



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΑΝΟΡΓΑΝΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**Ταυτόχρονος προσδιορισμός υποκατεστημένων και μη-
υποκατεστημένων λιπαρών οξέων μικρής αλυσίδας και αμινοξέων σε
βιολογικά δείγματα και επιλεγμένα τρόφιμα μετά από
παραγωγοποίηση και αεριοχρωματογραφία - φασματομετρία μάζας**

ΚΑΛΛΙΡΟΗ - ΜΑΡΙΑ ΚΑΤΣΑΡΗ

ΠΤΥΧΙΟΥΧΟΣ ΧΗΜΙΚΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2026

Διπλωματική Εργασία
Καλλιρόη-Μαρία Κάτσαρη

Επιβλέπων Καθηγητής:

Σταλίκας Κωνσταντίνος, Καθηγητής του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Υπόλοιπα μέλη τριμελούς επιτροπής:

Σακκάς Βασίλειος, Καθηγητής του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Τάκης Παντελεήμων, Καθηγητής του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία πραγματεύεται την ανάπτυξη μεθόδου ταυτόχρονου αεριοχρωματογραφικού ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού δεκατεσσάρων υποκατεστημένων (υδροξυ-, αμινο- και υδροξυ-αμινο-) και μη-υποκατεστημένων λιπαρών οξέων μικρής αλυσίδας (SCFAs) και δώδεκα αμινοξέων μέσω παραγωγοποίησης σε συνδυασμό με εκχύλιση υγρής φάσης με ανιχνευτή φασματομετρίας μάζας (GC-MS). Ως αντιδραστήριο παραγωγοποίησης χρησιμοποιήθηκε ο χλωροφορμικός ισοβουτυλεστέρας (iBCF) και ως διαλύτης για την εκχύλιση το εξάνιο. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα για την βελτιστοποίηση της αντίδρασης παραγωγοποίησης ως προς τον διαλύτη εκχύλισης, τις αναλογίες αντιδραστήριου παραγωγοποίησης: αλκοόλης: καταλύτη, την θερμοκρασία και την ιοντική ισχύ. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία για τον προσδιορισμό των SCFAs και των αμινοξέων σε δείγματα σιέλου, ούρων, κοπράνων όρνιθας και ανθρώπου και λυοφιλιωμένων αυγών. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα για την επίδραση του καφέ, του καπνίσματος και της άθλησης στη συγκέντρωση των αναλυτών με το χρόνο, σε δείγματα σιέλου και ούρων και εξήχθησαν τα αντίστοιχα συμπεράσματα. Τα δεδομένα έδειξαν ικανοποιητική γραμμικότητα με τον συντελεστή προσδιορισμού (R^2) να κυμαίνονταν από 0,9859 έως 0,9992. Τα Όρια Ανίχνευσης (LODs) κυμάνθηκαν από 0,011 έως 2,7 $\mu\text{g/mL}$ ενώ τα Όρια Ποσοτικοποίησης (LOQs) από 0,033 έως 8,0 $\mu\text{g/mL}$. Η διαδικασία έδειξε ότι η επαναληψιμότητα κυμάνθηκε από 0,1% έως 6,5% για τα βιολογικά δείγματα και από 0,7% έως 4,5% για το δείγμα του αυγού. Επίσης, υπολογίστηκε και η αναπαραγωγιμότητα, η οποία κυμάνθηκε από 0,01% έως 7,6% για τα βιολογικά δείγματα και από 2,0% έως 9,7% για το δείγμα αυγού. Ακολούθως, με εμβολιασμό των δειγμάτων με πρότυπα διαλύματα σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις υπολογίστηκε η επίδραση μήτρας και η ανάκτηση. Συγκεκριμένα, για τα βιολογικά δείγματα η επίδραση της μήτρας κυμάνθηκε από 99% έως 108% και η ανάκτηση από 90% έως 115%. Τέλος, για το δείγμα αυγού η επίδραση της μήτρας κυμάνθηκε από 98% έως 117% και η ανάκτηση από 95% έως 113%. Συμπεραίνοντας, αναπτύχθηκε μία γρήγορη μέθοδος ταυτόχρονου προσδιορισμού υποκατεστημένων και μη-υποκατεστημένων SCFAs και αμινοξέων μέσω παραγωγοποίησης και αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας, η οποία μπορεί να εφαρμοστεί σε μήτρες όπως βιολογικά δείγματα και τρόφιμα.

ABSTRACT

This master's thesis deals with the development of a method for the simultaneous gas chromatographic qualitative and quantitative determination of fourteen substituted (hydroxy-, amino-, and hydroxy-amino-) and unsubstituted short-chain fatty acids (SCFAs) and twelve amino acids following derivatization combined with liquid-phase extraction using a mass spectrometer (GC-MS). Isobutyl chloroformate (iBCF) was used as the derivatization reagent and hexane as the extraction solvent. Experiments were conducted to optimize the derivatization with respect to the extraction solvent, the ratios of derivatization reagent: alcohol: catalyst, temperature as well as ionic strength. The method was successfully applied to the determination of SCFAs and amino acids in saliva, urine, chicken and human feces, and freeze-dried eggs samples. In parallel, experiments were conducted to investigate the effect of coffee consumption, smoking, and exercise on the concentration of the analytes over time in saliva and urine samples, and relevant conclusions were drawn.

The method demonstrated satisfactory linearity, with the coefficient of determination (R^2) ranging from 0,9859 to 0,9992. The Limits of Detection (LODs) ranged from 0,011 to 2,7 $\mu\text{g/mL}$ and the Limits of Quantification (LOQs) ranged from 0,033 to 8,0 $\mu\text{g/mL}$. The repeatability (%RSD intra-day) ranged from 0,1% to 6,5% for the biological samples and from 0,7% to 4,5% for the egg sample. In addition, the reproducibility (%RSD inter-day) was calculated, ranging from 0,01% to 7,6% for the biological samples and from 2,0% to 9,7% for the egg sample. The matrix effect and recovery were subsequently evaluated by spiking samples with standard solutions at three concentration levels. For the biological samples, the matrix effect ranged from 99% to 108% and the recovery ranged from 89% to 115%. For the egg sample, the matrix effect ranged from 98% to 117% and the recovery ranged from 95% to 113%.

In conclusion, a simple and rapid method was developed for the simultaneous determination of substituted and unsubstituted SCFAs and amino acids via gas chromatography-mass spectrometry. The method is suitable for application to a variety of matrices, including biological samples and food products.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Κωνσταντίνου Σταλικά.

Πρωτίστως θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Κωνσταντίνο Σταλικά για την καθοδήγηση που μου παρείχε σε κάθε βήμα της διπλωματικής μου εργασίας, αλλά και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της περάτωσης της. Τον ευχαριστώ για την ευκαιρία ανάληψης ενός εξαιρετικά ενδιαφέροντος θέματος και για τις εκτενείς επιστημονικές συζητήσεις που πλαισίωσαν τη διπλωματική μου εργασία. Η υποστήριξη του, καθώς και το ενδιαφέρον του, υπήρξαν πολύ σημαντικοί παράγοντες για την επιτυχία των πειραμάτων που διεξήχθησαν στο πλαίσιο αυτής της διπλωματικής. Χωρίς την πολύτιμη βοήθειά του, η παρούσα εργασία δεν θα είχε πραγματοποιηθεί.

Θα ήθελα, επίσης, να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες και στα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Βασίλειο Σακκά και τον Καθηγητή κ. Παντελεήμων Τάκη. Ο χρόνος που αφιερώσατε και τα εποικοδομητικά σας σχόλια με βοήθησαν να εξελίξω την έρευνα μου.

Ξεχωριστές ευχαριστίες στον Καθηγητή κ. Παντελεήμων Τάκη για την πολύ καλή συνεργασία. Ήταν πάντα πρόθυμος να επιλύσει κάθε προβληματισμό μου πάνω σε θέματα λιπαρών οξέων μικρής αλυσίδας και μικροβιώματος.

Θερμές ευχαριστίες και στους συναδέλφους μου για την αγαστή συνεργασία μας στο χώρο του εργαστήριου. Η βοήθειά τους καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν σημαντική.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς και τους φίλους μου για την ψυχολογική - και όχι μόνο - υποστήριξη που μου παρείχαν και που μου παρέχουν αδιαλείπτως σε κάθε βήμα της ζωής μου. Χωρίς αυτούς δεν θα μπορούσα να υπερκεράσω κάθε μικρό ή μεγάλο εμπόδιο.

Περιεχόμενα

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
1.1 ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ ΜΙΚΡΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ (SCFAs)	1
1.2 ΕΝΤΕΡΙΚΗ ΧΛΩΡΙΔΑ	2
1.3 ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ SCFAs	2
1.4 ΟΦΕΛΗ ΤΩΝ SCFAs ΣΤΗΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΥΓΕΙΑ	5
1.4.1 ΚΑΡΚΙΝΟΣ	5
1.4.2 ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	6
1.4.3 ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ	7
1.4.4 ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	8
1.4.5 ΔΙΑΒΗΤΗΣ	8
1.4.7 ΥΓΕΙΑ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΟΥ	9
1.4.8 ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	9
1.5 ΑΜΙΝΟΞΕΑ	10
1.5.1 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ	11
1.5.1.1 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗΝ ΠΟΛΙΚΟΤΗΤΑ ΠΛΕΥΡΙΚΩΝ ΑΛΗΣΥΔΩΝ	11
1.5.1.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗΝ ΔΙΑΤΡΟΦΗ	12
1.5.1.3 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΙΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΗΣ ΠΛΕΥΡΙΚΗΣ ΟΜΑΔΑΣ	12
1.5.1.4 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗ ΤΥΧΗ	13
1.5.2 ΣΥΝΘΕΣΗ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ	13
1.5.2.1 ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ	13
1.5.2.2 ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ	17
1.5.2.4 ΑΠΟΣΠΑΣΗ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	18
1.5.3 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ	18
1.5.3.1 ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	18
1.5.3.2 ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	19
1.5.3.3 ΜΥΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	20
1.5.3.4 ΠΕΠΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	20
1.6.1 ΣΙΕΛΟΣ	21
1.6.2 ΟΥΡΑ	22
1.6.3 ΚΟΠΡΑΝΑ	22
1.6.4 ΑΥΓΟ	23
ΣΚΟΠΟΣ ΤΟΥ ΜΔΕ	26
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	27
2.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	27

2.2	ΟΡΓΑΝΑ-ΥΛΙΚΑ	29
2.3	ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ.....	29
2.4	ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΥΓΟΥ	29
2.5	ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΟΠΡΑΝΩΝ.....	29
2.6	ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΣΙΕΛΟΥ	30
2.8	ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΣΙΕΛΟΥ ΚΑΙ ΟΥΡΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΚΑΦΕ, ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΚΑΠΝΙΣΜΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΑΕΡΟΒΙΑ ΑΣΚΗΣΗ	30
2.9	ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ	30
2.10	ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ	31
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	32
3.1	ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗΣ	32
3.4.1	ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ.....	38
3.4.2	ΑΝΑΛΟΓΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ iBuOH:Py:iBCF	40
3.5	ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ	46
3.5.1	ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ, ΓΡΑΜΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ, LOD ΚΑΙ LOQ	46
3.5.2	ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ	49
3.5.3	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΗΤΡΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΚΤΗΣΕΙΣ	49
3.6	ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΕ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ	50
3.6.1	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ SCFAs ΚΑΙ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΛΥΟΦΙΛΙΩΜΕΝΩΝ ΑΥΓΩΝ	50
3.6.2	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ SCFAs ΚΑΙ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΟΠΡΑΝΩΝ ΟΡΝΙΘΑΣ ΚΑΙ ΑΝΘΡΩΠΟΥ	53
3.6.4	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΚΑΠΝΙΣΜΑΤΟΣ ΣΤΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΩΝ SCFAs ΚΑΙ ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΣΤΟ ΣΙΕΛΟ	68
3.6.5	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΕΡΟΒΙΑΣ ΑΣΚΗΣΗΣ ΣΤΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΩΝ SCFAs ΚΑΙ ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΣΤΟ ΣΙΕΛΟ	76
	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	80
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	81
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	93
1.	ΦΑΣΜΑΤΑ ΜΑΖΑΣ ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΑΝΑΛΥΤΩΝ	93
2.	ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ	104
3.	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΗΤΡΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΚΤΗΣΕΙΣ	109

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στη σημερινή εποχή η έξαρση ασθενειών όπως ο καρκίνος και τα αυτοάνοσα νοσήματα ταλανίζουν την ανθρωπότητα. Για αυτό το λόγο, η επιστημονική κοινότητα στρέφει το ενδιαφέρον της στην ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων για την γρήγορη και αξιόπιστη διάγνωση νοσημάτων. Η μελέτη του μεταβολισμού έχει αναδειχθεί σε βασικό πεδίο έρευνας, καθώς προσφέρει πολύτιμες πληροφορίες για την παθογένεια διαφόρων νοσημάτων. Στο πλαίσιο αυτό, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα SCFAs και τα αμινοξέα, τα οποία αποτελούν ενώσεις με σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση μεταβολικών και ανοσολογικών διεργασιών.

Τα SCFAs, όπως το οξικό, το προπιονικό και το βουτυρικό οξύ, παράγονται κυρίως μέσω της βακτηριακής ζύμωσης των διαιτητικών ινών στο κόλον του παχέος έντερο. Παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ακεραιότητας του εντερικού επιθηλίου και στην εύρυθμη λειτουργία του εντέρου, ενώ μεταβολές στα επίπεδά τους έχουν συνδεθεί με διάφορες ασθένειες, όπως ο διαβήτης τύπου I, η μη αλκοολική ηπατική κύρωση, η παχυσαρκία και πολλά άλλα νοσήματα (Blaak et al., 2020a).

Αντίστοιχα, τα αμινοξέα αποτελούν τις βασικές δομικές μονάδες των πρωτεϊνών. Πέρα αυτού, δρουν ως νευροδιαβιβαστές, διασπούν την τροφή, συμμετέχουν στη δημιουργία μυών, είναι πηγή ενέργειας, ενισχύουν το ανοσοποιητικό σύστημα και συμβάλουν στην καλή λειτουργία του πεπτικού συστήματος. Έλλειψη ή μεταβολή στη δομή των αμινοξέων οδηγεί στην εμφάνιση ασθενειών όπως φαινυλοκετονουρία, καρδιαγγειακών παθήσεων και νευρολογικών διαταραχών όπως η σχιζοφρένεια (Reeds & Jahoor, 2001).

Για αυτό, τόσο τα SCFAs όσο και τα αμινοξέα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες για την ύπαρξη ή μη ασθενειών ακόμα και στα αρχικά στάδια. Ωστόσο, η ταυτόχρονη μελέτη τους σε βιολογικά δείγματα και τρόφιμα αποτελεί πρόκληση, λόγω των διαφορετικών φυσικοχημικών τους ιδιοτήτων. Πρόκειται για πολικές, μη πτητικές ενώσεις με μικρό μοριακό βάρος και συχνά σε χαμηλές συγκεντρώσεις, κάτι που αποτελεί πρόβλημα για τον ποιοτικό και ποσοτικό τους προσδιορισμό.

Στις περισσότερες περιπτώσεις ο προσδιορισμός των SCFAs και των αμινοξέων πραγματοποιείται κατόπιν παραγωγοποίησης με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS). Η παραγωγοποίηση συνιστά χημική μετατροπή των χαρακτηριστικών ομάδων των SCFAs και των αμινοξέων σε εστέρες με σκοπό την μείωση της πολικότητας, την αύξηση της πτητικότητας και τον προσδιορισμό τους στο GC-MS (Chalova et al., 2023). Η επιλογή του κατάλληλου αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης και των πειραματικών συνθηκών είναι καθοριστικής σημασίας, καθώς επηρεάζει την απόδοση της αντίδρασης και την επαναληψιμότητα της μεθόδου.

Η αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας αποτελεί μία από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες τεχνικές για τον προσδιορισμό πτητικών και ημιπτητικών οργανικών ενώσεων. Ο διαχωρισμός των ενώσεων μέσω της χρωματογραφικής στήλης σε συνδυασμό με τον ιοντισμό και την παραγωγή ιόντων βάσει του λόγου μάζας προς φορτίο (m/z) δημιουργεί ένα μοναδικό χημικό «αποτύπωμα» για κάθε ένωση, προσφέροντας υψηλή εκλεκτικότητα, ευαισθησία και ακρίβεια (Vazquez-Roig & Pico, n.d.).

Συνοψίζοντας, η σημασία των SCFAs και των αμινοξέων στον οργανισμό οδηγεί στην εύρεση αναλυτικών μεθόδων για τον ποιοτικό και τον ποσοτικό προσδιορισμό τους. Στο πλαίσιο αυτό, η παρούσα εργασία επικεντρώνεται στην ανάπτυξη μιας μεθόδου ταυτόχρονου προσδιορισμού υποκατεστημένων και μη-υποκατεστημένων SCFAs και αμινοξέων, συμβάλλοντας στην καλύτερη κατανόηση του ρόλου τους και στη βελτίωση αναλυτικών εργαλείων που χρησιμοποιούνται στην μεταβολομική έρευνα.

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ ΜΙΚΡΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ (SCFAs)

Τα λιπαρά οξέα μικρής αλυσίδας (SCFAs) είναι αλειφατικά καρβοξυλικά οξέα με αριθμό ατόμων άνθρακα από ένα έως έξι, όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 1**. Τα κυριότερα και τα πιο συχνά ανιχνεύσιμα SCFAs στον ανθρώπινο οργανισμό είναι το οξικό, το προπιονικό και το βουτυρικό οξύ σε ποσοστό μεγαλύτερο του 90% και σε αναλογία περίπου 60:20:20 στο κόλον και στα κόπρανα (Takagi et al., 2016). Λιπαρά οξέα όπως το ισοβουτυρικό, το ισοβαλερικό και το 2-μεθυλοβουτυρικό είναι τα πιο γνωστά SCFAs διακλαδισμένης αλυσίδας (BSCFAs), τα οποία αποτελούν μόλις το 5% της συνολικής συγκέντρωσης των SCFAs στον ανθρώπινο οργανισμό (Ríos-Covián et al., 2016a).

Άλλη μία κατηγορία των SCFAs είναι και τα υδροξυ-SCFAs, τα οποία περιέχουν και υδροξυλομάδα στην δομή τους και έχουν πληθώρα οφελών για την υγεία. Είναι γνωστά για τις αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις τους, συμβάλλουν στη θεραπεία του διαβήτη και αποτελούν μονομερή για τη σύνθεση των πολύ(-υδροξυαλκανοϊκών) που χρησιμοποιούνται σε βιοϊατρικές εφαρμογές και συσκευασίες (Defoirdt et al., 2009; Pradhan et al., 2024). Αντίστοιχα, τα αμινο-SCFAs παράγονται κατά την αποδόμηση των αμινοξέων στο έντερο (Van den Abbeele et al., 2022). Στον άνθρωπο, τα αμινο-SCFAs έχουν αντιφλεγμονώδεις δράσεις και συμβάλλουν στην προστασία της καρδιάς και του ήπατος, στη καύση του λίπους παράγοντας θερμότητα καθώς και στη ρύθμιση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα, μειώνοντας τις πιθανότητες εμφάνισης διαβήτη τύπου II (Kitase et al., 2018; Tanianskii et al., 2019; Yi et al., 2023). Τα υδροξυ- και αμινο- SCFAs ανιχνεύονται σε ποσοστό που κυμαίνεται από 5% έως 10% στα κόπρανα, με κάποια όπως πχ. το 2-υδροξυπεντανοϊκό οξύ να είναι σε ποσοστό < 1% (Vernocchi et al., 2016).

Από χημικής άποψης, τα SCFAs διαθέτουν καρβοξυλική ομάδα, γεγονός που τους προσδίδει την ικανότητα να σχηματίζουν καρβοξυλικά ανιόντα σε περιβάλλον με pH μεγαλύτερο από το pK_a τους ($\sim 4,8 - 4,9$) (Den Besten et al., 2013). Η ιοντισμένη αυτή μορφή επηρεάζει σημαντικά τη διαλυτότητα, τις ιδιότητες διάχυσης και τη χημική τους συμπεριφορά σε υδατικά συστήματα. Λόγω του μικρού μήκους της υδρογονανθρακικής αλυσίδας, τα SCFAs παρουσιάζουν υψηλή πολικότητα σε σύγκριση με τα λιπαρά οξέα μεγάλης αλυσίδας και περιορίζονται οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις (Louis & Flint, 2017). Επιπλέον, η καρβοξυλική τους ομάδα δύναται να συμμετέχει σε δεσμούς υδρογόνου και σε ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Τέλος, τα SCFAs μπορούν να συμμετέχουν σε οξοοξασικές αντιδράσεις, σχηματισμό εστέρων και σχηματισμό συμπλοκών (Du et al., 2024; Koh et al., 2016).



Εικόνα 1: Τα κυριότερα SCFAs στο κόλον και στα κόπρανα και οι συντακτικοί τους τύποι.

1.2 ENΤΕΡΙΚΗ ΧΛΩΡΙΔΑ

Τα βρέφη γεννιούνται χωρίς εντερική χλωρίδα, η οποία αναπτύσσεται γρήγορα μετά τη γέννηση λόγω έκθεσής τους στα βακτήρια της μητέρας -μέσω του θηλασμού- και του περιβάλλοντος. Η εντερική χλωρίδα μεταβάλλεται μέχρι την ηλικία των 3 - 4 ετών, οπότε και σταθεροποιείται (Den Besten et al., 2013). Η σταθερή αυτή εντερική χλωρίδα ενισχύει το ανοσοποιητικό σύστημα, δίνοντας αντοχή σε μικροβιακά ερεθίσματα και λειτουργεί ως μεταβολικό όργανο, βοηθώντας στην πέψη των τροφών και στη σύνθεση βιταμινών και αμινοξέων (Zoetendal et al., 2001). Το εντερικό μικροβίωμα είναι μοναδικό σε κάθε άνθρωπο και διαμορφώνεται από τη γενετική, τη φυσιολογία, τους περιβαλλοντικούς παράγοντες, τη διατροφή και την λήψη φαρμάκων (Xu & Gordon, 2001).

Τα βακτήρια είναι οι μικροοργανισμοί που κυριαρχούν και ποικίλλουν στον κόλον του ανθρώπου. Μελέτες έχουν δείξει ότι στο κόλον ζουν 500 έως 1.000 είδη βακτηρίων που ανήκουν σε περισσότερα από 70 γένη (Zoetendal et al., 2001). Τα κύρια είδη περιλαμβάνουν τα Bacteroidetes, Firmicutes και Actinobacteria. Τα Bacteroidetes παράγουν κυρίως οξικό και προπιονικό οξύ, ενώ τα Firmicutes παράγουν βουτυρικό οξύ (Macfarlane & Macfarlane, 2003a). Η περισσότερη βακτηριακή δραστηριότητα λαμβάνει χώρα στο εγγύς κόλον λόγω της μεγαλύτερης διαθεσιμότητας υποστρώματος, καθιστώντας το τον κύριο χώρο ζύμωσης των υδατανθράκων, που δεν διασπάστηκαν στο στομάχι. Κύρια προϊόντα αυτής της ζύμωσης είναι τα SCFAs και αέρια όπως τα CO₂ και H₂ (Macfarlane & Macfarlane, 2003a). Στο άπω κόλον, τα πρωτεολυτικά βακτήρια αποδομούν τις πρωτεΐνες και τα αμινοξέα, παράγοντας λιπαρά οξέα διακλαδισμένης αλυσίδας και δυνητικά τοξικούς μεταβολίτες (Den Besten et al., 2013).

1.3 ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ SCFAs

Οι διαιτητικές ίνες αλλά και οι πρωτεΐνες και τα πεπτίδια που δεν διασπώνται από τα ένζυμα στο άνω έντερο, μεταβολίζονται στο κόλον (Macfarlane & Macfarlane, 2003b). Αρχικά οι μη αφομοιώσιμοι υδατάνθρακες όπως η κυτταρίνη και το ανθεκτικό άμυλο, υδρολύονται μέσω ενζύμων σε ολισακαχαρίτες και στη συνέχεια σε μονσακχαρίτες με κυριότερους την γλυκόζη, την φρουκτόζη και τη λακτόζη. Οι μονσακχαρίτες αυτοί ζυμώνονται υπό αναερόβιες συνθήκες. Οι κύριες μεταβολικές οδοί που χρησιμοποιούνται από τα βακτήρια για αυτή τη διαδικασία περιλαμβάνουν την οδό Embden-Meyerhof Parnas, η οποία είναι υπεύθυνη για τη γλυκόλυση των σακχάρων με έξι άτομα άνθρακα και την οδό φωσφορικών πεντοζών (Pentose Phosphate Pathway,

PPP), η οποία χρησιμοποιεί έξι σάκχαρα της γλυκόζης για την παραγωγή πεντοζών (Miller & Wolin, 1996). Κατά τη διάρκεια αυτής της μεταβολικής διαδικασίας, το ένζυμο γλυκεραλδεϋδη-3-φωσφορική αφυδρογονάση διευκολύνει το σχηματισμό του Νικοτιναμίδιο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου (NADH) όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 2**.

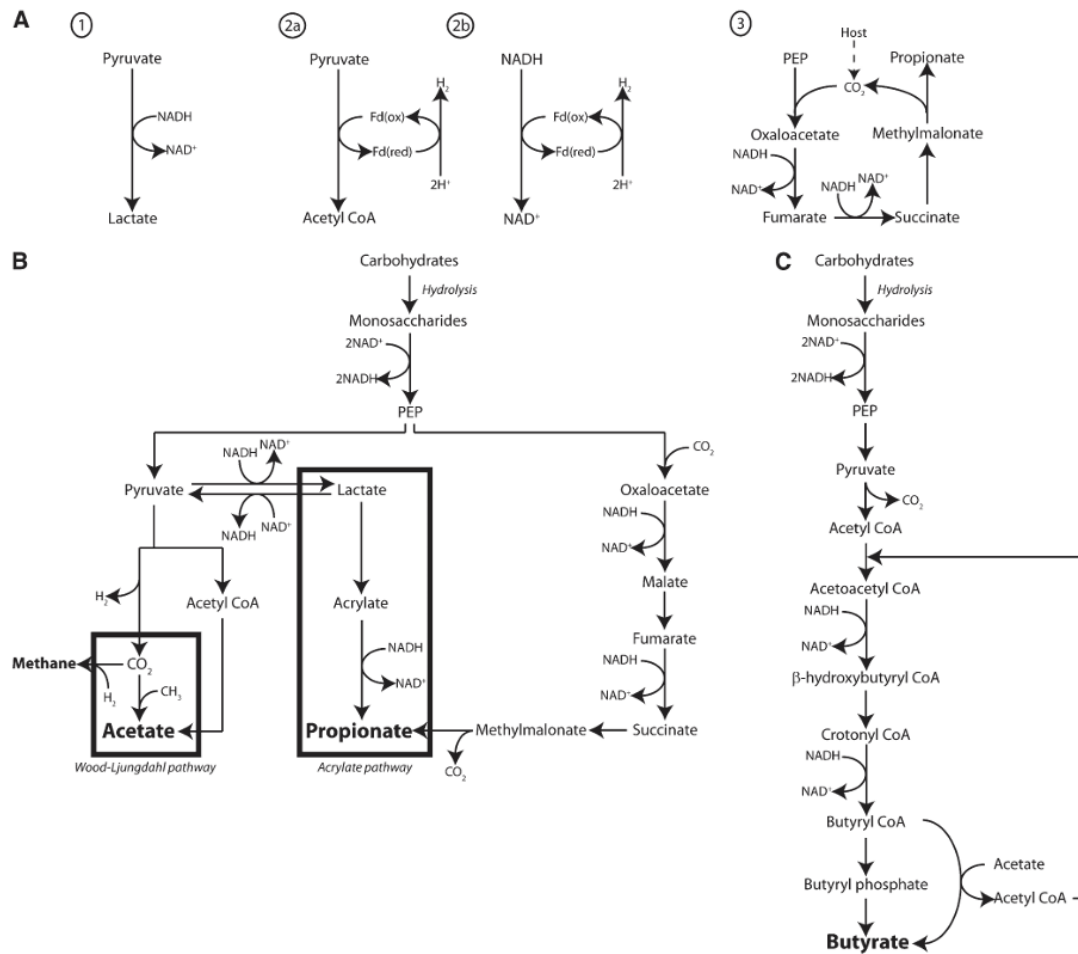
Σε αναερόβιες συνθήκες, τα βακτήρια πρέπει να οξειδώσουν εκ νέου το NADH σε NAD^+ για να διατηρήσουν τη μεταβολική ισορροπία και τη συνεχή παραγωγή ενέργειας. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιούν τρεις κύριες οδούς NADH. Η πρώτη οδός είναι η κλασική ζύμωση, όπου το πυροσταφυλικό οξύ ανάγεται σε γαλακτικό οξύ ή αιθανόλη. Η δεύτερη οδός περιλαμβάνει τη αποβολή ηλεκτρονίων μέσω παραγωγής H_2 (Fischbach & Sonnenburg, 2011). Η τρίτη οδός είναι η αναερόβια μεταφορά ηλεκτρονίων. Η διαδικασία ξεκινά όταν το φωσφοενολοπυροσταφυλικό οξύ καρβοξυλιώνεται για να σχηματίσει οξαλοξικό οξύ, το οποίο στη συνέχεια ανάγεται σε φουμαρικό οξύ και μέσω αντιδράσεων παράγεται προπιονικό οξύ και CO_2 , το οποίο μπορεί να εισέλθει και πάλι στον κύκλο του Krebs για επαναχρησιμοποίηση (Macy et al., 1978). Τα τελικά προϊόντα που προκύπτουν από τις παραπάνω μεταβολικές οδούς είναι κυρίως SCFAs. Ωστόσο, δεν έχει μελετηθεί η βιοσύνθεση όλων αυτών. Γνωστές είναι οι πορείες παραγωγής του οξικού, του προπιονικού και του βουτυρικού οξέος όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 3**.

Το οξικό οξύ παράγεται μέσω δύο μηχανισμών. Ο πρώτος περιλαμβάνει την οξείδωση του πυροσταφυλικού οξέος σε ακετυλο- CoA μέσω της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης, όπου στη συνέχεια μετατρέπεται σε οξικό οξύ (Den Besten et al., 2015). Ο δεύτερος περιλαμβάνει τον μηχανισμό Wood-Ljungdahl, στον οποίο παράγεται οξικό οξύ από CO_2 . Ο μηχανισμός έχει δύο κλάδους: στον πρώτο το CO_2 ανάγεται σε οξικό οξύ, ενώ στον δεύτερο κλάδο, το CO_2 ανάγεται σε CO μέσω του ενζύμου CO -δεϋδρογονάση. Τα προϊόντα των δύο κλάδων συνδυάζονται και παράγεται ακετυλο- CoA , το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε για την παραγωγή ενέργειας είτε για να την παραγωγή περισσότερου οξικού οξέος (Ragsdale & Pierce, 2008).

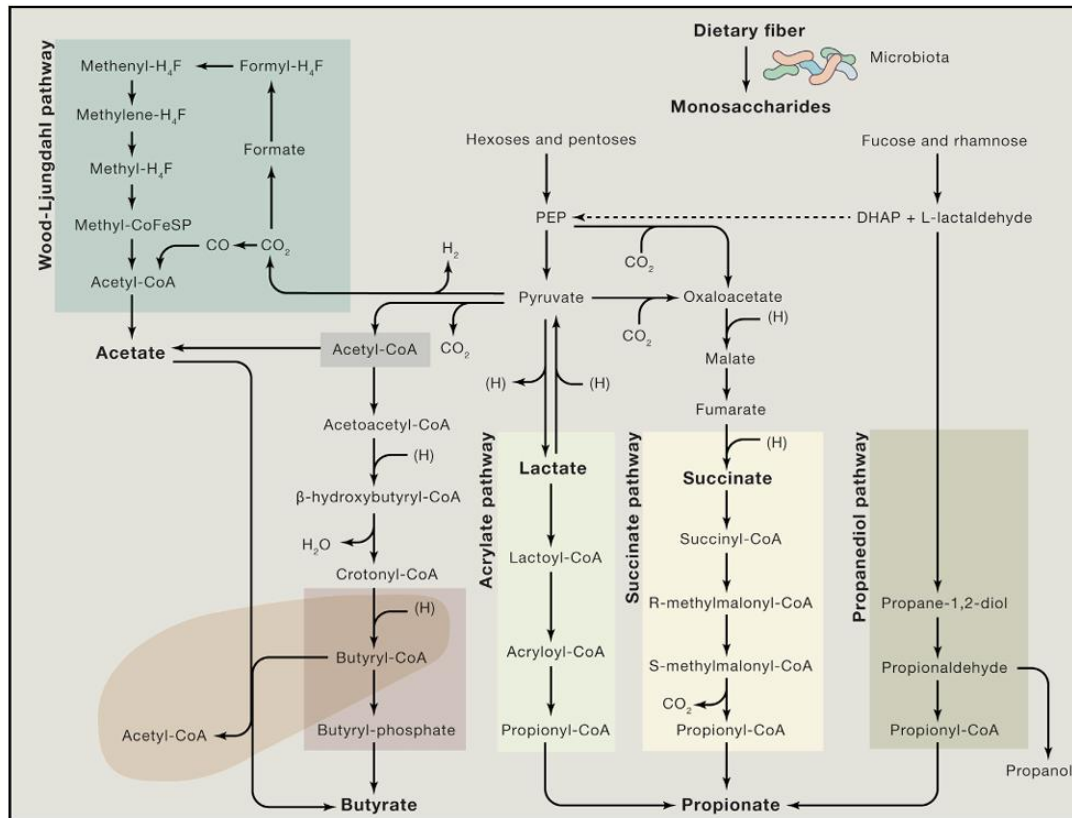
Όσον αφορά την παραγωγή του προπιονικού οξέος, αυτή επιτυγχάνεται μέσω τριών μεταβολικών οδών. Η πρώτη αναφέρεται στην οδό Wood – Werkman (ή οδός του ηλεκτρικού οξέος) κατά την οποία το πυροσταφυλικό οξύ μετατρέπεται σε ηλεκτρικό οξύ και στη συνέχεια σε μεθυλομαλονυλο- CoA και προπιονυλο- CoA , με τελικό προϊόν το προπιονικό οξύ (Piwowarek et al., 2018). Η δεύτερη περιλαμβάνει την οδό του ακρυλικού όπου το γαλακτικό οξύ αφυδατώνεται αρχικά σε ακρυλικό και στη συνέχεια ανάγεται σε προπιονικό οξύ (Hetzl et al., 2003). Η τρίτη και τελευταία οδός είναι η οδός της της προπανδιόλης στην οποία σάκχαρα όπως η φρουκτόζη, μεταβολίζονται και η 1,2-προπανδιόλη οξειδώνεται σε προπιοναλδεϋδη και κατόπιν σε προπιονυλο- CoA , οδηγώντας στην παραγωγή προπιονικού οξέος (Scott et al., 2006).

Το τρίτο από τα SCFAs, το βουτυρικό οξύ μπορεί να παραχθεί μέσω της κλασικής οδού, όπου το πυροσταφυλικό μετατρέπεται σε ακετυλο- CoA και μέσω μιας σειράς αντιδράσεων συμπύκνωσης και αναγωγής σχηματίζει βουτυρυλο- CoA , το οποίο στη συνέχεια υδrolύεται σε βουτυρικό οξύ (Louis et al., 2004). Επίσης, το βουτυρικό οξύ παράγεται και από την οδό της βουτυρυλ- CoA :οξικό CoA -τρανσφοράσης, στην οποία η βουτυρική ομάδα μεταφέρεται απευθείας στο οξικό- CoA (Duncan et al., 2002).

Επιπλέον, κάποια μικρόβια του εντέρου συνθέτουν βουτυρικό οξύ από το γαλακτικό καθώς και από πρωτεΐνες μέσω της οδού της λυσίνης (Vital et al., 2014).



Εικόνα 2: Σχήμα (Α)- Μηχανισμός σύνθεσης των SCFAs στο κόλον του παχέος εντέρου. Σχήμα (Β)- Μηχανισμοί παρασκευής του οξικού, προπιονικού και βουτυρικού οξέος (Den Besten et al., 2013).



Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση των μηχανισμών σύνθεσης του οξικού, προπιονικού και βουτυρικού οξέος από βακτήρια του παχέος εντέρου (Koh et al., 2016).

1.4 ΟΦΕΛΗ ΤΩΝ SCFAs ΣΤΗΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΥΓΕΙΑ

1.4.1 ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Πολλά SCFAs συμμετέχουν στην προστασία κατά διαφόρων ειδών καρκίνου. Έχει διαπιστωθεί ότι τα SCFAs αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που δημιουργούν καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Το βουτυρικό οξύ επηρεάζει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την απόπτωση και τροποποιεί την τοπική ανοσολογική απόκριση, αναστέλλοντας την εξέλιξη των προκαρκινικών αλλοιώσεων (Ravel et al., 2011). Μείωση της συγκέντρωσης των SCFAs σε συνδυασμό με διαταραχές στο μικροβίωμα του κόλπου οδηγεί σε αυξημένη λοίμωξη που οφείλεται στον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV) και σε τοπική φλεγμονή (Mitra et al., 2016).

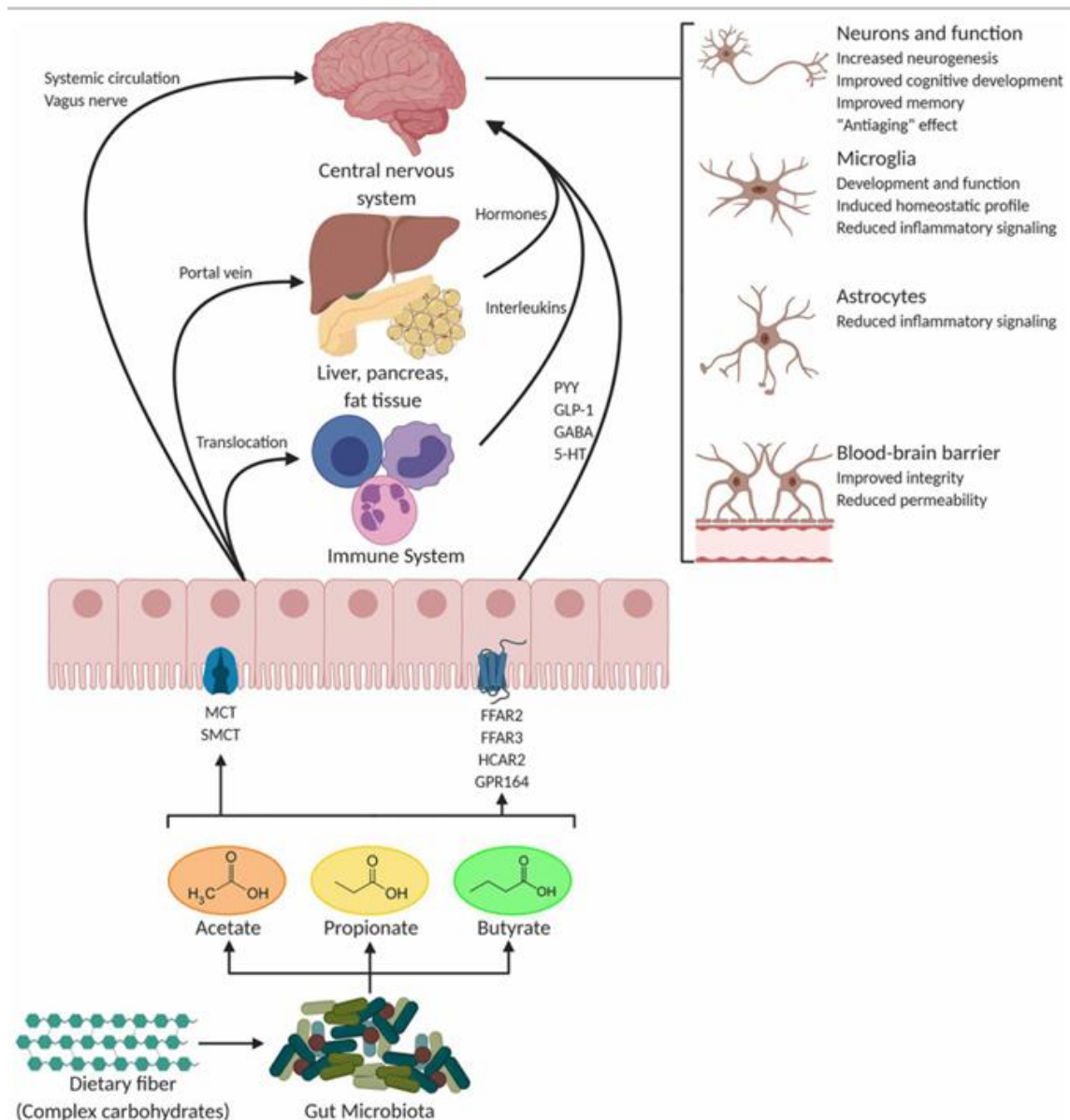
Στον καρκίνο του παχέος εντέρου, το οξικό και το προπιονικό οξύ αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που δημιουργούν τον καρκίνο (Casanova et al., 2018). Το βουτυρικό οξύ έχει διπλό ρόλο. Από την μία αποτελεί πηγή ενέργειας για την παραγωγή των φυσιολογικών κυττάρων του κόλον και από την άλλη οδηγεί στην επαγωγή απόπτωσης, στην αναστολή του κυτταρικού κύκλου και στην καταστολή των γονιδίων που προκαλούν όγκο (Donohoe et al., 2011).

Όσον αφορά τον καρκίνο του ήπατος, τα SCFAs ρυθμίζουν τον ηπατικό μεταβολισμό των λιπιδίων και της γλυκόζης και ενισχύουν την αντικαρκινική δράση, συμβάλλοντας

στην αναστολή της ηπατοκυτταρικής καρκινογένεσης. Επιπλέον, περιορίζουν τη μεταφορά λιποπολυσακχαριτών στο πυλαίο σύστημα και καταστέλλουν την ενεργοποίηση των ηπατικών κυττάρων και των προφλεγμονωδών μονοπατιών που συμμετέχουν στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την δημιουργία όγκου (Díaz de Sandy-Galán et al., 2025).

1.4.2 ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Όπως είναι γνωστό το νευρικό και το πεπτικό-εντερικό σύστημα επικοινωνούν μεταξύ τους όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 4**. Τα SCFAs είναι ικανά να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και να ανιχνευθούν στο ανθρώπινο εγκεφαλονωτιαίο υγρό σε εύρος συγκεντρώσεων 0 -171 μM για το οξικό, 0 - 6 μM για το προπιονικό και 0 - 2,8 μM για το βουτυρικό οξύ (Wishart et al., 2018). Τα SCFAs βοηθούν στον σχηματισμό νευρώνων, βελτιώνουν τη μνήμη, μειώνουν τη φλεγμονή των νεύρων και ενισχύουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, συμβάλλοντας στη διατήρηση της δραστηριότητας του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ). Επιπλέον, έχουν συσχετιστεί με προστατευτικές δράσεις έναντι νευροεκφυλιστικών και ψυχιατρικών διαταραχών, συμπεριλαμβανομένης της νόσου Alzheimer και της κατάθλιψης (Silva et al., 2020). Συγκεκριμένα, το βουτυρικό οξύ ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη γνωστική λειτουργία (Stilling et al., 2016) και την έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί την υδροξυλάση της τρυπτοφάνης, ένα βασικό ένζυμο της βιοσύνθεσης της σεροτονίνης, η οποία ως «η ορμόνη της ευτυχίας» βοηθά στη μείωση του άγχους και συμβάλλει στη βελτίωση της διάθεσης και της μνήμης.



Εικόνα 4: Τα κυριότερα μονοπάτια επικοινωνίας του εντέρου με τον εγκέφαλο. Τα SCFAs συμμετέχουν με πολλούς τρόπους στην σωστή λειτουργία του εγκεφάλου (Silva et al., 2020).

1.4.3 ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ

Τα SCFAs ρυθμίζουν την ανοσολογική απόκριση αφού διαμεσολαβούν στην σωστή αλληλεπίδραση μεταξύ του εντερικού μικροβιώματος και του ανοσοποιητικού συστήματος. Επιπλέον, συνεισφέρουν στη σωστή λειτουργία πολλών ειδών ανοσοκυττάρων, όπως τα μακροφάγα και τα ρυθμιστικά T κύτταρα, τα οποία συμβάλουν στην ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος, τον περιορισμό της φλεγμονής και τη δημιουργία αλλεργιών (Smith et al., 2013). Ειδικότερα, το βουτυρικό οξύ επηρεάζει την έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με αντιφλεγμονώδεις ανοσολογικές οδούς και δρα ως ισχυρός επαγωγέας της έκφρασης της αντιμικροβιακής πρωτεΐνης καθελικιδίνης, η οποία δρα ως «φυσικό αντιβιοτικό», καταστρέφοντας τις

μεμβράνες ιών και βακτηρίων, με αποτέλεσμα τη ρύθμιση της φλεγμονώδους απόκρισης και την επούλωση τραυμάτων (Schauber et al., 2006).

1.4.4 ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Οι παθήσεις του καρδιαγγειακού συστήματος απασχολούν μεγάλη μερίδα του παγκόσμιου πληθυσμού καθώς οι περισσότερες είναι χρόνιες και με μεγάλη θνησιμότητα. Αποτελέσματα ερευνών έχουν δείξει την αξία των SCFAs έναντι πολλών από αυτών των ασθενειών μέσω διαφόρων μηχανισμών.

Αρχικά, τα SCFAs συμμετέχουν στην προστασία έναντι της αθηροσκλήρωσης, καθώς συμβάλλουν στη μείωση της συστηματικής φλεγμονής, αναστέλλοντας την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών και ενισχύοντας τη διαφοροποίηση ρυθμιστικών T-λεμφοκυττάρων (Chang et al., 2014). Συγκεκριμένα, το βουτυρικό και το προπιονικό οξύ μειώνουν την απορρόφηση της χοληστερόλης από το έντερο, περιορίζοντας την αθηροσκλήρωση που προκαλείται από την κακή διατροφή (Chen et al., 2018; Haghikia et al., 2022). Εν συνεχεία, τα SCFAs ρυθμίζουν εν μέρει και την αρτηριακή πίεση μέσω της ενεργοποίησης ειδικών υποδοχέων, οι οποίοι συμμετέχουν στον έλεγχο του αγγειακού τόνου (Pluznick, 2016). Όσον αφορά τις παθήσεις του μυοκαρδίου, τα SCFAs φαίνεται να προστατεύουν έναντι τραυματισμών που προκαλούν ισχαιμία, μειώνοντας το μέγεθος του εμφράγματος. Ιδιαίτερα, το βουτυρικό οξύ επηρεάζει την ρύθμιση γονιδίων που σχετίζονται με την φλεγμονή, την καρδιακή υπερτροφία και τη δυσλειτουργία του μυοκαρδίου. Τέλος, το οξικό, το βουτυρικό και το προπιονικό οξύ συμμετέχουν στην αποκατάσταση βλαβών που οφείλονται σε έμφραγμα του μυοκαρδίου (Tang et al., 2019).

1.4.5 ΔΙΑΒΗΤΗΣ

Οι διάφοροι τύποι διαβήτη και κυρίως ο διαβήτης τύπου II ταλανίζει την παγκόσμια κοινότητα, καθώς πολλοί άνθρωποι πάσχουν από αυτόν. Αποτελέσματα ερευνών έχουν δείξει ότι τα SCFAs συμβάλλουν στην προστασία έναντι του σακχαρώδους διαβήτη, ρυθμίζοντας τον μεταβολισμό της γλυκόζης και της ινσουλινικής ευαισθησίας (McNabney & Henagan, 2017). Τα SCFAs, όπως το βουτυρικό οξύ μπορούν να αυξήσουν την έκκριση ινσουλίνης από τα κύτταρα του παγκρέατος, συμβάλλοντας στη βελτίωση του γλυκαιμικού ελέγχου. Παράλληλα, οι αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες των SCFAs ενισχύουν τη λειτουργία του εντερικού φραγμού, με αποτέλεσμα τη μείωση της συστηματικής φλεγμονής που σχετίζεται με την αντίσταση στην ινσουλίνη και την ανάπτυξη διαβήτη τύπου II (Zhou et al., 2017). Επιπρόσθετα, τα SCFAs επηρεάζουν το ΚΝΣ στο οποίο ελέγχεται ο κορεσμός με αποτέλεσμα την απώλεια βάρους, η οποία βελτιώνει την υγεία των ανθρώπων, ειδικά αυτών, που νοσούν με σακχαρώδη διαβήτη (Chambers et al., 2015). Συγκεκριμένα, το προπιονικό οξύ ενισχύει την αντοχή στην ινσουλίνη στον ηπατικό και περιφερικό ιστό, μειώνοντας την υπεργλυκαιμία και βελτιώνοντας το ποσοστό γλυκόζης πλάσματος μετά τα γεύματα (Tolhurst et al., 2012).

1.4.6 ΠΗΓΗ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ

Τα SCFAs αποτελούν την κύρια πηγή ενέργειας για τα επιθηλιακά κύτταρα του παχέος εντέρου, καλύπτοντας το 8% της ημερήσιας ανάγκης (Macfarlane & Macfarlane, 2003a). Ειδικότερα, το βουτυρικό οξύ αποτελεί την κύρια πηγή ενέργειας για τα κύτταρα του κόλον, ενισχύοντας τη βιοσύνθεση ATP μέσω οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και υποστηρίζοντας τη λειτουργία του εντερικού φραγμού (Blaak et al., 2020b). Επιπρόσθετα, τα SCFAs μειώνουν τη συσσώρευση λίπους που προκαλείται από την ινσουλίνη στον λιπώδη ιστό, μειώνοντας έτσι τη συσσώρευση λιπιδίων στον ήπαρ και στους σκελετικούς μύες. Πέρα από τον ρόλο τους στην παραγωγή ενέργειας, τα SCFAs εμπλέκονται στη ρύθμιση μεταβολικών οδών, επιδρώντας στη λιπολυτική δραστηριότητα και στην έκκριση ορμονών που σχετίζονται με την όρεξη (Silva et al., 2020).

1.4.7 ΥΓΕΙΑ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΟΥ

Τα SCFAs συμβάλλουν σε μεγάλο βαθμό στην υγεία του εντέρου και στη διατήρηση της εντερικής χλωρίδας. Γενικά, τα SCFAs μειώνουν το pH του εντέρου, αναστέλλουν την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών ενώ παράλληλα προστατεύουν τα «καλά» βακτήρια, με αποτέλεσμα την ρύθμιση της εντερικής ισορροπίας και του εντερικού μικροβιώματος (Blaak et al., 2020b). Συγκεκριμένα, το βουτυρικό οξύ αποτελεί την βασική πηγή ενέργειας των επιθηλιακών κυττάρων του κόλον, ρυθμίζοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των δυσλειτουργικών κυττάρων (Blaak et al., 2020b). Εν συνεχεία, το προπιονικό οξύ μετατρέπεται σε γλυκόζη μέσω της εντερικής γλυκονεογένεσης, προωθώντας το αίσθημα κορεσμού και μειώνοντας τον σχηματισμό γλυκόζης στο ήπαρ. Επιπλέον, συμβάλλει στη ρύθμιση της φλεγμονώδους απόκρισης και της τροποποίησης της λειτουργίας των ανοσοκυττάρων, ενισχύοντας την ανοσολογική ομοιοστάση του εντερικού βλεννογόνου (Koh et al., 2016). Εν κατακλείδι, τα SCFAs μεσολαβούν στην αλληλεπίδραση διατροφής-μικροβιώματος-ξενιστή, διατηρώντας σταθερή την χλωρίδα του εντέρου (Venegas et al., 2019).

1.4.8 ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Μελέτες έχουν δείξει ότι το μικροβίωμα του εντέρου μπορεί να συμμετέχει στη σωστή λειτουργία και άλλων συστημάτων στον ανθρώπινο οργανισμό, όπως το αναπνευστικό. Συγκεκριμένα, τα SCFAs που παράγονται στο παχύ έντερο μεταφέρονται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος στους πνεύμονες, ρυθμίζοντας τις ανοσολογικές λειτουργίες τους. Συγκεκριμένα, έχουν σημαντικό ρόλο στην προστασία έναντι διαφόρων παθήσεων του αναπνευστικού συστήματος όπως του άσθματος, της γρίπης, της βρογχίτιδας, της φυματίωσης και του COVID-19. Ειδικότερα, το οξικό οξύ συμβάλλει στη μείωση των βακτηρίων στους πνεύμονες που προκαλούν γρίπη και ενισχύει την παραγωγή των έμφυτων αντικών οδών (Rowland et al., 2025). Επίσης, το βουτυρικό οξύ ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό των T-κυττάρων, συμβάλλοντας στη θεραπεία ασθενειών όπως το άσθμα και την γρίπη. Το προπιονικό οξύ, από την άλλη, αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που σχετίζονται με τον καρκίνο του πνεύμονα με αποτέλεσμα την απόπτωση (Verma et al., 2024). Τέλος, όσον αφορά το αλλεργικό

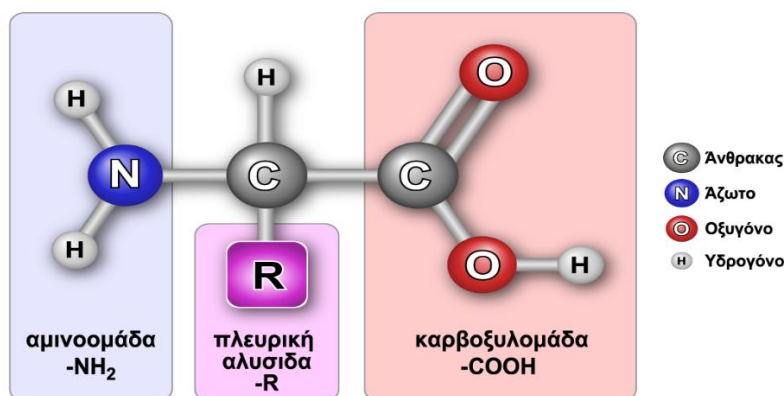
άσθμα, μελέτες τα τελευταία χρόνια έχουν δείξει ότι διατροφή με μειωμένη πρόσληψη φυτικών ινών σχετίζεται με χαμηλότερα επίπεδα SCFAs τόσο στο έντερο όσο και στο αίμα με αποτέλεσμα αύξηση της συχνότητας εμφάνισης αλλεργικών ασθμάτων (Cait et al., 2018).

1.5 AMINOΞΕΑ

Τα αμινοξέα αποτελούν τα βασικά δομικά συστατικά των πρωτεϊνών και διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο σε πλήθος βιολογικών διεργασιών. Από χημικής άποψης, είναι ένα α-αμινοκαρβοξυλικό οξύ στο οποίο το α άτομο άνθρακα φέρει τρεις άλλους υποκαταστάτες: μια αμινομάδα, ένα άτομο υδρογόνου και μια πλευρική ομάδα R, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 5**.

Στη φύση έχουν βρεθεί πάνω από 300 διαφορετικά αμινοξέα, ωστόσο στον ανθρώπινο οργανισμό τα γονίδια κωδικοποιούν μόνο 20 από αυτά. Τα αμινοξέα μπορούν να ταξινομηθούν με πολλούς τρόπους: με βάση την διατροφική αναγκαιότητα, την πλευρική ομάδα R- και με την πολικότητα (Wu, 2013). Πέρα από τα 20 αυτά αμινοξέα, μελέτες έχουν δείξει την ύπαρξη και άλλων αμινοξέων. Η σεληνιοκυστεΐνη ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1986 και από εκείνη τη στιγμή έχει ανιχνευθεί σε πληθώρα οργανισμών. Επίσης, αποτελέσματα ερευνών έχουν αναδείξει ένα παράγωγο της λυσίνης, την πυρρολυσίνη, το οποίο βρίσκεται κατά κύριο λόγο στο πυθμένα λιμνών. Εκτός από αυτά, μπορούν, αν και σπάνια, να βρεθούν σε πρωτεΐνες και αμινοξέα που προκύπτουν από τροποποιήσεις των 20 αμινοξέων. Παραδείγματα αποτελούν η υδροξυλυσίνη και η υδροξυπρολίνη, τα οποία αποτελούν δομικά συστατικά των πρωτεϊνών του κολλαγόνου και της ζελατίνης και το γ-καρβοξυγλουταμικό οξύ, το οποίο ανιχνεύεται σε πρωτεΐνες που δεσμεύουν ασβέστιο (Garrett & Grishman).

Τα αμινοξέα στον οργανισμό αποδομούνται σε NH_4^+ , που εισέρχονται στον κύκλο της ουρίας και σε έναν ανθρακικό σκελετό που εισέρχεται σε μεταβολικές οδούς για την παραγωγή ATP, γλυκόζης και λιπαρών οξέων. Επίσης, τα αμινοξέα χρησιμοποιούνται για την παραγωγή NO, νευροδιαβιβαστών, DNA και πρωτεϊνών. Αποτελούν θεμελιώδη μόρια ζωτικής σημασίας για τη δομή, τη λειτουργία και τη ρύθμιση των βιολογικών συστημάτων. Διαταραχές στον μεταβολισμό των αμινοξέων συνδέονται με πληθώρα παθολογικών καταστάσεων, συμπεριλαμβανομένων νευρολογικών διαταραχών και χρόνιων μεταβολικών ασθενειών. Ενδεικτικά, η φαινυλοκετονουρία αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα διαταραχής του μεταβολισμού αμινοξέων, με σοβαρές επιπτώσεις στη νευρολογική ανάπτυξη εάν δεν αντιμετωπιστεί έγκαιρα (Alsharhan & Ficicioglu, 2020).



Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση των αμινοξέων στην οποία φαίνεται η καρβοξυλική ομάδα, η πλευρική ομάδα R- και η αμινομάδα.

1.5.1 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ

Τα αμινοξέα λόγω της δομής, των ιδιοτήτων τους και τον τρόπο πρόσληψης μπορούν να ταξινομηθούν με διαφορετικούς τρόπους.

1.5.1.1 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗΝ ΠΟΛΙΚΟΤΗΤΑ ΠΛΕΥΡΙΚΩΝ ΑΛΗΣΥΔΩΝ

Η πιο χρήσιμη από τις ταξινομήσεις βασίζεται στην πολικότητα των πλευρικών αλυσίδων.

- **Μη πολικά αμινοξέα:** σε αυτά περιλαμβάνονται τα αμινοξέα που έχουν στην πλευρική ομάδα R- αλκυλο-αλυσίδες. Σε αυτά ανήκουν η αλανίνη, η βαλίνη, η λευκίνη, η ισολευκίνη, καθώς και η προλίνη-στην ασυνήθη κυκλική δομή της- η μεθειονίνη, η φαινυλαλανίνη και η τρυπτοφάνη. Τα μη πολικά αμινοξέα χρησιμοποιούνται στις διαδικασίες αναδίπλωσης των πρωτεϊνικών αλυσίδων.
- **Πολικά, αφόρτιστα αμινοξέα:** σε αυτά περιλαμβάνονται τα αμινοξέα που μπορούν να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου με το νερό και να συμμετέχουν με πολλούς πυρηνόφιλους ρόλους σε ενζυματικές αντιδράσεις.
- **Βασικά αμινοξέα:** σε αυτά περιλαμβάνονται τα αμινοξέα, των οποίων οι πλευρικές αλυσίδες έχουν καθαρό θετικό φορτίο σε ουδέτερο pH. Αυτά είναι η ιστιδίνη, η αργινίνη και η λυσίνη.
- **Όξινα αμινοξέα:** σε αυτά περιλαμβάνονται τα αμινοξέα, των οποίων οι πλευρικές αλυσίδες έχουν καθαρό αρνητικό φορτίο σε ουδέτερο pH. Αυτά είναι το ασπαργινικό και το γλουταμικό οξύ, στα οποία οι πλευρικές ομάδες R- περιέχουν μια καρβοξυλομάδα που είναι ασθενέστερο οξύ από την α-COOH αλλά όξινη αρκετά ώστε να δώσει το αρνητικό φορτίο.

1.5.1.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗΝ ΔΙΑΤΡΟΦΗ

Τα 20 αμινοξέα δεν συντίθενται όλα από τον οργανισμό οπότε πρέπει να προσληφθούν από την τροφή. Για αυτό το λόγο ταξινομούνται σε 3 κατηγορίες:

- **Απαραίτητα αμινοξέα:** οι δομές των αμινοξέων αυτών είναι πιο σύνθετες και απαιτούν μεγαλύτερο αριθμό ενζυματικών αντιδράσεων για την σύνθεσή τους στον οργανισμό, κάτι το οποίο δε μπορεί να πραγματοποιηθεί, οπότε η πρόσληψή τους γίνεται αποκλειστικά από την διατροφή. Αυτά είναι η ιστιδίνη, η ισολευκίνη, η λευκίνη, η λυσίνη, η μεθειονίνη, η φαινυλαλανίνη, η θρεονίνη, η τρυπτοφάνη και η βαλίνη.
- **Υπό όρους απαραίτητα αμινοξέα:** αυτά τα αμινοξέα μπορούν να συντεθούν από τον οργανισμό, αλλά σε ορισμένες καταστάσεις όπως λοίμωξη, τραυματισμός, έντονη σωματική άσκηση, ασθένεια και παρατεταμένη νηστεία, η ενδογενής σύνθεσή τους δεν επαρκεί για να καλύψει τις ανάγκες και η πρόσληψή τους γίνεται από την διατροφή. Αυτά τα αμινοξέα είναι η αργινίνη, η κυστεΐνη, η γλουταμίνη, η γλυκίνη, η προλίνη, η τυροσίνη και η σερίνη.
- **Μη απαραίτητα αμινοξέα:** σε αυτά περιλαμβάνονται αμινοξέα, τα οποία μπορούν να συντεθούν μόνα τους από τον οργανισμό. Αυτά τα αμινοξέα είναι η αλανίνη, η ασπαραγίνη, το ασπαραγινικό οξύ και το γλουταμικό οξύ (Kamble et al., 2021).

1.5.1.3 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΙΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΗΣ ΠΛΕΥΡΙΚΗΣ ΟΜΑΔΑΣ

Μία ακόμα ταξινόμηση των αμινοξέων είναι με βάση τις ιδιότητες της πλευρικής ομάδας ως υδρόφοβα, υδρόφιλα και αμφίφιλα.

- **Υδρόφοβα αμινοξέα:** οι πλευρικές ομάδες αυτών των αμινοξέων είναι γενικά μη πολικές και απωθούν το νερό. Συνήθως βρίσκονται στο εσωτερικό των πρωτεϊνών και με αυτό τον τρόπο σταθεροποιούν την τρισδιάστατη δομή τους. Αυτά τα αμινοξέα είναι η αλανίνη, η γλυκίνη, η ισολευκίνη, η λευκίνη, η φαινυλαλανίνη, η προλίνη, η βαλίνη και η κυστεΐνη.
- **Υδρόφιλα αμινοξέα:** οι πολικές ομάδες αυτών των αμινοξέων είναι πολικές, ελκύουν και αλληλεπιδρούν με το νερό μέσω διπολικών αλληλεπιδράσεων ή φορτίων. Συνήθως βρίσκονται στην επιφάνεια των πρωτεϊνών σε επαφή με το νερό. Αυτά τα αμινοξέα είναι η αργινίνη, η ασπαραγίνη, η σερίνη, η θρεονίνη, το γλουταμικό οξύ, η γλουταμίνη, η ιστιδίνη, η τρυπτοφάνη και η τυροσίνη.
- **Αμφίφιλα αμινοξέα:** οι πλευρικές ομάδες αυτών των αμινοξέων έχουν και υδρόφοβες και υδρόφιλες περιοχές μέσα στο ίδιο μόριο, κάνοντάς τις ικανές να αλληλεπιδρούν και με το νερό και με υδρόφοβες περιοχές. Αυτά τα αμινοξέα είναι η λυσίνη και η μεθειονίνη.

1.5.1.4 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗ ΤΥΧΗ

Η ταξινόμηση αυτή βασίζεται στο τελικό μονοπάτι, το οποίο μπορεί να οδηγήσει ο άνθρωπος της πλευρικής αλυσίδας ενός αμινοξέος μετά τον καταβολισμό.

- Γλυκογόνα αμινοξέα: αυτά τα αμινοξέα χρησιμοποιούνται ως πρόδρομοι για τον σχηματισμό γλυκόζης και γλυκογόνου. Τα αμινοξέα αυτά είναι η γλυκίνη, η αλανίνη, η σερίνη, το ασπαραγινικό οξύ, η ασπαραγίνη, το γλουταμικό οξύ, η γλουταμίνη, η προλίνη, η βαλίνη, η μεθειονίνη, η κυστεΐνη, η ιστιδίνη και η αργινίνη.
- Κετογόνα αμινοξέα: αυτά τα αμινοξέα διασπώνται για να σχηματίσουν κετόνες ή λιπώδη σώματα. Τα αμινοξέα αυτά είναι η λευκίνη και η λυσίνη.
- Γλυκογόνα και κετογόνα αμινοξέα: αυτά τα αμινοξέα διασπώνται για να σχηματίσουν πρόδρομες ουσίες τόσο για τα κετονικά σώματα όσο και για τη γλυκόζη. Αυτά τα αμινοξέα είναι η ισολευκίνη, η φαινυλαλανίνη, η τρυπτοφάνη και η τυροσίνη (Emery, 2012a).

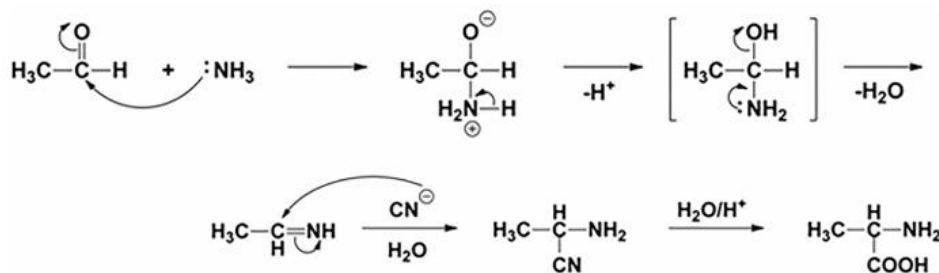
1.5.2 ΣΥΝΘΕΣΗ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ

Η σύνθεση των αμινοξέων αποτελεί θεμελιώδη βιοχημική διεργασία, απαραίτητη για τη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης και τη βιοσύνθεση των πρωτεϊνών. Ωστόσο και η χημική τους σύνθεση έχει αξία τόσο στη μελέτη των φυσικών ιδιοτήτων των αμινοξέων όσο και στην φαρμακευτική και στη βιομηχανία.

1.5.2.1 ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ

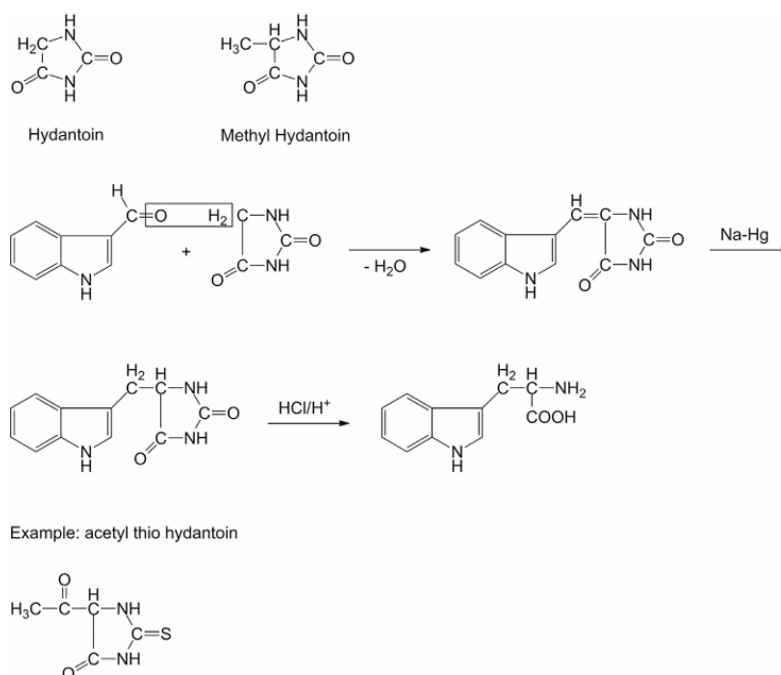
Όπως είναι γνωστό, τα αμινοξέα αποτελούνται από μία καρβοξυλομάδα, μία αμινομάδα, ένα άτομο υδρογόνου και μία πλευρική ομάδα R-. Όσον αφορά τη χημική τους σύνθεση, τα αμινοξέα μπορούν να παραχθούν μέσω διαφορετικών αντιδράσεων, ως ακολούθως:

- Σύνθεση Strecker: περιλαμβάνει την αντίδραση μίας αλδεΐδης ή κετόνης και αμίνης ή αμμωνίας. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 6, αρχικά η αλδεΐδη αντιδρά με υδροκυάνιο και D-α-μεθυλοβενζυλαμίνη σε μεθανόλη και στη συνέχεια το αμινονιτρίλιο που παράγεται υδρολύεται δίνοντας N-α-μεθυλοβενζυλαμινοξύ. Το τελικό στάδιο περιλαμβάνει την καταλυτική υδρογονόλυση του N-α-μεθυλοβενζυλαμινοξέος για την απομάκρυνση της μεθυλοβενζυλικής ομάδας από το μόριο του αμινοξέος (D'Este et al., 2018).



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση της σύνθεσης Strecker για την παραγωγή αμινοξέος (Dewangan et al., 2023).

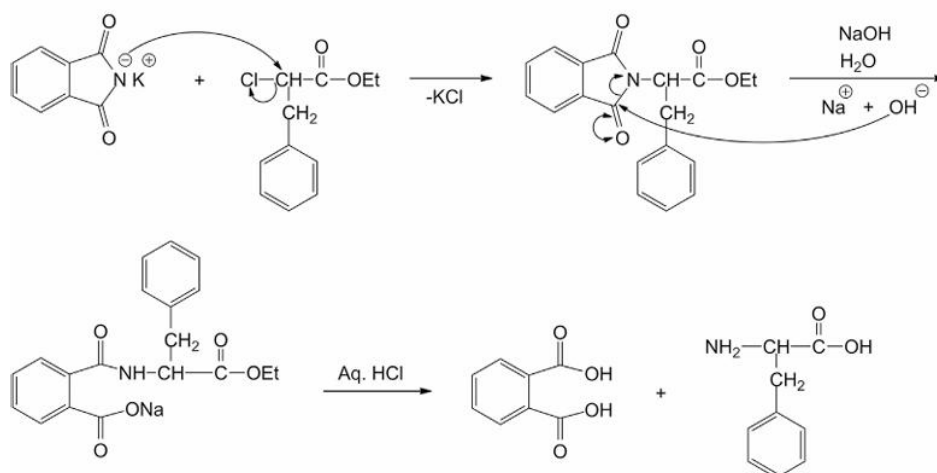
- Μέθοδο Bucherer-Bergs (σύνθεση υδαντοΐνης): αυτή η μέθοδος περιλαμβάνει την παραγωγή υδαντοΐνης από την αντίδραση κετόνης ή αλδεΐδης με ανθρακικό αμμώνιο και κυανιούχο νάτριο. Προκύπτει ένα ρακεμικό μείγμα αμινοξέων το οποίο υδρολύεται σε βασικό μέσο, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 7** (D'Este et al., 2018).



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση σταδίων αντικατάστασης του υδρογόνου της υδαντοΐνης για την παραγωγή αμινοξέος (Dewangan et al., 2023).

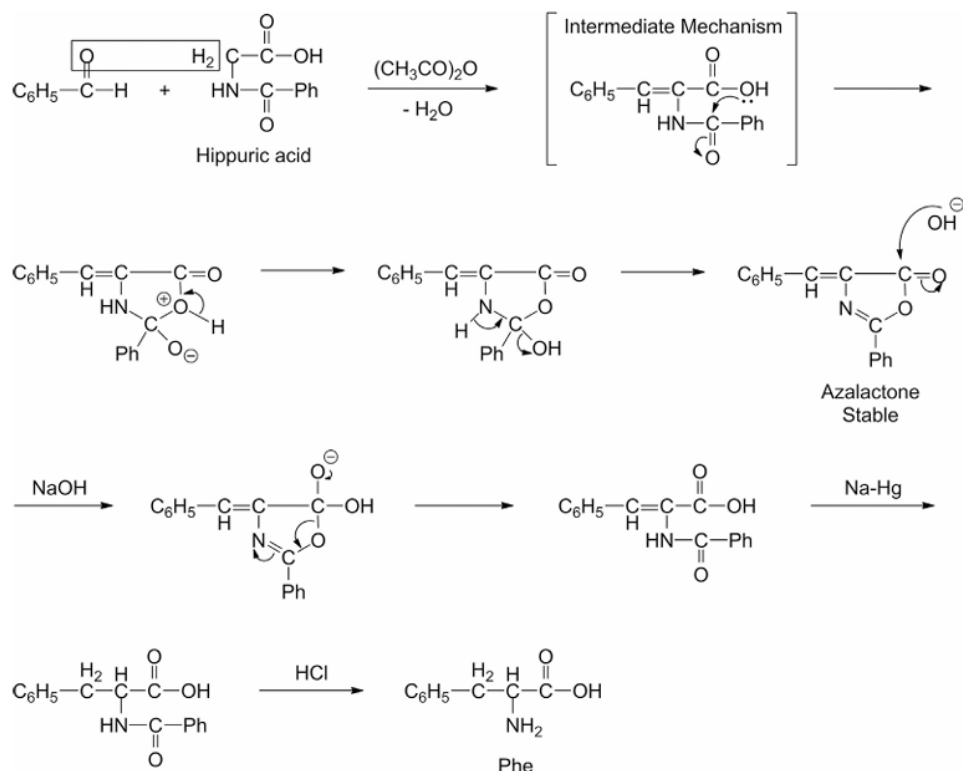
- Σύνθεση φθαλιμιδίου Gabriel: αποτελεί παραλλαγή της κλασικής σύνθεσης Gabriel. Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 8**, αρχικά το φθαλιμίδιο καλίου δρα ως ισχυρό νουκλεόφιλο, με το ανιόν του αζώτου να προσβάλλει τον α-άνθρακα του α-αλογονοεστέρα μέσω μηχανισμού πυρηνόφιλης υποκατάστασης τύπου $\text{S}_{\text{N}}2$, αντικαθιστώντας το αλογόνο. Ο παραγόμενος εστέρας αποτελεί ένα σταθερό ενδιάμεσο, το οποίο μετά από υδρόλυση και όξινη υδρόλυση της

φθαλιμιδικής ομάδας, οδηγεί στον σχηματισμό του αντίστοιχου πρωτοταγούς αμινοξέος. (Dewangan et al., 2023).



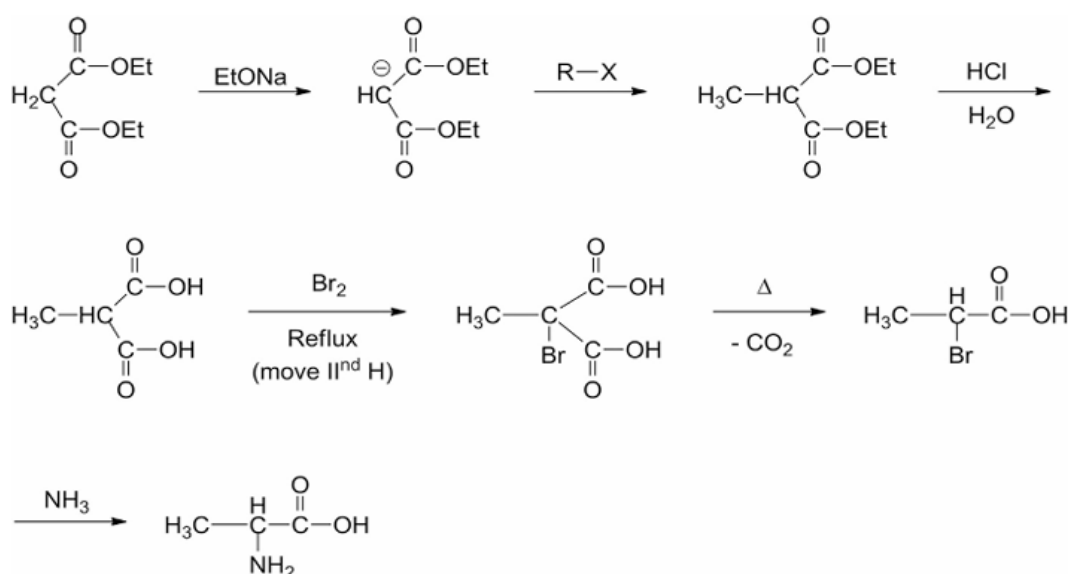
Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση σύνθεση της φαινυλαλανίνης μέσω σύνθεσης φθαλιμιδίου Gabriel (Dewangan et al., 2023).

- Σύνθεση Erlenmeyer-Plöchl: στη σύνθεση αυτή λαμβάνει χώρα αντίδραση συμπύκνωσης μεταξύ ιππουρικού οξέος και βενζαλδεϋδης παρουσία καταλύτη, όπως οξικός ανυδρίτης ή οξικό νάτριο, οδηγώντας στον σχηματισμό ενός α,β -ακόρεστου ενδιάμεσου. Στη συνέχεια, το ενδιάμεσο αυτό υφίσταται ενδομοριακή κυκλοποίηση με απομάκρυνση ενός μορίου νερού, σχηματίζοντας πενταμελή κυκλικό δακτύλιο οξαζολόνης. Με περαιτέρω υδρόλυση ή αναγωγή της οξαζολόνης παράγεται α -αμινοξύ όπως φαίνεται στην **Εικόνα 9** (Chandrasekhar & Karri, 2006).



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση των σταδίων σύνθεσης της φαινυλαλανίνης μέσω της σύνθεσης Erlenmeyer-Plöchl (Dewangan et al., 2023).

- Σύνθεση μηλονικού εστέρα: στη σύνθεση αυτή πραγματοποιείται αρχικά αντίδραση μεταξύ του μηλονικού εστέρα και ισχυρής βάσης, οδηγώντας στον σχηματισμό του αντίστοιχου ενδιάμεσου ενολικού ανιόντος. Στη συνέχεια, το ενολικό ανιόν αντιδρά με αλκυλαλογονίδια μέσω μηχανισμού πυρηνόφιλης υποκατάστασης τύπου $\text{S}_{\text{N}}2$, επιτρέποντας την εισαγωγή της επιθυμητής πλευρικής αλυσίδας. Μετά την αλκυλίωση, ακολουθεί υδρόλυση των εστερικών ομάδων και θερμική αποκαρβοξυλίωση, οδηγώντας στον σχηματισμό υποκατεστημένων καρβοξυλικών οξέων. Όταν η σύνθεση μηλονικού εστέρα γίνεται παρουσία αμμωνίας η παρασκευή α-αμινοξέος είναι αποτελεσματικότερη όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 10** (Dewangan et al., 2023).



Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση των σταδίων για την σύνθεση της αλανίνης μέσω της σύνθεσης μηλονικού εστέρα (Dewangan et al., 2023).

1.5.2.2 ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ

Όπως προαναφέρθηκε και παραπάνω τα αμινοξέα ταξινομούνται ανάλογα με την διατροφή σε απαραίτητα και μη απαραίτητα. Τα απαραίτητα τα προσλαμβάνει ο οργανισμός μέσω της διατροφής ενώ τα μη απαραίτητα τα συνθέτει μέσω διαφόρων βιοχημικών οδών, χρησιμοποιώντας ενδιάμεσα προϊόντα της γλυκόλυσης, του κύκλου του Krebs και της φωσφορικής οδού των πεντοζών. Συγκεκριμένα, το γλουταμικό οξύ συντίθεται μέσω τρυσαμίνωσης του α-κετογλουταρικού οξέος, το οποίο είναι ενδιάμεσο του κύκλου του Krebs, με την βοήθεια του ενζύμου γλουταμική αφυδρογονάση και συν-παράγοντα την βιταμίνη B6. Το ασπαραγινικό οξύ παράγεται, επίσης, μέσω τρυσαμίνωσης του οξαλοξικού οξέος από τον κύκλο του Krebs με την δράση της ασπαρτικής αμινοτρυσφεράσης. Η ασπαραγίνη συντίθεται από το ασπαραγινικό οξύ μέσω αμιδικής σύνθεσης. Τέλος, η αλανίνη παράγεται μέσω τρυσαμίνωσης του πυροσταφυλικού οξέος, το οποίο αποτελεί προϊόν της γλυκόλυσης, με την αλανινική αμινοτρυσφεράση (Emery, 2012).

Τα SCFAs, κυρίως το οξικό, το προπιονικό και το βουτυρικό οξύ συμμετέχουν έμμεσα στη βιοσύνθεση των αμινοξέων. Συγκεκριμένα, το οξικό και το βουτυρικό οξύ μετατρέπονται σε ακετυλο-CoA και το προπιονικό οξύ σε ηλεκτρυλο-CoA, τα οποία εισέρχονται στον κύκλο του Krebs. Το ακετυλο-CoA λειτουργεί ως υπόστρωμα για την παραγωγή ενέργειας και την σύνθεση βιομορίων ενώ το ηλεκτρυλο-CoA αποτελεί ενδιάμεσο του κύκλου. Αποτέλεσμα είναι η παραγωγή ενδιάμεσων του κύκλου όπως του α-κετογλουταρικού και του οξαλοξικού οξέος, που αποτελούν πρόδρομες ενώσεις για την βιοσύνθεση των μη-απαραίτητων αμινοξέων. Επιπρόσθετα, ο καταβολισμός των αμινοξέων στο έντερο οδηγεί τόσο στην παραγωγή τοξικών προϊόντων όπως φαινόλες και ινδόλες όσο και στην παραγωγή SCFAs μέσω απαμίνωσης. Συγκεκριμένα, η λευκίνη, η ισολευκίνη και η βαλίνη μετατρέπονται σε ισοβαλερικό,

ισοβουτυρικό και 2-μεθυλοβουτυρικό οξύ (Oliphant & Allen-Vercoe, 2019; Ríos-Covián et al., 2016b).

1.5.2.4 ΑΠΟΣΠΑΣΗ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Με αυτήν την διαδικασία μπορεί να επιτευχθεί, επίσης, η παραγωγή αμινοξέων σε μεγάλη κλίμακα για εμπορική χρήση καθώς περιλαμβάνει την απομάκρυνση αμινοξέων από διάφορες πηγές όπως φυτικές πρωτεΐνες και ζωικά προϊόντα. Μπορεί να πραγματοποιηθεί χημική ή ενζυμική υδρόλυση. Κατά τη χημική υδρόλυση χρησιμοποιείται ισχυρό οξύ ή βάση σε θερμοκρασία 110 – 120 °C για 12 - 24 ώρες. Με αυτόν τον τρόπο γίνεται πλήρη διάσπαση των πρωτεϊνών σε αμινοξέα, ωστόσο μπορεί να προκαλέσει απώλεια κάποιων αμινοξέων, όπως της τρυπτοφάνης και της κυστεΐνης. Αντίθετα, η ενζυμική υδρόλυση πραγματοποιείται μέσω πρωτεασών σε συγκεκριμένες τιμές θερμοκρασίας και pH. Με αυτή τη μέθοδο πραγματοποιείται διάσπαση συγκεκριμένων πεπτιδικών δεσμών διατηρώντας τις ιδιότητες ορισμένων αμινοξέων. Η ενζυμική υδρόλυση συνήθως χρησιμοποιείται σε φαρμακευτικές βιομηχανίες και βιομηχανίες τροφίμων όπου απαιτούνται πεπτίδια ή αμινοξέα πιο δραστικά (Akimova et al., 2024).

1.5.3 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ

Τα αμινοξέα είναι γνωστά κυρίως ως δομικές μονάδες των πρωτεϊνών. Ωστόσο, συμμετέχουν σε πολλούς μηχανισμούς και βιολογικές λειτουργίες του ανθρώπου, όπως στην αποκατάσταση των μυών μετά την άθληση, στην μείωση της κόπωσης και στον έλεγχο της ομοιόστασης, του μεταβολισμού και του νευρικού συστήματος.

1.5.3.1 ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

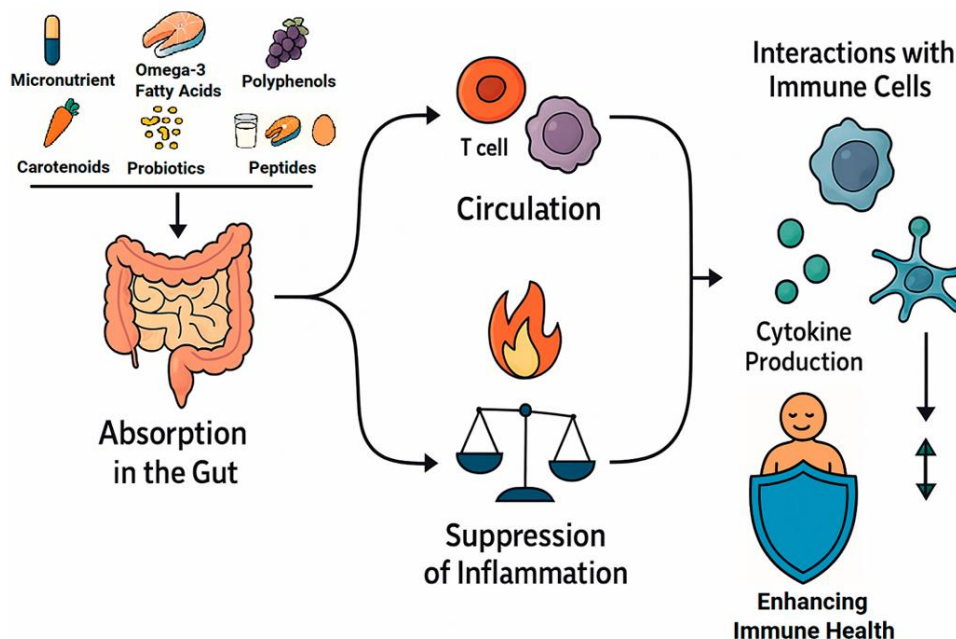
Τα αμινοξέα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη σωστή λειτουργία του νευρικού συστήματος αφού αποτελούν τους πιο διαδεδομένους νευροδιαβιβαστές του ΚΝΣ. Οι νευροδιαβιβαστές αμινοξέων βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο νευρικό σύστημα και είναι ευρέως διαδεδομένοι στα θηλαστικά (Workman, 2002). Οι κύριοι νευροδιαβιβαστές αμινοξέων είναι η γλυκίνη, το γλουταμικό, το ασπαραγινικό και το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (Chemchem et al., 2022).

Το γλουταμικό οξύ είναι ο κύριος νευροδιαβιβαστής του ΚΝΣ και έχει συνήθως διεγερτική δράση (Dalangin et al., 2020). Παίζει σημαντικό ρόλο στη μάθηση, στη μνήμη, στη γνωστική επεξεργασία και στη φυσιολογική λειτουργία του εγκεφάλου (Morris, 2013), ωστόσο μπορεί να προκαλέσει βλάβες στους νευρώνες, οι οποίες έχουν συσχετιστεί με νευροεκφυλιστικές και νευρολογικές διαταραχές όπως η νόσος Alzheimer, η νόσος Parkinson, η επιληψία και το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο (Lau & Tymianski, 2010). Το L-ασπαραγινικό οξύ αποτελεί τον δευτερεύον διεγερτικό νευροδιαβιβαστή του ΚΝΣ (Chemchem et al., 2022; Gundersen et al., 1998) και έχει συσχετιστεί έμμεσα με βλάβη στους νευρώνες σε παθολογικές καταστάσεις όπως είναι η ισχαιμία και οι νευροεκφυλιστικές παθήσεις (Dalangin et al., 2020).

Το γ-αμινοβουτυρικό οξύ αποτελεί τον κύριο ανασταλτικό νευροδιαβιβαστή στο ΚΝΣ των θηλαστικών (Bak et al., 2006). Διατηρεί την ισορροπία μεταξύ διέγερσης και αναστολής στον εγκέφαλο, ενώ διαταραχές στη νευροδιαβίβαση έχουν συσχετιστεί με ποικίλες νευρολογικές και ψυχιατρικές καταστάσεις, όπως η επιληψία, οι αγχώδεις διαταραχές, η σχιζοφρένεια, η κατάθλιψη, η νόσος Huntington και η νόσος Alzheimer (Dalangin et al., 2020). Η γλυκίνη είναι ο δεύτερος ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής στον νωτιαίο μυελό και την παρεγκεφαλίδα και συμβάλλει στη γνωστική ανάπτυξη (Dutertre et al., 2012). Τα υπόλοιπα αμινοξέα δεν είναι νευροδιαβιβαστές, ωστόσο συμμετέχουν στην σωστή λειτουργία του εγκεφάλου, αφού συμμετέχουν στη σύνθεση νευροδιαβιβαστών και στη διατήρηση της ενεργειακής ισορροπίας των νευρώνων (Jerath & Beveridge, 2019).

1.5.3.2 ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Οι πρωτεΐνες των διαφόρων τροφίμων απορροφώνται από το λεπτό έντερο και διασπώνται σε αμινοξέα, τα οποία στη συνέχεια συμμετέχουν εκτός των άλλων και σε λειτουργίες του ανοσοποιητικού συστήματος, ενισχύοντας την άμυνα του οργανισμού έναντι παθογόνων μικροοργανισμών όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 11** (Skenderidou et al., 2025).



Εικόνα 11: Μηχανισμοί άμυνας του οργανισμού για την προστασία ενάντια σε παθογόνους μικροοργανισμούς (Skenderidou et al., 2025).

Αρχικά, τα αμινοξέα συμμετέχουν στην ενεργοποίηση και πολλαπλασιασμό ανοσοκυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των T- και B- λεμφοκυττάρων, στην αντιοξειδωτική κατάσταση και στην παραγωγή αντισωμάτων. Συγκεκριμένα, η αλανίνη διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην ηπατική σύνθεση της γλυκόζης και

επηρεάζει την ανοσολογική λειτουργία (P. Li et al., 2007). Η αργινίνη δρα ως εκκριτικός παράγοντας για την ινσουλίνη και τις αυξητικές ορμόνες, επηρεάζοντας το μεταβολισμό της γλυκόζης και των αμινοξέων και ενισχύοντας την ανοσολογική λειτουργία μέσω διαφόρων ορμονών (Wu & Morris, 1998). Επιπλέον, το ασπαραγινικό και το γλουταμικό οξύ είναι εξίσου ζωτικής σημασίας για τον πολλαπλασιασμό και τη λειτουργία των λεμφοκυττάρων, τα οποία συμμετέχουν στην άμυνα του οργανισμού (P. Li et al., 2007). Επιπρόσθετα, η λευκίνη, η ισολευκίνη και η βαλίνη χρησιμοποιούνται από τα λεμφοκύτταρα για την αποδόμηση και τη σύνθεση της γλουταμίνης, η οποία συμμετέχει ενεργά στον κυτταρικό κύκλο.

Ακολουθώς, η γλουταμίνη είναι ένα βασικό αμινοξύ που βρίσκεται σε διάφορα βιολογικά υγρά και παίζει κρίσιμο ρόλο στο ανοσοποιητικό σύστημα, καθώς χρησιμεύει ως ενεργειακό υπόστρωμα για τα ανοσοκύτταρα. Καταβολίζεται για να παράγει γλουταμικό οξύ, το οποίο είναι απαραίτητο για τη σύνθεση της γλουταθειόνης, η οποία προστατεύει από το οξειδωτικό στρες. Όσον αφορά την τυροσίνη, αποτελεί πρόδρομος για τη σύνθεση των ορμονών του θυροειδούς, της ντοπαμίνης και της μελανίνης, οι οποίες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανοσοαπόκριση. Τέλος, η προλίνη συμβάλλει σημαντικά στο σχηματισμό κολλαγόνου, το οποίο είναι απαραίτητο για την επούλωση των πληγών και την ανοσολογική απόκριση (P. Li et al., 2007).

1.5.3.3 ΜΥΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Τα αμινοξέα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο μυϊκό σύστημα. Οι πρωτεΐνες που καταναλώνονται από την διατροφή διασπώνται σε αμινοξέα, τα οποία συμμετέχουν στην ανάπτυξη νέων μυών. Τα άτομα που δεν έχουν πρόσβαση σε επαρκείς ποσότητες πρωτεϊνών μπορεί να παρουσιάσουν μυϊκή ατροφία και μυϊκή απώλεια.

Στη σωστή λειτουργία του μυϊκού συστήματος, ιδιαίτερη σημασία έχουν τα απαραίτητα αμινοξέα και ειδικότερα τα BCAAs, τα οποία ρυθμίζουν το μεταβολισμό των πρωτεϊνών των σκελετικών μυών. Πρωτίστως, η λευκίνη είναι το κύριο αμινοξύ, το οποίο δρα ως σηματοδοτικό μόριο για τη σύνθεση πρωτεϊνών (G. Li et al., 2024). Επιπλέον, η αργινίνη είναι ο βασικός πρόδρομος του NO, το οποίο ρυθμίζει τη ροή του αίματος και των θρεπτικών συστατικών στους μύες (Cruzat et al., 2014). Επίσης, η γλουταμίνη επηρεάζει την μυϊκή μάζα και δρα ως έμμεσο αντιοξειδωτικό, συμβάλλοντας στη σύνθεση της γλουταθειόνης, η οποία μειώνει τη μυϊκή βλάβη (G. Li et al., 2024). Τέλος, η υψηλότερη πρόσληψη αμινοξέων ωφελεί τη σύνθεση των μυϊκών πρωτεϊνών περιορίζοντας τον καταβολισμό που παρατηρείται σε καταστάσεις έντονης σωματικής άσκησης, (Wolfe, 2006).

1.5.3.4 ΠΕΠΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Τα αμινοξέα διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη διατήρηση της λειτουργικής ακεραιότητας και της ομοιόστασης του πεπτικού συστήματος, καθώς αποτελούν βασικά δομικά και ρυθμιστικά μόρια για τα εντερικά κύτταρα. Συγκεκριμένα, η μεθειονίνη ρυθμίζει το μεταβολισμό, ενισχύοντας την εντερική ομοιόσταση και μετριάζοντας το οξειδωτικό στρες ενώ η αργινίνη, η τρυπτοφάνη, η φαινυλαλανίνη και η τυροσίνη, γνωστές ως αρωματικά αμινοξέα, μειώνουν τη φλεγμονή και συμβάλλουν

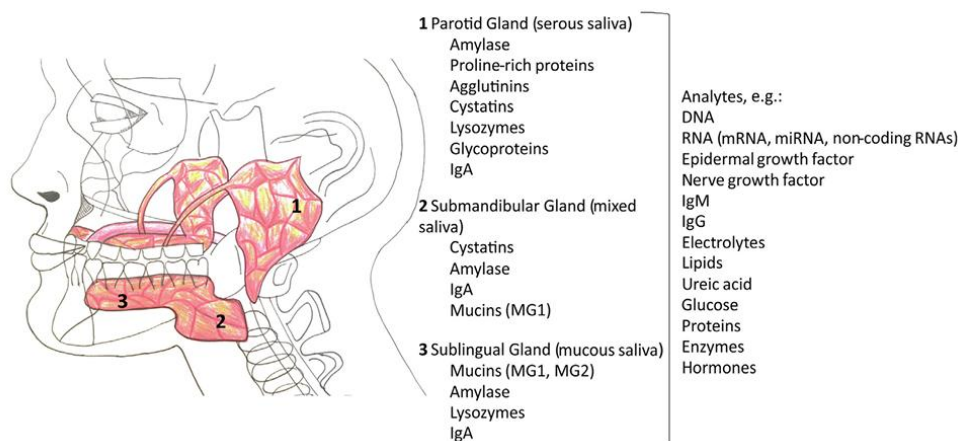
στην συνολική εντερική ακεραιότητα (Agus et al., 2018; He et al., 2018). Ακολουθώντας, η γλυκίνη, το γλουταμικό οξύ, η σερίνη, το ασπαραγινικό οξύ, η ασπαραγίνη και η προλίνη υποστηρίζουν τον πολλαπλασιασμό των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων, συμβάλλοντας στην ακεραιότητα του εντερικού φραγμού. Τέλος, η γλουταμίνη, ως το κυριότερο αμινοξύ στο πλάσμα, είναι ζωτικής σημασίας για την ακεραιότητα του φραγμού καθώς η έλλειψή της οδηγεί σε διάφορες παθήσεις (He et al., 2018).

1.6 ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

1.6.1 ΣΙΕΛΟΣ

Ο σίελος είναι ένα βιολογικό υγρό το οποίο παράγεται από τους σιελογόνους αδένες. Αποτελείται από νερό (99%), πρωτεΐνες (0,3%), ανόργανα και ιχνοστοιχεία (0,2%). Οι πρωτεΐνες στο σίελο (1–2 mg/mL) αποτελούνται κυρίως από γλυκοπρωτεΐνες, ένζυμα (π.χ. α-αμυλάση), ανοσοσφαιρίνες και ένα ευρύ φάσμα πεπτιδίων με αντιμικροβιακή δράση. Στα ανόργανα περιλαμβάνονται ηλεκτρολύτες όπως νάτριο, κάλιο και χλώριο όπως φαίνεται στην **Εικόνα 12** (Roblegg et al., 2019a; Schipper et al., 2007).

Ο σίελος είναι ένα πολύ σημαντικό βιολογικό υγρό για τον οργανισμό, που ρυθμίζει διάφορες λειτουργίες όπως τη λίπανση, την κατάποση, την πέψη και την αναγέννηση του στοματικού βλεννογόνου και συμβάλει στην άμυνα της στοματικής κοιλότητας και στην αντίληψη της γεύσης. (Roblegg et al., 2019b). Ο σίελος μπορεί να χρησιμοποιηθεί ευρέως για τον προσδιορισμό των SCFAs και των αμινοξέων καθώς η λήψη του είναι πιο εύκολη σε σχέση με αυτή των κοπράνων και του αίματος. Τα SCFAs παράγονται από gram- αρνητικά και θετικά βακτήρια που υπάρχουν στην στοματική κοιλότητα, ως τελικά προϊόντα μεταβολικών οδών. Μεταβολές στις συγκεντρώσεις των SCFAs στο σίελο σχετίζονται με παθήσεις της στοματικής κοιλότητας όπως κακοσμία, περιοδοντίτιδα, τερηδόνα καθώς και άλλα νοσήματα όπως το γλοιοβλάστωμα (Kashyap et al., 2024). Όσον αφορά τα αμινοξέα, η παρουσία τους στο σίελο οφείλεται στην διάσπαση των πρωτεϊνών στη στοματική κοιλότητα και στη μεταβολική δραστηριότητα της στοματικής μικροχλωρίδας. Μεταβολές στις συγκεντρώσεις των ελεύθερων αμινοξέων στο σίελο συνδέονται με στοματικές παθήσεις όπως η περιοδοντίτιδα και η τερηδόνα καθώς και με άλλες ασθένειες όπως ο καρκίνος του θυροειδούς και του μαστού, ο σακχαρώδης διαβήτης και οι νευροεκφυλιστικές νόσους (Balci et al., n.d.; Bel'skaya et al., 2024; Prathibha et al., 2013; Walton, 2018; J. Zhang et al., 2021).



Εικόνα 12: Απεικόνιση των περισσότερων και κυριότερων συστατικών του σιέλου και από που απεκκρίνονται (Roblegg et al., 2019a).

1.6.2 ΟΥΡΑ

Τα ούρα είναι ένα διαφανές, με κεχριμπαρένιο χρώμα υγρό, το οποίο αποτελεί το τελικό προϊόν της νεφρικής λειτουργίας. Τα φυσιολογικά ούρα αποτελούνται 95% από νερό και 5% από διαλυμένες ουσίες. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται η ουρία από τον μεταβολισμό των αμινοξέων, το ουρικό οξύ από την αποικοδόμηση των πουρινών, η κρεατίνη από τον μεταβολισμό των μυών, οργανικές ενώσεις, πρωτεΐνες, αμινοξέα, ανόργανα συστατικά όπως νάτριο, κάλιο, χλώριο, ασβέστιο καθώς και προϊόντα διάσπασης της αιμοσφαιρίνης, όπως η ουροβιλίνη, η οποία προσδίδει το χρώμα στα ούρα. Ο ημερήσιος όγκος των ούρων κυμαίνεται από 0,5 έως 2 L/day, η τιμή του pH από 4,8 έως 7,5 και η πυκνότητα από 1,015 έως 1,022 kg/L (Baig, 2011; Bouatra et al., 2013a). Τα ούρα ως υγρό έκκρισης του μεταβολισμού συμμετέχει σε πολλές λειτουργίες του οργανισμού, όπως αποβολή άχρηστων προϊόντων, ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης, του pH και των επιπέδων των ηλεκτρολυτών (Bouatra et al., 2013b).

Τα ούρα ως βιολογικό υγρό χρησιμοποιούνται κατά κόρον για βιοχημικές αναλύσεις καθώς η λήψη τους είναι εύκολη και οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες δεν μεταβάλλονται. Ειδικότερα, τα ούρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για τον προσδιορισμό των SCFAs και των αμινοξέων καθώς μεταβολές στις συγκεντρώσεις τους σχετίζονται με ασθένειες όπως η παχυσαρκία, ο διαβήτης τύπου II και τα αυτοάνοσα νοσήματα όπως η νόσος του Crohn (Ishida et al., 2023; Sushma et al., 2025; Tews et al., 2023).

1.6.3 ΚΟΠΡΑΝΑ

Τα κόπρανα είναι προϊόν μεταβολισμού του οργανισμού. Ο μέσος ενήλικας παράγει περίπου 100-130 g/day, με το εύρος αυτό να διαφέρει στα βρέφη και στα μικρά παιδιά. Τα κόπρανα αποτελούνται 75% από νερό και 25% από άλλα θρεπτικά συστατικά. Σε αυτό το 25% ανήκουν οργανικά όπως βακτηριακή βιομάζα, πρωτεΐνες και αζωτούχες ενώσεις, υδατάνθρακες και λιπίδια που δεν διασπώνται, ανόργανα συστατικά όπως

φωσφορικό ασβέστιο και φωσφορικό σίδηρο, εντερικές εκκρίσεις και βλέννα. Από χημικής άποψης, τα ανθρώπινα κόπρανα είναι σχετικά ουδέτερα με την τιμή pH να κυμαίνεται από 5,3 έως 7,5 (Rose et al., 2015).

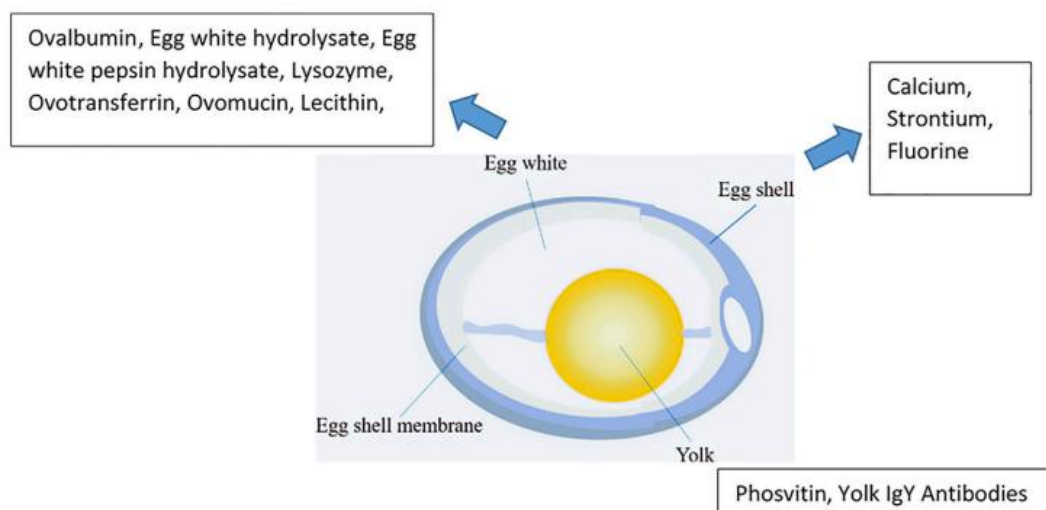
Τα κόπρανα στον άνθρωπο συντίθενται κατά το τελικό στάδιο της πέψης, το οποίο πραγματοποιείται στο κόλον του παχέος εντέρου. Ως τελικό προϊόν της πέψης, τα κόπρανα συμβάλλουν αρχικά στην απομάκρυνση ουσιών, οι οποίες δεν μπορούν να μεταβολιστούν ή να απορροφηθούν. Επιπλέον, απομακρύνουν και ένα μεγάλο ποσοστό βακτηρίων και νεκρών επιθηλιακών κυττάρων από τους αδένες του παχέος εντέρου με σκοπό την ανανέωση του εντερικού επιθηλίου και του μικροβιώματος.

Εκτός από αυτές τις λειτουργίες, τα κόπρανα μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για αναλύσεις με σκοπό την διάγνωση παθήσεων, λοιμώξεων και μεταβολικών διαταραχών. Δύο κατηγορίες ενώσεων που μπορούν να προσδιοριστούν στα κόπρανα είναι τα SCFAs και τα αμινοξέα. Μεταβολές στις συγκεντρώσεις τους σχετίζονται με τον καρκίνο του παχέος εντέρου, την παχυσαρκία, τον διαβήτη τύπου II, τη Διαταραχή Αυτιστικού Φάσματος και τα αυτοάνοσα νοσήματα όπως το Σύνδρομο του Ευερέθιστου Εντέρου (Ahmad et al., 2025; Chamtoury et al., 2023; El-Salhy et al., 2021).

1.6.4 ΑΥΓΟ

Το αυγό που παράγεται από την όρνιθα είναι ένα από τα τρόφιμα που έχει αναλυθεί ευρέως. Αποτελείται από το κέλυφος, το ασπράδι, τον κρόκο και τη μεμβράνη του κελύφους όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 13** και έχει υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και λιπίδια. Το φρέσκο αυγό αποτελείται περίπου από 76,1% νερό, 12,6% πρωτεΐνες, 9,5% λίπος, 0,7% υδατάνθρακες και 1,1% τέφρα. Οι πρωτεΐνες των αυγών έχουν σημαντική θρεπτική αξία για τον άνθρωπο αφού πλεονεκτούν έναντι αυτών του μητρικού γάλακτος με την κυριότερη, την οβαλβουμίνη να προσφέρει αντιοξειδωτικές δράσεις.

Όσον αφορά τα λιπίδια, αυτά βρίσκονται κατανεμημένα κυρίως στον κρόκο και αποτελούν βασικά συστατικά λιποπρωτεϊνών όπως χοληστερόλη, τριγλυκερίδια και φωσfolιπίδια. Οι υδατάνθρακες αποτελούν το 0,7% των συστατικών του αυγού και κατανέμονται μεταξύ του κρόκου και του ασπραδιού. Επιπρόσθετα, τα αυγά έχουν και υψηλή περιεκτικότητα σε βιταμίνες A, D, E, K και του συμπλέγματος B, ψευδάργυρο, σελήνιο και καροτενοειδή, που συμβάλλουν στο κίτρινο-πορτοκαλί χρώμα του κελύφους του αυγού (Usturoi et al., 2025).



Εικόνα 13: Σχηματική απεικόνιση της δομής του αυγού της όρνιθας και των κυριότερων συστατικών που περιέχει (X. Zhang et al., 2021).

Τα θρεπτικά συστατικά του αυγού έχουν πολλά οφέλη στην υγεία του ανθρώπου, για αυτό συνιστάται ως βασικό συστατικό σε μία ισορροπημένη διατροφή. Όσον αφορά την μεμβράνη κελύφους του αυγού, είναι μία μεμβράνη που περιέχει κολλαγόνο και υαλουρονικό οξύ, συμβάλλοντας έτσι στην επούλωση τραυμάτων. Επιπλέον, η μεμβράνη αυτή βελτιώνει την απορρόφηση ασβεστίου στα ανθρώπινα κύτταρα και ανακουφίζει τον πόνο σε ασθενείς με διαταραχές των αρθρώσεων. Ακολούθως, οι πρωτεΐνες του ασπραδιού, όπως η οβαλβουμίνη εμφανίζουν αντιοξειδωτική, αντιβακτηριακή και αντιφλεγμονώδη δράση, προστατεύοντας τα κύτταρα από το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες (Mohseni Ghalehghazi & Zhong, 2025).

1.7 ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΗΝ ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Η παραγωγοποίηση στην αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιείται συνήθως για να αλλάξει τις ιδιότητες των αναλυτών ώστε να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός στην χρωματογραφική στήλη. Ενώσεις, όπως αυτές που περιέχουν ενεργά άτομα υδρογόνου, τείνουν να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με αποτέλεσμα την αύξηση της πολικότητας και την μείωση της πτητικότητας. Μέσω της παραγωγοποίησης αντικαθίστανται τα ενεργά άτομα του υδρογόνου με άλλες λειτουργικές ομάδες αυξάνοντας την πτητικότητα. Επίσης, η παραγωγοποίηση βελτιώνει την θερμική σταθερότητα των ενώσεων ακόμα και των πτητικών αναλυτών καθώς και τη χημική σταθερότητα με προστασία ομάδων. Ακολούθως, ο αεριοχρωματογραφικός προσδιορισμός των εναντιομερών μπορεί να πραγματοποιηθεί μόνο μέσω στηλών με χειρόμορφες στατικές φάσεις, ωστόσο η παραγωγοποίηση μπορεί να βελτιώσει τον διαχωρισμό τους χωρίς την παραπάνω προϋπόθεση.

Οι χημικές αντιδράσεις παραγωγοποίησης μπορούν να ταξινομηθούν στις εξής κατηγορίες:

- Αντιδράσεις με σχηματισμό αλκυλικών ή αρυλικών παραγώγων
- Αντιδράσεις σιλυλίωσης
- Αντιδράσεις με σχηματισμό ακυλικών παραγώγων
- Αντιδράσεις προσθήκης σε ανθρακούχους ετεροπολυδεσμούς
- Αντιδράσεις με σχηματισμό κυκλικών ενώσεων
- Άλλες αντιδράσεις

Στις αντιδράσεις σχηματισμού παραγώγων αλκυλίου ή αρυλίου πραγματοποιείται αντικατάσταση των ατόμων υδρογόνου με ομάδα αλκυλίου ή αρυλίου. Οι αντιδράσεις αυτές γίνονται σε ενώσεις που περιέχουν στην δομή τους χαρακτηριστικές ομάδες όπως -OH, -COOH, -SH, -NH ή -CONH (C. Moldoveanu & David, 2019).

Στις αντιδράσεις σιλυλίωσης, ένα άτομο υδρογόνου αντικαθίσταται από ομάδα σιλυλίου. Οι αντιδράσεις αυτές γίνονται σε ενώσεις που έχουν ομάδες όπως -OH, -COOH, -SH, -NH, -CONH, -POH, -SOH ή καρβονύλιο που μπορεί να υδροξυλιωθεί. Στην χρωματογραφία, η σιλυλίωση χρησιμεύει για την αύξηση της πτητικότητας και της σταθερότητας καθώς και της συμπεριφοράς των ενώσεων. Το μειονέκτημα της σιλυλίωσης είναι ότι στο GC-MS τα φάσματα μάζας πολλών σιλυλιωμένων ενώσεων ενδέχεται να μην είναι διαθέσιμα σε κοινές βιβλιοθήκες με σκοπό την δύσκολη ταυτοποίησή τους. Επίσης, για την αύξηση της κινητικής της αντίδρασης είναι απαραίτητη η θέρμανση του δείγματος σε θερμοκρασίες περίπου στους 70 °C για 15 με 30 λεπτά (S. Zhang et al., 2019).

Στις αντιδράσεις με σχηματισμό ακυλικών παραγώγων πραγματοποιείται αντικατάσταση ατόμων υδρογόνου με ομάδα ακυλίου. Οι αντιδράσεις αυτές γίνονται σε ενώσεις με χαρακτηριστικές ομάδες όπως -OH, -SH, -NH, -CONH. Με την ακυλίωση αυξάνεται η πτητικότητα των ενώσεων όχι τόσο πολύ όσο στις περίπτωση της σιλυλίωσης.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΟΥ ΜΔΕ

Η ανάπτυξη μεθόδου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των SCFAs και των αμινοξέων παρουσιάζει επιστημονικό ενδιαφέρον, καθώς οι δύο αυτές κατηγορίες μεταβολιτών αποτελούν βασικούς δείκτες του μεταβολισμού του ξενιστή και της δραστηριότητας του εντερικού μικροβιώματος. Σκοπός της παρούσας Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας είναι η ανάπτυξη μεθόδου ταυτόχρονου προσδιορισμού υποκατεστημένων (υδροξυ-, αμινο- και υδροξυ-αμινο) και μη-υποκατεστημένων SCFAs και αμινοξέων μέσω παραγωγοποίησης και αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας σε βιολογικά δείγματα και επιλεγμένα τρόφιμα. Η συνδυασμένη ποσοτικοποίησή τους παρέχει μια ολοκληρωμένη εικόνα των μεταβολικών διεργασιών, διευκολύνει την αναζήτηση αξιόπιστων βιοδεικτών για διάφορες παθολογικές και μη-παθολογικές καταστάσεις και επιτρέπει την αξιολόγηση της επίδρασης διατροφικών και περιβαλλοντικών παραγόντων στον ανθρώπινο μεταβολισμό.

Για το σκοπό αυτό, αναπτύχθηκε μια απλή και γρήγορη μέθοδος παραγωγοποίησης με βάση το iBCF ως αντιδραστήριο παραγωγοποίησης και το εξάνιο ως διαλύτη εκχύλισης, η οποία βελτιστοποιήθηκε για την αύξηση της απόδοσής της και εφαρμόστηκε με επιτυχία στο προσδιορισμό των αναλυτών σε δείγματα σιέλου, ούρων, κοπράνων και αυγού. Παράλληλα, παρατηρήθηκε η επίδραση του καφέ, του καπνίσματος και της αερόβιας άθλησης στις συγκεντρώσεις των αναλυτών με βάση το χρόνο και εξήχθησαν τα αντίστοιχα συμπεράσματα.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Οι πρότυπες ενώσεις των αναλυτών, τα αντιδραστήρια παραγωγοποίησης και οι διαλύτες παρουσιάζονται στους **Πίνακες 1 έως 3** μαζί με τις καθαρότητες και τις εταιρείες από τις οποίες αγοράστηκαν.

Πίνακας 1: SCFAs, καθαρότητες και προμηθεύτριες εταιρείες

SCFA	ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ
φορμικό (μυρμηκικό) οξύ	Αναλυτική	Scharlau (Spain)
οξικό οξύ	≥99.8%	FlukaChemie GmbH (Switzerland)
προπιονικό οξύ βουτυρικό οξύ ισοβουτυρικό οξύ πεντανοϊκό οξύ οκτανοϊκό οξύ άλας νατρίου του DL-β υδροξυβουτυρικού οξέος	Αναλυτική ≥99% Αναλυτική Αναλυτική Αναλυτική ~98%	Sigma-Aldrich (USA)
3-μεθυλοβουτυρικό οξύ 2-υδροξυπεντανοϊκό οξύ	98% 97%	BLDpharm (China)
DL-2-υδροξυβουτυρικό νάτριο (-)-2-αμινοβουτυρικό οξύ DL-3-αμινοϊσοβουτυρικό οξύ 4-αμινο-3-υδροξυβουτυρικό οξύ	>98.0% >99.0% >98.0% >98.0%	TCI (Ιαπωνία)

Πίνακας 2: Αμινοξέα, καθαρότητες και προμηθεύτριες εταιρείες

ΑΜΙΝΟΞΥ	ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ
L-αλανίνη γλυκίνη L-βαλίνη L-φαινυλαλανίνη	≥99.5% >98% >99% >99%	FlukaChemie GmbH (Switzerland)
L-μεθειονίνη L-λυσίνη L-ισολευκίνη L-λευκίνη L-προλίνη (-)-ασπαραγίνη ασπαραγινικό οξύ L-γλουταμικό οξύ	Αναλυτική Αναλυτική Αναλυτική Αναλυτική Αναλυτική Αναλυτική Αναλυτική Αναλυτική	Sigma-Aldrich (USA)

Πίνακας 3: Διαλύτες, αντιδραστήρια παραγωγοποίησης και εσωτερικό πρότυπο, καθαρότητες και προμηθεύτριες εταιρείες.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ - ΔΙΑΛΥΤΗΣ	ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ
εξάνιο	Αναλυτική	CARLO ERBA Reagents (Italy)
ισοβουτανόλη (iBuOH) χλωροφορμικός ισοβουτυλεστέρας (iBCF)	>99% >98%	TCI (Ιαπωνία)
πυριδίνη υδροξείδιο του νατρίου	Αναλυτική >98%	Sigma-Aldrich (USA)
δεκαπεντάνιο	≥98%	FlukaChemie GmbH (Switzerland)

2.2 ΟΡΓΑΝΑ-ΥΛΙΚΑ

- Σύστημα αέριας χρωματογραφίας Nexis GC-2030 συνδεδεμένο με φασματογράφο μάζας GCMS-QP2020 NX. Το σύστημα περιλαμβάνει αυτόματο δειγματολήπτη AOC-20i Plus. Τα δεδομένα συλλέχθηκαν με την βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή, στον οποίο είναι εγκατεστημένο το λογισμικό Lab Solutions- GCMS Solutions, της εταιρείας Shimadzu (Japan).
- Στήλη SLB-5MS (30 m × 0,25 mm, πάχους 0,25 μm).
- Ήλιο καθαρότητας 99,999%
- Αναδευτήρας Vortex, της εταιρείας technoKartell (Italy)
- Λουτρό υπερήχων (ultrasonic bath), της εταιρείας Elma Schmidbauer GmbH (Germany)
- Φυγόκεντρος, της εταιρείας PrO-Research (United Kingdom)
- Αναλυτικός ζυγός, της εταιρείας Shimadzu (Japan)

2.3 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

Τα διαλύματα παρακαταθήκης των αναλυτών παρασκευάστηκαν ζυγίζοντας 10 mg από την κάθε πρότυπη ένωση και διαλύοντάς την σε 10 mL NaOH 0,1 με την βοήθεια των υπερήχων. Από αυτά με αραιώσεις προέκυψαν διαλύματα εργασίας συγκεντρώσεων 100 μg/mL και 10 μg/mL για κάθε αναλύτη. Ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε πρότυπο διάλυμα δεκαπεντανίου σε εξάνιο, συγκέντρωσης 100 μg/mL.

2.4 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΥΓΟΥ

Για τον προσδιορισμό των SCFAs, 100 mg λυοφιλιωμένου αυγού και 1 mL διαλύματος NaOH 0,1 M μεταφέρθηκαν σε φιαλίδιο 4 mL ομογενοποιήθηκαν σε λουτρό υπερήχων για 10 min και ακολούθησε φυγοκέντρωση για 10 min στις 8000 rpm. Εν συνεχεία, σε άλλο φιαλίδιο μεταφέρθηκαν 300 μL από το υπερκείμενο, 200 μL πυριδίνης και 100 μL iBuOH και το μείγμα ομογενοποιήθηκε σε vortex για 20 s. Ακολούθησε προσθήκη 100 μL iBCF με γρήγορη ανακίνηση και το φιαλίδιο παρέμεινε ανοικτό για 1 min για την απελευθέρωση του παραγόμενου αερίου. Ακολούθησαν εκχυλίσες με 2×500 μL εξανίου, φυγοκέντρωσεις στις 5000 rpm για 5 min και συλλογή των εξανικών φάσεων. Ο τελικός όγκος των φάσεων ήταν 1 mL με την προσθήκη εξανίου. Τέλος, προστέθηκαν 10 μL εσωτερικού προτύπου και το δείγμα εγχύθηκε στο GC-MS.

Για τον προσδιορισμό των αμινοξέων, ζυγίστηκαν 30 mg λυοφιλιωμένου αυγού και ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία ανάλυσης όπως παραπάνω, με ένα επιπλέον στάδιο αραιώσης καθώς 200 μL από το διάλυμα των εξανικών φάσεων αραιώθηκε σε τελικό όγκο 1 mL, πριν, προστεθούν 10 μL εσωτερικού προτύπου και γίνει έγχυση στο GC-MS.

2.5 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΟΠΡΑΝΩΝ

Ποσότητα 100 mg κοπράνων και 1 mL διαλύματος NaOH 0,1 M μεταφέρθηκαν σε φιαλίδιο χωρητικότητας 4 mL, ομογενοποιήθηκαν σε λουτρό υπερήχων για 10 min και ακολούθησε φυγοκέντρωση για 15 min στις 8000 rpm. Εν συνεχεία, σε άλλο φιαλίδιο

μεταφέρθηκαν 300 μL από το υπερκείμενο και ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία ανάλυσης, όπως παραπάνω.

2.6 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΣΙΕΛΟΥ

Βαμβάκι εμποτισμένο με σιέλο φυγοκεντρήθηκε για 10 min στις 3000 rpm. Στη συνέχεια, 200 μL σιέλου και 100 μL διαλύματος NaOH 0,1 M μεταφέρθηκαν σε φιαλίδιο και ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία ανάλυσης, όπως παραπάνω.

2.7 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΥΡΩΝ

Όγκος 200 μL ούρων και 100 μL διαλύματος NaOH 0,1 M μεταφέρθηκαν σε φιαλίδιο των 4 mL και ακολουθήθηκε η ίδια ανάλυση, όπως παραπάνω.

2.8 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΣΙΕΛΟΥ ΚΑΙ ΟΥΡΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΚΑΦΕ, ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΚΑΠΝΙΣΜΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΑΕΡΟΒΙΑ ΑΣΚΗΣΗ

Τα δείγματα σιέλου και ούρων συλλέχθηκαν από δύο εθελοντές ακολουθώντας το παρακάτω πρωτόκολλο:

Πριν αλλά και κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας δεν έγινε η κατανάλωση τροφίμων, νερού και η λήψη οποιoδήποτε φαρμάκου. Αρχικά, έγινε βούρτσισμα των δοντιών με οδοντόπαστα και καλή έκπλυση της στοματικής κοιλότητας. Μετά από 1,5 h πραγματοποιήθηκε η πρώτη λήψη δείγματος σιέλου ή/και ούρων. Στην συνέχεια έγινε κατανάλωση του καφέ ή κάπνισμα τσιγάρου και για τις επόμενες 3 h, ανά 1 h πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες. Τα δείγματα αποθηκευτήκαν στην κατάψυξη μέχρι την ανάλυσή τους και η προετοιμασία τους πραγματοποιήθηκε όπως παραπάνω. Για την αερόβια άσκηση συλλέχθηκαν, δείγματα με τον ίδιο τρόπο, με τις δειγματοληψίες να πραγματοποιούνται αμέσως μετά το πέρας της άσκησης καθώς και μετά από μία ώρα. Η αερόβια άσκηση διήρκεσε 1 h.

Για την κατανάλωση του καφέ συλλέχθηκαν δείγματα σιέλου και ούρων από τον ίδιο εθελοντή πριν καθώς και μετά την μετά την πάροδο τριών ωρών μετά την κατανάλωση, για τρεις διαφορετικές ημέρες. Για το κάπνισμα συλλέχθηκαν δείγματα σιέλου από τον ίδιο εθελοντή πριν καθώς και μετά την πάροδο τριών ωρών μετά το κάπνισμα, για τρεις διαφορετικές ημέρες. Τέλος, για την αερόβια άσκηση, συλλέχθηκαν δείγματα σιέλου από τον ίδιο εθελοντή πριν καθώς και αμέσως μετά το πέρας και μία ώρα μετά το πέρας της αερόβιας άσκησης, σε δύο διαφορετικές ημέρες.

2.9 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

Οι εγχύσεις έγιναν με κλειστή βαλβίδα-διαμοιραστή (splitless mode), ενώ μετά από 30 s η βαλβίδα άνοιξε με αναλογία διαμοιρασμού 50:1 (split ratio). Η θερμοκρασία στο σύστημα έγχυσης τέθηκε στους 250 °C, ενώ αντίστοιχα στην πηγή ιόντων ήταν στους 220 °C και στη διασύνδεση (interface) στους 280 °C. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα ήταν το εξής: αρχικά η θερμοκρασία στη στήλη ήταν 40 °C, όπου παρέμεινε για 5 min. Έπειτα, αυξήθηκε έως στους 250 °C με ρυθμό 8 °C/min, όπου παρέμεινε για 10 min. Το πρόγραμμα διήρκεσε συνολικά 41,25 min. Για τον ιοντισμό των ενώσεων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (electron impact) στα 70 eV.

Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία των χρωματογραφημάτων ήταν το Lab Solutions-GCMS Solutions της εταιρείας Shimadzu. Η ταυτοποίηση των ενώσεων έγινε μετά τη λήψη χρωματογραφημάτων σε λειτουργία «σάρωσης» SCAN σε εύρος m/z 40-400, με βάση το χρόνο κατακράτησης και τις βιβλιοθήκες προτύπων φασμάτων μάζας. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό λήφθηκαν χρωματογραφήματα σε λειτουργία SIM (Selective Ion Monitoring) με επιλεγμένα m/z (Qualifiers and Quantifier) σε συγκεκριμένες αναλογίες για κάθε αναλύτη με αποδεκτό εύρος απόκλισης το 30%.

2.10 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η γραμμικότητα της μεθόδου μελετήθηκε, χρησιμοποιώντας πρότυπα διαλύματα σε επτά διαφορετικές συγκεντρώσεις. Οι αντίστοιχες τιμές των κορυφών τους υπολογίστηκαν από το λόγο υψών H/H_i , όπου τα H και H_i αντιπροσωπεύουν τα ύψη της κορυφής του προτύπου διαλύματος και του εσωτερικού προτύπου αντίστοιχα. Το όριο ανίχνευσης (LOD = Limit of Detection) υπολογίστηκε ως τρεις φορές ο λόγος του σήματος προς τον θόρυβο ($S/N=3$) και το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ = Limit of Quantification) ως 10 φορές ο ίδιος λόγος ($S/N=10$).

Η επαναληψιμότητα υπολογίστηκε από τέσσερις διαδοχικές αναλύσεις δειγμάτων ούρων, σιέλου, κοπράνων και αυγού την ίδια μέρα (%RSD intra-day), ενώ η αναπαραγωγιμότητα υπολογίστηκε από τέσσερις αναλύσεις δειγμάτων κάθε μέρα, για τρεις διαδοχικές ημέρες (%RSD inter-day). Η επίδραση της μήτρας (matrix effect) και οι ανακτήσεις (recoveries) υπολογίστηκαν από εγχύσεις δειγμάτων με εμβολιασμό (spiked) πρότυπων διαλυμάτων σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις για κάθε αναλύτη.

Η επίδραση μήτρας υπολογίστηκε από την εξίσωση (Fu et al., 2022a):

$$(\%) \text{Επίδραση μήτρας} = \frac{A - B}{C} \times 100$$

όπου το A είναι το αναλυτικό σήμα του αναλύτη μετά τον εμβολιασμό με πρότυπο διάλυμα, B το αναλυτικό σήμα του αναλύτη χωρίς εμβολιασμό και C το αναλυτικό σήμα του αναλύτη του προτύπου διαλύματος. Ως αναλυτικό σήμα λήφθηκε ο λόγος του ύψους της χρωματογραφικής κορυφής του κάθε αναλύτη ως προς το ύψος της χρωματογραφικής κορυφής του εσωτερικού προτύπου.

Η ανάκτηση υπολογίστηκε από την εξίσωση:

$$(\%) \text{Ανάκτηση} = \frac{A - B}{C} \times 100$$

όπου A είναι η συγκέντρωση του συστατικού του δείγματος με εμβολιασμό, B η αρχική συγκέντρωση του συστατικού στο δείγμα και C η συγκέντρωση πρότυπου διαλύματος με την οποία εμβολιάστηκε το δείγμα.

Τέλος, για την κατανάλωση του καφέ, για το κάπνισμα και για την αερόβια άσκηση πραγματοποιήθηκε μονόδρομη ANOVA (Analysis of Variance) και t -test προκειμένου να διαπιστωθεί αν υπάρχει και που υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το χρόνο.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗΣ

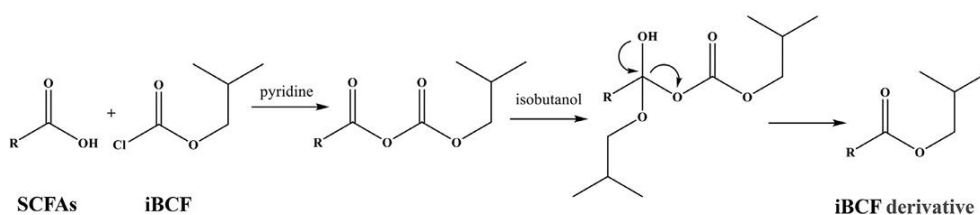
Για την παραγωγή των SCFAs και των αμινοξέων χρησιμοποιούνται ευρέως ως αντιδραστήρια παραγωγοποίησης οι χλωροφορμικοί αλκυλεστέρες, με τους πιο συνηθισμένους τους χλωροφορμικό αιθυλεστέρα, χλωροφορμικό προπυλεστέρα, χλωροφορμικό ισοβουτυλεστέρα και χλωροφορμικό βενζυλεστέρα. Η παραγωγοποίηση με χλωροφορμικούς αλκυλεστέρες οδηγεί στο σχηματισμό σταθερών παραγώγων με σημαντικές χρωματογραφικές ιδιότητες. Καθώς οι χλωροφορμικοί αλκυλεστέρες αντιδρούν μόνο με αμινομάδες, καρβοξυλομάδες και υδροξυλομάδες, η χρήση τους ειδικά στην περίπτωση των βιολογικών δειγμάτων πλεονεκτεί έναντι άλλων μηχανισμών παραγωγοποίησης όπως η σιλυλίωση, καθώς επιτρέπουν επιλεκτική παραγωγοποίηση των συστατικών του δείγματος, παρέχοντας πιο απλό χρωματογράφημα (Sobolevsky et al., 2004). Συγκεκριμένα, για τον iBCF, η χρήση του σε συνδυασμό με κατάλληλο διαλύτη μπορεί να αντιμετωπίσει το προβλήματα επικάλυψης κάποιων αναλυτών, όπως του φορμικού και του οξικού οξέος, λόγω του σχηματισμού παραγώγων με μεγαλύτερη μοριακή μάζα. Τέλος, η αντίδραση παραγωγοποίησης είναι γρήγορη και ολοκληρώνεται μέσα σε 3 min μετά την προσθήκη του iBCF σε υδατικό περιβάλλον, χωρίς την ανάγκη θέρμανσης (Furuhashi et al., 2018).

Όσον αφορά τον μηχανισμό της αντίδρασης, οι αναλύτες διαλύονται σε υδατικό διάλυμα NaOH. Υπό αυτές τις συνθήκες τα SCFAs βρίσκονται με τη μορφή καρβοξυλικού ανιόντος, καθιστώντας τα πιο δραστικά πυρηνόφιλα. Στη συνέχεια, το ανιόν προσβάλλει το καρβονύλιο του iBCF και η πυριδίνη, λειτουργώντας ως καταλύτης και δέκτης πρωτονίων, διευκολύνει την απομάκρυνση του χλωριδίου. Το αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός ενός μικτού ανυδρίτη με την ισοβουτανόλη να προσβάλλει την καρβονυλική ομάδα του SCFA στον μικτό ανυδρίτη. Ο μικτός ανυδρίτης διασπάται, απελευθερώνοντας CO₂ και σχηματίζοντας τον ισοβουτυλεστέρα του λιπαρού οξέος, όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 14** (Fu et al., 2022b).

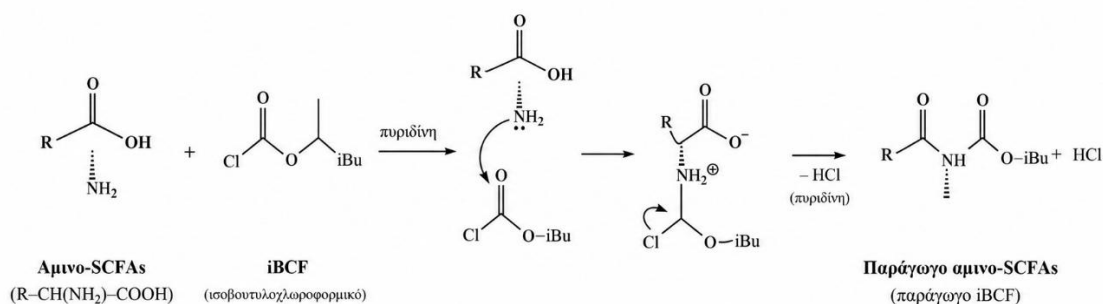
Για τα υδροξυ-SCFAs, εκτός από την καρβοξυλομάδα μπορεί να παραγωγοποιηθεί και η υδροξυλομάδα. Η παραγωγοποίηση της υδροξυλομάδας γίνεται με μία αντίδραση κατά την οποία η πυριδίνη απομακρύνει το υδρογόνο από την υδροξυλομάδα, καθιστώντας το οξυγόνο ισχυρότερο πυρηνόφιλο ώστε να αντιδράσει, στη συνέχεια, απευθείας με το iBCF, σχηματίζοντας τον εστέρα. Σε αυτή την αντίδραση η iBuOH δεν συμμετέχει.

Για τα αμινο-SCFAs, η παραγωγοποίηση της αμινομάδας πραγματοποιείται χωρίς τη συμμετοχή της iBuOH. Η αμινομάδα αντιδρά απευθείας με το iBCF σχηματίζοντας τον καρβαμιδικό εστέρα όπως φαίνεται στην **Εικόνα 15**. Αυτό γίνεται επειδή το άζωτο έχει ελεύθερο ζεύγος ηλεκτρονίων, καθιστώντας το ισχυρό πυρηνόφιλο. Η πυριδίνη στη συγκεκριμένη αντίδραση εξουδετερώνει το HCl που παράγεται, διότι σε αντίθετη περίπτωση το HCl θα πρωτονίωνε τις υπόλοιπες ελεύθερες αμινομάδες των αναλυτών, οι οποίες θα έχαναν την πυρηνοφιλία τους και η αντίδραση δεν θα προχωρούσε.

Παρόμοιος είναι και ο μηχανισμός παραγωγοποίησης των αμινοξέων. Η καρβοξυλομάδα του αμινοξέος αντιδρά με τον iBCF παρουσία πυριδίνης για τον σχηματισμό ενός μικτού ανυδρίτη και η ισοβουτανόλη στη συνέχεια προσβάλλει τον ανυδρίτη, οδηγώντας στον σχηματισμό του ισοβουτυλεστέρα του αμινοξέος με ταυτόχρονη έκλυση CO₂. Επίσης, η αμινομάδα αντιδρά με το iBCF οδηγώντας σε παράγωγα τύπου N-ισοβουτυλοκαρβονυλίου. Τέλος, για τα αμινοξέα που έχουν και άλλες δραστικές ομάδες, όπως υδροξυλομάδες (π.χ. η σερίνη) ή θειολομάδες (π.χ. η κυστεΐνη), αυτές μπορούν, επίσης, να αντιδράσουν με τον iBCF σχηματίζοντας αντίστοιχα ανθρακικά ή θειοανθρακικά παράγωγα.



Εικόνα 14: Σχηματική απεικόνιση της αντίδρασης παραγωγοποίησης της καρβοξυλομάδας των SCFAs με iBCF, ισοβουτανόλη και καταλύτη πυριδίνη σε αλκαλικό περιβάλλον (Fu et al., 2022b).



Εικόνα 15: Σχηματική απεικόνιση της αντίδρασης παραγωγοποίησης της αμινομάδας των SCFAs με iBCF, ισοβουτανόλη και καταλύτη πυριδίνη σε αλκαλικό περιβάλλον.

Στον **Πίνακα ΠΑ-1** αναφέρονται τα κυριότερα θραύσματα του φάσματος μάζας κάθε αναλύτη και στις **Εικόνες Π-1 έως Π-26** παρατίθενται τα φάσματα μάζας των αναλυτών. Για τα παραγωγοποιημένα SCFAs δεν παρατηρήθηκε το μοριακό ιόν των παραγωγοποιημένων εστέρων. Ωστόσο, παρατηρήθηκε το θραύσμα με $m/z = 57$, το οποίο αποδίδεται στο iBCF που προστίθεται στην καρβοξυλομάδα. Για τα υποκατεστημένα (υδροξυ-, αμινο- και υδροξυ-αμινο-) SCFAs παρατηρήθηκε, επιπλέον, το θραύσμα με $m/z = 101$, το οποίο αντιστοιχεί στο iBCF που προστίθεται στην αμινομάδα ή/και στην υδροξυλομάδα. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι παραγωγοποιήθηκαν και οι υπόλοιπες χαρακτηριστικές ομάδες των αναλυτών.

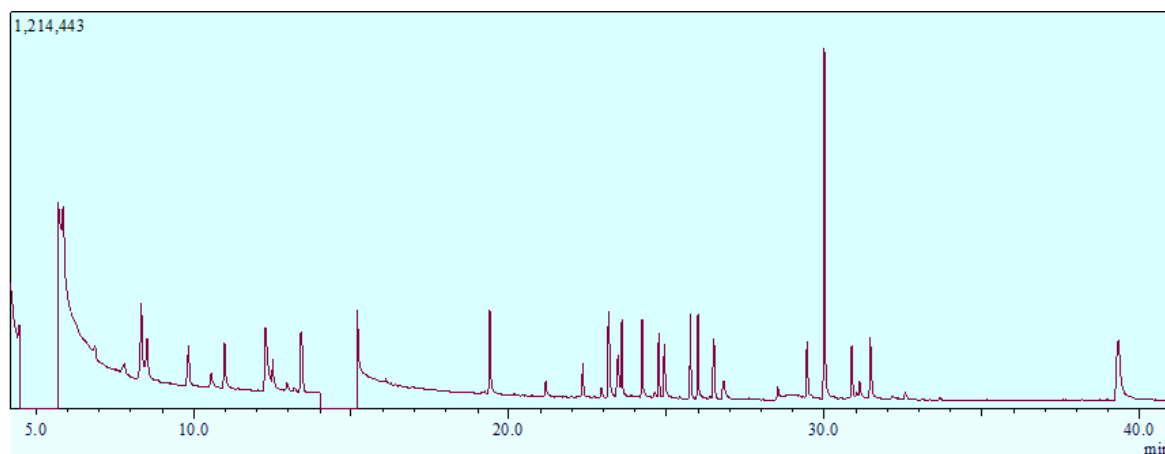
Όσον αφορά τα παραγωγοποιημένα αμινοξέα, για την L-αλανίνη, την γλυκίνη, το ασπαραγινικό οξύ, την L-προλίνη και για το γλουταμικό οξύ παρατηρήθηκε το μοριακό ιόν των παραγωγοποιημένων εστέρων. Επίσης, παρατηρήθηκε το θραύσμα με $m/z = 57$, το οποίο αποδίδεται στο iBCF που προστίθεται στην καρβοξυλομάδα. Στην

πλειονηφία των φασμάτων παρατηρήθηκε, επίσης, το θραύσμα που αποδίδεται στην παραγωγοποίηση της αμινομάδας. Τέλος, για το ασπαργινικό και το L-γλουταμικό οξύ παρατηρήθηκαν και τα θραύσματα για την παραγωγοποίηση και των δύο καρβοξυλομάδων και την παραγωγοποίηση της καρβοξυλομάδας και της αμινομάδας.

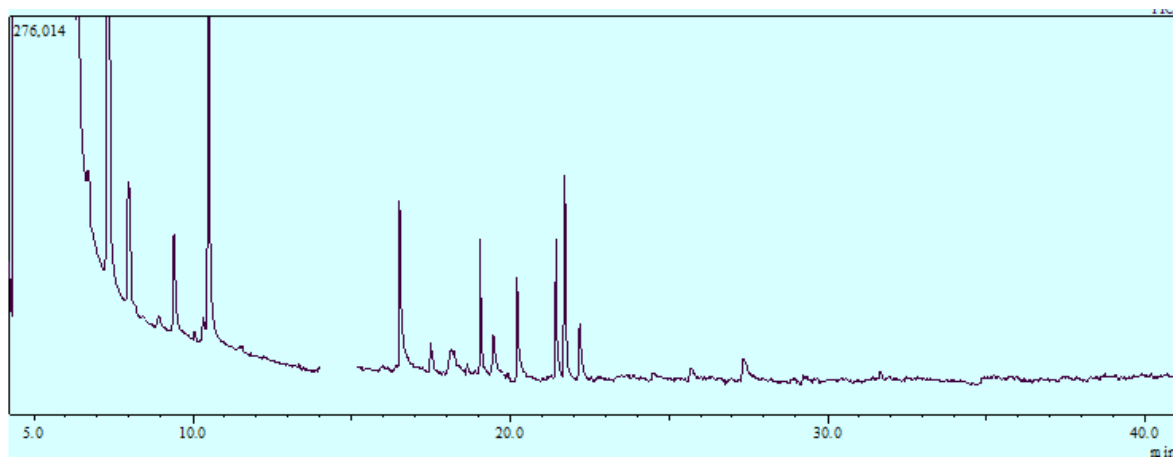
3.2 ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗΣ

Για τη σύγκριση του διαχωρισμού και του προσδιορισμού των παραγωγοποιημένων SCFAs και των αμινοξέων, πραγματοποιήθηκε η διαδικασία παραγωγοποίησης με δύο διαφορετικά αντιδραστήρια: τον χλωροφορμικό ισοβουτυλεστέρα και τον χλωροφορμικό αιθυλεστέρα, καθώς είναι δύο αντιδραστήρια με αλειφατικές αλυσίδες και με διαφορετικό μοριακό βάρος. Όπως αναμενόταν, η μορφή των δύο χρωματογραφήματων ήταν διαφορετική, όπως φαίνεται και στις **Εικόνες 16** και **17**. Η χρήση iBCF οδήγησε στο σχηματισμό παραγώγων με μεγαλύτερο μοριακό βάρος, με αποτέλεσμα την αύξηση των χρόνων κατακράτησης, τη βελτίωση της χρωματογραφικής ανάλυσης, τη μείωση των φαινομένων επικάλυψης και την παραγωγοποίηση και των 26 αναλυτών. Αντίθετα, η χρήση του χλωροφορμικού αιθυλεστέρα δεν οδήγησε στην παραγωγοποίηση όλων των αναλυτών και όπως φαίνεται στο χρωματογράφημα παρατηρήθηκε η εμφάνιση δύο μεγάλων κορυφών που αποδόθηκαν στην ισοβουτανόλη και την πυριδίνη, οι οποίες επικάλυπταν τις κορυφές του παραγωγοποιημένου φορμικού και οξικού οξέος. Για το λόγο αυτό, ως αντιδραστήριο παραγωγοποίησης χρησιμοποιήθηκε το iBCF.

Για το pH της αντίδρασης, η αρχική τιμή στο διάλυμα είναι ίση με 9,0. Με την προσθήκη της πυριδίνης η τιμή pH είναι 7,0 ενώ με την προσθήκη της ισοβουτανόλης η τιμή είναι ίση με 6,5. Τέλος, μετά την προσθήκη του iBCF το pH του διαλύματος παίρνει την τιμή 5,5 ακόμη κι αν προηγηθεί ρύθμιση με την προσθήκη HCl.



Εικόνα 16: Χρωματογράφημα GC-MS πρότυπου διαλύματος των παραγωγοποιημένων SCFAs και αμινοξέων, που λήφθηκε σε λειτουργία «σάρωσης» SCAN, με την χρήση του iBCF ως αντιδραστήριο παραγωγοποίησης.



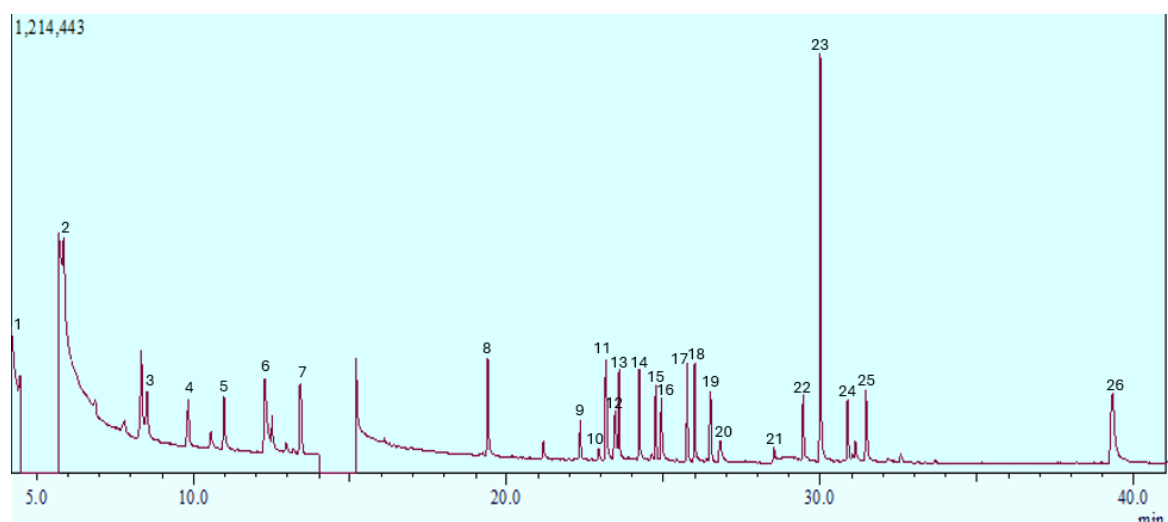
Εικόνα 17: Χρωματογράφημα GC-MS πρότυπου διαλύματος των παραγωγοποιημένων SCFAs και αμινοξέων που λήφθηκε σε λειτουργία «σάρωσης» SCAN, με την χρήση του χλωροφορμικού αιθυλεστέρα ως αντιδραστήριο παραγωγοποίησης.

3.3 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΑΝΑΛΥΤΩΝ

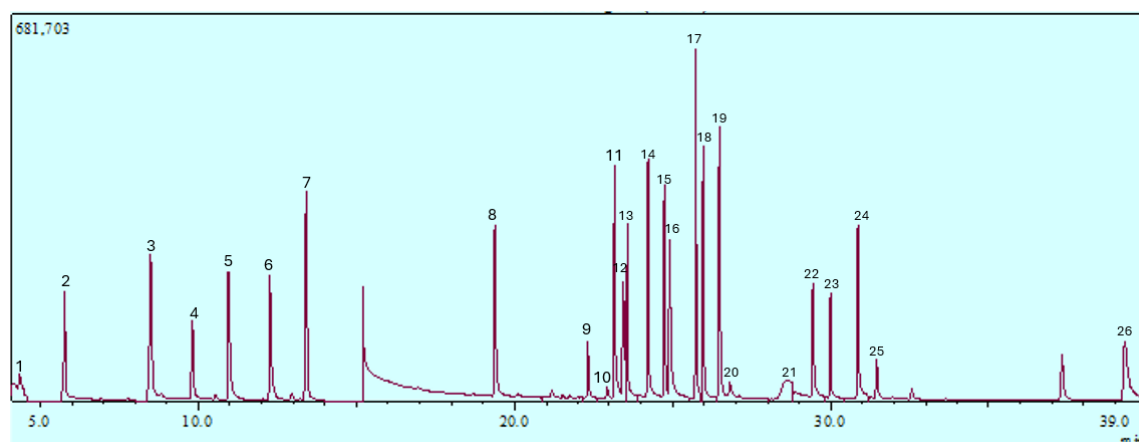
Η ταυτοποίηση των 26 αναλυτών πραγματοποιήθηκε με εγχύσεις πρότυπων διαλυμάτων από κάθε αναλύτη σε λειτουργία «σάρωσης» SCAN, με εύρος m/z 40-400. Στον **Πίνακα 4**, καταγράφονται οι χρόνοι κατακράτησης, η βασική κορυφή (αφθονία 100%) του κάθε φάσματος μάζας καθώς και τα θραύσματα των αναλυτών, που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίησή τους. Στην **Εικόνα 18**, παρουσιάζεται ένα χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος των παραγωγοποιημένων SCFAs και αμινοξέων που λήφθηκε υπό αυτές τις συνθήκες. Με βάση τα δεδομένα αυτά προγραμματίστηκε ο ανιχνευτής και στην **Εικόνα 19**, δίνεται το χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος των παραγωγοποιημένων SCFAs και αμινοξέων που λήφθηκε σε λειτουργία SIM. Στα βιολογικά δείγματα και τα δείγματα τροφίμων η ταυτοποίηση των αναλυτών έγινε επιπλέον και με τη συμφωνία των αναλογιών των θραυσμάτων με αποδεκτό εύρος απόκλισης το 30%.

Πίνακας 4: Χρόνοι κατακράτησης, βασική κορυφή και θραύσματα για την ταυτοποίηση για κάθε αναλύτη.

Αναλύτης	Χρόνος Κατακράτησης, min	<i>m/z</i> βασικής κορυφής	<i>m/z</i> θραυσμάτων για την ταυτοποίηση
φορμικό οξύ	4,17	56	60
οξικό οξύ	5,84	56	73
προπιονικό οξύ	8,54	57	75
ισοβουτυρικό οξύ	9,85	71	57
βουτυρικό οξύ	11,01	71	56
3-μεθυλοβουτυρικό οξύ	12,27	85	57
πεντανοϊκό οξύ	13,45	85	57
οκτανοϊκό οξύ	19,45	57	127
DL-β-υδροξυβουτυρικό οξύ	22,36	57	87
DL-2-υδροξυβουτυρικό οξύ	22,96	57	69
2-υδροξυπεντανοϊκό οξύ	23,62	57	73,101
2-αμινοβουτυρικό οξύ	24,26	158	57,102
DL-3 αμινοϊσοβουτυρικό οξύ	24,98	130	57,157
4-αμινο-3- υδροξυβουτυρικό οξύ	28,55	57	75,131
L-αλανίνη	23,17	144	57,88,116,44
γλυκίνη	23,45	57	130,102
L-βαλίνη	24,75	172	116,57,72
L-λευκίνη	25,75	186	57,86,130
L-ισολευκίνη	25,99	130	186,57,86
L-προλίνη	26,50	170	70,57,114,171
ασπαργίνη	26,82	57	69,169,113
L-μεθειονίνη	29,46	57	119,231
ασπαργινικό οξύ	30,00	57	240,88,144
L-γλουταμικό οξύ	30,88	57	57,120,74
L-φαινυλαλανίνη	31,47	148	202,102,84
L-λυσίνη	39,37	184	128,57,84



Εικόνα 18: Χρωματογράφημα GC-MS σε συνθήκες «σάρωσης» SCAN πρότυπου διαλύματος των παραγωγοποιημένων SCFAs και αμινοξέων, όπου οι αριθμοί των κορυφών αντιστοιχούν 1: φορμικό οξύ, 2: οξικό οξύ, 3: προπιονικό οξύ, 4: ισοβουτυρικό οξύ, 5: βουτυρικό οξύ, 6: 3-μέθυλοβουτυρικό οξύ, 7: πεντανοϊκό οξύ, 8: οκτανοϊκό οξύ, 9: DL-β-υδροξυβουτυρικό οξύ, 10: DL-2-υδροξυβουτυρικό οξύ, 11: L-αλανίνη, 12: L-γλυκίνη, 13: 2-υδροξυπεντανοϊκό οξύ, 14: (-)-2-αμινοβουτυρικό οξύ, 15: L-βαλίνη, 16: DL-3-αμινοϊσοβουτυρικό οξύ, 17: L-λευκίνη, 18: L-ισολευκίνη, 19: L-προλίνη, 20: (-)-ασπαραγίνη, 21: 4-αμινο-3-υδροξυβουτυρικό οξύ, 22: L-μεθειονίνη, 23: ασπαραγινικό οξύ, 24: L-γλουταμικό οξύ, 25: L-φαινυλαλανίνη, 26: L-λυσίνη.



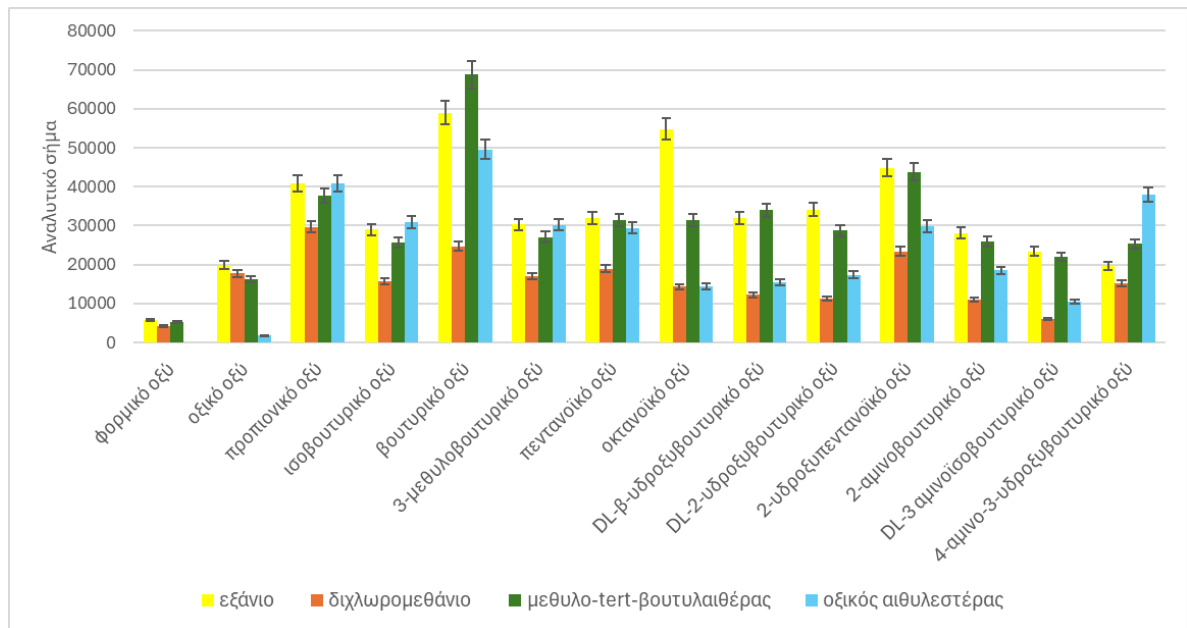
Εικόνα 19: Χρωματογράφημα GC-MS σε λειτουργία SIM προτύπου διαλύματος των παραγωγοποιημένων SCFAs και των αμινοξέων, όπου οι αριθμοί των κορυφών αντιστοιχούν 1: φορμικό οξύ, 2: οξικό οξύ, 3: προπιονικό οξύ, 4: ισοβουτυρικό οξύ, 5: βουτυρικό οξύ, 6: 3-μέθυλοβουτυρικό οξύ, 7: πεντανοϊκό οξύ, 8: οκτανοϊκό οξύ, 9: DL-β-υδροξυβουτυρικό οξύ, 10: DL-2-υδροξυβουτυρικό οξύ, 11: L-αλανίνη, 12: L-γλυκίνη, 13: 2-υδροξυπεντανοϊκό οξύ, 14: (-)-2-αμινοβουτυρικό οξύ, 15: L-βαλίνη, 16: DL-3-αμινοϊσοβουτυρικό οξύ, 17: L-λευκίνη, 18: L-ισολευκίνη, 19: L-προλίνη, 20: (-)-ασπαραγίνη, 21: 4-αμινο-3-υδροξυβουτυρικό οξύ, 22: L-μεθειονίνη, 23: ασπαραγινικό οξύ, 24: L-γλουταμικό οξύ, 25: L-φαινυλαλανίνη, 26: L-λυσίνη.

3.4 ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗΣ

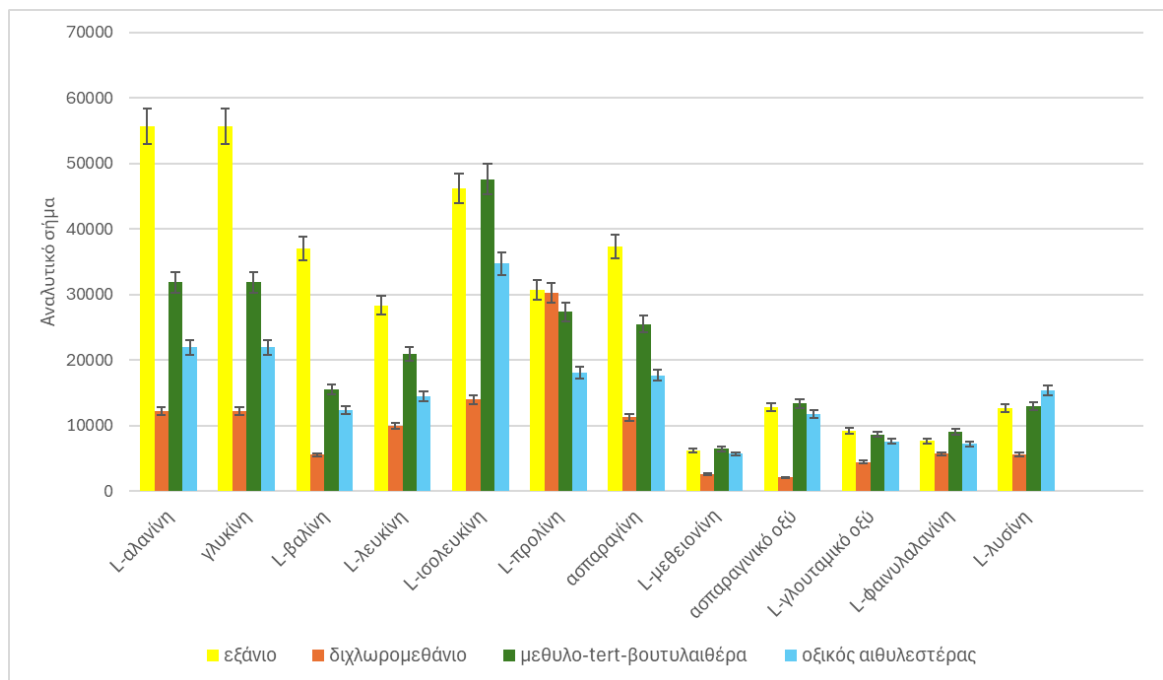
3.4.1 ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ

Για την αύξηση της απόδοσης εκχύλισης χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι διαλύτες: εξάνιο, διχλωρομεθάνιο, μεθυλο-*tert*-βουτυλαιθέρας και οξικό αιθυλεστέρα, καθώς είναι μη αναμίξιμοι με το νερό και έχουν διαφορετική πολικότητα (εξάνιο < μεθυλο-*tert*-βουτυλαιθέρας < οξικός αιθυλεστέρας < διχλωρομεθάνιο). Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 20**, για τα παραγωγοποιημένα SCFAs, τα αναλυτικά σήματα στο διχλωρομεθάνιο είναι μικρότερα σε σχέση με αυτά των άλλων διαλυτών. Αυτό οφείλεται στην αυξημένη διαλυτότητα του διχλωρομεθανίου στο νερό, με αποτέλεσμα ένα μέρος του διαλύτη - μαζί με ποσότητα των παραγωγοποιημένων SCFAs - να παραμένει διαλυτή στην υδατική φάση, οδηγώντας σε μειωμένο αναλυτικό σήμα. Ακολουθώς, στην περίπτωση του οξικού αιθυλεστέρα το παραγωγοποιημένο φορμικό οξύ δεν εμφάνισε ευκρινή κορυφή λόγω επικάλυψής της από τον ίδιο το διαλύτη, κάτι που οφείλεται στο μεγαλύτερο σημείο ζέσεως του οξικού αιθυλεστέρα σε σχέση με αυτό των υπόλοιπων διαλυτών. Συγκεκριμένα, μεγαλύτερα αναλυτικά σήματα παρατηρήθηκαν στο εξάνιο, με εξαίρεση το βουτυρικό και το DL-β-υδροξυβουτυρικό οξύ όπου τα μεγαλύτερα σήματα παρατηρήθηκαν στον μεθυλο-*tert*-βουτυλαιθέρα.

Για τα παραγωγοποιημένα αμινοξέα, όπως φαίνεται και από την **Εικόνα 21**, τα αναλυτικά σήματα είναι μικρότερα στο διχλωρομεθάνιο με εξαίρεση την L-ισολευκίνη. Τα μεγαλύτερα αναλυτικά σήματα παρατηρήθηκαν στο εξάνιο, με εξαίρεση τους αναλύτες L-λευκίνη και L-μεθειονίνη, όπου τα μεγαλύτερα σήματα παρατηρήθηκαν στον μεθυλο-*tert*-βουτυλαιθέρα. Ως διαλύτης εκχύλισης με βάση τα παραπάνω, επιλέχθηκε το εξάνιο.



Εικόνα 20: Αναλυτικά σήματα των παραγωγοποιημένων SCFAs στο εξάνιο, στο διχλωρομεθάνιο, στον μεθυλο-*tert*-βουτυλαιθέρα και στον οξικό αιθυλεστέρα. Ως αναλυτικό σήμα λήφθηκε το ύψος της χρωματογραφικής κορυφής του αναλύτη ως προς το ύψος της χρωματογραφικής κορυφής του εσωτερικού προτύπου.

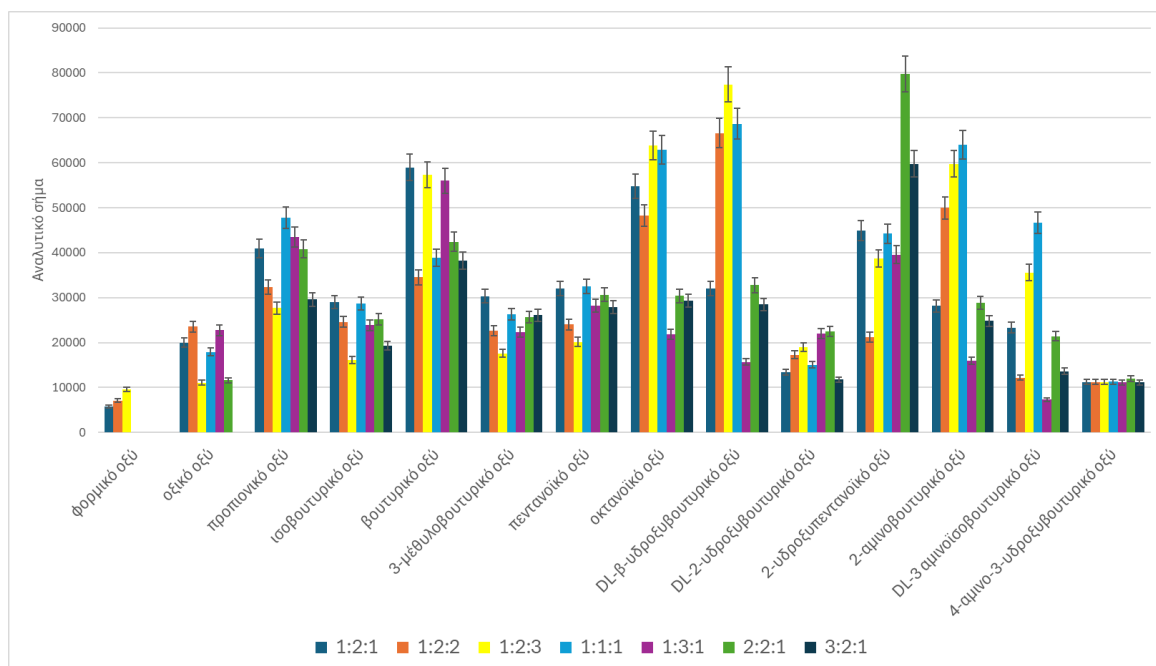


Εικόνα 21: Αναλυτικά σήματα των παραγωγοποιημένων αμινοξέων στο εξάνιο, στο διχλωρομεθάνιο, στον μεθυλο-*tert*-βουτυλαιθέρα και στον οξικό αιθυλεστέρα. Ως αναλυτικό σήμα λήφθηκε το ύψος της χρωματογραφικής κορυφής του αναλύτη ως προς το ύψος της χρωματογραφικής κορυφής του εσωτερικού προτύπου.

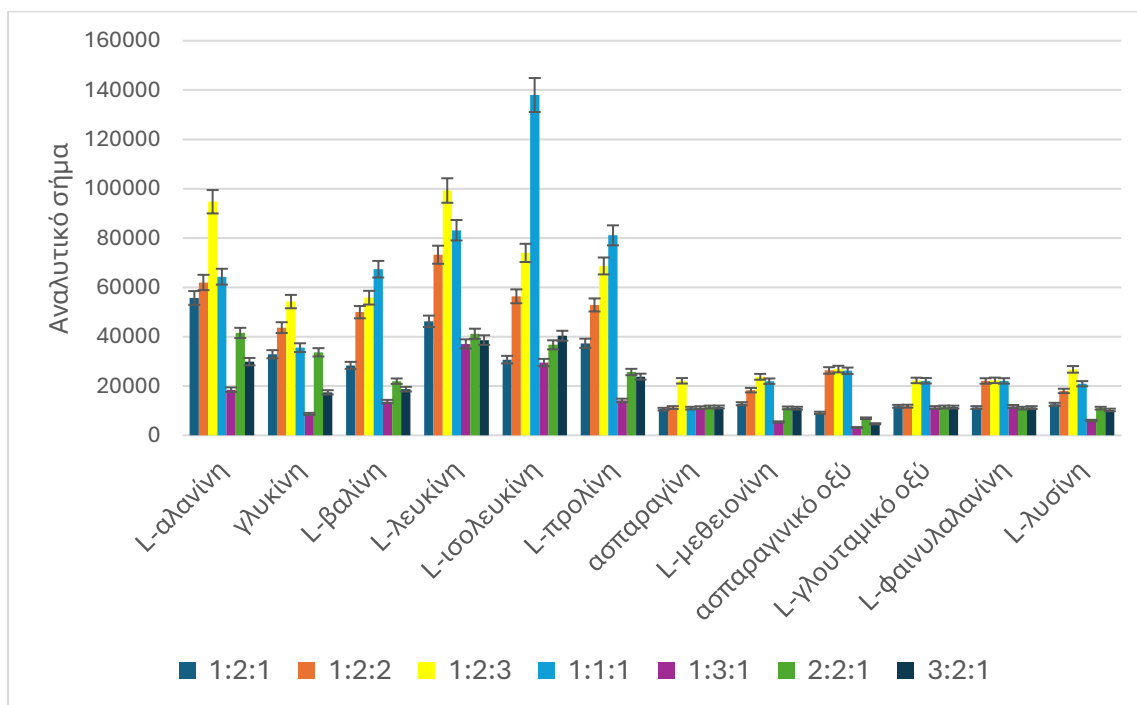
3.4.2 ΑΝΑΛΟΓΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ iBuOH:Py:iBCF

Για την αύξηση της απόδοσης αντίδρασης πραγματοποιήθηκαν δοκιμές σε διαφορετικές αναλογίες iBuOH :Py : iBCF ως εξής: 1:1:1, 1:2:1, 1:2:3, 2:2:1, 3:2:1, 1:2:2, 1:3:1. Όσον αφορά τα παραγωγοποιημένα SCFAs, στις αναλογίες 2:2:1 και 3:2:1 παρατηρήθηκε η εμφάνιση δύο μεγάλων κορυφών που κάλυπταν τις κορυφές του παραγωγοποιημένου φορμικού και οξικού οξέος με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση του προσδιορισμού τους. Οι κορυφές αυτές από τα φάσματα μάζας τους αποδόθηκαν στην ισοβουτανόλη και στην πυριδίνη αντίστοιχα. Επιπλέον, για τις αναλογίες 1:1:1 και 1:3:1 δεν παρατηρήθηκε κορυφή για το παραγωγοποιημένο φορμικό οξύ. Τέλος, όσον αφορά τις αναλογίες 1:2:2 και 1:2:3 η μορφή των κορυφών για το προπιονικό, το ισοβουτυρικό, το βουτυρικό, το 3-μεθυλοβουτυρικό και το πεντανοϊκό οξύ δεν ήταν συμμετρική. Στην **Εικόνα 22**, παρατηρήθηκε ότι για τα οξέα φορμικό, οξικό, προπιονικό, ισοβουτυρικό, βουτυρικό, 3-μεθυλοβουτυρικό, πεντανοϊκό εκτός του οκτανοϊκού, μεγαλύτερα αναλυτικά σήματα παρατηρήθηκαν στην αναλογία 1:2:1, αυξάνοντας την απόδοση της αντίδρασης. Τα υδροξυ- και αμινο-SCFAs εμφάνισαν μεγαλύτερα αναλυτικά σήματα στις αναλογίες 1:1:1 και 1:2:3, πιθανόν λόγω παραγωγοποίησης και των υδροξυλομάδων και των αμινομάδων που έχουν στη δομή τους.

Σε σχέση με τα παραγωγοποιημένα αμινοξέα, από την **Εικόνα 23** διαπιστώθηκε ότι η σύσταση 1:1:1 οδηγεί σε υψηλότερες αποδόσεις για τα περισσότερα αμινοξέα. Συγκεκριμένα, για τους αναλύτες L-ισολευκίνη, L-λευκίνη, L-βαλίνη και L-προλίνη παρατηρήθηκαν τα μεγαλύτερα σήματα στην αναλογία αυτή, επιβεβαιώνοντας ότι η συγκεκριμένη αναλογία ευνόησε τη σύνθεση διακλαδισμένων αμινοξέων. Τέλος, μικρότερα αναλυτικά σήματα παρατηρήθηκαν στις αναλογίες 1:3:1 και 3:2:1 για το σύνολο των αμινοξέων, υποδεικνύοντας μη ευνοϊκές συνθήκες για αύξηση της απόδοσης παραγωγοποίησης. Συμπερασματικά, ως καταλληλότερη αναλογία επιλέχθηκε η 1:2:1.



Εικόνα 22: Αναλυτικά σήματα των παραγωγοποιημένων SCFAs στις διαφορετικές αναλογίες iBuOH:Py:iBCF. Ως αναλυτικό σήμα λήφθηκε το ύψος της χρωματογραφικής κορυφής του αναλύτη ως προς το ύψος της χρωματογραφικής κορυφής του εσωτερικού προτύπου.



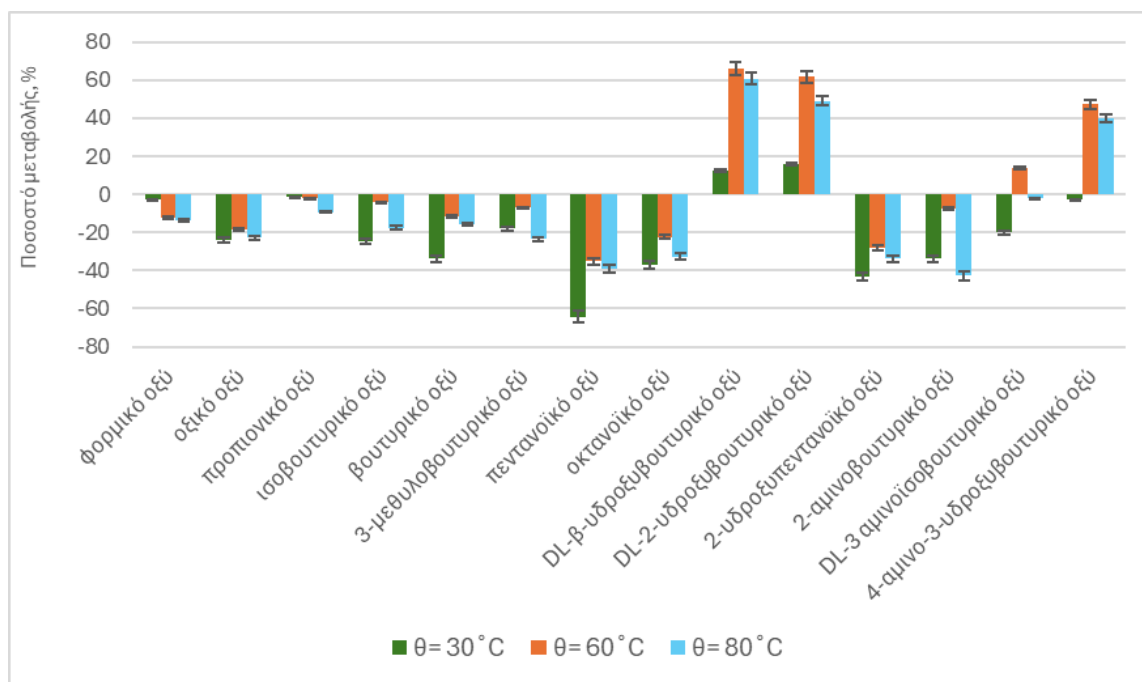
Εικόνα 23: Αναλυτικά σήματα των παραγωγοποιημένων αμινοξέων στις διαφορετικές αναλογίες iBuOH:Py:iBCF. Ως αναλυτικό σήμα λήφθηκε το ύψος της χρωματογραφικής κορυφής του αναλύτη ως προς το ύψος της χρωματογραφικής κορυφής του εσωτερικού προτύπου.

3.4.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗΣ

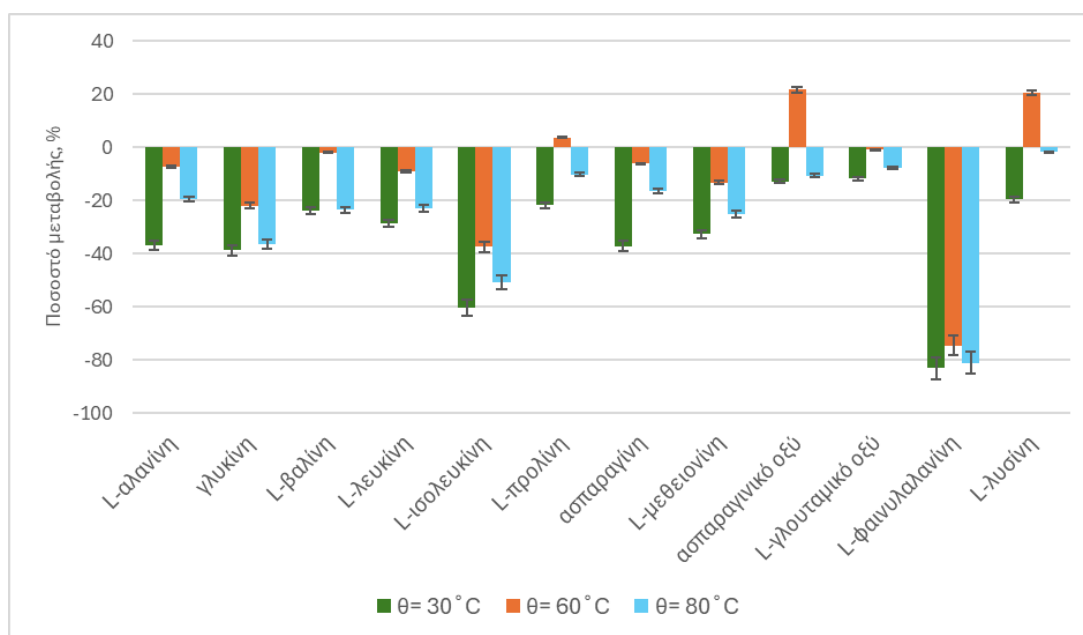
Για την μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας στην αύξηση απόδοσης παραγωγοποίησης πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες: 30°C, 60°C και 80°C. Μετά την προσθήκη iBCF σε πρότυπα διαλύματα παραγωγοποιημένων SCFAs και αμινοξέων και την απελευθέρωση του παραγόμενου αερίου, το φιαλίδιο με το περιεχόμενο μεταφέρθηκε σε υδατόλουτρο στις προαναφερθείσες θερμοκρασίες, όπου και παρέμεινε για 5 min. Στη συνέχεια, το φιαλίδιο αφέθηκε να έρθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, προστέθηκε 1 mL εξανίου και το δείγμα αναδεύτηκε στο vortex για 1 min. Συλλέχθηκε η εξανική φάση και έγινε έγχυση στο GC-MS.

Για τα παραγωγοποιημένα SCFAs, όπως φαίνεται και από την **Εικόνα 24**, για τους 30°C παρατηρήθηκε μείωση των αναλυτικών σημάτων για τα περισσότερα SCFAs σε σχέση με την θερμοκρασία περιβάλλοντος, με εξαίρεση το DL-2-υδροξυβουτυρικό και το DL-β-υδροξυβουτυρικό οξύ. Στους 60°C παρατηρήθηκε, επίσης, μείωση των αναλυτικών σημάτων για τα περισσότερα παραγωγοποιημένα SCFAs, πιθανόν λόγω αύξησης της πτητικότητά τους σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Εξαίρεση αποτέλεσαν το DL-2-υδροξυβουτυρικό, το DL-β-υδροξυβουτυρικό, το DL-3-αμινοϊσοβουτυρικό και το 4-άμινο-3-υδροξυβουτυρικό οξύ, για τα οποία παρατηρήθηκε αύξηση. Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και στους 80°C, με μείωση των αναλυτικών σημάτων για τα περισσότερα παραγωγοποιημένα SCFAs, κάτι που πιθανόν να οφείλεται σε θερμική αστάθεια των παραγώγων.

Σε σχέση με τα παραγωγοποιημένα αμινοξέα, όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 25**, παρατηρήθηκε μείωση των αναλυτικών σημάτων και στις τρεις θερμοκρασίες σε σχέση με τη θερμοκρασία περιβάλλοντος για την πλειοψηφία των αμινοξέων, μειώνοντας την απόδοση της αντίδρασης. Εξαίρεση αποτέλεσε η ασπαραγίνη, το ασπαραγινικό οξύ και η L-φαινυλαλανίνη, για τα οποία παρατηρήθηκε αύξηση στους 60°C. Από τα χρωματογραφήματα δεν διαπιστώθηκε η ύπαρξη κορυφών που να αποδίδονται σε πιθανή αποδόμηση των παραγώγων και σε παράπλευρες αντιδράσεις, όπως η αποκαρβοξυλίωση και η οξείδωση των αμινοξέων. Συμπερασματικά, η αύξηση της θερμοκρασίας οδήγησε σε μείωση της απόδοσης παραγωγοποίησης, γι' αυτό και επιλέχθηκε η θερμοκρασία περιβάλλοντος ως βέλτιστη για την παραγωγοποίηση.



Εικόνα 24: Ποσοστό μεταβολής (%) του αναλυτικού σήματος καθενός από τα παραγωγοποιημένα SCFAs στους 30°C, 60°C και 80°C σε σχέση με τη θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ως αναλυτικό σήμα λήφθηκε το ύψος της χρωματογραφικής κορυφής του αναλύτη ως προς το ύψος της χρωματογραφικής κορυφής του εσωτερικού προτύπου.



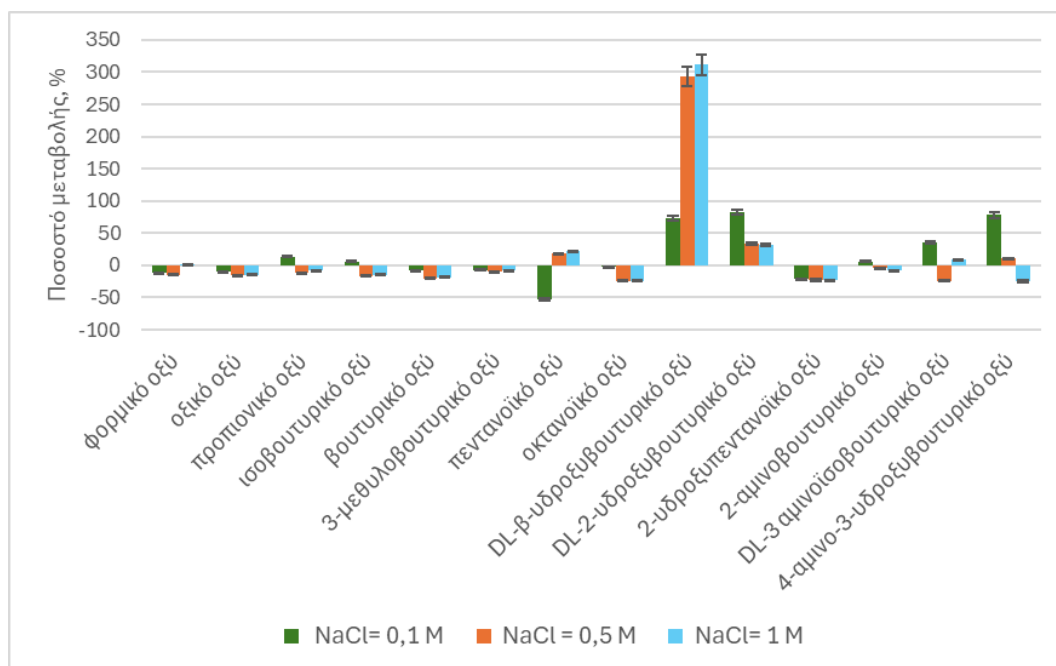
Εικόνα 25: Ποσοστό μεταβολής (%) του αναλυτικού σήματος καθενός από τα παραγωγοποιημένα αμινοξέα στους 30°C, 60°C και 80°C σε σχέση με τη θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ως αναλυτικό σήμα λήφθηκε το ύψος της χρωματογραφικής κορυφής του αναλύτη ως προς το ύψος της χρωματογραφικής κορυφής του εσωτερικού προτύπου.

3.4.4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΙΟΝΤΙΚΗΣ ΙΣΧΥΟΣ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗΣ

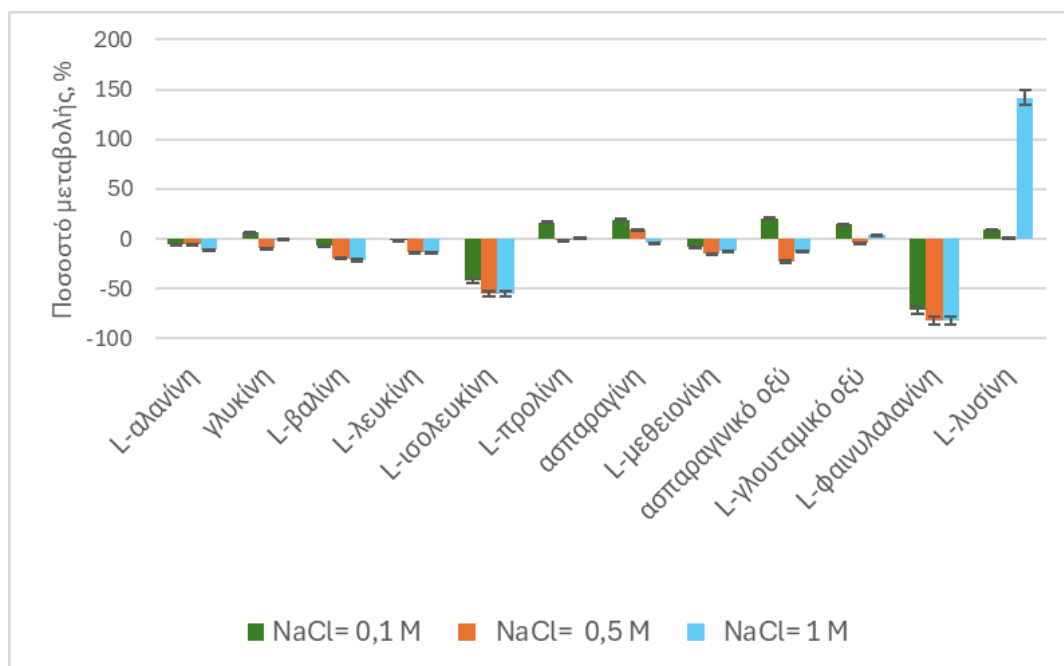
Για την αύξηση της απόδοσης της αντίδρασης παραγωγοποίησης, μελετήθηκε η επίδραση της ιοντικής ισχύος με την παρασκευή τριών πρότυπων διαλυμάτων, στα οποία προστέθηκε ο απαιτούμενος όγκος υδατικού διαλύματος NaCl 2 M ώστε στον τελικό όγκο της υδατικής φάσης η συγκέντρωση του NaCl να ήταν 0,1 M, 0,5 M και 1 M.

Για τα παραγωγοποιημένα SCFAs, όπως φαίνεται και από την **Εικόνα 26**, παρατηρήθηκε ότι η αύξηση της ιοντικής ισχύος οδήγησε σε μείωση των αναλυτικών σημάτων, σε σχέση με απουσία ρύθμισης. Τα SCFAs έχουν τιμή $pK_a \approx 4,8$ με εξαίρεση τα υδροξυ-SCFAs που η τιμή $pK_a \approx 3,6$ και τα άμινο- SCFAs που η τιμή $pK_a \approx 2,0$ για την καρβοξυλομάδα και $pK_a \approx 9,0$ για την αμινομάδα. Σε $pH = 5,5$ ($pH > pK_a$ της καρβοξυλομάδας) τα SCFAs βρίσκονται στη μη πρωτονιωμένη τους μορφή με αποτέλεσμα το σχηματισμό $Na^+ - RCOO^-$, μειώνοντας τη δραστηριότητα του καρβοξυλικού ανιόντος ως πυρηνόφιλου, οδηγώντας σε χαμηλότερη απόδοση παραγωγοποίησης. Εξαίρεση αποτέλεσε το πεντανοϊκό, το DL-2-υδροξυβουτυρικό, DL-3-αμινοϊσοβουτυρικό, το 4-αμινο-3-υδροξυβουτυρικό και το DL-β-υδροξυβουτυρικό οξύ, για τα οποία παρατηρήθηκε αύξηση λόγω εξαλάτωσης, ευνοώντας την απόδοση της αντίδρασης.

Όσον αφορά τα παραγωγοποιημένα αμινοξέα, στην **Εικόνα 27**, παρατηρήθηκε μείωση των αναλυτικών σημάτων με αύξηση της ιοντικής ισχύος για τα περισσότερα αμινοξέα. Σε $pH = 5,5$ τα περισσότερα αμινοξέα είναι στη διιοντική μορφή, καθώς η καρβοξυλομάδα βρίσκεται στην αποπρωτονιωμένη της μορφή ($pH > pK_{a1}$) και η αμινομάδα βρίσκεται στην πρωτονιωμένη της μορφή ($pH < pK_{a2}$). Με την προσθήκη NaCl, τα ιόντα του άλατος μειώνουν τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ιόντων των αμινοξέων, αυξάνοντας τη διαλυτότητά τους στην υδατική φάση, με αποτέλεσμα τη μείωση της απόδοσης αντίδρασης. Εξαίρεση αποτέλεσε η γλυκίνη, η L-προλίνη, η ασπαραγίνη, το ασπαραγινικό οξύ, το L-γλουταμικό οξύ και η L-φαινυλαλανίνη, που παρατηρήθηκε αύξηση. Συνοψίζοντας, δεν έγινε ρύθμιση της ιοντικής ισχύος κατά την προετοιμασία των δειγμάτων.



Εικόνα 26: Ποσοστό μεταβολής (%) του αναλυτικού σήματος καθενός από τα παραγωγοποιημένα SCFAs σε 0,1 M, 0,5 M και 1 M NaCl σε σχέση με απουσία προσθήκης. Ως αναλυτικό σήμα λήφθηκε το ύψος της χρωματογραφικής κορυφής του αναλύτη ως προς το ύψος της χρωματογραφικής κορυφής του εσωτερικού προτύπου.



Εικόνα 27: Ποσοστό μεταβολής (%) του αναλυτικού σήματος καθενός από τα παραγωγοποιημένα αμινοξέα σε 0,1 M, 0,5 M και 1 M NaCl σε σχέση με απουσία προσθήκης. Ως αναλυτικό σήμα λήφθηκε το ύψος της χρωματογραφικής κορυφής του αναλύτη ως προς το ύψος της χρωματογραφικής κορυφής του εσωτερικού προτύπου.

3.5 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

3.5.1 ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ, ΓΡΑΜΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ, LOD ΚΑΙ LOQ

Για την κατασκευή των καμπύλων βαθμονόμησης πραγματοποιήθηκαν εγχύσεις προτύπων διαλυμάτων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και υπολογίστηκε ο λόγος υψών με βάση το εσωτερικό πρότυπο καθώς και ο συντελεστής προσδιορισμού (R^2). Στον **Πίνακα 5** αναγράφονται οι εξισώσεις των καμπύλων βαθμονόμησης καθώς και το R^2 που κυμάνθηκε από 0,9859 έως 0,9992. Η γραμμικότητα κυμάνθηκε σε ένα εύρος διαφορετικό για κάθε αναλύτη, η οποία αναγράφεται στον **Πίνακα 6**. Στον ίδιο **Πίνακα** αναφέρονται τα Όρια Ανίχνευσης (LODs) κάθε αναλύτη που κυμάνθηκαν από 0,011 έως 2,7 μg/mL καθώς και τα Όρια Ποσοτικοποίησης (LOQs), τα οποία κυμάνθηκαν από 0,033 έως 8,0 μg/mL.

Πίνακας 5: Εξισώσεις των καμπύλων βαθμονόμησης των SCFAs και των αμινοξέων και οι συντελεστές προσδιορισμού (R^2).

Αναλύτης	Εξίσωση καμπύλης βαθμονόμησης	R^2
φορμικό οξύ	$y = 0,07x + 0,32$	0,9882
οξικό οξύ	$y = 0,32x - 0,012$	0,9901
προπιονικό οξύ	$y = 4,48x + 0,80$	0,9980
ισοβουτυρικό οξύ	$y = 2,43x + 0,30$	0,9959
βουτυρικό οξύ	$y = 3,06x + 0,68$	0,9937
3-μεθυλοβουτυρικό οξύ	$y = 3,30x + 0,39$	0,9954
πεντανοϊκό οξύ	$y = 5,10x + 0,74$	0,9979
οκτανοϊκό οξύ	$y = 2,44x + 0,55$	0,9937
DL-β-υδροξυβουτυρικό οξύ	$y = 2,86x - 0,32$	0,9981
DL-2-υδροξυβουτυρικό οξύ	$y = 0,09x - 0,09$	0,9959
2-υδροξυπεντανοϊκό οξύ	$y = 2,92x + 0,40$	0,9909
2-αμινοβουτυρικό οξύ	$y = 1,91x - 0,74$	0,9960
DL-3 αμινοϊσοβουτυρικό οξύ	$y = 1,39x - 0,10$	0,9948
4-αμινο-3-υδροξυβουτυρικό οξύ	$y = 0,05x + 0,08$	0,9991
L-αλανίνη	$y = 7,58x + 1,13$	0,9901
γλυκίνη	$y = 1634x - 55$	0,9859
L-βαλίνη	$y = 1,54x - 0,15$	0,9942
L-λευκίνη	$y = 4,08x + 0,51$	0,9902
L-ισολευκίνη	$y = 3,26x - 0,81$	0,9915
L-προλίνη	$y = 2,12x - 0,56$	0,9929
ασπαραγγίνη	$y = 0,19x - 0,11$	0,9958
L-μεθειονίνη	$y = 1,96x - 0,43$	0,9950
ασπαραγινικό οξύ	$y = 1,53x - 0,01$	0,9951
L-γλουταμικό οξύ	$y = 0,09x - 0,02$	0,9948
L-λυσίνη	$y = 0,11x - 0,06$	0,9840
L-φαινυλαλανίνη	$y = 2,21x - 0,27$	0,9992

Πίνακας 6: Όρια ποσοτικοποίησης (LOQs), όρια ανίχνευσης (LODs) και γραμμική περιοχή για κάθε αναλύτη.

Αναλύτης	Όριο ποσοτικοποίησης (LOQ)	Όριο ανίχνευσης (LOD)	Γραμμική περιοχή (μg/mL)
φορμικό οξύ	3,2	1,1	3,2 - 13
οξικό οξύ	0,22	0,073	0,22 – 7
προπιονικό οξύ	0,22	0,073	0,22 - 13
ισοβουτυρικό οξύ	0,033	0,011	0,033 - 13
βουτυρικό οξύ	0,11	0,037	0,11 - 13
3-μεθυλοβουτυρικό οξύ	0,11	0,073	0,11 – 11
πεντανοϊκό οξύ	0,22	0,073	0,22 - 13
οκτανοϊκό οξύ	0,54	0,18	0,54 - 13
DL-β-υδροξυβουτυρικό οξύ	0,32	0,11	0,32 – 15
DL-2-υδροξυβουτυρικό νάτριο	8,0	2,7	8,0 – $1,0 \times 10^2$
2-υδροξυπεντανοϊκό οξύ	0,26	0,11	0,26 - 13
2-αμινοβουτυρικό οξύ	1,1	0,35	1,1 – 17
DL-3-αμινοϊσοβουτυρικό οξύ	1,1	0,35	1,1 – 17
4-αμινο-3-υδροξυβουτυρικό οξύ	8,0	2,7	8,0 – 93
L-αλανίνη	0,32	0,11	0,32 - 13
γλυκίνη	3,2	1,1	3,2 – 17
L-βαλίνη	0,32	0,11	0,32 - 15
L-λευκίνη	0,11	0,04	0,11 – 9
L-ισολευκίνη	0,22	0,073	0,22 - 13
L-προλίνη	0,22	0,073	0,22 – 11
ασπαραγγίνη	6,6	2,2	6,6 – 19
L-μεθειονίνη	1,0	0,35	1,0 – 17
ασπαραγινικό οξύ	0,32	0,11	0,32 - 15
L-γλουταμικό οξύ	4,3	1,4	4,3 – 19
L-λυσίνη	3,2	1,1	3,2 - 13
L-φαινυλαλανίνη	0,22	0,073	0,22 - 13

3.5.2 ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ

Για την επαναληψιμότητα πραγματοποιήθηκαν τέσσερις αναλύσεις ($n=4$) δειγμάτων ούρων, σιέλου, κοπράνων και αυγού την ίδια μέρα και υπολογίστηκε η σχετική τυπική απόκλιση (%RSD intra-day). Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται και από τους **Πίνακες ΠΑ-2 έως ΠΑ-5**, για τα βιολογικά δείγματα η επαναληψιμότητα κυμάνθηκε από 0,1% έως 6,5% και για το δείγμα του αυγού από 0,7% έως 4,5%. Ακολούθως, για την αναπαραγωγιμότητα πραγματοποιήθηκαν τέσσερις αναλύσεις ($n=4$) των ίδιων δειγμάτων για τρεις διαδοχικές ημέρες και υπολογίστηκε η σχετική τυπική απόκλιση (%RSD inter-day), η οποία για τα βιολογικά δείγματα κυμάνθηκε από 0,01% έως 7,6% και για το δείγμα αυγού από 2,0% έως 9,7%. Για τον υπολογισμό της επαναληψιμότητας και της αναπαραγωγιμότητας πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός των πραγματικών δειγμάτων με πρότυπα διαλύματα των αναλυτών, ώστε η τελική συγκέντρωση στην υδατική φάση να ήταν 5 $\mu\text{g/mL}$.

3.5.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΗΤΡΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΚΤΗΣΕΙΣ

Για τον υπολογισμό της επίδρασης της μήτρας και των ανακτήσεων πραγματοποιήθηκαν εγχύσεις δειγμάτων σιέλου, ούρων, κοπράνων και αυγού, τα οποία είχαν εμβολιαστεί με πρότυπα διαλύματα των αναλυτών σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις για τον καθένα. Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται και από τους **Πίνακες ΠΑ-6 έως ΠΑ-9** για τα βιολογικά δείγματα η επίδραση της μήτρας κυμάνθηκε από 99% έως 108% και η ανάκτηση από 90% έως 115%, ενώ για το δείγμα αυγού η επίδραση της μήτρας κυμάνθηκε από 98% έως 117% και η ανάκτηση από 95% έως 113%.

3.6 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΕ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

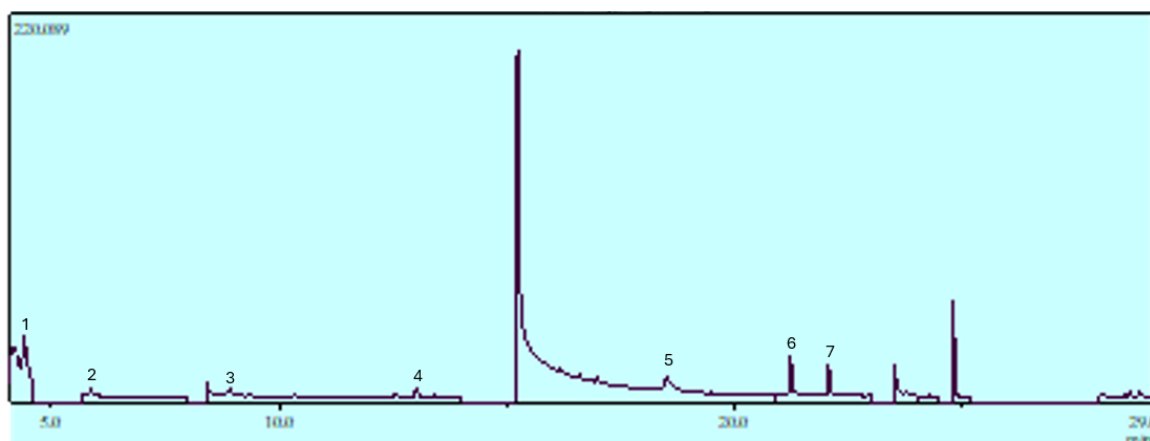
3.6.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ SCFAs ΚΑΙ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΛΥΟΦΙΛΙΩΜΕΝΩΝ ΑΥΓΩΝ

Η παραπάνω μέθοδος εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των SCFAs και των αμινοξέων σε τρία δείγματα λυοφιλιωμένων αυγών από όρνιθες ορνιθοτροφείου. Όπως φαίνεται και στον **Πίνακα 7** αλλά και στις **Εικόνες 28** και **29** και στα τρία δείγματα ανιχνεύθηκαν τα οξέα: φορμικό, οξικό, προπιονικό, πεντανοϊκό, οκτανοϊκό, DL-β-υδροξυβουτυρικό και 2-αμινοβουτυρικό. Το ισοβουτυρικό και το 4-αμινο-3-υδροξυβουτυρικό οξύ ανιχνεύθηκαν μόνο σε ένα από τα τρία δείγματα.

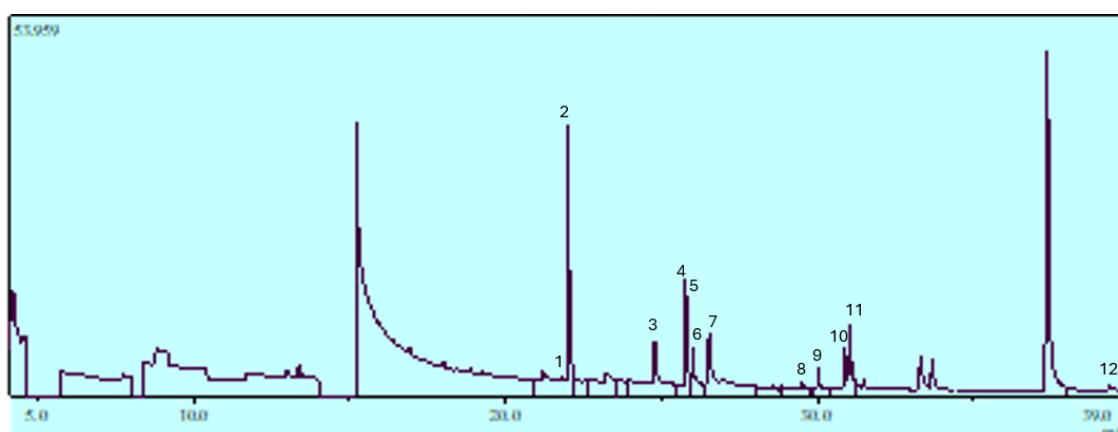
Όσον αφορά τα αμινοξέα, ανιχνεύθηκαν όλα και στα τρία δείγματα με εξαίρεση τη γλυκίνη, η οποία ανιχνεύθηκε μόνο στο ένα από τα τρία δείγματα. Όπως είναι γνωστό, το ασπράδι του αυγού περιέχουν υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες (1 αυγό περιέχει περίπου 6-7 g πρωτεΐνης) (Puglisi & Fernandez, 2022), κάτι που διαπιστώθηκε και από τον προσδιορισμό της πλειοψηφίας των αμινοξέων στα δείγματα.

Πίνακας 7: Συγκεντρώσεις των SCFAs και των αμινοξέων, σε $\mu\text{g/mL}$, σε δείγματα λυοφιλιωμένων αυγών.

Αναλύτης	Συγκέντρωση Δείγματος 1 ($\mu\text{g/ mL}$)	Συγκέντρωση Δείγματος 2 ($\mu\text{g/ mL}$)	Συγκέντρωση Δείγματος 3 ($\mu\text{g/ mL}$)
φορμικό οξύ	$10 \pm 0,2$	$7,2 \pm 0,2$	$8,0 \pm 0,2$
οξικό οξύ	$0,8 \pm 0,2$	$5,6 \pm 0,2$	$5,7 \pm 0,2$
προπιονικό οξύ	$1,0 \pm 0,1$	$4,4 \pm 0,1$	$4,5 \pm 0,1$
ισοβουτυρικό οξύ	$0,04 \pm 0,1$	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
βουτυρικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
3-μεθυλοβουτυρικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
πεντανοϊκό οξύ	$0,3 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,2$
οκτανοϊκό οξύ	$3,1 \pm 0,5$	$6,8 \pm 0,5$	$6,5 \pm 0,5$
DL-β-υδροξυβουτυρικό οξύ	$0,3 \pm 0,5$	$0,4 \pm 0,5$	$0,5 \pm 0,5$
DL-2-υδροξυβουτυρικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
2-υδροξυπεντανοϊκό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
2-αμινοβουτυρικό οξύ	$1,7 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,1$
DL-3 αμινοϊσοβουτυρικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
4-αμινο-3-υδροξυβουτυρικό οξύ	$25,0 \pm 0,1$	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
L-αλανίνη	$0,6 \pm 0,2$	$0,3 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,2$
γλυκίνη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	$3,5 \pm 0,1$
L-βαλίνη	$0,4 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,1$	$8,1 \pm 0,1$
L-λευκίνη	$0,2 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,1$	$8,4 \pm 0,1$
L-ισολευκίνη	$0,3 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,1$	$3,7 \pm 0,1$
L- προλίνη	$0,3 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,2$	$6,1 \pm 0,2$
ασπαραγίνη	Μη ανιχνεύσιμη	$7,0 \pm 0,1$	$8,7 \pm 0,1$
L-μεθειονίνη	$1,2 \pm 0,2$	$1,5 \pm 0,2$	$1,9 \pm 0,1$
ασπαραγινικό οξύ	$0,4 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1$	$4,7 \pm 0,1$
L-γλουταμικό οξύ	$4,4 \pm 0,1$	$4,9 \pm 0,1$	$4,5 \pm 0,1$
L-λυσίνη	$3,7 \pm 0,1$	$4,1 \pm 0,1$	$4,0 \pm 0,1$
L-φαινυλαλανίνη	$0,2 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,2$	$5,8 \pm 0,2$



Εικόνα 28: Χρωματογράφημα GC-MS δείγματος αυγού όρνιθας που λήφθηκε, σε λειτουργία SIM, για τον προσδιορισμό των SCFAs, όπου οι αριθμοί αντιστοιχούν: 1: φορμικό οξύ, 2: οξικό οξύ, 3: προπιονικό οξύ, 4: πεντανοϊκό οξύ, 5: οκτανοϊκό οξύ, 6: DL-β-υδροξυβουτυρικό οξύ, 7: 2-αμινοβουτυρικό οξύ.



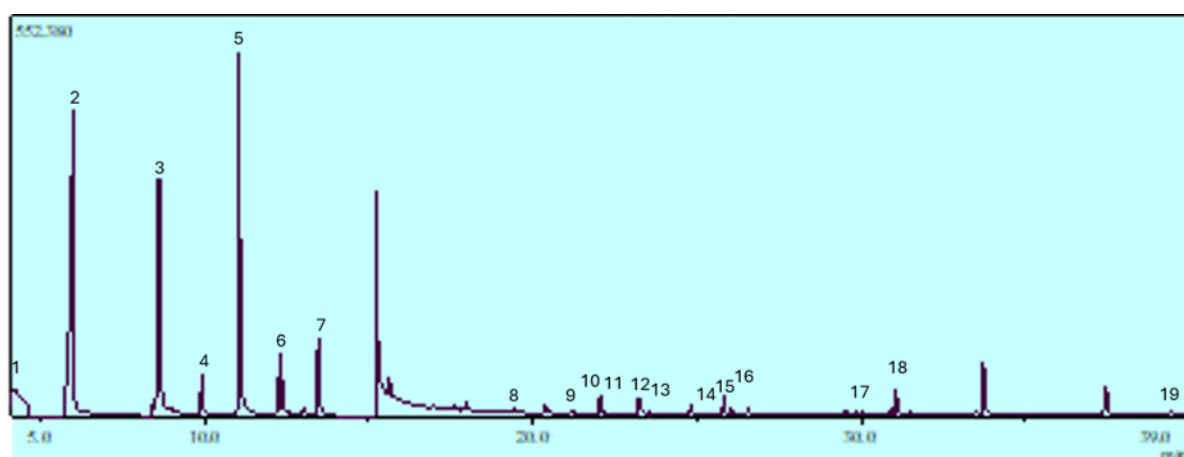
Εικόνα 29: Χρωματογράφημα GC-MS δείγματος αυγού όρνιθας που λήφθηκε, σε λειτουργία SIM, για τον προσδιορισμό των αμινοξέων, όπου οι αριθμοί αντιστοιχούν: 1: L-αλανίνη, 2: γλυκίνη, 3: L-βαλίνη, 4: L-λευκίνη, 5: L-ισολευκίνη, 6: L-προλίνη, 7: ασπαραγίνη, 8: L-μεθειονίνη, 9: ασπαραγινικό οξύ, 10: L-γλουταμικό οξύ, 11: L-φαινυλαλανίνη, 12: L-λυσίνη.

3.6.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ SCFAs ΚΑΙ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΟΠΡΑΝΩΝ ΟΡΝΙΘΑΣ ΚΑΙ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε, εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό των SCFAs και των αμινοξέων σε δείγματα κοπράνων όρνιθας και ανθρώπου. Στην **Εικόνα 30** παρατίθεται χρωματογράφημα δείγματος ανθρώπινων κοπράνων. Όπως φαίνεται στον **Πίνακα 8** όπου αναφέρονται οι συγκεντρώσεις των αναλυτών στα δύο δείγματα, τόσο στα κόπρανα της όρνιθας όσο και του ανθρώπου ανιχνεύθηκαν τα περισσότερα SCFAs (υποκατεστημένα και μη-), ενώ η πλειοψηφία των μελετούμενων αμινοξέων ανιχνεύθηκε και στα δύο δείγματα, με εξαίρεση την ασπαραγίνη, την L-μεθειονίνη και το L-γλουταμικό οξύ, τα οποία δεν ανιχνεύθηκαν στα κόπρανα του ανθρώπου.

Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η όρνιθα τρέφεται μόνο με φυτικές διαιτητικές ίνες και η δομή και η λειτουργία του γαστρεντερικού συστήματός της διαφέρει από αυτή του ανθρώπου. Στα πτηνά, η κύρια περιοχή μικροβιακής δραστηριότητας είναι τα τυφλά έντερα, όπου γίνεται η ζύμωση των υδατανθράκων, οδηγώντας σε παραγωγή SCFAs (Sergeant et al., 2014). Αντίθετα, στον άνθρωπο, η παραγωγή SCFAs λαμβάνει χώρα κυρίως στο κόλον του παχέος εντέρου μέσω της μικροβιακής ζύμωσης τόσο των φυτικών όσο και των ζωικών διαιτητικών ινών (Macfarlane & Macfarlane, 2003b).

Όσον αφορά τα αμινοξέα, στα πτηνά η πλειοψηφία των πρωτεϊνών απορροφάται στο λεπτό έντερο, με αποτέλεσμα μικρές ποσότητες αμινοξέων να φτάνουν στο παχύ έντερο (Liu et al., 2021). Αντίθετα, στον άνθρωπο, μέρος των πρωτεϊνών, οι οποίες δεν μπορούν να μεταβολιστούν από τα ένζυμα του λεπτού εντέρου, φτάνουν στο παχύ έντερο όπου και διασπώνται παράγοντας ελεύθερα αμινοξέα (Marchesi et al., 2016).



Εικόνα 30: Χρωματογράφημα GC-MS δείγματος κοπράνων ανθρώπου που λήφθηκε σε λειτουργία SIM, όπου οι αριθμοί αντιστοιχούν: 1: φορμικό οξύ, 2: οξικό οξύ, 3: προπιονικό οξύ, 4: ισοβουτυρικό οξύ, 5: βουτυρικό οξύ, 6: 3-μεθυλοβουτυρικό οξύ, 7: πεντανοϊκό οξύ, 8: οκτανοϊκό οξύ, 9: DL-β-υδροξυβουτυρικό οξύ, 10: L-αλανίνη, 11: γλυκίνη, 12: 2-αμινοβουτυρικό οξύ, 13: L-βαλίνη, 14: L-λευκίνη, 15: L-ισολευκίνη, 16: L-προλίνη, 17: ασπαραγινικό οξύ, 18: L-φαινυλαλανίνη, 19: L-λυσίνη.

Πίνακας 8: Συγκεντρώσεις των SCFAs και των αμινοξέων, σε µg/mL, σε δείγματα κοπράνων όρνιθας και ανθρώπου.

Αναλύτης	Συγκέντρωση σε κόπρανα όρνιθας (µg/ mL)	Συγκέντρωση σε κόπρανα ανθρώπου (µg/ mL)
φορμικό οξύ	9,5 ± 0,1	12,1 ± 0,1
οξικό οξύ	6,2 ± 0,1	12,1 ± 0,1
προπιονικό οξύ	12,1 ± 0,9	11,1 ± 0,9
ισοβουτυρικό οξύ	6,3 ± 0,3	4,3 ± 0,3
βουτυρικό οξύ	9,8 ± 0,3	12,1 ± 0,4
3-μεθυλοβουτυρικό οξύ	6,6 ± 0,1	3,4 ± 0,1
πεντανοϊκό οξύ	0,2 ± 0,1	2,5 ± 0,1
οκτανοϊκό οξύ	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1
DL-β-υδροξυβουτυρικό οξύ	2,3 ± 0,1	0,1 ± 0,1
DL-2-υδροξυβουτυρικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
2-υδροξυπεντανοϊκό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
2-αμινοβουτυρικό οξύ	2,0 ± 0,1	1,1 ± 0,1
DL-3 αμινοϊσοβουτυρικό οξύ	1,5 ± 0,1	Μη ανιχνεύσιμο
4-αμινο-3- υδροξυβουτυρικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
L-αλανίνη	7,5 ± 0,1	4,7 ± 0,1
γλυκίνη	5,0 ± 0,1	16,1 ± 0,1
L-βαλίνη	5,4 ± 0,1	4,3 ± 0,1
L-λευκίνη	2,9 ± 0,1	2,5 ± 0,1
L-ισολευκίνη	1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1
L-προλίνη	1,2 ± 0,1	2,2 ± 0,1
ασπαράγίνη	7,2 ± 0,2	Μη ανιχνεύσιμη
L-μεθειονίνη	1,5 ± 0,1	Μη ανιχνεύσιμη
ασπαραγινικό οξύ	5,9 ± 0,1	0,6 ± 0,1
L-γλουταμικό οξύ	10,1 ± 0,1	Μη ανιχνεύσιμη
L-λυσίνη	4,0 ± 0,1	11,1 ± 0,1
L-φαινυλαλανίνη	1,9 ± 0,1	1,4 ± 0,1

3.5.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ ΚΑΦΕ ΣΤΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΩΝ SCFAs ΚΑΙ ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΣΤΟ ΣΙΕΛΟ ΚΑΙ ΣΤΑ ΟΥΡΑ

Η κατανάλωση καφέ επηρεάζει το μικροβίωμα του εντέρου έχοντας άμεση επίδραση στις συγκεντρώσεις των διάφορων μεταβολιτών όπως τα SCFAs και τα αμινοξέα. Δεδομένα μελετών σε δείγματα κοπράνων ανθρώπων και ζώων μετά την κατανάλωση καφέ, έχουν δείξει αύξηση των βακτηρίων που σχετίζονται με την παραγωγή SCFAs με αποτέλεσμα την αύξηση των συγκεντρώσεών τους (Saygili et al., 2024a). Αυτό οφείλεται στην καφεΐνη, στις πολυφαινόλες καθώς και σε άλλα μη εύπεπτα συστατικά του καφέ όπως τα χλωρογενικά οξέα, που φτάνουν στο παχύ έντερο και υφίστανται ζύμωση από το μικροβίωμα (Rosa et al., 2024; Saygili et al., 2024b). Στο σίελο, τα SCFAs παράγονται από τα βακτήρια της στοματικής κοιλότητας. Ο καφές έχει άμεση επαφή με το μικροβίωμα του στόματος, επηρεάζοντας το pH με αποτέλεσμα μεταβολές στις συγκεντρώσεις των SCFAs (Oktanuli et al., 2023). Στα ούρα, η κατανάλωση καφέ, συνήθως, αυξάνει τη συγκέντρωσή των SCFAs, όχι σε τόσο μεγάλο βαθμό όπως στα κόπρανα καθώς τα SCFAs επηρεάζονται ισχυρά από την νεφρική λειτουργία (Hussain et al., 2021).

Όσον αφορά τα αμινοξέα, η καφεΐνη αυξάνει την παραγωγή της αδρεναλίνης, η οποία επηρεάζει το μεταβολισμό των αμινοξέων. Παράλληλα, τα χλωρογενικά οξέα, επηρεάζουν τον μεταβολισμό της γλυκόζης και της ινσουλίνης, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την πρόσληψη των αμινοξέων στους ιστούς, με αποτέλεσμα μεταβολές των συγκεντρώσεών τους στο αίμα (Cornelis et al., 2011; Graham, n.d.; Tsuda et al., 2019). Στο σίελο, ο καφές επηρεάζει άμεσα τη στοματική μικροχλωρίδα, μεταβάλλοντας τη συγκέντρωση των αμινοξέων όπως της προλίνης, της γλυκίνης και της αλανίνης, τα οποία σχετίζονται με τη λειτουργία των πρωτεϊνών του σιέλου και την αντιοξειδωτική άμυνα (Dame et al., 2015a). Στα ούρα, η κατανάλωση του καφέ σχετίζεται με αυξημένη απέκκριση ορισμένων αμινοξέων και παραγώγων τους, όπως της γλυκίνης και της ιστιδίνης, πιθανόν λόγω μεταβολής του μεταβολισμού τους στο ήπαρ. Τέλος, η διουρητική δράση του καφέ μπορεί να επηρεάσει τη συγκέντρωση των αμινοξέων εφόσον τα ούρα υφίσταται περαιτέρω αραίωση (Rothwell et al., 2014).

Στην παρούσα διπλωματική εργασία παρατηρήθηκε η επίδραση του καφέ πριν την κατανάλωση και σε διάστημα τριών ωρών από αυτήν σε δείγματα σιέλου και ούρων. Συγκεκριμένα, στις **Εικόνες 31 και 32** παρατηρούνται οι ποσοστιαίες μεταβολές των συγκεντρώσεων των SCFAs και των αμινοξέων για το 1^ο δείγμα σιέλου. Αντίστοιχα στις **Εικόνες 33 και 34** παρατηρούνται οι ποσοστιαίες μεταβολές των συγκεντρώσεων των SCFAs και των αμινοξέων για το 2^ο δείγμα σιέλου ενώ στις **Εικόνες 35 και 36** για το 3^ο δείγμα. Τα δείγματα λήφθηκαν από τον ίδιο εθελοντή σε τρεις διαφορετικές ημέρες. Ακολούθως, στις **Εικόνες 37 και 38** παρατηρούνται οι ποσοστιαίες μεταβολές των συγκεντρώσεων των SCFAs και των αμινοξέων για το 1^ο δείγμα ούρων ενώ στις **Εικόνες 39 και 40** για το 2^ο δείγμα. Παράλληλα, στους **Πίνακες 9 έως 11** αναφέρονται οι συγκεντρώσεις των SCFAs και των αμινοξέων πριν την κατανάλωση του καφέ και στην άροδο τριών ωρών μετά την κατανάλωση για το 1^ο, 2^ο και 3^ο δείγμα σιέλου. Κατά τον ίδιο τρόπο, στους **Πίνακες 12 και 13** αναγράφονται οι συγκεντρώσεις των SCFAs και των αμινοξέων για το 1^ο και το 2^ο δείγμα ούρων.

Όσον αφορά τα δείγματα σιέλου, για τα SCFAs την 1^η ώρα μετά την κατανάλωση καφέ παρατηρήθηκε αύξηση των συγκεντρώσεων και στα τρία δείγματα (1^ο, 2^ο και 3^ο). Εξαιρέσεις αποτέλεσαν το οξικό οξύ στο 3^ο δείγμα, καθώς και το DL-β-υδροξυβουτυρικό και το 2-αμινοβουτυρικό οξύ στο 2^ο δείγμα που καταγράφηκε μείωση. Τα δεδομένα αυτά οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η κατανάλωση καφέ αύξησε τις συγκεντρώσεις των περισσότερων SCFAs, καθώς και της δραστηριότητας ή/και της αφθονίας των βακτηρίων που τα παράγουν στο σιέλο. Για την 2^η ώρα, στο 1^ο δείγμα παρατηρήθηκε μείωση των συγκεντρώσεων για το σύνολο των SCFAs, κάτι το οποίο δεν επιβεβαιώθηκε στα άλλα δύο δείγματα, όπου καταγράφηκαν διακυμάνσεις. Τέλος, για την 3^η ώρα παρατηρήθηκαν αυξομειώσεις και στα τρία δείγματα (1^ο, 2^ο και 3^ο), χωρίς σαφές επαναλαμβανόμενο πρότυπο, με εξαίρεση το φορμικό οξύ, που εμφάνισε αύξηση και στα τρία δείγματα. Τέλος, παρατηρήθηκε ότι στο 1^ο δείγμα οι ποσοστιαίες μεταβολές που αφορούν στο βουτυρικό οξύ για την 2^η και την 3^η ώρα αλλά και στο 2^ο δείγμα οι ποσοστιαίες μεταβολές που αφορούν στο ισοβουτυρικό οξύ για την 1^η και την 2^η ώρα αλλά και στο 3^ο δείγμα οι ποσοστιαίες μεταβολές που αφορούν στο οξικό οξύ για την 1^η και την 2^η ώρα και για την 2^η και την 3^η ώρα και για την 1^η και την 3^η ώρα αλλά και οι ποσοστιαίες μεταβολές που αφορούν στο DL-2-υδροξυβουτυρικό οξύ για την 1^η και 2^η ώρα, για την 2^η και την 3^η ώρα και για την 1^η και την 3^η ώρα, οι ποσοστιαίες μεταβολές που αφορούν στο προπιονικό και στο βουτυρικό οξύ για την 1^η και την 2^η ώρα καθώς και οι ποσοστιαίες μεταβολές που αφορούν στο DL-β-υδροξυβουτυρικό οξύ για την 1^η και την 2^η ώρα, για την 2^η και την 3^η ώρα αλλά και για την 1^η και την 3^η ώρα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά.

Σε σχέση με τα αμινοξέα, για την 1^η ώρα μετά την κατανάλωση του καφέ παρατηρήθηκε μείωση των συγκεντρώσεων για τα περισσότερα αμινοξέα και στα τρία δείγματα. Εξαιρέσεις αποτέλεσαν η L-φαινυλαλανίνη στο 1^ο και στο 3^ο δείγμα καθώς και η L-αλανίνη, η L-βαλίνη και η L-λευκίνη στο 3^ο δείγμα, και η L-προλίνη στο 2^ο και στο 3^ο δείγμα, που παρουσίασαν αύξηση. Την 2^η ώρα παρατηρήθηκε παρόμοιο μοτίβο, με γενικευμένη μείωση των συγκεντρώσεων. Εξαίρεση του μοτίβου αποτέλεσε το ασπαργινικό οξύ στο 3^ο δείγμα, που παρατηρήθηκε αύξηση. Την 3^η ώρα παρατηρήθηκαν διακυμάνσεις χωρίς σαφές και επαναλαμβανόμενο πρότυπο. Μοναδική εξαίρεση αποτέλεσε η L-προλίνη, η οποία παρουσίασε αύξηση και στα τρία δείγματα. Τέλος, παρατηρήθηκε ότι για το 1^ο δείγμα οι ποσοστιαίες μεταβολές που αφορούν στην L-βαλίνη για την 2^η και την 3^η ώρα και οι ποσοστιαίες μεταβολές που αφορούν στην L-προλίνη για την 1^η και την 2^η ώρα αλλά και για το 2^ο δείγμα οι ποσοστιαίες μεταβολές που αφορούν στην L-αλανίνη για την 1^η και την 2^η ώρα και για την 2^η και την 3^η ώρα και για την 1^η και την 3^η ώρα αλλά και οι ποσοστιαίες μεταβολές που αφορούν στην γλυκίνη για την 1^η και την 2^η ώρα και οι ποσοστιαίες μεταβολές που αφορούν στην L-λευκίνη για την 2^η και την 3^η ώρα και οι ίδιες που αφορούν την L-ισολευκίνη διαφέρουν στατιστικά σημαντικά.

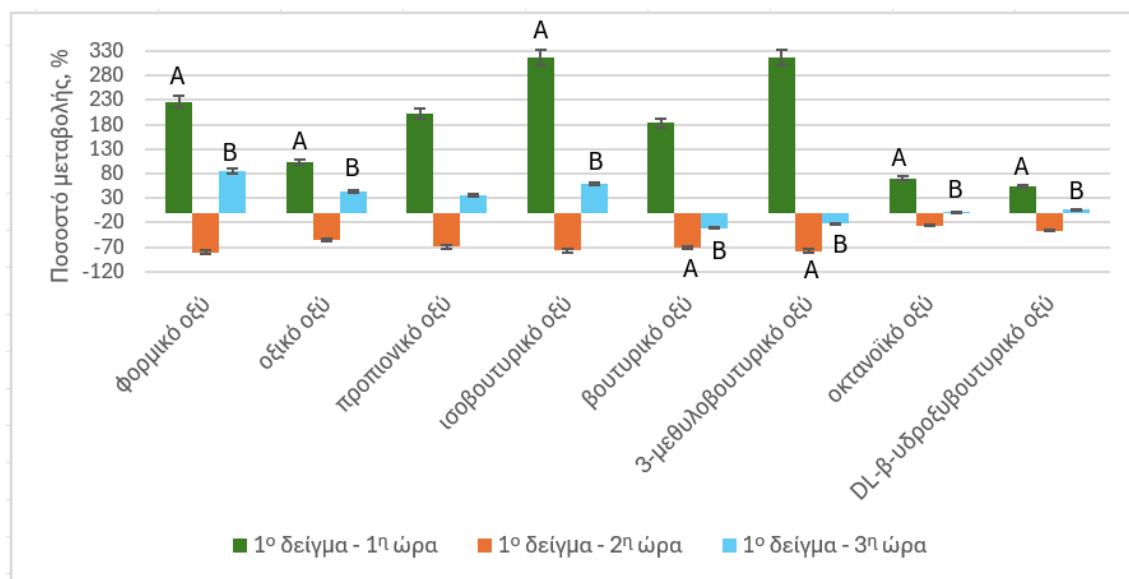
Όσον αφορά τα δείγματα ούρων, για τα SCFAs παρατηρήθηκε μείωση των συγκεντρώσεων και στα τρία δείγματα. Εξαίρεση αποτέλεσε το οκτανοϊκό οξύ στο 2^ο δείγμα, για το οποίο καταγράφηκε αύξηση της τάξης του 1%. Την 2^η ώρα παρατηρήθηκαν διακυμάνσεις χωρίς σαφές επαναλαμβανόμενο πρότυπο. Εξαιρέσεις αποτέλεσαν το βουτυρικό οξύ που εμφάνισε αύξηση και το DL-2-υδροξυβουτυρικό οξύ που παρουσίασε μείωση και στα δύο δείγματα. Τέλος, την 3^η ώρα καταγράφηκαν

αυξομειώσεις μεταξύ των δύο δειγμάτων, χωρίς σταθερό μοτίβο, με εξαίρεση το βουτυρικό οξύ που εμφάνισε αύξηση. Τέλος, παρατηρήθηκε ότι για το 1^ο δείγμα οι ποσοστιαίες μεταβολές που αφορούν στο οξικό και στο DL-β-υδροξυβουτυρικό οξύ για την 2^η και την 3^η ώρα και για την 1^η και την 3^η ώρα αλλά και οι ποσοστιαίες μεταβολές που αφορούν στο 2-αμινοβουτυρικό οξύ για την 1^η και την 2^η ώρα αλλά και για την 2^η και την 3^η ώρα και οι ποσοστιαίες μεταβολές που αφορούν στο DL-3-αμινοϊσοβουτυρικό οξύ για την 1^η και την 2^η ώρα αλλά και για το 2^ο δείγμα οι ποσοστιαίες μεταβολές που αφορούν στο DL-β-υδροξυβουτυρικό οξύ για την 1^η και την 2^η ώρα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά.

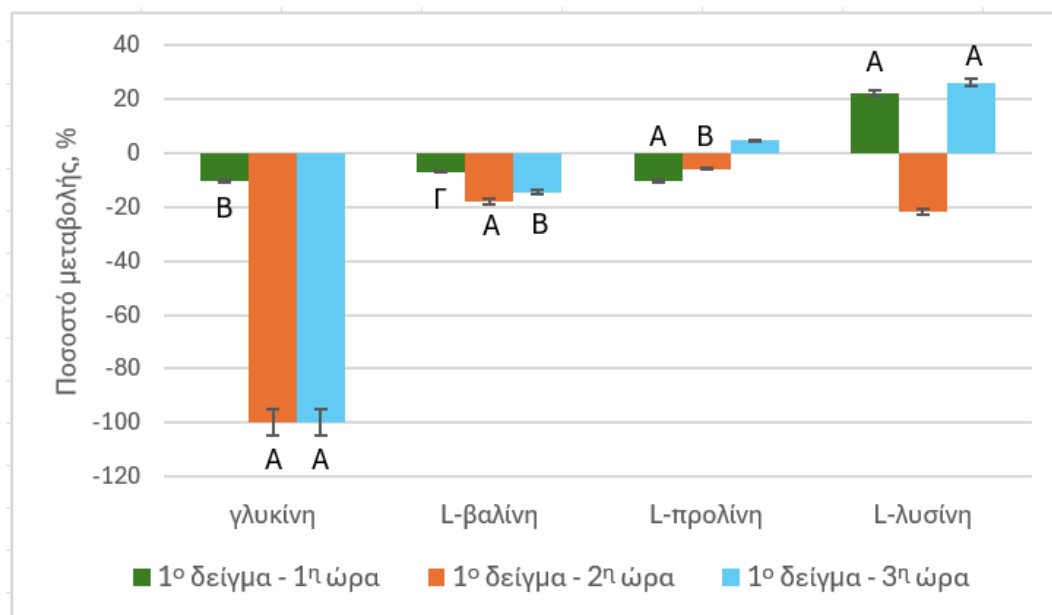
Σε ότι αφορά τα αμινοξέα, για την 1^η ώρα παρατηρήθηκε μείωση όλων των αμινοξέων και στα δύο δείγματα. Αντίστοιχα, για την 2^η ώρα παρατηρήθηκε ίδια συμπεριφορά. Για την 3^η ώρα παρατηρήθηκε, επίσης, μείωση και στα δύο δείγματα (1^ο και 2^ο). Εξαιρέσεις αποτέλεσαν η L-βαλίνη, η L-λευκίνη και η L-λυσίνη που παρουσίασαν μέγιστη αύξηση 14%. Τα δεδομένα αυτά οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι ο καφές λόγω της διουρητικής του ικανότητας μείωσε την συγκέντρωση των αμινοξέων στα ούρα. Τέλος, παρατηρήθηκε ότι για το 1^ο δείγμα οι ποσοστιαίες μεταβολές που αφορούν στην L-βαλίνη για την 1^η και την 2^η ώρα και την 2^η και την 3^η ώρα αλλά και οι ποσοστιαίες μεταβολές που αφορούν στην L-λευκίνη για την 1^η και την 2^η ώρα αλλά και για την 1^η και την 3^η ώρα αλλά και οι ποσοστιαίες μεταβολές που αφορούν στην ασπαραγίνη για την 1^η και τη 2^η ώρα και την 2^η και την 3^η ώρα αλλά και για την 1^η και 3^η ώρα, για το 2^ο δείγμα οι ποσοστιαίες μεταβολές που αφορούν στην L-αλανίνη για την 1^η και την 2^η ώρα και την 2^η και την 3^η ώρα αλλά και για την 1^η και την 3^η ώρα και οι ποσοστιαίες μεταβολές που αφορούν στην γλυκίνη για την 1^η και την 2^η ώρα αλλά και οι ίδιες που αφορούν στην L-προλίνη, στην ασπαραγίνη και στην L-λυσίνη διαφέρουν στατιστικά σημαντικά.

Πίνακας 9: Συγκεντρώσεις των SCFAs και των αμινοξέων, σε $\mu\text{g/mL}$, πριν την κατανάλωση καφέ και σε πάροδο των τριών ωρών για το 1^ο δείγμα σιέλου.

Αναλυτής	Συγκέντρωση πριν την κατανάλωση καφέ ($\mu\text{g/mL}$)	Συγκέντρωση 1 ώρα μετά την κατανάλωση καφέ ($\mu\text{g/mL}$)	Συγκέντρωση 2 ώρες μετά την κατανάλωση καφέ ($\mu\text{g/mL}$)	Συγκέντρωση 3 ώρες μετά την κατανάλωση καφέ ($\mu\text{g/mL}$)
φορμικό οξύ	$8,0 \pm 0,2$	$13,0 \pm 0,2$	$5,0 \pm 0,2$	$10,8 \pm 0,2$
οξικό οξύ	$3,1 \pm 0,5$	$6,4 \pm 0,5$	$2,8 \pm 0,5$	$4,5 \pm 0,5$
προπιονικό οξύ	$8,3 \pm 0,1$	$13,0 \pm 0,1$	$7,7 \pm 0,1$	$11,3 \pm 0,1$
ισοβουτυρικό οξύ	$0,3 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$
βουτυρικό οξύ	$0,6 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$
3-μεθυλοβουτυρικό οξύ	$1,0 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,1$
πεντανοϊκό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
οκτανοϊκό οξύ	$0,8 \pm 0,6$	$1,4 \pm 0,6$	$1,0 \pm 0,6$	$0,8 \pm 0,6$
DL-β-υδροξυβουτυρικό οξύ	$0,4 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$
DL-2-υδροξυβουτυρικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
2-υδροξυπεντανοϊκό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
2-αμινοβουτυρικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
DL-3 αμινοϊσοβουτυρικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
4-αμινο-3-υδροξυβουτυρικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
L-αλανίνη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη
γλυκίνη	$3,1 \pm 0,6$	$3,5 \pm 0,6$	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη
L-βαλίνη	$0,4 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,1$
L-λευκίνη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη
L-ισολευκίνη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη
L-προλίνη	$0,4 \pm 0,7$	$0,4 \pm 0,7$	$0,4 \pm 0,7$	$0,5 \pm 0,7$
ασπαργίνη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη
L-μεθειονίνη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη
ασπαργινικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη
L-γλουταμικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη
L-λυσίνη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη
L-φαινυλαλανίνη	$0,5 \pm 0,4$	$0,6 \pm 0,4$	$0,4 \pm 0,4$	$0,6 \pm 0,4$



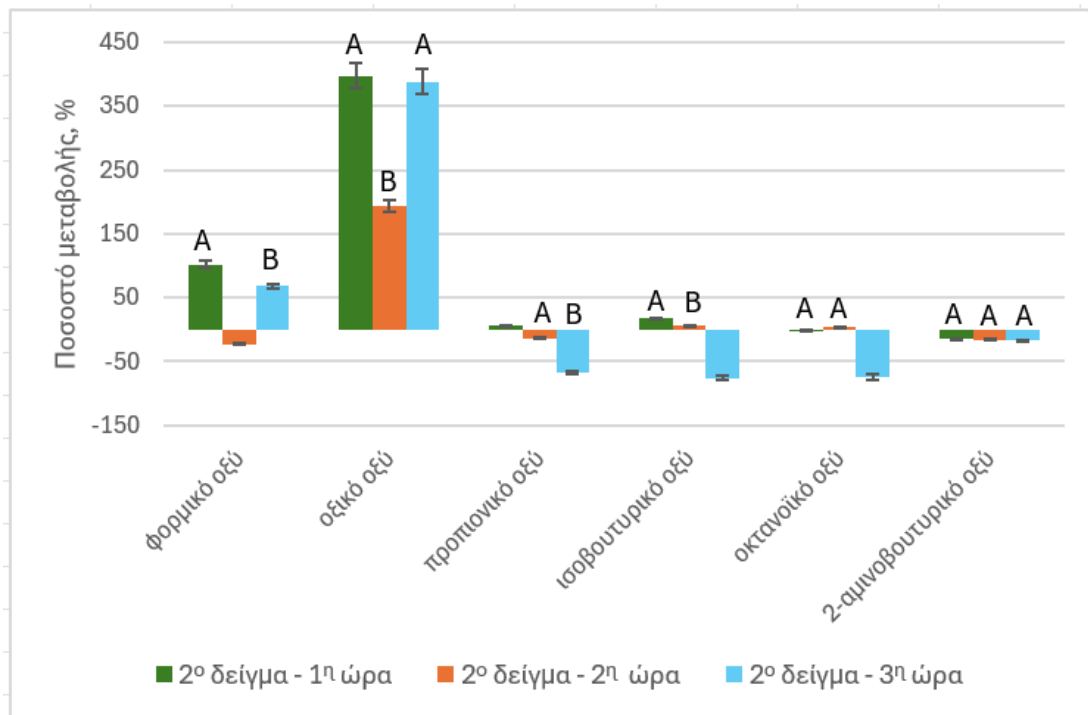
Εικόνα 31: Ποσοστό μεταβολής (%) της συγκέντρωσης καθενός από τα SCFAs σε σχέση με την κατανάλωση καφέ σε πάροδο τριών ωρών για το 1^ο δείγμα σιέλου. Το ίδιο γράμμα δείχνει ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p>0,05$).



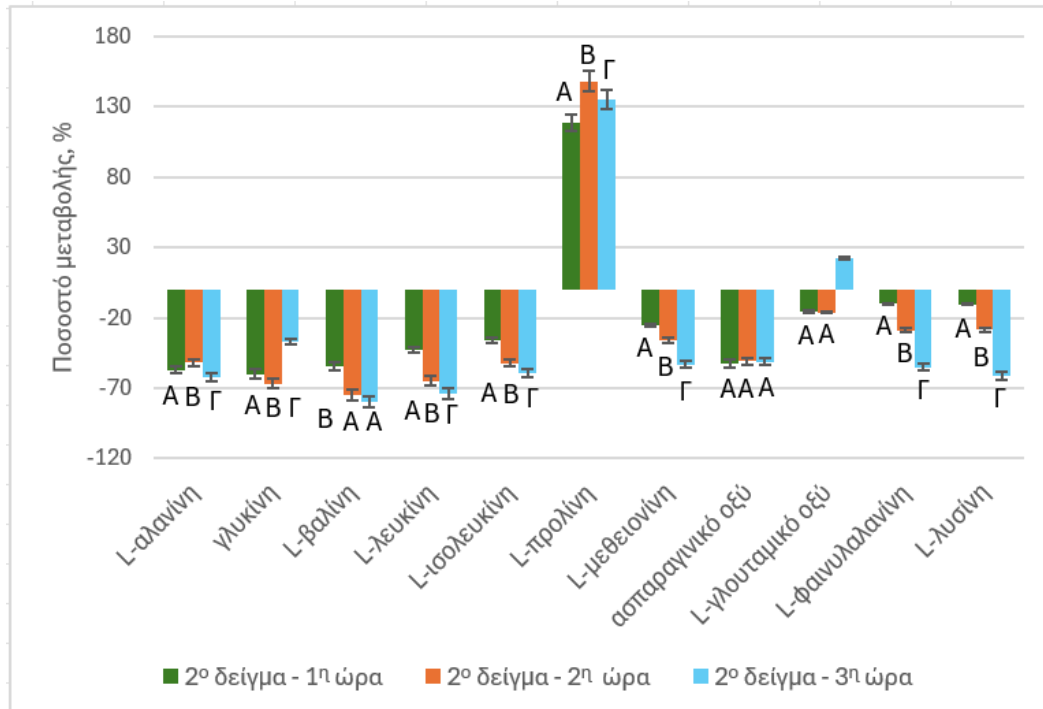
Εικόνα 32: Ποσοστό μεταβολής (%) της συγκέντρωσης καθενός από τα αμινοξέα σε σχέση με την κατανάλωση καφέ σε πάροδο τριών ωρών για το 1^ο δείγμα σιέλου. Το ίδιο γράμμα δείχνει ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p>0,05$).

Πίνακας 10: Συγκεντρώσεις των SCFAs και των αμινοξέων, σε $\mu\text{g/mL}$, πριν την κατανάλωση καφέ και σε πάροδο των τριών ωρών για το 2^ο δείγμα σιέλου.

Αναλυτής	Συγκέντρωση πριν την κατανάλωση καφέ ($\mu\text{g/mL}$)	Συγκέντρωση 1 ώρα μετά την κατανάλωση καφέ ($\mu\text{g/mL}$)	Συγκέντρωση 2 ώρες μετά την κατανάλωση καφέ ($\mu\text{g/mL}$)	Συγκέντρωση 3 ώρες μετά την κατανάλωση καφέ ($\mu\text{g/mL}$)
φορμικό οξύ	$0,6 \pm 0,2$	$12,0 \pm 0,2$	$4,3 \pm 0,2$	$9,3 \pm 0,2$
οξικό οξύ	$1,8 \pm 0,5$	$6,0 \pm 0,5$	$5,2 \pm 0,5$	$7,0 \pm 0,5$
προπιονικό οξύ	$8,1 \pm 0,1$	$8,6 \pm 0,1$	$7,1 \pm 0,1$	$2,7 \pm 0,1$
ισοβουτυρικό οξύ	$0,5 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,1$
βουτυρικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
3-μεθυλοβουτυρικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
πεντανοϊκό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
οκτανοϊκό οξύ	$1,2 \pm 0,6$	$1,3 \pm 0,6$	$1,3 \pm 0,6$	$0,3 \pm 0,6$
DL-β-υδροξυβουτυρικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
DL-2-υδροξυβουτυρικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
2-υδροξυπεντανοϊκό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
2-αμινοβουτυρικό οξύ	$1,5 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,2$
DL-3 αμινοϊσοβουτυρικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
4-αμινο-3-υδροξυβουτυρικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
L-αλανίνη	$0,9 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,2$
γλυκίνη	$12,3 \pm 0,6$	$5,0 \pm 0,6$	$4,1 \pm 0,6$	$7,8 \pm 0,6$
L-βαλίνη	$4,7 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$
L-λευκίνη	$2,3 \pm 0,3$	$1,3 \pm 0,3$	$0,8 \pm 0,3$	$0,6 \pm 0,3$
L-ισολευκίνη	$1,2 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1$
L-προλίνη	$2,7 \pm 0,7$	$6,0 \pm 0,7$	$6,8 \pm 0,7$	$6,4 \pm 0,7$
ασπαραγίνη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη
L-μεθειονίνη	$1,9 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,2$
ασπαραγινικό οξύ	$1,6 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1$
L-γλουταμικό οξύ	$8,6 \pm 0,1$	$7,2 \pm 0,1$	$7,2 \pm 0,1$	$10,5 \pm 0,1$
L-λυσίνη	$12,0 \pm 0,1$	$11,9 \pm 0,1$	$12,1 \pm 0,1$	$9,0 \pm 0,1$
L-φαινυλαλανίνη	$3,3 \pm 0,4$	$2,9 \pm 0,4$	$2,3 \pm 0,4$	$1,3 \pm 0,4$



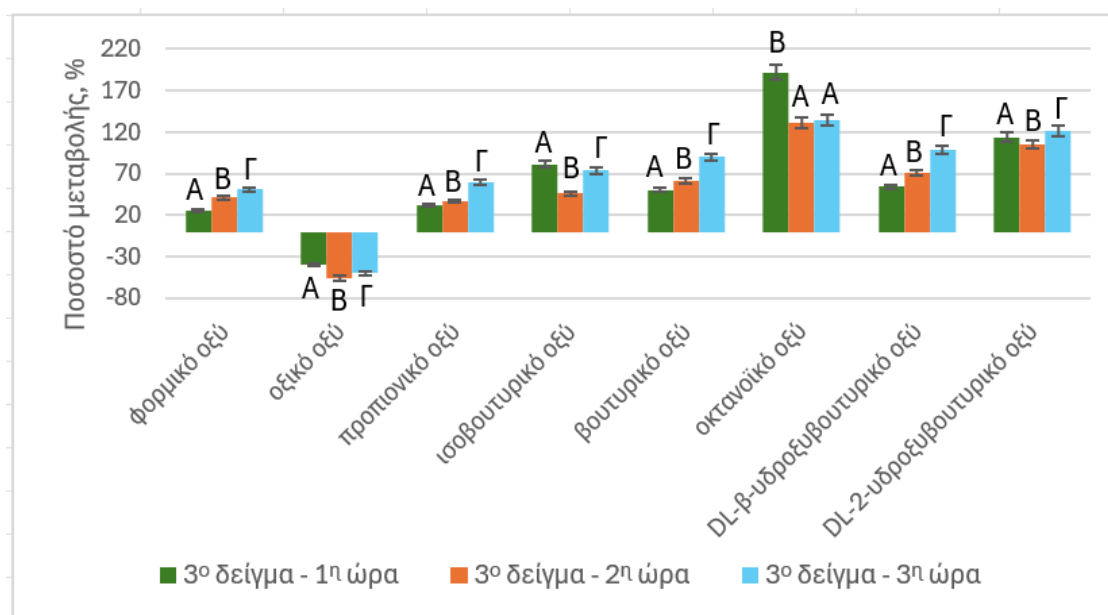
Εικόνα 33: Ποσοστό μεταβολής (%) της συγκέντρωσης καθενός από τα SCFAs σε σχέση με την κατανάλωση καφέ σε πάροδο τριών ωρών για το 2^ο δείγμα σιέλου. Το ίδιο γράμμα δείχνει ότι δεν υπάρχει στατιστική σημαντική διαφορά ($p>0,05$).



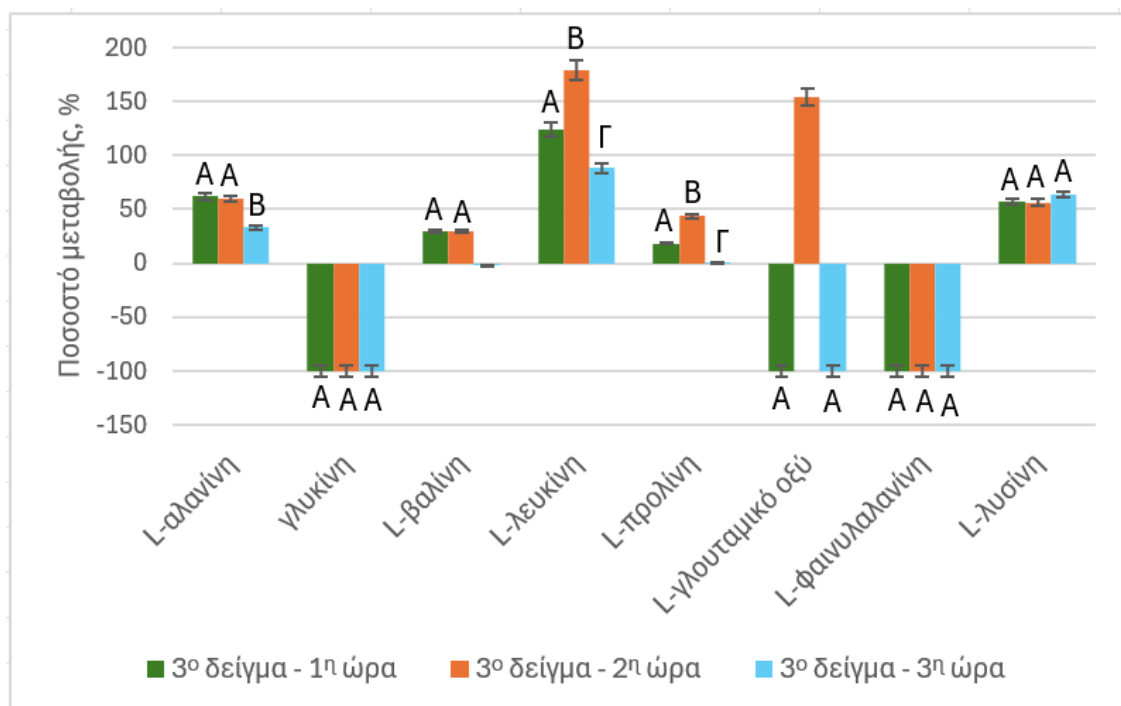
Εικόνα 34: Ποσοστό μεταβολής (%) της συγκέντρωσης καθενός από τα αμινοξέα σε σχέση με την κατανάλωση καφέ σε πάροδο τριών ωρών για το 2^ο δείγμα σιέλου. Το ίδιο γράμμα δείχνει ότι δεν υπάρχει στατιστική σημαντική διαφορά ($p>0,05$).

Πίνακας 11: Συγκεντρώσεις των SCFAs και των αμινοξέων, σε $\mu\text{g/mL}$, πριν την κατανάλωση καφέ και σε πάροδο των τριών ωρών για το 3^ο δείγμα σιέλου.

Αναλύτης	Συγκέντρωση πριν την κατανάλωση καφέ ($\mu\text{g/mL}$)	Συγκέντρωση 1 ώρα μετά την κατανάλωση καφέ ($\mu\text{g/mL}$)	Συγκέντρωση 2 ώρες μετά την κατανάλωση καφέ ($\mu\text{g/mL}$)	Συγκέντρωση 3 ώρες μετά την κατανάλωση καφέ ($\mu\text{g/mL}$)
φορμικό οξύ	$4,8 \pm 0,2$	$6,6 \pm 0,2$	$8,8 \pm 0,2$	$12,3 \pm 0,2$
οξικό οξύ	$6,6 \pm 0,5$	$5,8 \pm 0,5$	$4,2 \pm 0,5$	$4,8 \pm 0,5$
προπιονικό οξύ	$8,7 \pm 0,1$	$11,0 \pm 0,1$	$11,2 \pm 0,1$	$12,1 \pm 0,1$
ισοβουτυρικό οξύ	$1,2 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,1$
βουτυρικό οξύ	$2,2 \pm 0,1$	$3,3 \pm 0,1$	$3,6 \pm 0,1$	$4,2 \pm 0,1$
3-μεθυλοβουτυρικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
πεντανοϊκό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
οκτανοϊκό οξύ	$1,8 \pm 0,6$	$5,3 \pm 0,6$	$4,2 \pm 0,6$	$4,2 \pm 0,6$
DL-β-υδροξυβουτυρικό οξύ	$0,4 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$
DL-2-υδροξυβουτυρικό οξύ	$21,6 \pm 0,1$	$42,6 \pm 0,1$	$42,3 \pm 0,1$	$42,9 \pm 0,1$
2-υδροξυπεντανοϊκό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
2-αμινοβουτυρικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
DL-3 αμινοϊσοβουτυρικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
4-αμινο-3-υδροξυβουτυρικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
L-αλανίνη	$0,4 \pm 0,2$	$0,3 \pm 0,2$	$0,3 \pm 0,2$	$0,2 \pm 0,2$
γλυκίνη	$4,9 \pm 0,6$	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη
L-βαλίνη	$0,8 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1$
L-λευκίνη	$0,2 \pm 0,3$	$0,2 \pm 0,3$	$0,2 \pm 0,3$	$0,2 \pm 0,3$
L-ισολευκίνη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη
L-προλίνη	$3,3 \pm 0,7$	$3,9 \pm 0,7$	$4,7 \pm 0,7$	$3,3 \pm 0,1$
ασπαραγίνη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη
L-μεθειονίνη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη
ασπαραγινικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη
L-γλουταμικό οξύ	$4,6 \pm 0,1$	Μη ανιχνεύσιμη	$10,3 \pm 0,1$	Μη ανιχνεύσιμη
L-λυσίνη	$4,9 \pm 0,1$	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη
L-φαινυλαλανίνη	$0,8 \pm 0,4$	$1,3 \pm 0,4$	$1,3 \pm 0,4$	$1,4 \pm 0,1$



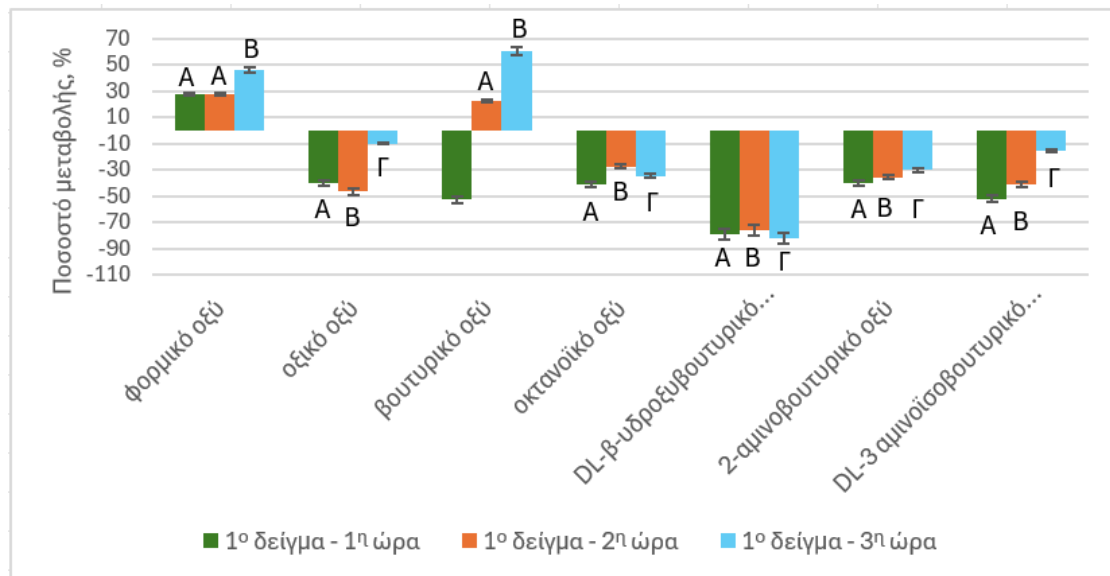
Εικόνα 35: Ποσοστό μεταβολής (%) της συγκέντρωσης καθενός από τα SCFAs σε σχέση με την κατανάλωση καφέ σε πάροδο τριών ωρών για το 3^ο δείγμα σιέλου. Το ίδιο γράμμα δείχνει ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p>0,05$).



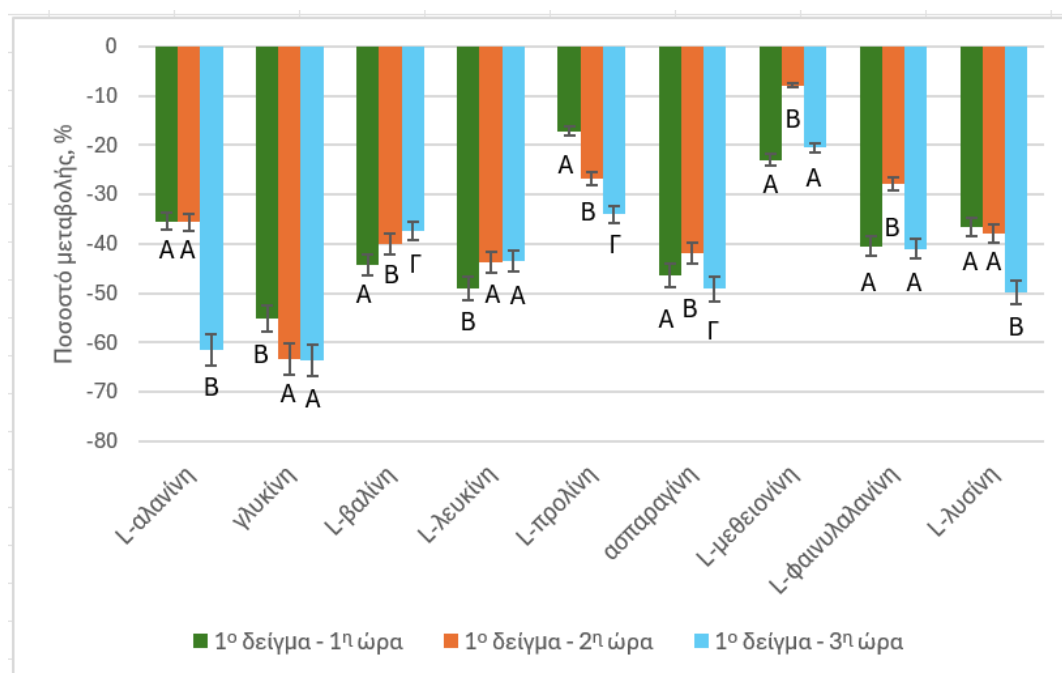
Εικόνα 36: Ποσοστό μεταβολής (%) της συγκέντρωσης καθενός από τα αμινοξέα σε σχέση με την κατανάλωση καφέ σε πάροδο τριών ωρών για το 3^ο δείγμα σιέλου. Το ίδιο γράμμα δείχνει ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p>0,05$).

Πίνακας 12: Συγκεντρώσεις των SCFAs και των αμινοξέων, σε $\mu\text{g/mL}$, πριν την κατανάλωση και σε πάροδο των τριών ωρών για το 1^ο δείγμα ούρων.

Αναλύτης	Συγκέντρωση πριν την κατανάλωση καφέ ($\mu\text{g/mL}$)	Συγκέντρωση 1 ώρα μετά την κατανάλωση καφέ ($\mu\text{g/mL}$)	Συγκέντρωση 2 ώρες μετά την κατανάλωση καφέ ($\mu\text{g/mL}$)	Συγκέντρωση 3 ώρες μετά την κατανάλωση καφέ ($\mu\text{g/mL}$)
φορμικό οξύ	$9,4 \pm 0,3$	$10,8 \pm 0,3$	$10,8 \pm 0,3$	$10,8 \pm 0,3$
οξικό οξύ	$2,5 \pm 0,4$	$1,5 \pm 0,4$	$1,4 \pm 0,4$	$2,3 \pm 0,4$
προπιονικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
ισοβουτυρικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
βουτυρικό οξύ	$1,0 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,1$
3-μεθυλοβουτυρικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
πεντανοϊκό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
οκτανοϊκό οξύ	$0,8 \pm 0,3$	$0,5 \pm 0,3$	$0,6 \pm 0,3$	$0,5 \pm 0,3$
DL-β-υδροξυβουτυρικό οξύ	$2,0 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,3$	$0,4 \pm 0,3$
DL-2-υδροξυβουτυρικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
2-υδροξυπεντανοϊκό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
2-αμινοβουτυρικό οξύ	$2,0 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,1$
DL-3 αμινοϊσοβουτυρικό οξύ	$5,5 \pm 0,1$	$2,6 \pm 0,1$	$3,3 \pm 0,1$	$4,6 \pm 0,1$
4-αμινο-3-υδροξυβουτυρικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
L-αλανίνη	$4,8 \pm 0,2$	$3,1 \pm 0,2$	$3,1 \pm 0,2$	$1,9 \pm 0,2$
γλυκίνη	$9,9 \pm 0,2$	$7,9 \pm 0,2$	$6,4 \pm 0,2$	$6,2 \pm 0,2$
L-βαλίνη	$4,6 \pm 0,1$	$2,6 \pm 0,1$	$2,8 \pm 0,1$	$2,9 \pm 0,1$
L-λευκίνη	$1,6 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$
L-ισολευκίνη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη
L-προλίνη	$0,7 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$
ασπαραγίνη	$12,0 \pm 0,1$	$11,8 \pm 0,1$	$12,7 \pm 0,1$	$11,2 \pm 0,1$
L-μεθειονίνη	$1,2 \pm 0,3$	$0,9 \pm 0,3$	$1,1 \pm 0,3$	$0,9 \pm 0,3$
ασπαραγινικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη
L-γλουταμικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη
L-λυσίνη	$8,6 \pm 0,1$	$4,1 \pm 0,1$	$6,0 \pm 0,1$	$4,9 \pm 0,1$
L-φαινυλαλανίνη	$4,8 \pm 0,1$	$3,0 \pm 0,1$	$3,0 \pm 0,1$	$2,4 \pm 0,1$



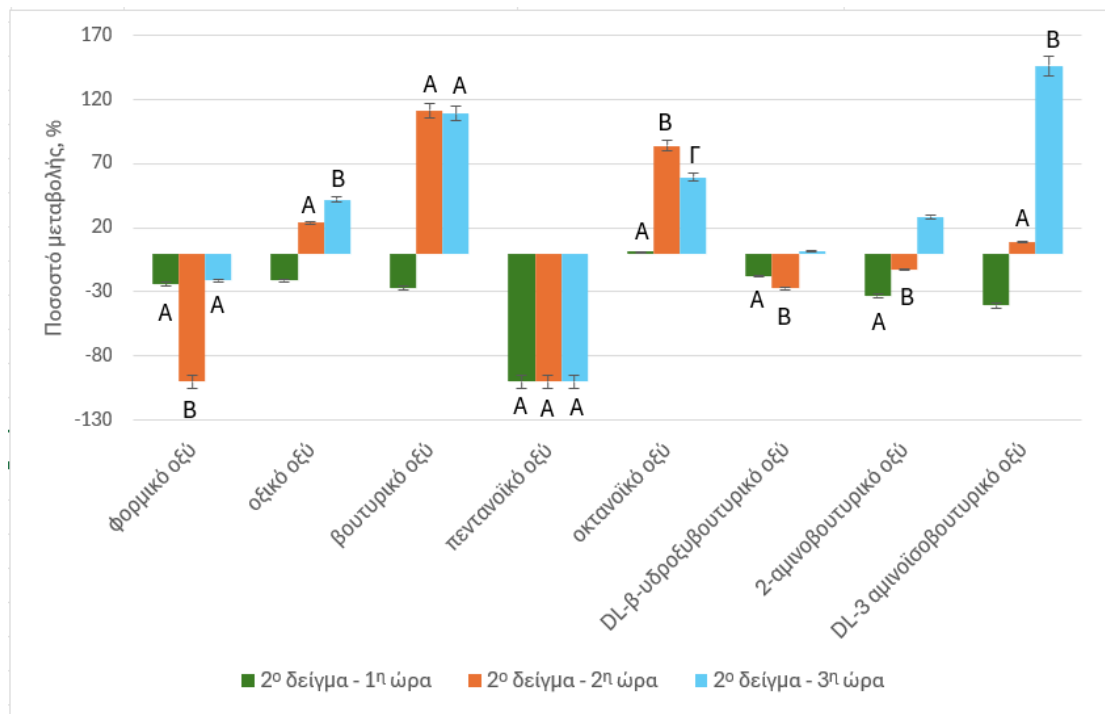
Εικόνα 37: Ποσοστό μεταβολής (%) της συγκέντρωσης του καθενός από τα SCFAs σε σχέση με την κατανάλωση καφέ σε πάροδο τριών ωρών για το 1^ο δείγμα ούρων. Το ίδιο γράμμα δείχνει ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p>0,05$).



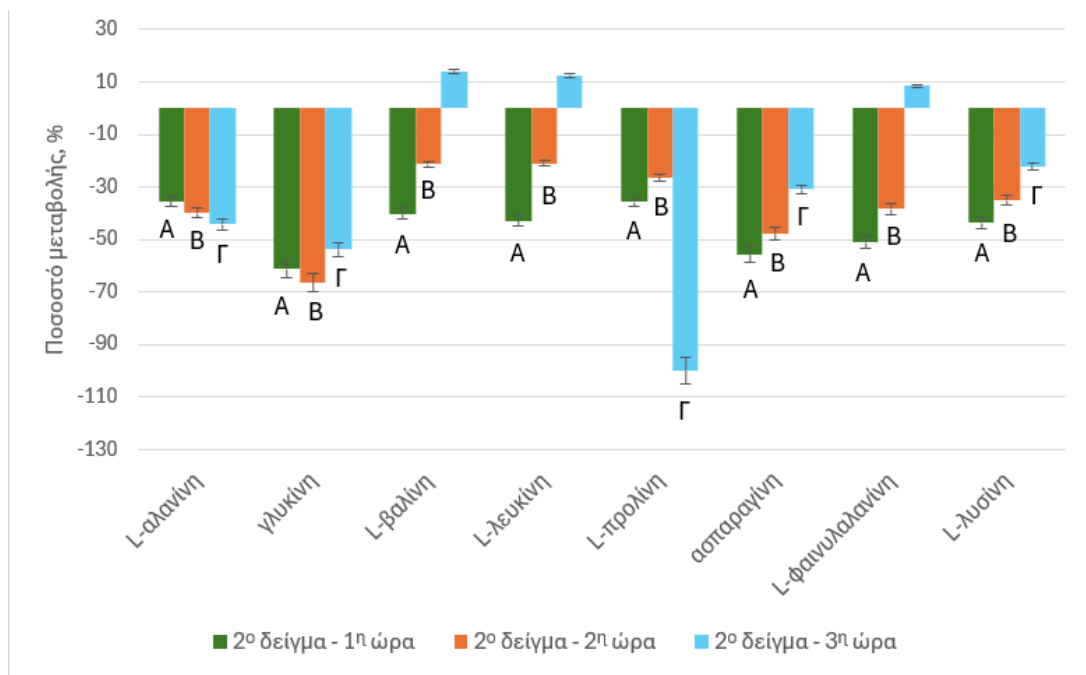
Εικόνα 38: Ποσοστό μεταβολής (%) της συγκέντρωσης καθενός από τα αμινοξέα σε σχέση με την κατανάλωση καφέ σε πάροδο τριών ωρών για το 1^ο δείγμα ούρων. Το ίδιο γράμμα δείχνει ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p>0,05$).

Πίνακας 13: Συγκεντρώσεις των SCFAs και των αμινοξέων, σε $\mu\text{g/mL}$, πριν την κατανάλωση και σε πάροδο των τριών ωρών για το 2^ο δείγμα ούρων.

Αναλύτης	Συγκέντρωση πριν την κατανάλωση καφέ ($\mu\text{g/mL}$)	Συγκέντρωση 1 ώρα μετά την κατανάλωση καφέ ($\mu\text{g/mL}$)	Συγκέντρωση 2 ώρες μετά την κατανάλωση καφέ ($\mu\text{g/mL}$)	Συγκέντρωση 3 ώρες μετά την κατανάλωση καφέ ($\mu\text{g/mL}$)
φορμικό οξύ	$12,3 \pm 0,3$	$6,5 \pm 0,3$	$3,0 \pm 0,3$	$12,5 \pm 0,3$
οξικό οξύ	$2,2 \pm 0,4$	$1,8 \pm 0,4$	$2,7 \pm 0,4$	$3,1 \pm 0,4$
προπιονικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
ισοβουτυρικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
βουτυρικό οξύ	$1,3 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,1$	$2,8 \pm 0,1$	$2,7 \pm 0,1$
3-μεθυλοβουτυρικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
πεντανοϊκό οξύ	$0,3 \pm 0,1$	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
οκτανοϊκό οξύ	$1,5 \pm 0,3$	$1,5 \pm 0,3$	$2,8 \pm 0,3$	$2,4 \pm 0,3$
DL-β-υδροξυβουτυρικό οξύ	$4,0 \pm 0,1$	$3,3 \pm 0,1$	$2,9 \pm 0,1$	$4,0 \pm 0,1$
DL-2-υδροξυβουτυρικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
2-υδροξυπεντανοϊκό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
2-αμινοβουτυρικό οξύ	$3,2 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,1$	$2,8 \pm 0,1$	$4,1 \pm 0,1$
DL-3 αμινοϊσοβουτυρικό οξύ	$14,6 \pm 0,1$	$10,4 \pm 0,1$	$15,1 \pm 0,1$	$16,2 \pm 0,1$
4-αμινο-3-υδροξυβουτυρικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
L-αλανίνη	$9,4 \pm 0,2$	$6,1 \pm 0,2$	$5,7 \pm 0,2$	$5,3 \pm 0,2$
γλυκίνη	$10,3 \pm 0,2$	$5,8 \pm 0,2$	$5,1 \pm 0,2$	$6,9 \pm 0,2$
L-βαλίνη	$8,6 \pm 0,1$	$5,2 \pm 0,1$	$6,8 \pm 0,1$	$9,8 \pm 0,1$
L-λευκίνη	$3,0 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,1$	$3,3 \pm 0,1$
L-ισολευκίνη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη
L-προλίνη	$1,4 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,1$	Μη ανιχνεύσιμη
ασπαραγίνη	$14,4 \pm 0,1$	$6,4 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,1$	$4,6 \pm 0,1$
L-μεθειονίνη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη
ασπαραγινικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη
L-γλουταμικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη
L-λυσίνη	$12,1 \pm 0,1$	$6,5 \pm 0,1$	$8,8 \pm 0,1$	$11,3 \pm 0,1$
L-φαινυλαλανίνη	$10,1 \pm 0,1$	$5,7 \pm 0,1$	$6,6 \pm 0,1$	$7,9 \pm 0,1$



Εικόνα 39: Ποσοστό μεταβολής (%) της συγκέντρωσης καθενός από τα SCFAs σε σχέση με την κατανάλωση καφέ σε πάροδο τριών ωρών για το 2ο δείγμα ούρων. Το ίδιο γράμμα δείχνει ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p > 0,05$).



Εικόνα 40: Ποσοστό μεταβολής (%) της συγκέντρωσης καθενός από τα αμινοξέα σε σχέση με την κατανάλωση καφέ σε πάροδο τριών ωρών για το 2ο δείγμα ούρων. Το ίδιο γράμμα δείχνει ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p > 0,05$).

3.6.4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΚΑΠΝΙΣΜΑΤΟΣ ΣΤΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΩΝ SCFAs ΚΑΙ ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΣΤΟ ΣΙΕΛΟ

Η νικοτίνη που περιέχει το τσιγάρο απορροφάται από τον οργανισμό επηρεάζοντας πολλά όργανα. Ένα από αυτά είναι και το έντερο, στο οποίο παρατηρείται μεταβολή της εντερικής χλωρίδας, επηρεάζοντας και την συγκέντρωση των μεταβολιτών όπως των SCFAs. Συγκεκριμένα, μελέτες σε ανθρώπους έχουν δείξει ότι οι καπνιστές παρουσίασαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις SCFAs στο πλάσμα και στα κόπρανα, κάτι που οφείλεται στη μείωση των βακτηρίων που τα παράγουν (Otake et al., 2025).

Στη στοματική κοιλότητα, τα SCFAs παράγονται από αναερόβια βακτήρια της οδοντικής πλάκας και σχετίζονται με φλεγμονώδεις διεργασίες των ούλων. Το κάπνισμα επηρεάζει τα βακτήρια αυτά, μεταβάλλοντας τη συγκέντρωση των SCFAs. Πειραματικά δεδομένα έχουν δείξει ότι η έκθεση βακτηρίων όπως το *Porphoryromonas gingivalis* στα συστατικά του καπνού, οδήγησε σε μείωση της παραγωγής SCFAs όπως του βουτυρικού και του προπιονικού οξέος (Zeller et al., 2019a).

Όσον αφορά τα αμινοξέα, οι χημικές ενώσεις του τσιγάρου όπως η νικοτίνη και οι ελεύθερες ρίζες επηρεάζουν τον μεταβολισμό των αμινοξέων με αποτέλεσμα την αύξηση ή τη μείωση της συγκέντρωσής τους (Parrott, 2006). Στο σίελο, πειραματικά δεδομένα έχουν δείξει ότι στους καπνιστές παρατηρήθηκε μεταβολή στην συγκέντρωση των αμινοξέων (Dame et al., 2015b).

Στην παρούσα εργασία υπολογίστηκε η ποσοστιαία μεταβολή της συγκέντρωσης των SCFAs και των αμινοξέων σε πάροδο τριών ωρών μετά το κάπνισμα σε σχέση με αυτήν πριν από το κάπνισμα σε δείγματα σιέλου. Στις **Εικόνες 41** και **42** παρατηρούνται οι ποσοστιαίες μεταβολές των SCFAs και των αμινοξέων για το 1^ο δείγμα, στις **Εικόνες 43** και **44** παρατηρούνται οι ποσοστιαίες μεταβολές των SCFAs και των αμινοξέων για το 2^ο δείγμα και στις **Εικόνες 45** και **46** για το 3^ο δείγμα. Επιπλέον, στους **Πίνακες 14 έως 16** αναφέρονται οι συγκεντρώσεις των αναλυτών πριν το κάπνισμα αλλά και σε πάροδο τριών ωρών μετά το κάπνισμα για το 1^ο, 2^ο και 3^ο δείγμα. Τα δείγματα λήφθηκαν από τον ίδιο εθελοντή σε τρεις διαφορετικές ημέρες.

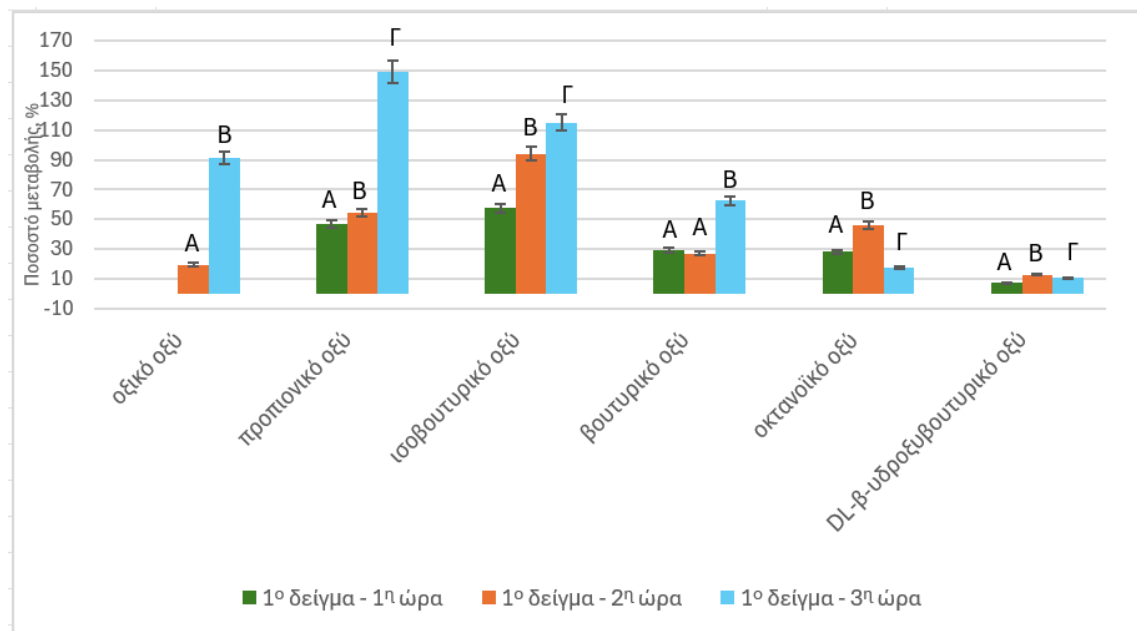
Όσον αφορά τα SCFAs, για την 1^η ώρα παρατηρήθηκε αύξηση των συγκεντρώσεων και στα τρία δείγματα (1^ο, 2^ο και 3^ο). Εξαίρεση αποτέλεσε το ισοβουτυρικό, το οκτανοϊκό, το οξικό, το προπιονικό και το βουτυρικό οξύ στο 2^ο δείγμα, που εμφάνισαν μείωση. Για την 2^η ώρα παρατηρήθηκε, επίσης, αύξηση των συγκεντρώσεων και στα τρία δείγματα, με εξαίρεση το οξικό και το προπιονικό οξύ στο 2^ο και 3^ο δείγμα. Τέλος, για την 3^η ώρα παρατηρήθηκε το ίδιο μοτίβο με αύξηση και στα τρία δείγματα (1^ο, 2^ο και 3^ο). Εξαίρεση αυτού του μοτίβου αποτέλεσε το βουτυρικό οξύ στο 2^ο δείγμα. Τα δεδομένα αυτά οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η νικοτίνη και οι υπόλοιπες χημικές ενώσεις του τσιγάρου επηρέασαν με αυξητική τάση την συγκέντρωση των SCFAs καθώς και των βακτηρίων που τα παράγουν (Zeller et al., 2019b). Τέλος, παρατηρήθηκε ότι για το 1^ο δείγμα οι ποσοστιαίες μεταβολές που αφορούν στο προπιονικό οξύ για την 1^η και την 2^η ώρα και οι ποσοστιαίες μεταβολές που αφορούν στο DL-β-υδροξυβουτυρικό οξύ για την 1^η και 2^η ώρα και την 2^η αλλά και την 3^η ώρα και την 1^η και την 3^η ώρα και για το 2^ο δείγμα οι ποσοστιαίες μεταβολές που αφορούν στο βουτυρικό οξύ για την 2^η και την 3^η ώρα και οι ίδιες που αφορούν στο DL-β-υδροξυβουτυρικό οξύ και για το 3^ο δείγμα, οι ποσοστιαίες μεταβολές που αφορούν

στο φορμικό οξύ για την 1^η και 2^η ώρα και για την 2^η και 3^η ώρα, οι ποσοστιαίες μεταβολές που αφορούν στο προπιονικό οξύ για την 1^η και 2^η ώρα αλλά και οι ίδιες που αφορούν στο ισοβουτυρικό, βουτυρικό και οκτανοϊκό οξύ διαφέρουν στατιστικά σημαντικά.

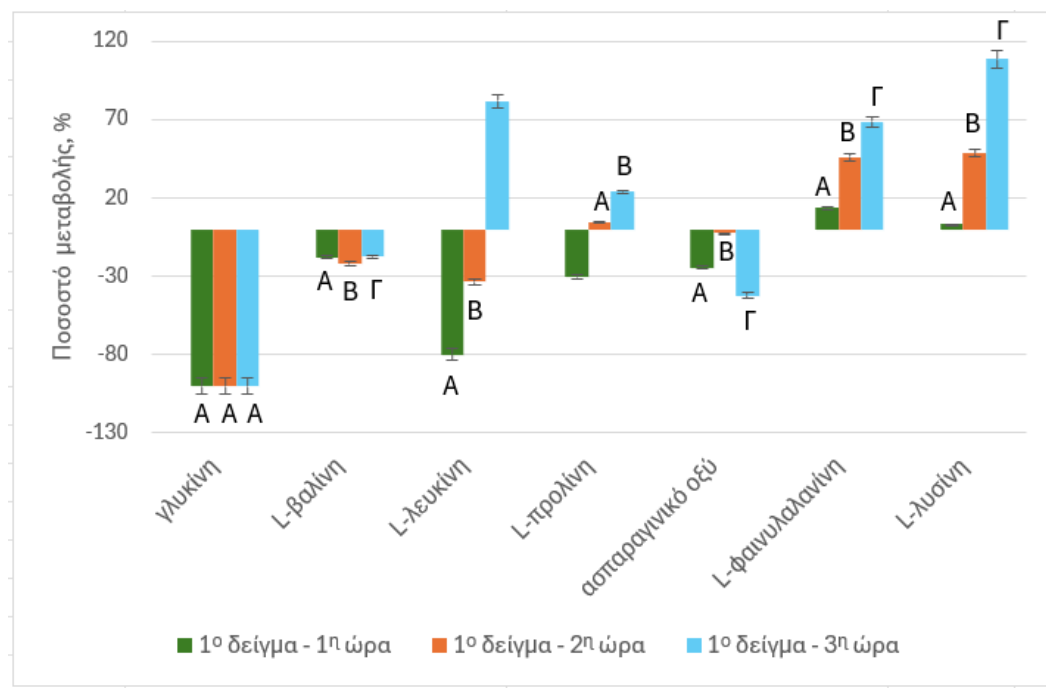
Σε ότι αφορά τα αμινοξέα, για την 1^η ώρα μετά το κάπνισμα παρατηρήθηκε μείωση των συγκεντρώσεων και στα τρία δείγματα (1^ο, 2^ο και 3^ο). Εξαίρεση αποτέλεσε η L-λυσίνη και η L-φαινυλαλανίνη που εμφάνισαν αύξηση και στα τρία δείγματα. Για την 2^η ώρα, παρατηρήθηκε το ίδιο μοτίβο, με εξαίρεση την L-φαινυλαλανίνη και τη L-λυσίνη, που παρουσίασαν αύξηση. Τέλος, για την 3^η ώρα παρατηρήθηκε αύξηση και στα τρία δείγματα για τα περισσότερα αμινοξέα. Τα δεδομένα αυτά ήρθαν να επαληθεύσουν αντίστοιχα προηγούμενων μελετών, ότι δηλαδή το κάπνισμα επηρεάζει το μεταβολισμό των αμινοξέων στο στόμα (Shen et al., 2026), μόνο που στην παρούσα εργασία η μεταβολή αυτή παρατηρήθηκε για μεγάλο χρονικό διάστημα μετά το κάπνισμα. Τέλος, παρατηρήθηκε ότι για το 1^ο δείγμα οι ποσοστιαίες μεταβολές που αφορούν στην L-βαλίνη για την 1^η και την 2^η ώρα αλλά και για την 2^η και την 3^η ώρα και για το 2^ο δείγμα οι ποσοστιαίες μεταβολές που αφορούν στην L-αλανίνη και στην L-προλίνη για την 1^η και την 2^η ώρα αλλά και για το 3^ο δείγμα οι ποσοστιαίες μεταβολές που αφορούν στη γλυκίνη για την 1^η και την 2^η ώρα, οι ίδιες ποσοστιαίες μεταβολές που αφορούν στο L-γλουταμικό οξύ αλλά και οι ποσοστιαίες μεταβολές που αφορούν στη L-βαλίνη για την 2^η και την 3^η ώρα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά.

Πίνακας 14: Συγκεντρώσεις των SCFAs και των αμινοξέων, σε $\mu\text{g/mL}$, πριν το κάπνισμα και σε πάροδο των τριών ωρών για το 1^ο δείγμα σιέλου.

Αναλύτης	Συγκέντρωση πριν το κάπνισμα ($\mu\text{g/mL}$)	Συγκέντρωση 1 ώρα μετά το κάπνισμα ($\mu\text{g/mL}$)	Συγκέντρωση 2 ώρες μετά το κάπνισμα ($\mu\text{g/mL}$)	Συγκέντρωση 3 ώρες μετά το κάπνισμα ($\mu\text{g/mL}$)
φορμικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
οξικό οξύ	$2,3 \pm 0,5$	$2,4 \pm 0,5$	$2,8 \pm 0,5$	$4,5 \pm 0,5$
προπιονικό οξύ	$3,4 \pm 0,1$	$5,0 \pm 0,1$	$5,3 \pm 0,1$	$8,5 \pm 0,1$
ισοβουτυρικό οξύ	$0,4 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$
βουτυρικό οξύ	$1,4 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,1$
3-μεθυλοβουτυρικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
πεντανοϊκό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
οκτανοϊκό οξύ	$0,9 \pm 0,6$	$1,1 \pm 0,6$	$1,3 \pm 0,6$	$1,0 \pm 0,6$
DL-β-υδροξυβουτυρικό οξύ	$0,4 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$
DL-2-υδροξυβουτυρικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
2-υδροξυπεντανοϊκό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
2-αμινοβουτυρικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
DL-3 αμινοϊσοβουτυρικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
4-αμινο-3-υδροξυβουτυρικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
L-αλανίνη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη
γλυκίνη	$3,6 \pm 0,6$	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
L-βαλίνη	$0,4 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$
L-λευκίνη	$0,5 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,1$
L-ισολευκίνη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη
L-προλίνη	$1,9 \pm 0,7$	$1,3 \pm 0,7$	$2,0 \pm 0,7$	$2,4 \pm 0,7$
ασπαραγίνη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη
L-μεθειονίνη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη
ασπαραγινικό οξύ	$0,7 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$
L-γλουταμικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη
L-λυσίνη	$3,8 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,1$	$2,6 \pm 0,1$	$2,9 \pm 0,1$
L-φαινυλαλανίνη	$0,4 \pm 0,4$	$0,4 \pm 0,4$	$0,5 \pm 0,4$	$0,8 \pm 0,4$



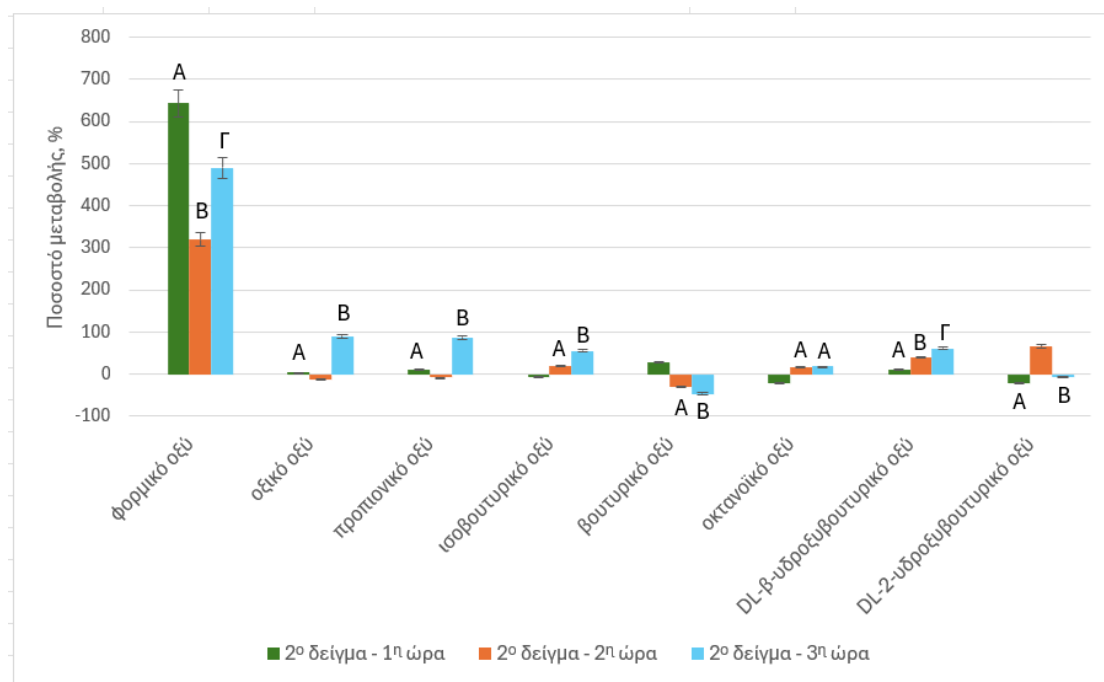
Εικόνα 41: Ποσοστό μεταβολής (%) της συγκέντρωσης καθενός από τα SCFAs σε σχέση με το κάπνισμα σε πάροδο τριών ωρών για το 1^ο δείγμα σιέλου. Το ίδιο γράμμα δείχνει ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p>0,05$).



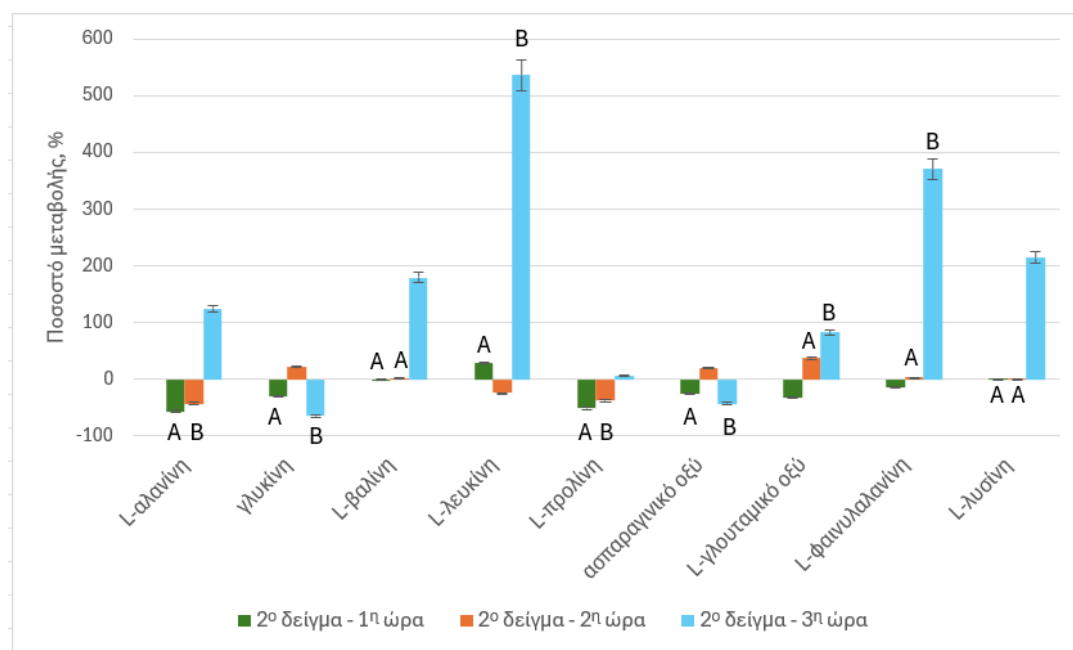
Εικόνα 42: Ποσοστό μεταβολής (%) της συγκέντρωσης καθενός από τα αμινοξέα σε σχέση με το κάπνισμα σε πάροδο τριών ωρών για το 1^ο δείγμα σιέλου. Το ίδιο γράμμα δείχνει ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p>0,05$).

Πίνακας 15: Συγκεντρώσεις των SCFAs και των αμινοξέων, σε $\mu\text{g/mL}$, πριν το κάπνισμα και σε πάροδο των τριών ωρών για το 2^ο δείγμα σιέλου.

Αναλύτης	Συγκέντρωση πριν το κάπνισμα ($\mu\text{g/mL}$)	Συγκέντρωση 1 ώρα μετά το κάπνισμα ($\mu\text{g/mL}$)	Συγκέντρωση 2 ώρες μετά το κάπνισμα ($\mu\text{g/mL}$)	Συγκέντρωση 3 ώρες μετά το κάπνισμα ($\mu\text{g/mL}$)
φορμικό οξύ	$3,3 \pm 0,2$	$12,6 \pm 0,2$	$6,3 \pm 0,2$	$9,5 \pm 0,2$
οξικό οξύ	$5,8 \pm 0,5$	$6,1 \pm 0,5$	$5,1 \pm 0,5$	$7,0 \pm 0,5$
προπιονικό οξύ	$1,7 \pm 0,1$	$6,6 \pm 0,1$	$4,8 \pm 0,1$	$12,2 \pm 0,1$
ισοβουτυρικό οξύ	$2,6 \pm 0,1$	$2,5 \pm 0,1$	$3,2 \pm 0,1$	$4,1 \pm 0,1$
βουτυρικό οξύ	$4,5 \pm 0,1$	$5,9 \pm 0,1$	$3,2 \pm 0,1$	$2,5 \pm 0,1$
3-μεθυλοβουτυρικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
πεντανοϊκό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
οκτανοϊκό οξύ	$3,1 \pm 0,6$	$2,4 \pm 0,6$	$3,6 \pm 0,6$	$3,7 \pm 0,6$
DL-β-υδροξυβουτυρικό οξύ	$0,5 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$
DL-2-υδροξυβουτυρικό οξύ	$22,2 \pm 0,1$	$20,9 \pm 0,1$	$26,3 \pm 0,1$	$21,9 \pm 0,1$
2-υδροξυπεντανοϊκό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
2-αμινοβουτυρικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
DL-3 αμινοϊσοβουτυρικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
4-αμινο-3-υδροξυβουτυρικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
L-αλανίνη	$0,8 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$
γλυκίνη	$5,0 \pm 0,6$	$3,5 \pm 0,6$	$6,2 \pm 0,6$	$1,7 \pm 0,6$
L-βαλίνη	$0,6 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,1$
L-λευκίνη	$0,1 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$
L-ισολευκίνη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη
L-προλίνη	$10,3 \pm 0,7$	$7,4 \pm 0,7$	$9,6 \pm 0,7$	$16,4 \pm 0,7$
ασπαραγίνη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη
L-μεθειονίνη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη
ασπαραγινικό οξύ	$0,7 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$
L-γλουταμικό οξύ	$5,5 \pm 0,1$	$3,7 \pm 0,1$	$7,5 \pm 0,1$	$10,0 \pm 0,1$
L-λυσίνη	$4,1 \pm 0,1$	$3,5 \pm 0,1$	$4,3 \pm 0,1$	$8,5 \pm 0,1$
L-φαινυλαλανίνη	$0,5 \pm 0,4$	$0,6 \pm 0,4$	$0,6 \pm 0,4$	$1,8 \pm 0,4$



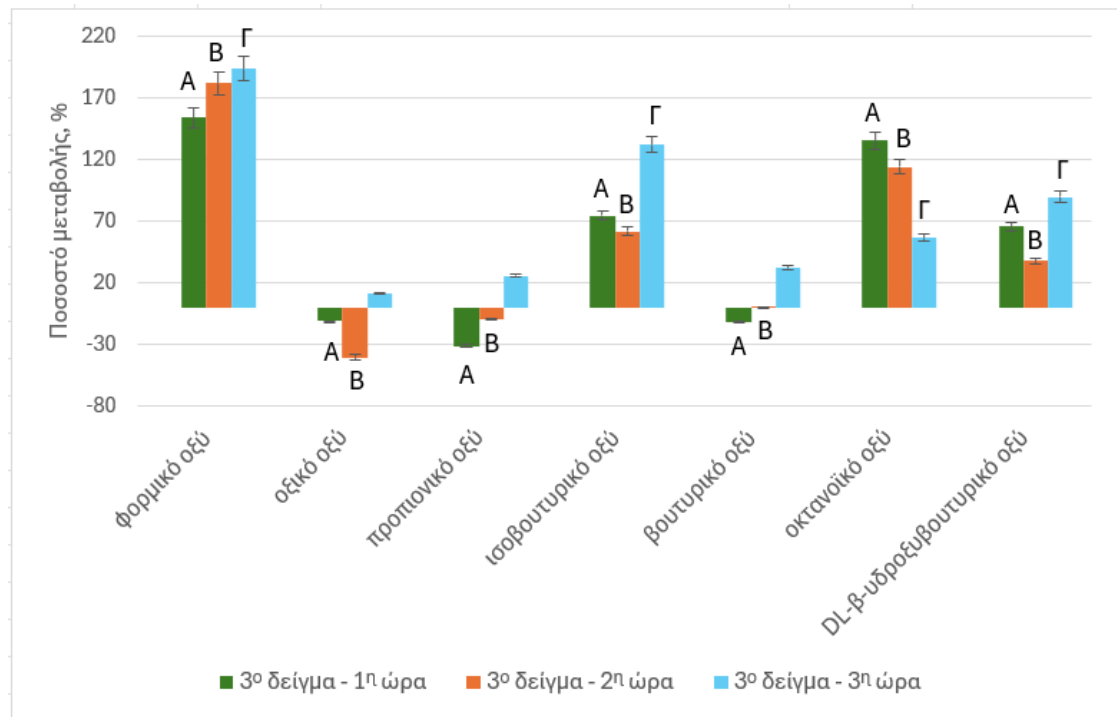
Εικόνα 43: Ποσοστό μεταβολής (%) της συγκέντρωσης καθενός από τα SCFAs σε σχέση με το κάπνισμα σε πάροδο τριών ωρών για το 2^ο δείγμα σιέλου. Το ίδιο γράμμα δείχνει ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p > 0,05$).



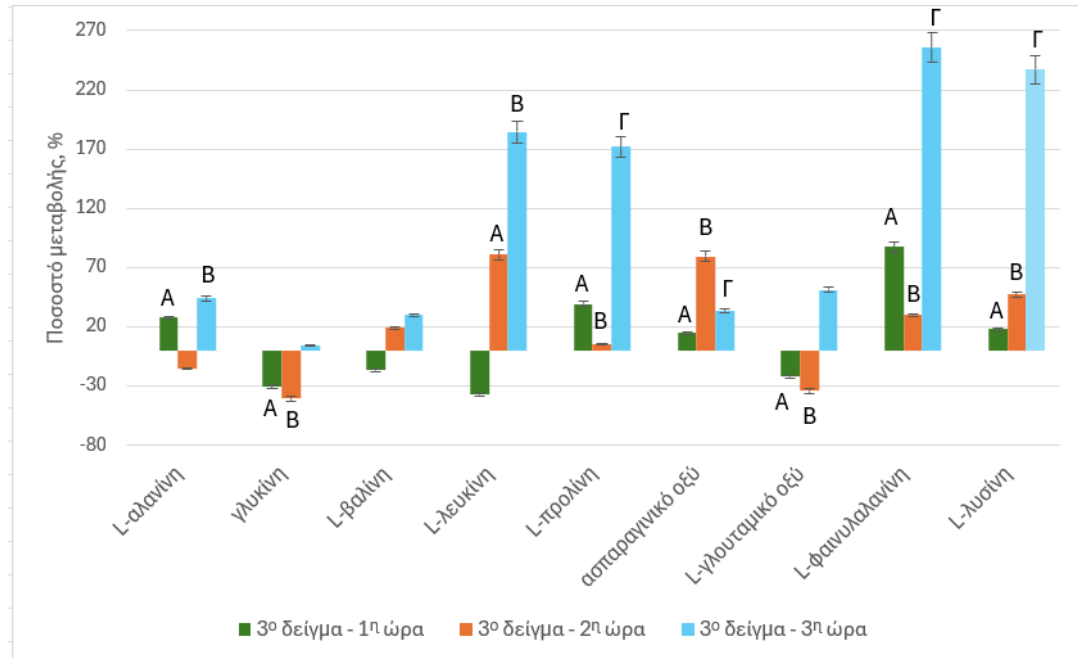
Εικόνα 44: Ποσοστό μεταβολής (%) της συγκέντρωσης καθενός από τα αμινοξέα σε σχέση με το κάπνισμα σε πάροδο τριών ωρών για το 2^ο δείγμα σιέλου. Το ίδιο γράμμα δείχνει ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p > 0,05$).

Πίνακας 16: Συγκεντρώσεις των SCFAs και των αμινοξέων, σε $\mu\text{g/mL}$, πριν το κάπνισμα και οι σε πάροδο των τριών ωρών για το 3^ο δείγμα σιέλου.

Αναλύτης	Συγκέντρωση πριν το κάπνισμα ($\mu\text{g/mL}$)	Συγκέντρωση 1 ώρα μετά το κάπνισμα ($\mu\text{g/mL}$)	Συγκέντρωση 2 ώρες μετά το κάπνισμα ($\mu\text{g/mL}$)	Συγκέντρωση 3 ώρες μετά το κάπνισμα ($\mu\text{g/mL}$)
φορμικό οξύ	$3,7 \pm 0,2$	$9,3 \pm 0,2$	$11,6 \pm 0,2$	$12,8 \pm 0,2$
οξικό οξύ	$3,7 \pm 0,5$	$4,4 \pm 0,5$	$5,6 \pm 0,5$	$6,6 \pm 0,5$
προπιονικό οξύ	$11,5 \pm 0,1$	$6,8 \pm 0,1$	$8,0 \pm 0,1$	$12,0 \pm 0,1$
ισοβουτυρικό οξύ	$2,3 \pm 0,1$	$4,1 \pm 0,1$	$3,7 \pm 0,1$	$5,4 \pm 0,1$
βουτυρικό οξύ	$6,8 \pm 0,1$	$6,0 \pm 0,1$	$6,8 \pm 0,1$	$9,0 \pm 0,1$
3-μεθυλοβουτυρικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
πεντανοϊκό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
οκτανοϊκό οξύ	$2,1 \pm 0,6$	$4,9 \pm 0,6$	$4,4 \pm 0,6$	$3,3 \pm 0,6$
DL-β-υδροξυβουτυρικό οξύ	$0,5 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,1$
DL-2-υδροξυβουτυρικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
2-υδροξυπεντανοϊκό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
2-αμινοβουτυρικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
DL-3 αμινοϊσοβουτυρικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
4-αμινο-3-υδροξυβουτυρικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
L-αλανίνη	$0,6 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1$
γλυκίνη	$6,6 \pm 0,6$	$4,6 \pm 0,6$	$3,9 \pm 0,6$	$6,9 \pm 0,6$
L-βαλίνη	$1,1 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,1$
L-λευκίνη	$0,3 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$
L-ισολευκίνη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη
L-προλίνη	$7,0 \pm 0,7$	$9,7 \pm 0,7$	$7,3 \pm 0,7$	$10,9 \pm 0,7$
ασπαραγίνη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη
L-μεθειονίνη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη
ασπαραγινικό οξύ	$0,6 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1$
L-γλουταμικό οξύ	$16,8 \pm 0,1$	$13,0 \pm 0,1$	$11,0 \pm 0,1$	$18,0 \pm 0,1$
L-λυσίνη	$10,6 \pm 0,1$	$17,8 \pm 0,1$	$13,7 \pm 0,1$	$18,6 \pm 0,1$
L-φαινυλαλανίνη	$1,2 \pm 0,4$	$1,4 \pm 0,4$	$1,7 \pm 0,4$	$3,9 \pm 0,4$



Εικόνα 45: Ποσοστό μεταβολής (%) της συγκέντρωσης καθενός από τα SCFAs σε σχέση με το κάπνισμα σε πάροδο τριών ωρών για το 3^ο δείγμα σιέλου. Το ίδιο γράμμα δείχνει ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p>0,05$).



Εικόνα 46: Ποσοστό μεταβολής (%) της συγκέντρωσης καθενός από τα αμινοξέα σε σχέση με το κάπνισμα σε πάροδο τριών ωρών για το 3^ο δείγμα σιέλου. Το ίδιο γράμμα δείχνει ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p>0,05$).

3.6.5 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΕΡΟΒΙΑΣ ΑΣΚΗΣΗΣ ΣΤΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΩΝ SCFAs ΚΑΙ ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΣΤΟ ΣΙΕΛΟ

Η αερόβια άσκηση αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή της σύστασης και της λειτουργίας του εντερικού μικροβιώματος, επηρεάζοντας άμεσα την παραγωγή SCFAs κυρίως του οξικού, του προπιονικού και του βουτυρικού οξέος (Clarke et al., 2014). Στο σίελο, η αερόβια άσκηση επηρεάζει το μικροβίωμα της στοματικής κοιλότητας και συνεπώς και τα βακτήρια που παράγουν τα SCFAs με αποτέλεσμα μεταβολές στις συγκεντρώσεις τους. Παράλληλα, αλλαγές στο pH και στη σύσταση του σιέλου κατά την διάρκεια της άσκησης επηρεάζουν την ανίχνευσή των SCFAs (Mancini et al., 2024).

Όσον αφορά τα αμινοξέα, κατά τη διάρκεια παρατεταμένης αερόβιας άσκησης, αυξάνεται η χρήση αμινοξέων ως ενεργειακό υπόστρωμα, ιδιαίτερα των BCAAs. Δεδομένα μελετών έχουν δείξει ότι μετά από αερόβια άσκηση παρατηρήθηκε αύξηση στις συγκεντρώσεις των ελεύθερων αμινοξέων όπως της αλανίνης, της προλίνης και της γλουταμίνης. Επιπλέον, η αυξημένη δραστηριότητα των σιελογόνων αδένων οδήγησε σε μείωση της ροής του σιέλου με παράλληλη αύξηση της συγκέντρωσης των αμινοξέων (Gleeson, 2005).

Στην παρούσα εργασία, συλλέχθηκαν δεδομένα ποσοστιαίας μεταβολής των συγκεντρώσεων των SCFAs και των αμινοξέων πριν την αερόβια άσκηση, αμέσως μετά το πέρας της άσκησης και μετά την πάροδο μίας ώρας από το πέρας της άσκησης. Συγκεκριμένα, στην **Εικόνα 47** παρατηρούνται οι ποσοστιαίες μεταβολές των SCFAs για το 1^ο και το 2^ο δείγμα και αντίστοιχα, στην **Εικόνα 48** παρατηρούνται οι ποσοστιαίες μεταβολές των αμινοξέων για το 1^ο και το 2^ο δείγμα. Παράλληλα, στους **Πίνακες 17** και **18** αναφέρονται οι συγκεντρώσεις των SCFAs και των αμινοξέων πριν αλλά και αμέσως μετά το πέρας της άσκησης αλλά και μετά από μία ώρα από το πέρας για το 1^ο και το 2^ο δείγμα.

Σε σχέση με τα SCFAs, αμέσως μετά το πέρας της αερόβιας άσκησης παρατηρήθηκε μείωση των συγκεντρώσεων των περισσότερων SCFAs και στα δύο δείγματα (1^ο και 2^ο). Εξαίρεση αποτέλεσε το φορμικό, το προπιονικό, το ισοβουτυρικό και το βουτυρικό οξύ στο 1^ο δείγμα και το DL-β-υδροξυβουτυρικό οξύ και στα δύο δείγματα που παρατηρήθηκε αύξηση, της τάξης του 9%. Για τα δεδομένα μετά από μία ώρα από το πέρας της άθλησης, τα περισσότερα SCFAs παρουσίασαν μείωση των συγκεντρώσεων και στα δύο δείγματα, με εξαίρεση το βουτυρικό και το DL-β-υδροξυβουτυρικό οξύ στο 1^ο δείγμα, που εμφάνισαν αύξηση. Τα δεδομένα αυτά οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η αερόβια άσκηση επηρέασε τα βακτήρια που παράγουν τα SCFAs και συνεπώς και την συγκέντρωσή τους άλλοτε αρνητικά και άλλοτε θετικά.

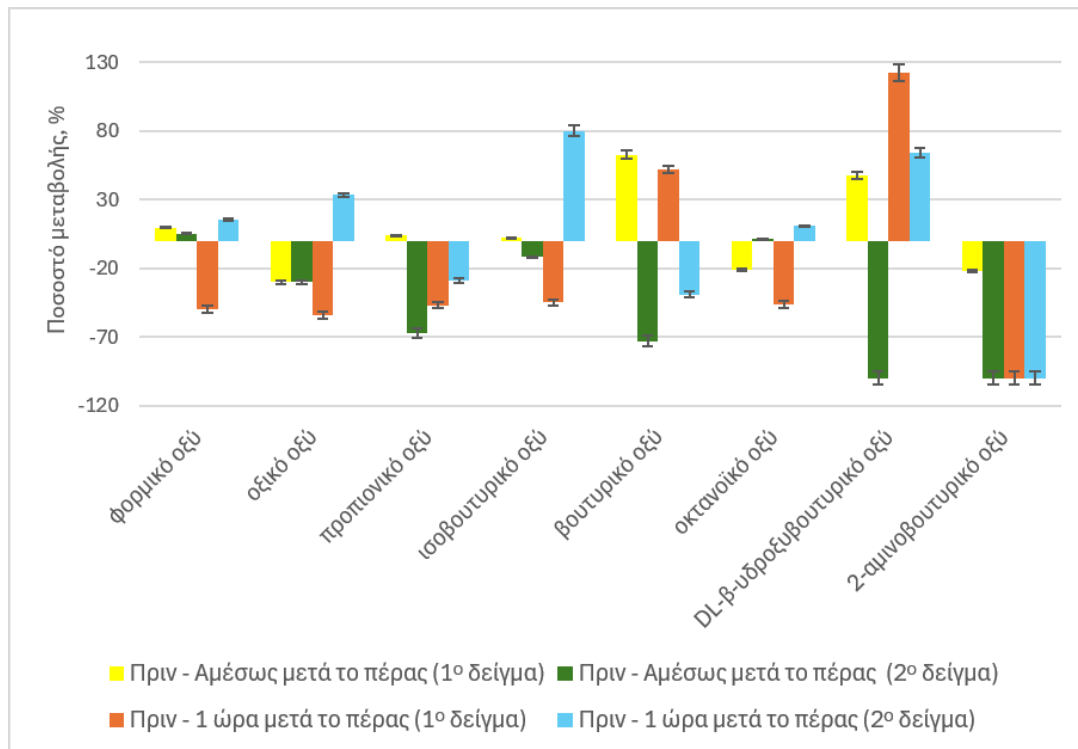
Σε ότι αφορά τα αμινοξέα, αμέσως μετά την άσκηση παρατηρήθηκε μείωση των συγκεντρώσεων για την πλειοψηφία των αμινοξέων και στα δύο δείγματα. Εξαίρεση αποτέλεσε το ασπαργινικό και το L-γλουταμικό οξύ στο 1^ο δείγμα, τα οποία εμφάνισαν αύξηση. Τέλος, μετά από μία ώρα από το πέρας της άσκησης παρατηρήθηκε μείωση των συγκεντρώσεων όλων των αμινοξέων και στα δύο δείγματα. Τα δεδομένα αυτά οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η αερόβια άσκηση μείωσε τη συγκέντρωση των αμινοξέων στο σίελο και μετά από το πέρας της άσκησης.

Πίνακας 17: Συγκεντρώσεις των SCFAs και των αμινοξέων, σε $\mu\text{g/mL}$, πριν την αερόβια άσκηση και αμέσως μετά το πέρας και μετά από μία ώρα από το πέρας της άσκησης για το 1^ο δείγμα σιέλου.

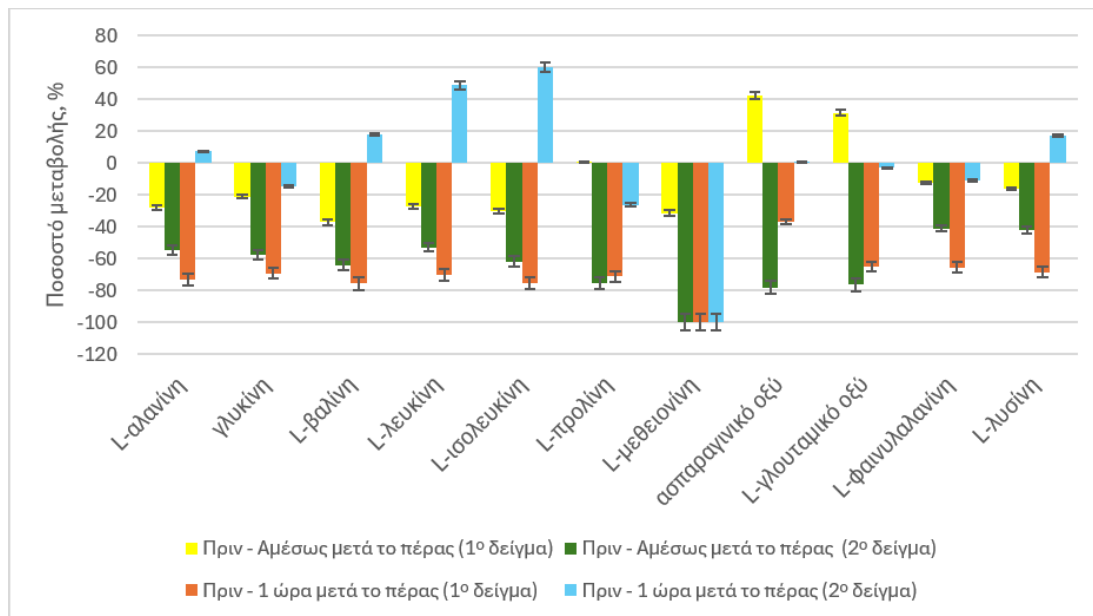
Αναλύτης	Συγκέντρωση πριν την άσκηση ($\mu\text{g/mL}$)	Συγκέντρωση αμέσως μετά το πέρας της άσκησης ($\mu\text{g/mL}$)	Συγκέντρωση 1 ώρα μετά το πέρας της άσκησης ($\mu\text{g/mL}$)
φορμικό οξύ	$7,7 \pm 0,2$	$5,2 \pm 0,2$	$5,5 \pm 0,2$
οξικό οξύ	$6,8 \pm 0,5$	$1,8 \pm 0,5$	$1,2 \pm 0,5$
προπιονικό οξύ	$11,5 \pm 0,1$	$10,5 \pm 0,1$	$6,5 \pm 0,1$
ισοβουτυρικό οξύ	$2,3 \pm 0,1$	$2,6 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,1$
βουτυρικό οξύ	$6,8 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,1$
3-μεθυλοβουτυρικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
πεντανοϊκό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
οκτανοϊκό οξύ	$2,1 \pm 0,6$	$6,1 \pm 0,6$	$3,9 \pm 0,6$
DL-β-υδροξυβουτυρικό οξύ	$0,5 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1$
DL-2-υδροξυβουτυρικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
2-υδροξυπεντανοϊκό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
2-αμινοβουτυρικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	$1,9 \pm 0,1$	Μη ανιχνεύσιμο
DL-3 αμινοϊσοβουτυρικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
4-αμινο-3-υδροξυβουτυρικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
L-αλανίνη	$0,6 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,2$	$1,7 \pm 0,2$
γλυκίνη	$6,6 \pm 0,2$	$6,6 \pm 0,2$	$2,5 \pm 0,2$
L-βαλίνη	$1,1 \pm 0,1$	$3,6 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,1$
L-λευκίνη	$0,3 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$
L-ισολευκίνη	Μη ανιχνεύσιμη	$12,9 \pm 0,1$	$5,9 \pm 0,1$
L-προλίνη	$7,0 \pm 0,7$	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμο
ασπαραγίνη	Μη ανιχνεύσιμη	$1,4 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$
L-μεθειονίνη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη
ασπαραγινικό οξύ	$0,6 \pm 0,1$	$14,7 \pm 0,1$	$13,5 \pm 0,1$
L-γλουταμικό οξύ	$16,8 \pm 0,1$	$18,0 \pm 0,1$	$12,3 \pm 0,1$
L-λυσίνη	$10,6 \pm 0,1$	$6,5 \pm 0,1$	$2,4 \pm 0,1$
L-φαινυλαλανίνη	$1,2 \pm 0,4$	$1,7 \pm 0,4$	$1,8 \pm 0,4$

Πίνακας 18: Συγκεντρώσεις, σε $\mu\text{g/mL}$, των SCFAs και των αμινοξέων πριν την αερόβια άσκηση και αμέσως μετά το πέρας και μετά από μία ώρα από το πέρας της άσκησης για το 2^ο δείγμα σιέλου.

Αναλύτης	Συγκέντρωση πριν άσκηση ($\mu\text{g/mL}$)	Συγκέντρωση αμέσως μετά το πέρας της άσκησης ($\mu\text{g/mL}$)	Συγκέντρωση 1 ώρα μετά το πέρας της άσκησης ($\mu\text{g/mL}$)
φορμικό οξύ	$6,7 \pm 0,2$	$5,1 \pm 0,2$	$5,5 \pm 0,2$
οξικό οξύ	$6,7 \pm 0,5$	$1,7 \pm 0,5$	$1,2 \pm 0,5$
προπιονικό οξύ	$5,2 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1$	$5,1 \pm 0,1$
ισοβουτυρικό οξύ	$0,7 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,1$
βουτυρικό οξύ	$0,8 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,1$
3-μεθυλοβουτυρικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
πεντανοϊκό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
οκτανοϊκό οξύ	$8,6 \pm 0,6$	$0,5 \pm 0,6$	$0,3 \pm 0,6$
DL-β-υδροξυβουτυρικό οξύ	$0,7 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$
DL-2-υδροξυβουτυρικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
2-υδροξυπεντανοϊκό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
2-αμινοβουτυρικό οξύ	$2,1 \pm 0,1$	Μη ανιχνεύσιμο	$1,4 \pm 0,1$
DL-3 αμινοϊσοβουτυρικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
4-αμινο-3-υδροξυβουτυρικό οξύ	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο	Μη ανιχνεύσιμο
L-αλανίνη	$5,4 \pm 0,2$	$0,7 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,2$
γλυκίνη	$3,6 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,2$
L-βαλίνη	$4,8 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$
L-λευκίνη	$2,5 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$
L-ισολευκίνη	$1,1 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,1$
L-προλίνη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη
ασπαραγίνη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη	Μη ανιχνεύσιμη
L-μεθειονίνη	$1,2 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$
ασπαραγινικό οξύ	$5,4 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,1$	$4,7 \pm 0,1$
L-γλουταμικό οξύ	$3,9 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$	$3,4 \pm 0,1$
L-λυσίνη	$4,6 \pm 0,1$	Μη ανιχνεύσιμη	$1,7 \pm 0,1$
L-φαινυλαλανίνη	$10,5 \pm 0,4$	$8,2 \pm 0,4$	$7,3 \pm 0,4$



Εικόνα 47: Ποσοστό μεταβολής (%) της συγκέντρωσης καθενός από τα SCFAs αμέσως μετά το πέρας και μετά από μία ώρα από το πέρας της άσκησης σε σχέση με την άσκηση για το 1^ο και το 2^ο δείγμα σιέλου.



Εικόνα 48: Ποσοστό μεταβολής (%) της συγκέντρωσης καθενός από τα αμινοξέα αμέσως μετά το πέρας και μετά από μία ώρα από το πέρας της άσκησης σε σχέση με πριν την άσκηση για το 1^ο και 2^ο δείγμα σιέλου.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία αναπτύχθηκε μία σχετικά γρήγορη, αξιόπιστη και ευαίσθητη μέθοδος ταυτόχρονου προσδιορισμού μη-υποκατεστημένων και υποκατεστημένων (υδροξυ-, αμινο- και υδροξυ-αμινο) SCFAs και αμινοξέων μετά από παραγωγοποίηση, με αέρια χρωματογραφία και ανιχνευτή φασματομετρία μάζας σε σχέση με άλλες μεθόδους στις οποίες γίνεται η χρήση μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (Fu et al., 2022c). Η χρήση μίας ενιαίας αναλυτικής μεθόδου μειώνει τον χρόνο, το κόστος και την απαιτούμενη ποσότητα δείγματος, καθιστώντας την ιδιαίτερα χρήσιμη για εφαρμογές στη στοχευμένη μεταβολομική, την κλινική έρευνα και την ανάλυση τροφίμων.

Η παραγωγοποίηση με iBCF οδήγησε στο σχηματισμό παραγώγων μοριακού βάρους μεγαλύτερου από αυτά άλλων χλωροφορμικών αλκυλεστέρων, όπως ο χλωροφορμικός αιθυλεστέρας, επιτρέποντας τον σαφή αεριοχρωματογραφικό διαχωρισμό των αναλυτών. Η χρήση του ανιχνευτή φασματομετρίας μάζας συνέβαλε στην αξιόπιστη ταυτοποίηση μέσω της δημιουργίας μοναδικού χημικού «αποτυπώματος» για κάθε αναλύτη. Ειδικότερα, για τα υδροξυ-, αμινο- και υδροξυ-αμινο-SCFAs και τα αμινοξέα, τα οποία περιέχουν δύο ή τρεις χαρακτηριστικές ομάδες, η αντίδραση παραγωγοποίησης ήταν επιτυχής. Η αναλυτική μέθοδος εμφάνισε καλή γραμμικότητα στις περιοχές συγκεντρώσεων που μελετήθηκαν καθώς και ικανοποιητική επαναληψιμότητα- αναπαραγωγικότητα. Παράλληλα, η διαδικασία προετοιμασίας των δειγμάτων αποδείχθηκε κατάλληλη για πολύπλοκα υποστρώματα, περιορίζοντας τις επιδράσεις μήτρας.

Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε με επιτυχία σε δείγματα σιέλου, ούρων, κοπράνων και σε επιλεγμένα τρόφιμα και παρουσίασε ικανοποιητική εκλεκτικότητα καθώς επιτεύχθηκε σαφής διαχωρισμός των ενώσεων. Σε δείγματα σιέλου και ούρων ανιχνεύθηκαν οι περισσότεροι αναλύτες ενώ σε δείγματα κοπράνων ανιχνεύθηκαν όλα τα SCFAs σε υψηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τα άλλα δύο βιολογικά δείγματα καθώς και τα περισσότερα αμινοξέα. Επιπλέον, στο δείγμα αυγού ανιχνεύθηκαν κάποια SCFAs και όλα τα μελετούμενα αμινοξέα. Οι διαφοροποιήσεις στα επίπεδα των αναλυτών έδειξαν την επίδραση της διατροφής και του μεταβολισμού στις συγκεντρώσεις τους.

Παράλληλα, μελετήθηκε και η επίδραση της κατανάλωσης καφέ, του καπνίσματος και της αερόβιας άσκησης στις συγκεντρώσεις των SCFAs και των αμινοξέων ως προς το χρόνο. Όσον αφορά την κατανάλωση καφέ, τα δεδομένα έδειξαν ότι αυξήθηκαν οι συγκεντρώσεις των αναλυτών στο σίελο την 1^η ώρα από την κατανάλωση ενώ στην 2^η ώρα μειώθηκαν και στην 3^η ώρα και πάλι αυξήθηκαν. Αυτή η συμπεριφορά δεν παρατηρήθηκε σε δείγματα ούρων, αφού σημειώθηκε μείωση της συγκέντρωσης των αναλυτών με την πάροδο του χρόνου. Αντίθετα, για το κάπνισμα τα δεδομένα έδειξαν αύξηση των συγκεντρώσεων με την πάροδο των τριών ωρών μετά από το κάπνισμα. Ίδια συμπεριφορά, με αύξηση των συγκεντρώσεων των αναλυτών παρατηρήθηκε και αμέσως μετά το πέρας καθώς και μία ώρα μετά το πέρας της αερόβιας άσκησης. Συνεπώς, η μέθοδος αυτή μπορεί να αποτελέσει ένα χρήσιμο εργαλείο για εφαρμογές στη βιοϊατρική έρευνα, στη στοχευμένη μεταβολομική, στη βιομηχανία τροφίμων και στον ποιοτικό έλεγχο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agus, A., Planchais, J., & Sokol, H. (2018). Gut Microbiota Regulation of Tryptophan Metabolism in Health and Disease. In *Cell Host and Microbe* (Vol. 23, Number 6, pp. 716–724). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.05.003>
- Ahmad, S., Assaf, M., Thomas, B., Ibrahim, H., Muppuri, G., Chand, P., Mercy, A., Kumar, M., Kumar, R., & Khan, A. (2025). Fecal Short-Chain Fatty Acids (SCFAs) and Their Role in Metabolic Disorders: A Systematic Review. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.91579>
- Akimova, D., Kakimov, A., Suychinov, A., Urazbayev, Z., Zharykbasov, Y., Ibragimo, N., Bauyrzhanova, A., & Utegenova, A. (2024). Enzymatic hydrolysis in food processing: biotechnological advancements, applications, and future perspectives. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 18, 347–365. <https://doi.org/10.5219/1962>
- Alsharhan, H., & Ficicioglu, C. (2020). Disorders of phenylalanine and tyrosine metabolism. *Translational Science of Rare Diseases*, 5(1–2), 3–58. <https://doi.org/10.3233/trd-200049>
- Baig, A. (2011). Biochemical Composition of Normal Urine. *Nature Precedings*. <https://doi.org/10.1038/npre.2011.6595.1>
- Bak, L. K., Schousboe, A., & Waagepetersen, H. S. (2006). The glutamate/GABA-glutamine cycle: Aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. In *Journal of Neurochemistry* (Vol. 98, Number 3, pp. 641–653). <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03913.x>
- Balci, N., Kurgan, Ş., Çekici, A., Çakır, T., & Serdar, M. A. (n.d.). *Free amino acid composition of saliva in patients with healthy periodontium and periodontitis*. <https://doi.org/10.1007/s00784-021-03977-7/Published>
- Bel'skaya, L. V., Sarf, E. A., & Solomatin, D. V. (2024). Free Salivary Amino Acid Profile in Breast Cancer: Clinicopathological and Molecular Biological Features. *Current Issues in Molecular Biology*, 46(6), 5614–5631. <https://doi.org/10.3390/cimb46060336>
- Blaak, E. E., Canfora, E. E., Theis, S., Frost, G., Groen, A. K., Mithieux, G., Nauta, A., Scott, K., Stahl, B., van Harselaar, J., van Tol, R., Vaughan, E. E., & Verbeke, K. (2020a). Short chain fatty acids in human gut and metabolic health. In *Beneficial Microbes* (Vol. 11, Number 5, pp. 411–455). Wageningen Academic Publishers. <https://doi.org/10.3920/BM2020.0057>
- Bouatra, S., Aziat, F., Mandal, R., Guo, A. C., Wilson, M. R., Knox, C., Bjorndahl, T. C., Krishnamurthy, R., Saleem, F., Liu, P., Dame, Z. T., Poelzer, J., Huynh, J., Yallou, F. S., Psychogios, N., Dong, E., Bogumil, R., Roehring, C., & Wishart, D. S. (2013a). The Human Urine Metabolome. *PLoS ONE*, 8(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073076>

- C. Moldoveanu, S., & David, V. (2019). Derivatization Methods in GC and GC/MS. In *Gas Chromatography - Derivatization, Sample Preparation, Application*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.81954>
- Cait, A., Hughes, M. R., Antignano, F., Cait, J., Dimitriu, P. A., Maas, K. R., Reynolds, L. A., Hacker, L., Mohr, J., Finlay, B. B., Zaph, C., McNagny, K. M., & Mohn, W. W. (2018). Microbiome-driven allergic lung inflammation is ameliorated by short-chain fatty acids. *Mucosal Immunology*, 11(3), 785–795. <https://doi.org/10.1038/mi.2017.75>
- Casanova, M. R., Azevedo-Silva, J., Rodrigues, L. R., & Preto, A. (2018). Colorectal Cancer Cells Increase the Production of Short Chain Fatty Acids by *Propionibacterium freudenreichii* Impacting on Cancer Cells Survival. *Frontiers in Nutrition*, 5. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00044>
- Chalova, P., Tazky, A., Skultety, L., Minichova, L., Chovanec, M., Ciernikova, S., Mikus, P., & Piestansky, J. (2023). Determination of short-chain fatty acids as putative biomarkers of cancer diseases by modern analytical strategies and tools: a review. In *Frontiers in Oncology* (Vol. 13). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1110235>
- Chambers, E. S., Viardot, A., Psichas, A., Morrison, D. J., Murphy, K. G., Zac-Varghese, S. E. K., MacDougall, K., Preston, T., Tedford, C., Finlayson, G. S., Blundell, J. E., Bell, J. D., Thomas, E. L., Mt-Isa, S., Ashby, D., Gibson, G. R., Kolida, S., Dhillo, W. S., Bloom, S. R., ... Frost, G. (2015). Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults. *Gut*, 64(11), 1744–1754. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307913>
- Chamtouri, M., Merghni, A., Salazar, N., Redruello, B., Gaddour, N., Mastouri, M., Arbolea, S., & de los Reyes-Gavilán, C. G. (2023). An Overview on Fecal Profiles of Amino Acids and Related Amino-Derived Compounds in Children with Autism Spectrum Disorder in Tunisia. *Molecules*, 28(7). <https://doi.org/10.3390/molecules28073269>
- Chandrasekhar, S., & Karri, P. (2006). Aromaticity in azlactone anions and its significance for the Erlenmeyer synthesis. *Tetrahedron Letters*, 47(32), 5763–5766. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2006.06.006>
- Chang, P. V., Hao, L., Offermanns, S., & Medzhitov, R. (2014). The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(6), 2247–2252. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322269111>
- Chemchem, M., Chemchem, A., Aydinler, B., & Seferoğlu, Z. (2022). Recent advances in colorimetric and fluorometric sensing of neurotransmitters by organic scaffolds. In *European Journal of Medicinal Chemistry* (Vol. 244). Elsevier Masson s.r.l. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114820>

- Chen, Y., Xu, C., Huang, R., Song, J., Li, D., & Xia, M. (2018). Butyrate from pectin fermentation inhibits intestinal cholesterol absorption and attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 56, 175–182. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.02.011>
- Clarke, S. F., Murphy, E. F., O’Sullivan, O., Lucey, A. J., Humphreys, M., Hogan, A., Hayes, P., O’Reilly, M., Jeffery, I. B., Wood-Martin, R., Kerins, D. M., Quigley, E., Ross, R. P., O’Toole, P. W., Molloy, M. G., Falvey, E., Shanahan, F., & Cotter, P. D. (2014). Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. *Gut*, 63(12), 1913–1920. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-306541>
- Cornelis, M. C., Monda, K. L., Yu, K., Paynter, N., Azzato, E. M., Bennett, S. N., Berndt, S. I., Boerwinkle, E., Chanock, S., Chatterjee, N., Couper, D., Curhan, G., Heiss, G., Hu, F. B., Hunter, D. J., Jacobs, K., Jensen, M. K., Kraft, P., Landi, M. T., ... Caporaso, N. E. (2011). Genome-wide meta-analysis identifies regions on 7p21 (AHR) and 15q24 (CYP1A2) as determinants of habitual caffeine consumption. *PLoS Genetics*, 7(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002033>
- Cruzat, V. F., Krause, M., & Newsholme, P. (2014). Amino acid supplementation and impact on immune function in the context of exercise. In *Journal of the International Society of Sports Nutrition* (Vol. 11, Number 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12970-014-0061-8>
- Dalangin, R., Kim, A., & Campbell, R. E. (2020). The role of amino acids in neurotransmission and fluorescent tools for their detection. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Number 17, pp. 1–36). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21176197>
- Dame, Z. T., Aziat, F., Mandal, R., Krishnamurthy, R., Bouatra, S., Borzouie, S., Guo, A. C., Sajed, T., Deng, L., Lin, H., Liu, P., Dong, E., & Wishart, D. S. (2015a). The human saliva metabolome. *Metabolomics*, 11(6), 1864–1883. <https://doi.org/10.1007/s11306-015-0840-5>
- Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W., & Bossier, P. (2009). Short-chain fatty acids and poly- β -hydroxyalkanoates: (New) Biocontrol agents for a sustainable animal production. In *Biotechnology Advances* (Vol. 27, Number 6, pp. 680–685). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.04.026>
- Den Besten, G., Bleeker, A., Gerding, A., Van Eunen, K., Havinga, R., Van Dijk, T. H., Oosterveer, M. H., Jonker, J. W., Groen, A. K., Reijngoud, D. J., & Bakker, B. M. (2015). Short-chain fatty acids protect against high-fat diet-induced obesity via a pparg-dependent switch from lipogenesis to fat oxidation. *Diabetes*, 64(7), 2398–2408. <https://doi.org/10.2337/db14-1213>
- Den Besten, G., Van Eunen, K., Groen, A. K., Venema, K., Reijngoud, D. J., & Bakker, B. M. (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. In *Journal of Lipid Research* (Vol. 54, Number 9, pp. 2325–2340). <https://doi.org/10.1194/jlr.R036012>

- D'Este, M., Alvarado-Morales, M., & Angelidaki, I. (2018). Amino acids production focusing on fermentation technologies – A review. In *Biotechnology Advances* (Vol. 36, Number 1, pp. 14–25). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.09.001>
- Dewangan, Y., Berdimurodov, E., & Verma, D. K. (2023). Amino acids: Classification, synthesis methods, reactions, and determination. In *Handbook of Biomolecules: Fundamentals, Properties and Applications* (pp. 3–23). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91684-4.00015-3>
- Díaz de Sandy-Galán, D. A., Villamil-Ramírez, H., Rodríguez-Cruz, M., López-Contreras, B., León-Mimila, P., Olivares-Arévalo, M., Maldonado-Hernández, J., Domínguez-Calderon, I., Salmerón, J., Cerqueda-García, D., Villarreal-Molina, T., Velázquez-Cruz, R., & Canizales-Quinteros, S. (2025). Association of Gut Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids With Persistent Elevated Serum Transaminase Levels in Normal Weight and Obesity: A Pilot Study. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2025(1). <https://doi.org/10.1155/jnme/6652392>
- Donohoe, D. R., Garge, N., Zhang, X., Sun, W., O'Connell, T. M., Bunger, M. K., & Bultman, S. J. (2011). The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell Metabolism*, 13(5), 517–526. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.02.018>
- Du, Y., He, C., An, Y., Huang, Y., Zhang, H., Fu, W., Wang, M., Shan, Z., Xie, J., Yang, Y., & Zhao, B. (2024). The Role of Short Chain Fatty Acids in Inflammation and Body Health. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 25, Number 13). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms25137379>
- Duncan, S. H., Barcenilla, A., Stewart, C. S., Pryde, S. E., & Flint, H. J. (2002). Acetate utilization and butyryl coenzyme A (CoA): Acetate-CoA transferase in butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10), 5186–5190. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.10.5186-5190.2002>
- Dutertre, S., Becker, C. M., & Betz, H. (2012). Inhibitory glycine receptors: An update. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 287, Number 48, pp. 40216–40223). <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.408229>
- El-Salhy, M., Valeur, J., Hausken, T., & Gunnar Hatlebakk, J. (2021). Changes in fecal short-chain fatty acids following fecal microbiota transplantation in patients with irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterology and Motility*, 33(2). <https://doi.org/10.1111/nmo.13983>
- Emery, P. W. (2012). Amino acids: Metabolism. In *Encyclopedia of Human Nutrition* (Vols. 1–4, pp. 72–78). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375083-9.00010-6>
- Fischbach, M. A., & Sonnenburg, J. L. (2011). Eating for two: How metabolism establishes interspecies interactions in the gut. In *Cell Host and Microbe* (Vol. 10, Number 4, pp. 336–347). <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.10.002>

- Fu, Z., Jia, Q., Zhang, H., Kang, L., Sun, X., Zhang, M., Wang, Y., & Hu, P. (2022b). Simultaneous quantification of eleven short-chain fatty acids by derivatization and solid phase microextraction - Gas chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1661. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462680>
- Furuhashi, T., Sugitate, K., Nakai, T., Jikumaru, Y., & Ishihara, G. (2018). Rapid profiling method for mammalian feces short chain fatty acids by GC-MS. *Analytical Biochemistry*, 543, 51–54. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.12.001>
- Haghikia, A., Zimmermann, F., Schumann, P., Jasina, A., Roessler, J., Schmidt, D., Heinze, P., Kaisler, J., Nageswaran, V., Aigner, A., Ceglarek, U., Cineus, R., Hegazy, A. N., Van Der Vorst, E. P. C., Doring, Y., Strauch, C. M., Nemet, I., Tremaroli, V., Dwibedi, C., ... Landmesser, U. (2022). Propionate attenuates atherosclerosis by immune-dependent regulation of intestinal cholesterol metabolism. *European Heart Journal*, 43(6), 518–533. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab644>
- He, F., Wu, C., Li, P., Li, N., Zhang, D., Zhu, Q., Ren, W., & Peng, Y. (2018). Functions and Signaling Pathways of Amino Acids in Intestinal Inflammation. In *BioMed Research International* (Vol. 2018). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2018/9171905>
- Hetzel, M., Brock, M., Selmer, T., Pierik, A. J., Golding, B. T., & Buckel, W. (2003). Acryloyl-CoA reductase from *Clostridium propionicum*: An enzyme complex of propionyl-CoA dehydrogenase and electron-transferring flavoprotein. *European Journal of Biochemistry*, 270(5), 902–910. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03450.x>
- Hussain, T., Murtaza, G., Kalhoro, D. H., Kalhoro, M. S., Metwally, E., Chughtai, M. I., Mazhar, M. U., & Khan, S. A. (2021). Relationship between gut microbiota and host-metabolism: Emphasis on hormones related to reproductive function. In *Animal Nutrition* (Vol. 7, Number 1, pp. 1–10). KeAi Communications Co. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2020.11.005>
- Ishida, Y., Inoue, R., & Tsunoda, M. (2023). Analysis of Urinary Amino Acids by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection Using 2,3-Naphthalenedicarboxaldehyde as Fluorescence Derivatization Reagent. *Separations*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/separations10040224>
- Jerath, R., & Beveridge, C. (2019). Emerging Phenomenological and Biological Principles of Consciousness: Top Insights of Prevailing Models, Concepts, and Observations. *World Journal of Neuroscience*, 09(03), 157–190. <https://doi.org/10.4236/wjns.2019.93011>
- Kashyap, B., Hyvärinen, E., & Kullaa, A. M. (2024). Salivary Short-chain Fatty Acids (SCFAs) Are Viable Predictors of Early Changes in Systemic Health. In *The Chinese journal of dental research* (Vol. 27, Number 3, pp. 193–202). <https://doi.org/10.3290/j.cjdr.b5698392>

- Kitase, Y., Vallejo, J. A., Gutheil, W., Vemula, H., Jähn, K., Yi, J., Zhou, J., Brotto, M., & Bonewald, L. F. (2018). β -aminoisobutyric Acid, L-BAIBA, Is a Muscle-Derived Osteocyte Survival Factor. *Cell Reports*, 22(6), 1531–1544. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.01.041>
- Koh, A., De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., & Bäckhed, F. (2016). From dietary fiber to host physiology: Short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. In *Cell* (Vol. 165, Number 6, pp. 1332–1345). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.041>
- Lau, A., & Tymianski, M. (2010). Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. In *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* (Vol. 460, Number 2, pp. 525–542). <https://doi.org/10.1007/s00424-010-0809-1>
- Li, G., Li, Z., & Liu, J. (2024). Amino acids regulating skeletal muscle metabolism: mechanisms of action, physical training dosage recommendations and adverse effects. In *Nutrition and Metabolism* (Vol. 21, Number 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12986-024-00820-0>
- Li, P., Yin, Y. L., Li, D., Kim, W. S., & Wu, G. (2007). Amino acids and immune function. In *British Journal of Nutrition* (Vol. 98, Number 2, pp. 237–252). <https://doi.org/10.1017/S000711450769936X>
- Liu, L., Li, Q., Yang, Y., & Guo, A. (2021). Biological Function of Short-Chain Fatty Acids and Its Regulation on Intestinal Health of Poultry. In *Frontiers in Veterinary Science* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.736739>
- Louis, P., Duncan, S. H., McCrae, S. I., Millar, J., Jackson, M. S., & Flint, H. J. (2004). Restricted Distribution of the Butyrate Kinase Pathway among Butyrate-Producing Bacteria from the Human Colon. *Journal of Bacteriology*, 186(7), 2099–2106. <https://doi.org/10.1128/JB.186.7.2099-2106.2004>
- Louis, P., & Flint, H. J. (2017). Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. In *Environmental Microbiology* (Vol. 19, Number 1, pp. 29–41). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13589>
- Macfarlane, S., & Macfarlane, G. T. (2003a). Regulation of short-chain fatty acid production. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62(1), 67–72. <https://doi.org/10.1079/pns2002207>
- Macy, J. M., Ljungdahl, L. G., & Gottschalk, G. (1978). Pathway of Succinate and Propionate Formation in *Bacteroides fragilis*. In *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*.
- Mancini, A., Vitucci, D., Lasorsa, V. A., Lupo, C., Brustio, P. R., Capasso, M., Orrù, S., Rainoldi, A., Schena, F., & Buono, P. (2024). Six months of different exercise type in sedentary primary schoolchildren: impact on physical fitness and saliva microbiota composition. *Frontiers in Nutrition*, 11. <https://doi.org/10.3389/fnut.2024.1465707>

- Marchesi, J. R., Adams, D. H., Fava, F., Hermes, G. D. A., Hirschfield, G. M., Hold, G., Quraishi, M. N., Kinross, J., Smidt, H., Tuohy, K. M., Thomas, L. V., Zoetendal, E. G., & Hart, A. (2016). The gut microbiota and host health: A new clinical frontier. *Gut*, 65(2), 330–339. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309990>
- McNabney, S. M., & Henagan, T. M. (2017). Short chain fatty acids in the colon and peripheral tissues: A focus on butyrate, colon cancer, obesity and insulin resistance. In *Nutrients* (Vol. 9, Number 12). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu9121348>
- Miller, T. L., & Wolin, M. J. (1996). Pathways of Acetate, Propionate, and Butyrate Formation by the Human Fecal Microbial Flora. In *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* (Vol. 62, Number 5).
- Mitra, A., MacIntyre, D. A., Marchesi, J. R., Lee, Y. S., Bennett, P. R., & Kyrgiou, M. (2016). The vaginal microbiota, human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia: What do we know and where are we going next? In *Microbiome* (Vol. 4). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0203-0>
- Mohseni Ghalehghazi, A., & Zhong, W. (2025). From Nutrition to Innovation: Biomedical Applications of Egg Components. In *Molecules* (Vol. 30, Number 15). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/molecules30153260>
- Morris, R. G. M. (2013). NMDA receptors and memory encoding. In *Neuropharmacology* (Vol. 74, pp. 32–40). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.04.014>
- Oktanuli, P., Patricia Zikir, A., Taher, P., Herawati, M., & Sean, M. (2023). Effect of Robusta Coffee (*Coffea Canephora*) on the Degree of Acidity (pH) of Saliva. *INTERNATIONAL JOURNAL OF CLINICAL SCIENCE AND MEDICAL RESEARCH*, 03(05). <https://doi.org/10.55677/IJCSMR/V3I5-02/2023>
- Oliphant, K., & Allen-Vercoe, E. (2019). Macronutrient metabolism by the human gut microbiome: Major fermentation by-products and their impact on host health. *Microbiome*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0704-8>
- Otake, S., Chubachi, S., Miyamoto, J., Haneishi, Y., Arai, T., Iizuka, H., Shimada, T., Sakurai, K., Okuzumi, S., Kabata, H., Asakura, T., Miyata, J., Irie, J., Asano, K., Nakamura, H., Kimura, I., & Fukunaga, K. (2025). Impact of smoking on gut microbiota and short-chain fatty acids in human and mice: Implications for COPD. *Mucosal Immunology*, 18(2), 353–365. <https://doi.org/10.1016/j.mucimm.2024.12.006>
- Parrott, A. C. (2006). Nicotine psychobiology: How chronic-dose prospective studies can illuminate some of the theoretical issues from acute-dose research. *Psychopharmacology*, 184(3–4), 567–576. <https://doi.org/10.1007/s00213-005-0294-y>

- Piwożarek, K., Lipińska, E., Hać-Szymańczuk, E., Kieliszek, M., & Ścibisz, I. (2018). *Propionibacterium* spp.—source of propionic acid, vitamin B12, and other metabolites important for the industry. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 102, Number 2, pp. 515–538). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8616-7>
- Pluznick, J. L. (2016). Gut microbiota in renal physiology: focus on short-chain fatty acids and their receptors. In *Kidney International* (Vol. 90, Number 6, pp. 1191–1198). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.06.033>
- Pradhan, S., Khan, M. T., & Moholkar, V. S. (2024). Polyhydroxyalkanoates (PHAs): Mechanistic Insights and Contributions to Sustainable Practices. *Encyclopedia*, 4(4), 1933–1947. <https://doi.org/10.3390/encyclopedia4040126>
- Prathibha, K. M., Johnson, P., Ganesh, M., & Subhashini, A. S. (2013). Evaluation of salivary profile among adult type 2 diabetes mellitus patients in south India. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 7(8), 1592–1595. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2013/5749.3232>
- Puglisi, M. J., & Fernandez, M. L. (2022). The Health Benefits of Egg Protein. In *Nutrients* (Vol. 14, Number 14). MDPI. <https://doi.org/10.3390/nu14142904>
- Ragsdale, S. W., & Pierce, E. (2008). Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl pathway of CO₂ fixation. In *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* (Vol. 1784, Number 12, pp. 1873–1898). <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.08.012>
- Ravel, J., Gajer, P., Abdo, Z., Schneider, G. M., Koenig, S. S. K., McCulle, S. L., Karlebach, S., Gorle, R., Russell, J., Tacket, C. O., Brotman, R. M., Davis, C. C., Ault, K., Peralta, L., & Forney, L. J. (2011). Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(SUPPL. 1), 4680–4687. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002611107>
- Reeds, P. J., & Jahoor, F. (2001). The amino acid requirements of disease. *Clinical Nutrition*, 20(SUPPL. 1), 15–22. <https://doi.org/10.1054/clnu.2001.0402>
- Ríos-Covián, D., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., Gueimonde, M., De los Reyes-Gavilán, C. G., & Salazar, N. (2016a). Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 7, Number FEB). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00185>
- Roblegg, E., Coughran, A., & Sirjani, D. (2019a). Saliva: An all-rounder of our body. In *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (Vol. 142, pp. 133–141). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.06.016>
- Rosa, F., Marigliano, B., Mannucci, S., Candelli, M., Savioli, G., Merra, G., Gabrielli, M., Gasbarrini, A., Franceschi, F., & Piccioni, A. (2024). Coffee and Microbiota: A Narrative Review. In *Current Issues in Molecular Biology* (Vol. 46, Number 1, pp. 896–908). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/cimb46010057>

- Rose, C., Parker, A., Jefferson, B., & Cartmell, E. (2015). The characterization of feces and urine: A review of the literature to inform advanced treatment technology. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 45(17), 1827–1879. <https://doi.org/10.1080/10643389.2014.1000761>
- Rothwell, J. A., Fillâtre, Y., Martin, J. F., Lyan, B., Pujos-Guillot, E., Fezeu, L., Hercberg, S., Comte, B., Galan, P., Touvier, M., & Manach, C. (2014). New biomarkers of coffee consumption identified by the non-targeted metabolomic profiling of cohort study subjects. *PLoS ONE*, 9(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093474>
- Rowland, S. N., Green, C. G., Halliwill, J. R., Singanayagam, A., & Heaney, L. M. (2025). Gut feelings on short-chain fatty acids to regulate respiratory health. In *Trends in Endocrinology and Metabolism* (Vol. 36, Number 10, pp. 889–898). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2024.12.007>
- Saygili, S., Hegde, S., & Shi, X. Z. (2024a). Effects of Coffee on Gut Microbiota and Bowel Functions in Health and Diseases: A Literature Review. In *Nutrients* (Vol. 16, Number 18). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/nu16183155>
- Schauber, J., Dorschner, R. A., Yamasaki, K., Brouha, B., & Gallo, R. L. (2006). Control of the innate epithelial antimicrobial response is cell-type specific and dependent on relevant microenvironmental stimuli. *Immunology*, 118(4), 509–519. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2006.02399.x>
- Schipper, R. G., Silletti, E., & Vingerhoeds, M. H. (2007). Saliva as research material: Biochemical, physicochemical and practical aspects. In *Archives of Oral Biology* (Vol. 52, Number 12, pp. 1114–1135). <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2007.06.009>
- Scott, K. P., Martin, J. C., Campbell, G., Mayer, C. D., & Flint, H. J. (2006). Whole-genome transcription profiling reveals genes up-regulated by growth on fucose in the human gut bacterium “Roseburia inulinivorans.” *Journal of Bacteriology*, 188(12), 4340–4349. <https://doi.org/10.1128/JB.00137-06>
- Sergeant, M. J., Constantinidou, C., Cogan, T. A., Bedford, M. R., Penn, C. W., & Pallen, M. J. (2014). Extensive microbial and functional diversity within the chicken cecal microbiome. *PLoS ONE*, 9(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091941>
- Shen, K., Tang, W., Wu, C., Zhao, H., Hussain, A., Yan, Y., Cao, Y., Fan, W., Li, M., Lu, Q., Kang, X., & Wu, P. (2026). Monitoring Changes in Salivary Amino Acids in Smokers Using Nanofiber-Based Solid-Phase Extraction Combined With High-Performance Liquid Chromatography. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.102104>
- Silva, Y. P., Bernardi, A., & Frozza, R. L. (2020). The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00025>

- Skenderidou, I., Leontopoulos, S., & Skenderidis, P. (2025). Functional Food Ingredients Enhancing Immune Health. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 26, Number 17). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms26178408>
- Smith, P. M., Howitt, M. R., Panikov, N., Michaud, M., Gallini, C. A., Bohlooly-Y, M., Glickman, J. N., & Garrett, W. S. (2013). The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic T reg cell homeostasis. *Science*, *341*(6145), 569–573. <https://doi.org/10.1126/science.1241165>
- Sobolevsky, T. G., Revelsky, A. I., Revelsky, I. A., Miller, B., & Oriedo, V. (2004). Simultaneous determination of fatty, dicarboxylic and amino acids based on derivatization with isobutyl chloroformate followed by gas chromatography - Positive ion chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, *800*(1–2), 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2003.09.013>
- Stilling, R. M., van de Wouw, M., Clarke, G., Stanton, C., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2016). The neuropharmacology of butyrate: The bread and butter of the microbiota-gut-brain axis? In *Neurochemistry International* (Vol. 99, pp. 110–132). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2016.06.011>
- Sushma, B. J., Parashar, S., Tomar, B. S., Meena, A., & Priyanka, B. J. (2025). Urinary Screening for Aminoacidurias Using Chromatography and Serum Amino Acid Profile in Type 2 Diabetes and Healthy Controls. *Biochemistry Research International*, *2025*(1). <https://doi.org/10.1155/bri/4060832>
- Takagi, R., Sasaki, K., Sasaki, D., Fukuda, I., Tanaka, K., Yoshida, K., Kondo, A., & Osawa, R. (2016). A single-batch fermentation system to simulate human colonic microbiota for high-throughput evaluation of prebiotics. *PLoS ONE*, *11*(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160533>
- Tang, T. W. H., Chen, H. C., Chen, C. Y., Yen, C. Y. T., Lin, C. J., Prajnamitra, R. P., Chen, L. L., Ruan, S. C., Lin, J. H., Lin, P. J., Lu, H. H., Kuo, C. W., Chang, C. M., Hall, A. D., Vivas, E. I., Shui, J. W., Chen, P., Hacker, T. A., Rey, F. E., ... Hsieh, P. C. H. (2019). Loss of Gut Microbiota Alters Immune System Composition and Cripples Postinfarction Cardiac Repair. *Circulation*, *139*(5), 647–659. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.035235>
- Tanianskii, D. A., Jarzebska, N., Birkenfeld, A. L., O'sullivan, J. F., & Rodionov, R. N. (2019). Beta-aminoisobutyric acid as a novel regulator of carbohydrate and lipid metabolism. In *Nutrients* (Vol. 11, Number 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu11030524>
- Tews, H. C., Elger, T., Gunawan, S., Fererberger, T., Sommersberger, S., Loibl, J., Huss, M., Liebisch, G., Müller, M., Kandulski, A., & Buechler, C. (2023). Fecal short chain fatty acids and urinary 3-indoxyl sulfate do not discriminate between patients with Crohn's disease and ulcerative colitis and are not of diagnostic utility for predicting disease severity. *Lipids in Health and Disease*, *22*(1). <https://doi.org/10.1186/s12944-023-01929-6>

- Tolhurst, G., Heffron, H., Lam, Y. S., Parker, H. E., Habib, A. M., Diakogiannaki, E., Cameron, J., Grosse, J., Reimann, F., & Gribble, F. M. (2012). Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2. *Diabetes*, 61(2), 364–371. <https://doi.org/10.2337/db11-1019>
- Tsuda, S., Hayashi, T., & Egawa, T. (2019). The effects of caffeine on metabolomic responses to muscle contraction in rat skeletal muscle. *Nutrients*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/nu11081819>
- Usturoi, M. G., Rațu, R. N., Crivei, I. C., Veleșcu, I. D., Usturoi, A., Stoica, F., & Radu Rusu, R. M. (2025). Unlocking the Power of Eggs: Nutritional Insights, Bioactive Compounds, and the Advantages of Omega-3 and Omega-6 Enriched Varieties. In *Agriculture (Switzerland)* (Vol. 15, Number 3). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/agriculture15030242>
- Van den Abbeele, P., Ghyselinck, J., Marzorati, M., Koch, A. M., Lambert, W., Michiels, J., & Chalvon-Demersay, T. (2022). The Effect of Amino Acids on Production of SCFA and bCFA by Members of the Porcine Colonic Microbiota. *Microorganisms*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040762>
- Venegas, D. P., De La Fuente, M. K., Landskron, G., González, M. J., Quera, R., Dijkstra, G., Harmsen, H. J. M., Faber, K. N., & Hermoso, M. A. (2019). Short chain fatty acids (SCFAs) mediated gut epithelial and immune regulation and its relevance for inflammatory bowel diseases. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 10, Number MAR). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00277>
- Verma, A., Bhagchandani, T., Rai, A., Nikita, N., Sardarni, U. K., Bhavesh, N. S., Gulati, S., Malik, R., & Tandon, R. (2024). Short-Chain Fatty Acid (SCFA) as a Connecting Link between Microbiota and Gut-Lung Axis—A Potential Therapeutic Intervention to Improve Lung Health. In *ACS Omega* (Vol. 9, Number 13, pp. 14648–14671). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c05846>
- Vernocchi, P., Del Chierico, F., & Putignani, L. (2016). Gut microbiota profiling: Metabolomics based approach to unravel compounds affecting human health. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 7, Number JUL). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01144>
- Vital, M., Howe, A. C., & Tiedje, J. M. (2014). Revealing the bacterial butyrate synthesis pathways by analyzing (meta)genomic data. *MBio*, 5(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.00889-14>
- Walton, E. L. (2018). Saliva biomarkers in neurological disorders: A “spitting image” of brain health? In *Biomedical Journal* (Vol. 41, Number 2, pp. 59–62). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2018.04.005>
- Wishart, D. S., Feunang, Y. D., Marcu, A., Guo, A. C., Liang, K., Vázquez-Fresno, R., Sajed, T., Johnson, D., Li, C., Karu, N., Sayeeda, Z., Lo, E., Assempour, N., Berjanskii, M., Singhal, S., Arndt, D., Liang, Y., Badran, H., Grant, J., ... Scalbert, A. (2018). HMDB 4.0: The human metabolome database for 2018.

- Nucleic Acids Research*, 46(D1), D608–D617.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkx1089>
- Wu, G. (2013). Functional amino acids in nutrition and health. In *Amino Acids* (Vol. 45, Number 3, pp. 407–411). <https://doi.org/10.1007/s00726-013-1500-6>
- Wu, G., & Morris, S. M. (1998). Arginine metabolism : nitric oxide and beyond. In *Biochem. J* (Vol. 336).
- Yi, X., Yang, Y., Li, T., Li, M., Yao, T., Hu, G., Wan, G., & Chang, B. (2023). Signaling metabolite β -aminoisobutyric acid as a metabolic regulator, biomarker, and potential exercise pill. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 14). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1192458>
- Zeller, I., Malovichko, M. V., Hurst, H. E., Renaud, D. E., & Scott, D. A. (2019a). Cigarette smoke reduces short chain fatty acid production by a *Porphyromonas gingivalis* clinical isolate. *Journal of Periodontal Research*, 54(5), 566–571. <https://doi.org/10.1111/jre.12660>
- Zhang, J., Wen, X., Li, Y., Li, X., Qian, C., Tian, Y., Ling, R., & Duan, Y. (2021). Diagnostic approach to thyroid cancer based on amino acid metabolomics in saliva by ultra-performance liquid chromatography with high resolution mass spectrometry. *Talanta*, 235. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122729>
- Zhang, S., Wang, H., & Zhu, M. J. (2019). A sensitive GC/MS detection method for analyzing microbial metabolites short chain fatty acids in fecal and serum samples. *Talanta*, 196, 249–254. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.12.049>
- Zhang, X., Chelliappan, B., Rajeswari, S., & Antonysamy, M. (2021). Recent Advances in Applications of Bioactive Egg Compounds in Nonfood Sectors. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.738993>
- Zhou, D., Pan, Q., Xin, F. Z., Zhang, R. N., He, C. X., Chen, G. Y., Liu, C., Chen, Y. W., & Fan, J. G. (2017). Sodium butyrate attenuates high-fat diet-induced steatohepatitis in mice by improving gut microbiota and gastrointestinal barrier. *World Journal of Gastroenterology*, 23(1), 60–75. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i1.60>
- Zoetendal, E. G., Akkermans, A. D. L., Akkermans-van Vliet, W. M., De Visser, J. A. G. M., & De Vos, W. M. (2001). The host genotype affects the bacterial community in the human gastrointestinal tract. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 13(3), 129–134. <https://doi.org/10.1080/089106001750462669>

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

1. ΦΑΣΜΑΤΑ ΜΑΖΑΣ ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΑΝΑΛΥΤΩΝ

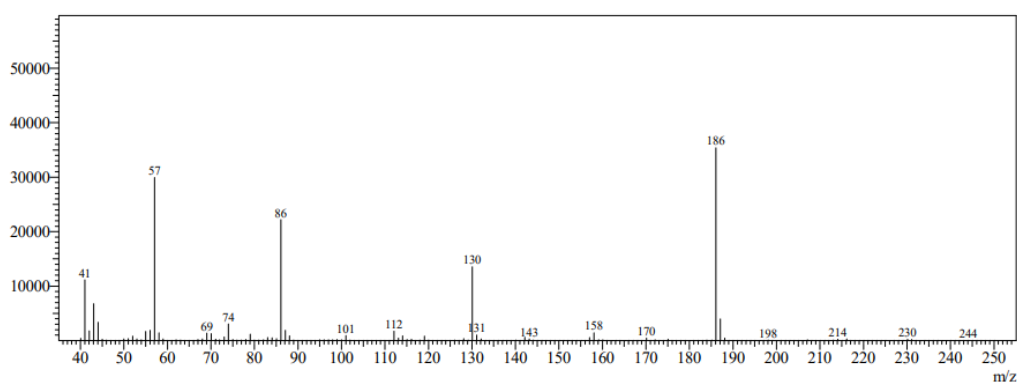
Στον **Πίνακα ΠΑ-1** αναφέρονται τα κυριότερα θραύσματα του φάσματος μάζας του κάθε αναλύτη και που αποδίδονται. Στις **Εικόνες Π-1 έως Π-26** παρατίθενται τα φάσματα μάζας προτύπων διαλυμάτων των παραγωγοποιημένων SCFAs και των αμινοξέων που λήφθηκαν σε λειτουργία SCAN με σκοπό την ταυτοποίησή τους.

Πίνακας ΠΑ-1: Επεξήγηση των φασμάτων μάζας των παραγωγοποιημένων SCFAs και αμινοξέων.

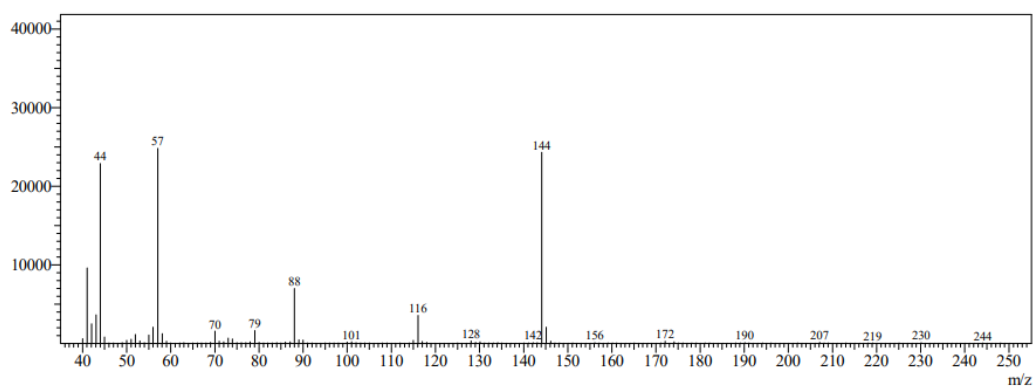
Ένωση	Χαρακτηριστικά θραύσματα
φορμικό οξύ	56- $C_4H_8^+$ 60- $C_2H_4O_2^+$
οξικό οξύ	56- $C_4H_8^+$ 79- $C_4H_7O^+$ 73- $C_3H_5O_2^+$ 61- $C_2H_5O_2^+$
προπιονικό οξύ	57- $C_4H_9^+$ 75- $C_3H_7O_2^+$
ισοβουτυρικό οξύ	57- $C_4H_9^+$ 56- $C_4H_8^+$ 89- $C_4H_8O_2^+$ 71- $C_4H_7O^+$
βουτυρικό οξύ	57- $C_4H_9^+$ 89- $C_4H_8O_2^+$ 71- $C_4H_7O^+$
3-μεθυλοβουτυρικό οξύ	57- $C_4H_9^+$ 103- $C_5H_{10}O_2^+$ 85- $C_5H_9O^+$
πεντανοϊκό οξύ	57- $C_4H_9^+$ 103- $C_5H_{10}O_2^+$ 85- $C_5H_9O^+$
οκτανοϊκό οξύ	57- $C_4H_9^+$ 145- $C_8H_{15}O_2^+$ 127- $C_8H_{13}O^+$
DL-β-υδροξυβουτυρικό οξύ	57- $C_4H_9^+$ 131- $C_6H_{11}O_3^+$ 149- $C_6H_{13}O_4^+$
DL-2-υδροξυβουτυρικό οξύ	57- $C_4H_9^+$ 87- $C_4H_7O_2^+$ 69- $C_4H_5O^+$
2-υδροξυπεντανοϊκό οξύ	57- $C_4H_9^+$ 163- $C_9H_{19}O_2^+$ 101- $C_5H_9O_2^+$ 117- $C_5H_9O_3^+$
2-αμινοβουτυρικό οξύ	57- $C_4H_9^+$ 158- $C_7H_{14}NO_3^+$ 101- $C_4H_7NO_2^+$

DL-3 αμινοϊσοβουτυρικό οξύ	57- $C_4H_9^+$ 186- $C_9H_{18}NO_4^+$ 157- $C_7H_{15}NO_3^+$ 130- $C_6H_{12}NO_2^+$ 101- $C_4H_7NO_2^+$
4-αμινο-3-υδροξυβουτυρικό οξύ	57- $C_4H_9^+$ 75- $C_3H_9NO^+$ 146- $C_6H_{12}NO_3^+$ 184- $C_8H_{16}NO_4^+$ 101- $C_4H_7NO_2^+$
L-αλανίνη	57- $C_4H_9^+$ 88- $C_3H_6NO_2^+$ 116- $C_5H_{10}NO_2^+$ 144- $C_7H_{14}NO_2^+$ 190- $C_8H_{15}NO_4^+$ 244- $C_{12}H_{22}NO_4^+$
γλυκίνη	57- $C_4H_9^+$ 248- $C_{11}H_{21}NO_4$ 102- $C_4H_8NO_2^+$ 130- $C_6H_{13}NO_2^+$ 176- $C_7H_{14}NO_4^+$ 230- $C_{11}H_{22}NO_4^+$ 74- $C_2H_4NO_2^+$
L-βαλίνη	57- $C_4H_9^+$ 72- $C_4H_{10}N^+$ 116- $C_5H_{10}NO_2^+$ 172- $C_9H_{19}NO_2^+$
L- λευκίνη	57- $C_4H_9^+$ 86- $C_5H_{12}N^+$ 130- $C_6H_{12}NO_2^+$ 186- $C_9H_{16}NO_3^+$ 230- $C_{11}H_{21}NO_4^+$
L- ισολευκίνη	57- $C_4H_9^+$ 86- $C_5H_{12}N^+$ 130- $C_6H_{12}NO_2^+$ 186- $C_9H_{16}NO_3^+$ 230- $C_{11}H_{21}NO_4^+$
L- προλίνη	57- $C_4H_9^+$ 271- $C_{14}H_{25}NO_4^+$ 70- $C_4H_8N^+$ 114- $C_5H_8NO_2^+$ 170- $C_9H_{16}NO_2^+$ 216- $C_{10}H_{17}NO_4^+$
ασπαραγίνη	57- $C_4H_9^+$ 69- $C_5H_9^+$ 169- $C_8H_{11}NO_3^+$ 187- $C_8H_{15}N_2O_3^+$ 230- $C_9H_{15}N_2O_5^+$
L-μεθειονίνη	57- $C_4H_9^+$

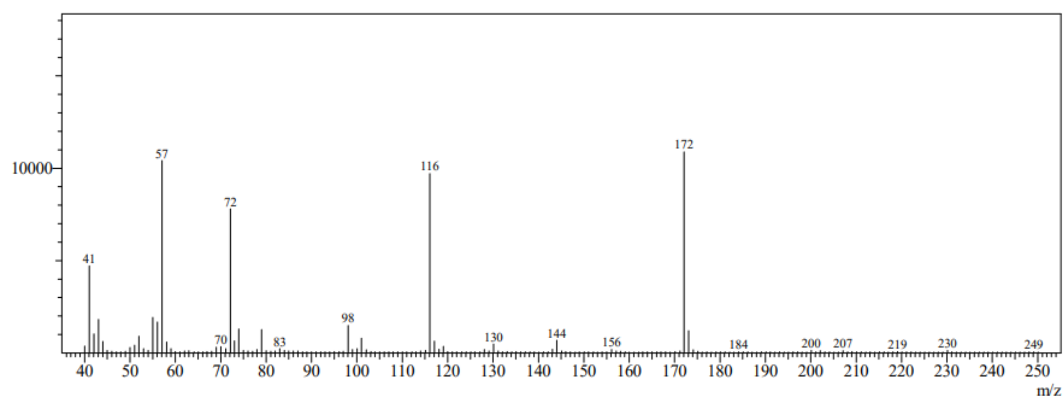
	119- $C_5H_{11}O_3^+$ 175- $C_7H_{13}NO_2S^+$ 231- $C_{10}H_{17}NO_3S^+$ 244- $C_{11}H_{18}NO_3S^+$ 204- $C_9H_{19}NO_2S^+$
ασπαραγινικό οξύ	57- $C_4H_9^+$ 244- $C_{12}H_{22}NO_4^+$ 144- $C_6H_{11}NO_3^+$ 88- $C_3H_6NO_2^+$ 132- $C_4H_6NO_4^+$ 188- $C_8H_{15}NO_4^+$ 289- $C_{13}H_{22}NO_6^+$ 345- $C_{17}H_{30}NO_6^+$
L- γλουταμικό οξύ	57- $C_4H_9^+$ 202- $C_9H_{16}NO_4^+$ 84- $C_4H_6NO^+$ 258- $C_{15}H_{24}NO_4^+$ 148- $C_5H_9NO_4^+$ 303- $C_{14}H_{25}NO_6^+$ 359- $C_{18}H_{30}NO_6^+$
L- φαινυλαλανίνη	220- $C_{13}H_{19}NO_2^+$ 57- $C_4H_9^+$ 91- $C_7H_7^+$
L- λυσίνη	57- $C_4H_9^+$ 184- $C_9H_{16}NO_2^+$ 128- $C_2H_6N_2^+$ 346- $C_{16}H_{30}N_2O_6^+$



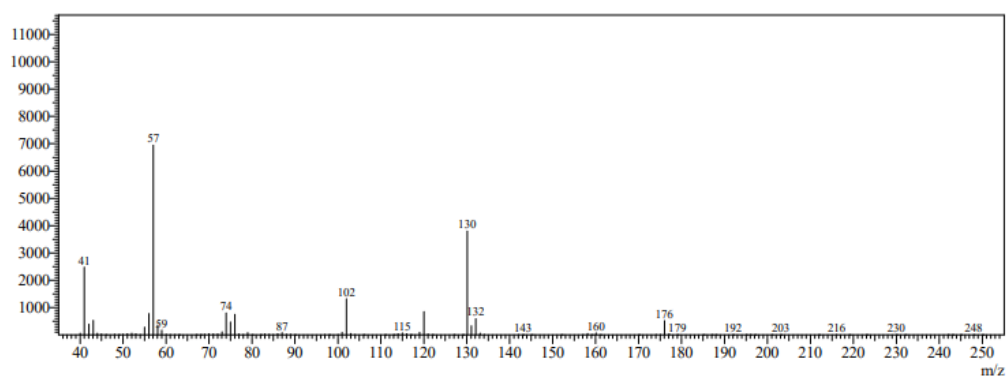
Εικόνα Π-1: Φάσμα μάζας της παραγωγοποιημένης με iBCF L-λευκίνης.



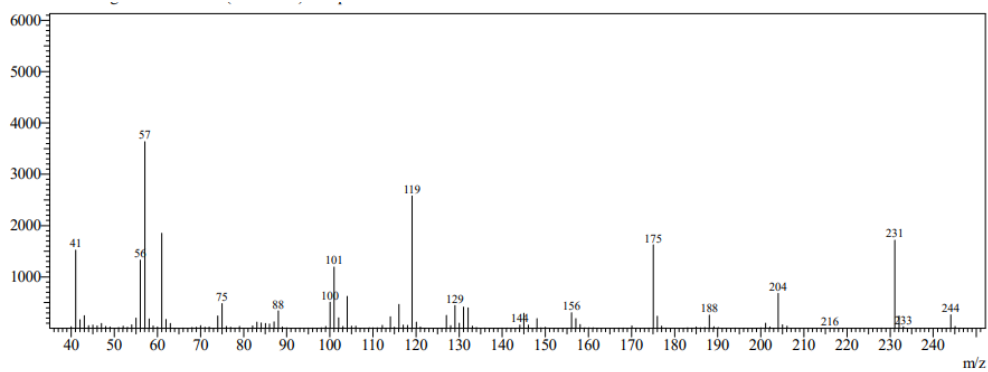
Εικόνα Π-2: Φάσμα μάζας της παραγωγοποιημένης με iBCF L-αλανίνης.



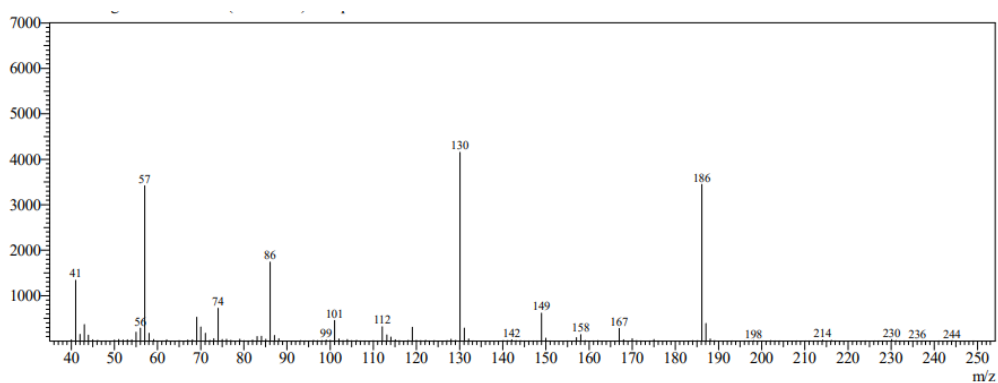
Εικόνα Π-3: Φάσμα μάζας της παραγωγοποιημένης με iBCF L-βαλίνης.



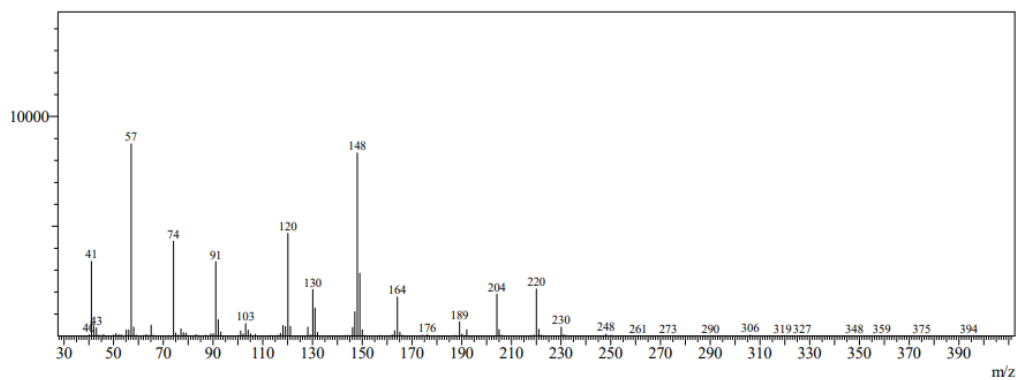
Εικόνα Π-4: Φάσμα μάζας της παραγωγοποιημένης με iBCF γλυκίνης.



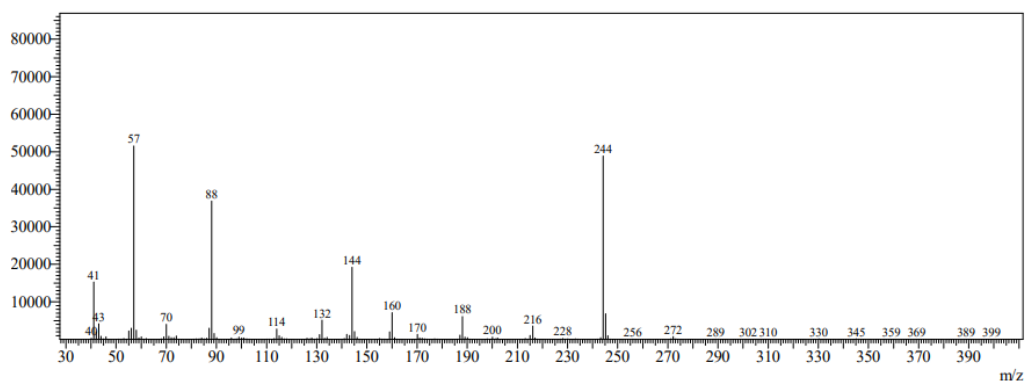
Εικόνα Π-5: Φάσμα μάζας της παραγωγοποιημένης με iBCF L-μεθειονίνης.



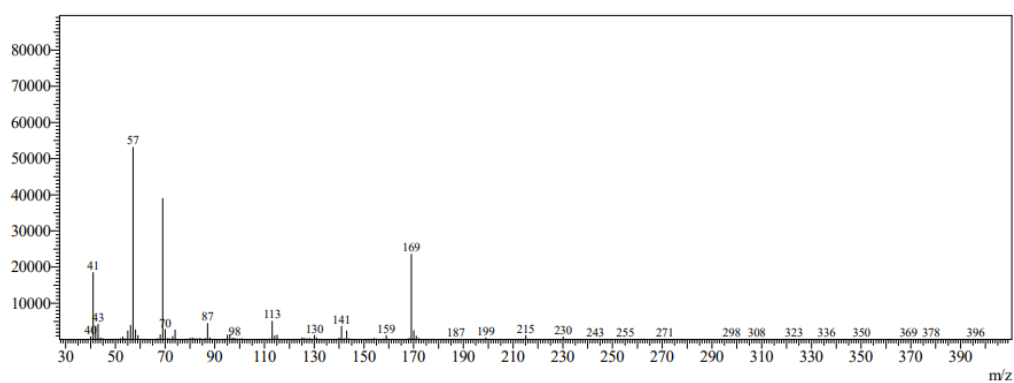
Εικόνα Π-6: Φάσμα μάζας της παραγωγοποιημένης με iBCF L-ισολευκίνης.



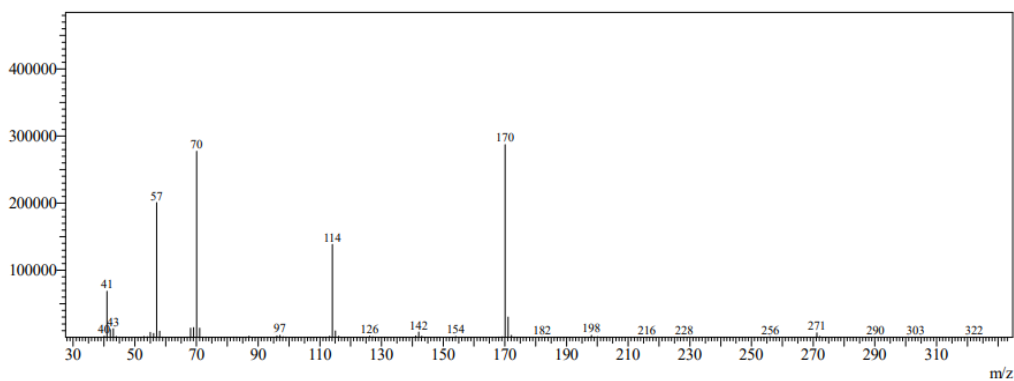
Εικόνα Π-7: Φάσμα μάζας της παραγωγοποιημένης με iBCF L-φαινυλαλανίνης.



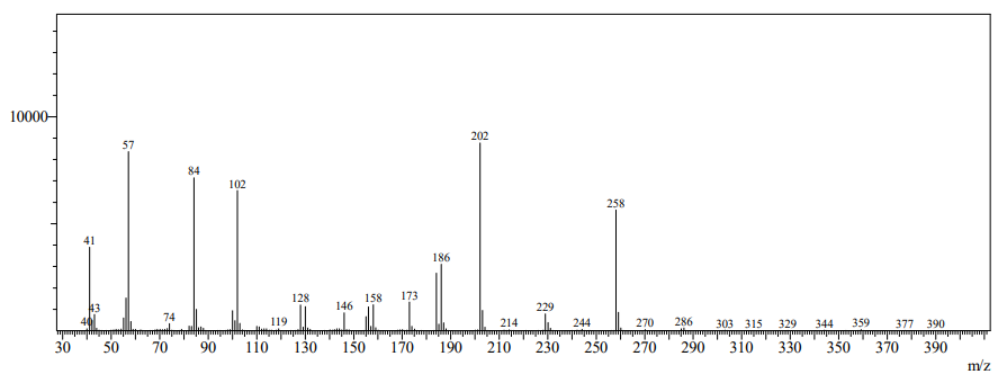
Εικόνα Π-8: Φάσμα μάζας του παραγωγοποιημένου με iBCF ασπαραγινικού οξέος.



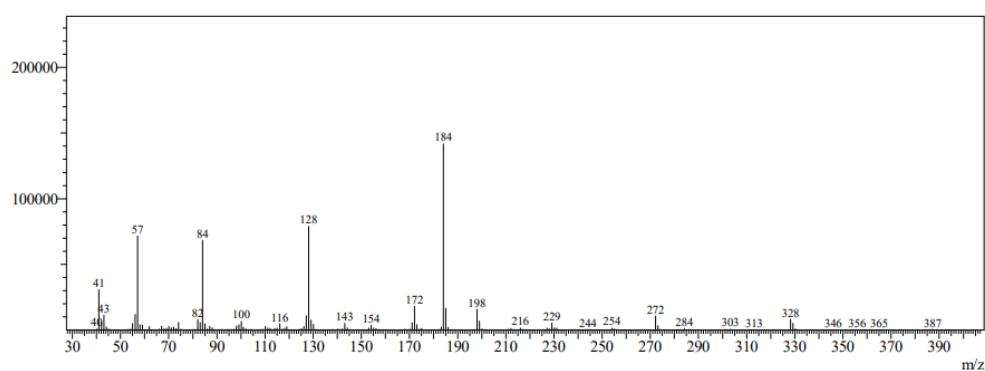
Εικόνα Π-9: Φάσμα μάζας της παραγωγοποιημένης με iBCF ασπαράγινης.



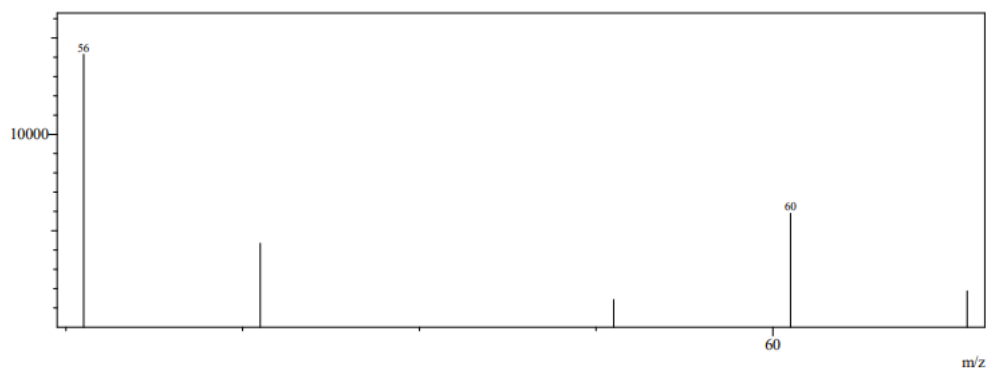
Εικόνα Π-10: Φάσμα μάζας της παραγωγοποιημένης με iBCF L-προλίνης.



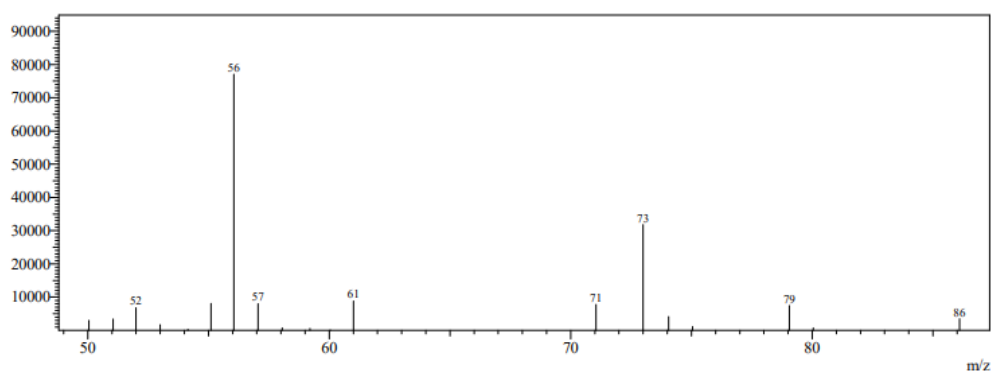
Εικόνα Π-11: Φάσμα μάζας του παραγωγοποιημένου με iBCF L-γλουταμικού οξέος.



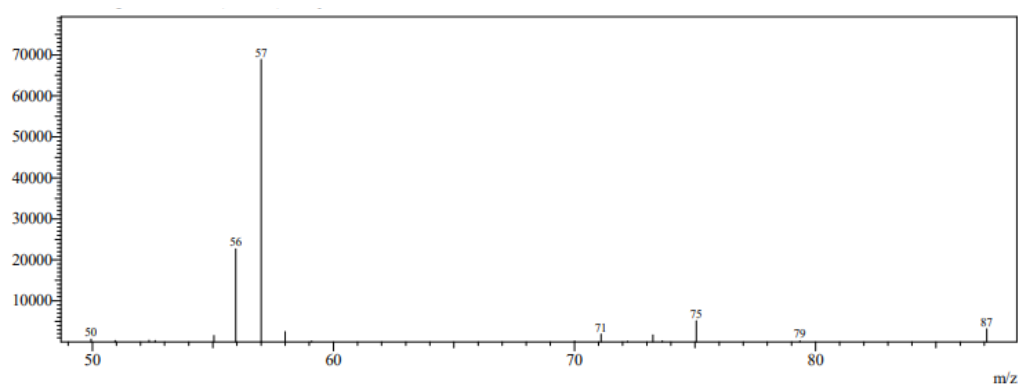
Εικόνα Π-12: Φάσμα μάζας της παραγωγοποιημένης με iBCF L-λυσίνης.



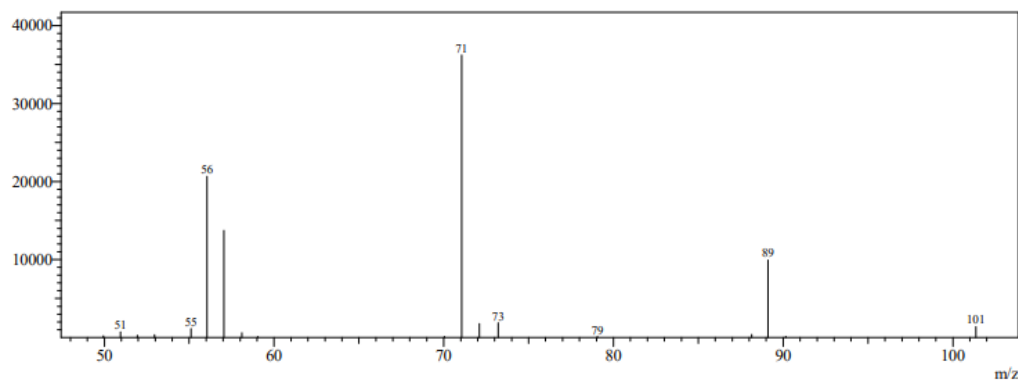
Εικόνα Π-13: Φάσμα μάζας του παραγωγοποιημένου με iBCF φορμικού οξέος.



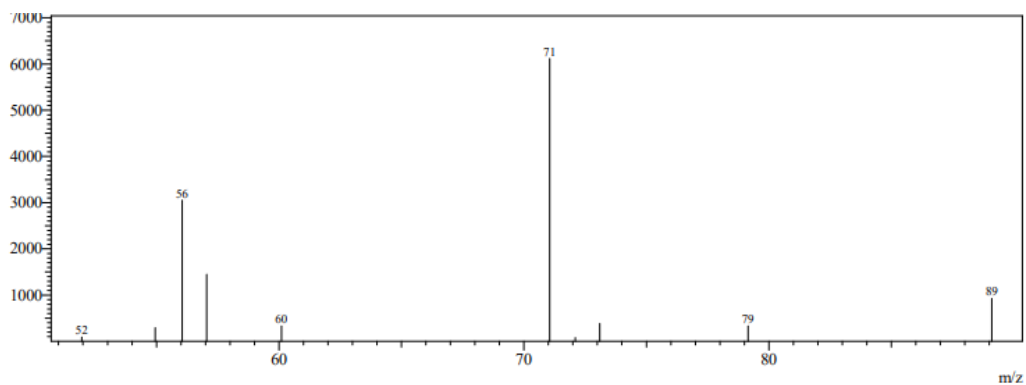
Εικόνα Π-14: Φάσμα μάζας του παραγωγισμένου με iBCF οξικού οξέος.



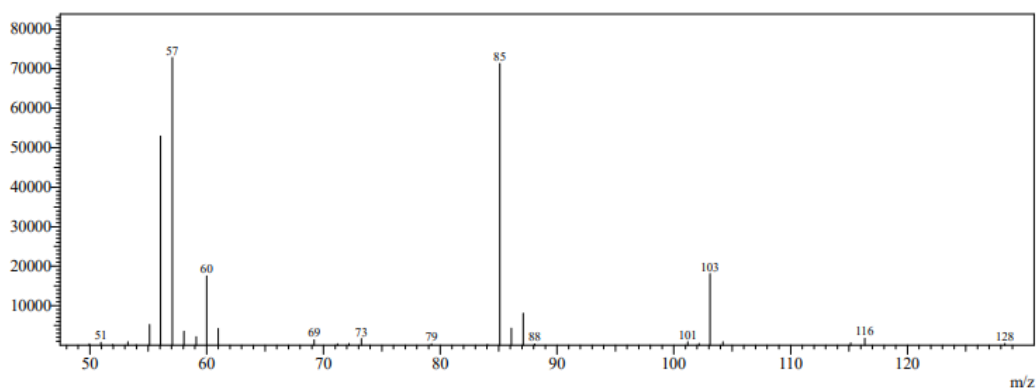
Εικόνα Π-15: Φάσμα μάζας του παραγωγισμένου με iBCF προπιονικού οξέος.



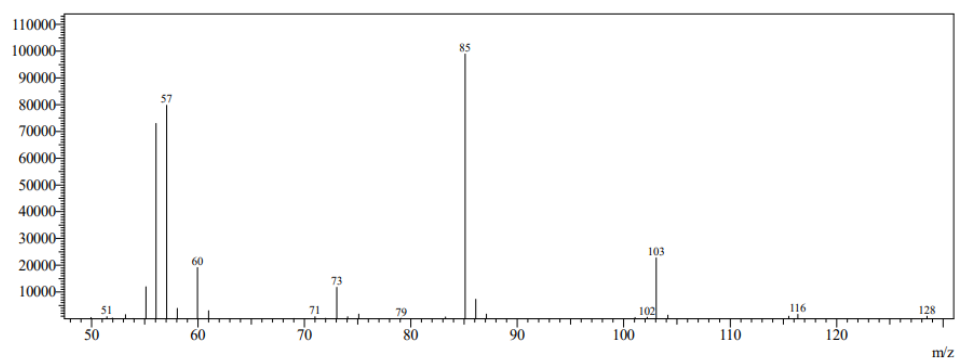
Εικόνα Π-16: Φάσμα μάζας του παραγωγισμένου με iBCF ισοβουτυρικού οξέος.



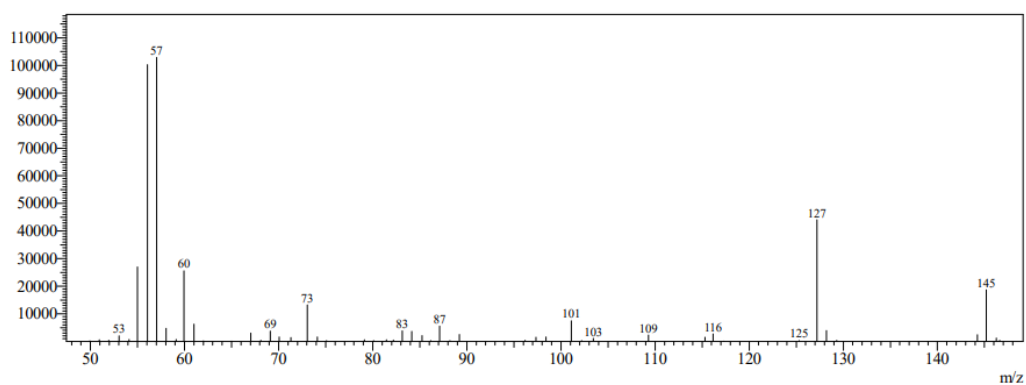
Εικόνα Π-17: Φάσμα μάζας του παραγωγοποιημένου με iBCF βουτυρικού οξέος.



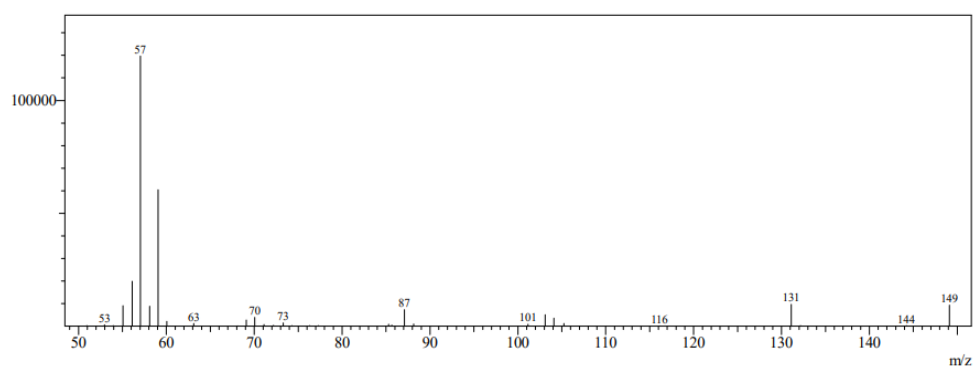
Εικόνα Π-18: Φάσμα μάζας του παραγωγοποιημένου με iBCF 3-μεθυλοβουτυρικού οξέος.



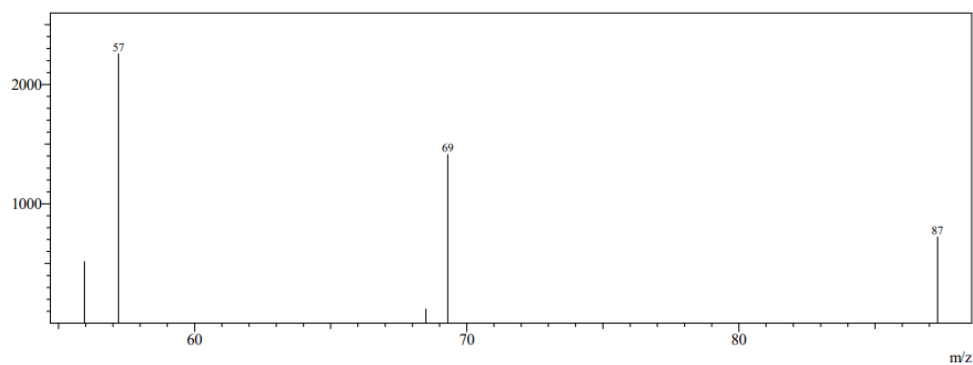
Εικόνα Π-19: Φάσμα μάζας του παραγωγοποιημένου με iBCF πεντανοϊκού οξέος.



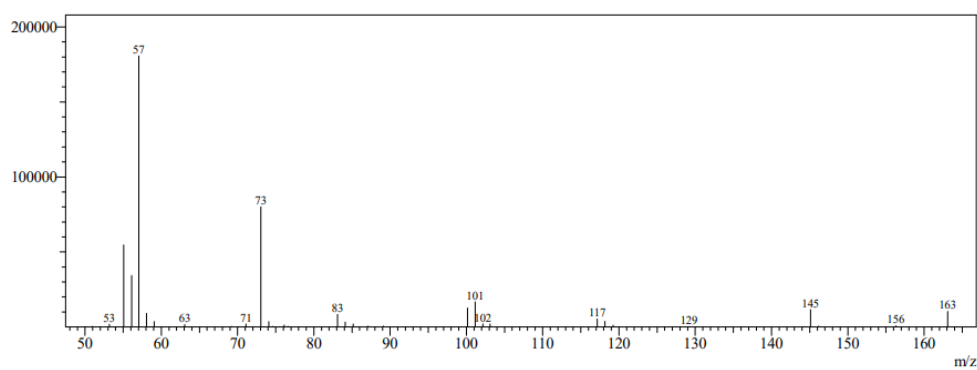
Εικόνα Π-20: Φάσμα μάζας του παραγωγοποιημένου με iBCF οκτανοϊκού οξέος.



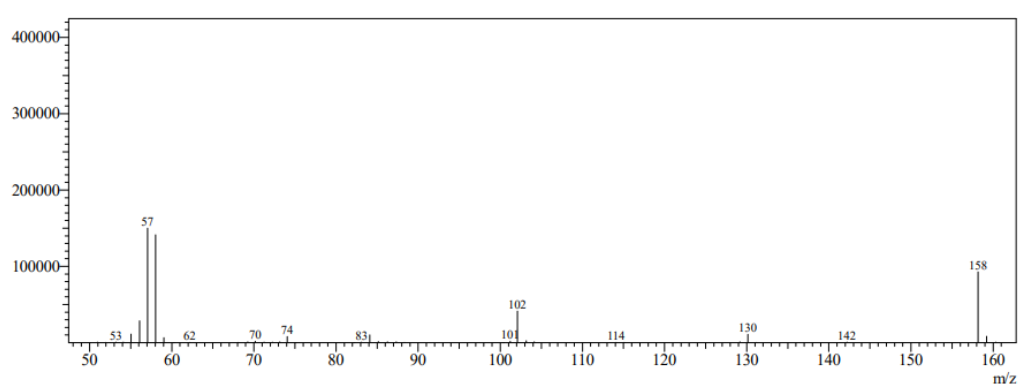
Εικόνα Π-21: Φάσμα μάζας του παραγωγοποιημένου με iBCF DL-β-υδροξυβουτυρικού οξέος.



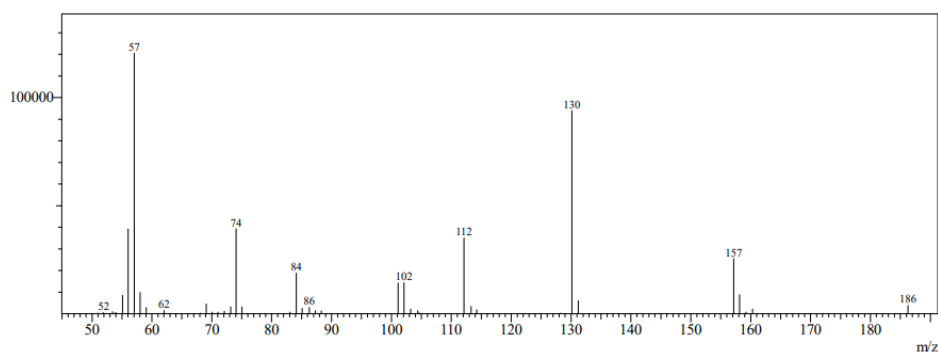
Εικόνα Π-22: Φάσμα μάζας του παραγωγοποιημένου με iBCF DL-2-υδροξυβουτυρικού οξέος.



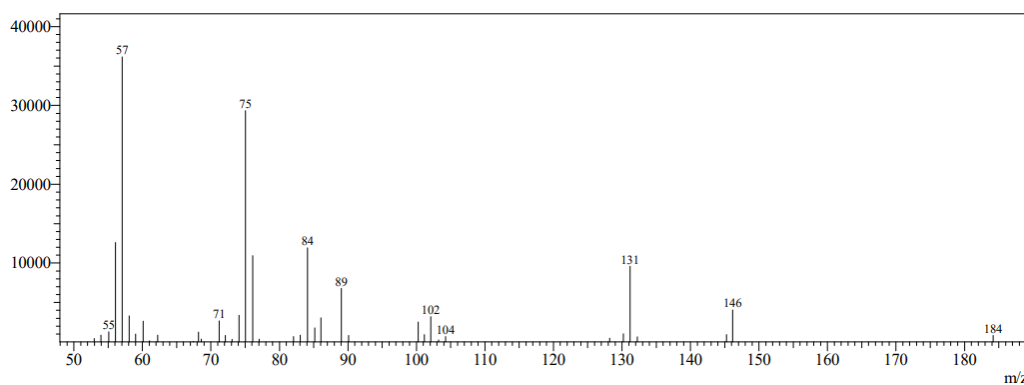
Εικόνα Π-23: Φάσμα μάζας του παραγωγοποιημένου με iBCF 2-υδροξυπεντανοϊκού οξέος.



Εικόνα Π-24: Φάσμα μάζας του παραγωγοποιημένου με iBCF 2-αμινοβουτυρικού οξέος.



Εικόνα Π-25: Φάσμα μάζας του παραγωγοποιημένου με iBCF DL-3-αμινοϊσοβουτυρικού οξέος.



Εικόνα Π-26: Φάσμα μάζας του παραγωγοποιημένου με iBCF 4-αμινο-3-υδροξυβουτυρικού οξέος.

2. ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ

Στους **Πίνακες ΠΑ-2 έως ΠΑ-5** παρατίθενται οι επαναληψιμότητες (%RSDs intra-day) και οι αναπαραγωγιμότητες (%RSDs inter-day) για το δείγμα σιέλου, ούρων, κοπράνων και αυγού.

Πίνακας ΠΑ-2: Επαναληψιμότητες και αναπαραγωγιμότητες για το δείγμα σιέλου.

Αναλύτης	Επαναληψιμότητα (RSD%)	Αναπαραγωγιμότητα (RSD%)
φορμικό οξύ	1,5	2,3
οξικό οξύ	3,2	1,3
προπιονικό οξύ	1,2	0,4
ισοβουτυρικό οξύ	1,1	0,1
βουτυρικό οξύ	1,1	0,01
3-μεθυλοβουτυρικό οξύ	1,3	1,6
πεντανοϊκό οξύ	3,5	3,9
οκτανοϊκό οξύ	0,2	0,06
DL-β-υδροξυβουτυρικό οξύ	5,7	0,02
DL-2-υδροξυβουτυρικό οξύ	0,3	0,1
2-υδροξυπεντανοϊκό οξύ	2,6	1,2
2-αμινοβουτυρικό οξύ	6,0	1,7
DL-3 αμινοίσοβουτυρικό οξύ	1,2	1,1
4-αμινο-3-υδροξυβουτυρικό οξύ	1,5	0,8
L-αλανίνη	6,1	2,0
γλυκίνη	0,9	1,1
L-βαλίνη	3,6	1,2
L-λευκίνη	2,9	0,6
L-ισολευκίνη	4,0	1,5
L-προλίνη	4,9	1,5
ασπαργίνη	1,0	1,4
L-μεθειονίνη	5,1	1,4
ασπαργινικό οξύ	2,7	0,8
L-γλουταμικό οξύ	7,2	2,6
L-λυσίνη	7,8	3,0
L-φαινυλαλανίνη	4,1	1,6

Πίνακας ΠΑ-3: Επαναληψιμότητες και αναπαραγωγιμότητες για το δείγμα ούρων.

Αναλύτης	Επαναληψιμότητα (RSD%)	Αναπαραγωγιμότητα (RSD%)
φορμικό οξύ	3,9	4,1
οξικό οξύ	2,6	6,1
προπιονικό οξύ	1,8	2,1
ισοβουτυρικό οξύ	2,3	3,0
βουτυρικό οξύ	1,5	1,7
3-μεθυλοβουτυρικό οξύ	1,0	1,4
πεντανοϊκό οξύ	3,1	3,9
οκτανοϊκό οξύ	1,4	2,3
DL-β-υδροξυβουτυρικό οξύ	4,1	7,7
DL-2-υδροξυβουτυρικό οξύ	4,0	5,2
2-υδροξυπεντανοϊκό οξύ	2,4	4,7
2-αμινοβουτυρικό οξύ	2,4	4,2
DL-3 αμινοϊσοβουτυρικό οξύ	4,1	1,2
4-αμινο-3-υδροξυβουτυρικό οξύ	1,2	1,4
L-αλανίνη	1,7	3,6
γλυκίνη	1,4	0,4
L-βαλίνη	1,1	4,6
L-λευκίνη	2,6	3,8
L-ισολευκίνη	0,9	1,0
L-προλίνη	4,8	1,3
ασπαργίνη	0,8	4,3
L-μεθειονίνη	0,9	8,4
ασπαργινικό οξύ	1,5	1,8
L-γλουταμικό οξύ	1,7	1,9
L-λυσίνη	3,0	7,0
L-φαινυλαλανίνη	2,3	3,0

Πίνακας ΠΑ-4: Επαναληψιμότητες και αναπαραγωγιμότητες για το δείγμα κοπράνων.

Αναλύτης	Επαναληψιμότητα (RSD%)	Αναπαραγωγιμότητα (RSD%)
φορμικό οξύ	3,7	4,9
οξικό οξύ	2,8	6,6
προπιονικό οξύ	3,8	3,4
ισοβουτυρικό οξύ	8,7	2,7
βουτυρικό οξύ	1,6	7,6
3-μεθυλοβουτυρικό οξύ	1,4	2,6
πεντανοϊκό οξύ	1,9	5,9
οκτανοϊκό οξύ	1,1	3,3
DL-β-υδροξυβουτυρικό οξύ	2,9	3,4
DL-2-υδροξυβουτυρικό οξύ	3,7	4,9
2-υδροξυπεντανοϊκό οξύ	1,9	2,5
2-αμινοβουτυρικό οξύ	3,2	3,0
DL-3 αμινοϊσοβουτυρικό οξύ	1,1	2,0
4-αμινο-3-υδροξυβουτυρικό οξύ	2,7	3,2
L-αλανίνη	0,1	2,8
γλυκίνη	0,7	1,0
L-βαλίνη	1,7	0,1
L-λευκίνη	1,3	5,6
L-ισολευκίνη	2,2	1,6
L-προλίνη	0,6	5,9
ασπαραγίνη	1,7	2,0
L-μεθειονίνη	1,6	2,2
ασπαραγινικό οξύ	5,3	2,4
L-γλουταμικό οξύ	6,5	5,0
L-λυσίνη	1,3	5,4
L-φαινυλαλανίνη	5,2	4,5

Πίνακας ΠΑ-5: Επαναληψιμότητες και αναπαραγωγιμότητες για το δείγμα αυγού.

Αναλύτης	Επαναληψιμότητα (RSD%)	Αναπαραγωγιμότητα (RSD%)
φορμικό οξύ	2,1	5,2
οξικό οξύ	1,2	4,3
προπιονικό οξύ	1,6	2,0
ισοβουτυρικό οξύ	0,9	7,2
βουτυρικό οξύ	3,4	4,0
3-μεθυλοβουτυρικό οξύ	2,8	3,5
πεντανοϊκό οξύ	1,9	2,2
οκτανοϊκό οξύ	1,5	2,0
DL-β-υδροξυβουτυρικό οξύ	2,6	3,2
DL-2-υδροξυβουτυρικό οξύ	1,8	2,1
2-υδροξυπεντανοϊκό οξύ	4,5	5,2
2-αμινοβουτυρικό οξύ	2,2	9,7
DL-3 αμινοϊσοβουτυρικό οξύ	2,9	5,2
4-αμινο-3-υδροξυβουτυρικό οξύ	3,0	4,1
L-αλανίνη	3,2	9,1
γλυκίνη	2,5	3,7
L-βαλίνη	2,9	9,6
L-λευκίνη	1,0	4,0
L-ισολευκίνη	0,7	8,7
L-προλίνη	0,6	7,0
ασπαραγίνη	5,7	9,8
L-μεθειονίνη	4,3	6,0
ασπαραγινικό οξύ	1,5	2,7
L-γλουταμικό οξύ	1,6	2,5
L-λυσίνη	2,8	2,6
L-φαινυλαλανίνη	0,9	4,1

3. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΗΤΡΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΚΤΗΣΕΙΣ

Στους Πίνακες ΠΑ-6 έως ΠΑ-9 παρατίθενται η επίδραση μήτρας και οι ανακτήσεις για τα δείγματα σιέλου, ούρων, κοπράνων και αυγού.

Πίνακας ΠΑ-6: Επίδραση μήτρας και ανακτήσεις των παραγωγοποιημένων SCFAs και αμινοξέων σε δείγμα σιέλου.

Αναλύτης	Συγκέντρωση εμβολιασμού (μg/ mL)	Επίδραση μήτρας (%)	Ανάκτηση (%)	Επαναληψιμότητα (RSD%)
φορμικό οξύ	3,5	102	107	4,6
	6,0	101	102	7,4
	8,0	100	100	5,5
οξικό οξύ	0,05	100	90	5
	0,1	100	111	4,9
	1,0	100	101	2,7
προπιονικό οξύ	0,5	101	101	7,4
	2,0	100	100	1,7
	4,5	99	99	1,7
ισοβουτυρικό οξύ	0,5	100	107	4,9
	1,0	101	106	1,5
	4,5	100	101	0,9
βουτυρικό οξύ	0,5	100	99	3,9
	2,0	101	101	2,9
	4,5	100	100	0,5
3-μεθυλοβουτυρικό οξύ	0,5	100	100	2,5
	2,0	100	100	2,7
	4,5	100	100	0,5
πεντανοϊκό οξύ	0,5	100	100	3,2
	2,0	104	104	2,2
	4,5	100	100	0,6

οκτανοϊκό οξύ	1,0	104	105	2,9
	3,5	100	100	1
	5,5	101	101	2,2
DL-β-υδροξυβουτυρικό οξύ	1,0	100	100	1,5
	3,5	100	100	1,5
	5,5	100	100	2,1
DL-2-υδροξυβουτυρικό οξύ	23,0	101	101	2,4
	35,0	100	100	2,3
	50,0	100	100	6,7
2-υδροξυπεντανοϊκό οξύ	0,5	103	103	3,9
	2,0	100	100	6,8
	5,5	100	100	0,8
2-αμινοβουτυρικό οξύ	2,0	100	100	4,8
	4,5	101	101	1,2
	7,0	101	101	0,9
DL-3- αμινοϊσοβουτυρικό οξύ	2,0	99	100	3,6
	4,5	100	100	2,2
	7,0	100	100	1,0
4-αμινο-3-υδροξυβουτυρικό οξύ	17,0	100	100	4,9
	28,0	100	99	3,9
	41,0	100	100	4,8
L-αλανίνη	1,0	100	100	4,0
	3,5	100	100	2,9
	5,5	100	100	2,5
γλυκίνη	2,0	100	100	2,3
	4,5	100	100	8,5
	7,0	100	100	9,0

L-βαλίνη	1,0	99	98	5,5
	3,5	101	101	3,2
	5,5	100	100	1,0
L-λευκίνη	0,5	101	101	6,2
	2,0	99	99	3,4
	4,5	100	99	0,5
L-ισολευκίνη	0,5	100	101	4,7
	2,0	100	101	2,1
	4,5	100	100	0,6
L-προλίνη	0,5	101	111	5,0
	2,0	101	101	2,3
	4,5	100	100	1,0
ασπαραγίνη	3,5	100	100	1,7
	5,5	100	100	2,1
	8,0	100	100	1,6
L-μεθειονίνη	2,0	101	102	4,0
	4,5	100	100	1,5
	7,0	100	100	0,4
ασπαραγινικό οξύ	1,0	100	100	2,1
	3,5	100	100	2,3
	5,5	100	100	0,7
L-γλουταμικό οξύ	4,5	101	100	5,3
	7,0	100	100	3,4
	5,5	101	101	1,2
L-λυσίνη	3,5	100	100	8,6
	5,5	101	101	1,3
	8,0	100	99	0,8

L-φαινυλαλανίνη	0,5	99	98	5,0
	2,5	100	100	2,3
	4,5	101	102	0,1

Πίνακας ΠΑ-7: Επίδραση μήτρας και ανακτήσεις των παραγωγοποιημένων SCFAs και αμινοξέων σε δείγμα ούρων.

Αναλύτης	Συγκέντρωση εμβολιασμού (μg/ mL)	Επίδραση μήτρας (%)	Ανάκτηση (%)	Επαναληψιμότητα (RSD%)
φορμικό οξύ	3,5	99	96	4,2
	5,0	101	104	3,3
	8,0	101	102	3,3
οξικό οξύ	0,05	100	104	7,9
	0,5	101	113	1,8
	1,0	101	103	4,7
προπιονικό οξύ	0,5	101	101	7,4
	2,0	100	100	1,7
	4,0	99	98	1,7
ισοβουτυρικό οξύ	0,5	104	106	3,7
	1,0	100	101	0,5
	4,0	100	100	0,6
βουτυρικό οξύ	0,5	100	99	2,6
	2,0	100	101	0,7
	4,0	100	100	0,4
3-μεθυλοβουτυρικό οξύ	0,5	100	101	1,4
	2,0	100	101	0,7
	4,0	100	100	0,4
πεντανόϊκό οξύ	0,5	102	102	2,0
	2,0	100	100	0,9
	4,0	101	100	0,4
οκτανοϊκό οξύ	1,0	101	101	1,7
	3,5	100	100	0,5
	5,0	100	100	1,3
DL-β-υδροξυβουτυρικό οξύ	1,0	103	105	0,8

	3,5	100	100	1,5
	5,0	100	100	0,4
DL-2-υδροξυβουτυρικό οξύ	23,0	102	102	2,1
	34,0	100	100	1,4
	50,0	100	100	0,6
2-υδροξυπεντανοϊκό οξύ	0,5	103	103	4,9
	2,0	101	100	4,4
	5,0	100	100	8,4
2-αμινοβουτυρικό οξύ	2,0	100	100	5,3
	4,0	100	100	1,1
	7,0	101	100	2,2
DL-3-αμινοϊσοβουτυρικό οξύ	2,0	100	101	6,9
	4,0	100	100	2,1
	7,0	101	101	3,2
4-αμινο-3-υδροξυβουτυρικό οξύ	17,0	101	100	4,5
	27,0	100	100	3,5
	41,0	101	100	4,7
L-αλανίνη	1,0	100	101	5,1
	3,5	100	100	1,3
	5,0	100	100	1,4
γλυκίνη	2,0	100	100	2,6
	4,0	101	100	1,0
	7,0	100	100	1,4
L-βαλίνη	1,0	100	99	7,1
	3,5	100	100	1,1
	5,0	100	101	2,2

L-λευκίνη	0,5	99	93	5,6
	2,0	100	100	0,8
	4,0	100	100	3,6
L-ισολευκίνη	0,5	107	107	8,2
	2,0	100	99	2,3
	4,0	100	100	2,5
L-προλίνη	0,5	99	96	5,1
	2,0	100	100	0,6
	4,0	100	101	2,7
ασπαραγίνη	3,5	100	101	7,4
	5,0	100	100	0,9
	8,0	103	107	2,4
L-μεθειονίνη	2,0	100	100	3,7
	4,0	100	100	2,1
	7,0	100	100	1,4
ασπαραγινικό οξύ	1,0	101	101	6,1
	3,5	100	101	0,4
	5,0	100	100	0,2
L-γλουταμικό οξύ	4,0	101	101	8,9
	7,0	100	100	0,4
	5,0	100	101	4,2
L-λυσίνη	3,5	101	101	8,9
	5,0	101	101	0,7
	8,0	100	100	5,7
L-φαινυλαλανίνη	0,5	100	100	7,2
	2,0	100	100	1,8
	4,0	100	100	2,7

Πίνακας ΠΑ-8: Επίδραση μήτρας και ανακτήσεις των παραγωγοποιημένων SCFAs και αμινοξέων σε δείγμα κοπράνων.

Αναλύτης	Συγκέντρωση εμβολιασμού ($\mu\text{g/mL}$)	Επίδραση μήτρας (%)	Ανάκτηση (%)	Επαναληψιμότητα (RSD%)
φορμικό οξύ	1,0	100	97	8,3
	3,5	100	101	5,3
	5,0	101	102	5,9
οξικό οξύ	0,005	100	109	8,3
	0,05	100	115	0,8
	0,5	101	109	2,9
προπιονικό οξύ	0,1	100	108	7,8
	0,5	101	105	0,8
	2,0	100	101	1,3
ισοβουτυρικό οξύ	0,05	100	106	3,4
	0,5	100	98	2,3
	1,0	100	101	1,8
βουτυρικό οξύ	0,05	100	101	2,6
	0,5	100	106	2,9
	2,0	100	100	3,1
3-μεθυλοβουτυρικό οξύ	0,05	100	108	3,2
	0,5	100	106	2,2
	2,0	100	101	1,6
πεντανοϊκό οξύ	0,05	100	103	3,6
	0,5	101	108	2,7
	2,0	100	101	2,5
οκτανοϊκό οξύ	0,5	100	100	1,7
	1,0	100	100	0,5
	3,5	100	100	0,8
DL-β-υδροξυβουτυρικό οξύ	0,5	108	114	7,7

	1,0	100	101	2,2
	3,5	100	100	0,7
DL-2-υδροξυβουτυρικό οξύ	11,0	100	100	6,1
	23,0	100	101	2,4
	34,0	100	100	1,0
2-υδροξυπεντανοϊκό οξύ	0,1	101	101	4,2
	0,5	106	106	3,7
	2,0	100	100	1,5
2-αμινοβουτυρικό οξύ	0,5	100	100	3,1
	2,0	100	100	1,9
	4,0	101	100	3,4
DL-3-αμινοϊσοβουτυρικό οξύ	0,5	101	101	2,0
	2,0	100	100	0,8
	4,0	100	100	2,0
4-αμινο-3-υδροξυβουτυρικό οξύ	4,0	101	100	6,7
	17,0	100	100	0,5
	27,0	100	100	2,2
L-αλανίνη	0,5	100	97	5,2
	1,0	100	100	1,2
	3,5	100	100	2,7
γλυκίνη	1,0	101	118	2,6
	2,0	100	100	0,8
	4,0	100	101	1,1
L-βαλίνη	0,5	100	99	4,5
	1,0	100	101	1,7
	3,5	100	100	3,7
L-λευκίνη	0,05	100	105	4,2

	0,5	100	99	0,7
	2,0	100	99	3,4
L-ισολευκίνη	0,1	100	98	4,6
	0,5	100	98	1,0
	2,0	100	100	3,3
L-προλίνη	0,1	101	113	3,6
	0,5	100	103	1,4
	2,0	100	100	4,0
ασπαραγίνη	1,0	102	102	4,0
	3,5	98	98	2,4
	5,0	100	100	2,1
L-μεθειονίνη	0,5	107	107	2,5
	2,0	101	102	1,3
	4,0	100	100	2,0
ασπαραγινικό οξύ	0,5	101	102	1,2
	1,0	103	105	0,6
	3,5	100	100	1,5
L-γλουταμικό οξύ	2,0	100	101	1,1
	4,0	101	100	0,8
	6,0	99	100	1,4
L-λυσίνη	1,0	100	102	5,2
	3,5	100	100	2,6
	5,0	100	100	4,3
L-φαινυλαλανίνη	0,1	100	105	2,1
	0,5	100	100	1,5
	2,0	100	100	3,0

Πίνακας ΠΑ-9: Επίδραση μήτρας και ανακτήσεις των παραγωγοποιημένων SCFAs και αμινοξέων σε δείγμα αυγού.

Αναλύτης	Συγκέντρωση εμβολιασμού ($\mu\text{g/mL}$)	Επίδραση μήτρας (%)	Ανάκτηση (%)	Επαναληψιμότητα (RSD%)
φορμικό οξύ	4,5	102	112	2,8
	7,0	98	92	3,5
	9,0	98	95	8,8
οξικό οξύ	0,05	100	115	5,6
	0,1	102	112	2,6
	1,0	117	111	5,3
προπιονικό οξύ	0,5	105	107	1,4
	2,0	100	100	0,9
	5,0	101	101	2,9
ισοβουτυρικό οξύ	0,5	107	107	1,8
	1,0	101	101	1,0
	5,0	101	100	3,7
βουτυρικό οξύ	0,5	101	101	2,0
	2,0	101	101	0,8
	5,0	103	104	1,4
3-μεθυλοβουτυρικό οξύ	0,5	96	97	1,6
	2,0	100	100	0,8
	5,0	101	102	0,8
πεντανοϊκό οξύ	0,5	104	104	2,6
	2,0	101	101	1,1
	5,0	104	105	1,1
οκτανοϊκό οξύ	1,0	101	102	1,8
	3,0	107	107	0,6
	7,0	103	103	2,6
DL-β-υδροξυβουτυρικό οξύ	1,0	100	100	4,2
	3,0	100	100	0,1
	7,0	101	101	1,5
DL-2-υδροξυβουτυρικό οξύ	28,5	103	104	7,8
	42,0	102	102	5,1
	61,0	99	99	5,5
2-υδροξυπεντανοϊκό οξύ	0,5	102	102	7,5

	2,0	100	101	0,7
	7,0	103	103	7,9
2-αμινοβουτυρικό οξύ	2,5	103	103	3,5
	5,0	100	100	1,6
	8,0	108	109	2,1
DL-3- αμινοϊσοβουτυρικό οξύ	2,0	101	101	0,5
	5,0	102	102	0,8
	8,0	100	100	4,5
4-αμινο-3-υδροξυβουτυρικό οξύ	21,0	103	103	1,5
	34,0	107	108	1,4
	50,0	100	100	4,3
L-αλανίνη	1,0	105	106	3,6
	4,0	101	101	1,2
	7,0	100	100	2,4
γλυκίνη	3,0	100	100	4,1
	6,0	101	101	2,7
	9,0	100	100	1,0
L-βαλίνη	1,5	102	106	2,6
	4,0	102	103	2,3
	7,0	107	108	2,8
L-λευκίνη	0,5	100	105	3,4
	3,0	101	102	2,3
	6,0	100	100	2,9
L-ισολευκίνη	0,5	99	96	5,6
	3,0	100	100	2,3
	6,0	101	101	1,6
L-προλίνη	0,5	101	111	2,9
	3,0	100	100	2,3
	6,0	100	100	2,9
ασπαργγίνη	4,0	101	101	5,8
	7,0	100	100	5,5
	11,0	104	104	7,9
L-μεθειονίνη	3,0	101	102	5,2
	6,0	101	101	0,8

	9,0	100	100	1,8
ασπαραγινικό οξύ	1,5	101	102	5,2
	4,0	101	102	0,7
	7,0	100	100	1,6
L-γλουταμικό οξύ	6,0	102	102	4,2
	9,5	100	100	1,9
	12,0	102	102	2,6
L-λυσίνη	4,0	101	103	7,8
	7,0	100	100	1,5
	11,0	100	100	1,6
L-φαινυλαλανίνη	0,5	100	103	4,4
	3,0	100	100	1,2
	6,0	99	99	0,9