



Χημική Και Βιομοριακή Ανάλυση

Πρόγραμμα Σπουδών

Πτυχιακή / Διπλωματική Εργασία

«Προσδιορισμός αμινοξέων σε γαλακτοκομικά προϊόντα»

«Ματθαίος Βούλγαρης»

Επιβλέπων καθηγητής: «ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΤΣΙΑΦΟΥΛΗΣ»

Πάτρα, Ιούνιος 2024

Η παρούσα εργασία αποτελεί πνευματική ιδιοκτησία του φοιτητή («συγγραφέας/δημιουργός») που την εκπόνησε. Στο πλαίσιο της πολιτικής ανοικτής πρόσβασης ο συγγραφέας/δημιουργός εκχωρεί στο ΕΑΠ, μη αποκλειστική άδεια χρήσης του δικαιώματος αναπαραγωγής, προσαρμογής, δημόσιου δανεισμού, παρουσίασης στο κοινό και ψηφιακής διάχυσής τους διεθνώς, σε ηλεκτρονική μορφή και σε οποιοδήποτε μέσο, για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, άνευ ανταλλάγματος και για όλο το χρόνο διάρκειας των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας. Η ανοικτή πρόσβαση στο πλήρες κείμενο για μελέτη και ανάγνωση δεν σημαίνει καθ' οιονδήποτε τρόπο παραχώρηση δικαιωμάτων διανοητικής ιδιοκτησίας του συγγραφέα/δημιουργού ούτε επιτρέπει την αναπαραγωγή, αναδημοσίευση, αντιγραφή, αποθήκευση, πώληση, εμπορική χρήση, μετάδοση, διανομή, έκδοση, εκτέλεση, «μεταφόρτωση» (downloading), «ανάρτηση» (uploading), μετάφραση, τροποποίηση με οποιονδήποτε τρόπο, τμηματικά ή περιληπτικά της εργασίας, χωρίς τη ρητή προηγούμενη έγγραφη συναίνεση του συγγραφέα/δημιουργού. Ο συγγραφέας/δημιουργός διατηρεί το σύνολο των ηθικών και περιουσιακών του δικαιωμάτων..

## Προσδιορισμό αμινοξέων σε γαλακτοκομικά προϊόντα

Ματθαίος Βούλγαρης

Επιτροπή Επίβλεψης Πτυχιακής / Διπλωματικής Εργασίας

Επιβλέπων Καθηγητής:

«ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΤΣΙΑΦΟΥΛΗΣ»

Μέλος Ε.Δ.Ι.Π., Βαθμός Α, Πανεπιστήμιο  
Ιωαννίνων, Τμήμα Χημείας, Εργαστήριο  
Αναλυτικής Χημείας, Κέντρο NMR.

Μέλος ΣΕΠ, Ελληνικό Ανοικτό  
Πανεπιστήμιο, ΠΜΣ «Χημική και  
Βιομοριακή Ανάλυση»

Συν-Επιβλέπων Καθηγητής:

«ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ ΜΠΑΚΕΑΣ»

Καθηγητής Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα  
Χημείας Εθνικό και Καποδιστριακό  
Πανεπιστήμιο Αθηνών

Πάτρα, Ιούνιος 2024

### *Ευχαριστίες*

Με την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής διπλωματικής μου εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους όσους συνέβαλλαν στην εκπόνησή της.

Ευχαριστώ ιδιαιτέρως τον επιβλέπων καθηγητή μου, κύριο Κωνσταντίνο Τσιαφούλη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο θέμα, την επιστημονική του καθοδήγηση, τις υποδείξεις του και την επιμονή του στη λεπτομέρεια.

Όπως και τους υπόλοιπους καθηγητές που κατά την διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος φρόντισαν να μας μεταλαμπαδεύσουν τις γνώσεις και το ενδιαφέρον τους για το αντικείμενο.

Τέλος, θα ήθελα εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου για όλη τη στήριξη, τη συμπαράσταση και την κατανόησή τους, καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

## Περίληψη

Στο πρώτο κεφάλαιο επισημαίνονται οι μέθοδοι προσδιορισμού της ποιότητας των πρωτεϊνών στα γαλακτοκομικά προϊόντα, ενώ στην επόμενη ενότητα συζητείται η ανίχνευση αμινοξέων μέσω γαλακτοκομικών προϊόντων με τη χρήση διαφορετικών τεχνικών - όξινη υδρόλυση, υδρόλυση με βάση και ενζυμική υδρόλυση- οι διαδικασίες επικυρώνονται περαιτέρω με ορισμένες διεργασίες. Στο επόμενο κεφάλαιο αποκαλύπτονται τα ευρήματα της ανάλυσης φασματομετρίας μάζας που βοηθά στην αποκάλυψη διατροφικών πληροφοριών καθώς και στον εντοπισμό συγκεκριμένων αμινοξέων που υπάρχουν στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Εν κατακλείδι: οι πρωτεΐνες είναι αμινοξέα και από όσα τονίστηκαν προηγουμένως σχετικά με την παρουσία των απαραίτητων αμινοξέων στα γαλακτοκομικά προϊόντα και την αναλογία τους - μπορεί να συναχθεί ότι τα αμινοξέα διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην ανθρώπινη υγεία. Αναπτύσσονται οι μέθοδοι προσδιορισμού της ποιότητας των πρωτεϊνών στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Στη συνέχεια παρουσιάζεται μια συζήτηση σχετικά με τον προσδιορισμό των αμινοξέων μέσω των γαλακτοκομικών προϊόντων με τη χρήση όξινης υδρόλυσης, βασικής υδρόλυσης και ενζυμικής υδρόλυσης - η οποία επικυρώνεται περαιτέρω μέσω ορισμένων διεργασιών. Το επόμενο κεφάλαιο αποκαλύπτει αργότερα ευρήματα με βάση την ανάλυση φασματομετρίας μάζας που βοηθά στη διατροφική πληροφόρηση και στον εντοπισμό συγκεκριμένων αμινοξέων που υπάρχουν στα γαλακτοκομικά προϊόντα, καθώς το επόμενο θα φέρει στο επίκεντρο το πώς οι πρωτεΐνες είναι αμινοξέα και γιατί είναι σημαντικά για την ανθρώπινη υγεία (όπως συζητήθηκε προηγουμένως για την παρουσία των απαραίτητων αμινοξέων στα γαλακτοκομικά προϊόντα και την αναλογία τους).

### Λέξεις – Κλειδιά

Αμινοξέα, γαλακτοκομικά προϊόντα, πρωτεΐνες, διατροφική αξία, ενόργανη ανάλυση, μέθοδοι ανίχνευσης, διαχωρισμός αμινοξέων, τεχνικές προσδιορισμού αμινοξέων, βιοαισθητήρες, τεχνικές ομογενοποίησης και εκχύλισης



## Abstract

The first chapter highlights protein quality determination methods in dairy products while the next section discusses amino acid detection through dairy products using different techniques— acid hydrolysis, base hydrolysis, and enzyme hydrolysis; the procedures are further validated by certain processes. Mass spectrometry analysis findings are revealed in the next chapter that helps in revealing nutritional information as well as identifying specific amino acids present in dairy products. In conclusion: proteins are amino acids and from what has been highlighted earlier about the presence of essential amino acids in dairy products and their ratio — it can be deduced that amino acids play a crucial role in human health. The quality determination methods of proteins in dairy products are elaborated. After that a discussion about amino acids identification through dairy products using acid hydrolysis, base hydrolysis and enzyme hydrolysis— which is further validated through certain processes is presented. The next chapter later reveals findings based on mass spectrometry analysis that helps in nutritional information and identifying specific amino acids present in dairy products as the next one will bring into focus how proteins are amino acids and why they are important to human health (as discussed earlier on the presence of essential amino acids in dairy products and their ratio).

## Keywords

Amino acids, dairy products, proteins, nutritional value, instrumental analysis, detection methods, amino acid separation, amino acid determination techniques, biosensors, homogenization and extraction techniques

## Περιεχόμενα

Περίληψη.....	v
Abstract .....	vii
Περιεχόμενα.....	viii
Κατάλογος Εικόνων / Σχημάτων .....	ix
Συντομογραφίες & Ακρωνύμια.....	xiii
1 Γάλα .....	1
1.1 Πρωτεΐνες και αμινοξέα στο γάλα .....	7
2 Εισαγωγή στα αμινοξέα .....	14
2.1 Ορισμός και δομή.....	16
2.2 Βιολογική σημασία .....	17
2.3 Ο ρόλος των αμινοξέων στην ποιότητα και τη διατροφή των γαλακτοκομικών προϊόντων.....	18
2.4 Διατροφική εκτίμηση .....	19
2.5 Κατηγοριοποίηση και λειτουργία .....	20
3 Ο ρόλος των αμινοξέων στα γαλακτοκομικά προϊόντα .....	22
3.1 Ποιότητα και διατροφική αξία πρωτεϊνών.....	22
3.2 Τύποι αμινοξέων που απαντώνται .....	24
3.3 Παράγοντες που επηρεάζουν τη σύνθεση.....	26
3.4 Προφίλ αμινοξέων σε διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα.....	30
3.5 Επίδραση της επεξεργασίας στη σύνθεση των αμινοξέων .....	30
3.6 Αμινοξέα στο γάλα, το τυρί και το γιαούρτι.....	30
3.6.1 Μετατροπή αμινοξέων από το γάλα σε τυρί.....	33
3.6.2 Σχέση των αμινοξέων στο γάλα, τυρί, γιαούρτι.....	34
4 Προετοιμασία δείγματος και προεπεξεργασία .....	35



4.1	Τεχνικές ομογενοποίησης και εκχύλισης.....	36
4.2	Τεχνικές παραγοντοποίησης .....	37
4.2.1	Αλληλεπίδραση των αμινοξέων με τον αναλυτή-στόχο .....	39
5	Αναλυτικές τεχνικές προσδιορισμού αμινοξέων .....	43
5.1	Κλασσικές μέθοδοι.....	46
5.2	Σύγχρονες ενόργανες τεχνικές .....	46
5.2.1	Χρωματογραφικές μέθοδοι .....	47
5.2.2	Φασματοσκοπικές μέθοδοι.....	49
5.2.3	Φασματομετρία Μάζας .....	51
5.2.4	Τεχνικές βιοαισθητήρων .....	54
5.3	Ποιοτικός έλεγχος και επικύρωση ανάλυσης αμινοξέων .....	59
5.3.1	Επικύρωση αναλυτικών μεθόδων .....	60
5.3.2	Πιστοποιημένα υλικά αναφοράς .....	60
5.4	Εφαρμογές της ανάλυσης αμινοξέων στη γαλακτοβιομηχανία .....	61
5.4.1	Ανάπτυξη και σύνθεση προϊόντων.....	62
5.4.2	Έρευνα και ανάπτυξη.....	63
5.4.3	Εφαρμογές ανάλυσης αμινοξέων στη γαλακτοβιομηχανία .....	65
5.4.4	Διατροφική επισήμανση και έλεγχος ποιότητας.....	66
5.4.5	Ανάπτυξη προϊόντων και σύνθεση.....	66
5.4.6	Έρευνα και ανάπτυξη.....	67
6	Προκλήσεις και μελλοντικές κατευθύνσεις .....	69
6.1	Εξελίξεις στην ανάλυση αμινοξέων .....	70
6.2	Πιθανές επιπτώσεις στη γαλακτοβιομηχανία.....	70
7	Συμπεράσματα .....	71
8	Βιβλιογραφία.....	75

## Κατάλογος Εικόνων / Σχημάτων

Εικόνα 1.1: Πρωτεϊνικός μεταβολισμός των αγελάδων γαλακτοπαραγωγής.....	7
Εικόνα 1.2.1: Κατανομή πρωτεϊνών στο βόειο γάλα.....	10
Εικόνα 1.2.2 : Προφίλ πρωτεϊνών ( $\text{g L}^{-1}$ ) του γάλακτος διαφορετικών ειδών (Crowley, 2016).....	13
Εικόνα 2.1: Δομή αμινοξέων .....	14
Εικόνα 3.4.2 : Μέση ( $\pm\text{SEM}$ ) περιεκτικότητα σε απαραίτητα αμινοξέα (EAA) (% από ολική πρωτεΐνη) διαφόρων διατροφικών πηγών πρωτεΐνης και του ανθρώπινου σκελετού μυϊκή πρωτεΐνη. Οι λευκές μπάρες αντιπροσωπεύουν φυτικές πηγές πρωτεΐνης, Οι γκρι ράβδοι αντιπροσωπεύουν πηγές πρωτεΐνης ζωικής προέλευσης και η μαύρη ράβδος αντιπροσωπεύει την πρωτεΐνη των σκελετικών μυών του ανθρώπου. Η διακεκομμένη γραμμή αντιπροσωπεύει το απαιτούμενο αμινοξέων για ενήλικες (WHO/FAO/UNU Expert Consultation 2007). Σημείωση: Το EAA είναι το άθροισμα των His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, και Val. Το Trp δεν μετρήθηκε.....	30
Εικόνα 3.4.1 : Μέση ( $\pm\text{SEM}$ ) περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη (% της πρώτης ύλης) διαφόρων πηγών διατροφικής πρωτεΐνης και ανθρώπινου σκελετικού μυϊκού ιστού με βάση την καθορισμένη περιεκτικότητα σε άζωτο πολλαπλασιαζόμενη επί 6,25 ως τον τυπικό συντελεστή μετατροπής. Οι λευκές ράβδοι αντιπροσωπεύουν πηγές πρωτεΐνης φυτικής προέλευσης, οι γκρι ράβδοι αντιπροσωπεύουν πηγές πρωτεϊνών που προέρχονται από ζώα και η μαύρη ράβδος αντιπροσωπεύει την πρωτεΐνη των ανθρώπινων σκελετικών μυών.....	31
Εικόνα 3.6.2.1 : Ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση των φυσικοχημικών παραμέτρων, η περιεκτικότητα σε ολικά ελεύθερα αμινοξέα και βιογενείς αμίνες των τεσσάρων ομάδων προσδιορίστηκαν μέσω ιεραρχικής ανάλυσης συγκροτήματος. (HCA).....	38
Εικόνα 4.2.1: (Α) Ανάλυση αμινοξέων πλάσματος ενός ασθενούς με ασθένεια ούρων χρησιμοποιώντας μια μέθοδο χρωματογραφίας ανταλλαγής ιόντων. Διακεκομμένη γραμμή: πρότυπο βαθμονόμησης. Συμπαγής γραμμή: δείγμα ασθενούς. (Β) Μέθοδος υγρής χρωματογραφίας-διαδοχικής φασματομετρίας μάζας παρακολούθησης	

πολλαπλών αντιδράσεων. Βέλη: διαγνωστικά αμινοξέα (αλοϊσολευκίνη, ισολευκίνη, λευκίνη και βαλίνη).....	39
Εικόνα 4.2.2: Χρωματογραφήματα δειγμάτων σε λειτουργία EIC για (α) πλήρες γάλα με λιπαρά στο $t_0$ και (β) πλήρες γάλα με λιπαρά στο $t_1$ . Αναγνώριση κορυφών: (IS) εσωτερικό πρότυπο, (1) αλανίνη, (2) γλυκίνη, (3) λευκίνη, (4) ισολευκίνη, (5) προλίνη, (6) γλουταμινικό οξύ και (7) φαινυλαλανίνη (Quigley et al., 2019).....	43
Εικόνα 5.1:Αντιπροσωπευτικά φάσματα MS/MS του πρωτονιωμένου Α) προτύπου MG-H1 Β) προτύπου MG-H2 Γ) προτύπου MG-H3 Δ) MG-H σε δείγμα μπισκότου (Akıllıoğlu & Lund, 2022). ....	49
Εικόνα 5.2.1: Σχηματική ανάλυση HPLC των αμινοξέων (AA) σε πρωτεΐνες ζωικών ιστών και τροφίμων με χρήση παραγωγοποίησης προ-στήλης με οφθαλδιαδεύδη (OPA). Η ανάλυση HPLC απαιτεί πολλαπλά στάδια, συμπεριλαμβανομένης της προετοιμασίας του δείγματος, της αυτοματοποιημένης παραγωγοποίησης του AA με OPA, της έγχυσης του δείγματος στη στήλη, της έκλουσης με κινητή φάση, της ανίχνευσης φθορισμού και της επεξεργασίας δεδομένων. Όλες οι διαδικασίες εκτελούνται σε θερμοκρασία δωματίου (20–25 °C). Η χρήση ενός αυτόματου δειγματολήπτη είναι απαραίτητη για τον ακριβή και αναπαραγώγιμο προσδιορισμό του AA. Το εσωτερικό πρότυπο (αιθανολαμίνη) μπορεί να παραλειφθεί όταν χρησιμοποιείται η βαθμονόμηση εξωτερικού προτύπου για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του AA σε προϊόντα υδρόλυσης πρωτεϊνών.....	50
Εικόνα 5.2.1.1 : Ανάλυση αμινοξέων παραγωγοποιημένων με χλωρομυρμηκικό προπυλεστέρα με GC MS σε λειτουργία SIM. Η περιοχή από 1 έως 2 λεπτά όπου εκλύονται τα περισσότερα αμινοξέα διευρύνεται.....	54
Εικόνα 5.2.1.2 : Ανάλυση ισομοριακού χλωρομυρμηκικού προπυλεστέρα – παραγωγοποιημένων αμινοξέων με RPLC–MS σε λειτουργία SRM. Η περιοχή από 1 έως 2,5 λεπτά όπου εκλύονται τα περισσότερα AA διευρύνεται.....	54
Εικόνα 5.2.1.: Φάσματα φθορισμού διέγερσης (πλήρης γραμμή) και εκπομπής (διακεκομμένη γραμμή) τρυπτοφάνης που καταγράφηκαν σε UHT ( ultra high temperature) γάλα – γάλα υψηλής παστερίωσης.....	56
Εικόνα 5.2: Υπάρχουν διάφορες γενιές αμπερομετρικών βιοαισθητήρων. Κατά την πρώτη γενιά βιοαισθητήρων, μετράται η μείωση της συγκέντρωσης του οξυγόνου ή του υπεροξειδίου του υδρογόνου που παράγεται. Κατά τη δεύτερη γενιά βιοαισθητήρων, συγκεκριμένοι μεσολαβητές μεταφέρουν τα ηλεκτρόνια στο ηλεκτρόδιο. Κατά την τρίτη	

γενιά βιοαισθητήρων, τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται απευθείας από το ένζυμο στο ηλεκτρόδιο.....	63
Εικόνα 5.4.1. : Τυπικά χρωματογραφήματα του προφίλ έκλυσης των αμινοξέων σε ένα πρότυπο εργασίας μέσου σημείου.....	69
Εικόνα 5.4.3.1 : Μέθοδοι ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών — πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα.....	74
Εικόνα 5.4.6.1. : Επίδραση του χρόνου υδρόλυσης (άξονας x, h) κατά την ανάλυση αμινοξέων στη μέση απόδοση θρεονίνης (πάνω) και σερίνης (κάτω) και ισολευκίνη (πάνω) και βαλίνη (κάτω).....	76

## Συντομογραφίες & Ακρωνύμια

FAO	
EU	
OECD	
ADEK	
PUFA	
BCM	
-COOH	
-NH <sub>2</sub>	
PDCAAS	
HPLC	Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης
GPP	
BCAA	
GPP	
DM	
PeNDF	
PDO	
BA	Βιογενείς αμίνες
FAA	
ACE	
OPA	
PITC	
RP-HPLC	Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης – Αντίστροφης φάσης
UPLC	
NIR	
LC-MS	
MRM	
MALDI-TOF-MS	matrix-assisted laser desorption/ionization
DAD	Ανιχνευτής δείκτη διάθλασης
FLD	Ανιχνευτής δείκτη διάθλασης
NanoUHPLC-DIA-HRMS	
SPR	
SCX	
HPDP	Γαλακτοκομικά προϊόντα υψηλής πρωτεΐνης
IC	Ιοντική χρωματογραφία

## 1 Γάλα

Το γάλα δεν είναι ένα οποιοδήποτε υγρό. Εκκρίνεται από όλα τα θηλυκά θηλαστικά - μια ομάδα που αποτελείται από περίπου 4500 διαφορετικά είδη (με μόνο το 20% των ειδών θηλαστικών να υπάρχει σήμερα). Ο σκοπός πίσω από αυτή την έκκριση αποσκοπεί κυρίως στην παροχή πλήρους διατροφής στο νεογέννητο. Οι πρωτεΐνες που υπάρχουν στο γάλα παίζουν ουσιαστικό ρόλο στην κάλυψη των διατροφικών αναγκών του βρέφους, συμπεριλαμβανομένης της παροχής των απαραίτητων αμινοξέων και αμινομάδων για τη σύνθεση άλλων μέσα στο σώμα. Εκτός από αυτούς τους ρόλους, οι οποίοι είναι σε μεγάλο βαθμό λειτουργικές απαιτήσεις του οργανισμού, οι πρωτεΐνες επιτελούν και άλλες σημαντικές λειτουργίες στο γάλα: δρουν ως ανοσοσφαιρίνες και ένζυμα ή αναστολείς ενζύμων κ.ο.κ. Εκτός από αυτές τις οργανικές ενώσεις, απαιτούνται πολλά ακόμη συστατικά: ενέργεια (που παρέχεται από τα λιπίδια και τη λακτόζη, ενώ οι πρωτεΐνες συμβάλλουν μόνο όταν χρειάζονται πέραν της ήδη λαμβανόμενης), απαραίτητα λιπαρά οξέα και βιταμίνες, καθώς και μέταλλα και νερό συνθέτουν αυτό το σύνθετο μείγμα που ονομάζεται "γάλα". Η ακαθάριστη σύνθεση του γάλακτος παρουσιάζει σημαντικές διαφορές μεταξύ των ειδών, οι οποίες είναι σχεδιασμένες για να καλύπτουν συγκεκριμένες ανάγκες, όπως οι διατροφικές απαιτήσεις με βάση την ωριμότητα του νεογνού κατά τη γέννηση, τον ρυθμό ανάπτυξης και τις ενεργειακές απαιτήσεις (που επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος). Αυτές οι διαφορές μεταξύ των ειδών αντικατοπτρίζουν τις ξεχωριστές ανάγκες για τις οποίες είναι προσαρμοσμένος κάθε τύπος γάλακτος (Fox and McSweeney, 1998- Fuquay et al., 2011- McSweeney and Fox, 2013- Fox et al., 2015). Παρά τον ειδικό σχεδιασμό της για κάθε είδος, η κατανάλωση από τον άνθρωπο του γάλακτος άλλων ειδών θηλαστικών χρονολογείται τουλάχιστον 8.000 χρόνια πριν (Kindstedt, 2012). Η παγκόσμια παραγωγή γάλακτος σημείωσε απότομη αύξηση τις τελευταίες δεκαετίες - από 500 εκατομμύρια τόνους το 1983 σε 811 εκατομμύρια τόνους το 2017 (FAO, 2018), αποδίδοντας περίπου 28 εκατομμύρια τόνους γαλακτοκομικών πρωτεϊνών, υποθέτοντας ότι η μέση περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες είναι περίπου 3,5%. Η Ινδία και η ΕΕ ηγούνται ως οι μεγαλύτεροι παραγωγοί γάλακτος παγκοσμίως με ποσοστό περίπου 20% η καθεμία και ακολουθούν οι Ηνωμένες Πολιτείες, η Κίνα, το Πακιστάν και η Βραζιλία. Τα γαλακτοκομικά αποτελούν βασικό συστατικό της ανθρώπινης διατροφής σε πολλά μέρη

του κόσμου - πάνω από 6 δισεκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως καταναλώνουν γάλα και τα προϊόντα του, με την πλειονότητα να προέρχεται από τις αναπτυσσόμενες χώρες (FAO, 2018). Μεταξύ των συστατικών του γάλακτος, το πρωτεϊνικό κλάσμα είναι αυτό που κατέχει την υψηλότερη αξία. Η αυξανόμενη αναγνώριση των διατροφικών πλεονεκτημάτων και των λειτουργικών ιδιοτήτων των πρωτεϊνών γάλακτος βοειδούς έχει οδηγήσει σε επαρκή ζήτηση παγκοσμίως για πολλούς τύπους παραγωγής διαφόρων πρωτεϊνικών συστατικών (π.χ. για βιομηχανικές εφαρμογές). Διαφορετικοί τύποι συστατικών πρωτεϊνών γάλακτος φιλοξενούν μια ποικιλία σύστασης και πρωτεϊνικού προφίλ που διαφέρουν ως προς τη θρεπτική σύνθεση, διαφέροντας έτσι και ως προς τις λειτουργικές τους ιδιότητες: έτσι είναι σε θέση να ικανοποιήσουν διαφορετικές βιομηχανικές εφαρμογές. Η ζήτηση για αυτά τα συστατικά είναι πιθανό να είναι υψηλή στο μέλλον λόγω των αλλαγών στις παγκόσμιες κοινωνικοοικονομικές συνθήκες και της μεγάλης αύξησης του πληθυσμού παγκοσμίως - θα υπάρχουν πάντα κάποιες ανάγκες για αυτούς τους τομείς. Εκτιμάται ότι μέχρι το 2050 ο παγκόσμιος πληθυσμός θα είναι 9,8 δισεκατομμύρια (FAO, 2017). Εκτός από αυτή την αύξηση του πληθυσμού, θα υπάρξει επίσης ανάγκη αύξησης της παραγωγής τροφίμων κατά περίπου 70%. Αυτό γίνεται σε μια προσπάθεια να ικανοποιηθούν οι πρόσθετες διατροφικές απαιτήσεις των ανθρώπων σε παγκόσμιο επίπεδο. Στις αναπτυσσόμενες χώρες αναμένεται σημαντική αύξηση, με την τελευταία έκθεση του ΟΟΣΑ/FAO να προβλέπει αύξηση της παγκόσμιας παραγωγής γάλακτος κατά 22% έως το 2027 σε σύγκριση με ό,τι είχε πραγματοποιηθεί μεταξύ 2015 και 2017 (OECD/FAO, 2018). Η χημεία του γάλακτος καθώς και οι φυσικοχημικές του ιδιότητες μελετώνται εδώ και σχεδόν δύο αιώνες: λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με το γάλα είναι ευρέως γνωστές λόγω της εκτεταμένης βιβλιογραφίας που υπάρχει για το θέμα αυτό. Στόχος του παρόντος κεφαλαίου είναι να εξετάσει τις πρωτεΐνες του γάλακτος από όσο το δυνατόν πιο γενική άποψη και να περιγράψει τα βασικά χαρακτηριστικά τους. Οι επιμέρους πρωτεΐνες τεκμηριώνονται με βάση τις κύριες χημικές και φυσικοχημικές ιδιότητές τους. Ακολουθεί μια επισκόπηση των αναλυτικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη των πρωτεϊνών του γάλακτος, καθώς και μια σφαιρική προοπτική των εμπορικά διαθέσιμων συστατικών πρωτεϊνών γάλακτος. Μέσα στο κείμενο παραπέμπεται πληθώρα άρθρων ανασκόπησης για να καθοδηγήσει τους αναγνώστες προς πρόσθετες πηγές για πιο εμπεριστατωμένες πληροφορίες.

Το γάλα είναι εξαιρετικά πολύπλοκο με αρκετές εκατοντάδες (ακόμη και χιλιάδες αν υπολογίσουμε όλα τα τριγλυκερίδια ξεχωριστά) μοριακά είδη. Τα κύρια συστατικά περιλαμβάνουν νερό, λιπίδια, σάκχαρα (λακτόζη) και πρωτεΐνες, ενώ άλλα πρόσθετα δευτερεύοντα συστατικά είναι παρόντα σε μικρότερες ποσότητες- όπως μέταλλα, βιταμίνες, ορμόνες, ένζυμα και άλλα. Η σύνθεση του γάλακτος - η οποία βασίζεται κυρίως στις διατροφικές ανάγκες του νεογέννητου - υφίσταται σημαντικές αλλαγές κατά τη διάρκεια της γαλουχίας. Οι πιο δραστικές τροποποιήσεις συμβαίνουν τις πρώτες ημέρες μετά τη γέννηση, όταν το κλάσμα των ανοσοσφαιρινών αυξάνεται σημαντικά. Αν και αρκετά σταθερή μέχρι τα μέσα της γαλακτοπαραγωγής, η σύνθεση του γάλακτος μετατοπίζεται σημαντικά προς τα τέλη της γαλακτοπαραγωγής, όπου αντανακλά τις μεταβολές της εκφύλισης του μαστικού αδένος μαζί με την αυξημένη εισροή συστατικών του αίματος: δεν παραμένει ομοιόμορφη καθ' όλη τη διάρκεια αυτής της περιόδου, αλλά μεταβάλλεται σύμφωνα με αυτές τις φυσιολογικές δυναμικές που εξελίσσονται με την πάροδο του χρόνου.

## Νερό

Το γάλα των περισσότερων ειδών αποτελείται κυρίως από νερό. Εκτός από την κάλυψη της ανάγκης του νεογνού για νερό, η περιεκτικότητα του γάλακτος σε νερό λειτουργεί ως διαλύτης για τα άλατα του γάλακτος, τη λακτόζη και τις πρωτεΐνες - ελέγχοντας έτσι τις ιδιότητες και τη σταθερότητά τους. Ρυθμίζει επίσης τον ρυθμό διαφόρων αντιδράσεων, όπως η αμαύρωση Maillard, η οξείδωση των λιπιδίων και η μικροβιακή ανάπτυξη- αυτές επηρεάζουν άμεσα τη σταθερότητα του γάλακτος. Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τη χημεία του νερού, συμπεριλαμβανομένης της μέτρησης και της σημασίας της στα τρόφιμα, ιδίως στα γαλακτοκομικά προϊόντα, υπάρχουν πολλές βιβλιογραφικές αναφορές όπως ενδεικτικά αναφέρονται αυτές των Duckworth (1975), Rockland and Beuchat (1987), Fennema (1996), Roos (1997, 2011), Franks (2000), Chieh (2006), McSweeney and Fox (2009), καθώς και στους Simatos et al. (2009, 2011)..



## Λιπίδια

Το λίπος του γάλακτος θεωρούνταν ιστορικά το πιο πολύτιμο συστατικό του. Στο παρελθόν, το γάλα εκτιμήθηκε κυρίως, αν όχι εξ ολοκλήρου, με βάση την περιεκτικότητά του σε λίπος. Η χημική σύνθεση των λιπιδίων του γάλακτος είναι εξαιρετικά πολύπλοκη και υπάρχουν ως ένα μοναδικό γαλάκτωμα (Nowakowski et al., 2022).

Τα λιπίδια του γάλακτος μπορούν σε γενικές γραμμές να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις κατηγορίες: Τα ουδέτερα λιπίδια αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος (98,5% των συνολικών λιπιδίων του γάλακτος) και αποτελούνται από εστέρες γλυκερόλης σε συνδυασμό με ένα, δύο ή τρία λιπαρά οξέα για μονο-, δι- και τριγλυκερίδια.

Μια άλλη κατηγορία είναι τα πολικά λιπίδια (που περιλαμβάνουν ένα σύνθετο μείγμα εστέρων λιπαρών οξέων γλυκερόλης ή σφιγγοσίνης) τα οποία συχνά περιέχουν φωσφορικό οξύ, ενώσεις που περιέχουν άζωτο ή σάκχαρα/ολιγοσακχαρίτες παρά το γεγονός ότι υπάρχουν σε χαμηλά επίπεδα (λιγότερο από 1% των συνολικών λιπιδίων του γάλακτος).

Εξαιρετικοί φυσικοί γαλακτωματοποιητές. Αυτά τα λιπίδια υπάρχουν σε υψηλές συγκεντρώσεις στη μεμβράνη των λιποσφαιρίων του γάλακτος, η οποία διατηρεί τα λιπίδια του γάλακτος σε ξεχωριστά σφαιρίδια. Εξασφαλίζει τη σταθερότητά τους τόσο από φυσική όσο και από βιοχημική άποψη.

Καροτενοειδή: μια σημαντική ομάδα λόγω της σημασίας τους ως φυσικές χρωστικές ουσίες (κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο) που είναι υπεύθυνες για τον χρωματισμό της απόχρωσης του βουτύρου και του τυριού - ορισμένοι καταναλωτές προτιμούν τα τυριά με έντονο χρώμα που λαμβάνονται μέσω εκχύλισματος πλούσιου σε καροτενοειδή annatto που προστίθεται για την προτίμηση του χρωματισμού. Αυτό το εκχύλισμα παρέχει καροτενοειδή που μπορούν να μετατραπούν σε βιταμίνη Α στο σκώτι- ως εκ τούτου, πρόσθετη διατροφική αξία εκτός από τη λειτουργία χρωστικής ουσίας.

Διάφορα λιπίδια: ένα μείγμα ενώσεων που δεν σχετίζονται χημικά μεταξύ τους ή με ουδέτερα/πολικά λιπίδια όπως η χοληστερόλη παίζουν μαζί με τις λιποδιαλυτές βιταμίνες μέλη της ομάδας ADEK- όπου κάθε άτομο παίζει συγκεκριμένους ρόλους μέσα σε αυτή

την ποικιλόμορφη σύνθεση χωρίς να υπάρχουν εμφανείς συνδέσεις μεταξύ τους με την πρώτη ματιά!

Η χημική σύνθεση των λιπιδίων του γάλακτος τα καθιστά παρόμοια με άλλα λιπίδια, αλλά έχουν ένα μοναδικό χαρακτηριστικό στη μεγάλη ποικιλία των λιπαρών οξέων που υπάρχουν. Θα μπορούσαν να υπάρχουν έως και 400 διαφορετικά λιπαρά οξέα στα λιπίδια του γάλακτος, αν και τα περισσότερα βρίσκονται σε πολύ μικρές ποσότητες. Τα λιπίδια του γάλακτος των μηρυκαστικών ξεχωρίζουν μεταξύ των φυσικών λιπιδίων ως η μόνη πηγή βουτυρικού (βουτανοϊκού) οξέος (C4:0)- έχουν επίσης υψηλές συγκεντρώσεις λιπαρών οξέων μεσαίας αλυσίδας [εξανοϊκού (C6:0), οκτανοϊκού (C8:0) και δεκανοϊκού (C10:0)], τα οποία βρίσκονται σε μεγάλο ποσοστό μόνο στο λάδι καρύδας και στο φοινικοπυρηνέλαιο εκτός από αυτά τα λίπη των μηρυκαστικών. Αυτά τα λιπαρά οξέα μικρής και μεσαίας αλυσίδας είναι μοναδικά λόγω του ότι είναι υδατοδιαλυτά, πτητικά με έντονο άρωμα και γεύση. Το λίπος του γάλακτος μηρυκαστικών έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) επειδή τα διατροφικά PUFA υδρογονώνονται από βακτήρια κοπράνων—αυτό μπορεί να επιτευχθεί με την ενθυλάκωση διατροφικών PUFA (**P**oly**u**nsaturated **F**atty **A**cids) ή πηγών πλούσιων σε PUFA μέσα σε διασταυρωμένες πρωτεΐνες ή θρυμματισμένους ελαιώδεις σπόρους, για να αποφευχθεί η βιοϋδρογόνωση και η επαφή με βακτήρια αλλοίωσης.: Το *B. fibrisolvens* δεν είναι ένα βακτήριο που είναι σε θέση να ολοκληρώσει αυτή τη διαδικασία, σχηματίζοντας έτσι συζευγμένο λινολεϊκό οξύ (γνωστό ως ρουμενικό οξύ) που παρουσιάζει ισχυρές αντικαρκινογόνες ιδιότητες. Αν και είναι εφικτά οκτώ ισομερή του συζευγμένου λινολαϊκού οξέος, το *cis*-9, *trans*-11 είναι το πιο βιολογικά ενεργό ((Pereira et al., 2022).

### Πρωτεΐνες

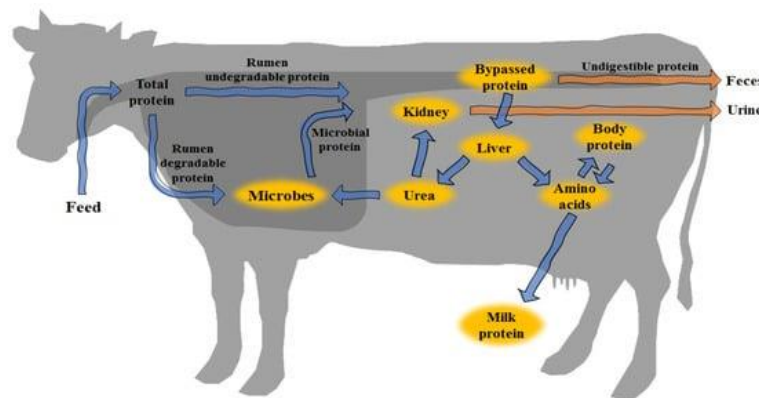
Οι πρωτεΐνες ασκούν την ισχυρότερη επιρροή τους στις ιδιότητες του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων του. Οι πρωτεΐνες που βρίσκονται στο γάλα είναι μοναδικές-λόγω της τεχνολογικής τους σημασίας, έχουν αποτελέσει αντικείμενο εκτεταμένης μελέτης, η οποία τις έχει καταστήσει ίσως το πιο καλά κατανοητό σύστημα πρωτεϊνών τροφίμων. Η έρευνα για τις πρωτεΐνες του γάλακτος χρονολογείται από τις αρχές του 19ου αιώνα: Ο J.J. Berzelius έκανε πρωτοποριακές αναφορές το 1814- ο H. Schubler ερεύνησε τη φυσικοχημική κατάσταση των πρωτεϊνών του γάλακτος το 1818- ο H. Braconnot

έγραψε ιστορία το 1830, καθώς δημοσίευσε την πρώτη εργασία στην οποία χρησιμοποιήθηκε ο όρος καζεΐνη. Μόλις το 1938 ο J.G. Mulder περιέγραψε μια μέθοδο για την παρασκευή πρωτεϊνών από το γάλα μέσω καταβύθισης με οξύ - κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας εισήγαγε τον όρο "πρωτεΐνη" ως συνώνυμο του "πρωτογενούς" ή "πρώτης τάξης". Η καζεΐνη ήταν η ονομασία που δόθηκε στην πρωτεΐνη που καταβυθίστηκε με οξύ (αν και ορισμένοι πρώτοι συγγραφείς αναφέρονταν στην πρωτεΐνη του γάλακτος που καταβυθίστηκε με οξύ ως καζεϊνογόνο, το οποίο μετατράπηκε από την πυτιά σε καζεΐνη και πήχτηκε παρουσία  $\text{Ca}^{2+}$ ) (van Slyke and Bosworth, 1913). Η κατάσταση αυτή είναι παρόμοια με τη μετατροπή του ινωδογόνου στο αίμα από τη θρομβίνη σε ινική, η οποία πήζει παρουσία  $\text{Ca}^{2+}$ . Ο όρος "καζεΐνη" υιοθετήθηκε αργότερα παγκοσμίως ως η αγγλική λέξη για την αδιάλυτη πρωτεΐνη του γάλακτος με pH 4,6. Ο O. Hammarsten τελειοποίησε τη μέθοδο για την όξινη (ισοηλεκτρική) καταβύθιση της καζεΐνης το 1883-85, γι' αυτό και η ισοηλεκτρική καζεΐνη συχνά αποκαλείται "καζεΐνη μετά Hammarsten".

Ένας βελτιωμένος τρόπος απομόνωσης της καζεΐνης περιγράφηκε από τους L.L. van Slyke και J.C. Baker το 1918- ήδη από το 1846, ο J.E. Schlossberger κατέγραψε τη διαίρεση της καζεΐνης σε δύο μέρη μετά την εργασία του Woodward το 1976, ενώ οι Danilewsky και Radenhausen πρότειναν ότι η ισοηλεκτρική καζεΐνη ήταν ετερογενής το 1880- επιβεβαιώθηκε από τον Hammarsten το 1883 και τον Lindqvist αργότερα το 1963. Ωστόσο, ο Hammarsten υποστήριξε ότι η καλά προετοιμασμένη καζεΐνη ήταν ομοιογενής. Μόνο όταν η έρευνα των Osborne και Wakeman μεταξύ του 1918 αποκάλυψε τη διαφορετική διαλυτότητα των διαλυμάτων αιθανόλης-HCl, προέκυψαν περισσότερα στοιχεία που υποδείκνυαν την ετερογενή ισοηλεκτρική καζεΐνη- οι μεταγενέστερες εργασίες των Linderstrøm-Lang κατά τα έτη 1925-1929 υποστήριξαν περαιτέρω αυτή την ανακάλυψη. Η ετερογένεια της καζεΐνης εδραιώθηκε μόνο όταν ο Pederson διεξήγαγε αναλυτικές δοκιμές υπερφυγοκέντρωσης το 1936, οι οποίες επικυρώθηκαν αργότερα από τον Mellander μέσω ηλεκτροφόρησης ελεύθερων ορίων το 1939 - και τα δύο πειράματα αναγνωρίστηκαν από την αναδρομική μελέτη του McMeekin που δημοσιεύθηκε το 1970. Κατά την καταβύθιση, αυτό που παραμένει ως υγρός ορός γάλακτος μετά από ισοηλεκτρική εκχύλιση είτε από αποβουτυρωμένο είτε από πλήρες γάλα αποδεικνύεται ότι δεν είναι πλούσιο αλλά μάλλον ένα αραιό διάλυμα που περιλαμβάνει πρωτεΐνες (περίπου

0,7% βοοειδούς γάλακτος), λακτόζη καθώς και άλατα και ακόμη και βιταμίνες με άλλα ιχνοστοιχεία που περιλαμβάνονται. Η κλασματοποίηση των πρωτεϊνών του ορού γάλακτος σε διαλυτά (λευκωματίνες) και αδιάλυτα (σφαιρίνες) κλάσματα επιτεύχθηκε από τον J. Sebelein το 1885 μέσω αλάτωσης με  $\text{MgSO}_4$ . Μια πρωτεΐνη κρυσταλλώθηκε από το αλβουμινικό κλάσμα του ορού γάλακτος από τον A. Wichmann το 1899 χρησιμοποιώντας  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  μαζί με οξίνιση - μια μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε αργότερα για την κρυστάλλωση της αλβουμίνης του ορού αίματος και της ωοαλβουμίνης. Κατά τα τέλη του 19ου αιώνα, οι πρωτεΐνες του ορού γάλακτος αναλύθηκαν με τεχνικές που ήταν διαθέσιμες εκείνη την εποχή- αυτές έδειξαν ομοιότητες μεταξύ των πρωτεϊνικών κλασμάτων του ορού γάλακτος και του αίματος, οδηγώντας στην υπόθεση ότι οι πρωτεΐνες περνούσαν απευθείας από το αίμα στο γάλα. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την ελάχιστη περαιτέρω μελέτη των πρωτεϊνών ορού γάλακτος μέχρι τη δεκαετία του 1930.

## 1.1 Πρωτεΐνες και αμινοξέα στο γάλα



Εικόνα 1.1: Πρωτεϊνικός μεταβολισμός των αγελάδων γαλακτοπαραγωγής (Kim & Lee, 2021)

Τα μηρυκαστικά λαμβάνουν πηγές αζώτου (N) που είναι διαθέσιμες για μεταβολισμό από την διατροφή, μικροβιακές πρωτεΐνες και ενδογενές N. Η διατροφική πρωτεΐνη χωρίζεται σε αποικοδομήσιμη πρωτεΐνη (RDP) και μη αποικοδομήσιμη πρωτεΐνη (RUP). Η RDP αποικοδομείται από τα μικρόβια της κοιλίας, στη συνέχεια συντίθεται σε μικροβιακή πρωτεΐνη ή παρακάμπτεται εν μέρει, ενώ το RUP παρακάμπτει άμεσα την κοιλιά. Το πέψιμο, που διαφεύγει από το στομάχι και φθάνει στο λεπτό έντερο, αποσυντίθεται και απορροφάται στην κυκλοφορία του αίματος και οι άπεπτες πρωτεΐνες απεκκρίνονται ως

κόπρανα. Τα απορροφούμενα ΑΑ περνούν μέσω του ήπατος στα νεφρά ή ρέουν στην κυκλοφορία του αίματος. Τα ΑΑ που φτάνουν στους μαστικούς αδένες συντίθενται σε πρωτεΐνη γάλακτος και στη συνέχεια εκκρίνονται στο γάλα.

Η σύνθεση πρωτεϊνών στο γάλα είναι μια εξαιρετικά περίπλοκη και υψηλού κόστους διαδικασία, επειδή η αποτελεσματικότητα μετατροπής της διατροφικής πρωτεΐνης σε πρωτεΐνη γάλακτος είναι πολύ χαμηλή στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής. Έτσι, ορισμένες μελέτες έχουν αυξήσει την πρωτεΐνη γάλακτος με τη χρήση συμπληρωμάτων πρωτεΐνης ή ένα μόνο αμινοξύ. Τα ΑΑ είναι τα δομικά στοιχεία της πρωτεΐνης και μπορούν επίσης να διεγείρουν την πρωτεϊνοσυνθετική οδό με τη χρήση των ΑΑ για την παραγωγή πρωτεΐνης γάλακτος (ιδιαίτερα με μεθειονίνη, λυσίνη και ιστιδίνη). Η σύνθεση του γάλακτος σχετίζεται τόσο με τη θρεπτική του αξία όσο με το εισόδημα των γαλακτοκομικών εκμεταλλεύσεων. Η περιεκτικότητα σε λιπαρά του γάλακτος έχει εξεταστεί εξονυχιστικά λόγω της θρεπτικής του αξίας αλλά η προτίμηση των καταναλωτών έχει μετατοπιστεί προς τα πρωτεϊνούχα προϊόντα και έχουν προκύψει μελέτες για την παραγωγή πρωτεΐνης γάλακτος. Οι αγελάδες παρουσιάζουν πολύ χαμηλή απόδοση στη μετατροπή του αζώτου (N) σε πρωτεΐνη στο σώμα ή στο γάλα τους: η αποτελεσματικότητα χρήσης του N είναι 25-35% . Σύμφωνα με το Εθνικό Συμβούλιο Ερευνών (NRC) (2001), η μέγιστη απόδοση γάλακτος και πρωτεΐνης γάλακτος αποδίδεται στο 22% της διαιτητικής CP. Για να την αντιμετωπίσει αυτό το πρόβλημα έχουν προταθεί κάποιες λύσεις όπως η χορήγηση συμπληρωμάτων πρωτεΐνης από το στόμα ή ενέσιμα. Μια γραμμική αύξηση στην απόδοση γάλακτος (26,6 έως 28,0 kg/ημέρα) και στην απόδοση πρωτεΐνης γάλακτος (940 έως 969 g/ημέρα) παρατηρήθηκε όταν οι σουηδικές κόκκινες αγελάδες τράφηκαν με δίαιτες βασισμένες σε ενσίρωση χόρτου – φρέσκο χόρτο με αυξημένη υγρασία (15,3% της CP), με διάφορα επίπεδα SBM (17,3%, 19,0% και 21,0% της CP) στην πρώιμη γαλουχία τους. Με την μέθοδο της έγχυσης καζεϊνικού νατρίου, καζεϊνικού ασβεστίου ή ενζυματικά υδρολυμένης καζεΐνης σε αγελάδες Holstein που τρέφονταν με δίαιτες που περιείχαν SBM (14,2% CP) ή SBM συν άλευρο γλουτένης καλαμποκιού (13,8% CP), η ομάδα καζεϊνικού νατρίου παρουσίασε αυξητικές τάσεις απόδοσης γάλακτος. Η παροχή πρωτεϊνούχας τροφής φαίνεται να είναι μια πιο σίγουρη μέθοδος για την αύξηση της παραγωγικότητας της αγελάδας, σε σύγκριση με άλλες μεθόδους, ωστόσο, οι τροφές με υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες στη δίαιτα αγελάδων γαλακτοπαραγωγής έχουν

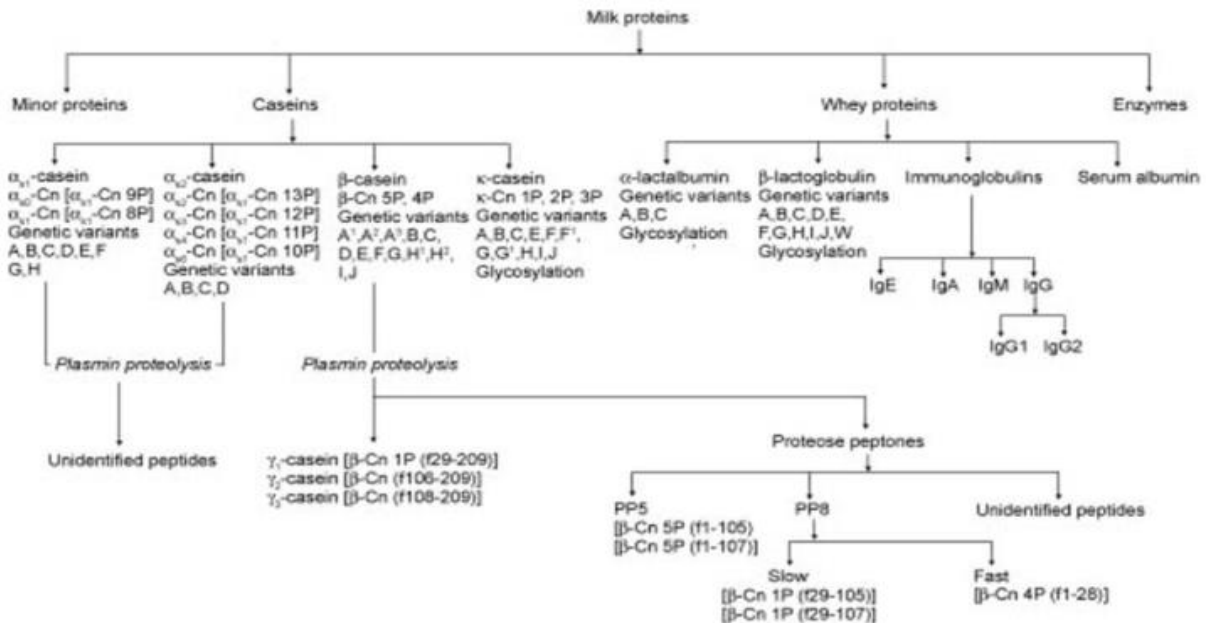
πολλά προβλήματα, όπως υψηλό κόστος, υψηλή απέκκριση N και περιβαλλοντική μόλυνση. Το πλεονέκτημα της ενδοφλέβιας έγχυσης είναι ότι μας επιτρέπει να ενσωματώσουμε τα αμινοξέα στην κυκλοφορία του αίματος του σώματος του ζώου

Λόγω της εξαιρετικής θρεπτικής αξίας των προϊόντων εμπλουτισμένων με αποξηραμένες γαλακτοκομικές πρωτεΐνες, τα οποία παρασκευάζονται από αγελαδινό γάλα, τα προϊόντα αυτά θεωρούνται συστατικά τροφίμων υψηλής αξίας. Αυτά τα εμπλουτισμένα με πρωτεΐνες συστατικά χρησιμοποιούνται στη σύνθεση των προϊόντων διατροφής προκειμένου να δεσμεύουν και να γαλακτωματοποιούν το λίπος, να δεσμεύουν και να παγιδεύουν το νερό και να παγιδεύουν και να σταθεροποιούν τον αέρα. Αυτές οι φυσικοχημικές και λειτουργικές ιδιότητες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην τροποποίηση των υφολογικών και ρεολογικών χαρακτηριστικών των τυποποιημένων τροφίμων, καθώς και στη συμβολή στη σταθερότητα και την αισθητηριακή ελκυστικότητα του προϊόντος. Ως αποτέλεσμα των δυνατοτήτων χρήσης τους σε τρόφιμα και εξειδικευμένα διατροφικά σκευάσματα, τα υδρόλυτα πρωτεϊνών γάλακτος και τα βιοενεργά πεπτίδια που παράγονται από πρωτεΐνες γάλακτος έχουν αναδειχθεί ως πιθανά μοναδικά συστατικά και διατροφικά προϊόντα. Το κανονικό γάλα βοοειδών είναι ένα πολύ πολύπλοκο σύστημα που περιλαμβάνει περίπου 3,5% κατά βάρος πρωτεΐνες. Η πρωτεΐνη χωρίζεται γενικά σε δύο πρωταρχικά μέρη ανάλογα με το πόσο καλά διαλύεται στο νερό. Οι καζεΐνες, οι οποίες αντιπροσωπεύουν περίπου το 80% του συνολικού αζώτου του γάλακτος, είναι αδιάλυτες στα ισοηλεκτρικά τους σημεία (~ pH 4,6) σε θερμοκρασίες που υπερβαίνουν τους 8 βαθμούς Κελσίου. Ως αποτέλεσμα, καθιζάνουν από το γάλα υπό αυτές τις συνθήκες. Από την άλλη πλευρά, το 20% του συνολικού αζώτου είναι διαλυτό στον ορό, με το 15% περίπου να είναι πρωτεΐνες ορού γάλακτος και τα υπόλοιπα συστατικά να είναι μη πρωτεϊνικά αζωτούχα συστατικά. Παρά το γεγονός ότι η πλειονότητα των πρωτεϊνών ορού γάλακτος είναι αδιάλυτες στα ισοηλεκτρικά τους σημεία (περίπου pH 5) όταν η ιοντική ισχύς είναι πολύ χαμηλή, είναι διαλυτές σε αυτό το pH στο ιοντικό περιβάλλον του γάλακτος. Υπάρχουν τέσσερις κύριες πρωτεΐνες (γονιδιακά προϊόντα) που συνθέτουν το πολύ ετερογενές κλάσμα καζεΐνης. Αυτές περιλαμβάνουν τις καζεΐνες as1-, as2-, - και κ-καζεΐνες, καθώς και τις β-καζεΐνες και γ-καζεΐνες, οι οποίες παράγονται από την καζεΐνη μέσω πρωτεολυτικών διεργασιών. Επιπλέον, υπάρχουν και άλλες δευτερεύουσες πρωτεΐνες και πεπτίδια που είναι παρόντα.



Οι αs1- και β-καζεΐνες δεν περιλαμβάνουν καθόλου κυστεΐνη ή κυστίνη, αλλά οι αs2- και κ-καζεΐνες έχουν η καθεμία δύο κατάλοιπα μισής κυστίνης που βρίσκονται γενικά με τη μορφή ομοιογενών δισουλφιδικών δεσμών. Η παρουσία υψηλής περιεκτικότητας προλίνης στις καζεΐνες έχει την τάση να εμποδίζει τη δημιουργία δευτεροταγών δομών. Επιπλέον, τα πρωτεϊνικά μόρια είναι μικροσκοπικές, αμφιπαθή ( περιέχουν πολικό και μη πολικό τμήμα κάνοντας τα και υδρόφιλα και λιπόφιλα), τυχαία συσπειρωμένες, κάπως ανοικτές ρευματομορφικές δομές και έχουν την τάση να αυτοσυνδέονται (μόρια της καζεΐνης τείνουν να συσσωματώνονται μεταξύ τους / self-association). Η παρουσία γενετικού πολυμορφισμού μεταξύ των καζεϊνών, ο οποίος οδηγεί σε διαφοροποιήσεις στη σύνθεση των αμινοξέων, σε διαφορετικούς βαθμούς φωσφορυλίωσης και σε διαφοροποιήσεις στη γλυκοζυλίωση της κ-καζεΐνης, συμβάλλει στη μεταβλητότητα του καθαρού φορτίου της πρωτεΐνης, της υδρόφιλης ιδιότητας και της δέσμευσης μετάλλων και, κατά συνέπεια, επηρεάζει τη συμπεριφορά των πρωτεϊνών του γάλακτος κατά τις διαδικασίες παρασκευής, όπως η πυτιά και η ζελατινοποίηση. Ως αποτέλεσμα των περιοχών υψηλής υδροφοβικότητας και της κατανομής φορτίου που προκύπτει από την αλληλουχία αμινοξέων, τη φωσφορυλίωση και τη γλυκοζυλίωση, οι καζεΐνες είναι επιρρεπείς στο σχηματισμό ενώσεων μεταξύ τους. Οι καζεΐνες, οι οποίες βρίσκονται στο γάλα, βρίσκονται με τη μορφή μικκυλίων, τα οποία είναι μαζικές κολλοειδείς ενώσεις που έχουν γενικά σφαιρικό σχήμα. Αυτά τα μικκύλια κυμαίνονται σε μέγεθος από περίπου 30 έως 600 νανόμετρα και έχουν μοριακό βάρος κοντά στα  $10^8$  Da. Αυτά τα μικκύλια μπορούν να απομονωθούν από τις μοριακά διασκορπισμένες πρωτεΐνες ορού γάλακτος με τη διαδικασία της υπερφυγοκέντρωσης. Τα μικκύλια καζεΐνης είναι στενά συσκευασμένα στο γάλα, με περίπου  $10^{14} \pm 10^{16}$  μικκύλια ανά χιλιοστόλιτρο γάλακτος. Αυτά τα μικκύλια απέχουν περίπου δύο διαμέτρους μικκυλίων το ένα από το άλλο λόγω της στενής τους εγγύτητας. Υπάρχει σημαντικός βαθμός ετερογένειας στο πρωτεϊνικό κλάσμα του ορού γάλακτος, το οποίο περιλαμβάνει την κύρια πρωτεΐνη του ορού γάλακτος, τη β-λακτοσφαιρίνη, καθώς και α-λακταλβουμίνη, λευκωματίνη ορού αίματος, ανοσοσφαιρίνες, πεπτόνες πρωτεόζης που προέρχονται από την καζεΐνη, πλήθος δευτερευουσών πρωτεϊνών, όπως η λακτοπεροξειδάση και η λακτοτρανσφερρίνη, και μια ποικιλία ενζύμων. Οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος, σε αντίθεση με τις καζεΐνες, έχουν σφαιρική διαμόρφωση και ένας σημαντικός αριθμός αλληλουχιών τους συμμορφώνεται με οργανωμένες δομές. Σε σύγκριση με τις καζεΐνες, οι δομές αυτές παρουσιάζουν

υψηλότερο βαθμό υδρόφιλης, χαμηλότερο βαθμό αμφιπαθητικότητας και πιο περιορισμένη δυνατότητα αυτοσυσχέτισης. Επιπλέον, είναι πιο ευαίσθητες στη θερμότητα, αλλά λιγότερο ευαίσθητες στις μεταβολές της ιοντικής ισχύος και του pH.



**Εικόνα 1.2.1: Κατανομή πρωτεϊνών στο βόειο γάλα**

Οι McDermott et al. (2016) και Master & Macedo (2021) εμβαθύνουν στο ρόλο των πρωτεϊνών και των αμινοξέων στο γάλα, παρουσιάζοντας πολύτιμες πληροφορίες. Οι McDermott et al. (2016) εξέτασαν διεξοδικά την επίδραση των βιοδραστικών μορίων του γάλακτος - συμπεριλαμβανομένων των γαλακτοκομικών λιπαρών, των πρωτεϊνών, των μικροθρεπτικών συστατικών και των βιταμινών - στους δείκτες φλεγμονής σε διάφορους ιστούς. Η εργασία υπογράμμισε τη δυνητική αντιφλεγμονώδη δράση που κρύβεται στη σύνθεση των πρωτεϊνών και των αμινοξέων των γαλακτοκομικών προϊόντων, ενώ άγγιξε επίσης τη βάση για το πώς τα κορεσμένα λιπαρά οξέα μπορούν να πυροδοτήσουν προφλεγμονώδεις δείκτες. Συζητήθηκε η αντισταθμιστική επίδραση που μπορεί να έχουν άλλα λιπαρά οξέα ή συστατικά των γαλακτοκομικών προϊόντων ως απάντηση σε αυτούς τους εκλυτικούς παράγοντες. Πρόσθετες εργασίες των Master & Macedo (2021) μαζί με τους Da Silva & Rudkowska (2015) ρίχνουν φως σε αυτό το θέμα. Μια μελέτη αξιολόγησης διεξήχθη από τον (2016) σχετικά με την αποτελεσματικότητα της



φασματοσκοπίας μέσου υπερύθρου (Mid-infrared spectroscopy – MIR) στην πρόβλεψη της σύνθεσης της πρωτεΐνης γάλακτος και των ελεύθερων αμινοξέων στο γάλα βοοειδών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε επίπεδο ποσοτικοποίησης, η φασματοσκοπία μέσου υπερύθρου μπορούσε να προβλέψει τα πρωτεϊνικά κλάσματα καθώς και ορισμένα ελεύθερα αμινοξέα που υπάρχουν στο γάλα, γεγονός που υποδεικνύει τις δυνατότητες αυτής της τεχνολογίας. Η ακρίβεια της πρόβλεψης τονίστηκε ως μέτρια (Moderate strength) που παρατηρήθηκε για τα πρωτεϊνικά κλάσματα και αδύναμη για τα ελεύθερα αμινοξέα, ενώ άλλες μελέτες πρότειναν αντιφλεγμονώδη δράση μέσω αμινοξέων ή πρωτεϊνών. Η ανασκόπηση των Da Silva & Rudkowska, 2015, παρουσίασε το ρόλο των βιοδραστικών μορίων των γαλακτοκομικών προϊόντων, συμπεριλαμβανομένων των μικροθρεπτικών συστατικών και των βιταμινών, μαζί με τους δείκτες φλεγμονής σε διάφορους ιστούς λόγω της επίδρασης που έχουν τα κορεσμένα λιπαρά οξέα στους προφλεγμονώδεις δείκτες. Οι Master & Macedo (2021) εξέτασαν τον αντίκτυπο της συμπληρωματικής χορήγησης πρωτεϊνών και αμινοξέων στην απόδοση και την αποκατάσταση μετά την άσκηση. Οι πρωτεΐνες γάλακτος βρέθηκαν στη μελέτη να είναι αποτελεσματικά συστατικά του συμπληρώματος πρωτεϊνών που θα μπορούσαν να οδηγήσουν στη σύνθεση μυϊκής πρωτεΐνης καθώς και στην ενίσχυση της άλιπης μάζας: παράλληλα με την προώθηση της αποκατάστασης από την άσκηση. Ωστόσο, ενώ ήταν ιδιαίτερα περιζήτητα για αυτά τα οφέλη, τα αποτελέσματα από τη συμπλήρωση αμινοξέων δεν ήταν αρκετά πειστικά - αυτά περιελάμβαναν αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας, γλουταμίνη ή λευκίνη, καθώς άλλα συγκεκριμένα παραδείγματα μπορεί επίσης να μην δικαιολογούν με βάση τα διαθέσιμα στοιχεία σύμφωνα με άλλες μελέτες. Παρά τα μικτά ευρήματα, και οι δύο ερευνητικές εργασίες προσφέρουν χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με το πώς οι πρωτεΐνες και τα αμινοξέα στο γάλα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες για την ποιότητα της σύνθεσης ή ως αντιφλεγμονώδεις παράγοντες: οι οποίοι υποστηρίζουν διαφορετικές πτυχές που σχετίζονται με τη σωματική δραστηριότητα. Ένα άτομο μπορεί να χρησιμοποιήσει αυτά τα ευρήματα, συμπεριλαμβανομένων περισσότερων λεπτομερειών μέσω της έρευνας για πρόσθετα αποτελέσματα για την υγεία: λόγω της πρόσληψης πρωτεϊνών και αμινοξέων γάλακτος που επηρεάζονται έτσι από αυτό που καταναλώνουν κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου. Η συγκεκριμένη ερευνητική εργασία των Puspasari et al. (2024) εμβαθύνει στη διερεύνηση των επιδράσεων μιας ουσίας που ονομάζεται "απόσταγμα κοτόπουλο-βότανο" (αποτελείται

από μια συνένωση κοτόπουλου ελεύθερης βοσκής, κόκκινου τζίντζερ, καστανής ζάχαρης, μελιού, σιγαμέλαιου, μοσχοκάρυδου, αλατιού και νερού) στα επίπεδα δύο σημαντικών συστατικών του γάλακτος: της προλακτίνης και της λακτοφερρίνης. Χρησιμοποιώντας ως πειραματικό μοντέλο θηλάζοντες αρουραίους, η μελέτη εξετάζει πώς αυτή η ουσία μπορεί να επηρεάσει την παραγωγή και τη σύνθεση του γάλακτος. Η έρευνα στοχεύει στην κατανόηση των πιθανών μηχανισμών μέσω των οποίων το "κοτόπουλο-βότανο" θα μπορούσε να τροποποιήσει τη διαδικασία παραγωγής και έκκρισης γάλακτος από τους μαστικούς αδένες στους μαστούς, παρέχοντας έτσι νέες γνώσεις για πιθανές παρεμβάσεις στη βελτίωση της ποιότητας και της ποσότητας του μητρικού γάλακτος. Η ίδια μελέτη σηματοδότησε επίσης ότι παρατηρήθηκε γαλακτογόνο δράση IgA, η οποία είναι απόγονος, υποδηλώνοντας έτσι ότι η πρόσληψη πρωτεϊνών διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο κατά τη διάρκεια της γαλουχίας. . Σε μια άλλη εργασία οι Hohmann et al., (2020) εξέτασαν τη σύνθεση της β-καζεΐνης στο γάλα βοοειδών, η οποία διακρίνεται σε τύπους A1 και A2, όπου τα A1 και A2 αναφέρονται σε δύο κύριες γενετικές παραλλαγές (ή αλληλόμορφα) της β-καζεΐνης, μιας σημαντικής πρωτεΐνης που βρίσκεται στο γάλα των βοοειδών (Hohmann et al., 2020). Η μελέτη κατέδειξε πιθανούς κινδύνους για την υγεία ως αποτέλεσμα της BCM-7 λόγω της πέψης από το γάλα A1 και A2: χαρακτηριστικά που μοιάζουν με οπιοειδή, πιθανώς υπεύθυνα για την πρόκληση διαφόρων ασθενειών. Μια μελέτη των Kang et al. (2019) για το γάλα διερεύνησε: τη σχέση μεταξύ της υγείας των οστών και της περιεκτικότητας σε ασβέστιο με τη σύνθεση των πρωτεϊνών στο γάλα καθώς και τις επιπτώσεις στην υγεία λόγω του γονότυπου της καζεΐνης (συζητώντας τις επιπτώσεις) (Kang et al., 2019). Μια άλλη μελέτη διερεύνησε τις αλλαγές σε δομικό επίπεδο και την παροχή θρεπτικών συστατικών, οι οποίες συμβαίνουν κατά την πέψη ανασυσταθέντων αγελαδινών, κατσικίσια, πρόβειων γαλάτων από εμπορικές σκόνες πλήρους γάλακτος. Τα ευρήματα δείχνουν ότι τα ανασυσταθέντα γάλατα χωνεύονται παρόμοια με το φρέσκο επεξεργασμένο γάλα, αλλά διαφέρουν ανάλογα με τις επεξεργασίες - τονίζοντας τη σημασία των αμινοξέων στις καζεΐνες και τις πρωτεΐνες ορού γάλακτος- αυτά καθορίζουν την πεπτικότητα του γάλακτος και υπογραμμίζουν τη σημασία της πρωτεϊνικής σύνθεσης στις σκόνες γάλακτος. Συνοψίζοντας, οι ερευνητικές εργασίες αποτελούν ένδειξη των σημαντικών πληροφοριών που βρίσκονται συλλογικά και παίζουν ρόλο στις πρωτεΐνες του γάλακτος και τα αμινοξέα. Επισημαίνονται οι άμεσες επιπτώσεις τους στην παραγωγή γάλακτος, οι επιδράσεις που σχετίζονται με την υγεία και

η συμπεριφορά της πέψης. Τα αποτελέσματα αυτών των ευρημάτων μπορούν να βοηθήσουν άλλους ερευνητές να εμβαθύνουν στη λεπτή σχέση που υπάρχει μεταξύ της σύνθεσης των πρωτεϊνών στο γάλα, συμπεριλαμβανομένων των επιπτώσεων της στη γαλουχία καθώς και στην υγεία και την πέψη.

	Infant formula	Human	Bovine	Caprine	Ovine	Buffalo	Equine	Camel	Yak	Reindeer
Total casein	4.8	2.4-4.2	24.6-28	23.3-46.3	41.8-46	32-40	9.4-13.6	22.1-26.0	34.3-45.8	70-80
$\alpha_{s1}$ -Casein	1.74	0.77	8.0-10.7	0.0-13.0	15.4-22.1	8.9	2.4	n.d.	9.3-13.1	n.d.
$\alpha_{s2}$ -Casein	0.48	–	2.8-3.4	2.3-11.6	n.d.	5.1	0.2	n.d.	3.6-6.5	n.d.
$\beta$ -Casein	1.62	3.87	8.6-9.3	0.0-29.6	15.6-17.6	12.6-20.9	10.66	n.d.	15.0-20.6	n.d.
$\kappa$ -Casein	0.6	0.14	2.3-3.3	2.8-13.4	3.2-4.3	4.1-5.4	0.24	–	4.9-8.5	n.d.
$\gamma$ -Casein	0.36	–	0.8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Total whey protein	7.2	6.2-8.3	5.5-7.0	3.7-7.0	10.2-11	6	7.4-9.1	5.9-8.1	n.d.	13.4
$\beta$ -Lactoglobulin	–	–	3.2-3.3	1.5-5.0	6.5-8.5	3.9	2.55	–	3.4-10.1	n.d.
$\alpha$ -Lactalbumin	1.4-2.3	1.9-3.4	1.2-1.3	0.7-2.3	1.0-1.9	1.4	2.37	0.8-3.5	0.2-1.7	n.d.
Serum albumin	n.d.	0.4-0.5	0.3-0.4	n.d.	0.4-0.6	0.29	0.37	7-11.9	0.2-3.1	n.d.
Protease peptone	n.d.		0.8-1.2	n.d.	n.d.	3.31	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Lactoferrin	0.05	1.5-2.0	0.02-0.5	0.02-0.2	0.8	0.03-3.4	0.1-2.0	0.02-7.28	n.d.	n.d.
Lysozyme	n.d.	0.1-0.9	$(70-600) \times 10^{-6}$	$250 \times 10^{-6}$	$100 \times 10^{-6}$	$(120-152) \times 10^{-6}$	0.5-1.33	$(60-1350) \times 10^{-6}$	n.d.	n.d.
Osteopontin	0.01	0.138	0.018	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Immunoglobulins	n.d.	1.0-1.3	0.5-1.0	n.d.	0.7	10.66	1.63	n.d.	n.d.	n.d.
IgG	n.d.	0.03	0.15-0.8	0.1-0.4	n.d.	0.37-1.34	0.38	n.d.	n.d.	n.d.
IgA	n.d.	0.96	0.05-0.14	0.03-0.08	n.d.	0.01-0.04	0.47	n.d.	n.d.	n.d.
IgM	n.d.	0.02	0.04-0.1	0.01-0.04	n.d.	0.04-1.91	0.03	n.d.	n.d.	n.d.
CN:WP ratio	40:60	29:71-33:67	82:18	78:22	76:24	82:18	52:48	73:27-76:24	82:18	80:20-83:17

n.d., no data.

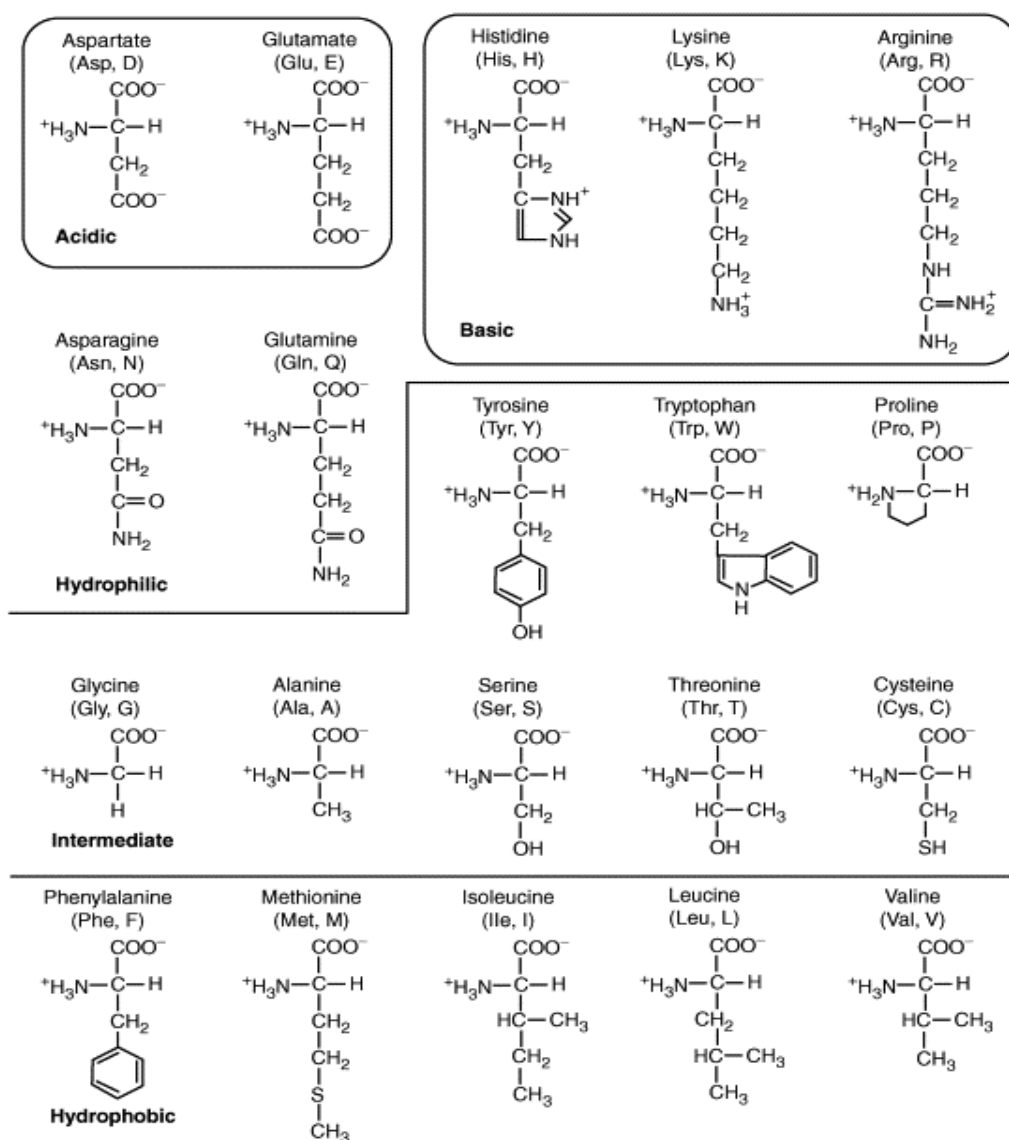
Milk protein system

**Εικόνα 1.2.2 : Προφίλ πρωτεϊνών ( $\text{g L}^{-1}$ ) του γάλακτος διαφορετικών ειδών  
(Crowley, 2016)**

## 2 Εισαγωγή στα αμινοξέα

Η πρόσληψη πρωτεϊνών υψηλής ποιότητας είναι πολύ σημαντική για τη διασφάλιση της ανάπτυξης, της συντήρησης και της υγείας των θηλαστικών. Η αξιολόγηση της ποιότητας των πρωτεϊνών σε τρόφιμα ή ζωοτροφές βασίζεται όχι μόνο στη σύνθεση των αμινοξέων αλλά και στη βιοδιαθεσιμότητα κάθε αμινοξέος (Herreman et al. 2020). Συγκεκριμένα, η βαθμονόμηση αμινοξέων, η οποία περιλαμβάνει τις συγκεντρώσεις των απαραίτητων ή ουσιαστικών αμινοξέων, χρησιμεύει για τον έλεγχο της ποιότητας των πρωτεϊνών με βάση τη σύγκριση με τις απαιτήσεις των θηλαστικών σε αμινοξέα. Τα απαραίτητα αμινοξέα είναι τα λυσίνη (Lys), μεθειονίνη (Met), κυστεΐνη (Cys), θρεονίνη (Thr), τρυπτοφάνη

(Trp), βαλίνη (Val), ισολευκίνη (Ile), λευκίνη (Leu), φαινυλαλανίνη (Phe) και ιστιδίνη (His) (Herreman et al.2020)(Adhikari et al., 2022). Επιπλέον, η ανάλυση και η αξιολόγηση αμινοξέων είναι σημαντική όχι μόνο στα γαλακτοκομικά προϊόντα αλλά και στη βιομηχανία γαλακτοκομικών ζωοτροφών για τον έλεγχο της ακρίβειας της συμπλήρωσης αμινοξέων. Αυτό είναι κρίσιμο επειδή τα αμινοξέα που λαμβάνουν τα ζώα μέσω της τροφής τους επηρεάζουν άμεσα τη σύσταση του γάλακτος που παράγουν. Συνεπώς, η σωστή ανάλυση και προσθήκη αμινοξέων στις ζωοτροφές είναι ουσιώδης για τη διασφάλιση της ποιότητας και της διατροφικής αξίας του παραγόμενου γάλακτος (Sefer et al., 2021).



Εικόνα 2.1: Δομή αμινοξέων

Τα αμινοξέα είναι τα δομικά στοιχεία των σημαντικών ενώσεων του σώματος που είναι γνωστές ως πρωτεΐνες. Σύμφωνα με τη γενική θεωρία της διατροφής, τα ελεύθερα αμινοξέα μπορούν να υποκαταστήσουν και να συμπληρώσουν βασικές ουσίες σε επαρκείς ποσότητες στη διατροφή που προέρχονται από πρωτεΐνες. Τα αμινοξέα εμπλέκονται σε σημαντικές φυσιολογικές λειτουργίες, όπως η παραγωγή ενέργειας, καθώς και στον ενδιάμεσο μεταβολισμό των θρεπτικών ουσιών που επηρεάζει τη χρησιμοποίηση των υδατανθράκων και των λιπών (Li & Wu, 2020)(Li et al.2021). Τα αμινοξέα επιφέρουν πολλές άλλες λειτουργίες, όπως η υποστήριξη της μεταφοράς θρεπτικών ουσιών και οξυγόνου και η μετάδοση νευρικών ερεθισμάτων. Η ποσοτικοποίηση των αμινοξέων είναι απαραίτητη όχι μόνο για την αξιολόγηση των πρωτεϊνών αλλά και για τον έλεγχο συμμόρφωσης και την επισημάνση των αμινοξέων σε προϊόντα ή δείγματα στη βιομηχανία τροφίμων και ζωοτροφών. Το προφίλ αμινοξέων χρησιμεύει ως βάση για τη βιολογική αξιολόγηση της θρεπτικής αξίας των πρωτεϊνών και εφαρμόζεται στην παρακολούθηση του ελέγχου στην επιστήμη των γαλακτοκομικών προϊόντων (Herreman et al.2020)(Landi et al., 2021).

## 2.1 Ορισμός και δομή

Οι ενώσεις αυτές ονομάζονται αμινοξέα επειδή είναι αμφοτερικές στη φύση και διαθέτουν τόσο όξινες όσο και βασικές ιδιότητες. Το όξινο τμήμα του μορίου περιέχει την ομάδα -COOH, η οποία μπορεί να απελευθερώσει ιόντα υδρογόνου ( $H^+$ ) και να ιονιστεί στο διάλυμα. Η βάση του μορίου είναι η ομάδα  $-NH_2$ , η οποία μπορεί να δέχεται ιόντα υδρογόνου ( $H^+$ ) όταν η ομάδα -COOH χάνει ιόντα υδρογόνου, επιτρέποντας στην ένωση να υπάρχει ως διπολικό ιόν σε υδατικό διάλυμα. Ως συνέπεια αυτών των διπλών ιδιοτήτων, τα αμινοξέα διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην ισορροπία οξέων-βάσεων των ζωντανών οργανισμών. Η ισορροπία αυτή είναι μια κατάσταση όπου ο αριθμός των κατιόντων (θετικά φορτισμένα ιόντα) είναι ίσος με τον αριθμό των ανιόντων (αρνητικά φορτισμένα ιόντα) (Hu et al., 2021; Kamei et al., 2020; Li et al., 2021).

Τα αμινοξέα είναι τα δομικά στοιχεία των πρωτεϊνών και απαιτούνται για την ανάπτυξη και την επιδιόρθωση των ιστών του σώματος. Είναι οργανικές ενώσεις που περιέχουν λειτουργικές ομάδες αμινών ( $-NH_2$ ) και καρβοξυλίου ( $-COOH$ ), μαζί με μια πλευρική

αλυσίδα (-R) που χαρακτηρίζει κάθε αμινοξύ. Είναι γνωστά περίπου 500 αμινοξέα, αλλά μόνο 20 είναι τα κοινά συστατικά των πρωτεϊνών στα τρόφιμα και στο ανθρώπινο σώμα. Τα αμινοξέα ταξινομούνται ως απαραίτητα, μη απαραίτητα ή υπό όρους (Li & Wu, 2020; Lopez & Mohiuddin, 2024). Τα απαραίτητα αμινοξέα δεν μπορούν να συντεθούν από τον άνθρωπο σε επαρκείς ποσότητες και, ως εκ τούτου, πρέπει να παρέχονται μέσω της διατροφής. Τα μη απαραίτητα αμινοξέα μπορούν να συντεθούν από τον άνθρωπο, εφόσον υπάρχει επαρκής παροχή των πρόδρομων ενώσεων. Τα υπό συνθήκη αμινοξέα δεν είναι συνήθως απαραίτητα, εκτός από τις περιπτώσεις ασθένειας ή στρες (Church et al., 2020; Lopez & Mohiuddin, 2024).

## 2.2 Βιολογική σημασία

Τα αμινοξέα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε βιολογικές διεργασίες, από την ανίχνευση θρεπτικών συστατικών μέσω του μονοπατιού mTORC1 (mTORC1) μέχρι την ενεργοποίηση της ορμόνης γκρελίνης. Μελέτες έχουν επίσης δείξει ότι ορισμένα αμινοξέα δρουν ως μόρια σηματοδότησης και εμπλέκονται στη ρύθμιση βασικών μεταβολικών μονοπατιών (Kelly & Pearce, 2020). Η ανάλυση των αμινοξέων δεν είναι επομένως μόνο σημαντική για την επισήμανση των τροφίμων για την ενημέρωση των καταναλωτών, αλλά και απαραίτητη για την αξιολόγηση της σχετικής ισορροπίας των αμινοξέων στη διατροφή για την υποστήριξη της ανάπτυξης, της επιδιόρθωσης και της διατήρησης της δομής και της λειτουργίας του σώματος. Οι πληροφορίες σχετικά με την περιεκτικότητα σε αμινοξέα χρησιμοποιούνται επίσης για την ανίχνευση πρωτεϊνών σε βιολογικά δείγματα. Δεδομένων των πολλαπλών ρόλων των αμινοξέων, η βιολογική ανάλυση αμινοξέων εφαρμόζεται επομένως σε διάφορους τύπους δειγμάτων από διαφορετικές πηγές (Singh-Povel et al. 2022).

Υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για την ανάλυση αμινοξέων για την αξιολόγηση της ποιότητας των πρωτεϊνών και την επισήμανση των πρωτεϊνών στα γαλακτοκομικά και τα εναλλακτικά γαλακτοκομικά προϊόντα. Οι γαλακτοκομικές πρωτεΐνες θεωρούνται ποιοτικά κορυφαία πηγή αμινοξέων και η βαθμολογία αμινοξέων με διόρθωση πεπτικότητας πρωτεΐνης (PDCAAS) κυμαίνεται από 1,0 έως 1,11 (Drewnowski, 2021; Roediger et al., 2020). Από όλες τις γαλακτοκομικές πρωτεΐνες, ο ορός γάλακτος διαθέτει υψηλότερη συγκέντρωση απαραίτητων αμινοξέων από την καζεΐνη (Goulding et al.,



2020). Διάφορα άτομα με διαφορετικές διατροφικές ανάγκες μπορούν να επωφεληθούν από μια ανάλυση αμινοξέων, συμπεριλαμβανομένων των χορτοφάγων και των vegans: μπορούν να αξιολογήσουν την πρόσληψη των απαραίτητων αμινοξέων τους. Η αντίστοιχη σύνθεση για αυτές τις κατηγορίες αναγράφεται στα εμπορικά διαθέσιμα προϊόντα διατροφής με τη σύνθεση των αμινοξέων, επιτρέποντας στους καταναλωτές να βασίσουν τεκμηριωμένες αποφάσεις ανάλογα με τις διατροφικές τους απαιτήσεις (Pourabbas et al. 2021).

### **2.3 Ο ρόλος των αμινοξέων στην ποιότητα των γαλακτοκομικών προϊόντων και τη διατροφή.**

Η μοναδική γεύση, τα πρόσθετα οφέλη για την υγεία και η σημαντική διατροφική αξία είναι οι κύριοι λόγοι για την κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων από τον άνθρωπο. Είναι γνωστό ότι τα γαλακτοκομικά προϊόντα αποτελούν καλή πηγή πρωτεϊνών, ασβεστίου και άλλων διαφόρων βασικών θρεπτικών συστατικών. Το γάλα θεωρείται πλήρης πηγή τροφής για τα νεαρά θηλαστικά, επειδή παρέχει όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη και την εξέλιξη. Οι πρωτεΐνες, με τη μορφή αμινοξέων, έχουν διάφορους σημαντικούς ρόλους στο σώμα, όπως η ρύθμιση των ορμονών, η λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, η επιδιόρθωση των ιστών και ο σχηματισμός των μυών, των οστών, του δέρματος και του αίματος. Οι γαλακτοκομικές πρωτεΐνες θεωρούνται πρωτεΐνες υψηλής ποιότητας ή πρώτης κατηγορίας, πράγμα που σημαίνει ότι διαθέτουν όλα τα απαραίτητα αμινοξέα στην κατάλληλη ποσότητα για την υποστήριξη της φυσιολογικής λειτουργίας του σώματος (Adhikari et al., 2022- Kim et al., 2020- Qin et al., 2022).

Η έρευνα στη σύνθεση των αμινοξέων των γαλακτοκομικών προϊόντων γίνεται όλο και πιο διαδεδομένη λόγω των σημαντικών επιπτώσεων που έχουν αυτές οι ενώσεις στην ποιότητα των προϊόντων καθώς και στην ανθρώπινη διατροφή και υγεία. Σύμφωνα με τους Van et al (2020), η σύνθεση των αμινοξέων επηρεάζεται από τον τρόπο επεξεργασίας των γαλακτοκομικών προϊόντων και αποτελεί επίσης έναν έμμεσο τρόπο καταγραφής της ποιότητας των πρωτεϊνών όσον αφορά την ανθρώπινη διατροφή (Van et. al, 2020). Έχοντας αυτό κατά νου, δεν είναι περίεργο που τα αμινοξέα κερδίζουν το ενδιαφέρον όχι μόνο της κοινότητας των γαλακτοκομικών προϊόντων και της επιστήμης των τροφίμων,

αλλά και των επιστημόνων της διατροφής και της δημόσιας υγείας (Wu, 2021). Σκοπός των παραπάνω είναι να επικεντρωθούμε στις γνώσεις που είναι διαθέσιμες σήμερα σχετικά με την παρουσία αμινοξέων στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Η έρευνα που διεξήχθη από τον Wu έως το 2021, αφορούσε το ρόλο των αμινοξέων και τις αναλυτικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται για αυτά (Wu, 2021).

## 2.4 Διατροφική εκτίμηση

Ο ρόλος των γαλακτοκομικών προϊόντων ως πρωταρχικών πηγών απαραίτητων αμινοξέων είναι ζωτικής σημασίας για τη διατροφική αξία των παγκόσμιων προμηθειών τροφίμων. Είναι γνωστό ότι η βιολογική αξία της πρωτεΐνης του γάλακτος είναι υψηλή και περιλαμβάνει όλα τα απαραίτητα αμινοξέα που απαιτούνται από τον άνθρωπο. Ωστόσο, η σύνθεση των αμινοξέων του γάλακτος μπορεί να μεταβληθεί σε μεγάλο βαθμό μέσω της επεξεργασίας. Για παράδειγμα, κατά την παρασκευή τυριού, μεγάλη ποσότητα αμινοξέων που υπάρχουν στο γάλα συγκεντρώνεται στο τυρόπηγμα, μειώνοντας έτσι σημαντικά το επίπεδο αμινοξέων στο κλάσμα του ορού γάλακτος που απομένει. Επίσης, η εμπορική υπερδιήθηση του τυρογάλακτος - που χρησιμοποιείται συνήθως για την παραγωγή συμπυκνωμένης πρωτεΐνης ορού γάλακτος - μειώνει περαιτέρω την περιεκτικότητα σε αμινοξέα από το διάλυμα (Alinovi et al. 2021). Με αυτόν τον τρόπο αυτές οι διαδικασίες στερούν τον πλούτο του γάλακτος σε απαραίτητα αμινοξέα- έχοντας πει αυτό όμως, αυτό που δεν μπορεί να παραβλεφθεί είναι επίσης η ικανότητα που έχει το γαλακτοκομικό προϊόν όταν πρόκειται να αποδώσει αυτά τα ζωτικά θρεπτικά συστατικά: ανεξάρτητα από το πόσο μεγάλη επεξεργασία μπορεί να έχει λάβει χώρα κατά μήκος της γραμμής παραγωγής του. Λόγω της αναγκαιότητας αυτών των αμινοξέων, και λαμβάνοντας υπόψη ότι τα γαλακτοκομικά προϊόντα καταναλώνονται ευρέως στην ανθρώπινη διατροφή, καθίσταται ζωτικής σημασίας η δυνατότητα ακριβούς προσδιορισμού των επιπέδων τους. Παρόμοια με άλλα συστατικά των τροφίμων, η ακρίβεια στον προσδιορισμό των αμινοξέων αποκτά σημασία, εάν η αριθμητική επισήμανση προορίζεται να μεταφέρει οποιοδήποτε νόημα (Md et al. 2020).

Προκειμένου να καταλήξουμε σε ακριβή αριθμητική διατροφική επισήμανση, πρέπει να έχουμε ακριβείς αναλυτικές πληροφορίες σχετικά με το από τι αποτελείται η τροφή μας- όλα εκείνα τα μεμονωμένα τρόφιμα που συνθέτουν τη διατροφή μας. Τα γαλακτοκομικά



προϊόντα εμπίπτουν σε αυτή την κατηγορία και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο ως πηγές απαραίτητων αμινοξέων μαζί με την πρωτεΐνη και το ασβέστιο- συστατικά άλλων ανόργανων συστατικών που πρέπει να υπάρχουν σε μια ανθρώπινη διατροφή. Αμινοξέα: αποτελούν τις βασικές δομικές μονάδες του σώματός μας. Τα χρειαζόμαστε για την ανάπτυξη, την επιδιόρθωση- συντήρηση για τις λειτουργίες όλων των κυττάρων και των ιστών του σώματος. Υπάρχουν δύο τύποι αμινοξέων που βρίσκονται στις πρωτεΐνες των γαλακτοκομικών προϊόντων: τα μη απαραίτητα από διατροφική άποψη (που συνήθως βρίσκονται σε επαρκείς ποσότητες μέσα σε μια κανονική διατροφή) και τα αντίστοιχα- τα απαραίτητα που πρέπει να περιλαμβάνονται στη διατροφή μας, ό,τι και να γίνει (Ratajczak et al.2021).

Τα αμινοξέα έχουν σημαντικό αντίκτυπο σε σχέση με τα λίπη και τις λιποδιαλυτές βιταμίνες στα δείγματα γαλακτοκομικών προϊόντων- επηρεάζοντας έτσι σημαντικά τόσο τη διατροφική ποιότητα όσο και τη βιολογική φύση του γάλακτος. Το μονοπάτι mTOR, υπό ειδική ρύθμιση από τα αμινοξέα σε επίπεδο πρωτεϊνοσύνθεσης, εμφανίζει μεγαλύτερη δραστηριότητα στο λεπτό έντερο σε σύγκριση με το γουρούνι, γεγονός που υπογραμμίζει τη σημασία των μεταφορικών αμινοξέων στην απορρόφηση και το μεταβολισμό των θρεπτικών συστατικών (Panwar et al., 2013). Τα αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας (Branched Chain Amino Acids/ BCAAs) είναι από τα πιο κρίσιμα, επειδή δρουν ως πρόδρομες ουσίες για τη σύνθεση των πρωτεϊνών του γάλακτος, ενώ παράλληλα εμπλέκονται στο μεταβολισμό των λιπιδίων μέσω της πρόσληψης από το μαστό μέσω της σύνθεσης λιπαρών οξέων - διαμορφώνοντας έτσι τη σύνθεση του λίπους του γάλακτος (Mandel-Gutfreund & Margalit, 1998). Οι σχέσεις μεταξύ βιταμινών και αμινοξέων είναι εξίσου ενδιαφέρουσες- οι βιταμίνες A, B και B6 παρουσιάζουν ξεχωριστή συγγένεια προς τα κατάλοιπα τυροσίνης, φαινυλαλανίνης και τρυπτοφάνης λόγω των ειδικών ρόλων τους που βασίζονται σε αλληλουχίες σύνδεσης με άλλες πρωτεΐνες που αποτελούν μέρος των λειτουργιών (Vincent et al., 2018). Διαφορετικές μεθοδολογίες πρωτεωμικής, όπως η αλληλουχία από πάνω προς τα κάτω ή η φασματομετρία μάζας, έχουν αποκαλύψει τον περίπλοκο κόσμο των πρωτεϊνών και πεπτιδίων στις μήτρες του γάλακτος- μια κατατοπιστική εικόνα που παρέχει λεπτομερή χαρακτηρισμό σχετικά με αυτές τις αλληλεπιδράσεις των συστατικών, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ανιχνευτές για τη μελέτη φυσιολογικών διεργασιών σε περαιτέρω στάδιο (Jiang et al., 2023-

Magnuson et al., 2022). Η αποκαρβοξυλίωση των αμινοξέων που οδηγεί στην παραγωγή βιογενών αμινών μπορεί να θέσει σε κίνδυνο την ποιότητα και την ασφάλεια των ιδιαίτερα ευαίσθητων αναλυτικών μεθόδων (Kasai et al., 2020) - έτσι μπορεί να επηρεαστεί η ποιότητα των γαλακτοκομικών προϊόντων. Η σύνθεση των λιπιδίων του γάλακτος μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με ακρίβεια μέσω φασματομετρίας μάζας, προκειμένου να κατανοηθούν καλύτερα οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ λιπιδίων και αμινοξέων: αυτό βοηθά στην εκτίμηση της διατροφικής αξίας (Ma et al., 2020). Ο τρόπος με τον οποίο τα λιπαρά οξέα διασπώνται και χρησιμοποιούνται από το σώμα μπορεί να αλλάξει αν κατασταλεί η έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων (ASIP σε επιθηλιακά κύτταρα του μαστού αγελάδας) δηλαδή τη μη έκφραση, γεγονός που συνεπάγεται γενετική επίδραση στα λιπίδια του γάλακτος που αλληλεπιδρούν με τα αμινοξέα (Xie et al., 2022). Τα συστατικά- αμινοξέα, λίπη, ακόμη και βιταμίνες- δεν βρίσκουν απλώς το δρόμο τους στη διατροφή μας- δεν επιτυγχάνονται απλώς σε βιολογικό επίπεδο, αλλά αντανακλούν μια αλληλεπίδραση. Μια λεπτή ισορροπία μεταξύ αυτών των συστατικών θα πρέπει επομένως να αναζητείται ανεξάρτητα από την πολυπλοκότητά της . Τα συστατικά περιλαμβάνουν βιολογικούς και γενετικούς παράγοντες. Οι πρώτοι επιδεινώνουν περαιτέρω την πολυπλοκότητα, ωστόσο η διαλεύκανση αυτών των διπλών δυναμικών είναι απαραίτητη για μια διττή προσέγγιση: βελτιστοποίηση της ποιότητας του γάλακτος από τη μία πλευρά και βελτιστοποίηση του διατροφικού περιεχομένου από την άλλη.

## 2.5 Κατηγοριοποίηση και λειτουργία

Αν και τα απαραίτητα αμινοξέα συνδέονται σε μεγάλο βαθμό με το ότι αποτελούν τις πρόδρομες ουσίες για τη σύνθεση πρωτεϊνών, μια σειρά άλλων βιολογικών διεργασιών εξαρτώνται επίσης από αυτά τα αμινοξέα. Τα "μη απαραίτητα" αμινοξέα απαιτούνται για διάφορες πτυχές του μεταβολισμού και συνήθως παρέχονται επίσης με τη διατροφή. Η ικανότητα του οργανισμού να συνθέτει αυτά τα μη απαραίτητα αμινοξέα μπορεί να είναι ανεπαρκής για να καλύψει τις απαιτήσεις μιας συγκεκριμένης φυσιολογικής κατάστασης. Εκτός από τη λειτουργία τους στη σύνθεση των πρωτεϊνών, τα αμινοξέα αποτελούν τον πρόδρομο για βιοδραστικά πεπτίδια, τα οποία μπορούν να ρυθμίσουν πολλές λειτουργίες του σώματος και να δράσουν τόσο στο γαστρεντερικό όσο και στο νευρικό σύστημα ως

σηματοδοτικά μόρια. Οι γαστρεντερικές ορμόνες περιέχουν επίσης αμινοξέα. Στα γαλακτοκομικά προϊόντα, τα ελεύθερα αμινοξέα μπορούν επίσης να συμβάλουν στην ανάπτυξη της γεύσης και να χρησιμεύσουν ως δείκτες ποιότητας του προϊόντος (Marccone et al. 2020).

Από διατροφική άποψη, τα αμινοξέα δεν αποτελούν μόνο τα δομικά στοιχεία των πρωτεϊνών, αλλά εξυπηρετούν ένα ευρύ φάσμα φυσιολογικών λειτουργιών που δεν σχετίζονται με τον δομικό τους ρόλο στους ιστούς του σώματος. Αυτά τα "μη απαραίτητα" ή "αναλώσιμα" αμινοξέα μπορούν να συντεθούν στο σώμα από άλλα αμινοξέα ή/και πρόδρομες ενώσεις. Ωστόσο, ορισμένα αμινοξέα είναι απαραίτητα για τη ζωή και θεωρούνται απαραίτητα στην ανθρώπινη διατροφή. Τα αμινοξέα ταξινομούνται με διάφορους τρόπους στη βιβλιογραφία. Συχνά αναφέρονται ως εκείνα τα αμινοξέα τα οποία ο οργανισμός δεν μπορεί να συνθέσει σε επαρκείς ποσότητες για να καλύψει τις απαιτήσεις για τη φυσιολογική ανάπτυξη και συντήρηση και συνεπώς πρέπει να παρέχονται με τη διατροφή. Σε περιόδους αυξημένων απαιτήσεων, όπως η ανάπτυξη, η εγκυμοσύνη και η γαλουχία, απαιτείται επίσης μια διαιτητική πηγή αυτών των αμινοξέων (Wu, 2021).

### 3 Ο ρόλος των αμινοξέων στα γαλακτοκομικά προϊόντα

Οι προσλαμβανόμενες πρωτεΐνες θεωρούνται σημαντική πηγή αμινοξέων. Ωστόσο, οι πρωτεΐνες του γάλακτος χωνεύονται και απορροφώνται εύκολα και έχουν πολύ υψηλή περιεκτικότητα σε αμινοξέα. Αυτά τα απαραίτητα αμινοξέα πρέπει να υπάρχουν σε καλή ισορροπία για να ενισχύσουν τη διατροφή και την υγεία του ατόμου. Οι άνθρωποι που δεν μπορούν να καταναλώσουν αρκετά αμινοξέα για να συνθέσουν τις πρωτεΐνες στο δικό τους σώμα πρέπει να βασίζονται στα ζώα για την παροχή αυτών των αμινοξέων. Τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης, συμπεριλαμβανομένων των γαλακτοκομικών προϊόντων, είναι οι κύριες πηγές των αμινοξέων που απαιτούνται από τον άνθρωπο. Εκτός του ότι παίζουν καθοριστικό ρόλο στην υγεία του ατόμου, τα αμινοξέα επηρεάζουν τη γεύση, την υφή και το χρώμα των τροφίμων. Ως εκ τούτου, ο προσδιορισμός και ο έλεγχος της σύνθεσης των αμινοξέων στα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι απαραίτητος για τους παρασκευαστές και τους καταναλωτές, προκειμένου να αξιολογηθεί η διατροφική ισορροπία και η ποιότητά τους (Li et al.2021)(Smith et al., 2022).

Μεταξύ όλων των απαραίτητων στοιχείων για τον άνθρωπο, τα αμινοξέα αποτελούν τα δομικά στοιχεία του οργανισμού και είναι κρίσιμος παράγοντας της διατροφής. Αποτελούν την πηγή για τη δημιουργία από τον οργανισμό πρωτεϊνών, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τους μύες, όλους τους ιστούς του σώματος και πολλές οργανικές ενώσεις και σωματικά υγρά. Η ισορροπία των υγρών, η μεταφορά οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών, το ανοσοποιητικό σύστημα, η συντήρηση και επιδιόρθωση των ιστών του σώματος, το δέρμα, τα μαλλιά και τα νύχια είναι μερικές από τις λειτουργίες του σώματος που ρυθμίζονται από τις πρωτεΐνες. Τα αμινοξέα είναι ζωτικής σημασίας για την ανθρώπινη υγεία, καθώς συμμετέχουν σε πολλές φυσιολογικές διεργασίες. Τα αμινοξέα είναι επίσης πρόδρομες ουσίες διαφόρων ουσιών που αποτελούν συστατικά των νεύρων και του νευρικού συστήματος. Εκτός από την άμεση διατροφική σημασία των αμινοξέων, η περιεκτικότητά τους καθορίζει επίσης τη διατροφική ποιότητα των διατροφικών πρωτεϊνικών πηγών (Lopez & Mohiuddin, 2023)(Wu, 2021).

#### 3.1 Ποιότητα και διατροφική αξία πρωτεϊνών

Η κατανάλωση γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων μπορεί να βελτιώσει αισθητά τη συνολική ποιότητα της διατροφής και τη θρέψη στην ανθρώπινη διατροφή. Οι

γαλακτοκομικές πρωτεΐνες είναι υψηλής διατροφικής ποιότητας επειδή αποτελούν πλούσια πηγή των απαραίτητων αμινοξέων, ιδίως των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας λευκίνη, ισολευκίνη και βαλίνη, τα οποία είναι ιδιαίτερα σημαντικά για τη σύνθεση των μυϊκών πρωτεϊνών. Πολλά αμινοξέα διαδραματίζουν επίσης ζωτικό ρόλο στις μεταβολικές διεργασίες του οργανισμού. Επιπλέον, τα ελεύθερα αμινοξέα ενισχύουν τη γεύση των τροφίμων και αποτελούν πρόδρομες ενώσεις οσμής, χρώματος και γεύσης που παράγονται κατά το μαγείρεμα ή άλλες θερμικές διεργασίες. Οι ζωικές πρωτεΐνες αποτελούν επίσης πηγή πλήρους προφίλ αμινοξέων, ενώ ορισμένες φυτικές πρωτεΐνες στερούνται ένα ή περισσότερα από τα απαραίτητα αμινοξέα. Το παρόν κεφάλαιο επικεντρώνεται στα γαλακτοκομικά προϊόντα- τα αμινοξέα τους, ειδικότερα, συζητούνται θεμελιωδώς όσον αφορά τη διατροφική αξία των πρωτεϊνών που περιέχουν. Οι κύριες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ποσοτικοποίηση των αμινοξέων από τα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι χρωματογραφικές τεχνικές, με ορισμένες τροποποιήσεις. Οι πιο συχνά εφαρμοζόμενες χρωματογραφικές τεχνικές για τον προσδιορισμό των αμινοξέων είναι η χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων, η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) ανταλλαγής κατιόντων και η HPLC αντίστροφης φάσης. Αυτές οι μέθοδοι συζητούνται όσον αφορά τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά τους (Master and Macedo2021).

Οι πρωτεΐνες αποτελούν τη βάση όλων των διαδικασιών της ζωής και θεωρούνται ζωτικό μέρος της ανθρώπινης διατροφής. Έχουν δομικό και μηχανικό ρόλο στη σύνθεση των μυών, των ιστών και των ζωτικών οργάνων, ενώ δρουν επίσης ως ένζυμα, φορείς λιπιδίων και βιταμινών, ορμόνες και αντισώματα, ελέγχοντας και ρυθμίζοντας διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες του σώματος. Η σύνθεση των αμινοξέων των πρωτεϊνών αποκαλύπτει την ποιότητα και τη διατροφική αξία μιας πρωτεΐνης καθώς και ενός προϊόντος διατροφής. Για την ανθρώπινη διατροφή, οι πρωτεΐνες από διάφορες πηγές πρέπει να είναι υψηλής ποιότητας. Οι ζωικές πρωτεΐνες θεωρούνται υψηλής διατροφικής αξίας επειδή περιέχουν όλα τα απαραίτητα αμινοξέα που απαιτούνται από τον άνθρωπο στις κατάλληλες αναλογίες. Μια πρωτεΐνη που περιέχει όλα αυτά τα απαραίτητα αμινοξέα στις ποσότητες που είναι απαραίτητες για τη βιολογική λειτουργία λέγεται ότι έχει υψηλή βιολογική αξία. Η βιολογική αξία μιας πρωτεΐνης σχετίζεται άμεσα με τη συγκέντρωση των απαραίτητων αμινοξέων (Gasco et al.2020)(Sá et al.2020).

### 3.2 Τύποι αμινοξέων που απαντώνται

Η περιεκτικότητα του γάλακτος σε πρωτεΐνες είναι σχετικά υψηλή και παρέχει όλα τα απαραίτητα αμινοξέα για τον άνθρωπο. Είναι ένα από τα πιο σημαντικά και πολύτιμα χαρακτηριστικά του γάλακτος. Το τυρί και άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα που παρασκευάζονται από γάλα θεωρούνται τρόφιμα υψηλής ποιότητας λόγω της σύνθεσης των αμινοξέων τους. Ολόκληρος ο οργανισμός χρειάζεται τα συγκεκριμένα μη απαραίτητα καθώς και τα απαραίτητα αμινοξέα για τη σύνθεση νέων και την επιδιόρθωση των υφιστάμενων πρωτεϊνών του σώματος, των ενζύμων και άλλων ενώσεων που περιέχουν άζωτο. Επομένως, το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα συμβάλλουν σημαντικά στη συνολική πρόσληψη αμινοξέων και πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη και την εξέλιξη ενός υγιούς οργανισμού. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες του γάλακτος έχουν υψηλή διατροφική αξία, καθώς αποτελούν καλή πηγή απαραίτητων αμινοξέων που, σε αντίθεση με τα συστατικά πρωτεΐνης ορού γάλακτος, δεν υπόκεινται σε μεγάλες διακυμάνσεις (Scholz-Ahrens et al., 2020)(Moughan, 2020).

Το γάλα αναγνωρίζεται γενικά ως καλή πηγή όλων των αμινοξέων, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που είναι απαραίτητα για τον άνθρωπο. Υπάρχουν περίπου 22 τύποι αμινοξέων που βρίσκονται στο γάλα, με τις σχετικές ποσότητες τους στο αγελαδινό γάλα να παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.1** (Landi et al., 2021). Εννέα από αυτά είναι απαραίτητα αμινοξέα που δεν συντίθενται από τον ανθρώπινο οργανισμό και πρέπει να προέρχονται από τη διατροφή μας. Αυτά τα απαραίτητα αμινοξέα είναι η ιστιδίνη, η ισολευκίνη, η λευκίνη, η λυσίνη, η μεθειονίνη, η φαινυλαλανίνη, η θρεονίνη, η τρυπτοφάνη και η βαλίνη και είναι ιδιαίτερα σημαντικά για τη διατροφή των παιδιών και των νέων.

**Πίνακας 3.1:** Σύνθεση ελεύθερων αμινοξέων του αγελαδινού νοπού. Οι τιμές είναι μέσοι όροι ( $\pm$ SD) και εκφράζονται σε mg ανά 100 g γάλακτος (Landi et al., 2021).

Σύμβολο	Ονομασία	Μέση συγκέντρωση
His	Ιστιδίνη	0,06
Ile	Ισολευκίνη	0,20
Leu	Λευκίνη	0,19
Lys	Λυσίνη	0,41
Phe	Φαινυλαλανίνη	0,24
Thr	Θρεονίνη	0,17
Trp	Τρυπτοφάνη	n.d.
Val	Βαλίνη	0,21
Non – essential amino acids		
AAAA	Ιστιδίνη	0,13
ABAA	Ισολευκίνη	0,13
Ala	Αλανίνη	0,91
Arg	Αργινίνη	0,34
Asn	Ασπαραγίνη	0,28
Asp	Ασπαρτικό οξύ	0,70
$\beta$ -Ala	B-Αλανίνη	0,13
Citr	Κιτρουλλίνη	0,14
Ethan	Αιθαναμίνη	1,16
Glu	Γλουταμικό οξύ	9,07
Gly	Γλυκίνη	1,52
Orn	Ορνιθίνη	0,08
Pea	Φαινυλαιθυλαμίνη	1,57
Phser	Φωσφοσερίνη	1,37
Pro	Προλίνη	0,48
Sarc	Σαρκοσίνη	0,14
Ser	Σερίνη	0,30
Taur	Ταυρίνη	1,38
Tyr	Τυροσίνη	0,11

Τα αμινοξέα που περιέχουν θείο, η μεθειονίνη και η κυστεΐνη, είναι σχετικά σπάνια στις περισσότερες φυτικές πρωτεΐνες, αλλά υπάρχουν στις πρωτεΐνες του γάλακτος σε επαρκείς ποσότητες και αναλογίες που επιτρέπουν την υψηλής ποιότητας σύνθεση πρωτεϊνών του σώματος. Το σιτάρι και η σίκαλη δεν έχουν ισορροπημένη σύνθεση αμινοξέων σε σχέση με τις απαιτήσεις του ανθρώπου. Η ανεπάρκεια αμινοξέων ή η περίσσεια μεταβολίσιμων πρωτεϊνών μπορεί να έχει επιβλαβή επίδραση τόσο στην απόδοση όσο και στη σύνθεση του γάλακτος (Church et al.2020)(Xiao & Guo, 2022).



### 3.3 Παράγοντες που επηρεάζουν τη σύνθεση

Ένας σημαντικός αριθμός μελετών έχει προσπαθήσει να προσδιορίσει την επίδραση διαφόρων παραγόντων, όπως η φυλή, η εποχή, η διατροφή και το στάδιο της γαλουχίας, στη σύνθεση των αμινοξέων των γαλακτοκομικών προϊόντων. Υπάρχουν σχετικά μικρές διαφορές στη σύνθεση των αμινοξέων των πρωτεϊνών στις διάφορες φυλές γαλακτοπαραγωγών βοοειδών. Αντίθετα, έχουν αναφερθεί έντονες εποχιακές διακυμάνσεις με υψηλότερα επίπεδα αρκετών απαραίτητων αμινοξέων, συμπεριλαμβανομένης της λυσίνης, της μεθειονίνης και της ιστιδίνης, το καλοκαίρι σε σχέση με το χειμώνα σε ορισμένες μελέτες. Αυτές οι διαφορές είναι πιθανό να σχετίζονται αιτιωδώς με τις αλλαγές στη σύνθεση των αμινοξέων των συμπληρωμάτων χόρτου και συμπυκνωμάτων κατά τη διάρκεια του έτους (PATEL et al., 2021 ; Jiang et al., 2021). Το στάδιο της γαλακτοπαραγωγής έχει επίσης βρεθεί ότι έχει σημαντική επίδραση στη σύνθεση των αμινοξέων των πρωτεϊνών σε ορισμένες μελέτες. Η διατροφή, ένας από τους πιο συχνά μελετώμενους παράγοντες, μπορεί επίσης να έχει σημαντική επίδραση. Όπως είναι αναμενόμενο, η σχέση μεταξύ διατροφής και σύνθεσης αμινοξέων είναι άμεση και αναλογική. Με άλλα λόγια, ο χειρισμός της δίαιτας είναι ένας αποτελεσματικός τρόπος όχι μόνο για να μεταβληθεί ο όγκος του παραγόμενου γάλακτος αλλά και για να μεταβληθούν οι συγκεντρώσεις των επιμέρους αμινοξέων που υπάρχουν στο γάλα (Connolly et al., 2023 ; Van et al., 2020 ; Reynaud et al. , 2021).

Η σύνθεση των αμινοξέων του γάλακτος δεν επηρεάζεται εύκολα - ωστόσο υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που μπορούν να την μεταβάλουν. Μελέτη των Onwulata et al. (2003) υπογράμμισαν ότι η υφή εξώθησης σε απομονωμένη πρωτεΐνη ορού γάλακτος (WPI) παρουσίασε αλλαγές στη διαλυτότητά της καθώς και στη σύνθεσή της λόγω περιβαλλοντικών μεταβολών που προκαλούνται από τις συνθήκες της διεργασίας (Onwulata et al., 2003). Παρατηρήθηκε ότι η αύξηση της περιεκτικότητας σε υγρασία προκάλεσε μια μικρή αύξηση της υδατοδιαλυτότητας της πρωτεΐνης, ενώ η β-λακτοσφαιρίνη μειώθηκε με υψηλότερα επίπεδα υγρασίας - παρόλο που η ποιότητα της πρωτεΐνης WPI παρέμεινε σχετικά αμετάβλητη, οι δομικές τροποποιήσεις επισήμαναν την ευαισθησία των μορίων στις περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως η θερμοκρασία ή η μηχανική δύναμη που εφαρμόζεται κατά τη διάρκεια των διαδικασιών παραγωγής, οι οποίες



διερευνήθηκαν περαιτέρω μέσω μιας άλλης μελέτης που επικεντρώθηκε στο ανθρώπινο μητρικό γάλα (HBM). Οι μεταβολίτες διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη του βρέφους, ιδίως τα αμινοξέα και τα λιπίδια μαζί με τους ολιγοσακχαρίτες του ανθρώπινου γάλακτος. Οι ενώσεις αυτές επισημαίνονται στην ανασκόπηση για τη συμβολή τους σε βασικά θρεπτικά συστατικά και βιοδραστικά συστατικά που υποστηρίζουν την ανάπτυξη του παιδιού κατά τη διάρκεια της πρώιμης ζωής (Garcia Rodenas et al., 2016; Yang et al., 2024). Η σύνθεση των αμινοξέων στο γάλα επηρεάζεται από μια σειρά παραγόντων που έχουν επισημανθεί σε διάφορες ερευνητικές μελέτες (Garcia Rodenas et al., 2016; Garwolińska et al., 2018; Onwulata et al., 2003). Για παράδειγμα, οι Qi & Onwulata (2003) σημείωσαν ότι οι αλλαγές στις συνθήκες εξώθησης κατά την υφή του απομονωμένου πρωτεϊνικού ορού γάλακτος οδήγησαν σε τροποποιήσεις της διαλυτότητας και της σύνθεσης της πρωτεΐνης. Αυτό οφειλόταν στη σχέση των επιπέδων υγρασίας με τη θερμοκρασία- παρόλο που οι δομικές αλλαγές υποδείκνυαν υψηλή ευαισθησία των πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένης της περιεκτικότητας σε β-λακτοσφαιρίνη, παρατηρήθηκαν κάποιες μικρές αυξήσεις υπό ορισμένες συνθήκες στο WPI. Στη μελέτη τους, οι Garwolińska & Namieśnik (2018) εμβάθυναν στο ανθρώπινο μητρικό γάλα (HBM) και στη σύνθεση των μεταβολιτών του- μια ακόμη οπτική γωνία προς την κατανόηση της σύνθεσης των αμινοξέων στο γάλα. Κατέδειξαν τη σημασία μεταβολιτών όπως οι ολιγοσακχαρίτες του ανθρώπινου γάλακτος, τα αμινοξέα και τα λιπίδια που συμμετέχουν στην ανάπτυξη των βασικών θρεπτικών συστατικών του βρέφους και επισήμαναν αυτές τις βιοδραστικές ενώσεις που παρέχονται από αυτά τα θρεπτικά συστατικά και βοηθούν στην ανάπτυξη του παιδιού στα πρώτα χρόνια της ζωής τους (Garwolińska et al., 2018).

Μια μελέτη που διεξήχθη από τους Garcia-Rodenas κ.ά. (2016) αποκάλυψε μια έρευνα σχετικά με τη σύνθεση αμινοξέων του μητρικού γάλακτος από μητέρες που ζούσαν σε αστικό κλοιό στην Κίνα. Με την έρευνα αποδείχθηκε ότι τόσο η λευκίνη και η μεθειονίνη αναγνωρίστηκαν ως τα πιο σημαντικά μεταξύ των απαραίτητων αμινοξέων, ενώ το γλουταμινικό οξύ και η γλουταμίνη υπερίσχυαν μεταξύ των άλλων. Το συμπέρασμα που εξήχθη από αυτή την έρευνα ήταν ότι η σύνθεση των αμινοξέων στο μητρικό γάλα κατοίκων αυτής της περιοχής δεν εμφανίζουν σημαντικές διαφορές με αντίστοιχα από άλλους γεωγραφικούς ή διατροφικούς παράγοντες (Garcia Rodenas et al., 2016).

Διάφοροι παράγοντες φαίνεται να επηρεάζουν τη σύνθεση των αμινοξέων στο γάλα με βάση τα ευρήματα των Ralli & Spyros (2023), Yang et al. (2022) και Madrigal et al. (2021). Σε μία άλλη έρευνα, έγινε ανάλυση του προφίλ των μεταβολιτών του τυριού γραβιέρα που πραγματοποιήθηκε από τους Ralli & Spyros (2023) με τη χρήση φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού  $^1\text{H}$  (NMR) και χημειομετρίας. Οι συγγραφείς αφού εξέτασαν τυριά από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές με ιδιαίτερη έμφαση σε αυτά της Κρήτης, διαπίστωσαν ότι η υψηλότερη περιεκτικότητα σε ολικά αμινοξέα υπήρχε στα τυριά που παράγονται στην ανατολική Κρήτη, γεγονός που υποδεικνύει την επίδραση της γεωγραφίας στα επίπεδα σύνθεσης των αμινοξέων (Madrigal et al., 2021; Ralli & Spyros, 2023; Yang et al., 2024).

Επιπλέον χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα χημειομετρικά, στατιστικά εργαλεία, μπόρεσαν να ταξινομήσουν αποτελεσματικά την γραβιέρα με βάση τις διαφορές σε διάφορα συστατικά, συμπεριλαμβανομένων των αμινοξέων και των λιπαρών οξέων, βοηθώντας έτσι στον χαρακτηρισμό του προϊόντος ως ΠΟΠ.

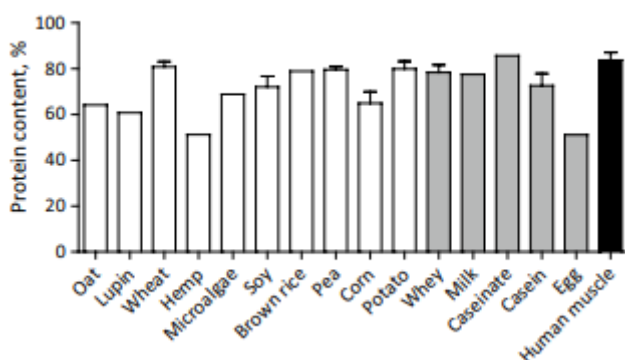
Οι Madrigal κ.ά. (2021) εμβάθυναν στην πρόσληψη πρωτεϊνών μεταξύ ισπανικών παιδιών ηλικίας ενός έως <10 ετών, εντοπίζοντας υψηλή συνεισφορά των πρωτεϊνών στη συνολική ενεργειακή πρόσληψη και για τις δύο ομάδες, με το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα να ξεχωρίζουν ως κύριες πηγές πρωτεϊνών. Όπως τονίστηκε στην μελέτη, η διατροφική πρωτεΐνη κατά τη διάρκεια της πρώιμης παιδικής ηλικίας χαρακτηρίζεται ως απαραίτητο στοιχείο για την αύξηση και την ανάπτυξη, προερχόμενο σε μεγάλο βαθμό από ζωικές πρωτεΐνες κατά προτίμηση έναντι των φυτικών πρωτεϊνών. Οι μελέτες αυτές καταδεικνύουν ότι η γεωγραφική θέση και τα βακτήρια θρεπτικών συστατικών του εδάφους ή οι διατροφικές πρακτικές παίζουν σημαντικό καθοριστικό ρόλο στα αμινοξέα που μπορούν να βρεθούν στο γάλα. Η σύνθεση των αμινοξέων του γάλακτος καθορίζεται από διάφορους παράγοντες: τη γεωγραφική θέση, τα βακτήρια του εδάφους και τη διατροφή. Κατανοώντας λοιπόν αυτά τα στοιχεία αντιλαμβανόμαστε τον τρόπο με τον οποίο η σύνθεση των αμινοξέων επηρεάζει την υγεία και την ανάπτυξη- τα στοιχεία περιλαμβάνουν την εφαρμογή συγκεκριμένων τροποποιήσεων που αφορούν αυτούς τους καθοριστικούς παράγοντες (Madrigal et al., 2021).

### 3.4 Προφίλ αμινοξέων σε διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα

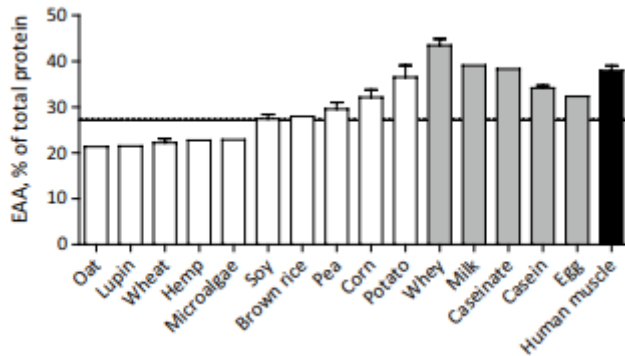
Η σύνθεση των αμινοξέων των γαλακτοκομικών προϊόντων εξαρτάται από το είδος του γαλακτοκομικού προϊόντος καθώς και από την προέλευση του γάλακτος- η μεγαλύτερη διαφοροποίηση παρατηρείται μεταξύ των ειδών. Η διαφορά αυτή οφείλεται σε συγκεκριμένες πρωτεϊνικές δομές που υπάρχουν σε κάθε είδος - έτσι, κάθε γαλακτοπαραγωγό ζώο έχει τη δική του ξεχωριστή γενετική ορμονική και διατροφική σύνθεση κατά την παραγωγή γάλακτος. Η σύνθεση των αμινοξέων ενός γαλακτοκομικού προϊόντος δεν εξαρτάται μόνο από τα επίπεδα των συστατικών αμινοξέων στο γάλα, αλλά μπορεί επίσης να επηρεαστεί από τις μεθόδους επεξεργασίας, ιδίως από τη θερμική επεξεργασία, μεταβάλλοντάς τα έτσι. Σε αυτή την ενότητα δίνεται η σύνθεση των αμινοξέων για μια ποικιλία γαλακτοκομικών προϊόντων από αγελάδα, κατσίκια, πρόβατο, βουβάλι, άλογο, καμήλα και τάρανδο με ανάλυση του τρόπου με τον οποίο το είδος, η διατροφή και η επεξεργασία επηρεάζουν το προφίλ των αμινοξέων αυτών των γαλακτοκομικών προϊόντων (Guha et al., 2021; Roy et al., 2020).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω τα αμινοξέα διαδραματίζουν ουσιαστικό ρόλο στην ανθρώπινη διατροφή, καθώς αποτελούν ένα από τα βασικά δομικά στοιχεία των πρωτεϊνών, που εμπλέκονται σε σημαντικές βιολογικές και μεταβολικές διεργασίες. Για τα άτομα που βρίσκονται σε πρώιμο στάδιο ανάπτυξης, τα εννέα λεγόμενα απαραίτητα αμινοξέα πρέπει να παρέχονται με τη διατροφή, καθώς δεν μπορούν να συντεθούν επαρκώς για να καλύψουν τις απαιτήσεις. Τα γαλακτοκομικά προϊόντα αποτελούν πλούσια πηγή αυτών των απαραίτητων αμινοξέων και θεωρούνται πρωτεΐνες υψηλής βιολογικής αξίας. Επομένως, η σύσταση σε αμινοξέα αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την αξιολόγηση της συνολικής διατροφικής ποιότητας των γαλακτοκομικών πρωτεϊνών. Οι συγκεντρώσεις των επιμέρους αμινοξέων διαφέρουν μεταξύ των γαλακτοκομικών ειδών και των αντίστοιχων μεταποιημένων γαλακτοκομικών προϊόντων τους. Οι διαφορές αυτές σχετίζονται με τη γενετική των ζώων, το στάδιο της γαλακτοπαραγωγής και τη θερμική επεξεργασία που χρησιμοποιείται κατά την επεξεργασία. Η ανάλυση προφίλ αμινοξέων σύμφωνα με την έρευνα των (Stefan H. M. Gorissen et al., 2018) έδειξε ότι οι πρωτεΐνες που προέρχονται από τα φυτά έχουν σχετικά χαμηλή περιεκτικότητα σε βασικά αμινοξέα και λευκίνη και ορισμένα χαμηλή περιεκτικότητα και σε λυσίνη και μεθειονίνη. Όμως η παγκόσμια αύξηση του πληθυσμού και οι ολοένα περιορισμένοι πόροι έχουν

οδηγήσει στην ανάγκη εύρεσης εναλλακτικών πηγών πρωτεΐνης για την κάλυψη των αναγκών κι έτσι ένας ισορροπημένος συνδιασμός διαφορετικών πρωτεϊνών προερχόμενων από φυτά μπορεί να παρέχει ένα μείγμα πρωτεϊνών υψηλής ποιότητας. Η ανάλυση προφίλ αμινοξέων ακολούθησε τα εξής πειραματικά στάδια. 6 mg σκόνης πρωτεΐνης ή κατεψυγμένο ξηρό ανθρώπινο σκελετικό μύ υδρολύθηκαν σε 3 mL HCl 6M για 12 ώρες στους 110°C. Έγινε ψύξη στους 4°C για να σταματήσει η υδρόλυση, αποξήρανση σε αγωγό αζώτου και διαλύθηκαν σε 5 mL νερού. Τα πρότυπα των αμινοξέων αραιώθηκαν σε τελικές συγκεντρώσεις 500, 375, 250, 125, 62,5 και 31,25. 10mL της υδρολυμένης πρωτεΐνης ή των προτύπων αναμείχθηκαν με 1500μL τριδεκαφθόροεπταικό οξύ 0,5mM και 10 μικρόλιτρα εσωτερικό πρότυπο που περιείχε σταθερό σημασμένο ισότοπο. Ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων των αμινοξέων έγινε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (UPLC) συνδιασμένο με διαδοχική φασματοσκοπία μάζας. Αν και κατά την όξινη υδρόλυση τα μη απαραίτητα αμινοξέα ασπαραγίνη και γλουταμίνη μετατρέπονται σε ασπαρτικό οξύ και γλουταμινικό αντίστοιχα, το απαραίτητο αμινοξύ τρυπτοφάνη αποσυντίθεται και η απουσία οξυγόνου συμβάλει στην μείωση απώλειας κυστεΐνης και μεθειονίνης, χρησιμοποιήθηκε ώστε να μπορέσουν να γίνουν άμεσες συγκρίσεις των δειγμάτων μεταξύ των διάφορων πηγών πρωτεΐνης.



**Εικόνα 3.4.1 :** Μέση ( $\pm$ SEM) περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη (% της πρώτης ύλης) διαφόρων πηγών διατροφικής πρωτεΐνης και ανθρώπινου σκελετικού μυϊκού ιστού με βάση την καθορισμένη περιεκτικότητα σε άζωτο πολλαπλασιαζόμενη επί 6,25 ως τον τυπικό συντελεστή μετατροπής. Οι λευκές ράβδοι αντιπροσωπεύουν πηγές πρωτεΐνης φυτικής προέλευσης, οι γκρι ράβδοι αντιπροσωπεύουν πηγές πρωτεϊνών που προέρχονται από ζώα και η μαύρη ράβδος αντιπροσωπεύει την πρωτεΐνη των ανθρώπινων σκελετικών μυών.



**Εικόνα 3.4.2 :** Μέση ( $\pm$ SEM) περιεκτικότητα σε απαραίτητα αμινοξέα (EAA) (% από ολική πρωτεΐνη) διαφόρων διατροφικών πηγών πρωτεΐνης και του ανθρώπινου σκελετού μυϊκή πρωτεΐνη. Οι λευκές μπάρες αντιπροσωπεύουν φυτικές πηγές πρωτεΐνης, Οι γκρι ράβδοι αντιπροσωπεύουν πηγές πρωτεΐνης ζωικής προέλευσης και η μαύρη ράβδος αντιπροσωπεύει την πρωτεΐνη των σκελετικών μυών του ανθρώπου. Η διακεκομμένη γραμμή αντιπροσωπεύει το απαιτούμενο αμινοξέων για ενήλικες (WHO/FAO/UNU Expert Consultation 2007). Σημείωση: Το EAA είναι το άθροισμα των His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, και Val. Το Trp δεν μετρήθηκε.

### 3.5 Επίδραση της επεξεργασίας στη σύνθεση των αμινοξέων

Η ενζυμική δραστηριότητα και η εξειδίκευση ποικίλλουν μεταξύ των ενζύμων. Αξιολογήθηκε η χρήση πρωτεολυτικών ενζύμων κατά την ανάλυση αμινοξέων. Παρασκευάστηκαν αλεσμένα δείγματα μυών βοοειδών και έγινε πέψη με διάφορα πρωτεολυτικά ένζυμα και ακολούθησε ανάλυση αμινοξέων (Roediger et al., 2020). Διαπιστώθηκε ότι η αλκαλάση και η θερμολυσίνη θα μπορούσαν να αντικαταστήσουν το συνδυασμό θρυψίνης-χυμοθρυψίνης στην απελευθέρωση αμινοξέων από τη μήτρα του δείγματος με πιθανή χρήση στην ανάλυση αμινοξέων. Σε μια άλλη εργασία των Mustatea et al. (2019) αξιολογήθηκαν ένζυμα πρωτεϊνικής υδρόλυσης που συμπληρώθηκαν με όξινη υδρόλυση για την ανάκτηση σουλφονίου κυστεΐνης και μεθειονίνης από σκόνες γαλακτοκομικών προϊόντων (Mustatea et al., 2019). Εξαιρετικές ανακτήσεις επιτεύχθηκαν με την πρωτεάση XIV και τη θερμολυσίνη, παρουσιάζοντάς τις ως έγκυρες επιλογές για την προεπεξεργασία δειγμάτων κατά τον προσδιορισμό του κυστεϊκού οξέος και της

σουλφονικής μεθειονίνης σε σκόνες γαλακτοκομικών προϊόντων (Mazorra-Manzano and Ramírez-Suárez2024).

Η ενζυμική υδρόλυση είναι το κλειδί για την απελευθέρωση και τον προσδιορισμό των ελεύθερων αμινοξέων. Η σύνθεση των αμινοξέων των πρωτεϊνών μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά μόνο μέσω της όξινης υδρόλυσης, η οποία χρησιμεύει για τη διάσπαση των πεπτιδικών δεσμών και την απελευθέρωση αμινοξέων για την επακόλουθη ανίχνευση. Ωστόσο, τα αμινοξέα που είναι δεσμευμένα σε πρωτεΐνες καταστρέφονται κατά την όξινη υδρόλυση και έτσι δεν συμβάλλουν στον προσδιορισμό του προφίλ των αμινοξέων στο τρόφιμο. Γενικά, η υδρόλυση (όξινη ή ενζυμική) είναι ένα απαραίτητο βήμα που συχνά αγνοείται κατά την προετοιμασία του δείγματος και μπορεί επίσης να έχει αρνητικό αντίκτυπο στον ποσοτικό προσδιορισμό των αμινοξέων, εάν δεν εκτελεστεί σωστά (Poojary et al., 2023)..

### **3.6 Αμινοξέα στο γάλα, το τυρί και το γιαούρτι**

Το γάλα είναι γνωστό ότι αποτελεί εξαιρετική πηγή πρωτεϊνών. Το μοτίβο των αμινοξέων στις πρωτεΐνες του γάλακτος είναι τέτοιο που παρέχει όλα τα απαραίτητα αμινοξέα που απαιτούνται στην ανθρώπινη διατροφή. Η πρωτεΐνη ορού γάλακτος είναι πλούσια σε κυστίνη και αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας (λευκίνη, ισολευκίνη, βαλίνη) και θεωρείται υψηλής διατροφικής αξίας. Η καζεΐνη, που υπάρχει στο γάλα σε ποσοστό περίπου 80% της συνολικής πρωτεΐνης, έχει πολύ υψηλή περιεκτικότητα σε προλίνη, αλλά κατά τα άλλα είναι πλούσια σε όλα τα άλλα απαραίτητα αμινοξέα, με σχετικά χαμηλά επίπεδα φαινυλαλανίνης, τυροσίνης και ισολευκίνης. Η καζεΐνη περιέχει επίσης θέσεις δέσμευσης για μέταλλα όπως το ασβέστιο και το φωσφορικό άλας. Το τυρί είναι ένα σημαντικό προϊόν της πρωτεΐνης του γάλακτος. Κατά την παρασκευή του τυριού, οι πρωτεΐνες καζεΐνης συμπυκνώνονται και τροποποιούνται με την οξίνιση, τη δράση της πυτιάς και τη δράση των πρωτεολυτικών ενζύμων. Ως αποτέλεσμα, η σύνθεση των αμινοξέων των τυριών είναι εξαιρετικά μεταβλητή. Οι διαδικασίες με τις οποίες τα αμινοξέα συμμετέχουν στη δημιουργία αρωματικών ενώσεων είναι ιδιαίτερα σημαντικές στα τυριά. Η ποικιλία των πρόδρομων αμινοξέων στις πρωτεΐνες του τυριού και η αποικοδόμησή τους κατά την ωρίμανσή τους, επιτρέπουν μια μεγάλη ποικιλία σχηματισμού αρωματικών ενώσεων. Λόγω της υψηλής μικροβιακής δραστηριότητας κατά



τη διάρκεια της ωρίμανσης του τυριού, η περιεκτικότητα σε άζωτο εκτός πρωτεϊνών, και συνεπώς οι συγκεντρώσεις αμινοξέων, μπορούν επίσης να μεταβληθούν (Herremán et al., 2020)(Goulding et al., 2020).

Το γάλα, το τυρί και το γιαούρτι είναι μερικά από τα πιο δημοφιλή γαλακτοκομικά προϊόντα. Τα τελευταία χρόνια, η σημασία των αμινοξέων στη διατροφή ενός ατόμου τονίζεται όλο και περισσότερο και κατά συνέπεια η προσοχή έχει στραφεί στην επάρκεια της περιεκτικότητας των γαλακτοκομικών προϊόντων σε πρωτεΐνες ως πηγές αμινοξέων που απαιτούνται για τη διατήρηση των ιστών του σώματος καθώς και για την ανάπτυξη. Ο προσδιορισμός και η αξιολόγηση της σύνθεσης των αμινοξέων των πρωτεϊνών στα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι, επομένως, ουσιαστικής σημασίας. Επιπλέον, τα αμινοξέα είναι επίσης σημαντικά ως πρόδρομες ουσίες γεύσης στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Η αλληλεπίδραση των αμινοξέων με άλλες πρόδρομες ουσίες, κατά τη διάρκεια της αντίδρασης Maillard ή της αποδόμησης Strecker, για παράδειγμα, αποτελούν σημαντικές οδούς για τη δημιουργία πτητικών ενώσεων στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Η μεταβλητότητα της συνολικής συγκέντρωσης αμινοξέων στο γάλα και ορισμένων συγκεκριμένων μεμονωμένων αμινοξέων έχει αποδειχθεί ότι εξαρτάται από διάφορους παράγοντες. Σε αυτούς περιλαμβάνονται το στάδιο της γαλακτοπαραγωγής, η διατροφή των αγελάδων, οι φυσιολογικές ή παθολογικές συνθήκες. Η γνώση της σύνθεσης των αμινοξέων των γαλακτοκομικών προϊόντων είναι σημαντική για σκοπούς ποιοτικού ελέγχου (ανίχνευση νοθείας), καθώς και για τη διατροφική επισήμανση (Lapierre et al., 2020)(Goulding et al., 2020).

Μια σειρά αμινοξέων καθιστά το γάλα, το τυρί και το γιαούρτι εξαιρετικά σημαντικά για τη διατροφή και την υγεία. Στα γαλακτοκομικά προϊόντα, οι καζεΐνες και οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος στέκονται ως οι κύριες πηγές αμινοξέων. Η πήξη των καζεϊνών στο στομάχι έχει ως αποτέλεσμα την αργή απελευθέρωση των αμινοξέων σε σύγκριση με τις πρωτεΐνες ορού γάλακτος- μια δράση που έχει διαφορετική επίδραση στη μεταγευματική διαθεσιμότητα αμινοξέων καθώς και στη σύνθεση μυϊκής πρωτεΐνης (Horstman & Huppertz, 2023). Η μεθειονίνη και η κυστεΐνη διαδραματίζουν βασικό ρόλο στις ζυμώσεις γαλακτοκομικών προϊόντων ως αμινοξέα που περιέχουν θείο και συμβάλλουν στο χαρακτηριστικό άρωμα του τυριού Cheddar. (Hernandez-Valdes et al., 2020). Κατά την ωρίμανση των τυριών παρατηρούνται πρωτεολυτικές διεργασίες που αναδεικνύουν

ελεύθερα αμινοξέα όπως η λευκίνη, η ανσερίνη και η L-καρνοσίνη, αν και οι ιδιαιτερότητες της περιεκτικότητάς τους εξαρτώνται από τα βακτηριακά στελέχη και τον χρόνο ωρίμανσης (Benkerroum, 2016). Ειδικότερα από τα γιαούρτια: η αφομοίωση της λευκίνης είναι υψηλότερη στα φρέσκα προϊόντα από ό,τι στα παστεριωμένα- η δυσανεξία στη λακτόζη μπορεί να επηρεάσει το ρυθμό αφομοίωσής της (Garbowska et al., 2020). Τα αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας (BCAA/ Branched Chain Amino Acids) περιλαμβάνουν τη λευκίνη, την ισολευκίνη και τη βαλίνη. Είναι σημαντικές για τη σύνθεση πρωτεϊνών και τη μεταβολική υγεία- ωστόσο, τα αυξημένα επίπεδα σχετίζονται με τον κίνδυνο εμφάνισης διαβήτη τύπου 2 (Fardet & Rock, 2018). Αντιοξειδωτικές ιδιότητες μπορούν να βρεθούν στις πρωτεΐνες γαλακτοκομικών προϊόντων λόγω συγκεκριμένων αμινοξέων στην καζεΐνη και ομάδων θειόλης στη β-λακτοσφαιρίνη (Jančová et al., 2020). Παρόλο που τα γαλακτοκομικά προϊόντα παρέχουν ευεργετικά αμινοξέα, η κατανάλωση υψηλών επιπέδων βιογενών αμινών όπως η τυραμίνη, η ισταμίνη και η πουτρεσκίνη - που προκύπτουν από την αποκαρβοξυλίωση κατά τη ζύμωση - μπορεί να θέσει σε κίνδυνο την υγεία. Είναι επομένως απαραίτητο να ελέγχονται οι βιογενείς αμίνες, ενώ ορισμένες από αυτές είναι κακές για την υγεία όταν λαμβάνονται σε υψηλά επίπεδα και άλλες έχουν ευεργετικές επιδράσεις.

### **3.6.1 Μετατροπή αμινοξέων από το γάλα σε τυρί**

Η παραγωγή τυριού από αμινοξέα που βρίσκονται στο γάλα περνάει από πολλά στάδια. Στους παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της ζύμωσης του κόλουρου, την πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών και τη μικροβιακή σύνθεση των πρωτεϊνών στους γαλακτοπαραγωγούς μοσχαράδες περιλαμβάνεται η συμπληρωματική χορήγηση σκόνης από στέμφυλα σταφυλιών (GPP), όπως προσδιορίστηκε από μια μελέτη που διεξήχθη από τους (Foiklang et al., 2016). Η GPP βρέθηκε να ενισχύει την αποτελεσματικότητα της ζύμωσης του κόλουρου καθώς και την πεπτικότητα και τη σύνθεση μικροβιακής πρωτεΐνης σε μοσχάρια που τρέφονται με επεξεργασμένο άχυρο ρυζιού. Εκείνοι στην ομάδα GPP παρουσίασαν υψηλότερη πεπτικότητα θρεπτικών συστατικών, πτητικά λιπαρά οξέα και επίπεδα προπιονικού σε σχέση με εκείνους στην ομάδα ελέγχου. Επιπλέον, η κατακράτηση αζώτου και η μικροβιακή ακατέργαστη πρωτεΐνη ήταν σημαντικά υψηλότερες στα μοσχάρια που έλαβαν συμπλήρωμα GPP.



Αντίθετα, μια άλλη μελέτη των Smith, Johnson, & Brown (2020) ασχολήθηκε με την αλλαγή του συστατικού των φυσικώς αποτελεσματικών ουδέτερων απορρυπαντικών ινών (reNDF) των σιτηρεσίων γαλακτοπαραγωγών αγελάδων με στόχο την προώθηση μιας θετικής κατάστασης του pH των τυμπάνων, καθώς και της πρωτεϊνοσύνθεσης μεταξύ των μικροβίων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αύξηση της περιεκτικότητας σε reNDF μέσω του μήκους των σωματιδίων χορτονομής στη δίαιτα προώθησε βελτιώσεις στο pH του τυμπάνου, αλλά δεν επηρέασε σημαντικά την πρόσληψη και την πεπτικότητα της τροφής ή την παραγωγή γάλακτος. Παρόλα αυτά, η αύξηση της αναλογίας της χορτονομής προς το συμπύκνωμα οδήγησε σε μείωση της κατανάλωσης DM και της γαλακτοπαραγωγής - ωστόσο επηρέασε θετικά την κατάσταση του pH του τυμπάνου και την απόδοση του γάλακτος.

Διαπιστώθηκε ότι η GPP και η περιεκτικότητα σε reNDF παίζουν ρόλο στην αποτελεσματικότητα της ζύμωσης του κόλουρου, στην πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών και στη σύνθεση των μικροβιακών πρωτεϊνών. Μια μελέτη που διεξήχθη στο τυρί Fiore Sardo (ένα ιταλικό τυρί ΠΟΠ) από τους Manca et al. (2020) προσδιόρισε ότι οι βιογενείς αμινικές ενώσεις (BA) είναι υπεύθυνες για κινδύνους για την υγεία των καταναλωτών λόγω της συσσώρευσής τους- ζήτησε την παρακολούθηση της περιεκτικότητας σε BA, η οποία βρέθηκε να συσχετίζεται θετικά με τα ελεύθερα αμινοξέα (FAA) καθώς και με τα επίπεδα pH. Μια άλλη μελέτη με επικεφαλής τους Wang κ.ά. (2021) διερεύνησε την ασπαρτική πρωτεάση Rhizomucor miehei, καταδεικνύοντας υψηλή δραστηριότητα πρωτεάσης του RmproB με βέλτιστη δραστηριότητα σε pH 2,5 και 40 °C - μια καινοτόμος προσέγγιση στην επεξεργασία τυριού που επηρεάζει το τελικό προϊόν μέσω της συμβολής του κατά τη μετατροπή των πρωτεϊνών του γάλακτος σε δομή τυριού. Η RmproB φάνηκε επίσης να έχει δραστηριότητα πήξης του γάλακτος ενώ παράλληλα λαμβάνει χώρα παραγωγή πεπτιδίων που αναστέλλουν το ACE, γεγονός που την καθιστά ελπιδοφόρο υποψήφιο για την παραγωγή τυριού. Επίσης, οι Mazorra-Manzano et al. (2020) μελέτησαν τη ζύμωση του τυρογάλακτος από τον εγγενή μικροβιόκοσμο του για την απελευθέρωση βιοδραστικών πεπτιδίων με ανασταλτική δράση του MEA. Διαπίστωσαν ότι οι πρωτεΐνες υδρολύθηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες - συν μια αύξηση σημαντικής τιμής στην ανασταλτική δράση του ACE μετά τη διαδικασία ζύμωσης που έλαβε χώρα. Αυτά τα ευρήματα τείνουν να υποδηλώνουν ότι πράγματι η ζύμωση του

τυρογάλακτος θα μπορούσε να είναι μια χρήσιμη διαδικασία για την παραγωγή λειτουργικών τροφίμων, που με τη σειρά τους έχουν οφέλη για την υγεία, γι' αυτό και εφιστούμε την προσοχή από αυτές τις μελέτες για το πώς θα πρέπει να γίνεται η μετατροπή από τα αμινοξέα σε τυρί- επιτήρηση της περιεκτικότητας σε ΒΑ- απασχόληση ειδικών πρωτεασών και διερεύνηση των ζυμώσεων, όλα στοχεύουν στην ενίσχυση της διατροφής των γαλακτοφόρων ζώων και των λειτουργικών ιδιοτήτων για τα τυροκομικά προϊόντα, όπως τονίζεται από αυτές τις διορατικές μελέτες.

### **3.6.2 Σχέση των αμινοξέων στο γάλα, τυρί, γιαούρτι**

Η μελέτη των Bradbury et al. (2017) εξετάζει τα αμινοξέα που βρίσκονται στο γάλα, το τυρί και το γιαούρτι με βάση τα διατροφικά πρότυπα. Αυτά περιλαμβάνουν κρεατοφάγους, χορτοφάγους και vegans - το καθένα αποκαλύπτει σημαντικές διαφορές στην κατανάλωσή τους. Η έρευνα αποκάλυψε ότι οι τακτικοί κρεατοφάγοι αντλούν ένα σημαντικό μέρος (25%) της ενεργειακής τους πρόσληψης από γαλακτοκομικά προϊόντα όπως το γάλα και το τυρί, μαζί με τα αυγά - σε πλήρη σύγκριση με τους χορτοφάγους και τους vegans που αντλούν τις ενεργειακές τους ανάγκες από αλλού, προτιμώντας όσπρια, ξηρούς καρπούς ή άλλες φυτικές επιλογές. Μια μελέτη των Abdel-Ghany & Zaki (2018) ασχολήθηκε με τον εμπλουτισμό του γιαουρτιού με βόειο πρωτόγαλα και σιρόπι χουρμάδων: μια συγχώνευση που αποσκοπεί στην ενίσχυση της θρεπτικής αξίας αυτού του τροφίμου. Τα αποτελέσματα έδειξαν θετικά αποτελέσματα, καθώς η προσθήκη αυτών των φυσικών συστατικών οδήγησε σε σημαντική αύξηση της συνολικής πρωτεΐνης, της ανοσοσφαιρίνης G, της λακτοφερρίνης και των ανόργανων συστατικών μεταξύ άλλων- σε σύγκριση με το συνηθισμένο γιαούρτι (Sobaih & Zaki, 2018). Το πρωτόγαλα βοοειδών είχε πρόσθετο όφελος στις τιμές ιξώδους καθώς και στη συνέκωση που είναι χαμηλότερη- γεγονός που συνεπάγεται καλύτερη υφή και σταθερότητα για το εμπλουτισμένο γιαούρτι, ενώ απαιτούνται καθημερινά για τις ανάγκες σε πρωτεΐνες και θρεπτικά συστατικά λιγότερα γραμμάρια, αλλά με πιο ικανοποιητική συνολική πρόσληψη θρεπτικών συστατικών, υπογράμμισε μια άλλη μελέτη με επικεφαλής τους Manca et al. (2020). Αυτή η μελέτη διερεύνησε τις βιογενείς αμίνες (ΒΑ) και τη σχέση τους με τα ελεύθερα αμινοξέα (FAA) και τη σύνθεση στο τυρί ΠΟΠ Fiore Sardo. Το ΠΟΠ τυρί Fiore Sardo είναι ένα τυρί που φτιάχνεται στην Σαρδηνία από νωπό πρόβειο γάλα και αυξάνει τον

κίνδυνο των καταναλωτών που οφείλεται στην συσσώρευση βιογενών αμινών. Μελέτες έχουν δείξει ότι ορισμένα δείγματα τυριού Fiore Sardo περιέχουν αυξημένα επίπεδα ΒΑ, συγκεκριμένα με υψηλότερες συγκεντρώσεις τυραμίνη πουτρεσίνη, ενώ σε χαμηλότερες οι καδαβερίνη, ισταμίνη, β-φαινυλαιθυλαμίνη και τρυπταμίνη. Γενικά συνολικά 54% από τα δείγματα που αναλύθηκαν υπερέβησαν το όριο των 90mg / 100g για τη συνολική περιεκτικότητα σε ΒΑ, θέτοντας δυνητικό κίνδυνο για τους καταναλωτές. Τα τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση έχουν την τάση να συσσωρεύουν βιογενής αμίνες, με τα ψάρια και τα τυριά να είναι τα πιο συνηθισμένα σε δηλητηριάσεις που οφείλονται σε αμίνες. Υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ των βιογενών αμινών (ΒΑ), των ολικών ελεύθερων αμινοξέων (FAA) σύμφωνα με τεστ συσχέτισης Pearson. Τόσο ο χρόνος ωρίμανσης όσο και η δραστηριότητα πρωτεόλυσης προάγουν τη διαθεσιμότητα προδρόμων αμινοξέων που είναι θεμελιώδεις για το σχηματισμό των ΒΑ όπως και τα υψηλά pH. (Manca & Kraus, 2020). Επιπλέον, μέσω της ιεραρχικής ανάλυσης κατά συστάδες, τα δείγματα ομαδοποιήθηκαν ανάλογα με τη συγκέντρωση ΒΑ και τους δείκτες πρωτεόλυσης- αυτό υπογραμμίζει τις προσπάθειες τροποποίησης των πρακτικών παραγωγής για τον περιορισμό του κινδύνου που συνδέεται με την υψηλή περιεκτικότητα ΒΑ στο τυρί. Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα από τις παραπάνω μελέτες δείχνουν τη σημασία του φυσικού εμπλουτισμού στη διατροφική αξία και ποιότητα, προσφέρουν μια έμμεση ένδειξη των σχέσεων αμινοξέων σε γαλακτοκομικά προϊόντα όπως το τυρί ή το γιαούρτι.

Parameters	1	2	Group 3	4
$a_w$	0,90±0,03 <sup>b</sup>	0,86±0,02 <sup>a</sup>	0,92±0,01 <sup>b</sup>	0,85±0,01 <sup>a</sup>
pH	5,1±0,2 <sup>a</sup>	5,1±0,1 <sup>a</sup>	5,4±0,1 <sup>b</sup>	5,2±0,1 <sup>ab</sup>
*Humidity	28,7±3,6 <sup>ab</sup>	29,7±2,7 <sup>ab</sup>	31,3±1,1 <sup>b</sup>	25,3±3,0 <sup>a</sup>
*Dry matter	71,3±3,6 <sup>ab</sup>	70,3±2,7 <sup>ab</sup>	68,7±1,1 <sup>a</sup>	74,7±3,0 <sup>b</sup>
*Fat	36,7±2,1 <sup>ab</sup>	33,2±2,7 <sup>a</sup>	36,0±0,6 <sup>ab</sup>	35,5±3,4 <sup>ab</sup>
*Fat/DM	51,5±2,0 <sup>b</sup>	47,2±3,4 <sup>a</sup>	52,4±1,4 <sup>b</sup>	47,4±2,6 <sup>a</sup>
*Protein	28,8±1,7 <sup>a</sup>	29,2±1,8 <sup>a</sup>	28,1±1,2 <sup>a</sup>	31,9±0,9 <sup>b</sup>
*Protein/DM	40,5±1,4 <sup>a</sup>	41,7±1,8 <sup>ab</sup>	40,8±1,1 <sup>ab</sup>	42,8±0,9 <sup>b</sup>
*Salt	2,90±0,60 <sup>ab</sup>	4,23±0,73 <sup>c</sup>	2,15±0,42 <sup>a</sup>	3,64±0,67 <sup>bc</sup>
*Salt/DM	4,07±0,81 <sup>ab</sup>	6,01±0,97 <sup>c</sup>	3,14±0,65 <sup>a</sup>	4,91±1,04 <sup>bc</sup>
**ΣFAA	1725±523 <sup>a</sup>	2360±629 <sup>ab</sup>	3133±165 <sup>b</sup>	2960±161 <sup>b</sup>
**ΣFAA/DM	2421±729 <sup>a</sup>	3368±926 <sup>ab</sup>	4566±1051 <sup>b</sup>	3969±259 <sup>b</sup>
**ΣBA	71±43 <sup>a</sup>	111±42 <sup>a</sup>	223±69 <sup>b</sup>	279±73 <sup>b</sup>
**ΣBA/DM	100±60 <sup>a</sup>	158±61 <sup>a</sup>	325±105 <sup>b</sup>	375±104 <sup>b</sup>
**Tryptamine	2±1 <sup>a</sup>	3±3 <sup>a</sup>	4±3 <sup>a</sup>	4±2 <sup>a</sup>
**β-Phenylethylamine	4±3 <sup>a</sup>	4±2 <sup>a</sup>	9±4 <sup>a</sup>	26±17 <sup>b</sup>
**Putrescine	9±14 <sup>a</sup>	19±19 <sup>ab</sup>	45±21 <sup>bc</sup>	53±43 <sup>c</sup>
**Cadaverine	3±3 <sup>a</sup>	9±9 <sup>ab</sup>	6±8 <sup>ab</sup>	14±9 <sup>b</sup>
**Histamine	3±4 <sup>a</sup>	7±9 <sup>a</sup>	25±27 <sup>c</sup>	11±13 <sup>bc</sup>
**Tyramine	51±33 <sup>a</sup>	69±26 <sup>a</sup>	136±33 <sup>b</sup>	171±37 <sup>b</sup>

**Εικόνα 3.6.2.1 :** Ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση των φυσικοχημικών παραμέτρων, η περιεκτικότητα σε ολικά ελεύθερα αμινοξέα και βιογενείς αμίνες των τεσσάρων ομάδων προσδιορίστηκαν μέσω ιεραρχικής ανάλυσης συγκροτήματος. (HCA).

## 4 Προετοιμασία δείγματος και προεπεξεργασία

Μεταλλοποιημένα δείγματα είναι προτιμότερα για στοιχειακή ανάλυση λόγω της υψηλότερης ομοιογένειας, της σταθερότητας και του εύκολου χειρισμού τους καθώς παρέχει έναν κατάλληλο τρόπο εισαγωγής δείγματος στο όργανο, αποφεύγοντας το φράξιμο του συστήματος και ελαχιστοποιώντας τις παρεμβολές στη μήτρα χωρίς να απαιτείται ιδιαίτερη προετοιμασία.

Η προετοιμασία δείγματος και προεπεξεργασία για την ανίχνευση αμινοξέων στο γάλα περιλαμβάνει μια σειρά σταδίων για την απομόνωση και τον καθαρισμό των αναλυτών. Αρχικά, λαμβάνεται ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα γάλακτος, το οποίο ομογενοποιείται και διατηρείται σε χαμηλή θερμοκρασία. Ακολουθεί η απομάκρυνση λιπιδικής φάσης, συνήθως μέσω φυγοκέντρησης ή χημικής εκχύλισης, για την απομάκρυνση των λιπιδίων.

Στη συνέχεια, οι πρωτεΐνες καταβυθίζονται με προσθήκη τριχλωροοξικού οξέος ή ακετονιτριλίου, ακολουθούμενη από φυγοκέντρηση. Το υπερκείμενο υφίσταται περαιτέρω καθαρισμό μέσω εκχύλισης στερεάς φάσης ή υπερδιήθησης. Σε περιπτώσεις ανάλυσης πεπτιδίων ή πρωτεϊνών, μπορεί να εφαρμοστεί υδρόλυση. Το δείγμα στη συνέχεια συμπυκνώνεται και επαναδιαλύεται σε κατάλληλο διαλύτη. Τέλος, γίνεται τελική προετοιμασία με φιλτράρισμα και πιθανή ρύθμιση pH, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να ακολουθήσει παραγωγοποίηση για βελτίωση της ανίχνευσης. Η ακριβής διαδικασία μπορεί να προσαρμοστεί ανάλογα με τη συγκεκριμένη αναλυτική μέθοδο και τα αμινοξέα που μελετώνται.

#### 4.1 Τεχνικές ομογενοποίησης και εκχύλισης

Το πρώτο βήμα της εκχύλισης είναι η διάσπαση της μεμβράνης των στερεών λιποσφαιρίων (SFGM / Solid Fat Globule Membrane) προκειμένου να απελευθερωθούν τα αμινοξέα στο διάλυμα. Η διάσπαση της SFGM είναι κρίσιμη για την απελευθέρωση των αμινοξέων, κυρίως επειδή είναι μεταξύ των συστατικών που συμμετέχουν στη σταθεροποίηση της μεμβράνης στο γάλα (Sun et al., 2022). Επιπλέον, τα αμινοξέα δεν συνδέονται ομοιοπολικά με τη μεμβράνη, όπως συμβαίνει με τις πρωτεΐνες που μπορεί να αλληλεπιδρούν με την SFGM μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Για το λόγο αυτό, μπορούν να εφαρμοστούν σχετικά ήπιες διαδικασίες για τη διαλυτοποίηση των αμινοξέων. Ωστόσο, ο καθαρισμός με λουτρό υπερήχων μπορεί να μην επαρκεί για την απελευθέρωση αμινοξέων από την SFGM, γεγονός που οδηγεί σε χαμηλές ανακτήσεις αμινοξέων. Επιπλέον, η θερμική επεξεργασία έχει προταθεί ως αποτελεσματική εναλλακτική ή συμπληρωματική μέθοδος για τη διάσπαση του SFGM, με βάση τη μετουσίωση των πρωτεϊνών που συνδέονται με τη μεμβράνη.

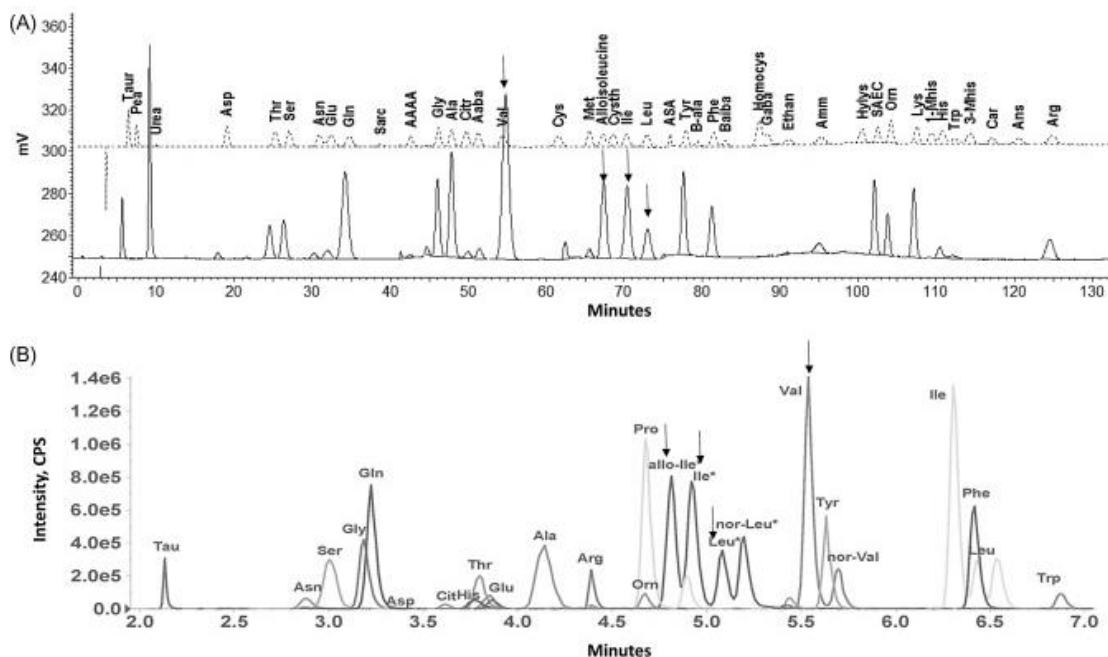
Ο προσδιορισμός των ελεύθερων αμινοξέων στα γαλακτοκομικά προϊόντα αποτελεί κρίσιμο βήμα για την αξιολόγηση των πρωτεϊνών καθώς και για την εκτίμηση της γεύσης των προϊόντων. Ωστόσο, η υψηλή πολυπλοκότητα της μήτρας του γάλακτος και τα ποικίλα χημικά χαρακτηριστικά των αμινοξέων εμποδίζουν την καθιέρωση ενός

μοναδικού πρωτοκόλλου για τον προσδιορισμό τους. Τα πρωτόκολλα εκχύλισης πρέπει να προσαρμόζονται προσεκτικά στα διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα, ώστε να επιτυγχάνεται η καλύτερη δυνατή απόδοση όσον αφορά την ανάκτηση των αναλυτών, ελαχιστοποιώντας παράλληλα τον χειρισμό του δείγματος και τον χρόνο ανάλυσης. Απαιτούνται απλά πρωτόκολλα εκχύλισης όχι μόνο για την αποτελεσματική εκχύλιση αμινοξέων από τα ποικίλα δείγματα γαλακτοκομικών προϊόντων, αλλά και για να καταστεί δυνατή η ταχεία ανάλυση που απαιτείται για διαλογή υψηλής απόδοσης.

## 4.2 Τεχνικές παραγωγοποίησης

Η επιλογή του αντιδραστηρίου για την παραγωγοποίηση υπαγορεύεται σε μεγάλο βαθμό από τη μέθοδο ανίχνευσης, αν και παράγοντες όπως η θερμοκρασία, το pH και η σταθερότητα των παραγώγων παίζουν επίσης ρόλο στον καθορισμό του κατάλληλου αντιδραστηρίου (Yada, 2004). Στην παραγωγοποίηση πριν από τη στήλη για την ανίχνευση με HPLC, χρησιμοποιείται συνήθως ως αντιδραστήριο η OPA/N-ακετυλο-I-κυστεΐνη, η οποία οδηγεί σε προϊόντα ισοινδόλης με έντονο φθορισμό κατά την αντίδραση με πρωτοταγείς αμίνες υπό ελαφρώς όξινες συνθήκες. Παρά την ευρεία χρήση του, αυτό το σύστημα αντιδραστηρίων έχει περιορισμούς, καθώς τα παράγωγά του δεν είναι σταθερά λόγω πιθανής παρεμβολής από ορισμένα α-υδροξυοξέα και βιογενείς αμίνες που σχηματίζουν πρόσθετα προϊόντα. Ως εκ τούτου, εισήχθη ένα εναλλακτικό σύστημα αντιδραστηρίου AAA-OPA για την ανίχνευση LC-FLD, το οποίο δεν απαιτεί N-ακετυλο-I-κυστεΐνη στην ανάλυση AA. Από την άλλη πλευρά, παράγωγα της PITC έχουν χρησιμοποιηθεί στην ανάλυση αμινοξέων μέσω HPLC-DAD και ανίχνευσης GC-MS. Στην περίπτωση αυτή, το αντιδραστήριο PITC αλληλεπιδρά με πρωτογενή και δευτερογενή αμινοξέα υπό ελαφρώς αλκαλικό pH για την παραγωγή σταθερών προϊόντων. Τα προϊόντα αυτά παρουσιάζουν διαφορετική χρωματογραφική συμπεριφορά λόγω διαφορετικών δομών κατά το σχηματισμό τους με την παραγωγή PITC. Η σταθερότητα του αντιδραστηρίου PITC επιτρέπει την εύκολη χρησιμοποίησή του σε πρωτόκολλο χαμηλού pH- ως εκ τούτου, προτιμάται σε μεγάλο βαθμό από τους επιστήμονες- ιδιαίτερα από εκείνους που ενδιαφέρονται τόσο για τα πρωτεϊνογενή όσο και για τα μη πρωτεϊνογενή αμινοξέα (Munir & Badri, 2020).

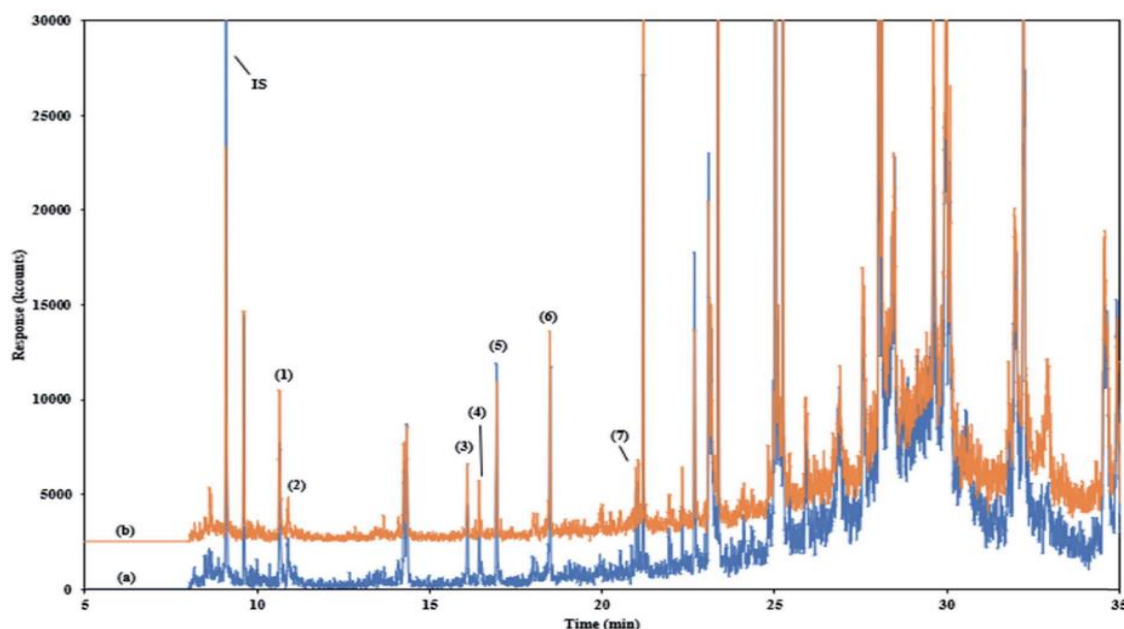




**Εικόνα 4.2.1: (Α) Ανάλυση αμινοξέων πλάσματος ενός ασθενούς με ασθένεια ούρων χρησιμοποιώντας μια μέθοδο χρωματογραφίας ανταλλαγής ιόντων. Διακεκομμένη γραμμή: πρότυπο βαθμονόμησης. Συμπαγής γραμμή: δείγμα ασθενούς. (Β) Μέθοδος υγρής χρωματογραφίας-διαδοχικής φασματομετρίας μάζας παρακολούθησης πολλαπλών αντιδράσεων. Βέλη: διαγνωστικά αμινοξέα (αλοϊσολευκίνη, ισολευκίνη, λευκίνη και βαλίνη).**

Στην περίπτωση της πολυπλοκότητας των γαλακτοκομικών μητρών- όπου τα αμινοξέα υπάρχουν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και αφθονούν πολυάριθμες παρεμβαλλόμενες ουσίες- ο καθαρισμός ή η προεπεξεργασία των δειγμάτων καθίσταται συχνά αναγκαία, ανεξάρτητα από τον τύπο της μεθόδου ανίχνευσης, εάν πρόκειται να διασφαλιστούν ακριβή και ακριβή αποτελέσματα. Έχουν αναφερθεί διάφορες μέθοδοι καθαρισμού δειγμάτων, οι οποίες περιλαμβάνουν ισοθειοκυανικό φαινυλο (PITC), ο-φθαλδιαλδεΰδη (OPA), χλωροφορμικό 9-φθορενυλομεθυλο (FMOC) και χλωριούχο δανσύλιο (DNS) για την ανίχνευση με HPLC- επιπλέον, οι μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας-ταυτόχρονης φασματομετρίας μάζας (LC-MS/MS) χρησιμοποιούν πιο πρόσφατα παραγωγή με προπιονικό ανυδρίτη ή βουτανόλη/HCl. Πολλές φορές σε καταστάσεις όπως αυτές, πρέπει να περάσουμε από διάφορες, συνεχείς πολλές φορές, διαδικασίες καθαρισμού πριν

μπορέσουμε να πάρουμε την καθαρότητα που χρειαζόμαστε. Ανεξάρτητα από το είδος της τεχνικής ανίχνευσης που χρησιμοποιείται, πολλά πράγματα μπορεί να παρεμβαίνουν σε αυτήν.. Οι αναφορές για την ανάλυση των αμινοξέων σε γαλακτοκομικά προϊόντα με τη χρήση άλλων μεθόδων ανίχνευσης είναι πιο περιορισμένες, αλλά απαιτούν επίσης παραγωγή, για παράδειγμα, μέθοδοι ανίχνευσης με αέρια χρωματογραφία (GC) που χρησιμοποιούν είτε N-(tert-butyldimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamide (MTBSTFA) είτε N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA), ή τεχνικές τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης (CE) που έχουν χρησιμοποιήσει παραγωγοποίηση φθοροζαμίνης πριν από την ανίχνευση με υπεριώδη ακτινοβολία (Gioia et al., 2007).



**Εικόνα 4.2.2:** Χρωματογραφήματα δειγμάτων σε λειτουργία EIC για (α) πλήρες γάλα με λιπαρά στο  $t_0$  και (β) πλήρες γάλα με λιπαρά στο  $t_1$ . Αναγνώριση κορυφών: (IS) εσωτερικό πρότυπο, (1) αλανίνη, (2) γλυκίνη, (3) λευκίνη, (4) ισολευκίνη, (5) προλίνη, (6) γλουταμινικό οξύ και (7) φαινυλαλανίνη (Quigley et al., 2019)

#### 4.2.1 Αλληλεπίδραση των αμινοξέων με τον αναλυτή-στόχο

Άλλες αλληλεπιδράσεις που υφίστανται τα αμινοξέα στα δείγματα γαλακτοκομικών προϊόντων είναι με τα φυσίγγια εκχύλισης στερεάς φάσης με ισχυρή κατιονική ανταλλαγή που χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό (Badawy et al., 2022). Αυτή η αλληλεπίδραση αποτελεί τη βάση για τον καθαρισμό των αμινοξέων στη μέθοδο που προτείνεται το Queensland Department of Primary Industries. Σύμφωνα με αυτή εφαρμόζεται η μέθοδος



της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC) με ανίχνευση φθορισμού για τον καθαρισμό και την ανίχνευση αμινοξέων. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιούν μια μέθοδο που ονομάζεται παραγωγή πριν από τη στήλη με ορθο-φθαλαλδεϋδη (OPA) και 9-φθορενυλομεθυλοχλωροφορμικό (FMOC) για τη μετατροπή των αμινοξέων σε φθορίζοντα παράγωγα, τα οποία στη συνέχεια διαχωρίζονται και ανιχνεύονται με τη χρήση HPLC με ανιχνευτή φθορισμού. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την ευαίσθητη και επιλεκτική ανίχνευση αμινοξέων σε διάφορα δείγματα. Η μέθοδος χρησιμοποιεί σουλφονικό πολυστυρένιο-διβινυλοβενζόλιο ως ροφητικό υλικό και τα αμινοξέα εκκλύονται με ρυθμιστικό διάλυμα ιμιδαζολίου  $0,2 \text{ molL}^{-1}$ , pH 8. Τα αμινοξέα υφίστανται επίσης ασθενή κατακράτηση ή καθόλου κατακράτηση στα ροφητικά υλικά αντίστροφης φάσης που χρησιμοποιούνται συνήθως για τον καθαρισμό των δειγμάτων γαλακτοκομικών προϊόντων. Έχει παρατηρηθεί ατελής έκλυση για τα αμινοξέα που κατανέμονται ισχυρά στα ασθενέστερα ροφητικά αντίστροφης φάσης (π.χ. αμινοξέα με φαινυλ, τρυπτοφάνη ή κυστεΐνη). Παρατηρήθηκε ανεπαρκής καθαρισμός του εκχυλίσματος όταν η έκλυση πραγματοποιήθηκε με ακετόνη ή μεθανόλη, ιδίως για τον προσδιορισμό των πολικών αμινοξέων (γλυκίνη, θρεονίνη, αργινίνη, αλανίνη και προλίνη) (Oakey et al., 2024).

Τα αμινοξέα υφίστανται αλληλεπιδράσεις σύζευξης ιόντων με τους κυρίαρχους στόχους (λίπη και λιποδιαλυτές βιταμίνες) στα δείγματα γαλακτοκομικών προϊόντων. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές μειώνουν τη διαλυτότητά τους στην κινητή φάση και αποτελούν την πηγή των φαινομένων μήτρας. Υπάρχουν διάφορες στρατηγικές για την παράκαμψη των επιδράσεων μήτρας που σχετίζονται με τον προσδιορισμό αμινοξέων σε γαλακτοκομικά δείγματα. Η αφαίρεση του λίπους από το γάλα γίνεται εύκολα με φυγοκέντρηση  $3000 \times g$  για 30 λεπτά). Μια τυπική στρατηγική περιλαμβάνει τη μείωση της περιεκτικότητας σε λίπος στα δείγματα μέσω αραίωσης, προεπεξεργασίας με οργανικούς διαλύτες (αιθέρας) ή όξινης υδρόλυσης. Μια άλλη προσέγγιση για την εξάλειψη του λίπους από το δείγμα πριν από την ανάλυση αμινοξέων είναι η καταβύθιση πρωτεϊνών με τριχλωροξικό οξύ. Η ισοηλεκτρική καταβύθιση σε pH 4,6 στους  $20^{\circ}\text{C}$ , όπου το ίζημα ανακτάται με διήθηση ή φυγοκέντρηση χαμηλής ταχύτητας για τον διαχωρισμό της καζεΐνης και μη καζεΐνης των πρωτεϊνών του γάλακτος. Μια άλλη μέθοδος διαχωρισμού των μικκυλίων της καζεΐνης είναι με υπερφυγοκέντρηση ( $100.00 \times g$  για 1 ώρα), ενώ οι

πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος δεν είναι ιζηματοποιήσιμες. Μία επίσης μέθοδος είναι η μέθοδος αλάτωσης όπου η καζεΐνη καταβυθίζεται με άλατα, όπως  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  στα 260 g/L ή κορεσμένο NaCl και διήθηση γέλης όπου είναι δυνατός ο διαχωρισμός των καζεϊνών από τις πρωτεΐνες ορού γάλακτος με χρωματογραφία μοριακής διήθησης, αλλά αυτή η μέθοδος δεν χρησιμοποιείται βιομηχανικά. Ακόμη η υπερδιήθηση και μικροδιήθηση όπου οι πρωτεΐνες του γάλακτος συγκρατούνται από ημιπερατές μεμβράνες μικρών πόρων και διαχωρίζονται από την λακτόζη και τα διαλυτά άλατα (χρησιμοποιείται ευρέως για την βιομηχανική παραγωγή συμπυκνωμάτων πρωτεΐνης γάλακτος). Οι μεμβράνες ενδιάμεσων πόρων χρησιμοποιούνται για τον διαχωρισμό των μικυλλίων καζεΐνης από τις πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος. Στη μικροδιήθηση, με τη χρήση μεμβρανών μεγάλων πόρων (1,4  $\mu\text{m}$ ), τόσο οι καζεΐνες όσο και οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος είναι διαπερατές, αλλά διατηρούνται >99,9% των βακτηρίων και άλλων μεγάλων σωματιδίων. Η μικροδιήθηση χρησιμοποιείται για την παραγωγή γάλακτος ροφήματος παρατεταμένης διάρκειας ζωής ή γάλακτος τυριού ή για την αφαίρεση σωματιδίων λιποπρωτεϊνών από τον ορό γάλακτος για τη βελτίωση της λειτουργικότητας του συμπυκνώματος πρωτεΐνης ορού γάλακτος. Η καθίζηση με αιθανόλη σπάνια χρησιμοποιείται σε εργαστηριακή ή σε βιομηχανική κλίμακα και οι καζεΐνες κατακρημνίζονται από το γάλα με 40% αιθανόλη, ενώ οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος παραμένουν διαλυτές. Τέλος στην κρυογενετική καθίζηση οι καζεΐνες σε μικυλλιακή μορφή αποσταθεροποιούνται και καταβυθίζονται λόγω μείωσης pH και αύξησης της  $[\text{Ca}^{2+}]$ . Αν και οι τεχνικές αυτές είναι επιτυχείς, πρέπει επίσης να αναγνωρίσουμε την απώλεια αμινοξέων κατά την επεξεργασία δειγμάτων γαλακτοκομικών πρωτεϊνών- ακόμη και όπως σημειώνεται σε συγκεκριμένες μελέτες όπως οι Goulding et al. (2020) και Md et al. (2020).

Τα αμινοξέα έχουν σημαντικό αντίκτυπο στη σχέση με τα λίπη και τις λιποδιαλυτές βιταμίνες στα δείγματα γαλακτοκομικών προϊόντων- επηρεάζοντας έτσι σημαντικά τόσο τη διατροφική ποιότητα όσο και τη βιολογική φύση του γάλακτος. Το μονοπάτι mTOR, υπό ειδική ρύθμιση από τα αμινοξέα σε επίπεδο πρωτεϊνσύνθεσης, εμφανίζει μεγαλύτερη δραστηριότητα στο λεπτό έντερο σε σύγκριση με το γουρούνι, γεγονός που υπογραμμίζει τη σημασία των μεταφορέων αμινοξέων στην απορρόφηση και το μεταβολισμό των θρεπτικών συστατικών (Panwar et al., 2013). Τα αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας

(BCAAs) είναι από τα πιο κρίσιμα, επειδή δρουν ως πρόδρομες ουσίες για τη σύνθεση των πρωτεϊνών του γάλακτος, ενώ παράλληλα εμπλέκονται στο μεταβολισμό των λιπιδίων μέσω της πρόσληψης από το μαστό μέσω της σύνθεσης λιπαρών οξέων - διαμορφώνοντας έτσι τη σύνθεση του λίπους του γάλακτος (Mandel-Gutfreund & Margalit, 1998). Οι σχέσεις μεταξύ βιταμινών και αμινοξέων είναι εξίσου ενδιαφέρουσες- οι βιταμίνες A, B και B6 παρουσιάζουν ξεχωριστή συγγένεια προς τα κατάλοιπα τυροσίνης, φαινυλαλανίνης και τρυπτοφάνης λόγω των ειδικών ρόλων τους που βασίζονται σε αλληλουχίες σύνδεσης με άλλες πρωτεΐνες που αποτελούν μέρος των λειτουργιών (Vincent et al., 2018). Διαφορετικές μεθοδολογίες πρωτεωμικής, όπως η αλληλουχία από πάνω προς τα κάτω ή η φασματομετρία μάζας, έχουν αποκαλύψει τον περίπλοκο κόσμο των πρωτεϊνών και πεπτιδίων στις μήτρες του γάλακτος- μια κατατοπιστική εικόνα που παρέχει λεπτομερή χαρακτηρισμό σχετικά με αυτές τις αλληλεπιδράσεις των συστατικών, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ανιχνευτές για τη μελέτη φυσιολογικών διεργασιών σε περαιτέρω στάδιο (Jiang et al., 2023- Magnuson et al., 2022). Η αποκαρβοξυλίωση των αμινοξέων που οδηγεί στην παραγωγή βιογενών αμινών μπορεί να θέσει σε κίνδυνο την ποιότητα και την ασφάλεια των ιδιαίτερα ευαίσθητων αναλυτικών μεθόδων (Kasai et al., 2020) - έτσι μπορεί να επηρεαστεί η ποιότητα των γαλακτοκομικών προϊόντων. Η σύνθεση των λιπιδίων του γάλακτος μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με ακρίβεια μέσω φασματομετρίας μάζας, προκειμένου να κατανοηθούν καλύτερα οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ λιπιδίων και αμινοξέων: αυτό βοηθά στην εκτίμηση της διατροφικής αξίας (Ma et al., 2020). Η μεταβολή του μεταβολισμού των λιπαρών οξέων μέσω της μη έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων (ASIP σε επιθηλιακά κύτταρα του μαστού αγελάδας) υπογραμμίζει τη μη έκφραση, γεγονός που συνεπάγεται γενετική επίδραση στα λιπίδια του γάλακτος που αλληλεπιδρούν με τα αμινοξέα (Xie et al., 2022). Τα συστατικά-αμινοξέα, λίπη, ακόμη και βιταμίνες- δεν βρίσκουν απλώς το δρόμο τους στη διατροφή σας- δεν επιτυγχάνονται απλώς σε βιολογικό επίπεδο, αλλά αντανakλούν μια αλληλεπίδραση. Μια λεπτή ισορροπία μεταξύ αυτών των συστατικών θα πρέπει επομένως να αναζητείται ανεξάρτητα από την πολυπλοκότητά της- λέει περισσότερα από όσα βλέπει το μάτι στο πιάτο σας καθημερινά. Τα συστατικά περιλαμβάνουν βιολογικούς και γενετικούς παράγοντες. Οι πρώτοι επιδεινώνουν περαιτέρω την πολυπλοκότητα, ωστόσο η διαλεύκανση αυτών των διπλών δυναμικών είναι απαραίτητη για μια διττή προσέγγιση:

βελτιστοποίηση της ποιότητας του γάλακτος από τη μία πλευρά και βελτιστοποίηση του διατροφικού περιεχομένου από την άλλη.

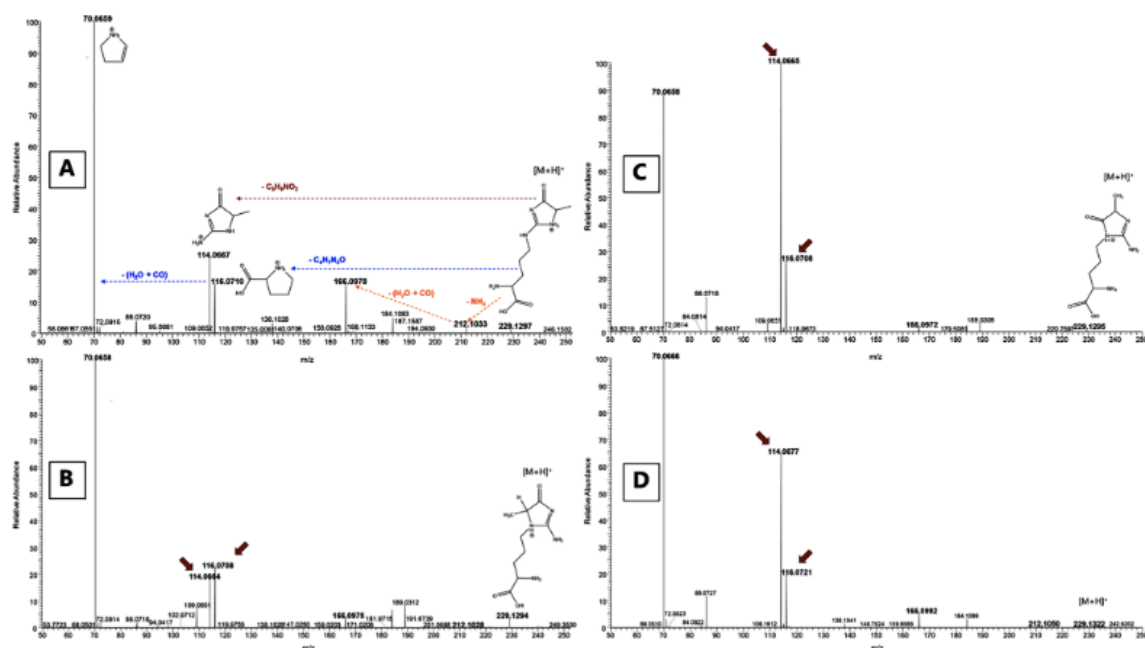
## 5 Αναλυτικές τεχνικές προσδιορισμού αμινοξέων

Η βασική χημεία των νέων και υφιστάμενων στηλών και προστηλών θα αποτελέσει το κύριο θέμα εδώ, καθώς προσφέρει μια πιο συγκεκριμένη προσέγγιση στον προσδιορισμό αμινοξέων. Στη συνέχεια θα παρουσιαστούν οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό αμινοξέων και θα δοθούν τα αντίστοιχα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματά τους. Στο τελευταίο βήμα θα γίνει ανάλυση της σημασίας των προφίλ των αμινοξέων ως προς την παρουσία τους και θα αναπτυχθούν ενδεικτικές ειδικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό ορισμένων από αυτά.

Οι Sargazi et al. (2022) έδειξαν ότι παρουσία του αντιδραστηρίου νινυδρίνη (που παρασκευάζεται σε 2-προπανόλη και περιέχει επαρκή ποσότητα αντιδραστικών οξέων, όπως φθαλκός ανυδρίτης και οξικό οξύ, ώστε να επιτρέπει την αντίδραση με τα αμινοξέα), τα χηλικά άλατα μετατρέπονται σε παράγωγα. Ως αποτέλεσμα της αντίδρασης, το χηλικό παράγωγο απορροφά ακτινοβολία σε διαφορετικά μήκη κύματος και τα επιμέρους αμινοξέα με τη μέτρηση της απορρόφησης των παραγώγων σε δύο διαφορετικά μήκη κύματος ποσοτικοποιούνται με τα όρια ανίχνευσης για τα περισσότερα αμινοξέα που απαντούν στη φύση να βρίσκονται στη χαμηλή μικρομοριακή περιοχή (Sargazi et al. 2022). Σε μια πιο διαδεδομένη τεχνική, το δείγμα διέρχεται από μια στήλη ανταλλαγής κατιόντων  $H^+$  και τα αμινοξέα διαχωρίζονται με έκλυση, αποδίδοντας αυξανόμενες συγκεντρώσεις αλκαλικού ρυθμιστικού διαλύματος. Το εκλούμενο μείγμα αναμιγνύεται με διάλυμα μετα-στήλης μεταλλικών κατιόντων, με αποτέλεσμα το σχηματισμό χηλικών αμινοξέων μεταλλικών κατιόντων, ικανών να απορροφούν φως σε διαφορετικά μήκη κύματος (Guan et al. 2021). Μέσω της υγρής χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης με ιοντική αλληλεπίδραση διαχωρίζονται όλα τα αμινοξέα των πρωτεϊνών χωρίς να απαιτείται πρόσθετη επεξεργασία πριν ή μετά τον διαχωρισμό. Με τη χρήση αυτής της τεχνικής είναι πλέον δυνατός ο προσδιορισμός αμινοξέων σε ελεύθερη μορφή στο γάλα και σε άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα σύμφωνα με μελέτη των Akillioğlu & Lund (Akillioğlu & Lund, 2022). Ο έλεγχος της αποτελεσματικότητας της υδρόλυσης στη συγκεκριμένη μελέτη, πραγματοποιήθηκε με την υποβολή συστημάτων μοντέλων

βεταλακτοσφαιρίνης (BLG) και γλυκόζης σε πρωτόκολλα υδρόλυσης με μικροκύματα και συμβατικά πρωτόκολλα υδρόλυσης φούρνου, ενώ για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας, τα περιεχόμενα λυσίνης και αργινίνης στα μοντέλα συστημάτων συγκρίθηκαν με θεωρητικές τιμές για το BLG, παρέχοντας μια βάση για την αξιολόγηση της απόδοσης και των δύο μεθόδων υδρόλυσης. Συγκεκριμένα, τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε τρία αντίτυπα για να διασφαλιστεί η αξιοπιστία και η αναπαραγωγιμότητα των αποτελεσμάτων, επικυρώνοντας έτσι την αποτελεσματικότητα των διαδικασιών υδρόλυσης για τον ποσοτικό προσδιορισμό των προηγμένων τελικών προϊόντων γλυκοζυλίωσης και των διασταυρούμενων δεσμών αμινοξέων στα τρόφιμα. Η προετοιμασία δείγματος για την ανάλυση προηγμένων τελικών προϊόντων γλυκοζυλίωσης (AGEs) και διασταυρούμενων δεσμών αμινοξέων περιλαμβάνει πολλά κρίσιμα βήματα. Πρώτον, προσδιορίζεται η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες κάθε δείγματος, ακολουθούμενη από την προσθήκη νερού στα ζυγισμένα δείγματα. Στη συνέχεια, η υδρόλυση πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας ένα πρωτόκολλο όξινης υδρόλυσης, όπου συμπυκνωμένο HCl προστίθεται σε κάθε δείγμα πριν από την υδρόλυση με τη βοήθεια μικροκύματος. Το προκύπτον υδρόλυμα στη συνέχεια διηθείται, εξατμίζεται και διαλύεται σε νερό για περαιτέρω ανάλυση, διασφαλίζοντας ότι γίνονται κατάλληλες αραιώσεις. Σε συγκεκριμένες περιπτώσεις, τα δείγματα μειώνονται πρώτα πριν υποβληθούν σε υδρόλυση για ορισμένες ενώσεις όπως η CML, ενισχύοντας την ακρίβεια της ανάλυσης. Στη συνέχεια γίνονται αραιώσεις και προσθήκη εσωτερικών προτύπων για την προετοιμασία των δειγμάτων για έγχυση στο χρωματογραφικό σύστημα, με διπλά πειράματα που εκτελούνται για κάθε δείγμα. Η ανάλυση LC-MS πραγματοποιήθηκε με τη χρήση συστήματος υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με στήλη υγρής χρωματογραφίας υδρόφιλης αλληλεπίδρασης (HILIC) για χρωματογραφικό διαχωρισμό. Για την έκλυση χρησιμοποιήθηκε δυαδική βαθμίδα νερού και ακετονιτριλίου με φορμικό αμμώνιο και μυρμηκικό οξύ με ελεγχόμενη ροή. Η χρωματογραφική εκτέλεση περιλάμβανε ένα πρόγραμμα διαβάθμισης για να εξασφαλιστεί ο αποτελεσματικός διαχωρισμός των ενώσεων ενδιαφέροντος εντός 20 λεπτών. Το στοιχείο της φασματομετρίας μάζας αποτελούνταν από φασματογράφο μάζας υψηλής ανάλυσης που λειτουργούσε σε λειτουργία θετικών ιόντων με βελτιστοποιημένες συνθήκες για βέλτιστη απόδοση. Η ταυτοποίηση και ο ποσοτικός προσδιορισμός επιτεύχθηκαν με τη χρήση MS πλήρους σάρωσης και PRM (Parallel Reaction Monitoring ) σε ανάλυση σε 17.500

FWHM (Full Width at Half Maximum), ενώ τα δεδομένα αναλύθηκαν με τη χρήση ιδιόκτητου λογισμικού. Επιπλέον, τα ιόντα ποσοτικοποίησης για κάθε αναλύτη προσδιορίστηκαν με βάση μια μέθοδο βαθμονόμησης εσωτερικού προτύπου για ακριβείς μετρήσεις. (Akillioğlu & Lund, 2022).



**Εικόνα 5.1:** Αντιπροσωπευτικά φάσματα MS/MS του πρωτονιωμένου Α) προτύπου MG-H1 Β) προτύπου MG-H2 Γ) προτύπου MG-H3 Δ) MG-H σε δείγμα μπισκότου (Akillioğlu & Lund, 2022).

Η ανάπτυξη των σύγχρονων αναλυτικών τεχνικών έχει οδηγήσει σε βελτίωση της ανίχνευσης των εγγενών αμινοξέων και ο σημαντικότερος ρόλος σε αυτό φαίνεται, σύμφωνα με μελέτη των Wang et. al (2023), να διαδραματίζει η χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων με παραγωγή μετά τη στήλη, όπου επιτυγχάνεται παραγωγή πριν από τη στήλη και στη συνέχεια υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (HPLC). Σύμφωνα με τους ίδιους συγγραφείς μέθοδοι όπως η έμμεση φωτομετρική και η αγωγιμομετρική ανίχνευση μπορούν επίσης να εφαρμοστούν με χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων (Wang et al. 2023).

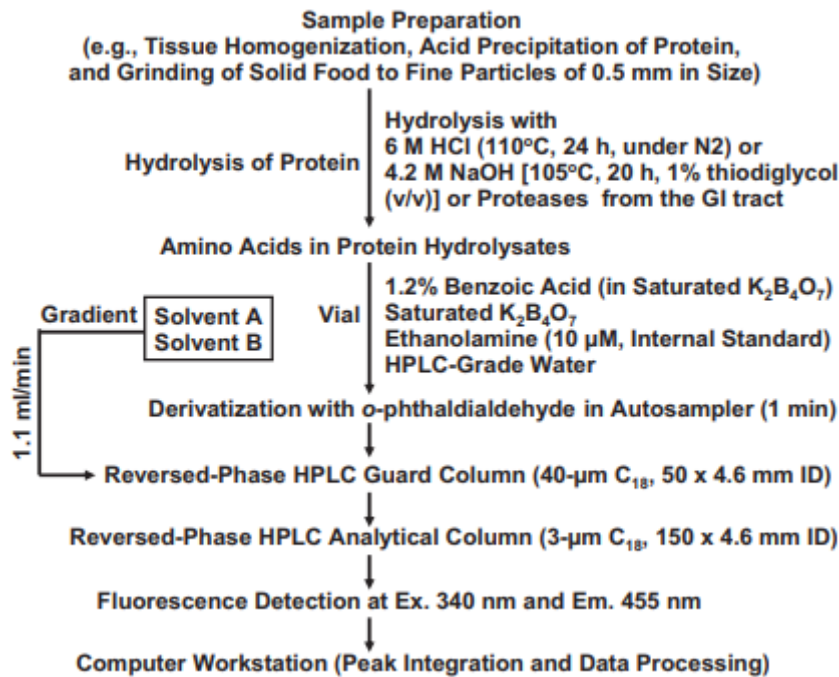


## 5.1 Κλασσικές μέθοδοι

Κλασσικά, η ανάλυση των αμινοξέων γινόταν με χρωματογραφία στήλης ανταλλαγής κατιόντων με παραγωγοποίηση μετά τη στήλη, συνηθέστερα με νινυδρίνη, ο-φθαλαλδεΰδη (OPA) ή φαινυλοϊσοθειοκυανικό (PITC) για να γίνουν τα αμινοξέα ορατά στην ανίχνευση με υπεριώδη ακτινοβολία- ή με φθορίζοντα αντιδραστήρια όπως η ναφθαλίνη-2,3-δικαρβοξυαλδεΰδη ή το πιο σταθερό αντιδραστήριο 6-αμινοκινολιλ-N-υδροξυσουκκινιμιδυλ (AccQ-Tag). Αν και αυτές οι μέθοδοι παραγωγοποίησης εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται ευρέως, απαιτούν εξειδικευμένους χειριστές, έχουν σχετικά μεγάλους χρόνους ανάλυσης και μπορεί να οδηγήσουν σε ανακρίβειες λόγω πλευρικών αντιδράσεων και ατελούς παραγωγοποίησης. Τα παράγωγα αμινοξέων που είναι ορατά με υπεριώδη ακτινοβολία ή φθορισμό συχνά δεν αναλύονται επαρκώς, ιδίως για τα ισομερή αμινοξέα. Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC) απαιτεί λιγότερο χρόνο και έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως με παραγωγοποίηση πριν από τη στήλη, ιδίως όταν χρησιμοποιούνται αντιδραστήρια 6-αμινοκινολιλ-N-υδροξυσουκκινιμιδυλίου (Rigas, 2012, 2013).

## 5.2 Σύγχρονες ενόργανες τεχνικές

Η παραγωγοποίηση (χημική τροποποίηση) πριν από τη στήλη με φθορίζοντα αντιδραστήρια εξακολουθεί να είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη προσέγγιση για την παραγωγή ανιχνεύσιμων παραγώγων αμινοξέων για ανάλυση με HPLC (Soma et al., 2022). Για την παρασκευή αμπερομετρικών βιοαισθητήρων με διαφορετικές τεχνικές ακινητοποίησης βιοσυνθετικών ενζύμων έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα αντιδραστήρια σύζευξης που αντιδρούν σε αμινοξέα, οξοοξέα, υδροξυοξέα και αμίνες. Με την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) χρησιμοποιείται στήλη που έχει σωματίδια πολύ μικρής διαμέτρου (συνήθως 3-10 μικρόμετρα) και λειτουργεί υπό συνθήκες υψηλής πίεσης (συνήθως 50-350 bar), βοηθώντας με τον τρόπο αυτό στην επίτευξη ταχύτερων και αποτελεσματικότερων διαχωρισμών των συστατικών ενός μείγματος. Σχετικά νέα στον τομέα της ανάλυσης αμινοξέων είναι η τεχνολογία των βιοαισθητήρων που χρησιμοποιεί ειδικά βιοσυνθετικά ένζυμα για την ανίχνευση των αμινοξέων-στόχων (Ghosh & Shahabi, 2021).



**Εικόνα 5.2.1:** Σχηματική ανάλυση HPLC των αμινοξέων (AA) σε πρωτεΐνες ζωικών ιστών και τροφίμων με χρήση παραγωγοποίησης προ-στήλης με οφθαλδιαλδεϋδη (OPA). Η ανάλυση HPLC απαιτεί πολλαπλά στάδια, συμπεριλαμβανομένης της προετοιμασίας του δείγματος, της αυτοματοποιημένης παραγωγοποίησης του AA με OPA, της έγχυσης του δείγματος στη στήλη, της έκλουσης με κινητή φάση, της ανίχνευσης φθορισμού και της επεξεργασίας δεδομένων. Όλες οι διαδικασίες εκτελούνται σε θερμοκρασία δωματίου (20–25 °C). Η χρήση ενός αυτόματου δειγματολήπτη είναι απαραίτητη για τον ακριβή και αναπαραγώγιμο προσδιορισμό του AA. Το εσωτερικό πρότυπο (αιθανολαμίνη) μπορεί να παραλειφθεί όταν χρησιμοποιείται η βαθμονόμηση εξωτερικού προτύπου για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του AA σε προϊόντα υδρόλυσης πρωτεϊνών.

Υπάρχουν επίσης έρευνες που αναφέρονται στη χρησιμοποίηση νανοϋλικών για την προετοιμασία του δείγματος για την αύξηση της ευαισθησίας του προσδιορισμού των αμινοξέων. Η χρησιμοποίηση νανοϋλικών στην ανίχνευση αμινοξέων έχει γίνει ένα από τα πιο δημοφιλή πεδία έρευνας τα τελευταία χρόνια. Τα νανοϋλικά, όπως οι νανοσωλήνες άνθρακα, οι νανοκρύσταλλοι και οι νανοσωματίδια, έχουν δείξει μεγάλη δυναμική στην ανίχνευση αμινοξέων λόγω της υψηλής τους επιφανειακής περιοχής και της δυνατότητας τροποποίησής τους με λειτουργικές ομάδες. Για παράδειγμα, οι νανοσωλήνες άνθρακα έχουν χρησιμοποιηθεί ως υποστρώματα για την ανίχνευση αμινοξέων μέσω ηλεκτροχημικής ανίχνευσης (Jacobs et al., 2010). Επιπλέον, οι νανοκρύσταλλοι έχουν χρησιμοποιηθεί ως σηματοδότες φθορισμού για την ανίχνευση αμινοξέων. Η



χρησιμοποίηση νανοϋλικών στην ανίχνευση αμινοξέων προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα, όπως την αυξημένη ευαισθησία και την επιλεκτικότητα, καθώς και τη δυνατότητα για την ανίχνευση πολλών αμινοξέων ταυτόχρονα..

Οι σύγχρονες ενόργανες τεχνικές που χρησιμοποιούνται ευρέως για τον προσδιορισμό των αμινοξέων στα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι η υγρή χρωματογραφία και η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση, σε συνδυασμό με διάφορες μεθόδους ανίχνευσης και κυρίως τη φασματομετρία μάζας. Αναπτύσσονται με την χρήση χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης σε σύζευξη με τεχνικές φασματομετρίας μάζας . Η υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης (Ultra Performance Liquid Chromatography - UPLC) είναι μια ισχυρή προσέγγιση που μπορεί να μειώσει σημαντικά τον χρόνο ανάλυσης και το κόστος των διαλυτών με τη γρήγορη έγχυση δειγμάτων και χημικής τροποποίησης πριν από την είσοδό τους στη χρωματογραφική στήλη. Πολύ πρόσφατες μέθοδοι χρησιμοποιούν νανοϋλικά για την προετοιμασία του δείγματος για να αυξήσουν περαιτέρω την ευαισθησία του προσδιορισμού των αμινοξέων. Σχετικά νέα στον τομέα της ανάλυσης αμινοξέων είναι η τεχνολογία των βιοαισθητήρων που χρησιμοποιεί ειδικά βιοσυνθετικά ένζυμα για την ανίχνευση των αμινοξέων-στόχων (Imperiale et al., 2023- Poinsot et al., 2014).

### 5.2.1 Χρωματογραφικές μέθοδοι

Τα αμινοξέα αποτελούν μια σημαντική κατηγορία κυτταρικών μεταβολιτών, θεμελιώδεις για πολλές βιοχημικές διεργασίες. Εκτός από το να χρησιμεύουν ως δομικά στοιχεία στη σύνθεση πρωτεϊνών, αντιπροσωπεύουν μια σημαντική πηγή ενέργειας, χρησιμεύουν ως βιοσυνθετικοί πρόδρομοι των κατεχολαμινών και η ανάλυση τους χρησιμοποιείται στην κλινική χημεία για την ανίχνευση βιοδεικτών εγγενών σφαλμάτων του μεταβολισμού. Γίνεται λοιπόν αντιληπτό πόσο σημαντική είναι η γρήγορη ποσοτική τους ανάλυση.

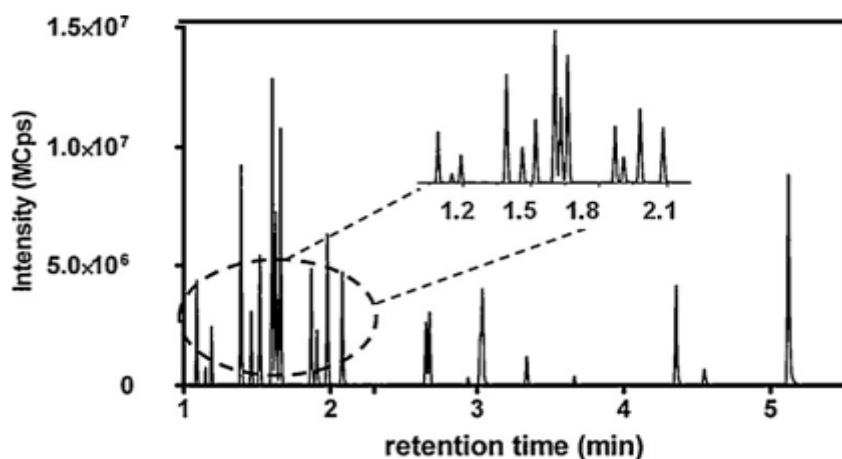
Οι μέθοδοι χρωματογραφίας έχουν ορισμένα πλεονεκτήματα έναντι της χρήσης βιοαισθητήρων για τον προσδιορισμό των αμινοξέων στα γαλακτοκομικά προϊόντα: είναι εξαιρετικά ακριβείς, έχουν χαμηλό όριο ανίχνευσης και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάλυση πολλών δειγμάτων γρήγορα. Στα μειονεκτήματά τους περιλαμβάνονται το υψηλό κόστος λειτουργίας, η ανάγκη για άρτια εκπαιδευμένο προσωπικό, η ανάγκη για

προεπεξεργασία του δείγματος εάν η μήτρα είναι πολύπλοκη (π.χ. καταβύθιση πρωτεϊνών, υπερδιήθηση), η χρήση τοξικών χημικών ουσιών και η παραγωγή σημαντικής ποσότητας χημικών αποβλήτων. Η εφαρμογή νέων, πιο μικρών και πιο αποτελεσματικών τεχνολογιών, όπως τα μικροσκοπικά συστήματα ανάλυσης και η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση, μπορεί να μειώσει ή να εξαλείψει κάποια από τα μειονεκτήματα των παραδοσιακών χρωματογραφικών μεθόδων (Krumprochova et al., 2015- Nejadmansouri et al., 2021- Shimatzu, n.d.).

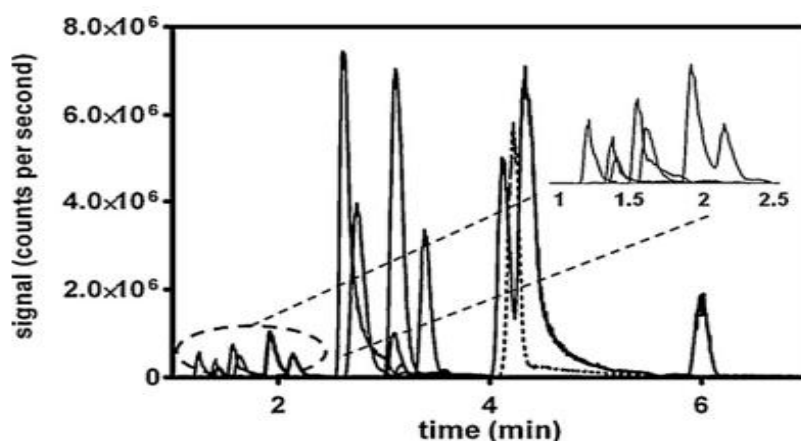
Αρκετά διαδεδομένη είναι η αέρια χρωματογραφία (GC) με ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας ή συλλέκτη ηλεκτρονίων με καλούς χρόνους και ισχύς ανάλυσης αλλά τα αμινοξέα πρέπει να παραγωγοποιηθούν πριν από την ανάλυση. Κάποια πρωτόκολλα παραγωγοποίησης GC περιλαμβάνουν ακυλίωση N και εστεροποίηση της ομάδας καρβοξυλικού οξέος από πενταφθοροπροπιονικό ανυδρίτη και ισοπροπανόλη ή τριφθοροξικό ανυδρίτη και ισοπροπανόλη ή όπως περιέγραψε ο Husek μια ταχεία παραγωγοποίηση των αμινοξέων από χλωρομυρμηκικούς αλκυλεστέρες όπου τα καρβοξυλικά οξέα μετατρέπονται σε εστέρες και οι ομάδες αμίνης σε καρβαμίδια και τα παράγωγα μπορούν εύκολα να εκχυλιστούν σε έναν οργανικό διαλύτη και να εγχυθούν απευθείας στο GC-MS.

Υπάρχουν επίσης αρκετές μέθοδοι για την ανάλυση των αμινοξέων σε βιολογικά δείγματα με βάση την υγρή χρωματογραφία (LC), με ή χωρίς παραγωγοποίηση. Ο διαχωρισμός ανάστροφης φάσης LC (RPLC) των υπο-ιοντοποιημένων αμινοξέων συνήθως δεν μπορεί να επιτευχθεί εκτός εάν χρησιμοποιηθούν παράγοντες ιοντοσύζευξης. Για RPLC-MS, θα πρέπει να επιλέγονται πτητικά μέσα ζευγαρώματος ιόντων, όπως υπερφθοροαλκανοϊκά οξέα με διαφορετικό μήκος άνθρακα, π.χ., TFA (C2). Ωστόσο, αυτά τα αντιδραστήρια ζευγαρώματος ιόντων εξακολουθούν να οδηγούν σε προβλήματα στο LC-MS, όπως η κακή απόδοση ιονισμού λόγω καταστολής ιονισμού και/ή μόλυνσης της πηγής ιόντων. Προκειμένου να αποφευχθούν τέτοια προβλήματα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί υδρόφιλη αλληλεπίδραση LC (HILIC). Το HILIC-MS χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία για τον διαχωρισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των αμινοξέων από διαφορετικές μήτρες. Η παραγωγοποίηση με ο-φθαλδιαλδεΰδη ή χλωριούχο φλουορενυλομεθυλοξυκαρβονύλιο ακολουθούμενη από υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης σε αντίστροφη φάση (HPLC) με ανίχνευση φθορισμού είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη χρωματογραφική μέθοδος για τον προσδιορισμό των αμινοξέων στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Η εφαρμογή

της παραγωγοποίησης της ο-φθαλδιαλδεϋδης με HPLC και UPLC είναι επωφελής λόγω της ταχύτητας, της ευαισθησίας, της ακρίβειας και της αυτοματοποίησής της. Εκτός από αυτές τις μεθόδους, άλλες τεχνικές ανίχνευσης που χρησιμοποιούνται με HPLC περιλαμβάνουν UV, NIR και φασματομετρία μάζας. Επιπλέον, μπορεί να εξεταστεί επίσης η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση σε συνδυασμό με ανίχνευση UV ή MS.. Μια εξαιρετικά ακριβής μέθοδος για τον προσδιορισμό των αμινοξέων θα ήταν η HPLC-φασματομετρία μάζας με αραίωση ισοτόπων, η οποία έχει αναπτυχθεί και επικυρωθεί ως μέθοδος αναφοράς (Hanczkó & Molnár-Perl, 2003- Rustam & Reid, 2018).



**Εικόνα 5.2.1.1 :** Ανάλυση αμινοξέων παραγωγοποιημένων με χλωρομυρμηκικό προπυλεστέρα με GC MS σε λειτουργία SIM. Η περιοχή από 1 έως 2 λεπτά όπου εκλούνται τα περισσότερα αμινοξέα διευρύνεται.



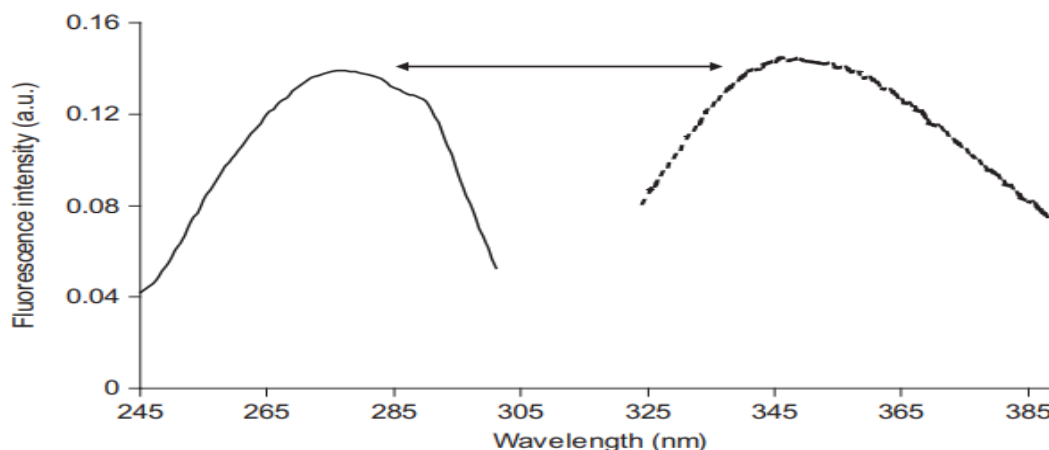
**Εικόνα 5.2.1.2 :** Ανάλυση ισομοριακού χλωρομυρμηκικού προπυλεστέρα – παραγωγοποιημένων αμινοξέων με RPLC–MS σε λειτουργία SRM. Η περιοχή από 1 έως 2,5 λεπτά όπου εκλούνται τα περισσότερα ΑΑ διευρύνεται.

Τα γαλακτοκομικά προϊόντα αποτελούν βασικό συστατικό της διατροφής πολλών ανθρώπων, επομένως είναι σημαντικό να διασφαλίζεται ότι η ποιότητα και η διατροφική αξία των προϊόντων αυτών είναι όπως διαφημίζεται. Η ανάλυση αμινοξέων μπορεί να βοηθήσει στον έλεγχο για απάτη στην ετικέτα ή να επιβεβαιώσει τη δηλωμένη σύνθεση αμινοξέων σε μια ποικιλία γαλακτοκομικών προϊόντων. Επιπλέον, η ανάλυση των αμινοξέων είναι σημαντική για την αξιολόγηση της ποιότητας των πρωτεϊνών. Είναι μια τυπική μέθοδος για τον προσδιορισμό της πλήρους σύνθεσης αμινοξέων των πρωτεϊνών στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Ενώ ο προσδιορισμός των αμινοξέων χρησιμοποιείται κυρίως ως μέσο χαρακτηρισμού των πρωτεϊνών, η ανάλυση των αμινοξέων μπορεί επίσης να διαδραματίσει ρόλο στην αξιολόγηση της ποιότητας των γαλακτοκομικών προϊόντων- για παράδειγμα, είναι ευαίσθητη στον χρόνο θερμικής επεξεργασίας στο γάλα και στον βαθμό πρωτεόλυσης στο τυρί. Η παρούσα μελέτη διερεύνησε τη χρήση της HPLC ως γρήγορης και αξιόπιστης μεθόδου για τον προσδιορισμό της σύνθεσης αμινοξέων διαφόρων γαλακτοκομικών προϊόντων. Η ανίχνευση φθορισμού προσφέρει αναφερόμενα πλεονεκτήματα, όπως υψηλή ευαισθησία, χαμηλό θόρυβο και εκλεκτικότητα. Τα δείγματα που διερευνήθηκαν περιλάμβαναν σκόνη αγελαδινού και κατσικίσιου γάλακτος, τυριά και σκόνες ορού γάλακτος και καζεΐνης. Διαπιστώθηκε ότι η υδρόλυση των δειγμάτων σε 6 N HCl για 24 ώρες και στη συνέχεια η παραγωγή των αμινοξέων με ισοθειοκυανικό φαινυλο οδήγησε στην καλύτερη χρωματογραφική απόδοση. Επιτεύχθηκε πλήρης διαχωρισμός 31 αμινοξέων σε λιγότερο από 80 λεπτά, με ρυθμό ροής 1 ml/min. Η μέθοδος ήταν αναπαραγώγιμη και ακριβής, με εκτιμήσεις σφαλμάτων χαμηλότερες από 2% (Darragh & Moughan, 2005).

### 5.2.2 Φασματοσκοπικές μέθοδοι

Η φασματοσκοπία υπερύθρου που λειτουργεί στη φασματική περιοχή του εγγύς υπερύθρου (NIR) (700-2500 nm) είναι μια ταχεία τεχνική που έχει χρησιμοποιηθεί για την ποσοτική ανάλυση διαφόρων συστατικών στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Η φασματική περιοχή που χρησιμοποιείται συνήθως για τον προσδιορισμό των αμινοξέων είναι η δεύτερη υπερύψωση των θεμελιωδών ζωνών τάνυσης NH και OH. Οι ζώνες NH είναι πολύ ισχυρές και παρέχουν το μεγαλύτερο μέρος της ευαισθησίας των σημάτων αμινοξέων. Το νερό έχει επίσης τον δεύτερο υπερτόνο του κοντά στη φασματική περιοχή

των αμινοξέων. Δεδομένου ότι τα περισσότερα γαλακτοκομικά προϊόντα περιέχουν μεγάλες ποσότητες νερού, η συμβολή του πρέπει να λαμβάνεται υπόψη (Karoui, 2018- Manley & Baeten, 2018).



**Εικόνα 5.2.1.:** Φάσματα φθορισμού διέγερσης (πλήρης γραμμή) και εκπομπής (διακεκομμένη γραμμή) τρυπτοφάνης που καταγράφηκαν σε UHT ( ultra high temperature) γάλα – γάλα υψηλής παστερίωσης.

Η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των αμινοξέων στα γαλακτοκομικά προϊόντα μπορεί να επιτευχθεί με πολλές φασματοσκοπικές μεθόδους που έχουν τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά τους. Με τη συνδυασμένη τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με δύο (εν σειρά) ανιχνευτές HPLC, DAD (Διάταξης Διόδου - Diode Array Detector) και FLD ( Φθορισμού - Fluorescence Detector) αναλύεται ευκολότερα το προφίλ ελεύθερων αμινοξέων σε πλάσμα πρωτογάλακτος χοίρων ενώ η ευαισθησία εξειδίκευσης εξασφαλίζεται μέσω υψηλής ευαισθησίας και εξειδίκευσης (Olk et al., 2008). Στην μελέτη των Sassi et al. (2015) παρουσιάστηκε μία νέα προσέγγιση, σύμφωνα με την οποία χρησιμοποιούνται ηλεκτρικές προσεγγίσεις για να μετρήσουν τις ιδιότητες των μορίων. Αυτή η μέθοδος βασίζεται στη χρήση συνδέσεων μεταξύ γραφενίου, μορίου και γραφενίου. Το γραφένιο είναι ένα υλικό με εξαιρετικές ηλεκτρικές ιδιότητες. Όταν ένα μόριο αμινοξέος προσεγγίσει τη σύνδεση γραφενίου-μορίου-γραφενίου, προκαλεί μια μοναδική διακύμανση του ρεύματος η οποία είναι χαρακτηριστική για το κάθε μόριο αμινοξέος και το διακρίνει από άλλα αμινοξέα. Έτσι γίνεται εφικτή μέτρηση των

αμινοξέων σε πραγματικό χρόνο, ακόμα και μέσα στο ζωντανό οργανισμό (in vivo) (Sassi et al., 2015).

Για την ανίχνευση αμινοξέων που περιέχουν θείο, όπως η μεθειονίνη και η κυστεΐνη, αναπτύσσονται βακτηριακοί βιοαισθητήρες. Οι βακτηριακοί βιοαισθητήρες είναι μικροοργανισμοί που έχουν σχεδιαστεί να ανιχνεύουν συγκεκριμένες ουσίες, όπως αμινοξέα μεταφράζοντας την παρουσία ενός μεταβολίτη (δηλαδή, ενός προϊόντος του μεταβολισμού) στην έκφραση γονιδίων αναφοράς. Αυτό σημαίνει ότι όταν ο βιοαισθητήρας ανιχνεύσει την παρουσία ενός αμινοξέος που περιέχει θείο, θα ενεργοποιήσει την έκφραση ενός συγκεκριμένου γονιδίου. Το γονίδιο αναφοράς είναι ένα γονίδιο που έχει επιλεγεί ως σημείο αναφοράς για την ανίχνευση της παρουσίας του αμινοξέος. Όταν το γονίδιο αυτό εκφράζεται, σημαίνει ότι ο βιοαισθητήρας έχει ανιχνεύσει την παρουσία του αμινοξέος. Σε αυτήν την περίπτωση, οι βιοαισθητήρες έχουν σχεδιαστεί να ανιχνεύουν αμινοξέα που περιέχουν θείο, όπως η μεθειονίνη και η κυστεΐνη. (Liu et al., 2021). Για να ανιχνεύσουν τη νοθεία μελαμίνης στο γάλα, χρησιμοποιούνται μικροσυστοιχίες κρυστάλλου χαλαζία που έχουν επικαλυφθεί με ειδικά σχεδιασμένα πολυμερή. Αυτά τα πολυμερή έχουν σχεδιαστεί να αναγνωρίζουν και να προσδένουν συγκεκριμένες πρωτεΐνες που υπάρχουν στο γάλα. Όταν η μελαμίνη είναι παρούσα, οι πρωτεΐνες αυτές αλληλεπιδρούν με το πολυμερές, προκαλώντας μια αλλαγή που μπορεί να ανιχνευθεί. Αυτή η μέθοδος εμφανίζεται ως ιδιαίτερως ευαίσθητη και μπορεί να ανιχνεύσει ακόμα και μικρές ποσότητες μελαμίνης στο γάλα. (Moniente et al., 2022). Η ανάλυση των αμινοξέων στα γαλακτοκομικά προϊόντα για μεγαλύτερη ακρίβεια και παραγωγικότητα μέσω φασματοσκοπικών μεθόδων δικαιολογείται από την άποψη του ποιοτικού ελέγχου και της ασφάλειας των τροφίμων.

### 5.2.3 Φασματομετρία Μάζας

Ο φασματομετρικός ποσοτικός προσδιορισμός μάζας των αμινοξέων πραγματοποιείται συνήθως μετά από χημική παραγωγοποίηση. Αυτό είναι απαραίτητο όταν τα αμινοξέα είναι ουδέτερα και δεν φέρουν ομάδα που ιονίζεται. Τα αμινοξέα μπορούν να υποστούν χημικές αντιδράσεις με διάφορα αντιδραστήρια για να σχηματίσουν νέες ενώσεις με διαφορετικές ιδιότητες. Αυτές οι αντιδράσεις μπορούν να οδηγήσουν στη δημιουργία φορτισμένων ή εύκολα ιοντιζόμενων ενώσεων (παραγωγοποίηση). Για παράδειγμα, τα αμινοξέα μπορούν να αντιδράσουν με αντιδραστήρια όπως οξέα ή βάσεις για να



σχηματίζουν ιόντα ή zwitterions (από το γερμανικό "Zwitter", που σημαίνει "διπλό", είναι ένα είδος χημικών ενώσεων που έχουν και θετική και αρνητική ηλεκτρική φορτίο στο ίδιο μόριο). Αυτές οι ενώσεις μπορούν να έχουν διαφορετικές ιδιότητες από τα αρχικά αμινοξέα, όπως διαφορετική πολικότητα, διαλυτότητα ή χημική σταθερότητα.

Σε αντίθεση με τις αέριες χρωματογραφικές αναλύσεις, στις οποίες τα αμινοξέα μετατρέπονται σε πτητικά παράγωγα, η υγρή χρωματογραφία απαιτεί παραγωγοποίηση με ενώσεις που παράγουν χρωμοφόρα ή φθορίζουσα και, επιπλέον, καθιστούν το αμινοξύ ή το παράγωγό του φορτισμένο. Χρησιμοποιώντας φωτοχημική παραγωγοποίηση (Photochemical derivatization - PD) μετέτρεπαν μη φθορίζων αναλυτές στις αντίστοιχες φθορίζουσες μορφές τους. Χρησιμοποίησαν την τεχνική PD, καθεμία με ξεχωριστές διαδικασίες και εφαρμογές. Στην PD πριν από τη στήλη, τα αναλυτικά στοιχεία υποβλήθηκαν σε φωτοχημικές αντιδράσεις πριν από τον διαχωρισμό στη χρωματογραφική στήλη. Αντίθετα, η PD μετά τη στήλη διεξήχθη μετά το διαχωρισμό στη στήλη αλλά πριν από την ανίχνευση. Ένας φωτοχημικός αντιδραστήρας τοποθετήθηκε για να διευκολύνει την ταχεία μετατροπή των μη φθορίζων αναλυτών στα φθορίζοντα παράγωγά τους. Το PD μετά τη στήλη είναι πολύτιμο για την ενίσχυση της επιλεκτικότητας και της ευαισθησίας στην ανίχνευση αναλυόμενης ουσίας. Στη μελέτη, η ακριβής ποσοτικοποίηση των αμινοξέων επιτεύχθηκε μέσω της χρήσης υγρής χρωματογραφίας συλλαβωμένης στο φωτοεπαγόμενο σύστημα ανίχνευσης φθορισμού μετά στήλη (Lc-HV-FLD). Αυτή η αναλυτική τεχνική διευκόλυνε τον ακριβή προσδιορισμό των αμινοξέων σε επίπεδα ιχνοστοιχείων σε διάφορες μήτρες δειγμάτων, συμπεριλαμβανομένων δειγμάτων τροφίμων, βιολογικών και περιβαλλοντικών. Οι αποτελεσματικές και αναπαραγωγίμες μέθοδοι παραγωγής με βάση την υπεριώδη ακτινοβολία που χρησιμοποιούνται στο σύστημα Lc-HV-FLD επέτρεψαν τον ποσοτικό προσδιορισμό των αναλυτών με εξαιρετική ευαισθησία, ειδικότητα, ευρωστία, κατώτερο όριο ανίχνευσης (LOD) και ελάχιστα εφέ μήτρας. Αυτή η μεθοδολογική προσέγγιση προσέφερε σημαντικά πλεονεκτήματα για τον ποσοτικό προσδιορισμό των αμινοξέων, παρουσιάζοντας ενισχυμένη ικανότητα ανίχνευσης αμινοξέων ακόμη και σε νανομοριακά επίπεδα (Muhammad et al. 2022).

Οι φασματομετρικές τεχνικές μάζας μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για ποσοτικοποίηση. Οι φασματομετρικές τεχνικές μάζας μπορούν επίσης να

χρησιμοποιηθούν για ποσοτικοποίηση. Το πλεονέκτημα της φασματομετρίας μάζας είναι ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με τεχνικές διαχωρισμού, όπως η αέρια χρωματογραφία, η υγρή χρωματογραφία ή η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση. Η φασματομετρία μάζας είναι πολύ επιλεκτική, επειδή η διάσπαση των μοριακών ιόντων λόγω σύγκρουσης παράγει θραύσματα που είναι μοναδικά για μια δεδομένη ένωση. Αυτό εφαρμόζεται περισσότερο όταν πρόκειται για διαφορετικά ισότοπα αμινοξέων που έχουν σημανθεί με σταθερά ισότοπα άνθρακα, αζώτου ή υδρογόνου. Η χρήση επισημασμένων με ισότοπα αμινοξέων ή παραγώγων τους έχει υψηλή εκλεκτικότητα στην ποσοτικοποίηση μεμονωμένων αμινοξέων σε πολύ σύνθετα μείγματα, όπως το υδρολυτικό πρωτεϊνών, με υγρή χρωματογραφία και φασματομετρία μάζας ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό (Hossain, 2020; Wei et al., 2022).

Η έρευνα των El-Ghaish et al. (2011) βρήκε ένα ενδιαφέρον αποτέλεσμα - τα κύτταρα *Lactobacillus fermentum* IFO3956 παρουσιάζουν υψηλότερη δραστικότητα πρωτεάσης όταν αναπτύσσονται σε μέσο με βάση το γάλα αντί για μέσο χωρίς γάλα. Η πιο αποτελεσματική εκχύλιση των πρωτεασών που συνδέονται με τα κύτταρα από το γάλα παρατηρήθηκε με 1% Tween 80, ενώ 1% SDS είχε ανασταλτική επίδραση στην πρωτεολυτική δραστηριότητα. Η ανάλυση με φασματομετρία μάζας όσον αφορά τους υδρολύτες της αS1-καζεΐνης αποκάλυψε συνολικά 24 πεπτίδια, τα οποία περιλάμβαναν φωσφορυλιωμένα πεπτίδια που προέρχονταν κυρίως από το N-τελικό τμήμα της αS1-καζεΐνης. Μια μελέτη κατάφερε να βρει 11 αμινοξέα χρησιμοποιώντας έναν στόχο τύπου MALDI από μονοϊσοτοπικά κατιονικά νανοσωματίδια 109 Ag με διαφορετικές ιδιότητες. Στη συγκεκριμένη εργασία ερευνήθηκε η απόκριση ενάντια στο βακτηριακό στέλεχος που είναι ικανό να υδρολύει την αS1-καζεΐνη σε πολλαπλά σημεία, μειώνοντας έτσι το αλλεργιογόνο δυναμικό της, και προτάθηκε μια καινοτόμα προσέγγιση για την ανίχνευση αμινοξέων εντός γαλακτοκομικών προϊόντων χρησιμοποιώντας τεχνικές φασματομετρίας μάζας. Αυτή η καινοτόμα στρατηγική αξιοποίησε την ενζυματική διάσπαση της αS1-καζεΐνης, οδηγώντας στη δημιουργία φορτισμένων ή εύκολα ιοντιζόμενων ενώσεων, οι οποίες μπορούν στη συνέχεια να αναλυθούν χρησιμοποιώντας φασματομετρία μάζας. Εκμεταλλευόμενοι τις μοναδικές ιδιότητες αυτών των ενώσεων, οι συγγραφείς ανέπτυξαν μια ευαίσθητη και ειδική μέθοδο για την ανίχνευση αμινοξέων σε γαλακτοκομικά προϊόντα, συμβάλλοντας τελικά στην ανάπτυξη μιας βαθύτερης κατανόησης του



αλλεργιογόνου δυναμικού αυτών των ενώσεων. Μια μελέτη κατάφερε να βρει 11 αμινοξέα χρησιμοποιώντας έναν στόχο τύπου MALDI από μονοϊσοτοπικά κατιονικά νανοσωματίδια  $10^9$  Ag με διαφορετικές ιδιότητες. Η προσέγγιση έδειξε υψηλή ευαισθησία, με όρια ανίχνευσης που κυμαίνονται από 100 µg/mL έως 1 ng/mL- αυτό μπορεί να απεικονιστεί ως 50 ng έως 500 fg για κάθε θέση στην οποία γίνονται οι μετρήσεις. Τα ευρήματα της συγκεκριμένης εργασίας υπογράμμισαν την περίπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ βακτηριακών πρωτεασών και πρωτεϊνών γάλακτος, προσφέροντας πληροφορίες για τους μηχανισμούς που διέπουν τη διαμόρφωση της ανοσοαντιδραστικότητας και της αλλεργιογονικότητας στα γαλακτοκομικά προϊόντα (El-Ghaish et al., 2011). Στην μελέτη του ο Harper (2007) χρονολογεί την εξέλιξη της χημείας γεύσης στα γαλακτοκομικά τρόφιμα για έξι δεκαετίες, επισημαίνοντας τη μετάβαση από τις παραδοσιακές προσεγγίσεις «υγρής χημείας» στην καινοτόμο χρήση χρωματογραφίας, των ραδιοϊσοτόπων και της φασματομετρίας μάζας. Μια σημαντική πρακτική συνέπεια αυτής της εκτεταμένης έρευνας ήταν η προσπάθεια να ενισχύσει την κατανόηση των σύνθετων προφίλ γεύσης των γαλακτοκομικών προϊόντων όπως το βούτυρο, το τυρί, το γάλα, το παγωτό και τα προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση. Χρησιμοποιώντας προηγμένες αναλυτικές τεχνικές, οι μελετητές εντόπισαν βασικές αρωματικές ενώσεις σε αυτά τα προϊόντα, οδηγώντας σε πιθανές εφαρμογές στην ανάπτυξη προϊόντων διατροφής και τον ποιοτικό έλεγχο. Επιπλέον, η εργασία υπογραμμίζει τη σημασία συγκεκριμένων ενώσεων για τη συμβολή στις μοναδικές γεύσεις των γαλακτοκομικών προϊόντων. Για παράδειγμα, η εξερεύνηση των αμινοξέων ως βασικών συστατικών στη γεύση τυριού Cheddar τη δεκαετία του 1940 ρίχνει φως στα θεμελιώδη δομικά στοιχεία της γεύσης στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Αυτή η γνώση φαίνεται ότι μπορεί να εφαρμοστεί πρακτικά στη δημιουργία στοχευμένων γεύσεων στις διαδικασίες παραγωγής τροφίμων για την κάλυψη των προτιμήσεων των καταναλωτών και την ενίσχυση της διαφοροποίησης των προϊόντων. Επιπλέον, η ανακάλυψη πολυλειτουργικών θειολών υψηλής γεύσης ως πιθανών συστατικών γεύσης στο τυρί Cheddar τη δεκαετία του 2000 δείχνει τη συνεχιζόμενη συνάφεια της έρευνας γεύσης στα γαλακτοκομικά τρόφιμα και τα ευρήματα έχουν πρακτικές επιπτώσεις στην ανάπτυξη νέων ποικιλιών τυριών ή στη βελτίωση των υπαρχόντων με χειρισμό αρωματικών ενώσεων για την επίτευξη συγκεκριμένων προφίλ γεύσης. Η έρευνα του Harper αν και παλιά (άνω των 60 ετών) ασχολείται με τις γεύσεις του βουτύρου, του τυριού, του

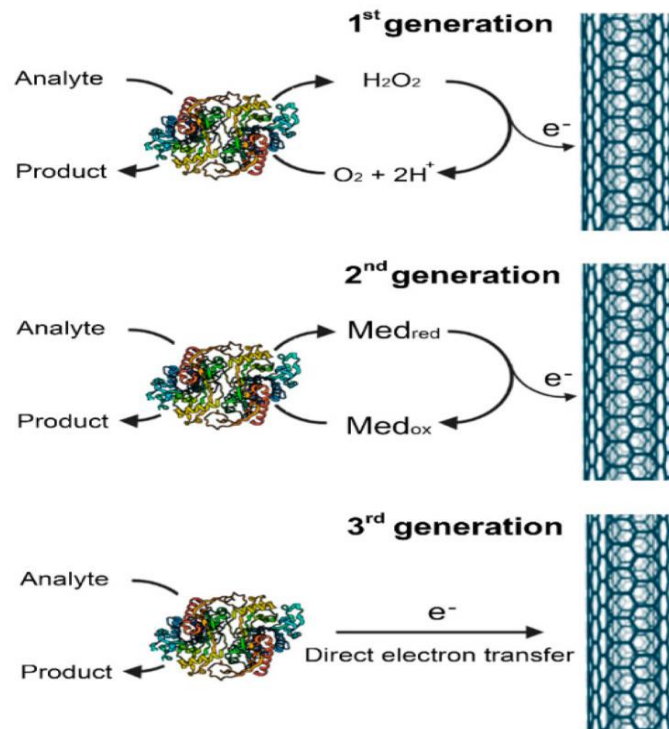
γάλακτος, του παγωτού καθώς και των ζυμωμένων προϊόντων και παρουσιάζει τα αμινοξέα ως τις ενώσεις που δίνουν στο τυρί Cheddar τη χαρακτηριστική του γεύση χρησιμοποιώντας τη φασματομετρία μάζας για την εύρεση πολυλειτουργικών θειολών που μπορεί να είναι σε θέση να συμβάλουν σημαντικά στη γεύση των γαλακτοκομικών προϊόντων, ενώ παράλληλα παρέχει πολύτιμες πληροφορίες για τους ερευνητές που ενδιαφέρονται να μελετήσουν διάφορα είδη τροφίμων μέσω της χημικής τους σύστασης.

#### 5.2.4 Τεχνικές βιοαισθητήρων

Σύμφωνα με τη Διεθνή Ένωση Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας (International Congress of Applied Chemistry / IUPAC) , ο "βιοαισθητήρας" είναι "μια συσκευή που χρησιμοποιεί συγκεκριμένες βιοχημικές αντιδράσεις που μεσολαβούνται από απομονωμένα ένζυμα, ανοσοσυστήματα, ιστούς, οργανίδια ή ολόκληρα κύτταρα για την ανίχνευση χημικών ενώσεων, συνήθως μέσω ηλεκτρικών, θερμικών ή οπτικών σημάτων" (Cammann, 1977; Thévenot et al., 2001). Αυτός ο ορισμός περιγράφει τη συσκευή ως "μια συσκευή που χρησιμοποιεί βιοαισθητήρες για την ανίχνευση χημικών ενώσεων". Τα ακόλουθα είναι τα τρία κύρια συστατικά που συνθέτουν έναν βιοαισθητήρα: i) ένας βιοϋποδοχέας, ο οποίος είναι ένα μόριο (όπως ένα ένζυμο, ένα κύτταρο ή ένα αντίσωμα) που αναγνωρίζει τον αναλύτη- ii) ένας μετατροπέας, ο οποίος είναι ένα στοιχείο που μετατρέπει το γεγονός της βιοαναγνώρισης σε μετρήσιμο σήμα- και iii) ηλεκτρονικά, τα οποία είναι ένα σύστημα επεξεργασίας σήματος που μετατρέπει το μετατρεπόμενο σήμα σε μορφή απεικόνισης, που απεικονίζει την παρουσία του αναλύτη-στόχου.

Οι διάφοροι τύποι βιοαισθητήρων διακρίνονται μεταξύ τους ανάλογα με την υποκείμενη αρχή λειτουργίας. Το συμβάν βιοαναγνώρισης (το σήμα) μπορεί να οδηγήσει σε ποικίλες φυσικές μεταβολές, συμπεριλαμβανομένων ενδεικτικά των εξής: (i) παραγωγή θερμότητας (θερμιδομετρικοί βιοαισθητήρες)- ii) διαφορετική κατανομή φορτίου (ποτενσιομετρικοί βιοαισθητήρες)- iii) κίνηση ηλεκτρονίων που παράγονται σε αντίδραση οξειδοαναγωγής (αμπερομετρικοί βιοαισθητήρες)- iv) αλλαγή απορρόφησης/φθορισμού (οπτικοί βιοαισθητήρες)- ή v) αλλαγή ταλάντωσης λόγω δέσμευσης μάζας σε κρυσταλλική επιφάνεια (πιεζοηλεκτρικοί βιοαισθητήρες). Η τεχνική του ηλεκτροχημικού

βιοαισθητήρα, γνωστή ως αμπερομετρία, είναι αυτή που έχει λάβει τη μεγαλύτερη προσοχή από τους ερευνητές. Η τεχνική αυτή περιλαμβάνει την εφαρμογή σταθερού δυναμικού μεταξύ ενός ηλεκτροδίου εργασίας και ενός ηλεκτροδίου αναφοράς. Το δυναμικό αυτό προκαλεί αντιδράσεις οξειδοαναγωγής, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα ένα καθαρό ρεύμα που είναι ανάλογο της συγκέντρωσης του αναλύτη στο διάλυμα (Patel et al., 2016; Rocchitta et al., 2016). Οι οξειδάσες είναι τα ένζυμα που έχουν χρησιμοποιηθεί συχνότερα για αυτούς τους βιοαισθητήρες. Οι οξειδάσες είναι υπεύθυνες για την παρακολούθηση είτε της ποσότητας οξυγόνου που καταναλώνεται είτε της ποσότητας υπεροξειδίου του υδρογόνου που δημιουργείται (Kacaniklic et al., 1994; Rosini et al., 2008). Έχουν δημιουργηθεί τρία διαφορετικά είδη αμπερομετρικών βιοαισθητήρων (Rocchitta et al., 2016). Στην πρώτη γενιά βιοαισθητήρων, το ηλεκτρικό σήμα παράγεται από το προϊόν της αντίδρασης που διαχέεται στον μετατροπέα. Στη δεύτερη γενιά χρησιμοποιούνται ειδικοί μεσολαβητές, οι οποίοι είναι οργανικές ενώσεις που μεταφέρουν ηλεκτρόνια απευθείας στο ηλεκτρόδιο, εξαλείφοντας έτσι την εξάρτηση από τη συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου. Τέλος, στην τρίτη γενιά βιοαισθητήρων, η ίδια η αντίδραση είναι υπεύθυνη για την παραγωγή της ηλεκτρικής απόκρισης. Λόγω της μεγάλης ευαισθησίας τους, οι βιοαισθητήρες φθορισμού χρησιμοποιούνται επίσης αρκετά συχνά. Το αναλυτικό σήμα που παράγεται από αυτούς τους βιοαισθητήρες προέρχεται από μια διαδικασία εκπομπής φθορισμού ή φωσφορισμού. Οι βιοαισθητήρες μπορούν να λειτουργήσουν με τρεις διαφορετικούς τρόπους: ως συσκευές εκτός σύνδεσης, ως συσκευές σε απευθείας σύνδεση ή ως *in vivo* αισθητήρες. Οι *offline* συσκευές ποσοτικοποιούν τους αναλυτές-στόχους μετά την ανάκτηση του δείγματος, ενώ οι *online* συσκευές παρέχουν μετρήσεις σε πραγματικό χρόνο με την εισαγωγή μιας συσκευής στο σώμα ή στη γραμμή παραγωγής. Οι *in vivo* αισθητήρες, από την άλλη πλευρά, παρακολουθούν συνεχώς τη συγκέντρωση του αναλύτη με την εμφύτευση μιας συσκευής στο σώμα (Castillo et al., 2004; Rocchitta et al., 2016).



**Εικόνα 5.2:** Υπάρχουν διάφορες γενιές αμπερομετρικών βιοαισθητήρων. Κατά την πρώτη γενιά βιοαισθητήρων, μετράται η μείωση της συγκέντρωσης του οξυγόνου ή του υπεροξειδίου του υδρογόνου που παράγεται. Κατά τη δεύτερη γενιά βιοαισθητήρων, συγκεκριμένοι μεσολαβητές μεταφέρουν τα ηλεκτρόνια στο ηλεκτρόδιο. Κατά την τρίτη γενιά βιοαισθητήρων, τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται απευθείας από το ένζυμο στο ηλεκτρόδιο.

Οι βιοαισθητήρες έχουν αποκτήσει σημαντικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια για τις εφαρμογές τους στην ιατρική διάγνωση, καθώς και σε βιομηχανίες όπως η φαρμακευτική, τα τρόφιμα και η γεωργία (Mehrotra, 2016; Patel et al., 2016). Ωστόσο, οι ιατρικές εφαρμογές κυριαρχούν σε αυτόν τον τομέα, με τους βιοαισθητήρες γλυκόζης αίματος μιας χρήσης να αντιπροσωπεύουν σήμερα το 85% της συνολικής αγοράς βιοαισθητήρων (Metkar & Girigoswami, 2019). Οι βιοαισθητήρες χρησιμοποιούνται ευρέως σε κλινικά περιβάλλοντα και έχουν αποδείξει την αποτελεσματικότητά τους στον εντοπισμό βιοδεικτών μοναδικών για διάφορες ασθένειες. Αυτοί οι βιοδείκτες περιλαμβάνουν δείκτες της συνολικής υγείας, της εμφάνισης της ασθένειας και της εξέλιξης της νόσου. Βοηθούν στην αξιολόγηση των ιατρικών θεραπειών (Malima et al., 2012). Τα οφέλη των βιοαισθητήρων έχουν παρακινήσει τους ερευνητές να αναπτύξουν νέες τεχνολογίες, με αποτέλεσμα να δημιουργηθεί μια βιομηχανία πολλών δισεκατομμυρίων δολαρίων. Ο

κλάδος των βιοαισθητήρων κινείται κυρίως από τον τομέα της υγείας (Mehrotra, 2016; Patel et al., 2016).

Η χρήση τεχνικών βιοαισθητήρων έχει ήδη αποδειχθεί αρκετά επιτυχής στον εντοπισμό ορισμένων σημαντικών λιπαρών οξέων, βιταμινών και χοληστερόλης που υπάρχουν στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Ωστόσο, ο προσδιορισμός των αμινοξέων είναι πιο πολύπλοκος από πολλά άλλα βασικά θρεπτικά συστατικά σε αυτόν τον τομέα. Παρόλο που τα διαθέσιμα στο εμπόριο συστήματα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με ιοντοεναλλαγή και παραγωγοποίηση νινυδρίνης μετά τη στήλη μπορούν να χειριστούν καλά τον προσδιορισμό αμινοξέων από γαλακτοκομικά προϊόντα, πρόκειται για μια χρονοβόρα διαδικασία, επειδή η προετοιμασία του δείγματος απαιτεί χρόνο (Rigas, 2012). Εκτός αυτού, το αντιδραστήριο παραγωγοποίησης είναι τοξικό, γεγονός που καθιστά τη χρήση του ακατάλληλη για τον σκοπό αυτό. Παρόλα αυτά, η χρήση βιοαισθητήρων για τον προσδιορισμό αμινοξέων σε γαλακτοκομικά προϊόντα υπόσχεται πολλά- περιλαμβάνει τεχνολογία αισθητήρων που μειώνει σημαντικά τον χρόνο ανάλυσης (καθώς και τις απαιτήσεις χειρισμού του δείγματος) καθώς και την ποσότητα του χρησιμοποιούμενου τοξικού υλικού. Παρόλο που οι βιοαισθητήρες για τον προσδιορισμό αμινοξέων σε γαλακτοκομικά προϊόντα δεν έχουν ακόμη αναπτυχθεί πλήρως, τα δυνητικά οφέλη έχουν νόημα- δικαιολογώντας έτσι την περαιτέρω έρευνα για την εν λόγω τεχνολογία αισθητήρων (Ziyaina et al., 2020; Zuo et al., 2023).

Μια ποικιλία τεχνικών χρησιμοποιείται στους βιοαισθητήρες για την ανίχνευση αμινοξέων σε γαλακτοκομικά προϊόντα οι οποίοι αναπτύσσονται με βάση διαφορετικές καινοτόμες προσεγγίσεις που χρησιμοποιούν μοναδικές αρχές και τεχνολογίες οι οποίες μπορούν να επιτύχουν υψηλή ευαισθησία καθώς και ειδικότητα. Για παράδειγμα, οι βιοαισθητήρες έχουν κατασκευαστεί για την ανίχνευση αμινοξέων που περιέχουν θείο, όπως η μεθειονίνη και η κυστεΐνη (που παίζουν κρίσιμο ρόλο στον σχηματισμό γεύσης για τις ζυμώσεις γαλακτοκομικών προϊόντων), χρησιμοποιώντας προωθητές που ανταποκρίνονται στη μεθειονίνη και στην κυστεΐνη για τον ποσοτικό προσδιορισμό αμινοξέων σε βακτηριακά υπερκείμενα μέσω βιοαισθητήρα. Η προσέγγιση αυτή παρέχει γραμμική απόκριση σε σχέση με τις συγκεντρώσεις μεθειονίνης (Hernandez-Valdes et al., 2020). Οι ανιχνευτές (probes) αναφέρονται σε ειδικές χημικές ενώσεις ή μόρια που χρησιμοποιούνται για να ανταποκριθούν σε συγκεκριμένες αμινοξέες, όπως η μεθειονίνη

και η κυστεΐνη, και να τις αναγνωρίσουν. Στην περίπτωση των βιοαισθητήρων, οι ανιχνευτές είναι σχεδιασμένοι να δεσμεύουν ειδικά τα αμινοξέα που περιέχουν θείο, όπως η μεθειονίνη και η κυστεΐνη, και να παράγουν ένα σήμα που μπορεί να μετρηθεί και να χρησιμοποιηθεί για τον ποσοτικό προσδιορισμό των αμινοξέων

Οι πρωτεϊνικοί αισθητήρες που βασίζονται στην ηλεκτροχημεία παρέχουν ευαισθησία συν εκλεκτικότητα- με τον ίδιο τρόπο, η ανίχνευση αμινοξέων γίνεται μέσω οξειδοαναγωγικών αμινοξέων χωρίς ετικέτες. Σε μία άλλη στρατηγική ανίχνευσης, αναπτύσσονται αισθητήρες με βάση τον φθορισμό για την ανίχνευση πρωτεϊνών σε σκόνη γάλακτος χρησιμοποιώντας χρωστικές που δεσμεύονται μόνο σε συγκεκριμένες τρισδιάστατες δομές των πρωτεϊνών (χωρίς ετικέτες) - μια απλή καθολική στρατηγική για αποτελεσματική ανίχνευση. Οι βιοαισθητήρες που βασίζονται στην ηλεκτροχημεία μπορούν να ανιχνεύσουν τη φαινυλαλανίνη σε υψηλά επίπεδα επιλεκτικότητας και ευαισθησίας λόγω των προσωπικών αναγκών των ατόμων με φαινυλκετονουρία και εμφανίζουν πολλά πλεονεκτήματα, όπως η υψηλή ευαισθησία, η ειδικότητα και η ταχύτητα ανίχνευσης, ενώ χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση της φαινυλαλανίνης σε διάφορες μορφές δειγμάτων, όπως ούρα, αίμα και σάλιο (Ermiş et al., 2017). Άλλοι ανοσοαισθητήρες αναγνωρίζουν χειρόμορφα αμινοξέα δεσμεύοντάς τα με βάση τη στερεοδομή τους και παρουσιάζουν αλλαγές χωρητικότητας σε επιφάνειες αισθητήρων SPR διακοσμημένες με τεχνητά στοιχεία αναγνώρισης επιδεικνύουν υψηλή απόδοση κατά την ανάλυση γλυκοπεπτιδικών αντιβιοτικών στο γάλα - και οι δύο τεχνικές είναι εξαιρετικά ευαίσθητες και επιλεκτικές. Συμπερασματικά, η χρήση μεθόδων HPLC και στοχευμένων προσεγγίσεων μεταβολομικής έπαιξαν ρόλο στον προσδιορισμό του προφίλ ελεύθερων αμινοξέων σε διάφορες γαλακτοκομικές μήτρες σε υψηλά επίπεδα ευαισθησίας και εξειδίκευσης (Gotti et al., 2022). Αυτές οι διαφορετικές τεχνικές βιοαισθητήρων συνολικά διασφαλίζουν ότι η ανίχνευση καθώς και ο ποσοτικός προσδιορισμός των αμινοξέων στα γαλακτοκομικά προϊόντα βελτιώνεται- ενισχύοντας έτσι την ασφάλεια των τροφίμων και τον ποιοτικό έλεγχο.

### **5.3 Ποιοτικός έλεγχος και επικύρωση ανάλυσης αμινοξέων**

Στην ανάλυση αμινοξέων έχουν περιγραφεί διάφορα σημεία ελέγχου για την επικύρωση της ακρίβειας της τεχνικής και της χημικής σύνθεσης της υπό εξέταση μήτρας. Για τον



ποιοτικό έλεγχο των πρωτεϊνών γάλακτος πριν από την ανάλυση αμινοξέων, η πρωτογενής ποιοτική ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιείται με τη μέτρηση της συγκέντρωσης ολικού αζώτου στην πρωτεΐνη γάλακτος. Εάν απαιτείται, μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλλες μέθοδοι ή η εξέταση πρέπει να ανατεθεί σε εξειδικευμένο εργαστήριο για τον προσδιορισμό της παρουσίας και της συγκέντρωσης των μη πρωτεϊνικών αζωτούχων ενώσεων στο δείγμα γάλακτος. Εκτός από τα μείγματα πρωτεϊνών, εφαρμόζονται επίσης ειδικοί ποιοτικοί έλεγχοι σε μείγματα αναφοράς αμινοξέων (Kwan et al., 2020).

Ο έλεγχος ρουτίνας για τις συγκεντρώσεις αμινοξέων στα γαλακτοκομικά προϊόντα διενεργείται συχνά σε εργαστήρια ποιοτικού ελέγχου, ιδίως σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας γάλακτος. Για να διασφαλιστεί η ακρίβεια της ανάλυσης αμινοξέων και η εγκυρότητα των αποτελεσμάτων στο πλέγμα γαλακτοκομικών προϊόντων, πρέπει να διενεργούνται διάφορα επίπεδα ποιοτικού ελέγχου και επικύρωσης. Η διόρθωση εσωτερικών προτύπων θα πρέπει να εφαρμόζεται σε όλα τα δείγματα χρησιμοποιώντας τόσο μεθόδους βαθμονόμησης ενός σημείου όσο και μεθόδους βαθμονόμησης πολλαπλών σημείων. Περαιτέρω επικύρωση μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση μιας δεύτερης ανεξάρτητης μεθόδου, όπως η χημική ανάλυση ή άλλες ενόργανες τεχνικές. Ο προσδιορισμός του βαθμού υδρόλυσης για τις πρωτεΐνες μπορεί να επιτευχθεί με τον ποσοτικό προσδιορισμό των συγκεντρώσεων των απελευθερωμένων πεπτιδίων από την ανάλυση αμινοξέων μετά τη λήψη τους. Η μέτρηση αυτή αποτελεί επικύρωση καθώς και βελτιστοποίηση των συνθηκών υδρόλυσης, αλλά είναι επίσης δυνατό να χρησιμοποιηθεί έλεγχος παρεμβολής με μεθόδους χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής ισοκρατικής ή βαθμωτής έκλουσης (Pereira et al., 2020; Rochow et al., 2021).

### **5.3.1 Επικύρωση αναλυτικών μεθόδων**

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση αμινοξέων συνήθως επικυρώνονται μέσω συγκεκριμένων διαδικασιών. Προκειμένου να παρέχονται ακριβή και αξιόπιστα αποτελέσματα αμινοξέων, οι αναλυτές μπορούν να διεξάγουν διεργαστηριακή σύγκριση εκτός από την τακτική επαλήθευση βαθμονόμησης και τους ελέγχους ελέγχου ποιότητας (όπως ορίζεται στη διαδικασία) (Boogers et al., 2008; Waters, 2024.).

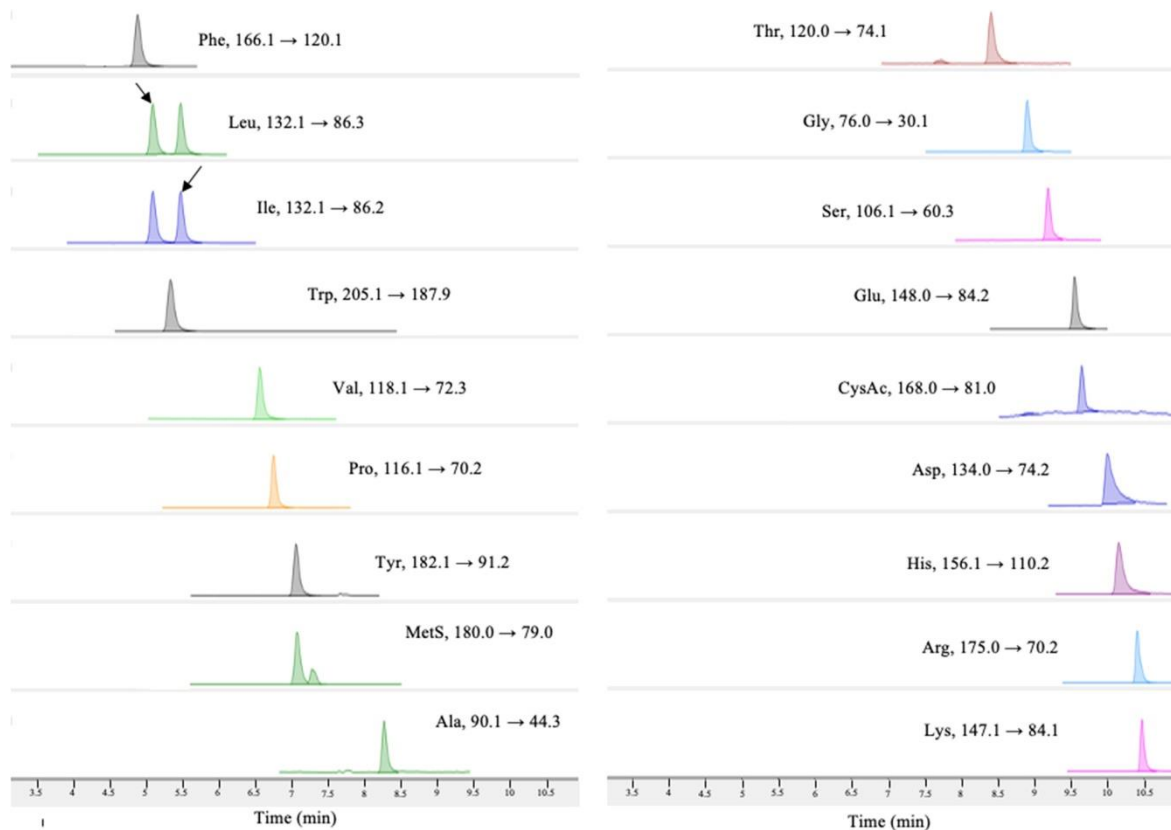


### 5.3.2 Πιστοποιημένα υλικά αναφοράς

Τα πιστοποιημένα υλικά αναφοράς (CRM) αναγνωρίζονται συνήθως ως το υψηλότερο επίπεδο μετρολογικής αξίας που αποδίδεται σε ένα υλικό αναφοράς, παρέχοντας μια δηλωμένη αβεβαιότητα που παράγεται στο πλαίσιο μιας διαπιστευμένης διαδικασίας πιστοποίησης. Βρίσκουν εκτεταμένη χρήση ως εργαλείο για τη διενέργεια ποιοτικού ελέγχου σε διάφορους τομείς, ιδίως στην αναλυτική χημεία. Οι τιμές που υπάρχουν σε ένα πιστοποιητικό ενός CRM που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της ποιότητας της αναλυτικής διαδικασίας μπορούν να βοηθήσουν στην επαλήθευση όχι μόνο του βήματος μέτρησης αλλά και του βήματος προεπεξεργασίας του δείγματος, υπό την προϋπόθεση ότι οι αναλύσεις που πρέπει να ελεγχθούν υπάρχουν στο CRM σε επίπεδα σχετικά με το εύρος συγκεντρώσεων που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση ρουτίνας πραγματικών δειγμάτων (Venelinov & Sahuquillo, 2006). Για να εξασφαλιστεί η ποιότητα των αποτελεσμάτων στην μελέτη των Itoh et al. (2004), χρησιμοποιήθηκε πιστοποιημένο υλικό αναφοράς ουρίας (CRM 6006-a) ως βαθμονόμησης για αναλύσεις N, C και H σε στοιχειακούς αναλυτές. Η μελέτη έλαβε υπόψη την καθαρότητα της ουρίας CRM και την παρουσία άλλων αναγνωρισμένων ακαθαρσιών για την ακριβή εκτίμηση των περιεχομένων C και H. Επιπλέον, η μελέτη παρατήρησε τις εντάσεις σήματος που ελήφθησαν όταν χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές μάζες του βαθμονόμησης, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι για μικρές μάζες H και N, οι εντάσεις σήματος ήταν απροσδόκητα χαμηλές, αλλά σταθεροποιήθηκαν στα περίπου 2 mg, εξασφαλίζοντας συνεπή αποτελέσματα. ανάλυση ρουτίνας, χρησιμοποιήθηκαν διάφορα CRM. Επιπλέον, η ποιότητα των αποτελεσμάτων διατηρήθηκε αναλύοντας τα CRM αμινοξέων και τροφίμων σε κλίμακα 2 mg με το CRM ουρίας ως βαθμονωτικό. Για τα CRM αμινοξέων, οι διαφορές μεταξύ αναλυτικού και θεωρητικού περιεχομένου κρίθηκαν αποδεκτές, με καλή επαναληψιμότητα που αποδείχθηκε. Συγκεκριμένες επαναλήψεις ελήφθησαν για CRM τροφίμων, που ταιριάζουν με αυτές των CRM αμινοξέων, επικυρώνοντας έτσι το CRM ουρίας ως αξιόπιστο βαθμονωτικό για αναλύσεις C, H και N σε στοιχειακούς αναλυτές. Αυτές οι σχολαστικές προσεγγίσεις και επικυρώσεις εξασφάλισαν συλλογικά την ποιότητα και την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων που ελήφθησαν στις στοιχειώδεις αναλύσεις αμινοξέων και δειγμάτων τροφίμων στη μελέτη (Itoh et al., 2014).

## 5.4 Εφαρμογές της ανάλυσης αμινοξέων στη γαλακτοβιομηχανία

Η υψηλή περιεκτικότητα των περισσότερων γαλακτοκομικών προϊόντων σε πρωτεΐνες σημαίνει ότι η ανάλυση αμινοξέων εφαρμόζεται κυρίως στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες μεθοδολογίες για την προετοιμασία δειγμάτων γαλακτοκομικών προϊόντων, διαφορετικές μέθοδοι υδρόλυσης και πολυάριθμες μέθοδοι ανίχνευσης αναλυτών, οι οποίες είναι διαθέσιμες στο εμπόριο, καθώς η ανάλυση αμινοξέων έχει γίνει ρουτίνα με αυτά τα πολύπλοκα βιολογικά δείγματα. Οι κατασκευαστές εξοπλισμού ανάλυσης αμινοξέων προσφέρουν μια σειρά αναλυτών που χρησιμοποιούν συστήματα χρωματομετρικής, φθορισμού και ηλεκτροχημικής ανίχνευσης. Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), συμπεριλαμβανομένης της χρήσης υγρής χρωματογραφίας υπερ-υψηλής απόδοσης (UPLC), είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος και με την προσθήκη της φασματομετρίας μάζας (MS), προσφέρει τη μεγαλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα. Η αέρια χρωματογραφία (GC) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ορισμένα αμινοξέα, αλλά συνήθως χρησιμοποιείται για μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων μακρύτερης αλυσίδας που προέρχονται ταυτόχρονα με τους μεθυλεστέρες αμινοξέων (Ortega et al., 2024; Rao et al., 2021).



**Εικόνα 5.4.1.** : Τυπικά χρωματογραφήματα του προφίλ έκλουσης των αμινοξέων σε ένα πρότυπο εργασίας μέσου σημείου.

Η ανάλυση των αμινοξέων έχει εδραιωθεί κυρίως στη γαλακτοβιομηχανία για τον προσδιορισμό του λόγου απόδοσης των πρωτεϊνών στη διατροφή των νεογέννητων. Εδώ, θα εξετάσουμε πρώτα την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες διαφόρων γαλακτοκομικών προϊόντων και στη συνέχεια θα συζητήσουμε την πρωταρχική και πιο παραδοσιακή εφαρμογή- τον προσδιορισμό του λόγου απόδοσης πρωτεϊνών. Ακολουθεί μια συζήτηση για την ανάλυση αμινοξέων, συμπεριλαμβανομένων των πρόσφατων εξελίξεων, και τις εφαρμογές της στη γαλακτοβιομηχανία, συμπεριλαμβανομένης της διατροφικής επισήμανσης, της αξιολόγησης της ποιότητας των πρωτεϊνών στο γάλα σε σκόνη και της διαχείρισης των αποβλήτων και των λυμάτων της γαλακτοβιομηχανίας..

#### 5.4.1 Ανάπτυξη και σύνθεση προϊόντων

Η ενεργειακή αξία της πρωτεΐνης πρέπει επίσης να λαμβάνεται υπόψη, τόσο σε σχέση με την επίδραση των υδατανθράκων στην εξοικονόμηση πρωτεϊνών όσο και με την πιθανή επίδραση του μείγματος αμινοξέων στην κατανάλωση ενέργειας. Η γεύση του προϊόντος

είναι μια άλλη παράμετρος- τα αμινοξέα συμβάλλουν στη γεύση ως πρόδρομες ουσίες των προϊόντων της αντίδρασης Maillard ή άλλων συστατικών της γεύσης. Ο βαθμός αμαύρωσης (δηλαδή της χημικής αντίδρασης που συμβαίνει όταν τα τρόφιμα θερμαίνονται, οδηγώντας σε αλλαγές στο χρώμα και τη γεύση τους) στις αντιδράσεις Maillard μπορεί να ελεγχθεί από τη διαθεσιμότητα μεμονωμένων αμινοξέων. Τα μείγματα αμινοξέων μπορούν να βελτιστοποιηθούν έτσι ώστε κάθε συστατικό να είναι παρόν σε επίπεδο κατάλληλο για την αντιδραστικότητά του, αποτρέποντας έτσι το σχηματισμό υπερβολικών παράπλευρων προϊόντων που θα μπορούσαν να καλύψουν τις επιθυμητές γεύσεις. Ο ρόλος των αμινοξέων στη γεύση και το χρώμα είναι μια σχετικά πολύπλοκη πτυχή της τυποποίησης που απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή (Liu et al., 2022).

Τα γαλακτοκομικά προϊόντα απαιτούν ιδιαίτερη προσοχή για να αναπτυχθούν για διαφορετικές ομάδες-στόχους. Για παράδειγμα, τα παιδιά αντιπροσωπεύουν έναν σημαντικό πληθυσμό στον οποίο θα πρέπει να κατευθύνονται τα προγράμματα. Η ανάπτυξη γαλακτοκομικών προϊόντων με στόχο τη διέγερση της σύνθεσης της αυξητικής ορμόνης απαιτεί την αντιστοίχιση διαφόρων ομάδων πρόδρομων ουσιών τροφίμων- η διαμόρφωση συνεπάγεται κάτι περισσότερο από την απλή ανάμειξη ενός μείγματος αμινοξέων. Είναι απαραίτητο να εξεταστούν οι σχετικές αναλογίες των αμινοξέων που υπάρχουν στις πρωτεΐνες, ώστε να εξασφαλιστεί μια αποτελεσματική ισορροπία των απαραίτητων αμινοξέων (Kang et al., 2019).

#### **5.4.2 Έρευνα και ανάπτυξη**

Τα εμπορικά γαλακτοκομικά προϊόντα υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες (HPDP) είναι εμπλουτισμένα με αμινοξέα που διεγείρουν τη σύνθεση μυϊκής πρωτεΐνης μετά από άσκηση. Οι γονείς αγοράζουν τα HPDP για αθλητικές εκδηλώσεις των παιδιών, αντικαθιστώντας το μητρικό γάλα. Οι έτοιμες προς κατανάλωση (RTD) και οι σκόνης μίγματος ποτών (DMP) καλύπτουν διαφορετικές ανάγκες της αγοράς, με το DMP να είναι πιο βολικό για αποθήκευση και μεταφορά. Η αγορά είναι ανταγωνιστική, και μελέτες δείχνουν ότι τα αμινοξέα μπορούν να επηρεάσουν την αλληλεπίδραση με γλυκόζη ή ινσουλίνη. Υπάρχουν ανησυχίες για τα αμινοξέα που προωθούν την ανάπτυξη των όγκων. Τα αμινοξέα μπορούν να επηρεάσουν τον κορεσμό και το διατροφικό πρότυπο. Η διαιτητική πρόσληψη GABA προωθείται για τη μείωση της αρτηριακής πίεσης, ενώ η προλίνη και η ιμιδαζόλη προτείνονται για άγχος και διπολικά προβλήματα αντίστοιχα.

Καθώς οι απαιτήσεις για εξειδικευμένα προϊόντα αυξάνονται, το μοτίβο αμινοξέων των γαλακτοκομικών μπορεί να χρειαστεί να τροποποιηθεί

Τα εμπορικά γαλακτοκομικά προϊόντα υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες (HPDP) είναι εμπλουτισμένα με αμινοξέα που διεγείρουν τη σύνθεση μυϊκής πρωτεΐνης μετά από σωματική δραστηριότητα ή άσκηση. Οι γονείς αγοράζουν τα HPDP για τα παιδιά, προετοιμάζοντάς τα για αθλητικές εκδηλώσεις και αντικαθιστώντας τη φυσική οργανική πηγή του ανθρώπινου μητρικού γάλακτος. Οι έτοιμες προς κατανάλωση (RTD) και οι σκόνες μίγματος ποτών (DMP) παράγονται για να ικανοποιήσουν διαφορετικά τμήματα της αγοράς. Το DMP απαιτεί λιγότερο χώρο αποθήκευσης, μειώνει το βάρος της συσκευασίας για την αποστολή, είναι λιγότερο ογκώδες καταλαμβάνοντας χώρο στο ράφι του καταστήματος και είναι πιο βολικό για τους ταξιδιώτες. Η αγορά γαλακτοκομικών προϊόντων είναι μια πολύ ανταγωνιστική επιχειρηματική έμφαση στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Μελέτες σε ανθρώπους, ζώα και έντομα δείχνουν ότι μπορεί να επηρεαστεί η αλληλεπίδραση μεταξύ μεμονωμένων αμινοξέων και γλυκόζης ή ινσουλίνης. Όσοι ενδιαφέρονται για τον καρκίνο ανησυχούν για την παρουσία αμινοξέων που προωθούν την ανάπτυξη ως διατροφικά προϊόντα στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Τέτοια αμινοξέα διεγείρουν τη σύνθεση της σωματομεδίνης C και της ινσουλίνης, οι οποίες συνδέονται με την προώθηση της ανάπτυξης των όγκων. Τα υψηλά επίπεδα υδρόφοβων ή/και αρωματικών αμινοξέων έχει αποδειχθεί ότι αυξάνουν την απελευθέρωση χολοκυστοκινίνης, η οποία μπορεί να επηρεάσει τον κορεσμό και το διατροφικό πρότυπο στον άνθρωπο. Η διαιτητική πρόσληψη GABA προωθείται για όσους ενδιαφέρονται για μια εναλλακτική προσέγγιση για τη μείωση της αρτηριακής πίεσης. Η προλίνη έχει προταθεί ως αμινοξύ κατά του άγχους ή της ηρεμίας. Ορισμένοι προτείνουν την ιμιδαζόλη, ως αμινοξύ για όσους έχουν διπολικά προβλήματα. Καθώς αναπτύσσονται νέες μελέτες και μόδες, το μοτίβο αμινοξέων των γαλακτοκομικών πηγών μπορεί να χρειαστεί να τροποποιηθεί για να καλύψει τις απαιτήσεις για εξειδικευμένα προϊόντα (Nishi et al., 2022).

Στην ανάπτυξη των γαλακτοκομικών προϊόντων, η πρωτεΐνη είναι ένα σημαντικό συστατικό. Η σύνθεση των απαραίτητων αμινοξέων της πρωτεΐνης είναι επίσης ένας κρίσιμος παράγοντας στην ανθρώπινη διατροφή. Συνεπώς, υπάρχει σημαντικό ενδιαφέρον για την ανάλυση των αμινοξέων στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Έχει περιγραφεί μια ταχεία

δοκιμασία για την υδρόλυση και την επακόλουθη ανίχνευση με φθορισμό των αμινοξέων στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Χρησιμοποιείται αυτόματος αναλυτής αμινοξέων και τα αμινοξέα παράγονται με ο-φθαλδιαλδεΐδη. Η μέθοδος μπορεί να προσδιορίσει τα περισσότερα αμινοξέα σε περίπου 40 λεπτά. Όταν στη σκόνη γάλακτος υπάρχουν διάφορες ουσίες που δεν περιέχουν άζωτο, π.χ. ουρία, ο ακριβής προσδιορισμός των αμινοξέων μπορεί να είναι ιδιαίτερα δύσκολος. Αυτό μπορεί να αποτελέσει ιδιαίτερο πρόβλημα στην ανάλυση νοθευμένου γάλακτος σε σκόνη όπου προστίθενται άλλες πηγές αζώτου. Για να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα έχει χρησιμοποιηθεί η παραγωγοποίηση των αμινοξέων πριν από τη στήλη με δ-αμινοκινολιλ-n-υδροξυσουκκινόϊμιδυλοκαρβαμικό και η ανάλυση με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης. Η μέθοδος αυτή, όταν χρησιμοποιήθηκε με ανιχνευτή φθορισμού, επέτρεψε τον επιλεκτικό προσδιορισμό των αμινοξέων σε σκόνη γάλακτος. Συγκεκριμένα στην ερευνητική εργασία χρησιμοποιούνται εκτενώς διάφορες μεθοδολογίες για την ανάλυση της σύνθεσης αμινοξέων σε πρωτεΐνες από ζωικούς ιστούς και τρόφιμα. Οι μέθοδοι υδρόλυσης πρωτεϊνών παίζουν καθοριστικό ρόλο στην απελευθέρωση των αμινοξέων για μεταγενέστερη ανάλυση, ενώ οι τεχνικές που εμπλέκονται στην υδρόλυση πρωτεϊνών περιλαμβάνουν επεξεργασία με 6 M HCl στους 110 °C για 24 ώρες, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τον μετασχηματισμό συγκεκριμένων αμινοξέων σε εναλλακτικές μορφές και την καταστροφή άλλων όπως η τρυπτοφάνη, επηρεάζοντας την ανάλυση της σύνθεσης αμινοξέων. Επιπλέον, στην εργασία διερευνώνται και άλλες εναλλακτικές μέθοδοι όπως η αλκαλική υδρόλυση χρησιμοποιώντας διαλύματα όπως το NaOH σε αυξημένες θερμοκρασίες, οι οποίες προσφέρουν οφέλη όπως μειωμένη αποικοδόμηση ορισμένων αμινοξέων, αν και η αποσύνθεση άλλων είναι σημαντική με αυτήν την προσέγγιση. Φαίνεται πως η ενζυματική υδρόλυση χρησιμοποιείται επίσης για τη μετατροπή πρωτεϊνών σε διαλυτά αμινοξέα, εστιάζοντας ιδιαίτερα στην προστασία συγκεκριμένων υπολειμμάτων όπως το Gln και το Asn χημικά πριν από την υδρόλυση και στην οξείδωση των υπολειμμάτων Cys σε κυστεϊκό οξύ. Επιπροσθέτως στην εργασία γίνεται μελέτη των πολυπλοκοτήτων που παρουσιάζει η υδρόλυση πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας μεθανοσουλφονικό οξύ και 3- (2-αμινοαιθυλο) ινδόλη, δίνοντας έμφαση στην ελάχιστη αποικοδόμηση της τρυπτοφάνης υπό αυτές τις συνθήκες. Εξετάζει τη σημασία της επιλογής κατάλληλων πρωτεασών για την επίτευξη ικανοποιητικής ανάκτησης συγκεκριμένων ΑΑ από πρωτεΐνες, λαμβάνοντας υπόψη παράγοντες όπως ο τύπος

δείγματος, οι ερευνητικοί στόχοι και οι διαθέσιμοι πόροι. Η μελέτη υπογραμμίζει την συνηθισμένη χρήση της όξινης υδρόλυσης με 6M HCl στους 110°C λόγω της αποτελεσματικότητας και της ευκολίας της στην υδρόλυση πρωτεϊνών, εξασφαλίζοντας επακόλουθη ακρίβεια ανάλυσης μέσω καθιερωμένων μεθόδων (Dai et al., 2014).

### 5.4.3 Εφαρμογές ανάλυσης αμινοξέων στη γαλακτοβιομηχανία

Τα τελευταία χρόνια, η ανάλυση αμινοξέων έχει αποκτήσει σημαντική σημασία στη γαλακτοβιομηχανία. Το προφίλ των αμινοξέων σε ένα τρόφιμο παρέχει πληροφορίες σχετικά με την παρουσία πρωτεϊνών από διαφορετικές πηγές, τη γνησιότητα, τη νοθεία και την προσθήκη βοηθητικών ουσιών επεξεργασίας. Επιπλέον, τα δεδομένα αμινοξέων χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό του θερμιδικού περιεχομένου των τροφίμων. Στην γαλακτοβιομηχανία, η ανάλυση αμινοξέων εφαρμόζεται για τον έλεγχο της ποιότητας των πρωτεϊνών των γαλακτοκομικών προϊόντων και την παράνομη προσθήκη μελαμίνης. Ωστόσο, η ανάλυση αμινοξέων στα γαλακτοκομικά προϊόντα παρουσιάζει κάποιες δυσκολίες λόγω της μήτρας τους. Ο σωστός προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες των τροφίμων είναι σημαντικός, καθώς καθορίζει την οικονομική αξία του προϊόντος και μπορεί να επηρεάσει την οικονομική σκοπιμότητα νέων βιομηχανιών για εναλλακτική παραγωγή πρωτεϊνών.

Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μέθοδοι για τη μέτρηση της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη στα τρόφιμα περιλαμβάνουν τη μέθοδο Kjeldahl, τη μέθοδο Dumas, τις μεθόδους άμεσης μέτρησης με χρήση φασματοσκοπίας UV και τη μέτρηση του δείκτη διάθλασης. Η μέθοδος Kjeldahl περιλαμβάνει την πέψη της τροφής με ένα ισχυρό οξύ έτσι ώστε να απελευθερώνεται άζωτο, το οποίο στη συνέχεια ποσοτικοποιείται χρησιμοποιώντας μια τεχνική τιτλοδότησης. Στη συνέχεια, η ποσότητα πρωτεΐνης υπολογίζεται από τη συγκέντρωση αζώτου του τροφίμου χρησιμοποιώντας έναν παράγοντα μετατροπής (συνήθως 6,25 που ισοδυναμεί με 0,16 g αζώτου ανά γραμμάριο πρωτεΐνης). Όμως δεν μετρά πάντοτε την αληθινή πρωτεΐνη και ο συντελεστής μετατροπής/διόρθωσης 6,25 δεν είναι κατάλληλος για όλους τους τύπους πρωτεϊνών και θα πρέπει να διορθωθεί με βάση τη σύνθεση αμινοξέων της εν λόγω πρωτεΐνης. Ένας αριθμός μελετών έχει εντοπίσει παράγοντες διόρθωσης/μετατροπής αζώτου για συγκεκριμένο είδος, όπως για παράδειγμα, συνιστάται συντελεστής μετατροπής 5,6 για τις γαρίδες και τα ψάρια, 5,4 ενώ άλλοι συγγραφείς έχουν προτείνει συντελεστές μετατροπής



4,9 για τα ψάρια. Η μέθοδος Dumas είναι γρήγορη και δεν χρησιμοποιεί χημικά, αλλά έχει ακριβό εξοπλισμό και δεν είναι πολύ ακριβής καθώς δεν μετράει την πραγματική πρωτεΐνη. Οι μέθοδοι φασματοφωτομετρίας UV, συμπεριλαμβανομένων των μεθόδων Biuret, Bradford και Lowry, είναι εύκολες στη χρήση, δεν είναι δαπανηρές και μπορούν να ποσοτικοποιήσουν μικρές ποσότητες πρωτεΐνης. Ωστόσο, μπορούν να δώσουν ψευδώς θετικές μετρήσεις πρωτεΐνης ανάλογα με τη μέθοδο παρασκευής του δείγματος που χρησιμοποιείται και τη διαλυτότητα του δείγματος δοκιμής. Η άμεση ανάλυση αμινοξέων περιλαμβάνει υδρόλυση της πρωτεΐνης με HCL και επακόλουθο ποσοτικό προσδιορισμό των αμινοξέων χρησιμοποιώντας HPLC. Ακολουθεί ο παρακάτω πίνακας με τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα της κάθε μεθόδου.

Protein Quantification Method	Advantages	Disadvantages
Kjeldahl method—digestion of food with a strong acid so that nitrogen is released which is then quantified using a titration technique.	Considered the standard method globally and therefore easy to compare results with other laboratories	Does not measure true protein and overestimations of protein can result due to use of standard nitrogen correction factor 6.25
Dumas method	Fast and does not use chemicals; can measure several samples at a time	Costly to set up and is not very accurate as it does not measure true protein.
UV spectroscopy methods	Simple, does not require any assay agents	Highly error prone due to other compounds that absorb at the selected absorbance wavelength (280 nm)
Biuret methods—protein–copper chelation and secondary detection of reduced copper, includes the bicinchoninic acid (BCA) and Lowry assay methods	Less protein–protein variation than the Coomassie dye-based assays; compatible with most surfactants used for protein extraction	Incompatible with copper-reducing surfactants and reducing agents including DTT
Bradford Coomassie Blue assay method—protein–dye binding and direct detection of the color change	Fast, performed at room temperature, compatible with most solvents	High protein–protein variation; incompatible with detergents
Fluorescent dye methods—protein–dye binding and direct detection of increase in fluorescence associated with the bound dye includes the Qubit assay and EZQ™ assay	Very sensitive and uses less protein	Requires a fluorescence detector
Direct amino acid analysis using hydrolysis and HPLC quantification	Accurate	Initial investment in HPLC equipment required; hydrolysis step required; time consuming

**Εικόνα 5.4.3.1 :** Μέθοδοι ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών — πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα

#### 5.4.4 Διατροφική επισήμανση και έλεγχος ποιότητας

Σχετικά νέες στο προσκήνιο είναι οι μέθοδοι που βασίζονται σε βιοαισθητήρες, οι οποίες, αν και πάσχουν από έλλειψη δημοσιευμένης αξιολόγησης σε ορισμένα γαλακτοκομικά προϊόντα, μπορούν να αποτελέσουν μια γρήγορη εναλλακτική λύση σε σχέση με τις πιο

συμβατικές "υγρές χημικές" προσεγγίσεις, οι οποίες απαιτούν σημαντικό χρόνο προετοιμασίας και ανάλυσης του δείγματος. Αντίθετα, πολλές από τις υγρές χημικές μεθόδους είναι υψηλής απόδοσης, εάν απαιτείται, και η ανάλυση μπορεί να διεξαχθεί γρήγορα με τη χρήση αυτόματων αναλυτών. Κάποιες συχνά χρησιμοποιούμενες μέθοδοι για τη μέτρηση της περιεκτικότητας πρωτεΐνης στα τρόφιμα περιλαμβάνουν τη μέθοδο Kjeldahl, τη μέθοδο Dumas, τις μεθόδους απευθείας μέτρησης με χρήση φασματοσκοπίας UV και τη μέτρηση του δείκτη διάθλασης. Κάθε μέθοδος έχει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα και αναφέρονται παρακάτω αναλυτικά.

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες των τροφίμων παρουσιάζει ενδιαφέρον τόσο για τη διατροφική επισήμανση και τον έλεγχο ποιότητας όσο και για τον καθορισμό της οικονομικής αξίας του τροφίμου όπου μπορεί να επηρεάσει την οικονομική σκοπιμότητα νέων βιομηχανιών για εναλλακτική παραγωγή πρωτεϊνών. Ο έλεγχος της ποιότητας των πρωτεϊνών των γαλακτοκομικών προϊόντων είναι σημαντικός λόγω του ότι ορισμένα αμινοξέα επηρεάζονται ιδιαίτερα κατά τη θερμική επεξεργασία τους. (Hayes, 2020).

#### **5.4.5 Ανάπτυξη προϊόντων και σύνθεση**

Οι πρωτεΐνες είναι βασικές θρεπτικές ουσίες που παρέχονται από τα γαλακτοκομικά προϊόντα και έχουν μια ευρεία ποικιλία λειτουργιών στο σώμα. Η περιεκτικότητα των γαλακτοκομικών προϊόντων σε αμινοξέα είναι μοναδική και συμβάλλει στην αξία των προϊόντων αυτών ως πηγές απαραίτητων και μη απαραίτητων αμινοξέων. Τα αμινοξέα στα γαλακτοκομικά προϊόντα μπορούν να προσδιοριστούν με διάφορες μεθόδους που απελευθερώνουν τα αμινοξέα από τις πρωτεΐνες. Οι μέθοδοι αυτές περιλαμβάνουν την όξινη υδρόλυση, την υδρόλυση με βάση και την ενζυμική υδρόλυση. Κάθε μία από αυτές τις μεθόδους έχει συγκεκριμένες εφαρμογές και περιορισμούς για τον προσδιορισμό των αμινοξέων στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Σε αυτό το κεφάλαιο, επανεξετάζουμε τον προσδιορισμό των αμινοξέων στα γαλακτοκομικά προϊόντα με τη χρήση αυτών και άλλων μεθόδων και παρέχουμε ορισμένα παραδείγματα ανάλυσης αμινοξέων (Górska-Warsewicz et al., 2019).

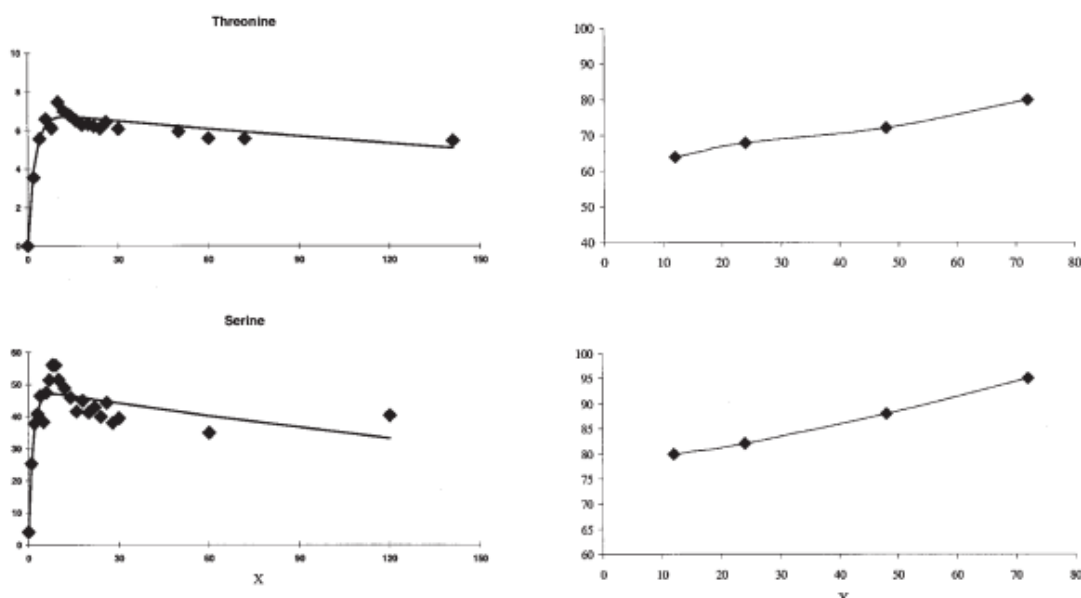
Τα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι καλές πηγές αμινοξέων για τη διατήρηση των ιστών και της λειτουργίας του σώματος. Ορισμένα γαλακτοκομικά προϊόντα, ωστόσο, έχουν χαμηλή

περιεκτικότητα σε συγκεκριμένα απαραίτητα αμινοξέα και μπορεί να χρειαστεί να διαμορφωθούν ώστε να αυξηθεί η διατροφική τους αξία. Για παράδειγμα, τα δημητριακά είναι χαμηλά σε λυσίνη αλλά υψηλά σε μεθειονίνη και κυστεΐνη, ενώ το αντίστροφο ισχύει για τις πρωτεΐνες του ορού γάλακτος. Συνδυάζοντας αυτές τις δύο πηγές πρωτεϊνών, μπορεί να παραχθεί ένα πιο ισορροπημένο από διατροφική άποψη προϊόν. Εκτός από τη χρήση πρωτεϊνών από άλλες πηγές, αμινοξέα μπορούν να προστεθούν στα γαλακτοκομικά προϊόντα για να αυξηθεί η διατροφική τους αξία. Τα αμινοξέα από τα γαλακτοκομικά προϊόντα μπορούν να απελευθερωθούν και να προσδιοριστεί η περιεκτικότητά τους κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης ορισμένων γαλακτοκομικών προϊόντων. Οι πληροφορίες αυτές είναι σημαντικές για τη διαμόρφωση του προϊόντος και, τελικά, για την παροχή πληροφοριών στον καταναλωτή σχετικά με τη διαιτητική χρήση και τη διατροφική αξία του προϊόντος.

#### 5.4.6 Έρευνα και ανάπτυξη

Τα γαλακτοκομικά προϊόντα αποτελούν βασικό συστατικό της διατροφής πολλών ανθρώπων, επομένως είναι σημαντικό να διασφαλίζεται ότι η ποιότητα και η διατροφική αξία των προϊόντων αυτών είναι όπως διαφημίζεται. Η ανάλυση αμινοξέων μπορεί να βοηθήσει στον έλεγχο για απάτη στην ετικέτα ή να επιβεβαιώσει τη δηλωμένη σύνθεση αμινοξέων σε μια ποικιλία γαλακτοκομικών προϊόντων. Επιπλέον, η ανάλυση των αμινοξέων είναι σημαντική για την αξιολόγηση της ποιότητας των πρωτεϊνών. Είναι μια τυπική μέθοδος για τον προσδιορισμό της πλήρους σύνθεσης αμινοξέων των πρωτεϊνών στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Ενώ ο προσδιορισμός των αμινοξέων χρησιμοποιείται κυρίως ως μέσο χαρακτηρισμού των πρωτεϊνών, η ανάλυση των αμινοξέων μπορεί επίσης να διαδραματίσει ρόλο στην αξιολόγηση της ποιότητας των γαλακτοκομικών προϊόντων- για παράδειγμα, είναι ευαίσθητη στον χρόνο θερμικής επεξεργασίας στο γάλα και στον βαθμό πρωτεόλυσης στο τυρί. Η παρούσα μελέτη διερεύνησε τη χρήση της HPLC ως γρήγορης και αξιόπιστης μεθόδου για τον προσδιορισμό της σύνθεσης αμινοξέων διαφόρων γαλακτοκομικών προϊόντων. Η ανίχνευση φθορισμού προσφέρει πλεονεκτήματα, όπως υψηλή ευαισθησία, χαμηλό θόρυβο και εκλεκτικότητα. Τα δείγματα που διερευνήθηκαν περιλάμβαναν σκόνη αγελαδινού και κατσικίσιου γάλακτος, τυριά και σκόνες ορού γάλακτος και καζεΐνης. Διαπιστώθηκε ότι η υδρόλυση των δειγμάτων σε 6 M HCl για 24 ώρες και στη συνέχεια η παραγωγοποίηση των αμινοξέων με ισοθειοκυανικό

φαινυλο οδήγησε στην καλύτερη χρωματογραφική απόδοση. Επιτεύχθηκε πλήρης διαχωρισμός 31 αμινοξέων σε λιγότερο από 80 λεπτά, με ρυθμό ροής 1 ml/min. Η μέθοδος ήταν αναπαραγώγιμη και ακριβής, με εκτιμήσεις σφαλμάτων χαμηλότερες από 2% (Darragh & Moughan, 2005).



Εικόνα 5.4.6.1. : Επίδραση του χρόνου υδρόλυσης (άξονας x, h) κατά την ανάλυση αμινοξέων στη μέση απόδοση θρεονίνης (πάνω) και σερίνης (κάτω) και ισολευκίνη (πάνω) και βαλίνη (κάτω).

## 6 Προκλήσεις και μελλοντικές κατευθύνσεις

Η πολυπλοκότητα του δείγματος είναι ένα σημαντικό ζήτημα που δυσχεραίνει τον προσδιορισμό του προφίλ των αμινοξέων στα τρόφιμα, συμπεριλαμβανομένων των γαλακτοκομικών προϊόντων, με τη χρήση πολλών αναλυτικών τεχνικών. Λόγω της έλλειψης απλότητας, οι διαδικασίες για την προετοιμασία του δείγματος είναι χρονοβόρες και συνεπάγονται τη χρήση σημαντικής ποσότητας χημικών ουσιών, με αποτέλεσμα την αύξηση της ποσότητας των αποβλήτων. Επιπλέον, η εμφάνιση κορυφών που αντιστοιχούν σε χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται στα στάδια προετοιμασίας του δείγματος μπορεί να επικαλύπτει τις κορυφές των αμινοξέων, μειώνοντας έτσι την ευαισθησία. Σε μελλοντικές μελέτες, είναι απαραίτητο να αναπτυχθούν απλές μέθοδοι προετοιμασίας δειγμάτων για τον προσδιορισμό αμινοξέων σε γαλακτοκομικά προϊόντα. Οι εν λόγω

μέθοδοι θα πρέπει να είναι σε θέση να μειώνουν στο ελάχιστο τις επιδράσεις της μήτρας, καθώς και την παρουσία συστατικών του δείγματος στα αναλυτικά σήματα κατά τη χρήση τεχνικών ανίχνευσης όπως η MS, οι οποίες συνιστώνται ιδιαίτερα για την αποφυγή προβλημάτων ποσοτικοποίησης και ταυτοποίησης των αμινοξέων.

Παρά τα πλεονεκτήματα που προσφέρει η IC για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε αμινοξέα, όπως ο ταυτόχρονος προσδιορισμός πολλών ενώσεων σε πολύπλοκες μήτρες, οι χαμηλές απαιτήσεις σε όγκο δείγματος και οι μικρές ποσότητες χημικών αποβλήτων που παράγονται ανά ανάλυση, υπάρχουν λίγες αναφορές για την εφαρμογή της IC στην ανάλυση αμινοξέων γαλακτοκομικών προϊόντων. Επιπλέον, η εκπόνηση εκτεταμένων βιβλιοθηκών που αντιπροσωπεύουν την περιεκτικότητα σε αμινοξέα των δειγμάτων γαλακτοκομικών προϊόντων παρεμποδίζεται από την ελλιπή χρήση αυτής της τεχνικής για τον προσδιορισμό αμινοξέων σε γαλακτοκομική μήτρα. Ένας από τους λόγους για αυτό είναι το υψηλό κόστος των μεθόδων προσδιορισμού αμινοξέων με βάση την IC. Επιπλέον, η χρήση του IC απαιτεί συστήματα αντλιών που δημιουργούν πρόσθετα έξοδα για τη συντήρησή τους, ενώ η ειδική συσκευασία στήλης που χρησιμοποιείται στο IC μειώνει επίσης τη διάρκεια ζωής του. Αυτά τα μειονεκτήματα του IC έχουν ευνοήσει τη χρήση συμβατικών μεθόδων που βασίζονται στην HPLC, οι οποίες απαιτούν στάδια καθαρισμού του δείγματος. Ωστόσο, η εφαρμογή της IC για τον προσδιορισμό αμινοξέων σε γαλακτοκομικά προϊόντα θα πρέπει να αυξηθεί λόγω των πλεονεκτημάτων που προσφέρει αυτή η τεχνική, και λαμβάνοντας υπόψη ότι το υψηλό κόστος μπορεί να μειωθεί εάν πραγματοποιηθεί εσωτερική επικύρωση και συντήρηση της IC..

## 6.1 Εξελίξεις στην ανάλυση αμινοξέων

Η ανάλυση αμινοξέων απαιτείται για τον πλήρη χαρακτηρισμό της πρωτεΐνης στα γαλακτοκομικά προϊόντα και για τη σωστή αξιολόγηση της ποιότητας της πρωτεΐνης. Η ανάλυση αμινοξέων είναι επίσης απαραίτητη για την αξιολόγηση της ποσότητας "πρωτεΐνης" που περιλαμβάνεται στη βιολογική επισήμανση των γαλακτοκομικών προϊόντων, προκειμένου να αποτραπούν απάτες. Πρόσφατα, οι Κοινές Συναντήσεις Εμπειρογνομόνων FAO/WHO για τη Διατροφή επινόησαν έναν νέο όρο, ο οποίος είναι η βαθμολογία αμινοξέων διορθωμένη ως προς την πεπτικότητα των πρωτεϊνών (PDCAAS), προκειμένου να γίνεται καλύτερη σύγκριση με τις διάφορες πηγές πρωτεϊνών. Η

πραγματική σύνθεση αμινοξέων είναι σημαντική για τον υπολογισμό του PDCAAS και, σε αυτό το κεφάλαιο, συζητάμε την ανάλυση αμινοξέων των γαλακτοκομικών προϊόντων. Η διατροφική αξία των πρωτεϊνών μπορεί να εκτιμηθεί ως το περιοριστικό απαραίτητο αμινοξύ. Προκειμένου να υπολογιστεί η περιεκτικότητα και η κατανομή των αμινοξέων στις πρωτεΐνες των γαλακτοκομικών προϊόντων, απαιτείται ακριβής περιγραφή της πρωτεΐνης του γάλακτος. Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη γάλακτος μπορεί να προσδιοριστεί με την αξιολόγηση ορισμένων πρωτεϊνικών συστατικών, όπως το άθροισμα των αμινοξέων ή η περιεκτικότητα σε μη πρωτεϊνικό άζωτο. Λόγω του μεγάλου αριθμού αμινοξέων που αποτελούν την πρωτεΐνη του γάλακτος, η ανάλυση των αμινοξέων περιλαμβάνει διάφορες τεχνικές.

## 6.2 Πιθανές επιπτώσεις στη γαλακτοβιομηχανία

Ο αντίκτυπος αυτών των δραστηριοτήτων ανάλυσης στη γαλακτοβιομηχανία δεν αναγνωρίζεται συχνά. Η γαλακτοβιομηχανία με όλα τα ποικίλα προϊόντα της ουσιαστικά μετατρέπει πρωτεΐνες χαμηλής βιολογικής αξίας σε πρωτεΐνες υψηλής βιολογικής αξίας. Οι διαδικασίες αυτές περιλαμβάνουν την προσθήκη ενζύμων με συγκεκριμένες δράσεις. Η παρουσία αναστολέων έναντι αυτών των ενζύμων στο γάλα θα μπορούσε να οδηγήσει σε ελαττωματική διαδικασία και απώλεια προϊόντος. Είναι γνωστό, για παράδειγμα, ότι η φαινυλαλανίνη είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη ορισμένων μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται στην παρασκευή γαλακτοκομικών προϊόντων και πρέπει να εξασφαλίζεται η διαθεσιμότητά της. Είναι πιθανό ότι η ανάλυση του προφίλ των αμινοξέων στα γαλακτοκομικά προϊόντα μπορεί να έχει κάποια αξία και αυτό αξιολογείται επί του παρόντος.

## 7 Συμπεράσματα

Εν κατακλείδι, τα αμινοξέα είναι απαραίτητα για τον ανθρώπινο οργανισμό και αποτελούν τα δομικά στοιχεία των πρωτεϊνών. Παίζουν μεγάλο ρόλο στην ανάπτυξη, την επισκευή και τη συντήρηση όλων των ιστών και των κυττάρων, καθώς και σε πολλές σημαντικές διαδικασίες του σώματος. Τα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι μία από τις



πλουσιότερες πηγές και των εννέα απαραίτητων αμινοξέων και αποτελούν εξαιρετική πηγή πρωτεΐνης. Είναι ευρέως αναγνωρισμένο ότι η διατροφική αξία της πρωτεΐνης που βρίσκεται στα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι υψηλή λόγω της ισορροπημένης αναλογίας όλων των απαραίτητων αμινοξέων. Επιπλέον, η πρωτεΐνη στα γαλακτοκομικά προϊόντα αφομοιώνεται και αξιοποιείται εύκολα από τον ανθρώπινο οργανισμό.

Τα γαλακτοκομικά αποτελούν μια καλή πηγή αμινοξέων- αυτών που είναι απαραίτητα για τις ανάγκες του οργανισμού μας. Έχουν αναπτυχθεί πολλές μέθοδοι για να διαπιστωθεί πόσα αμινοξέα υπάρχουν στα γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως η χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων καθώς και η παραγωγοποίηση μετά τη στήλη σε συνδυασμό με παραγωγοποίηση πριν από τη στήλη ή μέθοδοι άμεσης παραγωγοποίησης, όπως η φασματομετρία μάζας, η οποία δίνει τόσο ποιοτικές όσο και ποσοτικές πληροφορίες σχετικά με τη σύνθεση των αμινοξέων. Η χρήση βιοαισθητήρων έχει επίσης υποσχεθεί γρήγορη ανάλυση. Η παρούσα εργασία εξετάζει αυτές τις διάφορες τεχνικές- αυτές που έχουν χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των αμινοξέων που βρίσκονται ειδικά στα γαλακτοκομικά προϊόντα.

Οι πρωτεΐνες αποτελούνται από αμινοξέα και αυτό καθιστά τα αμινοξέα διατροφικά σημαντικά καθώς και τα στοιχειώδη συστατικά των πρωτεϊνών. Τα γαλακτοκομικά προϊόντα, αποτελούν τα ιδανικά διατροφικά συστατικά τόσο για τον άνθρωπο όσο και για τα ζώα λόγω της πλούσιας περιεκτικότητάς τους σε απαραίτητα αμινοξέα και την υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες. Η διατροφική αξία της πρωτεΐνης είναι συνδεδεμένη με τη σύνθεση αυτών των αμινοξέων που συνθέτουν το γαλακτοκομικό προϊόν. Όσον αφορά την ανίχνευση νοθευτικών ουσιών με βάση τις πρωτεΐνες που υπάρχουν στα γαλακτοκομικά προϊόντα, μια ανάλυση με βάση τα αμινοξέα θα ήταν κατάλληλη, καθώς θα μπορούσε όχι μόνο να αξιολογήσει τη διατροφική αξία αλλά και να εντοπίσει τις εν λόγω νοθευτικές ουσίες. Υπάρχουν διάφορες διαθέσιμες μέθοδοι για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε αμινοξέα στα γαλακτοκομικά προϊόντα- ωστόσο, είναι ως επί το πλείστον χρονοβόρες ή απαιτούν επίπονες εργασίες προετοιμασίας. Υπάρχουν διάφορα κιτ στην αγορά που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση των αμινοξέων και περιέχουν παράγωγα και προσυσκευασμένα πρότυπα μείγματα, καθώς και η μεθοδολογία τους είναι γρήγορη και εύκολη. Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (UPLC) είναι μια ισχυρή



μέθοδος διαχωρισμού. Είναι μια μέθοδος που απαιτεί μικρή προετοιμασία του δείγματος και μπορεί να εφαρμοστεί σε διάφορους τύπους τροφίμων .

Τα αμινοξέα είναι οι πρόδρομες ουσίες των πρωτεϊνών και τα περισσότερα από αυτά αποτελούν την πηγή της διατροφής. Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο η πρωτεϊνική αξία θεωρείται σημαντική όταν πρόκειται για τη σύνθεση αμινοξέων σε τρόφιμα. Τα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι μια μεγάλη πηγή αυτών των βασικών θρεπτικών συστατικών- αμινοξέων. Εδώ περιγράφουμε λεπτομερώς μια προσέγγιση που αναπτύχθηκε για τον γρήγορο προσδιορισμό του επιπέδου συγκέντρωσης αμινοξέων που υπάρχουν σε διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα και περιλαμβάνει τη χρήση εμπορικού κιτ ανάλυσης αμινοξέων καθώς και ενός συστήματος UPLC που μας επιτρέπει να προσδιορίσουμε 16 αμινοξέα σε γαλακτοκομικά προϊόντα μέσα σε σχεδόν 30 λεπτά, παρά την ελάχιστη προετοιμασία του δείγματος που απαιτείται. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα επίπεδα διέφεραν μεταξύ των εξεταζόμενων γαλακτοκομικών προϊόντων, ενώ ορισμένα δείγματα περιείχαν τόσο ελεύθερα όσο και δεσμευμένα σε πρωτεΐνες αμινοξέα. Η τεχνική είναι χρήσιμη για τον προσδιορισμό της σύνθεσης των αμινοξέων των γαλακτοκομικών προϊόντων στο πλαίσιο εκείνων των ερευνών όπου θα εξεταστεί η διατροφική αξία των γαλακτοκομικών προϊόντων ως προς τα αμινοξέα πρωτεΐνης ή η παρουσία και ο προσδιορισμός ξένων ουσιών (νοθευτές).

Μια συνήθης πρακτική στον τομέα της ανάλυσης τροφίμων είναι η διενέργεια αναλύσεων αμινοξέων με τη χρήση συστημάτων GC-MS ή LC-MS. Αυτές οι δύο μέθοδοι περιλαμβάνουν διαδικασίες παραγωγοποίησης- το GC-MS χρησιμοποιεί φαινυλοϊσοθειοκυανικό, χλωροφορμικό βενζύλο ή 3-νιτροφαινυλοϋδραζίνη, ενώ το LC-MS χρησιμοποιεί AccQ-Tag, χλωριούχο δανσύλιο ή ισοθειοκυανικό φαινυλο. Παρόλο που αυτές οι τεχνικές διαθέτουν υψηλά επίπεδα ακρίβειας, έχουν ένα κόστος - είναι χρονοβόρες. Κατά τη χρήση μεθόδων LC-MS, η παρουσία γαλακτοκομικών μητρών μπορεί να οδηγήσει σε καταστολή ιόντων που αλλοιώνει τα αποτελέσματα. Από την άλλη πλευρά, οι βιοαισθητήρες παρέχουν μια εναλλακτική προσέγγιση: στην ανάλυση αμινοξέων, επιδεικνύουν υψηλή ακρίβεια και χαμηλό κόστος, καθώς ο συγκεκριμένος τύπος βιοαισθητήρα μπορεί να χρησιμοποιήσει ποτενσιομετρία και βολταμμετρία για να προσδιορίσει την ποσότητα των αμινοξέων στα γαλακτοκομικά προϊόντα μέσα σε μερικά λεπτά. Η δημιουργία μεταβολών του pH με βάση την υδρόλυση συγκεκριμένων

ενζυμικών υποστρωμάτων, η οποία βοηθά στη μέτρησή τους με τη χρήση εσωτερικού ηλεκτροδίου αναφοράς που επιλέγει το pH. Αυτό το τυπικό δίλημμα παρεμβολής αποφεύγεται από τους ιοντοεκλεκτικούς αισθητήρες που ανιχνεύουν ένζυμα- αυτό καθιστά τον βιοαισθητήρα ταχύτητα, χαμηλό κόστος και υψηλή ακρίβεια - μια πιθανή αναδύομενη εναλλακτική λύση στις συμβατικές αναλυτικές μεθόδους για την αξιολόγηση της περιεκτικότητας σε αμινοξέα στα γαλακτοκομικά προϊόντα, επομένως ένα λαμπρό μέλλον στους βιοαισθητήρες. Η υψηλή συγκέντρωση των απαραίτητων αμινοξέων συνεπάγεται υψηλή ποιότητα πρωτεϊνών για τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Επιπλέον, τα γαλακτοκομικά προϊόντα έχουν μια σημαντική σύνθεση αμινοξέων επειδή συνδέεται στενά με τη γεύση. Τα αμινοξέα συμμετέχουν στο σχηματισμό ενώσεων επηρεάζοντας τη γεύση μέσω της αντίδρασης Maillard, της αποικοδόμησης Strecker και άλλων μονοπατιών που συμβάλλουν στη γεύση. Αυτές οι ενώσεις που σχηματίζονται από τα αμινοξέα είναι άμεσα υπεύθυνες για τον καθορισμό της τελικής γεύσης των γαλακτοκομικών προϊόντων. Η δυνατότητα ποσοτικού προσδιορισμού των αμινοξέων στα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι επομένως σημαντική όχι μόνο για την αξιολόγηση της ποιότητας των πρωτεϊνών, αλλά και για τον έλεγχο και την παρακολούθηση των μονοπατιών σχηματισμού της γεύσης..

## 8 Βιβλιογραφία

- Adhikari, S., Schop, M., De Boer, I. J. M., & Huppertz, T. (2022). Protein Quality in Perspective: A Review of Protein Quality Metrics and Their Applications. *Nutrients*, 14(5), 947. <https://doi.org/10.3390/nu14050947>
- Akillioğlu, H. G., & Lund, M. N. (2022). Quantification of advanced glycation end products and amino acid cross-links in foods by high-resolution mass spectrometry: Applicability of acid hydrolysis. *Food Chemistry*, 366, 130601. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130601>
- Alinovi, M., Mucchetti, G., Wiking, L., & Corredig, M. (2021). Freezing as a solution to preserve the quality of dairy products: The case of milk, curds and cheese. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(20), 3340–3360. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1798348>
- Altintas, Z. (2018). Surface plasmon resonance based sensor for the detection of glycopeptide antibiotics in milk using rationally designed nanoMIPs. *Scientific Reports*, 8(1), 11222. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29585-2>
- Arendowski, A., Nizioł, J., & Ruman, T. (2018). Silver-109-based laser desorption/ionization mass spectrometry method for detection and quantification of amino acids. *Journal of Mass Spectrometry*, 53(4), 369–378. <https://doi.org/10.1002/jms.4068>
- Arju, G., Taivosalo, A., Pismennoi, D., Lints, T., Vilu, R., Daneberga, Z., Vorslova, S., Renkonen, R., & Joenvaara, S. (2020). Application of the UHPLC-DIA-HRMS Method for Determination of Cheese Peptides. *Foods*, 9(8), 979. <https://doi.org/10.3390/foods9080979>
- Benkerroum, N. (2016). Biogenic Amines in Dairy Products: Origin, Incidence, and Control Means. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(4), 801–826. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12212>
- Bollella, P., & Katz, E. (2020). Enzyme-Based Biosensors: Tackling Electron Transfer Issues. *Sensors*, 20(12), 3517. <https://doi.org/10.3390/s20123517>
- Boogers, I., Plugge, W., Stokkermans, Y. Q., & Duchateau, A. L. L. (2008). Ultra-performance liquid chromatographic analysis of amino acids in protein hydrolysates using an automated pre-column derivatisation method. *Journal of Chromatography A*, 1189(1–2), 406–409. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.11.052>
- Bucur, B., Purcarea, C., Andreescu, S., & Vasilescu, A. (2021). Addressing the Selectivity of Enzyme Biosensors: Solutions and Perspectives. *Sensors*, 21(9), 3038. <https://doi.org/10.3390/s21093038>
- Cammann, K. (1977). Bio-sensors based on ion-selective electrodes. *Fresenius' Zeitschrift Für Analytische Chemie*, 287(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/BF00539519>

- Cao, W., Shu, N., Wen, J., Yang, Y., Jin, Y., & Lu, W. (2022). Characterization of the Key Aroma Volatile Compounds in Nine Different Grape Varieties Wine by Headspace Gas Chromatography–Ion Mobility Spectrometry (HS-GC-IMS), Odor Activity Values (OAV) and Sensory Analysis. *Foods*, 11(18), 2767. <https://doi.org/10.3390/foods11182767>
- Castillo, J., Gáspár, S., Leth, S., Niculescu, M., Mortari, A., Bontidean, I., Soukharev, V., Dorneanu, S. A., Ryabov, A. D., & Csöregi, E. (2004). Biosensors for life quality. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 102(2), 179–194. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2004.04.084>
- Church, D. D., Hirsch, K. R., Park, S., Kim, I.-Y., Gwin, J. A., Pasiakos, S. M., Wolfe, R. R., & Ferrando, A. A. (2020). Essential Amino Acids and Protein Synthesis: Insights into Maximizing the Muscle and Whole-Body Response to Feeding. *Nutrients*, 12(12), 3717. <https://doi.org/10.3390/nu12123717>
- Connolly, C., Yin, X., & Brennan, L. (2023). Impact of Lactation Stage on the Metabolite Composition of Bovine Milk. *Molecules*, 28(18), 6608. <https://doi.org/10.3390/molecules28186608>
- Dai, Z., Wu, Z., Jia, S., & Wu, G. (2014). Analysis of amino acid composition in proteins of animal tissues and foods as pre-column o-phthaldialdehyde derivatives by HPLC with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 964. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.03.025>
- Darragh, A. J., & Moughan, P. J. (2005). The Effect of Hydrolysis Time on Amino Acid Analysis. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 88(3), 888–893. <https://doi.org/10.1093/jaoac/88.3.888>
- Dinu, A., & Apetrei, C. (2020). A Review on Electrochemical Sensors and Biosensors Used in Phenylalanine Electroanalysis. *Sensors*, 20(9), 2496. <https://doi.org/10.3390/s20092496>
- Drewnowski, A. (2021). Adjusting for protein quality by food source may affect nutrient density metrics. *Nutrition Reviews*, 79(10), 1134–1144. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuaa117>
- El-Ghaish, S., Rabesona, H., Choiset, Y., Sitohy, M., Haertlé, T., & Chobert, J.-M. (2011). Proteolysis by *Lactobacillus fermentum* IFO3956 isolated from Egyptian milk products decreases immuno-reactivity of  $\alpha_{S1}$ -casein. *Journal of Dairy Research*, 78(2), 203–210. <https://doi.org/10.1017/S0022029911000100>
- Fardet, A., & Rock, E. (2018). In vitro and in vivo antioxidant potential of milks, yoghurts, fermented milks and cheeses: A narrative review of evidence. *Nutrition Research Reviews*, 31(1), 52–70. <https://doi.org/10.1017/S0954422417000191>

- Foiklang, S., Wanapat, M., & Norrapoke, T. (2015). Effect of Grape Pomace Powder, Mangosteen Peel Powder and Monensin on Nutrient Digestibility, Rumen Fermentation, Nitrogen Balance and Microbial Protein Synthesis in Dairy Steers. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 29(10), 1416–1423. <https://doi.org/10.5713/ajas.15.0689>
- Garbowska, M., Pluta, A., & Berthold-Pluta, A. (2020). Contents of Functionally Bioactive Peptides, Free Amino Acids, and Biogenic Amines in Dutch-Type Cheese Models Produced with Different Lactobacilli. *Molecules*, 25(22), 5465. <https://doi.org/10.3390/molecules25225465>
- Garcia Rodenas, C. L., Lepage, M., Ngom-Bru, C., Fotiou, A., Papagaroufalidis, K., & Berger, B. (2016). Effect of Formula Containing Lactobacillus reuteri DSM 17938 on Fecal Microbiota of Infants Born by Cesarean-Section. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 63(6), 681–687. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001198>
- Garwolińska, D., Namieśnik, J., Kot-Wasik, A., & Hewelt-Belka, W. (2018). Chemistry of Human Breast Milk-A Comprehensive Review of the Composition and Role of Milk Metabolites in Child Development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(45), 11881–11896. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b04031>
- Gasco, L., Acuti, G., Bani, P., Dalle Zotte, A., Danieli, P. P., De Angelis, A., Fortina, R., Marino, R., Parisi, G., Piccolo, G., Pinotti, L., Prandini, A., Schiavone, A., Terova, G., Tulli, F., & Roncarati, A. (2020). Insect and fish by-products as sustainable alternatives to conventional animal proteins in animal nutrition. *Italian Journal of Animal Science*, 19(1), 360–372. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2020.1743209>
- Ghosh, A. K., & Shahabi, D. (2021). Synthesis of amide derivatives for electron deficient amines and functionalized carboxylic acids using EDC and DMAP and a catalytic amount of HOBt as the coupling reagents. *Tetrahedron Letters*, 63, 152719. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2020.152719>
- Gioia, M. G., Andreatta, P., Boschetti, S., & Gatti, R. (2007). Development and validation of a liquid chromatographic method for the determination of branched-chain amino acids in new dosage forms. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 45(3), 456–464. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.07.016>
- Górska-Warsewicz, H., Rejman, K., Laskowski, W., & Czebotko, M. (2019). Milk and Dairy Products and Their Nutritional Contribution to the Average Polish Diet. *Nutrients*, 11(8), 1771. <https://doi.org/10.3390/nu11081771>
- Gotti, R., Esposito, E., Luise, D., Tullio, S., Interino, N., Trevisi, P., & Fiori, J. (2022). Determination of Free Amino Acids in Milk, Colostrum and Plasma of Swine via Liquid Chromatography with Fluorescence and UV Detection. *Molecules*, 27(13), 4153. <https://doi.org/10.3390/molecules27134153>

- Goulding, D. A., Fox, P. F., & O'Mahony, J. A. (2020). Milk proteins: An overview. In *Milk Proteins* (pp. 21–98). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815251-5.00002-5>
- Guan, G., Zhang, L., Zhu, J., Wu, H., Li, W., & Sun, Q. (2021). Antibacterial properties and mechanism of biopolymer-based films functionalized by CuO/ZnO nanoparticles against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Hazardous Materials*, 402, 123542. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123542>
- Guha, S., Sharma, H., Deshwal, G. K., & Rao, P. S. (2021). A comprehensive review on bioactive peptides derived from milk and milk products of minor dairy species. *Food Production, Processing and Nutrition*, 3(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s43014-020-00045-7>
- Hanczkó, R., & Molnár-Perl, I. (2003). Derivatization, stability and chromatographic behavior of o-phthaldialdehyde amino acid and amine derivatives: o-Phthaldialdehyde/ 2-mercaptoethanol reagent. *Chromatographia*, 57(S1), S103–S113. <https://doi.org/10.1007/BF02492091>
- Harris, N., Gonzalez Viejo, C., Barnes, C., & Fuentes, S. (2023). Non-Invasive Digital Technologies to Assess Wine Quality Traits and Provenance through the Bottle. *Fermentation*, 9(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/fermentation9010010>
- Hayes, M. (2020). Measuring Protein Content in Food: An Overview of Methods. *Foods*, 9(10), 1340. <https://doi.org/10.3390/foods9101340>
- Hernandez-Valdes, J. A., Dalglish, M. M., Hermans, J., & Kuipers, O. P. (2020). Development of *Lactococcus lactis* Biosensors for Detection of Sulfur-Containing Amino Acids. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01654>
- Herreman, L., Nommensen, P., Pennings, B., & Laus, M. C. (2020). Comprehensive overview of the quality of plant- And animal-sourced proteins based on the digestible indispensable amino acid score. *Food Science & Nutrition*, 8(10), 5379–5391. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1809>
- Horstman, A. M. H., & Huppertz, T. (2023). Milk proteins: Processing, gastric coagulation, amino acid availability and muscle protein synthesis. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(30), 10267–10282. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2078782>
- Hossain, M. (2020). The Mass Spectrometer Mass spectrometers and Its Components. In M. Hossain (Ed.), *Selected Reaction Monitoring Mass Spectrometry (SRM-MS) in Proteomics: A Comprehensive View* (pp. 17–52). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-53433-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-53433-2_2)



- Hou, Y., Hu, S., Li, X., He, W., & Wu, G. (2020). Amino Acid Metabolism in the Liver: Nutritional and Physiological Significance. In G. Wu (Ed.), *Amino Acids in Nutrition and Health* (Vol. 1265, pp. 21–37). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-45328-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-45328-2_2)
- Hu, T., Chen, R., Wang, Q., He, C., & Liu, S. (2021). Recent advances and applications of molecularly imprinted polymers in solid-phase extraction for real sample analysis. *Journal of Separation Science*, 44(1), 274–309. <https://doi.org/10.1002/jssc.202000832>
- Hughes, G., Pemberton, R. M., Fielden, P. R., & Hart, J. P. (2016). The design, development and application of electrochemical glutamate biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 79, 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.10.020>
- Imperiale, S., Morozova, K., Ferrentino, G., & Scampicchio, M. (2023). Analysis of milk with liquid chromatography–mass spectrometry: A review. *European Food Research and Technology*, 249(4), 861–902. <https://doi.org/10.1007/s00217-022-04197-3>
- Itoh, N., Yamazaki, T., Sato, A., Numata, M., & Takatsu, A. (2014). A certified urea reference material (NMIJ CRM 6006-a) as a reliable calibrant for the elemental analyses of amino acids and food samples. *Analytical Sciences: The International Journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, 30(4), 471–476. <https://doi.org/10.2116/analsci.30.471>
- Jančová, P., Pachlová, V., Čechová, E., Cedidlová, K., Šerá, J., Pištěková, H., Buňka, F., & Buňková, L. (2020). Occurrence of Biogenic Amines Producers in the Wastewater of the Dairy Industry. *Molecules*, 25(21), 5143. <https://doi.org/10.3390/molecules25215143>
- Jiang, F., Gao, H., Qin, W., Song, P., Wang, H., Zhang, J., Liu, D., Wang, D., & Zhang, T. (2021). Marked Seasonal Variation in Structure and Function of Gut Microbiota in Forest and Alpine Musk Deer. *Frontiers in Microbiology*, 12, 699797. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.699797>
- Jiang, Q., Sherlock, D. N., Guyader, J., & Loor, J. J. (2023). Abundance of Amino Acid Transporters and mTOR Pathway Components in the Gastrointestinal Tract of Lactating Holstein Cows. *Animals*, 13(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/ani13071189>
- Kacaniklic, V., Johansson, K., Marko–Varga, G., Gorton, L., Jönsson–Pettersson, G., & Csöregi, E. (1994). Amperometric biosensors for detection of L- and D-amino acids based on coimmobilized peroxidase and L- and D-amino acid oxidases in carbon paste electrodes. *Electroanalysis*, 6(5–6), 381–390. <https://doi.org/10.1002/elan.1140060505>



- Kamei, Y., Hatazawa, Y., Uchitomi, R., Yoshimura, R., & Miura, S. (2020). Regulation of Skeletal Muscle Function by Amino Acids. *Nutrients*, 12(1), 261. <https://doi.org/10.3390/nu12010261>
- Kang, K., Sotunde, O. F., & Weiler, H. A. (2019). Effects of Milk and Milk-Product Consumption on Growth among Children and Adolescents Aged 6–18 Years: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Advances in Nutrition*, 10(2), 250–261. <https://doi.org/10.1093/advances/nmy081>
- Karoui, R. (2018). Spectroscopic Technique: Fluorescence and Ultraviolet-Visible (UV-Vis) Spectroscopies. In *Modern Techniques for Food Authentication* (pp. 219–252). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814264-6.00007-4>
- Kasai, T., Ono, S., Koshiba, S., Yamamoto, M., Tanaka, T., Ikeda, S., & Kigawa, T. (2020). Amino-acid selective isotope labeling enables simultaneous overlapping signal decomposition and information extraction from NMR spectra. *Journal of Biomolecular NMR*, 74(2), 125–137. <https://doi.org/10.1007/s10858-019-00295-9>
- Kelly, B., & Pearce, E. L. (2020). Amino Assets: How Amino Acids Support Immunity. *Cell Metabolism*, 32(2), 154–175. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.06.010>
- Kim, W., Wang, Y., & Selomulya, C. (2020). Dairy and plant proteins as natural food emulsifiers. *Trends in Food Science & Technology*, 105, 261–272. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.09.012>
- Krumpochova, P., Bruyneel, B., Molenaar, D., Koukou, A., Wuhler, M., Niessen, W. M. A., & Giera, M. (2015). Amino acid analysis using chromatography–mass spectrometry: An inter platform comparison study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 114, 398–407. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.06.001>
- Kwan, C., Fusch, G., Rochow, N., Fusch, C., Kwan, C., Fusch, G., Rochow, N., el-Helou, S., Belfort, M., Festival, J., Hair, A., Hascoet, J.-M., Kuehn, T., Miris, Nelle, M., O'Connor, D., Pelligra, G., Poindexter, B., Fu, T., ... Fusch, C. (2020). Milk analysis using milk analyzers in a standardized setting (MAMAS) study: A multicentre quality initiative. *Clinical Nutrition*, 39(7), 2121–2128. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2019.08.028>
- Landi, N., Ragucci, S., & Di Maro, A. (2021). Amino Acid Composition of Milk from Cow, Sheep and Goat Raised in Ailano and Valle Agricola, Two Localities of ‘Alto Casertano’ (Campania Region). *Foods*, 10(10), 2431. <https://doi.org/10.3390/foods10102431>
- Lapierre, H., Martineau, R., Hanigan, M. D., van Lingen, H. J., Kebreab, E., Spek, J. W., & Ouellet, D. R. (2020). Review: Impact of protein and energy supply on the fate of amino acids from absorption to milk protein in dairy cows. *Animal*, 14, s87–s102. <https://doi.org/10.1017/S1751731119003173>

- Li, P., He, W., & Wu, G. (2021). Composition of Amino Acids in Foodstuffs for Humans and Animals. In G. Wu (Ed.), *Amino Acids in Nutrition and Health: Amino Acids in Gene Expression, Metabolic Regulation, and Exercising Performance* (pp. 189–210). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-74180-8\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-030-74180-8_11)
- Li, P., & Wu, G. (2020). Composition of amino acids and related nitrogenous nutrients in feedstuffs for animal diets. *Amino Acids*, 52(4), 523–542. <https://doi.org/10.1007/s00726-020-02833-4>
- Li, X., Han, T., Zheng, S., & Wu, G. (2021). Nutrition and Functions of Amino Acids in Aquatic Crustaceans. In G. Wu (Ed.), *Amino Acids in Nutrition and Health* (Vol. 1285, pp. 169–198). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-54462-1\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-030-54462-1_9)
- Liu, J., Li, T., Qin, H., Li, L., Yan, M., Zhu, C., Qu, F., & Abd El-Aty, A. M. (2022). Self-assembly and label-free fluorescent aptasensor based on deoxyribonucleic acid intercalated dyes for detecting lactoferrin in milk powder. *Frontiers in Nutrition*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.992188>
- Liu, S., Sun, H., Ma, G., Zhang, T., Wang, L., Pei, H., Li, X., & Gao, L. (2022). Insights into flavor and key influencing factors of Maillard reaction products: A recent update. *Frontiers in Nutrition*, 9, 973677. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.973677>
- Liu, Z., Li, X., Masai, H., Huang, X., Tsuda, S., Terao, J., Yang, J., & Guo, X. (2021). A single-molecule electrical approach for amino acid detection and chirality recognition. *Science Advances*, 7(10), eabe4365. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abe4365>
- Lopez, M. J., & Mohiuddin, S. S. (2024). Biochemistry, Essential Amino Acids. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557845/>
- Lovejoy, K., Fabel, S., Pietsch, M., Park, S. H., & Steiner, F. (n.d.). *Amino Acid Analysis of Mammalian Cell Culture Medium by Liquid Chromatography with UV and Fluorescence Detection and Derivatization with 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate*.
- Ma, C., Liu, Y., Liu, S., Lévesque, C. L., Zhao, F., Yin, J., & Dong, B. (2020). Branched chain amino acids alter fatty acid profile in colostrum of sows fed a high fat diet. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 11(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0423-9>
- Madrigal, C., Soto-Méndez, M. J., Hernández-Ruiz, Á., Valero, T., Lara Villoslada, F., Leis, R., Martínez De Victoria, E., Moreno, J. M., Ortega, R. M., Ruiz-López, M. D., Varela-Moreiras, G., & Gil, Á. (2021). Dietary Intake, Nutritional Adequacy, and Food Sources of Protein and Relationships with Personal and Family Factors in

- Spanish Children Aged One to <10 Years: Findings of the EsNuPI Study. *Nutrients*, 13(4), 1062. <https://doi.org/10.3390/nu13041062>
- Magnuson, A., Bukowski, M., & Picklo, M. (2022). Infusion Mass Spectrometric Analysis of Sphingomyelin Species in Dairy With Lithium-Mediated Fragmentation. *Current Developments in Nutrition*, 6, 775. <https://doi.org/10.1093/cdn/nzac063.017>
- Malima, A., Siavoshi, S., Musacchio, T., Upponi, J., Yilmaz, C., Somu, S., Hartner, W., Torchilin, V., & Busnaina, A. (2012). Highly sensitive microscale in vivo sensor enabled by electrophoretic assembly of nanoparticles for multiple biomarker detection. *Lab on a Chip*, 12(22), 4748. <https://doi.org/10.1039/c2lc40580f>
- Manca, G., Ru, A., Siddi, G., Mocci, A. M., Murittu, G., & De Santis, E. P. L. (2020). Biogenic amines content in Fiore Sardo cheese in relation to free amino acids and physicochemical characteristics. *Italian Journal of Food Safety*, 9(1). <https://doi.org/10.4081/ijfs.2020.8457>
- Manca, M., & Kraus, A. (2020). Defining the Protein Seeds of Neurodegeneration using Real-Time Quaking-Induced Conversion Assays. *Biomolecules*, 10(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/biom10091233>
- Mandel-Gutfreund, Y., & Margalit, H. (1998). Quantitative parameters for amino acid-base interaction: Implications for prediction of protein-DNA binding sites. *Nucleic Acids Research*, 26(10), 2306–2312. <https://doi.org/10.1093/nar/26.10.2306>
- Manley, M., & Baeten, V. (2018). Spectroscopic Technique: Near Infrared (NIR) Spectroscopy. In *Modern Techniques for Food Authentication* (pp. 51–102). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814264-6.00003-7>
- Maranata, G. J., Surya, N. O., & Hasanah, A. N. (2021). Optimising factors affecting solid phase extraction performances of molecular imprinted polymer as recent sample preparation technique. *Heliyon*, 7(1), e05934. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e05934>
- Marcone, G. L., Rosini, E., Crespi, E., & Pollegioni, L. (2020). D-amino acids in foods. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(2), 555–574. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10264-9>
- Master, P. B. Z., & Macedo, R. C. O. (2021). Effects of dietary supplementation in sport and exercise: A review of evidence on milk proteins and amino acids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(7), 1225–1239. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1756216>
- Mazorra-Manzano, M. A., & Ramírez-Suárez, J. C. (2024). Chapter 13—Proteolytic enzymes for production of functional protein hydrolysates and bioactive peptides. In R. Y. Yada & D. R. Dee (Eds.), *Improving and Tailoring Enzymes for Food Quality*

- and Functionality (Second Edition)* (pp. 325–354). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-15437-9.00013-6>
- Mazorra-Manzano, M. A., Robles-Porchas, G. R., González-Velázquez, D. A., Torres-Llanez, M. J., Martínez-Porchas, M., García-Sifuentes, C. O., González-Córdova, A. F., & Vallejo-Córdova, B. (2020). Cheese Whey Fermentation by Its Native Microbiota: Proteolysis and Bioactive Peptides Release with ACE-Inhibitory Activity. *Fermentation*, 6(1), 19. <https://doi.org/10.3390/fermentation6010019>
- Md Noh, M. F., Gunasegavan, R. D.-N., Mustafa Khalid, N., Balasubramaniam, V., Mustar, S., & Abd Rashed, A. (2020). Recent Techniques in Nutrient Analysis for Food Composition Database. *Molecules*, 25(19), 4567. <https://doi.org/10.3390/molecules25194567>
- Mehrotra, P. (2016). Biosensors and their applications – A review. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 6(2), 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.12.002>
- Metkar, S. K., & Girigoswami, K. (2019). Diagnostic biosensors in medicine – A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17, 271–283. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.11.029>
- Moniente, M., Botello-Morte, L., García-Gonzalo, D., Pagán, R., & Ontañón, I. (2022). Analytical strategies for the determination of biogenic amines in dairy products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21(4), 3612–3646. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12980>
- Moughan, P. J. (2020). Chapter 17 - Milk proteins: A rich source of bioactives for developing functional foods. In M. Boland & H. Singh (Eds.), *Milk Proteins (Third Edition)* (pp. 633–649). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815251-5.00017-7>
- Muhammad, N., Hussian, I., Ali, A., Hussain, T., Intisar, A., Ul Haq, I., Subhani, Q., Hedar, M., Zhong, J.-L., Asif, M., Guo, D., Cui, H., & Zhu, Y. (2022). A comprehensive review of liquid chromatography hyphenated to post-column photoinduced fluorescence detection system for determination of analytes. *Arabian Journal of Chemistry*, 15(9), 104091. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.104091>
- Munir, M. A., & Badri, K. H. (2020). The Importance of Derivatizing Reagent in Chromatography Applications for Biogenic Amine Detection in Food and Beverages. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2020, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2020/5814389>
- Nejadmansouri, M., Majdinasab, M., Nunes, G. S., & Marty, J. L. (2021). An Overview of Optical and Electrochemical Sensors and Biosensors for Analysis of Antioxidants in Food during the Last 5 Years. *Sensors*, 21(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/s21041176>

- Nielsen, S. D., Knudsen, L. J., Bækgaard, L. T., Rauh, V., & Larsen, L. B. (2022). Influence of Lactose on the Maillard Reaction and Dehydroalanine-Mediated Protein Cross-Linking in Casein and Whey. *Foods*, 11(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/foods11070897>
- Nishi, H., Uchida, K., Saito, M., Yamanaka, D., Nagata, H., Tomoshige, H., Miyata, I., Ito, K., Toyoshima, Y., Takahashi, S.-I., Hakuno, F., & Takenaka, A. (2022). Essential Amino Acid Intake Is Required for Sustaining Serum Insulin-like Growth Factor-I Levels but Is Not Necessarily Needed for Body Growth. *Cells*, 11(9), 1523. <https://doi.org/10.3390/cells11091523>
- Nuzzo, T., Miroballo, M., Casamassa, A., Mancini, A., Gaetani, L., Nisticò, R., Eusebi, P., Katane, M., Homma, H., Calabresi, P., Errico, F., Parnetti, L., & Usiello, A. (2020). Cerebrospinal fluid and serum d-serine concentrations are unaltered across the whole clinical spectrum of Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1868(12), 140537. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2020.140537>
- Olk, D. C., Fortuna, A., & Honeycutt, C. W. (2008). Using Anion Chromatography–Pulsed Amperometry to Measure Amino Compounds in Dairy Manure-Amended Soils. *Soil Science Society of America Journal*, 72(6), 1711–1720. <https://doi.org/10.2136/sssaj2007.0420>
- Onwulata, C., Konstance, R. P., Cooke, P., & Farrell, J., Harold. (2003). Functionality of Extrusion—Texturized Whey Proteins. *Journal of Dairy Science*, 86, 3775–3782. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73984-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73984-8)
- Ortega, A. F., Zhao, H., & Van Amburgh, M. E. (2024). Development and Validation of a Method for Hydrolysis and Analysis of Amino Acids in Ruminant Feeds, Tissue, and Milk Using Isotope Dilution Z-HILIC Coupled with Electrospray Ionization Triple Quadrupole LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 72(1), 833–844. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c05266>
- Palacios Colón, L., Rascón, A. J., Hejji, L., Azzouz, A., & Ballesteros, E. (2021). Validation and Use of an Accurate, Sensitive Method for Sample Preparation and Gas Chromatography–Mass Spectrometry Determination of Different Endocrine-Disrupting Chemicals in Dairy Products. *Foods*, 10(5), 1040. <https://doi.org/10.3390/foods10051040>
- Panwar, B., Gupta, S., & Raghava, G. P. S. (2013). Prediction of vitamin interacting residues in a vitamin binding protein using evolutionary information. *BMC Bioinformatics*, 14(1), 44. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-44>
- Parra, D., & Martínez, J. A. (2007). Amino acid uptake from a probiotic milk in lactose intolerant subjects. *British Journal of Nutrition*, 98(S1), S101–S104. <https://doi.org/10.1017/S0007114507833058>



- Patel, R. K., Singh, P. K., Pandey, R., Patel, B., & Mishra, S. (2021). AMINO ACID STATUS OF BOVINE MILK UNDER SEASONAL VARIATION AROUND SINGRAULI DISTRICT. *International Journal of Chemistry Research*, 1–4. <https://doi.org/10.22159/ijcr.2021v5i3.170>
- Patel, S., Nanda, R., Sahoo, S., & Mohapatra, E. (2016a). Biosensors in Health Care: The Milestones Achieved in Their Development towards Lab-on-Chip-Analysis. *Biochemistry Research International*, 2016, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2016/3130469>
- Patel, S., Nanda, R., Sahoo, S., & Mohapatra, E. (2016b). Biosensors in Health Care: The Milestones Achieved in Their Development towards Lab-on-Chip-Analysis. *Biochemistry Research International*, 2016, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2016/3130469>
- Pereira, E. V. dos S., Fernandes, D. D. de S., de Araújo, M. C. U., Diniz, P. H. G. D., & Maciel, M. I. S. (2020). Simultaneous determination of goat milk adulteration with cow milk and their fat and protein contents using NIR spectroscopy and PLS algorithms. *LWT*, 127, 109427. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109427>
- Peris-Vicente, J., Esteve-Romero, J., & Carda-Broch, S. (2015). Validation of Analytical Methods Based on Chromatographic Techniques: An Overview. In V. Pino, J. L. Anderson, A. Berthod, & A. M. Stalcup (Eds.), *Analytical Separation Science* (1st ed., pp. 1757–1808). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9783527678129.assep064>
- Poinsot, V., Ong-Meang, V., Gavard, P., & Couderc, F. (2014). Recent advances in amino acid analysis by capillary electromigration methods, 2011–2013. *ELECTROPHORESIS*, 35(1), 50–68. <https://doi.org/10.1002/elps.201300306>
- Poojary, M. M., Hellwig, M., Henle, T., & Lund, M. N. (2023). Covalent bonding between polyphenols and proteins: Synthesis of caffeic acid-cysteine and chlorogenic acid-cysteine adducts and their quantification in dairy beverages. *Food Chemistry*, 403, 134406. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134406>
- Pourabbas, M., Bagheri, R., Hooshmand Moghadam, B., Willoughby, D. S., Candow, D. G., Elliott, B. T., Forbes, S. C., Ashtary-Larky, D., Eskandari, M., Wong, A., & Dutheil, F. (2021). Strategic Ingestion of High-Protein Dairy Milk during a Resistance Training Program Increases Lean Mass, Strength, and Power in Trained Young Males. *Nutrients*, 13(3), 948. <https://doi.org/10.3390/nu13030948>
- Proteolysis by Lactobacillus fermentum IFO3956 isolated from Egyptian milk products decreases immuno-reactivity of  $\alpha$ SI-casein.* | Semantic Scholar. (n.d.). Retrieved May 31, 2024, from <https://www.semanticscholar.org/paper/Proteolysis-by-Lactobacillus-fermentum-IFO3956-from-El-Ghaish-Rabesona/602b3ee998126588335a12e338e9ed111cd7e174>

- Qin, P., Wang, T., & Luo, Y. (2022). A review on plant-based proteins from soybean: Health benefits and soy product development. *Journal of Agriculture and Food Research*, 7, 100265. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2021.100265>
- Ralli, E., & Spyros, A. (2023). A Study of Greek Graviera Cheese by NMR-Based Metabolomics. *Molecules*, 28(14), Article 14. <https://doi.org/10.3390/molecules28145488>
- Rao, P. S., Singh, P., Sharma, V., & Arora, S. (2021). Traditional analytical approaches for lactose residues determination in lactose hydrolysed milks: A review. *LWT*, 151, 112069. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112069>
- Ratajczak, A. E., Zawada, A., Rychter, A. M., Dobrowolska, A., & Krela-Kaźmierczak, I. (2021). Milk and Dairy Products: Good or Bad for Human Bone? Practical Dietary Recommendations for the Prevention and Management of Osteoporosis. *Nutrients*, 13(4), 1329. <https://doi.org/10.3390/nu13041329>
- Reynaud, Y., Buffière, C., Cohade, B., Vauris, M., Liebermann, K., Hafnaoui, N., Lopez, M., Souchon, I., Dupont, D., & Rémond, D. (2021). True ileal amino acid digestibility and digestible indispensable amino acid scores (DIAASs) of plant-based protein foods. *Food Chemistry*, 338, 128020. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128020>
- Rigas, P. G. (2012). REVIEW: LIQUID CHROMATOGRAPHY—POST-COLUMN DERIVATIZATION FOR AMINO ACID ANALYSIS: STRATEGIES, INSTRUMENTATION, AND APPLICATIONS. *Instrumentation Science & Technology*, 40(2–3), 161–193. <https://doi.org/10.1080/10739149.2011.651669>
- Rigas, P. G. (2013). Post-column labeling techniques in amino acid analysis by liquid chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(25), 7957–7992. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7127-3>
- Rocchitta, G., Spanu, A., Babudieri, S., Latte, G., Madeddu, G., Galleri, G., Nuvoli, S., Bagella, P., Demartis, M., Fiore, V., Manetti, R., & Serra, P. (2016). Enzyme Biosensors for Biomedical Applications: Strategies for Safeguarding Analytical Performances in Biological Fluids. *Sensors*, 16(6), 780. <https://doi.org/10.3390/s16060780>
- Rochow, N., Fusch, G., Ali, A., Bhatia, A., So, H. Y., Iskander, R., Chessell, L., el Helou, S., & Fusch, C. (2021). Individualized target fortification of breast milk with protein, carbohydrates, and fat for preterm infants: A double-blind randomized controlled trial. *Clinical Nutrition*, 40(1), 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2020.04.031>
- Roediger, R., Stein, H.-H., Callaghan-Gillespie, M., Blackman, J. K., Kohlmann, K., Maleta, K., & Manary, M. (2020). Protein quality in ready-to-use supplementary foods for moderate wasting. *Maternal & Child Nutrition*, 16(4), e13019. <https://doi.org/10.1111/mcn.13019>



- Rosini, E., Molla, G., Rossetti, C., Pilone, M. S., Pollegioni, L., & Sacchi, S. (2008). A biosensor for all d-amino acids using evolved d-amino acid oxidase. *Journal of Biotechnology*, 135(4), 377–384. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.06.001>
- Roy, D., Ye, A., Moughan, P. J., & Singh, H. (2020). Composition, Structure, and Digestive Dynamics of Milk From Different Species—A Review. *Frontiers in Nutrition*, 7. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.577759>
- Rustam, Y. H., & Reid, G. E. (2018). Analytical Challenges and Recent Advances in Mass Spectrometry Based Lipidomics. *Analytical Chemistry*, 90(1), 374–397. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04836>
- Rutherford, S. M. (2009). Accurate determination of the amino acid content of selected feedstuffs. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60 Suppl 7, 53–62. <https://doi.org/10.1080/09637480802269957>
- Sá, A. G. A., Moreno, Y. M. F., & Carciofi, B. A. M. (2020). Plant proteins as high-quality nutritional source for human diet. *Trends in Food Science & Technology*, 97, 170–184. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.01.011>
- Sargazi, S., Fatima, I., Hassan Kiani, M., Mohammadzadeh, V., Arshad, R., Bilal, M., Rahdar, A., Díez-Pascual, A. M., & Behzadmehr, R. (2022). Fluorescent-based nanosensors for selective detection of a wide range of biological macromolecules: A comprehensive review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 206, 115–147. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.02.137>
- Sassi, M., Arena, S., & Scaloni, A. (2015). MALDI-TOF-MS Platform for Integrated Proteomic and Peptidomic Profiling of Milk Samples Allows Rapid Detection of Food Adulterations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(27), 6157–6171. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b02384>
- Scholz-Ahrens, K. E., Ahrens, F., & Barth, C. A. (2020). Nutritional and health attributes of milk and milk imitations. *European Journal of Nutrition*, 59(1), 19–34. <https://doi.org/10.1007/s00394-019-01936-3>
- Sefer, M., Petronijevic, R. B., Trbovic, D., Ciric, J., Baltic, T., Parunovic, N., & Djordjevic, V. (2021). Amino acids in animal feed: Significance and determination techniques. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 854(1), 012082. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/854/1/012082>
- Shimadzu. (n.d.). *Analytical Methods for Amino Acids*. Retrieved May 30, 2024, from [https://www.shimadzu.eu/service-support/technical-support/liquide-chromatography/analysis\\_targets/amino.html](https://www.shimadzu.eu/service-support/technical-support/liquide-chromatography/analysis_targets/amino.html)
- Singh-Povel, C. M., Van Gool, M. P., Gual Rojas, A. P., Bragt, M. C., Kleinnijenhuis, A. J., & Hettinga, K. A. (2022). Nutritional content, protein quantity, protein quality and carbon footprint of plant-based drinks and semi-skimmed milk in the

- Netherlands and Europe. *Public Health Nutrition*, 25(5), 1416–1426. <https://doi.org/10.1017/S1368980022000453>
- Smith, N. W., Fletcher, A. J., Hill, J. P., & McNabb, W. C. (2022). Modeling the Contribution of Milk to Global Nutrition. *Frontiers in Nutrition*, 8. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.716100>
- Sobaih, A., & Zaki, D. (2018). Production of Novel Functional Yoghurt Fortified with Bovine Colostrum and Date Syrup for Children. *Alexandria Science Exchange Journal*, 39, 651–662. <https://doi.org/10.21608/asejaqjsae.2018.20475>
- Soma, Y., Izumi, Y., Shimohira, T., Takahashi, M., Imado, Y., Tominaga, S., Tokito, K., Hata, K., Shinadama, S., Oshiro, M., Hayakawa, Y., & Bamba, T. (2022). In-Needle Pre-Column Derivatization for Amino Acid Quantification (iPDAQ) Using HPLC. *Metabolites*, 12(9), 807. <https://doi.org/10.3390/metabo12090807>
- Sterneder, S., Stoeger, V., Dugulin, C. A., Liszt, K. I., Di Pizio, A., Korntheuer, K., Dunkel, A., Eder, R., Ley, J. P., & Somoza, V. (2021). Astringent Gallic Acid in Red Wine Regulates Mechanisms of Gastric Acid Secretion via Activation of Bitter Taste Sensing Receptor TAS2R4. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(36), 10550–10561. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c03061>
- Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A., & Wilson, G. S. (2001). Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. *International Union of Pure and Applied Chemistry: Physical Chemistry Division, Commission I.7 (Biophysical Chemistry); Analytical Chemistry Division, Commission V.5 (Electroanalytical Chemistry)*.1. *Biosensors and Bioelectronics*, 16(1–2), 121–131. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00115-4](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00115-4)
- Valdez-Flores, C., Revilla Vazquez, A., Ramírez-Bribiesca, J. E., López-Arellano, R., & Pérez-Becerril, E. (2014). High Performance Liquid Chromatography Fluorescence Method for the Determination of Seleno-Amino Acids in Ovine Blood Plasma. *Analytical Letters*, 47. <https://doi.org/10.1080/00032719.2013.843183>
- Van Lieshout, G. A. A., Lambers, T. T., Bragt, M. C. E., & Hettinga, K. A. (2020). How processing may affect milk protein digestion and overall physiological outcomes: A systematic review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(14), 2422–2445. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1646703>
- van Sadelhoff, J. H. J., Wiertsema, S. P., Garssen, J., & Hogenkamp, A. (2020). Free Amino Acids in Human Milk: A Potential Role for Glutamine and Glutamate in the Protection Against Neonatal Allergies and Infections. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01007>
- Venelinov, T., & Sahuquillo, A. (2006). Optimizing the uses and the costs of reference materials in analytical laboratories. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 25(5), 528–533. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2006.02.006>

- Vestergaard, M., Kerman, K., & Tamiya, E. (2007). An Overview of Label-free Electrochemical Protein Sensors. *Sensors*, 7(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/s7123442>
- Vincent, D., Mertens, D., & Rochfort, S. (2018). Optimisation of Milk Protein Top-Down Sequencing Using In-Source Collision-Induced Dissociation in the Maxis Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometer. *Molecules*, 23(11), 2777. <https://doi.org/10.3390/molecules23112777>
- Wang, S., Zhang, P., Xue, Y., Yan, Q., Li, X., & Jiang, Z. (2021). Characterization of a Novel Aspartic Protease from *Rhizomucor miehei* Expressed in *Aspergillus niger* and Its Application in Production of ACE-Inhibitory Peptides. *Foods*, 10(12), 2949. <https://doi.org/10.3390/foods10122949>
- Wang, X., Cui, D., Qu, X., You, H., Lei, F., Li, J., Xie, Y., Zhang, H., Zhang, Y., Jiang, S., & Xie, Q. (2023). Analytical Ultracentrifugation-Calibrated Anion-Exchange Chromatography for Sensitive and Intact Determination of Osteopontin in Infant Formula and Dairy Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(37), 13880–13888. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c03589>
- Waters. (n.d.). *Derivatization of Amino Acids Using Waters AccQ•Tag* | Waters. Retrieved June 4, 2024, from <https://www.waters.com/nextgen/us/en/education/primers/comprehensive-guide-to-hydrolysis-and-analysis-of-amino-acids/derivatization-of-amino-acids-using-waters-accqtag-chemistry.html>
- Waters. (2022, July 22). *How do AccQ•Fluor and AccQ•Tag Ultra reagents derivatize amino acids?* - WKB238328. Waters. [https://support.waters.com/KB\\_Chem/Columns/WKB238328\\_How\\_do\\_AccQFluor\\_and\\_AccQTag\\_Ultra\\_Reagents\\_derivatize\\_amino\\_acids](https://support.waters.com/KB_Chem/Columns/WKB238328_How_do_AccQFluor_and_AccQTag_Ultra_Reagents_derivatize_amino_acids)
- Wei, B., Zenaidee, M. A., Lantz, C., Ogorzalek Loo, R. R., & Loo, J. A. (2022). Towards understanding the formation of internal fragments generated by collisionally activated dissociation for top-down mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 1194, 339400. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339400>
- Wu, G. (2022). *Amino acids: Biochemistry and nutrition* (Second edition). CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Xiao, F., & Guo, F. (2022). Impacts of essential amino acids on energy balance. *Molecular Metabolism*, 57, 101393. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101393>
- Xie, T., Liu, Y., Lu, H., Iqbal, A., Ruan, M., Jiang, P., Yu, H., Meng, J., & Zhao, Z. (2022). The Knockout of the ASIP Gene Altered the Lipid Composition in Bovine Mammary Epithelial Cells via the Expression of Genes in the Lipid Metabolism Pathway. *Animals*, 12(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/ani12111389>

- Yang, J., Kuang, H., Xiong, X., Li, N., & Song, J. (2024). Alteration of the allergenicity of cow's milk proteins using different food processing modifications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 64(14), 4622–4642. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2144792>
- Zhang, S., Ding, J., Liu, Y., Kong, J., & Hofstetter, O. (2006). Development of a Highly Enantioselective Capacitive Immunosensor for the Detection of  $\alpha$ -Amino Acids. *Analytical Chemistry*, 78(21), 7592–7596. <https://doi.org/10.1021/ac060840h>
- Ziyaina, M., Rasco, B., & Sablani, S. S. (2020). Rapid methods of microbial detection in dairy products. *Food Control*, 110, 107008. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.107008>
- Zuo, W., Wu, P., He, W., Xiao, Q., Yang, J., Liu, X., Jiang, H., Dai, J., & Ju, Y. (2023). A fluorescent and ratiometric colorimetric biosensor for detection of different hazard contaminants in dairy products. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 374, 132816. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2022.132816>