

פיתוח אנאליזה ליפידומית זולה ומהירה, לחלב ולמוצריו באמצעות ספקטרוסקופיית

ראמאן רבקה אלבאום, נורית ארגוב ארגמן

הפקולטה לחקלאות מזון וסביבה, האוניברסיטה העברית, רחובות

תקציר

שומן החלב מהווה רכיב מרכזי בהרכב החלב ותורם לטעם, לערך התזונתי ולמאפייניו הטכנולוגיים. פרופיל חומצות השומן שבו רגיש לשינויים פיזיולוגיים, מיקרוביאליים וסביבתיים, והוא עשוי לשמש כסמן למצב המטבולי של הפרה ולמדד לאיכות החלב לאחר הפקתו. על אף חשיבותו, הכלים המקובלים לבחינת שינויים בשומן החלב מבוססים לרוב על שיטות כימיות מורכבות או על פרוצדורות ממושכות, שאינן תמיד מתאימות ליישום שגרתי. משום כך, עולה הצורך בפיתוח גישות אנליטיות מהירות ועדינות שיאפשרו אפיון הרכב השומן וזיהוי שינויים בו באופן ישיר. מטרת המחקר הייתה לבחון את השימוש בספקטרוסקופיית ראמאן כטכנולוגיה אנליטית לא פולשנית לאפיון שינויים בהרכב חומצות השומן ובמבנה השומני של החלב. לצורך כך נערכו ניסויים שנועדו להדגים כיצד תנאים שונים, ובהם תהליכי חמצון, אילוח בחיידקי סביבה אופייניים לרפת החלב ותנאי אחסון מגוונים, משתקפים בפרופיל חומצות השומן ובספקטרום הראמאן. התוצאות הראו כי בספקטרום הראמאן ניתן לזהות פיקים אופייניים המשקפים שינויים במבנה השומן ובקונפורמציות של חומצות השומן וכי פיקים אלו נמצאים במתאם עם תהליכים אותם החלב עובר לאחר הפקתו. מצבים של חמצון הדגימו הופעה ברורה של סימנים ספקטראליים בקשרים ספציפיים, שנמצאו במתאם עם שינויים בפרופיל חומצות השומן שנמדדו בכרומוטוגרפיית גזים (GC), באופן שעשוי להעיד על תהליכים חמצוניים. באילוח חיידקי נצפו הבדלים בהרכב חומצות השומן שהתבטאו גם בהבדלים בעוצמות ובמיקומים ספקטראליים. תנאי אחסון לא נאותים, וכן הקפאות והפשרות חוזרות, הובילו לשינויים ניכרים הן בהרכב הכימי והן בתבנית הראמאן. הממצאים מצביעים על כך שספקטרוסקופיית ראמאן יכולה לשמש ככלי משלים, רגיש ולא פולשני, לזיהוי שינויים בהרכב חומצות השומן ובמבנה השומני של החלב. במצבים ספציפיים נראה שספקטרוסקופיית ראמאן רגישה יותר משיטות נפוצות לזיהוי תהליכי חמצון של שומן בחלב. יכולת זו מאפשרת מעקב אחרי תהליכים כגון חמצון, אילוח חיידקי או אחסון לא נאות, ומדגישה את הפוטנציאל ליישם את הגישה גם לצורכי ניטור איכות ובקרת תהליכים.

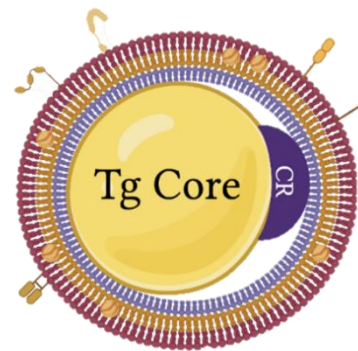
1. מבוא

חלב הוא נוזל ביולוגי המופרש על ידי בלוטת החלב של יונקים, ותפקידו לספק לוולד את מכלול הרכיבים התזונתיים הדרושים לו בתחילת חייו. מבחינה כימית הרכב החלב שונה בין מיני יונקים שונים, כאשר חלב פרה הוא החלב הנצרך ביותר בעולם, והוא מכיל כ-88% מים כ-5% פחמימות, בעיקר לקטוז, כ-4% חלבון המורכב מקזאין וחלבוני מי גבינה ושומנים כ-3.5% (Lu and Wang 2017). כל אחד מהמרכיבים הללו תורם לתפקוד הביולוגי והתזונתי של החלב. שומן החלב נמצא במבנה של בועיות (milk fat globule) מוקפות בממברנה המכונה ממברנת בועית השומן (Milk Fat Globule Membrane –MFGM), שתפקידה להגן על התוכן הליפידים מפני חמצון או פעילות אנזימטית וכן לייצב אל בועיות השומן בתוך הסביבה המימית של החלב (Verma et al. 2019). בליבת ה-MFG מצויים בעיקר טריגליצרידים המהווים מעל 95% מהשומן הכללי בחלב, לצד פוספוליפידים, כולסטרול, וסוגים נוספים של ליפידים מבניים שנמצאים בדופן הבועית (איור 1). הטריגליצרידים ומרבית הליפידים הפולריים מורכבים משרשראות של חומצות שומן באורכים שונים, הקשורות בקשר אסתרי אל שלד גליצרול. מבין רכיבי החלב, השומן הוא הרכיב שמראה הכי הרבה שונות, הן בריכוז הכללי בחלב והן בהרכבו הכימי (Grappin, Packard, and Ginn 1981). הרכב השומן מושפע מגורמים רבים כמו שלב בתחלובה, (Ghaffari et al. 2024), תזונה, מצב הבריאות של העטין, ותנאים סביבתיים לאחר החליבה כמו תנאי אחסון או זיהום מיקרוביאלי (J. G. Linn 1988). שינויים אלו יכולים לבוא לידי ביטוי הן באורכי השרשראות של חומצות השומן, הן בדרגת הרוויה שלהן, והן בתצורתן המרחבית (cis/trans).

1.1 סינתזת שומן החלב והיווצרות בועיות שומן בעטין

שומן החלב מיוצר ומופרש לחלב על ידי תאי האפיתל של רקמת העטין, באמצעות תהליך ביוסינתטי מורכב הכולל סינתזה של טריגליצרידים, הרכבתם לבועיות שומן (איור 1), והפרשתם אל חלל נאדיות החלב בעטין. חומצות השומן המשמשות לייצור טריגליצרידים או פוספוליפידים מגיעות לתאי אפיתל בלוטת החלב משני מקורות: חומצות שומן ארוכות שרשרת (<16 אטומי פחמן) הנספגות מהדם, וחומצות שומן קצרות ובינוניות שרשרת (>16 אטומי פחמן) הנוצרות בתוך התאים עצמם - ייצור דה-נובו. חומצות שומן ארוכות שרשרת אשר מקורן מהמזון או מפירוק רקמות שומן בגוף, מגיעות אל בלוטת החלב דרך מחזור הדם ובעזרת קולטנים ייעודיים הן נספגות אל תוך התא. במקביל, התאים האפיתליאליים של העטין מסוגלים לבצע סינתזה דה-נובו של חומצות שומן מתוך מטבוליטים המגיעים מהכרס, כגון אצטט ובוטיראט. תהליך זה מתבצע על ידי קומפלקס אנזימים כאשר התוצר הוא חומצות שומן רוויות באורך של ארבעה עד שישה עשר פחמנים. חומצות אלו הן קצרות ובינוניות שרשרת, והן יכולות לעבור הארכה או הוספת קשרים כפולים על ידי אנזימים כדי לייצר חומצות ארוכות יותר

ובלתי רוויות. חומצות השומן שמגיעות מהדם ואלה שנוצרו בתא מתכנסות לתהליך סינתזה של טריגליצרידים המתרחש בין עלעלי ממברנת הרשתית האנדופלסמית- תהליך של יצירת קשר אסתרי בין שלוש חומצות שומן למולקולת גליצרול והצטברות הטריגליצרידים ליצירת טיפת שומן. הטיפות הללו נבנות בהדרגה, ולאחר שהן מגיעות לגודל מסוים, הן משתחררות לציטופלסמת התא עטופות בשכבה אחת של פוספוליפידים מהרשתית האנדופלסמית. הן נעות לעבר הממברנה האפיקלית של התא, שם הן נעטפות בממברנה הדו-עלעלית של התא המכילה פוספוליפידים וחלבונים. הממברנה הזו, שמרכיבה את מעטפת בועית השומן כוללת רכיבים כמו כולסטרול ופוספוליפידים מסוג PE- Phosphatidylethanolamine, PS- Phosphatidylserine, PC- Phosphatidylcholine, אשר נמצאו כבעלי חשיבות תזונתית ובריאותית עבור צרכן החלב, הכוללת השפעה על מטבוליזם ופעילות נוגדת חמצון, בין אם על ידי נטרול רדיקלים חופשיים ובין אם באמצעות עיכוב תגובות חמצון (Huang et al. 2020). בסופו של דבר בועית השומן מופרשת בהפרשה אפוקרינית מהתאים אל חללי החלב בעטין. בשל תהליך ההפרשה בועית שומן החלב מופרשת במבנה ייחודי: ליבה הידרופובית של טריגליצרידים, מוקפת בקרום תלת שכבתי של ליפידים פולריים, חלבונים ומולקולות מצומדות שמקורן בממברנה החיצונית של התא ובממברנת הרשתית האנדופלסמית. מבנה זה מאפשר לבועית להישאר מופרדת בתוך הסביבה המימית של החלב (Argov-Argaman 2019).



איור 1. בועית שומן בחלב (Milk Fat Globule) נוצרת בתאי האפיתל של בלוטת החלב, כאשר טריגליצרידים (Tg) מסונתזים ברשת האנדופלזמטית (ER) ומצטברים כטיפות שומן תוך-תאיות. טיפות אלו מתלכדות וגדלות, נעות לכיוון הממברנה האפיקלית של התא, ומופרשות לחלל נאדית החלב כאשר במהלך ההפרשה, טיפות השומן נעטפות בממברנה הדו עלעלית של התא. הממברנה מורכבת מפוספוליפידים, חלבונים וגליקופורטאינים, ומוכרת כממברנת בועית השומן (Milk Fat Globule Membrane, MFGM). במהלך ההפרשה נלכדות שאריות של ציטופלזמה (CR) cytoplasmic remanence.

1.2 גורמים המשפיעים על הרכב שומן החלב

ייצור חלב בתעשיית החלב מתרחש במסגרת מערכת גידול מבוקרת – רפת, שבה מוחזקות פרות חולבות במעגלי ייצור מחזוריים המכונים "תחלובות". כל תחלובה מתחילה לאחר המלטה וממשיכה לאורך מספר חודשים במהלכם מנוהל ייצור החלב בהתאם לסטנדרטים תזונתיים, תברואתיים וטכנולוגיים מוקפדים. מחזור ייצור החלב מלווה בשינויים פיזיולוגיים נרחבים בפרה עצמה, המשפיעים על כמות החלב והרכבו. בהיבט של שומן החלב, ישנם מספר תהליכים פיזיולוגיים אשר יכולים לגרום לשינויים באחוז ופרופיל השומן כגון מאזן אנרגיה, תזונה, מצב בריאותי ועוד. מעבר לגורמים הפיזיולוגיים של הפרה גם התנאים הסביבתיים

לאחר החליבה לדוגמא- תנאי אחסון החלב, יכולים להשפיע פרופיל השומן (Products 1988). הפרקים הבאים יתמקדו בשני אשכולות מרכזיים של גורמים המשפיעים על שומן החלב: האחד – גורמים ביולוגיים והשני – גורמים סביבתיים. כל אחד מהגורמים יוצג בהרחבה, תוך התמקדות במנגנונים המשפיעים על הרכב חומצות השומן והמשמעות הפיזיולוגית והתעשייתית של אותם שינויים .

1.3 . אפיון שומן חלב

זיהוי מדויק של הרכב שומן החלב מחייב שימוש בשיטות אנליטיות מדויקות, ובפרט בגישות כרומטוגרפיות וספקטרוסקופיות. מבין השיטות הכרומטוגרפיות, כרומטוגרפיית גזים (Gas Chromatography) GC היא שיטה רווחת לקביעת פרופיל חומצות השומן, לאחר מיצוי והפיכתן לנגזרות בעלת טמפרטורת נידוף נמוכה יחסית- (Fatty Acid Methyl Esters) FAME). GC מאפשרת הבחנה בין חומצות רוויית, בלתי רוויית ואיזומרים, ונחשבת רגישה. עם זאת, השיטה דורשת שלבי הכנה מורכבים, שימוש בממסים אורגניים, כיוול תקני וציד ייעודי (Srighley and Mossoba 2017). ספקטרוסקופיות אינפרה-אדום (Fourier Transform Infrared, FTIR) מבוססת על בליעת קרינה אלטרקומגנטית בתחום התת-אדום, שנבלעת על ידי קשרים כימיים ספציפיים במולקולות. הבליעה מתרחשת כאשר תדירות הקרן תואמת לתדירות התנודות הפנימיות של הקשרים – תכונה המאפשרת זיהוי קבוצות פונקציונליות אופייניות. ספקטרוסקופיית FTIR מתמקדת בתנודות יסוד ומספקת מידע ישיר יחסית על נוכחות קשרים כמו C=O ו- C=C. בליעות בתחום התת אדום הקרוב (Near Infrared, NIR), מודדת בעיקר שילובים של תנודות אלה. שתיהן שיטות לא הרסניות, אינן דורשות מיצוי, ומתאימות להשוואות איכותיות או יחסיות, אך לא כמותיות (van de Voort, Sedman, and Russin 2001). עם זאת, לשיטות מבוססות בליעה ישנן מגבלות מסוימות, ובפרט כשמדובר בדגימות מורכבות כמו חלב. ראשית, המים שתכולתם גבוהה מאוד בחלב, בולעים בעוצמה בתחום התת-אדום וממסכים או מטשטשים את התרומות החלשות יותר של רכיבי השומן. שנית, הספקטרום המתקבל ב-FTIR עשוי להיות מושפע מחפיפות בין בליעות של רכיבים שונים, במיוחד כאשר מדובר בקשרים כימיים דומים הנפוצים גם בחלבונים בסוכרים ובפוספוליפידים. בספקטרוסקופיית NIR, אותות רחבים ופחות ממוקדים, כך שהיכולת לאפיין רכיבים ליפידיים מסוימים או שינויים עדינים במבנה הכימי שלהם מוגבלת. מגבלות אלו עשויות להקשות כאשר נדרש זיהוי סלקטיבי של שומנים או מעקב רגיש אחר שינוי בהרכבם בתוך תמיסה מימית מורכבת (Jurowski et al. 2024). במקרים כאלה, עולה הצורך בשיטה אנליטית שפחות רגישה להפרעות כמו מים, ויכולה לספק מידע מבני ישיר גם במטריצות מורכבות. ספקטרוסקופיית ראמאן (Raman) מהווה גישה משלימה ל-FTIR ו- NIR, ומתבססת על פיזור בלתי-אלסטי של אור, המאפשר קבלת מידע על מבנה מולקולרי באמצעות מדידת שינויים זעירים באנרגיה של הפוטונים המפוזרים. בניגוד לשיטות המבוססות

על בליעת אור תת אדום, פיזורי ראמאן רגישים למולקולות מים הרבה פחות, ולכן שיטה זו עשויה להתאים יותר לאפיון רכיבים ליפופיליים בתוך מטריצה מימית כגון חלב. מעבר לכך, שיטת ראמאן רגישה לשינויים במבנה הקשרים ובמיוחד לקשרים כפולים, טבעות ארומטיות, וסידור מרחבי, באופן שיכול לאפשר אבחנה בין סוגי חומצות שומן ואף בין איזומרים במקרים מסוימים. יתרונה הבולט הוא בכך שהיא אינה דורשת בהכרח מיצוי, ומתאימה למדידה ישירה של דוגמאות נוזליות או אמולסיות. עם זאת, יש לקחת בחשבון שהאותות הספקטרוליים בראמאן לעיתים חלשים ודורשים רגישות גבוהה של המערכת, ושהרכב הדגימה, כולל פלואורסצנציה טבעית, עלול להשפיע על איכות הנתונים. אף על פי כן, האפשרות לבצע מדידה לא הרסנית, הופכת את הראמאן לכלי מבטיח באפיון שומני חלב, במיוחד לצורך מעקב אחר שינויים כימיים עדינים לאורך זמן (He et al. 2019).

2. מטרת

מטרת מחקר זה היא לפתח ולבחון שיטה יעילה לאפיון שומן חלב באמצעות ספקטרוסקופיית ראמאן, ולהשוות בין פרופילים של שומן שהופקו מדוגמאות חלב שעברו טיפולים או שינויים כתוצאה מחשיפה לתנאי סביבה שונים. השיטה המוצעת נועדה לאפשר זיהוי של שינויים בהרכב חומצות השומן על ידי שימוש בטכניקה שאינה דורשת שלבי הכנה מורכבים. העבודה כללה שילוב בין מיצוי שומן וניתוח בכרומטוגרפיית גזים, לבין מדידות ספקטרוליות בשיטת ראמאן במטרה לאתר פיקים ייחודיים הקשורים להרכב ומבנה השומן במצבים שונים.

3. חומרים, תהליכי, ושיטות עבודה

3.1. מקורות החלב

במהלך העבודה נעשה שימוש בשני סוגים של דגימות חלב, כדי לאפשר השוואה בין חלב בתנאים טבעיים למוצר מסחרי מעובד. הסוג הראשון כלל חלב מסחרי מפוסטר והומוגני (3.5% שומן, תנובה), שנרכש מסופרמרקט מקומי ונשמר בהתאם להנחיות היצרן עד לשימוש. הסוג השני היה חלב גולמי, שנאסף ישירות מטנג הקירור ברפת "שלו" (בית אלעזרי) האוסף חלב מכלל החולבות ברפת (n=326) הניזונות ממנת חולבות שגרתית הנהוגה בעדר. הדוגמאות הועברו למעבדה על גבי קרח. עם הגעתן, הדגימות עברו עיבוד ראשוני בהתאם לפרוטוקול המחקר – בין אם באמצעות מיצוי שומן בשיטת Folch עבור אנליזת GC, ובין אם נשמרו בקירור עד למדידות ספקטרוסקופיית ראמאן.

3.2. מיצוי שומן – שיטת Folch

לצורך הפקת השומן מדגימות החלב בוצע מיצוי ליפידים בשיטה שהותאמה מהפרוטוקול הקלאסי של Lees & Sloane-Stanley 1957 (Folch). השיטה התבססה על תערובת

ממיסים אורגניים בטמפ' החדר, ויושמה לכל אחת מדגימות החלב שנבחרו לניתוח חומצות שומן. לדוגמאות החלב הוסף סטנדרט פנימי של $\text{C}_{17:0}$ heptadecanoic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA) ששימשה לחישוב הריכוז היחסי של חומצות השומן לאחר המיצוי, החומצות הומרו לאסטרים של מתיל (FAME) באמצעות הדגרה עם תמיסת מתנול בתוספת חומצה גופרתית (Sigma-Aldrich, MO, USA (v/v 5%)). לאחר מיצוי באמצעות פתרון אתר הדוגמאות נשמרו בהקפאה עד אנאליזה (-20°C).

3.3. מדידות כרומטוגרפיות גזים (GC)

לצורך קביעת פרופיל חומצות השומן בדגימות החלב, בוצע ניתוח באמצעות מערכת כרומטוגרפית גזים (GC) (Santa Clara, Agilent Technologies CA, USA), המצוידת בעמודת קפילרה מסוג DB-23 באורך של 60 מטר וקוטר פנימי של 0.25 מ"מ (Agilent Technologies). תוכנית הטמפרטורה כללה חימום ראשוני של התנור מ- 130°C ל- 170°C בקצב מהיר של 27°C לדקה, המשך העלאה מ- 170°C ל- 215°C בקצב של 2°C לדקה עם השהיה בת שמונה דקות בטמפרטורה זו, ולבסוף חימום נוסף מ- 215°C ל- 250°C בקצב של 40°C לדקה עם השהיה של חמש דקות. זמן הריצה הכולל עמד על 37.9 דקות. זיהוי הפיקים בוצע על בסיס השוואת זמני השהייה לסטנדרטים חיצוניים (Sigma Aldrich, MO, USA). חישוב ריכוזי חומצות השומן נעשה כאחוזים מולריים (mol%) מכלל חומצות השומן בדגימה.

מדידות ספקטרוסקופיות ראמאן

דגימות של 20 מיקרוליטר של מיצוי שומן הונחו על נייר אלומיניום שהונח על גבי זכוכית נושא, והושארו לייבוש בטמפרטורת חדר במשך כשתי דקות. לאחר הייבוש נמדדו שלושה אזורים שונים לדגימה, בהם נאספו מפות ספקטרליות שכל אחת מהן הורכבה ממדידה נקודתית של 30 ספקטרה. דגימות של חלב מלא טופלו באופן דומה, כאשר 20 מיקרוליטר מהחלב הונחו על נייר אלומיניום, יובשו במשך חמש דקות, ולאחר מכן נמדדו באופן דומה. המדידה נעשתה במערכת מסוג *inVia™ Raman Microscope* חברת Renishaw (Gloucestershire, England), המצוידת בלייזר באורך גל של 523 ננומטר. המדידות בוצעו תחת מיקרוסקופ סגור עם עדשת הגדלה של $\times 50$. הפרמטרים הטכניים של המדידה כללו זמן חשיפה של 0.1 שניות, עוצמת לייזר של 50%, וחמש מדידות לכל נקודה. המדידה כוונה לאזור ספקטרילי במרכז של $1100\text{ ס}^{\circ}\text{מ}^{-1}$. הנתונים נותחו באמצעות תוכנת Renishaw WiRE, וכללו ניקוי רקע פלואורסצנטי, נירמול לפי הפיק באזור $1440\text{ ס}^{\circ}\text{מ}^{-1}$, וחיתוך תחום הקריאה החל מ- $800\text{ ס}^{\circ}\text{מ}^{-1}$ לצורך המשך ניתוח כמותי והשוואתי. הנתונים שנאספו מכל אזור מדידה עברו קיבוץ ראשוני בתוכנת (WiRE Renishaw), באמצעות כלי ה-Create Map from singles, אשר יצר מפה ספקטרלית משולבת לכל דגימה. עבור כל מפה חושב ספקטרום ממוצע, לאחר תיקון קו בסיס (Baseline Correction) באמצעות התאמה פולינומית מדור שלישי, ונרמול לפי הפיק הבולט באזור $1440\text{ ס}^{\circ}\text{מ}^{-1}$. תהליך זה בוצע באחידות לכל הדגימות לשם השוואה בין

טיפולים. לאחר עיבוד ראשוני, כל ספקטרום ממוצע נשמר כקובץ טקסט (txt) לניתוח חיצוני. קבצים אלו הועברו לספרייה ייעודית לצורך ניתוח נוסף באמצעות קוד שנכתב בשפת Python (נספח א'). הקוד כלל שלבים של קריאת הספקטרומים, חישוב ממוצעים, זיהוי תדירויות מקומיות, וחילוץ ערכי עוצמה רלוונטיים. לצורך ניתוח מבני מדויק, בוצע זיהוי אוטומטי של פיקים בולטים באזורים הידועים כחיוניים לזיהוי הרכב שומן החלב, ובעיקר הפיקים באזור 1060 ס"מ⁻¹ ו-1080 ס"מ⁻¹. הקוד חילץ את ערכי העוצמה של שני הפיקים הללו מכל ספקטרום, וחישב את היחס בין עוצמת הפיק ב-1060 לעוצמת הפיק ב-1080 עבור כל דגימה. הנתונים שנאספו הוזנו לטבלה השוואתית אשר שימשה לניתוחים סטטיסטיים ולהסקת מסקנות כמותיות על פי שינוי יחסי הפיקים בין טיפולים שונים.

3.4. דוגמאות לאחר הפשרה- הקפאה

על מנת לבחון את השפעת דרך הכנת הדוגמא על הקריאות במכשיר, בצענו מחזורים של הקפאה והפשרה, הוכנו דגימות מיצוי שומן אשר נלקחו מראש מדגימות חלב באמצעות שיטת Folch, כמתואר. נפח של 100 מיקרוליטר מכל מיצוי הועבר למבחנת זכוכית, ואלו הוקפאו באופן מיידי בטמפרטורה של 20°C- לצורך שימור. כעבור כ-24 שעות, המבחנות הוצאו מהמקפיא והושארו להפשרה מלאה בטמפרטורת חדר (25°C) למשך כשעה, עד להגעה לטמפרטורה יציבה ולריכוז אחיד של השומן. מיד לאחר ההפשרה, המבחנות הוחזרו למקפיא בתנאים זהים. תהליך זה של הפשרה והקפאה חוזרת חזר על עצמו ארבע פעמים לכל דגימה, באופן אחיד ומבוקר. עם סיום המחזור הרביעי של ההפשרה וההקפאה, כל הדגימות הוצאו באופן סופי להפשרה מלאה. כאשר הדוגמאות נראו הומוגנית ואחידות ללא משקעים או גבישי קרח, הן נמדדו באמצעות ספקטרוסקופיית ראמאן.

3.5. חמצון באמצעות מי חמצן

לצורך הדמיית תהליך חמצון של רכיבי השומן בחלב, בוצע טיפול מבוקר באמצעות מי חמצן (H₂O₂). דגימות חלב גולמי שנאספו מהרפת הוקצו למבחנות זכוכית בנפח של 5 מ"ל. אל כל מבחנה הוסף מי חמצן בריכוז של 1 מולר (Sigma-Aldrich Ltd., Rehovot, Israel), לשם השראת תהליך חמצון כימי בתנאים אחידים. לאחר הוספת מי החמצן, התמיסה עברה ערבוב קצר על מנת להבטיח הומוגניות בין הממס למרכיבי השומן והודגרו בטמפ' החדר במשך 10 דקות. הדגימות שהופקו שימשו לניתוח הרכב חומצות השומן באמצעות GC, וכן להשוואה ספקטרלית באמצעות ספקטרוסקופיית ראמאן.

3.6. חמצון באמצעות ברזל וחומצה אסקורבית

לתוך 4.8 מ"ל חלב הוספו 100 מיקרוליטר של תמיסת ברזל כלוריד (FeCl₃) בריכוז 0.5 מילימול) ו-100 מיקרוליטר של תמיסת חומצה אסקורבית (5 מילימול), במים מזוקקים פעמיים

(DDW). קבוצת הביקורת קיבלה תוספת של מים מזוקקים פעמיים בלבד, לנפח סופי של 5 מ"ל. כל החומרים הכימיים נרכשו מחברת (Aldrich Ltd., Rehovot, Israel Sigma). הדגימות הודגרו בטמפרטורה של 37°C בניעור של 200 סל"ד. בנקודות הזמן 0, 1 ו-16 שעות, נלקחו 800 מיקרוליטר מהתמיסה וערבבו עם 800 מיקרוליטר של TCA (acid trichloroacetic) בריכוז של 12%. לאחר צנטריפוגה (10,000 סל"ד, 10 דקות), הנוזל העליון שהכיל את תוצרי החמצון (ללא המשקעים החלבוניים) עורבב עם 800 מיקרוליטר של תמיסת TBA (Thiobarbituric acid) (10 מילימול). הדגימות הודגרו ב-100°C במשך 40 דקות. TBA נוסף בעודף, ובתנאים אלה הוא מגיב עם קבוצות אלדהיד וקטון שמקורן בתוצרי חמצון של קשרים כפולים בחומצות שומן, ויוצר קומפלקסים בעלי בליעה ייחודית באורך גל 532 ננומטר. כמות החומרים הבולעים באורך גל זה פרופורציונלית לריכוז קבוצות אלדהיד/קטון, ומייצגת את רמת תוצרי החמצון (TBARS – thiobarbituric acid reactive species) לאחר הצינון, נמדדה הבליעה באורך גל של 532 ננומטר. ריכוז תוצרי החמצון חושב לפי הנוסחה: $C = A / (L \times \epsilon)$, כאשר, $\epsilon = 156,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; $L = 1 \text{ ס"מ}$; ו- $A = \text{ערך הבליעה הנמדד}$.

3.7 אילוח בחיידקים

חיידקי *Escherichia coli* -P4 ו- *Bacillus subtilis* -3610 נזרעו באמצעות לולאת זריעה סטרילית על מצע מוצק מסוג LB- lysogeny broth, המכיל 1.5% אגר (Difco, Le Pont-de-Claix, France). הצלחות הודגרו במשך 18 עד 24 שעות בתנאים אופטימליים: עבור *E. coli* 37°C עבור *B. subtilis* 25°C, עד להופעת מושבות נפרדות. לצורך קבלת תרבית נוזלית, מושבה בודדת מכל חיידק הועברה ל-10 מ"ל מצע LB נוזלי והודגרה באינקובטור רוטט (150 סל"ד) במשך 24 שעות בטמפרטורה המתאימה לכל מין. לאחר תקופת ההדגרה, 23 מיקרוליטר מהתרבית הוזרקו לתוך 1.5 מ"ל של חלב (מסחרי או גולמי), והדגימות הודגרו באינקובטור ב-30°C ובתנועה מתמדת (150 סל"ד), למשך פרקי זמן משתנים בהתאם לתכנון הניסוי. בניסוי אילוח החלב בחיידקים בריכוז נמוך, דגימות החלב-כ-1.5 מ"ל של דגימה, אולחו בריכוז של כ- 10^4 CFU/mL למך 24 שעות ואילו דגימות שאולחו בריכוזים גבוהים יותר אולחו עם *E. coli* בלבד בריכוז של כ- 10^6 CFU/mL , והודגרו למשכי זמן ארוכים יותר של יום, יומיים, ארבעה ימים ושישה ימים.

3.8 אחסון בטמפרטורה לא נאותה

לצורך הדמיית תנאי קלקול סביבתיים, דגימות חלב מסחרי (מפוסטר והומוגני, 3.5% שומן, תנובה) חולקו למבחנות סטריליות בנפח של 5 מ"ל והושארו בטמפרטורת החדר (כ-22°C) למשך פרקי זמן משתנים. בתום תקופת האחסון שנקבעה לכל קבוצה, הדגימות עורבבו באופן אחיד באמצעות vortex. נלקחו 0.5 מ"ל, אשר עברו מיצוי שומן בשיטת Folch. לאחר

המיצוי, הדגימות נותחו בשתי גישות אנליטיות נפרדות – ספקטרוסקופיית ראמן לניתוח איכותי של הרכב הקשרים המולקולריים, וכרומטוגרפיית גזים לזיהוי של חומצות השומן.

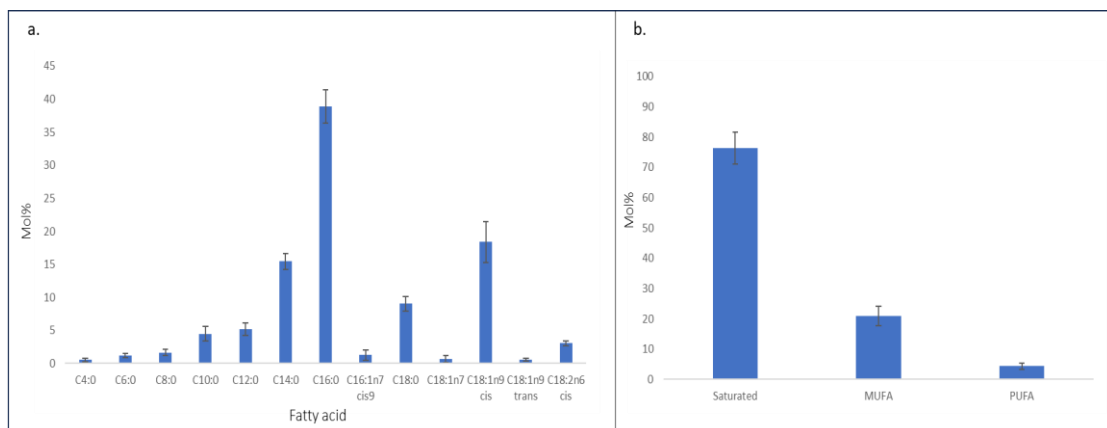
3.9. סטטיסטיקה

מובהקות ההבדלים בין ממוצעי הטיפולים השונים נבחנה במבחן שונות חד-כיווני (One-way ANOVA). כאשר נמצאו הבדלים מובהקים סטטיסטית ($p < 0.05$), בוצע מבחן השוואה מרובה (post-hoc tests) מסוג ניומן-קולס (Newman-Keuls test). תוצאות המבחנים יושמו על הגרפים באמצעות הקצאת אותיות לקבוצות כאשר קבוצות שסומנו באותה אות אינן שונות מובהקות זו מזו, בעוד שקבוצות בעלות אות שונה נחשבות כמובחנות באופן מובהק סטטיסטית ברמה של $p = 0.05$.

4. תוצאות

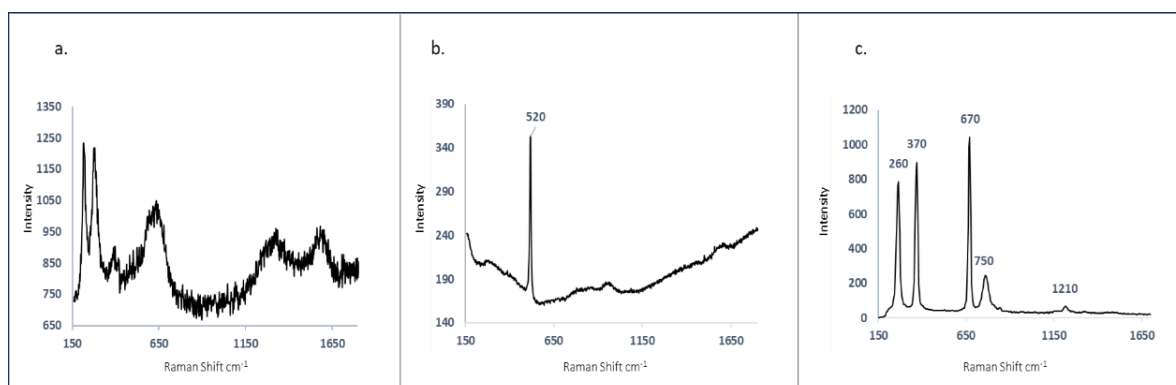
4.1. כיוול מערכת המדידה ואפיון ראשוני של שומן חלב גולמי

לצורך אפיון ראשוני, בוצע מיצוי שומן מחלב גולמי לא מפוסטר ולא מהומגן, אשר שימש כדגימת ביקורת בניסוי. לאחר מיצוי השומן, נותח הרכב חומצות השומן באמצעות כרומטוגרפיית גזים. שומן החלב הורכב בעיקר מחומצות שומן רוויות, כאשר חומצה פלמיטית (C16:0), חומצה סטארית (C18:0) וחומצה מיריסטית (C14:0) היו השכיחות ביותר. מבין החומצות הבלתי רוויות, חומצה אולאית (C18:1n9 cis) נמצאה באחוז הגבוה ביותר. סיווג לפי רמות רוויה הצביע על כך שכ-75% מהרכב השומן היו חומצות שומן רוויות (SFA), כ-20% חד-בלתי רוויות (MUFA), ופחות מ-5% רב-בלתי רוויות (PUFA). התוצאות חושבו על בסיס ממוצע של שלוש חזרות (איור 2).



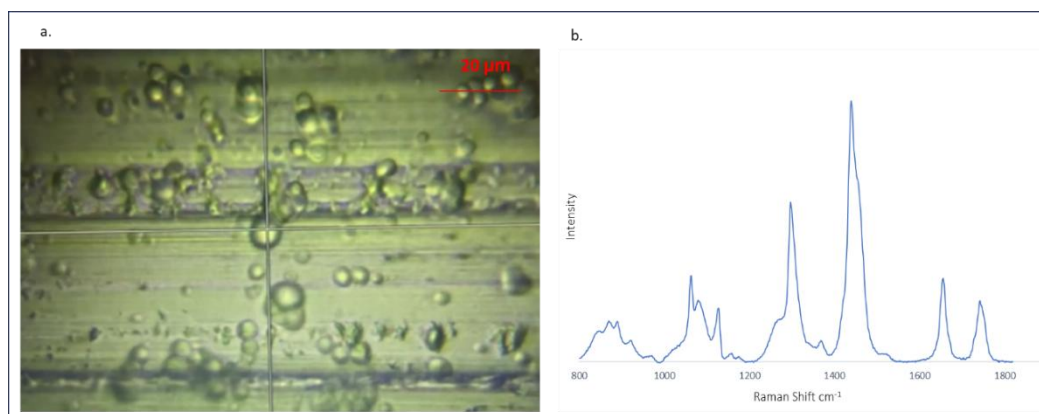
איור 2. הרכב חומצות השומן בשומן חלב גולמי. a- תוצאות כרומטוגרפיית גזים של דגימות שומן חלב גולמי, המציגות את אחוזי המול של חומצות השומן השונות. b- סיכום באחוזים של קבוצות חומצות השומן: חומצות שומן רוויות (SFA), חומצות שומן חד-בלתי רוויות (MUFA) וחומצות שומן רב-בלתי רוויות (PUFA).

בהמשך, בוצע כיוול לשיטת המדידה באמצעות ספקטרוסקופיית ראמאן, במטרה לאפשר מדידה אמינה של שומן חלב. מדידה על גבי משטח מתכת הניבה רמות רעש גבוהות ויחסי אות לרעש נמוכים (איור 3a). מעבר לשימוש בנייר אלומיניום כמצע הקטין את רעש הרקע ושיפר את איכות האות, תוך הופעת פיק אופייני ב-520 ס"מ⁻¹, המיוחס לסיליקון. (Borowich, Latek, and Rzdokiewisz 2012) (איור 3b). כדי לצמצם השפעות של ממסים מהמיצוי, נמדד ספקטרום של כלורופורם, שהראה פיקים אופייניים ב-260, 370, 670 ו-750 ס"מ⁻¹ (איור 3c), ובשל כך הוחלט לחתוך את ספקטרום המדידה מתחת ל-800 ס"מ⁻¹ ולהחיל תיקון קו בסיס.



איור 3. כיוול מערכת ספקטרוסקופיית ראמאן באמצעות מצעים שונים. a- ספקטרום ראמאן של מצע מתכת מיקרוסקופי, המציג בעיקר רעש ויחס אות לרעש- SN (signal to noise) נמוך, ללא פיקים אופייניים. b- ספקטרום ראמאן של מצע מתכת מכוסה בנייר אלומיניום, המציג שיפור משמעותי ביחס האות לרעש וירידה ברעש הרקע. פיק אופייני מופיע ב-520 ס"מ⁻¹. c- ספקטרום ראמאן של כלורופורם (CHCl₃), הממס המשמש במיצוי, עם פיקים אופייניים לממס זה (glavin and madden, 2024).

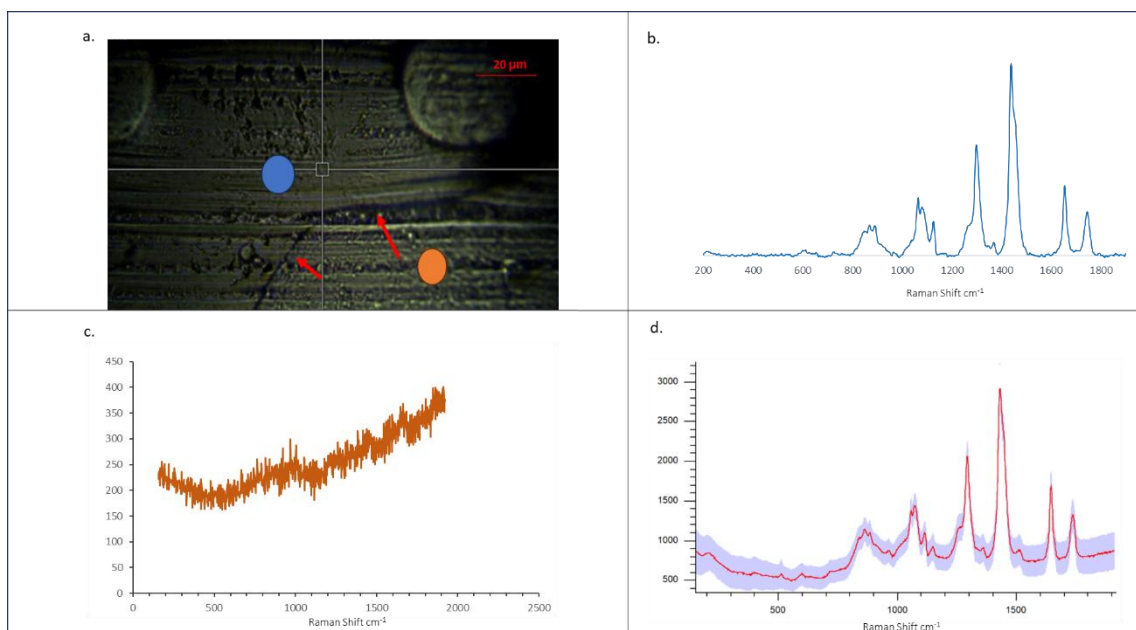
באמצעות פרוטוקול זה, נמדדה טיפת חלב גולמי שלא עבר פסטור או הומוגניזציה. תחת מיקרוסקופ אור ניתן לראות בועיות שומן בגדלים שונים, והמוקד הוגדר על בועית שומן בודדת (איור 4a). ספקטרום הראמאן שנמדד מהבועית, הציג פיקים אופייניים לשומן חלב עם יחס אות לרעש גבוה במיוחד (איור 4b). הספקטרום התקבל כממוצע של עשרים קריאות מאזורים שונים באותה בועית שומן.



איור 4. אפיון שומן בחלב גולמי לא מפוסטר ולא מהומגן. a- תמונה מיקרוסקופית בהגדלה 50x של חלב גולמי מלא, המציגה בועיות שומן בגדלים שונים על גבי המצע. b- ספקטרום ראמאן שנלקח מחלב גולמי מבועית שומן,

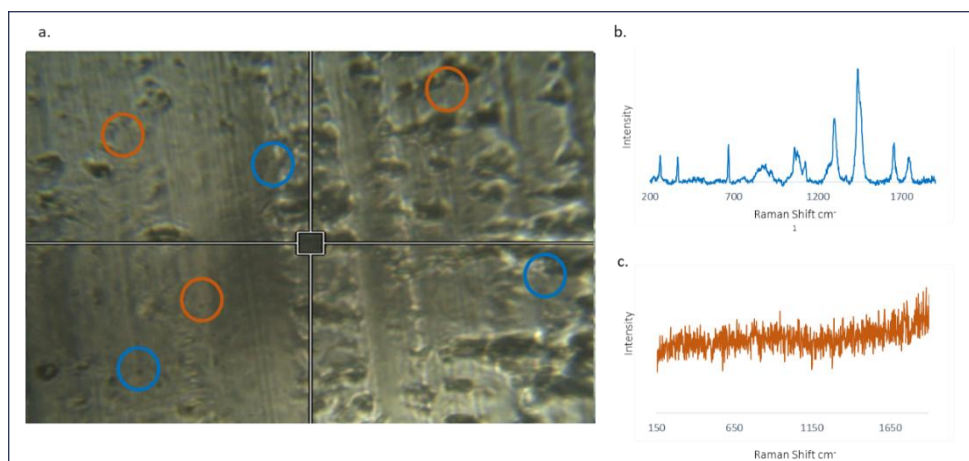
המציג פיקים אופייניים לשומן חלב עם יחס אות לרעש (SN) גבוה, המעיד על איכות נתונים גבוהה. הספקטרום נותח החל מ-800 cm^{-1} ועבר תיקון קו בסיס (baseline correction)

בהמשך, נבחן מיצוי שומן מחלב גולמי שהוקפא מיד לאחר המיצוי והופשר לפני המדידה. בהגדלה $\times 50$ נראתה טיפת שומן ברורה עם גבולות מוגדרים, שסומנו בחיצים אדומים (איור 5a). ספקטרום ראמאן מאזור טיפת השומן (עיגול כחול) הציג פיקים מובהקים לשומן חלב (איור 5b). בעוד שהמדידה מחוץ לטיפת השומן (עיגול כתום) הציגה רעש רקע בלבד (איור 5c). התוצאות הדגישו את יכולת השיטה לזהות בצורה מדויקת את אזור השומן ולהבחין בינו לבין הרקע.



איור 5. אפיון מיצוי שומן מחלב גולמי שעבר הקפאה אחת. a- תמונה מיקרוסקופית בהגדלה $\times 50$ של מיצוי שומן מחלב גולמי. העיגול הכחול מסמן אזור אחיד בתוך טיפת השומן; החיצים האדומים מצביעים על גבול טיפת השומן; העיגול הכתום מציינ אזור מחוץ לטיפת השומן. b- ספקטרום ראמאן שנלקח מהעיגול הכחול (אזור טיפת השומן), המציג פיקים אופייניים לשומן חלב עם יחס אות לרעש (SN) גבוה. c- ספקטרום ראמאן שנלקח מהעיגול הכתום (מחוץ לטיפת השומן), המציג בעיקר רעש רקע, ללא אות ספציפי לשומן. d- ספקטרום ראמאן כפי שמוצג ב-b עם הצגת סטיית התקן (אזור מוצל).

בשלב הבא נבחנו ההשפעות של הקפאות והפשרות חוזרות. מיצוי שומן חלב שהוקפא והופשר ארבע פעמים נמדד תחת אותם תנאי ניסוי. בתמונה (איור 6a) לא נצפתה טיפת שומן מוגדרת עם גבולות ברורים. מדידות ספקטרוסקופיות מאזורים אקראיים הראו כי חלקם הציגו פיקים אופייניים לשומן (איור 6b, עיגולים כחולים), בעוד שבאזורים אחרים נמדד רעש רקע בלבד (איור 6c, עיגולים כתומים). כמו כן, בספקטרה שהוצגו כאופייניים לשומן הופיעו פיקים אופייניים לכלורופורם, דבר המעיד על נוכחות ממסים, כנראה כתוצאה מפירוק מבני הנגרם מההקפאות המרובות. ממצאים אלה מצביעים על הקושי במדידה מדויקת של שומן לאחר פגיעה במבנה המקורי.



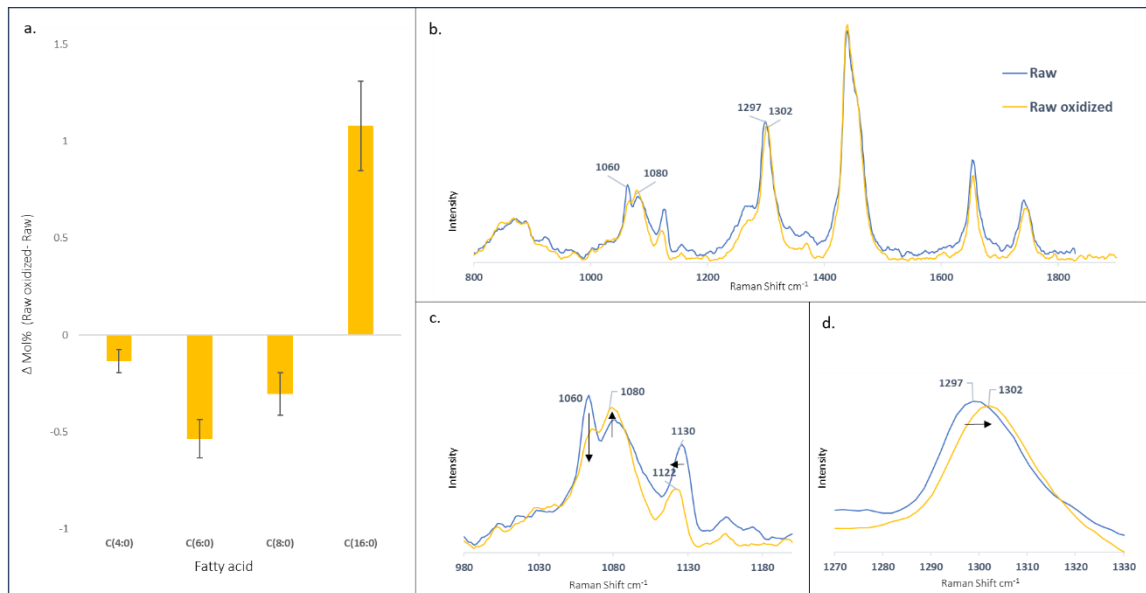
איור 6. השפעת הקפאות והפשרות חוזרות על מיצוי שומן מחלב גולמי. a- תמונה מיקרוסקופית בהגדלה 50X של מיצוי שומן מחלב גולמי שעבר 4 מחזורי הקפאה והפשרה. לא ניתן להבחין בטיפת שומן אחידה על גבי המצע. עיגולים כחולים וכתומים מסמנים אזורים שנבחרו באקראי למדידת ספקטרום ראמאן. b- ספקטרום ראמאן ממוצע שנלקח מהאזורים המסומנים בעיגולים כחולים, המציג פיקים אופייניים לשומן חלב. בתחילת הספקטרום ניתן להבחין גם בפיקים המאפיינים את הממס כלורופורם. c- ספקטרום ראמאן ממוצע שנלקח מהאזורים המסומנים בעיגולים כתומים, המציג רעש רקע, ומעיד על היעדר שומן באזורים אלו.

4.2 השפעת תהליכי חמצון מבוקרים על שומן חלב – ניתוח כימי וספקטראלי

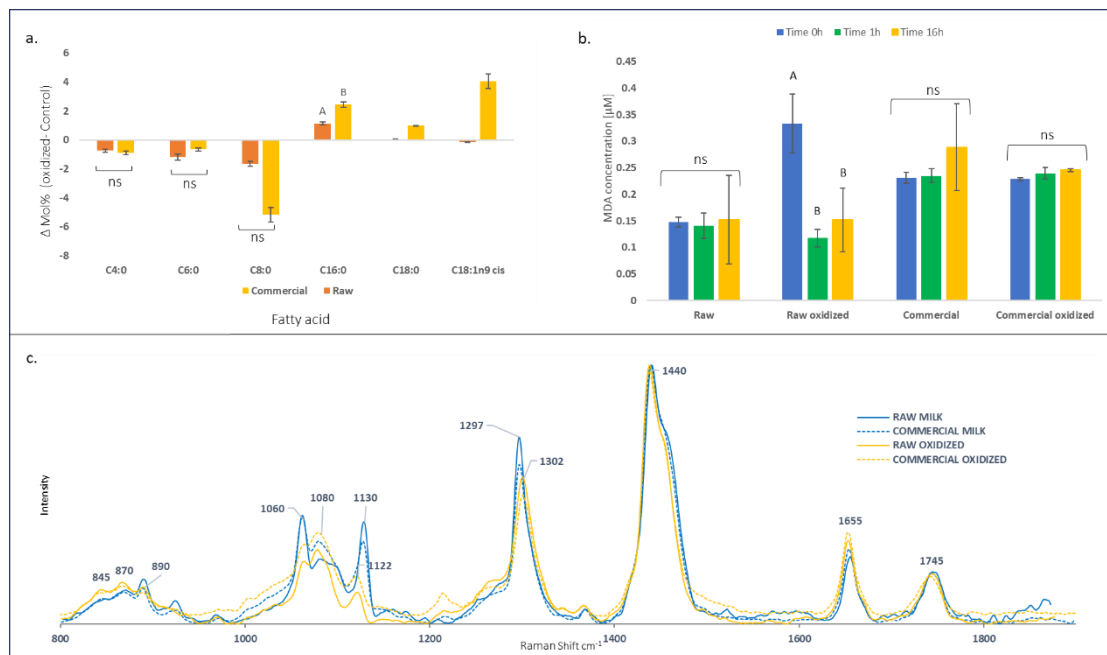
כדי להעריך את ההשפעה של תהליכי חמצון על שומן חלב, בוצעו ניסויי חמצון מבוקרים באמצעות שני סוגי מחמצנים: מי חמצן (H_2O_2) ותערובת של ברזל וחומצה אסקורבית. התוצאות נותחו באמצעות כרומטוגרפיית גזים וספקטרוסקופיית ראמאן.

4.2.1 חמצון באמצעות מי חמצן

כדי לבדוק את האפשרות לאפיין חלב שהתקלקל בעזרת ראמאן, נבדקו דוגמאות שומן לאחר טיפול במי חמצן. בתום תהליך החמצון נצפו שינויים מובהקים בהרכב חומצות השומן בשומן החלב, כפי שנמצא באמצעות GC (איור 7a). נרשמה ירידה מובהקת בריכוז של חומצות שומן קצרות שרשרת $C_4:0$, $C_6:0$, ו- $C_8:0$ ($p = 0.0001$, $p = 0.01$, $p = 0.0001$) בהתאמה. ועלייה מובהקת בחומצה פלמיטית $C_{16:0}$ ($p = 0.0095$), שהיא חומצת שומן רוויה ארוכת שרשרת. הממצאים הספקטראליים בראמאן (איור 7b-d) ומצביעים גם הם על שינויים מבניים בשומן. לאחר החמצון, הפיק ב- $1130\text{ ס}^{\circ}\text{מ}^{-1}$ הוסט ל- $1122\text{ ס}^{\circ}\text{מ}^{-1}$ והפיק ב- $1297\text{ ס}^{\circ}\text{מ}^{-1}$ הוסט ל- $1302\text{ ס}^{\circ}\text{מ}^{-1}$. כמו כן, נצפתה ירידה בעוצמת הפיק ב- $1060\text{ ס}^{\circ}\text{מ}^{-1}$ ועלייה בעוצמת הפיק ב- $1080\text{ ס}^{\circ}\text{מ}^{-1}$. היחס בין שני הפיקים, שהיה גדול מ-1 בדוגמת הביקורת, ירד לערכים קטנים מ-1 לאחר החמצון (טבלה 1).



איור 7. השפעת חמצון במי חמצן על הרכב חומצות השומן וספקטרום ראמאן של שומן חלב גולמי. **a-** הפרש אחוזי המול של חומצות שומן כפי שחשבו על בסיס תוצאות GC, כולל ירידה ב- C4:0, C6:0, ו- C8:0, ועלייה ב- C16:0. **b-** ספקטרום ראמאן במבט כללי לפני ואחרי חמצון. **c-** שינוי בעוצמות הפיקים ב-1060 ו-1080 ס"מ⁻¹ והסטות ב-1130 ל-1122. **יחס הפיקים** ב- 1060/1080 לאחר נרמול לפי הפיק ב-1440 ס"מ⁻¹, הראה מעבר מערכים גבוהים מ-1 לערכים נמוכים מ-1 בעקבות החמצון (טבלה 1). **d-** הסטת הפיק ב-1297 ל-1302 ס"מ⁻¹.



איור 8. השפעת חמצון באמצעות ברזל וחומצה אסקורבית על חלב גולמי ומסחרי. **a-** תוצאות כרומטוגרפית גזים (GC) של דגימות חלב גולמי (כתום) ומסחרי (צהוב) לפני ואחרי חמצון עם ברזל וחומצה אסקורבית. הגרף מציג את ההפרש (Δ) באחוזי המול של חומצות השומן, כאשר ערכים שליליים מצביעים על ירידה בריכוז לאחר החמצון, וערכים חיוביים מצביעים על עלייה. מוצגות רק חומצות השומן אשר השינוי בהן נמצא מובהק סטטיסטית לפחות באחד מסוגי החלב ($p < 0.05$) כאשר אותיות שונות מסמנות שונות מובהקות בשינוי בחומצות שומן בין שני הטיפולים, ו-ns מסמן חוסר מובהקות. **b-** ריכוזי מאלונאלדהיד (MDA) בדגימות חלב גולמי (Raw) ומסחרי (Commercial), עם מחמצן ובלו מחמצן, בזמנים 0 (כחול), 1 (ירוק) ו-16 (צהוב) שעות לאחר החמצון, כאשר זמן 0 מתואר כמידה שבוצעה מיד לאחר הוספת המחמצן. התוצאות מוצגות בריכוזים של מיקרומולר. - ספקטרום ראמאן של דגימות החלב לאחר חמצון של 16 שעות. בכחול: חלב גולמי; בכחול מקוקו: חלב מסחרי; בצהוב: חלב גולמי מחומצן; בצהוב מקוקו: חלב מסחרי מחומצן. לאחר החמצון נצפתה ירידה בעוצמת הפיק ב-1060 ס"מ⁻¹, עלייה בעוצמת הפיק ב-1080 ס"מ⁻¹, הסטה של הפיק מ-1130 ל-1122 ס"מ⁻¹, והסטה נוספת של הפיק מ-1297 ל-1302 ס"מ⁻¹.

טבלה 1: יחס עוצמת הפיקים ב-1060 סמ¹-ל-1080 סמ¹ עבור דגימות חלב גולמי (Raw) ומסחרי (Commercial) בתנאי ביקורת ובתנאי ניסוי שונים. תנאי הניסוי כללו חמצון באמצעות מי חמצן (H₂O₂) או באמצעות ברזל וחומצה אסקורבית, אילוח חיידקי בריכוזים נמוכים וגבוהים, וכן אחסון חלב בתנאים לא נאותים. היחס חושב באמצעות קוד פייתון ומאפשר השוואה כמותית בין מצבים שונים של החלב. הערכים מוצגים כממוצע ± טעות תקן של הממוצע (SEM), ומחושבים על בסיס שלוש חזרות מכל דגימה. יחס גבוה מ-1 מציין עוצמה גבוהה יותר של הפיק ב-1060 סמ¹ לעומת הפיק ב-1080 סמ¹.

Experiment	Details		Ratio
H₂O₂	Raw milk	control	1.2± 0.06
	Raw milk + H ₂ O ₂	oxidized	0.7± 0.01
Iron/ascorbic acid	Raw milk	control	1.9± 0.07
	Raw milk + Fe ²⁺	oxidized	0.8± 0.06
	Commercial milk	control	1.3± 0.08
	Commercial milk + Fe ²⁺	oxidized	0.8± 0.04
Inoculation at low concentration	Commercial milk	control	1.2± 0.09
	Commercial milk + <i>B. Sub</i>	0	0.9± 0.01
		24 hours	0.9± 0.01
	Commercial milk + <i>E. coli</i>	0	0.9± 0.02
		24 hours	0.9± 0.03
	Inoculation at high concentration	Commercial milk + <i>E. coli</i>	1 day
2 days			0.9± 0.04
4 days			3± 0.1
6 days			4± 0.3
Milk kept improperly	Commercial milk kept at room temperature	2 hours	0.9± 0.02
		4 hours	0.8± 0.01
		24 hours	0.9± 0.02
		3 days	0.9± 0.04
		5 days	0

טבלה 2: אורך גל (cm^{-1}) והשיוך המולקולרי של הפיקים העיקריים שנצפו בספקטרום הראמאן של פרקציית השומן בחלב (He et al. 2019, Yellin and Levin 1977, Czamara et al. 2015, Aslanian et al. 1986, Jurowski et al. 2024).

Raman Shift (cm^{-1})	Assignment
845	phospholipids
870	Phospholipids
1060	SATURATED- ALL TRANSE
1080	SATURATED-GAUCHE
1100	C-C -GAUCHE
1122	C-C terminal-GAUCHE
1130	C-C-ALL TRANSE
1170	C-O-C
1260	C-H UNSATURATED
1297	CH ₂ twisting-Saturated
1302	CH ₂ twisting
1420	CH ₂ scissoring
1440	CH ₂ scissoring
1460	CH ₂ (scissoring)-Saturated
1600	C=C stretching
1655	C=C Streching
1745	C=O

4.2.2. חמצון באמצעות ברזל וחומצה אסקורבית

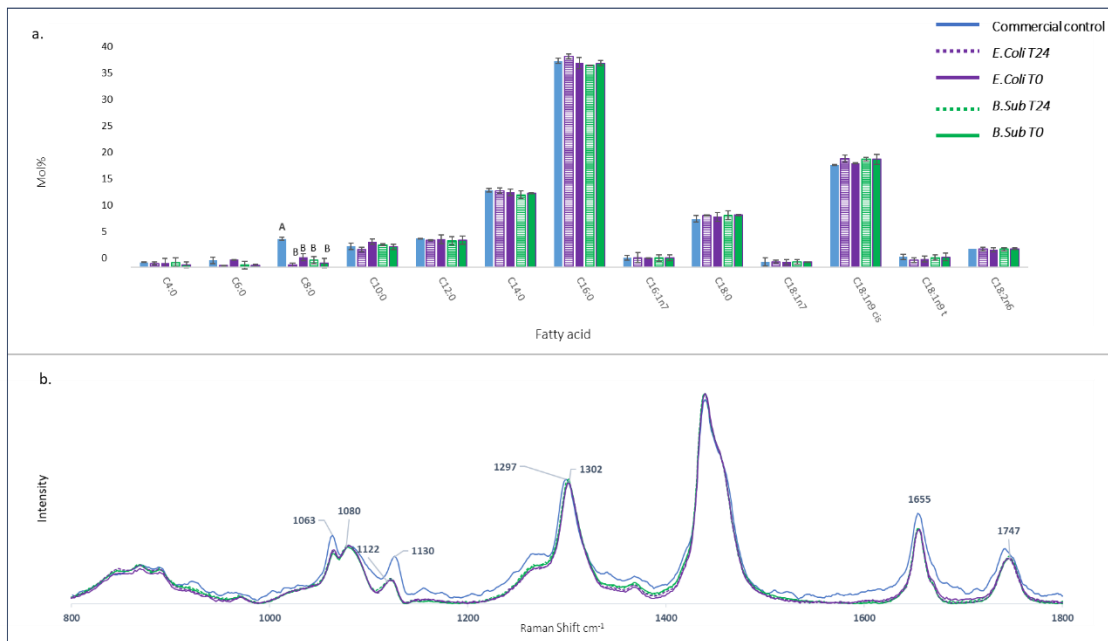
כדי לבדוק אם השינויים בספקטרום הראמאן מאפיינים חלב מחומצן, חימצנו דגימות של חלב גולמי וחלב מסחרי באמצעות ברזל דו-ערכי (Fe^{2+}) וחומצה אסקורבית. ניתוח תוצאות GC (איור 8a) הצביע על דפוסי שינוי שונים בין סוגי החלב. כמו בחמצון במי חמצן, בחלב המסחרי נרשמה ירידה מובהקת בחומצות שומן קצרות שרשרת C6:0 ($p = 0.0001$), C4:0 ($p = 0.0001$), ו-C8:0 ($p = 0.0001$). במקביל, נמצאה עלייה מובהקת ב-C16:0 ($p = 0.0003$), C18:0 ($p = 0.0002$), ובחומצה אולאית-C18:1n9 ($p < 0.05$). מדידת רמות מאלונאלדהיד (MDA) באמצעות מבחן TBARS נמצאה אינטראקציה מובהקת בין זמן לבין סוג הטיפול (Two-Way ANOVA, $p < 0.05$) המעידה כי דינמיקת החמצון תלויה בשילוב בין סוג החלב לבין משך החשיפה (איור 8b). בנייתו בתוך כל טיפול, לא נמצא הבדל מובהק בין זמני 0, 1 ו-16 שעות בחלב גולמי ללא מחמצן (NS), בעוד שבחלב גולמי בתוספת ברזל נמצא הבדל מובהק בין זמן 0 לבין זמנים 1 ו-16 ($p < 0.05$), ללא הבדל מובהק בין 1 ל-16 שעות. בהשוואה בין הטיפולים בתוך כל זמן, כבר בנקודת המוצא (0 שעות) נמצאו הבדלים מובהקים בין סוגי החלב, כאשר חלב גולמי הציג רמות חמצון נמוכות באופן מובהק לעומת חלב מהסופר, חלב לאחר 5 ימי אחסון וחלב בתוספת ברזל. לאחר שעה, שני טיפולי החלב הגולמי נותרו נמוכים באופן מובהק משאר הדוגמאות, ($p < 0.05$) בעוד שחלב מהסופר, עם או בלי תוספת ברזל, לא היה שונה באופן מובהק מחלב לאחר 5 ימי אחסון. ספקטרום שנמדד באמצעות ראמאן (איור 8c) הדגים דפוסי שינוי דומים לאלו שנראו לאחר חמצון במי חמצן: ירידה בעוצמת הפיק ב-1060 ס"מ⁻¹, עלייה ב-1080 ס"מ⁻¹, והסטה של הפיקים 1130 → 1122 ו-1297 → 1302 ס"מ⁻¹. יחסי העוצמות בין הפיקים נותחו לאחר נרמול לפיק ב-1440 ס"מ⁻¹ (טבלה 1) ונמצא כי בשני סוגי החלב, יחס 1060/1080 היה גבוה מ-1 לפני החמצון וירד לערכים נמוכים מ-1 לאחריו, גם כשמדד ה-MDA לא הראה שינוי מובהק.

4.2.3. השפעת אילוח חיידקי בריכוז נמוך על הרכב חומצות השומן וספקטרום ראמאן של

חלב מסחרי

במטרה לבחון האם אילוח חיידקי בריכוז נמוך עשוי להשפיע על הרכב שומן החלב, אולחו דגימות של חלב מסחרי בשני סוגי חיידקים *Escherichia coli* ו-*Bacillus subtilis* בריכוז של $10^4 \times 1.5$ CFU/mL. הרכב חומצות השומן נבחן באמצעות כרומטוגרפיית גזים, והתוצאות הושוּו לספקטרוסקופיית ראמאן (איור 9) מניתוח תוצאות ה-GC (איור 9a) עולה כי לא נמצאו שינויים מובהקים ברוב חומצות השומן בין קבוצות הביקורת לבין הקבוצות שאולחו. ניכר כי החומצות השומן הדומיננטיות בדגימות היו C18:0, C16:0, C14:0 ו-C18:1n9(Cis), אשר יחדיו הרכיבו כ-78% מכלל חומצות השומן בכל הדגימות. החריגה היחידה שנמצאה הייתה בירידה מובהקת בריכוז חומצה קפריית C8:0 ($p = 0.003$), בדגימות המאולחות לעומת

הביקורת בה נרשמה רמה גבוהה יותר של חומצה זו. הניתוח הספקטרלי (איור 9b) שני סוגי האילוח הובילו לדפוס ספקטרלי דומה זה לזה, אך שונה מזה של הביקורת. בפרט, נצפתה ירידה בעוצמת הפיק ב-1060 ס"מ⁻¹, עלייה בעוצמת הפיק ב-1080 ס"מ⁻¹ (טבלה 1), כאשר יחסי הפיקים בדוגמאות שאולחו בחיידקים, גם בזמן 0 וגם בזמן 24 זהים. בנוסף, הסטה של הפיק מ-1130 ל-1122 ס"מ⁻¹ והסטה נוספת מ-1297 ל-1302 ס"מ⁻¹. שינויים אלו תואמים לדפוס שנצפה גם לאחר חמצון כימי.



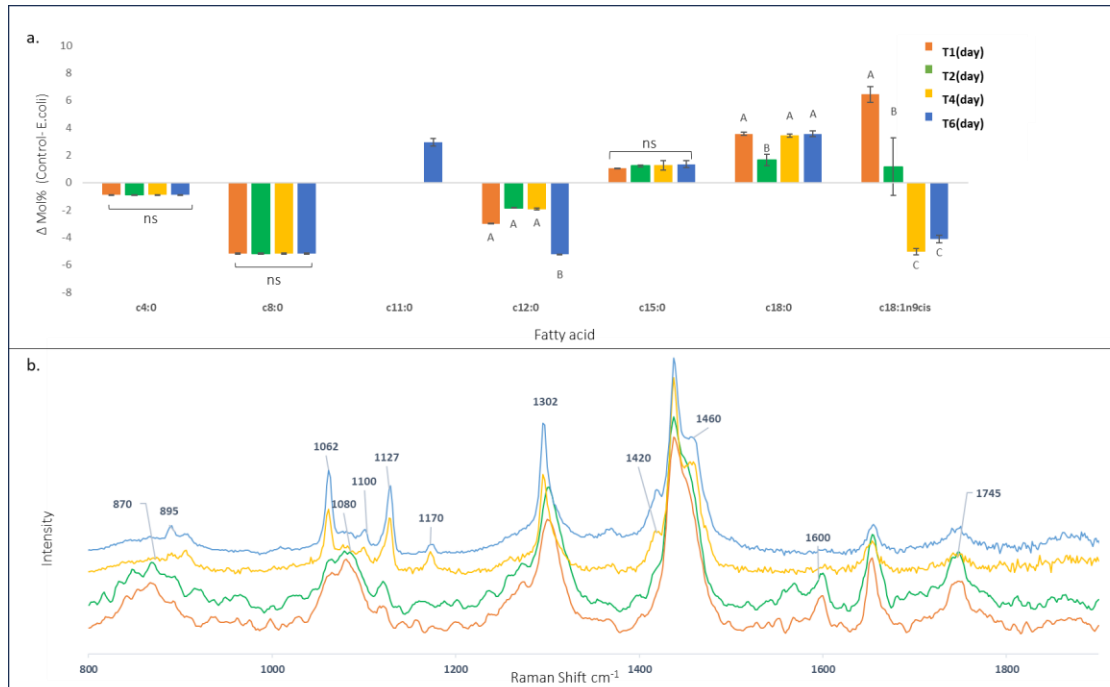
איור 9. השפעת אילוח חיידקי על חלב מסחרי. a- תוצאות כרומטוגרפית גזים של דגימות חלב מסחרי שאולחו בחיידקים *Escherichia coli* ו- *Bacillus subtilis* בזמנים 0 ו-24 שעות, וכן דגימת ביקורת ללא אילוח כאשר הגרף הכחול מייצר את הדוגמאת הביקורת- חלב מסחרי, הגרף הסגול מייצג את החלב המסחרי המאולח בחיידקי *E. coli* כאשר הקו המלא מציג אילוח בזמן 0 וקו מקווקו מציג אילוח בזמן של 24 שעות, הגרף הירוק מייצג את החלב המסחרי המאולח בחיידקי *B.sub* כאשר גם כאן הקו המלא מציג אילוח בזמן 0 וקו מקווקו מציג אילוח בזמן של 24 שעות. הגרף מציג את אחוזי המול של חומצות השומן השונות בכל אחת מהדגימות. תוצאות המסומנות באותיות מצביעות על שוני בעל משמעות סטטיסטית בין הדוגמאות. b- ספקטרה ראמאן של אותן דגימות. ניתן לראות כי הספקטרה של הדגימות שאולחו בחיידקים דומים זה לזה, אך שונים מדגימת הביקורת. השינויים כוללים ירידה בעוצמת הפיק ב-1060 ס"מ⁻¹, עלייה בעוצמת הפיק ב-1080 ס"מ⁻¹, הסטה של הפיק מ-1130 ל-1122 ס"מ⁻¹, והסטה נוספת של הפיק מ-1297 ל-1302 ס"מ⁻¹, בדומה לשינויים שנצפו בחלב שעבר חמצון.

4.2.4. השפעת אילוח חיידקי *Escherichia coli* בריכוז גבוה על הרכב חומצות השומן

וספקטרום ראמאן של חלב מסחרי

לצורך בחינת ההשפעה של אילוח ממושך בריכוז גבוה על שומן החלב, אולחו דגימות חלב מסחרי בחיידקי *Escherichia coli* בריכוז של 1.5×10^5 CFU/mL והודגרו באינקובציה למשך 1, 2, 4 ו-6 ימים. תוצאות כרומטוגרפית הגזים מצביעות על שינויים מובהקים בפרופיל חומצות השומן לאורך זמן (איור 10a) כבר מהיום הראשון נצפתה ירידה מובהקת בחומצות השומן הרוויות קצרות השרשרת: בחומצה C4:0 ($p = 0.0001$) ו- C8:0 ($p = 0.0001$), ובחומצה C12:0, בה נצפתה ירידה מובהקת בשלושת הזמנים שנבדקו – ביום 1, 2, 4 ו-6, כאשר הירידה ביום 6 הייתה המשמעותית ביותר ($p = 0.004$). במקביל, חלה עלייה מובהקת

בחומצות שומן אחרות. בחומצה C11:0 נרשמה עלייה מובהקת ביום 6 ($p = 0.0001$), ובחומצה C15:0 נצפתה עלייה עקבית לאורך הניסוי ($p = 0.009$). גם בחומצה סטארית (C18:0) נמצאה עלייה מובהקת – ביום 1 ($p = 0.0003$), ביום 2 ($p = 0.009$), ביום 4 ($p = 0.0003$) וביום 6 ($p = 0.0002$), כאשר העלייה ביום השני הייתה המתונה ביותר ונבדלה (0.0003), וביום 6 ($p = 0.0002$), כאשר העלייה ביום השני הייתה המתונה ביותר ונבדלה סטטיסטית משאר הימים. בחומצה האולאית (C18:1n9) נרשמה עלייה מובהקת בימים 1 ו-2 ($p < 0.05$), לאחרים נצפתה ירידה מובהקת בימים 4 ו-6 ($p < 0.05$), עד לרמות נמוכות מאלו שנמדדו בתחילת הניסוי.



איור 10. השפעת אילוח לאורך זמן בחיידק *Escherichia coli* על הרכב חלב מסחרי. a- תוצאות כרומטוגרפיות גזים (GC) של דגימות חלב מסחרי שאולחו בחיידק *Escherichia coli* לאחר תקופות אינקובציה של יום (כתום), יומיים (ירוק), 4 ימים (צהוב) ו-6 ימים (כחול). הגרף מציג את ההפרש (Δ) באחוזי המול של חומצות השומן, כאשר ערכים שליליים מצביעים על ירידה בריכוז לאחר האילוח, וערכים חיוביים מצביעים על עלייה, והאותיות מסמנות הבדלים מובהקים בין הקבוצות, ו-ns מסמן חוסר מובהקות (not significant). b- ספקטרה ראמאן של אותן דגימות, המציגים שינויים משמעותיים בפיקים ככל שמשך האילוח מתארך. השינויים כוללים עלייה בעוצמת הפיק ב-1060 cm^{-1} , ירידה בעוצמת הפיק ב-1080 cm^{-1} , ועוד פיקים מסומנים שמציגים שינויים שהתרחשו בספקטרום כתוצאה מהאילוח.

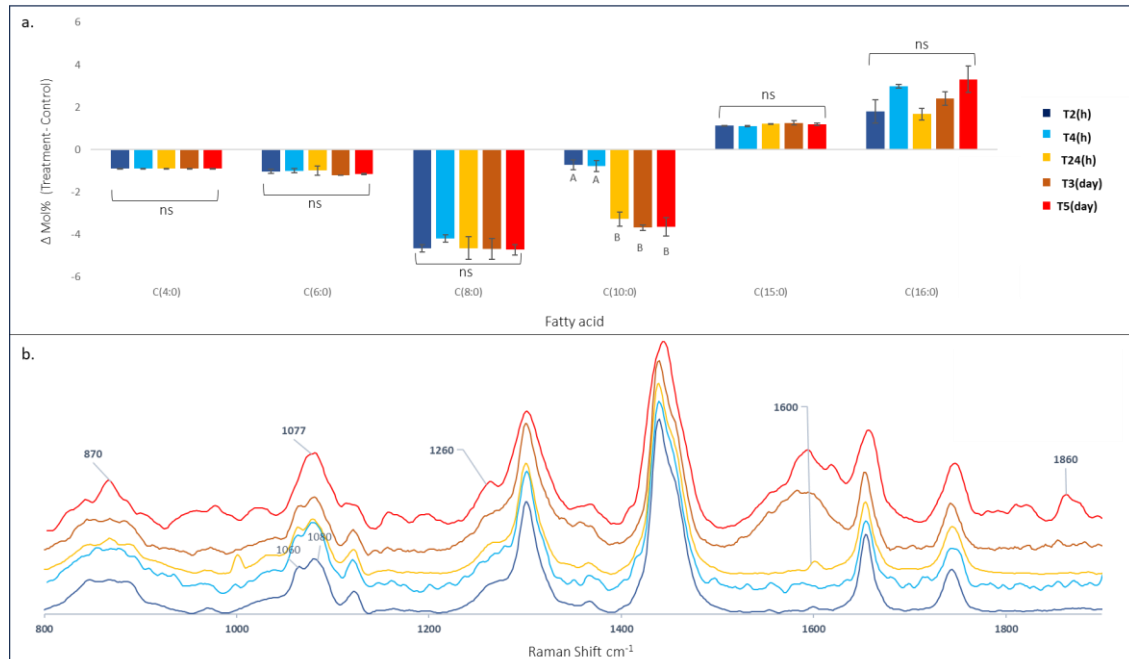
ספקטראות הראמאן חושבו כממוצע של שלוש חזרות ביולוגיות שכל אחת מהן כללה מספר קריאות אזוריות ומפות מדידה (איור 10b). זיהיתי שינויים מורכבים ומדורגים במבנה השומן ככל שמשך האילוח התארך. באזור הספקטראלי שבין 1000 ל-1200 cm^{-1} , הפיק ב-1080 cm^{-1} אשר הופיע בביקורת ובאילוחים הקצרים יותר נעלם לחלוטין לאחר 4 ימים. ביום 4 ו-6 הופיעו שני פיקים חדים ב-1062 וב-1127 cm^{-1} . ביום הרביעי הופיע פיק חדש נוסף ב-1170 cm^{-1} , שנשאר גם ביום השישי אך בעוצמה מופחתת. בנוסף, הופיעה "כתף" חדשה ב-1420 cm^{-1} , שהתחזקה ביום 6, וכן כתף נוספת ב-1460 cm^{-1} בשני הימים הללו. פיק ב-1600 cm^{-1} , שנצפה בבירור בימים 1 ו-2, נעלם כליל ביום 4 ו-6. גם הפיק ב-1745 cm^{-1} נחלש בהדרגה החל מהיום הרביעי, וכמעט ואינו נראה ביום 6. בנוסף, באזור שבין 800 ל-

1000 ס"מ⁻¹, שבו בדרך כלל מופיעה גבעה ספקטרלית רחבה, נצפתה ירידה הדרגתית בעוצמה עד להיעלמות כמעט מוחלטת ביום 6. יחס הפיקים $1060\text{ cm}^{-1}/1080\text{ cm}^{-1}$ השתנה לאורך האילוח (טבלה 1).

4.3. השפעת אחסון חלב מסחרי בתנאים לא נאותים על פרופיל חומצות השומן ודפוס

הספקטרום בראמאן

בכדי לדמות תהליך של קלקול חלב בתנאי אחסון שאינם נאותים, דגימות של חלב מסחרי אוחסנו בטמפרטורת החדר למשך 2 שעות, 4 שעות, 24 שעות, 3 ימים ו-5 ימים. ניתוח הרכב חומצות השומן בוצע באמצעות כרומטוגרפיית גזים והמאפיינים הספקטראליים נותחו באמצעות ספקטרוסקופיית ראמאן (איור 11). מניתוח תוצאות ה-GC עולה כי אחסון ממושך בתנאים לא אופטימליים השפיע באופן מובהק על פרופיל חומצות השומן (איור 11a). כפי שראינו בתהליכי חמצון ואילוח חיידקי, גם כאן נצפתה ירידה מובהקת בריכוז חומצות שומן קצרות שרשרת C4:0, C6:0, C8:0 ו- C10:0 ($p = 0.0001$, $p = 0.002$, $p = 0.0001$, $p = 0.005$). בהתאמה. חשוב לציין כי עבור חומצה C10:0 הירידה בריכוז הייתה הדרגתית אך מובהקת סטטיסטית, כאשר בזמנים הקצרים של 2 ו-4 שעות נמדדו ערכים נמוכים יותר באופן מובהק ($p = 0.0004$, $p = 0.0005$) בהתאמה) לעומת הזמנים הארוכים – 24 שעות, 3 ו-5 ימים. לעומת זאת, חלה עלייה מובהקת בחומצה C15:0 וב- C16:0 ($p = 0.0001$, $p = 0.006$ בהתאמה), בכל פרקי הזמן. בנוגע לתוצאות הראמאן, ניתן לזהות שינויים ברורים ומצטברים לאורך זמן (איור 11b). באזור 800–1000 ס"מ⁻¹, שבו בדרך כלל מופיעה גבעה ספקטרלית אופיינית, נצפתה ירידה כללית בעוצמה. החל מהיום החמישי, הגבעה הפכה לפיק מובהק ב-870 ס"מ⁻¹, שלא נצפה בזמנים המוקדמים. באזור 1000–1200 ס"מ⁻¹, הפיקים הקלאסיים ב-1060 ו-1080 ס"מ⁻¹ נעלמו בהדרגה, ובמקומם הופיע פיק חד ב-1077 ס"מ⁻¹. יחס הפיקים $1060\text{ cm}^{-1}/1080\text{ cm}^{-1}$ השתנה לאורך הטיפול, עד ליום החמישי בו לא ניתן היה לזהות את הפיק ב- 1060 cm^{-1} (טבלה 1). "כתף" שהופיעה בעבר ב-1260 ס"מ⁻¹ הפכה בולטת וחדה יותר ככל שהזמן עבר. כמו כן, באזור 1440 ס"מ⁻¹ הפיק המרכזי הפך לרחב יותר וה"כתף" המוכרת נעלמה. החל מזמן של 24 שעות, הופיע פיק חדש ב-1600 ס"מ⁻¹ שהלך והתחזק בזמנים המאוחרים של 3 ו-5 ימים, דבר שעשוי להעיד על הופעת תרכובות ארומטיות או שינויי קונפורמציה במבני חומצות השומן. לבסוף, ביום החמישי בלבד, הופיע פיק נוסף ב-1860 ס"מ⁻¹, אשר עשוי לשקף תוצרים מאוחרים של חמצון או פירוק מתקדם של שומנים.



איור 11. השפעת אחסון בתנאים לא נאותים על חלב מסחרי. a- תוצאות כרומטוגרפיית גזים (GC) של דגימות חלב מסחרי שאוחסנו בתנאים לא נאותים במשך 2 שעות, 4 שעות, 24 שעות, 3 ימים ו-5 ימים. הגרף מציג את ההפרש (Δ) באחוזי המול של חומצות השומן, כאשר ערכים שליליים מצביעים על ירידה בריכוז לאחר האחסון, וערכים חיוביים מצביעים על עלייה. האותיות מסמנות את ההבדלים המובהקים בין הקבוצות, ו-ns מסמן חוסר מובהקות (not significant). b- ספקטרה ראמאן של אותן דגימות, המציגים שינויים בפיקים כתוצאה מאחסון החלב. ניתן להבחין בהיעלמות הפיק ב-1060 ס"מ⁻¹, כאשר נשאר רק הפיק ב-1077 ס"מ⁻¹, וכן בפיקים נוספים המסומנים בגרף ונידונים בטקסט.

5. דיון ומסקנות

במהלך מחקר זה התמקדנו במקטע השומן בחלב כחומר רגיש שהרכבו עשוי להשתנות בגלל שלל גורמים פיזיולוגיים וסביבתיים. בהתאם, הנחנו כי שומן החלב יכול להוות חומר שידווח הן על תהליכים פיזיולוגיים בפרת החלב והן על שינויים ותהליכי קלקול לאחר הפקת החלב ואחסונו. על מנת לבחון את השערת המחקר, פיתחנו שיטה שתאפשר באמצעות ספקטרוסקופיית ראמאן לעקוב אחר שינויים במקטע השומן. המחקר כלל את השלבים הבאים: (1) הגדרת ספקטרום של חלב גולמי אופייני, מפרה ממוצעת, בשלבים שונים של התחלובה, ללא תחלואה מוגדרת. (2) בחינת חריגות מספקטרום חלב אופייני בשל חשיפה לחיידקים, אחסון בתנאים לא נאותים, וחשיפה לחומרים מחמצנים. (3) ניסיון למצוא סמני ראמאן ייחודיים המאפיינים חריגה מהספקטרה האופיינית ומצביעים על שינויים הנגרמים בשל תחלואה של הפרה, זיהום חיידקי, או קלקול. ממצאי העבודה מצביעים על האפשרות להשתמש בראמאן כדי לזהות תהליכים הקשורים לקלקול החלב באופן מהיר קל וזול, עם סמנים ייעודיים לחלב מקולקל. בשלב הבא, ממצאי המחקר יאפשרו לעבור לבחינת שומן החלב תחת תנאים פיזיולוגיים שחווה פרת החלב כמו דלקות עטין או חשיפה לעקות סביבתיות כמו טמפ' סביבה גבוהות, על מנת לבחון איך תנאים אלו משפיעים על שומן החלב והאם ניתן ליישם את הממצאים על מנת לזהות עקות אצל בעל החיים עצמו.

5.1 שימוש בספקטרוסקופיית ראמאן לאפיון מקטע השומן בחלב

במהלך העבודה בחנו את מידת ההתאמה של ספקטרוסקופיית ראמאן ככלי לזיהוי שינויים בהרכב השומן בחלב. השאלה המרכזית שנבחנה הייתה האם ספקטרוסקופיית ראמאן, המשמשת באופן שגרתי לאפיון מולקולות אורגניות, ומספקת רגישות גבוהה ואיננה הרסנית לדוגמאות, תאפשר להבחין בין דגימות חלב בתנאים משתנים דרך זיהוי הבדלים בפרופיל הליפידים ובעיקר בפרופיל חומצות השומן. כבר במדידות הראשוניות שביצענו על דגימות חלב שלא עברו כל טיפול, ניתן היה לזהות דפוס ספקטראלי עקבי שחזר על עצמו בעקביות על פני כל סוגי הדגימות – חלב מסחרי (חלב המשווק לרשתות השיווק), חלב גולמי (שנאסף ישירות ממיכל החלב ברפת), ודגימות מיצוי שומן חלב גולמי ומסחרי. הדפוס כלל קבוצת פיקים רחבה באזור $800\text{ ס}^{\circ}\text{מ}^{-1}$ שמיוחסים בעיקר לפוספוליפידים (Everett 2011), שלושה פיקים עוקבים באזור $1060, 1080$ ו- $1130\text{ ס}^{\circ}\text{מ}^{-1}$ המיוחסים לקשרי C-C (בשרשרת הפחמימנית, Meier, Csiszár, and Klumpp 2006) ולאחריהם פיק באזור $1300\text{ ס}^{\circ}\text{מ}^{-1}$ שמייצג את קבוצות המתיל (CH_2) (Okotrub et al. 2021) עם "כתף" אופיינית. הפיק המרכזי והבולט ביותר הופיע ב- $1440\text{ ס}^{\circ}\text{מ}^{-1}$ פיק שמייצג את המתיחות הסימטריות של קבוצות מתיל ומתילן (CH_2) פיק ב- $1654\text{ ס}^{\circ}\text{מ}^{-1}$ המשויך לקשרים כפולים C=C של חומצות שומן בלתי רוויות, ובאזור $1700\text{ ס}^{\circ}\text{מ}^{-1}$ פיק שמשויך לקשרי C=O באסטרים (טבלה 2) (Everett 2011). תבנית זו חזרה על עצמה בעקביות ניכרת ברוב הדגימות, ללא תלות בסוג החלב או בשיטת ההכנה. אחד היעדים המרכזיים בעבודה זו היה לבחון האם ניתן לאפיין שינויים בהרכב הליפידים בתנאים שונים גם בדגימות של חלב מלא ללא צורך במיצוי שומן. לצורך כך, תחילה ביצענו מיצוי שומן מחלב מלא, על מנת לזהות באופן ברור את מאפייני הספקטרום של הפאזה הליפידית. לאחר מכן, נעשה שימוש בדגימות חלב מלא (ללא מיצוי), תוך התמקדות בבוועיות שומן שזוהו באמצעות מיקרוסקופ, ונמצא כי ניתן היה לקבל מהן ספקטרום אופייני של ליפידים, באופן ישיר ובתוך שניות. עם זאת, מאחר שהדגימות עברו מניפולציות מבוקרות כגון חמצון כימי או אינקובציה בטמפרטורות שונות לאורך פרקי זמן משתנים, ומתוך רצון לצמצם השפעות חיצוניות ולהבטיח שהשונות הנצפית תיוחס באופן בלעדי לפאזה הליפידית, בחרנו לבצע מיצוי שומן גם בדגימות אלו.

לאור ממצאים אלו, נראה כי ספקטרוסקופיית ראמאן מהווה כלי יעיל ורגיש לאפיון פרקציית השומן בחלב. יתרונותיה באים לידי ביטוי במיוחד כאשר רוצים לבדוק שינויים דינמיים וכאלה שאינם גלויים לעין בשיטות כימיות מסורתיות. בהמשך הדיון נדון כיצד נראו שינויים אלה בתנאי חמצון, אילוח והחזקת חלב בתנאים לא נאותים.

עם זאת, יתרון משמעותי בעבודה שלנו אינו נובע מהשיטה הספקטרוסקופית עצמה, אלא מהמניפולציות והניתוח האנליטי שביצענו לנתוני הראמאן, אשר אפשרו לנו להתבסס על יחסים ספקטראליים בין פיקים במקום על עוצמה מוחלטת של פיק יחיד, תוך הפחתת רגישות

להשפעות רקע ורעש. למשל, חושב היחס בין הפיקים ב-1060 ל-1080 ס"מ¹, המיוחסים לחומצות שומן רוויות, ובפרט לקונפיגורציית טראנס וגוש בהתאמה (Liu and Lunter 2020), אשר שימשו כאינדיקטור לרמת חמצון או שינוי מבני בשומן.

5.2. סמני חמצון חלב בראמאן

המטרה המרכזית בעבודה הייתה לנסות ולזהות סמנים ספקטראליים שעשויים להעיד על תהליכי חמצון בפרקציית השומן של החלב, תוך שימוש בשיטה מהירה, רגישה ולא הרסנית-ספקטרוסקופיית ראמאן. לשם כך, בוצעו ניסויים שבמסגרתם הושרו תהליכי חמצון מבוקרים באמצעות מי חמצן (H_2O_2) וברזל (Fe^{2+}), אשר כל אחד מהם מדמה מסלול פוטנציאלי שונה של חמצון. במקביל בניסוי שבו ערכנו חמצון באמצעות הברזל (Fe^{2+}), נמדדו רמות TBARS לצורך הערכת MDA- תוצר מוכר של חמצון שומנים וכן בוצעו מדידות GC להרכב חומצות השומן (איור 8b). למרות שהתנאים שנבחרו נחשבים פרו-אוקסידנטיים, ערכי TBARS שהתקבלו היו נמוכים ביותר. ניתן להסביר ממצא זה בכך שתכולת חומצות השומן הרב-בלתי רוויות (PUFA), אשר נחשבות לרגישות במיוחד לחמצון, נמוכה יחסית בשומן חלב ומוערכת בכ-3% (Jensen 2002). כתוצאה מכך, גם לאחר חמצון, רק חלק קטן מאוד מהמערכת עבר שינוי מדיד. על מנת לחזק את השערה זו, בצענו ניסוי נוסף בו השתמשנו בשמן צמחי העשיר בחומצות שומן רב בלתי רוויות עבר את אותו התהליך. ואכן, בהתאם להשערותנו, שמן צמחי כזה הראה הבדל מהותי בערכי ה-TBARS לפני ואחרי חמצון (נספח 2). בנוסף, ניתוח ה-GC של אותן דגימות הראה כי בשני סוגי החמצון חלה ירידה עקבית בחומצות השומן קצרות-השרשרת (C4:0, C6:0, C8:0). ייתכן כי חומצות אלו רגישות לחמצון, או שבשל נדיפותן היחסית, הן אבדו במהלך העבודה. במקביל, נצפתה עלייה יחסית בריכוזי חומצות השומן הרוויות הארוכות C16:0 ובחלב מסחרי גם C18:0 ו-C18:1, אשר ככל הנראה נובעת מירידה בחומצות השומן הבלתי-רוויות, הידועות ברגישותן הגבוהה יותר לחמצון (איור 8a). שינוי יחסי זה משקף העדפה של תהליכי החמצון לפגוע בקשרים כפולים, וכתוצאה מכך נוצרה עלייה בריכוז היחסי של חומצות השומן הרוויות שנותרו יציבות יותר. לעומת זאת, ספקטרום ראמאן של אותן דוגמאות לפני ואחרי חמצון, אפשר זיהוי של שינויים עקביים שנראו בשתי קבוצות החמצון, והם עשויים להצביע על שינויים מוקדמים במבנה פרקציית השומן. הראשון היה שינוי ביחס שבין עוצמות הפיקים ב-1060 ס"מ¹ ל-1080 ס"מ¹ ותזוזה של הפיק מ-1130 לכיוון 1122 ס"מ¹. (איור 8c). הפיקים ב-1060 וב-1130 ס"מ¹ מיוחסים לתנודות C-C בשרשרת האליפטית בקונפיגורציה מרחבית מסוג טראנס (trans), אשר מאופיינת במבנה ישר יותר של השרשרת, עם סידור מרחבי של קבוצות הפחמן בהיפוך סימטרי, דבר המצביע על דרגת סדר גבוהה (Aslanian et al. 1986) הפיקים ב-1080 וב-1122 מיוחסים לתנודות C-C בקונפיגורציה מרחבית מסוג גוש (gauche) המאופיינת בזוויות קשר מקופלות ומבנה פחות מסודר (Levin and Bush 1981). בהתבסס על הבדלים אלה, ניתן לשער כי שינוי היחס בין

הפיקים, יחד עם תזוזת הפיק מ-1130 ל-1122 ס"מ⁻¹, משקפים מעבר הדרגתי של חלק מהשרשראות מקונפיגורציה ישרה וסדורה (trans) לקונפיגורציה גמישה ופחות מסודרת (gauche) כתוצאה מתהליכי החמצון. השערה זו מתחזקת לאור העובדה כי למרות שחומצות השומן הרב-בלתי רוויות הן אלו הרגישות ביותר לחמצון, הפגיעה בהן עשויה להשפיע על כלל המטריצה הליפידית, ולגרום לשיבוש הסידור המרחבי גם של חומצות שומן רוויות. תהליך זה עשוי להתבטא בהפחתה כללית בדרגת הסדר הליפידית ובעלייה במופעים של זוויות סיבוב לא יציבות, מה שמתורגם ספקטרלית לירידה יחסית בפיקי טראנס ולעומת זאת לעלייה בפיקי גוש. כלומר, גם בהיעדר עלייה חדה במדדי TBARS ניתן היה לזהות באמצעות ראמאן סימנים מוקדמים של שינויים בפרקציית השומן, שינויים שאינם מתבטאים מיד ברמות חמצון גבוהות. תמיכה עקיפה להשערה זו ניתן למצוא במחקר עדכני שבו נעשה שימוש בספקטרוסקופיית ראמאן למדידת שינויים בהרכב חלב גולמי בטמפרטורות שונות (Khan et al. 2023). החוקרים דיווחו על שינויים בעוצמות הפיקים באזור 1050–1150 ס"מ⁻¹, בדגש על ירידה בעוצמת הפיק ב-1059 ס"מ⁻¹ ועלייה ב-1080 ס"מ⁻¹, אותם הם ייחסו להשפעות תרמיות. עם זאת, ייתכן כי חלק מהשינויים שדווחו במחקרם לא נבעו רק מטמפרטורה, אלא היו תוצאה של חמצון ליפידים ובפרט לאור העובדה שהחלב שהשאירו בחוץ נחשף לחום, חמצן ואור, תנאים הידועים כמקדמי חמצון. בעבודה שלנו, כל הדגימות נמדדו בטמפרטורה זהה ובתנאים מבוקרים, ולכן ההסבר של השפעה תרמית פחות סביר, ונראה שתהליך החמצון עצמו אחראי לשינויים שנצפו בפיקים אלו. עם זאת, חשוב לציין כי מדד TBARS המבוסס על מדידת תוצרי פירוק שניוניים כגון (MDA) *malondialdehyde*, אינו מהווה הוכחה ישירה לכך שתהליך החמצון אכן התרחש בפרקציית השומן של החלב, אלא משמש אינדיקטור עקיף בלבד לפירוק מתקדם של חומצות שומן רב-בלתי רוויות. לפיכך, היעדר עלייה מובהקת בערכי TBARS אינו מאפשר לקבוע באופן חד-משמעי האם החלב התחמצן בפועל, או האם השינויים שנצפו בספקטרום הראמאן נובעים מתהליכי חמצון ליפידים ולא ממנגנונים מבניים אחרים. על מנת לבסס קשר סיבתי ישיר בין חמצון לבין השינויים הספקטראליים שנמדדו, נדרש ניסוי משלים שבו תתבצע אנליזה ספקטרלית בראמאן של שמן שעבר חמצון מבוקר ומאומת, אשר בו מתקיימת עלייה ברורה במדדי חמצון כימיים. השוואה כזו תאפשר ייחוס חד-משמעי יותר של השינויים בפיקים הספקטראליים לתהליכי חמצון ליפידים, ותסייע להבחין בין השפעות חמצון לבין שינויים פיזיקו-כימיים כלליים במטריצה הליפידית.

5.3. אילוח החלב בחיידקים

בשלב הראשון של הניסוי נבחנה ההשפעה של אילוח חיידקי עדין על חלב מלא, תוך שימוש בשני מינים מייצגים: *Escherichia coli* ו-*Bacillus subtilis* שהוספו לדגימות חלב בריכוז נמוך יחסית (איור 9). מינים אלו נבחרו מאחר שהם חיידקים סביבתיים שכיחים, הנפוצים בזיהומי מזון שונים, ונמצאים לעיתים קרובות גם בסביבת רפתות וכן על פני עטיני פרות

(2013) (Suojala, Kaartinen, and Pyörälä), (Elegbeleye and Buys 2020). ברפתות רבות מתבצע מאמץ שיטתי להפחתת נוכחותם, שכן הם עלולים לזהם את החלב הגולמי במהלך תהליך החליבה, האחסון או ההובלה (Ostrov et al. 2019, Drugea et al. 2025). לפיכך, פיתוח שיטה מהירה ופשוטה לזהות את החיידקים האלה לחלב יכול להוות כלי חשוב הן לתעשייה והן לרפת החלב. קביעת הרכב חומצות השומן לפני ואחרי ההדגרה עם החיידק קבעה כי לא חלו שינויים מהותיים בהרכב חומצות השומן בעקבות האילוח, וכי לא נצפתה שונות מובהקת בין הדגימות המאולחות לבין קבוצת הביקורת, וכן לא נרשם הבדל ברור בין שני מיני החיידקים שהוגדרו עם החלב. תוצאה זו עשויה להעיד כי בריכוזים ובטווח הזמן שנבדקו, לא התרחש פירוק משמעותי של שומן או שינוי כמותי שניתן לזיהוי באמצעות כרומטוגרפיית גזים (איור 9a). עם זאת, ניתוח ספקטראלי של ראמאן הצביע על תבנית מבנית עקבית בשתי קבוצות החיידקים, שכללה ירידה בפיק ב-1060 ס"מ⁻¹, עלייה יחסית בפיק ב-1080 ס"מ⁻¹, ותזוזה של הפיק מ-1130 ל-1122 ס"מ⁻¹ (איור 9b) – תבנית שזוהתה גם בניסויי החמצון הכימי, ונקשרה לשיבוש סדר קונפורמטיבי בפרקציית השומן. תופעה זו לא נצפתה בדגימות הביקורת, והיא חזרה על עצמה בשני סוגי האילוח החיידקי, ללא תלות בזוהר המין, דבר שמרמז על השפעה כללית של נוכחות חיידקים גם כאשר ריכוזם נמוך יחסית. ייתכן כי החיידקים תרמו גם בעצמם לתהליכי חמצון של השומן, בין אם דרך הפרשת ליפאזות שהפכו טריגליצרידים לחומצות שומן חופשיות, ובין אם דרך יצירת מולקולות מחמצנות או שינויים בסביבה, שיכולים לזרז חמצון ליפידים (Sadighara and Barin 2012). מנגנונים אלו עשויים להסביר את הדמיון בין פרופיל הראמאן של הדגימות המאולחות לבין הדפוסים שנראו לאחר חמצון יזום במי חמצן וברזל, ולחזק את האפשרות לפיה התבנית הספקטרלית משקפת תהליך של שינוי מבני המוקדם לחמצון. ממצא זה עשוי להעיד על יתרונה של ספקטרוסקופיית ראמאן ככלי רגיש במיוחד לאיתור שינויים מבניים ראשוניים בפרקציית השומן של חלב, גם במקרים שבהם שיטות כמותיות מסורתיות אינן מזהות שינוי ברור.

בשלב השני של הניסוי בוצע אילוח ייעודי בחיידק *Escherichia coli* בלבד, ללא השוואה לחיידק השני שנבחן בחלקים אחרים של המחקר, וזאת על מנת לבודד את ההשפעה הספציפית של חיידק זה על פרופיל חומצות השומן במערכת. האילוח בוצע בריכוז חיידקים גבוה במיוחד (1.5×10^6 CFU/mL) בהשוואה לערכים המדווחים בספרות (Wang et al. 1997), וזאת במטרה לגרום לנוכחות החיידק לשנות את הרכב חומצות השומן בדגימת החלב, כאיזושהי ביקורת חיובית להשפעה הצפויה של החיידק על החלב. כמו כן, רמות החיידק הגבוהות בהן השתמשנו עלולות להיות רלוונטיות מבחינה פתולוגית לבריאות העטין ולגרום לפגיעה באיכות החלב. אחרי האילוח בחיידקי *Escherichia coli*, נצפו שינויים מובהקים בהרכב חומצות השומן והם מצביעים על השפעה חיידקית על פרופיל השומן במערכת. ההשפעה יכולה להיות ישירה או עקיפה. כאשר בחנו את תוצאות ה-GC נצפתה ירידה בחומצות שומן רוויות קצרות שרשרת $C < 16$ (איור 10a), תופעה זו עשויה לנבוע מפירוק

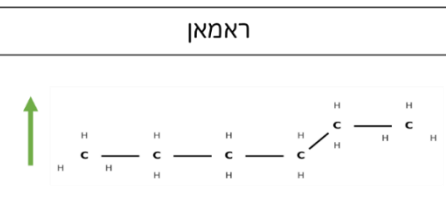
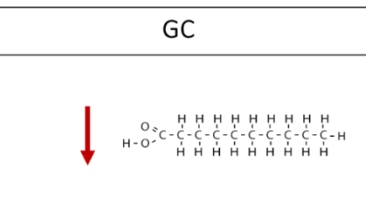

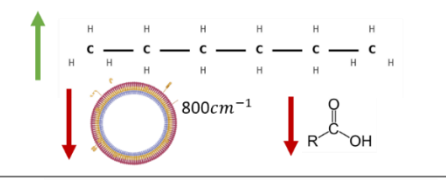
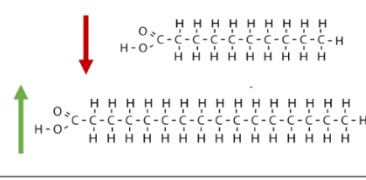

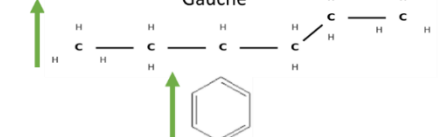
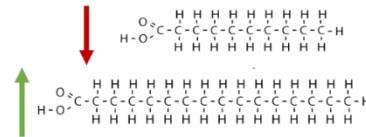

החומצות על ידי החיידק באמצעות מסלול β -אוקסידציה, המאפשר את ניצולן כמקור פחמן זמין (Pavoncello, Barras, and Bouveret 2022). במהלך תקופת האילוח ובכל נקודת זמן שנדגמה, נצפתה עלייה עקבית בריכוז חומצות השומן C18:0 ו-C15:0. שתיהן מתוארות בספרות כחלק מהרכב חומצות השומן בממברנה של *Escherichia coli*, אם כי בריכוזים שונים (Oursel et al. 2007). לפיכך, ייתכן שהופעתן והעלייה בריכוזן משקפות תרומה ישירה של ליפידים חיידקיים בין אם באמצעות התרבות או שחרור רכיבי ממברנה לתוך החלב. חומצת השומן אולאית C18:1 עלתה בריכוזה לאחר האילוח, ולאחר מכן ירדה הדרגתית עד סוף תקופת המעקב. גם חומצה זו מזוהה כחלק מהרכב הממברנה של *E. coli*. השינוי בריכוז שלה לאורך הזמן עשוי לשקף תגובה דו-שלבית: בשלב הראשון, העלייה בריכוזה עשויה לנבוע מהתרבות החיידק או מהסתגלות ממברנלית מוקדמת לתנאי הסביבה החדשים. בשלב המאוחר יותר, הירידה בריכוז החומצה הבלתי-רווייה עשויה לנבוע מתהליכי חמצון ליפידיים, שבמסגרתם קשרים כפולים רגישים לפירוק חמצוני. ייתכן והתגובה הדו שלבית לאילוח החלב מצביעה על שגשוג החיידק ולאחר מכן קריסה של האוכלוסייה כתוצאה מריבוי יתר. מאחר שחומצות שומן בלתי-רוויות אחרות נצפו ברמות נמוכות כבר בשלבים מוקדמים יותר, ייתכן שחומצה זו עברה חמצון רק לאחר שרוב חומצות השומן הרגישות יותר כבר התחמצנו, מה שמעיד על סדר אפשרי בפירוק החומצות במערכת. בנוסף, C11:0 שנצפתה רק ביום השישי לאחר האילוח, אינה מתוארת כחלק מהפרופיל הליפדי של *E. coli* ושל מרבית החיידקים בכלל, למעט חיידקים תרמופילים שנמצאים במעיינות חמים (Oshima and Ariga 1975). ייתכן ולאחר שישה ימים של הדגרת החלב המאולח בטמפרטורת החדר התפתחו אוכלוסיות של מיקרואורגניזמים אחרים ולהם פרופיל שונה של חומצות שומן. על מנת לבחון את האפשרות הזו לעומק יש לבצע אנאליזה של מיקרואורגניזמים המשגשגים בחלב באמצעות שיטות מיקרוביאליות ואחרות שאינן היו זמינות בשלב זה של המחקר. תמיכה מבנית לשינויים בהרכב חומצות השומן התקבלה באמצעות ספקטרוסקופיית ראמאן, שם נצפתה עלייה משמעותית בעוצמת הפיקים ב-1060 וב-1130 cm^{-1} . (איור 10b) פיקים שמיחוסים לרטט של קשרי-C trans בקונפורמציה β . בהקשר של מבנה הממברנה של החיידקים, קונפורמציות אלו מזוהות עם פאזה ג'לית ($L\beta$) (Tzong Hsien Lee et al. 2024) בה הליפידים מאורגנים באופן קשיח ונמצא בהם שיעור נמוך של מבנים מסוג gauche. למרות שבמצב גדילה רגיל *E. coli* שומרת על ממברנה נוזלית וגמישה יחסית, שינויים סביבתיים כגון pH טמפרטורה, או מצבי עקה עשויים להוביל למעבר למבנה מסודר וקשיח יותר, שיכול להיות הגורם להופעת הפיקים האלו. בנוסף, נצפתה ירידה מובהקת בעוצמת הפיק ב-1754 cm^{-1} , המיוחס לוויברציה של קבוצות קרבונל (C=O) באסטרים ליפידיים. ירידה זו עשויה לשקף פירוק של קשרים אסטריים כתוצאה מפעילות ליפוליטית שהחלה בעקבות האילוח החיידקי. ייתכן כי ביטוי האנזימים הליפאזים ארך זמן מה, והירידה שנצפתה משקפת שלב מתקדם יחסית בפירוק הליפידים על ידי החיידקים (Chandra et al. 2020).

5.4. השפעת אחסון חלב בתנאים לא נאותים

במהלך הניסוי נבחנו השפעות של אחסון חלב מסחרי בטמפרטורת החדר, החל ממספר שעות ועד 5 ימים על פרופיל חומצות השומן ודפוסי הספקטרום בראמאן, במטרה לדמות תנאים ריאליים של קלקול חלב, כפי שעלול להתרחש במהלך שרשרת האספקה או תנאי אחסון לא תקינים בבית הצרכן. הממצאים שהתקבלו הדגימו כי שינויים כימיים ופיזיקליים מתחילים להתרחש כבר בטווח של שעות ספורות, ומעמיקים ככל שזמן האחסון מתארך. ניתוח הרכב חומצות השומן באמצעות GC הראה ירידה בריכוז חומצות שומן קצרות שרשרת, ממצא אשר תואם את התנהגות החלב לאחר אילוח יזום ב- *E. coli* (איור 11a). בדומה להסבר שניתן שם, גם כאן ייתכן שהירידה נובעת מצריכה של חומצות שומן קצרות באמצעות מסלול β -אוקסידציה מיקרוביאלי על ידי חיידקים המצויים באופן טבעי בסביבה (Pavoncello et al. 2022). במקביל נצפתה עלייה בריכוז חומצות שומן בינוניות וארוכות שרשרת – בעיקר C15:0 ו-C16:0 מגמה שגם היא מזכירה את התנהגות המערכת לאחר אילוח חיידקי. כפי שפורט לעיל, ייתכן כי חומצות אלו משקפות נוכחות של רכיבי ממברנה חיידקיים, או לחלופין מייצגות עלייה יחסית על רקע ירידה של מרכיבים נדיפים יותר (Oursel et al. 2007). באופן טבעי, למרות שדוגמאות החלב לא אולחו בחלק זה של העבודה בחיידק ספציפי, חיידקים יכולים להגיע מהעטיין עצמו או מצידוד החליבה ולכן שינויים שמזכירים את השינויים בפרק הקודם (אילוח חיידקי) ככל הנראה מבטאים שגשוג חיידקים מוגבר בטמפר' החדר. בהקשר הספקטראלי, נמצאה ירידה חדה ביחס בין הפיקים 1060/1080 ס"מ⁻¹, עד להיעלמות מוחלטת של הפיק ב-1060 ס"מ⁻¹ (איור 11b), תוצאה המעידה על שינוי במבנה הסדר המולקולרי בפרקציה הליפידית. גם שינוי זה נצפה לאחר אילוח חיידקי, ומעיד ככל הנראה על מעבר למבנים המאופיינים בקונפיגורציית *gauche* של שרשראות השומן. הדמיון בין הדפוסים בשני התנאים עשוי לרמז על כך ששניהם מערבים פעילות מיקרוביאלית שמובילה לשינויים בהרכב ובארגון הפאזה הליפידית של החלב ומעבר מקונפיגורציית *trans* לקונפיגורציית *gauche*. הכתף שהייתה בדרך כלל באזור שבין 800 ל-880 ס"מ⁻¹ הפכה לפיק יותר חד ומורגש סביב 870 ס"מ⁻¹. מדובר בפיק שמקושר לנוכחות של פוספוליפידים, ובעיקר לקבוצת כולין-קבוצה כימית שנמצאת בראש של חלק מהפוספוליפידים ונחשבת לסמן אופייני שלהם. ההופעה הברורה של הפיק הזה יכולה לרמז על עלייה בכמות הפוספוליפידים בתמיסה, ככל הנראה בעקבות עומס חיידקי גבוה, שהוביל לנוכחות מרובה של ממברנות חיידקיות העשירות באופן טבעי בפוספוליפידים. הופעת הפיק ב-1600 ס"מ⁻¹ לאחר 24 שעות בלבד, שהלך והתגבר בזמנים מאוחרים יותר, ידוע בספרות כפיק שמייצג קשרים כפולים C=C בטבעות ארומטיות (Cao et al. 2006), אשר לא ידוע כפיק שמאפיין חומצות שומן. לאור זאת, סביר להניח כי מקורו של פיק זה אינו בשומני החלב עצמם, ייתכן כי בתרכובות אחרות נוצרו או נוספו למערכת במהלך האחסון, כתוצאה מחמצון בחמצן אטמוספרי וחום או בשל מטבוליזם של החיידקים.

אפשרות אחת היא שמדובר בתוצרים מטבוליים של חיידקים אשר פירקו חלבונים והובילו לשחרור או יצירה של תרכובות ארומטיות, כדוגמת פנול או נגזרות של חומצות אמינו ארומטיות. מכלול הנתונים הללו מצביע על כך ששילוב של GC וראמאן מאפשר תיאור רגיש ומעמיק של תהליך קלקול חלב הן במונחים כמותיים של חומצות שומן והן ברמה המבנית-מולקולרית. ממצאים אלו מחזקים את הטענה כי גם שינויים ראשוניים, באים לידי ביטוי ברור בספקטרום הראמאן. בנוסף, הניתוח הספקטראלי מאפשר לא רק זיהוי של תוצרים, אלא גם מעקב אחרי התקדמות התהליך והשלבים המולקולריים המלווים אותו.

5.5. מסקנות

ראמאן	GC	טיפול
		חמצון חלב 
		אילוח בחיידקים 
		אחסון בתנאים לא נאותים 

איור 12. איור מסכם, חיצים ירוקים מציינים עלייה יחסית בעוצמה, בשכיחות או בתרומה של התהליך/המרכיב המוצג, בעוד שחיצים אדומים מציינים ירידה יחסית. סמלים כימיים מייצגים שינויים מבניים או תגובות אופייניות בתהליך המבני של השומנים, וסמלי הכוסות מייצגים את מצב החלב תחת תנאים ניסיוניים שונים. התרשים מסכם מגמות כלליות ואינו משקף ערכים כמותיים מוחלטים.

ממצאי עבודה זו מסוכמים באיור 12 ומדגימים את הפוטנציאל של שימוש בשילוב בין ספקטרוסקופיית ראמאן לניתוח כימי-GC לפיתוח אלגוריתם שיאפשר ניטור של איכות חלב וזיהוי מוקדם של תהליכים לא תקינים, לרבות חמצון ואילוח חיידקי. הגישה שהצגנו מאפשרת איתור של שינויים מבניים בפרקציה הליפידית של החלב, וזיהוי של סמנים ספקטראליים אופייניים למצבים ספציפיים. חדשנותה של העבודה מתבטאת ביכולת לזהות אותות מוקדמים להתדרדרות באיכות החלב, עוד לפני שמתרחשים שינויים גסים במדדים סטנדרטיים, ובכך היא עשויה לתרום לפיתוח כלים יישומיים בתעשיית החלב לשם בקרת איכות, מיון, והתראה על תנאי אחסון לקויים או תהליכי קלקול ביולוגיים. עם זאת, יש לציין מספר מגבלות מהותיות. ראשית, למרות שהצלחנו לאפיין היטב את התגובה של החלב לתנאי עקה מלאכותיים כמו חמצון מבוקר או אילוח בריכוזים גבוהים, נדרש מחקר נוסף שיבחן שינויים אלו גם בתנאים פיזיולוגיים טבעיים למשל חלב שמקורו בפרות עם דלקות עטין כרוניות או אקוטיות. אתגר נוסף הוא יצירת בנק דגימות מייצג ומדויק, שבו רמת השונות בין הפרטים תהיה מינימלית, כך

שניתן יהיה לקשור בביטחון בין פרופיל ספקטרלי לבין מצב פיזיולוגי ספציפי של הפרה. יתרה מכך, קיימת מגבלה מובנית בזיהוי החיידקים עצמם או של שלב הדלקת, שכן בחלב גולמי המרקם הביולוגי מורכב מאוד, והסיגנל הספקטרלי מושפע ממגוון רחב של גורמים שאינם תמיד בשליטתנו. על כן, יש להמשיך ולפתח גישות נוספות שיאפשרו בידוד של משתנים ביולוגיים רלוונטיים, וחיזוק של היכולת לחלץ מידע משמעותי מתוך המורכבות של מטריצת החלב.

ספרות

- Argov-Argaman, Nurit. 2019. "Symposium Review: Milk Fat Globule Size: Practical Implications and Metabolic Regulation." *Journal of Dairy Science* 102(3):2783–95. doi:10.3168/jds.2018-15240.
- Aslanian, Dimitrina, Michel Négrerie, and Régis Chambert. 1986. "A Raman Spectroscopic Study on the Interaction of an Ion-Channel Protein with a Phospholipid in a Model Membrane System (Gramicidin A/ α -Lysophosphatidylcholine)." *European Journal of Biochemistry* 160(2):395–400. doi:10.1111/j.1432-1033.1986.tb09984.x.
- Ben Meir, Yehoshav A., Yoav Shaani, Daniel Bikel, Yuri Portnik, Shamaï Jacoby, Uzi Moallem, Joshua Miron, and Eyal Frank. 2023. "Reducing Dietary Sodium of Dairy Cows Fed a Low-Roughages Diet Affect Intake and Feed Efficiency, but Not Yield." *Animal Nutrition* 12:1–6. doi:10.1016/j.aninu.2022.09.002.
- Borowich, pawel, mariusz Latek, and witold R zodkiewicz. 2012. "Deep-Ultraviolet Raman Investigation of Silicon Oxide: Thin Film on Silicon Substrate versus Bulk Material." *ResearchGate* ((PDF) Analysis of the Effect of Unexpected Outliers in the Classification of Spectroscopy Data 2024). https://www.researchgate.net/publication/235346582_Deep-ultraviolet_Raman_investigation_of_silicon_oxide_Thin_film_on_silicon_substrate_versus_bulk_material.
- CAO, YU, DEYAN SHEN, YONGLAI LU, and YONG HUANG. 2006. "A Raman-Scattering Study on the Net Orientation of Biomacromolecules in the Outer Epidermal Walls of Mature Wheat Stems (*Triticum Aestivum*)." *Annals of Botany* 97(6):1091–94. doi:10.1093/aob/mcl059.
- Chandra, Prem, Enespa, Ranjan Singh, and Pankaj Kumar Arora. 2020. "Microbial Lipases and Their Industrial Applications: A Comprehensive Review." *Microbial Cell Factories* 19(1):169. doi:10.1186/s12934-020-01428-8.
- Churakov, M., J. Karlsson, A. Edvardsson Rasmussen, and K. Holtenius. 2021. "Milk Fatty Acids as Indicators of Negative Energy Balance of Dairy Cows in Early Lactation." *Animal* 15(7):100253. doi:10.1016/j.animal.2021.100253.

- Czamara, K., K. Majzner, M. Z. Pacia, K. Kochan, A. Kaczor, and M. Baranska. 2015. "Raman Spectroscopy of Lipids: A Review." *Journal of Raman Spectroscopy* 46(1):4–20. doi:10.1002/jrs.4607.
- Danchuk, V., V. Ushkalov, S. Midyk, L. Vigovska, O. Danchuk, and V. Korniyenko. 2021. "MILK LIPIDS AND SUBCLINICAL MASTITIS – DOAJ." <https://doaj.org/article/ed39bda422654c24976c48ffaa044121>.
- Decimo, Marilù, María C. Cabeza, Juan A. Ordóñez, Ivano De Noni, and Milena Brasca. 2018. "Volatile Organic Compounds Associated with Milk Spoilage by Psychrotrophic Bacteria." *International Journal of Dairy Technology* 71(3):593–600. doi:10.1111/1471-0307.12485.
- Drucea, Roxana Ionela, Mădălina Iulia Siteavu, Elena Pitoiu, Cristina Delcaru, Ecaterina Monica Sârbu, Carmen Postolache, and Stelian Bărăităreanu. 2025. "Prevalence and Antibiotic Resistance of Escherichia Coli Isolated from Raw Cow's Milk." *Microorganisms* 13(1):209. doi:10.3390/microorganisms13010209.
- Duckett, S. K., J. G. Andrae, and F. N. Owens. 2002. "Effect of High-Oil Corn or Added Corn Oil on Ruminal Biohydrogenation of Fatty Acids and Conjugated Linoleic Acid Formation in Beef Steers Fed Finishing Diets." *Journal of Animal Science* 80(12):3353–60. doi:10.2527/2002.80123353x.
- Elegbeleye, J. A., and E. M. Buys. 2020. "Molecular Characterization and Biofilm Formation Potential of Bacillus Subtilis and Bacillus Velezensis in Extended Shelf-Life Milk Processing Line." *Journal of Dairy Science* 103(6):4991–5002. doi:10.3168/jds.2019-17919.
- Everett, David W. 2011. "Composition of Bovine Milk Fat Globules by Confocal Raman Microscopy." *International Dairy Journal*. doi:10.1016/J.IDAIRYJ.2011.01.008.
- Ghaffari, M. H., M. V. Sanz-Fernandez, H. Sadri, H. Sauerwein, S. Schuchardt, J. Martín-Tereso, J. Doelman, and J. B. Daniel. 2024. "Longitudinal Characterization of the Metabolome of Dairy Cows Transitioning from One Lactation to the next: Investigations in the Liver." *Journal of Dairy Science* 107(6):4000–4016. doi:10.3168/jds.2023-24432.
- glavin, frank, and michael G. madden. 2024. "(PDF) Analysis of the Effect of Unexpected Outliers in the Classification of Spectroscopy Data." *ResearchGate*. doi:10.1007/978-3-642-17080-5_15.
- Grappin, R., V. S. Packard, and R. E. Ginn. 1981. "Variability and Interrelationship of Various Herd Milk Components 1." *Journal of Food Protection* 44(1):69–72. doi:10.4315/0362-028X-44.1.69.
- Gross, Josef, Hendrika A. van Dorland, Rupert M. Bruckmaier, and Frieder J. Schwarz. 2011. "Milk Fatty Acid Profile Related to Energy Balance in

- Dairy Cows.” *Journal of Dairy Research* 78(4):479–88. doi:10.1017/S0022029911000550.
- He, Huirong, Da-Wen Sun, Hongbin Pu, Lijun Chen, and Li Lin. 2019. “Applications of Raman Spectroscopic Techniques for Quality and Safety Evaluation of Milk: A Review of Recent Developments.” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 59(5):770–93. doi:10.1080/10408398.2018.1528436.
- Huang, Zhiguang, Charles Brennan, Hui Zhao, Wenqiang Guan, Maneesha S. Mohan, Letitia Stipkovits, Haotian Zheng, Jianfu Liu, and Don Kulasiri. 2020. “Milk Phospholipid Antioxidant Activity and Digestibility: Kinetics of Fatty Acids and Choline Release.” *Journal of Functional Foods* 68:103865. doi:10.1016/j.jff.2020.103865.
- Hudson, C. D., A. J. Bradley, J. E. Breen, and M. J. Green. 2012. “Associations between Udder Health and Reproductive Performance in United Kingdom Dairy Cows.” *Journal of Dairy Science* 95(7):3683–97. doi:10.3168/jds.2011-4629.
- Huppertz, T., T. Uniacke-Lowe, and A. L. Kelly. 2020. “Physical Chemistry of Milk Fat Globules.” Pp. 133–67 in *Advanced Dairy Chemistry, Volume 2: Lipids*, edited by P. L. H. McSweeney, P. F. Fox, and J. A. O’Mahony. Cham: Springer International Publishing.
- Jenkins, Thomas C., and Kevin J. Harvatine. 2014. “Lipid Feeding and Milk Fat Depression.” *Veterinary Clinics: Food Animal Practice* 30(3):623–42. doi:10.1016/j.cvfa.2014.07.006.
- Jensen, Robert G. 2002. “The Composition of Bovine Milk Lipids: January 1995 to December 2000.” *Journal of Dairy Science* 85(2):295–350. doi:10.3168/jds.S0022-0302(02)74079-4.
- Jurowski, Kamil, Maciej Noga, Damian Kobylarz, Łukasz Niżnik, and Alicja Krośniak. 2024. “Multimodal Imaging Using Raman Spectroscopy and FTIR in a Single Analytical Instrument with a Microscope (Infrared Raman Microscopy AIRsight, Shimadzu): Opportunities and Applications.” *International Journal of Molecular Sciences* 25(13):6884. doi:10.3390/ijms25136884.
- Khan, H. M. Hussain, Ultan McCarthy, Karen Esmonde-White, Imelda Casey, and Norah O’Shea. 2023. “Potential of Raman Spectroscopy for In-Line Measurement of Raw Milk Composition.” *Food Control* 152:109862. doi:10.1016/j.foodcont.2023.109862.
- Kielczewska, Katarzyna, Katarzyna Ambroziak, Dorota Krzykowska, and Marek Aljewicz. 2021. “The Effect of High-Pressure Homogenisation on the Size of Milk Fat Globules and MFGM Composition in Sweet Buttermilk and Milk.” *International Dairy Journal* 113:104898. doi:10.1016/j.idairyj.2020.104898.

- Levin, Ira W., and S. Fowler Bush. 1981. "Evidence for Acyl Chain *Trans/Gauche* Isomerization during the Thermal Pretransition of Dipalmitoyl Phosphatidylcholine Bilayer Dispersions." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 640(3):760–66. doi:10.1016/0005-2736(81)90106-1.
- Liu, Yali, and Dominique Jasmin Lunter. 2020. "Systematic Investigation of the Effect of Non-Ionic Emulsifiers on Skin by Confocal Raman Spectroscopy—A Comprehensive Lipid Analysis." *Pharmaceutics* 12(3):223. doi:10.3390/pharmaceutics12030223.
- López, S., J. France, N. E. Odongo, R. A. McBride, E. Kebreab, O. AlZahal, B. W. McBride, and J. Dijkstra. 2015. "On the Analysis of Canadian Holstein Dairy Cow Lactation Curves Using Standard Growth Functions." *Journal of Dairy Science* 98(4):2701–12. doi:10.3168/jds.2014-8132.
- Lu, Michael, and Nam Sun Wang. 2017. "Chapter 7 - Spoilage of Milk and Dairy Products." Pp. 151–78 in *The Microbiological Quality of Food, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*, edited by A. Bevilacqua, M. R. Corbo, and M. Sinigaglia. Woodhead Publishing.
- Lutsenko, Mariia, Oksana Halai, Victor Legkoduh, Iryna Lastovska, Oleksandr Borshch, and Valentyna Nadtochii. 2021. "Milk Production Process, Quality and Technological Properties of Milk for the Use of Various Types of Milking Machines." *Acta Scientiarum. Animal Sciences* 43:e51336. doi:https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v43i1.51336.
- Macdonald, Lauren E., James Brett, David Kelton, Shannon E. Majowicz, Kate Snedeker, and Jan M. Sargeant. 2011. "A Systematic Review and Meta-Analysis of the Effects of Pasteurization on Milk Vitamins, and Evidence for Raw Milk Consumption and Other Health-Related Outcomes." *Journal of Food Protection* 74(11):1814–32. doi:10.4315/0362-028X.JFP-10-269.
- Malau-Aduli, A. E. O., B. D. Siebert, C. D. K. Bottema, and W. S. Pitchford Pitchford. 1997. "(PDF) A Comparison of the Fatty Acid Composition of Triacylglycerols in Adipose Tissue from Limousin and Jersey Cattle." *ResearchGate*. doi:10.1071/A96083.
- Meier, Robert J., Agnes Csiszár, and Erwin Klumpp. 2006. "Detecting the Effect of Very Low Amounts of Penetrants in Lipid Bilayers Using Raman Spectroscopy." *The Journal of Physical Chemistry B* 110(42):20727–28. doi:10.1021/jp0615757.
- Nickerson, S., F. M. Kautz, L. O. Ely, and V. Ryman. 2019. "Germicidal Efficacy Testing of Forticept Udder Wash (Pre-Dip) and Forticept Udder Forte (Post-Dip) in Reducing the New Intramammary Infection Rate and SCC under Natural Exposure to Mastitis Pathogens, with Additional in Vitro Testing of Germicidal Activity."

- Okotrub, K. A., I. V. Zaytseva, S. V. Adichtchev, and N. V. Surovtsev. 2021. "Raman Spectroscopy and DSC Assay of the Phase Coexistence in Binary DMPC/Cholesterol Multilamellar Vesicles." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1863(2):183514. doi:10.1016/j.bbamem.2020.183514.
- Oshima, M., and T. Ariga. 1975. "Omega-Cyclohexyl Fatty Acids in Acidophilic Thermophilic Bacteria. Studies on Their Presence, Structure, and Biosynthesis Using Precursors Labeled with Stable Isotopes and Radioisotopes." *Journal of Biological Chemistry* 250(17):6963–68. doi:10.1016/S0021-9258(19)41026-0.
- Ostrov, Ievgeniia, Noa Sela, Eduard Belausov, Doron Steinberg, and Moshe Shemesh. 2019. "Adaptation of *Bacillus* Species to Dairy Associated Environment Facilitates Their Biofilm Forming Ability." *Food Microbiology* 82:316–24. doi:10.1016/j.fm.2019.02.015.
- Oursel, Delphine, Corinne Loutelier-Bourhis, Nicole Orange, Sylvie Chevalier, Victor Norris, and Catherine M. Lange. 2007. "Identification and Relative Quantification of Fatty Acids in *Escherichia Coli* Membranes by Gas Chromatography/Mass Spectrometry." *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 21(20):3229–33. doi:10.1002/rcm.3177.
- Pavoncello, Viola, Frédéric Barras, and Emmanuelle Bouveret. 2022. "Degradation of Exogenous Fatty Acids in *Escherichia Coli*." *Biomolecules* 12(8):1019. doi:10.3390/biom12081019.
- Pegolo, S., A. Toscano, V. Bisutti, A. Vanzin, D. Giannuzzi, L. Gallo, F. Tagliapietra, P. Ruegg, M. Gianesella, M. Mele, S. Schiavon, and A. Cecchinato. 2023. "Associations between Subclinical Intramammary Infection and Milk Fatty Acid Profile at the Quarter Level in Holstein Cattle." *Animal* 17(10):100978. doi:10.1016/j.animal.2023.100978.
- Pestana, Jose, Adriano Gennari, Bruna Monteiro, Daniel Lehn, and Cláudia Souza. 2015. "Effects of Pasteurization and Ultra-High Temperature Processes on Proximate Composition and Fatty Acid Profile in Bovine Milk." *American Journal of Food Technology* 10:265–72. doi:10.3923/ajft.2015.265.272.
- Polan, C. E., J. J. McNeill, and S. B. Tove. 1964. "BIOHYDROGENATION OF UNSATURATED FATTY ACIDS BY RUMEN BACTERIA." *Journal of Bacteriology* 88(4):1056–64. doi:10.1128/jb.88.4.1056-1064.1964.
- Prasad, V. Devi, N. Sumiran, R. Mahesh, and C. Pavan Kumar. 2018. "Rupture of Suspensory Ligament of Udder: A Report of Three Cases." *Research & Reviews: Journal of Veterinary Science and Technology* 4(2):22–24. doi:10.37591/rrjovst.v4i2.561.
- Products, National Research Council (US) Committee on Technological Options to Improve the Nutritional Attributes of Animal. 1988. "Factors Affecting the Composition of Milk from Dairy Cows." in *Designing Foods:*

Animal Product Options in the Marketplace. National Academies Press (US).

- Reh, W. A., E. A. Maga, N. M. B. Collette, A. Moyer, J. S. Conrad-Brink, S. J. Taylor, E. J. DePeters, S. Oppenheim, J. D. Rowe, R. H. BonDurant, G. B. Anderson, and J. D. Murray. 2004. "Hot Topic: Using a Stearoyl-CoA Desaturase Transgene to Alter Milk Fatty Acid Composition." *Journal of Dairy Science* 87(10):3510–14. doi:10.3168/jds.S0022-0302(04)73486-4.
- Rutten, M. J. M., H. Bovenhuis, K. A. Hettinga, H. J. F. van Valenberg, and J. A. M. van Arendonk. 2009. "Predicting Bovine Milk Fat Composition Using Infrared Spectroscopy Based on Milk Samples Collected in Winter and Summer." *Journal of Dairy Science* 92(12):6202–9. doi:10.3168/jds.2009-2456.
- Sadighara, P., and A. Barin. n.d. "The Oxidative Damages Caused by Bacterial Growth in Foodstuffs."
- Srigley, Cynthia, and Magdi Mossoba. 2017. "Current Analytical Techniques for Food Lipids." *United States Food and Drug Administration: Publications*. <https://digitalcommons.unl.edu/usfda/7>.
- Suojala, L., L. Kaartinen, and S. Pyörälä. 2013. "Treatment for Bovine Escherichia Coli Mastitis – an Evidence-Based Approach." *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 36(6):521–31. doi:10.1111/jvp.12057.
- Tripaldi, Carmela, Simona Rinaldi, Giuliano Palocci, Sabrina Di Giovanni, Salvatore Claps, and Luca Buttazzoni. 2021. "Effect of Storage and Heat Treatment of Milk Destined for Cheese Production on Its Oxidative Characteristics." *Dairy* 2(4):585–601. doi:10.3390/dairy2040046.
- Tzong Hsien Lee, Patrick Charchar, Frances Separovic, Reid Gavin E., and Irene Yarovsky. 2024. "The Intricate Link between Membrane Lipid Structure and Composition and Membrane Structural Properties in Bacterial Membranes." *Chemical Science* 15(10):3408–27. doi:10.1039/d3sc04523d.
- Verma, Aparna, Tamoghna Ghosh, Bharat Bhushan, Gopinath Packirisamy, Naveen K. Navani, Pranita P. Sarangi, and Kiran Ambatipudi. 2019. "Characterization of Difference in Structure and Function of Fresh and Mastitic Bovine Milk Fat Globules." *PLOS ONE* 14(8):e0221830. doi:10.1371/journal.pone.0221830.
- van de Voort, Frederick R., Jacqueline Sedman, and Ted Russin. 2001. "Lipid Analysis by Vibrational Spectroscopy." *European Journal of Lipid Science and Technology* 103(12):815–26. doi:10.1002/1438-9312(200112)103:12<815::AID-EJLT1111815>3.0.CO;2-P.

- Wang, Erdan, Manqian Cha, Shuo Wang, Qianqian Wang, Yajing Wang, Shengli Li, and Wei Wang. 2023. "Feeding Corn Silage or Grass Hay as Sole Dietary Forage Sources: Overall Mechanism of Forages Regulating Health-Promoting Fatty Acid Status in Milk of Dairy Cows." *Foods* 12(2):303. doi:10.3390/foods12020303.
- Wang, Guodong, Tong Zhao, and Michael P. Doyle. 1997. "Survival and Growth of *Escherichia Coli* O157:H7 in Unpasteurized and Pasteurized Milk." *Journal of Food Protection* 60(6):610–13. doi:10.4315/0362-028X-60.6.610.
- Yellin, Nehama, and Ira W. Levin. 1977. "Hydrocarbon Chain Trans-Gauche Isomerization in Phospholipid Bilayer Gel Assemblies." *Biochemistry* 16(4):642–47. doi:10.1021/bi00623a014.
- Young, J. W. 1977. "Gluconeogenesis in Cattle: Significance and Methodology1." *Journal of Dairy Science* 60(1):1–15. doi:10.3168/jds.S0022-0302(77)83821-6.

נספחים

נספח 1: קוד הפייתון ששימש אותנו לקריאה ואיחוד של קובצי ספקטרום ראמאן בפורמט טקסט, לזיהוי פיקים בסיסי ולחישוב יחס אינטנסיביות בין 1060 ל-1440 cm^{-1} הקוד עושה שימוש בספריות pandas ו- scipy.signal ומפיק קובץ Excel מרובה גיליונות הכולל את כל הנתונים המאוחדים, סיכום הפיקים ויחסי 1060/1440 סמ¹ לכל דגימה.

```
import pandas as pd
import os
from scipy.signal import find_peaks

def extract_data_from_txt(file_path):
    data = pd.read_csv(file_path, delim_whitespace=True)
    data['#Wave'] = data['#Wave'].round(0).astype(int)
    return data

def merge_data_into_master(master_df, new_df, file_name):
    fname = os.path.splitext(file_name)[0]
    new_df = new_df.rename(columns={"#Intensity": fname})
    master_df = pd.merge(master_df, new_df, on="#Wave", how="outer")
    master_df = master_df.loc[:, ~master_df.columns.duplicated()]
    master_df = master_df.drop(columns=[c for c in master_df.columns if
c.lower().startswith("#datasetindex")], errors='ignore')
    master_df = master_df.loc[:, (master_df != 0).any(axis=0)]
    return master_df

def process_txt_files_in_folder(folder_path):
    master_df = pd.DataFrame(columns=["#Wave"])

    for file_name in os.listdir(folder_path):
        if file_name.endswith(".txt"):
            print(f"Processing {file_name}")
            file_path = os.path.join(folder_path, file_name)
            df = extract_data_from_txt(file_path)
            master_df = merge_data_into_master(master_df, df, file_name)

    master_df = master_df.sort_values("#Wave").reset_index(drop=True)

    peaks_summary = []
    for col in master_df.columns:
        if col == "#Wave":
            continue
        intensities = master_df[col].fillna(0).values
        peak_inds, _ = find_peaks(intensities)
        for idx in peak_inds:
            peaks_summary.append({
                "File": col,
```

```

        "Wavelength": master_df.loc[idx, "#Wave"],
        "Intensity": master_df.loc[idx, col]
    })
peaks_df = pd.DataFrame(peaks_summary)

ratios = []
for col in master_df.columns:
    if col == "#Wave":
        continue
    intensity_1060 = master_df.loc[master_df["#Wave"] == 1060, col].values
    intensity_1440 = master_df.loc[master_df["#Wave"] == 1440, col].values
    if len(intensity_1060) > 0 and len(intensity_1440) > 0:
        val_1060 = intensity_1060[0]
        val_1440 = intensity_1440[0]
        ratio = val_1060 / val_1440 if val_1440 != 0 else None
    else:
        val_1060 = val_1440 = ratio = None
    ratios.append({
        "File": col,
        "Intensity_1060": val_1060,
        "Intensity_1440": val_1440,
        "Ratio_1060_to_1440": ratio
    })
ratios_df = pd.DataFrame(ratios)

output_path = os.path.join(folder_path, "output_data.xlsx")
with pd.ExcelWriter(output_path, engine="openpyxl") as writer:
    master_df.to_excel(writer, index=False, sheet_name="All_Data")
    peaks_df.to_excel(writer, index=False, sheet_name="Peaks")
    ratios_df.to_excel(writer, index=False,
sheet_name="1060_1440_Ratios")

    print(f"Data saved to: {output_path}")

folder_path = "/folder-path/"
process_txt_files_in_folder(folder_path)

```

נספח 2: ריכוזי MDA (μM) בשמן קנולה לאורך זמן. a- שמן בלבד ללא מחמצנים. b- שמן בנוכחות ברזל וחומצה אסקורבית. העמודות מציגות ממוצע סטיית תקן בשלושה זמנים: 0h, 1h, 16h (שעות).

