



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

**«Η μεταβολωμική ανάλυση των υδρόφιλων μεταβολιτών του
κελυφωτού φιστικιού (*Pistacia vera L.*) ως εργαλείο
ελέγχου της γεωγραφικής του προέλευσης»**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΜΑΡΙΑΝΘΗ Α. ΘΥΜΟΥ

ΑΘΗΝΑ, 2019

Αθανάσιος Μαλλούχος, Επίκουρος Καθηγητής (Επιβλέπων)

**«Η μεταβολωμική ανάλυση των υδρόφιλων μεταβολιτών του
κελυφωτού φιστικιού (*Pistacia vera L.*) ως εργαλείο
ελέγχου της γεωγραφικής του προέλευσης»**

**«Metabolomic analysis of the hydrophilic metabolites of
pistachio (*Pistacia vera L.*) as a tool to inspect its geographical
origin»**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΜΑΡΙΑΝΘΗ Α. ΘΥΜΟΥ

ΜΕΛΗ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Αθανάσιος Μαλλούχος, Επίκουρος Καθηγητής (Επιβλέπων)

Χρήστος Παππάς, Αναπληρωτής Καθηγητής

Χρυσανγή Γαρδέλη, Επίκουρη Καθηγήτρια

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η γεωγραφική διαφοροποίηση του φιστικιού Αιγίνης, σε σχέση με τα κελυφωτά φιστίκια (*Pistacia vera L.*) που παράγονται σε άλλες περιοχές της Ελλάδας. Ελήφθησαν αποξηραμένα κελυφωτά φιστίκια από την Αίγινα, την Φθιώτιδα, τα Μέγαρα και την Εύβοια. Αρχικά, έγινε προετοιμασία των δειγμάτων με υγρό άζωτο και πραγματοποιήθηκε άλεση. Ακολούθησε η εκχύλιση των υδρόφιλων μεταβολιτών με χρήση μίγματος οργανικών διαλυτών, σύμφωνα με τροποποιημένη μέθοδο Bligh-Dyer. Έπειτα, ακολούθησε λυοφιλίωση του εκχυλίσματος και σιλυλίωση των υδρόφιλων μεταβολιτών. Τέλος, τα παράγωγα των υδρόφιλων μεταβολιτών προσδιορίστηκαν με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μαζών (GC-MS). Επιπλέον, κατασκευάστηκε βάση δεδομένων φασματομετρίας μαζών και δεικτών κατακράτησης πρότυπων ενώσεων από το εύρος των μεταβολιτών που αναμενόταν να ανιχνευθούν στα δείγματα (σάκχαρα, αμινοξέα, οργανικά οξέα, κτλ). Ακολούθως, τα δεδομένα της φασματομετρίας μαζών επεξεργάστηκαν μέσω των λογισμικών GCMS-Solution, AMDIS και MS-DIAL, προκειμένου να προκύψει μία μήτρα δεδομένων κατάλληλη για στατιστική επεξεργασία με μεθόδους πολυμεταβλητής ανάλυσης με χρήση της διαδικτυακής πλατφόρμας MetaboAnalyst. Αρχικά, τα αποτελέσματα της ανάλυσης των κυρίων συνιστωσών (PCA), καθώς και της μεθόδου των μερικών ελαχίστων τετραγώνων διακριτικής ανάλυσης (PLS-DA), δεν ήταν ικανοποιητικά, καθώς τα δείγματα των διαφορετικών περιοχών δεν διαχωρίζονταν επαρκώς. Για τον λόγο αυτό τα δείγματα χωρίστηκαν σε δύο κατηγορίες, South (Νότια) και North (Βόρεια). Αξίζει να σημειωθεί ότι η ομάδα South αποτελούνταν μόνο από τα δείγματα φιστικιού Αιγίνης. Έτσι, η μέθοδος της ανάλυσης των κυρίων συνιστωσών (PCA), έδωσε πολύ καλύτερο διαχωρισμό των δειγμάτων, ενώ η μέθοδος των μερικών ελαχίστων τετραγώνων διακριτικής ανάλυσης (PLS-DA), διαχώρισε τα δείγματα αλλά η επικύρωση του μοντέλου δεν ήταν ικανοποιητική. Οι μεταβολίτες που εντοπίστηκαν από τα παραπάνω αποτελέσματα, καθώς και από τα t-tests, ως οι πιο σημαντικοί για την διάκριση των δειγμάτων σε South (Νότια) και North (Βόρεια) χρησιμοποιήθηκαν για περαιτέρω στατιστική ανάλυση. Μερικοί από τους μεταβολίτες αυτούς ήταν η τρεαλόζη, γαλακτινόλη, ινοσιτόλη, διάφορα αμινοξέα (γλυκίνη, τυροσίνη, θρεονίνη, αλανίνη, βαλίνη, λευκίνη), ηλεκτρικό οξύ, μαλτόζη, κ.α.. Εφαρμόστηκαν εκ νέου διάφορες μέθοδοι πολυμεταβλητής ανάλυσης (PCA, PLS-DA, OPLS-DA, HCA, K-means clustering), βάσει των οποίων προέκυψε πολύ καλή διαφοροποίηση των δειγμάτων από τις περιοχές North-South. Επιπρόσθετα, τα μοντέλα επικυρώθηκαν μέσω δοκιμών μεταστοιχείωσης. Συμπερασματικά, η μεταβολωμική με χρήση GC-MS, φαίνεται ότι μπορεί να αποτελέσει ένα χρήσιμο εργαλείο για την διάκριση της γεωγραφικής προέλευσης των κελυφωτών φιστικιών. Ωστόσο, λόγω του σχετικά μικρού αριθμού δειγμάτων που εξετάστηκαν, κρίνεται σκόπιμο να διερευνηθεί περαιτέρω η προτεινομένη μεθοδολογία με χρήση μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων από περισσότερες περιοχές της Ελλάδος ή/και άλλων χωρών.

Επιστημονική Περιοχή: μεταβολωμική, αναλυτική χημεία

Λέξεις κλειδιά: μεταβόλωμα, φιστίκι, υδρόφιλοι μεταβολίτες, γεωγραφική προέλευση, αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας, αυθεντικότητα, φιστίκι Αιγίνης

ABSTRACT

The purpose of the present study was to differentiate pistachio nuts (*Pistacia vera* L.) produced in various regions of Greece. Dried peanuts were obtained from Aegina, Fthiotida, Megara and Euboea. Initially, the samples were milled using liquid nitrogen. The hydrophilic polar metabolites were extracted using a mixture of organic solvents according to a modified Bligh-Dyer method. The extract was lyophilized and subsequently the silylated derivatives of the metabolites were produced and determined using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). In addition, a mass spectrometry database and retention indices of model compounds were constructed from the range of metabolites expected to be detected in the samples (sugars, amino acids, organic acids, etc.). Subsequently, the raw mass spectral data were processed using GCMS-Solution, AMDIS and MS-DIAL software, to obtain a data matrix suitable for statistical processing by multivariate analysis methods using the MetaboAnalyst online platform. Initially, the results of principal component analysis (PCA) and partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) were not satisfactory as the samples from the different regions were insufficiently separated. For this reason, the samples were divided into two categories, South and North. It is worth noting that the South group consisted only of pistachios from Aegina region. Thus, PCA gave much better sample separation, while the PLS-DA method separated the samples but the validation of the model was not satisfactory. Thus, the most statistically important metabolites identified by the aforementioned methods, as well as by t-tests, were used for further statistical analysis. Some of these metabolites were trehalose, galactinol, inositol, various amino acids (glycine, tyrosine, threonine, alanine, valine, leucine), succinic acid, maltose, etc. Various multivariate analysis methods were re-applied (PCA, PLS-DA, OPLS-DA, HCA, K-means clustering), which presented very good differentiation of the samples from the North and South regions. In addition, the models were validated by permutation tests. In conclusion, GC-MS metabolomics seems to be a useful tool for distinguishing the geographical origin of pistachio. However, due to the relatively small number of samples examined, it is appropriate to further investigate the proposed methodology using a larger number of samples from more regions of Greece and / or other countries.

Scientific Area: metabolomic, analytical chemistry

Key words: metabolomic, pistachio, hydrophilic metabolites, geographical origin, gas chromatography-mass spectrometry, authenticity, Aegina

Περιεχόμενα

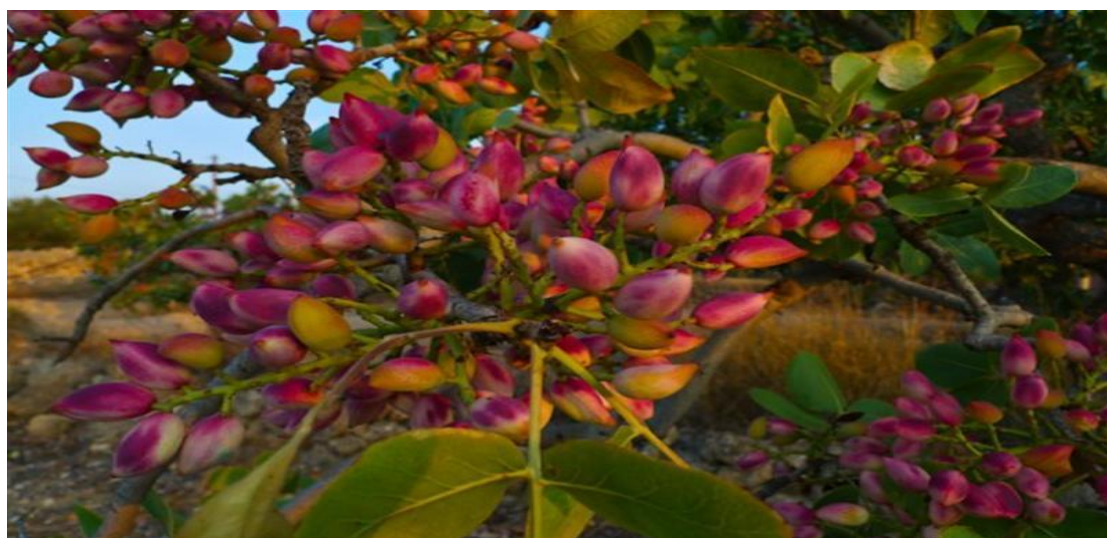
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
1.1. Το φιστίκι	6
1.2.Χρήσεις.....	8
1.3.Σύσταση και διατροφική αξία	8
1.4.Μικροβιολογία	10
1.5. Το ελληνικό φιστίκι.....	10
1.6. Τρόφιμα και αυθεντικότητα	11
1.7. Φιστίκι και μελέτες αυθεντικότητας.....	14
1.8. Μεταβολωμική (Metabolomics).....	16
1.9. Η μεταβολωμική στα τρόφιμα.....	18
1.10. Αέρια Χρωματογραφία/Φασματομετρία Μάζας (GC-MS).....	20
2.ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	23
3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	24
3.1. Πειραματικός σχεδιασμός	24
3.2. Προπαρασκευή Δειγμάτων.....	25
3.3.Ομογενοποίηση παγωμένων φιστικιών	25
3.4. Προετοιμασία ενοποιημένου δείγματος ελέγχου (pooled QC)	25
3.5. Μεταβολωμική ανάλυση με GC-MS.....	26
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	31
4.1. Επεξεργασία δεδομένων.....	31
4.2.Πολυμεταβλητή Ανάλυση	35
4.3. Συμπεράσματα.....	59
5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	60
Ξενόγλωσση βιβλιογραφία.....	60
Διαδίκτυο.....	62

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Το φιστίκι

Το γένος *Pistacia* αποτελείται από 11 είδη από τα οποία το φιστίκι είναι ο μοναδικός εμπορικός βρώσιμος καρπός. Η λατινική ονομασία του φιστικιού είναι *Pistacia vera L.* και πρόκειται για το μέλος με την μεγαλύτερη οικονομική σημασία της οικογένειας των *Anacardiaceae*. Οι φιστικιές είναι μικρού μεγέθους δέντρα που το ύψος τους έχει τη δυνατότητα να φτάσει τα 12m. Τα φύλλα των φιστικιών είναι συνήθως τρία με τέσσερα σε αριθμό και το σχήματος είναι ωοειδές ή επίμηκες πράσινου χρώματος. Η φιστικιά μπορεί να αναπτυχθεί σε στέπες και σε ημιερήμους. Πρόκειται για ένα φυλλοβόλο δέντρο στο οποίο βρίσκονται μόνο θηλυκά άνθη ή μόνο αρσενικά. Τα άνθη της φιστικιάς δεν έχουν πέταλα. Τα θηλυκά άνθη δεν έχουν νέκταρ και δεν μπορούν να προσελκύσουν μέλισσες. Τα φιστίκια αναπτύσσονται από το πρώτο έτος του δέντρου. Υπάρχει διαφοροποίηση στην χρονική περίοδο που αναπτύσσεται ο καρπός ανάλογα με την περιοχή και την ποικιλία (Bartzas & Komnitsas, 2017).

Το φιστίκι έχει σχήμα ωοειδές. Αποτελείται από το περικάρπιο, το οποίο περιβάλλει ένα σκληρό κέλυφος (το ενδοκάρπιο). Το περικάρπιο και το ενδοκάρπιο είναι μη βρώσιμα μέρη του καρπού. Μέσα στο ενδοκάρπιο βρίσκεται κλεισμένος ο βρώσιμος πυρήνας, οποίος καλύπτεται από ένα λεπτό και μαλακό στρώμα.



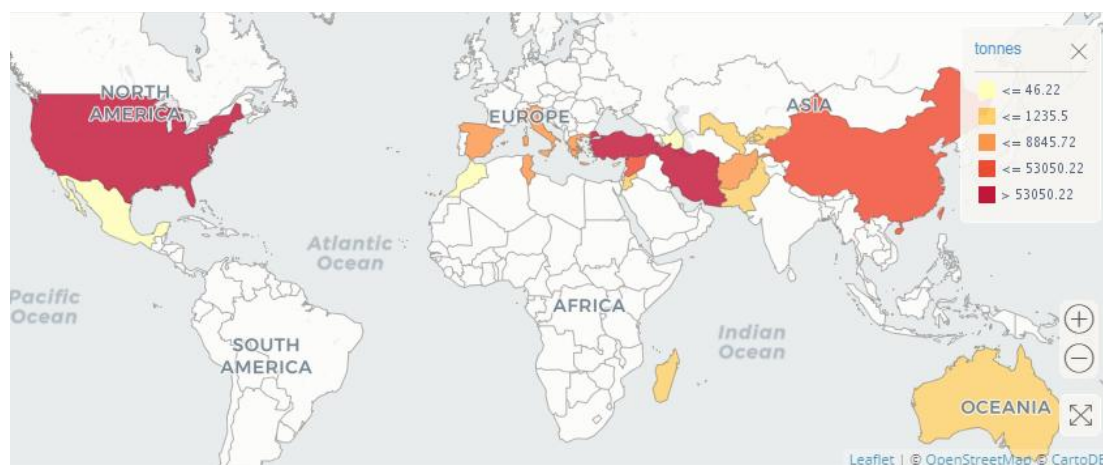
Εικόνα 1.1: Φιστικιά στην Φθιώτιδα (www.kelyfotafystikia-lamia.4ty.gr)

Η εμπορική παραγωγή φιστικιών γίνεται σε 18 χώρες παγκοσμίως. Σήμερα το γένος *Pistacia Vera L.* Αναπτύσσεται σε πολλές χώρες παγκοσμίως. Τα τελευταία 25 χρόνια υπάρχει αύξηση στην παραγωγή φιστικιών (www.fao.org). Η πρώτη παραγωγός χώρα παγκοσμίως είναι το Ιράν και ακολουθούν η ΗΠΑ και η Τουρκία. Στην Ευρώπη η πρώτη χώρα σε παραγωγή φιστικιού είναι η Ελλάδα και ακολουθεί η Ιταλία. Στην Ελλάδα το γένος *Pistacia Vera L.* παράγεται στην Φθιώτιδα, στην Εύβοια, στον Βόλο, στα Μέγαρα, στην Αίγινα, στην Θεσσαλία και στην Χαλκιδική (Bartzas & Komnitsas, 2017)



Εικόνα 1.2: Φιστίκια με κέλυφος μετά από ξήρανση (www.faros-24.gr).

Στην Ελλάδα το 2017 παράχθηκαν 12300 τόνοι φιστικιών και βρίσκεται στην έκτη θέση της παγκόσμιας κατάταξης σύμφωνα με τον FAO. Η Ελλάδα εξήγαγε 3000 τόνους παγκοσμίως το 2016 σύμφωνα με τον FAO. Το Ιράν και η Τουρκία είναι οι χώρες με τις περισσότερες εξαγωγές φιστικιού παγκοσμίως. Υπάρχει μεγάλος αριθμός ποικιλιών φιστικιού σε πολλές χώρες του κόσμου, των οποίων τα χαρακτηριστικά διαφέρουν ιδιαίτερος στο χρώμα, στο μέγεθος, το σχήμα και τη γεύση. Η γνησιότητα ενός προϊόντος συνδέεται και με την εμπορική του αξία. Σύμφωνα με το BBC, τα ιταλικά φιστίκια που παράγονται στην Σικελία στην περιοχή Μπρόντε, και αποτελούν προϊόν με προστατευόμενη ονομασία προέλευσης, πωλούνται σε σχεδόν διπλάσια τιμή από ότι τα ιρανικά και τα αμερικανικά, καθώς έχουν καλύτερη γεύση και διατηρούν για μεγαλύτερο διάστημα το πράσινο χρώμα τους. Για τον προηγούμενο λόγο και λόγω τις περιορισμένης παραγωγής τους, τα πράσινα φιστίκια του Μπρόντε φυλάσσονται από αστυνομικούς (www.kathimerini.gr).



Εικόνα 1.3: Μέσος όρος της παγκόσμιας παραγωγής φιστικιών για τις χρονολογίες 2000-2017 (www.fao.org).

1.2.Χρήσεις

Το φιστίκι χρησιμοποιείται κυρίως ως ξηρός καρπός που καταναλώνεται αφού έχει υποστεί ξήρανση και έχει ψηθεί, και με την προσθήκη ή όχι αλατιού. Το κύριο πλεονέκτημα του φιστικιού έναντι των υπόλοιπων ξηρών καρπών είναι ότι το κέλυφος συνοδεύει φυσικά το καρπό μετά την συγκομιδή του και έτσι είναι πιο εύκολη η κατανάλωση του χωρίς κάποια επιπλέον επεξεργασία. Ένα ακόμα στοιχείο υπεροχής του φιστικιού είναι ότι επιτρέπει την προσθήκη αλατιού και καθώς και την εφαρμογή ψησίματος χωρίς να αφαιρείται το κέλυφος. Λόγω της θρεπτικής του αξίας, του χρώματος και της γεύσης του, χρησιμοποιείται ευρέως στην παρασκευή γλυκών, αρτοσκευασμάτων και κρεάτων. Μικρή ποσότητα ελαίου φιστικιού χρησιμοποιείται για την δημιουργία καλλυντικών καθώς και για την παραγωγή βουτύρου (Kashaninejad & Tabil, 2011).

1.3.Σύσταση και διατροφική αξία

Το φιστίκι είναι ευρέως γνωστό για την διατροφική του αξία. Περιλαμβάνει φυτικές ίνες, πρωτεΐνες, βιταμίνες και μεγάλη περιεκτικότητα σε ακόρεστα λιπαρά οξέα, ενώ μικρή σε κορεσμένα λιπαρά οξέα. Σε σύγκριση με του υπόλοιπους ξηρούς καρπούς, το φιστίκι έχει λιγότερες θερμίδες και λιπαρές ουσίες, ενώ περιέχει

περισσότερες πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και νάτριο. Το φιστίκι διαφοροποιείται σε σύσταση ανάλογα με την ποικιλία, καθώς και τα επίπεδα ωρίμανσής του κατά την συγκομιδή (Kashaninejad, Mortazavi, Safekordi, & Tabil, 2006).

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η κατανάλωση φιστικιών συμβάλει στην πρόληψη ή ακόμα και στην θεραπεία ασθενειών όπως είναι ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές ασθένειες και ο διαβήτης. Κάποιες μελέτες έχουν δείξει ότι η ημερήσια κατανάλωση ποσότητας 30-80 g φιστικιού μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της συνολικής χοληστερόλης έως 10,1% (Ghasemynasabparizi, Ahmadi, & Mazloomi, 2017).

Τα 100 g φιστικιού προσδίδουν 570 kcal και αποτελούνται σε ποσοστό 55,2-60,5% από λιπαρές ύλες, 14,9-17,7% από υδατάνθρακες και 15,0-21,2% από πρωτεΐνη. Το φιστίκι αποτελεί μία από τις πλουσιότερες πηγές διαιτητικών ινών, καθώς σε 100 g φιστικιού περιέχονται περίπου 10,3 g ίνες (Ghasemynasabparizi et al., 2017). Το φιστίκι περιέχει διάφορα στοιχεία, όπως νάτριο (4,0 mg/100 g), ασβέστιο (120-150 mg/100 g), σίδηρο (5,8-11,4 mg/100g), φώσφορο (1048-1142 mg /100 g), σελήνιο (9,3 μg/100g), και μαγνήσιο (157,5-165,0 mg/100 g) (Ghasemynasabparizi et al., 2017).

Επιπλέον το φιστίκι περιέχει μεγάλη ποσότητα αντιοξειδωτικών, όπως φλαβονοειδή, καροτένια, τοκοφερόλες, λουτεΐνη, ρεσβερατρόλη και είναι πλούσιο σε βιταμίνη Α (Ghasemynasabparizi et al., 2017). Ως γνωστόν τα φλαβονοειδή έχουν ευεργετικές ιδιότητες στην ανθρώπινη υγεία. Επίσης, περιέχει ανθοκυανίνες, στις οποίες οφείλεται το μωβ-κόκκινο χρώμα του καρπού. Περιέχει λιπαρά οξέα εκ των οποίων τα σημαντικότερα είναι το παλμιτικό, παλμιτελαϊκό, στεατικό, ελαϊκό, λιγνυλοϊκό και λινολενικό οξύ. Τα κυριότερα αμινοξέα που περιέχει είναι: αλανίνη, αργινίνη, ασπαρτικό οξύ, γλουταμινικό οξύ, γλυκίνη, ιστιδίνη, ισολευκίνη, λευκίνη, λυσίνη, μεθειονίνη, φαινυλαλανίνη, προλίνη, θρεονίνη, σερίνη, τρυπτοφάνη, τυροσίνη και βαλίνη (Kashaninejad & Tabil, 2011). Οι περιβαλλοντικές συνθήκες επιδρούν στην σύνθεση των λιπαρών οξέων. Σύμφωνα με μελέτες (Arena, Campisi, Fallico, & Maccarone, 2007), τα λιπαρά οξέα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως κριτήριο προσδιορισμού της προέλευσης των φιστικιών. Τα φιστίκια περιέχουν σε μεγάλες ποσότητες βιταμίνη Α, Β και C. Η βιταμίνη Β1 είναι εκείνη που κυριαρχεί. Τέλος, είναι πλούσια σε φυτοστερόλες (214 mg/100 g), όπως είναι η καμπεστερόλη,

η β-σιτοστερόλη και η στιγμαστερόλη. Αυτό σημαίνει ότι η κατανάλωση φιστικιών μπορεί να συμβάλει στην διατήρηση της χοληστερόλης στον ανθρώπινο οργανισμό σε φυσιολογικά επίπεδα όπως έχουν δείξει μελέτες (Bulló, Juanola-Falgarona, Hernández-Alonso, & Salas-Salvadó, 2015).

1.4.Μικροβιολογία

Οι ξηροί καρποί είναι επιρρεπείς στους μικροοργανισμούς και έτσι έχουν τη δυνατότητα να προκαλέσουν μετά από αλλοίωση, τροφική δηλητηρίαση. Καθώς το φιστίκι είναι ένα έτοιμο προς κατανάλωση τρόφιμο, θα πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη σημασία στο μικροβιακό του φορτίο. Τα φιστίκια λόγω της χαμηλής ενεργότητας νερού δεν θεωρούνταν πιθανό να έχουν παθογόνα βακτήρια. Μελέτες έχουν δείξει ότι παθογόνα όπως τα γένη *Listeria*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, μπορούν να επιβιώσουν σε ένα φιστίκι για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο του ενός χρόνου, αλλά χωρίς να μπορούν να πολλαπλασιαστούν. Τα φιστίκια μπορούν να έχουν τοξικές επιδράσεις στον άνθρωπο. Πιο συγκεκριμένα, τα φιστίκια μπορεί να έχουν αφλατοξίνες. Οι αφλατοξίνες είναι δευτερογενείς μεταβολίτες διαφορετικών στελεχών του *Aspergillus parasiticus* και του *Aspergillus flavus*. Τα φιστίκια με χαλασμένο κέλυφος είναι πιο επιρρεπή σε μύκητες. Στην Ευρωπαϊκή κοινότητα τα επιτρεπόμενα επίπεδα αφλατοξινών είναι τα 4 ppb, λόγω του ότι οι αφλατοξίνες μπορούν να προκαλέσουν καρκίνο στο ήπαρ (Al-Moghazy, Boveri, & Pulvirenti, 2014).

1.5. Το ελληνικό φιστίκι

Στην Ελλάδα υπάρχουν πολλά είδη του γένους *Pistacia*, με το *Pistacia vera* να είναι το μοναδικό βρώσιμο. Η κύρια βρώσιμη ποικιλία στην Ελλάδα είναι το φιστίκι Αιγίνης. Το φιστίκι Αιγίνης περιέχει 55% λιπαρά οξέα, 23% πρωτεΐνες και 14% υδατάνθρακες. Πρόκειται για έναν ξηρό καρπό με υψηλή διατροφική αξία. Η περιεκτικότητά του σε υγρασία είναι 7,5-9% επί ξηρού και το βάρος του μετά από ξήρανση κυμαίνεται μεταξύ 0,97-1,12 g (Zakinthinow & Rouskas 2015) . Το φιστίκι Αιγίνης δίνει σε ποσοστό μέχρι 95% ανοιχτούς καρπούς (agrocapiital.gr). Θεωρείται ότι η πρώτη οργανωμένη καλλιέργεια που έγινε στην Αίγινα ήταν το 1896. Το ασβεστώδες έδαφος του νησιού σε συνδυασμό με το ξηρό περιβάλλον και την

υγρασία της θάλασσας, δημιουργούν τις κατάλληλες συνθήκες που προσδίδουν στο φιστίκι Αιγίνης ξεχωριστά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Το φιστίκι Αιγίνης από το 1997 αποτελεί προϊόν με προστατευόμενη ονομασία προέλευσης. Η ετήσια παραγωγή φιστικιών στην Αίγινα κυμαίνεται μεταξύ 600-800 τόνων (www.greekgastronomyguide.gr).

1.6. Τρόφιμα και αυθεντικότητα

Ένα τρόφιμο μπορεί να χαρακτηριστεί αυθεντικό εφόσον παράγεται κάτω από συγκεκριμένες διαδικασίες και κατά την διάρκεια παραγωγής του πληρούνται συγκεκριμένες προδιαγραφές. Επιπλέον, ένα τρόφιμο μπορεί να χαρακτηριστεί αυθεντικό όταν η χημική του σύσταση συμφωνεί με την περιγραφή του στην ετικέτα (μέθοδος παραγωγής, επεξεργασία, γεωγραφική προέλευση). Η χημική σύσταση ενός τροφίμου είναι ένας πολύπλοκος συνδυασμός διαφορετικών ενώσεων, που διαφοροποιούνται ως προς τη συγκέντρωση, τις χημικές και τις φυσικοχημικές ιδιότητες. Επίσης, οι χημικές ενώσεις μπορούν να διακριθούν στο αν προέρχονται από βιολογικές πρώτες ύλες ή αν σχηματίζονται κατά την διάρκεια της παραγωγής, επεξεργασίας ή αποθήκευσης ενός τροφίμου. Η γνησιότητα ενός τροφίμου μπορεί να επιβεβαιωθεί μέσω διαφόρων προσεγγίσεων. Τα τελευταία χρόνια μελετάται ευρέως η εφαρμογή των ωμικών τεχνολογιών (omics) στην αυθεντικότητα των τροφίμων. Διάφοροι κλάδοι της ωμικής τροφίμων (Foodomics), όπως είναι η γονιδιωματική, η πρωτεωμική και η μεταβολωμική, έχουν την δυνατότητα να απεικονίσουν την μοριακή οργάνωση ενός τροφίμου. Η μεταβολωμική ορίζεται ως η τεχνολογία που μελετά το σύνολο των ενδιάμεσων προϊόντων των μεταβολικών διαδικασιών (μεταβολίτες) ποιοτικά και ποσοτικά, που μεταβάλλεται ανάλογα με την φυσιολογία, την παθολογική και την εξελικτική κατάσταση του κυττάρου, ιστού, οργάνου ή οργανισμού. Οι μεταβολίτες ενός τροφίμου προκύπτουν από βιοχημικές αντιδράσεις και φέρουν πληροφορίες για τη βιολογική του σύσταση καθώς και για όλες τις διεργασίες που επιτελούνται κατά την διάρκεια παραγωγής και συντήρησής του. Ο προσδιορισμός της αυθεντικότητας ενός τροφίμου που βασίζεται στους μεταβολίτες απαιτεί σύγχρονες αναλυτικές τεχνικές όπως φασματοσκοπία FTIR, φασματομετρία μάζας (MS), φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

Κάποιοι συγκεκριμένοι μεταβολίτες για ένα τρόφιμο μπορούν να ερμηνευθούν ως χαρακτηριστικά της ταυτότητας του τροφίμου. Αυτό αποκαλύπτει ότι με τη παρουσία ή την απουσία ενός συγκεκριμένου μεταβολίτη μπορεί να διαπιστωθεί η αυθεντικότητα ενός προϊόντος. Ωστόσο, στις περισσότερες περιπτώσεις απαιτείται ο προσδιορισμός μιας ομάδας μεταβολιτών ή η καταγραφή του μεταβολικού αποτυπώματος του τροφίμου. Με χρήση NMR, μελετήθηκαν οι μύρες Rochefort Trappist (Mannina et al., 2016), όπου ανιχνεύθηκε η διπλάσια ποσότητα πυροσταφυλικού οξέος από τους υπόλοιπους τύπους μύρας. Σύμφωνα με μία άλλη μελέτη (Li et al., 2017), προσδιορίστηκαν μεταβολίτες στο γάλα με χρήση NMR, οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν για την εξακρίβωση της ζωικής προέλευσης του γάλακτος. Επίσης, με χρήση NMR, έχουν διαχωριστεί τα είδη καφέ *Coffea arabica* και *Coffea canephora* var. *Robusta* (Cagliani, Pellegrino, Giugno, & Consonni, 2013). Ακόμα, έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες μεταβολομικής για την διάκριση ποικιλιών φρούτων και λαχανικών. Κάποιες ποικιλίες φρούτων που περιέχουν τους ίδιους μεταβολίτες, ήταν δυνατό να διακριθούν καθώς διαφέρει η ποσοτική τους σύσταση. Παράδειγμα αποτελεί η διάκριση υδατικών εκχυλισμάτων δύο ποικιλιών ροδάκινου, *Percoca Romagnola 7* και *Flaminia* (Capitani et al., 2013). Δύο ποικιλίες γλυκιάς πιπεριάς ήταν δυνατό να διαχωριστούν με τη χρήση HR-MS, καθώς διέφεραν σε σάκχαρα, οργανικά οξέα και λιπαρά οξέα (Ritota, Marini, Sequi, & Valentini, 2010). Δείγματα κόκκινου και λευκού σκόρδου έχουν διαφοροποιηθεί μέσω της διαφορετικής περιεκτικότητάς τους σε μυρμηκικό και κιτρικό οξύ (Ritota et al., 2012). Η φασματοσκοπία NMR χρησιμοποιήθηκε για τη ανίχνευση μεταβολικών διαφορών σε οίνους από διαφορετικά είδη σταφυλιών, σε ελιές που παράγονται σε διαφορετικές περιοχές (Sicily, Apulia), καθώς και σε ποικιλίες ρυζιού Basmati και μη-Basmati (A. P. Sobolev, Circi, Capitani, Ingallina, & Mannina, 2017). Σύμφωνα με τους Ritota et al, πραγματοποιήθηκε με ανάλυση δεδομένων με NMR με PLS-DA, διάκριση μεταξύ των δύο ποικιλιών γλυκού πιπεριού. Οι μεταβολίτες που εντοπίστηκαν για την διαφοροποίηση αυτή ήταν σάκχαρα, αμινοξέα και λιπαρά οξέα (Ritota et al., 2010).

Έχουν πραγματοποιηθεί διάφορες μελέτες για την εξακρίβωση της γεωγραφικής προέλευσης τροφίμων με χρήση φασματοσκοπίας NMR. Σύμφωνα με μία μελέτη (A. Sobolev et al., 2014), με χρήση NMR ήταν εφικτός ο διαχωρισμός δειγμάτων σαφράν διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης (Ελλάδας, Ισπανίας,

Ουγγαρίας, Τουρκίας και Ιταλίας). Τα μεταβολωμικά προφίλ των εκχυλισμάτων σαφράν διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης εμφάνισαν σημαντικές διαφορές στην περιεκτικότητα ορισμένων μεταβολιτών. Σε μία άλλη μελέτη (Petrakis, Cagliani, Polissiou, & Consonni, 2015), πραγματοποιήθηκε η ανίχνευση νοθευμένου σαφράν με χρήση NMR φασματοσκοπίας και χημειομετρικών μεθόδων. Ο κρόκος Κοζάνης (σαφράν) μπορεί να αλλοιωθεί με προσθήκη φυτικών υλών (εκχύλισμα από τον καρπό *Gardenia jasminoides Ellis*), καθιστώντας τον νοθευμένο. Η χρήση NMR φασματοσκοπίας έκανε δυνατή την ανίχνευση νοθείας σε σαφράν σε ελάχιστη περιεκτικότητα 20% w/w.

Το 2016, μέσω της δισδιάστατης φασματοσκοπίας (NMR), μελετήθηκαν δεκατρείς μεταβολίτες τριών διαφορετικών ποικιλιών ρυζιού από τέσσερις διαφορετικές περιοχές (Chae & Kim, 2016). Τα δείγματα ρυζιού αφού εκχυλίστηκαν, διακρίθηκαν βάση της γεωγραφικής τους προέλευσης αλλά και με βάση την ποικιλία τους.

Μία άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε οίνους με NMR (Ong, Gall, & Early, 2008), αναφέρει ότι ήταν δυνατός ο διαχωρισμός τριών ποικιλιών, Campbell Early, Cabernet Sauvignon και Shiraz χρησιμοποιώντας πολυμεταβλητή ανάλυση (PCA, PLS-DA). Οι μεταβολίτες που επέτρεψαν τον διαχωρισμό ήταν η 2,3-βουτανοδιόλη, το γαλακτικό οξύ, το οξικό οξύ, η προλίνη, το ηλεκτρικό οξύ, το μηλικό οξύ, η γλυκερόλη, το τρυγικό οξύ, η γλυκόζη και διάφορες φαινολικές ενώσεις. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός οίνων ποικιλίας Cabernet Sauvignon από σταφύλια τα οποία παράχθηκαν σε διαφορετικές περιοχές, από την Αυστραλία, την Γαλλία και την Καλιφόρνια. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η περιεκτικότητα σε προλίνη των δειγμάτων από την Καλιφόρνια ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με τα δείγματα από την Αυστραλία και την Γαλλία.

Μια άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε (Jakes et al., 2015), απέδειξε την δυνατότητα διάκρισης του βοδινού κρέατος από το κρέας αλόγου μέσω σύγκρισης των αποτυπωμάτων των τριακυλογλυκερολών που λαμβάνονται με φασματοσκοπία NMR. Η διάκριση αυτή ήταν εφικτή μετά από εκχύλιση με χλωροφόρμιο.

Πολλές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για την αποτύπωση του μεταβολωμικού προφίλ σε εκχύλισμα φύλλων ακατέργαστου *Arabidopsis*. Με την χρήση GC-MS έγινε δυνατός ο προσδιορισμός αρκετών εκατοντάδων ενώσεων

(Fiehn, 2007). Στην συνέχεια επιπλέον μελέτες επέτρεψαν την δημιουργία βάσεων δεδομένων καθιστώντας δυνατή την επιστημονική επεξήγηση. Η ανάλυση πολικών φυτικών εκχυλισμάτων, επέτρεψε την γρήγορη διαφοροποίηση εννέα οικότυπων *Arabidopsis* μέσω NMR (Weimer & Slupsky 2013). Υγρή χρωματογραφία τριχοειδούς συζευγμένη με TOF-MS (CapLC-ESI-QqTOF-MS) οδήγησε στην ανίχνευση περίπου 2000 σημάτων μάζας συμπεριλαμβανομένων των δευτερογενών μεταβολιτών, σε εκχυλίσματα από τις ρίζες και τα φύλλα του (Kashaninejad & Tabil, 2011). Ακόμα έγινε διαχωρισμός του *Arabidopsis* από τους γονοτύπους των εσπεριδοειδών με την χρήση GC-MS και LC-MS, χρησιμοποιώντας την αξιολόγηση πολλών μεταβλητών δεδομένων (Arbona et al., 2010). Ακόμα, η συγκριμένη μελέτη έδωσε περαιτέρω στοιχεία για την σημασία της μη στοχευμένης μεταβολομικής ως ένα πολύτιμο εργαλείο για την ταχεία εύρεση του φαινότυπου των φυτών. Μία εικόνα του πρωτογενή μεταβολισμού που σχετίζεται με την ανάπτυξη των σπόρων και τη βλάστηση στο *Arabidopsis*, έδειξε τις αλλαγές που πραγματοποιούνται στην ποσότητα των μεταβολιτών την περίοδο μετά την άνθιση (Fait, Broos, Zrna, Lombi, & Hamon, 2006).

1.7. Φιστίκι και μελέτες αυθεντικότητας

Μία μελέτη το 1990 (Dyszal & Pettit, 1990), με συνδυασμό δύο τεχνικών, την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) και την διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (DSC), εφαρμόστηκε σε δείγματα φιστικιών από την Καλιφόρνια, το Ιράν και την Τουρκία με στόχο την αναγνώριση της χώρας προέλευσης. Η τεχνική (DSC), έχει χρησιμοποιηθεί από το τελωνείο των ΗΠΑ με σκοπό τον έλεγχο των φιστικιών για τον προσδιορισμό της χώρας προέλευσής τους. Στην μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα έλαια των δειγμάτων και προσδιορίστηκαν οι τριακυλογλυκερόλες μέσω αέριας χρωματογραφίας.

Μια μέθοδος που συνδυάζει τη στοιχειακή ανάλυση και τεχνικές ταξινόμησης με στόχο τον προσδιορισμό της γεωγραφικής προέλευσης φιστικιών πραγματοποιήθηκε σε δείγματα από το Ιράν, την Τουρκία και την Καλιφόρνια (Anderson & Smith, 2005). Πιο συγκεκριμένα, σε δείγματα φιστικιού προσδιορίστηκαν τα στοιχεία Ba, Be, Sr, Ti, Cd, Ca, Cu, V, Fe, Co, Ni, P, Cu, Zn, Cr, K, Mg, Mn, Na, με τη μέθοδο ICP- AES, (φασματομετρία ατομικής εκπομπής

επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος). Επιπλέον πραγματοποιήθηκε ανάλυση ανόργανων ανιόντων και οργανικών οξέων (σεληνικό, βρωμικό, φουμαρικό, μηλικό, πυροσταφυλικό, οξικό, φωσφορικό και ασκορβικό) με τριχοειδή ηλεκτροφόρηση (Anderson & Smith, 2005). Τα αποτελέσματα της συγκριμένης μελέτης έδειξαν ότι 18 στοιχεία, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την διαφοροποίηση των φιστικιών βάσει της γεωγραφικής τους προέλευσης. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι η συγκέντρωση των στοιχείων που μελετήθηκαν διαφοροποιείται ανάλογα με τη χρονική περίοδο.

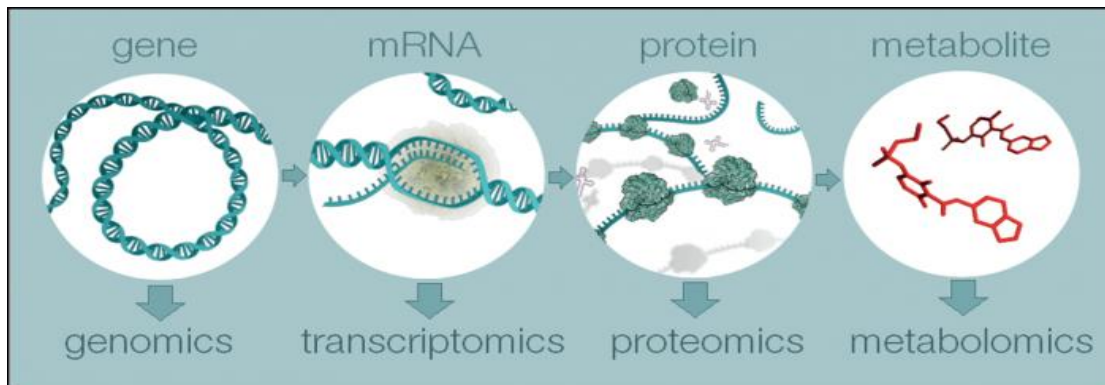
Το 2017 πραγματοποιήθηκε μία μελέτη (Zannella et al., 2017), που είχε στόχο την εξακρίβωση της νοθείας του Πράσινου φιστικιού από το Bronte, το οποίο είναι προϊόν προστατευόμενης ονομασίας προέλευσης. Οι ερευνητές πραγματοποίησαν απεικόνιση του γενετικού αποτυπώματος καθώς και στοιχειακή ανάλυση, η οποία στόχευε σε δεδομένα πολλών στοιχείων (B, Mn, Cr, Mg, K, Ti, Sc, P, S) και στην αναλογία των ισότοπων $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ τόσο στο έδαφος όσο και στο φυτικό ιστό. Το Sr μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη συσχέτιση του τροφίμου με την γεωγραφική του προέλευση. Το Sr επιλέχθηκε καθώς περιέχεται στα τρόφιμα σε ποσοστό μικρότερο από 0,1% (w/w) και διαφοροποιείται στην ισοτοπική του σύνθεση λόγω των γεωχημικών διαφορών του στα εδάφη (Zannella et al., 2017). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η εποχιακή και η ετήσια διακύμανση της αναλογίας των ισότοπων $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ είναι ασήμαντη. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα φιστίκια από το Bronte είχαν πολύ χαμηλή συγκέντρωση Sr (1.03-2.17 $\mu\text{g} / \text{g}$), με αρκετή διαφορά από τα ιρανικά και τα τουρκικά φιστίκια. Ακόμα, τα φιστίκια από το Bronte είχαν μικρότερη συγκέντρωση Mn (6,7-8,7 $\mu\text{g} / \text{g}$) συγκριτικά με τα ιρανικά και τα τουρκικά φιστίκια. Αντίθετα, η συγκέντρωση Fe ήταν χαμηλότερη στα δείγματα από τον Ιράν και την Τουρκία σε σχέση με εκείνα από το Bronte. Τέλος, αποδείχθηκε ότι το ισοτοπικό κλάσμα $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ στο φυτό συσχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με το αντίστοιχο στο έδαφος (Zannella et al., 2017).

Το 2014 με χρήση $^1\text{H-NMR}$, επιτεύχθηκε η διάκριση δειγμάτων φιστικιού (*Pistacia vera*) διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης βάσει του μεταβολικού τους προφίλ. Τα δείγματα προήλθαν από τις περιοχές Aleppo (Συρία), Sanliurfa (Τουρκία), Rafsanjan (Ιράν) και Bronte (Ιταλία) (Sciubba, Capuani, Di Cocco, Avanzato, & Delfini, 2014). Αναλύθηκαν υδατικά εκχυλίσματα των δειγμάτων και εντοπίστηκαν 48 υδρόφιλοι μεταβολίτες, και ποσοτικοποιήθηκαν οι 28 με 1D και 2D NMR. Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν με πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση. Οι

ενώσεις που ανιχνεύθηκαν ήταν οι εξής: βαλερικό οξύ, κιτρικό οξύ, γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ, σικιμικό οξύ, φουμαρικό οξύ, μυρμηκικό οξύ, μηλικό οξύ, ασκορβικό οξύ, ηλεκτρικό οξύ, πυροσταφυλικό οξύ, αλανίνη, θρεονίνη, αργινίνη, βαλίνη, ισολευκίνη, λευκίνη, λυσίνη, προλίνη, γλουταμικό οξύ, ασπαρτικό οξύ, ασπαραγίνη, τυροσίνη, τρυπτοφάνη, φαινυλαλανίνη, γλυκίνη, α-γλυκόζη, β-γλυκόζη, σουκρόζη, μυοϊνοσιτόλη, ραφινόζη, α-ξυλόζη, β-ξυλόζη, N-μεθυλο-*trans*-4-υδροξυ-L-προλίνη, αλαντοΐνη, χολίνη, κρεατίνη, κρεατινίνη, γλυκίνη-βεταΐνη, τριγωνελλίνη, ινδολο-3-οξικό οξύ, κερκετίνη-3-O-γλυκοσίδη, γαλακτικός αιθυλεστερας, ουριδίνη, αδενοσίνη, 5-τριφωσφορική αδενοσίνη (Sciubba et al., 2014).

1.8. Μεταβολωμική (Metabolomics)

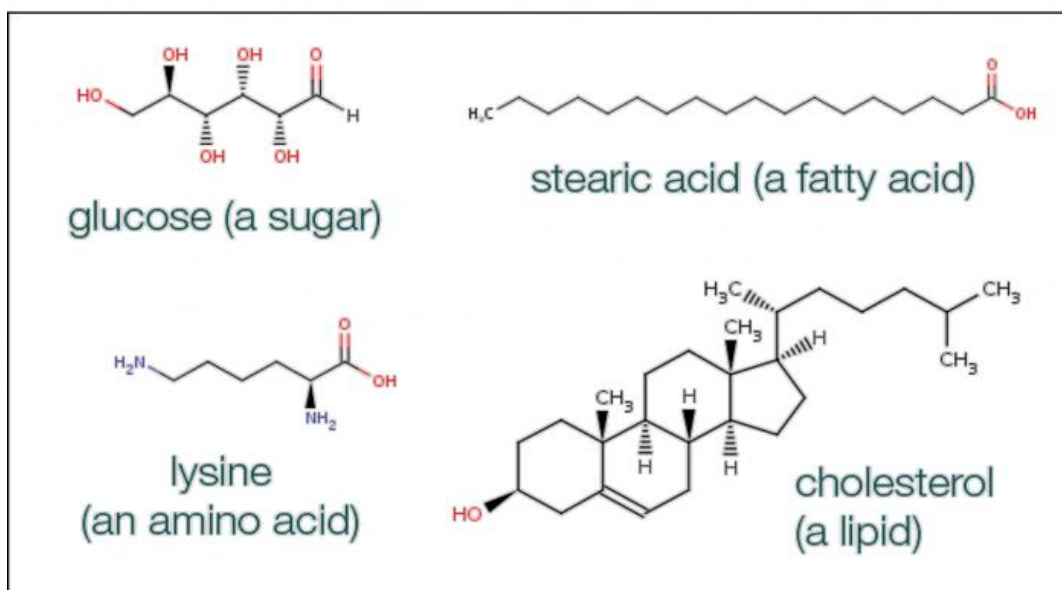
Ως μεταβολωμική ορίζεται η τεχνολογία που μελετά το σύνολο των ενδιάμεσων προϊόντων των μεταβολικών διαδικασιών (μεταβολίτες) ποιοτικά και ποσοτικά, ενός βιολογικού συστήματος (κύτταρο, ιστό, όργανο, βιολογικό υγρό ή οργανισμό) σε συγκεκριμένη χρονική στιγμή (nature.com). Το σύνολο των μεταβολιτών ενός βιολογικού συστήματος ονομάζεται μεταβόλωμα (metabolome) (www.ebi.ac.uk). Η γονιδιωματική είναι η μελέτη του συνόλου των γονιδίων και της γενετικής πληροφορίας μέσα σε ένα κύτταρο και η μεταγραφωμική είναι η μελέτη του συνόλου των μεταγραφημάτων (mRNA). Η μεταβολωμική είναι μια σημαντική προσέγγιση επειδή οι μεταβολίτες και οι συγκεντρώσεις τους, σε αντίθεση με τις υπόλοιπες ωμικές τεχνολογίες, αντικατοπτρίζουν άμεσα την βιοχημική δραστηριότητα και την κατάσταση των κυττάρων και των ιστών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, η μεταβολωμική να θεωρείται ο καλύτερος αντιπρόσωπος του μοριακού φαινότυπου.



Εικόνα 1.4: Omics (www.ebi.ac.uk)

Ο μεταβολίτης είναι μία οργανική ένωση μικρού μοριακού βάρους (<1500 Da), που συνήθως εμπλέκεται σε μια βιολογική διαδικασία ως υπόστρωμα ή προϊόν. Οι μεταβολίτες που μελετώνται συνήθως είναι λιπαρά οξέα, άλλα λιπίδια, αμινοξέα, φαινολικές ενώσεις, αλκαλοειδή, οργανικά οξέα και σάκχαρα. Εκτιμάται ότι στο φυτικό βασίλειο υπάρχουν περίπου 200.000 μεταβολίτες ενώ στους ανθρώπους περίπου 3.000 (www.ebi.ac.uk).

Υπάρχουν δύο προσεγγίσεις στην μελέτη των μεταβολιτών. Η πρώτη προσέγγιση γίνεται χωρίς μεροληψία και πρόκειται για μη στοχευόμενη μέθοδο. Η μέθοδος αυτή προσδιορίζει σε ένα σύνολο δειγμάτων όσο το δυνατόν περισσότερους μεταβολίτες. Η άλλη προσέγγιση ονομάζεται στοχευόμενη. Με την στοχευόμενη μέθοδο μελετάται μια ομάδα μεταβολιτών με συγκεκριμένη βιοχημική λειτουργία.



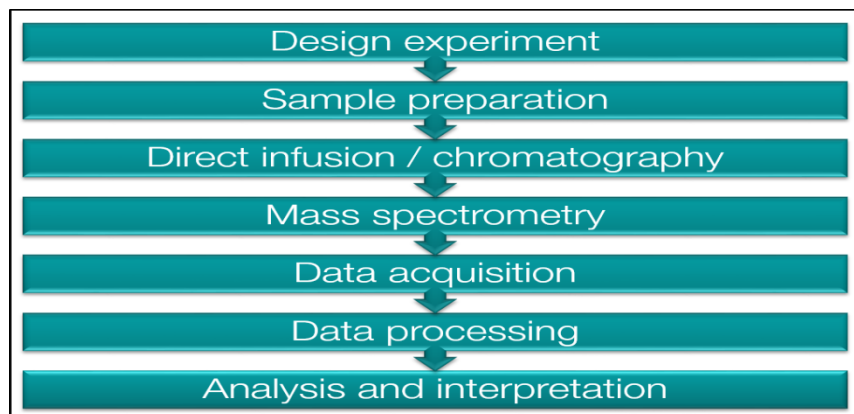
Εικόνα 1.5: Ορισμένοι μεταβολίτες (www.ebi.ac.uk).

1.9. Η μεταβολωμική στα τρόφιμα

Από την άποψη της αναλυτικής χημείας, τα τρόφιμα μπορούν να θεωρηθούν ως σύνθετα στερεά, ημιστερεά ή υγρές μήτρες αποτελούμενες από εκατοντάδες χιλιάδες ενώσεων: πρωτεΐνες, πεπτίδια, λιπίδια, υδατάνθρακες και από πολλές άλλες ενώσεις, όπως αμινοξέα, οργανικά οξέα, νουκλεϊνικά οξέα, λιπαρά οξέα, φυτοχημικά, και άλλα μικρά μόρια (πρόσθετα, όπως χρωστικές, αρώματα, συντηρητικά και άλλες εξωγενείς ενώσεις) που βρίσκονται στα προϊόντα των τροφίμων. Μελετώντας τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων (γεύση, άρωμα, υφή, εμφάνιση) και συγκεκριμένες ιδιότητες που καθορίζονται από το χημικό τους περιεχόμενο, η μεταβολωμική προσέγγιση δίνει την δυνατότητα απόκτησης πολύτιμων πληροφοριών που μπορούν να συσχετιστούν άμεσα με την επεξεργασία των τροφίμων, με την ποιότητα των τροφίμων, την ασφάλεια, την αποθήκευση και την αξιολόγηση της γνησιότητας.

Η μελέτη των μεταβολιτών έχει δώσει την δυνατότητα της κατανόησης των μηχανισμών της επιβίωσης και της δράσης των παθογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα. Όμως, πολλές μελέτες γίνονται πάνω στην βιομηχανία τροφίμων και στην foodomics, δείχνοντας ότι η μεταβολωμική προσέγγιση αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για την μελέτη της σύνθεσης των τροφίμων και την αξιολόγηση της ασφάλειας, της ποιότητας και της προέλευσης. Δύο μεταβολικές προσεγγίσεις χρησιμοποιούνται στην αναζήτηση νέων βιολογικών δεικτών ποιότητας και αυθεντικότητας, και συμβάλλουν στις βιοχημικές γνώσεις των τροφίμων και κατανόηση των μηχανισμών δράσης στις διαδικασίες παραγωγής τροφίμων. Οι δύο διαφορετικές αναλυτικές προσεγγίσεις που ακολουθούνται στη μη στοχευόμενη μεταβολωμική είναι: το «μεταβολικό προφίλ» το οποίο αναφέρεται στην ανάλυση μίας κατηγορίας μεταβολιτών (χημικώς συναφείς μεταβολίτες ή συσχετιζόμενη με μία συγκεκριμένη μεταβολική οδό) και το «μεταβολικό αποτύπωμα» το οποίο αναφέρεται στην ανάλυση του συνόλου των μεταβολιτών, χωρίς μεροληψία ως προς ορισμένες κατηγορίες ενώσεων, για γρήγορη ταξινόμηση των δειγμάτων. Το μεταβολικό αποτύπωμα παρέχει μόνο μία ταξινόμηση χωρίς να προσδιορίζει μεμονωμένα τους μεταβολίτες (Ibáñez, García-Cañas, Valdés, & Simó, 2013). Μέχρι στιγμής, καμία μεμονωμένη πλατφόρμα ανάλυσης δεν μπορεί να δώσει μία ολοκληρωμένη μεταβολωμική εικόνα για ένα δεδομένο δείγμα. Για τον λόγο αυτό πολλά τρόφιμα και μεθοδολογίες συνδυάζονται για την παροχή μίας πλήρους εικόνας

των μεταβολιτών σε συγκεκριμένες συνθήκες. Για τον λόγο αυτό μία σειρά αναλυτικών τεχνικών χρησιμοποιείται σε μεγάλο αριθμό δημοσιεύσεων, όπως είναι οι NMR, LC-MS, GC-MS και CE-MS.



Εικόνα 1.6: Διάγραμμα ροής των βασικών βημάτων ενός πειράματος MS-metabolomics (www.ebi.ac.uk).

Η εξέλιξη των τεχνικών που βασίζονται σε MS έχουν βελτιώσει ακόμα περισσότερο τα όρια ανίχνευσης ποιότητας και ασφάλειας των τροφίμων. Η φασματομετρία μαζών πλεονεκτεί σε πολλές περιπτώσεις, καθώς δίνει χαρακτηριστικά φάσμα με χαμηλά όρια ανίχνευσης. Ο αναλυτής χρόνου-πτήσης (TOF) είναι ένα όργανο που ταιριάζει καλύτερα στις μελέτες μεταβολομικής λόγω του ότι παρέχει υψηλή αναλυτική ισχύ (30.000-40.000 στα πιο πρόσφατα όργανα) με μεγάλη ακρίβεια μάζας (<3 ppm). Σύνθετα δείγματα μεταβολιτών μπορούν να αναλυθούν με τεχνικές Q/TOFMS, IT/TOF-MS και TOF/TOF-MS. Για ενώσεις πάνω από 500Da με FITCR-MS/MS επιτυγχάνεται σαφής αντιστοίχιση μοριακού τύπου.

Στην μεταβολομική ανάλυση, η προετοιμασία του δείγματος παίζει σημαντικό ρόλο στο αποτέλεσμα. Πριν από την ανάλυση με MS, το δείγμα πρέπει να επεξεργαστεί για να μετασχηματιστεί σε μία μορφή που να μπορεί να αναλυθεί. Ανάλογα με το δείγμα είναι σημαντικός ο προσεκτικός χειρισμός του, καθώς όταν τραυματίζονται οι φυτικοί ιστοί, τα κύτταρα χάνουν την φυσιολογική τους δομή και είναι πολύ πιθανό να επιτελούνται νέες μεταβολικές αντιδράσεις. Κατά την προετοιμασία του δείγματος για την μεταβολομική ανάλυση, απαιτείται η καταστολή της ενζυμικής δραστηριότητας και των χημικών αντιδράσεων προκειμένου να μην μεταβληθεί η σύσταση των μεταβολιτών. Έπειτα, οι μεταβολίτες εκχυλίζονται με

κάποιο διαλύτη ή συνηθέστερα με σύστημα διαλυτών. Στο στάδιο αυτό, είναι δυνατός ο εμπλουτισμός της συγκέντρωσης των μεταβολιτών, εφόσον είναι επιθυμητή η αύξηση των ορίων ανίχνευσης στην ανάλυση. Για να αναλυθεί το μεταβολικό αποτύπωμα ενός συγκριμένου τροφίμου, το πρωτόκολλο εκχύλισης που ακολουθείται θα πρέπει να εξάγει μεγάλο αριθμό μεταβολιτών. Παρόλα αυτά, όλες οι μέθοδοι εκχύλισης είναι επιλεκτικές ως προς κάποιους μεταβολίτες, με αποτέλεσμα να μην απομονώνονται όλοι (www.ebi.ac.uk).

Η μεταβολωμική προσέγγιση χαρακτηρίζεται από αμεροληψία. Οι στοχευόμενες μέθοδοι διακρίνουν ξεχωριστά κάθε αναλύτη. Στα φυτικά εκχυλίσματα, μία τυπική GC-MS ανάλυση ανιχνεύει συνήθως μερικές εκατοντάδες μεταβολίτες. Οι μέθοδοι όπως το GCxGC-TOF-MS είναι ικανές να δώσουν ένα χρωματογράφημα με χιλιάδες κορυφές. Είναι κατανοητό ότι η αμερόληπτη προσέγγιση ενός μεγάλου αριθμού πληροφοριών αποτελεί μία πρόκληση στην ανάλυση των μεταβολωμικών προφίλ των φυτών. Ολοκληρωμένες βάσεις δεδομένων φασμάτων έχουν δημιουργηθεί (Paul Lee, Wahjudi, Xu, & Go, 2010), (Cajka, Showalter, Riddellova, & Fiehn, 2016) και αναφέρονται στην Metabolomics Society (www.metabolomicsociety.org). Στην μεταβολωμική μελέτη των φυτών, σκοπός είναι η ταυτοποίηση των μεταβολιτών. Τα τελευταία χρόνια, πολλά εργαλεία, πλατφόρμες και στρατηγικές έχουν αναπτυχθεί και καθιερωθεί για τη διαχείριση δεδομένων (π.χ. επεξεργασία, κανονικοποίηση και οπτικοποίηση) για τον χαρακτηρισμό λειτουργικών γονιδίων και για την κατανόηση των μεταβολικών οδών (Weimer & Slupsky 2013). Ο συνδυασμός μονομεταβλητών και πολυμεταβλητών στατιστικών μεθόδων (π.χ. ανάλυση της διακύμανσης ANOVA, PCA, PLS) αποτελούν σημαντικά εργαλεία για την αξιολόγηση των μεταβολωμικών δεδομένων.

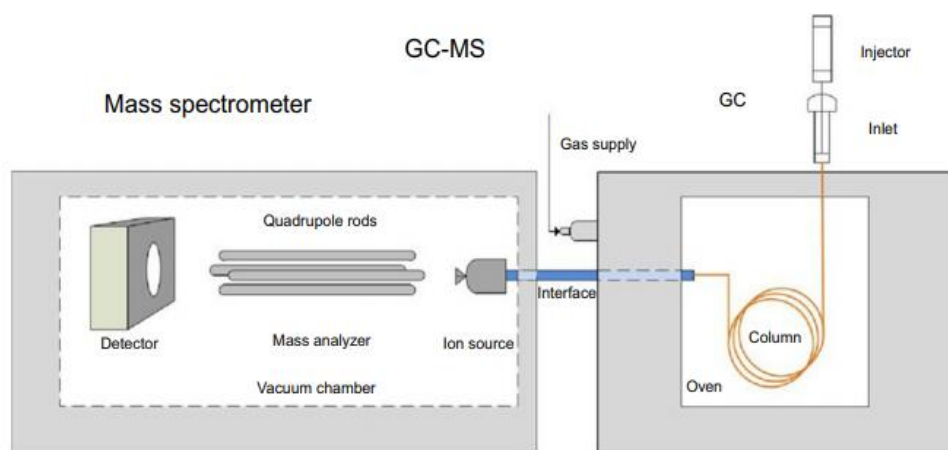
1.10. Αέρια Χρωματογραφία/Φασματομετρία Μάζας (GC-MS)

Η αέρια χρωματογραφία/φασματομετρία μάζας (GC-MS) είναι μια τεχνική που περιλαμβάνει έναν αέριο χρωματογράφο (GC) συζευγμένο με ένα φασματόμετρο μάζας (MS), με τον οποίο μπορούν να διαχωριστούν, να προσδιοριστούν και να ποσοτικοποιηθούν πολύπλοκα μίγματα χημικών ουσιών (Hübschmann H, n.d.). Τα πρώτα όργανα GC-MS κατασκευάστηκαν το 1960 από τον Robert Finnigan. Με το GC-MS δίνεται η δυνατότητα να αναλυθούν ενώσεις μη πολικές ή ημιπολικές, μικρού μοριακού βάρους (<600 amu), αρκετά πτητικές και σταθερές. Αρχικά πραγματοποιείται η εκχύλιση του δείγματος με τον κατάλληλο διαλύτη και στην

συνέχεια πραγματοποιείται η χημική τροποποίηση των ενώσεων (παραγωγοποίηση), εφόσον απαιτείται. Η παραγωγοποίηση αποσκοπεί στην αύξηση της πτητικότητας και της χημικής αδράνειας των προς ανάλυση ενώσεων. Η παραγωγοποίηση συμβάλει στον χρωματικό διαχωρισμό, ελαττώνοντας την πολικότητα των πολικών ομάδων υδροξυλίου, αμίνης, καρβοξυλίου και θειόλης, που υπάρχουν στα προς ανάλυση μόρια, μειώνοντας έτσι τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους, καθώς και με την στατική φάση. Στην πλειοψηφία των μελετών μεταβολομικής με χρήση GC-MS, η παραγωγοποίηση γίνεται σε δύο στάδια, περιλαμβάνοντας αντιδράσεις με μεθοξυαμίνη και αντιδραστήριο σιλυλίωσης (Deda, Gika, Raikos, & Theodoridis, 2018).

Έπειτα, το υγρό δείγμα ενίεται στον εισαγωγέα του GC όπου εξατμίζεται και το φέρον αέριο (συνήθως ήλιο) το μεταφέρει στη χρωματογραφική στήλη. Το φέρον αέριο (κινητή φάση) δεν αλληλεπιδρά με το δείγμα και η παρουσία του αποσκοπεί στην μετακίνηση του δείγματος μέσα στην στήλη. Το δείγμα καθώς ρέει μέσω της κινητής φάσης μέσα στην στήλη, χωρίζεται στα συστατικά του λόγω της αλληλεπίδρασής με την στατική φάση. Η στατική φάση είναι συνήθως υγρή και ακινητοποιημένη στην επιφάνεια ενός αδρανούς στερεού (Douglas A. Skoog - *Fundamentals of Analytical Chemistry, 9th*, n.d.). Το τελευταίο τμήμα της χρωματογραφικής στήλης διέρχεται από θερμαινόμενη γραμμή μεταφοράς και καταλήγει στην πηγή ιόντων (<http://www.bris.ac.uk>). Στα φασματομέτρα μαζών εφαρμόζεται ένα πολύπλοκο σύστημα κενού που διατηρεί χαμηλή πίεση (10^{-14} - 10^{-8} torr). Είναι απαραίτητη η εφαρμογή υψηλού κενού, διότι τα φορτισμένα σωματίδια, καθώς και τα ηλεκτρόνια, καταστρέφονται από τα συστατικά της ατμόσφαιρας. Στο φασματομέτρο μάζας πραγματοποιείται ο ιονισμός των ηλεκτρονίων το οποίο έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό αερίων ιόντων ενώσεων. Υπάρχουν δύο τρόποι μετατροπής των ενώσεων σε ιόντα (πηγή ιόντων MS). Η πρώτη μέθοδος, η οποία χρησιμοποιείται πιο συχνά, είναι η μέθοδος ιονισμού ηλεκτρονίων (EI). Η δεύτερη μέθοδος είναι η μέθοδος του χημικού ιονισμού (CI). Με την μέθοδο του ιονισμού ηλεκτρονίων, μία δέσμη ηλεκτρονίων προσκρούει πάνω στα μόρια του δείγματος, με αποτέλεσμα να χάσουν ένα ηλεκτρόνιο και να μετατραπούν μοριακά ιόντα (M^+). Λόγω της μεγάλης ενέργειας των μοριακών ιόντων, συνήθως θραυματοποιούνται, σχηματίζοντας μικρότερα ιόντα, τα οποία δίνουν ένα χαρακτηριστικό αποτύπωμα για το αρχικό μόριο. Τέλος, αποδίδεται πληθώρα ιόντων. Στην μέθοδο του χημικού

ιοντισμού, αρχικά ιοντίζεται κάποιο αέριο (συνήθως το μεθάνιο), το οποίο με την σειρά του ιοντίζει τα μόρια του δείγματος σχηματίζοντας ιόντα. Στον χημικό ιονισμό, σχηματίζονται μικρότερος αριθμός θραυσμάτων από ότι στον ιονισμό ηλεκτρονίων, με αποτέλεσμα να λαμβάνονται λιγότερες πληροφορίες για τη δομή της ένωσης. Την στιγμή που θα σχηματιστεί ένα μικρό θετικό φορτίο, τα ιόντα που έχουν δημιουργηθεί μπορούν να προωθηθούν έξω από τον θάλαμο ιονισμού (<http://www.bris.ac.uk>) προς τον αναλυτή μαζών. Υπάρχουν διάφοροι τύποι αναλυτών μάζας, όπως τετράπολα, παγίδες ιόντων, μαγνητικού τομέα (Douglas A. Skoog - *Fundamentals of Analytical Chemistry, 9th*, n.d.). Πραγματοποιείται σάρωση του λόγου μάζα/φορτίο και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται είτε σε πραγματικό χρόνο είτε μέσω ανασύνθεσης στον υπολογιστή, μετά το τέλος της ανάλυσης του δείγματος. Για το κάθε δείγμα λαμβάνεται μέσω υπολογιστή ένα χρωματογράφημα συνολικού ιοντικού ρεύματος ως προς τον χρόνο, ή ένα χρωματογράφημα ιοντικού ρεύματος ενός ιόντος ως προς τον χρόνο καθώς και φάσματα μαζών των κορυφών του χρωματογραφήματος (Douglas A. Skoog - *Fundamentals of Analytical Chemistry, 9th*, n.d.). Οι πληροφορίες που λαμβάνονται από το χρωματογράφημα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταυτοποίηση ενώσεων και να βοηθήσουν στην αποσαφήνιση της δομής άγνωστων μιγμάτων. Υπάρχουν ψηφιακές βιβλιοθήκες που διαθέτουν φασματικά δεδομένα για τον εντοπισμό των ενώσεων του δείγματος (π.χ.Nist).



Εικόνα 1.7: GC-MS (Deda et al., 2018)

Η σύζευξη της αέριας χρωματογραφίας (GC) με την φασματομετρία μαζών (MS) είναι μία από τις πιο παλιές και τις πιο διαδεδομένες, δοκιμασμένες και επιτυχημένες τεχνικές που χρησιμοποιούνται στην μεταβολωμική (Deda et al., 2018).

Στο GC, οι ενώσεις διαχωρίζονται καθώς μεταναστεύουν στη θερμαινόμενη στήλη. Η διαφορετική πτητικότητα και η πολικότητα των αναλυμένων ενώσεων είναι οι βασικές παράμετροι που οδηγούν στο διαχωρισμό των αναλυτών. Λόγω των διαφορετικών ιδιοτήτων τους, οι αναλύτες παρουσιάζουν ανόμοιες αλληλεπιδράσεις με τη στατική φάση. Οι ενώσεις οι οποίες δείχνουν αυξημένη αλληλεπίδραση μεταναστεύουν αργά και εκλούνται με μακρά συγκράτηση, ενώ οι αναλύτες με μικρές αλληλεπιδράσεις κινούνται γρήγορα και εκλούνται ταχύτερα. Τα βιολογικά δείγματα, λόγω πολυπλοκότητας, συνήθως διαχωρίζονται μέσω εφαρμογής θερμοκρασιακού προγράμματος, έτσι ώστε οι πιο πτητικές και άπολες ενώσεις να εκλούνται πρώτες.

Το GC-MS εφαρμόζεται πολύ συχνά στην μεταβολωμική, καθώς πλεονεκτεί σε σχέση με άλλες αναλυτικές τεχνικές. Το GC-MS δίνει την δυνατότητα ενός υψηλού χρωματογραφικού διαχωρισμού και ακριβή ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών, με χαμηλό κόστος. Ένα ακόμα πλεονέκτημα της τεχνικής GC-MS είναι η ύπαρξη πρωτοκόλλων, καθώς και επικυρωμένων μεθόδων για ένα μεγάλο αριθμό δειγμάτων. Ακόμα, η ευρεία χρήση του GC-MS έχει οδηγήσει στην ύπαρξη βιβλιοθηκών φασμάτων, δημοσίων και εμπορικών, οι οποίες κάνουν δυνατή την εύκολη ταυτοποίηση των μεταβολιτών.

2.ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η γεωγραφική διαφοροποίηση του φιστικιού Αιγίνης σε σχέση με τα κελυφωτά φιστίκια που παράγονται σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας. Για τον σκοπό αυτό, θα αναπτυχθεί μεθοδολογία μεταβολωμικής με χρήση αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών προκειμένου να μελετηθεί το αποτύπωμα των υδρόφιλων μεταβολιτών του φιστικιού. Τελικός στόχος είναι η ταυτοποίηση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των μεταβολιτών που θα επιτρέψει την γεωγραφική διαφοροποίηση των φιστικιών με χρήση πολυμεταβλητής ανάλυσης.

3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Πειραματικός σχεδιασμός

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν κελυφωτά φιστίκια τα οποία παράχθηκαν στον νομό Φθιώτιδας, στον νομό Ευβοίας, στην Τροιζήνα, στην Θήβα, στα Μέγαρα και στην Αίγινα. Όλα τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ανήκουν στις ποικιλίες Αιγίνης εκτός από ένα που ανήκει στην ποικιλία Ποντικής. Κατά την άφιξη των δειγμάτων στον πανεπιστημιακό χώρο, τοποθετούνταν σε πλαστικές σακούλες συντήρησης τροφίμων και αποθηκεύονταν άμεσα σε ψυγείο θερμοκρασίας 4°C-6°C. Τα δείγματα κωδικοποιήθηκαν βάσει της τοποθεσίας παραγωγής τους (Φθιώτιδα, Εύβοια, Τροιζήνα, Θήβα, Μέγαρα, Αίγινα), την περιοχή της καλλιέργειας (Μάκρη, Μενδενίτσα, Μώλος, Μόδι, Περιβόλα, Λεύκη, Σουβάλα, Βωβού, Φάρος, Κυψέλη, Καστανιώτιστα Ιστιαίας, Βαθύ Αυλίδας, Κουλινάρι, Λιβάδι, Ασώματοι, Καβουρόπετρα) και την χρονολογία παραγωγής (πίνακας 3.1).

Πίνακας 3.1: Κωδικοποίηση των δειγμάτων με βάση την τοποθεσία και την περιοχή.

Α/Α	ΚΩΔΙΚΟΣ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΤΟΠΟΘΕΣΙΑ	ΠΕΡΙΟΧΗ	SEQUENCE/VIAL CODE	ΞΗΡΑΝΣΗ	ΠΟΙΚΙΛΙΑ
1	ΜΑΚΡΗ-ΦΤΗΙΟΤ-2018-2-AIGINA	ΦΘΙΩΤΙΔΑ - ΜΑΚΡΗ	ΦΘΙΩΤΙΔΑ	ΜΑΚΡΗ	ΦΜΑΚ18_2	ΜΗΧΑΝΙΚΗ	ΑΙΓΙΝΗΣ
2	ΜΑΚΡΗ-ΦΤΗΙΟΤ-2018-1-PONTIKIS	ΦΘΙΩΤΙΔΑ - ΜΑΚΡΗ	ΦΘΙΩΤΙΔΑ	ΜΑΚΡΗ	ΦΜΑΚ18_1	ΜΗΧΑΝΙΚΗ	ΠΟΝΤΙΚΗΣ
3	MEND-FTHIOT-2018	ΦΘΙΩΤΙΔΑ - ΜΕΝΔΕΝΙΤΣΑ	ΦΘΙΩΤΙΔΑ	ΜΕΝΔΕΝΙΤΣΑ	FMEN18	ΜΗΧΑΝΙΚΗ	ΑΙΓΙΝΗΣ
4	MWL-LAM-2018	ΦΘΙΩΤΙΔΑ - ΜΩΛΟΣ	ΦΘΙΩΤΙΔΑ	ΜΩΛΟΣ	FMOL18	ΜΗΧΑΝΙΚΗ	ΑΙΓΙΝΗΣ
5	THIVA-2018	ΘΗΒΑ	ΦΘΙΩΤΙΔΑ	ΘΗΒΑ	FTHI18	ΜΗΧΑΝΙΚΗ	ΑΙΓΙΝΗΣ
6	MODI-FTHIOT-2018	ΦΘΙΩΤΙΔΑ - ΜΟΔΙ	ΦΘΙΩΤΙΔΑ	ΜΟΔΙ	FMOD18	ΜΗΧΑΝΙΚΗ	ΑΙΓΙΝΗΣ
7	PERIV-KSHRANT-2018	ΑΙΓΙΝΑ - ΠΕΡΙΒΟΛΑ	ΑΙΓΙΝΑ	ΠΕΡΙΒΟΛΑ	APER18	ΜΗΧΑΝΙΚΗ	ΑΙΓΙΝΗΣ
8	LEFK-KSHRANT-2018	ΑΙΓΙΝΑ - ΛΕΥΚΗ	ΑΙΓΙΝΑ	ΛΕΥΚΗ	ALEY18_M	ΜΗΧΑΝΙΚΗ	ΑΙΓΙΝΗΣ
9	SOUV-HLIOS-2018	ΑΙΓΙΝΑ - ΣΟΥΒΑΛΑ	ΑΙΓΙΝΑ	ΣΟΥΒΑΛΑ	ASOU18	ΦΥΣΙΚΗ	ΑΙΓΙΝΗΣ
10	VWVOY-KSHRANT-2018	ΑΙΓΙΝΑ - ΒΩΒΟΥ	ΑΙΓΙΝΑ	ΒΩΒΟΥ	AVOV18	ΜΗΧΑΝΙΚΗ	ΑΙΓΙΝΗΣ
11	FAROS-KSHRANT-2018	ΑΙΓΙΝΑ - ΦΑΡΟΣ	ΑΙΓΙΝΑ	ΦΑΡΟΣ	AFAR18	ΜΗΧΑΝΙΚΗ	ΑΙΓΙΝΗΣ
12	KYPSELI-HLIOS-2018	ΑΙΓΙΝΑ - ΚΥΨΕΛΗ	ΑΙΓΙΝΑ	ΚΥΨΕΛΗ	AKIP18_F	ΦΥΣΙΚΗ	ΑΙΓΙΝΗΣ
13	EYBOIA-1-2018	ΕΥΒΟΙΑ - ΚΑΣΤΑΝΙΩΤΙΣΣΑ ΙΣΤΙΑΙΑΣ	ΕΥΒΟΙΑ	ΚΑΣΤΑΝΙΩΤΙΣΣΑ	EKAS18_1	ΜΗΧΑΝΙΚΗ	ΑΙΓΙΝΗΣ
14	EYBOIA-2-2018	ΕΥΒΟΙΑ - ΚΑΣΤΑΝΙΩΤΙΣΣΑ ΙΣΤΙΑΙΑΣ	ΕΥΒΟΙΑ	ΚΑΣΤΑΝΙΩΤΙΣΣΑ	EKAS18_2	ΜΗΧΑΝΙΚΗ	ΑΙΓΙΝΗΣ
15	EYBOIA-3-2018	ΕΥΒΟΙΑ - ΒΑΘΥ ΑΥΛΙΔΑΣ (ΧΑΛΚΙΔΑ)	ΕΥΒΟΙΑ	ΒΑΘΥ	EVAT18	ΜΗΧΑΝΙΚΗ	ΑΙΓΙΝΗΣ
16	TROIZ-2018	ΤΡΟΙΖΗΝΑ	ΤΡΟΙΖΗΝΑ	ΤΡΟΙΖΗΝΑ	TRIZ18	ΦΥΣΙΚΗ	ΑΙΓΙΝΗΣ
17	LIAKOTA-2018	ΜΕΓΑΡΑ	ΜΕΓΑΡΑ	ΜΕΓΑΡΑ	MLIA18	ΜΗΧΑΝΙΚΗ	ΑΙΓΙΝΗΣ
18	VAREA-2018	ΜΕΓΑΡΑ	ΜΕΓΑΡΑ	ΜΕΓΑΡΑ	MVAR18	ΜΗΧΑΝΙΚΗ	ΑΙΓΙΝΗΣ
19	KOULINARI-AIGINA-2018	ΚΟΥΛΙΝΑΡΙ ΑΙΓΙΝΑΣ	ΑΙΓΙΝΑ	ΚΟΥΛΙΝΑΡΙ	AKOU18		ΑΙΓΙΝΗΣ
20	KYPSELI-KSHRANT-2018	ΑΙΓΙΝΑ - ΚΥΨΕΛΗ	ΑΙΓΙΝΑ	ΚΥΨΕΛΗ	AKIP18_M	ΜΗΧΑΝΙΚΗ	ΑΙΓΙΝΗΣ
21	LIVADI-2018	ΑΙΓΙΝΑ - ΛΙΒΑΔΙ	ΑΙΓΙΝΑ	ΛΙΒΑΔΙ	ALIV18		ΑΙΓΙΝΗΣ
22	KAVOURO-HLIOS-2018	ΑΙΓΙΝΑ - ΚΑΒΟΥΡΟΠΕΤΡΑ	ΑΙΓΙΝΑ	ΚΑΒΟΥΡΟΠΕΤΡΑ	AKAV18	ΦΥΣΙΚΗ	ΑΙΓΙΝΗΣ
23	ASWMA-2018	ΑΙΓΙΝΑ - ΑΣΩΜΑΤΟΙ	ΑΙΓΙΝΑ	ΑΣΩΜΑΤΟΙ	AASO18	ΦΥΣΙΚΗ	ΑΙΓΙΝΗΣ
24	LEFK-HLIOS-2018	ΑΙΓΙΝΑ - ΛΕΥΚΗ (από άλλο κτήμα σε σχέση με το προηγούμενο)	ΑΙΓΙΝΑ	ΛΕΥΚΗ	ALEY18_F	ΦΥΣΙΚΗ	ΑΙΓΙΝΗΣ

3.2. Προπαρασκευή Δειγμάτων

Αποκελύφωση φιστικιών

Αρχικά πραγματοποιήθηκε αποκελύφωση των φιστικιών δια χειρός. Δεν χρησιμοποιήθηκαν φιστίκια με τελείως κλειστό κέλυφος ή ελαττωματικά. Στην συνέχεια, τοποθετήθηκαν περίπου 50 g ολόκληρου καρπού φιστικιών σε μεταλλικό δοχείο, στο οποίο προστέθηκε υγρό άζωτο για να πραγματοποιηθεί άμεση ψύξη και αναστολή της μεταβολικής δραστηριότητας.

3.3.Ομογενοποίηση παγωμένων φιστικιών

Τα παγωμένα φιστίκια κάθε δείγματος, τοποθετήθηκαν σε μύλο άλεσης ProfiCook με δύο λεπίδες, ο οποίος είχε προψυχθεί για λίγα λεπτά στον καταψύκτη. Η άλεση πραγματοποιήθηκε για σύντομο χρονικό διάστημα (10-30s) και ο μύλος λειτουργούσε σε παλμούς. Έπειτα, κάθε αλεσμένο δείγμα τοποθετήθηκε αμέσως σε πλαστική σακούλα τροφίμων, η οποία βρίσκονταν σε δοχείο με πάγο, και κατόπιν τοποθετήθηκε στον καταψύκτη. Στην συνέχεια, από κάθε δείγμα ζυγίστηκαν 10-50 mg ($\pm 0,1$ mg) σε προζυγισμένα φιαλίδια Eppendorf των 2 mL με βιδωτό πώμα, τα οποία περιείχαν μεταλλικό σφαιρίδιο (2.5 mm). Η μάζα του κάθε δείγματος καταγράφηκε με ακρίβεια τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων. Μετά την ζύγιση, κάθε φιαλίδιο τοποθετήθηκε στην κατάψυξη στους -80°C προς περαιτέρω ανάλυση.

3.4. Προετοιμασία ενοποιημένου δείγματος ελέγχου (pooled QC)

Αυτό το στάδιο προετοιμασίας για να πραγματοποιηθεί απαιτεί την άλεση όλων των δειγμάτων, σύμφωνα με την πορεία που αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα. Σε μία πλαστική σακούλα τροφίμων, προστέθηκε μικρή ποσότητα (περίπου 10 g) από κάθε ομογενοποιημένο δείγμα. Το περιεχόμενο της σακούλας ανακατεύτηκε καλά και τοποθετήθηκε σε μύλο άλεσης ProfiCook, ο οποίος είχε προψυχθεί για λίγα λεπτά στον καταψύκτη έτσι ώστε να επιτευχθεί καλύτερη ομογενοποίηση. Το ενοποιημένο δείγμα αλέσθηκε για περίπου 10s. Έπειτα, από το δείγμα pooled QC ζυγίστηκαν 10-50 mg σε προζυγισμένα φιαλίδια Eppendorf των 2 mL με βιδωτό πώμα, τα οποία περιείχαν μεταλλικό σφαιρίδιο 2.5 mm. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργήθηκαν 9 pooled QC τα οποία τοποθετήθηκαν στην κατάψυξη στους -80°C . Τα δείγματα ελέγχου (QC - quality control) χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της αναπαραγωγιμότητας της μεθόδου, την ταυτοποίηση των κορυφών και για την

κανονικοποίηση των αγνώστων δειγμάτων. Τα QC είναι δείγματα όμοια με τα προς ανάλυση δείγματα, και υπόκεινται την ίδια ακριβώς διαδικασία εκχύλισης, παραγωγοποίησης και ανάλυσης (Dunn et al., 2011) (Fiehn, 2007).

3.5. Μεταβολωμική ανάλυση με GC-MS

Υλικά και Σκεύη

- Πλαστικά Eppendorf (2 mL) με βιδωτό πώμα και o-ring
- Γυάλινα vial με βιδωτό πώμα
- Σφαιρίδια από ανοξείδωτο ατσάλι, διαμέτρου 1.5 mm
- Μηχανικές πιπέτες (1000 μ L, 200 μ L, 100 μ L)
- Επαναληπτική πιπέτα
- Φιαλίδια για GC με κωνικά inserts
- Ογκομετρικές φιάλες
- Παγόλουτρο
- Γυάλινα Μπουκάλια Duran

Συσκευές

- Αναλυτικός ζυγός, METTLER Toledo AE200
- Κυκλοαναδευτήρας (Vortex), VELP Scientifica
- Φυγόκεντρος, Heraeus Biofuge Pico
- Λουτρό υπερήχων, Elmasonic S70
- Συσκευή λυοφιλίωσης, UNICRYO MC 4L, UNIEQUIP
- Θερμοθάλαμος με ταυτόχρονη ανάδευση
- Ομογενοποιητής TissueLyser
- Χρονόμετρο
- Shimadzu GC-MS

Αντιδραστήρια - Διαλύτες

- Δευτεριωμένη γλυκίνη (Glycine-d₅), 98 atom % D , SIGMA-ALDRICH
- Διάλυμα HCl 0,1 N
- Μεθανόλη, CH₃OH \geq 99,8%, Honeywell
- Απεσταγμένο νερό

- Χλωροφόρμιο, CHCl₃ 99,0-99,4% (GC), SIGMA-ALDRICH
- n-Hexane, 95% SIGMA-ALDRICH
- Πυριδίνη, άνυδρη 99,5%, ACROS
- Υδροχλωρική μεθοξυλαμίνη, 98+ %, ACROS
- N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA), 97%, ALFA AESAR
- Διχλωρομεθάνιο analytical, SIGMA-ALDRICH

Προετοιμασία εσωτερικού προτύπου Glycine-d5 (IS)

- Πρωτογενές διάλυμα εσωτερικού προτύπου (3000 µg/mL): ζυγίστηκαν 0.03g (\pm 0,1 mg) Glycine-d5 σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL και προστέθηκε νερό μέχρι την χαραγή.
- Διάλυμα εργασίας εσωτερικού προτύπου (300 µg/mL): μεταφέρθηκε 1 mL από το πρωτογενές διάλυμα εσωτερικού προτύπου σε ογκομετρική φιάλη των 10mL και προστέθηκε νερό μέχρι την χαραγή.
- Ομοίως, παρασκευάστηκαν διαλύματα mixA και mixB (πρωτογενή και εργασίας) διαφόρων εξωτερικών προτύπων (Πίνακας 3.2 και Πίνακας 3.3).

Πίνακας 3.2: Διάλυμα mixA εξωτερικών προτύπων.

Ένωση	Διαλύτης	Μάζα(mg)	Πρωτογενές διάλυμα µg/ mL	Διάλυμα Εργασίας µg/mL
Σουκρόζη	Νερό	11.3	45.2	11.3
Κιτρικό οξύ	Νερό	14.4	57.6	14.4
Αλανίνη	Νερό	19.5	78	19.5
Βαλίνη	Νερό	8	32	8
Σερίνη	Νερό	8	32	8
Μεθειονίνη	Νερό	18	72	18
Ασπαρτικό οξύ	Διάλυμα Α	21.3	85.2	21.3
Σαλικυλικό οξύ	Διάλυμα Α	14.5	58	14.5
Γλουταμινικό οξύ	Διάλυμα Α	9	36	9
Λυσίνη	Νερό	13.1	52.4	13.1
D-(+)-Γλυκόζη	Νερό	14.6	58.4	14.6
Χλωρογενικό οξύ	Μεθανόλη	15.5	62	15.5

*Διάλυμα Α: νερό/μεθανόλη/ισοπροπανόλη 2:5:2

Πίνακας 3.3: Διάλυμα mixB εξωτερικών προτύπων.

Ένωση	Διαλύτης	Μάζα (mg)	Πρωτογενές διάλυμα µg/mL	Διάλυμα Εργασίας µg/mL
Φρουκτόζη	Νερό	9.6	38.4	9.6
Πυροσταφυλικό	Νερό	10.3	41.2	10.3
Ηλεκτρικό οξύ	Νερό	11.8	47.2	11.8
Οξαλικό οξύ	Νερό	11.6	46.4	11.6
Ξυλόζη	Νερό	11.5	46	11.5
Φουμαρικό οξύ	Διάλυμα A	10.2	40.8	10.2
Γαλακτόζη	Νερό	9.4	37.6	9.4
Μαννόζη	Νερό	13.5	54	13.5
Τυροσίνη	HCl(0.1M)	10.2	40.8	10.2
Γαλλικό οξύ	Διάλυμα A	9.6	38.4	9.6
Τρυγικόοξύ	Νερό	11.5	46	11.5

*Διάλυμα A: νερό/μεθανόλη/ισοπροπανόλη 2:5:2

Πορεία εκχύλισης πολικών μεταβολιτών (Τροποποιημένη μέθοδος εκχύλισης λιπιδίων των Bligh-Dyer, 1959)

Πριν ξεκινήσει η εκχύλιση, προετοιμάστηκε μίγμα μεθανόλης/νερού (2:0.5 v/v), στο οποίο διαβιβάστηκε άζωτο. Το διάλυμα ψύχθηκε στον καταψύκτη στους -15°C.

Η διαδικασία που ακολουθεί πραγματοποιήθηκε σε παρόλουτρο. Στην πορεία του πειράματος, ο χειρισμός των ενοποιημένων δειγμάτων ελέγχου (pooled QC) έγινε όπως ακριβώς των υπολοίπων δειγμάτων. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν 5 κενά φιαλίδια Eppendorf 2 mL, ως δείγματα λευκού προσδιορισμού (Blank), ένα για κάθε μέρα εκχύλισης, των οποίων ο χειρισμός πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τον αντίστοιχο των αγνώστων δειγμάτων.

Σε κάθε φιαλίδιο Eppendorf των 2 mL με βιδωτό πώμα, που περιέχει 10-50 mg δείγματος και μεταλλικό σφαιρίδιο 2.5 mm (είχαν συντηρηθεί στους -80°C), προστέθηκαν 500 µL του μίγματος μεθανόλης/νερού (2:0.5 v/v) και 60 µL διαλύματος εργασίας εσωτερικού προτύπου (300 µg/ mL). Τα διαλύματα είχαν προψυχθεί στους -15°C. Το περιεχόμενο των φιαλιδίων ομογενοποιήθηκε ανά τετράδες με την χρήση ομογενοποιητή TissueLyser για 30s. Έπειτα, τα

ομογενοποιημένα δείγματα τοποθετήθηκαν σε παγόλουτρο μέχρι να ολοκληρωθεί η διαδικασία για τα υπόλοιπα δείγματα. Στην συνέχεια, σε κάθε φιαλίδιο προστέθηκαν 200 μL γλωροφορμίου, το οποίο είχε προψυχθεί στον καταψύκτη, και αναδεύτηκε για 30s με τον κυκλοαναδευτήρα (VELP Scientifica). Έπειτα, προστέθηκαν σε κάθε φιαλίδιο επιπλέον 200 μL γλωροφορμίου και αναδεύτηκε για 30s με τον κυκλοαναδευτήρα. Ακολούθησε η προσθήκη 200 μL απ. νερού (το οποίο είχε προψυχθεί), σε κάθε φιαλίδιο και πραγματοποιήθηκε ανάδευση για 30s με τον κυκλοαναδευτήρα. Τέλος, με σκοπό τον διαχωρισμό των δύο φάσεων που σχηματίστηκαν, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 2 min στις 12000 rpm.

Από κάθε φιαλίδιο παρελήφθησαν με πιπέτα 100 μL από την υπερκείμενη φάση (πολική) και μεταφέρθηκαν σε πλαστικό φιαλίδιο Eppendorf 2 mL. Το βήμα αυτό επαναλήφθηκε για κάθε δείγμα, ώστε να υπάρχουν αποθηκευμένα δείγματα σε περίπτωση κάποιου μετέπειτα λάθους χειρισμού. Τα προς ανάλυση δείγματα και τα αντι-δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80°C .

Παράλληλα, προετοιμάστηκαν δύο φιαλίδια Eppendorf 2 mL με πρότυπες ενώσεις, με την προσθήκη 50 μL (και 100 μL) από το MixA και 50 μL (και 100 μL) από το MixB. Τα φιαλίδια ψύχθηκαν στους -80°C . Στην πορεία του πειράματος που ακολουθεί τα δύο μίγματα προτύπων αντιμετωπίστηκαν όπως τα δείγματα.

Στην συνέχεια, αντικαταστάθηκαν τα πάματα όλων των φιαλιδίων Eppendorf 2 mL, με πάματα που έφεραν οπή και ακολούθησε λυοφιλίωση (UNICRYO MC 4L, UNIEQUIP) για περίπου 20 ώρες ώστε να απομακρυνθούν οι διαλύτες. Αμέσως μετά, στα δείγματα τοποθετήθηκαν καινούρια πάματα (χωρίς οπή) και ακολούθησε η διαδικασία της παραγωγοποίησης.

Παραγωγοποίηση

- Διάλυμα παραγωγοποίησης: 20 mg/mL MeOX (methoxyamine hydrochloride) σε πυριδίνη. Αυτό το διάλυμα προετοιμάστηκε ακριβώς πριν την διεξαγωγή του πειράματος.

Προστέθηκαν 40 μL από το διάλυμα παραγωγοποίησης (MeOX/πυριδίνη) σε κάθε δείγμα, με άμεσο πωματισμό. Επιπλέον, το διάλυμα παραγωγοποίησης προστέθηκε και σε ένα κενό φιαλίδιο προκειμένου να δημιουργηθεί ένα λευκό δείγμα

παραγωγοποίησης (derivatization reagent blank). Στην συνέχεια, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε περιστροφικό αναδευτήρα για 90 min στους 30°C σε θερμοθάλαμο. Έπειτα, έγινε φυγοκέντριση των δειγμάτων για 3 s στις 12000 rpm. Ακολούθως, προστέθηκαν σε κάθε δείγμα 70 μ L MSTFA (αντιδραστήριο σιλυλίωσης) με άμεσο πωματισμό. Έπειτα, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε περιστροφικό αναδευτήρα για 30 min στους 37°C σε θερμοθάλαμο. Μετά, έγινε φυγοκέντριση των δειγμάτων για 3 s στις 12000 rpm. Τέλος, αφού τα δείγματα απέκτησαν θερμοκρασία δωματίου, μεταφέρθηκε το περιεχόμενό τους, περίπου 100 μ L σε γυάλινα φιαλίδια αυτόματου δειγματολήπτη, που διαθέτουν micro-inserts και πώμα με ελαστικό διάφραγμα από τεφλόν και προστέθηκαν 20 μ L πρότυπου διαλύματος αλκανίων (3 mg/mL σε πυριδίνη), και έγινε ανάδευση για 30s με τον κυκλοαναδευτήρα (Vortex). Σε φιαλίδιο Eppendorf 2 mL προστέθηκε ποσότητα μίγματος αλκανίων άρτιου αριθμού ατόμων άνθρακα (C8-C24, 3 mg/mL). Ακόμα, σε φιαλίδιο Eppendorf 2 mL προστέθηκε ποσότητα πυριδίνης.

Ανάλυση δειγμάτων με Αέρια Χρωματογραφία-Φασματομετρία Μαζών

Όλα τα δείγματα, τα ενοποιημένα δείγματα (pooled QC), τα φιαλίδια με τα πρότυπα (mixA και mixB), το λευκό δείγμα παραγωγοποίησης (derivatization reagent blank), τα λευκά δείγματα (Blank), το μίγμα αλκανίων και η πυριδίνη αναλύθηκαν με σύστημα αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών Shimadzu GCMS QP2010 Ultra, με αυτόματο δειγματολήπτη AOC-20s. Στην ακολουθία ενέσεων, μετά από κάθε τέσσερα δείγματα τοποθετήθηκε για ανάλυση ένα ενοποιημένο δείγμα (pooled QC). Στον αυτόματο δειγματολήπτη, η έκπλυση ρυθμίστηκε να γίνεται πριν την ένεση με δείγμα. Μετά την έγχυση η έκπλυση της σύριγγας έγινε 6 φορές με οξικό αιθυλεστέρα. Η τεχνική της έγχυσης ήταν τύπου Sandwich. Ο όγκος έγχυσης ήταν 1 μ L splitless για 60 s. Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε σε τριχοειδή στήλη MEGA-5HT (30 m X 0,25 mm, d.f. 0,25 μ m). Χρησιμοποιήθηκε ως φέρον αέριο το ήλιο με σταθερή γραμμική ταχύτητα 36 cm/s. Το πρόγραμμα θερμοκρασίας του φούρνου ήταν 60 °C (για 1 min), ρυθμός ανόδου 10 °C/ min, 325 °C (για 10 min).

Στο φασματόμετρο μαζών, η θερμοκρασία της πηγής ιόντων ρυθμίστηκε στους 250 °C και της γραμμής σύζευξης (interface) στους 290 °C. Το φασματόμετρο μαζών λειτούργησε με ιονισμό ηλεκτρονίων (electron ionization- EI). Η ενέργεια ορίστηκε στα 70 eV και το εύρος σάρωσης μαζών 70-600 m/z.

Η ταυτοποίηση των ενώσεων επιτεύχθηκε συγκρίνοντας τους δείκτες κατακράτησης με τους αντίστοιχους πρότυπων ενώσεων και βιβλιογραφίας καθώς και με δεδομένα φασματομετρίας μαζών από τις βιβλιοθήκες Wiley, Nist και Golm Metabolome Database. Το λογισμικό καταγραφής κι επεξεργασίας των δεδομένων ήταν το GCMS Solution Version 4.30 (Shimadzu). Επιπρόσθετα, για την ταυτόχρονη επεξεργασία και αποσυνέλιξη των φασματομετρικών δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό MS-DIAL (Lai et al., 2017; Tsugawa et al., 2015)

Στατιστική επεξεργασία

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε στην ηλεκτρονική πλατφόρμα MetaboAnalyst 4.0 και περιγράφεται παρακάτω (Xia & Wishart, 2016; <https://www.metaboanalyst.ca/>)

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. Επεξεργασία δεδομένων

Με την χρήση του συστήματος αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών προέκυψαν χρωματογραφήματα για όλα τα δείγματα, τα ενοποιημένα δείγματα (pooled QC), τα πρότυπα (mixA και mixB), το λευκό δείγμα παραγωγοποίησης (derivatization reagent blank), τα λευκά δείγματα (Blank), για το μίγμα αλκανίων και για την πυριδίνη. Τα χρωματογραφήματα παρείχαν μη επεξεργασμένα δεδομένα (raw data) και με την χρήση του λογισμικού MS-DIAL, μετατράπηκαν σε μορφή δεδομένων που επέτρεψε την περαιτέρω στατιστική επεξεργασία.

Αρχικά, τα αρχεία από το λογισμικό GCMS Solution (Shimadzu) μετατράπηκαν σε αρχεία κατάλληλα για το λογισμικό MS-DIAL (*.ABF data) για μη στοχευμένη μεταβολωμική ανάλυση. Έπειτα, με την χρήση του MS-DIAL έγινε αποσυνέλιξη των φασμάτων (deconvolution), έτσι ώστε να μειωθεί ο χρωματογραφικός θόρυβος και να διαχωριστούν οι ενώσεις που εκλούνται ως μία κορυφή. Ακολούθως, έγινε ευθυγράμμιση των κορυφών βάσει των ενοποιημένων δειγμάτων (pooled QC) και ταυτοποιήθηκαν οι κορυφές των μεταβολιτών με βάση τους δείκτες κατακράτησης και τα φάσματα μαζών. Επικουρικά, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό AMDIS (Nist). Τέλος, αφού ολοκληρώθηκαν οι κορυφές προέκυψε μια μήτρα δεδομένων με ταυτοποιημένες ή μη ουσίες και τα αντίστοιχα ύψη κορυφών.

Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν με την παραπάνω πορεία, επεξεργάστηκαν επιπλέον όπως αναφέρουν οι Dunn et al., (2011). Πιο συγκριμένα, αφαιρέθηκαν οι μεταβολίτες που βρέθηκαν στο λευκό δείγμα καθώς και οι ψευδώς θετικές ουσίες (false positives). Επίσης, αφαιρέθηκαν ουσίες που ανευρέθηκαν σε ποσοστό < 50% στα δείγματα ελέγχου, ενώ ενοποιήθηκαν οι ουσίες που έδωσαν δύο ή περισσότερες κορυφές λόγω ατελούς παραγωγοποίησης ή λόγω των μορφών syn/anti (μεθοαμίνωση). Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων με την χρήση του λογισμικού LOWESS μέσω αλγορίθμου. Στην συνέχεια, τα ύψη των κορυφών διαιρέθηκαν με το ύψος του εσωτερικού προτύπου Glycine-d5 (IS) και την μάζα του δείγματος που χρησιμοποιήθηκε στην εκχύλιση. Τέλος, για όλα τα ενοποιημένα δείγματα (pooled QC), υπολογίστηκε η σχετική τυπική απόκλιση (RSD) όλων των μεταβολιτών, και αφαιρέθηκαν οι μεταβολίτες με RSD > 30%.

Με την παραπάνω επεξεργασία προέκυψαν αποτελέσματα που αναλύθηκαν στατιστικά με την χρήση της ηλεκτρονικής πλατφόρμας MetaboAnalyst 4.0.

Πίνακας 4.1 Οι μεταβολίτες που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα κελυφωτών φιστικιών.

A/A	Δείκτης κατακράτησης	m/z	Μεταβολίτης	Αξιοπιστία ταυτοποίησης*	INCHIKEY
1	1109	116	Alanine_2TMS	A	QNAYBMKLOCPYGJ-UHFFFAOYSA-N
2	1227	144	Valine_2TMS	A	KZSNJWFQEVHDMF-UHFFFAOYSA-N
3	1277	174	2-Aminoethanol_3TMS	DEF	HZAXFHJVJLSVMW-UHFFFAOYSA-N
4	1285	158	Leucine_2TMS	DEF	ROHFNLRQFUQHCH-UHFFFAOYSA-N
5	1289	299	Phosphate	DEF	NBIIXXVUZAFNBC-UHFFFAOYSA-N
6	1307	158	Isoleucine_2TMS_major	DEF	AGPKZVBTJJNPAG-UHFFFAOYSA-N
7	1308	142	Proline_2TMS	DEF	ONIBWKKTOPOVIA-UHFFFAOYSA-N
8	1317	174	Glycine_3TMS	A	
9	1317	176	Glycine_d5	IS	No record
10	1324	147	Succinic acid_2TMS	A	KDYFGRWQOYBRFD-UHFFFAOYSA-N
11	1348	189	Glyceric acid_3TMS	DEF	RBNPOMFGQQGHHO-UHFFFAOYSA-N
12	1355	245	Fumaric acid_2TMS	A	VZCYOOQTPROCHFL-OWOJBTEDSA-N
13	1374	156	Pipecolic acid_2TMS	PUT	NILQLFBWXTXNUE-UHFFFAOYSA-N
14	1377	204	Serine_3TMS_major	A	MTCFGRXMIJLQNBG-UHFFFAOYSA-N
15	1404	218	Threonine_3TMS_major	DEF	AYFVYJQAPQTCCC-UHFFFAOYSA-N
16	1452	172	Unknown_1452		No record
17	1509	73	Malic acid_3TMS	DEF	BJEPYKJPYRNKOW-UHFFFAOYSA-N
18	1534	128	Methionine_2TMS	A	FFEARJCKVFRZRR-UHFFFAOYSA-N
19	1535	217	Meso erythritol_4TMS	PUT	UNXHWFMMPAWVPI-ZZXARUISSA-N
20	1537	156	Pyroglutamic acid_2TMS	A	ODHCTXKNWHHXJC-UHFFFAOYSA-N
21	1540	232	Aspartic acid_3TMS	A	CKLJMWTZIZZHCS-UHFFFAOYSA-N
22	1544	174	4-AMINO BUTYRIC ACID_3TMS	DEF	BTCSSZJGUNDROE-UHFFFAOYSA-N

23	1545	230	HYDROXYPROLINE_3TMS	DEF	PMMYEEVYMWASQN-UHFFFAOYSA-N
24	1560	239	Pyrogallol_3TMS	DEF	WQGWDDDDVZFFDIG-UHFFFAOYSA-N
25	1568	142	5-Hydroxynorvaline, 3TMS	PUT	CKLJMWTZIZZHCS-UHFFFAOYNA-N
26	1571	292	Threonic acid_3TMS	DEF	JPIJQSOTBSSVTP-UHFFFAOYSA-N
27	1593	129	2-hydroxyglutaric acid	PUT	HWXBNTAVRSUOJR-UHFFFAOYNA-N
28	1594	198	a-Ketoglutaric acid	PUT	KPGXRSRHYNQIFN-UHFFFAOYSA-N
29	1596	142	unknown_1596		No record
30	1617	244	5-Hydroxypipelic acid, 3TMS	PUT	No record
31	1630	188	asparagine 4TMS minor	PUT	DCXYFEDJOCNDF-REOHCLBHS-A-N
32	1638	246	Glutamic acid_3TMS	A	WHUUTDBXJRKMK-UHFFFAOYSA-N
33	1642	192	Phenylalanine_2TMS	DEF	COLNVLHDVHWLRT-UHFFFAOYSA-N
34	1677	245	unknown_1677		GVDJEQRTZSCIOI-UHFFFAOYSA-N
35	1692	116	Asparagine_3TMS	DEF	DCXYFEDJOCNDF-UHFFFAOYSA-N
36	1697	100	Ribose	PUT	PYMYPHUHKUWMLA-LMVFSUKVSA-N
37	1705	260	alpha-aminoadipic acid	PUT	OYIFNHCXNCRBQI-BYPYZUCNSA-N
38	1743	217	Xylitol_5TMS	DEF	HEBKCHPVOIAQTA-QWWZWVQMSA-N
39	1753	174	Putrescine_4TMS	DEF	KIDHWZJUCRJVML-UHFFFAOYSA-N
40	1755	217	Arabitol_5TMS	DEF	HEBKCHPVOIAQTA-QWWZWVQMSA-N
41	1760	217	Ribitol_5TMS	DEF	HEBKCHPVOIAQTA-UHFFFAOYSA-N
42	1766	70	unknown_1766		No record
43	1787	103	Xylonic acid_5TMS	DEF	QXKAIJAYHKCRRRA-NUNKFHFFSA-N
44	1792	299	3-Phosphoglycerate_4TMS	PUT	AWUCVROLDVIAJX-UHFFFAOYNA-N
45	1807	299	O-Phosphoethanolamine_4TMS	DEF	SUHOOTKUPISOB-E-UHFFFAOYSA-N
46	1809	292	unknown_1809		BJHIKXHVCFQLS-UYFOZJQFSA-N
47	1817	73	Ribonic acid_5TMS	PUT	LKDRXBCSQODPBY-OEXCPVAWSA-N
48	1837	204	Shikimic acid_4TMS	DEF	JXOHGGNKMLTUBP-UHFFFAOYNA-N
49	1841	437	unknown_1841		No record
50	1843	117	unknown_1823		No record
51	1850	273	Citric acid_4TMS	A	KRKNYBCHXYNGOX-UHFFFAOYSA-N
52	1858	204	unknown_sugar_1858		No record
53	1899	345	Quinic acid	DEF	AAWZDTNXLGCEK-LNVDRNJUSA-N
54	1914	103	Fructose_major_5TMS_MeOX	A	BJHIKXHVCFQLS-UYFOZJQFSA-N
55	1917	331	Allantoin	DEF	POJWUDADGALRAB-UHFFFAOYSA-N
56	1920	219	unknown_1920		FBPFZTCFMRRESA-UNTFVMJOSA-N
57	1933	319	Galactose_major, 5TMS, MeOX	A	WQZGKKKJIFFOK-SVZMEOIVSA-N
58	1940	73	Glucose_1_5 TMS MeOX	A	GZCGUPFRVQAU-E-BGPJRJDNSA-N & WQZGKKKJIFFOK-QTVWNMPRSA-N
59	1943	156	Lysine_4TMS	A	KDXKERNBIXSRK-UHFFFAOYSA-N
60	1961	218	Tyrosine_major, 3TMS	A	OUYCCASQSFEME-UHFFFAOYSA-N
61	1971	319	Mannitol_6TMS	DEF	FBPFZTCFMRRESA-KVTDHHDQSA-N
62	1978	73	Sorbitol_6TMS	DEF	FBPFZTCFMRRESA-JGWLITMVSA-N
63	1980	332	Ascorbic acid_4TMS	DEF	No record
64	1987	333	Galacturonic acid_1_major	PUT	IAJILQKETJEXLJ-RSJOWCBRSA-N
65	2010	333	Saccharic acid_2010	PUT	IAJILQKETJEXLJ-RSJOWCBRSA-N
66	2020	204	Hexose_5TMS_2020		No record
67	2046	333	D-Gluconic acid_6TMS	DEF	RGHNJXZEOKUKBD-SQOUGZDYSA-N
68	2058	305	Inositol_6TMS_2058	PUT	CDAISMWEOUEBRE-UHFFFAOYSA-N

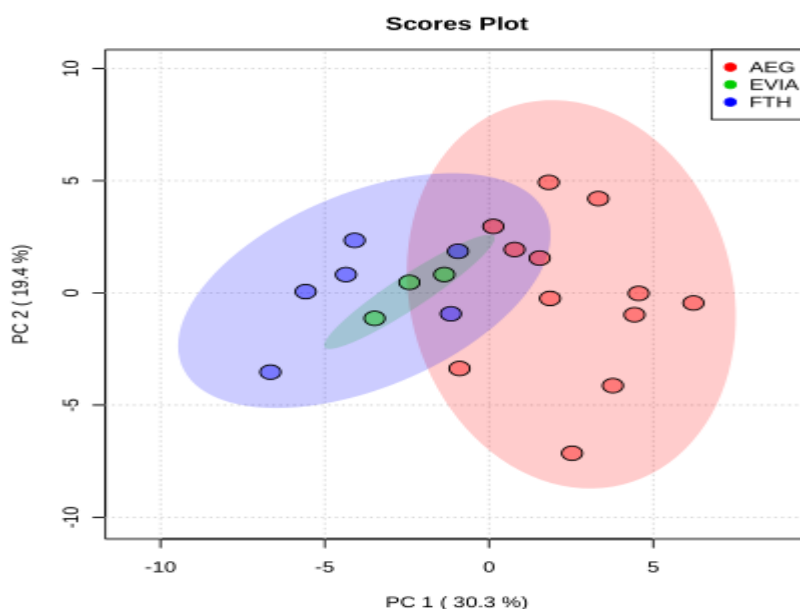
69	2059	333	Glucaric acid_6TMS	PUT	DSLZVSRJTYRBFB-LLEIAEIESA-N
70	2070	318	Inositol_6TMS_2070	PUT	CDAISMWEOUEBRE-GPIVLXJGSA-N
71	2090	292	Galactaric acid_6TMS	PUT	No record
72	2099	259	Pyrazine, 3,6-dihydro-3,6-dimethyl-2,3,5-tris(trimethylsilyloxy)-	PUT	No record
73	2131	305	Inositol_6TMS_2131	PUT	CDAISMWEOUEBRE-UHFFFAOYSA-N
74	2138	441	Uric acid	PUT	LEHOTFFKMJEONL-UHFFFAOYSA-N
75	2159	245	unknown_2159		No record
76	2211	218	Tryptophan_2TMS	PUT	QIVBCDIJAJPQS-VIFPVBQESA-N
77	2355	204	galactose-6-phosphate 2	PUT	NBSCHQHZLSJFNQ-SVZMEOIVSA-N
78	2413	433	unknown_2413		No record
79	2425	204	Unknown_2425		No record
80	2468	318	Inositol phosphate_7TMS	PUT	No record
81	2496	204	Salicyl alcohol-beta-glucoside	PUT	NGFMICBWJRZIBI-UHFFFAOYNA-N
82	2538	204	Lactose_8TMS_2538	PUT	GUBGYTABKSRVRQ-XLOQQCSPSA-N
83	2552	204	Unknown_2552		No record
84	2590	219	unknown_2590		No record
85	2649	230	Adenosine_4TMS	DEF	OIRDTQYFTABQOQ-KQYNXXCUSA-N
86	2684	361	Sucrose_8TMS	A	CZMRCDWAGMRECN-UGDNZRGBSA-N
87	2698	204	Sugar_2698		GUBGYTABKSRVRQ-UHFFFAOYNA-N
88	2713	191	D-(+)-Trehalose	PUT	HDTRYLNUVZCQOY-LIZSDCNHSA-N
89	2724	204	Cellobiose_8TMS	PUT	No record
90	2732	361	Maltose_2732	PUT	GUBGYTABKSRVRQ-PICCSMPSSA-N
91	2764	204	Maltose_2764	PUT	VQHSOMBJVWLPJR-JVCRWLNRSA-N
92	2772	361	Lactose_2772	PUT	GUBGYTABKSRVRQ-DCSYEGIMSA-N
93	2776	324	Guanosine	PUT	NYHBQMVGNKIUIF-UUOKFMHZA-N
94	2789	361	Lactose_2789	PUT	GUBGYTABKSRVRQ-DCSYEGIMSA-N
95	2822	361	Phenolic_2822	PUT	HDTRYLNUVZCQOY-LIZSDCNHSA-N
96	2843	368	Epicatechin_5TMS	PUT	PFTAWBLQPZVEMU-UHFFFAOYNA-N
97	2862	368	Catechine_5TMS	PUT	PFTAWBLQPZVEMU-DZGQCQFKSA-N
98	2871	204	Unknown_2870		No record
99	2895	361	sugar_2895		SERLAGPUMNYUCK-DCUALPFSSA-N
100	2900	456	gallocatechin	PUT	XMOCLSLCDHWDHP-SWLSCSKDSA-N
101	2910	456	Epigallocatechin	PUT	No record
102	2934	204	galactinol_2934	PUT	VCWMRQDBPZKXKG-ZNVDUFQESA-N
103	2975	204	galactinol_2975	PUT	VCWMRQDBPZKXKG-ZNVDUFQESA-N
104	3067	204	unknown_3067		No record
105	3082	204	galactinol_3082	PUT	VCWMRQDBPZKXKG-ZNVDUFQESA-N
106	3349	361	Raffinose	PUT	MUPFEKGTMRGPLI-ZQSKZDJDSA-N

* A: ταυτοποίηση με εξωτερικό πρότυπο, DEF: συμφωνία φάσματος και RI, PUT: συμφωνία μόνο με φάσμα μάζας

4.2. Πολυμεταβλητή Ανάλυση

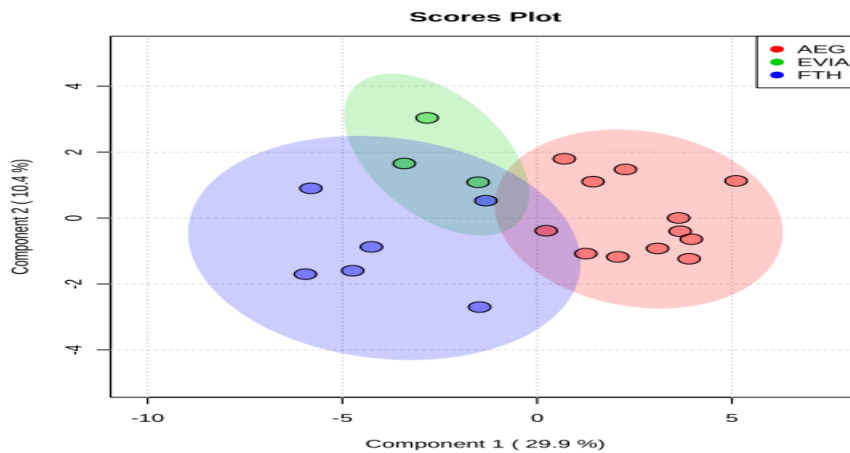
Τα δεδομένα επεξεργάστηκαν με την ηλεκτρονική πλατφόρμα MetaboAnalyst 4.0. Τα δείγματα χωρίστηκαν σε τρεις κατηγορίες δειγμάτων βάσει της περιοχής παραγωγής των φιστικιών. Οι τρεις κατηγορίες ήταν AEG για τα δείγματα που παράχθηκαν στην Αίγινα, EVIA για τα δείγματα που παράχθηκαν στην Εύβοια, FTH για τα δείγματα που παράχθηκαν στην Φθιώτιδα.

Εφαρμόστηκε η μέθοδος των κύριων συνιστωσών (PCA) (Διάγραμμα 4.1). Ένα γράφημα PCA παρουσιάζει ομάδες δειγμάτων με βάση την ομοιότητά τους (X), χωρίς να μεροληπτεί για την κατηγορία που ανήκουν τα δεδομένα (Y). Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 4.1, η διαφοροποίηση των κατηγοριών δεν ήταν ικανοποιητική. Επιπλέον, φαίνεται ότι οι κατηγορίες FTH-EVIA συμπίπτουν.



Διάγραμμα 4.1: Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA) για τα δείγματα που παράχθηκαν στην Αίγινα (AEG), στην Εύβοια (EVIA) και την Φθιώτιδα (FTH).

Επίσης, εφαρμόστηκε η μέθοδος των μερικών ελαχίστων τετραγώνων διακριτικής ανάλυσης (PLS-DA), έτσι ώστε να επιτευχθεί ένας μέγιστος διαχωρισμός μεταξύ των κλάσεων (Διάγραμμα 4.2).



Διάγραμμα 4.2: Μοντέλο PLS-DA για τα δείγματα που παράχθηκαν στην Αίγινα (AEG), στην Εύβοια (EVIA) και την Φθιώτιδα (FTH).

Στο Διάγραμμα 4.2 φαίνεται ότι δεν έγινε καλή διαφοροποίηση των τριών κατηγοριών (AEG, EVIA, FTH) και οι κατηγορίες EVIA, FTH συμπίπτουν. Ακόμα, η επικύρωση του μοντέλου αυτού δεν ήταν καλή (δεν παρουσιάζεται).

Για τους παραπάνω λόγους τα δείγματα χωρίστηκαν ανάλογα με την γεωγραφική τους προέλευση σε δύο κατηγορίες, NORTH-SOUTH (Βόρεια και Νότια). Αφαιρέθηκαν τα δείγματα που παράχθηκαν στην Τροιζήνα και τα Μέγαρα.

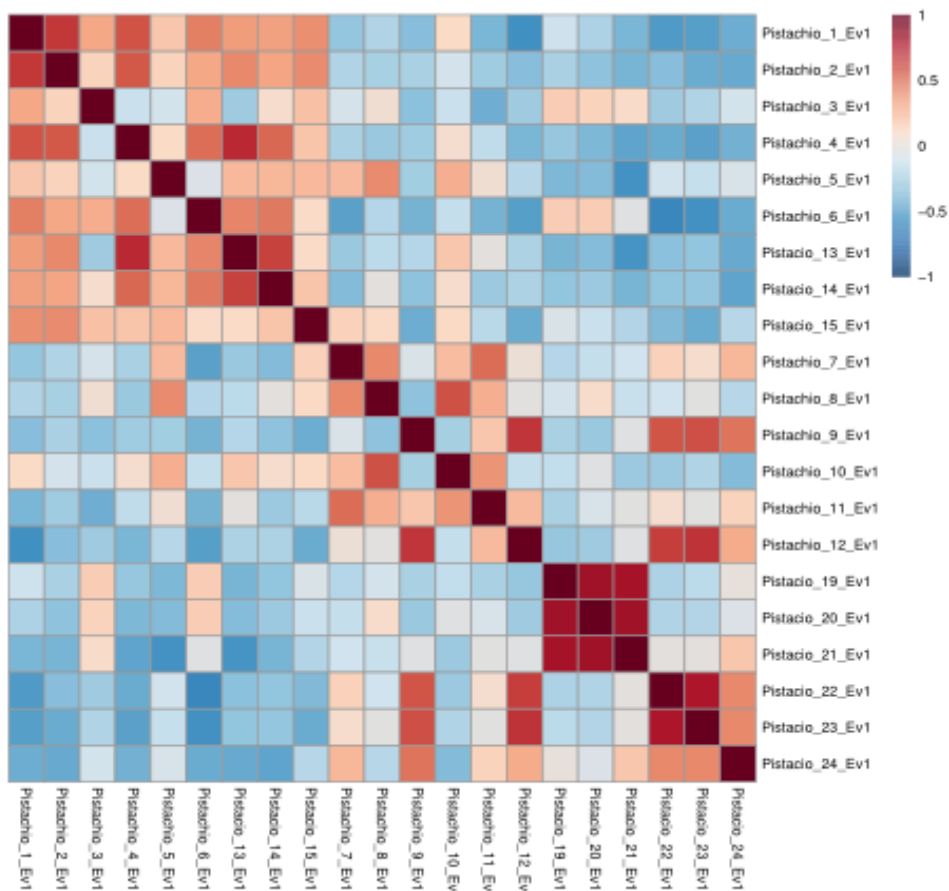
Πίνακας 4.2: Δείγματα που παράχθηκαν Βόρεια.

Δείγματα North	Περιοχή
Pistachio1	Φθιώτιδα
Pistachio2	Φθιώτιδα
Pistachio3	Φθιώτιδα
Pistachio4	Φθιώτιδα
Pistachio5	Φθιώτιδα
Pistachio6	Φθιώτιδα
Pistachio13	Εύβοια
Pistachio14	Εύβοια
Pistachio15	Εύβοια

Πίνακας 4.3: Δείγματα που παράχθηκαν Νότια.

Δείγματα South	Περιοχή
Pistachio 7	Αίγινα
Pistachio 8	Αίγινα
Pistachio 9	Αίγινα
Pistachio 10	Αίγινα
Pistachio 11	Αίγινα
Pistachio 12	Αίγινα
Pistachio 19	Αίγινα
Pistachio 20	Αίγινα
Pistachio 21	Αίγινα
Pistachio 22	Αίγινα
Pistachio 23	Αίγινα
Pistachio 24	Αίγινα

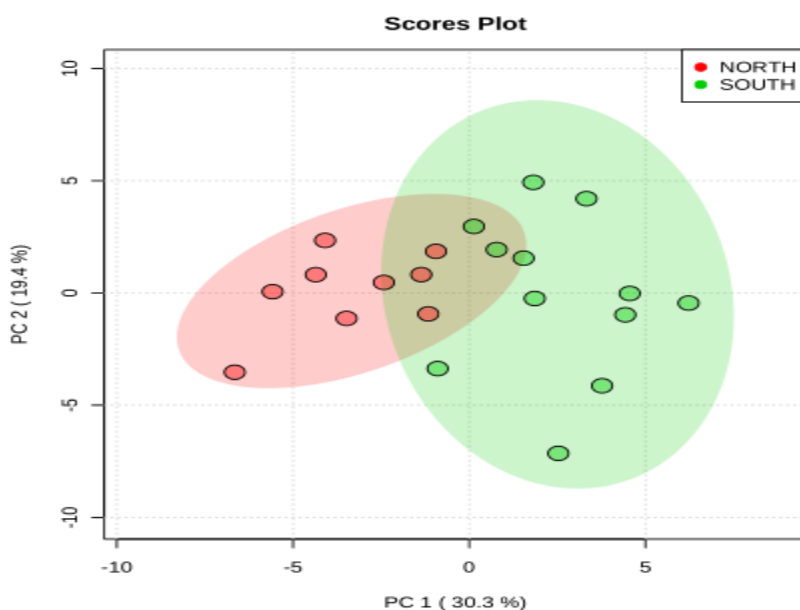
Αρχικά, εφαρμόσθηκε η μέθοδος Ανάλυση Συσχέτισης (Correlation analysis). Η ανάλυση συσχέτισης χρησιμοποιείται για την απεικόνιση των συνολικών συσχετισμών μεταξύ των δειγμάτων.



Διάγραμμα 4.3: Heatmap που παρουσιάζει την συσχέτιση μεταξύ των δειγμάτων (έχουν αφαιρεθεί τα δείγματα από την Τροιζήνα και τα Μέγαρα).

Τα δείγματα με θετική συσχέτιση επισημαίνονται με κόκκινο χρώμα, ενώ τα δείγματα με αρνητική συσχέτιση επισημαίνονται με μπλε χρώμα. Έτσι, στο Διάγραμμα 4.3 φαίνεται η θετική συσχέτιση των δειγμάτων που παράχθηκαν Βόρεια (North-Φθιώτιδα, Εύβοια), Pistachio 1, Pistachio 2, Pistachio 3, Pistachio 4, Pistachio 5, Pistachio 6, Pistachio 13, Pistachio 14, Pistachio 15. Ακόμα, φαίνεται η θετική συσχέτιση μεταξύ των δειγμάτων που παράχθηκαν Νότια (South-Αίγινα), Pistachio 8, Pistachio 20, Pistachio 11, Pistachio 10, Pistachio 7 και Pistachio 24, Pistachio 23, Pistachio 22, Pistachio 21, Pistachio 12, Pistachio 11, Pistachio 9, Pistachio 7, καθώς και μεταξύ των Pistachio 9, Pistachio 12, Pistachio 22, Pistachio 23.

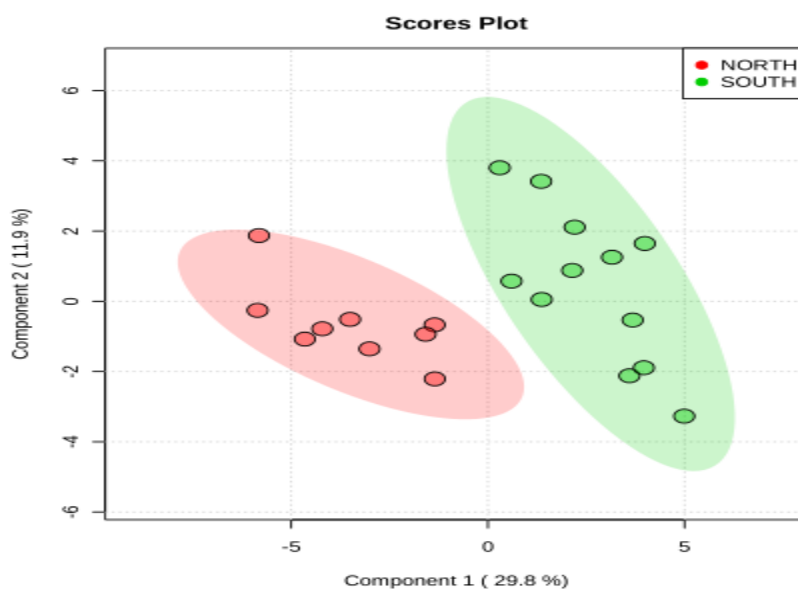
Έπειτα στο PCA scores plot με την μέθοδο των κύριων συνιστωσών φαίνεται ο διαχωρισμός των δειγμάτων σε South – North (Διάγραμμα 4.4).



Διάγραμμα 4.4: Διαχωρισμός των δειγμάτων σε South – North με το μοντέλο των κύριων συνιστωσών (PCA scores plot).

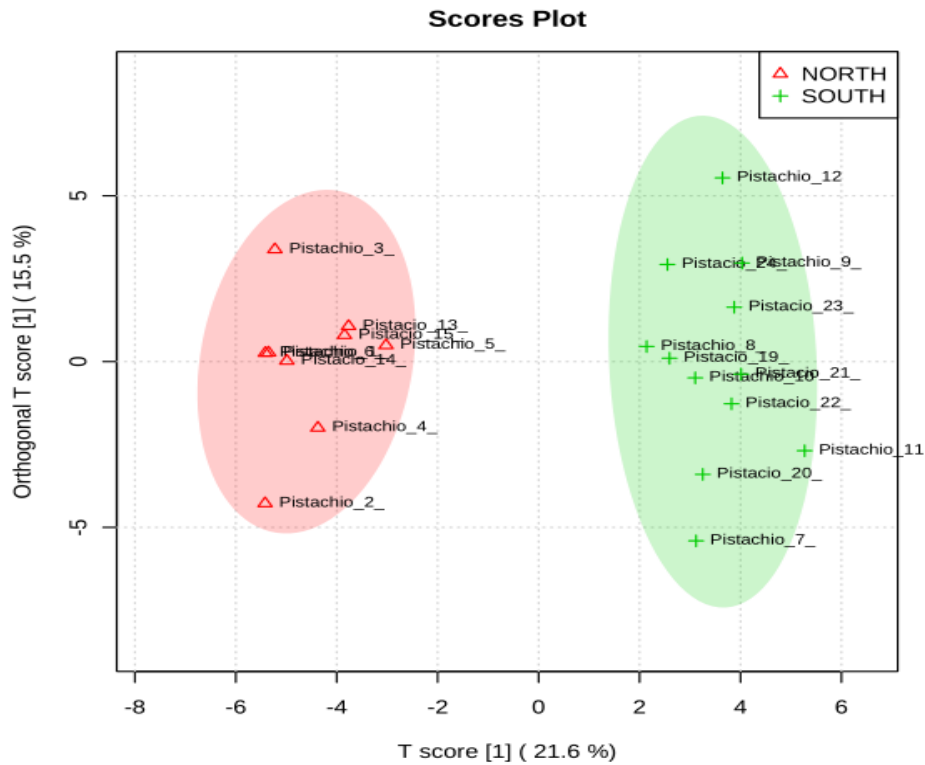
Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 4.4, ο διαχωρισμός των δειγμάτων σε South – North είναι σαφώς καλύτερος συγκριτικά με τον διαχωρισμό των δειγμάτων σε Αίγινα-Εύβοια-Φθιώτιδα (Διάγραμμα 4.1). Επισημαίνεται ότι όλα τα δείγματα South αφορούν αποκλειστικά φιστίκι Αιγίνης.

Στην συνέχεια έγινε διάγραμμα PLS-DA scores plot (Διάγραμμα 4.5), έτσι ώστε να επιτευχθεί ένας μέγιστος διαχωρισμός μεταξύ των κλάσεων. Παρόλο που ο διαχωρισμός κρίνεται ικανοποιητικός, η επικύρωση του μοντέλου δεν ήταν καλή (δεν παρουσιάζεται).

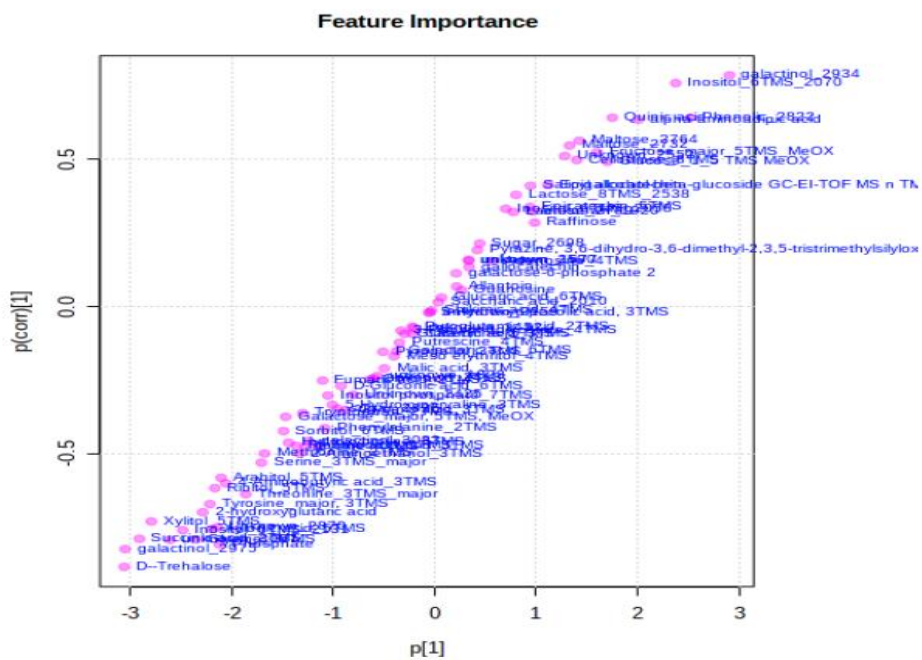


Διάγραμμα 4.5: Διαχωρισμός των δειγμάτων σε South – North με το μοντέλο μερικών ελαχίστων τετραγώνων διακριτικής (PLS-DA).

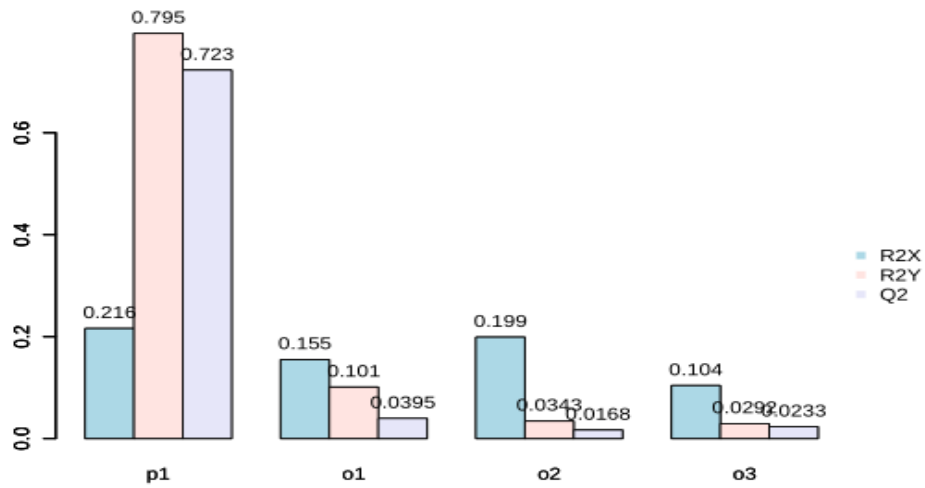
Στην συνέχεια, δημιουργήθηκαν διαγράμματα (Διαγράμματα 4.6,4.7,4.8,4.9) με το μοντέλο OPLS-DA (Orthogonal Partial Least Squares-Discriminant Analysis). Πρόκειται για ένα μοντέλο που χρησιμοποιείται για τη μείωση των διαστάσεων και την αναγνώριση των φασματικών χαρακτηριστικών που οδηγούν στο διαχωρισμό ομάδων. Η μέθοδος OPLS-DA δίνει την δυνατότητα δημιουργίας μοντέλων που είναι λιγότερο περίπλοκα και πιο διορατικά από την PLS-DA. Το μοντέλο αυτό δίνει την δυνατότητα διάκρισης ενός συνόλου δεδομένων σχετικής με την προβλέψιμη διάκριση, αλλά επιτρέπει και τον διαχωρισμό χωρίς συσχέτισμό με την προβλεπόμενη διάκριση.



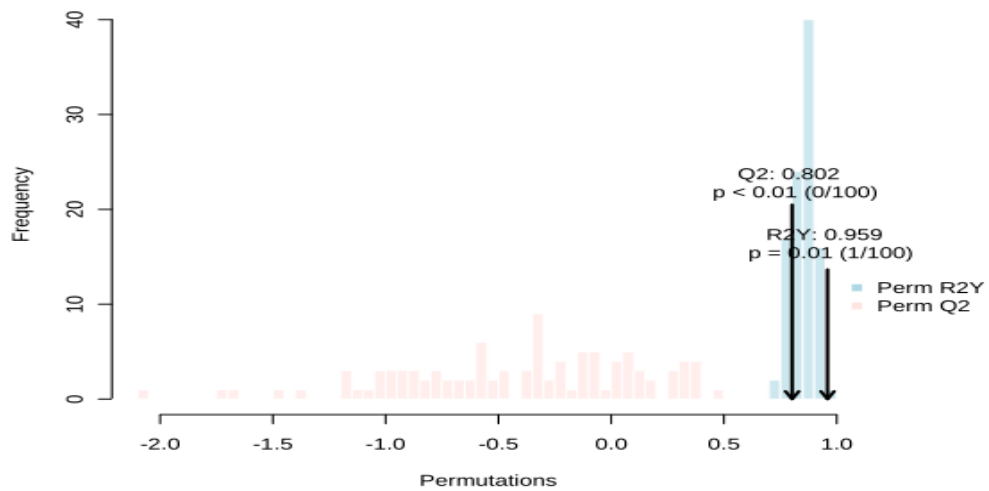
Διάγραμμα 4.6: OPLS-DA γράφημα με βάση όλους τους μεταβολίτες των δειγμάτων South – North.



Διάγραμμα 4.7: Γράφημα-S των φορτίων των μεταβλητών που παρουσιάζει την σημαντικότητα τους στο μοντέλο OPLS-DA, συνδυάζοντας τη συνδιακύμανση και τη συσχέτιση ($p[corr]$).

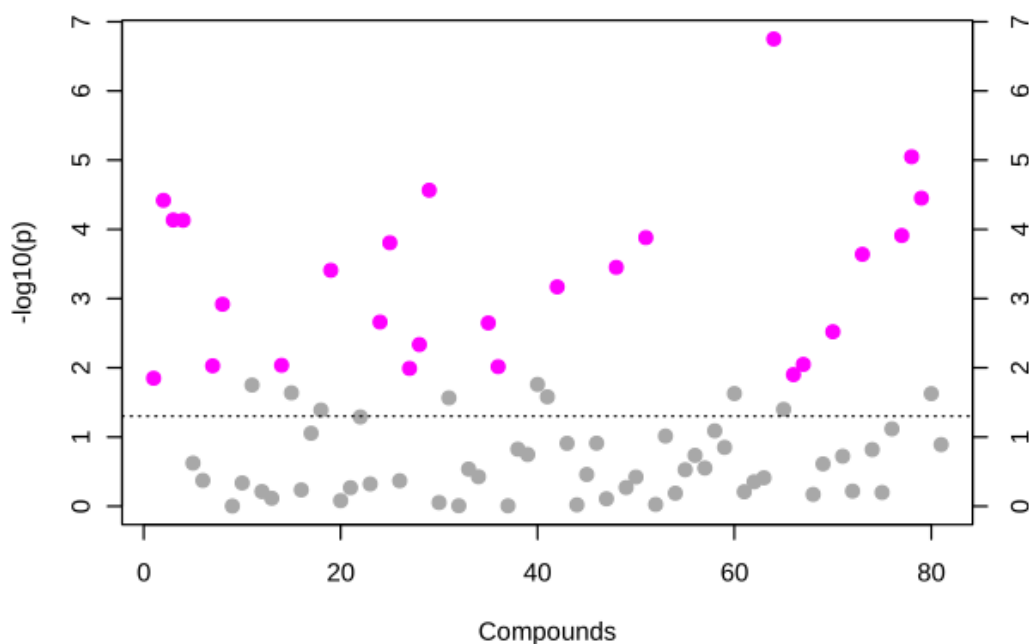


Διάγραμμα 4.8: Επικύρωση του μοντέλου OPLS-DA για τα δείγματα South – North, που παρουσιάζει τους συντελεστές R2X, R2Y και Q2 για τις ομάδες.



Διάγραμμα 4.9: Δοκιμή μεταστοιχείωσης (permutation test) του μοντέλου OPLS-DA, που δείχνει τους παρατηρούμενους και διασταυρωμένους συντελεστές R2Y και Q2.

Από τον συνδυασμό των παραπάνω τεχνικών και των t-tests εντοπίστηκαν οι πιο σημαντικές ενώσεις που διαφοροποιούν τα δείγματα (Διάγραμμα 4.10 και εικόνα 4.1) και πραγματοποιήθηκε εκ νέου πολυμεταβλητή ανάλυση.

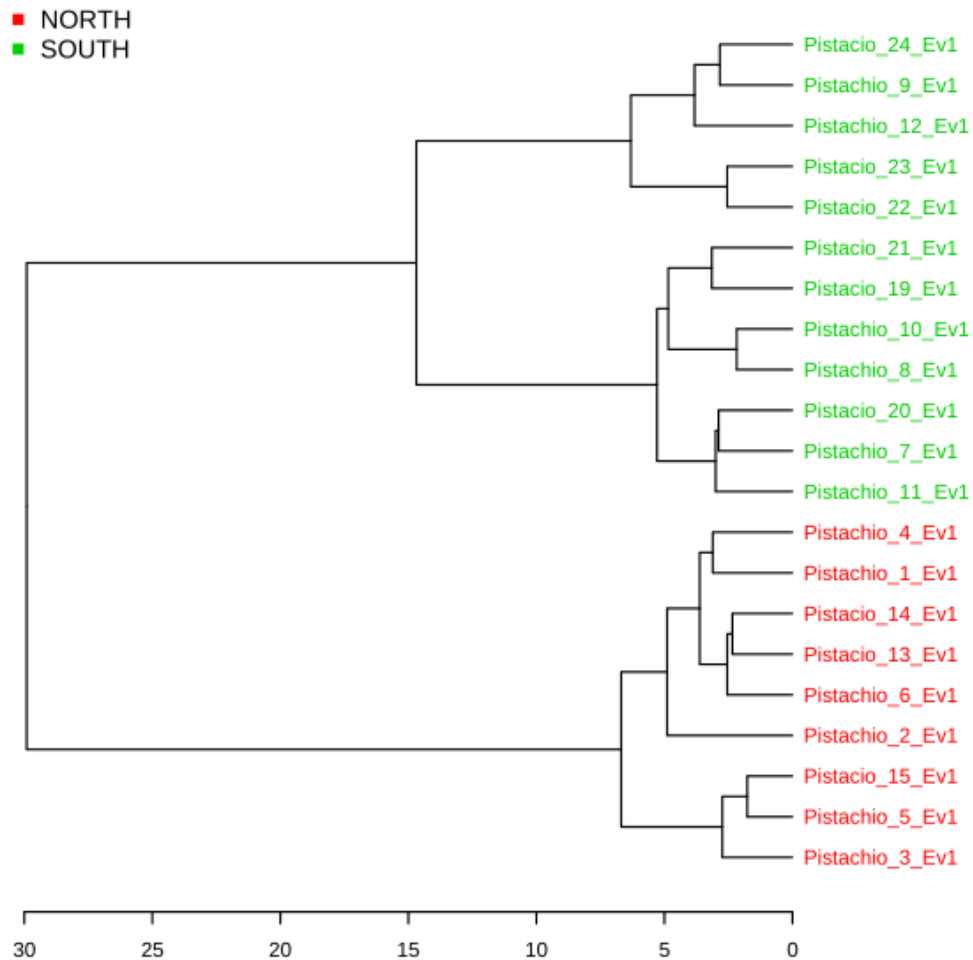


Διάγραμμα 4.10: Οι πιο σημαντικοί μεταβολίτες που επιλέχθηκαν βάση των t-tests σε στάθμη εμπιστοσύνης 95%. Τα ροζ σημεία αντιπροσωπεύουν σημαντικούς μεταβολίτες ($p < 0,05$). Οι τιμές p έχουν λογαριθμηθεί προκειμένου οι πιο σημαντικοί μεταβολίτες (με μικρότερες τιμές p) να εμφανίζονται ψηλότερα στο γράφημα.

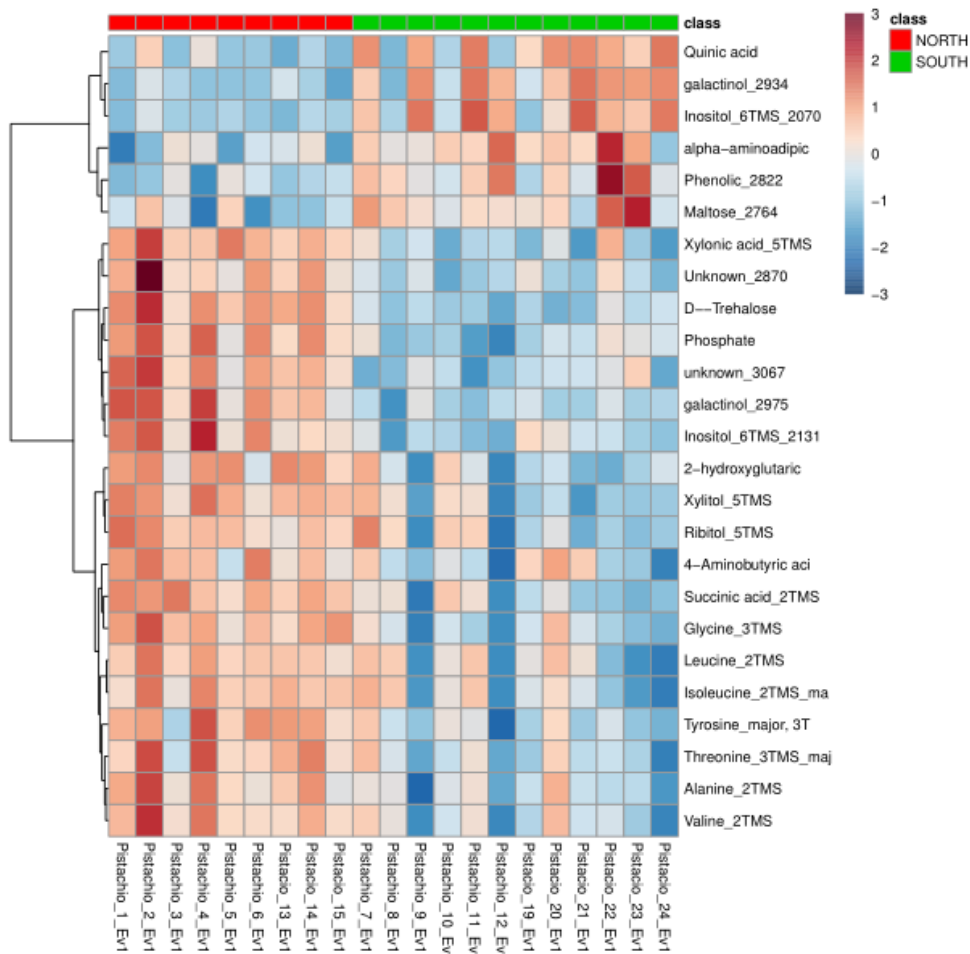
Compounds	t.stat	p.value	$-\log_{10}(p)$	FDR
1 D-Trehalose	7.9698	1.7727e-07	6.7514	1.4359e-05
2 galactinol_2975	6.003	8.9213e-06	5.0496	0.00036131
3 Xylonic acid_5TMS	5.4861	2.7163e-05	4.566	0.00061607
4 unknown_3067	5.3659	3.534e-05	4.4517	0.00061607
5 Phosphate	5.3326	3.8029e-05	4.4199	0.00061607
6 Glycine_3TMS	5.0377	7.3089e-05	4.1361	0.00085323
7 Succinic acid_2TMS	5.0337	7.3736e-05	4.1323	0.00085323
8 galactinol_2934	-4.807	0.00012252	3.9118	0.0011828
9 Inositol_6TMS_2131	4.7758	0.00013142	3.8813	0.0011828
10 Xylitol_5TMS	4.7001	0.00015588	3.8072	0.0012626
11 Unknown_2870	4.5305	0.00022877	3.6406	0.0016846
12 Inositol_6TMS_2070	-4.3393	0.00035328	3.4519	0.0023846
13 2-hydroxyglutaric acid	4.2963	0.00038965	3.4093	0.0024278
14 Tyrosine_major_3TMS	4.0547	0.00067625	3.1699	0.0039126
15 Threonine_3TMS_major	3.8015	0.0012056	2.9188	0.0065104
16 alpha-aminoadipic acid	-3.5417	0.0021789	2.6618	0.010704
17 Quinic acid	-3.5283	0.0022464	2.6485	0.010704
18 Phenolic_2822	-3.3992	0.0030098	2.5215	0.013544
19 Ribitol_5TMS	3.2098	0.0046119	2.3361	0.019661
20 Maltose_2764	-2.9132	0.0089159	2.0498	0.033879
21 4-Aminobutyric acid_3TMS	2.8995	0.0091891	2.0367	0.033879
22 Serine_3TMS_major	2.8914	0.009353	2.029	0.033879
23 Fructose_major_5TMS_MeOX	-2.8786	0.0096201	2.0168	0.033879
24 Arabitol_5TMS	2.8521	0.010195	1.9916	0.034409
25 Maltose_2732	-2.7575	0.012528	1.9021	0.040592
26 2-Aminoethanol_3TMS	2.7018	0.014133	1.8498	0.04403

Εικόνα 4.1: Παρουσιάζει τους πιο σημαντικούς μεταβολίτες όπως προέκυψαν βάση των t-tests.

Πραγματοποιήθηκε ιεραρχική ανάλυση κατά συστάδες (hierarchical cluster analysis). Σε αυτήν την μέθοδο, κάθε δείγμα ξεκινά ως ξεχωριστή συστάδα και με την βοήθεια των αλγόριθμων τα δείγματα συνδυάζονται σταδιακά μέχρις ότου όλα να ανήκουν σε μία συστάδα. Χρησιμοποιούνται δύο παράμετροι. Η πρώτη παράμετρος είναι το μέτρο ομοιότητας – Ευκλείδεια απόσταση, η συσχέτιση του Pearson, η συσχέτιση του Spearman. Η άλλη παράμετρος είναι οι αλγόριθμοι ομαδοποίησης.

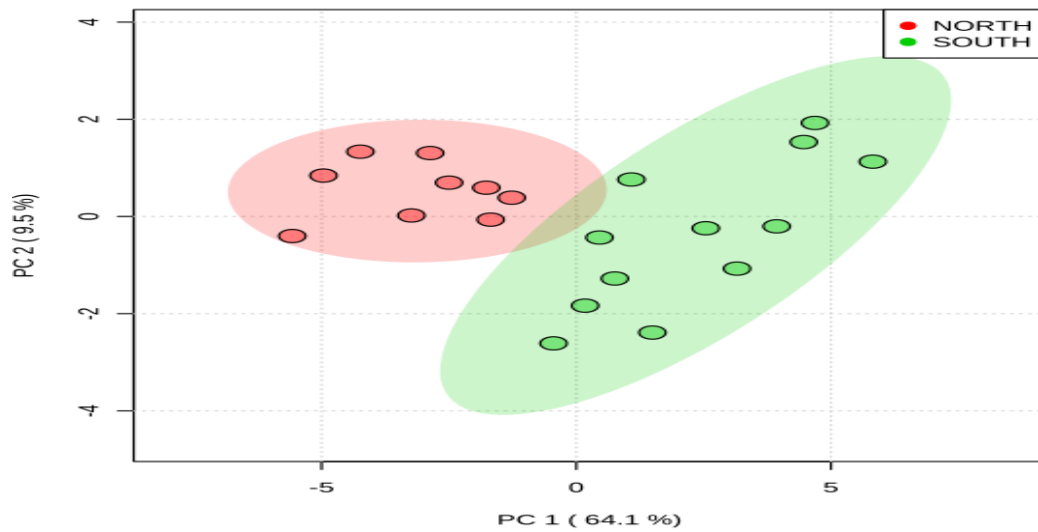


Διάγραμμα 4.11: Δενδρόγραμμα ομαδοποίησης των δειγμάτων σε South-North, με τις πιο σημαντικές ενώσεις που διαφοροποιούν τα δείγματα (μέτρηση απόστασης χρησιμοποιώντας το pearson και ομαδοποίηση με αλγόριθμο ward.D).



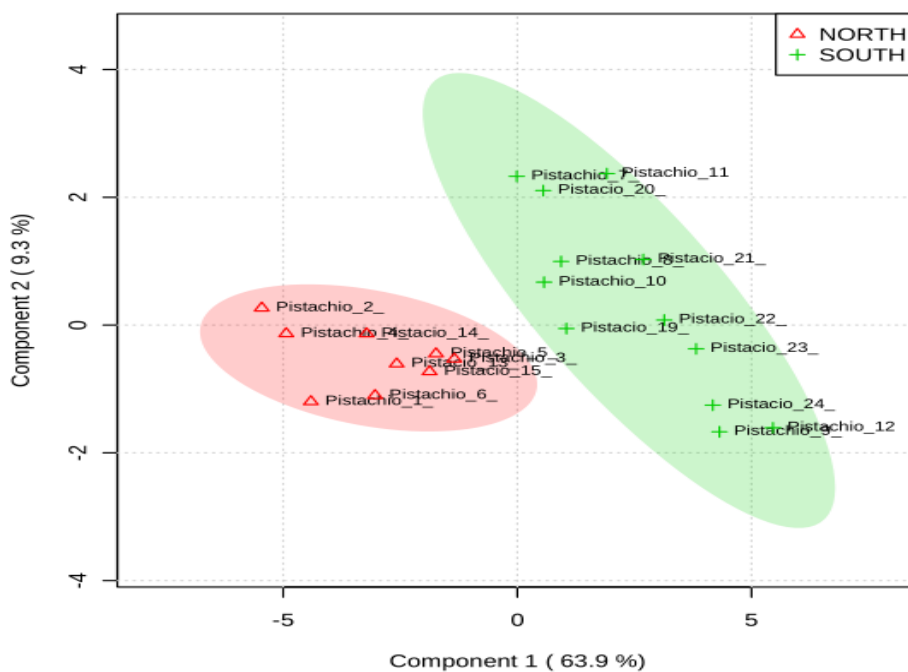
Διάγραμμα 4.12: Heatmap από το αποτέλεσμα της ομαδοποίησης (με Ευκλείδειο μέτρο απόστασης και με αλγόριθμο ομαδοποίησης χρησιμοποιώντας ward.D) για τις 27 χαρακτηριστικές ενώσεις διάκρισης των δειγμάτων.

Στο διάγραμμα 4.12 φαίνεται η θετική συσχέτιση των δειγμάτων North (Pistachio 1, Pistachio 2, Pistachio 3, Pistachio 4, Pistachio 5, Pistachio 6, Pistachio 13, Pistachio 14, Pistachio 15) με τις ενώσεις 2-υδροξυγλουταρικό οξύ, 4-αμινοβουτυρικό οξύ, αλανίνη, D-τρεαλόζη, γαλακτινόλη_2975, ινοσιτόλη_2070, γλυκίνη, ινοσιτόλη_2131, ισολευκίνη, λευκίνη, ριβιτόλη, φωσφορικό άλας, ηλεκτρικό οξύ, θρεονίνη, τυροσίνη, βαλίνη, ξυλονικό οξύ, ξυλιτόλη. Ακόμα, φαίνεται η θετική συσχέτιση των δειγμάτων South (Pistachio 7, Pistachio 8, Pistachio 9, Pistachio 10, Pistachio 11, Pistachio 12, Pistachio 19, Pistachio 20, Pistachio 21, Pistachio 22, Pistachio 23, Pistachio 24) με τις ενώσεις α-αμινοαδipικό οξύ, γαλακτινόλη, ινοσιτόλη, μαλτόζη_2764, φαινολικό οξύ και κινικό οξύ.



Διάγραμμα 4.13: Διαχωρισμός των δειγμάτων σε South – North με την μέθοδο των κύριων συνιστωσών (PCA scores plot) με τις πιο σημαντικές ενώσεις που διαφοροποιούν τα δείγματα.

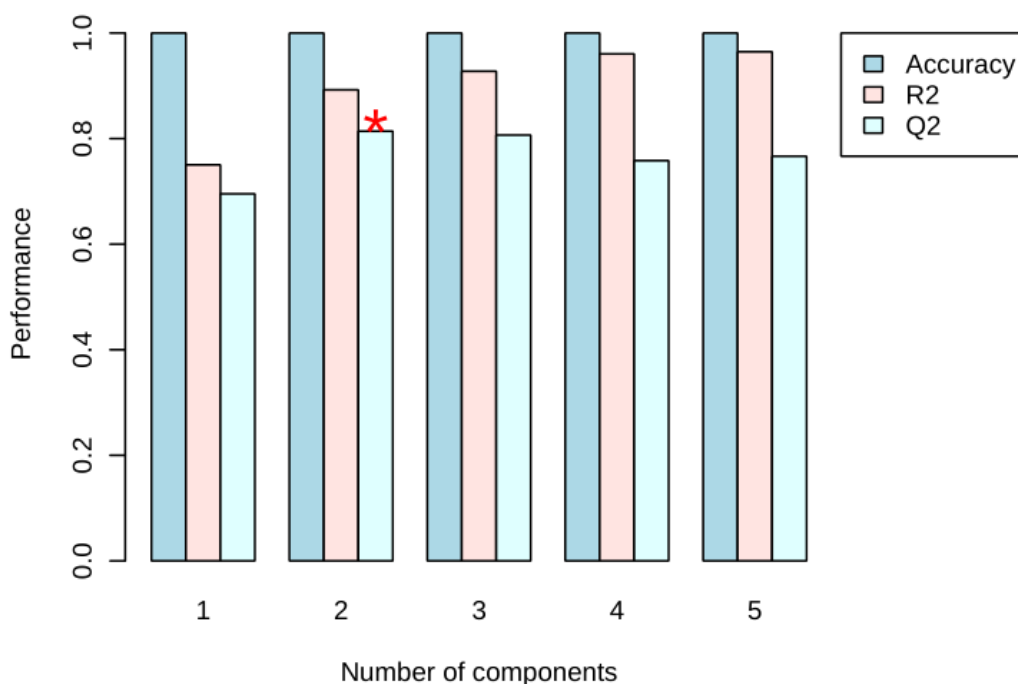
Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 4.13 τα δείγματα με την μέθοδο των κύριων συνιστωσών (PCA) για τις 27 πιο σημαντικές ενώσεις διαχωρίστηκαν σε δύο κατηγορίες, South – North.



Διάγραμμα 4.14 : Διαχωρισμός των δειγμάτων σε South – North με τη μέθοδο μερικών ελαχίστων τετραγώνων διακριτικής ανάλυσης PLS-DA για τις 27 πιο σημαντικές ενώσεις.

Στο διάγραμμα 4.14 φαίνεται ο καλός διαχωρισμός των δειγμάτων σε South – North με την μέθοδο PLS-DA για τις 27 πιο σημαντικές ενώσεις.

Έπειτα, με στόχο να αξιολογηθεί η ικανότητα πρόβλεψης του μοντέλου πραγματοποιήθηκε διασταυρούμενη επικύρωσή του (Cross Validation). Η μέθοδος αυτή καθορίζει τον αριθμό συνιστωσών για τον βέλτιστο διαχωρισμό των δειγμάτων, ώστε να αποκλείεται η περίπτωση υπερπροσαρμογής του μοντέλου (overfitting).

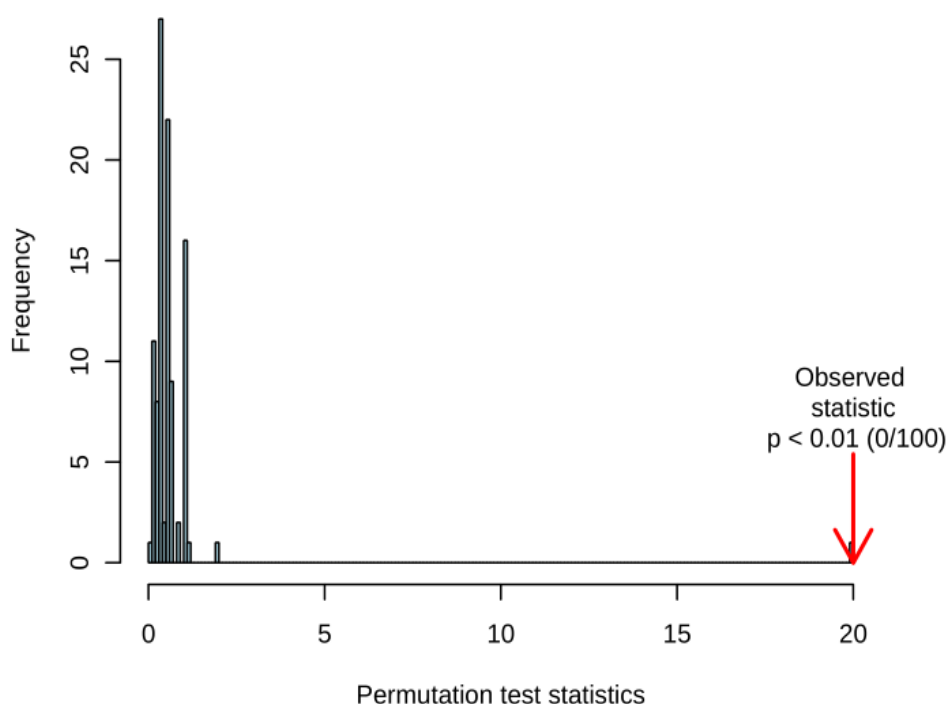


Διάγραμμα 4.15: Διασταυρούμενη επικύρωση του μοντέλου PLS-DA με την μέθοδο LOOCV

Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 4.15, το συγκεκριμένο μοντέλο προσδιορίζεται καλύτερα με δύο συνιστώσες. Για την ικανότητα πρόβλεψης του μοντέλου χρησιμοποιήθηκε η παράμετρος Q2, όπως υπολογίστηκε από την διαδικασία της διασταυρούμενη επικύρωσης. Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή Q2 τόσο καλύτερη είναι η ικανότητα πρόβλεψης του μοντέλου.

Επιπλέον, το μοντέλο αξιολογήθηκε με δοκιμή μεταστοιχείωσης (permutation test). Η δοκιμή μεταστοιχείωσης αποσκοπεί στην εκτίμηση του μοντέλου σε τυχαίο σχηματισμό των κλάσεων. Τα δεδομένα διαχωρίζονται τυχαία σε κλάσεις και έπειτα γίνεται η εκτίμηση του νέου μοντέλου που προκύπτει. Η διεργασία αυτή επαναλαμβάνεται αρκετές φορές. Στο τέλος, γίνεται σύγκριση του αρχικού μοντέλου με τα νέα τυχαία μοντέλα και εξακριβώνεται αν υπάρχει μεταξύ τους στατιστικά

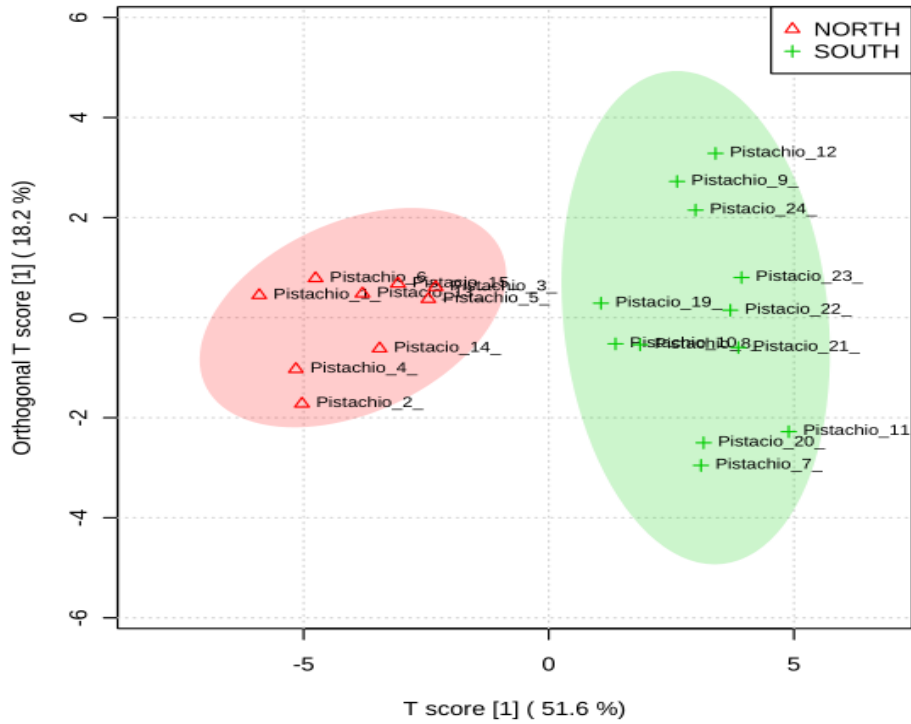
σημαντική διαφορά. Τα μοντέλα εκτιμήθηκαν βάσει του λόγου B/W (sum of squares between/sum of squares within), όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 4.16.



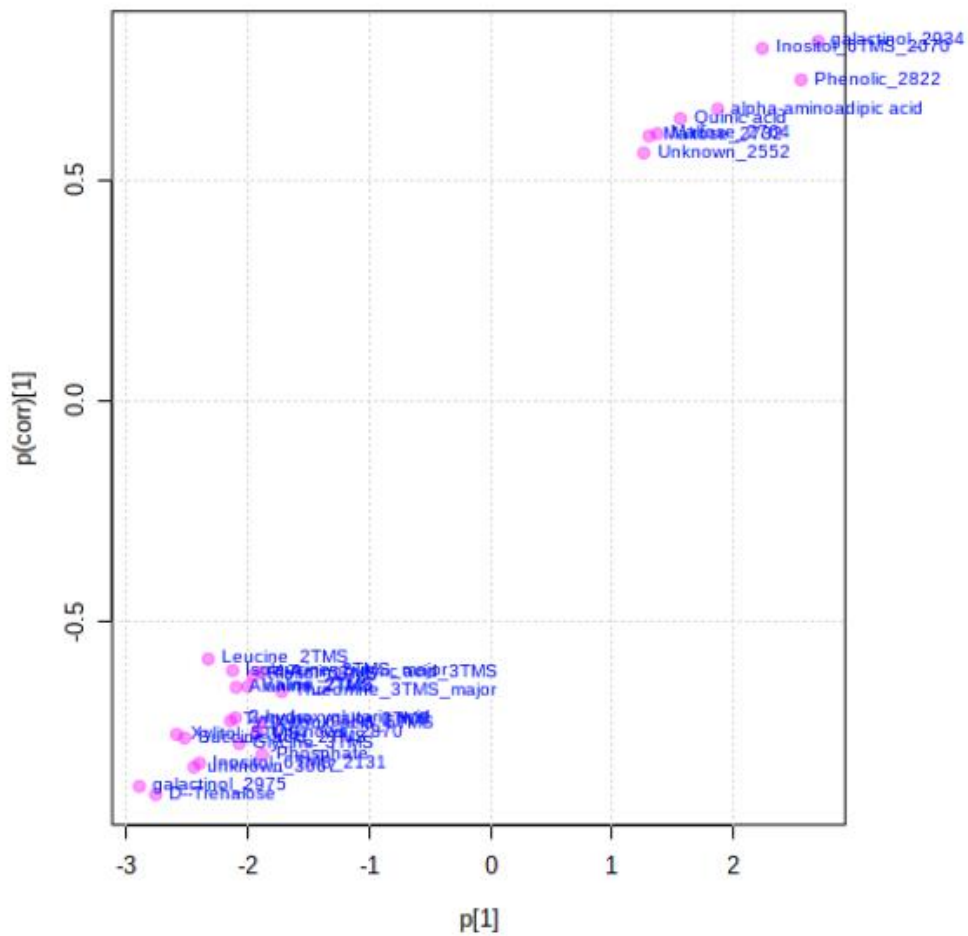
Διάγραμμα 4.16: Κατανομή τυχαίων ταξινομήσεων του μοντέλου PLS-DA.

Σε ένα διάγραμμα κατανομής τυχαίων ταξινομήσεων, όσο πιο δεξιά βρίσκεται ο λόγος του B/W του κανονικού μοντέλου τόσο πιο στατιστικά σημαντική είναι η διαφορά του από τα τυχαία μοντέλα. Όπως, φαίνεται στο Διάγραμμα 4.16, ο λόγος B/W του αρχικού μοντέλου εμφανίζει μεγάλη διαφορά από τους λόγους των τυχαίων μοντέλων, το οποίο σημαίνει ότι η διάκριση των κλάσεων του είναι στατιστικά σημαντική. Έτσι, από τα Διαγράμματα 4.15 και 4.16 συμπεραίνουμε ότι η επικύρωση του συγκεκριμένου μοντέλου είναι καλή. Ωστόσο, πρέπει να είμαστε ιδιαίτερα επιφυλακτικοί λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν.

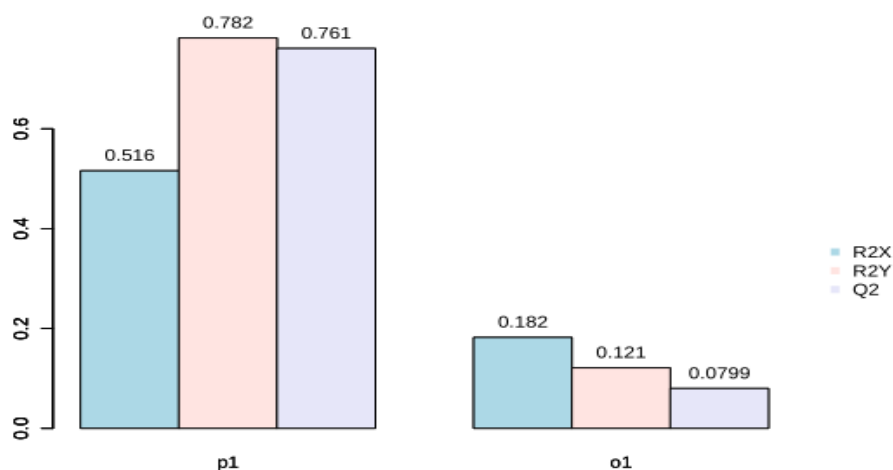
Στην συνέχεια έγιναν τα διαγράμματα με την μέθοδο των ορθογώνιων προβολών σε λανθάνοντες δομές διακριτικής ανάλυσης (OPLS-DA) για τις 27 πιο σημαντικές ενώσεις, όπου η διαφοροποίηση των κλάσεων ήταν επιτυχής (Διάγραμμα 4.17). Επίσης, η αξιολόγηση του μοντέλου ήταν θετική (Διαγράμματα 4.19 και 4.20).



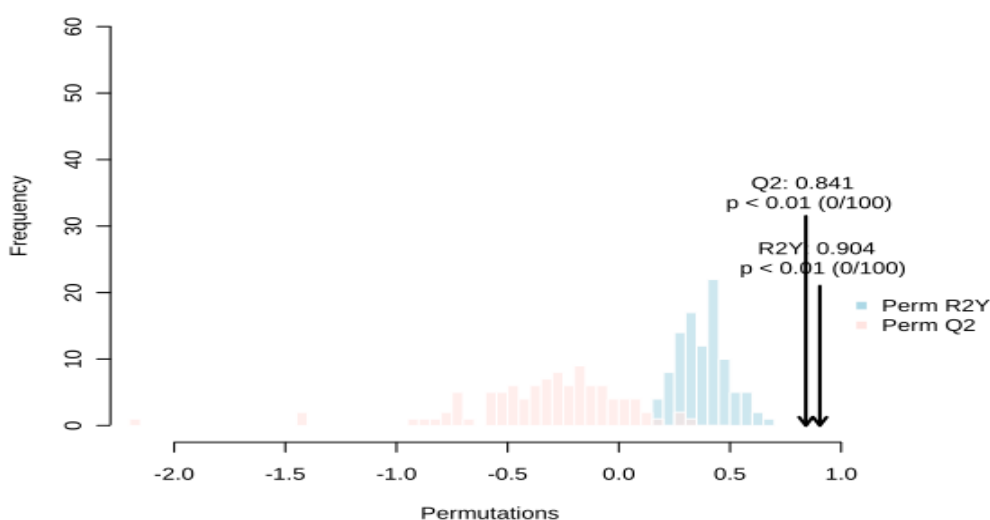
Διάγραμμα 4.17: Μοντέλο OPLS-DA των χαρακτηριστικών μεταβολιτών στα δείγματα South – North



Διάγραμμα 4.18: Μοντέλο OPLS-DA, S-γραφική παράσταση, σε δείγματα South – North, συνδυάζοντας τη συνδιακόμενη και το συσχετισμό (p(corr)) για τις 27 πιο σημαντικές ενώσεις.



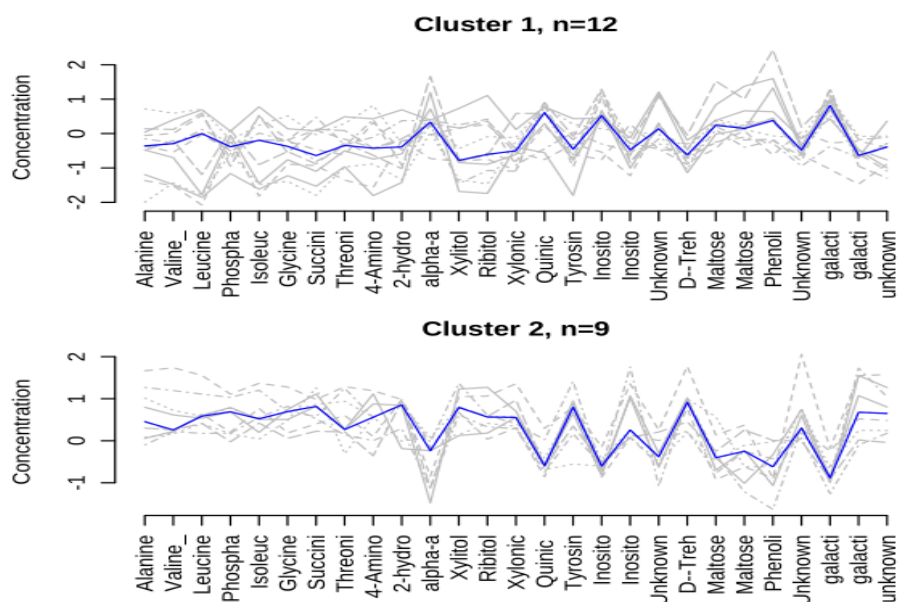
Διάγραμμα 4.19: Μοντέλο OPLS-DA, επισκόπηση σε δείγματα South – North, που παρουσιάζει τα R2X, R2Y, και οι συντελεστές Q2 για τις ομάδες, για τις 27 πιο σημαντικές ενώσεις.



Διάγραμμα 4.20: Δοκιμή μεταστοιχείωσης του μοντέλου OPLS-DA, που δείχνει τους παρατηρούμενους και διασταυρωμένους συντελεστές R2Y και Q2, για τις 27 πιο σημαντικές ενώσεις.

Έπειτα, εφαρμόστηκε Διαχωριστική Ανάλυση Συστάδων (Partitional Clustering) με την μέθοδο K-means. Πρόκειται για μία μέθοδο που μοιράζει τα δεδομένα σε k-συστάδες. Ο αριθμός των συστάδων καθορίζεται από τον αναλυτή. Η συγκεκριμένη μέθοδος μέσω ενός επαναληπτικού αλγορίθμου, διαχωρίζει τα δεδομένα στις συστάδες κρίνοντας ποια είναι πιο κοντά στην παρατήρηση. Ο σκοπός της μεθόδου είναι να ομαδοποιήσει τα δείγματα σε προδιαγεγραμμένο αριθμό συστάδων, έτσι ώστε να επιτυγχάνεται η καλύτερη ομοιομορφία εντός τους. Ο

διαχωρισμός που πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο K-means παρουσιάζεται στην εικόνα 4.2.



Διάγραμμα 4.21: K-means ανάλυση συμπλέγματος. Οι x-άξονες είναι μεταβλητοί δείκτες και οι άξονες y είναι οι σχετικές εντάσεις. Οι μπλε γραμμές αντιπροσωπεύουν διάμεσες εντάσεις αντίστοιχων ομάδων.

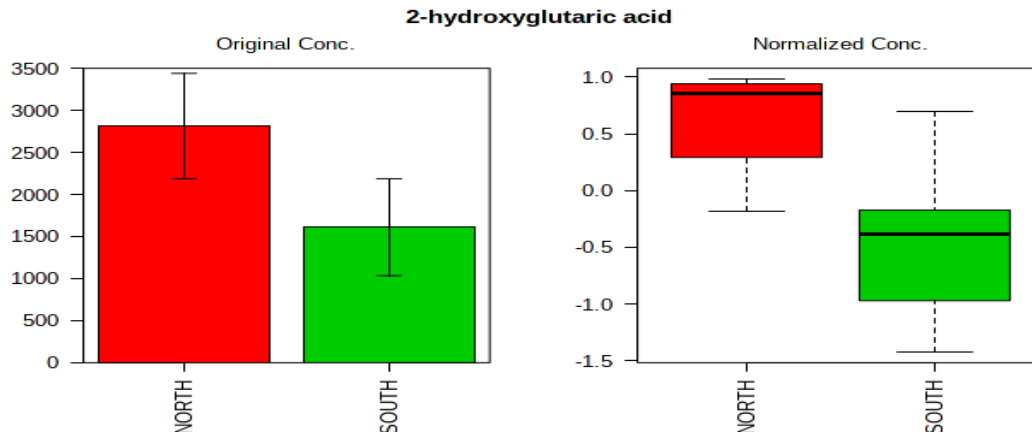
Στο διάγραμμα 4.21 φαίνεται ότι με την K-means ανάλυση συμπλέγματος τα δείγματα χωρίστηκαν σε δύο ομάδες βάση των 27 πιο σημαντικών ενώσεων.

	Samples in each cluster
Cluster(1)	Pistachio_7_Ev1 Pistachio_8_Ev1 Pistachio_9_Ev1 Pistachio_10_Ev1 Pistachio_11_Ev1 Pistachio_12_Ev1 Pistachio_19_Ev1 Pistachio_20_Ev1 Pistachio_21_Ev1 Pistachio_22_Ev1 Pistachio_23_Ev1 Pistachio_24_Ev1
Cluster(2)	Pistachio_1_Ev1 Pistachio_2_Ev1 Pistachio_3_Ev1 Pistachio_4_Ev1 Pistachio_5_Ev1 Pistachio_6_Ev1 Pistachio_13_Ev1 Pistachio_14_Ev1 Pistachio_15_Ev1

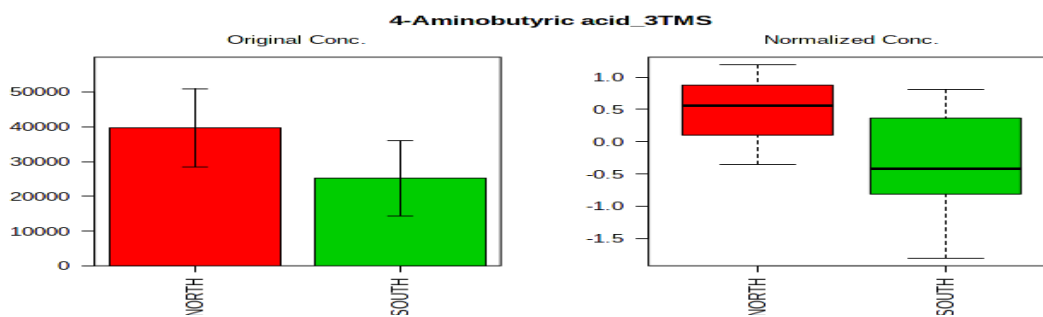
Εικόνα 4.2: Οι συστάδες των δειγμάτων όπως προέκυψαν από την Διαχωριστική Ανάλυση Συστάδων K-means των 27 πιο σημαντικών ενώσεων.

Στην εικόνα 4.2 φαίνεται ο διαχωρισμός των δειγμάτων σε δύο συστάδες με την K-means ανάλυση συμπλέγματος. Τα δείγματα διαχωρίστηκαν ορθά σε συστάδα (1) και συστάδα (2). Η ομάδα (1) περιλαμβάνει τα δείγματα South (Αίγινας), ενώ η ομάδα (2) περιλαμβάνει τα δείγματα North. Έτσι, με την τεχνική K-means ανάλυση συμπλέγματος, επιβεβαιώνεται η δυνατότητα διαχωρισμού των δειγμάτων σε δύο ομάδες, South και North.

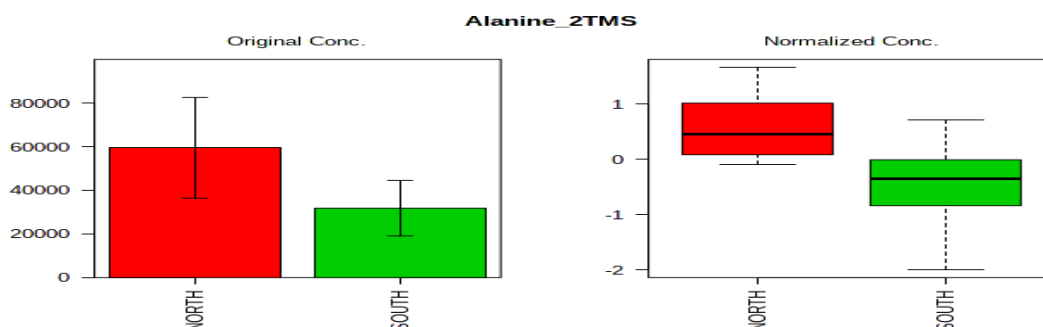
Έγιναν ραβδόγραμμα για τις πιο σημαντικές ουσίες που διαφοροποιούν τα δείγματα σε South και North, βάσει της αρχικής ποσότητας και της ποσότητας μετά από την κανονικοποίηση.



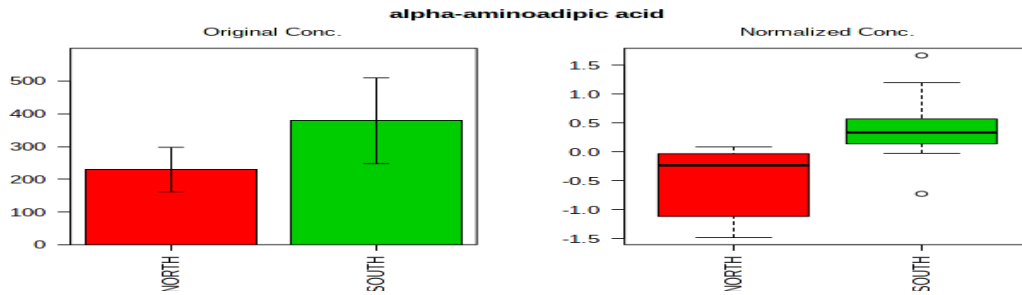
Εικόνα 4.3: Ραβδόγραμμα που παρουσιάζει την ποσότητα 2-υδρόξυγλουταρικού οξέος στα δείγματα South και North πριν και μετά την κανονικοποίηση.



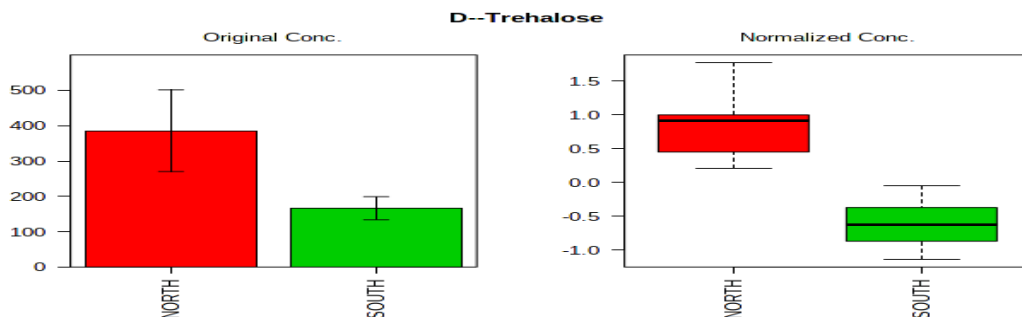
Εικόνα 4.4: Ραβδόγραμμα που παρουσιάζει την ποσότητα 4-αμινοβουτυρικού οξέος 3TMS στα δείγματα South και North πριν και μετά την κανονικοποίηση.



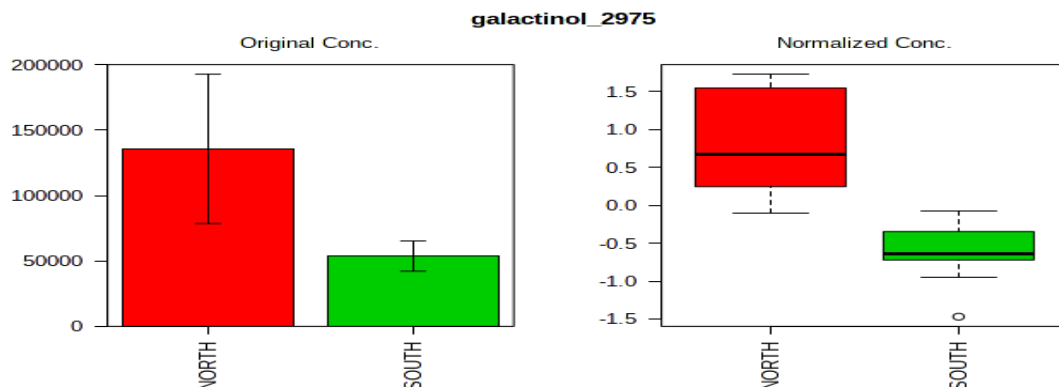
Εικόνα 4.5: Ραβδόγραμμα που παρουσιάζει την ποσότητα αλανίνης 2TMS στα δείγματα South και North πριν και μετά την κανονικοποίηση.



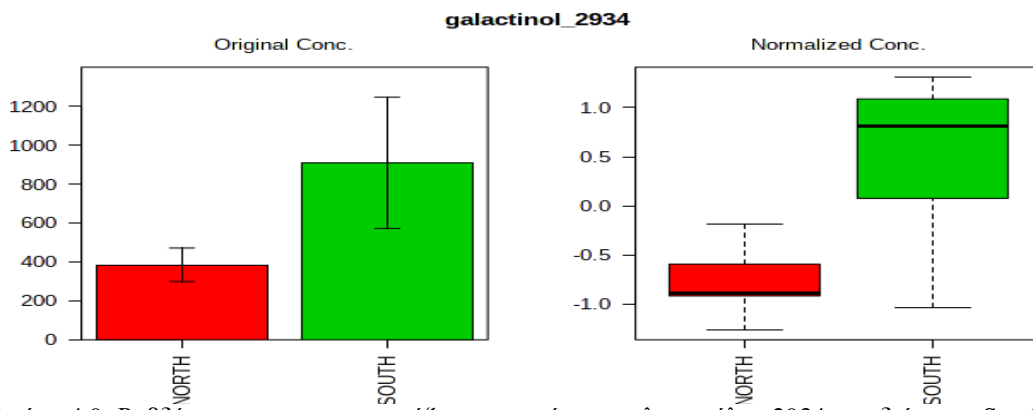
Εικόνα 4.6: Ραβδόγραμμα που παρουσιάζει την ποσότητα α-αμινοαδιπικού οξέος στα δείγματα South και North πριν και μετά την κανονικοποίηση.



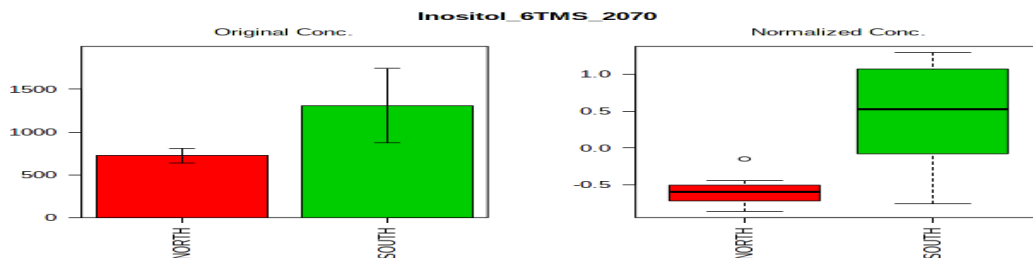
Εικόνα 4.7: Ραβδόγραμμα που παρουσιάζει την ποσότητα D-τρεαλόζης στα δείγματα South και North πριν και μετά την κανονικοποίηση.



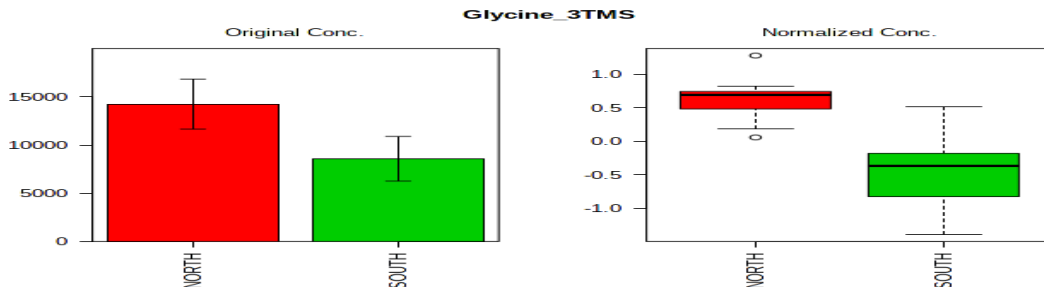
Εικόνα 4.8: Ραβδόγραμμα που παρουσιάζει την ποσότητα γαλακτινόλης 2975 στα δείγματα South και North πριν και μετά την κανονικοποίηση.



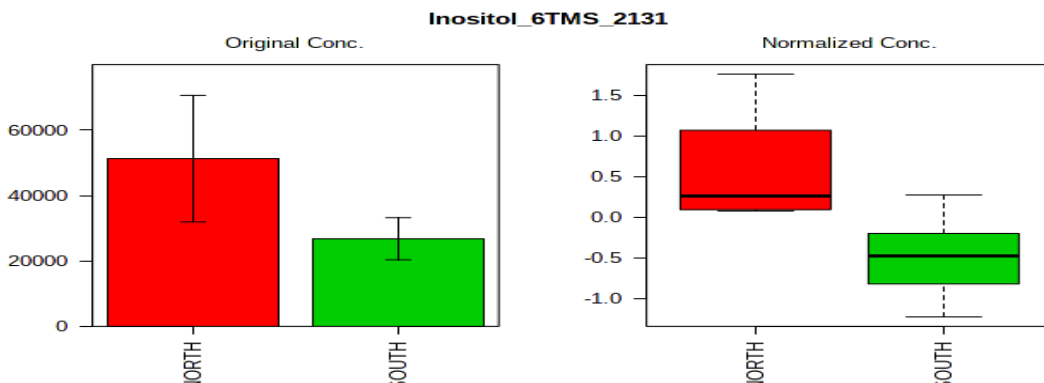
Εικόνα 4.9: Ραβδόγραμμα που παρουσιάζει την ποσότητα γαλακτινόλης 2934 στα δείγματα South και North πριν και μετά την κανονικοποίηση.



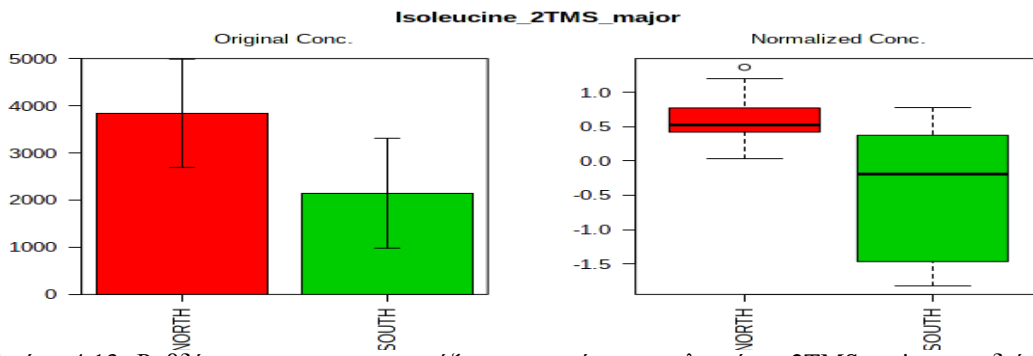
Εικόνα 4.10: Ραβδόγραμμα που παρουσιάζει την ποσότητα ινοσιτόλης 6TMS 2070 στα δείγματα South και North πριν και μετά την κανονικοποίηση.



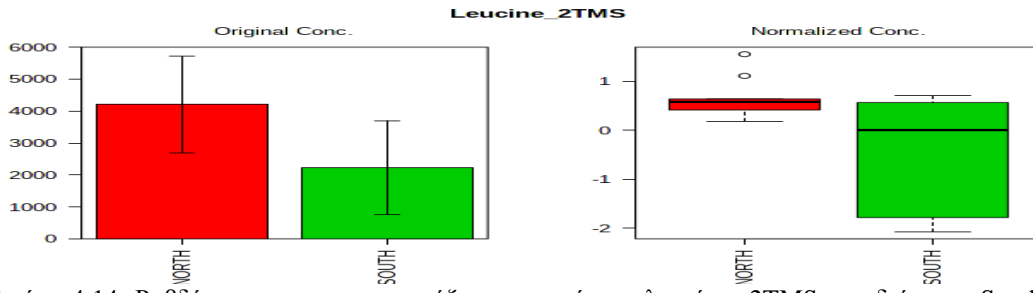
Εικόνα 4.11: Ραβδόγραμμα που παρουσιάζει την ποσότητα γλυκίνης 3TMS στα δείγματα South και North πριν και μετά την κανονικοποίηση.



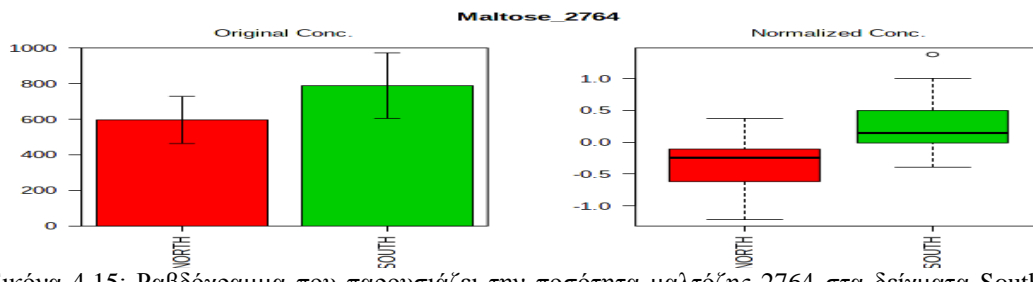
Εικόνα 4.12: Ραβδόγραμμα που παρουσιάζει την ποσότητα ινοσιτόλης 6TMS 2131 στα δείγματα South και North πριν και μετά την κανονικοποίηση.



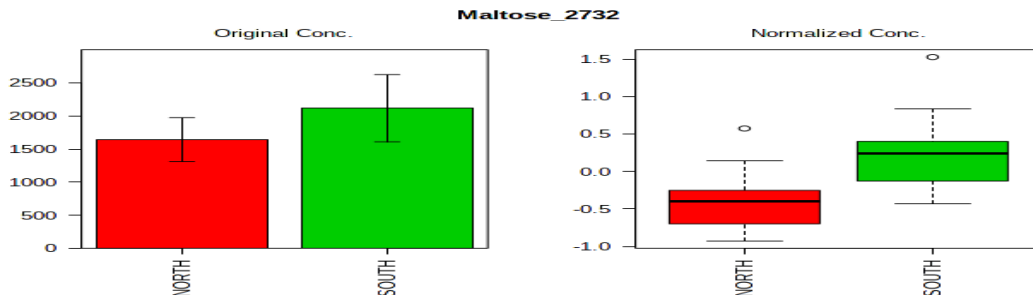
Εικόνα 4.13: Ραβδόγραμμα που παρουσιάζει την ποσότητα ισολευκίνης 2TMS major στα δείγματα South και North πριν και μετά την κανονικοποίηση.



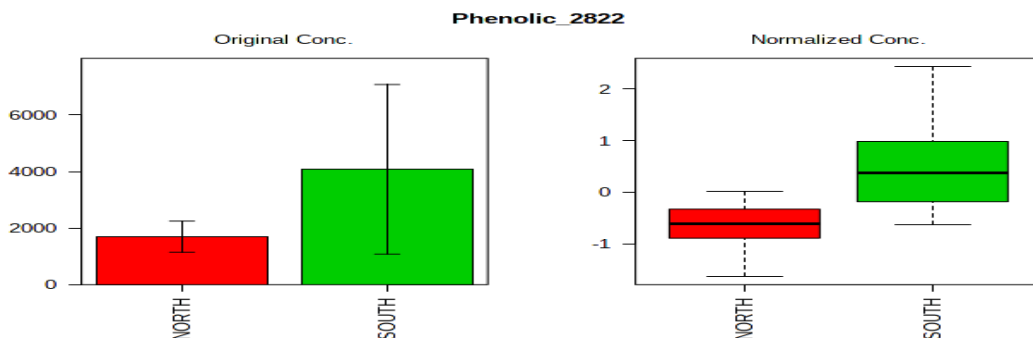
Εικόνα 4.14: Ραβδόγραμμα που παρουσιάζει την ποσότητα λευκίνης 2TMS στα δείγματα South και North πριν και μετά την κανονικοποίηση.



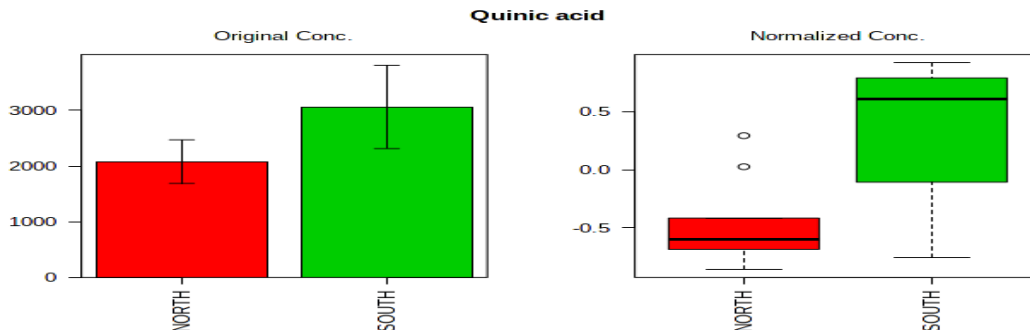
Εικόνα 4.15: Ραβδόγραμμα που παρουσιάζει την ποσότητα μαλτόζης 2764 στα δείγματα South και North πριν και μετά την κανονικοποίηση.



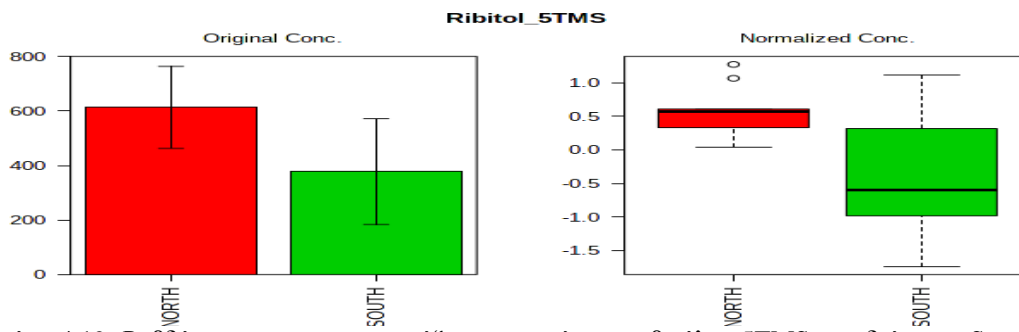
Εικόνα 4.16: Ραβδόγραμμα που παρουσιάζει την ποσότητα μαλτόζης 2732 στα δείγματα South και North πριν και μετά την κανονικοποίηση.



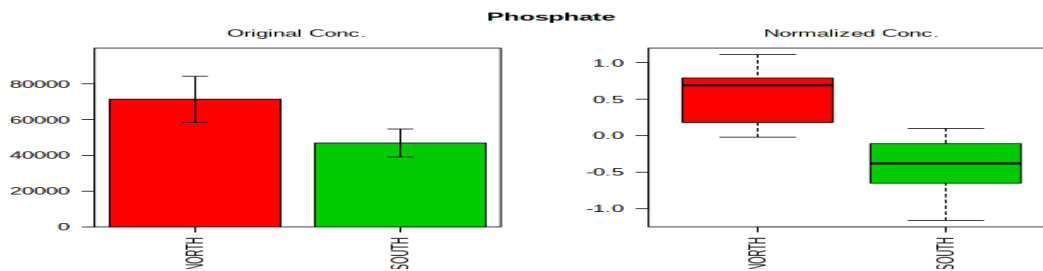
Εικόνα 4.17: Ραβδόγραμμα που παρουσιάζει την ποσότητα φαινολικού οξέος 2822 στα δείγματα South και North πριν και μετά την κανονικοποίηση.



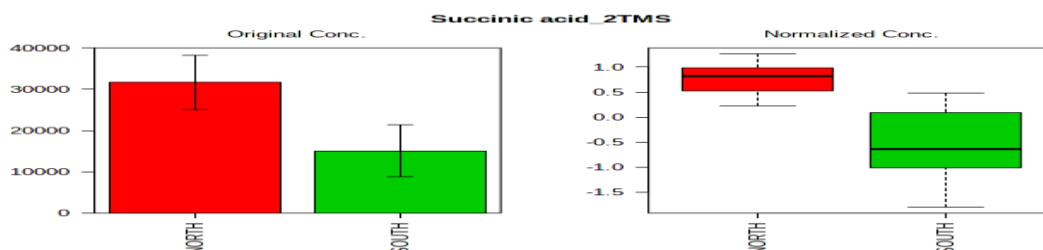
Εικόνα 4.18: Ραβδόγραμμα που παρουσιάζει την ποσότητα κινικού οξέος στα δείγματα South και North πριν και μετά την κανονικοποίηση.



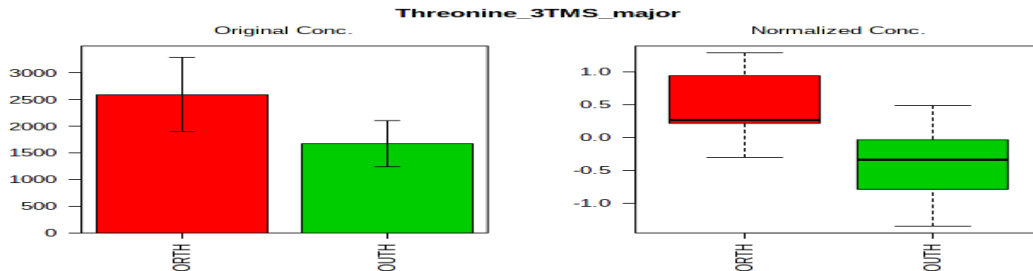
Εικόνα 4.19: Ραβδόγραμμα που παρουσιάζει την ποσότητα ριβιτόλης 5TMS στα δείγματα South και North πριν και μετά την κανονικοποίηση.



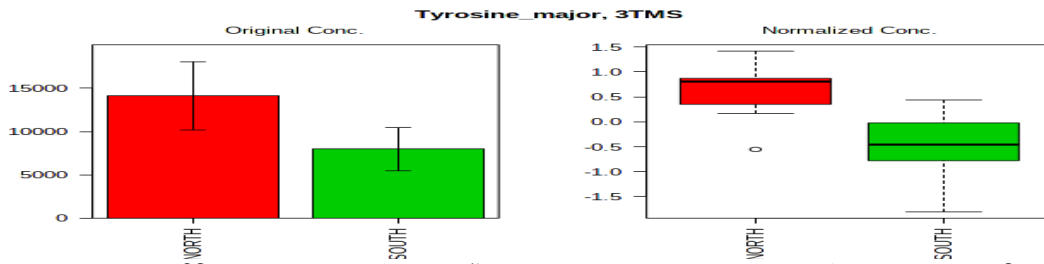
Εικόνα 4.20: Ραβδόγραμμα που παρουσιάζει την ποσότητα φωσφορικού άλατος στα δείγματα South και North πριν και μετά την κανονικοποίηση.



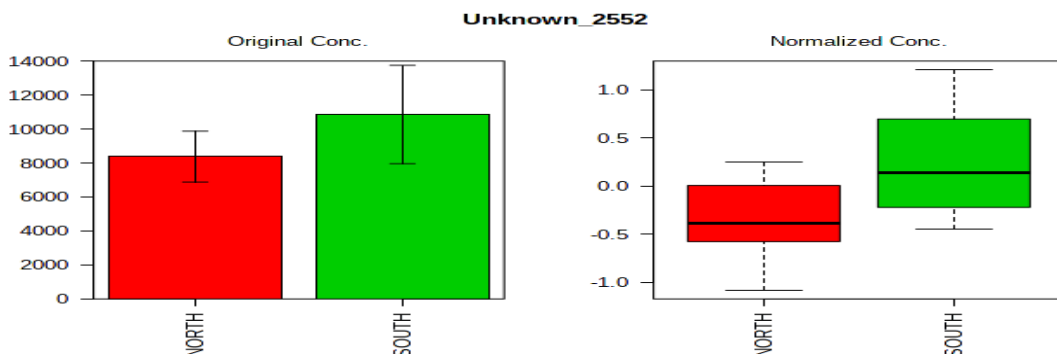
Εικόνα 4.21: Ραβδόγραμμα που παρουσιάζει την ποσότητα ηλεκτρικού οξέος 2TMS στα δείγματα South και North πριν και μετά την κανονικοποίηση.



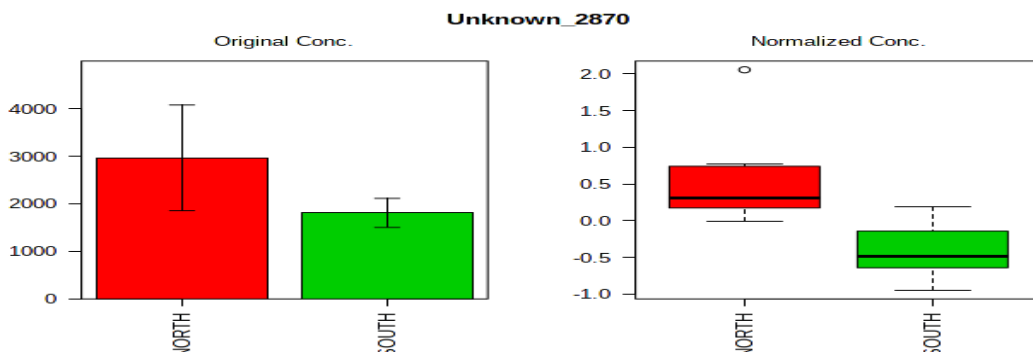
Εικόνα 4.22: Ραβδόγραμμα που παρουσιάζει την ποσότητα θρεονίνης 3TMS στα δείγματα South και North πριν και μετά την κανονικοποίηση.



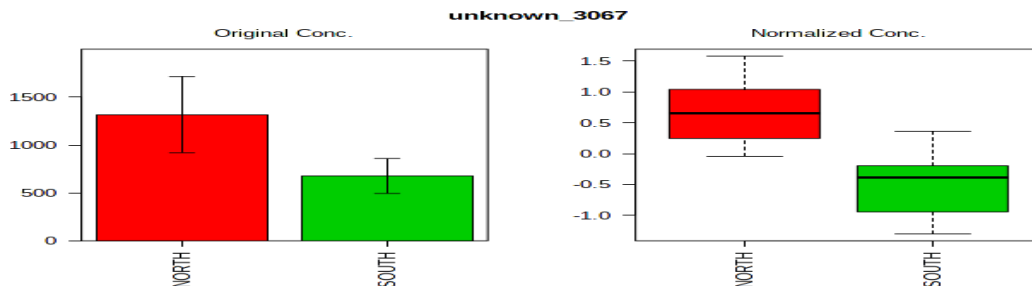
Εικόνα 4.23: Ραβδόγραμμα που παρουσιάζει την ποσότητα τυροσίνης major 3TMS στα δείγματα South και North πριν και μετά την κανονικοποίηση.



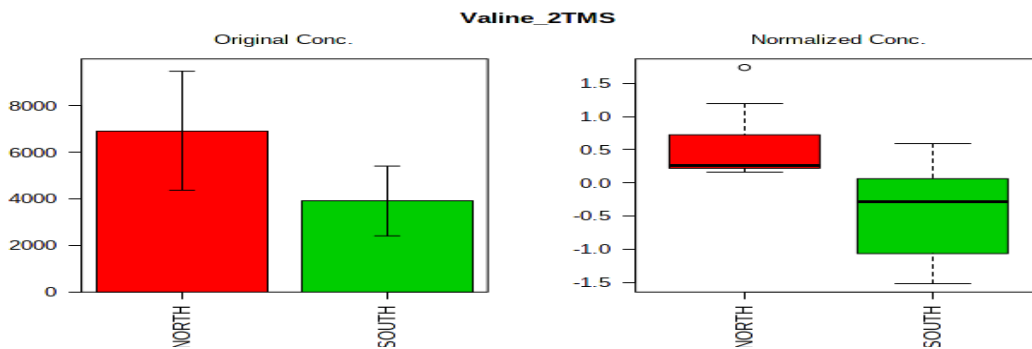
Εικόνα 4.24: Ραβδόγραμμα που παρουσιάζει την ποσότητα άγνωστης 2552 στα δείγματα South και North πριν και μετά την κανονικοποίηση.



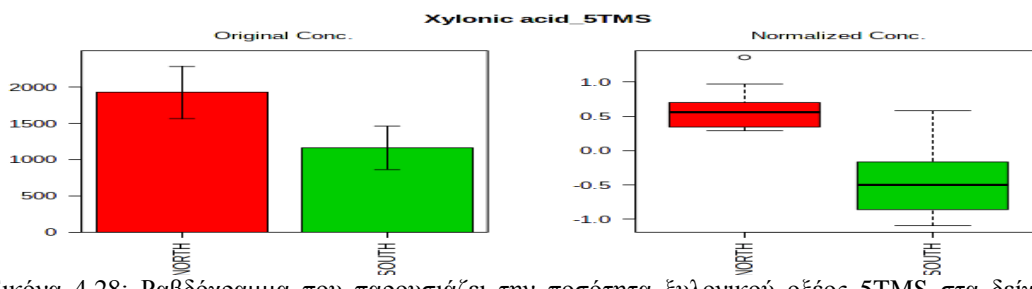
Εικόνα 4.25: Ραβδόγραμμα που παρουσιάζει την ποσότητα άγνωστης 2870 στα δείγματα South και North πριν και μετά την κανονικοποίηση.



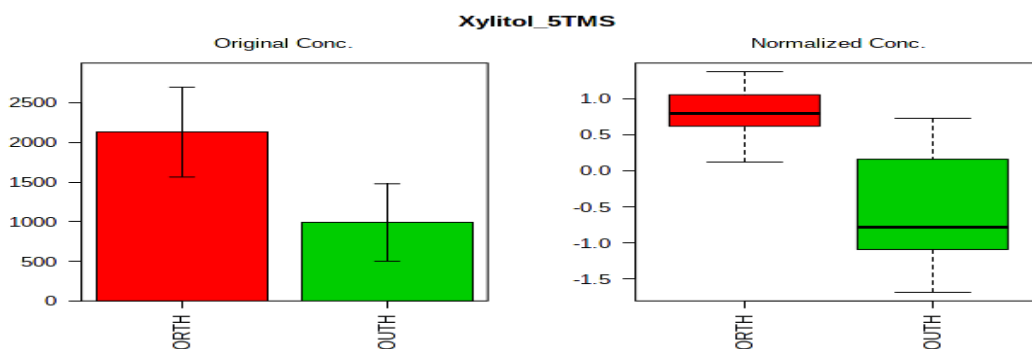
Εικόνα 4.26 : Ραβδόγραμμα που παρουσιάζει την ποσότητα άγνωστης 3067 στα δείγματα South και North πριν και μετά την κανονικοποίηση.



Εικόνα 4.27: Ραβδόγραμμα που παρουσιάζει την ποσότητα βαλίνης 2TMS στα δείγματα South και North πριν και μετά την κανονικοποίηση.



Εικόνα 4.28: Ραβδόγραμμα που παρουσιάζει την ποσότητα ξυλονικού οξέος 5TMS στα δείγματα South και North πριν και μετά την κανονικοποίηση.



Εικόνα 4.29: Ραβδόγραμμα που παρουσιάζει την ποσότητα ξυλιτόλης 5TMS στα δείγματα South και North πριν και μετά την κανονικοποίηση.

Όπως φαίνεται στις εικόνες 4.6, 4.9, 4.10, 4.15, 4.16, 4.17, 4.18, τα δείγματα της ομάδας South (Αίγινας) περιέχουν μεγαλύτερη ποσότητα από α-αμινοαδιπικό οξύ, γαλακτινόλη, ινοσιτόλη, μαλτόζη_2764, μαλτόζη_2732, φαινολικό οξύ και κινικό οξύ. Στις εικόνες 4.3, 4.4, 4.5, 4.7, 4.8, 4.11, 4.12, 4.13, 4.14, 4.19, 4.20, 4.21, 4.22, 4.23, 4.27, 4.28, 4.29 είναι εμφανής η μεγαλύτερη ποσότητα των δειγμάτων North σε 2-υδροξυγλουταρικό οξύ, 4-αμινοβουτυρικό οξύ, αλανίνη, D-τρεαλόζη, γαλακτινόλη 2975, ινοσιτόλη 2070, γλυκίνη, ινοσιτόλη 2131, ισολευκίνη, λευκίνη, ριβιτόλη, φωσφορικό άλας, ηλεκτρικό οξύ, θρεονίνη, τυροσίνη, βαλίνη, ξυλονικό οξύ, ξυλιτόλη.

Με την βοήθεια της διαδικτυακής πλατφόρμας Metaboanalyst έγινε συλλογή πληροφοριών σχετικά με τα βιοχημικά μονοπάτια στα οποία εμπλέκονται οι πιο σημαντικές ουσίες που διαφοροποιούν τα δείγματα σε South-North. Έτσι, το α-αμινοαδιπικό οξύ εμπλέκεται στην πορεία βιοσύνθεσης της λυσίνης αλλά και στην αποικοδόμησή της. Επίσης, εμπλέκεται στην βιοσύνθεση των αμινοξέων. Η ινοσιτόλη, συμμετέχει στον μεταβολισμό του ασκορβικού οξέος. Η μαλτόζη συμπεριλαμβάνεται στον μεταβολισμό της σουκρόζης και στην πέψη και την απορρόφηση των υδατανθράκων. Το 4-αμινοβουτυρικό οξύ συμμετέχει στον μεταβολισμό της αλανίνης, του ασπαρτικού, του γλουταμινικού, της αργινίνης, της προλίνης και της β-αλανίνης. Η βαλίνη συμμετέχει στην βιοσύνθεση και στην αποικοδόμηση της λευκίνης και της ισολευκίνης, καθώς και στην βιοσύνθεση των αμινοξέων. Η λευκίνη συμμετέχει στην βιοσύνθεση και στην αποικοδόμηση της ισολευκίνης και της βαλίνης, καθώς και στην βιοσύνθεση των αμινοξέων. Η ισολευκίνη συμμετέχει στην βιοσύνθεση και στην αποικοδόμηση της λευκίνης και της βαλίνης. Η γλυκίνη συμμετέχει στην πορεία βιοσύνθεσης των αμινοξέων, στην αποικοδόμηση λυσίνης και στον μεταβολισμό της θρεονίνης και της σερίνης. Το ηλεκτρικό οξύ συμμετέχει στην πορεία μεταβολισμού της αλανίνης, του ασπαρτικού, του γλουταμικού, της τυροσίνης, της φαινυλαλανίνης, του πυροσταφυλικού και στην αποικοδόμηση της λυσίνης. Η τυροσίνη συμμετέχει στην βιοσύνθεση των αμινοξέων, στην βιοσύνθεση της τυροσίνης, της φαινυλαλανίνης και της τρυπτοφάνης, καθώς και στον μεταβολισμό της τυροσίνης. Η D-(+)-τρεαλόζη συμβάλλει στον μεταβολισμό της σουκρόζης. Η θρεονίνη συμμετέχει στον μεταβολισμό της γλυκίνης και της σερίνης, στην βιοσύνθεση της βαλίνης, της λευκίνης, της ισολευκίνης και των αμινοξέων. Έτσι, από τα παραπάνω μπορούμε να συμπεράνουμε ότι μελετώντας τους

συγκεκριμένους μεταβολίτες μπορούμε να βγάλουμε κάποια πιθανά συμπεράσματα και για άλλες ενώσεις με τις οποίες συνδέονται μέσω βιοχημικών μονοπατιών.

4.3. Συμπεράσματα

Στην παρούσα μελέτη η ανάλυση των πολικών μεταβολιτών σε δείγματα φιστικιών που παράχθηκαν σε διαφορετικές περιοχές, με την χρήση GC-MS και πολυμεταβλητής ανάλυσης, απέδειξε την δυνατότητα διαφοροποίησης των φιστικιών που παράχθηκαν στην Αίγινα (South) συγκριτικά με εκείνα που παράχθηκαν στην Φθιώτιδα και την Εύβοια (North). Η διαφοροποίηση αυτή, όπως αποδείχθηκε, οφειλόταν σε 27 πολικούς μεταβολίτες, οι οποίοι ανήκαν σε διάφορες τάξεις (π.χ αμινοξέα, σάκχαρα, κλπ). Το φιστίκι Αιγίνης, είναι προϊόν προστατευόμενης ονομασίας προέλευσης. Η γνησιότητα ενός προϊόντος συνδέεται άμεσα με την εμπορική του αξία. Για τον λόγο αυτό είναι κατανοητή η σημασία της χρήσης της μεταβολωμικής ανάλυσης με GC-MS για την αποφυγή περιπτώσεων νοθείας και εξαπάτησης του καταναλωτικού κοινού. Η παρούσα μέθοδος επέτρεψε την ταχεία ανάλυση ικανού αριθμού δειγμάτων, καθιστώντας την καλή επιλογή για κάποιον αναλυτή. Η μεταβολωμική φαίνεται ότι αποτελεί ένα εξαιρετικά χρήσιμο εργαλείο γεωγραφικής διάκρισης των προϊόντων, σε έναν κόσμο που τα προϊόντα αποθηκεύονται και πωλούνται αρκετά μακριά από την περιοχή παραγωγής τους. Το μεταβολωμικό προφίλ, εκτός από την ποιοτική διασφάλιση, θα μπορούσε ενδεχομένως να δώσει την δυνατότητα εντοπισμού παρτίδων, καθιστώντας εφικτή την ιχνηλασιμότητα του προϊόντος. Η μεταβολωμική με χρήση GC-MS, φαίνεται ότι μπορεί να διακρίνει τα φιστίκια που παράγονται στην Αίγινα δίνοντας την λύση στην ανάγκη ανίχνευσής τους. Ωστόσο, λόγω του σχετικά μικρού αριθμού δειγμάτων που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη, κρίνεται σκόπιμο να διερευνηθεί περαιτέρω η προτεινομένη μεθοδολογία με χρήση μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων από περισσότερες περιοχές της Ελλάδος ή/και άλλων χωρών.

5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

- Al-Moghazy, M., Boveri, S., & Pulvirenti, A. (2014). Microbiological safety in pistachios and pistachio containing products. *Food Control*, 36(1), 88–93. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.07.030>
- Anderson, K. A., & Smith, B. W. (2005). Use of chemical profiling to differentiate geographic growing origin of raw pistachios. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(2), 410–418. <https://doi.org/10.1021/jf048907u>
- Arbona, C., Olvera, N., Rodriguez, N., Hagan, J., Linares, A., & Wiesner, M. (2010). Acculturative stress among documented and undocumented Latino immigrants in the United States. *Hispanic Journal of Behavioral Sciences*, 32(3), 362–384. <https://doi.org/10.1177/0739986310373210>
- Arena, E., Campisi, S., Fallico, B., & Maccarone, E. (2007). Distribution of fatty acids and phytosterols as a criterion to discriminate geographic origin of pistachio seeds. *Food Chemistry*, 104(1), 403–408. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.029>
- Bartzas, G., & Komnitsas, K. (2017). Life cycle analysis of pistachio production in Greece. *Science of the Total Environment*, 595, 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.251>
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911–917.
- Bulló, M., Juanola-Falgarona, M., Hernández-Alonso, P., & Salas-Salvadó, J. (2015). Nutrition attributes and health effects of pistachio nuts. *British Journal of Nutrition*, 113(S2), S79–S93. <https://doi.org/10.1017/S0007114514003250>
- Cagliani, L. R., Pellegrino, G., Giugno, G., & Consonni, R. (2013). Quantification of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* var. *robusta* in roasted and ground coffee blends. *Talanta*, 106, 169–173. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.12.003>
- Cajka, T., Showalter, M. R., Riddellova, K., & Fiehn, O. (2016). Advances in Mass Spectrometry for Food Authenticity Testing. In *Advances in Food Authenticity Testing*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100220-9.00007-2>
- Capitani, D., Sobolev, A. P., Tomassini, A., Sciubba, F., De Salvador, F. R., Mannina, L., & Delfini, M. (2013). Peach fruit: Metabolic comparative analysis of two varieties with different resistances to insect attacks by NMR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(8), 1718–1726. <https://doi.org/10.1021/jf303248z>
- Chae, Y. K., & Kim, S. H. (2016). Discrimination of rice products by geographical origins and cultivars by two-dimensional NMR spectroscopy. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 37(10), 1612–1617. <https://doi.org/10.1002/bkcs.10914>
- Deda, O., Gika, H., Raikos, N., & Theodoridis, G. (2018). GC-MS-Based Metabolic Phenotyping. In *The Handbook of Metabolic Phenotyping*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-812293-8.00004-9>
- Douglas A. Skoog - *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 9th. (n.d.).
- Dunn, W. B., Broadhurst, D., Begley, P., Zelena, E., Francis-mcintyre, S., Anderson, N., ... Consortium, H. (2011). Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nature Protocols*, (335).

- <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.335>
- Dyszal, S. M., & Pettit, B. C. (1990). Determination of the country of origin of pistachio nuts by DSC and HPLC. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 67(12), 947–951. <https://doi.org/10.1007/BF02541854>
- Fait, G., Broos, K., Zrna, S., Lombi, E., & Hamon, R. (2006). Tolerance of nitrifying bacteria to copper and nickel. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(8), 2000–2005. <https://doi.org/10.1897/05-517R.1>
- Fiehn, O. (2007). Validated high quality automated metabolome analysis of Arabidopsis: Quality control charts and standard operating procedures. *Concepts in Plant Metabolomics*, 1–18.
- Ghasemynasabparizi, M., Ahmadi, A., & Mazloomi, S. (2017). A review on pistachio: Its composition and benefits regarding the prevention or treatment of diseases. *Journal of Occupational Health and Epidemiology*, 4(1), 57–69. <https://doi.org/10.18869/acadpub.johe.4.1.57>
- Hübschmann H, 2015. (n.d.). *Chromatography Encyclopedia of Analytical Chemistry , Supplementary Mass Spectral and GC Data of Drugs , Poisons , Pesticides , .*
- Ibáñez, C., García-Cañas, V., Valdés, A., & Simó, C. (2013). Novel MS-based approaches and applications in food metabolomics. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 52, 100–111. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.06.015>
- Jakes, W., Gerdova, A., Defernez, M., Watson, A. D., McCallum, C., Limer, E., ... Kemsley, E. K. (2015). Authentication of beef versus horse meat using 60 MHz ¹H NMR spectroscopy. *Food Chemistry*, 175, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.110>
- Kashaninejad, M., Mortazavi, A., Safekordi, A., & Tabil, L. G. (2006). Some physical properties of Pistachio (*Pistacia vera* L.) nut and its kernel. *Journal of Food Engineering*, 72(1), 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.11.016>
- Kashaninejad, M., & Tabil, L. G. (2011). Pistachio (*Pistacia vera* L.). In *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits* (Vol. 4). <https://doi.org/10.1533/9780857092618.218>
- Lai, Z., Tsugawa, H., Wohlgemuth, G., Mehta, S., Mueller, M., Zheng, Y., ... Fiehn, O. (2017). *Identifying metabolites by integrating metabolome databases with mass spectrometry cheminformatics*. (November). <https://doi.org/10.1038/nmeth.4512>
- Li, Q., Yu, Z., Zhu, D., Meng, X., Pang, X., Liu, Y., ... Chen, G. (2017). The application of NMR-based milk metabolite analysis in milk authenticity identification. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(9), 2875–2882. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8118>
- Mannina, L., Marini, F., Antiochia, R., Cesa, S., Magrì, A., Capitani, D., & Sobolev, A. P. (2016). Tracing the origin of beer samples by NMR and chemometrics: Trappist beers as a case study. *Electrophoresis*, 37(20), 2710–2719. <https://doi.org/10.1002/elps.201600082>
- Ong, Y. O. H. H., Gall, J., & Early, C. (2008). *¹H Nuclear Magnetic Resonance-Based Metabolomic Characterization of Wines by Grape Varieties and Korea Cabernet Sauvignon 2005*. 8007–8016.
- Paul Lee, W. N., Wahjudi, P. N., Xu, J., & Go, V. L. (2010). Tracer-based metabolomics: Concepts and practices. *Clinical Biochemistry*, 43(16–17), 1269–1277. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.07.027>
- Petrakis, E. A., Cagliani, L. R., Polissiou, M. G., & Consonni, R. (2015). Evaluation of saffron (*Crocus sativus* L.) adulteration with plant adulterants by ¹H NMR metabolite fingerprinting. *Food Chemistry*, 173, 890–896.

- <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.107>
- Ritota, M., Casciani, L., Han, B. Z., Cozzolino, S., Leita, L., Sequi, P., & Valentini, M. (2012). Traceability of Italian garlic (*Allium sativum* L.) by means of HRMAS-NMR spectroscopy and multivariate data analysis. *Food Chemistry*, 135(2), 684–693. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.032>
- Ritota, M., Marini, F., Sequi, P., & Valentini, M. (2010). Metabolomic characterization of Italian sweet pepper (*Capsicum annum* L.) by means of HRMAS-NMR spectroscopy and multivariate analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(17), 9675–9684. <https://doi.org/10.1021/jf1015957>
- Sciubba, F., Capuani, G., Di Cocco, M. E., Avanzato, D., & Delfini, M. (2014). Nuclear magnetic resonance analysis of water soluble metabolites allows the geographic discrimination of pistachios (*Pistacia vera*). *Food Research International*, 62, 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.02.039>
- Sobolev, A., Carradori, S., Capitani, D., Vista, S., Trella, A., Marini, F., & Mannina, L. (2014). Saffron Samples of Different Origin: An NMR Study of Microwave-Assisted Extracts. *Foods*, 3(3), 403–419. <https://doi.org/10.3390/foods3030403>
- Sobolev, A. P., Circi, S., Capitani, D., Ingallina, C., & Mannina, L. (2017). Molecular fingerprinting of food authenticity. *Current Opinion in Food Science*, 16, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.08.002>
- Tsugawa, H., Cajka, T., Kind, T., Ma, Y., Higgins, B., Ikeda, K., ... Arita, M. (2015). *MS / MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis*. 12(6). <https://doi.org/10.1038/nmeth.3393>
- Xia, J., & Wishart, D. S. (2016). *Comprehensive Metabolomics Data Analysis*. (September), 1–91. <https://doi.org/10.1002/cpbi.11>
- Zannella, C., Carucci, F., Aversano, R., Prohaska, T., Vingiani, S., Carputo, D., & Adamo, P. (2017). Genetic and geochemical signatures to prevent frauds and counterfeit of high-quality asparagus and pistachio. *Food Chemistry*, 237, 545–552. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.158>
- Weimer, B., & Slupsky, C. (2013). *Metabolomics in food and nutrition*. Woodhead Publishing.

Λιαδίκτυο

www.kelyfotafystikia-lamia.4ty.gr
www.faros-24.gr
www.kathimerini.gr
www.fao.org
www.greekgastronomyguide.gr
www.ebi.ac.uk
www.ssi.shimadzu.com
www.nist.gov
www.metaboanalyst.ca
www.metabolomicsociety.org