



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΤΡΟΦΙΜΑ, ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Εκτίμηση της φρεσκότητας αποκελυφωμένου ολόκληρου αυγού
ωοπαραγωγών ορνίθων (*Gallus gallus domesticus*): μεταβολωμική
προσέγγιση με χρήση αέριας χρωματογραφίας - φασματομετρίας μαζών

Δήμητρα-Ιωάννα Α. Χλιάρα

Επιβλέπων Καθηγητής:
Μαλλούχος Αθανάσιος, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Αθήνα
2021

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Εκτίμηση της φρεσκότητας αποκελυφωμένου ολόκληρου αυγού
ωοπαραγωγών ορνίθων (*Gallus gallus domesticus*): μεταβολωμική
προσέγγιση με χρήση αέριας χρωματογραφίας - φασματομετρίας μαζών

“Freshness assessment of de-shelled whole eggs of laying hens (*Gallus
gallus domesticus*): a metabolomic approach using GC/MS”

Δήμητρα-Ιωάννα Α. Χλιάρα

Εξεταστική Επιτροπή:

Μαλλούχος Αθανάσιος, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Γαρδέλη Χρυσσαυγή, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ

Γκολιομύτης Μιχαήλ, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Εκτίμηση της φρεσκότητας αποκελυφωμένου ολόκληρου αυγού ωοπαραγωγών ορνίθων (*Gallus gallus domesticus*): μεταβολωμική προσέγγιση με χρήση αέριας χρωματογραφίας - φασματομετρίας μαζών

ΠΜΣ Τρόφιμα, Διατροφή και Υγεία

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Χημείας και Ανάλυσης Τροφίμων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η εφαρμογή της μεταβολωμικής ως εργαλείο ελέγχου της φρεσκότητας των αυγών ωοπαραγωγών ορνίθων (*Gallus gallus domesticus*). Βασικός στόχος ήταν η απομόνωση πολικών μεταβολιτών από τον κρόκο και την αλβουμίνη του αυγού και η ανίχνευση πιθανών δεικτών φρεσκότητας-αλλοίωσης. Παράλληλα μετρήθηκαν και οι μονάδες Haugh.

Μελετήθηκαν αυγά αποθηκευμένα για χρονικό διάστημα μέχρι 24 ημέρες από την ωοτοκία σε 8 χρονικά σημεία. Αναλύθηκε το πολικό κλάσμα μεταβολιτών, το οποίο λήφθηκε με εκχύλιση αποκελυφωμένων αυγών. Η ανίχνευση των μεταβολιτών έγινε με χρήση αέριας χρωματογραφίας - φασματομετρίας μαζών. Η επεξεργασία των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με διάφορες μεθόδους πολυμεταβλητής ανάλυσης μέσω της διαδικτυακής πλατφόρμας Metaboanalyst 5.0. και του λογισμικού The Unscrambler X.

Από την ανάλυση του πολικού κλάσματος μεταβολιτών, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης κύριων συνιστωσών (PCA) για την κατηγοριοποίηση των δειγμάτων με βάση το σημείο δειγματοληψίας, προέκυψε ότι τα δείγματα της πρώτης δειγματοληψίας (ημέρα ωοτοκίας) ήταν πλήρως διακριτά σε σχέση με τα υπόλοιπα, ενώ ο διαχωρισμός των υπόλοιπων δειγμάτων ήταν λιγότερο ικανοποιητικός. Επίσης, προέκυψε ότι η πρώτη κύρια συνιστώσα (PC1) περιγράφει τον χρόνο από την ωοτοκία και κατά επέκταση την φρεσκότητα των δειγμάτων.

Η στατιστική ανάλυση των δειγμάτων επαναλήφθηκε στη συνέχεια με τα δείγματα κατηγοριοποιημένα ως «εξαιρετικά φρέσκα» ή «μη εξαιρετικά φρέσκα» με βάση τον κανονισμό (ΕΚ) 589/2008. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της διακριτικής ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA), ο διαχωρισμός των δύο κλάσεων ήταν σαφώς ικανοποιητικός. Τα αυγά μπορούν να χαρακτηριστούν ως «εξαιρετικά φρέσκα» μέχρι την 9η ημέρα από την ωοτοκία.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης, ανιχνεύθηκαν δεκαεπτά (17) σημαντικοί μεταβολίτες. Οι μεταβολίτες αυτοί ανήκαν σε διάφορες χημικές τάξεις (υδατάνθρακες, οργανικά οξέα, αμινοξέα, πολυόλες κ.ά.). Η σχετική αφθονία δώδεκα (12) μεταβολιτών αυξανόταν με την πάροδο του χρόνου συντήρησης, ενώ για τρεις (3) μεταβολίτες μειωνόταν. Ο πιο σημαντικός μεταβολίτης που περιέγραφε την ποιοτική υποβάθμιση των αυγών ήταν η φρουκτόζη, η οποία αυξανόταν γραμμικά με τη πάροδο του χρόνου με υψηλό συντελεστή συσχέτισης ($R^2=0.9282$).

Οι μονάδες Haugh σημείωσαν φθίνουσα τάση μέχρι τη 17^η ημέρα από την ωοτοκία, ενώ στη συνέχεια δεν διαφοροποιήθηκαν σημαντικά.

Επιστημονική περιοχή: Χημεία τροφίμων

Λέξεις κλειδιά: μεταβολωμική, φρεσκότητα, αλλοίωση, αυγά, μεταβολίτες, αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μαζών

Freshness assessment of de-shelled whole eggs of laying hens (*Gallus gallus domesticus*): a metabolomic approach using GC/MS

MSc Food, Nutrition and Health

Department of Food Science and Human Nutrition

Laboratory of Food Chemistry and Analysis

ABSTRACT

In the current study, the application of metabolomics as a tool for freshness evaluation of laying hen eggs (*Gallus gallus domesticus*) was examined. The aim of this study was the isolation of polar metabolites from egg yolk and egg white and the determination of potential freshness-spoilage markers. Haugh Units were also measured.

Eggs were analyzed over a 24- day time period with 8 sampling points in total. The polar fraction of the metabolites was extracted and after chemical derivatization, the metabolites were determined using gas chromatography-mass spectrometry. Subsequently, the data were processed by various multivariate analysis methods using the MetaboAnalyst 5.0 web platform, as well as The Unscrambler X software.

Principal Component Analysis (PCA) for the classification of the samples based on the sampling point, showed that the samples of the first sampling point (day of laying) exhibited the clearest separation, whilst the separation of the rest of the samples was less satisfactory. The first principal component (PC1) described the time after laying and consequently the freshness of the samples.

The statistical analysis of the samples was repeated with the samples classified either as “extra-fresh” or “non extra-fresh” according to Council Regulation (EC) 589/2008. According to the results of the PLS-DA for this classification, the separation of the samples was satisfactory. The characterization “extra-fresh” can be given to eggs until the 9th day after laying.

According to the statistical analysis results, seventeen (17) significant metabolites were determined. These metabolites belonged to various chemical classes (carbohydrates, organic acids, amino acids, polyols etc.). The relative abundance of twelve (12) metabolites increased during storage, whereas for three (3) metabolites decreased. Fructose was the most significant metabolite that described the spoilage and increased linearly over time with a high correlation coefficient ($R^2=0.9282$).

The Haugh Units showed a declining trend until the 17th day after laying, with no subsequent significant change.

Scientific area: Food science

Key words: metabolomics, freshness, spoilage, eggs, gas chromatography-mass spectrometry, metabolites

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, με τίτλο «Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου», στην ειδίκευση «Χημεία Τροφίμων και Διατροφή», στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Το εργαστηριακό μέρος της μελέτης πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας και Ανάλυσης Τροφίμων το ακαδημαϊκό έτος 2020-2021.

Η ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής αυτής εργασίας θα ήταν αδύνατη χωρίς την διαρκή και πολύτιμη καθοδήγηση και υποστήριξη του επιβλέποντα καθηγητή μου, Επίκουρου καθηγητή του ΓΠΑ, κ. Μαλλούχου Αθανασίου, τον οποίο και ευχαριστώ θερμά.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να αποδώσω και στον Επίκουρο Καθηγητή του Εργαστηρίου Γενικής και Ειδικής Ζωοτεχνίας του ΓΠΑ, κ. Γκολιομύτη Μιχαήλ, για την ευγενική χορηγία των αυγών, χωρίς την οποία θα ήταν αδύνατη η πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την αμέριστη συμπαράστασή τους σε όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου και ιδιαίτερα τον αγαπημένο θείο μου κ. Αραβαντινό-Ζαφείρη Γεράσιμο. Τέλος, θα ήθελα να αποδώσω ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ στον σύζυγό μου Βαγγέλη για την απεριόριστη υποστήριξη και αγάπη του.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	1
1.1. Γενικά στοιχεία	1
1.2. Κανονιστικό πλαίσιο.....	2
1.3. Δομή και σύσταση του αυγού	6
1.3.1. Δομή του αυγού	6
1.3.2. Σύσταση του αυγού	7
1.4. Ποιοτικά χαρακτηριστικά	13
1.4.1. Ποιοτικά χαρακτηριστικά του εξωτερικού του αυγού.....	13
1.4.2. Ποιοτικά χαρακτηριστικά του εσωτερικού του αυγού	15
1.4.3. Ποιοτικά χαρακτηριστικά σχετικά με θέματα απάτης σε προϊόντα αυγών	18
1.5. Επίδραση της αποθήκευσης στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των αυγών.....	18
1.6. Δείκτες φρεσκότητας.....	19
1.6.1. Αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί	19
1.6.2. Μεταβολικοί δείκτες	20
1.6.3. Δείκτης διάθλασης αλβουμίνης	23
1.7. Μέθοδοι αξιολόγησης της φρεσκότητας στα αυγά και στα προϊόντα αυγών	23
1.7.1. Αισθητηριακή αξιολόγηση (καταστροφικός προσδιορισμός)	23
1.7.2. «Ηλεκτρονική μύτη» - τεχνητά συστήματα όσφρησης (μη καταστροφικός προσδιορισμός).....	24
1.7.3. Φασματοσκοπικές μέθοδοι.....	24
1.7.4. Χρωματογραφία	26
1.8. Μεταβολωμική	27
1.8.1. Γενικά στοιχεία	27
1.8.2. Μεταβολωμική στα τρόφιμα.....	29
1.8.3. Αναλυτικές τεχνικές.....	31
1.9. Μεταβολωμική ανάλυση με χρήση GC-MS.....	34
1.9.1. Προετοιμασία δειγμάτων.....	35
1.9.2. Παραγωγοποίηση.....	35
1.9.3. Διαχωρισμός των μεταβολιτών με αέρια χρωματογραφία και προσδιορισμός με φασματόμετρο μαζών	37
1.9.4. Επεξεργασία των δεδομένων - Χημειομετρία.....	38
1.9.5. Μεταβολωμική στα αυγά και προϊόντα αυγών	41

1.10. Σκοπός της μελέτης.....	42
2. Υλικά και μέθοδοι	45
2.1. Πειραματικός σχεδιασμός.....	45
2.2. Μέτρηση βάρους, υπολογισμός μονάδων Haugh	46
2.3. Προσδιορισμός πολικών μεταβολιτών με GC/MS	46
2.3.1. Προπαρασκευή δείγματος	48
2.3.2. Εκχύλιση πολικών μεταβολιτών από το ομογενοποιημένο μίγμα αλβουμίνης-κρόκου	48
2.3.3. Ενοποιημένο δείγμα ελέγχου ποιότητας (QC-pooled sample)	48
2.3.4. Παραγωγοποίηση πολικών μεταβολιτών	49
2.3.5. Ανάλυση δειγμάτων με αέρια χρωματογραφία - φασματομετρία μαζών	49
2.3.6. Στατιστική επεξεργασία.....	50
3. Αποτελέσματα και συζήτηση.....	51
3.1. Προ-επεξεργασία δεδομένων (πριν την στατιστική ανάλυση).....	51
3.2. Πολυμεταβλητή ανάλυση.....	53
3.3. Μονάδες Haugh.....	60
3.4. Μεταβολές στη συγκέντρωση των σημαντικότερων μεταβολιτών	61
4. Συμπεράσματα.....	71
5. Βιβλιογραφία	73
Παράρτημα	81
Π1. Σιτηρέσιο ορνίθων.....	81
Π2. Αλληλουχία ένεσης των δειγμάτων στο GC/MS.....	82
Π3. Ανιχνευθέντες μεταβολίτες	83
Π4. Διάγραμμα scores plot ανάλυσης PLS-DA.....	84
Π5. Δοκιμή μεταστοιχείωσης του μοντέλου PLS-DA	85
Π6. Οι σημαντικότεροι μεταβολίτες με αυξητική τάση.....	86
Π7. Οι σημαντικότεροι μεταβολίτες με μειούμενη τάση	88
Π8. Μεταβολίτες με ασαφή τάση.....	89

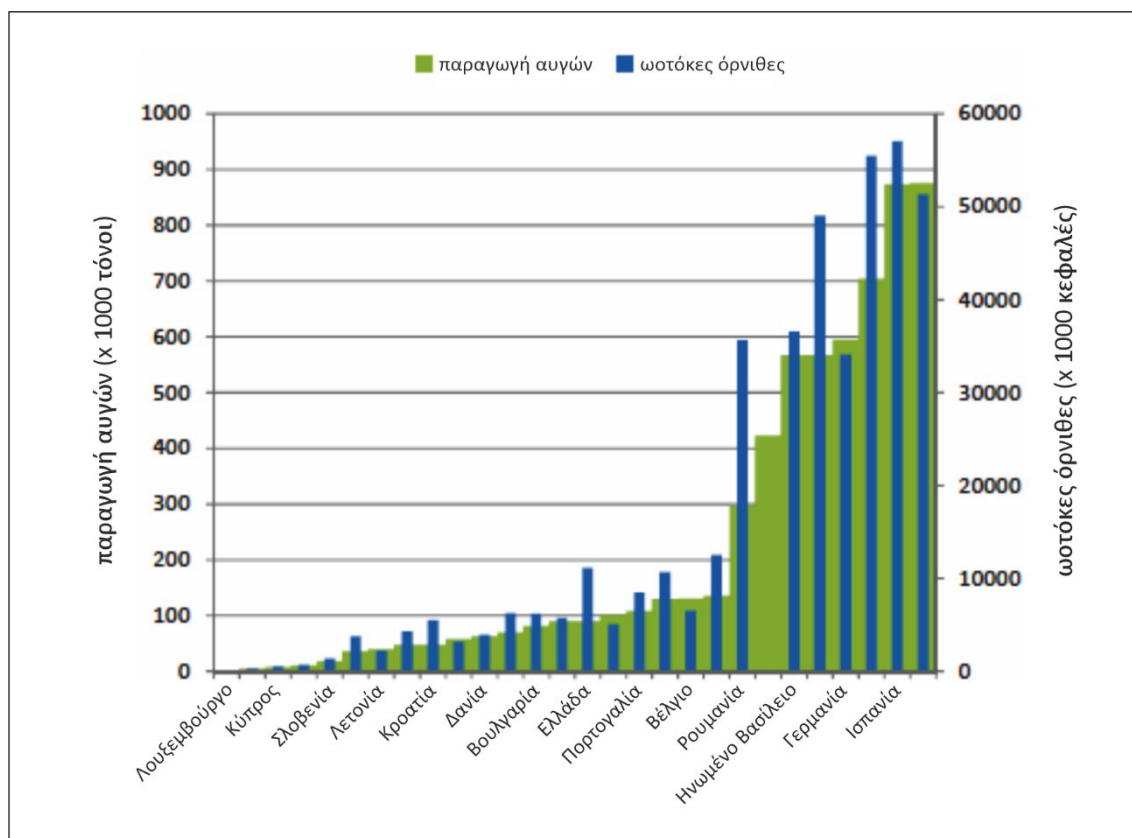
1. Εισαγωγή

1.1. Γενικά στοιχεία

Τα αυγά των ορνίθων αποτελούν μία από τις φθηνότερες και διατροφικά πληρέστερες τροφές ζωικής προέλευσης, καθώς παρέχουν βιταμίνες, λιπίδια, υδατάνθρακες, μέταλλα και υψηλής ποιότητας πρωτεΐνες (Karoui et al., 2009; Renzone et al., 2021; Sharaf Eddin et al., 2019). Παρουσιάζουν υψηλό γαστρονομικό και τεχνολογικό ενδιαφέρον, λόγω των ιδιαίτερων λειτουργικών τους ιδιοτήτων όπως ηηκτωματοποίηση, γαλακτωματοποίηση (κρόκος) και αφρισμός (αλβουμίνη) (Karoui et al., 2009; Karoui et al., 2006a; Renzone et al., 2021). Χρησιμοποιούνται αυτούσια ή μετά από επεξεργασία («προϊόντα αυγών») για την παραγωγή ή για τον εμπλουτισμό πολλών τύπων τροφίμων σε βιομηχανική κλίμακα (αφροί, γαλακτώματα, προϊόντα ζαχαροπλαστικής και αρτοποιίας κτλ.) αλλά και για οικιακή χρήση (Renzone et al., 2021; Suman et al., 2018).

Ο όρος «προϊόντα αυγών» αναφέρεται σε προϊόντα επεξεργασίας των αυγών και περιλαμβάνει προϊόντα αλβουμίνης, κρόκου και μίγμα αυτών, σε παστεριωμένη, υγρή ή κατεψυγμένη, ή αποξηραμένη μορφή (Suman et al., 2018).

Στη βιομηχανία τροφίμων ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα προϊόντα αυγών σε υγρή μορφή, τα οποία λαμβάνονται από αυγά που έχουν αποκελυφωθεί εντός 4 ημερών από την ωοτοκία και τα οποία έχουν υποστεί ομογενοποίηση και παστερίωση (Suman et al., 2018).



Σχήμα 1. Πληθυσμός ωοτόκων ορνίθων και παραγωγή αυγών σε Κράτη Μέλη της ΕΕ, για τα έτη 2003 έως 2010, ανάλογα με το Κράτος Μέλος (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014).

Τα προϊόντα αυτά προορίζονται κυρίως για την παρασκευή ζυμαρικών και προϊόντων αρτοποιίας (Suman et al., 2018).

Οι κύριες χώρες παραγωγής αυγών είναι η Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ), η Κίνα και οι ΗΠΑ (Suman et al., 2018). Το 2011, η παραγωγή αυγών στην ΕΕ των 27 εκτιμήθηκε σε 7,12 εκατομμύρια τόνους (ισοδύναμη με πάνω από 100 δισεκατομμύρια αυγά). Σχεδόν το 75% αυτών των αυγών παρήχθησαν σε επτά κράτη μέλη (Γαλλία, Γερμανία, Ιταλία, Ισπανία, Ηνωμένο Βασίλειο, Ολλανδία και Πολωνία).

Η παραγωγή και η κατανάλωση αυγών έχει αυξηθεί κατά τη διάρκεια των δύο τελευταίων δεκαετιών, με τον FAO (Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών) να προβλέπει παραγωγή 89 εκατομμυρίων τόνων αυγών το 2030 (Sharaf Eddin et al., 2019).

1.2. Κανονιστικό πλαίσιο

Η ποιοτική αξιολόγηση των αυγών είναι σημαντική για τη βιομηχανία τροφίμων, καθώς τα αυγά είναι πολύ ευπαθή. Η φρεσκότητα και η ποιότητα των αυγών ή των προϊόντων αυγών συνδέονται άμεσα με τη θρεπτική αξία και τις λειτουργικές ιδιότητές τους, καθώς και με τους κινδύνους ανάπτυξης ανεπιθύμητων μικροοργανισμών και προϊόντων αποικοδόμησης (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014; Renzone et al., 2021; Suman et al., 2018).

Στην ΕΕ η διάθεση αυγών και προϊόντων αυγών διέπεται κυρίως από τους Κανονισμούς 853/2004, 2073/2005, 589/2008 και 1308/2013. Ιδιαίτερη σημασία για την ταξινόμηση των αυγών και τα φυσικοχημικά και μικροβιολογικά κριτήρια των προϊόντων αυγών παρουσιάζουν οι εξής Κανονισμοί και Πρότυπα:

● Κανονισμός (ΕΚ) 853/2004

Με τον Κανονισμό (ΕΚ) 853/2004 καθορίζονται γενικά κριτήρια διάθεσης αυγών και προϊόντων αυγών.

Για τα αυγά καθορίζεται το ανώτατο χρονικό όριο παράδοσης των αυγών στον καταναλωτή σε 21 ημέρες από την ωοτοκία.

Για τα προϊόντα αυγών καθορίζονται μεταξύ άλλων και αναλυτικές προδιαγραφές:

- Η περιεκτικότητα σε 3-υδροξυ-βουτυρικό οξύ δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 10 mg/kg ξηράς ουσίας του μη μεταποιημένου προϊόντος αυγού.
- Η περιεκτικότητα της πρώτης ύλης που χρησιμοποιείται για την παρασκευή προϊόντων αυγών σε γαλακτικό οξύ δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1 g/kg ξηράς ουσίας. Εντούτοις, για τα προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση, η τιμή αυτή πρέπει να είναι η τιμή που καταγράφεται πριν από τη διαδικασία ζύμωσης.
- Η ποσότητα υπολειμμάτων κελυφών αυγών, μεμβρανών αυγών και άλλων πιθανών σωματιδίων στο μεταποιημένο προϊόν αυγών δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 100 mg/kg προϊόντος αυγού.

● Κανονισμός (ΕΚ) 2073/2005

Στον Κανονισμό (ΕΚ) 2073/2005 γίνεται αναφορά σε μικροβιολογικά κριτήρια για προϊόντα αυγών:

- μη ανίχνευση βακτηρίων του γένους *Salmonella* σε 25 g προϊόντος αυγών (εξαιρουμένων των προϊόντων για τα οποία η διαδικασία παρασκευής ή η σύνθεση του προϊόντος θα εξαλείψει τον κίνδυνο σαλμονέλλας).
- έλεγχος παρουσίας Enterobacteriaceae στο τέλος της διαδικασίας παραγωγής, με καθορισμό ορίων αποδοχής (πχ. ικανοποιητική εάν όλες οι τιμές από τα δείγματα είναι ≤ 10 cfu/g ή ml).

● Κανονισμός (ΕΚ) 589/2008

Ο Κανονισμός (ΕΚ) 589/2008 θεσπίζει λεπτομερείς κανόνες όσον αφορά τα πρότυπα εμπορίας για τα αυγά, όπως:

Χαρακτηριστικά ποιότητας των αυγών

Τα αυγά της κατηγορίας Α έχουν τα ακόλουθα χαρακτηριστικά ποιότητας:

- α) κέλυφος και κελυφική μεμβράνη: κανονικό σχήμα, καθαρά και ανέπαφα
- β) αεροθάλαμος: ύψος όχι μεγαλύτερο από 6 mm, σε κατάσταση ηρεμίας· για αυγά όμως που διατίθενται στο εμπόριο με την ένδειξη «εξαιρετικά», το ύψος δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 4 mm
- γ) κρόκος: ορατός κατά την ωσκόπηση μόνο υπό μορφή σκιάς, χωρίς σαφές περίγραμμα, μετακινείται ελαφρά κατά την περιστροφή του αυγού και επανέρχεται στην κεντρική θέση
- δ) ασπράδι: φωτεινό, διαυγές
- ε) βλαστικός δίσκος: ανεπαίσθητη ανάπτυξη
- στ) ξένες ύλες: δεν επιτρέπεται
- ζ) ξένη οσμή: δεν επιτρέπεται

Τα αυγά της κατηγορίας Β δεν ανταποκρίνονται στα χαρακτηριστικά ποιότητας που προβλέπονται παραπάνω. Επιπλέον, αυγά της κατηγορίας Α τα οποία δεν παρουσιάζουν πλέον τα εν λόγω χαρακτηριστικά είναι δυνατόν να υποβαθμιστούν στην κατηγορία Β.

Ταξινόμηση των αυγών της κατηγορίας Α ανάλογα με το βάρος

- α) XL — πολύ μεγάλο: βάρος ίσο ή μεγαλύτερο των 73 g
- β) L — μεγάλο: βάρος ίσο ή μεγαλύτερο των 63 g και μικρότερο των 73 g
- γ) M — μεσαίο: βάρος ίσο ή μεγαλύτερο των 53 g και μικρότερο των 63 g
- δ) S — μικρό: βάρος μικρότερο των 53 g

Σημάνσεις συσκευασιών

Μεταξύ άλλων, στις συσκευασίες θα πρέπει να αναφέρονται:

Ημερομηνία ελάχιστης διατηρησιμότητας: Ορίζεται σε 28 μέρες κατ' ανώτατο όριο μετά την ωτοκία. Ως ημερομηνία ελάχιστης διατηρησιμότητας ορίζεται η ημερομηνία μέχρι την οποία το τρόφιμο διατηρεί τις ιδιαίτερες ιδιότητες του σε κατάλληλες συνθήκες διατήρησης.

«Εξαιρετικά» ή «Εξαιρετικά φρέσκα»: Οι εκφράσεις «εξαιρετικά» ή «εξαιρετικά φρέσκα» μπορούν να χρησιμοποιούνται ως πρόσθετη ένδειξη ποιότητας στις συσκευασίες αυγών της κατηγορίας Α έως την ένατη ημέρα μετά την ωτοκία. Σε αυτή την περίπτωση, η ημερομηνία ωτοκίας και η ημερομηνία λήξης της προθεσμίας των εννέα ημερών αναγράφονται στη συσκευασία με τρόπο ευκρινή και ευανάγνωστο.

Προθεσμίες ταξινόμησης, σήμανσης και συσκευασίας αυγών

- Τα αυγά ταξινομούνται, σημαίνονται και συσκευάζονται εντός δέκα ημερών από την ημερομηνία ωτοκίας.
- Τα αυγά που διατίθενται στο εμπόριο με την ένδειξη «εξαιρετικά» ή «εξαιρετικά φρέσκα», ταξινομούνται, σημαίνονται και συσκευάζονται εντός τεσσάρων ημερών από την ημερομηνία ωτοκίας.

● Πρότυπα εμπορίας UNECE για αυγά με κέλυφος και για προϊόντα αυγών

Πέρα από τα εκάστοτε νομοθετικά πλαίσια, η εμπορία των αυγών ορνίθων και των προϊόντων αυγών ορνίθων, συντάσσεται διεθνώς και με τα πρότυπα εμπορικής ποιότητας της οικονομικής επιτροπής των Ηνωμένων Εθνών για την Ευρώπη, γνωστά και ως πρότυπα UNECE (United Nations Economic Commission for Europe). Τα πρότυπα αυτά θέτουν διεθνείς ορισμούς, προδιαγραφές ποιότητας και σύστημα κωδικοποίησης για τα αυγά και τα προϊόντα αυγών με σκοπό τη διευκόλυνση της επικοινωνίας και του ηλεκτρονικού εμπορίου.

Τα κριτήρια ποιότητας που θέτουν τα πρότυπα UNECE για τα αυγά και τα προϊόντα αυγών είναι σε γενικές γραμμές πανομοιότυπα με τους Κανονισμούς της ΕΕ. Συμπληρωματικά σημεία που αξίζουν να αναφερθούν είναι τα εξής:

EGG-1 UNECE πρότυπο για αυγά με κέλυφος (έκδοση 2017)

Αυγά κατηγορίας Α, τα οποία διακρίνονται σε:

- Αυγά κατηγορίας Α, Εξαιρετικά φρέσκα: τα αυγά σε αυτή τη κατηγορία πρέπει να είναι ανώτερης ποιότητας, να ταξινομούνται, επισημαίνονται και συσκευάζονται εντός 4 ημερών από την ωτοκία. Επίσης πρέπει να έχουν τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:
 - α) Κέλυφος και επιδερμίδα: κανονικό σχήμα, καθαρά και άθικτα
 - β) Θάλαμος αέρα: ύψος μέχρι 4 mm κατά τη στιγμή της συσκευασίας, ακίνητος
 - γ) Κρόκος: ορατός κατά την ωσκόπηση μόνο υπό μορφή σκιάς, χωρίς σαφές περίγραμμα, μετακινείται ελαφρά κατά την περιστροφή του αυγού και επανέρχεται στην κεντρική θέση
 - δ) Ασπράδι: διαυγές, καθαρό και ημιδιαφανές
 - ε) Βλαστικός δίσκος: ανεπαίσθητη ανάπτυξη
 - στ) Συνιστώμενη ημερομηνία πώλησης: μέχρι 9 ημέρες από την ωτοκία
- Αυγά κατηγορίας Α, κατηγορίας Ι: τα αυγά σε αυτή τη κατηγορία θα πρέπει να είναι καλής ποιότητας, να ταξινομούνται, επισημαίνονται και συσκευάζονται εντός 10 ημερών από την ωτοκία. Επίσης πρέπει να έχουν τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:
 - α) Κέλυφος και επιδερμίδα: κανονικό σχήμα, καθαρά και άθικτα
 - β) Θάλαμος αέρα: ύψος μέχρι 6 mm, ακίνητος ή με μικρή κίνηση

- γ) Κρόκος: ορατός κατά την ωσκόπηση μόνο υπό μορφή σκιάς, χωρίς σαφές περίγραμμα, μετακινείται ελαφρά κατά την περιστροφή του αυγού και επανέρχεται στην κεντρική θέση
- δ) Ασπράδι: διαυγές, καθαρό και ημιδιαφανές
- ε) Βλαστικός δίσκος: ανεπαίσθητη ανάπτυξη
- στ) Συνιστώμενη ημερομηνία πώλησης: καθορίζεται από τη νομοθεσία της χώρας
- ζ) Ημερομηνία ελάχιστης διατηρησιμότητας: καθορίζεται από τη νομοθεσία της χώρας

Αυγά κατηγορίας Β, όπου κατατάσσονται τα αυγά που δεν πληρούν τα κριτήρια ταξινόμησης που ισχύουν για την κατηγορία Α. Τα αυγά κατηγορίας Β έχουν τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

- α) Κέλυφος: κανονικό σχήμα, άθικτα, ελαφρώς λερωμένο και μπορεί να παρουσιάζει ελαφρές παραμορφώσεις. Το κέλυφος δεν πρέπει να φέρει δακτυλίους αίματος και τα περιεχόμενα δεν πρέπει να είναι λερωμένα. Όπου ισχύουν σχετικές νομοθετικές διατάξεις και υπάρχει συμφωνία μεταξύ αγοραστή και πωλητή, τα λερωμένα αυγά μπορούν να πλυθούν και καθαριστούν με ειδικές μεθόδους αρκεί να μην επηρεάζεται η ποιότητά τους
- β) Θάλαμος αέρα: ύψος μέχρι 9 mm, επιτρέπεται η ύπαρξη μετακινούμενου κενού μέχρι το ½ του μήκους του αυγού
- γ) Κρόκος: ορατός κατά την ωσκόπηση, ελαφρώς πεπλατυσμένος και κινητός
- δ) Ασπράδι: σχετικά ημιδιαφανές
- ε) Βλαστικός δίσκος: ανεπαίσθητη ανάπτυξη

EGG-2 UNECE πρότυπο για προϊόντα αυγών (έκδοση 2017)

Στο πρότυπο αυτό καθορίζονται και φυσικοχημικοί δείκτες για προϊόντα αυγών που έχουν παραχθεί μέσω συμβατικών τεχνολογιών, όπως παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα:

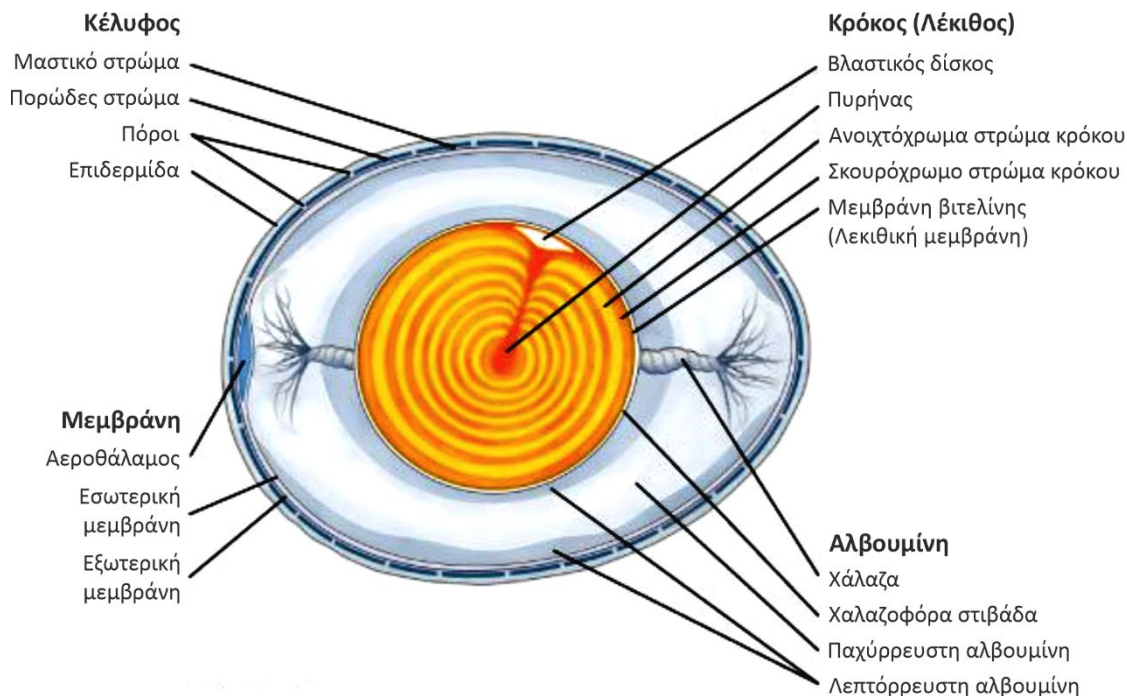
Πίνακας 1. Φυσικοχημικοί δείκτες με βάση το EGG-2 UNECE πρότυπο για προϊόντα αυγών που έχουν παραχθεί μέσω συμβατικών τεχνολογιών.

	Προϊόν						
	Ολόκληρο αυγό		Κρόκος		Αλβουμίνη		
	Υγρό και κατεψυγμένο	Αποξηραμένο	Υγρός και κατεψυγμένος	Αποξηραμένος	Υγρή και κατεψυγμένη	Αποξηραμένη	
σε δίσκους ξήρανσης						με ψεκασμό	
ολικά στερεά (%)	≥ 22,0	≥ 95,0	≥ 43,0	≥ 95,0	≥ 10,5	≥ 84,0	≥ 92,0
λιπαρά (%)	≥ 9,8	≥ 39,0	≥ 25,0	≥ 55,0	≥ 0,05	≥ 0,5	
πρωτεΐνες (%)	≥ 10,5	≥ 45,0	≥ 15,0	≥ 33,0	≥ 10,0	≥ 71,0	≥ 75,0
ξένες ύλες	Κανένα σωματίδιο μεγαλύτερο από 1 mm στα 100 g, μέγιστη συγκέντρωση 100 mg/ kg						
pH	≥ 7,0	≥ 7,5	≥ 5,9	≥ 6,0	≥ 8,5	≥ 4,0	
β-υδροξυβουτυρικό οξύ (mg/kg)	≤ 10	≤ 10	≤ 10	≤ 10	≤ 10	≤ 10	
γαλακτικό οξύ (mg/kg)	≤ 1000	-	≤ 1000	-	≤ 1000	-	
ηλεκτρικό οξύ (mg/kg)	≤ 25	-	≤ 25	-	≤ 25	-	

1.3. Δομή και σύσταση του αυγού

1.3.1. Δομή του αυγού

Ανατομικά, από έξω προς τα μέσα, το αυγό αποτελείται από (Σχήμα 2):



Σχήμα 2. Σχηματική απεικόνιση μορφολογίας αυγού (προσαρμογή από <https://www.britannica.com/science/egg-biology>)

- α) Την επιδερμίδα, η οποία καλύπτει την εξωτερική επιφάνεια του κελύφους και είναι κυρίως πρωτεϊνικής σύστασης (Li-Chan & Kim, 2008; Sharaf Eddin et al., 2019).
- β) Το κέλυφος, το οποίο αποτελείται κυρίως από ανθρακικό ασβέστιο (94%), με άλλα συστατικά όπως ανθρακικό μαγνήσιο (1%), φωσφορικό ασβέστιο (1%) και οργανικό υλικό που είναι κυρίως πρωτεΐνες (4%) (Sunwoo & Gujral, 2015).
- γ) Τις δύο κελυφικές μεμβράνες (εξωτερική και εσωτερική), οι οποίες εφάπτονται σε όλη την εσωτερική επιφάνεια του κελύφους πλην του αμβλέως άκρου του αυγού, όπου αφίστανται σχηματίζοντας τον αεροθάλαμο. Οι μεμβράνες αυτές λειτουργούν και ως άμυνα έναντι βακτηριακής διείσδυσης (Parsons, 1982; Sharaf Eddin et al., 2019; Sunwoo & Gujral, 2015).
- δ) Την αλβουμίνη (λεύκωμα, ασπράδι), που αποτελείται από την χαλαζοφόρο ή εσωτερική παχύρρευστη αλβουμίνη (3%) και η οποία περικλείει τη μεμβράνη βιτελίνης, την εσωτερική λεπτόρρευστη αλβουμίνη (17%), την εξωτερική παχύρρευστη αλβουμίνη (57%) και την εξωτερική λεπτόρρευστη αλβουμίνη (23%) (Li-Chan & Kim, 2008).
- ε) Τις χάλαζες, δύο σπειροειδή νήματα που συγκρατούν τον κρόκο στο κέντρο του αυγού, συνδέοντας τις αντιδιαμετρικές άκρες του κρόκου με κάθε άκρο του κελύφους (Sharaf Eddin et al., 2019).

στ) Τον κρόκο (λέκιθος), ο οποίος περιβάλλεται από πολύ λεπτή διάφανη μεμβράνη (μεμβράνη βιτελίνης ή λεκιθική μεμβράνη). Η μεμβράνη αυτή περιορίζει της ανταλλαγές ουσιών μεταξύ του κρόκου και της αλβουμίνης, ενώ είναι και το τελικό φράγμα έναντι βακτηριακής διείσδυσης. (Nys & Guyot, 2011; Sharaf Eddin et al., 2019). Στην επιφάνεια του κρόκου υπάρχει διαυγής δίσκος διαμέτρου της τάξης των 3,5 mm, ο οποίος καλείται βλαστικός δίσκος, περιέχει τα θηλυκά χρωμοσώματα και είναι η θέση πολλαπλασιασμού των εμβρυικών κυττάρων (Nys & Guyot, 2011; Sharaf Eddin et al., 2019).

1.3.2. Σύσταση του αυγού

Μια προσεγγιστική σύσταση του αυγού και των μερών αυτού (κέλυφος, αλβουμίνη, κρόκος) δίνεται στον Πίνακα 2. Το αυγό αποτελείται από 9-11% κέλυφος, 60-63% αλβουμίνη, και 28-29% κρόκο (κατά βάρος). Οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια αποτελούν τα κύρια συστατικά του αυγού, με τα λιπίδια να ανιχνεύονται σχεδόν αποκλειστικά στον κρόκο. Τα ανόργανα στοιχεία αποτελούν το κύριο συστατικό του κελύφους. Στο αυγό ανιχνεύονται όλες οι βιταμίνες (εκτός από τη βιταμίνη C). Ένα αυγό παρέχει ~ 12%, 6%, 9% και 8% της συνιστώμενης ημερήσιας δόσης για βιταμίνη A, βιταμίνη D, ριβοφλαβίνη και παντοθενικό οξύ, αντίστοιχα (Li-Chan & Kim, 2008; Nys & Guyot, 2011).

Πίνακας 2. Σύσταση (κατά προσέγγιση) ολόκληρου αυγού, κελύφους, αλβουμίνης και κρόκου (Li-Chan & Kim, 2008)

Συστατικό αυγού (%)	Σύσταση κατά προσέγγιση (% κατά βάρος)				
	Υγρασία	Πρωτεΐνες	Λιπίδια	Υδατάνθρακες	Τέφρα
Ολόκληρο αυγό (100%)	66,1	12,8-13,4	10,5-11,8	0,3-1,0	0,8-1,0
Κέλυφος (9-11%)	1,6	6,2-6,4	0,03	ΐχνη	91-92
Αλβουμίνη (60-63%)	87,6	9,7-10,6	0,03	0,4-0,9	0,5-0,6
Κρόκος (28-29%)	48,7	15,7-16,6	31,8-35,5	0,2-1,0	1,1

Κέλυφος

Το κέλυφος του αυγού συνίσταται από πολυκρυσταλλική ασβεστοποιημένη δομή σε οργανικό τρισιδιάστατο πλέγμα. Τα ανόργανα στοιχεία ανέρχονται σε ~ 95-97% (κατά βάρος) του κελύφους, από τα οποία το 98% είναι Ca. Άλλα ανόργανα στοιχεία περιλαμβάνουν P, Mg και ίχνη Fe και S, που βρίσκονται σε ποσοστό μικρότερο του 0,05%. Οι οργανικές ουσίες του κελύφους ανέρχονται σε ~ 1-2% (κατά βάρος) και αποτελούνται κυρίως από πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες πλούσιους σε θείο (Li-Chan & Kim, 2008; Sharaf Eddin et al., 2019; Sunwoo & Gujral, 2015).

Μεμβράνες κελύφους

Οι μεμβράνες αποτελούνται από πρωτεΐνες (κολλαγόνο τύπου I και V). Εμφανίζουν αντιβακτηριακή δράση, με την ωοτρανσφερίνη, τη λυσοζύμη και τη Ν-ακετυλο-β-D-γλυκοζαμινιδάση (b-NAGase), να είναι τα κύρια υπεύθυνα συστατικά (Li-Chan & Kim, 2008; Sunwoo & Gujral, 2015).

ΑλβουμίνηΠρωτεΐνες

Το νερό αποτελεί το κύριο συστατικό της αλβουμίνης, με εύρος τιμών από 84% έως 89% από τα εξωτερικά στρώματα προς τα εσωτερικά. Οι πρωτεΐνες αποτελούν το κύριο συστατικό των στερεών της αλβουμίνης. Υπάρχουν περισσότερα από 40 διαφορετικά είδη πρωτεϊνών, που δίνουν συνολικό περιεχόμενο 10-11% του βάρους της αλβουμίνης. Οι κυριότερες πρωτεΐνες είναι η ωοαλβουμίνη (54%), η ωοτρανσφερίνη (12%), η ωομυκοειδής (11%), η ωομυκίνη και η λυσοζύμη, που αποτελούν >83% του συνόλου των πρωτεϊνών της αλβουμίνης. Οι πρωτεΐνες της αλβουμίνης είναι κυρίως σφαιρικές πρωτεΐνες με όξινο ισοηλεκτρικό σημείο (pI), με εξαίρεση τη λυσοζύμη και την αβιδίνη. Στον Πίνακα 3 δίνεται το περιεχόμενο της αλβουμίνης σε αμινοξέα και στον Πίνακα 4 δίνεται το περιεχόμενο, το ισοηλεκτρικό σημείο και η μοριακή μάζα μερικών πρωτεϊνών της αλβουμίνης (Li-Chan & Kim, 2008; Sharaf Eddin et al., 2019; Sunwoo & Gujral, 2015).

Η πρωτεϊνική σύσταση των λεπτόρρευστων και παχύρρευστων στρωμάτων της αλβουμίνης διαφέρει κυρίως όσον αφορά στο περιεχόμενο σε ωομυκίνη. Το περιεχόμενο σε ωομυκίνη της παχύρρευστης αλβουμίνης είναι τετραπλάσιο αυτό της λεπτόρρευστης (Sunwoo & Gujral, 2015).

Πίνακας 3. Περιεχόμενο της αλβουμίνης και του κρόκου σε αμινοξέα (Li-Chan & Kim, 2008)

Αμινοξύ	Περιεχόμενο (g/100 g αλβουμίνης)	Περιεχόμενο (g/100 g κρόκου)
Τρυπτοφάνη	0,125	0,177
Θρεονίνη	0,449	0,687
Ισολευκίνη	0,661	0,866
Λευκίνη	1,016	1,399
Λυσίνη	0,806	1,217
Μεθειονίνη	0,399	0,378
Κυστίνη	0,287	0,264
Φαινυλαλανίνη	0,686	0,681
Τυροσίνη	0,457	0,678
Βαλίνη	0,809	0,949
Αργινίνη	0,648	1,099
Ιστιδίνη	0,290	0,416
Αλανίνη	0,704	0,836
Ασπαρτικό οξύ	1,220	1,550
Γλουταμινικό οξύ	1,550	1,970
Γλυκίνη	0,413	0,488
Προλίνη	0,435	0,646
Σερίνη	0,798	1,326

Πίνακας 4. Περιεχόμενο, ισοηλεκτρικό σημείο και μοριακή μάζα μερικών πρωτεϊνών που ανιχνεύονται στην αλβουμίνη (Li-Chan & Kim, 2008)

Πρωτεΐνη	Ποσοστό % των πρωτεϊνών της αλβουμίνης	Ισοηλεκτρικό σημείο	Μοριακή μάζα (kDa)
Ωοαλβουμίνη (Ovalbumin)	54	4,5 (5,1-5,3)	45 (42,4)
Ωοτρανσφερίνη (Ovotransferrin)	12	6,1 (6,2-6,7)	76 (85-75)
Ωομυκοειδής (Ovomucoid)	11	4,1 (5,0-5,3)	28 (37,2-43,1)
Ωομυκίνη (Ovomucin)	3,5	4,5-5,0	5500-8300
Λυσοζύμη (Lysozyme)	3,4	10,7	14,3 (15)
γ2 Σφαιρίνη (G2 globulin)	4,0	5,5	30-45
γ3 Σφαιρίνη (G3 globulin)	4,0	4,8	(δεν προσδιορίστηκε)
Ωοαναστολέας (Ovoinhibitor)	1,5	5,1 (6,2-6,4)	49 (69,5-63,6)
Ωογλυκοπρωτεΐνη (Ovoglycoprotein)	1,0	3,9 (5,0-5,4)	24,4 (37,2-43,1)
Ωοφλαβοπρωτεΐνη (Ovoflavoprotein)	0,8	4 (5,0-5,2)	32 (37,4-40)
Ωομακροσφαιρίνη (Ovomacroglobulin)	0,5	4,5	769
Κυστατίνη (Cystatin)	0,05	5,1 (6,1)	12,7(17)
Αβιδίνη (Avidin)	0,05	10	68,3

Λιπίδια

Το περιεχόμενο της αλβουμίνης σε λιπίδια είναι πολύ χαμηλό (0,03% κατά βάρος). Τα κυριότερα λιπαρά οξέα στην αλβουμίνη είναι το παλμιτικό (16:0), το ελαϊκό (18:1 *n*-9), το λινελαϊκό (18:2 *n*-6), το αραχιδονικό (20:4 *n*-6) και το στεατικό (18:0) (Πίνακας 5) (Li-Chan & Kim, 2008; Sunwoo & Gujral, 2015)

Πίνακας 5. Σύσταση σε λιπαρά οξέα (g/100 g ολικών λιπιδίων) της αλβουμίνης, του πλάσματος κρόκου και των κόκκων κρόκου (Li-Chan & Kim, 2008)

Λιπαρό οξύ ¹	Αλβουμίνη	Πλάσμα κρόκου	Κόκκοι κρόκου
16 : 0	18,30	22,49	24,24
16 : 1 <i>n</i> -7	0,81	1,32	1,18
17 : 0	0,27	0,22	0,16
18 : 0	7,76	11,22	12,40
18 : 1 <i>n</i> -9	16,66	31,28	28,48
18 : 2 <i>n</i> -6	20,92	27,60	26,81
18 : 3 <i>n</i> -6	0,23	0,18	ND ²
18 : 3 <i>n</i> -3	0,15	0,43	0,26
20 : 1 <i>n</i> -9	0,06	0,18	ND
20 : 2 <i>n</i> -6	0,23	0,31	0,23
20 : 3 <i>n</i> -6	0,40	0,27	0,27
20 : 4 <i>n</i> -6	9,92	2,36	3,53
22 : 4 <i>n</i> -6	1,14	0,16	ND
22 : 5 <i>n</i> -3	0,37	ND	ND
22 : 5 <i>n</i> -6	0,90	0,55	0,83
22 : 6 <i>n</i> -3	2,07	0,60	0,93
SFA	26,34	33,92	36,80
MUFA	17,53	32,78	29,66
PUFA	36,33	32,48	32,86
<i>n</i> -6	33,74	31,44	31,67
<i>n</i> -3	2,59	1,03	1,19
<i>n</i> -6/ <i>n</i> -3	13,84	30,49	26,67
SFA/PUFA	0,73	1,05	1,12

¹ SFA: Ολικά κορεσμένα λιπαρά οξέα, MUFA: ολικά μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, PUFA: ολικά πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, *n*-6: ολικά ωμέγα-6 λιπαρά οξέα, *n*-3: ολικά ωμέγα-3 λιπαρά οξέα

² ND: μη προσδιορισμένο

Υδατάνθρακες - Σάκχαρα

Οι υδατάνθρακες (περίπου 1%) βρίσκονται στην αλβουμίνη εν μέρει δεσμευμένοι σε πρωτεΐνες (0,5%) και εν μέρει ελεύθεροι (0,4-0,5%). Οι ελεύθεροι υδατάνθρακες περιλαμβάνουν γλυκόζη (98%), καθώς και μαννόζη, γαλακτόζη, αραβινόζη, ξυλόζη, ριβόζη και δεοξυριβόζη, συνολικά 0,2-2,0 mg/100g αλβουμίνης. Δεν υπάρχουν ελεύθεροι ολιγοσακχαρίτες ή πολυσακχαρίτες (Belitz et al., 2009; Li-Chan & Kim, 2008). Στον Πίνακα 6 δίνεται η υδατανθρακική σύσταση μερικών γλυκοπρωτεϊνών της αλβουμίνης.

Πίνακας 6. Υδατανθρακική σύσταση μερικών γλυκοπρωτεϊνών αλβουμίνης (Belitz et al., 2009)

Πρωτεΐνη	Υδατάν- θρακας (%)	Συστατικά (moles/mole πρωτεΐνης)				
		Γαλακτόζη	Μαννόζη	Γλυκοζαμίνη	Γαλακτοζαμίνη	Σιαλικό οξύ
Ωοαλβουμίνη	3,2		5	3		
Ωομυκοειδής	23	2	7	23		1
α-Ωομυκίνη	13	21	46	63	6	7
Ωογλυκοπρωτεΐνη	31	6	12	19		2
Ωοαναστολέας (Α)	9,2		10*	14		0,2
Αβιδίνη**	10		4(5)	3		

* άθροισμα γαλακτόζης και μαννόζης

** δεδομένα ανά υπομονάδα (16 kdal)

Ανόργανα στοιχεία

Τα κυριότερα ανόργανα στοιχεία της αλβουμίνης είναι το θείο, το κάλιο, το νάτριο και το χλώριο. Έπονται ο φωσφόρος, το ασβέστιο και το μαγνήσιο. Στον Πίνακα 7 δίνεται το περιεχόμενο ολόκληρου του αυγού, της αλβουμίνης και του κρόκου στα κυριότερα ανόργανα στοιχεία. (Li-Chan & Kim, 2008)

Πίνακας 7. Ανόργανα στοιχεία σε ολόκληρο αυγό* (ανά αυγό), στην αλβουμίνη και στον κρόκο, καθώς και η σχετική τους αναλογία στην αλβουμίνη και στον κρόκο (προσαρμογή από Watkins, 1995)

Στοιχείο	Ολόκληρο αυγό (mg)	Αλβουμίνη		Κρόκος	
		(mg)	(%)	(mg)	(%)
Ca	29,2	3,8	13%	25,2	86%
Cl	96	66,1	69%	29,9	31%
Cu	0,033	0,009	27%	0,024	73%
Fe	1,08	0,053	5%	1,02	94%
I	0,026	0,001	4%	0,024	92%
K	74	57	77%	17	23%
Mg	6,33	4,15	66%	2,15	34%
Mn	0,021	0,002	10%	0,019	90%
Na	71	63	89%	9	13%
P	111	8	7%	102	92%
S	90	62	69%	28	31%
Zn	0,72	0,05	7%	0,66	92%

* Με βάση αυγό βάρους 60,9 g (συμπεριλαμβανομένου του κελύφους), με 38,4 g αλβουμίνης και 16,7 g κρόκου, που περιέχουν 12,1% και 51,8% στερεά αντίστοιχα.

Βιταμίνες

Η αλβουμίνη δεν περιέχει λιποδιαλυτές βιταμίνες, αλλά περιέχει σημαντικές ποσότητες υδατοδιαλυτών βιταμινών, όπως βιοτίνη, νιασίνη και ριβοφλαβίνη (Πίνακας 8). Πολλές από τις βιταμίνες βρίσκονται σε δεσμευμένη μορφή με πρωτεΐνες (Li-Chan & Kim, 2008).

Πίνακας 8. Βιταμίνες σε ολόκληρο αυγό* (ανά αυγό), στην αλβουμίνη και στον κρόκο (προσαρμογή από Watkins, 1995)

Βιταμίνη (μονάδες)	Ολόκληρο αυγό	Αλβουμίνη	Κρόκος
Βιταμίνη Α (IU)	264	—	260
Βιταμίνη D (IU)	27	—	27
Βιταμίνη Ε (mg)	0,88	—	0,87
Βιταμίνη Β ₁₂ (μg)	0,48	—	0,48
Βιοτίνη (μg)	11,0	2,58	8,35
Χολίνη (mg)	237	0,46	238
Φυλλικό οξύ (mg)	0,023	0,006	0,026
Ινοσιτόλη (mg)	5,94	1,52	4,35
Νιασίνη (mg)	0,045	0,035	0,010
Παντοθενικό οξύ (mg)	0,83	0,09	0,73
Πυριδοξίνη (mg)	0,065	0,008	0,057
Ριβοφλαβίνη (mg)	0,18	0,11	0,07
Θειαμίνη (mg)	0,05	0,004	0,048

* Με βάση αυγό βάρους 60,9 g (συμπεριλαμβανομένου του κελύφους), με 38,4 g αλβουμίνης και 16,7 g κρόκου, που περιέχουν 12,1% και 51,8% στερεά αντίστοιχα.

Κρόκος

Ο κρόκος είναι ένα γαλάκτωμα λίπους σε νερό και περιέχει ~ 50% στερεά, με τα λιπίδια (~ 65-70% σε ξηρή βάση) και τις πρωτεΐνες (~ 30% σε ξηρή βάση) να αποτελούν τα κύρια συστατικά (Πίνακας 2) (Belitz et al., 2009, pp. 553-554; Li-Chan & Kim, 2008).

Πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες του κρόκου υφίστανται κυρίως ως λιποπρωτεΐνες χαμηλής (LDL) και υψηλής (HDL) πυκνότητας. Η LDL είναι η κύρια πρωτεΐνη και ανέρχεται έως 65% των συνολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου του κρόκου και θεωρείται ότι ευθύνεται για τις λειτουργικές ιδιότητες του κρόκου, ιδίως της γαλακτωματοποιητικής ικανότητας. Άλλες πρωτεΐνες του κρόκου είναι η φωσβιτίνη και η λιβετίνη (Li-Chan & Kim, 2008). Στον Πίνακα 3 δίνεται το περιεχόμενο του κρόκου σε αμινοξέα και στον Πίνακα 9 οι κυριότερες πρωτεΐνες του κρόκου.

Πίνακας 9. οι κυριότερες πρωτεΐνες του κρόκου (Li-Chan & Kim, 2008)

Πρωτεΐνη	ποσοστό επί του συνόλου των πρωτεϊνών
Αποβιτελλενίνη I-IV	37,3%
α-Λιποβιτελίνη	26,7%
β-Λιποβιτελίνη	13,3%
α-Λιβετίνη (αλβουμίνη ορού)	2,7%
β-Λιβετίνη (α-2-γλυκοπρωτεΐνη)	4,0%
γ-Λιβετίνη (γ-σφαιρίνη)	2,7%
Φωσβιτίνη	13,3%
Πρωτεΐνη δέσμευσης βιοτίνης (Biotin binding protein)	Ίχνη

Με φυγοκέντρηση ο κρόκος διαχωρίζεται σε κλάσμα πλάσματος (υπερκείμενο) και κλάσμα κόκκων (ίζημα). Το πλάσμα αποτελεί ~ 78% του συνολικού κρόκου, περιέχει ~ 51% στερεά, τα οποία αποτελούνται κυρίως από λιπίδια (~ 80%), τέφρα (2%) και μη λιπιδικό υλικό (18%) που είναι κυρίως πρωτεΐνες. Οι κόκκοι, από την άλλη πλευρά, περιέχουν ~ 34% λιπίδια, 60% πρωτεΐνη και 5% τέφρα (σε ξηρή βάση) (Li-Chan & Kim, 2008).

Οι πρωτεΐνες των κόκκων αποτελούνται κατά 70% HDL, 16% φωσβιτίνη και 12% LDL. Η HDL αποτελείται από α- και β- λιποβιτελλίνες (Li-Chan & Kim, 2008; Watkins, 1995). Η φωσβιτίνη είναι μια φωσφογλυκοπρωτεΐνη που περιέχει περίπου 10% φωσφόρο, με τις α- και β- φωσβιτίνη να περιέχουν περίπου 2% και 9% φωσφόρο, αντίστοιχα. Είναι μία από τις πιο φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες που απαντώνται στη φύση. Περίπου το 80% του πρωτεϊνικού φωσφόρου στον κρόκο του αυγού βρίσκεται στη φωσβιτίνη (Li-Chan & Kim, 2008).

Στο πλάσμα περιέχονται λιβετίνες, οι οποίες είναι μη λιπιδικές σφαιρικές πρωτεΐνες και LDL (Watkins, 1995).

Λιπίδια

Τα λιπίδια είναι τα κύρια συστατικά (32 - 36%) του κρόκου (Li-Chan & Kim, 2008; Nys & Guyot, 2011). Η σύσταση των λιπιδίων του κρόκου γενικά είναι περίπου 65% τριγλυκερίδια, 28-30% φωσφολιπίδια και 4-5% χοληστερίνη (Li-Chan & Kim, 2008; Nys & Guyot, 2011; Sunwoo & Gujral, 2015). Στον Πίνακα 10 δίνονται τα λιπίδια στον κρόκο και στον Πίνακα 5 η σύσταση σε λιπαρά οξέα των λιπιδίων πλάσματος και κόκκων του κρόκου

Σχεδόν όλα τα λιπίδια βρίσκονται ως συμπλέγματα λιποπρωτεϊνών. Σε σύγκριση με άλλα λιπίδια ζωικής προέλευσης, τα λιπίδια αυγών περιέχουν μεγάλα επίπεδα ακόρεστων λιπαρών οξέων (Nys & Guyot, 2011).

Πίνακας 10. Λιπίδια στον κρόκο (Li-Chan & Kim, 2008)

Λιπίδιο	ποσοστό επί του συνόλου των λιπιδίων
Τριγλυκερίδια	65%
Φωσφατιδυλοχολίνη	26%
Φωσφατιδυλαιθανολαμίνη	3,8%
Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη	0,6%
Χοληστερίνη	4%
Σφιγγομυελίνη	0,6%

Υδατάνθρακες - Σάκχαρα

Η περιεκτικότητα του κρόκου σε υδατάνθρακες είναι περίπου 0,2-1,0%. Μέρος των υδατανθράκων βρίσκεται σε δεσμευμένη μορφή σε γλυκοπρωτεΐνες και γλυκολιπίδια. Από τους ελεύθερους υδατάνθρακες, πέρα από τη γλυκόζη, στον κρόκο ανιχνεύονται οι ίδιοι μονοσακχαρίτες με αυτούς στην αλβουμίνη (Belitz et al., 2009, p. 556; Li-Chan & Kim, 2008; Nys & Guyot, 2011).

Ανόργανα στοιχεία

Η περιεκτικότητα του κρόκου σε ανόργανα στοιχεία είναι περίπου 1%. Το κύριο ανόργανο στοιχείο στον κρόκο είναι ο φωσφόρος, 60% του οποίου περιέχεται σε φωσφολιπίδια. Άλλα ανόργανα στοιχεία που περιέχονται είναι: Cl, S, Ca, K, Na, Mg και Fe καθώς και άλλα σε μικρότερες ποσότητες (Πίνακας 7) (Li-Chan & Kim, 2008; Sunwoo & Gujral, 2015). Ο κρόκος περιέχει το μεγαλύτερο μέρος του Fe στο αυγό, ενώ η περιεκτικότητα σε Na είναι χαμηλή σε σύγκριση με την αλβουμίνη (Nys & Guyot, 2011).

Βιταμίνες

Ο κρόκος περιέχει όλες τις λιποδιαλυτές βιταμίνες του αυγού. Έχει επίσης υψηλά επίπεδα υδατοδιαλυτών βιταμινών σε σύγκριση με την αλβουμίνη, εκτός από τη νιασίνη και τη ριβοφλαβίνη (Πίνακας 8) (Li-Chan & Kim, 2008; Nys & Guyot, 2011). Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 8, οι βιταμίνες A, D και E βρίσκονται αποκλειστικά στον κρόκο. Η χολίνη, το φυλλικό οξύ και το παντοθενικό οξύ βρίσκονται κυρίως στον κρόκο. Συγκριτικά, ο κρόκος περιέχει το πιο σημαντικό ποσοστό βιταμινών ενός αυγού (Sunwoo & Gujral, 2015).

Χρωστικές

Το χρώμα του κρόκου οφείλεται στα καροτενοειδή που συσσωρεύονται στο αυγό. Οι όρνιθες δεν έχουν την ικανότητα να συνθέτουν καροτενοειδή και τα λαμβάνουν από την τροφή (Nys & Guyot, 2011). Τα κύρια συστατικά των καροτενοειδών στον κρόκο είναι οι ξανθοφύλλες, συμπεριλαμβανομένων της λουτεΐνης, της ζεαξανθίνης και της β-κρυπτοξανθίνης. Υπάρχουν επίσης μικρές ποσότητες καροτενίων, συμπεριλαμβανομένου του β-καροτενίου (Li-Chan & Kim, 2008; Watkins, 1995).

1.4. Ποιοτικά χαρακτηριστικά

Εκτός από τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των αυγών και των προϊόντων αυγών που προσδιορίζονται με κανονισμούς, όπως αυτοί που ισχύουν στην ΕΕ, ως κριτήρια ποιότητας χρησιμοποιούνται και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τόσο του εξωτερικού (επιδερμίδα, κέλυφος), όσο και του εσωτερικού (κρόκος, αλβουμίνη) μέρους του αυγού.

1.4.1. Ποιοτικά χαρακτηριστικά του εξωτερικού του αυγού

Βάρος

Σύμφωνα με τον Κανονισμό (ΕΚ) 589/2008 τα αυγά ορνίθων κατηγοριοποιούνται ανάλογα με το βάρος τους. Το απαιτούμενο βέλτιστο βάρος κυμαίνεται μεταξύ 53 και 73 g, που αντιστοιχεί σε αυγά διαστάσεων Medium (M) και Large (L). Παράγοντες που επηρεάζουν το βάρος του αυγού είναι η γενετική, η υγεία και η διατροφή των ορνίθων (Schwägele, 2011).

Κατά την αποθήκευση παρατηρείται μείωση του βάρους του αυγού λόγω της απώλειας υδρατμών και διοξειδίου του άνθρακα μέσω των πόρων του κελύφους. Το φαινόμενο αυτό αφορά κυρίως την αλβουμίνη. Το ποσοστό των αέριων που διαφεύγουν εξαρτάται από το πορώδες του κελύφους, την ποιότητα της επιδερμίδας και περιβαλλοντικές παραμέτρους, όπως η θερμοκρασία, η σχετική υγρασία και η διάρκεια αποθήκευσης (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 50).

Χρώμα κελύφους

Το χρώμα του κελύφους του αυγού δεν επηρεάζει τη θρεπτική του αξία, αλλά αποτελεί σημαντική παράμετρο για τους καταναλωτές. Το κέλυφος μπορεί να έχει χρώμα καφέ, λευκό ή κάποια ενδιάμεση απόχρωση. Οι περισσότερες από αυτές τις χρωστικές ουσίες βρίσκονται στην επιδερμίδα του αυγού, αλλά μπορούν επίσης να βρεθούν στο κέλυφος (π.χ. η πρωτοπορφυρίνη μπορεί να απομονωθεί ακόμη και από λευκά κελύφη) (Mertens et al., 2011).

Το χρώμα των αυγών εξαρτάται από την υγεία, τη γενετική και τις συνθήκες διαβίωσης των ωοτόκων ορνίθων (Mertens et al., 2011; Schwägele, 2011). Η ένταση του χρώματος του κελύφους, ιδιαίτερα των καφέ αυγών, μειώνεται με αύξηση της ηλικίας των ορνίθων (Mertens et al., 2011).

Παραδοσιακά, το χρώμα του κελύφους μετρείται με χρωματόμετρο (π.χ. με χρωματικό μοντέλο RGB ή L^*a^*b). Ωστόσο, νέες προσεγγίσεις όπως η τιμή χρώματος μετάδοσης (transmission colour value - TCV), μέθοδος η οποία βασίζεται στην φασματοσκοπία Ορατού / Εγγύς Υπερύθρου (visual/ near infrared VIS/NIR), παρέχουν περισσότερες πληροφορίες σχετικά με την εναπόθεση των χρωστικών μέσα και πάνω στο κέλυφος (Mertens et al., 2011).

Επιδερμίδα και μεμβράνες κελύφους

Η επιδερμίδα του αυγού αποτελεί κρίσιμο φυσικό φράγμα ενάντια στην βακτηριακή διείσδυση (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 49; Mertens et al., 2011). Η ποιότητά της ποικίλλει ανά αυγό και υποβαθμίζεται με την πάροδο του χρόνου (Liu et al., 2020), συσχετιζόμενη με παραμέτρους όπως η υγρασία, η θερμοκρασία του αυγού και η θερμοκρασία περιβάλλοντος (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 49). Η ακατάλληλη πλύση των αυγών επίσης συμβάλλει στη σταδιακή υποβάθμισή της (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 49).

Σε θερμοκρασία δωματίου η επιδερμίδα προσφέρει προστασία από τη βακτηριακή διείσδυση για τουλάχιστον 4 ημέρες, ενώ περίπου 3 εβδομάδες μετά την ωοτοκία αρχίζει να γίνεται εύθραυστη και να αποικοδομείται (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 49).

Η ποιότητα της επιδερμίδας μπορεί να εκτιμηθεί με τη μέθοδο των Board and Halls (1973) με χρωματόμετρο (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 59; Mertens et al., 2011).

Οι μεμβράνες του κελύφους συμβάλλουν στην αντοχή του (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 46). Όπως και η επιδερμίδα, αποτελούν αποτελεσματικό εμπόδιο κατά της βακτηριακής διείσδυσης ενώ έχουν και αντιβακτηριδιακές ιδιότητες (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 46). Οι μεμβράνες του κελύφους εξετάζονται μέσω καταστροφικών μηχανικών δοκιμών ως προς τη δύναμη προσκόλλησης μεταξύ της εξωτερικής μεμβράνης και του κελύφους, καθώς και ως προς την αντίσταση στη θραύση (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 59).

Αντοχή κελύφους

Η αντοχή του κελύφους επηρεάζεται άμεσα από το πάχος και τη σύνθεσή του, ενώ μειώνεται με την ηλικία των ορνίθων (Mertens et al., 2011).

Για τον προσδιορισμό της αντοχής του κελύφους χρησιμοποιούνται άμεσες (καταστροφικές) και έμμεσες (καταστροφικές και μη) μέθοδοι (Mertens et al., 2011).

Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη άμεση μέθοδος είναι η άσκηση δύναμης θραύσης-συμπίεσης. Οι έμμεσες μέθοδοι συσχετίζουν ποιοτικές παραμέτρους του κελύφους (π.χ. πάχος, πυκνότητα αυγού, ποσοστό βάρους του κελύφους επί του αυγού) με την αντοχή του (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 59; Mertens et al., 2011). Νέες έμμεσες μέθοδοι περιλαμβάνουν την χρήση δοκιμής ακουστικής/δονητικής απόκρισης (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 60).

Ανίχνευση ρωγμών

Η μείωση της αντοχής του κελύφους συνεπάγεται την εμφάνιση ρωγμών (hair cracks), γεγονός που αυξάνει τον κίνδυνο για βακτηριακή επιμόλυνση (Mertens et al., 2011).

Η ανίχνευση των ρωγμών πραγματοποιείται με ωσκόπηση (Mertens et al., 2011). Έχουν αναπτυχθεί αυτοματοποιημένα συστήματα ωσκόπησης καθώς και εναλλακτικά συστήματα που βασίζονται σε ανάλυση δονήσεων (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 60; Mertens et al., 2011).

Ανίχνευση ακαθαρσιών και ανωμαλιών

Η βρωμιά και οι λεκέδες στα αυγά προκαλούνται κυρίως από μολυσματικούς παράγοντες όπως κόπρανα (λεκέδες από μαύρο έως ανοιχτό καφέ), ουρικό οξύ (λευκοί λεκέδες), κρόκο, αλβουμίνη και αίμα (Mertens et al., 2011). Η παρουσία αυτών των παραγόντων συνδέεται με την παρουσία δυνητικά παθογόνων βακτηρίων που μπορεί να οδηγήσουν σε αλλοίωση του εσωτερικού του αυγού (Mertens et al., 2011). Η ανίχνευσή τους πραγματοποιείται με την τεχνική της ωσκόπησης, είτε από ανθρώπινο δυναμικό είτε με αυτόματα συστήματα με κάμερες (Mertens et al., 2011).

1.4.2. Ποιοτικά χαρακτηριστικά του εσωτερικού του αυγού

Η ποιότητα του εσωτερικού των αυγών είναι δύσκολο να μετρηθεί χωρίς να σπάσει το κέλυφος.

Κρόκος (Λέκιθος)

- Χρώμα Κρόκου

Για τους καταναλωτές το χρώμα του κρόκου θεωρείται ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά της καλής ποιότητας των αυγών (Mertens et al., 2011). Ποικίλει από ανοιχτό κίτρινο μέχρι βαθύ πορτοκαλί και επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τη σύσταση των ζωοτροφών (π.χ. περιεκτικότητα σε καροτενοειδή) (Mertens et al., 2011; Schwägele, 2011). Είναι, όμως, υποκειμενικό κριτήριο ποιότητας καθώς δεν επηρεάζει τη θρεπτική αξία του αυγού (Mertens et al., 2011).

Το χρώμα κρόκου ορίζεται με βάση τη κλίμακα χρώματος Roche ή μέσω μέτρησης ανάκλασης (reflectance measurement) (Mertens et al., 2011).

- Δείκτης Κρόκου

Ως δείκτης κρόκου ορίζεται ο λόγος του ύψους προς το πλάτος αυτού και αποτελεί ένδειξη της ποιότητας της μεμβράνης βιτελίνης (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 60; Mertens et al., 2011).

Με τη πάροδο του χρόνου ο δείκτης κρόκου μειώνεται καθώς μεταφέρεται νερό από την αλβουμίνη στον κρόκο με αποτέλεσμα την αύξηση του μεγέθους του καθώς και την εξασθένηση της μεμβράνης της βιτελίνης (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 59; Liu et al., 2020; Mertens et al., 2011). Ένα φρέσκο αυγό καλής ποιότητας έχει συνήθως δείκτη κρόκου περίπου 0,45 (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 60; Mertens et al., 2011).

- Αντοχή μεμβράνης βιτελίνης

Η αντοχή της μεμβράνης της βιτελίνης μειώνεται κατά την αποθήκευση λόγω της υποβάθμισης της δομικής της ακεραιότητας και της αύξησης του όγκου του κρόκου (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 51). Μπορεί να εκτιμηθεί με τεχνικές τριχοειδούς κενού (capillary vacuum) ή με συσκευές συμπίεσης (compression -texture- device) (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 60; Mertens et al., 2011).

Αλβουμίνη

Η ποιότητα της αλβουμίνης του αυγού χαρακτηρίζεται από τη συνοχή και τη διαύγεια της (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 60; Mertens et al., 2011). Για την αξιολόγησή της χρησιμοποιούνται παράμετροι όπως τα χαρακτηριστικά του θαλάμου αέρα, το ύψος της παχύρρευστης αλβουμίνης και οι μονάδες Haugh (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 60).

- Χαρακτηριστικά θαλάμου αέρα

Ο μικρός θάλαμος αέρα στο αμβλύ άκρο του αυγού αποτελεί ένδειξη φρεσκότητας (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 59; Schwägele, 2011). Το μέγεθος του θαλάμου αέρα συσχετίζεται με το βάρος του αυγού και τη σχετική υγρασία αποθήκευσης (Karoui et al., 2006a).

Τα αυγά κατηγορίας Α έχουν ύψος θαλάμου αέρα μέχρι 6 mm ενώ τα αυγά με το χαρακτηρισμό «εξαιρετικά» έχουν ύψος μέχρι 4 mm. Θεωρητικά αυτά τα χαρακτηριστικά πρέπει να ισχύουν για τα συσκευασμένα αυγά μέχρι την ημερομηνία λήξης. Ωστόσο, η θερμοκρασία και η σχετική υγρασία επηρεάζουν σημαντικά το ύψος του θαλάμου αέρα, με συνέπεια ο αυστηρός έλεγχος αυτών των δύο παραμέτρων να είναι απαραίτητος σε ολόκληρο τον κύκλο εμπορίας των αυγών προκειμένου να διασφαλιστεί η ποιότητά τους (Karoui et al., 2006a).

Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης των αυγών, το εσωτερικό νερό διαφεύγει από τους πόρους του κελύφους των αυγών, προκαλώντας την αύξηση του όγκου και του ύψους του θαλάμου αέρα (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 50; Liu et al., 2020). Η αύξηση του ύψους του θαλάμου αέρα γίνεται αντιληπτή από την πρώτη εβδομάδα αποθήκευσης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και συνεχίζεται για έως και 5 εβδομάδες, οδηγώντας εν τέλει σε τριπλάσια αύξηση του αρχικού όγκου (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 50).

Το ύψος του αεροθαλάμου μπορεί να μετρηθεί κατά την ωσκόπηση με ειδικό μετρητή.

- Ύψος παχύρρευστης αλβουμίνης

Το ύψος της παχύρρευστης αλβουμίνης μετράται με τη διάσπαση του αυγού σε λεία επίπεδη επιφάνεια (Karoui et al., 2006a). Μειώνεται με την πάροδο του χρόνου αποθήκευσης και ιδιαίτερα σε υψηλότερες θερμοκρασίες (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 50), καθώς και με την αύξηση της ηλικίας της όρνιθας (Karoui et al., 2006a).

Το ύψος της παχύρρευστης αλβουμίνης χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των μονάδων Haugh (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 50).

- Μονάδες Haugh

Οι μονάδες Haugh αποτελούν διεθνώς τον πιο διαδεδομένο δείκτη της ποιότητας της αλβουμίνης (Karoui et al., 2006a). Για τον προσδιορισμό τους χρησιμοποιείται η εξής σχέση:

$$HU = 100 \times \log(h - 1,7 \times w^{0,37} + 7,6)$$

όπου HU = μονάδες Haugh, h = ύψος παχύρρευστης αλβουμίνης (mm), w = βάρος αυγού (g).

Οι μονάδες Haugh μειώνονται κατά την αποθήκευση (Liu et al., 2020). Οι σχετικά υψηλές μονάδες Haugh (>75) αποτελούν ένδειξη φρεσκότητας ενός αυγού (Schwägele, 2011).

Σύμφωνα με το Υπουργείο Γεωργίας των ΗΠΑ (USDA - United States Department of Agriculture), τα αυγά κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες AA, A και B. Ανάμεσα στα κριτήρια που πρέπει να πληρούνται για την κατηγοριοποίηση των αυγών είναι και η αξιολόγηση των χαρακτηριστικών της αλβουμίνης. Για την αξιολόγηση αυτών, μεταξύ άλλων, χρησιμοποιούνται και οι μονάδες Haugh: κατηγορία AA ($HU \geq 72$), κατηγορία A ($60 \leq HU < 72$) και κατηγορία B ($HU < 60$) (USDA, 2000). Μια άλλη κατηγοριοποίηση των αυγών με κέλυφος ανάλογα με τις μονάδες Haugh περιλαμβάνει τις κατηγορίες AA ($HU \geq 72$), A ($60 \leq HU \leq 71$), B ($31 \leq HU \leq 59$) και μια επιπλέον κατηγορία C ($HU \leq 30$) (Haugh Unit - Egg Tester, n.d.).

Έχουν διατυπωθεί αμφιβολίες για την αξιοπιστία της χρήσης των μονάδων Haugh για την αξιολόγηση της φρεσκότητας της αλβουμίνης και των αυγών (Karoui et al., 2006a; Mertens et al., 2011) και έχουν προταθεί εναλλακτικές μέθοδοι οι οποίες βασίζονται σε φασματοσκοπικές τεχνικές ή στη καταγραφή πτητικών ενώσεων από «ηλεκτρονική μύτη» (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 60; Mertens et al., 2011). Οι μέθοδοι αυτές συσχετίζουν τη φρεσκότητα με παραμέτρους ποιότητας της αλβουμίνης (π.χ. ιξώδες, pH) (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 60; Karoui et al., 2006a; Mertens et al., 2011).

Οι εναλλακτικές μέθοδοι βρίσκονται ακόμη σε πειραματική κλίμακα και δεν έχουν μεταφερθεί στην γραμμή παραγωγής (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 60; Mertens et al., 2011).

- pH

Η αλβουμίνη ενός αυγού ημέρας έχει pH μεταξύ 7,6 και 8,5 (Karoui et al., 2006a). Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης το pH της αλβουμίνης αυξάνεται με ρυθμό που συσχετίζεται θετικά με τη θερμοκρασία, σε τιμές από 8,9 έως 9,4 (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 50; Karoui et al., 2006a). Η αύξηση του pH της αλβουμίνης οφείλεται στην απώλεια διοξειδίου του άνθρακα από το αυγό μέσω των πόρων του κελύφους. Το pH της αλβουμίνης εξαρτάται από την ισορροπία μεταξύ διαλυμένου διοξειδίου του άνθρακα, διττανθρακικών ιόντων (bicarbonates ions), ανθρακικών ιόντων και πρωτεϊνών (Karoui et al., 2006a).

Η αύξηση του pH της αλβουμίνης συνεπάγεται την υγροποίηση της παχύρρευστης αλβουμίνης. Το φαινόμενο αυτό δεν έχει διασαφηνιστεί πλήρως, αν και έχει παρατηρηθεί ότι εμπλέκονται τροποποιήσεις στην δομή της ωομυκίνης και αλληλεπιδράσεις αυτών με τη λυσοζύμη (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 50).

Η μείωση του ιξώδους της αλβουμίνης συνεπάγεται τη σταδιακή μετανάστευση του κρόκου στο αμβλύ άκρο του αυγού ενώ με τη διάσπαση των χαλαζών ο κρόκος έρχεται σε επαφή με τις μεμβράνες του κελύφους (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 50).

1.4.3. Ποιοτικά χαρακτηριστικά σχετικά με θέματα απάτης σε προϊόντα αυγών

Το 3-υδροξυ-βουτυρικό οξύ χρησιμοποιείται ως δείκτης ανίχνευσης γονιμοποιημένων αυγών. Σύμφωνα με τον Κανονισμό (ΕΚ) 853/2004, η συγκέντρωση του 3-υδροξυ-βουτυρικού οξέος δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 10 mg / kg ξηράς ουσίας του μη τροποποιημένου προϊόντος αυγού (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 50).

1.5. Επίδραση της αποθήκευσης στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των αυγών

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των αυγών επηρεάζονται από τις συνθήκες αποθήκευσης (θερμοκρασία, σχετική υγρασία, συγκεντρώσεις O₂ και CO₂), καθώς και από τη διάρκεια της αποθήκευσης (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 59; Karoui et al., 2006a; Renzone et al., 2021). Η μεταβολή των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των αυγών έχει άμεση επίδραση τόσο στο μικροβιακό φορτίο του αυγού όσο και στις λειτουργικές ιδιότητες των προϊόντων στα οποία χρησιμοποιούνται τα αυγά ως πρώτη ύλη (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 59).

Οι μεταβολές που λαμβάνουν χώρα κατά την αποθήκευση των αυγών (υπό κανονικές συνθήκες χειρισμού) και ασκούν τη σημαντικότερη επίδραση στην ποιότητά τους είναι οι ακόλουθες (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 59):

- 1) Υποβάθμιση της αντοχής (ακεραιότητας) της επιδερμίδας και του κελύφους του αυγού (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 59; Liu et al., 2020).

Ο αντίκτυπος αυτής της μεταβολής στα τελικά προϊόντα στα οποία χρησιμοποιούνται τα αυγά ως πρώτη ύλη είναι ιδιαίτερα σημαντικός εάν το βακτηριακό φορτίο της επιφάνειας του κελύφους είναι υψηλό, εάν υπάρχει αυξημένη υγρασία και εάν υπάρχει θετική διαφορά θερμοκρασίας κατά την αποθήκευση των αυγών.

- 2) Απώλεια βάρους του αυγού ταυτόχρονα με αύξηση του όγκου του θαλάμου αέρα (αύξηση διαμέτρου και ύψους), διαχωρισμό των μεμβρανών του κελύφους και θραύση της εσωτερικής μεμβράνης (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 59; Liu et al., 2020; Renzone et al., 2021).

- 3) Μείωση του διαχωρισμού μεταξύ των διαμερισμάτων του κρόκου και της αλβουμίνης καθώς ανταλλάσσονται νερό και μέταλλα μεταξύ τους, με αποτέλεσμα τη μείωση του ιξώδους του κρόκου του αυγού και της αντοχής της μεμβράνης βιτελίνης (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 59; Renzone et al., 2021).

Εξαιτίας της διαφοράς ωσμωτικής πίεσης στις δυο πλευρές της μεμβράνης βιτελίνης, το νερό μετακινείται από την περισσότερο ενυδατωμένη αλβουμίνη στον λιγότερο ενυδατωμένο κρόκο (Renzone et al., 2021), ενώ η ταυτόχρονη μεταφορά μεταλλικών κατιόντων από την αλβουμίνη στον κρόκο συμβάλλει στην υγροποίηση της αλβουμίνης

(Renzone et al., 2021). Η μετανάστευση των μετάλλων αυξάνεται σε υψηλές θερμοκρασίες αποθήκευσης (Renzone et al., 2021).

4) Αύξηση του pH της αλβουμίνης.

Αποτέλεσμα αυτής της μεταβολής είναι η μείωση του ιξώδους της αλβουμίνης (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 59; Liu et al., 2020) καθώς και η δημιουργία ευνοϊκών συνθηκών για την ανάπτυξη βακτηριδίων σε προϊόντα αλβουμίνης (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 59).

5) Μετατροπή της ωοαλβουμίνης σε S-ωοαλβουμίνη (Deleu et al., 2015).

Η ωοαλβουμίνη είναι η κύρια πρωτεΐνη της αλβουμίνης του αυγού. Υψηλό pH και θερμοκρασία αποθήκευσης επιταχύνουν τη μεταβολή της σε μια πιο θερμοανθεκτική μορφή, την S-ωοαλβουμίνη. Η μετατροπή αυτή επηρεάζει τις λειτουργικές ιδιότητες των αυγών.

1.6. Δείκτες φρεσκότητας

Η συστηματική παρακολούθηση της φρεσκότητας των αυγών ή των προϊόντων αυγών αποτελεί κρίσιμη παράμετρο για τη διάθεση ασφαλών προϊόντων υψηλής και ομοιόμορφης ποιότητας (Cavanna et al., 2018; Karoui et al., 2006a). Ωστόσο, η αξιολόγηση της φρεσκότητας των αυγών μέσω ισχυρών χημικών δεικτών αλλοίωσης-φρεσκότητας (Cavanna et al., 2018) και γρήγορων, αξιόπιστων και μη καταστρεπτικών προσεγγίσεων είναι ακόμα υπό διερεύνηση (Cavanna et al., 2018; Tan et al., 2020).

Ως δείκτες φρεσκότητας των αυγών και κατά επέκταση των προϊόντων αυγών μπορούν να χρησιμοποιηθούν ορισμένα από τα ποιοτικά χαρακτηριστικά που προαναφέρθηκαν στην ενότητα 1.4. (π.χ. χαρακτηριστικά θαλάμου αέρα, Μονάδες Haugh, pH).

Η αξιολόγηση της φρεσκότητας και της μικροβιακής ποιότητας των προϊόντων αυγών μπορεί επίσης να πραγματοποιηθεί με μεθόδους που στοχεύουν στην ανίχνευση είτε αλλοιογόνων μικροοργανισμών, είτε μεταβολιτών που μπορούν να θεωρηθούν ως δείκτες αλλοίωσης, όπως π.χ. τα οργανικά οξέα που περιγράφονται στον Κανονισμό (ΕΚ) 853/2004, (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 61). Ο δείκτης διάθλασης αλβουμίνης έχει επίσης προταθεί για την εκτίμηση της φρεσκότητας.

Η χρήση μεταβολικών δεικτών μικροβιολογικής ποιότητας και φρεσκότητας για τα παστεριωμένα υγρά προϊόντα αυγών δεν έχει αναπτυχθεί επαρκώς για την κάλυψη των αναγκών της βιομηχανίας και των καταναλωτών (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 63). Επιπλέον η χρήση ενός ή δύο δεικτών για την αξιολόγηση μιας κρίσιμης παραμέτρου όπως η φρεσκότητα δεν είναι πάντοτε αρκετή (Cavanna et al., 2018). Υπάρχει ανάγκη για περαιτέρω έρευνα για την χρήση δεικτών ποιότητας, οι οποίοι θα επιτρέπουν την έγκαιρη πρόβλεψη της αλλοίωσης των αυγών και των προϊόντων αυγών (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 63).

1.6.1. Αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί

Η ανάπτυξη βακτηρίων που σχετίζονται με την αλλοίωση των προϊόντων αυγών μπορεί να αξιολογηθεί όχι μόνο με κλασικές μικροβιολογικές μεθόδους, αλλά και με βάση οπτικές, θερμιδομετρικές ή μοριακές τεχνικές (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 61). Ωστόσο, οι οπτικές τεχνικές έχουν μικρή ευαισθησία ενώ οι θερμιδομετρικές απαιτούν εξειδικευμένο

εξοπλισμό (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 63). Τέλος, οι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί μπορούν να ανιχνευτούν και με ποσοτική PCR. Η μέθοδος αυτή υπερέχει των κλασικών μικροβιολογικών μεθόδων ως προς την αξιοπιστία, την ταχύτητα και την ευαισθησία αλλά προορίζεται μόνο για σπορογόνα βακτήρια και δεν διακρίνει τα αλλοιογόνα από τα μη αλλοιογόνα στελέχη (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, pp. 61-63). Στον Πίνακα 11 αναφέρονται ενδεικτικά μέθοδοι αξιολόγησης της μικροβιακής ποιότητας προϊόντων αυγών.

Πίνακας 11. Ενδεικτικές μέθοδοι για την αξιολόγηση της μικροβιακής ποιότητας προϊόντων αυγών (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 61)

Μέθοδοι	Υγρό προϊόν αυγών / τρόφιμο που περιέχει αυγά	Κριτήρια αλλοίωσης	Πλεονεκτήματα μεθόδου	Μειονεκτήματα μεθόδου
Ανίχνευση αλλοιογόνων βακτηρίων				
δοκιμή αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)	Ολόκληρο αυγό και τρόφιμα που περιέχουν αυγά	Ανίχνευση και ταυτοποίηση σπορογόνων βακτηρίων	Ευαίσθητη Ταχεία Αξιόπιστη	Στοχεύει μόνο σπορογόνα βακτήρια. Μη διάκριση αλλοιογόνων και μη αλλοιογόνων στελεχών
Ισοθερμικό θερμιδόμετρο	Ολόκληρο αυγό	Μικροβιακή ανάπτυξη, ενζυματικές δραστηριότητες	Ευαίσθητη	Δύσχρηστος εξοπλισμός
Οπτικό σύστημα ερυθρού φωτός	Ασπράδι αυγού	Βακτηριακή ανάπτυξη	Κατάλληλη για την ανάπτυξη μοντέλων πρόβλεψης	Απαιτείται υψηλός αριθμός βακτηρίων (> 10 ⁶ CFU/g)
Ανίχνευση δεικτών αλλοίωσης				
Ανάλυση οσμής	Ολόκληρο αυγό, ασπράδι αυγού, κρόκος αυγού	Οσμή ελαφρώς όξινη, αποσύνθεσης	Ευαίσθητη Ταχεία	Απαιτείται ειδικευμένο πάνελ, υψηλό κόστος
Αέρια χρωματογραφία Φασματομετρία μαζών	Ολόκληρο αυγό, ασπράδι αυγού, κρόκος αυγού	Διμεθυλοσουλφίδιο	Ευαίσθητη	Υψηλοί τεχνικοί περιορισμοί
Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης	Ολόκληρο αυγό	Ουρακίλη, γαλακτικό και οξικό οξύ	Ταχεία	Όχι αρκετά ευαίσθητη
Ενζυματικά κιτ	Ολόκληρο αυγό και φρέσκα ζυμαρικά	3-υδροξυβουτυρικό, ηλεκτρικό και γαλακτικό οξύ, ουρακίλη	Ταχεία	Χαμηλή απόδοση εκχύλισης Όχι ευαίσθητη

1.6.2. Μεταβολικοί δείκτες

Οι μεταβολικοί δείκτες που συνδέονται με την αλλοίωση των προϊόντων αυγών μπορούν να ανιχνευτούν με μεθόδους όπως η αισθητηριακή ανάλυση πτητικών συστατικών από εκπαιδευμένο πάνελ, ενζυματικές δοκιμασίες και τεχνικές χρωματογραφικής ανάλυσης (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 63).

Σύμφωνα με τη νομοθεσία της ΕΕ μόνο το γαλακτικό οξύ θεωρείται αξιόπιστος δείκτης φρεσκότητας των προϊόντων αυγών. Άλλα οργανικά οξέα όπως το ηλεκτρικό και το 3-υδροξυβουτυρικό, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ανίχνευση απάτης σύμφωνα με το EGG-2 UNECE πρότυπο.

- **Οργανικά οξέα**

- Γαλακτικό οξύ

Ο Κανονισμός (ΕΚ) 853/2004 θέτει ως μοναδικό αξιόπιστο δείκτη φρεσκότητας των προϊόντων αυγών, το γαλακτικό οξύ (≤ 1 g/kg ξηράς ουσίας). Το γαλακτικό οξύ συσχετίζεται με τη μικροβιακή ανάπτυξη, καθώς και με την ανάπτυξη του εμβρύου σε περίπτωση που το αυγό είναι γονιμοποιημένο (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 62).

Η μέση συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος στα αυγά που διατίθενται στην αγορά είναι 250 mg/kg (Carazzolo et al., 2002, as cited in EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 62), ενώ κατά τις 10 πρώτες ημέρες μετά την ωοτοκία έχουν ανιχνευτεί χαμηλότερα επίπεδα της τάξης των 1-7 mg/kg (Hidalgo et al., 2008).

Η συγκέντρωσή του γαλακτικού οξέος αυξάνεται με το χρόνο, ενώ ο ρυθμός μεταβολής της συγκέντρωσης επηρεάζεται από την θερμοκρασία αποθήκευσης (Carazzolo et al., 2002, as cited in EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 62). Η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος δεν επηρεάζεται από την υγρασία του περιβάλλοντος ή το βάρος του αυγού (Carazzolo et al., 2002, as cited in EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 62).

Σε χαμηλές θερμοκρασίες (4°C), η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος στα αυγά παραμένει σημαντικά χαμηλότερη του νομοθετικού ορίου για μεγάλο χρονικό διάστημα αποθήκευσης (έως και 6 μήνες) (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 62).

Σε υψηλότερες θερμοκρασίες τα αποτελέσματα είναι λιγότερο σαφή. Σύμφωνα με τους Heaney and Curtis (1976), το επίπεδο του γαλακτικού οξέος παρέμενε πολύ χαμηλό σε αυγά που αποθηκεύτηκαν για 18 ημέρες στους 37°C. Και οι Cattaneo & Balzaretto (1989, as cited in EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 62) ανέφεραν ότι το γαλακτικό οξύ παραμένει σε παραπλήσιες συγκεντρώσεις με αυτές των φρέσκων αυγών μετά την αποθήκευση για 6 ημέρες στους 37°C. Ωστόσο, οι Stijve & Diserens (1987, as cited in EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, pp. 62,63) παρατήρησαν σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος σε μπαγιάτικα αυγά (2130 mg/kg ξηράς ουσίας) σε σύγκριση με φρέσκα (164 mg/kg ξηράς ουσίας). Οι Carazzolo et al. (2002, as cited in EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 63) παρατήρησαν επίσης αύξηση της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος σε αυγά που αποθηκεύτηκαν στους 20°C για 37 ημέρες από την ωοτοκία. Ωστόσο, παρά την αυξητική της τάση, η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος δεν ξεπέρασε ποτέ τα 500 mg/kg, παρέμεινε δηλαδή πολύ χαμηλότερη από το νομοθετικό όριο των 1000 mg/kg.

Η αύξηση της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος συνήθως δεν είναι γραμμική σε σχέση με το χρόνο, οπότε το γαλακτικό οξύ θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως «καθυστερημένος» δείκτης γήρανσης των αυγών, δηλαδή αποτελεί ένδειξη σημαντικής υποβάθμισης (Cavanna et al., 2018; Cavanna et al., 2019; Renzone et al., 2021).

- Ηλεκτρικό οξύ

Όπως και το γαλακτικό οξύ, το ηλεκτρικό οξύ συσχετίζεται με τη μικροβιακή αλλοίωση των αυγών και η αύξηση της συγκέντρωσής του συχνά δεν είναι γραμμική σε σχέση με το χρόνο (Cavanna et al., 2018; Cavanna et al., 2019; Renzone et al., 2021).

Η παρακολούθηση της συγκέντρωσης του ηλεκτρικού οξέος στα προϊόντα αυγών, αποτελούσε παλαιότερα νομοθετική απαίτηση στην ΕΕ (συγκέντρωση ηλεκτρικού οξέος ≤ 25

mg/kg ξηράς ουσίας), αλλά δεν θεωρείται πλέον αξιόπιστος δείκτης φρεσκότητας των προϊόντων αυγών και κατά συνέπεια δεν περιλαμβάνεται στα κριτήρια ποιότητας των προϊόντων αυγών που θεσπίζει ο Κανονισμός (ΕΚ) 853/2004 (Cavanna et al., 2018; Cavanna et al., 2019; EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 62). Ωστόσο, αναγράφεται ακόμη ως κριτήριο ποιότητας στο EGG-2 UNECE πρότυπο για προϊόντα αυγών, μαζί με το γαλακτικό και το 3-υδροξυβουτυρικό οξύ.

- **Ουρακίλη**

Η ουρακίλη συνδέεται με την καταλυτική δραστηριότητα βακτηριακών νουκλεοσιδικών φωσφορυλάσεων στην ουριδίνη του αυγού. Θεωρείται αποτελεσματικός δείκτης βακτηριακής ανάπτυξης σε ορισμένα προϊόντα αυγών (παστεριωμένο ολόκληρο αυγό, κρόκος αυγού και ασπράδι αυγού). Η συγκέντρωση της ουρακίλης αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας αποθήκευσης. Το όριο ανίχνευσης της ουρακίλης είναι αρκετά υψηλό και αντιστοιχεί σε προϊόντα τα οποία είναι ακατάλληλα προς κατανάλωση λόγω υψηλού μικροβιακού φορτίου. Κατά συνέπεια η χρήση της ουρακίλης ως δείκτη φρεσκότητας των προϊόντων αυγών δεν χρήζει πρακτικής εφαρμογής (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 63).

- **Ουριδίνη, Πυρογλουταμικό οξύ**

Αυτοί οι χημικοί δείκτες αυξάνονται τόσο στην αλβουμίνη όσο και στο κρόκο κατά την αποθήκευση των αυγών (Karoui et al., 2006a). Αποτελούν δείκτες αποδόμησης και δεν χρησιμοποιούνται συχνά λόγω της θερμομειωσιμότητάς τους ή της φυσικής μεταβλητότητάς τους στην πρώτη ύλη (Coat et al., 2018).

- **Διμεθυλοσουλφίδιο**

Η μέτρηση του διμεθυλοσουλφιδίου ως δείκτη αλλοίωσης προϊόντων αυγών με τεχνικές όπως η αέρια χρωματογραφία μάζας θεωρείται αντικειμενική μέθοδος αξιολόγησης των υγρών ή κατεψυγμένων προϊόντων αυγών (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 63).

- **Φουροσίνη ή ε-N- (2 -φουροϋλομεθυλο-1-λυσίνη)**

Αποτελεί δείκτη αποδόμησης που παράγεται με την όξινη υδρόλυση των ενώσεων Amadori και ανιχνεύεται στην αλβουμίνη. Αυτός ο δείκτης δείχνει υψηλή επαναληψιμότητα, χαμηλή φυσική μεταβλητότητα στα φρέσκα αυγά και είναι ανεξάρτητος από το βάρος του αυγού, την ηλικία της όρνιθας και τη σχετική υγρασία αποθήκευσης. Η φουροσίνη θεωρείται πιθανός δείκτης φρεσκότητας στα αυγά με κέλυφος (Karoui et al., 2006a).

- **S-ωοαλβουμίνη (ovalbumin)**

Η ωοαλβουμίνη αντιπροσωπεύει πάνω από το 50% της πρωτεΐνης στο λεύκωμα του αυγού. Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης των αυγών μετατρέπεται σε πιο θερμοσταθερές ενδιάμεσες μορφές καθώς και σε S-ωοαλβουμίνη (Deleu et al., 2015). Το υψηλό pH και η θερμοκρασία αποθήκευσης επιταχύνουν τη μετατροπή της ωοαλβουμίνης σε S-ωοαλβουμίνη (Deleu et al., 2015).

Σε μελέτη των Huang et al. (2012), η S-ωοαλβουμίνη προτείνεται ως πιθανός δείκτης φρεσκότητας αυγών με κέλυφος καθώς παρουσίαζε υψηλό συντελεστή συσχέτισης σε σχέση με το χρόνο σε δεδομένη θερμοκρασία. Επιπλέον, στην ίδια μελέτη η S-ωοαλβουμίνη είχε υψηλή αρνητική συσχέτιση με το δείκτη κρόκου και τις μονάδες Haugh και υψηλή θετική συσχέτιση με το pH της αλβουμίνης.

1.6.3. Δείκτης διάθλασης αλβουμίνης

Σύμφωνα με τους Stanescu et al. (1995, as cited in Karoui et al., 2006a) ο δείκτης διάθλασης της αλβουμίνης αποτελεί πιθανό δείκτη φρεσκότητας των αυγών. Ωστόσο, αυτή η μέτρησή του είναι χρονοβόρα σε σύγκριση με μετρήσεις όπως το pH και οι μονάδες Haugh (Karoui et al., 2006a).

1.7. Μέθοδοι αξιολόγησης της φρεσκότητας στα αυγά και στα προϊόντα αυγών

Η εκτίμηση της φρεσκότητας και της αλλοίωσης των αυγών μέχρι στιγμής επαφίεται κατά κύριο λόγο στην αξιολόγηση ορισμένων ποιοτικών χαρακτηριστικών (βλ. ενότητα 1.4), ενώ η φρεσκότητα και η μικροβιακή ποιότητα των προϊόντων αυγών αξιολογείται με βάση μικροβιολογικές δοκιμές και ελάχιστους χημικούς δείκτες (βλ. ενότητα 1.6) (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 61).

Η βιομηχανία τροφίμων απαιτεί γρήγορες και αξιόπιστες μεθόδους αξιολόγησης της φρεσκότητας των αυγών και των προϊόντων αυγών, καθώς και επιβεβαιωτικές μεθόδους πιστοποίησης ποιότητας και αυθεντικότητας (Suman et al., 2018).

Η ορθή αξιολόγηση περίπλοκων και κρίσιμων για τη βιομηχανία τροφίμων ζητημάτων όπως η φρεσκότητα και η αλλοίωση, απαιτεί τη δυνατότητα ταυτόχρονης αξιολόγησης περισσότερων μορίων-στόχων (Cavanna et al., 2018; Suman et al., 2018).

Μέχρι στιγμής ιδιαίτερα κατάλληλες τεχνικές για γρήγορη αξιολόγηση της φρεσκότητας σε βιομηχανικό επίπεδο (screening) αποτελούν τα συστήματα «ηλεκτρονικής μύτης» και οι φασματοσκοπικές τεχνικές (Johnson et al., 2020).

Οι φασματοσκοπικές τεχνικές σε συνδυασμό με μεθόδους στατιστικής πολυμεταβλητής ανάλυσης παρουσιάζουν ευρεία εφαρμογή στη μελέτη του προσδιορισμού της φρεσκότητας των αυγών (Karoui et al., 2006a). Οι τεχνικές αυτές παρουσιάζουν δυνατότητες εφαρμογής για αυτοματοποιημένο ποιοτικό έλεγχο καθώς είναι ταχείες, με χαμηλό κόστος, μη καταστρεπτικές, απαιτούν ελάχιστη ή καθόλου προετοιμασία δείγματος και αξιολογούν ταυτόχρονα πολλαπλές παραμέτρους (πολυπαραμετρικές μετρήσεις) (Coat et al., 2018, p. 171; Karoui et al., 2006a; Renzone et al., 2021). Ωστόσο, μειονεκτούν ως προς τη διακριτική ικανότητα και την ευαισθησία (Coat et al., 2018, p. 171).

Οι επιβεβαιωτικές προσεγγίσεις βασίζονται στον προσδιορισμό δεικτών που σχετίζονται με συγκεκριμένα ποιοτικά χαρακτηριστικά και κατά συνέπεια με την πιστοποίηση της αυθεντικότητας στα αυγά (Suman et al., 2018). Σε αυτόν τον τομέα ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μεταβολωμική ανάλυση με διάφορες φασματοσκοπικές και χρωματογραφικές τεχνικές (Coat et al., 2018, p. 161).

1.7.1. Αισθητηριακή αξιολόγηση (καταστροφικός προσδιορισμός)

Όπως αναφέρθηκε και πριν (βλ. ενότητες 1.4, 1.6), η φρεσκότητα των αυγών μπορεί να αξιολογηθεί με ορισμένες φυσικοχημικές και μικροβιολογικές παραμέτρους, οι οποίες μεταβάλλονται με τη πάροδο του χρόνου. Οι παράμετροι αυτές μπορούν να αξιοποιηθούν σε συνδυασμό με αισθητηριακή αξιολόγηση από εκπαιδευμένα πάνελ για την ανάπτυξη μοντέλου πρόβλεψης της ηλικίας των αυγών (Karoui et al., 2006a).

1.7.2. «Ηλεκτρονική μύτη» - τεχνητά συστήματα όσφρησης (μη καταστροφικός προσδιορισμός)

Η ηλεκτρονική μύτη αποτελεί μία ταχεία, εύχρηστη και χαμηλού κόστους τεχνική, η οποία βασίζεται στην ανίχνευση χαρακτηριστικών μοτίβων οργανικών πτητικών ενώσεων (global fingerprint) (Suman et al., 2018). Η τεχνική αυτή συνδυάζεται με την ανάπτυξη χημειομετρικών μοντέλων (Suman et al., 2018).

Η αξιολόγηση της φρεσκότητας με ηλεκτρονική μύτη έχει μελετηθεί τόσο σε αυγά με κέλυφος (Li et al., 2017; Yimenu et al., 2017) όσο και σε προϊόντα αυγών (Suman et al., 2007). Ενδεικτικά, οι Dutta et al. (2003) ανέπτυξαν ένα σύστημα βασισμένο σε ηλεκτρονική μύτη το οποίο μετά από πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση προέβλεπε την φρεσκότητα των αυγών σε ένα από 3 στάδια με 95% επιτυχία, χωρίς όμως να προσδιορίζονται τα χημικά συστατικά που συσχετίζονταν με τη φρεσκότητα των αυγών (Karoui et al., 2006a). Επιπλέον, έχει αναπτυχθεί σύστημα ηλεκτρονικής μύτης γρήγορης αέριας χρωματογραφίας (fast-GC electronic nose) το οποίο θεωρείται ένας γρήγορος τρόπος συλλογής του πτητικού αποτυπώματος των αυγών ορνίθων (Yimenu et al., 2017).

Τα οργανικά πτητικά συστατικά που μπορούν να προσδιοριστούν με την ηλεκτρονική μύτη περιλαμβάνουν αλδεΐδες, αρωματικά και θειούχα συστατικά, εκ των οποίων οι ενώσεις μεθυλοσουλφιδίου (methyl-sulphide compounds) συνδέονται με την υποβάθμιση του αυγού και την ανάπτυξη ανεπιθύμητων οσμών. Η ηλεκτρονική μύτη αποτελεί μια καλή εναλλακτική λύση τεχνικών εκχύλισης και ανάλυσης (steam-distillation, solvent extraction, purge and trap κτλ.), οι οποίες απαιτούν συχνά διαδικασίες θέρμανσης μέσω των οποίων ενδέχεται να παραχθούν νέες ενώσεις με αποτέλεσμα να μην αντικατοπτρίζουν την πραγματική κατάσταση του αυγού (Suman et al., 2018).

1.7.3. Φασματοσκοπικές μέθοδοι

Φασματοσκοπία υπερύθρου (IR) και ορατού (Vis) (μη καταστρεπτικές)

Το εύρος του φάσματος που χρησιμοποιείται συνήθως για τη μελέτη των αυγών και των προϊόντων αυγών αντιστοιχεί στην περιοχή του ορατού (Vis) και του υπερύθρου (IR). Τα δεδομένα που προκύπτουν μετά την ανάλυση του φάσματος απαιτούν χρήση πολυμεταβλητής στατιστικής ανάλυσης λόγω της πολυπλοκότητας του υποστρώματος.

Οι Kemps et al. (2006) χρησιμοποίησαν φασματοσκοπία VIS/NIR για τη μελέτη της φρεσκότητας των αυγών με κέλυφος. Ανέπτυξαν μοντέλα πρόβλεψης της φρεσκότητας μέσω συσχέτισης του φάσματος στην περιοχή 570-750 nm είτε με τις μονάδες Haugh, είτε με το pH της αλβουμίνης.

Οι Schmilovitch et al. (2002, as cited in Karoui et al., 2009) χρησιμοποίησαν φασματοσκοπία near-NIRT (near infrared transmittance, φάσμα κάτω από 1100 nm) για τον προσδιορισμό της φρεσκότητας των αυγών μέσω στατιστικού μοντέλου. Τα φάσματα συσχετίστηκαν με παραμέτρους όπως ο αριθμός των ημερών μετά την ωοτοκία, το μέγεθος του θαλάμου αέρα, η απώλεια βάρους και το pH. Ωστόσο οι συντελεστές συσχέτισης των παραμέτρων αυτών δεν αναφέρονταν σε μεμονωμένα αυγά αλλά σε μέσους όρους (group means). Ο Bamelis (2003, as cited in Karoui et al., 2006a) χρησιμοποίησε φασματοσκοπία VIS-NIR για την μελέτη της φρεσκότητας των αυγών. Οι Abdanan Mehdizadeh et al. (2014) συσχέτισαν φασματοσκοπικές μετρήσεις στη περιοχή Vis-IR (400-1100 nm) με τις μονάδες

Haugh και τον δείκτη κρόκου σε άθικτα αυγά με τη πάροδο του χρόνου. Σε μελέτη των Liu et al. (2007) συσχετίστηκαν οι ίδιες παράμετροι με φασματοσκοπικές μετρήσεις στην περιοχή του UV/Vis (200-800 nm) σε άθικτα αυγά. Οι Kempers et al. (2007) χρησιμοποίησαν φασματοσκοπία NIR σε συνδυασμό με χαμηλής διακριτικής ικανότητας NMR (low-resolution NMR) για τη μελέτη της φρεσκότητας της αλβουμίνης.

Η φασματοσκοπία NIR έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση της σύστασης των προϊόντων αυγών (ξηρή ύλη, υγρασία, ολικές πρωτεΐνες, λιπίδια) καθώς και για τη μελέτη των φυσικοχημικών αλλαγών στη σύσταση λυοφιλιωμένων κρόκων αυγών ανάλογα με τη διατροφή των ορνίθων (πολυακόρεστα λιπαρά οξέα) (Dalle Zotte et al., 2006; Wehling et al., 1988). Η φασματοσκοπία Vis/NIR μπορεί να παρέχει πληροφορίες σχετικές με ποιοτικά χαρακτηριστικά των αυγών όπως η ανίχνευση κηλίδων αίματος και κρέατος, καθώς και σχετικά με τη σύνθεση των προϊόντων αυγών (Karoui et al., 2009).

Η φασματοσκοπία υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier παρέχει πληροφορίες για την δομή των πρωτεϊνών και τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης- πρωτεΐνης και πρωτεΐνης- λιπιδίου, καθώς και για την δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών (Karoui et al., 2006a). Αποτελεί τη τεχνική που χρησιμοποιείται πιο συχνά σε συνδυασμό με τη MIR (Φασματοσκοπία Μέσου Υπερύθρου) για την ανάλυση πολύπλοκων υποστρωμάτων, ενώ χρησιμοποιείται και σε συνδυασμό με NIR (FT-NIR) για μεγαλύτερη ταχύτητα, επαναληψιμότητα και ακρίβεια (Coat et al., 2018, pp. 171, 190). Η FTIR (Fourier-transform infrared spectroscopy, φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier) έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς για την μελέτη της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών στα αυγά (Blume et al., 2015; Furlan et al., 2007; Sanchez-Ruiz & Martinez-Carrion, 1988) και λιγότερο συχνά για την μελέτη της φρεσκότητας των αυγών (EGG-2 UNECE STANDARD). Η τεχνική FT-NIR αναπτύχθηκε πρόσφατα για την ανάπτυξη στατιστικών μοντέλων που βασίζονται στη σύγκριση του φάσματος με ποιοτικά χαρακτηριστικά των αυγών με κέλυφος που σχετίζονται με τη φρεσκότητα (μονάδες Haugh, pH αλβουμίνης κτλ.) (Giunchi et al., 2008; Lin et al., 2011; Zhao et al., 2010).

Φασματοσκοπία φθορισμού εμπρόσθιας όψης (Front-face fluorescence spectroscopy)

Ο προσδιορισμός της φρεσκότητας των αυγών με φασματοσκοπία φθορισμού εμπρόσθιας όψης έχει πραγματοποιηθεί μόνο σε προκαταρκτικές μελέτες πιθανόν λόγω της πολύπλοκης μήτρας του αυγού η οποία περιέχει πολυάριθμα φωσφορίζοντα συστατικά (Karoui et al., 2006a). Ωστόσο, η τεχνική αυτή μπορεί να αξιοποιηθεί για την αξιολόγηση της φρεσκότητας των αυγών μέσω της ποσοτικοποίησης της πορφυρίνης στα κελύφη των αυγών, η οποία μειώνεται με τη πάροδο του χρόνου (Karoui et al., 2006a). Επιπλέον, σύμφωνα με τους Karoui et al. (2006b) τα φάσματα φθορισμού στην παχύρρευστη και λεπτόρρευστη αλβουμίνη διαφοροποιούνται ανάλογα με τη φρεσκότητα των αυγών λόγω της ανίχνευσης προϊόντων της αντίδρασης Maillard που φωσφορίζουν όπως π.χ. η φουροσίνη.

Η φασματοσκοπία φθορισμού είναι 100-1000 φορές πιο ευαίσθητη σε σχέση με άλλες φασματοφωτομετρικές τεχνικές και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον χαρακτηρισμό των δομικών αλλαγών που λαμβάνουν χώρα κατά τη μετουσίωση των πρωτεϊνών καθώς και τις αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών με άλλα συστατικά των τροφίμων (Karoui et al., 2006a).

Φασματοσκοπία Raman

Η φασματοσκοπία Raman είναι συμπληρωματική της φασματοσκοπίας υπερύθρου καθώς μπορεί να διεξάγει μετρήσεις σε υδατικά μέσα ενώ η φασματοσκοπία υπερύθρου παρουσιάζει ευαισθησία σε πολικά μέσα. Η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον χαρακτηρισμό της μοριακής σύνθεσης ενός δείγματος μέσω ταυτοποίησης των χημικών ομάδων που το απαρτίζουν (Coat et al., 2018, pp. 195-206).

Οι Liu et al. (2020) χρησιμοποίησαν τη φασματοσκοπία Raman για την αξιολόγηση της φρεσκότητας σε αυγά με κέλυφος. Τα φάσματα που προέκυψαν συσχετίστηκαν με φυσικοχημικές παραμέτρους (μονάδες Haugh, pH αλβουμίνης, διάμετρος και ύψος αεροθαλάμου) μέσω χημειομετρικών μοντέλων με αρκετά υψηλούς συντελεστές συσχέτισης.

Φασματοσκοπία μαγνητικού πυρηνικού συντονισμού (NMR)

Η φασματοσκοπία μαγνητικού πυρηνικού συντονισμού (NMR) βρίσκει ευρεία εφαρμογή στον αγροδιατροφικό τομέα, αλλά η εφαρμογή του στον τομέα των αυγών και των προϊόντων αυγών είναι περιορισμένη σε σχέση με άλλες αναλυτικές τεχνικές (Coat et al., 2018, pp. 206-222). Ωστόσο, ενδεικτικά αναφέρονται παρακάτω ορισμένες μελέτες σχετικές με τη χρήση NMR για την μελέτη των αυγών γενικότερα.

Οι Dutta et al. (2003) χρησιμοποίησαν NMR για την διερεύνηση των αλλαγών στην μοριακή κινητικότητα του νερού σε αυγά που αποθηκεύονται σε διαφορετικές συνθήκες (θερμοκρασία, ατμόσφαιρα, φωτισμός).

Οι Tan et al. (2020) χρησιμοποίησαν low field-NMR και MRI (magnetic resonance imaging) για την εκτίμηση της φρεσκότητας των αυγών.

Οι Schwägele et al. (2001, as cited in Kempf et al., 2006) χρησιμοποίησαν NMR χαμηλής διακριτικής ικανότητας (low resolution) για την αξιολόγηση της ποιότητας άθικτων αυγών μέσω συσχέτισης των μετρήσεων με την αύξηση της υγροποίησης της αλβουμίνης κατά την αποθήκευση.

Οι Laghi et al. (2005) χρησιμοποίησαν NMR για τη μελέτη της υποβάθμισης της ποιότητας της αλβουμίνης και του κρόκου αυγών ορνίθων κατά τις πρώτες μέρες αποθήκευσης. Οι διαφοροποιήσεις που παρατηρήθηκαν στις μετρήσεις της παχύρρευστης αλβουμίνης αποδόθηκαν στην αύξηση του pH που προκαλείται από την απώλεια του διοξειδίου του άνθρακα.

1.7.4. Χρωματογραφία

Η χρήση της χρωματογραφίας για την μελέτη της φρεσκότητας των αυγών μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε αυτούσια είτε σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών για μεγαλύτερη ευαισθησία (εκτενέστερη ανάλυση των τεχνικών χρωματογραφίας σε σύζευξη με τη φασματομετρία μαζών γίνεται στις ενότητες 1.8 και 1.9).

Η αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιείται για την ανάλυση ενώσεων που είναι θερμοανθεκτικές και πτητικές. Οι θερμοευαίσθητες ή μη πτητικές ενώσεις μπορούν να αναλυθούν μετά από παραγωγολογία (Coat et al., 2018, pp. 226-229). Επίσης, μεταξύ άλλων προσεγγίσεων (π.χ. ενζυματικές δοκιμές), μπορεί να χρησιμοποιηθεί σύμφωνα με την επίσημη μέθοδο AOAC 970.31, για την ανίχνευση των καρβοξυλικών οξέων που σχετίζονται με κύριες

παραμέτρους ποιότητας των αυγών (γαλακτικό οξύ, ηλεκτρικό οξύ, 3-υδροξυβουτυρικό οξύ) (EGG-2 UNECE STANDARD).

Οι Cavanna et al. (2019) αξιολόγησαν την φρεσκότητα προϊόντων αυγών με μη-στοχευμένη ανάλυση πτητικού αποτυπώματος με φασματοσκοπία κινητικότητας ιόντων σε σύζευξη με αέρια χρωματογραφία (GC-IMS). Το χημειομετρικό μοντέλο που αναπτύχθηκε κατέταξε τα δείγματα είτε ως «φρέσκα» είτε ως «μη φρέσκα» με 97% επιτυχία πρόβλεψης. Τα πτητικά αποτυπώματα συσχετίστηκαν με χημικούς δείκτες οι οποίοι συνδέονται με διαδικασίες κατά τη θερμική αποικοδόμηση των αυγών. Η ταυτοποίηση αυτών των δεικτών πραγματοποιήθηκε με τη τεχνική αέριας χρωματογραφίας μικρο-εκχύλισης στερεάς φάσης σε σύζευξη με φασματομετρία μαζών (SPME-GC-MS).

Η υγρή χρωματογραφία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση θερμοευαίσθητων, μη πτητικών ενώσεων, οι οποίες δεν είναι συμβατές με ανάλυση με αέρια χρωματογραφία. Η LC-MS δεν απαιτεί παραγωγοποίηση πριν από την ένεση.

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) έχει χρησιμοποιηθεί συχνά σε συνδυασμό με χημειομετρική επεξεργασία για τον διαχωρισμό των οργανικών και των συμβατικών αυγών μέσω της αξιολόγησης του δακτυλικού αποτυπώματος των καροτενοειδών (van Ruth et al., 2011).

Επιπλέον, ο προσδιορισμός της ουρακίλης και της ουριδίνης σε προϊόντα αυγών, μπορεί να πραγματοποιηθεί με HPLC σύμφωνα με την αναλυτική μέθοδο του Morris (1987).

1.8. Μεταβολωμική

Οι φασματοσκοπικές τεχνικές και η ηλεκτρονική μύτη που προαναφέρθηκαν είναι κατάλληλες για γρήγορους ελέγχους (screening) της φρεσκότητας των αυγών και των προϊόντων αυγών στη βιομηχανία καθώς δεν είναι καταστρεπτικές και έχουν μειωμένο χρόνο και κόστος (Cavanna et al., 2018). Ωστόσο, αυτές οι τεχνικές δεν είναι πάντοτε αξιόπιστες (Renzone et al., 2021).

Η ταυτοποίηση ισχυρών δεικτών φρεσκότητας-αλλοίωσης, ενώσεων δηλαδή των οποίων η συγκέντρωση μεταβάλλεται με την διάρκεια του χρόνου αποθήκευσης, διεξάγεται με μεταβολωμική ανάλυση (Cavanna et al., 2018).

1.8.1. Γενικά στοιχεία

Η μεταβολωμική (metabolomics) εντάσσεται στις «ωμικές» μεθοδολογίες μαζί με τη γονιδιωματική (genomics), τη μεταγραφωμική (transcriptomics) και την πρωτεωμική (proteomics) (Castro-Puyana et al., 2017). Οι «ωμικές» μεθοδολογίες χρησιμοποιούνται στην έρευνα της βιολογίας συστημάτων, δηλαδή την ολιστική μελέτη των πρωτεϊνών, των γονιδίων, των μεταγραφημάτων και των μεταβολιτών σε οργανισμούς, ιστούς, κύτταρα ή κυτταρικά διαμερίσματα (Fiehn, 2002; Gonzalez-Riano et al., 2016).

Η μεταβολωμική έχει χρησιμοποιηθεί κυρίως σε μελέτες κλινικού ή φαρμακευτικού ενδιαφέροντος (π.χ. διάγνωση νόσων, ανάπτυξη και αξιολόγηση φαρμάκων, κλινική τοξικολογία) (Wishart, 2008), τη μελέτη της φυσιολογίας των φυτών (Cevallos-Cevallos et al., 2009) και του μικροβιακού μεταβολισμού (Dunn et al., 2011). Τα τελευταία χρόνια η μεταβολωμική χρησιμοποιείται και στην επιστήμη των τροφίμων και της διατροφής (Cevallos-Cevallos et al., 2009; Wishart, 2008).

Η μεταβολωμική, όπως και το σχετιζόμενο πεδίο της μεταβονωμικής (metabonomics), εστιάζει στην υψηλού βαθμού ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση μεταβολιτών στο μεταβόλωμα (Dunn et al., 2011; Wishart, 2008). Οι μεταβολίτες είναι μικρά μόρια με μοριακό βάρος <1500 Da, όπως αμινοξέα, οργανικά οξέα, υδατάνθρακες (μονο- και δισακχαρίτες), μικρά πεπτίδια, λιπίδια, αμίνες, βιταμίνες, φαινολικά συστατικά, στεροειδή, καρτενοειδή, αλκαλοειδή, μεταλλικά στοιχεία κ.ά. Τα νουκλειικά οξέα και οι πρωτεΐνες δεν θεωρούνται μεταβολίτες εξαιτίας του εξαιρετικά μεγάλου μοριακού τους βάρους. Δεδομένου ότι οι μεταβολίτες αποτελούν προϊόντα κυτταρικών ενζυματικών διεργασιών και μπορούν να θεωρηθούν ως η τελική απόκριση ενός βιολογικού συστήματος σε γενετικές ή/και σε περιβαλλοντικές διακυμάνσεις (Castro-Puyana et al., 2017; Coat et al., 2018; Fiehn, 2002; Lacalle-Bergeron et al., 2021; Vinaixa et al., 2016; Wishart, 2008).

Το σύνολο των μεταβολιτών σε ένα βιολογικό σύστημα αποτελεί το μεταβόλωμα αυτού (Fiehn, 2002).

Το πλεονέκτημα της μεταβολωμικής σε σχέση με τις υπόλοιπες «ωμικές» μεθοδολογίες, έγκειται στην ικανότητα ταυτοποίησης των αλλαγών στους μεταβολίτες σε κυτταρικό επίπεδο, με αποτέλεσμα να υπάρχει απευθείας αντιστοίχιση με το αποτέλεσμα περίπλοκων δικτύων βιοχημικών αντιδράσεων (Liu & Locasale, 2017; Mastrangelo et al., 2015). Επιπλέον, παρουσιάζει τη στενότερη βιολογική εγγύτητα με το φαινότυπο του συστήματος και κατά συνέπεια επιτρέπει την ταχεία παρακολούθηση των διαταραχών του συστήματος μέσω του μεταβολώματος (Dunn et al., 2011).

Ωστόσο, παρά τη σημαντική συνεισφορά της μεταβολωμικής στη γνώση της κυτταρικής φυσιολογίας, δεν αναπτύσσεται τόσο γρήγορα όσο οι υπόλοιπες «ωμικές» μεθοδολογίες (Vinaixa et al., 2016). Το γεγονός αυτό ενδεχομένως οφείλεται στη μη ύπαρξη καθιερωμένου τρόπου καταμέτρησης των μεταβολιτών, στις σημαντικές αποκλίσεις όσον αφορά τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες (π.χ. πολικότητα, πτητικότητα) (Lacalle-Bergeron et al., 2021) και τη συγκέντρωσή τους καθώς και στη δυναμική φύση του μεταβολώματος (Dettmer & Hammock, 2004) δεδομένου ότι η σύσταση αυτού μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού (Gonzalez-Riano et al., 2016).

Επιπλέον, η μετατροπή των ακατέργαστων φασματικών δεδομένων σε βιολογική πληροφορία παρουσιάζει αρκετές απαιτήσεις με αποτέλεσμα η ταυτοποίηση και ο χαρακτηρισμός της δομής των μεταβολιτών να δυσχεραίνεται (Vinaixa et al., 2016).

Στην μεταβολωμική υπάρχουν δύο διαφορετικές προσεγγίσεις ανάλογα με τους διάφορους τύπους δεδομένων που παράγονται και στην αντίστοιχη επεξεργασία τους και χρησιμοποιούνται συμπληρωματικά (Lacalle-Bergeron et al., 2021):

Στοχευμένη (targeted) μεταβολωμική ή μεταβολικό προφίλ (metabolic profiling)

Η στοχευμένη μεταβολωμική εφαρμόζεται για την ταυτοποίηση και τη ποσοτικοποίηση όσο το δυνατόν περισσότερων μεταβολιτών που εντάσσονται στην ίδια χημική ομάδα ή εμπλέκονται σε μία συγκεκριμένη βιοχημική οδό (Castro-Puyana et al., 2017). Η προσέγγιση αυτή είναι σημαντική για την αξιολόγηση των μεταβολών μιας συγκεκριμένης κατηγορίας μεταβολιτών υπό καθορισμένες συνθήκες (Cevallos-Cevallos et al., 2009). Η στοχευμένη μεταβολωμική απαιτεί υψηλότερο επίπεδο καθαρότητας και εκλεκτικής εκχύλισης των μεταβολιτών (Cevallos-Cevallos et al., 2009).

Μη στοχευμένη (untargeted) μεταβολωμική ή μεταβολικό αποτύπωμα (metabolic fingerprinting)

Αντίθετα, η μη στοχευμένη μεταβολωμική εστιάζει στην ανίχνευση όσο το δυνατόν περισσότερων κατηγοριών μεταβολιτών με σκοπό τη σύγκριση μοτίβων ή αποτυπωμάτων (fingerprints) που μεταβάλλονται ως αντίδραση σε κάποιον ενδογενή ή εξωγενή παράγοντα, χωρίς απαραίτητα την ταυτοποίηση ή την ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων συστατικών (Cevallos-Cevallos et al., 2009; Lacalle-Bergeron et al., 2021). Μόλις ανακαλυφθεί ένα μοτίβο διαφοροποίησης, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για τη ταυτοποίηση των συστατικών που συμμετέχουν (ποιοτικές) και για τον καθορισμό των απόλυτων ποσοτήτων των μεταβολιτών που συμμετέχουν στην διαδικασία που μελετάται (ποσοτικές) (Lacalle-Bergeron et al., 2021).

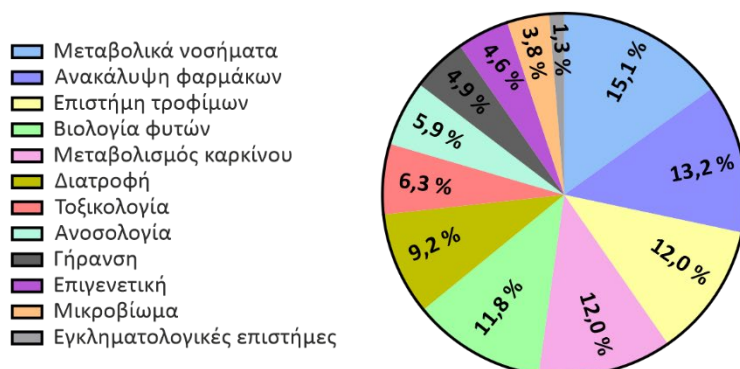
Επειδή, οι μεταβολίτες περιλαμβάνουν χημικές ενώσεις που κατηγοριοποιούνται σε πολλές διαφορετικές χημικές τάξεις, σημαντικά διαφορετικής πολικότητας και πτητικότητας (Castro-Puyana et al., 2017; Lacalle-Bergeron et al., 2021; Wishart, 2008), η ανάλυση του πλήρους φάσματος του μεταβολώματος απαιτεί το συνδυασμό των αποτελεσμάτων παραπάνω από μίας τεχνικών (Castro-Puyana et al., 2017; Gonzalez-Riano et al., 2016).

Για την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών οι δύο πιο συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνικές στη μεταβολωμική είναι η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και η φασματομετρία μαζών (MS) (Vinaixa et al., 2016). Οι τεχνικές αυτές συχνά συνδυάζονται με τεχνικές διαχωρισμού (υγρή ή αέρια χρωματογραφία (Vinaixa et al., 2016)).

1.8.2. Μεταβολωμική στα τρόφιμα

Η χρήση των «ωμικών» μεθοδολογιών για την μελέτη των τροφίμων και της διατροφής σε συνδυασμό με εργαλεία βιοπληροφορικής, αναφέρεται ως Foodomics (ωμικές τεχνολογίες τροφίμων) (Castro-Puyana et al., 2017; Lacalle-Bergeron et al., 2021).

Ενδεικτικά αναφέρεται ότι, για το χρονικό διάστημα 2015-2016, οι δημοσιευμένες μελέτες σχετικά με τη μεταβολωμική αφορούσαν κυρίως τα μεταβολικά νοσήματα, την ανακάλυψη φαρμάκων, το μεταβολισμό του καρκίνου και την επιστήμη των τροφίμων όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.



Σχήμα 3. Κατανομή δημοσιευμένων μελετών σχετικών με την εφαρμογή της μεταβολωμικής για τα έτη 2015-2016 (Liu & Locasale, 2017)

Η μεταβολωμική χρησιμοποιείται στην επιστήμη των τροφίμων κυρίως (Cevallos-Cevallos et al., 2009; Wishart, 2008):

- Στην ανάλυση των συστατικών των τροφίμων, προσφέροντας τη δυνατότητα λεπτομερούς κατανόησης σε μοριακό επίπεδο της συσχέτισης της σύστασης με τη μοναδικότητα στη γεύση, υφή, άρωμα ή χρώμα συγκεκριμένων τροφίμων ή τη δυνατότητα προσδιορισμού βιοδραστικών συστατικών στα τρόφιμα και καλύτερης κατανόησης της δράσης τους (Wishart, 2008).
- Για την αξιολόγηση της ποιότητας, της ασφάλειας, της ιχνηλασιμότητας και της αυθεντικότητας των τροφίμων. Το μεταβολικό προφίλ των προϊόντων με την ελάχιστη συμμόρφωση στα επιθυμητά χαρακτηριστικά ποιότητας (π.χ. σύσταση, οργανοληπτικές και θρεπτικές ιδιότητες) μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως «κατώφλι» για την αποδοχή ενός προϊόντος, ενώ πολλαπλές παράμετροι ποιότητας μπορούν να μετρηθούν και να προβλεφθούν ταυτόχρονα με μία μόνο ανάλυση μεταβολωμικού προφίλ, μειώνοντας το χρόνο και το κόστος ανάλυσης. Όσον αφορά την ασφάλεια των τροφίμων, η μεταβολωμική μπορεί να εφαρμοστεί για την ανίχνευση της μικροβιακής αλλοίωσης, αλλεργιογόνων, περιβαλλοντικών επιμολυντών, τοξινών και απαγορευμένων ενώσεων. Επιπλέον, το μεταβολικό προφίλ ενός τροφίμου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της προέλευσής του, την ανίχνευση πιθανής νοθείας (αυθεντικότητα), καθώς και για την συνεχή παρακολούθησή του σε όλα τα στάδια παραγωγής, μεταποίησης και διανομής του (ιχνηλασιμότητα) (Castro-Puyana et al., 2017; Cevallos-Cevallos et al., 2009; Lacalle-Bergeron et al., 2021; Wishart, 2008).
- Για την αξιολόγηση της συμμόρφωσης των τροφίμων με τα κανονιστικά πλαίσια (π.χ. αναγραφόμενα συστατικά, γεωγραφική προέλευση, περιβαλλοντικοί επιμολυντές, γενετικά τροποποιημένες πρώτες ύλες) (Cevallos-Cevallos et al., 2009).
- Στη μικροβιολογία τροφίμων, με την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση βακτηριακής επιμόλυνσης, την κατανόηση του μικροβιακού μεταβολισμού ή την ανακάλυψη ειδικών βιοδεικτών (Cevallos-Cevallos et al., 2009).
- Για την ανίχνευση των φυσικοχημικών αλλαγών που προκύπτουν κατά την επεξεργασία των τροφίμων (π.χ. θερμική επεξεργασία, ζύμωση, αποθήκευση) όπως και διαφορές μεταξύ διαφορετικών τρόπων προ-επεξεργασίας (π.χ. παραγωγή οργανικών τροφίμων, χαρακτηρισμοί αυγών όπως: «παραγωγής εκτός κλωβοστοιχιών» και «κατηγορίας Α») (Cevallos-Cevallos et al., 2009).
- Στην ανάπτυξη προϊόντων τροφίμων (πχ. μέσω του προσδιορισμού των συστατικών που αποδίδουν μια προτιμώμενη από τους καταναλωτές γεύση) (Cevallos-Cevallos et al., 2009).

Η μεταβολωμική ήδη χρησιμοποιείται σε προγράμματα έρευνας στα τρόφιμα όπως το Metabolomics for Plants, Health and OutReach (METHA-PHOR) και θεωρείται πιθανό εργαλείο αντιμετώπισης μελλοντικών αναγκών στην γεωργία και στην ανθρώπινη διατροφή (Cevallos-Cevallos et al., 2009).

Η μεταβολωμική ανάλυση παρουσιάζει πολλές δυνατότητες στη βιομηχανία τροφίμων, αλλά προς το παρόν κυριαρχούν άλλες συμβατικές μέθοδοι ανάλυσης. Ωστόσο, η μεταβολωμική μπορεί να αξιοποιηθεί για την ανάδειξη βιοδεικτών (είτε μεμονωμένων είτε ως μεταβολικό προφίλ), ενώσεων δηλαδή που υποδεικνύουν μια μεταβολή στην κατάσταση του

μεταβολώματος του τροφίμου. Οι βιοδείκτες χρησιμοποιούνται για την δημιουργία μοντέλων πρόβλεψης της κατάταξης αγνώστων δειγμάτων σε συγκεκριμένες κατηγορίες όπως π.χ. φρέσκο ή αλλοιωμένο.

1.8.3. Αναλυτικές τεχνικές

Η επιλογή της αναλυτικής τεχνικής είναι κρίσιμη για την μεταβολωμική ανάλυση. Η ιδανική τεχνική έχει την λιγότερη δυνατή προετοιμασία δείγματος και τη δυνατότητα αξιόπιστης ανάλυσης ενός ευρέος φάσματος μεταβολιτών (Onuh & Aluko, 2019). Επίσης το επιλεγμένο αναλυτικό όργανο πρέπει να προσφέρει υψηλή απόδοση, διακριτική ικανότητα, επαναληψιμότητα και ευαισθησία (Dettmer & Hammock, 2004). Η επιλογή της τεχνικής πρέπει να γίνεται και σε συνδυασμό με την έκταση των διαθέσιμων βάσεων δεδομένων για την ταυτοποίηση των μεταβολιτών, καθώς και την υπάρχουσα εμπειρία του αναλυτή στην ανάλυση δεδομένων και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων (Coat et al., 2018; Lacalle-Bergeron et al., 2021).

Όπως προαναφέρθηκε, οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνικές ανίχνευσης στη μεταβολωμική είναι η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και η φασματομετρία μαζών (MS) (Vinaixa et al., 2016). Λιγότερο χρησιμοποιούμενες τεχνικές ανίχνευσης είναι η εγγύς υπέρυθρη φασματοσκοπία (NIR) και η υπεριώδης (UV) (Cevallos-Cevallos et al., 2009).

Η φασματομετρία μαζών μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε σύζευξη με τεχνικές διαχωρισμού, όπως η υγρή ή αέρια χρωματογραφία (LC-MS και GC-MS αντίστοιχα) ή η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (CE-MS) (Allochio Filho et al., 2021; Onuh & Aluko, 2019). Ειδικότερα για την υγρή χρωματογραφία, η χρήση υψηλής πίεσης (HPLC ή UPLC) αποδίδει περισσότερες πληροφορίες (Cevallos-Cevallos et al., 2009) ενώ μία αναδυόμενη τεχνική για υψηλώς πολικά συστατικά αποτελεί η χρωματογραφία υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων (HILIC-hydrophilic interaction chromatography) (Allochio Filho et al., 2021; Castro-Puyana et al., 2017).

Άλλες λιγότερο συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνικές είναι η υπέρυθρη φασματοσκοπία μετασχηματισμού Fourier (FTIR) καθώς και γρήγορες τεχνικές όπως η φασματομετρία μαζών απευθείας έγχυσης (DIMMS), φασματοσκοπία ιοντικής κινητικότητας (IMS) και η EESI-MS (extractive electrospray-ionization) (Cevallos-Cevallos et al., 2009; Onuh & Aluko, 2019).

Αξίζει να αναφερθεί, ότι σημαντικές προοπτικές στη μεταβολωμική των τροφίμων παρουσιάζουν και οι τεχνικές φασματομετρίας μαζών AMS (ambient mass spectrometry). Οι τεχνικές αυτές έχουν πολύ μικρή προετοιμασία δείγματος και μικρότερο χρόνο ανάλυσης σε σχέση με άλλες τεχνικές φασματομετρίας μαζών. Ωστόσο, προς το παρόν παρέχουν μόνο ποιοτικές μετρήσεις (Aszyk et al., 2018).

NMR

Η NMR αποτελούσε την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη τεχνική ανίχνευσης στα πρώτα χρόνια της ανάπτυξης της μεταβολωμικής. Η φασματομετρία μαζών σταδιακά υποκατέστησε τη χρήση της NMR (Castro-Puyana et al., 2017), ενώ η σύζευξη αέριας χρωματογραφίας με φασματομετρία μαζών αποτελεί την πιο διαδεδομένη τεχνική στη μεταβολωμική για σχεδόν 50 χρόνια (Fiehn, 2016).

GC-MS

Η μεταβολωμική με GC-MS επιτρέπει την ανίχνευση πτητικών, μικρού μοριακού βάρους συστατικών (Dunn et al., 2011; Mastrangelo et al., 2015). Η παραγωγοποίηση διευρύνει το φάσμα των μεταβολιτών που μπορούν να αναλυθούν με GC-MS καθώς επιτρέπει τη μελέτη θερμοευαίσθητων ή μη πτητικών συστατικών, καθώς και σχετικά πολικών μεταβολιτών όπως αμινοξέα, οργανικά οξέα, σάκχαρα (μονοσακχαρίτες και δισακχαρίτες), αμίνες, αλκοόλες και αμίδια (Mastrangelo et al., 2015; Pereira Braga & Adamec, 2019). Επιπλέον, με GC-MS μπορούν να ανιχνευτούν φωσφορυλιωμένοι μεταβολίτες (π.χ. glucose-6-phosphate) και η χοληστερόλη (Dunn et al., 2011).

Η GC-MS αποτελεί την πιο αξιόπιστη τεχνική καθώς παρουσιάζει τη μεγαλύτερη αναπαραγωγικότητα όσον αφορά τους χρόνους κατακράτησης και τα φάσματα μάζας (Mastrangelo et al., 2015) και παρέχει υψηλή χρωματογραφική διαχωριστική ικανότητα και ευαισθησία (Lacalle-Bergeron et al., 2021). Επιπλέον οδηγεί σε διαχωρισμό των ισομερών, μείωση των επιδράσεων της μήτρας (matrix effects), μείωση της καταστολής ιόντων, ακριβέστερη ποσοτικοποίηση και καλύτερη ταυτοποίηση μεταβολιτών (Mastrangelo et al., 2015). Ωστόσο, θερμοευαίσθητα συστατικά δεν μπορούν να αναλυθούν άθικτα, ενώ ορισμένες άγνωστες ενώσεις που ανιχνεύονται συχνά αποτελούν θόρυβο του οργάνου (artifacts) και σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της θερμής έγχυσης και του διαχωρισμού (Fiehn, 2016).

Η GC-MS είναι πιο κατάλληλη για σάκχαρα και καρβοξυλικά οξέα, τα οποία δύσκολα διαχωρίζονται με LC-MS, ενώ η ανίχνευση βιογενών αμινών, συμπεριλαμβανομένων των αμινοξέων, είναι αρκετά απαιτητική λόγω επιδράσεων της μήτρας. Για την απόλυτη ποσοτικοποίηση των αμινοξέων χρησιμοποιείται παραγωγοποίηση με MTBSTFA που έχει ως αποτέλεσμα πιο σταθερά παράγωγα (Fiehn, 2016).

Ένα από τα πλεονεκτήματα του GC-MS είναι η χρήση πηγής ιοντισμού πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (EI), το οποίο προσδίδει εκλεκτικότητα (Fiehn, 2016). Πρόκειται για πηγή «σκληρού» ιοντισμού, δηλαδή προκαλεί σημαντική θραυσματοποίηση, και με τη χρήση της προκύπτουν υψηλά αναπαραγώγιμα μοτίβα ιοντικών θραυσμάτων ως προς τις τιμές m/z αλλά και ως προς την σχετική αφθονία των αντίστοιχων ιόντων (Lacalle-Bergeron et al., 2021; Mastrangelo et al., 2015). Αυτά τα μοτίβα είναι ανεξάρτητα από το όργανο και τον κατασκευαστή. Κατά συνέπεια, η αντιστοίχιση των κορυφών (peak assignment) βάση της σύγκρισης με βάσεις φασμάτων, πραγματοποιείται με μεγαλύτερη ακρίβεια και αξιοπιστία (Mastrangelo et al., 2015).

Σε στοχευμένες μεταβολωμικές αναλύσεις συχνά εφαρμόζεται χημικός ιοντισμός, που αποτελεί τεχνική «μαλακού» ιοντισμού και διατηρεί το μητρικό ιόν (Lacalle-Bergeron et al., 2021).

Ο αναλυτής μάζας που χρησιμοποιείται πιο συχνά για τον προσδιορισμό του μεταβολικού προφίλ με GC-MS είναι είτε χρόνου πτήσης (TOF) είτε τετράπολο (Q). Οι ανιχνευτές χρόνου πτήσης είναι προτιμότεροι λόγω υψηλότερης ευαισθησίας και ποσοστών ανάκτησης (Dunn et al., 2011), ενώ το τετράπολο συμφέρει λόγω χαμηλού κόστους (Mastrangelo et al., 2015).

Το GC-EI-MS προτιμάται για μεταβολωμική ανάλυση σε σχέση με τεχνικές όπως η LC-MS λόγω της μεγαλύτερης ανάπτυξης βιβλιοθηκών φασμάτων όπως η NIST, οι οποίες επιτρέπουν

την ταχεία ταυτοποίηση των δεικτών μέσω ταύτισης των φασμάτων μάζας (Lacalle-Bergeron et al., 2021).

LC-MS

Η μεταβολωμική με LC-MS χρησιμοποιείται για την ανάλυση κυρίως θερμοευαίσθητων συστατικών με μέτρια έως υψηλή πολικότητα και χαμηλή πτητικότητα. Στα πλεονεκτήματά της συγκαταλέγονται η σχετικά απλή προετοιμασία δείγματος και ο μικρότερος χρόνος ανάλυσης σε σχέση με το GC-MS. Συχνά εφαρμόζεται για υδατικά δείγματα όπως βιολογικά υγρά και ορισμένα υποστρώματα τροφίμων, καθώς η ανάλυση με GC-MS προϋποθέτει επιπρόσθετη προετοιμασία τους με ξήρανση ή ανταλλαγή διαλυτών (Lacalle-Bergeron et al., 2021).

Οι πολικοί μεταβολίτες συνήθως διαχωρίζονται με στήλες ανταλλαγής ιόντων ή χρωματογραφίας υδρόφιλης αλληλεπίδρασης (HILIC), ενώ οι πολικοί μεταβολίτες χωρίς φορτίο διαχωρίζονται με στήλες χρωματογραφίας κανονικής φάσης (NPLC) (Pereira Braga & Adamec, 2019). Η HILIC έχει χρησιμοποιηθεί για υψηλής πολικότητας μεταβολίτες όπως φωσφολιπίδια, μικρά πεπτίδια και αμινοξέα, ενώ συχνά χρησιμοποιείται συμπληρωματικά για πολικά συστατικά που δεν μπορούν να διαχωριστούν με στήλες χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης (RPLC) (Lacalle-Bergeron et al., 2021).

Οι ημι-πολικοί και μη πολικοί μεταβολίτες διαχωρίζονται, ανάλογα με το πόσο υδρόφοβοι είναι, σε στήλες αντίστροφης φάσης (C4, C8 ή C18) εκ των οποίων η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη είναι η C18 (Lacalle-Bergeron et al., 2021; Pereira Braga & Adamec, 2019).

Οι περισσότερες εφαρμογές υγρής χρωματογραφίας περιλαμβάνουν τη χρήση στηλών αντίστροφης φάσης καθώς παρέχουν αποδοτική κατακράτηση και διαχωρισμό σχετικά μη πολικών μεταβολιτών ενός ευρέος φάσματος μοριακών βαρών (50 έως >1500). Σε αυτούς τους μεταβολίτες περιλαμβάνονται λιπίδια υψηλού μοριακού βάρους όπως π.χ. φωσφολιπίδια και τριγλυκερίδια, καθώς και μη πολικά αμινοξέα όπως π.χ. τρυπτοφάνη (Dunn et al., 2011).

Στη μη στοχευμένη μεταβολωμική ανάλυση με LC-MS συνήθως χρησιμοποιείται θετικός ή αρνητικός ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI) (Lacalle-Bergeron et al., 2021). Ωστόσο, σε σύγκριση με το GC-EI-MS, το LC-ESI-MS παρουσιάζει περισσότερες διακυμάνσεις ανά όργανο με αποτέλεσμα τη δύσκολη ταυτοποίηση μέσω βιβλιοθηκών φασμάτων. Επιπλέον, οι βιβλιοθήκες φασμάτων για LC είναι λιγότερο ανεπτυγμένες (Lacalle-Bergeron et al., 2021).

Τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται ιδιαίτερα η υγρή χρωματογραφία υπερ-υψηλής απόδοσης (UHPLC) λόγω της υψηλής αποδοτικότητάς της, της καλής χρωματογραφικής διαχωριστικής ικανότητας, τους σχετικά μικρούς χρόνους ανάλυσης και της συμβατότητάς της με φασματομετρία μαζών (Castro-Puyana et al., 2017; Dunn et al., 2011). Η μεταβολωμική ανάλυση με UHPLC-MS περιλαμβάνει επίσης πολύ πιο απλή προετοιμασία δείγματος σε σχέση με το GC-MS καθώς δεν απαιτείται παραγωγopoίηση (Dunn et al., 2011).

Η UHPLC-MS αντίστροφης φάσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση συστατικών με υψηλότερο μοριακό βάρος και μέτρια προς υψηλή λιποφιλικότητα, συμπεριλαμβανομένων πολλών τάξεων λιπιδίων (γλυκερολιπίδια, φωσφολιπίδια, λιπαρά οξέα, χολικά οξέα και στερόλες) (Dunn et al., 2011).

Στις μελέτες μεταβολικού προφίλ με UHPLC-MS συστήνεται η χρήση τόσο θετικού (ESI+) όσο και αρνητικού ιοντισμού (ESI-) καθώς παρέχουν συμπληρωματικά δεδομένα (Dunn et al., 2011).

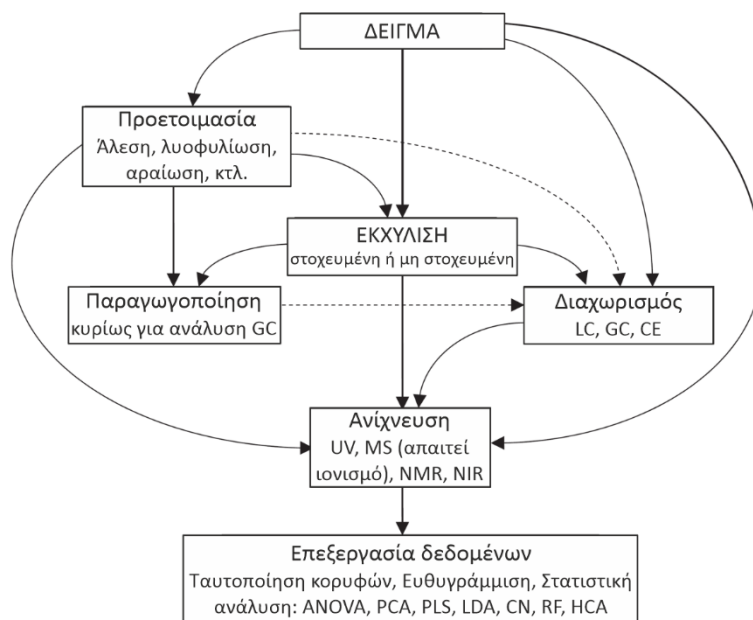
Χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μαζών υψηλής διακριτικής ικανότητας

Η μεταβολωμική ανάλυση περίπλοκων βιολογικών υποστρωμάτων όπως τα τρόφιμα απαιτεί τεχνικές με υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα, καθώς και εξαγωγή δεδομένων με ακρίβεια μάζας από το πλήρες φάσμα (Lacalle-Bergeron et al., 2021). Για αυτούς τους λόγους προτείνεται η χρήση αναλυτών μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας όπως TOF (χρόνου πτήσης), QTOF (τετράπολο και χρόνου πτήσης) ή Orbitrap (παγίδας ιόντων). Οι αναλυτές αυτοί επιτρέπουν τον ακριβή προσδιορισμό μάζας, καθώς και τη διάκριση ισομερικών και ισοβαρών ενώσεων. Επιπλέον, η διεξαγωγή πειραμάτων με δύο ή περισσότερους αναλυτές μάζας (MS/MS) βελτιώνει σημαντικά τις δυνατότητες ταυτοποίησης των άγνωστων μεταβολιτών (Castro-Puyana et al., 2017). Η σύζευξη φασματομετρίας μαζών υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRMS) με μία τεχνική διαχωρισμού, κυρίως GC και LC, μειώνει την περιπλοκότητα των δεδομένων στα φάσματα μάζας με αποτέλεσμα την καλύτερη ευαισθησία της ανίχνευσης και την παροχή επιπρόσθετων πληροφοριών για τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των μορίων (Lacalle-Bergeron et al., 2021).

1.9. Μεταβολωμική ανάλυση με χρήση GC-MS

Στην παρούσα μελέτη διενεργήθηκε μη στοχευμένη μεταβολωμική ανάλυση χρησιμοποιώντας GS-MS με πηγή ιοντισμού πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (EI)

Στο Σχήμα 4 δίνεται σχηματικά η τυπική διαδικασία μεταβολωμικής ανάλυσης και ακολούθως αναλύονται τα διάφορα βήματα.



Σχήμα 4. Σχηματική παράσταση της διαδικασίας της μεταβολωμικής ανάλυσης (Cevallos-Cevallos et al., 2009)

1.9.1. Προετοιμασία δειγμάτων

Η μεταβολωμική ανάλυση με GC-MS χρησιμοποιείται για πτητικά συστατικά μικρού μοριακού βάρους, που είναι θερμοανθεκτικά και έχουν μικρή ή μέτρια πολικότητα (Mastrangelo et al., 2015). Η προετοιμασία των δειγμάτων αποτελεί κρίσιμο σημείο της μεταβολωμικής ανάλυσης και περιλαμβάνει στάδια όπως η αποπρωτεϊνοποίηση, η λυοφιλίωση και η χημική παραγωγοποίηση (Dunn et al., 2011).

- **Ομογενοποίηση, εκχύλιση και απόρριψη υψηλού μοριακού βάρους συστατικών (πρωτεΐνες)**

Για να διασφαλιστεί η αδρανοποίηση των μεταβολικών διαδικασιών, τα δείγματα προς ανάλυση πρέπει να διατηρούνται σε χαμηλή θερμοκρασία τόσο κατά την προετοιμασία τους όσο και κατά την αποθήκευσή τους. Για αυτό το λόγο συστήνεται η χρήση ξηρού πάγου ή υγρού αζώτου για την προετοιμασία των δειγμάτων (άλεση, ομογενοποίηση).

Στη συνέχεια πραγματοποιείται η απαλλαγή του δείγματος από τα υψηλού μοριακού βάρους συστατικά όπως οι πρωτεΐνες, με την ταυτόχρονη εκχύλιση των υπό μελέτη συστατικών. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι διαλύτες για την εκχύλιση των μεταβολιτών και την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών είναι η μεθανόλη, η αιθανόλη, η ισοπροπανόλη, το χλωροφόρμιο και το ακετονιτρίλιο. Αυτοί οι διαλύτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε αυτούσιοι είτε σε συνδυασμό με συγκεκριμένη αναλογία νερού. Η τελική επιλογή των διαλυτών εκχύλισης είναι συμβιβασμός μεταξύ αποτελεσματικής ανάκτησης πολικών και μη πολικών μεταβολιτών. Η αναλογία τουλάχιστον 1:3 δείγματος προς διαλύτη εκχύλισης είναι απαραίτητη για να εξασφαλιστεί πλήρης καθίζηση πρωτεϊνών (Mastrangelo et al., 2015).

- **Λυοφιλίωση**

Μετά την εκχύλιση το υπερκείμενο λυοφιλιώνεται ώστε να απομακρυνθεί όσο το δυνατόν περισσότερη υγρασία. Η πλήρης ξήρανση του δείγματος είναι κρίσιμη για την αποτελεσματικότητα του επόμενου βήματος, της παραγωγοποίησης (Mastrangelo et al., 2015), καθώς η ύπαρξη υγρασίας προκαλεί αποσύνθεση τόσο των αντιδραστηρίων σιλυλίωσης όσο και των παραγώγων.

1.9.2. Παραγωγοποίηση

Για ανάλυση με αέρια χρωματογραφία οι μη πτητικές ενώσεις πρέπει είτε να απομακρύνονται είτε να παραγωγοποιούνται χημικά (Lacalle-Bergeron et al., 2021). Η διαδικασία της παραγωγοποίησης αυξάνει την πολυπλοκότητα και το χρόνο της προετοιμασίας του δείγματος αλλά ταυτόχρονα συμβάλλει στα εξής (Little, 1999):

- 1) στην αύξηση της πτητικότητας των αναλυτών
- 2) στον καλύτερο διαχωρισμό και τη συμμετρία των κορυφών παράλληλα με μείωση των αντιδράσεων μεταξύ του δείγματος και της χρωματογραφικής στήλης
- 3) στην αύξηση της απόκρισης του ανιχνευτή
- 4) στην ενίσχυση της θερμικής σταθερότητας των αναλυτών

Η παραγωγοποίηση ουσιαστικά μειώνει το σημείο βρασμού πολλών πρωτογενών μεταβολιτών καθιστώντας τους έτσι αρκετά πτητικούς και σταθερούς στη θερμότητα ώστε να επιτρέπεται η διέλευσή τους από στήλες GC σε θερμοκρασίες έως 350°C (Dunn et al., 2011).

Οι περισσότεροι πρωτογενείς μεταβολίτες έχουν υψηλά σημεία βρασμού (π.χ. γαλακτικό, πυροσταφυλικό, μηλικό οξύ, γλυκόζη) λόγω της παρουσίας υδρόφιλων λειτουργικών ομάδων που εξυπηρετούν διάφορους κυτταρικούς σκοπούς (π.χ. μεταφορά στο υδατικό κυτταρικό περιβάλλον ή μεταξύ διαμερισμάτων και οργάνων) (Fiehn, 2016). Με την παραγωγοποίηση των ομάδων αυτών απομακρύνονται οι δεσμοί υδρογόνου και αυξάνεται η πτητικότητα. Οι αντιδράσεις παραγωγοποίησης εκτελούνται υπό πολύ ήπιες συνθήκες και συμβαίνουν γρήγορα και με πολύ υψηλές αποδόσεις (Fiehn, 2016). Με την παραγωγοποίηση καθίσταται δυνατή η ανίχνευση με αέρια χρωματογραφία πολλών κατηγοριών μεταβολιτών όπως μονο- και δισακχαρίτες, οργανικά οξέα, αμινοξέα και αμίνες (Dunn et al., 2011).

Η παραγωγοποίηση αποτελεί συνήθως διαδικασία δύο σταδίων:

Σχηματισμός οξιμών (oximation/ methoxymation)

Το αρχικό μίγμα μεταβολιτών αντιδρά με διάλυμα υδροχλωρικής Ο-μεθοξυαμίνης σε πυριδίνη, ώστε από τις καρβονυλικές ομάδες (αλδεΐδες και οι κετόνες) των μεταβολιτών να σχηματιστούν οι αντίστοιχες οξίμες (μεθοξυαμινομάδες) (Cevallos-Cevallos et al., 2009; Mastrangelo et al., 2015). Η αντίδραση αυτή παρεμποδίζει την κυκλοποίηση των αναγωγικών σακχάρων και προστατεύει τα α-κετοξέα από τον ταυτομερισμό κετο-ενόλης και την αποκαρβοξυλίωση (Lacalle-Bergeron et al., 2021; Mastrangelo et al., 2015).

Σιλυλίωση (silylation)

Μετά την ολοκλήρωση του πρώτου σταδίου, πραγματοποιείται το στάδιο της σιλυλίωσης, όπου η πτητικότητα των μεταβολιτών αυξάνεται μέσω της αντικατάστασης των δραστικών ατόμων υδρογόνου (-H) των πολικών λειτουργικών τους ομάδων (-OH, -COOH, -NH₂, -SH και -PO₄⁻³) με μια αλκυλοσιλυλομάδα, συνήθως τριμεθυλοσιλυλική (TMS) (Cevallos-Cevallos et al., 2009; Lacalle-Bergeron et al., 2021; Mastrangelo et al., 2015).

Ανάλογα με τη χημική φύση του όξινου πρωτονίου που αντικαθίσταται, η αντίδραση μπορεί να είναι ατελής και να οδηγήσει σε πολλαπλά παράγωγα λόγω της απλής, διπλής ή τριπλής αντικατάστασης (Mastrangelo et al., 2015).

Η προηγηθείσα αντίδραση της μετατροπής των ομάδων κετόνης σε οξίμες είναι απαραίτητη καθώς διαφορετικά οι κετονομάδες δεν αντιδρούν γρήγορα με τις ομάδες TMS (Dunn et al., 2011). Επιπλέον, αν τα δραστικά άτομα υδρογόνου παραμείνουν, λαμβάνει χώρα σχηματισμός διαμοριακών και ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου, οπότε αυξάνονται τα σημεία βρασμού των μεταβολιτών καθιστώντας τους ακατάλληλους για ανάλυση με GC-MS. Μπορεί επίσης να υπάρχει μια σειρά από άγνωστες ενώσεις (artifacts) που δρουν ως θόρυβος στα χρωματογραφήματα (Dunn et al., 2011).

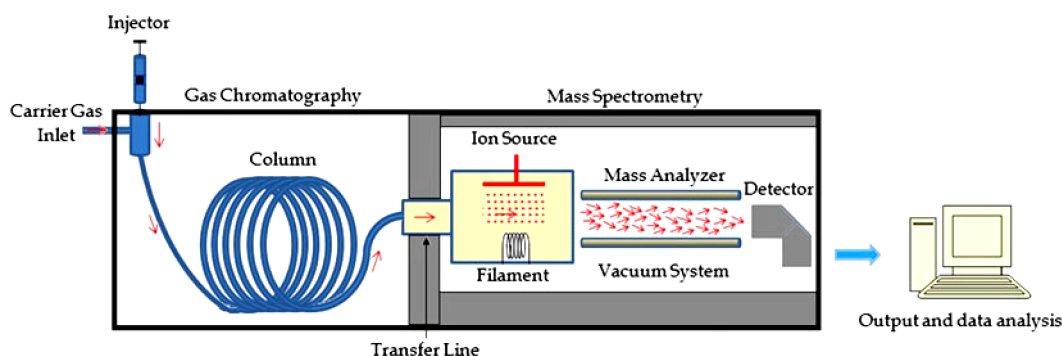
Η σιλυλίωση πραγματοποιείται συνήθως με τη χρήση του αντιδραστήριου MSTFA (N-μεθυλ-N-τριμεθυλοσιλυλο-τριφθοροακεταμίδιο), ενώ άλλα λιγότερο συχνά χρησιμοποιούμενα αποτελούν το BSTFA (N, O-δισ-τριμεθυλοσιλυλο-τριφθοροακεταμίδιο) και το MTBSTFA (N-τρι-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλο-N-μεθυλο-τριφθοροακεταμίδιο), γνωστό και ως MTB-TFA ή MBDSTFA, με ή χωρίς την συμπληρωματική προσθήκη 1% TMCS (τριμεθυλοχλωροσιλάνιο) ως καταλύτη (Cevallos-Cevallos et al., 2009; Fiehn, 2016; Lacalle-Bergeron et al., 2021; Mastrangelo et al., 2015). Το MTBSTFA χρησιμοποιείται στην περίπτωση που απαιτείται ο απόλυτος ποσοτικός προσδιορισμός αμινοξέων και πολυαμινών. Ωστόσο, η χρήση του δεν συνίσταται για

τον προσδιορισμό υδατανθράκων καθώς λόγω της στερικής παρεμπόδισης της ομάδας τριβουτυλοδιμεθυλοσιλυλίου παρατηρείται ατελής παραγωγοποίηση (Fiehn, 2016).

Αξίζει να σημειωθεί ότι συστήνεται η πραγματοποίηση προκαταρκτικών πειραμάτων για τον προσδιορισμό του βέλτιστου συνδυασμού θερμοκρασίας - χρόνου συλιλίωσης που εγγυάται τη μέγιστη ανίχνευση των αναλυτών. Στην μεταβολωμική ανάλυση αρκετές αντιδράσεις συλιλίωσης πραγματοποιούνται στους 37°C για 90 λεπτά (Cevallos-Cevallos et al., 2009).

1.9.3. Διαχωρισμός των μεταβολιτών με αέρια χρωματογραφία και προσδιορισμός με φασματόμετρο μαζών

Αφού οι αναλύτες καταστούν πτητικοί, το δείγμα εισάγεται στη στήλη του αέριου χρωματογράφου, που περιέχει την υγρή στατική φάση (που συγκρατείται σε αδρανές στερεό υπόστρωμα). Το δείγμα κινείται εντός της στήλης συμπαρασυρόμενο από το αδρανές φέρον αέριο που αποτελεί την κινητή φάση. Οι αναλύτες κατανέμονται μεταξύ των δύο φάσεων ανάλογα με τη χημική τους συγγένεια με τη στατική φάση και τη θερμοκρασία της στήλης, με συνέπεια να διαχωρίζονται και να εκλύονται σε διαφορετικούς χρόνους (χρόνοι κατακράτησης). Όσο μεγαλύτερη είναι η χημική συγγένεια του αναλύτη με τη στατική φάση τόσο πιο αργά θα μετακινηθεί στη στήλη και κατά συνέπεια θα αυξηθεί ο χρόνος κατακράτησης. Οι αναλύτες που δεν παρουσιάζουν χημική συγγένεια και άρα δεν αλληλεπιδρούν με τη στήλη εκλύονται νωρίτερα. Η πτητικότητα και η πολικότητα των μεταβολιτών αποτελούν παραμέτρους επιλογής της κατάλληλης χρωματογραφικής στήλης, ώστε να επιτευχθεί καλός διαχωρισμός των αναλυτών.



Σχήμα 5. Σχηματική απεικόνιση της οργανολογίας του GC-MS (Emwas et al., 2015)

Στη συνέχεια οι διαχωρισμένοι αναλύτες ταυτοποιούνται με φασματομετρία μαζών, η οποία βασίζεται στον ιοντισμό των μορίων, την παραγωγή ιοντικών θραυσμάτων και εν συνεχεία στον διαχωρισμό τους με βάση το λόγο μάζας προς φορτίο (m/z).

Αρχικά, οι αναλύτες ιοντίζονται με την εισαγωγή τους στην πηγή ιοντισμού, η οποία συνήθως είναι πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (EI). Από τον ιοντισμό κάθε μορίου προκύπτουν ιοντικά θραύσματα.

Στη συνέχεια τα ιοντικά θραύσματα εισέρχονται στον αναλυτή μαζών, όπου διαχωρίζονται με βάση τον λόγο μάζας προς φορτίο (m/z). Ο αναλυτής συνήθως είναι τετράπολο. Το τετράπολο αποτελείται από τέσσερις ράβδους που ισαπέχουν και ανά δύο σχηματίζουν ζεύγη ηλεκτροδίων. Σε κάθε ζεύγος εφαρμόζεται εναλλασσόμενη και συνεχής διαφορά δυναμικού για να συλλεχθεί το φάσμα μάζας. Για κάθε τιμή της έντασης του πεδίου

μόνο ιόντα με συγκεκριμένο m/z περνούν από το τετράπολο και τα υπόλοιπα παρεκκλίνουν από την πορεία τους. Τα ιόντα με επαρκή κινητική ενέργεια προσκρούουν στον ανιχνευτή, προκαλώντας την εκπομπή δευτερογενών ηλεκτρονίων με αποτέλεσμα την ενίσχυση του σήματος.

Εντέλει συλλέγεται το φάσμα μαζών κάθε αναλύτη, το οποίο αναπαριστά την αφθονία του κάθε θραύσματος σε σχέση με τον λόγο m/z . Η θραυσματοποίηση μιας χημικής ένωσης, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, γίνεται πάντα με το ίδιο τρόπο. Κατά συνέπεια, το φάσμα μάζας μιας ένωσης αποτελεί το «δακτυλικό αποτύπωμά» της.

Παράλληλα με το φάσμα μαζών λαμβάνεται και το χρωματογράφημα, όπου η κάθε κορυφή αντιστοιχεί ιδανικά με έναν μόνο αναλύτη του αρχικού δείγματος. Στην αέρια χρωματογραφία οι χρόνοι κατακράτησης για κάθε αναλύτη υπό τις ίδιες συνθήκες παρουσιάζουν μεγαλύτερη επαναληψιμότητα από ότι στην υγρή χρωματογραφία, ενώ οι κορυφές είναι πιο οξείες.

Ο χρόνος που εμφανίζεται η κάθε κορυφή στο χρωματογράφημα σε συνδυασμό με τις πληροφορίες του φάσματος μαζών, επιτρέπουν την ταυτοποίηση της ουσίας με ηλεκτρονικές βάσεις δεδομένων φασμάτων μαζών, όπως τη NIST 14 ή τη FiehnLib. Το μέγεθος της κορυφής (εμβαδόν ή ύψος) χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της.

Σημειώνεται ότι η έκταση της παραγωγοποίησης ή η ατελής παραγωγοποίηση συχνά συνεπάγεται την αντιστοίχιση παραπάνω από μία κορυφών σε κάθε συστατικό. Σε αυτή την περίπτωση είναι δυνατός μόνο ο ποιοτικός προσδιορισμός των αναλυτών μέσω της σύγκρισης πανομοιότυπων κορυφών χρωματογραφημάτων, ενώ ο απόλυτος ποσοτικός προσδιορισμός απαιτεί καμπύλες βαθμονόμησης (Lubbe et al., 2013).

1.9.4. Επεξεργασία των δεδομένων - Χημειομετρία

Η χημειομετρία (chemometrics) εισήχθη ως έννοια το 1970 και αποτελεί το επιστημονικό πεδίο που χρησιμοποιεί μαθηματικά και στατιστικά εργαλεία για την βελτιστοποίηση ενός πειραματικού σχεδιασμού καθώς και για τη βέλτιστη εξαγωγή χρήσιμων πληροφοριών από μεγάλα σύνολα δεδομένων με πολλές μεταβλητές (Putnik et al., 2019; Sarker & Nahar, 2015).

Το σύνολο των δεδομένων που προκύπτει από μια μεταβολωμική ανάλυση τροφίμων είναι μεγάλο και περίπλοκο, δεδομένου ότι οι κύριες αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται, όπως η φασματομετρία μαζών και η NMR, συνήθως ανιχνεύουν 100-1000 μεταβολίτες (Putnik et al., 2019; Samuelsson & Larsson, 2008). Οι μέθοδοι πολυμεταβλητής στατιστικής ανάλυσης αποτελούν ένα ισχυρό εργαλείο διερεύνησης των συσχετίσεων ή των συνδιακυμάνσεων των δεδομένων καθώς εφαρμόζουν την ταυτόχρονη ανάλυση μίας ή περισσότερων εξαρτημένων μεταβλητών έναντι δύο ή περισσότερων ανεξάρτητων μεταβλητών (Lacalle-Bergeron et al., 2021; Putnik et al., 2019). Η επεξεργασία των δεδομένων με αυτόν τον τρόπο είναι απαραίτητη για τη μείωση του σφάλματος τύπου I (απόρριψη της μηδενικής υπόθεσης ενώ είναι σωστή), δηλαδή για την αποφυγή λανθασμένων συμπερασμάτων (Putnik et al., 2019). Κατά συνέπεια, η εφαρμογή της χημειομετρίας και ειδικότερα κάποιας μορφής πολυμεταβλητής στατιστικής ανάλυσης, είναι απαραίτητη για την απόκτηση έγκυρων συμπερασμάτων (Putnik et al., 2019; Samuelsson & Larsson, 2008).

Οι μέθοδοι με στόχο την βέλτιστη αξιολόγηση των πειραματικών δεδομένων διακρίνονται σε δύο κύριες κατηγορίες (Beebe et al., 1998; Brereton, 2003; Mastrangelo et al., 2015; Samuelsson & Larsson, 2008):

1. Διερεύνηση και Περιγραφή των Δεδομένων - Μέθοδοι αναγνώρισης μοτίβων (Pattern recognition methods): διακρίνονται σε επιβλεπόμενες (supervised) και μη επιβλεπόμενες (unsupervised) μεθόδους κατηγοριοποίησης των δεδομένων. Στις επιβλεπόμενες μεθόδους, στο μοντέλο περιλαμβάνεται εκ των προτέρων η τάξη (class) στην οποία ανήκει το κάθε δείγμα, ενώ στις μη επιβλεπόμενες δεν περιλαμβάνεται καμιά πληροφορία για την αρχική κατάταξη των δειγμάτων και η όποια πιθανή πληροφορία προκύπτει μετά τη χημειομετρική ανάλυση. Τέτοιες πληροφορίες μπορεί να είναι ο χρόνος δειγματοληψίας, η ηλικία, η προέλευση του δείγματος κ.ά. Οι μη επιβλεπόμενες μέθοδοι χρησιμοποιούνται για την συνολική επισκόπηση της μελέτης με σκοπό τον εντοπισμό τάσεων, ομαδοποιήσεων ή επαναλαμβανόμενων μοτίβων και πιθανών ακραίων τιμών, ενώ οι επιβλεπόμενες ταξινομούν τις παρατηρήσεις και επισημαίνουν πιθανούς δείκτες.

2. Μοντέλα Συσχέτισης - Μέθοδοι πολυμεταβλητής βαθμονόμησης και πρόβλεψης (Multivariate Calibration and Prediction Methods): τα δεδομένα χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία μοντέλων συσχέτισης που προβλέπουν τις ιδιότητες ή τις φυσικοχημικά χαρακτηριστικά αγνώστων δειγμάτων. Η πολυμεταβλητή βαθμονόμηση χρησιμοποιείται για ποσοτική αξιολόγηση.

Οι πολυμεταβλητές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται συχνότερα για την επεξεργασία των δεδομένων που προκύπτουν από μία μη στοχευμένη μεταβολωμική ανάλυση είναι η PCA (Principal Component Analysis - ανάλυση κύριων συνιστωσών) και η PLS-DA (Partial Least Squares-Discriminant Analysis - διακριτική ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων). Οι μέθοδοι αυτές «συμπιέζουν» το μεγάλο όγκο μεταβλητών σε μερικές λανθάνουσες μεταβλητές που εξηγούν την ταυτόχρονη συσχέτιση μεταξύ τους (Mastrangelo et al., 2015).

PCA

Η PCA είναι μία μη επιβλεπόμενη μέθοδος αναγνώρισης μοτίβων και συχνά αποτελεί το πρώτο βήμα στην ανάλυση των δεδομένων της μεταβολωμικής (Samuelsson & Larsson, 2008). Η PCA δημιουργεί μέσω γραμμικών συνδυασμών των αρχικών μεταβλητών (πχ. των μεταβολιτών που ανιχνεύονται) νέες μη συσχετιζόμενες μεταβλητές που ονομάζονται κύριες συνιστώσες (PC). Οι κύριες συνιστώσες συμβολίζονται με άξονες δημιουργούμενους σύμφωνα με κοινά μοτίβα και με μεγιστοποίηση της διακύμανσης των δεδομένων. Κατά συνέπεια η διαστατικότητα των δεδομένων μειώνεται ενώ διατηρείται ακόμα η πληροφορία από το αρχικό σύνολο δεδομένων και δημιουργείται μια πιο κατανοητή οπτική επισκόπηση τους (Lacalle-Bergeron et al., 2021; Samuelsson & Larsson, 2008).

Η πρώτη κύρια συνιστώσα περιγράφει τη μέγιστη διακύμανση μεταξύ των δειγμάτων. Η δεύτερη κύρια συνιστώσα είναι ορθογώνια προς την πρώτη και περιγράφει τη δεύτερη μεγαλύτερη διακύμανση, δηλαδή τη μέγιστη μεταβλητότητα που δεν μπορεί να εξηγήσει η πρώτη. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται για τις υπόλοιπες συνιστώσες (Lacalle-Bergeron et al., 2021). Ο συνολικός αριθμός των κύριων συνιστωσών μπορεί να είναι μέχρι και ίσος με τον αρχικό αριθμό των μεταβλητών, αλλά συνήθως οι πρώτες κύριες συνιστώσες περιγράφουν το μεγαλύτερο ποσοστό της διακύμανσης των δεδομένων (Martelo-Vidal & Vázquez, 2014). Η PCA

προσπαθεί να εξηγήσει όσο το δυνατόν μεγαλύτερη διακύμανση με όσο το δυνατόν λιγότερες συνιστώσες (van den Berg et al., 2006).

Η προβολή των τιμών των πρώτων (συνήθως 2-3) κύριων συνιστωσών σε ένα σύστημα αξόνων ονομάζεται γράφημα βαθμών συνιστωσών (Scores Plot) και χρησιμεύει για την παρατήρηση μοτίβων, τάσεων, ομαδοποιήσεων ή/και ακραίων τιμών. Η προβολή της συνεισφοράς των αρχικών μεταβλητών στην κάθε κύρια συνιστώσα απεικονίζεται στο γράφημα φορτίων (Loadings Plot) (Martelo-Vidal & Vázquez, 2014; Samuelsson & Larsson, 2008).

Στην πράξη η PCA καθιστά πιο εύκολη τη γραφική αναπαράσταση των αρχικών δεδομένων και ταυτόχρονα τα ομαδοποιεί, έτσι ώστε να αποκαλυφθούν διάφορα μοτίβα όπως στο πώς διαφέρουν τα δείγματα μεταξύ τους, ποιες μεταβλητές συνεισφέρουν περισσότερο στις διαφορές αυτές και αν αυτές οι μεταβλητές συνεισφέρουν με τον ίδιο τρόπο (συσχετιζόμενες) ή είναι ανεξάρτητες μεταξύ τους (μη συσχετιζόμενες) (Kemsley et al., 2007; Xia & Wishart, 2016).

PLS, PLS-DA και OPLS-DA

Συνήθως μετά την ομαδοποίηση των δεδομένων με PCA και την ανίχνευση μοτίβων ή τάσεων, έπεται κάποια μορφή επιβλεπόμενης μεθόδου ανάλυσης. Ο στόχος των επιβλεπόμενων μεθόδων είναι η αξιολόγηση των δεδομένων όσον αφορά την ικανότητά τους ή όχι, να κατατάσσουν τα δείγματα στις προκαθορισμένες τάξεις. Επιβλεπόμενες μέθοδοι είναι η PLS, η PLS-DA και η παραλλαγή της η OPLS-DA (Samuelsson & Larsson, 2008).

Οι επιβλεπόμενες τεχνικές μπορεί να είναι πολύ χρήσιμες για την επισήμανση των διαφορών μεταξύ των ομάδων όταν τα αποτελέσματα της PCA είναι ασαφή λόγω υψηλής μεταβλητότητας εντός των ομάδων, μεταξύ άλλων λόγων. (Lacalle-Bergeron et al., 2021).

PLS

Η μέθοδος των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS) είναι μία επιβλεπόμενη μέθοδος που χρησιμοποιεί τεχνικές πολυμεταβλητής παλινδρόμησης για την δημιουργία μοντέλων πρόβλεψης (εντάσσεται στις μεθόδους πολυμεταβλητής βαθμονόμησης). Η PLS στοχεύει στη μείωση των αρχικών μεταβλητών (X) και στον εντοπισμό γραμμικών συνδυασμών τους, οι οποίοι ονομάζονται λανθάνουσες μεταβλητές. Ο εντοπισμός γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε να περιγράφεται ή/και να προβλέπεται όσο το δυνατόν καλύτερα η διακύμανση των τιμών κάποιας ζητούμενης ιδιότητας (Y). Οι μεταβλητές X ονομάζονται ανεξάρτητες και οι μεταβλητές Y εξαρτημένες (Cevallos-Cevallos et al., 2009; Wold et al., 2001).

PLS-DA

Η διακριτική ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) αποτελεί επιβλεπόμενη μέθοδο αναγνώρισης μοτίβων και συνδυάζει τις χημειομετρικές μεθόδους PLS και DA (διακριτική ανάλυση ή ανάλυση διακριτότητας). Η DA συνδυάζει τις διαθέσιμες μεταβλητές έτσι ώστε να μεγιστοποιείται ο διαχωρισμός μεταξύ των διαφόρων ομάδων. Η βασική αρχή της PLS-DA είναι η ίδια με της PLS, με τη διαφορά ότι οι μεταβλητές Y, βάση των οποίων γίνεται ο προκαθορισμός των ομάδων, δεν είναι συνεχείς αλλά λαμβάνουν διακριτές τιμές (Lacalle-Bergeron et al., 2021; Xia & Wishart, 2016).

Σε αντίθεση με άλλες μεθόδους κατηγοριοποίησης, οι οποίες πολλές φορές αδυνατούν να κατατάξουν όλα τα δείγματα σε κάποια συγκεκριμένη ομάδα, η PLS-DA κατατάσσει όλα ανεξαιρέτως τα δείγματα σε κάποια ομάδα.

Η PLS-DA προβάλλει τις μεταβλητές X σε ένα χώρο λίγων διαστάσεων που μεγιστοποιεί τον διαχωρισμό μεταξύ των διαφόρων ομάδων δεδομένων στις πρώτες λίγες διαστάσεις (λανθάνουσες μεταβλητές). Αυτές οι λανθάνουσες μεταβλητές κατατάσσονται ανάλογα με το πόσο καλά εξηγούν τη διακύμανση των Y (Xia & Wishart, 2011).

Η μέθοδος αυτή είναι χρήσιμη όταν πρέπει να αναλυθεί μεγάλος αριθμός ανεξάρτητων μεταβλητών. Επειδή όμως ο ρόλος του μοντέλου στη μείωση των διαστάσεων μπορεί εύκολα να παρερμηνευθεί και να οδηγήσει σε υπερβολική τοποθέτηση των δεδομένων (overfitting), η διασταυρούμενη επικύρωση του μοντέλου είναι απαραίτητη (Ruiz-Perez et al., 2020; Xia & Wishart, 2016).

OPLS-DA

Μια παραλλαγή της PLS-DA είναι ορθογώνια διακριτική ανάλυση μερικών ελάχιστων τετραγώνων (OPLS-DA). Στην OPLS-DA το μέρος της διακύμανσης των ανεξάρτητων μεταβλητών X που δεν συσχετίζεται με τις εξαρτημένες μεταβλητές Y αφαιρείται, δηλαδή με μαθηματικούς όρους αφαιρείται η συστηματική διακύμανση του X που είναι ορθογώνια ως προς το Y . Κατά συνέπεια, η ερμηνεία του μοντέλου ταξινόμησης που προκύπτει είναι ευκολότερη ενώ η μη συσχετιζόμενη διακύμανση μπορεί να αναλυθεί αργότερα (Trygg & Wold, 2002). Επισημαίνεται ότι η απόδοση του μοντέλου ταξινόμησης PLS-DA δεν αλλάζει (Lacalle-Bergeron et al., 2021).

Στην OPLS-DA οι ομάδες περιγράφονται υποχρεωτικά μόνο από τη πρώτη και τη δεύτερη συνιστώσα (Lacalle-Bergeron et al., 2021).

1.9.5. Μεταβολωμική στα αυγά και προϊόντα αυγών

Οι μεταβολωμικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί για τα αυγά και τα προϊόντα αυγών είναι ελάχιστες και αφορούν κατά κύριο λόγο την αξιολόγηση της φρεσκότητάς τους και τις διαφορές στη σύστασή τους ανάλογα με τον τρόπο εκτροφής, τη φυλή και το σιτηρέσιο των ορνίθων.

Ειδικότερα, οι Cavanna et al. (2018) μελέτησαν τη φρεσκότητα προϊόντων αυγών με υγρή χρωματογραφία υπερ-υψηλής απόδοσης σε σύζευξη με φασματομετρία μαζών υψηλής διακριτικής ικανότητας (UHPLC-HRMS). Στη μελέτη τους επιλέχθηκαν με μεταβολωμική προσέγγιση και χημειομετρική επεξεργασία 31 συστατικά για το χαρακτηρισμό προϊόντων αυγών ως «φρέσκα» ή «μη φρέσκα», δίνοντας έτσι μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα για την μικροβιακή ανάπτυξη με τη πάροδο του χρόνου.

Οι Johnson et al. (2018) μελέτησαν το μεταβολωμικό προφίλ αυγών κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής τους χρησιμοποιώντας υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης σε σύζευξη με φασματομετρία μαζών με τετράπολο πτήσης χρόνου (HPLC-Q-ToF-MS). Στη μελέτη τους η χολίνη ταυτοποιήθηκε ως πιθανός δείκτης φρεσκότητας των αυγών. Οι ίδιοι ερευνητές σε μεταγενέστερη μελέτη τους (Johnson et al., 2020), χρησιμοποίησαν επίσης HPLC-Q-ToF-MS για την μελέτη του μεταβολωμικού προφίλ σε αυγά αποθηκευμένα σε διαφορετικές θερμοκρασίες (5°C και 23°C). Σύμφωνα με αυτή τη μελέτη, το μεταβολικό προφίλ των αυγών ήταν σημαντικά διαφορετικό στους 5°C από ότι στους 23°C, αλλά η χολίνη μπορεί να θεωρηθεί ως δείκτης φρεσκότητας μόνο στους 23°C.

Η αναζήτηση δεικτών φρεσκότητας των αυγών έχει πραγματοποιηθεί και με άλλους «ωμικούς» κλάδους, όπως η πεπτιδωμική. Ειδικότερα, οι Renzone et al. (2021), χρησιμοποιώντας nanoLC-ESI-Q-Orbitrap-MS/MS, ταυτοποίησαν με διαδικασίες πεπτιδωμικής 19 πεπτίδια στην αλβουμίνη και 25 στον κρόκο ως δείκτες φρεσκότητας των αυγών.

Όσον αφορά την εφαρμογή της μεταβολωμικής στον προσδιορισμό της αυθεντικότητας των αυγών, οι Johnson et al. (2019) μελέτησαν το μεταβονωμικό προφίλ μικρών μορίων σε κρόκους αυγών για τη διάκριση του τρόπου εκτροφής των ορνίθων (εμπλουτισμένες κλωβοστοιχίες, αχυρώνα) με HPLC-Q-ToF-MS και παρατήρησαν σημαντικές διαφορές στην συγκέντρωση πολλών άγνωστων συστατικών. Συμπέραναν ότι το προφίλ λιπιδίων των κρόκων αυγών ειδικότερα, παρουσιάζει δυνατότητες ως μέθοδος διάκρισης των αυγών από διαφορετικά συστήματα εκτροφής.

Οι Mi et al. (2019) μελέτησαν το προφίλ των λιπιδίων (λιπιδωμική) των κρόκων αυγών από τρεις διαφορετικές φυλές ορνίθων με LC-MS/MS. Ανίχνευσαν 1633 είδη λιπιδίων σε όλες τις φυλές, με διαφοροποιήσεις στην αφθονία των λιπιδίων και στη σύνθεση της πλευρικής αλυσίδας των λιπαρών οξέων. Με βάση το λιπιδωμικό προφίλ ανέπτυξαν ένα μοντέλο κατάταξης των κρόκων στις τρεις φυλές και ανέδειξαν 22 λιπίδια ως πιθανούς δείκτες διαφοροποίησης μεταξύ των κρόκων των αυγών από τις τρεις φυλές.

Οι Goto et al. (2019) μελέτησαν με μεταβολωμική προσέγγιση την επίδραση της φυλής και του σιτηρεσίου των ορνίθων σε ορισμένα χαρακτηριστικά των αυγών καθώς και στη χημική τους σύσταση (χρησιμοποιώντας GC-MS/MS). Συμπέραναν ότι η φυλή των ορνίθων συσχετιζόταν με ορισμένα χαρακτηριστικά των αυγών (π.χ. βάρος του κρόκου) και με έναν μεταβολίτη στην αλβουμίνη. Το είδος του σιτηρεσίου των ορνίθων (μικτό ή ζυμωμένο) είχε σημαντική επίδραση σε 3 μεταβολίτες στον κρόκο και σε 12 στην αλβουμίνη, ενώ μια σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ φυλής και είδους σιτηρεσίου παρατηρήθηκε και για έναν μεταβολίτη στην αλβουμίνη. Επιπλέον, τα αυγά των ορνίθων που τρέφονταν με ζυμωμένο σιτηρέσιο είχαν τόσο στον κρόκο όσο και στην αλβουμίνη υψηλότερα επίπεδα αλκοολών σακχάρων, ενώ το λινελαϊκό οξύ ήταν επίσης αυξημένο στην αλβουμίνη των αυγών του ζυμωμένου σιτηρεσίου.

Οι Ogura et al. (2020) μελέτησαν την επίδραση της θερμικής επεξεργασίας (βράσιμο) και του σιτηρεσίου (με βάση το ρύζι ή το καλαμπόκι) στο υδατοδιαλυτό κλάσμα των μεταβολιτών σε αυγά ορνίθων, χρησιμοποιώντας CE-MS και LC-MS. Βρέθηκε ότι το σιτηρέσιο με ρύζι επαγόταν τρεις φορές μεγαλύτερη αφθονία σε συγκεκριμένους μεταβολίτες, έναν στον κρόκο και έναν στην αλβουμίνη. Η θερμική επεξεργασία είχε ως αποτέλεσμα την περισσότερο από τέσσερις φορές αύξηση των συγκεντρώσεων αμινοξέων και φρουκτόζης στην αλβουμίνη, ενώ δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στους μεταβολίτες στον κρόκο.

1.10. Σκοπός της μελέτης

Η εκτίμηση της φρεσκότητας των αυγών και των προϊόντων αυγών επί του παρόντος πραγματοποιείται με καταστροφικούς προσδιορισμούς ορισμένων ποιοτικών χαρακτηριστικών, μικροβιολογικές δοκιμές και ελάχιστους χημικούς δείκτες.

Η χρήση συστημάτων «ηλεκτρονικής μύτης» και φασματοσκοπικών τεχνικών για την ταχεία και μη καταστρεπτική αξιολόγηση της φρεσκότητας των αυγών και των προϊόντων αυγών παρουσιάζει πολλές δυνατότητες εφαρμογής για αυτοματοποιημένο έλεγχο στη

βιομηχανική παραγωγή. Ωστόσο οι τεχνικές αυτές μειονεκτούν ως προς τη διακριτική ικανότητα και την ευαισθησία.

Η μεταβολωμική ανάλυση αποτελεί μία ιδανική εναλλακτική μέθοδο της εκτίμησης της φρεσκότητας των αυγών και των προϊόντων αυγών καθώς προσφέρει τη δυνατότητα ταυτόχρονης αξιολόγησης περισσότερων μορίων-στόχων και κατά συνέπεια μπορεί μέσω συσχέτισης με ορισμένα ποιοτικά χαρακτηριστικά των αυγών, να ανιχνεύσει ισχυρούς χημικούς δείκτες αλλοίωσης-φρεσκότητας.

Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν ελάχιστες μελέτες μεταβολωμικής για τα αυγά και τα προϊόντα αυγών. Ως εκ τούτου, η παρούσα μελέτη αφορά την εφαρμογή της μεταβολωμικής για τον προσδιορισμό του πολικού κλάσματος των μεταβολιτών σε ομογενοποιημένο μίγμα αλβουμίνης και κρόκου αυγών ωοπαραγωγών ορνίθων με GC/MS κατά τη διάρκεια συντήρησης των αυγών σε ελεγχόμενη θερμοκρασία αποθήκευσης. Στόχος της παρούσας μελέτης αποτελεί η εύρεση πιθανών χημικών δεικτών αλλοίωσης-φρεσκότητας και η συλλογή πληροφοριών σχετικά με το μηχανισμό της αλλοίωσης.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1. Πειραματικός σχεδιασμός

Για την διεξαγωγή της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκαν ολόκληρα αυγά ωοπαραγωγών ορνίθων με λευκό κέλυφος, που παραχωρήθηκαν από το Εργαστήριο Γενικής και Ειδικής Ζωοτεχνίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Οι όρνιθες είχαν κοινό σιτηρέσιο (βλ. παράρτημα Π1), ανήκαν στη φυλή Lohmann LSL White, ήταν ηλικίας 51 εβδομάδων και εκτρέφονταν σε διευθετημένες κλωβοστοιχίες.

Έγινε προμήθεια συνολικά 60 αυγών, τα οποία προέρχονταν από κοινό χρονικό διάστημα ωοτοκίας 18 ωρών (μεταξύ 3:00 μ.μ. 28/9/2020 και 9:00 π.μ. 29/9/2020). Ως ώρα ωοτοκίας για το σύνολο των συλλεχθέντων αυγών, λόγω αδυναμίας ακριβούς καταγραφής, θεωρήθηκε η ώρα της αρχικής παραλαβής (9:00 π.μ. 29/9/2020).

Κατά την άφιξή τους στο χώρο του εργαστηρίου, τα αυγά κωδικοποιήθηκαν, ζυγίστηκαν σε ζυγό ακρίβειας 2 δ.ψ. και στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν σε θερμοθάλαμο ελεγχόμενης θερμοκρασίας (24°C). Σε κάθε δειγματοληψία γινόταν έλεγχος της θερμοκρασίας και της σχετικής υγρασίας του θερμοθαλάμου. Επίσης, σε κάθε δειγματοληψία γινόταν καταγραφή του χρόνου που είχε παρέλθει από τη στιγμή της ωοτοκίας (σε ώρες).

Το πλάνο δειγματοληψίας διαμορφώθηκε ως εξής (βλ. Πίνακα 12): ανά ορισμένα χρονικά διαστήματα λαμβάνονταν από το θερμοθάλαμο τυχαία 6 αυγά προς ανάλυση (6 δείγματα). Συνολικά έλαβαν χώρα 8 δειγματοληψίες σε διάστημα 25 ημερών, συμπεριλαμβανομένης της ημέρας 0 (ημέρα της ωοτοκίας) οπότε έλαβε χώρα η πρώτη δειγματοληψία. Συνολικά αναλύθηκαν 48 αυγά.

Σε κάθε δειγματοληψία γινόταν αρχικά μέτρηση του βάρους των αυγών και του ύψους της παχύρρευστης αλβουμίνης για τον προσδιορισμό των μονάδων Haugh. Στη συνέχεια γινόταν ομογενοποίηση του κάθε αυγού (αλβουμίνη και κρόκος) και προετοιμασία για ανάλυση των πολικών μεταβολιτών.

Πίνακας 12. Σχέδιο δειγματοληψίας

ΣΗΜΕΙΟ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ	ΧΡΟΝΟΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ*	
		ΗΜΕΡΕΣ	ΩΡΕΣ
1	29/9/2020	0	5
2	2/10/2020	3	73
3	5/10/2020	6	144
4	8/10/2020	9	217
5	12/10/2020	13	312
6	16/10/2020	17	408
7	20/10/2020	21	504
8	23/10/2020	24	576

* Χρόνος αποθήκευσης μετρούμενος από την ώρα ωοτοκίας (9:00 π.μ. 29/9/2020)

2.2. Μέτρηση βάρους, υπολογισμός μονάδων Haugh

Για τον υπολογισμό των μονάδων Haugh έγινε χρήση ζυγού ακρίβειας 2 δ.ψ., παχύμετρου και κοχλίας με τρίποδα και δίσκο (Εικόνες 1, 2).



Εικόνα 1. Δίσκος και κοχλίας με τρίποδα, που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση του ύψους της παχύρρευστης αλβουμίνης



Εικόνα 2. Παχύμετρο

Αρχικά έλαβε χώρα η καταγραφή του βάρους του κάθε αυγού και στη συνέχεια έγινε προσεκτική θραύση του πάνω στο κέντρο του δίσκου.

Για τη μέτρηση του ύψους της παχύρρευστης αλβουμίνης, ο τρίποδας τοποθετούνταν πάνω στο δίσκο και η άκρη του κοχλίας ρυθμιζόταν μέχρι να αγγίζει την επιφάνεια της αλβουμίνης του αυγού σε απόσταση περίπου 1 cm από τον κρόκο (και μακριά από τα χάλια). Στη συνέχεια ακολουθούσε καταγραφή της απόστασης του κοχλίας από την επιφάνεια του δίσκου με παχύμετρο.

Ο υπολογισμός των μονάδων Haugh έγινε, χρησιμοποιώντας την σχέση:

$$HU = 100 \times \log(h - 1,7 \times w^{0,37} + 7,6)$$

όπου HU = μονάδες Haugh, h = ύψος παχύρρευστης αλβουμίνης (mm), w = βάρος αυγού (g).

2.3. Προσδιορισμός πολικών μεταβολιτών με GC/MS

Υλικά – Σκεύη

- Πλαστικά φιαλίδια Eppendorf (2 mL) με βιδωτό πώμα και o-ring
- Σφαιρίδια από ανοξείδωτο ατσάλι, διαμέτρου 2,5 mm
- Δοχείο με πάγο
- Μηχανικές πιπέτες (1000 μL, 200 μL, 100 μL, 20μL)

- Φιαλίδια για GC με κωνικά inserts
- Ογκομετρικά σιφώνια 10 mL

Συσκευές

- Αναλυτικός ζυγός, METTLER AE200
- Κυκλοαναδευτήρας (Vortex), VELP Scientifica
- Φυγόκεντρος, Heraeus Biofuge pico
- Συσκευή λυοφιλίωσης, UNICRYO MC 4L, UNIEQUIP
- Θερμοθάλαμος με ταυτόχρονη ανάδευση
- Σύστημα Αέριας Χρωματογραφίας - Φασματομετρίας Μαζών, Shimadzu GCMS QP-2010 Ultra

Αντιδραστήρια – Διαλύτες

- Υδατικό διάλυμα δευτεριωμένης γλυκίνης (Glycine-d5, SIGMA-ALDRICH) συγκέντρωσης 300 mg/mL, ως εσωτερικό πρότυπο
- Μεθανόλη, $\geq 99,8\%$, Honeywell
- Απεσταγμένο νερό
- Χλωροφόρμιο, CHCl_3 99,0-99,4% (GC), SIGMA-ALDRICH
- Πυριδίνη, άνυδρη 99,5%, ACROS
- Υδροχλωρική μεθοξυαμίνη, 98+ %, ACROS ORGANICS
- N-Μεθυλο-N-(τριμεθυλοσιλυλο)-τριφθοροακεταμίδιο (MSTFA), 97%, ALFAAESAR



Εικόνα 3. Συσκευή λυοφιλίωσης



Εικόνα 4. Θερμοθάλαμος

2.3.1. Προπαρασκευή δείγματος

Μετά την μέτρηση των μονάδων Haugh το δείγμα (η αλβουμίνη και ο κρόκος του αυγού) ομογενοποιούταν με ραβδομπλέντερ. Στη συνέχεια ζυγίζόταν άμεσα ποσότητα 50-100 mg σε αναλυτικό ζυγό ακρίβειας 4 δ.ψ. σε φιαλίδιο Eppendorf των 2 mL με βιδωτό πώμα, στο οποίο είχε προστεθεί ένα ανοξειδωτο σφαιρίδιο (διαμέτρου 2,5 mm). Μετά τη ζύγιση, το φιαλίδιο εμβαπτιζόταν σε δοχείο με πάγο για αναστολή των μεταβολικών διαδικασιών και ακολουθούσε το στάδιο της εκχύλισης των πολικών μεταβολιτών.

2.3.2. Εκχύλιση πολικών μεταβολιτών από το ομογενοποιημένο μίγμα αλβουμίνης-κρόκου

Αρχικά παρασκευάστηκε μίγμα $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (1:1 v/v) το οποίο διατηρήθηκε στους 4°C.

Σε κάθε φιαλίδιο Eppendorf που περιείχε το δείγμα, μεταφέρονταν 20 μL εσωτερικού προτύπου (γλυκίνη-d5, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) και 800 μL από το μίγμα $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$. Το φιαλίδιο αναδεύόταν στον κυκλοαναδευτήρα για 1-2 min και ακολουθούσε φυγοκέντρηση για 20-30 sec. Στη συνέχεια γινόταν προσθήκη 400 μL H_2O και ανάδευση στον κυκλοαναδευτήρα για 1 min.

Τέλος, γινόταν φυγοκέντρηση για 5 min στις 10.000 rpm, ώστε να διαχωριστούν οι δύο φάσεις (υδατομεθανολική-χλωροφορμική). Από την υπερκείμενη πολική φάση, λαμβάνονταν 200 μL , τα οποία μεταφέρονταν σε νέο φιαλίδιο Eppendorf με προ-τρυπημένο πώμα. Παράλληλα, από κάθε εκχύλισμα, λαμβάνονταν 100 μL από την πολική φάση και τοποθετούνταν σε γυάλινο φιαλίδιο (8 mL) για την προετοιμασία του ενοποιημένου δείγματος ελέγχου ποιότητας (pooled QC).

Καθ' όλη τη διάρκεια της προσθήκης των διαλυτών τα φιαλίδια Eppendorf παρέμεναν εμβαπτισμένα στον πάγο όπως και το φιαλίδιο για το ενοποιημένο δείγμα ελέγχου ποιότητας.

Τα δείγματα καταψύχονταν άμεσα στους -20°C για 15 min και ακολουθούσε λυοφιλίωση για περίπου 4 ώρες. Στη συνέχεια, τα πώματα αντικαθιστούνταν με καινούρια (χωρίς τρύπα) και τα δείγματα αποθηκεύονταν στους -20°C.

Παράλληλα με τα δείγματα, αναλύθηκε σε κάθε δειγματοληψία και λευκό δείγμα (blank).

2.3.3. Ενοποιημένο δείγμα ελέγχου ποιότητας (QC-pooled sample)

Σε κάθε σημείο δειγματοληψίας, μετά την ολοκλήρωση της εκχύλισης όλων των δειγμάτων (6), λαμβάνονταν 100 μL από το κάθε εκχύλισμα πολικών μεταβολιτών και μεταφέρονταν σε γυάλινο φιαλίδιο χωρητικότητας 8 mL, το οποίο παρέμενε εμβαπτισμένο στο πάγο κατά τη διάρκεια της μεταφοράς και αποθηκεύονταν κάθε φορά στους -20°C. Αυτό επαναλήφθηκε για όλα τα σημεία δειγματοληψίας, οπότε μετά την ολοκλήρωση όλων των δειγματοληψιών, το ενοποιημένο δείγμα ελέγχου ποιότητας (QC) περιείχε ισόποσο εκχύλισμα από κάθε δείγμα που μελετήθηκε (σύνολο 48). Στη συνέχεια, από το δείγμα QC μεταφέρθηκαν 100 μL σε 20 φιαλίδια Eppendorf, τα οποία τοποθετήθηκαν στους -20°C, αποτελώντας τις επαναλήψεις του ενοποιημένου δείγματος ποιότητας (δείγματα QC).

Τα ενοποιημένα δείγματα ελέγχου ποιότητας χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της αναπαραγωγιμότητας της αναλυτικής μεθόδου, για τον υπολογισμό της επαναληψιμότητας της πειραματικής διαδικασίας, καθώς και για την ταυτοποίηση των κορυφών και την κανονικοποίηση των δεδομένων (Dunn et al., 2011; Fiehn, 2007).

2.3.4. Παραγωγοποίηση πολικών μεταβολιτών

Τα δείγματα που είχαν υποστεί λυοφιλίωση αφαιρέθηκαν από τους -20°C και τοποθετήθηκαν ξανά στη λυοφιλίωση για 1 ώρα για να αποφευχθεί η επαναπρόσληψη υγρασίας.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η αντίδραση παραγωγής οξιμών με την προσθήκη μεθοξαμίνης. Συγκεκριμένα, σε κάθε φιαλίδιο δείγματος προστέθηκαν 40 μL διαλύματος μεθοξαμίνης σε άνυδρη πυριδίνη (20 mg/mL), με τον άμεσο πωματισμό του φιαλιδίου μετά την προσθήκη του αντιδραστήριου. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε θερμοθάλαμο για 90 min στους 30°C , υπό ανάδευση και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν για 15 sec.

Ακολούθησε η αντίδραση σιλυλίωσης, με προσθήκη 70 μL MSTFA σε κάθε φιαλίδιο δείγματος (με τον άμεσο πωματισμό του φιαλιδίου μετά την προσθήκη του αντιδραστήριου) και παραμονή στους 37°C για 30 min, με ακόλουθη φυγοκέντρηση για 15 sec.

Μετά την ολοκλήρωση της παραγωγοποίησης, 100 μL από κάθε φιαλίδιο μεταφέρθηκαν με τη χρήση μηχανικού σιφωνίου σε φιαλίδιο αυτόματου δειγματολήπτη που έφερε micro-insert (χωρητικότητα 200 μL) και πώμα με ελαστικό παρέμβυσμα και επικάλυψη από τεφλόν. Στο φιαλίδιο αυτό είχαν ήδη προστεθεί 2 μL μίγματος n-αλκανίων με ζυγό αριθμό ατόμων άνθρακα (C10-C24), ώστε να προσδιοριστούν οι δείκτες κατακράτησης κατά την ανάλυση των δειγμάτων (Retention Index, RI) και να διευκολυνθεί η ταυτοποίηση.

Η παραπάνω διαδικασία ακολουθήθηκε και για ορισμένα λευκά δείγματα, καθώς και για τα δείγματα QC.

Η παραγωγοποίηση των δειγμάτων έλαβε χώρα σε δύο παρτίδες (Batch). Για τη πρώτη παρτίδα αναλύθηκαν 24 δείγματα αυγών, 11 δείγματα QC και 2 λευκά δείγματα. Για τη δεύτερη παρτίδα αναλύθηκαν 24 δείγματα αυγών, 9 δείγματα QC και 2 λευκά δείγματα.

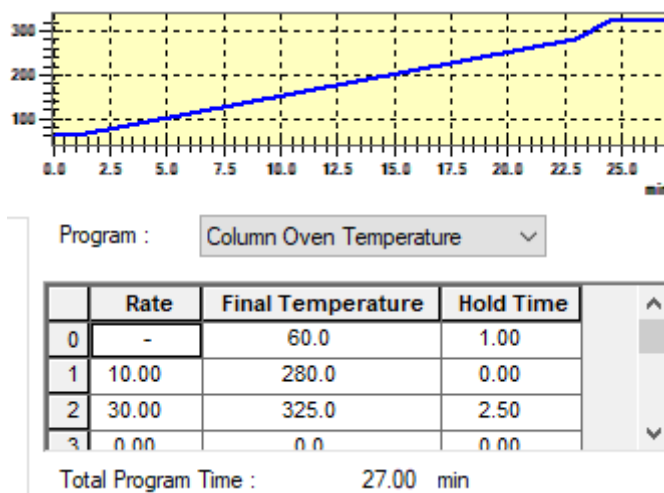
Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των δειγμάτων για την ένεσή τους στο GC/MS, έγινε με τυχαίο τρόπο, με τη σειρά ανάλυσης που δίνεται στο Παράρτημα Π2.

2.3.5. Ανάλυση δειγμάτων με αέρια χρωματογραφία - φασματομετρία μαζών

Ο προσδιορισμός των παραγώγων των πολικών μεταβολιτών πραγματοποιήθηκε με σύστημα αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών Shimadzu GCMS QP2010 Ultra, με αυτόματο δειγματολήπτη AOC-20s. Η θερμοκρασία του εισαγωγέα διατηρήθηκε στους 250°C . Η αναλογία διαμοιρασμού (split ratio) ήταν 1:10 και ο όγκος έκχυσης 1 μL . Χρησιμοποιήθηκε τριχοειδής στήλη διαχωρισμού MEGA-5HT (30 m x 0,25 mm, df 0,25 μm). Το φέρον αέριο ήταν ήλιο με σταθερή γραμμική ταχύτητα 36 cm/s . Το πρόγραμμα θερμοκρασίας του φούρνου παρουσιάζεται στην Εικόνα 5.

Η θερμοκρασία της πηγής ιόντων και του συστήματος σύζευξης (interface) ήταν 230°C και 290°C αντίστοιχα. Ο τρόπος λειτουργίας του φασματόμετρου μαζών ήταν ιοντισμός ηλεκτρονίων (electron ionization EI), με την ενέργεια ορισμένη στα 70 eV και εύρος μαζών 50-600 m/z.

Η ταυτοποίηση των ενώσεων επιτεύχθηκε συγκρίνοντας τους δείκτες κατακράτησης με τους αντίστοιχους προτύπων ενώσεων και βιβλιογραφίας καθώς και με τα δεδομένα φασματομετρίας μαζών από τη βιβλιοθήκη NIST. Το λογισμικό καταγραφής και επεξεργασίας των δεδομένων ήταν το GCMS Solution Version 4.30 (Shimadzu).



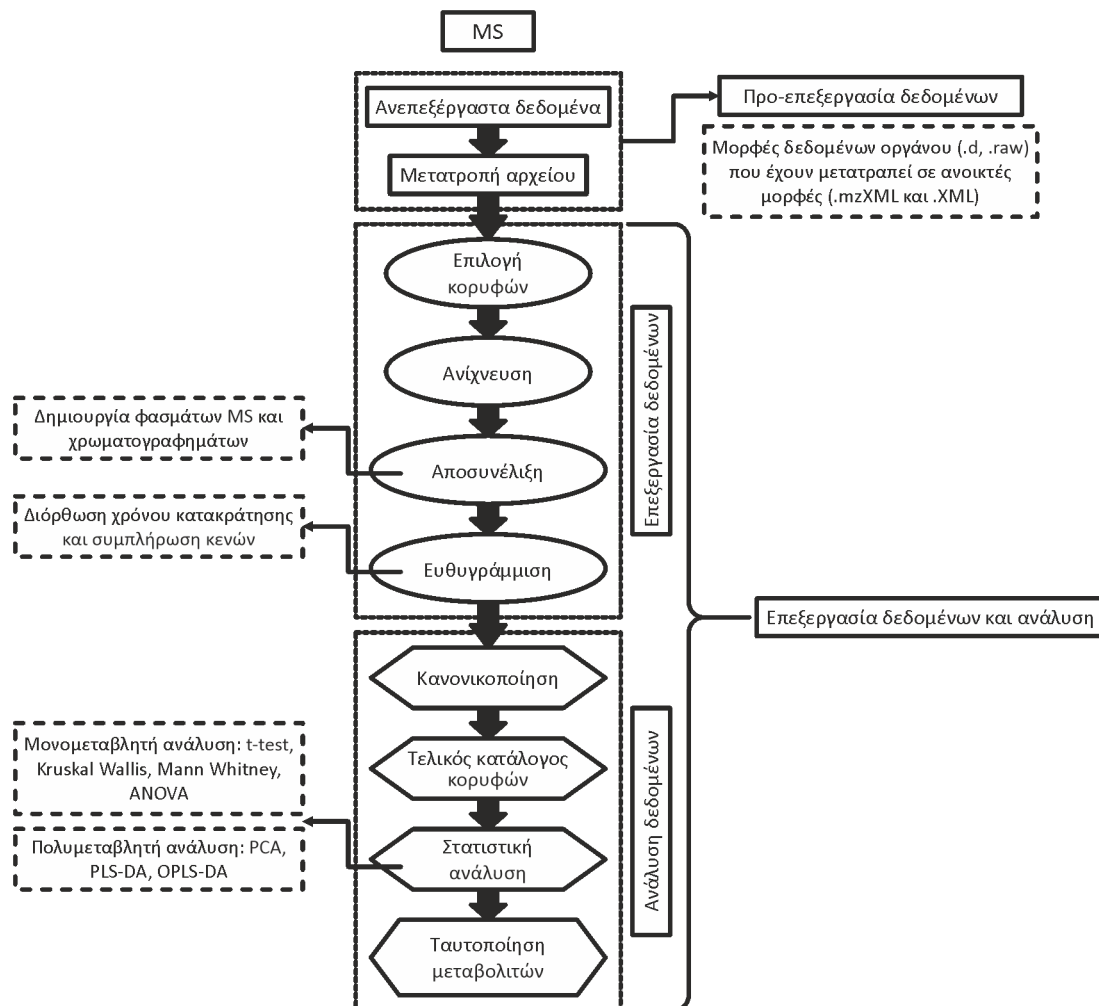
Εικόνα 5. Πρόγραμμα θερμοκρασίας φούρνου και στοιχεία στήλης κατά την ανάλυση GC/MS

2.3.6. Στατιστική επεξεργασία

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε στην ηλεκτρονική πλατφόρμα MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) (Chong et al., 2018; Xia et al., 2015; Xia & Wishart, 2016). Παράλληλα, τα δεδομένα επεξεργάστηκαν και με το λογισμικό The Unscrambler X (CAMO Software AS, Oslo, Norway).

3. Αποτελέσματα και συζήτηση

Στο Σχήμα 6 δίνεται εποπτικά το διάγραμμα ροής της επεξεργασίας των δεδομένων που προκύπτουν από μεταβολωμική ανάλυση με φασματομετρία μαζών.



Σχήμα 6. Διάγραμμα ροής της επεξεργασίας των δεδομένων που προκύπτουν από μεταβολωμική ανάλυση με φασματομετρία μαζών (προσαρμογή από Pereira Braga & Adamec, 2019)

3.1. Προ-επεξεργασία δεδομένων (πριν την στατιστική ανάλυση)

Η επεξεργασία των δεδομένων που προέκυψαν από την ανάλυση με GC/MS έγινε με τη χρήση του λογισμικού MS-DIAL (Mass Spectrometry - Data Independent Analysis), ώστε τα «ακατέργαστα» δεδομένα (raw data) να μετασχηματιστούν σε μορφή κατάλληλη για στατιστική επεξεργασία (Tsugawa et al., 2015).

Τα αρχεία που προέκυψαν από το λογισμικό Shimadzu και τα οποία περιείχαν τα ακατέργαστα δεδομένα, μετατράπηκαν σε αρχεία .ABF (Analysis Base File), ώστε να είναι δυνατή η επεξεργασία τους από το λογισμικό MS-DIAL.

Με το MS-DIAL αρχικά γίνεται η αποσυνέλιξη των φασμάτων (spectra deconvolution) και η ευθυγράμμιση των χρωματογραφικών κορυφών (peak alignment). Η αποσυνέλιξη των

φασμάτων πραγματοποιείται με ειδικούς αλγόριθμους και στόχος της είναι ο διαχωρισμός των ουσιών που συνεκλούνται. Στη συνέχεια, οι χρωματογραφικές κορυφές ενός δείγματος ευθυγραμμίζονται με τις αντίστοιχες των υπολοίπων δειγμάτων με χρήση των δεικτών κατακράτησης (RI). Η ευθυγράμμιση των κορυφών αναιρεί τυχόν μετατοπίσεις στους χρόνους κατακράτησης των ουσιών (Yi et al., 2016).

Η ταυτοποίηση των μεταβολιτών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των RI σε συνδυασμό με τη χρήση πρότυπων ενώσεων και το βαθμό ομοιότητας των φασμάτων μάζας των αναλυτών με τα αντίστοιχα από βιβλιοθήκες φασμάτων μαζών (NIST14 και GCMS DB_AllPublic-KovatsRI-VS3). Με βάση τις ταυτοποιημένες κορυφές έγινε η σύνταξη ενός πίνακα του ύψους των κορυφών, όπου οι οριζόντιες γραμμές αντιστοιχούν στα δείγματα και οι στήλες στους μεταβολίτες.

Πριν την στατιστική επεξεργασία του πίνακα αυτού πραγματοποιήθηκαν τα εξής (Dunn et al., 2011):

1) Αφαίρεση κορυφών

Αφαιρέθηκαν οι κορυφές που ανιχνεύονται σε λιγότερο από το 50% των δειγμάτων QC καθώς και οι κορυφές που ανιχνεύονται στα λευκά δείγματα. Επιπλέον, αφαιρέθηκαν οι κορυφές με λανθασμένη (false positive) ταυτοποίηση λόγω ομοιότητας των φασμάτων μάζας, οι πλασματικές ενώσεις παραγωγοποίησης που προκύπτουν κατά τη σιλυλίωση (artifacts), καθώς και οι ενώσεις με πολύ χαμηλό σήμα (Dunn et al., 2011; Little, 1999).

2) Κανονικοποίηση (normalization)

Στη συνέχεια έγινε κανονικοποίηση για τη διόρθωση του σήματος, ώστε να εξαλειφθούν σφάλματα τα οποία οφείλονται στην χρησιμοποιούμενη τεχνική, όπως για παράδειγμα ο θόρυβος (Yi et al., 2016).

Η κανονικοποίηση πραγματοποιήθηκε στο MS-DIAL με τη χρήση των δειγμάτων QC (τα οποία περιείχαν ως εσωτερικό πρότυπο τη γλυκίνη-d5) και τον αλγόριθμο LOWESS, προκειμένου να εξομαλυνθεί η ολίσθηση (drift) του σήματος του φασματομέτρου μαζών (Dunn et al., 2011). Κατόπιν, υπολογίστηκε η σχετική τυπική απόκλιση όλων των μεταβολιτών στα δείγματα QC και αφαιρέθηκαν από όλα τα δείγματα οι μεταβολίτες που εμφάνισαν σχετική τυπική απόκλιση (RSD) > 30% (Dunn et al., 2011).

Στη συνέχεια αθροίστηκαν τα ύψη των παραγώγων που αντιστοιχούσαν στο ίδιο μητρικό μόριο. Η ύπαρξη πολλαπλών παραγώγων ενός αναλύτη μπορεί να οφείλεται είτε σε μη πλήρη παραγωγοποίηση (π.χ. αμινοξέα όπως Valine 1TMS και Valine 2TMS), είτε στο σχηματισμό ισομερών (π.χ. σχηματισμός *syn* και *anti* ισομερών των σακχάρων, λόγω του σχηματισμού οξιμών) (Fiehn, 2016).

Το ύψος των κορυφών των μεταβολιτών διαιρέθηκε με την αντίστοιχη μάζα του δείγματος του αυγού που χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση.

Με τις παραπάνω ενέργειες προέκυψε πίνακας 67 γραμμών (όλα τα δείγματα QC πλην ενός και όλα τα δείγματα των αυγών) και 54 στηλών (μεταβολίτες), ο οποίος χρησιμοποιήθηκε για περεταίρω στατιστική ανάλυση. Στο παράρτημα Π3 δίνεται ο πίνακας με τους 54 μεταβολίτες που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα αυγών. Οι ουσίες αυτές περιλαμβάνουν αμινοξέα, οργανικά οξέα, υδατάνθρακες και άλλους μεταβολίτες.

3.2. Πολυμεταβλητή ανάλυση

Τα προ-επεξεργασμένα δεδομένα μεταφορτώθηκαν στην ηλεκτρονική πλατφόρμα MetaboAnalyst 5.0 (Xia et al., 2015; Xia & Wishart, 2016) και πριν την στατιστική ανάλυση, οι κανονικοποιημένες τιμές των μεταβολιτών λογαριθμήθηκαν (log transformation) και μετασχηματίστηκαν (mean-centered scaling).

Η πολυμεταβλητή ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τις εξής δύο κατηγοριοποιήσεις: α) με βάση τη σειρά δειγματοληψίας και β) με βάση τον χαρακτηρισμό «εξαιρετικά φρέσκα».

α) Πολυμεταβλητή ανάλυση με βάση τη σειρά δειγματοληψίας

Αρχικά τα δείγματα χωρίστηκαν σε 8 κατηγορίες (κλάσεις) ανάλογα με το χρονικό σημείο δειγματοληψίας όπως απεικονίζεται στον Πίνακα 13.

Πίνακας 13. Κατηγοριοποίηση των δειγμάτων αυγών με βάση το χρόνο συντήρησης των αυγών στους 24°C μετά την περίοδο ωστοκίας¹.

Κλάσεις ²	Ώρες από την ωστοκία
1	5
2	73
3	144
4	217
5	312
6	408
7	504
8	576

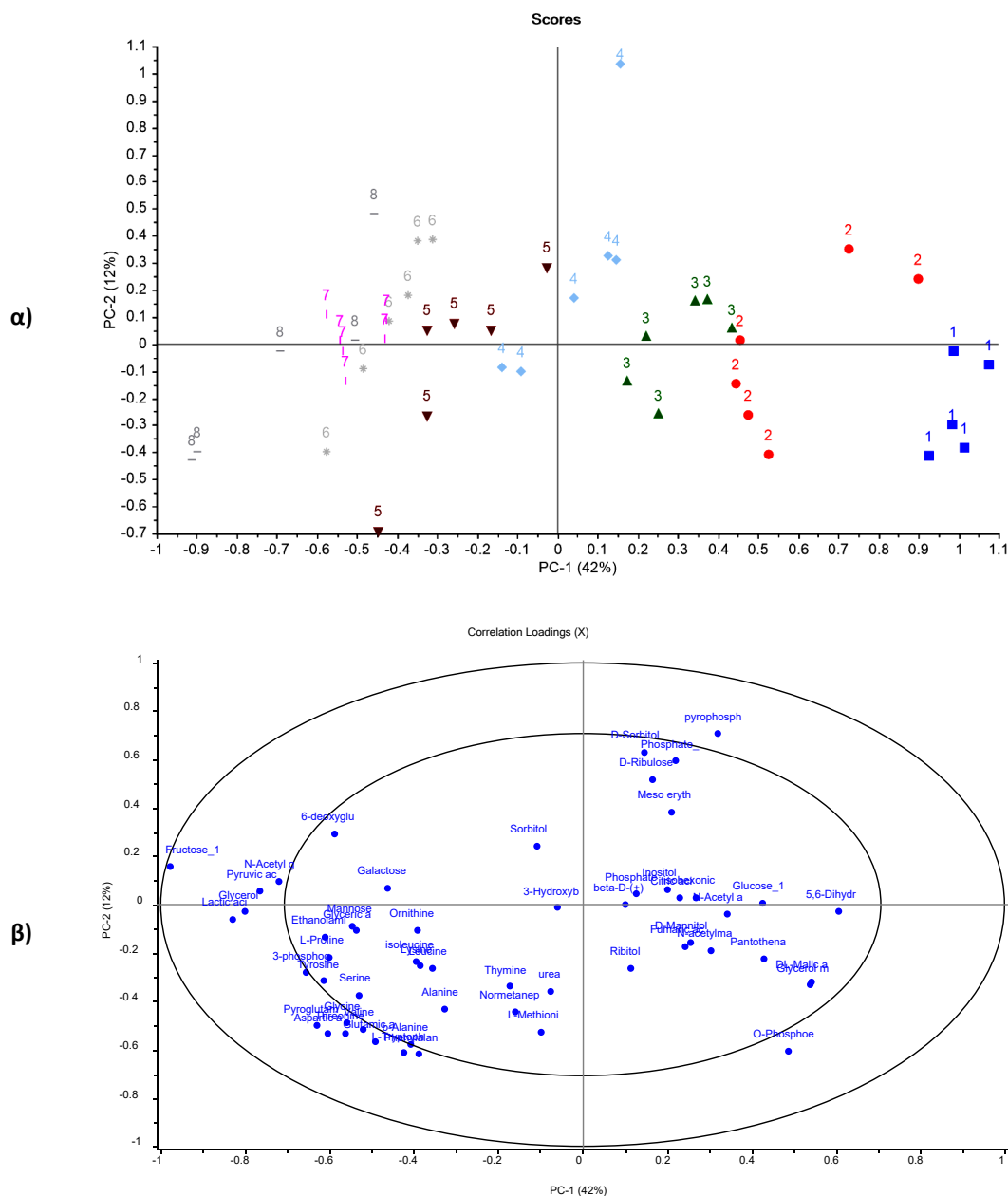
¹ Ως χρόνος έναρξης της συντήρησης ορίστηκε το πέρας της περιόδου ωστοκίας (3:00 μ.μ. 28/9/2020 έως 9:00 π.μ. 29/9/2020)

² Κάθε ψηφίο αντιστοιχεί σε χρονικό σημείο δειγματοληψίας

Τα δεδομένα των μεταβολιτών υποβλήθηκαν αρχικά σε ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) από την οποία προέκυψε το Διάγραμμα 1.α. Είναι εμφανής ο πλήρης διαχωρισμός των δειγμάτων της κλάσης 1 (5 ώρες) που αντιστοιχεί στα δείγματα που αναλύθηκαν την 1^η μέρα της ωστοκίας. Οι υπόλοιπες κλάσεις δεν είναι σαφώς διαχωρισμένες, ενώ με τη πάροδο του χρόνου ο διαχωρισμός τους γίνεται πιο δυσδιάκριτος. Οι κλάσεις 1,2,3 (5 έως 144 ώρες), που αντιστοιχούν στα αρχικά στάδια της αλλοίωσης, διαχωρίζονται από τις κλάσεις 5,6,7,8 (312 έως 576 ώρες) που αντιστοιχούν σε χρόνο πέραν του χρονικού ορίου για τον χαρακτηρισμό των αυγών ως «εξαιρετικά φρέσκα».

Οι κύριες συνιστώσες που προέκυψαν από την ανάλυση με PCA εξηγούν τη διακύμανση των αρχικών δεδομένων (X) χωρίς να λαμβάνεται υπόψη η κατηγορία που ανήκουν (Y). Οι τέσσερις πρώτες κύριες συνιστώσες που προκύπτουν από τη συγκεκριμένη κατηγοριοποίηση, εξηγούν το 70,4% της μεταβλητότητας των δεδομένων, ενώ η πρώτη κύρια συνιστώσα PC1 (οριζόντιος άξονας) επεξηγεί το 42% της μεταβλητότητας των δεδομένων, δίνοντας την καλύτερη ομαδοποίηση.

Η PC1 φαίνεται να περιγράφει το χρόνο συντήρησης των αυγών στους 24°C και ενσωματώνει την πληροφορία όλων των μεταβολιτών σε μία παράμετρο που μπορεί να περιγράψει την εξέλιξη της αλλοίωσης των αυγών.

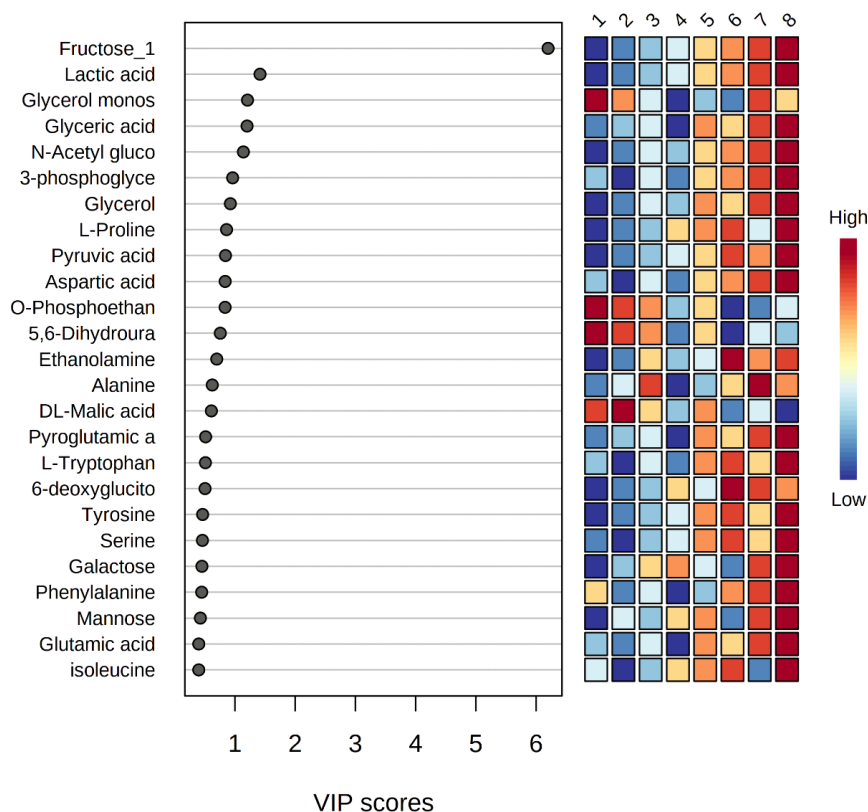


Διάγραμμα 1. **α)** Γράφημα των βαθμών των κύριων συνιστωσών PCA (scores plot) βάσει των υδρόφιλων μεταβολιτών σε αυγά συντηρημένα στους 24°C. **β)** Γράφημα συσχετίσεων των φορτίων των κύριων συνιστωσών PCA (correlation loadings). Οι κλάσεις (1,2,3,4,5,6,7,8) των δειγμάτων περιγράφονται στον Πίνακα 13.

Στο Διάγραμμα 1.β απεικονίζεται η συσχέτιση των μεταβολιτών μεταξύ τους. Αυτό το διάγραμμα επιβεβαιώνει ότι η φρουκτόζη (Fructose_1) αποτελεί τον πιο σημαντικό μεταβολίτη για την περιγραφή της αλλοίωσης των αυγών (το σχετικό περιεχόμενο της αυξάνει κατά τη διάρκεια της συντήρησης), ενώ παράλληλα απεικονίζει τους μεταβολίτες που είναι σημαντικοί για την αλλοίωση και συσχετίζονται θετικά με τη φρουκτόζη (γαλακτικό οξύ, γλυκερόλη, πυροσταφυλικό οξύ, N-ακετυλο γλυκοζαμίνη).

Στο Παράρτημα P4, παρουσιάζονται και τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση PLS-DA για την κατηγοριοποίηση των δειγμάτων σύμφωνα με τον Πίνακα 13, ενώ στο

Διάγραμμα 2 παρουσιάζονται οι 25 πιο σημαντικοί μεταβολίτες, αυτοί δηλαδή που συνεισφέρουν σημαντικά στο μοντέλο PLS-DA, όπως προέκυψαν μετά τον υπολογισμό των VIP Scores (Variable Importance for Prediction). Σύμφωνα με αυτό το διάγραμμα, ο μεταβολίτης που συνεισφέρει περισσότερο είναι με μεγάλη διαφορά η φρουκτόζη.

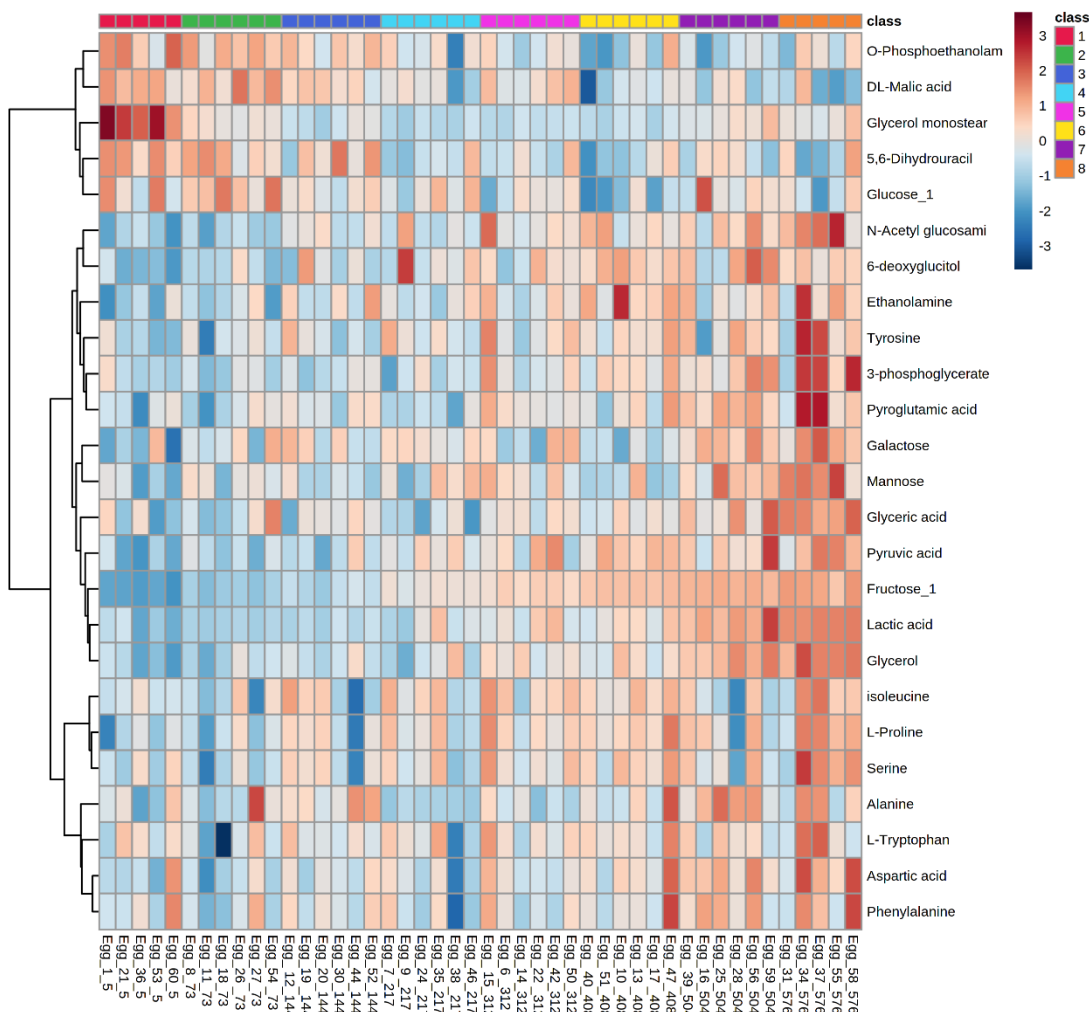


Διάγραμμα 2. Οι 25 σημαντικότεροι μεταβολίτες της αλλοίωσης των αυγών που συνεισφέρουν στο μοντέλο PLS-DA σύμφωνα με την κατηγοριοποίηση των δειγμάτων όπως απεικονίζεται στον Πίνακα 13. Τα έγχρωμα κελιά στην δεξιά στήλη δείχνουν την διάμεση τιμή της ποσότητας κάθε μεταβολίτη στην αντίστοιχη κλάση.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε δοκιμή μεταστοιχείωσης (permutation test) του μοντέλου PLS-DA με την κατηγοριοποίηση των δειγμάτων σύμφωνα με τον Πίνακα 13. Σε αυτή την ανάλυση χρησιμοποιούνται τα ίδια δεδομένα, αλλά τα δείγματα τοποθετούνται σε τυχαίους επανασηματισμούς και αναπτύσσεται ένα νέο μοντέλο. Η επίδοση του μοντέλου αξιολογείται και ολόκληρη η διαδικασία επαναλαμβάνεται πολλές φορές (>1000). Κάθε φορά η επίδοση του αρχικού μοντέλου συγκρίνεται με τα τυχαία που αναπτύχθηκαν, ελέγχοντας αν η διαφορά τους είναι στατιστικώς σημαντική (Bijlsma et al., 2006; Fredrickson & Chen, 2019). Η επίδοση των μοντέλων περιγράφεται με το λόγο B/W (sum of squares between/ sum of squares within). Οι λόγοι B/W παριστάνονται γραφικά σε ιστόγραμμα (κατανομή τυχαίων ταξινομήσεων) όπως απεικονίζεται στο Παράρτημα Π5. Όσο πιο δεξιά βρίσκεται ο λόγος B/W του «πραγματικού» μοντέλου, τόσο πιο σημαντική είναι η διάκριση και επομένως οι διαφορές των κλάσεων του πραγματικού μοντέλου είναι στατιστικώς σημαντικές.

Στο Διάγραμμα 3 απεικονίζονται -υπό τη μορφή θερμικού χάρτη (Heatmap)- τα αποτελέσματα της ιεραρχικής ανάλυσης συστάδων (Hierarchical Cluster Analysis - HCA) όσον αφορά τη μεταβολή της συγκέντρωσης των σημαντικότερων μεταβολιτών (βάσει των VIP

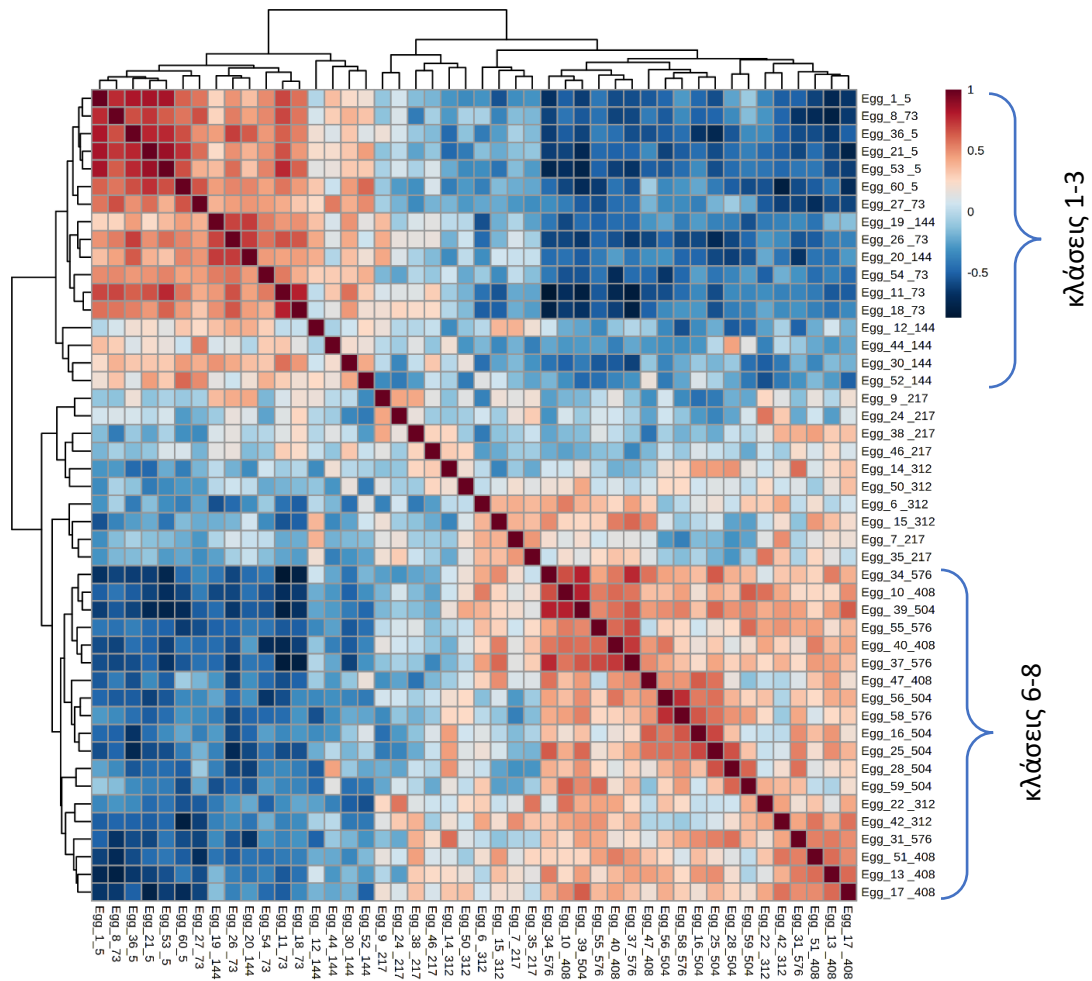
scores) συναρτήσει του χρόνου από την ωστοκία. Οι θερμικοί χάρτες απεικονίζουν τα μοτίβα που ακολουθούν οι μεταβολίτες ανάμεσα στα δείγματα, καθιστώντας με αυτό τον τρόπο πιο εύκολη την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Το μπλε χρώμα αναπαριστά τη χαμηλή συγκέντρωση ενός μεταβολίτη, ενώ το κόκκινο χρώμα την υψηλή συγκέντρωση. Η συγκέντρωση των πρώτων 5 ενώσεων μειώνεται με τη πάροδο του χρόνου, ενώ η συγκέντρωση των υπολοίπων 20 παρουσιάζει αυξητική τάση.



Διάγραμμα 3. Θερμικός χάρτης (Heatmap) αποτελεσμάτων HCA που απεικονίζει την ομαδοποίηση των σημαντικότερων μεταβολιτών (βάσει των VIP Scores) μεταξύ των διαφορετικών κλάσεων δειγμάτων (1,2,3,4,5,6,7,8) όπως περιγράφονται στον Πίνακα 13. Τα έγχρωμα κελιά απεικονίζουν τη σχετική αφθονία του κάθε μεταβολίτη. Το μπλε χρώμα αντιστοιχεί σε χαμηλή σχετική αφθονία και όσο μεταβάλλεται προς το κόκκινο χρώμα η σχετική αφθονία του μεταβολίτη αυξάνεται.

Στο Διάγραμμα 4 απεικονίζεται η συσχέτιση μεταξύ των δειγμάτων. Η αρνητική συσχέτιση συμβολίζεται με μπλε χρώμα, ενώ η θετική με κόκκινο. Τα δείγματα που ανήκουν στις κλάσεις 1 έως 3 και αντιστοιχούν σε χρόνους 5 h έως 144 h από την ωστοκία (βρίσκονται στο άνω μέρος του κάθετου άξονα και αριστερά στον οριζόντιο) παρουσιάζουν αρνητική συσχέτιση με τα δείγματα που ανήκουν στις κλάσεις 6-8, οι οποίες αντιστοιχούν σε χρόνους από 408 h έως 576 h (βρίσκονται στο κάτω μέρος του κάθετου άξονα και δεξιά στον οριζόντιο).

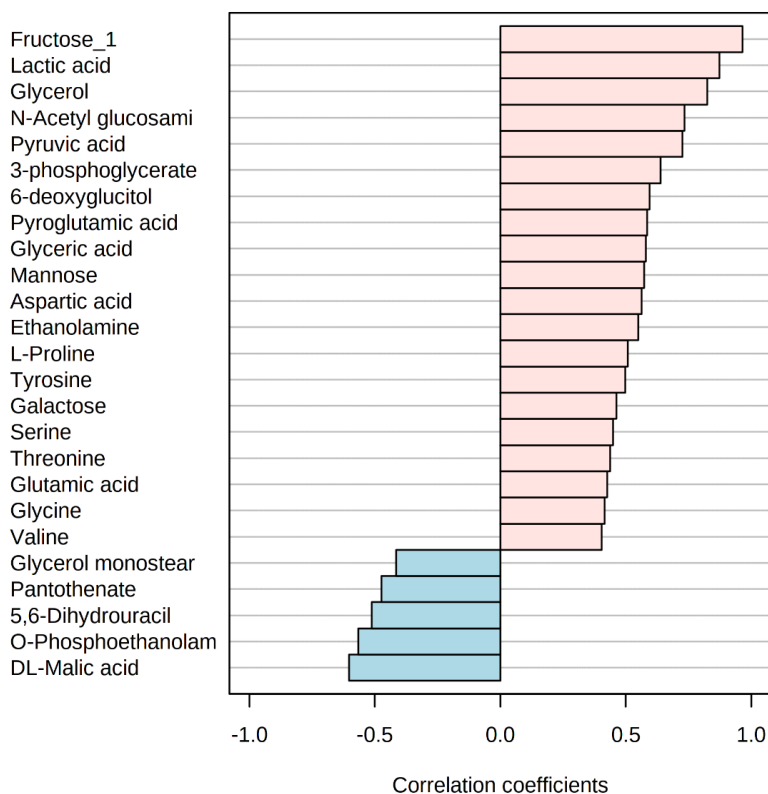
Η συσχέτιση μεταξύ των κλάσεων 4 και 5 που αντιστοιχούν στις 217 h και 312 h (βρίσκονται στη μέση του κάθετου άξονα και στη μέση του οριζώντιου) και των κλάσεων 1 έως 3 είναι ασαφής. Ομοίως ισχύει για τη συσχέτιση των κλάσεων 4 και 5 με τις κλάσεις 6 έως 8.



Διάγραμμα 4. Θερμικός χάρτης (Heatmap) που απεικονίζει την συσχέτιση μεταξύ των δειγμάτων. Η κλίμακα χρώματος αντιπροσωπεύει τους συντελεστές συσχέτισης όπως προέκυψαν από την ανάλυση συσχέτισης Pearson r . Με κόκκινο και μπλε απεικονίζεται η θετική και αρνητική συσχέτιση αντίστοιχα.

Ένα ακόμα εργαλείο του Metaboanalyst αποτελεί το Pattern Hunter το οποίο αποδίδει τη πιθανή συσχέτιση κάποιων μεταβολιτών με κάποιο συγκεκριμένο μοτίβο. Το Διάγραμμα 5 προέκυψε μετά από συσχέτιση του μοτίβου 1-2-3-4-5-6-7-8 με τους 25 πιο σημαντικούς μεταβολίτες και χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση των μεταβολιτών που αυξάνονται γραμμικά σε σχέση με το χρόνο σε ένα σύνολο δεδομένων με 8 σημεία (8 κλάσεις δειγμάτων, μία για κάθε χρονικό σημείο δειγματοληψίας). Οι μεταβολίτες με ροζ χρώμα εμφανίζουν θετική συσχέτιση (δηλαδή αυξάνεται η σχετική αφθονία τους με τη πάροδο του χρόνου από την ωτοκία), ενώ αυτοί με γαλάζιο αρνητική (δηλαδή μειώνεται η σχετική αφθονία τους με τη πάροδο του χρόνου από την ωτοκία).

Top 25 compounds correlated with the 1-2-3-4-5-6-7-8



Διάγραμμα 5. Οι 25 σημαντικότεροι μεταβολίτες που συσχετίζονται (θετικά ή αρνητικά) με το μοτίβο (1-2-3-4-5-6-7-8), όπως προέκυψαν από ανάλυση συσχέτισης Pearson r . Με ροζ χρώμα απεικονίζονται οι μεταβολίτες που αυξάνεται η σχετική αφθονία τους κατά την πάροδο του χρόνου από την ωτοκία, ενώ με γαλάζιο όσοι μειώνεται η σχετική αφθονία τους. Ο άξονας x απεικονίζει την τιμή του συντελεστή συσχέτισης.

β) Πολυμεταβλητή ανάλυση με βάση το χαρακτηρισμό «εξαιρετικά φρέσκα»

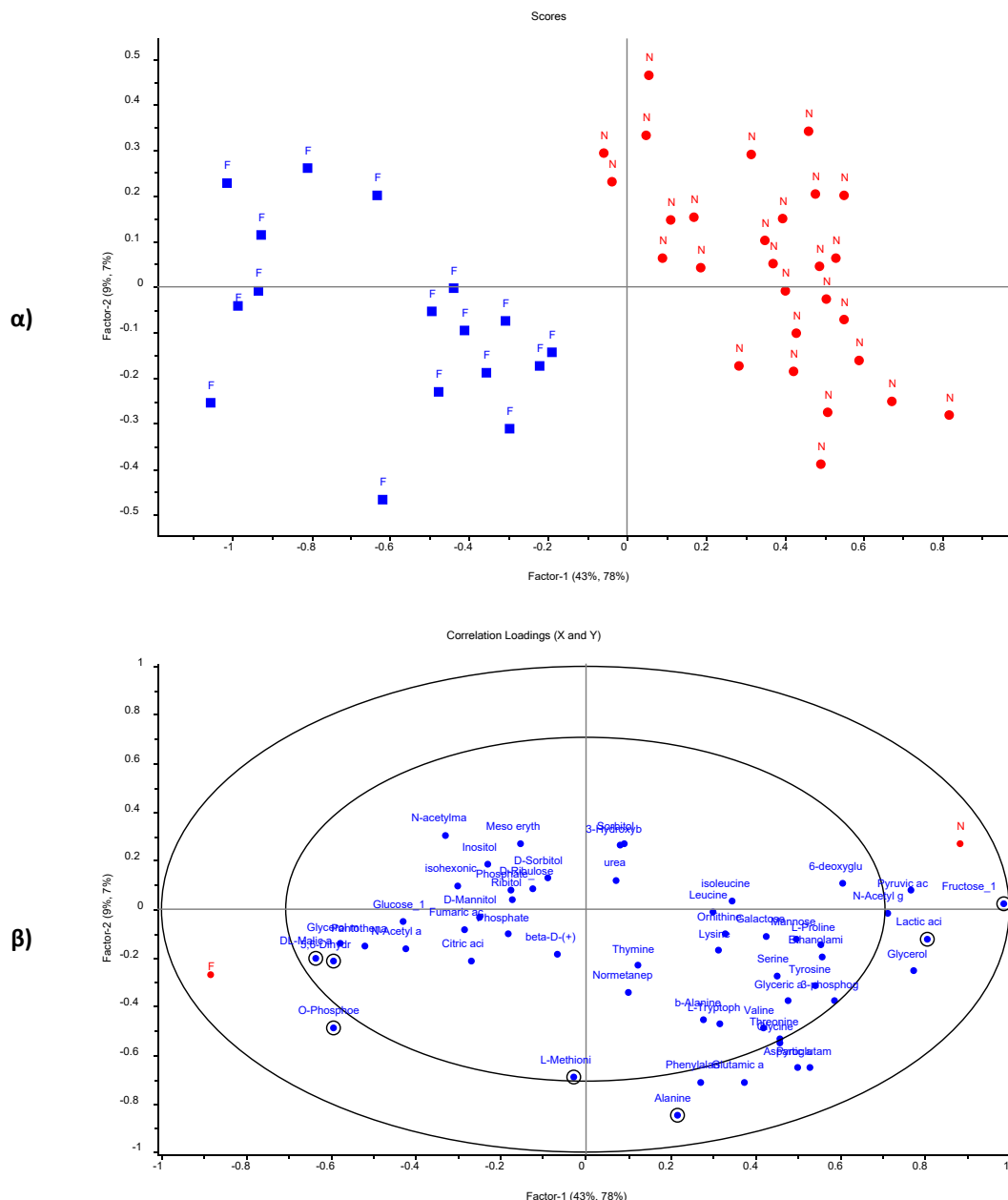
Στη συνέχεια, η στατιστική ανάλυση των δειγμάτων επαναλήφθηκε με τα δείγματα χωρισμένα σε 2 κατηγορίες (κλάσεις) όπως απεικονίζεται στον Πίνακα 14.

Η κατηγοριοποίηση αυτή κατατάσσει θεωρητικά τα αυγά σε «εξαιρετικά φρέσκα» (Κλάση F) και «μη εξαιρετικά φρέσκα» (Κλάση N), δεδομένου ότι οι 217 ώρες (4^ο σημείο δειγματοληψίας) αντιστοιχούν σε περίπου 9 ημέρες από την ωτοκία, δηλαδή το μέγιστο χρονικό διάστημα σύμφωνα με το οποίο τα αυγά μπορούν να χαρακτηριστούν ως «εξαιρετικά φρέσκα» σύμφωνα με τη νομοθεσία (ΕΚ 589/2008).

Πίνακας 14. Κατηγοριοποίηση των δειγμάτων αυγών ανάλογα με το χαρακτηρισμό «εξαιρετικά φρέσκα».

Κλάση	Ώρες από την ωτοκία				
	5	73	144	504	576
F					
N	217	312	408	504	576

Στο Διάγραμμα 6.α απεικονίζεται η ανάλυση με PLS-DA των δεδομένων σύμφωνα με την κατηγοριοποίηση του Πίνακα 14. Παρατηρείται διαχωρισμός μεταξύ των δειγμάτων που θεωρούνται «εξαιρετικά φρέσκα» (Κλάση F) και «μη εξαιρετικά φρέσκα» (Κλάση N) βάσει του χρονικού διαστήματος που έχει παρέλθει από την ωτοκία. Οι κύριες συστατώσεις που προέκυψαν από την ανάλυση με PLS-DA είναι αποτέλεσμα της μεγιστοποίησης της συνδιακύμανσης μεταξύ των αρχικών δεδομένων (X) και της κατηγορίας που ανήκουν (Y).



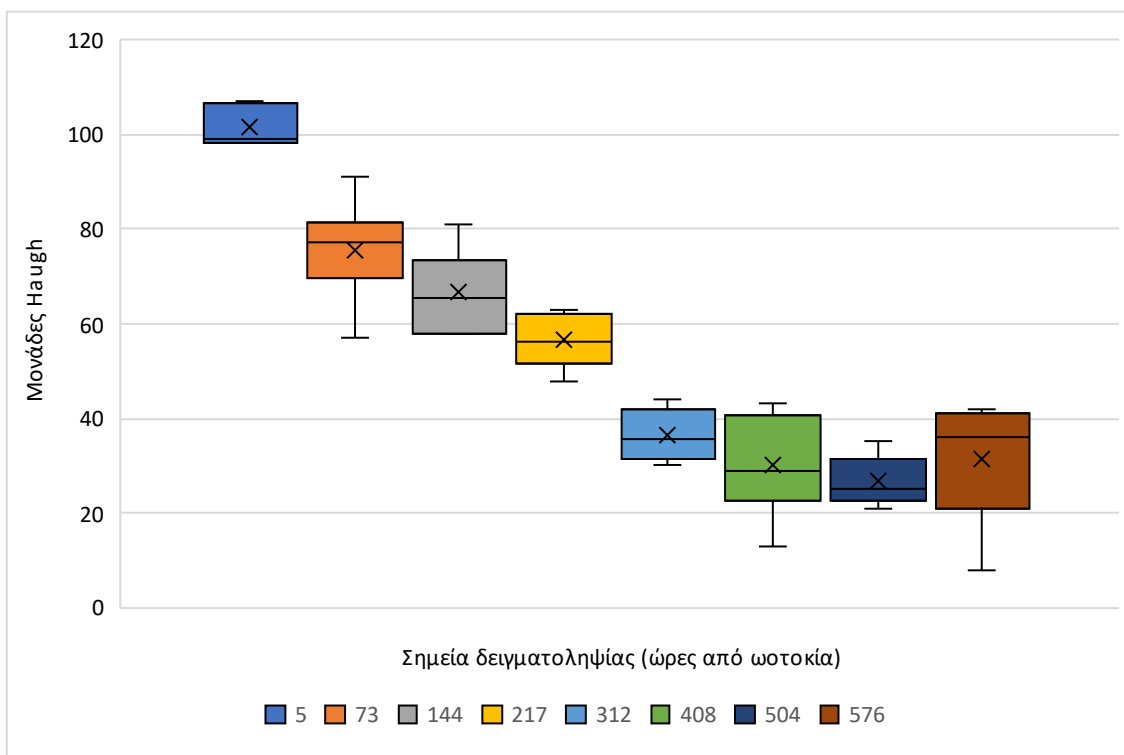
Διάγραμμα 6. α) Γράφημα των βαθμών της διακριτικής ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων PLS-DA (scores plot) βάσει των υδρόφιλων μεταβολιτών σε αυγά συντηρημένα στους 24°C. β) Γράφημα συσχετίσεων των φορτίων της διακριτικής ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων PLS-DA (correlation loadings). Οι κλάσεις (F, N) των δειγμάτων περιγράφονται στον Πίνακα 14.

Στο Διάγραμμα 6.β απεικονίζεται η συσχέτιση των μεταβολιτών μεταξύ τους. Σύμφωνα με το διάγραμμα αυτό, επιβεβαιώνεται ότι η φρουκτόζη (*Fructose_1*) αποτελεί τον πιο

σημαντικό μεταβολίτη για τον διαχωρισμό των «εξαιρετικά φρέσκων» αυγών από τα «μη εξαιρετικά φρέσκα» (το σχετικό περιεχόμενό της αυξάνει κατά τη διάρκεια της συντήρησης). Στο ίδιο διάγραμμα απεικονίζονται και άλλοι μεταβολίτες που είναι σημαντικοί για τον παραπάνω διαχωρισμό και συσχετίζονται θετικά με τη φρουκτόζη (γαλακτικό οξύ, γλυκερόλη, πυροσταφυλικό οξύ, N-ακετυλο γλυκοζαμίνη), ενώ ανιχνεύεται και ένας σημαντικός μεταβολίτης που συσχετίζεται αρνητικά με τη φρουκτόζη (το σχετικό περιεχόμενό του μειώνεται κατά τη διάρκεια της συντήρησης), η Ο-φωσφοαιθανολαμίνη.

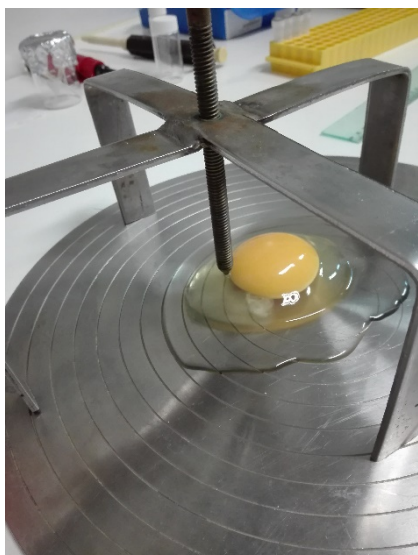
3.3. Μονάδες Haugh

Στο Διάγραμμα 7 απεικονίζεται η μεταβολή των μονάδων Haugh συναρτήσει του χρόνου που έχει παρέλθει από την ωτοκία. Παρατηρείται μία γραμμική μείωση των μονάδων Haugh μέχρι τις 408 ώρες (17 ημέρες), ενώ στη συνέχεια δεν μεταβάλλονται σημαντικά.



Διάγραμμα 7. Θηκόγραμμα που αναπαριστά τις μονάδες Haugh συναρτήσει του χρόνου από την ωτοκία (συνολικά 8 χρονικά σημεία δειγματοληψίας).

Ενδεικτικά, στην Εικόνα 6 παρουσιάζεται η διαφοροποίηση των χαρακτηριστικών της αλβουμίνης για αυγά ημέρας ωτοκίας και της τελευταίας ημέρας δειγματοληψίας.



(α)



(β)

Εικόνα 6. Εικόνα αυγών κατά τη μέτρηση των μονάδων Haugh: (α) την ημέρα της ωοτοκίας - 1ο σημείο δειγματοληψίας και (β) 24 ημέρες από την ωοτοκία - 8ο σημείο δειγματοληψίας.

Στον Πίνακα 15 καταγράφεται ο μέσος όρος των μονάδων Haugh σε κάθε σημείο δειγματοληψίας. Για την κατάταξη των δειγμάτων ακολουθήθηκε η παραλλαγή της ταξινόμησης βάσει του προτύπου USDA AMS 56 (2000) σε 4 κατηγορίες: AA ($HU \geq 72$), A ($60 \leq HU \leq 71$), B ($31 \leq HU \leq 59$) και C ($HU \leq 30$).

Πίνακας 15. Κατάταξη σε κατηγορίες ποιότητας των δειγμάτων αυγών, βάσει των μονάδων Haugh.

Σημείο δειγματοληψίας	Ώρες από την ωοτοκία	Μέση τιμή μονάδων Haugh	Κατηγορία ποιότητας (παραλλαγή USDA)
1	5	102	AA
2	73	76	AA
3	144	67	A
4	217	57	B
5	312	37	B
6	408	30	C
7	504	27	C
8	576	31	C

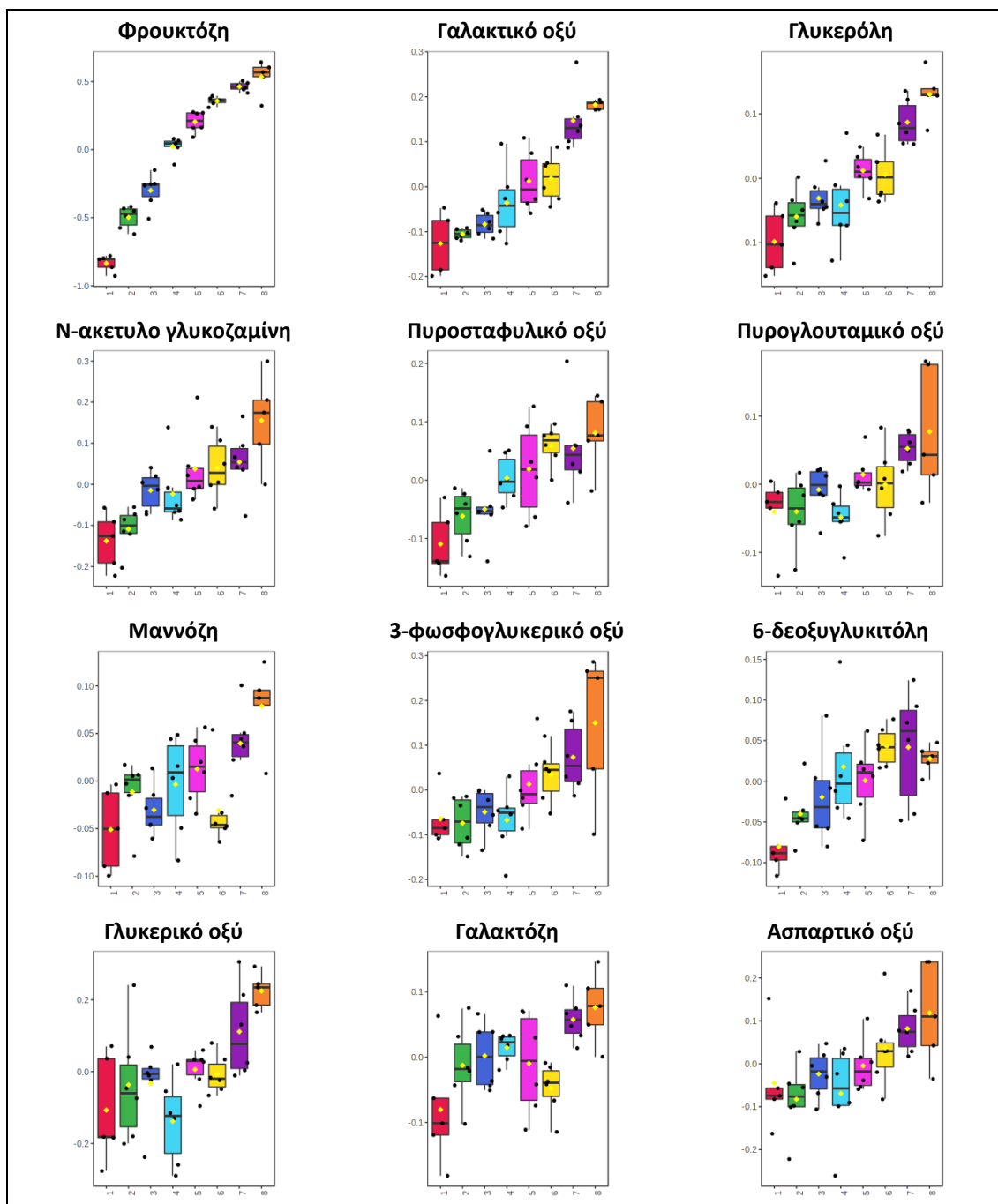
3.4. Μεταβολές στη συγκέντρωση των σημαντικότερων μεταβολιτών

Οι σημαντικότεροι μεταβολίτες, όπως προέκυψαν μετά από πολυμεταβλητή ανάλυση (Kruskal-Wallis ANOVA, PCA, συσχέτιση Pearson r , Θερμικοί χάρτες και VIP Scores όπως προκύπτουν από τη PLS-DA) για την κατηγοριοποίηση των δειγμάτων ανάλογα με το σημείο δειγματοληψίας όπως περιγράφεται στον Πίνακα 13, εντάσσονται σε διάφορες κατηγορίες χημικών ενώσεων.

Οι μεταβολίτες αυτοί διακρίνονται σε δύο κύριες κατηγορίες:

1. Μεταβολίτες των οποίων η συγκέντρωση παρουσιάζει αυξητική τάση κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης (βλ. Διάγραμμα 8).

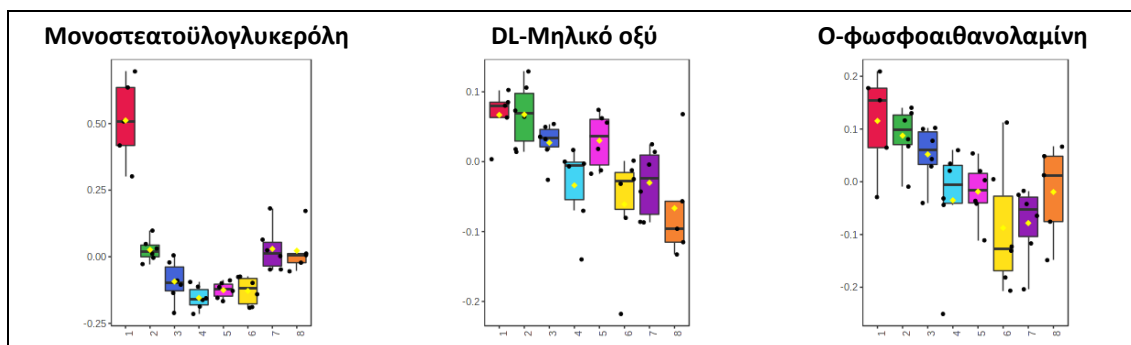
2. Μεταβολίτες των οποίων η συγκέντρωση παρουσιάζει μειούμενη τάση κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης (βλ. Διάγραμμα 9).



Διάγραμμα 8. Μεταβολή της συγκέντρωσης των στατιστικά σημαντικών μεταβολιτών που αυξάνονται κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης των αυγών. Ο κάθετος άξονας παριστάνει την κανονικοποιημένη τιμή της συγκέντρωσης του μεταβολίτη. Ο οριζόντιος άξονας παριστάνει τις κλάσεις όπως αναφέρονται στον Πίνακα 13.

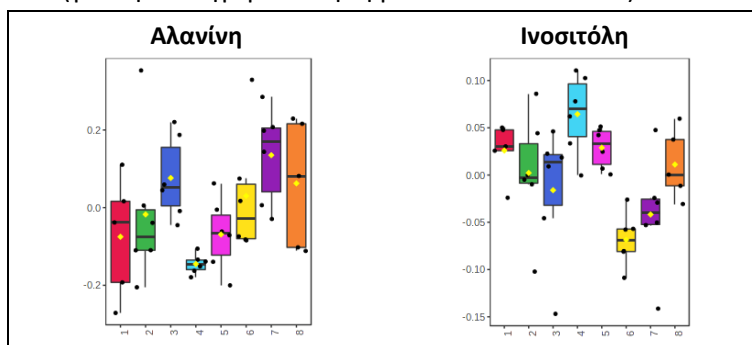
Στην πρώτη κατηγορία εντάσσονται μονοσακχαρίτες (φρουκτόζη, μαννόζη, γαλακτόζη) και ένα παράγωγο αμίδιο μονοσακχαρίτη (N-ακετυλο γλυκοζαμίνη), οργανικά οξέα (γαλακτικό οξύ, πυροσταφυλικό οξύ, 3-φωσφογλυκερικό οξύ, γλυκερικό οξύ) και αμινοξέα (ασπαρτικό οξύ) και ένα παράγωγο αμινοξέος (πυρογλουταμικό οξύ, γνωστό και ως 5-οξοπρόλίνη). Επιπλέον εντάσσονται δύο πολυόλες (γλυκερόλη, 6-δεοξυγλυκικό οξύ).

Στη δεύτερη κατηγορία εντάσσονται η μονοστεατοϋλογλυκερόλη, το μηλικό οξύ και η Ο-φωσφοαιθανολαμίνη.



Διάγραμμα 9. Μεταβολή της συγκέντρωσης των στατιστικά σημαντικών μεταβολιτών που μειώνονται κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης των αυγών. Ο κάθετος άξονας παριστάνει την κανονικοποιημένη τιμή της συγκέντρωσης του μεταβολίτη. Ο οριζόντιος άξονας παριστάνει τις κλάσεις όπως αναφέρονται στον Πίνακα 13.

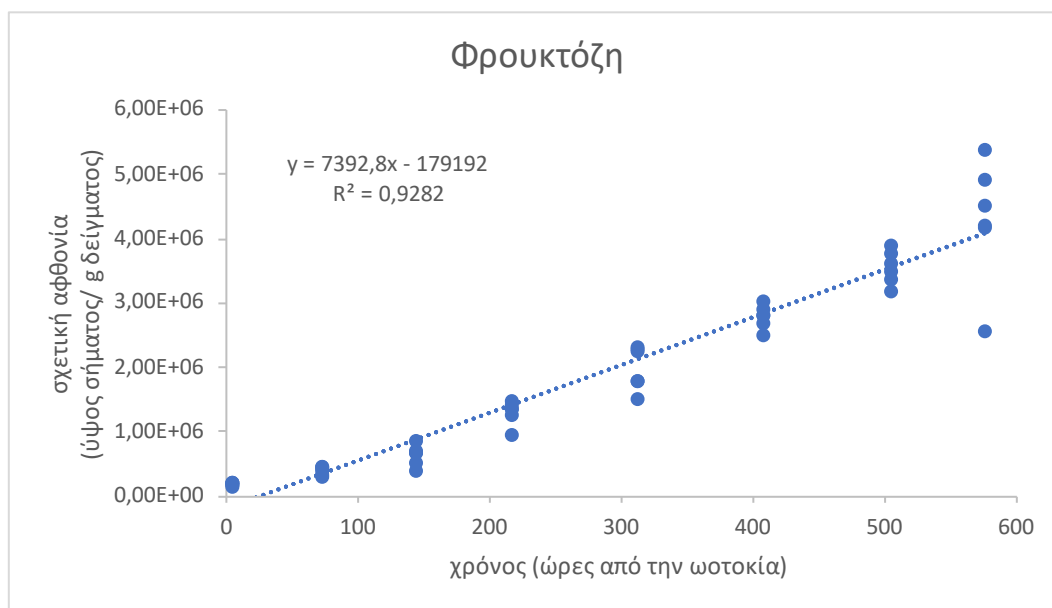
Η αλανίνη και η ινοσιτόλη αποτελούν ξεχωριστή περίπτωση καθώς δεν εμφανίζουν σαφή μεταβολή (βλ. Διάγραμμα 10). Η ινοσιτόλη ειδικότερα, αν και αναδείχτηκε ως στατιστικά σημαντική ένωση με ανάλυση ANOVA, βάσει των VIP Scores δεν συνεισέφερε σημαντικά στο μοντέλο της PLS-DA (για την κατηγοριοποίηση βάσει του Πίνακα 13).



Διάγραμμα 10. Μεταβολή της συγκέντρωσης της αλανίνης και της ινοσιτόλης κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης των αυγών. Ο κάθετος άξονας παριστάνει την κανονικοποιημένη τιμή της συγκέντρωσης της ινοσιτόλης. Ο οριζόντιος άξονας παριστάνει τις κλάσεις όπως αναφέρονται στον Πίνακα 13.

Από τους παραπάνω μεταβολίτες, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η φρουκτόζη καθώς, όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 11, η αύξησή της είναι γραμμική σε σχέση με τη πάροδο του χρόνου από την ωοτοκία με υψηλό συντελεστή συσχέτισης ($R^2 = 0,9282$). Υπενθυμίζεται ότι σύμφωνα με το γράφημα συσχετίσεων των φορτίων των κύριων συνιστωσών PCA (correlation loadings plot - Διάγραμμα 1.β) και τα VIP-Scores όπως προκύπτουν από την ανάλυση με PLS-DA (Διάγραμμα 2), η φρουκτόζη φαίνεται να είναι, με σημαντική διαφορά από τους υπόλοιπους μεταβολίτες, ο πιο σημαντικός μεταβολίτης που περιγράφει την εξέλιξη της αλλοίωσης των αυγών. Επιπλέον, σύμφωνα με το γράφημα συσχετίσεων των φορτίων της διακριτικής ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων PLS-DA (correlation loadings - Διάγραμμα 6.β), η φρουκτόζη αποτελεί τον πιο σημαντικό μεταβολίτη για τον διαχωρισμό των «εξαιρετικά φρέσκων» και «μη εξαιρετικά φρέσκων» αυγών.

Με βάση τα παραπάνω, η φρουκτόζη μπορεί να προταθεί ως πιθανός δείκτης αλλοίωσης (ή φρεσκότητας) των αυγών.



Διάγραμμα 11. Γράφημα της σχετικής αφθονίας της φρουκτόζης συναρτήσει του χρόνου που έχει παρέλθει από την ωτοκία σε ώρες (συνολικά 8 σημεία δειγματοληψίας όπως περιγράφονται στον Πίνακα 12).

Όσον αφορά τους υπόλοιπους υδατάνθρακες που ανιχνεύτηκαν, η γαλακτόζη και η μαννόζη παρουσιάζουν παρόμοια μεταβολή κατά τη διάρκεια του χρόνου με μία απότομη μείωση στην 6^η δειγματοληψία και μία επακόλουθη αύξηση στην 7^η και 8^η (βλ. Διάγραμμα 8).

Οι Ogura et al. (2020) ανίχνευσαν φρουκτόζη, μαννόζη, γλυκόζη και ινοσιτόλη τόσο στον κρόκο όσο και στην αλβουμίνη του αυγού καθώς και φωσφορική-6-φρουκτόζη στην αλβουμίνη. Σύμφωνα με αυτή τη μελέτη ο υδατάνθρακας που υπήρχε σε μεγαλύτερη αφθονία στον κρόκο και στην αλβουμίνη ήταν η γλυκόζη. Ωστόσο, μετά από θερμική επεξεργασία του αυγού (βρασμός) παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της φρουκτόζης στην αλβουμίνη παράλληλα με μείωση της γλυκόζης, πιθανότατα λόγω της αύξησης του ισομερισμού της γλυκόζης.

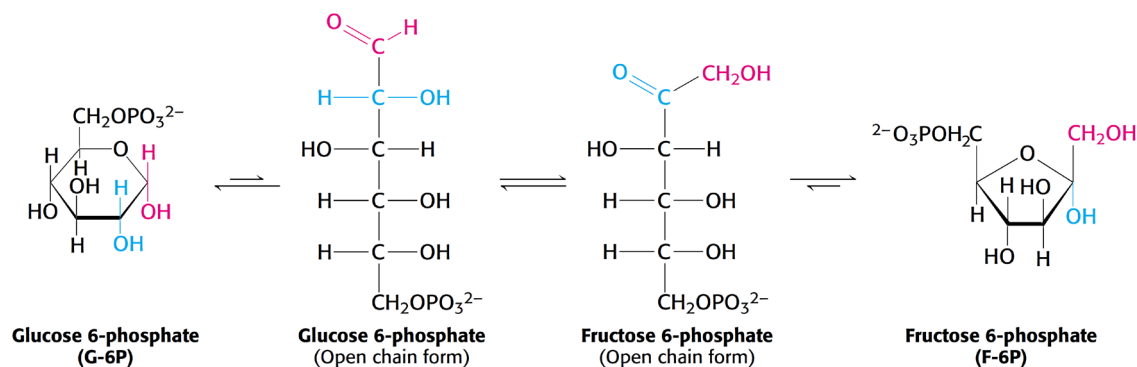
Όπως προαναφέρθηκε, σύμφωνα με τους Belitz et al. (2009), Li-Chan and Kim (2008), οι υδατάνθρακες που ανιχνεύονται στα αυγά είναι σε πολύ μικρό ποσοστό (0,3-1%) και βρίσκονται κατά κύριο λόγο στην αλβουμίνη του αυγού, είτε δεσμευμένοι με πρωτεΐνες, είτε ελεύθεροι. Στους ελεύθερους υδατάνθρακες συγκαταλέγεται κυρίως η γλυκόζη και σε μικρότερα ποσοστά η μαννόζη, η γαλακτόζη κ.ά, αλλά όχι η φρουκτόζη. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί πως οι υδατάνθρακες μπορούν να αποτελέσουν περισσότερο από το 60% του βάρους της γλυκοπρωτεΐνης (Jan et al., 2018).

Επιπλέον, όσον αφορά την ταυτοποίηση των παραπάνω ενώσεων, οι Mastrangelo et al. (2015) αναφέρουν πως η ταυτοποίηση μονοσακχαριτών όπως π.χ. γλυκόζη, αλλόζη, μαννόζη, καθώς και της φωσφορικής-6-φρουκτόζης (και άλλων φωσφορικών σακχάρων) είναι αμφιλεγόμενη λόγω σχηματισμού ισομερών και μειωμένης απόδοσης της παραγωγοποίησης ή μετασχηματισμών αντίστοιχα.

Με βάση τα παραπάνω, όσον αφορά την αύξηση της μεταβολής της φρουκτόζης, μπορεί να υποθεθεί με επισφάλεια ο ισομερισμός της γλυκόζης σε φρουκτόζη ως μέρος του κύκλου

γλυκόλυσης που μετατρέπει τη γλυκόζη σε πυροσταφυλικό οξύ. Αναλυτικότερα, μόλις η γλυκόζη εισέρχεται στα κύτταρα φωσφορυλιώνεται από ATP και μετατρέπεται σε φωσφορική-6-γλυκόζη (glucose 6-phosphate), η οποία στη συνέχεια ισομερίζεται σε φωσφορική-6-φρουκτόζη (fructose 6-phosphate) (βλ. Σχήμα 7).

Στην παραπάνω άποψη συνεισφέρει επίσης το γεγονός ότι το πυροσταφυλικό οξύ, το οποίο αποτελεί προϊόν της γλυκόλυσης, συσχετίζεται θετικά με τη φρουκτόζη (σύμφωνα με το Διάγραμμα 1.β - γράφημα συσχετίσεων PCA), και σημειώνει αύξηση με τη πάροδο του χρόνου.



Σχήμα 7. Γλυκόλυση (Berg et al., 2002)

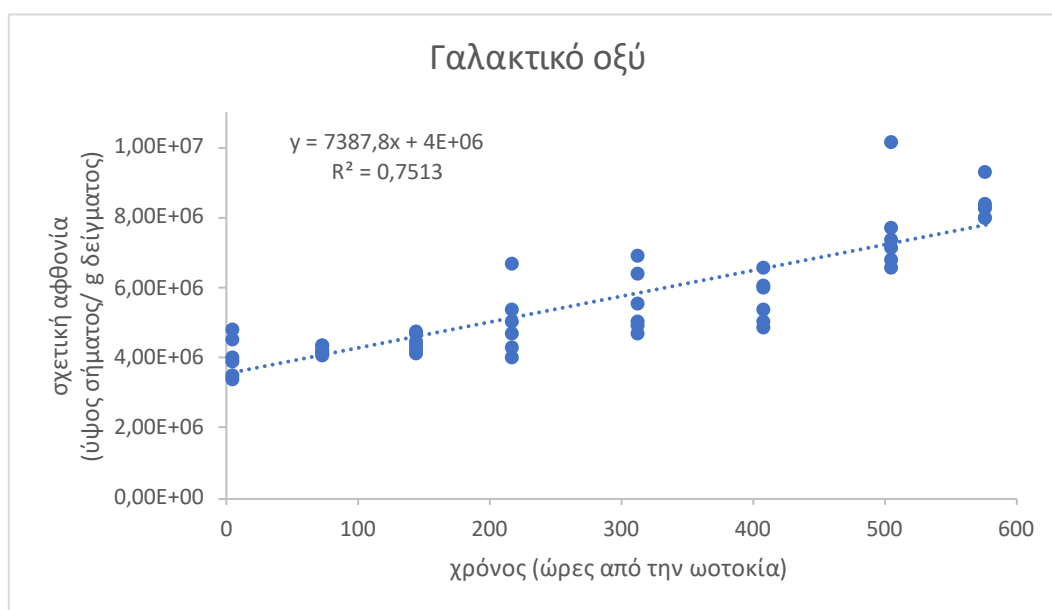
Μία άλλη πιθανή εξήγηση για την αύξηση της φρουκτόζης, της γαλακτόζης και τη μαννόζης, αποτελεί η απελευθέρωσή τους από τις πρωτεΐνες της αλβουμίνης του αυγού (Belitz et al., 2009). Η μη συμπερίληψη της γλυκόζης στους σημαντικούς μεταβολίτες, ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι η γλυκόζη απαντάται κυρίως ελεύθερη στην αλβουμίνη του αυγού (98% ελεύθερων υδατανθράκων) (Belitz et al., 2009) και κατά συνέπεια δεν μεταβάλλεται σημαντικά.

Αξίζει να αναφερθεί πως η Ν-ακετυλο γλυκοζαμίνη, ένα αμιδικό παράγωγο της γλυκόζης, επίσης σημειώνει αύξηση με τη πάροδο του χρόνου (βλ. Διάγραμμα 8), ενώ σύμφωνα με το Διάγραμμα 1.β (γράφημα συσχετίσεων PCA) συσχετίζεται θετικά με τη φρουκτόζη. Η Ν-ακετυλο γλυκοζαμίνη ανιχνεύεται στην εξωκυτταρική μήτρα ζωικών κυττάρων, ως μέρος πολλών διαφορετικών πολυμερών σακχάρων (Κοπορκα, 2012). Επιπλέον, η αύξηση της συγκέντρωσης του μεταβολίτη αυτού με το χρόνο μπορεί να οφείλεται στην αποδεύσμευσή του από πρωτεΐνες της αλβουμίνης του αυγού όπως π.χ. ωοαλβουμίνη, ωοτρανσφερίνη, α-ωομυκίνη (Belitz et al., 2009). Ειδικότερα όσον αφορά την ωομυκίνη, όπως προαναφέρθηκε, τροποποιήσεις στη δομή της και αλληλεπιδράσεις αυτών με τη λυσοζύμη της αλβουμίνης του αυγού συνεπάγονται την αύξηση του pH της αλβουμίνης και υγροποίηση της παχύρρευστης αλβουμίνης με τη πάροδο του χρόνου (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 50).

Όσον αφορά τα οργανικά οξέα, το πυρογλουταμικό οξύ (ή 5-οξοπρολίνη) που ανιχνεύτηκε, επίσης αυξάνεται με τη πάροδο του χρόνου (βλ. Διάγραμμα 8). Ο μεταβολίτης αυτός έχει ήδη προταθεί ως δείκτης φρεσκότητας των αυγών, καθώς αυξάνεται με τη πάροδο του χρόνου (Karoui et al., 2006a). Ωστόσο, η θερμοευαισθησία του και η φυσική του μεταβλητότητα αποτελούν σημαντικά μειονεκτήματα της χρήσης του ως δείκτη φρεσκότητας (Coat et al., 2018). Το πυρογλουταμικό οξύ αποτελεί τη κυκλική λακτάμη (lactam) του γλουταμικού οξέος και σχηματίζεται από τη γλουταθειόνη μέσω ενός ενζύμου (κύκλος γ-γλουταμυλίου) (Kumar & Bachhawat, 2011). Η γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπτίδιο από κυστεΐνη, γλουταμινικό οξύ και γλυκίνη (Alanazi et al., 2015). Ο ρόλος του πυρογλουταμικού

οξύς στον μεταβολισμό των κυττάρων δεν έχει ακόμα διασαφηνιστεί πλήρως (Kumar & Bachhawat, 2011).

Όσον αφορά το γαλακτικό οξύ, το μοναδικό επί του παρόντος αξιόπιστο δείκτη φρεσκότητας των προϊόντων αυγών βάσει της ευρωπαϊκής νομοθεσίας, στη παρούσα μελέτη αυξάνεται με τη πάροδο του χρόνου, αλλά όχι γραμμικά (συντελεστής συσχέτισης $R^2 = 0,7513$) όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 12, ενώ όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 8 σημειώνει μία απότομη αύξηση από την 6^η στην 7^η δειγματοληψία. Επιπλέον, σύμφωνα με το Διάγραμμα 1.β (γράφημα συσχετίσεων PCA) συσχετίζεται θετικά με τη φρουκτόζη. Αξίζει ωστόσο να σημειωθεί ότι ακόμα και στην αρχή της συντήρησης των αυγών, τα επίπεδα του γαλακτικού οξέος είναι σχετικά υψηλά, όπως υποδηλώνει η τεταγμένη της ευθείας παλινδρόμησης. Αντιθέτως, η φρουκτόζη είτε δεν ανιχνεύεται ή προσδιορίζεται σε ίχνη σε αυγά ημέρας (Διάγραμμα 11).



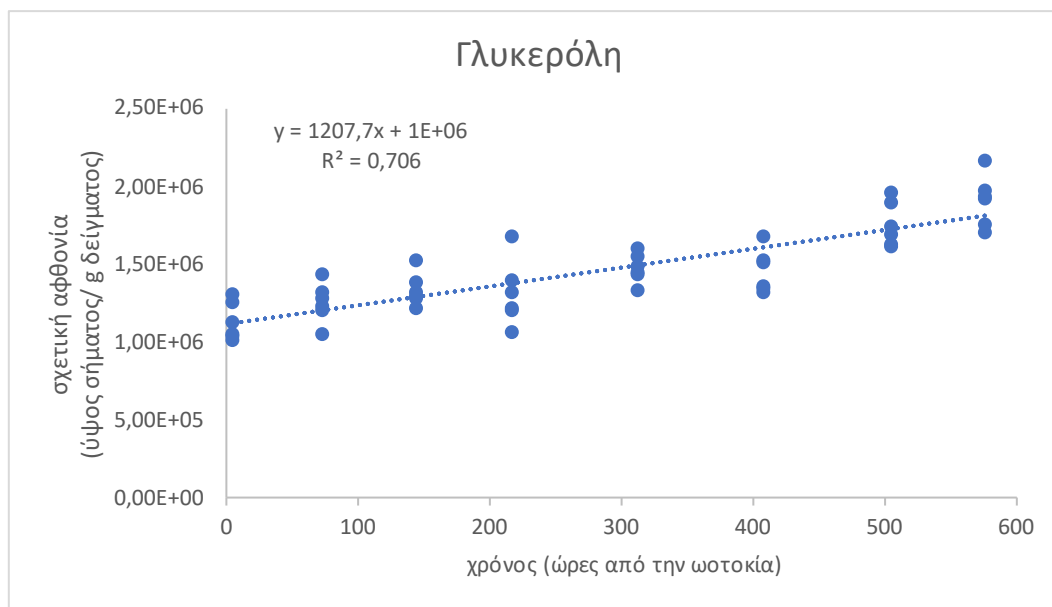
Διάγραμμα 12. Γράφημα της σχετικής αφθονίας του γαλακτικού οξέος συναρτήσει του χρόνου που έχει παρέλθει από την ωτοκία σε ώρες (συνολικά 8 σημεία δειγματοληψίας όπως περιγράφονται στον Πίνακα 12).

Υπενθυμίζεται ότι το γαλακτικό οξύ συσχετίζεται με τη μικροβιακή ανάπτυξη, αλλά λόγω της μη γραμμικής του αύξησης με το χρόνο αποτελεί «καθυστερημένο δείκτη» (Cavanna et al., 2018; Cavanna et al., 2019; Renzone et al., 2021).

Όσον αφορά το μεταβολισμό, το γαλακτικό οξύ προκύπτει από τη γλυκόζη μετά από οξείδωση του πυροσταφυλικού οξέος από την γαλακτική αφυδρογονάση κατά την αναερόβια γλυκόλυση (Bender, 2003).

Αξίζει να σημειωθεί ότι το ηλεκτρικό οξύ, το οποίο παλαιότερα αποτελούσε νομοθετικό κριτήριο στην ΕΕ για τα προϊόντα αυγών, δεν συγκαταλέγεται στους σημαντικούς μεταβολίτες της αλλοίωσης των αυγών όπως προέκυψαν από την παρούσα μελέτη. Το 3-υδροξυ-βουτυρικό οξύ, το οποίο χρησιμοποιείται ως δείκτης ανίχνευσης γονιμοποιημένων αυγών σύμφωνα με την ευρωπαϊκή νομοθεσία (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 50), επίσης δεν συγκαταλέγεται στους σημαντικούς μεταβολίτες της παρούσας μελέτης.

Ένα ακόμη μεταβολίτη με ενδιαφέρον αποτελεί η γλυκερόλη, η οποία αυξάνεται με τη πάροδο του χρόνου με παρόμοιο τρόπο με το γαλακτικό οξύ, όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 13. Η γλυκερόλη μπορεί να προέκυψε από την υδρόλυση τριγλυκεριδίων με λιπάσες (Jan et al., 2018).



Διάγραμμα 13. Γράφημα της σχετικής αφθονίας της γλυκερόλης συναρτήσει του χρόνου που έχει παρέλθει από την ωστοκία σε ώρες (συνολικά 8 σημεία δειγματοληψίας όπως περιγράφονται στον Πίνακα 12).

Άλλοι μεταβολίτες που πιθανότατα συνδέονται με τη δράση λιπασών αποτελούν η μονοστεατοϋλογλυκερόλη και η Ο-φωσφοαιθανολαμίνη. Η πρώτη σημειώνει απότομη μείωση από την 1^η στη 2^η δειγματοληψία και αυξάνεται μεταξύ της 6^{ης} και 7^{ης} δειγματοληψίας (βλ. Διάγραμμα 9). Ο μεταβολίτης αυτός είναι ένα μονογλυκερίδιο που είναι πιθανό να προέκυψε από τη δράση λιπασών σε τριγλυκερίδια ή φωσφολιπίδια του κρόκου που περιείχαν στεατικό οξύ. Το στεατικό οξύ είναι ένα κορεσμένο λιπαρό οξύ και αποτελεί περίπου το 14% των λιπαρών οξέων του κρόκου (Jan et al., 2018).

Η Ο-φωσφοαιθανολαμίνη σημειώνει πιο γραμμική μείωση με τη πάροδο του χρόνου (βλ. Διάγραμμα 9).

Υπενθυμίζεται ότι τα λιπίδια είναι τα κύρια συστατικά (32 - 36%) του κρόκου (Li-Chan & Kim, 2008; Nys & Guyot, 2011), ενώ η σύσταση των λιπιδίων του κρόκου γενικά είναι περίπου 65% τριγλυκερίδια, 28-30% φωσφολιπίδια και 4-5% χοληστερίνη (Li-Chan & Kim, 2008; Nys & Guyot, 2011; Sunwoo & Gujral, 2015). Σχεδόν όλα τα λιπίδια βρίσκονται σε συμπλέγματα λιποπρωτεϊνών (Nys & Guyot, 2011). Επίσης, αξίζει να αναφερθεί ότι η σύνθεση των πολυακόρεστων και μονοακόρεστων λιπαρών οξέων του κρόκου επηρεάζεται από τη διατροφή των ορνίθων, ενώ το ίδιο δεν ισχύει και για τα κορεσμένα λιπαρά οξέα όπως το στεατικό (Jan et al., 2018).

Σύμφωνα με μελέτη των Qingling et al. (2017) σε αυγά αποθηκευμένα στους 4°C και 22°C για 50 ημέρες, δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική αλλαγή στα προφίλ των

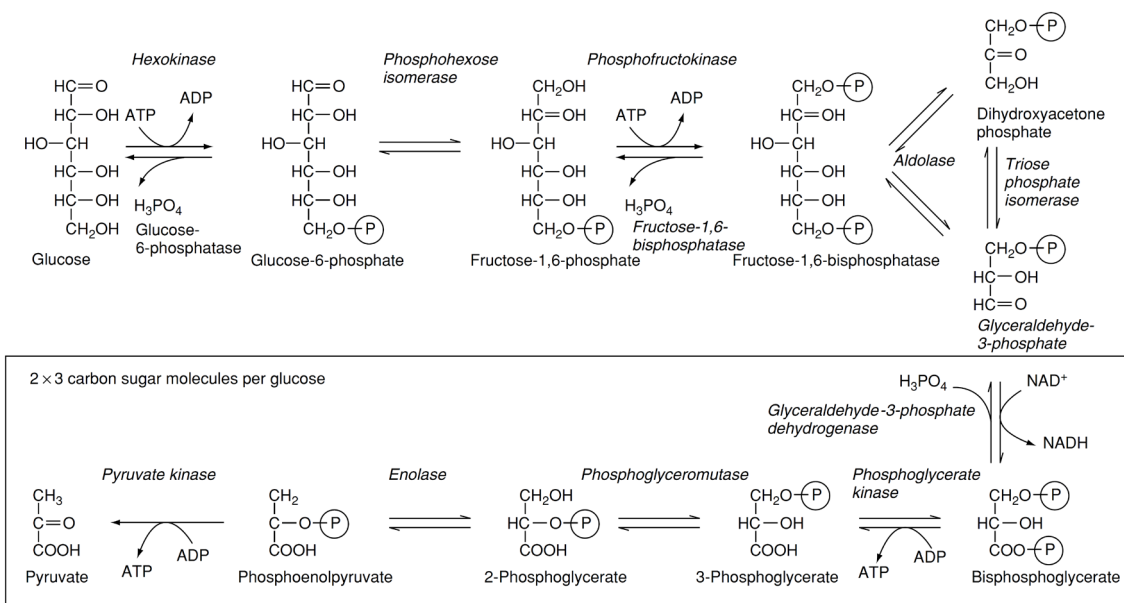
λιπιδίων αλλά σύμφωνα με την ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων προέκυψε ότι μειώθηκε σημαντικά η συγκέντρωση των φωσfolιπιδίων (φωσφατιδυλοχολίνη, φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη και φωσφατιδυλοϊνσιτόλη) λόγω υδρολυτικής δράσης της λιπάσης με παράλληλη αύξηση των ελεύθερων λιπαρών οξέων (Jan et al., 2018).

Το στεατικό οξύ αποτελεί το 12% των κορεσμένων λιπαρών οξέων στην φωσφατιδυλοφυλοχολίνη και το 26% στην φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (Jan et al., 2018). Τη δράση φωσfolιπασών στην φωσφατιδυλοχολίνη και στη φωσφατιδυλοϊνσιτόλη αναφέρουν επίσης οι Johnson et al. (2018) και οι (Majerus et al., 1988) αντίστοιχα.

Με βάση τα παραπάνω μπορεί να υποτεθεί ότι η μονοστεατοϋλογλυκερόλη και η Ο-φωσφοαιθανολαμίνη προέκυψαν από τη δράση λιπασών. Η μειούμενη τάση τους με τη πάροδο του χρόνου πιθανότατα οφείλεται στον μετασηματισμό τους σε άλλα προϊόντα με κάποιο άγνωστο μηχανισμό. Επιπλέον, πιθανό είναι και το ενδεχόμενο λανθασμένης ταυτοποίησής τους (χαμηλό επίπεδο MSI, βλ. Παράρτημα Π3).

Το μηλικό οξύ είναι ένα ενδιάμεσο προϊόν του κύκλου του κιτρικού οξέος (Lee et al., 2019). Ο μεταβολίτης αυτός μειώνεται με τη πάροδο του χρόνου (βλ. Διάγραμμα 9).

Το γλυκερικό οξύ αποτελεί προϊόν της οξειδωσης της γλυκερόλης, ενώ τα φωσφορικά παράγωγά του όπως το 3-φωσφογλυκερικό οξύ, είναι σημαντικά βιοχημικά ενδιάμεσα στη γλυκόλυση (Bender, 2003). Οι δύο αυτοί μεταβολίτες σημειώνουν αύξηση με τη πάροδο του χρόνου (βλ. Διάγραμμα 8).

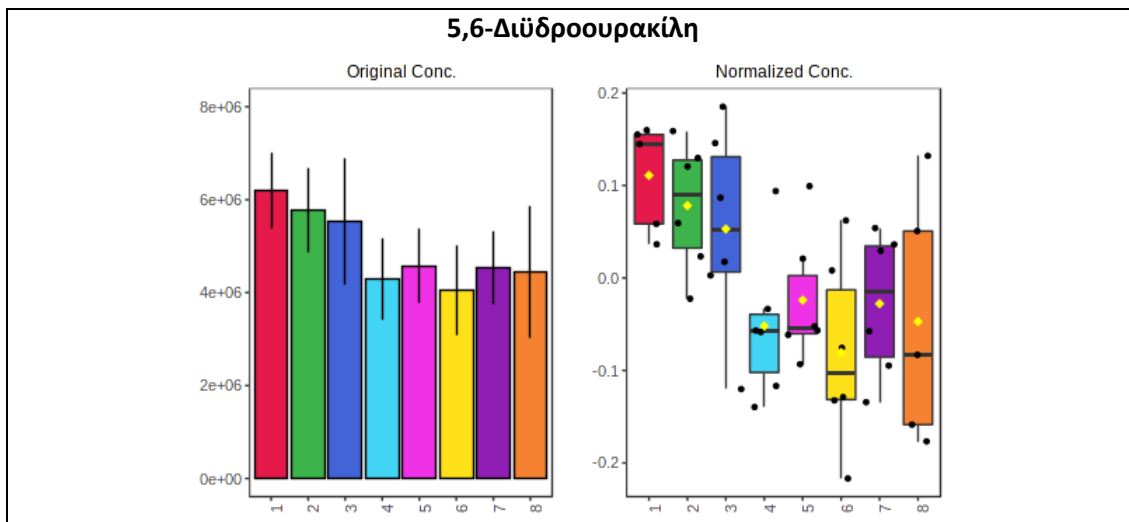


Σχήμα 8. Η βιοχημική οδός της γλυκόλυσης (Bender, 2003)

Τέλος, ένας μεταβολίτης που αναδείχθηκε σημαντικός μόνο μέσω των VIP Scores και όχι της ANOVA, αποτελεί η 5,6-διϋδροουρακίλη. Ο μεταβολίτης αυτός ανήκει στις πυριμιδόνες (ενώσεις με δακτύλιο πυριμιδίνης ο οποίος περιέχει κετονομάδα) και αποτελεί ενδιάμεσο του καταβολισμού της ουρακίλης (Blanco & Blanco, 2017). Η ουρακίλη δεν ανιχνεύεται φυσικώς στα αυγά (Jan et al., 2018) και συνδέεται με την καταλυτική δραστηριότητα βακτηριακών νουκλεοσιδικών φωσφορυλάσεων στην ουριδίνη του αυγού (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 63). Ο μεταβολίτης αυτός αυξάνεται με τη πάροδο του χρόνου στα προϊόντα αυγών,

αλλά έχει κριθεί ως αναποτελεσματικός δείκτης της φρεσκότητάς τους καθώς το όριο ανίχνευσής του αντιστοιχεί σε υψηλό μικροβιακό φορτίο (EFSA Panel on Biological Hazards, 2014, p. 63).

Στην παρούσα μελέτη, η 5,6-διϋδροουρακίλη μειώνεται με τη πάροδο του χρόνου στα αυγά όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 14.



Διάγραμμα 14. Μεταβολή της συγκέντρωσης της 5,6-διϋδροουρακίλης κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης των αυγών. Ο κάθετος άξονας παριστάνει την κανονικοποιημένη τιμή της συγκέντρωσης του μεταβολίτη. Ο οριζόντιος άξονας παριστάνει τις κλάσεις όπως αναφέρονται στον Πίνακα 13.

Όπως προαναφέρθηκε, οι μελέτες που σχετίζονται με τη μεταβολωμική ανάλυση για την αξιολόγηση της φρεσκότητας των αυγών ωοπαραγωγών ορνίθων είναι ελάχιστες προς το παρόν. Επιπλέον, ελάχιστοι είναι και οι δείκτες αλλοίωσης-φρεσκότητας που είτε καθιερώνονται από τη νομοθεσία, είτε προτείνονται από τη βιβλιογραφία τόσο για ολόκληρα αυγά όσο και για προϊόντα αυγών. Κατά συνέπεια, ελάχιστοι από τους σημαντικούς μεταβολίτες που ανιχνεύτηκαν στην παρούσα εργασία μπόρεσαν να συγκριθούν. Ωστόσο, η ταυτοποίηση μεταβολιτών με γραμμική αύξηση με τη πάροδο του χρόνου όπως η φρουκτόζη, υπογραμμίζει τις δυνατότητες που παρουσιάζει η μεταβολωμική για την ανίχνευση αξιόπιστων δεικτών αλλοίωσης-φρεσκότητας στα αυγά.

4. Συμπεράσματα

Στην παρούσα μελέτη, ο προσδιορισμός του πολικού κλάσματος των μεταβολιτών των αυγών (κρόκος και αλβουμίνη) ωπααραγωγών ορνίθων με χρήση GC/MS σε συνδυασμό με τη χρήση μεθόδων πολυμεταβλητής στατιστικής ανάλυσης, αποδείχθηκε ένα εργαλείο με πολλές δυνατότητες για την ανίχνευση των μεταβολών που λαμβάνουν χώρα σε μοριακό επίπεδο με τη πάροδο του χρόνου.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα της PCA για την κατηγοριοποίηση των δειγμάτων βάσει του χρονικού σημείου δειγματοληψίας (βλ. Πίνακα 13), ο διαχωρισμός της κλάσης 1, που αντιστοιχούσε στα δείγματα της ημέρας της ωτοκίας, είναι εμφανής, ενώ οι υπόλοιπες κλάσεις διαχωρίζονται ικανοποιητικώς. Η συνιστώσα PC1 φαίνεται να περιγράφει σε σημαντικό βαθμό το χρόνο συντήρησης των αυγών και επομένως την μεταβολή της φρεσκότητάς τους. Ο διαχωρισμός των δειγμάτων όπως προέκυψε από την PLS-DA για την κατηγοριοποίηση των δειγμάτων με βάση τον χαρακτηρισμό των αυγών ως «εξαιρετικά φρέσκα» ή «μη εξαιρετικά φρέσκα» (βλ. Πίνακα 14) ήταν καλύτερος. Και στις δύο κατηγοριοποιήσεις, ο πιο σημαντικός μεταβολίτης που περιέγραφε την αλλοίωση ήταν η φρουκτόζη.

Από την στατιστική ανάλυση με βάση την κατηγοριοποίηση των δειγμάτων ανά χρονικό σημείο δειγματοληψίας προέκυψαν 17 σημαντικοί μεταβολίτες εκ των οποίων 12 είχαν αυξανόμενη τάση, 3 μειούμενη και 2 ασαφή. Η φρουκτόζη ήταν ο μοναδικός μεταβολίτης με γραμμική μεταβολή με τη πάροδο του χρόνου (αύξηση) και κατά συνέπεια μπορεί να προταθεί ως πιθανός δείκτης αξιολόγησης της φρεσκότητας των αυγών. Το γαλακτικό οξύ που αποτελεί το μοναδικό δείκτη φρεσκότητας των προϊόντων αυγών όπως ορίζεται από την ευρωπαϊκή νομοθεσία ανιχνεύθηκε επίσης αλλά χωρίς γραμμική μεταβολή, αποτέλεσμα το οποίο επιβεβαιώνεται από την βιβλιογραφία.

Οι μονάδες Haugh σημείωσαν φθίνουσα τάση μέχρι τη 17^η ημέρα από την ωτοκία, ενώ στη συνέχεια δεν διαφοροποιήθηκαν σημαντικά.

Η αξιολόγηση της φρεσκότητας των αυγών χρήζει περεταίρω ανάλυσης καθώς μέχρι στιγμής επαφίεται σε μεθόδους με περιορισμένη αξιοπιστία όπως η αξιολόγηση ποιοτικών χαρακτηριστικών (π.χ. μονάδες Haugh) δεδομένου ότι έχουν καθιερωθεί ελάχιστοι δείκτες φρεσκότητας-αλλοίωσης, οι οποίοι συνήθως αποτελούν ένδειξη σημαντικής υποβάθμισης και δεν προβλέπουν την εξέλιξη της αλλοίωσης των αυγών. Η χρήση της μεταβολωμικής παρουσιάζει πολλές δυνατότητες για την επίλυση του προβλήματος αυτού καθώς αποτελεί μία μέθοδο που μπορεί να εξετάσει πολλές παραμέτρους (μεταβολίτες) ταυτόχρονα και κατά συνέπεια μπορεί, μέσω συσχέτισης με ορισμένα ποιοτικά χαρακτηριστικά, να ανιχνεύσει ισχυρούς χημικούς δείκτες αλλοίωσης-φρεσκότητας των αυγών.

Στη παρούσα μελέτη, η φρουκτόζη αναδείχθηκε ως πιθανός δείκτης της φρεσκότητας-αλλοίωσης των αυγών. Ωστόσο, για τον ορισμό του μεταβολίτη αυτού ως αξιόπιστου δείκτη, απαιτούνται περεταίρω μελέτες εκλεκτικής απομόνωσης, ταυτοποίησης και ποσοτικοποίησής του στα αυγά ωπααραγωγών ορνίθων.

5. Βιβλιογραφία

- Abdanan Mehdizadeh, S., Minaei, S., Hancock, N. H., & Karimi Torshizi, M. A. (2014). An intelligent system for egg quality classification based on visible-infrared transmittance spectroscopy. *Information Processing in Agriculture*, 1(2), 105-114.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.inpa.2014.10.002>
- Alanazi, A. M., Mostafa, G. A. E., & Al-Badr, A. A. (2015). Chapter Two - Glutathione. In H. G. Brittain (Ed.), *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology* (Vol. 40, pp. 43-158). Academic Press.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.podrm.2015.02.001>
- Allochio Filho, J. F., Macrino, C. J., Oliveira, B. G., Jr, V. L., & Romão, W. (2021). 2.05 - Ambient Ionization Mass Spectrometry in Food Metabolomics. In A. Cifuentes (Ed.), *Comprehensive Foodomics* (pp. 54-76). Elsevier.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22776-5>
- Aszyk, J., Byliński, H., Namieśnik, J., & Kot-Wasik, A. (2018). Main strategies, analytical trends and challenges in LC-MS and ambient mass spectrometry-based metabolomics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 108, 278-295.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.09.010>
- Beebe, K. R., Pell, R. J., & Seasholtz, M. B. (1998). *Chemometrics : a practical guide*. Wiley.
- Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). *Food chemistry* (4th rev. and extended ed.). Springer.
- Bender, D. A. (2003). GLUCOSE | Function and Metabolism. In B. Caballero (Ed.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)* (pp. 2904-2911). Academic Press.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00558-7>
- Berg, J. M., Tymoczko, J., & Stryer, L. (2002). Glycolysis is an energy-conversion pathway in many organisms. *Biochemistry. 5th ed. New York: WH Freeman*.
- Bijlsma, S., Bobeldijk, I., Verheij, E. R., Ramaker, R., Kochhar, S., Macdonald, I. A., Van Ommen, B., & Smilde, A. K. (2006). Large-scale human metabolomics studies: a strategy for data (pre-) processing and validation. *Analytical Chemistry*, 78(2), 567-574.
- Blanco, A., & Blanco, G. (2017). Chapter 18 - Purine and Pyrimidine Metabolism. In A. Blanco & G. Blanco (Eds.), *Medical Biochemistry* (pp. 413-423). Academic Press.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803550-4.00018-5>
- Blume, K., Dietrich, K., Lilienthal, S., Ternes, W., & Drotleff, A. M. (2015). Exploring the relationship between protein secondary structures, temperature-dependent viscosities, and technological treatments in egg yolk and LDL by FTIR and rheology. *Food Chemistry*, 173, 584-593. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.084>
- Brereton, R. G. (2003). *Chemometrics: data analysis for the laboratory and chemical plant*. John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/0470863242>
- Castro-Puyana, M., Pérez-Míguez, R., Montero, L., & Herrero, M. (2017). Application of mass spectrometry-based metabolomics approaches for food safety, quality and traceability. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 93, 102-118.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.05.004>

- Cavanna, D., Catellani, D., Dall'Asta, C., & Suman, M. (2018). Egg product freshness evaluation: A metabolomic approach. *Journal of Mass Spectrometry*, 53(9), 849–861. <https://doi.org/10.1002/jms.4256>
- Cavanna, D., Zanardi, S., Dall'Asta, C., & Suman, M. (2019). Ion mobility spectrometry coupled to gas chromatography: A rapid tool to assess eggs freshness. *Food Chemistry*, 271, 691–696. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.204>
- Cevallos-Cevallos, J. M., Reyes-De-Corcuera, J. I., Etxeberria, E., Danyluk, M. D., & Rodrick, G. E. (2009). Metabolomic analysis in food science: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 20(11), 557-566. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.07.002>
- Chong, J., Soufan, O., Li, C., Caraus, I., Li, S., Bourque, G., Wishart, D. S., & Xia, J. (2018). MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W486-W494. <https://doi.org/10.1093/nar/gky310>
- Coat, R., Gouilleux, B., Thouand, G., Assaf, A., Arhaliass, A., Legrand, J., Thierry, A., Martineau, E., Courant, F., Giraudeau, P., & Gonçalves, O. (2018). 3 - Characterizing the Spoilage of Egg Products using Targeted and Non-targeted Approaches. In *Alteration of Ovoproducts: From Metabolomics to Online Control* (pp. 157–258). ISTE Press - Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78548-271-7.50003-1>
- Dalle Zotte, A., Berzaghi, P., Hedberg, L.-M., & Andrighetto, I. (2006). The Use of Near-Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) in the Prediction of Chemical Composition of Freeze-dried Egg Yolk and Discrimination Between Different n-3 PUFA Feeding Sources. *Animal Feed Science and Technology*, 128, 108-121. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.09.009>
- Deleu, L. J., Wilderjans, E., Van Haesendonck, I., Courtin, C. M., Brijs, K., & Delcour, J. A. (2015). Storage induced conversion of ovalbumin into S-ovalbumin in eggs impacts the properties of pound cake and its batter. *Food Hydrocolloids*, 49, 208-215. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.03.014>
- Dettmer, K., & Hammock, B. D. (2004). Metabolomics--a new exciting field within the " omics" sciences. *Environmental health perspectives*, 112(7), A396-A397.
- Dunn, W. B., Broadhurst, D., Begley, P., Zelena, E., Francis-McIntyre, S., Anderson, N., Brown, M., Knowles, J. D., Halsall, A., & Haselden, J. N. (2011). Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nature protocols*, 6(7), 1060-1083. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nprot.2011.335>
- Dutta, R., Hines, E. L., Gardner, J. W., Udrea, D. D., & Boilot, P. (2003). Non-destructive egg freshness determination: an electronic nose based approach. *Measurement Science and Technology*, 14(2), 190-198. <https://doi.org/10.1088/0957-0233/14/2/306>
- EFSA Panel on Biological Hazards. (2014). Scientific Opinion on the public health risks of table eggs due to deterioration and development of pathogens. *EFSA Journal*, 12(7), 3782. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3782>
- EGG-1 UNECE STANDARD EGGS-IN-SHELL 2017 EDITION. http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trade/agr/standard/eggs/Egg-1_EggsIn_Shell_Nov2017_E.docx
- EGG-2 UNECE STANDARD EGG PRODUCTS 2017 EDITION. http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trade/agr/standard/eggs/Egg-2_EggProducts_Nov2017_E.docx

- Emwas, A.-H., Al-Talla, Z., Yang, Y., & Kharbatia, N. (2015). Gas Chromatography–Mass Spectrometry of Biofluids and Extracts. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1277, 91-112. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2377-9_8
- Fiehn, O. (2002). Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes. *Functional genomics*, 155-171.
- Fiehn, O. (2007). Validated high quality automated metabolome analysis of Arabidopsis thaliana leaf disks. In *Concepts in plant metabolomics* (pp. 1-18). Springer.
- Fiehn, O. (2016). Metabolomics by Gas Chromatography-Mass Spectrometry: Combined Targeted and Untargeted Profiling. *Curr Protoc Mol Biol*, 114, 30.34.31-30.34.32. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb3004s114>
- Fredrickson, M. M., & Chen, Y. (2019). Permutation and randomization tests for network analysis. *Social Networks*, 59, 171-183.
- Furlan, P. Y., Scott, S. A., & Peaslee, M. H. (2007). FTIR-ATR Study of pH Effects on Egg Albumin Secondary Structure. *Spectroscopy Letters*, 40(3), 475-482. <https://doi.org/10.1080/00387010701295950>
- Giunchi, A., Berardinelli, A., Ragni, L., Fabbri, A., & Silaghi, F. A. (2008). Non-destructive freshness assessment of shell eggs using FT-NIR spectroscopy. *Journal of Food Engineering*, 89(2), 142-148. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.04.013>
- Gonzalez-Riano, C., Garcia, A., & Barbas, C. (2016). Metabolomics studies in brain tissue: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 130, 141-168. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.07.008>
- Goto, T., Mori, H., Shiota, S., & Tomonaga, S. (2019). Metabolomics approach reveals the effects of breed and feed on the composition of chicken eggs. *Metabolites*, 9(10), 224.
- Haugh Unit - Egg Tester. (n.d.). ORKA Food Technology. Retrieved 26/5/2021 from <https://eggtester.com/haugh-unit/>
- Heaney, R. K., & Curtis, R. F. (1976). Some further studies on incubator reject eggs. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 27(11), 1057-1063. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jsfa.2740271112>
- Hidalgo, A., Franzetti, L., Rossi, M., & Pompei, C. (2008). Chemical Markers for the Evaluation of Raw Material Hygienic Quality in Egg Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(4), 1289–1297. <https://doi.org/10.1021/jf072201t>
- Huang, Q., Qiu, N., Ma, M., Jin, Y., Yang, H., Geng, F., & Sun, S. (2012). Estimation of egg freshness using S-ovalbumin as an indicator. *Poultry Science*, 91(3), 739–743. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-01639>
- Jan, S., Baron, F., Coat, R., & Gonçalves, O. (2018). 2 - Spoilage of Egg Products. In *Alteration of Ovo products: From Metabolomics to Online Control* (pp. 51–156). ISTE Press - Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78548-271-7.50003-1>
- Johnson, A., Sidwick, K., Pirgozliev, V., Edge, A., & Thompson, D. (2018). Metabonomic Profiling of Chicken Eggs during Storage Using High-Performance Liquid Chromatography–Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 90(12), 7489–7494. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01031>
- Johnson, A., Sidwick, K., Pirgozliev, V., Edge, A., & Thompson, D. (2019). The use of metabonomics to uncover differences between the small molecule profiles of eggs from

- cage and barn housing systems. *Food Control*, 100, 165–170.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.01.023>
- Johnson, A., Sidwick, K., Pirgozliev, V., Edge, A., & Thompson, D. (2020). The effect of storage temperature on the metabolic profiles derived from chicken eggs. *Food Control*, 109, 106930. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106930>
- Karoui, R., De Ketelaere, B., Kemps, B., Bamelis, F., Mertens, K., & De Baerdemaeker, J. (2009). Eggs and Egg Products. In *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control* (pp. 399–414). Academic Press.
- Karoui, R., Kemps, B., Bamelis, F., De Ketelaere, B., Decuypere, E., & De Baerdemaeker, J. (2006a). Methods to evaluate egg freshness in research and industry: A review. *European Food Research and Technology*, 222(5-6), 727–732.
<https://doi.org/10.1007/s00217-005-0145-4>
- Karoui, R., Kemps, B., Bamelis, F., De Ketelaere, B., Merten, K., Schoonheydt, R., Decuypere, E., & De Baerdemaeker, J. (2006b). Development of a rapid method based on front face fluorescence spectroscopy for the monitoring of egg freshness: 1—evolution of thick and thin egg albumens. *Eur Food Res Technol*, 223, 303-312.
<https://doi.org/10.1007/s00217-005-0204-x>
- Kemps, B., Bamelis, F., De Ketelaere, B., Mertens, K., Tona, K., Decuypere, E., & De Baerdemaeker, J. (2006). Visible transmission spectroscopy for the assessment of egg freshness. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(9), 1399–1406.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.2528>
- Kemps, B., De Ketelaere, B., Bamelis, F., Mertens, K., Decuypere, E., De Baerdemaeker, J., & Schwägele, F. (2007). Albumen Freshness Assessment by Combining Visible Near-Infrared Transmission and Low-Resolution Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Poultry Science*, 86, 752-759. <https://doi.org/10.1093/ps/86.4.752>
- Kemsley, E. K., Le Gall, G., Dainty, J. R., Watson, A. D., Harvey, L. J., Tapp, H. S., & Colquhoun, I. J. (2007). Multivariate techniques and their application in nutrition: a metabolomics case study. *Br J Nutr*, 98(1), 1-14. <https://doi.org/10.1017/s0007114507685365>
- Konopka, J. B. (2012). N-Acetylglucosamine Functions in Cell Signaling. *Scientifica*, 2012, 489208. <https://doi.org/10.6064/2012/489208>
- Kumar, A., & Bachhawat, A. (2011). Pyroglutamic acid: Throwing light on a lightly studied metabolite. *Curr. Sci.*, 102.
- Lacalle-Bergeron, L., Izquierdo-Sandoval, D., Sancho, J. V., López, F. J., Hernández, F., & Portolés, T. (2021). Chromatography hyphenated to high resolution mass spectrometry in untargeted metabolomics for investigation of food (bio)markers. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 135, 116161.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116161>
- Laghi, L., Cremonini, M. A., Placucci, G., Sykora, S., Wright, K., & Hills, B. (2005). A proton NMR relaxation study of hen egg quality. *Magnetic Resonance Imaging*, 23(3), 501-510.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mri.2004.12.003>
- Lee, J. A., Ahn, J. H., & Lee, S. Y. (2019). 3.15 - Organic Acids: Succinic and Malic Acids☆. In M. Moo-Young (Ed.), *Comprehensive Biotechnology (Third Edition)* (pp. 172-187). Pergamon. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64046-8.00159-2>
- Li-Chan, E. C. Y., & Kim, H.-O. (2008). Structure and Chemical Composition of Eggs. In Y. Mine (Ed.), *Egg bioscience and biotechnology*. John Wiley & Sons.

- Li, J., Zhu, S., Jiang, S., & Wang, J. (2017). Prediction of egg storage time and yolk index based on electronic nose combined with chemometric methods. *LWT - Food Science and Technology*, 82, 369–376. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.04.070>
- Lin, H., Zhao, J., Sun, L., Chen, Q., & Zhou, F. (2011). Freshness measurement of eggs using near infrared (NIR) spectroscopy and multivariate data analysis. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12(2), 182-186. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ifset.2011.01.008>
- Little, J. L. (1999). Artifacts in trimethylsilyl derivatization reactions and ways to avoid them. *Journal of Chromatography A*, 844(1-2), 1-22.
- Liu, X., & Locasale, J. W. (2017). Metabolomics: a primer. *Trends in biochemical sciences*, 42(4), 274-284. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2017.01.004>
- Liu, Y., Ren, X., Yu, H., Cheng, Y., Guo, Y., Yao, W., & Xie, Y. (2020). Non-destructive and online egg freshness assessment from the egg shell based on Raman spectroscopy. *Food Control*, 118, 107426. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107426>
- Liu, Y., Ying, Y., Ouyang, A., & Li, Y. (2007). Measurement of internal quality in chicken eggs using visible transmittance spectroscopy technology. *Food Control*, 18, 18-22. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.07.011>
- Lubbe, A., Ali, K., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2013). NMR-Based Metabolomics Analysis. In M. Lämmerhofer & W. Weckwerth (Eds.), *Metabolomics in Practice - Successful Strategies to Generate and Analyze Metabolic Data* (pp. 209-238). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Majerus, P., Connolly, T., Bansal, V. S., Inhorn, R., Ross, T., & Lips, D. (1988). Inositol phosphates: Synthesis and Degradation. *The Journal of biological chemistry*, 263, 3051-3054. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)69030-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)69030-1)
- Martelo-Vidal, M. J., & Vázquez, M. (2014). Determination of polyphenolic compounds of red wines by UV–VIS–NIR spectroscopy and chemometrics tools. *Food Chemistry*, 158, 28-34. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.080>
- Mastrangelo, A., Ferrarini, A., Rey-Stolle, F., García, A., & Barbas, C. (2015). From sample treatment to biomarker discovery: A tutorial for untargeted metabolomics based on GC-(EI)-Q-MS. *Analytica Chimica Acta*, 900, 21-35. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.10.001>
- Mertens, K., Kemp, B., Perianu, C., De Baerdemaeker, J., Decuypere, E., & De Ketelaere, B. (2011). Advances in egg defect detection, quality assessment and automated sorting and grading. In Y. Nys, M. Bain, & F. Van Immerseel (Eds.), *Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products: Volume 1: Egg Chemistry, Production and Consumption* (Vol. 1, pp. 209-241). Woodhead Publishing.
- Mi, S., Shang, K., Zhang, C.-H., & Fan, Y.-Q. (2019). Characterization and discrimination of selected chicken eggs in China's retail market based on multi-element and lipidomics analysis. *Food Research International*, 126, 108668.
- Morris, C. (1987). Determination of uracil, uridine and formic acid in egg products by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 394(2), 408–413. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)94196-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)94196-2)
- Nys, Y., & Guyot, N. (2011). Egg formation and chemistry. In Y. Nys, M. Bain, & F. Van Immerseel (Eds.), *Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products: Volume 1: Egg Chemistry, Production and Consumption* (Vol. 1, pp. 83-132). Woodhead Publishing.

- Ogura, T., Wakayama, M., Ashino, Y., Kadowaki, R., Sato, M., Soga, T., & Tomita, M. (2020). Effects of feed crops and boiling on chicken egg yolk and white determined by a metabolome analysis. *Food Chemistry*, 327, 127077.
- Onuh, J. O., & Aluko, R. E. (2019). Metabolomics as a tool to study the mechanism of action of bioactive protein hydrolysates and peptides: A review of current literature. *Trends in Food Science & Technology*, 91, 625-633.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.08.002>
- Parsons, A. (1982). Structure of the eggshell. *Poultry Science*, 61(10), 2013-2021.
<https://doi.org/10.3382/ps.0612013>
- Pereira Braga, C., & Adamec, J. (2019). Metabolome Analysis. In S. Ranganathan, M. Gribskov, K. Nakai, & C. Schönbach (Eds.), *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology* (pp. 463-475). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20134-9>
- Putnik, P., Granato, D., Da Cruz, A. G., Rodionova, O. Y., Pomerantsev, A., Rocchetti, G., Lucini, L., & Kovacevic, D. B. (2019). Trends in chemometrics and meat products. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science,
- Qingling, W., Guofeng, J., Ning, W., Xin, G., Yongguo, J., & Meihu, M. (2017). Lipolysis and oxidation of lipids during egg storage at different temperatures. *Czech Journal of Food Sciences*, 35(3), 229-235.
- Renzone, G., Novi, G., Scaloni, A., & Arena, S. (2021). Monitoring aging of hen egg by integrated quantitative peptidomic procedures. *Food Research International*, 140, 110010. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.110010>
- Ruiz-Perez, D., Guan, H., Madhivanan, P., Mathee, K., & Narasimhan, G. (2020). So you think you can PLS-DA? *BMC Bioinformatics*, 21(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s12859-019-3310-7>
- Samuelsson, L., & Larsson, J. (2008). Contributions from metabolomics to fish research. *Molecular bioSystems*, 4, 974-979. <https://doi.org/10.1039/b804196b>
- Sanchez-Ruiz, J. M., & Martinez-Carrion, M. (1988). A Fourier-transform infrared spectroscopic study of the phosphoserine residues in hen egg phosvitin and ovalbumin. *Biochemistry*, 27(9), 3338-3342. <https://doi.org/10.1021/bi00409a033>
- Sarker, S. D., & Nahar, L. (2015). Chapter 19 - Applications of High Performance Liquid Chromatography in the Analysis of Herbal Products. In P. K. Mukherjee (Ed.), *Evidence-Based Validation of Herbal Medicine* (pp. 405-425). Elsevier.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800874-4.00019-2>
- Schwägele, F. C. (2011). Egg quality assurance schemes and egg traceability. In Y. Nys & N. Guyot (Eds.), *Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products: Volume 1: Egg Chemistry, Production and Consumption* (Vol. 1, pp. 62-80). Woodhead Publishing.
- Sharaf Eddin, A., Ibrahim, S., & Tahergorabi, R. (2019). Egg quality and safety with an overview of edible coating application for egg preservation. *Food Chemistry*, 296, 29–39.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.182>
- Suman, M., Cavanna, D., Zerbini, M., Ricchetti, D., Sanfelici, D., Cavandoli, E., & Mirone, L. (2018). Eggs and egg products. In *FOODINTEGRITY HANDBOOK A GUIDE TO FOOD AUTHENTICITY ISSUES AND ANALYTICAL SOLUTIONS* (pp. 27–41). Eurofins Analytics France. <https://doi.org/10.32741/fihb>

- Suman, M., Riani, G., & Dalcanale, E. (2007). MOS-based artificial olfactory system for the assessment of egg products freshness. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 125(1), 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2007.01.031>
- Sunwoo, H., & Gujral, N. (2015). Chemical Composition of Eggs and Egg Products. In P. C. K. Cheung & B. M. Mehta (Eds.), *Handbook of Food Chemistry* (pp. 331-363). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-36605-5_28
- Tan, W., Zhang, Q., Yang, L., Tian, L., Jia, J., Lu, M., Liu, X., & Duan, X. (2020). Actual time determination of egg freshness: A centroid rate based approach. *Food Packaging and Shelf Life*, 26, 100574. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100574>
- Trygg, J., & Wold, S. (2002). Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). *Journal of Chemometrics*, 16(3), 119-128. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cem.695>
- Tsugawa, H., Cajka, T., Kind, T., Ma, Y., Higgins, B., Ikeda, K., Kanazawa, M., VanderGheynst, J., Fiehn, O., & Arita, M. (2015). MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. *Nature methods*, 12(6), 523-526.
- USDA. (2000). United States Standards, Grades, and Weight Classes for Shell Eggs AMS 56. https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/Shell_Egg_Standard%5B1%5D.pdf
- van den Berg, R. A., Hoefsloot, H. C. J., Westerhuis, J. A., Smilde, A. K., & van der Werf, M. J. (2006). Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics*, 7(1), 142. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-142>
- van Ruth, S., Alewijn, M., Rogers, K., Newton-Smith, E., Tena, N., Bollen, M., & Koot, A. (2011). Authentication of organic and conventional eggs by carotenoid profiling. *Food Chemistry*, 126(3), 1299-1305. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.081>
- Vinaixa, M., Schymanski, E. L., Neumann, S., Navarro, M., Salek, R. M., & Yanes, O. (2016). Mass spectral databases for LC/MS- and GC/MS-based metabolomics: State of the field and future prospects. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 78, 23-35. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.09.005>
- Watkins, B. A. (1995). The Nutritive Value of the Egg. In W. J. Stadelman & O. J. Cotterill (Eds.), *Egg Science and Technology* (4th ed., pp. 177-194). Food Products Press.
- Wehling, R. L., Pierce, M. M., & Froning, G. W. (1988). Determination of Moisture, Fat and Protein in Spray-Dried Whole Egg by Near Infrared Reflectance Spectroscopy. *Journal of Food Science*, 53(5), 1355-1359. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1988.tb09276.x>
- Wishart, D. S. (2008). Metabolomics: applications to food science and nutrition research. *Trends in Food Science & Technology*, 19(9), 482-493. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.03.003>
- Wold, S., Sjöström, M., & Eriksson, L. (2001). PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*, 58(2), 109-130.
- Xia, J., Sinelnikov, I. V., Han, B., & Wishart, D. S. (2015). MetaboAnalyst 3.0—making metabolomics more meaningful. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), W251-W257. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv380>
- Xia, J., & Wishart, D. S. (2011). Web-based inference of biological patterns, functions and pathways from metabolomic data using MetaboAnalyst. *Nature protocols*, 6(6), 743-760. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.319>

- Xia, J., & Wishart, D. S. (2016). Using MetaboAnalyst 3.0 for Comprehensive Metabolomics Data Analysis. *Curr Protoc Bioinformatics*, 55, 14.10.11-14.10.91. <https://doi.org/10.1002/cpbi.11>
- Yi, L., Dong, N., Yun, Y., Deng, B., Ren, D., Liu, S., & Liang, Y. (2016). Chemometric methods in data processing of mass spectrometry-based metabolomics: A review. *Analytica Chimica Acta*, 914, 17-34.
- Yimenu, S. M., Kim, J. Y., & Kim, B. S. (2017). Prediction of egg freshness during storage using electronic nose. *Poultry Science*, 96(10), 3733–3746. <https://doi.org/10.3382/ps/pex193>
- Zhao, J., Lin, H., Chen, Q., Huang, X., Sun, Z., & Zhou, F. (2010). Identification of egg's freshness using NIR and support vector data description. *Journal of Food Engineering*, 98(4), 408-414. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.01.018>
- Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 589/2008 της Επιτροπής της 23ης Ιουνίου 2008 για τον καθορισμό λεπτομερών κανόνων εφαρμογής του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1234/2007 του Συμβουλίου σχετικά με τις προδιαγραφές εμπορίας των αυγών. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2008/589/oj>
- Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 853/2004 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 29ης Απριλίου 2004 για τον καθορισμό ειδικών κανόνων υγιεινής για τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης. <http://data.europa.eu/eli/reg/2005/2073/2020-03-08>
- Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 της Επιτροπής της 15ης Νοεμβρίου 2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα (Κείμενο που παρουσιάζει ενδιαφέρον για τον ΕΟΧ). <http://data.europa.eu/eli/reg/2005/2073/2020-03-08>

Παράρτημα

Π1. Σιτηρέσιο ορνίθων

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ: Καλαμπόκι 61,3%, σογιάλευρο γενετικά τροποποιημένο 25%, πίτυρα σίτου 2,5%, Ανθρακικό ασβέστιο 9,5%, φωσφορικό μονοασβέστιο 0,8%, αλάτι 0,3%, φυτικό λιπος 0,2%, πρόμιγμα (αμινοξέα, βιταμίνες και ιχνοστοιχεία, φυτάση, carorhyll red, αντιοξειδωτικό) 0,4%.

Π2. Αλληλουχία ένεσης των δειγμάτων στο GC/MS

A/A	Δείγμα	Παρτίδα
1	QC_1	1
2	QC_2	1
3	QC_3	1
4	QC_4	1
5	QC_5	1
6	BL_1	1
7	Egg_55_576	1
8	Egg_59_504	1
9	Egg_1_5	1
10	Egg_44_144	1
11	QC_6	1
12	Egg_28_504	1
13	Egg_8_73	1
14	Egg_37_576	1
15	Egg_11_73	1
16	QC_7	1
17	Egg_46_217	1
18	Egg_21_5	1
19	Egg_30_144	1
20	Egg_57_576	1
21	QC_8	1
22	Egg_31_576	1
23	Egg_27_73	1
24	Egg_14_312	1
25	Egg_25_504	1
26	QC_9	1
27	Egg_20_144	1
28	Egg_56_504	1
29	Egg_52_144	1
30	Egg_47_408	1
31	QC_10	1
32	Egg_16_504	1
33	Egg_60_5	1
34	Egg_58_576	1
35	Egg_18_73	1
36	QC_11	1
37	BL_2	1

A/A	Δείγμα	Παρτίδα
38	QC_12a	2
39	QC_13	2
40	QC_14	2
41	BL_3	2
42	Egg_35_217	2
43	Egg_36_5	2
44	Egg_7_217	2
45	Egg_50_312	2
46	QC_15	2
47	Egg_34_576	2
48	Egg_19_144	2
49	Egg_26_73	2
50	Egg_13_408	2
51	QC_16	2
52	Egg_54_73	2
53	Egg_3_5	2
54	Egg_38_217	2
55	Egg_12_144	2
56	QC_17	2
57	Egg_42_312	2
58	Egg_6_312	2
59	Egg_53_5	2
60	Egg_24_217	2
61	QC_18	2
62	Egg_17_408	2
63	Egg_15_312	2
64	Egg_51_408	2
65	Egg_22_312	2
66	QC_19	2
67	Egg_10_408	2
68	Egg_39_504	2
69	Egg_40_408	2
70	Egg_9_217	2
71	QC_20	2
72	BL_4	2

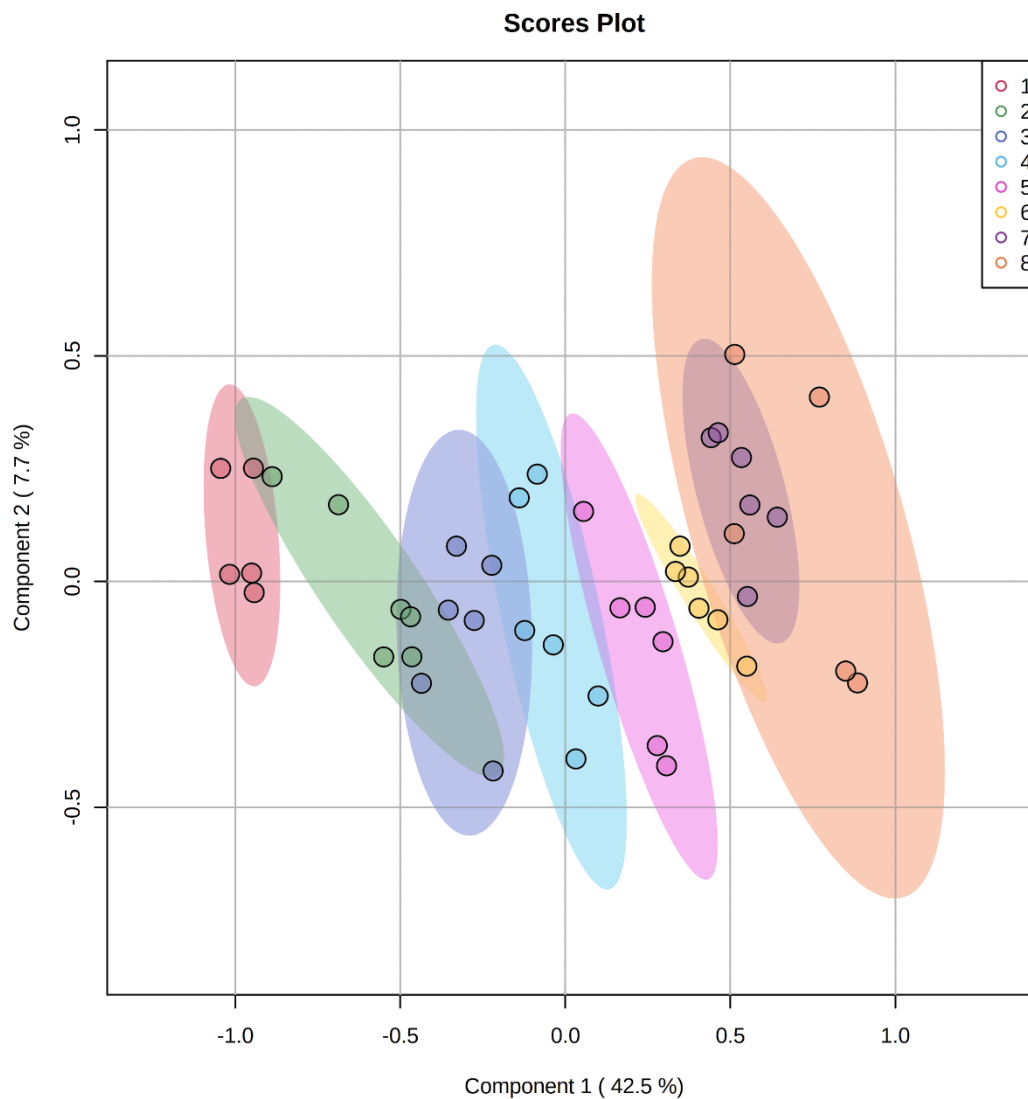
Π3. Ανιχνευθέντες μεταβολίτες

Οι μεταβολίτες που ανιχνεύθηκαν στα αυγά και οι αντίστοιχοι δείκτες κατακράτησης (RI). Το επίπεδο MSI (metabolomics standards initiative) αντιπροσωπεύει τα επίπεδα εμπιστοσύνης της ταυτοποίησης των μεταβολιτών. Το επίπεδο 1 αντιπροσωπεύει μεταβολίτες που έχουν ταυτοποιηθεί/επιβεβαιωθεί με τη χρήση προτύπων ενώσεων και ανάλυση με φασματομετρία μαζών, το επίπεδο 2 αντιπροσωπεύει μεταβολίτες που έχουν ταυτοποιηθεί με τη χρήση βιβλιοθηκών φασμάτων μαζών, το επίπεδο 3 αντιπροσωπεύει υποθετικά χαρακτηρισμένες τάξεις συστατικών βάσει ομοιότητας φασμάτων μάζας με γνωστά συστατικά μιας χημικής τάξης, και το επίπεδο 4 αντιπροσωπεύει άγνωστα συστατικά τα οποία αν και δεν ταυτοποιούνται ή κατηγοριοποιούνται, μπορούν να διαφοροποιηθούν και να ποσοτικοποιηθούν με βάση τα δεδομένα φασματομετρίας μαζών.

RI	Μεταβολίτης	Επίπεδο MSI	RI	Μεταβολίτης	Επίπεδο MSI
1057,47	Pyruvic acid	1	1849,17	Citric acid	1
1067,6	Lactic acid	1	1867,43	Lysine	2
1148,97	5,6-Dihydrouracil	4	1888,31	beta-D-(+)-Glucose	4
1160,42	Leucine	2	1913,74	Fructose_1	1
1168,32	3-Hydroxybutyric acid	2	1928,06	Mannose	1
1180,69	L-Proline	2	1933,36	Galactose	1
1181,55	Isoleucine	2	1941,62	Glucose_1	1
1090,85	Valine (1+ 2 TMS)	1	1900,73	Tyrosine (2 +3 TMS)	1
1226,3		1	1961,25		1
1247,44	urea	2	1970,97	D-Mannitol	2
1268,02	Serine	1	1978,45	Sorbitol	2
1277,17	Ethanolamine	2	1992,2	isohexonic acid	4
1289,52	Phosphate	1	2018,05	Pantothenate	2
1290,46	Glycerol	1	2071,97	N-acetylmannosamine	4
1306,32	Threonine	2	2123,94	N-Acetyl glucosamine_1	2
1125,76	Glycine (2+3 TMS)	1	2069,94	Inositol	3
1318,26		1	2130,74		2
1347,85	Glyceric acid	2	2148,21	Normetanephine	3
1355,34	Fumaric acid	1	2225,63	L-Tryptophan	2
1109,06	Alanine (2+3 TMS)	1	2343,31	D-Sorbitol 6-phosphate	3
1370,25		2	2365,32	Phosphate_sugar_2365*	3
1379,21	Thymine	3	2501,79	D-Ribulose 1,5-diphosphate	3
1417,19	L-Methionine	1	2668,04	Glycerol monostearate	4
1434,46	Aspartic acid	1	* Ο αριθμός αναφέρεται στον δείκτη κατακράτησης (RI).		
1438,99	b-Alanine	2			
1508,49	DL-Malic acid	2			
1534,8	Meso erythritol	2			
1536,27	Pyroglutamic acid	1			
1543,58	Glutamic acid	1			
1555,37	Phenylalanine	2			
1674,94	N-Acetyl aspartic acid	2			
1754,75	Ribitol	3			
1760,03	6-deoxyglucitol	3			
1766,66	Ornithine	2			
1792,63	3-phosphoglycerate	2			
1807,33	O-Phosphoethanolamine	3			

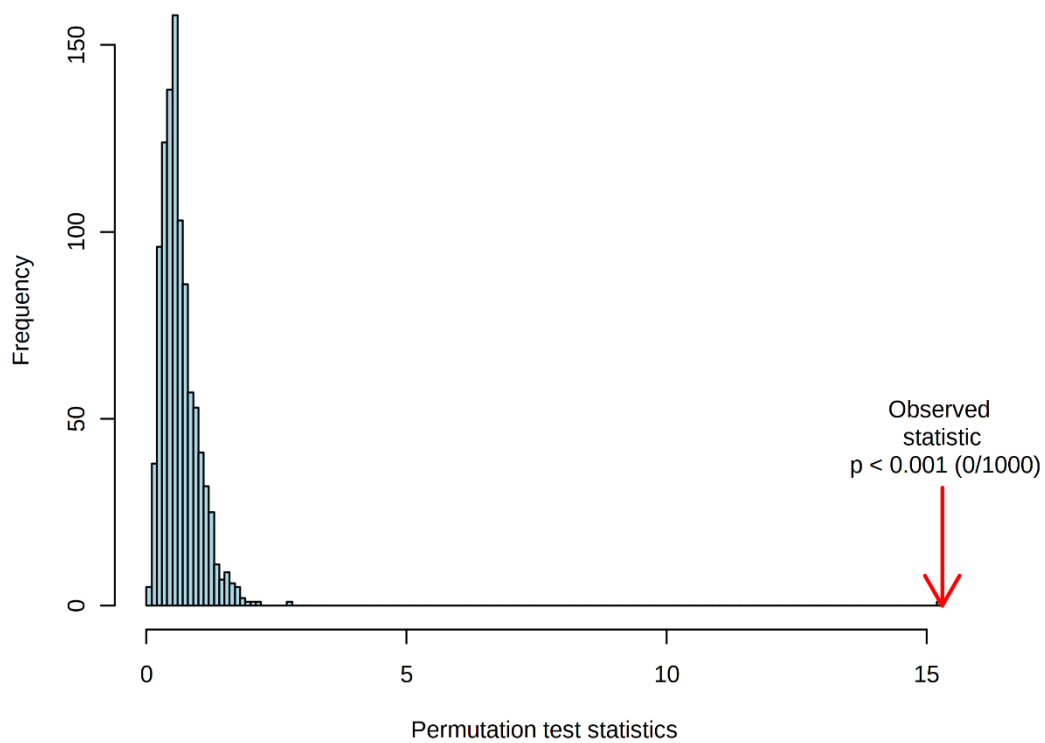
Π4. Διάγραμμα scores plot ανάλυσης PLS-DA

Γράφημα των βαθμών της διακριτικής ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων PLS-DA (scores plot) βάσει των υδρόφιλων μεταβολιτών σε αυγά συντηρημένα στους 24°C. Οι κλάσεις (1,2,3,4,5,6,7,8) των δειγμάτων περιγράφονται στον Πίνακα 13. Οι σκιασμένες περιοχές αντιστοιχούν σε 95% διαστήματα εμπιστοσύνης.

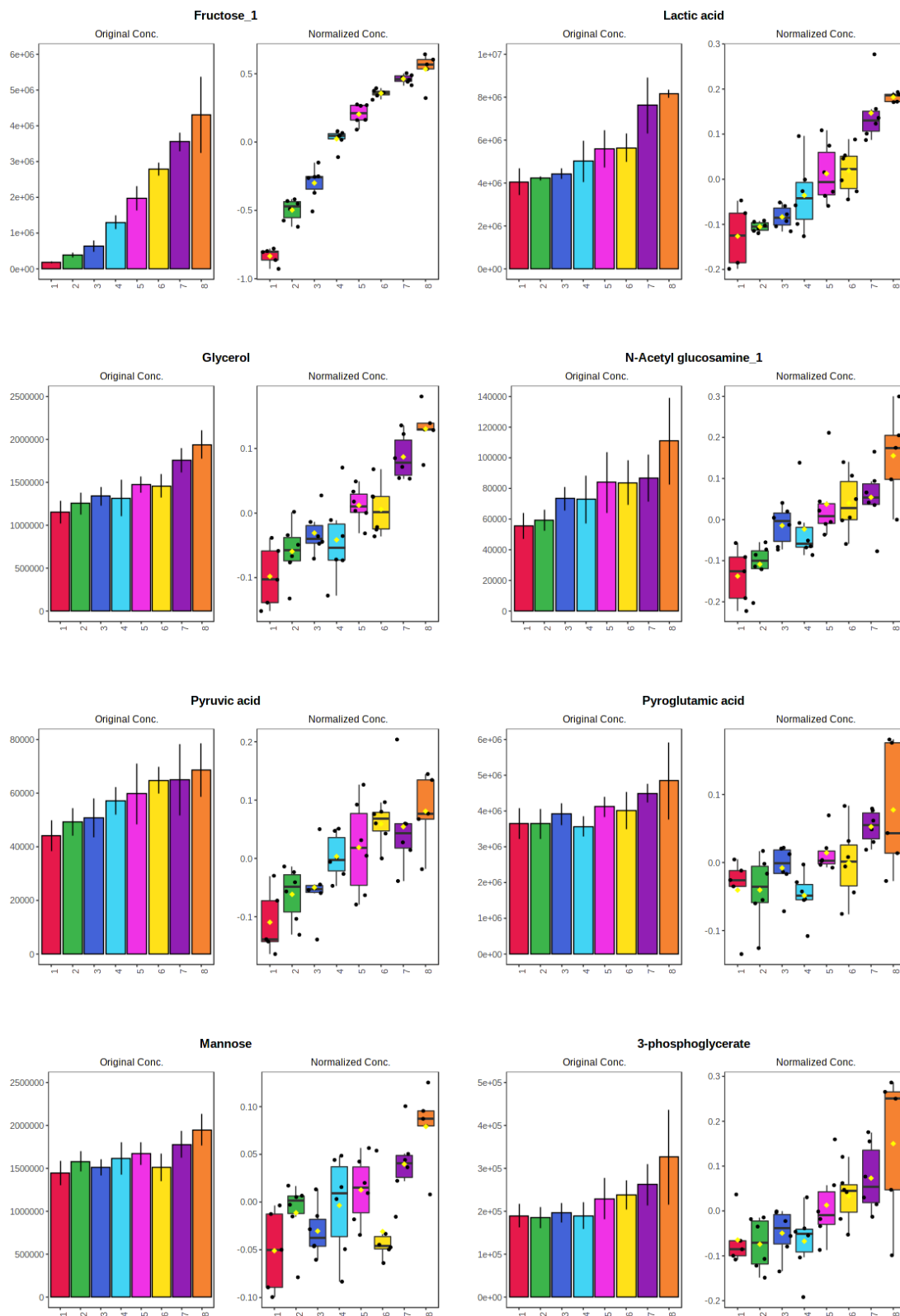


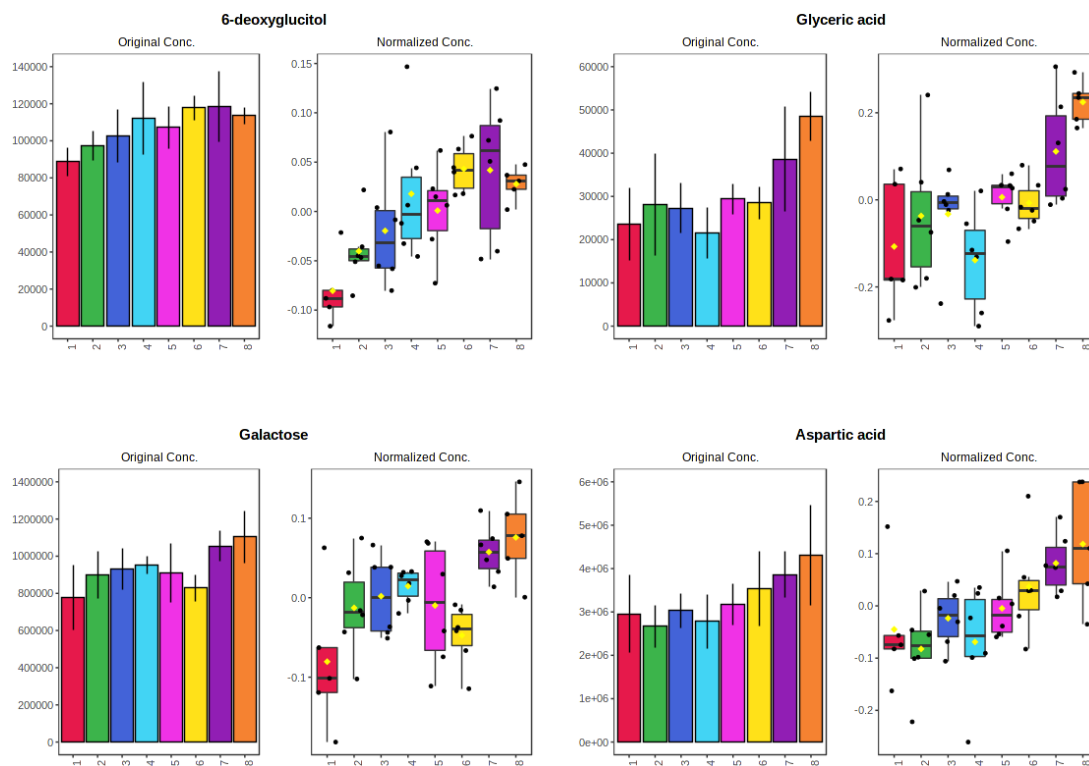
Π5. Δοκιμή μεταστοιχείωσης του μοντέλου PLS-DA

Κατανομή τυχαίων ταξινομήσεων του μοντέλου PLS-DA σύμφωνα με την κατηγοριοποίηση του Πίνακα 13. Η επίδοση του μοντέλου έγινε με χρήση του λόγου B/W (sum of squares between / sum of squares within).

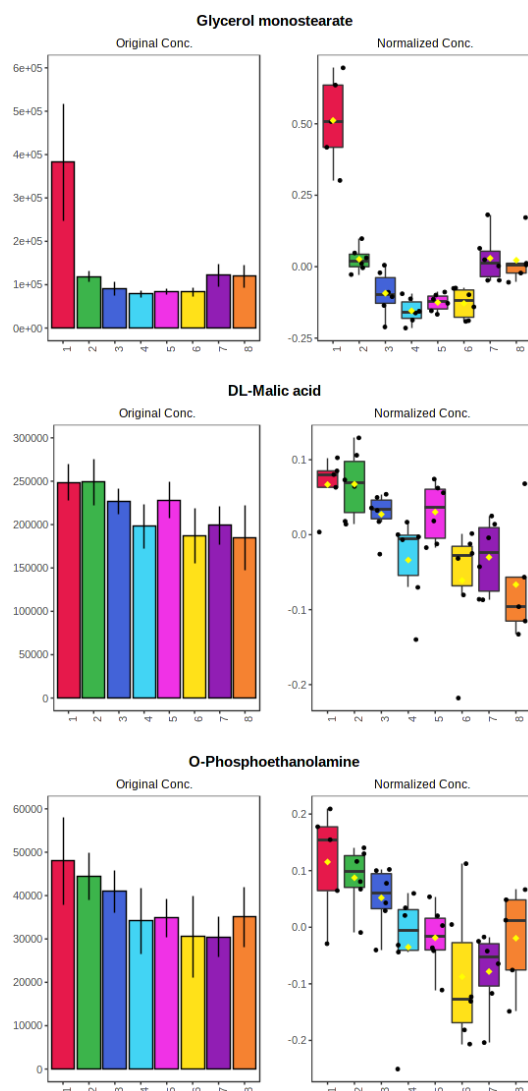


Π6. Οι σημαντικότεροι μεταβολίτες με αυξητική τάση





Π7. Οι σημαντικότεροι μεταβολίτες με μειούμενη τάση



Π8. Μεταβολίτες με ασαφή τάση

