



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**«ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΕΝΖΥΜΟΑΝΟΣΟΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ
ΠΟΛΥΚΛΩΝΙΚΟΥ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ ΕΝΑΝΤΙ ΤΗΣ ΒΟΕΪΟΥ κ-ΚΑΖΕΪΝΗΣ ΓΙΑ
ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΝΟΘΕΙΑΣ ΑΙΓΟΠΡΟΒΕΙΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΚΑΙ ΤΥΡΙΟΥ ΜΕ
ΑΓΕΛΑΔΙΝΟ»**

**ΜΠΑΝΟΥ ΣΟΦΙΑ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΙΟΥΝΙΟΣ 2019

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**«ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΕΝΖΥΜΟΑΝΟΣΟΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ
ΠΟΛΥΚΛΩΝΙΚΟΥ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ ΕΝΑΝΤΙ ΤΗΣ ΒΟΕΪΟΥ κ-ΚΑΖΕΪΝΗΣ ΓΙΑ
ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΝΟΘΕΙΑΣ ΑΙΓΟΠΡΟΒΕΙΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΚΑΙ ΤΥΡΙΟΥ ΜΕ
ΑΓΕΛΑΔΙΝΟ»**

ΜΠΑΝΟΥ ΣΟΦΙΑ

A.M.: 11610

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Αναστάσιος Οικονόμου, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας Ε.Κ.Π.Α.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Αναστάσιος Οικονόμου, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Ε.Κ.Π.Α.
Σωτήριος Κακαμπάκος, Ερευνητής Α΄, Ε.ΚΕ.Φ.Ε. «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ»
Χρήστος Κόκκινος, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 27/06/2019

Στη μητέρα μου Αλεξάνδρα που με έμαθε να παλεύω.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική ερευνητική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ανοσοαναλύσεων/Ανοσοαισθητήρων του Ινστιτούτου Πυρηνικών & Ραδιολογικών Επιστημών & Τεχνολογίας, Ενέργειας & Ασφάλειας (Ι.Π.Ρ.Ε.Τ.Ε.Α.) του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος» στα πλαίσια της υποχρεωτικής ερευνητικής εργασίας για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού διπλώματος Ειδίκευσης Αναλυτικής Χημείας από το Τμήμα Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Εκπονήθηκε κατά τα ακαδημαϊκά έτη 2018-2019 με επιβλέποντα τον Καθηγητή Δρα Α. Οικονόμου και επιστημονικό υπεύθυνο τον Δρα Σ. Κακαμπάκο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή Α. Οικονόμου για τις πολύτιμες γνώσεις που μου προσέφερε κατά την διάρκεια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος καθώς και για την κατανόηση του στην πορεία της συνεργασίας μας, καθώς και το Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» για την διάθεση της εργαστηριακής υποδομής προκειμένου να πραγματοποιηθεί η παρούσα εργασία. Ιδιαίτερες ευχαριστίες αποδίδω στη Διευθύντρια Ερευνών του Ι.Π.Ρ.Ε.Τ.Ε.Α., Δρ. Π. Πέτρου και τον Διευθυντή Ερευνών του Ι.Π.Ρ.Ε.Τ.Ε.Α. Δρ. Σ. Κακαμπάκο, οι οποίοι έδειξαν άμεση εμπιστοσύνη και κατά την διάρκεια της διπλωματικής μου, μου παρείχαν συνεχή καθοδήγηση και επίβλεψη και αμέριστη κατανόηση στις δυσκολίες που αντιμετώπιζα στην πορεία μου. Οι παρατηρήσεις του αλλά κυρίως η υπομονή τους ήταν καθοριστικοί παράγοντες για να καταφέρω να αναπτύξω εργαστηριακά τις γνώσεις μου.

Ένα εγκάρδιο ευχαριστώ οφείλω επίσης στην επιβλέπουσα της ερευνητικής εργασίας μου, Δρα Μιχαηλία Αγγελοπούλου, η οποία μου προσέφερε αμέριστα τις γνώσεις, τον χρόνο και την καθοδήγηση της, κατά την διάρκεια εκπόνησης αυτής της εργασίας. Η υπομονή και η επιστημονική αφιέρωση της για την πραγματοποίηση των πειραμάτων μου με οδήγησαν στην επίτευξη του στόχου μου. Θερμές ευχαριστίες αποδίδω επίσης σε όλη την

επιστημονική ομάδα του Εργαστηρίου και πιο συγκεκριμένα στους υποψήφιους διδάκτορες Α. Κανιούρα, Δ. Τσουνίδη, Β. Αναστασιάδη, Ε. Σταυρά και στους Δρ. Γ. Κουκουβίνο, και Δρ. Γεωργία Κάπρου που με αγκάλιασαν και δημιούργησαν ένα εξαιρετικό περιβάλλον συνεργασίας. Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου και τα άτομα που με στήριξαν και με στηρίζουν στην προσπάθεια της επίτευξης των στόχων μου. Τέλος, ευχαριστώ ιδιαίτερα την οικογένεια μου, την μητέρα μου Αλεξάνδρα και τον αδελφό μου Άγγελο και τον σύζυγο μου Θέμη, που με συνοδεύουν σε κάθε βήμα της ζωής μου με αγάπη και υπομονή.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	18
---------------	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Εισαγωγή

1.1.1 Σημαντικότητα του γάλακτος.....	22
1.1.2 Είδη γάλακτος	22
1.1.3 Χαρακτηριστικά αγελαδινού γάλακτος.....	23
1.1.4 Χαρακτηριστικά πρόβειου γάλακτος.....	23
1.1.5 Χαρακτηριστικά κατσικίσιου γάλακτος.....	23
1.1.6 Σύσταση γάλακτος.....	24
1.1.7 Πρωτεΐνες Ορού Γάλακτος.....	25
1.1.8 Καζεΐνες: Χαρακτηριστικά και σύσταση.....	25
1.2.1 Τυρί.....	27
1.2.2 Τύποι τυριού ανά είδος προέλευσης και επεξεργασίας.....	27
1.2.3 Χαρακτηριστικά του τυριού.....	28
1.3.1 Ορισμός νοθείας.....	28
1.3.2 Ευρωπαϊκή νομοθεσία.....	29
1.3.3 Αίτια νοθείας.....	29
1.3.4 Γιατί είναι σημαντικός ο έλεγχος της νοθείας.....	30
1.3.5 Γάλα διαφορετικής ζωικής προέλευσης	31

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΒΟΕΙΑΣ Κ-ΚΑΖΕΙΝΗΣ ΣΕ ΓΑΛΑ ΚΑΙ ΤΥΡΙ

2.1 Μέθοδοι ανίχνευσης βόειας κ-καζεΐνης σε γάλα και τυρί.....	32
2.1.1 Μέθοδος ανοσοαποτύπωσης (Western Blot)	32
2.1.2 Μέθοδοι ανίχνευσης DNA.....	33
2.1.3 Υγρή Χρωματογραφία / HPLC.....	35
2.2 Ανοσοχημικές μέθοδοι ανάλυσης.....	38
2.2.1 Ανταγωνιστικού και μη ανταγωνιστικού τύπου ανοσοανάλυση.....	39

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΣΚΟΠΟΣ.....	44
-------------	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων.....	45
4.1.1 Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων κ-καζεΐνης.....	46
4.1.2 Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο γάλα.....	46
4.1.3 Παρασκευή αντιορού βόειας κ-καζεΐνης (πολυκλωνικού αντισώματος Pab).....	47
4.2 Πρωτόκολλο παρασκευής χλωρού αιγοπρόβειου τυριού.....	49
4.3 Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων από δείγματα αγελαδινού και κατσικίσιου τυριού.....	51
4.4 Πρωτόκολλο ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού ανταγωνιστικού τύπου ELISA.....	52
4.4.1 Ενζυμοανοσοχημικός προσδιορισμός ανταγωνιστικού τύπου (ELISA) βόειας κ-καζεΐνης σε φρεάτια μικροτίτλοδότησης.....	55
4.4.2 Ενζυμοανοσοχημικός προσδιορισμός ανταγωνιστικού τύπου (ELISA) αγελαδινού γάλακτος/τυριού σε κατσικίσιο γάλα/τυρί σε φρεάτια μικροτίτλοδότησης.....	56

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 Ανάπτυξη ενζυμοαναστοχμηικού προσδιορισμού ανταγωνιστικού τύπου για την ανίχνευση της κ-καζεΐνης σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης.....	59
5.1.1 Επιλογή βέλτιστης συγκέντρωσης του ειδικού αντισώματος έναντι της κ-καζεΐνης. Βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης της κ-καζεΐνης για ακινητοποίηση σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης.....	60
5.1.2 Έλεγχος επίδρασης συγκέντρωσης κ-καζεΐνης για ακινητοποίηση στην ευαισθησία ανίχνευσης.....	62
5.1.3 Βελτιστοποίηση σύνθεσης διαλυμάτων ενζυμοαναστοχμηικού προσδιορισμού της κ-καζεΐνης.....	63
5.1.4 Χρονική μελέτη ανοσοαντίδρασης.....	76
5.1.5 Χρονική μελέτη αντίδρασης του αντισώματος έναντι των γ-σφαιρινών κουνελιού με το ειδικό αντίσωμα έναντι της κ-καζεΐνης.....	78
5.1.6 Χρονική Μελέτη προεπώασης των προτύπων διαλυμάτων με το πολυκλωνικό αντίσωμα.....	79
5.1.7 Έλεγχος ειδικότητας του ενζυμοαναστοχμηικού προσδιορισμού κ-καζεΐνης με προσδιορισμό της διασταυρούμενης αντίδρασης ως προς την α-, β- και ολική καζεΐνη (cross reaction).....	81
5.1.8 Αναλυτικά χαρακτηριστικά του ενζυμοαναστοχμηικού προσδιορισμού της κ-καζεΐνης και της ολικής καζεΐνης σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης.....	83
5.2 Ανάπτυξη ενζυμοαναστοχμηικού προσδιορισμού ανταγωνιστικού τύπου για την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος και τυριού σε αιγοπρόβειο γάλα και τυρί σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης.....	87
5.2.1 Έλεγχος επίδρασης αραίωσης γάλακτος ως μήτρα στο αναλυτικό σήμα και την ευαισθησία της ανίχνευσης.....	88
5.2.2 Έλεγχος επίδρασης αραίωσης τυριού ως μήτρα στο αναλυτικό σήμα και την ευαισθησία της ανίχνευσης.....	90

5.3	Αναλυτικά χαρακτηριστικά ανοσοενζυμικού προσδιορισμού ανταγωνιστικού τύπου του αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο γάλα και τυρί σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης.....	92
------------	--	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	97
---------------	----

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Τιμές οπτικής απορρόφησης στα 405 nm που ελήφθησαν για διαφορετικές αραιώσεις του ειδικού αντισώματος σε συνδυασμό με συγκεντρώσεις της κ-καζεΐνης για ακινητοποίηση: 0,5 μg/mL (■), 1 μg/mL (●), 2 μg/mL (▲), 5 μg/mL (▼) και 10 μg/mL (◀). Κάθε τιμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.....61

Σχήμα 2: Τιμές οπτικής απορρόφησης στα 405 nm που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα και τα πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης συγκέντρωσης 0,01, 0,1 και 1 μg/mL, όταν η συγκέντρωση της κ-καζεΐνης για ακινητοποίηση ήταν 0,5 μg/mL (■), 1 μg/mL (●) και 2 μg/mL (▲).....63

Σχήμα 3: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης για τα πρότυπα διαλύματα κ- καζεΐνης συγκέντρωσης 0,01, 0,1 και 1 μg/mL, όταν η συγκέντρωση της κ-καζεΐνης για ακινητοποίηση ήταν 0,5 μg/mL (■), 1 μg/mL (●) και 2 μg/mL (▲).....63

Σχήμα 4: Τιμές οπτικής απορρόφησης στα 405 nm που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα καθώς και τα πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης συγκεντρώσεως 0,01, 0,1 και 1 μg/mL χρησιμοποιώντας ως διάλυμα ανοσοαντίδρασης ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM που περιείχε 0,9% NaCl (β/o), 0,05% Tween 20 (o/o) με: (α) 0,5% (β/o) BSA (■) και (β) 1% (β/o) BSA (●), Κάθε τιμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.....65

Σχήμα 5: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για τα πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης συγκεντρώσεως 0,01, 0,1 και 1 μg/mL χρησιμοποιώντας ως διάλυμα ανοσοαντίδρασης: Διάλυμα ανοσοαντίδρασης 1 (■) , Διάλυμα ανοσοαντίδρασης 2 (●), Διάλυμα ανοσοαντίδρασης 3 (▲) Διάλυμα ανοσοαντίδρασης και Διάλυμα ανοσοαντίδρασης 4 (▼). Κάθε τιμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.....66

Σχήμα 6: Τιμές οπτικής απορρόφησης στα 405 nm που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα καθώς και τα πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης συγκεντρώσεως 0,01, 0,1 και 1 μg/mL χρησιμοποιώντας ως διάλυμα ανοσοαντίδρασης ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM που περιείχε 0,9% NaCl (β/o), 0,05% Tween 20 (o/o) με: (α) 0,5% (β/o) BSA (■) και (β) 1% (β/o) BSA (●), Κάθε τιμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων ±SD.....67

Σχήμα 7: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για τα πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης συγκεντρώσεως 0,01, 0,1 και 1 μg/mL χρησιμοποιώντας ως διάλυμα ανοσοαντίδρασης ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM που περιείχε 0,9% NaCl (β/o), 0,05% Tween 20 (o/o) με: (α) 0,5% (β/o) BSA (■) και (β) 1% (β/o) BSA (●). Κάθε τιμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων ±SD.....68

Σχήμα 8: Τιμές οπτικής απορρόφησης που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα και για τα πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεως 0,01, 0,1 και 1 μg/mL όταν πραγματοποιήθηκε έκπλυση με: (Α) Διάλυμα έκπλυσης που δεν περιείχε Tween 20 σε κανένα στάδιο του ανοσοπροσδιορισμού (■), (Β) Διάλυμα έκπλυσης που περιείχε Tween σε όλα τα στάδια του ανοσοπροσδιορισμού (●) και (Γ) Διάλυμα έκπλυσης που περιείχε Tween 20 μετά το στάδιο της ανοσοαντίδρασης (▲). Κάθε τιμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων ±SD.....70

Σχήμα 9: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για τα πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεως 0,01, 0,1 και 1 μg/mL όταν πραγματοποιήθηκε έκπλυση με: (Α) Διάλυμα έκπλυσης που δεν περιείχε Tween 20 σε κανένα στάδιο του ανοσοπροσδιορισμού (■), (Β) Διάλυμα έκπλυσης που περιείχε Tween σε όλα τα στάδια του ανοσοπροσδιορισμού (●) και (Γ) Διάλυμα έκπλυσης που περιείχε Tween 20 μετά το στάδιο της ανοσοαντίδρασης (▲). Κάθε τιμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων ±SD.....70

Σχήμα 10: Αναλυτικό σήμα που ελήφθη για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα συγκριτικά με το σήμα μη ειδικής δέσμευσης (τιμές οπτικής απορρόφησης) όταν πραγματοποιήθηκε έκπλυση με: (Α) Διάλυμα έκπλυσης που δεν περιείχε Tween 20 σε κανένα στάδιο του ανοσοπροσδιορισμού, (Β) Διάλυμα έκπλυσης που περιείχε Tween σε όλα τα στάδια του ανοσοπροσδιορισμού και (Γ) Διάλυμα έκπλυσης που περιείχε Tween20 μετά το στάδιο της ανοσοαντίδρασης. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών Μετρήσεων $\pm$ SD.....71

Σχήμα 11: Τιμές οπτικής απορρόφησης που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα και για τα πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης συγκεντρώσεως 0,01, 0,1 και 1 $\mu\text{g/mL}$ όταν πραγματοποιήθηκε έκπλυση με: (Α) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, pH 7,4 (■) και (Β) ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών/όξινων ανθρακικών 50 mM, pH 9,2 (●). Κάθε τιμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.....72

Σχήμα 12: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα και για τα πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης συγκεντρώσεως 0,01, 0,1 και 1 $\mu\text{g/mL}$ όταν πραγματοποιήθηκε έκπλυση με: (Α) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, pH 7,4 (■) και (Β) ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών/όξινων ανθρακικών 50mM, pH 9,2 (●). Κάθε τιμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.....73

Σχήμα 13: Τιμές οπτικής απορρόφησης στα 405 nm που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα και τα πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης συγκεντρώσεως 0,01, 0,1 και 1 $\mu\text{g/mL}$ χρησιμοποιώντας ως διάλυμα αποκλεισμού ελευθέρων θέσεων: Διάλυμα Α (■), Διάλυμα Β (●), Διάλυμα Γ (▲) και Διάλυμα Δ (▼). Κάθε τιμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.....75

Σχήμα 14: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για τα πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης συγκεντρώσεως 0,01, 0,1 και 1 $\mu\text{g/mL}$ χρησιμοποιώντας ως διάλυμα αποκλεισμού ελευθέρων θέσεων: Διάλυμα Α

(■), Διάλυμα Β (●), Διάλυμα Γ (▲) και Διάλυμα Δ (▼). Κάθε τιμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.....75

Σχήμα 15: Αναλυτικό σήμα που ελήφθη για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα συγκριτικά με το σήμα μη ειδικής δέσμευσης (τιμές οπτικής απορρόφησης) όταν χρησιμοποιήθηκε ως διάλυμα αποκλεισμού ελευθέρων θέσεων: Διάλυμα Α , Διάλυμα Β, Διάλυμα Γ και Διάλυμα Δ. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.....76

Σχήμα 16: Τιμές οπτικής απορρόφησης στα 405 nm που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα (■), και το πρότυπο διαλύματα κ-καζεΐνης συγκεντρώσεως 0,1 μ g/mL (●), για χρόνους ανοσοαντίδρασης: 15, 30, 60 και 120 λεπτών . Κάθε τιμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.....77

Σχήμα 17: Τιμές οπτικής απορρόφησης στα 405 nm που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης του δευτέρου αντισώματος με το ειδικό αντίσωμα έναντι της κ-καζεΐνης. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.....78

Σχήμα 18: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για τα πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης συγκεντρώσεως 0,01, 0,025, 0,05, 0,1 και 0,5 μ g/mL για χρόνους προεπώασης 0 min, 15 min, 30 min και 60 min : Διάλυμα Α (■) 0 min, Διάλυμα Β (●) 15min, Διάλυμα Γ (▲) 30 min και Διάλυμα Δ (▼) 60min. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.....80

Σχήμα 19: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για μηδενικό πρότυπο διάλυμα καθώς και για τα πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης (■), ολικής καζεΐνης (●), και β-καζεΐνης (▲).Κάθε τιμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.....81

Σχήμα 20: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για μηδενικό πρότυπο διάλυμα καθώς και για τα πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης (■) και α-καζεΐνης (●).Κάθε τιμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.....82

Σχήμα 21: Τιμές οπτικής απορρόφησης που ελήφθησαν για την τυπική καμπύλη βαθμονόμησης της κ-καζεΐνης με το τελικό πρωτόκολλο ενζυμοανασοχημικού προσδιορισμού. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.....83

Σχήμα 22: Τιμές οπτικής απορρόφησης που ελήφθησαν για την τυπική καμπύλη βαθμονόμησης της ολικής καζεΐνης με το τελικό πρωτόκολλο ενζυμοανασοχημικού προσδιορισμού. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.....84

Σχήμα 23 Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για τα πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης με το τελικό πρωτόκολλο ενζυμοανασοχημικού προσδιορισμού. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.....84

Σχήμα 24 Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για τα πρότυπα διαλύματα ολικής καζεΐνης με το τελικό πρωτόκολλο ενζυμοανασοχημικού προσδιορισμού. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.85

Σχήμα 25: Τιμές οπτικής απορρόφησης στα 405nm του μηδενικού προτύπου διαλύματος που ελήφθησαν για αραιώσεις κατσικίσιου γάλακτος από 0 έως 1:1000. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.....89

Σχήμα 26: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα κατσικίσιου γάλακτος και για τα πρότυπα διαλύματα κατσικίσιου γάλακτος, τα οποία μετά από κάθε αρραίωση είχαν τελική περιεκτικότητα 0,001% σε αγελαδινό γάλα.....89

Σχήμα 27: Τιμές οπτικής απορρόφησης στα 405nm του μηδενικού προτύπου διαλύματος που ελήφθησαν για αραιώσεις αιγοπρόβειου τυριού από 0 έως 1:1000. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.....91

Σχήμα 28: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα αιγοπρόβειου τυριού και για τα πρότυπα διαλύματα αιγοπρόβειου τυριού, τα οποία μετά από κάθε αραίωση είχαν τελική περιεκτικότητα 0,02% σε αγελαδινό τυρί.....	91
Σχήμα 29: Τυπική καμπύλη βαθμονόμησης αγελαδινού γάλακτος σε κασικίσιο γάλα που ελήφθη με το τελικό πρωτόκολλο ενζυμοανασοχημικού προσδιορισμού.....	92
Σχήμα 30: Τυπική καμπύλη βαθμονόμησης αγελαδινού τυριού σε κασικίσιο τυρί που ελήφθη με το τελικό πρωτόκολλο ενζυμοανασοχημικού προσδιορισμού ανταγωνιστικού τύπου. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.....	93

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση ενζυμοανασοχημικού προσδιορισμού μη ανταγωνιστικού τύπου (sandwich) και ανταγωνιστικού τύπου.....	41
Εικόνα 2: Ανταγωνιστικού τύπου ενζυμοανασοχημικός προσδιορισμός ELISA.....	42
Εικόνα 3: Στάδιο στραγγίσματος κατά την παρασκευή τυριού στο Εργαστήριο.....	52
Εικόνα 4: Συσκευή μέτρησης οπτικής απορρόφησης σε φρεάτια μικροπιλοδότησης ELISA, Victor3 Multilabel Readers (PerkinElmer).....	58

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Χημική σύσταση γάλακτος ανά είδος προέλευσης.....	5
Πίνακας 2: Μέσος όρος σύστασης του τυριού ανά είδος επεξεργασίας.....	9
Πίνακας 3: Αναλυτικά χαρακτηριστικά ολικής καζεΐνης και κ-καζεΐνης ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης.....	78
Πίνακας 4: Αναλυτικά χαρακτηριστικά ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού ανταγωνιστικού τύπου του αγελαδινού γάλακτος σε κασικίσιο γάλα.....	91
Πίνακας 5: Αναλυτικά χαρακτηριστικά ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού ανταγωνιστικού τύπου του αγελαδινού τυριού σε κασικίσιο τυρί.....	91
Πίνακας 6: Επί τοις εκατό ανάκτηση αγελαδινού γάλακτος μετά από προσθήκη γνωστών συγκεντρώσεων σε φρέσκο κασικίσιο γάλα.....	95
Πίνακας 7: Επί τοις εκατό ανάκτηση αγελαδινού τυριού μετά από προσθήκη γνωστών συγκεντρώσεων σε κασικίσιο τυρί.....	96

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η νοθεία του αιγοπρόβειου και του πρόβειου γάλακτος με χρήση αγελαδινού γάλακτος εμφανίζεται συχνά στο εμπόριο των γαλακτοκομικών προϊόντων και επηρεάζει μεγάλο μέρος του εμπορικού κοινού καθώς και τις ευπαθείς ομάδες των καταναλωτών που παρουσιάζουν αλλεργία σε συγκεκριμένα είδη γαλακτοκομικών προϊόντων. Εξαιτίας αυτού, οι παγκόσμιοι οργανισμοί διασφάλισης ποιότητας, έχουν θεσπίσει κανόνες και όρια, που υποχρεώνουν τις βιομηχανίες τροφίμων να δηλώνουν τόσο την προέλευση των γαλακτοκομικών προϊόντων τους όσο και την σύσταση τους, προκειμένου να προστατεύσουν τα οικονομικά δικαιώματα των καταναλωτών καθώς και να μειώσουν τον κίνδυνο στον οποίο τίθεται η δημόσια υγεία. Για την αποφυγή της νοθείας, καθίσταται απαραίτητος ο έλεγχος των δειγμάτων στις γαλακτοβιομηχανίες προκειμένου να εντοπιστούν τυχόν προσμίξεις με γάλα διαφορετικής ζωικής προέλευσης ή με ορό γάλακτος. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η ανάπτυξη μεθόδου ενζυμοανασοχημικού προσδιορισμού ανταγωνιστικού τύπου για την ανίχνευση της βόειας κ-καζεΐνης σε δείγματα αιγοπρόβειου γάλακτος και τυριού με χρήση ειδικού πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της βοείου κ-καζεΐνης, που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο. Η μέθοδος αξιολογήθηκε ως προς τα αναλυτικά χαρακτηριστικά της και τη δυνατότητα προσδιορισμού νοθείας αιγοπρόβειου γάλακτος και τυριού με βόειο. Για την επίτευξη αυτού του σκοπού, ελέγχθηκαν και βελτιστοποιήθηκαν όλες οι παράμετροι της μεθόδου με κριτήρια το ύψος του αναλυτικού σήματος, την ευαισθησία ανίχνευσης, την περιοχή εργασίας, την ακρίβεια, την ενδο- και δι-αναλυτική επαναληψιμότητα, την ειδικότητα και τη διάρκεια της ανάλυσης. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε ήταν ταχεία, ευαίσθητη και ακριβής, με όρια ανίχνευσης εφάμιλλα ή χαμηλότερα των εμπορικά διαθέσιμων μεθόδων που χρησιμοποιούνται από τις βιομηχανίες. Τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου που αναπτύχθηκε τόσο για το γάλα όσο και για το τυρί ήταν χαμηλότερα του 1% που έχει τεθεί ως όριο από την Ευρωπαϊκή Νομοθεσία ως προς τον έλεγχο της νοθείας και του ποσοστού πρόσμιξης, ως εκ τούτου θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως μια αξιόπιστη μέθοδος ελέγχου από τις βιομηχανίες παραγωγής γαλακτοκομικών προϊόντων

για τον έλεγχο και την ανίχνευση νοθείας κατσικίσιου γάλακτος και τυριού με αγελαδινό γάλα.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Ανίχνευση βόειας κ-καζεΐνης με ανοσοενζυμικούς μεθόδους

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: νοθεία, γάλα, τυρί, ELISA, κ-καζεΐνη

ABSTRACT

Adulteration of goat/sheep or sheep milk with use of cow's milk is often observed in the trade of dairy products and affects a huge part of the commercial community as well as vulnerable groups of consumers that present allergy in specific dairy products. Because of that, the global organisations of quality assurance have established rules and thresholds that force food industries to declare both the origin of dairy products and their ingredients, in order to protect the financial rights of consumers as well as to reduce the danger that public health is exposed to. In order to avoid adulteration, sample testing is mandatory in dairy industries so as to detect possible mixtures with milk of different origin or milk serum. The objective of this diploma thesis is the development of an enzymatic immunochemical competitive type method for the detection of bovine k-casein in samples of goat/sheep milk and cheese with the use of a specific polyclonal antibody against bovine k-casein, produced in our lab. The method was assayed as to its analytical characteristics and the ability to detect adulteration of goat/sheep milk and cheese with bovine. In order to accomplish this task, all the parameters of this method were tested and optimised using as criteria the intensity of the analytical signal, the detection sensitivity, the work place, the accuracy, the inter- and intra-analytical repeatability, the specificity and the duration of the analysis. The method which was developed is quick, sensitive and accurate with detection limits comparable or even lower than that of commercially available methods being used by industry. The detection limits of this method for both milk and cheese were lower than 1%, a threshold set by EU legislation for the control of adulteration and mixture rate. As a result, this method can be used as a reliable method of quality assurance by dairy production industries for testing and detecting adulteration of goat milk and cheese by cow's milk.

SUBJECT AREA: Detection of bovine k-casein with immunoenzymatic methods

KEYWORDS: adulteration, milk, cheese, ELISA, k-casein

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Σημαντικότητα του γάλακτος

Το γάλα είναι η πρώτη τροφή για τα θηλαστικά και παρέχει όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά και την ενέργεια που απαιτείται για την υγιή ανάπτυξή τους και κυρίως για την διαμόρφωση των οστών. Τα γαλακτοκομικά προϊόντα θεωρούνται υψηλής διατροφικής αξίας τρόφιμα και συχνά συμπεριλαμβάνονται στα πλαίσια σχημάτων υγιεινής διατροφής [1]. Το γάλα αποτελεί αποκλειστική τροφή των νεογνών ενώ ιδιαίτερο ρόλο για την ομαλή μεταγεννητική εντερική λειτουργία τους παίζει και το πρωτόγαλα που εκκρίνεται από τους μαστικούς αδένες τις πρώτες ώρες ή μέρες μετά τον τοκετό [2]. Μεγάλος αριθμός μελετών έχει δείξει ότι η ισορροπημένη κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων, όπως το γάλα και το τυρί συνδέεται με μείωση της προδιάθεσης ή/και της εκδήλωσης παθολογικών καταστάσεων και σημαντικών ασθενειών. Μέσω μελετών μετα-ανάλυσης έχειδειχθεί ότι η επαρκής κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων τόσο στην παιδική ηλικία όσο και κατά την ενήλικη ζωή μειώνει την πιθανότητα εμφάνισης παχυσαρκίας, σακχαρώδη διαβήτη Τύπου 2, καρδιαγγειακών παθήσεων, οστεοπόρωσης καθώς και συγκεκριμένων τύπων καρκίνου [3].

1.1.2 Είδη γάλακτος

Τα πιο συχνά είδη γάλακτος που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων και αφομοιώνονται από τον ανθρώπινο οργανισμό είναι το βόειο (αγελαδινό), το πρόβειο καθώς και το κατσικίσιο γάλα. Η διεθνής γαλακτοκομική βιομηχανία βασίζεται κυρίως σε προϊόντα που παράγονται κυρίως από αγελάδες, βούβαλους, κασικές ή αιγοειδή, πρόβατα, και καμήλες. Σύμφωνα με τα στατιστικά δεδομένα του Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών (2010) για το έτος 2009, η συνολική

κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων ανήλθε σε 696.6 εκατομμύρια kg από τα οποία 83.3% (580.5 εκατομμύρια kg) ήταν αγελαδινό γάλα, 13% (90.3 εκατομμύρια kg) βουβαλίσιο γάλα, 2.2% (15.1 εκατομμύρια kg) κατσικίσιο γάλα, 1.3% (9 εκατομμύρια kg) πρόβειο γάλα, και 0.2% (1.6 εκατομμύρια kg) γάλα καμήλας [4].

1.1.3 Χαρακτηριστικά αγελαδινού γάλακτος

Το αγελαδινό γάλα εμπεριέχει συστατικά που είναι απαραίτητα για την αύξηση και την υγιή ανάπτυξη των οστών και αποτελεί σημαντική πηγή λιπιδίων, πρωτεϊνών, βιταμινών, αμινοξέων και μεταλλικών στοιχείων. Το βόειο γάλα αποτελεί μια από τις σημαντικότερες διατροφικές πηγές λινολεϊκού οξέος το οποίο μέσω ερευνών έχει αποδειχθεί ότι έχει θετική επίδραση και βελτιώνει την χοληστερόλη καθώς και ότι έχει αντικαρκινική δράση μέσω της δομής του για ορισμένους τύπους καρκίνου [5].

1.1.4 Χαρακτηριστικά πρόβειου γάλακτος

Το πρόβειο γάλα έχει υψηλότερη περιεκτικότητα σε λιπαρά, πρωτεΐνες και λακτόζη σε σύγκριση με το γάλα κατσίκας αγελάδας καθώς και το βουβαλίσιο/. Η υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη και η σύσταση του πρόβειου γάλακτος, το καθιστούν ιδιαίτερα κατάλληλο για την παραγωγή τυριού και γιαουρτιού [6]. Η μέση περιεκτικότητα του πρόβειου γάλακτος σε λίπος και σε πρωτεΐνη ανέρχεται αντιστοίχως σε ποσοστό 8,96 % και 6,57%, [7] .

1.1.5 Χαρακτηριστικά κατσικίσιου γάλακτος

Το γάλα που παράγεται από κατσίκες περιέχει σχεδόν παραπλήσιο ποσοστό σε λίπος συγκριτικά με το αγελαδινό γάλα. Διαφέρει ωστόσο ως προς την

περιεκτικότητα σημαντικών συστατικών όπως το φολικό οξύ και οι βιταμίνες B12 καθώς και η B6 [8]. Βάσει ερευνητικών μελετών, το γάλα που παράγεται από κασίκες, χρησιμοποιείται συχνά ως υποκατάστατο του αγελαδινού γάλακτος σε ευπαθείς ομάδες, και ειδικότερα ως συστατικό του διατροφολογίου παιδιών που πάσχουν από ατοπική δερματίτιδα και τα οποία παρουσιάζουν υψηλή ανεκτικότητα στο συγκεκριμένο είδος γάλακτος [8].

1.1.6 Σύσταση γάλακτος

Βάσει αναλύσεων, κατά μέσο όρο το γάλα αποτελείται από 87% νερό, 4% έως 5% λακτόζη, 3% πρωτεΐνες, 3% έως 4% λιπίδια, 0,8% μεταλλικά στοιχεία και 0,1% βιταμίνες [5]. Το γάλα περιέχει ανοσοσφαιρίνες, ορμόνες, αυξητικούς παράγοντες, κυτοσίνες, νουκλεοτίδια, πολυαμίνες, πεπτίδια, ένζυμα καθώς και βιοενεργές δομές. Τα στερεά συστατικά του γάλακτος, συμπεριλαμβάνουν θεμελιώδης διατροφικούς παράγοντες, όπως ανόργανα άλατα, λίπη, υδατάνθρακες και πρωτεΐνες [9]. Τα λιπίδια απαντώνται στο γάλα με τη μορφή μικρών σφαιριδίων, των λιποσφαιρίων, αποτελούμενων από έναν ετερογενή πυρήνα τριγλυκεριδίων, ο οποίος περιβάλλεται από μεμβράνη πρωτεϊνικής κυρίως φύσης. Οι πρωτεΐνες του γάλακτος χωρίζονται σε δυο μεγάλες κατηγορίες, τις διαλυτές και τις αδιάλυτες πρωτεΐνες. Οι διαλυτές πρωτεΐνες, οι οποίες ονομάζονται και πρωτεΐνες ορού γάλακτος (whey proteins), αντιπροσωπεύουν το 20% του συνολικού κλάσματος πρωτεϊνών που περιέχονται στο γάλα ενώ οι αδιάλυτες πρωτεΐνες, οι καζεΐνες, απαρτίζουν το υπόλοιπο 80% του συνόλου. Οι καζεΐνες βρίσκονται στο γάλα υπό την μορφή καζεϊνικών μικκυλίων, τα οποία είναι μικρά σωματίδια αποτελούμενα από καζεΐνη, νερό, άλατα και ένζυμα. Τα καζεϊνικά μικκύλια είναι σχετικά πορώδη κολλοειδή σωματίδια, αρνητικά φορτισμένα με μέση διάμετρο περίπου 120 nm και το κάθε ένα περιλαμβάνει περίπου 5000-10000. Και οι δυο κατηγορίες πρωτεϊνών του γάλακτος κατατάσσονται στις υψηλής σημασίας πρωτεΐνες, λαμβάνοντας υπόψιν την κάλυψη που παρέχουν αναφορικά με το όριο απαραίτητης πρόσληψης αμινοξέων. Το προφίλ των αμινοξέων των διαλυτών

πρωτεϊνών διαφοροποιείται από εκείνων των αδιάλυτων, καθώς ο ορός είναι πλούσιος σε αμινοξέα με δομή διακλαδισμένων αλυσίδων, όπως η λευκίνη, ισολευκίνη και η βαλίνη και η λυσίνη ενώ η καζεΐνη έχει υψηλότερη περιεκτικότητα σε ιστιδίνη, μεθειονίνη και φαινυλαλαμίνη. Η χημική σύσταση του γάλακτος παρουσιάζεται στον Πίνακα 1 [10,11].

Πίνακας 1: Χημική σύσταση γάλακτος ανά είδος προέλευσης .

Σύσταση / Είδος	Κατσίκισιο	Πρόβειο	Αγελαδινό	Πρωτόγαλα
Λιπίδια (%)	3,8	7,9	3,6	4
Λακτόζη (%)	4,1	4,9	4,7	6,9
Πρωτεΐνη (%)	3,4	6,2	3,2	1,2
Ενέργεια (kcal/100 mL)	70	105	69	68
Ασβέστιο (mg/100 g)	134	193	122	33
Φωσφόρος (mg/100g)	121	158	119	43
Βιταμίνη Α (IU)	185	146	126	190
Βιταμίνη D (IU)	2,3	0,18 (μg)	2	1,4

1.1.7 Πρωτεΐνες Ορού Γάλακτος

Οι πρωτεΐνες που εντοπίζονται στο διαλυτό μέρος του ορού του γάλακτος περιλαμβάνουν τις β-λακτοσφαιρίνες, τις α-λακταλβουμίνες (κύριες γαλακταλβουμίνες), καθώς και κάποιες άλλες, αλλά σε μικρότερο ποσοστό όπως η αλβουμίνη ορού βοός (BSA), οι ανοσοσφαιρίνες γ (IgG) (δευτερεύουσες πρωτεΐνες ορού γάλακτος), η λακτοφερίνη, η γαλακτοϋπεροξειδάση, η λυσοζύμη, οι πρωτεάσες, και οι τρανσφερίνες [12]. Από αυτές τις πρωτεΐνες, οι λακτοφερίνες, οι γαλακτοϋπεροξειδάση και η λυσοζύμη έχουν υψηλή αντιμικροβιακή δράση ενώ παράλληλα η λακτοφερίνη όταν δρα συνεργιστικά με την β-λακτοσφαιρίνη και την α-λακταλβουμίνη έχει

αποδειχθεί ότι συμμετέχει κατασταλτικά στην ανάπτυξη κακοηθών όγκων. Η β-λακτοσφαιρίνη έχει και έναν επιπλέον σημαντικό λειτουργικό ρόλο, καθώς είναι φορέας της ρετινόλης, υποβοηθά στην πρόσδεση των λιπαρών οξέων και έχει ισχυρές αντιοξειδωτικές ικανότητες. Η λακτοφερίνη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο ποσοστό απορρόφησης του σιδήρου και επιτελεί στην αντιοξειδωτική κατά του καρκίνου δράση στον οργανισμό [13]. Τέλος, είναι πολύ σημαντικό να αναφερθεί ότι οι ανοσοσφαιρίνες μεταφέρονται από το μητρικό γάλα στο νεογέννητο και έχουν ιδιαίτερα υψηλή περιεκτικότητα στο πρωτόγαλα [14].

1.1.8 Καζεΐνες: Χαρακτηριστικά και σύσταση

Η καζεΐνη εντοπίζεται στο αδιάλυτο μέρος του γάλακτος και του τυριού. Είναι η κυρίαρχη πρωτεϊνική ομάδα στο γάλα, σε ποσοστό 80%, και συνεισφέρει δρώντας ως βασικός μεταφορέας σημαντικών συστατικών και κυρίως του ασβεστίου και του φωσφόρου καθώς και μεταλλικών στοιχείων. Η καζεΐνη του γάλακτος είναι μια οικογένεια φωσφοπρωτεϊνών (αS_1 -, αS_2 -, β -, και κ -καζεΐνη) [15]. Η καζεΐνες λόγω του σχετικά λιπόφιλου χαρακτήρα τους βρίσκονται στο γάλα σε εναιώρημα υπό τη μορφή μικκυλίων. Η αναλογία καζεϊνών στα μικκύλια είναι σχετικά σταθερή και καθ' αντιστοιχία είναι ίση περίπου με 37%, 37%, 13% και 13%. Η κατανομή των καζεϊνών δεν είναι ομοιόμορφη εντός των μικκυλίων. Τα μικκύλια περιλαμβάνουν ένα κεντρικό υδρόφοβο τμήμα και ένα περιφερειακό υδρόφιλο στρώμα όπου εκτίθεται το C-τερματικό πολικό άκρο των μορίων κ -καζεΐνης (π.χ., μακροπεπτίδιο καζεΐνης). Οι πολικές περιοχές των άλλων καζεϊνών (αS_1 -, αS_2 -, και β -) και κυρίως οι θέσεις φωσφορυλίωσης που περιέχουν υπολείμματα φωσφοσερίνης υπάρχουν επίσης στην περιφέρεια των μικκυλίων και σχετίζονται με τις ιδιότητες πρόσδεσης και μεταφοράς ασβεστίου. Η αS_1 -, αS_2 -, β -, και κ -καζεΐνη έχουν μικρή ομολογία δομής. Οι λειτουργικές τους ιδιότητες διαφέρουν επίσης καθώς τρεις από αυτές, οι αS_1 -, αS_2 - και β -καζεΐνη, φαίνεται να είναι

ευαίσθητες στο ασβέστιο, ενώ η κ-καζεΐνη χαρακτηρίζεται ως η πιο ανθεκτική [16].

Η κ-καζεΐνη απομονώθηκε από το γάλα ως μείγμα πολυμερών (διμερή έως οκταμερή) συνδεδεμένα με δισουλφιδικούς δεσμούς. Βάσει ερευνητικών μελετών, έχει προταθεί ότι τα μόρια της κ-καζεΐνης που συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς, σχηματίζουν πολυμερή τα όποια δομούνται έτσι ώστε τα υδρόφιλα τμήματα που σχηματίζονται, τα καρβοξυ-τελικά άκρα της, να εκτείνονται προς την υδατική φάση (ορός γάλακτος), ενώ η υδρόφοβη περιοχή της δομής τους να κατευθύνεται προς τον πυρήνα του μικκυλίου. Η κ-καζεΐνη δρα τόσο ως φυσικός γαλακτωματοποιητής και υποβοηθά την διαδικασία πήξης του γάλακτος. Κατά την διαδικασία παραγωγής του τυριού, η κ-καζεΐνη υδρολύεται μέσω της δράσης της χυμοσίνης (πρωτεόλυση). Πιο συγκεκριμένα, η χυμοσίνη διασπά την κ-καζεΐνη στον δεσμό μεταξύ της φαινυλαλανίνης 105 και της μεθειονίνης 106, παράγοντας μέσω αυτής της αντίδρασης, την πάρα-κ-καζεΐνη (κατάλοιπα 1 έως 105) και ένα μακροπεπτίδιο, το οποίο καλείται καζεΐνομακροπεπτίδιο (caseinomacropeptide MP) ή γλυκομακροπεπτίδιο (GMP) (κατάλοιπα 106 έως 169). Το καζεΐνομακροπεπτίδιο προκαλεί αποσταθεροποίηση των μικκυλίων της κ-καζεΐνης, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την πήξη και την παραγωγή τυροπήγματος το οποίο διαχωρίζεται από το τυρόγαλο [17]. Η αδιάλυτη παρα-κ-καζεΐνη διατηρείται στο πήγμα ενώ το διαλυτό υδρόφιλο καζεΐνομακροπεπτίδιο απελευθερώνεται στον ορό του γάλακτος [18]. Το καζεΐνομακροπεπτίδιο (GMP), είναι ένα βιοενεργό πεπτίδιο του ορού του γάλακτος και χαρακτηρίζεται από αντιμικροβιακή, προβιοτική καθώς και ανοσορρυθμιστική δράση [17,19]. Αξίζει να σημειωθεί, ότι παρότι το καζεΐνομακροπεπτίδιο απελευθερώνεται από την κ-καζεΐνη μέσω της πρωτεόλυσης κατά την διαδικασίας της παραγωγής του τυριού, χαμηλότερες συγκεντρώσεις αυτού ανιχνεύονται και στο αγελαδινό γάλα σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες κατά δέκα φορές τουλάχιστον σε σύγκριση με το τυρόγαλο [20].

1.2.1 Τυρί

Ένα από τα βασικότερα προϊόντα που προέρχονται από την κατεργασία του γάλακτος, είναι το τυρί. Το τυρί παρασκευάζεται από το γάλα κατόπιν ειδικής επεξεργασίας με προσθήκη πυτιάς. Η πυτιά είναι ένα συστατικό που περιέχει το ένζυμο ρεννίνη και παράγεται τόσο σε υγρή, όσο και σε στερεή μορφή και χρησιμοποιείται στην διαδικασία πήξης του τυριού. Σήμερα, ο κύριος λόγος κατανάλωσης του τυριού και η απαραίτητη ένταξη του στην διατροφική αλυσίδα, είναι η δυνατότητα που προσφέρει ως τροφή για την πρόσληψη θρεπτικών συστατικών. Στην σημερινή εποχή, ο βασικότερος λόγος για την κατανάλωση του τυριού είναι η προσφορά σημαντικών θρεπτικών ουσιών. Η τεχνολογική πρόοδος στην βιομηχανία παρασκευής τυριού, έχει αναπτύξει πολλούς διαφορετικούς τύπους τυριών στην αγορά έτσι να αποκρίνονται σε ποικίλες απαιτήσεις και συνθήκες. Πλέον η έρευνα δεν βασίζεται τόσο στην παραγωγή τυριών υψηλής ποιότητας, αλλά κυρίως στην βελτιστοποίηση του προϊόντος και στην αύξηση της λειτουργικότητας του ως προϊόν τροφής. Αυτή η τάση καθιστά σημαντική την εύρεση μεθόδων που θα επιτυγχάνουν την ήπια επεξεργασία του ως τρόφιμο ώστε να διατηρούνται τα θρεπτικά συστατικά που παρέχει και να απομακρύνονται τα ανεπιθύμητα, δεδομένου ότι όλο και μεγαλύτερο ποσοστό του πληθυσμού ελέγχει την υγεία του και επιλέγει είδη διατροφής που τηρούν τις οδηγίες των προτύπων ποιότητας. [21].

1.2.2 Τύποι τυριού ανά είδος προέλευσης και επεξεργασίας

Οι διάφοροι τύποι τυριού μπορούν να ταξινομηθούν βάσει του τύπου γάλακτος και της ζωικής προέλευσης και παραγωγής του και να διακριθούν σε αγελαδινό, κατσικίσιο, πρόβειο, βουβαλίσιο καθώς και από τον τρόπο επεξεργασίας για του γάλακτος για την παραλαβή του . . Επιπλέον, το τυρί μπορεί να κατηγοριοποιηθεί και βάσει της διαφορετικότητας στην συνεκτικότητα και την υφή του με χαρακτηριστικές τις εκδοχές του σκληρού, ημίσκληρου ή μαλακού τυριού. Μια επιπλέον κατηγοριοποίηση προκύπτει από την ποσοστιαία περιεκτικότητα του τυριού σε λιπαρά και τον τρόπο

ζύμωσης και επεξεργασίας των οξέων του και κυρίως του γαλακτικού. Οι διαφορετικοί τύποι τυριών μπορεί να διαφέρουν σημαντικά ως προς τη γεύση καθώς και ως προς την περιεκτικότητα σε βιοδραστικά συστατικά ή ως προς τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους [22]. Στον Πίνακα 2, παρατίθεται η μέση περιεκτικότητα τυριών σε νερό, πρωτεΐνη, λιπαρά, λακτόζη καθώς και μεταλλικά στοιχεία και βιταμίνες αναλόγως της σκληρότητάς τους [23].

Πίνακας 2: : Μέσος όρος σύστασης του τυριού ανά είδος επεξεργασίας.

Είδος g·kg ⁻¹	Νερό	Πρωτεΐνη	Λιπαρά	Λακτόζη	Μεταλλικά στοιχεία και Βιταμίνες
Φρέσκο τυρί	700	110	80	30	80
Μαλακό τυρί	520	200	220	0	60
Ημίσκληρο τυρί	400	250	270	0	80
Σκληρό τυρί	350	270	310	0	70
Πολύ σκληρό τυρί	300	290	330	0	80

1.2.3 Χαρακτηριστικά του τυριού

Το τυρί περιέχει αρκετά θρεπτικά συστατικά και τα οποία λαμβάνονται από την συνιστάμενη πρόσληψη ανά είδος τυριού. Κατά το στάδιο της ωρίμανσης του τυριού, ένα μεγάλο μέρος της λακτόζης που περιέχει εκπλένεται με τον ορό του γάλακτος και ως εκ τούτου απομακρύνεται από το τυρί ενώ το υπόλοιπο μέσω της διαδικασίας της ζύμωσης μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ και εν συνεχεία σε διακετύλιο, ακετυλαλδεΐδη, οξικό οξύ, αιθανόλη και διοξειδίο του άνθρακα [24]. Το γεγονός αυτό το καθιστά ως τρόφιμο φιλικό προς το ευπαθές καταναλωτικό κοινό που παρουσιάζει δυσανεξία στη λακτόζη και το οποίο ανέρχεται σε ποσοστό 70% του παγκόσμιου πληθυσμού για ηλικίες άνω των 18.

1.3.1 Ορισμός νοθείας

Η νοθεία ορίζεται ως ο υποβιβασμός της ποιότητας ενός προϊόντος μέσω της ανάμειξής του με άλλο παρόμοιο αλλά κατώτερης ποιότητας. Στην περίπτωση

των γαλακτοκομικών προϊόντων, η νοθεία ορίζεται ως η πρόσμιξη γάλακτος διαφορετικής προέλευσης ή σε διαφορετικές αναλογίες από άλλα είδη γάλακτος με σκοπό την μείωση του κόστους παραγωγής και την αύξηση κέρδους του παραγωγού και των γαλακτοβιομηχανιών. Βάσει ερευνών ως νοθεία θεωρείται η πρόσμιξη και με άλλες ουσίες πέραν του γάλακτος όπως με ορό ή με σκόνη γάλακτος.

1.3.2 Ευρωπαϊκή νομοθεσία

Για την προφύλαξη των καταναλωτών τόσο από την απάτη που προκύπτει κατά την νοθεία των προϊόντων όσο και για την πρόληψη κινδύνου υγειονομικής φύσης, η Επιτροπή Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων επέβαλε μέσω της οδηγίας EC Directive 273/2008 αυστηρά όρια για την ανίχνευση έτερων ουσιών στα τρόφιμα κατά την ανάλυση τους ως προς τον Έλεγχο Ποιότητας. Στον τομέα των γαλακτοκομικών προϊόντων που παρασκευάζονται υποχρεωτικά από αιγοπρόβριο γάλα (Π.Ο.Π.), τα ανώτατα επιτρεπτά όρια παρουσίας πρωτεϊνών βοείου γάλακτος (ή βοείου καζεΐνης) πέραν του οποίου το γάλα ή το τυρί θεωρούνται νοθευμένα δεν μπορούν να είναι υψηλότερα του 1% για το γάλα και του 0,5% για το τυρί. Πιο συγκεκριμένα σχετικά με την ανίχνευση της βόειας καζεΐνης κατά την παραγωγή τους, σύμφωνα με την παραπάνω διάταξη, η καζεΐνη που προέρχεται από αγελαδινό γάλα κατά την ανάλυση του δείγματος με πιστοποιημένη μέθοδο αναφοράς, δεν πρέπει να υπερβαίνει το όριο του 1% και ειδικότερα στην παρασκευή του τυριού δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερη του 0,5% [25].

1.3.3 Αίτια νοθείας

Στην παγκόσμια βιομηχανία τροφίμων, παρατηρείται τα τελευταία χρόνια αύξηση των κρουσμάτων νοθείας στα προϊόντα γαλακτοκομικής προέλευσης. Εξαιτίας της υψηλής διατροφικής αξίας που χαρακτηρίζει την συγκεκριμένη κατηγορία τροφίμων και κυρίως το γάλα και το τυρί, παρατηρείται αύξηση του κόστους βάσει ποσοστιαίας κατανομής του πληθυσμού. Οι παραγωγοί, εκμεταλλευόμενοι την παράμετρο αυτή και προκειμένου να διευρύνουν το

οικονομικό τους κέρδος, υποβιβάζουν το επίπεδο ποιότητας των προϊόντων τους καθώς και την αυθεντικότητα της σύστασής τους κατά την παραγωγή των γαλακτοκομικών προϊόντων, μέσω νοθείας. Βάσει επίσημης καταγραφής και δεδομένων, οι πιο συχνά απαντώμενοι τρόποι πρόκλησης νοθείας είναι η προσθήκη ορού γάλακτος, η αραίωση με νερό καθώς και η προσθήκη ποσότητας αγελαδινού γάλακτος κατά την παραγωγή προϊόντων έτερης ζωικής προέλευσης.

1.3.4 Γιατί είναι σημαντικός ο έλεγχος της νοθείας

Στην παρούσα εποχή είναι κρίσιμος και απόλυτα σημαντικός ο έλεγχος και η ταυτοποίηση των συστατικών των προϊόντων ζωικής προέλευσης και η συμφωνία τους με τα νομοθετικά πλαίσια που έχουν οριστεί από αρμόδιους θεσμούς [26]. Ειδικότερα, η προστασία και ενημέρωση των ευαίσθητων ομάδων από την υποκατάσταση ή την ανάμειξη είναι πολύ σημαντική στην βιομηχανία γαλακτοκομικών προϊόντων καθώς θέτει σε κίνδυνο τη δημόσια υγεία και υποβαθμίζει την ποιότητα του προϊόντος που αναμένει ο καταναλωτής. Ο έλεγχος της νοθείας είναι σημαντικός επίσης καθώς μπορεί να καταπατά ηθικούς, θρησκευτικούς και πολιτισμικούς περιορισμούς στους οποίους υπακούσουν διάφορες πληθυσμιακές ομάδες. [27]. Για την αποφυγή του αθέμιτου ανταγωνισμού και την προστασία των καταναλωτών είναι απαραίτητη η ύπαρξη αξιόπιστων αναλυτικών μεθόδων των οποίων η χρήση θα διασφαλίζει την αυθεντικότητα προέλευσης των γαλακτοκομικών προϊόντων και θα ενδυναμώνει τα μέτρα που έχουν θεσπιστεί από τις αρμόδιες αρχές για να αποφευχθεί η νοθεία σε οποιαδήποτε μορφή της [28].

Ένας επιπρόσθετος λόγος, που καθιστά σημαντικό τον έλεγχο της νοθείας των γαλακτοκομικών προϊόντων, είναι η πρόκληση αλλεργιών στην ευπαθή καταναλωτική ομάδα που παρουσιάζει αλλεργία σε συγκεκριμένα είδη γάλακτος. Τροφικές αλλεργίες οι οποίες οφείλονται στην κατανάλωση γάλακτος είναι συνήθως παροδικές και προκαλούνται από αλλεργιογόνες

πρωτεΐνες προερχόμενες από ζώα (καζεΐνες, αλβουμίνες, σφαιρίνες) [29]. Οι πρωτεΐνες του αγελαδινού γάλακτος είναι γνωστές για τις λειτουργικές τους ιδιότητες τους ως συστατικά ή συμπληρώματα διατροφής, ωστόσο είναι υπεύθυνες και για την πρόκληση αλλεργιών [30]. Το κατσικίσιο γάλα εμπεριέχει χαμηλές ποσότητες της αS₁-καζεΐνης, που είναι η πιο αλλεργιογόνος.

1.3.5 Γάλα διαφορετικής ζωικής προέλευσης

Εν γένει, τα γαλακτοκομικά προϊόντα, αποτελούν πολύ σημαντικά συστατικά της διατροφής του ανθρώπου, και παρέχονται κυρίως τόσο από το αγελαδινό όσο και από το πρόβειο και το κατσικίσιο γάλα. Ειδικότερα, το πρόβειο γάλα, χαρακτηρίζεται από την υψηλότερη συγκέντρωση σε πρωτεΐνες (65,92 mg/mL) και ακολουθεί το κατσικίσιο (46,9 mg/mL) και τέλος το αγελαδινό (40,03 mg/mL). Αναφορικά με το ποσοστό λίπους, το κατσικίσιο γάλα περιέχει το μεγαλύτερο ποσοστό συγκριτικά με το αγελαδινό και πιο συγκεκριμένα το υψηλότερο ποσοστό των απαραίτητων λιπαρών οξέων (κυρίως μικρής και μέσης αλυσίδας) σε σχέση με το αγελαδινό. Ένα επιπλέον χαρακτηριστικό του κατσικίσιου γάλακτος είναι ότι κατά την κατανάλωση του και την είσοδο του στο στομάχι, το γάλα κασίκας, σχηματίζει ένα λιγότερο πυκνό τυρόπηγμα. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τις διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες του κατσικίσιου γάλακτος το καθιστά πιο εύπεπτο, σε σχέση με το αγελαδινό γάλα, κυρίως από τα νεογνά [31].

Το πρόβειο και το κατσικίσιο γάλα, αποτελεί μια εναλλακτική πηγή πρόσληψης πρωτεϊνών για τους ανθρώπους που παρουσιάζουν ευαισθησία στην κατανάλωση του αγελαδινού γάλακτος [32].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΒΟΕΙΑΣ Κ-ΚΑΖΕΙΝΗΣ ΣΕ ΓΑΛΑ ΚΑΙ ΤΥΡΙ

2.1 Μέθοδοι ανίχνευσης βόειας κ-καζεΐνης σε γάλα και τυρί

Οι μέθοδοι της βιβλιογραφίας για την ανίχνευση της βόειας κ-καζεΐνης ποικίλλουν ως προς το είδος τους και τον τρόπο ανίχνευσης της κ-καζεΐνης καθώς και ως προς τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου. Για την ανίχνευση της νοθείας γάλακτος ή τυριού που προέρχονται από άλλα είδη ζώων με προσθήκη αγελαδινού έχουν αναπτυχθεί αναλυτικές μέθοδοι όπως οι χρωματογραφικές, οι ηλεκτροφορητικές, μέθοδοι ανίχνευσης DNA και ανοσοχημικές μέθοδοι [33,34]. Παρακάτω, θα παρουσιαστούν και θα αναλυθούν οι κυριότερες μέθοδοι της βιβλιογραφίας για την ανίχνευση νοθείας αιγοπρόβειου γάλακτος και τυριού με αγελαδινό.

2.1.1 Μέθοδος ανοσοαποτύπωσης (Western Blot)

Η μέθοδος Western Blot αποτελεί μια από τις σημαντικότερες μεθόδους στον τομέα της κυτταρικής και της μοριακής βιολογίας. Χρησιμοποιείται πειραματικά για τον διαχωρισμό και την ταυτοποίηση πρωτεϊνών καθώς είναι ικανή να αναγνωρίσει με υψηλή ειδικότητα πρωτεΐνες από συμπλέγματα πρωτεϊνών που εξάγονται από τα κύτταρα. Ο επιμέρους διαχωρισμός των πρωτεϊνών, βασίζεται στο μοριακό τους βάρος και έμμεσα στον τύπο τους και λαμβάνει χώρα μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, οι ζώνες των διαφορετικών πρωτεϊνών μεταφέρονται (αποτύπωση) σε ειδική μεμβράνη, και ανιχνεύονται με κατάλληλη χρώση. Οι παρατηρούμενες ζώνες είναι μοναδικές για κάθε πρωτεΐνη [35].

Το 2008, οι Chavez et al., ανέπτυξαν μέθοδο Western blot μέθοδο για την διερεύνηση της νοθείας του γάλακτος με τον ορό τυριού. Ο πιο συνήθης τρόπος εντοπισμού αυτού του τύπου νοθείας είναι μέσω της ανίχνευσης του γλυκομακροπεπτιδίου της βοείου κ-καζεΐνης το οποίο εντοπίζεται στον ορό του τυριού. Το πρωτόκολλο της μεθόδου που αναπτύχθηκε από το συγκεκριμένο εργαστήριο, χρησιμοποίησε ειδικά πολυκλωνικά αντισώματα έναντι του γλυκομακροπεπτιδίου με όρια ανίχνευσης 0.001% (β/ο) γλυκομακροπεπτιδίου και 0.5% (ο/ο) σε ορό τυριού. Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η ευκολία της μεθόδου καθώς και η μικρή χρονική διάρκεια, η υψηλή ευαισθησία και η ειδικότητα της [34].

2.1.2 Μέθοδοι ανίχνευσης DNA

Στον τομέα της έρευνας, έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι που στηρίζονται στην ανίχνευση του γονιδιώματος και χρησιμοποιούνται κυρίως σε αναλύσεις που αφορούν στη μελέτη και τον προσδιορισμό αλλεργιογόνων ουσιών σε τρόφιμα με χαμηλό ποσοστό συγκέντρωσης πρωτεΐνη ή σε τρόφιμα στα οποία οι πρωτεΐνες αλλοιώνονται έπειτα από την επεξεργασία τους. Βιβλιογραφικά, έχουν αναφερθεί διάφορες εκδοχές μεθόδων DNA που στοχεύουν στην ανίχνευση αλλεργιογόνων ή συγκεκριμένων πρωτεϊνών σε τρόφιμα [36,37].

PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια τεχνική, η οποία επιτρέπει την ενζυματική ενίσχυση θραυσμάτων του DNA [38].

Οι PCR ως μέθοδοι, χρησιμοποιούν ολιγονουκλεοτίδια, τα οποία λειτουργούν ως εκκινητές. Υπάρχουν δυο κατηγορίες PCR:

- ❖ η PCR τελικού σημείου (end-point) και
- ❖ η PCR πραγματικού χρόνου (real-time)

Οι αλληλουχίες-στόχοι του γονιδιώματος, δεν κωδικοποιούν απαραίτητα αλληλουχίες συγκεκριμένης πρωτεΐνης ή αλλεργιογόνου πρωτεΐνης, αλλά σε

αρκετές αναλύσεις αυτού του τύπου, ανιχνεύεται το γενωμικό DNA του τροφίμου που τίθεται υπό ανάλυση, ανεξάρτητα από την παρουσία της πρωτεΐνης η οποία είναι υπεύθυνη για την πρόκληση αλλεργικής αντίδρασης [39].

Η ανάγκη για εφαρμογή της νομοθεσία για την σήμανση τροφίμων, δημιούργησε την κινητήρια δύναμη για την ανάπτυξη αναλυτικών τεχνικών για την ανάλυση των συστατικών της τροφής. Το 2007, η ερευνητική ομάδα των I. López-Calleja et al., ανέπτυξε μέθοδο PCR για την ποσοτικοποίηση μιγμάτων κατσικίσιου γάλακτος με πρόβειο γάλα. Η τεχνική περιλαμβάνει την χρήση PCR πραγματικού χρόνου (real-time PCR), βασισμένη στην ενίσχυση ενός τμήματος του γονιδίου που κωδικοποιεί το μιτοχονδριακό 12S ριβοσωμικό RNA (12S rRNA). Η μέθοδος που αναπτύχθηκε συνδυάζει την χρήση εκκινητών ειδικών που ενισχύουν ένα τμήμα 171 ζευγών βάσεων του DNA της κατσίκας και διαφορετικών εκκινητών, ειδικών για DNA από είδη θηλαστικών που ενισχύουν τμήμα 119 ζευγών βάσεων, οι οποίοι και χρησιμοποιούνται ως ενδογενής αντίδραση ελέγχου. Ένας εσωτερικός φθορισμογενής ανιχνευτής (TaqMan), που υβριδοποιείται τόσο στα ειδικά για το κατσικίσιο όσο και στα ειδικά για θηλαστικά, τμήματα DNA χρησιμοποιείται για να καταγραφεί η ενίσχυση του γονιδίου στόχου. Μία σύγκριση του αριθμού των κύκλων (Ct) στους οποίους ανιχνεύονται για πρώτη φορά τα ειδικά για τα θηλαστικά και τα ειδικά για την κατσικά PCR παράγωγα, σε συνδυασμό με την χρήση σταθερών παραγώγων αναφοράς από γνωστό προϊόν αιγοειδών, επιτρέπει τον καθορισμό του ποσοστού του κατσικίσιου γάλακτος σε ένα μίγμα γάλακτος. Η τεχνική χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να αναλυθούν ακατέργαστα και επεξεργασμένα με θερμότητα διπλά μίγματα γάλακτος (κατσικίσιο/πρόβειο), επιτρέποντας την ποσοτικοποίηση του κατσικίσιου γάλακτος σε εύρος 0.6-10%. Η περιγραφόμενη δοκιμασία PCR αντιπροσωπεύει ένα γρήγορο και ευθές εργαλείο που θα εφαρμόζεται στην πιστοποίηση της αυθεντικότητας του γάλακτος και άλλων γαλακτοκομικών προϊόντων [40].

Με μια διαφορετική εκδοχή εφαρμογής της μεθόδου PCR, το 2012 η ομάδα των N.P.A. Rodrigues et al εξέτασε τη νοθεία του κατσικίσιου γάλακτος που

παράγεται από μικρούς παραγωγούς της βορειοανατολικής Βραζιλίας με βόειο γάλα ως μέσο νοθείας. Η μελέτη ζητήθηκε από την ένωση των μικρών παραγωγών της περιοχής για να ελεγχθούν και να εμποδιστούν οι πρακτικές νοθείας ως ανάγκη να εξασφαλιστεί η ποιότητα και η ασφάλεια του κατσικίσιου γάλακτος. Μία δοκιμασία διπλής PCR (duplex PCR) αναπτύχθηκε και τυποποιήθηκε. Πραγματοποιήθηκε, περαιτέρω επαλήθευση σε 160 φρέσκα δείγματα "χύμα" κατσικίσιου γάλακτος. Το όριο ανίχνευσης της δοκιμασίας PCR ήταν στο 0.5% σε βόειο γάλα και τα αποτελέσματα κατέδειξαν ότι το 41.2% του κατσικίσιου γάλακτος που κυκλοφορούσε στην αγορά ήταν θετικό ως προς την περιεκτικότητα σε βόειο γάλα. Καθιστώντας την δοκιμασία διαθέσιμη στην ένωση μικρών παραγωγών, ταυτόχρονα με εκτεταμένες ενέργειες που έλαβαν χώρα, μείωσαν την πιθανότητα νοθείας του κατσικίσιου γάλακτος που πωλούνταν από μικρής κλίμακας γαλακτοκομικές φάρμες και εξασφάλισαν την προέλευση είδους για το κατσικίσιο γάλα στην πολιτεία της Παραϊμπά [41].

2.1.3 Υγρή Χρωματογραφία / HPLC

Μια άλλη κατηγορία μεθόδου διαχωρισμού, είναι η υγρή χρωματογραφία (liquid chromatography) και η οποία έχει χρησιμοποιηθεί τόσο για τον διαχωρισμό και την απομόνωση όσο και για την ταυτοποίηση πρωτεϊνών. Η υγρή χρωματογραφία συνδέεται με διάφορους τύπους ανιχνευτών, όπως ο ανιχνευτής οπτικής απορρόφησης και φθορισμού αλλά και με συστοιχίες φωτοδιοδίων [42]. Οι τεχνικές που στηρίζονται στην υγρή χρωματογραφία, έχουν την πιο συχνή εφαρμογή στον αναλυτικό διαχωρισμό των πρωτεϊνών που εντοπίζονται στα τρόφιμα. Οι βασικότερες εκδοχές της υγρής χρωματογραφίας είναι η χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, η χρωματογραφία ιονανταλλαγής, η χρωματογραφία συγγένειας και η χρωματογραφία αποκλεισμού που στηρίζεται στον διαχωρισμό των ενώσεων βάσει μεγέθους [43]. Μια από τις γνωστές αναλυτικές, που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό και την ταυτοποίηση ενώσεων με υδροφοβικό χαρακτήρα

όπως παρατηρείται στις πρωτεΐνες, είναι η χρωματογραφία αντίστροφης φάσης υψηλής απόδοσης (RP-HPLC). Με την χρωματογραφία αντίστροφης φάσης υψηλής απόδοσης, έχει προσδιοριστεί μεγάλος αριθμός αλλεργιογόνων σε τρόφιμα, μεταξύ των οποίων και η καζεΐνη [44,45]. Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης έχει μεγάλη απήχηση ως μέθοδος ανίχνευσης και στον τομέα της έρευνας σχετικά με την νοθεία κατσικίσιου γάλακτος και τυριού με αγελαδινό γάλα. Πιο συγκεκριμένα, το 2003 η ομάδα των I.M.P.L.V.O. Ferreira και H. Caçote, ανέπτυξαν μια μέθοδο που στηρίζεται στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης, προκειμένου να ερευνήσουν την ύπαρξη νοθείας από αγελαδινό γάλα σε κατσικίσιο και πρόβειο γάλα. Η μέθοδος διακρίνεται από υψηλή ευαισθησία και καλή γραμμικότητα με όριο ανίχνευσης 2% [33].

Το 2004, η ερευνητική ομάδα των R. Chen και L. W. Chang, ανέπτυξαν μια μέθοδο βασισμένη στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) και φασματομετρίας μάζας ηλεκτροψεκασμού ιόντων για την ανίχνευσης νοθείας από αγελαδινό γάλα σε γάλα αιγός. Ο συνολικός χρόνος αντίδρασης ήταν 28 λεπτά με όριο ανίχνευσης 5% [46].

Επιπροσθέτως, προκειμένου να προσδιοριστούν πρωτεΐνες του γάλακτος μέσω διαδικασίας παραγωγοποίησης των καταλοίπων κυστεΐνης, έχει αναπτυχθεί μέθοδος που συνδυάζει την χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) μέσω σύνδεσης με ανιχνευτή φθορισμού [47].

Τέλος, το 2010, η ερευνητική ομάδα των X. J. Ding et al., ανέπτυξε μέθοδο που στηρίζεται στην ηλεκτροφορητική μέθοδο της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης σε συνδυασμό με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, προκειμένου να προσδιοριστεί η α-λακταλβουμίνη και η β-λακτοσφαιρίνη σε σκόνη γάλακτος, σε βρεφικά σκευάσματα καθώς και σε φρέσκο γάλα [48]. Τα συτήματα υγρή χρωματογραφίας διακρίνονται από υψηλή ικανότητα διαχωρισμού ενώσεων στις αναλύσεις, χαρακτηριστικό το οποίο σε συνδυασμό με την αυτοματοποίηση τους, τα καθιστούν κατάλληλα για σύνδεση με προηγμένες τεχνικές ανάλυσης, όπως είναι η φασματομετρία μάζας (mass spectrometry MS).

Ο φασματογράφος μάζας αποτελείται ως σύστημα από τρία διακριτά μέρη: την πηγή ιόντων, τον αναλυτή μαζών και τον ανιχνευτή. Στον τομέα της έρευνας των τροφίμων, χρησιμοποιούνται κυρίως δύο τύποι μεθόδων ιονισμού για την ανίχνευση αλλεργιογόνων : α) ο ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI) και β) ο ιονισμός εκρόφησης με λέιζερ υποβοηθούμενος από την μήτρα (MALDI). Από τους αναλυτές μαζών, αυτοί που έχουν την πιο συχνή εφαρμογή, είναι ο αναλυτής χρόνου πτήσης (time of flight TOF) και οι παγίδες ιόντων (IT). Για την ανίχνευση αλλεργιογόνων πρωτεϊνών και για τον προσδιορισμό πεπτιδίων, έχουν αναπτυχθεί διαφορετικές εκδοχές όπως η μέθοδος φασματομετρίας μαζών σε σειρά (MSⁿ) και τα υβριδικά συστήματα MS όπως το ESI-qTOF και το MALDI-TOF [49].

Οι διαφορετικές εκδοχές τεχνικών, οι οποίες στηρίζονται στην φασματομετρία μαζών, μπορούν να διαχωριστούν σε δύο είδη:

- στο 1^ο είδος ως αναλύτης είναι αυτούσια η πρωτεΐνη, η οποία ιονίζεται και αναλύεται μέσω φασματομετρίας μάζας (MS)
- στο 2^ο είδος, στο οποίο ο αναλύτης είναι χαρακτηριστικά πεπτίδια τα οποία προκύπτουν έπειτα από πέψη των πρωτεϊνών με πρωτεολυτικά ένζυμα όπως η τρυψίνη [50].

Αναφορικά με την ανάλυση αυτούσιων πρωτεϊνών (1^ο είδος), έχουν αναπτυχθεί αρκετές μέθοδοι, κάποιες από τις οποίες μελετούν την ανίχνευση της α-λακταλβουμίνης και β-λακτοσφαιρίνης σε προϊόντα γάλακτος [51,52] καθώς και β-λακτοσφαιρίνης για την ανίχνευση νοθείας κατσικίσιου γάλακτος με αγελαδινό γάλα με χρήση συνδυαστικού συστήματος LC-ESI-MS/MS [46]. Στη 2^{ου} είδους ανάλυση, οι μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί χρησιμοποιούν χαρακτηριστικά πεπτίδια από μια πρωτεΐνη, όπως ο προσδιορισμός της κ-καζεΐνης σε γαλακτοκομικά προϊόντα [53] ή πεπτίδια από διάφορες πρωτεΐνες για την ταυτοποίηση της παρουσίας ενός ή περισσότερων ειδών τροφίμων. Μια επίσης ενδιαφέρουσα εφαρμογή ήταν η ανίχνευση διαφορετικών τύπων γάλακτος στην παραγωγή του τυριού [54]. Η ερευνητική ομάδα του Heick,

ανέπτυξε μέθοδο LC-MS/MS/MS για τον προσδιορισμό οχτώ αλλεργιογόνων σε τρόφιμα μεταξύ των οποίων είναι και το γάλα [42].

Αν και η φασματομετρία μάζας δομείται από τεχνικές που παρέχουν την δυνατότητα ταυτόχρονου προσδιορισμού πολλαπλών αλλεργιογόνων ουσιών με αρκετά υψηλή ακρίβεια, προϋποθέτουν κοστοβόρου και ογκώδους εξοπλισμού καθώς και εξειδικευμένο σε αυτού του είδους τα συστήματα προσωπικό. Επιπρόσθετα, μειονέκτημα αποτελεί και η ανάγκη προκατεργασίας του εκάστοτε δείγματος ώστε να επιτευχθεί ο απαιτούμενος καθαρισμός και χρωματογραφικός διαχωρισμός του δείγματος που θα χρησιμοποιηθεί στην ανάλυση με σκοπό να μειωθεί η επίδραση συστατικών της μήτρας του δείγματος που θα προκαλούσαν μείωση της ακρίβειας και των ορίων ποσοτικοποίησης της μεθόδου [55].

2.2 Ανοσοχημικές μέθοδοι ανάλυσης

Οι ανοσοχημικές αναλύσεις ανήκουν στην οικογένεια των βιοαναλυτικών μεθόδων κατά τις οποίες ο ποσοτικός προσδιορισμός του αναλύτη, βασίζεται στην ανοσοαντίδραση που λαμβάνει χώρα μεταξύ αντιγόνου (αναλύτη) και ενός αντισώματος [56]. Τα αντισώματα που συμμετέχουν στην ανοσοαντίδραση διαχωρίζονται σε δυο κύριες κατηγορίες: α) στα πολυκλωνικά αντισώματα τα οποία αναγνωρίζουν και προσδένονται σε πολλαπλούς επιτόπους και β) στα μονοκλωνικά αντισώματα τα οποία αναγνωρίζουν και προσδένονται σε έναν επίτοπο. Χαρακτηριστικά, τα μονοκλωνικά αντισώματα διακρίνονται από υψηλή εκλεκτικότητα ενώ τα πολυκλωνικά αντισώματα κρίνονται πιο κατάλληλα ως προς την χρήση τους για αναγνώριση πρωτεϊνών που έχουν υποστεί κάποιου είδους ήπια τροποποίηση ή επεξεργασία.

Οι ανοσοχημικές μέθοδοι ανάλυσης κατηγοριοποιούνται ανάλογα με τον τρόπο της ανοσοαντίδρασης και τον τρόπο που πραγματοποιείται η πρόσδεση κατά την ανοσοαντίδραση. Από τους βασικότερους τύπους ανοσοχημικών μεθόδων είναι οι ανταγωνιστικού και μη ανταγωνιστικού τύπου

ενζυμοανοσοχημικοί προσδιορισμοί, η ανοσοαποτύπωση κηλίδων και οι ανοσοχρωματογραφικές τεχνικές με κυριότερες εκδοχές, τις συσκευές πλευρικής ροής και τις ταινίες εμβάπτισης (dipstick tests). Στα υποκεφάλαια που θα ακολουθήσουν, θα αναλυθούν περαιτέρω οι αρχές μεθόδων των εν λόγω τεχνικών καθώς και θα αναφερθούν τα πρωτόκολλα που αναπτύχθηκαν βασισμένα στις αρχές μεθόδων των ανοσοχημικών αναλύσεων για την ανίχνευση των σχετικών με την παρούσα ερευνητική εργασία.

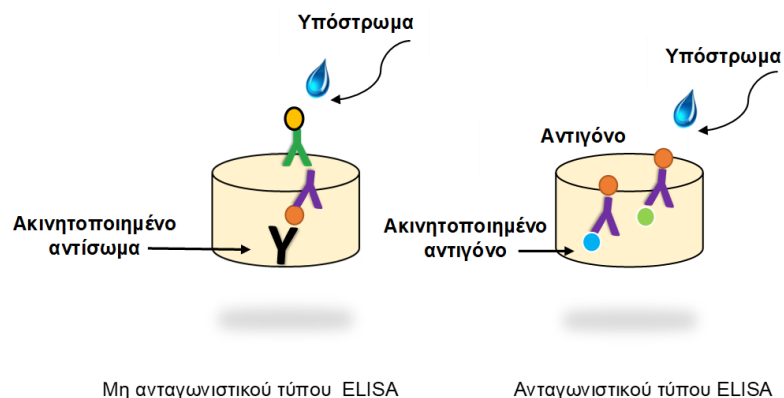
2.2.1 Ανταγωνιστικού και μη ανταγωνιστικού τύπου ανοσοανάλυση

Οι ανοσοχημικοί προσδιορισμοί ανταγωνιστικού και μη ανταγωνιστικού τύπου είναι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνικές για τον προσδιορισμό πρωτεϊνών (Εικόνα 1).

Στις ανοσοαναλύσεις ανταγωνιστικού τύπου (ELISA), το αντιγόνο βρίσκεται ακινητοποιημένο σε στερεά επιφάνεια και ανταγωνίζεται το αντιγόνο που εντοπίζεται στα πρότυπα διαλύματα του φέροντος δείγματος για την κάλυψη των θέσεων δέσμευσης του αντισώματος που χρησιμοποιείται στην ανοσοαντίδραση το οποίο προστίθεται στο δείγμα αναφοράς κατά σταθερή συγκέντρωση, η οποία είναι χαμηλότερη της συγκέντρωσης του προς προσδιορισμό αντιγόνου.

Στην εκδοχή του άμεσου προσδιορισμού (direct competitive ELISA), το αντίσωμα που χρησιμοποιείται στην ανοσοανάλυση και το οποίο είναι ειδικό ως προς το αντιγόνο, είναι επισημασμένο με έναν ιχνηθέτη, ενώ στην εκδοχή του έμμεσου προσδιορισμού (indirect competitive ELISA), κατά την ανοσοαντίδραση προστίθεται ένα δεύτερο αντίσωμα που δρα έναντι των γ-σφαιρινών του είδους που έχει παραχθεί το ειδικό για το αντιγόνο αντίσωμα και το οποίο αντίστοιχα είναι επισημασμένο με έναν ιχνηθέτη. Κατά την ανοσοαντίδραση, απουσία του αντιγόνου, παρατηρείται το μέγιστο ποσοστό σύνδεσης του ειδικού αντισώματος που χρησιμοποιείται στην ανοσοανάλυση με το αντιγόνο που βρίσκεται ακινητοποιημένο στην στερεά επιφάνεια και συνεπώς το αναλυτικό σήμα που λαμβάνεται είναι σε αντιστροφή αναλογία ως προς τη συγκέντρωση του αντιγόνου που υπάρχει στο δείγμα [57].

Στους ενζυμοανοσοχημικούς προσδιορισμούς μη ανταγωνιστικού τύπου, κατά την διάρκεια της ανοσοαντίδρασης, το ειδικό αντίσωμα, ακολούθως της ακινητοποίησης του σε στερεή επιφάνεια, αναγνωρίζει και προσδένεται σε έναν επίτοπο του αντιγόνου το οποίο εντοπίζεται στο διάλυμα του δείγματος, δημιουργώντας καθ' αυτόν τον τρόπο ένα σύμπλεγμα αντιγόνου και αντισώματος (συμβολικά Ag-Ab). Σε επόμενο στάδιο ή και στο ίδιο, το εν λόγω σύμπλεγμα αντιγόνου και αντισώματος συμμετέχει σε μια επιμέρους δεύτερη ανοσοαντίδραση με ένα δεύτερο ειδικό αντίσωμα, το οποίο προσδένεται σε έναν διαφορετικό επίτοπο του αντιγόνου, δημιουργώντας σύμπλεγμα τύπου sandwich. Το αντίσωμα αυτό μπορεί να είναι επισημασμένο με κάποιο ραδιοϊσότοπο, με κάποιο ένζυμο ή με χημειοφωταυγή ή βιοφωταυγή, φθορίζοντα ή ηλεκτρενεργά μόρια [58,59].



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού μη ανταγωνιστικού τύπου (sandwich) και ανταγωνιστικού τύπου

Στον τομέα έρευνας που σχετίζεται με την ανίχνευση του αγελαδινού γάλακτος ως μέσο νοθείας σε διαφορετικής ζωικής προέλευσης γάλατα, όπως το κατσικίσιο, το πρόβειο και το βουβαλίσιο γάλα, έχουν αναπτυχθεί διάφορες εκδοχές ενζυμοανασοχημικών μεθόδων. Οι μέθοδοι αυτές βασίζονται στην δράση είτε πολυκλωνικών είτε μονοκλωνικών αντισωμάτων που έχουν αναπτυχθεί έναντι των πρωτεϊνών του ορού γάλακτος ή των καζεϊνών. Στο εμπόριο, υπάρχουν πλέον διάφορα τυποποιημένα συστήματα που στηρίζονται σε πρωτόκολλα ενζυμοανασοχημικών μεθόδων είτε ανταγωνιστικού είτε μη ανταγωνιστικού τύπου για τον προσδιορισμό πρωτεϊνών προερχόμενων από το γάλα με όρια ανίχνευσης που κυμαίνονται από 0,1 έως 5 mg/kg [57].

Σημαντικό ενδιαφέρον παρουσιάζεται και στην ανάπτυξη ανοσοχημικών τεχνικών ανταγωνιστικού τύπου για την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος και βόειας κ-καζεΐνης σε κατσικίσιο γάλα και τυρί και αντίστοιχα σε πρόβειο με χρήση ειδικών αντισωμάτων που δρουν έναντι των γ-καζεϊνών με όριο ανίχνευσης μεθόδου σε ποσοστό 0,1% [60]. Αντίστοιχα, έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι ανοσοχημικού τύπου για την ανίχνευση του αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο γάλα με χρήση ειδικών αντισωμάτων κατά των β-καζεϊνών με όρια ανίχνευσης 2% [61].

Μη ανταγωνιστικού μέθοδοι (τύπου sandwich)

Πέραν των ενζυμοανασοχημικών προσδιορισμών ανταγωνιστικού τύπου, η ερευνητική ομάδα των I. P. Hurley et al. ανέπτυξε μέθοδο μη ανταγωνιστικού τύπου sandwich για την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο και πρόβειο γάλα και τυρί. Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου που αναπτύχθηκε στο γάλα ήταν 0,01% ενώ το όριο ανίχνευσης στο τυρί ήταν 0,001% [62].

Επίσης, το 2012, η ομάδα των N. A. Chavez et al., ανέπτυξε πρωτόκολλο μη ανταγωνιστικού τύπου (sandwich) για τον προσδιορισμό του γλυκομακροπεπτιδίου προκειμένου να ανιχνευθεί το ποσοστό του αγελαδινού τυρόγαλου σε φρέσκο γάλα. Η μέθοδος είχε όριο ανίχνευσης 0.047% (ο/ο) και όριο ποσοτικοποίησης 0,14% (ο/ο) [63].

Ανταγωνιστικού τύπου μέθοδοι (competitive ELISA)

Στα πλαίσια της διερεύνησης της ανίχνευσης του αγελαδινού γάλακτος σε διαφορετικούς τύπους γάλακτος, το 2004 η ομάδα των I. P. Hurley et al. , ανέπτυξε μια μέθοδο έμμεσου προσδιορισμού ανταγωνιστικού τύπου (indirect competitive ELISA), με χρήση ενός μονοκλωνικού αντισώματος κατά της βόειας IgG. Το μονοκλωνικό αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν ειδικό ως προς το είδος ζωικής προέλευσης. Η μέθοδος είχε όριο ανίχνευσης 0,1% (ο/ο) ως προς την ανίχνευση του αγελαδινού γάλακτος [64].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΣΚΟΠΟΣ

Η νοθεία γαλακτοκομικών προϊόντων με γάλα διαφορετικής ζωικής προέλευσης έχει αρνητικά πολύπλευρο αντίκτυπο καθώς αλλοιώνει την αναμενόμενη από τον καταναλωτή ποιότητα βάσει κόστους, θέτει σε κίνδυνο την δημόσια υγεία των ευαίσθητων ομάδων καταναλωτών και καταπατά αρχές βιοηθικής και θρησκείας που διέπουν εν μέρει διαφορετικούς πολιτισμούς. Παρά την ύπαρξη πολλών βιβλιογραφικών μεθόδων για την ανίχνευση της νοθείας, η μελέτη των πρόσφατων δημοσιεύσεων καταδεικνύει την ανάγκη ανάπτυξης νέων, ταχειών, ευαίσθητων και χαμηλού κόστους μεθόδων με δυνατότητα μαζικής ανάλυσης δειγμάτων με στόχο την προστασία των καταναλωτών.

Στα πλαίσια αυτά, σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η ανάπτυξη ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού για τον προσδιορισμό βοείου κ-καζεΐνης, με χρήση πολυκλωνικού αντισώματος κουνελιού το οποίο αναπτύχθηκε στο Εργαστήριο ως προς αυτή την πρωτεΐνη, η αξιολόγηση των αναλυτικών χαρακτηριστικών του και ο έλεγχος της δυνατότητας της μεθόδου να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό νοθείας αιγοπρόβειου γάλακτος και τυριού με αγελαδινό. Στο πρώτο μέρος της εργασίας πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη ανοσοχημικού προσδιορισμού της βόειας κ-καζεΐνης σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης, με στόχο την αξιολόγηση των διαθέσιμων αντιδραστηρίων και την καταρχήν επιλογή των βέλτιστων συνθηκών ανάλυσης. Στη συνέχεια, ακολούθησε η ανάπτυξη των τελικών πρωτοκόλλων της μεθόδου για γάλα και τυρί και η ανάλυση των αποτελεσμάτων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων

➤ Αρχή μεθόδου

Πρότυπα διαλύματα βόειας κ-καζεΐνης παρασκευάστηκαν σε διάλυμα ανοσοαντίδρασης με κατάλληλη προσθήκη ποσοτήτων από διαλύματα παρακαταθήκης. Για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο γάλα παρασκευάστηκαν μίγματα κατσικίσιου γάλακτος με αγελαδινό γάλα σε διαφορετικές αναλογίες. Αντίστοιχα, πραγματοποιήθηκε και η παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων αγελαδινού τυριού σε αιγοπρόβειο τυρί.

➤ Υλικά

- Όξινο ανθρακικό νάτριο, NaHCO_3 , (Merck, Germany).
- Ανθρακικό νάτριο, Na_2CO_3 , (Merck, Germany).
- Νατραζίδιο, NaN_3 , (Merck, Germany).
- Δις απεσταγμένο νερό.
- Διάλυμα ακινητοποίησης (ELISA): ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών/όξινων ανθρακικών 0,05 M, pH 9,2.
- κ-καζεΐνη (Sigma-Aldrich Co., Darmstadt, Germany).

➤ Όργανα

- Αναλυτικός Ζυγός Ακριβείας ALT 220-AM, (KERN & SOHN, Germany).
- Ογκομετρικοί κύλινδροι.
- Πιπέττες Eppendorf σταθερού όγκου.

- Λουτρό Υπερήχων, Elmasonic S30H, Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Γερμανία
- Φυγόκεντρος

4.1.1 Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων κ-καζεΐνης

➤ Εκτέλεση

Εμπορικά διαθέσιμο σκεύασμα κ-καζεΐνης από αγελαδινό γάλα ζυγίζεται και διαλύεται σε ανάλογο όγκο διαλύματος ακινητοποίησης προκειμένου να παρασκευαστεί το διάλυμα παρακαταθήκης. Η τελική συγκέντρωση του διαλύματος είναι 1 mg/mL και φυλάσσεται στους 4°C για μέγιστη χρονική διάρκεια 10 ημερών.

4.1.2 Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο γάλα

➤ Εκτέλεση

Για τα πρότυπα διαλύματα αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο γάλα που θα χρησιμοποιηθούν στην ενζυμοαναστοχική μέθοδο ανταγωνιστικού τύπου, παρελήφθη φρέσκο αγελαδινό και κατσικίσιο γάλα από διαφορετικές φάρμες της Αττικής. Στα δυο είδη γάλακτος προστέθηκε NaN₃ και στη συνέχεια, ποσότητα αυτών κατανεμήθηκε σε κλάσματα του 1,0 mL, τα οποία φυλάχθηκαν στους -20°C. Για την παρασκευή προτύπων διαλυμάτων αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο γάλα τοποθετήθηκαν τα φιαλίδια του 1,0 mL σε λουτρό υπερήχων για 15 min για ομογενοποίηση και φυγοκεντρήθηκαν προκειμένου να απομακρυνθεί όσο το δυνατόν μεγαλύτερο ποσοστό λίπους. Έπειτα, παρασκευάστηκαν μίγματα του κατσικίσιου γάλακτος με γνωστές ποσότητες αγελαδινού γάλακτος, έτσι ώστε να προκύψουν δείγματα που κυμαίνονται από 0,001% έως 0,5% (o/o).

➤ Υλικά

- Όξινο ανθρακικό νάτριο, NaHCO_3 , (Merck, Germany).
- Ανθρακικό νάτριο, Na_2CO_3 , (Merck, Germany).
- Νατραζίδιο, NaN_3 , (Merck, Germany).
- Δις απεσταγμένο νερό.
- Διάλυμα ακινητοποίησης (ELISA): ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών/όξινων ανθρακικών 0,05 M, pH 9,2.
- κ-καζεΐνη (Sigma-Aldrich Co., Darmstadt, Germany).
- Φρέσκο αγελαδινό γάλα από φάρμες της Αττικής.
- Φρέσκο κατσικίσιο γάλα από φάρμες της Αττικής.
- Φρέσκο πρόβειο γάλα από φάρμες της Αττικής.

➤ Όργανα

- Ογκομετρικοί κύλινδροι.
- Πιπέττες Errendorf σταθερού όγκου.
- Λουτρό Υπερήχων, Elmasonic S30H, Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Γερμανία
- Φυγόκεντρος

4.1.3 Παρασκευή αντιορού βόειας κ-καζεΐνης (πολυκλωνικού αντισώματος Pab)

➤ Αρχή Μεθόδου

Προκειμένου να επιτευχθεί η ανταγωνιστικού τύπου ανοσοαντίδραση, παρασκευάζεται ειδικό πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της βόειας κ-καζεΐνης.

➤ Εκτέλεση

Ο αντιορός κατά της κ-καζεΐνης παρασκευάστηκε από το Εργαστήριο σε κουνέλια που είχαν ανοσοποιηθεί με πολλαπλές ενδοδερμικές ενέσεις στη ράχη, επί 6 μήνες. Η ανοσοποίηση γινόταν μια φορά κάθε μήνα με 2 mL γαλακτώματος, που περιείχε 1 mL διαλύματος βόειας κ-καζεΐνης (1 mg/mL) σε φυσιολογικό ορό και 1 mL πλήρους ανοσοενισχυτικού Freund. Οι αιμοληψίες (από φλέβα του αυτιού) άρχισαν 10 ημέρες μετά τη δεύτερη χορήγηση ανοσογόνου και συνεχίστηκαν, με τον ίδιο ρυθμό, μετά από κάθε νέα ανοσοποίηση. Ο αντιορός διαχωριζόταν με φυγοκέντρηση του αίματος (3000 RCF, 15 min, 20-22 °C) και φυλασσόταν στους -25 °C. Μετά από κάθε αιμοληψία, ελεγχόταν ο τίτλος του αντιορού. Στη μέθοδο χρησιμοποιήθηκε αντιορός υψηλού τίτλου (1:7000).

➤ Υλικά

- κ-καζεΐνη αγελαδινού γάλακτος (Sigma-Aldrich Co., Darmstadt, Germany)
- Ανοσοενισχυτικό Freund's
- Διάλυμα παρακαταθήκης (stock solution): ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,1M, pH 7,4, 8,7 % NaCl (w/v)
- Διάλυμα ακινητοποίησης (coating buffer) : ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών/όξινων ανθρακικών 0,05M, pH 9,2
- Διάλυμα αποκλεισμού ελεύθερων θέσεων δέσμευσης (blocking buffer) : ρυθμιστικό διάλυμα όξινων ανθρακικών 0,1M, pH 8,5, 1% BSA (w/v)
- Διάλυμα έκπλυσης (washing buffer): ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM, pH 7,4, 0,05% Tween 20
- Διάλυμα ανοσοαντίδρασης (assay buffer): ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10mM, pH 7,4, 0,05% Tween 20, 0.5% BSA, 0.05% Tween 20, 0.05% NaN₃

- Διάλυμα δεύτερου αντισώματος (Anti Rabbit 2nd IgG buffer): ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 0,15M, pH 8,25, 0,5% BSA (w/v), 0,02% Thimerosal
- Διάλυμα υποστρώματος της υπεροξειδάσης (ABTS): ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών/κιτρικών 0,05M, pH 4,4, 3,2 mM $\text{NaBO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 1,9 mM ABTS

➤ Όργανα

- Αναλυτικός Ζυγός Ακριβείας ALT 220-AM, (KERN & SOHN, Germany).
- Ογκομετρικοί κύλινδροι.
- Πιπέττες Eppendorf σταθερού όγκου.
- Σύστημα ομογενοποίησης Ultra-Turrax T25 Emulsifier, (IKA Werke GmbH & Co.-Janke & Kunkel, Germany).
- Φυγόκεντρος Heraus Christo Labofuge A.

4.2 Πρωτόκολλο παρασκευής χλωρού αιγοπρόβειου τυριού

➤ Αρχή Μεθόδου

Για την ανίχνευση αγελαδινού τυριού σε αιγοπρόβειο τυρί, παρασκευάστηκε στο εργαστήριο λευκό αιγοπρόβειο τυρί καθώς και αιγοπρόβειο τυρί το οποίο περιείχε αγελαδινό τυρί βάσει του πρωτοκόλλου παρασκευής γαλακτοκομικών προϊόντων.

➤ Υλικά

- Νατραζίδιο, NaN_3 , (Merck, Germany).
- Δις απεσταγμένο νερό.
- Πυτιά

- Φρέσκο αγελαδινό τυρί από φάρμες της Αττικής.
- Φρέσκο κατσικίσιο τυρί από φάρμες της Αττικής.

➤ Όργανα

- Θερμόμετρο
- Ειδικά σκεύη θέρμανσης
- Θερμαντική εστία
- Διηθητικά πανιά

➤ Εκτέλεση

Για την παρασκευή του αιγοπρόβειου τυριού, αναμείχθηκαν αρχικά 3,5 L πρόβειου γάλακτος με 1,5 L κατσικίσιου γάλακτος έτσι ώστε η τελική αναλογία τους να είναι 70:30 (ο/ο). Στην συνέχεια 2 L του αιγοπρόβειου γάλακτος τοποθετήθηκαν σε ειδικό σκεύος για παστερίωση στους 68°C επί 10 λεπτά και μετά το πέρας της διαδικασίας, αφέθηκε το σκεύος σε θερμοκρασία 36°C σκεπασμένο με πανί. Για την πήξη του γάλακτος κατά την τυροποίηση, προστέθηκαν 0,08 gr πτυιάς υπό ανάδευση και ακολούθησε η τοποθέτηση του τυριού σε ειδικά διηθητικά πανιά (τσαντίλες). Υπό αυτή τη μορφή, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3, τα διηθητικά πανιά που περιείχαν το τυρί αναρτήθηκαν για στράγγισμα και αφέθηκαν για 24h σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως, το τυρί που παρασκευάστηκε, κατανεμήθηκε σε ίσες ποσότητες των 10 γραμμαρίων και φυλάχθηκε υπό την μορφή δειγμάτων στους -20°C.



Εικόνα 3: Στάδιο του στραγγίσματος κατά την παρασκευή του τυριού στο Εργαστήριο

4.3 Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων από δείγματα αγελαδινού και κατσικίσιου τυριού

Για την ανίχνευση νοθείας αιγοπρόβειου τυριού με αγελαδινό, παρασκευάστηκαν πρότυπα δείγματα αγελαδινού τυριού σε αιγοπρόβειο τυρί. Για τον σκοπό αυτό, ζυγίστηκαν 6 gr από κάθε είδος τυριού, και στη συνέχεια αναμίχθηκαν με ανάλογη ποσότητα διαλύματος εκπλύσεως (6 mL). Στη συνέχεια προστέθηκε ίση ποσότητα δείγματος σε errendorfs του 1,5 mL, προκειμένου να φυγοκεντρηθούν για 15 min. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης ακολούθησε λήψη του υπερκείμενου υγρού από κάθε errendorf, το οποίο και χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων.

➤ Υλικά

- Αιγοπρόβειο τυρί παρασκευασμένο στο εργαστήριο από φρέσκο αιγοπρόβειο γάλα από φάρμες της Αττικής.
- Μείγμα αγελαδινού τυριού με αιγοπρόβειο τυρί σε αναλογία 30:70 (β/β)

- Διάλυμα ανοσοαντίδρασης (assay buffer): ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10mM, pH 7,4, 0,05% Tween 20, 0.5% BSA, 0.05% Tween 20, 0.05% NaN₃

➤ Όργανα

- Αναλυτικός Ζυγός Ακριβείας ALT 220-AM, (KERN & SOHN, Germany).
- Ογκομετρικοί κύλινδροι.
- Πιπέττες Eppendorf σταθερού όγκου.
- Λουτρό Υπερήχων, Elmasonic S 30 H, Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Γερμανία
- Φυγόκεντρος

4.4 Πρωτόκολλο ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού ανταγωνιστικού τύπου ELISA

➤ Αρχή Μεθόδου

Η αρχή μεθόδου του ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού βόειας κ-καζεΐνης στηρίζεται στην ανταγωνιστικού τύπου ανοσοανάλυση. Το εξεταζόμενο αντιγόνο ή αντίσωμα αρχικά ακινητοποιείται σε στερεά επιφάνεια. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί μέσω της φυσικής προσρόφησης με σχηματισμό υδρόφοβου δεσμού (προσρόφηση σε πλαστική επιφάνεια). Στα φρεάτια μικροτιτλόδητησης (microwells), όπου πρόκειται για πλαστική πλάκα που περιέχει 96 μικροφρεάτια, πραγματοποιούνται διαδοχικά όλα τα στάδια της ανάλυσης. Στη παρούσα εργασία αναπτύχθηκαν δυο πρωτόκολλα ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού:

- Το πρωτόκολλο για την ανίχνευση της βόειας κ-καζεΐνης
- Το πρωτόκολλο για την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος/τυριού σε αιγοπρόβριο γάλα/τυρί.

➤ **Υλικά**

- Όξινο ανθρακικό νάτριο, NaHCO_3 , (Merck, Germany)
- Ανθρακικό νάτριο, Na_2CO_3 , (Merck, Germany)
- Νατραζίδιο, NaN_3 , (Merck, Germany)
- Χλωριούχο νάτριο, NaCl (Sigma, USA)
- Τρις(υδροξυ-μέθυλο)-άμινο-μεθάνιο, (Fischer Scientific)
- Αιθυλο-υδραργυρο-θειο-σαλικυλικό οξύ σε μορφή άλατος με νάτριο (Thimerosal, Janssen Chimica, Belgium)
- 2,2-αζινο-δισ-(3-αιθυλοβενζοθειαζολινο-6-)σουλφονικό οξύ, ABTS (Sigma, USA)
- Αλβουμίνη ορού βοός (BSA, Sigma, St. Louis, Mo, USA)
- Tween 20 (Merck, Germany)
- Πλάκα 96 φρεατίων μικροπιλοδότησης (SPL Life Sciences)
- Διάλυμα παρακαταθήκης (stock solution): ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,1M, pH 7,4, 8,7 % NaCl (w/v)
- Διάλυμα ακινητοποίησης (coating buffer) : ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών/όξινων ανθρακικών 0,05M, pH 9,2
- Διάλυμα αποκλεισμού ελεύθερων θέσεων δέσμευσης (blocking buffer) : ρυθμιστικό διάλυμα όξινων ανθρακικών 0,1M, pH 8,5, 1% BSA (w/v)
- Διάλυμα έκπλυσης (washing buffer): ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10mM, pH 7,4, 0,05% Tween 20
- Διάλυμα ανοσοαντίδρασης (assay buffer): ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10mM, pH 7,4, 0,05% Tween 20, 0.5% BSA, 0.05% Tween 20, 0.05% NaN_3
- Διάλυμα δεύτερου αντισώματος (Anti Rabbit 2nd IgG buffer): ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 0,15M, pH 8,25, 0,5% BSA (w/v), 0,02% Thimerosal.

- Διάλυμα υποστρώματος της υπεροξειδάσης (ABTS): ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών/κιτρικών 0,05M, pH 4,4, 3,2 mM $\text{NaBO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 1,9 mM ABTS
- κ-καζεΐνη αγελαδινού γάλακτος (Sigma-Aldrich Co.,Darmstadt, Germany)
- Πολυκλωνικό αντίσωμα
- Δείγματα αγελαδινού, κατσικίσιου και πρόβειου γάλακτος από φάρμα Κεντρικής Ελλάδας
- Δείγματα αγελαδινού, κατσικίσιου και πρόβειου τυριού

➤ Όργανα

- Πιπέττες Errendorf σταθερού όγκου
- Ογκομετρικοί κύλινδροι
- Λουτρό Υπερήχων, Elmasonic S 30 H, Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Γερμανία
- Συσκευή μέτρησης οπτικής απορρόφησης σε φρεάτια μικροπιτλοδότησης, Victor³ Multilabel Readers (PerkinElmer,ΗΠΑ)
- pH-μετρο, pH 127 (Xenon, Ελλάδα)
- Φυγόκεντρος
- Αναδευτήρας φρεατίων μικροπιτλοδότησης



Εικόνα 4: Συσκευή μέτρησης οπτικής απορρόφησης σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης ELISA, Victor³ Multilabel Readers (PerkinElmer)

4.4.1 Ενζυμοανασοχημικός προσδιορισμός ανταγωνιστικού τύπου (ELISA) βόειας κ-καζεΐνης σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης

➤ Εκτέλεση

Σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης προστίθενται 100 μL πρότυπου διαλύματος βόειας κ-καζεΐνης συγκέντρωσης 0,5 $\mu\text{g/mL}$ σε διάλυμα ακινητοποίησης και αφήνονται προκειμένου να πραγματοποιηθεί η προσρόφηση για διάρκεια μιας νύχτας σε θερμοκρασία δωματίου. Τα φρεάτια μικροτιτλοδότησης εκπλένονται επί δυο φορές επαναληπτικά με 300 μL του διαλύματος έκπλυσης. Στο επόμενο βήμα, προστίθενται στα φρεάτια μικροτιτλοδότησης 300 μL από το διάλυμα αποκλεισμού θέσεων (blocking buffer) των μικροφρεατίων και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για διάρκεια 60 min. Στη συνέχεια, ακολουθεί έκπλυση των φρεατίων μικροτιτλοδότησης καθ' αντιστοιχία με το προηγούμενο βήμα και προστίθενται σε αυτά 100 μL μίγματος προτύπων διαλυμάτων βόειας κ-καζεΐνης με πολυκλωνικό αντίσωμα κατά της κ-καζεΐνης σε αναλογία αραιώσης 1:5000, τα οποία είχαν προηγουμένως προεπωαστεί επί 30 min. Τα πρότυπα διαλύματα είχαν παρασκευαστεί όπως περιγράφεται στο υποεδάφιο 5.1.1. Η πλάκα των φρεατίων μικροτιτλοδότησης τέθηκε υπό ανάδευση για το στάδιο της ανοσοαντίδρασης το οποίο είχε διάρκεια 1h. Μετά

την ολοκλήρωση της ανοσοαντίδρασης, ακολούθησε το στάδιο της έκπλυσης επί 4 φορές επαναληπτικά με 300 μL διαλύματος έκπλυσης (washing buffer) και προστίθενται στα φρεάτια 100 μL αντισώματος αιγός κατά των γ -σφαιρινών κουνελίου συζευγμένο με HRP σε αραιώση 1:1000, για διάρκεια 45 min υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Στο τελευταίο στάδιο, έγινε έκπλυση των φρεατίων μικροτιτλοδότησης και προστέθηκε ποσότητα 100 μL από το διάλυμα υποστρώματος της HRP (ABTS) και η πλάκα αφέθηκε σε ανάδευση για διάρκεια 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε η μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 405 nm.

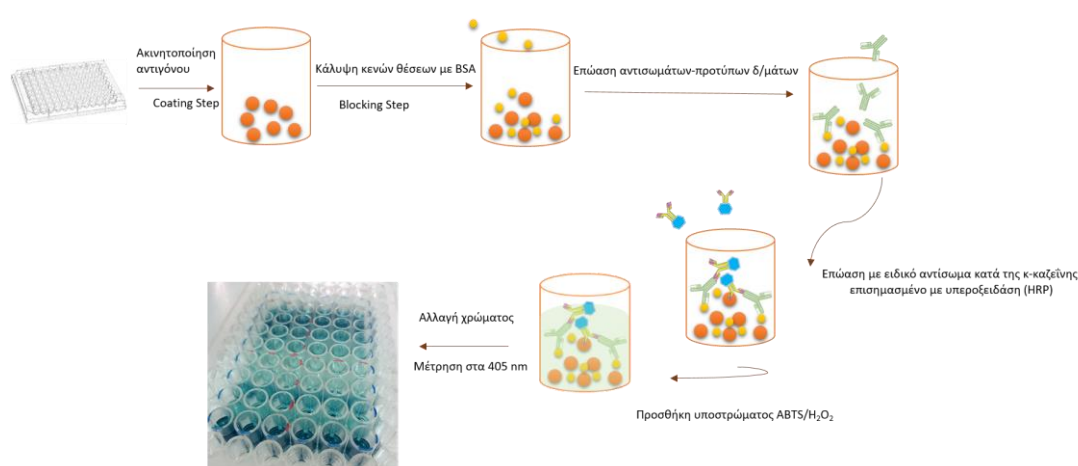
4.4.2 Ενζυμοανοσοχημικός προσδιορισμός ανταγωνιστικού τύπου (ELISA) αγελαδινού γάλακτος/τυριού σε κατσικίσιο γάλα/τυρί σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης

➤ Εκτέλεση

Σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης προστίθενται 100 μL μίγματος προτύπων διαλυμάτων αγελαδινού γάλακτος/τυριού σε κατσικίσιο γάλα/τυρί συγκέντρωσης 0,5 $\mu\text{g/mL}$ σε διάλυμα ακινητοποίησης και αφήνονται προκειμένου να πραγματοποιηθεί η προσρόφηση για διάρκεια μιας νύχτας σε θερμοκρασία δωματίου. Τα φρεάτια μικροτιτλοδότησης εκπλένονται επί δυο φορές επαναληπτικά με 300 μL του διαλύματος έκπλυσης. Στο επόμενο βήμα, προστίθενται στα φρεάτια μικροτιτλοδότησης 300 μL από το διάλυμα αποκλεισμού θέσεων (blocking buffer) των μικροφρεατίων και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για διάρκεια 60 min. Στη συνέχεια, ακολουθεί έκπλυση των φρεατίων μικροτιτλοδότησης καθ' αντιστοιχία με το προηγούμενο βήμα και προστίθενται σε αυτά 100 μL μίγματος προτύπων διαλυμάτων βόειας κ-καζεΐνης με πολυκλωνικό αντίσωμα κατά της κ-καζεΐνης σε αναλογία αραιώσης 1:3500, τα οποία είχα προηγουμένως προ επωαστεί επί 30 min. Τα πρότυπα διαλύματα είχαν παρασκευαστεί όπως περιγράφεται στο υποεδάφιο 5.1.1 και εν συνεχεία αραιώθηκαν 50 φορές σε διάλυμα ανοσοαντίδρασης. Η πλάκα των φρεατίων μικροτιτλοδότησης τέθηκε υπό ανάδευση για το στάδιο

της ανοσοαντίδρασης το οποίο είχε διάρκεια 1h. Μετά την ολοκλήρωση της ανοσοαντίδρασης, ακολούθησε το στάδιο της έκπλυσης επί 4 φορές επαναληπτικά με 300 μL διαλύματος έκπλυσης (washing buffer) και προστίθενται στα φρεάτια 100 μL αντισώματος αιγός κατά των γ-σφαιρινών κουνελιού συζευγμένο με HRP σε αραιώση 1:1000, για διάρκεια 45 min υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Στο τελευταίο στάδιο, έγινε έκπλυση των φρεατίων μικροτιτλοδότησης και προστέθηκε ποσότητα 100 μL από το διάλυμα υποστρώματος της HRP (ABTS) και η πλάκα αφέθηκε σε ανάδευση για διάρκεια 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε η μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 405 nm.

Στην Εικόνα 2 περιγράφονται σχηματικά τα στάδια του ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού ανταγωνιστικού τύπου (ELISA).



Εικόνα 4: Ανταγωνιστικού τύπου ενζυμοανοσοχημικός προσδιορισμός ELISA

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 Ανάπτυξη ενζυμοανοδοχημικού προσδιορισμού ανταγωνιστικού τύπου για την ανίχνευση της κ-καζεΐνης σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης

Στα πλαίσια της ανάπτυξης μεθόδου ανίχνευσης νοθείας μελετήθηκε αρχικά μέθοδος ανταγωνιστικού τύπου σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης, προκειμένου να αξιολογηθούν τα ανοσοαντιδραστήρια και να επιλεγθούν οι βέλτιστες συνθήκες της ανάλυσης. Στα πλαίσια της βελτιστοποίησης της μεθόδου ελέγχθηκαν οι εξής παράμετροι:

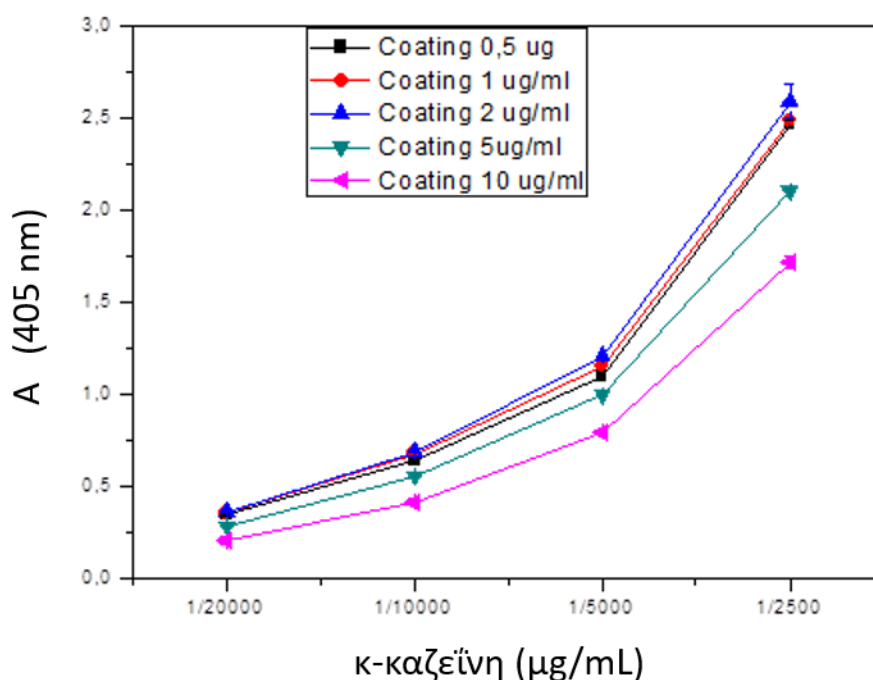
- Επιλογή βέλτιστης συγκέντρωσης του ειδικού αντισώματος έναντι της κ-καζεΐνης. Βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης της κ-καζεΐνης για ακινητοποίηση σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης
- Έλεγχος επίδρασης συγκέντρωσης κ-καζεΐνης για ακινητοποίηση στην ευαισθησία ανίχνευσης
- Βελτιστοποίηση σύνθεσης διαλυμάτων ενζυμοανοδοχημικού προσδιορισμού της κ-καζεΐνης
- Χρονική μελέτη ανοσοαντίδρασης
- Χρονική μελέτη αντίδρασης του αντισώματος έναντι των γ-σφαιρινών κουνελιού με το ειδικό αντίσωμα έναντι της κ-καζεΐνης
- Χρονική Μελέτη προεπώασης των προτύπων διαλυμάτων με το πολυκλωνικό αντίσωμα
- Έλεγχος ειδικότητας του ενζυμοανοδοχημικού προσδιορισμού κ-καζεΐνης με προσδιορισμό της διασταυρούμενης αντίδρασης ως προς την α-, β- και ολική καζεΐνη (cross reaction)

5.1.1 Επιλογή βέλτιστης συγκέντρωσης του ειδικού αντισώματος έναντι της κ-καζεΐνης. Βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης της κ-καζεΐνης για ακινητοποίηση σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης.

Οι κυριότερες παράμετροι που επηρεάζουν το απόλυτο σήμα και την ευαισθησία ανίχνευσης είναι η συγκέντρωση του αντιγόνου για ακινητοποίηση στα φρεάτια μικροτιτλοδότησης καθώς και η συγκέντρωση του ειδικού αντισώματος. Για το σκοπό αυτό, ελέγχθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις κ-καζεΐνης για ακινητοποίηση στα φρεάτια σε συνδυασμό με διαφορετικές αραιώσεις του ειδικού αντισώματος έναντι της κ-καζεΐνης.

Για την επιλογή της βέλτιστης συγκέντρωσης του ειδικού αντισώματος έναντι της κ-καζεΐνης και της συγκέντρωσης της κ-καζεΐνης για ακινητοποίηση σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης ως διάλυμα ακινητοποίησης χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, pH 7,4, ενώ ως διάλυμα αποκλεισμού ελευθέρων θέσεων χρησιμοποιήθηκε διάλυμα όξινων ανθρακικών 100 mM, pH 8,5 που περιείχε 1% BSA (β/ο). Επιπλέον, ως διάλυμα ανοσοαντίδρασης χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM, pH 7,4 που περιείχε 0.5% (β/ο) BSA και 0,9% (β/ο) χλωριούχο νάτριο και ως διάλυμα έκπλυσης χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM, pH 7,4. Η χρονική διάρκεια της ανοσοαντίδρασης καθώς και η χρονική διάρκεια της αντίδρασης του πολυκλωνικού αντισώματος έναντι των γ-σφαιρινών κουνελιού ήταν 1h.

Στο Σχήμα 1 παρουσιάζονται οι τιμές της οπτικής απορρόφησης που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα (αναλυτικό σήμα), όταν η συγκέντρωση της κ-καζεΐνης που χρησιμοποιήθηκε για ακινητοποίηση στα φρεάτια μικροτιτλοδότησης κυμαινόταν από 0,5 μg έως 10 $\mu\text{g/mL}$, ενώ παράλληλα ελέγχθηκαν αραιώσεις του ειδικού αντισώματος που κυμαίνονταν από 1:10000 έως 1:2500.



Σχήμα 1: Τιμές οπτικής απορρόφησης στα 405 nm που ελήφθησαν για διαφορετικές αραιώσεις του ειδικού αντισώματος σε συνδυασμό με συγκεντρώσεις της κ-καζεΐνης για ακινητοποίηση: 0,5 μg/mL (■), 1 μg/mL (●), 2 μg/mL (▲), 5 μg/mL (▼) και 10 μg/mL (◄). Κάθε τιμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων ±SD.

Βάσει αποτελεσμάτων και της σχετικής τους ανάλυσης, ικανοποιητικό και παρεμφερές αναλυτικό σήμα ($OD \geq 1$) ελήφθη για αραιώσεις του πολυκλωνικού αντισώματος $\leq 1:5000$ και για συγκεντρώσεις κ-καζεΐνης για ακινητοποίηση από 0.5 έως 2 μg/mL. Αντίθετα, για συγκεντρώσεις κ-καζεΐνης ≥ 5 μg/mL παρατηρήθηκε πτώση του αναλυτικού σήματος. Για τον λόγο αυτό, επιλέχθηκε η αραιώση του πολυκλωνικού αντισώματος 1:5000 και ελέγχθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης της κ-καζεΐνης για ακινητοποίηση στα φρεάτια μικροτιτλοδότησης στην ευαισθησία της ανίχνευσης.

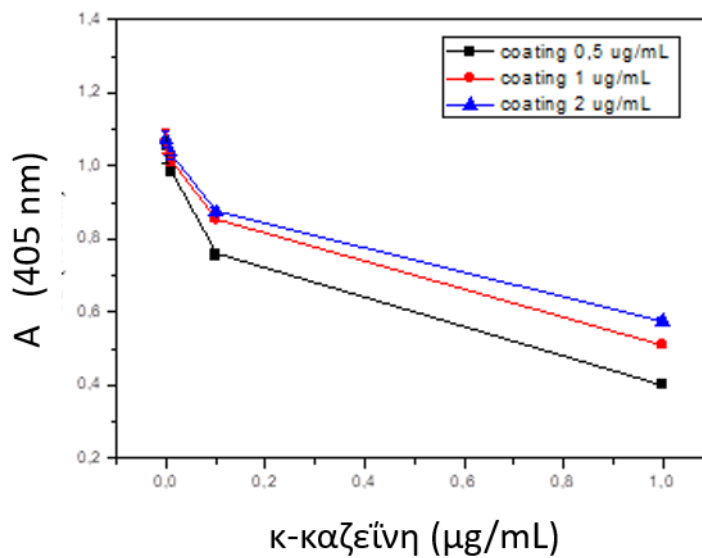
5.1.2 Έλεγχος επίδρασης συγκέντρωσης κ-καζεΐνης για ακινητοποίηση στην ευαισθησία ανίχνευσης

Σύμφωνα με την παράγραφο 5.1.1 βρέθηκε ότι επάρκεια αναλυτικού σήματος ελήφθη όταν η συγκέντρωση της κ-καζεΐνης για ακινητοποίηση στα φρεάτια μικροτιτλοδότησης ήταν εντός του εύρους 0,5-2 $\mu\text{g/mL}$ για αραιώση πολυκλωνικού αντισώματος 1:5000. Για τον έλεγχο της επίδρασης της συγκέντρωσης κ-καζεΐνης στην ευαισθησία της ανίχνευσης χρησιμοποιήθηκαν πέραν του μηδενικού προτύπου διαλύματος και τρία πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης.

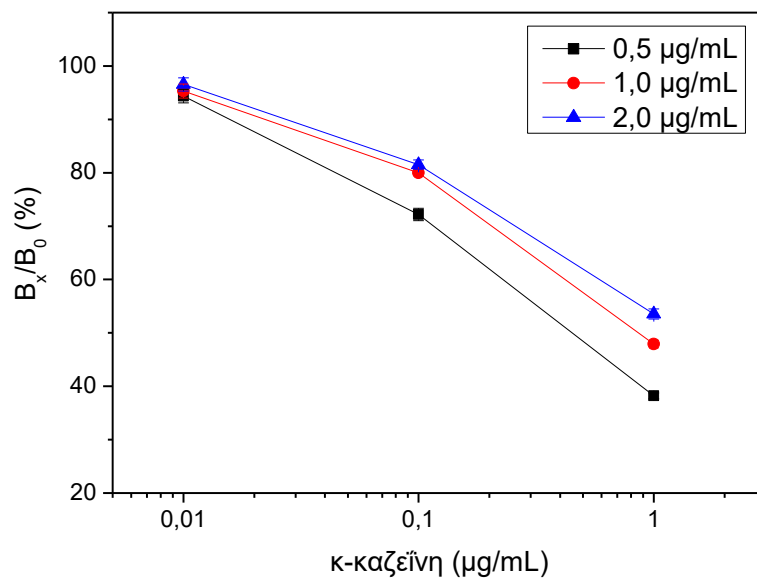
Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ακινητοποίηση της κ-καζεΐνης, τον αποκλεισμό ελευθέρων θέσεων φρεατίων, το στάδιο της ανοσοαντίδρασης και την έκπλυση των φρεατίων ήταν εκείνα που χρησιμοποιήθηκαν στην υποπαράγραφο 5.1.1.

Στο Σχήμα 2 παρουσιάζονται οι τιμές οπτικής απορρόφησης που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα καθώς επίσης και για πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης συγκεντρώσεων 0,01, 0,1 και 1 $\mu\text{g/mL}$ συναρτήσει τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων κ-καζεΐνης (0,5, 1 και 2 $\mu\text{g/mL}$) για ακινητοποίηση στα φρεάτια μικροτιτλοδότησης.

Στο Σχήμα 3 παρουσιάζονται οι τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για τα πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης (0,01, 0,1 και 1 $\mu\text{g/mL}$) συναρτήσει τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων κ-καζεΐνης (0,5, 1 και 2 $\mu\text{g/mL}$) για ακινητοποίηση στα φρεάτια μικροτιτλοδότησης.



Σχήμα 2: Τιμές οπτικής απορρόφησης στα 405 nm που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα και τα πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης συγκέντρωσης 0,01, 0,1 και 1 μg/mL, όταν η συγκέντρωση της κ-καζεΐνης για ακινητοποίηση ήταν 0,5 μg/mL (■), 1 μg/mL (●) και 2 μg/mL (▲).



Σχήμα 3: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης για τα πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης συγκέντρωσης 0,01, 0,1 και 1 μg/mL, όταν η συγκέντρωση της κ-καζεΐνης για ακινητοποίηση ήταν 0,5 μg/mL (■), 1 μg/mL (●) και 2 μg/mL (▲).

Βάσει των αποτελεσμάτων που παρουσιάστηκαν στα Σχήματα 2 και 3, η ευαισθησία της ανίχνευσης ήταν παρεμφερής όταν οι συγκεντρώσεις της κ-καζεΐνης που χρησιμοποιήθηκαν για ακινητοποίηση ήταν 1 και 2 $\mu\text{g/mL}$. Αντίθετα, παρατηρήθηκε βελτίωση στην ευαισθησία της ανίχνευσης όταν η συγκέντρωση της κ-καζεΐνης για ακινητοποίηση ήταν 0,5 $\mu\text{g/mL}$.

Συμπερασματικά, από τις υποπαραγράφους 5.1.1 και 5.1.2 επιλέχθηκε η αραιώση του ειδικού αντισώματος 1:5000 ενώ η βέλτιστη συγκέντρωση κ-καζεΐνης ήταν 0,5 $\mu\text{g/mL}$.

5.1.3 Βελτιστοποίηση σύνθεσης διαλυμάτων ενζυμοανανοσοχημικού προσδιορισμού της κ-καζεΐνης

Για την ανάπτυξη ενζυμοανανοσοχημικού προσδιορισμού της κ-καζεΐνης σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης μελετήθηκε η σύσταση των διαλυμάτων ακινητοποίησης, αποκλεισμού ελευθέρων θέσεων των φρεατίων, ανοσοαντίδρασης και έκπλυσης των φρεατίων χρησιμοποιώντας την αραιώση του ειδικού αντισώματος και την συγκέντρωση της κ-καζεΐνης για ακινητοποίηση που επιλέχθηκε στις υποπαραγράφους 5.1.1 και 5.1.2.

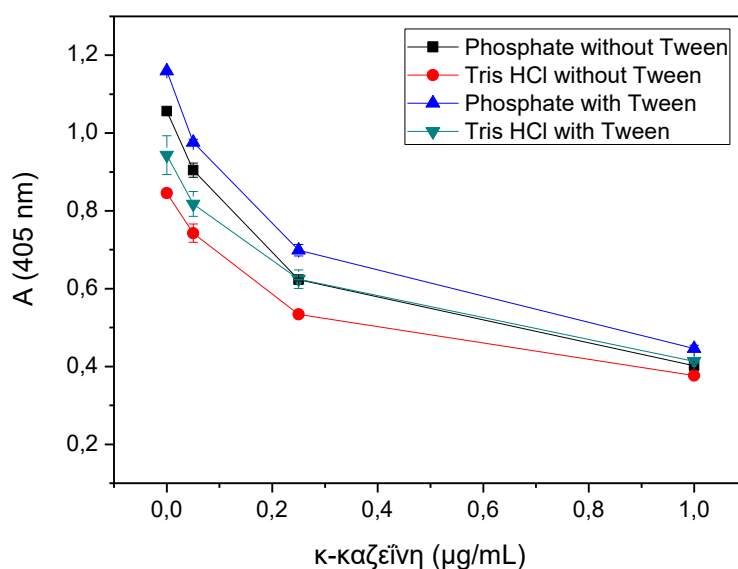
A. Ρυθμιστικό διάλυμα ανοσοαντίδρασης

Η επιλογή της βέλτιστης σύστασης του διαλύματος ανοσοαντίδρασης πραγματοποιήθηκε βάσει των τιμών οπτικής απορρόφησης του μηδενικού προτύπου διαλύματος καθώς επίσης και των τιμών οπτικής απορρόφησης τριών προτύπων διαλυμάτων κ-καζεΐνης. Πιο συγκεκριμένα, ως ρυθμιστικά διαλύματα ανοσοαντίδρασης δοκιμάστηκαν τα εξής:

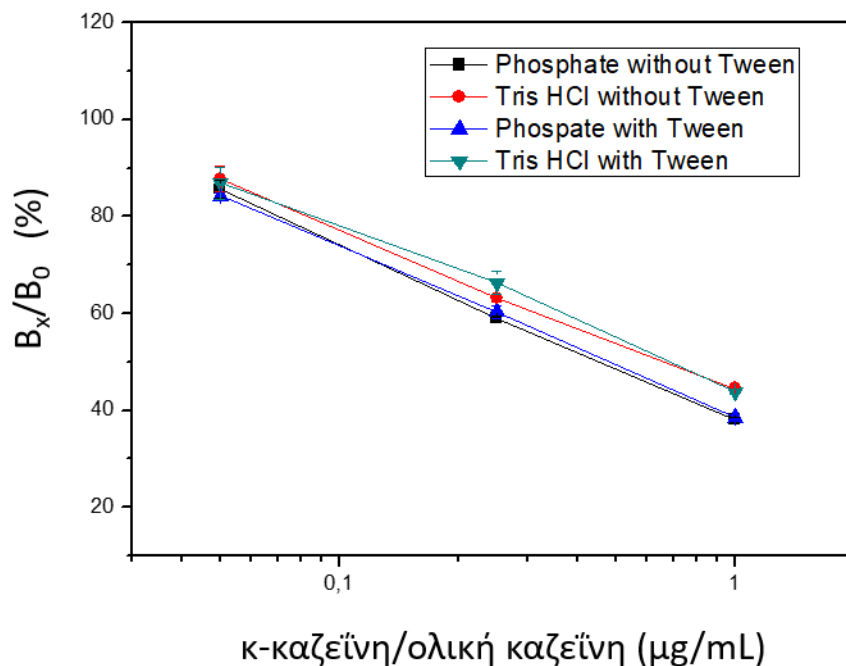
- Διάλυμα ανοσοαντίδρασης (1) : Tris HCl 50 mM, pH 7,8, 0,9% (β/o), NaCl, 0,5% BSA (β/o), 0,5% Tween 20 (o/o)
- Διάλυμα ανοσοαντίδρασης (2) : Tris HCl 50 mM, pH 7,8, 0,9% (β/o), NaCl, 0,5% BSA (β/o),
- Διάλυμα ανοσοαντίδρασης (3) : ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM, pH 7,4, 0,5% BSA (β/o), 0,05% Tween 20 (o/o)

- Διάλυμα ανοσοαντίδρασης (4) : ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM, pH 7,4, 0,5% BSA (β/o)

Για τις τέσσερις παραπάνω περιπτώσεις, ως διάλυμα ακινητοποίησης χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, pH 7,4, ως διάλυμα αποκλεισμού ελευθέρων θέσεων χρησιμοποιήθηκε διάλυμα όξινων ανθρακικών 100 mM, pH 8,5 που περιείχε 1% BSA (β/o) ενώ ως διάλυμα έκπλυσης χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM, pH 7,4. Στο Σχήμα 4 παρουσιάζονται οι τιμές οπτικής απορρόφησης που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα καθώς και τα πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης συγκεντρώσεως 0,01, 0,1 και 1 $\mu\text{g/mL}$ χρησιμοποιώντας τα τέσσερα διαφορετικά διαλύματα ανοσοαντίδρασης, ενώ στο Σχήμα 5 παρουσιάζονται οι τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης των τριών προτύπων διαλυμάτων κ-καζεΐνης.



Σχήμα 4: Τιμές οπτικής απορρόφησης στα 405 nm που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα καθώς και τα πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης συγκεντρώσεως 0,01, 0,1 και 1 $\mu\text{g/mL}$ χρησιμοποιώντας ως διάλυμα ανοσοαντίδρασης: Διάλυμα ανοσοαντίδρασης 1 (■), Διάλυμα ανοσοαντίδρασης 2 (●), Διάλυμα ανοσοαντίδρασης 3 (▲), Διάλυμα ανοσοαντίδρασης και Διάλυμα ανοσοαντίδρασης 4 (▼). Κάθε τιμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm\text{SD}$.

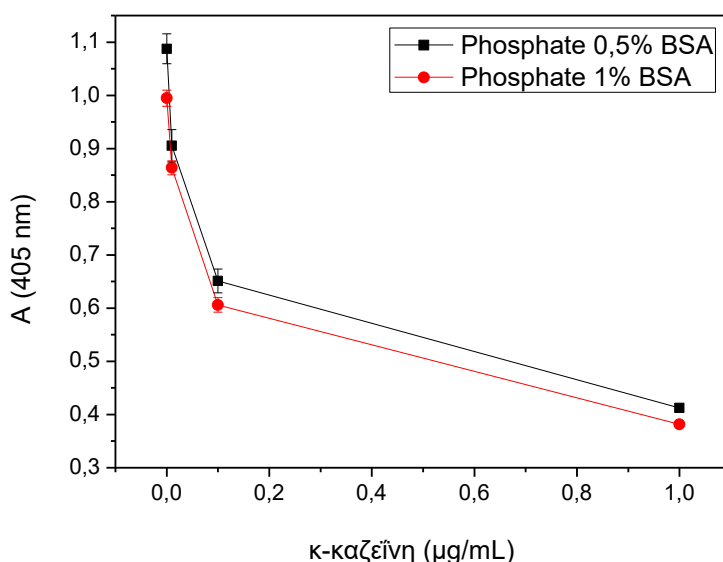


Σχήμα 5: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για τα πρότυπα διαλύματα κ-κασζείνης συγκεντρώσεως 0,01, 0,1 και 1 μg/mL χρησιμοποιώντας ως διάλυμα ανοσοαντίδρασης: Διάλυμα ανοσοαντίδρασης 1 (■) , Διάλυμα ανοσοαντίδρασης 2 (●), Διάλυμα ανοσοαντίδρασης 3 (▲) Διάλυμα ανοσοαντίδρασης και Διάλυμα ανοσοαντίδρασης 4 (▼). Κάθε τιμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων ±SD.

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω σχήματα, με χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 10 mM, pH 7,4, 0,5% BSA (β/ο) επιτυγχάνεται υψηλότερο αναλυτικό σήμα σε σχέση με αυτό που λαμβάνεται με χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος TrisHCl 50 mM, pH 7,8, 0,9% (β/ο), NaCl, 0,5% BSA (β/ο). Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η προσθήκη του επιφανειοδραστικού Tween 20 στα παραπάνω διαλύματα ανοσοαντίδρασης παρείχε περαιτέρω 10% αύξηση στο αναλυτικό σήμα. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην ευαισθησία της ανίχνευσης με την χρήση των τεσσάρων διαφορετικών διαλυμάτων ανοσοαντίδρασης. Για τον λόγο αυτό, επιλέχθηκε ως διάλυμα ανοσοαντίδρασης το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM, pH 7,4, 0,5% BSA (β/ο), 0,05% Tween 20 (ο/ο) (Διάλυμα

ανοσοαντίδρασης 3) το οποίο παρείχε και το υψηλότερο ικανοποιητικό σήμα για περαιτέρω μελέτη.

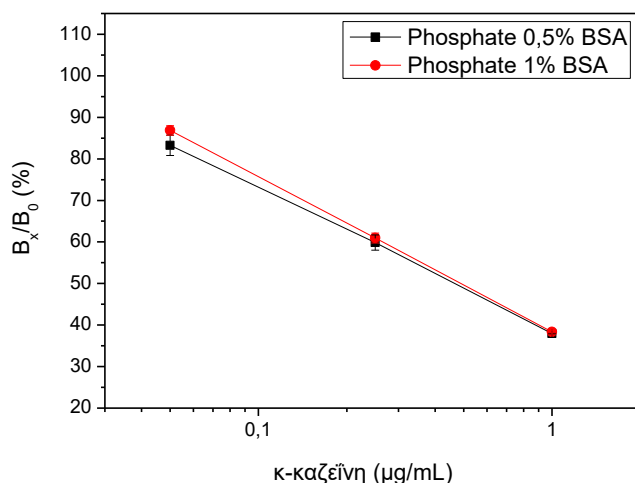
Η σύσταση του διαλύματος ανοσοαντίδρασης μελετήθηκε εκτενέστερα ως προς την περιεκτικότητά του σε φέρουσα πρωτεΐνη. Πιο αναλυτικά, ελέγχθηκε η επίδραση της αύξησης της περιεκτικότητας του διαλύματος ανοσοαντίδρασης σε BSA στο αναλυτικό σήμα και την ευαισθησία της ανίχνευσης. Στο Σχήμα 6 παρουσιάζονται οι τιμές οπτικής απορρόφησης που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα και τα πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης συγκεντρώσεως 0,01, 0,1 και 1 $\mu\text{g/mL}$ με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 10 mM που περιείχε 0,9% NaCl (β/ο), 0,05% Tween 20 (ο/ο) με: (α) 0,5% (β/ο) BSA και (β) 1% (β/ο) BSA.



Σχήμα 6: Τιμές οπτικής απορρόφησης στα 405 nm που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα καθώς και τα πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης συγκεντρώσεως 0,01, 0,1 και 1 $\mu\text{g/mL}$ χρησιμοποιώντας ως διάλυμα ανοσοαντίδρασης ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM που περιείχε 0,9% NaCl (β/ο), 0,05% Tween 20 (ο/ο) με: (α) 0,5% (β/ο) BSA (■) και (β) 1% (β/ο) BSA (●), Κάθε τιμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm\text{SD}$.

Στο Σχήμα 7 παρουσιάζονται οι τιμές της επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για τα πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης

συγκεντρώσεως 0,01, 0,1 και 1 $\mu\text{g/mL}$ με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 10 mM που περιείχε 0,9% NaCl (β/ο), 0,05% Tween 20 (ο/ο) με: (α) 0,5% (β/ο) BSA και (β) 1% (β/ο) BSA.



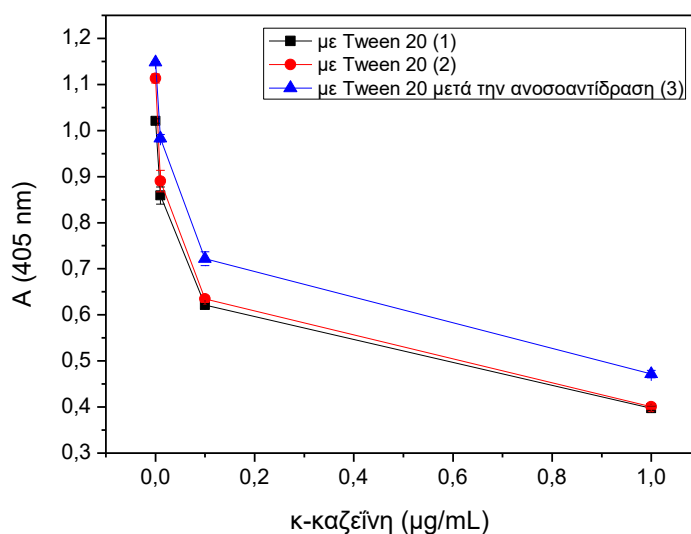
Σχήμα 7: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για τα πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης συγκεντρώσεως 0,01, 0,1 και 1 $\mu\text{g/mL}$ χρησιμοποιώντας ως διάλυμα ανοσοαντίδρασης ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM που περιείχε 0,9% NaCl (β/ο), 0,05% Tween 20 (ο/ο) με: (α) 0,5% (β/ο) BSA (■) και (β) 1% (β/ο) BSA (●). Κάθε τιμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στα σχήματα 6.5 και 6.6, η αύξηση της περιεκτικότητας του διαλύματος ανοσοαντίδρασης σε φέρουσα πρωτεΐνη (BSA) από 0,5% (β/ο) σε 1% (β/ο) οδήγησε σε αύξηση του αναλυτικού σήματος (~10%), ενώ αντιθέτως δεν παρατηρήθηκε ιδιαίτερα σημαντική μεταβολή στην ευαισθησία της ανίχνευσης. Για τον λόγο αυτό, επιλέχθηκε ως διάλυμα ανοσοαντίδρασης το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM που περιείχε 0,9% NaCl (β/ο), 0,05% Tween 20 (ο/ο) και 0,5% (β/ο) BSA.

B. Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης

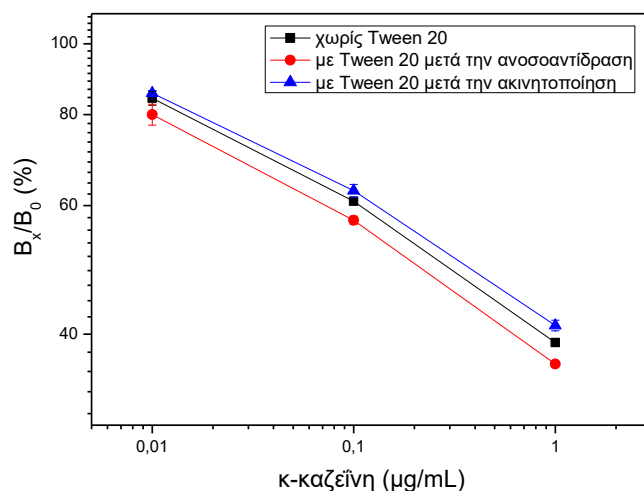
Για την επιλογή των κατάλληλων διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται για τον ενζυμοαναστοχμητικό προσδιορισμό της κ-καζεΐνης ήταν σημαντική και η βελτιστοποίηση της σύστασης του ρυθμιστικού διαλύματος εκπλύσεων. Η σύσταση αυτή βελτιστοποιήθηκε κυρίως ως προς την περιεκτικότητα του διαλύματος εκπλύσεων σε επιφανειοδραστικό Tween 20. Για τον λόγο αυτό, ελέγχθηκε η επίδραση της προσθήκης 0,05% (ο/ο) Tween 20 στο ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης (φωσφορικών 10 mM που περιείχε 0,9% NaCl (β/ο)) στο αναλυτικό σήμα του μηδενικού προτύπου διαλύματος καθώς και στο σήμα μη ειδικής δέσμευσης.

Στο Σχήμα 8 παρουσιάζεται το αναλυτικό σήμα που λαμβάνεται για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα και τα πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεως (0,01, 0,1 και 1 $\mu\text{g/mL}$) όταν η έκπλυση των φρεατίων μικροπιλοδότησης πραγματοποιήθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης: (Α) απουσία του επιφανειοδραστικού Tween 20 σε όλα τα στάδια, (Β) προσθήκη του επιφανειοδραστικού Tween 20 μετά το στάδιο της ανοσοαντίδρασης, (Γ) προσθήκη του επιφανειοδραστικού Tween 20 μετά το στάδιο της ακινητοποίησης της κ-καζεΐνης στα φρεάτια.



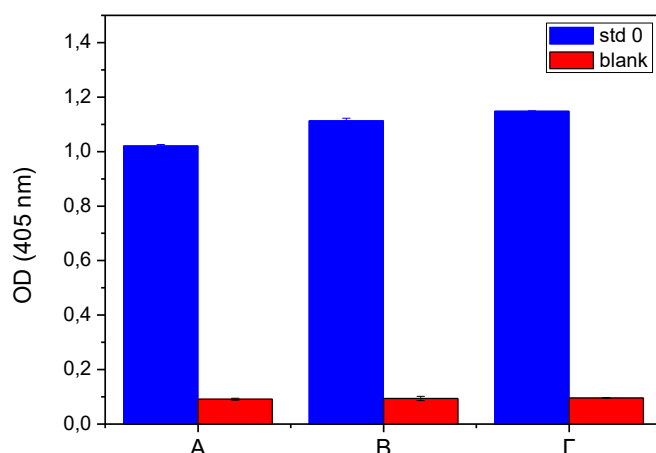
Σχήμα 8: Τιμές οπτικής απορρόφησης που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα και για τα πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεως 0,01, 0,1 και 1 $\mu\text{g/mL}$ όταν πραγματοποιήθηκε έκπλυση με: (Α) Διάλυμα έκπλυσης που δεν περιείχε Tween 20 σε κανένα στάδιο του ανοσοπροσδιορισμού (■), (Β) Διάλυμα έκπλυσης που περιείχε Tween σε όλα τα στάδια του ανοσοπροσδιορισμού (●) και (Γ) Διάλυμα έκπλυσης που περιείχε Tween 20 μετά το στάδιο της ανοσοαντίδρασης (▲). Κάθε τιμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm\text{SD}$.

Στο Σχήμα 9 παρουσιάζεται η επί τοις εκατό ποσοστιαία εκτόπιση που λαμβάνεται για τα πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεως (0,01, 0,1 και 1 $\mu\text{g/mL}$) όταν η έκπλυση των φρεατίων μικροτιτλοδότησης πραγματοποιήθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης: (Α) απουσία του επιφανειοδραστικού Tween 20 σε όλα τα στάδια, (Β) προσθήκη του επιφανειοδραστικού Tween 20 μετά το στάδιο της ανοσοαντίδρασης, (Γ) προσθήκη του επιφανειοδραστικού Tween 20 μετά το στάδιο της ακινητοποίησης της κ-καζεΐνης στα φρεάτια. Στο Σχήμα 10 παρουσιάζεται η σύγκριση του αναλυτικού σήματος του μηδενικού προτύπου διαλύματος με το αναλυτικό σήμα μη ειδικής δέσμευσης.



Σχήμα 9: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για τα πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεως 0,01, 0,1 και 1 $\mu\text{g/mL}$ όταν πραγματοποιήθηκε έκπλυση με: (Α) Διάλυμα έκπλυσης που δεν περιείχε Tween 20 σε κανένα στάδιο του ανοσοπροσδιορισμού (■), (Β) Διάλυμα έκπλυσης που περιείχε Tween σε όλα τα στάδια του ανοσοπροσδιορισμού (●) και (Γ) Διάλυμα έκπλυσης που περιείχε Tween 20

μετά το στάδιο της ανοσοαντίδρασης (▲). Κάθε τιμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.



Σχήμα 10: Αναλυτικό σήμα που ελήφθη για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα συγκριτικά με το σήμα μη ειδικής δέσμευσης (τιμές οπτικής απορρόφησης) όταν πραγματοποιήθηκε έκπλυση με: (Α) Διάλυμα έκπλυσης που δεν περιείχε Tween 20 σε κανένα στάδιο του ανοσοπροσδιορισμού, (Β) Διάλυμα έκπλυσης που περιείχε Tween σε όλα τα στάδια του ανοσοπροσδιορισμού και (Γ) Διάλυμα έκπλυσης που περιείχε Tween 20 μετά το στάδιο της ανοσοαντίδρασης. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.

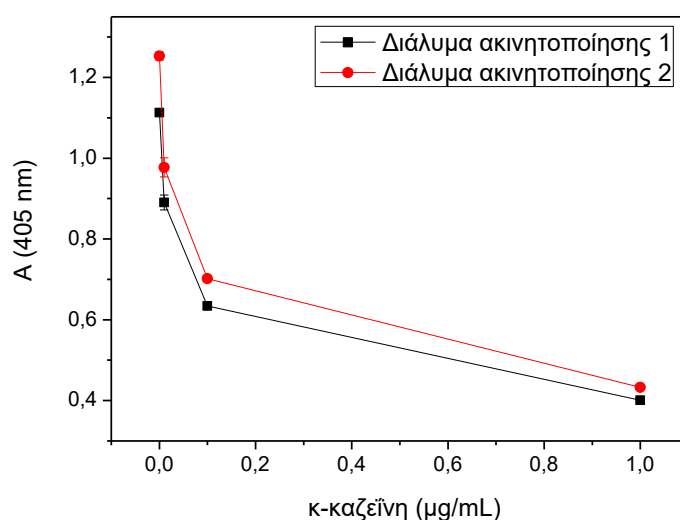
Βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων, παρατηρήθηκε ότι η προσθήκη 0,05% (o/o) επιφανειοδραστικού Tween 20 στο διάλυμα έκπλυσης οδήγησε σε αύξηση του ειδικού αναλυτικού σήματος. Ωστόσο, η βέλτιστη ευαισθησία ανίχνευσης προέκυψε όταν η έκπλυση των φρεατίων με διάλυμα έκπλυσης το οποίο περιείχε 0,05% (o/o) Tween 20, πραγματοποιήθηκε μετά το στάδιο της ανοσοαντίδρασης. Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση του επιφανειοδραστικού Tween 20 στο αναλυτικό σήμα της μη ειδικής δέσμευσης. Για τον λόγο αυτό επιλέχθηκε ως διάλυμα έκπλυσης το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM, 0,9% NaCl (β/o) που περιείχε 0,05% (o/o) Tween 20 για την έκπλυση των φρεατίων μικροτιτλοδότησης μετά το στάδιο της ανοσοαντίδρασης.

Γ. Διάλυμα ακινητοποίησης

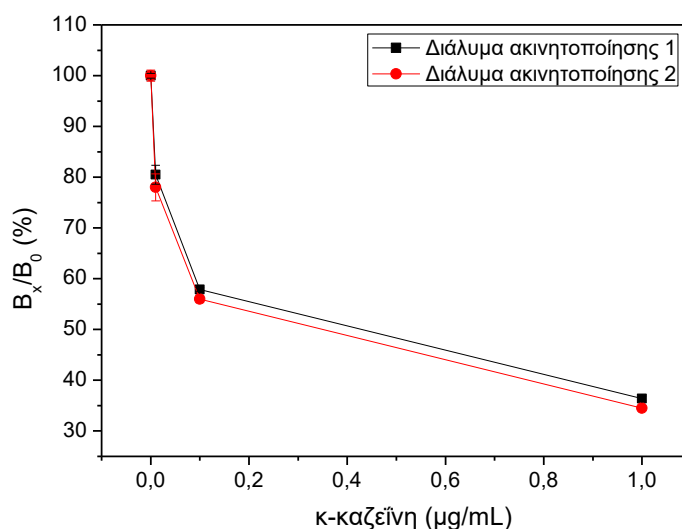
Για όλες τις παραπάνω παραμέτρους, ως διάλυμα ακινητοποίησης χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, pH 7,4. Στο σημείο αυτό, ελέγχθηκε η επίδραση του ρυθμιστικού διαλύματος ακινητοποίησης στο αναλυτικό σήμα και την ευαισθησία της ανίχνευσης.

Στο Σχήμα 11 παρουσιάζονται οι τιμές οπτικής απορρόφησης που ελήφθησαν όταν χρησιμοποιήθηκε ως διάλυμα για την ακινητοποίηση της κ-καζεΐνης στα φρεάτια μικροτιτλοδότησης: (Α) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, pH 7,4 και (Β) ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών/όξινων ανθρακικών 50 mM, pH 9,2.

Στο Σχήμα 12 παρουσιάζονται οι τιμές της επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης όταν χρησιμοποιήθηκαν ως διαλύματα ακινητοποίησης τα (Α) και (Β).



Σχήμα 11: Τιμές οπτικής απορρόφησης που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα και για τα πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης συγκεντρώσεως 0,01, 0,1 και 1 μg/mL όταν πραγματοποιήθηκε έκπλυση με: (Α) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, pH 7,4 (■) και (Β) ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών/όξινων ανθρακικών 50 mM, pH 9,2 (●). Κάθε τιμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.

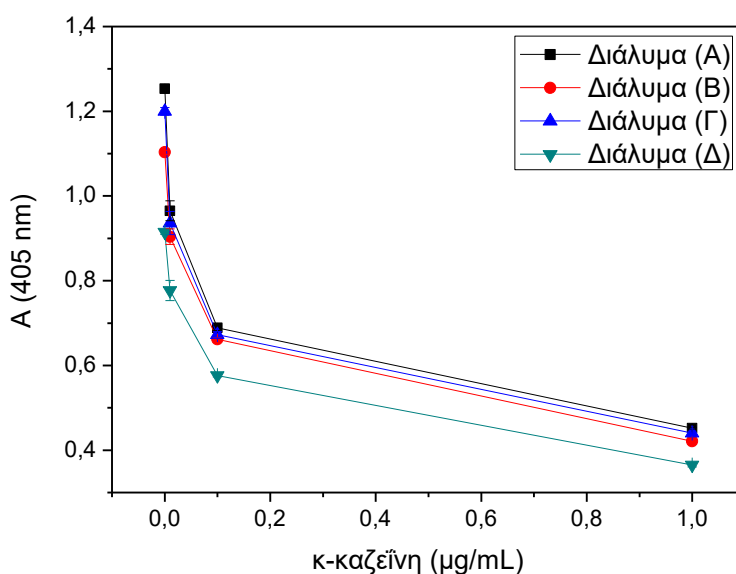


Σχήμα 12: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα και για τα πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης συγκεντρώσεως 0,01, 0,1 και 1 μg/mL όταν πραγματοποιήθηκε έκπλυση με: (A) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, pH 7,4 (■) και (B) ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών/όξινων ανθρακικών 50 mM, pH 9,2 (●). Κάθε τιμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.

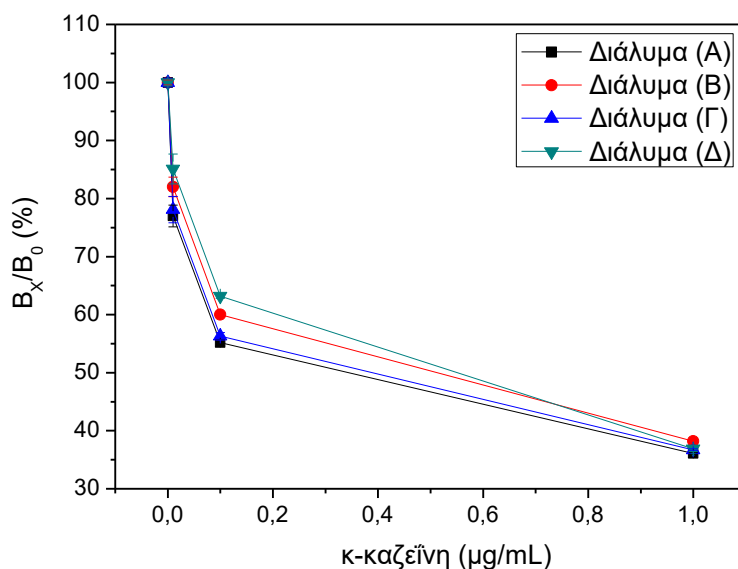
Όπως φαίνεται από τα σχήματα 11 και 12, παρατηρήθηκε αύξηση του ειδικού αναλυτικού σήματος (~12%) όταν χρησιμοποιήθηκε ως διάλυμα ακινητοποίησης, το ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών/όξινων ανθρακικών 50 mM, pH 9,2 (Διάλυμα ακινητοποίησης (B)) σε σχέση με το αναλυτικό σήμα που ελήφθη όταν χρησιμοποιήθηκε ως διάλυμα ακινητοποίησης το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, pH 7,4 (Διάλυμα ακινητοποίησης (A)). Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην ευαισθησία της ανίχνευσης για τα δυο διαφορετικά διαλύματα ακινητοποίησης. Επομένως, ως διάλυμα ακινητοποίησης της κ-καζεΐνης στα φρεάτια μικροτιτλοδότησης επιλέχθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών/όξινων ανθρακικών 50 mM, pH 9,2 (Διάλυμα ακινητοποίησης (B)).

Δ. Διάλυμα αποκλεισμού ελευθέρων θέσεων της επιφάνειας των φρεατίων μικροτιτλοδότησης

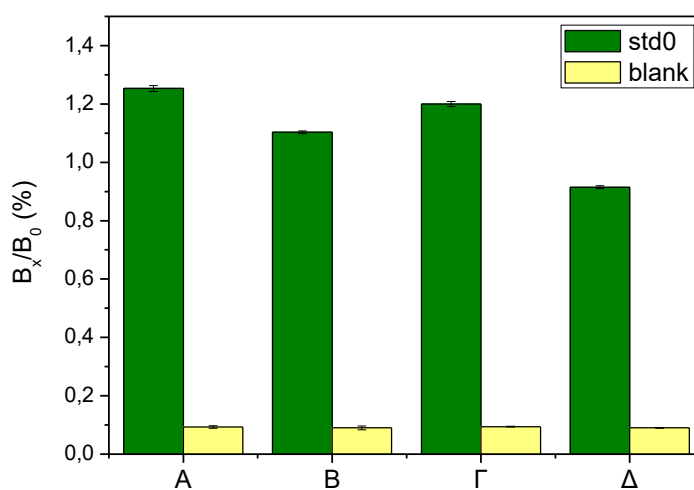
Μεταξύ των παραμέτρων που ελέγχθηκαν κατά την βελτιστοποίηση της ανάπτυξης της ενζυμοανανοσοχημικής μεθόδου, μελετήθηκε η επίδραση του διαλύματος αποκλεισμού ελευθέρων θέσεων των φρεατίων στο ειδικό αναλυτικό σήμα, στην ευαισθησία ανίχνευσης καθώς και στο σήμα μη ειδικής δέσμευσης. Στα πλαίσια αυτά, δοκιμάστηκαν τα εξής διαλύματα: (Α) διάλυμα όξινων ανθρακικών 100 mM, pH 8,5, 1% BSA (β/o), (Β) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM, pH 7,4, 1% BSA (β/o), (Γ) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM, pH 7,4, 1% κασικίσιο γάλα (ο/ο) και (Δ) ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 50 mM, pH 7.8, 1% BSA (β/o). Στο Σχήμα 13 παρουσιάζεται το αναλυτικό σήμα που ελήφθη για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα αλλά και για τα για τα πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης συγκεντρώσεως 0,01, 0,1 και 1 $\mu\text{g/mL}$ και στο Σχήμα 14 οι αντίστοιχες τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης όταν χρησιμοποιήθηκαν τα παραπάνω τέσσερα διαλύματα ως διαλύματα αποκλεισμού ελευθέρων θέσεων των φρεατίων. Επιπλέον, στο Σχήμα 15 παρουσιάζονται οι τιμές οπτικής απορρόφησης της μη ειδικής δέσμευσης συγκριτικά με το σήμα του μηδενικού προτύπου διαλύματος για τα τέσσερα διαφορετικά διαλύματα αποκλεισμού ελευθέρων θέσεων.



Σχήμα 13: Τιμές οπτικής απορρόφησης στα 405 nm που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα και τα πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης συγκεντρώσεως 0,01, 0,1 και 1 μg/mL χρησιμοποιώντας ως διάλυμα αποκλεισμού ελευθέρων θέσεων: Διάλυμα Α (■), Διάλυμα Β (●), Διάλυμα Γ (▲) και Διάλυμα Δ (▼). Κάθε τιμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων ±SD.



Σχήμα 14: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για τα πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης συγκεντρώσεως 0,01, 0,1 και 1 μg/mL χρησιμοποιώντας ως διάλυμα αποκλεισμού ελευθέρων θέσεων: Διάλυμα Α (■), Διάλυμα Β (●), Διάλυμα Γ (▲) και Διάλυμα Δ (▼). Κάθε τιμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων ±SD.



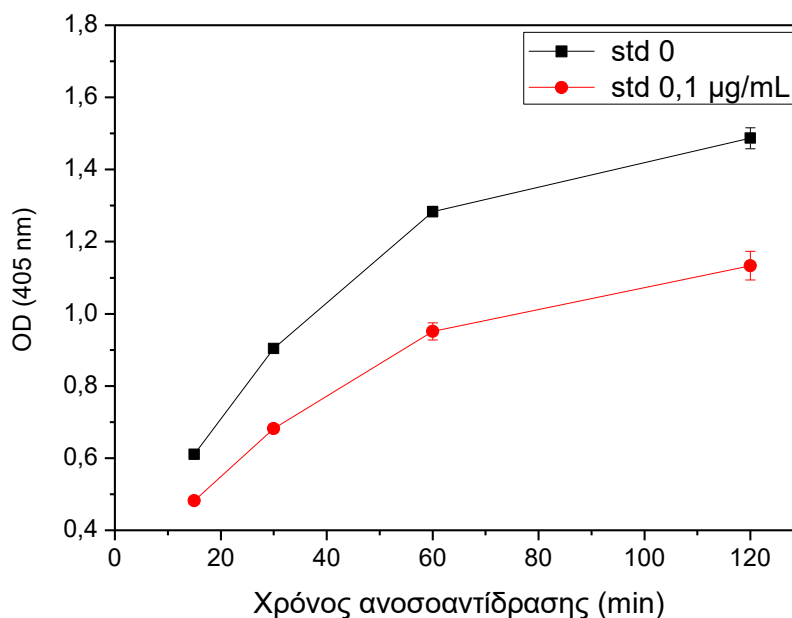
Σχήμα 15: Αναλυτικό σήμα που ελήφθη για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα συγκριτικά με το σήμα μη ειδικής δέσμευσης (τιμές οπτικής απορρόφησης) όταν χρησιμοποιήθηκε ως διάλυμα αποκλεισμού ελευθέρων θέσεων: Διάλυμα Α , Διάλυμα Β, Διάλυμα Γ και Διάλυμα Δ. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.

Βάσει των αποτελεσμάτων, βέλτιστο ειδικό αναλυτικό σήμα και ευαισθησία ανίχνευσης ελήφθη όταν χρησιμοποιήθηκε ως διάλυμα αποκλεισμού ελευθέρων θέσεων το διάλυμα όξινων ανθρακικών 100 mM, pH 8,5, 1% BSA (β/ο) (Διάλυμα Α) και το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM, pH 7,4, 1% κατσικίσιο γάλα (ο/ο) (Διάλυμα Γ). Με χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 100 mM, pH 7,4, 1% BSA (β/ο) (Διάλυμα Β) παρατηρήθηκε 15% μείωση του ειδικού αναλυτικού σήματος, ενώ με χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl 50 mM, pH 7.8, 1% BSA (β/ο) (Διάλυμα Δ) παρατηρήθηκε ακόμη μεγαλύτερη μείωση του ειδικού αναλυτικού σήματος (35%). Για όλα τα παραπάνω διαλύματα, το σήμα μη ειδικής δέσμευσης ήταν μικρότερο από 0,094. Επομένως, ως διάλυμα αποκλεισμού των ελευθέρων θέσεων της επιφάνειας των φρεατίων μικροπιτλοδότησης το διάλυμα όξινων ανθρακικών 100 mM, pH 8,5, 1% BSA (β/ο) (Διάλυμα Α).

5.1.4 Χρονική μελέτη ανοσοαντίδρασης

Μια πολύ σημαντική παράμετρος που μελετήθηκε κατά την ανάπτυξη του ανοσοενζυμικού προσδιορισμού ήταν η επίδραση του χρόνου της ανοσοαντίδρασης στο ειδικό αναλυτικό σήμα αλλά και στην ευαισθησία της ανίχνευσης. Χρησιμοποιώντας τις συνθήκες που επιλέχθηκαν κατά την πορεία των βελτιστοποιήσεων της μεθόδου και αναφέρονται στις παραπάνω υποπαραγράφους, ελέγχθηκε το αναλυτικό σήμα του μηδενικού προτύπου διαλύματος καθώς και του προτύπου διαλύματος κ-καζεΐνης συγκεντρώσεως 0,1 μ g/mL, για χρόνους ανοσοαντίδρασης 15 min, 30 min, 60 min και 120 min. Σε όλες τις περιπτώσεις, ο χρόνος της αντίδρασης του ειδικού αντισώματος με το επισημασμένο με HRP αντίσωμα έναντι των γ-σφαιρινών κουνελιού ήταν

60 min. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν για τους τέσσερις διαφορετικούς χρόνους ανοσοαντίδρασης παρουσιάζονται στο Σχήμα 16.

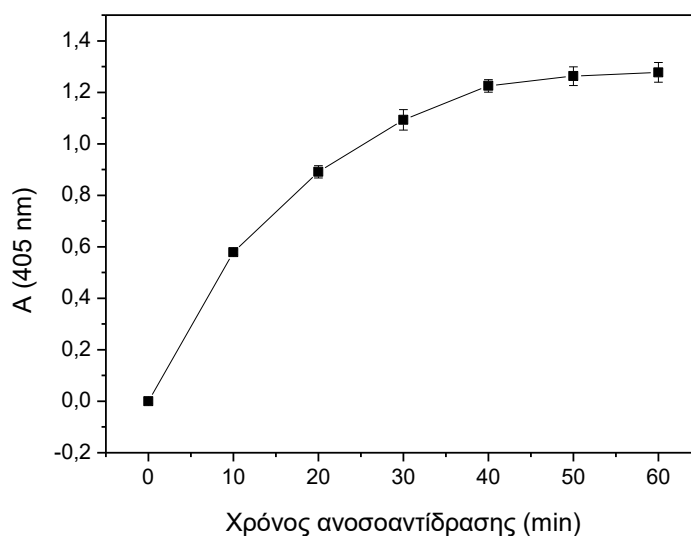


Σχήμα 16: Τιμές οπτικής απορρόφησης στα 405 nm που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα (■), και το πρότυπο διαλύματα κ-καζεΐνης συγκεντρώσεως 0,1 µg/mL (●), για χρόνους ανοσοαντίδρασης: 15, 30, 60 και 120 min. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.

Όπως φαίνεται, η αύξηση του χρόνου ανοσοαντίδρασης από 15 min σε 120 min, οδήγησε σε αύξηση του ειδικού αναλυτικού σήματος που ελήφθη για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα καθώς και για το πρότυπο διάλυμα κ-καζεΐνης συγκεντρώσεως 0,1 µg/mL, ενώ μέγιστες τιμές οροφής ελήφθησαν για χρόνους ανοσοαντίδρασης μεγαλύτερους από 60 min. Η αύξηση του χρόνου ανοσοαντίδρασης από 60 min σε 120 min, δεν παρείχε σημαντική αύξηση στο αναλυτικό σήμα (αύξηση αναλυτικού σήματος < 9%). Επιπλέον, δεν παρατηρηθήκε καμία μεταβολή στην ευαισθησία της ανίχνευσης για τους τέσσερις διαφορετικούς χρόνους της ανοσοαντίδρασης. Επομένως, για τον ενζυμοανοσοχημικό προσδιορισμό της κ-καζεΐνης επιλέχθηκε ως χρόνος ανοσοαντίδρασης τα 60 min.

5.1.5 Χρονική μελέτη αντίδρασης του αντισώματος έναντι των γ-σφαιρινών κουνελιού με το ειδικό αντίσωμα έναντι της κ-καζεΐνης

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στην υποπαράγραφο 5.1.3, ο χρόνος αντίδρασης του αντισώματος έναντι των γ-σφαιρινών κουνελιού (δεύτερο αντίσωμα) με το ειδικό αντίσωμα έναντι της κ-καζεΐνης ήταν 60 min για τις έως τώρα βελτιστοποιήσεις που πραγματοποιήθηκαν στο πλαίσιο της ενζυμοανοσοχημικής μεθόδου για τον προσδιορισμό της κ-καζεΐνης. Ο βέλτιστος χρόνος αντίδρασης του δεύτερου αντισώματος με το ειδικό αντίσωμα μελετήθηκε με κριτήριο την επάρκεια του αναλυτικού σήματος ($OD \geq 1$) του μηδενικού προτύπου διαλύματος. Στο Σχήμα 17 παρουσιάζεται η μεταβολή του ειδικού αναλυτικού σήματος, που ελήφθη για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα κ-καζεΐνης συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης του δεύτερου αντισώματος με το ειδικό αντίσωμα.

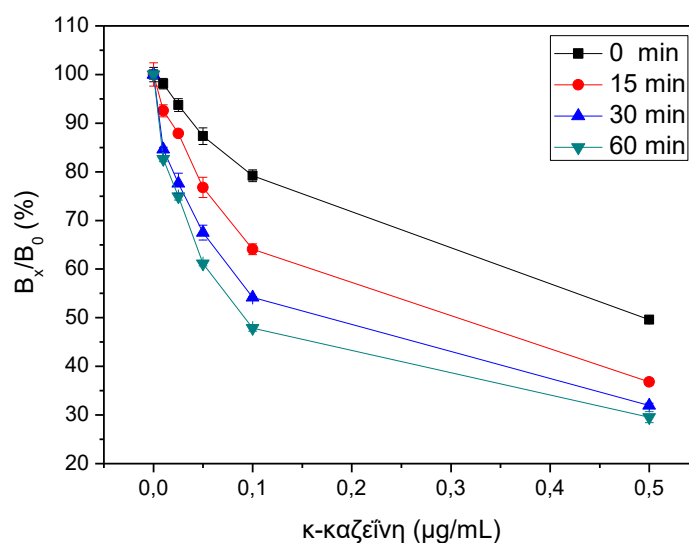


Σχήμα 17: Τιμές οπτικής απορρόφησης στα 405 nm που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης του δεύτερου αντισώματος με το ειδικό αντίσωμα έναντι της κ-καζεΐνης. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm SD$.

Σύμφωνα με το παραπάνω σχήμα, επάρκεια αναλυτικού σήματος ελήφθη για χρόνο αντίδρασης του δευτέρου αντισώματος με το ειδικό αντίσωμα μεγαλύτερο ή ίσο των 30 min, ενώ τιμές οροφής ελήφθησαν για χρόνο αντίδρασης μεγαλύτερο ή ίσο των 40 min (OD: 1,2252). Για τον λόγο αυτό, ως χρόνος αντίδρασης του δευτέρου αντισώματος με το ειδικό αντίσωμα έναντι της κ-καζεΐνης για το τελικό πρωτόκολλο ενζυμοανασοχημικού προσδιορισμού της κ-καζεΐνης, επιλέχθηκε ο χρόνος των 40 min.

5.1.6 Χρονική Μελέτη προεπώασης των προτύπων διαλυμάτων με το πολυκλωνικό αντίσωμα

Μια εξίσου σημαντική παράμετρος προς μελέτη είναι η επίδραση της χρονικής διάρκειας της προεπώασης των προτύπων διαλυμάτων κ-καζεΐνης με το πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της κ-καζεΐνης στην ευαισθησία της μεθόδου. Η ευαισθησία της μεθόδου εκφράζεται από την κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης. Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε ακινητοποίηση κ-καζεΐνης σε συγκέντρωση 0,5μg/mL σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης και παρασκευάστηκαν μίγματα προτύπων διαλυμάτων της κ-καζεΐνης με το διάλυμα του πολυκλωνικού αντισώματος σε τελική αραίωση 1:10000. Μετά τον αποκλεισμό ελεύθερων θέσεων των φρεατίων, προστέθηκαν στα φρεάτια μικροτιτλοδότησης τα μίγματα των προτύπων διαλυμάτων τα οποία είχαν προεπωασθεί για διαφορετικούς χρόνους καθώς και μίγματα αντιστοίχων συγκεντρώσεων, στα οποία δεν είχαν υποστεί καμία προεπώαση. Στο Σχήμα 18 παρουσιάζονται οι τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για τα πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων 0,01, 0,025, 0,05, 0,1 και 0,5 μg/mL, τα οποία είχαν προεπωασθεί με το πολυκλωνικό αντίσωμα για 15 min, για 30 min, για 60 min καθώς και για τα πρότυπα διαλύματα αντιστοίχων συγκεντρώσεων, στα οποία δεν είχε πραγματοποιηθεί καμία προεπώαση.

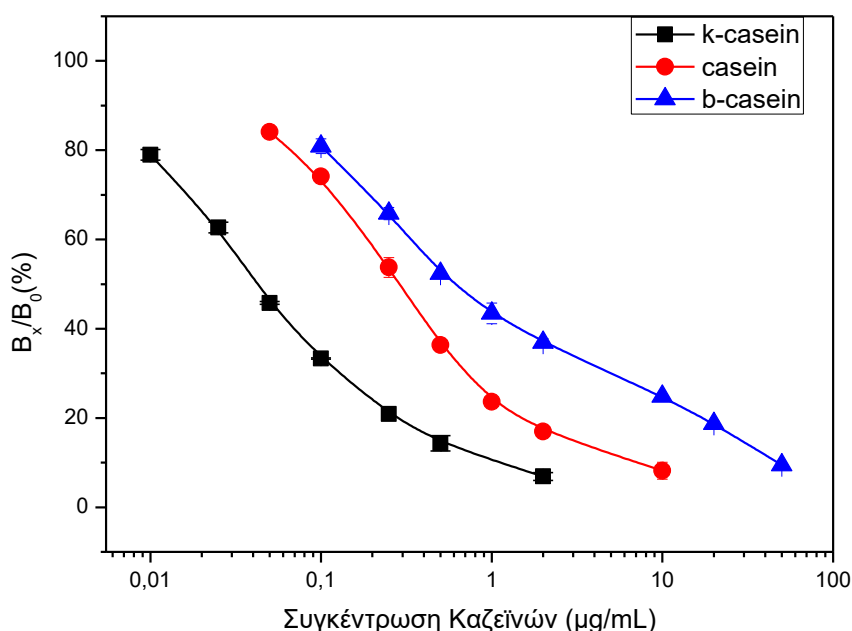


Σχήμα 18: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για τα πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης συγκεντρώσεως 0,01, 0,025, 0,05, 0,1 και 0,5 μg/mL για χρόνους προεπώσεως 0 min, 15 min, 30 min και 60 min : Διάλυμα Α (■) 0 min, Διάλυμα Β (●) 15min, Διάλυμα Γ (▲) 30 min και Διάλυμα Δ (▼) 60min. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων ±SD.

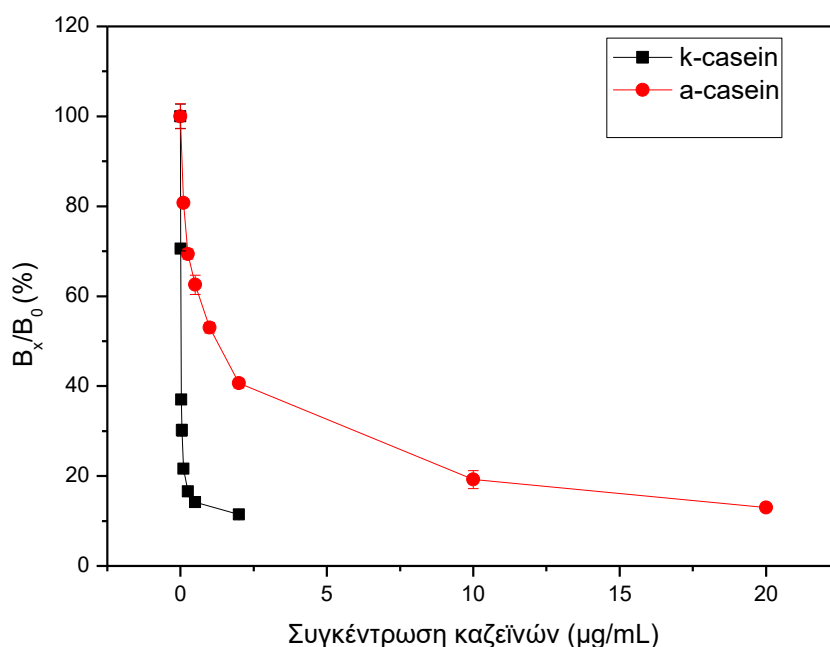
Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, η προεπώαση των προτύπων διαλυμάτων κ-καζεΐνης με το πολυκλωνικό αντίσωμα, βελτίωσε την ευαισθησία της ανίχνευσης. Πιο συγκεκριμένα, η αύξηση του χρόνου προεπώσεως από 0 σε 15 και 30 min, βελτίωνε την ευαισθησία ανίχνευσης κατά 3 και 10 φορές, αντιστοίχως. Αντιθέτως, η αύξηση του χρόνου προεπώσεως από 30 σε 60 min δεν παρείχε περαιτέρω βελτίωση στην ευαισθησία της ανίχνευσης καθώς η επί τοις εκατό ποσοστιαία εκτόπιση που ελήφθη για το πρότυπο διάλυμα συγκεντρώσεως 0,01 μg/mL, ήταν κατά 2% χαμηλότερη όταν ο χρόνος προεπώσεως ήταν 30 min από εκείνη που ελήφθη όταν ο χρόνος προεπώσεως ήταν 60 min. Επομένως ο χρόνος προεπώσεως των 30 λεπτών επιλέχθηκε για το τελικό πρωτόκολλο ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού κ-καζεΐνης σε φρεάτια μικροτιτλόδοτησης.

5.1.7 Έλεγχος ειδικότητας του ενζυμοαναστοχμικού προσδιορισμού κ-καζεΐνης με προσδιορισμό της διασταυρούμενης αντίδρασης ως προς την α-, β- και ολική καζεΐνη (cross reaction)

Προκειμένου να διερευνηθεί η ειδικότητα του πολυκλωνικού αντισώματος ως προς την βόεια κ-καζεΐνη, πραγματοποιήθηκαν πειράματα διασταυρούμενης δραστικότητας έναντι της β-καζεΐνης, της α-καζεΐνης και της ολικής καζεΐνης. Ως εκ τούτου κατασκευάστηκαν καμπύλες βαθμονόμησης και των τριών παραπάνω καζεϊνών καθώς και της κ-καζεΐνης και προσδιορίστηκε το επί τοις εκατό ποσοστό της συγκέντρωσης της κ-καζεΐνης που αντιστοιχεί σε 50% ποσοστιαία εκτόπιση ως προς τη συγκέντρωση της εκάστοτε καζεΐνης (παρεμποδιστής) που αντιστοιχεί σε 50% εκτόπιση. Στο Σχήμα 19 παρουσιάζονται οι τιμές της επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για μηδενικό πρότυπο διάλυμα καθώς και για τα πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης, α-καζεΐνης, β-καζεΐνης και ολικής καζεΐνης.



Σχήμα 19: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για μηδενικό πρότυπο διάλυμα καθώς και για τα πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης (■), ολικής καζεΐνης (●), και β-καζεΐνης (▲). Κάθε τιμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.



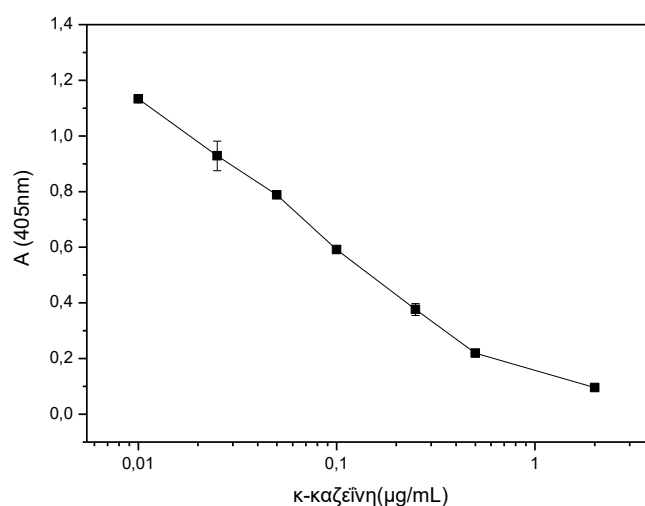
Σχήμα 20: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για μηδενικό πρότυπο διάλυμα καθώς και για τα πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης (■) και α-καζεΐνης (●). Κάθε τιμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.

Προκειμένου να ελεγχθεί η αλληλεπίδραση μεταξύ των καζεϊνών υπολογίστηκαν τα ποσοστά της διασταυρούμενης διαδραστικότητας που ορίζεται ως ο λόγος συγκεντρώσεως του αναλύτη προς την συγκέντρωση του παρεμποδιστή για εκτόπιση κατά 50%. Ως εκ τούτου, υπολογίστηκε ότι η διασταυρούμενη δραστηριότητα της ολικής καζεΐνης ανέρχεται σε ποσοστό 14,8%, της β-καζεΐνης σε ποσοστό 7,18% και της α-καζεΐνης σε ποσοστό 3,7%. Βάσει αυτών των αποτελεσμάτων, η διασταυρούμενη διαδραστικότητα των άλλων καζεϊνών στη μέθοδο που ανπτύχθηκε θεωρείται σχεδόν αμελητέα.

5.1.8 Αναλυτικά χαρακτηριστικά του ενζυμοανασοχημικού προσδιορισμού της κ-καζεΐνης και της ολικής καζεΐνης σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης

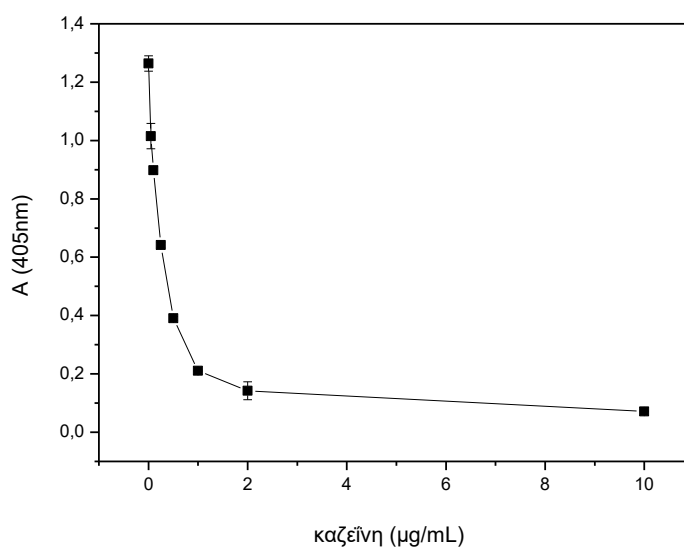
Καμπύλες Βαθμονόμησης:

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα τα οποία προέκυψαν από τις διαφορετικές παραμέτρους οι οποίες βελτιστοποιήθηκαν στο πλαίσιο της ανάπτυξης του ενζυμοανασοχημικού προσδιορισμού της κ-καζεΐνης, προέκυψε το τελικό πρωτόκολλο για την ανίχνευση της κ-καζεΐνης το οποίο περιγράφεται αναλυτικά στην επόμενη υποπαράγραφο. Στο πλαίσιο της ανάπτυξης ενζυμοανασοχημικής αντίδρασης για την ανίχνευση της κ-καζεΐνης αξιολογήθηκε το πολυκλωνικό αντίσωμα και για την ανίχνευση ολικής καζεΐνης. Στα Σχήματα 21 και 22 παρουσιάζονται οι τιμές οπτικής απορρόφησης που ελήφθησαν για τις τυπικές καμπύλες βαθμονόμησης της κ-καζεΐνης και της ολικής καζεΐνης βάσει του τελικού πρωτοκόλλου του ενζυμοανασοχημικού προσδιορισμού, ενώ στα Σχήματα 23 και 24 παρουσιάζονται οι τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για τα πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης και ολικής καζεΐνης.

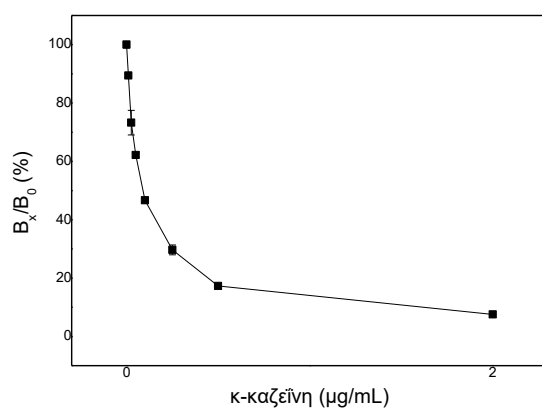


Σχήμα 21: Τιμές οπτικής απορρόφησης που ελήφθησαν για την τυπική καμπύλη βαθμονόμησης της κ-καζεΐνης με το τελικό πρωτόκολλο ενζυμοανασοχημικού

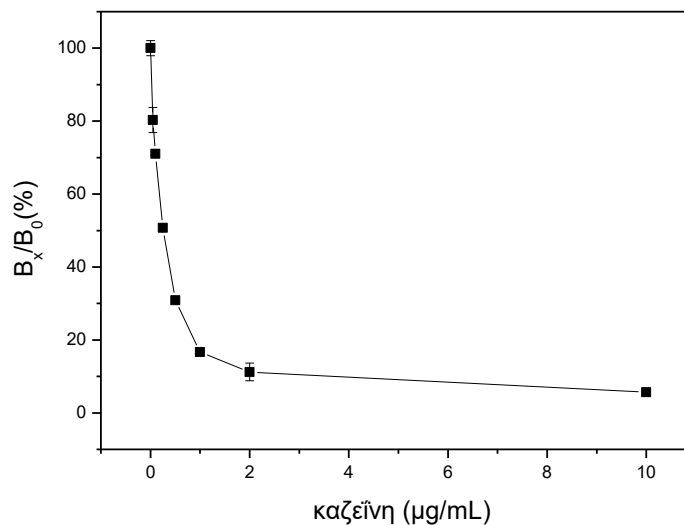
προσδιορισμού. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.



Σχήμα 22 Τιμές οπτικής απορρόφησης που ελήφθησαν για την τυπική καμπύλη βαθμονόμησης της ολικής καζεΐνης με το τελικό πρωτόκολλο ενζυμοανασοχημικού προσδιορισμού. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.



Σχήμα 23 Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για τα πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης με το τελικό πρωτόκολλο ενζυμοανασοχημικού προσδιορισμού. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.



Σχήμα 24 Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για τα πρότυπα διαλύματα ολικής καζεΐνης με το τελικό πρωτόκολλο ενζυμοανασοχημικού προσδιορισμού. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.

Αναλυτικά χαρακτηριστικά:

Το όριο ανίχνευσης (LOD) της κ-καζεΐνης και της ολικής καζεΐνης προσδιορίστηκε ως η συγκέντρωση που αντιστοιχεί σε ποσοστιαία πτώση του αναλυτικού σήματος ίση με $100-3SD$ 24 επαναληπτικών μετρήσεων του αντίστοιχου μηδενικού προτύπου διαλύματος ενώ το όριο ποσοτικοποίησης προσδιορίστηκε ως η συγκέντρωση που αντιστοιχεί σε ποσοστιαία πτώση του αναλυτικού σήματος ίση με $100-6SD$ 24 επαναληπτικών μετρήσεων του μηδενικού προτύπου διαλύματος. Επιπλέον, προσδιορίστηκε το IC50, το οποίο ορίζεται ως η συγκέντρωση της κ-καζεΐνης/ολικής καζεΐνης που αντιστοιχεί σε ποσοστιαία πτώση του αναλυτικού σήματος ίση με 50% ως προς το σήμα του μηδενικού προτύπου διαλύματος. Ακόμα, προσδιορίστηκε η επαναληψιμότητα του ενζυμοανασοχημικού προσδιορισμού η οποία εκφράζεται ως ο συντελεστής διακύμανσης της μέσης τιμής των μετρήσεων (CV%). Για τον σκοπό αυτό, παρασκευάστηκαν τρία δείγματα με προσθήκη τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων της κ-καζεΐνης (0,02 $\mu\text{g/mL}$, 0,08 $\mu\text{g/mL}$

και 0,4 µg/mL) και της ολικής καζεΐνης (0,08 µg/mL, 0,2 µg/mL και 0,8 µg/mL) σε διάλυμα ανοσοαντίδρασης που επιλέχθηκε κατά την βελτιστοποίηση της ενζυμοανοσοχημικής μεθόδου. Πιο συγκεκριμένα, η ενδο-επαναληπτική επαναληψιμότητα προέκυψε από τρεις επαναληπτικές μετρήσεις των δειγμάτων ελέγχου κατά τον ίδιο προσδιορισμό και η διαναλυτική επαναληψιμότητα προέκυψε από μέτρηση των ίδιων δειγμάτων εις διπλούν σε 20 διαφορετικές ημέρες σε διάστημα τριών ημερών. Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται τα αναλυτικά χαρακτηριστικά ολικής και κ-καζεΐνης του ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού.

Πίνακας 3: Αναλυτικά χαρακτηριστικά ολικής καζεΐνης και κ-καζεΐνης ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης

Αναλυτικά Χαρακτηριστικά	Ολικής Καζεΐνης	κ-καζεΐνης
Όριο ανίχνευσης (LOD)	0,017 (ng/mL)	0,0030 (ng/mL)
Όριο ποσοτικοποίησης (LOQ)	0,031 (ng/mL)	0,0064 (ng/mL)
IC ₅₀	0,26 (ng/mL)	0,09 (ng/mL)
Δυναμικό Εύρος (D.R.)	0,05-10 (ng/mL)	0,01-2 (ng/mL)
Ενδο-αναλυτική επαναληψιμότητα (CV %)	1,2-2,5	1,2-2,4
Δι-αναλυτική επαναληψιμότητα (CV %)	1,5-3,6	1,5-3,1

5.2 Ανάπτυξη ενζυμοανοδοχημικού προσδιορισμού ανταγωνιστικού τύπου για την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος και τυριού σε αιγοπρόβριο γάλα και τυρί σε φρεάτια μικροτιλοδότσης

Στο πλαίσιο της ανάπτυξης της ενζυμοανοδοχημικού μεθόδου ανταγωνιστικού τύπου για τον προσδιορισμό αγελαδινού γάλακτος και τυριού σε κασικίσιο γάλα και αιγοπρόβριο τυρί αντίστοιχα, πραγματοποιήθηκε εκ νέου προσδιορισμός του τίτλου του πολυκλωνικού αντισώματος προκειμένου το αναλυτικό σήμα του μηδενικού προτύπου διαλύματος να είναι ικανοποιητικό (τιμές οπτικής απορρόφησης ≥ 1) χωρίς να επηρεάζεται αρνητικά η ευαισθησία της ανίχνευσης.

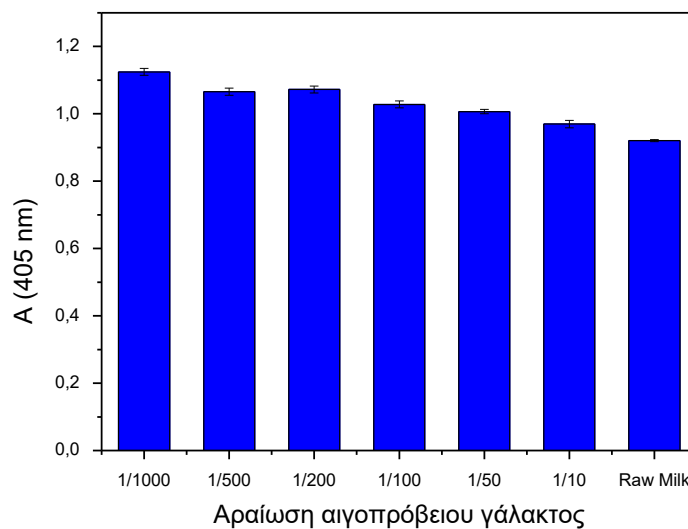
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, όταν χρησιμοποιήθηκε η αραιώση αντιορού 1:5000 ικανοποιητικό αναλυτικό σήμα ελήφθη όταν η αραιώση του αντιορού που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1:3500. Όταν η αραιώση του αντιορού μειώθηκε από 1:5000 σε 1:3500 το αναλυτικό σήμα αυξήθηκε κατά 32% και ήταν επαρκές για την ανάλυση. Επιπλέον χρησιμοποιώντας την αραιώση 1:3500 η ευαισθησία της ανίχνευσης ήταν παρεμφερής συγκριτικά με εκείνη που ελήφθη όταν η αραιώση του αντιορού ήταν 1:5000. Επομένως η αραιώση 1:3500 επιλέχθηκε ως βέλτιστη και θα χρησιμοποιηθεί στο τελικό πρωτόκολλο για την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος καθώς και αγελαδινού τυριού σε κασικίσιο γάλα και αιγοπρόβριο τυρί αντίστοιχα.

Τέλος, στο πλαίσιο των βελτιστοποιήσεων της ενζυμοανοδοχημικής μεθόδου ανταγωνιστικού τύπου μελετήθηκε τόσο η επίδραση της αραιώσης του κασικίσιου γάλακτος καθώς και του αιγοπρόβριο τυριού στο αναλυτικό σήμα και την ευαισθησία της ανίχνευσης.

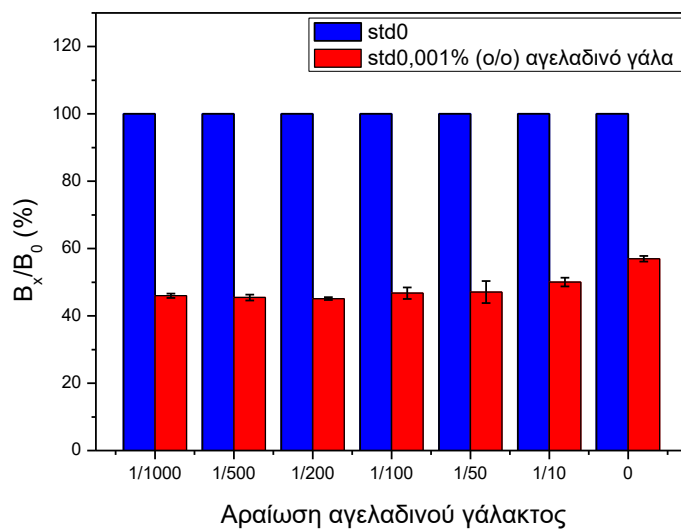
5.2.1 Έλεγχος επίδρασης αραιώσης γάλακτος ως μήτρα στο αναλυτικό σήμα και την ευαισθησία της ανίχνευσης

Για την ανίχνευση της βόειας κ-καζεΐνης σε κατσικίσιο και πρόβειο γάλα, μελετήθηκε τόσο η επίδραση της αραιώσης του δείγματος στο αναλυτικό σήμα όσο και στην ευαισθησία της ανίχνευσης. Για τον σκοπό αυτό, αναλύθηκαν δείγματα κατσικίσιου και πρόβειου γάλακτος με γνωστή προσθήκη αγελαδινού γάλακτος σε διαφορετικές περιπτώσεις αραιώσεων. Πιο συγκεκριμένα, οι αραιώσεις του κατσικίσιου γάλακτος που ελέγχθηκαν, κυμαίνονταν από 0 έως και 1:1000. Επιπλέον, προκειμένου να προσδιοριστεί η επίδραση του γάλακτος στην ευαισθησία της ανίχνευσης, παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα κατσικίσιου γάλακτος τα οποία μετά από κάθε αραιώση είχαν τελική περιεκτικότητα 0,001% (ο/ο) σε αγελαδινό γάλα. Στο Σχήμα 25 παρουσιάζονται οι τιμές οπτικής απορρόφησης του μηδενικού προτύπου διαλύματος που ελήφθησαν για αραιώσεις κατσικίσιου γάλακτος από 0 έως 1:1000, ενώ στο Σχήμα 26 παρουσιάζονται οι τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα και για τα πρότυπα διαλύματα, τα οποία μετά από κάθε αραιώση είχαν τελική περιεκτικότητα 0,001% σε αγελαδινό γάλα.

Βάσει των αποτελεσμάτων από τις τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν από το σχήμα, δεν παρατηρήθηκε σημαντική επίδραση της αραιώσης του κατσικίσιου γάλακτος στο αναλυτικό σήμα σχεδόν για ολόκληρο το εύρος των αραιώσεων, ενώ παρατηρήθηκε μικρή πτώση του αναλυτικού σήματος όταν το κατσικίσιο γάλα που χρησιμοποιήθηκε δεν είχε αραιωθεί (πυκνό γάλα) με αποτέλεσμα σε αραιώση μικρότερη από την 1:10 να επηρεάζεται αρνητικά η ευαισθησία της ανίχνευσης. Επομένως, για το τελικό πρωτόκολλο υιοθετήθηκε η αραιώση των προτύπων διαλυμάτων αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο 1:50, προκειμένου να εξασφαλιστεί ικανοποιητική ευαισθησία ανίχνευσης της νοθείας και το δυναμικό εύρος της πρότυπης καμπύλης να περιλαμβάνει το όριο συγκεντρώσεως, πάνω από το οποίο η προσθήκη αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο θεωρείται νοθεία.



Σχήμα 25: Τιμές οπτικής απορρόφησης στα 405nm του μηδενικού προτύπου διαλύματος που ελήφθησαν για αραιώσεις κατσικίσιου γάλακτος από 0 έως 1:1000. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.



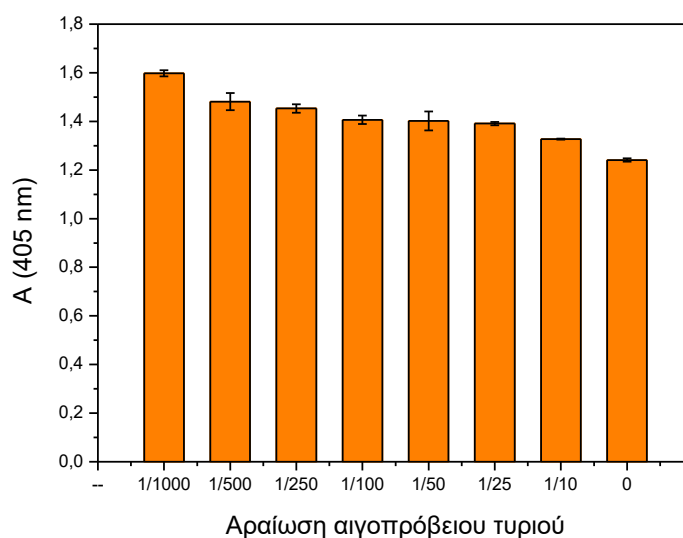
Σχήμα 26: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα κατσικίσιου γάλακτος και για τα πρότυπα διαλύματα κατσικίσιου γάλακτος, τα οποία μετά από κάθε αραιώση είχαν τελική περιεκτικότητα 0,001% σε αγελαδινό γάλα.

5.2.2 Έλεγχος επίδρασης αραίωσης τυριού ως μήτρα στο αναλυτικό σήμα και την ευαισθησία της ανίχνευσης

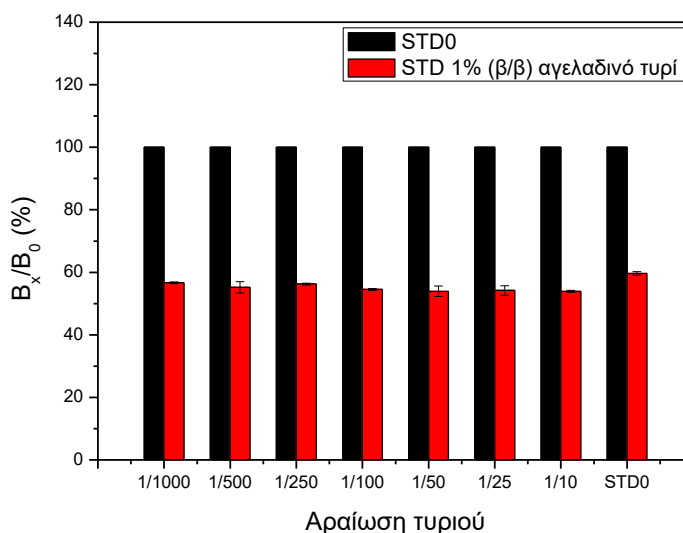
Για την ανίχνευση της νοθείας αιγοπρόβειου τυριού με αγελαδινό τυρί, μελετήθηκε όπως και στην υποπαράγραφο 5.2.1 τόσο η επίδραση της αραίωσης του δείγματος στο αναλυτικό σήμα όσο και στην ευαισθησία της ανίχνευσης. Για τον λόγο αυτό, παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν δείγματα αιγοπρόβειου τυριού, τα οποία περιείχαν γνωστή προσθήκη αγελαδινού τυριού σε διαφορετικές περιπτώσεις αραιώσεων οι οποίες κυμαίνονταν από μηδενική αραίωση έως και 1000 φορές αραίωση του δείγματος. Επιπρόσθετα, προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση του τυριού ως μήτρα στην ευαισθησία της ανίχνευσης, παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα αιγοπρόβειου τυριού, τα οποία μετά από κάθε αραίωση είχαν τελική περιεκτικότητα 0,02% (β/β) σε αγελαδινό τυρί. Στο Σχήμα 27 παρουσιάζονται οι τιμές οπτικής απορρόφησης του μηδενικού προτύπου διαλύματος που ελήφθησαν για αραιώσεις αιγοπρόβειου τυριού από 0 έως 1:1000, ενώ στο Σχήμα 28 παρουσιάζονται οι τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα και για τα πρότυπα διαλύματα, τα οποία μετά από κάθε αραίωση είχαν τελική περιεκτικότητα 0,02% σε αγελαδινό τυρί.

Βάσει των αποτελεσμάτων από τις τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν από το σχήμα, παρατηρήθηκε μικρή αύξηση του αναλυτικού σήματος όταν η αραίωση του αιγοπρόβειου τυριού ήταν 1:1000, ενώ για το εύρος των αραιώσεων που κυμαινόταν από 1:25 έως 1:500, το αναλυτικό σήμα το οποίο ελήφθη ήταν παρεμφερές. Επιπλέον, παρατηρήθηκε πτώση του αναλυτικού σήματος για αραιώσεις μικρότερες ή ίσες από 1:10. Όσον αφορά στην ευαισθησία της ανίχνευσης δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά των επί τοις εκατό ποσοστιαίων εκτοπίσεων που ελήφθησαν για το πρότυπο διάλυμα αιγοπρόβειου τυριού το οποίο περιείχε 0,02% αγελαδινό τυρί για το εύρος αραιώσεων που κυμαινόταν από 1:10 έως 1:1000. Αντιθέτως, στην περίπτωση της μηδενικής αραίωσης (πυκνός ορός τυριού) παρατηρήθηκε ασθενής πτώση του αναλυτικού σήματος συγκριτικά με εκείνο το οποίο ελήφθη για τις υπόλοιπες αραιώσεις. Επομένως, για το τελικό

πρωτόκολλο υιοθετήθηκε η αραιώση των προτύπων διαλυμάτων αγελαδινού τυριού σε αιγοπρόβειο τυρί 1:50, προκειμένου να εξασφαλιστεί ικανοποιητική ευαισθησία ανίχνευσης της νοθείας και το δυναμικό εύρος της πρότυπης καμπύλης να περιλαμβάνει το όριο συγκεντρώσεως 1% (β/β), πάνω από το οποίο η προσθήκη αγελαδινού τυριού σε αιγοπρόβειο τυρί θεωρείται νοθεία.



Σχήμα 27: Τιμές οπτικής απορρόφησης στα 405nm του μηδενικού προτύπου διαλύματος που ελήφθησαν για αραιώσεις αιγοπρόβειου τυριού από 0 έως 1:1000. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.

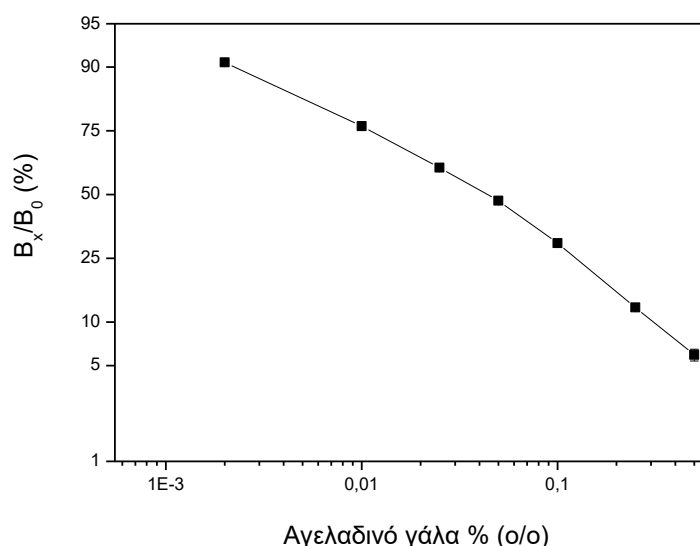


Σχήμα 28: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα αιγοπρόβειου τυριού και για τα πρότυπα διαλύματα αιγοπρόβειου τυριού, τα οποία μετά από κάθε αραιώση είχαν τελική περιεκτικότητα 0,02% σε αγελαδινό τυρί.

5.3 Αναλυτικά χαρακτηριστικά ανοσοενζυμικού προσδιορισμού ανταγωνιστικού τύπου του αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο γάλα και τυρί σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης

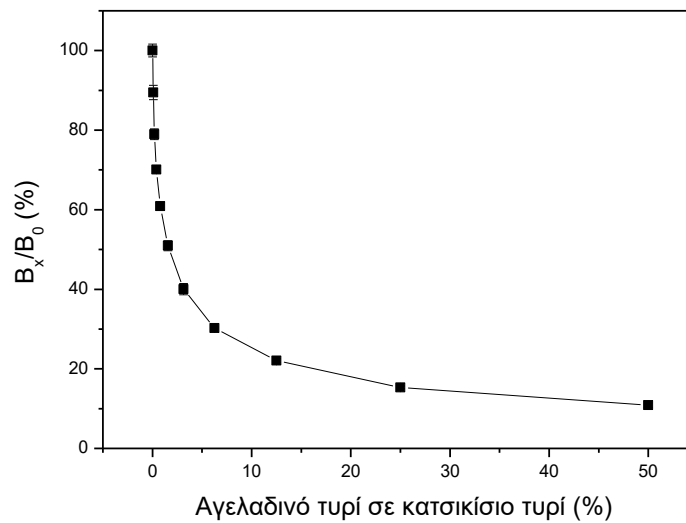
Καμπύλες Βαθμονόμησης:

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα τα οποία προέκυψαν από τις διαφορετικές παραμέτρους οι οποίες βελτιστοποιήθηκαν στο πλαίσιο της ανάπτυξης του ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού του αγελαδινού γάλακτος/τυριού σε κατσικίσιο γάλα/τυρί, προέκυψε το τελικό πρωτόκολλο βάσει του οποίου ελήφθησαν οι τυπικές καμπύλες βαθμονόμησης αγελαδινού γάλακτος σε αιγοπρόβειο γάλα και τυρί. Στα Σχήματα 29 και 30 παρουσιάζονται οι τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν .



Σχήμα 29: Τυπική καμπύλη βαθμονόμησης αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο γάλα που ελήφθη με το τελικό πρωτόκολλο ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού

ανταγωνιστικού τύπου. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.



Σχήμα 30: Τυπική καμπύλη βαθμονόμησης αγελαδινού τυριού σε κατσικίσιο τυρί που ελήφθη με το τελικό πρωτόκολλο ενζυμοανοδοχημικού προσδιορισμού ανταγωνιστικού τύπου. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm$ SD.

Αναλυτικά χαρακτηριστικά:

Στους Πίνακες 4 και 5 παρουσιάζονται τα αναλυτικά χαρακτηριστικά του ενζυμοανοδοχημικού προσδιορισμού του αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο γάλα και σε τυρί αντίστοιχα, τα οποία προσδιορίστηκαν όπως προαναφέρθηκε στο προηγούμενο εδάφιο.

Πίνακας 4: Αναλυτικά χαρακτηριστικά ενζυμοανασοχημικού προσδιορισμού ανταγωνιστικού τύπου του αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο γάλα

Αναλυτικά Χαρακτηριστικά	Τιμές (αγελαδινό γάλα %, ο/ο)
Όριο ανίχνευσης (LOD)	0,0183
Όριο ποσοτικοποίησης (LOQ)	0,045
IC ₅₀	0,05
Δυναμικό Εύρος (D.R.)	0,001-0,5
Ενδο-αναλυτική επαναληψιμότητα (CV %)	0,9-2,0
Δι-αναλυτική επαναληψιμότητα (CV %)	1,3-2,5

Πίνακας 5: Αναλυτικά χαρακτηριστικά ενζυμοανασοχημικού προσδιορισμού ανταγωνιστικού τύπου του αγελαδινού τυριού σε κατσικίσιο τυρί

Αναλυτικά Χαρακτηριστικά	Τιμές (αγελαδινό τυρί %, ο/ο)
Όριο ανίχνευσης (LOD)	0,045 %
Όριο ποσοτικοποίησης (LOQ)	0,09 %
IC ₅₀	1,66
Δυναμικό Εύρος (D.R.)	0,001-50%
Ενδο-αναλυτική επαναληψιμότητα (CV %)	0,9-1,8
Δι-αναλυτική επαναληψιμότητα (CV %)	1,0-1,95

Για την αξιολόγηση της ακρίβειας της αναπτυχθείσας μεθόδου ενζυμοανασοχημικού προσδιορισμού ανταγωνιστικού τύπου πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανάκτησης. Για την ανάκτηση χρησιμοποιήθηκαν δείγματα φρέσκου κατσικίσιου γάλακτος από φάρμες της Αττικής στα οποία προστέθηκε φρέσκο αγελαδινό γάλα σε συγκεντρώσεις 0,4, 0,2, 0,08 και 0,04% και αναλύθηκαν με ενζυμοανασοχημικό προσδιορισμό ανταγωνιστικού τύπου τόσο πριν όσο και μετά την προσθήκη αγελαδινού γάλακτος. Σε κανένα από τα δείγματα κατσικίσιου γάλακτος δεν ανιχνεύτηκε αγελαδινό γάλα σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από το όριο ανίχνευσης. Στον Πίνακα 6 παρουσιάζεται η μέση τιμή της περιεκτικότητας που προσδιορίστηκε μετά την προσθήκη αγελαδινού γάλακτος. Στον Πίνακα 6 παρουσιάζεται το ποσοστό επί τοις εκατό ανάκτησης του αγελαδινού γάλακτος μετά την προσθήκη γνωστών συγκεντρώσεων.

Πίνακας 6: Επί τοις εκατό ανάκτηση αγελαδινού γάλακτος μετά από προσθήκη γνωστών συγκεντρώσεων σε φρέσκο κατσικίσιο γάλα

Προσθεθείσα περιεκτικότητα αγελαδινού γάλακτος (%)	Προσδιορισθείσα περιεκτικότητα αγελαδινού γάλακτος (%)	Ανάκτηση (%)
0	<LOD	-
0,4	0,38±0,0079	95
0,2	0,198±0,027	99
0,08	0,082±0,13	101
0,04	0,056±0,36	107

Αντίστοιχα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανάκτησης και για τα δείγματα του τυριού. Για την ανάκτηση χρησιμοποιήθηκαν δείγματα κατσικίσιου τυριού

στα οποία προστέθηκε αγελαδινού τυριού σε συγκεντρώσεις 0,5, 1, 5 και 20% και αναλύθηκαν με ενζυμοαναστοχημικό προσδιορισμό ανταγωνιστικού τύπου τόσο πριν όσο και μετά την προσθήκη αγελαδινού τυριού. Στον Πίνακα 7 παρουσιάζεται η μέση τιμή της περιεκτικότητας που προσδιορίστηκε μετά την προσθήκη αγελαδινού τυριού.

Πίνακας 7: Επί τοις εκατό ανάκτηση αγελαδινού τυριού μετά από προσθήκη γνωστών συγκεντρώσεων σε κατσικίσιο τυρί

Προσθεθείσα περιεκτικότητα αγελαδινού τυριού (%)	Προσδιορισθείσα περιεκτικότητα αγελαδινού τυριού (%)	Ανάκτηση (%)
0	<LOD	-
0,5	0,48±0,003	96
1	1,143±0,019	114
5	4,897±0,13	98
20	19,4±0,36	97

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Με στόχο την προστασία των καταναλωτών, η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει ορίσει κατευθυντήριες οδηγίες προκειμένου να ελέγχεται και να αποφεύγεται η νοθεία γαλακτοκομικών προϊόντων με γάλα διαφορετικής ζωικής προέλευσης. Για τον λόγο αυτό έχει αναπτυχθεί και προτείνεται μεγάλος αριθμός μεθόδων για τον προσδιορισμό της νοθείας στη διεθνή βιβλιογραφία. Οι μέθοδοι αυτές βασίζονται κυρίως σε ηλεκτροφορητικές, χρωματογραφικές, ανοσοχημικές τεχνικές καθώς και σε τεχνικές ανίχνευσης DNA. Ωστόσο, παρά την ύπαρξη ποικιλίας μεθόδων, η μελέτη της πρόσφατης βιβλιογραφίας, καταδεικνύει την ανάγκη ανάπτυξης νέων, ταχείων, ευαίσθητων και χαμηλού κόστους μεθόδων που θα βοηθούσαν τον έλεγχο μεγάλου αριθμού δειγμάτων, με συνεπακόλουθο την αυξημένη προστασία των καταναλωτών.

Στα πλαίσια αυτά, σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η ανάπτυξη ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού για τον προσδιορισμό βοείου κ-καζεΐνης, με χρήση πολυκλωνικού αντισώματος κουνελιού (αντιορός), το οποίο αναπτύχθηκε στο Εργαστήριο ως προς αυτή την πρωτεΐνη, η αξιολόγηση των αναλυτικών χαρακτηριστικών του και ο έλεγχος της δυνατότητας της μεθόδου να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό νοθείας αιγοπρόβειου γάλακτος και τυριού με αγελαδινό. Στο πρώτο μέρος της εργασίας πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη ανοσοχημικού προσδιορισμού της βόειας κ-καζεΐνης σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης, με στόχο την αξιολόγηση των διαθέσιμων αντιδραστηρίων και την καταρχήν επιλογή των βέλτιστων συνθηκών ανάλυσης. Στη συνέχεια, ακολούθησε η ανάπτυξη των τελικών πρωτοκόλλων της μεθόδου για γάλα και τυρί και η ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Για την επίτευξη αυτού του στόχου βελτιστοποιήθηκαν όλες οι επιμέρους παράμετροι της μεθόδου όπως :

- η συγκέντρωση του διαλύματος κ-καζεΐνης για ακινητοποίηση

- η συγκέντρωση του ειδικού αντισώματος έναντι της κ-καζεΐνης
- η σύνθεση των ρυθμιστικών διαλυμάτων του ενζυμοαναστοχμικού προσδιορισμού
- ο χρόνος της ανοσοαντίδρασης του ειδικού αντισώματος έναντι της κ-καζεΐνης
- ο χρόνος της αντίδρασης αντισώματος έναντι των γ-σφαιρινών κουνελιού με την ακινητοποιημένη στα φρεάτια κ-καζεΐνη
- ο χρόνος της προεπώασης των προτύπων διαλυμάτων με το ειδικό πολυκλωνικό αντίσωμα
- η ειδικότητα του ενζυμοαναστοχμικού προσδιορισμού κ-καζεΐνης έναντι της α-, β- και ολικής καζεΐνης (cross reaction).

Η βελτιστοποίηση πραγματοποιήθηκε λαμβάνοντας ως κριτήρια την επάρκεια του αναλυτικού σήματος, την ευαισθησία ανίχνευσης του προσδιορισμού και την επαναληψιμότητα των μετρήσεων.

Οι κυριότερες παράμετροι που επηρεάζουν το απόλυτο σήμα και την ευαισθησία ανίχνευσης είναι η συγκέντρωση του αντιγόνου για ακινητοποίηση στα φρεάτια μικροτιτλοδότησης καθώς και η συγκέντρωση του ειδικού αντισώματος. Για το σκοπό αυτό, ελέγχθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις κ-καζεΐνης για ακινητοποίηση στα φρεάτια σε συνδυασμό με διαφορετικές αραιώσεις του ειδικού αντισώματος έναντι της κ-καζεΐνης.

Για την επιλογή της βέλτιστης συγκέντρωσης της κ-καζεΐνης για ακινητοποίηση σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης καθώς και της αραιώσης του ειδικού αντιορού έναντι της κ-καζεΐνης οι συγκεντρώσεις της κ-καζεΐνης που χρησιμοποιήθηκαν για ακινητοποίηση στα φρεάτια μικροτιτλοδότησης ήταν 0,5-10 $\mu\text{g/mL}$, ενώ οι αραιώσεις του ειδικού αντισώματος κυμαίνονταν από 1:10000 έως 1:2500. Βρέθηκε ότι ικανοποιητικό αναλυτικό σήμα ($\text{OD} \geq 1$) ελήφθη για αραιώσεις του πολυκλωνικού αντισώματος $\leq 1:5000$ και για συγκεντρώσεις κ-καζεΐνης για ακινητοποίηση από 0.5 έως 2 $\mu\text{g/mL}$ ενώ για υψηλότερες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκε πτώση του αναλυτικού σήματος.

Επιπλέον, βρέθηκε ότι η υψηλότερη ευαισθησία ανίχνευσης επιτεύχθηκε όταν η συγκέντρωση της κ-καζεΐνης για ακινητοποίηση ήταν 0,5 $\mu\text{g/mL}$. Βάσει αυτών των αποτελεσμάτων επιλέχθηκε η 1:5000 αραίωση του πολυκλωνικού αντισώματος σε συνδυασμό με 0,5 $\mu\text{g/mL}$ κ-καζεΐνης για ακινητοποίηση στα φρεάτια μικροτιτλοδότησης για την περαιτέρω μελέτη.

Από την διαδικασία βελτιστοποίησης των ρυθμιστικών διαλυμάτων, βρέθηκε ότι τα καλύτερα αποτελέσματα ελήφθησαν όταν ως διάλυμα ακινητοποίησης χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών/όξινων ανθρακικών 50 mM, pH 9,2, ως διάλυμα αποκλεισμού ελευθέρων θέσεων χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα όξινων ανθρακικών 100 mM, pH 8,5, 1% BSA (β/α), ως ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM, 0,9% NaCl (β/α) που περιείχε 0,05% (α/α) Tween 20 για την έκπλυση των φρεατίων μικροτιτλοδότησης ενώ ως διάλυμα ανοσοαντίδρασης χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM που περιείχε 0,9% NaCl (β/α), 0,05% Tween 20 (α/α) και 0,5% (β/α) BSA.

Ως προς την χρονική διάρκεια της ανοσοαντίδρασης, βρέθηκε ότι μέγιστες τιμές οροφής ελήφθησαν για χρόνους ανοσοαντίδρασης μεγαλύτερους από 60 min, ενώ περαιτέρω αύξηση του χρόνου έως 120 min, δεν παρείχε σημαντική αύξηση στο αναλυτικό σήμα (αύξηση αναλυτικού σήματος < 9%), ενώ η ευαισθησία της ανίχνευσης δεν βρέθηκε να επηρεάζεται από τον χρόνο της ανοσοαντίδρασης. Επομένως, για τον ενζυμοανοσοχημικό προσδιορισμό της κ-καζεΐνης επιλέχθηκε ως χρόνος ανοσοαντίδρασης τα 60 min.

Από την άλλη πλευρά, ως προς τον χρόνο αντίδρασης του αντισώματος έναντι των γ -σφαιρινών κουνελιού με το ειδικό αντίσωμα έναντι της κ-καζεΐνης, τιμές αναλυτικού σήματος οροφής επιτευχθήκαν για χρόνους αντίδρασης ≥ 40 min. Ωστόσο επάρκεια σήματος ($\text{OD} \geq 1$), ελήφθη για χρόνους αντίδρασης 30 min. Βάσει αυτών και με στόχο την μείωση του χρόνου της ανάλυσης, για το τελικό πρωτόκολλο υιοθετήθηκαν τα 30 min ως χρόνος αντίδρασης του αντισώματος έναντι των γ -σφαιρινών κουνελιού με το ειδικό αντίσωμα έναντι της κ-καζεΐνης.

Μια σημαντική παράμετρος που μελετήθηκε και επηρέασε σημαντικά της ευαισθησία ανίχνευσης της μεθόδου, ήταν ο χρόνος προεπώασης του ειδικού αντισώματος έναντι της κ-καζεΐνης με τα πρότυπα διαλύματα/ ή και τα δείγματα πριν την προσθήκη τους στα φρεάτια μικροτιπλοδότησης. Οι χρόνοι προεπώασης που μελετήθηκαν ήταν από 0 έως 60 min. Βρέθηκε ότι με διάρκεια προεπώασης 30 min η ευαισθησία της ανίχνευσης αυξανόταν 10 φορές σε σύγκριση με εκείνην που επιτυγχανόταν χωρίς προεπώαση, ενώ αύξηση του χρόνου προεπώασης σε 1 h δεν παρείχε περαιτέρω βελτίωση της ευαισθησίας ανίχνευσης. Επομένως στο τελικό πρωτόκολλο περιλήφθηκε στάδιο προεπώασης 30 min.

Ο έλεγχος της ειδικότητας του προσδιορισμού πραγματοποιήθηκε μέσω πειραμάτων διασταυρούμενης δραστηριότητας έναντι της α-, της β- και της ολικής βοείου καζεΐνης. Βρέθηκε ότι η διασταυρούμενη δραστηριότητα της β-καζεΐνης ήταν 7,18% ενώ της α-καζεΐνης 3,7%. Από την άλλη πλευρά η διασταυρούμενη δραστηριότητα της ολικής καζεΐνης ήταν 14,8%. Λαμβάνοντας υπ όψιν ότι το ποσοστό της κ-καζεΐνης στην ολική ανέρχεται περίπου σε 15%, το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ότι ουσιαστικά δεν υπάρχει επίδραση των άλλων επιμέρους καζεϊνών στην ανάλυση. Τα μικρά ποσοστά διασταυρούμενης αντίδρασης που παρατηρήθηκαν με την α- και β-καζεΐνη απουσία κ-καζεΐνης είναι δυνατόν να ελαχιστοποιούνται παρουσία κ-καζεΐνης (όπως συμβαίνει στην περίπτωση της ολικής) λόγω σημαντικά υψηλότερης σταθεράς συγγενείας του αναπτυχθέντος αντισώματος ως προς την κ-καζεΐνη έναντι των άλλων δύο καζεϊνών.

Χρησιμοποιώντας τις βέλτιστες συνθήκες της μεθόδου προσδιορίστηκαν τα αναλυτικά της χαρακτηριστικά με χρήση προτύπων διαλυμάτων κ-καζεΐνης και ολικής καζεΐνης σε διάλυμα ανοσοαντίδρασης. Βρέθηκε ότι το όριο ανίχνευσης της ολικής καζεΐνης ήταν 0,017 ng/mL ενώ της κ-καζεΐνης 0,0030 ng/mL και αντίστοιχα το όριο ποσοτικοποίησης προσδιορίστηκε 0,031 ng/mL για την ολική καζεΐνη και 0,0064 ng/mL για την κ-καζεΐνη. Η περιοχή εργασίας κυμαινόταν από 0,05-10 ng/mL για την ολική καζεΐνη ενώ για την κ-καζεΐνη από 0,01 έως 2 ng/mL. Η ενδο και δι- αναλυτική επαναληψιμότητα της μεθόδου ήταν μικρότερη από 2,5 και 3,6 αντίστοιχα.

Για τον προσδιορισμό του ποσοστού νοθείας αιγοπρόβειου γάλακτος με αγελαδινό γάλα, η σημαντικότερη παράμετρος που μελετήθηκε από το σύνολο των βελτιστοποιήσεων, ήταν η επίδραση της μήτρας του δείγματος τόσο ως προς το αναλυτικό σήμα όσο και ως προς τα αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου. Βρέθηκε ότι και τα δύο είδη μήτρας ακόμη και σε αραιώσεις μέχρι 1000 φορές, μείωναν το αναλυτικό σήμα κατά τουλάχιστον 25%. Για τον λόγο αυτό, επαναπροσδιορίστηκε η αραιώση του ειδικού κατά της κ-καζεΐνης αντισώματος, ώστε να επιτευχθεί επάρκεια αναλυτικού σήματος. Βρέθηκε ότι όταν η αραιώση του αντισώματος που χρησιμοποιείται στην ανάλυση ήταν 1:3500 και για 50 φορές αραιωμένο γάλα ή τυρόγαλου το αναλυτικό σήμα ήταν πρακτικά ίδιο με αυτό που λαμβάνεται όταν τα πρότυπα διαλύματα ήταν σε ρυθμιστικό διάλυμα ανοσοαντίδρασης. Επιπλέον, από την μελέτη της επίδρασης της αραιώσης του γάλακτος ή τυρόγαλου στην ευαισθησία της μεθόδου, διαπιστώθηκε ότι όταν η αραιώση που θα χρησιμοποιηθεί είναι ≥ 10 φορές, η ευαισθησία της ανίχνευσης είναι ίδια με εκείνη που επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας πρότυπα διαλύματα παρασκευασμένα σε ρυθμιστικό διάλυμα ανοσοαντίδρασης.

Επομένως, για το τελικό πρωτόκολλο υιοθετήθηκε η αραιώση των προτύπων διαλυμάτων αγελαδινού τυριού σε αιγοπρόβειο τυρί 1:50, προκειμένου να εξασφαλιστεί ικανοποιητική ευαισθησία ανίχνευσης της νοθείας και το δυναμικό εύρος της πρότυπης καμπύλης να περιλαμβάνει το όριο συγκεντρώσεως 1% (β/β), πάνω από το οποίο η πρόσμιξη θεωρείται νοθεία.

Για τον προσδιορισμό της νοθείας αγελαδινού γάλακτος/τυριού σε κατσικίσιο γάλα/τυρί, παρασκευάστηκαν δείγματα αντιστοίχως και προσδιορίστηκαν τα αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου. Ο ενζυμοανοσοχημικός προσδιορισμός αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο γάλα είχε όριο ανίχνευσης 0,0183 % και όριο ποσοτικοποίησης 0,045% ενώ ο ενζυμοανοσοχημικός προσδιορισμός αγελαδινού τυριού σε κατσικίσιο τυρί είχε όριο ανίχνευσης 0,045% και όριο ποσοτικοποίησης 0,09% αντίστοιχα. Το δυναμικό εύρος κυμαινόταν από 0,001 έως 0,5 για την ανίχνευση νοθείας στο κατσικίσιο γάλα ενώ στο τυρί κυμαινόταν από 0,1 έως 50%. Η ενδοαναλυτική επαναληψιμότητα της μεθόδου ήταν μικρότερη του 2% τόσο στο γάλα όσο και

στο τυρί ενώ η διαναλυτική επαναληψιμότητα ήταν χαμηλότερη από 2,5%. Όπως παρατηρείται, βάσει των αναλυτικών χαρακτηριστικών, η περιοχή εργασίας διαφοροποιείται μεταξύ γάλακτος και τυριού, κάτι που θεωρείται αναμενόμενο, καθώς το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε στα πλαίσια της ανοσοανάλυσης ήταν πολυκλωνικό και είχε αναπτυχθεί έναντι της κ-καζεΐνης. Επομένως, μέρος μόνο του πληθυσμού των διαφορετικών κλώνων αναγνωρίζει το καζεΐνομακροπεπτίδιο που βρίσκεται στον ορό του γάλακτος μετά την πήξη ενώ μεγάλο μέρος του πληθυσμού δεν είναι δυνατόν να συμμετέχει στον ανταγωνισμό.

Οι μέθοδοι που αναπτύχθηκαν τόσο για τον προσδιορισμό νοθείας αιγοπρόβειου γάλακτος με αγελαδινό όσο και του τυριού ήταν ακριβείς όπως διαπιστώθηκε μέσω πειραμάτων ανάκτησης (95-114%). Σε σύγκριση με άλλους ενζυμοανοσοπροσδιορισμούς που προτείνονται στη βιβλιογραφία, η αναπτυχθείσα μέθοδος είτε εμφανίζει υψηλότερη ευαισθησία [63, 64] είτε εφάμιλλη [62].

Συμπερασματικά, η μέθοδος που αναπτύχθηκε ήταν ταχεία, ευαίσθητη και ακριβής, με όρια ανίχνευσης εφάμιλλα ή χαμηλότερα των εμπορικά διαθέσιμων μεθόδων που χρησιμοποιούνται από τις βιομηχανίες. Τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου που αναπτύχθηκε τόσο για το γάλα όσο και για το τυρί ήταν χαμηλότερα του 1% που έχει τεθεί ως όριο από την Ευρωπαϊκή Νομοθεσία ως προς τον έλεγχο της νοθείας και του ποσοστού πρόσμιξης, ως εκ τούτου θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως μια αξιόπιστη μέθοδος ελέγχου από τις βιομηχανίες παραγωγής γαλακτοκομικών προϊόντων για τον έλεγχο και την ανίχνευση νοθείας κατσικίσιου γάλακτος και τυριού με αγελαδινό γάλα.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
Polymerase Chain Reaction	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
Dot Immunoblotting	Ανοσοαποτύπωση κηλίδων
Bovine Serum Albumin	Αλβουμίνη ορού βοός
Liquid Chromatography	Υγρή Χρωματογραφία
Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography	Χρωματογραφία αντίστροφης φάσης υψηλής απόδοσης
Limit of detection	Όριο ανίχνευσης
Dipstick Tests	Δοκιμασία εμβάπτισης

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

IgG	Ανοσοσφαιρίνες Γ
BSA	Bovine Serum Albumin
GMP	Καζεΐνομακροπεπτίδιο
SDS-PAGE	Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου παρουσία δωδεκυλοθειϊκού νατρίου
PCR	Polymerase Chain Reaction
DNA	Δεοξυριβονουκλεϊκό Οξύ
LC	Liquid Chromatography
Ab	Αντίσωμα
Ag	Αντιγόνο
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ESI	Electrospray Ionization
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
LOD	Limit of Detection
LOQ	Όριο ποσοτικοποίησης
CV	Συντελεστής Διακύμανσης
SD	Τυπική Απόκλιση
ABTS	2,2-αζινο-δις-(3-αιθυλοβενζοθειαζολινο-6-)σουλφονικό οξύ
HRP	Υπεροξειδάση της ραπτανίδος
PBS	Phosphate buffer Solution

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. P.C. Pereira, Milk nutritional composition and its role in human health, *Nutrition*, 2014, 30(6), 619-27.
2. C. Martin, P.-R. Ling & G. Blackburn, Review of Infant Feeding: Key Features of Breast Milk and Infant Formula, *Nutrients*, 2016, 8(5), 279.
3. T. K. Thorning, A. Raben, T. Tholstrup, S. S Soedamah-Muthu, I. Givens, & A. Astrup, Milk and dairy products: good or bad for human health, An assessment of the totality of scientific evidence, *Food & Nutrition Research*, 2016, 60(1), 32527.
4. J. Barłowska, M. Sz wajkowska, Z. Litwińczuk, & J. Król, Nutritional Value and Technological Suitability of Milk from Various Animal Species Used for Dairy Production. Comprehensive Reviews in *Food Science and Food Safety*, 2011, 10(6), pp. 291–302.
5. A. Haug, A. T. Høstmark, & O. M. Harstad, Bovine milk in human nutrition – a review. *Lipids in Health and Disease*, 2007, 6(1), 25.
6. A. Kapaj, & E. Deci, World Milk Production and Socio-Economic Factors Effecting Its Consumption, *Dairy in Human Health and Disease Across the Lifespan*, 2017, (7), pp. 107–115.
7. R. Kanwal, T. Ahmed & B. Mirza, Comparative Analysis of Quality of Milk Collected from Buffalo, Cow, Goat and Sheep of Rawalpindi/Islamabad, *Asian Journal of Plant Sciences*, 2004, Vol.3, 300-305.
8. L. Monaci, V.Tregoat, A.J. van Hengel, E. Anklam, Milk Allergens, their characteristics and their detection in food: A review, *Eur. Food Res. Technol.*, 2006, Vol.223, pp.149-179.
9. P.F. Fox, A. Kelly, Developments in the chemistry and technology of milk proteins-Some Recent research findings and overview of possible future developments, *Food Aust.*, 2003, Vol. 55, pp.537-539.
10. J.E. Ford, K.J. Scott, The folic acid activity of some milk foods for babies, *Journal of Dairy Research*, 1968, Vol.35,(1) pp. 85-90.
11. Y. W. Park, M. Juárez, M. Ramos, & G. F. W. Haenlein, Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk, *Small Ruminant Research*, 2007, 68(1-2), pp. 88–113.
12. J. M. Jandal, Comparative aspects of goat and sheep milk, *Small Ruminant Research*, 1996, 22(2), pp. 177–185.
13. S. Séverin, & X. Wenshui, Milk Biologically Active Components as Nutraceuticals: Review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2005, 45(7-8), pp. 645–656.

14. S. Mills, R.P. Ross, C. Hill, G.F. Fitzgerald, & C. Stanton, Milk intelligence: Mining milk for bioactive substances associated with human health, *International Dairy Journal*, 2011, 21(6), pp. 377–401.
15. I. Politis, R. Chronopoulou, Milk Peptides and Immune Response in the Neonate, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2008, 606, pp. 253-69.
16. G.O. Phillips and P.A. Williams, Handbook of Food Proteins, Caseins B.T. O’Kennedy, Woodhead Publishing Series in Food Science, *Technology and Nutrition*, 2011, pp. 13-29.
17. L. K. Creamer, J. E. Plowman, M. J. Liddell, M.H. Smith, J.P. Hill, Micelle stability: Kappa-casein structure and function, *J. Dairy Sci.*, 1998, Vol. 81, pp. 3004-3012.
18. R.J. Reid, T. Coolbear, J.S. Ayers & K. P. Coolbear, The action of chymosin on κ -casein and its macropeptide: Effect of pH and analysis of products of secondary hydrolysis, *International Dairy Journal*, 1997, 7(8-9), pp. 559–569.
19. C. Thoma-Worringer, J. Sorensen, R. Lopez-Findino, Health effects and technological features of caseinomacropeptide, *Int. Dairy J.*, 2006, Vol. 16 pp.1324-1333.
20. Neelima, R. Sharma, Y.S. Rajput and B. Mann, Chemical and functional properties of glycomacropeptide (GMP) and its role in the detection of cheese whey adulteration in milk: a review, *Dairy Sci., Technol.*, 2013, Vol. 93, pp. 21-43).
21. B. Walther, A. Schmid, R. Sieber, & K. Wehrmüller, Cheese in nutrition and health, *Dairy Science and Technology*, 2008, 88(4-5), pp. 389–405.
22. P. Molimard, H.E. Spinnler, Review: compounds involved in the flavor of surface mold-ripened cheeses: origins and properties, 1996, *J. Dairy Sci.*, 79, pp. 169–184.
23. A. Schmid, R. Sieber, K. Wehrmülle, Cheese in nutrition and health, *Dairy Science & Technology*, 2008, Vol. 88, pp. 389–405.
24. B.A Law, Flavour development in cheeses, In: Davies F.L., Law B.A. (Eds.), *Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk*, *Elsevier Appl. Sci. Publ.*, 1984, pp.187–208.
25. Commission Regulation (EC) No 273/2008 of 5 March 2008, laying down detailed rules for the application of Council Regulation (EC) No 1255/1999 as regards methods for the analysis and quality evaluation of milk and milk products, 2008, *Official Journal of the European Union*.

26. J. Sawyer, C. Wood, D. Shanahan, S. Gout, & D. McDowell, Real-time PCR for quantitative meat species testing. *Food Control*, 2003, 14(8), pp. 579–583.
27. R. Branciar, I. J. Nijman, M. E. Plas, E. Di Antonio, & J. A. Lenstra, Species Origin of Milk in Italian Mozzarella and Greek Feta Cheese, *Journal of Food Protection*, 2000, 63(3), pp. 408–411
28. I. López-Calleja, I.G. Alonso, V. Fajardo, M.A. Rodríguez, P. E. Hernández, T. García, & R. Martín, PCR detection of cows' milk in water buffalo milk and mozzarella cheese, *International Dairy Journal*, 2005, 15(11), pp. 1122–1129.
29. S.H. Sicheher, H.A. Sampson, Food Allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment, *J.Allergy Clin. Immun.*, 2014, Vol. 133, pp. 291-307.
30. P.F. Fox, T. Uniacke-Lowe, P.L. Sweeney, J.A. O'Mahony, *Dairy Chemistry and Biochemistry*, Springer 2005.
31. L.Monaci, V.Tregoat, A. J.van Hengel, E.Anklam, Milk Allergens, their characteristics and their detection in food: A review, *Eur. Food Res. Technol.*, 2006, Vol.223, pp. 149-179.
32. W.K.A. da Costa, E.L. de Souza, E.M. Beltrao, G.K.V. Vasconcelos, T. Santi-Gadelha, C.A.D. Gadelha, O.L. Franco, R.D.R.D. Queiroga, M. Magnani, Comparative Protein Composition Analysis of goat milk Produced by the Alpine and Saanen Breeds in Northeastern Brazil and Related Antibacterial Activities, *Plos One*, 2014, Vol. 9, pp.1-8.
33. I.M.P.L.V.O. Ferreira, H. Caçote, Detection and quantification of bovine, ovine and caprine milk percentages in protected denomination of origin cheeses by reversed-phase high-performance liquid chromatography of beta-lactoglobulins, *Journal of Chromatography A*, 2003,1015 pp.111–118.
34. N.A. Chávez, E. Salinas, J. Jauregui, L.A. Palomares, & K. Macías, Detection of bovine milk adulterated with cheese whey by western blot immunoassay, 2008, *Food and Agricultural Immunology*, 19(4), pp. 265–272.
35. P.C. Yang & T. Mahmood, Western blot: Technique, theory, and trouble shooting, *North American Journal of Medical Sciences*, 2012, 4(9), 429.
36. A. Demmel, C. Hupfer, E.I. Hampe, U. Busch, K.H. Engel, Development of a real-time PCR for the detection of lupine DNA (lupines species) in foods, *J. Agr. Food Chem.*, 2008, Vol. 56, pp. 4328-4332.

37. L. Monaci, A. Visconti, Immunochemical and DNA-based methods in food allergen analysis and quality assurance perspectives, *Trends Food Sci. Tech.*, 2010, Vol. 21, pp. 272-283.
38. K. B. Mullis, The unusual origin of the polymerase chain reaction, *Scientific American*, 1990, 262(4):56–61. 64–5.
39. R.E. Poms, E. Anklam, M. Kuhn, Polymerase chain reaction techniques for food allergen detection, *J. AOAC Int.*, 2004, Vol. 87, pp.1391-1397.
40. I. López-Calleja, González, V. Fajardo, I. Martín, P. E. Hernández, T. García & R. Martín, Quantitative detection of goats' milk in sheep's milk by real-time PCR, *Food Control*, 18(11), 2007, pp. 1466–1473.
41. N. P. A. Rodrigues, P. E. N. Givisiez, R.C.R. E. Queiroga, P. S. Azevedo, W. A. Gebreyes & C.J.B. Oliveira, Milk adulteration: Detection of bovine milk in bulk goat milk produced by smallholders in northeastern Brazil by a duplex PCR assay, 2012, *Journal of Dairy Science*, 95(5), pp. 2749–2752.
42. J. Heick, M. Fischer, B. Popping, First screening method for the simultaneous detection of seven allergens by liquid chromatography mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 2011, Vol. 1218, pp. 938-943.
43. M. V. Moreno-Arribas & M. C. Polo, Chromatography | High-performance Liquid Chromatography. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 2003, pp. 1274–1280.
44. S. H. Ashoor, P. G. Stiles, Determination of Soy Protein, Whey- Protein and Casein in unheated Meats by High Performance Liquid Chromatography, *J. Chromatog. R*, 1987, Vol.393, pp.321-328.
45. A. C. A Veloso, N. Teixeira, I.M.P.LV.O. Ferreira, Separation and quantification of the major casein fractions b reverse-phase high performance liquid chromatography and urea-polyacrylamide gel electrophoresis- Detection of milk adulterations, *J. Chromatogr. A*, 2002, Vol.967, pp. 209-218.
46. R.K. Chen, L.W. Chang, Y. Y. Chung, M. H. Lee, Y.C. & Ling, Quantification of cow milk adulteration in goat milk using high-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2004, 18(10), pp. 1167–1171.
47. N. Z. Ballin, Estimation of whey protein in casein coprecipitate and milk powder by high-performance liquid chromatography quantification of cysteine, *J. Agr. Food Chem.*, 2006, Vol. 54, pp. 4131-4135.
48. X. J. Ding, Y. Y. Yang, S. Zhao, Y. Li, Z. Wang, Analysis of alpha-lactalbumin, beta-lactoglobulin A and B in whey protein powder,

- colostrum, raw milk and infant formula by CE and LC, *Diary Sci. Technol.*, 2011, Vol. 91, pp. 213-225.
49. M. Koeberl, D. Clarke, A.L. Lopata, Next Generation of food allergen quantification using mass spectrometric systems, *J. Proteome Res.*, 2014, Vol.13 pp. 3499-3509.
 50. S. Kirsch, S. Fourdrillis, R. Dobson, M.L. Scippo, G. Maghuin-Rogister, E. De Pauw, Quantitative methods for food allergens: a review, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, Vol. 395, pp. 57-65.
 51. C. Czerwenka, I. Maier, N. Potocnik, F. Pittner, W. Lindner, Absolute quantitation of beta-lactoglobulin by protein liquid chromatography-Mass spectrometry and its application to different milk products, *Anal. Chem.*, 2007, Vol.79, pp. 5165-5172.
 52. Y.P. Ren, Z. Han, X.J. Chu, J.S. Zhang, Z.X. Cai, Y.J. Wu, Simultaneous determination of bovine alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin in infant formulae by ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta*, 2010, Vol. 18, pp. 96-102.
 53. D. Weber, P. Raymond, S. Ben-Rejeb, B. Lau, Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method using capillary liquid chromatography and nanoelectrospray ionization-quadrupole time of flight hybrid mass spectrometer for the detection of food allergens, *J. Agr. Food Chem.*, 2006, Vol. 54, pp. 1604-1610.
 54. N. Bernardi, G. Benetti, N.M. Haouett, M. Sergi, L. Grotta, S. Marchetti, F. Castellani, G. Martino, A rapid high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry assay for unambiguous detection of different milk species employed in cheese manufacturing, *J. Dairy Sci.*, 2015, Vol. 98, pp.8405-8413.
 55. R. Schuhmacher, M. Sulyok, R. Krska, Recent developments in the application of liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of organic residues and contaminants, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, Vol.390, pp. 253-256.
 56. I. A. Darwish, Immunoassay Methods and their Applications in Pharmaceutical Analysis: Basic Methodology and Recent Advances, *Int. J Biomed Sci.*, 2006, 2(3): 217–235.
 57. R. E Poms, C. L. Klein & E. Anklam, Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Additives and Contaminants*, 2004 21(1), pp.1–31.
 58. M.A. Κουππάρης, Ειδικά Κεφάλαια Αναλυτικής Χημείας, Αθήνα 1989
 59. Θ.Π. Χατζηγιάννου, M.A. Κουππάρης, Ενόργανη Ανάλυση, Αθήνα 2000

60. W. Richter, I. Krause, C. Graf, I. Sperrer, C. Schwarzer, H. Klostermeyer, An indirect competitive ELISA for the detection of cows' milk and caseinate in goats' and ewes' milk and cheese using polyclonal antibodies against bovine γ -caseins, *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung Unters FA*, 1997, Vol. 204, pp. 21-26.
61. H X Song, H Y Xue, Y. Han, Detection of cow's milk in Shaanxi goat's milk with an ELISA assay, *Food Control*, 2011, Vol.22, pp. 883-887.
62. I. P. Hurley, R. C. Coleman, H. E. Ireland & J. H. H. Williams, Use of sandwich IgG ELISA for the detection and quantification of adulteration of milk and soft cheese, *International Dairy Journal*, 2006, 16(7), pp. 805–812.
63. N.A. Chávez, J. Jauregui, L. A. Palomares, K. E. Macías, M. Jiménez, & E. Salinas, A highly sensitive sandwich ELISA for the determination of glycomacropeptide to detect liquid whey in raw milk. *Dairy Science & Technology*, 2012, 92(2), pp. 121–132.
64. I. P. Hurley, R. C. Coleman, H. E. Ireland, & J. H. H. Williams, Measurement of Bovine IgG by Indirect Competitive ELISA as a Means of Detecting Milk Adulteration, *Journal of Dairy Science*, 2004, 87(3), pp. 543–549.