



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

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

Εκτίμηση της φρεσκότητας αποκελυφωμένου αυγού και ποσοτικός προσδιορισμός της φρουκτόζης σε δείγματα ολόκληρου αυγού, λέκιθου και αλβουμίνης ωοπαραγωγών ορνίθων (*Gallus Gallus Domesticus*) με χρήση αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών

**Κωνσταντίνα Α. Σκαρβελάκη**

Επιβλέπων Καθηγητής

Αθανάσιος Μαλλούχος, Επίκουρος Καθηγητής ΕΤΔΑ

**Αθήνα 2022**

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

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

Εκτίμηση της φρεσκότητας αποκελυφωμένου αυγού και ποσοτικός προσδιορισμός της φρουκτόζης σε δείγματα ολόκληρου αυγού, λέκιθου και αλβουμίνης ωοπαραγωγών ορνίθων (*Gallus Gallus Domesticus*) με χρήση αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών

«Freshness assessment of deshelled whole eggs and quantification of fructose in whole eggs, yolk, and albumin in laying hens (*Gallus Gallus Domesticus*) using gas chromatography-mass spectrometry»

**Κωνσταντίνα Α. Σκαρβελάκη**

Εξεταστική Επιτροπή

Αθανάσιος Μαλλούχος, Επίκουρος Καθηγητής ΕΤΔΑ (Επιβλέπων)

Χρυσανγή Γαρδέλη, Επίκουρη Καθηγήτρια ΕΤΔΑ

Μιχαήλ Γκολιομύτης, Επίκουρος Καθηγητής ΕΖΠΥ

Εκτίμηση της φρεσκότητας αποκελυφωμένου αυγού και ποσοτικός προσδιορισμός της φρουκτόζης σε δείγματα ολόκληρου αυγού, λέκιθου και αλβουμίνης ωοπααραγωγών ορνίθων (*Gallus Gallus Domesticus*) με χρήση αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών

*ΠΜΣ Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων  
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου  
Εργαστήριο Χημείας και Ανάλυσης Τροφίμων*

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο προσδιορισμός των πολικών μεταβολιτών σε αυγά ωοπααραγωγών ορνίθων κατά τη διάρκεια συντήρησής τους (για 21 ημέρες) σε ελεγχόμενη θερμοκρασία (20°C) μέσω μιας ωμικής προσέγγισης με χρήση αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών. Στην πραγματικότητα, η παρούσα μελέτη είχε ως στόχο την επαλήθευση των αποτελεσμάτων που εξάχθηκαν σε προηγούμενη παρόμοια έρευνα, η οποία εντόπισε την φρουκτόζη ως σημαντικό βιοδείκτη της φρεσκότητας των αυγών. Επομένως, στο 1<sup>ο</sup> μέρος της πειραματικής πορείας πραγματοποιήθηκε μη στοχευμένος προσδιορισμός των πολικών μεταβολιτών σε ολόκληρο αυγό (άνευ κελύφους) και επιβεβαιώθηκαν τα αποτελέσματα που είχαν προκύψει από την προηγούμενη μελέτη. Πιο συγκεκριμένα, επιβεβαιώθηκε ότι η φρουκτόζη αποτελεί το σημαντικότερο χημικό δείκτη της φρεσκότητας-αλλοίωσης των αυγών. Τα δεδομένα που λήφθηκαν από τις μετρήσεις επεξεργάστηκαν με μεθόδους πολυμεταβλητής ανάλυσης με σκοπό την εξαγωγή συμπερασμάτων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης, η φρουκτόζη αποτέλεσε τον πιο σημαντικό μεταβολίτη, με μια αυξητική γραμμική τάση κατά την πάροδο του χρόνου, για τον χαρακτηρισμό της φρεσκότητας. Μέσω διακριτικής ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA), επιτεύχθηκε σαφής διαχωρισμός μεταξύ εξαιρετικά φρέσκων (από 0 έως και 9 ημέρες συντήρησης) και μη εξαιρετικά φρέσκων αυγών (έως και 21 ημέρες συντήρησης). Ως εκ τούτου, στο 2<sup>ο</sup> μέρος της πειραματικής πορείας αναπτύχθηκε μία στοχευμένη μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού της φρουκτόζης σε ομογενοποιημένο αυγό, αλβουμίνη και κρόκο, ξεχωριστά, με χρήση αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της φρουκτόζης βασίστηκε στην χρήση επισημασμένης φρουκτόζης (<sup>13</sup>C6). Ο ποσοτικός προσδιορισμός της φρουκτόζης στα δείγματα ομογενοποιημένου αυγού, κρόκου και αλβουμίνης έδειξε πως η αύξηση αυτή πιθανά να οφείλεται στον ισομερισμό της γλυκόζης σε φρουκτόζη μέσω της γλυκόλυσης ή/και στην απελευθέρωση των σακχάρων από τις γλυκοπρωτεΐνες.

**Επιστημονική περιοχή:** Μεταβολωμική ανάλυση

**Λέξεις κλειδιά:** φρεσκότητα, αλλοίωση, μεταβολωμική, ποσοτικοποίηση, αυγά, δείκτες, φρουκτόζη, χρωματογραφία, φασματομετρία

**Freshness assessment of deshelled whole eggs and quantification of fructose in whole eggs, yolk, and albumin in laying hens (*Gallus Gallus Domesticus*) using gas chromatography-mass spectroscopy**

*MSc Food Science and Technology  
Department of Food Science and Human Nutrition  
Laboratory of Food Chemistry and Analysis*

## **ABSTRACT**

The aim of this study was the determination of the polar metabolites in laying hens's eggs during storage (for 21 days) at a controlled temperature (20°C) through an omics approach using gas chromatography-mass spectrometry. In fact, the current study was intended to verify the results obtained in a previous similar study, which identified fructose as an important biomarker of egg freshness. Therefore, in the first part of the experimental procedure, untargeted determination of polar metabolites was carried out in whole egg (without shell) and the results obtained from the previous study were confirmed. Specifically, it was confirmed that fructose is the most important chemical marker of egg freshness-spoilage. The data were processed using multivariate analysis methods in order to come to a conclusion. According to the results of the statistical analysis, fructose was the most significant metabolite, with an increasing linear trend during egg storage, that described freshness. Through partial least-squares discriminant analysis (PLS-DA), the separation between extra fresh (from 0 to 9 days of storage) and non-extra fresh (up to 21 days of storage) eggs was achieved. Therefore, in the second part of the experimental procedure, a targeted method for the quantification of fructose in homogenized egg, albumin and yolk was developed, individually, using gas chromatography-mass spectrometry. The calculation of fructose concentration was based on the use of labeled fructose (13C6). Quantification of fructose in whole egg, yolk and albumin samples demonstrated that this increase was probably due to the isomerism of glucose to fructose through glycolysis and/or the hydrolysis of sugars from glycoproteins.

**Scientific area:** Metabolomics

**Keywords:** freshness, spoilage, egg, metabolomic, chromatography, spectrometry, quantification, markers, fructose



## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε με αφοσίωση και έντονο ενδιαφέρον, στο πλαίσιο του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών με τίτλο «Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων» του Τμήματος Επιστήμη Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου (ΕΤΔΑ) του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΓΠΑ), με ειδίκευση στα «Συστήματα Διαχείρισης Ποιότητας και Ασφάλειας Τροφίμων». Το πειραματικό μέρος της εργασίας πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας και Ανάλυσης Τροφίμων.

Με την περάτωση αυτής, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν σε αυτό και κατά κύριο λόγο, τον Επιβλέπων Καθηγητή μου, κ. Αθανάσιο Μαλλούχο για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το αντικείμενο που τόσο αγαπώ, την υποστήριξη, τις συμβουλές αλλά και την καθοδήγησή του.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή του Εργαστηρίου Γενικής και Ειδικής Ζωοτεχνίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΓΠΑ), κ. Γκολιομύτη Μιχαήλ που μας παρείχε τα αυγά με σκοπό την πραγματοποίηση της μελέτης και που χωρίς την βοήθεια του δεν θα είχε επιτευχθεί.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλονται στα μέλη του Εργαστηρίου, πρώτα από όλα για το ευχάριστο κλίμα που επικράτησε μεταξύ μας αλλά και για την βοήθεια σε ό,τι χρειάστηκα.

Παρά τις πρωτόγνωρες συνθήκες που κληθήκαμε να αντιμετωπίσουμε όλοι μας εξαιτίας, της πανδημίας, η οικογένεια, οι φίλοι και όσοι άλλοι αποτέλεσαν σημαντικό κομμάτι στην ολοκλήρωση της διατριβής μου και παράλληλα των σπουδών μου, αξίζουν πολλά ευχαριστώ για την εμπύχωση και την στήριξη που μου έδωσαν.

Με την άδειά μου, η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη ελέγχθηκε από τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής με την χρήση λογισμικού ανίχνευσης λογοκλοπής. Το λογισμικό αυτό διατίθεται από το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο και έτσι διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της.



## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

|                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....                                                                                         | 3  |
| ABSTRACT .....                                                                                         | 4  |
| ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ .....                                                                                      | 6  |
| Εισαγωγή .....                                                                                         | 10 |
| 1.1 Εισαγωγικές πληροφορίες .....                                                                      | 10 |
| 1.2 Νομοθετικό πλαίσιο .....                                                                           | 11 |
| 1.3 Δομή και σύσταση αυγού .....                                                                       | 17 |
| 1.3.1 Μορφολογία αυγού .....                                                                           | 17 |
| 1.3.2 Σύσταση αυγού .....                                                                              | 19 |
| 1.4 Ποιοτικά χαρακτηριστικά αυγού .....                                                                | 27 |
| 1.4.1 Στο εξωτερικό του αυγού .....                                                                    | 28 |
| 1.4.2 Στο εσωτερικό του αυγού .....                                                                    | 29 |
| 1.5 Δείκτες φρεσκότητας .....                                                                          | 31 |
| 1.5.1 Χημικοί δείκτες .....                                                                            | 31 |
| 1.5.2 Δείκτης διάθλασης αλβουμίνης .....                                                               | 33 |
| 1.5.3 Αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί .....                                                                | 33 |
| 2.1 Μέθοδοι αξιολόγησης .....                                                                          | 35 |
| 2.2 Μεταβολωμική .....                                                                                 | 37 |
| 2.3 Τεχνικές ανάλυσης στην μεταβολωμική μέθοδο .....                                                   | 39 |
| 2.4 Μεταβολωμική ανάλυση με χρήση αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών (GC-MS) .....             | 41 |
| 2.4.1 Προετοιμασία δείγματος .....                                                                     | 41 |
| 2.4.2 Διαχωρισμός των μεταβολιτών με αέρια χρωματογραφία και προσδιορισμός με φασματόμετρο μαζών ..... | 43 |
| 2.5 Επεξεργασία και αξιολόγηση των πειραματικών δεδομένων .....                                        | 44 |
| 2.6 Σκοπός .....                                                                                       | 45 |
| 3. Πειραματικό μέρος .....                                                                             | 46 |
| 3.1 Συλλογή και συντήρηση αυγών .....                                                                  | 46 |
| 3.2 Προσδιορισμός μονάδων Haugh .....                                                                  | 48 |
| 3.3 Προσδιορισμός πολικών μεταβολιτών .....                                                            | 49 |
| 3.4 Προσδιορισμός φρουκτόζης .....                                                                     | 54 |
| 4. Αποτελέσματα .....                                                                                  | 55 |
| 4.1 Μετρήσεις μάζας και υπολογισμός μονάδων Haugh .....                                                | 55 |



|                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.2 Μεταβολωμική.....                                                        | 58 |
| 4.2.1 Στάδια επεξεργασίας πριν την στατιστική ανάλυση .....                  | 58 |
| 4.2.2 Πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση .....                                 | 59 |
| 4.2.2.1 Αποτελέσματα με βάση τη σειρά δειγματοληψίας.....                    | 60 |
| 4.2.3 Αποτελέσματα κατηγοριοποίησης με βάση την φρεσκότητα .....             | 69 |
| 4.3 Ποσοτικός προσδιορισμός φρουκτόζης.....                                  | 72 |
| 4.3.1 Αποτελέσματα ποσοτικοποίησης στα δείγματα ομογενοποιημένου αυγού ..... | 73 |
| 4.3.2 Αποτελέσματα ποσοτικοποίησης στα δείγματα κρόκου και αλβουμίνης .....  | 74 |
| 5.Συμπεράσματα.....                                                          | 76 |
| Βιβλιογραφία.....                                                            | 78 |
| Παράρτημα .....                                                              | 84 |

## Εισαγωγή

### 1.1 Εισαγωγικές πληροφορίες

Η βιομηχανία παραγωγής αυγών και προϊόντων αυτών αποτελεί έναν από τους πλέον σημαντικούς κλάδους στο παγκόσμιο εμπόριο καθώς, σχετίζεται άμεσα και με την παραγωγή κρέατος πουλερικών. Ο όρος προϊόντα αυγών αναφέρεται σε επεξεργασμένες μορφές συμπεριλαμβανομένου τα ολόκληρα αυγά, τα ασπράδια και τους κρόκους αυγών σε κατεψυγμένη, παστεριωμένη, υγρή ή και αποξηραμένη μορφή (Suman et al., n.d.).

Μεγάλο ποσοστό της παραγωγής των αυγών πωλούνται ακέραια ενώ άλλα χρησιμοποιούνται σε διαφορετικές παρασκευές της βιομηχανίας των τροφίμων ή επεξεργάζονται για την ανάπτυξη προϊόντων αυγού.

Επιπλέον, εξαιτίας των πλούσιων συστατικών τους χαρακτηρίζονται ως μια σημαντική τροφή που πρέπει να περιλαμβάνεται στη διατροφή του ανθρώπου. Πιο συγκεκριμένα, τα αυγά διαθέτουν υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, λιπίδια και υδατάνθρακες που είναι απαραίτητα για μια σωστή διατροφή (Karoui et al., 2009) (Renzzone et al., 2021) (Sharaf Eddin et al., 2019). Περιέχουν επίσης, βιταμίνες και ανόργανα στοιχεία τα οποία είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη. Πέραν αυτών όμως, το ασπράδι και ο κρόκος του αυγού διαθέτουν μοναδικές λειτουργικές ιδιότητες, όπως η πηκτωματοποίηση, η γαλακτωματοποίηση (κρόκος) και ο αφρισμός (αλβουμίνη) (Karoui et al., 2009) (Karoui et al., 2006) (Renzzone et al., 2021).

Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως, μονάχα τα αυγά που παράγονται από όρνιθες που ανήκουν στο είδος *Gallus Gallus Domesticus*, μπορούν να διατεθούν για εμπορική χρήση (Γεωργιάδης Μ., 2019). Περίπου το 35% των συστημάτων παραγωγής ακολουθούν το συμβατικό τρόπο εκτροφής (κλωβοστοιχίες) ενώ το υπόλοιπο 65% επιλέγει τα εναλλακτικά συστήματα παραγωγής (αυγά αχυρώνα ή στρωμνής, ελεύθερης βοσκής και βιολογικά) (Κόλιας Β., 2020).

Οι ελάχιστες απαιτήσεις που πρέπει να πληρούν τα συστήματα παραγωγής για τις διάφορες μεθόδους εκτροφής ωοτόκων ορνίθων είναι οι εξής (Γεωργιάδης Μ., 2019):

1. Αυγά κλωβοστοιχίας: να παράγονται σε εγκαταστάσεις οι οποίες πληρούν τουλάχιστον τις προϋποθέσεις του άρθρου 6 της Οδηγίας 1999/74/EK.
2. Αυγά αχυρώνα: να παράγονται σε εγκαταστάσεις οι οποίες πληρούν τουλάχιστον τις προϋποθέσεις του άρθρου 4 της Οδηγίας 1999/74/EK.
3. Αυγά ελεύθερης βοσκής: να παράγονται σε εγκαταστάσεις οι οποίες πληρούν τουλάχιστον τις προϋποθέσεις του άρθρου 4 της Οδηγίας 1999/74/EK και κάποιες επιπλέον απαιτήσεις.
4. Αυγά βιολογικής παραγωγής: επιβάλλεται να παράγονται σε μονάδες βιολογικής εκτροφής ορνίθων αυγοπαραγωγής. Εκτός από την υποχρεωτική εφαρμογή του άρθρου 4 της Οδηγίας 1999/74/EK, θα πρέπει να εφαρμόζεται

και ο 227(I)/2004 (καταγωγή ορνίθων, διατροφή αυτών, συνθήκες διαβίωσης, τη σήμανση, τον έλεγχο και την πιστοποίηση των αυγών).

Ο τρόπος εκτροφής, η διατροφή αλλά και οι συνθήκες διαβίωσης παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην τελική ποιότητα του αυγού αλλά και στα προϊόντα αυτών (Κόλιας Β., 2020). Στην παρούσα μελέτη, τα αυγά παράχθηκαν από όρνιθες ελευθέρως βοσκής. Πιο συγκεκριμένα, πρόκειται για κλωβούς που είναι διαταγμένοι σε σειρά σε μια μονάδα. Αυτά τα συστήματα στέγασης μειώνουν την επιθετικότητα και τον κανιβαλισμό μεταξύ των ορνίθων περιορίζοντας όμως τις κινήσεις τους. Διαφέρουν έντονα με τον εναλλακτικό τρόπο παραγωγής όπου υπάρχει συνεχής πρόσβαση, κατά την διάρκεια της μέρας, σε εξωτερικό χώρο ενώ υπάρχει περισσότερος χώρος ελεύθερος για την κάθε όρνιθα.

## 1.2 Νομοθετικό πλαίσιο

Στην βιομηχανία των τροφίμων, τα αυγά αλλά και τα προϊόντα αυτών χαρακτηρίζονται ως εξαιρετικά ευπαθή. Για τον λόγο αυτό, η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει θεσπίσει ορισμένους Κανονισμούς (853/2004, 2073/2005, 589/2008, 1308/2013) και Πρότυπα με σκοπό, την ταξινόμηση τους σε συγκεκριμένες κατηγορίες.

Επιπλέον, η θρεπτική αξία, ο ενδεχόμενος κίνδυνος ανάπτυξης ανεπιθύμητων παθογόνων μικροοργανισμών αλλά και ορισμένες λειτουργικές ιδιότητες των αυγών και των προϊόντων αυτών, σχετίζονται άμεσα με την φρεσκότητα και την ποιότητα τους (EFSA, 2014).

Επομένως, η ποιοτική αξιολόγηση των αυγών επιτυγχάνεται με βάση, τα φυσικοχημικά και μικροβιολογικά κριτήρια που παρουσιάζονται στους Κανονισμούς που αναφέρθηκαν. Αναλυτικότερα,

- *Κανονισμός (ΕΚ) 853/2004*

Βάση του Κανονισμού (ΕΚ) 853/2004 καθορίζονται οι ειδικοί κανόνες που οφείλουν να τηρούν οι υπεύθυνοι των επιχειρήσεων σχετικά με την υγιεινή των τροφίμων ζωικής προέλευσης (Κανονισμός (ΕΚ) Αριθ. 853/2004).

Μέρη του Κανονισμού (Παράρτημα Ι και ΙΙ Τμήμα Χ), αναγράφουν τα κριτήρια και τις πληροφορίες που αφορούν την διάθεση των αυγών και των προϊόντων τους στην αγορά.

Πιο συγκεκριμένα, η μεταφορά και η αποθήκευση των αυγών πρέπει να γίνεται σε σταθερή θερμοκρασία η οποία, εξασφαλίζει την καλύτερη διατήρηση των ιδιοτήτων τους σχετικά με, την υγιεινή. Επιπλέον, είναι σημαντικό το ανώτατο χρονικό όριο για την παράδοση στον καταναλωτή, να μην υπερβαίνει τις 21 ημέρες από την ωοτοκία.

Πέραν των απαιτήσεων που καθορίζονται για τις εγκαταστάσεις, τις πρώτες ύλες αλλά και την παρασκευή και επισήμανση προϊόντων αυγού, αναφέρονται ορισμένες αναλυτικές προδιαγραφές. Σύμφωνα με αυτές:

1. Η περιεκτικότητα σε 3-υδροξυ-βουτυρικό οξύ δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 10 mg/kg ξηράς ουσίας του μη μεταποιημένου προϊόντος αυγού.
2. 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. Σχετικά με τα προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση, η τιμή αυτή πρέπει να είναι εκείνη που καταγράφεται πριν από τη διαδικασία ζύμωσης.
3. Η ποσότητα των υπολειμμάτων κελυφών, μεμβρανών αυγών και άλλων σωματιδίων στο μεταποιημένο προϊόν αυγών δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 100 mg/kg προϊόντος αυγού.

▪ *Κανονισμός 2073/2005*

Ο παρών κανονισμός καθορίζει τα μικροβιολογικά κριτήρια για συγκεκριμένους μικροοργανισμούς και τους κανόνες εφαρμογής προς τους οποίους πρέπει να συμμορφώνονται οι υπεύθυνοι επιχειρήσεων τροφίμων όταν εφαρμόζουν τα γενικά και ειδικά μέτρα υγιεινής (852/2004) (Κανονισμός (ΕΚ) Αριθ. 2073/2005).

1. Σχετικά με τα βακτήρια του γένους *Salmonella* απαιτείται μη ανίχνευση αυτού του γένους σε 25 g προϊόντος. Εξαίρεση βέβαια αποτελούν τα προϊόντα αυγών για τα οποία η διαδικασία παρασκευής ή η σύνθεση του προϊόντος θα εξαλείψει τον κίνδυνο σαλμονέλλας.
2. Όσον αφορά το γένος *Enterobacteriaceae*, στο τέλος της διαδικασίας παρασκευής καθορίζονται τα όρια αποδοχής. Πιο συγκεκριμένα, χαρακτηρίζεται ως:
  - Ικανοποιητική, εάν όλες οι τιμές που παρατηρούνται είναι  $\leq 10$  cfu/g ή mL.
  - Αποδεκτή, εάν ένας μέγιστος αριθμός τιμών 2/5 (μονάδες δειγματοληψίας μεταξύ 10 και 100 cfu/g ή mL και δείγματος) είναι μεταξύ 10 και 100 cfu/g ή mL και οι υπόλοιπες τιμές που παρατηρούνται είναι  $\leq 10$  cfu/g ή mL.
  - Μη ικανοποιητική, εάν μία ή περισσότερες από τις τιμές που παρατηρούνται είναι  $> 100$  cfu/g ή mL ή αριθμός τιμών μεγαλύτερος από 2/5 είναι μεταξύ 10 και 100 cfu/g ή mL.

▪ *Κανονισμός 589/2008*

Ο κανονισμός αυτός θεσπίζει κανόνες αναφορικά με τα πρότυπα εμπορίας για τα αυγά. Πιο αναλυτικά, γίνεται αναφορά στην σήμανση, στις πληροφορίες της συσκευασίας, τα χαρακτηριστικά ποιότητας, τις χύμα πωλήσεις κ.α (Κανονισμός (ΕΚ) Αριθ. 589/2008). Εστιάζοντας σε κάποια από αυτά:

- Χαρακτηριστικά ποιότητας:

Αυγά κατηγορίας Α:

1. Κέλυφος και κελυφική μεμβράνη: κανονικό σχήμα, καθαρά και ανέπαφα.

2. 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.
3. Κρόκος: ορατός κατά την ωοσκόπηση μόνο υπό μορφή σκιάς, χωρίς σαφές περίγραμμα, μετακινείται ελαφρά κατά την περιστροφή του αυγού και επανέρχεται στην κεντρική του θέση.
4. Ασπράδι: φωτεινό και διαυγές.
5. Βλαστικός δίσκος: ανεπαίσθητη ανάπτυξη.
6. Ξένες ύλες: δεν επιτρέπεται.
7. Ξένη οσμή: δεν επιτρέπεται

**!** Τα αυγά της κατηγορίας B δεν ανταποκρίνονται στα χαρακτηριστικά ποιότητας που αναφέρθηκαν παραπάνω. Επίσης, αυγά της κατηγορίας A τα οποία δεν παρουσιάζουν πλέον τα χαρακτηριστικά εκείνα ενδέχεται να υποβαθμιστούν στην κατηγορία B.

- Ταξινόμηση αυγών:

#### Αυγά κατηγορίας A:

1. Με βάση τη μάζα:
  - a) XL — πολύ μεγάλο:  $\geq 73$  g.
  - b) L — μεγάλο: μάζα ίση ή μεγαλύτερη των 63 g  $\leq$  μάζα < 73 g.
  - c) M — μεσαίο: 53 g  $\leq$  μάζα < 63 g.
  - d) S — μικρό: < 53 g.
2. Η κατηγορία της μάζας δηλώνεται με τα γράμματα ή τους παραπάνω όρους.
3. Κατά παρέκκλιση, όταν συσκευάζονται στην ίδια συσκευασία αυγά της κατηγορίας A διαφορετικού μεγέθους, η ελάχιστη καθαρή μάζα των αυγών αναφέρεται σε γραμμάρια και η ένδειξη «Αυγά διαφόρων μεγεθών».

- Συσκευασίες:

1. Ημερομηνία ελάχιστης διατηρησιμότητας: η ημερομηνία μέχρι την οποία το τρόφιμο διατηρεί τις ιδιαίτερες ιδιότητες του σε κατάλληλες συνθήκες διατήρησης. Ορίζεται σε 28 μέρες κατά ανώτατο όριο μετά την ωοτοκία.
2. «Εξαιρετικά φρέσκα»: χρησιμοποιείται ως πρόσθετη ένδειξη ποιότητας στις συσκευασίες αυγών της κατηγορίας A έως την ένατη ημέρα μετά την ωοτοκία. Η ημερομηνία ωοτοκίας και η ημερομηνία λήξης της προθεσμίας των εννέα ημερών αναγράφονται στη συσκευασία με τρόπο ευκρινή και ευανάγνωστο.
3. «Πλυμένα αυγά»: πρόκειται για αυγά που έχουν πλυθεί σύμφωνα με το άρθρο 3 του παρόντος κανονισμού.
4. Τα αυγά ταξινομούνται, σημαίνονται και συσκευάζονται εντός δέκα ημερών από την ημερομηνία ωοτοκίας. Τα αυγά που διατίθενται στο εμπόριο με την ένδειξη «εξαιρετικά φρέσκα», ταξινομούνται, σημαίνονται και συσκευάζονται εντός τεσσάρων ημερών από την ημερομηνία ωοτοκίας.

- Πωλήσεις αυγών χύμα:

Με τρόπο ευκρινή και ευανάγνωστο να αναγράφονται οι ακόλουθες πληροφορίες:

1. Η κατηγορία ποιότητας.
2. Η κατηγορία μάζας.
3. Ένδειξη της μεθόδου εκτροφής.
4. Διευκρίνιση της έννοιας του κωδικού παραγωγού.
5. Ημερομηνία ελάχιστης διατηρησιμότητας.

#### ▪ Πρότυπα εμπορίας UNECE

Τα πρότυπα εμπορικής ποιότητας UNECE (United Nations Economic Commission for Europe) εφαρμόζονται σε διεθνές επίπεδο και σκοπός αυτών είναι η θέσπιση διαφόρων ορισμών, διατάξεων που αφορούν την ποιότητα και πρόσθετων πληροφοριών που αφορούν τα αυγά και τα προϊόντα αυτών. Επιπλέον, παρέχουν και ένα σύστημα κωδικοποίησης των προϊόντων αυτών με στόχο την καλύτερη και πιο εύκολη εμπορία και επικοινωνία (EGG-1 UNECE STANDARD | EGGS IN SHELL, 2017) (EGG-2 UNECE STANDARD | EGG PRODUCTS , 2017).

- Ταξινόμηση αυγών (με βάση το EGG-1 standard 2017):

#### Αυγά κατηγορίας Α (εξαιρετικά φρέσκα):

Πρόκειται για αυγά ανώτερης ποιότητας τα οποία πρέπει να ταξινομούνται και συσκευάζονται εντός 4 ημερών από την ημέρα της ωοτοκίας. Διαθέτουν τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

1. Κέλυφος και επιδερμίδα: κανονικό σχήμα, καθαρά και χωρίς ρωγμές.
2. Θάλαμος αέρα: ύψος έως και 4 mm κατά τη στιγμή της συσκευασίας και ακίνητος.
3. Κρόκος: ορατός κατά την ωοσκόπηση μόνο υπό μορφή σκιάς, χωρίς σαφές περίγραμμα, μετακινείται ελαφρά κατά την περιστροφή του αυγού και επανέρχεται στην κεντρική του θέση.
4. Ασπράδι: διαυγές, καθαρό και ημιδιαφανές.
5. Βλαστικός δίσκος: ανεπαίσθητη ανάπτυξη.
6. Συνίσταται να πωλείται έως και 9 ημέρες από την ωοτοκία.

#### Αυγά κατηγορίας Α, κατηγορίας Ι:

Χαρακτηρίζονται τα αυγά που είναι καλής ποιότητας, τα οποία ταξινομούνται, επισημαίνονται και συσκευάζονται εντός 10 ημερών από την ωοτοκία. Διαθέτουν τα εξής:

1. Κέλυφος και επιδερμίδα: κανονικό σχήμα, καθαρά και χωρίς ρωγμές.
2. Θάλαμος αέρα: ύψος έως και 6 mm, ακίνητος ή έστω με μικρή κίνηση.
3. Κρόκος: ορατός κατά την ωοσκόπηση μόνο υπό μορφή σκιάς, χωρίς σαφές περίγραμμα, μετακινείται ελαφρά κατά την περιστροφή του αυγού και επανέρχεται στην κεντρική του θέση.

4. Ασπράδι: διαυγές, καθαρό και ημιδιαφανές.
5. Βλαστικός δίσκος: ανεπαίσθητη ανάπτυξη.
6. Η Νομοθεσία του κάθε κράτους ορίζει την ημερομηνία πώλησης και αυτήν της ελάχιστης διατηρησιμότητας.

#### Αυγά κατηγορίας B:

Τα συγκεκριμένα αυγά δεν πληρούν τα κριτήρια ταξινόμησης που ισχύουν για την κατηγορία A επομένως, χαρακτηρίζονται ως B. Χαρακτηριστικά αυτών είναι:

1. Κέλυφος: έχει κανονικό σχήμα, είναι άθικτο, ελαφρώς λερωμένο και ενδέχεται να διαθέτει μικρές παραμορφώσεις. Επιπλέον, δεν θα πρέπει να φέρει κηλίδες αίματος ενώ, ούτε τα περιεχόμενα του θα πρέπει να είναι λερωμένα. Σε περίπτωση που υπάρχουν σχετικές, τα λερωμένα αυγά μπορούν να πλυθούν και καθαριστούν με ειδικές μεθόδους αρκεί να μην επηρεάζεται η ποιότητά τους.
2. Θάλαμος αέρα: ύψος έως και 9 mm, επιτρέπεται υπάρξει μετακίνηση του κενού έως και το μισό του μήκους του αυγού.
3. Κρόκος: ορατός κατά την ωσκόπηση, ελαφρώς πεπλατυσμένος και κινητός.
4. Ασπράδι: σχετικά ημιδιαφανές.
5. Βλαστικός δίσκος: ανεπαίσθητη ανάπτυξη.

Στο Παράρτημα I του EGG-2 standard (2017) γίνεται μια αναφορά στους φυσικοχημικούς δείκτες που καθορίζονται για τα αυγά και τα προϊόντα αυτών, των οποίων η παραγωγή έχει επιτευχθεί μέσω συμβατικών μεθόδων, χωρίς τη χρήση ειδικών διαδικασιών για την αλλαγή της σύνθεσης ή των ιδιοτήτων τους. Οι συγκεκριμένοι δείκτες παρουσιάζονται στον Πίνακα 1, συγκεντρωτικά.

Πίνακας 1. Φυσικοχημικοί δείκτες για τα αυγά και τα προϊόντα αυτών βάσει του EGG-2 standard (2017).

|                                             | <b><u>Product</u></b>                                           |       |                   |       |                   |            |              |
|---------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-------|-------------------|-------|-------------------|------------|--------------|
|                                             | <u>Whole egg</u>                                                |       | <u>Egg yolk</u>   |       | <u>Albumen</u>    |            |              |
|                                             | Liquid and frozen                                               | Dried | Liquid and frozen | Dried | Liquid and frozen | Dried      |              |
|                                             |                                                                 |       |                   |       |                   | Pan-drying | Spray-drying |
| Minimum solids matter content (%) *         | 22,0                                                            | 95,0  | 43,0              | 95,0  | 10,5              | 84,0       | 92,0         |
| Minimum fat content (%)                     | 9,8                                                             | 39,0  | 25,0              | 55,0  | 0,05              | 0,5        |              |
| Minimum protein content (%)                 | 10,5                                                            | 45,0  | 15,0              | 33,0  | 10,0              | 71,0       | 75,0         |
| Extraneous matter                           | No particles over 1 mm in 100 g and should not exceed 100 mg/kg | Same  | Same              | Same  | Same              | Same       |              |
| Minimum concentration of hydrogen ions (pH) | 7,0                                                             | 7,5   | 5,9               | 6,0   | 8,5               | 4,0        |              |
| Maximum beta-hydroxybutyric acid (mg/kg)    | 10                                                              | 10    | 10                | 10    | 10                | 10         |              |
| Maximum lactic acid (mg/kg)                 | 1000                                                            | -     | 1000              | -     | 1000              | -          |              |
| Maximum succinic acid (mg/kg)               | 25                                                              |       | 25                |       | 25                |            |              |

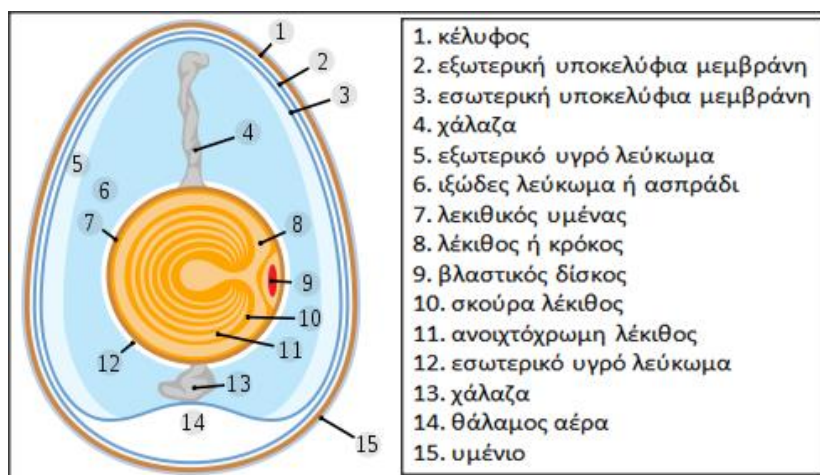
\* Για τα προϊόντα αποξηραμένων αυγών, η αναλογία μάζας της λιπαρής ύλης και της αλβουμίνης των αυγών υπολογίζεται ως στερεή ύλη. Τα επίπεδα υγρασίας στα αποξηραμένα αυγά πρέπει να ελέγχονται.



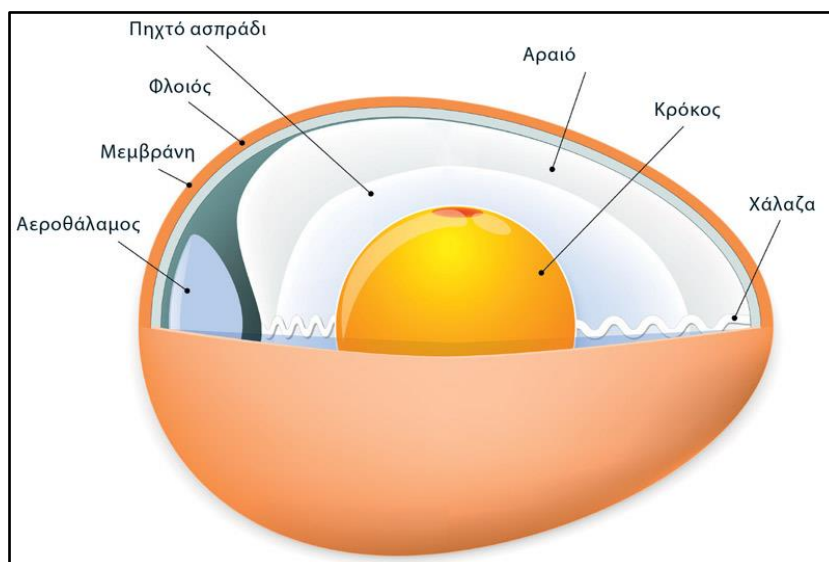
### 1.3 Δομή και σύσταση αυγού

#### 1.3.1 Μορφολογία αυγού

Τα τρία κυριότερα μέρη του αυγού ο κρόκος ή λέκιθος (28-29% κ.β.), το λεύκωμα ή ασπράδι του αυγού (60-63%) και το κέλυφος (9-11%). Στις παρακάτω *Εικόνες 1 και 2* αποτυπώνεται η τυπική δομή του αυγού (σε κάθετη και οριζόντια θέση).



Εικόνα 1. Αποτύπωση δομής αυγού σε κάθετη θέση.



Εικόνα 2. Αποτύπωση δομής αυγού σε οριζόντια θέση.

Πιο συγκεκριμένα,

1. Το κέλυφος ή τσόφλι αποτελεί το προστατευτικό μέρος του αυγού που συντίθεται κυρίως από ανθρακικό ασβέστιο ( $\text{CaCO}_3$ ) σε ποσοστό 94% αλλά και από άλλα άλατα όπως το ανθρακικό μαγνήσιο ( $\text{MgCO}_3$ ) και φωσφορικό ασβέστιο ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) (Sunwoo & Gujral, 2015). Δεν θεωρείται πλήρως στεγανό καθώς, διαθέτει μικροσκοπικούς πόρους μέσω των οποίων πραγματοποιείται ανταλλαγή αερίων, με σκοπό την αναπνοή του εμβρύου (πορώδες στρώμα). Οι πόροι επιτρέπουν την απώλεια νερού αλλά και την είσοδο μικροβίων κάτω από ορισμένες συνθήκες. Το κέλυφος καλύπτεται από ένα εξωτερικό περίβλημα που λέγεται επιδερμίδα και είναι πρωτεϊνικής σύστασης (Li-Chan & Kim, 2007) (PARSONS, 1982) (EFSA, 2014).
2. Ακολουθούν οι δύο μεμβράνες (εσωτερική-εξωτερική) οι οποίες, καλύπτουν εσωτερικά το κέλυφος, προστατεύουν το αυγό από την είσοδο βακτηρίων και είναι στενά συνδεδεμένες μεταξύ τους. Αξίζει να σημειωθεί πως, δεν εφάπτονται στο αμβλύ άκρο του αυγού όπου και σχηματίζεται ο αεροθάλαμος (Li-Chan & Kim, 2007) (Sharaf Eddin et al., 2019) (PARSONS, 1982).
3. Ο αεροθάλαμος σχηματίζεται κατά την διάρκεια της γέννησης, μόλις δηλαδή το αυγό αλλάξει απότομα θερμοκρασία ( $41^\circ\text{C}$ -εξωτερικό περιβάλλον). Κατά αυτόν τον τρόπο, κρυώνει, συστέλλεται και έτσι δημιουργεί ένα μικρό κενό στο κάτω μέρος του αυγού (μεγαλύτερη επιφάνεια) στο σημείο όπου χωρίζονται οι δύο μεμβράνες του κελύφους (PARSONS, 1982).
4. Οι χάλαζες αποτελούν δύο σπειροειδή νήματα που ξεκινούν από την επιφάνεια του κρόκου προς το κέλυφος. Σκοπό έχουν την συγκράτηση του κρόκου στο κέντρο του αυγού (Sharaf Eddin et al., 2019).
5. Το ασπράδι ή λεύκωμα είναι ένα διαφανές ωχροκίτρινο στρώμα το οποίο αποτελείται από τέσσερα μέρη. Τα μέρη αυτά είναι τα εξής: η εξωτερική υγρή αλβουμίνη (23,3%), η εξωτερική παχύρευστη αλβουμίνη (57,3%), η εσωτερική υγρή αλβουμίνη (16,8%) και τέλος η εσωτερική παχύρευστη αλβουμίνη (2,6%) η οποία και βρίσκεται γύρω από τον κρόκο του αυγού (μεμβράνη βιτελίνης) (Li-Chan & Kim, 2007). Οι αναλογίες αυτές εξαρτώνται από το είδος της κότας, τις συνθήκες, το μέγεθος του αυγού αλλά και τον ρυθμό παραγωγής. Το ιξώδες των παχύρευστων στρωμάτων είναι υψηλότερο από εκείνο των υγρών, εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητάς του σε ωομυκίνη.
6. Ο κρόκος (λέκιθος) βρίσκεται στο κέντρο του αυγού και έχει χρώμα κίτρινο-πορτοκαλί. Περιβάλλεται από μια λεπτή διάφανη μεμβράνη (μεμβράνη βιτελίνης ή λεκιθικός υμένες), η οποία περιορίζει τις ανταλλαγές διαφόρων ουσιών μεταξύ κρόκου και λευκώματος (Sharaf Eddin et al., 2019) (Nys & Guyot, 2011). Επιπλέον, αποτελεί και το τελικό φράγμα έναντι της εισόδου των

βακτηρίων (Sharaf Eddin et al., 2019). Όπως και στην περίπτωση της αλβουμίνης, ο κρόκος διαθέτει στρώσεις από σκούρα και ανοιχτόχρωμη λέκιθο.

7. Τέλος, ο βλαστικός δίσκος εντοπίζεται στην επιφάνεια του κρόκου. Είναι ένας διαυγής δίσκος διαμέτρου 3,5 mm, ο οποίος, περιέχει τα θηλυκά χρωμοσώματα και αποτελεί την θέση πολλαπλασιασμού των εμβρυικών κυττάρων (Sharaf Eddin et al., 2019) (Nys & Guyot, 2011).

### 1.3.2 Σύσταση αυγού

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τα κύρια συστατικά του αυγού είναι τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες που όμως βρίσκονται κατεξοχήν στον κρόκο αλλά και ορισμένες βιταμίνες όπως, A, D, B<sub>2</sub> και B<sub>5</sub>. Στον Πίνακα 2 αναφέρονται συγκεντρωτικά τα ποσοστά των συστατικών που υπάρχουν σε κάθε μέρος του αυγού.

Πίνακας 2. Συγκεντρωτικός πίνακας της ποσοστιαίας σύστασης σε υγρασία, πρωτεΐνες, λιπίδια, υδατάνθρακες και τέφρα των επιμέρους συστατικών του αυγού (Li-Chan & Kim, 2007).

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

Με βάση τα δεδομένα αυτά, γίνεται μια πιο αναλυτική περιγραφή της σύστασης του αυγού.

#### ▪ Κρόκος

Έτσι λοιπόν, ο κρόκος του αυγού είναι ένα γαλάκτωμα λίπους σε νερό. Περιέχει περίπου 50% στερεά, όπου τα λιπίδια (65-70% σε ξηρή βάση) και οι πρωτεΐνες (30% ξηρή βάση) αποτελούν τα κύρια συστατικά. Σε μικρότερες ποσότητες εντοπίζονται οι υδατάνθρακες και τα ανόργανα συστατικά (Li-Chan & Kim, 2007) (Belitz et al., 2009).

Όσον αφορά τα λιπίδια (Πίνακας 3), που εντοπίζονται και σε μεγαλύτερη ποσότητα στον κρόκο, βρίσκονται κυρίως υπό την μορφή συμπλεγμάτων λιποπρωτεϊνών και αποτελούνται από περίπου 65% τριακυλογλυκερόλες, 28-30% φωσφολιπίδια και 4-5% χοληστερόλη (Li-Chan & Kim, 2007). Σημαντικό είναι το γεγονός πως τα λιπίδια αυτά περιέχουν ακόρεστα λιπαρά οξέα σε υψηλά επίπεδα.

Πίνακας 3. Αναλυτική σύσταση των λιπιδίων στον κρόκο του αυγού (Li-Chan & Kim, 2007).

| <i>Είδη λιπιδίων</i>   | <i>Ποσοστό επί του συνόλου (%)</i> |
|------------------------|------------------------------------|
| Τριακυλογλυκερόλες     | 65                                 |
| Φωσφατιδυλοχολίνη      | 26                                 |
| Φωσφατιδυλαιθανολαμίνη | 3,8                                |
| Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη  | 0,6                                |
| Χοληστερόλη            | 4                                  |
| Σφιγγομυελίνη          | 0,6                                |

Οι πρωτεΐνες που περιέχονται στον κρόκο είναι είτε λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (LDL), είτε υψηλής πυκνότητας (HDL), είτε πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL). Η γαλακτωματοποιητική ικανότητα που διαθέτει ο κρόκος οφείλεται στην παρουσία της LDL (σε ποσοστό 65% του συνόλου της πρωτεΐνης στον κρόκο) (Li-Chan & Kim, 2007). Πέραν των θρεπτικών και λειτουργικών τους ιδιοτήτων, διαθέτουν αντιμικροβιακή δράση αλλά και αντισυγκολλητικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Li-Chan & Kim, 2007). Αξίζει να σημειωθεί πως έχουν βρεθεί αρκετές ακόμα πρωτεΐνες, σε μικρότερες βέβαια ποσότητες, όπως αναγράφονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Αναλυτική σύσταση των πρωτεϊνών στον κρόκο του αυγού (Li-Chan & Kim, 2007).

| <i>Είδη πρωτεϊνών</i>          | <i>Ποσοστό επί του συνόλου (%)</i> |
|--------------------------------|------------------------------------|
| 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                                  |
| γ-Λιβετίνη (γ-σφαιρίνη)        | 2,7                                |
| Φωσβιτίνη                      | 13,3                               |
| Πρωτεΐνη δέσμησης βιοτίνης     | Ίχνη                               |

Σύμφωνα με τον Πίνακα 2, η περιεκτικότητα του κρόκου σε υδατάνθρακες είναι περίπου 0,2-1,0%. Μέρος των αυτών βρίσκεται σε δεσμευμένη μορφή με πρωτεΐνες (γλυκοπρωτεΐνες) και λιπίδια (γλυκολιπίδια). Από τους ελεύθερους υδατάνθρακες, πέρα από τη γλυκόζη (0,3%), στον κρόκο ανιχνεύονται και γαλακτόζη, μανόζη, αραβινόζη κ.α. (Li-Chan & Kim, 2007) (Belitz et al., 2009).

Η περιεκτικότητα του κρόκου σε ανόργανα στοιχεία είναι περίπου 1%. Το κυριότερο είναι ο φωσφόρος (60% σε φωσφολιπίδια) και σε μικρότερες ποσότητες είναι χλώριο, θείο, ασβέστιο κ.α. (Πίνακας 5) (Li-Chan & Kim, 2007). Από την συνολική περιεκτικότητα του αυγού σε σίδηρο, το μεγαλύτερο μέρος αυτού βρίσκεται στον κρόκο (Nys & Guyot, 2011). Οι ποσότητες των στοιχείων αυτών έχουν άμεση εξάρτηση με την διατροφή που δίνεται από τον παραγωγό.

Πίνακας 5. Ποσότητα (mg) κάθε ανόργανου στοιχείου που βρίσκεται στον κρόκο του αυγού. Με βάση αυγό μάζας 60,9 g, συμπεριλαμβανομένου του κελύφους με (38,4 g αλβουμίνη και 16,7 g κρόκο) που περιέχουν 12,1% και 51,8% στερεά αντίστοιχα (Li-Chan & Kim, 2007).

| <i>Είδη ανόργανων στοιχείων (Units)</i> | <i>Περιεχόμενο στον κρόκο (mg)</i> |
|-----------------------------------------|------------------------------------|
| Ca                                      | 25,2                               |
| Cl                                      | 29,9                               |
| Cu                                      | 0,024                              |
| I                                       | 0,024                              |
| Fe                                      | 1,02                               |
| Mg                                      | 2,15                               |
| Mn                                      | 0,019                              |
| P                                       | 102                                |
| K                                       | 17                                 |
| Na                                      | 9                                  |
| S                                       | 28                                 |
| Zn                                      | 0,66                               |

Εξαιτίας της μορφής και της σύστασης του κρόκου, όλες οι λιποδιαλυτές βιταμίνες (A, D, E) του αυγού περιέχονται σε αυτόν. Επίσης, πέραν των λιποδιαλυτών βιταμινών ένα εξαιρετικά μεγάλο ποσοστό και υδατοδιαλυτών βιταμινών (B<sub>5</sub>, B<sub>9</sub>) βρίσκονται στον κρόκο του αυγού (Πίνακας 6) (Li-Chan & Kim, 2007) (Sunwoo & Gujral, 2015).

Πίνακας 6. Τα είδη των βιταμινών στον κρόκο του αυγού και η αντίστοιχη περιεκτικότητα (Li-Chan & Kim, 2007).

| <i>Είδη βιταμινών</i> | <i>Περιεχόμενο στον κρόκο (mg/100g)</i> |
|-----------------------|-----------------------------------------|
| A                     | 1,12                                    |
| D                     | 0,0056                                  |
| Τοκφερόλες            | 6,5                                     |
| α-τοκοφερόλη          | 5,4                                     |
| B1 (θειαμίνη)         | 0,29                                    |
| B2 (ριβοφλαβίνη)      | 0,44                                    |
| B3 (νιασίνη)          | 0,065                                   |
| B5 (παντοθενικό οξύ)  | 3,72                                    |
| B6 (πυριδοξίνη)       | 0,3                                     |
| B7 (βιοτίνη)          | 0,053                                   |
| B9 (φυλλικό οξύ)      | 0,15                                    |

Το χρώμα του κρόκου αποδίδεται στα λιποδιαλυτά καροτενοειδή, τα οποία προέρχονται αποκλειστικά από την τροφή καθώς οι όρνιθες δεν έχουν την ικανότητα να συνθέτουν τις ουσίες αυτές. Τα κύρια συστατικά των καροτενοειδών είναι οι ξανθοφύλλες (λουτεΐνη, ζεαξανθίνη και β-κρυπτοξανθίνη). Επιπλέον, υπάρχουν και

μικρές ποσότητες καροτενίων, όπως το β-καροτένιο (Li-Chan & Kim, 2007) (Sunwoo & Gujral, 2015). Η διατήρηση ενός ομοιόμορφου χρώματος στον κρόκο εξαρτάται από την ποσότητα, τη χρωματική ικανότητα και τη σταθερότητα των καροτενοειδών (Li-Chan & Kim, 2007).

#### ▪ *Αλβουμίνη*

Το κύριο συστατικό της λευκωματίνης του αυγού είναι το νερό όπου και υπολογίζεται στο 84 με 89% της συνολικής μάζας. Το υπόλοιπο μέρος αυτής αποτελούν τα στερεά συστατικά δηλαδή, οι πρωτεΐνες που κυμαίνονται από 10-11% και σε μικρότερο ποσοστό, οι υδατάνθρακες (κυρίως γλυκόζη), τα λιπίδια και τα ανόργανα στοιχεία (Li-Chan & Kim, 2007).

Αναφορικά με την ομάδα των πρωτεϊνών (40 διαφορετικά είδη), σχετίζονται άμεσα με ποικίλες βιολογικές ιδιότητες. Παραδείγματα αυτών είναι η αντιμικροβιακή, αντικαρκινική και ανασταλτική δράση, η ικανότητα δέσμευσης βιταμινών αλλά και ορισμένες λειτουργικές ιδιότητες όπως ο αφρισμός. Πολλές είναι οι πρωτεΐνες οι οποίες παραμένουν ακόμη και σήμερα άγνωστες (Li-Chan & Kim, 2007). Στον Πίνακα 7 παρατίθενται ορισμένες πρωτεΐνες της αλβουμίνης με τα αντίστοιχα ισοηλεκτρικά σημεία και τις μοριακές τους μάζες. Οι κυριότερες είναι η ωοαλβουμίνη, η ωοτρανσφερίνη, η ωομυκοειδής, η ωομυκίνη και η λυσοζύμη, που αποτελούν > 83% του συνόλου των πρωτεϊνών της αλβουμίνης. Χαρακτηρίζονται ως σφαιρικές με όξινο ισοηλεκτρικό σημείο (pI). Εξάίρεση αποτελούν η λυσοζύμη και την αβιδίνη. Η ωομυκίνη βρίσκεται σε μεγαλύτερη ποσότητα στα παχύρευστα στρώματα της αλβουμίνης πράγμα που εξηγεί το υψηλότερο ιξώδες (Li-Chan & Kim, 2007) (Sunwoo & Gujral, 2015).

Πίνακας 7. Παράθεση ειδών πρωτεΐνης που εντοπίζονται στην λευκωματίνη του αυγού με το αντίστοιχο ισοηλεκτρικό σημείο, μοριακή μάζα (σε kDa) και το ποσοστό στη συνολική μάζα αυτής (Li-Chan & Kim, 2007).

| <i>Πρωτεΐνη</i>        | <i>Ποσοστό (%) στη συνολική μάζα της αλβουμίνης</i> | <i>Ισοηλεκτρικό σημείο (pI)</i> | <i>Μοριακή μάζα (kDa)</i> |
|------------------------|-----------------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------|
| Ωοαλβουμίνη            | 54                                                  | 4,5                             | 45                        |
| Ωοτρανσφερίνη          | 12                                                  | 6,1                             | 76                        |
| Ωομυκοειδής            | 11                                                  | 4,1                             | 28                        |
| Ωομυκίνη               | 3,5                                                 | 4,5-5                           | 5500-8300                 |
| Λυσοζύμη (G1 σφαιρίνη) | 3,4                                                 | 10,7                            | 14,3                      |
| G2 Σφαιρίνη            | 4                                                   | 5,5                             | 30-45                     |
| G3 Σφαιρίνη            | 4                                                   | 5,8                             | Δεν προσδιορίστηκε        |
| Ωοαναστολέας           | 1,5                                                 | 5,1                             | 49                        |
| Ωογλυκοπρωτεΐνη        | 1                                                   | 3,9                             | 24,4                      |
| Φλαβοπρωτεΐνη          | 0,8                                                 | 4                               | 32                        |
| Ωομακροσφαιρίνη        | 0,5                                                 | 4,5                             | 769-900                   |
| Κυστατίνη              | 0,05                                                | 5,1                             | 12,7                      |
| Αβιδίνη                | 0,05                                                | 9,5                             | 68,3                      |
| Κλαστερίνη             | Δεν προσδιορίστηκε                                  | 6,1-6,6                         | 32,4-33                   |

Πέραν των πρωτεϊνών που υπάρχουν στην λευκωματίνη του αυγού, ιδιαίτερα σημαντική είναι και η παρουσία διαφόρων αμινοξέων που συμμετέχουν σε αρκετές αντιδράσεις και παίζουν πολύ σπουδαίο ρόλο στην όλη σύσταση του αυγού (Li-Chan & Kim, 2007). Στον Πίνακα 8, παρουσιάζεται το περιεχόμενο σε αμινοξέα, στην αλβουμίνη αλλά και στον κρόκο. Παρατηρείται πως στον κρόκο του αυγού η περιεκτικότητα στο κάθε αμινοξύ είναι μεγαλύτερη, συγκριτικά με την λευκωματίνη. Εξαιρέση αποτελούν τα αμινοξέα, μεθειονίνη, κυστίνη και φαινυλαλανίνη με ελαφρώς υψηλότερο περιεχόμενο (Li-Chan & Kim, 2007) (Sunwoo & Gujral, 2015).

Πίνακας 8. Το περιεχόμενο των αμινοξέων που βρίσκονται στην αλβουμίνη και τον κρόκο του αυγού, αντίστοιχα (Li-Chan & Kim, 2007).

| <i>Αμινοξέα</i>  | <i>Περιεκτικότητα στην αλβουμίνη<br/>(g/100g)</i> | <i>Περιεκτικότητα στον κρόκο<br/>(g/100g)</i> |
|------------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Τρυπτοφάνη       | 0,125                                             | 0,177                                         |
| Θρεονίνη         | 0,449                                             | 0,687                                         |
| Ισολευκίνη       | 0,661                                             | 0,866                                         |
| Λευκίνη          | 1,016                                             | 1,339                                         |
| 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         | 0,29                                              | 0,416                                         |
| Αλανίνη          | 0,704                                             | 0,836                                         |
| Ασπαρτικό οξύ    | 1,22                                              | 1,55                                          |
| Γλουταμινικό οξύ | 1,55                                              | 1,97                                          |
| Γλυκίνη          | 0,413                                             | 0,488                                         |
| Σερίνη           | 0,798                                             | 1,326                                         |
| Προλίνη          | 0,435                                             | 0,646                                         |

Όσον αφορά τα λιπίδια, η περιεκτικότητά τους στην αλβουμίνη είναι εξαιρετικά χαμηλή (0,03% w/w). Τα κύρια λιπαρά οξέα 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 οξύ (18:0) - Πίνακας 9- (Li-Chan & Kim, 2007) (Sunwoo & Gujral, 2015).



Πίνακας 9. Περιεχόμενο σε λιπαρά οξέα στην αλβουμίνη, το πλάσμα του κρόκου και τους κόκκους του κρόκου (Li-Chan & Kim, 2007).

| <i>Λιπαρά οξέα</i> | <i>Περιεχόμενο σε g/100 g αλβουμίνης</i> | <i>Περιεχόμενο σε g/100 g πλάσματος κρόκου</i> | <i>Περιεχόμενο σε g/100 g κόκκους κρόκου</i> |
|--------------------|------------------------------------------|------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| 16:0               | 18,3                                     | 22,49                                          | 24,24                                        |
| 16:1 n-7           | 0,81                                     | 1,32                                           | 1,18                                         |
| 17:0               | 0,27                                     | 0,22                                           | 0,16                                         |
| 18:0               | 7,76                                     | 11,22                                          | 12,4                                         |
| 18:1 n-9           | 16,66                                    | 31,28                                          | 28,48                                        |
| 18:2 n-6           | 20,92                                    | 27,6                                           | 26,81                                        |
| 18:3 n-6           | 0,23                                     | 0,18                                           | Δεν προσδιορίστηκε                           |
| 18:3 n-3           | 0,15                                     | 0,43                                           | 0,26                                         |
| 20:1 n-9           | 0,06                                     | 0,18                                           | Δεν προσδιορίστηκε                           |
| 20:2 n-6           | 0,23                                     | 0,31                                           | 0,23                                         |
| 20:3 n-6           | 0,4                                      | 0,27                                           | 0,27                                         |
| 20:4 n-6           | 9,92                                     | 2,36                                           | 3,53                                         |
| 22:4 n-6           | 1,14                                     | 0,16                                           | Δεν προσδιορίστηκε                           |
| 22:5 n-3           | 0,37                                     | Δεν προσδιορίστηκε                             | Δεν προσδιορίστηκε                           |
| 22:5 n-6           | 0,9                                      | 0,55                                           | 0,83                                         |
| 22:6 n-3           | 2,07                                     | 0,6                                            | 0,93                                         |
| SFA                | 26,34                                    | 33,92                                          | 36,8                                         |
| MUFA               | 17,53                                    | 32,78                                          | 29,66                                        |
| PUFA               | 36,33                                    | 32,48                                          | 32,86                                        |

Οι υδατάνθρακες εντοπίζονται στην αλβουμίνη σε δύο μορφές. Αυτές είναι, είτε με τη μορφή N ή O- συζευγμένων ολιγοσακχαριτών με πρωτεΐνες ή γλυκοπρωτεΐνες (0,5%), είτε ελεύθεροι (0,4-0,5%). Σχετικά με τους ελεύθερους υδατάνθρακες, σε μεγαλύτερο ποσοστό βρίσκεται η γλυκόζη (98%) και ακολουθούν μαννόζη, γαλακτόζη, αραβινόζη, ξυλόζη, ριβόζη και δεοξυριβόζη, σε περιεκτικότητα ίση με 0,2-2 mg/100 g αλβουμίνης. Η γλυκόζη συνηθίζεται να απομακρύνεται μέσω ζύμωσης πριν από την διαδικασία ξήρανσης της λευκωματίνης έτσι ώστε να αποφευχθεί η αμαύρωση που προκαλείται από την αντίδραση Maillard. Ελεύθεροι ολιγοσακχαρίτες ή πολυσακχαρίτες δεν υπάρχουν (Li-Chan & Kim, 2007) (Belitz et al., 2009).

Πίνακας 10. Σύσταση σε υδατάνθρακες της κάθε πρωτεΐνης που βρίσκεται στην λευκωματίνη του αυγού (Belitz et al., 2009).

| Πρωτεΐνη         | Υδατάνθρακας (%) | Περιεχόμενο (mol/mol πρωτεΐνης) |         |             |               |             |
|------------------|------------------|---------------------------------|---------|-------------|---------------|-------------|
|                  |                  | Γαλακτόζη                       | Μαννόζη | Γλυκοζαμίνη | Γαλακτοζαμίνη | Σιαλικό οξύ |
| Ωοαλβουμίνη      | 3,2              | -                               | 5       | 3           | -             |             |
| Ωομυκοειδή       | 23               | 2                               | 7       | 23          | -             | 1           |
| α-Ωομυκίνη       | 13               | 21                              | 46      | 63          | 6             | 7           |
| Ωογλυκο-πρωτεΐνη | 31,6             | 6                               | 12      | 19          | -             | 2           |
| Ωοαναστολέας (A) | 9,2              | -                               | 10      | 14          | -             | 0,2         |
| Αβιδίνη          | 10               | -                               | 4 (5)   | 3           | -             | -           |

Αναφορικά με τα παραπάνω δεδομένα, το περιεχόμενο της μαννόζης στην γλυκοπρωτεΐνη ωοαναστολέα, αποτελεί άθροισμα γαλακτόζης και μαννόζης. Επιπλέον, στην περίπτωση της αβιδίνης τα δεδομένα είναι ανά υπομονάδα 16 kDa (Belitz et al., 2009).

Τα κύρια ανόργανα συστατικά στην αλβουμίνη είναι το θείο, το κάλιο, το νάτριο και το χλώριο. Επιπλέον, ο φωσφόρος, το ασβέστιο και το μαγνήσιο βρίσκονται σε μικρότερες ποσότητες, όπως και άλλα ιχνοστοιχεία (Πίνακας 11) (Li-Chan & Kim, 2007).

Πίνακας 11. Ανόργανα συστατικά και το αντίστοιχο περιεχόμενο τους στην αλβουμίνη και σε ολόκληρο το αυγό. Με βάση αυγό μάζας 60,9 g, συμπεριλαμβανομένου του κελύφους με (38,4 g αλβουμίνη και 16,7 g κρόκο) που περιέχουν 12,1% και 51,8% στερεά αντίστοιχα (Stadelman & Cotterill, 2017)

| Είδη ανόργανων στοιχείων (Units) | Περιεχόμενο (mg) στην αλβουμίνη | Περιεχόμενο (mg) σε ολόκληρο το αυγό |
|----------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|
| Ca                               | 3,8                             | 29,2                                 |
| Cl                               | 66,1                            | 96                                   |
| Cu                               | 0,009                           | 0,033                                |
| I                                | 0,001                           | 0,026                                |
| Fe                               | 0,053                           | 1,08                                 |
| Mg                               | 4,15                            | 6,33                                 |
| Mn                               | 0,002                           | 0,021                                |
| P                                | 8                               | 111                                  |
| K                                | 57                              | 74                                   |
| Na                               | 63                              | 71                                   |
| S                                | 62                              | 90                                   |
| Zn                               | 0,05                            | 0,72                                 |

Η αλβουμίνη, σε αντίθεση με τον κρόκο του αυγού δεν περιέχει λιποδιαλυτές βιταμίνες. Όμως είναι πλούσια σε υδατοδιαλυτές βιταμίνες όπως το παντοθενικό οξύ, η νιασίνη και η ριβοφλαβίνη. Πολλές εξ αυτών βρίσκονται σε δεσμευμένη μορφή με τις πρωτεΐνες. Το περιεχόμενο των διαφόρων βιταμινών στην αλβουμίνη και σε ολόκληρο αυγό αναγράφονται στον *Πίνακα 12* (Li-Chan & Kim, 2007).

*Πίνακας 12.* Είδη βιταμινών στην αλβουμίνη αλλά και σε ολόκληρο το αυγό σε πλήρη αντιστοιχία με την περιεκτικότητά τους (Stadelman & Cotterill, 2017).

| <i>Είδη βιταμινών</i> | <i>Περιεχόμενο στην αλβουμίνη<br/>(mg/100g)</i> | <i>Περιεχόμενο σε ολόκληρο το<br/>αυγό (mg/100g)</i> |
|-----------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| A                     | -                                               | 0,22                                                 |
| D                     | -                                               | 0,003                                                |
| Τοκφερόλες            | -                                               | 2,3                                                  |
| α-τοκοφερόλη          | -                                               | 1,9                                                  |
| B1 (θειαμίνη)         | 0,022                                           | 0,11                                                 |
| B2 (ριβοφλαβίνη)      | 0,27                                            | 0,3                                                  |
| B3 (νιασίνη)          | 0,1                                             | 0,1                                                  |
| B5 (παντοθενικό οξύ)  | 0,14                                            | 1,59                                                 |
| B6 (πυριδοξίνη)       | 0,012                                           | 0,08                                                 |
| B7 (βιοτίνη)          | 0,007                                           | 0,025                                                |
| B9 (φυλλικό οξύ)      | 0,009                                           | 0,051                                                |
| K                     | -                                               | 0,009                                                |

#### ▪ **Κέλυφος**

Το κέλυφος αποτελείται από κρυστάλλους ασβετίτη σε οργανικό τρισιδιάστατο πλέγμα. Περίπου το 98% της συνολικής ποσότητας των ανόργανων συστατικών (96%) του κελύφους είναι ασβέστιο ενώ, άλλα στοιχεία που βρίσκονται σε μικρότερη ποσότητα είναι ο φώσφορος και το μαγνήσιο (Li-Chan & Kim, 2007). Ίχνη σιδήρου και θείου μπορούν επίσης να εντοπιστούν στην σύσταση του κελύφους. Τέλος σε ποσοστό ίσο με 1-2% κ.β ανέρχονται οι πρωτεΐνες και οι πολυσακχαρίτες πλούσιοι σε θείο (Li-Chan & Kim, 2007) (Sunwoo & Gujral, 2015).

#### ▪ **Μεμβράνες κελύφους**

Οι μεμβράνες που συνιστούν το κέλυφος αποτελούνται από πρωτεΐνες και πιο συγκεκριμένα από κολλαγόνο τύπου I και V. Η αντιβακτηριακή δράση που εμφανίζουν οφείλεται στην παρουσία της ωοτρανσφερίνης, της λυσοζύμης και της N-ακετυλο-β-γλυκοζαμινιδάσης (b-NAGase) (Sunwoo & Gujral, 2015) (Li-Chan & Kim, 2007).

### **1.4 Ποιοτικά χαρακτηριστικά αυγού**

Η εξωτερική ποιότητα του αυγού σχετίζεται με τη μάζα, την υφή, την καθαριότητα και το σχήμα του κελύφους, ενώ η εσωτερική ποιότητα επικεντρώνεται στο ιξώδες και την

καθαρότητα της αλβουμίνης, το μέγεθος του αεροθαλάμου, το σχήμα του κρόκου και την αντοχή αυτού. Γενικότερα, τα χαρακτηριστικά των αυγών καθορίζονται από αρκετούς παράγοντες όπως για παράδειγμα η ηλικία και ο γονότυπος της όρνιθας, η διατροφή και ο τρόπος εκτροφής που ακολουθείται αλλά και ο χρόνος της ωοτοκίας. Αξίζει να σημειωθεί πως, η ποιότητα του αυγού αμέσως μετά την ωοτοκία δεν μπορεί να βελτιωθεί, επομένως είναι απαραίτητο η αποθήκευση και η συντήρηση των αυγών να γίνεται σωστά έτσι ώστε να διατηρηθεί στον μέγιστο βαθμό η ποιότητα αυτών.

#### **1.4.1 Στο εξωτερικό του αυγού**

Με βάση και τα δεδομένα και τις οδηγίες που λαμβάνονται από τους Κανονισμούς (ΕΚ) και τα Πρότυπα, η ποιότητα των εξωτερικών αυγών κρίνεται με βάση την υφή, το χρώμα, το σχήμα του κελύφους, τη μάζα και την καθαρότητα.

Το κέλυφος κάθε αυγού πρέπει να είναι λείο, καθαρό και χωρίς ρωγμές. Τα αυγά πρέπει να έχουν ομοιόμορφο χρώμα, μέγεθος και σχήμα. Αρχικά, το χρώμα του κελύφους δεν έχει αντίκτυπο στην θρεπτική αξία του αυγού και ποικίλλει (λευκό, καφέ, ενδιάμεσα χρώματα) ανάλογα με την ηλικία, τις συνθήκες εκτροφής, την κατάσταση της υγείας και τον γονότυπο της όρνιθας (Mertens et al., 2011) (Schwägele, 2011). Η ένταση του χρώματος μειώνεται με την αύξηση της ηλικίας της όρνιθας και επιπλέον μπορεί να μετρηθεί μέσω μεθόδων που βασίζονται στην φασματοσκοπία ορατού (Mertens et al., 2011). Το μέγεθος και το σχήμα του αυγού πρέπει να συμβαδίζει με τα νομοθετικά πλαίσια που έχουν τεθεί.

Η μάζα κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 53-73 g και εξαρτάται κυρίως από το είδος της διατροφής που ακολουθείται, την κατάσταση της υγείας και τον γονότυπο της όρνιθας (Schwägele, 2011). Η απώλεια υγρασίας και CO<sub>2</sub> από το εσωτερικό του αυγού (μέσω των πόρων) οδηγεί σε άμεση μείωση της μάζας, πράγμα που συνδέεται άμεσα με την σύσταση της αλβουμίνης (EFSA, 2014). Η μείωση της μάζας εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως, η εξωτερική θερμοκρασία και υγρασία, το πορώδες του αυγού, η ποιότητα της επιδερμίδας και των μεμβρανών αλλά και ο χρόνος αποθήκευσης.

Σχετικά με την ποιότητα της επιδερμίδας και των μεμβρανών του κελύφους, η συσχέτιση με την θερμοκρασία (αυγού και περιβάλλοντος), την υγρασία και την πλύση των αυγών είναι άμεση. Διατηρώντας το αυγό σε θερμοκρασία δωματίου η επιδερμίδα παραμένει ακέραιη για τουλάχιστον 4 ημέρες προστατεύοντας έτσι το αυγό από ενδεχόμενη βακτηριακή μόλυνση. Μετά την πάροδο 21 ημερών από την ωοτοκία, η σύσταση αυτής αλλοιώνεται και γίνεται περισσότερο εύθραυστη με αποτέλεσμα να μην διαθέτει πλέον τα προηγούμενα χαρακτηριστικά της. Επιπλέον, η ακατάλληλη πλύση των αυγών επιταχύνει την αλλοίωση επιδερμίδας και μεμβρανών (EFSA, 2014) (Li-Chan & Kim, 2007).

Η αντοχή του κελύφους μειώνεται με την αύξηση της ηλικίας των ορνίθων και επηρεάζεται άμεσα από το πάχος και την σύσταση του ίδιου του κελύφους (Mertens et

al., 2011). Πλέον, υπάρχουν αρκετές μέθοδοι, καταστροφικές ή μη, για τον προσδιορισμό της αντοχής του κελύφους (π.χ. άσκηση δύναμης θραύσης-συμπίεσης). Η μείωση της αντοχής οδηγεί στην εμφάνιση ρωγμών. Η κύρια μέθοδος εντοπισμού ρωγμών αλλά και ακαθαρσιών είναι η ωσκόπηση (με ανάπτυξη και εναλλακτικών συστημάτων) (EFSA, 2014). Στην περίπτωση των ακαθαρσιών, η ανίχνευσή τους μπορεί να επιτευχθεί και με παρουσία ανθρωπίνου δυναμικού ή συστημάτων με κάμερες (Mertens et al., 2011) (EFSA, 2014).

#### **1.4.2 Στο εσωτερικό του αυγού**

Ο κρόκος αυγού αμέσως μετά την ωοτοκία είναι στρογγυλός και σφιχτός. Με την πάροδο των ημερών, ο κρόκος αρχίζει να απορροφά νερό από την αλβουμίνη του αυγού, αυξάνοντας έτσι το μέγεθός του. Αποτέλεσμα αυτού είναι και η μεγέθυνση και η αλλοίωση της μεμβράνης της βιταλίνης (εκτιμάται με συσκευές συμπίεσης ή τριχοειδούς κενού) (EFSA, 2014). Ο δείκτης κρόκου (ύψος/πλάτος) αποτελεί ένδειξη της ποιότητας της μεμβράνης αυτής. Για ένα αυγό φρέσκο και καλής ποιότητας ο δείκτης αυτός έχει τιμή περίπου στο 0,45 (Mertens et al., 2011) (EFSA, 2014). Το χρώμα του ποικίλλει από ανοιχτό κίτρινο μέχρι βαθύ πορτοκαλί αναλόγως την διατροφή που ακολουθούν οι όρνιθες (π.χ. πλούσια σε καροτενοειδή). Αξίζει να σημειωθεί πως το χρώμα δεν αποτελεί ένδειξη καλής ή κακής ποιότητας του αυγού ούτε επηρεάζει την θρεπτική αξία. Το χρώμα μπορεί να μετρηθεί μέσω της ανάκλασης ή της κλίμακας Roche (Mertens et al., 2011). Το pH του κρόκου είναι γενικά κοντά στο 6,0. Ωστόσο, κατά την αποθήκευση αυξάνεται σταδιακά για να φτάσει το 6,4 με 6,9 (EFSA, 2014).

Η αρχική τιμή pH της αλβουμίνης, αμέσως μετά την παραγωγή του αυγού, κυμαίνεται μεταξύ 7,6 και 8,5. Κατά την αποθήκευση, το pH αυξάνεται με ρυθμό που εξαρτάται από τη θερμοκρασία. Η μέγιστη τιμή που μπορεί να λάβει είναι περίπου 9,7. Αφού περάσουν 21 ημέρες αποθήκευσης, το pH βρίσκεται κοντά στο 9,4, ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία αποθήκευσης (3-35°C) (EFSA, 2014). Οι αυξήσεις στο pH οφείλονται στην απώλεια CO<sub>2</sub> μέσω των πόρων του κελύφους αλλά και το διαλυμένο CO<sub>2</sub>, τα διττανθρακικά και ανθρακικά ιόντα και την ύπαρξη πρωτεϊνών. Η συγκέντρωση των ανθρακικών ιόντων επηρεάζεται από τη μερική πίεση του CO<sub>2</sub> στο εξωτερικό περιβάλλον (EFSA, 2014) (Karoui et al., 2006). Η αύξηση αυτή οδηγεί στην υγροποίηση του παχύρευστου λευκώματος, πιθανόν εξαιτίας της τροποποίησης της δομής της ωομυκίνης και την αλληλεπίδραση με λυσοζύμη. Αποτέλεσμα της υγροποίησης είναι η μεταφορά του κρόκου από το κέντρο του αυγού προς το άκρο και την άμεση επαφή με τις μεμβράνες (διάσπαση χαλαζών) (EFSA, 2014).

Η θολή εμφάνιση της αλβουμίνης οφείλεται επίσης στο CO<sub>2</sub>. Με την πάροδο των ημερών, η απώλεια CO<sub>2</sub> κάνει το λεύκωμα να γίνεται περισσότερο διαφανές. Επιπλέον, κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης των αυγών, το εσωτερικό νερό αρχίζει να διαφεύγει από τους πόρους, προκαλώντας έτσι έως και την τριπλάσια αύξηση του όγκου και του ύψους του θαλάμου αέρα σε διάστημα 5 εβδομάδων. Οι δύο αυτές

παράμετροι σχετίζονται άμεσα με την ποιότητα και την φρεσκότητα του αυγού, για αυτό τον λόγο υπόκεινται και σε αυστηρούς ελέγχους. Το ύψος του θαλάμου μετρείται κατά την ωοσκόπηση (EFSA, 2014).

Σχετικά με το ύψος της παχύρρευστης αλβουμίνης, αυτό μειώνεται με την πάροδο του χρόνου αποθήκευσης, την αύξηση της ηλικίας της όρνιθας αλλά και με την φύλαξη σε υψηλές θερμοκρασίες (Liu et al., 2020) (Karoui et al., 2006). Η τιμή του ύψους χρησιμοποιείται στον υπολογισμό του πιο γνωστού δείκτη ποιότητας για την αλβουμίνη, τις μονάδες Haugh. Οι μονάδες αυτές προσδιορίζονται μέσω της παρακάτω εξίσωσης:

$$HU = 100 \times \log_{10}(h - (1,7 \times w^{0,37}) + 7,6) \quad - 1 -$$

Όπου HU είναι οι μονάδες Haugh, h το ύψος της παχύρρευστης αλβουμίνης μετρημένο σε mm και w η μάζα αυγού σε g.

Οι μονάδες αυτές μειώνονται κατά την αποθήκευση καθώς όπως προαναφέρθηκε το ύψος της παχύρρευστης αλβουμίνης μειώνεται. Όταν οι τιμές αυτές είναι σχετικά υψηλές (>75) αυτό αποτελεί ένδειξη φρεσκότητας (Schwägele, 2011).

Σύμφωνα με το Υπουργείο Γεωργίας των ΗΠΑ (USDA) τα αυγά κατατάσσονται σε κατηγορίες σύμφωνα και με τις τιμές που μπορεί να έχουν οι μονάδες Haugh (Haugh Unit-HU). Έτσι λοιπόν, στην κατηγορία AA ανήκουν τα αυγά με  $HU \geq 72$ , στην κατηγορία A αυτά με τιμές από 60 έως 72 και στην κατηγορία B εκείνα με  $HU < 60$ . Επιπλέον, έχει αναφερθεί άλλη μια κατηγοριοποίηση όπου, AA ( $HU \geq 72$ ), A ( $60 \leq HU \leq 71$ ), B ( $31 \leq HU \leq 59$ ) και μια C ( $HU \leq 30$ ) (United States Department of Agriculture Marketing and Regulatory Programs, 2000).

Λόγω του ότι, από μεγάλη μερίδα ερευνητών οι μονάδες Haugh δεν θεωρούνται αξιόπιστοι δείκτες αξιολόγησης της φρεσκότητας, έχουν ξεκινήσει να προτείνονται νέες εναλλακτικές μέθοδοι για τον χαρακτηρισμό της φρεσκότητας, αν και βρίσκονται ακόμα σε πειραματικό στάδιο. Μερικές από αυτές είναι οι φασματοσκοπικές τεχνικές αλλά και η ηλεκτρονική μύτη (καταγραφή πτητικών ενώσεων) όπου βασίζονται κυρίως στην συσχέτιση της φρεσκότητας με ορισμένα ποιοτικά χαρακτηριστικά που αναφέρθηκαν προηγουμένως (π.χ. pH) (Mertens et al., 2011) (EFSA, 2014).

Γενικότερα, η αποθήκευση των αυγών σε θερμοκρασίες άνω των 15,5 °C αυξάνει την απώλεια υγρασίας. Επιπλέον, η υψηλή σχετική υγρασία (RH>70%) βοηθά στη μείωση των απωλειών νερού άρα και στην μείωση της απώλειας μάζας και την διατήρηση της φρεσκότητας για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα. Η μεταβολή των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των αυγών έχει άμεση επίδραση στο μικροβιακό φορτίο του αυγού αλλά και στις λειτουργικές ιδιότητες των προϊόντων όπου τα αυγά χρησιμοποιούνται ως πρώτη ύλη. Αξίζει να ειπωθεί πως, τα αυγά είναι πολύ επιρρεπή στο να προσλάβουν οσμές από άλλα προϊόντων κατά την κοινή αποθήκευσή τους επομένως, συνιστάται η χωριστή αποθήκευση. Τέλος, η ωοαλβουμίνη θεωρείται η κύρια πρωτεΐνη της αλβουμίνης. Έχοντας λοιπόν τιμές υψηλού pH και θερμοκρασίας αποθήκευσης η

μεταβολή της σε μια πιο θερμοανθεκτική μορφή, την S-ωοαλβουμίνη, επιταχύνεται. Το γεγονός αυτό έχει άμεσο αντίκτυπο στις λειτουργικές ιδιότητες των αυγών (EFSA, 2014) (Karoui et al., 2006) (Liu et al., 2020).

### **1.5 Δείκτες φρεσκότητας**

Είναι πολύ σημαντικό να πραγματοποιείται συνεχής έλεγχος και παρακολούθηση της φρεσκότητας των αυγών και των προϊόντων αυτών. Τα αυγά αποτελούν ένα τρόφιμο με πλούσιο θρεπτικό και χημικό προφίλ αλλά και εξαιρετικά ευαίσθητα. Η παραγωγή προϊόντων υψηλής ποιότητας και ασφάλειας αποτελεί στόχο όλων των βιομηχανιών. Αν και η αξιολόγηση ισχυρών δεικτών φρεσκότητας και αλλοίωσης βρίσκεται ακόμα σε πρώιμο στάδιο έχουν αναπτυχθεί ορισμένες μέθοδοι με σκοπό να επιτευχθεί ο στόχος αυτός. Απαιτείται όμως περαιτέρω έρευνα στον τομέα αυτό έτσι ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί πρακτικά από την βιομηχανία και να προβλεφθεί έγκαιρα η αλλοίωση των αυγών και το επίπεδο φρεσκότητάς τους (Cavanna et al., 2018). Πέραν των ορισμένων ποιοτικών χαρακτηριστικών που αναφέρθηκαν προηγουμένως ως δείκτες φρεσκότητας (π.χ. μονάδες Haugh), η αξιολόγηση μπορεί να πραγματοποιηθεί και μέσω της ανίχνευσης αλλοιογόνων μικροοργανισμών, του δείκτη διάθλασης αλβουμίνης αλλά και άλλων μεταβολιτών που περιγράφονται και στον Κανονισμό (ΕΚ) 853/2004 (EFSA, 2014) (Cavanna et al., 2018). Ενδέχεται ο συνδυασμός δεικτών για την αξιολόγηση της φρεσκότητας να μην επαρκεί για την πλήρη περιγραφή και μελέτη της συγκεκριμένης παραμέτρου (Cavanna et al., 2018).

#### **1.5.1 Χημικοί δείκτες**

Οι διάφορες φυσικοχημικές αντιδράσεις που πραγματοποιούνται στο εσωτερικό του αυγού αλλά και η πληθώρα των χημικών ενώσεων που διαθέτει, μπορούν να συνδεθούν άμεσα με την αλλοίωση αλλά και την φρεσκότητα των αυγών. Έτσι λοιπόν, αναπτύσσονται μεταβολικοί δείκτες βοηθώντας στην μελέτη των αυγών αλλά και την ανίχνευση αλλοίωσης ή ακόμα και απάτης. Εξειδικευμένο και εκπαιδευμένο προσωπικό είναι ικανό να χρησιμοποιήσει την μέθοδο της αισθητηριακής ανάλυσης των πτητικών συστατικών αλλά και να προχωρήσει σε τεχνικές χρωματογραφικής και ενζυματικής ανάλυσης (EFSA, 2014). Τα όσα μετρούνται βασίζονται στην υπάρχουσα Νομοθεσία που έχει δοθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση αλλά και από άλλα Πρότυπα.

Πιο συγκεκριμένα, με βάση τη Νομοθεσία της ΕΕ (853/2004) το γαλακτικό οξύ είναι το μόνο που χαρακτηρίζεται ως αξιόπιστος δείκτης φρεσκότητας ενώ με βάση το Πρότυπο EGG-2 UNECE, το ηλεκτρικό και το 3-υδροξυβουτυρικό οξύ θεωρείται δείκτης ανίχνευσης ενδεχόμενης απάτης.

Αναλυτικότερα, το γαλακτικό οξύ σχετίζεται άμεσα με την μικροβιακή ανάπτυξη αλλά και με την ανάπτυξη του εμβρύου σε ένα γονιμοποιημένο αυγό. Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως η Νομοθεσία ορίζει ως μέγιστη αποδεκτή τιμή του γαλακτικού οξέος στο αυγό τα 1000 mg/kg (ξηράς ουσίας). Με την πάροδο του χρόνου αποθήκευσης και την μεταβολή της θερμοκρασίας, η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος αυξάνεται. Εν αντιθέσει με την υγρασία του περιβάλλοντος και τη μάζα του αυγού, όπου δεν

επηρεάζουν σε κανένα βαθμό την συγκέντρωση αυτή. Για αυτόν τον λόγο άλλωστε θεωρείται ως ένας δείκτης γήρανσης των αυγών δηλαδή, αποτελεί ένδειξη υποβάθμισης αυτών με την πάροδο του χρόνου. Ενδεικτικά, 10 ημέρες μετά την ωοτοκία, η τιμή του γαλακτικού οξέος εντοπίζεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα (1-7 mg/kg). Στα αυγά που διατίθενται στην αγορά η συγκέντρωση αυτού έχει τιμή ίση με 250 mg/kg. Επιπλέον, στην θερμοκρασία αποθήκευσης των 4°C, η τιμή του γαλακτικού οξέος παραμένει σε πολύ χαμηλά επίπεδα για μεγάλο χρονικό διάστημα (έως 6 μήνες). Αναλογική αύξηση με το χρόνο παρατηρήθηκε όταν τα αυγά αποθηκεύτηκαν στους 20°C για 37 ημέρες μετά την ωοτοκία. Σε κάθε περίπτωση η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος δεν υπερέβη την τιμή των 500 mg/kg (EFSA, 2014).

Πέραν του γαλακτικού οξέος και το ηλεκτρικό οξύ μπορεί να χαρακτηριστεί ως κριτήριο ποιότητας με βάση το EGG-2 UNECE καθώς, σχετίζεται άμεσα με τη μικροβιακή αλλοίωση. Αν και παλαιότερα αποτελούσε απαίτηση από την Νομοθεσία της ΕΕ ( $\leq 22$  mg/kg) πλέον, δεν θεωρείται αξιόπιστος δείκτης φρεσκότητας επομένως, δεν περιλαμβάνεται στους Κανονισμούς. Η παρακολούθηση της συγκέντρωσής του στα αυγά παραμένει όμως στην μελέτη του χημικού τους προφίλ όπως και το 3-υδροξυβουτυρικό οξύ ( $\leq 1$  mg/kg) (Renzon et al., 2021) (Cavanna et al., 2018).

Αν και η Νομοθεσία έχει θέσει τα κριτήρια ποιότητας και τους δείκτες φρεσκότητας για τα αυγά, η ύπαρξη κι άλλων ενώσεων που προσφέρουν πληροφορίες για την κατάσταση του αυγού, ενδέχεται να λειτουργήσουν ως πιθανοί δείκτες.

Έτσι λοιπόν, η ωοαλβουμίνη αποτελεί παραπάνω από το 50% της πρωτεΐνης που εμπεριέχεται στην αλβουμίνη. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη μετατρέπεται σε πιο θερμοσταθερή μορφή, την S-ωοαλβουμίνη κατά την διάρκεια της αποθήκευσης των αυγών (Deleu et al., 2015). Η μετατροπή αυτή εξαρτάται άμεσα από την θερμοκρασία στην οποία είναι αποθηκευμένα τα αυγά αλλά και το υψηλό pH. Σύμφωνα με την μελέτη των Huang et al. (2012), η S-ωοαλβουμίνη παρουσίασε υψηλό συντελεστή συσχέτισης με το χρόνο (σε συγκεκριμένη T), θετική συσχέτιση με το pH της αλβουμίνης αλλά και υψηλή αρνητική συσχέτιση με το δείκτη κρόκου του αυγού και τις μονάδες Haugh (Huang et al., 2012).

Ο προσδιορισμός του διμεθυλοσουλφιδίου μέσω αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρία μάζας (GC-MS) μπορεί να θεωρηθεί ως αντικειμενική μέθοδος αξιολόγησης κυρίως, των υγρών αλλά και κατεψυγμένων προϊόντων αυγών (EFSA, 2014).

Η ουρακίλη εξαιτίας της δομής και της μορφής της συνδέεται με την καταλυτική δραστηριότητα που διαθέτουν οι βακτηριακές νουκλεοσιδικές φωσφορυλάσες στην ουριδίνη που εμπεριέχεται στο αυγό. Είναι ένας άκρως αποτελεσματικός δείκτης βακτηριακής ανάπτυξης σε ορισμένα προϊόντα αυγών. Η συγκέντρωση της ουρακίλης αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας αποθήκευσης. Όταν η τιμή της ουρακίλης είναι σε πολύ υψηλά επίπεδα, αυτό αποτελεί ένδειξη υψηλού μικροβιακού φορτίου στο εσωτερικό του αυγού επομένως, κρίνονται και ακατάλληλα για βρώση (EFSA, 2014).



Τόσο η ουριδίνη όσο και το πυρογλουταμινικό οξύ χαρακτηρίζονται ως δείκτες αποδόμησης που αυξάνονται τόσο στον κρόκο, όσο και στην αλβουμίνη (Karoui et al., 2006). Κατά την διάρκεια της αποθήκευσης των αυγών, οι συγκεντρώσεις των ενώσεων αυξάνονται έντονα. Εξαιτίας όμως της θερμοευαισθησίας τους και της μεταβλητότητάς τους δεν επιλέγονται (Coat et al., 2018).

Τέλος και η φουροσίνη θεωρείται ένας δείκτης αποδόμησης αλλά και πιθανός δείκτης φρεσκότητας στα αυγά με κέλυφος. Η φουροσίνη παράγεται μέσω της όξινης υδρόλυσης των ενώσεων Amadori και μπορεί να ανιχνευθεί στην αλβουμίνη του αυγού. Επιπλέον, ο δείκτης αυτός δείχνει υψηλή επαναληψιμότητα και χαμηλή φυσική μεταβλητότητα στα φρέσκα αυγά. Αξίζει όμως να σημειωθεί πως δεν εξαρτάται από παράγοντες όπως, η ηλικία της όρνιθας, την σχετική υγρασία κατά την αποθήκευση αλλά και τη μάζα του αυγού (Karoui et al., 2006).

### **1.5.2 Δείκτης διάθλασης αλβουμίνης**

Ο δείκτης διάθλασης της αλβουμίνης αποτελεί πιθανό δείκτη φρεσκότητας των αυγών με βάση έρευνες των Stanescu et al (1995). Η μέτρηση όμως του δείκτη αυτού είναι αρκετά χρονοβόρα εν συγκρίσει με τις μετρήσεις του pH και των μονάδων Haugh, για αυτό και δεν επιλέγεται (Karoui et al., 2006).

### **1.5.3 Αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί**

Οι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί χρήζουν τεράστιας προσοχής και παρακολούθησης καθώς, η ανάπτυξη ορισμένων ικανών βακτηρίων μπορεί να προκαλέσει αλλοίωση στα αυγά και να επηρεάσει άμεσα την ασφάλεια και την ποιότητά τους. Η αξιολόγηση των μικροοργανισμών αυτών μπορεί να πραγματοποιηθεί με μικροβιολογικές μεθόδους αλλά και με μοριακές, οπτικές και θερμιδομετρικές τεχνικές. Συνήθως επιλέγονται οι κλασσικές μικροβιολογικές μέθοδοι καθώς, οι οπτικές τεχνικές χαρακτηρίζονται από μικρή ευαισθησία και οι θερμιδομετρικές απαιτούν ένα εξειδικευμένο προσωπικό και εξοπλισμό. Η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR) αν και θεωρείται πιο αξιόπιστη, ευαίσθητη και γρήγορη από τις κλασσικές μεθόδους, δεν καταφέρνει να διακρίνει τα αλλοιογόνα από τα μη στελέχη παρά μόνο τα σπορογόνα και έτσι δεν ακολουθείται. Στην *Εικόνα 3* παρουσιάζονται ορισμένες εναλλακτικές μέθοδοι εκτίμησης της μικροβιακής ποιότητας κάποιων προϊόντων αυγού όπως αυτές δίνονται από την EFSA (EFSA, 2014).

| Μέθοδοι                                        | Υγρό προϊόν αυγών / τρόφιμο που περιέχει αυγά | Κριτήρια αλλοίωσης                                       | Πλεονεκτήματα μεθόδου                         | Μειονεκτήματα μεθόδου                                                                 |
|------------------------------------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Ανίχνευση αλλοιογόνων βακτηρίων</b>         |                                               |                                                          |                                               |                                                                                       |
| δοκιμή αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) | Ολόκληρο αυγό και τρόφιμα που περιέχουν αυγά  | Ανίχνευση και ταυτοποίηση σπορογόνων βακτηρίων           | Ευαίσθητη<br>Ταχεία<br>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 <sup>6</sup> CFU/g)                         |
| <b>Ανίχνευση δεικτών αλλοίωσης</b>             |                                               |                                                          |                                               |                                                                                       |
| Ανάλυση οσμής                                  | Ολόκληρο αυγό, ασπράδι αυγού, κρόκος αυγού    | Οσμή ελαφρώς όξινη, αποσύνθεσης                          | Ευαίσθητη<br>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 kit                                 | Ολόκληρο αυγό και φρέσκα ζυμαρικά             | 3-υδροξυβουτυρικό, ηλεκτρικό και γαλακτικό οξύ, ουρακίλη | Ταχεία                                        | Χαμηλή απόδοση εκχύλισης<br>Όχι ευαίσθητη                                             |

Εικόνα 3. Εναλλακτικές μέθοδοι εκτίμησης της μικροβιακής ποιότητας ορισμένων προϊόντων του αυγού .

## 2. Αξιολόγηση και εκτίμηση φρεσκότητας

Στο προηγούμενο κεφάλαιο έγινε μια αναφορά στις μεθόδους αξιολόγησης και εκτίμησης της φρεσκότητας, της αλλοίωσης και της μικροβιακής ποιότητας των αυγών και των προϊόντων αυτών. Με την χρήση μερικών χημικών δεικτών, μικροβιολογικών τεχνικών αλλά και την μελέτη ορισμένων ποιοτικών χαρακτηριστικών, μπορεί να επιτευχθεί η αξιολόγηση. Πραγματοποιούνται συνεχείς έρευνες έτσι ώστε, να βρεθούν αξιόπιστες και συνάμα γρήγορες μέθοδοι που θα μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν πρακτικά από την βιομηχανία των τροφίμων. Είναι πολύ σημαντικό μια επιχείρηση να έχει η ίδια την δυνατότητα να αξιολογήσει την φρεσκότητα των προϊόντων της, άμεσα και έχοντας έγκυρα αποτελέσματα αλλά να μπορεί και να πιστοποιήσει την ποιότητα και την αυθεντικότητα αυτών.

Τέτοιες είδους τεχνικές μέχρι στιγμής είναι οι φασματοσκοπικές, σε συνδυασμό με μεθόδους στατιστικής πολυμεταβλητής ανάλυσης, και το σύστημα της «ηλεκτρονικής μύτης». Εξαιτίας του χαμηλού κόστους τους, το γεγονός πως δεν είναι καταστρεπτικές, δεν απαιτούν (ή απαιτούν ελάχιστη) προετοιμασία δείγματος είναι ταχείες και έχουν την δυνατότητα να αξιολογούν ταυτόχρονα πολλαπλές παραμέτρους, η εφαρμογή τους σε αυτοματοποιημένο ποιοτικό έλεγχο είναι συχνή (Coat et al., 2018) (Karoui et al., 2006). Όμως, η χαμηλή διακριτική ικανότητα και ευαισθησία τους αποτελούν μειονέκτημα για τις μεθόδους αυτές (Coat et al., 2018). Στα πλαίσια της μελέτης αυτής, η μεταβολωμική ανάλυση με χρήση διαφόρων φασματοσκοπικών και χρωματογραφικών τεχνικών έρχεται να βοηθήσει στην πιστοποίηση της αυθεντικότητας των αυγών μέσα από προσδιορισμό ορισμένων δεικτών.

## 2.1 Μέθοδοι αξιολόγησης

Το σύστημα «ηλεκτρονικής μύτης» αποτελεί μια τεχνική που βασίζεται στην ανίχνευση ορισμένων χαρακτηριστικών μοτίβων που παρουσιάζουν οι οργανικές πτητικές ενώσεις (global fingerprint) (Suman et al., 2018). Τέτοιου είδους ενώσεις είναι συνήθως αρωματικές, θειούχες (μεθυλοσουλφίδιο) αλλά και οι αλδεΐδες καθώς, συνδέονται άμεσα με την αλλοίωση και υποβάθμιση της ποιότητας και των χαρακτηριστικών των αυγών. Λόγω του ότι κατά την επεξεργασία των δειγμάτων πραγματοποιούνται διάφορες τεχνικές εκχύλισης και ανάλυσης (steam distillation, solvent extraction κ.α) οι οποίες, ενδέχεται να οδηγήσουν στην παραγωγή νέων ενώσεων που δεν αντικατοπτρίζουν το πραγματικό χημικό προφίλ του αυγού, το σύστημα της «ηλεκτρονικής μύτης» αποτελεί μια σημαντική εναλλακτική λύση (Suman et al., 2018). Για να επιτευχθεί όμως η αξιολόγηση της φρεσκότητας απαιτείται και η ανάπτυξη κάποιων χημειομετρικών μοντέλων. Η συγκεκριμένη μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί και σε αυγά με κέλυφος αλλά και σε προϊόντα αυτών. Τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί ένα σύστημα «ηλεκτρονικής» μύτης το οποίο, συνδυάζεται με την μέθοδο της γρήγορης αέριας χρωματογραφίας δίνοντας έτσι πληροφορίες για το πτητικό αποτύπωμα των αυγών σε πολύ μικρό χρόνο (Yimenu et al., 2017).

Πέραν του συστήματος της «ηλεκτρονικής μύτης», οι φασματοσκοπικές τεχνικές αποτελούν όπως ειπώθηκε προηγουμένως, έναν εξίσου σημαντικό τρόπο αξιολόγησης της φρεσκότητας των αυγών.

Πιο συγκεκριμένα, οι μετρήσεις πραγματοποιούνται συνήθως στην περιοχή του ορατού (Vis) και εγγύς υπέρυθρου (NIR)-υπέρυθρου (IR). Η φασματοσκοπία Vis/NIR παρέχει πληροφορίες για τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των αυγών καθώς και τη σύνθεση των προϊόντων τους (Kemps et al., 2006). Αντίστοιχα, η φασματοσκοπία NIR έχει χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη των φυσικοχημικών αλλαγών που προκύπτουν, ανάλογα με την διατροφή που ακολουθεί η όρνιθα, στην σύσταση των λυοφιλιωμένων κρόκων αυγών αλλά και για την ανάλυση της σύστασης των προϊόντων του αυγού (υγρασία, λιπίδια, πρωτεΐνες κ.α). Αρκετές μελέτες πραγματοποιήθηκαν πάνω σε αυτό το κομμάτι όπως για παράδειγμα, η συσχέτιση των φασμάτων που προέκυψαν μέσω φασματοσκοπίας εγγύς υπέρυθρου με διαπερατότητα (near infrared transmittance NIRT) με παραμέτρους όπως το pH, η απώλεια μάζας και οι μέρες μετά την ωοτοκία όπως περιέγραψαν οι Schmilovitch et al. (2002) (Karoui et al., 2009). Αργότερα, οι Kemps et al. (2006) συσχέτισαν τις μονάδες Haugh και το pH της αλβουμίνης με το φάσμα που προέκυψε στην περιοχή των 570-750 nm. Οι ίδιοι ένα χρόνο μετά χρησιμοποίησαν την φασματοσκοπία NIR με χαμηλή διακριτική ικανότητα (low-resolution NMR) ώστε να μελετήσουν την φρεσκότητα της αλβουμίνης (Kemps et al., 2007). Έρευνα των Abdanan Mehdizadeh et al. το 2014 συσχέτισαν το φάσμα που λήφθηκε στη περιοχή του Vis-NIR (400-1100 nm) -για άθικτα αυγά- με τις μονάδες Haugh και τον δείκτη κρόκου κατά την πάροδο του χρόνου (Abdanan Mehdizadeh et al., 2014). Αναπτύχθηκαν έτσι στατιστικά μοντέλα με σκοπό να προβλέψουν την φρεσκότητα των αυγών.

Επιπλέον, η φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier έχει την δυνατότητα να παρέχει πληροφορίες σχετικά με την τριτοταγή και δευτεροταγή (κυρίως στα αυγά) δομή που διαθέτουν οι πρωτεΐνες αλλά και για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών και πρωτεϊνών-λιπιδίων (Karoui et al., 2006). Η συγκεκριμένη μέθοδος δεν χρησιμοποιείται τόσο συχνά για την μελέτη της φρεσκότητας των αυγών, σύμφωνα με το Πρότυπο Egg-2 UNECE Standard. Τελευταίες έρευνες έχουν δείξει πως η φασματοσκοπία εγγύς υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier σε συνδυασμό με φασματοσκοπία εγγύς υπέρυθρου (FT-NIR) συσχετίζει μέσω στατιστικών μοντέλων, το φάσμα με ορισμένα ποιοτικά χαρακτηριστικά των αυγών με κέλυφος όπως, οι μονάδες Haugh και το pH την αλβουμίνης. Αν και μπορεί να συνδυαστεί και με φασματοσκοπία μέσου υπέρυθρου (MIR) για την ανάλυση πολύπλοκων υποστρωμάτων, τα αποτελέσματα με FT-NIR δίνονται με περισσότερη ακρίβεια, ταχύτητα και επαναληψιμότητα (Karoui et al., 2006).

Η φασματοσκοπία Raman διεξάγει μετρήσεις σε υδατικά δείγματα εν αντιθέσει, με την φασματοσκοπία υπέρυθρου όπου παρουσιάζει ευαισθησία σε διάφορα πολικά μέσα. Μέσω της ταυτοποίησης των χημικών ενώσεων μπορεί να γίνει ο χαρακτηρισμός της προφίλ ενός δείγματος (Coat et al., 2018). Σύμφωνα με τους Liu et al. (2020) επιτεύχθηκε αξιολόγηση της φρεσκότητας αυγών με κέλυφος μέσω της φασματοσκοπίας Raman. Επιπλέον, έγινε συσχέτιση (υψηλοί συντελεστές), με την βοήθεια χημειομετρικών μοντέλων, των αποτελεσμάτων με παραμέτρους όπως, οι μονάδες Haugh, το pH της αλβουμίνης αλλά και η διάμετρος και το ύψος του αεροθαλάμου (Liu et al., 2020).

Εξαιτίας της ύπαρξης αρκετών φθοριζόντων συστατικών στο αυγό, υπάρχει η δυνατότητα να γίνει χρήση της φασματοσκοπίας φθορισμού εμπρόσθιας όψης (front face fluorescence spectroscopy). Επιπλέον, αλλαγές που πραγματοποιούνται κατά τη μετουσίωση των πρωτεϊνών καθώς και αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών και άλλων ενώσεων ανιχνεύονται μέσω της φασματοσκοπίας αυτής (Karoui et al., 2006). Θεωρείται 100 έως και 1000 φορές πιο ευαίσθητη από τις προηγούμενες φασματοσκοπικές μεθόδους που περιγράφηκαν (Karoui et al., 2006). Η πορφυρίνη εντοπίζεται στα κελύφη των αυγών και η συγκέντρωσή της μειώνεται με την πάροδο του χρόνου αποθήκευσης (Karoui et al., 2006). Έτσι λοιπόν, η ποσοτικοποίηση της ένωσης αυτής μπορεί να οδηγήσει στην αξιολόγηση της φρεσκότητας. Αξίζει να σημειωθεί πως, στην παχύρρευστη και λεπτόρρευστη αλβουμίνη ενδέχεται να πραγματοποιηθεί η αντίδραση Maillard, σχηματίζοντας έτσι ορισμένες ενώσεις στις οποίες περιλαμβάνεται και η φθορίζουσα φουροσίνη. Η ένωση αυτή μπορεί να ανιχνευθεί μέσω της φασματοσκοπίας φθορισμού και να οδηγήσει σε διαφοροποίηση των φασμάτων της παχύρρευστης και λεπτόρρευστης αλβουμίνης ανάλογα με την φρεσκότητα των αυγών (Karoui et al., 2006).

Τέλος, η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) χρησιμοποιείται ευρέως στα προϊόντα αγροδιατροφής αλλά η μελέτη των αυγών και των προϊόντων αυτών είναι περιορισμένη (Coat et al., 2018). Οι Dutta et al. το 2003 παρακολούθησαν την αλλαγή στην κινητικότητα των μορίων του νερού στα αυγά καθώς αυτά

αποθηκεύτηκαν σε διαφορετικές συνθήκες (θερμοκρασία, φωτισμός, ατμόσφαιρα) (Dutta et al., 2003). Αργότερα, οι Laghi et al. (2005) χρησιμοποίησαν την τεχνική NMR έτσι ώστε, να μελετήσουν το πώς διαφοροποιείται η ποιότητα της αλβουμίνης αλλά και του κρόκου των αυγών τις πρώτες μέρες της αποθήκευσης. Τα όσα παρατηρήθηκαν στις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν στην παχύρρευστη αλβουμίνη αποδόθηκαν στην αύξηση της τιμής του pH (Laghi et al., 2005).

Πέραν των φασματοσκοπικών μεθόδων, η χρήση της χρωματογραφίας βοηθά εξίσου στην αξιολόγηση της φρεσκότητας των αυγών. Σημαντικό είναι το γεγονός πως μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών, έχοντας έτσι μεγαλύτερη ευαισθησία. Ευρέως γνωστή και χρησιμοποιούμενη (και σε αυτήν την μελέτη) είναι η αέρια χρωματογραφία (GC) η οποία, βασίζεται στην ανίχνευση και ανάλυση πτητικών και θερμοανθεκτικών ενώσεων που εμπεριέχονται στα αυγά και τα προϊόντα των αυγών (Coat et al., 2018). Επίσης, άλλες προσεγγίσεις (ενζυματικές τεχνικές-επίσημη AOAC 970.31 | EGG-2 UNECE Standard) χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση καρβοξυλικών οξέων που συνδέονται άμεσα με ορισμένες σημαντικές παραμέτρους όπως το γαλακτικό και το ηλεκτρικό οξύ. Η υγρή χρωματογραφία (LC) μπορεί να οδηγήσει στην ανάλυση θερμοευαίσθητων και μη πτητικών ενώσεων όπου, δεν είναι συμβατές με την αέρια. Ο συνδυασμός αυτής με φασματομετρία μαζών (LC-MS) δεν απαιτεί να έχει προηγηθεί παραγωγοποίηση από την ένεση (Van Ruth et al., 2011). Τέλος, μέσω της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) προσδιορίζεται η ουρακίλη και η ουριδίνη σε προϊόντα αυγών όπως περιγράφει η μέθοδος του Morris (1987). Σε συνδυασμό με χημειομετρική επεξεργασία επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός μεταξύ οργανικών και συμβατικών αυγών, μελετώντας το δακτυλικό αποτυπώματα των καροτενοειδών.

## 2.2 Μεταβολωμική

Η μεταβολωμική ανάλυση (metabolomics) αποτελεί μια μελέτη των χημικών δακτυλικών αποτυπωμάτων κάποιων ενώσεων που προκύπτουν μέσω κυτταρικών διεργασιών. Οι ενώσεις είναι τελικά ή και ενδιάμεσα προϊόντα των διεργασιών αυτών και για αυτό τον λόγο ονομάζονται μεταβολίτες. Η σχετική μοριακή μάζα αυτών είναι μικρότερη του 1,5 kDa όπως για παράδειγμα αμινοξέα, οργανικά οξέα, πεπτίδια, λιπίδια, βιταμίνες, αμίνες, στεροειδή, καροτενοειδή, μονοσακχαρίτες, δισακχαρίτες αλλά και μεταλλικά στοιχεία. Στην κατηγορία αυτή δεν ανήκουν οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα αφού η σχετική μοριακή μάζα είναι αρκετά υψηλή και δεν επιτρέπουν τέτοιου είδους ανάλυση. Το πλήρες σύνολο των μεταβολιτών σε ένα κύτταρο, όργανο, ιστό κλπ. καλείται μεταβόλωμα (Castro-Puyana et al., 2017) (Coat et al., 2018) (Fiehn, 2002).

Η μεταβολωμική όπως και οι, γονιδιωματική (genomics-DNA), μεταγραφωμική (transcriptomics-RNA), πρωτεωμική (proteomics-proteins) συγκαταλέγονται στις «ωμικές (-omics)» μεθόδους βρίσκοντας έτσι εφαρμογή στην έρευνα των βιολογικών συστημάτων. Το γεγονός πως υπάρχουν αποκλίσεις στις φυσικοχημικές ιδιότητες, στις συγκεντρώσεις αλλά και στην συνεχή διαφοροποίηση του μεταβολώματος δεν έχει

επιτρέπει την γρήγορη ανάπτυξη της μεταβολωμικής ανάλυσης, συγκριτικά με τις υπόλοιπες μεθοδολογίες (Vinaixa et al., 2015) (Lacalle-Bergeron et al., 2021). Επιπλέον, η μετατροπή των φασμάτων σε βιολογική πληροφορία αποτελεί ένα πολύ δύσκολο και απαιτητικό στάδιο πράγμα που δυσχεραίνει την χρήση αυτής στον ερευνητικό τομέα (Vinaixa et al., 2015). Όμως, μέσω της μεταβολωμικής ταυτοποιούνται οι αλλαγές που συμβαίνουν στους μεταβολίτες, σε κυτταρικό επίπεδο προσφέροντας έτσι μια συνολική εικόνα για την πορεία των βιοχημικών διεργασιών αλλά και μια στενότερη παρακολούθηση όσον αφορά τις διαταραχές που συμβαίνουν στο σύστημα (εγγύτητα με φαινότυπο) (Dunn et al., 2011) (Mastrangelo et al., 2015).

Χρησιμοποιείται ευρέως από την φαρμακοβιομηχανία για την ανάπτυξη και έρευνα νέων φαρμάκων, σε κλινικές μελέτες για την διάγνωση νόσων αλλά και στην μελέτη της φυσιολογίας των φυτών (Dunn et al., 2011) (Cevallos-Cevallos et al., 2009). Πέραν αυτών όμως, τα τελευταία χρόνια βρίσκει εφαρμογή και στην επιστήμη των τροφίμων-διατροφής γεγονός που προσφέρει πληθώρα χρήσιμων πληροφοριών (Cevallos-Cevallos et al., 2009). Έτσι λοιπόν, εκτός από τις φασματοσκοπικές μεθόδους και το σύστημα της «ηλεκτρονικής μύτης» που αναφέρθηκε προηγουμένως, η μεταβολωμική ανάλυση έχει την δυνατότητα να ταυτοποιήσει και να ποσοτικοποιήσει ενώσεις που λειτουργούν ως ισχυροί δείκτες αλλοίωσης-φρεσκότητας και έτσι να δοθούν πληροφορίες για το στάδιο και την κατάσταση που βρίσκεται το τρόφιμο.

Ανάλογα με τον τύπο των δεδομένων που έχουν ληφθεί αλλά και το είδος της επεξεργασίας το οποίο έχουν υποστεί συμπληρωματικά, η μεταβολωμική ανάλυση διαθέτει δύο διαφορετικές προσεγγίσεις (Lacalle-Bergeron et al., 2021).

Πιο συγκεκριμένα λοιπόν, η στοχευμένη μεταβολωμική (targeted) βρίσκει εφαρμογή στην ταυτοποίηση αλλά και ποσοτικοποίηση μεταβολιτών που είτε ανήκουν στην ίδια χημική ομάδα είτε προέρχονται από το ίδιο βιοχημικό μονοπάτι. Λόγω του ότι, η αξιολόγηση των συγκεκριμένων μεταβολιτών που βρίσκονται σε καθορισμένες συνθήκες απαιτεί εκλεκτική εκχύλιση και υψηλή καθαρότητα, η διαδικασία είναι ιδιαίτερα σημαντική και εξειδικευμένη (Cevallos-Cevallos et al., 2009).

Η μη στοχευμένη μεταβολωμική (untargeted) αποτελεί την δεύτερη προσέγγιση της μεθοδολογίας αυτής. Στην περίπτωση αυτή, στόχος είναι η εύρεση και σύγκριση όσο το δυνατόν περισσότερων μεταβολιτών, οι οποίοι μεταβάλλονται συνεχώς ως αποτέλεσμα μιας αντίδρασης με εξωγενή ή ενδογενή παράγοντα. Αξίζει να σημειωθεί πως, επικεντρώνεται σε περισσότερες κατηγορίες μεταβολιτών χωρίς να οδηγηθεί απαραίτητως σε ταυτοποίηση ή ποσοτικοποίηση αν δεν είναι επιθυμητό (Lacalle-Bergeron et al., 2021) (Cevallos-Cevallos et al., 2009) (Castro-Puyana et al., 2017). Για την πραγματοποίηση ποιοτικών και ποσοτικών μελετών απαιτούνται περαιτέρω διαδικασίες καθώς, η πολυπλοκότητα των μεταβολιτών (διαφορετικές χημικές ομάδες) χρήζει συνδυασμό παραπάνω τεχνικών. Τέτοιου είδους τεχνικές είναι η φασματομετρία μαζών (MS) και η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) σε συνδυασμό με αέρια ή υγρή χρωματογραφία (GC/LC) (Vinaixa et al., 2015).

Τα τελευταία χρόνια, η μεταβολωμική δεν βρίσκει εφαρμογή μονάχα σε κλινικές μελέτες, έρευνες νέων φαρμάκων και παρακολούθηση της βιολογίας των φυτών αλλά και στην βιομηχανία των τροφίμων. Σε συνδυασμό και με διάφορα, χρήσιμα εργαλεία βιοπληροφορικής έχει δημιουργηθεί μια νέα κατηγορία που ονομάζεται «Foodomics» (Castro-Puyana et al., 2017) (Lacalle-Bergeron et al., 2021).

Μέσω της μεταβολωμικής, αναπτύσσονται νέα προϊόντα τροφίμων καθώς προσδιορίζονται χαρακτηριστικά τα οποία είναι επιθυμητά από τον καταναλωτή/πελάτη. Επιπλέον, μέσω της ανάλυσης των συστατικών τους παρέχονται πληροφορίες για την υφή, την γεύση, το άρωμα, ενδεχόμενες προσμίξεις με αποτέλεσμα να αξιολογείται η συμμόρφωση των τροφίμων με τα νομοθετικά πλαίσια αλλά και να κατανοείται πλήρως το προφίλ του τρόφιμου (Wishart, 2008). Σημαντικό είναι επίσης το γεγονός πως γνωρίζοντας το μεταβολικό προφίλ αλλά και τον τρόπο δράσης διαφόρων βιοδραστικών συστατικών μπορεί να αξιολογηθεί η ασφάλεια, η αυθεντικότητα, η ποιότητα αλλά και η ιχνηλασιμότητα του κάθε τρόφιμου (Castro-Puyana et al., 2017) (Cevallos-Cevallos et al., 2009). Αν επομένως ένα τρόφιμο δεν διαθέτει το επιθυμητό προφίλ τότε δρα ως βάση για την αποδοχή ή απόρριψη ενός προϊόντος, σε συνδυασμό πάντα με την μέτρηση και άλλων παραμέτρων. Αυτό προσφέρει μια χαμηλού κόστους αλλά και γρήγορη ανάλυση με αξιόπιστα αποτελέσματα.

Σχετικά με την ασφάλεια, μέσω της μεταβολωμικής μπορεί να πραγματοποιηθεί ανίχνευση πιθανών αλλοιογόνων ή και παθογόνων μικροοργανισμών, φυτοφαρμάκων, τοξινών, περιβαλλοντικών επιμολυντών και άλλων ακατάλληλων ουσιών. Το γεγονός πως γίνεται γνωστό το προφίλ του τρόφιμου δίνει την δυνατότητα εντοπισμού πιθανής νοθείας αλλά και παρακολούθησης όλων των σταδίων παραγωγής, επεξεργασίας και διανομής στα οποία υπόκεινται (Cevallos-Cevallos et al., 2009) (Castro-Puyana et al., 2017). Τέλος, στα στάδια που προαναφέρθηκαν, το τρόφιμο πιθανά να υποστεί ορισμένες φυσικοχημικές αλλαγές εξαιτίας των διαφόρων τεχνικών που χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία (π.χ. θερμική επεξεργασία, ζύμωση κλπ.).

Έτσι λοιπόν, η μεταβολωμική ανάλυση ανιχνεύει τις διαφορές μεταξύ του τρόφιμου πριν υποστεί επεξεργασία και μετά δίνοντας έτσι πληροφορίες που είναι σημαντικές αλλά και πολλές φορές απαιτούμενες από την Νομοθεσία ή τον καταναλωτή.

Αν και το εύρος εφαρμογής της μεταβολωμικής στον κλάδο των τροφίμων είναι μεγάλο και πλούσιο, δεν χρησιμοποιείται αρκετά από τους ερευνητές καθώς, κυριαρχούν άλλες συμβατικές τεχνικές ανάλυσης. Στην παρούσα μελέτη όμως, βιοδείκτες εντοπίζονται μέσω της μεταβολωμικής ανάλυσης και χρησιμοποιούνται για την δημιουργία μοντέλων πρόβλεψης. Τα συγκεκριμένα μοντέλα βοηθούν στην κατάταξη των δειγμάτων σε κατηγορίες (π.χ. φρέσκο/αλλοιωμένο).

### **2.3 Τεχνικές ανάλυσης στην μεταβολωμική μέθοδο**

Κατά την μεταβολωμική ανάλυση είναι πολύ σημαντικό να γίνει η κατάλληλη επιλογή της αναλυτικής τεχνικής. Σύμφωνα και με όσα αναφέρθηκαν σε προηγούμενη ενότητα,

η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητισμού (NMR) και η φασματομετρία μαζών σε συνδυασμό με μια τεχνική διαχωρισμού (αέρια/υγρή χρωματογραφία GC-LC ή τριχοειδή ηλεκτροφόρηση CE) είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες στην μεταβολωμική (Vinaixa et al., 2015).

Επιπλέον, ο συνδυασμός φασματομετρίας μαζών υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRMS) με GC και LC επιφέρει μείωση της περιπλοκότητας των δεδομένων στα φάσματα μάζας και ως αποτέλεσμα αυτού επιτυγχάνεται καλύτερη ευαισθησία και παροχή επιπρόσθετων πληροφοριών. Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητισμού χρησιμοποιήθηκε κυρίως κατά τα πρώτα χρόνια της μεταβολωμικής ενώ τα τελευταία χρόνια έχει καθιερωθεί σχεδόν η φασματομετρία μαζών (Fiehn, 2016).

Πέραν της φασματομετρίας μάζας εντοπίζεται μια πληθώρα τεχνικών που όμως δεν χρησιμοποιούνται σε μεγάλο βαθμό. Μερικά παραδείγματα αυτών είναι η χρωματογραφία υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων (HILIC), η υπέρυθρη φασματοσκοπία μετασχηματισμού Fourier (FTIR), η φασματοσκοπία εγγύς υπέρυθρου (NIR) ή υπεριώδους (UV) κ.α (Cevallos-Cevallos et al., 2009). Αξίζει να σημειωθεί πως, αν και παρέχουν μονάχα ποιοτικές μετρήσεις, οι τεχνικές φασματομετρίας μαζών (AMS) φαίνεται να έχουν προοπτική στην μεταβολωμική ανάλυση εξαιτίας του μικρού χρόνου προετοιμασίας δείγματος και της μετέπειτα ανάλυσης (Aszyk et al., 2018).

Η χρήση της υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (LC-MS) επιλέγεται για υγρά δείγματα και υποστρώματα τροφίμων έχοντας ως στόχο την ανάλυση συστατικών τα οποία είναι θερμοευαίσθητα και χαρακτηρίζονται από μέτρια-υψηλή πολικότητα και χαμηλή πτητικότητα (Filho et al., 2020) (Onuh & Aluko, 2019).

Συγκριτικά με τις προηγούμενες μεθόδους, περισσότερες πληροφορίες λαμβάνονται με την χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Τα τελευταία χρόνια η υπερ-υψηλής απόδοσης (UHPLC) επιλέγεται περισσότερο. Η υψηλή διαχωριστική ικανότητα και αποδοτικότητά της, ο μικρός χρόνος ανάλυσης και το γεγονός πως είναι συμβατή με φασματομετρία μαζών (δεν απαιτεί παραγωγοποίηση) είναι μερικά από τα πλεονεκτήματα της (Cevallos-Cevallos et al., 2009) (Castro-Puyana et al., 2017) (Onuh & Aluko, 2019).

Το 2018 οι Cavanna et al. μέσω UHPLC-HRMS μελέτησαν τη φρεσκότητα των προϊόντων αυγών. Δόθηκε έτσι το μεταβολωμικό προφίλ αυτών και πως μεταβάλλεται με την πάροδο του χρόνου, χαρακτηρίζοντάς τα ως φρέσκα ή μη φρέσκα (Cavanna et al., 2018). Οι Ogura et al. (2020) μελέτησαν τις αλλαγές στο υδατοδιαλυτό κλάσμα των μεταβολιτών σε αυγά, από την επίδραση της διατροφής των ορνίθων αλλά και την θερμική επεξεργασία που έχουν υποστεί (αύξηση θερμοκρασίας) (με LC-MS και CE-MS). Τα αποτελέσματα έδειξαν αύξηση της συγκέντρωσης των αμινοξέων και της φρουκτόζης στην αλβουμίνη αλλά καμία αλλαγή στον κρόκο κατά την θερμική επεξεργασία στην οποία υποβλήθηκαν (Ogura et al., 2020).

Στην περίπτωση μελέτης του μεταβολικού προφίλ, προτείνεται η χρήση είτε θετικού είτε αρνητικού ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI+/-). Αναλόγως την πολικότητα και



την φύση των μεταβολιτών επιλέγεται και το είδος της στήλης χρωματογραφίας (Dunn et al., 2011).

Η μεταβολωμική ανάλυση με χρήση αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών (GC-MS) επιλέγεται πιο συχνά και πλεονεκτεί έναντι άλλων τεχνικών. Έχει ως στόχο κυρίως, την ανίχνευση πτητικών συστατικών με μικρή σχετική μοριακή μάζα (Dunn et al., 2011) (Mastrangelo et al., 2015).

Αναλυτικότερα, πέραν των πτητικών συστατικών που εμπεριέχονται στα τρόφιμα εντοπίζονται και ορισμένα θερμοευαίσθητα, μη πτητικά ή και σχετικά πολικά συστατικά όπως είναι τα σάκχαρα, αμινοξέα, αμίνες τα οποία υπόκεινται σε παραγωγοποίηση έτσι ώστε να αναλυθούν (Mastrangelo et al., 2015).

Η GC-MS θεωρείται η πιο αξιόπιστη μέθοδος και αυτό οφείλεται στην υψηλή διαχωριστική ικανότητα, ευαισθησία και αναπαραγωγιμότητα (για χρόνους κατακράτησης και φάσματα μάζας) που διαθέτει. Η ποσοτικοποίηση και ταυτοποίηση των μεταβολιτών είναι ακριβέστερη καθώς, επιτυγχάνει σωστό διαχωρισμό μεταξύ των ισομερών και μειώνει αρκετά τις επιδράσεις που δέχεται από την μήτρα (Mastrangelo et al., 2015) (Lacalle-Bergeron et al., 2021).

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε μη στοχευμένη μεταβολωμική ανάλυση κάνοντας χρήση αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών με πηγή ιοντισμού πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (EI). Συγκρίνοντας τα δεδομένα που προκύπτουν με τις βάσεις φασμάτων εξάγονται συμπεράσματα με αξιοπιστία και ακρίβεια. Αξίζει να σημειωθεί πως πρόκειται για μια αρκετά «σκληρή» τεχνική που όμως στην περίπτωση της στοχευμένης ανάλυσης μπορεί να γίνει χρήση χημικού ιοντισμού ο οποίος, δεν δρα τόσο έντονα («μαλακή» τεχνική) διατηρώντας το μητρικό ιόν άθικτο (Lacalle-Bergeron et al., 2021) (Mastrangelo et al., 2015)

## **2.4 Μεταβολωμική ανάλυση με χρήση αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών (GC-MS)**

### **2.4.1 Προετοιμασία δείγματος**

Αφού ληφθεί το δείγμα προς μελέτη, φυλάσσεται και επεξεργάζεται σε χαμηλή θερμοκρασία (πάγος) με σκοπό την αδρανοποίηση όλων των μεταβολικών διεργασιών που πραγματοποιούνται.

Εν συνεχεία, το δείγμα ομογενοποιείται, αν κρίνεται απαραίτητο, και ακολουθεί εκχύλιση αυτού με διαλύτες όπως, αιθανόλη, μεθανόλη, χλωροφόρμιο, ακετονιτρίλιο ή και ισοπροπανόλη. Η χρήση αυτών γίνεται είτε σε αναλογία με νερό είτε αυτούσιοι, αναλόγως την φύση του δείγματος (πολική-μη πολική). Μέσω της εκχύλισης επιτυγχάνεται η απομάκρυνση των συστατικών υψηλού μοριακού βάρους (π.χ. πρωτεΐνες) τα οποία, δεν μελετώνται στην παρούσα φάση.

Με την ολοκλήρωση της εκχύλισης του δείγματος, επόμενο στάδιο είναι η λυοφιλίωση. Στόχος του βήματος αυτού είναι η πλήρης απομάκρυνση της υγρασίας από το δείγμα

καθώς, η ύπαρξη αυτής οδηγεί σε αποσύνθεση και αδρανοποίηση των αντιδραστηρίων που θα χρησιμοποιηθούν παρακάτω στην παραγωγή.

Τελευταίο στάδιο της προετοιμασίας αποτελεί η παραγωγή. Αν και θεωρείται πολύπλοκη και χρονοβόρα διαδικασία πλεονεκτεί σε πολλά σημεία. Αρχικά, αυξάνεται η πτητικότητα των μεταβολιτών, μειώνεται η αλληλεπίδραση μεταξύ στήλης και ενώσεων, ο διαχωρισμός των ενώσεων είναι καλύτερος ενώ ταυτόχρονα, αυξάνεται η απόκριση του ανιχνευτή. Επιπλέον, ενισχύεται η θερμοσταθερότητα ορισμένων αναλυτών καθώς, το σημείο ζέσεως μειώνεται έτσι ώστε να επιτρέπεται η ομαλή διέλευσή τους από την στήλη της αέριας χρωματογραφίας χωρίς να αποσυντεθούν. Η μείωση αυτή επιτυγχάνεται με διάσπαση των δεσμών υδρογόνου σε ήπιες συνθήκες, με πολύ υψηλές αποδόσεις και γρήγορα.

Κατά την πρώτη μέθοδο, η παραγωγή πραγματοποιείται σε δύο στάδια. Αρχικά, στο δείγμα προστίθεται ποσότητα υδροχλωρικής Ο-μεθοξυαμίνης σε πυριδίνη με σκοπό τον σχηματισμό οξιμών από τις καρβονυλικές ομάδες (αλδεΐδες-κετόνες) των μεταβολιτών. Έχοντας οι μεταβολίτες την μορφή των οξιμών δεν οδηγούνται σε κυκλοποίηση των αναγωγικών σακχάρων, αποκαρβοξυλίωση και ταυτομερισμό κετο-ενόλης των α-κετοξέων.

Μετά την ολοκλήρωση του σχηματισμού των οξιμών πραγματοποιείται σιλυλίωση. Η πρώτη αντίδραση θεωρείται πολύ σημαντική καθώς, η ύπαρξη κετονομάδων δεν οδηγεί σε γρήγορη αντίδραση με τις τριμεθυλοσιλυλικές ομάδες. Πιο συγκεκριμένα, μια αλκυλοσιλυλομάδα (τριμεθυλοσιλυλική-TMS) αντικαθιστά το δραστικό άτομο υδρογόνου (-H) των λειτουργικών ομάδων των συστατικών (-OH, -COOH, -NH<sub>2</sub>, -SH). Ορισμένα από τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται είναι το N-μεθυλο-N-τριμεθυλοσιλυλο-τριφθοροακεταμίδιο (MSTFA), το N, O-δις-τριμεθυλοσιλυλο-τριφθοροακεταμίδιο (BSTFA) και το N-τριβουτυλοδιμεθυλοσιλυλο-N-μεθυλο-τριφθοροακεταμίδιο (MTBSTFA ή MTB-TFA ή MBDSTFA) με χρήση ή μη καταλύτη 1% τριμεθυλοχλωροσιλάνιο (TMCS). Το τελευταίο επιλέγεται συνήθως όταν επιθυμείται ποσοτικός προσδιορισμός αμινοξέων και πολυαμινών και όχι για υδατάνθρακες καθώς προκαλεί στερική παρεμπόδιση της σιλυλικής ομάδας οδηγώντας σε ατελή παραγωγή. Αποτέλεσμα την σιλυλίωσης είναι η αύξηση της πτητικότητας των μεταβολιτών επομένως, καθίστανται καταλληλότεροι για ανάλυση μέσω αέριας χρωματογραφίας. Αξίζει να σημειωθεί πως η φύση του δραστικού όξινου πρωτονίου επηρεάζει άμεσα την πορεία της αντίδρασης. Κάτι τέτοιο, ενδέχεται να οδηγήσει σε δημιουργία πολλών παραγώγων εξαιτίας της απλής, διπλής, τριπλής αντικατάστασης ή και σε ατελή πορεία. Επιπλέον, σε περίπτωση που ορισμένα άτομα υδρογόνου παραμείνουν τότε σχηματίζονται διαμοριακοί και ενδομοριακοί δεσμοί οι οποίοι, προκαλούν αύξηση του σημείου ζέσεως των συγκεκριμένων ενώσεων με αποτέλεσμα να μην μπορεί να πραγματοποιηθεί ανάλυση με GC-MS. Τέλος, αν η διαδικασία δεν ακολουθηθεί σωστά και με προσοχή μπορεί να δημιουργηθεί θόρυβος στο χρωματογράφημα ο οποίος, οφείλεται σε άγνωστες ενώσεις (artifacts).

Σχετικά με την δεύτερη μέθοδο παραγωγής, το πρώτο εκ των τριών σταδίων αυτής είναι όμοιο με την πρώτη μέθοδο. Πραγματοποιείται επομένως, η παραγωγή

οξυμών από τις καρβονυλικές ομάδες των μεταβολιτών. Με την ολοκλήρωση του σταδίου αυτού γίνεται προσθήκη οξικού ανυδρίτη (αντίδραση ακετυλίωσης). Τα προϊόντα της συγκεκριμένης αντίδρασης διαφέρουν αναλόγως την δομή που διαθέτει η οξύμη (κέτο-οξύμη ή αλδο-οξύμη). Επομένως, ενδέχεται να προκύψουν, είτε ακετονιτρίλιο (από αλδο-οξύμη) είτε, ακετυλ-οξύμη (από κέτο-οξύμη). Ακολούθως, τα δείγματα υπόκεινται θέρμανση σε θερμοκρασία ίση με 50 °C και ταυτόχρονη ξήρανση με άζωτο. Τέλος, πριν την ανάλυση μέσω GC/MS τα δείγματα επαναδιαλύονται με οξικό αιθυλεστέρα. Η πτητικότητα των προϊόντων αυτών είναι σαφώς βελτιωμένη ενώ, η διαδικασία αυτή απαιτεί ελάχιστη επεξεργασία και θεωρείται λιγότερο ευαίσθητη (Wahjudi et al., 2010).

#### **2.4.2 Διαχωρισμός των μεταβολιτών με αέρια χρωματογραφία και προσδιορισμός με φασματομέτρο μάζων**

Ο διαχωρισμός μέσω της αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας ακολουθεί της παραγωγοποίησης. Ποσότητα του δείγματος εισάγεται στην στήλη του οργάνου και συμπαρασύρεται με την βοήθεια του αδρανούς φέροντος αερίου το οποίο αποτελεί την κινητή φάση.

Επιπλέον, η στήλη έχει επικαλυφθεί με υγρή στατική φάση, που συγκρατείται σε ένα αδρανές στερεό υπόστρωμα. Καθώς το δείγμα περνά από την στήλη τα συστατικά αυτού κατανέμονται μεταξύ κινητής και στατικής φάσης. Η κατανομή αυτή εξαρτάται από την θερμοκρασία που διαθέτει η στήλη αλλά και την χημική συγγένεια μεταξύ αναλυτών και στατικής φάσης.

Ως αποτέλεσμα αυτού, ο διαχωρισμός και η έκλυση των συστατικών επιτυγχάνεται σε διαφορετικούς χρόνους κατακράτησης. Συμπληρωματικά, μεγαλύτερος χρόνος κατακράτησης υποδηλώνει αυξημένη χημική συγγένεια μεταξύ στατικής φάσης και αναλύτη ενώ, μηδενική αλληλεπίδραση με την στατική φάση έχει ως αποτέλεσμα και μικρότερο χρόνο κατακράτησης.

Αφού ολοκληρωθεί ο διαχωρισμός των συστατικών, εισάγονται στην πηγή ιοντισμού (πρόσκρουση ηλεκτρονίων-EI) με σκοπό τον ιοντισμό τους και έτσι την παραγωγή ιοντικών θραυσμάτων.

Εν συνεχεία, τα ιοντικά θραύσματα εισέρχονται στον αναλυτή μάζας (τετράπολο) όπου επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός τους βάσει του λόγου μάζας/φορτίο ( $m/z$ ). Αξίζει να σημειωθεί πως, για κάθε τιμή της έντασης του πεδίου, μονάχα ιόντα με συγκεκριμένο λόγο μάζας/φορτίο εισέρχονται στον αναλυτή ενώ, τα υπόλοιπα θραύσματα ακολουθούν άλλη πορεία. Όσα ιόντα διαθέτουν επαρκή κινητική ενέργεια καταφέρνουν και προσκρούουν στον ανιχνευτή με αποτέλεσμα την εκπομπή δευτερογενών ηλεκτρονίων και έτσι την ενίσχυση του σήματος που λαμβάνεται (Emwas et al., 2015).

## 2.5 Επεξεργασία και αξιολόγηση των πειραματικών δεδομένων

Αφού ολοκληρωθεί η μεταβολωμική ανάλυση των τροφίμων σειρά έχει η επεξεργασία των δεδομένων που προέκυψαν από τις ενόργανες τεχνικές με την χρήση διαφόρων στατιστικών εργαλείων. Το βήμα αυτό είναι πολύ σημαντικό καθώς, συμβάλλει στην καλύτερη διεξαγωγή συμπερασμάτων και πληροφοριών όσον αφορά το προφίλ των τροφίμων αλλά βελτιστοποιεί και τον πειραματικό σχεδιασμό.

Αρχικά, για την περιγραφή των δεδομένων εντοπίζονται μέθοδοι αναγνώρισης μοτίβων (pattern recognition methods) οι οποίες κατηγοριοποιούνται στις επιβλεπόμενες (supervised) και στις μη επιβλεπόμενες (unsupervised). Στις επιβλεπόμενες μεθόδους η κατάταξη των δειγμάτων σε ομάδες αλλά και ορισμένες πληροφορίες (προέλευση, ηλικία δειγμάτων κλπ.) είναι από την αρχή γνωστές. Σκοπός έχουν την ταξινόμηση των παρατηρήσεων αλλά και η επισημάνση των δεικτών. Εν αντιθέσει με τις μη επιβλεπόμενες που στοχεύουν στον εντοπισμό πιθανών τάσεων, επαναλαμβανόμενων μοτίβων των δειγμάτων αλλά και ακραίων τιμών που μπορεί να λάβουν. Στην περίπτωση αυτή, η τάξη (class) στην οποία ανήκουν τα δείγματα δεν είναι γνωστή (Brereton, 2003) (Mastrangelo et al., 2015) (Samuelsson & Larsson, 2008).

Μια δεύτερη κατηγορία αφορά τα μοντέλα συσχέτισης των δεδομένων δηλαδή, μεθόδους πολυμεταβλητής βαθμονόμησης και πρόβλεψης (multivariate calibration and prediction methods). Η πολυμεταβλητή βαθμονόμηση που χρησιμοποιείται έχει σκοπό την ποσοτική αξιολόγηση των δεδομένων. Η ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA-Principal Component Analysis) και η διακριτική ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA Partial Least Squares-Discriminant Analysis) αποτελούν ένα τέτοιο παράδειγμα.

Αναλυτικότερα, η ανάλυση κύριων συνιστωσών χαρακτηρίζεται ως μια μη επιβλεπόμενη μέθοδος η οποία έχει ως στόχο τη μείωση των αρχικών μεταβλητών διατηρώντας ταυτόχρονα την πληροφορία που προσφέρουν. Πραγματοποιεί γραμμικό συνδυασμό των αρχικών μεταβλητών, ώστε αυτές να είναι ανεξάρτητες μεταξύ τους. Η πρώτη εκ των κύριων συνιστωσών (PC1) διαθέτει μεγαλύτερο ποσοστό, καθώς συμμετέχει περισσότερο στην εξήγηση της μεταβλητότητας των δεδομένων. Ο αριθμός των κύριων συνιστωσών ενδέχεται να είναι και ίσος αριθμητικά με τις αρχικές μεταβλητών. Εν συνεχεία, με τη δημιουργία γραφικής αναπαράστασης επιτυγχάνεται μια οπτική διαφοροποίηση των δειγμάτων. Στα Loading plots, απεικονίζεται η συμβολή της κάθε μεταβλητής στην τελική κύρια συνιστώσα. Η προβολή σε ένα σύστημα αξόνων, των τιμών των πρώτων κύριων συνιστωσών ονομάζεται Scores Plot (γράφημα βαθμών) και συμβάλλει στην παρατήρηση τάσεων, ομαδοποιήσεων αλλά και μοτίβων (Bro & Smilde, 2014).

Με την ολοκλήρωση της ομαδοποίησης των δεδομένων μέσω της ανάλυσης κύριων συνιστωσών ακολουθεί μια επιβλεπόμενη μέθοδος ανάλυσης. Μερικές εξ' αυτών είναι η PLS, PLS-DA και η OPLS-DA οι οποίες, σκοπεύουν στην επισημάνση των διαφορών

που παρατηρούνται μεταξύ των ομάδων στην περίπτωση που τα πρώτα αποτελέσματα είναι ασαφή λόγω υψηλής μεταβλητότητας εντός των ομάδων.

Η ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS) κατασκευάζει νέες μεταβλητές πρόβλεψης, ως γραμμικούς συνδυασμούς των αρχικών μεταβλητών πρόβλεψης. Επομένως, συνδυάζει πληροφορίες σχετικά με τις παραλλαγές τόσο των προβλέψεων όσο και των αποκρίσεων, λαμβάνοντας παράλληλα υπόψιν τις συσχετίσεις μεταξύ τους. Έχοντας περισσότερες κύριες συνιστώσες επιτυγχάνεται η καλύτερη συσχέτιση αυτών. Η αξιολόγηση αυτής γίνεται με βάση τον συντελεστή προσδιορισμού  $R^2$  (κοντά στο 1-καλύτερη συσχέτιση) της καμπύλης αναφοράς της προβλεπόμενης τιμής συναρτήσει της πραγματικής αλλά και της τετραγωνικής ρίζας του μέσου των τετραγώνων των υπολοίπων τιμών (RMSE) (Wold et al., 2001).

Η διακριτική ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) πραγματοποιείται προκειμένου να επιταχυνθεί ο διαχωρισμός μεταξύ των παρατηρήσιμων μεταβλητών και να εντοπιστούν οι μεταβλητές που παρέχουν πληροφορίες. Θεωρείται αρκετά χρήσιμη στην περίπτωση που απαιτείται ανάλυση μεγάλου αριθμού ανεξαρτήτων μεταβλητών (Lee et al., 2018) (Tobias, 1995).

Κατά την ορθογώνια διακριτή ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (OPLS-DA) γίνεται μια ευκολότερη επεξήγηση του μοντέλου ταξινόμησης. Αξίζει να σημειωθεί πως οι ομάδες περιγράφονται υποχρεωτικά από τη πρώτη και δεύτερη συνιστώσα. Τέλος, αν και η μέθοδος αυτή αποτελεί παραλλαγή του μοντέλου ταξινόμησης PLS-DA, η απόδοση αυτού δεν αλλάζει (Lee et al., 2018) (Tobias, 1995).

## 2.6 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι ο προσδιορισμός των πολικών μεταβολιτών σε αυγά ωοπαραγωγών ορνίθων κατά τη διάρκεια συντήρησής τους σε ελεγχόμενη θερμοκρασία μέσω μιας ωμικής προσέγγισης. Στην πραγματικότητα, η παρούσα μελέτη έχει ως στόχο την επαλήθευση των αποτελεσμάτων που εξάχθηκαν σε προηγούμενη παρόμοια έρευνα, η οποία εντόπισε την φρουκτόζη ως σημαντικό βιοδείκτη της φρεσκότητας των αυγών. Εφόσον επαληθευθεί η μελέτη, θα αναπτυχθεί στοχευμένη μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού της φρουκτόζης.

Η μεταβολωμική ανάλυση εξαιτίας της δυνατότητας που παρέχει για ταυτόχρονη αξιολόγηση πολλών ενώσεων αποτελεί εξαιρετική μέθοδο εκτίμησης της φρεσκότητας των αυγών και των προϊόντων τους. Σε συσχέτιση με κάποια από τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των αυγών ανιχνεύονται χημικοί δείκτες που συνδέονται άμεσα με την φρεσκότητα και την αλλοίωση αυτών. Αξίζει να σημειωθεί πως, εντοπίζονται ελάχιστες σχετικές μελέτες επομένως, δεν υπάρχει πληθώρα πληροφοριών και δεδομένων σχετικά με την εφαρμογή της μεταβολωμικής ανάλυσης στα αυγά. Οι έρευνες αυτές αφορούν κυρίως τις διαφορές στην σύσταση του αυγού που οφείλονται στη φυλή, την διατροφή, τον τρόπο εκτροφής των ορνίθων αλλά και την εκτίμηση της φρεσκότητας.

### 3. Πειραματικό μέρος

#### 3.1 Συλλογή και συντήρηση αυγών

Για την διεξαγωγή του πειράματος ήταν απαραίτητο να γίνει η συλλογή των αυγών που παράχθηκαν στο Εργαστήριο Γενικής και Ειδικής Ζωοτεχνίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Πρόκειται για αυγά ωοπαραγωγών ορνίθων της φυλής Lohmann Brown, με καφέ κέλυφος. Οι συγκεκριμένες όρνιθες ήταν ελευθέρως βοσκής (κωδικός μονάδας: 1L2501) και ηλικίας 55 εβδομάδων. Το σιτηρέσιο τους ήταν κοινό και αποτελούνταν από: καλαμπόκι (65,5%), σόγια 44% (25%), αλάτι (0,5%), ανθρακικό ασβέστιο -μαρμαρόσκονη- (8,5%), Nutriphos 22% (0,5%), ισορροπιστής ιχνοστοιχείων και βιταμινών (0,002%) και χρωστική carophyll red (80 g/t).

Η προμήθεια των 56 αυγών πραγματοποιήθηκε στις 1/12/2021 κατά το χρονικό διάστημα 8.30-9.30 π.μ (ωτοκία). Τα αυγά κατά την άφιξη στο εργαστήριο, κωδικοποιήθηκαν, καταγράφηκε η μάζα τους σε αναλυτικό ζυγό ( $\pm 0,01$  g) (Εικόνα 5) και τοποθετήθηκαν σε θερμοθάλαμο ελεγχόμενης θερμοκρασίας 20°C (Εικόνα 4).

Κατά την διάρκεια της συντήρησης πραγματοποιήθηκαν συνολικά 8 δειγματοληψίες σε διάστημα 21 ημερών (5 αυγά για κάθε σημείο δειγματοληψίας - συνολικά 40 δείγματα). Σε κάθε δειγματοληψία καταγράφηκε ο χρόνος που έχει παρέλθει από την στιγμή της ωτοκίας (σε ώρες), ελέγχθηκε η θερμοκρασία του θαλάμου, ζυγίστηκαν εκ νέου τα αυγά που επιλέχθηκαν και μετρήθηκε το ύψος της αλβουμίνης για τον προσδιορισμό των μονάδων Haugh.

Για το δεύτερο μέρος της πειραματικής διαδικασίας, τις ημέρες 0, 9 και 21 (3 δειγματοληψίες) επιλέγονται τυχαία 3 αυγά από τα 5 που πάρθηκαν με σκοπό την λήψη δείγματος κρόκου και αλβουμίνης προτού γίνει η ομογενοποίησή τους.

Στον Πίνακα 13 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά, οι πληροφορίες για τις 8 δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν όπως, η ημερομηνία, οι ώρες που έχουν παρέλθει από την ωτοκία και αντίστοιχα οι ημέρες.



Εικόνα 4. Θερμοθάλαμος.



Εικόνα 5. Ζυγός δύο δεκαδικών ψηφίων.

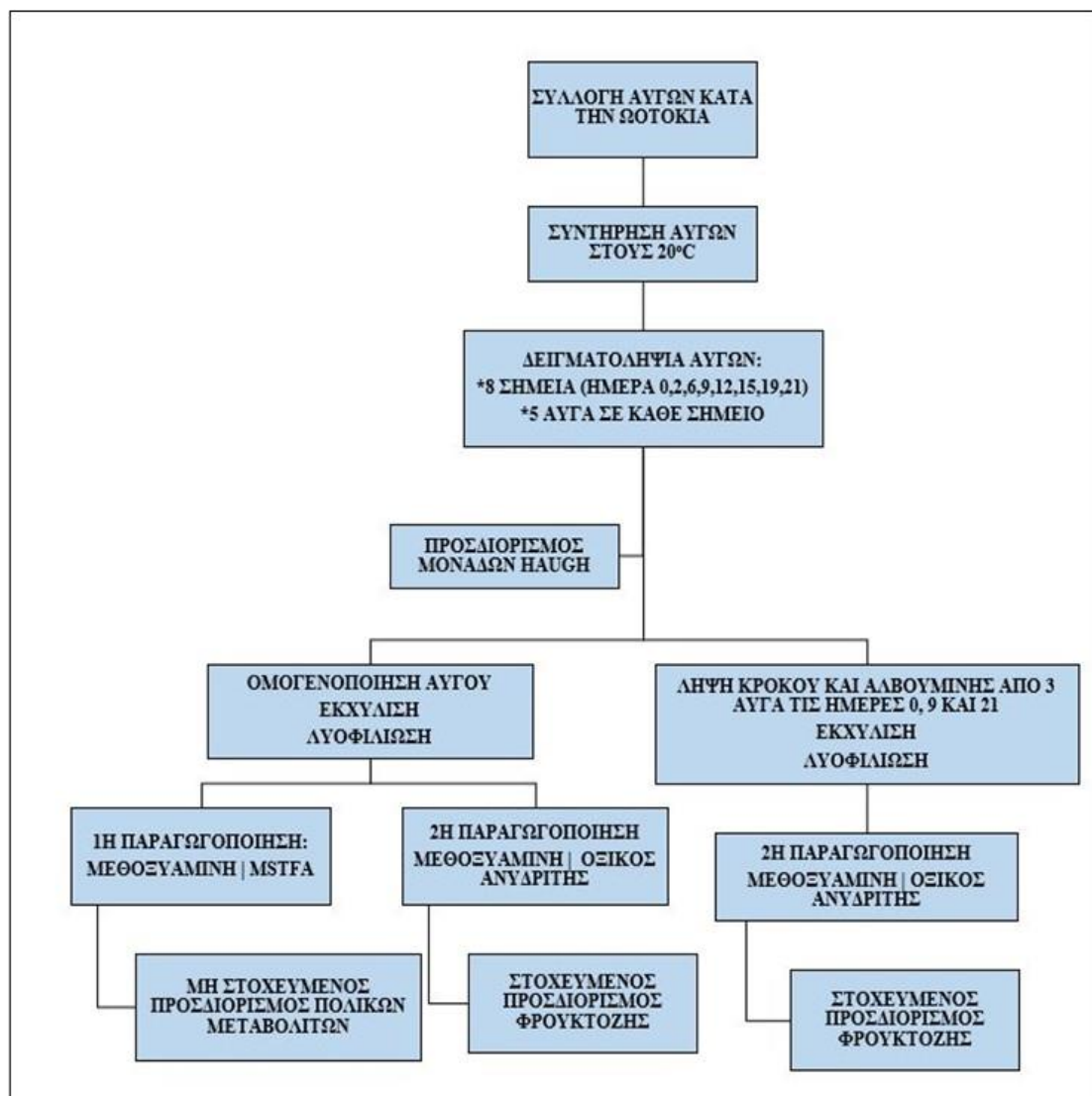
Πίνακας 13. Καταγραφή πληροφοριών για κάθε δειγματοληψία που πραγματοποιήθηκε.

| <i>Δειγματοληψία</i> | <i>Ημερομηνία δειγματοληψίας</i> | <i>Ώρες από την ωοτοκία</i> | <i>Ημέρες από ωοτοκία</i> |
|----------------------|----------------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| 1                    | 1/12/21                          | 1                           | 0                         |
| 2                    | 3/12/21                          | 48                          | 2                         |
| 3                    | 7/12/21                          | 144                         | 6                         |
| 4                    | 10/12/21                         | 216                         | 9                         |
| 5                    | 13/12/21                         | 288                         | 12                        |
| 6                    | 16/12/21                         | 360                         | 15                        |
| 7                    | 20/12/21                         | 456                         | 19                        |
| 8                    | 22/12/21                         | 504                         | 21                        |

#### ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

- Διάλυμα CHCl<sub>3</sub> (99,0-99,4% Sigma Aldrich)-CH<sub>3</sub>OH ( $\geq 99.8\%$  Honeywell) 1:1 v/v.
- Μητρικό διάλυμα κ-αλκανίων (C8-C24): από διάλυμα παρακαταθήκης κ-αλκανίων C8-C24 (3,196 mg/mL) λαμβάνεται ποσότητα ίση με 300  $\mu$ L και προστίθενται 700  $\mu$ L άνυδρης πυριδίνης 99,5% (Acros Organics). Η συγκέντρωση του διαλύματος που προέκυψε ήταν 959  $\mu$ g/mL.
- Μητρικό διάλυμα εικοσιοκτανίου (C28) σε εξάνιο με συγκέντρωση 1000  $\mu$ g/mL.
- Διάλυμα εργασίας κ-αλκανίων: σε φιαλίδιο μεταφέρονται 500  $\mu$ L μητρικού διαλύματος C8-C24 και 500  $\mu$ L από το διάλυμα παρακαταθήκης C28. Από το διάλυμα αυτό, προστίθενται 2  $\mu$ L στο insert κάθε φιαλιδίου με δείγμα προς ανάλυση με GC-MS.
- Διάλυμα μεθοξυαμίνης (Acros Organics) σε άνυδρη πυριδίνη με συγκέντρωση 20  $\mu$ g/mL. Παρασκευάζεται αυθημερόν.
- Υδατικό πρότυπο διάλυμα επισημασμένης d5-γλυκίνης (Sigma-Aldrich) με συγκέντρωση 520  $\mu$ g/mL.
- Υδατικό πρότυπο διάλυμα επισημασμένης φρουκτόζης (<sup>13</sup>C6) με συγκέντρωση 530  $\mu$ g/mL (Eurisotop).
- Διάλυμα εργασίας εσωτερικών προτύπων (Working mix IS): αναμιγνύονται ίσα μέρη όγκου των δύο διαλυμάτων επισημασμένων προτύπων 1:1 (v/v). Η συγκέντρωση της επισημασμένης γλυκίνης ισούται με 260  $\mu$ g/mL και της επισημασμένης φρουκτόζης ισούται με 265  $\mu$ g/mL.

Παρακάτω παρουσιάζεται συνοπτικά το διάγραμμα ροής της πειραματικής πορείας που ακολουθήθηκε.



Εικόνα 6. Διάγραμμα ροής της πειραματικής πορείας.

### 3.2 Προσδιορισμός μονάδων Haugh

Μετά την μέτρηση της μάζας των αυγών σε κάθε δειγματοληψία και πριν γίνει η ομογενοποίηση αυτών όπως αναφέρεται παραπάνω, μετρήθηκε το ύψος της παχύρευστης αλβουμίνης με σκοπό τον υπολογισμό των μονάδων Haugh. Για το στάδιο αυτό είναι απαραίτητη η θραύση του αυγού στο κέντρο του δίσκου. Πάνω από το αυγό τοποθετείται μια ηλεκτρονική συσκευή-τρίποδο (Εικόνα 7). Στην μέση αυτού υπάρχει ένας μεταλλικός κύλινδρος όπου η άκρη του ρυθμίζεται έτσι ώστε να αγγίζει την επιφάνεια της αλβουμίνης. Το σημείο που αγγίζει πρέπει να βρίσκεται μακριά από τη χάλαζα και να απέχει περίπου 1 cm από τον κρόκο. Η συσκευή διαθέτει ένδειξη όπου εμφανίζεται η τιμή του ύψους (σε mm) της παχύρευστης αλβουμίνης. Μέσω της *Εξίσωσης 1* (1.4.2 Στο εσωτερικό του αυγού), υπολογίζονται οι μονάδες Haugh. Μετά από κάθε μέτρηση, καθαρίζεται ο δίσκος και η συσκευή μέτρησης. Είναι σημαντικό η διαδικασία να γίνει γρήγορα καθώς, με την πάροδο του χρόνου και την αλλαγή της θερμοκρασίας το αυγό χάνει μάζα και «ανοίγει» στην επιφάνεια του δίσκου (αλλοιωμένη ένδειξη).



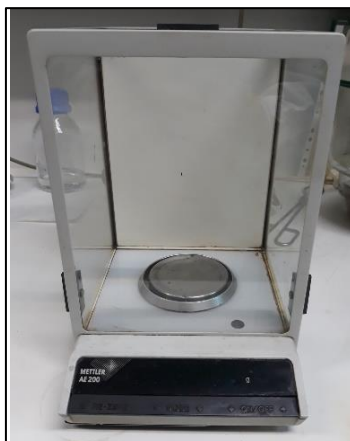


Εικόνα 7. Μέτρηση μονάδων Haugh (δίσκος και συσκευή).

### 3.3 Προσδιορισμός πολικών μεταβολιτών

Αρχικά γίνεται ομογενοποίηση του κρόκου και της αλβουμίνης με ραβδομπλέντερ. Με τη βοήθεια πιπέτας των 100  $\mu\text{L}$  λαμβάνεται μια ποσότητα ομογενοποιημένου αυγού, η οποία αντιστοιχεί σε 50-100 mg, μεταφέρεται σε φιαλίδιο Eppendorf (2 mL), καταγράφεται η μάζα σε αναλυτικό ζυγό ( $\pm 0,1 \text{ mg}$ ) (Εικόνα 8), προστίθεται ανοξείδωτο σφαιρίδιο διαμέτρου 2,5 mm και πωματίζεται.

Καθόλη την διάρκεια αναμονής, τα φιαλίδια με το δείγμα παραμένουν εμβαπτισμένα σε δοχείο με πάγο με σκοπό τον περιορισμό της μεταβολικής δραστηριότητας.



Εικόνα 8. Ζυγός τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων.

Στη συνέχεια, σε κάθε φιαλίδιο με δείγμα προστίθενται 800  $\mu\text{L}$   $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$  (1:1 v/v) με επαναληπτικό μηχανικό σιφώνιο και 20  $\mu\text{L}$  διαλύματος εργασίας εσωτερικών προτύπων (Working mix IS). Τα φιαλίδια τοποθετούνται στον κυκλοαναδευτήρα για 2 min και ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 10.000 rpm για 30 s (Εικόνα 8).

Έπειτα γίνεται προσθήκη 400  $\mu\text{L}$  υπερκάθαρου νερού, ακολουθεί ανάδευση για 1 min σε κυκλοαναμίκτη και διαχωρισμός των φάσεων (υδατομεθανολική-χλωροφορμική) με φυγοκέντρωση (10.000 rpm/5 min). Από την ανώτερη (υδατομεθανολική) φάση λαμβάνονται 200  $\mu\text{L}$  και μεταφέρονται σε νέο φιαλίδιο Eppendorf με προ-τρυπημένο πώμα. Επιπλέον, λαμβάνονται 200  $\mu\text{L}$  για τον προσδιορισμό της φρουκτόζης (όπως περιγράφεται παρακάτω).



Εικόνα 9. Συσκευή φυγοκέντρωσης.

Τα φιαλίδια τοποθετούνται στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  για 15 min και ακολουθεί λυοφιλίωση όλων των δειγμάτων για 4 ώρες (Εικόνα 9). Μετά το πέρας της λυοφιλίωσης, τοποθετούνται νέα πώματα χωρίς οπή και φυλάσσονται στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  μέχρι το στάδιο της παραγωγοποίησης.

Επιπρόσθετα, για την παρασκευή του ενοποιημένου δείγματος ελέγχου (QC), συλλέγονταν 100  $\mu\text{L}$  από το κάθε εκχύλισμα και ενοποιούνταν σε φιαλίδιο των 8 mL.

Σε κάθε αλληλουχία εκχύλισης των δειγμάτων, προετοιμάστηκε σύμφωνα με τον ανωτέρω τρόπο και ένα λευκό δείγμα (blank).



Εικόνα 10. Συσκευή λυοφιλίωσης.

Μετά την ολοκλήρωση του σταδίου της εκχύλισης και της λυοφιλίωσης όλων των δειγμάτων, τα λυοφιλωμένα εκχυλίσματα των πολικών μεταβολιτών χωρίστηκαν σε δύο παρτίδες (batches) προκειμένου να υποστούν παραγωγοποίηση σε δύο συνεχόμενες ημέρες. Η κάθε παρτίδα περιελάμβανε 20 δείγματα αυγού (ομογενοποιημένο), 9 δείγματα QC και 2 λευκά δείγματα.

Τα φιαλίδια που περιέχουν τους πολικούς μεταβολίτες αφαιρούνται από τους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  και υποβάλλονται εκ νέου σε λυοφιλίωση για 1 ώρα έτσι ώστε να αποκλειστεί το ενδεχόμενο επαναπρόσληψης υγρασίας. Αυτό αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για επιτυχημένη παραγωγοποίηση.

Αξίζει να σημειωθεί πως η ίδια διαδικασία (εκχύλιση-λυοφιλίωση) ακολουθήθηκε και για τα δείγματα κρόκου και αλβουμίνης που λήφθηκαν από την 1<sup>η</sup>, 4<sup>η</sup> και 8<sup>η</sup> δειγματοληψία (9 δείγματα κρόκου και 9 αλβουμίνης)

Μετά το πέρας της λυοφιλίωσης, σε κάθε φιαλίδιο προστίθενται 40  $\mu\text{L}$  διαλύματος μεθοξυλαμίνης σε άνυδρη πυριδίνη (20 mg/mL) και πωματίζεται άμεσα. Κατόπιν, τα φιαλίδια τοποθετούνται σε θερμοθάλαμο για 90 min στους  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , υπό συνεχή ανάδευση.

Ακολουθεί φυγοκέντριση (12.000 rpm/15s), προσθήκη σε κάθε φιαλίδιο 70  $\mu\text{L}$  του αντιδραστηρίου σιλυλίωσης (MSTFA, 97%, Alfaesar), άμεσος πωματισμός και ανάδευση στους  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  για 30 min.

Μετά το πέρας των αντιδράσεων παραγωγοποίησης, τα φιαλίδια φυγοκεντρούνται (12.000 rpm/15s), λαμβάνονται 100  $\mu\text{L}$  και μεταφέρεται σε γυάλινο φιαλίδιο αυτόματου δειγματολήπτη που φέρει micro-insert και 2  $\mu\text{L}$  διαλύματος εργασίας κ-αλκανίων (C8-C24 και C28).

Η αλληλουχία παραγωγοποίησης και ανάλυσης με GC/MS πραγματοποιήθηκε με τυχαίο τρόπο και παρουσιάζεται στο *Παράρτημα III*.

Κατά το στάδιο της σιλυλίσωσης, η πρώτη αντίδραση θεωρείται πολύ σημαντική καθώς, η ύπαρξη κετονομάδων δεν οδηγεί σε γρήγορη αντίδραση με τις τριμεθυλοσιλυλικές ομάδες.

Πιο συγκεκριμένα, μια αλκυλοσιλυλομάδα (τριμεθυλοσιλυλική-TMS) αντικαθιστά το δραστικό άτομο υδρογόνου (-H) των λειτουργικών ομάδων των συστατικών (-OH,-COOH,-NH<sub>2</sub>,-SH). Ορισμένα από τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται είναι το N-μεθυλο-N-

#### *ΕΝΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ (QC)*

Τα δείγματα αυτά χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της αναπαραγωγιμότητας της αναλυτικής μεθόδου αλλά και για την ταυτοποίηση των κορυφών και κανονικοποίηση των δεδομένων.

- Από κάθε σημείο δειγματοληψίας, τα εκχυλίσματα των πολικών μεταβολιτών (5x100  $\mu$ L) μεταφέρονταν σε γυάλινο φιαλίδιο χωρητικότητας 8 mL (συνεχή παραμονή σε δοχείο με πάγο). Η αποθήκευσή του γινόταν στους -20 °C.
- Μετά την ολοκλήρωση όλων των δειγματοληψιών κατά την συντήρηση των αυγών, το ενοποιημένο δείγμα ελέγχου ποιότητας (QC) περιείχε ισόποσο εκχύλισμα από κάθε δείγμα (40x100  $\mu$ L).
- Από το QC προετοιμάστηκαν 18 φιαλίδια Eppendorf που το καθένα περιείχε 200  $\mu$ L QC. Εν συνεχεία, τοποθετήθηκαν σε καταψύκτη (-20 °C) για 5 min και λυοφιλιώθηκαν για περίπου 4h. Έπειτα φυλάσσονταν ξανά στους -20 °C.
- Τα QC χρησιμοποιήθηκαν στο στάδιο της παραγωγοποίησης, όπως περιγράφηκε ανωτέρω.

#### *ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ-ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (GC/MS)*

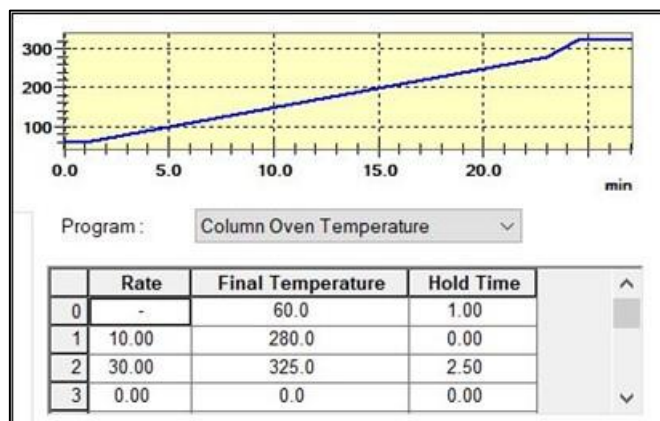
Το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των δειγμάτων ήταν Shimadzu GCMS QP2010 Ultra, με αυτόματο δειγματολήπτη AOC-20s (Εικόνα 13).

Η θερμοκρασία φούρνου στην περίπτωση του προσδιορισμού των πολικών μεταβολιτών ήταν ίση με 60°C (1<sup>η</sup> μέθοδος) ενώ, κατά τον προσδιορισμό της φρουκτόζης η τιμή αυτής ήταν 180°C (2<sup>η</sup> μέθοδος). Η θερμοκρασία του εισαγωγέα και στις δύο περιπτώσεις ισούταν με 250°C. Η αναλογία διαμοιρασμού (split ratio) ήταν 1:10 κατά την 1<sup>η</sup> μέθοδο και 1:15 στην 2<sup>η</sup> μέθοδο ενώ, ο όγκος έκχυσης διατηρήθηκε στο 1  $\mu$ L.

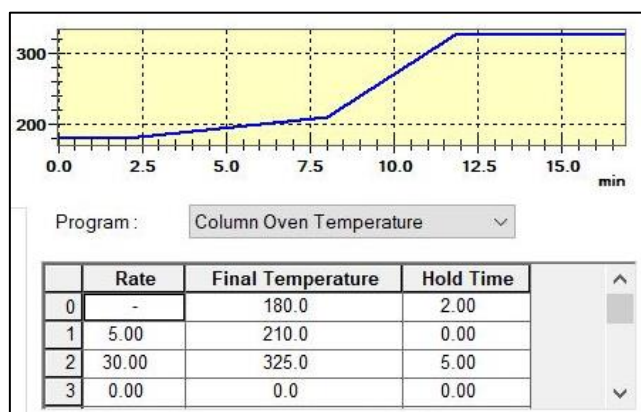
Έγινε χρήση τριχοειδούς στήλης διαχωρισμού MEGA-5HT (29,4 m x 0,25 mm, thickness 0,25  $\mu$ m). Το ήλιο (φέρων αέριο) είχε σταθερή γραμμική ταχύτητα ίση με 36 cm/s. Η θερμοκρασία πηγής ιόντων και του συστήματος σύζευξης (interface) ήταν ίση με 230°C και 290°C, αντίστοιχα.

Το φασματόμετρο μάζας λειτουργεί με ιοντισμό ηλεκτρονίων όπου η ενέργεια των ηλεκτρονίων ορίζεται στα 70 eV και το εύρος μαζών είναι 50- 600 m/z (1<sup>η</sup> μέθοδος) | 85-500 m/z (2<sup>η</sup> μέθοδος).

Στις *Εικόνες 11* και *12* παρουσιάζεται το πρόγραμμα θερμοκρασίας του φούρνου κατά τον προσδιορισμό των πολικών μεταβολιτών και του προσδιορισμού της φρουκτόζης, αντίστοιχα.



*Εικόνα 11.* Πρόγραμμα θερμοκρασίας φούρνου κατά την διάρκεια του προσδιορισμού των πολικών μεταβολιτών.



*Εικόνα 7.* Πρόγραμμα θερμοκρασίας φούρνου κατά την διάρκεια του προσδιορισμού της φρουκτόζης.

Το λογισμικό καταγραφής και επεξεργασίας των δεδομένων που χρησιμοποιήθηκε ήταν το GCMS Solution Version 4.30 (Shimadzu). Η επεξεργασία των δεδομένων παρουσιάζεται αναλυτικά στο μέρος 4. *Αποτελέσματα.*



Εικόνα 8. GC-MS QP2010 Ultra Shimadzu.

### 3.4 Προσδιορισμός φρουκτόζης

Τα λυοφιλιωμένα εκχυλίσματα πολικών μεταβολιτών που προέκυψαν κατά το πρώτο μέρος διαχωρίστηκαν σε τρεις παρτίδες (batches). Η πρώτη περιελάμβανε τα 9 δείγματα από τον κρόκο αυγού, 9 δείγματα από την αλβουμίνη, 1 δείγμα QC και 1 λευκό. Οι επόμενες δύο αποτελούνται από 20 δείγματα ολόκληρου αυγού (ομογενοποιημένο), 1 δείγμα QC και 1 λευκό δείγμα.

Σε κάθε φιαλίδιο προστίθενται 50  $\mu\text{L}$  διαλύματος μεθοξυλαμίνης σε άνυδρη πυριδίνη (20 mg/mL) και αμέσως πωματίζεται. Τοποθετούνται σε θερμοθάλαμο για 90 min στους 30  $^{\circ}\text{C}$ , υπό ανάδευση και ακολουθεί φυγοκέντριση στις 12000 rpm για 15s.

Πραγματοποιείται επομένως, η παραγωγή οξιμών από τις καρβονυλικές ομάδες των μεταβολιτών. Εν συνεχεία, προστίθενται 250  $\mu\text{L}$  οξικού ανυδρίτη (άμεσο κλείσιμο φιαλιδίου), παραμονή στους 45  $^{\circ}\text{C}$  για 60 min και φυγοκέντριση στις 12000 rpm για 15s (αντίδραση ακετυλίωσης).

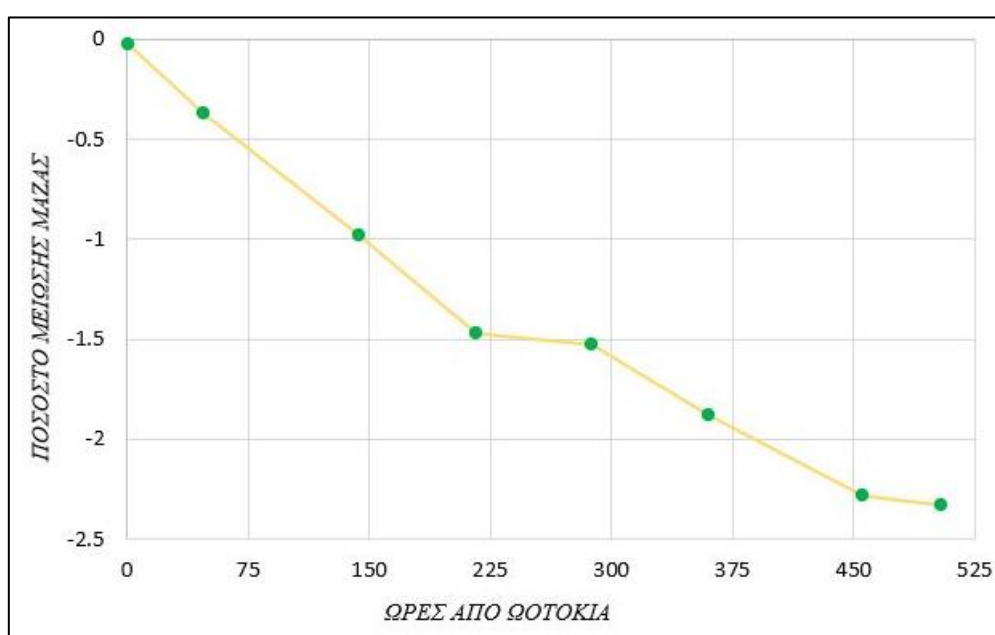
Ακολούθως, τα φιαλίδια τοποθετούνται σε θερμαινόμενη πλάκα (thermoblock) στους 50  $^{\circ}\text{C}$  προς απομάκρυνση των διαλυτών υπό ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού. Κατόπιν, το υπόλειμμα επαναδιαλύεται με την προσθήκη 100  $\mu\text{L}$  οξικού αιθυλεστέρα και μεταφέρεται σε γυάλινο φιαλίδιο αυτόματου δειγματολήπτη με micro-insert (των 200  $\mu\text{L}$ ). Η αλληλουχία των δειγμάτων που ορίστηκε για την ανάλυση στο GC/MS έγινε με τυχαίο τρόπο και παρουσιάζεται στο *Παράρτημα III*.

## 4. Αποτελέσματα

### 4.1 Μετρήσεις μάζας και υπολογισμός μονάδων Haugh

Όπως προαναφέρθηκε, τα αυγά ζυγίστηκαν σε ένα ζυγό 2 δεκαδικών ψηφίων την ημέρα της συλλογής τους και πριν την αποθήκευσή τους στο θερμοθάλαμο και έπειτα ζυγίζονταν όσα επιλέγονταν σε κάθε σημείο δειγματοληψίας. Οι τιμές της μάζας καταγράφηκαν και παρουσιάζονται στον *Παράρτημα Π2*.

Με την πάροδο του χρόνου αποθήκευσης παρατηρήθηκε μείωση στη μάζα του αυγού γεγονός που είναι εμφανές στο ακόλουθο γράφημα (*Εικόνα 14*). Η μείωση αυτή οφείλεται στην αποβολή υγρασίας από το εσωτερικό του αυγού μέσω των πόρων που διαθέτει το κέλυφος.



Εικόνα 14. Ποσοστιαία (%) μείωση της μάζας των αυγών κατά την συντήρησή τους στους 20°C.

Πέραν όμως της μείωσης της μάζας, παρατηρείται και αλλαγή στην ανθεκτικότητα και ποιότητα του κελύφους αλλά και της εσωτερικής μεμβράνης, κατά το σπάσιμο του αυγού. Αυτό επιτυγχάνεται δυσκολότερα καθώς, η σύσταση του κελύφους και των μεμβρανών επηρεάζεται άμεσα από την θερμοκρασία συντήρησης. Όπως αναφέρεται και στην υποενότητα 1.4 *Ποιοτικά χαρακτηριστικά αυγού*, αποθηκεύοντας το αυγό σε θερμοκρασία δωματίου η επιδερμίδα παραμένει ακέραιη για 4 περίπου ημέρες ενώ, με την πάροδο 21 ημερών από την ωοτοκία γίνεται περισσότερο εύθραυστη.

Επιπλέον, κατά το στάδιο της δειγματοληψίας παρατηρήθηκαν αλλαγές στην μορφή, το χρώμα, την εικόνα του κελύφους, την αλβουμίνη αλλά και τον κρόκο. Πιο συγκεκριμένα, μέχρι περίπου την 12<sup>η</sup> μέρα από την ωοτοκία, ο κρόκος των αυγών διατήρησε το στρογγυλό σχήμα του και ήταν σφιχτός. Απορροφώντας όμως υγρασία από την αλβουμίνη, άρχισε η σταδιακή αλλοίωση της μεμβράνης (βιταλίνη) που τον περιβάλλει γεγονός που οδήγησε στην αύξηση του μεγέθους του, με αποτέλεσμα το

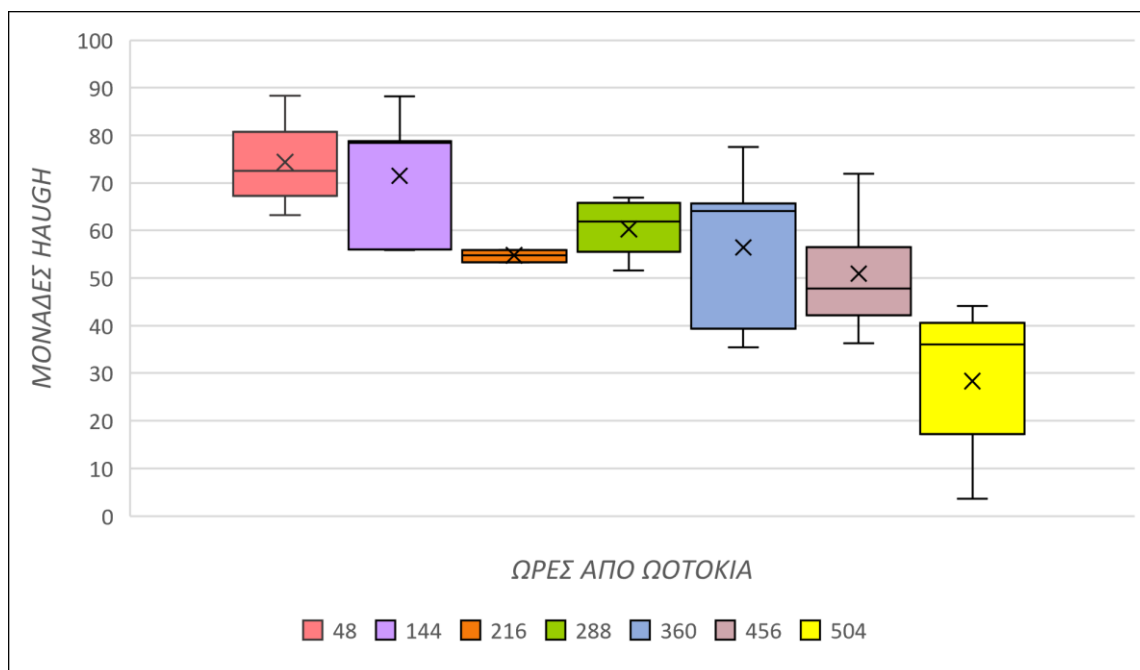
ευκολότερο σπάσιμό του (EFSA, 2014). Το χρώμα του κρόκου παρέμεινε πορτοκαλί αλλά η οσμή γίνεται πιο έντονη και δυσάρεστη με την πάροδο του χρόνου.

Τέλος, η αλβουμίνη εντοπίζεται σε δύο μορφές την λεπτόρευστη και την παχύρευστη. Τις πρώτες μέρες, με το σπάσιμο του αυγού ο διαχωρισμός των δύο μορφών ήταν διακριτός και η αλβουμίνη είχε μια θολή εικόνα οφειλόμενη στο CO<sub>2</sub> που εντοπίζεται. Καθώς, ο χρόνος συντήρησης αυξανόταν, η παχύρευστη αλβουμίνη άρχισε να υγροποιείται πιθανόν λόγω της τροποποίησης της δομής της ωομυκίνης, την αλληλεπίδραση με την λυσοζύμη αλλά και την συγκέντρωση άλλων ιόντων. Πέραν της υγροποίησης, η αλβουμίνη έχασε την θολερότητα της και έγινε περισσότερο διαφανή εξαιτίας, της απώλειας CO<sub>2</sub> μέσω των πόρων (EFSA, 2014) (Karoui et al., 2006). Αξίζει να σημειωθεί πως, από την δεύτερη κιόλας δειγματοληψία παρατηρήθηκαν οι πρώτες, μικρές διαφορές που στην πορεία έγιναν εντονότερες.

Καθώς, το ύψος της παχύρευστης αλβουμίνης μειώνεται και οι μονάδες Haugh σημειώνουν μείωση αφού υπάρχει μεταξύ τους συσχέτιση. Στο *Παράρτημα Π3*, δίνονται οι τιμές του ύψους της παχύρευστης αλβουμίνης του κάθε δείγματος και η τελική τιμή των μονάδων όπως αυτή υπολογίστηκε μέσω της *Εξίσωσης 1 (1.4.2 Στο εσωτερικό του αυγού)*.

Στην *Εικόνα 15* απεικονίζεται η μεταβολή των μονάδων Haugh συναρτήσει των ωρών από την ωτοκία. Οι τιμές των μονάδων Haugh φαίνεται να έχουν μια όχι τόσο έντονη πτωτική και σχετικά γραμμική τάση, κατά το διάστημα των 48 έως 216 ωρών από την ωτοκία ενώ, κατά το διάστημα μεταξύ των ωρών 288 έως 504 από την ωτοκία παρουσιάζεται μια σταθερότητα. Με βάση την πορεία αυτή, συμπεραίνεται πως οι μονάδες Haugh δεν αποτελούν έναν αξιόπιστο δείκτη αξιολόγησης της φρεσκότητας.





Εικόνα 95. Γράφημα μεταβολής των μονάδων Haugh κατά την περίοδο συντήρησης αυγών στους 20°C.

Επιπλέον, στον Πίνακα 14 τα δείγματα κατηγοριοποιούνται σε ομάδες με βάση την φρεσκότητα ακολουθώντας τις οδηγίες του USDA (1.4.2 Στο εσωτερικό του αυγού). Για την κατηγοριοποίηση αυτή υπολογίστηκε η μέση τιμή των μονάδων Haugh σε κάθε ένα από τα οκτώ σημεία δειγματοληψίας που πραγματοποιήθηκαν.

Πίνακας 144. Καταγραφή ωρών από την ωοτοκία, την μέση τιμή μονάδων Haugh και τελικά την κατηγοριοποίηση των δειγμάτων σε ομάδες με βάση την φρεσκότητα (USDA).

| Δειγματοληψία | Ωρες από την ωοτοκία | Μέση τιμή μονάδων Haugh | Κατηγορία ποιότητας USDA |
|---------------|----------------------|-------------------------|--------------------------|
| 1             | 1                    | 87,40                   | AA                       |
| 2             | 48                   | 74,41                   | AA                       |
| 3             | 144                  | 71,47                   | A                        |
| 4             | 216                  | 54,78                   | B                        |
| 5             | 288                  | 60,33                   | A                        |
| 6             | 360                  | 56,42                   | B                        |
| 7             | 456                  | 50,93                   | B                        |
| 8             | 504                  | 28,35                   | C                        |

\*Με βάση το πρότυπο USDA AMS 56 (2000): AA ( $HU \geq 72$ ), A ( $60 \leq HU \leq 71$ ), B ( $31 \leq HU \leq 59$ ) και C ( $HU \leq 30$ )

Όπως είναι λογικό, με την παρατεταμένη συντήρηση των αυγών η φρεσκότητα αυτών επηρεάζεται άμεσα κάτι που επιβεβαιώνεται από τις τιμές των μονάδων Haugh αλλά και την αλλαγή στην κατηγορία όπου ανήκουν. Με βάση την Νομοθεσία, μέχρι την 9<sup>η</sup> ημέρα (216 ώρες - 4<sup>η</sup> δειγματοληψία) από την ωοτοκία το αυγό θεωρείται φρέσκο (AA ή και A κατηγορίας). Στην συγκεκριμένη περίπτωση, η μέση τιμή των μονάδων Haugh είναι κάτω από το όριο που έχει τεθεί για την A κατηγορία ( $> 59$ ) για αυτό και θεωρούνται B κατηγορίας. Επιπλέον, παρατηρείται πως κατά την 12<sup>η</sup> μέρα (288 ώρες - 5<sup>η</sup> δειγματοληψία) χαρακτηρίζονται εκ νέου ως A κατηγορίας. Η μέση τιμή των μονάδων Haugh όμως είναι κατά το ελάχιστο μεγαλύτερη από το κατώτατο όριο (60)

για να θεωρούνται ως Α κατηγορίας. Επομένως, μεταξύ αυτών των 2 δειγματοληψιών φαίνεται οι αλλαγές στην σύσταση της αλβουμίνης να μην είναι έντονες με αποτέλεσμα να μην υπάρχει σαφής διαφοροποίηση. Αξίζει να ειπωθεί όμως πως, από την 9<sup>η</sup> ημέρα (216 ώρες) η διαφορά στην μέση τιμή είναι αξιοσημείωτη γεγονός που υποδηλώνει την μείωση της φρεσκότητας επομένως επιβεβαιώνονται και τα όσα ορίζει η Νομοθεσία για το χαρακτηρισμό των εξαιρετικά φρέσκων αυγών.

## **4.2 Μεταβολωμική**

### **4.2.1 Στάδια επεξεργασίας πριν την στατιστική ανάλυση**

Όπως έχει προαναφερθεί, η παρούσα μελέτη διαχωρίστηκε σε δύο βασικά μέρη. Το πρώτο μέρος αφορούσε την επαλήθευση των ευρημάτων που προέκυψαν από προγενέστερη μελέτη (Χλιάρα Δήμητρα Ιωάννα, 2021) που είχε ως στόχο την εύρεση βιοδεικτών φρεσκότητας-αλλοίωσης ολόκληρων αυγών κατά τη συντήρησή τους σε θερμοκρασία δωματίου μέσω μιας μεταβολωμικής προσέγγισης.

Με την ολοκλήρωση του σταδίου της ανάλυσης με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC/MS) ακολουθεί η προ-επεξεργασία των δεδομένων. Αρχικώς, πραγματοποιήθηκε μετατροπή των αρχείων δεδομένων του λογισμικού GCMS Solution σε αρχεία .ABF (Analysis Base File) μέσω της εφαρμογής Analysis Base File Converter. Το βήμα αυτό είναι απαραίτητο για την επεξεργασία τους στο λογισμικό MS-DIAL. Το στάδιο της αποσυνέλιξης των φασμάτων (spectra deconvolution) που πραγματοποιείται αρχικά στο MS-DIAL έχει ως αποτέλεσμα, τον διαχωρισμό όσων ουσιών συνεκλούνται μέσω ορισμένων αλγορίθμων (Tsugawa et al., 2015). Εν συνεχεία, κρίνεται απαραίτητο όλες οι χρωματογραφικές κορυφές όλων των δειγμάτων να είναι ευθυγραμμισμένες (peak alignment) με βάση τους δείκτες κατακράτησης (RI) χωρίς έτσι, να παρατηρούνται μετατοπίσεις στους χρόνους κατακράτησης των συγκεκριμένων ουσιών (Yi et al., 2016).

Για την ταυτοποίηση των μεταβολιτών έγινε χρήση των δεικτών κατακράτησης και των φασμάτων μαζών πρότυπων ουσιών καθώς και των αντίστοιχων που εμπεριέχονται στις βιβλιοθήκες NIST14 (<https://chemdata.nist.gov/>) και GCMS DB-Public-KovatsRI-VS3 (<http://prime.psc.riken.jp/compsms/msdial/main.html#MSP>).

Ο αριθμός των κορυφών που προκύπτει από την παραπάνω διαδικασία είναι αρκετά μεγάλος (ίσος με 454) γεγονός που απαιτεί έναν πρώτο διαχωρισμό αυτών. Επομένως, απορρίπτονται κορυφές που ανιχνεύονται στα λευκά δείγματα αλλά και σε ποσοστό μικρότερο του 50% των ενοποιημένων δειγμάτων. Επιπλέον, αφαιρέθηκαν ενώσεις που οφείλονταν σε προϊόντα αποδόμησης του υλικού της στήλης, παραπροϊόντα των αντιδραστηρίων παραγωγοποίησης, ενώσεις με πολύ χαμηλό σήμα καθώς και πλασματικές ενώσεις (artifacts) που οφείλονταν στη διαδικασία αποσυνέλιξης (Dunn et al., 2011).

Ακολουθώς, η κανονικοποίηση αποτελεί ένα απαραίτητο και σημαντικό στάδιο καθώς, πρέπει να γίνει η εξάλειψη όλων των σφαλμάτων (π.χ θόρυβος) με χρήση του αλγορίθμου Lowess του λογισμικού MSDIAL. Η κανονικοποίηση πραγματοποιήθηκε

με βάση το εσωτερικό πρότυπο της d5-γλυκίνης και τα δείγματα QC προκειμένου να εξομαλυνθεί η ολίσθηση του σήματος του φασματομέτρου μαζών (Dunn et al., 2011). Στη συνέχεια, από τα δεδομένα που λήφθηκαν, υπολογίστηκε η σχετική τυπική απόκλιση (RSD) κάθε ένωσης στα ενοποιημένα δείγματα. Ενώσεις που διέθεταν τιμές σχετικής τυπικής απόκλισης άνω του 30% απορρίφθηκαν (Dunn et al., 2011). Επομένως, με βάση και τον πρώτο διαχωρισμό που πραγματοποιήθηκε, παρέμειναν 65 ενώσεις.

Τέλος, τα ύψη των παραγώγων, εξαιτίας μη πλήρους παραγωγοποίησης, ισομερών κ.α, που ανήκαν στο ίδιο μητρικό μόριο αθροίστηκαν μεταξύ τους. Στο *Παράρτημα Π4* παρατίθενται οι 55 μεταβολίτες που τελικά επιλέχθηκαν με τους αντίστοιχους δείκτες κατακράτησής τους. Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως τα ύψη των ενώσεων αυτών σε κάθε δείγμα, διαιρέθηκαν με την μάζα που χρησιμοποιήθηκε κατά το στάδιο της εκχύλισης του εκάστοτε δείγματος. Με βάση τους ταυτοποιημένους μεταβολίτες και τις κανονικοποιημένες τιμές του ύψους της κορυφής κάθε μεταβολίτη δημιουργήθηκε ένα αρχείο δεδομένων, όπου οι γραμμές αναφέρονταν σε μεταβολίτες και οι στήλες σε δείγματα (55 μεταβολίτες X 40 δείγματα), και το οποίο χρησιμοποιήθηκε για περαιτέρω στατιστική ανάλυση.

#### **4.2.2 Πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση**

Τα δεδομένα που προέκυψαν επεξεργάζονται μέσω της διαδικτυακής πλατφόρμας MetaboAnalyst 5.0 (Xia et al., 2015) (Chong et al., 2018) και του λογισμικού The Unscrambler X (CAMO software, demo version). Αξίζει να σημειωθεί πως η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε για δύο διαφορετικές περιπτώσεις. Πιο συγκεκριμένα, τα δείγματα κατηγοριοποιήθηκαν με βάση α) την σειρά της δειγματοληψίας, δηλαδή την διάρκεια (ώρες ή ημέρες) συντήρησης από την ωτοκία, και β) την φρεσκότητά τους σε δύο επίπεδα (εξαιρετικό φρέσκο και μη εξαιρετικό φρέσκο). Αρχικά, οι ήδη κανονικοποιημένες τιμές των μεταβολιτών, όπως αναφέρεται στην προηγούμενη ενότητα, λογαριθμήθηκαν (log transformation) και μετασχηματίστηκαν με χρήση μέσης κλιμάκωσης (mean-centered scaling), όσον αφορά την πρώτη περίπτωση. Για την δεύτερη περίπτωση, οι τιμές μετασχηματίστηκαν με βάση την τετραγωνική ρίζα (square root transformation) και με αυτοκλιμάκωση (auto scaling). Στον *Πίνακα 15* παρατίθενται οι ώρες από την ωτοκία όπως αυτές αντιστοιχούν στην σειρά που πραγματοποιήθηκαν οι δειγματοληψίες. Επιπλέον, με βάση αυτά που περιγράφηκαν στην ενότητα *1.2 Νομοθετικό πλαίσιο*, τα αυγά χαρακτηρίστηκαν ως εξαιρετικά φρέσκα (Fresh | F) από την 1<sup>η</sup> έως και την 9<sup>η</sup> ημέρα (216 ώρες) από την ωτοκία, ενώ τα υπόλοιπα αυγά, δηλαδή αυτά που αντιστοιχούν από την 12<sup>η</sup> έως την 21<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης, χαρακτηρίστηκαν ως μη εξαιρετικά φρέσκα (Non-Fresh | NF).

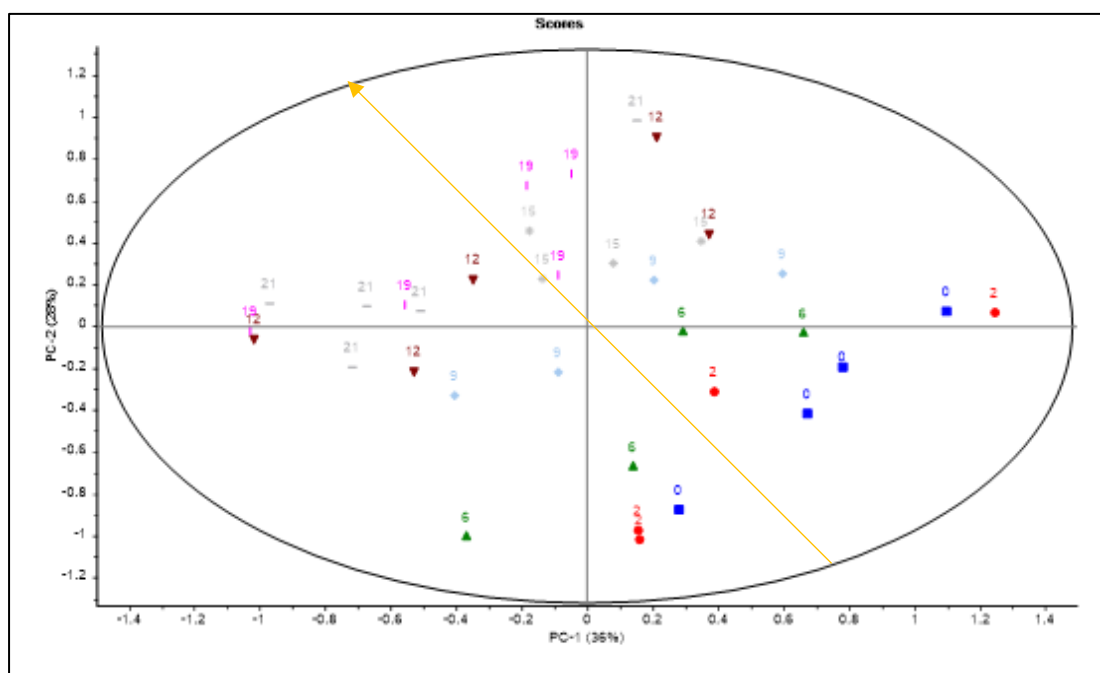
Πίνακας 15. Πίνακας παράθεσης ωρών από ωοτοκία όπως αυτές αντιστοιχούν στο σημείο δειγματοληψίας αλλά και στον χαρακτηρισμό ως εξαιρετικά φρέσκα (F) και μη εξαιρετικά φρέσκα (NF).

| <i>Ώρες από ωοτοκία</i> | <i>Ημέρες από ωοτοκία</i> | <i>Σημείο δειγματοληψίας</i> | <i>Φρεσκότητα</i> |
|-------------------------|---------------------------|------------------------------|-------------------|
| 1                       | 0                         | 1                            | F                 |
| 48                      | 2                         | 2                            | F                 |
| 144                     | 6                         | 3                            | F                 |
| 216                     | 9                         | 4                            | F                 |
| 288                     | 12                        | 5                            | NF                |
| 360                     | 15                        | 6                            | NF                |
| 456                     | 19                        | 7                            | NF                |
| 504                     | 21                        | 8                            | NF                |

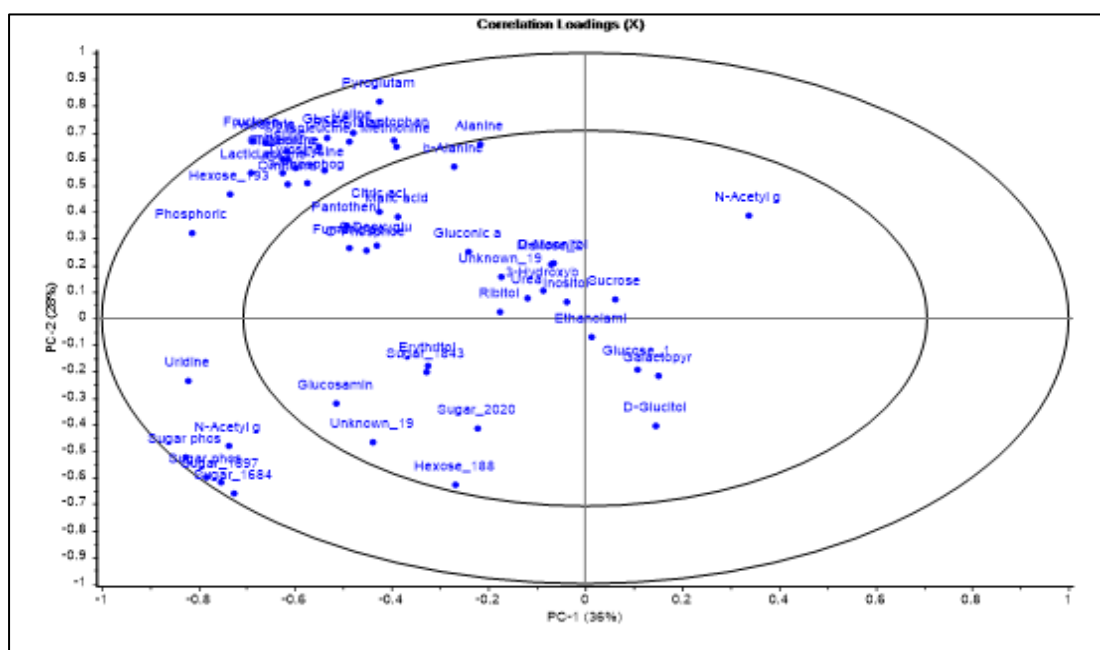
#### **4.2.2.1 Αποτελέσματα με βάση τη σειρά δειγματοληψίας**

Αρχικώς, τα δεδομένα των μεταβολιτών υποβλήθηκαν σε ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA). Ορισμένα δείγματα (1\_43, 2\_34, 3\_14, 4\_25 και 6\_39) δεν συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση καθώς χαρακτηρίστηκαν έκτροπα (outliers) βάσει της ανάλυσης των υπολοίπων. Από το γράφημα των βαθμών των κύριων συνιστωσών (Εικόνα 16α) προκύπτει ότι τα αυγά διαχωρίζονται ικανοποιητικώς βάσει των ημερών συντήρησης από την ωοτοκία. Αυτός ο διαχωρισμός φαίνεται να λαμβάνει χώρα κατά την κατεύθυνση που υποδεικνύεται με το κίτρινο βέλος. Είναι επίσης εμφανές ότι τα αυγά που συντηρήθηκαν έως και την 9<sup>η</sup> ημέρα διαχωρίζονται σε μεγαλύτερο βαθμό συγκριτικά με εκείνα που συντηρήθηκαν περισσότερες ημέρες (12<sup>η</sup> – 21<sup>η</sup> ημέρα). Οι δύο κύριες συνιστώσες (PC-1, PC-2) επεξηγούν το 64% της διακύμανσης.

**α**



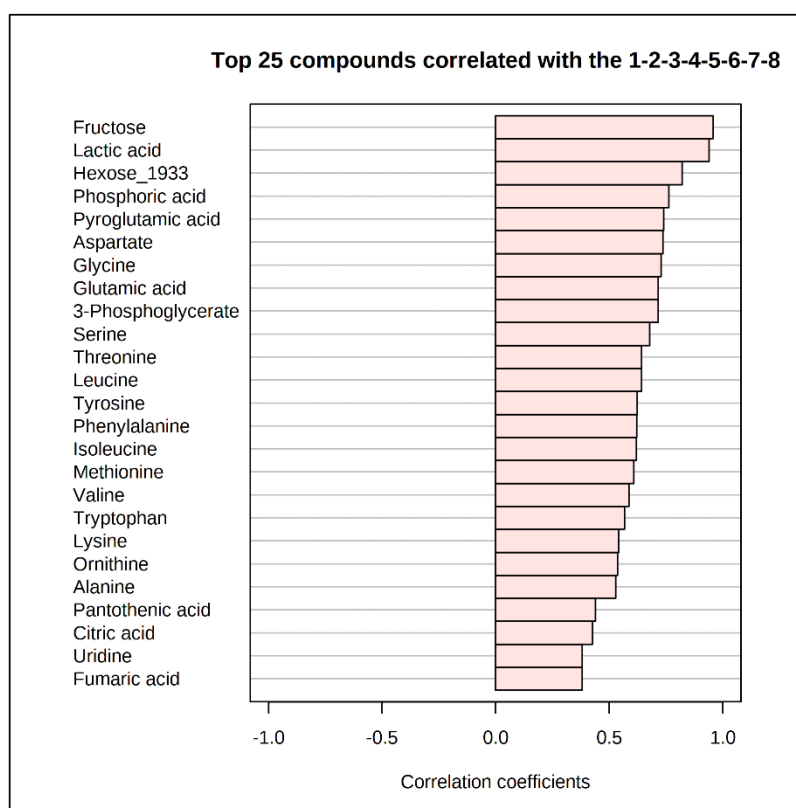
**β**



Εικόνα 16. α) Γράφημα των βαθμών των κύριων συνιστωσών PCA βάσει των πολικών μεταβολιτών σε αυγά συντηρημένα στους 20°C. β) Γράφημα συσχετίσεων των φορτίων των κύριων συνιστωσών PCA (correlation loadings). Οι κλάσεις (1,2,3,4,5,6,7,8) των δειγμάτων αντιστοιχούν σε ημέρες συντήρησης από την ωοτοκία (βλ. Πίνακα 16).

Στην Εικόνα 16β παρουσιάζεται το γράφημα συσχετίσεων των φορτίων (correlation loadings plot) βάσει του οποίου αναδεικνύονται οι μεταβολίτες που συνεισφέρουν σημαντικά στο διαχωρισμό των δειγμάτων που περιγράφηκε προηγουμένως καθώς και τη συσχέτιση μεταξύ τους. Πιο συγκεκριμένα, μεταβολίτες που βρίσκονται στην

περιοχή μεταξύ της εξωτερικής και εσωτερικής έλλειψης θεωρούνται ότι συνεισφέρουν σημαντικά στο μοντέλο. Επίσης, μεταβολίτες που γειτνιάζουν εμφανίζουν θετική συσχέτιση μεταξύ τους. Διακρίνονται δύο ομάδες μεταβολιτών – η 1<sup>η</sup> ομάδα τοποθετείται στο άνω αριστερό τεταρτημόριο και περιλαμβάνει μεταξύ άλλων την φρουκτόζη, ενώ η 2<sup>η</sup> ομάδα τοποθετείται στο κάτω αριστερό τεταρτημόριο και περιλαμβάνει κυρίως σάκχαρα και παράγωγά τους. Επιπρόσθετα, το περιεχόμενο των μεταβολιτών της 1<sup>η</sup> ομάδας αυξάνεται κατά την κατεύθυνση του κίτρινου βέλους, η οποία αντικατοπτρίζει το χρονικό διάστημα συντήρησης των αυγών, όπως ήδη έχει αναφερθεί. Τα ανωτέρω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με χρήση του εργαλείου Pattern Hunter (Metaboanalyst) για την εύρεση μεταβολιτών που εμφανίζουν σημαντική συσχέτιση με τη σειρά δειγματοληψίας (1-2-3-4-5-6-7-8) βάσει του συντελεστή Spearman's  $\rho$  (Εικόνα 17).

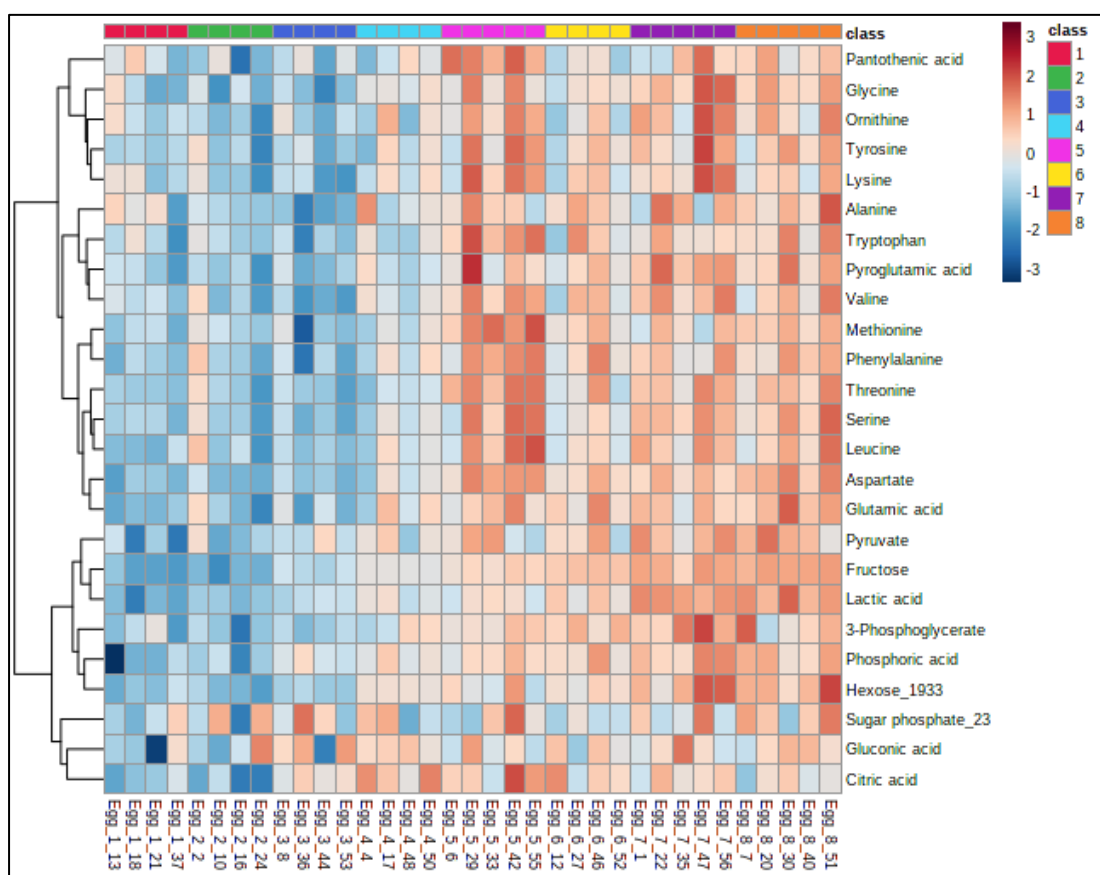


Εικόνα 17. Οι κυριότεροι 25 μεταβολίτες που συσχετίζονται σημαντικά με τη σειρά δειγματοληψίας (1-2-3-4-5-6-7-8), όπως προέκυψαν από ανάλυση συσχέτισης Spearman. Με ροζ χρώμα απεικονίζονται οι μεταβολίτες των οποίων το περιεχόμενο αυξάνεται κατά την πάροδο του χρόνου από την ωοτοκία των αυγών. Ο οριζόντιος άξονας απεικονίζει την τιμή του συντελεστή συσχέτισης Spearman's  $\rho$ .

Τους υψηλότερους συντελεστές συσχέτισης εμφάνισαν η φρουκτόζη (0,96) και το γαλακτικό οξύ (0,94), γεγονός που επιβεβαιώνει τα ευρήματα της προηγούμενης μεταπτυχιακής μελέτης (Χλιάρα Δήμητρα Ιωάννα, 2021). Άλλοι σημαντικοί μεταβολίτες που ανιχνεύθηκαν ήταν στην πλειονότητά τους αμινοξέα.

Στην Εικόνα 18 παρουσιάζεται ένας θερμικός χάρτης ιεραρχικής ανάλυσης συστάδων, ο οποίος απεικονίζει την μεταβολή σχετικού περιεχομένου των 25 σημαντικότερων μεταβολιτών (βάσει ANOVA) συναρτήσει των κλάσεων (1-2-3-4-5-6-7-8) που

αντιστοιχούν στα σημεία δειγματοληψίας (Πίνακας 13). Η μεταβολή του χρώματος των κελιών από σκούρο μπλε σε σκούρο κόκκινο αντιστοιχεί σε μεταβολή της σχετικής αφθονίας του μεταβολίτη από χαμηλή σε υψηλή. Αξίζει να σημειωθεί ότι όλοι οι μεταβολίτες παρουσιάζουν αυξητική τάση κατά το χρόνο συντήρησης των αυγών με μεταβατικό σημείο (σχετική αφθονία  $\approx 0$ ) την κλάση 4, η οποία αντιστοιχεί σε 9 ημέρες συντήρησης των αυγών και συνδέεται άμεσα με το ανώτατο όριο για χαρακτηρισμό των αυγών ως εξαιρετικά φρέσκα βάσει της κείμενης Νομοθεσίας (1.2 Νομοθετικό πλαίσιο). Επιπρόσθετα, η πλειονότητα των σημαντικών μεταβολιτών που ανιχνεύονται με την παρούσα ανάλυση είναι ίδιοι με εκείνους που εντοπίστηκαν ανωτέρω με χρήση PCA και συσχέτιση Spearman.

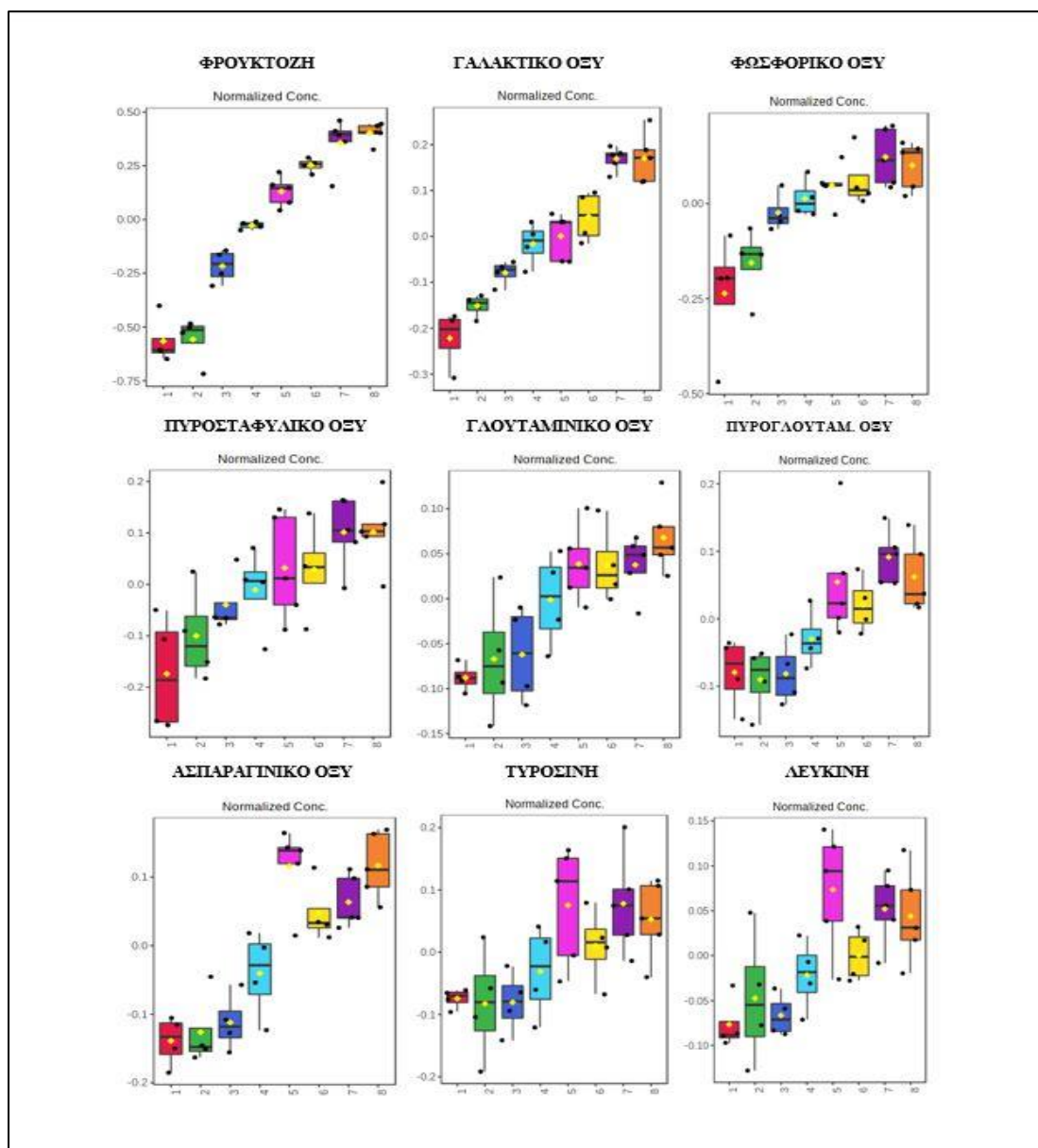


Εικόνα 18. Θερμικός χάρτης ιεραρχικής ανάλυσης συστάδων, ο οποίος αποτυπώνει χρωματικά την μεταβολή της σχετικής αφθονίας κάθε μεταβολίτη σε συνάρτηση με τα σημεία δειγματοληψίας (κλάσεις 1-2-3-4-5-6-7-8). Η ένταση του χρώματος (μπλε-κόκκινο) απεικονίζει τη σχετική αφθονία των μεταβολιτών.

#### 4.2.2.2 Σημαντικότεροι μεταβολίτες-μεταβολή στη συγκέντρωσή τους

Οι σημαντικότεροι μεταβολίτες, όπως αυτοί προέκυψαν από πολυμεταβλητή ανάλυση παρουσιάζουν μια εικόνα βάσει της μεταβολής της συγκέντρωσής τους κατά την πάροδο του χρόνου (στην πορεία των 8 δειγματοληψιών). Πιο συγκεκριμένα, ορισμένοι ενδέχεται να εμφανίζουν μια αυξητική τάση, άλλοι μειούμενη και κάποιοι εξ αυτών να μην έχουν σαφή μεταβολή.

Επομένως, η παρακάτω *Εικόνα 19* συγκεντρώνει τους μεταβολίτες των οποίων η συγκέντρωση τείνει να αυξάνεται κατά την διάρκεια της αποθήκευσης των δειγμάτων. Στην κατηγορία αυτή εντάσσονται μονοσακχαρίτες (φρουκτόζη), οργανικά οξέα (γαλακτικό οξύ, φωσφορικό οξύ, πυροσταφυλικό οξύ), αμινοξέα (ασπαραγινικό οξύ, γλουταμινικό οξύ, τυροσίνη, λευκίνη) και ένα παράγωγο αμινοξέος (πυρογλουταμικό οξύ).



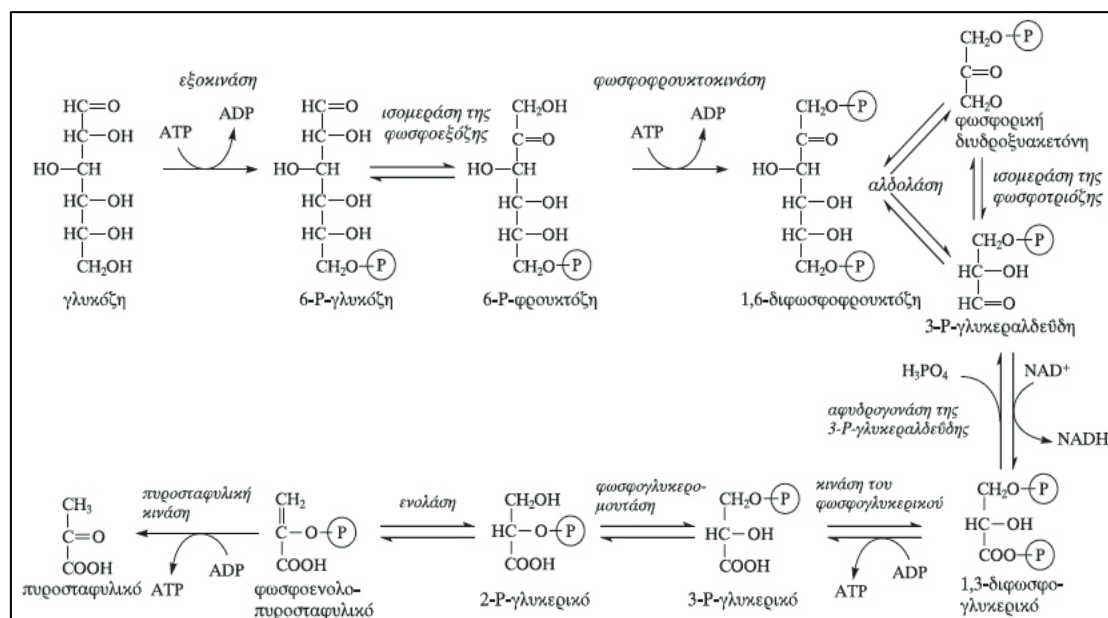
*Εικόνα 19.* Στατιστικώς σημαντικοί μεταβολίτες των οποίων η μεταβολή της συγκέντρωσης παρουσιάζει αυξητική τάση κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης των αυγών. Η κανονικοποιημένη τιμή της συγκέντρωσης του μεταβολίτη περιγράφεται από τον κάθετο άξονα. Ο οριζόντιος άξονας παριστάνει τις 8 δειγματοληψίες (διάρκεια συντήρησης αυγών).



Σύμφωνα με τους Belitz et al. και Li-Chan&Kim, οι υδατάνθρακες που ανιχνεύονται στα αυγά εντοπίζονται σε ποσοστό 0,3-1% και κατά κύριο λόγο στην αλβουμίνη του αυγού, είτε δεσμευμένοι με πρωτεΐνες, είτε ελεύθεροι (Belitz et al., 2009) (Li-Chan & Kim, 2007). Σχετικά με την φρουκτόζη εκτενέστερη αναφορά και επεξήγηση της αυξητικής της τάσης γίνεται στην υποενότητα 4.3.2 *Αποτελέσματα ποσοτικοποίησης στα δείγματα κρόκου και αλβουμίνης*.

Το γαλακτικό οξύ, βάσει της Ευρωπαϊκής Νομοθεσίας αποτελεί το μοναδικό αξιόπιστο δείκτη φρεσκότητας των προϊόντων αυγών καθώς συσχετίζεται με την μικροβιακή ανάπτυξη (Cavanna et al., 2018) (Renzzone et al., 2021). Προκύπτει από την οξείδωση του πυροσταφυλικού οξέος από την γαλακτική αφυδρογονάση κατά την αναερόβια γλυκόλυση (Μικροβιολογία Τροφίμων και Εφαρμοσμένη Μικροβιολογία, 2020-21). Παρατηρείται αύξηση αυτού με τη πάροδο του χρόνου σχεδόν γραμμικά ενώ, κατά την 7η και 8η δειγματοληψία εμφανίζει μια σταθερότητα. Επιπλέον, σύμφωνα με την *Εικόνα 17* συσχετίζεται θετικά με τη φρουκτόζη.

Κατά τον κύκλο της γλυκόλυσης, η γλυκόζη μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό οξύ. Αναλυτικότερα, η γλυκόζη εισέρχεται στα κύτταρα και φωσφορυλιώνεται από την ATP σχηματίζοντας 6-φωσφορική γλυκόζη (glucose 6-phosphate). Ακολούθως, αυτή ισομεριώνεται σε 6-φωσφορική φρουκτόζη (fructose 6-phosphate) και μέσω μερικών ακόμα σταδίων (*Εικόνα 20- (Μεταβολισμός Της Γλυκόζης, n.d.)*) παράγεται πυροσταφυλικό οξύ. Στη συνέχεια, από το πυροσταφυλικό μπορεί να σχηματιστεί γαλακτικό οξύ, ακετυλο-Συνένζυμο Α ή ακεταλδεΐδη (Μικροβιολογία Τροφίμων και Εφαρμοσμένη Μικροβιολογία, 2020-21). Έτσι επιβεβαιώνεται η αυξητική τάση που σημειώνει ο συγκεκριμένος μεταβολίτης.



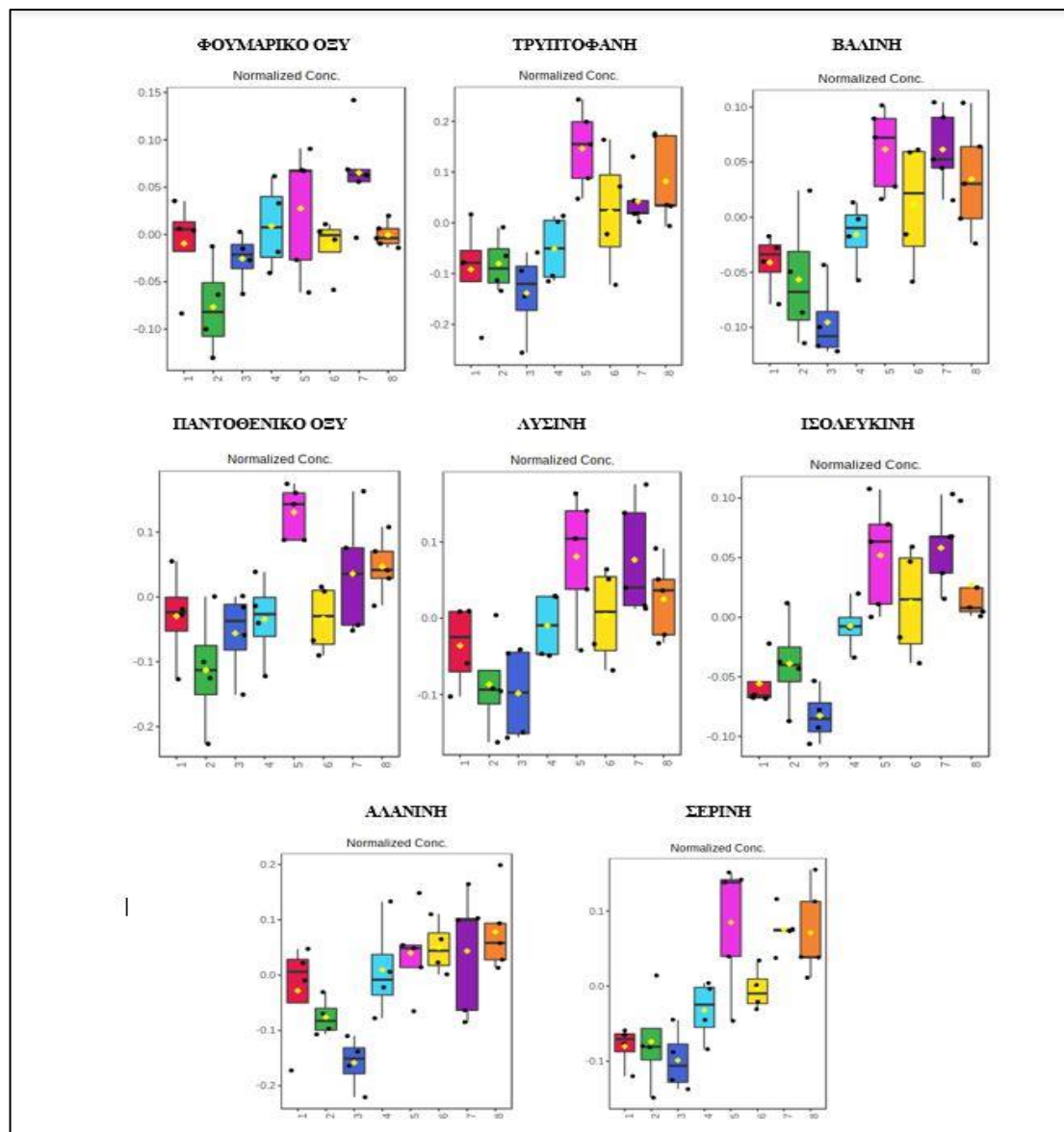
Εικόνα 20. Πορεία γλυκόλυσης .

Το πυρογλουταμικό οξύ αποτελεί τη κυκλική λακτάμη του γλουταμικού οξέος και σχηματίζεται από τη γλουταθειόνη μέσω ενός ενζύμου (κύκλος γ-γλουταμυλίου) (Kumar A. & Bachhawat A., 2011) (Μικροβιολογία Τροφίμων και Εφαρμοσμένη

Μικροβιολογία, 2020-21). Έχει προταθεί ως δείκτης φρεσκότητας των αυγών, από τους Karoui et al. (Karoui et al., 2006). Το γεγονός όμως πως αποτελεί μια ένωση αρκετά θερμοευαίσθητη και με αυξημένη φυσική μεταβλητότητα δεν του επιτρέπει να χαρακτηριστεί ως ένας τέτοιος δείκτης (Coat et al., 2018). Ο ρόλος αυτού στον μεταβολισμό των κυττάρων δεν έχει ακόμα διασαφηνιστεί (Kumar A. & Bachhawat A., 2011).

Σύμφωνα και με την υποενότητα 1.3.2 *Σύσταση αυγού*, σημαντική είναι η παρουσία διαφόρων αμινοξέων τα οποία συμμετέχουν σε αρκετές αντιδράσεις και έχουν σπουδαίο ρόλο στην σύσταση του αυγού. Στον κρόκο του αυγού η περιεκτικότητα στο κάθε αμινοξύ είναι μεγαλύτερη, συγκριτικά με την αλβουμίνη. Επομένως, ορισμένα αμινοξέα (τυροσίνη, λευκίνη, γλουταμινικό οξύ κ.α) παρουσιάζουν μια αυξητική πορεία κατά την πάροδο του χρόνου από την ωοτοκία εξαιτίας της συμμετοχής τους σε αντιδράσεις που ευνοούνται από την αλλοίωση του αυγού και την μεταβολή της σύστασής του.

Αντιθέτως, άλλα αμινοξέα όπως η σερίνη και η ισολευκίνη όπως παρουσιάζονται στην *Εικόνα 21* δεν έχουν σαφή μεταβολή της συγκέντρωσής τους στο χρόνο. Πέραν όμως των αμινοξέων (τρυπτοφάνη, βαλίνη, λυσίνη, ισολευκίνη, αλανίνη, σερίνη) στην κατηγορία αυτή εντάσσονται οργανικά οξέα (φουμαρικό οξύ) και ένα παράγωγο αμινοξέος (παντοθενικό οξύ-βιταμίνη B5).

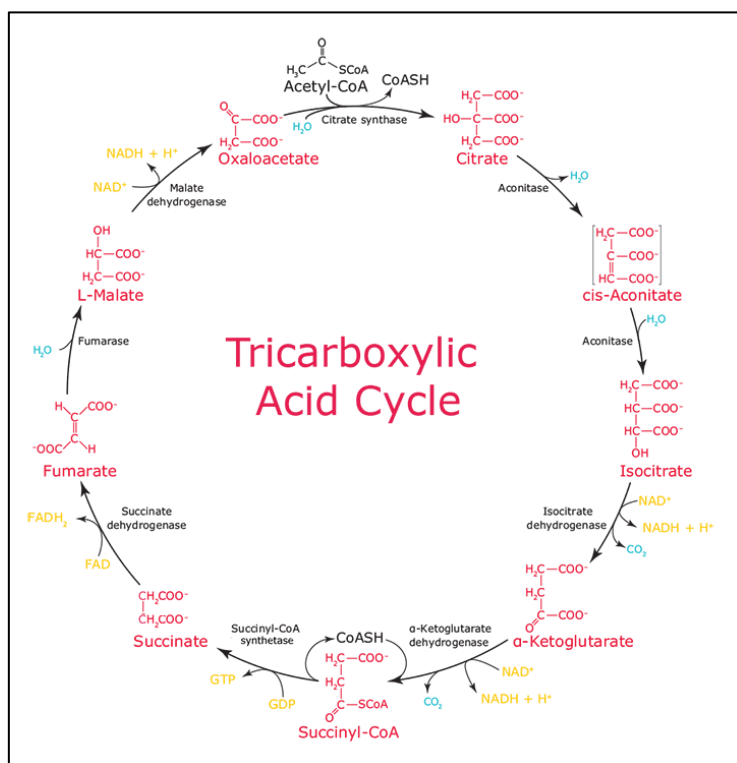


Εικόνα 21. Στατιστικά σημαντικοί μεταβολίτες των οποίων η μεταβολή της συγκέντρωσης δεν είναι σαφής κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης των αυγών. Η κανονικοποιημένη τιμή της συγκέντρωσης του μεταβολίτη περιγράφεται από τον κάθετο άξονα. Ο οριζόντιος άξονας παριστάνει τις 8 δειγματοληψίες

Το παντοθενικό οξύ θεωρείται απαραίτητο συστατικό για τον μεταβολισμό των λιπαρών οξέων (σε πληθώρα στην αλβουμίνη, το πλάσμα και τους κόκκους του κρόκου) καθώς και για την σύνθεση πρωτεϊνών και υδατανθράκων. Κύρια λειτουργία αυτού είναι η σύνθεση του συνενζύμου Α (CoA) και της πρωτεΐνης φορέα ακυλίου (ACP). Προέρχεται μέσω συνδυασμού παντοϊκού οξέως και β-αλανίνης, η οποία αποτελεί έναν σημαντικό μεταβολίτη που συσχετίζεται θετικά με την φρουκτόζη (Bates, 2013). Η αλβουμίνη είναι πλούσια σε υδατοδιαλυτές βιταμίνες όπως το παντοθενικό οξύ συγκριτικά με τον κρόκο του αυγού που περιέχει ως επί το πλείστον λιποδιαλυτές πρωτεΐνες (Πίνακας 6 και 12).

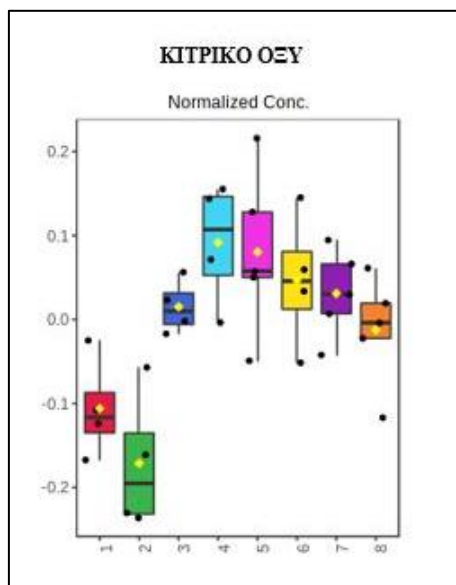
Τέλος, το κιτρικό οξύ είναι ο μόνος σημαντικός μεταβολίτης που φαίνεται να παρουσιάζει μια σχετικά ξεκάθαρη μειούμενη τάση κατά την πάροδο του χρόνου αποθήκευσης (Εικόνα 22). Μεταξύ της 2<sup>ης</sup> (2<sup>η</sup> ημέρα-48 ώρες) και 4<sup>ης</sup> (9<sup>η</sup> ημέρα-216

ώρες) δειγματοληψίας η συγκέντρωση αυτού αυξάνεται έντονα ενώ, μεταξύ 4<sup>ης</sup> και 8<sup>ης</sup> (21<sup>η</sup> ημέρα-504 ώρες) δειγματοληψίας παρατηρείται μια ομαλή ελάττωση της συγκέντρωσης του κιτρικού οξέος. Το κιτρικό οξύ σχηματίζεται ως ενδιάμεσο προϊόν στον κύκλο του κιτρικού οξέος (*Εικόνα 22- (The Krebs Cycle — Harnessing Chemical Energy for Cellular Respiration, n.d.)* από την αντίδραση ενός μορίου οξαλοξικού οξέος και μιας ακετυλομάδας του acetyl CoA (μετατροπή από πυροσταφυλικό οξύ μέσω της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης) (Μικροβιολογία Τροφίμων και Εφαρμοσμένη Μικροβιολογία, 2020-21).



Εικόνα 22. Κύκλος κιτρικού οξέος (TCA).

Το φουμαρικό οξύ που αναφέρθηκε προηγουμένως ως ένας μεταβολίτης που παρουσιάζει ασαφή μεταβολή στην συγκέντρωσή σχηματίζεται και αυτό κατά τον κύκλο του κιτρικού οξέος μέσω οξειδωσης του ηλεκτρικού οξέος παρουσία του ενζύμου της ηλεκτρικής αφυδρογονάσης (Μικροβιολογία Τροφίμων και Εφαρμοσμένη Μικροβιολογία, 2020-21). Λόγω του ότι συμμετέχει και στον σχηματισμό μηλικού οξέος ως ένα στάδιο στον κύκλο αυτό ενδέχεται να επηρεάζεται συνεχώς η συγκέντρωση του δίνοντας έτσι μια τέτοια τάση. Στην περίπτωση του κιτρικού οξέος, η αντίδραση σχηματισμού αυτού γίνεται παρουσία κιτρικής συνθάσης (Μικροβιολογία Τροφίμων και Εφαρμοσμένη Μικροβιολογία, 2020-21).

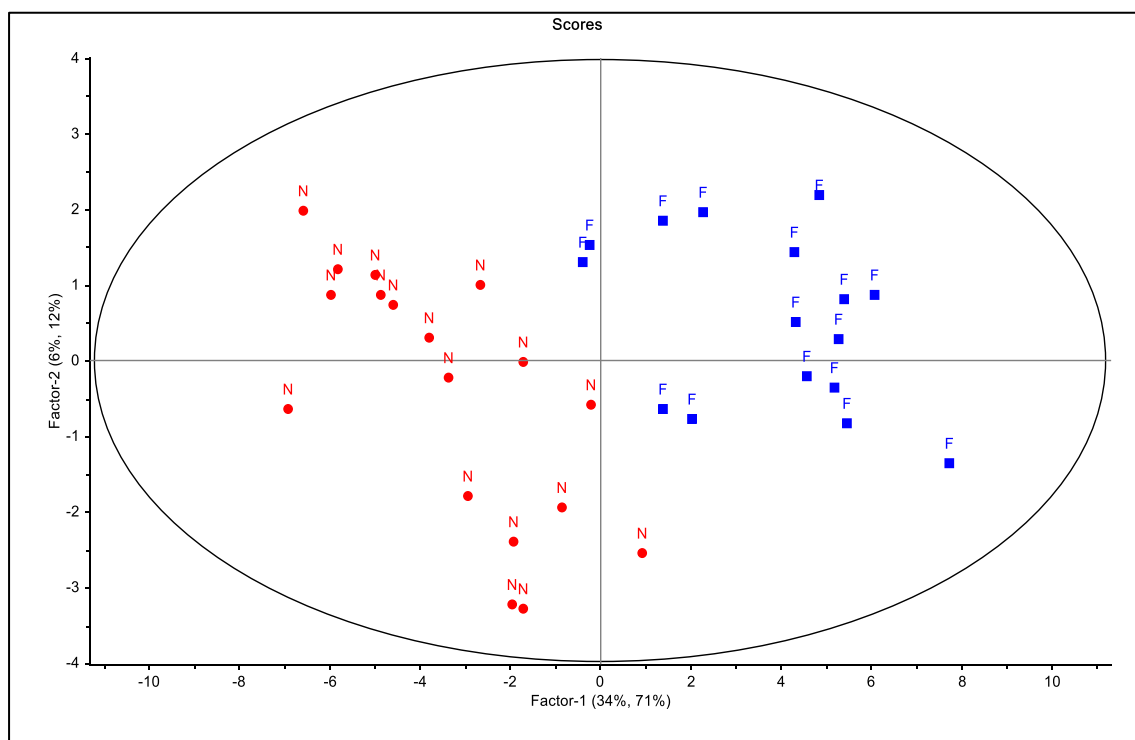


Εικόνα 23. Στατιστικά σημαντικός μεταβολίτης που παρουσιάζει μια σχετικά ξεκάθαρη μειούμενη τάση κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης των αυγών. Η κανονικοποιημένη τιμή της συγκέντρωσης του μεταβολίτη περιγράφεται από τον κάθετο άξονα. Ο οριζόντιος άξονας παριστάνει τις 8 δειγματοληψίες.

Με βάση τις μέχρι τώρα μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, ελάχιστοι είναι οι δείκτες αλλοίωσης-φρεσκότητας που έχουν καθιερωθεί από την Νομοθεσία ή προταθεί από τις μελέτες αυτές. Επομένως, δεν υπάρχουν αρκετές πληροφορίες και βάσεις δεδομένων για να γίνει μια σύγκριση των όσων προέκυψαν στην παρούσα έρευνα για αυτόν τον λόγο δεν γίνεται και εκτενής αναφορά σε κάθε σημαντικό μεταβολίτη. Αξίζει όμως να σημειωθεί πως, η φρουκτόζη παρουσίασε μια σημαντική αυξητική τάση και σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ποσοτικοποίηση της φρουκτόζης (4.3. Ποσοτικός προσδιορισμός φρουκτόζης) φαίνεται να μπορεί μελλοντικά να αποτελέσει έναν αξιόπιστο δείκτη αλλοίωσης-φρεσκότητας των αυγών και των προϊόντων αυτών.

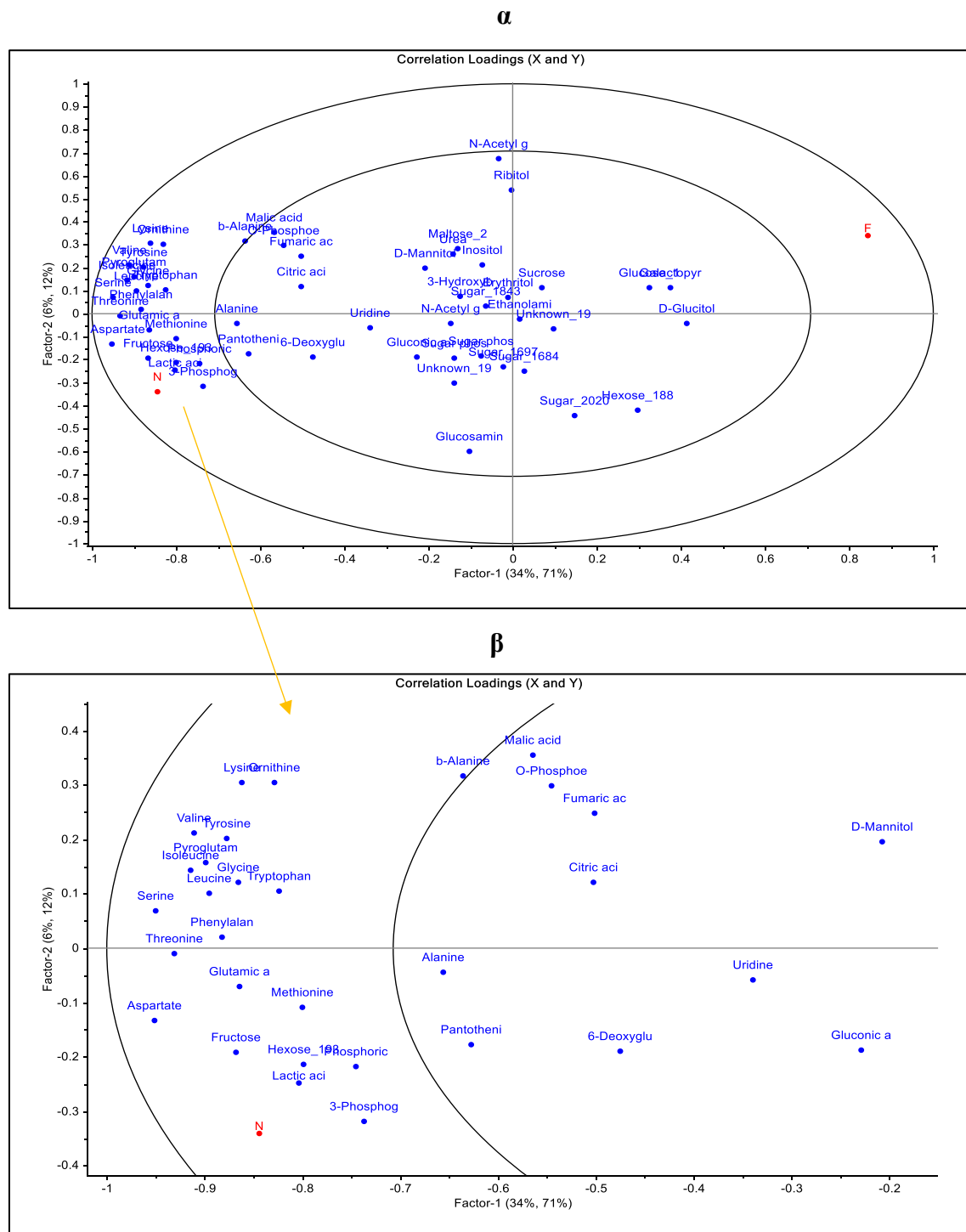
#### 4.2.3 Αποτελέσματα κατηγοριοποίησης με βάση την φρεσκότητα

Τα δείγματα κατηγοριοποιήθηκαν σε δύο κατηγορίες φρεσκότητας – εξαιρετικά φρέσκο (F) και μη εξαιρετικό φρέσκο (N) – όπως απεικονίζεται στον Πίνακα 15. Τα δείγματα της κατηγορίας «εξαιρετικό φρέσκο» αντιστοιχούν σε αυγά που συντηρήθηκαν για μέγιστο χρονικό διάστημα 9 ημερών (έως και το 4<sup>ο</sup> σημείο δειγματοληψίας) σύμφωνα με τον κανονισμό ΕΚ 589/2008. Πραγματοποιήθηκε διακριτική ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) και το γράφημα των βαθμών των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών που προέκυψε αποτυπώνεται στην Εικόνα 24. Παρατηρείται ικανοποιητικός διαχωρισμός μεταξύ των δύο κλάσεων.



Εικόνα 24. Γράφημα των βαθμών των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών της διακριτικής ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων PLS-DA βάσει των πολικών μεταβολιτών σε αυγά συντηρημένα στους 20°C. Οι κλάσεις (F, N) των δειγμάτων περιγράφονται στον Πίνακα 16.

Από το γράφημα συσχετίσεων των φορτίων (Εικόνα 25) προκύπτουν οι πιο σημαντικοί μεταβολίτες που διαχωρίζουν τις δύο κλάσεις. Αυτοί είναι το γαλακτικό οξύ, η φρουκτόζη, και το 3-φωσφογλυκερικό οξύ, διότι βρίσκονται πιο κοντά στην κλάση N (μη εξαιρετικό φρέσκο) και η σχετική τους αφθονία είναι μεγαλύτερη συγκριτικά με την κλάση F (εξαιρετικό φρέσκο). Επίσης, συνεισφέρουν στο διαχωρισμό, αλλά με μικρότερη διακριτική ικανότητα, και όσοι μεταβολίτες βρίσκονται μεταξύ των δύο ελλείψεων που επεξηγούν το 50% και το 100% της διακύμανσης.



Εικόνα 25. α) Γράφημα συσχετίσεων των φορτίων της διακριτικής ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων PLS-DA βάσει των πολικών μεταβολιτών σε αυγά συντηρημένα στους 20°C. β) εστιασμένη περιοχή του γραφήματος. Οι κλάσεις (F, N) των δειγμάτων περιγράφονται στον Πίνακα 16.

### 4.3 Ποσοτικός προσδιορισμός φρουκτόζης

Ο στόχος για ποσοτικοποίηση της φρουκτόζης στο αυγό καθόλη την διάρκεια των δειγματοληψιών που πραγματοποιήθηκαν, επιτεύχθηκε κάνοντας χρήση μιας διαφορετικής, δεύτερης μεθόδου παραγωγοποίησης. Έχοντας ως δεδομένο την ύπαρξη φρουκτόζης στα προς μελέτη δείγματα έγινε η προσπάθεια για εύρεση ενός τρόπου υπολογισμού της συγκέντρωσης του σημαντικού αυτού μεταβολίτη. Όπως περιεγράφηκε και στην ενότητα 3. Πειραματικό μέρος τα δείγματα αυγού που αναλύθηκαν αφορούσαν όλες τις δειγματοληψίες. Όμως, λόγω του ότι δεν έχει επιβεβαιωθεί το τι προκαλεί την αύξηση της φρουκτόζης στο αυγό, λήφθηκαν δείγματα ξεχωριστά από κρόκο, αλβουμίνη και ομογενοποιημένο αυγό έτσι ώστε, να υπάρχει πιο πληρέστερη και γενική εικόνα. Τα δείγματα του κρόκου και της αλβουμίνης πάρθηκαν μονάχα από τις δειγματοληψίες 1 (1h), 4 (216h), 8 (504h) δηλαδή την ημέρα 0, 9 και 21 από την ωοτοκία. Τα σημεία αυτά αποτελούν σημαντική ένδειξη για την πορεία της αλλοίωσης με βάση τα όσα θέτει η Νομοθεσία και επομένως και της συγκέντρωσης της φρουκτόζης.

Με βάση τις πληροφορίες που παρέχουν τα φάσματα μαζών και οι χρόνοι κατακράτησης των πρότυπων ενώσεων ταυτοποιήθηκε η φρουκτόζη στο χρωματογράφημα αλλά και το θραύσμα ( $m/z=197$ ) που την χαρακτηρίζει. Επίσης, πέραν της φρουκτόζης μελετήθηκε η γλυκόζη ( $m/z=187$ ) αλλά και το εσωτερικό πρότυπο επισημασμένης φρουκτόζης ( $^{13}\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$  |  $m/z=104$ ) που είχε προστεθεί στο στάδιο της εκχύλισης (Wahjudi et al., 2010). Τα φάσματα μάζας για την φρουκτόζη και το πρότυπο της επισημασμένης φρουκτόζης στα δείγματα ομογενοποιημένου αυγού, αλβουμίνης και κρόκου παρουσιάζονται στο Παράρτημα Π8.

Επομένως, τα ακατέργαστα δεδομένα (raw data) που λήφθηκαν από την ανάλυση με την αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC/MS) επεξεργάζονται μέσω μιας μεθόδου για ποσοτική ανάλυση που έχει δημιουργηθεί στο λογισμικό GCMS Real Time Analysis. Αφού υποστούν ολοκλήρωση οι κορυφές και ταυτοποιηθούν οι επιθυμητές ενώσεις, καταγράφεται η τιμή του ύψους της εκάστοτε κορυφής. Για κάθε ένωση εκλούνται δύο κορυφές, οι οποίες αντιστοιχούν στα γεωμετρικά ισομερή syn (Z) και anti (E) των οξιμών των σακχάρων, και για αυτόν τον λόγο λαμβάνεται το άθροισμα των δύο τιμών ύψους κορυφής (Fiehn, 2016).

Για την ποσοτικοποίηση της φρουκτόζης σε κάθε δείγμα αρχικά υπολογίστηκε η συγκέντρωση του εσωτερικού προτύπου επισημασμένης φρουκτόζης σύμφωνα με την 3.1 Συλλογή και συντήρηση αυγών.

$$[13\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6] = 265 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \times 0,02 \text{ mL} = 5,3 \mu\text{g}$$

Όπου, η τελική συγκέντρωση του προτύπου φρουκτόζης στο διάλυμα εργασίας εσωτερικών προτύπων (Working mix IS) είναι ίση με 265  $\mu\text{g/mL}$  και η ποσότητα του διαλύματος αυτού που προστίθεται κατά το στάδιο της εκχύλισης ισούται με 20  $\mu\text{L}$ .



Ακολουθώντας,

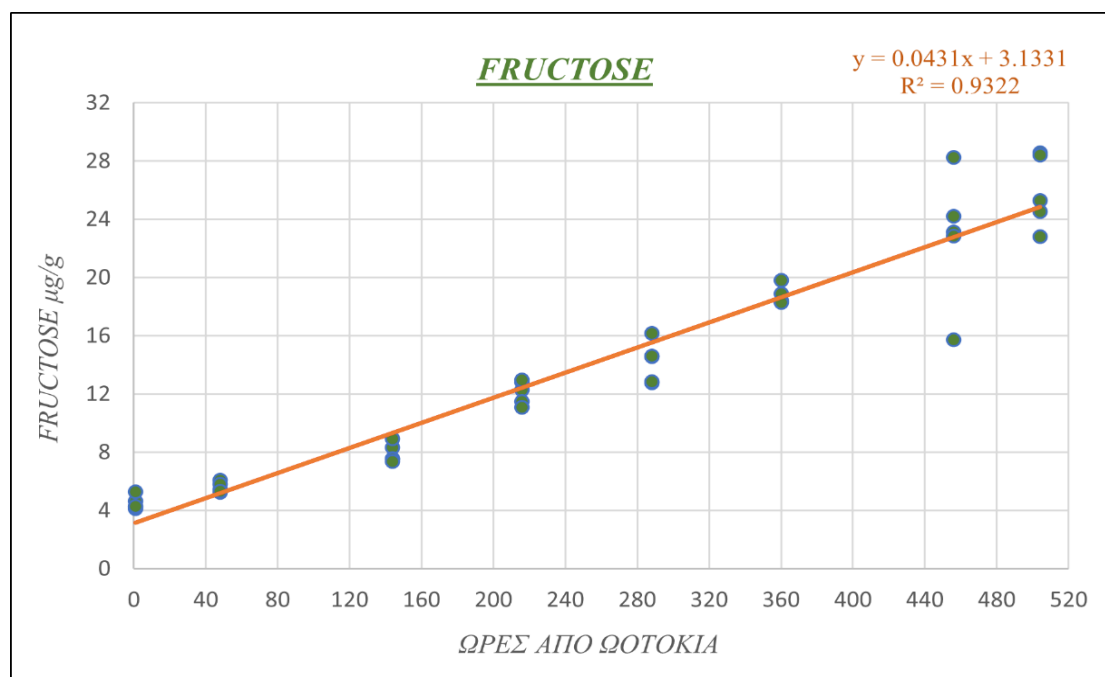
$$Fructose = \frac{Height_{fructose} \times [^{13}C_6H_{12}O_6]}{Height_{[^{13}C_6H_{12}O_6]} \times \text{μάζα δείγματος}} \quad - 2 -$$

Όπου, Height fructose είναι το ύψος της φρουκτόζης στο δείγμα (άθροισμα των δύο ισομερών),  $[^{13}C_6H_{12}O_6]$  η μάζα του επισημασμένου προτύπου φρουκτόζης όπως υπολογίστηκε προηγουμένως (5,3 μg), Height  $^{13}C_6H_{12}O_6$  το ύψος του εσωτερικού προτύπου (άθροισμα δύο ισομερών) και η μάζα του εκάστοτε δείγματος σε g.

#### 4.3.1 Αποτελέσματα ποσοτικοποίησης στα δείγματα ομογενοποιημένου αυγού

Στο Παράρτημα Π5 παρατίθενται όλες οι τιμές του ύψους για το εσωτερικό πρότυπο της επισημασμένης φρουκτόζης, της φρουκτόζης, τη μάζα του δείγματος πριν υποστεί εκχύλιση, σε πλήρη αντιστοίχιση με τον κωδικό του δείγματος.

Η τιμή για την συγκέντρωση της φρουκτόζης στο δείγμα 6\_39 διαφέρει σημαντικά συγκριτικά με τις τιμές των υπόλοιπων δειγμάτων της ίδιας δειγματοληψίας (6<sup>η</sup>). Για τον λόγο αυτό χαρακτηρίζεται ως έκτροπη τιμή και έτσι δεν συμπεριλαμβάνεται στο παρακάτω γράφημα αποτύπωσης της πορείας της φρουκτόζης κατά συντήρηση των αυγών στους 20 °C μετά την ωτοκία. Η αυξητική και γραμμική (Pearson's R = 0,93) τάση της φρουκτόζης επιβεβαιώνεται και σε αυτήν την περίπτωση. Μέσω της εξίσωσης που περιγράφει την σχέση της ποσοτικοποιημένης φρουκτόζης με τον χρόνο ( $y=0,0431x+3,1331$ ) μπορεί να υπολογιστεί ανά πάσα χρονική στιγμή η τιμή του μεταβολίτη αυτού ή αντιστρόφως, αν προσδιοριστεί η συγκέντρωση της φρουκτόζης σε ένα άγνωστο δείγμα, μπορεί να προβλεφθεί το χρονικό διάστημα που έχει συντηρηθεί (σε θερμοκρασία 20 °C).

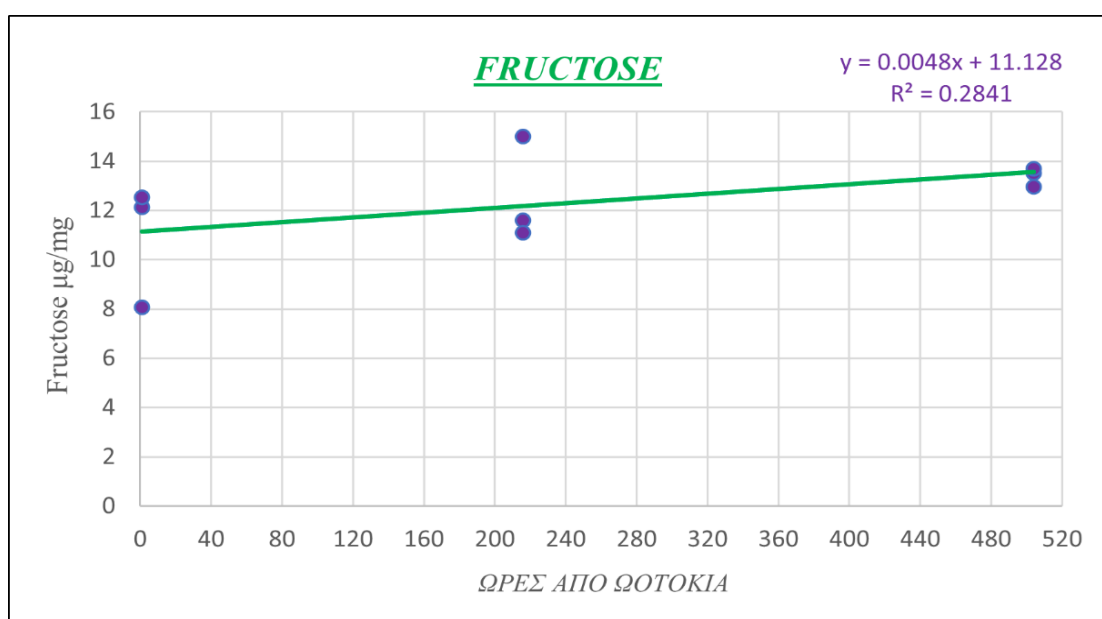


Εικόνα 26. Γράφημα της συγκέντρωσης της φρουκτόζης σε δείγματα ομογενοποιημένου αυγού κατά το χρονικό διάστημα των 21 ημερών συντήρησης από την ωτοκία.

#### 4.3.2 Αποτελέσματα ποσοτικοποίησης στα δείγματα κρόκου και αλβουμίνης

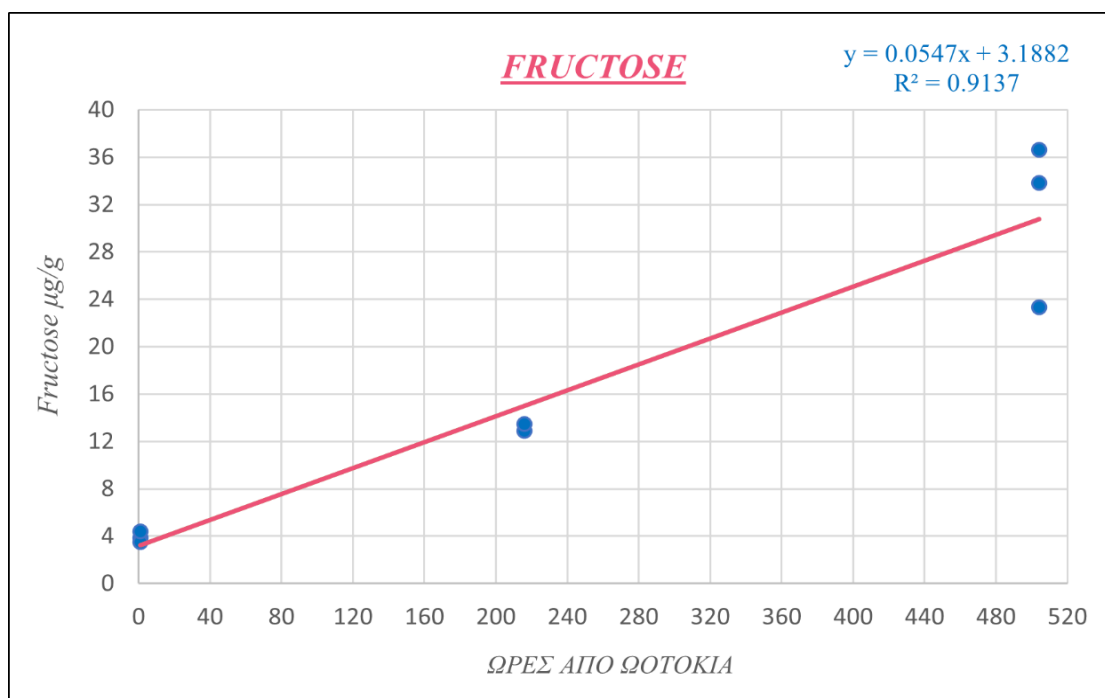
Στο Παράρτημα Π6 παρατίθενται όλες οι τιμές του ύψους για το εσωτερικό πρότυπο της επισημασμένης φρουκτόζης, της φρουκτόζης, τη μάζα του δείγματος του κρόκου πριν υποστεί εκχύλιση, σε αντιστοιχία με τον κωδικό του δείγματος. Στο Παράρτημα Π7 παρουσιάζονται οι αντίστοιχες τιμές που αφορούν το δείγμα της αλβουμίνης.

Στην παρακάτω Εικόνα 27 αποτυπώνεται το γράφημα της συγκέντρωσης της φρουκτόζης στα δείγματα κρόκου την ημέρα 0, 9 και 21 από την στιγμή της ωτοκίας. Μπορεί να διακριθεί μια μικρή τάση αύξησης της τιμής της φρουκτόζης κατά την πάροδο του χρόνου, ωστόσο μετά από ανάλυση διακύμανσης (ANOVA), προέκυψε ότι το γραμμικό μοντέλο δεν είναι στατιστικώς σημαντικό ( $P = 0,14$ ) και επομένως η περιεκτικότητα της φρουκτόζης δεν διαφέρει μεταξύ των τριών χρονικών σημείων.



Εικόνα 27. Γράφημα της συγκέντρωσης της φρουκτόζης σε δείγματα κρόκου κατά το χρονικό διάστημα τη; 1<sup>η</sup>, 4<sup>η</sup> και 8<sup>η</sup> δειγματοληψίας από την ωτοκία.

Τέλος, το αντίστοιχο γράφημα για τα δείγματα της αλβουμίνης παρουσιάζεται, στην Εικόνα 28. Η τιμή της φρουκτόζης για το δείγμα 4\_25 εξαιτίας του ότι αποκλίνει αρκετά από τα υπόλοιπα δείγματα της 4<sup>ης</sup> δειγματοληψίας δεν συμπεριλαμβάνεται στην κατασκευή του γραφήματος καθώς, θεωρείται έκτροπη τιμή (βάσει Grubb's test). Η συγκέντρωση της φρουκτόζης στις τρεις αυτές δειγματοληψίες φαίνεται να έχει μια γραμμικά αυξανόμενη τάση κατά την πάροδο του χρόνου συντήρησης από την ωτοκία. Αυτό επιβεβαιώνεται και από την τιμή του συντελεστή Pearson's R που ισούται με 0,91.



Εικόνα 28. Γράφημα της συγκέντρωσης της φρουκτόζης σε δείγματα αλβουμίνης σε συνάρτηση με το χρόνο συντήρησης των αυγών από την ωοτοκία.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ποσοτικοποίηση της φρουκτόζης στα δείγματα ομογενοποιημένου αυγού, κρόκου και αλβουμίνης συμπεραίνεται πως η αύξηση της φρουκτόζης παρατηρείται έντονα στην αλβουμίνη και κατά συνέπεια και στο ομογενοποιημένο αυγό. Στα δείγματα του κρόκου, η μεταβολή στις τιμές της φρουκτόζης μεταξύ των διαφορετικών δειγματοληψιών δεν είναι σημαντική σε αντίθεση με τα δείγματα αλβουμίνης.

Επομένως, αν και ανιχνεύεται γενικότερα χαμηλό ποσοστό υδατανθράκων (0,3-1%) στην αλβουμίνη, φαίνεται να είναι η εξήγηση για την ομαλή αύξηση της φρουκτόζης στα δείγματα αυγού. Πιο συγκεκριμένα, η γλυκόζη αποτελεί τον κυριότερο ελεύθερο υδατάνθρακα στην αλβουμίνη ενώ, η φρουκτόζη δεν εντοπίζεται (Belitz et al., 2009) (Li-Chan & Kim, 2007). Επομένως, με βάση και τον κύκλο της γλυκόλυσης (μετατροπή γλυκόζης σε πυροσταφυλικό οξύ) η γλυκόζη υπόκειται σε ισομερισμό προς φρουκτόζη γεγονός που αυξάνει την τιμή της στο δείγμα. Με βάση και τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την στατιστική ανάλυση της πρώτης μεθόδου παραγωγοποίησης, το πυροσταφυλικό οξύ συσχετίζεται θετικά με την φρουκτόζη και αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου. Μία άλλη πιθανή εξήγηση για την αύξηση της φρουκτόζης κατά τη συντήρηση των αυγών, μπορεί να αποδοθεί στην υδρόλυση των γλυκοπρωτεϊνών της αλβουμίνης. Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός πως, οι υδατάνθρακες αποτελούν έως και το 60% της μάζας της γλυκοπρωτεΐνης (Gonçalves & Legrand, 2018).

Σε αντίθεση με την φρουκτόζη και το πυροσταφυλικό οξύ, η γλυκόζη δεν παρουσίασε σημαντική μεταβολή κατά την διάρκεια της συντήρησης καθώς, δεν συμπεριλαμβάνεται στους 25 κυριότερους μεταβολίτες πιθανότατα διότι απαντάται

κυρίως σε ελεύθερη μορφή στην αλβουμίνη (98% των ελεύθερων υδατανθράκων) (Belitz et al., 2009).

## 5.Συμπεράσματα

Ανακεφαλαιώνοντας, σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν επαλήθευση των όσων παρουσιάστηκαν σε πρόσφατη μεταπτυχιακή μελέτη σχετικά με την παρουσία και ταυτόχρονη αύξηση της φρουκτόζης σε δείγματα αυγού ωοπαραγωγών ορνίθων, σε διάστημα 21 ημερών. Ο προσδιορισμός του πολικού κλάσματος των μεταβολιτών πραγματοποιήθηκε με χρήση αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (GC/MS) σε συνδυασμό με τη χρήση μεθόδων πολυμεταβλητής στατιστικής ανάλυσης. Η μεταβολωμική ανάλυση αποτελεί απαραίτητο εργαλείο μελέτης, ταυτοποίησης και απομόνωσης των μεταβολιτών που προέκυψαν.

Για την στατιστική ανάλυση, τα δεδομένα που προέκυψαν κατηγοριοποιήθηκαν με βάση την σειρά της δειγματοληψίας και φρεσκότητα. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης κύριων συνιστωσών (PCA) -*Εικόνα 15*- για την κατηγορία της σειράς δειγματοληψίας παρουσίασε έναν εμφανή διαχωρισμό μεταξύ των δειγματοληψιών 1-4 και 5-8. Επιπλέον, οι πρώτες 4 κλάσεις φαίνεται να διαχωρίζονται ελαφρώς, σε αντίθεση με τις κλάσεις 5-8 όπου τα δείγματα δεν είναι ομαδοποιημένα. Αυτό πιθανά να οφείλεται και στο αυξημένο στάδιο αλλοίωσης που παρατηρείται μετά την 9<sup>η</sup> ημέρα (4<sup>η</sup> δειγματοληψία). Για τον διαχωρισμό με βάση την φρεσκότητα έγινε χρήση της διακριτής ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) της οποίας το scores plot (*Εικόνα 23*) αποτυπώνει τον πλήρη διαχωρισμό μεταξύ των εξαιρετικά φρέσκων αυγών (1<sup>η</sup>-4<sup>η</sup> δειγματοληψία) και των μη εξαιρετικά φρέσκων (5<sup>η</sup>-8<sup>η</sup> δειγματοληψία) όπως ορίζεται από την Νομοθεσία.

Σε κάθε περίπτωση, η φρουκτόζη χαρακτηρίζεται και επιβεβαιώνεται ως ο πλέον σημαντικός μεταβολίτης ο οποίος, μπορεί να συσχετιστεί με το στάδιο της αλλοίωσης του αυγού θεωρώντας τον έτσι ως ένα δείκτη φρεσκότητας, πέραν του γαλακτικού οξέος (ορίζεται βάσει Ευρωπαϊκής Νομοθεσίας). Κατά την πάροδο του χρόνου από την ωοτοκία, η τάση της φρουκτόζης είναι γραμμική και συνεχώς αυξάνεται (*Εικόνα 17* και *18*).

Επιπλέον, μέσω μια διαφορετικής μεθόδου παραγωγοποίησης επιβεβαιώθηκε η αυξητική τάση της φρουκτόζης σε δείγματα ομογενοποιημένου αυγού και αλβουμίνης, στο ίδιο χρονικό διάστημα ενώ, πραγματοποιήθηκε και ποσοτικοποίηση αυτής. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης σε ομογενοποιημένο αυγό και σε αλβουμίνη (*Εικόνα 26* και *28*) δείχνουν την έντονη αύξηση της φρουκτόζης στην πάροδο των ημερών από την ωοτοκία σε αντίθεση με την ανάλυση των δειγμάτων κρόκου όπου, η συγκέντρωση της φρουκτόζης δεν μεταβάλλεται σημαντικά. Μέσω αυτού, φαίνεται να δίνεται μια εξήγηση για το τι προκαλεί την αύξηση της φρουκτόζης η οποία, εντοπίζεται σε ίχνη στο αυγό κατά την ωοτοκία. Ο ισομερισμός της γλυκόζης, που βρίσκεται σε μεγάλο ποσοστό στην αλβουμίνη, σε φρουκτόζη μέσω γλυκόλυσης ή/και η απελευθέρωση της φρουκτόζης-γλυκόζης από τις γλυκοπρωτεΐνες της αλβουμίνης επικρατούν περισσότερο ως οι λόγοι αύξησης.

Τέλος, εκτός του γαλακτικού οξέος που ορίζεται ως ένας δείκτης φρεσκότητας του αυγού και οι μονάδες Haugh μπορούν να παρέχουν μια εικόνα για το στάδιο της αλλοίωσης που εντοπίζονται τα αυγά, αν και δεν είναι τόσο αξιόπιστες. Η τιμές των μονάδων με βάση την *Εικόνα 14*, φαίνεται να έχουν μια ήπια πτωτική και σχετικά γραμμική τάση, κυρίως μεταξύ 1<sup>ης</sup> και 3<sup>ης</sup> δειγματοληψίας ενώ, κατά τις 4<sup>η</sup> – 8<sup>η</sup> παρουσιάζεται μια σταθερότητα.

Τα όσα προέκυψαν χρήζουν περαιτέρω ανάλυσης και μελέτης όμως πλέον μπορεί να ειπωθεί πως η φρουκτόζη αποτελεί έναν σημαντικό δείκτη φρεσκότητας για τα αυγά ωοπαγωγών ορνίθων, δίνοντας έτσι ένα πρόσθετο εργαλείο στην βιομηχανία των τροφίμων.

## 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/10.1016/J.INPA.2014.10.002>
- 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/10.1016/J.TRAC.2018.09.010>
- Bates, C. J. (2013). Pantothenic Acid. *Encyclopedia of Human Nutrition*, 4–4, 1–5. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375083-9.00222-1>
- Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). Food chemistry. *Food Chemistry*, 1–1070. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-69934-7>
- Brereton, R. G. (2003). *Chemometrics Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*. [www.wiley-europe.com](http://www.wiley-europe.com)
- Bro, R., & Smilde, A. K. (2014). *Principal component analysis*. <https://doi.org/10.1039/c3ay41907j>
- 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*, 96, 62–78. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2017.08.007>
- 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>
- Cevallos-Cevallos, J. M., Reyes-De-Corcuera, J. I., Etxeberria, E., Danyluk, M. D., & Rodrick, G. E. (n.d.). Metabolomic analysis in food science: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 20, 557–566. <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). Characterizing the Spoilage of Egg Products using Targeted and Non-targeted Approaches. *Alteration of Ovoproducs: From Metabolomics to Online Control*, 302 p. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78548-271-7.50003-1>
- 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>
- Dunn, W. B., Broadhurst, D., Begley, P., Zelena, E., Francis-Mcintyre, S., Anderson, N., Brown, M., Knowles, J. D., Halsall, A., Haselden, J. N., Nicholls, A. W.,

- Wilson, I. D., Kell, D. B., & Goodacre, R. (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/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. (2014). Scientific Opinion on the public health risks of table eggs due to deterioration and development of pathogens. *EFSA Journal*, 12(7). <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2014.3782>
- EGG-1 UNECE STANDARD | EGGS IN SHELL. (2017). [https://view.officeapps.live.com/op/view.aspx?src=https%3A%2F%2Funece.org%2Ffileadmin%2FDAM%2Ftrade%2Fagr%2Fstandard%2Feggs%2FEgg-1\\_EggsIn\\_Shell\\_Nov2017\\_E.docx&wdOrigin=BROWSELINK](https://view.officeapps.live.com/op/view.aspx?src=https%3A%2F%2Funece.org%2Ffileadmin%2FDAM%2Ftrade%2Fagr%2Fstandard%2Feggs%2FEgg-1_EggsIn_Shell_Nov2017_E.docx&wdOrigin=BROWSELINK)
- EGG-2 UNECE STANDARD | EGG PRODUCTS . (2017). [https://view.officeapps.live.com/op/view.aspx?src=https%3A%2F%2Funece.org%2Ffileadmin%2FDAM%2Ftrade%2Fagr%2Fstandard%2Feggs%2FEgg-2\\_EggProducts\\_Nov2017\\_E.docx&wdOrigin=BROWSELINK](https://view.officeapps.live.com/op/view.aspx?src=https%3A%2F%2Funece.org%2Ffileadmin%2FDAM%2Ftrade%2Fagr%2Fstandard%2Feggs%2FEgg-2_EggProducts_Nov2017_E.docx&wdOrigin=BROWSELINK)
- Emwas, A. H. M., Al-Talla, Z. A., Yang, Y., & Kharbatia, N. M. (2015). Gas chromatography–mass spectrometry of biofluids and extracts. *Methods in Molecular Biology*, 1277, 91–112. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2377-9\\_8](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. [https://doi.org/10.1007/978-94-010-0448-0\\_11](https://doi.org/10.1007/978-94-010-0448-0_11)
- Fiehn, O. (2016). Metabolomics by gas chromatography-mass spectrometry: Combined targeted and untargeted profiling. *Current Protocols in Molecular Biology*, 2016. <https://doi.org/10.1002/0471142727.MB3004S114>
- Filho, J. F. A., Macrino, C. J., Oliveira, B. G., Lacerda, V., & Romão, W. (2020). Ambient Ionization Mass Spectrometry in Food Metabolomics. *Comprehensive Foodomics*, 54–76. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22776-5>
- Gonçalves, O., & Legrand, J. (2018). *Alteration of Ovoproducts : From Metabolomics to Online Control*.
- Huang, Q., Qiu, N., Ma, M. H., Jin, Y. G., Yang, H., Geng, F., & Sun, S. H. (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>
- Karoui, R., De Ketelaere, B., Kemps, B., Bamelis, F., Mertens, K., & De Baerdemaeker, J. (2009). Eggs and Egg Products. *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*, 399–414. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374136-3.00015-8>
- Karoui, R., Kemps, B., Bamelis, F., De Ketelaere, B., Decuypere, E., & De Baerdemaeker, J. (2006). Methods to evaluate egg freshness in research and industry: A review. *European Food Research and Technology = Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und -Forschung. A*, 222(5–6), 727–732.

<https://doi.org/10.1007/S00217-005-0145-4>

Kemps, B. J., Bamelis, F. R., De Ketelaere, B., Mertens, K., Tona, K., Decuypere, E. M., & De Baerdemaeker, J. G. (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. J., De Ketelaere, B., Bamelis, F. R., Mertens, K., Decuypere, E. M., De Baerdemaeker, J. G., & Schwägele, F. (2007). Albumen Freshness Assessment by Combining Visible Near-Infrared Transmission and Low-Resolution Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Poultry Science*, 86(4), 752–759. <https://doi.org/10.1093/PS/86.4.752>

Kumar A., & Bachhawat A. (2011). *Pyroglutamic acid : throwing light on a lightly studied metabolite* | *Semantic Scholar*.  
<https://www.semanticscholar.org/paper/Pyroglutamic-acid-%3A-throwing-light-on-a-lightly-Kumar-Bachhawat/c50e3ad15345b8901709d52d89f38c1c0fb6080c>

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. (n.d.). Retrieved April 6, 2022, from <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EL/TXT/?uri=CELEX%3A02004R0853-20140601>

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. <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/10.1016/J.MRI.2004.12.003>

Lee, L. C., Liong, C. Y., & Jemain, A. A. (2018). Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) for classification of high-dimensional (HD) data: A review of contemporary practice strategies and knowledge gaps. *Analyst*, 143(15), 3526–3539. <https://doi.org/10.1039/C8AN00599K>

Li-Chan, E. C. Y., & Kim, H. O. (2007). Structure and Chemical Compositions of Eggs. *Egg Bioscience and Biotechnology*, 1–95. <https://doi.org/10.1002/9780470181249.CH1>

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. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2020.107426>

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/10.1016/J.ACA.2015.10.001>

Mertens, K., Kemps, B., Perianu, C., De Baerdemaeker, J., Decuypere, E., De Ketelaere, B., & Bain, M. (2011). Advances in egg defect detection, quality assessment and automated sorting and grading. *Improving the Safety and Quality*



- of Eggs and Egg Products: Egg Chemistry, Production and Consumption*, 209–241. <https://doi.org/10.1533/9780857093912.2.209>
- 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. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2019.108668>
- Nys, Y., & Guyot, N. (2011). Egg formation and chemistry. *Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products: Egg Chemistry, Production and Consumption*, 83–132. <https://doi.org/10.1533/9780857093912.2.83>
- 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. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2020.127077>
- 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 and Technology*, 91, 625–633. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2019.08.002>
- PARSONS, A. H. (1982). Structure of the Eggshell. *Poultry Science*, 61(10), 2013–2021. <https://doi.org/10.3382/PS.0612013>
- Renzzone, G., Novi, G., Scaloni, A., & Arena, S. (2021). Monitoring aging of hen egg by integrated quantitative peptidomic procedures. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 140. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2020.110010>
- Samuelsson, L. M., & Larsson, D. G. J. (2008). Contributions from metabolomics to fish research. *Molecular BioSystems*, 4(10), 974–979. <https://doi.org/10.1039/B804196B>
- Schwägele, F. C. (2011). Egg quality assurance schemes and egg traceability. *Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products: Egg Chemistry, Production and Consumption*, 62–80. <https://doi.org/10.1533/9780857093912.1.62>
- Sharaf Eddin, A., Ibrahim, S. A., & 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>
- Stadelman, W. J., & Cotterill, O. J. (2017). *The Nutritive Value of the Egg*. 177–194. <https://doi.org/10.1201/9780203758878-7>
- Suman, M., Cavanna, D., Zerbini, M., Ricchetti, D., Sanfelici, D., Cavandoli, E., & Mirone, L. (n.d.). *Eggs and egg products - FOODINTEGRITY HANDBOOK A GUIDE TO FOOD AUTHENTICITY ISSUES AND ANALYTICAL SOLUTIONS (2018)*. <https://doi.org/10.32741/fihb.2.eggs>
- Sunwoo, H. H., & Gujral, N. (2015). Chemical Composition of Eggs and Egg Products. *Handbook of Food Chemistry*, 331–363. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-36605-5\\_28](https://doi.org/10.1007/978-3-642-36605-5_28)
- The Krebs Cycle — Harnessing Chemical Energy for Cellular Respiration*. (n.d.). Retrieved April 6, 2022, from <https://www.sigmaaldrich.com/GR/en/technical->

documents/technical-article/research-and-disease-areas/metabolism-research/citric-acid-cycle

- Tobias, R. D. (1995). *An Introduction to Partial Least Squares Regression*.
- Tsugawa, H., Cajka, T., Kind, T., Ma, Y., Higgins, B., Ikeda, K., Kanazawa, M., Vanderghelynst, J., Fiehn, O., & Arita, M. (2015). MS-DIAL: Data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. *Nature Methods*, 12(6), 523–526. <https://doi.org/10.1038/NMETH.3393>
- United States Department of Agriculture Marketing and Regulatory Programs Agricultural Marketing Service Poultry Programs. (2000). [www.ams.usda.gov/poultry](http://www.ams.usda.gov/poultry).
- 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/10.1016/J.FOODCHEM.2010.11.081>
- Vinaixa, M., Schymanski, E. L., Neumann, S., Navarro, M., Salek, R. M., & Yanes, O. (2015). *Mass spectral databases for LC/MS and GC/MS-based metabolomics: state of the field and future prospects*. <http://www.elsevier.com/open-access/userlicense/1.0/2>
- Wahjudi, P. N., Patterson, M. E., Lim, S., Yee, J. K., Mao, C. S., & Lee, W. N. P. (2010). Measurement of glucose and fructose in clinical samples using gas chromatography/mass spectrometry. *Clinical Biochemistry*, 43(1–2), 198–207. <https://doi.org/10.1016/J.CLINBIOCHEM.2009.08.028>
- Wishart, D. S. (2008). Metabolomics: applications to food science and nutrition research. *Trends in Food Science & Technology*, 19(9), 482–493. <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. [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(01\)00155-1](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(01)00155-1)
- 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>
- 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. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2016.02.001>
- 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>
- Γεωργιάδης Μ. (2019). Εμπορία αυγών Οι πρόνοιες της νομοθεσίας. *Τμήμα Γεωργίας-Υπουργείο Γεωργίας Αγροτικής Ανάπτυξης Και Περιβάλλοντος*.
- Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 της Επιτροπής της 15ης Νοεμβρίου 2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα. (n.d.). Retrieved April 6, 2022, from <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2005/2073/oj/ell>

*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.* (n.d.). Retrieved April 6, 2022, from <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2008/589/oj>

Κόλιας Β. (2020). Εκτροφή Πουλερικών για Παραγωγή Αυγών Κατανάλωσης. *Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης Και Τροφίμων.*

*Μεταβολισμός της γλυκόζης.* (n.d.). Retrieved April 6, 2022, from <https://rea.elke.uoa.gr/rea/lesson/900803B7-901B-453E-8E15-14C74A79B9F2/paradeigma1.html>

Χλιάρα Δήμητρα Ιωάννα. (2021). *Εκτίμηση της φρεσκότητας αποκελυφωμένου ολόκληρου αυγού ωοπαραγωγών ορνίθων (Gallus gallus domesticus): μεταβολομική προσέγγιση με χρήση αέριας χρωματογραφίας- φασματομετρίας μαζών.* <http://dspace.aua.gr/xmlui/handle/10329/7360>

## Παράρτημα

Π1. Σειρά δειγμάτων προς ανάλυση με GC/MS

■ 1<sup>Η</sup> Παραγωγοποίηση

| <u>1<sup>Η</sup> ΠΑΡΤΙΔΑ</u> |         | <u>2<sup>Η</sup> ΠΑΡΤΙΔΑ</u> |         |
|------------------------------|---------|------------------------------|---------|
| A/A                          | ΔΕΙΓΜΑ  | A/A                          | ΔΕΙΓΜΑ  |
| 1                            | QC_1    | 1                            | QC_10   |
| 2                            | QC_2    | 2                            | QC_11   |
| 3                            | QC_3    | 3                            | QC_12   |
| 4                            | QC_4    | 4                            | QC_13   |
| 5                            | Blank_1 | 5                            | Blank_3 |
| 6                            | 5--55 D | 6                            | 1--43 D |
| 7                            | 1--21 D | 7                            | 4--48 D |
| 8                            | 8--51 D | 8                            | 6--12 D |
| 9                            | 3--14 D | 9                            | 2--24 D |
| 10                           | QC_5    | 10                           | QC_14   |
| 11                           | 6--46 D | 11                           | 8--7 D  |
| 12                           | 7--35 D | 12                           | 6--39 D |
| 13                           | 2--10 D | 13                           | 3--8 D  |
| 14                           | 4--25 D | 14                           | 5--6 D  |
| 15                           | QC_6    | 15                           | QC_15   |
| 16                           | 7--56 D | 16                           | 7--1 D  |
| 17                           | 2--34 D | 17                           | 1--37 D |
| 18                           | 5--42 D | 18                           | 8--40 D |
| 19                           | 1--13 D | 19                           | 3--53 D |
| 20                           | QC_7    | 20                           | QC_16   |
| 21                           | 4--50 D | 21                           | 2--16 D |
| 22                           | 3--44 D | 22                           | 3--36 D |
| 23                           | 6--27 D | 23                           | 7--47 D |
| 24                           | 1--18 D | 24                           | 4--17 D |
| 25                           | QC_8    | 25                           | QC_17   |
| 26                           | 8--30 D | 26                           | 6--52 D |
| 27                           | 5--29 D | 27                           | 8--20 D |
| 28                           | 7--22 D | 28                           | 2--2 D  |
| 29                           | 4--4 D  | 29                           | 5--33 D |
| 30                           | QC_9    | 30                           | QC_18   |
| 31                           | Blank_2 | 31                           | Blank_4 |

▪ 2<sup>Η</sup> Παραγωγοποίηση

| <u>1<sup>Η</sup> ΠΑΡΤΙΔΑ</u> |           | <u>2<sup>Η</sup> ΠΑΡΤΙΔΑ</u> |          | <u>3<sup>Η</sup> ΠΑΡΤΙΔΑ</u> |          |
|------------------------------|-----------|------------------------------|----------|------------------------------|----------|
| A/A                          | ΔΕΙΓΜΑ    | A/A                          | ΔΕΙΓΜΑ   | A/A                          | ΔΕΙΓΜΑ   |
| 1                            | QC_21     | 1                            | QC_22    | 1                            | QC_20_   |
| 2                            | BL_7      | 2                            | BL_8     | 2                            | BL_6     |
| 3                            | 1_13_YOLK | 3                            | 1_13_EGG | 3                            | 2_2_EGG  |
| 4                            | 1_18_YOLK | 4                            | 1_18_EGG | 4                            | 4_17_EGG |
| 5                            | 1_43_YOLK | 5                            | 1_21_EGG | 5                            | 2_16_EGG |
| 6                            | 4_4_YOLK  | 6                            | 1_37_EGG | 6                            | 6_27_EGG |
| 7                            | 4_17_YOLK | 7                            | 1_43_EGG | 7                            | 8_20_EGG |
| 8                            | 4_25_YOLK | 8                            | 3_8_EGG  | 8                            | 4_4_EGG  |
| 9                            | 8_7_YOLK  | 9                            | 3_14_EGG | 9                            | 2_34_EGG |
| 10                           | 8_20_YOLK | 10                           | 3_36_EGG | 10                           | 6_12_EGG |
| 11                           | 8_30_YOLK | 11                           | 3_44_EGG | 11                           | 8_51_EGG |
| 12                           | 1_13_ALB  | 12                           | 3_53_EGG | 12                           | 4_50_EGG |
| 13                           | 1_18_ALB  | 13                           | 5_6_EGG  | 13                           | 2_10_EGG |
| 14                           | 1_43_ALB  | 14                           | 5_29_EGG | 14                           | 4_25_EGG |
| 15                           | 4_4_ALB   | 15                           | 5_33_EGG | 15                           | 6_39_EGG |
| 16                           | 4_17_ALB  | 16                           | 5_42_EGG | 16                           | 8_30_EGG |
| 17                           | 4_25_ALB  | 17                           | 5_55_EGG | 17                           | 6_52_EGG |
| 18                           | 8_7_ALB   | 18                           | 7_1_EGG  | 18                           | 8_7_EGG  |
| 19                           | 8_20_ALB  | 19                           | 7_22_EGG | 19                           | 2_24_EGG |
| 20                           | 8_30_ALB  | 20                           | 7_35_EGG | 20                           | 6_46_EGG |
| 21                           | -         | 21                           | 7_47_EGG | 21                           | 8_40_EGG |
| 22                           | -         | 22                           | 7_56_EGG | 22                           | 4_48_EGG |

Π2. Καταγραφή της μάζας (g) των αποκελυφωμένων αυγών πριν αλλά και μετά την συντήρησή τους σε θερμοθάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 20 °C.

| <i>Κωδικός<br/>δείγματος<br/>(#δειγματοληψίας)</i> | <i>Μάζα πριν<br/>την<br/>συντήρηση<br/>(g)</i> | <i>Μάζα μετά<br/>την<br/>συντήρηση<br/>(g)</i> |  | <i>Κωδικός<br/>δείγματος<br/>(#δειγματοληψίας)</i> | <i>Μάζα πριν<br/>την<br/>συντήρηση<br/>(g)</i> | <i>Μάζα μετά<br/>την<br/>συντήρηση<br/>(g)</i> |
|----------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|--|----------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| 1 (7)                                              | 64,2                                           | 62,73                                          |  | 30 (8)                                             | 62,95                                          | 61,53                                          |
| 2 (2)                                              | 60,9                                           | 60,71                                          |  | 33 (5)                                             | 66,88                                          | 65,94                                          |
| 4 (4)                                              | 63,01                                          | 61,97                                          |  | 34 (2)                                             | 66,59                                          | 66,33                                          |
| 6 (5)                                              | 65,73                                          | 64,79                                          |  | 35 (7)                                             | 72,25                                          | 70,85                                          |
| 7 (8)                                              | 80,58                                          | 79,25                                          |  | 36 (3)                                             | 68,85                                          | 68,32                                          |
| 8 (3)                                              | 77,41                                          | 76,72                                          |  | 37 (1)                                             | 64,44                                          | 64,43                                          |
| 10 (2)                                             | 64,59                                          | 64,33                                          |  | 39 (6)                                             | 61,7                                           | 60,7                                           |
| 12 (6)                                             | 64,63                                          | 63,35                                          |  | 40 (8)                                             | 67,44                                          | 65,61                                          |
| 13 (1)                                             | 70,32                                          | 70,3                                           |  | 42 (5)                                             | 68,35                                          | 67,26                                          |
| 14 (3)                                             | 70,79                                          | 70,22                                          |  | 43 (1)                                             | 65,11                                          | 65,08                                          |
| 16 (2)                                             | 65,01                                          | 64,75                                          |  | 44 (3)                                             | 63,28                                          | 62,73                                          |
| 17 (4)                                             | 56,81                                          | 55,79                                          |  | 46 (6)                                             | 66,54                                          | 65,49                                          |
| 18 (1)                                             | 71,52                                          | 71,51                                          |  | 47 (7)                                             | 72,4                                           | 70,91                                          |
| 20 (8)                                             | 75,08                                          | 73,16                                          |  | 48 (4)                                             | 69,83                                          | 68,9                                           |
| 21 (1)                                             | 66,52                                          | 66,51                                          |  | 50 (4)                                             | 63,1                                           | 62,25                                          |
| 22 (7)                                             | 68,93                                          | 66,8                                           |  | 51 (8)                                             | 69,63                                          | 67,92                                          |
| 24 (2)                                             | 66,03                                          | 65,8                                           |  | 52 (6)                                             | 68,91                                          | 67,71                                          |
| 25 (4)                                             | 67,99                                          | 67,15                                          |  | 53 (3)                                             | 69,26                                          | 68,16                                          |
| 27 (6)                                             | 68,50                                          | 66,81                                          |  | 55 (5)                                             | 69,02                                          | 67,95                                          |
| 29 (5)                                             | 67,12                                          | 66,01                                          |  | 56 (7)                                             | 60,04                                          | 58,81                                          |

Π3. Καταγραφή του ύψους της παχύρευστης αλβουμίνης (mm) για κάθε αυγό προς μελέτη με τις αντίστοιχες μονάδες Haugh.

| <i>Κωδικός<br/>δείγματος<br/>(#δευματοληψίας)</i> | <i>Ύψος<br/>παχ.αλβ.<br/>(mm)</i> | <i>Μονάδες<br/>Haugh</i> | <i>Κωδικός<br/>δείγματος<br/>(#δευματοληψίας)</i> | <i>Ύψος<br/>παχ.αλβ.<br/>(mm)</i> | <i>Μονάδες<br/>Haugh</i> |
|---------------------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| 1 (7)                                             | 3,3                               | 56,45                    | 30 (8)                                            | 2,97                              | 44,16                    |
| 2 (2)                                             | 4,46                              | 63,28                    | 33 (5)                                            | 4,96                              | 65,82                    |
| 4 (4)                                             | 3,76                              | 54,82                    | 34 (2)                                            | 8,06                              | 88,28                    |
| 6 (5)                                             | 4,51                              | 61,84                    | 35 (7)                                            | 5,87                              | 71,98                    |
| 7 (8)                                             | 2,06                              | 3,67                     | 36 (3)                                            | 8,13                              | 88,17                    |
| 8 (3)                                             | 4,49                              | 55,88                    | 37 (1)                                            | 8,62                              | 91,8                     |
| 10 (2)                                            | 6,75                              | 80,72                    | 39 (6)                                            | 6,13                              | 77,55                    |
| 12 (6)                                            | 4,83                              | 65,7                     | 40 (8)                                            | 2,69                              | 36,11                    |
| 13 (1)                                            | 8,56                              | 90,09                    | 42 (5)                                            | 4,06                              | 55,54                    |
| 14 (3)                                            | 4,23                              | 56,03                    | 43 (1)                                            | 7,17                              | 83,25                    |
| 16 (2)                                            | 5,06                              | 67,26                    | 44 (3)                                            | 6,35                              | 78,45                    |
| 17 (4)                                            | 5,38                              | 73,66                    | 46 (6)                                            | 2,65                              | 35,45                    |
| 18 (1)                                            | 6,79                              | 78,8                     | 47 (7)                                            | 3,27                              | 42,22                    |
| 20 (8)                                            | 2,21                              | 17,26                    | 48 (4)                                            | 2,84                              | 36,18                    |
| 21 (1)                                            | 8,95                              | 93,02                    | 50 (4)                                            | 3,86                              | 55,88                    |
| 22 (7)                                            | 3,45                              | 47,76                    | 51 (8)                                            | 3,04                              | 40,55                    |
| 24 (2)                                            | 5,71                              | 72,49                    | 52 (6)                                            | 4,86                              | 64,08                    |
| 25 (4)                                            | 3,88                              | 53,37                    | 53 (3)                                            | 6,65                              | 78,84                    |
| 27 (6)                                            | 2,92                              | 39,32                    | 55 (5)                                            | 5,16                              | 66,86                    |
| 29 (5)                                            | 3,69                              | 51,57                    | 56 (7)                                            | 2,38                              | 36,24                    |

Π4. Μεταβολίτες που ανιχνεύθηκαν με τους αντίστοιχους χρόνους κατακράτησης (RI).

| <u>RI</u> | <u>METABOΛΙΤΗΣ</u>     |  | <u>RI</u> | <u>METABOΛΙΤΗΣ</u>                     |
|-----------|------------------------|--|-----------|----------------------------------------|
| 1058,25   | Pyruvate               |  | 1843,14   | Sugar_1843                             |
| 1066,75   | Lactic acid            |  | 1848,52   | Citric acid                            |
| 1109,63   | Alanine                |  | 1887,69   | Hexose_1888                            |
| 1160,51   | Leucine                |  | 1925,5    | Fructose                               |
| 1168,18   | 3-Hydroxybutyric acid  |  | 1933,03   | Hexose_1933                            |
| 1090,77   | Valine (TMS + 2TMS)    |  | 1940,91   | Glucose_1                              |
| 1226,21   |                        |  | 1942,89   | Galactopyranose                        |
| 1248,13   | Urea                   |  | 1866,77   | Lysine (3TMS + 4TMS)                   |
| 1268,34   | Serine                 |  | 1943,26   |                                        |
| 1277,13   | Ethanolamine           |  | 1901,29   | Tyrosine (2TMS +3TMS)                  |
| 1289,36   | Phosphoric acid        |  | 1961,2    |                                        |
| 1306,56   | Threonine              |  | 1970,87   | D-Mannitol                             |
| 1181,71   | Isoleucine (TMS +2TMS) |  | 1978,55   | D-Glucitol                             |
| 1306,21   |                        |  | 1992,19   | Unknown_1992                           |
| 1318,12   | Glycine                |  | 1994,12   | Unknown_1994                           |
| 1355,9    | Fumaric acid           |  | 2018,54   | Pantothenic acid                       |
| 1418,77   | Methionine             |  | 2019,11   | Glucosaminic acid                      |
| 1434,5    | Aspartate minor        |  | 2020,5    | Sugar_2020                             |
| 1438,65   | b-Alanine              |  | 2041,49   | Gluconic acid                          |
| 1506,97   | Malic acid             |  | 2072,5    | N-Acetyl glucosamine_1 (minor + major) |
| 1532,77   | Erythritol             |  | 2124,27   |                                        |
| 1534,39   | Pyroglutamic acid      |  | 2070,26   | Inositol (6TMS + nTMS)                 |
| 1541,62   | Glutamic acid          |  | 2131,1    |                                        |
| 1553,69   | Phenylalanine          |  | 2226,33   | Tryptophan                             |
| 1683,55   | Sugar_1684             |  | 2344,55   | Sugar phosphate_2345                   |
| 1696,63   | Sugar_1697             |  | 2365,74   | Sugar phosphate_2366                   |
| 1752,48   | Ribitol                |  | 2481,21   | Uridine                                |
| 1758,84   | 6-Deoxyglucitol        |  | 2551,4    | N-Acetyl glucosamine 6-phosphate_1     |
| 1764,83   | Ornithine              |  | 2716,79   | Sucrose                                |
| 1791,71   | 3-Phosphoglycerate     |  | 2735,59   | Maltose_2                              |
| 1807,81   | O-Phosphoethanolamine  |  |           |                                        |

Π5. Παράθεση κωδικού δείγματος με την αντίστοιχη τιμή της μάζας του ομογενοποιημένου αυγού κατά το στάδιο της εκχύλισης (σε g), την μέση τιμή του ύψους του εσωτερικού προτύπου φρουκτόζης (13C6), το άθροισμα των δύο τιμών του ύψους της φρουκτόζης και το αποτέλεσμα της εξίσωσης (5.Ποσοτικός προσδιορισμός φρουκτόζης) για την ποσοτικοποίηση του συγκεκριμένου μεταβολίτη.



| <i>ΔΕΙΓΜΑ</i> | <i>ΜΑΖΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ</i> | <i>FRUCTOSE<br/>(13C6)</i> | <i>FRUCTOSE</i> | <i>QUANT FRUCTOSE</i> |
|---------------|-----------------------|----------------------------|-----------------|-----------------------|
| 1_13          | 0.0555                | 39324                      | 1916            | 4.652867698           |
| 1_18          | 0.0593                | 26669                      | 1228            | 4.115407187           |
| 1_21          | 0.056                 | 42000                      | 1889            | 4.25667517            |
| 1_37          | 0.0601                | 47761                      | 2871            | 5.30104119            |
| 1_43          | 0.0535                | 50208                      | 2184            | 4.309251086           |
| 2_2           | 0.0511                | 34370                      | 2017            | 6.086692133           |
| 2_10          | 0.0581                | 50451                      | 2901            | 5.24538883            |
| 2_16          | 0.0545                | 64145                      | 3604            | 5.463882359           |
| 2_24          | 0.0551                | 55996                      | 3375            | 5.797503814           |
| 2_34          | 0.0558                | 55969                      | 3129            | 5.310063155           |
| 3_8           | 0.0546                | 26702                      | 2287            | 8.313915381           |
| 3_14          | 0.0647                | 43433                      | 4014            | 7.570579582           |
| 3_36          | 0.0591                | 48294                      | 4047            | 7.514990144           |
| 3_44          | 0.0544                | 45544                      | 3454            | 7.388701682           |
| 3_53          | 0.0607                | 51692                      | 5290            | 8.935513492           |
| 4_4           | 0.0533                | 34213                      | 4229            | 12.29122555           |
| 4_17          | 0.0556                | 37134                      | 4986            | 12.79916445           |
| 4_25          | 0.0549                | 42213                      | 5666            | 12.95787773           |
| 4_48          | 0.0653                | 58417                      | 8285            | 11.51107679           |
| 4_50          | 0.0649                | 57654                      | 7828            | 11.08798286           |
| 5_6           | 0.0571                | 3384                       | 466             | 12.7818973            |
| 5_29          | 0.0527                | 42213                      | 6110            | 14.55661001           |
| 5_33          | 0.0564                | 3674                       | 571             | 14.60473637           |
| 5_42          | 0.0572                | 8028                       | 1400            | 16.15848028           |
| 5_55          | 0.0555                | 27365                      | 3685            | 12.85952497           |
| 6_12          | 0.0583                | 24830                      | 5030            | 18.41613883           |
| 6_27          | 0.0578                | 56001                      | 11542           | 18.8987604            |
| 6_39          | 0.0583                | 57608                      | 5968            | 9.41788388            |
| 6_46          | 0.0547                | 42386                      | 8667            | 19.81230048           |
| 6_52          | 0.0657                | 40508                      | 9183            | 18.28749764           |
| 7_1           | 0.0549                | 34837                      | 8352            | 23.14479094           |
| 7_22          | 0.0532                | 36745                      | 8931            | 24.21397418           |
| 7_35          | 0.0548                | 51111                      | 8309            | 15.72279283           |
| 7_47          | 0.0638                | 40036                      | 13615           | 28.25024093           |
| 7_56          | 0.0601                | 57674                      | 14959           | 22.87303985           |
| 8_7           | 0.0579                | 38088                      | 9490            | 22.80737744           |
| 8_20          | 0.0537                | 24400                      | 7067            | 28.5855695            |
| 8_30          | 0.0609                | 54971                      | 15971           | 25.28465599           |
| 8_40          | 0.068                 | 69033                      | 21724           | 24.52731473           |
| 8_51          | 0.0641                | 25301                      | 8693            | 28.40860008           |

Π6. Παράθεση κωδικού δείγματος με την αντίστοιχη τιμή της μάζας του κρόκου κατά το στάδιο της εκχύλισης (σε g), την μέση τιμή του ύψους του εσωτερικού προτύπου φρουκτόζης (13C6), το άθροισμα των δύο τιμών του ύψους της φρουκτόζης και το αποτέλεσμα της ποσοτικοποίησης του συγκεκριμένου μεταβολίτη.

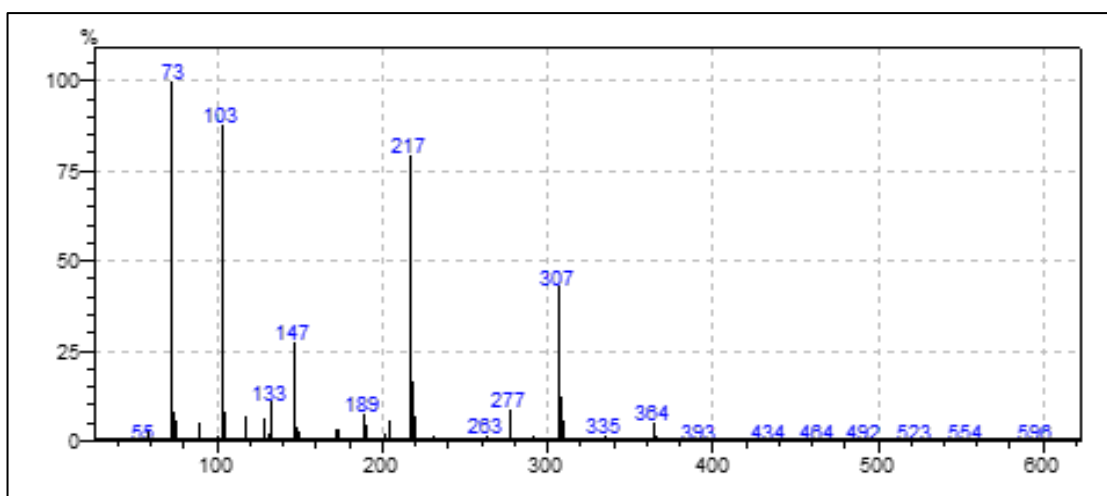
| <i>ΩΡΕΣ</i> | <i>ΔΕΙΓΜΑ</i> | <i>ΜΑΖΑ<br/>ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ</i> | <i>13C6</i> | <i>FRUCTOSE</i> | <i>QUANT<br/>FRUCTOSE</i> |
|-------------|---------------|---------------------------|-------------|-----------------|---------------------------|
| 1           | 1_13          | 0.0509                    | 30709       | 3575            | 12.12183753               |
| 1           | 1_18          | 0.0552                    | 38015       | 4962            | 12.53252435               |
| 1           | 1_43          | 0.0589                    | 29963       | 2683            | 8.057419091               |
| 216         | 4_4           | 0.0617                    | 24517       | 3313            | 11.60766363               |
| 216         | 4_17          | 0.0566                    | 32436       | 3841            | 11.08859327               |
| 216         | 4_25          | 0.0537                    | 23278       | 3540            | 15.00925659               |
| 504         | 8_7           | 0.0607                    | 30469       | 4719            | 13.52318393               |
| 504         | 8_20          | 0.0531                    | 34218       | 4439            | 12.94827372               |
| 504         | 8_30          | 0.0597                    | 27668       | 4264            | 13.68172848               |

Π7. Παράθεση κωδικού δείγματος με την αντίστοιχη τιμή της μάζας της αλβουμίνης κατά το στάδιο της εκχύλισης (σε g), την μέση τιμή του ύψους του εσωτερικού προτύπου φρουκτόζης (13C6), το άθροισμα των δύο τιμών του ύψους της φρουκτόζης και το αποτέλεσμα της ποσοτικοποίησης του συγκεκριμένου μεταβολίτη.

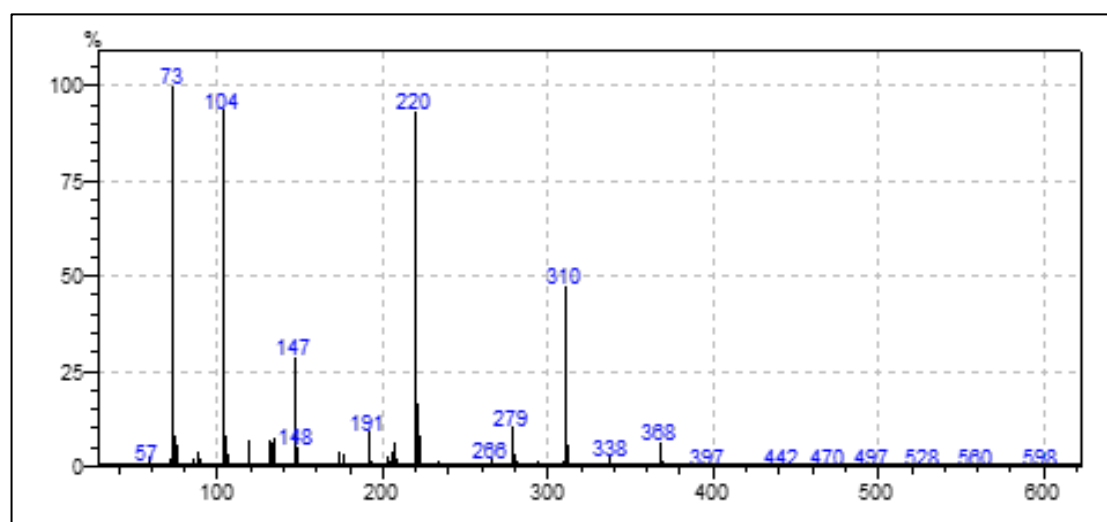
| <i>ΩΡΕΣ</i> | <i>ΔΕΙΓΜΑ</i> | <i>ΜΑΖΑ<br/>ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ</i> | <i>13C6</i> | <i>FRUCTOSE</i> | <i>QUANT<br/>FRUCTOSE</i> |
|-------------|---------------|---------------------------|-------------|-----------------|---------------------------|
| 1           | 1_13          | 0.0574                    | 38374       | 1609            | 3.871532863               |
| 1           | 1_18          | 0.0519                    | 53769       | 1847            | 3.507869656               |
| 1           | 1_43          | 0.0524                    | 46814       | 2042            | 4.411888921               |
| 216         | 4_4           | 0.0516                    | 26539       | 3333            | 12.8996203                |
| 216         | 4_17          | 0.0512                    | 21942       | 2861            | 13.49732035               |
| 216         | 4_25          | 0.0568                    | 19974       | 10744           | 50.19130503               |
| 504         | 8_7           | 0.0548                    | 29936       | 7221            | 23.32914841               |
| 504         | 8_20          | 0.0632                    | 47083       | 20576           | 36.64845034               |
| 504         | 8_30          | 0.0634                    | 29373       | 11879           | 33.80789951               |

Π8. Φάσμα μάζας των ακετυλιωμένων μεθυλοξιδών της α) φρουκτόζης β) επισημασμένης φρουκτόζης ( $U-^{13}C_6$ ) και γ) γλυκόζης.

**α**



**β**



**γ**

