η GPC και η GPE παρατηρείται ότι αυξάνονται με το πέρας των μηνών, ενώ η Glu-6P να μειώνεται μέχρι να φτάσει σε μηδενική ποσότητα τον μήνα Ιούλιο. Τέλος, οι υπόλοιποι μεταβολίτες του γάλακτος παρατηρείται να παραμένουν σε σταθερές συγκεντρώσεις.



Σχήμα 4.1.3. Διάγραμμα μελέτης της διακύμανσης της συγκέντρωσης (μmol/gr) της β-γαλακτόζης και του φορμικού στα βουβαλίσια δείγματα κατά την διάρκεια της δειγματοληψίας.

4.2 Ποσοτικός προσδιορισμός των μεταβολιτών του άπολου εκχυλίσματος

Ομοίως πραγματοποιήθηκε η ολοκλήρωση των φασμάτων ^1H NMR του άπολου εκχυλίσματος των δειγμάτων γάλακτος και υπολογίστηκε η % περιεκτικότητα των λιπαρών τους σύμφωνα με τις εξισώσεις που παρουσιάστηκαν στο κεφάλαιο 2. Τα αποτελέσματα των υπολογισμών παρουσιάζονται στο παράρτημα. Ακολουθούν πίνακες με την διάμεση, μέγιστη και την ελάχιστη τιμή της εκατοστιαίας περιεκτικότητας των λιπαρών οξέων για τα διάφορα είδη γαλακτοπαραγωγού ζώου αλλά και για τους διαφορετικούς μήνες δειγματοληψίας για το κάθε είδος ξεχωριστά, με εξαίρεση αυτής του γαϊδουριού.

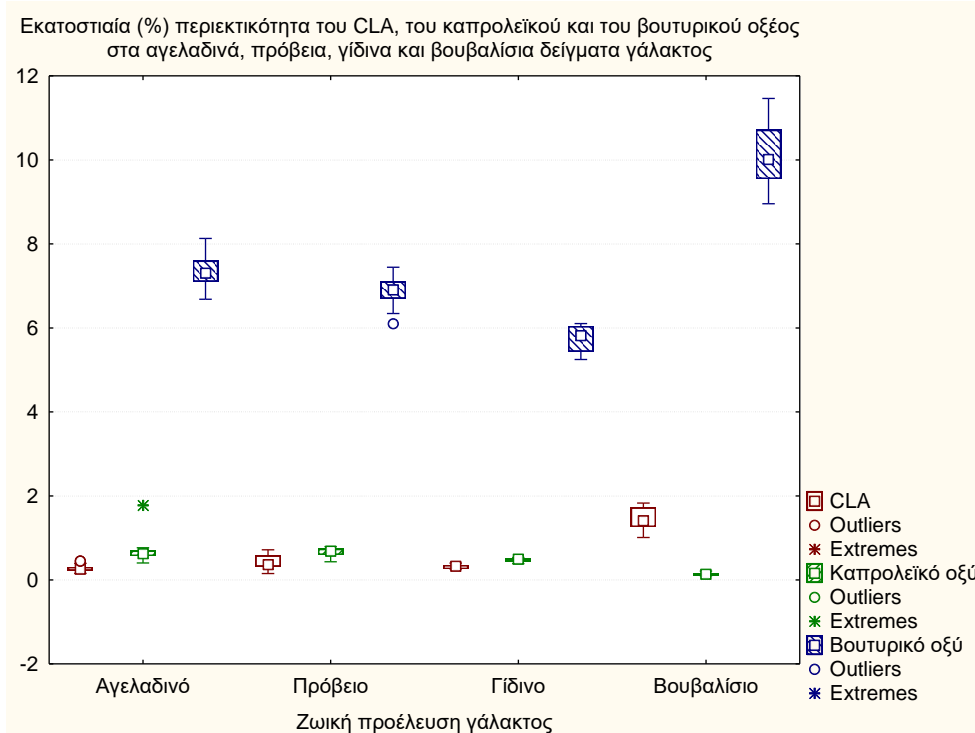
Πίνακας 4.2.1. Διάμεση, μέγιστη και ελάχιστη τιμή της εκατοστιαίας (%) περιεκτικότητας των μεταβολιτών του άπολου εκχυλίσματος των δειγμάτων γάλακτος από τα φάσματα ^1H NMR ως προς την ζωική προέλευση του γαλακτοπαραγωγού ζώου.

Ένωση	Αγελαδινό			Πρόβειο			Γίδινο		
	Διάμεση τιμή	Μέγιστη	Ελάχιστη	Διάμεση τιμή	Μέγιστη	Ελάχιστη	Διάμεση τιμή	Μέγιστη	Ελάχιστη
CLA	0.26	0.45	0.16	0.36	0.72	0.15	0.33	0.40	0.26
Καπρολεϊκό οξύ	0.62	1.78	0.40	0.69	0.79	0.43	0.49	0.53	0.39
Βουτυρικό οξύ	7.30	8.13	6.68	6.91	7.45	6.10	5.82	6.10	5.25
Λινολενικό οξύ	0.32	0.74	0.12	0.55	0.73	0.36	0.56	0.94	0.36
Λινελαϊκό οξύ	2.72	3.74	2.30	2.87	3.12	2.13	2.34	2.61	2.23
Ελαϊκό οξύ	20.54	27.19	17.65	18.30	21.28	13.11	18.43	19.00	17.00
Κορεσμένα λιπαρά οξέα	68.47	71.66	61.58	71.08	76.86	66.93	72.30	74.59	71.81
Στερόλες	0.18	0.23	0.16	0.15	0.19	0.14	0.19	0.22	0.16
1,2-διγλυκερίδια	2.11	2.99	1.58	0.81	1.81	0.46	0.91	0.96	0.77
2-μονογλυκερίδια	0.18	0.54	0.05	0.02	0.10	0.00	0.03	0.08	0.00

Ένωση	Βουβαλίσιο			Όνου		
	Διάμεση τιμή	Μέγιστη	Ελάχιστη	Διάμεση τιμή	Μέγιστη	Ελάχιστη
CLA	1.41	1.83	1.01	0.00	0.00	0.00
Καπρολεϊκό οξύ	0.13	0.21	0.10	1.62	2.09	0.39
Βουτυρικό οξύ	10.01	11.46	8.96	0.48	1.23	0.43
Λινολενικό οξύ	0.82	1.26	0.70	4.23	8.63	2.85
Λινελαϊκό οξύ	1.81	2.44	1.59	7.54	15.95	6.61
Ελαϊκό οξύ	25.12	28.32	22.65	22.53	28.19	13.64
Κορεσμένα λιπαρά οξέα	60.98	62.94	57.80	59.75	69.76	58.19
Στερόλες	0.11	0.12	0.10	0.27	0.35	0.22
1,2-διγλυκερίδια	1.41	2.35	1.09	2.05	3.89	1.37
2-μονογλυκερίδια	0.04	0.15	0.00	2.24	2.86	0.71

Όπως παρατηρείται και από την διάμεση τιμή των μεταβολιτών για τα διάφορα είδη γάλακτος, η ζωική προέλευση του επηρεάζει σημαντικά και την επί τοις εκατό περιεκτικότητα των λιπαρών σε αυτό. Πιο συγκεκριμένα, ορισμένες σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα είδη αποτελούν η εκατοστιαία περιεκτικότητα του CLA, του βουτυρικού, του καπρολεϊκού, του

λινολενικού, του λινελαϊκού οξέος και των 2-μονογλυκεριδίων. Στο **Σχήμα 4.2.1** που ακολουθεί παρουσιάζονται οι διακυμάνσεις της επί τοις εκατό περιεκτικότητας CLA, καπρολεϊκού και βουτυρικού οξέος ως προς την ζωική προέλευση του γάλακτος. Σε αυτό το σχήμα παραλείπονται οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις στα γαϊδουρινά γάλατα λόγω του μικρού αριθμού διαθέσιμων δειγμάτων.



Σχήμα 4.2.1. Διάγραμμα boxplot για την μελέτη της εκατοστιαίας (%) περιεκτικότητας του CLA, του καπρολεϊκού και του βουτυρικού οξέος στα αγελαδινά, τα πρόβεια, τα γίδινα και τα βουβαλίσια δείγματα γάλακτος.

Το CLA βρέθηκε στην παρούσα μελέτη να περιέχεται σε μεγάλη ποσότητα στο βουβαλίσιο γάλα σε σχέση με τα υπόλοιπα γάλατα, σε συμφωνία με την βιβλιογραφία [81]. Ωστόσο αξίζει να αναφερθεί ότι σε μελέτη του H. Abbas και των συνεργατών του [59] και για την ίδια περίοδο περίπου δειγματοληψίας (Μάιος-Ιούλιος) μέσω υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματοσκοπία μάζας αναφέρθηκε αρκετά μικρότερη ποσότητα από αυτό τον μεταβολίτη. Μετά το βουβαλίσιο γάλα ακολουθούν, σε συμφωνία με τα αποτελέσματα από τους G. Zervas και E. Tsiplakou [13], [82], το πρόβειο και το γίδινο, τα οποία παρουσιάζουν μικρή διαφορά μεταξύ τους. Στην συγκεκριμένη μελέτη των G. Zervas και E. Tsiplakou [82] θέλησαν να εξακριβώσουν αν η μεγαλύτερη ποσότητα του CLA που παρατηρήθηκε στο πρόβειο γάλα έναντι του γιδίνου, διαφορά που επιβεβαιώνεται και στην παρούσα μελέτη, οφείλεται στο είδος

του ζώου και όχι μόνο στην διατροφή που ακολουθεί και για αυτό τον σκοπό έγινε εκτροφή αυτών των δύο ειδών γαλακτοπαραγωγών ζώων υπό ελεγχόμενες συνθήκες.

Ομοίως το βουτυρικό φαίνεται να υπάρχει στο βουβαλίσιο γάλα σε πολύ μεγάλη περιεκτικότητα σε σχέση με τα δεδομένα που αναφέρονται στην μελέτη του H. Abbas και των συνεργατών του [59], όπου για παρόμοιους μήνες που έγινε η δειγματοληψία (Μάιος-Ιούλιος) αναφέρεται χαμηλότερη ποσότητα βουτυρικού. Και πάλι πιθανώς αυτές οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στο CLA και το βουτυρικό οξύ από την συγκεκριμένη μελέτη να οφείλονται στον διαφορετικό τρόπο και τόπο εκτροφής των βουβαλίων. Μετά το βουβαλίσιο, ακολουθεί σε περιεκτικότητα σε βουτυρικό οξύ το αγελαδινό γάλα, παρατήρηση που συμφωνεί και με την εργασία της M. Markiewicz-Keszycska και των συνεργατών της [83]. Συγκεκριμένα, σε αυτό το άρθρο έγινε σύγκριση των λιπαρών του αγελαδινού, του πρόβειου και του γίδινου γάλακτος και βρέθηκε ότι το αγελαδινό έχει μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε βουτυρικό, με την ποσότητά του να αναφέρεται λίγο χαμηλότερη από αυτή της παρούσας εργασίας.

Για το γαϊδουρινό γάλα παρατηρείται ότι χαρακτηρίζεται από χαμηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά, αλλά υψηλό ποσοστό μονοακόρεστων (ελαϊκό οξύ) και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (λινολενικό και λινελαϊκό οξύ), παρατήρηση που συμφωνεί και τονίζεται ιδιαίτερα επίσης στην έρευνα του L. Li και των συνεργατών του [11]. Τέλος, το γίδινο γάλα περιέχει την μεγαλύτερη εκατοστιαία ποσότητα κορεσμένων λιπαρών οξέων σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη, γεγονός που σύμφωνα με τον Young W. Park [84] οφείλεται εν μέρει στην ύπαρξη μεγάλης λιποπρωτεϊνικής δραστηριότητας της λιπάσης.

Πίνακας 4.2.2. Διάμεση, μέγιστη και ελάχιστη τιμή της εκατοστιαίας (%) περιεκτικότητας των μεταβολιτών του άπολου εκχυλίσματος των αγελαδινών δειγμάτων γάλακτος από τα φάσματα ¹H NMR για όλους τους μήνες δειγματοληψίας.

Αγελαδινό γάλα									
Ένωση	Μάρτιος			Απρίλιος			Μάιος		
	Διάμεση τιμή	Μέγιστη	Ελάχιστη	Διάμεση τιμή	Μέγιστη	Ελάχιστη	Διάμεση τιμή	Μέγιστη	Ελάχιστη
CLA	0.30	0.33	0.20	0.23	0.36	0.16	0.25	0.45	0.21
Καπρολεϊκό οξύ	0.66	0.72	0.46	0.61	0.76	0.53	0.67	0.71	0.41
Βουτυρικό οξύ	7.44	8.13	6.70	7.20	8.11	6.91	7.23	7.73	6.68
Λινολενικό οξύ	0.33	0.52	0.20	0.31	0.54	0.22	0.30	0.51	0.18
Λινελαϊκό οξύ	2.67	3.38	2.37	2.73	3.58	2.30	2.69	3.58	2.38
Ελαϊκό οξύ	20.62	24.50	18.75	20.06	23.27	18.78	20.00	24.79	18.59
Κορεσμένα λιπαρά οξέα	68.61	71.66	64.47	68.67	70.82	65.82	69.02	71.53	63.23
Στερόλες	0.18	0.20	0.16	0.18	0.21	0.18	0.18	0.23	0.16
1,2-διγλυκερίδια	2.08	2.39	1.89	2.38	2.99	1.86	2.25	2.56	1.88
2-μονογλυκερίδια	0.20	0.52	0.14	0.17	0.39	0.06	0.23	0.54	0.09

Ένωση	Ιούνιος			Ιούλιος		
	Διάμεση τιμή	Μέγιστη	Ελάχιστη	Διάμεση τιμή	Μέγιστη	Ελάχιστη
CLA	0.26	0.39	0.20	0.25	0.45	0.18
Καπρολεϊκό οξύ	0.61	0.71	0.44	0.59	1.78	0.40
Βουτυρικό οξύ	7.43	7.77	6.72	7.40	7.96	6.98
Λινολενικό οξύ	0.30	0.74	0.12	0.31	0.50	0.18
Λινελαϊκό οξύ	2.94	3.74	2.40	2.76	3.51	2.31
Ελαϊκό οξύ	21.37	25.51	17.65	20.82	27.19	19.05
Κορεσμένα λιπαρά οξέα	67.79	71.61	62.99	68.04	70.95	61.58
Στερόλες	0.19	0.20	0.18	0.18	0.20	0.17
1,2-διγλυκερίδια	2.03	2.48	1.84	1.91	2.42	1.58
2-μονογλυκερίδια	0.15	0.44	0.07	0.16	0.46	0.05

Για τα λιπαρά των αγελαδινών δειγμάτων γάλακτος που αναλύθηκαν σε βάθος μηνών (Μάιος-Ιούνιος), δεν παρατηρήθηκε καμιά αισθητή και σημαντική διαφορά στην σύσταση τους. Πιο συγκεκριμένα, διακρίνονται ορισμένες μικρές μόνο διακυμάνσεις στην σύσταση του λινελαϊκού, του λινολενικού, του ελαϊκού και των 2-μονογλυκεριδίων και μια μικρή αύξηση μέχρι τον Απρίλιο για τα 1,2-διγλυκερίδια.

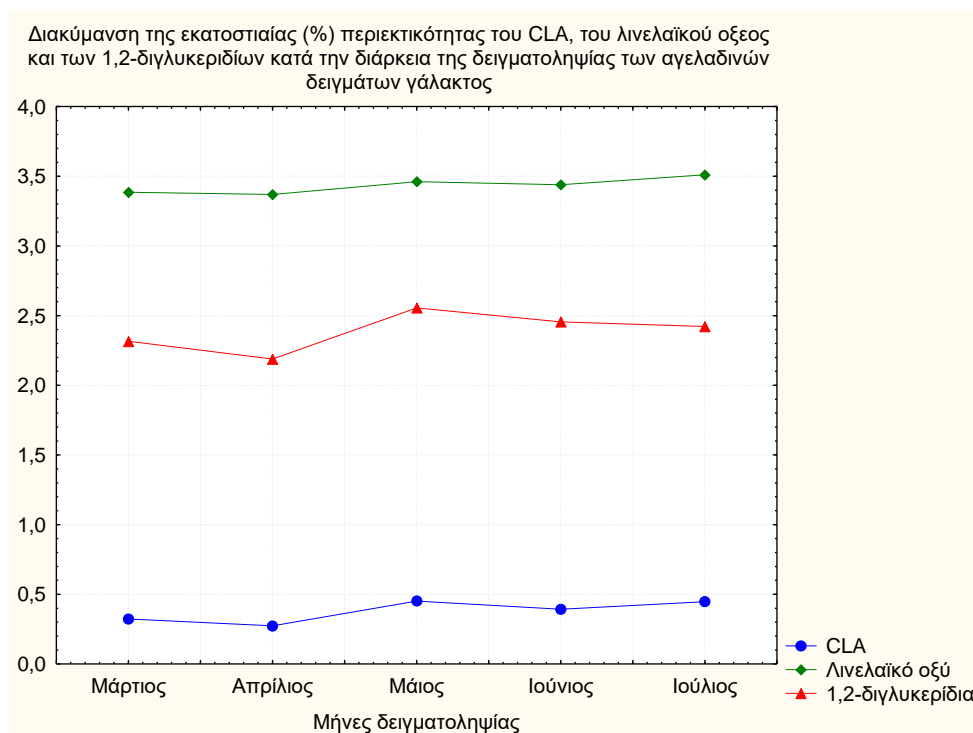
Από την μελέτη του D. Zhu και των συνεργατών του [60], μέσω της τεχνικής της UHPLC-QToF/MS για δείγματα αγελαδινού γάλακτος που ελήφθησαν από τον Οκτώβριο του 2017 μέχρι τον Απρίλιο του 2018, βρέθηκε ότι οι συγκεντρώσεις του λινολενικού και του λινελαϊκού ήταν μέγιστες στις αρχές και στα τέλη της περιόδου δειγματοληψίας. Ωστόσο, στην παρούσα έρευνα που η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε από τον Μάιο μέχρι τον Ιούλιο, παρατηρείται ότι παραμένουν σχετικά σταθερές. Τέλος, παρατηρείται μια σχετική σταθερότητα στην εκατοστιαία περιεκτικότητα των υπόλοιπων λιπαρών οξέων, με μικρές αυξομειώσεις κατά την περίοδο της δειγματοληψίας.

Πίνακας 4.2.3. Διάμεση, μέγιστη και ελάχιστη τιμή της εκατοστιαίας (%) περιεκτικότητας των μεταβολιτών του άπολου εκχυλίσματος των πρόβειων δειγμάτων γάλακτος από τα φάσματα ¹H NMR για όλους τους μήνες δειγματοληψίας.

Πρόβειο γάλα									
Ένωση	Μάιος			Ιούνιος			Ιούλιος		
	Διάμεση τιμή	Μέγιστη	Ελάχιστη	Διάμεση τιμή	Μέγιστη	Ελάχιστη	Διάμεση τιμή	Μέγιστη	Ελάχιστη
CLA	0.41	0.72	0.15	0.33	0.61	0.26	0.36	0.36	0.36
Καπρολεϊκό οξύ	0.68	0.75	0.43	0.69	0.79	0.50	0.67	0.74	0.60
Βουτυρικό οξύ	6.81	7.45	6.41	6.93	7.11	6.10	6.86	6.94	6.78
Λινολενικό οξύ	0.56	0.73	0.36	0.50	0.66	0.40	0.56	0.57	0.56
Λινελαϊκό οξύ	2.87	3.12	2.13	2.68	2.94	2.16	2.95	2.98	2.92
Ελαϊκό οξύ	17.89	21.28	13.11	18.66	19.83	16.14	18.20	19.53	16.86
Κορεσμένα λιπαρά οξέα	71.85	76.86	66.93	70.27	73.92	69.72	71.07	72.52	69.62

Στερόλες	0.15	0.17	0.14	0.15	0.19	0.14	0.16	0.16	0.15
1,2-διγλυκερίδια	0.86	1.81	0.78	0.65	0.82	0.46	0.73	0.83	0.62
2-μονογλυκερίδια	0.05	0.10	0.01	0.00	0.03	0.00	0.05	0.09	0.01

Όσον αφορά τη σύσταση του πρόβειου γάλακτος και πως αυτή κυμαίνεται ανάλογα με το μήνα δειγματοληψίας παρατηρήθηκε μια μικρή αύξηση του CLA, του λινολενικού, του λινελαϊκού οξέος, των 1,2-διγλυκεριδίων και των 2-μονογλυκεριδίων για τον μήνα του Μαΐου και μια μικρή μείωση τον επόμενο μήνα. Στο **Σχήμα 4.2.2** απεικονίζεται η διακύμανση που παρατηρείται στην εκατοστιαία περιεκτικότητα του CLA, του λινελαϊκού οξέος και των 1,2-διγλυκεριδίων στους μήνες δειγματοληψίας. Αντιθέτως, με τους προηγούμενους μεταβολίτες, το βουτυρικό και το ελαϊκό εμφάνισε μια μικρή αύξηση αυτό τον μήνα. Τέλος, για τους υπόλοιπους μεταβολίτες (καπρολεϊκό, κορεσμένα λιπαρά οξέα και στερόλες) δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική διακύμανση, πέρα από πολύ μικρές αυξομειώσεις.



Σχήμα 4.2.2. Διάγραμμα μελέτης της εκατοστιαίας (%) περιεκτικότητας του CLA, του λινελαϊκού οξέος και των 1,2-διγλυκεριδίων κατά την διάρκεια της δειγματοληψίας στα αγελαδινά δείγματα γάλακτος.

Πίνακας 4.2.4. Διάμεση, μέγιστη και ελάχιστη τιμή της εκατοστιαίας (%) περιεκτικότητας των μεταβολιτών του άπολου εκχυλίσματος των γίδινων δειγμάτων γάλακτος από τα φάσματα ¹H NMR για όλους τους μήνες δειγματοληψίας.

Γίδινο γάλα						
Ένωση	Μάιος			Ιούνιος		
	Διάμεση τιμή	Μέγιστη	Ελάχιστη	Διάμεση τιμή	Μέγιστη	Ελάχιστη
CLA	0.35	0.35	0.26	0.31	0.40	0.26
Καπρολεϊκό οξύ	0.49	0.50	0.39	0.50	0.53	0.44
Βουτυρικό οξύ	6.04	6.10	5.73	5.44	5.91	5.25
Λινολενικό οξύ	0.59	0.94	0.36	0.52	0.73	0.40
Λινελαϊκό οξύ	2.30	2.61	2.23	2.37	2.41	2.26
Ελαϊκό οξύ	18.53	19.00	18.08	18.33	18.74	17.00
Κορεσμένα λιπαρά οξέα	72.02	72.58	71.91	73.25	74.59	71.81
Στερόλες	0.17	0.18	0.16	0.20	0.22	0.19
1,2-διγλυκερίδια	0.91	0.92	0.91	0.84	0.96	0.77
2-μονογλυκερίδια	0.02	0.05	0.02	0.04	0.08	0.00

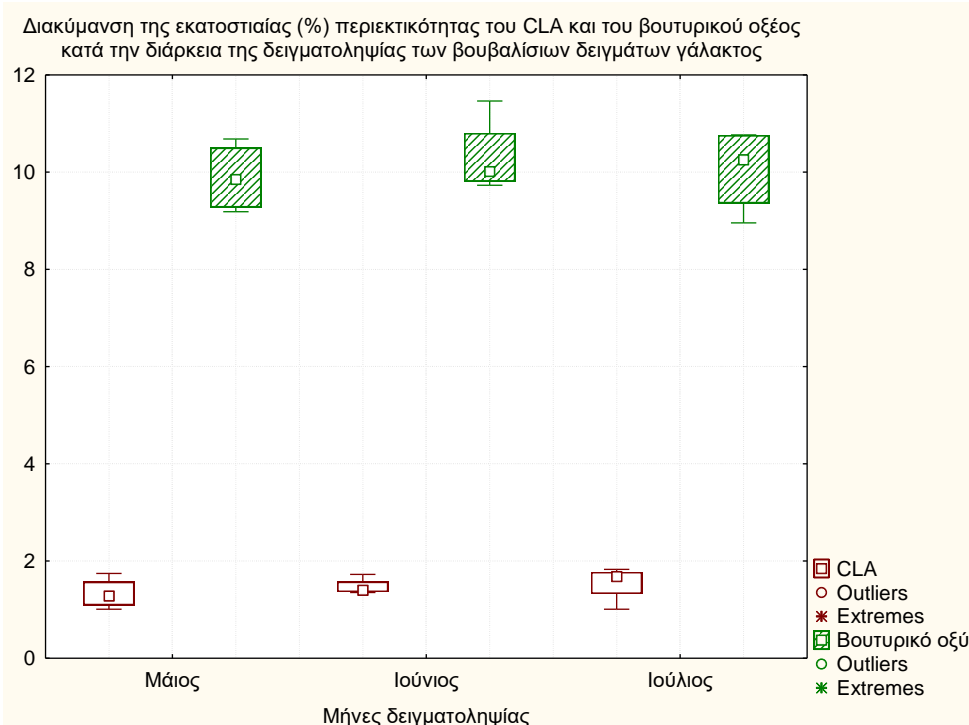
Στην περίπτωση των γίδινων δειγμάτων γάλακτος τα διαθέσιμα δείγματα δεν ήταν αρκετά, ούτε υπήρχε μεγάλη ποικιλία στους μήνες δειγματοληψίας. Ωστόσο, διακρίθηκαν μερικές μεταβολές και συγκεκριμένα το CLA, το βουτυρικό, το λινολενικό, το ελαϊκό και τα 1,2-διγλυκερίδια μειώθηκαν τον δεύτερο μήνα, ενώ αντιθέτως το λινελαϊκό, τα κορεσμένα λιπαρά οξέα και οι στερόλες αυξήθηκαν ελάχιστα. Τέλος, η εκατοστιαία περιεκτικότητα του καπρολεϊκού και των 2-μονογλυκεριδίων παρέμεινε σταθερή κατά την διάρκεια της δειγματοληψίας.

Πίνακας 4.2.5. Διάμεση, μέγιστη και ελάχιστη τιμή της εκατοστιαίας (%) περιεκτικότητας των μεταβολιτών του άπολου εκχυλίσματος των βουβαλίσων δειγμάτων γάλακτος από τα φάσματα ¹H NMR για όλους τους μήνες δειγματοληψίας.

Βουβαλίσιο γάλα									
Ένωση	Μάιος			Ιούνιος			Ιούλιος		
	Διάμεση τιμή	Μέγιστη	Ελάχιστη	Διάμεση τιμή	Μέγιστη	Ελάχιστη	Διάμεση τιμή	Μέγιστη	Ελάχιστη
CLA	1.29	1.75	1.01	1.40	1.73	1.35	1.68	1.83	1.01
Καπρολεϊκό οξύ	0.15	0.21	0.12	0.12	0.16	0.10	0.13	0.18	0.11
Βουτυρικό οξύ	9.85	10.68	9.19	10.01	11.46	9.73	10.26	10.77	8.96
Λινολενικό οξύ	0.79	1.19	0.73	0.85	1.26	0.82	0.74	0.97	0.70
Λινελαϊκό οξύ	1.74	2.29	1.68	2.01	2.44	1.85	1.76	2.12	1.59
Ελαϊκό οξύ	24.36	27.85	22.65	24.63	26.24	22.80	25.12	28.32	22.81

Κορεσμένα λιπαρά οξέα	61.88	62.73	58.45	60.59	61.86	59.47	60.54	62.94	57.80
Στερόλες	0.12	0.12	0.11	0.11	0.12	0.10	0.12	0.12	0.10
1,2-διγλυκερίδια	1.35	2.35	1.17	1.46	1.52	1.09	1.37	2.04	1.14
2-μονογλυκερίδια	0.05	0.11	0.00	0.02	0.04	0.00	0.05	0.15	0.02

Από τις μέσες τιμές των μεταβολιτών για τα δείγματα των βουβαλίσσιων δειγμάτων, παρατηρήθηκε σταθερή αύξηση του CLA και του βουτυρικού κατά την διάρκεια της δειγματοληψίας, ενώ οι υπόλοιποι μεταβολίτες δεν παρουσιάζουν κάποια σημαντική και αισθητή μεταβολή. Στο **Σχήμα 4.2.3** απεικονίζεται η εκατοστιαία περιεκτικότητα του CLA και του βουτυρικού και πως αυτή διακυμαίνεται κατά την διάρκεια της δειγματοληψίας.



Σχήμα 4.2.3. Διάγραμμα boxplot για την μελέτη της εκατοστιαίας (%) περιεκτικότητας του CLA και του βουτυρικού οξέος κατά την διάρκεια της δειγματοληψίας στα βουβαλίσσια δείγματα γάλακτος.

Στον **Πίνακα 4.2.6** συγκρίνονται οι πειραματικές τιμές ορισμένων σημαντικών συστατικών του γάλακτος για όλα τα είδη γαλακτοπαραγωγών ζώων που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία με την ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία, προκειμένου να γίνουν αντιληπτές τυχόν ομοιότητες ή διαφορές στα πειραματικά δεδομένα. Στην περίπτωση της λακτόζης έγινε κατάλληλη μετατροπή των μονάδων προκειμένου να γίνουν άμεσα συγκρίσιμες οι αντίστοιχες τιμές.

Παρατηρείται ότι για το CLA και το βουτυρικό οξύ οι τιμές της βιβλιογραφίας με τις πειραματικές τιμές αυτής της εργασίας είναι σχετικά κοντά και εμφανίζουν παρόμοιες διακυμάνσεις ανά είδος. Συγκεκριμένα, την μεγαλύτερη ποσότητα CLA εμφανίζουν τα βουβαλίσια γάλατα, ενώ το γαϊδουρινό εμφανίζει έλλειψη αυτού του οξέος. Τις μεγαλύτερες ποσότητες βουτυρικού οξέος έχουν το αγελαδινό και το βουβαλίσιο γάλα, ενώ το γαϊδουρινό έχει την μικρότερη συγκέντρωση από όλα. Αντιθέτως, στην περίπτωση του λινολενικού και του λινελαϊκού οξέος τα γαϊδουρινά γάλατα είναι αυτά που περιέχουν τις μεγαλύτερες ποσότητες αυτών των μεταβολιτών, ενώ λίγες διαφορές μεταξύ των πειραματικών και βιβλιογραφικών τιμών παρατηρούνται στα υπόλοιπα είδη. Επιπλέον, στην παρούσα μελέτη μεγαλύτερη επί τοις εκατό περιεκτικότητα σε κορεσμένα λιπαρά οξέα είχαν τα πρόβεια και τα γίδινα, ενώ στις τιμές που παρατίθενται από την βιβλιογραφία το αγελαδινό φαίνεται να υπερτερεί. Τέλος, η περιεκτικότητα της λακτόζης σε όλα τα είδη φαίνεται να είναι παρόμοια, εκτός από το γαϊδουρινό είδος, το οποίο εμφανίζει αρκετά μεγαλύτερη συγκέντρωση λακτόζης. Στις αντίστοιχες πειραματικές τιμές το αγελαδινό, το πρόβειο και το γίδινο γάλα φαίνεται να είναι σχετικά στα ίδια επίπεδα όσον αφορά την λακτόζη, ενώ το βουβαλίσιο και το γαϊδουρινό εμφανίζουν μεγαλύτερες ποσότητες.

Όποιες μικρές διαφορές παρατηρούνται στις πειραματικές τιμές με αυτές της βιβλιογραφίας, ενδεχομένως να οφείλονται στην διαφορετική εποχή δειγματοληψίας, στον διαφορετικό τρόπο (διατροφή) και τόπο εκτροφής των γαλακτοπαραγωγών ζώων ή και στην διαφορετική φυλή κάθε είδους.

Πίνακας 4.2.6. Σύγκριση διάμεσων τιμών ορισμένων σημαντικών μεταβολιτών του γάλακτος για όλα τα δείγματα γάλακτος που αναλύθηκαν (αριστερή στήλη) σε σχέση με άλλες αντίστοιχες τιμές της βιβλιογραφίας (δεξιά στήλη).

	<u>Αγελαδινό</u>		<u>Πρόβειο</u>		<u>Γίδινο</u>		<u>Βουβαλίσιο</u>		<u>Γαϊδουρινό</u>	
CLA (%)	0.26	0.57 ^α	0.36	0.76 ^α	0.33	0.45 ^α	1.41	0.4-1 ^β	-	- ^δ
Βουτυρικό οξύ (%)	7.30	8.65 ^γ	6.91	6.06 ^γ	5.82	2.03 ^α	10.1	8.45 ^γ	0.48	1.06 ^γ
Λινολενικό οξύ (%)	0.32	0.13 ^γ	0.55	1.11 ^γ	0.56	0.77 ^α	0.82	0.42 ^γ	4.23	0.51 ^γ
Λινελαϊκό οξύ (%)	2.72	1.12 ^γ	2.87	2.62 ^γ	2.34	2.25 ^α	1.81	1.52 ^γ	7.54	5.53 ^γ
Κορεσμένα λιπαρά οξέα (%)	68.47	75.49 ^γ	71.08	70.97 ^γ	72.30	68.79 ^α	60.98	73.99 ^γ	59.75	57.96 ^γ
Λακτόζη (gr/Kg)	40.30	48 ^δ	41.86	48 ^δ	42.08	44 ^δ	50.15	48 ^δ	57.81	66 ^δ

Βιβλιογραφική αναφορά τιμών: α= [85], β= [81], γ= [86], δ= [87]

ΚΕΦΑΛΑΙΑ 5 - Μεταβολομική ανάλυση ως προς την ζωική προέλευση του γάλακτος

Συνολικά ταυτοποιήθηκαν και υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις 30 μεταβολιτών στο υδατικό εκχύλισμα, μέσω των φασμάτων ^1H και ^{31}P NMR, και 10 στο άπολο μέσω των φασμάτων ^1H NMR για κάθε ένα από τα διαθέσιμα 91 δείγματα γάλακτος. Από την ολοκλήρωση όλων των φασμάτων NMR που ελήφθησαν και σχολιάστηκαν σε προηγούμενα κεφάλαια, προέκυψε ένα σετ δεδομένων το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη πολυπαραμετρικών στατιστικών μοντέλων.

Ανάλογα με το σκοπό της ανάλυσης επιλέχθηκαν τα αντίστοιχα δεδομένα και το κατάλληλο μοντέλο ανάλυσης. Όλα τα στατιστικά μοντέλα (PCA και OPLS-DA) που θα παρουσιαστούν προκύπτουν μετά από εσωτερική επικύρωση (cross validation) που διενεργείται από το ίδιο το λογισμικό. Για αυτή την εσωτερική επικύρωση των μοντέλων πραγματοποιείται πρωτίστως ο αποκλεισμός του 1/7 των συνολικών δειγμάτων που αναλύθηκαν, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν μετά την ανάπτυξη τους για την επαλήθευση της στατιστικής ισχύος τους. Επομένως, παρατίθενται παρακάτω μόνο τα μοντέλα που επιδεικνύουν ισχυρή διαχωριστική ικανότητα. Παράλληλα με τα στατιστικά μοντέλα, θα παρουσιαστούν διαγράμματα Loadings και VIP (Variable Importance of the Projection), όπως προκύπτουν αυτά για το κάθε μοντέλο. Μέσω αυτών των διαγραμμάτων λαμβάνονται πληροφορίες σχετικά με την σημαντικότητα κάθε μεταβλητής στην ανάπτυξη των αντίστοιχων μοντέλων, καθώς και με την διαχωριστική ικανότητα της. Ωστόσο πριν γίνει η ανάπτυξη των μοντέλων αυτών πραγματοποιήθηκε η ανάλυση ANOVA με το λογισμικό Statistica (StatSoft Inc.), όπου με κόκκινο χρώμα υποδεικνύονται οι μεταβολίτες του γάλακτος που η διαφοροποίηση που παρουσιάζουν ανάμεσα στις κατηγορίες είναι στατιστικά σημαντική και έχουν όριο εμπιστοσύνης μεγαλύτερο του 95% ($p < 0.05$).

5.1 Στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση ως προς το είδος του γαλακτοπαραγωγού ζώου

Σε αυτή την ενότητα θα μελετηθεί η πιθανή διαφοροποίηση των δειγμάτων γάλακτος σύμφωνα με το είδος του γαλακτοπαραγωγού ζώου βάσει της σύστασής τους. Αρχικά, έγινε ανάλυση ANOVA η οποία παρουσιάζεται στον **Πίνακα 5.1.1**. Παρατηρούνται με κόκκινο χρώμα ($p < 0.05$) σχεδόν όλοι οι μεταβολίτες, το οποίο σημαίνει ότι είναι σημαντικοί για το εξεταζόμενο διαχωρισμό, εκτός της λακτόζης (α - και β -), της σουκρόζης και της GPC.

Από την έρευνα του R. Lamanna και των συνεργατών του [88] μέσω της στατιστικής ανάλυσης ANOVA που πραγματοποιήθηκε, παρατηρήθηκε ότι το κιτρικό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μεταβολίτης διαχωρισμού των διάφορων ειδών γάλακτος και συγκεκριμένα

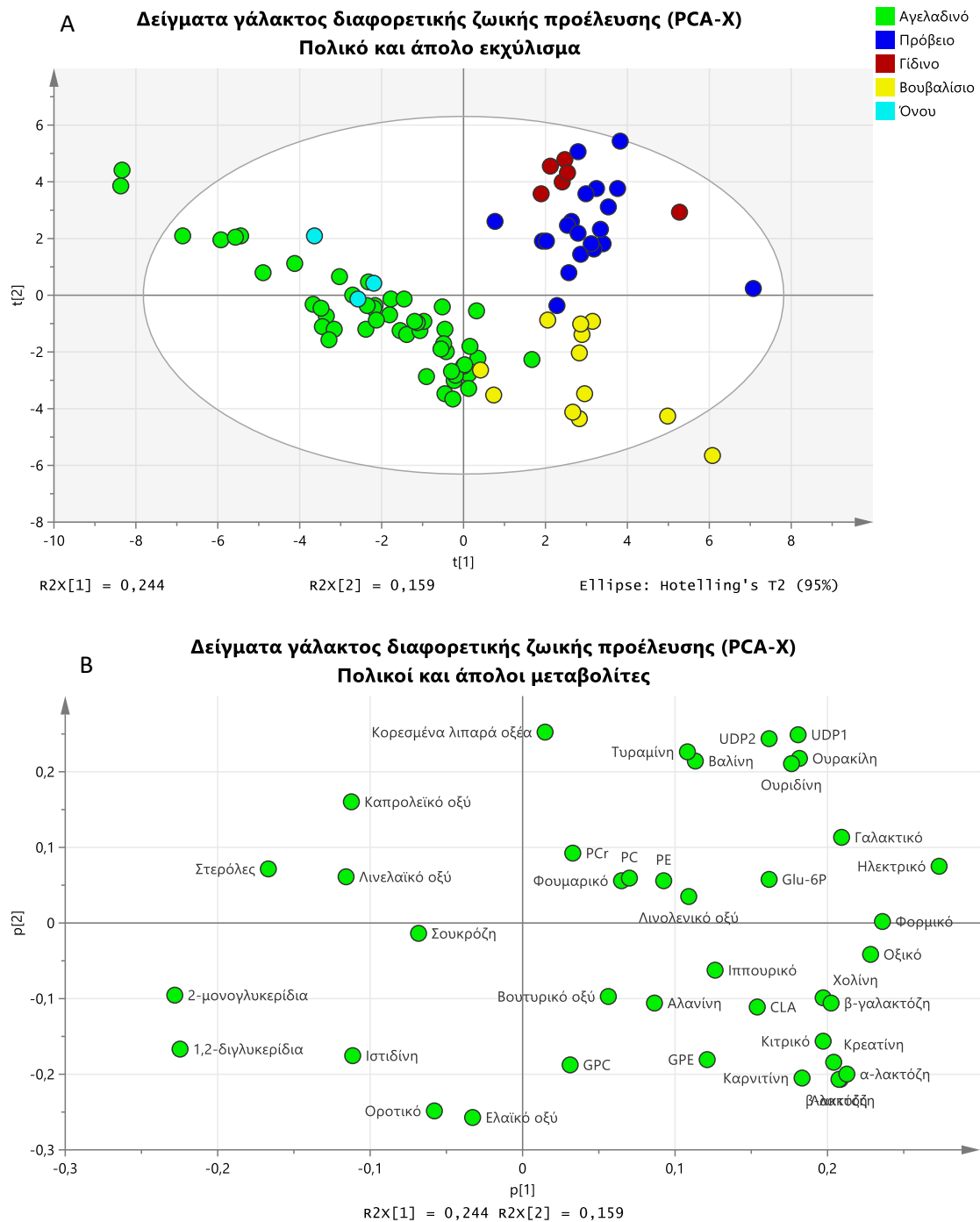
του αγελαδινού και του πρόβειου, ενώ η λακτόζη δεν φαίνεται να επηρεάζει καθόλου σε αυτή την κατηγοριοποίηση, σε συμφωνία με την παρούσα εργασία.

Πίνακας 5.1.1. Ανάλυση διακύμανσης ή διασποράς (ANOVA) όλων των μεταβολιτών που αναλύθηκαν για όλα τα δείγματα γάλακτος με παράμετρο διαφοροποίησης το είδος του γαλακτοπαραγωγού ζώου.

Ένωση	SS Model	df Model	MS Model	SS Residual	df Residual	MS Residual	F	p
Οξικό	5,54	4	1,385	14,1	86	0,164	8,4422	0,000009
Αλανίνη	0,04	4	0,010	0,1	86	0,001	13,3431	0,2*10 ⁻⁷
Βαλίνη	0,16	4	0,041	0,1	86	0,001	50,3330	>>10 ⁻⁷
Γαλακτικό	611,73	4	152,932	1325,8	86	15,416	9,9205	0,000001
Κιτρικό	110,93	4	27,732	500,3	86	5,817	4,7672	0,001602
Κρεατίνη	3,46	4	0,865	6,2	86	0,072	12,0606	0,8*10 ⁻⁷
Χολίνη	15,12	4	3,781	26,3	86	0,306	12,3720	0,5*10 ⁻⁷
Καρνιτίνη	29,46	4	7,365	156,3	86	1,817	4,0534	0,004654
β-λακτόζη	3826,77	4	956,692	46034,1	86	535,280	1,7873	0,138753
Λακτόζη	18174,43	4	4543,607	169880,1	86	1975,350	2,3002	0,065195
α-λακτόζη	2783,41	4	695,852	24998,0	86	290,675	2,3939	0,056681
β-γαλακτόζη	2,29	4	0,572	4,0	86	0,047	12,2290	0,6*10 ⁻⁷
Σουκρόζη	1,81	4	0,453	44,7	86	0,520	0,8717	0,484401
Οροτικό	0,52	4	0,129	0,8	86	0,009	14,7107	>>10 ⁻⁷
Φορμικό	4,38	4	1,096	2,2	86	0,025	43,6443	>>10 ⁻⁷
Ιστιδίνη	0,06	4	0,015	0,1	86	0,001	20,5050	>>10 ⁻⁷
Ουρακίλη	0,21	4	0,053	0,1	86	0,002	34,4242	>>10 ⁻⁷
Φουμαρικό	0,00	4	0,000	0,0	86	0,000	7,9555	0,000017
Ιππουρικό	0,07	4	0,018	0,1	86	0,001	13,7260	0,1*10 ⁻⁷
Ουριδίνη	0,57	4	0,141	0,3	86	0,003	44,9386	>>10 ⁻⁷
Τυραμίνη	0,00	4	0,001	0,0	86	0,000	11,8728	0,1*10 ⁻⁶
Ηλεκτρικό	0,97	4	0,242	1,3	86	0,015	15,7565	>>10 ⁻⁷
PCr	0,22	4	0,054	0,1	86	0,001	85,7907	>>10 ⁻⁷
GPC	0,22	4	0,055	2,6	86	0,030	1,8440	0,127778
GPE	0,07	4	0,018	0,2	86	0,003	6,3372	0,000162
PC	0,32	4	0,079	0,2	86	0,002	42,6347	>>10 ⁻⁷
PE	0,05	4	0,012	0,0	86	0,000	31,4403	>>10 ⁻⁷
Glu-6P	0,47	4	0,119	1,1	86	0,012	9,6062	0,000002
UDPI	2,78	4	0,694	1,2	86	0,014	50,6249	>>10 ⁻⁷
UDP2	2,10	4	0,524	1,1	86	0,013	39,9058	>>10 ⁻⁷
CLA	14,38	4	3,594	1,6	86	0,018	194,9120	>>10 ⁻⁷
Καπρολεϊκό οξύ	4,55	4	1,137	3,4	86	0,040	28,6112	>>10 ⁻⁷
Βουτυρικό οξύ	241,61	4	60,401	16,4	86	0,191	316,4613	>>10 ⁻⁷
Λινολενικό οξύ	69,23	4	17,307	19,7	86	0,229	75,4602	>>10 ⁻⁷
Λινελαϊκό οξύ	166,72	4	41,680	63,7	86	0,740	56,2925	>>10 ⁻⁷
Ελαϊκό οξύ	391,85	4	97,962	406,4	86	4,725	20,7308	>>10 ⁻⁷
Κορεσμένα λιπαρά οξέα	1075,20	4	268,800	455,4	86	5,295	50,7642	>>10 ⁻⁷
Στερόλες	0,09	4	0,024	0,0	86	0,000	89,4132	>>10 ⁻⁷
1,2-δγλυκερίδια	30,30	4	7,574	10,5	86	0,122	62,0214	>>10 ⁻⁷
2-μονογλυκερίδια	9,99	4	2,498	3,1	86	0,037	68,1943	>>10 ⁻⁷

Έπειτα, οι πειραματικές τιμές των ολοκληρώσεων των φασμάτων χρησιμοποιήθηκαν σαν δεδομένα εισόδου για την σύσταση μοντέλων PCA-X, και OPLS-DA με την χρήση του λογισμικού Simca (Umetrics). Αρχικά, παρατίθεται σε εικόνα το διάγραμμα ανάλυσης κύριων

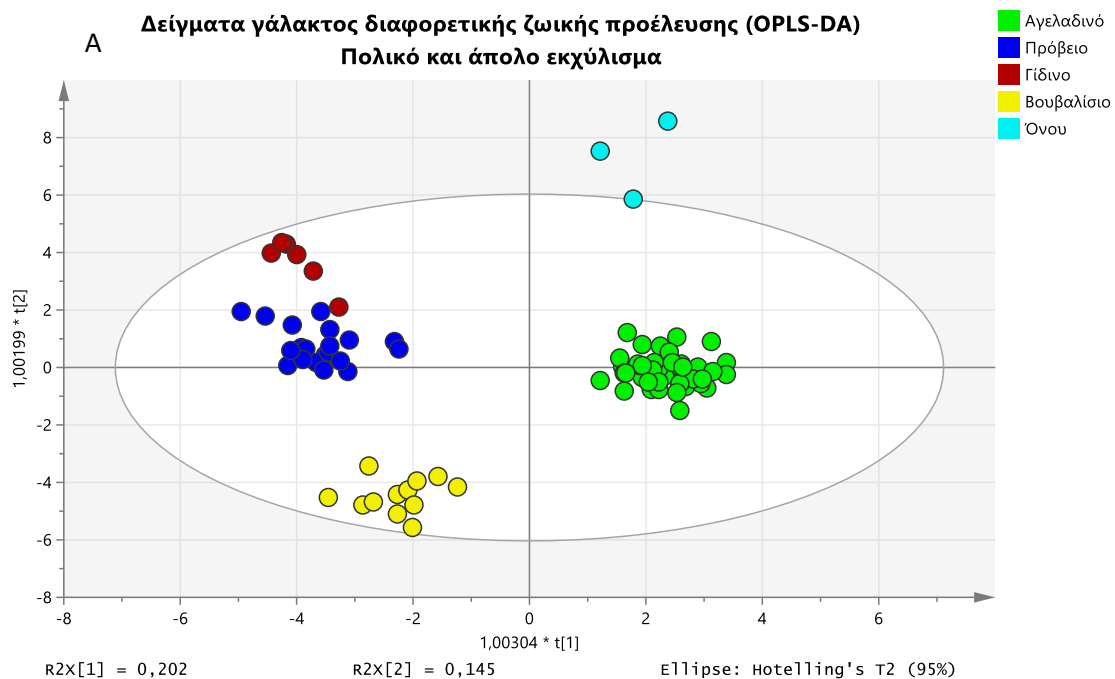
συνιστωσών (PCA) με κύριους άξονες τους PC1 και PC2 και δεδομένα εισόδου τις ολοκληρώσεις όλων των μεταβολιτών που ταυτοποιήθηκαν στο υδατικό και άπολο εκχύλισμα των δειγμάτων γάλακτος.

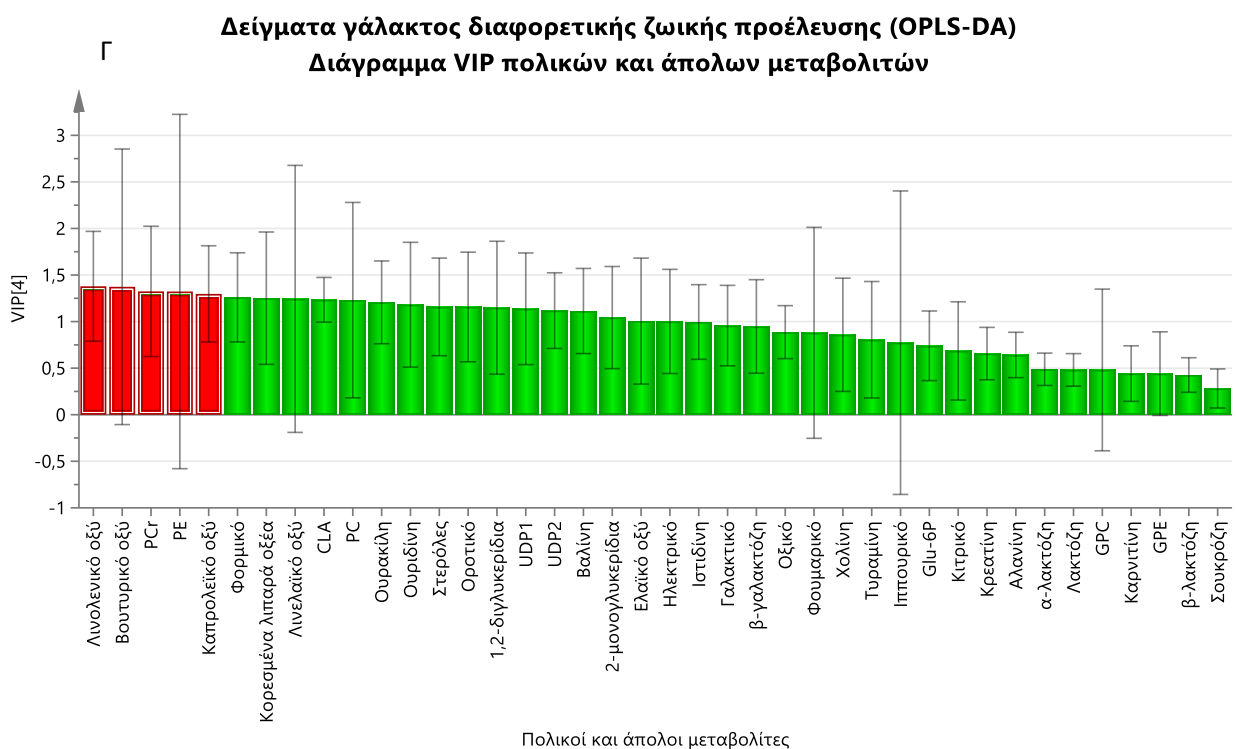
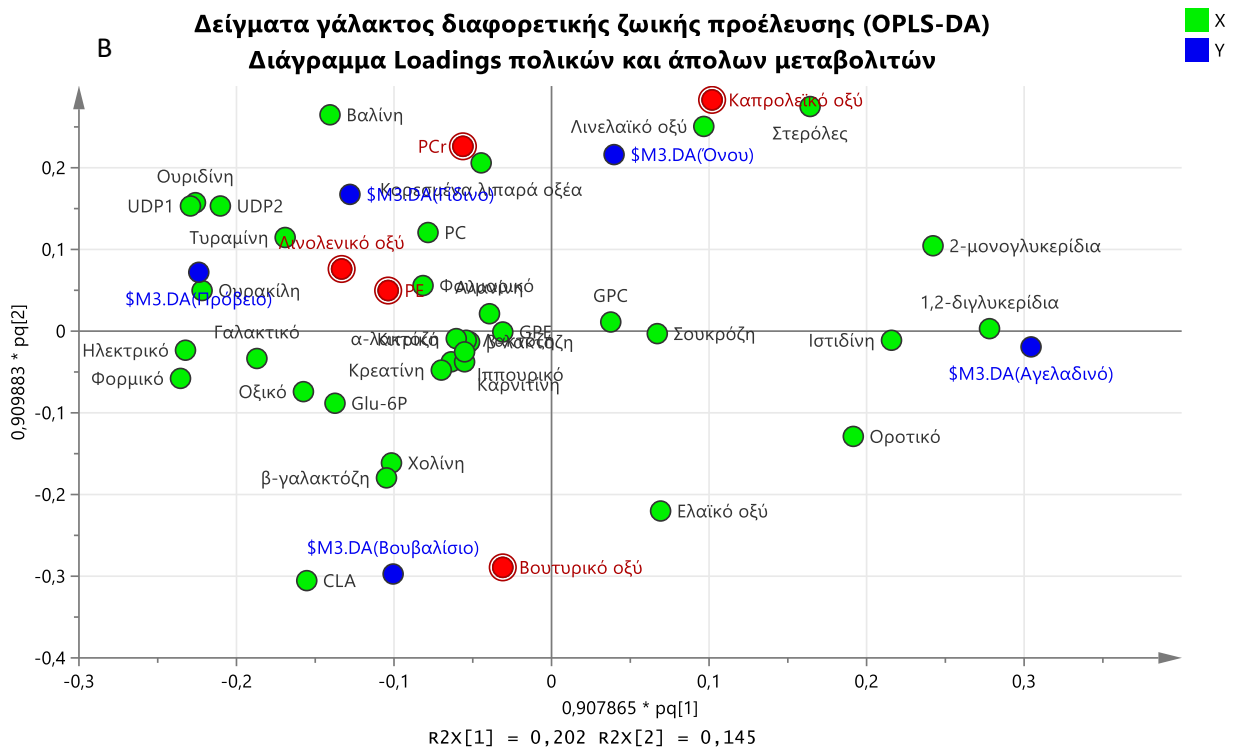


Εικόνα 5.1.1. Διάγραμμα ανάλυσης κύριων συνιστωσών (PCA) για τα δείγματα γάλακτος διαφορετικής ζωικής προέλευσης με τους μεταβολίτες του πολικού και άπολου εκχυλίσματος (A) και διάγραμμα βαρύτητας των μεταβολιτών τους (B) [$Q = 0.528$, $R^2X = 0.756$].

Στην **Εικόνα 5.1.1** παρουσιάζεται το διάγραμμα PCA, όπου και παρατηρείται μερικώς διαχωρισμός ανάμεσα στα είδη των γαλακτοπαραγωγών ζώων. Πιο συγκεκριμένα, φαίνεται από το μοντέλο ότι τα πρόβεια και τα γίδινα δείγματα γάλακτος διαφοροποιούνται από τα υπόλοιπα και όχι μεταξύ τους, ενώ πραγματοποιείται μερική διαφοροποίηση των βουβαλίσσιων δειγμάτων από αυτά των αγελαδινών και των γαϊδουρίσιων. Οι δύο πρώτοι κύριοι άξονες περιγράφουν συνολικά το 40.3% της διασποράς των μεταβλητών, το οποίο αντιστοιχεί σε 24.4% στον PC1 και 15.9% στον PC2. Η προβλεπτική ικανότητα (Q^2) αυτού του μοντέλου PCA είναι σχετικά καλή και ίση με 0.528, επομένως μπορεί και να χρησιμοποιηθεί ως μοντέλο διαχωρισμού ορισμένων ειδών γάλακτος. Ακόμη παραθέτετε το διάγραμμα βαρύτητας μεταβλητών (Loadings) για το μοντέλο PCA των πολικών και άπολων μεταβολιτών.

Καθώς ο πλήρης διαχωρισμός των δειγμάτων γάλακτος βάση της ζωικής τους προέλευσης με την μέθοδο ανάλυσης PCA δεν ήταν εφικτός, χρησιμοποιήθηκε για τα ίδια δεδομένα εισόδου η μέθοδος ανάλυσης διακριτότητας μερικών ορθογωνικών ελαχίστων τετραγώνων (OPLS-DA).

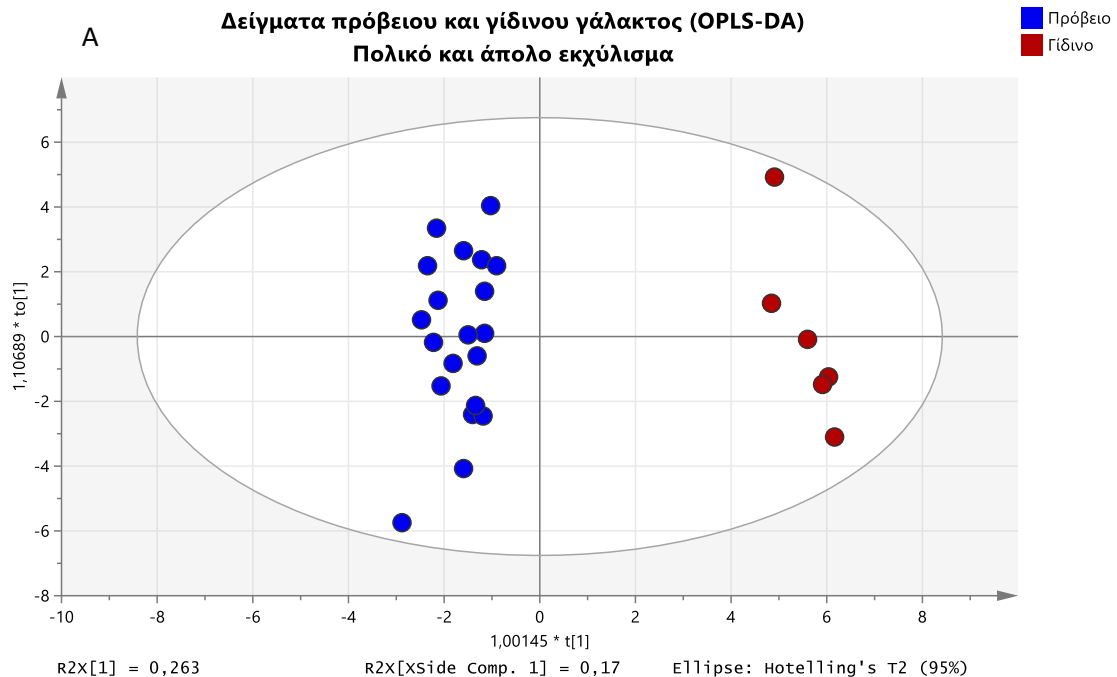


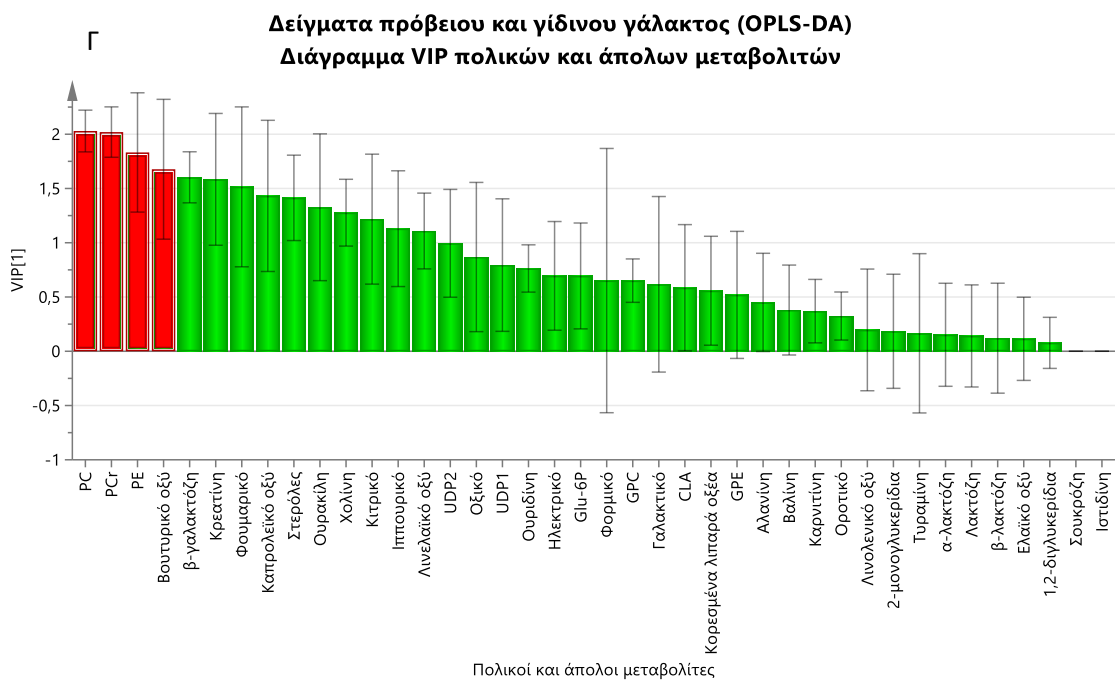
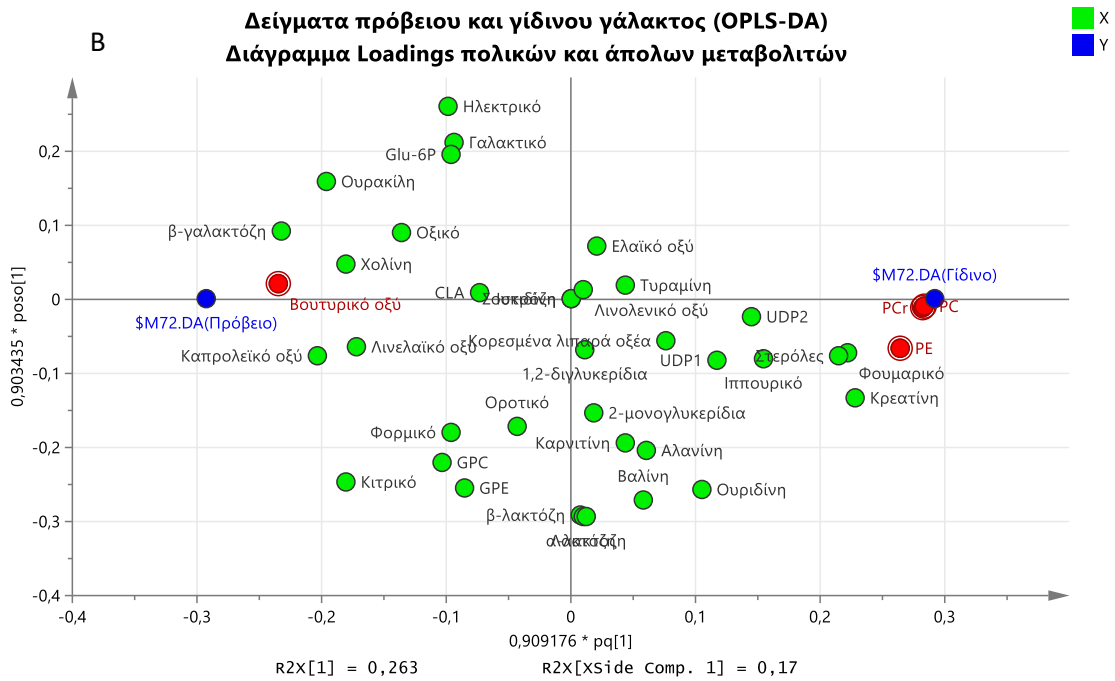


Εικόνα 5.1.2. Διάγραμμα OPLS-DA για τα δείγματα γάλακτος διαφορετικής ζωικής προέλευσης για τους μεταβολίτες του πολικού και άπολου εκχυλίσματος (A), διάγραμμα βαρύτητας όλων των μεταβολιτών τους Loadings (B) και διάγραμμα VIP (Γ) [Q= 0.876, R²X= 0.748, R²Y= 0.907, p<0.05].

Στην **Εικόνα 5.1.2** παρουσιάζεται το μοντέλο ανάλυσης διακρίτοτητας OPLS-DA, όπου φαίνεται μια ξεκάθαρη κατηγοριοποίηση των δειγμάτων ως προς το είδος του γαλακτοπαραγωγού ζώου. Πιο συγκεκριμένα, τα αγελαδινά, τα βουβαλίσια και τα γαϊδουρινά δείγματα γάλακτος φαίνεται να ξεχωρίζουν πλήρως μεταξύ τους και από τα πρόβεια/γίδινα, ενώ ο διαχωρισμός των πρόβειων και γίδινων δειγμάτων είναι μερικός αλλά ικανοποιητικός. Οι δύο πρώτοι κύριοι άξονες περιγράφουν συνολικά το 34.7% της διασποράς των μεταβλητών, το οποίο αντιστοιχεί σε 20.2% στον t1 και 14.5% στον t2. Η προβλεπτική ικανότητα (Q^2) αυτού του μοντέλου είναι πολύ καλή και ίση με 0.876 και επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί το μοντέλο αυτό για ταυτοποίηση ακόμα και άγνωστων δειγμάτων. Μαζί με το μοντέλο αυτό αναπτύχθηκαν και τα διαγράμματα βαρύτητας (Loadings) και συνεισφοράς (VIP) των μεταβολιτών, στα οποία έχουν χρωματιστεί με κόκκινο οι πέντε πιο σημαντικοί μεταβολίτες που συνεισφέρουν σε αυτό τον διαχωρισμό και είναι με την σειρά το λινολενικό, το βουτυρικό, η PCr, η PE και το καπρολεϊκό ($VIP > 1.30$). Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται και σε συμφωνία με τις παρατηρήσεις που σημειώθηκαν στο κεφάλαιο 4 με τις μέσες τιμές των μεταβολιτών ανάμεσα στα είδη.

Για τον καλύτερο διαχωρισμό των πρόβειων και των γίδινων δειγμάτων, αναπτύχθηκε ένα αντίστοιχο μοντέλο ανάλυσης διακρίτοτητας με δεδομένα εισόδου τις συγκεντρώσεις όλων των μεταβολιτών (πολικών και μη) για τον διαχωρισμό των δύο ειδών μεταξύ τους.



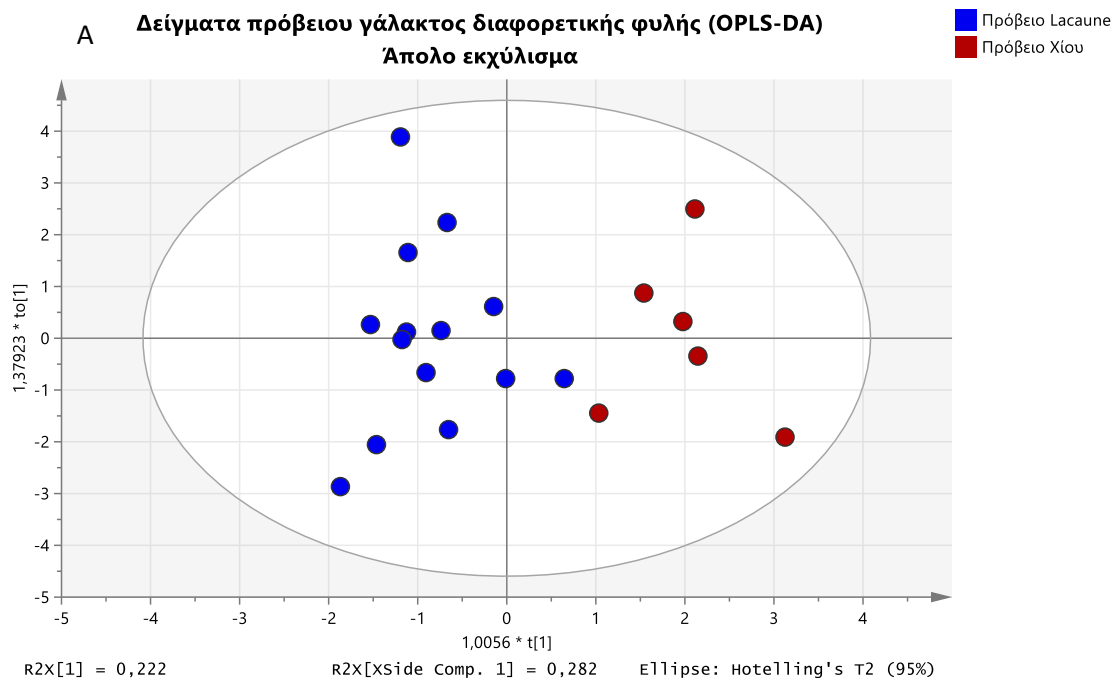


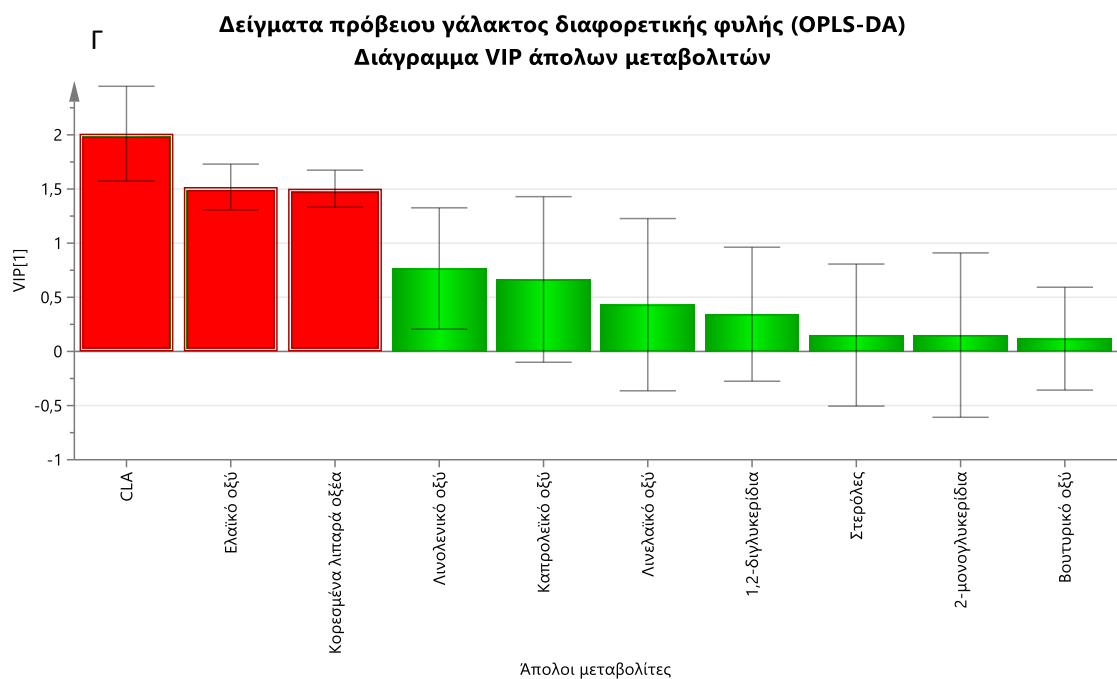
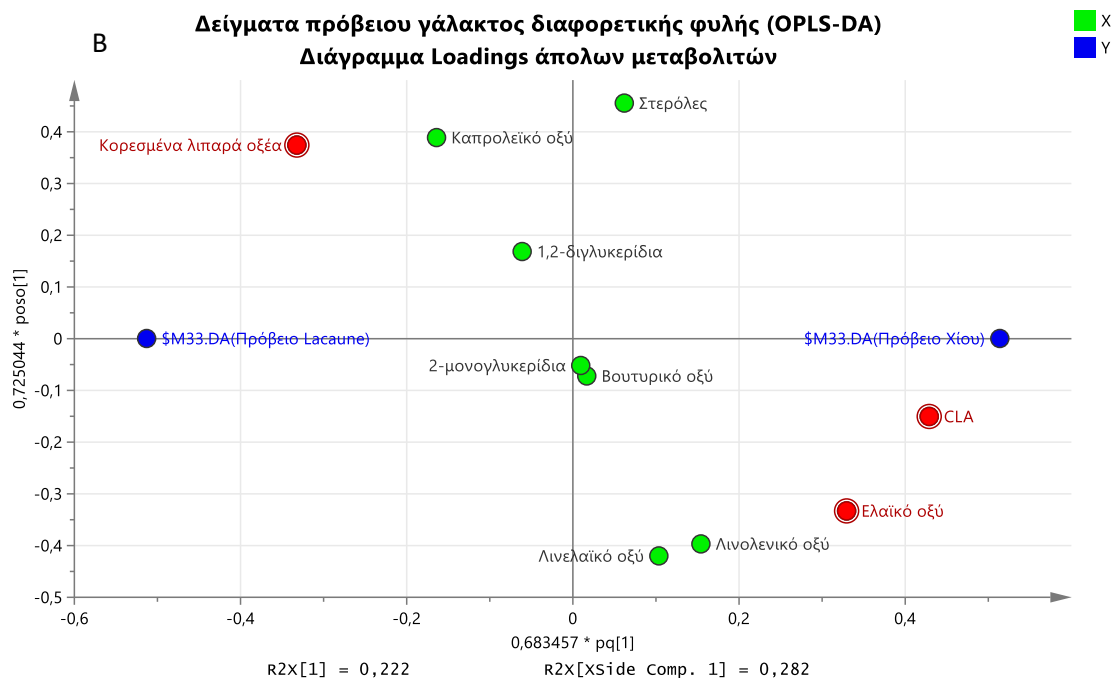
Εικόνα 5.1.3. Διάγραμμα OPLS-DA για τα πρόβεια και γίδινα δείγματα γάλακτος για τους μεταβολίτες του πολικού και άπολου εκχυλίσματος (Α), διάγραμμα βαρύτητας όλων των μεταβολιτών τους Loadings (Β) και διάγραμμα VIP (Γ) [$Q=0.942$, $R^2X=0.433$, $R^2Y=0.97$, $p<0.05$].

Στο μοντέλο ανάλυσης διακρίτοτητας OPLS-DA της **Εικόνα 5.1.3** πραγματοποιείται ξεκάθαρα ο διαχωρισμός των πρόβειων και των γίδινων δειγμάτων μεταξύ τους. Μαζί με το μοντέλο αυτό αναπτύχθηκαν και τα διαγράμματα βαρύτητας (Loadings) και συνεισφοράς (VIP) των μεταβολιτών, στα οποία έχουν χρωματιστεί με κόκκινο οι τέσσερις πιο σημαντικοί

μεταβολίτες που συνεισφέρουν σε αυτό τον διαχωρισμό και είναι με την σειρά η PC, η PCr, η PE και το βουτυρικό οξύ (VIP>1.68). Οι δύο πρώτοι κύριοι άξονες περιγράφουν συνολικά το 43.3% της διασποράς των μεταβλητών, το οποίο αντιστοιχεί σε 26.3% στον t1 και 17.0% στον t2. Η προβλεπτική ικανότητα (Q^2) αυτού του μοντέλου είναι πάρα πολύ καλή και ίση με 0.942 και επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί το μοντέλο αυτό για ταυτοποίηση ακόμα και άγνωστων δειγμάτων.

Επιπρόσθετα, λόγω της ύπαρξης δύο διαφορετικών ειδών προβάτων, πραγματοποιήθηκε προσπάθεια διαχωρισμού αυτών των δύο φυλών. Ως δεδομένα εισόδου χρησιμοποιήθηκαν μόνο οι μεταβολίτες του άπολου εκχυλίσματος των δειγμάτων γάλακτος, με το βέλτιστο μοντέλο να παραθέτετε παρακάτω.





Εικόνα 5.1.4. Διάγραμμα OPLS-DA για τα δείγματα πρόβειου γάλακτος διαφορετικής φυλής (Lacaune και Χίου) για τους μεταβολίτες του άπολου εκχυλίσματος (A), διάγραμμα βαρύτητας (Loadings) όλων των μεταβολιτών του (B) και διάγραμμα VIP (Γ) [Q= 0.592, R²X= 0.65, R²Y= 0.805, p=0.04].

Στην **Εικόνα 5.1.4** παρουσιάζεται το μοντέλο ανάλυσης OPLS-DA, όπου φαίνεται ξεκάθαρα ο διαχωρισμός των προβάτων ως προς την φυλή τους (Lacaune και Χίου). Πιο συγκεκριμένα και με την βοήθεια των διαγραμμάτων βαρύτητας (Loadings) και συνεισφοράς (VIP) των μεταβολιτών, απεικονίζονται οι μεταβολίτες που συνεισφέρουν περισσότερο σε αυτό τον

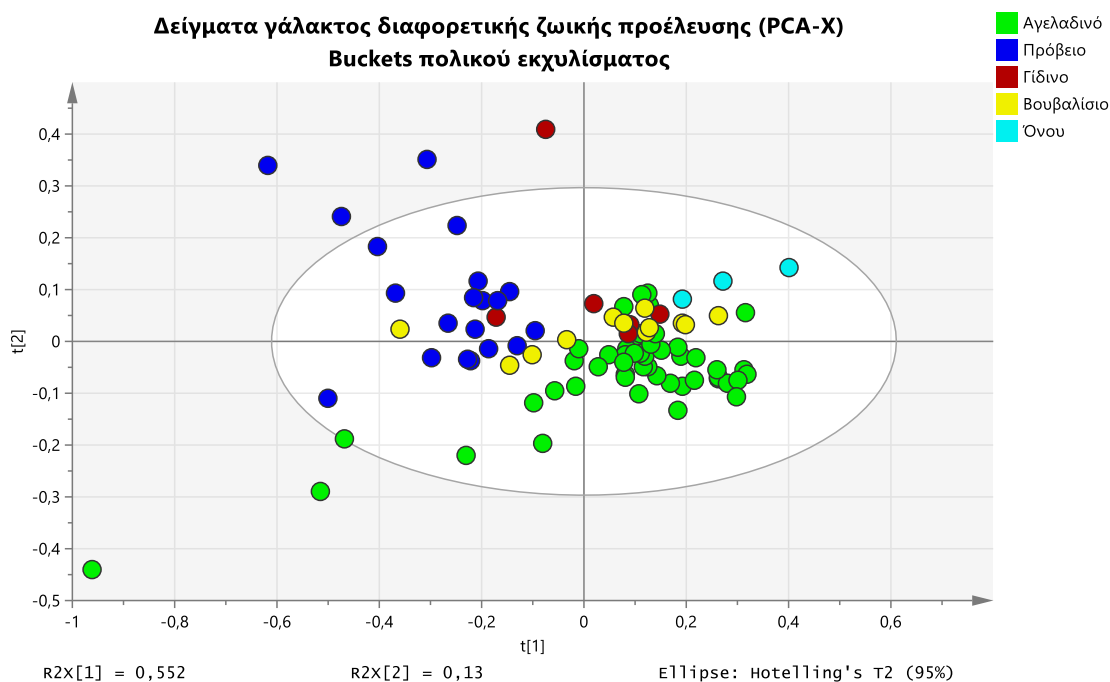
διαχωρισμό και είναι κατά σειρά το CLA, το ελαϊκό και η συνολική συγκέντρωση των κορεσμένων λιπαρών οξέων στο γάλα ($VIP > 1.5$). Οι δύο πρώτοι κύριοι άξονες περιγράφουν συνολικά το 50.4% της διασποράς των μεταβλητών, το οποίο αντιστοιχεί σε 22.2% στον t1 και 28.2% στον t2. Η προβλεπτική ικανότητα (Q^2) αυτού του μοντέλου είναι ικανοποιητική και ίση με 0.592, επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί για κατηγοριοποίηση και άγνωστων δειγμάτων.

Γενικότερα, έχει ερευνηθεί από την E. Tsiplakou και τους συνεργάτες της [89] αν η ράτσα του προβάτου μπορεί να επηρεάσει την σύσταση του γάλακτος και συγκεκριμένα την ποσότητα του CLA. Για αυτό τον σκοπό συλλέγονταν γάλα από γαλακτοπαραγωγά ζώα τεσσάρων διαφορετικών φυλών προβάτου την ίδια μέρα, τα οποία είχαν τον ίδιο τρόπο εκτροφής. Από αυτή την έρευνα προέκυψε το συμπέρασμα ότι οι διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των φυλών δεν είναι σημαντικές, και μόνο το πρόβατο της φυλής Friesland παρουσιάζει λίγο μικρότερη ποσότητα CLA από τις υπόλοιπες (Awassi, Lacaune και Χίου). Ακόμη, σε μια αντίστοιχη μελέτη της S. Simeou και των συνεργατών της [68] για την αύξηση του CLA στα πρόβατα Χίου, διαπιστώθηκε ότι η χρήση του σωστά επεξεργασμένου και συντηρημένου κασιόγαρου (ενός παραπροϊόντος από την έκθλιψη της ελιάς κατά την παραγωγή του ελαιολάδου) αποτελεί έναν ακόμη τρόπο αύξησης αυτού του λιπαρού οξέος στο γάλα. Παράλληλα, παρατηρήθηκε μείωση των κορεσμένων λιπαρών οξέων, που έχουν αρνητική επίδραση στην υγεία του ανθρώπου, και αύξηση των ακόρεστων λιπαρών. Επομένως, ο διαχωρισμός των δύο φυλών προβάτων που παρουσιάζεται στην παρούσα έρευνα ενδεχομένως να οφείλεται και στην διατροφική συνήθεια των ζώων.

5.2 Μη στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση ως προς το είδος του γαλακτοπαραγωγού ζώου

Παράλληλα πραγματοποιήθηκε και η μη στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση των δειγμάτων γάλακτος, για την οποία αναπτύχθηκαν τα αντίστοιχα μοντέλα που απεικονίστηκαν στην προηγούμενη ενότητα με το ίδιο λογισμικό και τρόπο λειτουργίας. Η διαφορά είναι ότι στην συγκεκριμένη περίπτωση ως δεδομένα εισόδου δεν χρησιμοποιήθηκαν οι μεταβολίτες που ταυτοποιήθηκαν αλλά ολόκληρα τα φάσματα 1H και ^{31}P NMR που ελήφθησαν διαμοιρασμένα σε κομμάτια των 0.02ppm, όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο 2.

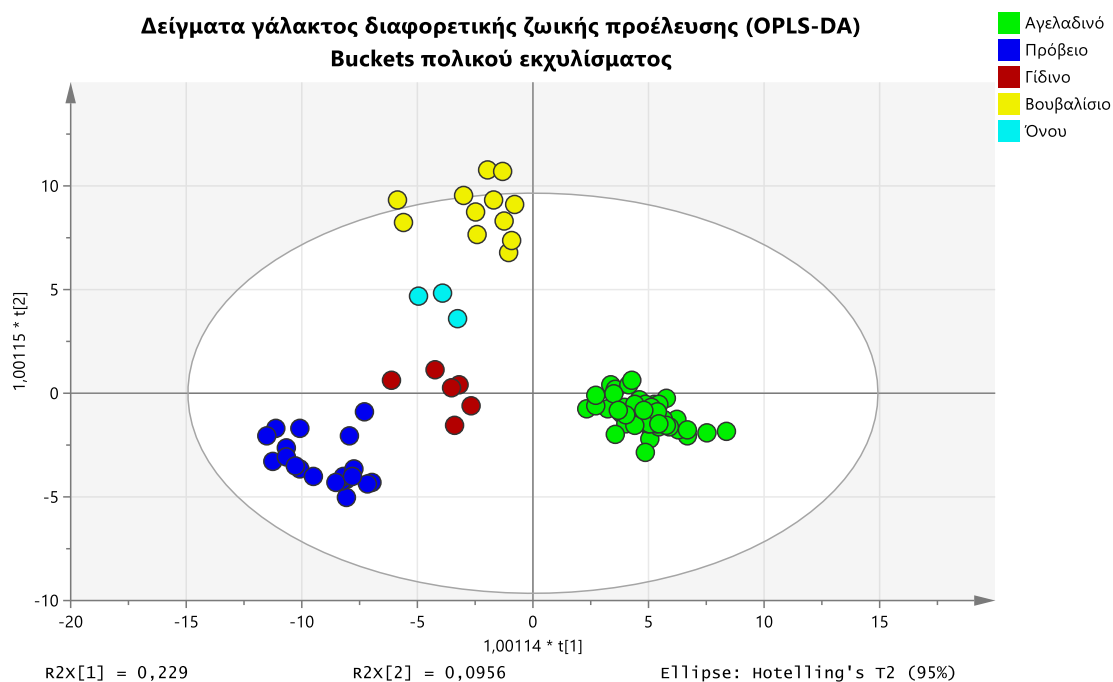
Σε αυτή την ενότητα απεικονίζονται μόνο τα μοντέλα που εμφανίζουν σημαντική διαχωριστική ισχύ ως προς το είδος του γαλακτοπαραγωγού ζώου και πρωτίστως παρατίθεται ένα διάγραμμα ανάλυσης κύριων συνιστωσών (PCA). Για αυτό το διάγραμμα χρησιμοποιήθηκαν ως δεδομένα εισόδου μόνο τα buckets του πολικού εκχυλίσματος των δειγμάτων γάλακτος για τα φάσματα 1H NMR..



Εικόνα 5.2.1. Διάγραμμα ανάλυσης κύριων συνιστωσών (PCA) για τα δείγματα γάλακτος διαφορετικής ζωικής προέλευσης με τα buckets του πολικού εκχυλίσματος [$Q=0.888$, $R^2X=0.969$].

Στην **Εικόνα 5.2.1** παρουσιάζεται το διάγραμμα κύριων αξόνων PC1 και PC2 (PCA), στο οποίο δεν πραγματοποιείται κάποιος ικανοποιητικός διαχωρισμός των ειδών μεταξύ τους. Πιο συγκεκριμένα, φαίνεται να γίνεται μερικώς αλλά όχι επαρκής διαχωρισμός μόνο των πρόβειων και των αγελαδινών δειγμάτων από τα διάφορα άλλα είδη. Οι δύο πρώτοι κύριοι άξονες περιγράφουν συνολικά το 68.2% της διασποράς των μεταβλητών, το οποίο αντιστοιχεί σε 55.2% στον PC1 και 13.0% στον PC2. Η προβλεπτική ικανότητα (Q^2) αυτού του μοντέλου PCA είναι πολύ καλή και ίση με 0.888.

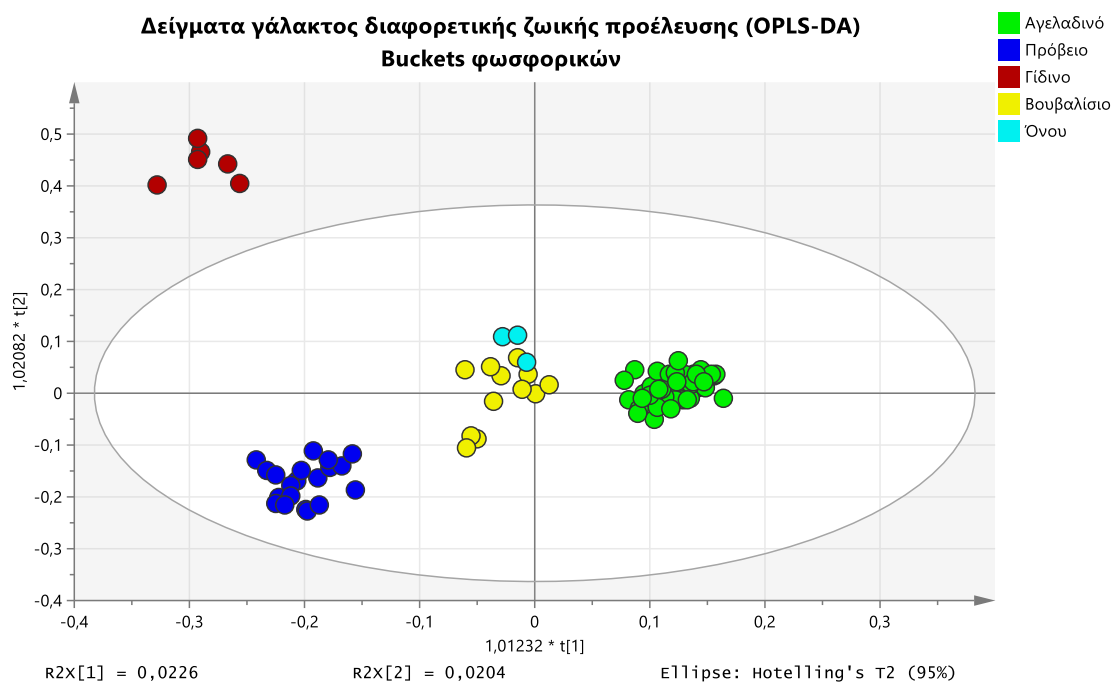
Καθώς ο πλήρης διαχωρισμός των δειγμάτων γάλακτος βάση της ζωικής τους προέλευσης με την μέθοδο ανάλυσης PCA δεν ήταν εφικτός, χρησιμοποιήθηκε για τα ίδια δεδομένα εισόδου για τα φάσματα 1H NMR η μέθοδος ανάλυσης διακριτότητας μερικών ορθογωνικών ελαχίστων τετραγώνων (OPLS-DA).



Εικόνα 5.2.2. Διάγραμμα OPLS-DA για τα δείγματα γάλακτος διαφορετικής ζωικής προέλευσης με τα buckets του πολικού εκχυλίσματος [$Q=0.876$, $R^2X=0.786$, $R^2Y=0.919$, $p<0.05$].

Στην **Εικόνα 5.2.2** παρουσιάζεται το μοντέλο ανάλυσης OPLS-DA, όπου φαίνεται ξεκάθαρα ο διαχωρισμός όλων των ειδών γαλακτοπαραγωγών ζώων μεταξύ τους. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρούνται τα αγελαδινά δείγματα να διαχωρίζονται πλήρως από όλα τα άλλα δείγματα και να κατατάσσονται στο δεξί μισό του μοντέλου, ενώ τα υπόλοιπα να διαχωρίζονται πλήρως και να βρίσκονται στο αριστερό τμήμα της εικόνας. Οι δύο πρώτοι κύριοι άξονες περιγράφουν συνολικά το 32.5% της διασποράς των μεταβλητών, το οποίο αντιστοιχεί σε 22.9% στον t1 και 9.6% στον t2. Η προβλεπτική ικανότητα (Q^2) αυτού του μοντέλου είναι πολύ καλή και ίση με 0.876, επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη και άγνωστων δειγμάτων.

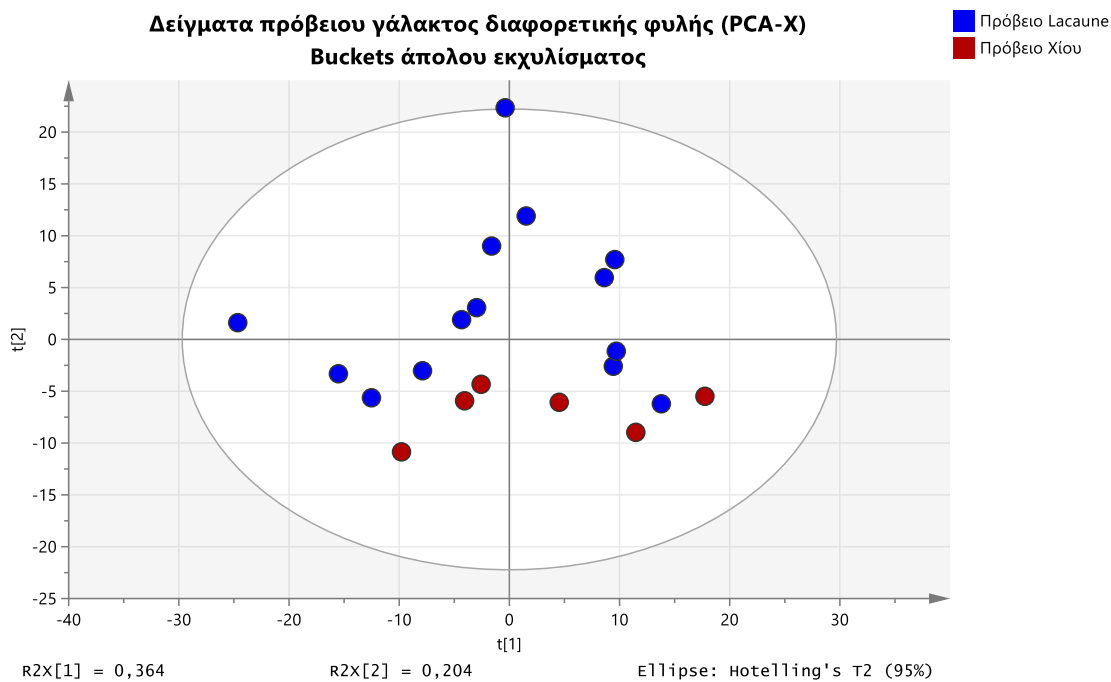
Στην **Εικόνα 5.2.3** δίνεται το αντίστοιχο OPLS-DA μοντέλο των buckets των φασμάτων που ελήφθησαν με ^{31}P NMR, προκειμένου να συγκριθεί με το μοντέλο της **Εικόνας 5.2.2**.



Εικόνα 5.2.3. Διάγραμμα OPLS-DA για τα δείγματα γάλακτος διαφορετικής ζωικής προέλευσης με τα buckets των φασμάτων ^{31}P NMR του πολικού εκχυλίσματος [$Q= 0.425$, $R^2X= 0.10$, $R^2Y= 0.959$, with no transformation, $p<0.05$].

Στην **Εικόνα 5.2.3** παρουσιάζεται το μοντέλο ανάλυσης OPLS-DA, στο οποίο φαίνεται ξεκάθαρα ο πλήρης διαχωρισμός μόνο ορισμένων ειδών. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρούνται τα αγελαδινά, τα πρόβεια και τα γίδινα δείγματα να διαχωρίζονται πλήρως από όλα τα άλλα δείγματα, ενώ τα αντίστοιχα βουβαλίσια και γαϊδουρινά πραγματοποιείται μερικώς διαχωρισμός και κατατάσσονται κοντά στο κέντρο του μοντέλου. Οι δύο πρώτοι κύριοι άξονες περιγράφουν συνολικά το 4.3% της διασποράς των μεταβλητών, το οποίο αντιστοιχεί σε 2.3% στον t1 και 2.0% στον t2. Η προβλεπτική ικανότητα (Q^2) αυτού του μοντέλου είναι σχετικά χαμηλή και ίση με 0.425.

Στην συνέχεια παρουσιάζεται το μοντέλο PCA που αναπτύχθηκε για τον διαχωρισμό των δύο φυλών προβάτων που αναλύθηκαν. Ως δεδομένα εισόδου χρησιμοποιήθηκαν στην συγκεκριμένη περίπτωση τα buckets του άπολου εκχυλίσματος των δειγμάτων για τα φάσματα ^1H NMR.



Εικόνα 5.2.4. Διάγραμμα ανάλυσης κύριων συνιστωσών (PCA) για τα δείγματα πρόβειου γάλακτος διαφορετικής φυλής με τα buckets του πολικού εκχυλίσματος [$Q= 0.577$, $R^2X= 0.809$].

Στην **Εικόνα 5.2.4** παρουσιάζεται το διάγραμμα κύριων αξόνων PC1 και PC2 (PCA), όπου παρατηρείται ικανοποιητικός διαχωρισμός ανάμεσα στις δύο φυλές προβάτων που αναλύθηκαν και συγκεκριμένα ανάμεσα στο πρόβατο Lacaune και Χίου. Οι δύο πρώτοι κύριοι άξονες περιγράφουν συνολικά το 56.8% της διασποράς των μεταβλητών, το οποίο αντιστοιχεί σε 36.4% στον PC1 και 20.4% στον PC2. Η προβλεπτική ικανότητα (Q^2) αυτού του μοντέλου PCA είναι σχετικά καλή και ίση με 0.577.

ΚΕΦΑΛΑΙΑ 6 - Μεταβολομική ανάλυση ως προς τον μήνα δειγματοληψίας και τον παραγωγό

6.1 Στατιστική ανάλυση ANOVA

Αντίστοιχα με το προηγούμενο κεφάλαιο, προτού γίνει η ανάπτυξη των πολυπαραμετρικών στατιστικών μοντέλων διαχωρισμού ανάλογα τον μήνα που πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία των δειγμάτων γάλακτος για κάθε είδος γαλακτοπαραγωγού ζώου, πραγματοποιήθηκε η ανάλυση ANOVA. Στον **Πίνακα 6.1.1** καταγράφονται όλοι οι μεταβολίτες που ταυτοποιήθηκαν στο κεφάλαιο 3 και με κόκκινο χρωματίζονται μόνο αυτοί που η διαφοροποίηση που παρουσιάζουν κατά την διάρκεια της δειγματοληψίας είναι στατιστικά σημαντική και έχουν όριο εμπιστοσύνης μεγαλύτερο του 95% ($p < 0.05$). Από αυτόν τον πίνακα παρατηρείται ότι οι μεταβολίτες που είναι στατιστικά σημαντικοί για αυτήν την κατηγοριοποίηση των δειγμάτων είναι το οξικό, η καρνιτίνη, το φορμικό, η ιστιδίνη, η ουρακίλη, η ουριδίνη, η τυραμίνη, το ηλεκτρικό, η GPC, οι UDP και τα 1,2διγλυκερίδια.

Πίνακας 6.1.1. Ανάλυση διακύμανσης ή διασποράς (ANOVA) όλων των μεταβολιτών που αναλύθηκαν για όλα τα δείγματα γάλακτος με παράμετρο διαφοροποίησης τον μήνα δειγματοληψίας τους.

Ένωση	SS Model	df Model	MS Model	SS Residual	df Residual	MS Residual	F	p
Οξικό	2,40	4	0,601	17,2	86	0,201	2,996363	0,022911
Αλανίνη	0,00	4	0,001	0,1	86	0,001	1,044517	0,389127
Βαλίνη	0,02	4	0,005	0,2	86	0,002	1,890434	0,119407
Γαλακτικό	106,39	4	26,597	1831,1	86	21,292	1,249178	0,296359
Κιτρικό	25,47	4	6,367	585,7	86	6,811	0,934829	0,447767
Κρεατίνη	0,45	4	0,114	9,2	86	0,107	1,065573	0,378596
Χολίνη	2,55	4	0,637	38,9	86	0,452	1,409396	0,237689
Καρνιτίνη	22,57	4	5,642	163,2	86	1,897	2,974010	0,023697
β-λακτόζη	4056,75	4	1014,188	45804,1	86	532,606	1,904198	0,117029
Λακτόζη	18207,13	4	4551,782	169847,4	86	1974,969	2,304735	0,064751
α-λακτόζη	2343,43	4	585,858	25438,0	86	295,791	1,980649	0,104625
β-γαλακτόζη	0,41	4	0,103	5,9	86	0,069	1,496262	0,210439
Σουκρόζη	0,54	4	0,134	46,0	86	0,534	0,251288	0,908144
Οροτικό	0,11	4	0,028	1,2	86	0,013	2,105514	0,087038
Φορμικό	0,85	4	0,213	5,7	86	0,066	3,217548	0,016406
Ιστιδίνη	0,03	4	0,007	0,1	86	0,001	6,662127	0,000102
Ουρακίλη	0,05	4	0,013	0,3	86	0,003	3,708033	0,007825
Φουμαρικό	0,00	4	0,000	0,0	86	0,000	0,473892	0,754766
Ιππουρικό	0,01	4	0,001	0,2	86	0,002	0,689299	0,601326
Ουριδίνη	0,11	4	0,027	0,7	86	0,008	3,148815	0,018200
Τυραμίνη	0,00	4	0,000	0,0	86	0,000	2,722068	0,034643
Ηλεκτρικό	0,33	4	0,083	2,0	86	0,023	3,625651	0,008860
PCr	0,01	4	0,003	0,3	86	0,003	0,987833	0,418636
GPC	0,43	4	0,109	2,3	86	0,027	3,974439	0,005240
GPE	0,02	4	0,006	0,3	86	0,003	1,638653	0,171893
PC	0,02	4	0,006	0,5	86	0,005	1,088943	0,367179
PE	0,00	4	0,000	0,1	86	0,001	0,281508	0,889220
Glu-6P	0,13	4	0,031	1,4	86	0,016	1,917158	0,114832
UDP1	0,74	4	0,184	3,2	86	0,037	4,912375	0,001292

UDP2	0,45	4	0,113	2,8	86	0,032	3,519837	0,010394
CLA	1,00	4	0,250	15,0	86	0,174	1,438908	0,228092
Καπρολείκό οξύ	0,19	4	0,047	7,8	86	0,090	0,522439	0,719468
Βουτυρικό οξύ	5,18	4	1,294	252,8	86	2,940	0,440188	0,779229
Λινολενικό οξύ	4,24	4	1,060	84,7	86	0,985	1,075728	0,373600
Λινελαϊκό οξύ	6,63	4	1,657	223,8	86	2,602	0,636672	0,637728
Ελαϊκό οξύ	15,63	4	3,907	782,6	86	9,100	0,429306	0,787095
Κορεσμένα λιπαρά οξέα	51,33	4	12,832	1479,2	86	17,201	0,746031	0,563307
Στερόλες	0,00	4	0,001	0,1	86	0,001	0,955775	0,436077
1,2-διγλυκερίδια	9,38	4	2,346	31,4	86	0,365	6,422898	0,000143
2-μονογλυκερίδια	0,33	4	0,084	12,8	86	0,149	0,561347	0,691321

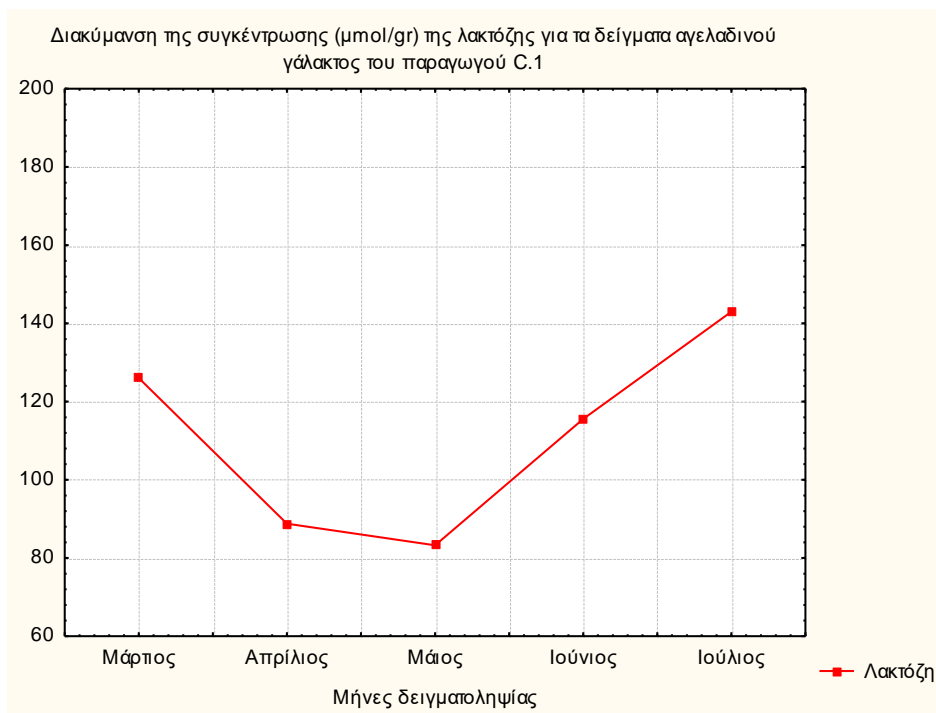
6.2 Ποσοτική ανάλυση της σύστασης του γάλακτος συναρτήσει του μήνα δειγματοληψίας και της προέλευσης (παραγωγός)

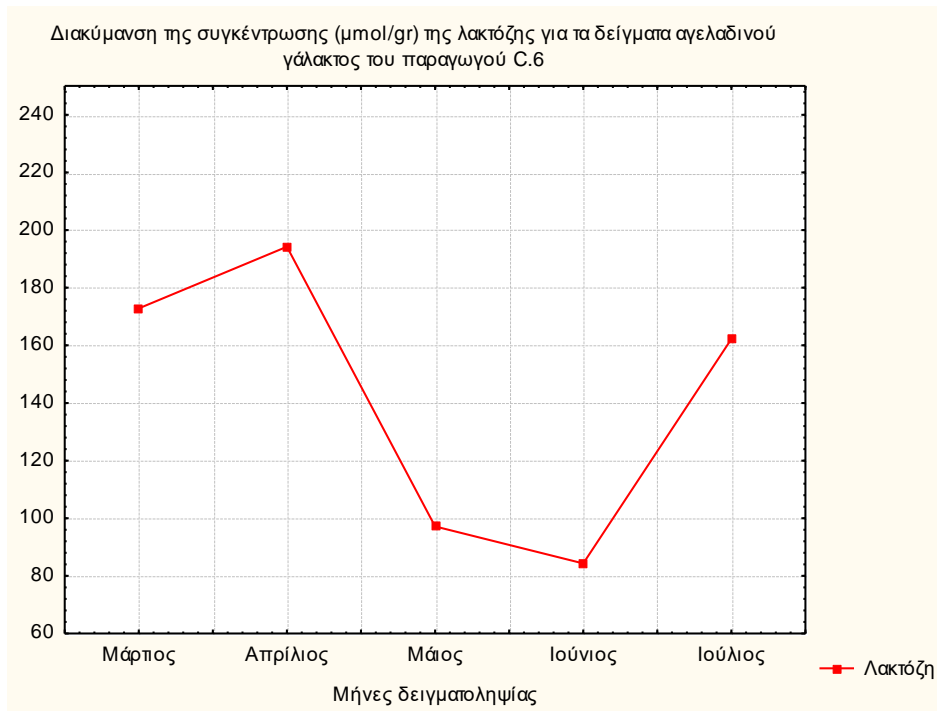
Στην συγκεκριμένη ενότητα εξετάζεται η επίδραση του μήνα παραγωγής του γάλακτος και της προέλευσής του (συγκεκριμένου παραγωγού) στη σύσταση του γάλακτος. Γενικότερα, παρατηρήθηκε ότι η σύσταση των δειγμάτων γάλακτος, ανεξαρτήτως της ζωικής προελεύσεως τους, παρέμεινε σχετικά σταθερή για όλους τους μήνες που πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία, χωρίς να παρατηρηθούν πολλές σημαντικές διαφορές. Στην περίπτωση των δειγμάτων αγελαδινού γάλακτος η παρατήρηση της διακύμανσης των μεταβολιτών είναι πιο αξιόπιστη λόγω της μεγαλύτερης διάρκειας της δειγματοληψίας (πέντε μήνες). Στην περίπτωση των πρόβειων δειγμάτων γάλακτος στα σχήματα και στις εικόνες που χρησιμοποιήθηκαν απεικονίζονται μόνο αυτά που η δειγματοληψία διήρκησε τρεις μήνες, έναντι δύο που ήταν των υπολοίπων. Τέλος, σχολιάζονται και παρουσιάζονται οι διακυμάνσεις και των βουβαλίσια δείγματα στα οποία, ομοίως με τα πρόβεια, οι συνολικοί μήνες που διήρκησε η δειγματοληψία τους ήταν μόλις τρεις.

Η λακτόζη αποτελεί τον κύριο μεταβολίτη που περιέχεται στο γάλα σε μεγάλη ποσότητα, επομένως θα ήταν ενδιαφέρον να παρατηρηθεί η διακύμανση της συγκέντρωσής της ανάλογα την εποχή και τον παραγωγό προέλευσης για τα διάφορα είδη γάλακτος. Στον Πίνακα 1 στο **Παράρτημα** δίνονται οι τιμές της λακτόζης για όλα τα δείγματα γάλακτος όπως μετρήθηκαν στην παρούσα διατριβή. Αυτό που διαπιστώνεται για τα αγελαδινά δείγματα είναι ότι για τους περισσότερους παραγωγούς η λακτόζη (μαζί η α και η β-λακτόζη) παρουσιάζεται σημαντική μείωση της ποσότητάς της για τους μήνες του Απριλίου και του Μαΐου, ενώ από τον Ιούνιο και μετά φαίνεται να αυξάνεται. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι για έναν και μόνο παραγωγό (C.6) η διακύμανση της συγκέντρωσης της λακτόζης ήταν λίγο διαφορετική και συγκεκριμένα η ελάχιστη τιμή της ποσότητάς της παρουσιάστηκε τον μήνα Ιούνιο. Αυτή η διαφορά μπορεί να οφείλεται σε εξωγενείς παράγοντες, όπως ο γεωγραφικός τόπος εκτροφής του ζώου ή ακόμα

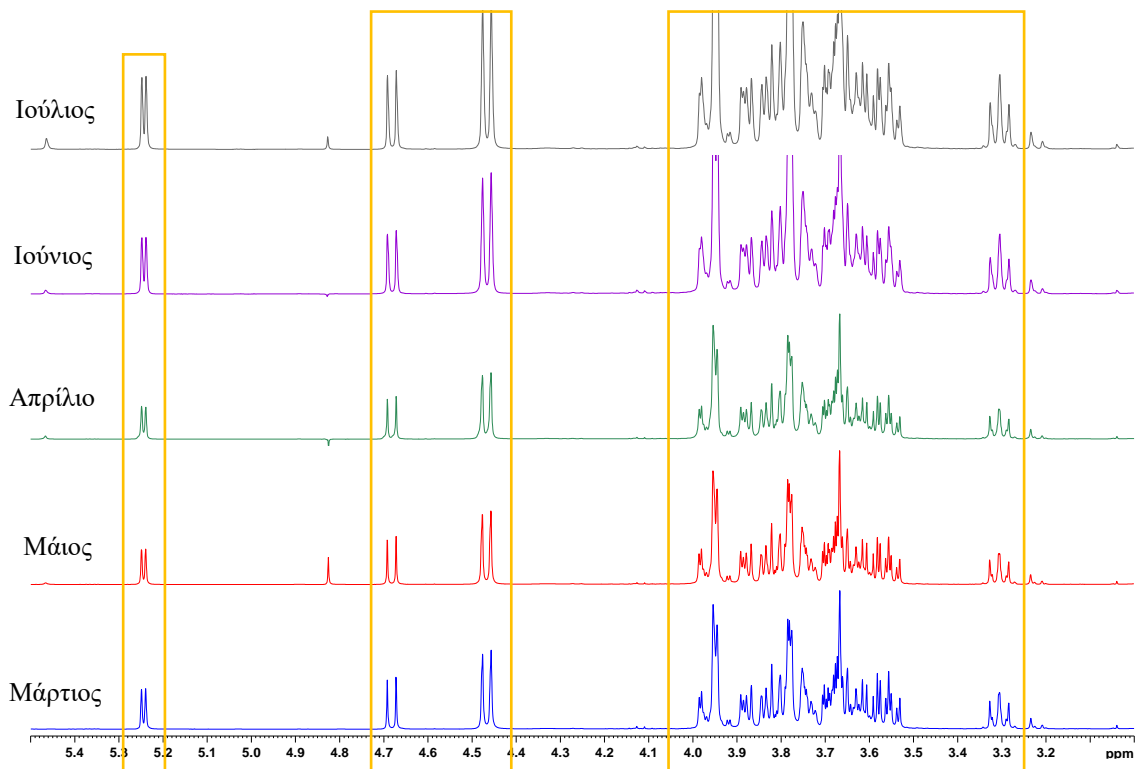
και η διαφορετική τεχνική εκτροφής, δηλαδή τι είδους τροφή χρησιμοποιεί ο συγκεκριμένος παραγωγός.

Στο **Σχήμα 6.2.1** δίνεται ενδεικτικά ως παράδειγμα η διακύμανση της ποσότητας λακτόζης στα αγελαδινά γάλατα του παραγωγού C.1 και του παραγωγού C.6, ο οποίος διαφέρει από τους υπόλοιπους. Ακόμη, παρατίθεται στην **Εικόνα 6.2.1** τα φάσματα των δειγμάτων του παραγωγού C.1 με μεγέθυνση στις κορυφές της λακτόζης (τα φάσματα παρατίθενται με την ίδια κάθετη κλίμακα), όπου και είναι εμφανής η μείωση της έντασης των κορυφών για τους μήνες του Απριλίου (B) και του Μαΐου (Γ).





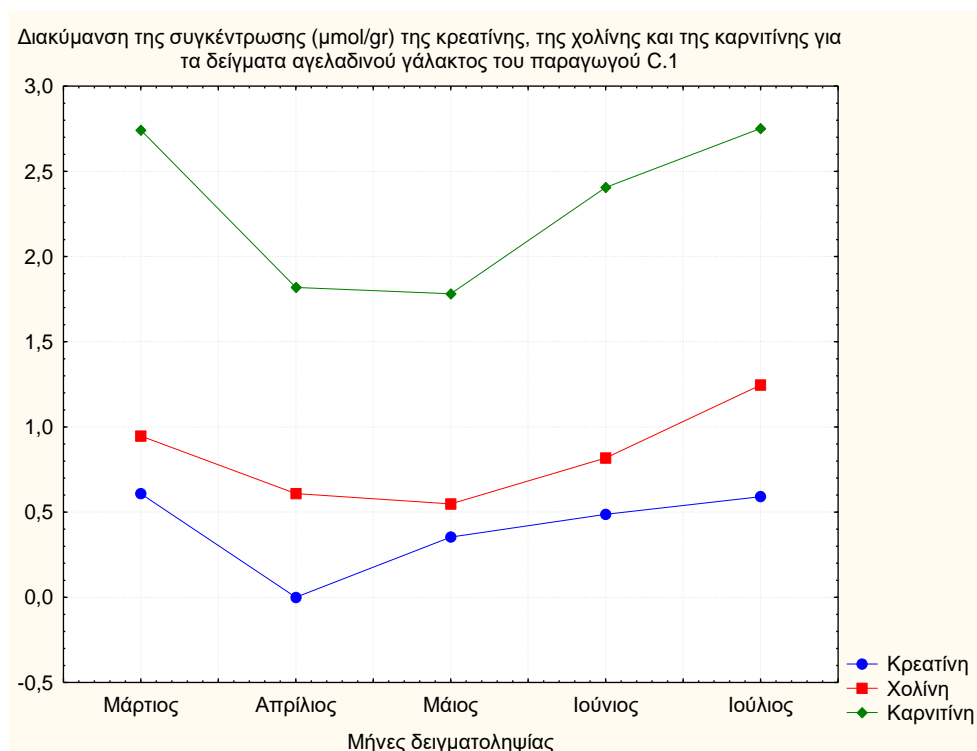
Σχήμα 6.2.1. Διάγραμμα μελέτης της διακύμανσης της συγκέντρωσης (μmol/gr) της λακτόζης στα αγελαδινά δείγματα των παραγωγών C.1 (πάνω) και C.6 (κάτω) κατά την διάρκεια της δειγματοληψίας.

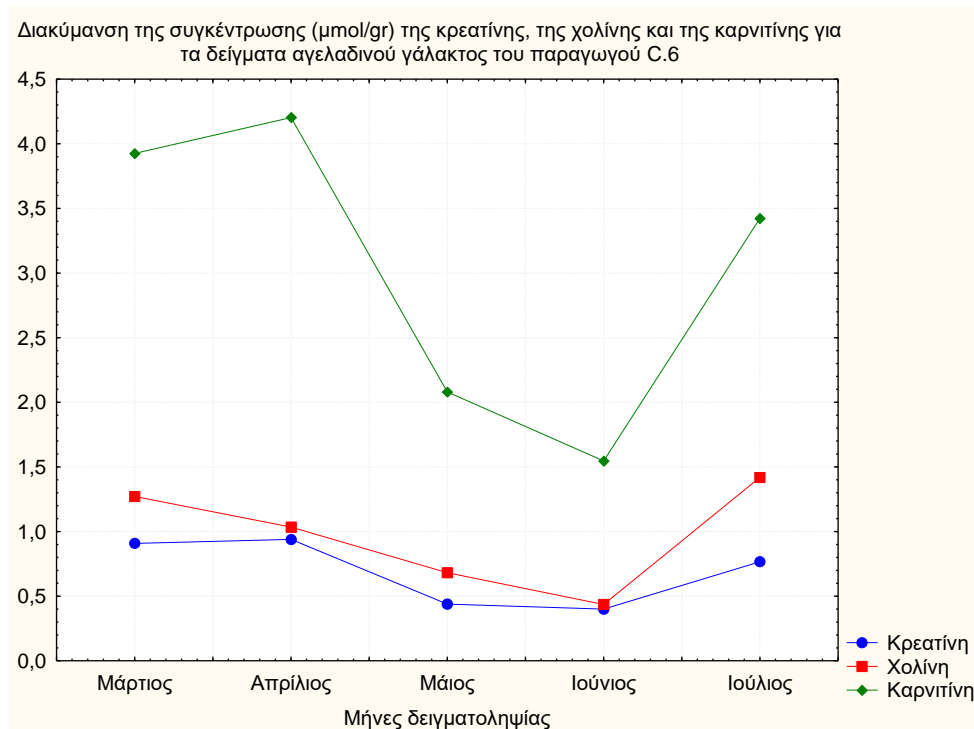


Εικόνα 6.2.1. Απεικόνιση της διακύμανσης της συγκέντρωσης της λακτόζης (κίτρινο) στα φάσματα ^1H NMR για τα δείγμα γάλακτος αγελαδινής προέλευσης του παραγωγού C.1 για τους μήνες του Μαρτίου, Απριλίου, Μαΐου, Ιουνίου και Ιουλίου. Το φάσμα αφορά πολικό εκχύλισμα γάλακτος σε διαλύτη D_2O -TMS- d_4 και λειτουργική συχνότητα 400MHz.

Αισθητή και παρόμοια διακύμανση με την λακτόζη ανάμεσα στους μήνες δειγματοληψίας παρατηρήθηκε και για ορισμένες αζωτούχες ενώσεις, συγκεκριμένα για την καρνιτίνη, την χολίνη, την κρεατίνη και το κιτρικό οξύ. Η πλειονότητα των δειγμάτων παρουσίαζαν ελάχιστες τιμές τους μήνες Απρίλιο ή Μάιο σε αυτούς τους μεταβολίτες, ενώ μόνο τα δείγματα του παραγωγού C.6 εμφάνισαν ελάχιστο τον Ιούνιο. Η καρνιτίνη έχει παρατηρηθεί από προηγούμενες έρευνες των U. Sundekilde [51] και D. Zhu [60] και των συνεργατών τους, ότι αποτελεί δείκτη διάκρισης των διάφορων φυλών αγελάδων και συγκεκριμένα της ράτσας Holstein-Friesian και Jersey. Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία παρατηρήθηκε σημαντική διακύμανση της καρνιτίνης στα αγελαδινά δείγματα, ωστόσο δεν μπορεί να γίνει συσχέτιση με τη φυλή των αγελάδων, καθώς αυτή δεν είναι γνωστή. Ακόμη, από τον L. Tenori και τους συνεργάτες του [52] έχει μελετηθεί η επίδραση του είδους της τροφής του ζώου, όπως είναι το σανό, στην σύσταση του γάλακτος και πως μπορεί ο παραγωγός τελικά να επωφεληθεί και να παράγει γάλα υψηλής θρεπτικής σημασίας σε συγκεκριμένους μεταβολίτες που επηρεάζουν θετικά τον οργανισμό, όπως είναι η κρεατίνη.

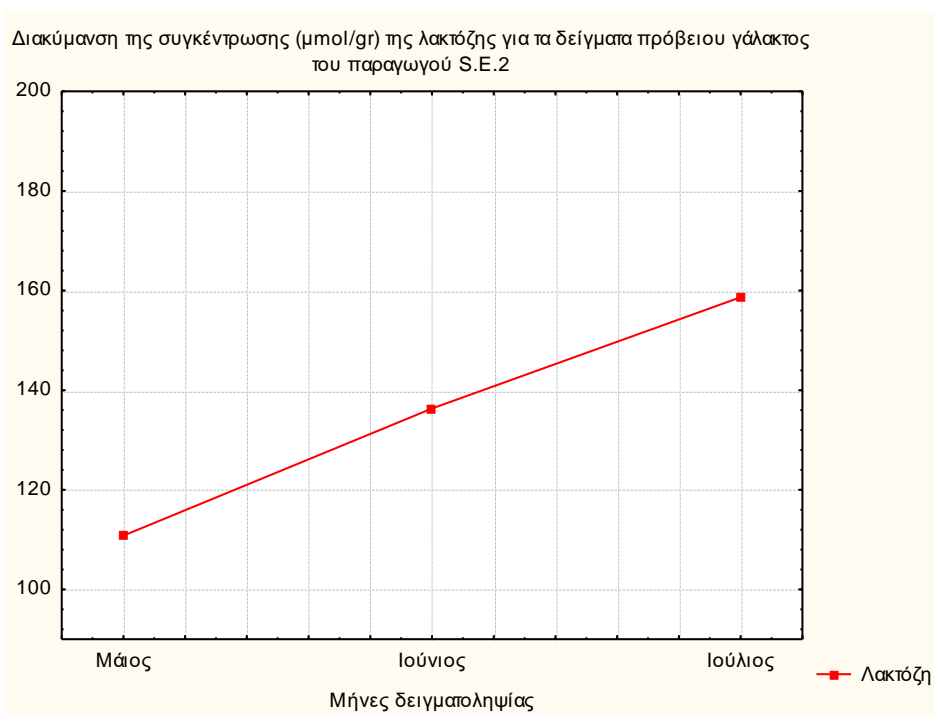
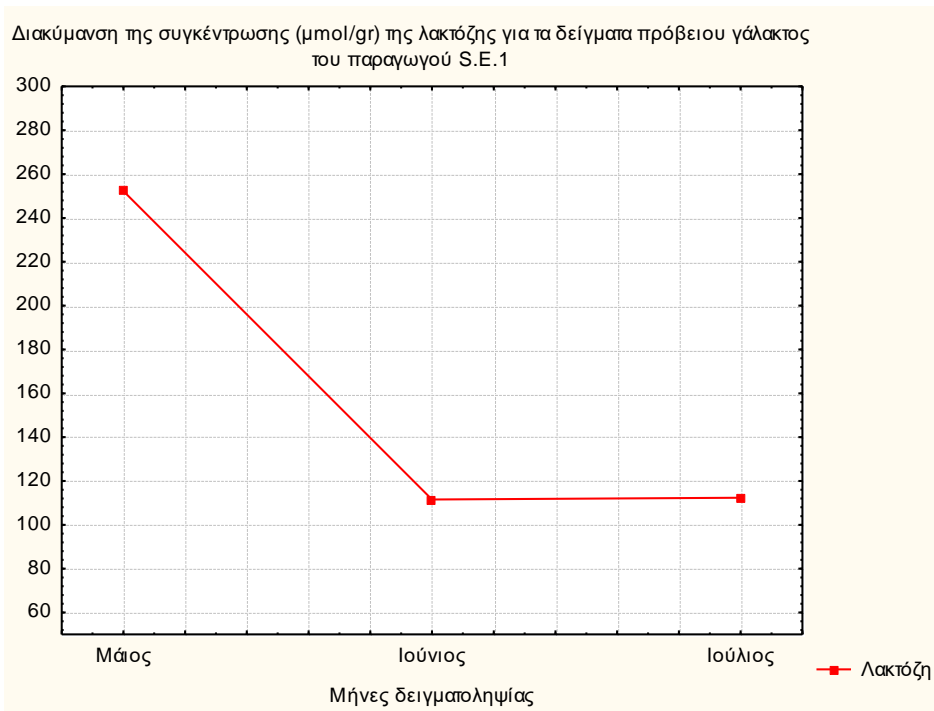
Στο **Σχήμα 6.2.2** δίνεται ενδεικτικά ως παράδειγμα η διακύμανση των προαναφερθεισών αζωτούχων ενώσεων στα αγελαδινά γάλατα του παραγωγού C.1 και του παραγωγού C.6 που διαφοροποιείται από τους υπόλοιπους. Τέλος, οι υπόλοιποι μεταβολίτες, συμπεριλαμβανομένης της σύστασης σε λιπαρά, δεν παρουσίασαν κάποια σημαντική διαφοροποίηση κατά την διάρκεια της δειγματοληψίας.





Σχήμα 6.2.2. Διάγραμμα μελέτης της διακύμανσης της συγκέντρωσης (μmol/gr) της κρεατίνης, της χολίνης και της καρνιτίνης στα αγελαδινά δείγματα των παραγωγών C.1 (πάνω) και C.6 (κάτω) κατά την διάρκεια της δειγματοληψίας.

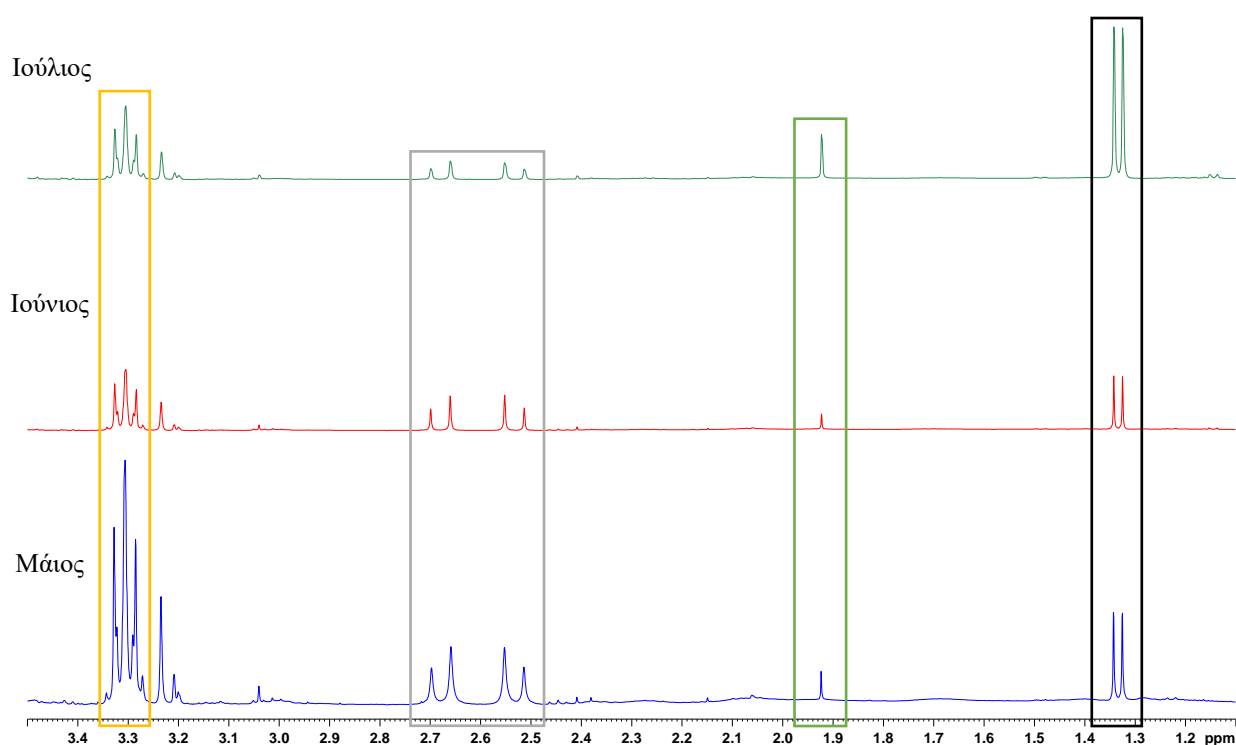
Παρόμοια μελετήθηκε και η σύσταση του γάλακτος για τα πρόβεια δείγματα γάλακτος και συγκρίθηκαν μόνο αυτά των παραγωγών S.E.1 και S.E.2, λόγω της μεγαλύτερης περιόδου δειγματοληψίας (τρεις μήνες έναντι δύο των υπολοίπων). Στο **Σχήμα 6.2.3** παρατηρούνται οι διακυμάνσεις της ποσότητας της λακτόζης κατά την διάρκεια της δειγματοληψίας και συγκεκριμένα φαίνεται η λακτόζη στα δείγματα του παραγωγού S.E.2 να αυξάνεται γραμμικά από μια χαμηλή συγκέντρωση, ενώ στην άλλη περίπτωση (παραγωγός S.E.1) να μειώνεται από μια μεγάλη ποσότητα που παρατηρείται τον Μάιο. Παρόμοια διακύμανση παρατηρήθηκε και για άλλους μεταβολίτες και συγκεκριμένα το κιτρικό, την καρνιτίνη και την GPC.



Σχήμα 6.2.3. Διάγραμμα μελέτης της διακύμανσης της συγκέντρωσης της λακτόζης, της α-λακτόζης και της β-λακτόζης στα πρόβεια δείγματα των παραγωγών S.E.1 (πάνω) και S.E.2 (κάτω) κατά την διάρκεια της δειγματοληψίας.

Αξίζει ακόμη να σημειωθεί ότι στα δείγματα γάλακτος του παραγωγού S.E.1 παρατηρήθηκε ότι η ένταση των κορυφών του λακτικού για τον μήνα του Ιουλίου είναι αρκετά μεγαλύτερη από τους δύο προηγούμενους μήνες, κάτι που δεν συμβαίνει στα δείγματα του παραγωγού

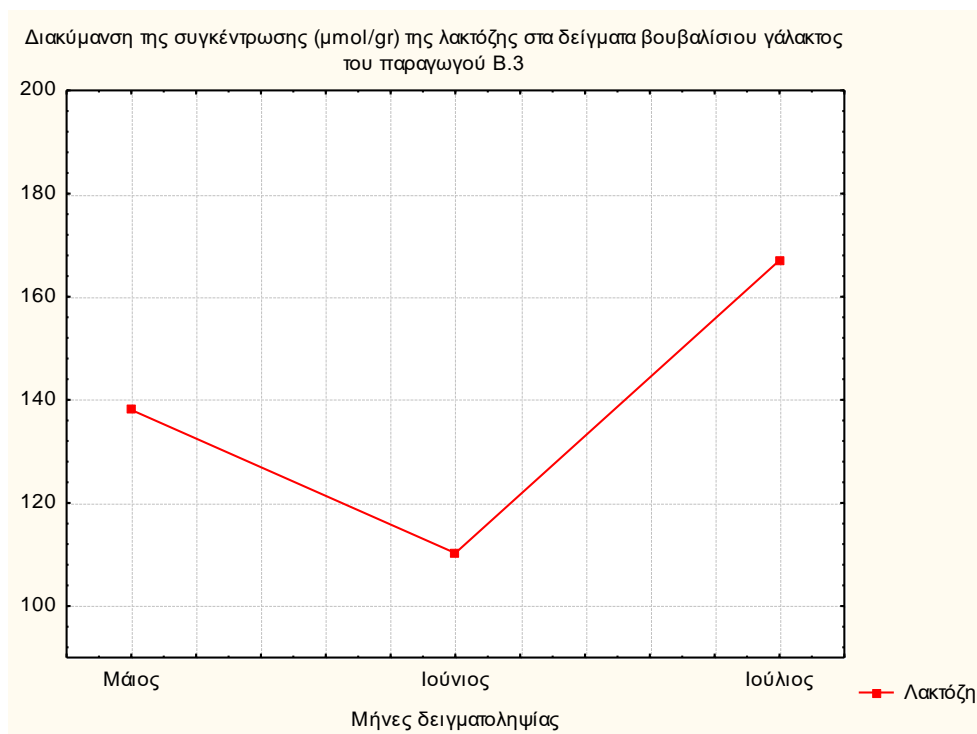
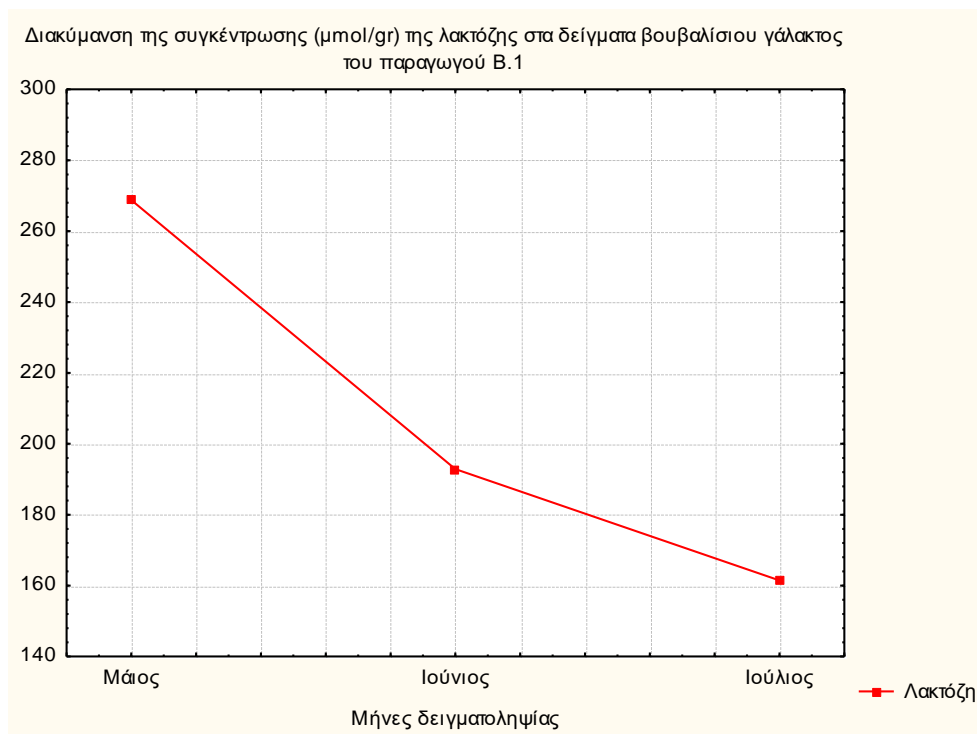
S.E.2. Στην **Εικόνα 6.2.2** παρουσιάζονται τα φάσματα ^1H NMR για τις πολικές εκχυλίσεις των δειγμάτων πρόβειου γάλακτος του παραγωγού S.E.1 και για τους τρεις μήνες δειγματοληψίας. Σε αυτή την εικόνα απεικονίζεται η απότομη μείωση της ποσότητας της β-λακτόζης από τον Μάιο στον Ιούνιο, που προαναφέρθηκε στην προηγούμενη παράγραφο, αλλά και η αισθητή αύξηση του λακτικού και του οξικού τον Ιούλιο (τα φάσματα παρατίθενται με την ίδια κάθετη κλίμακα). Αντιθέτως, παρατηρείται σταδιακή μείωση των κορυφών του κιτρικού κατά την διάρκεια της περιόδου δειγματοληψίας. Τέλος, οι υπόλοιποι μεταβολίτες, καθώς και τα λιπαρά οξέα του γάλακτος δεν παρουσίασαν κάποια άλλη εμφανή/αξιοσημείωτη διακύμανση για τους τρεις μήνες που πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία.

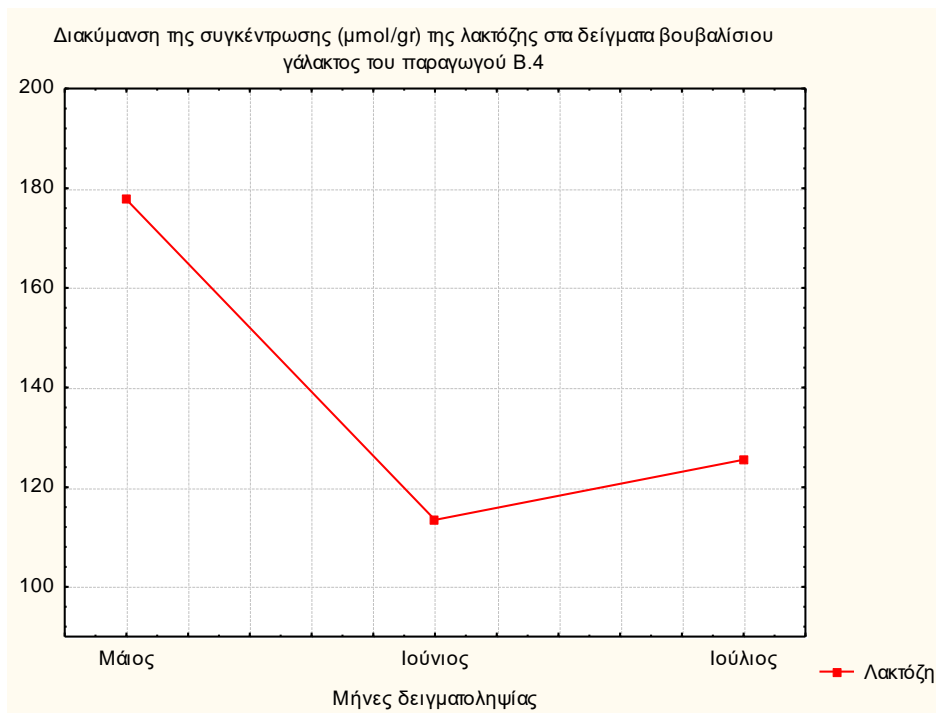


Εικόνα 6.2.2. Απεικόνιση της διακύμανσης του λακτικού (μαύρο), του οξικού (πράσινο), του κιτρικού (γκρι) και της β-λακτόζης (κίτρινο) στα φάσματα ^1H NMR για τα δείγματα γάλακτος πρόβειας προέλευσης του παραγωγού S.E.1 για τους μήνες του Μαΐου, Ιουνίου και Ιουλίου. Το φάσμα αφορά πολικό εκχύλισμα γάλακτος σε διαλύτη $\text{D}_2\text{O-TMSP-d}_4$ και λειτουργική συχνότητα 400MHz.

Στην περίπτωση των βουβαλίσσιων δειγμάτων όλων των παραγωγών που μελετήθηκαν, η περιεκτικότητα της λακτόζης παρουσίασε φθίνουσα πορεία από τον Μάιο στον Ιούνιο στην πλειονότητά τους, με εξαίρεση αυτή του παραγωγού B.2, όπου εμφανίστηκε μία σταθερότητα στην συγκέντρωσή της. Αντιθέτως, τον επόμενο μήνα παρατηρήθηκε μια μικρή αύξηση στα δείγματα όλων των παραγωγών εκτός του παραγωγού B.1, όπου συνεχίστηκε η φθίνουσα

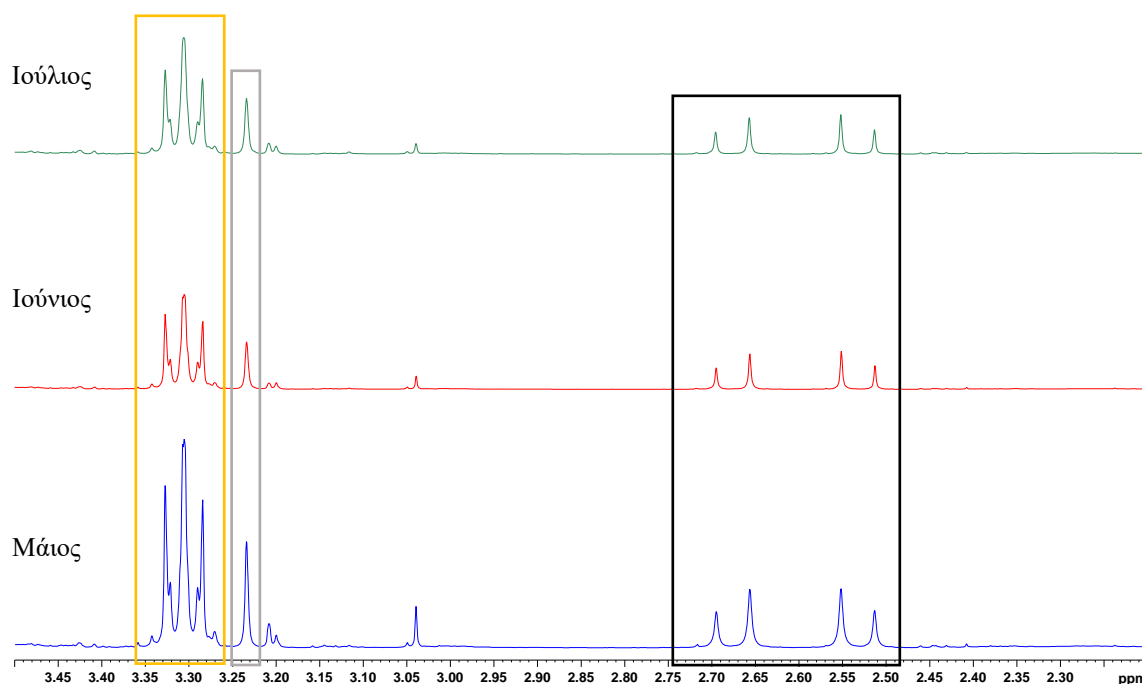
πορεία του και του παραγωγού B.4, όπου παρέμεινε σταθερή. Στο **Σχήμα 6.2.4** απεικονίζονται τα διαγράμματα διακύμανσης της συγκέντρωσης της λακτόζης που προαναφέρθηκε στα δείγματα βουβαλίσου γάλακτος των παραγωγών B.1, .B.3 και B.4.





Σχήμα 6.2.4. Διάγραμμα μελέτης της διακύμανσης της συγκέντρωσης (μmol/gr) της λακτόζης, της α-λακτόζης και της β-λακτόζης στα βουβαλίσια δείγματα των παραγωγών B.1 (πάνω), B.3 (μέση) και B.4 (κάτω) κατά την διάρκεια της δειγματοληψίας.

Επιπλέον, αισθητή και παρόμοια διακύμανση με την λακτόζη σε κάθε δείγμα εμφάνισαν το κιτρικό και η καρνιτίνη κατά την διάρκεια της δειγματοληψίας. Πιο συγκεκριμένα, για τα δείγματα γάλακτος που προέρχονταν από τους παραγωγούς B.2 και B.3 οι συγκεντρώσεις των δύο μεταβολιτών αυξήθηκαν με διαφορετικούς ρυθμούς στο διάστημα αυτών των τριών μηνών που μελετήθηκε το βουβαλίσιο γάλα. Αντιθέτως, το δείγμα του παραγωγού B.1 παρουσίασε μείωση σε αυτές τις δύο ουσίες κατά την περίοδο δειγματοληψίας, ενώ στον παραγωγό B.4 η αυτή μείωση παρατηρήθηκε μόνο από τον Μάιο στον Ιούνιο, ενώ στον επόμενο μήνα οι ποσότητές τους στο γάλα αυξήθηκαν. Αρχικά, στην **Εικόνα 6.2.3**, όπως σχολιάστηκε σε προηγούμενη παράγραφο, παρατηρείται η ένταση της τριπλής κορυφής της β-λακτόζης να μειώνεται από τον Μάιο στον Ιούνιο, ενώ τον επόμενο μήνα να αυξάνεται ελάχιστα. Ακόμη, παρατηρούνται οι συγκεντρώσεις της καρνιτίνης, της κρεατίνης και του κιτρικού να είναι μέγιστες τον μήνα του Μαΐου και να παραμένουν σχετικά σταθερές τους δύο επόμενους μήνες. Σημαντικό να σημειωθεί, ότι τα φάσματα παρατίθενται με την ίδια κάθετη κλίμακα.



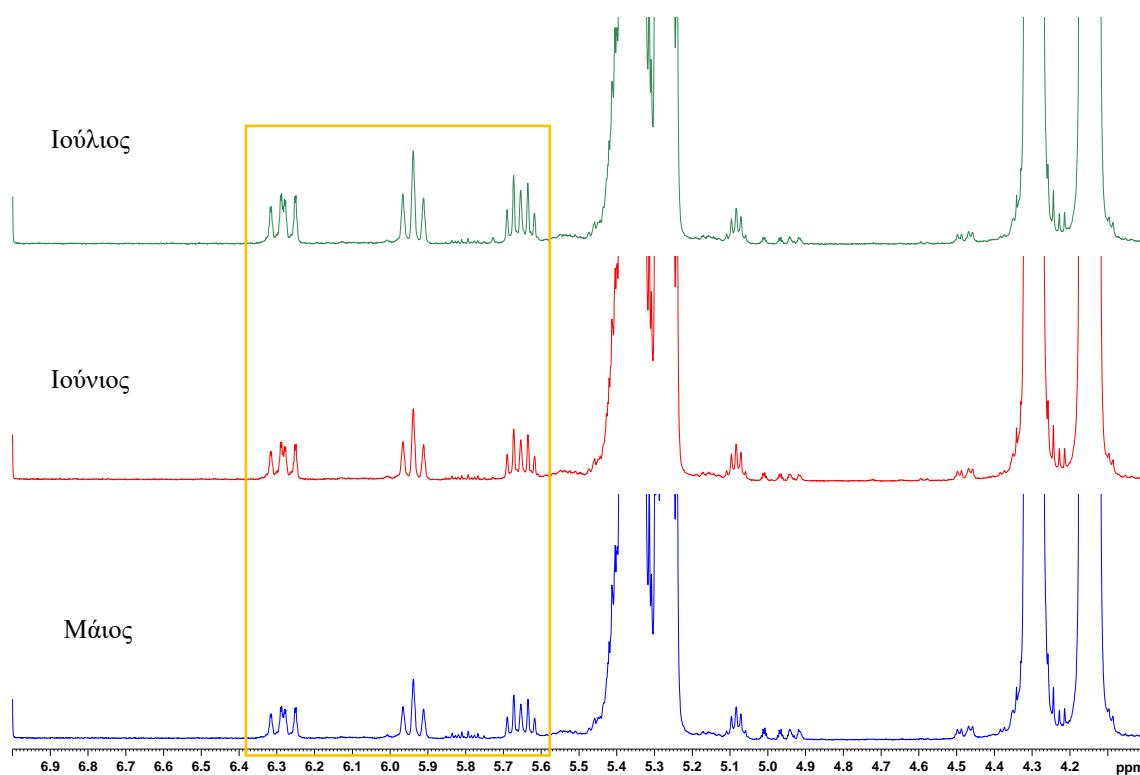
Εικόνα 6.2.3. Απεικόνιση διακύμανσης του κιτρικού (μαύρο), της κρεατίνης (γκρι) και β-λακτόζης (κίτρινο) μέσω φασμάτων ^1H NMR για τα δείγματα γάλακτος βουβαλίσιας προέλευσης του παραγωγού B.4 για τους μήνες του Μαΐου, Ιουνίου και Ιουλίου. Το φάσμα αφορά πολικό εκχύλισμα γάλακτος σε διαλύτη $\text{D}_2\text{O-TMSP-d}_4$ και λειτουργική συχνότητα 400MHz.

Αξίζει να σημειωθεί, επιπλέον, ότι μόνο στα δείγματα του παραγωγού B.4 η ποσότητα του CLA που περιέχεται στο γάλα παρουσίασε αυξητική τάση στους μήνες που πραγματοποιήθηκε η έρευνα, ξεκινώντας ωστόσο από χαμηλότερη συγκέντρωση σε σχέση με τα υπόλοιπα αντίστοιχα δείγματα, στα οποία η ποσότητα του CLA παρέμεινε σχετικά σταθερή σε υψηλές τιμές. Παράλληλα με την αύξηση του CLA, αυξήθηκε αντίστοιχα και η ποσότητα του ελαϊκού και μειώθηκαν τα κορεσμένα λιπαρά οξέα στο γάλα, γεγονός που θα μπορούσε να οφείλεται σε διαφοροποιήσεις στην διατροφή των ζώων.

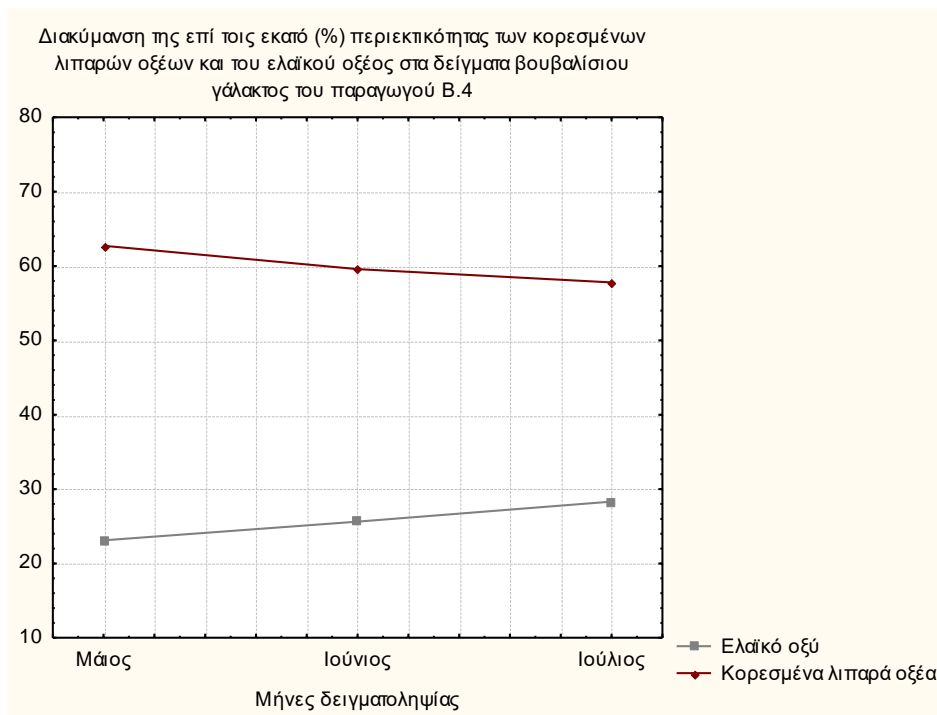
Εξαιτίας της θετικής επίδρασης του CLA στον ανθρώπινο οργανισμό, έχουν μελετηθεί διάφορες στρατηγικές εκτροφής των γαλακτοπαραγωγών ζώων και έχει παρατηρηθεί από τον C. Tsiafouli και τους συνεργάτες τους μέσω της φασματοσκοπίας NMR [12], ότι το οργανικό γάλα σε σχέση με το συμβατικό περιέχει μεγαλύτερες ποσότητες CLA, καθώς και λινολενικού και λινελαϊκού οξέος. Ακόμη, έχει παρατηρηθεί ότι με την χρήση οργανικής τροφής μειώνονται τα κορεσμένα λιπαρά του γάλακτος και αυξάνονται τα μονοακόρεστα και πολυακόρεστα λιπαρά, διότι η προέλευση των λιπαρών οξέων με μακριές αλυσίδες είναι αποκλειστικά από την διατροφή του γαλακτοπαραγωγού ζώου, ενώ οι βραχείες αλυσίδες βιοσυντίθενται στον μαστικό αδένα του [18].

Στην **Εικόνα 6.2.4** διακρίνεται η αυξητική πορεία της συγκέντρωσης του CLA στα βουβαλίσια γάλατα σε όλη την διάρκεια της δειγματοληψίας με τον μήνα του Ιουλίου να φτάνει την ίδια περίπου ποσότητα με τα αντίστοιχα των άλλων παραγωγών (τα φάσματα παρατίθενται με την ίδια κάθετη κλίμακα). Στο **Σχήμα 6.2.5** απεικονίζεται η φθίνουσα και η αυξητική πορεία της εκατοστιαίας περιεκτικότητας των κορεσμένων λιπαρών οξέων και του ολεϊκού οξέος, αντίστοιχα.

Τέλος, οι υπόλοιποι μεταβολίτες μαζί και τα λιπαρά του βουβαλίσσιου γάλακτος δεν παρουσίασαν κάποια άλλη εμφανής και αξιοσημείωτη διακύμανση για τους τρεις μήνες που πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία τους.



Εικόνα 6.2.4. Απεικόνιση της διακύμανσης της συγκέντρωσης του CLA (κίτρινο) στα φάσματα ¹H NMR για τα δείγματα γάλακτος βουβαλίσιας προέλευσης του παραγωγού B.4 για τους μήνες του Μαΐου, Ιουνίου και Ιουλίου. Το φάσμα αφορά άπολο εκχύλισμα γάλακτος σε διαλύτη CDCl₃-TMS και λειτουργική συχνότητα 400MHz.

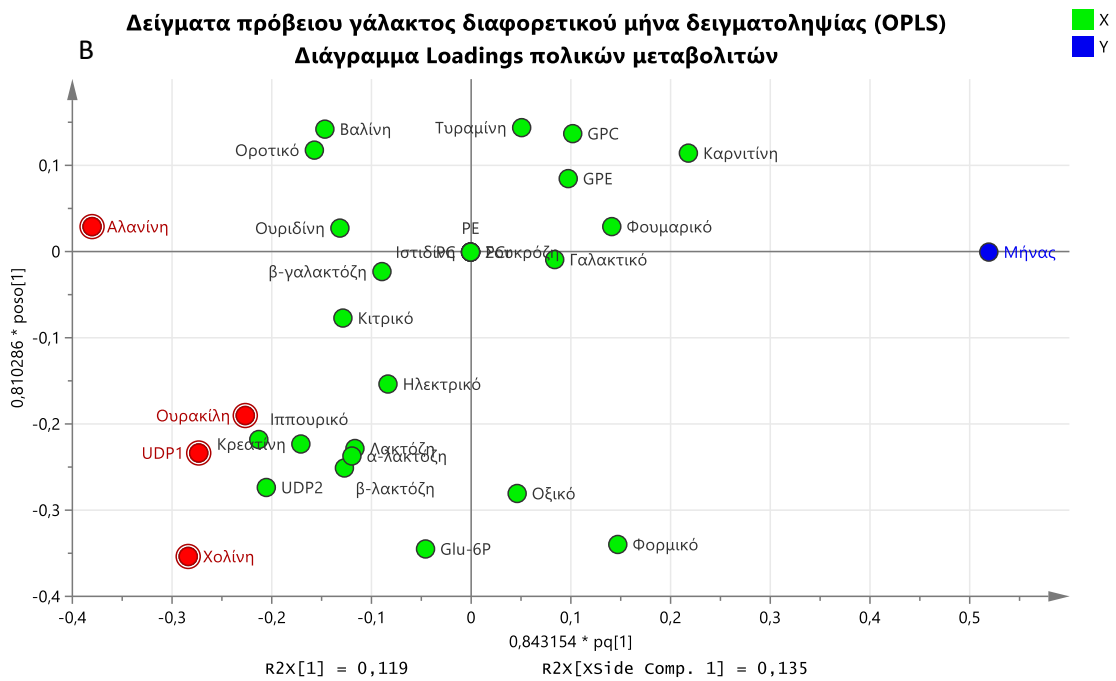
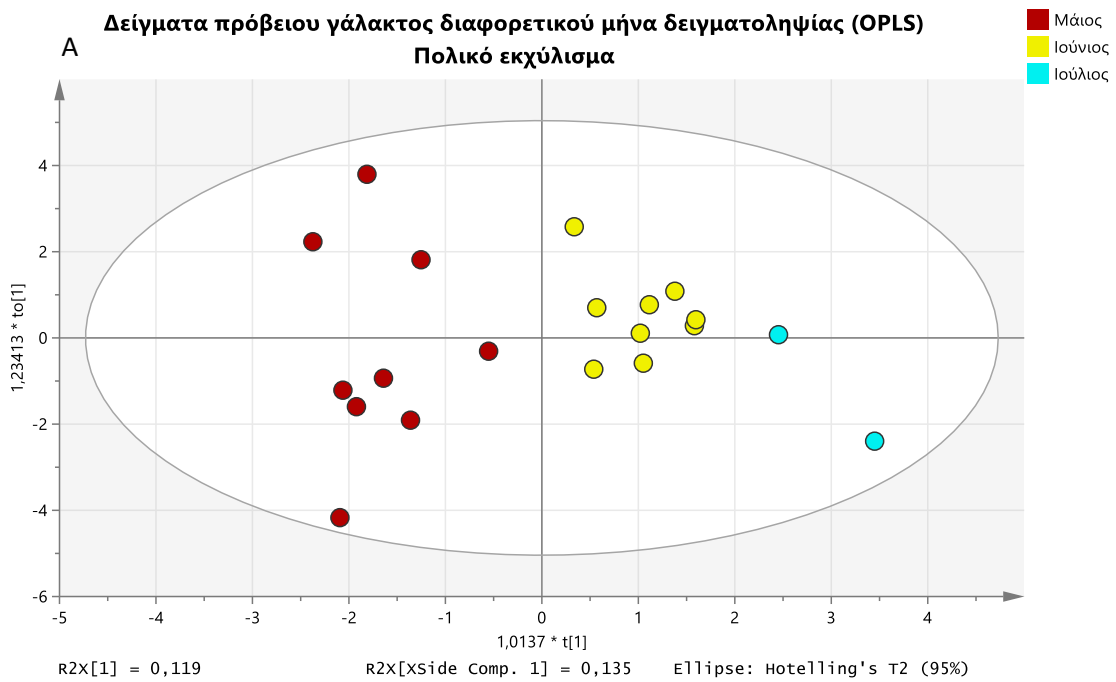


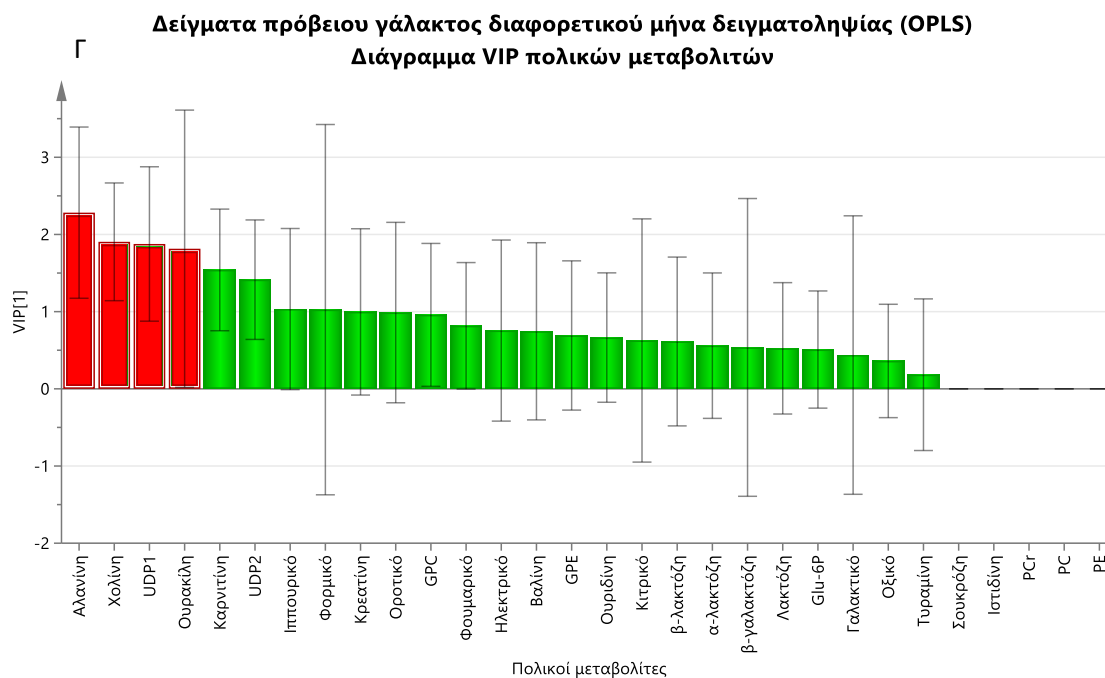
Σχήμα 6.2.5. Διάγραμμα μελέτης της διακύμανσης της επί τοις εκατό περιεκτικότητας των κορεσμένων λιπαρών οξέων και του ελαϊκού οξέος στα βουβαλίσια δείγματα των παραγωγών Β.4 κατά την διάρκεια της δειγματοληψίας.

6.3 Στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση ως προς τον μήνα δειγματοληψίας

Εκτός από τα μοντέλα διαχωρισμού των δειγμάτων ανάλογα το είδος του γαλακτοπαραγωγού ζώου, πραγματοποιήθηκε και στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση για την κατηγοριοποίησή τους ως προς τον μήνα δειγματοληψίας. Ομοίως με την αντίστοιχη ενότητα του προηγούμενου κεφαλαίου, μετά την ταυτοποίηση και την ανάλυση ANOVA των διαθέσιμων δειγμάτων, ακολούθησε η ανάπτυξη πολυπαραμετρικών στατιστικών μοντέλων OPLS με την χρήση του λογισμικού Simca (Umetrics). Παρακάτω παρατίθενται μόνο τα μοντέλα που επιδεικνύουν ισχυρή διαχωριστική ικανότητα, ενώ παράλληλα σε ορισμένα στατιστικά μοντέλα, θα παρουσιαστούν διαγράμματα Loadings και VIP (Variable Importance of the Projection), όπως προκύπτουν αυτά για το κάθε ένα. Μέσω αυτών των διαγραμμάτων λαμβάνονται πληροφορίες σχετικά με την σημαντικότητα κάθε μεταβλητής στην ανάπτυξη των αντίστοιχων μοντέλων, καθώς και με την διαχωριστική ικανότητα της.

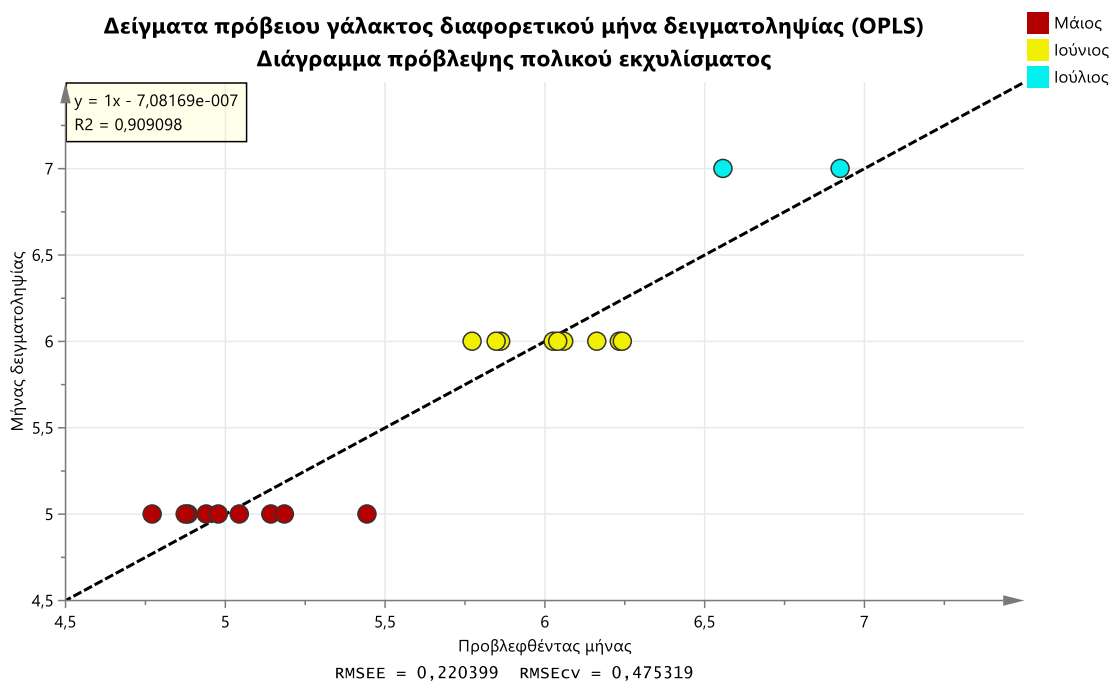
Για τα πρόβεια δείγματα γάλακτος και για τους μήνες δειγματοληψίας Μάιο μέχρι Ιούλιο, το βέλτιστο μοντέλο είναι αυτό στο οποίο χρησιμοποιήθηκαν ως δεδομένα εισόδου οι μεταβολίτες του πολικού εκχυλίσματος των δειγμάτων.





Εικόνα 6.3.1. Διάγραμμα OPLS για τα δείγματα πρόβειου γάλακτος διαφορετικού μήνα δειγματοληψίας (Μάιος με Ιούλιος) για τους μεταβολίτες του πολικού εκχυλίσματος (A), διάγραμμα βαρύτητας (Loadings) όλων των μεταβολιτών του (B) και διάγραμμα VIP (Γ) [$Q= 0.472$, $R^2X= 0.353$, $R^2Y= 0.909$].

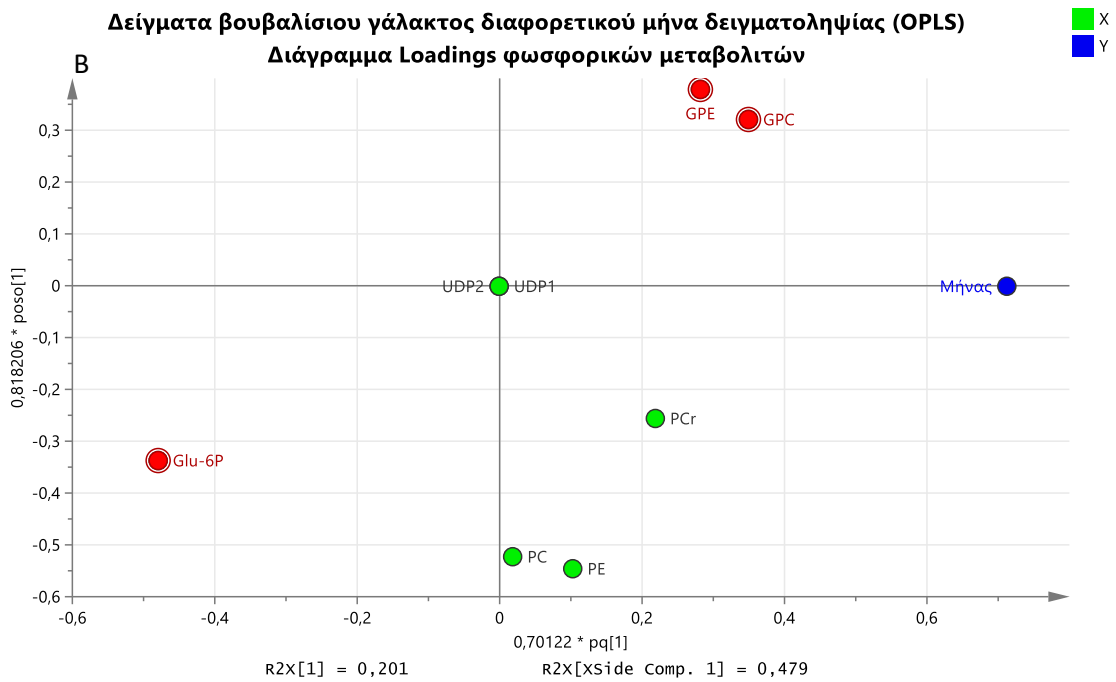
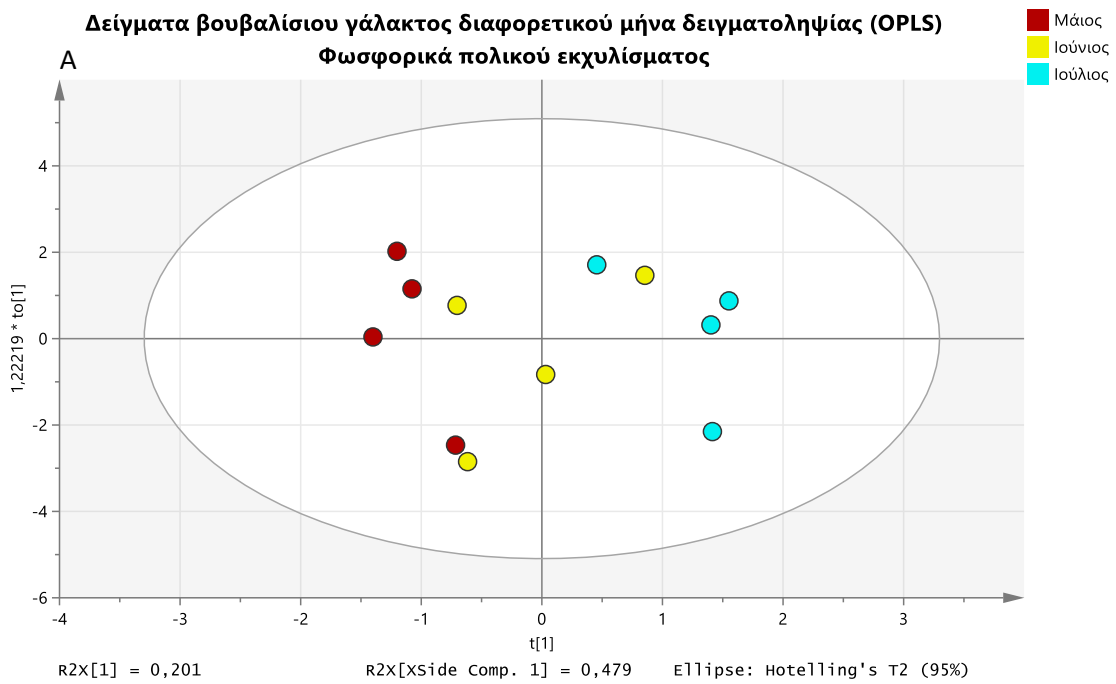
Στην **Εικόνα 6.3.1** παρουσιάζεται το μοντέλο ανάλυσης OPLS, όπου παρατηρείται ικανοποιητικός διαχωρισμός των δειγμάτων ως προς τον μήνα δειγματοληψίας, με τα δείγματα του Μαΐου να συγκεντρώνονται αριστερά στο διάγραμμα, αυτά του Ιουλίου δεξιά και αυτά του Ιουνίου να βρίσκονται ενδιάμεσα. Ακόμη, από τα διαγράμματα βαρύτητας (Loadings) και συνεισφοράς (VIP) των μεταβολιτών χρωματίστηκαν οι πιο σημαντικοί μεταβολίτες και φαίνεται να έχουν αρνητική συσχέτιση με τον μήνα, δηλαδή να μειώνεται η συγκέντρωσή τους με το πέρας της εποχής. Οι μεταβολίτες αυτοί είναι με την σειρά η αλανίνη, η χολίνη, η UDP και η ουρακίλη με $VIP > 1.82$. Οι παρατηρήσεις αυτές είναι σε συμφωνία με τις αντίστοιχες που έγιναν στο κεφάλαιο 4, από τη σύγκριση των μέσων τιμών των μεταβολιτών στα δείγματα του πρόβειου γάλακτος και την μηνιαία διακύμανσή τους. Η προβλεπτική ικανότητα (Q^2) αυτού του μοντέλου είναι χαμηλή και ίση με 0.472.

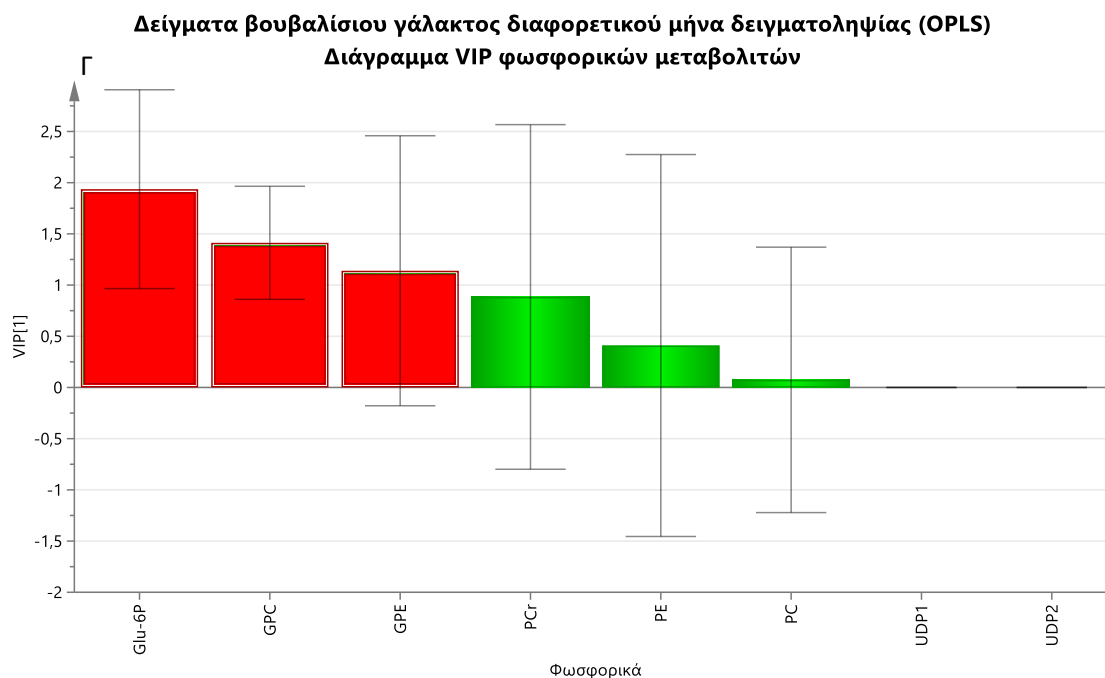


Εικόνα 6.3.2. Διάγραμμα προβλεφθέντα vs πραγματικού μήνα δειγματοληψίας για τα δείγματα πρόβειου γάλακτος.

Από το παραπάνω μοντέλο ανάλυσης OPLS δίνεται στην **Εικόνα 6.3.2** και το αντίστοιχο διάγραμμα προβλεφθείσας περιόδου δειγματοληψίας έναντι του πραγματικού μήνα όπου λήφθηκαν τα δείγματα. Όπως παρατηρείται και από την εικόνα η πρόβλεψη του μοντέλου για την κατάταξη των δειγμάτων σε συγκεκριμένους μήνες δειγματοληψίας με βάση την σύσταση του γάλακτος, είναι αρκετά καλή, με την διασπορά να είναι πολύ μικρή και ικανοποιητική ($R^2=0.91$).

Για των διαχωρισμό των δειγμάτων βουβαλίσιου γάλακτος συναρτήσει του μήνα δειγματοληψίας, ως δεδομένα εισόδου χρησιμοποιήθηκαν οι μεταβολίτες που ταυτοποιήθηκαν από τα φάσματα ^{31}P NMR, με το αντίστοιχο μοντέλο να απεικονίζεται στην **Εικόνα 6.3.3** ακολούθως.





Εικόνα 6.3.3. Διάγραμμα OPLS για τα δείγματα βουβαλίσσιου γάλακτος διαφορετικού μήνα δειγματοληψίας (Μάιος με Ιούλιος) για τους μεταβολίτες του πολικού εκχυλίσματος των φασμάτων ^{31}P NMR (A), διάγραμμα βαρύτητας (Loadings) των μεταβολιτών του (B) και διάγραμμα VIP (Γ) [$Q=0.573$, $R^2X=0.1$, $R^2Y=0.803$].

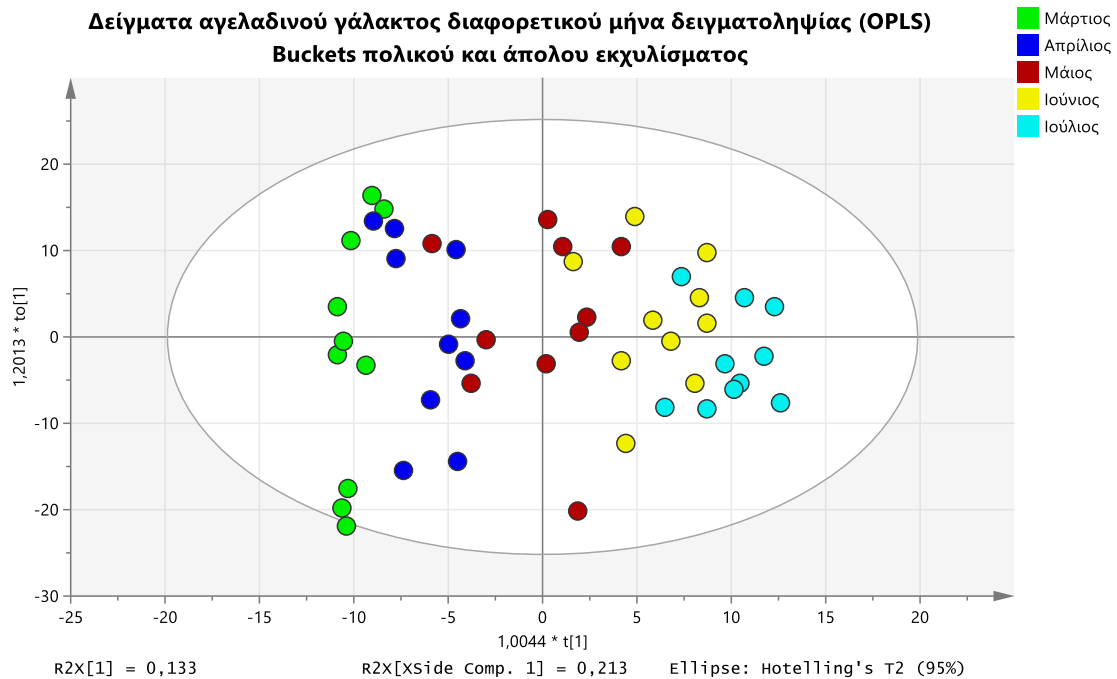
Ο διαχωρισμός των δειγμάτων στην **Εικόνα 6.3.3** με το μοντέλο ανάλυσης OPLS ως προς τον μήνα παραγωγής δεν είναι τόσο εμφανής όσο ο αντίστοιχος για τα πρόβεια γάλατα, ωστόσο χρησιμεύει στον προσδιορισμό των μεταβολών στην φωσφολιπιδική σύσταση του βουβαλίσσιου γάλακτος. Στα διαγράμματα βαρύτητας (Loadings) και συνεισφοράς (VIP) των μεταβολιτών επισημάνθηκαν με κόκκινο χρώμα οι πιο σημαντικοί μεταβολίτες, Glu-6P, GPC και GPE με $VIP > 1$. Όπως φαίνεται και από το διάγραμμα Loadings η Glu-6P έχει αρνητική συσχέτιση με τον μήνα παραγωγής, δηλαδή μειώνεται η συγκέντρωσή της, ενώ η GPC και η GPE παρουσιάζουν θετική συσχέτιση, κάτι που παρατηρήθηκε και αναφέρθηκε και στην ποσοτική ανάλυση του κεφαλαίου 4. Η προβλεπτική ικανότητα (Q^2) αυτού του μοντέλου είναι σχετικά καλή και ίση με 0.573.

6.4 Μη στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση ως προς τον μήνα δειγματοληψίας

Ομοίως πραγματοποιήθηκε και η μη στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση των δειγμάτων γάλακτος για την κατηγοριοποίηση των διάφορων ειδών ανάλογα τον μήνα που πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία. Τα μοντέλα σχεδιάστηκαν με το ίδιο λογισμικό και τρόπο

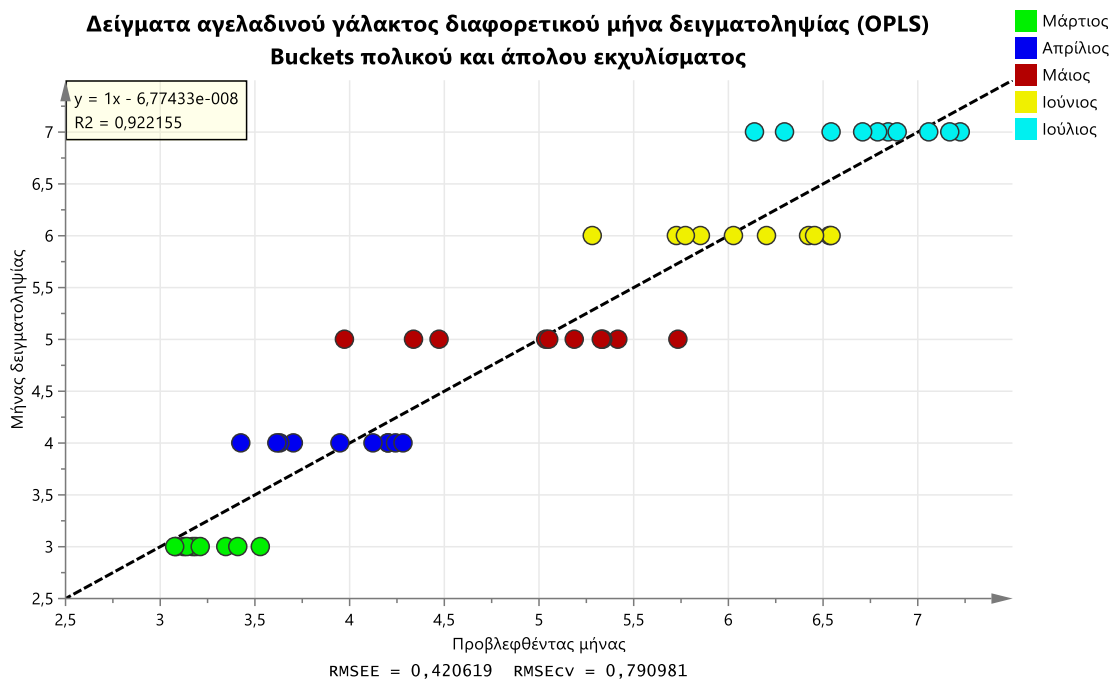
λειτουργίας που αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 5. Στην συγκεκριμένη περίπτωση, ωστόσο, ως δεδομένα εισόδου χρησιμοποιήθηκαν ολόκληρα τα φάσματα ^1H και ^{31}P NMR που ελήφθησαν.

Παρακάτω απεικονίζονται μόνο τα μοντέλα που εμφανίζουν σημαντική διαχωριστική ισχύ και πρωτίστως παρατίθεται ένα μοντέλο OPLS για τα αγελαδινά δείγματα. Σε αυτό το χρησιμοποιήθηκαν ως δεδομένα εισόδου τα buckets του πολικού και άπολου εκχυλίσματος των δειγμάτων γάλακτος για τα φάσματα ^1H NMR..



Εικόνα 6.4.1. Διάγραμμα OPLS για τα δείγματα αγελαδινού γάλακτος διαφορετικού μήνα δειγματοληψίας (Μάρτιος με Ιούλιος) από τα buckets του πολικού και άπολου εκχυλίσματος των φασμάτων ^1H NMR [$Q=0.687$, $R^2X=0.922$, $R^2Y=0.586$].

Στην **Εικόνα 6.4.1** παρουσιάζεται το μοντέλο ανάλυσης OPLS, όπου γίνεται μερικός διαχωρισμός των δειγμάτων ως προς τον μήνα που έγινε η δειγματοληψία και συγκεκριμένα φαίνεται τα δείγματα του Μαρτίου κατατάσσονται αριστερά στο μοντέλο και όσο περνάνε οι μήνες τα δείγματα να μετατοπίζονται όλο πιο δεξιά. Η προβλεπτική ικανότητα (Q^2) αυτού του μοντέλου είναι ικανοποιητική και ίση με 0.687.



Εικόνα 6.4.2. Διάγραμμα προβλεφθέντα vs πραγματικού μήνα δειγματοληψίας για τα δείγματα αγελαδινού γάλακτος.

Από το μοντέλο ανάλυσης OPLS της **Εικόνας 6.4.1** δίνεται στην **Εικόνα 6.4.2** η πρόβλεψη του μοντέλου για την κατάταξη των δειγμάτων σε συγκεκριμένους μήνες ανάλογα την σύσταση του γάλακτος βάσει ολόκληρου του φάσματος ^1H NMR. Από αυτό το διάγραμμα φαίνεται η διασπορά των δειγμάτων γάλακτος να είναι πολύ μικρή ($R^2= 0.92$).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία έγινε προσπάθεια μελέτης με την χρήση της φασματοσκοπίας NMR του πρώτου τρόφιμου όλων των θηλαστικών ζώων μαζί και του ανθρώπου, το γάλα. Τα συστατικά του γάλακτος και η θρεπτική αξία που το χαρακτηρίζει, το καθιστούν απαραίτητο για μια σωστή και ισορροπημένη ανάπτυξη. Αυτό οδήγησε την ανάγκη για την ενδελεχή ανάλυση του με σκοπό την κατανόηση της επίδρασης διαφόρων παραγόντων (ζωική προέλευση, εποχή παραγωγής, παραγωγός κ.λπ.) στην διακύμανση της σύστασης των συστατικών του, και κατ' επέκταση στην υγεία του ανθρώπου.

Συνολικά παραχωρήθηκαν για αυτή την έρευνα 91 δείγματα γάλακτος διαφορετικής ζωικής προέλευσης, με διαφορετικούς μήνες δειγματοληψίας για κάθε είδος και προερχόμενα από διαφορετικούς παραγωγούς. Στα δείγματα εφαρμόστηκε μία απλή τεχνική, αυτή της εκχύλισης, για την απομόνωση των πολικών και άπολων εκχυλισμάτων τους και ακολούθησε η λήψη φασμάτων ^1H και ^{31}P NMR για την ποιοτική, ποσοτική και στατιστική ανάλυση των μεταβολιτών τους. Βασικός στόχος αυτής της έρευνας είναι η ανάπτυξη ενός μεταβολικού προφίλ για κάθε είδος γάλακτος και η διερεύνηση πιθανών διαφοροποιήσεων ως προς την ζωική προέλευση. Ακόμη, δόθηκε η δυνατότητα μελέτης της διακύμανσης της σύστασης του γάλακτος κατά τους διαφορετικούς μήνες δειγματοληψίας του αλλά και η οποιαδήποτε διαφοροποίηση στη σύσταση που μπορεί να παρατηρείται ανάμεσα σε δείγματα που προέρχονται από διαφορετικούς παραγωγούς.

Η τεχνική της φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς για την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση 39 μεταβολιτών του γάλακτος, οι οποίοι απομονώθηκαν στην πολική και άπολη φάση των εκχυλίσεων.

Μετά την ποιοτική ανάλυση των φασμάτων που ελήφθησαν και την ταυτοποίηση όσο το δυνατόν περισσότερων μεταβολιτών, ακολούθησε η ποσοτικοποίησή τους. Από τις διάμεσες τιμές που υπολογίστηκαν για κάθε είδος γάλακτος βρέθηκε ότι η σύσταση του γάλακτος, με βάση την ζωική προέλευση, διαφέρει μερικώς και κάθε είδος προσφέρει συγκεκριμένα θρεπτικά χαρακτηριστικά. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι στο βουβαλίσιο γάλα περιέχεται μεγάλη ποσότητα CLA και βουτυρικού οξέος, με το γαϊδουρινό να εμφανίζει μηδενική και ελάχιστη ποσότητα στους δύο αυτούς μεταβολίτες αντίστοιχα. Οι δύο αυτοί μεταβολίτες έχει παρατηρηθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόληψη διάφορων ειδών καρκίνου, αφού το πρώτο έχει αντιπολλαπλασιαστική δράση και το δεύτερο αποτελεί γνωστό διαμορφωτή της γονιδιακής λειτουργίας. Αντιθέτως, το γαϊδουρινό χαρακτηρίζεται από πολύ υψηλή περιεκτικότητα σε λινολενικό και λινελαϊκό οξύ σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη, τα οποία ως πολυακόρεστα λιπαρά μπορούν και αντιδρούν με ελεύθερες ρίζες που υπάρχουν μέσα στα

κύνταρα, παρέχοντας αντιοξειδωτική προστασία. Στα πρόβεια και γίδινα γάλατα ανιχνεύτηκε υψηλότερη περιεκτικότητα σε κορεσμένα λιπαρά οξέα, τα οποία έχουν συνδεθεί με παθολογίες όπως η παχυσαρκία και αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιακών παθήσεων. Ο λόγος που παρατηρείται αυτή η διαφοροποίηση των κορεσμένων λιπαρών σε αυτά τα δύο είδη γάλακτος πιθανότατα οφείλεται στον διαφορετικό μεταβολισμό αυτών των θηλαστικών. Τέλος, παρατηρήθηκε ότι το αγελαδινό γάλα, που καταναλώνεται από τον άνθρωπο περισσότερο από κάθε άλλο είδος, περιέχει την μικρότερη ποσότητα από τον κύριο μεταβολίτη, την λακτόζη.

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση των μεταβολομικών δεδομένων του γάλακτος με την χρήση της στοχευμένης και μη στοχευμένης τεχνικής και η ανάπτυξη των αντίστοιχων πολυπαραμετρικών στατιστικών μοντέλων PCA, OPLS-DA και OPLS, προκειμένου να ελεγχθεί η κατηγοριοποίηση των δειγμάτων. Ορισμένα μοντέλα κατάφεραν να ομαδοποιήσουν και να διαφοροποιήσουν αρκετά ικανοποιητικά τα δεδομένα βάσει της ζωικής προέλευσης του γάλακτος, παρ' όλο που η χημική σύστασή του μεταβάλλονταν ελαφρά ανάλογα τον μήνα που πραγματοποιούνταν η δειγματοληψία.

Από τις δύο τεχνικές που προαναφέρθηκαν, αυτή της μη στοχευμένης φάνηκε να υπερτερεί και να διαχωρίζει καλύτερα τα δείγματα ως προς την ζωική προέλευση και για τα δύο εκχυλίσματα που ελέγχθηκαν. Από το μοντέλο της **Εικόνας 5.1.2** φαίνεται, ότι τα αγελαδινά, τα βουβαλίσια και τα γαϊδουρινά δείγματα ξεχωρίζουν από τα υπόλοιπα είδη, ενώ αυτά των πρόβειων και των γίδινων διαχωρίζοντας μόνο μερικώς μεταξύ τους. Από αυτό συμπεραίνεται ότι τα δύο αυτά είδη γάλακτος έχουν παρόμοια χαρακτηριστικά και κατατάσσονται αντιδιαμετρικά από αυτά των αγελαδινών. Ακόμη παρατηρείται, ότι τα βουβαλίσια δείγματα τοποθετούνται απέναντι από αυτά των γαϊδουρινών, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης στα πρώτα των CLA και βουτυρικού οξέος σε σχέση με όλα τα άλλα είδη γάλακτος, ενώ τα δεύτερα έχουν πολύ μικρή συγκέντρωση έως καθόλου. Επομένως, το μοντέλο αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για έλεγχο της αυθεντικότητας του βουβαλίσιου και του γαϊδουρινού γάλακτος από εμπορικές προσπάθειες νόθευσης με άλλα είδη γάλακτος, αλλά και για την πρόβλεψη της ζωικής προέλευσης άγνωστων δειγμάτων γάλακτος μέσω της φασματοσκοπίας NMR. Ακόμη από τα δεδομένα των πολικών και άπολων μεταβολιτών αναπτύχθηκαν μοντέλα για την πιθανή διαφοροποίηση των πρόβειων δειγμάτων γάλακτος ανάλογα την ράτσα του προβάτου (Lacaune και Χίου). Από τα αντίστοιχα διαγράμματα Loadings και VIP παρατηρείται, ότι οι πιο σημαντικοί μεταβολίτες που συνεισφέρουν σε αυτό τον διαχωρισμό είναι ορισμένα φωσφολιπίδια (PC, PCr, PE) και το βουτυρικό οξύ. Το CLA, στο οποίο έχει μελετηθεί αρκετά η διακύμανσή του βάσει της διατροφής του ζώου, στην συγκεκριμένη διαφοροποίηση δεν φαίνεται να συνεισφέρει ιδιαίτερα στον διαχωρισμό της ράτσας των δύο τύπων προβάτων.

Για την μελέτη της διακύμανσης της σύστασης του γάλακτος με βάση το μήνα που πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία για κάθε είδος ζώου, δημιουργήθηκαν τα αντίστοιχα διαγράμματα scatterplot απεικονίζοντας τις όποιες διαφορές υπάρχουν στα δείγματα διαφορετικής ζωικής προέλευσης. Από αυτή την ανάλυση παρατηρήθηκε ότι τα δείγματα γάλακτος εμφάνισαν και διαφορετική διακύμανση από παραγωγό σε παραγωγό. Αυτές οι διαφορές μπορεί να οφείλονται στον διαφορετικό τόπο ή και την διαφορετική στρατηγική εκτροφής των γαλακτοπαραγωγών ζώων. Ωστόσο, λόγω έλλειψης πληροφοριών σχετικά με την γεωγραφική περιοχή κάθε φάρμας και με το είδος της τροφής με την οποία εκτρέφονταν τα ζώα, όποια συμπεράσματα αναφέρθηκαν αποτελούν μόνο ως πιθανές ενδείξεις. Παράλληλα, αναπτύχθηκαν μοντέλα διαχωρισμού των δειγμάτων ως προς το μήνα δειγματοληψίας αλλά μόνο για τα πρόβεια και τα βουβαλίσια γάλατα, χωρίς κάποιο από τα μοντέλα να τα διαχωρίζει ικανοποιητικά. Για τα αγελαδινά γάλατα δεν παρατηρήθηκε κάποια ταξινόμηση, ενώ για τα γίδινα και τα γαϊδουρινά ήταν πολύ μικρός ο αριθμός των διαθέσιμων δειγμάτων.

Συνοπτικά, η φασματοσκοπία NMR αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για την ανάλυση τροφίμων και όπως δείχθηκε στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία, για την ανάλυση γάλακτος με διαφορετική ζωική προέλευση. Η μεταβολομική ανάλυση στο γάλα αντιπροσωπεύει ένα πολλά υποσχόμενο πεδίο μελέτης και έχει τη δυνατότητα να προσφέρει σε πολλά διαφορετικά επίπεδα στους πρωτογενείς παραγωγούς, τη βιομηχανία και τους καταναλωτές, είτε ανιχνεύοντας και αποτρέποντας ανεπιθύμητες πρακτικές νόθευσης, είτε ως εργαλείο επιλεκτικής βελτιστοποίησης της θρεπτικής αξίας του. Ακόμη, αυτού του είδους οι μελέτες είναι σημαντικές για την καλύτερη κατανόηση της φυσιολογίας των μαστικών αδένων των ζώων, των γαλακτοκομικών προϊόντων, της επιστήμης των ζώων και των τροφίμων γενικότερα. Τέλος, θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι μεταβολίτες του γάλακτος που ανιχνεύονται από τη μεταβολομική ανάλυση με βάση τη Φασματοσκοπία NMR, είναι σημαντικοί και εξαιτίας της σχέσης τους με τη διατροφική ποιότητα του γάλακτος, τις τεχνολογικές του ιδιότητες, τον ποιοτικό του έλεγχο και τη βιοδραστικότητα που εμφανίζουν στον ανθρώπινο οργανισμό.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Faye, B. and G. Konuspayeva, *The sustainability challenge to the dairy sector – The growing importance of non-cattle milk production worldwide*. International Dairy Journal, 2012. **24**(2): p. 50-56.
2. Tsiplakou, E., A. Kominakis, and G. Zervas, *The interaction between breed and diet on CLA and fatty acids content of milk fat of four sheep breeds kept indoors or at grass*. Small Ruminant Research, 2008. **74**(1): p. 179-187.
3. Sundekilde, U.K., L.B. Larsen, and H.C. Bertram, *NMR-Based Milk Metabolomics*. Metabolites, 2013. **3**(2): p. 204-222.
4. Lucey, J.A., *Raw Milk Consumption: Risks and Benefits*. Nutrition Today, 2015. **50**(4): p. 189-193.
5. Angulo, F.J., J.T. LeJeune, and P.J. Rajala-Schultz, *Unpasteurized Milk: A Continued Public Health Threat*. Clinical Infectious Diseases, 2009. **48**(1): p. 93-100.
6. Claeys, W.L., et al., *Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits*. Food Control, 2013. **31**(1): p. 251-262.
7. Watts, S.M., *A mini review on technique of milk pasteurization*. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 2016. **5**: p. 99-101.
8. Thorning, T.K., et al., *Milk and dairy products: Good or bad for human health? An assessment of the totality of scientific evidence*. Food and Nutrition Research, 2016. **60**.
9. Lagutin, K., et al., *HPLC-MS, GC and NMR Profiling of Bioactive Lipids of Human Milk and Milk of Dairy Animals (Cow, Sheep, Goat, Buffalo, Camel, Red Deer)*. Separations, 2022. **9**(6).
10. Haug, A., A.T. Høstmark, and O.M. Harstad, *Bovine milk in human nutrition - A review*. Lipids in Health and Disease, 2007. **6**.
11. Li, L., X. Liu, and H. Guo, *The nutritional ingredients and antioxidant activity of donkey milk and donkey milk powder*. Food Science and Biotechnology, 2018. **27**(2): p. 393-400.
12. Tsiafoulis, C.G., et al., *NMR-based metabolomics of the lipid fraction of organic and conventional bovine milk*. Molecules, 2019. **24**(6).
13. Zervas, G. and E. Tsiplakou. *23. Goat Milk*. 2013.
14. Wu, J., et al., *NMR-based metabolite profiling of human milk: A pilot study of methods for investigating compositional changes during lactation*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2016. **469**(3): p. 626-632.
15. Tomassini, A., et al., *NMR-based metabolomics to evaluate the milk composition from Friesian and autochthonous cows of Northern Italy at different lactation times*. Natural Product Research, 2019. **33**(8): p. 1085-1091.
16. Boiani, M., et al., *Integration of high and low field 1H NMR to analyse the effects of bovine dietary regime on milk metabolomics and protein-bound moisture characterisation of the resulting mozzarella cheeses during ripening*. International Dairy Journal, 2019. **91**: p. 155-164.
17. Zhao, Y., et al., *1H NMR-based compositional identification of different powdered infant formulas*. Food Chemistry, 2017. **230**: p. 164-173.
18. Mazzei, P. and A. Piccolo, *NMR-based metabolomics of water-buffalo milk after conventional or biological feeding*. Chemical and Biological Technologies in Agriculture, 2018. **5**(1).
19. Van Leeuwen, S.S., et al., *Goat Milk Oligosaccharides: Their Diversity, Quantity, and Functional Properties in Comparison to Human Milk Oligosaccharides*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020. **68**(47): p. 13469-13485.
20. Boccia, A.C., et al., *NMR lipid profile of milk from alpine goats with supplemented hempseed and linseed diets*. Molecules, 2020. **25**(7).

21. Vincenzetti, S., et al., *A Proteomic Study on Donkey Milk*. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 2012. **1**: p. 1-8.
22. Guo, H.Y., et al., *Composition, physiochemical properties, nitrogen fraction distribution, and amino acid profile of donkey milk*. *Journal of Dairy Science*, 2007. **90**(4): p. 1635-1643.
23. Nazzaro, F., et al., *Isolation of components with antimicrobial property from the donkey milk: a preliminary study*. *The Open Food Science Journal*, 2010. **4**: p. 43-47.
24. Granato, D., et al., *Use of principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) for multivariate association between bioactive compounds and functional properties in foods: A critical perspective*. *Trends in Food Science & Technology*, 2018. **72**: p. 83-90.
25. Brereton, R.G., *A short history of chemometrics: a personal view*. *Journal of Chemometrics*, 2014. **28**(10): p. 749-760.
26. Rocchetti, G. and T.F. O'Callaghan, *Application of metabolomics to assess milk quality and traceability*. *Current Opinion in Food Science*, 2021. **40**: p. 168-178.
27. Maher, A.D. and S.J. Rochfort, *Applications of NMR in dairy research*. *Metabolites*, 2014. **4**(1): p. 131-141.
28. Sobolev, A.P., et al., *Use of NMR applications to tackle future food fraud issues*. *Trends in Food Science & Technology*, 2019. **91**: p. 347-353.
29. Triba, M.N., et al., *PLS/OPLS models in metabolomics: The impact of permutation of dataset rows on the K-fold cross-validation quality parameters*. *Molecular BioSystems*, 2015. **11**(1): p. 13-19.
30. Wold, S., et al., *Some recent developments in PLS modeling*. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2001. **58**(2): p. 131-150.
31. Trygg, J. and S. Wold, *Orthogonal projections to latent structures (O-PLS)*. *Journal of Chemometrics*, 2002. **16**(3): p. 119-28.
32. Bylesjö, M., et al., *OPLS discriminant analysis: Combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification*. *Journal of Chemometrics*, 2006. **20**(8-10): p. 341-351.
33. Yang, Y., et al., *Metabolomic biomarkers identify differences in milk produced by Holstein cows and other minor dairy animals*. *Journal of Proteomics*, 2016. **136**: p. 174-182.
34. Kwon, D.-J., et al., *Assessment of green coffee bean metabolites dependent on coffee quality using a ¹H NMR-based metabolomics approach*. *Food Research International*, 2015. **67**: p. 175-182.
35. Wei, F., et al., *¹³C NMR-Based Metabolomics for the Classification of Green Coffee Beans According to Variety and Origin*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012. **60**(40): p. 10118-10125.
36. Yilmaz, A., et al., *¹H NMR metabolic fingerprinting of saffron extracts*. *Metabolomics*, 2010. **6**(4): p. 511-517.
37. Petrakis, E.A., et al., *Evaluation of saffron (*Crocus sativus* L.) adulteration with plant adulterants by ¹H NMR metabolite fingerprinting*. *Food Chemistry*, 2015. **173**: p. 890-896.
38. Amargianitaki, M. and A. Spyros, *NMR-based metabolomics in wine quality control and authentication*. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 2017. **4**(1): p. 9.
39. Cuny, M., et al., *Fruit juice authentication by ¹H NMR spectroscopy in combination with different chemometrics tools*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008. **390**(1): p. 419-427.
40. Spraul, M., et al., *NMR-Based Multi Parametric Quality Control of Fruit Juices: SGF Profiling*. *Nutrients*, 2009. **1**(2): p. 148-155.

41. Monakhova, Y.B., et al., *Validation studies for multicomponent quantitative NMR analysis: the example of apple fruit juice*. Accreditation and Quality Assurance, 2014. **19**(1): p. 17-29.
42. Spraul, M., et al., *Mixture analysis by NMR as applied to fruit juice quality control*. Magnetic Resonance in Chemistry, 2009. **47**(S1): p. S130-S137.
43. Consonni, R., et al., *Analytical method for authentication of Traditional Balsamic Vinegar of Modena*. Talanta, 2008. **75**(3): p. 765-769.
44. Boffo, E.F., et al., *Classification of Brazilian vinegars according to their ¹H NMR spectra by pattern recognition analysis*. LWT - Food Science and Technology, 2009. **42**(9): p. 1455-1460.
45. Kazalaki, A., et al., *Identification and quantitative determination of carbohydrate molecules in Greek honey by employing ¹³C NMR spectroscopy*. Analytical Methods, 2015. **7**(14): p. 5962-5972.
46. Spiteri, M., et al., *Combination of ¹H NMR and chemometrics to discriminate manuka honey from other floral honey types from Oceania*. Food Chemistry, 2017. **217**: p. 766-772.
47. Spiteri, M., et al., *Fast and global authenticity screening of honey using ¹H-NMR profiling*. Food Chemistry, 2015. **189**: p. 60-66.
48. Parlak, Y. and N. Guzeler, *Nuclear magnetic resonance spectroscopy applications in foods*. Current Research in Nutrition and Food Science, 2016. **4**(SpecialIssue2): p. 161-168.
49. Scano, P., et al., *NMR metabolite profiles of dairy: A review*. International Dairy Journal, 2019. **90**: p. 56-67.
50. Brescia, M.A., et al., *Characterisation of the geographical origin of buffalo milk and mozzarella cheese by means of analytical and spectroscopic determinations*. Food Chemistry, 2005. **89**(1): p. 139-147.
51. Sundekilde, U.K., et al., *Relationship between the metabolite profile and technological properties of bovine milk from two dairy breeds elucidated by NMR-based metabolomics*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011. **59**(13): p. 7360-7367.
52. Tenori, L., et al., *NMR metabolomic fingerprinting distinguishes milk from different farms*. Food Research International, 2018. **113**: p. 131-139.
53. Sun, Y., et al., *Characterization of the serum metabolic profile of dairy cows with milk fever using ¹H-NMR spectroscopy*. Veterinary Quarterly, 2014. **34**(3): p. 159-163.
54. Sundekilde, U.K., et al., *Nuclear magnetic resonance metabolomics reveals strong association between milk metabolites and somatic cell count in bovine milk*. Journal of Dairy Science, 2013. **96**(1): p. 290-299.
55. Marincola, F.C., et al., *A metabolomic study of preterm human and formula milk by high resolution NMR and GC/MS analysis: Preliminary results*. Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine, 2012. **25**(SUPPL. 5): p. 62-67.
56. Gómez-Gallego, C., et al., *Human breast milk NMR metabolomic profile across specific geographical locations and its association with the milk microbiota*. Nutrients, 2018. **10**(10).
57. Foroutan, A., et al., *Chemical Composition of Commercial Cow's Milk*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019. **67**(17): p. 4897-4914.
58. Murgia, A., et al., *Characterization of donkey milk and metabolite profile comparison with human milk and formula milk*. LWT, 2016. **74**: p. 427-433.
59. Abbas, H., et al., *Bioactive Lipids and Phospholipids Classes of Buffalo and Goat Milk Affected by Seasonal Variations*. 2019.
60. Zhu, D., et al., *Changes in milk metabolome during the lactation of dairy cows based on ¹H NMR and UHPLC-QToF/MS*. International Dairy Journal, 2020. **111**: p. 104836.

61. Gatzias, I.S., et al., *Characterization and differentiation of sheep's milk from Greek breeds based on physicochemical parameters, fatty acid composition and volatile profile*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2018. **98**(10): p. 3935-3942.
62. Anagnostopoulos, A.K., et al., *Milk of Greek sheep and goat breeds; characterization by means of proteomics*. Journal of Proteomics, 2016. **147**: p. 76-84.
63. Sinanoglou, V.J., et al., *Assessment of lactation stage and breed effect on sheep milk fatty acid profile and lipid quality indices*. Dairy Science and Technology, 2015. **95**(4): p. 509-531.
64. Anagnostopoulos, A.K., et al., *Dataset of milk whey proteins of three indigenous Greek sheep breeds*. Data in Brief, 2016. **8**: p. 877-880.
65. Tsiplakou, E. and G. Zervas, *The effect of dietary inclusion of olive tree leaves and grape marc on the content of conjugated linoleic acid and vaccenic acid in the milk of dairy sheep and goats*. Journal of Dairy Research, 2008. **75**(3): p. 270-278.
66. Tsiplakou, E., et al., *Differences in sheep and goats milk fatty acid profile between conventional and organic farming systems*. Journal of Dairy Research, 2010. **77**(3): p. 343-349.
67. Anagnostopoulos, A.K., et al., *Dataset of milk whey proteins of two indigenous greek goat breeds*. Data in Brief, 2016. **8**: p. 692-696.
68. Symeou, S., et al., *Nuclear magnetic resonance screening of changes in fatty acid and cholesterol content of ovine milk induced by ensiled olive cake inclusion in Chios sheep diets*. Small Ruminant Research, 2019. **177**: p. 111-116.
69. Fotakis, C., et al., *Front face synchronous fluorescence as a tool for the quality assurance of Greek milk*. Arabian Journal of Chemistry, 2020. **13**(11): p. 7875-7885.
70. Tsartsianidou, V., et al., *Caprine and ovine Greek dairy products: The official German method generates false-positive results due to κ -casein gene polymorphism*. Journal of Dairy Science, 2017. **100**(5): p. 3539-3547.
71. Qin, C., et al., *Advancement of omics techniques for chemical profile analysis and authentication of milk*. Trends in Food Science & Technology, 2022. **127**: p. 114-128.
72. Wehrli, S.L., et al., *^31P NMR analysis of red blood cell UDPGlucose and UDPGalactose: Comparison with HPLC and enzymatic methods*. Analytical Biochemistry, 1992. **202**(1): p. 105-110.
73. Alexandri, E., et al., *High Resolution NMR Spectroscopy as a Structural and Analytical Tool for Unsaturated Lipids in Solution*. Molecules, 2017. **22**(10): p. 1663.
74. Li, Q., et al., *The application of NMR-based milk metabolite analysis in milk authenticity identification*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2017. **97**(9): p. 2875-2882.
75. Sen, C., P.R. Ray, and M. Bhattacharyya, *A critical review on metabolomic analysis of milk and milk products*. International Journal of Dairy Technology, 2021. **74**(1): p. 17-31.
76. Sanchez, L.J., et al., *Optimization of nuclear magnetic resonance and gas chromatography-mass spectrometry-based fingerprinting methods to characterize goat milk powder*. Journal of Dairy Science, 2021. **104**(1): p. 102-111.
77. Bruschetta, G., et al., *A promising ^31P NMR-multivariate analysis approach for the identification of milk phosphorylated metabolites and for rapid authentication of milk samples*. Biochemistry and Biophysics Reports, 2021. **27**: p. 101087.
78. Brescia, M.A., et al., *^1H NMR characterization of milk lipids: A comparison between cow and buffalo milk*. JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society, 2004. **81**(5): p. 431-436.
79. Tociu, M., et al., *Fast approach for fatty acid profiling of dairy products fats using ^1H -NMR spectroscopy*. International Dairy Journal, 2018. **83**: p. 52-57.

80. McManaman, J. and M. Neville, *Mammary physiology and milk secretion*. Advanced drug delivery reviews, 2003. **55**: p. 629-41.
81. Roy, D., et al., *Composition, Structure, and Digestive Dynamics of Milk From Different Species—A Review*. Frontiers in Nutrition, 2020. **7**.
82. Tsiplakou, E. and G. Zervas, *Comparative study between sheep and goats on ruminic acid and vaccenic acid in milk fat under the same dietary treatments*. Livestock Science, 2008. **119**(1): p. 87-94.
83. Markiewicz-Keszycka, M., et al., *Fatty acid profile of milk - A review*. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, 2013. **57**(2): p. 135-139.
84. Park, Y.W., *Goat Milk – Chemistry and Nutrition*, in *Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals*. 2017. p. 42-83.
85. Markiewicz-Kęszycka, M., et al., *Fatty Acid Profile of Milk - A Review*. Journal of Veterinary Research, 2013. **57**(2): p. 135-139.
86. Zou, X., et al., *Lipid Composition Analysis of Milk Fats from Different Mammalian Species: Potential for Use as Human Milk Fat Substitutes*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013. **61**(29): p. 7070-7080.
87. Jenness, R., *Composition and Characteristics of Goat Milk: Review 1968–1979*. Journal of Dairy Science, 1980. **63**(10): p. 1605-1630.
88. Lamanna, R., et al., *Identification of milk mixtures by ¹H NMR profiling*. Magnetic Resonance in Chemistry, 2011. **49**(SUPPL. 1): p. S22-S26.
89. Tsiplakou, E., K.C. Mountzouris, and G. Zervas, *The effect of breed, stage of lactation and parity on sheep milk fat CLA content under the same feeding practices*. Livestock Science, 2006. **105**(1-3): p. 162-167.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 1: Συγκεντρωτικός πίνακας των μεταβολιτών που προσδιορίστηκαν ποσοτικά με ¹H NMR στο υδατικό εκχύλισμα των δειγμάτων γάλακτος με τις τιμές να είναι εκφρασμένες σε μmol/gr.

<u>Δείγματα</u>	<u>Οξικό</u>	<u>Αλανίνη</u>	<u>Βαλίνη</u>	<u>Γαλακτικό</u>	<u>Κιτρικό</u>	<u>Κρεατίνη</u>	<u>Χολίνη</u>
C.1.3	0,81	0,04	0,07	2,21	6,47	0,61	0,95
C.2.3	0,51	0,05	0,03	0,12	10,35	0,92	1,94
C.3.3	0,51	0,04	0,05	0,25	8,76	0,72	1,41
C.4.3	0,47	0,04	0,03	0,17	8,23	0,55	1,64
C.5.3	0,12	0,00	0,00	0,02	0,82	0,04	0,11
C.6.3	0,24	0,05	0,03	0,08	10,14	0,91	1,27
C.7.3	0,15	0,01	0,00	0,01	2,07	0,11	0,23
C.8.3	0,13	0,00	0,01	0,01	0,84	0,04	0,10
C.9.3	0,34	0,02	0,02	0,38	5,84	0,57	0,95
C.10.3	0,34	0,03	0,02	0,26	6,84	0,55	1,21
C.1.4	0,49	0,01	0,03	1,09	4,41	0,00	0,61
C.2.4	0,38	0,03	0,03	0,10	8,58	0,63	1,39
C.3.4	0,19	0,01	0,01	0,39	3,42	0,23	0,46
C.4.4	0,19	0,02	0,03	0,19	6,92	0,42	1,44
C.5.4	0,18	0,01	0,02	0,19	6,55	0,48	1,29
C.6.4	0,50	0,05	0,03	0,07	11,51	0,94	1,03
C.7.4	0,68	0,04	0,05	3,11	9,93	0,79	1,34
C.8.4	0,50	0,03	0,02	0,13	11,14	0,96	0,98
C.9.4	0,53	0,01	0,00	0,34	6,52	0,55	0,88
C.10.4	0,59	0,01	0,02	0,80	6,30	0,47	1,20
C.1.5	0,85	0,00	0,02	1,18	4,66	0,35	0,55
C.2.5	0,74	0,03	0,02	0,07	8,23	0,57	1,26
C.3.5	0,42	0,02	0,02	0,09	5,36	0,37	0,66
C.4.5	0,44	0,00	0,00	0,00	3,57	0,21	0,58
C.5.5	0,47	0,02	0,00	0,22	5,69	0,42	1,10
C.6.5	0,39	0,03	0,00	0,06	6,41	0,44	0,68
C.7.5	0,33	0,00	0,00	0,02	2,74	0,16	0,22
C.8.5	0,27	0,01	0,00	0,02	2,85	0,20	0,34
C.9.5	0,48	0,02	0,02	0,48	7,78	0,65	0,67
C.10.5	0,93	0,04	0,03	0,86	7,71	0,61	1,25
C.1.6	0,78	0,00	0,01	2,86	6,23	0,49	0,82
C.2.6	0,53	0,03	0,00	0,09	10,02	0,79	1,68
C.3.6	0,54	0,02	0,04	0,06	9,26	0,89	1,24
C.4.6	0,38	0,02	0,02	0,10	6,40	0,42	1,29
C.5.6	0,38	0,01	0,02	0,10	6,40	0,49	1,15
C.6.6	0,36	0,01	0,00	0,04	5,39	0,40	0,44
C.7.6	0,52	0,00	0,00	0,10	6,71	0,51	0,90
C.8.6	0,63	0,03	0,00	0,18	9,69	1,01	1,69
C.9.6	0,57	0,00	0,00	3,79	7,75	0,72	1,19
C.10.6	0,87	0,00	0,06	6,78	10,39	0,85	1,99
C.1.7	0,61	0,00	0,00	1,80	7,61	0,59	1,25
C.2.7	0,48	0,04	0,00	0,04	9,02	0,78	1,90
C.3.7	0,43	0,02	0,00	0,31	5,44	0,40	0,64
C.4.7	0,44	0,03	0,00	0,15	9,19	0,62	2,01
C.5.7	0,37	0,03	0,02	0,21	6,97	0,59	1,50
C.6.7	0,42	0,04	0,03	0,10	9,56	0,77	1,42
C.7.7	0,46	0,04	0,03	0,11	10,19	0,85	1,82
C.8.7	0,95	0,00	0,00	4,70	7,79	0,68	1,33
C.9.7	0,70	0,00	0,00	4,91	6,82	0,60	0,86
C.10.7	0,49	0,03	0,00	0,32	9,58	0,75	2,25
S.P.1.5	0,97	0,19	0,13	0,13	9,57	0,48	2,79

S.P.2.5	1,22	0,04	0,07	1,87	10,45	0,44	1,60
S.P.3.5	1,35	0,11	0,08	2,15	8,02	0,60	2,34
S.P.4.5	1,07	0,04	0,05	6,71	7,56	0,51	3,27
S.P.5.5	0,78	0,04	0,06	8,80	9,21	0,62	1,24
S.P.6.5	0,64	0,06	0,22	3,00	10,47	0,55	1,65
S.P.7.5	1,24	0,05	0,06	2,88	7,02	0,47	2,76
G.8.5	0,41	0,06	0,14	1,03	6,09	0,80	0,44
G.9.5	0,33	0,05	0,13	2,95	6,04	0,65	0,37
G.10.5	1,08	0,00	0,05	20,81	2,55	0,82	0,95
S.E.1.5	0,82	0,05	0,15	5,50	16,49	0,74	2,57
S.E.2.5	0,58	0,08	0,16	8,28	8,83	0,42	0,91
S.E.1.6	0,82	0,06	0,11	5,03	8,41	0,42	1,05
S.E.2.6	0,58	0,02	0,07	2,07	11,41	0,52	1,08
S.E.1.7	3,77	0,00	0,05	21,87	5,31	0,46	1,14
S.E.2.7	0,86	0,03	0,11	0,52	12,12	0,53	1,04
S.P.1.6	0,70	0,00	0,08	3,36	9,55	0,43	2,17
S.P.2.6	0,76	0,00	0,04	10,72	10,00	0,40	1,20
S.P.3.6	0,56	0,00	0,12	16,50	7,27	0,45	1,60
S.P.4.6	0,55	0,00	0,12	21,45	6,96	0,42	1,56
S.P.5.6	0,66	0,00	0,06	15,06	7,53	0,52	1,63
S.P.6.6	0,65	0,00	0,12	2,20	10,73	0,58	1,22
S.P.7.6	0,52	0,00	0,07	0,43	7,09	0,39	1,18
G.8.6	0,39	0,07	0,18	0,46	4,70	0,82	0,46
G.9.6	0,42	0,06	0,08	0,34	5,63	0,78	0,49
G.10.6	0,75	0,06	0,12	0,63	6,84	1,52	0,52
B.1.5	1,68	0,04	0,00	0,98	11,01	2,03	2,65
B.2.5	1,43	0,08	0,00	2,06	6,24	0,85	2,01
B.3.5	1,62	0,06	0,00	0,85	5,65	0,78	2,54
B.4.5	0,73	0,04	0,00	0,11	9,58	1,45	1,76
B.1.6	1,59	0,04	0,00	1,27	9,06	1,63	1,45
B.2.6	1,17	0,04	0,00	1,63	6,56	0,84	1,37
B.3.6	1,40	0,03	0,00	0,67	5,76	0,65	1,95
B.4.6	0,53	0,02	0,00	0,10	5,35	0,63	0,79
B.1.7	1,00	0,07	0,00	0,84	8,20	1,21	1,50
B.2.7	0,65	0,06	0,00	0,26	7,59	1,07	2,08
B.3.7	0,68	0,05	0,00	0,14	7,94	1,16	1,72
B.4.7	0,55	0,03	0,00	0,06	5,32	0,54	1,14
D.1.6	0,58	0,16	0,10	0,00	3,93	1,03	0,03
D.2.6	0,67	0,10	0,10	0,00	4,58	0,77	0,12
D.2.7	0,67	0,12	0,17	0,00	7,50	0,58	0,15

Δείγματα	Καρνιτίνη	β-λακτόζη	Λακτόζη	α-λακτόζη	β-γαλακτόζη	Σουκρόζη	Οροτικό
C.1.3	2,74	69,79	126,03	50,42	0,20	0,00	0,18
C.2.3	2,77	89,20	164,96	64,19	0,36	0,00	0,34
C.3.3	3,77	81,79	152,00	58,76	0,27	0,00	0,27
C.4.3	1,77	70,72	130,55	51,13	0,25	0,00	0,23
C.5.3	0,11	3,54	6,51	2,56	0,01	0,27	0,01
C.6.3	3,93	93,47	172,79	67,27	0,19	0,00	0,28
C.7.3	0,46	11,43	21,51	8,24	0,04	0,00	0,04
C.8.3	0,14	3,75	6,94	2,70	0,00	0,00	0,01
C.9.3	2,07	53,19	98,19	38,30	0,19	0,00	0,19
C.10.3	1,58	57,02	103,03	40,59	0,14	0,00	0,21
C.1.4	1,82	45,60	88,78	33,14	0,13	0,00	0,09
C.2.4	2,41	71,71	138,00	51,04	0,30	0,00	0,29
C.3.4	1,06	25,72	49,34	18,10	0,09	0,00	0,07
C.4.4	1,46	61,42	119,19	43,93	0,19	0,00	0,20
C.5.4	1,75	54,50	103,86	38,47	0,12	3,13	0,15
C.6.4	4,20	101,58	194,22	71,96	0,24	0,00	0,31

C.7.4	3,36	85,20	160,83	60,40	0,39	0,00	0,26
C.8.4	3,17	100,51	191,06	69,97	0,22	0,00	0,31
C.9.4	1,58	57,57	107,69	40,21	0,16	0,00	0,14
C.10.4	1,20	49,62	92,97	34,72	0,17	0,00	0,15
C.1.5	1,78	43,01	83,26	30,69	0,16	0,00	0,08
C.2.5	2,27	65,69	125,96	46,69	0,27	0,00	0,27
C.3.5	2,03	43,40	83,40	31,16	0,07	0,00	0,17
C.4.5	0,78	27,34	52,68	0,00	0,05	0,00	0,09
C.5.5	1,61	48,05	92,50	34,52	0,20	3,38	0,17
C.6.5	2,08	50,25	97,16	35,90	0,15	0,00	0,16
C.7.5	0,69	17,12	32,50	12,03	0,05	0,00	0,05
C.8.5	0,78	19,98	38,11	14,19	0,08	0,00	0,05
C.9.5	2,86	59,28	113,61	42,03	0,11	0,00	0,15
C.10.5	2,52	64,67	123,53	45,80	0,14	0,00	0,20
C.1.6	2,41	60,95	115,57	43,01	0,24	0,00	0,17
C.2.6	3,28	89,27	170,44	62,99	0,35	0,00	0,39
C.3.6	4,80	98,16	186,54	69,77	0,30	0,00	0,38
C.4.6	1,62	57,05	108,53	40,67	0,23	0,00	0,15
C.5.6	1,83	55,39	105,30	39,40	0,22	3,55	0,15
C.6.6	1,55	44,94	84,33	31,58	0,10	0,00	0,13
C.7.6	2,43	59,13	112,55	42,10	0,17	0,00	0,21
C.8.6	4,11	108,95	210,16	77,91	0,42	0,00	0,38
C.9.6	3,14	75,25	143,15	53,91	0,41	0,00	0,21
C.10.6	3,75	100,86	191,63	71,47	0,31	0,00	0,29
C.1.7	2,75	75,13	142,99	54,31	0,32	0,00	0,18
C.2.7	3,36	88,94	172,82	63,70	0,41	0,00	0,34
C.3.7	2,11	42,73	82,25	30,72	0,18	0,00	0,11
C.4.7	2,33	86,37	167,05	61,91	0,34	0,00	0,24
C.5.7	2,22	66,85	127,73	48,28	0,26	3,85	0,21
C.6.7	3,42	84,78	162,20	60,87	0,30	0,00	0,27
C.7.7	3,99	89,82	172,15	64,73	0,70	0,00	0,31
C.8.7	2,92	73,88	141,28	52,85	0,36	0,00	0,20
C.9.7	2,60	60,93	116,31	43,56	0,29	0,00	0,16
C.10.7	3,17	81,89	157,10	58,58	0,39	0,00	0,24
S.P.1.5	0,51	70,04	131,84	50,11	0,20	0,00	0,03
S.P.2.5	2,32	66,73	124,20	48,00	0,79	0,00	0,03
S.P.3.5	1,68	65,00	121,22	46,44	1,58	0,00	0,03
S.P.4.5	0,55	64,51	120,29	45,63	0,58	0,00	0,02
S.P.5.5	2,84	63,92	123,36	46,72	0,46	0,00	0,04
S.P.6.5	2,14	78,29	151,83	56,78	0,42	0,00	0,03
S.P.7.5	0,34	63,60	117,67	45,50	0,66	0,00	0,03
G.8.5	3,09	67,80	129,38	49,73	0,06	0,00	0,02
G.9.5	2,56	61,50	119,23	45,13	0,08	0,00	0,02
G.10.5	2,00	58,62	113,55	42,77	0,18	0,00	0,01
S.E.1.5	6,63	130,10	252,24	94,26	0,33	0,00	0,06
S.E.2.5	3,16	57,51	110,80	42,53	0,73	0,00	0,58
S.E.1.6	2,98	56,81	111,57	42,26	0,70	0,00	0,02
S.E.2.6	4,30	70,03	136,32	50,10	0,29	0,00	0,04
S.E.1.7	3,10	59,28	112,38	43,20	1,07	0,00	0,03
S.E.2.7	5,72	81,95	158,66	59,81	0,25	0,00	0,04
S.P.1.6	2,00	68,45	133,67	50,25	0,33	0,00	0,00
S.P.2.6	2,90	59,44	112,24	42,65	0,94	0,00	0,00
S.P.3.6	3,02	56,50	107,96	40,72	0,39	0,00	0,03
S.P.4.6	2,87	52,92	99,93	38,81	0,16	0,00	0,03
S.P.5.6	1,75	58,93	110,86	42,19	0,69	0,00	0,03
S.P.6.6	2,73	82,93	157,99	59,89	0,35	0,00	0,03
S.P.7.6	1,99	63,97	125,44	46,96	0,17	0,00	0,03
G.8.6	3,07	64,80	122,75	47,15	0,05	0,00	0,02

G.9.6	2,64	64,48	123,13	46,26	0,05	0,00	0,02
G.10.6	4,60	107,89	210,18	79,52	0,10	0,00	0,04
B.1.5	7,59	136,56	268,78	100,36	0,28	0,00	0,13
B.2.5	1,27	62,91	123,05	47,78	0,71	0,00	0,04
B.3.5	1,61	71,39	138,04	51,76	0,20	0,00	0,03
B.4.5	5,51	92,10	177,74	66,45	0,26	0,00	0,11
B.1.6	6,85	100,88	192,87	72,58	0,57	0,00	0,09
B.2.6	2,11	63,11	123,02	47,17	0,92	0,00	0,03
B.3.6	2,75	56,62	110,26	42,64	0,86	0,00	0,04
B.4.6	3,41	57,94	113,43	42,09	0,21	0,00	0,05
B.1.7	5,50	83,68	161,46	60,68	0,24	0,00	0,06
B.2.7	3,17	78,26	154,99	57,36	0,27	0,00	0,04
B.3.7	4,98	85,36	167,05	61,86	0,30	0,00	0,07
B.4.7	3,93	64,72	125,52	46,80	0,30	0,00	0,04
D.1.6	3,93	85,01	168,88	63,80	0,02	0,00	0,00
D.2.6	2,45	86,63	176,76	66,53	0,02	0,00	0,00
D.2.7	2,13	79,75	159,77	60,02	0,00	0,00	0,00

<u>Δείγματα</u>	<u>Φορμικό</u>	<u>Ιστιδίνη</u>	<u>Ουρακίλη</u>	<u>Φουμαρικό</u>	<u>Ιπλουρικό</u>	<u>Ουριδίνη</u>	<u>Τυραμίνη</u>
C.1.3	0,48	0,11	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00
C.2.3	0,46	0,10	0,00	0,01	0,06	0,00	0,00
C.3.3	0,34	0,10	0,00	0,00	0,04	0,02	0,00
C.4.3	0,44	0,05	0,00	0,01	0,06	0,00	0,00
C.5.3	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.6.3	0,13	0,07	0,00	0,00	0,04	0,03	0,00
C.7.3	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.8.3	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.9.3	0,11	0,05	0,01	0,00	0,03	0,00	0,00
C.10.3	0,10	0,06	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00
C.1.4	0,07	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.2.4	0,06	0,06	0,00	0,00	0,07	0,04	0,00
C.3.4	0,07	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.4.4	0,09	0,05	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00
C.5.4	0,05	0,05	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00
C.6.4	0,08	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.7.4	0,06	0,06	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00
C.8.4	0,07	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.9.4	0,08	0,06	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00
C.10.4	0,06	0,09	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00
C.1.5	0,05	0,05	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00
C.2.5	0,08	0,04	0,00	0,01	0,06	0,00	0,00
C.3.5	0,10	0,06	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00
C.4.5	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.5.5	0,13	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.6.5	0,10	0,07	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00
C.7.5	0,08	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.8.5	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.9.5	0,09	0,07	0,00	0,00	0,07	0,00	0,00
C.10.5	0,12	0,05	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00
C.1.6	0,13	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.2.6	0,15	0,00	0,00	0,00	0,04	0,06	0,00
C.3.6	0,16	0,11	0,00	0,00	0,03	0,07	0,00
C.4.6	0,12	0,06	0,00	0,01	0,05	0,00	0,00
C.5.6	0,08	0,00	0,00	0,00	0,04	0,03	0,00
C.6.6	0,10	0,06	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00
C.7.6	0,13	0,07	0,00	0,00	0,04	0,01	0,00
C.8.6	0,18	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.9.6	0,10	0,08	0,03	0,00	0,03	0,00	0,00

C.10.6	0,17	0,08	0,03	0,00	0,05	0,00	0,00
C.1.7	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.2.7	0,12	0,06	0,00	0,00	0,06	0,04	0,00
C.3.7	0,08	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.4.7	0,09	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00
C.5.7	0,07	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00
C.6.7	0,08	0,08	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00
C.7.7	0,10	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00
C.8.7	0,10	0,00	0,03	0,00	0,06	0,00	0,00
C.9.7	0,06	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00
C.10.7	0,09	0,07	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00
S.P.1.5	0,50	0,00	0,32	0,00	0,05	0,09	0,00
S.P.2.5	0,56	0,00	0,22	0,00	0,05	0,06	0,00
S.P.3.5	0,40	0,00	0,22	0,00	0,07	0,20	0,02
S.P.4.5	0,37	0,00	0,16	0,00	0,03	0,09	0,00
S.P.5.5	0,22	0,00	0,05	0,00	0,00	0,23	0,00
S.P.6.5	0,23	0,00	0,08	0,00	0,06	0,36	0,02
S.P.7.5	0,25	0,00	0,16	0,00	0,07	0,18	0,00
G.8.5	0,19	0,00	0,00	0,00	0,09	0,42	0,01
G.9.5	0,15	0,00	0,03	0,00	0,11	0,22	0,01
G.10.5	0,18	0,00	0,04	0,01	0,12	0,15	0,00
S.E.1.5	0,75	0,00	0,15	0,00	0,09	0,32	0,00
S.E.2.5	0,26	0,00	0,09	0,00	0,00	0,11	0,01
S.E.1.6	0,39	0,00	0,06	0,00	0,00	0,13	0,01
S.E.2.6	0,43	0,00	0,01	0,00	0,07	0,30	0,00
S.E.1.7	0,67	0,00	0,11	0,00	0,00	0,09	0,00
S.E.2.7	0,56	0,00	0,00	0,00	0,09	0,28	0,00
S.P.1.6	0,34	0,00	0,08	0,00	0,00	0,13	0,00
S.P.2.6	0,29	0,00	0,14	0,00	0,05	0,02	0,00
S.P.3.6	0,42	0,00	0,17	0,00	0,00	0,02	0,03
S.P.4.6	0,30	0,00	0,15	0,00	0,00	0,02	0,03
S.P.5.6	0,30	0,00	0,14	0,00	0,03	0,03	0,01
S.P.6.6	0,43	0,00	0,03	0,01	0,00	0,23	0,01
S.P.7.6	0,32	0,00	0,08	0,00	0,00	0,14	0,01
G.8.6	0,40	0,00	0,03	0,01	0,03	0,27	0,02
G.9.6	0,24	0,00	0,00	0,01	0,21	0,22	0,01
G.10.6	0,81	0,00	0,00	0,01	0,28	0,20	0,00
B.1.5	0,99	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00
B.2.5	0,60	0,00	0,07	0,00	0,02	0,00	0,00
B.3.5	0,55	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00
B.4.5	0,47	0,00	0,00	0,00	0,16	0,00	0,00
B.1.6	1,27	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00
B.2.6	1,26	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00
B.3.6	0,95	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00
B.4.6	0,80	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
B.1.7	0,72	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00
B.2.7	0,46	0,00	0,03	0,01	0,10	0,04	0,00
B.3.7	0,54	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00
B.4.7	0,53	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00
D.1.6	0,35	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
D.2.6	0,56	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00
D.2.7	0,46	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00

Πίνακας 2: Συγκεντρωτικός πίνακας των μεταβολιτών που προσδιορίστηκαν ποσοτικά με ^1P NMR στο υδατικό εκχύλισμα των δειγμάτων γάλακτος με τις τιμές να είναι εκφρασμένες σε $\mu\text{mol}/\text{gr}$.

<u>Δείγματα</u>	<u>PCr</u>	<u>GPC</u>	<u>GPE</u>	<u>PC</u>	<u>PE</u>	<u>Glu-6P</u>	<u>UDP1</u>	<u>UDP2</u>
C.1.3	0,00	100965,17	16022,28	23907,80	0,00	0,00	0,00	0,00
C.2.3	0,00	69,52	14,29	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.3.3	0,00	141,90	32,86	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.4.3	0,00	54,88	11,93	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.5.3	0,00	16,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.6.3	0,00	157,71	30,89	34,30	17,17	19,32	19,32	19,32
C.7.3	0,00	13,21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.8.3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.9.3	0,00	42,51	15,39	9,56	9,09	8,67	8,67	8,67
C.10.3	0,00	69,88	22,24	0,00	0,00	50,07	50,07	50,07
C.1.4	0,00	71,21	13,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.2.4	0,00	46,91	9,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.3.4	0,00	39,26	13,87	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.4.4	0,00	46,27	8,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.5.4	0,00	49,42	23,49	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.6.4	8,97	91,15	20,95	14,85	11,94	12,60	12,60	12,60
C.7.4	0,00	69,54	14,57	0,00	0,00	12,57	12,57	12,57
C.8.4	0,00	40,94	17,87	5,25	8,02	44,19	44,19	44,19
C.9.4	0,00	26,25	9,96	0,00	0,00	58,65	58,65	58,65
C.10.4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	33,13	33,13	33,13
C.1.5	0,00	103,55	15,94	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.2.5	0,00	106,95	15,76	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.3.5	0,00	82,65	7,47	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.4.5	0,00	17,99	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.5.5	0,00	37,35	7,62	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.6.5	0,00	56,88	8,97	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.7.5	0,00	12,47	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.8.5	0,00	21,27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.9.5	19,95	85,87	37,88	21,48	12,95	0,00	0,00	0,00
C.10.5	0,00	72,99	15,74	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.1.6	0,00	92,00	19,58	0,00	0,00	20,65	20,65	20,65
C.2.6	0,00	84,28	22,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.3.6	0,00	100,28	19,74	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.4.6	0,00	52,21	5,92	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.5.6	0,00	48,70	8,43	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.6.6	0,00	46,61	6,72	0,00	0,00	14,56	14,56	14,56
C.7.6	0,00	53,74	15,69	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.8.6	0,00	95,89	20,56	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.9.6	0,00	87,40	21,41	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.10.6	0,00	87,34	22,35	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.1.7	0,00	103,56	9,64	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.2.7	0,00	101,16	22,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.3.7	0,00	66,20	12,53	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.4.7	0,00	64,11	11,62	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.5.7	0,00	66,17	10,49	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.6.7	0,00	97,71	20,63	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.7.7	0,00	148,28	21,82	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.8.7	0,00	77,61	22,63	0,00	0,00	23,26	23,26	23,26
C.9.7	0,00	100,12	22,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C.10.7	0,00	85,25	21,48	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S.P.1.5	0,00	0,00	12,15	0,00	0,00	66,39	66,39	66,39
S.P.2.5	0,00	57,22	27,27	0,00	0,00	21,40	21,40	21,40
S.P.3.5	0,00	38,01	16,12	0,00	0,00	45,17	45,17	45,17
S.P.4.5	0,00	4,72	4,25	0,00	0,00	100,30	100,30	100,30
S.P.5.5	0,00	113,86	24,37	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S.P.6.5	0,00	67,04	17,22	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

S.P.7.5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	54,31	54,31	54,31
G.8.5	38,07	30,23	15,62	72,33	41,14	0,00	0,00	0,00
G.9.5	41,01	25,54	10,79	56,29	17,48	0,00	0,00	0,00
G.10.5	21,06	0,00	0,00	46,22	8,80	41,90	41,90	41,90
S.E.1.5	0,00	127,09	43,70	0,00	0,00	45,54	45,54	45,54
S.E.2.5	0,00	115,17	25,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S.E.1.6	0,00	96,05	24,18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S.E.2.6	0,00	154,12	31,26	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S.E.1.7	0,00	95,43	34,41	0,00	0,00	12,73	12,73	12,73
S.E.2.7	0,00	148,13	36,96	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S.P.1.6	0,00	42,77	10,82	0,00	0,00	33,04	33,04	33,04
S.P.2.6	0,00	97,96	25,28	0,00	0,00	25,55	25,55	25,55
S.P.3.6	0,00	21,10	22,76	0,00	0,00	102,76	102,76	102,76
S.P.4.6	0,00	15,12	8,35	0,00	0,00	92,18	92,18	92,18
S.P.5.6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	80,43	80,43	80,43
S.P.6.6	0,00	84,60	20,83	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S.P.7.6	0,00	12,11	7,48	0,00	0,00	42,39	42,39	42,39
G.8.6	25,07	41,67	12,56	61,99	22,82	0,00	0,00	0,00
G.9.6	23,78	48,64	7,32	42,21	21,75	0,00	0,00	0,00
G.10.6	33,73	24,30	13,87	63,97	28,74	10,46	10,46	10,46
B.1.5	0,00	7,76	36,13	0,00	0,00	94,12	94,12	94,12
B.2.5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	93,68	93,68	93,68
B.3.5	0,00	0,00	0,00	13,54	17,81	123,65	123,65	123,65
B.4.5	0,00	123,42	79,01	0,00	0,00	17,91	17,91	17,91
B.1.6	7,12	81,68	41,14	23,53	7,83	38,04	38,04	38,04
B.2.6	0,00	0,00	15,93	0,00	0,00	68,81	68,81	68,81
B.3.6	0,00	0,00	0,00	21,52	20,62	130,05	130,05	130,05
B.4.6	0,00	121,64	47,27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
B.1.7	11,15	57,37	38,97	17,62	17,36	31,07	31,07	31,07
B.2.7	0,00	76,47	23,24	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
B.3.7	0,00	117,44	37,45	0,00	11,02	0,00	0,00	0,00
B.4.7	0,00	147,66	58,32	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
D.1.6	95,38	154,46	57,76	97,08	0,00	0,00	0,00	0,00
D.2.6	44,97	74,32	30,12	7,38	0,00	0,00	0,00	0,00
D.2.7	28,72	88,45	15,16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Πίνακας 3: Συγκενρωτικός πίνακας των μεταβολιτών που προσδιορίστηκαν ποσοτικά με ¹H NMR στο άπολο εκχύλισμα των δειγμάτων γάλακτος με τις τιμές να είναι εκφρασμένες σε εκατοστιαία (%) περιεκτικότητα.

Δείγμα	CLA	Καπρολεϊκό οξύ	Βουτυρικό οξύ	Λινολενικό οξύ	Λινελαϊκό οξύ
C.1.3	21,46	13,07	0,00	0,00	0,00
C.2.3	0,20	0,63	6,82	0,20	2,37
C.3.3	0,32	0,57	6,94	0,38	3,39
C.4.3	0,31	0,63	8,13	0,34	2,73
C.5.3	0,31	0,72	7,49	0,21	2,48
C.6.3	20,08	5,83	0,00	0,00	0,00
C.7.3	18,07	6,56	0,00	0,00	0,00
C.8.3	18,87	8,63	0,00	0,00	0,00
C.9.3	18,07	8,32	0,00	0,00	0,00
C.10.3	19,24	10,38	0,00	0,00	0,00
C.1.4	22,70	13,85	0,00	0,00	0,00
C.2.4	20,51	5,12	0,00	0,00	0,00
C.3.4	19,09	7,25	0,00	0,00	0,00
C.4.4	16,76	8,37	0,00	0,00	0,00

C.5.4	18,06	6,54	0,00	0,00	0,00
C.6.4	26,24	6,44	0,00	0,00	0,00
C.7.4	16,54	6,24	0,00	0,00	0,00
C.8.4	23,23	8,91	0,00	0,00	0,00
C.9.4	22,89	8,60	0,00	0,00	0,00
C.10.4	20,99	10,57	0,00	0,00	0,00
C.1.5	21,77	12,55	0,00	0,00	0,00
C.2.5	19,06	4,36	0,00	0,00	0,00
C.3.5	22,70	8,46	0,00	0,00	0,00
C.4.5	20,42	10,29	0,00	0,00	0,00
C.5.5	21,20	4,40	0,00	0,00	0,00
C.6.5	20,03	4,94	0,00	0,00	0,00
C.7.5	16,44	5,16	0,00	0,00	0,00
C.8.5	18,85	6,98	0,00	0,00	0,00
C.9.5	16,85	7,93	0,00	0,00	0,00
C.10.5	18,24	12,87	0,00	0,00	0,00
C.1.6	18,57	12,46	0,00	0,00	0,00
C.2.6	17,31	5,58	0,00	0,00	0,00
C.3.6	21,58	9,46	0,00	0,00	0,00
C.4.6	16,85	2,93	0,00	0,00	0,00
C.5.6	17,85	3,04	0,00	0,00	0,00
C.6.6	21,78	6,01	0,00	0,00	0,00
C.7.6	18,13	6,42	0,00	0,00	0,00
C.8.6	17,27	8,10	0,00	0,00	0,00
C.9.6	17,59	8,58	0,00	0,00	0,00
C.10.6	16,57	18,92	0,00	0,00	0,00
C.1.7	14,87	10,06	0,00	0,00	0,00
C.2.7	15,19	4,41	0,00	0,00	0,00
C.3.7	20,73	7,09	0,00	0,00	0,00
C.4.7	15,47	12,17	0,00	0,00	0,00
C.5.7	19,16	6,14	0,00	0,00	0,00
C.6.7	19,83	6,48	0,00	0,00	0,00
C.7.7	13,67	5,22	0,00	0,00	0,00
C.8.7	16,74	7,88	0,00	0,00	0,00
C.9.7	17,61	9,49	0,00	0,00	0,00
C.10.7	16,51	12,68	0,00	0,00	0,00
S.P.1.5	14,13	11,12	0,00	0,00	0,00
S.P.2.5	7,48	15,77	0,00	0,00	0,00
S.P.3.5	17,39	9,91	0,00	0,00	0,00
S.P.4.5	8,07	14,91	0,00	0,00	0,00
S.P.5.5	7,56	19,29	0,00	0,00	0,00
S.P.6.5	7,89	15,04	0,00	0,00	0,00
S.P.7.5	9,68	14,61	0,00	0,00	0,00
G.8.5	8,51	9,62	0,00	0,00	0,00
G.9.5	8,56	25,37	0,00	0,00	0,00
G.10.5	8,31	14,93	0,00	0,00	0,00
S.E.1.5	9,85	19,63	0,00	0,00	0,00
S.E.2.5	8,15	14,79	0,00	0,00	0,00
S.E.1.6	7,46	14,46	0,00	0,00	0,00
S.E.2.6	7,90	15,30	0,00	0,00	0,00
S.E.1.7	5,92	15,28	0,00	0,00	0,00
S.E.2.7	7,84	14,96	0,00	0,00	0,00
S.P.1.6	6,06	10,70	0,00	0,00	0,00
S.P.2.6	6,56	14,10	0,00	0,00	0,00
S.P.3.6	5,78	12,39	0,00	0,00	0,00
S.P.4.6	5,62	12,27	0,00	0,00	0,00
S.P.5.6	7,64	17,48	0,00	0,00	0,00
S.P.6.6	4,38	13,50	0,00	0,00	0,00

S.P.7.6	7,76	13,48	0,00	0,00	0,00
G.8.6	8,70	10,37	0,00	0,00	0,00
G.9.6	7,24	19,34	0,00	0,00	0,00
G.10.6	7,87	13,95	0,00	0,00	0,00
B.1.5	10,63	21,29	0,00	0,00	0,00
B.2.5	21,89	30,99	0,00	0,00	0,00
B.3.5	12,56	18,69	0,00	0,00	0,00
B.4.5	12,34	19,01	0,00	0,00	0,00
B.1.6	13,30	21,08	0,00	0,00	0,00
B.2.6	10,16	22,32	0,00	0,00	0,00
B.3.6	13,63	21,18	0,00	0,00	0,00
B.4.6	13,79	32,08	0,00	0,00	0,00
B.1.7	18,47	18,38	0,00	0,00	0,00
B.2.7	10,47	17,86	0,00	0,00	0,00
B.3.7	10,61	19,33	0,00	0,00	0,00
B.4.7	14,08	24,78	0,00	0,00	0,00
D.1.6	12,08	73,31	0,00	0,00	0,00
D.2.6	17,98	112,50	0,00	0,00	0,00
D.2.7	38,01	251,98	0,00	0,00	0,00

<u>Δείγματα</u>	<u>Ελαϊκό οξύ</u>	<u>Κορεσμένα Λ.Ο.</u>	<u>Στερόλες</u>	<u>1,2-διγλυκερίδια</u>	<u>2-μονογλυκερίδια</u>
C.1.3	0,28	0,71	0,20	2,39	0,18
C.2.3	18,75	71,66	0,16	1,98	0,19
C.3.3	24,50	64,47	0,19	2,32	0,20
C.4.3	20,87	67,62	0,17	1,89	0,16
C.5.3	20,38	69,13	0,17	2,06	0,53
C.6.3	0,30	0,58	0,17	2,28	0,20
C.7.3	0,33	0,46	0,18	2,05	0,21
C.8.3	0,21	0,68	0,18	2,10	0,27
C.9.3	0,29	0,69	0,19	2,00	0,21
C.10.3	0,30	0,69	0,19	2,13	0,14
C.1.4	0,36	0,76	0,21	2,49	0,18
C.2.4	0,20	0,61	0,18	2,43	0,34
C.3.4	0,27	0,53	0,19	2,19	0,15
C.4.4	0,17	0,60	0,18	1,87	0,12
C.5.4	0,33	0,67	0,18	2,04	0,39
C.6.4	0,28	0,57	0,18	2,99	0,30
C.7.4	0,21	0,59	0,19	1,92	0,08
C.8.4	0,16	0,74	0,18	2,58	0,37
C.9.4	0,23	0,70	0,18	2,54	0,16
C.10.4	0,23	0,60	0,18	2,33	0,07
C.1.5	0,22	0,66	0,23	2,43	0,25
C.2.5	0,24	0,68	0,17	2,23	0,25
C.3.5	0,45	0,53	0,20	2,56	0,23
C.4.5	0,25	0,70	0,18	2,28	0,20
C.5.5	0,25	0,68	0,18	2,49	0,54
C.6.5	0,30	0,55	0,18	2,31	0,24
C.7.5	0,22	0,41	0,18	1,96	0,15
C.8.5	0,21	0,71	0,18	2,12	0,26
C.9.5	0,26	0,55	0,16	1,88	0,09
C.10.5	0,36	0,71	0,20	2,02	0,09
C.1.6	0,21	0,55	0,21	2,13	0,12
C.2.6	0,28	0,62	0,18	1,94	0,20
C.3.6	0,39	0,47	0,19	2,46	0,18
C.4.6	0,27	0,63	0,18	1,89	0,16
C.5.6	0,25	0,70	0,18	2,13	0,44
C.6.6	0,27	0,60	0,19	2,48	0,15

C.7.6	0,25	0,44	0,19	2,08	0,11
C.8.6	0,20	0,71	0,18	1,97	0,25
C.9.6	0,23	0,63	0,19	1,94	0,07
C.10.6	0,36	0,58	0,18	1,84	0,07
C.1.7	0,23	0,60	0,21	1,69	0,05
C.2.7	0,26	0,55	0,18	1,77	0,22
C.3.7	0,45	0,40	0,19	2,42	0,16
C.4.7	0,24	0,59	0,18	1,93	0,17
C.5.7	0,28	0,70	0,18	2,26	0,46
C.6.7	0,26	0,63	0,19	2,25	0,25
C.7.7	0,22	1,78	0,17	1,58	0,09
C.8.7	0,19	0,73	0,18	1,89	0,09
C.9.7	0,24	0,58	0,19	1,99	0,07
C.10.7	0,32	0,58	0,19	1,85	0,15
S.P.1.5	0,31	0,68	0,15	1,51	0,10
S.P.2.5	0,32	0,74	0,15	0,78	0,02
S.P.3.5	0,15	0,72	0,17	1,81	0,06
S.P.4.5	0,41	0,60	0,15	0,85	0,03
S.P.5.5	0,72	0,43	0,15	0,81	0,03
S.P.6.5	0,61	0,70	0,14	0,85	0,05
S.P.7.5	0,69	0,63	0,16	1,02	0,08
G.8.5	0,26	0,49	0,19	0,91	0,05
G.9.5	0,35	0,50	0,17	0,91	0,02
G.10.5	0,35	0,39	0,16	0,92	0,02
S.E.1.5	0,34	0,59	0,14	1,03	0,07
S.E.2.5	0,44	0,75	0,16	0,86	0,01
S.E.1.6	0,36	0,70	0,15	0,79	0,02
S.E.2.6	0,55	0,60	0,15	0,84	0,08
S.E.1.7	0,36	0,60	0,15	0,62	0,01
S.E.2.7	0,36	0,74	0,16	0,83	0,09
S.P.1.6	0,32	0,60	0,14	0,65	0,02
S.P.2.6	0,33	0,79	0,15	0,69	0,00
S.P.3.6	0,26	0,69	0,17	0,61	0,00
S.P.4.6	0,28	0,69	0,17	0,59	0,00
S.P.5.6	0,51	0,50	0,14	0,82	0,00
S.P.6.6	0,61	0,74	0,15	0,46	0,00
S.P.7.6	0,61	0,74	0,19	0,81	0,03
G.8.6	0,31	0,44	0,22	0,96	0,08
G.9.6	0,40	0,50	0,19	0,77	0,04
G.10.6	0,26	0,53	0,20	0,84	0,00
B.1.5	1,75	0,12	0,11	1,17	0,00
B.2.5	1,18	0,21	0,12	2,35	0,11
B.3.5	1,39	0,16	0,11	1,38	0,02
B.4.5	1,01	0,15	0,12	1,33	0,08
B.1.6	1,73	0,10	0,10	1,47	0,00
B.2.6	1,42	0,16	0,12	1,09	0,00
B.3.6	1,38	0,11	0,10	1,45	0,04
B.4.6	1,35	0,13	0,11	1,52	0,04
B.1.7	1,72	0,13	0,11	2,04	0,15
B.2.7	1,01	0,18	0,12	1,14	0,03
B.3.7	1,65	0,11	0,10	1,17	0,04
B.4.7	1,83	0,12	0,12	1,57	0,05
D.1.6	0,00	1,62	0,22	1,37	0,71
D.2.6	0,00	0,39	0,35	2,05	2,24
D.2.7	0,00	2,09	0,27	3,89	2,86