



*Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Agricultural University Of Athens*

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΤΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ

ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ

ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ με τίτλο

*«Ολοκληρωμένη Διαχείριση Παραγωγής Γάλακτος και Γαλακτοκομικών
Προϊόντων»*

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ
ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΥΘΕΝΤΙΚΟΤΗΤΑΣ
ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Της Μαρίας Γιακουμέλου

Εξεταστική επιτροπή:

Μασσούρας, Θ., Επίκουρος Καθηγητής, εισηγητής

Φραγκιαδάκη-Ξυλούρη, Ε., Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Καμιναρίδης, Σ., Καθηγητής

ΜΑΪΟΣ 2011 – ΑΘΗΝΑ



*Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Agricultural University Of Athens*

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΤΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ

ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ

ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ με τίτλο

*«Ολοκληρωμένη Διαχείριση Παραγωγής Γάλακτος και Γαλακτοκομικών
Προϊόντων»*

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ
ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΥΘΕΝΤΙΚΟΤΗΤΑΣ
ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Της Μαρίας Γιακουμέλου

Εξεταστική επιτροπή:

Μασσούρας, Θ., Επίκουρος Καθηγητής, εισηγητής

Φραγκιαδάκη-Ξυλούρη, Ε., Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Καμιναρίδης, Σ., Καθηγητής

ΜΑΪΟΣ 2011 – ΑΘΗΝΑ

Ευχαριστίες

Από την παρούσα θέση θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερω τον επιβλέποντα της Μεταπτυχιακής μου διατριβής Κο Μασσούρα Θ., Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, για την ανάθεση του θέματος της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης αλλά και για την συνεχή καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια εκπόνησης και συγγραφής της μελέτης.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την Κα Φραγκιαδάκη-Ξυλούρη Ε., Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών, μέλος της τριμελούς επιτροπής μου, για την πολύτιμη βοήθειά της κατά τη διάρκεια εκπόνησης και συγγραφής της μελέτης, καθώς και για την διαμεσολάβησή της στην πραγματοποίηση τμήματος της μελέτης στο Πανεπιστήμιο της Πάντοβα Ιταλίας μέσω του προγράμματος Erasmus.

Ευχαριστώ τον Κο Καμιναρίδη Σ., Καθηγητή του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, ο οποίος δέχτηκε να είναι μέλος της συμβουλευτικής και εξεταστικής επιτροπής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Κο Αλετρά Α., Αναπληρωτή καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Πατρών, ο οποίος κατά τη διάρκεια εκπόνησης του πειραματικού τμήματος της παρούσας διατριβής στο εργαστήριο Βιοχημείας, με το ευρύ γνωστικό πεδίο του, την εμπειρία, και την καθοδήγηση του συνέβαλε καθοριστικά στην πραγματοποίησή της, όπως και την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Γιάννα Σμυρλάκη του Εργαστηρίου για τη βοήθειά της κατά τη διάρκεια της παραμονής μου εκεί.

Ευχαριστώ το Ευρωπαϊκό πρόγραμμα Erasmus που μου έδωσε την ευκαιρία να παραμείνω τρεις μήνες στο εργαστήριο Γαλακτοκομίας του Τμήματος Ζωικής Παραγωγής της Πάντοβα Ιταλίας και να πραγματοποιήσω τμήμα της εργασίας εκεί, όπως και τον Καθηγητή Giovanni Bittante του Τμήματος Ζωικής Παραγωγής του Πανεπιστημίου της Πάντοβα Ιταλίας, καθώς και τον υποψήφιο διδάκτορα Claudio Cipolat, για την αμέριστη βοήθεια τους κατά τη διάρκεια της παραμονής μου εκεί.

Ευχαριστώ επίσης την προπτυχιακή φοιτήτρια Ελένη Γ. Ξυλούρη, η οποία κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους της πτυχιακής της μελέτης, εφάρμοσε τις ανοσοποιήσεις στα πρόβατα και έκανε την παραγωγή των πολυκλωνικών αντισωμάτων για τη διενέργεια των δοκιμασιών ELISA.

Ευχαριστώ τον συνάδελφο και φίλο, διδάκτορα του Τμήματος Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, Γιώργο Συμεών για την πολύτιμη βοήθεια του κατά τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων.

Θα ήταν παράλειψή μου να μην ευχαριστήσω όλους εκείνους τους φίλους που με φιλοξένησαν κατά τη διάρκεια του μεταπτυχιακού αυτού προγράμματος και με στήριξαν στην δύσκολη αυτή περίοδο.

Ξεχωριστά και ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω, το σύζυγό μου, για την παρότρυνσή του στην παρακολούθηση αυτού του μεταπτυχιακού προγράμματος αλλά και για τη συνεχή και απεριόριστη ηθική συμπαράσταση και στήριξή του σε όλη τη διάρκεια των σπουδών.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες

<i>Περιεχόμενα</i>	5
<i>Περίληψη</i>	9
<i>Abstract</i>	10
<i>Πρόλογος</i>	11
<i>Κεφάλαιο 1</i>	13
1.1 Ανίχνευση νοθείας	13
1.1.1 Σημεία αυθεντικότητας γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων	13
1.1.2 Μέθοδοι ανίχνευσης νοθείας	14
1.2 Πρωτεΐνες ορού γάλακτος	17
1.2.1 Ανοσοσφαιρίνες	18
1.2.1.1 Δομή ανοσοσφαιρινών IgG	21
1.3 Πηγές αντισωμάτων, η χρήση τους και ο καθαρισμός τους	23
1.3.1 Μέθοδοι καθαρισμού αντισωμάτων	24
1.3.1.1 Καθαρισμός με κατακρήμνιση	24
1.3.1.2 Καθαρισμός με χρήση χρωματογραφικών μεθόδων	26
1.3.1.3 Καθαρισμός με εφαρμογή χρωματογραφίας συγγένειας (Affinity Chromatography)	29
1.4 Επισήμανση αντισωμάτων (Labeling antibodies)	32
1.4.1 Άμεση vs έμμεσης ανίχνευσης	33
1.4.2 Επιλογές επισήμανσης αντισωμάτων	34
1.5 Εφαρμογή ανοσολογικών μεθόδων για τον προσδιορισμό της ανοσοσφαιρίνης IgG και την ανίχνευση της νοθείας στο γάλα	36
1.5.1 Ακτινωτή ανοσοδιάχυση (Radial immunodiffusion, RID)	37
1.5.2 Ανοσοηλεκτροφόρηση (Immunoelectrophoresis)	38

1.5.3 Νεφελομετρία (Nephelometric immunoassay)	39
1.5.4 Μέτρηση με βιοισθητήρες (Surface Plasmon Resonance, SPR).....	40
1.5.5 Ενζυμική Ανοσοπροσροφητική Μέθοδος Προσδιορισμού (Enzyme-Linked Immunosorbent Assays, ELISAs).....	42
1.5.5.1. Άμεση (Direct ELISA).....	43
1.5.5.2. Έμμεση (Indirect ELISA).....	43
1.5.5.3. Sandwich ELISA.....	44
1.5.5.4. Ανταγωνιστικές τεχνικές.....	45
Κεφάλαιο 2.....	49
2.1 Λιπίδια γάλακτος.....	49
2.2 Το λίπος του γάλακτος στα διαφορετικά είδη ζώων.....	50
2.3 Το προφίλ των λιπαρών οξέων των λιπιδίων.....	51
2.3.1 Κορεσμένα λιπαρά οξέα (SFA: Saturated Fatty Acids).....	51
2.3.2 Ακόρεστα λιπαρά οξέα (Unsaturated Fatty Acids, UFA).....	52
2.3.2.1 Cis-ακόρεστα λιπαρά οξέα.....	53
2.3.2.2 Trans-ακόρεστα λιπαρά οξέα.....	53
2.4 Λιπαρά οξέα στο αγελαδινό, πρόβειο και αίγιο γάλα.....	54
2.5 Μέθοδοι προσδιορισμού λιπαρών οξέων.....	55
2.5.1. Αέριος Χρωματογραφία (Gas Chromatography).....	55
2.5.1.1 Μέθοδοι εκχύλισης λιπιδίων για την εφαρμογή αέριας χρωματογραφίας.....	57
2.5.2. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC).....	60
2.5.3. Φασματομετρία μαζών (Mass Spectrometry).....	61
2.5.4. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (N.M.R-Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy).....	62
2.5.5. Αέριος Χρωματογραφία – Φασματομετρία Μαζών (GC-MS).....	62
2.5.6. Συνδυασμός Υγρής Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης – Φασματομετρία Μαζών (HPLC-MS).....	63
Κεφάλαιο 3.....	64

Υλικά και μέθοδοι.....	64
3.1 Ανάπτυξη ανοσοενζυμικής μεθόδου sandwich ELISA.....	64
3.1.1 Σκοπός της μελέτης.....	64
3.1.2 Ανάπτυξη αντισωμάτων έναντι αίγειας και βόειας ανοσοσφαιρίνης IgG σε πρόβατα	65
3.1.2.1 Σκοπός της πειραματικής διαδικασίας	65
3.1.2.2 Ανοσοποίηση και αιματοληψία ζώων	65
3.1.3 Έλεγχος τίτλου αντισωμάτων	66
3.1.3.1 Σκοπός της πειραματικής διαδικασίας	66
3.1.4 Καθαρισμός και παραλαβή αντισωμάτων με τη μέθοδο χρωματογραφία συγγένειας (Affinity Chromatography)	70
3.1.4.1 Σκοπός της πειραματικής διαδικασίας	70
3.1.5 Βιοτινυλίωση αντισωμάτων goat IgG	75
3.1.5.1 Σκοπός της πειραματικής διαδικασίας	75
3.1.5.2 Προετοιμασία των προς επισήμανση αντισωμάτων για τη διαδικασία της βιοτινυλίωσης	76
3.1.5.3 Βιοτινυλίωση.....	77
3.1.6 Εφαρμογή ανοσοενζυμικής μεθόδου ELISA για ανίχνευση αίγειου γάλακτος σε πρόβειο	80
3.2 Προσδιορισμός της σύνθεσης των λιπαρών οξέων διαφορετικών μιγμάτων γάλακτος	85
3.2.1 Σκοπός της μελέτης.....	85
3.2.2 Παραλαβή λίπους γάλακτος.....	85
3.2.2.1 Παραλαβή λίπους με τη μέθοδο επιταχυνόμενης εκχύλισης με διαλύτες (ASE: Accelerated Solvent Extraction).....	86
3.2.2.2 Παραλαβή λίπους με τη μέθοδο Rose Gotlieb	88
3.2.3 Ανάλυση λιπαρών οξέων με τη μέθοδο αέριας χρωματογραφίας.....	90
3.2.3.1 Μετατροπή του λίπους σε μεθυλεστέρες	91
3.2.3.2 Εφαρμογή αέριας χρωματογραφίας.....	92
3.3 Στατιστική ανάλυση.....	93
Κεφάλαιο 4.....	94
Αποτελέσματα και Συζήτηση	94

4.1 Έλεγχος τίτλου αντισωμάτων	94
4.2 Αραίωση βιοτινυλιωμένου αντισώματος.....	97
4.3 Προσδιορισμός πρόσμιξης αίγειου γάλακτος σε πρόβειο	98
4.3.1 Προσδιορισμός πρόσμιξης αίγειου γάλακτος σε πρόβειο με εφαρμογή της ανοσοενζυμικής μεθόδου ELISA.....	98
4.3.2 Επίδραση θερμικής επεξεργασίας στον προσδιορισμό πρόσμιξης αίγειου γάλακτος σε πρόβειο με εφαρμογή της ανοσοενζυμικής μεθόδου ELISA.....	105
4.4 Αποτελέσματα ανάλυσης των λιπαρών οξέων του λίπους μιγμάτων διαφόρων ειδών γάλακτος.....	108
4.4.1 Ανάλυση λιπαρών οξέων μιγμάτων Αγελαδινού και Αίγειου γάλακτος.....	108
4.4.2 Ανάλυση λιπαρών οξέων μιγμάτων Πρόβειου και Αγελαδινού γάλακτος.....	112
4.4.3 Ανάλυση λιπαρών οξέων μιγμάτων Πρόβειου και Αίγειου γάλακτος	115
Κεφάλαιο 5.....	118
Συμπεράσματα.....	118
5.1 Συμπεράσματα από την εφαρμογή της τεχνικής sandwich ELISA	118
5.2 Συμπεράσματα από την ανάλυση των λιπαρών οξέων.....	119
5.3 Σύγκριση μεθόδων	120
Βιβλιογραφία	121
Παράρτημα.....	130

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη και χρήση ανοσοενζυμικής μεθόδου ELISA για την ακριβή ανίχνευση του είδους γάλακτος που χρησιμοποιείται για την παρασκευή γαλακτοκομικών προϊόντων. Για το σκοπό αυτό παράχθηκαν αντισώματα έναντι της αίγειας ανοσοσφαιρίνης IgG και έγινε έλεγχος του τίτλου αντισωμάτων με εφαρμογή έμμεσης ELISA. Τα αντισώματα αίγειας IgG παραλήφθησαν μετά από καθαρισμό τους με χρήση χρωματογραφίας συγγένειας. Για την ανάπτυξη της ανοσοενζυμικής μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν τα παραπάνω αντισώματα τα οποία αποτέλεσαν το αντίσωμα δέσμευσης.

Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε μίγματα γνωστής πρόσμιξης αίγειου γάλακτος σε πρόβειο (5-100%). Επίσης ερευνήθηκε η επίδραση της θερμικής επεξεργασίας στην αποτελεσματικότητα της μεθόδου. Παράλληλα πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της σύνθεσης των λιπαρών οξέων στα μίγματα πρόβειου-αίγειου γάλακτος με σκοπό την ανίχνευση νοθείας με βάση τη διαφοροποίηση του ποσοστού των λιπαρών οξέων, αλλά και σε μίγματα αγελαδινού-αίγειου και αγελαδινού-πρόβειου.

Από τα αποτελέσματα της ανοσοενζυμικής μεθόδου προέκυψε ότι υπήρξε υψηλός συντελεστής συσχέτισης ($r=0.93$) μεταξύ πραγματικού και ανιχνεύσιμου ποσοστού αίγειου γάλακτος. Η μέθοδος παρουσίασε υψηλή ακρίβεια με συντελεστή διακύμανσης 3.96%. Η μέθοδος, μπορεί να εφαρμοστεί εξίσου αποτελεσματικά και στους 65°C για 5 min, ενώ η θερμική επεξεργασία των 90°C για 5min επηρέασε την αποτελεσματικότητα της μεθόδου. Η θέρμανση του γάλακτος στους 68°C για 10 min προκάλεσε μείωση του ανιχνεύσιμου ποσοστού αίγειου γάλακτος κατά 17% ενώ η θέρμανση στους 80°C για 15 sec προκάλεσε μείωση κατά 11%.

Από τον προσδιορισμό της σύνθεσης των λιπαρών οξέων στα μίγματα πρόβειου-αίγειου παρατηρήθηκε διαφοροποίηση στον C18. Περισσότερες διαφοροποιήσεις παρατηρήθηκαν στα μίγματα αγελαδινού-αίγειου, συγκεκριμένα στα C8, C10, C16, στα μικρής και μεσαίας αλύσου λιπαρά οξέα (C4-C16) όπως και στο κλάσμα C12:C10 και τέλος στα μίγματα αγελαδινού-πρόβειου παρατηρήθηκε διαφοροποίηση στα C8, C10, C16, στα μεσαίας αλύσου λιπαρά οξέα (C12-C16) όπως και στο κλάσμα C12:C10.

Λέξεις κλειδιά: ELISA, IgG, νοθεία, λιπαρά οξέα, γάλα

Abstract

The purpose of this study was the development and use of an ELISA immunoassay method to accurately detect the type of milk used to manufacture dairy products. For this purpose, antibodies were produced against goat immunoglobulin IgG and became control of titer antibodies by using indirect ELISA. Goat IgG antibodies were received after purification by affinity chromatography. For the development of the immunoassay method were used the above produced antibodies.

The method was applied to mixtures of known quantity of goat milk in sheep milk (5-100%). Also, was researched the effect of heat treatment on the effectiveness of the method. Additionally, was determined the composition of mixtures of fatty acids in sheep-goat milk to detect fraud based on the modulation rate of fatty acids, but also of mixtures of cows-goats milk and cows-sheep milk.

The results of the immunoassay method showed that there was a high correlation coefficient ($r = 0.93$) between real and detectable rate of goat milk. The method showed high precision with coefficient of variation, 3.96%. The method can be applied equally effectively to 65° C for 5 min, while the thermal treatment of 90° C for 5min affected the effectiveness of the method. The heating of milk at 68° C for 10 min caused a reduction in detectable percentage of goat's milk by 17% while the heating at 80° C for 15 sec caused a decrease of 11%.

By determining the composition of mixtures of fatty acids in sheep-goat milk, differentiation observed only in C18. More differences were observed in mixtures of cows-goats milk, particularly in the C8, C10, C16, small and medium-chain fatty acids (C4-C16) as the fraction of C12: C10 and finally in mixtures of cow-sheep milk, variation was observed in C8, C10, C16, the medium-chain fatty acids (C12-C16) as the fraction of C12: C10.

Keywords: ELISA, IgG, fraud, fatty acids, goat milk, sheep milk

Πρόλογος

Το γάλα, το τυρί και άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα καταναλώνονται ευρέως σε παγκόσμια κλίμακα και έχουν τεράστια εμπορική σημασία στη βιομηχανία τροφίμων. Το γάλα που χρησιμοποιείται για την παρασκευή τέτοιων προϊόντων προέρχεται από διαφορετικά ζωικά είδη όπως αγελαδινό, πρόβειο, αίγαιο και βουβαλίσιο. Ενώ το τυρί που παράγεται από αγελαδινό γάλα, κυριαρχεί στην αγορά των περισσότερων χωρών, ένα σημαντικό μέρος της παγκόσμιας αγοράς καταλαμβάνουν και τα τυριά που παράγονται από άλλα ζωικά είδη. Συγκεκριμένα οι μεσογειακές χώρες, ανάμεσα στις οποίες και η Ελλάδα, παράγουν υψηλής ποιότητας παραδοσιακά τυριά, τα οποία προέρχονται από αίγαιο, πρόβειο ή βουβαλίσιο γάλα (π.χ. φέτα, ροκφόρ και μοτσαρέλλα). Η σύσταση του γάλακτος διαφορετικών ζωικών ειδών επηρεάζει τη χαρακτηριστική γεύση και τις οργανοληπτικές ιδιότητες του κάθε τυριού (Haza *et al.*, 1996).

Η χρήση άλλου ζωικού είδους γάλακτος σε διάφορες αναλογίες από εκείνου που καθιερωμένα παράγεται το κάθε είδος τυριού (και τα χαρακτηρίζει) αποτελεί **νοθεία**. Έτσι συνήθως αναμιγνύονται ποσότητες γάλακτος από διαφορετικά ζωικά είδη με σκοπό κυρίως την μείωση του κόστους παραγωγής. Η νοθεία στο γάλα που χρησιμοποιείται για την παρασκευή τυριών οδηγεί επομένως σε ένα τελικό προϊόν κατώτερο των προσδοκιών του καταναλωτή (Maudet & Taberlet, 2001).

Η αυξημένη τιμή του γάλακτος, καθώς και η εποχική διακύμανση στην διαθεσιμότητα του πρόβειου και του αίγειου γάλακτος, οδηγούν στην υιοθέτηση μιας επικερδούς τακτικής των παρασκευαστών τυριών, η οποία συνίσταται στην νοθεία των πιο ακριβών γαλάτων με αγελαδινό, ούτως ώστε να μειώσουν το κόστος παραγωγής και να αυξήσουν το περιθώριο κέρδους (Maudet & Taberlet, 2001). Οι παρασκευαστές τροφίμων είναι υποχρεωμένοι να δηλώνουν την προέλευση του είδους του γάλακτος που χρησιμοποιούν για την παρασκευή τυριών και άλλων γαλακτοκομικών προϊόντων (European Commission, 2001). Κάποιοι καταναλωτές αποφεύγουν το αγελαδινό γάλα για λόγους υγείας (μη ανεκτικότητα, δυσανεξία ή αλλεργία) (Sampson, 2003), θρησκευτικούς, ηθικούς ή ακόμη και λόγω διαφορετικής κουλτούρας (Shatenstein & Ghadirian, 1998). Έτσι, από πλευράς νομικής και για την προστασία του καταναλωτή και τη στήριξη της εμπιστοσύνης του, τα τυριά πρέπει να είναι αυθεντικά και η ετικέτα να δηλώνει απόλυτα το περιεχόμενό τους (Moatsou & Anifantakis, 2003). Επομένως,

αποτελεί **αναγκαιότητα η δυνατότητα** της ακριβούς εκτίμησης των ζωικών ειδών γάλακτος που χρησιμοποιούνται στα γαλακτοκομικά προϊόντα, κυρίως για τα υψηλής ποιότητας τυριά που παρασκευάζονται αποκλειστικά με πρόβειο ή αίγιο γάλα, πολλά από τα οποία έχουν χαρακτηριστεί από τον Ευρωπαϊκό κανονισμό ως προϊόντα ΠΟΠ (Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης) (Bottero *et al.*, 2002).

Κεφάλαιο 1

1.1 Ανίχνευση νοθείας

Σήμερα, υπάρχει η ανάγκη για την ύπαρξη γρήγορων, αποτελεσματικών, με μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα, αξιόπιστων μεθόδων ελέγχου, με τις οποίες να μπορεί να προσδιοριστεί η ακριβής σύνθεση του γάλακτος από το οποίο προέρχεται κάποιο τυρί ή οποιοδήποτε άλλο γαλακτοκομικό προϊόν (López-Calleja *et al.*, 2006). Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί πολλές αναλυτικές εργαστηριακές τεχνικές για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό των **λιπών** ή των **πρωτεϊνών** σε μίγματα γάλακτος από διαφορετικά ζωικά είδη για την αντιμετώπιση της νοθείας.

Έτσι κάποιες μέθοδοι βασίζονται στον προσδιορισμό της σύνθεσης του λίπους του γάλακτος όπως η αναλογία των διακριτών λιπαρών οξέων ή το προφίλ των τριγλυκεριδίων. Στη περίπτωση αυτή βασικό μειονέκτημα αποτελεί το γεγονός ότι οποιαδήποτε νοθεία με άπαχο γάλα δεν μπορεί να ανιχνευθεί.

Για το λόγο αυτό, εφαρμόζονται οι πλέον εξειδικευμένες τεχνικές που βασίζονται στην ανάλυση των πρωτεϊνών με βασικότερες τις ανοσολογικές. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι η ηλεκτροφόρηση, η χρωματογραφία και οι μοριακές τεχνικές, όπως η PCR (Mayer, 2005).

1.1.1 Σημεία αυθεντικότητας γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων

Γενικά, τα σημεία αυθεντικότητας εμπίπτουν σε μια τουλάχιστον από τις κάτωθι κατηγορίες:

α) μη συμβατότητα με τις νομοθετικές απαιτήσεις (πρότυπα προϊόντα), όπως:

- μέγιστη/ελάχιστη περιεκτικότητα σε νερό,
- ΣΥΑΛ και λίπος σε βασικά γαλακτοκομικά προϊόντα (βούτυρο, τυρί, γιαούρτι, κλπ.)
- γεωγραφική προέλευση του προϊόντος


β) παράνομη προσθήκη βασικών συστατικών γαλακτοκομικής ή μη προέλευσης όπως:

- αραίωση του γάλακτος με νερό
- γάλα διαφορετικών ζωικών ειδών

- προσθήκη μη γαλακτοκομικών πρωτεϊνών
- αλλαγή του κλάσματος καζεΐνες/πρωτεΐνες ορού
- προσθήκη βουτυρογάλακτος ή σκόνης ορού σε σκόνη γάλακτος
- προσθήκη φυτικών ή άλλων ζωικών λιπιδίων στο λίπος γάλακτος
- μη εγκεκριμένα συντηρητικά

γ) μη συμβατότητα όσον αφορά τη χρήση βασικών τεχνολογικών διαδικασιών

- θερμική επεξεργασία
- ωρίμανση τυριών
- τεχνολογία μεμβρανών

Οποιοδήποτε είδος νοθείας και αν διαπράττεται, η διαπίστωση της αυθεντικότητας βασίζεται είτε σε μια βασική διαφορά μεταξύ του γνήσιου προϊόντος και του νοθευμένου, είτε σε καλή γνώση της σύνθεσής τους καθώς και των πιθανών διακυμάνσεων στα όρια της σύστασής τους. α παράδειγμα η ανίχνευση ξένων πρωτεϊνών που προστίθενται στο γάλα ενός συγκεκριμένου είδους, μπορεί να πραγματοποιηθεί ανιχνεύοντας τις διαφορές της ηλεκτροφορητικής τους κινητικότητας. Εκεί λοιπόν, τυχόν βασική ανομοιομορφία χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της καθαρότητας του προϊόντος. Αν δεν υπάρχουν απτές διαφορές, τα στοιχεία της σύστασης των αυθεντικών δειγμάτων πρέπει να συλλεχθούν και να ληφθούν υπόψη όλες οι πιθανές φυσικές διακυμάνσεις όπως η φυλή του ζώου, το στάδιο της γαλακτικής περιόδου, το παραγωγικό σύστημα, η γεωγραφική προέλευση κλπ. Η αυθεντικότητα του προϊόντος επιβεβαιώνεται όταν τα προσδιοριζόμενα στοιχεία της σύστασής του ταιριάζουν στα στοιχεία εκείνα που αντιπροσωπεύουν τα αυθεντικά δείγματα (Smit, 2003).

1.1.2 Μέθοδοι ανίχνευσης νοθείας

Όπως προαναφέρθηκε, οι σύγχρονοι μέθοδοι νοθείας βασίζονται στις διαφορές μεταξύ των **πρωτεϊνικών** κλασμάτων των τριών ζωικών ειδών γάλακτος και διακρίνονται ανάλογα με την μέθοδο προσδιορισμού σε χρωματογραφικές, και ηλεκτροφορητικές (Ανυφαντάκης, 2004). Μέχρι σήμερα έχουν χρησιμοποιηθεί ηλεκτροφόρηση, ισοηλεκτρικός εστιασμός (IEF), τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (CE), υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ανεστραμμένης φάσης (RP HPLC), υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ιοντοανταλλαγής (IE HPLC), χρωματογραφία

υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων (HIC), ανοσοχημικές μέθοδοι (ELISA), τεχνικές PCR και η φασματομετρία μαζών (Borkova & Snaselova, 2005).

Η σύγχρονη μέθοδος αναφοράς από την Ευρωπαϊκή Ένωση για την ανίχνευση του αγελαδινού γάλακτος είναι ο ισοηλεκτρικός εστιασμός της β-καζεΐνης (IsoElectric Focusing, IEF) (Commission Regulation (EC) No. 1081/96 of 14 June 1996). Ωστόσο, η ανίχνευση της νοθείας ενός είδους γάλακτος με άλλο που βασίζεται στην ανάλυση των πρωτεϊνών του γάλακτος είναι ιδιαίτερα περίπλοκη αφού η σύστασή τους ποικίλει τόσο μεταξύ των διαφόρων ζωικών ειδών όσο και μεταξύ του ίδιου ζωικού είδους. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών περιπλέκεται από την ύπαρξη γενετικού και μη γενετικού πολυμορφισμού και από την τεχνολογική επεξεργασία του γάλακτος (π.χ. θέρμανση κλπ) (Borkova & Snaselova, 2005).

Στον Πίνακα 1-1 παρουσιάζονται συστατικά των πρωτεϊνών που χρησιμοποιούνται ως δείκτες για την ανίχνευση διαφόρων ειδών γάλακτος και οι αντίστοιχες τεχνικές που χρησιμοποιούνται.

Ο προσδιορισμός πρωτεϊνών με χρωματογραφικές και ηλεκτροφορητικές τεχνικές παρόλο που έχουν σημαντική αξία σε πολλές περιπτώσεις, δεν είναι εύκολα εφαρμόσιμες για αναλύσεις δειγμάτων ρουτίνας επειδή είναι σχετικά δαπανηρές, χρονοβόρες και πολύπλοκες στην εκτέλεση (Asensio *et al.*, 2008). Έτσι, είναι μειωμένης διαγνωστικής αξίας όσον αφορά τους ελέγχους ρουτίνας για νοθεία στο γάλα και το τυρί (Colak *et al.*, 2006).

Οι μέθοδοι προσδιορισμού με μοριακές τεχνικές είναι οι πιο ακριβείς και ευαίσθητες για την ανίχνευση αυθεντικότητας των συστατικών των τροφίμων. Απαιτούν όμως, δαπανηρό εργαστηριακό εξοπλισμό και έναν σημαντικό βαθμό εμπειρίας. Εναλλακτικά των παραπάνω συνιστάται ο προσδιορισμός των πρωτεϊνών με εφαρμογή ανοσολογικών τεχνικών οι οποίες μπορεί να χρησιμοποιηθούν για να μειώσουν **τον χρόνο** διενέργειας των ελέγχων ρουτίνας και **τη δαπάνη**, δίνοντας εξίσου αξιόπιστα αποτελέσματα για τη νοθεία (Asensio *et al.*, 2008).

Πίνακας 1-1: Συστατικά των πρωτεϊνών που χρησιμοποιούνται ως δείκτες για την ανίχνευση διαφόρων ειδών γάλακτος (Borkova & Snaselova, 2005)

Τεχνικές	Συστατικό δείκτης
Ηλεκτροφορητικές	
Ηλεκτροφόρηση	βόεια παρα-κ-καζεΐνη βόεια αs1-καζεΐνη βόεια α-καζεΐνη
Ισοηλεκτρικός εστιασμός	βόεια γ2 και γ3 καζεΐνη, μέθοδος αναφοράς της ΕΕ αίγεια και πρόβεια παρα-κ-καζεΐνη
Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση	αίγεια α-γαλακταλβουμίνη και βόεια β-γαλακτοσφαιρίνη πλήρης ανάλυση βόειων καζεϊνών και πρωτεϊνών ορού πλήρης ανάλυση βόειων, πρόβειων και αίγειων καζεϊνών και πρωτεϊνών ορού βόεια αs1-καζεΐνη
Χρωματογραφικές	
RP HPLC	βόεια, αίγεια και πρόβεια β-γαλακτοσφαιρίνη βόεια α-γαλακτοσφαιρίνη και β-γαλακτοσφαιρίνη Β βόεια α-καζεΐνη
HIC	βόεια, αίγεια και πρόβεια αs1-, αs2-, β- και κ- καζεΐνη
Φασματομετρία μαζών	
MALDI-MS	βόεια α-γαλακταλβουμίνη, β-γαλακτοσφαιρίνη Α και Β
Ανοσολογικές	
Έμμεση ELISA	βόεια κ-καζεΐνη βόεια ανοσοσφαιρίνη G αίγεια αs2-καζεΐνη βόεια β-καζεΐνη βόεια αs1-καζεΐνη
Sandwich ELISA	βόεια β-καζεΐνη αίγειες πρωτεΐνες ορού βόεια β-γαλακτοσφαιρίνη

1.2 Πρωτεΐνες ορού γάλακτος

Το γάλα έχει ένα σύστημα πρωτεϊνών, το οποίο αποτελείται από δυο βασικές οικογένειες πρωτεϊνών: τις καζεΐνες (μη διαλυτές) και τις πρωτεΐνες του ορού (διαλυτές). Οι καζεΐνες αποτελούν το 80% (w/w) των συνολικών πρωτεϊνών και μπορούν εύκολα να διαχωριστούν από το άπαχο γάλα μέσω ισοηλεκτρικής κατακρήμνισης (με προσθήκη οξέος ή *in situ* παραγωγή οξέος) ή μέσω πήξης με πυτιά. Προϊόν και των δυο αυτών μεθόδων είναι ο ορός. Οι πρωτεΐνες του ορού είναι σφαιρικά μόρια με βασικό συστατικό ένα μοτίβο α-έλικας, στο οποίο τα όξινα/βασικά και υδροφοβικά/υδροφιλικά αμινοξέα είναι κατανομημένα με αρκετά ισορροπημένο τρόπο κατά μήκος της πολυπεπτιδικής τους αλυσίδας. Το προφίλ των πρωτεϊνών του ορού, συμπεριλαμβανομένων γενικών χημικών και φυσικοχημικών ιδιοτήτων απεικονίζεται στον πίνακα 1-2. (Madureira *et al.*, 2007). Οι πρωτεΐνες του ορού περιλαμβάνουν την β-γαλακτοσφαιρίνη (β-Lg), την α-γαλακταλβουμίνη (α-La), ανοσοσφαιρίνες (Ig), αλβουμίνη του ορού (BSA), λακτοφερίνη (BLF) και λακτουπεροξειδάση (LP) μαζί με άλλα συστατικά που βρίσκονται σε πολύ μικρή ποσότητα.

Πίνακας 1-2: Προφίλ πρωτεϊνών ορού γάλακτος και βασικές ιδιότητες πρωτογενούς δομής (Madureira *et al.*, 2007)

Πρωτεΐνη	Συγκέντρωση στο γάλα gr/l	Μοριακό βάρος kDa	Αριθμός αμινοξέων
β-γαλακτοσφαιρίνη	1,3	18.277	162
α-γαλακταλβουμίνη	1,2	14.175	123
Αλβουμίνη του ορού (BSA)	0,4	66.267	582
Ανοσοσφαιρίνες (A, M και G)	0,7	25.000 (ελαφριά αλυσίδα) & 50.000-70.000 (βαριά αλυσίδα)	
Λακτοφερίνη	0,1	80.000	700
Λακτουπεροξειδάση	0,03	70.000	612
Γλυκομακροπεπτιδίο	1,2	6.700	64

Η ακριβής συγκέντρωση των πρωτεϊνών του ορού εξαρτάται από τον τύπο του ορού (όξινο ή γλυκό), την πηγή του γάλακτος (αγελαδινό, αίγιο ή πρόβιο), την εποχή του έτους, τον τύπο της διατροφής, το στάδιο της γαλακτικής περιόδου και την επεξεργασία του γάλακτος (Madureira *et al.*, 2007).

Οι Pintado *et al.*, 1999 εντόπισαν βασικές διαφορές στη σύσταση των πρωτεϊνών του ορού μεταξύ των τριών ειδών γάλακτος, αγελαδινό, πρόβιο και αίγιο κατά την εφαρμογή χρωματογραφίας μοριακής διήθησης, από την οποία προέκυψε η σύσταση του συμπυκνώματος πρωτεϊνών (WPC: Whey Protein Concentrate) στις τέσσερις βασικές πρωτεΐνες του ορού (Πίν. 1-3). Το πρόβιο παρουσίασε την υψηλότερη συγκέντρωση σε β-γαλακτοσφαιρίνη, το αγελαδινό τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σε α-γαλακταλβουμίνη ενώ το αίγιο την υψηλότερη συγκέντρωση σε ανοσοσφαιρίνη G. Το αίγιο συμπύκνωμα πρωτεϊνών παρουσίασε το υψηλότερο κλάσμα σε IgG, ενώ το αγελαδινό το χαμηλότερο. Αντίστοιχα αποτελέσματα προέκυψαν και για την BSA του πρόβιου και αίγιου συμπυκνώματος, όπου η χαμηλότερη τιμή για την πρωτεΐνη αυτή βρέθηκε στο αγελαδινό συμπύκνωμα. Η β-Lg ήταν η πιο άφθονη πρωτεΐνη σε όλα τα συμπυκνώματα (περίπου το 50% των ολικών πρωτεϊνών), όπως δηλαδή συμβαίνει και στον κανονικό ορό γάλακτος (Pintado *et al.*, 1999).

Πίνακας 1-3: Συγκέντρωση των βασικότερων πρωτεϊνών του WPC (whey protein concentrate) αγελαδινού, πρόβιου και αίγιου ορού (Pintado *et al.*, 1999).

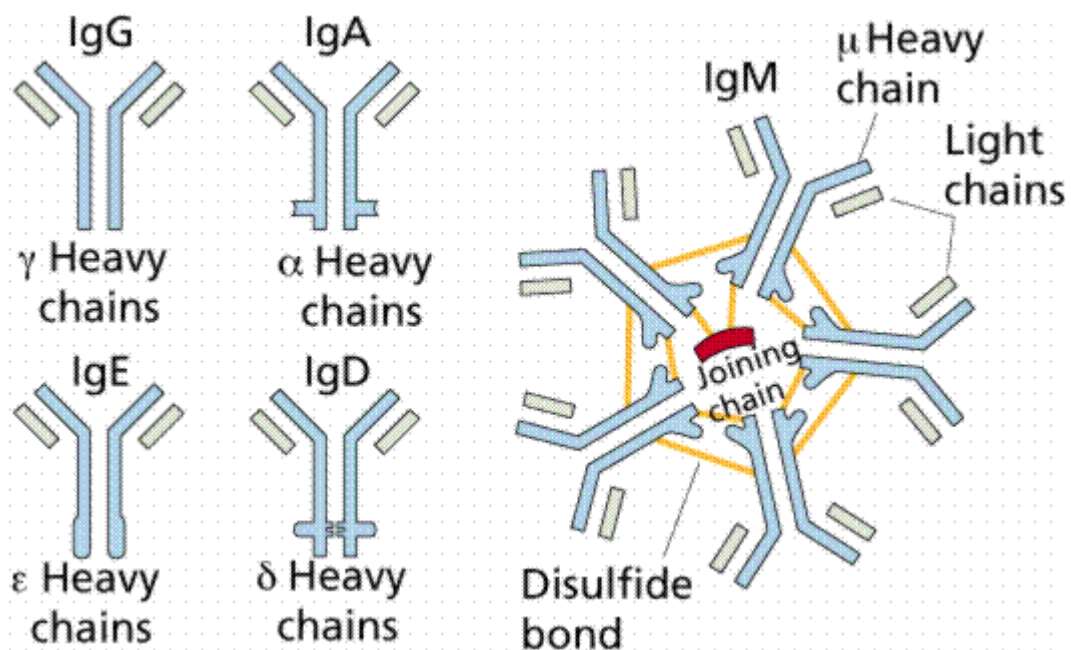
Πρωτεΐνη	WPC (g/100g)		
	Πρόβιο	Αίγιο	Αγελαδινό
IgG	7.32	9.80	6.16
BSA	7.97	7.82	6.12
β-Lg	52.54	48.17	47.33
α-La	24.90	27.14	36.91

1.2.1 Ανοσοσφαιρίνες

Πρωτεϊνικά μόρια τα οποία συνδέονται ειδικά με αντιγόνα καλούνται αντισώματα [antibodies, ab(s)]. Οι πρωτεΐνες που έχουν αντισωματική δράση αναφέρονται ως ανοσοσφαιρίνες (Immunoglobulins – Ig(s)) και χαρακτηρίζονται ως γ-σφαιρίνες με μοριακά βάρη κυμαινόμενα από 150.000 ως 900.000 KD (Kilo Daltons). Όλες οι

ανοσοσφαιρίνες έχουν την ίδια βασική δομή και αποτελούνται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, δύο μεγάλες (ή βαριές) και δύο μικρές (ή ελαφριές).

Με βάση διαφορές στις καθοριστικές ομάδες του μορίου των ανοσοσφαιρινών, οι βαριές αλυσίδες διακρίνονται σε πέντε είδη, την γ , α , μ , δ , και ϵ και οι ελαφριές αλυσίδες σε δύο είδη, την κ και λ . Το μόριο της ανοσοσφαιρίνης αποτελείται από δύο πανομοιότυπες βαριές και δύο πανομοιότυπες ελαφριές αλυσίδες. Ανάλογα με το είδος της βαριάς αλυσίδας διακρίνονται πέντε τάξεις (ή κλάσεις) ανοσοσφαιρινών, οι: IgG, IgA, IgM, IgD και IgE. Τα μόρια των Igs παράγονται από τα πλασματοκύτταρα, τελικά κύτταρα των B λεμφοκυττάρων (Δημητρακόπουλος, 1994).



Εικόνα 1-1: Οι πέντε τάξεις των ανοσοσφαιρινών

Πηγή: <http://www.cartage.org.lb/en/themes/sciences/lifescience/generalbiology/physiology/LymphaticSystem/Antibodymediated/Antibodymediated.htm>

Οι ανοσοσφαιρίνες (αντισώματα) είναι προστατευτικές πρωτεΐνες, οι οποίες είναι πολύ σημαντικές για τη μεταφορά παθητικής ανοσίας από τη μητέρα στο νεογνό. Τα νεογνά των θηλαστικών γεννιούνται με ανώριμο ανοσοποιητικό σύστημα, οπότε οι ανοσοσφαιρίνες της παθητικής ανοσίας παρουσιάζουν αντιγονική δράση και τα προστατεύουν, μέχρι να αναπτύξουν δικά τους αντισώματα (Campanella *et al.*, 2009). Οι ανοσοσφαιρίνες υφίστανται μεταγεννητική μεταφορά μέσω του πρωτογάλακτος, αφού ο πλακούντας δεν επιτρέπει συνήθως την μεταφορά μακρομορίων (Madureira *et al.*, 2007).

Οι εκκρίσεις γάλακτος (ορός και γάλα) περιέχουν τις τρεις βασικές τάξεις ανοσοσφαιρινών, τις: IgG, IgM και IgA. Αυτές μεταφέρονται μέσω του ορού του αίματος στο μαστικό αδένα, ως αποτέλεσμα του οποίου είναι το πρωτόγαλα να περιέχει πολύ υψηλή συγκέντρωση ανοσοσφαιρινών (40-200 mg/ml). Οι ανοσοσφαιρίνες μειώνονται προοδευτικά μέσα σε μερικές ημέρες μετά τον τοκετό και φτάνουν σε συγκέντρωση της τάξεως του 0,7-1,0 mg/ml (Korhonen *et al.*, 2000). Η ανοσοσφαιρίνη G (IgG με υποκλάσεις IgG1 και IgG2) είναι το βασικότερο ανοσοσυστατικό του πρωτογάλακτος. Τα επίπεδα των διαφόρων τάξεων ανοσοσφαιρινών αγελάδας και γυναίκας δίνονται ενδεικτικά στον Πίνακα 1-4 (Gapper *et al.*, 2007).

Πίνακας 1-4: Συγκέντρωση ανοσοσφαιρινών σε ορό αίματος, σε ορό γάλακτος και γάλα αγελάδας και γυναίκας (Gapper *et al.*, 2007).

Είδος	Ανοσοσφαιρίνες	Συγκέντρωση (mg/ml)		
		Ορός αίματος	Πρωτόγαλα	Γάλα
Αγελάδα	Ολική IgG	25.0	32-212	0.72
	IgG1	14.0	20-200	0.60
	IgG2	11.0	12.0	0.12
	IgA	0.4	3.5	0.13
	IgM	3.1	8.7	0.04
Γυναίκα	Ολική IgG	12.1	0.4	0.04
	IgA	2.5	17.4	1.00
	IgM	0.9	1.6	0.10

Στα μηρυκαστικά, η κυρίαρχη ανοσοσφαιρίνη του γάλακτος IgG1, προέρχεται κυρίως από το αίμα και μεταφέρεται διαμέσου των αδενοκυψελίδων μέσω ενός μηχανισμού ενεργού υποδοχέα. Η IgG2 επίσης προέρχεται από το αίμα ή συντίθεται από τα πλασματοκύτταρα ή τα επιθηλιακά κύτταρα του μαστικού αδένα και μεταφέρεται στα μαστικά εκκριτικά κύτταρα. Η IgA και η IgM επίσης συντίθενται από τα πλασματοκύτταρα ή τα επιθηλιακά κύτταρα του μαστικού αδένα. Οι ανοσοσφαιρίνες συσσωρεύονται στο μαστικό αδένα κατά τη διάρκεια της προ του τοκετού ξηράς περιόδου και μετά εκκρίνονται στο πρωτόγαλα και το γάλα. Η IgG1 αποτελεί περίπου το 80% της ολικής IgG που περιέχεται στο αγελαδινό γάλα, ενώ η κυρίαρχη ανοσοσφαιρίνη στα περισσότερα υπόλοιπα είδη γάλακτος, των μονογαστρικών θηλαστικών,

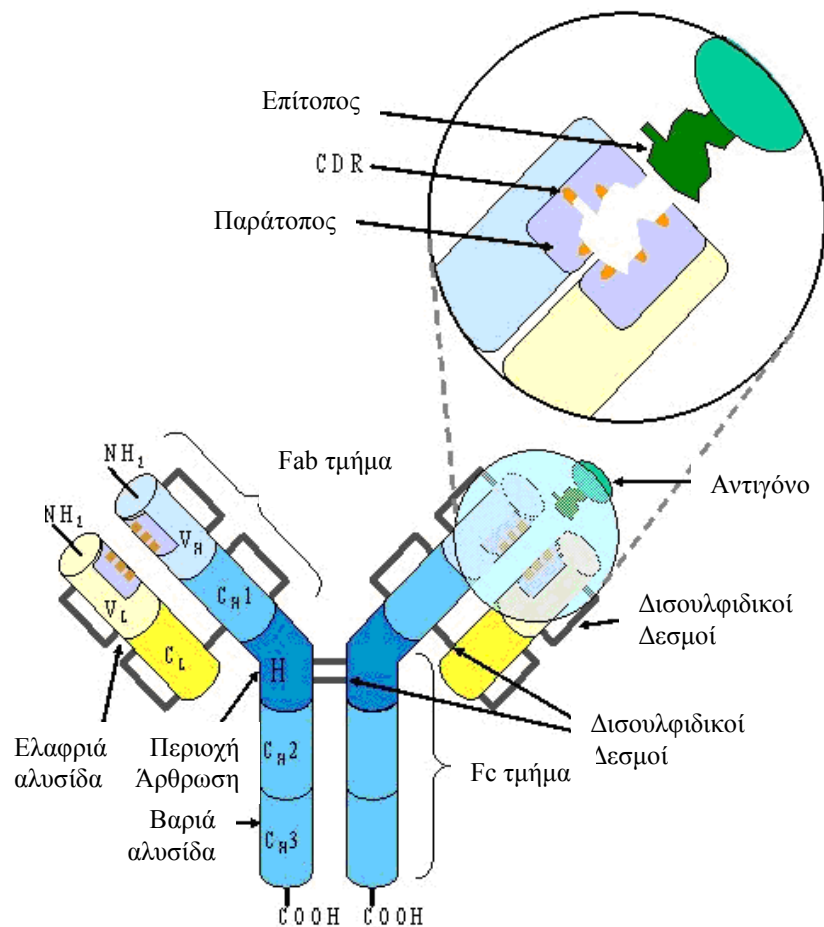
συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπινου, είναι η ανοσοσφαιρίνη IgA (Gapper *et al.*, 2007).

1.2.1.1. Δομή ανοσοσφαιρινών IgG

Το μόριο της IgG αποτελείται από δύο βαριές αλυσίδες γ που ανήκουν στην ίδια υποτάξη και φέρουν τους ίδιους αλλότυπους. Το μοριακό βάρος της IgG είναι 150.000 KD. Αποτελεί το 80% των ανοσοσφαιρινών του ορού του αίματος και των εσωτερικών εκκρίσεων. Η μεγάλη συγκέντρωσή της στον ορό είναι αποτέλεσμα του μεγάλου ρυθμού συνθέσεων και του μικρού ρυθμού καταβολισμού της συγκεκριμένης ανοσοσφαιρίνης. Αντιγονικές καθοριστικές ομάδες, επίτοποι, στο σταθερό τμήμα διαχωρίζουν την γ αλυσίδα σε τέσσερις υποτάξεις (ισότυπους), ενώ άλλες καθοριστικές ομάδες στο ίδιο τμήμα διαχωρίζουν περαιτέρω τις υποτάξεις σε αλλότυπους. Το μόριο της IgG είναι σταθερό στους $56^{\circ} - 60^{\circ} \text{ C}$ και διατηρείται για μεγάλο χρονικό διάστημα στη θερμοκρασία ψυγείου ($+4^{\circ} \text{ C}$). Σε κάθε αντιγονικό ερεθισμό πρώτη παράγεται η IgM σε μικρά ποσά και ακολουθεί η παραγωγή της IgG σε μεγαλύτερη αναλογία. Η παραγωγή της IgG προσφέρει στον οργανισμό ανοσολογική μνήμη. Κατά την δεύτερη χορήγηση του ίδιου αντιγόνου πρώτη παράγεται πάλι η IgM σε μικρά ποσά, και ακολουθεί η παραγωγή πολύ μεγάλων ποσοτήτων IgG. Το ίδιο επαναλαμβάνεται και κατά τις αναμνηστικές χορηγήσεις του αντιγόνου (Δημητρακόπουλος, 1994).

Η IgG αποτελείται από δύο πανομοιότυπες βαριές αλυσίδες (H) και δύο πανομοιότυπες ελαφριές αλυσίδες (L) με κάθε μια να περιέχει μία μεταβλητή και μία σταθερή περιοχή (Εικ. 1-2). Οι τέσσερις αλυσίδες συνδέονται έτσι ώστε να σχηματίζουν ένα μόριο με μορφή Y. Κάθε ελαφριά αλυσίδα συνδέεται με μια βαριά και οι δύο βαριές αλυσίδες συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς. Η κάθε ελαφριά αλυσίδα αποτελείται από μία μεταβλητή (VL) και μια σταθερή περιοχή (CL), ενώ η κάθε βαριά αλυσίδα αποτελείται από μία μεταβλητή και τρεις ή τέσσερις σταθερές περιοχές. Κάθε μεταβλητή περιοχή της βαριάς αλυσίδας (VH) ή της ελαφριάς αλυσίδας (VL) περιέχει τρεις υπερμεταβλητές περιοχές (CDRs). Από τις τρεις περιοχές αυτές η μεγαλύτερη μεταβλητότητα συγκεντρώνεται στην CDR3, που βρίσκεται στο σημείο σύνδεσης C και V. Η V είναι η περιοχή που συνεισφέρει περισσότερο στην πρόσδεση του αντιγόνου. Τα τμήματα των μορίων των αντισωμάτων συχνά ονομάζονται με βάση τις ιδιότητες των πρωτεολυτικών κλασμάτων των ανοσοσφαιρινών. Το κλάσμα ενός αντισώματος που

περιέχει μια ολόκληρη ελαφριά αλυσίδα συνδεδεμένη με την περιοχή V και την πρώτη περιοχή C της βαριάς αλυσίδας είναι αυτό που περιέχει το τμήμα του αντισώματος που απαιτείται για την αναγνώριση του αντιγόνου και ονομάζεται Fab (Fragment antigen binding, κλάσμα πρόσδεσης αντιγόνου). Οι υπόλοιπες C περιοχές αποτελούν την Fc περιοχή ή κρυσταλλικό κλάσμα (Fragment crystalline) επειδή τείνει να σχηματίζει κρυστάλλους όταν βρίσκεται σε διάλυμα. Σε κάθε μόριο ανοσοσφαιρίνης υπάρχουν δύο μόρια Fab που προσδένονται με το αντιγόνο και ένα τμήμα Fc που είναι υπεύθυνο για τις περισσότερες δραστικές λειτουργίες των αντισωμάτων. Μεταξύ των περιοχών Fab και Fc υπάρχει ένα ευλύγιστο τμήμα που καλείται περιοχή άρθρωσης (hinge region). Το καρβοξυτελικό άκρο της βαριάς αλυσίδας μπορεί να αγκυροβολεί στην κυταροπλασματική μεμβράνη ή να έχει ένα τελικό τμήμα που στερείται αυτής της άγκυρας με αποτέλεσμα το αντίσωμα να παράγεται στην μορφή εκκρινόμενης πρωτεΐνης. Οι ελαφριές αλυσίδες δεν συνδέονται με την μεμβράνη (Janeway *et al*, 1999; Abbas & Lichtman, 2001).



Εικ. 1-2: Σχηματική αναπαράσταση ενός μορίου ανοσοσφαιρίνης G (IgG)

Πηγή: <http://www.karstenfaehrich.de/Immunosensors/immunosensors.htm>

1.3 Πηγές αντισωμάτων, η χρήση τους και ο καθαρισμός τους

Κάθε είδος αντισώματος παράγεται από έναν ειδικό κλώνο κυττάρων του πλάσματος μετά την διαφοροποίησή τους από τα Β-λεμφοκύτταρα. Μετά τον ερεθισμό από το αντιγόνο, αυτοί οι κλώνοι πολλαπλασιάζονται και παράγουν σημαντικές ποσότητες του ειδικού αντισώματος. Τα αντισώματα αυτά παρουσιάζουν μοναδικές ιδιότητες σύνδεσης απέναντι σε ένα μεγάλο αριθμό φυσικών και συνθετικών ουσιών. Αυτά τα χαρακτηριστικά οδήγησαν σε σημαντικές προσπάθειες για την απόκτηση τέτοιων αντισωμάτων σε ικανοποιητικές ποσότητες (Huse *et al.*, 2002).

Ένας αυξανόμενος αριθμός σύγχρονων διαγνωστικών και θεραπευτικών τεχνολογιών βασίζεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ των αντισωμάτων με υψηλή συγγένεια και των ειδικών τους αντιγόνων, π.χ. ραδιοανοσολογική μέθοδος (RIA, Radio ImmunoAssay), ανοσοραδιομετρική μέθοδος (IRMA, ImmunoRadioMetric Assay), ανοσο-ενζυμική μέθοδος (ELISA, enzyme linked immunosorbent assay) ή ειδική blot τεχνική (Huse *et al.*, 2002). Οι παραπάνω αναφερόμενες τεχνικές απαιτούν τη χρήση αντισωμάτων – πρωτεϊνών σε καθαρή μορφή (Harlow & Lane, 1988). Ο βαθμός καθαρότητας των ανοσοσφαιρινών είναι ιδιαίτερης σημασίας επειδή άλλες ουσίες στην αρχική πηγή μπορεί να παρεμποδίσουν την διαδικασία αντίχενωσης (Huse *et al.*, 2002). Οι πηγές από τις οποίες απομονώνονται τα αντισώματα είναι ο ορός του αίματος (πολυκλωνικά αντισώματα), το ασκητικό υγρό ή το υπερκείμενο καλλιέργειας μιας υβριδωματικής συνεχούς κυτταρικής σειράς (μονοκλωνικά αντισώματα) (Harlow & Lane, 1988).

Τα καθαρισμένα αντισώματα έχουν τις παρακάτω χρήσεις: α) ως θεραπευτικά εμβόλια για ασθενείς, β) ως εργαλείο στην έρευνα για κλινικές διαγνώσεις και γ) για την βιοχημική τους ανάλυση (εξειδίκευση, ισότοποι ή κλωνική διαφοροποίηση). Οι περισσότερες από αυτές τις εφαρμογές απαιτούν η ικανότητα σύνδεσης των ανοσοσφαιρινών να διατηρείται κατά τη διάρκεια όλης της διαδικασίας καθαρισμού (Layer *et al.*, 2000).

1.3.1 Μέθοδοι καθαρισμού αντισωμάτων

Ο καθαρισμός των αντισωμάτων μπορεί να πραγματοποιηθεί σύμφωνα με τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, τη βιολογική τους δραστηριότητα ή τον συνδυασμό και των δυο (Layer *et al.*, 2000). Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός μεθόδων που χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό των αντισωμάτων. Η σωστή επιλογή της κατάλληλης μεθόδου καθαρισμού εξαρτάται από πολλούς παράγοντες συμπεριλαμβανομένων: της χρήσης για την οποία προορίζονται, τα ζωικά είδη στα οποία αναπτύχθηκαν, η κλάση και η υποκλάση τους, αν πρόκειται για μονοκλωνικό αντίσωμα, η πηγή η οποία θα αποτελέσει το αρχικό υλικό για τον καθαρισμό (Harlow & Lane, 1988), όπως επίσης από την ποσότητα και την καθαρότητα του αντισώματος αλλά και το γενικό κόστος της διαδικασίας (Huse *et al.*, 2002). Παρακάτω παρατίθενται εν συντομία οι πιο σημαντικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό των αντισωμάτων.

1.3.1.1 Καθαρισμός με κατακρήμνιση

Η διαλυτότητα των πρωτεϊνών σε νερό, βασίζεται στην ικανότητα τους να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου μεταξύ πολικών ή ιονικών ομάδων με τα μόρια του νερού (υδροφιλικές αλληλεπιδράσεις). Εξαρτάται δε η διαλυτότητα από τη θερμοκρασία. Οποιοσδήποτε εξωτερικός παράγοντας είναι ικανός να τροποποιήσει τους δεσμούς υδρογόνου ή να μειώσει την μέση υδροφιλικότητα, μπορεί να μειώσει τη διαλυτότητα των πρωτεϊνών και τελικά να οδηγήσει στην κατακρήμνισή τους (Layer *et al.*, 2000). Για αυτό το λόγο μπορούν να χρησιμοποιηθούν διαφορετικές διαδικασίες κατακρήμνισης για την απομόνωση των ανοσοσφαιρινών από τα υγρά, όπως αναφέρονται παρακάτω:

Κατακρήμνιση με χρήση Αιθανόλης (Ethanol Precipitation)

Ο καθαρισμός των ανοσοσφαιρινών IgG με την χρήση της τεχνικής κατακρήμνισης που βασίζεται στην αιθανόλη, αποτελεί τεχνική η οποία αναπτύχθηκε από τους Cohn *et al.*, το 1946, και χρησιμοποιείται μέχρι σήμερα. Αυτή η τεχνική προκαλεί κατακρήμνιση των πρωτεϊνών του ορού αυξάνοντας σταδιακά την συγκέντρωση της αιθανόλης από 8% σε 40%. Η κατακρήμνιση πραγματοποιείται στους -5°C για να προστατευτούν οι πρωτεΐνες από την μετουσίωση που μπορεί να προκληθεί

από τον οργανικό διαλύτη. Με την χρήση αυτής της μεθόδου μπορεί να παραληφθεί IgG καθαρότητας μεγαλύτερης από 90%, αλλά η αξιοποίηση είναι μόλις στο 50-60%.

Επιπλέον, αυτή η τεχνική είναι δαπανηρή δεδομένου της φυγοκέντρωσης υπό συνθήκες ψύξης που απαιτείται για τον διαχωρισμό των κατακρημνισμένων πρωτεϊνών από το υπερκείμενο. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται όταν απαιτούνται μεγάλα ποσά ανοσοσφαιρινών, κυρίως για θεραπευτικούς σκοπούς (Wang *et al.*, 2009; Layer *et al.*, 2000).

Κατακρήμνιση με χρήση θεικού αμμωνίου (Ammonium Sulfate Precipitation)

Ιόντα χαμηλού και υψηλού φορτίου, όπως είναι τα αμμωνιακά, αντικαθιστούν τα συνδεδεμένα μόρια νερού όταν βρίσκονται σε ικανοποιητική συγκέντρωση. Αυτό μειώνει την διαλυτότητα των πρωτεϊνών και όταν η συγκέντρωση του θεικού αμμωνίου αυξάνεται σταδιακά, ακολουθεί κατακρήμνιση των πρωτεϊνών, η οποία πραγματοποιείται μετά και από φυγοκέντρωση. Αποτελεί μια σχετικά οικονομική τεχνική αλλά μειονεκτεί όσον αφορά τη χαμηλή απόδοση και τη χαμηλή καθαρότητα. Το κατακρημνισμένο κλάσμα εκτός από ανοσοσφαιρίνες περιέχει και άλλες πρωτεΐνες του ορού. Αν απαιτείται καθαρό προϊόν επιβάλλεται ο συνδυασμός της μεθόδου αυτής με κάποια άλλη (Wang *et al.*, 2009; Layer *et al.*, 2000).

Κατακρήμνιση με χρήση καπρυλικού οξέος (Caprylic Acid Precipitation)

Η κατακρήμνιση που στηρίζεται στη χρήση καπρυλικού οξέος είναι ακόμα μια χαμηλού κόστους τεχνική για τον καθαρισμό των ανοσοσφαιρινών IgG. Η μέθοδος αυτή συνίσταται στην κατακρήμνιση των μη ανοσοσφαιρινών με τη χρήση καπρυλικού οξέος σε pH 4,8-6,5. Στη συνέχεια η IgG ανακτάται στο υπερκείμενο που παραλαμβάνεται μετά από φυγοκέντρωση. Μειονεκτεί στο ότι μια σημαντική ποσότητα της IgG παραμένει παγιδευμένη μέσα στο καπρυλικό οξύ δημιουργώντας ιζήματα, ή κατακρημνίζεται μαζί με τις μη IgG πρωτεΐνες, περιορίζοντας έτσι την αξιοποίηση της. Επίσης η αλβουμίνη, η οποία βρίσκεται σε μεγάλο ποσοστό στον ορό (45mg/ml) δεν μπορεί να κατακρημνιστεί πλήρως. Επομένως χρειάζεται να συνδυαστεί με κάποια άλλη μέθοδο για την παραλαβή κλασμάτων υψηλής καθαρότητας (Wang *et al.*, 2009; Layer *et al.*, 2000).

1.3.1.2 Καθαρισμός με χρήση χρωματογραφικών μεθόδων

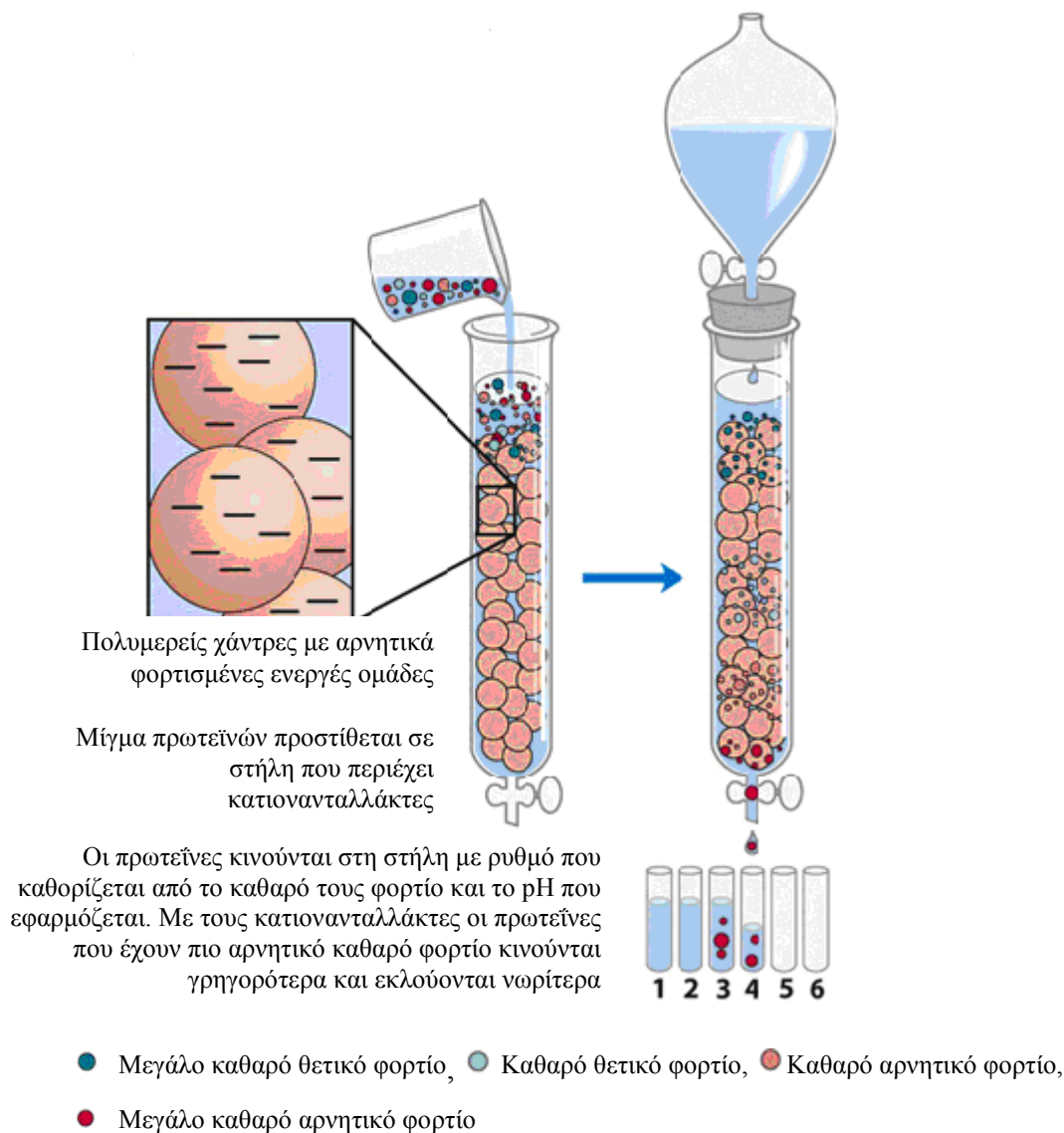
Στις χρωματογραφικές διαδικασίες, ενώσεις σε διάλυμα διαχωρίζονται κατά την ροή τους μέσα σε ένα επιλεκτικό μέσο το οποίο μεταφέρεται σε μια στήλη. Διαφορετικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων και του υλικού της στήλης, είναι υπεύθυνες για την μετανάστευσή τους με διάφορες ταχύτητες, ή ακόμη και την πλήρη ακινητοποίησή τους. Τα διαχωρισμένα μόρια ανακτώνται στα εκπλύματα της στήλης. Πολλά εμπορικά διαθέσιμα σκευάσματα, επιτρέπουν διαχωρισμό των πρωτεϊνών, σύμφωνα με τις διάφορες φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τη χρήση των μέσων αυτών παρέχονται από τους παρασκευαστές ή μπορεί να βρεθούν στη βιβλιογραφία για συγκεκριμένες εφαρμογές (Layer *et al.*, 2000).

Χρωματογραφία ιοντοαλλαγής (Ion Exchange Chromatography)

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται με εκλεκτικές δεσμεύσεις και αποδεσμεύσεις μεταξύ των ιονισμένων συστατικών ενός υγρού και μιας στερεάς στατικής φάσης (ρητίνης) που φέρει δραστικές ομάδες στις οποίες συνδέονται ευκίνητα ιόντα που μπορούν να ανταλλάξουν με τα ιόντα του υγρού. Τα προς διαχωρισμό συστατικά του μίγματος βρίσκονται σε ιοντική μορφή με αντίθετο φορτίο ως προς τη στατική φάση και έλκονται σ' αυτήν με ηλεκτροστατικές δυνάμεις (Εικ. 1-3). Στη συνέχεια οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με σταδιακή προσθήκη ενός ρυθμιστικού διαλύματος NaCl (Gapper *et al.*, 2007; Layer *et al.*, 2000).

Αφού η δύναμη της αλληλεπίδρασης μεταξύ πρωτεΐνης-μέσου εξαρτάται από το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης, μια διαδοχική έκλουση μπορεί να πραγματοποιηθεί με σταδιακά αυξανόμενη συγκέντρωση άλατος (Layer *et al.*, 2000).

Επειδή οι ανοσοσφαιρίνες έχουν ένα πιο βασικό ισοηλεκτρικό σημείο από ότι οι περισσότερες άλλες πρωτεΐνες του ορού, η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον καθαρισμό τους. Η μέθοδος αυτή μπορεί να δώσει καθαρά αντισώματα σε ικανοποιητική μορφή αν η αρχική πηγή είναι υπερκείμενο κυτταρικής καλλιέργειας ή ασκητικό υγρό, αλλά πρέπει να συνδυαστεί με μια επιπλέον μέθοδο καθαρισμού όταν πρόκειται για δείγματα ορού. Η μέθοδος αυτή είναι επίσης οικονομική και ενδείκνυται για μεγάλες αρχικές ποσότητες (Layer *et al.*, 2000).



Εικόνα 1-3: Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής

Πηγή: http://dolly.biochem.arizona.edu/Bioc462b_Honors_Spring_2009/ighare/techniques.html

Χρωματογραφία υδροξυ-απατίτη (Hydroxyapatite Chromatography)

Ο υδροξυ-απατίτης είναι η κρυσταλλική μορφή του φωσφορικού ασβεστίου. Όταν μια πρωτεΐνη προστίθεται σε υδροξυαπατίτη, οι θετικά φορτισμένες αμινομάδες στην επιφάνεια της πρωτεΐνης έλκονται από τα φωσφορικά ανιόντα ενώ απωθούνται από τα κατιόντα ασβεστίου. Επίσης, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φωσφορικών ομάδων και των κατιόντων ασβεστίου με τις καρβοξυλικές ομάδες της πρωτεΐνης εμφανίζονται αρκετά ισχυρότερες από μια απλή ηλεκτροστατική έλξη. Μια τυπική χρωματογραφία με υδροξυαπατίτη, περιλαμβάνει φόρτωμα του δείγματος με ρυθμιστικό διάλυμα χαμηλής

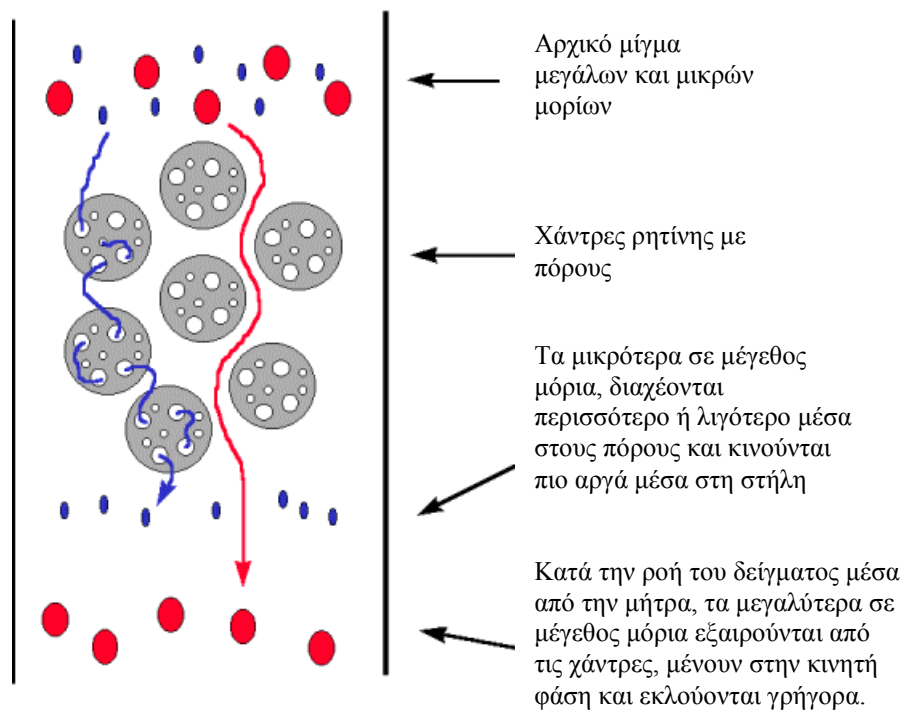
ιονικής ισχύος και έκλυση της δεσμευμένης όξινης πρωτεΐνης με αυξανόμενη συγκέντρωση φωσφορικών (Bonner, 2007).

Όταν απαιτούνται κλάσματα ανοσοσφαιρινών υψηλής καθαρότητας, η μέθοδος πρέπει να συνδυαστεί με άλλη, αναλόγως του αρχικού υλικού (Layer *et al.*, 2000).

Χρωματογραφία μοριακής διήθησης (Πηκτική Filtration Chromatography)

Η μήτρα στη χρωματογραφία μοριακής διήθησης αποτελείται από χάντρες που έχουν πόρους διαφόρων μεγεθών. Κατά την ροή του δείγματος μέσα από την μήτρα, τα μεγαλύτερα σε μέγεθος μόρια εξαιρούνται από τις χάντρες. Αυτά μένουν στην κινητή φάση και κινούνται γρήγορα. Τα μικρότερα σε μέγεθος μόρια, αναλόγως αρχικά του μεγέθους τους αλλά και του σχήματός τους, διαχέονται περισσότερο ή λιγότερο μέσα στους πόρους και κινούνται πιο αργά μέσα στη στήλη (Εικ. 1-4) Έτσι η μέθοδος αυτή επιτρέπει το διαχωρισμό των πρωτεϊνών ανάλογα με το μέγεθός τους (Layer *et al.*, 2000).

Και η μέθοδος αυτή συνήθως συνδυάζεται με κάποια άλλη για την παραλαβή αντισωμάτων υψηλής καθαρότητας και κυρίως η χρήση της περιορίζεται στον καθαρισμό της IgM (Layer *et al.*, 2000).



Εικόνα 1-4: Χρωματογραφία μοριακής διήθησης

Πηγή: http://www.zampbioworld.org/material/bioch_lab/bc040_a.php

1.3.1.3 Καθαρισμός με εφαρμογή χρωματογραφίας συγγένειας (Affinity Chromatography)

Η χρωματογραφία συγγένειας αποτελεί μια από τις περισσότερο υποσχόμενες τεχνικές για καθαρισμό αλλά και ποσοτική ανάλυση της IgG (Gapper *et al.*, 2007).

Η αποτελεσματικότητα των καθαρισμών με χρωματογραφία συγγένειας βασίζεται στην ικανότητα του αντισώματος να αναγνωρίζει ειδικά έναν προσροφητή συγγένειας, ο οποίος αποτελείται από ένα ακινητοποιημένο πρόσδεμα και τη μήτρα στην οποία δένεται το πρόσδεμα (Huse *et al.*, 2002).

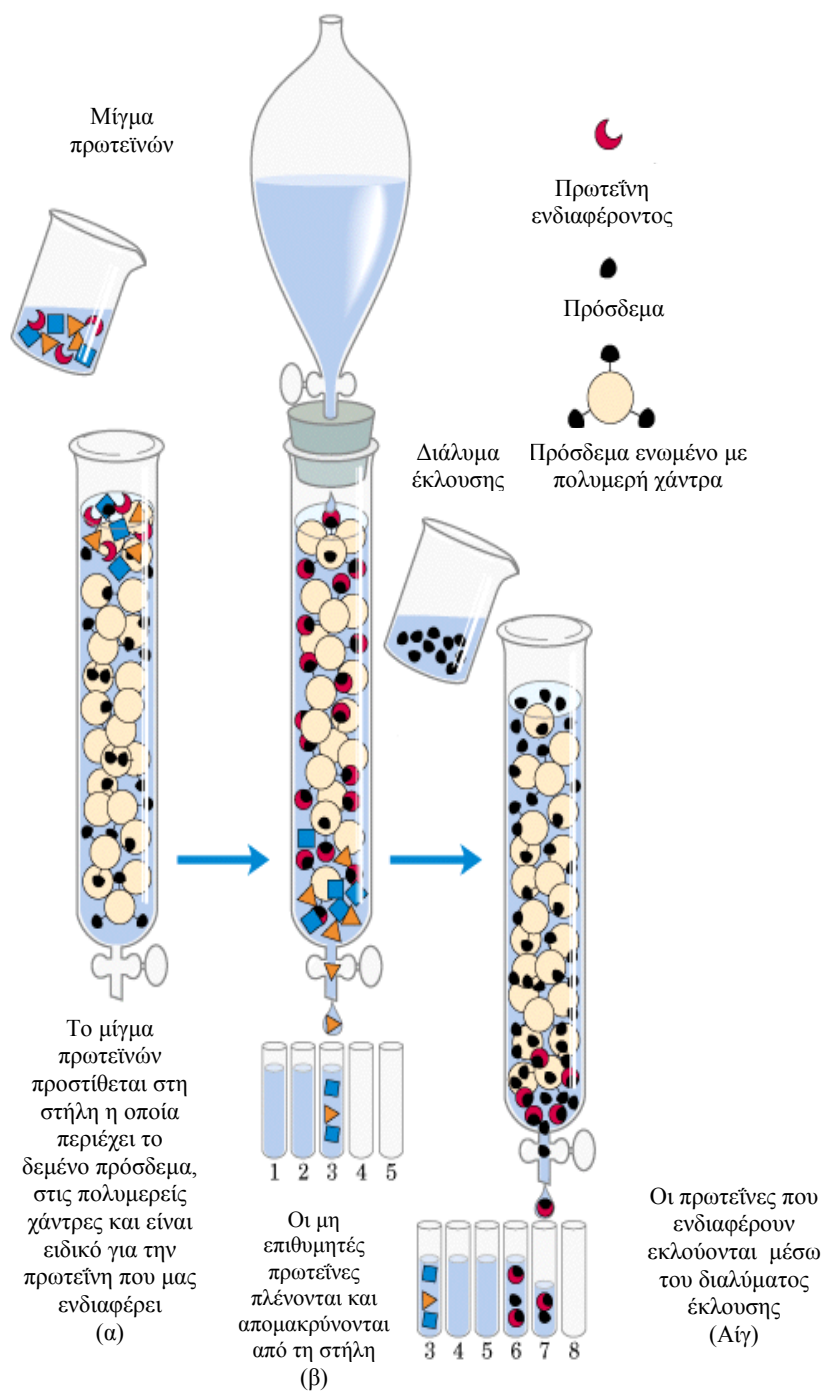
Ο καθαρισμός των ανοσοσφαιρινών με τεχνικές συγγένειας εκμεταλλεύεται τη βασική δομή τους. Δύο γενικές στρατηγικές μπορούν να συναχθούν από την αρχιτεκτονική τους. Η πρώτη εκμεταλλεύεται την ειδικότητα του αντιγόνου δέσμευσης, ενώ η δεύτερη στοχεύει στο σταθερό μέρος των αντισωμάτων, το τμήμα Fc. Αν και υπάρχει μικρή διαφορά στη χρήση του αντιγόνου για τον καθαρισμό, υπάρχουν πολύ διαφορετικά προσδέματα που στοχεύουν το τμήμα Fc (Huse *et al.*, 2002).

Η μέθοδος αυτή είναι υψηλής ακρίβειας και δίνει ανοσοσφαιρίνες υψηλής καθαρότητας. Επίσης αποτελεί μέθοδο ενός βήματος. Τα μόρια που συνδέονται με τις ανοσοσφαιρίνες ανήκουν σε τρεις βασικές ομάδες: α) τη βακτηριακή πρωτεΐνη A ή πρωτεΐνη G, β) τα ειδικά αντιγόνα, γ) τα μονοειδικά αντισώματα που προορίζονται για τις επιτόπους των ανοσοσφαιρινών (όπως goat anti-human IgG) (Layer *et al.*, 2000).

Αρχή μεθόδου χρωματογραφίας συγγένειας

Στην χρωματογραφία συγγένειας, τα δείγματα που περιέχουν ανοσοσφαιρίνες επωάζονται σε μήτρα, η οποία αποτελείται από ένα συνδετικό μόριο της ανοσοσφαιρίνης, ομοιοπολικά συνδεδεμένο σε χάντρες χρωματογραφίας. Τα μη συνδεδεμένα μόρια απομακρύνονται με πλύσιμο και οι ειδικά συνδεδεμένες ανοσοσφαιρίνες εκλύονται με τη χρήση ενός κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος (Εικ. 1-5).

Μετά την έκλυση, στα κλάσματα που λαμβάνονται είναι καλύτερα να ακολουθεί απευθείας έλεγχος ύπαρξης ανοσοσφαιρινών με ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) στα 280 nm. Εναλλακτικά, κλάσματα μπορούν να συλλέγονται και να ελέγχονται χωριστά χρησιμοποιώντας είτε απορρόφηση UV ή περισσότερο εξειδικευμένη διαδικασία (Layer *et al.*, 2000).



Εικόνα 1-5: Διαδικασία παραλαβής αντισωμάτων μέσω της χρωματογραφίας συγγένειας

Πηγή: http://www.biochem.arizona.edu/classes/bioc462/462a/NOTES/Protein_Properties/protein_purification.htm

Χρωματογραφία συγγένειας που χρησιμοποιεί ακινητοποιημένη πρωτεΐνη G και A

Αυτή η τεχνική εκμεταλλεύεται την ειδική σύνδεση της IgG σε έναν υποδοχέα όπως είναι η πρωτεΐνη G ή η πρωτεΐνη A, οι οποίες είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένες στις χάντρες χρωματογραφίας (Gapper *et al.*, 2007). Οι πρωτεΐνες αυτές επειδή συνδέονται με το σταθερό τμήμα Fc των ανοσοσφαιρινών, χαρακτηρίζονται ως Fc υποδοχείς. Η πρωτεΐνη A βρίσκεται μέσα στα βακτηριακά κυτταρικά τοιχώματα του *Staphylococcus aureus* ενώ η πρωτεΐνη G του *Streptococcus spp.* Συνδέονται με το ίδιο τμήμα των σταθερών περιοχών της IgG, υποδεικνύοντας μια συγκλίνουσα εξέλιξη των εν λόγω πρωτεϊνών. Χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα σε πολλές εφαρμογές συγγένειας, αλλά πιο κοινή μέθοδο για τον καθαρισμό αντισωμάτων αποτελεί η χρωματογραφία συγγένειας με την πρωτεΐνη A (Layer *et al.*, 2000; Huse *et al.*, 2002).

Έτοιμη προς χρήση μήτρα με ακινητοποιημένη πρωτεΐνη G ή A είναι εμπορικά διαθέσιμη και λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τις ιδιότητες δέσμευσης αυτών των δύο πρωτεϊνών, μπορούν να βρεθούν στη βιβλιογραφία ή παρέχονται από τους κατασκευαστές (Layer *et al.*, 2000).

Χρωματογραφία συγγένειας που χρησιμοποιεί ακινητοποιημένο αντί-αντίσωμα (anti-Igs)

Οι σταθερές περιοχές τόσο των βαριών όσο και των ελαφριών αλυσίδων των αντισωμάτων είναι πιθανοί στόχοι για τον καθαρισμό συγγένειας των αντισωμάτων με τη χρήση ακινητοποιημένου αντι-αντισώματος. Ειδικά για την απομόνωση μονοκλωνικών αντισωμάτων, τα οποία πολύ συχνά αντιστέκονται στον καθαρισμό από την πρωτεΐνη A ή ακόμα και την G, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η ελαφριά αλυσίδα των anti-rat IgG, αφού συνδεθεί με αγαρόζη (Huse *et al.*, 2002).

Σε αυτή τη μέθοδο, χρησιμοποιώντας αντισώματα διαφόρων ειδικοτήτων, είναι δυνατόν να απομονωθούν είτε ολικά η Igs (με τη χρήση αντι-κ και -λ αλυσίδων), είτε ειδικά Ig ισότοπα (με χρήση αντι-μ, -γ, -δ, -α ή -ε αλυσίδα) ή υποτάξεις της IgG (με τη χρήση αντι-γ1, -γ2 - γ3 ή - γ4 αλυσίδων). Η αλληλεπίδραση μεταξύ ακινητοποιημένης και στοχοποιημένης ανοσοσφαιρίνης είναι απλά ένα συγκεκριμένος τύπος αλληλεπίδρασης αντισώματος – αντιγόνου (Layer *et al.*, 2000).

Χρωματογραφία συγγένειας που χρησιμοποιεί ακινητοποιημένο αντιγόνο

Ο καθαρισμός αντισώματος με ακινητοποιημένο αντιγόνο ως πρόσδεμα συγγένειας, χρησιμοποιείται ευρέως, επειδή υπάρχει ειδική αναγνώριση αντιγόνου από το αντίσωμα. Η μέθοδος πλεονεκτεί εάν ένα συγκεκριμένο αντίσωμα, πρέπει να ληφθεί από μίγμα ανοσοσφαιρινών με διαφορετικές ειδικότητες. Ο καθαρισμός των μονοειδικών (monospecific) αντισωμάτων από ορούς ανοσοποιημένων ζώων, είναι ένα τυπικό παράδειγμα μιας τέτοιας μεθόδου. Η συχνά συμβαίνουσα διασταυρούμενη αντίδραση των αντισωμάτων μερικές φορές επιτρέπει τον καθαρισμό συγγένειας με προσδέματα διαφορετικά από το αντιγόνο που χρησιμοποιήθηκε για την ανοσοποίηση. Η προσέγγιση αυτή είναι πολύτιμη, αν π.χ., το αντιγόνο είναι ακριβό, δύσκολο στον χειρισμό ή περιοριστικό στην χρήση του.

Είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη χρωματογραφία ανοσοσυγγένειας. Στη μέθοδο αυτή ισχύουν οι ίδιες συνθήκες δέσμευσης, έκπλυσης και έκλουσης που εφαρμόζονται και για την απομόνωση των αντιγόνων με ακινητοποιημένα αντισώματα. (Huse *et al.*, 2002).

Οι παραπάνω μέθοδοι καθαρισμού αντισωμάτων αποτελούν μόνο ένα μέρος αυτών που έχουν αναπτυχθεί και περιγραφεί για τον καθαρισμό των αντισωμάτων. Πολλές παραλλαγές και/ή συνδυασμοί μεθόδων μπορούν να χρησιμοποιηθούν προκειμένου να καλυφθεί μια συγκεκριμένη ανάγκη. Βέβαια, οι διαδικασίες του καθαρισμού συγγένειας φαίνεται να αποτελούν τις πιο επιλεκτικές και εκλεκτικές μεθόδους (Layer *et al.*, 2000). Άλλες μέθοδοι χρωματογραφίας συγγένειας που δεν αναφέρθηκαν παραπάνω είναι οι: προσδέματα μιμετρικής πρωτεΐνης A (Protein-A-mimetic ligands), χρωματογραφία συγγένειας προσδέματος ιστοιδίνης (Histidine-ligand-affinity chromatography), χρωματογραφία συγγένειας μετάλλων (Metal-affinity chromatography), θειοφιλική αλληλεπίδραση (Thiophilic interaction), χρωματογραφία συγγένειας λεκτίνης (Lectin-affinity chromatography) (Huse *et al.*, 2002).

1.4 Επισήμανση αντισωμάτων (Labeling antibodies)

Πολλές ανοσολογικές τεχνικές εξαρτώνται από την χρήση των επισημασμένων αντισωμάτων. Ο βασικότερος λόγος για την επισήμανση ενός αντισώματος είναι ο

εντοπισμός του, και σε κάποιες περιπτώσεις η ποσοτικοποίησή του, όταν αυτό εμφανίζεται ανάμεσα σε μια πολύπλοκη σειρά άλλων μορίων. Επειδή τα αντισώματα παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια με το αντίστοιχο αντιγόνο τους, αν υπάρχει ένα εύκολα ανιχνεύσιμο σήμα δεσμευμένο στο αντίσωμα, επιτρέπει την ανίχνευση του αντιγόνου με ένα γρήγορο, φθηνό και ποσοτικό τρόπο.

Έτσι λοιπόν και οι ανοσολογικές μέθοδοι χρειάζονται σημασμένα αντισώματα. Στις μεθόδους αυτές, χρησιμοποιούνται διάφορα σχήματα για την εμφάνιση ή δέσμευση του αντιγόνου, το οποίο στη συνέχεια εντοπίζεται και ποσοτικοποιείται χρησιμοποιώντας ένα επισημασμένο αντίσωμα. Δηλαδή οι μέθοδοι αυτοί βασίζονται στα επισημασμένα αντισώματα για τον εντοπισμό του αντιγόνου.

Οι σημαντικότερες αποφάσεις που πρέπει να παρθούν όταν ετοιμάζεται μια τέτοια μέθοδος είναι αν θα χρησιμοποιηθούν άμεσες ή έμμεσες μέθοδοι για τον εντοπισμό του αντιγόνου και τι είδος σήμανση ταιριάζει καλύτερα στις απαιτήσεις της τεχνικής (Harlow & Lane, 1999).

1.4.1 Άμεση vs έμμεσης ανίχνευσης

Οι τεχνικές ανίχνευσης μπορούν να διαχωριστούν σε δυο βασικές κατηγορίες: άμεσες και έμμεσες. Στην άμεση τεχνική, ένα αντίσωμα καθαρίζεται, επισημαίνεται με ένα εύκολα ανιχνεύσιμο σήμα και χρησιμοποιείται για να συνδεθεί άμεσα με το αντιγόνο. Το αντιγόνο τότε ανιχνεύεται με οποιοδήποτε σήμα έχει προστεθεί στο αντίσωμα. Στην έμμεση μέθοδο, το αντίσωμα είναι μη επισημασμένο και δεν χρειάζεται να καθαριστεί. Συνδέεται με το αντιγόνο, τα μη συνδεδεμένα αντισώματα απομακρύνονται με πλύσιμο και το σύμπλεγμα αντιγόνο/αντίσωμα ανιχνεύεται με έναν δευτερεύοντα παράγοντα όπως είναι τα επισημασμένα αντισώματα αντί-ανοσοσφαιρινών. Σε όλες αυτές τις εφαρμογές το αντίσωμα που συνδέεται με το αντιγόνο αναφέρεται ως πρωτογενές, το οποίο είναι επισημασμένο στην άμεση μέθοδο αλλά μη επισημασμένο στην έμμεση. Το αντίσωμα, το οποίο δεσμεύεται στο πρωτογενές αντίσωμα είναι γνωστό ως δευτερογενές και είναι πάντα επισημασμένο.

Η επιλογή για την εφαρμογή άμεσης ή έμμεσης τεχνικής εξαρτάται από τις συνθήκες του πειράματος. Σε ανοσολογικές τεχνικές, στις οποίες απαιτείται καλή ποσοτικοποίηση, είναι σημαντική η χρήση επισημασμένων πρωτογενών αντισωμάτων (http://en.wikipedia.org/wiki/Antibody_labeling; Harlow & Lane 1999).

1.4.2 Επιλογές επισήμανσης αντισωμάτων

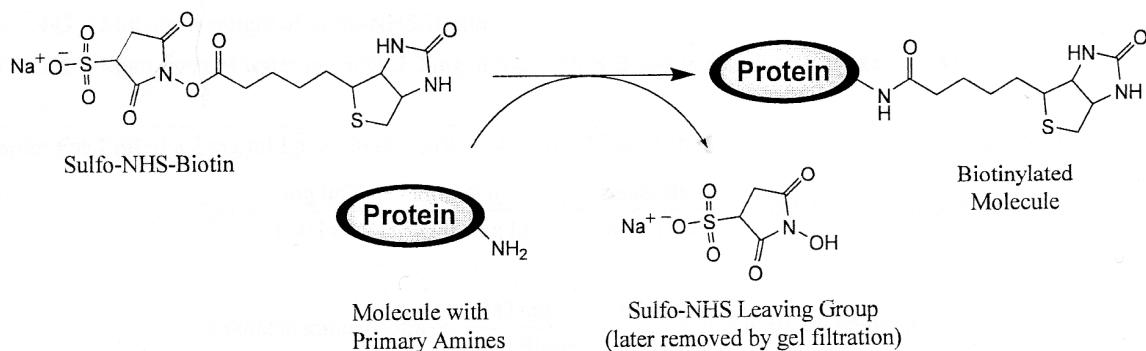
Ανεξάρτητα αν εφαρμοστεί άμεση ή έμμεση τεχνική, αποτελεί πολύ σημαντική απόφαση η επιλογή του σήματος. Στις ανοσολογικές τεχνικές μπορούν να χρησιμοποιηθούν αντισώματα συζευγμένα με ένζυμα, ιωδιωμένα ή βιοτινυλιωμένα. Γενικά, τα συζευγμένα αντισώματα με ένζυμα έχουν το πλεονέκτημα ενός άμεσου ορατού αποτελέσματος και παρουσιάζουν μεγάλη ευαισθησία αλλά είναι πιο δύσκολο να χρησιμοποιηθούν σε ποσοτικές τεχνικές. Ένας μεγάλος αριθμός ενζύμων έχει χρησιμοποιηθεί για την επισήμανση των αντισωμάτων. Τα πιο κοινά χρησιμοποιούμενα είναι η υπεροξειδάση αγριοραπανίδας (Horse Radish Peroxidase: HRP), η αλκαλική φωσφατάση και η β-γαλακτοσειδάση.

Τα επισημασμένα με ιώδιο αντισώματα, πιο συγκεκριμένα, ιωδιωμένα μονοκλωνικά αντισώματα, μπορούν να δώσουν εντυπωσιακά ακριβή ποσοτικά αποτελέσματα σε διάφορες μεθόδους. Η ιωδίωση των αντισωμάτων αποτελεί μια αποτελεσματική μέθοδο επισήμανσης. Η ευκολία της ανίχνευσης και η ποσοτικοποίηση, την καθιστά ιδανική επιλογή σε κάποιες εφαρμογές. Το πιο κοινό χρησιμοποιούμενο ραδιοϊσότοπο του ιωδίου είναι το ^{125}I , το οποίο χρησιμοποιείται σε πολλές ανοσοχημικές αναλύσεις. Η διάσπαση του ^{125}I δίνει χαμηλής ενέργειας ακτινοβολία γ και ακτίνων X και έτσι είναι εύκολο να ανιχνευθεί. Η ιωδίωση συνίσταται στην εισαγωγή του ραδιενεργού ιωδίου σε ορισμένα αμινοξέα (συνήθως τυροσίνες), σε πρωτεΐνες και πεπτίδια. Η ιωδίωση λαμβάνει χώρα στις θέσεις “ορθο” στην ομάδα υδροξυλίου στην τυροσίνη και μπορεί να προκύψει μονο-ή δι-υποκατάσταση.

Η βιοτινυλίωση των πρωτογενών αντισωμάτων είναι μια πολυεφαρμοζόμενη λύση σε πολλές δυσκολίες επισήμανσης. Τα αντισώματα μπορούν εύκολα να τροποποιηθούν και να περιέχουν βιοτίνη. Η αντίδραση βιοτινυλίωσης είναι απλή και ήπια και σπάνια αδρανοποιεί τα αντισώματα λόγω του μικρού μοριακού βάρους της βιοτίνης (MW=244.31Da). Τα βιοτινυλιωμένα αντισώματα μπορούν να ανιχνευθούν χρησιμοποιώντας στρεπταβιδίνη ή αβιδίνη συνδεδεμένη με ένζυμα, χρωστικές ουσίες φθορισμού ή ιώδιο. Αυτό επιτρέπει σε ένα καθαρό αντίσωμα μόλις συνδεθεί με τη βιοτίνη να ανιχνευθεί με κάποιο από τα πολλά διαφορετικά είδη σήμανσης. Τα δευτερογενή αντιδραστήρια, αβιδίνη και στρεπταβιδίνη, είναι εμπορικά διαθέσιμα και συνδέονται τόσο σφικτά και με τέτοια ταχύτητα όπου τα μειονεκτήματα μιας διαδικασίας που περιλαμβάνει πολλά στάδια, μειώνονται σημαντικά. Τα βιοτινυλιωμένα αντισώματα

μπορούν να αποθηκευθούν για χρόνια χωρίς να χάσουν την συγκεκριμένη δραστηριότητά τους (Harlow & Lane 1988).

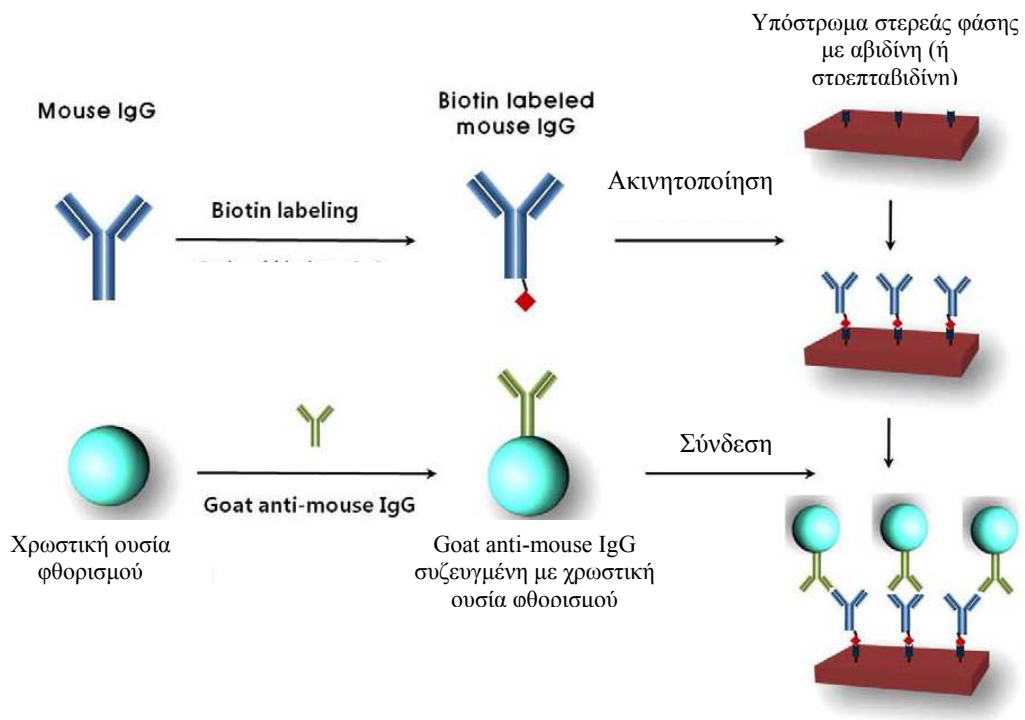
Οι περισσότερες βιοτινυλίσεις πραγματοποιούνται χρησιμοποιώντας έναν εστέρα υδροξυσουκινιμιδίου της βιοτίνης (N-hydroxysuccinimide ester of biotin). Η σύνδεση πραγματοποιείται μεταξύ των ελεύθερων αμινομάδων του αντισώματος ή άλλης πρωτεΐνης, σύμφωνα με την αντίδραση της Εικ. 1-6, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό της βιοτινυλιωμένης πρωτεΐνης (<http://en.wikipedia.org/wiki/Biotinylation>).



Εικόνα 1-6: Αντίδραση μεταξύ εστέρα υδροξυσουκινιμιδίου της βιοτίνης με πρωτεΐνη

Πηγή: <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=01030904>

Επίσης αξίζει να αναφερθεί ότι στις ανοσολογικές μεθόδους, τα αντισώματα συνήθως ακινητοποιούνται στην επιφάνεια ενός υποστρώματος στερεάς φάσης ως μοριακό στρώμα δέσμευσης (Luppa *et al.*, 2001). Το κύριο πρόβλημα στην διαδικασία ακινητοποίησης των αντισωμάτων στις επιφάνειες, είναι η μείωση της δραστηριότητας σύνδεσης λόγω του άτακτου προσανατολισμού των αντισωμάτων. Το αντίσωμα έχει μια διαμορφωμένη δομή σχήματος «Υ» με δύο θέσεις πρόσδεσης, στις δύο μεταβλητές περιοχές F(ab')_s. Η περιοχή Fc του αντισώματος θα πρέπει να συνδέεται ειδικά με την επιφάνεια του υποστρώματος στερεάς φάσης. Για την αντιμετώπιση αυτού του ζητήματος, η σύνδεση βιοτίνης-αβιδίνης (ή στρεπταβιδίνης) έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε ανοσολογικές τεχνικές για την ακινητοποίηση αντισώματος στη στερεά φάση, δεδομένου ότι αντιμετωπίζει το πρόβλημα με τον προσανατολισμό των αντισωμάτων. Ως εκ τούτου, οι F(ab') περιοχές του βιοτινυλιωμένου αντισώματος εκτίθενται στα μόρια στόχο, αφού πρώτα το βιοτινυλιωμένο αντίσωμα έχει συνδεθεί με την αβιδίνη (ή στρεπταβιδίνη) αφού η βιοτίνη ειδικότερα επισημαίνεται στην Fc περιοχή των αντισωμάτων (Εικ. 1-7) (Ahluwalia *et al.*, 1991).



Εικόνα 1-7: Σύνδεση βιοτινυλιωμένου αντισώματος με υπόστρωμα στερεάς φάσης επικαλυμένο με αβιδίνη (ή στρεπταβιδίνη)

Πηγή: Lee et al., 2010

1.5 Εφαρμογή ανοσολογικών μεθόδων για τον προσδιορισμό της ανοσοσφαιρίνης IgG και την ανίχνευση της νοθείας στο γάλα

Οι ανοσολογικές μέθοδοι είναι κατάλληλες για την ανίχνευση ειδικών κλασμάτων βόειων, πρόβειων ή αίγειων πρωτεϊνών γάλακτος. Βασίζονται στην αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος, χρησιμοποιώντας μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά αντισώματα. Τα αντισώματα αυτά αντιδρούν με τις πρωτεΐνες ορού ή τα κλάσματα καζεϊνών του γάλακτος (Grappin *et al.*, 2004).

Θεωρούνται εξαιρετικές για την αντικατάσταση των συμβατικών αναλυτικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση του ζωικού είδους του γάλακτος. Διακρίνονται για την υψηλή εξειδίκευση, τα χαμηλά όρια ανίχνευσης, καθώς και το μικρό κόστος (Haza *et al.*, 1999).

Έχουν περιγραφεί ανοσολογικές τεχνικές όπως η Ακτινωτή Ανοσοδιάχυση (Radial immunodiffusion, RID), η Νεφελομετρία (Nephelometric immunoassay), η Ανοσοηλεκτροφόρηση (Immunoelectrophoresis) και η Ενζυμική Ανοσοπροσροφητική

Μέθοδος προσδιορισμού (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) όπως επίσης έχει αναφερθεί και η τεχνική Surface Plasmon Resonance (SPR) που βασίζεται στη μορφή βιοαισθητήρα.

1.5.1 Ακτινωτή ανοσοδιάχυση (Radial immunodiffusion, RID)

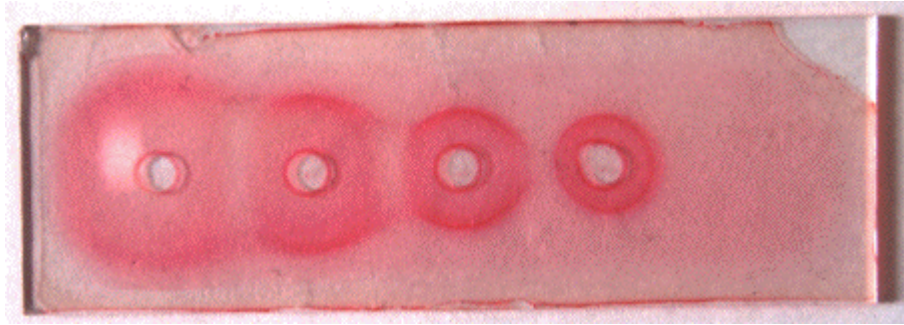
Μέχρι σήμερα, αυτή ήταν μια εξαιρετικά δημοφιλής τεχνική λόγω της ευρείας διαθεσιμότητας και της απλότητάς της. Παρόλα αυτά μπορεί να είναι χρονοβόρα και έχει αποδειχθεί ότι πάσχει από την χαμηλή ποσοτική ακρίβειά της (Gapper *et al.*, 2000).

Βασίζεται στην αλληλεπίδραση αντιγόνου-αντισώματος και τη σήμανση του συμπλέγματος που σχηματίζεται από αυτά με ραδιενεργό δείκτη (Chu, 2003). Η αρχή της μεθόδου είναι απλή: το αντιγόνο διαχέεται σε πηκτή αгарόζης, στην οποία το αντίσωμα είναι ομοιόμορφα κατανομημένο. Η περιοχή του ιζήματος που σχηματίζεται όταν η διάχυση ολοκληρωθεί (διάμετρος δακτυλίου), είναι ανάλογη με την ποσότητα του παρόντος αντιγόνου (Jalanti & Henney, 1972). Εν συνεχεία κατασκευάζεται μια καμπύλη βαθμονόμησης με πρότυπα γνωστής συγκεντρώσεως, και τα άγνωστα "διαβάζονται" από αυτή την καμπύλη (Εικ. 1-8). Πολλά διαφορετικά πακέτα είναι διαθέσιμα στο εμπόριο, ωστόσο, είναι σημαντικό να λαμβάνεται υπόψη ότι η μέθοδος του πρωτογενούς προτύπου ποσοτικοποίησης μπορεί να διαφέρει μεταξύ των κατασκευαστών, με αποτέλεσμα να υπάρχει σημαντική διακύμανση στην εκτιμώμενη ποσότητα IgG, όταν χρησιμοποιούνται kits από διαφορετικούς κατασκευαστές (Gapper *et al.*, 2000).

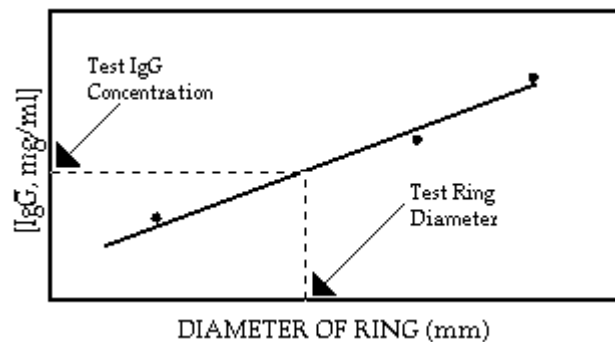
Ο Levieux (1977), ανέπτυξε μέθοδο ακτινωτής ανοσοδιάχυσης, την οποία εφάρμοσε σε νωπό γάλα αλλά και σε γάλα που δεν είχε θερμανθεί σε υψηλές θερμοκρασίες και προσδιόρισε με αυτήν νοθεία μέχρι 1%. Όταν χρησιμοποιείται αντιορός αγελαδινού γάλακτος για την ανίχνευση της νοθείας του πρόβειου και αίγειου γάλακτος με αγελαδινό, η τεχνική της ακτινωτής ανοσοδιάχυσης εμφανίζεται με την ονομασία CV Test και BC Test, όταν χρησιμοποιείται αντιορός αίγειου γάλακτος για την ανίχνευση νοθείας του πρόβειου γάλακτος με αίγιο.

Οι Ανυφαντάκης κ.ά., (1985), μελέτησαν τη δυνατότητα εφαρμογής της παραπάνω μεθόδου του Levieux (CV Test) για τον προσδιορισμό της νοθείας σε φέτα με βάση το πρόβειο γάλα, όταν έχει πρόσμιξη και νοθεία με αγελαδινό. Βρέθηκε ότι ενώ η μέθοδος αυτή μπορεί να εφαρμοστεί για ποσοτικό προσδιορισμό νοθείας πρόβειου γάλακτος με αγελαδινό εξίσου αποτελεσματικά στο νωπό και το παστεριωμένο γάλα

(63°C για 30min ή 72°C για 16sec), δεν μπορεί να εφαρμοστεί για τον ποσοτικό προσδιορισμό νοθείας φέτας πρόβειου γάλακτος με νωπό ή παστεριωμένο αγελαδινό γάλα. Αντίθετα ήταν δυνατός ο ποιοτικός προσδιορισμός νοθείας με 5% αγελαδινό τις πρώτες 10 ημέρες της ωρίμανσης των τυριών.



(α)



(β)

Εικόνα 1-8: Μέθοδος Ακτινωτής ανοσοδιάχυσης

(α) Σχηματιζόμενοι δακτύλιοι από την διάχυση του αντιγόνου στην πηκτή (β) Πρότυπη καμπύλη.

Πηγή: <http://www.medschool.lsuhs.edu/microbiology/DMIP/dmex03.htm>

1.5.2 Ανοσοηλεκτροφόρηση (Immunoelectrophoresis)

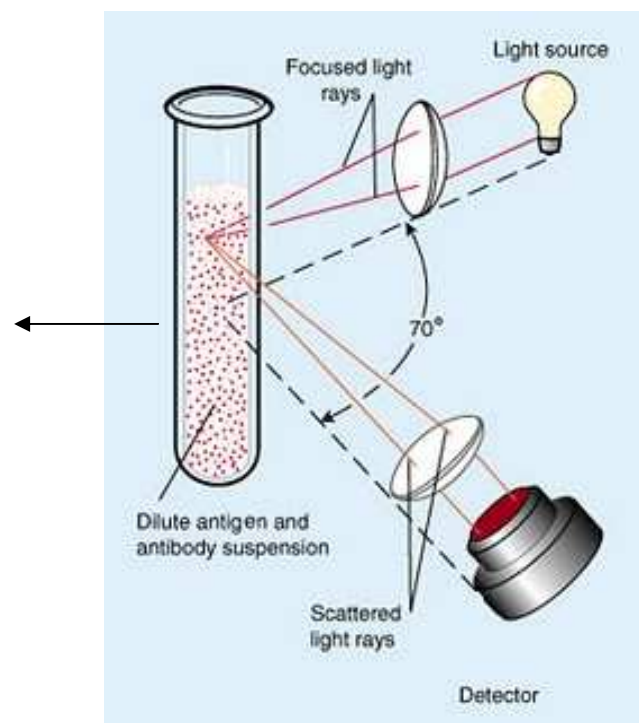
Και στην μέθοδο αυτή, όπως και στην ακτινωτή ανοσοδιάχυση, η παρουσία του αντισώματος (ή αντιγόνου) στο δείγμα προκαλεί την δημιουργία ιζήματος σε αгарόζη που περιέχει αντιγόνο (ή αντίσωμα). Στην μέθοδο όμως αυτή προηγείται διαχωρισμός των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση, πριν την επώαση τους με αντισώματα, σε παράλληλες γραμμές και τελικά την δημιουργία τόξων ιζήματος (Wild, 2005).

1.5.3 Νεφελομετρία (Nephelometric immunoassay)

Όταν μια δέσμη φωτός εισέρχεται σε θολό διάλυμα, μέρος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας απορροφάται, ένα μέρος διαπερνά το διάλυμα και ένα άλλο διαχέεται από τα μόρια. Νεφελομετρία λοιπόν είναι ο προσδιορισμός της σκέδασης του φωτός που εισέρχεται σε θολό διάλυμα (Εικ. 1-9) (Eisenhauer *et al.*, 1984). Βασίζεται στο γεγονός ότι τα συμπλέγματα αντιγόνου-αντισώματος είναι μη διαλυτά, οπότε το διάλυμα διαχέει το φως, ή γίνεται πιο θολό (απορροφά το φως), όπου σε αυτή την περίπτωση αναφέρεται ως θολομετρία (Nakamura *et al.*, 1992; Wild, 2005). Παράγεται λοιπόν ένα σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος που διαχέει το φως σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι τα μη συνδεδεμένα συστατικά. Η περίσσεια της σκέδασης του φωτός συνδέεται αναλογικά με την συγκέντρωση των IgG1 στο δείγμα (Gapper *et al.*, 2000).

Αποτελεί μια εύκολη μέθοδο στην εφαρμογή της, γρήγορη, ευαίσθητη και είναι ακριβής (Montagne *et al.*, 1991), αλλά η απαιτούμενη σχετικά χρονοβόρος προετοιμασία των δειγμάτων περιορίζει τη χρήση της για αναλύσεις ρουτίνας (Campanella *et al.*, 2009).

Το εναιώρημα που περιέχει τα συμπλέγματα αντιγόνου αντισώματος προκαλεί σκέδαση του φωτός. Το ποσό του σκεδασμένου φωτός καθορίζεται με ανιχνευτές μετά από τη συλλογή του φωτός υπό γωνία (συνήθως περίπου 70-75 °).



Εικόνα 1-9: Σχηματική απεικόνιση μεθόδου νεφελομετρίας

Πηγή: http://mines45.multiply.com/journal/item/380/M.E.D.T.E.C.H._Entry_No._151_Advanced_Hematology_Report_Serum_Iron_Ferritin_and_Transferrin

Οι Collin *et al.*, (2002), ανέπτυξαν μια νεφελομετρική ανοσολογική μέθοδο για τον προσδιορισμό της ανοσοσφαιρίνης στο αγελαδινό γάλα, με εύρος ανίχνευσης 0,3-5 g IgG₁/l. Η μέθοδος δεν εμφάνισε σημαντική διασταυρούμενη αντίδραση με τις: α_{s1}-καζεΐνη, α_{s2}-καζεΐνη, β-καζεΐνη, κ-καζεΐνη ή β-lactoglobulin και εμφάνισε 39% διασταυρούμενη αντίδραση με την IgG₂. Η νεφελομετρική αυτή μέθοδος συγκρίθηκε με ELISA και RID. Το συμπέρασμα ήταν ότι πρόκειται για αξιόπιστη, γρήγορη και εύκολη μέθοδο, κατάλληλη για τον προσδιορισμό της ποσότητας IgG₁ στο γάλα. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί στα εργαστήρια των γαλακτοκομικών προϊόντων για αναλύσεις ρουτίνας για την ποιοτική κατάταξη του γάλακτος μέσω του προσδιορισμού της IgG₁.

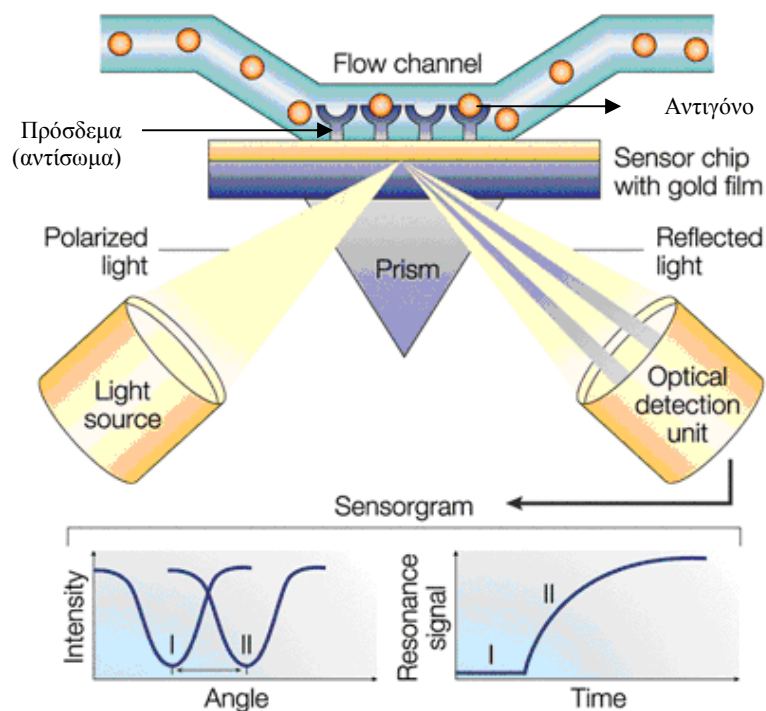
Μια νεφελομετρική ανοσολογική μέθοδος αναπτύχθηκε από τους Marchal *et al.*, (1991), για τον προσδιορισμό των α-λακταλβουμίνης και β-λακτοσφαιρίνης στο αγελαδινό γάλα, ορό και τυρόπηγμα από μαλακό τυρί (Camembert) και πιεσμένο τυρί (Saint Paulin). Χρησιμοποιήθηκαν αραιωμένο γάλα, ορός γάλακτος, και δείγματα διαλυμένου τυροπήγματος χωρίς προεπεξεργασία, τα οποία αναμίχθηκαν με μικροσφαιρίδια επικαλυμένα με α-λακταλβουμίνη ή β-λακτοσφαιρίνη, όπως επίσης χρησιμοποιήθηκαν πολύ αραιωμένη ειδική αντι-α-λακταλβουμίνη ή ειδική αντι-β-λακτοσφαιρίνη συγκεκριμένου αντιορού. Μετά από αντίδραση μιας ώρας, το φώς διαχύθηκε από τις συσπειρώσεις των επενδεδυμένων μικροσφαιριδίων και μετρήθηκε με νεφελόμετρο. Η ανάκτηση (97,2 έως 102,2%) όπως και οι συντελεστές διακύμανσης (1,4 έως 6,1% για το γάλα και τον ορό γάλακτος αντίστοιχα), απέδειξαν την αξιοπιστία αυτής της μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών ορού γάλακτος.

1.5.4 Μέτρηση με βιοαισθητήρες (Surface Plasmon Resonance, SPR)

Η μέθοδος αυτή αποτελεί μια αξιόπιστη τεχνική, αυτοματοποιημένη και έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα χρήσιμη για τον προσδιορισμό πρωτεϊνών μικρών συγκεντρώσεων. Έτσι έχει χρησιμοποιηθεί και για την ανάλυση των μικρής συγκέντρωσης πρωτεϊνών γάλακτος (Gapper *e. al.*, 2000).

Οι βιοαισθητήρες ορίζονται ως αναλυτικά συστήματα αποτελούμενα από ένα ακινητοποιημένο βιολογικό υλικό που βρίσκεται σε πολύ στενή επαφή με κατάλληλη συσκευή αισθητήρα που μετατρέπει το βιοχημικό σήμα σε μετρήσιμο ηλεκτρικό (Grappin *et al.*, 2004). Ένα σύστημα SPR απαιτεί μια πηγή φωτός laser, έναν ανιχνευτή, ένα γυάλινο πρίσμα και μια επιφάνεια μετάλλου, συνηθέστερα χρυσού (Εικ. 1-10) (Indyk, 2006). Μια τροποποιημένη επιφάνεια μετάλλου του βιοαισθητήρα από

ομοιοπολικά συνδεδεμένο πρόσδεμα, χρησιμοποιείται για την στήριξη μιας αλληλεπιδρόμενης δέσμευσης και για ποσοτικούς προσδιορισμούς της συγκέντρωσης πρωτεΐνης. Το ακινητοποιημένο πρόσδεμα είναι συνήθως ένα ειδικό αντίσωμα. Το δείγμα ρέει στην επιφάνεια για να επιτραπεί η σύνδεση με το αντιγόνο - στόχο σε καθορισμένο χρόνο, πριν εκτελεστεί το βήμα για να περάσει το επόμενο δείγμα από την επιφάνεια. Αυτή η ομοιοπολική ένωση του αντισώματος με το αντιγόνο, οδηγεί σε αλλαγές στο δείκτη διάθλασης, οι οποίες καταγράφονται ως μονάδες συντονισμού (resonance units) σε ένα τυπικό σενσογράφημα σε συνάρτηση με το χρόνο (Grappin *et al.*, 2004; Indyk, 2006; Gutierrez-Gallego *et al.*, 2009).



Εικόνα 1-10: Σχηματική αποϊκόνιση SPR και σενσογράφημα

Πηγή: http://www.nature.com/nrd/journal/v1/n7/fig_tab/nrd838_F2.html

Οι Indyk & Filonzi (2003), ανέπτυξαν έναν αυτοματοποιημένο βιοαισθητήρα SPR για τον προσδιορισμό της ανοσοσφαιρίνης G (IgG) σε αγελαδινό γάλα και σε πρωτόγαλα, χρησιμοποιώντας ως μόρια ανίχνευσης rabbit ή goat anti-bovine IgG ή πρωτεΐνη G. Οι παράμετροι της μεθόδου συμπεριελάμβαναν εύρος λειτουργίας από 15 έως 10.000 ng / mL, όριο ανίχνευσης 0,08 mg / mL και σχετική τυπική απόκλιση (RSDR) 0,47%.

Οι Haasnoot *et al.*, (2004) χρησιμοποίησαν μονοκλωνικά αντισώματα έναντι των αγελαδινών κ-καζεϊνών σε αυτοματοποιημένο οπτικό βιοαισθητήρα για την ανίχνευση

αγελαδινού γάλακτος σε αίγιο και πρόβιο γάλα με όριο ευαισθησίας ανίχνευσης 0,1 & και εύρος μέτρησης 0,1-10% αγελαδινού γάλακτος.

1.5.5 Ενζυμική Ανοσοπροσροφητική Μέθοδος Προσδιορισμού (Enzyme-Linked Immunosorbent Assays, ELISAs)

Από το 1990, η ELISA αποτελεί την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη ανοσολογική μέθοδο για την ανίχνευση νοθείας γάλακτος διαφορετικών ζωικών ειδών. Είναι ένα απλό, ευαίσθητο, γρήγορο, αξιόπιστο και ευέλικτο σύστημα ποσοτικού προσδιορισμού αντιγόνων και αντισωμάτων. Στηρίζεται στην ανάπτυξη και εμφάνιση χρώματος από ένα αντίσωμα ή αντιγόνο που φέρει ένα ένζυμο-δείκτη (συνήθως υπεροξειδάση ή αλκαλική φωσφατάση), το οποίο προκαλεί υδρόλυση ενός χρωμογόνου υποστρώματος. Μπορεί να ανιχνεύσει ποσότητα αντιγόνου 10pg/ml, γεγονός, το οποίο εξαρτάται από τη σχέση μεταξύ των διαθέσιμων αντισωμάτων και τη διαμόρφωση της δοκιμασίας. Η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι άμεσα αναλογική με την συγκέντρωση των προτύπων που χρησιμοποιούνται στη δοκιμασία, όπως και με το αντιγόνο που περιέχεται στο αναλυόμενο δείγμα. Οι ELISAs είναι διαθέσιμες εμπορικά με τη μορφή των 96 μικροκυψελίδων που επιτρέπουν τη χρήση μικρών ποσοτήτων δείγματος και την γρήγορη ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων. Τα αποτελέσματα λαμβάνονται από ειδικά σχεδιασμένα πολυδιαυλικά φασματοφωτόμετρα (Moatsou & Anifantakis, 2003).

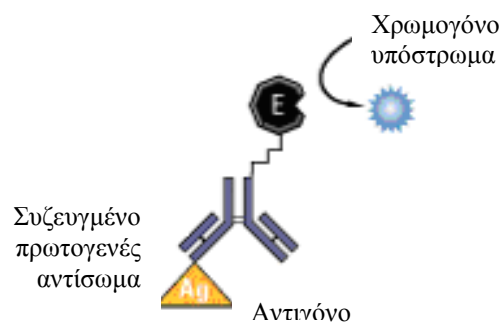
Στις μεθόδους ELISA, για την ανίχνευση των συστατικών τροφίμων μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολυκλωνικά και μονοκλωνικά αντισώματα. Τα πολυκλωνικά αντισώματα προσφέρουν έναν αριθμό πλεονεκτημάτων όπως την αναγνώριση ενός μίγματος με διαφορετικούς επιτόπους των αντιγόνων, μεγαλύτερη ανεκτικότητα στις μικρές αλλαγές στη φύση του αντιγόνου, όπως πολυμερισμό ή ελαφριά μετουσίωση και αποτελούν την προτιμώμενη επιλογή για ανίχνευση μετουσιωμένων πρωτεϊνών. Βέβαια παρουσιάζουν κάποιους περιορισμούς όπως, μεταβλητή συγγένεια, περιορισμένη παραγωγή και απαιτούν διαδικασίες εκτεταμένης καθαρότητας, για την εξάλειψη διασταυρούμενης αντίδρασης για ένα συγκεκριμένο προσδιορισμό ζωικών ειδών. Αντιθέτως, τα μονοκλωνικά αντισώματα πρωτεϊνών είναι ένας ομοιογενής πληθυσμός αντισωμάτων, που παράγονται με τεχνολογία υβριδώματος και τα οποία έχουν καθορισμένη βιολογική δραστηριότητα, συνεχή ιδιαιτερότητα και η παραγωγή τους μπορεί να είναι απεριόριστη. Τόσο τα πολυκλωνικά όσο και τα μονοκλωνικά αντισώματα

χρησιμοποιούνται στις διάφορες μεθόδους ELISA που περιγράφηκαν παραπάνω (Asensio *et al.*, 2008).

Υπάρχουν τρεις βασικές μέθοδοι που διαμορφώνουν την δομή όλων των ELISA: α) Άμεση (Direct ELISA), β) Έμμεση (Indirect ELISA) και γ) Sandwich ELISA. Και τα τρία αυτά συστήματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να διαμορφώσουν τη βάση μιας ομάδας δοκιμών που ονομάζονται ανταγωνιστικές (Competitive Assays) (Crowther, 2001).

1.5.5.1. Άμεση (Direct ELISA)

Αποτελεί την απλούστερη τεχνική ELISA (Crowther, 2001). Το αντίσωμα ή το αντιγόνο έρχεται σε επαφή με μια στερεά φάση και αντιδρά άμεσα με ένα αντιγόνο ή αντίσωμα αντιστοίχως που φέρει ένα ένζυμο δείκτη (Εικ. 1-11) (Moatsou & Anifantakis, 2003).



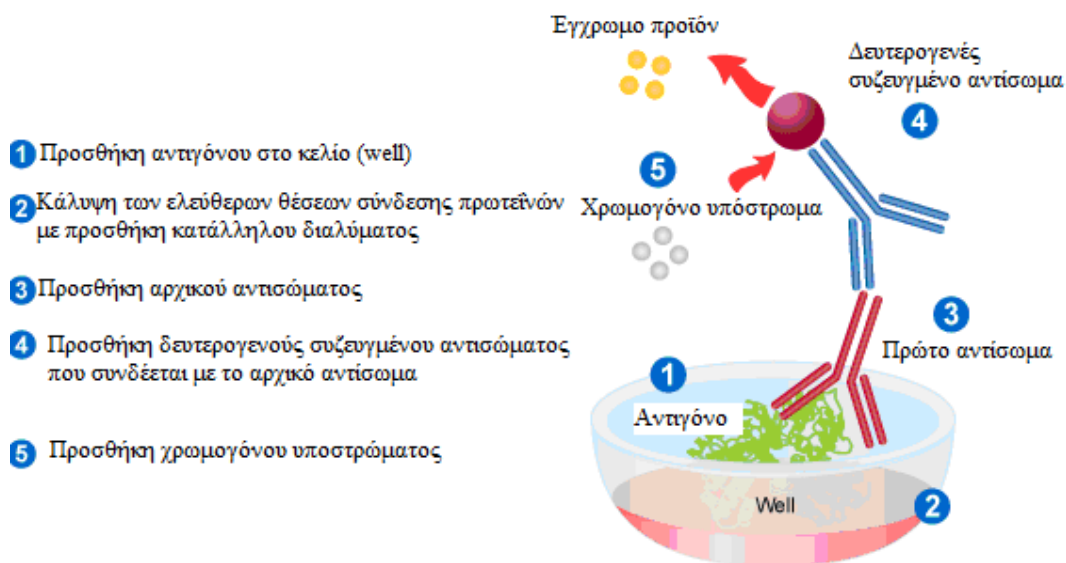
Εικόνα 1-11: Άμεση τεχνική Elisa

Πηγή: <http://www.piercenet.com/proteomics/browse.cfm?fldID=f88adec9-1b43-4585-922e-836fe09d8403>

1.5.5.2. Έμμεση (Indirect ELISA)

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για την ανίχνευση αντισωμάτων αντί - αντιγόνων. Τα αντιγόνα είναι και πάλι άμεσα συνδεδεμένα στη στερεά φάση και τα αντισώματα που αναπτύσσονται σε ένα συγκεκριμένο είδος, αντιδρούν με τα αντιγόνα αυτά. Οποιοδήποτε συνδεδεμένο αντίσωμα ανιχνεύεται με προσθήκη αντί-ορού που φέρει ένα ένζυμο δείκτη (Crowther, 2001; Moatsou & Anifantakis, 2003). Η διαδικασία απεικονίζεται σχηματικά στην εικόνα 1-12.

Indirect ELISA



Εικόνα 1-12: Σχηματική απεικόνιση έμμεσης ELISA

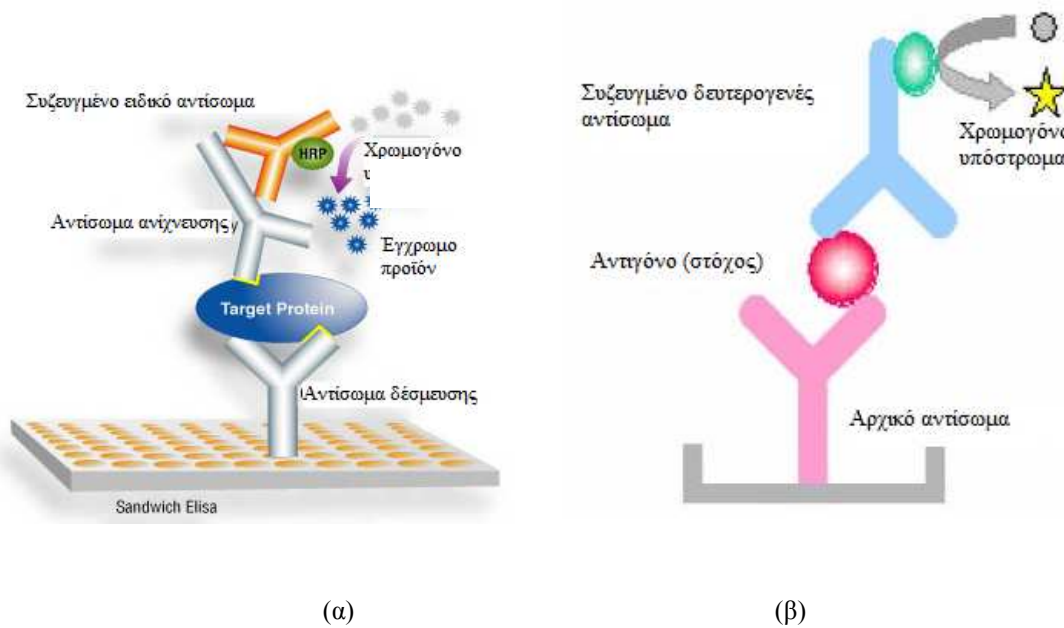
Πηγή: http://www.leinco.com/indirect_elisa

1.5.5.3. Sandwich ELISA

Η sandwich ELISA αποτελεί την πιο εξειδικευμένη και ευαίσθητη μέθοδο ELISA. Το αντιγόνο ενώνεται με δυο αντισώματα, το αντίσωμα δέσμευσης και το αντίσωμα ανίχνευσης. Η μέθοδος αυτή μπορεί να διακριθεί σε δυο επιμέρους μορφές, την άμεση μορφή και την έμμεση μορφή (Chu, 2003).

Στην άμεση μορφή τα αντισώματα είναι συνδεδεμένα στη στερεά φάση για να δεσμεύσουν τα αντιγόνα. Αυτή η δέσμευση ανιχνεύεται με τη χρήση εξειδικευμένου για το αντιγόνο ορού, που φέρει ένα ένζυμο δείκτη. Η δέσμευση και η ανίχνευση αντισώματος μπορεί να είναι από τον ίδιο τον ορό ή από διαφορετικές πηγές. Το αντιγόνο πρέπει να έχει τουλάχιστον δυο διαφορετικές αντιγονικές πλευρές, αφού τόσο το αντίσωμα δέσμευσης όσο και το αντίσωμα ανίχνευσης πρέπει να συνδεθούν (Εικ 1-13) (Moatsou & Anifantakis, 2003).

Στην έμμεση μορφή, το αντίσωμα ανίχνευσης είναι από διαφορετικό ζωικό είδος από το αντίσωμα δέσμευσης. Ένα αντίσωμα αντί-είδους που φέρει ειδικό ένζυμο συνδέεται με το αντίσωμα ανίχνευσης συγκεκριμένα και όχι με το αντίσωμα δέσμευσης (Moatsou & Anifantakis, 2003).



Εικόνα 1-12: (α) Έμμεση sandwich Elisa, (β) Άμεση sandwich ELISA,

Πηγή: <http://www.fomobio.com/MoELISAKit.html>

1.5.5.4. Ανταγωνιστικές τεχνικές

Αυτές μπορεί να είναι άμεσες ή έμμεσες καθώς και αντιγόνου ή αντισώματος. Δυο αντιδρώντα (αντισώματα ή αντιγόνα) προσπαθούν να συνδεθούν με ένα τρίτο. Περιλαμβάνουν την ταυτόχρονη προσθήκη των δυο ανταγωνιστών (Moatsou & Anifantakis, 2003).

Οι ανοσολογικές μέθοδοι, είναι ποσοτικές μέθοδοι, οι οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την ανίχνευση νοθείας στο γάλα (Anguita *et al.*, 1997; Beer *et al.*, 1996; Haza *et al.*, 1999; Hurley *et al.*, 2004; Richter *et al.*, 1997). Η πλειοψηφία των ανοσολογικών αυτών μεθόδων έχουν χρησιμοποιήσει αντισώματα, τα οποία αναπτύχθηκαν έναντι των πρωτεϊνών γάλακτος που βρίσκονται σε αφθονία, όπως είναι οι καζεΐνες ή γαλακτοσφαιρίνες. Βέβαια αυτές οι πρωτεΐνες στόχοι είναι επιρρεπείς στην πρωτεόλυση και οι καζεΐνες είναι συχνά φτωχά ανοσογόνα (Levieux & Venien, 1994). Επίσης, επειδή υπάρχει ομοιότητα μεταξύ της πρωτοταγούς δομής των καζεϊνών, πολλές μέθοδοι παρουσιάζουν μικρή ικανότητα να ξεχωρίσουν γάλα που προέρχεται από στενά συσχετιζόμενα είδη ζώων όπως είναι π.χ. από αγελάδα και βούβαλο, από πρόβατο και αίγα (Bottero *et al.*, 2002).

Οι Song *et al.*, (2011), ανέπτυξαν μια έμμεση τεχνική ELISA, με χρήση πολυκλωνικών αντισωμάτων εναντίον της β-καζεΐνης, για να προσδιορίσουν ποσοτικά τη

νοθεία του αίγιου γάλακτος με αγελαδινό. Τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου αυτής ήταν 2% για τα διάφορα είδη γάλακτος, συμπεριλαμβανομένου νοπού και θερμικά επεξεργασμένου γάλακτος. Η νοθεία μπορεί να ποσοτικοποιηθεί σε ένα εύρος από 2% έως 50%, πράγμα πολύ ελκυστικό, όταν μια τεχνική προορίζεται για χρήση σε αναλύσεις γαλακτοκομικών προϊόντων μεγάλης κλίμακας. Τα πολυκλωνικά αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν, πρώτα τροποποιήθηκαν με ανάμειξή τους με λυοφιλοποιημένη αίγια β-καζεΐνη και τα μπλοκαρισμένα αντισώματα που προέκυψαν δεν εμφάνισαν διασταυρούμενη αντίδραση με βόεια α_1 -καζεΐνη και με τις πρωτεΐνες του ορού γάλακτος.

Οι Rolland *et al.*, (1993), χρησιμοποίησαν πολυκλωνικά αντισώματα έναντι του αγελαδινού κλάσματος της α_{s1} -καζεΐνης [α_{s1} -CN f(140-149)] και μπόρεσαν να ανιχνεύσουν αγελαδινό γάλα σε πρόβειο γάλα και τυρί με όρια ανίχνευσης 0,125% και 0,5% αντίστοιχα. Η μέθοδος αυτή δεν επηρεάστηκε από την θερμική επεξεργασία του γάλακτος.

Οι Richter *et al.*, (1997), ανέπτυξαν μια έμμεση ανταγωνιστική τεχνική ELISA με την οποία ανίχνευσαν 0,1% αγελαδινού γάλακτος σε πρόβειο και αίγιο γάλα και τυρί. Για τη μέθοδο αυτή χρησιμοποίησαν πολυκλωνικά αντισώματα έναντι των γ_3 -καζεϊνών, που αναπτύχθηκαν σε κουνέλια και κοτόπουλα, και η τεχνική δεν επηρεάστηκε από την ένταση της θερμικής επεξεργασίας του αγελαδινού γάλακτος

Οι Rodriguez *et al.*, (1991), διαμόρφωσαν μια έμμεση ELISA για την ανίχνευση διαφόρων ποσοστών αίγιου γάλακτος (1-25%) σε πρόβειο γάλα και τυρί. Για τη μέθοδο χρησιμοποιήθηκαν πολυκλωνικά αντισώματα έναντι των αίγιων καζεϊνών. Η ανάλυση δειγμάτων πρόβειου γάλακτος και τυριού που περιείχαν διαφορετικές ποσότητες αίγιου γάλακτος επηρέασε το χρώμα που αναπτύχθηκε από την ενζυμική τροποποίηση του υποστρώματος και παρατηρήθηκαν σαφείς διαφορές της οπτικής πυκνότητας ανάλογες με την ποσότητα του προστιθέμενου αίγιου γάλακτος.

Οι Rodriguez *et al.*, (1993) διαμόρφωσαν μια sandwich ELISA για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό αγελαδινού γάλακτος σε πρόβειο γάλα και τυρί με τη χρήση πολυκλωνικών αντισωμάτων έναντι των αγελαδινών καζεϊνών. Η μέθοδος είχε όριο ανίχνευσης 0,5-15% και 0,5-25% αγελαδινού γάλακτος σε πρόβειο γάλα και τυρί.

Μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της αίγιας α_{s2} -καζεΐνης έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό αίγιου γάλακτος σε πρόβειο γάλα (Haza *et al.*, 1996) και πρόβειο τυρί (Haza *et al.*, 1999). Το όριο ανίχνευσης των μεθόδων και στις δυο αυτές περιπτώσεις ανέρχεται σε 0,5% αίγιου γάλακτος.

Οι Lopez-Calleza *et al.*, (2007), χρησιμοποίησαν μια έμμεση ELISA, κατά την οποία αξιοποίησαν μονοκλωνικά αντισώματα (AH4) έναντι της αγελαδινής β-καζεΐνης, για την ανίχνευση μικρού ποσοστού αγελαδινού γάλακτος ($\geq 1\%$) σε πρόβειο και αίγιο τυρί.

Οι Hurley *et al.*, (2004), ανέπτυξαν μια έμμεση, ανταγωνιστική ELISA για την ταχεία ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος στο γάλα των αιγών, προβάτων και βουβαλιών. Χρησιμοποίησαν μονοκλωνικά αντισώματα τα οποία αναπτύχθηκαν κατά της βόειας IgG. Τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου ήταν 1,0 $\mu\text{g} / \text{mL}$ βόειας IgG, ή 0,1% νοθεία με αγελαδινό γάλα. Η δοκιμή εμφάνισε καλή επαναληψιμότητα ($\text{CV} < 10\%$) και τα αποτελέσματα ήταν εξίσου ικανοποιητικά όταν χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση βόειας IgG σε μίγματα με τα τρία ζωικά είδη γάλακτος. Η μέθοδος παρουσίασε την ίδια ευαισθησία όταν εφαρμόστηκε σε παστεριωμένο γάλα, αλλά δεν ίσχυσε το ίδιο και στην UHT θερμική επεξεργασία του γάλακτος, στην οποία προκλήθηκε μετουσίωση του επιτόπου στόχου.

Επειδή η μέθοδος αυτή είχε χαμηλότερη ευαισθησία όταν εφαρμόστηκε σε τυριά, δυο χρόνια αργότερα οι Hurley *et al.*, (2006), ανέπτυξαν μια sandwich ELISA χρησιμοποιώντας τα ίδια μονοκλωνικά αντισώματα σε συνδυασμό με ένα goat anti-bovine IgG. Τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου στο γάλα ήταν 0,001% νοθεία με αγελαδινό γάλα σε πρόβειο ή βουβαλίσιο και 0,01% νοθεία με αγελαδινό γάλα σε αίγιο. Τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου σε μαλακό τυρί ήταν 0,001% στο αίγιο τυρί και 0,01% στο πρόβειο ή βουβαλίσιο τυρί. Επίσης ήταν ο $\text{CV} < 10\%$ και η ευαισθησία της μεθόδου δεν επηρεάστηκε από την παστερίωση του γάλακτος αλλά στην UHT θερμική επεξεργασία δεν μπόρεσε να ανιχνεύσει την νοθεία λόγω της μετουσίωσης του επιτόπου στόχου.

Στον Πίνακα 1-5 περιλαμβάνονται συγκεντρωτικά οι παραπάνω ανοσολογικές μέθοδοι που έχουν εφαρμοστεί από διάφορους ερευνητές για την ανίχνευση νοθείας, τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για το σκοπό αυτό, όπως και τα όρια ανίχνευσης νοθείας που προσδιορίστηκαν.

Πίνακας 1-5: Εφαρμοζόμενες ανοσολογικές μέθοδοι ανίχνευσης νοθείας, χρησιμοποιούμενα αντισώματα και όρια ανίχνευσης νοθείας με βάση τις μεθόδους αυτές

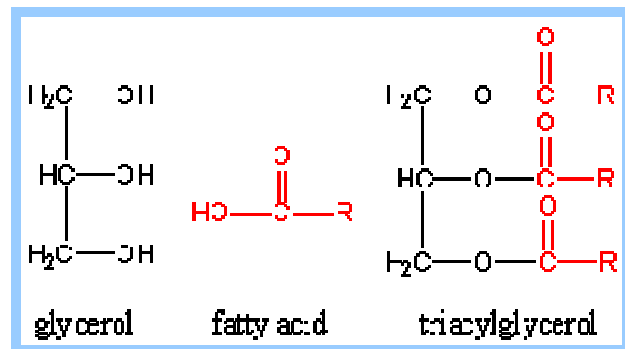
Ανοσολογική μέθοδος	Χρήση αντισωμάτων	Ανίχνευση νοθείας	Όριο ανίχνευσης νοθείας
Ακτινωτή ανοσοδιάχυση	Πολυκλωνικά IgG Πολυκλωνικά IgG	Αγελαδινό σε αίγιο και πρόβειο γάλα Αγελαδινό σε αίγιο και πρόβειο τυρί	1% Ποιοτική ανίχνευση με 5% αγελαδινό
Τεχνικές ELISA			
<i>Έμμεση ELISA</i>	Πολυκλωνικά β-καζεΐνης Πολυκλωνικά ολικής καζεΐνης Πολυκλωνικά αs1 καζεΐνης Μονοκλωνικά β-καζεΐνης	Αγελαδινό σε αίγιο γάλα Αίγιο σε πρόβειο γάλα Αγελαδινό σε πρόβειο γάλα και τυρί Αγελαδινό σε πρόβειο και αίγιο τυτί	2% - 50% 1%-25% 0,125% στο γάλα 0,5% στο τυρί ≥ 1%
<i>Έμμεση ανταγωνιστική ELISA</i>	Πολυκλωνικά γ3 καζεΐνης Μονοκλωνικά IgG	Αγελαδινό σε πρόβειο και αίγιο γάλα Αγελαδινό σε πρόβειο, αίγιο και βουβαλίσιο γάλα	0,1% 0.1%
<i>Sandwich ELISA</i>	Πολυκλωνικά ολικής καζεΐνης Μονοκλωνικά IgG	Αγελαδινό σε πρόβειο γάλα και τυρί Αγελαδινό σε πρόβειο, αίγιο και βουβαλίσιο γάλα και τυρί	0.5% -15% στο γάλα 0,5% -25% στο τυρί 0.001% στο γάλα 0,01% στο τυρί
Βιοαισθητήρας	Μονοκλωνικά κ-καζεΐνης	Αγελαδινό σε πρόβειο και αίγιο γάλα	0,1-10%

Κεφάλαιο 2

2.1 Λιπίδια γάλακτος

Τα λιπίδια είναι ένα από τα βασικότερα συστατικά του γάλακτος από άποψη κόστους, θρεπτικότητας, καθώς και για τα φυσικά και γευστικά χαρακτηριστικά που προσδίδουν στα γαλακτοκομικά προϊόντα (Park *et al.*, 2007). Τα τριγλυκερίδια αποτελούν περισσότερο από το 98% των λιπιδίων του γάλακτος. Αυτά είναι εστέρες της γλυκερόλης με τρία συνήθως διαφορετικά λιπαρά οξέα (Εικ. 2-1). Το 1% αποτελείται από φωσfolιπίδια (~0,6% των συνολικών λιπιδίων), μικρή ποσότητα δι-γλυκεριδίων (~0,35% των συνολικών λιπιδίων), μονο-γλυκεριδίων (~0,03% των συνολικών λιπιδίων) και ελεύθερων λιπαρών οξέων. Λιγότερο από 1% αποτελείται από μη-σαπωνοποιήσιμα συστατικά όπως οι στερόλες, κυρίως χοληστερόλη (~0,3% των συνολικών λιπιδίων), λιποδιαλυτές βιταμίνες και άλλα λιπίδια όπως τα καροτενοειδή, που είναι πρόδρομοι της βιταμίνης Α και υπεύθυνα για το κίτρινο χρώμα του λίπους του αγελαδινού γάλακτος (Καμιναρίδης & Μοάτσου, 2009).

Τα λιπίδια προέρχονται σχεδόν ισοδύναμα από δυο πηγές, την τροφή και τη μικροβιακή δραστηριότητα στη μεγάλη κοιλία των μηρυκαστικών και βρίσκονται στο γάλα με τη μορφή σφαιρικών σωματιδίων δημιουργώντας γαλάκτωμα (προσδίδοντας το όνομα και το χρώμα στο γάλα) (Mansson, 2008). Τα σωματίδια αυτά ονομάζονται λιποσφαίρια και περιβάλλονται από μεμβράνη (Καμιναρίδης & Μοάτσου, 2009). Τα λιποσφαίρια στο πρόβειο και στο αίγιο γάλα είναι χαρακτηριστικά άφθονα, με μέγεθος μικρότερο από 3,5μm ενώ το μέγεθος των λιποσφαιρίων του αγελαδινού γάλακτος είναι 4,55 μm). Η δομή και η σύνθεση των μεμβρανών των λιποσφαιρίων των τριών ζωικών ειδών λίπους γάλακτος είναι παρόμοια και αντιπροσωπεύει περίπου το 1% του συνολικού όγκου του λίπους του γάλακτος (Park *et al.*, 2007).



Εικόνα 2-1: Τριγλυκερίδιο 1

Πηγή: <http://www.rpi.edu/dept/bcbp/molbiochem/MBWeb/mb2/part1/fatcatab.htm>

2.2 Το λίπος του γάλακτος στα διαφορετικά είδη ζώων

Το γάλα όλων των θηλαστικών περιέχει λιπίδια αλλά η συγκέντρωσή τους διαφέρει σημαντικά από ζωικό είδος σε είδος (Πίν. 2-1). Ο βασικός ρόλος των λιπιδίων είναι να αποτελούν πηγή ενέργειας για να νεογέννητα και η λιποπεριεκτικότητα του γάλακτος, κυρίως αντιπροσωπεύει τις ενεργειακές ανάγκες του κάθε ζωικού είδους, π.χ. είδη ζώων που ζουν σε κρύο περιβάλλον και τα θαλάσσια θηλαστικά εκκρίνουν υψηλά επίπεδα λιπιδίων στο γάλα τους (Fox & McSweeney, 1998).

Το γάλα της αγελάδας, του ανθρώπου, της αίγας και της καμήλας έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε λίπος. Το γάλα όμως του βουβαλιού και του προβάτου περιέχει ποσότητα λίπους ελαφρώς υψηλότερη. Δεν έχει παρατηρηθεί συγκεκριμένη σχέση μεταξύ της περιεκτικότητας του λίπους του γάλακτος στα μηρυκαστικά (αγελάδα, πρόβατο, αίγα, βουβάλι και καμήλα) και στα μονογαστρικά (άνθρωπος, κουνέλι, φώκια και χοίρος). Βέβαια, φαίνεται ότι τα κατοικιδιοποιημένα ζώα τείνουν να παράγουν γάλα με χαμηλότερη λιποπεριεκτικότητα σε σχέση με τα μη κατοικιδιοποιημένα (Fox & McSweeney, 2006).

Πίνακας 2-1: Μέση λιποπεριεκτικότητα γάλακτος διαφορετικών ζωικών ειδών

Είδος ζώου	Λιποπεριεκτικότητα (% w/w)
Αγελάδα	3,5
Πρόβατο	7,8
Αίγα	4,2
Βουβάλι	6,8
Καμήλα	4,0
Κουνέλι	18,3
Φώκια	42,1
Χοίρος	6,8
Άνθρωπος	3,8

Fox & McSweeney, 2006

2.3 Το προφίλ των λιπαρών οξέων των λιπιδίων

Το λίπος του γάλακτος, κυρίως των μηρυκαστικών, περιέχει μεγάλη ποικιλία λιπαρών οξέων, γεγονός το οποίο το καθιστά το πιο σύνθετο από όλα τα φυσικά λίπη (Mansson, 2008). Περισσότερα από 400 λιπαρά οξέα έχουν ανιχνευτεί στο αγελαδινό λίπος γάλακτος. Βέβαια η πλειοψηφία αυτών συναντάται μόνο σε ίχνη συγκεντρώσεων (Fox & McSweeney, 1998). Υπάρχουν όμως περίπου 15 λιπαρά οξέα τα οποία βρίσκονται σε συγκεντρώσεις του 1% ή ακόμα μεγαλύτερες. Πολλοί παράγοντες σχετίζονται με τις διακυμάνσεις στην ποσότητα και στη σύνθεση των λιπαρών οξέων των λιπιδίων. Αυτοί μπορεί να είναι η προέλευση του ζώου συσχετιζόμενη γενετικά (φυλή και επιλογή), το στάδιο της γαλακτικής περιόδου, μαστίτιδα, διατροφικοί παράγοντες, π.χ. η πρόσληψη σε ενέργεια, ινώδεις ουσίες και διαιτητικά λίπη και τέλος η περιοχή και η εποχή του έτους (Mansson, 2008).

Οι ποσότητες των βασικών λιπαρών οξέων προσδιορίζονται εύκολα με τη χρήση της αέριας χρωματογραφίας (Gas Chromatography, GC) (Fox & McSweeney, 2006). Ποσοστά αυτών στα τρία είδη γάλακτος, αγελαδινό, πρόβειο και αίγιο, αναφέρονται στον Πίνακα 2-2.

2.3.1 Κορεσμένα λιπαρά οξέα (SFA: Saturated Fatty Acids)

Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα που παρουσιάζονται σε σημαντικές ποσότητες στο λίπος του γάλακτος είναι μόρια με μη διακλαδισμένες αλυσίδες υδρογονανθράκων, το μήκος των οποίων ποικίλει από 4 έως 18 άτομα άνθρακα (Εικ. 2-2). Αυτά τα λιπαρά οξέα αποτελούν περίπου το 70 με 75% των ολικών λιπαρών οξέων. Το πιο σημαντικό κορεσμένο λιπαρό οξύ από πλευράς ποσότητας είναι το 16:0 το οποίο αποτελεί το 25 με 30% των ολικών, ενώ δυο άλλα κορεσμένα λιπαρά οξέα, τα 14:0 και 18:0 κυμαίνονται στη περιοχή του 10 με 13% (Πίν. 2-2) (Fox & McSweeney, 2006).



Εικόνα 2-2: Κορεσμένα λιπαρά οξέα

Πηγή: <http://telstar.ote.cmu.edu/biology/MembranePage/index2.html>

Πίνακας 2-2: Βασικά λιπαρά οξέα (% των ολικών) στο αγελαδινό, πρόβειο και αίγιο λίπος γάλακτος

Λιπαρά Οξέα	Κοινή Ονομασία ^a	Είδος λίπους γάλακτος		
		Αγελαδινό ^b	Πρόβειο ^b	Αίγιο ^b
Κορεσμένα (SFA)				
C4:0	Βουτυρικό	3,3	3,51	2,18
C6:0	Καπροϊκό	1,6	2,9	2,39
C8:0	Καπρυλικό	1,3	2,64	2,73
C10:0	Καπρικό	3,0	7,82	9,97
C12:0	Λαουρικό	3,1	4,38	4,99
C14:0	Μυριστικό	11,1 ^c	10,4	9,81
C16:0	Παλμιτικό	27,9 ^c	25,9	28,2
C18:0	Στεαρικό	12,2 ^c	9,57	8,88
Μονοακόρεστα (MUFA)				
C14:1	Μυριστολεϊκό	0,8 ^c	0,28	0,18
C16:1	Παλμιτολεϊκό	2,3	1,03	1,59
C18:1	Ολεϊκό	29,8	21,1	19,3
Πολυακόρεστα (PUFA)				
C18:2	Λινολεϊκό	2,4	3,21	3,19
CLA	Συζευγμένο Λινολεϊκό οξύ	1,1 ^c	0,74	0,70
C18:3	α Λινολενικό	0,80	0,80	0,42

^a Fox & McSweeney, 1998

^b Park et al., 2007

^c Fox & McSweeney, 2006

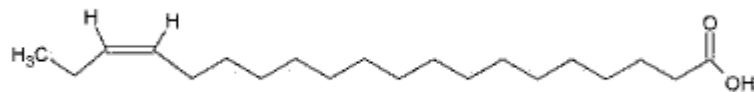
2.3.2 Ακόρεστα λιπαρά οξέα (Unsaturated Fatty Acids, UFA)

Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα συναντώνται με τη μορφή των cis ή trans ισομερών. Τα trans ισομερή, τα οποία έχουν υψηλότερο σημείο τήξης από τα αντίστοιχα cis ισομερή, θεωρούνται διατροφικά μη επιθυμητά (Fox & McSweeney, 1998). Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα διακρίνονται σε μονοακόρεστα (MUFA), τα οποία φέρουν ένα διπλό δεσμό και σε πολυακόρεστα (PUFA) που φέρουν περισσότερους του ενός διπλούς δεσμούς.

2.3.2.1 Cis-ακόρεστα λιπαρά οξέα

Τα cis-μονοακόρεστα οξέα του λίπους του αγελαδινού γάλακτος (Εικ. 2-3) αποτελούν το 18-24% των cis-ακόρεστων λιπαρών οξέων. Το ελαϊκό οξύ (9c-18:1) είναι το κυρίαρχο cis-μονοακόρεστο λιπαρό οξύ που αποτελεί περίπου το 15-21% των ολικών λιπαρών οξέων. Υπάρχει περίπου 0,5% 11c-18:1, ενώ οι αναλογίες των υπολοίπων cis-18:1 ισομερών είναι μικρές. Υπάρχουν επίσης σχετικά μικρές αλλά σημαντικές συνεισφορές άλλων cis- μονοακόρεστων οξέων που είναι τα 14:1 (περίπου 1%) και 16:1 (περίπου 1,5%), (Fox & McSweeney, 2006).

Τα cis-πολυακόρεστα οξέα παρουσιάζονται σε μικρές συγκεντρώσεις στο λίπος του γάλακτος λόγω των αντιδράσεων βιοϋδρογόνωσης που λαμβάνουν χώρα στη μεγάλη κοιλία. Αυτά τα οξέα αποτελούνται σχεδόν αποκλειστικά από το λινολεϊκό οξύ (9c, 12c-18:2) περίπου 1.2-1.7% και από το α-λινολενικό οξύ (9c, 12c, 15c-18:3) περίπου 0,9 - 1,2%. Αυτά τα δυο λιπαρά οξέα είναι πολύ σημαντικά διότι δεν μπορεί να τα συνθέσει ο οργανισμός και πρέπει να διοχετευτούν μέσω της διατροφής. Πρόσφατα, η χρήση του όρου 'απαραίτητα' έχει επεκταθεί και περιλαμβάνει και παράγωγα αυτών των λιπαρών οξέων, τα οποία δεν συντίθενται σε σημαντικές ποσότητες (π.χ. εικοσαπεντανοϊκό οξύ, 20:5 και δοκοσαεξανοϊκό οξύ, 22:6). Η αναλογία του α-λινολενικού οξέος φαίνεται να επηρεάζεται από τη διατροφή της αγελάδας. Η συγκέντρωσή του είναι μεγαλύτερη στο γάλα που προέρχεται από βόσκουσες αγελάδες σε σύγκριση με το γάλα που προέρχεται από εκτρεφόμενες στο σταύλο αγελάδες. (Fox & McSweeney, 2006).



Εικόνα 2-3: cis-μονοακόρεστο λιπαρό οξύ

Πηγή: <http://www.anηκτήςplus.com/ArticleHufa.htm>

2.3.2.2 Trans-ακόρεστα λιπαρά οξέα

Η παρουσία του C18 trans-λιπαρού οξέος στο λίπος του γάλακτος είναι το αποτέλεσμα της μη πλήρους βιοϋδρογόνωσης των λιπιδίων στη μεγάλη κοιλία. Αυτά τα λιπαρά οξέα έχουν προσελκύσει τη προσοχή λόγω των δυσμενών διατροφικών επιπτώσεων που προκαλούν. Κλινικά πειράματα έχουν δείξει ότι τα trans-οκταδεκανοϊκά

οξέα, σε σχέση με τα *cis* ισομερή, μπορούν να αυξήσουν την LDL χοληστερόλη και να μειώσουν την HDL, προκαλώντας έτσι μη επιθυμητό αποτέλεσμα στο κλάσμα LDL:HDL.

Το βασσενικό οξύ (11*t*-18:1) είναι το πιο σημαντικό *trans* ισομερές με αναλογία που κυμαίνεται μεταξύ 30 και 60% του ολικού *trans*-18:1. Η συγκέντρωση του *trans*-18:1 ποικίλει σημαντικά από 2 έως 6%, με μέση ποσότητα για το λίπος του γάλακτος από πολλές Ευρωπαϊκές χώρες μεταξύ 3,3 με 4,4%.

Το 9*c*, 11*t*-18:2 (RA: Rumenic acid) είναι το βασικό ισομερές του συζευγμένου λινολεϊκού οξέος (CLA: Conjugated Linoleic Acids) στο λίπος του αγελαδινού γάλακτος, αποτελώντας περίπου το 80-90% του ολικού. Αυτό το ισομερές παράγεται ως ενδιάμεσο κατά τη διάρκεια της βιοϋδρογόνωσης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στη μεγάλη κοιλία των μηρυκαστικών, κυρίως του λινολεϊκού (LA) και α -λινολενικού (*cis*-9,*cis*-12,*cis*-15 C18:3, LNA), και από τον αποκορεσμό του βασσενικού οξέος (*trans*-11 C18:1, TVA) στο μαστικό αδένιο, μέσω της D9 (Prandini et al., 2010). Ο όρος CLA αναφέρεται σε ένα μίγμα γεωμετρικών ισομερών του οκταδεκαδιενοϊκού οξέος με συζευγμένους διπλούς δεσμούς (π.χ. 10*t*,12*c*-18:2, 10*t*,12*t*-18:2) (Fox & McSweeney, 2006).

Σύμφωνα με τους Jahreis et al., 1999, η ολική μέση ποσότητα του CLA φαίνεται να μειώνεται ως ακολούθως: πρόβιο>αγελαδινό>αίγιο λίπος γάλακτος με 1,08%, 1,01% και 0,65% αντιστοίχως, αλλά οι πληροφορίες σχετικά με τα μικρά μηρυκαστικά είναι πολύ ανεπαρκείς για να υπάρχει πλήρης εικόνα. Η συγκέντρωση του CLA σε διαφορετικά είδη μηρυκαστικών ποικίλει ανάλογα με την εποχή κυρίως λόγω των διακυμάνσεων που προκαλούνται στους διατροφικούς παράγοντες. Η μεγαλύτερη εποχική διαφορά που μετρήθηκε στο πρόβιο γάλα ήταν 1,28% το καλοκαίρι και 0,54% στο τέλος της χειμερινής περιόδου (Park et al., 2007).

2.4 Λιπαρά οξέα στο αγελαδινό, πρόβιο και αίγιο γάλα

Τα περισσότερα λιπαρά οξέα, από το οξικό (C2:0) μέχρι το αραχιδονικό οξύ (C20:0), περιέχουν ζυγό αριθμό ατόμων άνθρακα. Πέντε λιπαρά οξέα (C10:0, C14:0, C16:0, C18:0, και C18:1) αποτελούν ποσοστό >75% των ολικών λιπαρών οξέων του αίγιου και του πρόβιου γάλακτος (Πίν. 2-2). Τα επίπεδα των μεταβολικής αξίας μικρής και μεσαίας αλύσου λιπαρών οξέων, καπροϊκό (C6:0) (2.9%, 2.4%, 1.6%), καπρυλικό (C8:0) (2.6%, 2.7%, 1.3%), καπρικό (C10:0) (7.8%, 10.0%, 3.0%), και λαουρικό (C12:0)

(4.4%, 5.0%, 3.1%) είναι σημαντικά υψηλότερα στο πρόβειο και στο αίγιο γάλα σε σχέση με το αγελαδινό αντιστοίχως. Αυτά τα λιπαρά οξέα σχετίζονται με τη χαρακτηριστική γεύση των τυριών και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση μίξης με γάλα διαφορετικών ζωικών ειδών (Park *et al.*, 2007).

Το πρόβειο και το αίγιο γάλα περιέχουν μεγαλύτερη αναλογία λιπαρών οξέων C:8 – C:14 σε σχέση με το αγελαδινό (Καμιναρίδης & Μοάτσου, 2009).

2.5 Μέθοδοι προσδιορισμού λιπαρών οξέων

Ο προσδιορισμός των λιπαρών οξέων μπορεί να γίνει με διάφορες μεθόδους, σύμφωνα με την βιβλιογραφία, μερικές από τις οποίες αναφέρονται παρακάτω:

- Αέριος Χρωματογραφία (G.C)
- Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)
- Φασματομετρία Μαζών (M.S)
- Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (N.M.R)

2.5.1. Αέριος Χρωματογραφία (Gas Chromatography)

Η αέριος χρωματογραφία είναι μια από τις πολλές μεθόδους χρωματογραφίας. Περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1952 και αποτελεί την περισσότερο διαδεδομένη μέθοδο λόγω της ταχύτητας και της ευκολίας με την οποία πολύπλοκα μίγματα μπορούν να αναλυθούν, αφού απαιτείται πολύ μικρή ποσότητα δείγματος, εμφανίζει ευελιξία, αξιοπιστία και χαμηλό κόστος εξοπλισμού .

Η χρωματογραφία είναι μια διαδικασία διαχωρισμού που χρησιμοποιεί τη διαφορά των συντελεστών ισορροπίας των συστατικών ενός μίγματος για να διαχωριστούν αυτά ανάμεσα σε μια στατική φάση μεγάλης ειδικής επιφάνειας και μιας κινητής φάσης, η οποία διέρχεται τη στατική.

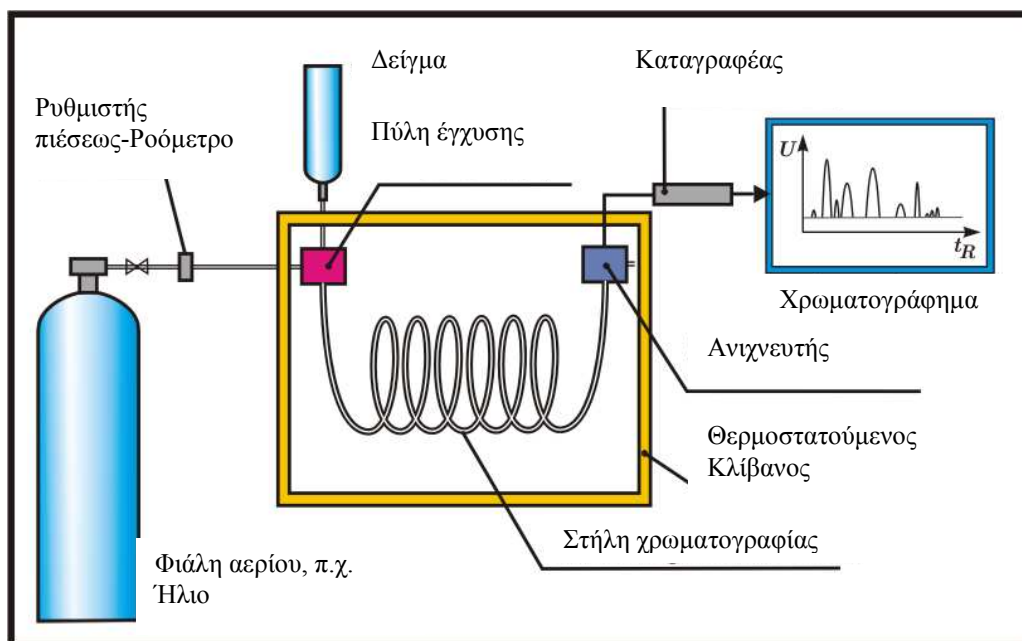
Η χρωματογραφία χρησιμοποιεί αυτές τις δυο διαφορετικές φάσεις: μια στατική και μια κινητή. Αυτές οι δυο συνθήκες μαζί εγγυώνται πολύ γρήγορη μεταφορά μάζας μεταξύ των φάσεων και ραγδαία τοπική ισορροπία. Τα συστατικά του αναλυόμενου μίγματος πρέπει να είναι διαλυτά στην κινητή φάση και πρέπει να υπάρχει κάποιου είδους φυσικοχημική επεξεργασία, η οποία επιτρέπει στα συστατικά του αναλυόμενου μίγματος να ισορροπούν μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης. Έτσι οι

εξεταζόμενες ουσίες πρέπει να είναι πτητικές ή να μετατρέπονται σε πτητικά παράγωγα με κατάλληλα αντιδραστήρια, όπως συμβαίνει με τις λιπαρές ύλες όπου τα γλυκερίδια των λιπαρών οξέων μετατρέπονται σε μεθυλεστέρες, πτητικές ενώσεις.

Η στατική φάση μπορεί να είναι στερεά ή υγρή. Στην πρώτη περίπτωση (Αέρια-Στερεή Χρωματογραφία) η προσρόφηση είναι η κύρια διαδικασία ισορροπίας που χρησιμοποιείται, ενώ στη δεύτερη περίπτωση (Αέρια - Υγρή Χρωματογραφία), για να αποφευχθούν πιθανές καταστροφικές συνέπειες του μεταφερόμενου δείγματος και να επιτραπεί γρήγορη ανταλλαγή μεταξύ των δυο φάσεων, το υγρό διασκορπίζεται σε μια στερεά φάση. Η κινητή φάση μπορεί να είναι αέρια ή υγρή. Σχεδόν σε όλες τις εφαρμογές θεωρείται ότι η συμπεριφορά της αέριας κινητής φάσης είναι ιδανική (Guiochon & Guillemin, 1988; Fox & McSweeney 2006).

Τα βασικά μέρη ενός τυπικού συστήματος αέριας χρωματογραφίας είναι: α) Φέρον αέριο, β) Ρυθμιστής πίεσεως-Ροόμετρο, γ) Σύστημα εισαγωγής δείγματος, δ) Στήλες, ε) Θερμοστατούμενος κλίβανος, στ) Ανιχνευτής και ζ) Καταγραφέας -H/Y-Εκτυπωτής (Εικ. 2-4).

Συνοπτικά, ένας αέριος χρωματογράφος λειτουργεί ως εξής: ένα αδρανές φέρον αέριο [συνηθέστερα ήλιο (He)] ρέει συνεχώς, από ένα μεγάλο κύλινδρο που φέρει το αέριο, μέσα από την πύλη έγχυσης, την στήλη και τον ανιχνευτή. Ο ρυθμός ροής του φέροντος αερίου ελέγχεται προσεκτικά για να εξασφαλιστεί η αναπαραγωγή των χρόνων (όγκων) συγκρατήσεως. Το δείγμα εισάγεται (συνήθως με μικροσύριγγα) στην θερμαινόμενη πύλη έγχυσης όπου εξατμίζεται και μεταφέρεται μέσα στη στήλη, συνήθως μια τριχοειδή στήλη μήκους 15 με 30 μέτρα, καλυμμένη εσωτερικά με ένα λεπτό (0,2μm) φιλμ υψηλού βρασμού υγρό (στατική φάση). Το δείγμα χωρίζεται μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης και τελικά διαχωρίζεται στα συστατικά του βασιζόμενο σε μια σχετική διαλυτότητα στην υγρή φάση και στις σχετικές πιέσεις ατμού. Μετά τη στήλη, το φέρον αέριο και το δείγμα περνούν από έναν ανιχνευτή. Με τον ανιχνευτή γίνεται φανερό η παρουσία καθενός από τα συστατικά του μίγματος, τα οποία εξέρχονται από τη στήλη, προσδιορίζεται η ποσότητα ή η συγκέντρωσή τους μέσα στο φέρον αέριο και δημιουργείται ένα ηλεκτρικό σήμα. Το σήμα αυτό μεταφέρεται σε ένα σύστημα επεξεργασίας δεδομένων, το οποίο τελικά διαμορφώνει ένα χρωματογράφημα. Στο τέλος του αεριοχρωματογραφήματος δίνονται ο χρόνος συγκράτησης, το εμβαδόν και η εκατοστιαία σύσταση των συστατικών του δείγματος (McNair & Miller 2009).



Εικόνα 2-4: Σχηματική απεικόνιση αέριου χρωματογράφου

Πηγή: http://en.wikibooks.org/wiki/A-level_Applied_Science/Finding_out_about_substances/Chromatography

2.5.1.1 Μέθοδοι εκχύλισης λιπιδίων για την εφαρμογή αέριας χρωματογραφίας

Στις τεχνικές αέριας χρωματογραφίας για τον προσδιορισμό των λιπαρών οξέων, απαιτείται η παραλαβή των λιπιδίων πριν από τη σαπωνοποίηση του δείγματος. Σε βιβλία και σε άρθρα, μπορούν να βρεθούν διάφορες διαδικασίες, με χρήση διαφόρων διαλυτών που στοχεύουν στη βελτίωση της εκχύλισης του λίπους από τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Οι πιο γνωστές από τις μεθόδους αυτές είναι οι εξής:

- Η μέθοδος του Folch όπου χρησιμοποιούνται ως μέσα εκχύλισης χλωροφόρμιο και αιθανόλη.
- Η μέθοδος Soxhlet, η οποία χρησιμοποιεί ως μέσο εκχύλισης οργανικό διαλύτη, συνήθως εξάνιο ή πετρελαϊκό αιθέρα (IDF, 1995).
- Η μέθοδος Bligh and Dyer (1959), η οποία χρησιμοποιεί ως μέσα εκχύλισης μίγμα χλωροφορμίου και μεθανόλης (Bligh and Dyer, 1957).
- Η μέθοδος Sheppard (1963), η οποία χρησιμοποιεί ως μέσα εκχύλισης μίγμα αιθανόλης και διαιθυλαιθέρα (http://www.incardiology.gr/odigies/odigies_xolisterini.htm)

- Η μέθοδος «Rose-Gottlieb» (RG), στην οποία χρησιμοποιείται αρχικά αμμωνία και αιθυλική αλκοόλη και στην συνέχεια γίνονται εκχυλίσεις με διαιθυλαιθέρα και πετρελαϊκό αιθέρα.
- Η μέθοδος με μέσο εκχύλισης τον διαιθυλαιθέρα (DE).
- Η μέθοδος με μέσο εκχύλισης το εξάνιο.
- Η μέθοδος που χρησιμοποιεί για την εκχύλιση, αμμωνία, διαιθυλαιθέρα και πετρελαϊκό αιθέρα.
- Η μέθοδος Schmid Bondzynsky Ratzlaff (SBR) που χρησιμοποιεί αρχικά υδροχλώριο και αιθυλική αλκοόλη και στη συνέχεια διαιθυλαιθέρα και πετρελαϊκό αιθέρα.
- Η μέθοδος που χρησιμοποιεί ως μέσο εκχύλισης μίγμα χλωροφόρμιου και μεθανόλης.
- Η μέθοδος IDF (International Dairy Federation), η οποία χρησιμοποιεί για την εκχύλιση, αμμωνία, αιθανόλη και πετρελαϊκό αιθέρα.
- Η μέθοδος AOAC, η οποία για την εκχύλιση χρησιμοποιεί χλωροφόρμιο, μεθανόλη και νερό.

Η μέθοδος Soxhlet είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη ημισυνεχής μέθοδος. Η μέθοδος αυτή περιγράφηκε από τον Soxhlet το 1879 και χρησιμοποιεί ένα ειδικό όργανο, τον εκχυλιστή Soxhlet (www.extraction\Lipid extraction, general methods.htm). Ως μειονεκτήματα αυτής της μεθόδου αναφέρονται: η μικρή εκχύλιση των πολικών λιπιδίων, το μεγάλο χρονικό διάστημα που απαιτείται, και ο κίνδυνος από τις υψηλές θερμοκρασίες στις οποίες θερμαίνονται οι διαλύτες (www.cyberlipid.org/sterols/ster0003.htm).

Μια ευρύτατα διαδεδομένη μέθοδος που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση των λιπιδίων είναι η μέθοδος του Folch. Η μέθοδος του Folch συγκρίθηκε με εκείνη των Bligh and Dyer και διαπιστώθηκε πως έδωσε ελαφρά αυξημένη τιμή λιπαρών οξέων. Δύο ακόμη, πολύ συνηθισμένες μέθοδοι που έχουν αναφερθεί για την προετοιμασία του δείγματος, η AOAC και η Sheppard, περιλαμβάνουν πολλαπλά βήματα που απαιτούν ομογενοποίηση του δείγματος, υψηλές ποσότητες διαλυτών, ποσοτική μεταφορά και διήθηση μέσω ηθμού. Το εκχύλισμα πλένεται με νερό ή διάλυμα αλατιού και φυγοκεντρείται ώστε να διαχωριστούν οι φάσεις. Η φάση με το χλωροφόρμιο διηθείται από θειικό νάτριο και τελικά εξατμίζεται με άζωτο (http://www.incardiology.gr/odigies/odigies_xolisterini.htm). Οι Washburn & Nix, (1974) αναφέρουν ότι η χρήση θειικού νατρίου ή όχι, δεν έχει καμία επίπτωση στο ποσοστό των

λιπιδίων που εκχειλίζονται. Η πιο ευρεία όμως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την παραλαβή των λιπιδίων και της χοληστερόλης είναι η μέθοδος Folch.

Η υψηλή ευαισθησία των αναλυτικών μεθόδων, που απαιτούνται για την παραλαβή μικρών ποσοτήτων λιπιδίων, απαιτεί τη χρήση πολύ καθαρών διαλυτών και σκευών. Επιπλέον, όλα τα λιπίδια πρέπει να προστατευθούν από την υποβάθμιση μέσω της οξειδωσης από το διαλύτη, το οξυγόνο και τα ένζυμα, σε συνδυασμό με τη θερμοκρασία και το φως.

Δεδομένου ότι η απροσεξία στο προκαταρκτικό στάδιο της εκχύλισης μπορεί να οδηγήσει στην απώλεια συστατικών που μας ενδιαφέρουν, πρέπει να λαμβάνονται διάφορες προφυλάξεις που συνοψίζονται κατωτέρω. Οι Gunstone & Padley (1997) αναφέρουν ότι η καταλληλότητα του διαλύτη εξαρτάται από την πολικότητα της ουσίας προς εκχύλιση, καθώς και από την πολικότητα του διαλύτη. Τα πολικά λιπίδια είναι περισσότερο ευδιάλυτα σε πολικούς διαλύτες, όπως στην αλκοόλη, από ότι σε μη πολικούς, όπως στο εξάνιο. Διαφορετικά συστατικά έχουν διαφορετική πολικότητα, που σημαίνει ότι είναι απίθανο να επιλεγεί ένας οργανικός διαλύτης για να εκχειλίσει όλα τα συστατικά. Επίσης ο διαλύτης που θα επιλεγεί πρέπει να έχει σχετικά χαμηλό σημείο βρασμού, έτσι ώστε να απομακρυνθεί εύκολα στον εξατμιστήρα.

Τα ουδέτερα λιπίδια ή γενικά τα λιπίδια εκχυλίζονται με σχετικά μη πολικούς διαλύτες όπως ο διαιθυλαιθέρας ή το χλωροφόρμιο, τα οποία πρέπει να βρίσκονται σε σκοτεινόχρωμα μπουκάλια ή σε σκοτεινούς χώρους. Αυτοί οι διαλύτες πρέπει να εξετάζονται ως προς τα επίπεδα υπεροξειδίου, τα οποία πρέπει να διατηρούνται χαμηλά.

Η αλκοόλη είναι καλός διαλύτης για τα περισσότερα λιπίδια, καθώς επίσης και η μεθανόλη. Το χλωροφόρμιο είναι ένας πολύ χρησιμοποιούμενος διαλύτης, ιδιαίτερα για τα λιπίδια της ενδιάμεσης πολικότητας και όταν αναμιγνύεται με την μεθανόλη, δημιουργείται μίγμα, που χρησιμοποιείται ως γενικός διαλύτης εκχύλισης του λίπους. Δεν είναι πολύ σταθερό, αφού σχηματίζει φωσγένιο και υδροχλώριο στον αέρα. Το διχλωρομεθάνιο (ή διχλωρίδιο μεθυλενίου) είναι ένα παρόμοιο μέσο εκχύλισης του λίπους, αλλά λιγότερο οξειδώσιμο.

Μεταξύ των υδρογονανθράκων, το εξάνιο είναι αυτό που χρησιμοποιείται πιο συχνά. Το εξάνιο μπορεί να αντικατασταθεί από τον πετρελαϊκό αιθέρα, που αποτελεί μίγμα διάφορων υδρογονανθράκων με 5 έως 8 άτομα άνθρακα. Το κυκλοεξάνιο χρησιμοποιείται μερικές φορές για να εκχυλίσει τα κλάσματα του λίπους στο κρύο, χωρίς τον κίνδυνο εξατμίσεώς τους, δεδομένου ότι παγώνει στους -6°C . Το βενζόλιο δεν

χρησιμοποιείται πλέον, διότι θεωρείται ότι περιέχει μια ισχυρή καρκινογόνο ουσία. Αυτό μπορεί να αντικατασταθεί από το τολουόλιο που, όμως, είναι δυσκολότερο να εξατμιστεί.

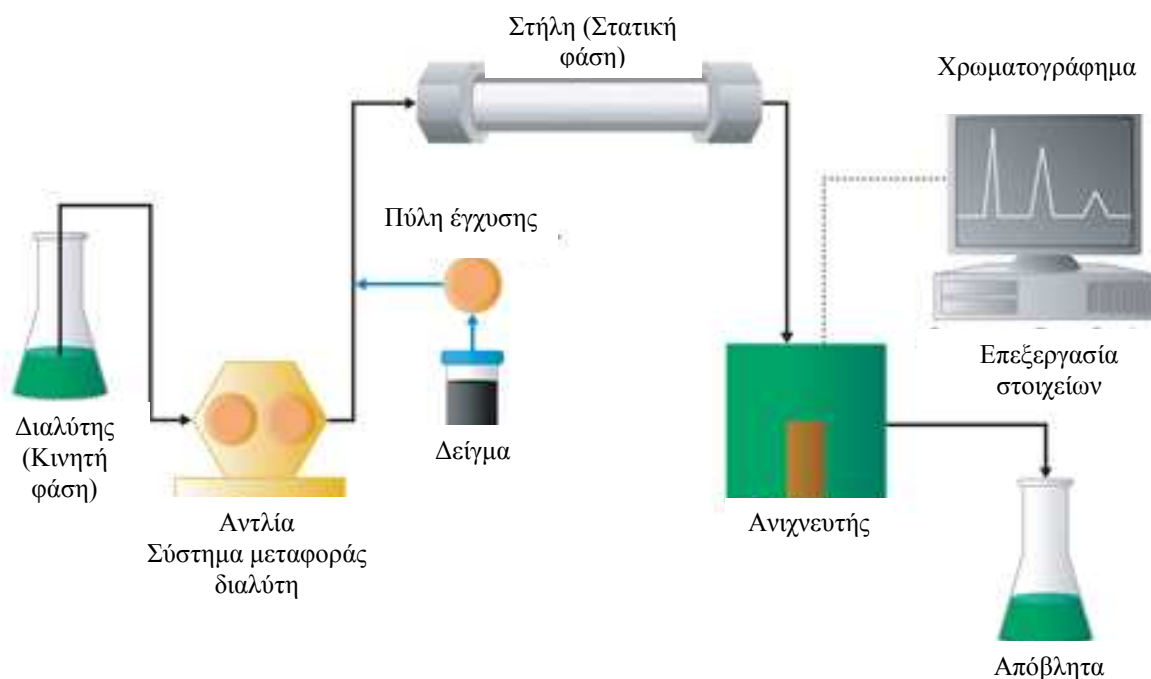
2.5.2. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Στην υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης ή απόδοσης (ή απλώς υγρή χρωματογραφία), η στατική φάση είναι στερεό υπόστρωμα, που βρίσκεται συσκευασμένο σε στήλη, ενώ η κινητή φάση είναι υγρό. Η διαβίβαση της υγρής κινητής φάσης μέσα από τη στατική φάση πετυχαίνεται με την χρησιμοποίηση αντλιών υψηλής πίεσης, όταν η στατική φάση αποτελείται από πολύ μικρής διαμέτρου και επομένως μεγάλης αντίστασης, σωματίδια υψηλής διαχωριστικής απόδοσης (Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης ή Απόδοσης - HPLC).

Η υγρή χρωματογραφία είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για το διαχωρισμό και την ανάλυση μειγμάτων μοριακών ή ιοντικών ενώσεων με χαμηλές τάσεις ατμών, καθώς και θερμικά ασταθών ενώσεων, που δεν μπορούν να εξαερωθούν χωρίς να διασπασθούν. Η HPLC είναι σήμερα η περισσότερο χρησιμοποιούμενη χρωματογραφική τεχνική για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση πολύπλοκων μειγμάτων (LKB – Producter, 1982).

Ένα σύστημα HPLC αποτελείται από τα εξής μέρη: α) δοχείο κινητής φάσης-διαλύτη, β) υψηλής πίεσης αντλία, γ) σύστημα έγχυσης του δείγματος, δ) στήλη, ε) ανιχνευτή, στ) καταγραφέα ή ηλεκτρονικό υπολογιστή - εκτυπωτή (Εικ. 2-5).

Η διαδικασία ανάλυσης ενός δείγματος με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφία πραγματοποιείται ως εξής: καθώς ο διαλύτης (κινητή φάση) προωθείται προς τη στήλη με τη βοήθεια της αντλίας, το δείγμα εισάγεται στο σύστημα με ένεση στη μονάδα εισαγωγής δείγματος ακριβώς πριν τη στήλη. Έτσι, η κινητή φάση, περιέχοντας και μια μικρή ποσότητα δείγματος, εισέρχεται στην στενή, κυλινδρική, γεμισμένη χρωματογραφική στήλη. Καθώς το δείγμα κινείται μέσα στη στήλη, με τη βοήθεια της κινητής φάσης, τα συστατικά του διαχωρίζονται και όταν εκκλύονται, σε διαφορετικούς χρόνους, η ύπαρξή τους καταγράφεται από έναν ανιχνευτή. Η ύπαρξη μοντέλων χρωματογραφημάτων για συγκεκριμένες ουσίες, κάνει δυνατή την ταυτοποίηση των συστατικών των δειγμάτων, βάσει των χρόνων ή των ποσοτήτων έκλουσης. Η ποσότητα του κάθε συστατικού προσδιορίζεται από το ύψος ή την περιοχή της κορυφής του στο χρωματογράφημα (Strobel & Heineman, 1989; McMaster, 2007; Meyer, 2010).



Εικ. 2-5: Διαγραμματική απεικόνιση χρωματογράφου HPLC

Πηγή: http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10049055&locale=en_GR

2.5.3. Φασματομετρία μαζών (Mass Spectrometry)

Βασική αρχή της φασματομετρίας μαζών είναι η δημιουργία ιόντων, είτε από ανόργανα είτε από οργανικά συστατικά, με οποιαδήποτε κατάλληλη μέθοδο, ο διαχωρισμός των ιόντων αυτών ανάλογα με το πηλίκο m/z (μάζα /φορτίο) και η ανίχνευσή τους ποιοτικά και ποσοτικά σύμφωνα με το αντίστοιχο πηλίκο τους m/e και την ποσότητά τους.

Τα φασματόμετρα μαζών αποτελούνται από: α) το θάλαμο ιοντισμού, όπου μετατρέπεται η ένωση σε ιόντα, συνήθως κατιόντα με απόσπαση ενός ηλεκτρονίου, β) τον αναλυτή μαζών, όπου γίνεται διαχωρισμός των ιόντων με βάση το λόγο m/z , και γ) τον ανιχνευτή.

Στο φασματόμετρο μαζών τα παραγόμενα ιόντα επιταχύνονται στο εσωτερικό ηλεκτρικού πεδίου και στη συνέχεια αποκλίνουν από την αρχική τους πορεία υπό την επίδραση μαγνητικού πεδίου, ανάλογα με το πηλίκο m/z . Στη συνέχεια με τον ανιχνευτή μπορεί να μετρηθεί το ηλεκτρικό ρεύμα, που παρέχουν τα ιόντα με διαφορετικό λόγο m/z . Το διάγραμμα (προφίλ) που θα προκύψει από την ένταση του μετρούμενου ρεύματος, σε συνάρτηση με το λόγο m/z , αποτελεί το φάσμα μαζών (Gross, 2004).

2.5.4. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (N.M.R- Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy)

Το NMR είναι μια τεχνική φασματοσκοπίας, η οποία βασίζεται στις μαγνητικές ιδιότητες του ατομικού πυρήνα. Όταν βασικοί ατομικοί πυρήνες τοποθετούνται σε ένα ισχυρό μαγνητικό πεδίο, συντονίζονται σε μια χαρακτηριστική συχνότητα στο φάσμα ραδιοσυχνοτήτων του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Ελαφριές διακυμάνσεις στη συχνότητα συντονισμού δίνουν λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τη δομή των μορίων στα οποία ανήκει το άτομο. Η βασική διάταξη για την παρατήρηση φάσματος N.M.R περιλαμβάνει ένα ισχυρό μαγνήτη, ένα πομπό ραδιοσυχνότητας, ένα δέκτη- ενισχυτή και ένα καταγραφέα (Jacobsen, 2007).

Τα κύρια χαρακτηριστικά της φασματοσκοπίας NMR είναι: είναι μια μέθοδος, που καθιστά δυνατή την πραγματοποίηση διαφορετικών αναλύσεων στο ίδιο δείγμα. Μπορεί να ανιχνεύσει διαφορετικούς πυρήνες, επιτρέποντας την μελέτη του δείγματος υπό διαφορετικές πλευρές. Είναι ευαίσθητης δομής, δηλαδή ικανή να ερευνά δομικά χαρακτηριστικά, είναι ευαίσθητη σε δυναμικές επιτρέποντας την διαφοροποίηση μεταξύ των μορίων ή τμημάτων των μορίων με διαφορετική κινητικότητα (Belloque and Ramos, 1999).

2.5.5. Αέριος Χρωματογραφία – Φασματομετρία Μαζών (GC-MS)

Η αέριος χρωματογραφία είναι βασικά μέθοδος διαχωρισμού και όχι μέθοδος ταυτοποίησης των συστατικών του δείγματος. Όταν όμως αυτή συνδυαστεί με τη φασματομετρία μαζών, τότε γίνεται ισχυρότατο μέσο ταυτοποίησης πολυπλοκότερων δειγμάτων. Το G.C-M.S αποτελεί μια από τις πιο πετυχημένες συνδυαστικές τεχνικές.

Ο αέριος χρωματογράφος χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των ουσιών ενώ το φασματόμετρο μαζών (M.S) χρησιμοποιείται για την απόλυτη ταυτοποίηση των ουσιών (McMaster, 2008).

2.5.6. Συνδυασμός Υγρής Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης – Φασματομετρία Μαζών (HPLC-MS)

Ο συνδυασμός της χρωματογραφίας με τη φασματομετρία μαζών σήμερα παρέχει την πιο ευρεία αναλυτική προσέγγιση για τον χαρακτηρισμό πολύπλοκων μιγμάτων. Παρόλο που η τεχνική GC-MS αποτελεί την πιο συχνή επιλογή για τον χαρακτηρισμό πτητικών, θερμικά σταθερών συστατικών, ο συνδυασμός HPLC-MS παρέχει παρόμοια αναλυτική τεχνολογία για την μεγαλύτερη αναλογία των συστατικών, είτε μη πτητικών είτε μη θερμικά σταθερών, δηλαδή όλων αυτών που δεν μπορούν να διαχωριστούν με την αέριο χρωματογραφία.

Το μειονέκτημα των συστημάτων αυτών είναι το κόστος τους, το οποίο είναι υψηλό τόσο ώστε η αγορά τους από τα περισσότερα εργαστήρια να είναι ανέφικτη (Jinno, 1992).

Κεφάλαιο 3

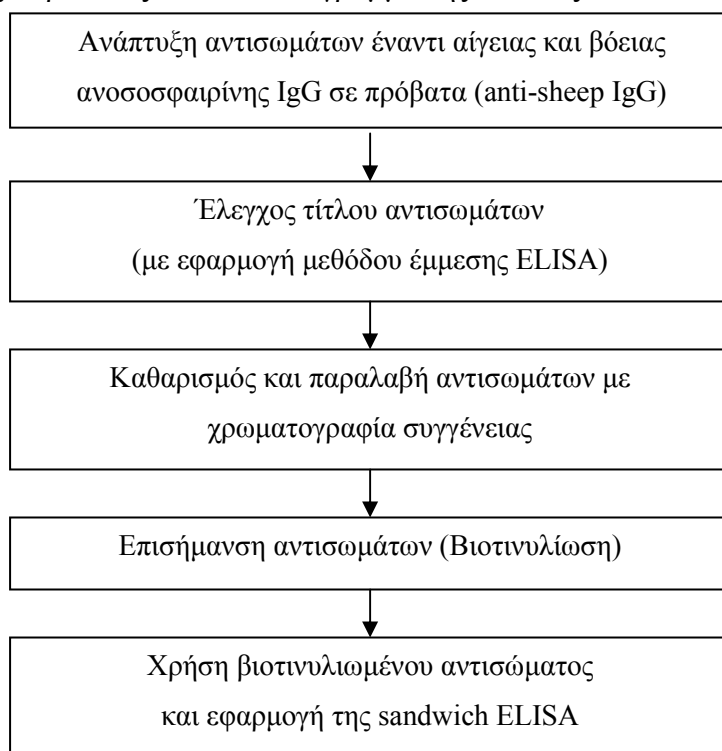
Υλικά και μέθοδοι

3.1 Ανάπτυξη ανοσοενζυμικής μεθόδου sandwich ELISA

3.1.1 Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της παρούσας πειραματικής μελέτης ήταν ο προσδιορισμός της νοθείας γαλακτοκομικών προϊόντων με δυο τρόπους. Ο πρώτος ήταν η ανάπτυξη ανοσολογικής μεθόδου (in house sandwich ELISA) και ο δεύτερος με προσδιορισμό των λιπαρών οξέων.

Έτσι για τον πρώτο τρόπο αναπτύχθηκε ανοσοενζυμική μέθοδος sandwich ELISA με σκοπό την ακριβή ανίχνευση του είδους γάλακτος που χρησιμοποιείται για την παρασκευή γαλακτοκομικών προϊόντων. Για την εφαρμογή της μεθόδου παράχθηκαν ειδικά αντισώματα έναντι της αίγειας ανοσοσφαιρίνης IgG. Τα στάδια της πειραματικής αυτής διαδικασίας παρουσιάζονται στο διάγραμμα της Εικόνας 3-1.



Εικόνα 3-1: Διάγραμμα απεικόνισης σταδίων για την εφαρμογή της μεθόδου sandwich ELISA

3.1.2 Ανάπτυξη αντισωμάτων έναντι αίγειας και βόειας ανοσοσφαιρίνης IgG σε πρόβατα

3.1.2.1 Σκοπός της πειραματικής διαδικασίας

Σκοπός ήταν η ανάπτυξη αντισωμάτων σε πρόβατα έναντι της αίγειας και της βόειας ανοσοσφαιρίνης IgG. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα θηλυκά πρόβατα φυλής Μπούτσικο, στα οποία πραγματοποιήθηκε η ανοσοποίηση. Η ανοσοποίηση έλαβε χώρα στις πειραματικές σταυλικές εγκαταστάσεις του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών κατά το χρονικό διάστημα Ιουνίου - Σεπτεμβρίου του 2010.

Το πρωτόκολλο χορήγησης ανοσογόνου και δειγματοληψιών περιελάμβανε τα εξής στάδια (Πιν. 3-1):

Πίνακας 3-1: Στάδια πειραματικής διαδικασίας

Ημερομηνία	Εβδομάδα	Εργασία
30-06-2010	0	1 ^η δειγματοληψία αίματος
05-07-2010	0	1 ^η ανοσοποίηση με πλήρες ανοσοενισχυτικό
14-07-2010	2	1 ^η αναμνηστική με μη πλήρες ανοσοενισχυτικό
21-07-2010	3	2 ^η δειγματοληψία αίματος
27-07-2010	4	3 ^η δειγματοληψία αίματος & ακολούθως 2 ^η αναμνηστική με μη πλήρες ανοσοενισχυτικό
13-08-2010	7	4 ^η δειγματοληψία αίματος
17-08-2010	7	3 ^η αναμνηστική με μη πλήρες ανοσοενισχυτικό
06-09-2010	11	5 ^η δειγματοληψία αίματος

3.1.2.2 Ανοσοποίηση και αιματοληψία ζώων

Πραγματοποιήθηκαν συνολικά τέσσερις ανοσοποιήσεις στα ζώα σε διαδοχικές ημερομηνίες και πέντε αιματοληψίες. Στα δύο από τα τέσσερα ζώα πραγματοποιήθηκαν ανοσοποιήσεις με αντιγόνο αίγειας IgG και στα άλλα δύο ανοσοποιήσεις με αντιγόνο βόειας IgG.

Υλικά

- Πλήρες ανοσοενυσητικό (Freunds Complete Adjuvant (FCA)) – 0 εβδομάδα
- Μη πλήρες ανοσοενυσητικό (Freunds incomplete Adjuvant (FIA)) - 2-3 εβδομάδες
- Goat IgG antigen
- Bovine IgG antigen
- Σύριγγες γυάλινες των 3ml με βελόνες 25-27 gauge (Εικ. 3-1)
- Σύριγγες των 10 ml
- Δοκιμαστικοί σωλήνες αιματοληψίας
- Φυγόκεντρος

Μέθοδος

Η πρώτη αιματοληψία πραγματοποιήθηκε πριν την ανοσοποίηση. Παραλήφθηκαν 4 ml αίματος από τη σφαγήτιδα φλέβα ανά ζώο, στα οποία ακολούθησε φυγοκέντρηση με τελική παραλαβή 1ml ορού αίματος ανά ζώο και φύλαξη στην κατάψυξη στους -20°C .

Στη συνέχεια στα δύο από τα τέσσερα ζώα πραγματοποιήθηκαν ανοσοποιήσεις με αίγεια IgG και στα άλλα δύο ανοσοποιήσεις με βόεια IgG.

Για την 1^η ανοσοποίηση χρησιμοποιήθηκαν 2ml αντιγόνο IgG και 2ml πλήρους ανοσοενυσητικού FCA (Freud's Complete Adjuvant). Η χορήγηση έγινε ενδοδερμικά.

Στην 1^η αναμνηστική ανοσοποίηση χορηγήθηκε 2ml αντιγόνου IgG και 2ml μη πλήρους ανοσοενυσητικού FIA (Freunds Incomplete Adjuvant). Μετά την πραγματοποίηση των 2 ανοσοποιήσεων πραγματοποιήθηκαν 2 διαδοχικές αιματοληψίες. Σε κάθε μια από αυτές παραλήφθηκε 1ml ορού από το κάθε ζώο, το οποίο φυλάχθηκε στην κατάψυξη στους -20°C .

Ακολούθησαν άλλες δύο αναμνηστικές ανοσοποιήσεις και άλλες δυο αιματοληψίες κατά τον προαναφερθέντα τρόπο με σκοπό την παραλαβή του ορού.

3.1.3 Έλεγχος τίτλου αντισωμάτων

3.1.3.1 Σκοπός της πειραματικής διαδικασίας

Σκοπός ήταν ο έλεγχος του τίτλου των αντισωμάτων αίγειας και βόειας IgG μετά την πραγματοποίηση των διαδοχικών ανοσοποιήσεων. Χρησιμοποιήθηκε ο ορός

που παραλήφθηκε σε κάθε αιματοληψία. Για το σκοπό αυτό εφαρμόστηκε ELISA έμμεσου τύπου (indirect) στο εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Πατρών.

Η μέθοδος εφαρμόστηκε τόσο για τον έλεγχο του τίτλου των αντισωμάτων έναντι της αίγειας IgG, όσο και για τον έλεγχο του τίτλου των αντισωμάτων έναντι της βόειας IgG.

Υλικά

- Πλάκα ELISA με 96 βοθρία
- Οροί αίματος ανοσοποιημένων ζώων
- Goat IgG antigen
- Bovine IgG antigen
- Anti-sheep IgG
- Αλβουμίνη ορού (BSA) 4%
- Ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M NaHCO₃ pH 9.5
- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS-Tween (2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄ και 0,05% Tween)
- Χρωμογόνο υπόστρωμα διάλυμα TMB (3,3',5,5' τετραμεθυλβενζιδίνη)
- Διάλυμα 2M H₂SO₄
- Πιπέττες και ρύγχοι (tips)
- Φωτόμετρο

Μέθοδος

Για την επίστρωση των βοθρίων στις πλάκες πολυστυρολίου ή πολυστυρένιο χρησιμοποιήθηκε διάλυμα αίγειας ή βόειας ανοσοσφαιρίνης 0,1μg/ml σε ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών pH 9,5 και προστέθηκαν από αυτό 100μl σε κάθε βοθρίο της πλάκας ELISA. Οι δυο πλάκες έμειναν όλη τη νύχτα για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου.

Την επόμενη ημέρα ακολούθησε 3 φορές πλύσιμο των πλακών ELISA με διάλυμα πλύσης PBS-Tween. Απομακρυνόταν το διάλυμα από τα φρεάτια, αναποδογυρίζοντας τις πλάκες και απορρίπτοντας το περιεχόμενο με το υλικό πλύσης. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 200μl διαλύματος πλύσης στα βοθρία και μετά αφαιρέθηκαν. Η διαδικασία

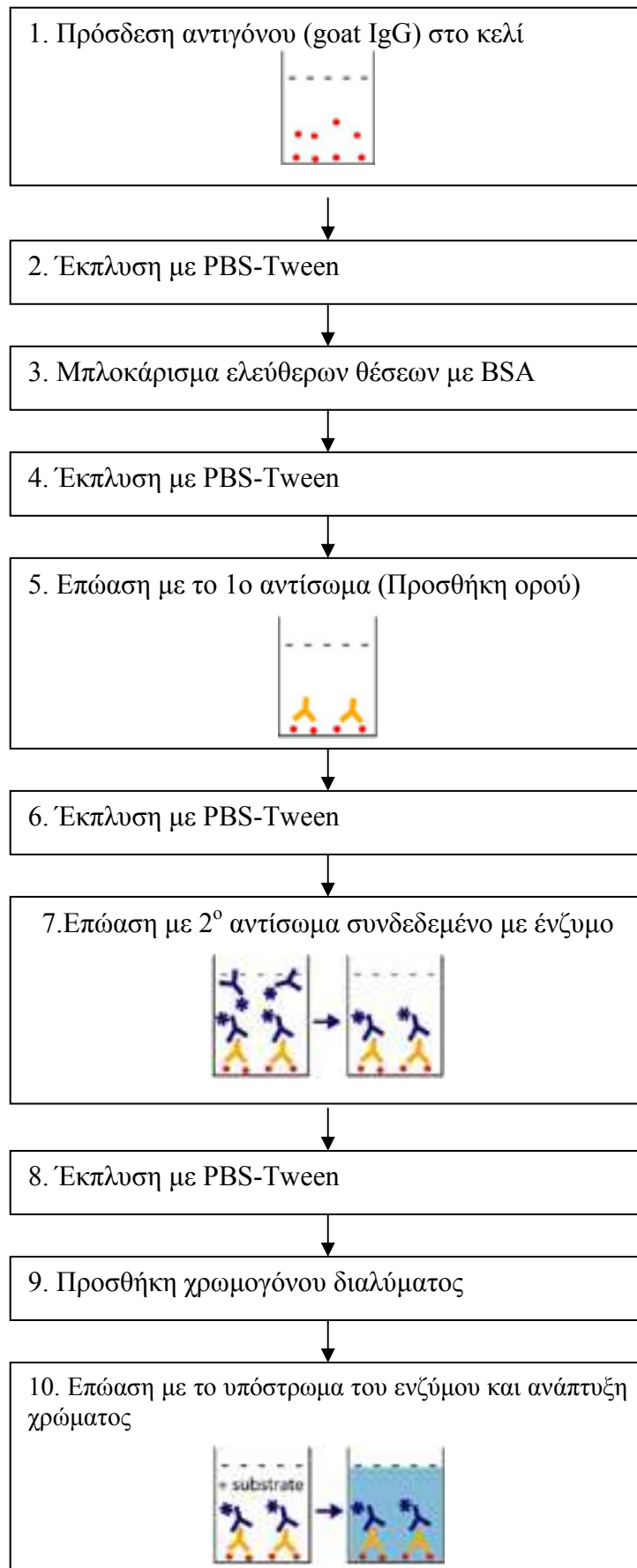
πλύσης επαναλήφθηκε άλλες δυο φορές. Στόχος ήταν να απομακρυνθεί πλήρως το ελεύθερο αντιγόνο. Αφού απομακρύνθηκε το τελευταίο υγρό πλύσης, έγινε εφαρμογή της διαδικασίας blocking. Διάλυμα blocking: BSA 4% με PBS-Tween: 1.600 mg BSA και 40ml PBS-Tween, και προστέθηκαν από αυτό 200ml ανά βοθρίο και στις δυο πλάκες. Σκοπός του blocking ήταν να μπλοκαριστούν οι πιθανές ελεύθερες θέσεις (σημεία προσρόφησης) στις πλάκες, ώστε όταν προστεθούν τα δείγματα ορών να δεσμευτούν τα αντισώματα μόνο με τα δικά τους αντιγόνα. Ακολούθησε επώαση 1 ώρα στους 37⁰C.

Ακολούθησε πλύσιμο των πλακών με PBS-Tween δυο φορές όπως προηγουμένως. Εν συνεχεία προστέθηκε το εξεταζόμενο αντίσωμα (οροί αίματος ανοσοποιημένου προβάτου με goat IgG στη μια πλάκα και οροί αίματος ανοσοποιημένου προβάτου με bovine IgG στην άλλη πλάκα). Πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις των προς εξέταση ορών διαδοχικά ως εξής: 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000. Έγινε προσθήκη 100μl αραιωμένου ορού σε κάθε βοθρίο εις διπλούν, όπως και 100μl τυφλού (αρνητικό control). Ακολούθησε επώαση για 2 ώρες και στη συνέχεια πλύσιμο πλακών 3 φορές με PBS-Tween.

Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε σημασμένο αντίσωμα του εμπορίου anti-sheep IgG συζευγμένο με υπεροξειδάση σε αραιώση 1/5000: 4μl anti-sheep IgG και 20ml PBS-Tween, και έγινε προσθήκη 100μl από το αραιωμένο αντίσωμα σε κάθε βοθρίο. Το σημασμένο αντίσωμα συνδέεται με το εξεταζόμενο αντίσωμα/αντί-ορό που έχει προσδεθεί. Ακολούθησε επώαση για 1 ώρα στους +37⁰C και στη συνέχεια πλύσιμο πλακών 3 φορές με PBS-Tween.

Ακολούθως προστέθηκαν 100μl διαλύματος υποστρώματος και χρωμογόνου TMB σε κάθε φρεάτιο, το οποίο με την καταλυτική δράση της υπεροξειδάσης του σημασμένου αντισώματος δίνει έγχρωμο τελικό προϊόν. Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκοτεινό μέρος και μετά από περίπου 5min παρατηρήθηκε η εμφάνιση χρώματος. Τερματίστηκε η αντίδραση προσθέτοντας 100μl διαλύματος 2M θειικού οξέος σε κάθε βοθρίο.

Μετρήθηκε η απορρόφηση σε φωτόμετρο μικροπλακιδίων ELISA σε μήκος κύματος 450nm. Βγήκαν οι μέσοι όροι από τις δυο απορροφήσεις ανά δείγμα και από αυτό αφαιρέθηκε ο μέσος όρος του τυφλού. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στο κεφάλαιο 4-1. Διαγραμματικά η παραπάνω περιγραφόμενη διαδικασία απεικονίζεται στην Εικόνα 3-2.



Εικόνα 3-2: Διάγραμμα απεικόνισης σταδίων κατά την εφαρμογή της μεθόδου έμμεσης ELISA

3.1.4 Καθαρισμός και παραλαβή αντισωμάτων με τη μέθοδο χρωματογραφία συγγένειας (Affinity Chromatography)

3.1.4.1 Σκοπός της πειραματικής διαδικασίας

Σκοπός της εφαρμογής της χρωματογραφίας συγγένειας ήταν η παραλαβή των αντισωμάτων goat IgG από τον ορό των προβάτων στα οποία έγινε η ανοσοποίηση με τα αντίστοιχα αντιγόνα. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην αντιστρεπτή σύνδεση της μακρομοριακής ουσίας, η οποία βρίσκεται στην κινητή φάση και θέλουμε να απομονώσουμε (αντισωμάτα goat IgG), και ενός μικρού ειδικού μορίου που λέγεται πρόσδεμα ή ligand (αντιγόνο goat IgG), που είναι συνδεδεμένο με την στερεά φάση (Κεφ. 1.3.1.3). Διαγραμματικά η πειραματική διαδικασία απεικονίζεται στην Εικόνα 3-3.

Η διαδικασία έλαβε χώρα στο εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Πατρών.

Υλικά

- Ορός προβάτων (Abs)
- Goat IgG antigen
- CNBr-activated Sepharose 4B
- Buffer NaHCO₃ 0.25 M και NaCl 1 M PH 8,5
- HCl 1mM
- Ethanolamine 1 M
- Ρυθμιστικό διάλυμα οξικών 0,1M και NaCl 0,5 M, pH 4
- Ρυθμιστικό διάλυμα 0.2M Γλυκίνη και 0.5M NaCl, pH 2.3 (2X) και 10% Διοξάνη
- Tris 1M
- Διάλυμα πλύσης PBS-Tween (2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄ και 0,05% Tween)
- Φιάλη κενού
- Πορώδες γυάλινο φίλτρο (sintered glass filter)
- Στήλη χρωματογραφίας περιεκτικότητας 10ml
- Κόκκοι κρυστάλλων (anti-bumping granules)
- Πιπέτα Pasteur

- Πιπέττες και ρύγχη (tips)
- Πλαστική ράβδος
- Falcon 15ml
- Ζυγός ακριβείας
- Φυγόκεντρος
- Φωτόμετρο

Μέθοδος

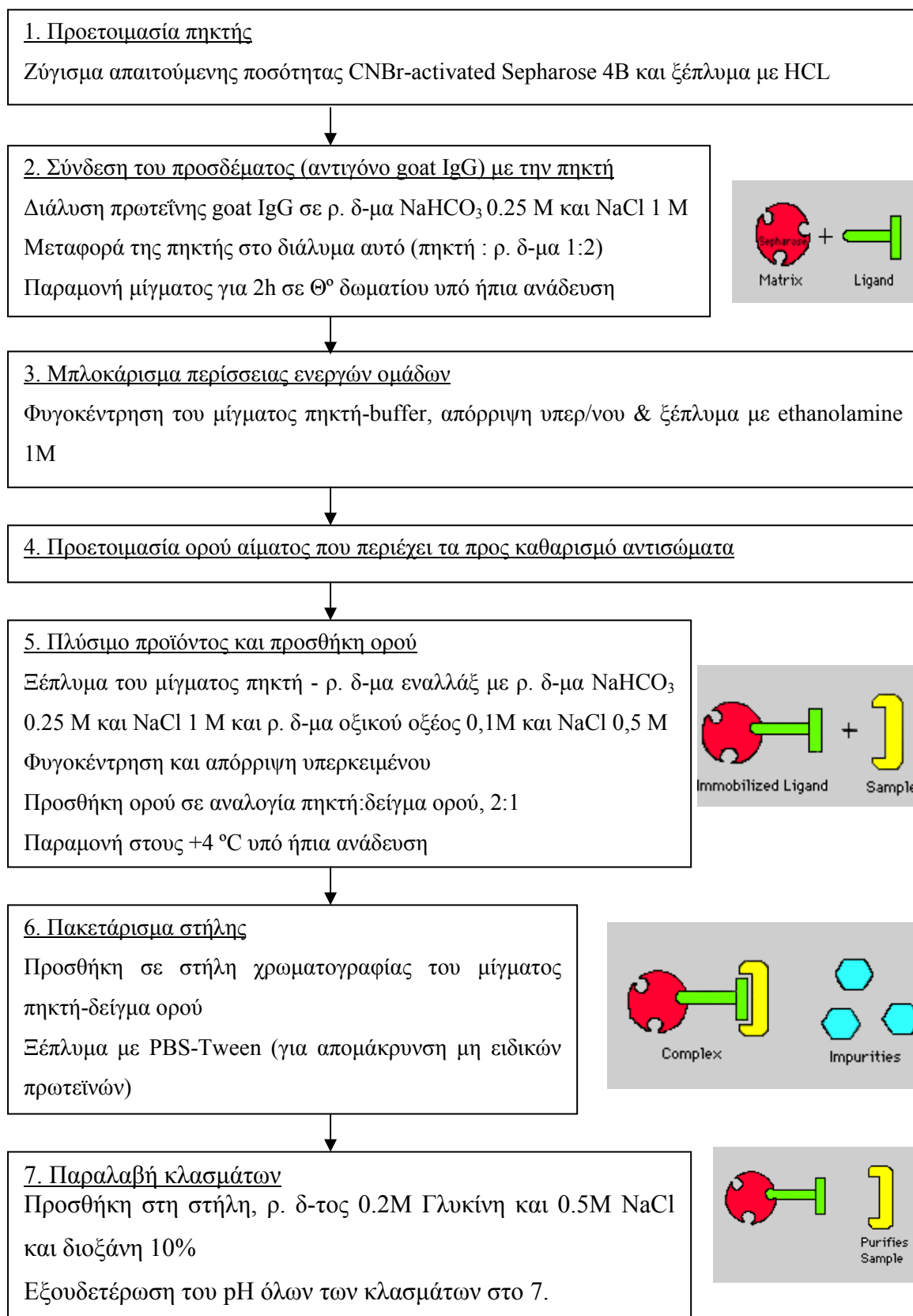
1. Προετοιμασία πηκτής (διόγκωση και πλύσιμο)

Λήφθηκε η απαιτούμενη ποσότητα CNBr-activated Sepharose 4B. Η CNBr-activated Sepharose 4B είναι ένα προενεργοποιημένο μέσο για την ακινητοποίηση προσδεμάτων που περιέχουν πρωτοταγείς αμινοομάδες. Βρίσκεται σε μορφή λυόφιλη με την παρουσία προσθέτων. Τα πρόσθετα αυτά πρέπει να ξεπλυθούν σε χαμηλό pH (pH 2-3) πριν τη σύνδεση του επιθυμητού προσδέματος. Η χρήση του χαμηλού pH διατηρεί την δραστικότητα των αντιδρώντων ομάδων, οι οποίες διαφορετικά υδρολύονται σε υψηλό pH. Για αυτό στη συνέχεια ακολούθησε ξέπλυμα της πηκτής με HCl 1mM.

1gr CNBr-activated Sepharose 4B δίνει όγκο 4,5ml πηκτής. Οπότε για πηκτή 3ml λήφθηκαν 700mgr CNBr-activated Sepharose 4B. Για να διαλυθεί αυτή η ποσότητα έγινε προσθήκη λίγων ml HCl 1 mM και παρέμεινε σε ηρεμία για 15 min όπου και πραγματοποιήθηκε διόγκωση της πηκτής. Ακολούθησε τοποθέτηση της πηκτής σε πορώδες γυάλινο φίλτρο το οποίο τοποθετήθηκε πάνω σε φιάλη κενού, για να ξεπλυθεί με διάλυμα HCl 1mM. Έγινε προσθήκη μικρής ποσότητας HCl 1mM, ανάδευση με πλαστική ράβδο και εφαρμογή κενού. Επαναλήφθηκε η διαδικασία (προσθήκη HCl-ανάδευση-εφαρμογή κενού) έως ότου χρησιμοποιήθηκαν 200ml HCl 1 mM.

Σύνδεση του προσδέματος (αντιγόνο goat IgG)

Διαλύθηκε η πρωτεΐνη goat IgG antigen σε 0,85% NaCl και προέκυψε ποσότητα 10mg /ml. Ακολούθησε προσθήκη 9mg από το διάλυμα αυτό σε 6ml ρυθμιστικού διαλύματος NaHCO₃ 0.25 M και NaCl 1 M pH 8.5. Έγινε γρήγορη μεταφορά της πηκτής η οποία είχε ξεπλυθεί με το HCl 1mM, στο παραπάνω διάλυμα πρωτεΐνης και ρυθμιστικού διαλύματος. Η αναλογία πηκτή:ρυθμιστικό διάλυμα 1:2, θεωρείται ιδανική για τη σύνδεση. Το μίγμα αυτό παρέμεινε για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχόμενη ήπια ανάδευση.



Εικόνα 3-3: Διάγραμμα απεικόνισης σταδίων χρωματογραφίας συγγένειας

Μπλοκάρισμα περίσσειας ενεργών ομάδων

Μετά τις 2 ώρες ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 2.000 rpm/min και απόρριψη του υπερκείμενου. Εν συνεχεία προστέθηκαν 9 ml ethanolamine 1M, ακολούθησε ξέπλυμα, φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες και απόρριψη του υπερκείμενου. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε 2 φορές. Μετά τις πλύσεις προστέθηκαν μέχρι 10 ml ethanolamine 1M και παρέμεινε για 2 ώρες υπό ήπια ανάδευση. Στόχος ήταν να μπλοκαριστούν υπολείμματα ενεργών ομάδων, οι οποίες παραμένουν στην πηκτή μετά τη σύνδεση του προσδέματος.

Παράλληλα τοποθετήθηκε 1 ml ορού που παρουσίασε τον υψηλότερο τίτλο αντισωμάτων (Κεφάλαιο 4-1), σε υδατόλουτρο στους $+56^{\circ}\text{C}$ για 30 min για να πραγματοποιηθεί αδρανοποίηση του συμπληρώματος.

Πλύσιμο προϊόντος

Μετά την παρέλευση των δυο ωρών, τοποθετήθηκε η πηκτή στην φιάλη κενού με το πορώδες γυάλινο φίλτρο και ακολούθησε ξέπλυμα με ρυθμιστικό διάλυμα NaHCO_3 0.25 M και NaCl 1 M (1X), έγινε ανάδευση και εφαρμογή κενού. Στη συνέχεια ακολούθησε ξέπλυμα με ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος 0,1M και NaCl 0,5 M. Εφαρμόστηκε η διαδικασία ξεπλύματος με τα δυο ρυθμιστικά διαλύματα εναλλάξ, χρησιμοποιώντας συνολικά περίπου 100ml από το καθένα¹. Στη συνέχεια προστέθηκε PBS-Tween εξισορροπώντας το pH στο 7.

Η ξεπλυμένη πλέον πηκτή τοποθετήθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα των 15ml. Ξεπλύθηκε το υπόλειμμα από το πορώδες γυάλινο φίλτρο με PBS-Tween και προστέθηκε και αυτό στο δοκιμαστικό σωλήνα. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 2000 στροφές για ένα λεπτό. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και προστέθηκε ποσότητα ορού τέτοια ώστε να δημιουργηθεί τελικά αναλογία πηκτή:δείγμα ορού, 2:1. Παρέμεινε το μίγμα στο ψυγείο στους $+4^{\circ}\text{C}$ για όλο το βράδυ υπό ήπια συνεχή ανάδευση.

Πακετάρισμα στήλης

Σε στήλη χρωματογραφίας χωρητικότητας 10ml προστέθηκαν μερικοί κόκκοι πορσελάνης για την αποφυγή απομάκρυνσης της πηκτής έξω από τη στήλη. Προστέθηκε στη στήλη PBS-Tween και στη συνέχεια το μίγμα πηκτή-δείγμα ορού. Ακολούθησε

¹ Αυτή η διαδικασία εναλλάξ πλυσίματος με ρυθμιστικά διαλύματα υψηλού και χαμηλού pH, απομακρύνει την περίσσεια προσδέματος που δεν έχει προσδεθεί στην πηκτή αλλά παραμένει ιονικά συνδεδεμένη με το ακινητοποιημένο πρόσδεμα.

ξέπλυμα του δοκιμαστικού σωλήνα που περιείχε το μίγμα πηκτή-δείγμα ορού με PBS-Tween με τη χρήση πιπέτας Pasteur και προσθήκη αυτής της ποσότητας στη στήλη. Σιγά - σιγά απομακρύνθηκε το PBS-Tween από την στήλη (σταγόνα-σταγόνα). Όταν στο τέλος είχε φύγει το PBS-Tween, η πηκτή επικάθησε ομοιόμορφα στη στήλη (Εικ. 3-4).

Ακολούθησε σταδιακά ξέπλυμα με συνολική ποσότητα 30ml PBS-Tween με σκοπό να απομακρυνθούν οι μη ειδικές πρωτεΐνες που υπήρχαν (δηλ. οι πρωτεΐνες εκτός της goat IgG). Λήφθηκε 1 ml PBS-Tween προς το τέλος και αυτό φωτομετρήθηκε στα 280nm για να διαπιστωθεί αν υπάρχει ακόμα ξένη πρωτεΐνη. Εφόσον διαπιστώθηκε ότι υπήρχε μηδενική ξένη πρωτεΐνη, πράγμα που σήμαινε ότι στην πηκτή υπήρχε ενωμένη με το πρόσδεμα μόνο η goat IgG, ακολούθησε η παραλαβή των κλασμάτων.

Προστέθηκαν στη στήλη ρυθμιστικό διάλυμα 0.2M Γλυκίνη pH 2.3 με 0.5M NaCl και διοξάνη 10%, με το οποίο πραγματοποιήθηκε η έκλουση των αντισωμάτων goat IgG από το πρόσδεμα. Λήφθηκαν 10 κλάσματα του 1 ml. Εν συνεχεία έγινε έλεγχος του pH κάθε κλάσματος και πραγματοποιήθηκε εξουδετέρωση του pH όλων των κλασμάτων στο 7¹.

Προετοιμάστηκε ένα τυφλό διάλυμα με 1ml 0.2M Γλυκίνη pH 2.3 και 0.5M NaCl και διοξάνη 10% και προστέθηκαν σε αυτό 110μl Tris, οπότε το pH έφτασε στο 7.

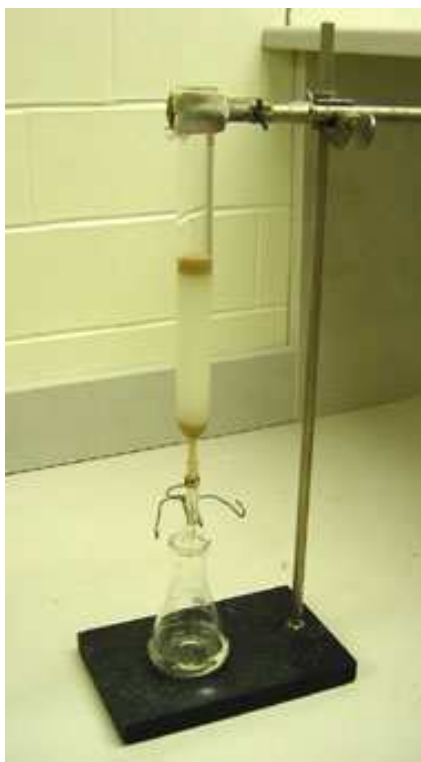
Φωτομετρήθηκαν ένα - ένα τα κλάσματα στο φωτόμετρο στα 280nm με πρώτο το τυφλό διάλυμα.

Μετά την παραλαβή των κλασμάτων προστέθηκε στη στήλη που περιείχε τη πηκτή, PBS-Tween και νατραζίδιο 0,1% για συντήρηση.

Ξεπακετάρισμα στήλης

Για να μπορέσει να ξαναχρησιμοποιηθεί η στήλη, έπρεπε να ξεπακεταριστεί. Αυτό έγινε προσθέτοντας σταδιακά PBS-Tween και μεταφέροντας την πηκτή με το PBS-Tween με τη βοήθεια πιπέτας pasteur σε δοκιμαστικούς σωλήνες των 15ml. Ακολούθησε φυγοκέντρηση και αφού απορρίφθηκε το υπερκείμενο, η πηκτή χρησιμοποιήθηκε για την παραλαβή αντισωμάτων από ακόμα 1ml ορού με αντισώματα goat IgG σύμφωνα με την παραπάνω περιγραφόμενη διαδικασία.

¹ Τα αντισώματα αν παραμείνουν σε χαμηλό PH καταστρέφονται



Εικόνα 3-4: Στήλη για χρωματογραφία συγγένειας

Πηγή: Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Πατρών

3.1.5 Βιοτινυλίωση αντισωμάτων goat IgG

3.1.5.1 Σκοπός της πειραματικής διαδικασίας

Σκοπός της βιοτινυλίωσης των αντισωμάτων goat IgG ήταν η επισήμανσή τους με βιοτίνη με στόχο την δέσμευσή τους με την στρεπταβιδίνη της στερεάς επιφάνειας των πλακών ELISA. Βιοτινυλίωση είναι η διαδικασία κατά την οποία πραγματοποιείται η επισήμανση αντισωμάτων, πρωτεϊνών και άλλων μακρομορίων που περιέχουν πρωτοταγείς αμινοομάδες. Κατά τη διαδικασία αυτή συνδέεται η βιοτίνη με την πρωτοταγή αμινοομάδα της πρωτεΐνης. Η βιοτίνη είναι μια βιταμίνη μοριακής μάζας 224 Da, που αποτελεί συνένζυμο των καρβοξυλασών και μπορεί να συζευχθεί με πολλές πρωτεΐνες χωρίς όμως να αλλάζει τη βιολογική τους δράση. Έχει υψηλή συγγένεια με τις πρωτεΐνες αβιδίνη και στρεπταβιδίνη (Κεφ. 1.4.2).

Η διαδικασία έλαβε χώρα στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Πατρών.

3.1.5.2 Προετοιμασία των προς επισήμανση αντισωμάτων για τη διαδικασία της βιοτινυλίωσης

Συμπύκνωση κλασμάτων

Μετά τη φωτομέτρηση των κλασμάτων που παρελήφθησαν από τη στήλη ακολουθεί η διαδικασία συμπύκνωσής τους.

Υλικά

- Corning Concentrators MWCO 30.000, χωρητικότητας 6ml
- Φυγόκεντρος
- Φωτόμετρο
- Πιπέτες Pasteur

Μέθοδος

Συλλέχθηκαν τα κλάσματα σε corning με φίλτρο από το οποίο περνάνε μόρια με MB μικρότερο των 30.000 KDa. Οπότε τα αντισώματα IgG παρέμειναν πάνω από το φίλτρο αφού το MB τους είναι 150.000 KDa. Πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές φυγοκεντρήσεις στις 4000 rpm/min (στροφές/λεπτό), προσθέτοντας σταδιακά και τα 14 κλάσματα που επιλέχθηκαν, όσα δηλαδή περιείχαν αντισώματα IgG σύμφωνα με τη φωτομέτρηση (παράρτημα), δηλ. σύνολο 14ml. Έτσι από το φίλτρο πέρασαν τελικά 13,5ml ενώ πάνω από το φίλτρο έμειναν 0,5ml, στο οποίο υπήρξε η συνολική ποσότητα των αντισωμάτων IgG που παρελήφθησαν από 2ml ορού αίματος.

Εν συνεχεία πραγματοποιήθηκε αραίωση του παραπάνω συμπυκνώματος 100 φορές. Δηλαδή προστέθηκαν 5ml συμπυκνώματος σε 500ml PBS. Ακολούθησε φωτομέτρηση στα 280nm.

Διαπίδυση

Υλικά

- Μεμβράνη διαπίδυσης
- Κύλινδρος χωρητικότητας 110ml
- PBS (2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄)

Μέθοδος

Για την βιοτινυλίωση των αντισωμάτων απαιτείται η χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων που δεν περιέχουν πρωτοταγείς αμίνες, όπως το Tris και η γλυκίνη, για αυτό πραγματοποιήθηκε διαπίδυση των 500μl συμπυκνώματος αντισωμάτων σε 110ml PBS. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε μεμβράνη στην οποία προστέθηκαν τα 500 μl συμπυκνώματος και αυτή τοποθετήθηκε σε κύλινδρο με 110ml PBS. Παρέμειναν όλο το βράδυ στο ψυγείο υπό συνεχή ανάδευση σε αναδευτήρα.

Την επόμενη μέρα παρελήφθη το αντίσωμα σε PBS και ακολούθησε η διαδικασία της βιοτινυλίωσης.

Υπολογισμός ποσότητας αντισώματος

Παρελήφθησαν 480μl αντισώματος σε PBS, προστέθηκαν στη μεμβράνη 30μl PBS για ξέπλυμα και από τα 510μl συνολικά αραιώθηκαν τα 10μl σε 490μl PBS. Ακολούθησε φωτομέτρηση στα 280nm.

OD Δείγματος: 0.0633

OD Τυφλού: 0.0245

OD Δείγματος - OD Τυφλού=0, 0388

Στα 10mg/ml η απορρόφηση είναι 14

X; 0, 0388

X=0,0277mg/ml ή 27,7μg/ml ή 13,85μg/500μl, δηλαδή

13,85μg αντισώματος στα 10μl συμπυκνώματος, δηλαδή 692,5μg/500μl ή 1,385mg/ml

3.1.5.3 Βιοτινυλίωση

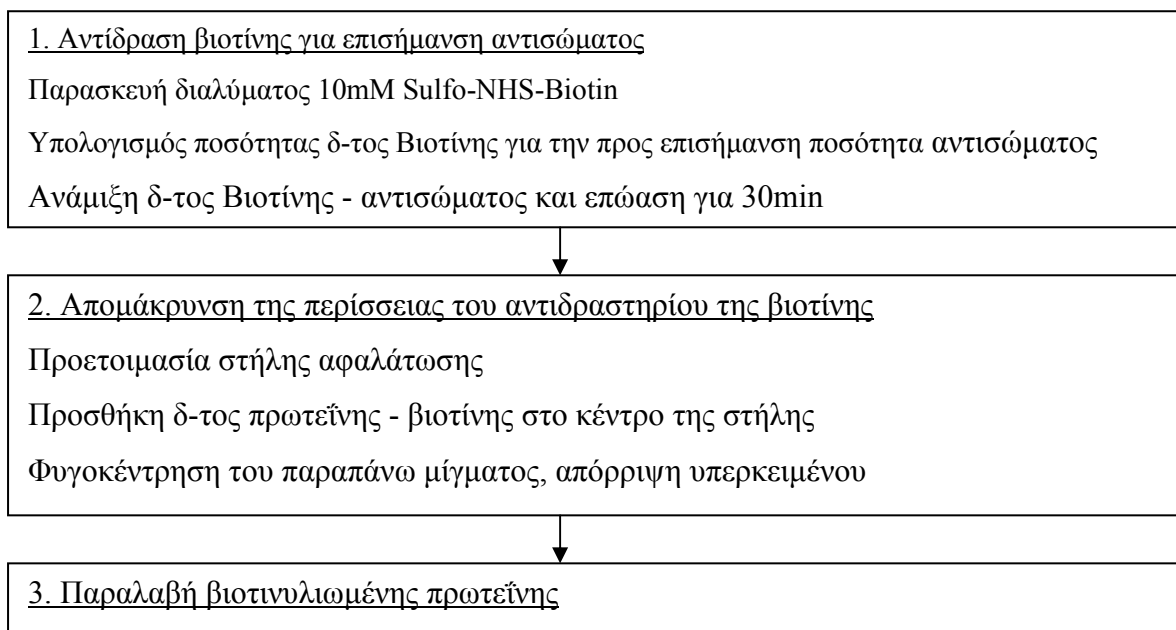
Υλικά

- Το προς επισήμανση αντίσωμα goat IgG (1,385mg/ml)
- Αντιδραστήριο βιοτίνης - Sulfo-NHS-Biotin (sulfosuccinimidyl-6-[biotin-amido] hexanoate)
- Zeba Desalt Spin Column, 5ml για δείγματα 500-2000μl, 7000 MWCO
- PBS (2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄)
- Συντηρητικό protein diluent

- Δοκιμαστικοί σωλήνες 15ml
- Φυγόκεντρος

Μέθοδος

Διαγραμματικά η πειραματική διαδικασία της βιοτινυλίωσης απεικονίζεται στην Εικόνα 3-5.



Εικόνα 3-5: Διάγραμμα απεικόνισης σταδίων βιοτινυλίωσης αντισώματος

Αντίδραση βιοτίνης για επισήμανση

Μεταφέρθηκε το αντιδραστήριο βιοτίνης (Sulfo-NHS-Biotin) από τον καταψύκτη (-20⁰C) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, πριν ανοίξει. Παρασκευάστηκε διάλυμα 10mM Sulfo-NHS-Biotin διαλύοντας 1,1mg σε 250μl δισαπεσταγμένου νερού.

Έγινε υπολογισμός της ποσότητας του διαλύματος βιοτίνης που έπρεπε να προστεθεί ανάλογα με την ποσότητα της πρωτεΐνης (1,385mg IgG) που υπήρχε προς επισήμανση. Ο υπολογισμός έγινε σύμφωνα με τους κάτωθι τύπους¹:

1. $\text{ml protein} \times (\text{mg protein} / \text{ml protein}) \times (\text{mmol protein} / \text{mg protein}) \times (20 \text{mmol Biotin} / \text{mmol protein}) = \text{mmol Biotin}$, και
2. $\text{mmol Biotin} \times (443 \text{mg} / \text{mmol Biotin}) \times (250 \mu\text{l} / 1,1 \text{mg}) = \mu\text{l Biotin Solution}$

¹ Οι τύποι περιλαμβάνονται στις οδηγίες για την βιοτινυλίωση στο EZ-Link Sulfo-NHS-Biotinylation Kit της εταιρίας Pierce.

- 443= Μοριακό βάρος του Sulfo-NHS-Biotin
- 250=Μικρόλιτρα δισαπεσταγμένου νερού στα οποία διαλύθηκαν 1,1mg Sulfo-NHS-Biotin για να προκύψει διάλυμα 10mM

οπότε για 0,5ml διαλύματος 1,385mg/ml IgG (150.000 MW), προκύπτει:

1. 0.5ml IgG X 1.385mg IgG/ml IgG X 1mmol IgG/150.000IgG X 20mmol Biotin/1mmol IgG = 0.0000923 mmol Biotin και
2. 0.0000923 X 443mg/mmol Biotin X 250μl /1.1mg = 9.2929 ~10μl Biotin Solution

Επομένως στο διάλυμα πρωτεΐνης προστέθηκαν 10μL διαλύματος Biotin. Έγινε επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 30min.

Απομάκρυνση της περίσσειας του αντιδραστηρίου της βιοτίνης με τη χρήση στηλών αφαλάτωσης

Προετοιμάστηκε μια στήλη αφαλάτωσης (Εικ. 3-6), σπάζοντας το κάτω μέρος και τοποθετώντας την σε δοκιμαστικούς σωλήνες των 15 ml. Ακολούθησε φυγοκέντρηση της στήλης στις 1000 rpm/min για 2min, απόρριψη του εκλούσματος και επιστροφή της στήλης στο ίδιο δοκιμαστικό σωλήνα.

Ακολούθησε προσθήκη 2,5ml PBS στη στήλη, στο πάνω μέρος της κλήνης ρητίνης και έγινε ξανά φυγοκέντρηση στις 1000 rpm/min για 2min. Απορρίφθηκε το έκλουσμα και επαναλήφθηκε αυτό το στάδιο 3 φορές.

Εν συνεχεία η στήλη τοποθετήθηκε σε ένα νέο δοκιμαστικό σωλήνα των 15ml και προστέθηκε το διάλυμα πρωτεΐνης και βιοτίνης κατευθείαν στο κέντρο της κλήνης ρητίνης. Αφέθηκε το δείγμα να απορροφηθεί μέσα στη ρητίνη αφού πρώτα προστέθηκαν 100μl δισαπεσταγμένου νερού¹.

Ακολούθησε φυγοκέντρηση της στήλης στις 1000 rpm/min στροφές για 2min. Το έκλουσμα που συλλέχθηκε (600μl) ήταν το δείγμα καθαρισμένης πρωτεΐνης. Σε αυτό έγινε προσθήκη 600μl συντηρητικού protein diluent, οπότε η συγκέντρωση της πρωτεΐνης έγινε ~0,5mg/ml.

Μεταφέρθηκε σε erendorf για συντήρηση στους -20⁰C με την σήμανση:

Biotin Goat anti-Sheep IgG ≈ 0.5mg / ml

¹ Για δείγματα <1000μl, προστίθενται 100μl δισαπεσταγμένου νερού στο πάνω μέρος του προς απορρόφηση δείγματος για να αυξηθεί η ανάκτηση της πρωτεΐνης.



Εικόνα 3-6: Στήλη αφαλάτωσης του EZ-Link Sulfo-NHS-Biotinylation Kit της εταιρίας Pierce

Πηγή: Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Πατρών

3.1.6 Εφαρμογή ανοσοενζυμικής μεθόδου ELISA για ανίχνευση αίγειου γάλακτος σε πρόβειο

Η μέθοδος αυτή την οποία αναπτύξαμε στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Πατρών στηρίζεται στην ανίχνευση των ανοσοσφαιρινών IgG της αίγας που υπάρχουν στο αίγειο γάλα και οι οποίες διαφέρουν από αυτές του προβάτου που υπάρχουν στο πρόβειο γάλα. Έτσι, με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων που αναγνωρίζουν μόνο τις ανοσοσφαιρίνες IgG της αίγας και όχι τις ανοσοσφαιρίνες IgG του προβάτου είναι δυνατόν να διαπιστωθεί με την ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA η ύπαρξη ανοσοσφαιρινών IgG αίγας σε δείγματα πρόβειου γάλακτος, υποδηλωτικό πρόσμιξης αίγειου γάλακτος σε πρόβειο.

Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε δείγματα γάλακτος με γνωστές προσμίξεις αίγειου σε πρόβειο γάλα, αλλά και σε δείγματα γάλακτος με γνωστές προσμίξεις αίγειου και αγελαδινού σε πρόβειο γάλα. Σε κάθε περίπτωση ανιχνευόταν η πρόσμιξη του αίγειου γάλακτος.

Υλικά

- Πλάκα ELISA 96 βοθρίων με αποσπώμενες οκτάδες βοθρίων (streptavidin strips) (Εικ. 3-7)
- 1ο αντίσωμα - ειδικό: Biotin Goat anti-sheep IgG (αυτό που παρασκευάσαμε, απομονώθηκε και βιοτινυλιώθηκε)

- 2^ο αντίσωμα: Goat anti-sheep IgG HRP (horseradish peroxidase) conjugated
- 5 πρότυπα διαλύματα ανοσοσφαιρίνης IgG αίγας αυξανόμενης συγκέντρωσης που αντιστοιχεί σε πρόσμιξη 2,06%, 8,15%, 16,5%, 33% και 49,5%
- Χρωμογόνο υπόστρωμα διάλυμα TMB (3,3',5,5' τετραμέθυλβενζιδίνη)
- PBS-Tween (2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄ και 0,05% Tween)
- Δοκιμαστικοί σωλήνες των 15ml
- Φωτόμετρο για ανάγνωση οπτικής πυκνότητας A450 μεταξύ 0,0 και 3,0.



Εικόνα 3-7: Πλάκα ELISA με αποσπώμενες οκτάδες βοθρίων

Πηγή: Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Πατρών

Μέθοδος

Στην πλάκα ELISA τοποθετούνταν τόσες οκτάδες βοθρίων όσες χρειαζόνταν κάθε φορά ανάλογα με τον αριθμό των προς ανάλυση δειγμάτων και οι υπόλοιπες τοποθετούνταν πάλι στην αλουμινένια συσκευασία, κλείνονταν καλά και φυλάσσονταν στο ψυγείο.

Τα δείγματα γάλακτος που επρόκειτο να αναλυθούν αποψύχονταν από την προηγούμενη στους +4^οC. Ακολουθούσε αραιώση των δειγμάτων 1:50 (δηλ. 40μl γάλα σε 2ml PBS-Tween) και 1:100 σε εκείνα τα δείγματα τα οποία είχαν γνωστή πρόσμιξη αίγειου μεγαλύτερη του 49.5%¹ (δηλ. 50μl γάλα σε 5ml PBS-Tween).

Ακολουθούσε αραιώση του 1^{οο} αντισώματος. Σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα των 15ml μεταφερόταν ο απαιτούμενος όγκος διαλύματος PBS-Tween (ανάλογα με τα κελιά που χρησιμοποιούνταν) και στη συνέχεια προσθέτονταν 40μl/ml PBS-Tween και έτσι προέκυπτε το αραιωμένο 1^ο αντίσωμα.

¹ Επειδή τα πρότυπα έφταναν μέχρι 49,5%, οπότε σε αυτά τα δείγματα στο τέλος πολλαπλασιαζόταν το αποτέλεσμα X2

Εν συνεχεία τοποθετούνταν εις διπλούν στα βοθρία της πλάκας: 50μl PBS-T, το οποίο χρησιμοποιούταν ως τυφλό, 50μl των 5 πρότυπων διαλυμάτων και 50μl από τα αραιωμένα δείγματα γάλακτος. Ακολούθως προσθέτονταν σε όλα τα βοθρία 50μl από το αραιωμένο 1^ο αντίσωμα. Η πλάκα αφηνόταν για 40 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος υπό συνεχή ανάδευση.

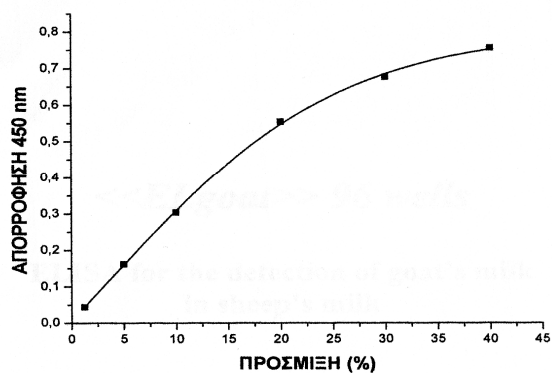
Μετά την παρέλευση των 40 λεπτών γινόταν απόρριψη του περιεχομένου των βοθρίων και η πλάκα εκπλένοταν 3 φορές με 200 μL διαλύματος PBS-Tween ανά βοθρίο. Στη συνέχεια προσθέτονταν 100 μL ανά βοθρίο από το διάλυμα του αραιωμένου 2^{ου} αντισώματος. Αυτό προέκυπτε μεταφέροντας σε δοκιμαστικό σωλήνα των 15ml τον απαιτούμενο όγκο διαλύματος PBS-Tween, ανάλογα με τα χρησιμοποιούμενα βοθρία, και σε αυτό προσθέτονταν 10μl / ml PBS-Tween. Η πλάκα αφηνόταν για 30 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος υπό συνεχή ανάδευση.

Μετά την παρέλευση των 30 λεπτών, γινόταν απόρριψη του περιεχομένου των βοθρίων και η πλάκα εκπλένοταν 3 φορές με 200 μL διαλύματος PBS-Tween ανά βοθρίο. Στη συνέχεια προσθέτονταν 100 μL ανά βοθρίο TMB και η πλάκα αφηνόταν για 15 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και σε σκοτάδι.

Στην συνέχεια η αντίδραση τερματιζόταν με την προσθήκη διαλύματος 100μL ανά βοθρίο 2M H₂SO₄ και λάμβανε χώρα η μέτρηση της απορρόφησης κάθε βοθρίου σε φωτόμετρο στα 450 nm.

Μετά την φωτομέτρηση υπολογιζόταν ο μέσος όρος των δυο απορροφήσεων για κάθε δείγμα γάλακτος, τα πρότυπα διαλύματα και το τυφλό. Από κάθε μέσο όρο αφαιρούνταν ο μέσος όρος του τυφλού.

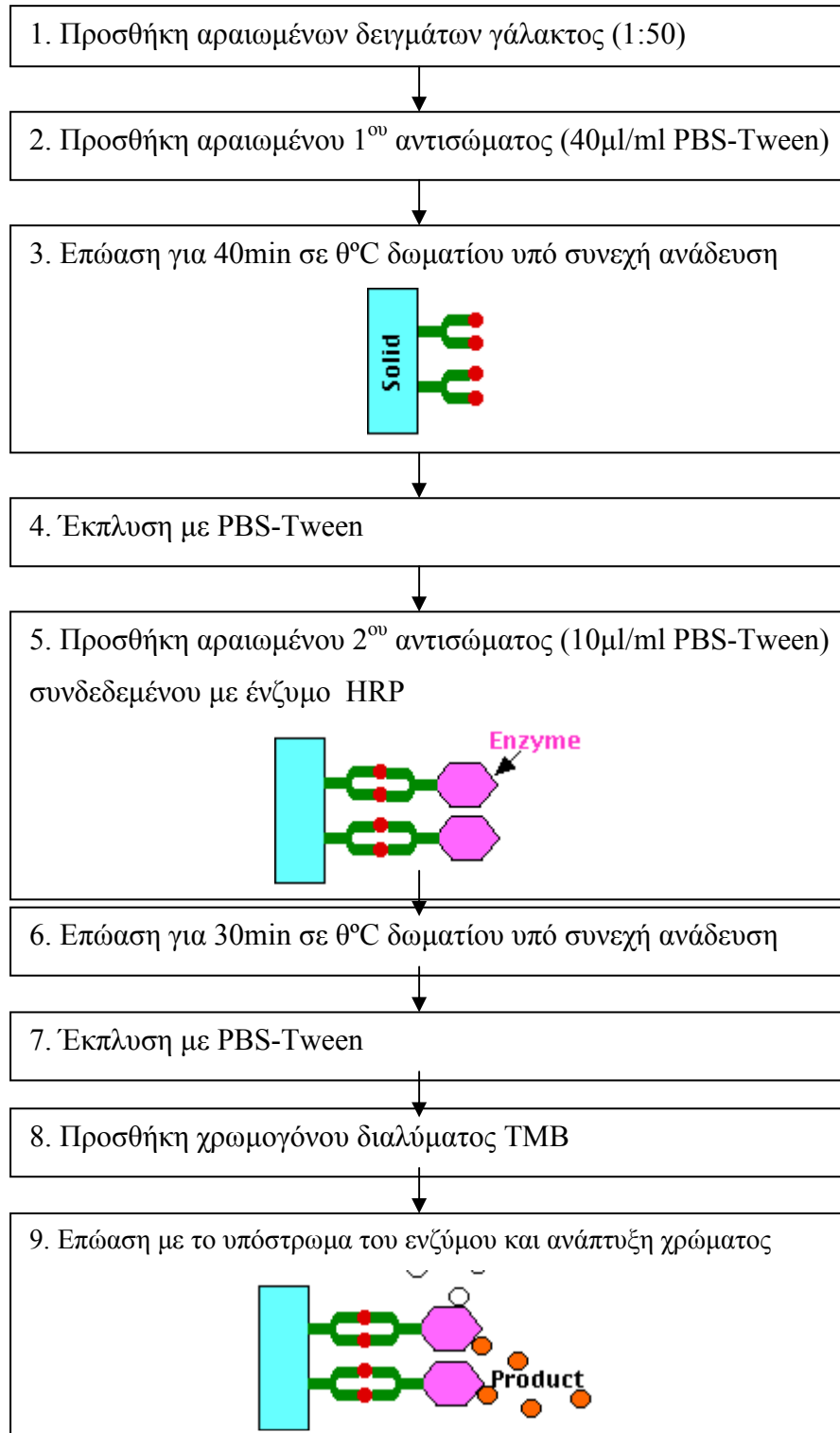
Κατασκευάστηκε μια πρότυπη καμπύλη τοποθετώντας στον άξονα X την (%) πρόσμιξη των πρότυπων διαλυμάτων και στον άξονα Ψ την καθαρή, μετά την αφαίρεση του τυφλού, απορρόφηση των πρότυπων διαλυμάτων αντίστοιχα (Εικ 3-8). Ο υπολογισμός της πρόσμιξης των δειγμάτων γάλακτος σε αίγιο, γινόταν παρεμβάλλοντας τις τιμές της απορρόφησης των δειγμάτων, μετά την αφαίρεση του τυφλού, στην καμπύλη αναφοράς.



Εικόνα 3-8: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς

Στα δείγματα γάλακτος περιλαμβάνονταν και 4 δείγματα με αραιώση καθαρού αίγειου γάλακτος 10% και άλλα 4 δείγματα με αραιώση καθαρού αίγειου γάλακτος 30%. Ο στόχος ήταν να συγκριθεί ο μέσος όρος των τελικών απορροφήσεων των 4 δειγμάτων με τις αντίστοιχες απορροφήσεις των προτύπων διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν και να αποφασιστεί αν τελικά η πρότυπη καμπύλη χρειαζόταν να διορθωθεί.

Διαγραμματικά η παραπάνω περιγραφόμενη διαδικασία απεικονίζεται στην Εικόνα 3-9.

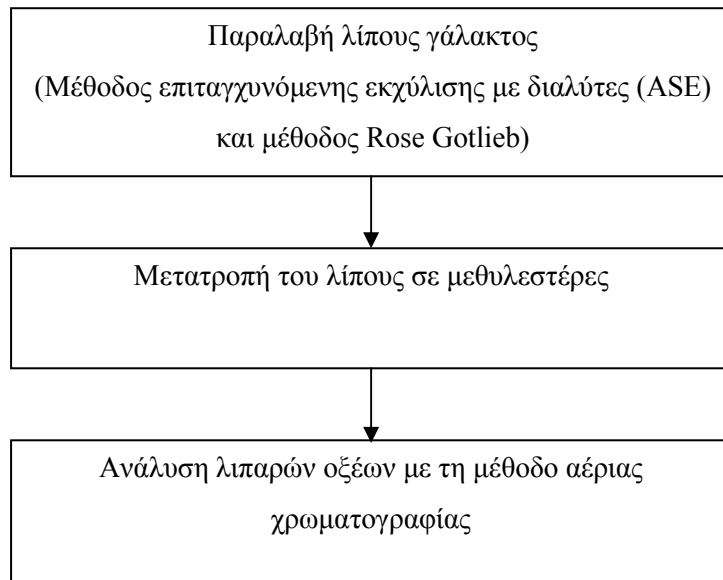


Εικόνα 3-9: Διάγραμμα απεικόνισης σταδίων sandwich ELISA

3.2 Προσδιορισμός της σύνθεσης των λιπαρών οξέων διαφορετικών μιγμάτων γάλακτος

3.2.1 Σκοπός της μελέτης

Στο δεύτερο τμήμα της παρούσας μελέτης, όπως έχει αναφερθεί, αναλύθηκε το προφίλ των λιπαρών οξέων σε μίγματα αίγειου-πρόβειου γάλακτος καθώς και σε μίγματα αγελαδινού-αίγειου και αγελαδινού-πρόβειου. **Σκοπός ήταν η ανίχνευση νοθείας με βάση τη διαφοροποίηση του ποσοστού των λιπαρών οξέων στα διαφορετικά μίγματα γάλακτος.** Τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας παρουσιάζονται στο διάγραμμα της Εικόνας 3-10.



Εικόνα 3-10: Διάγραμμα απεικόνισης σταδίων για την ανάλυση των λιπαρών οξέων

3.2.2 Παραλαβή λίπους γάλακτος

Για την παραλαβή του λίπους από τα δείγματα γάλακτος εφαρμόστηκαν δυο μέθοδοι. Η πρώτη μέθοδος ήταν αυτή της επιταχυνόμενης εκχύλισης με διαλύτες, η οποία έλαβε χώρα στο Εργαστήριο Γαλακτοκομίας του Τμήματος Ζωικής παραγωγής του Πανεπιστημίου της Πάντοβα, Ιταλίας, ενώ η δεύτερη ήταν η μέθοδος Rose Gotlieb η οποία έλαβε χώρα στο Εργαστήριο Γαλακτοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

3.2.2.1 Παραλαβή λίπους με τη μέθοδο επιταχυνόμενης εκχύλισης με διαλύτες (ASE: Accelerated Solvent Extraction)

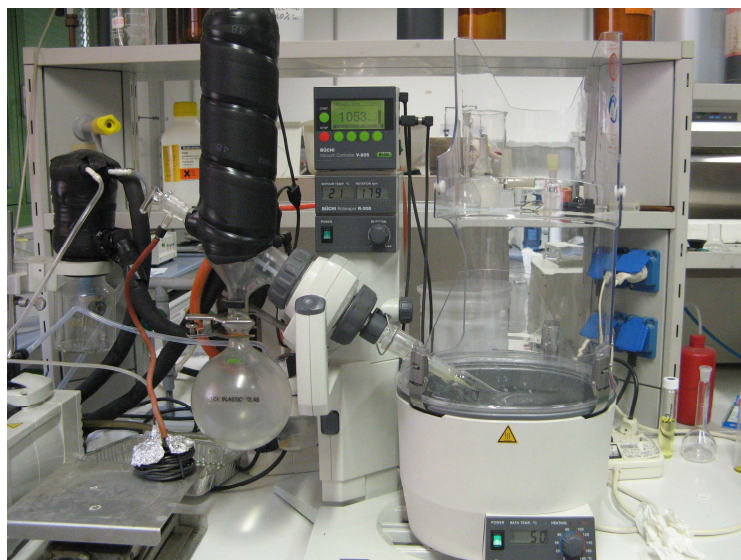
Πρόκειται για μια μέθοδο προσδιορισμού του λίπους του γάλακτος (πλήρες, ομογενοποιημένο/UHT γάλα, άπαχο γάλα (0,1% λίπος), όπως επίσης και για τον προσδιορισμό του λίπους στην κρέμα, στο τυρί και στο βούτυρο. Στο πείραμα αυτό εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό του λίπους σε πλήρες αγελαδινό, αίγιο και πρόβειο γάλα καθώς και σε μίγματα αυτών ανά δύο, σε διάφορες αναλογίες.

Η μέθοδος στηρίζεται στην διάλυση του λίπους σε οργανικούς διαλύτες, στη συγκεκριμένη περίπτωση σε πετρελαϊκό αιθέρα και ισοπροπανόλη σε αναλογία 2:1. Έχει το πλεονέκτημα της γρήγορης παραλαβής του λίπους (8-10 λεπτά) λόγω της αυξανόμενης θερμοκρασίας (μέχρι 120⁰C) και πίεσης (μέχρι 1500psi) που εφαρμόζεται, αυξάνοντας έτσι την ταχύτητα της διαδικασίας εξαγωγής του λίπους. Επίσης είναι μια αυτοματοποιημένη μέθοδος, η οποία επιτρέπει την ταυτόχρονη εξαγωγή του λίπους από 24 διαφορετικά δείγματα (Εικ. 3-11). Εν συνεχεία εξατμίζονται οι διαλύτες σε περιστροφικό εξατμιστήρα υπό κενό (Εικ: 3-12), προκειμένου να παραληφθεί το λίπος χωρίς τους διαλύτες.



Εικόνα 3-11: Συσκευή Accelerated Solvent Extraction της εταιρίας Dionex

Πηγή: Τμήμα Ζωικής Παραγωγής, University of Padova



Εικόνα 3-12: Περιστροφικός εξατμιστήρας υπό κενό
Πηγή: Τμήμα Ζωικής Παραγωγής, University of Padova

Υλικά

- ASE Prep DE (γη διατόμων)
- Πετρελαϊκός αιθέρας
- Ισοπροπανόλη
- ASE 200 Accelerated Solvent Extractor με κάψουλες από ανοξείδωτο ατσάλι των 22ml.
- Φίλτρα κυτταρίνης
- Φιαλίδια συλλογής των 40 ml
- Αναλυτικός ζυγός
- Περιστροφικός εξατμιστήρας υπό κενό
- Φούρνος - Κλίβανος
- Σιφόνια των 4 ml

Μέθοδος

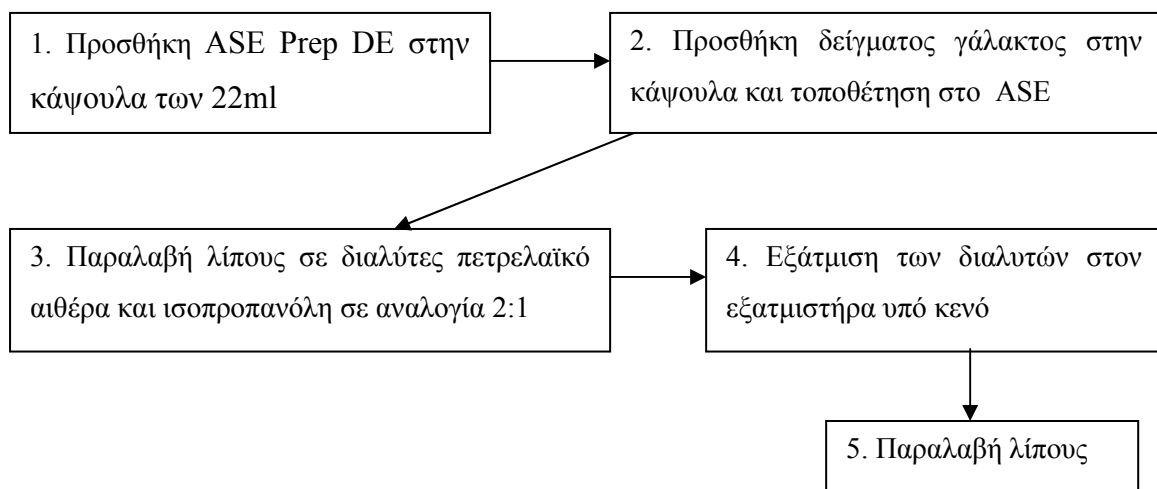
Στον πυθμένα της κάψουλας των 22ml τοποθετούταν ένα φίλτρο κυτταρίνης. Ζυγίζονταν σε ζυγό ακριβείας 6 gr ASE Prep DE και προσθέτονταν στην κάψουλα. Λαμβάνονταν 4 ml γάλακτος από το προς ανάλυση δείγμα και προσθέτονταν στο κέντρο της κάψουλας. Η κάψουλα έκλεινε και τοποθετούταν στο μηχάνημα έχοντας πρώτα τοποθετήσει σε αυτό και το αντίστοιχο φιαλίδιο των 40 ml, στο οποίο παραλαμβάνονταν

το λίπος με τους διαλύτες. Η ίδια διαδικασία ακολουθούσε και για τα υπόλοιπα δείγματα. Στον ASE 200 Accelerated Solvent Extractor τοποθετούνταν μέχρι 12 δείγματα.

Εν συνεχεία τοποθετούνταν ένα - ένα τα φιαλίδια στον εξατμιστήρα, όπου πραγματοποιούταν συμπύκνωση υπό κενό σε θερμοκρασία 50°C, μέχρι να εξατμιστούν πλήρως οι διαλύτες και να μείνει μόνο το λίπος.

Ακολουθούσε τοποθέτηση των φιαλιδίων με το λίπος σε κλίβανο στους 70 °C για 10 λεπτά και παραλαβή του λίπους με τη βοήθεια πετρελαϊκού αιθέρα για κατάψυξή του (-20 °C) μέχρι την ανάλυσή του.

Διαγραμματικά η παραπάνω διαδικασία απεικονίζεται στην Εικόνα 3-13.



Εικόνα 3-13: Διάγραμμα απεικόνισης σταδίων παραλαβής λίπους με τη μέθοδο ASE

3.2.2.2 Παραλαβή λίπους με τη μέθοδο Rose Gottlieb

Η παραλαβή του λίπους με την μέθοδο Rose Gottlieb βασίζεται στο πρότυπο 16C: 1987 της Διεθνούς Ομοσπονδίας Γάλακτος (IDF Standard 16C: 1987).

Η μέθοδος αποτελεί ποσοτικό προσδιορισμό του λίπους του γάλακτος και είναι κατάλληλη για τον προσδιορισμό του λίπους στην κρέμα, στο παγωτό και σε άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα. Βασίζεται στην εξαγωγή ενός αμμωνιακού αιθανολικού διαλύματος από το δείγμα, το οποίο εξάγεται μέσω ενός μίγματος αιθέρων. Έπειτα εξατμίζεται ο αιθέρας και παραμένει το εξαχθέν λίπος.

Υλικά

- Αιθυλαιθέρας

- Πετρελαϊκός αιθέρας
- Διάλυμα αμμωνίας (NH₄OH) 80%
- Αιθανόλη 99%
- Σιφώνια των 1 και 10 ml.
- Πιπέτες Pasteur 1 ml.
- Φιάλη Rose Gottlieb
- Φιάλες περιστροφικού εξατμιστήρα.
- Περιστροφικός εξατμιστήρας υπό κενό.

Μέθοδος

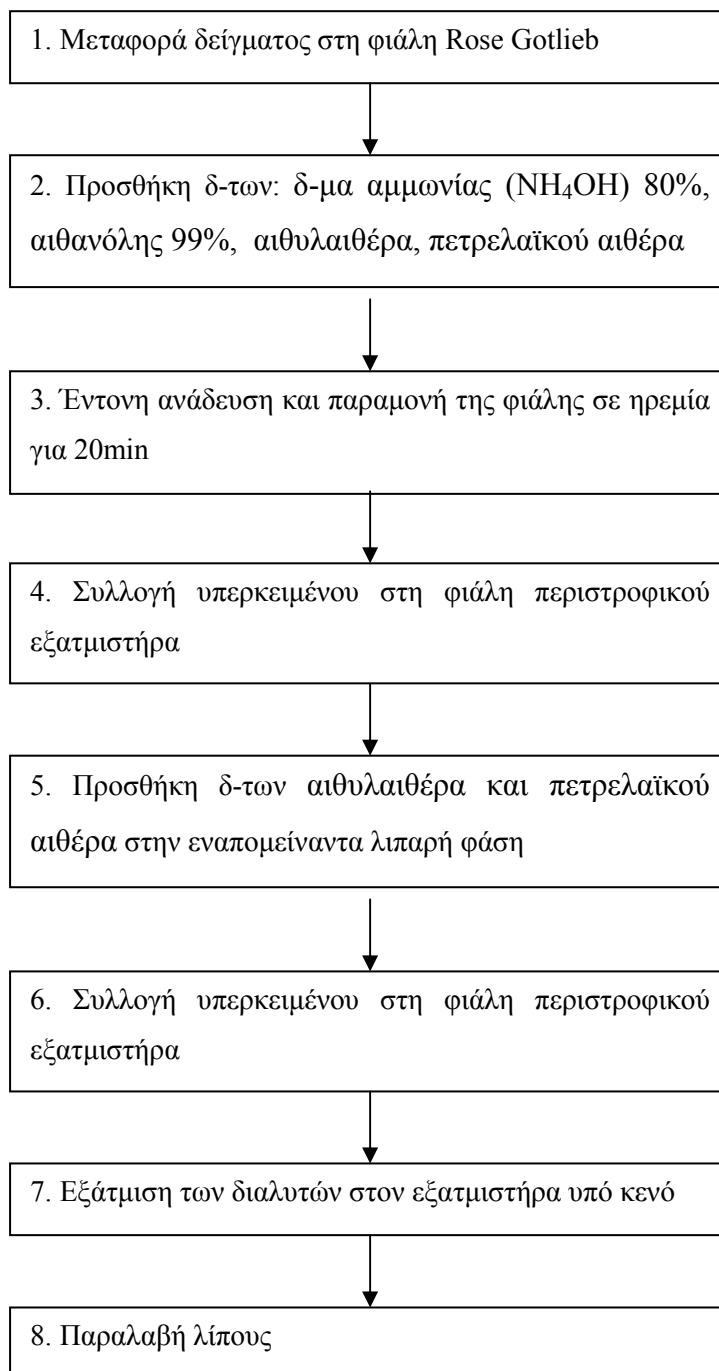
Πριν την ανάλυση, το δείγμα ομογενοποιούταν με ήπια ανάδευση της φιάλης δειγματοληψίας. Η θερμοκρασία του προς ανάλυση δείγματος έπρεπε να είναι περίπου +20 °C κατά την αρχή της διαδικασίας. Στη συνέχεια λαμβάνονταν 10 ml γάλακτος με την βοήθεια σιφωνίου, το οποίο μεταφερόταν στην φιάλη Rose Gottlieb. Ακολουθούσε προσθήκη 1 ml διαλύματος αμμωνίας (NH₄OH) 80%, 10 ml αιθανόλης 99%, 25 ml αιθυλαιθέρα και 25 ml πετρελαϊκού αιθέρα. Ακολουθώς τοποθετούταν πώμα στην φιάλη και ακολουθούσε έντονη ανάδευση για 30 sec περίπου, με κυκλικές κινήσεις κρατώντας ταυτόχρονα και το πώμα της φιάλης. Μετά το τέλος της ανάδευσης, η φιάλη αφηνόταν για 20 min να ηρεμήσει και να πραγματοποιηθεί ο πρώτος διαχωρισμός του λίπους από την υδατινή φάση. Όλη η διαδικασία λάμβανε χώρα κάτω από απαγωγό.

Μετά το πέρας των 20 min και με την βοήθεια ενός σιφωνίου, αφαιρούταν το υπερκείμενο υγρό και συλλεγόταν στην φιάλη του περιστροφικού εξατμιστήρα. Στην λιπαρή φάση που είχε απομείνει στην φιάλη Rose Gottlieb, προσθέτονταν 15 ml αιθυλαιθέρα και 15 ml πετρελαϊκού αιθέρα για ένα δεύτερο διαχωρισμό του λίπους. Ακολουθούσε έντονη ανάδευση όπως προηγουμένως και ένα διάστημα ηρεμίας 20 min.

Εν συνεχεία συλλεγόταν πάλι το υπερκείμενο στην φιάλη του περιστροφικού εξατμιστήρα. Ακολουθούσε συμπύκνωση της συνολικής ποσότητας του υπερκειμένου μέχρι να εξατμιστούν πλήρως οι διαλύτες, σε περιστροφικό εξατμιστήρα υπό κενό και σε θερμοκρασία 50 °C.

Το εναπομείναν λίπος, συλλεγόταν με την βοήθεια πιπέτας Pasteur σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα όπου και φυλασσόταν σε θερμοκρασία 4 °C μέχρι την ανάλυσή του.

Διαγραμματικά η παραπάνω διαδικασία απεικονίζεται στην Εικόνα 3-14.



Εικόνα 3-14: Διάγραμμα απεικόνισης σταδίων παραλαβής λίπους με τη μέθοδο Rose Gotlieb

3.2.3 Ανάλυση λιπαρών οξέων με τη μέθοδο αέριας χρωματογραφίας

Το λίπος, το οποίο παραλήφθηκε με τις δυο προαναφερθέντες μεθόδους, χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των λιπαρών οξέων με τη μέθοδο της αέριας

χρωματογραφίας. Προϋπόθεση για την εφαρμογή της μεθόδου αυτής είναι η μετατροπή του λίπους σε μεθυλεστέρες (FAMES).

3.2.3.1 Μετατροπή του λίπους σε μεθυλεστέρες

Η μετατροπή του λίπους σε μεθυλεστέρες πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της trans εστεροποίησης, η οποία βασίζεται στο πρότυπο 182: 1999 της Διεθνούς Ομοσπονδίας Γάλακτος (IDF Standard 182: 1999).

Υλικά

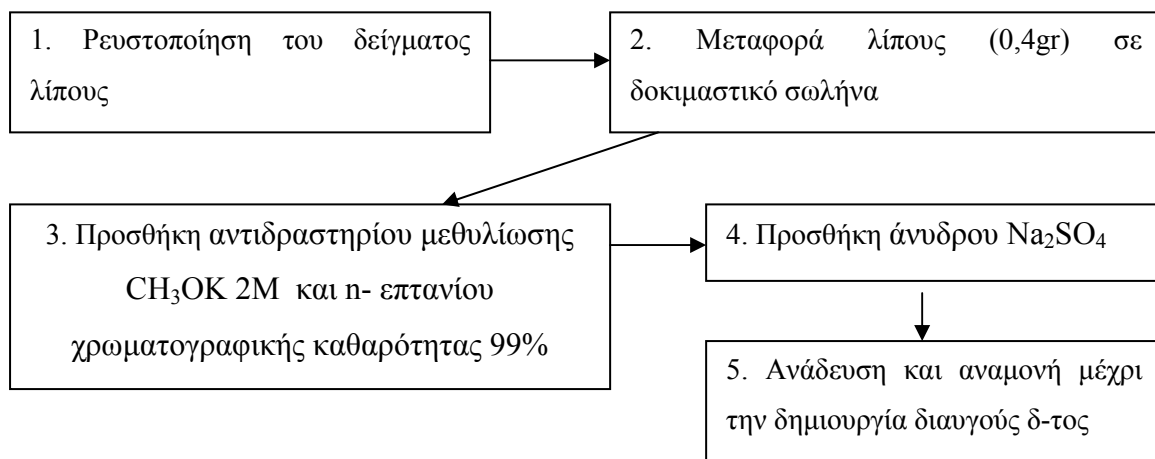
- Αντιδραστήριο μεθυλίωσης CH_3OK 2 M.
- n- επτάνιο, χρωματογραφικής καθαρότητας 99%.
- Άνυδρο Na_2SO_4 .
- Υδατόλουτρο.
- Πιπέτες Pasteur 1 ml.
- Δοκιμαστικοί σωλήνες με εσφυρισμένα πώματα.
- Σιφώνια 1 και 10 ml.
- Φιάλη βιομηχανικού αζώτου.
- Vortex.

Μέθοδος

Αρχικά πραγματοποιούταν τοποθέτηση του προς ανάλυση δείγματος λίπους σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας $20\text{ }^\circ\text{C}$ για να προκληθεί ρευστοποίησή του. Εν συνεχεία για την εξάτμιση τυχόν υπολειμμάτων διαλυτών χρησιμοποιούταν ρεύμα αζώτου.

Ακολούθως με την βοήθεια πιπέτας Pasteur μεταφέρονταν 0,4 gr λίπους στον δοκιμαστικό σωλήνα. Προσθέτονταν 0,5 ml αντιδραστηρίου μεθυλίωσης CH_3OK 2M και 10 ml n- επτανίου χρωματογραφικής καθαρότητας 99%. Εν συνέχεια, με την βοήθεια μιας σπάτουλας, τοποθετούταν μικρή ποσότητα άνυδρου Na_2SO_4 στο δοκιμαστικό σωλήνα και αυτός πωματιζόταν. Ακολουθούσε ανάδευση σε Vortex για 1 min και παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου, έως ότου το περιεχόμενο υγρό στον δοκιμαστικό σωλήνα να γίνει διαυγές.

Διαγραμματικά η παραπάνω διαδικασία απεικονίζεται στην Εικόνα 3-15.



Εικόνα 3-15: Διάγραμμα απεικόνισης σταδίων μεθυλεστεροποίησης του λίπους

3.2.3.2 Εφαρμογή αέριας χρωματογραφίας

Ο προσδιορισμός των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων έγινε σε αέριο χρωματογράφο (GC- 17A Shimadzu, Columbia, USA).

Για την ανάλυση του κάθε δείγματος λαμβανόταν ποσότητα 2μl με σύριγγα και γινόταν ένεση σε τριχοειδή στήλη Nulon [μήκος 30 m, εσωτερική διάμετρος 0,25 mm και πάχος φιλμ 0,25 μm (film thickness)] συνδεδεμένη σε έναν ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID) θερμοκρασίας 280 °C. Η ταχύτητα ροής του φέροντος αερίου (ήλιο) ήταν 2,5 ml/min.

Η θερμοκρασία εισόδου του δείγματος ήταν 150°C. Το πρόγραμμα των θερμοκρασιών που εφαρμόστηκε ήταν: 45 °C για διάστημα 3min, αύξηση της θερμοκρασίας με ρυθμό 5 °C/ min μέχρι τους 150 °C και παραμονή στη θερμοκρασία αυτή για χρονικό διάστημα 10 min. Έπειτα, αύξηση της θερμοκρασίας με ρυθμό 7 °C/ min μέχρι τους 220 °C και παραμονή για 20 min.

Ο προσδιορισμός των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων του γάλακτος πραγματοποιήθηκε με σύγκριση των χρόνων απόκρισης (retention time) των άγνωστων μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων με πρότυπα μεθυλεστέρων.

Η συλλογή και η ανάλυση των δεδομένων έγινε με το χρωματογραφικό εργαστηριακό αυτοματοποιημένο λογισμικό σύστημα Chromomelon G.C.

3.3 Στατιστική ανάλυση

Για την ανάλυση των δεδομένων των λιπαρών οξέων χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση διακύμανσης (one-way ANOVA) στην οποία τέθηκε ως σταθερός παράγοντας η σύσταση των μιγμάτων. Η σύγκριση των μέσων όρων πραγματοποιήθηκε με το κριτήριο του Tukey HSD. Το επίπεδο σημαντικότητας ήταν 5% ($P < 0,05$), ενώ για τιμές $P < 0.1$ (<10%) θεωρήθηκε ότι υπάρχει η τάση για μεταβολή. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τυπικά σφάλματα.

Για την περιγραφή της σχέσεως μεταξύ των εκτιμώμενων και των ανιχνεύσιμων τιμών ποσοστού αίγειου γάλακτος χρησιμοποιήθηκε μία ανάλυση παλινδρόμησης κατά την οποία εφαρμόστηκε ένα γραμμικό μοντέλο ($y = ax + b$) και ακολούθησε η εκτίμηση των συντελεστών συσχέτισης (CC), προσδιορισμού (R^2) και διακύμανσης (CV).

Η ανάλυση όλων των δεδομένων έγινε με το στατιστικό πακέτο StatGraphics Plus.

Κεφάλαιο 4

Αποτελέσματα και Συζήτηση

4.1 Έλεγχος τίτλου αντισωμάτων

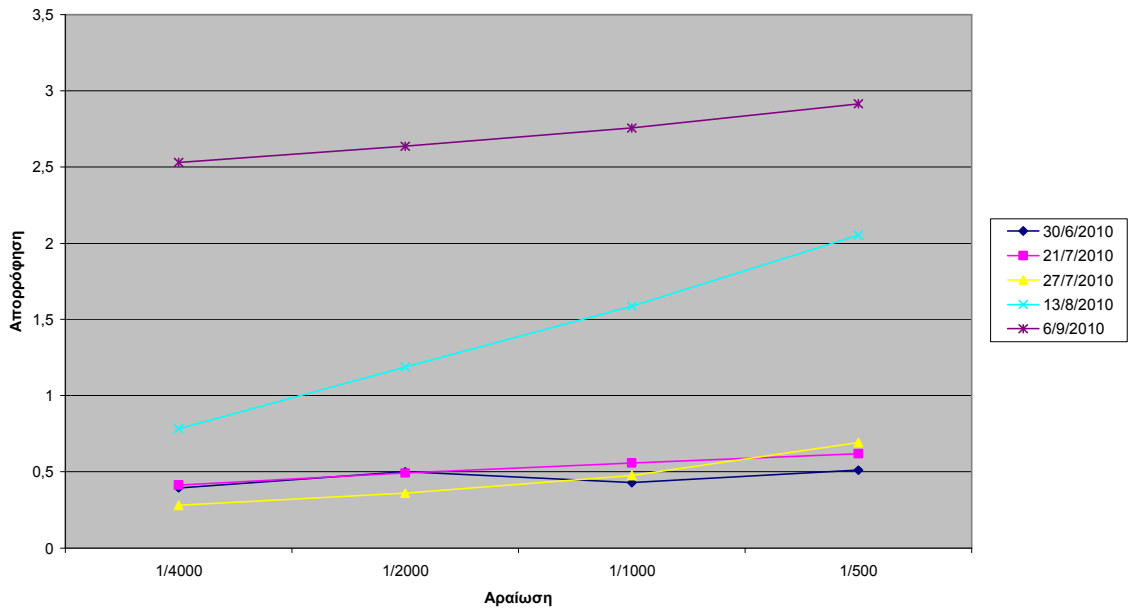
Οι ανοσοποιήσεις και οι αιματοληψίες των προβάτων που πραγματοποιήθηκαν (Κεφ. 3.1) ανά ημερομηνία και ανά ζώο συνοψίζονται στον πίνακα 4-1.

Πίνακας 4-1: Πραγματοποιούμενες ανοσοποιήσεις και αιμοληψίες ανά ζώο και ημερομηνία.

a/a	Goat	Ανοσοποίηση	Αιμοληψία	a/a	Bovine	Ανοσοποίηση	Αιμοληψία
	IgG				IgG		
1	885	-	30/6/2010	1	887	-	30/6/2010
2	886			2	889		
3	885	5/7/2010	21/7/2010	3	887	5/7/2010	21/7/2010
4	886			4	889		
5	885	14/7/2010	27/7/2010	5	887	14/7/2010	27/7/2010
6	886			6	889		
7	885	27/7/2010	13/8/2010	7	887	27/7/2010	13/8/2010
8	886			8	889		
9	885	17/8/2010	6/9/2010	9	887	17/8/2010	6/9/2010
10	886			10	889		

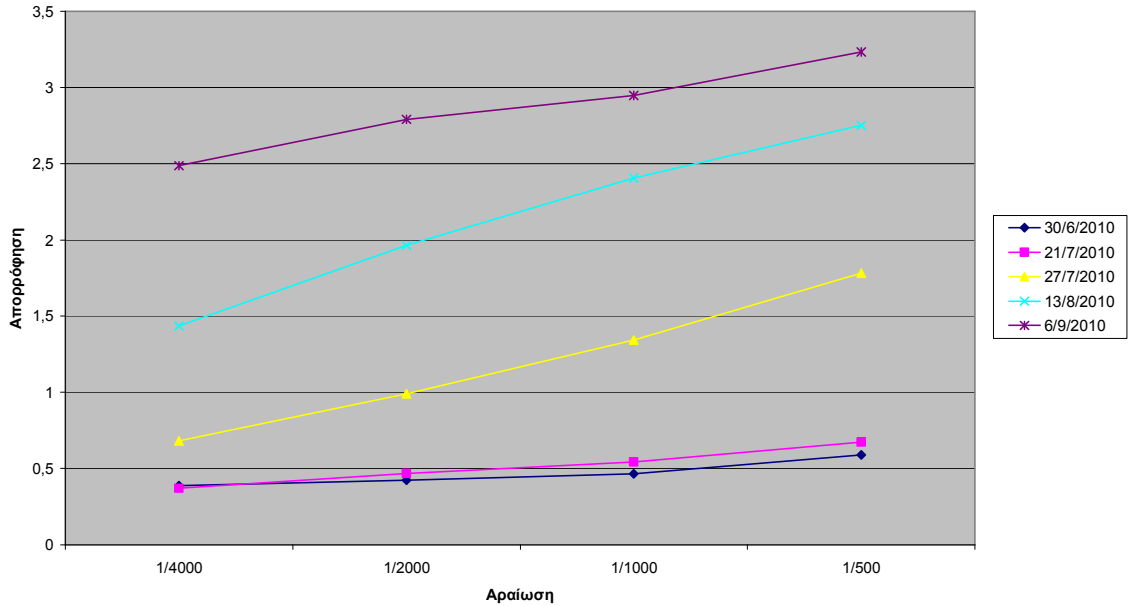
Μετά από κάθε αιματοληψία παραλήφθηκε ο ορός. Εφαρμόστηκε έμμεση ELISA με διαδοχικές αραιώσεις των προς έλεγχο αντιορών για την ανίχνευση του τίτλου των αντισωμάτων Goat IgG και Bovine IgG. Τα αποτελέσματα μετά την μέτρηση της απορρόφησης των δειγμάτων στο φωτόμετρο, αφού βγήκαν οι μέσοι όροι από τις δυο απορροφήσεις ανά δείγμα και από αυτό αφαιρέθηκε ο μέσος όρος του τυφλού (Κεφ. 3.2.1), παρουσιάζονται στα παρακάτω 4 γραφήματα, ένα/ζώο.

Αύξηση τίτλου αντισώματος στο ζώο 885



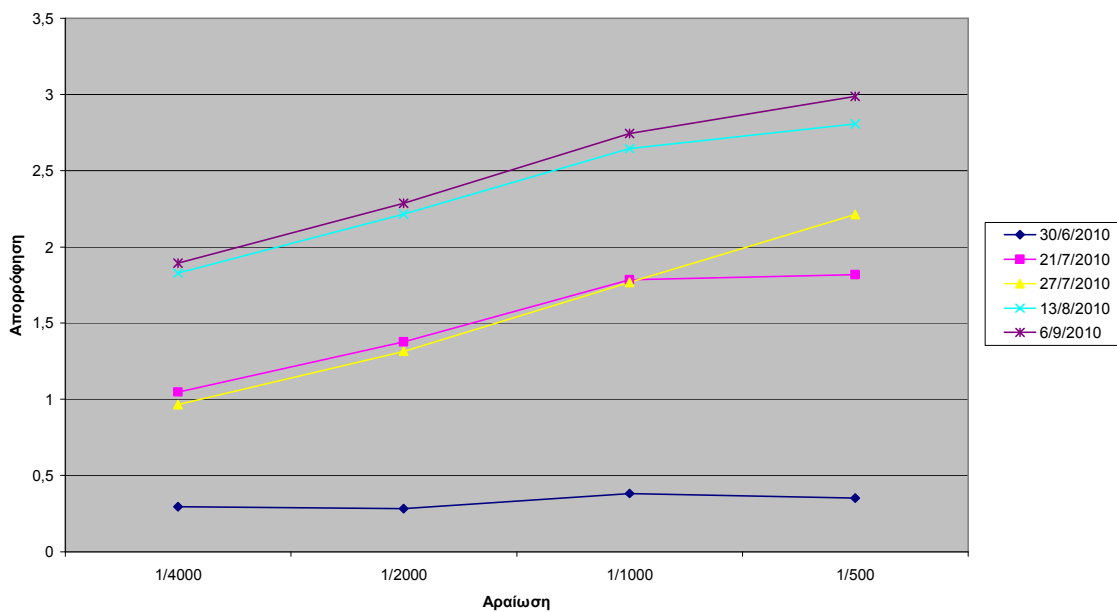
Εικόνα 4-1: Αύξηση του τίτλου των αντισωμάτων ανά αιμοληψία που ακολουθούσε την αντίστοιχη ανοσοποίηση με goat IgG στο ζώο 885

Αύξηση τίτλου αντισώματος στο Ζώο 886



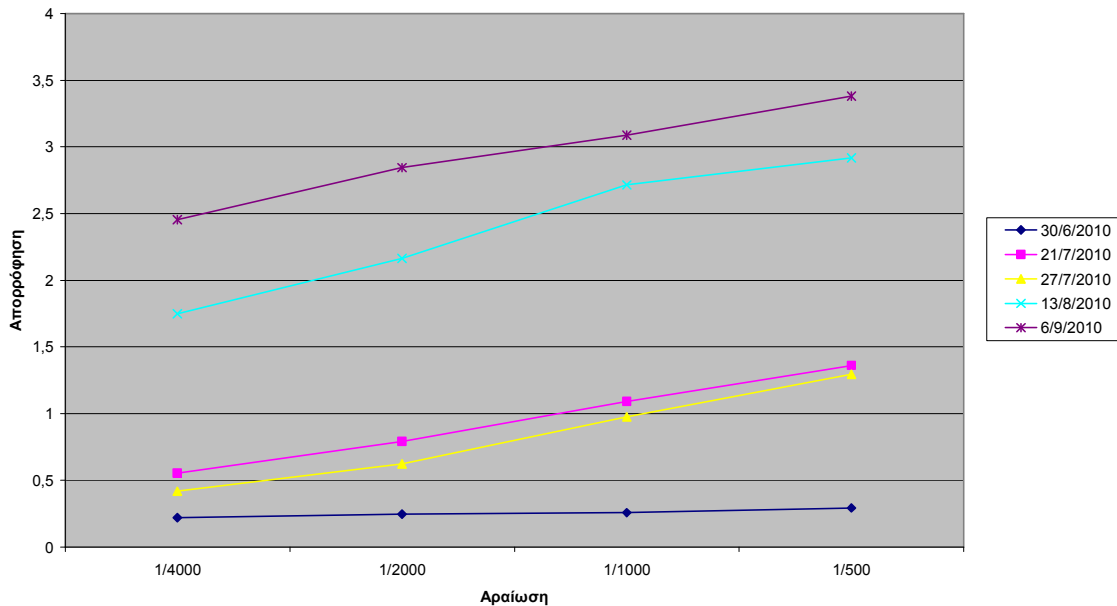
Εικόνα 4-2: Αύξηση του τίτλου των αντισωμάτων ανά αιμοληψία που ακολουθούσε την αντίστοιχη ανοσοποίηση με goat IgG στο ζώο 886

Αύξηση τίτλου αντισώματος στο Ζώο 887



Εικόνα 4-3: Αύξηση του τίτλου των αντισωμάτων ανά αιμοληψία που ακολουθούσε την αντίστοιχη ανοσοποίηση με bovine IgG στο ζώο 887

Αύξηση τίτλου αντισώματος στο Ζώο 889



Εικόνα 4-4: Αύξηση του τίτλου των αντισωμάτων ανά αιμοληψία που ακολουθούσε την αντίστοιχη ανοσοποίηση με bovine IgG στο ζώο 887

Από τα παραπάνω τέσσερα γραφήματα φαίνεται ότι υπήρξε σταδιακή αύξηση του τίτλου των αντισωμάτων ανά αιματοληψία, η οποία ακολουθούσε αντίστοιχη ανοσοποίηση. Υψηλότερος τίτλος παρουσιάζεται μετά τη δεύτερη αναμνηστική ανοσοποίηση και κυρίως μετά την τρίτη αναμνηστική ανοσοποίηση, δηλαδή στην τελευταία αιμοληψία (6/9/2010). Όπως παρατηρείται και στα τέσσερα γραφήματα, τα αντισώματα IgG ανιχνεύθηκαν ακόμα και στην μεγαλύτερη αραίωση που εφαρμόστηκε, 1/4000.

Την ίδια τεχνική ανάπτυξης πολυκλωνικών αντισωμάτων IgG ακολούθησε και ο Leveux (1977, 1980) κατά την ανάπτυξη τεστ ακτινωτής ανοσοδιάχυσης. Πρόβατο ανοσοποιήθηκε με αίγεια IgG και παρήχθησαν αντισώματα που αναγνώριζαν συγκεκριμένα την IgG αίγειου γάλακτος σε ένα μίγμα αίγειου και πρόβειου γάλακτος. Χρησιμοποιώντας την ίδια τεχνική, παρήχθησαν ειδικά αντισώματα έναντι IgG αγελαδινού γάλακτος στις αίγες και τα πρόβατα. Η διαδικασία αυτή βασίζεται στην αρχή της ανοχής: το ανοσοποιητικό σύστημα είναι σε θέση να διακρίνει ξένα μόρια από συνηθισμένα δομικά στοιχεία του σώματος – οι οργανισμοί συνήθως δεν παρουσιάζουν ανοσοποιητικές αντιδράσεις κατά των ίδιων των μακρομορίων τους (Rolland *et al.*, 1993).

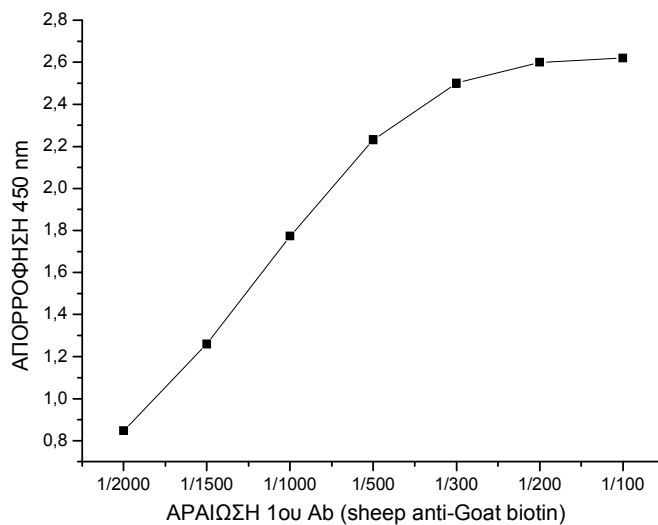
Πολυκλωνικά αντισώματα ανέπτυξαν και οι Μασούρας κ.ά., (1995), έναντι της IgG αγελαδινού γάλακτος όπως και έναντι της ολικής και της κ-καζεΐνης του αγελαδινού γάλακτος, με σκοπό να χρησιμοποιηθούν κατά την εφαρμογή ανοσολογικών μεθόδων. Ο έλεγχος του τίτλου των αντισωμάτων πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή απλής και διπλής ανοσοδιάχυσης. Ο τίτλος των αντισωμάτων ήταν 1:50 και τα ποσοστά του αγελαδινού γάλακτος που ανιχνεύθηκαν σε πρόβειο γάλα με τη χρήση των αντισωμάτων IgG και την εφαρμογή της μεθόδου ανοσοδιάχυσης ήταν μέχρι και 1%.

4.2 Αραίωση βιοτινυλιωμένου αντισώματος

Προκειμένου να καθοριστεί η άριστη αραίωση του αντισώματος δέσμησης (καθαρισμένο και βιοτινυλιωμένο, παρ.3.3&3.4), ώστε να πραγματοποιείται η βέλτιστη και πλήρης αξιοποίησή του, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις του (1/100, 1/200, 1/300, 1/500, 1/1000, 1/1500 & 1/2000) με PBS-T και εφαρμόστηκε τεχνική ELISA, χρησιμοποιώντας ως πρώτο αντίσωμα το βιοτινυλιωμένο σε διαδοχικές αραιώσεις. Τα αποτελέσματα έδωσαν το γράφημα της εικόνας 4-5.

Από το γράφημα αυτό συμπεραίνουμε ότι η βέλτιστη αραίωση του αντισώματος είναι 1/300. Στην αραίωση αυτή πραγματοποιείται η μέγιστη απορρόφηση, δηλαδή επέρχεται κορεσμός του αντισώματος. Επειδή όμως σύμφωνα με το πρωτόκολλο της ELISA (Παρ. 3,5), στην πλάκα μαζί με το αραιωμένο αντίσωμα (50μl) προστίθεται και ίδια ποσότητα αραιωμένου γάλακτος (50μl), η αρχική αραίωση του αντισώματος πρέπει να είναι 1/150 ώστε τελικά να διαμορφωθεί σε 1/300.

Άρα τελικά χρησιμοποιήθηκε αραιωμένο αντίσωμα 1/150.



Εικόνα 4-5: Γράφημα για την βέλτιστη αραίωση αντισώματος δέσμευσης

4.3 Προσδιορισμός πρόσμιξης αίγειου γάλακτος σε πρόβειο

4.3.1 Προσδιορισμός πρόσμιξης αίγειου γάλακτος σε πρόβειο με εφαρμογή της ανοσοενζυμικής μεθόδου ELISA

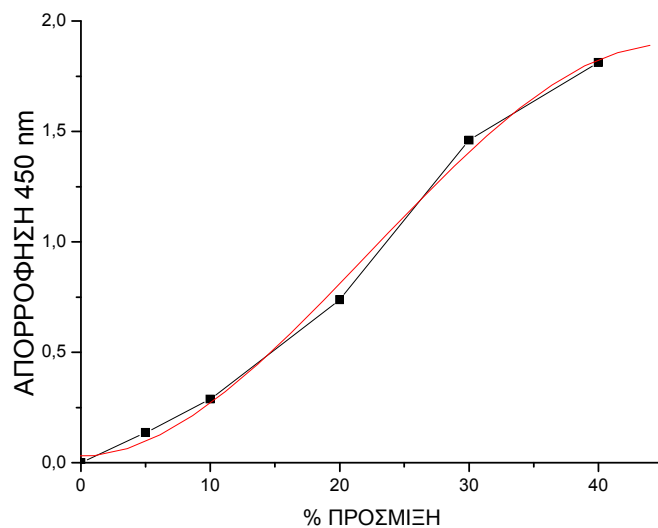
Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε μίγματα γάλακτος με γνωστές προσμίξεις αίγειου (Αίγ) σε πρόβειο γάλα (Π), σε μίγματα με γνωστές προσμίξεις αίγειου (Αίγ) και αγελαδινού (Α) γάλακτος σε πρόβειο (Π), αλλά δοκιμάστηκε και σε μίγματα αγελαδινού (Α) και αίγειου (Αίγ), όπως και σε μίγματα που δεν περιείχαν καθόλου αίγιο αλλά μόνο αγελαδινό (Α) και πρόβειο (Π).

Τα παραπάνω μίγματα με συγκεκριμένες προσμίξεις παρασκευάστηκαν στο Εργαστήριο Τυροκομίας του Τμήματος Ζωικής Παραγωγής του Πανεπιστημίου της Πάντοβα Ιταλίας, τα οποία και μεταφέρθηκαν εν συνεχεία στην Ελλάδα.

Στόχος ήταν να διαπιστωθεί κατά πόσο η μέθοδος μπορούσε να ανιχνεύσει το ποσοστό του αίγιου γάλακτος σε όλα τα προαναφερθέντα μίγματα.

Όπως περιγράφηκε στη μεθοδολογία εφαρμογής της μεθόδου ELISA στο κεφ. 3.5, τα δείγματα, τοποθετήθηκαν εις διπλούν στην πλάκα ELISA. Μετά την φωτομέτρηση υπολογιζόταν ο μέσος όρος των δυο απορροφήσεων για κάθε δείγμα γάλακτος, τα πρότυπα διαλύματα και το τυφλό και από κάθε μέσο όρο αφαιρούταν ο μέσος όρος του τυφλού. Οι απορροφήσεις που προέκυψαν τελικά από το κάθε δείγμα γάλακτος παρεμβλήθηκαν στην πρότυπη καμπύλη αναφοράς και προέκυψαν έτσι οι προσμίξεις του αίγιου με βάση τη μέθοδο αυτή.

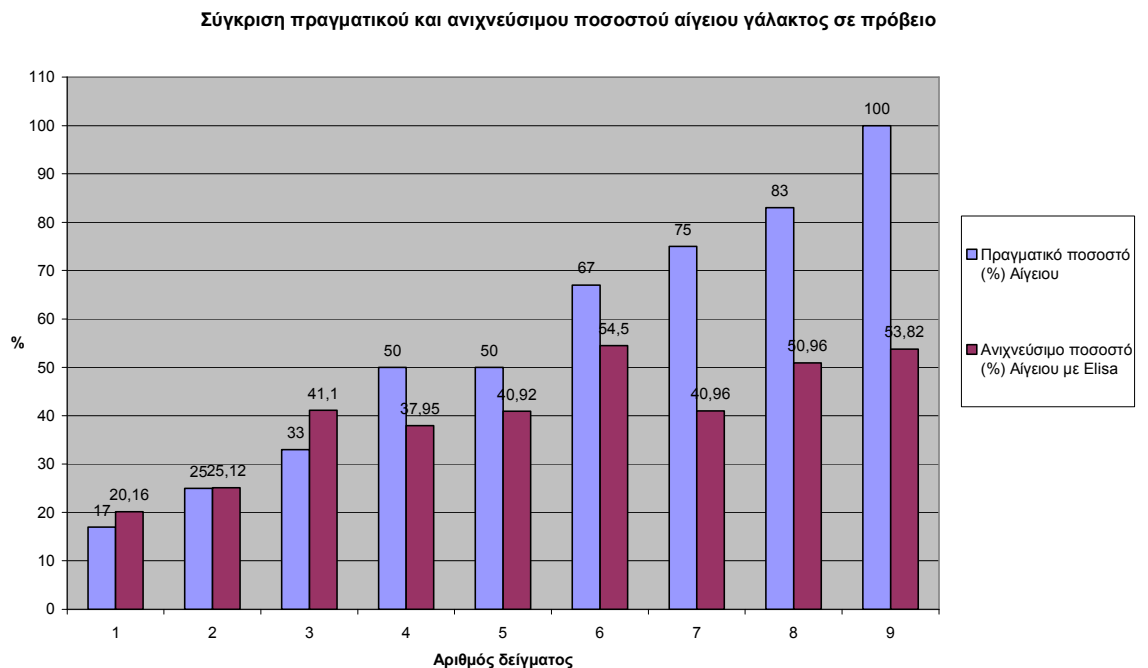
Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης (Εικ. 4-6) και την ανίχνευση της πρόσμιξης με βάση αυτή χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα Origin. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στους πίνακες 4-2, 4-3, 4-4 και 4-5 και στα γραφήματα των Εικόνων 4-7, 4-8, 4-9, και 4-10.



Εικόνα 4-6: Πρότυπη καμπύλη για τον προσδιορισμό αίγιου γάλακτος σε πρόβειο

Πίνακας 4-2: Αποτελέσματα ανίχνευσης πρόσμιξης αίγειου γάλακτος στα μίγματα Πρόβειου (Π) και Αίγειου (Αίγ)

Αρ. Μίγματος	Πρόσμιξη (%) Πρόβειο(Π):Αίγειο(Αίγ)	Πραγματικό ποσοστό (%) αίγειου	Ανιχνεύσιμο ποσοστό (%) αίγειου με ELISA
1	83 (Π) : 17 (Αίγ)	17	20,16
2	75 (Π): 25 (Αίγ)	25	25,12
3	67 (Π): 33 (Αίγ)	33	41,1
4	50 (Π): 50 (Αίγ)	50	37,95
5	50 (Π): 50 (Αίγ)	50	40,92
6	33 (Π): 67 (Αίγ)	67	54,5
7	25 (Π): 75 (Αίγ)	75	40,96
8	17 (Π): 83 (Αίγ)	83	50,96
9	100 (Αίγ)	100	53,82

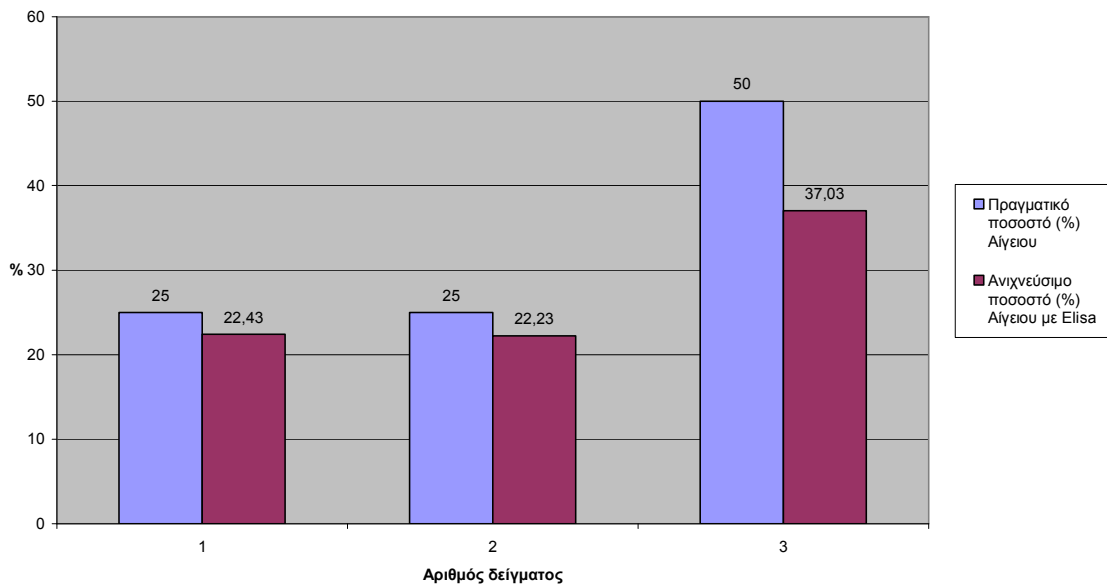


Εικόνα 4-7: Γράφημα σύγκρισης πραγματικού και ανιχνεύσιμου ποσοστού αίγειου γάλακτος στα μίγματα Πρόβειου (Π) και Αίγειου (Αίγ)

Πίνακας 4-3: Αποτελέσματα ανίχνευσης πρόσμιξης αίγειου γάλακτος στα μίγματα Αγελαδινού (Α), Πρόβειου (Π) και Αίγειου (Αίγ)

Αρ. Μίγματος	Πρόσμιξη (%) Αγελαδινό(Α):Αίγειο(Αίγ): Πρόβειο(Π)	Πραγματικό ποσοστό (%) αίγειου	Ανιχνεύσιμο ποσοστό (%) αίγειου με ELISA
1	50 (Α): 25 (Αίγ): 25 (Π)	25	22,43
2	25 (Α): 25 (Αίγ): 50 (Π)	25	22,23
3	25 (Α): 50 (Αίγ): 25 (Π)	50	37,03

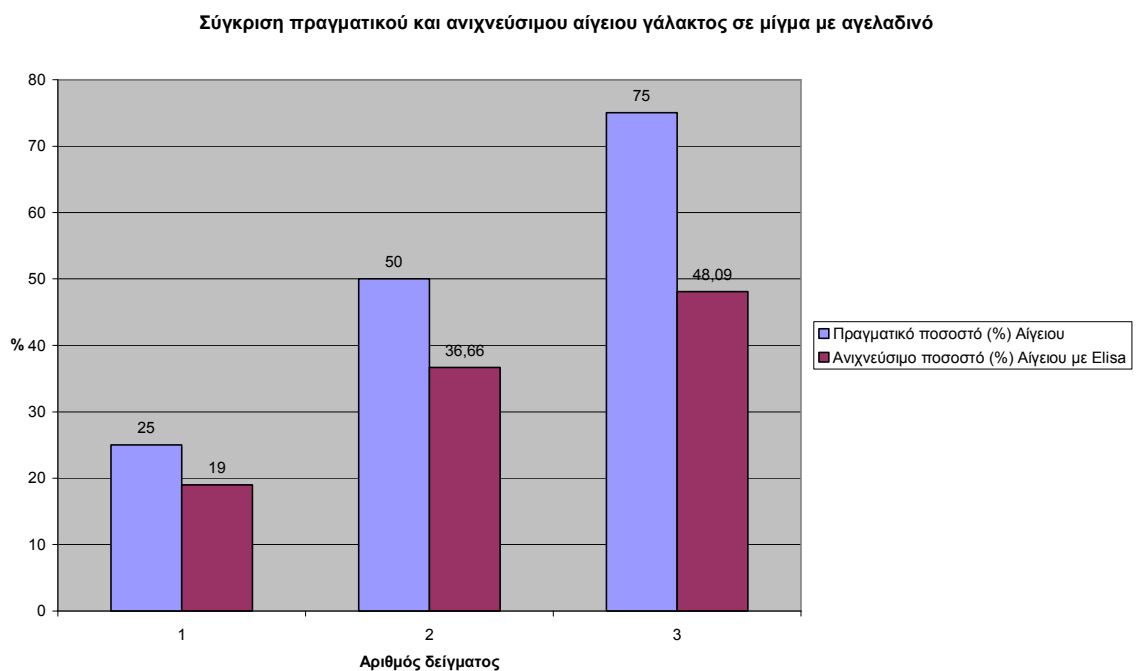
Σύγκριση πραγματικού και ανιχνεύσιμου ποσοστού αίγειου γάλακτος σε μίγματα με αγελαδινό/πρόβειο



Εικόνα 4-8: Γράφημα σύγκρισης πραγματικού και ανιχνεύσιμου ποσοστού αίγειου γάλακτος στα μίγματα Αγελαδινού (Α), Πρόβειου (Π) και Αίγειου (Αίγ)

Πίνακας 4-4: Αποτελέσματα ανίχνευσης πρόσμιξης αίγειου γάλακτος στα μίγματα Αγελαδινού (Α) και Αίγειου (Αίγ)

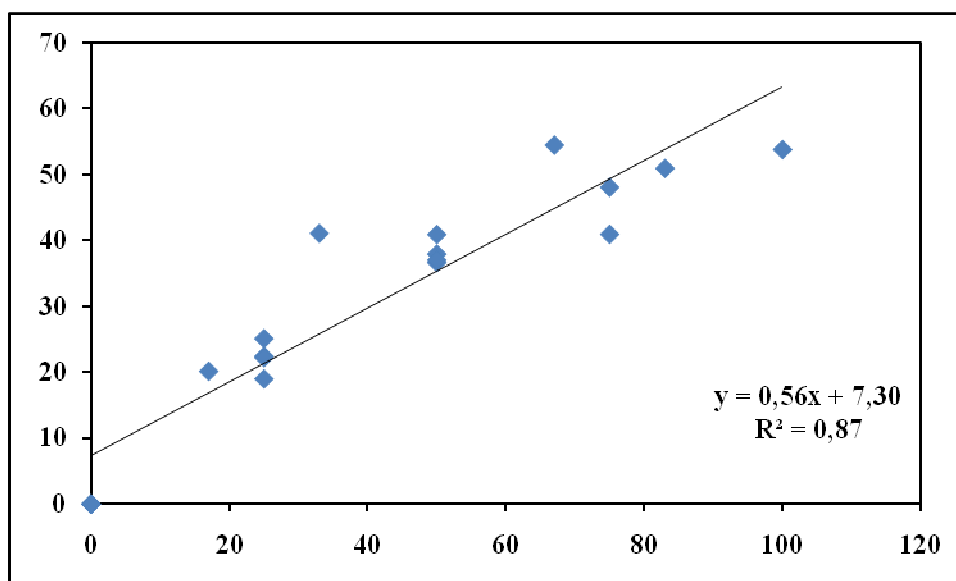
Αρ. Μίγματος	Πρόσμιξη (%) Αγελαδινό(Α):Αίγειο(Αίγ)	Πραγματικό ποσοστό (%) αίγειου	Ανιχνεύσιμο ποσοστό (%) αίγειου με ELISA
1	75 (Α) : 25 (Αίγ)	25	19
2	50 (Α): 50 (Αίγ)	50	36,66
3	25 (Α): 75 (Αίγ)	75	48,09



Εικόνα 4-9: Γράφημα σύγκρισης πραγματικού και ανιχνεύσιμου ποσοστού αίγειου γάλακτος στα μίγματα Αγελαδινού (Α) και Αίγειου (Αίγ)

Πίνακας 4-5: Αποτελέσματα ανίχνευσης πρόσμιξης αίγειου γάλακτος στα μίγματα Αγελαδινού (Α) και Πρόβειου (Π)

Αρ. δείγματος	Πρόσμιξη (%) Αγελαδινό(Α):Πρόβειο(Π)	Πραγματικό ποσοστό (%) αίγειου	Ανιχνεύσιμο ποσοστό (%) αίγειου με ELISA
1	75 (Α): 25 (Π)	0	0
2	50 (Α): 50 (Π)	0	0
3	25 (Α): 75 (Π)	0	0



Εικόνα 4-10: Συσχέτιση πραγματικού και υπολογισμένου ποσοστού (%) αίγειου γάλακτος
 Άξονας X: Πραγματικό ποσοστό (%) αίγειου γάλακτος
 Άξονας Y: Ανιχνεύσιμο ποσοστό (%) αίγειου γάλακτος

Η σχέση μεταξύ πραγματικού και ανιχνεύσιμου ποσοστού (%) αίγειου γάλακτος περιγράφεται ικανοποιητικά από ένα γραμμικό μοντέλο (Εικ 4-10) καθώς ο συντελεστής προσδιορισμού είναι σχετικά υψηλός ($R^2 = 87\%$). Επίσης, τα δύο ποσοστά παρουσιάζουν μία αρκετά μεγάλη θετική συσχέτιση (συντελεστής συσχέτισης=0,93).

Κατά τη διεξαγωγή της μεθόδου αυτής τοποθετήθηκε ένα συγκεκριμένο μίγμα στην πλάκα ELISA 13 φορές με σκοπό να υπολογιστεί ο συντελεστής διακύμανσης (CV) δηλαδή να βρεθεί η απόκλιση που παρουσιάζουν οι τιμές που προκύπτουν από το ίδιο δείγμα. Βρέθηκε $CV=3.96\%$. Το εύρος τιμών θεωρείται αποδεκτό όταν $CV<10\%$. Άρα το $CV=3.96\%$ που υπολογίσαμε υποδεικνύει πολύ μικρή απόκλιση μεταξύ των τιμών του ίδιου δείγματος άρα υψηλή ακρίβεια της μεθόδου.

Συμπερασματικά λοιπόν βλέπουμε ότι υπάρχει αρκετά στενή συσχέτιση (0.93) μεταξύ των πραγματικών και ανιχνεύσιμων ποσοστών αίγειου γάλακτος στα μίγματα. Παρατηρώντας τα γραφήματα στις εικόνες 4-7, 4-8, και 4-9, βλέπουμε ότι η απόκλιση μεταξύ των πραγματικών και ανιχνεύσιμων ποσοστών αυξάνεται όσο αυξάνεται το ποσοστό του αίγειου γάλακτος στα μίγματα (κυρίως πάνω από 50%). Αυτό μπορεί να ερμηνευτεί αν λάβουμε υπόψη ότι τα πρότυπα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης έφταναν μέχρι το ποσοστό του 49,5%. Επομένως

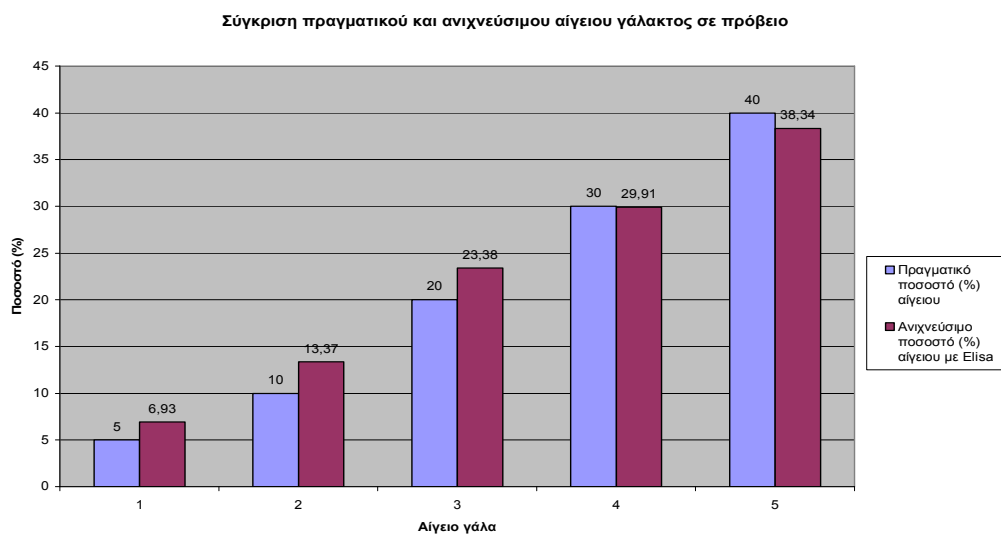
κυρίως μετά το ποσοστό του 50% πρόσμιξης με αίγιο η διαφορά μεταξύ πραγματικής και ανιχνεύσιμης τιμής αυξάνεται σημαντικά.

Τέλος θα μπορούσαμε να παρατηρήσουμε ότι η παρουσία αγελαδινού γάλακτος δεν επηρεάζει το αποτέλεσμα ανίχνευσης του αίγιου γάλακτος στο μίγμα (Εικ. 4-8 και Εικ. 4-9) όπως επίσης ότι στα μίγματα γάλακτος που δεν περιέχεται αίγιο γάλα, δεν υπάρχει, όπως ήταν αναμενόμενο, ανίχνευση (Πιν. 4-5).

Στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Πατρών εφαρμόστηκε η μέθοδος ELISA σε μίγματα πρόβειου και αίγιου γάλακτος με ποσοστά πρόσμιξης αίγιου 5-40%. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον πίνακα 4-6 και στο γράφημα της Εικόνας 4-11.

Πίνακας 4-6: Αποτελέσματα σε μίγματα με προσμίξεις 5-40% αίγιο

Πραγματικές προσμίξεις (%) με αίγιο	Υπολογισμένες προσμίξεις (%) με αίγιο
5	6,93
10	13,37
20	23,38
30	29,91
40	38,34



Εικόνα 4-11: Σύγκριση πραγματικού και ανιχνεύσιμου ποσοστού αίγιου γάλακτος σε πρόβειο

4.3.2 Επίδραση θερμικής επεξεργασίας στον προσδιορισμό πρόσμιξης αίγειου γάλακτος σε πρόβειο με εφαρμογή της ανοσοενζυμικής μεθόδου ELISA

Οι θερμικές επεξεργασίες συνήθως εφαρμόζονται για την παραλαβή ασφαλούς γάλακτος και για την διασφάλιση μακράς διάρκειας ζωής. Διάφορα συστήματα και τεχνολογίες που εφαρμόζονται με διαφορετικούς συνδυασμούς χρόνου-θερμοκρασίας έχουν εφαρμοστεί για το σκοπό αυτό. Μεγάλη προσοχή πρέπει να δίνεται στην αξιολόγηση της αυθεντικότητας ενός θερμικά επεξεργασμένου γάλακτος δεδομένου ότι η θερμική επεξεργασία αλλάζει τη βιοχημική του σύνθεση (Suju *et al.*, 2010).

Οι Rynne *et al.*, (2004), στην έρευνα τους για την επίδραση της θερμοκρασίας παστερίωσης και της μετουσίωσης των πρωτεϊνών του ορού στην ποιότητα των τυριών Cheedar, βρήκαν ότι μετά από παστερίωση του γάλακτος στους 72°C, 77°C, 82°C ή 87°C για 26 δευτερόλεπτα, τα μέσα επίπεδα μετουσίωσης των πρωτεϊνών του ορού στο παστεριωμένο γάλα ήταν 2,8%, 8,4%, 20,2% και 34,1% του συνόλου των πρωτεϊνών ορού γάλακτος, αντίστοιχα.

Οι Suju *et al.*, (2010), έδειξαν ότι τα επίπεδα των κύριων πρωτεϊνών του ορού γάλακτος μειώθηκαν λιγότερο από 23% στο παστεριωμένο γάλα και περισσότερο από 85% στο γάλα UHT σε σύγκριση με το νωπό. Πιο συγκεκριμένα, η α-λακταλβουμίνη (α-LA) παρουσίασε τη μεγαλύτερη θερμική αντοχή: περίπου 32% αυτής παρέμεινε στην αρχική της κατάσταση μετά από θέρμανση του γάλακτος στους 100°C για 10 λεπτά, περίπου το 42% της β-LG A και το 53% της β-LG B χάθηκαν μετά από θέρμανση του γάλακτος στους 75°C για 30 λεπτά. Η BSA χάθηκε σχεδόν εντελώς, όταν το γάλα σε pH 5,0, θερμάνθηκε σε θερμοκρασία 75°C ή υψηλότερη.

Οι Rolland *et al.*, (1993), χρησιμοποίησαν πολυκλωνικά αντισώματα έναντι του αγελαδινού κλάσματος της α_{s1}-καζεΐνης [α_{s1} -CN f(140-149)] και μπόρεσαν να ανιχνεύσουν αγελαδινό γάλα σε πρόβειο γάλα και τυρί με όρια ανίχνευσης 0,125% και 0,5% αντίστοιχα. Η μέθοδος αυτή δεν επηρεάστηκε από την έντονη θερμική επεξεργασία που εφαρμόστηκε στο γάλα (110°C για 1 ώρα και 115°C για 15 λεπτά).

Οι Richter *et al.*, (1997), ανέπτυξαν μια έμμεση ανταγωνιστική ELISA με την οποία ανίχνευσαν 0,1% αγελαδινού γάλακτος σε πρόβειο και αίγειο γάλα και τυρί. Για τη μέθοδο αυτή χρησιμοποίησαν πολυκλωνικά αντισώματα έναντι των γ₃-καζεϊνών και η

τεχνική δεν επηρεάστηκε από την ένταση της θερμικής επεξεργασίας του αγελαδινού γάλακτος.

Σύμφωνα με τους Moatsou & Anifantakis (2003), η ανοσοβιολογική δραστηριότητα των καζεϊνών δεν επηρεάζεται από τη θέρμανση.

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης διερευνήθηκε και η επίδραση της θερμικής επεξεργασίας του γάλακτος στην ικανότητα της μεθόδου sandwich ELISA, που εφαρμόστηκε με βάση τα πολυκλωνικά αντισώματα έναντι της IgG, να ανιχνεύει το ποσοστό του αίγιου γάλακτος στο πρόβειο.

Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκε τυχαία το μίγμα με αναλογία 67% Πρόβειο (Π) και 33% Αίγιο (Αίγ) και σε αυτό εφαρμόστηκαν θερμικές επεξεργασίες αντίστοιχες με αυτές που εφαρμόζονται για την παρασκευή γαλακτοκομικών προϊόντων (τυρί, γιαούρτι, κλπ.). Οι θερμικές αυτές επεξεργασίες συνοψίζονται στον Πίνακα 4-7.

Πίνακας 4-7: Εφαρμοζόμενες θερμικές επεξεργασίες

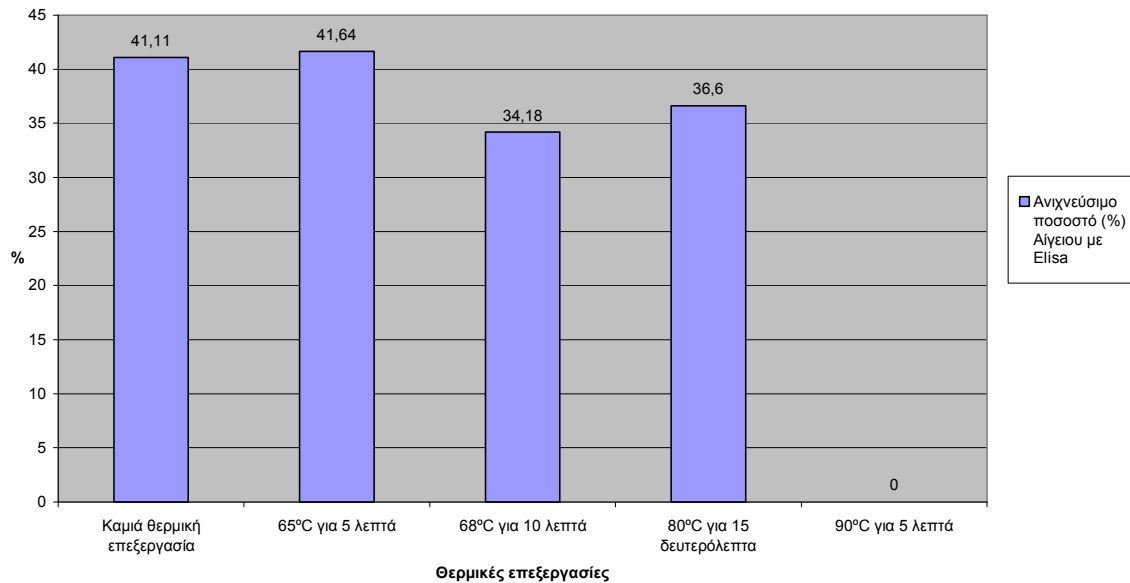
Θερμική επεξεργασία	Συνδυασμός θερμοκρασίας - χρόνου
Θέρμιση	65°C για 5 λεπτά
Παστερίωση	68°C για 10 λεπτά
Υψηλή Παστερίωση	80°C για 15 δευτερόλεπτα
Θερμική επεξεργασία για παρασκευή γιαουρτιού και ζυμούμενου γάλακτος	90°C για 5 λεπτά

Τα αποτελέσματα ανίχνευσης πρόσμιξης του αίγιου γάλακτος στο μίγμα Πρόβειου (Π) και Αίγιου (Αίγ) μετά από κάθε θερμική επεξεργασία παρουσιάζονται στον Πίνακα 4-8 και στο γράφημα της Εικόνας 4-12.

Πίνακας 4-8: Αποτελέσματα ανίχνευσης πρόσμιξης του αίγιου γάλακτος στο μίγμα Πρόβειου (Π) και Αίγιου (Αίγ) μετά τις θερμικές επεξεργασίες

Θερμικές επεξεργασίες μίγματος 33% Αίγιο(Αίγ): 67%Πρόβειο (Π)	Πραγματικό ποσοστό (%) αίγιου	Ανιχνεύσιμο ποσοστό (%) αίγιου με ELISA
Καμιά θερμική επεξεργασία	33	41,11
65°C για 5 λεπτά	33	41,64
68°C για 10 λεπτά	33	34,18
80°C για 15 δευτερόλεπτα	33	36,6
90°C για 5 λεπτά	33	0

Επίδραση θερμικής επεξεργασίας στην ανίχνευση του αίγιου γάλακτος



Εικόνα 4-12: Γράφημα επίδρασης θερμικής επεξεργασίας στην ανίχνευση του αίγιου γάλακτος

Παρατηρούμε ότι η μέθοδος είναι το ίδιο αποτελεσματική στους 65°C για 5 min, ενώ η θερμική επεξεργασία των 90°C για 5min επηρέασε την αποτελεσματικότητα της μεθόδου καθιστώντας μη δυνατή την ανίχνευση του αίγιου γάλακτος στο μίγμα στις συνθήκες αυτές. Η θέρμανση του γάλακτος στους 68°C για 10 min προκάλεσε μείωση του ανιχνεύσιμου ποσοστού αίγιου γάλακτος κατά 17% ενώ η θέρμανση στους 80°C για 15 sec προκάλεσε μείωση κατά 11%.

Από όλα τα παραπάνω θα μπορούσαμε να αναφέρουμε ότι ουσιαστικά το αποτέλεσμα επηρεάζεται από τη θερμοκρασία των 90°C λόγω της μετουσίωσης του επιτόπου στόχου. Σε παρόμοιο συμπέρασμα κατέληξαν και οι Hurley *et al.*, (2004), οι οποίοι ανέπτυξαν μια έμμεση, ανταγωνιστική ELISA για την ταχεία ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος στο γάλα των αιγών, προβάτων και βουβαλιών, χρησιμοποιώντας ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που αναπτύχθηκε κατά της βόειας IgG. Βρήκαν ότι η μέθοδος παρουσίασε την ίδια ευαισθησία όταν εφαρμόστηκε σε παστεριωμένο γάλα, αλλά δεν ίσχυσε το ίδιο και στην UHT θερμική επεξεργασία του γάλακτος, στην οποία προκλήθηκε μετουσίωση του επιτόπου στόχου.

Επίσης οι Li-Chan *et al.*, (1995), οι οποίοι ερεύνησαν την σταθερότητα των βόειων ανοσοσφαιρινών στην θερμική επεξεργασία, βρήκαν ότι η περιεχόμενη ποσότητα της IgG στο γάλα δεν άλλαξε μετά από θερμική επεξεργασία στους 62,7°C για 30 λεπτά, ούτε μετά από διατήρηση του γάλακτος για 24 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ή

στους 4°C, ενώ μετά την HTST (High Temperature Short Time) παστερίωση του γάλακτος, η επί της εκατό διατήρηση της IgG μετά την παστερίωση κυμάνθηκε από 59% έως 76%.

4.4 Αποτελέσματα ανάλυσης των λιπαρών οξέων του λίπους μιγμάτων διαφόρων ειδών γάλακτος

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά μίγματα ανά δύο είδη γάλακτος (Αγελαδινό(Α)-Αίγιο(Αίγ), Αγελαδινό(Α)-Πρόβειο(Π) και Πρόβειο(Π)-Αίγιο(Αίγ), με σκοπό να ανιχνευθεί η δυνατότητα προσδιορισμού της κάθε πρόσμιξης με βάση τις διαφοροποιήσεις στα λιπαρά οξέα του λίπους κάθε μίγματος. Τα μίγματα Πρόβειο(Π)-Αίγιου(Αίγ) είναι τα ίδια με αυτά που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εφαρμογή της μεθόδου ELISA για την ανίχνευση της νοθείας.

4.4.1 Ανάλυση λιπαρών οξέων μιγμάτων Αγελαδινού και Αίγιου γάλακτος

Στον πιο κάτω πίνακα (Πιν. 4-9) περιλαμβάνονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα ανάλυσης των λιπαρών οξέων σε επτά διαφορετικά μίγματα αγελαδινού και αίγιου γάλακτος.

Παρατηρήθηκε ότι τα λιπαρά οξέα που παρουσίασαν σημαντική διαφορά τιμών ($P < 0.05$) στα διάφορα μίγματα είναι το C8 (Καπρυλικό), το C10 (Καπρινικό), το C16 (Παλμιτικό), το C14:1 (Μυριστολεϊκό) και το C18:3 (Λινολενικό). Οι διαφοροποιήσεις των υπολοίπων λιπαρών οξέων δεν ήταν σημαντικές.

Το C8 (Καπρυλικό), το C10 (Καπρινικό) και το C18:3 (Λινολενικό) όπως προκύπτει από τον Πίνακα 4-9, μειώνονται σταδιακά όσο η περιεκτικότητα του αίγιου γάλακτος στο μίγμα μειώνεται και η περιεκτικότητα του αγελαδινού αυξάνεται. Δηλαδή η περιεκτικότητα του αίγιου γάλακτος είναι μεγαλύτερη σε αυτά τα λιπαρά οξέα σε σχέση με το αγελαδινό, τα C8, C10 και C18:3 βρίσκονται σε αναλογίες 4.09%, 13.4%, 0.10% αντιστοίχως στο αίγιο και 1,86%, 4,47%, 0,05% στο αγελαδινό και όσο μειώνεται η περιεκτικότητα του αίγιου στο μίγμα τόσο μειώνονται και αυτά.

Πίνακας 4-9: Λιπαρά οξέα (% των ολικών λιπαρών οξέων) στο λίπος διαφορετικών προσμίξεων αγελαδινού (A) και αίγειου (Αίγ) γάλακτος

Λιπαρά οξέα	M1 100%(Αίγ)	M2 83% (Αίγ): 17% (A)	M3 67% (Αίγ): 33% (A)	M4 50% (Αίγ): 50% (A)	M5 33% (Αίγ): 67% (A)	M6 17% (Αίγ): 83% (A)	M7 100%(A)	SEM
C4	1.52	2.09	1.85	1.89	2.39	2.07	2.92	0.51
C6	3.08	3.22	2.84	2.28	2.22	2.23	2.12	0.52
C8	4.09 ^a	4.27 ^a	3.46 ^{ab}	2.79 ^{ab}	2.40 ^{ab}	2.39 ^{ab}	1.86 ^b	0.34
C10	13.4 ^a	13.11 ^a	11.06 ^{ab}	9.09 ^{abc}	7.38 ^{bc}	6.42 ^{bc}	4.47 ^b	0.89
C12	6.00	6.24	6.09	5.94	5.26	5.75	5.42	0.54
C12:C10	0,45 ^c	0,47 ^{de}	0,55 ^d	0,65 ^c	0,71 ^c	0,89 ^b	1,21 ^a	0,01
C14	12.41	13.64	14.32	14.93	14.58	15.60	15.29	0.60
C15	0.88	0.86	0.95	0.94	1.02	1.06	1.05	0.04
C16	23.39 ^c	25.21 ^{ed}	27.5 ^{cde}	29.23 ^{bcd}	31.63 ^{abc}	33.23 ^{ab}	34.94 ^a	0.83
C17	0.24	0.20	0.24	0.21	0.25	0.22	0.23	0.02
C18	8.26	7.76	7.67	7.43	7.68	7.09	7.03	0.71
C14:1	0.31 ^f	0.48 ^c	0.78 ^d	0.94 ^c	1.16 ^b	1.40 ^a	1.55 ^a	0.02
C16:1	1.93	2.26	1.3	2.77	1.64	1.71	1.95	0.63
C18:1	20.41	18.21	19.22	19.14	19.64	18.47	18.76	2.02
C18:2	3.41	1.98	2.22	1.93	2.17	1.94	1.90	0.32
C18:3	0.10 ^a	0.10 ^a	0.06 ^b	0.07 ^b	0.06 ^b	0.06 ^b	0.05 ^b	0.005
CLA	0.52	0.33	0.38	0.39	0.46	0.31	0.40	0.07

a, b,c,d,e,f: Μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες στην ίδια γραμμή διαφέρουν σημαντικά (P<0.05)

Οι παρατηρήσεις αυτές σχετικά με τα C8 και C10 συμφωνούν με τους Alonso et al., (1999), οι οποίοι έδειξαν ότι τα χαρακτηριστικά αυτά λιπαρά οξέα του αίγειου γάλακτος C8 (2.7%) και C10 (9,9%) είναι υψηλότερα σε σχέση με το αγελαδινό γάλα. Σε αντίστοιχα αποτελέσματα κατέληξαν και οι Goudjil et al., (2004) με C8 και C10, 2,7% και 10% αντιστοίχως στο αίγειο και 1,3% και 3% στο αγελαδινό. Ομοίως και οι Lucas et al., (2008), οι οποίοι ερευνώντας τη σχέση μεταξύ αγελάδων και αιγών διαπίστωσαν ότι το λίπος του αίγειου γάλακτος ήταν κατά ποσοστό >30% πλουσιότερο σε C8 και C10 σε σχέση με το αγελαδινό.

Όσον αφορά τα C16 (Παλμιτικό) και C14:1 (Μυριστολεϊκό) αυξάνονται σταδιακά όσο η περιεκτικότητα του αίγειου γάλακτος στο μίγμα μειώνεται και η περιεκτικότητα του αγελαδινού αυξάνεται. Στο αίγειο γάλα το ποσοστό των λιπαρών αυτών οξέων είναι

C16: 23.39% και C14:1: 0.31% ενώ στο αγελαδινό γάλα οι αντίστοιχες αναλογίες είναι 34,94% και 1,55%. Αυξάνονται δηλαδή σταδιακά με την σταδιακή μείωση του αίγειου στο μίγμα.

Σε αντίστοιχες τιμές όσον αφορά τα λιπαρά αυτά οξέα κατέληξαν οι Ceballos *et al.*, (2009) με C16, 25.64% και 32,24% στο αίγειο και αγελαδινό αντίστοιχα. Για το C14:1 βρήκαν περιεκτικότητα 0,14% στο αίγειο και 0,49% στο αγελαδινό.

Οι ίδιοι ερευνητές κατέληξαν στο ότι το συνολικό ποσοστό του αίγειου γάλακτος σε CLA, ήταν 62% υψηλότερο από ότι στο αγελαδινό γάλα ενώ αντιθέτως οι Jarheis *et al.*, (1999) βρήκαν ποσοστό CLA στο αίγειο γάλα 0,65% ενώ στο αγελαδινό 1,01%. Στην παρούσα μελέτη δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των τιμών του CLA ($P > 0.05$) στα διάφορα μίγματα. Οι μεγάλες αυτές διαφοροποιήσεις μπορούν να εξηγηθούν αν λάβουμε υπόψη τις μεγάλες διακυμάνσεις του CLA στο γάλα κυρίως λόγω διαφοροποιήσεων στους παράγοντες διατροφής (Chilliard & Ferlay, 2004).

Άλλος σημαντικός παράγοντας που έχει χρησιμοποιηθεί από πολλούς ερευνητές κυρίως για την ανίχνευση παρουσίας αγελαδινού γάλακτος σε αίγειο είναι ο λόγος C12:C10. Το κλάσμα αυτό προτάθηκε από τους Ramos and Juarez (1986) για την ανίχνευση αυθεντικότητας αίγειου γάλακτος. Οι Alonso *et al.*, (1999) όρισαν το κλάσμα αυτό σε 0.50 ± 0.04 παρόμοια τιμή με αυτήν που δημοσιεύθηκε από τους Iverson and Sheppard (1989) στο αίγειο γάλα (0.46 ± 0.04) και από τον Wolf (1995) στο αίγειο τυρί (0.56 ± 0.05), αλλά πολύ διαφορετικές από τις τιμές που δημοσιεύθηκαν από τους ίδιους για το αγελαδινό γάλα (1,16 και 1,14 αντιστοίχως). Αντίστοιχες τιμές με τα παραπάνω παρατηρήσαμε και στην μελέτη αυτή όπου το αντίστοιχο κλάσμα C12:C10 για το αίγειο και το αγελαδινό γάλα βρέθηκε $0,45 \pm 0,01$ και $1,21 \pm 0,01$ αντιστοίχως, με σταδιακή αύξηση του κλάσματος ανάλογη με την αύξηση του αγελαδινού γάλακτος.

Στον Πίνακα 4-10 παρουσιάζονται τα λιπαρά οξέα του λίπους των παραπάνω διαφορετικών προσμίξεων αγελαδινού και αίγειου γάλακτος ομαδοποιημένα.

Πίνακας 4-10: Ομαδοποιημένα λιπαρά οξέα (% των ολικών λιπαρών οξέων) στο λίπος διαφορετικών προσιμίξεων αγελαδινού (A) και αίγιου (Αίγ) γάλακτος

Λιπαρά οξέα	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	SEM
	100%(Αίγ)	83% (Αίγ): 17% (A)	67% (Αίγ): 33% (A)	50% (Αίγ): 50% (A)	33% (Αίγ): 67% (A)	17% (Αίγ): 83% (A)	100%(A)	
SFA ¹	73.3	76.62	76.02	74.74	74.84	76.09	75.35	1.69
MUFA ²	22.66	20.95	21.31	22.86	22.45	21.59	22.26	1.68
PUFA ³	4.04	2.42	2.67	2.39	2.7	2.31	2.37	0.34
UFA ⁴	26,69	23,37	23,98	25,25	25,15	23,90	24,63	1,69
SFA/ UFA ⁵	3,81	4,67	4,53	4,41	4,43	4,68	4,72	1,50
SCFA ⁶	22,10	22,70	19,22	16,05	14,41	13,12	11,38	2,06
MCFA ⁷	42,69 ^e	45,96 ^{de}	48,87 ^{cd}	51,04 ^{bc}	52,50 ^{abc}	55,65 ^{ab}	56,72 ^a	0,86
LCFA ⁸	8,50	7,96	7,91	7,64	7,92	7,31	7,26	0,73

a,b,c,d,e: Μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες στην ίδια γραμμή διαφέρουν σημαντικά (P<0.05)

¹ SFA (Saturated Fatty Acids: Κορεσμένα λιπαρά οξέα)

² MUFA (Mono-unsaturated Fatty Acids: Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα)

³ PUFA (Poly-unsaturated Fatty Acids: Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα)

⁴ UFA (Unsaturated Fatty Acids: Ακόρεστα λιπαρά οξέα)

⁵ SFA/UFA (Saturates Fatty Acids / Unsaturated Fatty Acids: Κορεσμένα /Ακόρεστα λιπαρά οξέα)

⁶ SCFA (Short Chain Fatty Acids: Μικρής αλύσου λιπαρά οξέα)

⁷ MCFA (Medium Chain Fatty Acids: Μεσαίας αλύσου λιπαρά οξέα)

⁸ LCFA (Long Chain Fatty Acids: Μακράς αλύσου λιπαρά οξέα)

Σύμφωνα με τους Chilliard et al., (2006a), χαρακτηριστικό του αίγιου γάλακτος είναι η υψηλότερη περιεκτικότητά του σε μικρής και μεσαίας αλύσου λιπαρά οξέα σε σχέση με το αγελαδινό γάλα, όπου η περιεκτικότητα του αίγιου σε C6-C10 λιπαρά οξέα είναι 16% ενώ του αγελαδινού μόλις 8%. Οι Ceballos et al., (2009) έδειξαν στην έρευνά τους ότι το αίγιο γάλα περιέχει κατά 40% υψηλότερη περιεκτικότητα σε μικρής και μέσης αλύσου λιπαρά οξέα (C6-14) από ότι το αγελαδινό γάλα.

Στη μελέτη αυτή παρατηρήσαμε (Πιν. 4-10) ότι η περιεκτικότητα του αίγιου γάλακτος σε μικρής αλύσου λιπαρά οξέα (C4-C10) ήταν 22,10% ενώ του αγελαδινού 11,38%, και σε μεσαίας αλύσου λιπαρά οξέα (C12-C16) ήταν 42,69% ενώ του αγελαδινού 56,72%. Δηλαδή φαίνεται το αίγιο να έχει μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε μικρής αλύσου λιπαρά οξέα, η οποία μειώνεται όσο μειώνεται και το ποσοστό του στο μίγμα, και μικρότερη περιεκτικότητα σε μεσαίας αλύσου λιπαρά οξέα η οποία αυξάνεται

όσο μειώνεται το ποσοστό του αίγειου με ταυτόχρονη αύξηση του αγελαδινού γάλακτος στο μίγμα.

4.4.2 Ανάλυση λιπαρών οξέων μιγμάτων Πρόβειου και Αγελαδινού γάλακτος

Στον παρακάτω Πίνακα (Πιν. 4-11) περιλαμβάνονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα ανάλυσης των λιπαρών οξέων σε επτά διαφορετικά μίγματα αγελαδινού και πρόβειου γάλακτος.

Πίνακας 4-11: Λιπαρά οξέα (% των ολικών λιπαρών οξέων) στο λίπος διαφορετικών προσμίξεων αγελαδινού (Α) και πρόβειου (Π) γάλακτος

Λιπαρά οξέα	M1 100%(Π)	M2 83%(Π): 17%(Α)	M3 67%(Π): 33%(Α)	M4 50%(Π): 50%(Α)	M5 33%(Π): 67%(Α)	M6 17%(Π): 83%(Α)	M7 100%(Α)	SEM
C4	3.75	3.31	3.43	4.61	3.30	3.74	2.92	0.78
C6	3.92	3.00	3.34	3.98	2.78	3.23	2.31	0.42
C8	4.39 ^a	3.79 ^a	3.93 ^a	4.36 ^a	3.14 ^{ab}	3.11 ^{ab}	2.04 ^b	0.42
C10	12.75	11.40	11.42	11.96	8.83	8.56	5.54	1.34
C12	7.32	6.68	6.75	7.58	6.2	6.99	6.20	0.75
C12:C10	0,57 ^b	0,58 ^b	0,59 ^b	0,65 ^b	0,70 ^b	0,81 ^{ab}	1,15 ^a	0,07
C14	14.07	14.14	14.25	14.24	14.41	15.70	16.69	0.65
C15	0.98	1.04	1.04	0.99	1.06	1.185	1.37	0.10
C16	26.94 ^c	28.51 ^{bc}	28.29 ^{bc}	28.19 ^{bc}	30.8 ^{ab}	30.86 ^{ab}	34.27 ^a	1.12
C17	0.33	0.35	0.34	0.21	0.28	0.27	0.23	0.04
C18	5.10	5.44	5.32	4.58	5.79	5.14	5.59	0.73
C14:1	0.5 ^d	0.64 ^d	0.76 ^{cd}	0.78 ^{cd}	1.06 ^{bc}	1.42 ^b	1.84 ^a	0.06
C16:1	1.85 ^a	1.97 ^a	1.94 ^a	0.69 ^b	1.97 ^a	1.9 ^a	1.81 ^a	0.07
C18:1	15.50	16.98	16.42	14.77	17.76	15.79	17.06	1.31
C18:2	2.08	2.21	2.25	2.62	2.15	1.69	1.78	0.34
C18:3	0.1 ^a	0.11 ^a	0.10 ^a	0.1 ^a	0.07 ^{ab}	0.07 ^{ab}	0.04 ^b	0.008
CLA	0.38	0.40	0.38	0.31	0.37	0.3	0.28	0.03

a, b,c,d: Μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες στην ίδια γραμμή διαφέρουν σημαντικά (P<0.05)

Παρατηρήθηκε ότι τα λιπαρά οξέα που παρουσίασαν σημαντική διαφορά τιμών ($P < 0.05$) στα διάφορα μίγματα πρόβειου-αγελαδινού γάλακτος είναι το C8 (Καπρυλικό), το C16 (Παλμιτικό), το C14:1 (Μυριστολεϊκό), το C16:1 (Παλμιτελαϊκό) και το C18:3 (Λινολενικό). Οι διαφοροποιήσεις των υπολοίπων λιπαρών οξέων δεν ήταν σημαντικές.

Το C8 (Καπρυλικό) και το C18:3 (Λινολενικό) όπως προκύπτει από τον πίνακα 4-11, μειώνονται σταδιακά όσο η περιεκτικότητα του πρόβειου γάλακτος στο μίγμα μειώνεται ενώ η περιεκτικότητα του αγελαδινού αυξάνεται. Στο πρόβειο η αναλογία σε C8 και C18:3 είναι 4,39% και 0,1% αντιστοίχως ενώ στο αγελαδινό είναι 2,04% και 0,04%. Υπάρχει σταδιακή μείωση των λιπαρών αυτών οξέων όσο μειώνεται σταδιακά το πρόβειο στο μίγμα.

Οι Alonso *et al.*, (1999) για τον C8 δημοσίευσαν ελαφρώς χαμηλότερες τιμές, συγκεκριμένα 2,6% για το πρόβειο και 1,3% για το αγελαδινό.

Το C16 (Παλμιτικό) και το C14:1 (Μυριστολεϊκό) αυξάνονται σταδιακά όσο η περιεκτικότητα του πρόβειου γάλακτος στο μίγμα μειώνεται ενώ η περιεκτικότητα του αγελαδινού αυξάνεται. Στο πρόβειο το C16 βρίσκεται σε αναλογία 26,94% ενώ στο αγελαδινό 34,27% και το C14:1 βρίσκεται σε αναλογία 0,5% στο πρόβειο και 1,84% στο αγελαδινό. Αυξάνονται δηλαδή σταδιακά με η μείωση του πρόβειου.

Οι τιμές του C16:1 (Παλμιτελαϊκό) αν και παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές ($P < 0.05$) στα διαφορετικά μίγματα αγελαδινού και πρόβειου γάλακτος, οι διαφορές αυτές δεν είναι ανάλογες με την σταδιακή μείωση του πρόβειου γάλακτος και την ταυτόχρονη αύξηση του αγελαδινού.

Σύμφωνα με τους Juarez & Ramos (1993), το πρόβειο γάλα περιέχει περισσότερο καπροϊκό (C6), καπρυλικό (C8) και καπρικό (C10) από ότι το αγελαδινό γάλα. Αυτά τα λιπαρά οξέα που συνδέονται και με τη χαρακτηριστική γεύση των τυριών από πρόβειο γάλα μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση μιγμάτων γάλακτος από διαφορετικά είδη (Juarez & Ramos, 1993; Park *et al.*, 2007). Πέρα από τον C8 που όπως προαναφέρθηκε εμφάνισε σημαντική στατιστική διαφορά στα διαφορετικά μίγματα πρόβειου και αγελαδινού γάλακτος, μπορούμε να παρατηρήσουμε στον πίνακα 4-11 ότι και τα C6 και C10 παρουσιάζουν μια φθίνουσα πορεία ανάλογη με την μείωση του πρόβειου και αύξηση του αγελαδινού.

Οι Iverson & Sheppard (1989) χρησιμοποίησαν το λόγο C12:C10 όχι μόνο για την ανίχνευση παρουσίας αγελαδινού γάλακτος σε αίγιο αλλά και για την παρουσία αγελαδινού γάλακτος σε πρόβειο. Υπολογίζοντας το λόγο αυτό και στην παρούσα μελέτη, παρατηρήθηκε ότι το κλάσμα αυτό αυξάνεται με την μείωση του πρόβειου

γάλακτος και αύξηση του αγελαδινού, με τιμές $0,57\pm 0,07$ για το αίγαιο γάλα και $1,15\pm 0,07$ για το αγελαδινό.

Στον πίνακα 4-12 παρουσιάζονται τα λιπαρά οξέα του λίπους των παραπάνω διαφορετικών προσμίξεων αγελαδινού και πρόβειου γάλακτος ομαδοποιημένα.

Πίνακας 4-12: Ομαδοποιημένα λιπαρά οξέα (% των ολικών λιπαρών οξέων) στο λίπος διαφορετικών προσμίξεων αγελαδινού (Α) και πρόβειου (Π) γάλακτος

Λιπαρά οξέα	M1 100%(Π)	M2 83% (Π): 17% (Α)	M3 67% (Π): 33% (Α)	M4 50% (Π): 50% (Α)	M5 33% (Π): 67% (Α)	M6 17% (Π): 83% (Α)	M7 100%(Α)	SEM
SFA ¹	79.57	77.68	78.14	80.72	76.6	78.83	77.17	1.44
MUFA ²	17.86	19.59	19.12	16.25	20.79	19.10	20.71	1.35
PUFA ³	2.57	2.72	2.74	3.03	2.6	2.06	2.10	0.32
UFA ⁴	20,43	22,31	21,86	19,28	23,39	21,17	22,82	1,44
SFA/ UFA ⁵	3,93	3,50	3,60	4,18	3,27	3,74	3,40	0,31
SCFA ⁶	24,81	21,52	22,12	24,92	18,06	18,66	12,81	2,42
MCFA ⁷	49,32	50,37	50,34	51,00	52,46	54,75	58,52	1,66
LCFA ⁸	5,43	5,79	5,66	4,79	6,07	5,42	5,83	0,72

¹ SFA (Saturated Fatty Acids: Κορεσμένα λιπαρά οξέα)

² MUFA (Mono-unsaturated Fatty Acids: Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα)

³ PUFA (Poly-unsaturated Fatty Acids: Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα)

⁴ UFA (Unsaturated Fatty Acids: Ακόρεστα λιπαρά οξέα)

⁵ SFA/UFA (Saturates Fatty Acids / Unsaturated Fatty Acids: Κορεσμένα /Ακόρεστα λιπαρά οξέα)

⁶ SCFA (Short Chain Fatty Acids: Μικρής αλύσου λιπαρά οξέα)

⁷ MCFA (Medium Chain Fatty Acids: Μεσαίας αλύσου λιπαρά οξέα)

⁸ LCFA (Long Chain Fatty Acids: Μακράς αλύσου λιπαρά οξέα)

Παρατηρείται μεγαλύτερο ποσοστό μικρής αλύσου λιπαρών οξέων στο πρόβειο (24,81%) σε σχέση με το αγελαδινό (12,81%) αλλά δεν υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των ενδιάμεσων τιμών ($P>0.05$) ούτε και φθίνουσα τάση ανάλογη με την μείωση της περιεκτικότητας του πρόβειου. Τα μεσαίας αλύσου λιπαρά οξέα βρίσκονται σε μικρότερο ποσοστό στο πρόβειο (49,32%) σε σχέση με το αγελαδινό (58,52%) αλλά και εδώ δεν υπάρχει σημαντική στατιστική διαφορά. Παρατηρείται μόνο μια τάση αύξησης των τιμών ανάλογη με τη μείωση του πρόβειου και αύξηση του αγελαδινού.

4.4.3 Ανάλυση λιπαρών οξέων μιγμάτων Πρόβειου και Αίγειου γάλακτος

Στον παρακάτω πίνακα (Πιν. 4-13) περιλαμβάνονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα ανάλυσης των λιπαρών οξέων σε επτά διαφορετικά μίγματα αίγειου και πρόβειου γάλακτος.

Πίνακας 4-13: Λιπαρά οξέα (% των ολικών λιπαρών οξέων) στο λίπος διαφορετικών προσμίξεων αίγειου (Αίγ) και πρόβειου (Π) γάλακτος

Λιπαρά οξέα	M1 100%(Π)	M2 83%(Π): 17%(Αίγ)	M3 67%(Π): 33%(Αίγ)	M4 50%(Π): 50%(Αίγ)	M5 33%(Π): 67%(Αίγ)	M6 17%(Π): 83%(Αίγ)	M7 100%(Αίγ)	SEM
C4	3.80 ^{abc}	3.75 ^{abc}	3.79 ^{abc}	2.8 ^{abc}	4.01 ^a	2.62 ^{ab}	2.07 ^c	0.31
C6	3.73	3.89	3.60	3.26	3.65	3.01	2.84	0.31
C8	4.58	4.97	4.65	4.43	4.84	4.10	3.86	0.34
C10	13.72	14.18	15.05	13.125	15.13	12.8	12.48	1.17
C12	7.49 ^{ab}	8.13 ^a	7.72 ^{ab}	7.03 ^{ab}	7.50 ^{ab}	6.48 ^{ab}	5.78 ^b	0.37
C14	13.77	11.34	13.11	12.0	12.72	12.38	13.37	0.81
C15	0.98	0.91	0.89	0.87	0.88	0.92	0.99	0.04
C16	26.81 ^a	23.71 ^{ab}	25.05 ^{ab}	25.53 ^{ab}	23.27 ^b	24.31 ^{ab}	24.87 ^{ab}	0.58
C17	0.37 ^a	0.23 ^b	0.30 ^{ab}	0.28 ^{ab}	0.24 ^{ab}	0.24 ^b	0.24 ^{ab}	0.02
C18	4.76 ^c	4.32 ^c	5.20 ^{bc}	6.39 ^{abc}	6.50 ^{bc}	7.47 ^{ab}	8.65 ^a	0.43
C14:1	0.43	0.41	0.40	0.37	0.39	0.34	0.35	0.03
C16:1	1.25	4.53	2.12	1.02	1.62	1.46	0.34	1.01
C18:1	15.56 ^{ab}	13.68 ^b	15.17 ^b	17.68 ^{ab}	15.82 ^{ab}	18.79 ^{ab}	20.57 ^a	0.91
C18:2	2.10	5.45	2.35	4.48	3.24	4.32	2.75	0.82
C18:3	0.14	0.13	0.10	0.13	0.12	0.12	0.13	0.02
CLA	0.46 ^{ab}	0.38 ^b	0.46 ^{ab}	0.55 ^{ab}	0.52 ^{ab}	0.59 ^{ab}	0.67 ^a	0.04

a,b,c: Μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες στην ίδια γραμμή διαφέρουν σημαντικά (P<0.05)

Παρατηρήθηκε ότι τα λιπαρά οξέα που παρουσίασαν σημαντική διαφορά τιμών (P<0.05) στα διάφορα μίγματα πρόβειου-αίγειου γάλακτος είναι το C4 (Βουτυρικό), το C12 (Λαουρικό), το C16 (Παλμιτικό), το C17, το C18 (Στεατικό), το C18:1 (Ελαϊκό) και το CLA (Συζευγμένο Λινελαϊκό Οξύ).

Όλα τα προαναφερθέντα λιπαρά οξέα, με εξαίρεση το C18 (Στεατικό), το οποίο αυξάνεται όσο μειώνεται το πρόβειο στο μίγμα (4,76% στο πρόβειο και 8,65% στο

αίγειο), δεν παρουσιάζουν σταδιακή αύξηση ή μείωση ανάλογη με τη σταδιακή μείωση του πρόβειου και αύξηση του αίγειου.

Η παραπάνω παρατήρηση συμπίπτει με τον Jadal (1996), ο οποίος ανέφερε ότι τα λιπίδια του πρόβειου γάλακτος είναι κατά κάποιον τρόπο παρόμοια με αυτά του αίγειου γάλακτος. Ο ίδιος πρόσθεσε ότι πιο σημαντική ίσως διαφορά μεταξύ των δυο αυτών ειδών γάλακτος είναι ότι τα μικρού μήκους λιπαρά οξέα, όπως το καπροϊκό (C6), καπρυλικό (C8) και καπρικό (C10), βρίσκονται σε μεγαλύτερο ποσοστό στο αίγειο γάλα, αλλά και τα μεσαίας αλύσου λιπαρά οξέα είναι ελαφρώς υψηλότερα στο αίγειο σε σχέση με το πρόβειο γάλα.

Στον πίνακα 4-14 παρουσιάζονται τα λιπαρά οξέα του λίπους των παραπάνω διαφορετικών προσμιξέων αγελαδινού και πρόβειου γάλακτος ομαδοποιημένα.

Πίνακας 4-14: Ομαδοποιημένα λιπαρά οξέα (% των ολικών λιπαρών οξέων) στο λίπος διαφορετικών προσμιξέων αίγειου (Αίγ) και πρόβειου (Π) γάλακτος

Λιπαρά οξέα	M1 100%(Π)	M2 83%(Π): 17%(Αίγ)	M3 67%(Π): 33%(Αίγ)	M4 50%(Π): 50%(Αίγ)	M5 33%(Π): 67%(Αίγ)	M6 17%(Π): 83%(Αίγ)	M7 100%(Αίγ)	SEM
SFA ¹	80.03	75.42	79.38	75.75	78.26	74.36	75.18	1.78
MUFA ²	17.24	18.61	17.70	19.08	17.85	20.60	21.27	1.39
PUFA ³	2.71	5.96	2.91	5.16	3.88	5.04	3.55	0.80
UFA ⁴	19,96	24,58	20,60	24,25	21,73	25,64	24,82	1,77
SFA/ UFA ⁵	4,04	3,11	3,89	3,12	3,60	2,94	3,03	0,33
SCFA ⁶	25,85	26,77	27,10	23,61	27,63	22,54	21,27	1,87
MCFA ⁷	49,05	44,09	46,78	45,45	44,37	44,10	45,01	0,98
LCFA ⁸	5,12 ^c	4,55 ^c	5,50 ^{bc}	6,67 ^{abc}	6,25 ^{bc}	7,71 ^{ab}	8,89 ^a	0,44

a.,b,c: Μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες στην ίδια γραμμή διαφέρουν σημαντικά (P<0.05)

¹ SFA (Saturated Fatty Acids: Κορεσμένα λιπαρά οξέα)

² MUFA (Mono-unsaturated Fatty Acids: Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα)

³ PUFA (Poly-unsaturated Fatty Acids: Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα)

⁴ UFA (Unsaturated Fatty Acids: Ακόρεστα λιπαρά οξέα)

⁵ SFA/UFA (Saturates Fatty Acids / Unsaturated Fatty Acids: Κορεσμένα /Ακόρεστα λιπαρά οξέα)

⁶ SCFA (Short Chain Fatty Acids: Μικρής αλύσου λιπαρά οξέα)

⁷ MCFA (Medium Chain Fatty Acids: Μεσαίας αλύσου λιπαρά οξέα)

⁸ LCFA (Long Chain Fatty Acids: Μακράς αλύσου λιπαρά οξέα)

Στον πίνακα αυτό παρατηρούμε μόνο σημαντικές διαφορές ($P < 0.05$) στις τιμές των μακράς αλύσου λιπαρών οξέων. Οι διαφορές αυτές οφείλονται στον C18 που όπως αναφέρθηκε παραπάνω (Πιν. 4-13) παρουσιάζει μικρότερη τιμή στο πρόβειο γάλα η οποία αυξάνεται όσο μειώνεται το πρόβειο γάλα στο μίγμα.

Κεφάλαιο 5

Συμπεράσματα

5.1 Συμπεράσματα από την εφαρμογή της τεχνικής sandwich ELISA

Όσον αφορά την εφαρμογή της τεχνικής sandwich ELISA για την ανίχνευση νοθείας πρόβειου γάλακτος με αίγιο, τα συμπεράσματα μπορούν να συνοψισθούν ως εξής:

1. Πρόκειται για μια ποιοτική και ποσοτική μέθοδο με υψηλό συντελεστή συσχέτισης μεταξύ πραγματικής και μετρούμενης τιμής αίγειου γάλακτος σε πρόβειο ($r=0,93$) και πολύ ακριβής ($CV=3,9$). Όπως φάνηκε από τα δείγματα στα οποία εφαρμόστηκε, παρουσιάζει μεγαλύτερη ακρίβεια σε ποσοστά πρόσμιξης με αίγιο μέχρι 40%, ελαφρώς μικρότερη ακρίβεια σε ποσοστά μέχρι 50% ενώ πάνω από το ποσοστό αυτό η διαφορά μεταξύ πραγματικής και υπολογισμένης τιμής είναι πολύ μεγάλη.

2. Τα αποτελέσματα της μεθόδου δεν επηρεάζονται από την παρουσία αγελαδινού γάλακτος στο μίγμα.

3. Η μέθοδος ήταν το ίδιο αποτελεσματική στους 65°C για 5 min, ενώ η θερμική επεξεργασία των 90°C για 5min επηρέασε την αποτελεσματικότητα της μεθόδου καθιστώντας μη δυνατή την ανίχνευση του αίγειου γάλακτος στο μίγμα στις συνθήκες αυτές. Η θέρμανση του γάλακτος στους 68°C για 10 min προκάλεσε μείωση του ανιχνεύσιμου ποσοστού αίγειου γάλακτος κατά 17% ενώ η θέρμανση στους 80°C για 15 sec προκάλεσε μείωση κατά 11%.

4. Η μέθοδος αυτή παρουσιάζει το πλεονέκτημα ότι μπορεί να πραγματοποιηθεί σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα (συνολικά λιγότερο από δυο ώρες) και είναι εύκολη στη χρήση με αποτέλεσμα να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ελέγχους ρουτίνας από μη εξειδικευμένο προσωπικό.

5. Η παραγωγή των αντισωμάτων έναντι της αίγιας και βόειας IgG είναι πολύ μεγάλης σημασίας διότι μπορεί να παραχθούν μεγάλες ποσότητες πολυκλωνικών αντισωμάτων, τα οποία επαρκούν για αρκετά μεγάλο αριθμό δειγμάτων (~19 πλάκες των 96 βοθρίων) και επιπλέον δίνουν τη δυνατότητα να υπάρχουν πάντα διαθέσιμα.

Η μέθοδος αυτή, πραγματοποιείται πρώτη φορά στην Ελλάδα και αποτελεί γόνιμο έδαφος για συνέχιση της έρευνας με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων όχι μόνο στο γάλα αλλά και στο τυρί, για να μπορέσουν να διεξαχθούν πιο ακριβή συμπεράσματα όσον αφορά την ταύτιση πραγματικού και ανιχνεύσιμου ποσοστού νοθείας στο πρόβειο γάλα, όχι μόνο με αίγαιο αλλά και με αγελαδινό γάλα.

5.2 Συμπεράσματα από την ανάλυση των λιπαρών οξέων

Όσον αφορά τα συμπεράσματα για την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε αίγαιο, αγελαδινού γάλακτος σε πρόβειο και αίγειο γάλακτος σε πρόβειο, με βάση τη διαφοροποίηση των λιπαρών οξέων στα διάφορα μίγματα, τα συμπεράσματα μπορούν να συνοψισθούν ως εξής:

Μίγμα αγελαδινού-αίγειου:

1. Σχετικά με την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε αίγαιο παρατηρήθηκε ότι τα C8, C10 και C18:3 μειώνονται σταδιακά όσο μειώνεται το αίγαιο γάλα στο μίγμα, ενώ τα C16 και C14:1 αυξάνονται σταδιακά όσο μειώνεται το αίγαιο γάλα.

2. Τα μικρής αλύσου λιπαρά οξέα (C4-C10) βρίσκονται σε μεγαλύτερο ποσοστό στο αίγαιο γάλα και μειώνονται σταδιακά με τη μείωση αυτού και αύξηση του αγελαδινού, ενώ τα μεσαίας αλύσου λιπαρά οξέα (C12-C16) βρίσκονται σε μικρότερο ποσοστό στο αίγαιο γάλα και αυξάνονται σταδιακά με τη μείωση αυτού και αύξηση του αγελαδινού.

3. Το κλάσμα C12:C10 αυξάνεται όσο αυξάνεται το αγελαδινό γάλα στο μίγμα με ακραίες τιμές $0,45 \pm 0,05$ για το αίγαιο και $1,22 \pm 0,05$ στο αγελαδινό.

Μίγμα αγελαδινού-Πρόβειου:

1. Παρατηρήθηκε ότι τα C8 και C18:3 μειώνονται σταδιακά όσο μειώνεται το πρόβειο γάλα στο μίγμα, ενώ τα C16 και C14:1 αυξάνονται όσο μειώνεται το πρόβειο γάλα στο μίγμα.

2. Παρατηρήθηκε μεγαλύτερο ποσοστό μικρής αλύσου λιπαρών οξέων στο πρόβειο σε σχέση με το αγελαδινό αλλά δεν υπήρξε σημαντική διαφορά μεταξύ των ενδιάμεσων τιμών ούτε και φθίνουσα τάση ανάλογη με την μείωση της περιεκτικότητας του πρόβειου. Τα μεσαίας αλύσου λιπαρά οξέα βρέθηκαν σε μικρότερο ποσοστό στο πρόβειο σε σχέση με το αγελαδινό, αλλά και εδώ δεν υπήρξε σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ των τιμών ούτε ανάλογη διαφοροποίηση με τη μείωση του πρόβειου και αύξηση του αγελαδινού.

3. Το κλάσμα C12:C10 αυξάνεται όσο αυξάνεται το αγελαδινό γάλα στο μίγμα με ακραίες τιμές 0,57 για το αίγαιο και 1,16 στο αγελαδινό.

Μίγμα Αίγειου-Πρόβειου:

1. Παρατηρήθηκε ότι το C18 αυξάνεται όσο αυξάνεται το αίγαιο στο μίγμα αυτό.

Συμπερασματικά θα μπορούσαμε να πούμε ότι στα μίγματα αγελαδινού και αίγειου όπως και αγελαδινού και πρόβειου παρατηρούνται μεταβολές στα ίδια λιπαρά οξέα και ανάλογες με την μείωση του πρόβειου ή αίγειου γάλακτος στα μίγματα αυτά αντίστοιχα. Ωστόσο πιο ξεκάθαρες αυτές οι μεταβολές παρατηρήθηκαν στα μίγματα αγελαδινού και αίγειου γάλακτος. Όσον αφορά τα μίγματα πρόβειου και αίγειου δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφοροποιήσεις στα λιπαρά οξέα. Τα παραπάνω συμπίπτουν με τον Jadal (1996), ο οποίος ανέφερε ότι τα λιπίδια του πρόβειου γάλακτος είναι κατά κάποιο τρόπο παρόμοια με αυτά του αίγειου γάλακτος.

Γενικά γνωρίζουμε ότι η σύσταση του λίπους είναι η πιο ευμετάβλητη συνιστώσα του γάλακτος τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως το στάδιο της γαλακτικής περιόδου, την εποχή, τη φυλή των ζώων και κυρίως τη διατροφή τους (Raynal-Ljutovac et al., 2008). Σύμφωνα με τους De La Fuente et al., (2009) σημαντικό ρόλο στην μεγάλη διακύμανση της σύστασης του λίπους παίζει επίσης η ηλικία του ζώου, το ποίμνιο ακόμα και η ημέρα ελέγχου (TD). Για αυτό χρειάζεται μεγάλη προσοχή κατά την εκτίμηση της νοθείας γάλακτος με βάση τα λιπαρά οξέα.

5.3 Σύγκριση μεθόδων

Συγκρίνοντας τις δυο μεθόδους (ELISA και ανάλυση λιπαρών οξέων) που εφαρμόσαμε για την ανίχνευση νοθείας πρόβειου γάλακτος με αίγαιο αλλά και σε μίγματα αγελαδινού και αίγειου, μπορούμε να αναφέρουμε ότι πλεονεκτεί η μέθοδος ELISA λόγω της μεγαλύτερης ακρίβειας της μεθόδου και της δυνατότητας ποσοτικού προσδιορισμού της νοθείας.

Η τάση αύξησης ή μείωσης συγκεκριμένων λιπαρών οξέων καθώς και του κλάσματος C12:C10 στα μίγματα αγελαδινού-αίγειου γάλακτος και αγελαδινού-πρόβειου γάλακτος αποτελεί ένδειξη νοθείας, αλλά δεν είναι δυνατός ο ποσοτικός προσδιορισμός της νοθείας με τη μέθοδο αυτή.

Βιβλιογραφία

Ελληνόγλωσση Βιβλιογραφία

- Ανυφαντάκης, Ε. Μ. (2004)**, Τυροκομία. Αθήνα: Εκδόσεις Σταμούλης β' έκδοση
- Ανυφαντάκης, Ε., Καλατζόπουλος, Γ., Βουτσινάς, Λ., Μασούρας, Θ. (1985)**, Μελέτη μεθόδων προσδιορισμού της νοθείας φέτας πρόβειου γάλακτος με αγελαδινό. Πρακτικά 1^{ου} Συνεδρίου Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Θεσσαλονίκη 1985
- Δημητρακόπουλος, Γ. (1994)**, Βασικές αρχές ανοσολογίας, Α' μέρος, Αθήνα: Εκδόσεις Παπαντωνόπουλος
- Καμιναρίδης, Σ. & Μοάτσου, Γ. (2009)**, Γαλακτοκομία.. Αθήνα: Εκδόσεις Έμβρυο
- Μασούρας, Θ., Κανδαράκης, Ι., Ευαγγελάτος, Γρ., Ανυφαντάκης, Εμ., (1995)**, Έρευνα για ανάπτυξη πολυκλωνικών αντισωμάτων έναντι των πρωτεϊνών αγελαδινού γάλακτος, Πρακτικά 5^{ου} Πανελληνίου Συνεδρίου Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Αθήνα 1995

Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

- Abbas, A., Lichtman, A. (2001)**, Basic immunology: Functions and disorders of the immune system, 1st edition
- Ahluwalia, A., De Rossi, D., Ristori, C., Schirone, A., Serra, G. (1991)**, A comparative study of protein immobilization techniques for optical immunosensors. Biosens. Bioelectron 7, 207
- Alonso, L., Fontecha, J., Lozada, L., Fraga, M. J. & Juarez, M. (1999)**, Fatty Acid Composition of Caprine Milk: Major, Branched-Chain, and Trans Fatty Acids. Journal of Dairy Science, Vol. 82, No. 5
- Anguita, G., Martin, R., Garcia, T., Morales, P., Haza, A. I., Gonzalez, L., Sanz, B., Hernandez, P. E. (1997)**, A competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine milk in ovine and caprine milk and cheese using a monoclonal antibody against bovine beta-casein, Journal of Food Protection, 60(1), 64–66.
- Asensio, L., Gonzalez, I., Garcia, T., Martin, R. (2008)**, Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Food Control 19, 1-8

- Beer, M., Krause, I., Stapf, M., Schwarzer, C., Klostermeyer, H. (1996)**, Indirect competitive enzyme linked immunosorbent assay for the detection of native and heat denatured bovine beta-lactoglobulin in ewes' and goats' milk cheese. *European Food Research and Technology*, 203(1), 21–26
- Belloque, J. and Ramos, M. (1999)**, Application of NMR spectroscopy to milk and dairy products. *Trends in food science & technology* 10, 313-320
- Bligh E. G. and Dyer. W. J. (1957)**, *Can. J. Biochem. Phystol.* 911
- Bonner, L. R. Philip. (2007)**, *Protein purification-Basics*, Taylor and Francis Ltd
- Borkova M and Snaselova J. (2005)**, Possibilities of different animal milk detection in milk and dairy products – a review. *Czech J. Food Sci.*, 23, 41–50
- Bottero, M. T., Civera, T., Anastasio, A., Turi, R. M., & Rosati, S. (2002)**, Identification of cows' milk in “buffalo” cheese by duplex polymerase chain reaction. *Journal of Food Protection*, 65, 362–366
- Campanella, L., Martini, E., Pintore, M., Tomassetti, M. (2009)**, Determination of Lactoferrin and Immunoglobulin G in Animal Milks by New Immunosensors. *Sensors*, 9, 2202-2221
- Ceballos, L. S., Morales, E. R., Adarve, Gloria de la Torre, Castro, J. D., Martinez, L. P., Sanz Sampelayo, M. R. (2009)**, Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology. *Journal of Food Composition and Analysis* 22, 322–329
- Colak, H., Aydin, A., Nazli, B., Ergun, O. (2006)**, Detection of presence of cow's milk in sheep's cheeses by immunochromatography, *Food control* 17, 905-908
- Collin, R., Prosser, C., McLaren, R., Thomson, M., & Malcolm, D. (2002)**. Development and validation of a nephelometric immunoassay for IgG1 in milk, *Journal of Dairy Research* 69, 27±35.
- Commission Regulation (EC) No. 1081/96 of 14. June 1996**, establishing a reference method for the detection of cows' milk and caseinate in cheeses from ewes' milk, goats' milk and buffalos' milk or mixtures of ewes' milk, goats' milk and buffalos' milk, *Off. J. L142*, 15/06/1996, 15–25
- Chilliard, Y., & Ferlay, A. (2004)**, Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties. *Reprod. Nutr. Dev.* 44, 467-492
- Chilliard, Y., Rouel, J., Ferlay, A., Bernard, L., Gaborit, P., Raynal-Ljutovac, K., Lauret, A., Leroux, C. (2006a)**, Optimizing goat's milk and cheese fatty acid

composition. In: Williams, C., Buttriss, J. (Eds.), *Improving the Fat Content of Foods*. Woodhead Publishing Ltd, UK

Chu, F. S. (2003), *Immunoassays / Radioimmunoassay and Enzyme Immunoassay*. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition, 3248-3255

Crowther, J. (2001). *The Elisa Guidebook*, New Jersey: Humana Press Inc

Eisenhauer, P., Lambrecht, G., Petzoldt, K., Henkel, E. (1984), Comparison of Nephelometry and Single Radial Immunodiffusion for the Determination of IgG and IgM Concentrations in Newborn Foals and their Dams. *Zbl. Vet. Med. B* 31, 481-486

European Commission. (2001), **EC 213/2001** Methods for the analysis and quality evaluation of milk and milk products. *Official Journal of the European Communities*, 44, L37/31–L37/99

Fox, P.F. and McSweeney, P.L.H. (1998), *Diary Chemistry and Biochemistry*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers

Fox, P.F. and McSweeney, P.L.H. (2006), *Advanced Dairy Chemistry, Volume 2, Lipids*, New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers

Gapper, L., Copestake, D., Otter, D., Indyk H. (2000), Analysis of bovine immunoglobulin G in milk, colostrum and dietary supplements: a review, *Anal Bioanal Chem* 389, 93–109

Goudjil, H., Fontecha, J., Luna, P., Fuente de la, M. A., Alonso, L., Juarez, M. (2004), Quantitative characterization of unsaturated and trans fatty acids in ewe's milk fat. *Lait* 84, 473-482

Grappin, R., Dupont, D., Pochet, S., Lefier, D. (2004), *Milk Proteins/Analytical Methods*, Encyclopedia of Dairy Sciences, 1967-1976

Gross, H. J. (2004), *Mass Spectrometry A Textbook*, 2nd Edition, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, London

Guiochon, G. and Guillemin, L. C. (1988), *Quantitative gas chromatography for laboratory analysis and on-line process control*. Elsevier Science Publishers B.V., Netherlands

Gunstone, F. D., Harwood, J. L., and Padley, F. B. (1997), *The Lipid Handbook*, 2nd Edition

Gutierrez-Gallego, R., Bosch, J., Such-Sanmartun, G., Segura, J. (2009). Surface Plasmon Resonance Immunoassays – A perspective, *Growth Hormone & IGF Research* 19, 388-398

- Haasnoot, W., Smits, N. G. E., Kemmeres-Vonchen, A. E. M. and Bremer, M. G. E. G. (2004)**, Fast biosensor immunoassays for the detection of cows' milk in the milk of ewes and goats. *Journal of Dairy Research*, 71, 322-329
- Harlow, E. and Lane, D. (1988)**, *Antibodies: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Harlow, E. and Lane, D. (1999)**, *Using Antibodies: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Haza, A. I., Morales, P., Martin, R., Garcia, T., Anguita, G., Gonzalez, I., Sanz, B., Hernandez P. E. (1996)**, Development of monoclonal antibodies against caprine alpha (S2)-casein and their potential for detecting the substitution of ovine milk by caprine milk by an indirect ELISA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(7), 1756–1761
- Haza, A. I., Morales, P., Martin, R., Garcia, T., Anguita, G., Sanz, B., Hernandez, P. E. (1999)**, Detection and quantification of goat's cheese in ewe's cheese using a monoclonal antibody and two ELISA formats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(7), 1043–1047
- Hurley, I. P., Coleman, R. C., Ireland, H. E., Williams, J. H. H. (2004a)**, Measurement of bovine IgG by indirect competitive ELISA as a means of detecting milk adulteration. *Journal of Dairy Science*, 87(3), 543–549.
- Hurley, I. P., Coleman, R. C. Ireland, H. E., Williams, J.H.H. (2006)**, Use of sandwich IgG ELISA for the detection and quantification of adulteration of milk and soft cheese. *International Dairy Journal*, 16, 805–812
- Huse, K., Bohme, H-J., Scholz, G. (2002)**, Review article, Purification of antibodies by affinity chromatography. *Journal of Biochemical and Biophysical methods*, 51, 217-231
- Indyk, E. H., & Filonzi, L. E. (2003)**, Determination of Immunoglobulin G in Bovine Colostrum and Milk by Direct Biosensor SPR-Immunoassay, *Journal OF AOAC International* 86, NO. 2
- Indyk, E.H. (2006)**, *Optical Biosensors: Making Sense of Interactions*, Chemistry in New Zealand, 42-46
- Iverson, J. L., and Sheppard, A. J. (1989)**, Detection of adulteration in cow, goat, and sheep cheeses utilizing gas-liquid chromatographic fatty acid data. *J. Dairy Sci.* 72:1707–1712.
- Jacobsen, E. N. (2007)**, *NMR Spectroscopy Explained, Simplified Theory, Applications and Examples for Organic Chemistry and Structural Biology*. John Wiley & Sons Inc., Hoboken, New Jersey

- Jahreis, G., Fritsche, J., Kraft, J. (1999)**, Species dependent, seasonal, and dietary variation of conjugated linoleic acid in milk. In: Yurawecz, M.P., Mossoba, M.M., Kramer, J.K.G., Pariga, M.W., Nelson, G.J. (Eds.), *Advances in Conjugated Linoleic Acid*. American Oil Chemists Society, Champaign, IL.
- Jalanti, R., & Henney, C. (1972)**, Studies on single radial immunodiffusion techniques for the quantitation of antigen and antibody. *Journal of Immunological Methods* 1, 123-131
- Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Capra, D. (1999)**, *Immunobiology: The Immune system in health and disease*, 4th Edition
- Jinno, K. (1992)**, *Hyphenated techniques in supercritical fluid chromatography and extraction*. Elsevier Science Publishers B.V. Netherlands
- Juarez, M., Ramos, M. (2003)**, Sheep Milk, *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, Pages 5198-5205
- Kaminarides S.E. and Koukiassa P. (2002)**, Detection of bovine milk in ovine yoghurt by electrophoresis of para- κ -casein. *Food Chemistry*, 78, 53–55
- Korhonen, H., Marnila¹, P., Gill, H. S. (2000)**, Milk immunoglobulins and complement factors. *British Journal of Nutrition* 84, 75-80
- Layer, A., Schneider, P., Tissot, J.-D., Duchosal, M. A., (2000)**, *Essential Guides for Isolation/purification of Immunoglobulins*, Appendix 1/Essential guides for isolation/purification of immunoglobulins
- Lee, J. H., Choi, H. K., Chang, J. H. (2010)**. Optimization of biotin labeling of antibodies using mouse IgG and goat anti-mouse IgG-conjugated fluorescent beads and their application as capture probes on protein chip, *Journal of Immunological methods* 362, 38-42
- Levieux, D. (1977)**, New technique for detecting adulteration of goat's and ewe's milk. *Dossiers de VElevage* 1 (2), 37-46
- Levieux, D. (1980)**, The development of a rapid and sensitive method based on haemagglutination inhibition for the measurement of cow milk in goat milk. *Annales de Recherches Ve'terinaires* 11, 151-156
- Levieux, D., and Venien, A. (1994)**, Rapid, sensitive 2-site Elisa for detection of cows milk in goats or ewes milk using monoclonal- antibodies. *Journal of Dairy Research* 61, 91–99

- Li-Ghan, E., Kummer, A., Losso, J. N., Kitts, D. D. & Nakai, S. (1995).** Stability of bovine immunoglobulins to thermal treatment and processing. *Food Research International*, Vol. 28, No. 1, 9-16
- LKB – Producter (1982),** High performance liquid chromatography for the biochemist – Basic Principles. LKB, Bromma editions, Sweden
- López-Calleja, I., González, I., Fajardo, V., Hernandez, P., García, T., Martín, R. (2007),** Application of an indirect ELISA and a PCR technique for detection of cows' milk in sheep's and goats' milk cheeses. *International Dairy Journal* 17, 87–93
- Lucas, A., Rock, E., Agabriel, C., Chilliard, Y., Coulon, J.B. (2008),** Relationships between animal species (cow versus goat) and some nutritional constituents in raw milk farmhouse cheeses. *Small Ruminant Research*, 74, 243-248
- Luppa, P.B., Sokoll, L.J., Chan, D.W. (2001),** Immunosensors principles and applications to clinical chemistry. *Clin. Chim. Acta* 314, 1
- Marchal, E., Collard-Bovy, C., Humbert, G., Linden, G. Montagne, P. Duheille, J. Varcin P. (1991),** Microparticle-Enhanced Nephelometric Immunoassay. 2. Measurement of α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin. *Journal of Dairy Science*, 74, 3702-3708
- Madureira, A., Pereira, C., Gomes, A., Pintado, M., Malcata, X. (2007),** Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. *Food Research International*, 40, 1197-1211
- Mansson, H. L. (2008),** Fatty acids in bovine milk fat. *Food & Nutrition Research*, 52
- Maudet, C., & Taberlet, P. (2001),** Detection of cows' milk in goats' cheeses inferred from mitochondrial DNA polymorphism. *Journal of Dairy Research*, 68(2), 229–235
- Mayer, H.K. (2005),** Milk species identification in cheese varieties using electrophoretic, chromatographic and PCR techniques. *International Dairy Journal*, 15, 595–604
- McMaster, C. M. (2007),** HPLC A Practical User's Guide, second edition. John Willey & Sons, Inc Hoboken, New Jersey
- McMaster, C. M. (2008),** GC/MS: A Practical User's. John Willey & Sons, Inc Hoboken, New Jersey
- McNair, M.H., & Miller, M.J. (2009),** Basic gas chromatography, Second edition. John Willey & Sons, Inc Hoboken, New Jersey
- Meyer, R. V. (2010),** Practical High-Performance LiquidChromatography. John Willey & Sons, Ltd, United Kingdom

- Moatsou, G., and Anifantakis, E. (2003)**, Recent developments in antibody based analytical methods for the differentiation of milk from different species. *International Journal of Dairy Technology*, 56(3), 133–138
- Montagne, P., Gavriloff, C., Humbert, G., Cuilliere, M.L., Duheille, J., Linden, G. (1991)**. Microparticle-enhanced nephelometric immunoassay for immunoglobulins G in cow's milk. *Lait* 71,493-499
- Nakamura, R., Kasahara, Y., Rechnitz, G. (1992)**, Immunochemical assays and Biosensor technology for the 1990s. USA
- Prandini, A., Sigolo, S., Piva, G. (2011)**, A comparative study of fatty acid composition and CLA concentration in commercial cheeses. *Journal of Food Composition and Analysis* , Article in Press
- Park, Y.W., Juarez, M., Ramos, M., Haenlein, G.F.W. (2007)**, Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk, *Small Ruminant Research* 68, 88–113
- Phillips, A.P., Martin, K.L., Horton, W.H. (1984)**, The Choice of Methods for Immunoglobulin IgG Purification: Yield and Purity of Antibody Activity, *Journal of Immunological Methods* 74, 385-393
- Pintado, M., Lopes da Silva, J.A. and Malcata, X. (1999)**, Comparative Characterization of Whey Protein Concentrates from Ovine, Caprine and Bovine Breeds.
- Ramos, M. and Juarez, M. (1986)** Chromatographic, electrophoretic and immunological methods for detecting mixtures of milks from different species. *Int. Dairy Fed., Brussels, Belgium Pages 175–187 in IDF Doc. 202.*
- Raynal-Ljutovac, K., Lagrifful, G., Paccard, P., Guillet, I., Chilliard, Y. (2008)**, Composition of goat and sheep milk products: An update. *Small Ruminant Research* 79, 57-72
- Richter, W., Krause, I., Graf, C., Sperrer, I., Schwarzer, C., Klostermeyer, H. (1997)**. An indirect competitive ELISA for the detection of cows' milk and caseinate in goats' and ewes' milk and cheese using polyclonal antibodies against bovine gamma-caseins. *European Food Research and Technology*, 204(1), 21–26
- Rodriguez, E., Martin, R., Garcia, T., Azcona, J. I., Sanz, B. & Hernandez, P. E. (1991)**, Indirect ELISA for detection of goats' milk in ewes' milk and cheese. *International Journal of Food Science and Technology*, 26, 457-465
- Rodriguez, E., Martin, R., Garcia, T., Gonzalez, I., Morales, P., Sanz, B. & Hernandez, P. E. (1993)**, Detection of cows' milk in ewes' milk and cheese by a

sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 61, 175-180

Rolland, M-P., Bitri, L., Besanon, P. (1993), Polyclonal antibodies with predetermined specificity against bovine α ₁-casein: application to the detection of bovine milk in ovine milk and cheese. *Journal of Dairy Research*, 60, 413-420

Rynne, M. N., Beresford, P. T., Kelly, L. A., Guinee, P. T. (2004), Effect of milk pasteurization temperature and in situ whey protein denaturation on the composition, texture and heat-induced functionality of half-fat Cheddar cheese. *International Dairy Journal* 14, 989–1001

Sampson, H. A. (2003). Food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111(2), 540–547

Shatenstein, B., and Ghadirian, P. (1998), Influences on diet, health behaviours and their outcome in select ethnocultural and religious groups. *Nutrition*, 14, 223–230

Smit, G. (2003), Dairy Processing Improving quality. England: Woodhead Publishing Limited

Song, H., Xue, H., Han, Y. (2011), Detection of cow's milk in Shaanxi goat's milk with an ELISA assay. *Food Control* 22,883-887

Strange E.D., Malin E.L., Van Hekken D.L., Basch J.J. (1992), Chromatographic and electrophoretic methods used for analysis of milk proteins. *Journal of Chromatography A*, 624, 81-102

Strobel, H. A. and Heineman, W. R. (1989), Chemical Instrumentation: A systematic Approach, John Wiley and Sons Inc., Canada

Suju, L., Jing, S., Dongdong, C., Jiankang, C., Weibo, J. (2010), Distinction of different heat-treated bovine milks by native-PAGE fingerprinting of their whey proteins. *Food Chemistry* 121, 803–808

Veloso A.C.A., Teixeira N., Ferreira I.M.P.L.V.O. (2002), Separation and quantification of the major casein fractions by reverse-phase high-performance liquid chromatography and urea-polyacrylamide π ηκτή electrophoresis. Detection of milk adulterations. *Journal of Chromatography A*, 967, 209–218

Wang, L., Zheng Mah, K., Ghosh, R. (2009), Purification of human IgG using membrane based hybrid bioseparation technique and its variants: A comparative study. *Separation and Purification Technology*, 66, 242–247

Washburn, K. W. and Nix, D. F. (1974), *Poult. Sci.* 53

Wild, D. (2005). The immunoassay handbook. 3rd edition, UK: Elsevier Ltd

Wolf, R. L. (1995). Content and distribution of *trans*-18:1 acids in ruminant milk and meat fats. Their importance in European diets and their effect on human milk. JAOCS 72, 259–272.

Ηλεκτρονική Βιβλιογραφία

http://en.wikipedia.org/wiki/Antibody_labeling;

<http://en.wikipedia.org/wiki/Biotinylation>

http://www.incardiology.gr/odigies/odigies_xolisterini.htm

<http://www.extraction\Lipid extraction, general methods.htm>

<http://www.cyberlipid.org/sterols/ster0003.htm>

Παράρτημα

Τα αποτελέσματα φωτομέτρησης μετά την παραλαβή των κλασμάτων από τη στήλη κατά την απομόνωση αντισωμάτων goat IgG από το 1^ο ml ορού (Κεφ. 3.3.1), παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα:

	OD	OD(Κλάσμα -T)	Mg/ml*
Τυφλό	0.277	-	-
1^ο κλάσμα	-	-	-
2^ο κλάσμα	0.0774	-	-
3^ο κλάσμα	0.3716	0.0946	0.0675
4^ο κλάσμα	0.5405	0.2635	0.1882
5^ο κλάσμα	0.4145	0.1375	0.098
6^ο κλάσμα	0.3504	0.0734	0.0524
7^ο κλάσμα	0.3412	0.0642	0.0458
8^ο κλάσμα	0.3034	0.0264	0.0188
9^ο κλάσμα	0.2792	-	-
10^ο κλάσμα	0.2698	-	-
Σύνολο			0,4707

*Προκύπτει με απλή μέθοδο των τριών:

Στα 10mg/ml η απορρόφηση είναι 14

X; Κλάσμα-T

Από αυτά για συμπύκνωση επιλέχθηκαν τα κλάσματα 3-8, δηλ 6ml.

Τα αποτελέσματα φωτομέτρησης μετά την παραλαβή των κλασμάτων από τη στήλη κατά την απομόνωση αντισωμάτων goat IgG από το 2^ο ml ορού, παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα:

	OD	OD(Κλάσμα -T)	Mg/ml*
Τυφλό	0.2524	-	-
1^ο κλάσμα	0,0538	-	-
2^ο κλάσμα	0.0586	-	-
3^ο κλάσμα	0.3648	0.1124	0.0803
4^ο κλάσμα	0.6498	0.3974	0.2838
5^ο κλάσμα	0.4101	0.1577	0.1126
6^ο κλάσμα	0.3252	0.0728	0.052
7^ο κλάσμα	0.2863	0.0339	0.0242
8^ο κλάσμα	0.2743	0.0219	0.0156
9^ο κλάσμα	0.2729	0.0205	0.0146
10^ο κλάσμα	0.2617	0.0093	0.0066
Σύνολο			0,5897

Από αυτά για συμπύκνωση επιλέχθηκαν τα κλάσματα 3-10, δηλ 8ml.

Βιογραφικό Σημείωμα: Μαρία Γιακουμέλου – Γεωπόνος

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

- 2010-2011 Μεταπτυχιακό δίπλωμα ειδίκευσης με τίτλο **‘Ολοκληρωμένη διαχείριση γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων’**.
ΔΠΜΣ των τμημάτων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών,
Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και
Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών
- 1997 - 2004 Πτυχίο Γεωπόνου, Τμήμα Ζωικής Παραγωγής,
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
Βαθμός πτυχίου: 7,05 / 10.

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- 4/2010-Σήμερα Κέντρο Ελέγχου Πιστοποίησης Πολλαπλασιαστικού Υλικού
και Ελέγχου Λιπασμάτων Αργοστολίου
Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων
- 12/2007 – 4/2010 Τοπικό Κέντρο Αγροτικής Ανάπτυξης Αργοστολίου
Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων
- 2/2005 - 12/2007 Εταιρία Φυτοπροστατευτικών προϊόντων «ΓΕΩΦΑΡΜ ΑΕΒΕ»
•Τεχνικό Τμήμα
- 9/2003 – 2/2005 Τράπεζα Κύπρου
• Συμνηφισμός, Εισαγωγές, Εξαγωγές, Ταμείο

ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ ΣΕ ΙΔΡΥΜΑΤΑ ΑΝΩΤΑΤΗΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ

- 1/10/2008 - 5/7/2009 ΤΕΙ Ιονίων Νήσων, Τμήμα Βιολογικής Γεωργίας,
Μάθημα Βιολογικής Κτηνοτροφίας
- 1/10/2009 – 5/7/2010 ΤΕΙ Ιονίων Νήσων, Τμήμα Βιολογικής Γεωργίας,
Μάθημα Ανατομίας & Φυσιολογίας Αγροτικών Ζώων

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

- Αγγλικά Άριστο επίπεδο, πτυχίο: Certificate of Proficiency in English,
University of Michigan.
- Γερμανικά Ικανοποιητικό επίπεδο, πτυχίο: Zertifikat Deutsch, Goethe-
Institut.

ΑΛΛΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

- Πρόγραμμα εξ΄
αποστάσεως
εκπαίδευση (e-learning)
– 8 μήνες (120 ώρες) Ασφάλεια (HACCP) & Ποιότητα Τροφίμων: Πρότυπα
ISO22000:2005 & ISO9001:2008
Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Κέντρο Επαγγελματικής Κατάρτισης

ΑΛΛΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ

- Γνώση και χρήση Η/Υ σε περιβάλλον MS Windows 2007/XP, προγράμματα:
Word, Excel, Internet, ECDL Progress Certificate