

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ
ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ (NMR)



ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΡΗΤΙΚΩΝ ΛΕΥΚΩΝ ΤΥΡΙΩΝ
ΑΛΜΗΣ ΜΕ ΤΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ
ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ NMR**

ΓΙΩΡΓΟΣ ΜΑΡΚΑΚΗΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ ΣΠΥΡΟΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2017

Εξεταστική Επιτροπή

Σπύρος Απόστολος, Μόνιμος επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Περγαντής Σπυρίδων, Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Μήλιος Κωνσταντίνος, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Στον Πατέρα μου...

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR), του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, υπό την επίβλεψη του επίκ. καθηγητή κ. Απόστολου Σπύρου, στα πλαίσια του Γενικού Μεταπτυχιακού Προγράμματος.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Απόστολο Σπύρο για την ανάθεση αυτής της εργασίας και την αμέριστη συμπαράσταση, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, αλλά και για την καθοδήγηση και τις συμβουλές του στις όποιες ερευνητικές μου προσπάθειες. Ευχαριστώ τους καθηγητές κ. Κωνσταντίνο Μήλιο και κ. Σπυρίδων Περγαντή που δέχτηκαν να συμμετάσχουν στην τριμελή επιτροπή της διατριβής μου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου, τη Μαρία Αμαργιανιτάκη, τη Σοφία Σφακιανάκη, την Ευσταθία Μανωλοπούλου και την Ευαγγελία Ράλλη για το ευχάριστο περιβάλλον και την καλή συνεργασία που υπήρχε στο εργαστήριο όλα αυτά τα χρόνια.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, τους γονείς μου Ιωάννη και Άννα για την στήριξη τους, ηθική και υλική, την οποία μου παρείχαν και την αδελφή μου Κατερίνα για την στήριξη που μου προσφέρουν σε όλες τις στιγμές.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	1
Abstract	2
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
1.1 Λευκά Τυριά άλμης.....	3
1.2 Μεταβολομική ανάλυση.....	9
1.2.1 Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA)	10
1.2.2 Μέθοδος Μερικών Ελάχιστων Τετραγώνων (PLS) και Ορθογωνικών Μερικών Ελάχιστων Τετραγώνων (OPLS)	10
1.2.3 Ανάλυση Διακριτότητας (Discriminant Analysis, DA)	11
1.2.4 Ανάλυση Διακριτότητας Μερικών Ελάχιστων Τετραγώνων (PLS-DA) και Ορθογωνικών Μερικών Ελάχιστων Τετραγώνων (OPLS-DA).....	12
1.3 Μεταβολομική ανάλυση σε τρόφιμα με την Φασματοσκοπία NMR	12
1.4 Μεταβολομική ανάλυση σε τυριά με την Φασματοσκοπία NMR	14
1.5 Μεταβολομική ανάλυση σε τυριά με άλλες τεχνικές	16
ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	19
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	20
2.1 Αντιδραστήρια και πρότυπες ενώσεις.....	20
2.2 Δείγματα λευκού τυριού άλμης.....	20
2.3 Προετοιμασία δειγμάτων για τη λήψη φασμάτων NMR	21
2.4 Φάσματα NMR.....	22
2.4.1 Φάσματα NMR 1D	22
2.4.2 Φάσματα NMR 2D	22
2.5 Επιλογή διαδικασίας εκχύλισης, όρια ανίχνευσης-ποσοτικοποίησης.....	24
2.6 Προσδιορισμός περιεκτικότητας εκχυλίσματος λιπαρών	24
2.7 Μεταβολομική ανάλυση	26
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	27
3.1 Προσδιορισμός μεταβολιτών με τη φασματοσκοπία ^1H NMR.....	27
3.1.1 Ποιοτικός προσδιορισμός των μεταβολιτών στα φάσματα του υδατικού εκχυλίσματος των λευκών τυριών άλμης	27

3.1.2 Ποιοτικός προσδιορισμός των μεταβολιτών στα φάσματα του εκχυλίσματος λιπαρών των λευκών τυριών άλμης	34
3.1.3 Πίνακες χημικών μετατοπίσεων ^1H και ^{13}C NMR	37
3.1.4 Δομές ταυτοποιημένων ενώσεων	39
3.2 Ποσοτικός προσδιορισμός των μεταβολιτών με τη φασματοσκοπία ^1H NMR	43
3.2.1 Ποσοτικός προσδιορισμός των ενώσεων του υδατικού εκχυλίσματος ων λευκών τυριών άλμης	43
3.2.2 Ποσοτικός προσδιορισμός των ενώσεων του εκχυλίσματος λιπαρών των λευκών τυριών άλμης	49
3.3 Στοχευμένη Μεταβολομική Ανάλυση.....	52
3.3.1 Φέτα - Λευκό Τυρί Κρήτης (Αιγοπρόβειο).....	52
3.3.2 Αιγοπρόβειο - Αγελαδινό	55
3.3.3 Λευκό Τυρί Αιγοπρόβειο - Λευκό Τυρί Αγελαδινό	61
3.3.4 Φέτα - Λευκό Τυρί Αιγοπρόβειο	66
3.4 Μη Στοχευμένη Μεταβολομική Ανάλυση	67
3.4.1 Φέτα - Λευκό Τυρί Κρήτης (Αιγοπρόβειο).....	68
3.4.2 Αιγοπρόβειο - Αγελαδινό	75
3.4.3 Λευκό Τυρί Αιγοπρόβειο - Λευκό Τυρί Αγελαδινό	85
3.4.4 Φέτα - Λευκό Τυρί Αιγοπρόβειο	88
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	98
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	101

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα μελέτη αναφέρεται στην ανάπτυξη μιας μεθοδολογίας που επιτρέπει την ανάλυση της σύστασης των λευκών τυριών άλμης με την χρήση της φασματοσκοπίας NMR και της στατιστικής μεταβολομικής ανάλυσης, καθώς και τον έλεγχο της αυθεντικότητας του τυριού με Προστατευμένη Ονομασία Προέλευσης (ΠΟΠ) Φέτα, σε σχέση με άλλα ελληνικά λευκά τυριά άλμης. Τα δείγματα από λευκά τυριά που αναλύθηκαν προέρχονται από παραγωγούς που δραστηριοποιούνται σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας. Οι τύποι λευκού τυριού που αναλύθηκαν ήταν φέτα, λευκό τυρί από αιγοπρόβειο γάλα και λευκό τυρί από αγελαδινό γάλα.

Η φασματοσκοπία NMR χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό ενώσεων των λευκών τυριών άλμης, στις οποίες περιλαμβάνονται αμινοξέα (αλανίνη, ασπαραγίνη, βαλίνη, γλυκίνη, ισολευκίνη, λευκίνη, λυσίνη, μεθειονίνη, τυραμίνη, τυροσίνη, φαινυλαλανίνη), οργανικά οξέα (λακτικό, ηλεκτρικό, κιτρικό, βουτυρικό, γ-αμινοβουτυρικό, φορμικό, οξικό, 3-υδροξυβουτυρικό), σάκχαρα (λακτόζη, γαλακτόζη, γλυκόζη), λιπαρά οξέα (λινολεϊκό, λινολενικό, διγλυκερίδια, τριγλυκερίδια, βουτυρικό, καπρολεϊκό, χοληστερόλη) και άλλες ενώσεις (γλυκερόλη, χολίνη, ουρακίλη).

Η προετοιμασία για την ανάλυση των δειγμάτων και την ανίχνευση των παραπάνω ενώσεων πραγματοποιήθηκε με δύο διαδοχικά πειραματικά πρωτόκολλα με διαλύτες διαφορετικής πολικότητας, νερό για την απομόνωση των αμινοξέων, των οργανικών οξέων, των σακχάρων και των άλλων ενώσεων με μικρό μοριακό βάρος, και χλωροφόρμιο για την απομόνωση των λιπαρών οξέων του τυριού.

Το ποσοτικό μεταβολικό προφίλ και τα φάσματα ^1H NMR των δειγμάτων των λευκών τυριών, σε συνδυασμό με κατάλληλες πολυπαραμετρικές στατιστικές μεθόδους ανάλυσης, αποτέλεσαν χρήσιμα εργαλεία για την ανάπτυξη μεταβολομικών μοντέλων, τα οποία μπορούν να διαχωρίσουν τα δείγματα της φέτας και των λευκών τυριών ανάλογα με τον τύπο γάλακτος (αιγοπρόβειο - αγελαδινό) και το είδος τυριού (φέτα - λευκό τυρί). Επίσης, από τα μοντέλα αυτά προσδιορίστηκαν οι μεταβολίτες και οι περιοχές του φάσματος NMR που είναι υπεύθυνα για τον επιτυχή διαχωρισμό των δειγμάτων.

Λέξεις-κλειδιά: Φασματοσκοπία NMR, λευκό τυρί, φέτα, μεταβολομική ανάλυση

ABSTRACT

The main objective of the present study is the development of an analytical methodology for the determination of the metabolite and lipid profile of white brine cheeses by combining NMR spectroscopy and chemometrics. This methodology was then used to examine the authenticity of Protected Designation of Origin feta cheese. For the purpose of this study, feta cheese was compared to other Greek white brine cheeses. The white cheese samples that were analyzed originate from cheese producers that are operating in different regions of Greece. The types of analyzed white cheeses were feta, white cheese made from sheep's and goat's milk and white cheese made from cow's milk.

NMR spectroscopy was used to detect and quantify the chemical compounds present in white brine cheese. The quantified compounds include amino acids (alanine, asparagine, valine, glycine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, tyramine, tyrosine, phenylalanine), organic acids (lactic, succinic, citric, butyric, gamma-aminobutyric, formate, acetate, 3-hydroxybutyrate), sugars (lactose, galactose, glucose), fatty acids (linoleic, linolenic, diglycerides, triglycerides, butyrate, caproic, cholesterol) and other compounds (glycerol, choline, uracil).

Two sequential sample pretreatment experimental protocols, using solvents of different polarity, were followed in order to perform the separate analysis of polar and apolar fraction of white cheese. Water was used as a solvent for the isolation of amino acids, organic acids, sugars and other low molecular weight organic compounds, while chloroform was used for the isolation of fatty acids and lipid profiling of cheese.

The quantitative metabolic profile and the ^1H NMR spectra of the white cheese samples, in combination with appropriate multivariate statistical analysis methods were used as effective tools for the development of metabolomics models which can separate feta samples from other white cheeses according to the type of milk (sheep - cow) and the type of cheese (feta cheese - white cheese). With the use of the aforementioned models, additionally, the metabolites and the NMR spectral regions that are more effective in successful separating white brine cheese samples according to milk type and production type were obtained.

Keywords: NMR Spectroscopy, white brine cheese, feta, metabolomics

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Λευκά τυριά άλμης

Όπως είναι ευρέως γνωστό, οι Έλληνες είναι από τους λαούς της υψηλίου που καταναλώνουν τις μεγαλύτερες ποσότητες τυριού. Μαζί με τους Γάλλους είναι οι πρωταθλητές στην κατανάλωση τυριού, καταναλώνοντας περίπου 23 κιλά τυριών το χρόνο, από τα οποία τα 12 είναι Φέτα. Ο ιδιαίτερος αυτός δεσμός των Ελλήνων με το συγκεκριμένο τυρί αποδίδεται στο γεγονός ότι πρόκειται για ένα τυρί που παρασκευάζεται στην Ελλάδα αδιάλειπτα, επί πολλούς αιώνες και έχει συνδεθεί με τα ήθη, τα έθιμα και τις διατροφικές τους συνήθειες. Πιστεύεται ότι το βυζαντινό όνομα της φέτας ήταν «πρόσφατος» (δηλ. τυρός). Το όνομα φέτα είναι ιταλικής προέλευσης και προέρχεται από μια αναφορά του 17ου αιώνα στο είδος του τυριού που κοβόταν σε φέτες για να τοποθετηθεί σε βαρέλια.

Αναζητώντας την προέλευση στην αρχαία Ελλάδα, πρόγονος της Φέτας μυθολογικά θεωρείται το τυρί που παρασκεύαζε στη σπηλιά του ο Κύκλωπας Πολύφημος και περιγράφει ο Όμηρος στην Οδύσσεια, το οποίο πιθανώς εξελίχθηκε στη συνέχεια σταδιακά στη σημερινή του μορφή από τους Έλληνες. Ίσως δεν είναι τυχαίο ότι οι Έλληνες είναι σήμερα, σε παγκόσμια κλίμακα, μακράν οι μεγαλύτεροι καταναλωτές τυριών άλμης, χαρακτηριστικός εκπρόσωπος των οποίων είναι η Φέτα.

Για πολλούς αιώνες η Φέτα ήταν γνωστή μόνο στις γειτονικές χώρες της Ελλάδας, όμως κατά τη διάρκεια του περασμένου αιώνα έγινε μαζική μετανάστευση ελλήνων σε διάφορες χώρες και κυρίως στις ΗΠΑ, στον Καναδά, στη Γερμανία και στην Αυστραλία, όπου μεταξύ άλλων μετέφεραν και τις διατροφικές τους συνήθειες, στις οποίες περιλαμβάνονταν και η κατανάλωση της Φέτας. Έτσι σταδιακά έγινε ευρύτερα γνωστή, για να φτάσουμε σήμερα να έχει αναγνωριστεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση ως ελληνικό προϊόν Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (Π.Ο.Π.).

Σύμφωνα με την ελληνική¹ αλλά και την ευρωπαϊκή νομοθεσία η παραδοσιακή Φέτα, είναι μαλακό λευκό τυρί άλμης που παρασκευάζεται από πρόβειο γάλα ή αιγοπρόβειο, δηλαδή, μείγμα πρόβειου με γίδινο γάλα σε περιεκτικότητα έως 30%. Συνδυάζει πρωτότυπα ευχάριστα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά που αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσής της, η οποία γίνεται σε άλμη και διαρκεί τουλάχιστον δύο μήνες. Πρόκειται για ένα μαλακό τυρί με υφή συμπαγή, με λίγες μηχανικές σχισμές, χρώμα λευκό, οπές λίγες ακανόνιστες αλλά κατανεμημένες σε όλη τη μάζα, γεύση λιπόλυσης, ευχάριστη, ελαφριά όξινη και πλούσιο άρωμα. Η σύσταση της Φέτας πρέπει να έχει, μέγιστη υγρασία 56% και ελάχιστη λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού 43%.

Η Φέτα πρέπει να προέρχεται μόνο από συγκεκριμένες περιοχές της Ελλάδας και από συγκεκριμένες φυλές αιγοπροβάτων. Πιο συγκεκριμένα, οι περιοχές παραγωγής που μπορούν σύμφωνα με την ισχύουσα νομοθεσία να χρησιμοποιούν την

ετικέτα και να παράγουν φέτα είναι η ηπειρωτική Ελλάδα, η Μακεδονία, Θράκη, Ήπειρος, Θεσσαλία, Στερεά Ελλάδα και Πελοπόννησος και από την νησιωτική χώρα μόνο η νήσος Λέσβος. Οι επίσημες προσπάθειες που έγιναν για την ένταξη και άλλων περιοχών όπως η Κρήτη δεν απέδωσαν, και έτσι σήμερα συνεχίζει να ισχύει ο νόμος για την απαγόρευση παραγωγής Φέτας στην Κρήτη, της οποίας η παραγωγή ονομάζεται λευκό τυρί όπως και στην υπόλοιπη Ελλάδα εκτός των περιοχών που προαναφέρθηκαν.

Επομένως, το όνομα «Φέτα» δεν μπορεί πλέον να χρησιμοποιηθεί σε τυριά παρόμοιας σύστασης που παρασκευάζονται εκτός και εντός Ελλάδος και με άλλη διαδικασία από την παραδοσιακή.

Η Φέτα απέκτησε καλή φήμη λόγω των πρωτότυπων χαρακτηριστικών της. Ένα από αυτά είναι το είδος του γάλακτος που χρησιμοποιείται για την παρασκευή της Φέτας, που είναι το πρόβειο ή μίγματά του με γίδινο. Είναι επιστημονικά τεκμηριωμένο σήμερα ότι τα διάφορα είδη γάλακτος δίδουν διαφορετικά τυριά, εξαιτίας διαφορών στη χημική τους σύσταση και στα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά. Είναι κατά συνέπεια αδύνατο να αναπαράγει κανείς τα χαρακτηριστικά τυριών πρόβειου γάλακτος όταν αυτό αντικατασταθεί με αγελαδινό, όσα πρόσθετα και τεχνολογικές επεμβάσεις και αν επιχειρηθούν. Να σημειώσουμε ότι οι εδαφοκλιματικές συνθήκες κάθε χώρας είναι παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα του γάλακτος και των τυριών της, ιδιαίτερα των παραδοσιακών.

Η διατροφή των ζώων που παράγουν το γάλα της τυροκόμησης επηρεάζει επίσης την ποιότητα των τυριών. Στην περίπτωση της παραδοσιακής Φέτας, τα γαλακτοπαραγωγά ζώα εκτρέφονται κατά τρόπο εκτατικό και στηρίζουν τη διατροφή τους στη βόσκηση σε φυσικούς ορεινούς και ημιορεινούς λειμώνες που είναι συνήθως φτωχοί σε βλάστηση, χαρακτηρίζονται όμως από τη μεγάλη ποικιλία των φυτών που αναπτύσσονται σε αυτούς, πολλά από τα οποία είναι γηγενή. Η Ελλάδα ως χώρα, λαμβάνοντας υπόψη και την έκτασή της, θεωρείται ότι έχει περισσότερα γηγενή φυτά από κάθε άλλη ευρωπαϊκή χώρα και κατά συνέπεια παρουσιάζει από την άποψη αυτή μία ιδιαιτερότητα που αντανάκλαται και στην ποιότητα του αιγοπρόβειου γάλακτος της.

Ένας ακόμα παράγοντας που επηρεάζει τόσο τη σύσταση του γάλακτος όσο και την ποιότητα των τυριών που παρασκευάζονται απ' αυτό, είναι οι εκτρεφόμενες φυλές ζώων γαλακτοπαραγωγής. Στην Ελλάδα οι εκτρεφόμενες φυλές προβάτων είναι εγχώριες, μικρόσωμες, ανθεκτικές, προσαρμοσμένες στις δύσκολες εδαφοκλιματικές συνθήκες της χώρας, δίδουν όμως μικρή απόδοση, περίπου 95 κιλά γάλα το χρόνο, το οποίο ωστόσο είναι ιδιαίτερα πλούσιο σε αρωματικά συστατικά.

Η μακρόχρονη εμπειρία των ελλήνων τυροκόμων σε συνδυασμό με την παραδοσιακή τεχνολογία που ανέπτυξαν στο πέρασμα των αιώνων, είναι παράγοντες που οπωσδήποτε συνέβαλαν και συμβάλλουν στη διαρκή αναβάθμιση της ποιότητας της παραδοσιακής Φέτας.

Διαφορές και ομοιότητες ανάμεσα στη Φέτα και στο Λευκό τυρί άλμης

Η Φέτα διαχωρίζεται από τα υπόλοιπα Λευκά τυριά άλμης, με το πρώτο να έχει περίπου διπλάσια τιμή πώλησης από το δεύτερο. Το γεγονός αυτό οφείλεται κυρίως στην πρώτη ύλη που χρησιμοποιείται αλλά και στη διαδικασία παραγωγής.

Και τα δύο είναι λευκά μαλακά τυριά και ωριμάζουν μέσα σε άλμη, όμως παρουσιάζουν μια σειρά από διαφορές, οι οποίες παρουσιάζονται συνοπτικά στον παρακάτω πίνακα.

Φέτα	Λευκό τυρί άλμης
Παράγεται από πρόβειο γάλα ή μίγμα πρόβειου με γίδινο, του οποίου το ποσοστό δεν επιτρέπεται να υπερβαίνει το 30% της συνολικής ποσότητας του χρησιμοποιημένου γάλακτος	Παράγεται από οποιοδήποτε είδος γάλακτος (αγελαδινό, πρόβειο, γίδινο, βουβάλο και μίγματα αυτών)
Το λίπος του γάλακτος που χρησιμοποιείται για την παραγωγή της φέτας πρέπει να έχει λιπαρά τουλάχιστον 6% κατά βάρος (δεν επιτρέπεται δηλαδή να είναι αποβουτυρωμένο)	Μπορεί να χρησιμοποιηθεί μερικώς αποβουτυρωμένο γάλα ή μίγματα αυτών με κρέμα γάλακτος
Παράγεται παραδοσιακά μόνο στην Ελλάδα και ο όρος «Φέτα» χρησιμοποιείται μόνο από την Ελλάδα (προστατευόμενη ονομασία προέλευσης Π.Ο.Π)	Δεν υπάρχει περιορισμός
Το γάλα που χρησιμοποιείται για την παρασκευή της φέτας προέρχεται αποκλειστικά από τις περιοχές της Μακεδονίας, Θράκης, Ηπείρου, Θεσσαλίας, Στερεάς Ελλάδας, Πελοποννήσου και του Νομού Λέσβου	Δεν υπάρχει περιορισμός
Χρειάζεται συνολικό χρόνο ωρίμανσης τουλάχιστον δύο μήνες	Χρειάζεται ωρίμανση μέσα σε άλμη τουλάχιστον 15 ημέρες εφόσον το γάλα έχει υποστεί παστερίωση ή δυο μήνες εφόσον το γάλα δεν έχει παστεριωθεί
ΑΠΑΓΟΡΕΥΕΤΑΙ η προσθήκη συντηρητικών	ΕΠΙΤΡΕΠΕΤΑΙ προαιρετικά, η προσθήκη ορισμένων συντηρητικών
Διατίθεται στο εμπόριο σε μια και μόνο ποιότητα με μέγιστη υγρασία 56% και με λιπαρά τουλάχιστον 18,9 %	Διατίθεται στο εμπόριο σε τρεις ποιότητες με μέγιστη υγρασία 58% και με λιπαρά τουλάχιστον 14,7 %

Να προσθέσουμε ότι, οι φυσικοχημικές ιδιότητες που έχουν το πρόβειο και το γίδινο γάλα τα διαφοροποιούν από το αγελαδινό γάλα, γι' αυτό και τα προϊόντα τους θεωρούνται υψηλής ποιότητας. Τα τυριά που παράγονται από αιγοπρόβειο γάλα έχουν ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, δηλαδή γεύση, άρωμα, χρώμα, υφή και δομή, που τα κάνουν ξεχωριστά από τα άλλα είδη τυριών. Το πρόβειο γάλα με την προσθήκη πυτιάς δίνει εξαιρετικό συνεκτικό πήγμα, το οποίο με την τεχνολογία της Φέτας εξελίσσεται σε ένα τυρί κρεμώδες, που κόβεται εύκολα σε φέτες και είναι εύγευστο.

Με την προσθήκη γίδινου γάλακτος μέχρι 30% βελτιώνεται η δομή και η υφή της φέτας, η γεύση γίνεται πιο πικάντικη και το άρωμα πιο χαρακτηριστικό. Το γίδινο γάλα μόνο του δίνει τυρί σκληρό, με γεύση διαφορετική η οποία διαφέρει και δεν είναι η χαρακτηριστική της Φέτας.

Το τυρί άλμης που παρασκευάζεται από αγελαδινό γάλα με την παραδοσιακή τεχνολογία της Φέτας, είναι τυρί σκληρό που τρίβεται εύκολα, με γεύση ξινή και ελλιπή. Αυτό το λευκό τυρί κατά την ωρίμανση και συντήρηση του παθαίνει εύκολα αλλοιώσεις που δεν παρατηρούνται στη Φέτα, όπως απορρόφηση άλμης και μαλάκωμα, λάσπισμα, έντονη γεύση πρωτεόλυσης και αποκρουστική οσμή. Το αγελαδινό γάλα είναι εξαιρετικό για πολλά τυριά κυρίως σκληρά και ημίσκληρα.

Το γάλα το οποίο χρησιμοποιείται για την παρασκευή Φέτας πρέπει να πληροί τις ακόλουθες προϋποθέσεις:

- Όπως ήδη αναφέραμε, το γίδινο γάλα δεν μπορεί να υπερβαίνει το 30% κατά βάρος.
- Η λιποπεριεκτικότητα του γάλακτος πρέπει να είναι τουλάχιστον 6% κατά βάρος.
- Το pH του γάλακτος πρέπει να είναι τουλάχιστον 6,5.
- Η πήξη του γάλακτος πρέπει να γίνεται εντός 48 ωρών από την άμελξη. Το γάλα μέχρι την πήξη διατηρείται σε ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας.
- Το γάλα, πρέπει να προέρχεται από φυλές προβάτων και αιγών που εκτρέφονται παραδοσιακά, είναι προσαρμοσμένες στην περιοχή παρασκευής της Φέτας και η διατροφή τους βασίζεται στην χλωρίδα της εν λόγω περιοχής.
- Το γάλα πρέπει να προέρχεται από αμέλξεις, που γίνονται 10 ημέρες τουλάχιστον μετά τον τοκετό.
- Το γάλα πρέπει να είναι καθαρό, αγνό, πλήρες.
- Το γάλα πρέπει να είναι νωπό ή παστεριωμένο.

Τεχνολογία παρασκευής Φέτας

Για την παρασκευή Φέτας¹ χρησιμοποιείται γάλα, το οποίο πρέπει να πληροί τις προϋποθέσεις που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Το γάλα μετά την τυποποίηση φιλτράρεται και παστεριώνεται στους 68°C για 10 min (αργή παστερίωση), ή στους 72 °C για 15 sec (γρήγορη παστερίωση). Μετά την παστερίωση το γάλα ψύχεται στους 34-36 °C, προστίθονται αβλαβείς οξυγαλακτικές καλλιέργειες βακτηρίων, χλωριούχο ασβέστιο σε αναλογία 10-20 g/100kg γάλακτος και μετά από 20 λεπτά περίπου τόση πυτιά ή άλλα ένζυμα με ανάλογη δράση, ώστε η πήξη να γίνει μέσα σε χρόνο 45-60 λεπτά. Όταν ολοκληρωθεί η πήξη του γάλακτος το τυρόπηγμα διαιρείται σε κύβους ακμής 1-2 cm περίπου, αφήνεται σε ακινησία για 10 λεπτά, αναδεύεται πολύ ήπια, αφήνεται και πάλι σε ακινησία για 10 λεπτά και στη συνέχεια μεταφέρεται στα καλούπια. Τα καλούπια είναι ανοξείδωτα μεταλλικά ή πλαστικά, σε ορθογώνιο ή

κυλινδρικό σχήμα, με μεγάλο αριθμό οπών σε όλη την επιφάνειά τους για να διευκολύνεται η στράγγιση του πήγματος. Τα καλούπια με το τυρόπηγμα μεταφέρονται στη συνέχεια σε χώρο με ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας 16-18 °C και σχετικής υγρασίας τουλάχιστον 85%, όπου παραμένουν για 18-24 ώρες. Κατά την παραμονή τους αυτή αναστρέφονται περιοδικά για καλύτερη στράγγιση. Την επόμενη ημέρα, το τυρί εξάγεται από τα καλούπια, διαιρείται σε τεμάχια σφηνοειδούς ή ορθογώνιου παραλληλεπίπεδου σχήματος, τοποθετείται προσωρινά είτε σε ξύλινα βαρέλια είτε σε μεταλλικά δοχεία, και αλατίζεται κατά στρώσεις με χονδρόκοκκο αλάτι, σε ποσότητα 3% του βάρους του τυριού. Κατά το στάδιο αυτό αναπτύσσεται στην επιφάνεια του τυροπήγματος άφθονη μικροχλωρίδα, η οποία θα συμβάλει σημαντικά στην ωρίμανση και στην ανάπτυξη ειδικών οργανοληπτικών ιδιοτήτων της Φέτας. Μετά 2-3 ημέρες, τα τεμάχια του τυριού τοποθετούνται οριστικά σε βαρέλια ή σε δοχεία από λευκοσίδηρο, καλύπτονται με άλμη 7% και μεταφέρονται σε θάλαμο θερμοκρασίας 16-18 °C, όπου παραμένουν για 10-15 ημέρες μέχρι να ολοκληρωθεί το πρώτο στάδιο της ωρίμανσής τους. Σε αυτό το διάστημα αναπτύσσονται τα ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της Φέτας. Με το τέλος του πρώτου σταδίου της ωρίμανσης το τυρί Φέτα έχει υγρασία μικρότερη από 56% και pH 4,4 - 4,6. Στη συνέχεια, κατά το δεύτερο στάδιο της ωρίμανσης μεταφέρονται σε ψυκτικούς θαλάμους με θερμοκρασία 2-4 °C μέχρι να συμπληρωθούν 2 μήνες από την παρασκευή τους, οπότε ολοκληρώνεται η ωρίμανση τους και, σύμφωνα με τη νομοθεσία, είναι έτοιμα για διάθεση.

Αξίζει να σημειωθεί ότι, σύμφωνα με τον κανονισμό, απαγορεύεται η συμπύκνωση, η προσθήκη σκόνης ή συμπυκνώματος γάλακτος, πρωτεϊνών γάλακτος, καζεϊνικών αλάτων, χρωστικών, και συντηρητικών ουσιών στο γάλα, και η χρήση συντηρητικών και αντιβιοτικών ουσιών στο τυρί ή στην άλμη.

Στα μέσα συσκευασίας που περιέχουν Φέτα αναγράφονται υποχρεωτικά οι ακόλουθες ενδείξεις: (ποιοτικά, οργανοληπτικά χαρακτηριστικά):

1. «ΦΕΤΑ»
2. Προστατευόμενη ονομασία προέλευσης (Π.Ο.Π.)
3. Τυρί
4. Η επωνυμία και η έδρα του παραγωγού-συσκευαστή
5. Το βάρος του περιεχομένου.
6. Η ημερομηνία παραγωγής.
7. Στοιχεία ελέγχου που αναλύονται ως εξής:
 - i. Τα δύο πρώτα γράμματα της ονομασίας προέλευσης: ΦΕ.
 - ii. Ο αύξων αριθμός του μέσου συσκευασίας
 - iii. Η ημερομηνία παραγωγής.

Υπάρχει κατά συνέπεια μία πλήρως καταγεγραμμένη και αναλυτική διαδικασία παραγωγής για τη Φέτα που υποδεικνύει κατά τρόπο αντικειμενικό και αδιαμφισβήτητο ότι η Φέτα παρασκευάστηκε και εξελίχθηκε στη σημερινή της μορφή στην Ελλάδα, από έλληνες τυροκόμους, ότι συνδυάζει πρωτότυπα χαρακτηριστικά που δεν αναπαράγονται εκτός της ζώνης παραγωγής της και ότι το προϊόν αυτό συνδέεται άμεσα με τα ήθη, τα έθιμα και τις διατροφικές συνήθειες των Ελλήνων.

Ειδικές προδιαγραφές για τη Φέτα είχαν συμπεριληφθεί στο Άρθρο 83 του Κώδικα Τροφίμων και Ποτών το 1988. Η φέτα, ως Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης κατοχυρώθηκε, σε εθνικό επίπεδο το 1994,¹ ενώ το 1996, στα πλαίσια του ΚΑΝ. (ΕΟΚ) 2081/92, με τον ΚΑΝ. (ΕΟΚ) 1107/96 κατοχυρώθηκε σε Κοινοτικό επίπεδο. Η καταχώριση της φέτας στον κατάλογο των προϊόντων Π.Ο.Π. προκάλεσε πολλές αντιδράσεις από χώρες που παρήγαν ως τότε μεγάλες ποσότητες φέτας, όπως η Δανία, η Γαλλία και η Γερμανία, με αποτέλεσμα σύμφωνα με τον ΚΑΝ. (ΕΚ) 1070/99, η φέτα να διαγραφεί από το Κοινοτικό μητρώο ΠΟΠ και ΠΓΕ.

Στη συνέχεια και με εντολή του Δικαστηρίου των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, η Ευρωπαϊκή Επιτροπή, προκειμένου να αξιολογήσει την κατάσταση, πραγματοποίησε αναλυτική έρευνα στα κράτη – μέλη σχετικά με την παραγωγή, την κατανάλωση και τη γνώση των καταναλωτών της Ευρωπαϊκής Ένωσης για την ονομασία «Φέτα». Με βάση τα συμπεράσματα της συγκεκριμένης έρευνας και τη σύμφωνα γνώμη της επιστημονικής επιτροπής, η οποία συμβουλεύει την Ευρωπαϊκή Επιτροπή στο έργο της, η Φέτα, με τον ΚΑΝ.(ΕΚ) 1829/2002, επανακαταχωρήθηκε στο Κοινοτικό μητρώο ΠΟΠ και ΠΓΕ ως προϊόν με Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης.

Ακολούθησαν νέες προσφυγές της Δανίας και της Γερμανίας κατά της Ευρωπαϊκής Επιτροπής. Τελικά στις 25 Οκτωβρίου 2005, το Δικαστήριο των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων εξέδωσε απόφαση με την οποία δικαιώνει την Ευρωπαϊκή Επιτροπή για την επανακαταχώριση της φέτας στο Κοινοτικό μητρώο. Σύμφωνα με την εθνική και Κοινοτική νομοθεσία που ισχύει σήμερα, η ονομασία φέτα είναι Προστατευόμενη ονομασία Προέλευσης (ΠΟΠ) και χρησιμοποιείται αποκλειστικά για το τυρί που παράγεται με παραδοσιακό τρόπο στην Ελλάδα στην οριοθετημένη γεωγραφική περιοχή.

Η αμφισβήτηση της ελληνικότητας της φέτας επεκτείνεται πλέον και εκτός Ε.Ε. όπου δεν αναγνωρίζεται η κατοχύρωση του προϊόντος ως Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (ΠΟΠ). Πιο συγκεκριμένα, με την Συμφωνία της Ευρωπαϊκής Ένωσης με τη Νότια Αφρική (SADC) (η οποία έχει ήδη ολοκληρωθεί από τον Σεπτέμβριο του 2014) καθώς και με την αντίστοιχη συμφωνία Ε.Ε.-Καναδά (CETA) η Φέτα εξαιρείται από την εν δυνάμει προστασία της ως ΠΟΠ. Επί της ουσίας οι συμφωνίες αυτές εκτιμάται ότι πιθανώς θα οδηγήσουν στην μελλοντική απώλεια της ιδιαίτερης ταυτότητας της φέτας από τον παγκόσμιο διατροφικό χάρτη, καθώς η καταναλωτική αναγνώριση για το εθνικό αυτό προϊόν προβλέπεται να ατονήσει, με τη ζυγαριά να στρέφεται υπέρ κάθε είδους λευκού τυριού.

1.2 Μεταβολομική ανάλυση

Η μεταβολομική ανάλυση² είναι μια χημειομετρική μέθοδος που χρησιμοποιεί πολυπαραμετρικά στατιστικά μοντέλα για να εξάγει τον μέγιστο δυνατό όγκο χρήσιμης πληροφορίας από ένα συνήθως μεγάλο αριθμό πειραματικών δεδομένων που έχουν προσδιοριστεί αναλυτικά για ένα μεγάλο αριθμό δειγμάτων. Η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να συσχετίσει αναλυτικά δεδομένα που προέρχονται από διαφορετικές υποκατηγορίες δειγμάτων αλλά και να συγκρίνει διαφορετικές μεθόδους που έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση κοινών δειγμάτων. Η μεταβολομική ανάλυση έχει βρει ευρεία εφαρμογή στην επιστήμη των τροφίμων, κυρίως με την ανάλυση φασματοσκοπικών δεδομένων που προέρχονται από τη φασματοσκοπία μαζών και τη φασματοσκοπία NMR. Η παρουσία εκατοντάδων ενώσεων σε ένα δείγμα τροφίμου με ξεχωριστές ιδιότητες η καθεμία, και η πιθανή μεταξύ τους αλληλεπίδραση δημιουργούν ένα σύνολο αναλυτικών δεδομένων, τα οποία είναι αδύνατον να κατανοηθούν με απλή στατιστική ανάλυση μιας ή δυο μεταβλητών.³ Στόχος της μεταβολομικής ανάλυσης με τη χρήση της φασματοσκοπίας NMR σε τρόφιμα, μπορεί να είναι η κατηγοριοποίηση ή η διάκριση δειγμάτων (π.χ. ως προς την γεωγραφική τους προέλευση), η πληροφόρηση (ενημέρωση βάσεων δεδομένων) και η πρόβλεψη (μοντέλα βαθμονόμησης για τον προσδιορισμό αγνώστων δειγμάτων) ανάλογα με τον σκοπό της κάθε μελέτης και την επιθυμητή επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων.

Η μεταβολομική ανάλυση δεδομένων NMR μπορεί να εφαρμοστεί στην ανάλυση τροφίμων ακολουθώντας δύο διαφορετικές μεθοδολογίες. Η πρώτη μέθοδος ονομάζεται στοχευμένο μεταβολομικό προφίλ (targeted metabolic profiling) και περιλαμβάνει την ανίχνευση, ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση του μέγιστου δυνατού αριθμού μεταβολιτών με τη φασματοσκοπία NMR, οι οποίοι χρησιμοποιούνται στη συνέχεια ως δεδομένα εισόδου πολυπαραμετρικών στατιστικών μοντέλων για την ταξινόμηση των δειγμάτων και/ή την αποκάλυψη βιοδεικτών (biomarkers) που σχετίζονται με συγκεκριμένες διαδικασίες ενδιαφέροντος στα τρόφιμα (π.χ. ωρίμανση, κλιματολογικές συνθήκες, επεξεργασία κτλ) ή με ποιοτικό έλεγχο των τροφίμων. Στη δεύτερη μέθοδο, η οποία ονομάζεται μέθοδος μεταβολομικού αποτυπώματος (metabolic fingerprinting), και αποτελεί μη στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση, τα φάσματα NMR των δειγμάτων (μετά από κατάλληλη επεξεργασία) χρησιμοποιούνται απευθείας ως δεδομένα εισόδου των στατιστικών μοντέλων, χωρίς ποσοτικοποίηση των επιμέρους χημικών συστατικών τους. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την ανάλυση δειγμάτων με πολλά άγνωστα συστατικά, όπου η ποσοτικοποίηση των φασμάτων NMR είναι δυσχερής.

Στην παρούσα εργασία, οι πολυπαραμετρικές στατιστικές μέθοδοι ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη των δειγμάτων είναι η Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA), η Ανάλυση Διακριτότητας Ορθογωνικών Μερικών Ελάχιστων Τετραγώνων (Orthogonal Partial Least Squares – Discriminant Analysis, OPLS-DA) και η μέθοδος των Μερικών Ελάχιστων Τετραγώνων (Partial Least Squares, PLS).

1.2.1 Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA)

Η ανάλυση κύριων συνιστωσών (Principal component analysis, PCA), που προτάθηκε το 1901 από τον Pearson⁴, αποτελεί μια χημειομετρική μέθοδο κατάλληλη για τη διερεύνηση συσχετίσεων μεταξύ των δεδομένων δειγμάτων διαφορετικών κατηγοριών ή ομάδων. Η ανάλυση PCA βασίζεται στην ανακατανομή της διασποράς (variables) του σετ δεδομένων με τον επαναπροσδιορισμό των αξόνων ενός διαγράμματος των μεταβλητών και τη δραστική μείωση τους σε δύο ή τρεις άξονες. Οι άξονες αυτοί ονομάζονται κύριοι άξονες (principal components) και είναι ορθογώνιοι μεταξύ τους. Οι κύριοι άξονες προέρχονται από γραμμικούς συνδυασμούς των αρχικών μεταβλητών και επιτρέπουν την οπτική εξέταση της λανθάνουσας δομής των μετρήσεων. Ο πρώτος κύριος άξονας περιγράφει το μεγαλύτερο ποσοστό διασποράς (variance) των μετρήσεων, ενώ οι επόμενοι περιγράφουν μικρότερα ποσοστά διασποράς.

Για τη διευκόλυνση της στατιστικής ανάλυσης των μετρήσεων χρησιμοποιείται η παράμετρος που αναφέρεται στη συνεισφορά ή τη βαρύτητα (loading) των μεταβλητών στους κύριους άξονες. Η συγκεκριμένη παράμετρος αποτελεί μέτρο για το ποια ή ποιες μεταβλητές συνεισφέρουν περισσότερο στη δημιουργία ορισμένων κύριων αξόνων⁵, και βοηθούν στην κατανομή και καλύτερη απεικόνιση της διασποράς των δειγμάτων με βάση τυχόν ομαδοποιήσεις, αλλά και στην ανακάλυψη μεταβλητών που παρουσιάζουν κοινή διασπορά.

Ακόμα μια παράμετρος που διευκολύνει την ερμηνεία της στατιστικής ανάλυσης με τη μέθοδο PCA είναι οι τιμές (scores) των δειγμάτων ως προς το νέο σύστημα αξόνων που ορίζουν οι κύριοι άξονες PCA. Σε ένα τέτοιο διάγραμμα τα δείγματα τοποθετούνται με βάση τις τιμές τους στο μοντέλο PCA (π.χ. PC1-PC2), απεικονίζοντας πιθανές τάσεις, ομαδοποιήσεις και ταξινομήσεις που προκύπτουν από το σετ πειραματικών δεδομένων για τα μελετηθέντα δείγματα. Η μέθοδος PCA αποτελεί ένα πολύ ισχυρό χημειομετρικό εργαλείο για την κατ' αρχήν ανάλυση μεγάλων σετ πειραματικών δεδομένων, και την απεικόνιση ομαδοποιήσεων και τάσεων, οι οποίες μπορούν να μελετηθούν στη συνέχεια πιο εκτεταμένα με τη χρήση χημειομετρικών μοντέλων ταξινόμησης, όπως αυτά που προκύπτουν από τις μεθόδους PLS και PLS-DA.

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

Η Μέθοδος Μερικών Ελάχιστων Τετραγώνων (PLS) αναπτύχθηκε το 1966 από τον Herman Wold⁶ και συνδυάζει στοιχεία από την Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών με τεχνικές πολλαπλής παλινδρόμησης (multiple regression).⁷ Η μέθοδος PLS χρησιμοποιεί μια μήτρα δεδομένων X (ανεξάρτητες μεταβλητές) που περιέχει τις μεταβλητές που εξάγονται από τα πειραματικά δεδομένα και αποσκοπεί στην ανάλυση ή πρόβλεψη μίας σειράς εξαρτώμενων συνεχών μεταβλητών, που

αποτελούν την μήτρα δεδομένων Y . Στη μέθοδο αυτή επιδιώκεται να βρεθούν ανεξάρτητοι γραμμικοί συνδυασμοί (λανθάνουσες μεταβλητές) της μήτρας X που περιγράφουν και/ή προβλέπουν όσο δυνατόν καλύτερα τη διακύμανση των τιμών των εξαρτημένων μεταβλητών της μήτρας Y . Αυτό επιτυγχάνεται με την εξαγωγή ορθογωνικών παραγόντων, που ονομάζονται λανθάνουσες μεταβλητές, από την μήτρα X οι οποίοι έχουν την βέλτιστη δυνατή προβλεπτική ικανότητα.

Η Μέθοδος Ορθογωνικών Μερικών Ελάχιστων Τετραγώνων (OPLS) αποτελεί μια βελτιωμένη επέκταση της μεθόδου PLS που παρουσιάστηκε για πρώτη φορά το 2002⁸, και στην οποία η συστηματική διακύμανση της μήτρας X που οφείλεται σε μεταβλητές που δεν περιλαμβάνονται στη μήτρα Y , συγκεντρώνονται σε ορθογωνικούς παράγοντες, ανεξαρτητους των λανθάνουσων μεταβλητών. Με τον τρόπο αυτό, ενώ η προβλεπτική ικανότητα παραμένει σταθερή, βελτιώνεται η οπτική απεικόνιση των σχέσεων ανάμεσα στις λανθάνουσες μεταβλητές και τις συνεχείς μεταβλητές Y , συνεπώς το μοντέλο PLS γίνεται πιο απλό στην ερμηνεία του και πιο εύκολα κατανοήσιμο.

1.2.3 Ανάλυση Διακριτότητας (Discriminant Analysis, DA)

Η στατιστική μέθοδος της Ανάλυσης Διακριτότητας (DA) είναι μια ισχυρή πολυπαραμετρική στατιστική τεχνική, η οποία χρησιμοποιείται για τη διαφοροποίηση ή ταξινόμηση δειγμάτων σε ομάδες (classes) με βάση μια σειρά από ανεξάρτητες μεταβλητές. Η ανάλυση διακριτότητας (DA) συνδυάζει τις διαθέσιμες μεταβλητές με τέτοιο τρόπο ώστε να μεγιστοποιούνται οι διαφορές μεταξύ των διάφορων κατηγοριών. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ανάλυση DA ανήκει στην κατηγορία των επιβλεπόμενων χημειομετρικών τεχνικών, αφού η κατηγοριοποίηση σε ομάδες είναι δεδομένη και χρησιμοποιείται. Πλεονέκτημα της μεθόδου είναι το γεγονός ότι με την κατάλληλη επικύρωση της μεθοδολογίας, τα χημειομετρικά μοντέλα που προκύπτουν έχουν υψηλή προβλεπτική ικανότητα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταξινόμηση άγνωστων δειγμάτων, τα οποία δεν συμμετείχαν στην ανάπτυξη του μοντέλου DA.

Η αρχή λειτουργίας της DA βασίζεται στην δημιουργία διακριτών συναρτήσεων (discriminant functions) R , οι οποίες ονομάζονται και κανονικές ρίζες (canonical roots). Το σύνολο των συναρτήσεων R_i για τις διάφορες ομάδες ($i=1,2,3,..$) αποτελεί το μοντέλο ανάλυσης DA. Οι συναρτήσεις R_i είναι εξαρτημένες μεταβλητές οι οποίες προκύπτουν από τον γραμμικό συνδυασμό των ανεξάρτητων μεταβλητών, x_m ($m=1,2,3,..$), που χρησιμοποιούνται για τη διάκριση των κατηγοριών ή ομάδων. Οι συναρτήσεις R χρησιμοποιούνται για την επικύρωση (validation) του μοντέλου, και στη συνέχεια για την ταξινόμηση άγνωστων δειγμάτων, τα οποία δεν συμμετείχαν στη δημιουργία του μοντέλου DA.

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

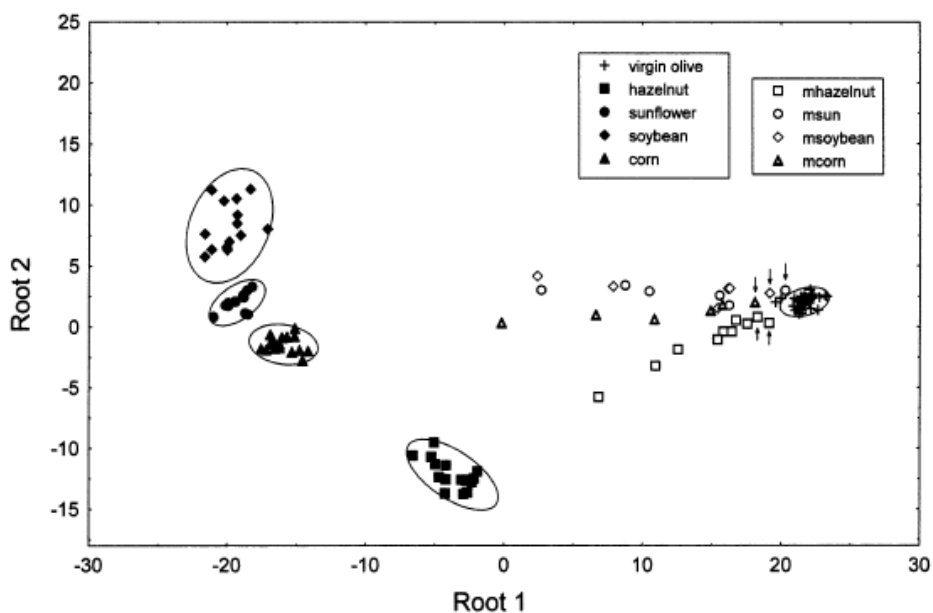
Η Ανάλυση Διακριτότητας Μερικών Ελάχιστων Τετραγώνων (PLS-DA) συνδυάζει δύο χημειομετρικές μεθόδους (PLS και DA) με σκοπό να μεγιστοποιηθεί ο διαχωρισμός των υπό μελέτη δειγμάτων σε διαφορετικές κατηγορίες. Οι βασικές αρχές των δύο αυτών μεθόδων, PLS-DA και PLS, είναι ίδιες, με τη διαφορά ότι η μήτρα Y δεν περιέχει συνεχείς μεταβλητές αλλά μια τεχνητή μεταβλητή (artificial variable) που λαμβάνει διακριτές τιμές, και η οποία αποτελεί την μεταβλητή διάκρισης/ταξινόμησης του μοντέλου PLS-DA, ενώ στην μέθοδο PLS οι μεταβλητές της μήτρας Y είναι συνεχείς (αριθμητικές). Κατ' αναλογία με τη μέθοδο OPLS, στη μέθοδο OPLS-DA το μέρος της διακύμανσης της μήτρας X των ανεξάρτητων μεταβλητών που δεν οφείλεται στη μεταβλητή ταξινόμησης (μήτρα Y) συγκεντρώνεται σε ορθογωνικούς παράγοντες, ανεξάρτητους των λανθάνουσων μεταβλητών OPLS. Οι συναρτήσεις διάκρισης που προκύπτουν από τα μοντέλα PLS-DA και OPLS-DA μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταξινόμηση άγνωστων δειγμάτων, μετά την επικύρωση των αντίστοιχων στατιστικών μοντέλων πρόβλεψης.

1.3 Μεταβολομική ανάλυση σε τρόφιμα με την Φασματοσκοπία NMR

Η Φασματοσκοπία NMR είναι μια από τις πολλά υποσχόμενες όσο και δυναμικά αναπτυσσόμενες αναλυτικές τεχνικές. Αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για την ανάλυση της χημικής σύστασης τροφίμων και ποτών, καθώς σαν τεχνική είναι γρήγορη και επιτρέπει την ταυτόχρονη ποσοτική ανάλυση πολλών χημικών ενώσεων (μεταβολιτών). Σύμφωνα με τα παραπάνω και σε συνδυασμό με την μεταβολομική ανάλυση των φασματοσκοπικών δεδομένων NMR μπορούν να εξαχθούν χρήσιμες πληροφορίες για ένα μεγάλο αριθμό χημικά πολύπλοκων δειγμάτων τροφίμων.⁹ Η πρώτη εφαρμογή της Φασματοσκοπίας NMR (low resolution NMR) στην ανάλυση των τροφίμων έγινε το 1950, ενώ το 1962 πραγματοποιήθηκε η πρώτη εφαρμογή NMR υψηλής διακριτικής ικανότητας, στον υπολογισμό του βαθμού ακορεστότητας των ελαίων.

Η μεταβολομική ανάλυση NMR έχει εφαρμοστεί με επιτυχία στην ανάλυση ελαίων και λιπών, τόσο φυτικής όσο και ζωικής προέλευσης, με σκοπό τον προσδιορισμό της σύστασής τους. Επίσης, με βάση τη λιπιδική τους σύσταση και σε συνδυασμό με την χρήση μεταβολομικών μεθόδων στατιστικής ανάλυσης, δείγματα ελαιολάδου μελετήθηκαν με την Φασματοσκοπία ^1H και ^{31}P NMR για να διαπιστωθεί η επίδραση της περιοχής καλλιέργειας και της ελαιουργικής περιόδου στην σύσταση του ελαιολάδου.¹⁰

Η μεταβολομική ανάλυση NMR έχει εφαρμοστεί με επιτυχία και στην ανάλυση του εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου και έχει οδηγήσει στη ταξινόμηση των εδώδιμων ελαίων και την ανίχνευση της νοθείας του ελαιολάδου με σπορέλαια αλλά και με άλλα ελαιόλαδα υποβαθμισμένης ποιότητας.¹¹



Εικόνα 1.1. Διάγραμμα των συναρτήσεων διάκρισης Root 1 και Root 2 του μοντέλου DA για τον διαχωρισμό πέντε τύπων ελαιολάδου. Τα δείγματα που προέρχονται από μείγματα παρουσιάζονται με κενά σύμβολα.⁸

Πιο συγκεκριμένα, με την χρήση φασμάτων ^1H και ^{31}P NMR, έγινε εφικτός ο διαχωρισμός 128 δειγμάτων βρώσιμων φυτικών ελαίων από διάφορες περιοχές της Ελλάδας, σύμφωνα με την βοτανική προέλευσή τους. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων χρησιμοποιήθηκαν στο μοντέλο πρόβλεψης με τη χρήση της Ανάλυσης Διακριτότητας (DA), με αποτέλεσμα την διάκριση των διαφόρων κατηγοριών ελαίων καθώς και τη επίτευξη 100% της σωστής ταξινόμησης 64 δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την επικύρωση της μεθόδου. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα της εικόνας 1, είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί πολύ καλός διαχωρισμός μεταξύ των πέντε πλέον οικονομικά σημαντικών ειδών εδώδιμων ελαίων.

Μεταβολομικές μελέτες NMR έχουν πραγματοποιηθεί και σε λαχανικά και φρούτα προκειμένου να βρεθεί η χημική τους σύσταση, καθώς και να γίνει διαφοροποίηση μεταξύ των γενετικά τροποποιημένων και των συμβατικών ποικιλιών.¹² Επιπλέον η πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση με την Φασματοσκοπία NMR έχει χρησιμοποιηθεί για την μελέτη των ποικιλιών¹³, της ποιότητας¹⁴ και της γεωγραφικής προέλευσης¹⁵ διαφόρων λαχανικών με επιτυχία. Λόγω υψηλής διατροφικής αξίας, οι χυμοί φρούτων είναι ένα πολύ ενδιαφέρον αντικείμενο το οποίο έχει μελετηθεί με την φασματοσκοπία NMR, για τον έλεγχο της ποιότητας και ανθεκτικότητας διαφόρων χυμών φρούτων καθώς και εκτίμηση της γεωγραφικής τους προέλευσης.¹⁶

Η φασματοσκοπία NMR έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς και στην ανάλυση αλκοολούχων και μη αλκοολούχων ποτών. Σε αλκοολούχα ποτά, μία από τις πρώτες εφαρμογές της Φασματοσκοπίας NMR ήταν ο προσδιορισμός της ποσότητας της αιθανόλης και η πιστοποίηση της μεθόδου NMR με τις κλασικές μεθόδους

ανάλυσης.¹⁷ Η Φασματοσκοπία NMR χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη της αλλαγής της χημικής σύστασης των οίνων καθ' όλη την διάρκεια της οινοποίησης,¹⁸ όπως και της διαδικασίας παλαίωσης του οίνου.¹⁹

Ακόμα, η φασματοσκοπία ¹H NMR σε συνδυασμό με τη χρήση της μεθόδου PCA έχει χρησιμοποιηθεί στην ανάλυση δειγμάτων μύρας,²⁰ και αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη μεθοδολογία η οποία μπορεί να ανιχνεύσει τις διαφορές στη χημική σύσταση δειγμάτων μύρας διαφορετικής προέλευσης, διαφορετικού χρόνου παραγωγής και διαφορετικής ωρίμανσης.²¹

Σε μια ακόμα μελέτη που πραγματοποιήθηκε με αλκοολούχα ποτά (τσίπουρο, ρακί) χρησιμοποιήθηκαν τα μοντέλα PCA και OPLS-DA και έγινε ταξινόμηση των δειγμάτων ανάλογα με τη ποικιλία, τον χρόνο παραγωγής και την γεωγραφική προέλευση.²² Με παρόμοιο τρόπο, έγινε η σύγκριση του μεταβολικού προφίλ διαφόρων αλκοολούχων ποτών απόσταξης με σκοπό την διαφοροποίηση της Ζιβανίας, ενός παραδοσιακού κυπριακού αποστάγματος, από αποστάγματα που προέρχονται από την Ευρώπη.²³

Η φασματοσκοπία NMR και η στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν και για τον διαχωρισμό μη αλκοολούχων ποτών. Κατά την ανάλυση δύο διαφορετικές ποικιλίες σπόρων καφέ αναφέρθηκαν διαφοροποιήσεις τόσο μεταξύ των δύο διαφορετικών ποικιλιών, όσο και μεταξύ ποικιλιών που καλλιεργήθηκαν σε διαφορετικές περιοχές.²⁴ Εφικτή είναι επίσης η διαφοροποίηση δειγμάτων τσαγιού της ίδιας ποικιλίας τα οποία προέρχονται από καλλιέργειες σε διαφορετικό υψόμετρο με την χρήση μοντέλων OPLS-DA.²⁵

Τέλος, σε μεταβολομική μελέτη με την εφαρμογή της φασματοσκοπίας NMR έχει επιτευχθεί διαχωρισμός ανάμεσα σε δείγματα κρέατος μόσχου διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης με βάση τις διαφορές στο μεταβολικό τους προφίλ.²⁶

1.4 Μεταβολομική ανάλυση τυριών με την Φασματοσκοπία NMR

Αρκετοί τύποι τυριών έχουν μελετηθεί με την φασματοσκοπία NMR με σκοπό τον προσδιορισμό της σύστασής τους, την διάκριση και την σύγκριση των συστατικών τους.²⁷ Οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί δίνουν έμφαση στα εκχυλίσματα του τυριού τόσο με διαλύτη χλωροφόρμιο, όπου λαμβάνονται τα λιπίδια, όσο και σε νερό όπου εκχυλίζονται ενώσεις μικρού μοριακού βάρους, όπως αμινοξέα, οργανικά οξέα, και σάκχαρα κ.α.

Η Mozzarella di Bufala Campana είναι ένα τυρί Π.Ο.Π. το οποίο έχει μελετηθεί με την φασματοσκοπία NMR, με σκοπό την χρήση του μεταβολικού προφίλ για την διαφοροποίηση δειγμάτων Π.Ο.Π. και Π.Γ.Ε..²⁸ Επίσης έχει πραγματοποιηθεί μεταβολομική ανάλυση με τη φασματοσκοπία HR-MASNMR στη στερεή φάση για να αξιολογηθεί η ποιότητα και η ιχνηλασιμότητα του τυριού Mozzarella από την περιοχή Campana. Για το ίδιο τυρί, έγιναν αναλύσεις με HR-

NMR και LR-NMR (NMR χαμηλής διακριτικής ικανότητας) για τον προσδιορισμό της δομής του τυριού και του μεταβολικού του προφίλ.²⁹

Το τυρί Grana Padano είναι ένα από τα δημοφιλέστερα ιταλικά τυριά. Στην ποιότητα του τελικού προϊόντος συμβάλλει η περίπλοκη διαδικασία παραγωγής, η μακρά ωρίμανση και κυρίως η ποιότητα του γάλακτος που χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη. Με την χρήση της φασματοσκοπίας NMR, προσδιορίστηκε το μεταβολικό προφίλ, και μελετήθηκε η εξέλιξη της συγκέντρωσης των μεταβολιτών του Grana Padano κατά την διάρκεια της διαδικασίας ωρίμανσης.³⁰

Έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί και για το τυρί Parmigiano Reggiano, όπου τα φάσματα ^1H NMR του υδατικού εκχυλίσματος του τυριού συγκρίθηκαν, με βάση τις περιεκτικότητες των αμινοξέων, για δείγματα με ωρίμανση 14, 24 και 30 μήνες. Η ανάλυση OPLS έδειξε ότι υπάρχει κατηγοριοποίηση των δειγμάτων ανάλογα με τους μήνες ωρίμανσης. Στην ίδια μελέτη βρέθηκε διαφοροποίηση ανάμεσα στα ιταλικά και τα μη ιταλικά δείγματα Parmigiano Reggiano ανεξαρτήτως της διάρκειας του χρόνου ωρίμανσης, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο PLS-DA.³¹ Σε μία πιο πρόσφατη μελέτη, αναλύθηκαν τμήματα τυριού Parmigiano Reggiano για την παρατήρηση της εσωτερικής ανομοιογένειας και τον προσδιορισμό της κατανομής των αμινοξέων στην μάζα τους.³²

Το τυρί Asiago d' Alleva, με Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης, αναλύθηκε επίσης με την φασματοσκοπία NMR. Σε αυτή την μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δείγματα τυριού από φάρμες παραγωγής και βιομηχανίες οι οποίες βρίσκονταν σε χαμηλό και υψηλό υψόμετρο, με σκοπό την πιθανή διαφοροποίησή τους. Αφού προσδιορίστηκε το προφίλ των λιπαρών, ποσοτικοποιήθηκαν οι μεταβολίτες και δημιουργήθηκαν μοντέλα PCA όπου εμφανίζεται διαφοροποίηση με βάση το υψόμετρο των δειγμάτων που προέρχονται από φάρμες, ενώ τα δείγματα από βιομηχανίες δεν στάθηκε δυνατό να διαφοροποιηθούν. Τέλος, στη μελέτη αυτή αναφέρονται οι μεταβολίτες που συνεισφέρουν στην διαφοροποίηση, και αν συσχετίζονται θετικά ή αρνητικά με το υψόμετρο της φάρμας προέλευσης.³³

Το ιταλικό τυρί Pecorino Sardo με Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης, μελετήθηκε με την φασματοσκοπία ^1H και ^{13}C NMR για τον χαρακτηρισμό του μεταβολικού προφίλ των λιπιδίων του. Τα δείγματα που αναλύθηκαν, προέρχονταν από διαφορετικούς παραγωγούς από την περιοχή της Σαρδηνίας, η οποία είναι η επίσημη περιοχή προέλευσης του τυριού.³⁴

Στην Σαρδηνία επίσης, παράγεται και το Π.Ο.Π. τυρί Fiore Sardo, στο οποίο μελετήθηκε η επίδραση διαφορετικών καλλιεργειών εκκίνησης στην εξέλιξη των μεταβολιτών κατά την ωρίμανση.³⁵

1.5 Μεταβολομική ανάλυση σε τυριά με άλλες τεχνικές

Για την ανάλυση του τυριού, εκτός από τη Φασματοσκοπία NMR, έχουν χρησιμοποιηθεί και αρκετές άλλες αναλυτικές τεχνικές. Παρακάτω, αναφέρονται ενδεικτικά κάποιες από αυτές, ξεκινώντας με αυτές που αφορούν τυριά διαφορετικά από τη φέτα.

Δείγματα του τυριού Mozzarella, τα οποία παράγονται από διαφορετικό τύπο γάλακτος, αγελαδινό ή βουβαλίσιο, και διαφορετικές καλλιέργειες εκκίνησης, μελετήθηκαν με τη χρήση αέρια χρωματογραφία (GC-MS), με σκοπό το χαρακτηρισμό του μεταβολικού τους προφίλ και το διαχωρισμός τους με την μέθοδο PCA.³⁶

Επίσης, με αέρια χρωματογραφία (GC πολικής στατικής φάσης) μελετήθηκε η περιεκτικότητα του τυριού Gorgonzola σε διγλυκερίδια, των οποίων η εξαγωγή είχε πραγματοποιηθεί με εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE).³⁷

Σε μια άλλη μελέτη, αναλύθηκαν οι πτητικές ενώσεις του τυριού Provolone dei Nebrodi, σε τέσσερα διαφορετικά στάδια ωρίμανσης και χαρακτηρίστηκαν για πρώτη φορά με SPME-GC/MS όπου βρέθηκε ότι η σύστασή τους διαφέρει σε σχέση με άλλα τυριά παρόμοιου τύπου.³⁸

Σε παλαιότερη μελέτη έχει χρησιμοποιηθεί η ιονταλλακτική χρωματογραφία για την ανάλυση των ελεύθερων αμινοξέων των τυριών Appenzeller, Emmentaler, Gruyere, Raclette, Sbrinz και Tilsiter, και την ποσοτικοποίηση των αμινοξέων αυτών κατά την διάρκεια των πέντε πρώτων μηνών της ωρίμανσης τους.³⁹

Επίσης, υψηλής απόδοσης ιοντική χρωματογραφία (HPIC), φασματοσκοπία ατομικής εκπομπής επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP-AES) και Φασματομετρία μάζας λόγου ισοτόπων (IRMS) και φασματοσκοπία NMR χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό διαφόρων ενώσεων σε συνδυασμό με χημειομετρικές μεθόδους για το γεωγραφικό χαρακτηρισμό των τυριών μοτσαρέλα, από βουβαλίσιο γάλα, που προέρχεται από δύο περιοχές της νότια Ιταλία.²⁸

Η οπτικοθερμική φασματοσκοπία FTIR και η φασματοσκοπία FTIR-ATR συνεκρίθησαν ως προς την αξιοπιστία τους για την ανάλυση της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες, λιπαρά και υγρασία διαφόρων μαλακών και σκληρών τυριών.⁴⁰

Επίσης, με τη φασματοσκοπία FT-IR, μελετήθηκαν οι περιοχές των λιπαρών και των πρωτεϊνών σε δείγματα Mozzarella και Cheddar.⁴¹ Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε από την ίδια ομάδα για την ανάλυση δειγμάτων τυριού Cheddar πλήρη λιπαρών (full-fat) και ελαττωμένων λιπαρών, (reduced-fat) με σκοπό την μελέτη της μεταβολής στη σύσταση των λιπαρών οξέων κατά την διάρκεια της ωρίμανσης.⁴²

Με τη φασματοσκοπία FTIR-ATR αναλύθηκαν επίσης δείγματα ελβετικού τυριού για την κατηγοριοποίηση τους με βάση τον παραγωγό και το χρόνο ωρίμανσης, με τη μέθοδο PLSR.⁴³

Σε μια άλλη μελέτη, για τον χαρακτηρισμό και την πρόβλεψη του σταδίου ωρίμανσης τυριών τύπου Camembert, χρησιμοποιήθηκε φασματοσκοπία Μέσου Υπερύθρου (Mid-IR) και η μέθοδος PLS, μελετώντας έτσι δείγματα από τον πυρήνα (core) και την εξωτερική (under-rind) περιοχή.⁴⁴

Αρκετές δημοσιεύσεις στην βιβλιογραφία έχουν ασχοληθεί με την ανάλυση και τον ποσοτικό προσδιορισμό της χημικής σύστασης της Φέτας. Η φασματοσκοπία του εγγύς υπερύθρου (NIR) εξετάστηκε για τη χρήση της ως τεχνική για τον έλεγχο της παραγωγικής διαδικασίας της φέτας, προσδιορίζοντας τα ποσοστά της υγρασίας, του λίπους και των πρωτεϊνών.⁴⁵

Ο σχηματισμός βιογενών αμινών μελετήθηκε κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του τυριού Φέτα για χρονικό διάστημα 4 μηνών. Η ανάλυση έγινε με τη μέθοδο προσδιορισμού του ολικού αζώτου με την μέθοδο Kjeldahl, και έδειξε ότι το χαμηλό pH και η υψηλή συγκέντρωση αλατιού περιορίζουν την αποκαρβοξυλίωση των αμινοξέων.⁴⁶

Σε μια ακόμα μελέτη, εξετάστηκε η εξέλιξη της πρωτεόλυσης κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης της Φέτας σε 4 δοκιμαστικά δείγματα που παρασκευάστηκαν. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης RP-HPLC χρησιμοποιήθηκε για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των αζωτούχων κλασμάτων με τις σημαντικότερες αλλαγές να συμβαίνουν τις πρώτες 18 μέρες.⁴⁷ Επίσης, έχει χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση των κυριότερων υδατοδιαλυτών πεπτιδίων του τυριού Φέτα.⁴⁸

Δείγματα τυριού Φέτα αναλύθηκαν επίσης με αέρια χρωματογραφία (GC) με σκοπό να διερευνηθεί αν η μερική αντικατάσταση του NaCl από KCl επηρεάζει την λυπόλυση κατά την πορεία παλαίωσης του τυριού. Πέντε διαφορετικές αναλογίες δοκιμάστηκαν χωρίς να εμφανιστούν σημαντικές διαφορές στα ελεύθερα λιπαρά οξέα.⁴⁹

Η επίδραση εμπορικής βακτηριακής καλλιέργειας στη σύσταση των λιπαρών οξέων μελετήθηκε κατά την παρασκευή τυριού Φέτα με χαμηλά λιπαρά, με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας (GC).⁵⁰ Σε μια άλλη έρευνα αναλύθηκαν οι παράγοντες που επηρεάζουν τη σύσταση της Φέτας που παρασκευάζεται από γάλα με χαμηλή περιεκτικότητα λιπαρών. Βρέθηκε ότι η ποσότητα της υγρασίας και των πρωτεϊνών στο τυρί αυξήθηκαν ενώ ανεπηρέαστα έμειναν το pH, η περιεκτικότητα σε αλάτι και η οξύτητα. Παράλληλα, οι διαδικασίες της πρωτεόλυσης και της λιπόλυσης μειώθηκαν, ενώ τα γευστικά χαρακτηριστικά του τυριού υποβαθμίστηκαν.⁵¹

Για την παρουσία αφλατοξίνης (καρκινογόνος τοξίνη που παράγεται στα τρόφιμα από κάποια είδη μυκήτων) ελέγχθηκαν με αναλυτικές τεχνικές ανοσοανίχνευσης δείγματα από πρόβειο γάλα, τυροπήγμα και τυρί Φέτα. Το γάλα βρέθηκε να έχει πολύ μικρές ποσότητες αφλατοξίνης ενώ το τυρόπηγμα βρέθηκε εμπλουτισμένο σε αφλατοξίνη και το τελικό προϊόν ήταν πλήρως απαλλαγμένο.⁵²

Τέλος, μελετήθηκε η επίδραση της καλλιέργειας εκκίνησης στα χημικά και μικροβιολογικά χαρακτηριστικά της Φέτας, για να βρεθεί η πλέον κατάλληλη καλλιέργεια που προσδίδει τα καλύτερα δυνατά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.⁵³ Επίσης, αναλύθηκαν τέσσερα δείγματα τυριού Φέτας από διαφορετικούς παραγωγούς για τον εντοπισμό και ταυτοποίηση της μικροχλωρίδας τους.⁵⁴

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανάπτυξη μιας μεθοδολογίας ποιοτικής και ποσοτικής ανάλυσης λευκών τυριών άλμης με την χρήση της Φασματοσκοπίας NMR. Η μεθοδολογία θα αφορά τόσο την ανάλυση της χημικής σύστασης του υδατοδιαλυτού μέρους του λευκού τυριού, όσο και τον ποσοτικό προσδιορισμό της σύστασης σε λιπαρά οξέα (fatty acid profile). Θα διερευνηθεί η δυνατότητα της αξιοποίησης του μεταβολικού και λιπιδικού προφίλ με τη χρήση πολυπαραμετρικών στατιστικών μοντέλων ανάλυσης (μεταβολομικής ανάλυσης) για την πιθανή διαφοροποίηση των διάφορων τύπων λευκών τυριών άλμης καθώς και η εξέταση της δυνατότητας χρήσης αυτής για την πιστοποίηση της αυθεντικότητας του τυριού Φέτα. Η ανάγκη εύρεσης αναλυτικής μεθόδου πιστοποίησης προκύπτει από το γεγονός ότι δεν υπάρχει εγκεκριμένη αναλυτική μέθοδος που δύναται να πιστοποιεί την αυθεντικότητα του τυριού Φέτα, με αποτέλεσμα αυτή να διεξάγεται προς το παρόν από τις αρμόδιες αρχές μόνο με τον έλεγχο των πρώτων υλών και της διαδικασίας παραγωγής που ακολουθείται στις τυροκομικές μονάδες. Παράλληλα, θα εξεταστούν οι πιθανές διαφοροποιήσεις του μεταβολικού προφίλ που προκύπτουν σε λευκά τυριά άλμης τα οποία έχουν παραχθεί από διαφορετικό τύπο γάλακτος, και σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές.

Στην παρούσα εργασία θα παρουσιαστεί η ανάλυση με τη μεταβολομική φασματοσκοπία NMR 31 δείγματα λευκών τυριών που προέρχονται από διάφορες περιοχές της Ελλάδας. Οι τύποι λευκών τυριών που μελετήθηκαν ήταν φέτα, λευκό τυρί από αιγοπρόβειο γάλα, και λευκό τυρί από αγελαδινό γάλα. Τα τυριά αυτά έχουν παρόμοιο χρόνο ωρίμανσης αλλά προέρχονται από διαφορετικές παραγωγικές μονάδες.

Με την φασματοσκοπία NMR θα πραγματοποιηθεί η ταυτοποίηση και η ακριβής ποσοτικοποίηση των χημικών ενώσεων (αμινοξέα, οργανικά οξέα, λιπαρά οξέα, κ.ά.) που υπάρχουν στα δείγματα των τυριών, με την χρήση κατάλληλου λογισμικού και την ολοκλήρωση των φασμάτων NMR. Τα δεδομένα που προκύπτουν θα χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη πολυπαραμετρικών στατιστικών μοντέλων με σκοπό την διαφοροποίηση των δειγμάτων, ανάλογα με τον τύπο γάλακτος και το είδος τυριού, με βάση το ποσοτικό μεταβολικό προφίλ τους (στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση). Λόγω του πολύπλοκου μεταβολικού προφίλ των δειγμάτων τυριού, ο αριθμός των μεταβολιτών που είναι δυνατό να ποσοτικοποιηθούν στα υδατικά εκχυλίσματα είναι συνήθως αρκετά μικρότερος συγκριτικά με τον αριθμό των ταυτοποιημένων ενώσεων. Για την ανάκτηση της «χαμένης» αυτής πληροφορίας, θα επιχειρηθεί η ανάπτυξη στατιστικών μοντέλων με τη μέθοδο της μη στοχευμένης μεταβολομικής ανάλυσης, στα οποία σαν δεδομένα εισόδου χρησιμοποιούνται απευθείας ολόκληρα τα φάσματα ^1H NMR, μετά από κατάλληλη προκατεργασία. Η σχετική επιτυχία των δύο αυτών μεταβολομικών αναλυτικών προσεγγίσεων στην διαφοροποίηση των διάφορων τύπων λευκών τυριών άλμης θα αξιολογηθεί με βάση την επικύρωση των στατιστικών μοντέλων που θα αναπτυχθούν.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Αντιδραστήρια και πρότυπες ουσίες

Οι δευτεριωμένοι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία για την παρασκευή των δειγμάτων ήταν το δευτεριωμένο νερό (D₂O) περιεκτικότητας σε δευτέριο 99,9% το οποίο περιείχε εσωτερικό πρότυπο 0,05% 3-τριμεθυλο-σιλυλο-προπιονικό 2,2,3,3 TMSP-d₄, και δευτεριωμένο χλωροφόρμιο CDCl₃ περιεκτικότητας σε δευτέριο 99,8% το οποίο περιείχε εσωτερικό πρότυπο 0,03% τετραμεθυλοσιλάνιο TMS. Οι παραπάνω διαλύτες αγοράστηκαν από την εταιρία SIGMA-ALDRICH.

2.2 Δείγματα λευκού τυριού άλμης

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν συνολικά 31 δείγματα λευκού τυριού άλμης. Τα 10 από τα παραπάνω δείγματα ήταν φέτα, ενώ τα 21 λευκό τυρί άλμης. Από τα 31 δείγματα λευκού τυριού άλμης που αναλύθηκαν, 10 προέρχονταν από τυροκομικές μονάδες στη Κρήτη, 1 από την Κεφαλονιά, 1 από την Λήμνο, 18 από την ηπειρωτική Ελλάδα, και ένα εκτός Ελλάδας. Από τα παραπάνω δείγματα μόνο τα δείγματα φέτας από την ηπειρωτική Ελλάδα φέρουν την ένδειξη ΠΟΠ (Προϊόντα Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης). Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται αναλυτικότερα πληροφορίες για τα δείγματα που αναλύθηκαν.

Αριθμός Δείγματος	Δείγμα	Περιοχή	Τύπος	Τύπος Γάλακτος
1	Φέτα Ήπειρος	Ήπειρος	Φέτα ΠΟΠ	Αιγοπρόβειο
2	Φέτα Δωδώνη	Δωδώνη	Φέτα ΠΟΠ	Αιγοπρόβειο
3	Φέτα Χριστάκης	Έδεσσα	Φέτα ΠΟΠ	Αιγοπρόβειο
4	Φέτα Χωριό σε Άλμη	Ιωάννινα	Φέτα ΠΟΠ	Αιγοπρόβειο
5	Φέτα Χαλκιαδάκης	Άγνωστη	Φέτα ΠΟΠ	Αιγοπρόβειο
6	Τυρί Παραδοσιακό ΒΑΛΜΑΣ Χαλκιδικής	Χαλκιδική	Φέτα ΠΟΠ	Αιγοπρόβειο
7	Τυρί Λευκό ΒΑΛΜΑ	Χαλκιδική	Τυρί Λευκό	Αγελαδινό
8	Τυρί Λευκό Όλυμπος Χωριάτικο	Λάρισα	Τυρί Λευκό	Αγελαδινό
9	Σελλιανό Προϊόν Γάλακτος	Ρέθυμνο	Τυρί Λευκό	Αιγοπρόβειο
10	Φέτα Τρικάλων Βαρελίσια	Τρίκαλα	Φέτα ΠΟΠ	Αιγοπρόβειο
11	Φέτα Βαρελίσια Παρνασσού	Παρνασσός	Φέτα ΠΟΠ	Αιγοπρόβειο
12	Φέτα Πίνδου Δοχείο	Πίνδος	Φέτα ΠΟΠ	Αιγοπρόβειο
13	Λευκό Τυρί Άλμης Ηλιάκη	Ρέθυμνο	Τυρί Λευκό	Αιγοπρόβειο
14	Λευκό Τυρί Φάρμα Τρικάλων	Τρίκαλα	Τυρί Λευκό	Αγελαδινό
15	Λευκό Τυρί Άλμης Σοφουλη	Χανιά	Τυρί Λευκό	Αιγοπρόβειο
16	Βαρελίσιο Τυρί Κεφαλονιάς	Κεφαλονιά	Τυρί Λευκό	Αιγοπρόβειο
17	Χωριάτικο Λευκό Τυρί δοχείο	Άγνωστη	Τυρί Λευκό	Αγελαδινό
18	ΑΒ Επιλογή Τυρί	Άγνωστη	Τυρί Λευκό	Κατσικίσιο

19	Τυρί Καλαθάκι Λήμνου	Λήμνος	Τυρί Λευκό	Αιγοπρόβειο
20	Λευκό Τυρί Καλογεράκης	Ηράκλειο	Τυρί Λευκό	Αιγοπρόβειο
21	Λευκό Τυρί Αεράκης	Ηράκλειο	Τυρί Λευκό	Αιγοπρόβειο
22	Λευκό Τυρί Τζουρμπάκης	Ρέθυμνο	Τυρί Λευκό	Αιγοπρόβειο
23	Λευκό Τυρί Καργάκης	Ηράκλειο	Τυρί Λευκό	Αιγοπρόβειο
24	Λευκό Τυρί Μανουράς	Ηράκλειο	Τυρί Λευκό	Αιγοπρόβειο
25	Λευκό Τυρί Τζουρμπάκης	Ρέθυμνο	Τυρί Λευκό	Αιγοπρόβειο
26	Λευκό Τυρί Alta gusto	Άγνωστη	Τυρί Λευκό	Αιγοπρόβειο
27	Λευκό Τυρί Καλογεράκης	Ηράκλειο	Τυρί Λευκό	Αγελαδινό
28	Φέτα Τριπόλεως	Τρίπολη	Φέτα ΠΟΠ	Αιγοπρόβειο
29	Λευκό Τυρί Βίγλα Ελασónας	Λάρισα	Τυρί Λευκό	Αγελαδινό
30	Λευκό Τυρί Βουλγαρίας	Βουλγαρία	Τυρί Λευκό	Αγελαδινό
31	Λευκό Τυρί Carrefour Discount	Άγνωστη	Τυρί Λευκό	Αγελαδινό

2.3 Προετοιμασία εκχυλισμάτων τυριού για τη λήψη φασμάτων NMR

Τα δείγματα αφού καταψύχθηκαν, κόπηκαν σε κύβους (ένας κύβος για κάθε δείγμα) και τοποθετήθηκαν σε λυοφιλιοτή Telstar Freeze-Dryer Cryodos στους -50°C για 16 ώρες, έτσι ώστε να απομακρυνθεί όσο το δυνατόν περισσότερη υγρασία. Στην συνέχεια, τα δείγματα κονιορτοποιήθηκαν με υγρό άζωτο. Από τα δείγματα παραλήφθηκε ποσότητα περίπου 0,30 γραμμαρίων και μαζί με 1 ml υπερκάθαρου νερού εισήχθησαν σε 3 φιαλίδια Eppendorf των 1,5 ml. Μετά από εκχύλιση σε λουτρό υπερήχων για 30', τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 14.000 rpm για 10'. Από τις τρεις φάσεις που δημιουργήθηκαν η κεντρική φάση ήταν η υδατική, η οποία και αφαιρέθηκε με προσοχή και τοποθετήθηκε σε σφαιρική φιάλη των 50ml. Αφού επαναλήφθηκε άλλες δυο φορές η εκχύλιση, για να επιτευχθεί ποσοτική εκχύλιση των υδατοδιαλυτών ενώσεων, τα δείγματα καταψύχθηκαν για να τοποθετηθούν στο freeze-drier για 16 ώρες έτσι ώστε να απομακρυνθεί το νερό. Στη συνέχεια, προστέθηκαν στη φιάλη 700μl δευτεριωμένου διαλύτη $\text{D}_2\text{O-TMSP}$ και τοποθετήθηκαν σε λουτρό υπερήχων για 30'. Τέλος το δείγμα διηθήθηκε με υαλοβάμβακα τοποθετημένο σε πιπέτα παστέρ απευθείας σε σωλήνα NMR διαμέτρου 5mm για τη λήψη του φάσματος.

Στο μέρος του δείγματος που παρέμεινε στα φιαλίδια Eppendorf μετά τη φυγοκέντρηση προστέθηκε 1ml CHCl_3 σε κάθε φιαλίδιο, τοποθετήθηκαν σε λουτρό υπερήχων για 30' και φυγοκεντρήθηκαν για 10' στις 10.000 rpm. Από τις δυο φάσεις που δημιουργήθηκαν αφαιρέθηκε με προσοχή η οργανική φάση (υπερκείμενο) και τοποθετήθηκε σε σφαιρική φιάλη των 50ml. Αφού επαναλήφθηκε άλλες δυο φορές η εκχύλιση, τα εκχυλίσματα τοποθετήθηκαν και αφέθηκαν να ξηρανθούν μέχρι ξηρού υπό κενό. Τέλος, προστέθηκαν στη σφαιρική φιάλη 700μl δευτεριωμένου διαλύτη $\text{CDCl}_3\text{-TMS}$ και το διάλυμα διηθήθηκε με υαλοβάμβακα τοποθετημένο σε πιπέτα παστέρ απευθείας σε σωλήνα NMR για τη λήψη του φάσματος.

2.4 Φάσματα NMR

Όλα τα πειράματα NMR πραγματοποιήθηκαν σε φασματόμετρο Bruker Avance III 500 λειτουργικής συχνότητας 500,1 MHz για το πρωτόνιο και 125,75 MHz για τον πυρήνα του άνθρακα. Η θερμοκρασία στο δοκιμαστή ήταν 302K κατά τη διάρκεια όλων των πειραμάτων.

2.4.1 Φάσματα 1D-NMR

Τα φάσματα ^1H NMR ελήφθησαν με τη χρήση κατάλληλης ακολουθίας παλμών, zgpg για το δευτεριωμένο νερό, η οποία εξαλείφει το ισχυρό υπολειμματικό σήμα του νερού, και zg30 για τον διαλύτη δευτεριωμένο χλωροφόρμιο. Το φασματικό εύρος ήταν 12 ppm και ελήφθησαν 64 K πραγματικά δεδομένα (data points). Για κάθε φάσμα λήφθηκαν 256 σαρώσεις και χρησιμοποιήθηκαν επίσης 8 ψευδοσαρώσεις (dummy scans) ώστε το σύστημα των σπιν να φτάσει σε δυναμική ισορροπία πριν την εφαρμογή της επόμενης ακολουθίας παλμών. Η χρονική διάρκεια του παλμού 90° μοιρών ήταν 12 μsec, ο χρόνος αναμονής (relaxation time) μεταξύ δυο συνεχόμενων επαναλήψεων της ακολουθίας παλμών ήταν 1 sec και ο χρόνος καταγραφής του σήματος (acquisition time) ήταν 5.45 sec. Η επεξεργασία των φασμάτων μετά το μετασχηματισμό Fourier περιελάμβανε διόρθωση φάσης μηδενικής και πρώτης τάξης και ακολούθησε διόρθωση της γραμμής βάσης του φάσματος (baseline correction) με ένα πολυώνυμο πέμπτης τάξης. Η επεξεργασία έγινε με το λογισμικό TopSpin της εταιρίας Bruker. Οι χημικές μετατοπίσεις των σημάτων ^1H NMR αναφέρονται στην κλίμακα δ έχοντας την κορυφή των πρωτονίων του εσωτερικού προτύπου (TMSP ή TMS) σε χημική μετατόπιση δ 0.0 ppm.

Τα φάσματα ^{13}C DEPT NMR ελήφθησαν με την ακολουθία παλμών dept135. Για κάθε φάσμα ελήφθησαν 168 σαρώσεις και 4 ψευδοσαρώσεις (dummy scans). Η χρονική διάρκεια του παλμού 90° ήταν 10 μsec, ο χρόνος αναμονής (relaxation time) μεταξύ δυο συνεχόμενων επαναλήψεων της ακολουθίας παλμών ήταν 2 sec και ο χρόνος καταγραφής του σήματος (acquisition time) ήταν 1.62 sec. Μετά τον μετασχηματισμό Fourier έγινε διόρθωση φάσης μηδενικής και πρώτης τάξης και ακολούθησε διόρθωση της γραμμής βάσης του φάσματος (baseline correction) με ένα πολυώνυμο πέμπτης τάξης.

2.4.2 Φάσματα 2D-NMR

Φάσματα ^1H - ^1H gCOSY 2D NMR

Τα ομοπυρηνικά φάσματα ^1H - ^1H COSY 2D NMR ελήφθησαν με την ακολουθία παλμών cosygrrgrqf με εξάλειψη της υπολειμματικής κορυφής του νερού σε διαλύτη D_2O . Χρησιμοποιήθηκαν 2K πραγματικά δεδομένα (data points) κατά τη διάρκεια της ανίχνευσης (t_2) και 128 πραγματικά δεδομένα κατά τη διάρκεια της εξέλιξης (t_1), το εύρος του φάσματος ήταν 12 ppm για κάθε διάσταση και η χρονική

διάρκεια του παλμού 90° ήταν 12 μsec . Για κάθε φάσμα ελήφθησαν 56 σαρώσεις και 16 ψευδοσαρώσεις με χρονική καθυστέρηση 1s και ο χρόνος καταγραφής του σήματος ήταν 0,17 sec με increment 10 μs .

Φάσματα ^1H - ^1H gTOCSY 2D NMR

Τα ομοπυρηνικά φάσματα ^1H - ^1H gTOCSY ελήφθησαν με την ακολουθία παλμών `mlevprg.2` σε διαλύτη D_2O . Χρησιμοποιήθηκαν 2K πραγματικά δεδομένα (data points) κατά τη διάρκεια της ανίχνευσης (t_2) και 254 πραγματικά δεδομένα κατά τη διάρκεια της εξέλιξης (t_1), το εύρος του φάσματος ήταν 10 ppm για κάθε διάσταση και η χρονική διάρκεια του παλμού 90° ήταν 12 μsec . Για κάθε φάσμα ελήφθησαν 64 σαρώσεις και 16 ψευδοσαρώσεις. Ο χρόνος καθυστέρησης ανάμεσα στις σαρώσεις ήταν 2 sec, ο χρόνος ανάμιξης 0,08 sec και ο χρόνος καταγραφής του σήματος ήταν 0,2 sec με increment 20 μs στην δεύτερη διάσταση.

Φάσματα ^1H - ^{13}C gHSQC-TOCSY και gHSQC 2D NMR

Τα ετεροπυρηνικά φάσματα ^1H - ^{13}C gHSQC-TOCSY και gHSQC ελήφθησαν με τις ακολουθίες παλμών `hsqcddtgpisp.2` και `hsqcddtgpisp.3` αντίστοιχα, σε διαλύτη D_2O . Για κάθε φάσμα χρησιμοποιήθηκαν 2K πραγματικά δεδομένα (data points) κατά τη διάρκεια της ανίχνευσης (t_2) και 128 πραγματικά δεδομένα κατά τη διάρκεια της εξέλιξης (t_1), το εύρος του φάσματος ήταν 12×165.65 ppm και η χρονική διάρκεια του παλμού 90° ήταν 12 μsec . Ελήφθησαν 128 σαρώσεις και 32 ψευδοσαρώσεις. Ο χρόνος καθυστέρησης ανάμεσα στις σαρώσεις ήταν 2 sec και ο χρόνος καταγραφής του σήματος ήταν 0,17 sec με increment 3 μs στην δεύτερη διάσταση.

Φάσματα ^1H - ^{13}C gHMBC 2D NMR

Τα ετεροπυρηνικά φάσματα ^1H - ^{13}C gHMBC ελήφθησαν με την ακολουθία παλμών `hmbcggprndqf` με διαλύτη D_2O . Για κάθε φάσμα χρησιμοποιήθηκαν 2K πραγματικά δεδομένα (data points) κατά τη διάρκεια της ανίχνευσης (t_2) και 128 πραγματικά δεδομένα κατά τη διάρκεια της εξέλιξης (t_1), το εύρος του φάσματος ήταν 12×240 ppm και η χρονική διάρκεια του παλμού 90° ήταν 12 μsec . Ελήφθησαν 192 σαρώσεις και 16 ψευδοσαρώσεις. Ο χρόνος καθυστέρησης ανάμεσα στις σαρώσεις ήταν 1,5 sec και ο χρόνος καταγραφής του σήματος ήταν 0,15 sec με increment 2 μs στην δεύτερη διάσταση.

Φάσματα ^1H - ^1H j-resolved 2D NMR

Τα ομοπυρηνικά φάσματα ^1H - ^1H j-resolved 2D NMR ελήφθησαν με ακολουθία παλμών `jresqf` με διαλύτη D_2O . Για κάθε φάσμα χρησιμοποιήθηκαν 2K

πραγματικά δεδομένα (data points) κατά τη διάρκεια της ανίχνευσης (t_2) και 64 πραγματικά δεδομένα κατά τη διάρκεια της εξέλιξης (t_1), το εύρος του φάσματος ήταν 10 ppm και η χρονική διάρκεια του παλμού 90° ήταν 12 μsec . Ελήφθησαν 32 σαρώσεις και 16 ψευδοσαρώσεις, ο χρόνος καθυστέρησης ανάμεσα στις σαρώσεις ήταν 2 sec και ο χρόνος καταγραφής του σήματος ήταν 1,99 sec με increment 0,8 μs στην δεύτερη διάσταση.

2.5 Επιλογή διαδικασίας εκχύλισης και όρια ανίχνευσης - ποσοτικοποίησης

Για να επιβεβαιωθεί ότι η πειραματική διαδικασία απομόνωσης των μεταβολιτών είναι αξιόπιστη, έγινε έλεγχος ως προς το ποσοστό ανάκτησης από το δείγμα τυριού ώστε να επιβεβαιωθεί ότι οι συγκεντρώσεις που προκύπτουν από τις ολοκληρώσεις των φασμάτων NMR είναι αντιπροσωπευτικές. Πραγματοποιήθηκαν 5 διαδοχικές εκχυλίσεις σε ένα τυχαίο δείγμα λευκού τυριού άλμης, και το μέσο ποσοστό ανάκτησης μετά την 3^η εκχύλιση για το σύνολο των μεταβολιτών βρέθηκε μεγαλύτερο ή ίσο με 90 %, οπότε επιλέχθηκε να ακολουθηθεί η διαδικασία απομόνωσης με τρεις διαδοχικές εκχυλίσεις.

Το όριο ανίχνευσης υπολογίστηκε με βάση την ποσοτικοποίηση κορυφών φάσματος με ελάχιστο λόγο σήματος προς θόρυβο $S/N=4$ και βρέθηκε ότι με το πειραματικό πρωτόκολλο λήψης φασμάτων NMR που περιγράφεται στην παράγραφο 2.4.1 είναι ίσο με 0,026 $\mu\text{mol}/\text{g}$ τυριού. Αντίστοιχα, το όριο ποσοτικοποίησης υπολογίστηκε ίσο με 0,05 $\mu\text{mol}/\text{g}$ τυριού και αντιστοιχεί σε κορυφή με λόγο $S/N>10$.

2.6 Προσδιορισμός περιεκτικότητας εκχυλίσματος λιπαρών

Οι ενώσεις οι οποίες εκχυλίζονται από το τυρί με διαλύτη το χλωροφόρμιο είναι κορεσμένα λιπαρά οξέα και ακόρεστα λιπαρά οξέα όπως φαίνονται στον πίνακα 3.2. Τα λιπαρά οξέα δεν βρίσκονται ελεύθερα στο τυρί, αλλά ως εστέρες της γλυκερόλης, τα γλυκερίδια, και αποτελούν το 99% περίπου του άπολου εκχυλίσματος. Από τα ολοκληρώματα των κορυφών τους στο φάσμα ^1H NMR του εκχυλίσματος των λιπαρών είναι δυνατόν να υπολογιστεί η επί τοις % σύσταση σε κορεσμένα, μονοακόρεστα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα των γλυκεριδίων. Από τον πίνακα 3.2 προκύπτει ότι στο φάσμα ^1H NMR μπορούν να διακριθούν κορυφές που αντιστοιχούν σε μία μόνο ένωση (22,24,25 και 16,17,23 κλπ), από τις οποίες μπορεί να προσδιοριστεί απευθείας το ποσοστό των ενώσεων αυτών. Ωστόσο, στο ίδιο φάσμα υπάρχουν και κορυφές στις οποίες συνεισφέρουν με πρωτόνια περισσότερες από μία ενώσεις. Τα ολοκληρώματα αυτών των κορυφών μπορούν να συνδυαστούν και να συνεξεταστούν με άλλα ολοκληρώματα του φάσματος, έτσι ώστε τελικά να γίνει δυνατό να προσδιοριστεί το ποσοστό όλων των λιπαρών οξέων που έχουν ταυτοποιηθεί στο άπολο κλάσμα του λευκού τυριού άλμης. Η διαδικασία αυτή περιγράφεται συνοπτικά ως ακολούθως (Η αντιστοιχία συμβόλων και

ολοκληρωμάτων φαίνεται στον πίνακα 3.2. Αρχικά, το ποσοστό του λινολενικού μπορεί να υπολογιστεί από την παρακάτω σχέση:

$$[\text{Λινολενικό}] = \frac{E}{E+F+Butyric} \cdot 100 \quad (\text{Εξ. 2.1})$$

όπου ο παρονομαστής είναι το άθροισμα όλων των μεθυλίων στο εκχύλισμα, δηλαδή αυτά του λινολενικού (E), του βουτυρικού και των μεθυλίων εκτός των προαναφερθέντων που εμφανίζονται στην κορυφή F.

Παρακάτω φαίνονται οι σχέσεις οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για τον ποσοτικό επί τις εκατό προσδιορισμό της σύστασης των λιπαρών οξέων στα λευκά τυριά άλμης:

$$[CLA] = \frac{G}{2} \cdot 100 \quad (\text{Εξ. 2.2})$$

$$[\text{Καπρολεϊκό}] = \frac{H}{2} \cdot 100 \quad (\text{Εξ. 2.3})$$

$$[\text{Βουτυρικό}] = \frac{I}{E+F+Butyric} \cdot 100 \quad (\text{Εξ. 2.4})$$

$$[\text{Λινολεϊκό}] = \frac{A - 4 \cdot \frac{E}{3}}{B} \cdot 100 \quad (\text{Εξ. 2.5})$$

$$[\text{Ολεϊκό}] = \frac{0,25 \left(C - (4 \cdot G) - (2 \cdot H) - \left(4 \cdot \frac{E}{3} \right) - \left(4 \cdot \frac{A - 4 \cdot \frac{E}{3}}{2} \right) \right)}{\frac{B}{2}} \cdot 100 \quad (\text{Εξ. 2.6})$$

$$[\text{Κορεσμένα}] = \left(\frac{F}{E+F+I} - \frac{[CLA]}{100} - \frac{[LO]}{100} - \frac{[OL]}{100} \right) \cdot 100 \quad (\text{Εξ. 2.7})$$

$$[IV] = \left(\frac{\frac{CH=CH}{2}}{\frac{E+F+Butyric}{3}} \right) \cdot 86 \quad (\text{Εξ. 2.8})$$

Για κάθε εξίσωση λήφθηκε υπόψιν η συνεισφορά των πρωτονίων του κάθε λιπαρού οξέος σε κάθε ολοκλήρωμα κορυφής. Το λινολεϊκό συνεισφέρει στην κορυφή A με 2 πρωτόνια ενώ το λινολεϊκό με 4, γι αυτό και στην εξίσωση 2.5 αφαιρείται από το ολοκλήρωμα η ποσότητα πρωτονίων που αντιστοιχεί στο λινολεϊκό ($4 \cdot \frac{E}{3}$) και στην συνέχεια διαιρείται το υπόλοιπο με την ποσότητα των συνολικών λιπαρών. Για το ολεϊκό, αφαιρέθηκαν από το ολοκλήρωμα C οι ποσότητες πρωτονίων που αντιστοιχούν σε καπρολεϊκό, λινολεϊκό, λινολενικό και CLA, δηλαδή όλων των ακόρεστων οξέων που έχουν ήδη ποσοτικοποιηθεί, και στην συνέχεια διαιρέθηκε με όλων των λιπαρών. Το καπρολεϊκό, το CLA και το βουτυρικό οξύ υπολογίστηκαν βάσει των κορυφών στις οποίες συνεισέφεραν αποκλειστικά, αφού πρώτα τα αντίστοιχα ολοκληρώματα διαιρέθηκαν με τον αριθμό πρωτονίων όπου αυτό χρειάστηκε και στην συνέχεια με την συνολική ποσότητα των λιπαρών για να προσδιοριστεί η ποσοστιαία % σύσταση των λιπαρών του λευκού τυριού άλμης.

Για τον ποιοτικό προσδιορισμό των trans λιπαρών χρησιμοποιήθηκε το ολοκλήρωμα της κορυφής των ακόρεστων trans C18:1 λιπαρών οξέων το οποίο διαιρέθηκε με την ποσότητα των συνολικών ακόρεστων λιπαρών.

$$[trans] = \left(\frac{L}{K+L} \right) \cdot 100 \quad (\text{Εξ. 2.9})$$

2.7 Μεταβολομική ανάλυση

Για την μεταβολομική ανάλυση των δειγμάτων τυριού χρησιμοποιήθηκε το υπολογιστικό πρόγραμμα SIMCA 13.02 της εταιρείας Umetrics. Για την στοχευμένη ανάλυση, μεταφέρθηκαν με τη μορφή πίνακα και χρησιμοποιήθηκαν ως δεδομένα εισόδου στο SIMCA οι συγκεντρώσεις των ενώσεων που είχαν υπολογισθεί από την ποσοτικοποίηση των φασμάτων NMR για όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν. Κάθε ποσοτικοποιημένος μεταβολίτης αντιστοιχούσε σε μία ανεξάρτητη μεταβλητή. Πριν την χημειομετρική ανάλυση των δεδομένων, όσες μεταβλητές παρουσίαζαν σύμμετρη κατανομή τιμών ταυτοποιήθηκαν μέσω του προγράμματος Simca και κανονικοποιήθηκαν με λογαριθμικό μετασχηματισμό (log-transformation). Επιπλέον, έγινε προσαρμογή των μεταβλητών με την κλίμακα Unit Variance (UV-scaling), η οποία διαιρεί τις τιμές κάθε μεταβλητής με την τυπική της απόκλιση. Η μέθοδος UV-scaling χρησιμοποιείται για να προσαρμόζει μεταβολομικά δεδομένα έτσι ώστε η επίδραση κάθε μεταβλητής να συσχετίζεται με την στατιστική της σημαντικότητα και τα χημειομετρικά μοντέλα να μην επηρεάζονται ανισοβαρώς από μεταβλητές με μεγάλες αριθμητικές τιμές.

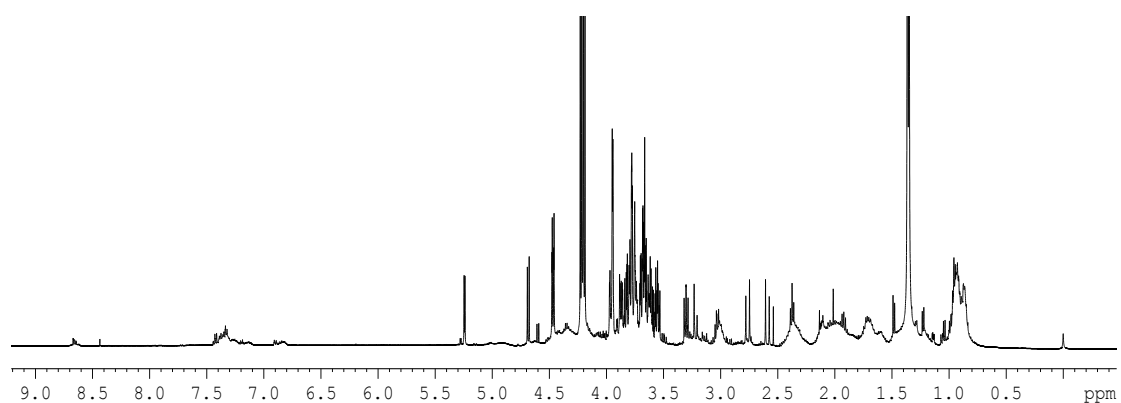
Για την μη στοχευμένη ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν τα φάσματα ^1H NMR των δειγμάτων σε διαλύτες D_2O και CDCl_3 . Τα φάσματα NMR μετατράπηκαν σε μορφή κατάλληλη για επεξεργασία με στατιστικές μεθόδους ανάλυσης με την εφαρμογή της τεχνικής «κάδου» (bucket analysis) με τη χρήση του ειδικού λογισμικού AMIX της εταιρείας Bruker. Τα φάσματα NMR χωρίστηκαν σε N υποπεριοχές (buckets) εύρους 0,02 ppm, και υπολογίστηκε το ολοκλήρωμα (S) που αντιστοιχεί σε κάθε υποπεριοχή, επιτρέποντας την πλήρη αναπαράστασή του φάσματος σε μορφή ραβδογράμματος N σημείων (υποπεριοχών, buckets) εμβαδού S. Με αυτή τη μορφή, τα δεδομένα εισήχθησαν στο πρόγραμμα SIMCA 13.02 για την ανάλυσή τους με τη χρήση πολυπαραμετρικών στατιστικών μοντέλων ανάλυσης. Για την προσαρμογή του μεταβολομικού σετ δεδομένων χρησιμοποιήθηκε η κλίμακα Pareto. Η κλίμακα Pareto χρησιμοποιείται κυρίως για φασματικά δεδομένα και παραμένει πιο κοντά στις αρχικές μετρήσεις σε σχέση με την προσαρμογή UV-scaling, αφού ελαχιστοποιεί την επίδραση του φασματικού θορύβου και χρησιμοποιεί την τετραγωνική ρίζα της τυπικής απόκλισης για την προσαρμογή των δεδομένων.⁴⁵

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Προσδιορισμός μεταβολιτών με τη φασματοσκοπία ^1H NMR

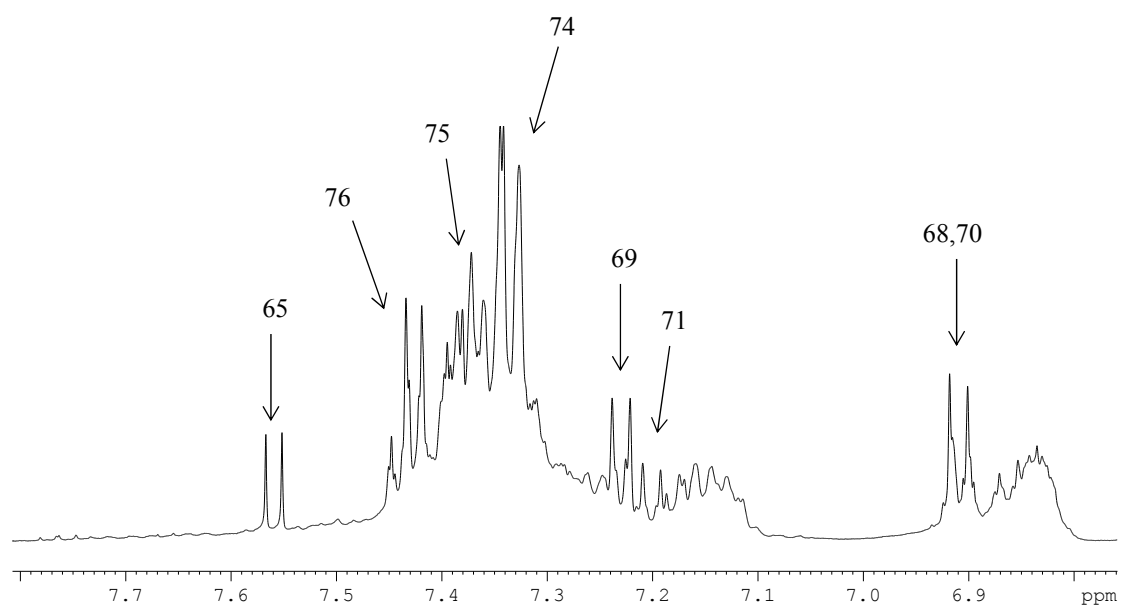
3.1.1 Ποιοτικός προσδιορισμός των μεταβολιτών στα φάσματα του υδατικού εκχυλίσματος των λευκών τυριών άλμης

Μετά τη λήψη των φασμάτων NMR σε διαλύτη δευτεριωμένο νερό (D_2O) πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός των οργανικών ενώσεων των λευκών τυριών άλμης με την ανάθεση των κορυφών στα φάσματα ^1H NMR. Στο φάσμα NMR της εικόνας 3.1 μπορούμε να διακρίνουμε μια πληθώρα σακχάρων και αμινοξέων που περιέχονται στο λευκό τυρί άλμης, καθώς και το βασικό οξύ που αναμένεται, το λακτικό οξύ (δ 4.19, δ 1.35).



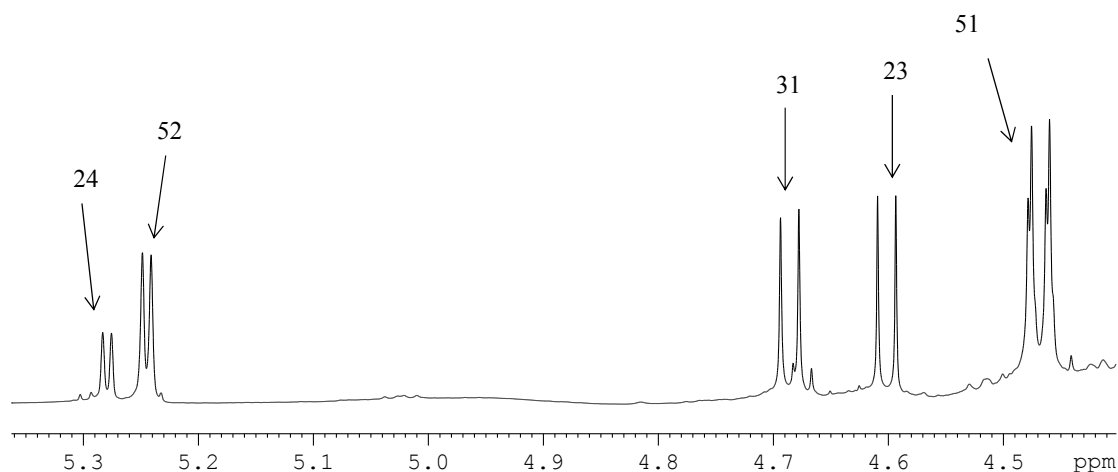
Εικόνα 3.1. Φάσμα ^1H του λευκού τυριού άλμης σε διαλύτη D_2O και σε πεδίο συχνότητας 500MHz.

Πιο αναλυτικά:



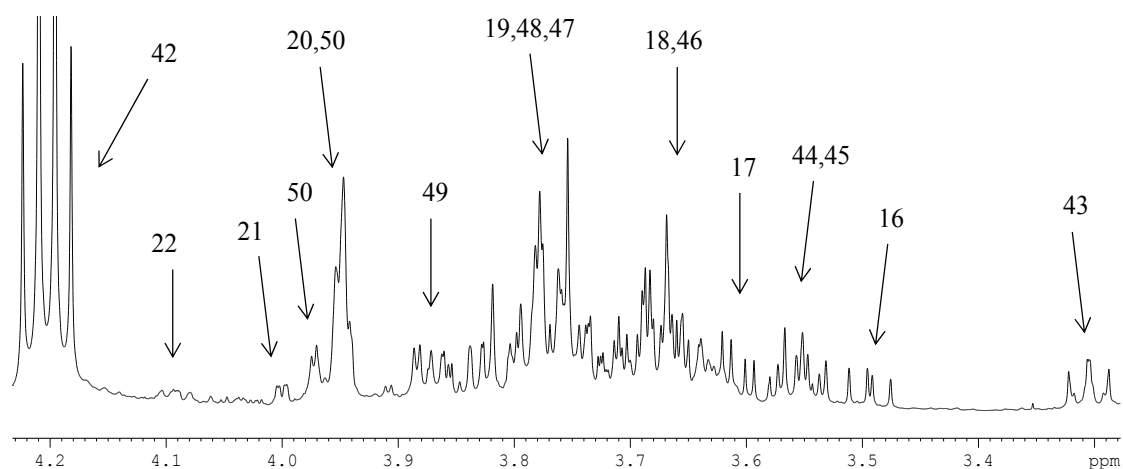
Εικόνα 3.2. Φάσμα ^1H του λευκού τυριού άλμης σε D_2O , διευρυμένη αρωματική περιοχή.

Στην εικόνα 3.2, φαίνονται οι κορυφές ^1H NMR τις τυροσίνης (70,71) σε δ 6.89 και 7.19 και της τυραμίνης (68,69) σε δ 6.89 και 7.21. Αμέσως μετά εμφανίζονται οι πολλαπλές κορυφές της φαινυλαλανίνης (74,75,76) σε δ 7.33-7.42. Ακολουθεί η διπλή κορυφή της ουρακίλης (65). Οι αριθμοί σε παρένθεση αντιστοιχούν στις χημικές μετατοπίσεις των ενώσεων όπως δίνονται στον πίνακα 3.1.



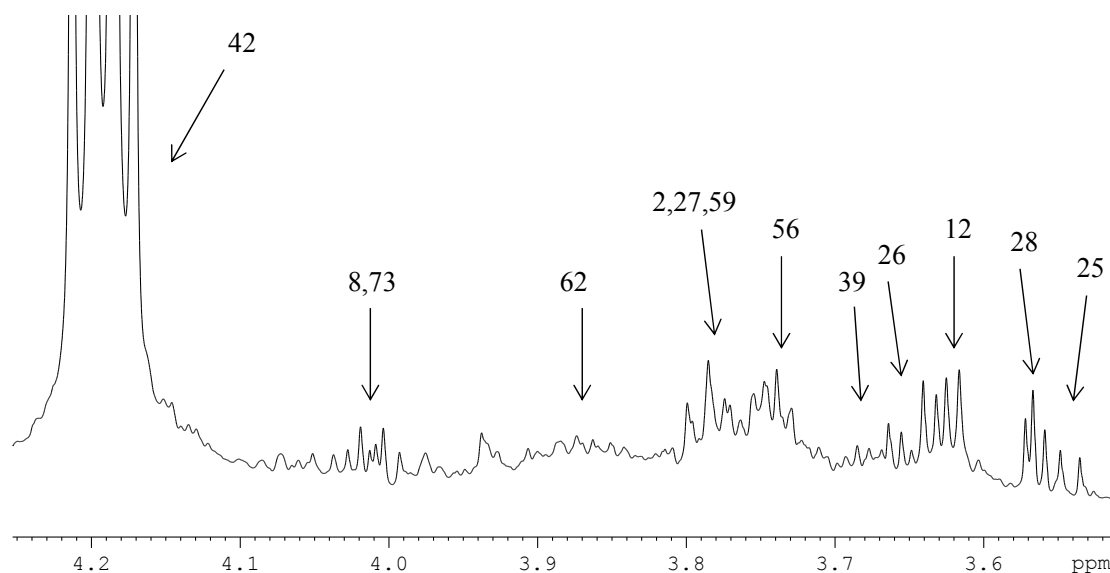
Εικόνα 3.3. Φάσμα ^1H NMR του λευκού τυριού άλμης σε διαλύτη D_2O . Περιοχή των ανωμερικών πρωτονίων των σακχάρων.

Στην εικόνα 3.3, παρατηρούνται οι δύο διπλές κορυφές των ανωμερικών πρωτονίων της β - και α -λακτόζης σε δ 4.45 (51) και 5.22 (52) αντίστοιχα. Επίσης σε δ 4.58 (23) και 5.26 (24) εμφανίζονται οι δυο διπλές κορυφές των ανωμερικών πρωτονίων της β - και α -γαλακτόζης αντίστοιχα. Τέλος, η διπλή κορυφή σε δ 4.67 (31) αντιστοιχεί στο ανωμερικό πρωτόνιο της β -γλυκόζης.



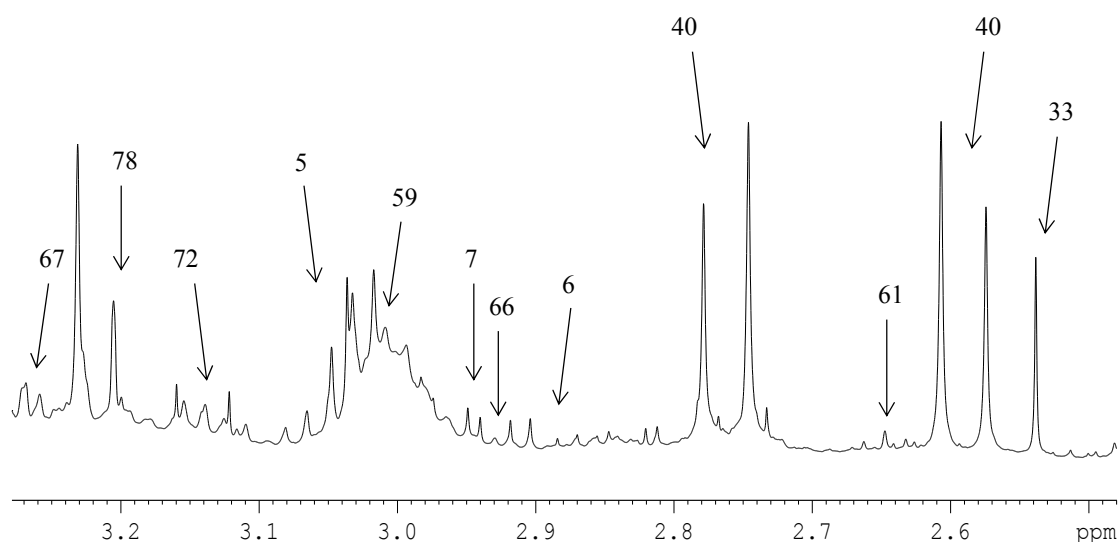
Εικόνα 3.4. Φάσμα ^1H του λευκού τυριού άλμης σε D_2O . Περιοχή πρωτονίων δίπλα σε καρβοξυλική ομάδα.

Προχωρώντας στο ίδιο φάσμα ^1H NMR προς τα αριστερά σε υψηλότερες συχνότητες (κλίμακα δ) (εικόνα 3.4) γίνεται πιο δύσκολη η ανάθεση των κορυφών. Αυτό οφείλεται στις μεγάλες συγκεντρώσεις των σακχάρων, ωστόσο, υπάρχουν κάποιες κορυφές που ξεχωρίζουν είτε ως προς την ένταση τους αλλά και ως προς την ελάχιστη αλληλεπικάλυψη με άλλες κορυφές. Επίσης υπάρχουν διαφοροποιήσεις από δείγμα σε δείγμα, πράγμα το οποίο μας δίνει τη δυνατότητα να ταυτοποιήσουμε κορυφές που ενώ υπάρχουν και στα άλλα φάσματα, αλληλεπικαλύπτονται (κυρίως από τις κορυφές των σακχάρων). Για το λόγο αυτό, παρατίθεται παρακάτω η ίδια περιοχή του φάσματος από άλλο δείγμα όπου είναι εμφανείς οι ενώσεις που είναι δυσδιάκριτες στην παραπάνω εικόνα (3.4). να σημειώσουμε ότι στην παραπάνω εικόνα οι κορυφές που παρατηρούνται, με εξαίρεση την τετραπλή κορυφή του λακτικού οξέος, ανήκουν στα πρωτόνια της λακτόζης και της γαλακτόζης.



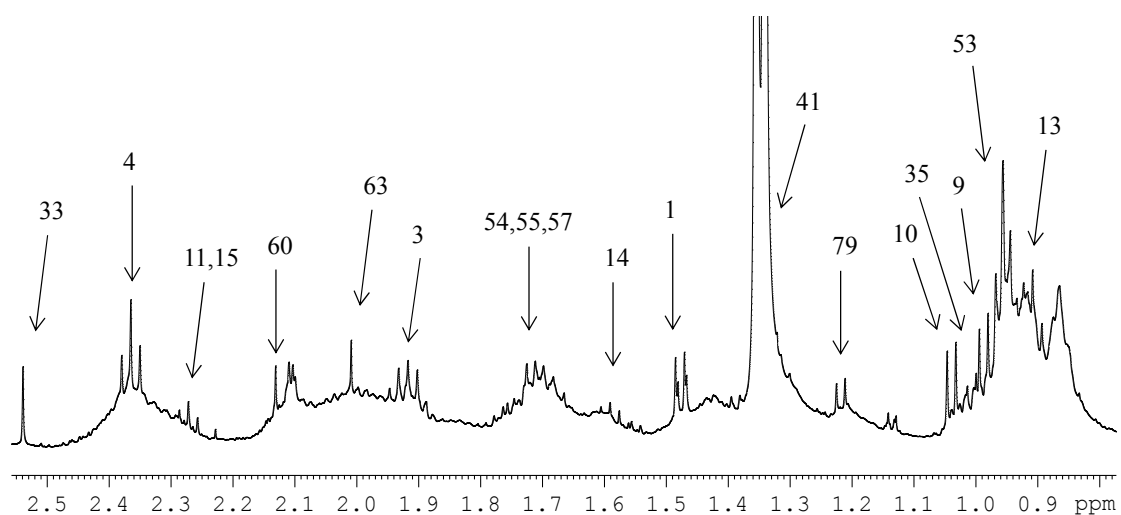
Εικόνα 3.5. Φάσμα ^1H του λευκού τυριού άλμης σε D_2O . Περιοχή πρωτονίων δίπλα σε καρβοξυλική ομάδα.

Αντίθετα στην εικόνα 3.5, διακρίνουμε την απλή κορυφή των πρωτονίων της γλυκίνης σε δ 3.56 (28), η οποία βρίσκεται ανάμεσα στις δύο διπλές κορυφές των πρωτονίων των 1-C και 3-C της γλυκερόλης σε δ 3.55 (25), οι υπόλοιπες δυο βρίσκονται σε δ 3.64 (26). Ανάμεσα τους βρίσκεται η διπλή κορυφή σε δ 3.62 η οποία ανήκει στα πρωτόνια του α -C της βαλίνης (12), αμέσως μετά τις κορυφές της γλυκερόλης εμφανίζεται η διπλή κορυφή της ισολευκίνης στα 3.69 (39). Ακολουθούν σε δ 3.7-3.8, οι κορυφές των πρωτονίων των α -C της λυσίνης (59), της λευκίνης (56), της αλανίνης (2), καθώς και η κορυφή των πρωτονίων του 2-C της γλυκερόλης (27). Σε δ 3.83-3.95, εμφανίζονται οι κορυφές των α -H της μεθειονίνης (62) και πιο αριστερά στο φάσμα, σε δ 4.0 και δ 4.01, εμφανίζονται οι κορυφές των α -H της φαινυλαλανίνης (73) και της ασπαραγίνης (8), αντίστοιχα. Χαρακτηριστική είναι και εδώ η τετραπλή κορυφή του λακτικού οξέος σε δ 4.19 (42).



Εικόνα 3.6. Φάσμα ^1H NMR του λευκού τυριού άλμης σε D_2O . Αλειφατική περιοχή μεταξύ δ 2.5-3.3.

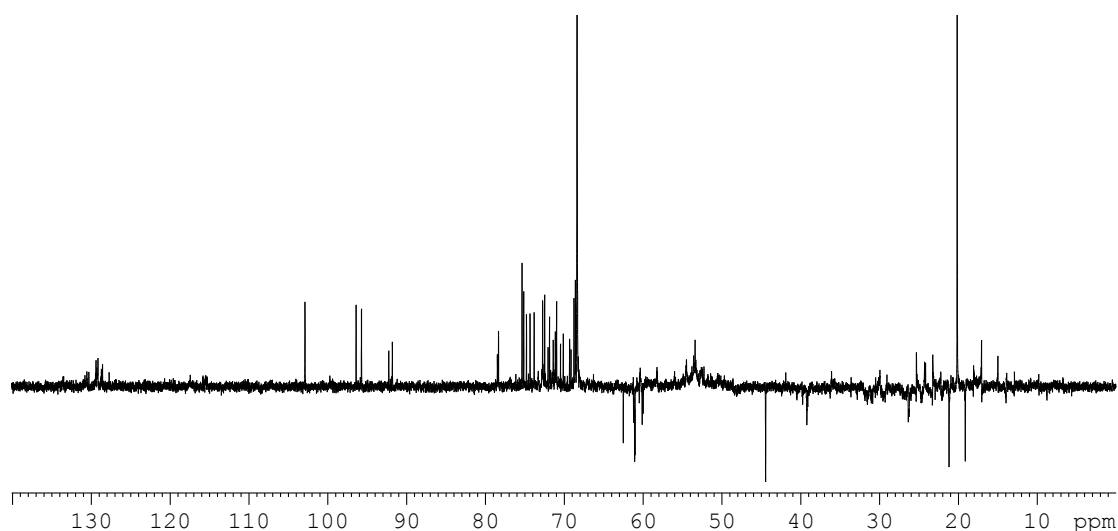
Στην εικόνα 3.6, παρατηρούνται οι δύο διπλές κορυφές του κιτρικού οξέος σε δ 2.59 και 2.76 (40). Ανάμεσά τους είναι η τριπλή κορυφή του $\gamma\text{-CH}_2$ της μεθειονίνης σε δ 2.64 (61). Ακολουθούν οι κορυφές της ασπαραγίνης στην περιοχή δ 2.87- 2.95 (6,7). Ανάμεσα στις κορυφές της ασπαραγίνης βλέπουμε να εμφανίζεται και η τριπλή κορυφή των $\alpha\text{-CH}_2$ της τυραμίνης (66). Στην συνέχεια ακολουθούν σε δ 3.0 η τριπλή κορυφή των πρωτονίων του $\alpha\text{-C}$ της λυσίνης (59) και του $\gamma\text{-C}$ του γ -αμινοβουτυρικού (5). Αμέσως μετά, σε δ 3.12 οι δύο διπλές κορυφές των πρωτονίων του $\beta\text{-C}$ της φαινυλαλανίνης (72), σε δ 3.20 η απλή κορυφή των πρωτονίων των μεθυλίων της χολίνης (78), του $\alpha\text{-C}$ της τυραμίνης σε δ 3.23 (67) και σε δ 3.28 η δεύτερη κορυφή των πρωτονίων του $\beta\text{-C}$ της φαινυλαλανίνης (72).



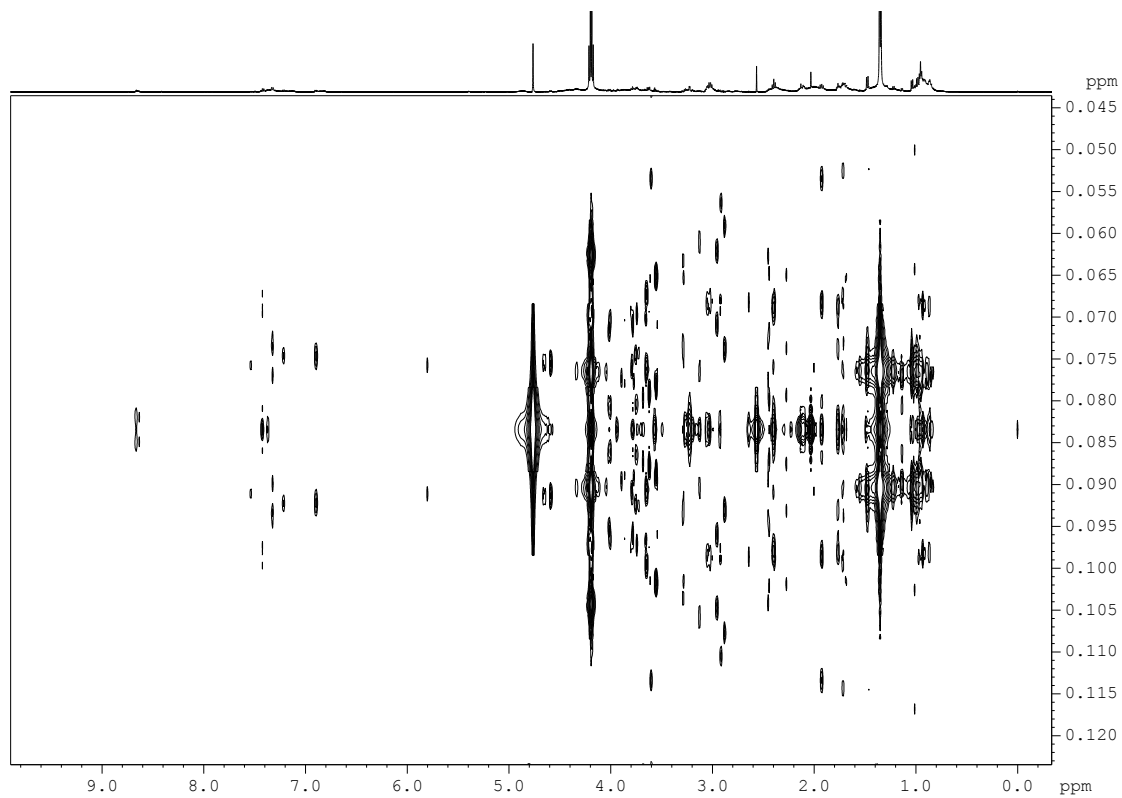
Εικόνα 3.7. Φάσμα ^1H NMR του λευκού τυριού άλμης σε D_2O . Αλειφατική περιοχή μεταξύ δ 0.8 -2.5.

Στην εικόνα 3.7, διακρίνονται: η διπλή κορυφή των πρωτονίων στον β-C του λακτικού οξέος σε δ 1.35 (41), η τριπλή κορυφή των πρωτονίων στον γ-C του βουτυρικού οξέος σε δ 0.90 (13) η τριπλή κορυφή των πρωτονίων των δύο ισοδύναμων μεθυλίων της λευκίνης σε δ 0.95 (53), οι δύο διπλές κορυφές των πρωτονίων στους γ-C και γ'-C της βαλίνης σε δ 0.98 και 1.04 αντίστοιχα (9,10). Επίσης παρατηρείται η διπλή κορυφή των πρωτονίων στον γ-C του 3-υδροξυβουτυρικού οξέος σε δ 1,22 (79), η διπλή κορυφή των πρωτονίων στον β-C της αλανίνης σε δ 1.48 (1), Ανάμεσα στις δύο διπλές κορυφές της βαλίνης παρατηρείται η διπλή κορυφή των πρωτονίων του γ'-C της ισολευκίνης σε δ 1.005 (35) και λίγο πιο κάτω η κορυφή των πρωτονίων του δ-C σε δ 0.92. Πιο αριστερά φαίνεται η πενταπλή κορυφή των β-CH₂ του γ-αμινοβουτυρικού οξέος σε δ 1.92 (3) και η απλή κορυφή των πρωτονίων του μεθυλίου του οξικού οξέος σε δ 2.01 (63). Σε δ 2.27 βρίσκονται οι κορυφές του πρωτονίου του β-C της βαλίνης, σε δ 2.37 η τριπλή κορυφή του α-C του γ-αμινοβουτυρικού (4) και επίσης, υπάρχει μία απλή κορυφή σε δ 2,53 των ισοδύναμων πρωτονίων των α,β-C του ηλεκτρικού οξέος (33). Τέλος δεν πρέπει να παραλειφθούν οι πολλαπλές κορυφές σε δ 1.71 και 1.97 περίπου, που αντιστοιχούν σε πρωτόνια των ανθράκων β-C και γ-C της λευκίνης (54,55) και β-C της ισολευκίνης, καθώς και η πολλαπλή κορυφή σε δ 2.13 των πρωτονίων του β-C και δ-C της μεθειονίνης (60).

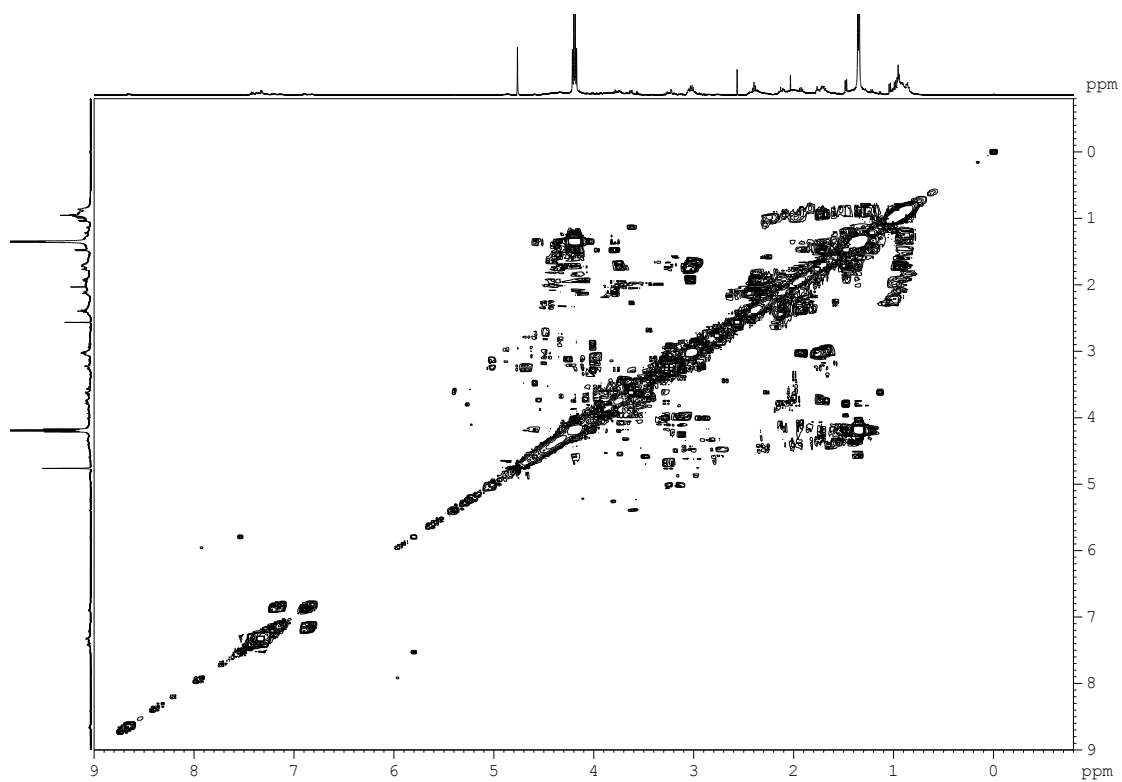
Όλες οι κορυφές των οποίων η ανάθεση σε συγκεκριμένες οργανικές ενώσεις παρουσιάστηκε στις εικόνες 3.1-3.7 ταυτοποιήθηκαν και επιβεβαιώθηκαν με την χρήση δισδιάστατων φασμάτων NMR gCOSY, gTOCSY, gHSQC, gHMBC και gHMQC, καθώς και με την χρήση του προγράμματος ChenomX. Στη συνέχεια παρατίθενται τα επιπρόσθετα φάσματα NMR που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάθεση των κορυφών του υδατικού μέρους του τυριού.



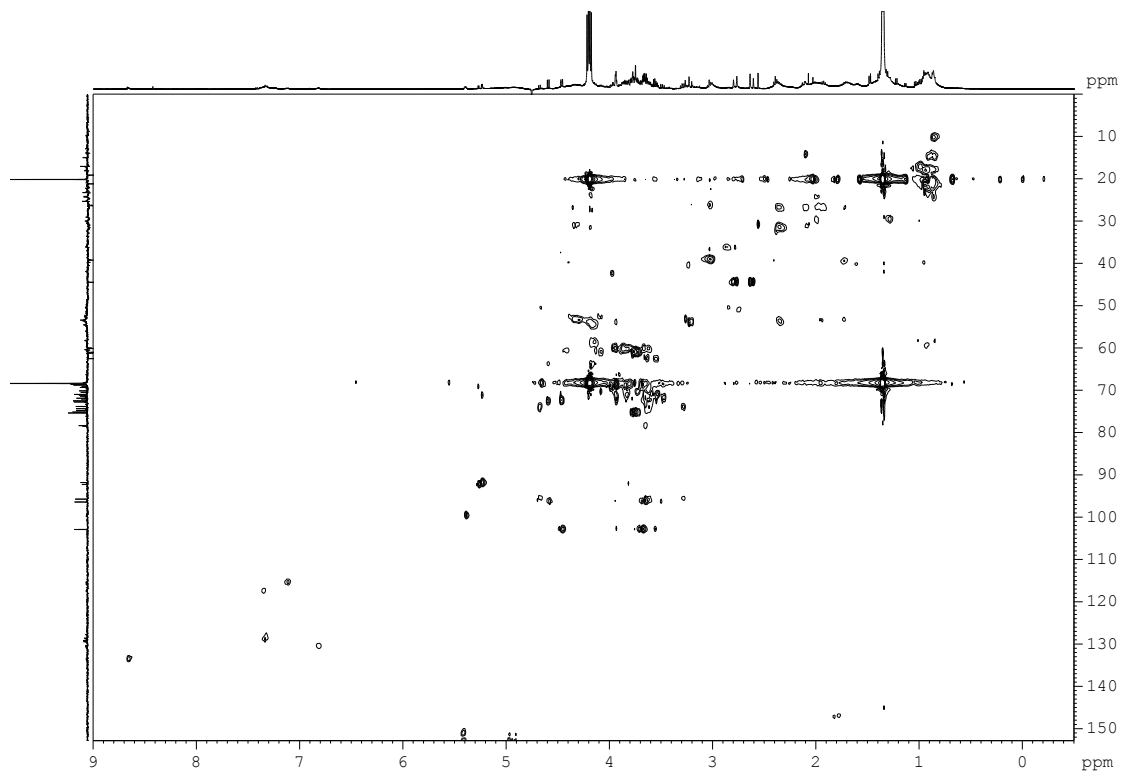
Εικόνα 3.8. Φάσμα ¹³C NMR dept135 του λευκού τυριού άλμης σε D₂O και σε συχνότητα 125.1 MHz.



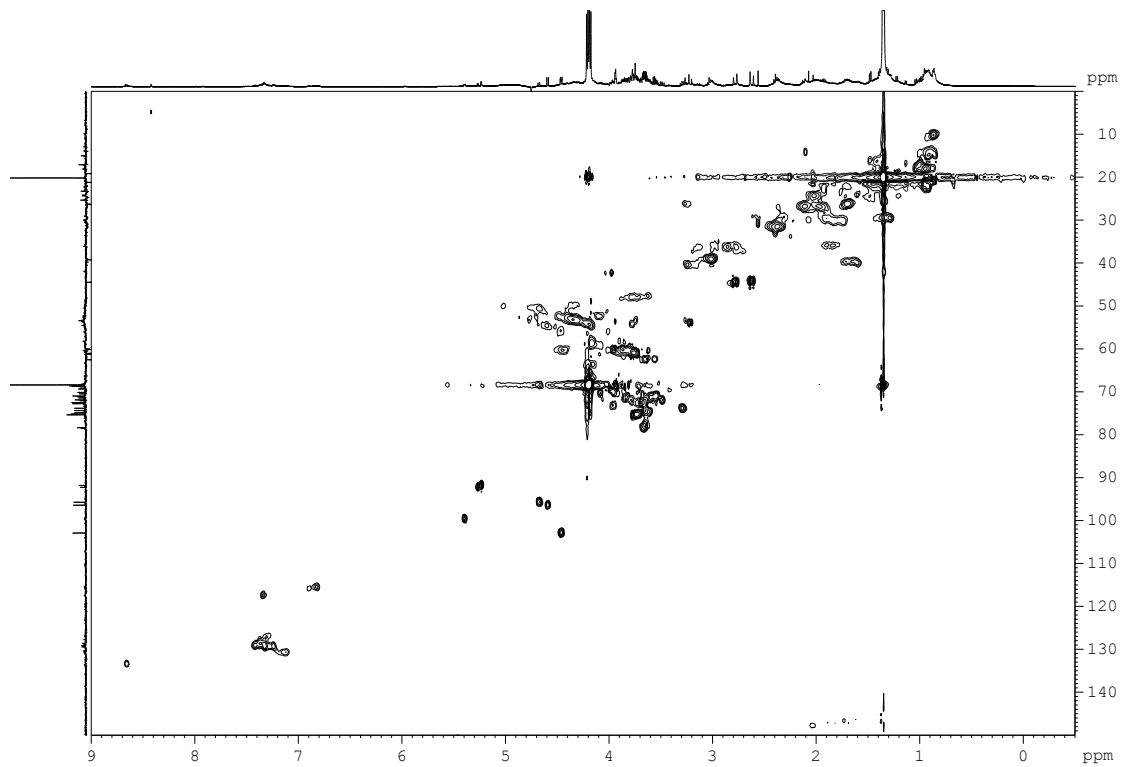
Εικόνα 3.9. Φάσμα ^1H 2D j-resolved του λευκού τυριού άλμης σε D_2O και σε συχνότητα 500MHz.



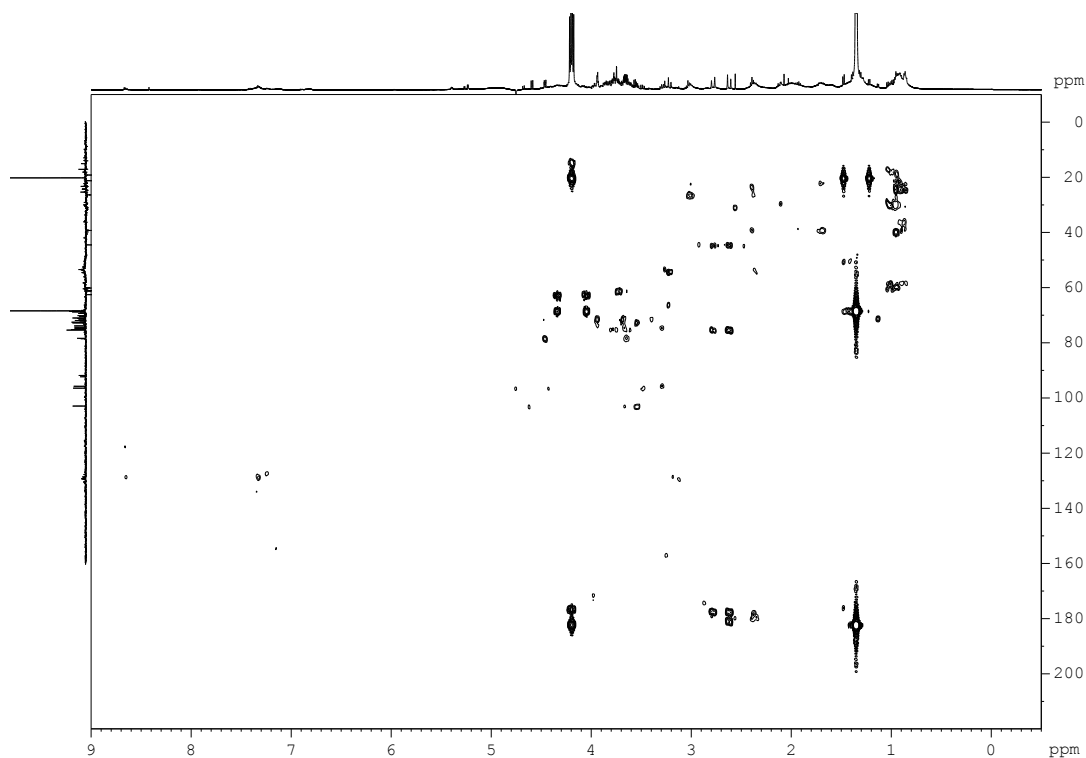
Εικόνα 3.10. Διδιάστατο φάσμα NMR ομοπυρηνικής συσχέτισης ^1H - ^1H gCOSY του λευκού τυριού άλμης σε D_2O και σε συχνότητα 500MHz.



Εικόνα 3.11. Δισδιάστατο φάσμα NMR ετεροπυρηνικής συσχέτισης ^1H - ^{13}C gHSQC-TOCSY του λευκού τυριού άλμης σε D_2O και συχνότητα 500MHz.



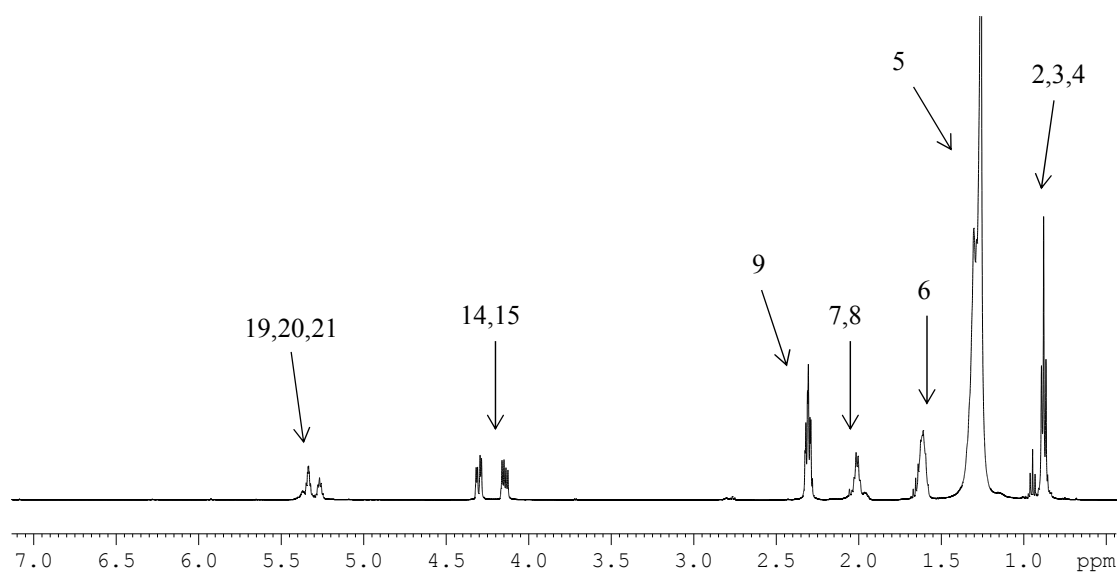
Εικόνα 3.12. Δισδιάστατο φάσμα NMR ετεροπυρηνικής συσχέτισης ^1H - ^{13}C HSQC του λευκού τυριού άλμης σε D_2O και σε συχνότητα 500MHz.



Εικόνα 3.13. Δισδιάστατο φάσμα NMR ετεροπυρηνικής συσχέτισης μακράς εμβέλειας ^1H - ^{13}C gHMBC του λευκού τυριού άλμης σε D_2O και σε συχνότητα 500MHz.

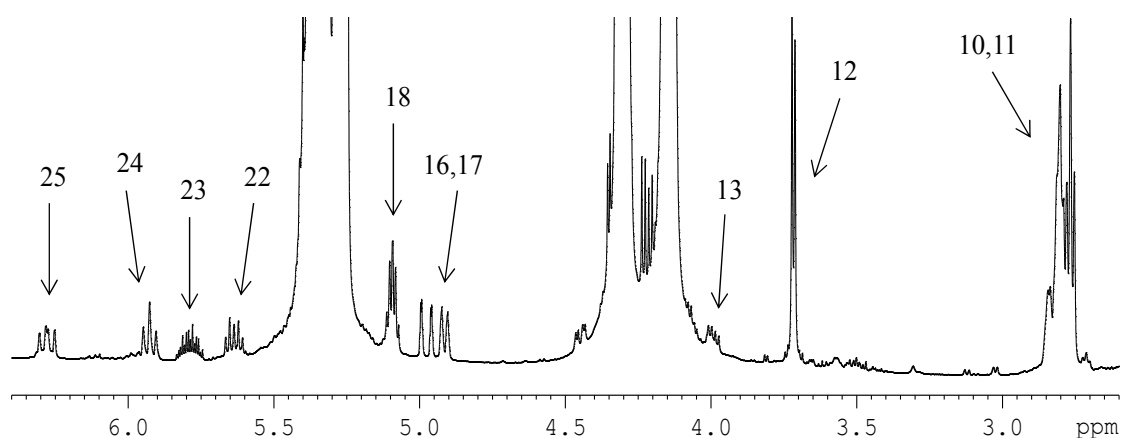
3.1.2 Ποιοτικός προσδιορισμός των μεταβολιτών στα φάσματα του εκχυλίσματος λιπαρών των λευκών τυριών άλμης

Σε αυτή την ενότητα παρουσιάζονται τα φάσματα NMR που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των ενώσεων του λιπαρού μέρους του λευκού τυριού άλμης σε διαλύτη CDCl_3 . Οι αριθμοί αντιστοιχούν στις χημικές μετατοπίσεις των ενώσεων όπως δίνονται στον πίνακα 3.2.



Εικόνα 3.14. Φάσμα ^1H NMR σε διαλύτη CDCl_3 του λευκού τυριού άλμης σε συχνότητα 500MHz.

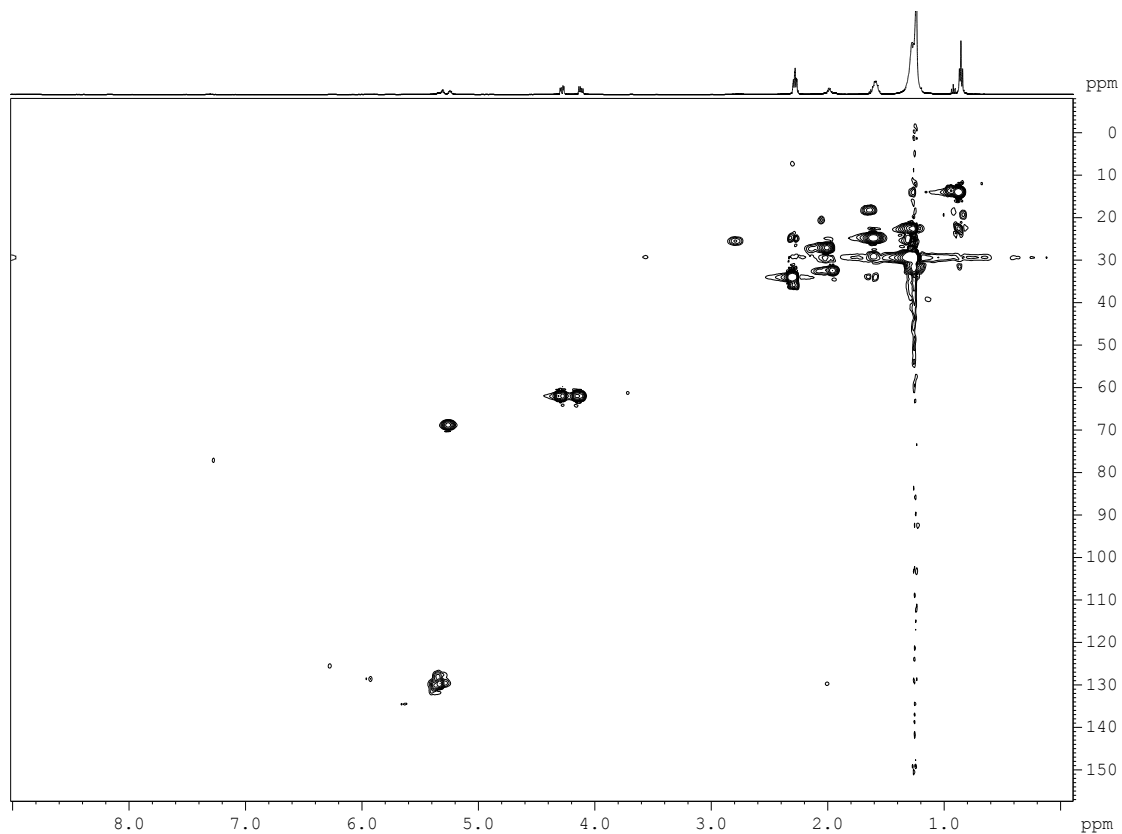
Στην εικόνα 3.14 παρουσιάζεται ένα φάσμα πρωτονίου λευκού τυριού άλμης σε διαλύτη CDCl_3 . Μπορούν να διακριθούν οι κορυφές των μεθυλίων των λιπαρών (2,3,4). Ακολουθούν η κορυφή των ενδιάμεσων CH_2 των λιπαρών (5) η οποία προκύπτει από όλα σχεδόν τα λιπαρά, η κορυφή των $\beta\text{-CH}_2$ των λιπαρών (6) και η κορυφή των $\alpha\text{-CH}_2$ των λιπαρών (9). Ενδιάμεσα των 6 και 9, εμφανίζονται οι κορυφές των CH_2 δίπλα σε διπλό δεσμό των ακόρεστων *cis* και *trans* λιπαρών (7,8). Πιο αριστερά, εμφανίζονται οι κορυφές των $\text{-CH}_2\text{-OCO-}$ των τριγλυκεριδίων (14,15) και ακολουθούν η κορυφή του -CH-OCO- των τριγλυκεριδίων (21) και οι κορυφές των βινυλικών πρωτονίων των ακόρεστων *cis*- και *trans*- λιπαρών οξέων (19,20).



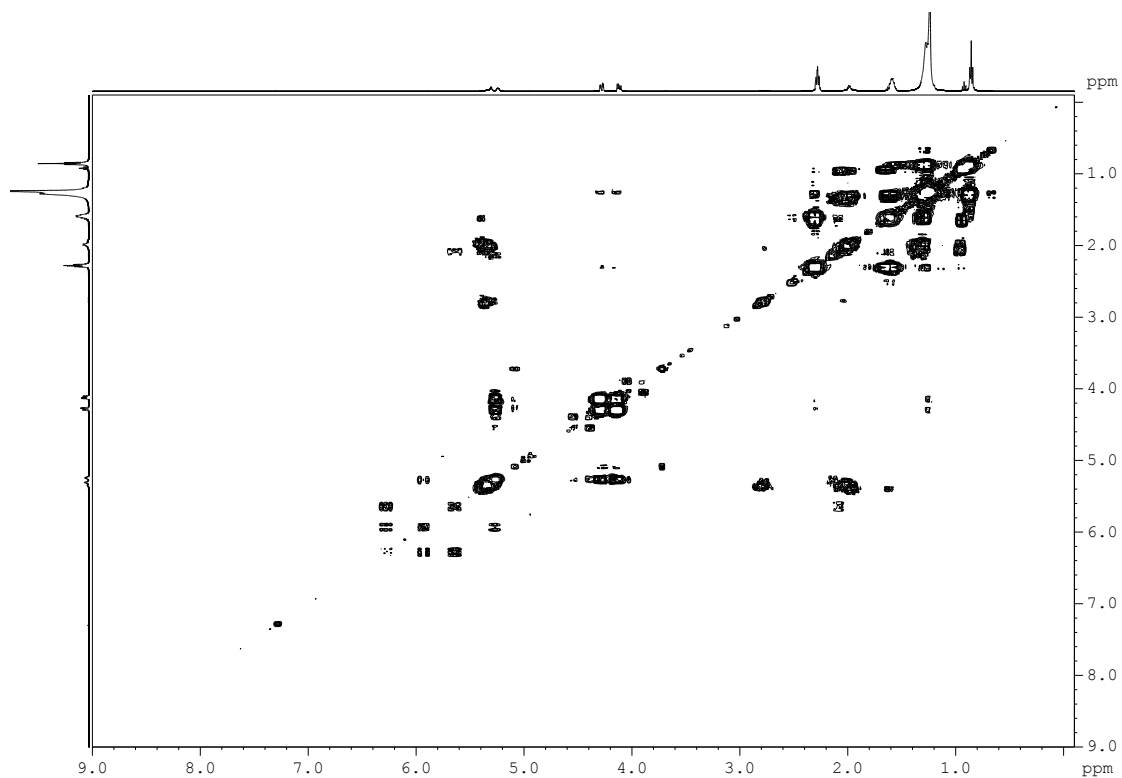
Εικόνα 3.15. Φάσμα ^1H NMR σε διαλύτη CDCl_3 του λευκού τυριού άλμης σε συχνότητα 500 MHz. Περιοχή δ 2.7-6.5 σε μεγέθυνση.

Η εικόνα 3.15 παρουσιάζει σε μεγαλύτερη κατακόρυφη κλίμακα την περιοχή του φάσματος μεταξύ δ 2.5-6.5 του φάσματος της εικόνας 3.14. Στα 2.74 ppm εμφανίζονται οι κορυφές των μεθυλενικών $\text{-CH}_2\text{-}$ που βρίσκονται ανάμεσα σε διπλούς δεσμούς και αντιστοιχούν σε αυτά του λινολεϊκού (10) και του λινολενικού οξέος (11). Ακολουθούν η κορυφή των $\text{HO-CH}_2\text{-CH-}$ των 1,2-διγλυκεριδίων (12) και λίγο πιο αριστερά η κορυφή των $\text{-CH}_2\text{-OOC-}$ των 1,3 διγλυκεριδίων (13). Σε δ 5 ppm περίπου εμφανίζονται οι κορυφές των H10 πρωτονίων του καπρολεϊκού (16,17) και σε δ 5.78 η κορυφή του H9 πρωτονίου της ίδιας ένωσης (23). Στα αριστερά του φάσματος εμφανίζονται οι κορυφές των πρωτονίων των διπλών δεσμών του συζευγμένου λινολεϊκού οξέος και πιο συγκεκριμένα των H11 (25), H10 (24) και H12 (22). Η κορυφή του H9 εμφανίζεται στα 5.28 μαζί με τις κορυφές 20-19.

Παρακάτω παρουσιάζονται τα δισδιάστατα φάσματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των κορυφών των λιπαρών οξέων στο άπολο εκχύλισμα του λευκού τυριού άλμης.



Εικόνα 3.16. Δισδιάστατο φάσμα NMR ομοπυρηνικής συσχέτισης ^1H - ^1H gCOSY του λευκού τυριού άλμης σε διαλύτη CDCl_3 και σε συχνότητα 500MHz.



Εικόνα 3.17. Δισδιάστατο φάσμα NMR ετεροπυρηνικής συσχέτισης ^1H - ^{13}C gHSQC του λευκού τυριού άλμης σε διαλύτη CDCl_3 σε συχνότητα 500MHz.

3.1.3 Πίνακες χημικών μετατοπίσεων ^1H και ^{13}C NMR

Στη συνέχεια παρουσιάζονται οι συγκεντρωτικοί πίνακες με τις χημικές μετατοπίσεις όλων των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν με τη φασματοσκοπία NMR τόσο στο υδατικό εκχύλισμα όσο και στο εκχύλισμα λιπαρών του λευκού τυριού άλμης.

Πίνακας 3.1. Ενώσεις και χημικές μετατοπίσεις των ενώσεων του λευκού τυριού άλμης σε διαλύτη D_2O .

	Ένωση	Ανάθεση	^1H ppm	^{13}C ppm
1	Αλανίνη	$\beta\text{-CH}_3$	1.48	16.2
2	Αλανίνη	$\alpha\text{-CH}$	3.77	50.6
3	γ -Αμινοβουτυρικό οξύ	$\beta\text{-CH}_2$	1.92	22.8
4	γ -Αμινοβουτυρικό οξύ	$\alpha\text{-CH}_2$	2.37	36.4
5	γ -Αμινοβουτυρικό οξύ	$\gamma\text{-CH}_2$	3.04	42.0
6	Ασπαραγίνη	$\beta\text{-CH}_2$	2.87	36.4
7	Ασπαραγίνη	$\beta\text{-CH}_2$	2.95	-
8	Ασπαραγίνη	$\alpha\text{-CH}$	4.01	51.5
9	Βαλίνη	$\gamma\text{-CH}_3$	0.99	17.2
10	Βαλίνη	$\gamma'\text{-CH}_3$	1.04	18.2
11	Βαλίνη	$\beta\text{-CH}$	2.27	29.1
12	Βαλίνη	$\alpha\text{-CH}$	3.62	60.4
13	Βουτυρικό	$\gamma\text{-CH}_3$	0.91	15.0
14	Βουτυρικό	$\beta\text{-CH}_2$	1.57	21.4
15	Βουτυρικό	$\alpha\text{-CH}_2$	2.27	-
16	Γαλακτόζη (β)	3-CH	3.49	72.1
17	Γαλακτόζη (β)	4-CH	3.65	-
18	Γαλακτόζη (α)	CH	3.70	-
19	Γαλακτόζη (β)	4-CH	3.80	-
20	Γαλακτόζη (β)	5-CH	3.92	-
21	Γαλακτόζη (α)	5-CH	3.98	69.5
22	Γαλακτόζη (α)	6-CH	4.08	70.3
23	Γαλακτόζη (β)	CH	4.58	96.4
24	Γαλακτόζη (α)	2-CH	5.26	92.3
25	Γλυκερόλη	1,3- CH_2	3.55	62.8
26	Γλυκερόλη	1,3- CH_2	3.65	62.8
27	Γλυκερόλη	2-CH	3.77	72.4
28	Γλυκίνη	$\alpha\text{-CH}_2$	3.56	41.7
29	Γλυκόζη (β)	CH	3.29	73.8
30	Γλυκόζη (α)	CH	3.59	-
31	Γλυκόζη (β)	CH	4.67	95.7
32	Γλυκόζη (α)	CH	5.22	91.9
33	Ηλεκτρικό	2,3 CH_2	2.53	30.9
34	Ισολευκίνη	$\delta\text{-CH}_3$	0.92	11.0
35	Ισολευκίνη	$\beta'\text{-CH}_3$	1.01	14.9
36	Ισολευκίνη	$\gamma'\text{-CH}$	1.25	24.5

37	Ισολευκίνη	γ -CH	1.46	24.5
38	Ισολευκίνη	β -CH	1.97	35.9
39	Ισολευκίνη	α -CH	3.69	59.7
40	Κιτρικό	2,4 -CH ₂	2.76/2.59	44.5
41	Λακτικό	β -CH ₃	1.35	20.1
42	Λακτικό	α -CH	4.19	68.3
43	Λακτόζη	3-CH	3.29	73.8
44	Λακτόζη	6,4,16-CH	3.54	71.0
45	Λακτόζη	4,5,15-CH	3.58	71.2
46	Λακτόζη	13-CH	3.65	78.4
47	Λακτόζη	19-CH ₂	3.73	75.5
48	Λακτόζη	6,19,1-CH	3.78	-
49	Λακτόζη	14-CH/17-CH ₂	3.87	60.3
50	Λακτόζη	CH	3.94	60.4
51	Λακτόζη	CH	4.45	103.0
52	Λακτόζη (α -γλυκόζης)	CH	5.22	91.9
53	Λευκίνη	δ, δ' -CH ₃	0.96	18.3 22.0
54	Λευκίνη	β -CH ₂	1.71	39.8
55	Λευκίνη	γ -CH	1.71	24.2
56	Λευκίνη	α -CH	3.73	53.4
57	Λυσίνη	δ -CH ₂	1.70	-
58	Λυσίνη	ϵ -CH ₂	1.92	-
59	Λυσίνη	α -CH ₂	3.01	-
60	Μεθειονίνη	δ -CH ₃ / β -CH ₂	2.13	14.1
61	Μεθειονίνη	γ -CH ₂	2.64	26.1
62	Μεθειονίνη	α -CH	3.85	-
63	Οξικό	α -CH ₃	2.01	24.7
64	Ουρακίλη	2-CH	5.80	100.3
65	Ουρακίλη	1-CH	7.54	143.5
66	Τυραμίνη	β -CH ₂	2.93	31.7
67	Τυραμίνη	α -CH ₂	3.23	31.7
68	Τυραμίνη	3,5-H	6.89	115.8
69	Τυραμίνη	2,6-H	7.21	130.5
70	Τυροσίνη	3,5-H	6.89	115.8
71	Τυροσίνη	2,6-H	7.19	130.7
72	Φαινυλαλανίνη	β -CH ₂	3.12/3.28	36.26
73	Φαινυλαλανίνη	α -CH ₂	4.00	56.09
74	Φαινυλαλανίνη	2,6-CH	7.33	129.4
75	Φαινυλαλανίνη	4-CH	7.37	128.7
76	Φαινυλαλανίνη	3,5-CH	7.42	129.1
77	Φορμικό	HCOO	8.41	-
78	Χολίνη	CH ₃	3.20	54.0
79	3-υδροξυβουτυρικό οξύ	7-CH ₃	1.22	24.3

Πίνακας 3.2. Ενώσεις και χημικές μετατοπίσεις των ενώσεων του λευκού τυριού άλμης σε διαλύτη CDCl₃.

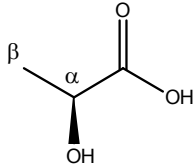
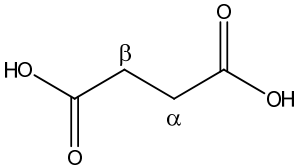
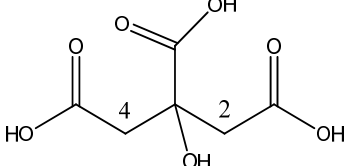
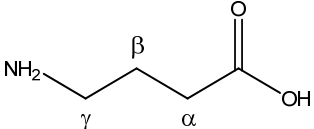
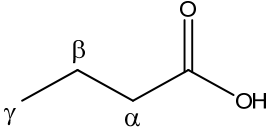
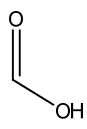
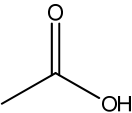
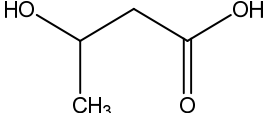
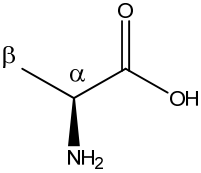
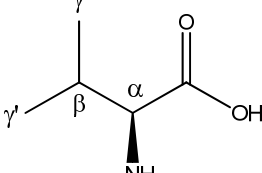
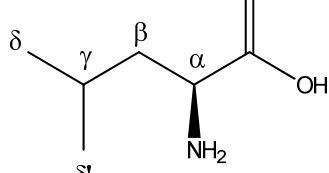
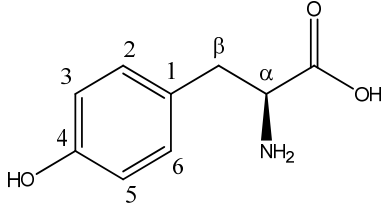
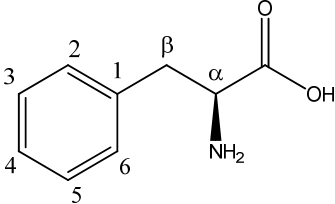
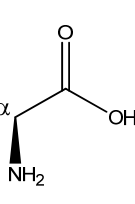
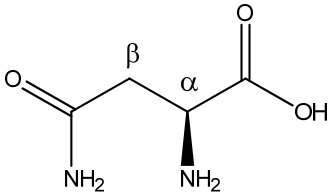
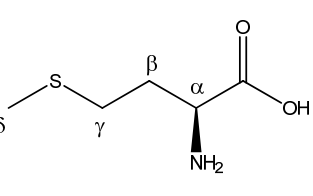
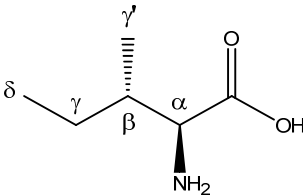
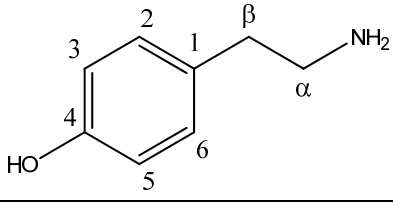
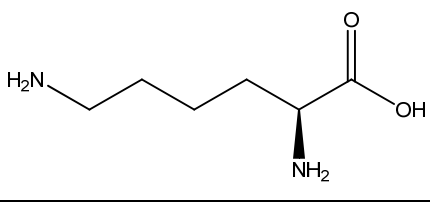
	Ένωση		Ανάθεση	Χημική μετατόπιση ¹ H (ppm)	
1	Στερόλες	α	-CH ₃	0.68	
2	Λ.Ο. εκτός n-3/Βουτυρικό	ω1	-CH ₃	0.88	F
3	Βουτυρικό	H4	-CH ₃	0.94	I
4	N-3 λιπαρά	ω1	-CH ₃	0.97	E
5	Όλα τα λιπαρά οξέα		-(CH ₂)n-	1.26	
6	Όλα τα λιπαρά οξέα	H3	-O-CO-CH ₂ -CH ₂ -	1.61	B
7	Ακόρεστα -trans Λ.Ο.		-CH ₂ -CH=CH-	1.97	C
8	Ακόρεστα -cis Λ.Ο.		-CH ₂ -CH=CH-	2.01	C
9	Όλα τα λιπαρά οξέα	H2	-O-CO-CH ₂ -CH ₂	2.30	D
10	Πολυακόρεστα Λ.Ο.(Λινολεϊκό, LO)	H11	=CH-CH ₂ -CH=	2.77	A
11	Πολυακόρεστα Λ.Ο.(Λινολενικό, LN)	H11 H14	=CH-CH ₂ -CH=	2.80	A
12	1,2-διγλυκερίδια		HO-CH ₂ -CH-	3.72	
13	1,3-διγλυκερίδια		-CH ₂ - O-CO-	3.99	
14	Τριγλυκερίδια		-CH ₂ - O-CO-	4.14	
15	Τριγλυκερίδια		-CH ₂ -O-OC-	4.30	
16	Καπρολεϊκό	H10 α	=CH	4.91	H
17	Καπρολεϊκό	H10β	=CH	4.98	H
18	1,2-διγλυκερίδια		-CH-O-CO-	5.09	
19	Τριγλυκερίδια		-CH-O-CO	5.26	
20	Ακόρεστα -cis Λ.Ο.		-CH=CH-	5.33	K
21	Ακόρεστα -trans Λ.Ο.		-CH=CH-	5.37	L
22	Συζευγμένο Λινολεϊκό (CLA)	H12	-CH=	5.63	
23	Καπρολεϊκό	H9	-CH=CH ₂	5.78	
24	Συζευγμένο Λινολεϊκό (CLA)	H10	-CH=	5.92	
25	Συζευγμένο Λινολεϊκό (CLA)	H11	-CH=	6.27	G

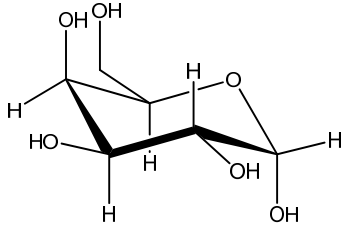
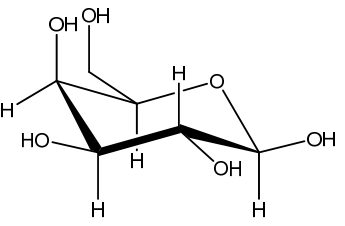
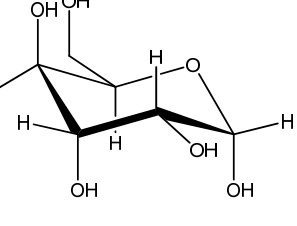
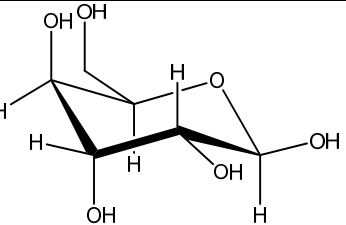
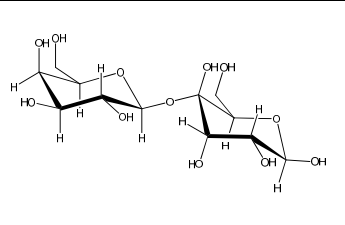
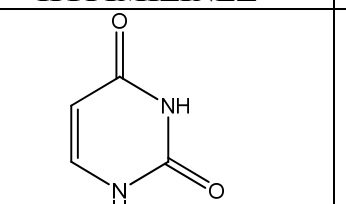
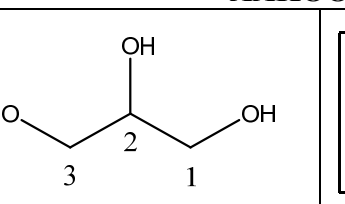
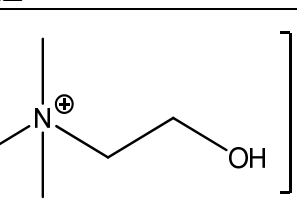
Η αρίθμηση των ατόμων των χημικών ενώσεων στους πίνακες 3.1 και 3.2 δίνεται στην επόμενη ενότητα (πίνακες 3.3 και 3.4).

3.1.4 Δομές ταυτοποιημένων ενώσεων

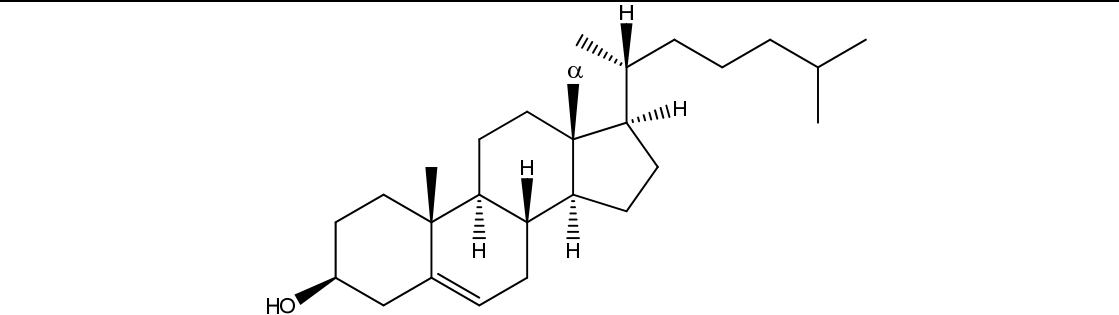
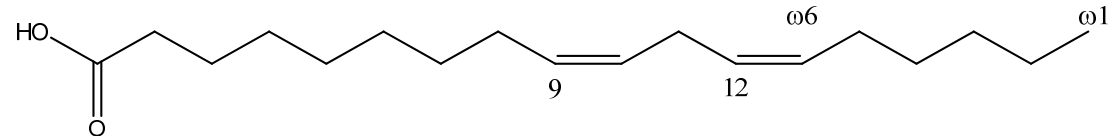
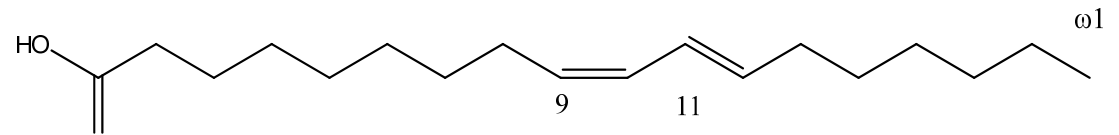
Σε αυτήν την ενότητα παρουσιάζονται οι δομές των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στο υδατικό και στο άπολο εκχύλισμα. Τα οργανικά οξέα του πίνακα 3.3 παρουσιάζονται στην πρωτονιωμένη τους δομή, ενώ για λόγους απλότητας τα λιπαρά οξέα του πίνακα 3.4 παρουσιάζονται ως ελεύθερα λιπαρά οξέα και όχι στην πραγματική τους κατάσταση, που είναι σε εστεροποιημένη με γλυκερόλη μορφή τριγλυκεριδίων και διγλυκεριδίων.

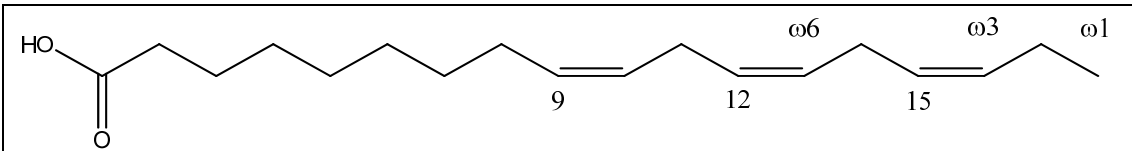
Πίνακας 3.3. Χημική δομή των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στο φάσμα ^1H NMR του υδατικού εκχυλίσματος.

ΟΡΓΑΝΙΚΑ ΟΞΕΑ		
		
Λακτικό Οξύ	Ηλεκτρικό Οξύ	Κιτρικό Οξύ
		
γ-αμινοβουτυρικό οξύ-GABA	Βουτυρικό Οξύ	Φορμικό Οξύ
		
Οξικό Οξύ	3-Υδροξυβουτυρικό οξύ	
ΑΜΙΝΟΞΕΑ		
		
Αλανίνη	Βαλίνη	Λευκίνη
		
Τυροσίνη	Φαινυλαλανίνη	Γλυκίνη
		
Ασπαραγίνη	Μεθειονίνη	Ισολευκίνη
		
Τυραμίνη	Λυσίνη	
ΣΑΚΧΑΡΑ		

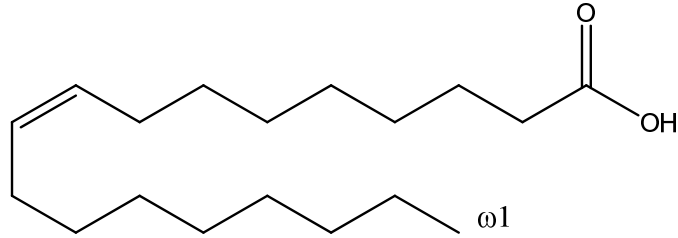
		
α-Γαλακτόζη	β-Γαλακτόζη	α-Γλυκόζη
		
β-Γλυκόζη	Λακτόζη	
ΠΥΡΙΜΙΔΙΝΕΣ		ΑΛΚΟΟΛΕΣ
		
Ουρακίλη	Γλυκερόλη	Χολίνη

Πίνακας 3.4. Χημική δομή των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στο φάσμα ^1H NMR του εκχυλίσματος λιπαρών.

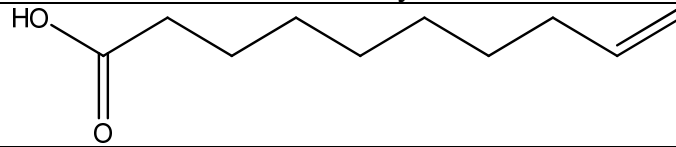

Χοληστερόλη

Λινολεϊκό Οξύ

Συζευγμένο Λινολεϊκό Οξύ



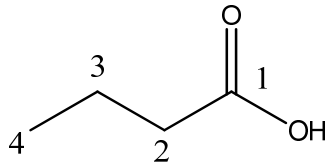
α-Λινολενικό Οξύ



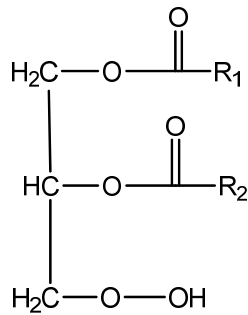
Ολεϊκό Οξύ



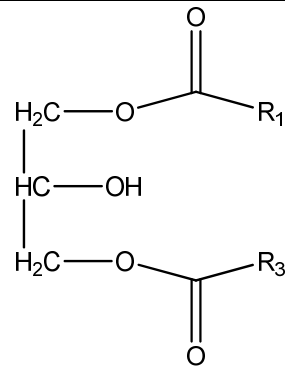
Καπρολεϊκό Οξύ



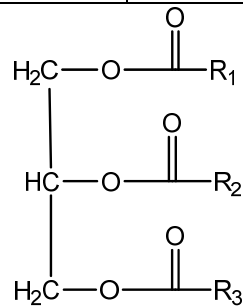
Βουτυρικό Οξύ



1,2 Διγλυκερίδιο



1,3 Διγλυκερίδιο



Τριγλυκερίδιο

3.2 Ποσοτικός προσδιορισμός των μεταβολιτών με τη φασματοσκοπία ^1H NMR

3.2.1 Ποσοτικός προσδιορισμός των ενώσεων του υδατικού εκχυλίσματος του λευκού τυριού άλμης

Η ποσοτική ανάλυση των φασμάτων 1D ^1H NMR πραγματοποιήθηκε με σκοπό τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων των οργανικών ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στα δείγματα λευκού τυριού άλμης. Η ποσοτικοποίηση ήταν εφικτή για τις ενώσεις που εμφάνιζαν στο φάσμα ^1H NMR τουλάχιστον μια κορυφή ελεύθερη από αλληλεπικαλύψεις. Το εσωτερικό πρότυπο που χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση των ενώσεων ήταν το TMS- d_4 (δ 0.0), και του οποίου το ολοκλήρωμα αντιστοιχούσε σε 18284,4 nmol πρωτονίων, ποσότητα που διαιρούμενη με τον αριθμό πρωτονίων (9) που περιέχονται στην ένωση μας δίνει τη μοριακή της συγκέντρωση στο δείγμα. Η διαδικασία της ποσοτικοποίησης ακολουθήθηκε ήταν η εξής: Μετά την ταυτοποίηση της κάθε ένωσης πραγματοποιήθηκε α) ολοκλήρωση των κορυφών που επιλέχθηκαν ως οι πλέον κατάλληλες για ποσοτικοποίηση με το λογισμικό WIN-NMR της εταιρίας Bruker, β) κανονικοποίηση ως προς τον αριθμό των πρωτονίων που συνεισφέρουν σε κάθε κορυφή και τέλος διαίρεση με την μάζα του δείγματος που χρησιμοποιήθηκε. Με τον τρόπο αυτό υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις ($\mu\text{mol/g}$) των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στα δείγματα λευκού τυριού άλμης που αναλύθηκαν. Παρακάτω παρατίθεται ο πίνακας 3.5 που προκύπτει από τις ολοκληρώσεις των ενώσεων στα φάσματα ^1H NMR του υδατικού εκχυλίσματος.

Πίνακας 3.5. Συγκεντρώσεις σε $\mu\text{mol/g}$ των μεταβολιτών που προσδιορίστηκαν στα δείγματα λευκών τυριών άλμης από την ποσοτική ανάλυση με ^1H NMR των υδατικών εκχυλισμάτων τους.

Δείγμα	Λευκίνη	Βαλίνη	Αλανίνη	Μεθειονίνη	Τυροσίνη	Φαινυλαλανίνη
1	5,06	2,16	4,83	0,54	0,17	2,68
2	50,62	23,39	35,20	0,00	2,46	21,61
3	33,06	11,43	22,77	3,23	0,88	14,45
4	25,39	10,74	18,47	3,65	2,28	12,29
5	8,49	3,44	13,60	$\Delta.$	0,56	4,66
6	73,66	33,78	54,71	9,48	4,64	39,75
7	47,59	15,67	33,12	$\Delta.$	1,09	16,98
8	0,00	1,79	6,96	0,00	1,09	1,85
9	67,43	54,90	45,36	14,99	2,74	37,73
10	9,88	3,44	11,43	1,80	0,22	3,66
11	5,97	1,75	3,82	0,49	0,41	1,46
12	9,78	3,38	6,14	$\Delta.$	1,40	4,25
13	10,78	4,20	14,31	$\Delta.$	3,53	5,83
14	1,43	0,68	4,19	$\Delta.$	0,52	1,14
15	29,74	7,88	12,24	1,79	5,13	11,90
16	49,94	10,33	32,62	5,46	1,42	11,51
17	5,00	3,36	10,45	0,00	1,09	4,76
18	20,02	8,93	20,33	2,44	0,83	9,66
19	44,26	18,04	36,05	9,30	$\Delta.$	20,07

20	88,32	46,23	54,36	0,00	7,23	47,41
21	8,08	4,41	11,07	Δ.α.	0,67	2,96
22	0,98	0,57	1,18	Δ.α.	0,05	0,49
23	0,32	0,32	1,06	Δ.α.	0,03	0,40
24	0,84	1,00	148,62	0,00	0,07	0,73
25	1,43	0,74	2,32	Δ.α.	0,11	0,48
26	4,35	2,02	3,53	0,77	0,15	1,61
27	0,66	0,35	1,10	0,09	0,11	0,39
28	2,82	0,95	2,20	Δ.α.	0,13	0,76
29	0,76	0,29	1,04	0,11	0,26	0,72
30	0,58	0,24	0,71	0,06	Δ.α.	0,36
31	1,32	0,28	1,47	0,38	0,41	0,62

Δείγμα	Λακτικό	Κιτρικό	Ηλεκτρικό	Οξικό	GABA	Φορμικό
1	250,36	Δ.α.	3,56	1,58	14,02	0,63
2	2759,36	101,47	8,59	3,14	0,00	5,51
3	1536,21	22,52	12,33	2,68	28,52	2,91
4	1064,14	6,96	9,17	5,00	Δ.α.	4,47
5	991,67	54,27	6,23	2,92	41,07	6,94
6	2944,50	57,93	16,13	5,86	Δ.α.	12,35
7	2134,23	Δ.α.	26,94	16,89	0,00	8,83
8	925,18	31,14	3,33	2,23	Δ.α.	6,22
9	3313,44	Δ.α.	9,44	24,45	213,36	19,13
10	1189,56	Δ.α.	3,87	5,26	30,53	4,00
11	254,60	8,36	1,02	0,90	19,16	0,65
12	724,98	24,96	2,54	1,84	18,40	5,22
13	1554,60	11,31	11,88	11,32	38,17	6,09
14	509,21	20,36	1,29	0,80	2,54	2,55
15	1508,77	Δ.α.	19,10	8,98	47,98	10,10
16	2354,98	Δ.α.	17,01	16,06	98,56	10,89
17	1435,20	54,82	4,02	3,61	29,76	6,80
18	1846,31	28,47	7,50	53,44	92,68	7,16
19	2670,23	24,59	22,57	13,51	198,83	9,05
20	3970,34	49,72	31,89	19,24	0,00	11,86
21	1632,92	65,40	4,10	0,36	27,57	5,69
22	165,37	4,20	0,41	0,18	3,06	0,34
23	148,63	2,18	0,50	0,31	3,28	0,35
24	133,54	2,45	0,59	0,91	2,06	0,60
25	341,43	11,70	1,10	0,10	Δ.α.	0,59
26	261,58	6,65	1,07	0,58	13,77	0,48
27	609,99	5,02	0,56	0,29	3,06	0,48
28	192,69	2,44	1,52	0,72	3,55	1,05
29	124,32	3,12	0,31	0,32	2,78	0,24
30	109,57	Δ.α.	0,99	Δ.α.	1,82	0,31
31	140,57	Δ.α.	2,96	0,55	2,43	0,84

Δείγμα	Λακτόζη	Γαλακτόζη	Γλυκόζη	Ουρακίλη	Χολίνη	Τυραμίνη
1	1,07	2,77	3,91	0,43	0,27	1,03
2	Δ.α.	89,37	2,50	0,97	3,47	4,83
3	13,06	0,23	2,24	2,77	2,19	8,91
4	10,83	2,60	5,57	1,75	0,95	3,30
5	39,32	7,84	13,69	0,59	1,89	1,31
6	43,73	85,38	20,50	4,95	7,18	9,12
7	338,16	34,00	164,24	1,83	7,06	4,87
8	50,34	6,26	17,28	0,52	1,59	0,18
9	Δ.α.	323,97	13,80	4,67	4,35	10,07
10	2,37	0,27	2,57	1,54	0,40	1,48
11	1,33	8,08	0,59	0,30	0,09	0,47
12	0,00	38,92	Δ.α.	0,44	0,94	Δ.α.
13	273,98	10,83	138,22	1,01	0,41	Δ.α.
14	46,33	2,49	17,01	0,21	0,67	0,11
15	50,57	22,66	18,74	0,45	0,08	Δ.α.
16	Δ.α.	Δ.α.	Δ.α.	2,62	1,34	1,45
17	105,35	34,25	22,03	0,84	1,62	1,01
18	45,78	28,60	17,35	1,27	1,01	3,24
19	89,63	10,85	38,94	5,75	0,88	11,95
20	8,54	235,95	Δ.α.	7,69	1,16	8,34
21	64,56	15,14	3,18	2,15	1,38	0,38
22	0,25	0,02	Δ.α.	0,22	0,14	0,16
23	0,34	0,50	Δ.α.	0,15	0,10	0,12
24	Δ.α.	7,43	Δ.α.	0,11	0,32	0,31
25	25,78	8,28	13,12	Δ.α.	0,43	Δ.α.
26	10,93	Δ.α.	1,76	0,68	0,09	0,66
27	14,52	3,96	6,62	0,04	0,14	0,06
28	5,23	1,81	1,21	0,27	0,20	0,46
29	12,33	0,80	6,23	0,05	0,17	0,04
30	0,29	Δ.α.	Δ.α.	0,02	0,05	0,19
31	5,79	Δ.α.	1,03	0,07	0,01	Δ.α.

*Δεν ανιχνεύτηκε-Δ.α.

Από τον παραπάνω πίνακα υπολογίστηκαν οι μέσοι όροι, οι ελάχιστες και οι μέγιστες τιμές για κάθε μεταβολίτη για ορισμένες κατηγορίες των λευκών τυριών άλμης που μελετήθηκαν και που αναλύονται αργότερα στο επόμενο υποκεφάλαιο. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους πίνακα 3.6, 3.7, 3.8 και 3.9 που ακολουθούν.

Πίνακας 3.6. Μέσος όρος, μέγιστη και ελάχιστη τιμή των μεταβολιτών σε μmol/g τυριού στο υδατικό εκχύλισμα για τα είδη τυριού Φέτα και λευκό τυρί Κρήτης (αιγοπρόβειο).

	Φέτα			Λευκό Τυρί Κρήτης (Αιγοπρόβειο)		
	n=10			n=9		
	Μ. Όρος	Ελάχιστη	Μέγιστη	Μ. Όρος	Ελάχιστη	Μέγιστη
Λευκίνη	22,47	2,82	73,66	23,10	0,32	88,32
Βαλίνη	9,45	0,95	33,78	13,36	0,32	54,90
Αλανίνη	17,32	2,20	54,71	32,28	1,06	148,62
Μεθειονίνη	1,92	0,00	9,48	1,86	0,00	14,99
Τυροσίνη	1,32	0,13	4,64	2,17	0,03	7,23
Φαινυλαλανίνη	10,56	0,76	39,75	11,99	0,40	47,41
Λακτικό	1190,81	192,69	2944,50	1418,78	133,54	3970,34
Κιτρικό	27,89	0,00	101,47	16,33	0,00	65,40
Ηλεκτρικό	6,50	1,02	16,13	8,78	0,41	31,89
Οξικό	2,99	0,72	5,86	7,32	0,10	24,45
GABA	15,52	0,00	41,07	37,27	0,00	213,36
Φορμικό	4,37	0,63	12,35	6,08	0,34	19,13
Λακτόζη	12,08	0,00	43,73	47,11	0,00	273,98
Γαλακτόζη	23,64	0,46	89,37	69,42	0,04	323,97
Γλυκόζη	5,28	0,00	20,50	20,78	0,00	138,22
Ουρακίλη	1,40	0,27	4,95	1,83	0,00	7,69
Χολίνη	1,76	0,09	7,18	0,93	0,08	4,35
Τυραμίνη	3,09	0,00	9,12	2,15	0,00	10,07

Στον παραπάνω πίνακα παρατηρούνται κάποιες διαφορές ανάμεσα στους μεταβολίτες που περιέχονται στα τυριά που μελετήθηκαν με τα Λευκά τυριά Κρήτης να έχουν σε μεγαλύτερη ποσότητα σχεδόν όλους τους μεταβολίτες εκτός από τη μεθειονίνη, το κιτρικό, τη χολίνη και τη τυραμίνη. Στους πίνακες 3.7 και 3.8 συγκρίνονται οι τιμές των διαφόρων μεταβολιτών για τις κατηγορίες Αιγοπρόβειο – Αγελαδινό και Λευκό τυρί Αιγοπρόβειο – Λευκό τυρί Αγελαδινό. Τις μεγαλύτερες ποσότητες για τη λευκίνη, τη βαλίνη, την αλανίνη, τη μεθειονίνη, τη τυροσίνη, τη φαινυλαλανίνη, το λακτικό, το κιτρικό, το ηλεκτρικό, το οξικό, το γ-αμινοβουτυρικό, το φορμικό, τη γαλακτόζη, την ουρακίλη και τη τυραμίνη, περιέχουν τα τυριά στις κατηγορίες Αιγοπρόβεια και Λευκά τυριά Αιγοπρόβεια αντίστοιχα. Η λακτόζη, η γλυκόζη και η χολίνη βρίσκεται στα αγελαδινά τυριά σε μεγαλύτερες ποσότητες, με σημαντικότερη διαφορά αυτή της λακτόζης. Επίσης, στα τυριά από αγελαδινό γάλα παρατηρείται και η μικρότερη ποσότητα γαλακτόζης σε σύγκριση με όλες τις άλλες κατηγορίες.

Πίνακας 3.7. Μέσος όρος, μέγιστη και ελάχιστη τιμή των μεταβολιτών σε $\mu\text{mol/g}$ τυριού στο υδατικό εκχύλισμα για τις κατηγορίες λευκών τυριών άλμης με βάση το τύπο γάλακτος.

	Αιγοπρόβειο			Αγελαδινό		
	n=22			n=8		
	Μ. Όρος	Ελάχιστη	Μέγιστη	Μ. Όρος	Ελάχιστη	Μέγιστη
Λευκίνη	24,15	0,32	88,32	8,19	0,58	47,59
Βαλίνη	11,14	0,32	54,90	2,83	0,24	15,67
Αλανίνη	24,36	1,06	148,62	7,38	0,71	33,12
Μεθειονίνη	2,34	0,00	14,99	0,08	0,00	0,38
Τυροσίνη	1,56	0,00	7,23	0,57	0,00	1,09
Φαινυλαλανίνη	11,21	0,40	47,41	3,35	0,36	16,98
Λακτικό	1362,00	133,54	3970,34	748,53	109,57	2134,23
Κιτρικό	20,78	0,00	101,47	14,31	0,00	54,82
Ηλεκτρικό	8,39	0,41	31,89	5,05	0,31	26,94
Οξικό	5,72	0,10	24,45	3,09	0,00	16,89
GABA	36,45	0,00	213,36	5,30	0,00	29,76
Φορμικό	5,40	0,34	19,13	3,28	0,24	8,83
Λακτόζη	29,33	0,00	273,98	71,17	0,29	338,16
Γαλακτόζη	39,64	0,00	323,97	10,22	0,00	34,25
Γλυκόζη	12,75	0,00	138,22	29,30	0,00	164,24
Ουρακίλη	1,80	0,00	7,69	0,45	0,02	1,83
Χολίνη	1,29	0,08	7,18	1,41	0,01	7,06
Τυραμίνη	2,93	0,00	11,95	0,81	0,00	4,87

Πίνακας 3.8. Μέσος όρος, μέγιστη και ελάχιστη τιμή των μεταβολιτών σε $\mu\text{mol/g}$ τυριού στο υδατικό εκχύλισμα για τα είδη Λευκό τυρί Αιγοπρόβειο και λευκό τυρί Αγελαδινό.

	Λευκό Τυρί Αιγοπρόβειο			Λευκό Τυρί Αγελαδινό		
	n=12			n=8		
	Μ. Όρος	Ελάχιστη	Μέγιστη	Μ. Όρος	Ελάχιστη	Μέγιστη
Λευκίνη	25,54	0,32	88,32	8,19	0,58	47,59
Βαλίνη	12,55	0,32	54,90	2,83	0,24	15,67
Αλανίνη	30,23	1,06	148,62	7,38	0,71	33,12
Μεθειονίνη	2,69	0,00	14,99	0,08	0,00	0,38
Τυροσίνη	1,76	0,00	7,23	0,57	0,00	1,09
Φαινυλαλανίνη	11,76	0,40	47,41	3,35	0,36	16,98
Λακτικό	1504,65	133,54	3970,34	748,53	109,57	2134,23
Κιτρικό	14,85	0,00	65,40	14,31	0,00	54,82
Ηλεκτρικό	9,97	0,41	31,89	5,05	0,31	26,94
Οξικό	8,00	0,10	24,45	3,09	0,00	16,89
GABA	53,88	0,00	213,36	5,30	0,00	29,76
Φορμικό	6,26	0,34	19,13	3,28	0,24	8,83
Λακτόζη	43,71	0,00	273,98	71,17	0,29	338,16
Γαλακτόζη	52,97	0,00	323,97	10,22	0,00	34,25
Γλυκόζη	18,98	0,00	138,22	29,30	0,00	164,24
Ουρακίλη	2,13	0,00	7,69	0,45	0,02	1,83
Χολίνη	0,89	0,08	4,35	1,41	0,01	7,06
Τυραμίνη	2,79	0,00	11,95	0,81	0,00	4,87

Πίνακας 3.9. Μέσος όρος, μέγιστη και ελάχιστη τιμή των μεταβολιτών σε $\mu\text{mol/g}$ τυριού στο υδατικό εκχύλισμα για τα είδη τυριού Φέτα και λευκό τυρί Αιγοπρόβειο.

	Φέτα			Λευκό τυρί Αιγοπρόβειο		
	n=10			n=12		
	Μ. Όρος	Ελάχιστη	Μέγιστη	Μ. Όρος	Ελάχιστη	Μέγιστη
Λευκίνη	22,47	2,82	73,66	25,54	0,32	88,32
Βαλίνη	9,45	0,95	33,78	12,55	0,32	54,90
Αλανίνη	17,32	2,20	54,71	30,23	1,06	148,62
Μεθειονίνη	1,92	0,00	9,48	2,69	0,00	14,99
Τυροσίνη	1,32	0,13	4,64	1,76	0,00	7,23
Φαινυλαλανίνη	10,56	0,76	39,75	11,76	0,40	47,41
Λακτικό	1190,81	192,69	2944,50	1504,65	133,54	3970,34
Κιτρικό	27,89	0,00	101,47	14,85	0,00	65,40
Ηλεκτρικό	6,50	1,02	16,13	9,97	0,41	31,89
Οξικό	2,99	0,72	5,86	8,00	0,10	24,45
GABA	15,52	0,00	41,07	53,88	0,00	213,36
Φορμικό	4,37	0,63	12,35	6,26	0,34	19,13
Λακτόζη	12,08	0,00	43,73	43,71	0,00	273,98
Γαλακτόζη	23,64	0,46	89,37	52,97	0,00	323,97
Γλυκόζη	5,28	0,00	20,50	20,71	0,00	138,22
Ουρακίλη	1,40	0,27	4,95	2,13	0,00	7,69
Χολίνη	1,76	0,09	7,18	0,89	0,08	4,35
Τυραμίνη	3,09	0,00	9,12	2,79	0,00	11,95

Τέλος, στον πίνακα 3.9 παρατηρείται να βρίσκονται στην κατηγορία Λευκό τυρί αιγοπρόβειο οι μεγαλύτερες ποσότητες για την πλειοψηφία των μεταβολιτών εκτός από το κιτρικό, τη χολίνη και την τυραμίνη.

3.2.2 Ποσοτικός προσδιορισμός των ενώσεων του εκχυλίσματος λιπαρών του λευκού τυριού άλμης.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των λιπαρών έγινε με βάση τους μαθηματικούς υπολογισμούς που αναφέρθηκαν στο υποκεφάλαιο 2.6. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρουσιάζονται στον πίνακα 3.10.

Πίνακας 3.10. Εκατοστιαία (%) περιεκτικότητα λιπαρών οξέων στο άπολο εκχύλισμα των λευκών τυριών άλμης.

Δείγμα	CLA	Καπρολεϊκό	Βουτυρικό	Λινολενικό	Λινολεϊκό	Ολεϊκό	Κορεσμένα	Στερόλες	Σύνολο
1	0,73	0,52	9,85	0,23	2,50	14,33	71,68	0,43	99,85
2	0,64	0,60	10,14	0,32	2,66	9,38	76,07	0,42	99,82
3	0,41	0,77	9,11	0,25	2,37	9,00	77,89	0,47	99,79
4	1,31	0,49	9,95	0,31	2,43	12,13	73,24	0,44	99,86
5	0,49	0,57	8,85	0,25	2,59	10,90	76,18	0,43	99,83
6	0,84	0,47	8,94	0,22	2,70	10,49	76,22	0,43	99,88
7	0,56	0,62	9,89	0,21	2,13	12,54	73,87	0,53	99,83
8	0,46	0,54	9,84	0,17	2,51	10,69	75,64	0,49	99,85
9	1,08	0,56	9,80	0,28	2,81	9,89	75,41	0,42	99,83
10	0,89	0,40	9,25	0,30	2,78	12,51	73,76	0,44	99,89
11	0,61	0,56	8,09	0,25	2,66	11,61	76,07	0,46	99,86
12	0,86	0,48	8,87	0,28	2,64	11,81	74,91	0,46	99,85
13	0,85	0,88	5,65	0,14	2,79	9,34	80,12	0,71	99,77
14	0,66	0,55	10,43	0,18	2,43	14,25	71,35	0,56	99,85
15	0,76	0,33	9,13	0,21	2,91	15,07	71,53	0,43	99,95
16	1,10	0,45	9,45	0,35	2,83	10,87	74,84	0,45	99,88
17	1,85	0,36	11,10	0,38	2,81	14,91	68,48	0,46	99,89
18	0,42	0,39	7,10	0,25	2,44	11,03	78,22	0,35	99,84
19	1,43	0,54	10,70	0,33	2,76	12,06	72,01	0,51	99,84
20	0,85	0,33	11,55	0,27	3,18	11,90	71,85	0,42	99,92
21	1,17	0,59	9,87	0,25	2,50	10,75	74,67	0,46	99,82
22	0,87	0,46	10,43	0,35	2,73	11,51	73,51	0,43	99,87
23	0,81	0,31	10,42	0,39	2,76	10,00	75,21	0,42	99,89
24	0,67	0,39	9,72	0,26	2,54	12,46	73,85	0,39	99,88
25	0,74	0,47	9,71	0,36	2,19	8,44	77,85	0,36	99,76
26	0,63	0,59	9,30	0,25	2,45	10,49	76,12	0,43	99,84
27	0,60	0,43	9,99	0,16	2,86	11,64	74,20	0,48	99,87
28	0,89	0,42	9,13	0,28	2,83	10,20	76,12	0,40	99,88
29	0,32	0,65	9,04	0,16	2,34	12,77	74,49	0,51	99,77
30	0,41	0,58	9,83	0,19	1,97	13,19	73,62	0,52	99,79
31	0,34	0,54	9,46	0,09	2,31	11,56	75,50	0,50	99,80

Όπως και στην περίπτωση των μεταβολιτών των υδατικών εκχυλισμάτων, υπολογίστηκαν για τα λιπαρά εκχυλίσματα στις αντίστοιχες κατηγορίες, οι μέσοι όροι, οι ελάχιστες και οι μέγιστες τιμές για κάθε μεταβολίτη των λευκών τυριών άλμης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους πίνακα 3.11, 3.12, 3.13 και 3.14 που ακολουθούν.

Πίνακας 3.11. Μέσος όρος, μέγιστη και ελάχιστη τιμή επί τοις εκατό των λιπαρών οξέων στο άπολο εκχύλισμα για τις κατηγορίες τυριού Φέτα και λευκό τυρί Κρήτης (Αιγοπρόβειο).

	Φέτα			Λευκό τυρί Κρήτης (Αιγοπρόβειο)		
	n=10			n=9		
	Μ. Όρος	Ελάχιστη	Μέγιστη	Μ. Όρος	Ελάχιστη	Μέγιστη
CLA	0,77	0,41	1,31	0,87	0,67	1,17
Καπρολεϊκό	0,53	0,40	0,77	0,48	0,31	0,88
Βουτυρικό	9,22	8,09	10,14	9,59	5,65	11,55
Λινολενικό	0,27	0,22	0,32	0,28	0,14	0,39
Λινολεϊκό	2,62	2,37	2,83	2,71	2,19	3,18
Ολεϊκό	11,24	9,00	14,33	11,04	8,44	15,07
Κορεσμένα	75,22	71,68	77,89	74,89	71,53	80,12
Στερόλες	0,44	0,40	0,47	0,45	0,36	0,71
Σύνολο	99,85	99,79	99,89	99,85	99,76	99,95

Πίνακας 3.12. Μέσος όρος, μέγιστη και ελάχιστη τιμή επί τοις εκατό των λιπαρών οξέων στο άπολο εκχύλισμα για τις κατηγορίες λευκών τυριών άλμης με βάση το τύπο γάλακτος.

	Αιγοπρόβειο			Αγελαδινό		
	n=22			n=8		
	Μ. Όρος	Ελάχιστη	Μέγιστη	Μ. Όρος	Ελάχιστη	Μέγιστη
CLA	0,85	0,41	1,43	0,65	0,32	1,85
Καπρολεϊκό	0,51	0,31	0,88	0,53	0,36	0,65
Βουτυρικό	9,45	5,65	11,55	9,95	9,04	11,10
Λινολενικό	0,28	0,14	0,39	0,19	0,09	0,38
Λινολεϊκό	2,66	2,19	3,18	2,42	1,97	2,86
Ολεϊκό	11,14	8,44	15,07	12,69	10,69	14,91
Κορεσμένα	74,96	71,53	80,12	73,40	68,48	75,64
Στερόλες	0,45	0,36	0,71	0,51	0,46	0,56
Σύνολο	99,85	99,76	99,95	99,83	99,77	99,89

Πίνακας 3.13. Μέσος όρος, μέγιστη και ελάχιστη τιμή επί τοις εκατό των λιπαρών οξέων στο άπολο εκχύλισμα για τις κατηγορίες Λευκό τυρί Αιγοπρόβειο και Λευκό τυρί Αγελαδινό.

	Λευκό Τυρί Αιγοπρόβειο			Λευκό Τυρί Αγελαδινό		
	n=12			n=8		
	Μ. Όρος	Ελάχιστη	Μέγιστη	Μ. Όρος	Ελάχιστη	Μέγιστη
CLA	0,91	0,63	1,43	0,65	0,32	1,85
Καπρολεϊκό	0,49	0,31	0,88	0,53	0,36	0,65
Βουτυρικό	9,65	5,65	11,55	9,95	9,04	11,10
Λινολενικό	0,29	0,14	0,39	0,19	0,09	0,38
Λινολεϊκό	2,70	2,19	3,18	2,42	1,97	2,86
Ολεϊκό	11,07	8,44	15,07	12,69	10,69	14,91
Κορεσμένα	74,75	71,53	80,12	73,40	68,48	75,64
Στερόλες	0,45	0,36	0,71	0,51	0,46	0,56
Σύνολο	99,85	99,76	99,95	99,83	99,77	99,89

Πίνακας 3.14. Μέσος όρος, μέγιστη και ελάχιστη τιμή επί τους εκατό των λιπαρών οξέων στο άπολο εκχύλισμα για τις κατηγορίες Φέτα και Λευκό τυρί Αιγοπρόβειο.

	Φέτα			Λευκό τυρί Αιγοπρόβειο		
	n=10			n=12		
	Μ. Όρος	Ελάχιστη	Μέγιστη	Μ. Όρος	Ελάχιστη	Μέγιστη
CLA	0,77	0,41	1,31	0,91	0,63	1,43
Καπρολεϊκό	0,53	0,40	0,77	0,49	0,31	0,88
Βουτυρικό	9,22	8,09	10,14	9,65	5,65	11,55
Λινολενικό	0,27	0,22	0,32	0,29	0,14	0,39
Λινολεϊκό	2,62	2,37	2,83	2,70	2,19	3,18
Ολεϊκό	11,24	9,00	14,33	11,07	8,44	15,07
Κορεσμένα	75,22	71,68	77,89	74,75	71,53	80,12
Στερόλες	0,44	0,40	0,47	0,45	0,36	0,71
Σύνολο	99,85	99,79	99,89	99,85	99,76	99,95

Αναλύοντας τους μέσους όρους για τα λιπαρά οξέα του εκχυλίσματος παρατηρείται ότι το βουτυρικό και οι στερόλες βρίσκεται σε μικρότερη αναλογία επί των συνολικών λιπαρών στα τυριά Φέτα ενώ τα κορεσμένα λιπαρά σε μεγαλύτερες αναλογίες, με μικρές όμως διαφορές από τις υπόλοιπες κατηγορίες. Επίσης, το καπρολεϊκό βρίσκονται με την ίδια % περιεκτικότητα περίπου σε όλες τις κατηγορίες. Το λινολενικό, το λινολεϊκό και το CLA βρίσκονται σε μεγαλύτερο ποσοστό στα τυριά από αιγοπρόβειο γάλα, σε αντίθεση με το ολεϊκό και τις στερόλες που βρίσκονται σε μεγαλύτερο ποσοστό στα τυριά από αγελαδινό γάλα.

3.3 Στοχευμένη Μεταβολομική Ανάλυση

Με την ολοκλήρωση του ποσοτικού προσδιορισμού των μεταβολιτών, στα υδατικά και τα άπολα εκχυλίσματα των λευκών τυριών άλμης, με τη Φασματοσκοπία NMR, τα πειραματικά αυτά αποτελέσματα χρησιμοποιήθηκαν για την σύσταση μοντέλων PCA και OPLS-DA με την χρήση του λογισμικού Simca (Umetrics). Ανάλογα με το σκοπό της ανάλυσης επιλέχθηκαν και τα αντίστοιχα δεδομένα και το κατάλληλο μοντέλο ανάλυσης. Όλα τα στατιστικά μοντέλα που θα παρουσιαστούν προκύπτουν μετά από εσωτερική επικύρωση (cross validation) που διενεργείται από το λογισμικό. Η διαδικασία της εσωτερικής επικύρωσης συνίσταται στον τυχαίο αποκλεισμό του 1/7 των δειγμάτων από την ανάπτυξη του μοντέλου (τεστ σετ), και στη χρήση τους αποκλειστικά για την επαλήθευση της στατιστικής ισχύος του μοντέλου. Μόνο τα μοντέλα τα οποία επιδεικνύουν στατιστικά ισχυρή διαχωριστική ικανότητα για όλα τα διαδοχικά και τυχαία επιλεγμένα υποσέτ τεστ δεδομένων αναφέρονται στην παρούσα μελέτη.

Βάση της χημικής σύστασης των διάφορων λευκών τυριών άλμης που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, καθίσταται δυνατή η σύσταση μοντέλων ώστε να βρεθεί πιθανή διαφοροποίηση μεταξύ τους. Δεδομένο αυτού, οι συγκεντρώσεις των μεταβολιτών που ταυτοποιήθηκαν, 18 στο υδατικό εκχύλισμα και 8 στο άπολο εκχύλισμα, για όλα τα δείγματα (30) εισήχθησαν στο λογισμικό και πραγματοποιήθηκε ανάλυση PCA και OPLS-DA.

3.3.1 Φέτα - Λευκό τυρί Κρήτης (Αιγοπρόβειο)

Αρχικά, έγινε Ανάλυση Μεταβλητών (ANOVA) με το λογισμικό Statistica 7.1 (StatSoft Inc.) για να βρεθούν, αν υπάρχουν, στατιστικά πραγματικές διαφορές μεταξύ των μεταβολιτών ώστε να μπορούν να διαφοροποιηθούν τα δείγματα στις κατηγορίες Φέτα - Κρητικό Λευκό τυρί (Αιγοπρόβειο γάλα). Στον πίνακα 3.15 που ακολουθεί εμφανίζονται με κόκκινο χρώμα οι μεταβολίτες οι οποίοι έχουν p μικρότερο από 0,05 (5%), το οποίο, σημαίνει ότι η διαφορά του συγκεκριμένου μεταβολίτη ανάμεσα στις δύο κατηγορίες είναι στατιστικά πραγματική με όριο εμπιστοσύνης (confidence) >95%.

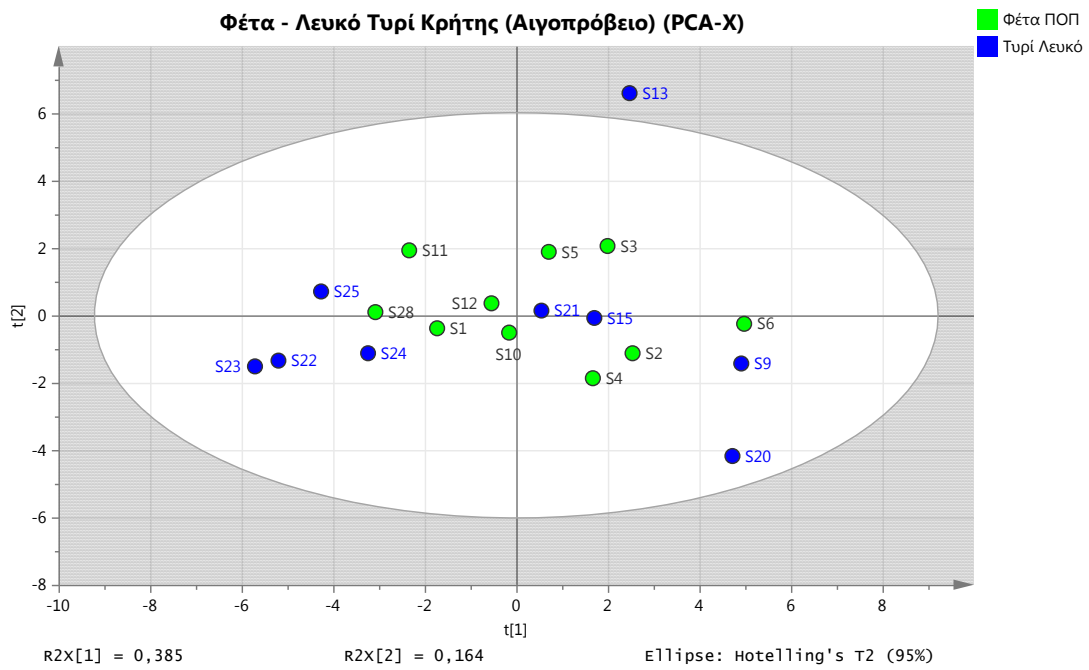
Πίνακας 3.15 Ανάλυση Μεταβλητών (ANOVA) για τις κατηγορίες Φέτα – Κρητικά Λευκά τυριά άλμης (Αιγοπρόβειο γάλα)

	SS Model	df Model	MS Model	SS Residual	df Residual	MS Residual	F	p
Λευκίνη	1,9	1	1,9	13624	17	801	0,0023	0,9620
Βαλίνη	72,5	1	72,5	4731	17	278	0,2607	0,6162
Λακτικό	246183,0	1	246183,0	24854354	17	1462021	0,1684	0,6867
Αλανίνη	1060,4	1	1060,4	20697	17	1217	0,8710	0,3637
GABA	2240,8	1	2240,8	39496	17	2323	0,9645	0,3398
Οξικό	88,6	1	88,6	727	17	43	2,0738	0,1680
Ηλεκτρικό	24,7	1	24,7	1162	17	68	0,3614	0,5557
Κιτρικό	633,0	1	633,0	14715	17	866	0,7313	0,4043
Γαλακτόζη	9929,7	1	9929,7	129582	17	7622	1,3027	0,2695
Ουρακίλη	0,9	1	0,9	77	17	5	0,1912	0,6674
Τυροσίνη	3,5	1	3,5	75	17	4	0,7825	0,3887
Τυραμίνη	4,2	1	4,2	236	17	14	0,2994	0,5914
Φαινυλαλανίνη	9,8	1	9,8	3918	17	230	0,0424	0,8393
Φορμικό	13,9	1	13,9	459	17	27	0,5134	0,4834
Μεθειονίνη	0,0	1	0,0	277	17	16	0,0009	0,9762
Λακτόζη	5814,1	1	5814,1	64901	17	3818	1,5229	0,2340
Γλυκόζη	1139,1	1	1139,1	16336	17	961	1,1854	0,2915
Χολίνη	3,3	1	3,3	58	17	3	0,9552	0,3421
CLA	0,0	1	0,0	1	17	0	1,0100	0,3290
caproic	0,0	1	0,0	0	17	0	0,5099	0,4849
butyric	0,6	1	0,6	25	17	1	0,4482	0,5122
LN	0,0	1	0,0	0	17	0	0,1081	0,7464
LO	0,0	1	0,0	1	17	0	0,8767	0,3622
OL	0,2	1	0,2	54	17	3	0,0570	0,8141
SAT	0,5	1	0,5	90	17	5	0,0948	0,7619
DG12	1,4	1	1,4	5	17	0	4,5104	0,0487
Sterols	0,0	1	0,0	0	17	0	0,0861	0,7727
IV	0,1	1	0,1	39	17	2	0,0222	0,8834
trans	56,9	1	56,9	425	17	25	2,2770	0,1497

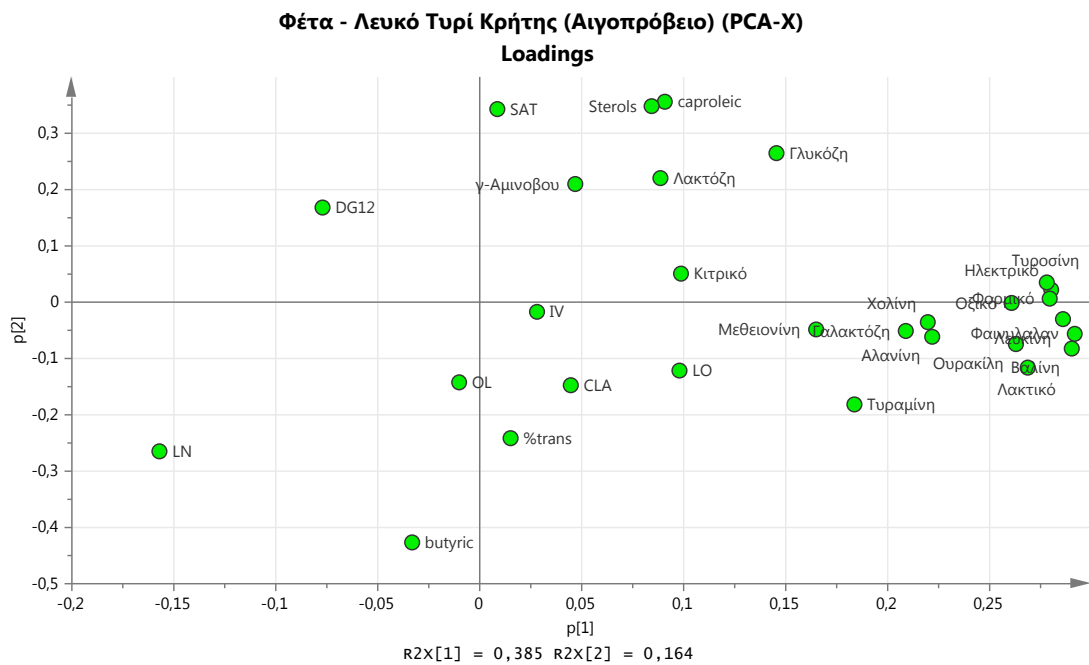
Παρατηρείται ότι ο μεταβολίτης που εμφανίζει διαφορές με στατιστική σημαντικότητα ανάμεσα στις δύο κατηγορίες είναι μόνο τα 1,2 διγλυκερίδια (DG12).

Αρχικά, έγινε προσπάθεια να συσταθούν μοντέλα PCA για τους μεταβολίτες του υδατικού, καθώς και του άπολου εκχυλίσματος (δηλαδή την κατανομή % των λιπαρών οξέων), χωρίς ωστόσο να επιτευχθεί η ανάδειξη μοντέλου με εσωτερικά επικυρωμένη λύση.

Στην εικόνα 3.18 παρουσιάζεται το διάγραμμα τιμών που προκύπτει από την ανάλυση PCA των λευκών τυριών άλμης με την χρήση όλων των μεταβολιτών που ταυτοποιήθηκαν τόσο στο υδατικό εκχύλισμα όσο και στο άπολο εκχύλισμα. Στο διάγραμμα κύριων αξόνων που προκύπτει δεν φαίνεται να υπάρχει διαχωρισμός των δειγμάτων. Οι κύριοι άξονες που προσδιορίστηκαν είναι τρεις και περιγράφουν συνολικά το 68,1% της διασποράς των μεταβλητών, το οποίο αντιστοιχεί σε 38,5% στον PC1, 16,4% στον PC2 και 13,1% στον PC3. Η προβλεπτική ικανότητα (Q^2) του μοντέλου PCA είναι πολύ χαμηλή και ίση με 0,345. Στην εικόνα 3.19 εμφανίζεται το διάγραμμα βαρύτητας μεταβλητών για το μοντέλο PCA.



Εικόνα 3.18 Διάγραμμα ανάλυσης κύριων συνιστωσών (PCA) για τις κατηγορίες Φέτα - Λευκό Τυρί Κρήτης (Αιγοπρόβειο)



Εικόνα 3.19 Διάγραμμα βαρύτητας όλων των μεταβολιτών για το μοντέλο PCA

Καθώς ο διαχωρισμός των δειγμάτων με την μέθοδο ανάλυσης PCA δεν ήταν εφικτός, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Ανάλυση Διακριτότητας Μερικών Ορθογωνικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Orthogonal Partial Least Square-Discriminal Analysis, OPLS-DA). Στη μέθοδο OPLS-DA η διαφοροποίηση του μεταβολομικού προφίλ (X metabolite variance) των δειγμάτων τυριού εξαιτίας παραγόντων (π.χ. πεδιοκλιματικές συνθήκες, τύπος γάλακτος κτλ.) που δεν σχετίζονται με την μεταβλητή Y που μοντελοποιείται, συγκεντρώνεται σε ορθογωνικούς παράγοντες, ενώ στη συνέχεια πραγματοποιείται ανάλυση διακριτότητας ως προς την επιθυμητή παράμετρο Y, που στην προκειμένη περίπτωση είναι ο τύπος τυριού δηλαδή φέτα ή λευκό τυρί Κρήτης (Αιγοπρόβειο).

Ωστόσο και σε αυτή την περίπτωση δεν κατέστη εφικτή η σύσταση μοντέλου με εσωτερικά επικυρωμένη λύση, τόσο για τους μεταβολίτες του υδατικού και του άπολου εκχυλίσματος όσο και με την χρήση και των δύο. Άρα δεν επετεύχθηκε διαχωρισμός για τις κατηγορίες αυτές.

3.3.2 ΤΥΠΟΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ (ΑΙΓΟΠΡΟΒΕΙΟ – ΑΓΕΛΑΔΙΝΟ)

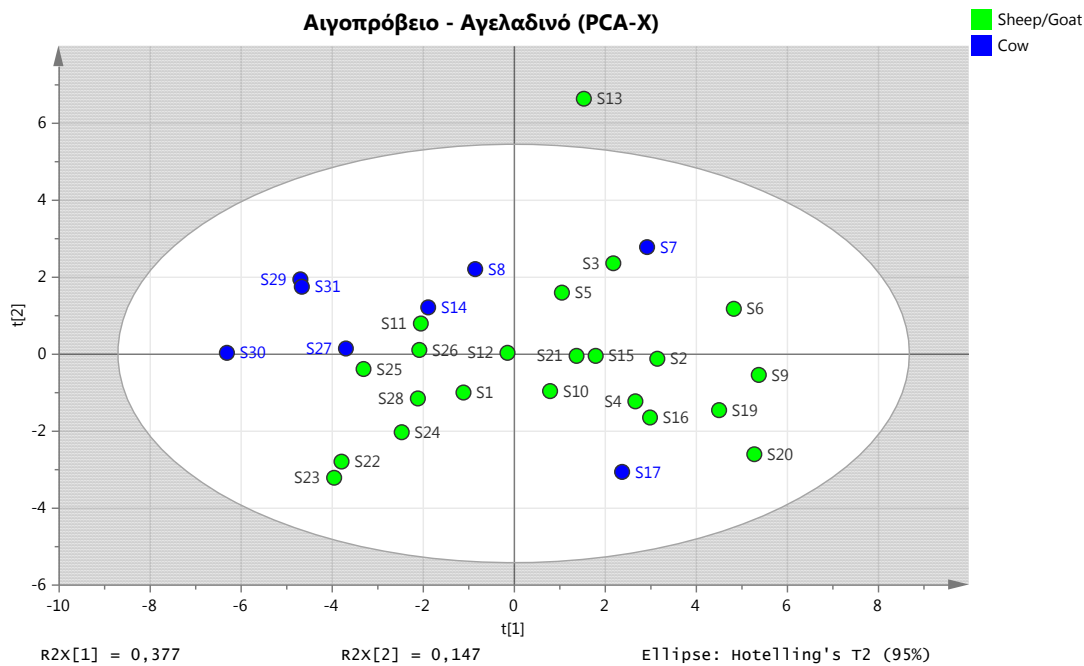
Σε μία άλλη προσέγγιση, δεδομένα που αφορούν τα λευκά τυριά άλμης χρησιμοποιήθηκαν ώστε να ερευνηθεί η διαφοροποίηση ανάμεσα στους διαφορετικούς τύπους γάλακτος, αιγοπρόβειο και αγελαδινό. Αρχικά, έγινε Ανάλυση Μεταβλητών (ANOVA) με το λογισμικό Statistica 7.1 (StatSoft Inc.) για να βρεθεί αν υπάρχουν στατιστικά πραγματικές διαφορές μεταξύ των μεταβολιτών ώστε να μπορούν να διαφοροποιηθούν τα δείγματα στις κατηγορίες Αιγοπρόβειο - Αγελαδινό. Στον πίνακα 3.16 που ακολουθεί εμφανίζονται με κόκκινο χρώμα οι μεταβολίτες οι οποίοι έχουν p μικρότερο από 0,05 (5%) το οποίο, όπως έχει ήδη αναφερθεί, σημαίνει ότι η διαφορά του συγκεκριμένου μεταβολίτη ανάμεσα στις δύο κατηγορίες είναι στατιστικά πραγματική με όριο εμπιστοσύνης (confidence) >95%.

Πίνακας 3.16 Ανάλυση Μεταβλητών (ANOVA) για τις κατηγορίες Αιγοπρόβειο - Αγελαδινό

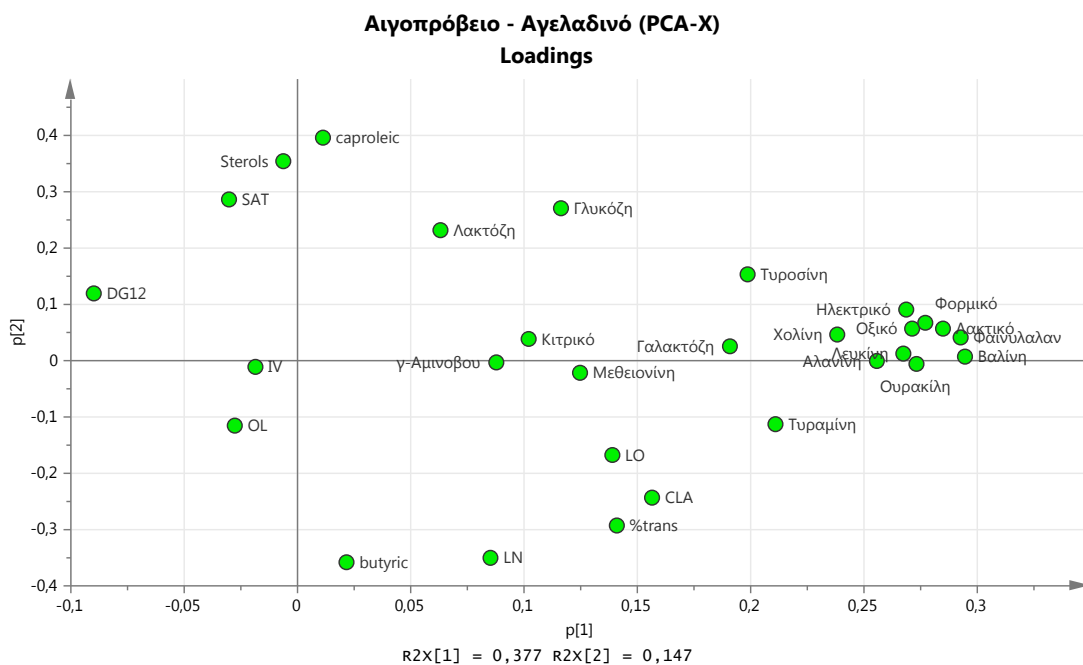
	SS Model	df Model	MS Model	SS Residual	df Residual	MS Residual	F	p
Λευκίνη	1691	1	1691	17008	28	607	2,7836	0,1064
Βαλίνη	405	1	405	5132	28	183	2,2093	0,1484
Λακτικό	2207856	1	2207856	32751702	28	1169704	1,8875	0,1804
Αλανίνη	1691	1	1691	23237	28	830	2,0379	0,1645
GABA	5693	1	5693	75315	28	2690	2,1163	0,1569
Οξικό	41	1	41	1246	28	45	0,9161	0,3467
Ηλεκτρικό	66	1	66	2089	28	75	0,8791	0,3565
Κιτρικό	246	1	246	18831	28	673	0,3651	0,5505
Γαλακτόζη	5078	1	5078	145653	28	5202	0,9761	0,3316
Ουρακίλη	11	1	11	99	28	4	3,0333	0,0926
Τυροσίνη	6	1	6	85	28	3	1,8835	0,1808
Τυραμίνη	26	1	26	350	28	13	2,1034	0,1581
Φαινυλαλανίνη	362	1	362	4325	28	154	2,3460	0,1368
Φορμικό	26	1	26	626	28	22	1,1806	0,2865
Μεθειονίνη	30	1	30	342	28	12	2,4595	0,1280
Λακτόζη	10267	1	10267	165202	28	5900	1,7401	0,1978
Γλυκόζη	1607	1	1607	39707	28	1418	1,1335	0,2961
Χολίνη	0	1	0	102	28	4	0,0262	0,8725
CLA	0	1	0	3	28	0	2,1046	0,1580
caproic	0	1	0	0	28	0	0,2313	0,6343
butyric	1	1	1	29	28	1	1,3664	0,2523
LN	0	1	0	0	28	0	10,2020	0,0035
LO	0	1	0	2	28	0	6,0735	0,0201
OL	14	1	14	70	28	2	5,6598	0,0244
SAT	14	1	14	141	28	5	2,8601	0,1019
DG12	2	1	2	8	28	0	6,3719	0,0175
Sterols	0	1	0	0	28	0	5,8172	0,0227
IV	15	1	15	50	28	2	8,1274	0,0081
trans	247	1	247	806	28	29	8,5686	0,0067

Παρατηρείται ότι μόνο μερικοί από τους μεταβολίτες του λιπαρού εκχυλίσματος (λινολενικό, λινολεϊκό, ολεϊκό, 1,2διγλυκερίδια (DG12), στερόλες, βαθμός ακορεστότητας (IV), trans λιπαρά) έχουν στατιστικά πραγματικές διαφορές και πιθανώς μπορούν να διαφοροποιήσουν τα δείγματα.

Στην εικόνα 3.20 παρουσιάζεται το διάγραμμα τιμών που προκύπτει από την ανάλυση PCA των λευκών τυριών άλμης με την χρήση όλων των μεταβολιτών που ταυτοποιήθηκαν. Στο διάγραμμα κύριων αξόνων που προκύπτει φαίνεται να υπάρχει μερικός διαχωρισμός των δειγμάτων. Οι κύριοι άξονες που προσδιορίστηκαν είναι τρεις και περιγράφουν συνολικά το 63,2% της διασποράς των μεταβλητών, το οποίο αντιστοιχεί σε 37,7% στον PC1, 14,7% στον PC2 και 10,8% στον PC3. Η προβλεπτική ικανότητα (Q^2) του μοντέλου PCA είναι πολύ χαμηλή και ίση με 0,324. Στην εικόνα 3.21 εμφανίζεται το διάγραμμα βαρύτητας μεταβλητών για το μοντέλο PCA.



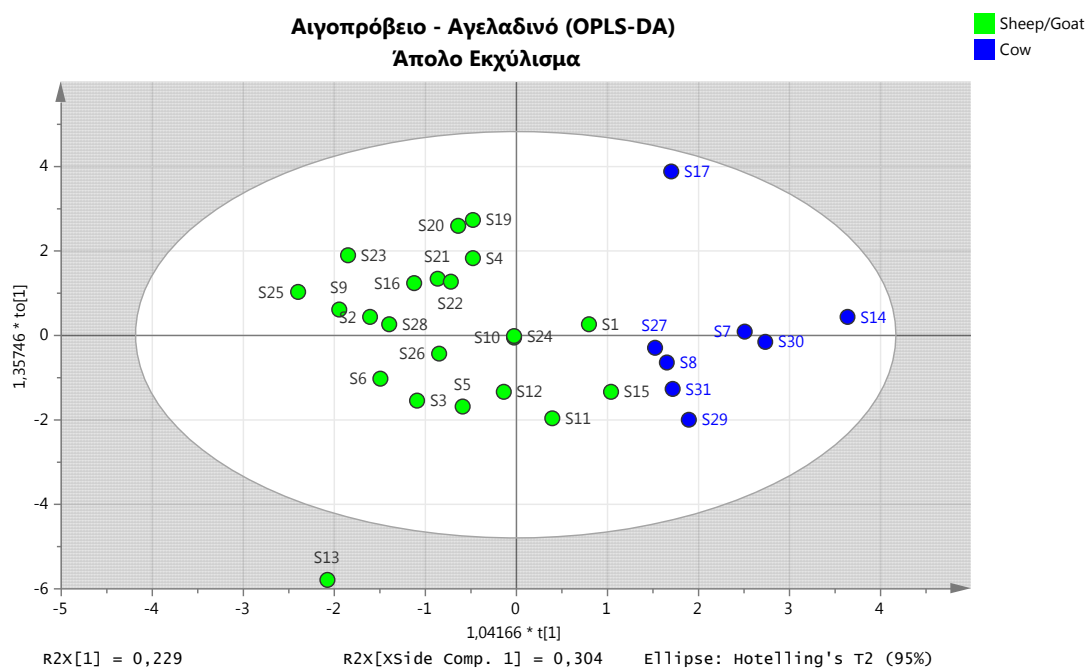
Εικόνα 3.20 Διάγραμμα ανάλυσης κύριων συνητωσών (PCA) για τις κατηγορίες Αιγοπρόβειο - Αγελαδινό



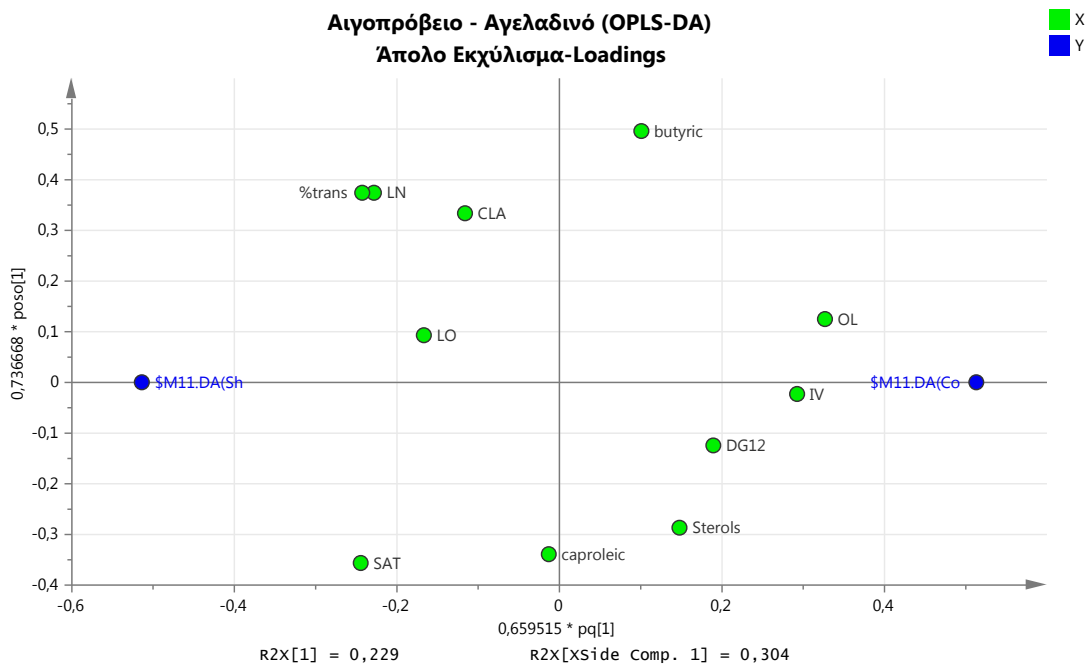
Εικόνα 3.21 Διάγραμμα βαρύτητας όλων των μεταβολιτών για το μοντέλο PCA

Καθώς ο διαχωρισμός των δειγμάτων με την μέθοδο ανάλυσης PCA δεν ήταν πλήρης, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Ανάλυση Διακριτότητας Μερικών Ορθογωνικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Orthogonal Partial Least Square-Discriminal Analysis, OPLS-DA). Στη συγκεκριμένη ανάλυση διακριτότητας η επιθυμητή παράμετρος Y, στην προκειμένη περίπτωση είναι ο τύπος γάλακτος δηλαδή αιγοπρόβειο ή αγελαδινό.

Στην εικόνα 3.22, παρουσιάζεται το μοντέλο ανάλυσης OPLS-DA για τους άπολους μεταβολίτες. Η προβλεπτική ικανότητα (Q^2) του μοντέλου είναι ικανοποιητική και ίση με 0,543 και η διαφοροποίηση που δίνει είναι $R^2X=0,533$ και $R^2Y=0,709$. Στη εικόνα 3.23 παρουσιάζεται το διάγραμμα βαρύτητας μεταβλητών του μοντέλου. (Το αντίστοιχο μοντέλο του υδατικού εκχυλίσματος δεν κατέληξε σε εσωτερικά επικυρωμένη λύση).

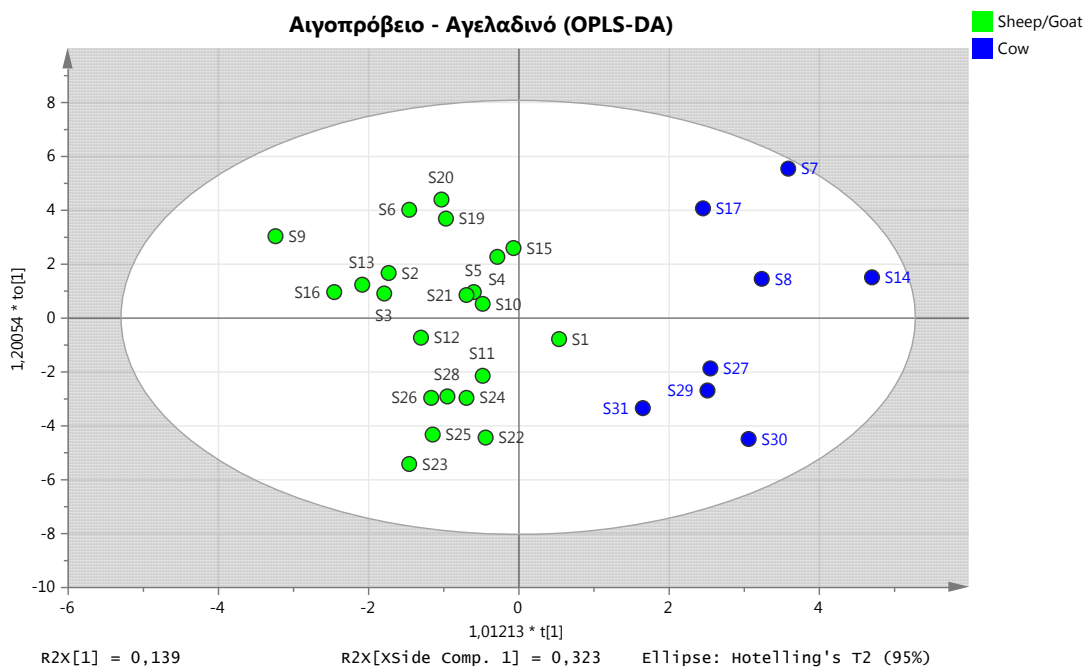


Εικόνα 3.22 Διάγραμμα ανάλυσης OPLS-DA για τις κατηγορίες Αιγοπρόβειο - Αγελαδινό

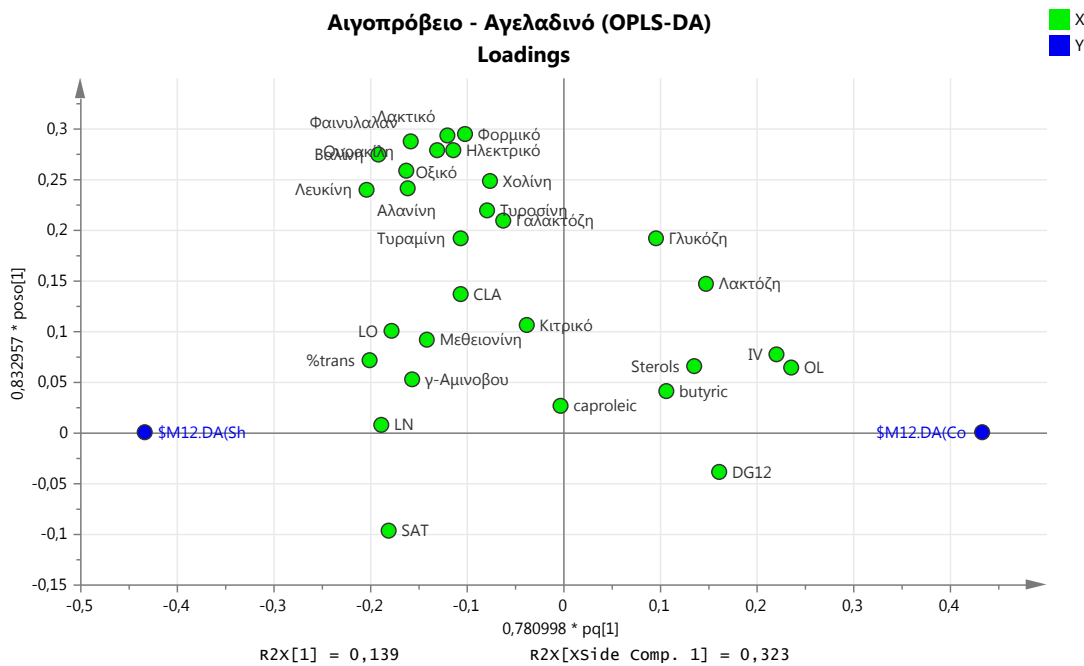


Εικόνα 3.23 Διάγραμμα βαρύτητας όλων των μεταβολιτών για το μοντέλο OPLS-DA

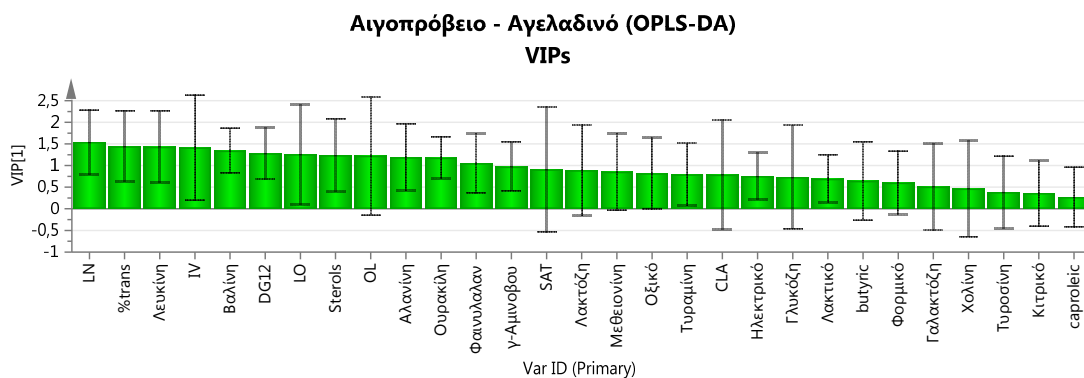
Στην συνέχεια, αφού εξετάστηκαν χωριστά οι μεταβολίτες των δύο εκχυλισμάτων ως προς την ικανότητά τους να διαχωρίσουν τα δείγματα, πραγματοποιήθηκε ανάλυση OPLS-DA με δεδομένα τις συγκεντρώσεις όλων των μεταβολιτών. Στην εικόνα 3.24 παρουσιάζεται το μοντέλο ανάλυσης OPLS-DA όπου φαίνεται να υπάρχει διαφοροποίηση. Ωστόσο η προβλεπτική ικανότητα (Q^2) του μοντέλου είναι χαμηλή και ίση με 0,428 και έχει $R^2X=0,568$ και $R^2Y=0,824$.



Εικόνα 3.24 Διάγραμμα ανάλυσης OPLS-DA για τις κατηγορίες Αιγοπρόβειο -Αγελαδινό



Εικόνα 3.25 Διάγραμμα βαρύτητας όλων των μεταβολιτών για το μοντέλο OPLS-DA



Εικόνα 3.26 Διάγραμμα VIP μεταβολιτών στο μοντέλο OPLS-DA για τις κατηγορίες Αιγοπρόβειο – Αγελαδινό

Από το διάγραμμα της εικόνας 3.26, διαπιστώνεται ότι μεταβολίτες με την μεγαλύτερη συνεισφορά (Variable Importance Parameter, $VIP > 1,5$) στο μοντέλο διαφοροποίησης Αιγοπρόβειο - Αγελαδινό OPLS-DA της εικόνας 3.24 είναι το λινολενικό, ενώ οι μεταβολίτες με συνεισφορά ($VIP = 1-1,5$) είναι έντεκα δηλαδή από τα trans λιπαρά έως τη φαινυλαλανίνη. Και σε αυτή την περίπτωση φαίνεται ότι τα αποτελέσματα της ανάλυσης Απονα και της Ανάλυσης Διακριτότητας Μερικών Ορθογωνικών Ελαχίστων Τετραγώνων βρίσκονται σε συμφωνία, κυρίως για τους άπολους μεταβολίτες. Το γεγονός αυτό, αποτελεί μια επιπλέον επικύρωση των στατιστικών μοντέλων, μειώνοντας την πιθανότητα να οφείλονται σε τυχαίους παράγοντες.

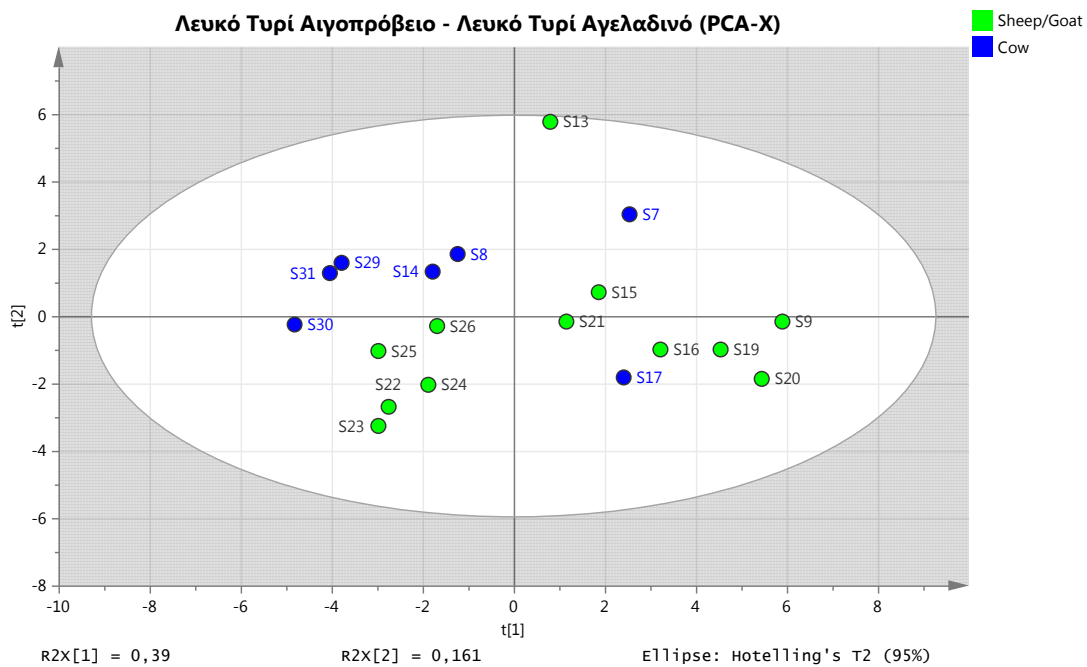
3.3.3 ΛΕΥΚΟ ΤΥΡΙ ΑΙΓΟΠΡΟΒΕΙΟ - ΛΕΥΚΟ ΤΥΡΙ ΑΓΕΛΑΔΙΝΟ

Στη συνέχεια, επικεντρώνοντας στα λευκά τυριά, χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα που αφορούν τα λευκά τυριά τόσο από την Κρήτη όσο και από την υπόλοιπη Ελλάδα ώστε να ερευνηθεί και η διαφοροποίηση τους και πάλι με βάση τον τύπο γάλακτος. Αρχικά, έγινε Ανάλυση Μεταβλητών (ANOVA) με το λογισμικό Statistica 7.1 (StatSoft Inc.) για να βρεθεί αν υπάρχουν στατιστικά πραγματικές διαφορές μεταξύ των μεταβολιτών ώστε να μπορούν να διαφοροποιηθούν τα δείγματα στις κατηγορίες Λευκά τυριά Αιγοπρόβεια - Λευκά τυριά Αγελαδινά. Στον πίνακα 3.17 που ακολουθεί εμφανίζονται με κόκκινο χρώμα οι μεταβολίτες οι οποίοι έχουν p μικρότερο από 0,05 (5%) το οποίο, όπως έχει ήδη αναφερθεί, σημαίνει ότι η διαφορά του συγκεκριμένου μεταβολίτη ανάμεσα στις δύο κατηγορίες είναι στατιστικά πραγματική με όριο εμπιστοσύνης (confidence) >95%. Παρατηρείται, επίσης και σε αυτές τις κατηγορίες, ότι μόνο οι άπολοι μεταβολίτες μπορούν να διαφοροποιήσουν τα δείγματα, και συγκεκριμένα το λινολεϊκό, το ολεϊκό, τα 1,2-διγλυκερίδια (DG12), IV και τα trans λιπαρά.

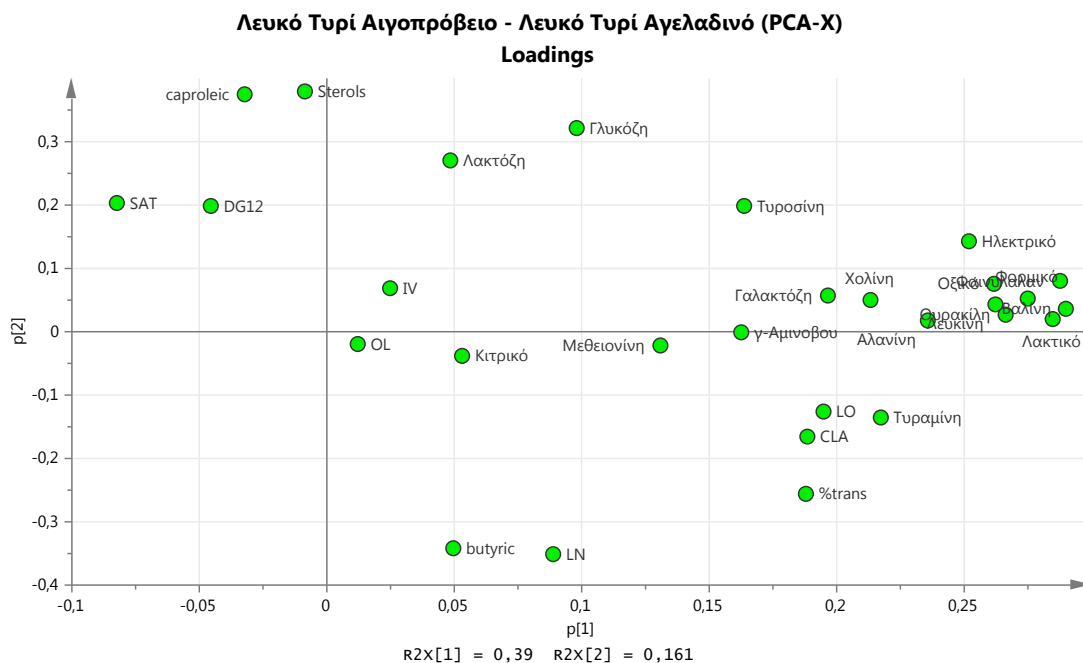
Πίνακας 3.17 Ανάλυση Μεταβλητών (ANOVA) για τις κατηγορίες Λευκά τυριά (Αιγοπρόβεια) – Λευκά τυριά (Αγελαδινά)

	SS Model	df Model	MS Model	SS Residual	df Residual	MS Residual	F	p
Λευκίνη	1345	1	1345	11898	17	700	1,9213	0,1836
Βαλίνη	388	1	388	3987	17	235	1,6533	0,2157
Λακτικό	2397009	1	2397009	23507538	17	1382796	1,7335	0,2054
Αλανίνη	2130	1	2130	19794	17	1164	1,8292	0,1939
GABA	10300	1	10300	65346	17	3844	2,6795	0,1200
Οξικό	90	1	90	1070	17	63	1,4307	0,2481
Ηλεκτρικό	81	1	81	1775	17	104	0,7760	0,3906
Κιτρικό	3	1	3	7734	17	455	0,0060	0,9392
Γαλακτόζη	7746	1	7746	129570	17	7622	1,0163	0,3275
Ουρακίλη	12	1	12	76	17	4	2,6054	0,1249
Τυροσίνη	6	1	6	65	17	4	1,4580	0,2438
Τυραμίνη	16	1	16	242	17	14	1,0873	0,3117
Φαιτυλαλανίνη	282	1	282	2952	17	174	1,6228	0,2198
Φορμικό	29	1	29	484	17	28	1,0341	0,3235
Μεθειονίνη	30	1	30	258	17	15	1,9925	0,1761
Λακτόζη	5586	1	5586	153722	17	9042	0,6178	0,4427
Γλυκόζη	814	1	814	37699	17	2218	0,3669	0,5527
Χολίνη	2	1	2	53	17	3	0,7013	0,4140
CLA	0	1	0	2	17	0	2,1028	0,1652
caproic	0	1	0	0	17	0	0,7325	0,4040
butyric	0	1	0	25	17	1	0,2612	0,6159
LN	0	1	0	0	17	0	5,6154	0,0299
LO	1	1	1	1	17	0	7,8714	0,0122
OL	14	1	14	46	17	3	5,2104	0,0356
SAT	10	1	10	109	17	6	1,4887	0,2391
DG12	2	1	2	2	17	0	16,4991	0,0008
Sterols	0	1	0	0	17	0	2,5354	0,1297
IV	11	1	11	39	17	2	4,7421	0,0438
trans	342	1	342	472	17	28	12,3119	0,0027

Στην εικόνα 3.27 παρουσιάζεται το διάγραμμα τιμών που προκύπτει από την ανάλυση PCA των λευκών τυριών με την χρήση όλων των μεταβολιτών που ταυτοποιήθηκαν καθώς τα μοντέλα PCA για το ύδατικό και το άπολο εκχύλισμα δεν ήταν εφικτό να συσταθούν. Στο διάγραμμα κύριων αξόνων που προκύπτει δεν φαίνεται να υπάρχει διαχωρισμός των δειγμάτων. Οι κύριοι άξονες που προσδιορίστηκαν είναι έξι και περιγράφουν συνολικά το 85,9% της διασποράς των μεταβλητών, το οποίο αντιστοιχεί σε 39% στον PC1, 16,1% στον PC2, 11,4% στον PC3, 8,6% στον PC4, 5,8% στον PC5 και 5% στον PC6. Η προβλεπτική ικανότητα (Q^2) του μοντέλου PCA είναι πολύ χαμηλή και ίση με 0,0688. Στην εικόνα 3.28 εμφανίζεται το διάγραμμα βαρύτητας μεταβλητών για το μοντέλο PCA.



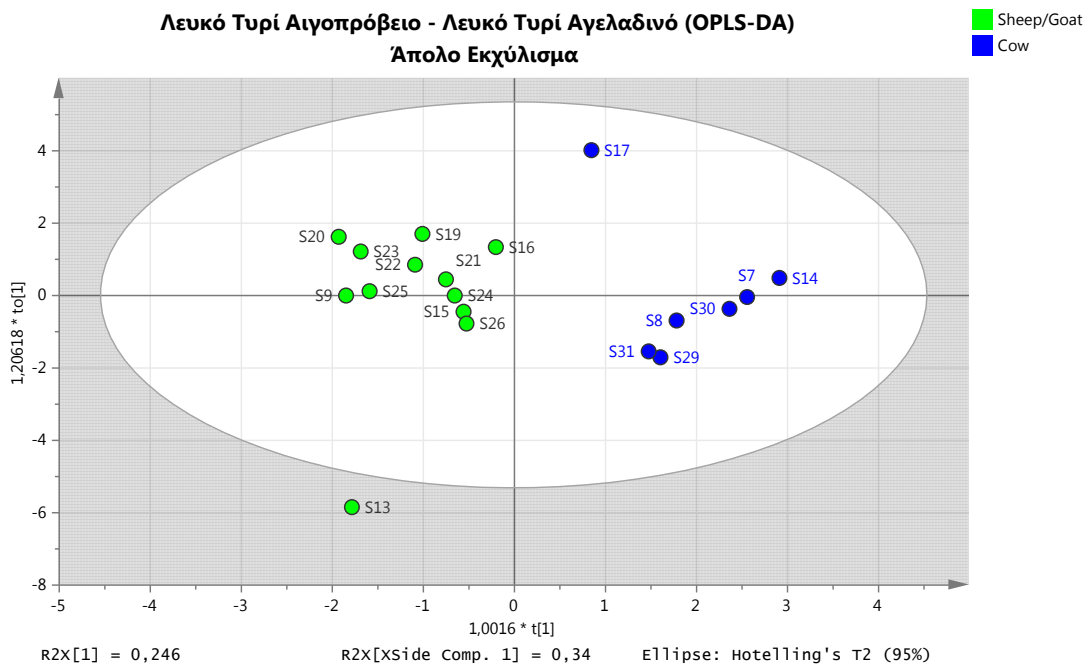
Εικόνα 3.27 Διάγραμμα ανάλυσης κύριων συνηστωσών (PCA) για τις κατηγορίες κατηγορίες Λευκό τυρί Αιγοπρόβειο - Λευκό τυρί Αγελαδινό



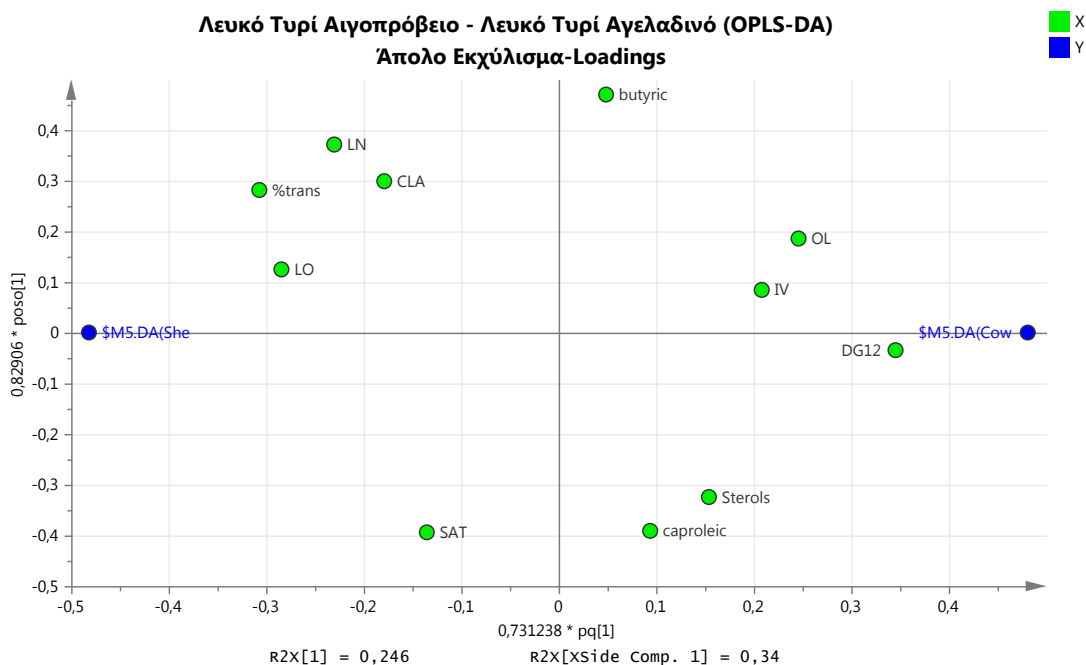
Εικόνα 3.28 Διάγραμμα βαρύτητας όλων των μεταβολιτών για το μοντέλο PCA

Καθώς ο διαχωρισμός των δειγμάτων με την μέθοδο ανάλυσης PCA δεν ήταν πλήρης, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Ανάλυσης Διακριτότητας Ορθογωνικών Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Orthogonal Partial Least Square-Discriminal Analysis, OPLS-DA). Στη συγκεκριμένη ανάλυση διακριτότητας η επιθυμητή παράμετρος Y , και σε αυτή την περίπτωση είναι ο τύπος γάλακτος δηλαδή αιγοπρόβειο ή αγελαδινό.

Στην εικόνα 3.29, παρουσιάζεται το επικυρωμένο μοντέλο ανάλυσης OPLS-DA για τους άπολους μεταβολίτες. Η προβλεπτική ικανότητα (Q^2) του μοντέλου είναι ικανοποιητική και ίση με 0,586 και η διαφοροποίηση που δίνει είναι $R^2X=0,756$ και $R^2Y=0,854$. Όπως είναι εμφανές υπάρχει πλήρης διαφοροποίηση των δειγμάτων λευκού τυριού από αιγοπρόβειο και αγελαδινό γάλα, γεγονός το οποίο συμφωνεί με την ανάλυση Απονα. Στη εικόνα 3.30 παρουσιάζεται το διάγραμμα βαρύτητας μεταβλητών του μοντέλου.

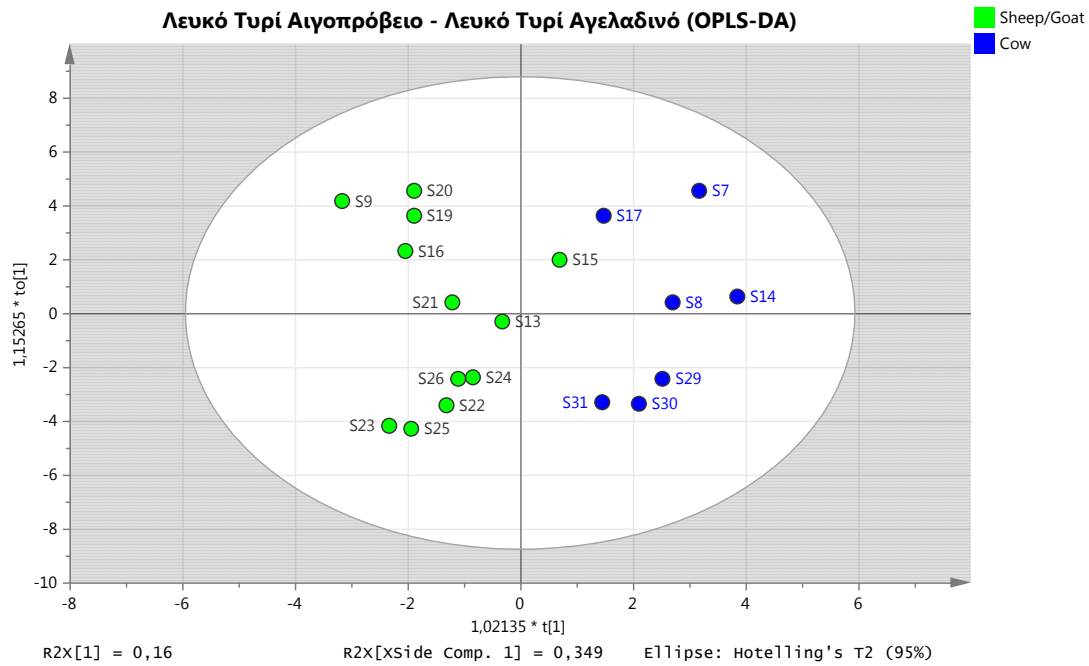


Εικόνα 3.29 Διάγραμμα ανάλυσης OPLS-DA για τις κατηγορίες κατηγορίες Λευκό τυρί Αιγοπρόβειο - Λευκό τυρί Αγελαδινό

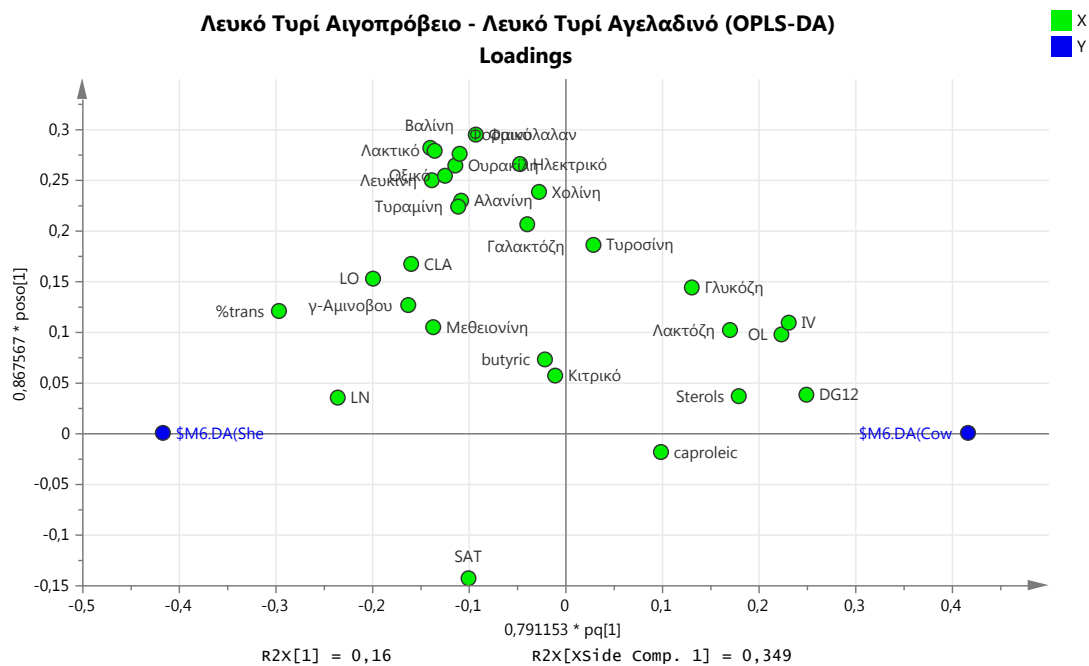


Εικόνα 3.30 Διάγραμμα βαρύτητας όλων των μεταβολιτών για το μοντέλο OPLS-DA

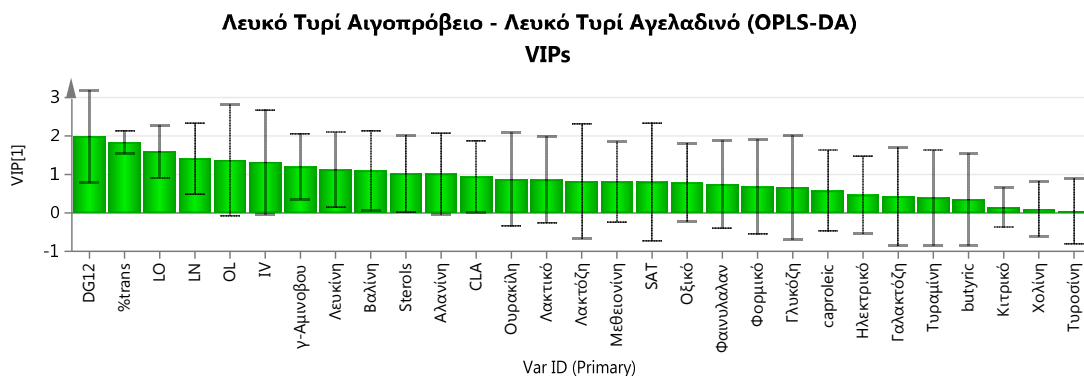
Εσωτερικά επικυρωμένο μοντέλο OPLS-DA για το υδατικό εκχύλισμα δεν ήταν εφικτό να συσταθεί ούτε σε αυτή την περίπτωση. Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ανάλυση OPLS-DA με δεδομένα τις συγκεντρώσεις όλων των μεταβολιτών. Στην εικόνα 3.31 παρουσιάζεται το μοντέλο ανάλυσης OPLS-DA όπου φαίνεται να υπάρχει διαφοροποίηση, παρόλα αυτά, η προβλεπτική ικανότητα (Q^2) του μοντέλου είναι χαμηλή και ίση με 0,425 και έχει $R^2X=0,509$ και $R^2Y=0,811$.



Εικόνα 3.31 Διάγραμμα ανάλυσης OPLS-DA για τις κατηγορίες κατηγορίες Λευκό τυρί Αιγοπρόβειο - Λευκό τυρί Αγελαδινό



Εικόνα 3.32 Διάγραμμα βαρύτητας όλων των μεταβολιτών για το μοντέλο OPLS-DA



Εικόνα 3.33 Διαγράμμα VIP μεταβολιτών στο μοντέλο OPLS-DA για τις κατηγορίες κατηγορίες Λευκό τυρί Αιγοπρόβειο - Λευκό τυρί Αγελαδινό

Από το διάγραμμα της εικόνας 3.33, διαπιστώνεται ότι οι μεταβολίτες με την μεγαλύτερη συνεισφορά (Variable Importance Parameter, $VIP > 1,5$) στο μοντέλο διαφοροποίησης Λευκό τυρί Αιγοπρόβειο – Λευκό τυρί Αγελαδινό OPLS-DA της εικόνας 3.31 είναι τα 1,2 διγλυκερίδια (DG12), τα trans λιπαρά και το λινολεϊκό, γεγονός το οποίο συμφωνεί με το αποτέλεσμα της ανάλυσης Anova ($p < 0,05$), ενώ οι μεταβολίτες με συνεισφορά ($VIP = 1-1,5$) είναι οκτώ δηλαδή από το λινολενικό έως την αλανίνη.

3.3.4 ΦΕΤΑ - ΛΕΥΚΟ ΤΥΡΙ ΑΙΓΟΠΡΟΒΕΙΟ

Τέλος, χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα που αφορούν τα λευκά τυριά άλμης από αιγοπρόβειο γάλα και τις φέτες για να εντοπίσουμε τυχών διαφοροποιήσεις ανάμεσα τους. Για το σκοπό αυτό, έγινε Ανάλυση Μεταβλητών (ANOVA) για να βρεθεί αν υπάρχουν στατιστικά πραγματικές διαφορές μεταξύ των μεταβολιτών ώστε να μπορούν να διαφοροποιηθούν τα δείγματα στις κατηγορίες Φέτα - Λευκά τυριά άλμης Αιγοπρόβεια. Στον πίνακα 3.18 που ακολουθεί παρουσιάζεται η ανάλυση μεταβολιτών ANOVA. Όπως παρατηρείται, σε αυτές τις κατηγορίες, κανένας μεταβολίτης δεν εμφανίζεται με κόκκινο χρώμα, δηλαδή με p μικρότερο από 0,05, γεγονός που υποδεικνύει ότι δεν υπάρχει σημαντική στατιστική διαφοροποίηση στα δείγματα αυτά.

Πίνακας 3.18 Ανάλυση μεταβλητών (ANOVA) για τις κατηγορίες Φέτα - Λευκά τυριά άλμης (Αιγοπρόβεια)

	SS Model	df Model	MS Model	SS Residual	df Residual	MS Residual	F	p
Λευκίνη	51,2	1	51,2	15072	20	754	0,0680	0,7969
Βαλίνη	52,6	1	52,6	4883	20	244	0,2156	0,6474
Λακτικό	537262,2	1	537262,2	28547569	20	1427378	0,3764	0,5465
Αλανίνη	908,9	1	908,9	21487	20	1074	0,8460	0,3686
GABA	8026,8	1	8026,8	66594	20	3330	2,4106	0,1362
Οξικό	136,8	1	136,8	881	20	44	3,1065	0,0933
Ηλεκτρικό	65,9	1	65,9	1462	20	73	0,9015	0,3537
Κιτρικό	927,5	1	927,5	15117	20	756	1,2270	0,2811
Γαλακτόζη	4693,5	1	4693,5	139404	20	6970	0,6734	0,4216
Ουρακίλη	2,9	1	2,9	93	20	5	0,6154	0,4420
Τυροσίνη	1,1	1	1,1	83	20	4	0,2592	0,6162
Τυραμίνη	0,5	1	0,5	330	20	17	0,0305	0,8632
Φαινυλαλανίνη	7,9	1	7,9	4090	20	205	0,0387	0,8460
Φορμικό	19,5	1	19,5	522	20	26	0,7473	0,3976
Μεθειονίνη	3,3	1	3,3	338	20	17	0,1922	0,6658
Λακτόζη	5459,4	1	5459,4	70099	20	3505	1,5576	0,2264
Γλυκόζη	1024,2	1	1024,2	17420	20	871	1,1758	0,2911
Χολίνη	4,1	1	4,1	59	20	3	1,4009	0,2505
CLA	0,1	1	0,1	1	20	0	1,9525	0,1776
caproic	0,0	1	0,0	0	20	0	0,3773	0,5460
butyric	1,0	1	1,0	26	20	1	0,7718	0,3901
LN	0,0	1	0,0	0	20	0	0,4755	0,4984
LO	0,0	1	0,0	1	20	0	0,9071	0,3523
OL	0,2	1	0,2	55	20	3	0,0577	0,8126
SAT	1,2	1	1,2	100	20	5	0,2388	0,6304
DG12	0,9	1	0,9	7	20	0	2,6577	0,1187
Sterols	0,0	1	0,0	0	20	0	0,2286	0,6378
IV	0,3	1	0,3	40	20	2	0,1545	0,6984
trans	112,1	1	112,1	519	20	26	4,3246	0,0506

Καθώς, η σύσταση των μοντέλων PCA δεν κατέστη εφικτή για τις κατηγορίες Φέτα - Λευκό τυρί άλμης (Αιγοπρόβειο), χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Ανάλυση Διακριτότητας Μερικών Ορθογωνικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Orthogonal Partial Least Square-Discriminal Analysis, OPLS-DA). Στη συγκεκριμένη ανάλυση διακριτότητας η επιθυμητή παράμετρος Y, είναι ο τύπος τυριού δηλαδή Φέτα ή Λευκό τυρί. Παρόλα αυτά και στην περίπτωση αυτή, δεν κατέστη εφικτή η σύσταση εσωτερικά επικυρωμένων μοντέλων, τόσο για τους μεταβολίτες του υδατικού και του άπολου εκχυλίσματος όσο και με την χρήση και των δύο.

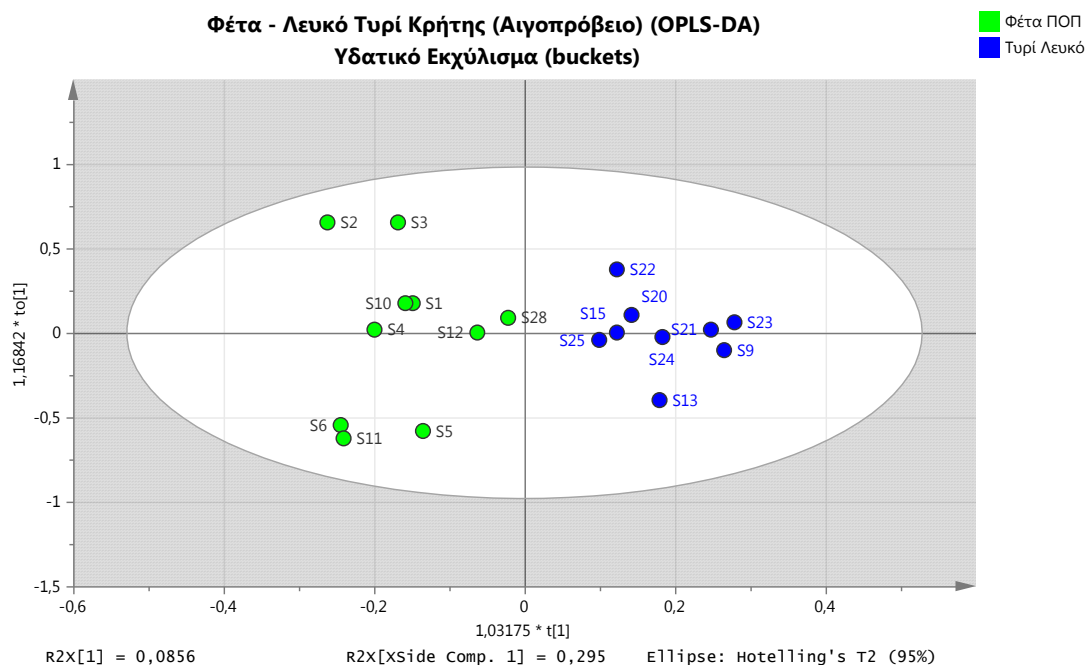
3.4 Μη Στοχευμένη Μεταβολομική Ανάλυση

Στη στοχευμένη ανάλυση δεν προέκυψε μοντέλο το οποίο να διαχωρίζει πλήρως τα δείγματα των λευκών τυριών άλμης, για όλες τις κατηγορίες που επιλέχθηκαν προς διαχωρισμό, οπότε, ακολουθήθηκε η μέθοδος της μη στοχευμένης ανάλυσης. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η μη στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση βασίζεται στην μέθοδο ανάλυσης bucketing, δηλαδή στον «τεμαχισμό» των

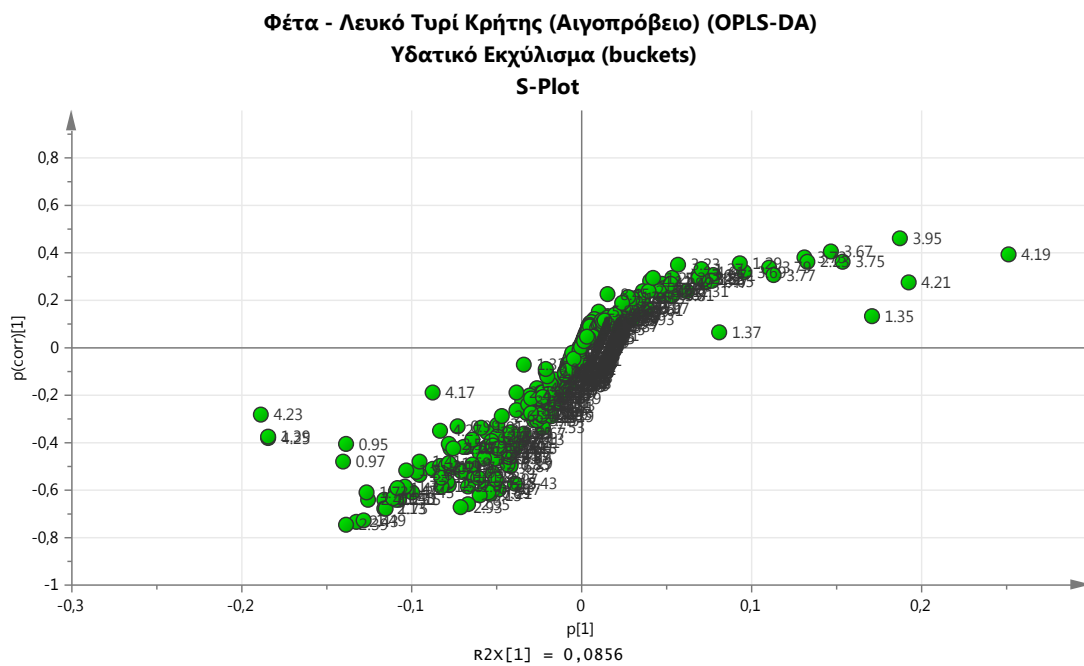
φασμάτων σε υποπεριοχές με συγκεκριμένο πλάτος (0,02 ppm), χωρίς να λαμβάνεται υπόψιν η ταυτοποίηση των ενώσεων, και υπολογισμό του εμβαδού των υποπεριοχών που σχηματίστηκαν. Μία βασική διαφορά σε σχέση με την στοχευμένη ανάλυση, εκτός του τύπου των δεδομένων εισόδου, είναι ότι η κλιμάκωση (scaling) των δεδομένων γίνεται με την χρήση κλίμακας Pareto.

3.4.1 ΦΕΤΑ - ΛΕΥΚΟ ΤΥΡΙ ΚΡΗΤΗΣ (Αιγοπρόβειο)

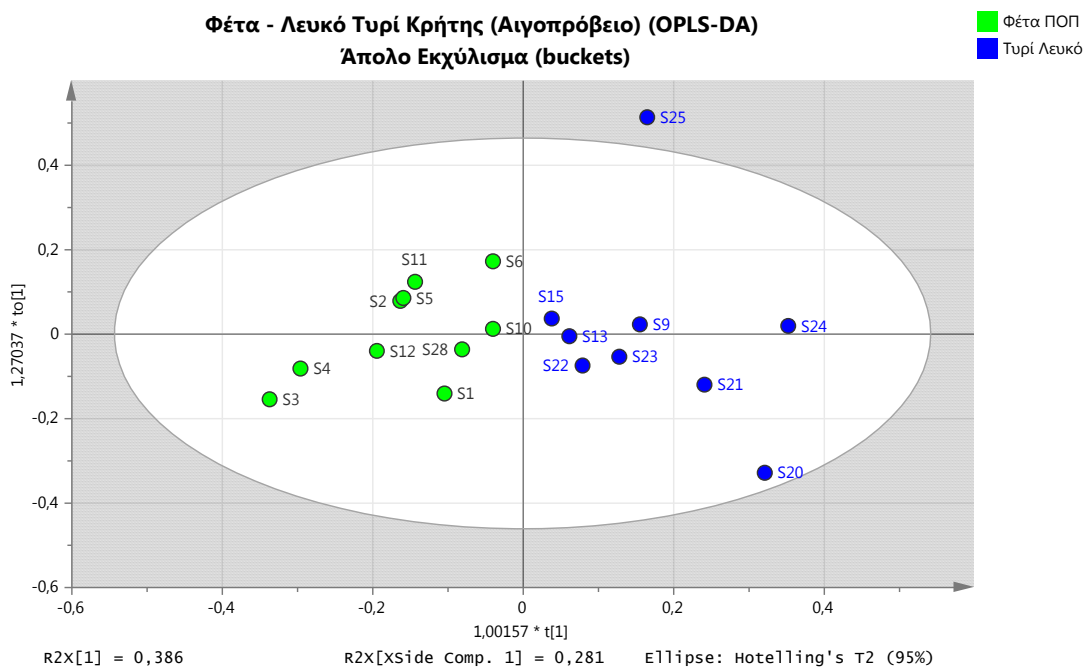
Όπως και στην στοχευμένη ανάλυση (κεφάλαιο 3.3), αρχικά έγινε προσπάθεια για τη σύσταση μοντέλων PCA για την διαφοροποίηση των τυριών βάσει μόνο των πειραματικών τιμών που προέκυψαν από την μέθοδο bucketing. Όμως δεν κατέστη δυνατή η σύσταση επικυρωμένων μοντέλων για τα δείγματα των δυο κατηγοριών, Φέτα - Λευκό Τυρί Κρήτης (Αιγοπρόβειο). Για το λόγο αυτό, συστάθηκαν μοντέλα OPLS-DA όπως έγινε και κατά την στοχευμένη ανάλυση. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκαν τα buckets των φασμάτων με διαλύτη D₂O, ακολουθούν τα buckets των φασμάτων με διαλύτη γλωροφόρμιο και, τέλος, χρησιμοποιήθηκαν τα buckets όλων των φασμάτων. Στις εικόνες 3.34 και 3.36 παρουσιάζονται τα μοντέλα OPLS-DA των buckets των υδατικών και των άπολων εκχυλισμάτων αντίστοιχα καθώς και τα διαγράμματα βαρύτητας των μεταβλητών τους.



Εικόνα 3.34 Διάγραμμα ανάλυσης OPLS-DA για τις κατηγορίες Φέτα - Λευκό Τυρί Κρήτης (Αιγοπρόβειο) – υδατικό εκχύλισμα

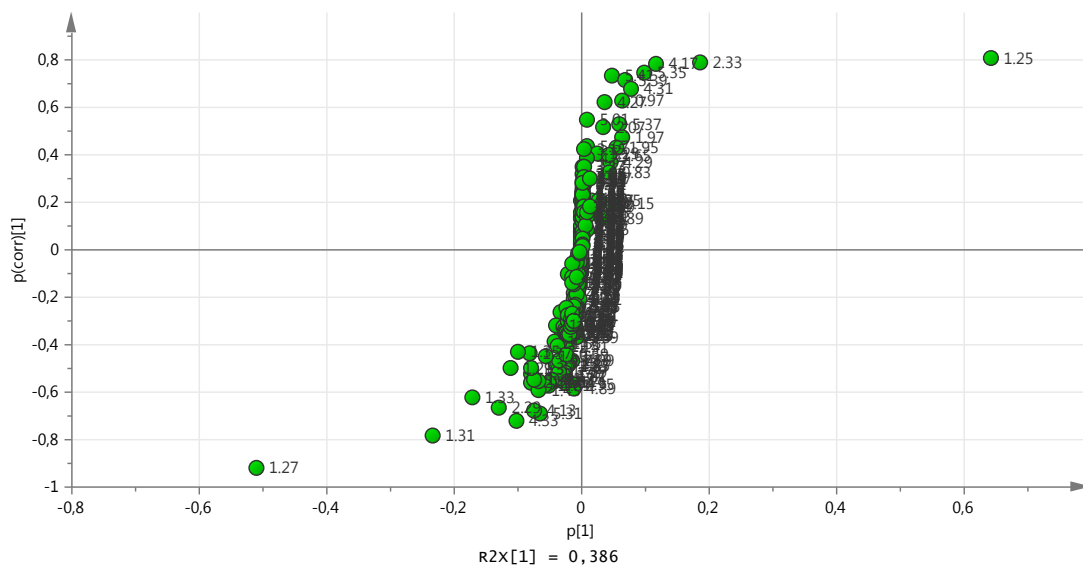


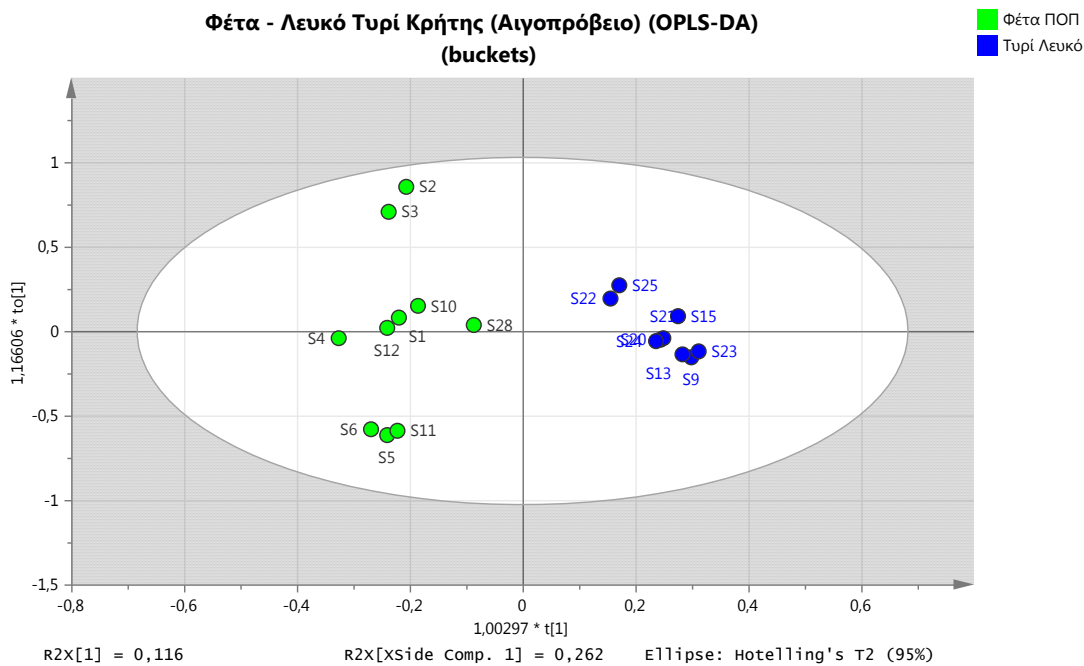
Εικόνα 3.35 Διάγραμμα βαρύτητας όλων των μεταβλητών για το μοντέλο OPLS-DA του Σχήματος 3.34



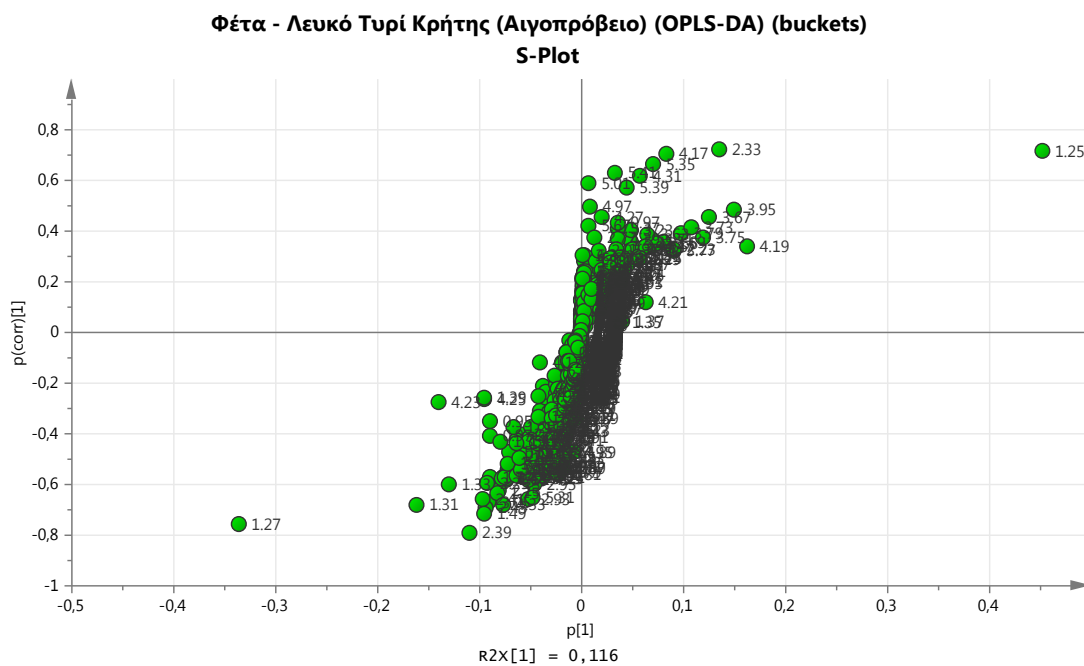
Εικόνα 3.36 Διάγραμμα ανάλυσης OPLS-DA για τις κατηγορίες Φέτα - Λευκό Τυρί Κρήτης (Αιγοπρόβειο) – άπολο εκχύλισμα

**Φέτα - Λευκό Τυρί Κρήτης (Αιγοπρόβειο) (OPLS-DA)
Άπολο Εκχύλισμα (buckets)**
S-Plot





Εικόνα 3.38 Διάγραμμα ανάλυσης OPLS-DA για τις κατηγορίες Φέτα - Λευκό Τυρί Κρήτης (Αιγοπρόβειο), υδατικό και άπολο εκχύλισμα



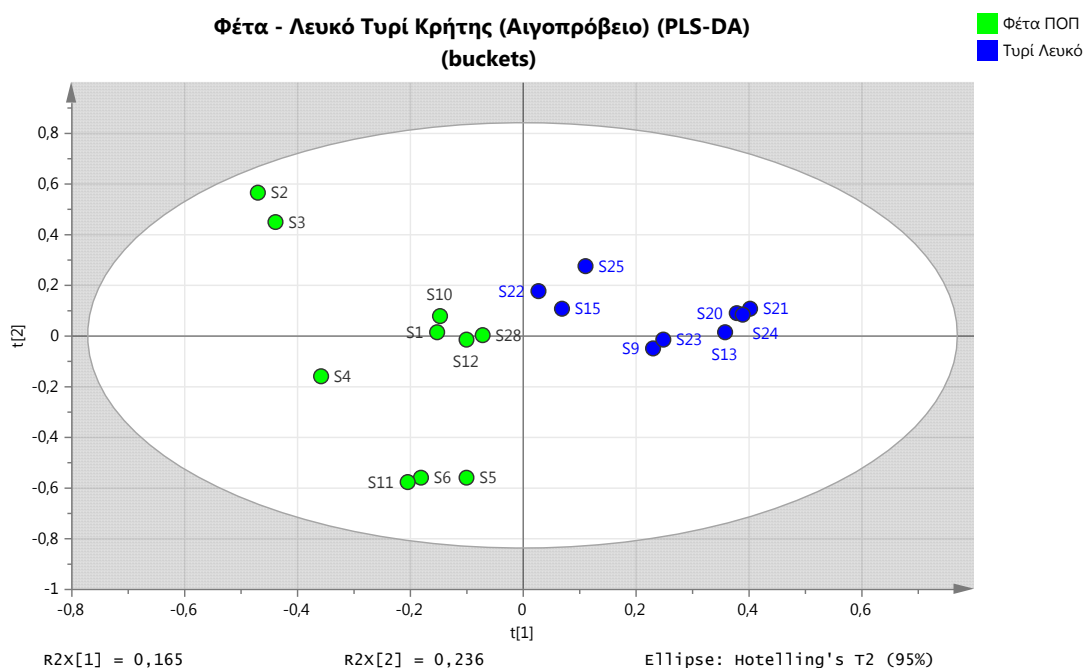
Εικόνα 3.39 Διάγραμμα βαρύτητας όλων των μεταβλητών για το μοντέλο OPLS-DA του Σχήματος 3.38

	SS	DF	MS	F	p	SD
Total corr.	18	18	1			1
Regression	10,044	6	1,67399	2,52487	0,0811777	1,29383
Residual	7,95603	12	0,663003			0,81425

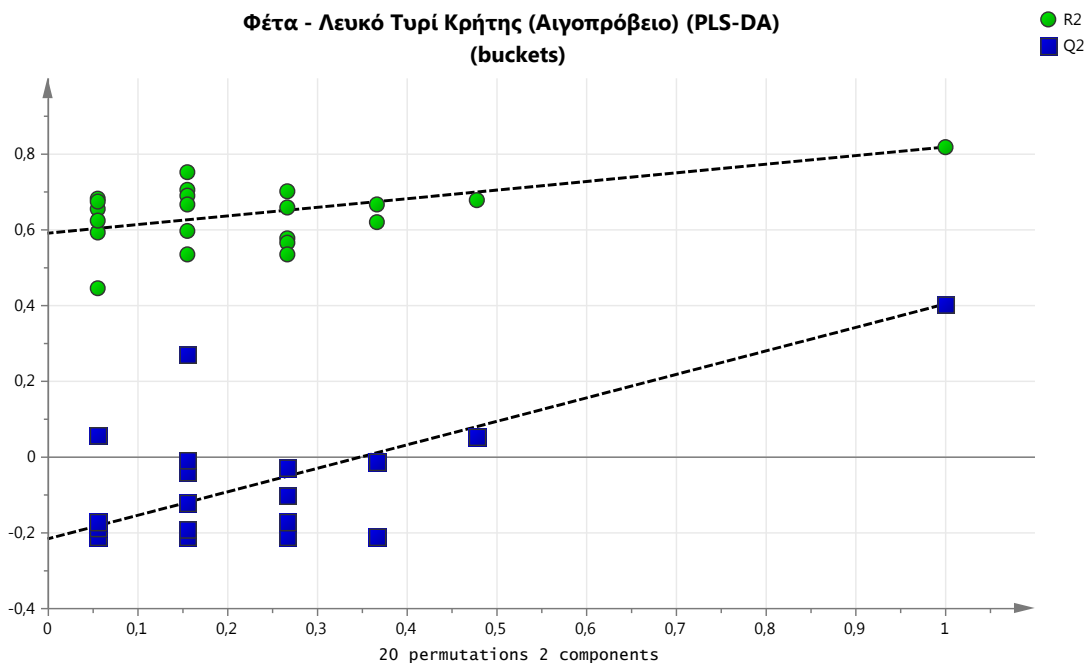
Πίνακας 3.19 Ανάλυση CV-ANOVA

Από την ανάλυση CV-Απονα των μεταβλητών του μοντέλου της εικόνας 3.38 το p είναι ίσο με 0,0812 δηλαδή η πιθανότητα το μοντέλο να προέκυψε ως τυχαίο αποτέλεσμα είναι μεγάλη κοντά στο 8%. Επομένως, το μοντέλο έχει μικρή προβλεπτική αξία. Από το διάγραμμα S-plot, μπορούν να διακριθούν τα buckets, δηλαδή οι υποπεριοχές του φάσματος που επηρεάζουν την διαφοροποίηση στο μοντέλο OPLS-DA.

Έπειτα, τα φασματικά δεδομένα (buckets) των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη ενός ακόμα μοντέλου, με ανάλυση διακριτότητας μερικών ελάχιστων τετραγώνων (PLS-DA). Η ανάλυση αυτή επιλέχθηκε με σκοπό να επιβεβαιωθεί η αξιοπιστία και η εγκυρότητα των προηγούμενων μοντέλων με επαλήθευση, που πραγματοποιείται μέσω έλεγχου των αποτελεσμάτων που προκύπτουν αν μετατεθεί η επιλεγμένη μεταβλητή Y (permutations). Το διάγραμμα PLS-DA που προκύπτει καθώς και τα αντίστοιχα permutations παρουσιάζονται στην εικόνα 3.40 και εικόνα 3.41.



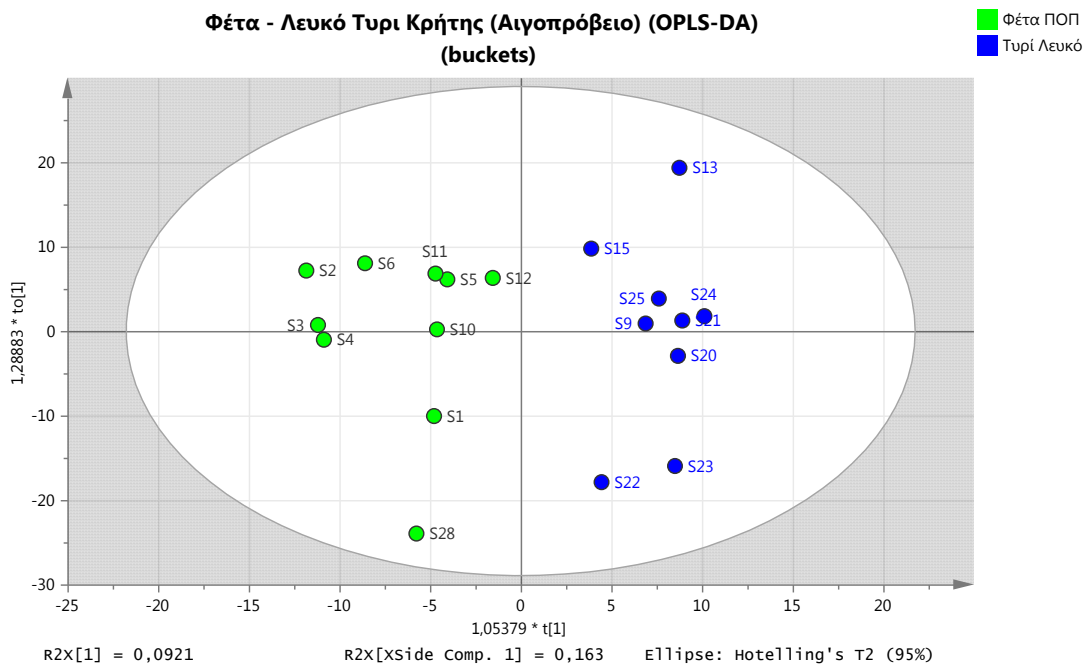
Εικόνα 3.40 Διάγραμμα ανάλυσης PLS-DA για τις κατηγορίες Φέτα - Λευκό τυρί Κρήτης (Αιγοπρόβειο)



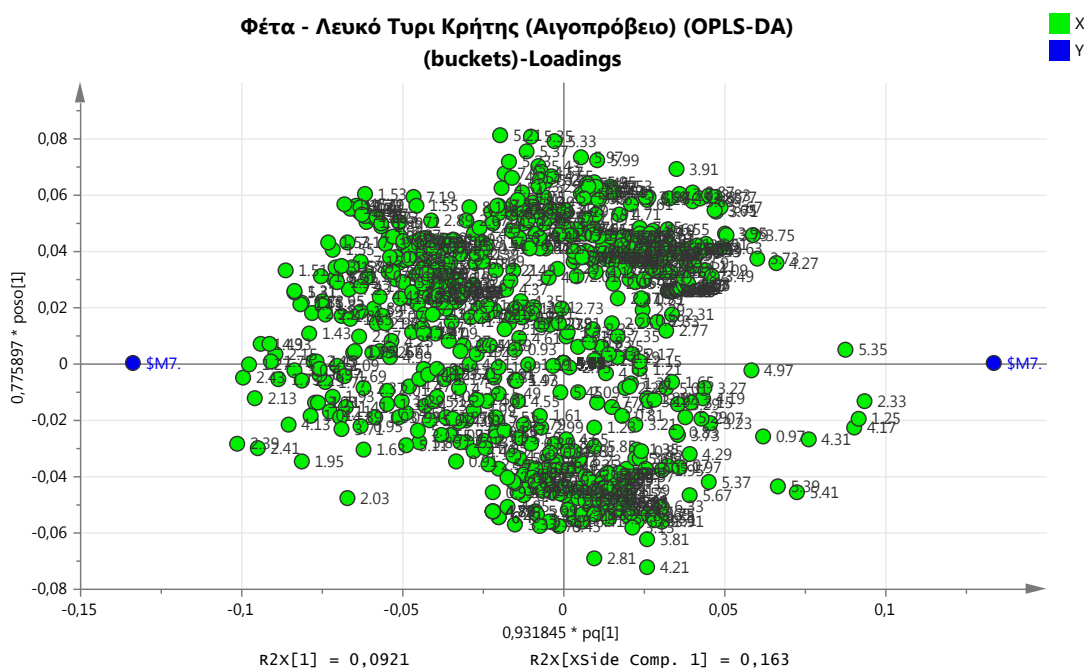
Εικόνα 3.41 Διάγραμμα permutations PLS-DA για τις κατηγορίες Φέτα - Λευκό τυρί Κρήτης (Αιγοπρόβειο)

Παρατηρούμε ότι υπάρχει διαφοροποίηση των δειγμάτων όπως συμβαίνει και στα μοντέλα OPLS-DA με διαχωρισμό ($R^2X=0,402$, $R^2Y=0,817$) και η προβλεπτική ικανότητα (Q^2) του μοντέλου είναι 0,402. Επίσης, είναι φανερό ότι το μοντέλο που αναπτύχθηκε παρουσιάζει την μεγαλύτερη δυνατή διαχωριστική ικανότητα σε συνδυασμό με τα βέλτιστα Q^2 και R^2 που προκύπτουν, επικυρώνοντας τη στατιστική σταθερότητα τόσο του μοντέλου αυτού, όσο και των προηγούμενων μεταβολομικών μοντέλων.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε η σύσταση ενός ακόμα μοντέλου OPLS-DA επιλέγοντας την προκατεργασία των δεδομένων με την UV κλίμακα αντί για Pareto (η οποία συνηθίζεται να χρησιμοποιείται για την ανάλυση με buckets), και χρησιμοποιώντας LOG-transformation στα πειραματικά δεδομένα των buckets. Η προσπάθεια αυτή αποσκοπεί στην εξέταση των ορίων της στατιστικής ανάλυσης των δεδομένων και την επίδραση της ισχυρής προκατεργασίας των δεδομένων. Το μοντέλο OPLS-DA που αναπτύχθηκε είχε $R^2X= 0,255$, $R^2Y=0,867$ και $Q^2= 0,304$.



Εικόνα 3.42 Διάγραμμα ανάλυσης OPLS-DA με UV-scale για τις κατηγορίες Φέτα - Λευκό τυρί Κρήτης (Αιγοπρόβειο)



Εικόνα 3.43 Διάγραμμα βαρύτητας όλων των μεταβλητών για το μοντέλο OPLS-DA

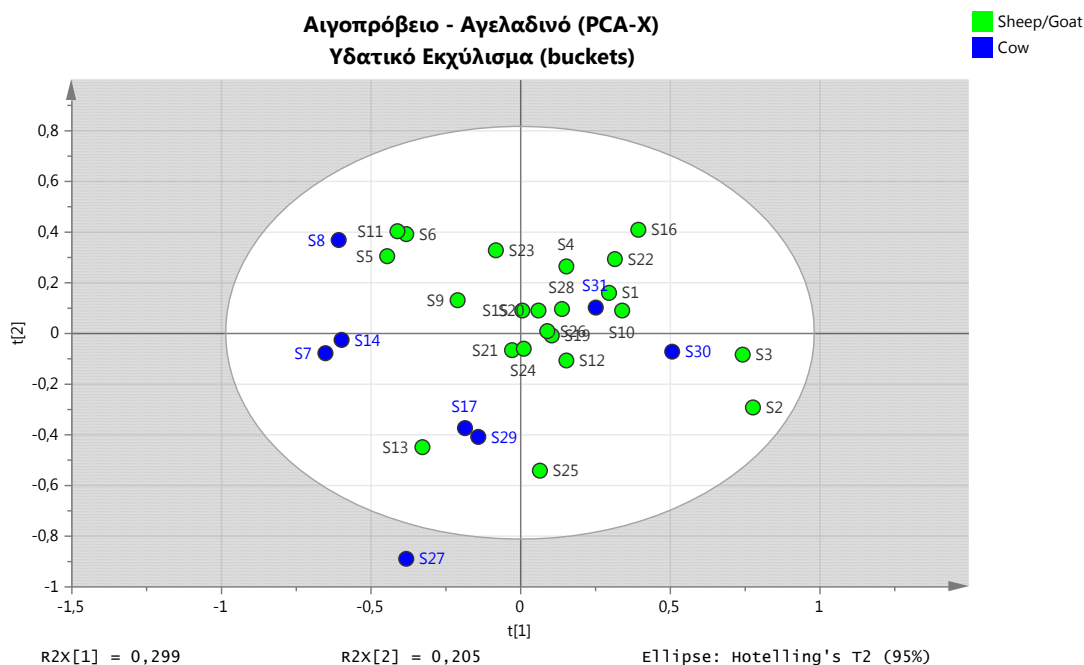
	SS	DF	MS	F	p	SD
Total corr.	18	18	1			1
Regression	5,47588	4	1,36897	1,53029	0,247058	1,17003
Residual	12,5241	14	0,89458			0,945822

Πίνακας 3.20 Ανάλυση CV-ANOVA

Όπως και στο μοντέλο OPLS-DA με κλιμάκωση Pareto, έτσι και αυτό το μοντέλο εμφανίζεται να διαφοροποιεί πλήρως τα δείγματα ανάλογα με το είδος τυριού. Η επικύρωση του μοντέλου αυτού με τη μέθοδο CV-Απονα έδειξε ότι στο μοντέλο αυτό το p είναι ίσο περίπου με 0,247, δηλαδή το μοντέλο εμφανίζει πιθανότητα 24,7% να προέκυψε με τυχαίο τρόπο. Η τιμή $p=0,247$ είναι πολύ μεγαλύτερη από το συνήθως χρησιμοποιούμενο όριο στατιστικής σημασίας 0,05, και είναι μεγαλύτερη από την τιμή που προέκυψε από το αντίστοιχο μοντέλο με Pareto scaling ($p=0,08$), υποδεικνύοντας ότι η ισχυρή προκατεργασία των πειραματικών δεδομένων, μπορεί να οδηγήσει σε οπτικά ελκυστικά στατιστικά μοντέλα διαχωρισμού, τα οποία όμως διαθέτουν μικρότερη στατιστική σημαντικότητα.

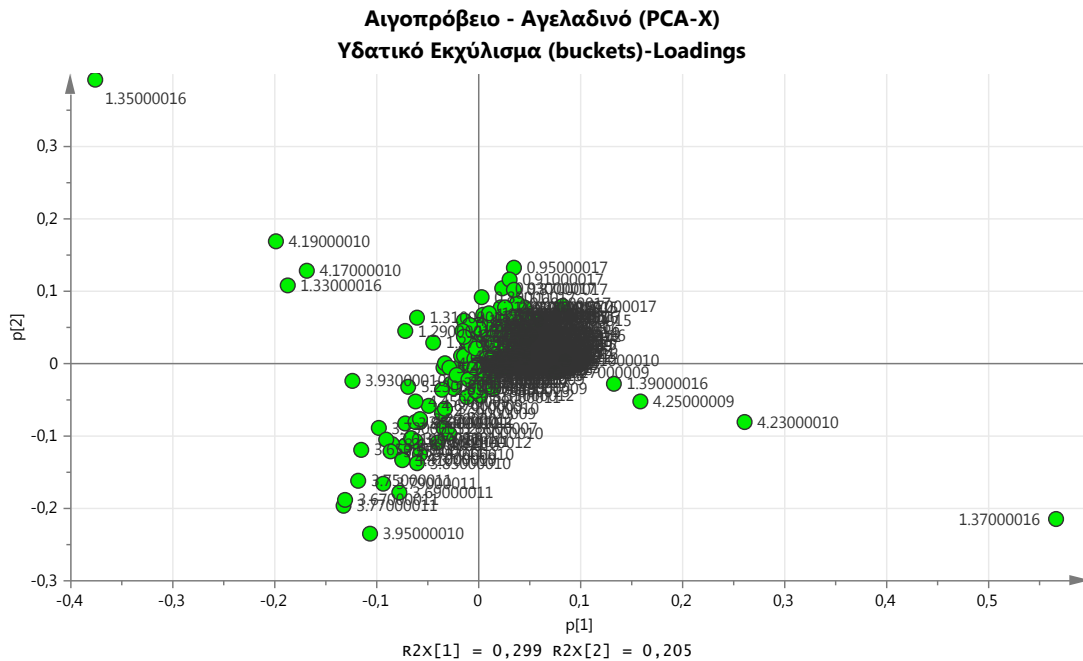
3.4.2 ΤΥΠΟΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ (ΑΙΓΟΠΡΟΒΕΙΟ – ΑΓΕΛΑΔΙΝΟ)

Στη συνέχεια, έγινε σύσταση μοντέλου PCA για την διαφοροποίηση των τυριών με βάση τον τύπο γάλακτος. Έτσι, προέκυψαν μοντέλα που παρουσιάζονται παρακάτω. Στο μοντέλο της εικόνας 3.44 χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα που προέκυψαν από τα buckets των φασμάτων του υδατικού εκχύλισματος των δειγμάτων.



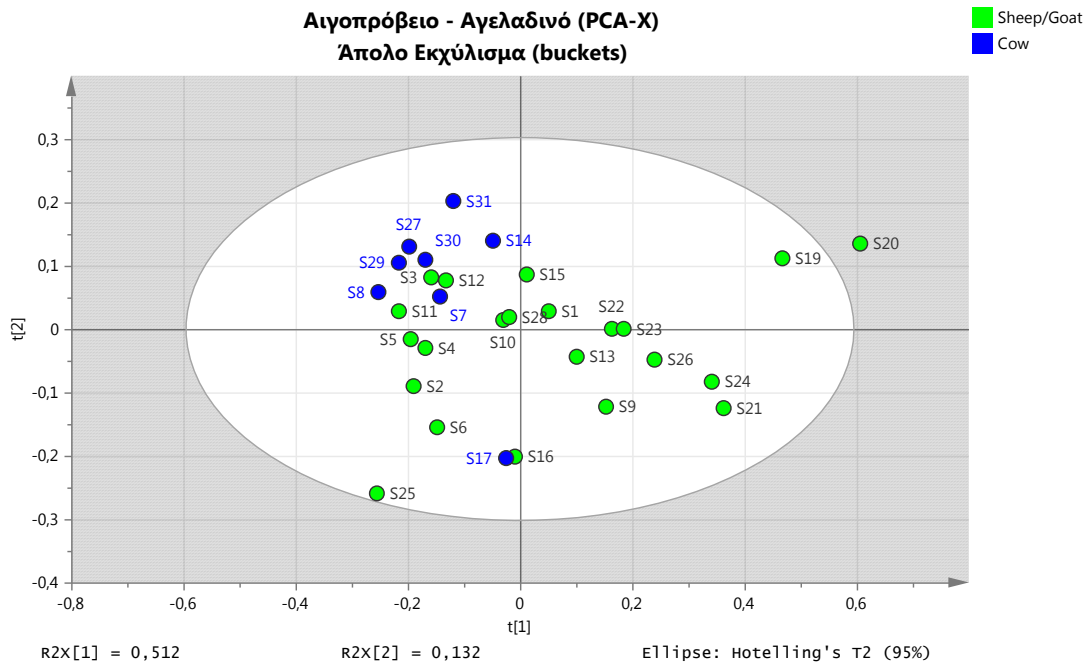
Εικόνα 3.44 Διάγραμμα ανάλυσης κύριων συνηθιστών (PCA) για τις κατηγορίες Αιγοπρόβειο - Αγελαδινό

Οι κύριοι άξονες που προσδιορίστηκαν είναι 5. Ενδεικτικά, ο κύριος άξονας PC1 περιγράφει το 29,9% της διασποράς, ο PC2 το 20,5%, ο PC3 το 12,8%, ο PC4 το 7,5% και ο PC5 το 5,5%. Το μοντέλο αυτό περιγράφει συνολικά το 76,2% της διασποράς των μεταβλητών. Η προβλεπτική ικανότητα (Q^2) του μοντέλου PCA είναι πολύ χαμηλή και ίση με 0,374. Επίσης στο διάγραμμα αυτό δεν υπάρχει διαφοροποίηση ανάμεσα στις δύο εξεταζόμενες κατηγορίες δειγμάτων (Αιγοπρόβειο - Αγελαδινό). Ακολουθεί το διάγραμμα βαρύτητας μεταβλητών (εικόνα 3.45).

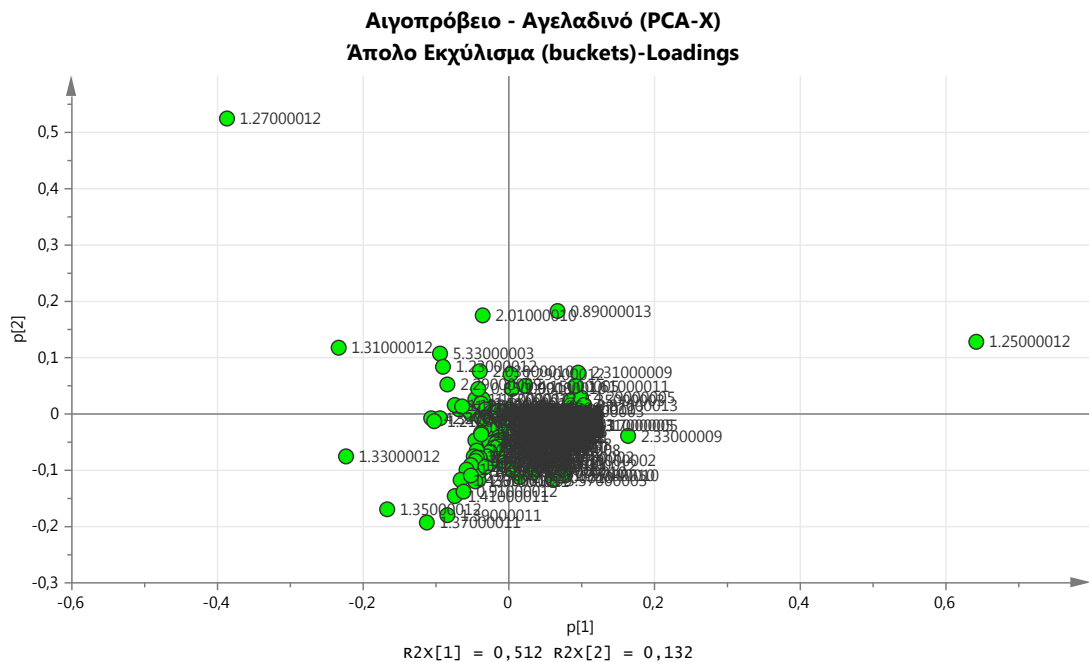


Εικόνα 3.45 Διάγραμμα βαρύτητας υδατικού εκχυλίσματος για το μοντέλο PCA

Στην συνέχεια, έγινε σύσταση του ίδιου μοντέλου αλλά αυτή την φορά χρησιμοποιήθηκαν τα buckets των φασμάτων του άπολου εκχυλίσματος. Οι κύριοι άξονες που προσδιορίστηκαν είναι 5. Ενδεικτικά, ο κύριος άξονας PC1 περιγράφει το 51,2% της διασποράς, ο PC2 το 13,2%, ο PC3 το 10,4%, ο PC4 το 7,2% και ο PC5 το 4,9%. Το μοντέλο αυτό περιγράφει συνολικά το 86,9% της διασποράς των μεταβλητών. Η προβλεπτική ικανότητα (Q^2) του μοντέλου PCA είναι αρκετά καλή και ίση με 0,69. Ωστόσο και πάλι φαίνεται να υπάρχει μερική μόνο διαφοροποίηση ανάμεσα στις κατηγορίες Αιγοπρόβειο - Αγελαδινό. Το μοντέλο αυτό καθώς και το διάγραμμα βαρύτητας μεταβλητών φαίνεται στην εικόνα 3.46 και 3.47 αντίστοιχα.



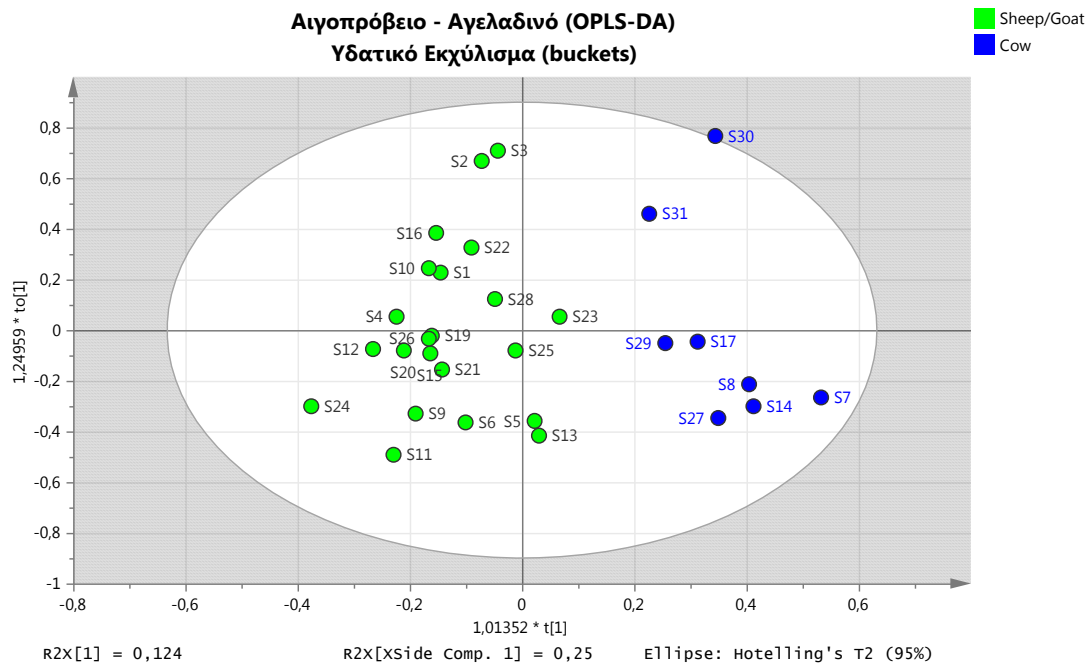
Εικόνα 3.46 Διάγραμμα ανάλυσης κύριων συνηστωσών (PCA) για τις κατηγορίες Αιγοπρόβειο - Αγελαδινό



Εικόνα 3.47 Διάγραμμα βαρύτητας άπολου εκχυλίσματος για το μοντέλο PCA

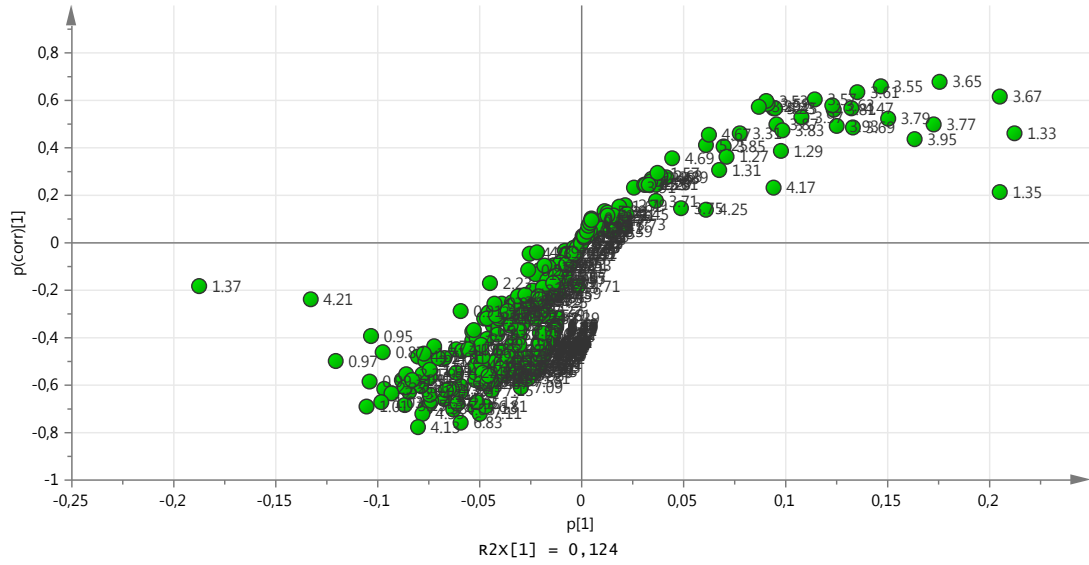
Αφού μελετήθηκαν τα δύο κλάσματα ξεχωριστά, χρησιμοποιήθηκαν όλα τα φασματικά δεδομένα (buckets υδατικών και άπολων εκχυλισμάτων) για τα δείγματα τυριών, χωρίς να επιτευχθεί σύσταση εσωτερικά επικυρωμένου μοντέλου PCA.

Κατόπιν, συστάθηκαν μοντέλα OPLS-DA, ακολουθώντας την σειρά των μοντέλων PCA, πρώτα χρησιμοποιήθηκαν τα buckets των φασμάτων με διαλύτη D₂O, ακολουθούν τα buckets των φασμάτων με διαλύτη χλωροφόρμιο και, τέλος, χρησιμοποιήθηκαν τα buckets όλων των φασμάτων. Στις εικόνες 3.48 και 3.49 παρουσιάζονται τα μοντέλα OPLS-DA των buckets των υδατικών εκχυλισμάτων και στις εικόνες 3.50 και 3.51 των άπολων αντίστοιχα καθώς και τα διαγράμματα βαρύτητας των μεταβλητών τους.

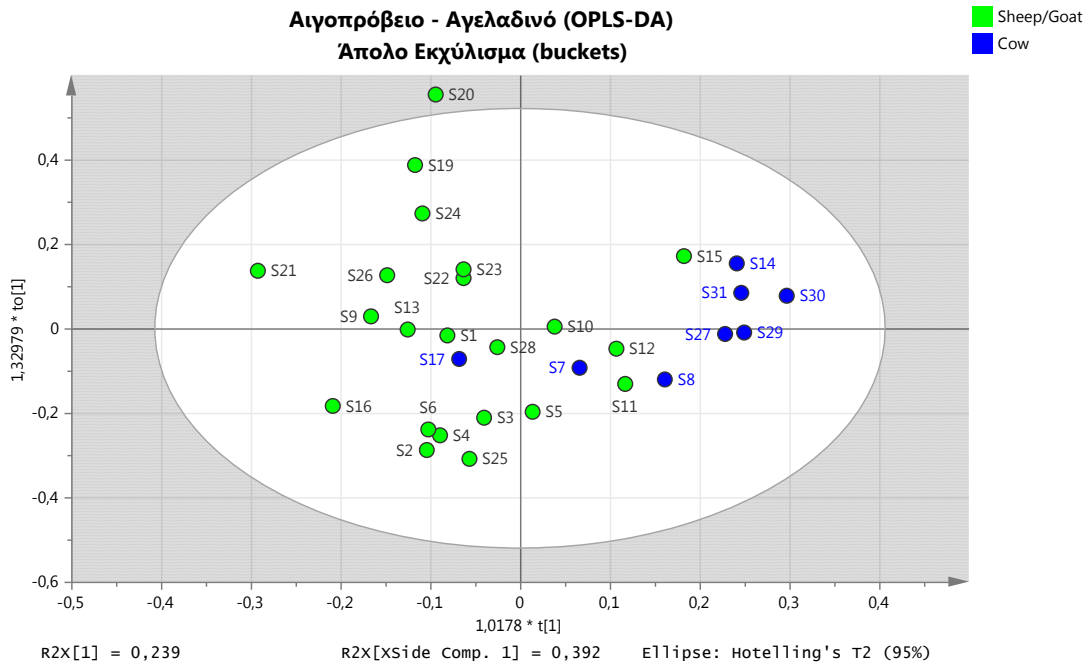


Εικόνα 3.48 Διάγραμμα ανάλυσης OPLS-DA για τις κατηγορίες Αιγοπρόβειο - Αγελαδινό

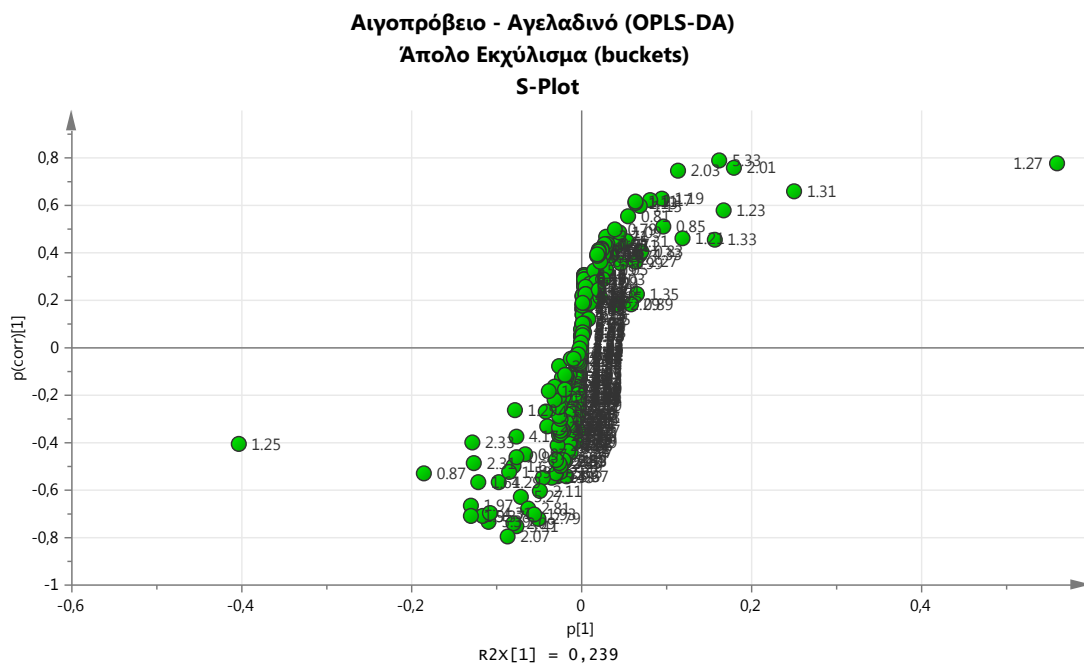
**Αιγοπρόβειο - Αγελαδινό (OPLS-DA)
Υδατικό Εκχύλισμα (buckets)
S-Plot**



Εικόνα 3.49 Διάγραμμα βαρύτητας όλων των μεταβλητών για το μοντέλο OPLS-DA

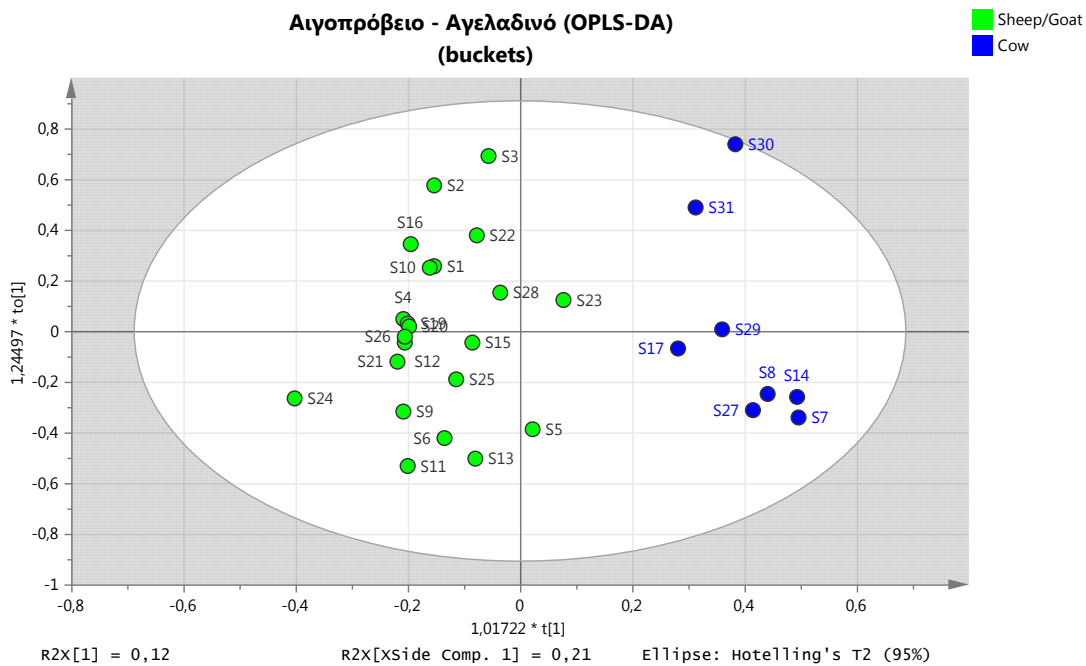


Εικόνα 3.50 Διάγραμμα ανάλυσης OPLS-DA για τις κατηγορίες Αιγοπρόβειο - Αγελαδινό

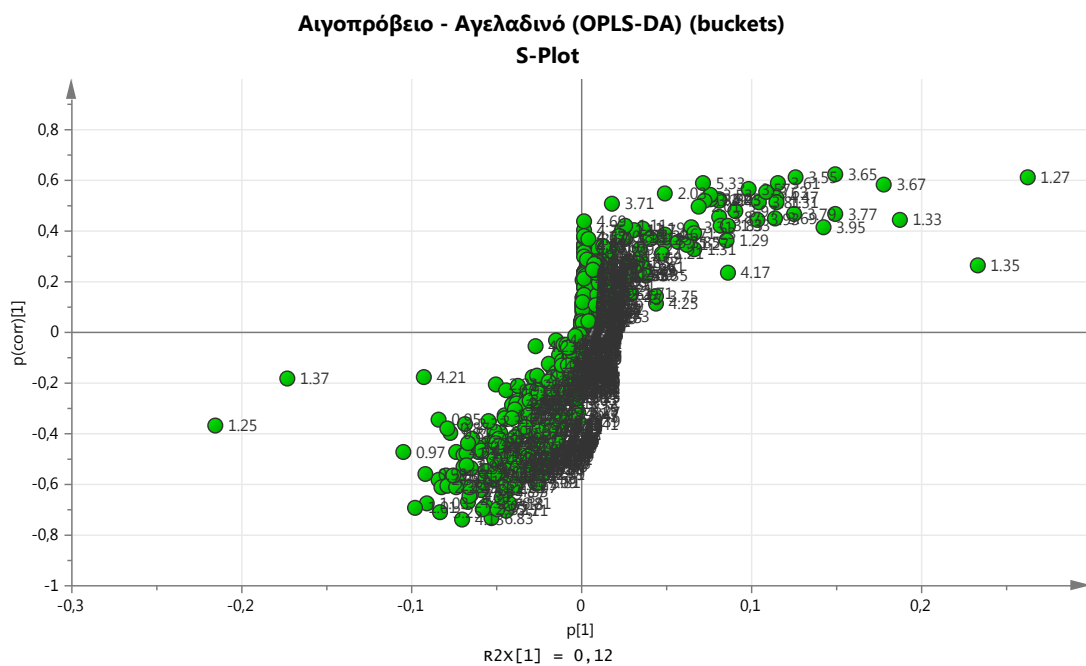


Εικόνα 3.51 Διάγραμμα βαρύτητας όλων των μεταβλητών για το μοντέλο OPLS-DA

Στο μοντέλο των φασμάτων των υδατικών εκχυλισμάτων φαίνεται ότι υπάρχει πλήρης διαχωρισμός των δειγμάτων ωστόσο η προβλεπτική ικανότητα (Q^2) του μοντέλου είναι οριακά καλή και ίση με 0,501 ($R^2X=0,564$, $R^2Y=0,821$). Αντίθετα, στο μοντέλο των φασμάτων του άπολου εκχυλίσματος, δεν υπάρχει τόσο ικανοποιητικός διαχωρισμός ($R^2X=0,631$, $R^2Y=0,496$) και η προβλεπτική ικανότητα (Q^2) του μοντέλου είναι πολύ χαμηλή και ίση με 0,265. Τέλος, στην εικόνα 3.52 παρουσιάζεται το μοντέλο στο οποίο συμπεριλαμβάνονται όλα τα buckets καθώς και το διάγραμμα βαρύτητας μεταβλητών του στην εικόνα 3.53. Στο μοντέλο αυτό φαίνεται ότι υπάρχει ο επιθυμητός διαχωρισμός ανάμεσα στις κατηγορίες Αιγοπρόβειο - Αγελαδινό ($R^2X=0,472$, $R^2Y=0,873$) καθώς και ικανοποιητική προβλεπτική ικανότητα (Q^2) ίση με 0,579.



Εικόνα 3.52 Διάγραμμα ανάλυσης OPLS-DA για τις κατηγορίες Αιγοπρόβειο - Αγελαδινό



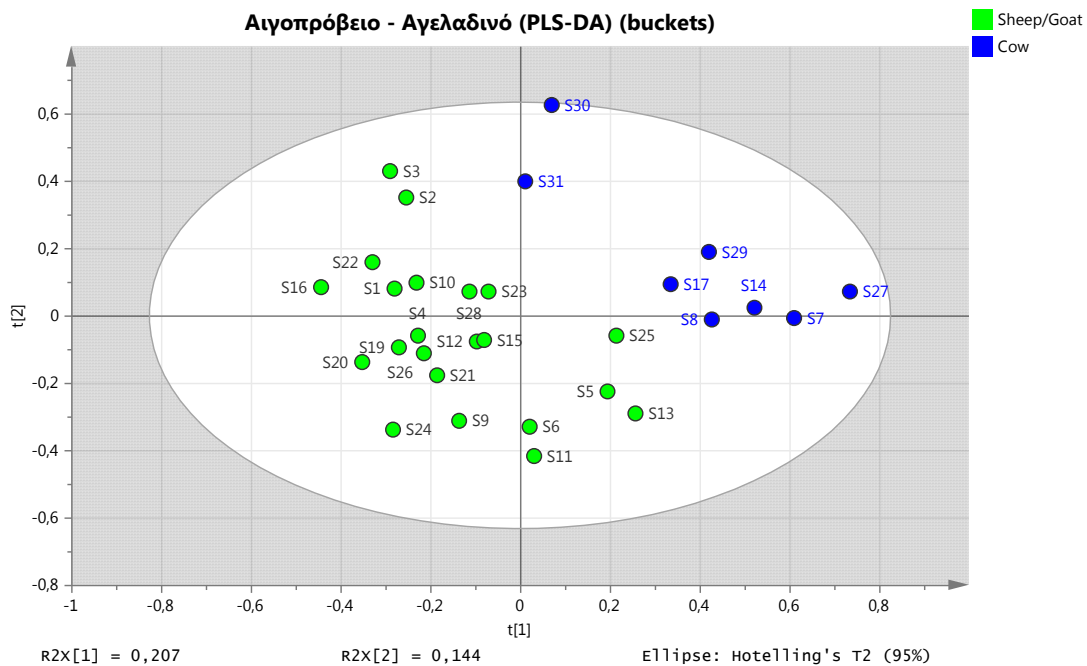
Εικόνα 3.53 Διάγραμμα βαρύτητας όλων των μεταβολιτών για το μοντέλο OPLS-DA

	SS	DF	MS	F	p	SD
Total corr.	29	29	1			1
Regression	16,7904	6	2,7984	5,27154	0,00151793	1,67284
Residual	12,2096	23	0,530851			0,728595

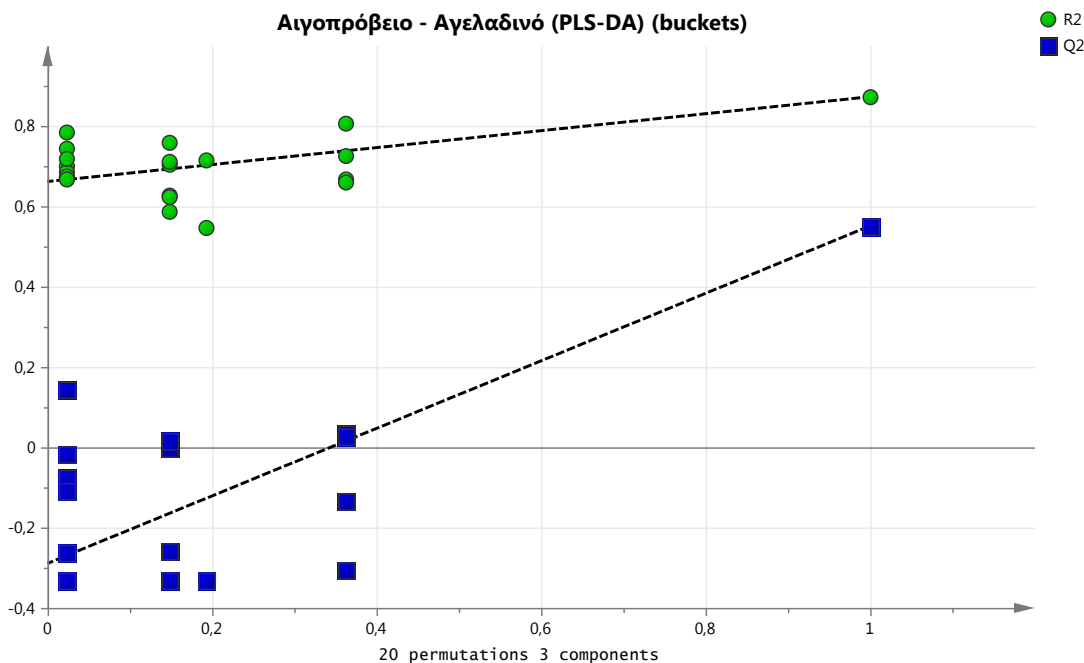
Πίνακας 3.21 Ανάλυση CV-ANOVA

Από την ανάλυση CV-Απονα των μεταβλητών του μοντέλου της εικόνας 3.52 το p είναι ίσο με 0,0015 δηλαδή η πιθανότητα το μοντέλο να προέκυψε ως τυχαίο αποτέλεσμα είναι περίπου 0,15%. Έτσι επιβεβαιώνεται από τη στοχευμένη και τη μη στοχευμένη ανάλυση ότι η διαφορές στον τύπο γάλακτος είναι σημαντικές και αποτυπώνονται στο τόσο ποσοτικό προφίλ των μεταβολιτών όσο και στο φασματικό αποτύπωμα των τυριών.

Στη συνέχεια, τα φασματικά δεδομένα (buckets) των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη ενός ακόμα μοντέλου, με ανάλυση διακριτότητας μερικών ελάχιστων τετραγώνων (PLS-DA). Η ανάλυση αυτή επιλέχθηκε με σκοπό να επιβεβαιωθεί η αξιοπιστία και η εγκυρότητα των προηγούμενων μοντέλων με επαλήθευση, που πραγματοποιείται μέσω έλεγχου των αποτελεσμάτων που προκύπτουν αν μετατεθεί η επιλεγμένη μεταβλητή Y (permutations). Το διάγραμμα PLS-DA που προκύπτει καθώς και τα αντίστοιχα permutations παρουσιάζονται στην εικόνα 3.54 και εικόνα 3.55.



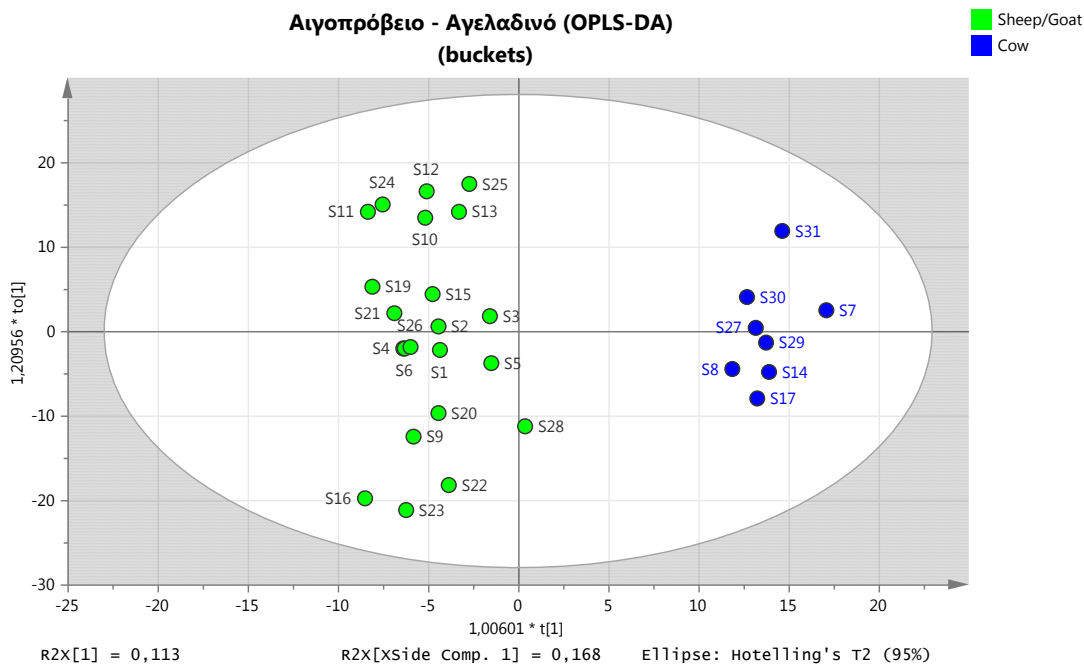
Εικόνα 3.54 Διάγραμμα ανάλυσης PLS-DA για τις κατηγορίες Αιγοπρόβειο - Αγελαδινό



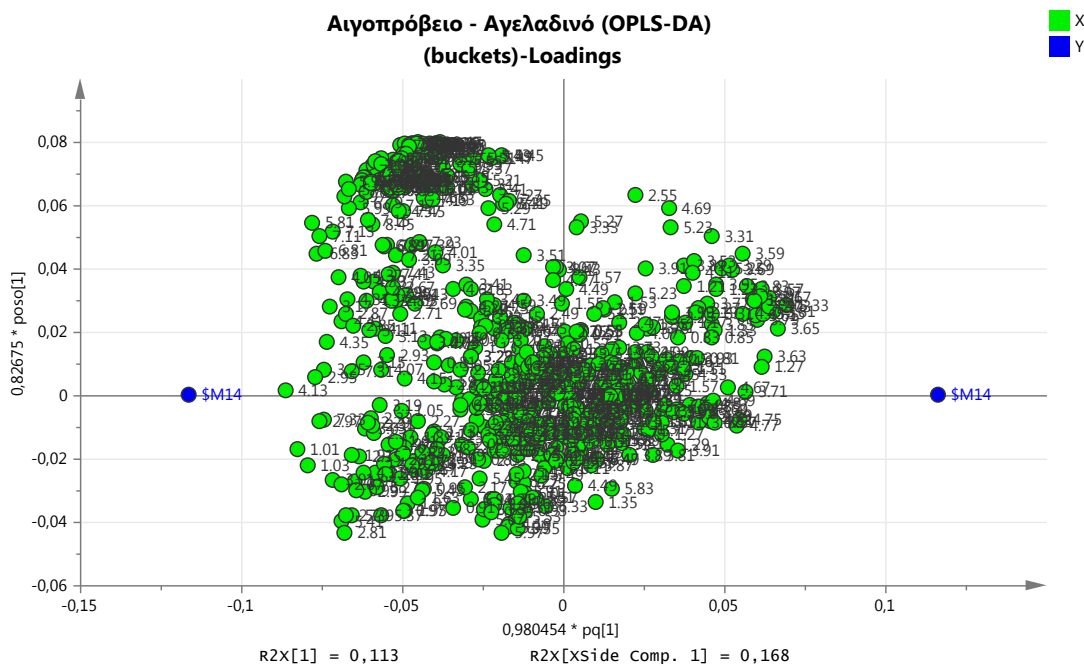
Εικόνα 3.55 Διάγραμμα permutations PLS-DA για τις κατηγορίες Αιγοπρόβειο - Αγελαδινό

Παρατηρούμε ότι υπάρχει διαφοροποίηση των δειγμάτων όπως συμβαίνει και στα μοντέλα OPLS-DA με διαχωρισμό ($R^2X=0,472$, $R^2Y=0,873$) και η προβλεπτική ικανότητα (Q^2) του μοντέλου είναι ικανοποιητική και ίση με 0,551. Επίσης, είναι εμφανές ότι το μοντέλο που αναπτύχθηκε παρουσιάζει την μεγαλύτερη δυνατή διαχωριστική ικανότητα σε συνδυασμό με τα βέλτιστα Q^2 και R^2 που προκύπτουν, επικυρώνοντας τη στατιστική σταθερότητα και την μοναδικότητα τόσο του μοντέλου PLS-DA, όσο και των προηγούμενων αντίστοιχων μεταβολομικών μοντέλων OPLS-DA.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε η σύσταση ενός μοντέλου OPLS-DA επιλέγοντας την προκατεργασία των δεδομένων με την UV κλίμακα αντί για Pareto (η οποία συνηθίζεται να χρησιμοποιείται για την ανάλυση με buckets), και χρησιμοποιώντας LOG-transformation στα πειραματικά δεδομένα των buckets, όπως και στις προηγούμενες κατηγορίες. Η προσπάθεια αυτή αποσκοπεί στην εξέταση των ορίων της στατιστικής ανάλυσης των δεδομένων και την επίδραση της ισχυρής προκατεργασίας των δεδομένων. Το μοντέλο OPLS-DA που αναπτύχθηκε είχε $R^2X=0,359$, $R^2Y=0,941$ και $Q^2=0,618$.



Εικόνα 3.56 Διάγραμμα ανάλυσης OPLS-DA με UV-scale για τις κατηγορίες Αιγοπρόβειο - Αγελαδινό



Εικόνα 3.57 Διάγραμμα βαρύτητας όλων των μεταβολιτών για το μοντέλο OPLS-DA

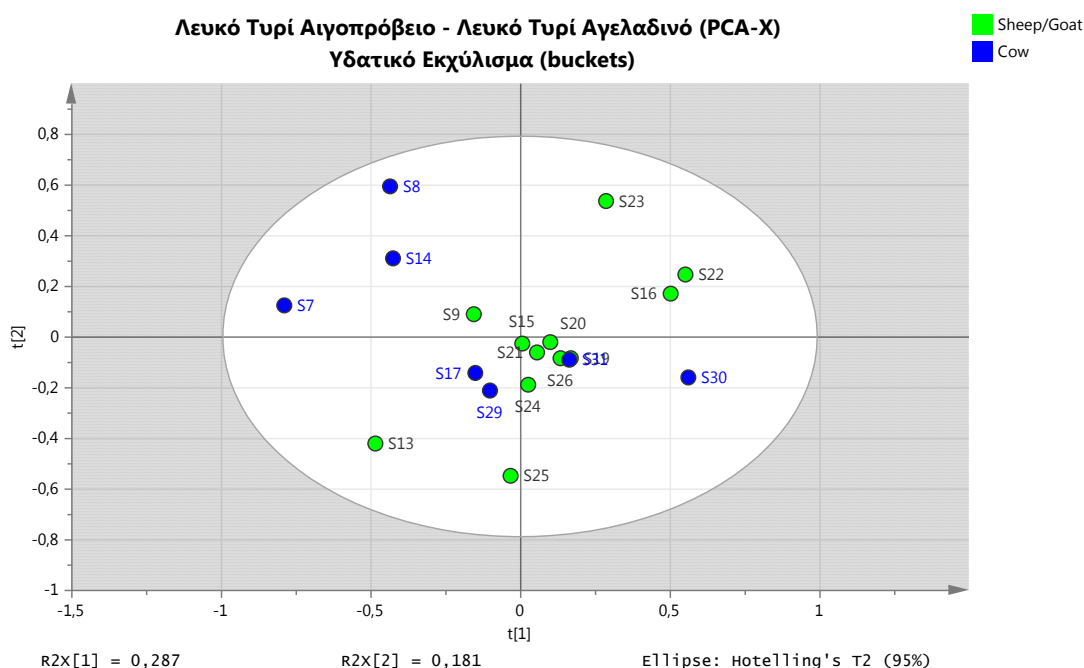
	SS	DF	MS	F	p	SD
Total corr.	29	29	1			1
Regression	17,9162	6	2,98603	6,19632	0,000558512	1,72801
Residual	11,0838	23	0,481904			0,694193

Πίνακας 3.22 Ανάλυση CV-ANOVA

Όπως και στο μοντέλο OPLS-DA με κλιμάκωση Pareto, έτσι και αυτό το μοντέλο εμφανίζεται να διαφοροποιεί πλήρως τα δείγματα των τυριών ανάλογα με τον τύπο γάλακτος. Η επικύρωση του μοντέλου αυτού με τη μέθοδο CV-Ανονα έδειξε ότι στο μοντέλο αυτό το p είναι ίσο με 0,00056, δηλαδή το μοντέλο εμφανίζει πιθανότητα μικρότερη από 0,056% να προέκυψε με τυχαίο τρόπο. Η τιμή $p=0,00056$ είναι αρκετά μικρότερη από το συνήθως χρησιμοποιούμενο όριο στατιστικής σημασίας 0,05, και μικρότερη από την τιμή που προέκυψε από το αντίστοιχο μοντέλο με Pareto scaling ($p=0,0015$).

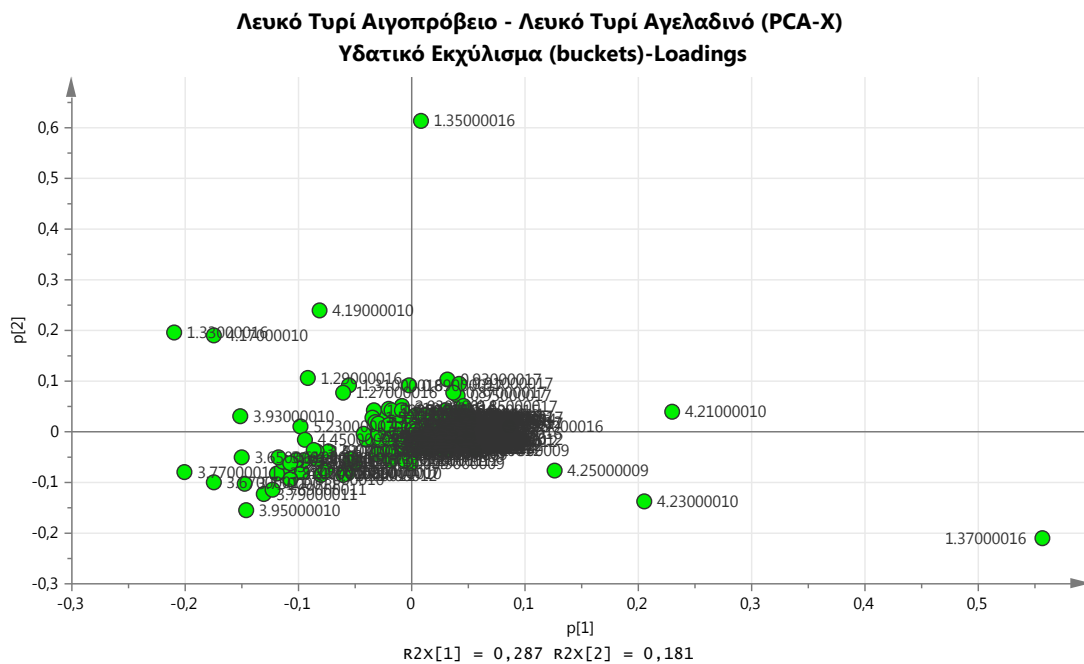
3.4.3 ΛΕΥΚΟ ΤΥΡΙ ΑΙΓΟΠΡΟΒΕΙΟ - ΛΕΥΚΟ ΤΥΡΙ ΑΓΕΛΑΔΙΝΟ

Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα που αφορούν τα λευκά τυριά τόσο από την Κρήτη όσο και από την υπόλοιπη Ελλάδα ώστε να ερευνηθεί η διαφοροποίηση τους και πάλι με βάση τον τύπο γάλακτος. Στην εικόνα 3.58 παρουσιάζεται το διάγραμμα που προκύπτει από την ανάλυση PCA από τα buckets των φασμάτων του υδατικού εκχυλίσματος των δειγμάτων, και στην εικόνα 3.59 φαίνεται το διάγραμμα βαρύτητας μεταβλητών.



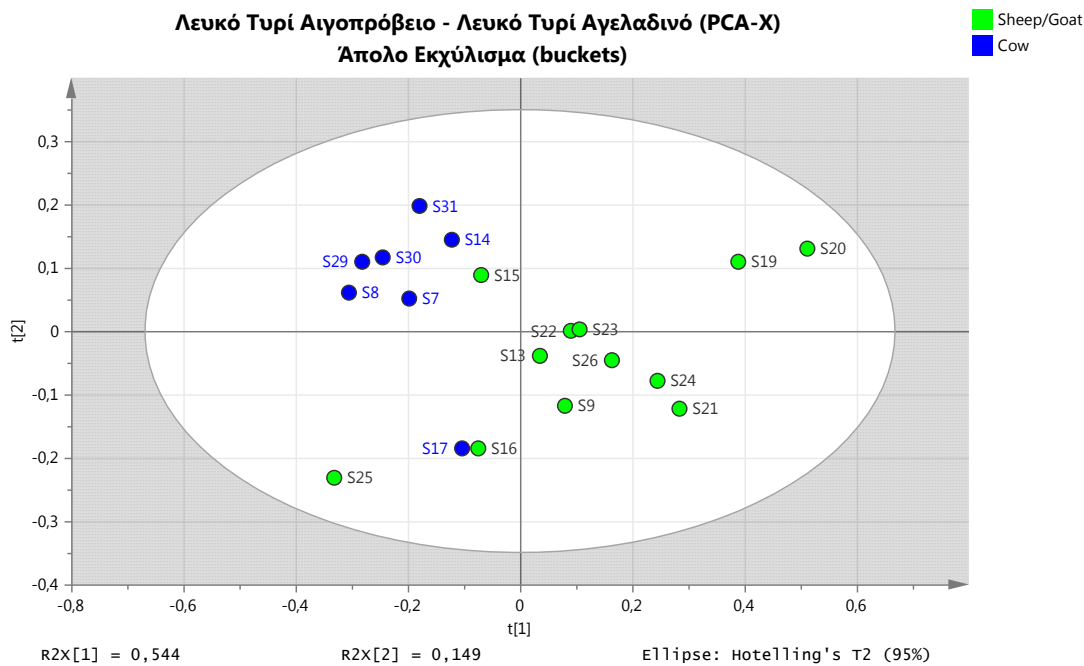
Εικόνα 3.58 Διάγραμμα ανάλυσης κύριων συνηστωσών (PCA) για τις κατηγορίες κατηγορίες Λευκό τυρί Αιγοπρόβειο - Λευκό τυρί Αγελαδινό

Οι κύριοι άξονες που προσδιορίστηκαν είναι 2. Ενδεικτικά, ο κύριος άξονας PC1 περιγράφει το 28,7% της διασποράς, ο PC2 το 18,1% και ο PC3 το 15%. Το μοντέλο αυτό περιγράφει συνολικά το 61,8% της διασποράς των μεταβλητών. Η προβλεπτική ικανότητα (Q^2) του μοντέλου PCA είναι πάρα πολύ χαμηλή και ίση με 0,0876. Επίσης στο διάγραμμα παρατηρείται ότι δεν υπάρχει διαφοροποίηση ανάμεσα στις δύο εξεταζόμενες κατηγορίες δειγμάτων (Λευκό τυρί Αιγοπρόβιο - Λευκό τυρί Αγελαδινό). Ακολουθεί το διάγραμμα βαρύτητας μεταβλητών.

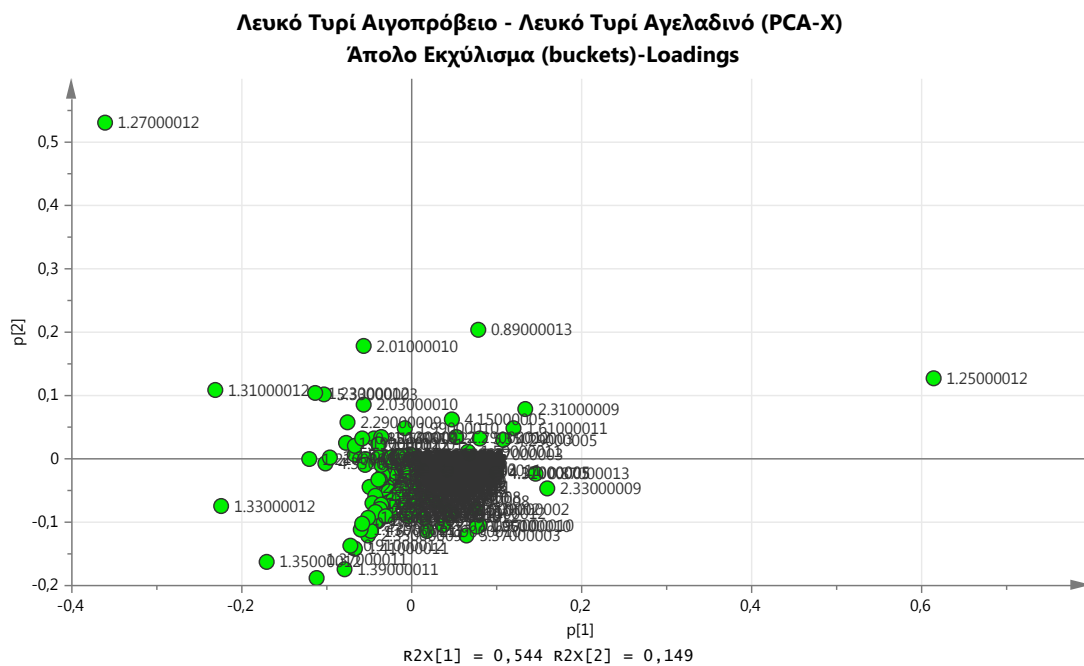


Εικόνα 3.59 Διάγραμμα βαρύτητας υδατικού εκχυλίσματος για το μοντέλο PCA

Στην συνέχεια, έγινε σύσταση του ίδιου μοντέλου αλλά αυτή την φορά χρησιμοποιήθηκαν τα buckets των φασμάτων του άπολου εκχυλίσματος. Οι κύριοι άξονες που προσδιορίστηκαν είναι 2. Ενδεικτικά, ο κύριος άξονας PC1 περιγράφει το 54,4% της διασποράς και ο PC2 το 14,9%. Το μοντέλο αυτό περιγράφει συνολικά το 69,3% της διασποράς των μεταβλητών. Η προβλεπτική ικανότητα (Q^2) του μοντέλου PCA είναι οριακά καλή και ίση με 0,508. Ωστόσο φαίνεται να υπάρχει μερική μόνο διαφοροποίηση ανάμεσα σε Λευκό τυρί Αιγοπρόβιο - Λευκό τυρί Αγελαδινό. Το μοντέλο αυτό καθώς και το διάγραμμα βαρύτητας μεταβλητών φαίνεται στην εικόνα 3.60 και 3.61 αντίστοιχα.



Εικόνα 3.60 Διάγραμμα ανάλυσης κύριων συνηστωσών (PCA) για τις κατηγορίες Λευκό τυρί Αιγοπρόβειο - Λευκό τυρί Αγελαδινό

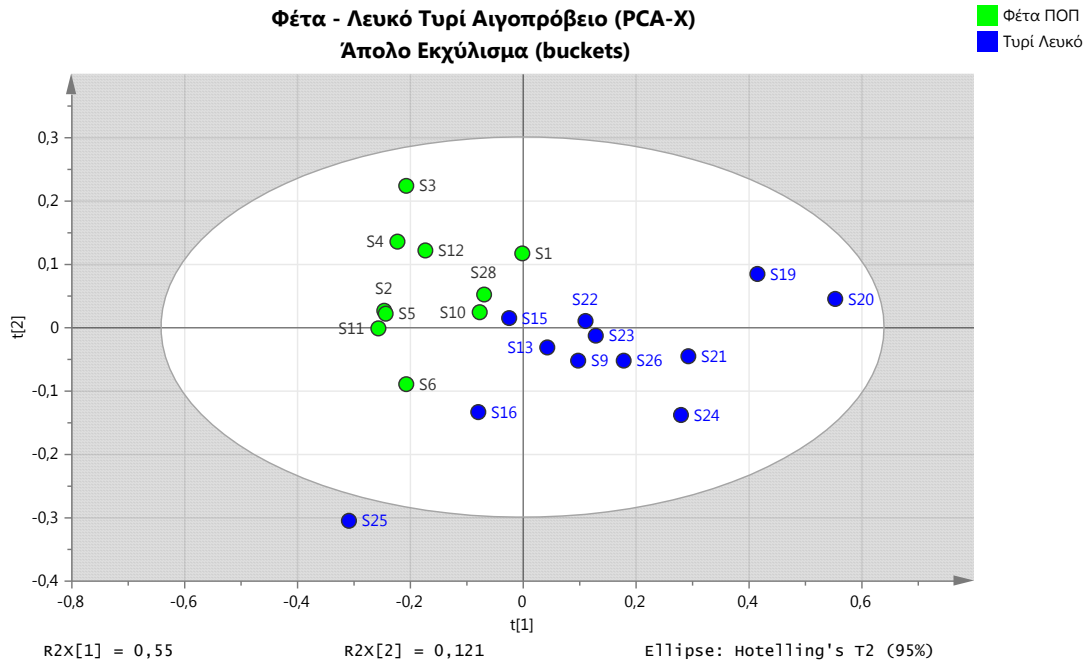


Εικόνα 3.61 Διάγραμμα βαρύτητας άπολου εκχυλίσματος για το μοντέλο PCA

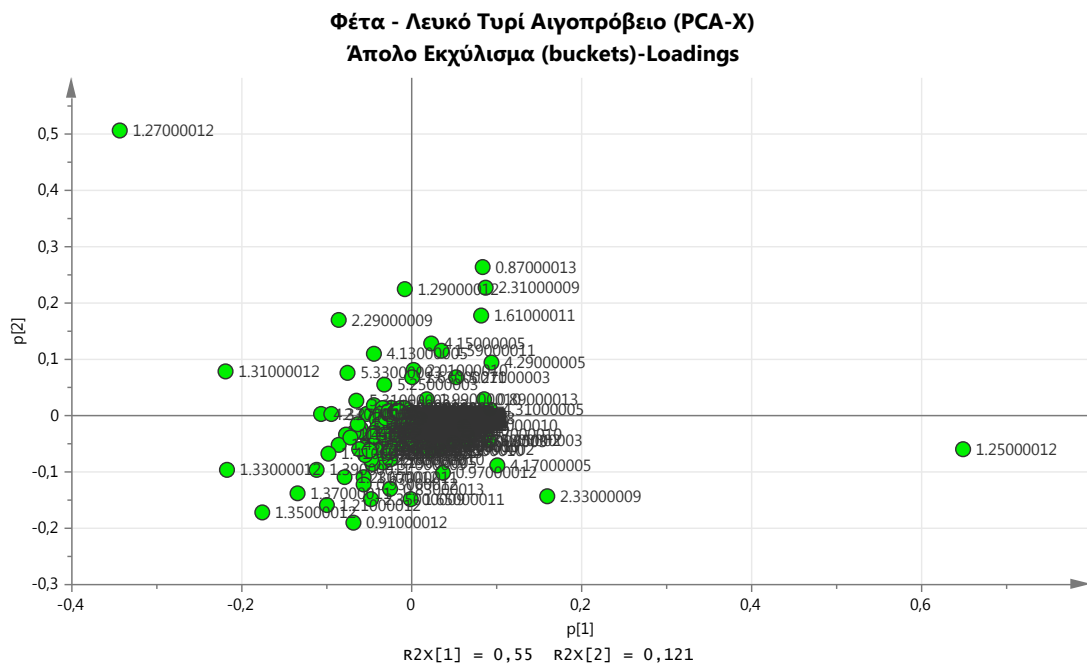
Αφού μελετήθηκαν τα δύο κλάσματα ξεχωριστά, χρησιμοποιήθηκαν όλα τα φασματικά δεδομένα για τα δείγματα τυριών, χωρίς να επιτευχθεί σύσταση επικυρωμένου μοντέλου PCA. Κατόπιν, αφού δεν επιτεύχθηκε ικανοποιητικός διαχωρισμός των δειγμάτων στις δυο κατηγορίες, Λευκό τυρί Αιγοπρόβειο - Λευκό τυρί Αγελαδινό, με την ανάλυση PCA, επιχειρήθηκε σύσταση μοντέλων OPLS-DA. Ωστόσο και σε αυτή την περίπτωση δεν κατέστη εφικτή η σύσταση επικυρωμένων μοντέλων.

3.4.4 ΦΕΤΑ - ΛΕΥΚΟ ΤΥΡΙ ΑΙΓΟΠΡΟΒΕΙΟ

Τέλος, χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα που αφορούν τα λευκά τυριά άλμης από αιγοπρόβειο γάλα και τις φέτες. Στην εικόνα 3.62 παρουσιάζεται το διάγραμμα που προκύπτει από την ανάλυση PCA των buckets των φασμάτων του άπολου εκχυλίσματος των δειγμάτων, και στην εικόνα 3.63 φαίνεται το διάγραμμα βαρύτητας μεταβλητών.



Εικόνα 3.62 Διάγραμμα ανάλυσης κύριων συνηστωσών (PCA) για τις κατηγορίες Φέτα - Λευκό τυρί Αιγοπρόβειο

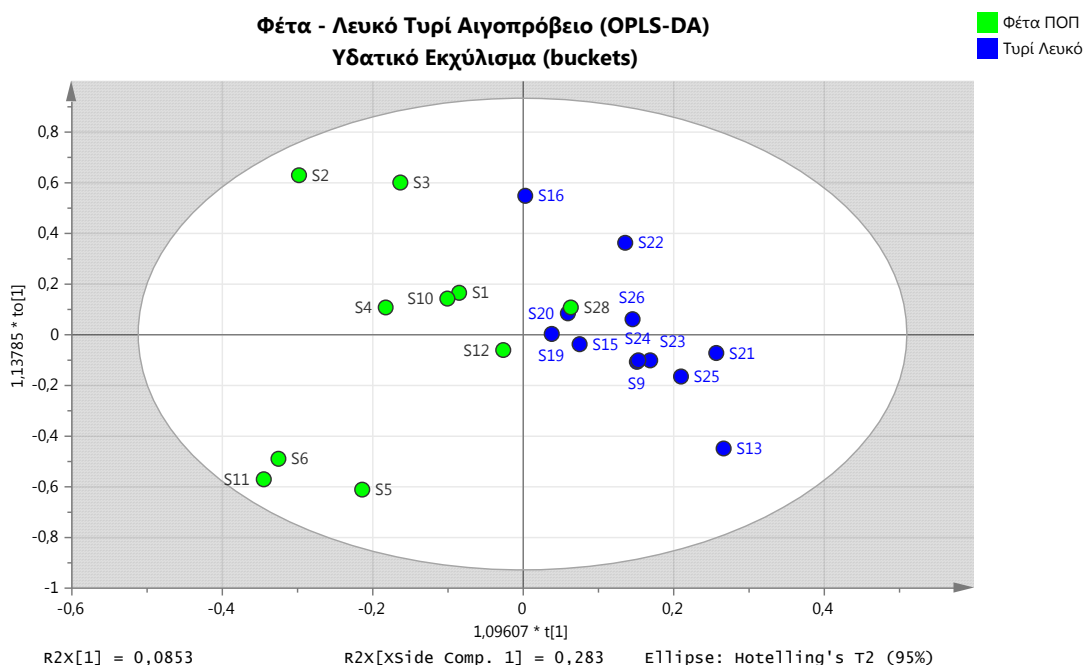


Εικόνα 3.63 Διάγραμμα βαρύτητας άπολου εκχυλίσματος για το μοντέλο PCA

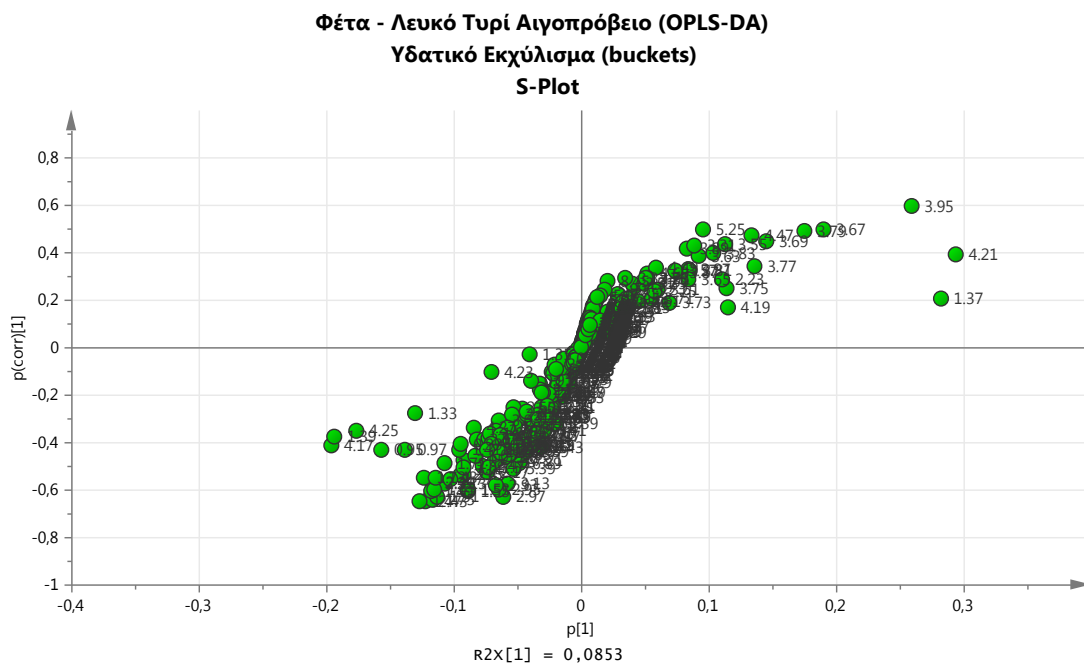
Οι κύριοι άξονες που προσδιορίστηκαν είναι 5. Ενδεικτικά, ο κύριος άξονας PC1 περιγράφει το 55% της διασποράς, ο PC2 το 12,1%, ο PC3 το 9,2%, ο PC4 το 7,8% και ο PC5 το 4,1%. Το μοντέλο αυτό περιγράφει συνολικά το 88,2% της διασποράς των μεταβλητών. Η προβλεπτική ικανότητα (Q^2) του μοντέλου PCA είναι οριακά καλή και ίση με 0,516. Όπως παρατηρείται υπάρχει διαφοροποίηση για τα δείγματα των κατηγοριών Φέτα - Λευκό τυρί Αιγοπρόβιο. Το γεγονός αυτό πιθανώς οφείλεται σε φασματικές διαφορές που δεν ήταν προσβάσιμες να μελετηθούν από τους μεταβολίτες που ποσοτικοποιήθηκαν, αφού στη προσπάθεια που πραγματοποιήθηκε για τη σύσταση μοντέλων με τα δεδομένα των μεταβολιτών παρέμεινε άκαρπη.

Να σημειωθεί ότι η σύσταση εσωτερικά επικυρωμένων μοντέλων PCA για το υδατικό εκχύλισμα και για τα συνολικά φασματικά δεδομένα (buckets υδατικών και άπολων εκχυλισμάτων), δεν κατέστη εφικτή.

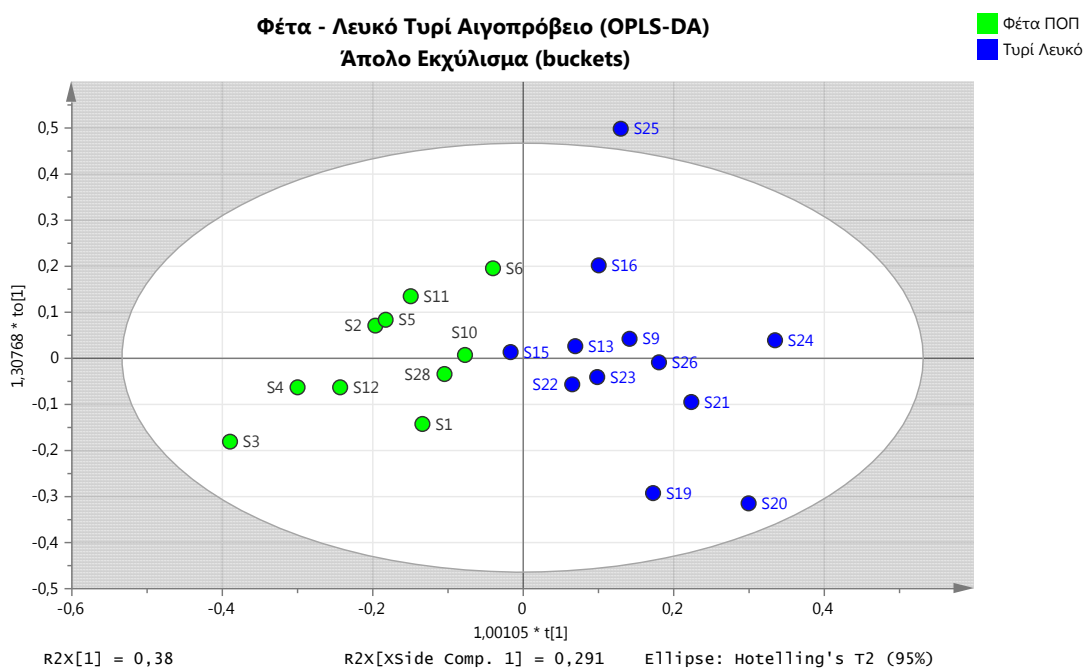
Στη συνέχεια, συστάθηκαν μοντέλα OPLS-DA για τις δυο κατηγορίες, Λευκό τυρί Αιγοπρόβιο - Λευκό τυρί Αγελαδινό. Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν τα buckets των φασμάτων με διαλύτη D_2O , ακολουθούν τα buckets των φασμάτων με διαλύτη χλωροφόρμιο και, τέλος, χρησιμοποιήθηκαν τα buckets όλων των φασμάτων. Στις εικόνες 3.64 και 3.65 παρουσιάζονται τα μοντέλα OPLS-DA των buckets των υδατικών εκχυλισμάτων και στις εικόνες 3.66 και 3.67 των άπολων αντίστοιχα καθώς και τα διαγράμματα βαρύτητας των μεταβλητών τους.



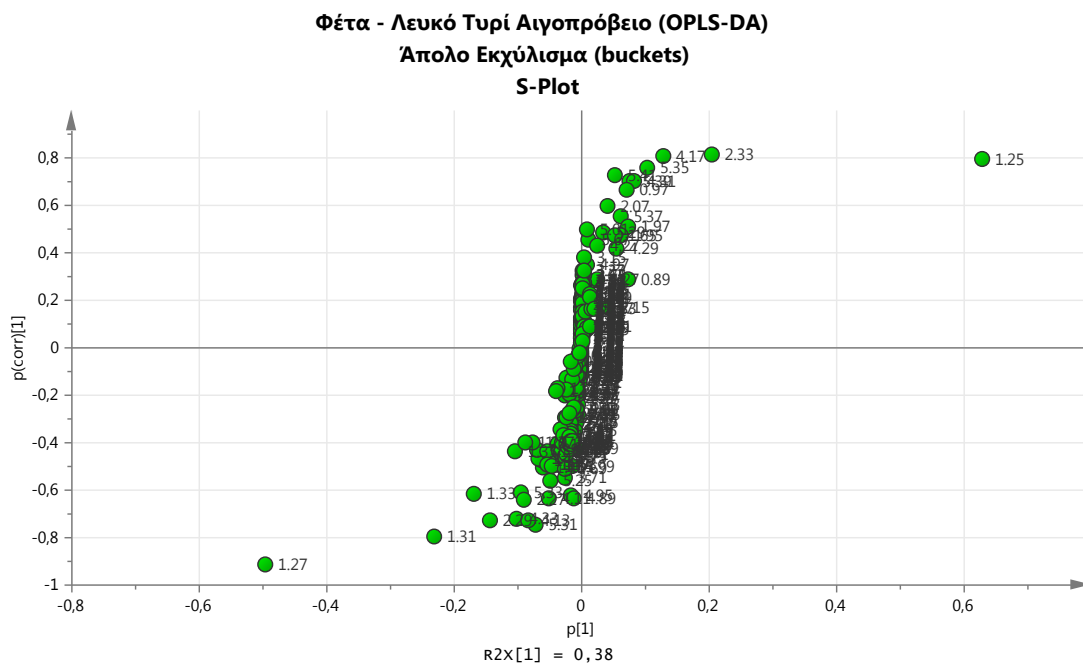
Εικόνα 3.64 Διάγραμμα ανάλυσης OPLS-DA για τις κατηγορίες Φέτα - Λευκό τυρί Αιγοπρόβιο



Εικόνα 3.65 Διάγραμμα βαρύτητας όλων των μεταβολιτών για το μοντέλο OPLS-DA

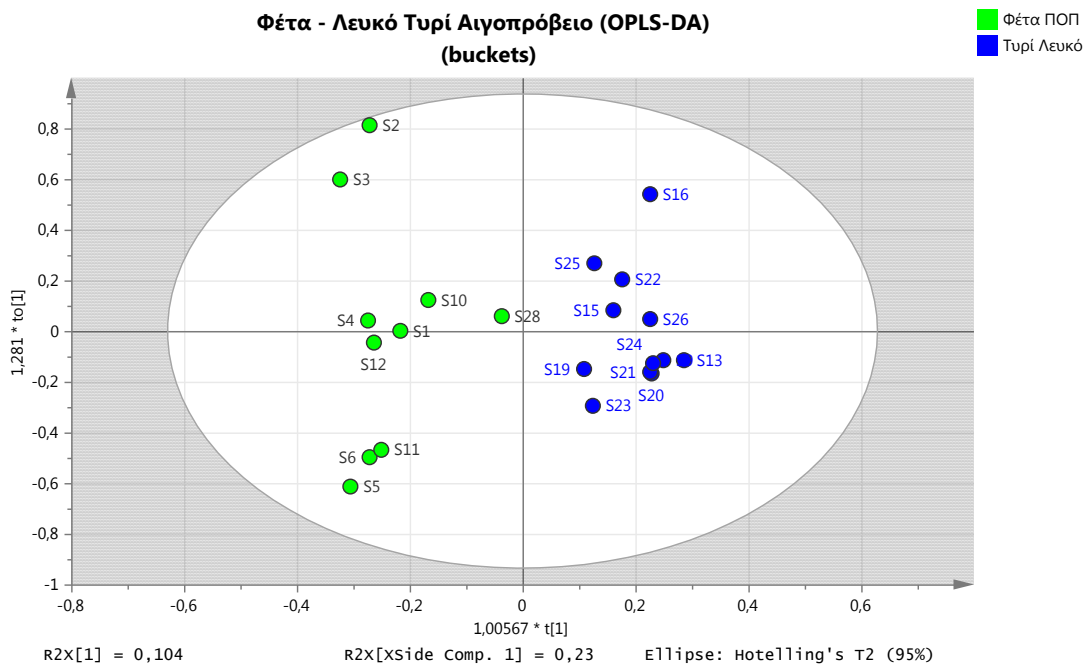


Εικόνα 3.66 Διάγραμμα ανάλυσης OPLS-DA για τις κατηγορίες Φέτα - Λευκό τυρί Αιγοπρόβειο

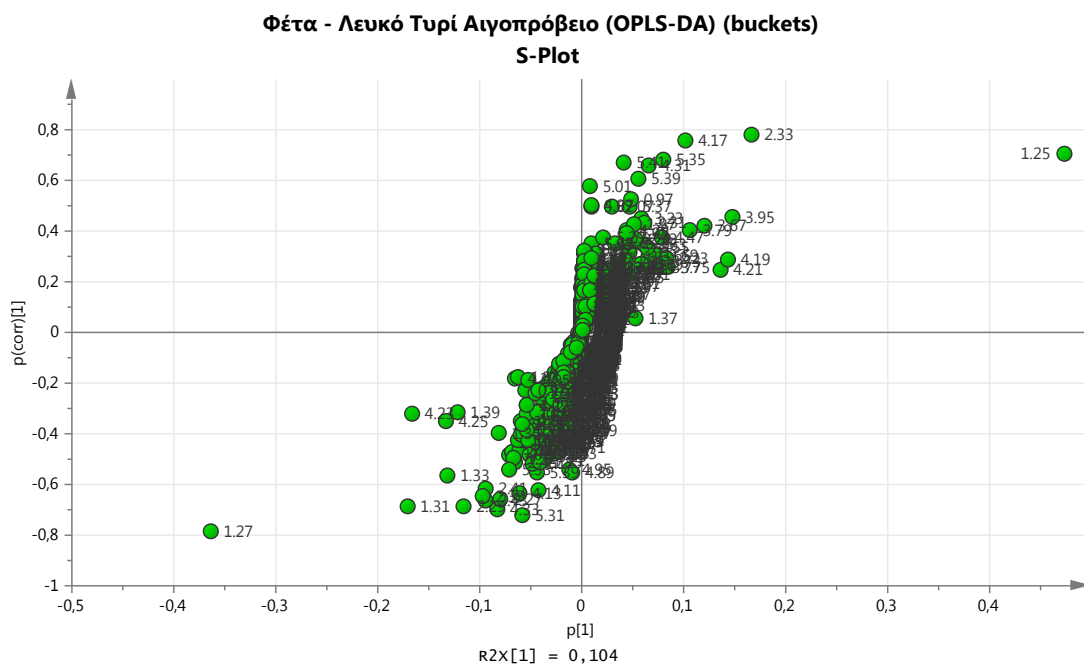


Εικόνα 3.67 Διάγραμμα βαρύτητας όλων των μεταβολιτών για το μοντέλο OPLS-DA

Στο μοντέλο των φασμάτων των υδατικών εκχυλισμάτων φαίνεται ότι υπάρχει μερικός διαχωρισμός των δειγμάτων αλλά η προβλεπτική ικανότητα (Q^2) του μοντέλου είναι πολύ χαμηλή και ίση με 0,192 ($R^2X=0,369$, $R^2Y=0,683$). Αντίθετα, στο μοντέλο των φασμάτων του άπολου εκχυλίσματος, όπως και στο αντίστοιχο μοντέλο PCA, υπάρχει ικανοποιητικός διαχωρισμός ($R^2X=0,671$, $R^2Y=0,74$) και η προβλεπτική ικανότητα (Q^2) του μοντέλου είναι αρκετά καλή και ίση με 0,605. Τέλος, στην εικόνα 3.68 παρουσιάζεται το μοντέλο στο οποίο συμπεριλαμβάνονται όλα τα buckets καθώς και το διάγραμμα βαρύτητας μεταβλητών του στην εικόνα 3.69. Στο μοντέλο αυτό φαίνεται ότι υπάρχει διαχωρισμός ανάμεσα στις κατηγορίες Φέτα - Λευκό τυρί Αιγοπρόβειο ($R^2X=0,437$, $R^2Y=0,915$) καθώς και ικανοποιητική προβλεπτική ικανότητα (Q^2) ίση με 0.564.



Εικόνα 3.68 Διάγραμμα ανάλυσης OPLS-DA για τις κατηγορίες Φέτα - Λευκό τυρί Αιγοπρόβειο



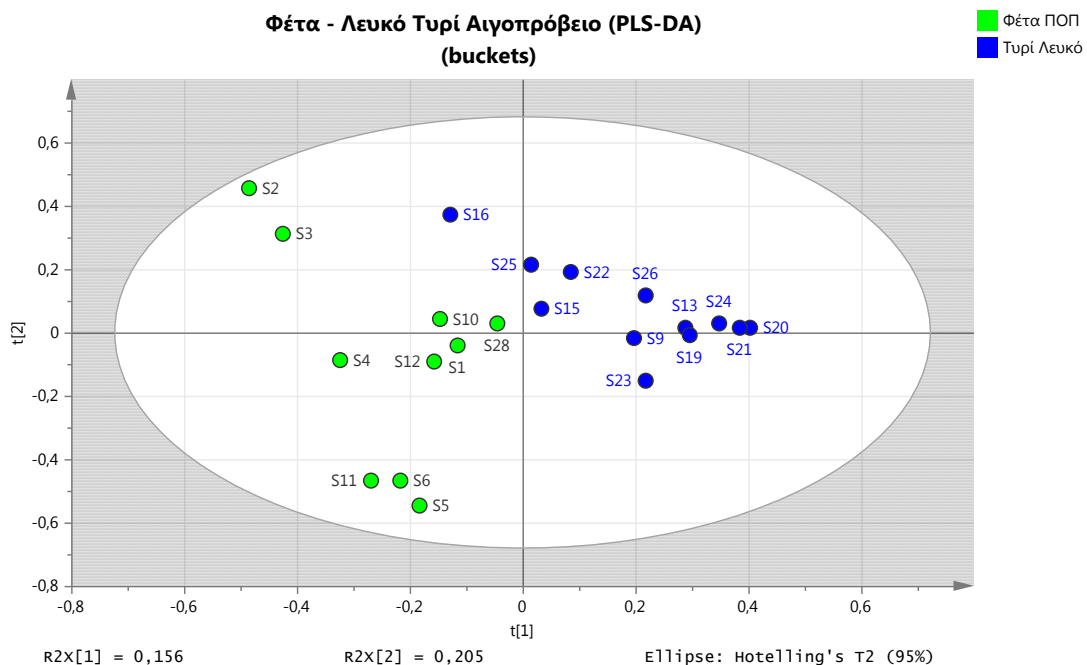
Εικόνα 3.69 Διάγραμμα βαρύτητας όλων των μεταβολιτών για το μοντέλο OPLS-DA

	SS	DF	MS	F	p	SD
Total corr.	21	21	1			1
Regression	11,8431	6	1,97385	3,23339	0,0304134	1,40494
Residual	9,15688	15	0,610459			0,781319

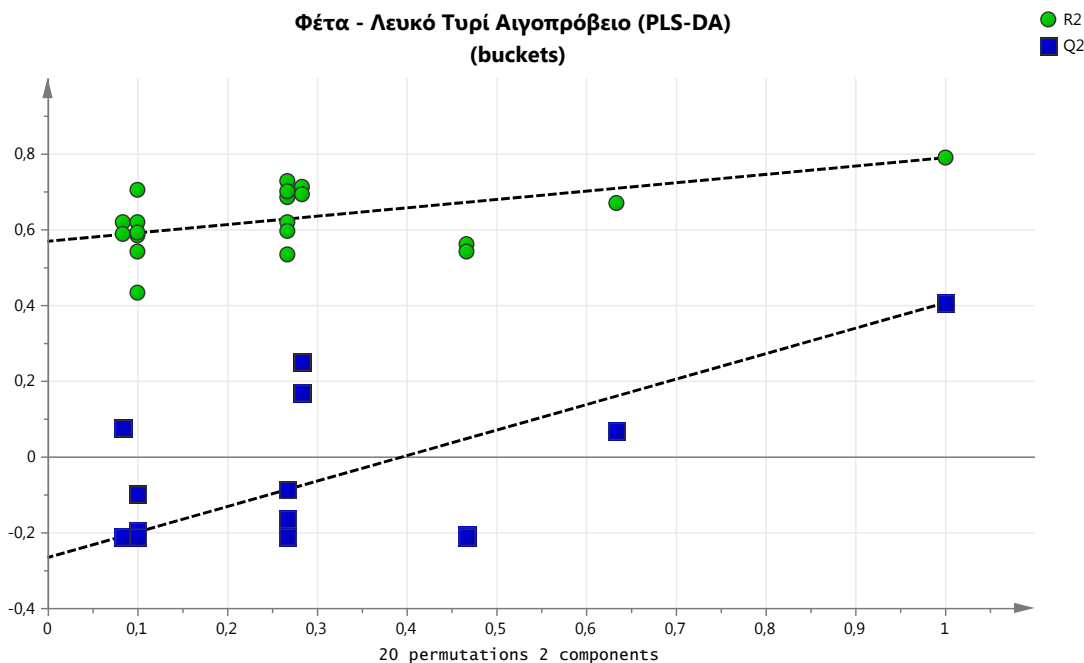
Πίνακας 3.23 Ανάλυση CV-ANOVA

Από την ανάλυση CV-Απονοα των μεταβλητών του μοντέλου της εικόνας 3.68 το p είναι ίσο με 0,0304 δηλαδή η πιθανότητα το μοντέλο να προέκυψε ως τυχαίο αποτέλεσμα είναι περίπου του 3%.

Στη συνέχεια, τα φασματικά δεδομένα (buckets) των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη ενός ακόμα μοντέλου, με ανάλυση διακριτότητας μερικών ελάχιστων τετραγώνων (PLS-DA). Η ανάλυση αυτή επιλέχθηκε με σκοπό να επιβεβαιωθεί η αξιοπιστία και η εγκυρότητα των προηγούμενων μοντέλων με επαλήθευση, που πραγματοποιείται μέσω έλεγχου των αποτελεσμάτων που προκύπτουν αν μετατεθεί η επιλεγμένη μεταβλητή Y (permutations). Το διάγραμμα PLS-DA που προκύπτει καθώς και τα αντίστοιχα permutations παρουσιάζονται στην εικόνα 3.70 και εικόνα 3.71.



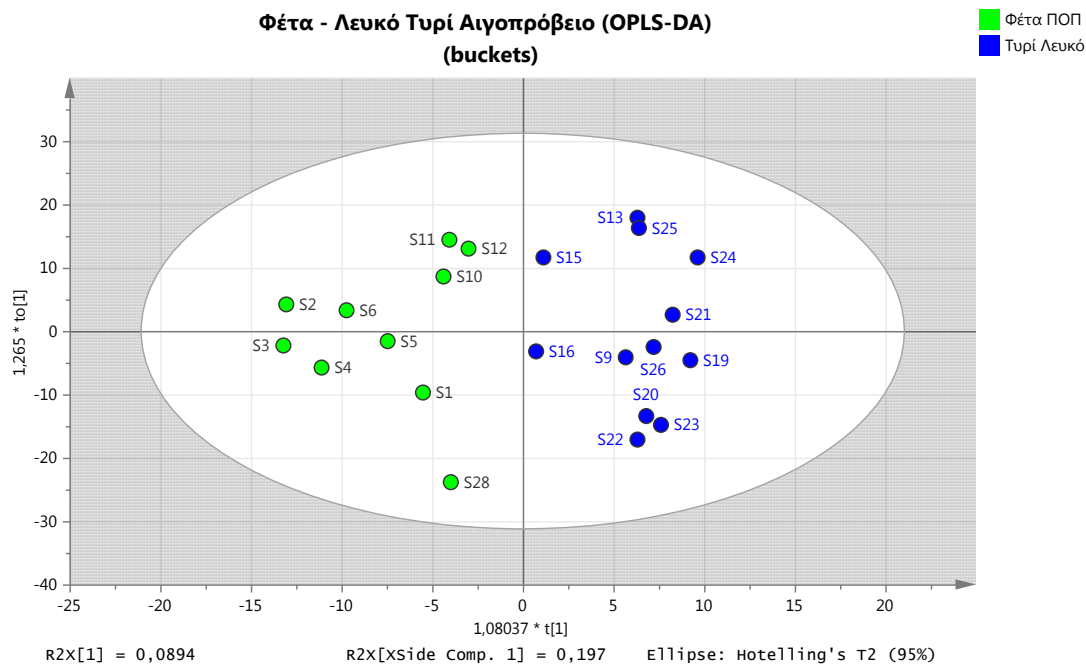
Εικόνα 3.70 Διάγραμμα ανάλυσης PLS-DA για τις κατηγορίες Φέτα - Λευκό τυρί Αιγοπρόβειο



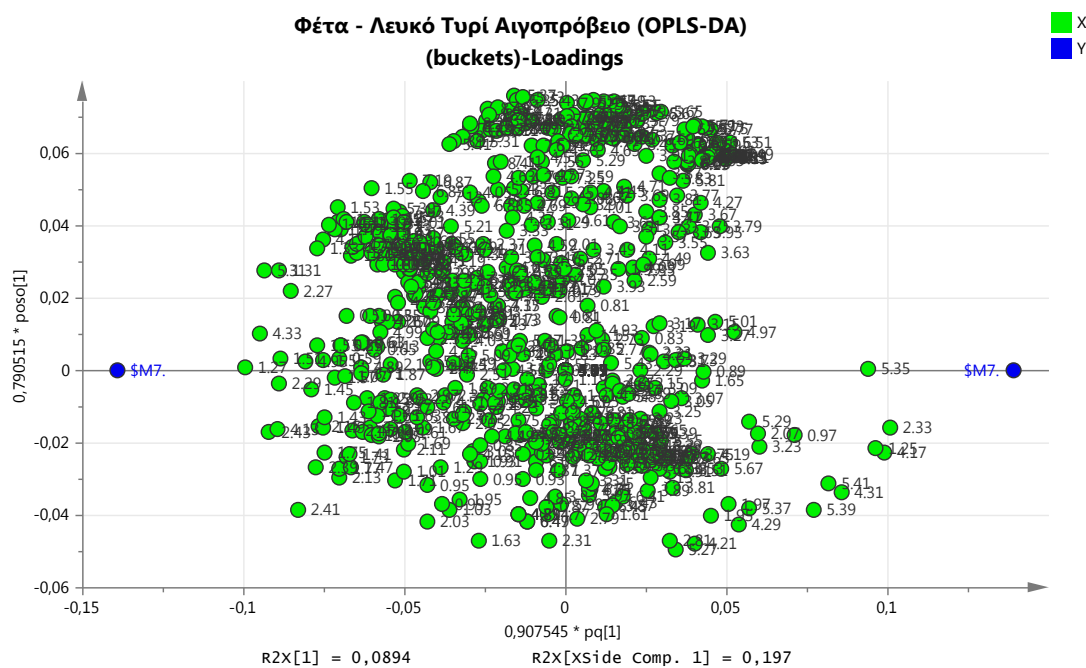
Εικόνα 3.71 Διάγραμμα permutations PLS-DA για τις κατηγορίες Φέτα - Λευκό τυρί Αιγοπρόβειο

Παρατηρούμε ότι υπάρχει διαφοροποίηση των δειγμάτων όπως συμβαίνει και στα μοντέλα OPLS-DA με διαχωρισμό ($R^2X=0,36$, $R^2Y=0,789$) και η προβλεπτική ικανότητα (Q^2) του μοντέλου είναι χαμηλή και ίση με 0,405. Επίσης, είναι φανερό ότι το μοντέλο που αναπτύχθηκε παρουσιάζει την μεγαλύτερη δυνατή διαχωριστική ικανότητα σε συνδυασμό με τα βέλτιστα Q^2 και R^2 που προκύπτουν, επικυρώνοντας τη στατιστική σταθερότητα και τη μοναδικότητα του μοντέλου αυτού, όσο και των προηγούμενων αντίστοιχων μεταβολομικών μοντέλων OPLS-DA.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε η σύσταση ενός ακόμα μοντέλου OPLS-DA επιλέγοντας την προκατεργασία των δεδομένων με την UV κλίμακα αντί για Pareto (η οποία συνηθίζεται να χρησιμοποιείται για την ανάλυση με buckets), και χρησιμοποιώντας LOG-transformation στα πειραματικά δεδομένα των buckets. Η προσπάθεια αυτή αποσκοπεί στην εξέταση των ορίων της στατιστικής ανάλυσης των δεδομένων και την επίδραση της ισχυρής προκατεργασίας των δεδομένων. Το μοντέλο OPLS-DA που αναπτύχθηκε είχε $R^2X=0,286$, $R^2Y=0,823$ και $Q^2=0,389$.



Εικόνα 3.72 Διάγραμμα ανάλυσης PLS-DA με UV-scale για τις κατηγορίες Φέτα - Λευκό τυρί Αιγοπρόβειο



Εικόνα 3.73 Διάγραμμα βαρύτητας όλων των μεταβολιτών για το μοντέλο OPLS-DA

	SS	DF	MS	F	p	SD
Total corr.	21	21	1			1
Regression	8,16019	4	2,04005	2,70104	0,0657127	1,4283
Residual	12,8398	17	0,755283			0,86907

Πίνακας 3.24 Ανάλυση CV-ANOVA

Όπως και στο μοντέλο OPLS-DA με κλιμάκωση Pareto, έτσι και αυτό το μοντέλο εμφανίζεται να διαφοροποιεί πλήρως τα δείγματα. Η επικύρωση του μοντέλου αυτού με τη μέθοδο CV-Απονα έδειξε ότι στο μοντέλο αυτό το p είναι ίσο περίπου με 0,0657, δηλαδή το μοντέλο εμφανίζει πιθανότητα μικρότερη από 6,6% να προέκυψε με τυχαίο τρόπο. Η τιμή $p=0,0657$ είναι λίγο μεγαλύτερη από το συνήθως χρησιμοποιούμενο όριο στατιστικής σημασίας 0,05, και είναι μεγαλύτερη από την τιμή που προέκυψε από το αντίστοιχο μοντέλο με Pareto scaling ($p=0,03$), υποδεικνύοντας ότι η ισχυρή προκατεργασία των πειραματικών δεδομένων, μπορεί να οδηγήσει σε στατιστικά μοντέλα διαχωρισμού, τα οποία διαθέτουν μικρότερη στατιστική σημαντικότητα.

Τέλος, επιχειρήθηκε να γίνει μια ακόμα επικύρωση και διασταύρωση των αποτελεσμάτων ανάμεσα στη στοχευμένη και μη στοχευμένη ανάλυση. Αρχικά, βρέθηκαν τα buckets που συνεισφέρουν στο διαχωρισμό της εκάστοτε κατηγορίας, και οι κορυφές στο φάσμα που αντιστοιχούν όπου αυτό ήταν εφικτό. Έπειτα, έγινε προσπάθεια να συσχετιστούν με τους στατιστικά σημαντικούς μεταβολίτες ($VIP>1$) που προέκυψαν στη στοχευμένη ανάλυση. Ωστόσο, η δυνατότητα να πραγματοποιηθεί ο παραπάνω έλεγχος, υπήρχε μόνο για τον διαχωρισμό με βάση τον τύπο γάλακτος, δηλαδή, αιγοπρόβειο - αγελαδινό, διότι, στις υπόλοιπες κατηγορίες δεν συστάθηκαν τα αντίστοιχα μοντέλα στη στοχευμένη και στη μη στοχευμένη ανάλυση.

Αναλυτικότερα, στο υδατικό εκχύλισμα οι μεταβολίτες που βρέθηκαν να συσχετίζονται θετικά με το αιγοπρόβειο γάλα, στη στοχευμένη ανάλυση, ήταν η λευκίνη, η βαλίνη, η αλανίνη, η ουρακίλη και η φαινυλαλανίνη. Οι αντίστοιχοι μεταβολίτες, στη μη στοχευμένη ανάλυση, ήταν το λακτικό (1,37 και 4,21), η λευκίνη (0,97 και 0,95), η βαλίνη (1,01, 0,99 και 1,03) και το γ -αμινοβουτυρικό (2,35). Οι μεταβολίτες με τη μεγαλύτερη συνεισφορά που συσχετίζονται θετικά με το αγελαδινό γάλα, στη στοχευμένη ανάλυση, ήταν η γαλακτόζη και η γλυκόζη, ($1>VIP>0,7$). Οι αντίστοιχοι μεταβολίτες, στη μη στοχευμένη ανάλυση, ήταν το λακτικό (1,35 και 1,33), η γλυκόζη (3,67), η λακτόζη (3,77, 3,95, 3,79, 3,55) και η γαλακτόζη (3,65 και 3,81). Να σημειωθεί ότι λόγω του μεγάλου αριθμού buckets, δόθηκε έμφαση σε αυτά που εμφανίζουν συνεισφορά $VIP>2$.

Αντίστοιχα, στο άπολο εκχύλισμα οι μεταβολίτες που βρέθηκαν να συσχετίζονται θετικά με το αιγοπρόβειο γάλα, στη στοχευμένη ανάλυση, ήταν το λινολενικό, τα trans λιπαρά και το λινολεϊκό. Οι αντίστοιχοι μεταβολίτες, στη μη στοχευμένη ανάλυση, ήταν τα συνολικά λιπαρά (1,25, 2,33, 2,31, 1,61) και τα λιπαρά εκτός n-3/βουτυρικό (0,87) με $VIP>2$, τα άκορεστα trans λιπαρά (1,95, 5,37 και 1,97) και τα τριγλυκερίδια (4,31) με $1,5>VIP>1$. Οι μεταβολίτες με τη μεγαλύτερη συνεισφορά που συσχετίζονται θετικά με το αγελαδινό γάλα, στη στοχευμένη ανάλυση, ήταν ο IV (βαθμός ακορεστότητας), τα 1,2-διγλυκερίδια, οι στερόλες και το ολεϊκό. Οι αντίστοιχοι μεταβολίτες, στη μη στοχευμένη ανάλυση,

ήταν τα συνολικά λιπαρά (1,27, 1,31 και 1,33) και τα ακόρεστα cis λιπαρά (2,01 και 5,33) με VIP>2.

Από τα παραπάνω, γίνεται αντιληπτό ότι υπάρχει σύνδεση ανάμεσα στα αποτελέσματα των δύο μεθόδων, στοχευμένης και μη στοχευμένης ανάλυσης, τόσο στους μεταβολίτες του υδατικού όσο και στους μεταβολίτες του άπολου εκχυλίσματος.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία, η Φασματοσκοπία NMR χρησιμοποιήθηκε για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση δειγμάτων λευκών τυριών άλμης με σκοπό την διερεύνηση της πιθανής διαφοροποίησής τους ως προς το τύπο γάλακτος και τη γεωγραφική προέλευση με βάση την χημική σύσταση. Τα λευκά τυριά προέρχονταν από διάφορες περιοχές της Ελλάδος, ηπειρωτικής και νησιώτικης, και είχαν παραχθεί σε διάφορες μικρές και μεγάλες τοπικές τυροκομικές μονάδες. Ο χρόνος ωρίμανσης δεν αποτελεί παράγοντα διαφοροποίησης καθώς κυμαινόταν μεταξύ 2 και 3 μηνών.

Ο βασικός στόχος της εργασίας ήταν η ανίχνευση, η ταυτοποίηση και ο ποσοτικός προσδιορισμός του μεταβολομικού προφίλ της Φέτας και των λευκών τυριών άλμης. Επίσης εξετάστηκε η διαφοροποίηση των δειγμάτων σύμφωνα με τον τύπο γάλακτος, αιγοπρόβειο ή αγελαδινό, καθώς και το είδος τυριού (φέτα, λευκό τυρί) γεγονός που συνδέεται με την προέλευση, αφού αυτή καθορίζει αν ένα λευκό τυρί άλμης από αιγοπρόβειο γάλα αποτελεί προϊόν ΠΟΠ, δηλαδή φέτα.

Τα δείγματα των τυριών επεξεργάστηκαν με κατάλληλες διαδικασίες ώστε να ληφθούν φάσματα NMR για τα υδατικά και άπολα εκχυλίσματά τους, τα οποία μελετήθηκαν ποιοτικά και ποσοτικά. Αφού έγινε η ταυτοποίηση των ενώσεων, τα φάσματα των εκχυλισμάτων ολοκληρώθηκαν με κατάλληλο λογισμικό και υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις των ενώσεων ανά γραμμάριο τυριού και η ποσοστιαία περιεκτικότητα, για τις υδατικές και λιπαρές ενώσεις, αντίστοιχα. Χρησιμοποιώντας αυτά τα αποτελέσματα έγινε Στοχευμένη και Μη Στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση του μεταβολομικού προφίλ των δειγμάτων τυριού, με διάφορες πολυπαραμετρικές στατιστικές μεθόδους ανάλυσης (Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών PCA, Ανάλυση Διακριτότητας Ορθογωνικών Μερικών Ελάχιστων Τετραγώνων OPLS-DA, Ανάλυση Διακριτότητας Μερικών Ελάχιστων Τετραγώνων PLS-DA), ώστε να αποκαλυφθούν τυχόν υπάρχουσες διαφοροποιήσεις μεταξύ των διαφόρων κατηγοριών δειγμάτων.

Ο προσδιορισμός του πλήρους μεταβολομικού προφίλ των δειγμάτων των λευκών τυριών έδειξε ότι δεν υπάρχουν σημαντικές ποιοτικές διαφορές της χημικής σύστασης ανάμεσα στα λευκά τυριά άλμης. Ωστόσο, υπάρχει αβεβαιότητα για κάποια δείγματα το οποίο οφείλεται στο ότι οι κορυφές των σακχάρων στη περιοχή 3,3-4ppm, σε ένα αριθμό δειγμάτων δημιουργούν επικαλύψεις με αμινοξέα που εμφανίζουν κορυφές στην ίδια περιοχή του φάσματος. Για το λόγο αυτό, δεν είναι δυνατό να γνωρίσουμε αν κάποιοι μεταβολίτες, που εμφανίζουν κορυφές μόνο σε αυτή την περιοχή, όπως η γλυκερόλη και η γλυκίνη, υπάρχουν αλλά επικαλύπτονται ή δεν υπάρχουν καθόλου. Αντίθετα, προσδιορίστηκαν σημαντικές ποσοτικές διαφορές στο μεταβολομικό προφίλ των δειγμάτων λευκών τυριών τόσο του υδατικού, όσο και του άπολου εκχυλίσματος. Ο υπολογισμός των μέσων τιμών των μεταβολιτών ανά κατηγορία (τύπος τυριού, τύπος γάλακτος) έδειξε μεγάλες, αλλά μη συστηματικές διαφορές ανάμεσα στις κατηγορίες που μελετήθηκαν (Φέτα - λευκό

τυρί Κρήτης, Αιγοπρόβειο - Αγελαδινό, λευκό τυρί αιγοπρόβειο - λευκό τυρί αγελαδινό, Φέτα - λευκό τυρί αιγοπρόβειο).

Με την ανάλυση των μεταβολομικών δεδομένων των λευκών τυριών άλμης με πολυπαραμετρικές στατιστικές μεθόδους ανάλυσης, έγιναν πιο ευδιάκριτες οι διαφοροποιήσεις ανάμεσα στις πιο πάνω κατηγορίες δειγμάτων όπως υπολογίστηκαν με τη μεταβολομική φασματοσκοπία NMR. Η διαφοροποίηση αυτή εντείνεται στις κατηγορίες όπου υπεισέρχεται ο παράγοντας του τύπου γάλακτος, γεγονός καθόλου απρόσμενο, ενισχύοντας την προβλεπτική ικανότητα των μοντέλων. Συγκεκριμένα, η ανάλυση των μεταβολικών προφίλ των τυριών με την μέθοδο της μη επιβλεπόμενης Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών έδειξε ότι υπάρχει ομαδοποίηση, αλλά όχι διαχωρισμός των δειγμάτων με βάση τον τύπο γάλακτος. Η επιβλεπόμενη μέθοδος OPLS-DA έδωσε καλύτερα αποτελέσματα, τόσο με την χρήση του άπολου όσο και του πλήρους μεταβολικού προφίλ των δειγμάτων, ωστόσο από τα μοντέλα OPLS-DA που προέκυψαν είχαν ικανοποιητική προβλεπτική ικανότητα Q^2 μόνο τα μοντέλα του άπολου εκχυλίσματος. Το γεγονός αυτό επικυρώνεται και από την στατιστική ανάλυση Ανονα των ποσοτικών δεδομένων, όπου είναι φανερό ότι η σημαντικότερες στατιστικές διαφορές εντοπίζονται στους μεταβολίτες του άπολου εκχυλίσματος.

Η μη στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση των φασματικών δεδομένων NMR, κατά την οποία δεν απαιτείται προηγούμενη ταυτοποίηση των ενώσεων στα υδατικά και άπολα εκχυλίσματα, έδωσε πολύ καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά την διαφοροποίηση των λευκών τυριών άλμης, τόσο σε επίπεδο μη επιτηρούμενης ανάλυσης PCA, όσο και με την επιτηρούμενη ανάλυση OPLS-DA. Αναλυτικότερα, από τα μοντέλα που αναπτύχθηκαν με βάση τα φάσματα (σε μορφή buckets) των εκχυλισμάτων των δειγμάτων για τις κατηγορίες τυριών που μελετήθηκαν προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα:

Τα μοντέλα OPLS-DA που προέκυψαν από τα εκχυλίσματα των δειγμάτων για τις κατηγορίες φέτα – λευκό τυρί Κρήτης (αιγοπρόβειο), έδειξαν ότι υπάρχει διαχωρισμός με ικανοποιητική προβλεπτική ικανότητα μετά από εσωτερική επικύρωση ($Q^2 = 0,558$), και αυτό συγκρίθηκε με την ανεξάρτητη επικύρωσή με τη μέθοδο CV-Ανονα ($p=0,08$). Για το διαχωρισμό με βάση τον τύπο γάλακτος για τις κατηγορίες Αιγοπρόβειο - Αγελαδινό, έδειξαν ότι υπάρχει και πάλι διαχωρισμός με υψηλή προβλεπτική ικανότητα μετά από εσωτερική επικύρωση ($Q^2 = 0,579$), και αυτό επιβεβαιώθηκε από την ανεξάρτητη επικύρωσή του με τη μέθοδο CV-Ανονα ($p=0,0015$). Στις κατηγορίες λευκό τυρί αιγοπρόβειο – λευκό τυρί αγελαδινό και φέτα – λευκό τυρί αιγοπρόβειο, τα μοντέλα μη επιτηρούμενης ανάλυσης PCA, τα οποία συστάθηκαν για το άπολο εκχύλισμα των δειγμάτων είχαν ικανοποιητική προβλεπτική ικανότητα μετά από εσωτερική επικύρωση (Q^2 0,508 και 0,516 αντίστοιχα). Ακόμα, στη δεύτερη κατηγορία, στα μοντέλα OPLS-DA που συστάθηκαν, προέκυψε διαχωρισμός με υψηλή προβλεπτική ικανότητα μετά από εσωτερική επικύρωση (Q^2 0,605 και 0,564), και αυτό επιβεβαιώθηκε από την ανεξάρτητη επικύρωσή του με τη μέθοδο CV-Ανονα ($p=0,03$)

Τέλος, η παρούσα διατριβή απέδειξε ότι η Φασματοσκοπία NMR είναι ένα πολύ σημαντικό και χρήσιμο εργαλείο στην ανάλυση της σύστασης λευκών τυριών άλμης. Τα μεταβολομικά δεδομένα NMR μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη πολυπαραμετρικών στατιστικών μοντέλων ανάλυσης με στόχο την αυθεντικοποίηση της Π.Ο.Π. Φέτας, την μελέτη της επίδρασης του τύπου γάλακτος και της επίδρασης της γεωγραφικής προέλευσης του γάλακτος.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Εφημερίδα της Κυβερνήσεως της Ελληνικής Δημοκρατίας. *Υπ. Απόφαση Αριθ. 313025* Τεύχος Δεύτερο Αρ. Φύλλου 8 11/01/1994
2. Cevallos-Cevallos, J. M., Reyes-De-Corcuera, J. I., Etxeberria, E., Danyluk, M. D. & Rodrick, G. E. Metabolomic analysis in food science: a review. *Trends Food Sci. Technol.* **20**, 557–566 (2009).
3. Arvanitoyannis, I. Application of quality control methods for assessing wine authenticity: Use of multivariate analysis (chemometrics). *Trends Food Sci. Technol.* **10**, 321–336 (1999).
4. Pearson, K. LIII. *On lines and planes of closest fit to systems of points in space.* *Philos. Mag. Ser. 6* **2**, 559–572 (1901).
5. Oliveri, P. & Forina, M. Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications data, chap.2, analysis and chemometrics. (2012).
6. Wold, H. Estimation of principal components and related models by iterative least squares. *Multivar. Anal.* **1**, 391–420 (1966).
7. Abdi, H. Partial Least Square Regression PLS-Regression. *Neil Salkind SAGE Publ. Inc* (2007).
8. Trygg, J. & Wold, S. Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). *J. Chemom.* **16**, 119–128 (2002).
9. Spyros, A. & Dais, P. *NMR spectroscopy in food analysis.* (RSC Publ, 2013).
10. Agiomyrgianaki, A., Petrakis, P. V. & Dais, P. Influence of harvest year, cultivar and geographical origin on Greek extra virgin olive oils composition: A study by NMR spectroscopy and biometric analysis. *Food Chem.* **135**, 2561–2568 (2012).
11. Vigli, G., Philippidis, A., Spyros, A. & Dais, P. Classification of Edible Oils by Employing ^{31}P and ^1H NMR Spectroscopy in Combination with Multivariate Statistical Analysis. A Proposal for the Detection of Seed Oil Adulteration in Virgin Olive Oils. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 5715–5722 (2003).
12. Sobolev, A. P. *et al.* NMR-Metabolic Methodology in the Study of GM Foods. *Nutrients* **2**, 1–15 (2010).

13. Abdel-Farid, I. B., Kim, H. K., Choi, Y. H. & Verpoorte, R. Metabolic Characterization of *Brassica rapa* Leaves by NMR Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 7936–7943 (2007).
14. Di Anibal, C. V., Ruisánchez, I. & Callao, M. P. High-resolution ¹H Nuclear Magnetic Resonance spectrometry combined with chemometric treatment to identify adulteration of culinary spices with Sudan dyes. *Food Chem.* **124**, 1139–1145 (2011).
15. Ritota, M., Marini, F., Sequi, P. & Valentini, M. Metabolomic Characterization of Italian Sweet Pepper (*Capsicum annum* L.) by Means of HRMAS-NMR Spectroscopy and Multivariate Analysis. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 9675–9684 (2010).
16. Spraul, M. *et al.* Mixture analysis by NMR as applied to fruit juice quality control. *Magn. Reson. Chem.* **47**, S130–S137 (2009).
17. Anders, U., Tittgemeier, F. & Hailer, G. ¹H-NMR determination of ethanol in wine, winelike beverages, and liquors (author's transl). *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **162**, 21–24 (1976).
18. Hong, Y.-S. NMR-based metabolomics in wine science: NMR in wine science. *Magn. Reson. Chem.* **49**, S13–S21 (2011).
19. Αμαργιανιτάκη Μ. Ανάλυση και βελτιστοποίηση της διαδικασίας παλαίωσης του οίνου με τη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR. *Πανεπιστήμιο Κρήτης Τμήμα Χημείας* (2015).
20. Almeida, C. *et al.* Composition of Beer by ¹H NMR Spectroscopy: Effects of Brewing Site and Date of Production. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 700–706 (2006).
21. Rodrigues, J. A., Barros, A. S., Carvalho, B., Brandão, T. & Gil, A. M. Probing beer aging chemistry by nuclear magnetic resonance and multivariate analysis. *Anal. Chim. Acta* **702**, 178–187 (2011).
22. Fotakis, C. *et al.* NMR metabolite profiling of Greek grape marc spirits. *Food Chem.* **138**, 1837–1846 (2013).
23. Petrakis, P. *et al.* Authenticity of the Traditional Cypriot Spirit ‘Zivania’ on the Basis of ¹H NMR Spectroscopy Diagnostic Parameters and Statistical Analysis. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 5293–5303 (2005).

24. Wei, F. *et al.* ^{13}C NMR-Based Metabolomics for the Classification of Green Coffee Beans According to Variety and Origin. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 10118–10125 (2012).
25. Ohno, A., Oka, K., Sakuma, C., Okuda, H. & Fukuhara, K. Characterization of Tea Cultivated at Four Different Altitudes Using ^1H NMR Analysis Coupled with Multivariate Statistics. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 5181–5187 (2011).
26. Jung, Y. *et al.* Discrimination of the Geographical Origin of Beef by ^1H NMR-Based Metabolomics. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 10458–10466 (2010).
27. Karoui, R. & Debaerdemaeker, J. A review of the analytical methods coupled with chemometric tools for the determination of the quality and identity of dairy products. *Food Chem.* **102**, 621–640 (2007).
28. Brescia, M. Characterisation of the geographical origin of buffalo milk and mozzarella cheese by means of analytical and spectroscopic determinations. *Food Chem.* **89**, 139–147 (2005).
29. Gianferri, R., Maioli, M., Delfini, M. & Brosio, E. A low-resolution and high-resolution nuclear magnetic resonance integrated approach to investigate the physical structure and metabolic profile of Mozzarella di Bufala Campana cheese. *Int. Dairy J.* **17**, 167–176 (2007).
30. de Angelis Curtis, S. *et al.* Amino acid profile in the ripening of Grana Padano cheese: a NMR study. *Food Chem.* **71**, 495–502 (2000).
31. Consonni, R. & Cagliani, L. R. Ripening and geographical characterization of Parmigiano Reggiano cheese by ^1H NMR spectroscopy. *Talanta* **76**, 200–205 (2008).
32. Vezzani, M. *et al.* ^1H -NMR spectra—a highly sensitive tool in the analysis of Grana Parmigiano-Reggiano type hard cheese. *Agro FOOD Ind. Hi Tech* **26**, 3 (2015).
33. Schievano, E., Pasini, G., Cozzi, G. & Mammi, S. Identification of the Production Chain of Asiago d'Allevo Cheese by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Principal Component Analysis. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 7208–7214 (2008).
34. Scano, P. *et al.* ^1H - and ^{13}C -NMR Characterization of the Molecular Components of the Lipid Fraction of Pecorino Sardo Cheese. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **88**, 1305–1316 (2011).

35. Piras, C. *et al.* A NMR metabolomics study of the ripening process of the Fiore Sardo cheese produced with autochthonous adjunct cultures. *Food Chem.* **141**, 2137–2147 (2013).
36. Pisano, M. B., Scano, P., Murgia, A., Cosentino, S. & Caboni, P. Metabolomics and microbiological profile of Italian mozzarella cheese produced with buffalo and cow milk. *Food Chem.* **192**, 618–624 (2016).
37. Koprivnjak, O., Conte, L., Boschelle, O. & Morassi, S. Validation of diglyceride contents in cheeses using co-ordinated chromatographic techniques. *Z. Für Leb. - Forsch.* **204**, 429–432 (1997).
38. Ziino, M., Condurso, C., Romeo, V., Giuffrida, D. & Verzera, A. Characterization of ‘Provola dei Nebrodi’, a typical Sicilian cheese, by volatiles analysis using SPME-GC/MS. *Int. Dairy J.* **15**, 585–593 (2005).
39. Bütikofer, U. & Fuchs, D. Development of free amino acids in Appenzeller, Emmentaler, Gruyère, Raclette, Sbrinz and Tilsiter cheese. *Le Lait* **77**, 91–100 (1997).
40. McQueen, D. H., Wilson, R., Kinnunen, A. & Jensen, E. P. Comparison of two infrared spectroscopic methods for cheese analysis. *Talanta* **42**, 2007–2015 (1995).
41. Chen, M. & Irudayaraj, J. Sampling Technique for Cheese Analysis by FTIR Spectroscopy. *J. Food Sci.* **63**, 96–99 (1998).
42. Chen, M., Irudayaraj, J. & McMahon, D. J. Examination of Full Fat and Reduced Fat Cheddar Cheese During Ripening by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *J. Dairy Sci.* **81**, 2791–2797 (1998).
43. Rodriguez-Saona, L. E., Koca, N., Harper, W. J. & Alvarez, V. B. Rapid Determination of Swiss Cheese Composition by Fourier Transform Infrared/Attenuated Total Reflectance Spectroscopy. *J. Dairy Sci.* **89**, 1407–1412 (2006).
44. Martín-del-Campo, S. T., Picque, D., Cosío-Ramírez, R. & Corrieu, G. Middle infrared spectroscopy characterization of ripening stages of Camembert-type cheeses. *Int. Dairy J.* **17**, 835–845 (2007).
45. Adamopoulos, K. G., Goula, A. M. & Petropakis, H. J. Quality Control During Processing of Feta Cheese—NIR Application. *J. Food Compos. Anal.* **14**, 431–440 (2001).

46. Valsamaki, K., Michaelidou, A. & Polychroniadou, A. Biogenic amine production in Feta cheese. *Food Chem.* **71**, 259–266 (2000).
47. Moatsou, G., Massouras, T., Kandarakis, I. & Anifantakis, E. Evolution of proteolysis during the ripening of traditional Feta cheese. *Le Lait* **82**, 601–611 (2002).
48. Michaelidou, A., Alichanidis, E., Urlaub, H., Polychroniadou, A. & Zerfiridis, G. K. Isolation and Identification of Some Major Water-soluble Peptides in Feta Cheese. *J. Dairy Sci.* **81**, 3109–3116 (1998).
49. Katsiari, M. ., Voutsinas, L. ., Alichanidis, E. & Roussis, I. . Lipolysis in reduced sodium Feta cheese made by partial substitution of NaCl by KCl. *Int. Dairy J.* **10**, 369–373 (2000).
50. Kondyli, E., Katsiari, M. ., Masouras, T. & Voutsinas, L. . Free fatty acids and volatile compounds of low-fat Feta-type cheese made with a commercial adjunct culture. *Food Chem.* **79**, 199–205 (2002).
51. Katsiari, M. C. & Voutsinas, L. P. Manufacture of low-fat Feta cheese. *Food Chem.* **49**, 53–60 (1994).
52. Kaniou-Grigoriadou, I., Eleftheriadou, A., Mouratidou, T. & Katikou, P. Determination of aflatoxin M1 in ewe's milk samples and the produced curd and Feta cheese. *Food Control* **16**, 257–261 (2005).
53. Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetakis, N. & Vafopoulou-Mastrojiannaki, A. Effect of the type of lactic starter on microbiological, chemical and sensory characteristics of Feta cheese. *Food Microbiol.* **10**, 31–41 (1993).
54. Rantsiou, K., Urso, R., Dolci, P., Comi, G. & Cocolin, L. Microflora of Feta cheese from four Greek manufacturers. *Int. J. Food Microbiol.* **126**, 36–42 (2008).