



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ « Αναλυτική Χημεία »**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Ανάπτυξη ηλεκτροχημικού ανοσοαισθητήρα για την
ανίχνευση νοθείας αιγοπρόβειου τυριού με αγελαδινό γάλα**

**ΛΙΒΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2019

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Ανάπτυξη ηλεκτροχημικού ανοσοαισθητήρα για την ανίχνευση νοθείας αιγοπρόβειου τυριού με αγελαδινό γάλα

ΛΙΒΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

A.M.: 11705

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Χρήστος Κόκκινος, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Χρήστος Κόκκινος, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

Αναστάσιος Οικονόμου, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Παναγιώτα Πέτρου, Ερευνήτρια Α' ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 22/10/2019

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η νοθεία στην βιομηχανία τροφίμων είναι ένα σημαντικό πρόβλημα με αμέτρητες επιπτώσεις στην υγεία των καταναλωτών αλλά και στην ποιότητα των παραγόμενων προϊόντων. Ιδιαίτερα για τις γαλακτοβιομηχανίες η νοθεία του γάλακτος ή/και των προϊόντων του επηρεάζει τόσο ανθρώπους που έχουν δυσανεξία ή αλλεργία στο γάλα (κυρίως το αγελαδινό) αλλά και εκείνους που για θρησκευτικούς και κοινωνικούς λόγους δεν επιθυμούν να καταναλώνουν κρέας και προϊόντα που προέρχονται από συγκεκριμένα ζώα. Στην Ευρωπαϊκή Ένωση έχουν θεσπιστεί κατευθυντήριες οδηγίες ως προς τις βιομηχανίες για την σωστή καταγραφή της προέλευσης του γάλακτος στις συσκευασίες των προϊόντων αλλά και νομοθεσίες που θέτουν τα όρια της νοθείας στο γάλα και τα προϊόντα του. Στην βιβλιογραφία, υπάρχει ποικιλία αναλυτικών τεχνικών που ενώ τα αποτελέσματα που παράγουν είναι ικανοποιητικά ο εξοπλισμός που απαιτείται είναι ιδιαίτερος ακριβός και απαιτείται πολύς χρόνος (συνήθως πολλές ώρες έως και μέρες) για να πραγματοποιηθεί η ανάλυση. Για το σκοπό αυτό, μέσω της παρούσας εργασίας αναπτύχθηκε ηλεκτροχημικός ανοσοαισθητήρας για την ανίχνευση νοθείας αιγοπρόβειου τυριού με αγελαδινό γάλα. Ο αισθητήρας αυτός είναι χαμηλού κόστους και η ανάλυση είναι ταχεία. Στο πλαίσιο της ανάπτυξης του ανοσοαισθητήρα, αναπτύχθηκε ανταγωνιστικού τύπου ενζυμοανοσοχημικός προσδιορισμός (ELISA) βόειας κ-καζεΐνης στο αιγοπρόβειο γάλα και τυρί, με χρήση πολυκλωνικού ειδικού αντισώματος κουνελιού έναντι της βόειας κ-καζεΐνης σε φρεάτια μικροπιλοδότησης. Μετά από την βελτιστοποίηση των συνθηκών, των διαλυμάτων και των συγκεντρώσεων των αντιδραστηρίων, ο προσδιορισμός αυτός μεταφέρθηκε στον ηλεκτροχημικό ανοσοαισθητήρα χρησιμοποιώντας κβαντικές κουκκίδες ως επισημαντές, όπου βελτιστοποιήθηκαν περαιτέρω οι συνθήκες του προσδιορισμού. Επετεύχθη αξιόπιστη και ταχεία (5 min) ανίχνευση νοθείας αιγοπρόβειου τυριού με αγελαδινό με όριο ανίχνευσης 0.07% (β/β) και όριο ποσοτικοποίησης 0.22% (β/β) σε αγελαδινό τυρί, τα οποία είναι κάτω από το όριο που θεσπίζει η ευρωπαϊκή νομοθεσία (1% (β/β)).

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Ανίχνευση νοθείας αιγοπρόβειου τυριού

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: ELISA, ηλεκτροχημικός ανοσοαισθητήρας, αιγοπρόβειο τυρί, νοθεία

ABSTRACT

Adulteration at the food industry is of great importance since it affects not only consumers' health but also the quality of the product. Especially for the dairy industry, adulteration of milk and its products pose a threat both to consumer that are lactose intolerant or allergic to milk (bovine milk allergy is by far the most common) and to consumers that for religious and societal reasons avoid to consume specific animals' dairy products. According to both the European Union and USA legislation, food industries are obliged to indicate the species origin of the milk used for food preparation in order to protect consumers that are prone to allergies. Nowadays, there are a number of analytical techniques and methods employed in order to determine the adulteration of milk and its products. While their results are adequate, these methods require very expensive instrumentation, highly skilled scientists in order to perform the analysis and also are time-consuming. In order to overcome these drawbacks, through this M.Sc. thesis an electrochemical immunosensor for the detection of goats' and ewes' cheese adulteration with bovine cheese has been developed. The proposed sensor is cheap, doesn't require highly trained personnel for its operation and the analysis is rapid. To achieve this, a competitive ELISA method for the detection of adulteration in goats' and ewes' milk and cheese was developed in 96-well microtiter plates. For this method, an anti-bovine- κ -casein specific polyclonal antibody developed in rabbits was used. After careful optimization of the conditions and solutions, the method was transferred for implementation at the electrochemical immunosensor. The reactions' conditions were optimized again and the resulting analysis took up 5 min and an LOD of 0.07% (w/w) and an LOQ of 0.22% (w/w) were achieved. These results are below the legal limit in the European Union which places a 1% (w/w) limit to determine if a cheese is adulterated.

SUBJECT AREA: Goats' and ewes' cheese adulteration

KEYWORDS: ELISA, electrochemical immunosensor, goats' and ewes' cheese, adulteration

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για τη διεκπεραίωση της παρούσας ερευνητικής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή Χ. Κόκκινο για τη συνεργασία και την πολύτιμη συμβολή του στην ολοκλήρωση της, την 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 για την καθοδήγησή τους στα τεχνικά θέματα αλλά και για την μεταλαμπάδευση των γνώσεων που ήταν καθοριστικές για την πορεία των πειραμάτων και της εργασίας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες αποδίδω στην υπεύθυνη μου Δρ. Μ. Αγγελοπούλου, καθώς από την πρώτη στιγμή ανέλαβε την εκπαίδευσή και επίβλεψη μου τόσο στα τεχνικά αλλά και στα θεωρητικά θέματα, για την συμβολή της στην σύνταξη της παρούσας εργασίας και για το κλίμα συνεργασίας και επικοινωνίας που αναπτύξαμε.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη της ερευνητικής ομάδας του εργαστηρίου και πιο συγκεκριμένα την Δρ. Α. Κανιούρα, τον Δρ. Γ. Κουκουβίνο, τους υποψήφιους διδάκτορες Β. Αναστασιάδη, Ε. Σταυρά, Δ. Τσουνίδη και την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Μ. Αντωνίου για την υποδοχή τους, τις συμβολές τους, τις τεχνικές και μη συζητήσεις και τον σχηματισμό ενός εξαιρετικού περιβάλλοντος εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους κοντινούς μου ανθρώπους για την υποστήριξή τους σε κάθε βήμα που κάνω στην ζωή μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	22
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	23
1. ΤΥΡΙ	23
1.1 Το τυρί ως μέρος της διατροφής του ανθρώπου	23
1.2 Παρασκευή τυριού από γάλα.....	24
1.3 Πρωτεϊνική σύσταση αγελαδινού γάλακτος	24
1.3.1 Πρωτεΐνες ορού γάλακτος.....	25
1.3.2 Καζεΐνες	26
2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	29
2. ΝΟΘΕΙΑ	29
2.1 Σημαντικότητα ανίχνευσης.....	29
2.2 Χαρακτηριστικά ειδών γάλακτος.....	30
2.3 Κίνητρα υπέρ της νοθείας γαλακτοκομικών προϊόντων	31
3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	33
3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΝΟΘΕΙΑΣ ΑΙΓΟΡΠΟΒΕΙΟΥ ΤΥΡΙΟΥ ΚΑΙ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΜΕ ΑΓΕΛΑΔΙΝΟ	33
3.1 Χρωματογραφικές τεχνικές	33
3.2 Τεχνικές που βασίζονται στην ανάλυση DNA	35
3.3 Τεχνικές φασματομετρίας μάζας.....	37
3.4 Ανοσοχημικές Μέθοδοι.....	38
3.4.1 Ανταγωνιστικού και μη ανταγωνιστικού τύπου ανοσοπροσδιορισμό	39
3.4.2 Ανοσοχρωματογραφικές συσκευές πλευρικής ροής	42
3.4.3 Ανοσοαποτύπωση κηλίδων (Western Blot)	43

4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	45
4. ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ	45
4.1 Ιστορική αναδρομή	45
4.2 Είδη βιοαισθητήρων	47
4.3 Οπτικοί βιοαισθητήρες.....	47
4.4 Ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες	51
4.4.1 Βολταμμετρία	51
4.4.2 Ηλεκτρόδια στην αναδιαλυτική βολταμμετρία.....	55
4.4.3 Μεταλλικά ηλεκτρόδια	58
4.4.4 Κατασκευή αισθητήρα με την τεχνική εκτύπωσης μέσω πλέγματος και με τρισδιάτατη εκτύπωση.....	61
4.4.5 Ηλεκτροχημικός ανοσοαισθητήρας	63
5. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	66
5. ΣΚΟΠΟΣ	67
6. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6	68
6. ΜΕΘΟΔΟΙ - ΥΛΙΚΑ	69
6.1 Καταβύθιση κλάσματος γ-σφαιρινών από ορό κουνελιού έναντι βόειας κ- καζεΐνης.....	69
6.2 Παρασκευή συζεύγματος πρωτεϊνών με βιοτίνη (μέθοδος βιοτινυλίωσης)	71
6.3 Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων	72
6.3.1 Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων βόειας κ-καζεΐνης σε ρυθμιστικό διάλυμα ανοσοαντίδρασης	73
6.3.2 Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο γάλα	74
6.3.3 Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων αγελαδινού σε αιγοπρόβειο τυρί.....	75
6.4 Ανταγωνιστικού τύπου ενζυμικοί ανοσοχημικοί προσδιορισμοί.....	76

6.4.1	Ανταγωνιστικού τύπου ενζυμικός ανοσοχημικός προσδιορισμός κ-καζεΐνης σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης.....	77
6.4.2	Ανταγωνιστικού τύπου ενζυμικός ανοσοχημικός προσδιορισμός νοθείας κατσικίσιου τυριού με αγελαδινό.....	80
6.5	Προσδιορισμός νοθείας αιγοπρόβειου τυριού με αγελαδινό σε ηλεκτροχημικό βιοαισθητήρα	81
6.5.1	Ανοσοχημική ενεργοποίηση ηλεκτροδίων και ανάπτυξη ανοσοχημικού προσδιορισμού στα ηλεκτρόδια.....	86
6.5.2	Διαλυτοποίηση κβαντικών κουκίδων και ηλεκτροχημική μέτρηση.....	89
7.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7	91
7.	Αποτελέσματα	91
7.1	Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση ανταγωνιστικού τύπου ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού βόειας κ-καζεΐνης σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης με καθαρισμένο πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι βόειας κ-καζεΐνης	91
7.1.1	Έλεγχος και βελτιστοποίηση συγκέντρωσης βόειας κ-καζεΐνης για το διάλυμα ακινητοποίησης σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης και προσδιορισμός βέλτιστης συγκέντρωσης πολυκλωνικού αντισώματος κουνελιού	92
7.1.2	Βελτιστοποίηση σύνθεσης διαλυμάτων του ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού της βόειας κ-καζεΐνης σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης.....	93
7.1.3	Μελέτη και βελτιστοποίηση χρόνου αντίδρασης ειδικού αντισώματος έναντι βόειας κ-καζεΐνης (πρώτου αντισώματος) και γενικού αντισώματος κατά των γ-σφαιρινών κουνελιού (δεύτερου αντισώματος).....	100
7.1.4	Μελέτη της επίδρασης του χρόνου προεπώασης του μίγματος προτύπου διαλύματος με το ειδικό αντίσωμα (πρώτο αντίσωμα) στην ευαισθησία της καμπύλης αναφοράς	103
7.1.5	Μελέτη ανθεκτικότητας ακινητοποιημένης βόειας κ-καζεΐνης σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης στο ψυγείο (4 βαθμοί Κελσίου) με ξηραντικό.....	105
7.1.6	Καμπύλη αναφοράς κ-καζεΐνης στις βελτιστοποιημένες συνθήκες	107

7.2 Ανάπτυξη ανταγωνιστικού τύπου ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού με βιοτινυλιωμένο πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της βόειας κ-καζεΐνης	110
7.2.1 Επαναπροσδιορισμός βέλτιστης συγκέντρωσης βιοτινυλιωμένου αντισώματος	111
7.2.2 Μελέτη της επίδρασης της προεπώασης του μίγματος προτύπου διαλύματος με το ειδικό βιοτινυλιωμένο αντίσωμα (πρώτο αντίσωμα) στην ευαισθησία της καμπύλης αναφοράς.....	112
7.2.3 Καμπύλη αναφοράς κ-καζεΐνης με βιοτινυλιωμένο ειδικό πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της κ-καζεΐνης βοός.....	114
7.3 Ανάπτυξη ανταγωνιστικού τύπου ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού σε μήτρα τυριού	115
7.3.1 Βελτιστοποίηση συγκεντρώσεως βιοτινυλιωμένου αντισώματος για τον ανταγωνιστικό τύπου ενζυμοανοσοχημικό προσδιορισμό αγελαδινού γάλακτος σε κασικίσιο	116
7.3.2 Μελέτη επίδρασης της μήτρας του γάλακτος στο αναλυτικό σήμα και την ευαισθησία της ανίχνευσης.....	117
7.3.3 Καμπύλη αναφοράς γάλακτος με το βιοτινυλιωμένο αντίσωμα.....	119
7.3.4 Βελτιστοποίηση συγκεντρώσεως βιοτινυλιωμένου αντισώματος για τον ανταγωνιστικό ενζυμοανοσοχημικό προσδιορισμό του αγελαδινού τυριού σε αιγοπρόβειο τυρί.....	121
7.3.5 Μελέτη επίδρασης της μήτρας του τυριού	122
7.3.6 Καμπύλη αναφοράς τυριού με το βιοτινυλιωμένο αντίσωμα	124
7.3.7 Μελέτη ανάκτησης και γραμμικότητας αραίωσης της μήτρας του τυριού .	126
7.4 Ανάπτυξη ανταγωνιστικού τύπου ενζυμικού ανοσοχημικού προσδιορισμού νοθείας αιγοπρόβειου τυριού με αγελαδινό σε ηλεκτροχημικό αισθητήρα	128
7.4.1 Χαρακτηρισμός επιφανείας ηλεκτροδίων εργασίας του ηλεκτροχημικού ανοσοαισθητήρα.....	128
7.4.2 Μελέτη σχηματισμού μεταλλικού φιλμ στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου ..	130
7.4.3 Βελτιστοποίηση συνθηκών ηλεκτροχημικού βιοαισθητήρα	131

7.4.4	Επαναπροσδιορισμός βέλτιστων αναλυτικών συνθηκών ενζυμοανοδοχημικού προσδιορισμού για μεταφορά στον ηλεκτροχημικό βιοαισθητήρα	135
7.4.5	Προσδιορισμός νοθείας αιγοπρόβειου τυριού με αγελαδινό (καμπύλη αναφοράς) στον ηλεκτροχημικό ανοσοαισθητήρα	141
8.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8	144
8.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	145
9.	ΑΝΑΦΟΡΕΣ	153

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Τιμές απορροφήσεως στα 405nm για μηδενικό πρότυπο σε πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις ακινητοποιημένης βόειας κ-καζεΐνης και για πέντε συγκεντρώσεις ειδικού πολυκλωνικού αντισώματος κουνελιού έναντι βόειας κ-καζεΐνης. Οι συγκεντρώσεις του αντισώματος είχαν ως εξής: 180 ng/mL (■), 364 ng/mL (●), 728 ng/mL (▲), 1820 ng/mL (▼), 3640 ng/mL (◄). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων ± τυπική απόκλιση (± SD).....93

Σχήμα 2: Τιμές απορροφήσεως στα 405 nm μηδενικού και μη-μηδενικών προτύπων διαλυμάτων κ-καζεΐνη συγκέντρωσης 0.2, 0.5 και 1 μg/mL σε δύο περιεκτικότητες του διαλύματος ανοσοαντίδρασης σε TWEEN 20. Καμπύλη προτύπων διαλυμάτων για περιεκτικότητα σε TWEEN 20 0% (●) και 0.05% (■). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών (3) επαναληπτικών μετρήσεων ± τυπική απόκλιση (±SD).94

Σχήμα 3: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για το μηδενικό και τα μη-μηδενικά πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης συγκέντρωσης 0.2, 0.5 και 1 μg/mL. Καμπύλη για 0% TWEEN 20 (●) και για 0.05% TWEEN 20 (■). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων ± σχετική τυπική απόκλιση% (±%RSD). ..95

Σχήμα 4: Τιμές απορροφήσεως στα 405 nm μηδενικού και μη-μηδενικών προτύπων διαλυμάτων κ-καζεΐνης συγκέντρωσης 0.2, 0.5 και 1 μg/mL σε δύο περιεκτικότητες του διαλύματος ανοσοαντίδρασης σε BSA. Καμπύλη προτύπων διαλυμάτων για περιεκτικότητα σε 1% (β/ο) BSA (●) και 0.5% (β/ο) (■). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων ± τυπική απόκλιση (±SD).96

Σχήμα 5: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για το μηδενικό και τα μη-μηδενικά πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης συγκέντρωσης 0.2, 0.5 και 1 μg/mL. Καμπύλη για 1% (β/ο) BSA (●) και για 0.5% (β/ο) BSA (■). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων ± σχετική τυπική απόκλιση% (±%RSD).....96

Σχήμα 6: Τιμές απορροφήσεως στα 405 nm μηδενικού (■), μη-μηδενικού προτύπου διαλύματος κ-καζεΐνης συγκέντρωσης 0.5 μg/mL (■) και σήματος μη ειδικής δέσμευσης (■) όταν προηγήθηκαν: 1) διάλυμα έκπλυσης χωρίς TWEEN 20 σε όλα τα στάδια του ανοσοχημικού προσδιορισμού κ-καζεΐνης, 2) διάλυμα έκπλυσης με 0.05% (ο/ο) TWEEN 20 σε όλα τα στάδια μετά την ακινητοποίηση της κ-καζεΐνης, 3) διάλυμα έκπλυσης με

0.05% (o/o) TWEEN 20 σε όλα τα στάδια μετά τον αποκλεισμό των ελεύθερων θέσεων δέσμευσης των φρεατίων, 4) διάλυμα έκπλυσης με 0.05% (o/o) TWEEN 20 σε όλα τα στάδια μετά την ανοσοαντίδραση και 5) διάλυμα έκπλυσης με 0.05% (o/o) TWEEN 20 σε όλα τα στάδια μετά την επώαση με των φρεατίων με το δεύτερο αντίσωμα. Κάθε ράβδος αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων + τυπική απόκλιση (+SD).....98

Σχήμα 7: Τιμές απορροφήσεως στα 405 nm μηδενικού και μη-μηδενικών προτύπων διαλυμάτων κ-καζεΐνης συγκέντρωσης 0.2, 0.5 και 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ όταν ως διάλυμα αποκλεισμού ελευθέρων θέσεων δέσμευσης της επιφανείας των φρεατίων είναι ρυθμιστικό διάλυμα όξινων ανθρακικών 100 mM, pH 8.5, 1% (β/o) BSA (■) ή ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, pH 7.4, 1% (β/o) BSA (●). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm τυπική απόκλιση ($\pm\text{SD}$). 100

Σχήμα 8: Τιμές απορροφήσεως στα 405 nm μηδενικού προτύπου για χρόνους ανοσοαντίδρασης 10, 15, 30, 45, 60, 90 και 120 min. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm τυπική απόκλιση ($\pm\text{SD}$). 101

Σχήμα 9: Τιμές απορροφήσεως στα 405 nm μηδενικού προτύπου για χρόνους αντίδρασης δευτέρου αντισώματος 2, 5, 10, 15, 20, 30, 45 και 60 min. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm τυπική απόκλιση ($\pm\text{SD}$). 102

Σχήμα 10: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για το μηδενικό και τα μη-μηδενικά πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης συγκέντρωσης 0.01, 0.02, 0.05, 0.1 και 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Καμπύλη για χρόνο προεπάσης 60 min (▼), 30 min (▲), 15 min (●) και 0 min (■). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm σχετική τυπική απόκλιση% ($\pm\% \text{RSD}$)..... 104

Σχήμα 11: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για 0, 7, 30 και 60 ημέρες διατήρησης των φρεατίων μικροπιλοδότησης στο ψυγείο στους 4 βαθμούς Κελσίου. Κάθε ράβδος αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm τυπική απόκλιση ($\pm\text{SD}$). 106

Σχήμα 12: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm σχετική τυπική απόκλιση% ($\pm\% \text{RSD}$)..... 109

Σχήμα 13: Τιμές απορροφήσεως στα 405 nm μηδενικού προτύπου (■) για συγκεντρώσεις πρώτου ειδικού αντισώματος έναντι κ-καζεΐνης 16, 32, 64, 127 και 254 ng/mL και προτύπου διαλύματος κ-καζεΐνης συγκέντρωσης 0.1 μg/mL (●) για συγκεντρώσεις πρώτου ειδικού αντισώματος έναντι κ-καζεΐνης 16, 32, 64, 127 και 254 ng/mL. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων ± τυπική απόκλιση (±SD).....	112
Σχήμα 14: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για το μηδενικό και τα μη-μηδενικά πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης συγκέντρωσης 0.01, 0.05, και 0.25 μg/mL. Καμπύλη με προεπώαση 30 min (■) και χωρίς προεπώαση (■). Κάθε ράβδος αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων ± τυπική απόκλιση (±SD).	113
Σχήμα 15: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για το μηδενικό και τα μη-μηδενικά πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων ± τυπική απόκλιση (±SD).	114
Σχήμα 16: Τιμές απορροφήσεως στα 405 nm για αντίσωμα συγκεντρώσεως 127 ng/mL (■), 85 ng/mL (■) και 64 ng/mL (■) σε μηδενικό πρότυπο αιγοπρόβειου γάλακτος και πρότυπο νοθείας 0.1% (o/o) αιγοπρόβειου γάλακτος με αγελαδινό. Κάθε ράβδος αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων + τυπική απόκλιση (+SD).	116
Σχήμα 17: Τιμές απορροφήσεως στα 405 nm για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα κασικίσιου γάλακτος σε αραιώσεις της μήτρας 0, 10, 50, 100, 200, 500 και 1000 φορές με διάλυμα ανοσοαντίδρασης. Κάθε ράβδος αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων + τυπική απόκλιση (+SD).	118
Σχήμα 18: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης για μηδενικό πρότυπο διάλυμα κασικίσιου γάλακτος καθώς για ένα πρότυπο διάλυμα, το οποίο είχε περιεκτικότητα 0.002% (o/o) σε αγελαδινό γάλα μετά από αραιώση 0, 10, 50, 100, 200, 500 και 1000 φορές με διάλυμα ανοσοαντίδρασης. Κάθε ράβδος αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων + τυπική απόκλιση (+SD).	118
Σχήμα 19: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για τα πρότυπα διαλύματα αγελαδινού γάλακτος σε κασικίσιο (o/o). Καμπύλη με (o/o) προεπώαση 30 min. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων ± τυπική απόκλιση (±SD).....	120

Σχήμα 20: Τιμές απορροφήσεως στα 405 nm για αντίσωμα συγκεντρώσεως 127 ng/mL (■), 85 ng/mL (■) και 64 ng/mL (■) σε μηδενικό πρότυπο αιγοπρόβειου τυριού και πρότυπο διάλυμα αγελαδινού τυριού περιεκτικότητας 1% (o/o). Κάθε ράβδος αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων + τυπική απόκλιση (+SD).....	121
Σχήμα 21: Τιμές απορροφήσεως στα 405 nm για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα αιγοπρόβειου τυριού σε αραιώσεις της μήτρας 0, 10, 50, 100, 200, 500 και 1000 φορές με διάλυμα ανοσοαντίδρασης. Κάθε ράβδος αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων + τυπική απόκλιση (+SD).	123
Σχήμα 22: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης για μηδενικό πρότυπο διάλυμα αιγοπρόβειου τυριού καθώς για ένα πρότυπο διάλυμα, το οποίο είχε περιεκτικότητα 0.002% (o/o) σε αγελαδινό τυρί μετά από αραιώση 0, 10, 50, 100, 200, 500 και 1000 φορές με διάλυμα ανοσοαντίδρασης. Κάθε ράβδος αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων + τυπική απόκλιση (+SD).	123
Σχήμα 23: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για τα πρότυπα διαλύματα αιγοπρόβειου τυριού με αγελαδινό τυρί. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων ± τυπική απόκλιση (±SD).	125
Σχήμα 24: Συσχέτιση των αναμενόμενων με τις προσδιορισθείσες συγκεντρώσεις αγελαδινού γάλακτος σε κασικίσιο που ελήφθησαν με διαδοχικές αραιώσεις δειγμάτων στα οποία η αρχική προσθήκη ήταν: 3% (o/o) (●) και 1.6% (o/o) (●). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 7 επαναληπτικών μετρήσεων ± τυπική απόκλιση (±SD).	127
Σχήμα 25: Συνολική εικόνα ανάλυσης με EDX (Α), απεικόνιση EDX μόνο οξειδίων Sb (Β), απεικόνιση EDX μόνο οξειδίων Sn (Γ) και εικόνα SEM (Δ) της επιφάνειας του εκτυπωμένου ηλεκτροδίου.....	129
Σχήμα 26: Διάγραμμα ενέργειας και στοιχειακή ανάλυση εκτυπωμένου ηλεκτροδίου εργασίας.	130
Σχήμα 27: Βολταμμογράφημα σχηματισμού φιλμ στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας για χρόνο προσυγκέντρωσης 0s (■), 240s (■), 480s (■) και 720s (■) . Ένταση ρεύματος προς διαφορά δυναμικού.....	131
Σχήμα 28: Καμπύλη ύψους έντασης ρεύματος κορυφής καδμίου προς δυναμικό ηλεκτροχημικής εναπόθεσης.	132
Σχήμα 29: Καμπύλη ύψους κορυφής καδμίου προς χρόνο ηλεκτροαπόθεσης.....	133

Σχήμα 30: Βολταμμογραφήματα καμπύλης καδμίου για συγκεντρώσεις καδμίου 0 (■), 5 (■), 10 (■), 15 (■), 20 (■), 25 (■), 30 (■), 35 (■), 40 (■), 45 (■) και 50 (■) µg/L.....	134
Σχήμα 31: Καμπύλη αναφοράς καδμίου.....	134
Σχήμα 32: Ένταση ηλεκτρικού ρεύματος για 20 ppb Cd με ηλεκτρόδιο εργασίας πάστας γραφίτη (■) και πάστας γραφίτη και οξειδίων Sb/Sn (■).	135
Σχήμα 33: Ένταση ηλεκτρικού ρεύματος που ελήφθη για διαφορετικές συγκεντρώσεις ακινητοποιημένης κ-καζεΐνης στην επιφάνεια των ηλεκτροδίων εργασίας.	137
Σχήμα 34: Ένταση ηλεκτρικού ρεύματος που ελήφθη για διαφορετικές αραιώσεις πολυκλωνικού αντισώματος.	138
Σχήμα 35: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης αναλυτικού σήματος για πρότυπα διαλύματα αιγοπρόβειου τυριού με 0% (■), 1%(■) και 10% (■) αγελαδινό τυρί για χρόνους ανοσοαντίδρασης 5, 10, 15, 30 και 60 min.	139
Σχήμα 36: Ένταση ηλεκτρικού ρεύματος για μηδενικό πρότυπο διάλυμα αιγοπρόβειου τυριού για χρόνους επώασης επισημασμένων με αβιδίνη κβαντικών κουκκίδων 5, 10, 15 και 30 min.	140
Σχήμα 37: Βολταμμογραφήματα των προτύπων διαλυμάτων της καμπύλης αναφοράς 0% (■), 0.1% (■), 0.5% (■), 1% (■), 2.5% (■), 5% (■), 10% (■) και τυφλού (■).	141
Σχήμα 38: Καμπύλη αναφοράς προτύπων διαλυμάτων αιγοπρόβειου τυριού με αγελαδινό τυρί. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στον μέσο όρο τριών επαναληπτικών μετρήσεων ± τυπική απόκλιση (±SD).	142

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση νοθείας με αγελαδινό γάλα	30
Εικόνα 2: Διαγραμματική αναπαράσταση τυπικών περιπτώσεων νοθείας ταξινομημένων ως προς συγκεκριμένα χαρακτηριστικά του γάλακτος και ως προς την πολυπλοκότητα προετοιμασίας του δείγματος κάθε εφαρμοζόμενης τεχνικής.	33
Εικόνα 3: Απλοποιημένη διαγραμματική αναπαράσταση μιας απλής οργανολογικής διάταξης υγροχρωματογραφίας	34
Εικόνα 4: Απλοποιημένη διαγραμματική αναπαράσταση οργανολογίας ενός συστήματος φασματομετρίας μαζών	37
Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση μη ανταγωνιστικού (Α) και ανταγωνιστικού (Β) ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού.....	41
Εικόνα 6: Χαρακτηριστικό σύστημα ηλεκτροχημικών μετρήσεων που περιλαμβάνει το ηλεκτροχημικό στοιχείο (κυψελίδα), τον ποτενσιοστάτη και το υπολογιστικό σύστημα απεικόνισης και καταγραφής του αναλυτικού σήματος.	53
Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση του ανταγωνιστικού τύπου ανοσοχημικού προσδιορισμού κ-καζεΐνης σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης.	79
Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση επιπέδων εκτύπωσης ηλεκτροδίου εργασίας	83
Εικόνα 9: Φωτογραφία σειράς 7 εκτυπωμένων μέσω πλέγματος ηλεκτροδίων εργασίας. Οι διαστάσεις είναι σε cm.	84
Εικόνα 10: Τρισδιάστατο σχέδιο ηλεκτροχημικής μικροκυψελίδας με τα ηλεκτρόδια γραφίτη (ηλεκτρόδιο αναφοράς και βοηθητικό ηλεκτρόδιο) (οι εικονιζόμενες διαστάσεις είναι σε cm) (Α), συγκριτικό μέγεθος κυψελίδας και σπύριτου (Β) και φωτογραφία ολοκληρωμένης ηλεκτροχημικής μικροκυψελίδας, ηλεκτροδίων γραφίτη (ηλεκτρόδιο αναφοράς και βοηθητικό ηλεκτρόδιο) και ηλεκτροδίου εργασίας (Γ).....	85
Εικόνα 11: Τρισδιάστατος εκτυπωτής Creator Pro της Flashforge	86

Εικόνα 12: Σχηματική αναπαράσταση πρωτοκόλλου για τον προσδιορισμό νοθείας αιγοπρόβειου τυριού με αγελαδινό στον ηλεκτροχημικό ανοσοαισθητήρα**Error!**
Bookmark not defined.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Βέλτιστες συνθήκες του ανταγωνιστικού τύπου ενζυμικού ανοσοχημικού προσδιορισμού βόειας κ-καζεΐνης	107
Πίνακας 2: Αναλυτικά χαρακτηριστικά ανταγωνιστικού τύπου ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού βόειας κ-καζεΐνης	110
Πίνακας 3: Αναλυτικά χαρακτηριστικά ανταγωνιστικού τύπου ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού κ-καζεΐνης με βιοτινυλιωμένο αντίσωμα	115
Πίνακας 4: Αναλυτικά χαρακτηριστικά του ανταγωνιστικού τύπου ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού αγελαδινού γάλακτος σε κατσίκισιο	120
Πίνακας 5: Αναλυτικά χαρακτηριστικά του ανταγωνιστικού τύπου ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού αγελαδινού τυριού σε κατσίκισιο	125
Πίνακας 6: Επί τοις εκατό ανάκτηση αγελαδινού τυριού μετά από προσθήκη γνωστών συγκεντρώσεων σε αιγοπρόβειο τυρί	126
Πίνακας 7: Αναλυτικά χαρακτηριστικά του ανταγωνιστικού τύπου ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού νοθείας αιγοπρόβειου τυριού με αγελαδινό στον ηλεκτροχημικό ανοσοαισθητήρα.....	143
Πίνακας 8: Αναλυτικές τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί στην βιβλιογραφία για την ανίχνευση νοθείας τυριού	149
Πίνακας 9: Ακρωνύμια και η ανάπτυξή τους	151

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία εκπονήθηκε την περίοδο 10/2018 έως 10/2019 στο Εργαστήριο Ανοσοαναλύσεων του Ινστιτούτου Πυρηνικών & Ραδιολογικών Επιστημών & Τεχνολογίας, Ενέργειας & Ασφάλειας (Ι.Π.Ρ.Ε.Τ.Ε.Α) του Εθνικού Κέντρου Φυσικών Επιστημών (Ε.Κ.Ε.Φ.Ε) «Δημόκριτος» υπό την επίβλεψη των Δρ. Π. Πέτρου και Δρ. Σ. Κακαμπάκο σε συνεργασία με το εργαστήριο αναλυτικής χημείας του τμήματος Χημείας του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (Ε.Κ.Π.Α) υπό την καθοδήγηση και επίβλεψη του επίκουρου καθηγητή Χ. Κόκκινου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΤΥΡΙ

1.1 Το τυρί ως μέρος της διατροφής του ανθρώπου

Ως τυρί, χαρακτηρίζεται μία τεράστια ομάδα τροφίμων, τα οποία έχουν ως κοινό χαρακτηριστικό ότι είναι προϊόντα ζύμωσης γαλακτοκομικής προέλευσης. Η προέλευση του τυριού τοποθετείται το 10 000 π.Χ. [1] στην περιοχή της Μέσης Ανατολής όπου χρονολογείται ή περίοδος που άρχισε η εξημέρωση του πρόβατου και της κασίκας για την παραγωγή και κατανάλωση του γάλακτός τους ως βασική τροφή των πρώτων κτηνοτρόφων. Η εξέλιξη του γάλακτος σε τυρί εστιάζεται χρονικά στο 6000 π.Χ. και χωρικά στην γόνιμη περιοχή που οριοθετούσαν οι ποταμοί Τίγρης και Ευφράτης στην περιοχή του σημερινού Ιράκ [2]. Το κλίμα της περιοχής εκείνης ήταν ιδιαίτερος εύκρατο κάτι το οποίο είχε ως άμεση συνέπεια την σύντομη ζωή του γάλακτος πριν αρχίσει να αλλοιώνεται. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την μεταφορά του γάλακτος σε τσάντες από δέρματα ζώου κατά την μετακίνησή του από περιοχή σε περιοχή θεωρείται πως οδήγησε στην εμφάνιση των πρώτων μορφών τυριού [1]. Καθώς το γάλα αλλοιώνεται, ή αλλιώς ξινίζει, η οξύτητά του αυξάνεται και τα σάκχαρα του τίθενται σε μια διαδικασία ζύμωσης, η οποία αρχίζει να δημιουργεί συσσωματώματα τα οποία διαχωρίζονται από τα υδατικά μέρη του γάλακτος. Η συνεχής μετακίνηση του πληθυσμού και η μεταφορά του γάλακτος διαμέσου εκτάσεων αρκετών χιλιομέτρων είχε ως αποτέλεσμα τον πλήρη διαχωρισμό των πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων από το υδατικό μέρος του γάλακτος και την δημιουργία των πρώτων τυριών. Με την προσθήκη αλατιού στην νέα αυτή παρασκευή το προϊόν αυτό καταναλωνόταν και ήταν κρίσιμο για την επιβίωση των φυλών αυτών καθώς διατηρούσε την υψηλή διατροφική αξία που είχε το γάλα και την μεγαλύτερη περίοδο διατήρησής του κατά τις μετακινήσεις του πληθυσμού. Η νομαδική φύση των πληθυσμών της περιοχής οδήγησε στην μεταφορά των τυριών προς την ευρωπαϊκή χερσόνησο όπου η τότε ρωμαϊκή αυτοκρατορία πήρε την ιδέα αυτού του προϊόντος, την βιομηχανοποίησε και

διέδωσε σε όλη την υπόλοιπη Ευρώπη [1]. Από τότε η μετατροπή του γάλακτος σε τυρί εξελίχθηκε από ένα τυχαίο γεγονός σε επιτηδευμένη επεξεργασία του έτσι ώστε να μπορέσει το προϊόν να διατηρηθεί για περισσότερο καιρό. Αυτό με την σειρά του επέτρεψε την περαιτέρω εξάπλωσή του σε κάθε γωνία του πλανήτη καθώς και την καθιέρωσή του στις διατροφικές συνήθειες των ανθρώπων. Το διαφορετικό κλίμα κάθε περιοχής της Ευρώπης σε σχέση με την Μέση Ανατολή αλλά και μεταξύ τους οδήγησε σταδιακά στην δημιουργία πολλών διαφορετικών τύπων τυριών φτάνοντας σήμερα να αριθμούνται περισσότερα από 1800 [3] διακριτά είδη τυριών ανά τον κόσμο.

1.2 Παρασκευή τυριού από γάλα

Η βασική πρώτη ύλη για την διαδικασία παρασκευής ενός τυριού είναι το γάλα. Υπάρχουν πολλά είδη γάλακτος είτε ζωικής προέλευσης (πρόβειο, κατσικίσιο, βουβαλίσιο) είτε φυτικής όπως γάλα σόγιας, καρύδας και άλλα. Επισημώς, ως γάλα χαρακτηρίζεται αυστηρά μόνο το προϊόν, το οποίο έχει προέλθει από θηλαστικό. Πάρα ταύτα, η κοινή χρήση του όρου περιλαμβάνει και το φυτικής προέλευσης γάλα.

1.3 Πρωτεϊνική σύσταση αγελαδινού γάλακτος

Η πρωτεϊνική σύσταση ενός τυριού ανακλά πλήρως την σύσταση του γάλακτος από το οποίο παρασκευάστηκε. Για αυτό και διαφορετικά είδη γάλακτος οδηγούν σε διαφορετικές μορφές, γεύσεις, υφές αλλά και τρόπους επεξεργασίας των τυριών που προκύπτουν.

Το αγελαδινό γάλα είναι η πιο επικρατής μορφή γάλακτος που παράγεται και καταναλώνεται παγκοσμίως. Έχει υψηλή θρεπτική αξία και περιέχει ευεργετικά συστατικά. Οι πρωτεΐνες του γάλακτος ευθύνονται τόσο για τις επιθυμητές ιδιότητες και τα χαρακτηριστικά του, αλλά είναι υπεύθυνες και για την πρόκληση αλλεργικών επεισοδίων [4].

Το κύριο συστατικό του γάλακτος είναι το νερό, σε ποσοστό ~85% του τελικού προϊόντος. Τα στερεά συστατικά του περιλαμβάνουν λίπη, πρωτεΐνες, ανόργανα άλατα και υδατάνθρακες σε περιεκτικότητα 11.5%-12%. Όσον αφορά τις πρωτεΐνες, περιέχει πάνω από 20 διαφορετικά είδη πρωτεϊνών σε ποσοστό 3-3.5% οι οποίες, διακρίνονται σε δύο κατηγορίες βάσει της διαλυτότητάς τους: τις πρωτεΐνες ορού γάλακτος και τις καζεΐνες [4].

1.3.1 Πρωτεΐνες ορού γάλακτος

Οι πρωτεΐνες που βρίσκονται διαλυτές στο υδατικό μέρος του γάλακτος ονομάζονται πρωτεΐνες ορού και αποτελούν το 20% των ολικών πρωτεϊνών του αγελαδινού γάλακτος. Χωρίζονται σε 5 μεγάλες κατηγορίες οι οποίες θα περιγραφούν συνοπτικά στην συνέχεια.

- α-λακταλβουμίνη (ALA)

Η α-λακταλβουμίνη (ALA) αποτελεί το 25% των πρωτεϊνών του ορού του γάλακτος και είναι ένα από τα κύρια αλλεργιογόνα συστατικά του [5]. Είναι μία μεταλλοπρωτεΐνη η οποία δεσμεύει το ασβέστιο και παίζει κύριο ρόλο στην σύνθεση της λακτόζης. [6]

- β-λακτογλοβουλίνη (β-LG)

Η β-λακτογλοβουλίνη (β-LG) αποτελεί την κυριότερη πρωτεΐνη ορού στο γάλα με περιεκτικότητα 50% [5] και το κυριότερο αλλεργιογόνο συστατικό του γάλακτος [6]. Η βιολογική δράσης της, παρατηρείται στην δέσμευση ποικιλίας μορίων όπως η χοληστερόλη, η ρετινόλη, κορεσμένα και ακόρεστα λιπαρά οξέα, δισθενή ιόντα σιδήρου και χαλκού καθώς επίσης έχει και αντιοξειδωτική δράση [6].

- βόεια οραλβουμίνη (BSA)

Η βόεια οραλβουμίνη ενώ βρίσκεται σε χαμηλή περιεκτικότητα στο γάλα, αντιδρά με τα αντισώματα ορού ανθρώπων αλλεργικών στο γάλα στο 50% των περιπτώσεων [6]. Αυτό σημαίνει ότι αποτελεί ένα κύριο αλλεργιογόνο του γάλακτος. Η κύρια βιολογική δράση της σχετίζεται με την μεταφορά, τον μεταβολισμό, μεταφορά/κατανομή διαφόρων μορίων (λιπαρά οξέα, ορμόνες,

φάρμακα) καθώς και προστασία από ελεύθερες ρίζες [6]. Επιπλέον, η βόεια οραλβουμίνη αποτελεί το κύριο αλλεργιογόνο συστατικό για τους αλλεργικούς στο μοσχαρίσιο κρέας [5].

- βόεια ανοσοσφαιρίνη γ (IgG)

Η βόεια ανοσοσφαιρίνη γ αποτελεί το 3% των ολικών πρωτεϊνών του γάλακτος και το 6% των πρωτεϊνών του ορού του γάλακτος [6]. Συναντάται ως αλλεργιογόνο τόσο στο αγελαδινό γάλα όσο και στο μοσχαρίσιο κρέας [5]. Η αλλεργική της δράση βρίσκεται ακόμα υπό εξέταση αλλά έχει παρατηρηθεί πως δεσμεύεται από τα αντισώματα του ορού ανθρώπων που είναι αλλεργικοί στο γάλα [6].

- λακτοφερρίνη (Lactoferrin)

Η λακτοφερρίνη, βρίσκεται σε περιεκτικότητα <1% στο γάλα των περισσότερων ειδών [6]. Η κύρια βιολογική της λειτουργία είναι η προστασία του οργανισμού έναντι των λοιμώξεων και των φλεγμονών καθώς απομακρύνει/δεσμεύει τον σίδηρο από τον περιβάλλοντα χώρο με αποτέλεσμα να δημιουργείται έλλειψη του κύριου συστατικού της βακτηριακής ανάπτυξης. Επιπλέον, έχει ρόλο αντιοξειδωτικού και εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες [6].

1.3.2 Καζεΐνες

Οι καζεΐνες αποτελούν την κύρια κατηγορία πρωτεϊνών του γάλακτος της τάξεως του 80% συνολικής πρωτεΐνης καθώς και επίσης το κύριο ενδιαφέρον της παρούσας εργασίας καθώς ο προσδιορισμός της νοθείας που πραγματοποιήθηκε βασίζεται στην ανίχνευση της κ-καζεΐνης, η οποία αποτελεί ένα κλάσμα αυτών. Η ολική καζεΐνη, βρίσκεται σε διάλυμα ως μια ενιαία πρωτεϊνική δομή που απαρτίζεται από τις εξής διακριτές πρωτεΐνες: την as1, την as2, την β-, την γ- και την κ-καζεΐνη. Οι as1-καζεΐνες αποτελούν πάνω από το 40% των καζεϊνών στο αγελαδινό γάλα ενώ οι as2-καζεΐνες

συναντώνται σε ποσοστό ~12.5% και είναι οι πλέον υδρόφιλες των καζεϊνών. Η β-καζεΐνη αποτελεί το 35% της ολικής καζεΐνης και είναι η πλέον υδρόφοβη και πολύπλοκη δομικά λόγω μιας ενδογενούς πρωτεάσης, της πλασμίνης. Η ομάδα των γ-καζεϊνών αποτελείται από τις γ1-, γ2- και γ3-καζεΐνες οι οποίες είναι προϊόντα διάσπασης της β-καζεΐνης από την πλασμίνη. Τέλος, η κ-καζεΐνη, αποτελεί το 12-15% της ολικής πρωτεΐνης και παρότι είναι εκείνη με την μικρότερη συγκέντρωση παίζει σημαντικό ρόλο στην σταθερότητα και πήξη του γάλακτος.

Με μοναδική εξαίρεση την κ-καζεΐνη, οι υπόλοιπες είναι ευαίσθητες στο ασβέστιο, κάτι το οποίο σημαίνει ότι λόγω της δομής τους, τους επιτρέπεται ο σχηματισμός χηλικών ενώσεων με το ασβέστιο [7]. Σε φυσιολογικές συνθήκες, στο γάλα περιέχονται 30 mM ασβεστίου κάτι το οποίο θα είχε ως αποτέλεσμα την ταχεία πήξη του λόγω του σχηματισμού χηλικών ενώσεων με τις καζεΐνες. Ωστόσο, κάτι τέτοιο δεν συμβαίνει καθώς οι καζεΐνες σε διάλυμα δημιουργούν μικκύλια μετά από αντιδράσεις μεταξύ τους. Σε αυτές ακριβώς τις δομές καθώς και στα λιποσφαίρια οφείλεται το λευκό χρώμα του γάλακτος λόγω της ολικής ανάκλασης του φωτός στην επιφάνειά τους. Ένας εύκολος τρόπος επιβεβαίωσης αυτού είναι η απομόνωση του ορού του γάλακτος, ο οποίος έχει υπόλευκο-υποκίτρινο χρώμα καθώς δεν περιέχει καζεΐνες.

Τα μικκύλια είναι κολλοειδείς δομές με την εσωτερική τους επιφάνεια να είναι υδρόφοβη ενώ η εξωτερική επιφάνεια είναι υδρόφιλη. Η αιτία σχηματισμού των μικκυλίων, είναι οι υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις των κατάλληλων περιοχών των καζεϊνών, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα των σχηματισμό ενός υδρόφοβου πυρήνα [8]. Η πρόσδεση του ασβεστίου επιφέρει σταθεροποίηση των μικκυλιακών δομών καθώς εξαλείφει την περίσσεια ομώνυμων ανιονικών φορτίων στην περιοχή του πυρήνα. Με την σειρά της, η κ-καζεΐνη, παρέχει περαιτέρω σταθεροποίηση περικλείοντας το υδρόφοβο υπομικκύλιο και σχηματίζοντας μία στοιβάδα που μοιάζει σαν το τριχωτό της κεφαλής του ανθρώπου. Έτσι, το καρβοξυτελικό άκρο της, ως υδρόφιλο, προεξέχει από το μικκύλιο και δημιουργεί μία μεσόφαση η οποία προστατεύει τις ευαίσθητες στο ασβέστιο καζεΐνες από το υδατικό περιβάλλον του γάλακτος.

Κατά την απομόνωση της κ-καζεΐνης από το γάλα εμφανίζεται ως μίγμα πολυμερών από διμερή έως και οκταμερή τα οποία είναι συνδεδεμένα με δισουλφιδικούς δεσμούς. Κατά την παραγωγή τυριού, η χυμοσίνη διασπά πολύ ειδικά την κ-καζεΐνη στο δεσμό μεταξύ της φαινυλαλανίνης 105 και της μεθειονίνης 106, δημιουργώντας δύο επιμέρους πεπτίδια τα οποία ονομάζονται πάρα κ-καζεΐνη (θραύσμα 1 έως 105) και καζεΐνομακροπεπτιδιο-γλυκομακροπεπτιδιο (GlycoMacroPeptide/CaseinMacroPeptide, GMP/CMP) (θραύσμα 106 έως 169). Η πάρα κ-καζεΐνη είναι αδιάλυτη και παραμένει στην επιφάνεια των μικκυλίων προκαλώντας τη συσσωμάτωσή τους και την δημιουργία πηκτώματος ενώ το GMP είναι διαλυτό, παραμένει στον ορό και μεταφέρεται στο τυρί όπου τίθεται υπό περαιτέρω ενζυμική αποικοδόμηση [8]. Το GMP είναι βιοενεργό πεπτιδιο του ορού του γάλακτος, το οποίο περιέχει όλους τους υδαάνθρακες της κ-καζεΐνης και επιπλέον παρέχει ανοσορυθμιστική, προβιοτική και αντιμικροβιακή δράση [9]. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί πως παρότι το GMP σχηματίζεται κατά την διαδικασία παραγωγής τυριού ανιχνεύεται και στο αγελαδινό γάλα σε περίπου 10 φορές μικρότερη συγκέντρωση [10].

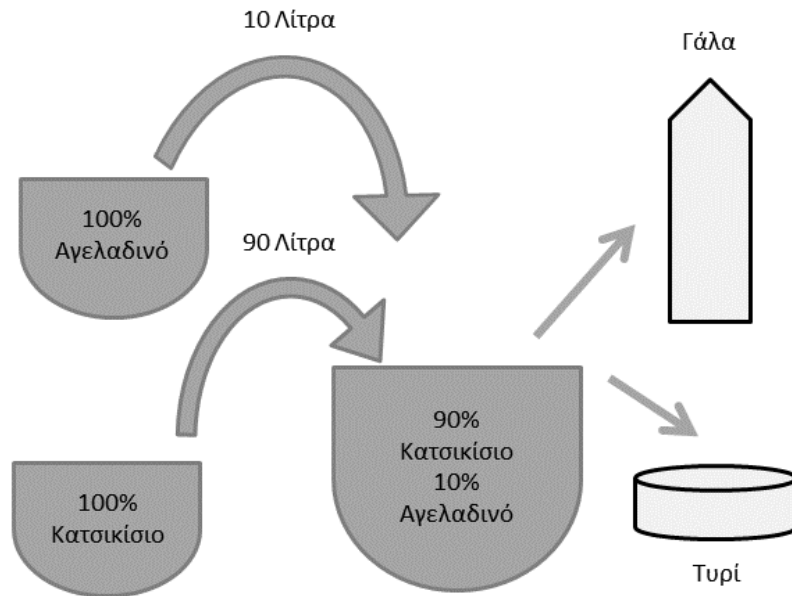
Στο πειραματικό στάδιο της παρούσας εργασίας, το ειδικό πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της βόειας κ-καζεΐνης αναγνωρίζει και δεσμεύει τόσο την βόεια κ-καζεΐνη αλλά και το GMP του ορού γάλακτος στο τυρί και μέσω αυτού καθίσταται εφικτός ο προσδιορισμός της νοθείας αιγοπρόβειου τυριού με αγελαδινό.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΝΟΘΕΙΑ

2.1 Σημαντικότητα ανίχνευσης

Η νοθεία στην βιομηχανία τροφίμων και ιδιαιτέρως στα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι συχνό φαινόμενο, το οποίο κατά καιρούς έρχεται στο φως της δημοσιότητας εξαιτίας των τεράστιων επιπτώσεων που μπορεί να έχει στην ανθρώπινη υγεία. Κύριο κίνητρο πίσω από κάθε προσπάθεια νοθείας ενός προϊόντος είναι η αύξηση του κέρδους. Η πρακτική αυτή μπορεί να έχει ποικίλες επιδράσεις όπως το να επηρεάσει την εμφάνιση ή την γεύση του προϊόντος χωρίς την πρόκληση κανενός άμεσου ή έμμεσου προβλήματος υγείας για τους καταναλωτές, αλλά μπορεί επιπλέον να προκαλέσει σοβαρά προβλήματα υγείας σε ευαίσθητες ομάδες καταναλωτών ή ακόμα και να θέσει σε κίνδυνο την ζωή τους. Στην Ευρώπη, υπάρχουν κατευθυντήριες οδηγίες [11, 12] που υποχρεώνουν τους παραγωγούς να αναφέρουν ρητά στην συσκευασία των προϊόντων τους το είδος του γάλακτος που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή επεξεργασμένων τροφίμων. Επιπλέον, ό,τι αναφέρεται στην συσκευασία πρέπει να μην αποπροσανατολίζει τον υποψήφιο αγοραστή/καταναλωτή. Τα γαλακτοκομικά προϊόντα αποτελούν ένα πολύ μεγάλο μέρος της αγοράς αλλά και των διατροφικών συνηθειών του ανθρώπου και συνεπακόλουθα, η ανάγκη αποτελεσματικού ελέγχου των γαλακτοκομικών προϊόντων προς αποφυγή τυχαίας ή επιτηδευμένης νοθείας αποκτά ιδιαίτερα υψηλή σημασία..



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση νοθείας με αγελαδινό γάλα

2.2 Χαρακτηριστικά ειδών γάλακτος

Τα τρία πιο κοινά είδη παραγωγής και κατανάλωσης γάλακτος είναι το αγελαδινό, το κατσικίσιο, το πρόβειο γάλα καθώς και τα προϊόντα τους. Την υψηλότερη πρωτεϊνική συγκέντρωση παρουσιάζει το πρόβειο γάλα με 66 mg/mL, δεύτερο βρίσκεται το κατσικίσιο με συγκέντρωση 47 mg/mL και τρίτο το αγελαδινό με 40 mg/mL συγκέντρωση πρωτεϊνών. Όσον αφορά στο ποσοστό λίπους, το κατσικίσιο περιέχει περισσότερο λίπος και λιπαρά οξέα μεσαίας και μικρής αλυσίδας από το αγελαδινό. Επιπροσθέτως, κατά την κατανάλωσή του κατσικίσιου γάλακτος, το τυρόπηγμα που σχηματίζεται στο στομάχι του καταναλωτή είναι λιγότερο πυκνό από ότι στην περίπτωση του αγελαδινού γάλακτος. Αυτό σε συνδυασμό με την διαφορετική φυσικοχημική σύσταση του κατσικίσιου ίσως καθιστά το κατσικίσιο γάλα εύπεπτο συγκριτικά με το αγελαδινό, ιδιαίτερα στα νεογνά.

Οι άνθρωποι εμφανίζουν σε διαφορετικό βαθμό ευαισθησίες και αλλεργικές αντιδράσεις ως προς το αγελαδινό γάλα, οι οποίες ενώ στην πλειοψηφία τους εμφανίζονται αλλά και εξαλείφονται σε μικρή ηλικία μπορούν να διαρκέσουν

για όλη την διάρκεια ζωής. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η κατανάλωση γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων που προέρχονται από πρόβειο ή κατσικίσιο γάλα αποτελεί μία εναλλακτική πηγή πρωτεϊνών. Στο κατσικίσιο γάλα, η as1-καζεΐνη υπάρχει σε πολύ μικρές ποσότητες και μιας και αυτή αποτελεί το κυριότερο αλλεργιογόνο συστατικό του αγελαδινού γάλακτος συνεπάγεται πως το κατσικίσιο θα έχει πολύ χαμηλότερο αλλεργιογόνο φορτίο.

2.3 Κίνητρα υπέρ της νοθείας γαλακτοκομικών προϊόντων

Ως γαλακτοκομικά προϊόντα εννοούνται τα εξής: εμφιαλωμένο γάλα, βούτυρο, τυρί και γιαούρτι. Κάθε ένα από αυτά μπορεί να παρασκευαστεί με οποιοδήποτε είδος γάλακτος ή ακόμα και μίγματα αυτών σε κατάλληλες αναλογίες, δημιουργώντας έτσι ένα διακριτό προϊόν κάθε φορά. Ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα για τους καταναλωτές είναι η νοθεία του γάλακτος που προέρχεται από άλλα είδη πέραν του αγελαδινού, με αγελαδινό γάλα ή με ορό αγελαδινού τυριού. Ο ορός τυριού είναι ένα φυσικό παραπροϊόν της παραγωγής τυριού και αποτελεί ελκυστικό μέσο νοθείας καθώς το κόστος του είναι 5 φορές χαμηλότερο από το αγελαδινό γάλα, το οποίο είναι και το φθηνότερο γάλα στο εμπόριο. Σύνηθες κίνητρο επομένως, είναι η μείωση του κόστους των παραγόμενων προϊόντων και η αναμενόμενη αύξηση των περιθωρίων κέρδους τόσο των παραγωγών όσο και των γαλακτοβιομηχανιών [13]. Όμως, αξίζει να σημειωθεί ότι εκτός από τους ανθρώπους που έχουν δυσανεξίες ή αλλεργίες σε κάποιο είδος γάλακτος και των προϊόντων του, είναι σημαντικό να μπορεί να ανιχνευθεί η νοθεία καθώς τα γαλακτοκομικά προϊόντα ως τρόφιμα τίθενται υπό εξέταση και από καταναλωτές που για ιδεολογικούς, ηθικούς, πολιτισμικούς ή θρησκευτικούς λόγους προτιμούν ή αποφεύγουν συγκεκριμένες πηγές γάλακτος [14].

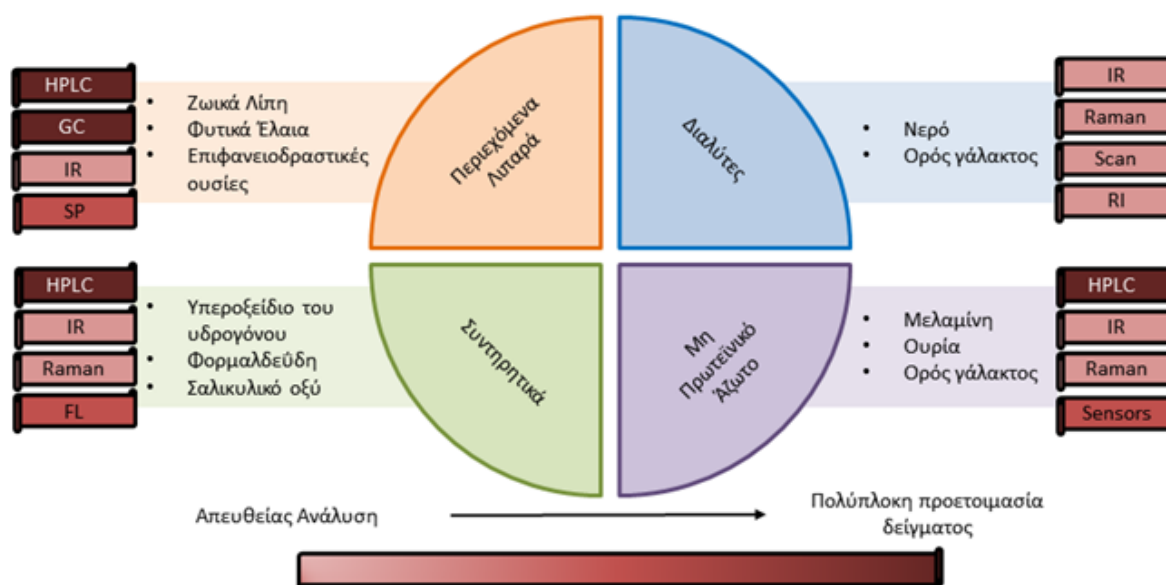
Τα τελευταία χρόνια, έχει παρατηρηθεί αύξηση της κατανάλωσης του κατσικίσιου γάλακτος παγκοσμίως τόσο λόγω της ευκολίας στην πέψη, της υψηλότερης διατροφικής του αξίας και της ιδιαίτερης γεύσης του, ενώ είναι ακριβότερο από το αγελαδινό και τα αντίστοιχα προϊόντα του. Λαμβάνοντας υπόψιν τα προηγούμενα και την περιορισμένη γεωγραφική και εποχική

διαθεσιμότητα και παραγωγή του κασικίσιου γάλακτος, είναι φανερό πως καθίσταται ελκυστικό για νοθεία.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΝΟΘΕΙΑΣ ΑΙΓΟΡΠΟΒΕΙΟΥ ΤΥΡΙΟΥ ΚΑΙ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΜΕ ΑΓΕΛΑΔΙΝΟ

Όπως προαναφέρθηκε, η νοθεία αιγοπρόβειου γάλακτος και τυριού είναι σημαντικό πρόβλημα και για αυτό έχουν αναπτυχθεί πολλές μέθοδοι για τον έλεγχό τους. Οι κυριότερες τεχνικές που συναντώνται στην βιβλιογραφία είναι η υγρή χρωματογραφία, η ανάλυση DNA, η φασματομετρία μάζας και οι ανοσοχημικές τεχνικές. Στην συνέχεια, θα περιγραφούν τα βασικά στοιχεία αυτών των τεχνικών.



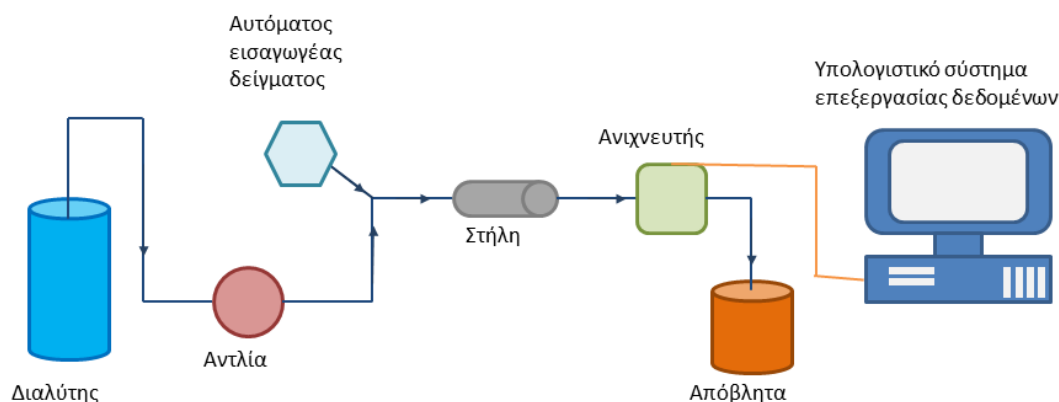
Εικόνα 2: Διαγραμματική αναπαράσταση τυπικών περιπτώσεων νοθείας ταξινομημένων ως προς συγκεκριμένα χαρακτηριστικά του γάλακτος και ως προς την πολυπλοκότητα προετοιμασίας του δείγματος κάθε εφαρμοζόμενης τεχνικής.

3.1 Χρωματογραφικές τεχνικές

Οι χρωματογραφικές τεχνικές αποτελούν μια μεγάλη κατηγορία τεχνικών διαχωρισμού μιγμάτων ουσιών και εφαρμόζονται σε καθημερινή βάση σε

διάφορες βιομηχανίες τόσο για τον έλεγχο ποιότητας των προϊόντων αλλά και για την παραγωγή ή καθαρισμό πρώτων υλών ή τελικών προϊόντων. Ο διαχωρισμός σε αυτήν την ομάδα τεχνικών βασίζεται στις διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες των μορίων, οι οποίες αξιοποιούνται για την επιλεκτική απομόνωση ουσιών από ένα πολύπλοκο δείγμα.

Οι χρωματογραφικές τεχνικές με κριτήριο τα υλικά των στατικών και κινητών φάσεων που βρίσκονται σε επαφή χωρίζονται σε χρωματογραφίες στήλης και επιπεδικές χρωματογραφίες. Στην συνέχεια, οι τεχνικές χρωματογραφίας στήλης χωρίζονται σε υγρή και αέρια χρωματογραφία, ανάλογα με το είδος της κινητής φάσης της στήλης.



Εικόνα 3: Απλοποιημένη διαγραμματική αναπαράσταση μιας απλής οργανολογικής διάταξης υγροχρωματογραφίας

Δεδομένου ότι στον διαχωρισμό πρωτεϊνών καλό θα ήταν να αποφεύγονται οι υψηλές θερμοκρασίες καθώς υπάρχει κίνδυνος αποδιάταξής τους, κάτι το οποίο δεν θα έχει το επιθυμητό αποτέλεσμα στην περίπτωση του ελέγχου νοθείας, στην βιβλιογραφία συναντάται μόνο η χρήση της υγρής χρωματογραφίας για την εφαρμογή αυτή καθώς οι θερμοκρασίες λειτουργίας είναι χαμηλές σε αντίθεση με την αέρια χρωματογραφία όπου οι θερμοκρασίες είναι πολύ υψηλές. Για παράδειγμα, δύο πρωτεϊνικά μόρια μπορεί να διαφέρουν σημαντικά στο μέγεθος τους οπότε και μία στήλη μοριακού

αποκλεισμού κατάλληλου μεγέθους πόρων θα μπορούσε να διαχωρίσει την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει από τα υπόλοιπα συστατικά του μίγματος [15].

Το 2014, αναπτύχθηκε μέθοδος υγρής χρωματογραφίας σε σύζευξη με φασματομετρία μαζών, για τον προσδιορισμό νοθείας βόειου γάλακτος με τυρόγαλο [16]. Ο προσδιορισμός βασίστηκε στην ανίχνευση του καζεΐνομακροπεπτιδίου με όριο ανίχνευσης 1 $\mu\text{g/mL}$ και όριο ποσοτικοποίησης 5 $\mu\text{g/mL}$.

Το 2016, αναπτύχθηκε μέθοδος ηλεκτροφόρησης γέλης σε περιβάλλον αποδιάταξης σε σύζευξη με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης για τον προσδιορισμό νοθείας βουβαλίσσιου τυριού (mozzarella di bufallo) με αγελαδινό [17]. Επιτεύχθηκε όριο ανίχνευσης 5% (β/β).

Το 2017, αναπτύχθηκε μέθοδος υγρής χρωματογραφίας σε σύζευξη με φασματομετρία μαζών για τον προσδιορισμό νοθείας με αγελαδινό τυρί σε βουβαλίσσιο τυρί (mozzarella di bufallo) μέσω δεικτών μικρού μοριακού βάρους όπως είναι το β -καροτένιο και η εργοκαλσιφερόλη [18]. Επιτεύχθηκε όριο ανίχνευσης 5% (β/β).

3.2 Τεχνικές που βασίζονται στην ανάλυση DNA

Η ανάλυση DNA στηρίζεται στην αλυσιδωτή αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) και τις παραλλαγές τις.

Οι μέθοδοι PCR, βασίζονται στην ενίσχυση συγκεκριμένου τμήματος DNA κάνοντας χρήση συγκεκριμένων ολιγονουκλεοτιδίων που λειτουργούν ως εκκινήτες και μπορούν να δώσουν ποιοτική πληροφορία (PCR τελικού σημείου) ή ποσοτική πληροφορία (PCR πραγματικού χρόνου, Real Time-PCR). Στις μεθόδους αυτές, οι αλληλουχίες-στόχοι δεν χρειάζεται να κωδικοποιούν αλληλουχίες κάποιας αλλεργιογόνου πρωτεΐνης αλλά στην πλειοψηφία των περιπτώσεων ανιχνεύεται το γενομικό DNA του ζώου από το οποίο προέρχεται η πρόσμιξη, ανεξάρτητα με την παρουσία ή μη συγκεκριμένων πρωτεϊνών στο δείγμα [19]. Κατά την ποιοτική ανάλυση DNA,

η ανίχνευση πραγματοποιείται μέσω ηλεκτροφόρησης μετά το πέρας της ενίσχυσης της αλληλουχίας-στόχου ενώ στην ποσοτική ανάλυση, η ανίχνευση μπορεί να πραγματοποιηθεί ακόμη και μετά από κάθε κύκλο ενίσχυσης. Η ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου επιτυγχάνεται με την χρήση συγκεκριμένων ολιγονουκλεοτιδίων-φάρων (molecular beacons) τα οποία, περιέχουν αλληλουχία συμπληρωματική της αλληλουχίας-στόχου και είναι επισημασμένα στο ένα άκρο τους με φθορίζουσα ουσία ενώ στο άλλο με ουσία που αποσβένει φθορισμό (quencher). Ακολουθώντας κατάλληλο σχεδιασμό της αλληλουχίας των ολιγονουκλεοτιδίων, τα δύο άκρα που προαναφέρθηκαν, απουσία του συμπληρωματικού DNA στο δείγμα του τροφίμου, υβριδίζονται και λόγω της γεινίασης της φθορίζουσας ομάδας και του καταστολέα φθορισμού, ο εκπεμπόμενος φθορισμός είναι χαμηλός. Καθώς πολλαπλασιάζονται οι στοχευόμενες αλληλουχίες με κάθε κύκλο, τα ολιγονουκλεοτίδια-φάρω υβριδίζονται με τα παραγόμενα αντίγραφα του στόχου στο δείγμα με αποτέλεσμα τα σημασμένα με φθορίζουσα άκρα να απομακρύνονται από τους καταστολείς φθορισμού με συνεπακόλουθη αύξηση της έντασης φθορισμού [19].

Το 2004, αναπτύχθηκε μέθοδος PCR για την ανίχνευση νοθείας βουβαλίσου τυριού με αγελαδινό χρησιμοποιώντας μιτοχονδριακό DNA ως βιοδείκτη [20]. Επιτεύχθηκε όριο ανίχνευσης 0.5% (o/o).

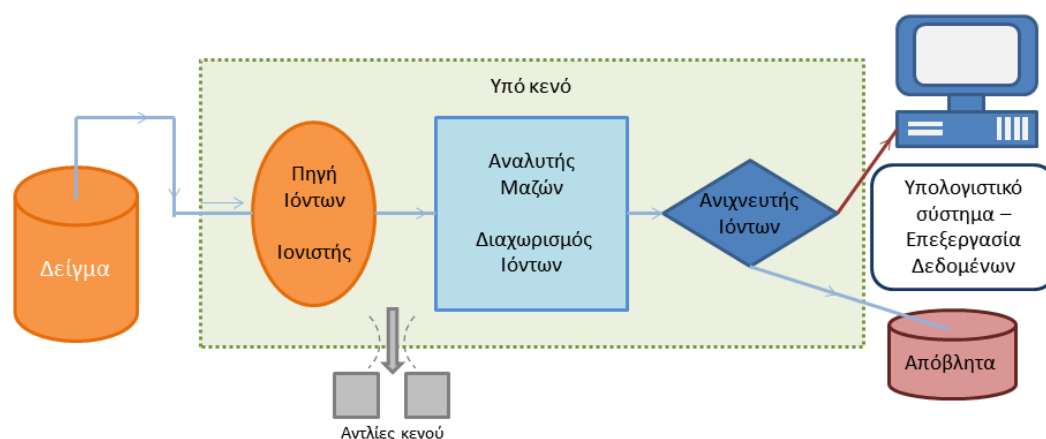
Το 2014, αναπτύχθηκε μέθοδος διπλής PCR για την ανίχνευση νοθείας κατσικίσου τυριού με αγελαδινό χρησιμοποιώντας ως βιοδείκτη μιτοχονδριακό DNA [21]. Επιτεύχθηκε όριο ανίχνευσης 0.5% (o/o).

Το 2015, αναπτύχθηκε μέθοδος τετραπλής PCR για την ανίχνευση νοθείας κατσικίσου, πρόβειου και βουβαλίσου γάλακτος και τυριού με αγελαδινό [22]. Επιτεύχθηκε όριο ανίχνευσης 0.1% (o/o) αγελαδινού γάλακτος τόσο για μίγματα γάλακτος όσο και τυριών.

Τέλος, δύο χρόνια αργότερα (2017) αναπτύχθηκε μέθοδος προσδιορισμού ταυτότητας του γάλακτος που χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη στην παραγωγή τυριού μέσω PCR πραγματικού χρόνου [23].

3.3 Τεχνικές φασματομετρίας μάζας

Οι τεχνικές φασματομετρίας μαζών βασίζονται στον διαχωρισμό μοριακών ιόντων ενός δείγματος με βάση το μοριακό τους βάρος και το φέρον φορτίο τους. Τα γενικά στάδια που περιλαμβάνονται σε μία τεχνική φασματομετρίας μαζών είναι η δημιουργία μοριακών ιόντων και η μετατροπή ενός μέρους των ατόμων αυτών σε ρεύμα ιόντων, ο διαχωρισμός των ιόντων αυτών με βάση τον λόγο μάζας προς φορτίο και τέλος η απαρίθμηση των επιλεγμένων ιόντων. Με αυτόν τον τρόπο και παρακολουθώντας το μητρικό ιόν καθώς και τα θυγατρικά μοριακά θραύσματα μπορεί να ταυτοποιηθεί η παρουσία μητρικής ένωσης στο αρχικό δείγμα και να ανιχνευθεί η πιθανή νοθεία ενός τροφίμου [24].



Εικόνα 4: Απλοποιημένη διαγραμματική αναπαράσταση οργανολογίας ενός συστήματος φασματομετρίας μαζών

Το 2002, αναπτύχθηκε μέθοδος φασματομετρίας μαζών με ιονισμό εκρόφησης με λέιζερ υποβοηθούμενο από υλικό μήτρας, για ανίχνευση νοθείας σε βουβαλίσιο και πρόβειο τυρί χρησιμοποιώντας πρωτεΐνες ορού γάλακτος ως βιοδείκτες [25].

Το 2016, αναπτύχθηκε μέθοδος φασματομετρίας μαζών για την ανίχνευση νοθείας βουβαλίσιου, πρόβειου ή κατσικίσιου τυριού ricotta, με αγελαδινό τυρόγαλο [26]. Επιτεύχθηκε όριο ανίχνευσης 0.5% (o/o).

Το 2018, αναπτύχθηκε μέθοδος φασματομετρίας μαζών με ηλεκτροψεκασμό και ανιχνευτή παγίδας ιόντων (ion trap) σε συνδυασμό με νανο-υγρή χρωματογραφία για την ανίχνευση νοθείας κατσικίσιου γάλακτος με αγελαδινό [27]. Επιτεύχθηκε όριο ανίχνευσης 1% (ο/ο).

3.4 Ανοσοχημικές Μέθοδοι

Οι ανοσοχημικές μέθοδοι βασίζονται στην ειδική αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος για τον ποσοτικό ή ποιοτικό προσδιορισμό βιολογικών μορίων μικρού ή μεγάλου μοριακού βάρους σε μεγάλη ποικιλία πολύπλοκων δειγμάτων (βιολογικά και περιβαλλοντικά δείγματα, τρόφιμα κ.ά). Λόγω της σχετικής απλότητας τους τόσο ως προς την εκτέλεση όσο και ως προς την διαδικασία επεξεργασίας δείγματος χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο κατά τα τελευταία χρόνια για την ανίχνευση νοθείας ή επιβλαβών ουσιών σε τρόφιμα.

Τα ειδικά αντισώματα, που αποτελούν το θεμελιώδες εργαλείο για την ανάπτυξη των ανοσοπροσδιορισμών, διακρίνονται σε πολυκλωνικά και μονοκλωνικά. Τα πολυκλωνικά αντισώματα παράγονται με εμβολιασμό ζώου διαφορετικής φυλογενετικής προέλευσης από το ζώο ή τον οργανισμό ως προς τα αντιγόνα του οποίου επιδιώκεται η ανάπτυξη ειδικού αντισώματος. Το αντίσωμα παραλαμβάνεται από τον ορό αίματος του ζώου μετά από καθαρισμό και απομόνωση. Τα μονοκλωνικά αντισώματα παράγονται μέσω εμβολιασμού, κυρίως ποντικού, με κατάλληλο ανοσογόνο. Στη συνέχεια, τα σπληνικά λεμφοκύτταρα και πλασματοκύτταρα συντήκονται *in vitro* με μυελωματικά (καρκινικά) κύτταρα ποντικού ώστε να προκύψουν αθανατοποιημένα υβριδικά κύτταρα. Ακολουθεί κλωνοποίηση των υβριδικών κυττάρων ώστε να επιλεγούν οι κλώνοι που παράγουν το επιθυμητό αντίσωμα και καλλιέργειά τους *in vitro* ώστε το μονοκλωνικό αντίσωμα να παραλαμβάνεται από το καλλιεργητικό μέσο και να καθαρίζεται. Σε άλλες περιπτώσεις οι επιλεγμένοι κλώνοι χορηγούνται ενδοπεριτοναϊκά σε ποντίκια ώστε να δημιουργηθεί ασκίτης και με παρακέντηση λαμβάνεται το υγρό που περιέχει τα αντισώματα [28].

Ένα μονοκλωνικό αντίσωμα μπορεί να αναγνωρίσει και να προσδέσει μόνο ένα συγκεκριμένο τμήμα του αντιγόνου (επίτοπο), κάτι το οποίο το καθιστά πολύ εκλεκτικό για το συγκεκριμένο αντιγόνο. Αντιθέτως, τα πολυκλωνικά αντισώματα αναγνωρίζουν πολλούς επίτοπους του αντιγόνου κάτι το οποίο τα καθιστά λιγότερο εκλεκτικά σε σύγκριση με τα αντίστοιχα μονοκλωνικά.

Οι ανοσοχημικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό νοθείας αιγοπρόβειου γάλακτος και τυριού με αγελαδινό περιλαμβάνουν τις ανοσοχρωματογραφικές τεχνικές όπως οι ταινίες εμβάπτισης και οι συσκευές πλευρικής ροής, την ανοσοαποτύπωση κυλίδων (Western Blot) καθώς και ανταγωνιστικού και μη ανταγωνιστικού τύπου ανοσοενζυμοχημικούς προσδιορισμούς σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης και θα αναλυθούν στην συνέχεια.

3.4.1 Ανταγωνιστικού και μη ανταγωνιστικού τύπου ανοσοπροσδιορισμό

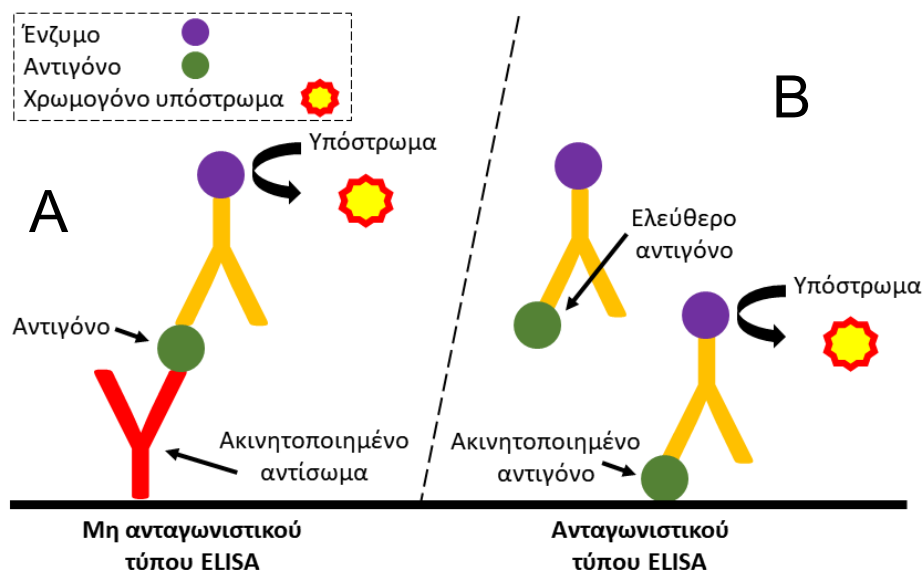
Οι ανταγωνιστικού και μη ανταγωνιστικού τύπου ανοσοπροσδιορισμοί είναι οι συχνότερα χρησιμοποιούμενες τεχνικές που συναντώνται στην βιβλιογραφία για την ανίχνευση βιομορίων σε διάφορα δείγματα όπως για παράδειγμα αλλεργιογόνες ουσίες στα τρόφιμα. Στην αγορά υπάρχουν πλέον εμπορικά διαθέσιμες συσκευασίες για συγκεκριμένους αναλυτές. Η χρησιμότητα τέτοιων εμπορικά διαθέσιμων συσκευασιών, είναι μείζονος σημασίας ιδιαίτερα, για τις βιομηχανίες τροφίμων, οι οποίες τις χρησιμοποιούν για τον γρήγορο ή/και επιτόπιο έλεγχο είτε των πρώτων υλών ή των τελικών προϊόντων [28].

Στην μη ανταγωνιστικού τύπου ανοσοανάλυση το ειδικό αντίσωμα είναι ακινητοποιημένο σε σταθερή επιφάνεια, όπως η επιφάνεια ενός φρεατίου μικροτιτλοδότησης και συνδέεται σε έναν επίτοπο του αντιγόνου που βρίσκεται στο προς ανάλυση δείγμα (Εικόνα 5A). Έτσι δημιουργείται ένα σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος (Antigen-Antibody, Ag-Ab), το οποίο είτε ταυτόχρονα ή σε επόμενο στάδιο αντιδρά με ένα άλλο επισημασμένο αντίσωμα (Ab*). Το αντίσωμα αυτό αναγνωρίζει και συνδέεται σε έναν επίτοπο του αντιγόνου διαφορετικό από εκείνον με τον οποίο δεσμεύεται το ακινητοποιημένο αντίσωμα δημιουργώντας ένα νέο σύμπλεγμα τύπου

sandwich. Το επισημασμένο αντίσωμα μπορεί να είναι συνδεδεμένο με κάποιο ένζυμο, φθορίζουσα ουσία, ηλεκτρενεργά μόρια, ραδιοϊσότοπα και άλλα αναλόγως του τρόπου ανίχνευσης του σήματος και της ευαισθησίας που απαιτείται. Σε κάθε περίπτωση, το σήμα που λαμβάνεται από το σύμπλεγμα αυτό Ab-Ag-Ab* θα είναι ανάλογο της συγκέντρωσης του αντιγόνου στόχου στο δείγμα. Αυτός ο τύπος μη ανταγωνιστικής ανοσοανάλυσης είναι πιο άμεσος από τον ανταγωνιστικού τύπου και είναι κατάλληλος για προσδιορισμό αντιγόνων, τα οποία διαθέτουν τουλάχιστον δύο διαφορετικούς και χωρικά απομακρυσμένους επίτοπους. Οι προσδιορισμοί αυτοί συνήθως χαρακτηρίζονται από υψηλή ευαισθησία ανίχνευσης [28].

Το 2006, αναπτύχθηκε μέθοδος ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού τύπου sandwich για την ανίχνευση νοθείας κατσικίσιου, πρόβειου και βουβαλίσιου με αγελαδινό γάλα και τυρί με όριο ανίχνευσης 0.01% (ο/ο) [29].

Το 2012, αναπτύχθηκε μέθοδος ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού τύπου sandwich για την ανίχνευση νοθείας γάλακτος με τυρόγαλο μέσω της ανίχνευσης του γλυκομακροπεπτιδίου [30]. Επιτεύχθηκε όριο ανίχνευσης 0.047% (ο/ο), όριο ποσοτικοποίησης 0.14% (ο/ο), ανάκτηση από 95.62% έως 113.88% και ένδο-αναλυτική επαναληψιμότητα και διαναλυτική επαναληψιμότητα <6% και <7%, αντίστοιχα.



Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση μη ανταγωνιστικού (A) και ανταγωνιστικού (B) ενζυμοανοδοχημικού προσδιορισμού

Κατά τον ανταγωνιστικού τύπου ενζυμοανοδοχημικό προσδιορισμό (Εικόνα 5B) το αντιγόνο είναι ακινητοποιημένο στην επιφάνεια των φρεατίων μικροτιτλοδότησης. Στην συνέχεια προστίθεται μίγμα του δείγματος προς ανάλυση και του ειδικού αντισώματος έναντι του αντιγόνου. Σε αυτό το στάδιο το αντίσωμα έχει δύο διαφορετικού τύπου αντιγόνα για να αναγνωρίσει και να προσδεθεί, το ακινητοποιημένο στην σταθερή επιφάνεια και το αντιγόνο στο δείγμα. Μετά από αυτό το στάδιο είναι απαραίτητη η απομάκρυνση του ελεύθερου συμπλέγματος αντιγόνου-αντισώματος ώστε να παραμένει μόνο όσο αντίσωμα προσδέθηκε στο ακινητοποιημένο αντιγόνο. Η ανίχνευση πραγματοποιείται άμεσα: το ειδικό αντίσωμα είναι επισημασμένο με κατάλληλο μόριο ή ιχνηθέτη ή έμμεσα: χρησιμοποιείται σε επόμενο στάδιο ένα νέο αντίσωμα έναντι των γ-σφαιρινών του ζώου στο οποίο αναπτύχθηκε το ειδικό αντίσωμα. Σε αυτόν τον τύπο ανοδοχημικής ανάλυσης το σήμα είναι αντιστρόφως ανάλογο της συγκεντρώσεως του αντιγόνου στο δείγμα λόγω του μηχανισμού που αναφέρθηκε προηγουμένως. Επομένως, μέγιστο σήμα λαμβάνεται απουσία αντιγόνου από το δείγμα, δηλαδή εξ' ολοκλήρου αντίδραση του ειδικού αντισώματος με το ακινητοποιημένο αντιγόνο. Αντιθέτως, πτώση του αναλυτικού σήματος παρατηρείται με αύξηση της συγκεντρώσεως του αντιγόνου στο δείγμα.

Το 1997, αναπτύχθηκε ανταγωνιστικού τύπου ενζυμοανοδοχημικός προσδιορισμός για την ανίχνευση βόειου γάλακτος σε αιγοπρόβριο γάλα και τυρί με χρήση αντισωμάτων έναντι των γ-καζεϊνών με όριο ανίχνευσης 0.1% (ο/ο) [31].

Επιπλέον το 2011, αναπτύχθηκε ανταγωνιστικού τύπου ενζυμοανοδοχημικός προσδιορισμός για την ανίχνευση βόειου γάλακτος σε αιγοπρόβριο γάλα και τυρί με χρήση αντισωμάτων έναντι της β-καζεΐνης με όριο ανίχνευσης 2% (ο/ο) [32].

3.4.2 Ανοσοχρωματογραφικές συσκευές πλευρικής ροής

Οι συσκευές πλευρικής ροής είναι απλοποιημένες μορφές ανταγωνιστικού και μη ανταγωνιστικού τύπου ανοσοανάλυσης, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν χωρίς να απαιτούν εξειδικευμένο προσωπικό, έχουν χαμηλό κόστος και είναι φορητές. Τα χαρακτηριστικά αυτά τις καθιστούν ιδανικές για αναλύσεις ποιοτικού όσο και ποσοτικού ενδιαφέροντος στο πεδίο. Η λειτουργία τους βασίζεται στην μεταφορά μάζας λόγω τριχοειδούς φαινομένου στις κατάλληλα επεξεργασμένες σπογγώδεις επιφάνειες που καλύπτουν την ενεργή επιφάνεια της συσκευής. Το πρώτο σπογγώδες μαξιλαράκι δεν έχει εμπλουτιστεί με βιομόρια και ο ρόλος του είναι η κατακράτηση της περίσσειας του δείγματος. Στην συνέχεια το δείγμα κινείται μέσω τριχοειδών φαινομένων στο επόμενο μαξιλαράκι, το οποίο περιέχει το επισημασμένο αντίσωμα ή αντιγόνο και άλατα για την ρύθμιση του pH της ανοσοαντίδρασης. Το υγρό διαλυτοποιεί το αντιδραστήριο και το παρασύρει κατά μήκος μεμβράνης πολυμερούς (Πολυβινυλοφθορίδιο (PVDF), Νιτροκυτταρίνη (Nitrocellulose)) στην οποία έχει ακινητοποιηθεί το αντιγόνο ή το αντίσωμα εάν η αρχή λειτουργίας της συγκεκριμένης συσκευής είναι ανταγωνιστικού ή μη ανταγωνιστικού τύπου ανοσοπροσδιορισμός, αντίστοιχα. Σε κάθε περίπτωση είτε το αντίσωμα υγρής φάσης είναι επισημασμένο με έγχρωμα σωματίδια, όπως νανοσωματίδια χρυσού ή latex. Επομένως, όταν το επισημασμένο αντίσωμα φτάσει στο σημείο της μεμβράνης που είναι ακινητοποιημένο το αντιγόνο ή το σύμπλεγμα

ακίνητοποιημένου αντισώματος-αντιγόνου θα συνδεθεί, θα ακίνητοποιηθεί και στην θέση αυτή θα εμφανιστεί μία έγχρωμη κηλίδα ενώ η περίσσεια του δείγματος και του επισημασμένου αντισώματος που δεν δεσμεύτηκε απομακρύνεται.

Το 2010, αναπτύχθηκε μέθοδος ανοσοχρωματογραφικού προσδιορισμού νοθείας πρόβειου και κατσικίσιου τυριού με αγελαδινό τυρί [33]. Επιτεύχθηκε όριο ανίχνευσης 1% αγελαδινού γάλακτος σε πρόβειο και κατσικίσιο τυρί.

Το 2018, πραγματοποιήθηκε επικύρωση μιας ταχείας μεθόδου ανοσοχρωματογραφικής συσκευής πλευρικής ροής για την ανίχνευση νοθείας βουβαλίσιου, πρόβειου ή κατσικίσιου γάλακτος με αγελαδινό [34]. Επιτεύχθηκε όριο ανίχνευσης 0.5% (ο/ο) αγελαδινού γάλακτος κάτι που είναι κάτω από το 1% (ο/ο) που είναι το όριο που έχει τεθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση ως ανώτατο επιτρεπόμενο όριο αγελαδινού γάλακτος σε άλλα είδη γάλακτος.

3.4.3 Ανοσοαποτύπωση κηλίδων (Western Blot)

Η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη μεθοδολογία ταυτοποίησης πρωτεϊνών μετά από τον διαχωρισμό τους με ηλεκτροφόρηση είναι αυτή του ανοσοαποτυπώματος (ή μεταφοράς) κατά Western. Πρόκειται για μια αναλυτική μέθοδο που βασίζεται στον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό και τη μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή σε ένα λεπτό και μεμβρανώδες υλικό στήριξης. Στην συνέχεια, η ανίχνευση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται με χρήση μονοκλωνικών ή πολυκλωνικών αντισωμάτων. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, μπορούν να εφαρμοστούν πολλά πρωτόκολλα ανοσοαποτύπωσης όπως το ανοσοαποτύπωμα κηλίδας (dot blot) και η δυσδιάστατη ανοσοαποτύπωση (2D blot), αλλά το δημοφιλέστερο είναι το ανοσοαποτύπωμα Western (Western blotting) [35].

Το 2008, αναπτύχθηκε μέθοδος ανοσοαποτύπωσης κυλίδων για την ανίχνευση νοθείας αγελαδινού γάλακτος με τυρόγαλα [36]. Επιτεύχθηκε όριο

ανίχνευσης 0.001% (β/ο) ως προς το γλυκομακροπεπτίδιο, 0.5% (ο/ο) ως προς το τυρόγαλο και 0.001% (β/ο) ως προς το αφυδατωμένο τυρόγαλο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ

4.1 Ιστορική αναδρομή

Σύμφωνα με την Διεθνή Ένωση Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας (International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC) ως βιοαισθητήρας ορίζεται μία συσκευή η οποία χρησιμοποιεί ειδικές βιοχημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα μέσω απομονωμένων ενζύμων, ανοσοσυστημάτων, ιστών, οργανιδίων ή ακόμη και ολόκληρων κυττάρων για την ανίχνευση χημικών ουσιών συνήθως μέσω ηλεκτρικών, θερμικών ή οπτικών σημάτων [37]. Πιο συγκεκριμένα, είναι μία ολοκληρωμένη συσκευή που έχει την δυνατότητα να παρέχει ποσοτική ή ημιποσοτική αναλυτική πληροφορία χρησιμοποιώντας ένα βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης (βιοχημικός υποδοχέας) όπως περιεγράφηκε παραπάνω. Το βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης βρίσκεται σε άμεση επαφή με ένα φυσικοχημικό στοιχείο μετατροπής του αναλυτικού σήματος το οποίο ονομάζεται μεταλλάκτης. Το βιολογικό στοιχείο είναι ακινητοποιημένο σε ένα στερεό φορέα μαζί με τον οποίο αποτελούν την βιοδραστική επιφάνεια του αισθητήρα και έχει την δυνατότητα να αναγνωρίζει την παρουσία ή την συγκέντρωση ενός συγκεκριμένου αναλύτη [38]. Ο μεταλλάκτης, μπορεί να μετατρέπει την φυσικοχημική μεταβολή που λαμβάνει χώρα στην βιοδραστική επιφάνεια του αισθητήρα σε ηλεκτρικό σήμα με την βοήθεια κατάλληλου ηλεκτρονικού συστήματος το οποίο περιλαμβάνει ανιχνευτή, ενισχυτή, επεξεργαστή και συσκευή καταγραφής σήματος [39].

Τα πρώτα ίχνη ηλεκτροχημικού τύπου αισθητήρων αρχίζουν να εμφανίζονται το 1906 όπου αποδείχθηκε από τον M. Cremer ότι, η συγκέντρωση ενός οξέος σε υγρό είναι ανάλογη με το ηλεκτρικό δυναμικό που αναπτύσσεται μεταξύ μερών του υγρού που βρίσκεται σε αντίθετες πλευρές μιας υάλινης μεμβράνης [40]. Στην συνέχεια, το 1909 εμφανίστηκε η ιδέα του pH, δηλαδή μέτρηση συγκέντρωσης ιόντων υδρογόνου, από τον Søren Peder Lauritz

Sørensen κάτι που οδήγησε στην δημιουργία του πρώτου ηλεκτροδίου μέτρησης pH το 1922 από τον W.S. Hughes [41]. Η πρώτη εμφάνιση βιοαισθητήρα γίνεται το 1956 από τον Leland C. Clark Jr. [42] για την ανίχνευση οξυγόνου. Για την εφεύρεσή του αυτή ονομάστηκε ο πατέρας των βιοαισθητήρων και επιπλέον δόθηκε το όνομά του στο ηλεκτρόδιο οξυγόνου, το οποίο είναι πλέον γνωστό και ως ηλεκτρόδιο Clark. Το 1962 ακολούθησε επίδειξη από τον Clark, ενός αμπερομετρικού ενζυμικού ηλεκτροδίου για την ανίχνευση της γλυκόζης στο αίμα. Αυτό, οδήγησε στην εμφάνιση και του πρώτου ποτενσιομετρικού βιοαισθητήρα ανίχνευσης της ουρίας το 1969 από τους Guilbault και Montalvo, Jr. [43]. Έπειτα, το 1970 εφευρέθηκε το εκλεκτικό ηλεκτρόδιο με τρανζίστορ επίδρασης πεδίου από τον Bergveld [44]. Ο πρώτος οπτικός αισθητήρας εμφανίστηκε το 1975 από τους Lubbers και Orpitz, και χρησιμοποιούσε οπτική ίνα για την ανίχνευση διοξειδίου του άνθρακα και οξυγόνου [40]. Τον ίδιο χρόνο, έγινε η πρώτη εμπορική εμφάνιση βιοαισθητήρα γλυκόζης, βασισμένου στο έργο του Clark, από την Yellow Spring Instruments [45] καθώς και ο πρώτος ανοσοαισθητήρας βασισμένος σε μικρόβιο από τον Suzuki και τους συνεργάτες του [46]. Λίγα έτη αργότερα, 1982, κατασκευάστηκε ο πρώτος βιοαισθητήρας με οπτική ίνα για την ανίχνευση της γλυκόζης από τον Schultz [47]. Εντός διετίας, αναπτύχθηκε ανοσοαισθητήρας βασισμένος στο συντονισμό επιφανειακών πλασμονίων (SPR) από τον Liedberg και τους συνεργάτες του το 1983 καθώς και ο πρώτος mediated αμπερομετρικός βιοαισθητήρας φερροκενίου με οξειδάση της γλυκόζης για την ανίχνευση γλυκόζης το 1984 [48]. Ακόμα, το 1990, αναπτύχθηκε εμπορικά διαθέσιμος βιοαισθητήρας βασισμένος τον συντονισμό επιφανειακών πλασμονίων από την εταιρεία Pharmacia Biacore [40] και το 1992 ο πρώτος συμπαγής και φορητός βιοαισθητήρας αίματος από την εταιρεία i-STAT [40]. Από την στιγμή που εμφανίστηκε ο φορητός αυτός βιοαισθητήρας η πρόοδος και το ενδιαφέρον για το πεδίο των βιοαισθητήρων αυξήθηκε και επεκτάθηκε σε επιστημονικά πεδία όπως η εφαρμοσμένη ιατρική, μικρο/νάνο-τεχνολογία και ηλεκτρονική σε συνεργασία με τις αρχές των βασικών επιστημών όπως είναι η βιολογία, η φυσική και η χημεία [40].

Τα αναλυτικά χαρακτηριστικά της μέτρησης που λαμβάνεται από έναν αισθητήρα, καθορίζουν την λειτουργικότητα και την αποτελεσματικότητά του. Τα χαρακτηριστικά αυτά είναι η ευαισθησία ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου, η αξιοπιστία, η ακρίβεια και η ειδικότητα. Μεταξύ των χαρακτηριστικών αυτών, η ταχεία απόκριση του αισθητήρα είναι μείζονος σημασίας και πρέπει να είναι ανεξάρτητη από ηλεκτρικές και περιβαλλοντικές μεταβολές. Ένας λειτουργικός αισθητήρας πρέπει να είναι ανθεκτικός, χαμηλού κόστους και να παρέχει την δυνατότητα επαναχρησιμοποίησής του [49, 50].

4.2 Είδη βιοαισθητήρων

Ανάλογα με τον μεταλλάκτη σήματος που χρησιμοποιείται κάθε φορά, οι βιοαισθητήρες κατηγοριοποιούνται σε θερμικούς, πιεζοηλεκτρικούς, οπτικούς και ηλεκτροχημικούς όταν η μεταβαλλόμενη φυσικοχημική παράμετρος είναι θερμότητα, μάζα, φως και ηλεκτρισμός, αντίστοιχα.

4.3 Οπτικοί βιοαισθητήρες

Οι οπτικοί βιοαισθητήρες έχουν αναπτυχθεί ραγδαίως τις τελευταίες δεκαετίες και βρίσκουν εφαρμογή στους τομείς της υγείας, των τροφίμων, των φαρμάκων αλλά και του περιβάλλοντος [51]. Αξίζει να σημειωθεί, πως ένα σημαντικό πλεονέκτημα των οπτικών είναι το γεγονός ότι μπορεί να γίνει παρακολούθηση της ανοσοαντίδρασης σε πραγματικό χρόνο [52].

Όλοι οι οπτικοί βιοαισθητήρες βασίζονται στην χρήση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, η οποία είτε ανακλάται, διαθλάται, σκεδάζεται, εκπέμπεται (όταν αλληλοεπιδρά με κάποια επιφάνεια) ή διασπείρεται και ανιχνεύουν μεταβολές στην έντασή της.

Σύμφωνα με την αρχή της φασματοσκοπίας ολικής εσωτερικής ανάκλασης, μια ακτινοβολία που διαδίδεται από οπτικά πυκνό υλικό με δείκτη διάθλασης n_1 σε οπτικά αραιό υλικό με δείκτη διάθλασης n_2 ($n_1 > n_2$) διαδίδεται μέσω ολικής εσωτερικής ανάκλασης αποκλειστικά στο μέσο με το μεγαλύτερο δείκτη διάθλασης εφόσον προσπέσει στην μεσεπιφάνεια υπό γωνία (θ) μεγαλύτερη από την οριακή γωνία θ_c , η οποία υπολογίζεται από την σχέση $\theta_c = \sin^{-1}(n_2/n_1)$

[53]. Η διάδοση της ακτινοβολίας ονομάζεται κυματοδήγηση και το μέσο με δείκτη διάθλασης n_1 , κυματοδηγός [53]. Κατά το φαινόμενο ολικής ανάκλασης στην μεσεπιφάνεια, δημιουργείται ένα ταλαντούμενο ηλεκτρομαγνητικό πεδίο, το οποίο εισέρχεται στο υλικό με τον χαμηλότερο δείκτη διάθλασης n_2 . Το πεδίο αυτό ονομάζεται φθίνον πεδίο ή φθίνον κύμα (evanescent wave) και η ενέργειά του είναι συγκεντρωμένη στην εγγύτητα της μεσεπιφάνειας. Η ένταση του κύματος παρουσιάζει εκθετική μείωση σε συνάρτηση με την απόσταση από την επιφάνεια του κυματοδηγού [54]. Αξιοποιώντας το φαινόμενο ολικής ολικής εσωτερικής ανάκλασης η πλειοψηφία των οπτικών βιοαισθητήρων βασίζεται σε οπτικούς κυματοδηγούς, ως στερεούς φορείς για την πραγματοποίηση της αντίδρασης, με δείκτη διάθλασης (n_1) μεγαλύτερο από τον δείκτη διάθλασης του δείγματος (n_2) και χρησιμοποιεί οπτικές πηγές για την εκπομπή της ακτινοβολίας καθώς επίσης και φωτοανιχνευτές για την καταγραφή του αναλυτικού σήματος [55].

Οι οπτικοί αισθητήρες μπορούν να χωριστούν σε δύο κύριες κατηγορίες, στους αισθητήρες που δεν απαιτούν χρήση ιχνηθέτη και σε αυτούς που απαιτούν χρήση ιχνηθέτη όπως για παράδειγμα κάποιο φθορίζον ή χημειοφωταυγές αντιδραστήριο ή ακόμα και μεταλλικά σωματίδια και μαγνητικά νανοσωματίδια.

Μεταξύ των βιοαισθητήρων που δεν απαιτούν χρήση ιχνηθέτη, οι βιοαισθητήρες που βασίζονται στον συντονισμό επιφανειακών πλασμονίων (Surface Plasmon Resonance, SPR) και οι συμβολομετρικοί αισθητήρες παρουσιάζουν ιδιαίτερη ανάπτυξη στον τομέα της ανάλυσης των τροφίμων.

Οι ανοσοαισθητήρες SPR, βασίζονται στην διέγερση επιφανειακών ηλεκτρονίων (πλασμονίων) ενός μεταλλικού φιλμ από Ag ή Au από εξωτερικά προσπίπτουσα ακτινοβολία. Η διέγερση αυτή προκαλεί ταλάντωση των πλασμονίων δημιουργώντας ένα κύμα ηλεκτρονικής πυκνότητας. Το κύμα αυτό διαδίδεται κατά μήκος του μεταλλικού φιλμ και του διηλεκτρικού στρώματος, όπου βρίσκονται ακινητοποιημένα τα βιοδραστικά μόρια, και δημιουργεί ένα φθίνον κύμα το οποίο μετά την διείσδυσή του στο διηλεκτρικό στρώμα αλληλεπιδρά με τα μόρια αυτά. Κατά την αντίδραση που λαμβάνει χώρα στην αισθητήρια επιφάνεια μεταβάλλεται ο δείκτης διάθλασης του

διηλεκτρικού στρώματος και ως επακόλουθο τα χαρακτηριστικά του κύματος πλασμονίων [56]. Μια παραλλαγή του SPR είναι οι βιοαισθητήρες που βασίζονται στον εντοπισμένο συντονισμό επιφανειακών πλασμονίων (Localized-SPR). Σε αυτή την περίπτωση, η ακτινοβολία προσπίπτει πάνω σε μεταλλικά νανοσωματίδια, τα οποία απορροφούν την ακτινοβολία όταν η οπτική συχνότητα συντονίζεται με την συχνότητα των ηλεκτρονίων αγωγιμότητας [57].

Οι συμβολομετρικοί αισθητήρες βασίζονται στην σύγκριση των διαφορών που προκύπτουν από δύο δέσμες φωτός οι οποίες διαδίδονται κατά μήκος δύο παρεμφερών οπτικών διαδρομών και συμβάλλουν μετά από μια συγκεκριμένη απόσταση [58]. Οι βιοαντιδράσεις πραγματοποιούνται στην μία οπτική διαδρομή προκαλώντας μεταβολές στο μήκος κύματος ή στην ταχύτητα διάδοσης του φωτός με αποτέλεσμα να αλλάζει η φάση του φωτός και να δημιουργείται ένα φάσμα συμβολής. Δύο αρκετά διαδεδομένοι βιοαισθητήρες αυτής της κατηγορίας είναι οι βιοαισθητήρες των οποίων οι οπτικοί κυματοδηγοί είναι διαμορφωμένοι ως συμβολόμετρα Mach-Zehnder και Young [59, 60].

Για την ανίχνευση νοθείας αιγοπρόβειου γάλακτος ή τυριού με αγελαδινό, η πλειοψηφία των βιοαισθητήρων που έχουν αναπτυχθεί βασίζονται σε βιοαισθητήρες συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων, ενώ έχει αναπτυχθεί και ένας βιοαισθητήρας που βασίζεται σε συμβολομετρία Mach-Zehnder.

Το 2004, αναπτύχθηκε μέθοδος προσδιορισμού κ-καζεΐνης στο γάλα, χρησιμοποιώντας δύο ειδικά αντισώματα έναντι της κ-καζεΐνης σε δύο αντιδιαμετρικούς επιτόπους, μέσω ενός οπτικού αισθητήρα συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων [61]. Επιτεύχθηκε όριο ανίχνευσης 0.45 $\mu\text{g/mL}$, ένδο-αναλυτική επαναληψιμότητα 4.28%, διαναλυτική επαναληψιμότητα 6.8%, χρόνος ανάλυσης ανά δείγμα λιγότερο από 10 min και επαναχρησιμοποίηση της επικαλυμμένης (με αντίσωμα) επιφάνειας για περισσότερους από 150 προσδιορισμούς.

Την ίδια χρονιά, αναπτύχθηκε μέθοδος ποσοτικοποίησης της β-καζεΐνης σε γάλα και τυρί, με την χρήση οπτικού βιοαισθητήρα συντονισμού επιφανειακών

πλασμονίων με χρόνο ανάλυσης ανά δείγμα λιγότερο από 10 min και χωρίς προκατεργασία του δείγματος ενώ η επιφάνεια μπορούσε να επαναχρησιμοποιηθεί για περισσότερους από 250 προσδιορισμούς [62]. Αυτό κατέστη δυνατό χρησιμοποιώντας δύο ειδικά αντισώματα έναντι της β-καζεΐνης σε δύο αντιδιαμετρικούς επίτοπους της. Επιπροσθέτως, επιτεύχθηκε όριο ανίχνευσης 85 ng/mL, ένδο-αναλυτική επαναληψιμότητα 2.6% και διαναλυτική επαναληψιμότητα 6.2%.

Επίσης, την ίδια περίοδο αναπτύχθηκε μέθοδος προσδιορισμού αγελαδινού γάλακτος, σε πρόβειο και κατσικίσιο γάλα, με χρήση δύο μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι της βόειας κ-καζεΐνης μέσω ενός αυτοματοποιημένου οπτικού βιοαισθητήρα συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων [63]. Κάθε τροποποιημένη με αντίσωμα επιφάνεια είχε την δυνατότητα πραγματοποίησης πάνω από 350 δοκιμές, το όριο ανίχνευσης που επιτεύχθηκε ήταν 0.1% (o/o) αγελαδινού γάλακτος σε πρόβειο ή κατσικίσιο γάλα και ο χρόνος ανάλυσης ήταν περίπου 5 min ανά δείγμα.

Το 2006, αναπτύχθηκε οπτικός βιοαισθητήρας (Spreeta biosensor) για τον προσδιορισμό κ-καζεΐνης (αγελαδινού γάλακτος) σε πρόβειο και κατσικίσιο γάλα αλλά και σκόνη βόειας πτυιάς τυρογάλακτος σε σκόνη γάλακτος [64]. Το όριο ανίχνευσης που επιτεύχθηκε για το αγελαδινό γάλα ήταν 0.17% (o/o) ενώ για την σκόνη βόειας πτυιάς τυρογάλακτος ήταν 1% (β/β) αντίστοιχα.

Το 2007, αναπτύχθηκε ένας οπτικός βιοαισθητήρας εντοπισμένου συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων για την ανίχνευση καζεΐνης στο γάλα με μικρή προκατεργασία δείγματος [65]. Το όριο ανίχνευσης που επιτεύχθηκε ήταν 10 ng/mL.

Το 2015, αναπτύχθηκε οπτικός βιοαισθητήρας χωρίς τη χρήση ιχνηθέτη βασισμένος σε συμβολομετρία Mach-Zehnder, για τον προσδιορισμό νοθείας κατσικίσιου γάλακτος με αγελαδινό με χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της κ-καζεΐνης, όπου επιτεύχθηκε όριο ανίχνευσης 0.04% (o/o) αγελαδινού σε κατσικίσιο γάλα, δυναμικό εύρος 0.1-1.0% (o/o), εύρος ανάκτησης 93-110%, ένδο-αναλυτική επαναληψιμότητα 12% και διαναλυτική επαναληψιμότητα 15% με συνολικό χρόνο ανοσοαντίδρασης 10 min [66].

4.4 Ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες

Οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες έχουν αποκτήσει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον τις τελευταίες δεκαετίες καθώς εξασφαλίζουν πολύ καλά αναλυτικά χαρακτηριστικά (υψηλή ευαισθησία ανίχνευσης, επαναληψιμότητα, ευρείες δυναμικές περιοχές) χαμηλό κόστος οργάνολογίας, καθώς και γρήγορα και αξιόπιστα αποτελέσματα. Ο ηλεκτρενεργός αναλύτης ανάγεται ή οξειδώνεται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας, το οποίο υποβάλλεται σε κατάλληλο δυναμικό και στην συνέχεια καταγράφεται το ηλεκτροχημικό σήμα [67].

Στις ηλεκτροχημικές τεχνικές, οι φυσικές ιδιότητες που αξιοποιούνται [68] για την μέτρηση αναλυτικού σήματος και οι αντίστοιχες ονομασίες των τεχνικών είναι:

- i. η ένταση ηλεκτρικού ρεύματος για τις αμπερομετρικές τεχνικές
- ii. η διαφορά δυναμικού ή συσσώρευση ηλεκτρικού φορτίου για τις βολταμμετρικές τεχνικές και,
- iii. η μέτρηση της αλλαγής της ηλεκτρικής αγωγιμότητας του μέσου μεταξύ δύο ηλεκτροδίων για τις αγωγιμομετρικές τεχνικές

Οι ηλεκτροχημικοί αισθητήρες διακρίνονται κυρίως σε αμπερομετρικούς, βολταμμετρικούς και αισθητήρες εμπέδησης [69].

4.4.1 Βολταμμετρία

Η βολταμμετρία, ή αλλιώς βολταμπερομετρία, περιλαμβάνει σειρά από ηλεκτροαναλυτικές τεχνικές, στις οποίες η αναλυτική πληροφορία παρέχεται από την μέτρηση του ηλεκτρικού ρεύματος ως συνάρτηση εφαρμοζόμενης διαφοράς δυναμικού σε συνθήκες πόλωσης του ηλεκτροδίου εργασίας.

- Ιστορική αναδρομή

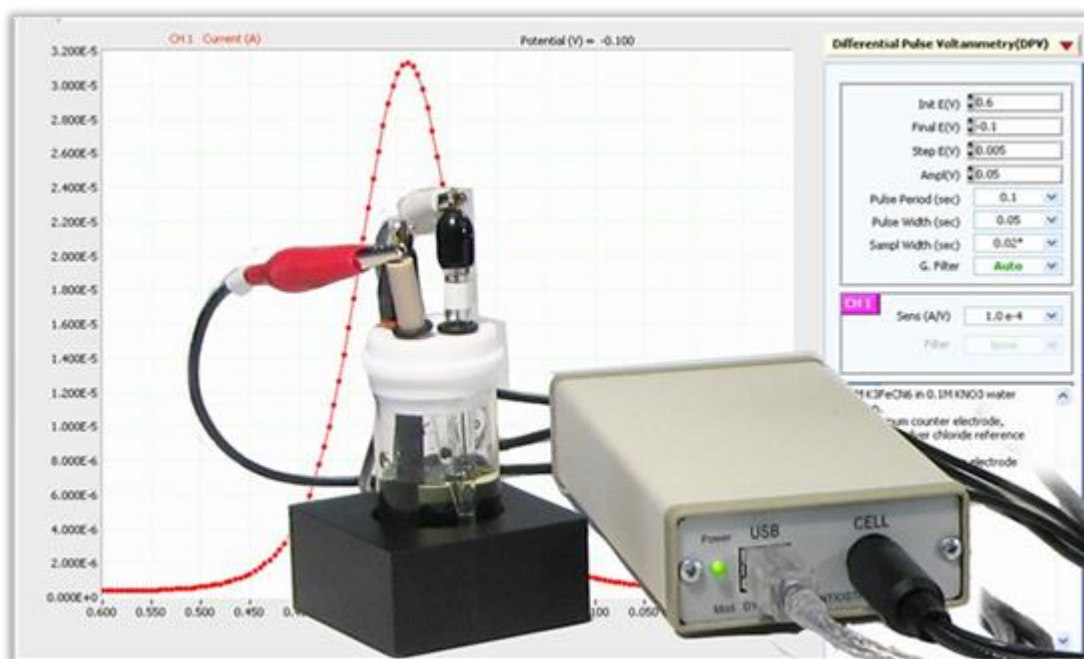
Το 1920, ο χημικός Jaroslav Heyrovsky επινόησε έναν ειδικό τύπο βολταμμετρίας, οποίος ονομάστηκε πολαρογραφία [70]. Η καινοτομία αυτής της βολταμμετρικής τεχνικής ήταν η χρήση ενός σταγονικού ηλεκτροδίου υδραργύρου ως ηλεκτρόδιο εργασίας. Η κλασική μορφή της πολαρογραφίας στηρίζεται στην εφαρμογή μιας διαφοράς δυναμικού, η οποία μεταβάλλεται γραμμικώς χρονικά στο σταγονικό ηλεκτρόδιο υδραργύρου και στην ταυτόχρονη καταγραφή της έντασης του ηλεκτρικού ρεύματος που αναπτύσσεται συναρτήσει της εφαρμοζόμενης διαφοράς δυναμικού. Στα μέσα της δεκαετίας του 1960, εμφανίστηκαν οι πρώτοι τελεστικοί ενισχυτές, γεγονός που κατέστησε δυνατή την κατασκευή φθηνών αναλυτικών οργάνων, τα οποία και έκαναν την εμφάνισή τους στο εμπόριο. Άμεσο αποτέλεσμα αυτού, ήταν η αναζωπύρωση του ενδιαφέροντος ως προς τις εφαρμογές των βολταμμετρικών τεχνικών στον προσδιορισμό ποικίλων ουσιών κυρίως φαρμακευτικού βιολογικού και περιβαλλοντικού ενδιαφέροντος [71].

ο Τυπική βολταμμετρική οργανολογία

Το σύστημα που εκτελεί βολταμμετρικές μετρήσεις αποτελείται από το ηλεκτροχημικό στοιχείο/κυψελίδα, έναν ποτενσιοστάτη και έναν καταγραφέα σήματος. Η ηλεκτροχημική κυψελίδα αποτελείται από τρία ηλεκτρόδια, τα οποία είναι βυθισμένα σε διάλυμα που φέρει τον αναλύτη καθώς και περίσσεια αδρανούς ηλεκτρολύτη. Τα περιεχόμενα ηλεκτρόδια είναι:

- το ηλεκτρόδιο εργασίας (working electrode): Στο ηλεκτρόδιο αυτό μεταβάλλεται γραμμικά το δυναμικό του με το χρόνο,
- το ηλεκτρόδιο αναφοράς (reference electrode): Σε αυτό το ηλεκτρόδιο το δυναμικό παραμένει σταθερό καθ' όλη την διάρκεια των μετρήσεων και
- το αντισταθμιστικό ηλεκτρόδιο (counter electrode): Ο ρόλος του ηλεκτροδίου αυτού είναι η αγωγή του παραγόμενου ηλεκτρικού ρεύματος από την πηγή σήματος διαμέσου του διαλύματος προς το ηλεκτρόδιο εργασίας.

Η πηγή του ηλεκτρικού σήματος είναι μια γεννήτρια δυναμικού γραμμικής σάρωσης. Το σήμα εξόδου από την πηγή εισάγεται σε κύκλωμα ποτενσιοστάτη. Η ηλεκτρική αντίσταση του κυκλώματος ελέγχου (που περιλαμβάνει το ηλεκτρόδιο αναφοράς) είναι τόσο μεγάλη ($>10^{11} \Omega$), ώστε να παρεμποδίζεται η ροή ηλεκτρικού ρεύματος διαμέσου του ηλεκτροδίου. Έτσι, όλο το ρεύμα από την πηγή μεταφέρεται από το αντισταθμιστικό ηλεκτρόδιο προς το ηλεκτρόδιο εργασίας. Επιπλέον, το κύκλωμα ποτενσιοστατικού ελέγχου ρυθμίζει το ρεύμα αυτό έτσι, ώστε η διαφορά δυναμικού μεταξύ ηλεκτροδίου εργασίας και αναφοράς να είναι ίση με το δυναμικό εξόδου της γεννήτριας γραμμικού δυναμικού. Το ρεύμα που δημιουργείται, μετατρέπεται σε διαφορά δυναμικού και καταγράφεται συναρτήσει του χρόνου.



Εικόνα 6: Χαρακτηριστικό σύστημα ηλεκτροχημικών μετρήσεων που περιλαμβάνει το ηλεκτροχημικό στοιχείο (κυψελίδα), τον ποτενσιοστάτη και το υπολογιστικό σύστημα απεικόνισης και καταγραφής του αναλυτικού σήματος.

- Αναδιαλυτικές τεχνικές

Ενδιαφέρουσα κατηγορία βολταμμετρικών τεχνικών είναι οι αναδιαλυτικές τεχνικές. Κοινό γνώρισμα αυτών είναι το πρώτο στάδιο, το οποίο ονομάζεται απόθεση ή ηλεκτροεναπόθεση [72]. Ένα τυπικό πρωτόκολλο μεθόδου

αναδιαλυτικής βολταμμετρίας αποτελείται από τρία κύρια στάδια. Αρχικά, το δείγμα τοποθετείται στην ηλεκτροχημική κυψελίδα συνήθως παρουσία κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος και εφαρμόζεται προκαθορισμένη διαφορά δυναμικού υπό ήπια ανάδευση για ορισμένο χρόνο. Σε αυτό το σημείο ο αναλύτης αποτίθεται ηλεκτροχημικά στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας όπου δημιουργείται μία συγκέντρωση του κατά πολύ μεγαλύτερη από ότι στην κύρια μάζα του διαλύματος. Μετά το πέρας του χρόνου της ηλεκτροχημικής εναπόθεσης, διακόπτεται η ανάδευση και πραγματοποιείται σάρωση του δυναμικού εντός προκαθορισμένου εύρους δυναμικού. Σε αυτό το στάδιο πραγματοποιείται η αντίθετη διαδικασία από εκείνη του πρώτου σταδίου καθώς ο προσυγκεντρωμένος στο ηλεκτρόδιο αναλύτης οξειδώνεται και επαναδιαλύεται δημιουργώντας ροή ηλεκτρικού ρεύματος. Τέλος, η ένταση του ρεύματος καταγράφεται υπό την μορφή βολταμμογραφήματος σε ηλεκτρονικό υπολογιστή όπου και στην συνέχεια επεξεργάζεται. Στις ανοδικές αναδιαλυτικές μεθόδους το ηλεκτρόδιο εργασίας λειτουργεί ως κάθοδος κατά το στάδιο της ηλεκτροχημικής εναπόθεσης και ως άνοδος κατά το στάδιο σάρωσης του δυναμικού [73].

Η αναδιαλυτική βολταμμετρία αναπτύχθηκε εξυπηρετεί τον προσδιορισμό ουσιών που συναντώνται σε ιχνοποσότητες τόσο με περιβαλλοντικό όσο και με κλινικό και βιομηχανικό ενδιαφέρον. Τα πλεονεκτήματα της αναδιαλυτικής βολταμμετρίας είναι:

- **Ταχύτητα μέτρησης.** Η αυτοματοποίηση των μετρήσεων και η δυνατότητα πολυστοιχειακής ανάλυσης καθιστά την αναδιαλυτική βολταμμετρία αποτελεσματική και γρήγορη σε σχέση με μη ηλεκτροχημικές τεχνικές.
- **Φθηνός εργαστηριακός εξοπλισμός.** Όσον αφορά την απόδοση των φασματοσκοπικών τεχνικών, η ατομική απορρόφηση χωρίς φλόγα πετυχαίνει αντίστοιχη ευαισθησία ανίχνευσης με τις αναδιαλυτικές εφαρμογές αλλά με πολύ μεγαλύτερο κόστος. Οι αναδιαλυτικές τεχνικές έχουν τον μεγαλύτερο λόγο απόδοσης προς κόστος από οποιαδήποτε άλλη αναλυτική τεχνική και επιπλέον η οργάνολογία που

απαιτούν είναι απλή και μικρού μεγέθους ώστε να επιτρέπει και την ανάλυση στο πεδίο δειγματοληψίας.

- **Χαμηλά όρια και υψηλή ευαισθησία ανίχνευσης.** Τυπική περιοχή εφαρμογής των αναδιαλυτικών τεχνικών είναι η τάξη των $\mu\text{g/L}$ ενώ έχει επιτευχθεί και ανίχνευση ουσιών με συγκεντρώσεις της τάξεως των pg/L .
- **Ανάλυση χημικών μορφών στοιχείων (speciation).** Με αυτήν την ικανότητα είναι δυνατός ο προσδιορισμός της ακριβούς χημικής μορφής ενός ιχνοστοιχείου μέσω ενός μικρού αριθμού πειραμάτων.
- **Πολυστοιχειακή ανάλυση.** Με την χρήση αναδιαλυτικών τεχνικών καθίσταται εφικτή η ανάλυση 4 με 6 μεταλλικών ιόντων, ανιόντων ή οργανικών ουσιών σε συγκεντρώσεις της τάξεως των $\mu\text{g/L}$.

Παρά τα σημαντικά πλεονεκτήματα της αναδιαλυτικής βολταμμετρίας, υπάρχουν περιορισμοί στην εφαρμογή της. Για παράδειγμα, ο αναλύτης ή η ουσία πρέπει να είναι ηλεκτρενεργός ή να μπορεί να μετατραπεί σε ηλεκτρενεργό προϊόν για να αναλυθεί. Επιπλέον, κατά την διαδικασία της μέτρησης μπορούν να δημιουργηθούν παρεμβολές, οι οποίες μπορεί να είναι από σχηματισμό διαμεταλλικών ενώσεων στο ηλεκτρόδιο κατά την ηλεκτροεναπόθεση, από τον κορεσμό της επιφάνειας του ηλεκτροδίου, από την αλληλεπικάλυψη βολταμμετρικών κορυφών δύο ουσιών και από την απενεργοποίηση του ηλεκτροδίου λόγω προσρόφησης οργανικών ουσιών [73].

Σήμερα, οι αναδιαλυτικές τεχνικές αξιοποιούνται στην ανάλυση βιολογικών υγρών, φαρμακευτικών προϊόντων, οργανικών ουσιών και προσδιορισμό μετάλλων όπως το Cd, Ag, Au, Pb, Bi και άλλα.

4.4.2 Ηλεκτρόδια στην αναδιαλυτική βολταμμετρία

- Ηλεκτρόδιο υδραργύρου

Το μεγάλο υπερδυναμικό αναγωγής των ιόντων υδρογόνου στα ηλεκτρόδια υδραργύρου, τα καθιστά κατάλληλα για την εναπόθεση και κατά συνέπεια, την μέτρηση μεταλλικών ιόντων (όπως ο ψευδάργυρος και το κάδμιο σε όξινα διαλύματα) χωρίς το σχηματισμό φυσαλίδων υδρογόνου στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας, παρόλο που θεωρητικά κάτι τέτοιο δεν είναι εφικτό.

Στην πολαρογραφία, το σταγονικό ηλεκτρόδιο υδραργύρου προσφέρει το πλεονέκτημα ότι η σταγόνα ανανεώνεται και έτσι αντιμετωπίζονται οι ασταθείς συμπεριφορές που παρατηρούνται στα στερεά μεταλλικά ηλεκτρόδια λόγω ακαθαρσιών [73]. Όμως, το σημαντικό ελάττωμα του ηλεκτροδίου υδραργύρου είναι πως αυτό-οξειδώνεται σε δυναμικά θετικότερα από +0.4 V κάτι που το καθιστά ανήμπορο για την ανάλυση στοιχείων και ενώσεων με δυναμικά κορυφής σε θετικότερες περιοχές δυναμικού. Τέλος, η μεγάλη τοξικότητα του υδραργύρου έχει κινητοποιήσει την ερευνητική κοινότητα προς την εύρεση και ανάπτυξη νέων υλικών που να έχουν παρόμοιες ιδιότητες χωρίς τα μειονεκτήματα και τους περιορισμούς.

ο Ηλεκτρόδια άνθρακα

Ο άνθρακας είναι ένα σχετικά άφθονο υλικό, φθινό, αδρανές και παρουσιάζεται σε πολλές φυσικές και χημικές μορφές. Αποτελεί πολύ δημοφιλές υλικό για κατασκευή ηλεκτροδίων καθώς διαθέτει ενδιαφέρουσες ηλεκτροχημικές ιδιότητες, όπως ευρεία περιοχή πόλωσης και χαμηλά ρεύματα υποβάθρου. Οι πιο συχνές μορφές με τις οποίες αξιοποιείται ο άνθρακας για την κατασκευή βιοαισθητήρων είναι:

- **ο πυρολυτικός γραφίτης:** Παρασκευάζεται από υδρογονάνθρακες μικρού μοριακού βάρους. Ο πυρολυτικός γραφίτης που προκύπτει έχει: μεγαλύτερη πυκνότητα από τον φυσικό άνθρακα, μικρότερο πορώδες, λεία επιφάνεια και συνήθως παρουσιάζει χαμηλό ρεύμα υποβάθρου. Επιπλέον, είναι αδρανής και έχει χαμηλή κινητική κατά τις ηλεκτροδιακές αντιδράσεις. Είναι εφικτό όμως, μετά από επεξεργασία να αλλάξει η συμπεριφορά του υλικού και να μπορεί να

χρησιμοποιηθεί, για παράδειγμα, για προσρόφηση ουσιών αυξάνοντας όμως το ρεύμα υποβάθρου [74].

- **ο πολυκρυσταλλικός γραφίτης:** Παρασκευάζεται από κλάσματα πετρελαίου μετά από εξεργασία σε υψηλή θερμοκρασία. Η πιο συχνή μορφή του είναι ο κονιοποιημένος γραφίτης.
- **ο υαλώδης άνθρακας:** Παρασκευάζεται κατά την θέρμανση πολυμερών φαινόλης/φορμαλδεΐδης ή πολυακρυλονιτριλίου. Τα ηλεκτρόδια υαλώδους άνθρακα είναι συχνά σε χημικούς αισθητήρες καθώς έχει πολύ καλές χημικές ιδιότητες, δεν είναι διαπερατός από νερό ή οργανικούς διαλύτες, έχει χαμηλό ρεύμα υποβάθρου, ποικίλες περιοχές πόλωσης και κινητικές αντιδράσεων αναλόγως με τον καθαρισμό και την επεξεργασία του.
- **τα ανθρακονήματα:** Παρασκευάζονται με καύση πολυακρυλονιτριλίου /πίσσας ή με καταλυτική αφυδρογόνωση βενζολίου σε θερμή επιφάνεια μετάλλου. Το μεγάλο πλεονέκτημα των μικροηλεκτροδίων από ανθρακονήματα είναι το μικρό μέγεθος που τους επιτρέπει να χρησιμοποιηθούν για in vivo μετρήσεις.
- **το γραφένιο:** Παρασκευάζεται μέσω μηχανικής αποφλοιώσης φύλλων γραφενίου. Παρουσιάζει μεγαλύτερη ηλεκτρική αγωγιμότητα από εκείνη του Ag και μεγάλη θερμική αγωγιμότητα. Επίσης είναι αδιαπέραστο από αέρια και είναι χημικά σταθερό.
- **οι νανοσωλήνες:** Παρασκευάζονται με εκκένωση τόξου άνθρακα ή απόθεση με παλμικό laser ή με χημική εναπόθεση ατμών θερμικά εξατμιζόμενων υδρογονανθράκων. Παρουσιάζονται είτε ως μονού τοιχώματος είτε ως πολλαπλού τοιχώματος. Η τεράστια αντοχή τους στον εφελκυσμό, καθώς και η καλή θερμική και ηλεκτρική αγωγιμότητα τους καθιστούν χρήσιμους ως υλικά για την κατασκευή ηλεκτροδίων.

Για καθένα από τις παραπάνω μορφές άνθρακα οι δεσμοί C-C παραμένουν ίδιοι. Ωστόσο, η δομή των υλικών αυτών στον χώρο, η κρυσταλλική δομή τους καθώς και οι διάφορες ομάδες που μπορούν να ακινητοποιηθούν στην επιφάνεια του άνθρακα επηρεάζουν την κινητική των ηλεκτροχημικών

αντιδράσεων μεταφοράς φορτίου και την δεσμευτική του ικανότητα καθιστώντας τον κατάλληλο για την ακινητοποίηση βιομορίων στην επιφάνειά του.

- Ηλεκτρόδια πάστας άνθρακα

Τα ηλεκτρόδια πάστας άνθρακα (Carbon Paste Electrodes, CPE) παρασκευάζονται με ανάμειξη σκόνης γραφίτη με έναν χαμηλής πηχτικότητας οργανικό διαλύτη. Η τεχνική αυτή πρωτοεμφανίστηκε στο 1958 [75] από τον R.N. Adams. Ο γραφίτης που περιέχεται είναι συνήθως 70% και οι διαλύτες που θα χρησιμοποιηθούν θα πρέπει να είναι χημικά αδρανείς, ηλεκτρανενεργοί και υδρόφοβοι ώστε να μην αναμιγνύονται με το διάλυμα του αναλύτη. Συνήθεις διαλύτες είναι το Νujol, εξάνιο, δεκάνιο και έλαια σιλικόνης. Σημαντικά χαρακτηριστικά των ηλεκτροδίων πάστας γραφίτη είναι το ιδιαίτερα χαμηλό ρεύμα υποβάθρου, η επαναληπτικότητα κατασκευής, η εύκολη ανανέωση της επιφάνειάς τους και η επιδεκτικότητά τους στη χημική τροποποίηση.

4.4.3 Μεταλλικά ηλεκτρόδια

Τα μεταλλικά ηλεκτρόδια μπορούν να χωριστούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες που εμφανίζουν ενδιαφέρον για τις ηλεκτροχημικές τεχνικές, τα στερεά ηλεκτρόδια ευγενών μετάλλων και τα ηλεκτρόδια βισμούθιου.

- Στερεά ηλεκτρόδια ευγενών μετάλλων

Τα στερεά μεταλλικά ηλεκτρόδια όπως ο Au, ο Ag, ο Pt και ο ανοξειδωτος χάλυβας χαρακτηρίζονται από πολύ καλές ηλεκτρικές και μηχανικές ιδιότητες, όπως υψηλή ηλεκτρική αγωγιμότητα (και κατά συνέπεια χαμηλά ρεύματα υποβάθρου) αλλά και δυνατότητα τροποποίησης των επιφανειών τους. Ο καθαρισμός τους μετά από μια ανάλυση μπορεί να είναι είτε ηλεκτροχημικός είτε μηχανικός. Παρόλα αυτά, τα στερεά ηλεκτρόδια ευγενών μετάλλων χαρακτηρίζονται από περιορισμούς όπως ο υψηλός θόρυβος κατά την

εκτέλεση της ανάλυσης, ο σχηματισμός οξειδωμένων υμενίων, η μικρή διαχωριστικότητα των κορυφών και το χαμηλό καθοδικό υπερδυναμικό, όταν συγκριθούν με τα αντίστοιχα ηλεκτρόδια του υδραργύρου [76, 77].

ο Ηλεκτρόδια Βισμούθιου

Στις αρχές της χιλιετίας που διανύουμε, εφευρέθηκε ένας νέος τύπος ηλεκτροδίων, τα οποία ονομάστηκαν ηλεκτρόδια λεπτού στρώματος βισμούθιου (ΗΛΣΒ) (Bismuth-Film Electrodes, BiFE). Η κατασκευή αυτών παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς πραγματοποιείται με απόθεση του βισμούθιου επάνω σε κατάλληλο υπόστρωμα. Το βισμούθιο, είναι πολύ λιγότερο τοξικό από τον υδράργυρο αλλά οι ηλεκτροχημικές του ιδιότητες προσομοιάζουν εκείνες των ηλεκτροδίων υδραργύρου, καθιστώντας τα ιδανικά για προσδιορισμούς μετάλλων με τη χρήση αναδιαλυτικής βολταμμετρίας ακόμα και όταν αποτελούν ιχνοποσότητες στο δείγμα.

Συνήθης τεχνική για των σχηματισμό ΗΛΣΒ είναι η ηλεκτροαπόθεση και το συχνότερο υπόστρωμα είναι διάφορες μορφές άνθρακα όπως αυτές που έχουν αναφερθεί σε προηγούμενη παράγραφο (υαλώδη άνθρακα [78, 79, 80], πάστα γραφίτη [81, 82], πυρολυτικό γραφίτη [83], ηλεκτρόδια πλέγματος με μελάνες που περιέχουν άνθρακα [84, 85], μίγματα εποξεικού υλικού-άνθρακα [86], ίνες άνθρακα [78, 87, 88], αδάμαντα επιμολυσμένο με βόριο [89]). Η απόθεση του βισμούθιου έχει πραγματοποιηθεί επιπλέον και σε επιφάνειες άλλων μετάλλων όπως ο Cu, ο Au και ο Pt [87, 88].

Για την ηλεκτροαπόθεση του βισμούθιου στην αγώγιμη επιφάνεια υπάρχουν δύο κύριες τεχνικές, η ex-situ ηλεκτροαπόθεση και η in-situ ηλεκτροαπόθεση.

Στην πρώτη περίπτωση, το φιλμ του βισμούθιου σχηματίζεται με ηλεκτροαπόθεση σε διάλυμα διαφορετικό από αυτό στο οποίο θα πραγματοποιηθεί η ανάλυση. Η αντίδραση που πραγματοποιείται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου σε αυτό το στάδιο είναι η εξής:



Μετά τον σχηματισμό του φιλμ το ηλεκτρόδιο μπορεί να μεταφερθεί στο υπό ανάλυση διάλυμα και να πραγματοποιήσει την ηλεκτροχημική μέτρηση. Το υμένιο που σχηματίζεται με αυτόν τον τρόπο δεν είναι σε καμία περίπτωση ομοιογενές και λείο καθώς επηρεάζεται σε υψηλό βαθμό από τις συνθήκες κατά τις οποίες πραγματοποιήθηκε η ηλεκτροαπόθεση. Τα ΗΛΣΒ μπορούν να χρησιμοποιηθούν για πολλαπλές μετρήσεις στο ίδιο διάλυμα αλλά απαιτούν την μεσολάβηση ενός σταδίου καθαρισμού πριν από μια νέα μέτρηση. Όσον αφορά την περίπτωση της ανοδικής αναδιαλυτικής βολταμμετρίας ο καθαρισμός πρέπει να πραγματοποιηθεί σε δυναμικό αρνητικότερο από το δυναμικό οξειδωσης του Bi και θετικότερο από το δυναμικό οξειδωσης των μετρούμενων μεταλλικών ιόντων.

Στην δεύτερη περίπτωση, ο σχηματισμός του φιλμ σχηματίζεται εγγενώς στο διάλυμα στο οποίο θα πραγματοποιηθεί η αναλυτική μέτρηση. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων η in-situ ηλεκτροαπόθεση χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με την ανοδική αναδιαλυτική βολταμμετρία. Η τεχνική αυτή στηρίζεται στην προσθήκη ιόντων Bi(III) συγκεντρώσεως από 400-1000 µg/L στο διάλυμα στο οποίο θα πραγματοποιηθεί η μέτρηση. Επομένως, την στιγμή της ηλεκτροχημικής ανάλυσης πραγματοποιούνται ταυτοχρόνως οι παρακάτω δύο ηλεκτροδιακές αντιδράσεις:



Εδώ είναι σημαντικό να αναφερθεί πως η συγκέντρωση του προστιθέμενου Bi θα πρέπει να είναι τουλάχιστον μια τάξη μεγέθους μεγαλύτερη από την συγκέντρωση του αναλύτη που θέλουμε να ανιχνευθεί/προσδιοριστεί ώστε να αποφεύγεται ο κορεσμός της επιφανείας του ηλεκτροδίου. Παρόλα αυτά, υπάρχουν ενδείξεις στην βιβλιογραφία πως μικρότερη συγκέντρωση Bi στο διάλυμα οδηγεί σε υψηλότερη ευαισθησία [90, 91]. Μετά το τέλος της μέτρησης εφαρμόζεται στο ηλεκτρόδιο δυναμικό θετικότερο από το δυναμικό οξειδωσης του Bi για την απομάκρυνση του υμενίου.

Όπως αναφέρθηκε στην αρχή της παραγράφου, το βισμούθιο είναι φιλικό προς το περιβάλλον, έχει χαμηλή τοξικότητα και χρησιμοποιείται ευρέως στον

τομέα των φαρμάκων. Τα ηλεκτρόδια βισμούθιου εμφανίζουν υψηλή επαναληψιμότητα μεταξύ των μετρήσεων, καλό διαχωρισμό κορυφών, υψηλό δυναμικό αναγωγής ιόντων υδρογόνου και ευρεία περιοχή πόλωσης. Ο μεγαλύτερος περιορισμός αυτών των ηλεκτροδίων είναι πως το Βi οξειδώνεται πολύ πιο εύκολα από τον υδράργυρο και έτσι δεν μπορεί να έχει εφαρμογή στην ανοδική περιοχή μέτρησης των ηλεκτροδίων.

4.4.4 Κατασκευή αισθητήρα με την τεχνική εκτύπωσης μέσω πλέγματος και με τρισδιάστατη εκτύπωση

Στην παρούσα εργασία, στο ηλεκτροχημικό στοιχείο του βιοαισθητήρα χρησιμοποιήθηκαν δύο ηλεκτρόδια γραφίτη, το ηλεκτρόδιο αναφοράς και το βοηθητικό/αντισταθμιστικό, τα οποία κατασκευάστηκαν μέσω τρισδιάστατης εκτύπωσης από αγώγιμα νήματα καθώς και ένα εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο εργασίας, το οποίο κατασκευάστηκε με την τεχνική εκτύπωσης μέσω πλέγματος και με την χρήση μελανιού που περιείχε πάστα οξειδίων αντιμονίου και κασσιτέρου. Ακόμη, η κυψελίδα και τα ηλεκτρόδια αναφοράς και βοηθητικό κατασκευάστηκαν μέσω τρισδιάστατης εκτύπωσης από μη αγώγιμα νήματα.

Τα ηλεκτρόδια εργασίας από κράμα οξειδίων αντιμονίου/κασσιτέρου κατασκευάστηκαν με την τεχνική της εκτύπωσης ηλεκτροδίων μέσω πλέγματος (screen printed), η οποία βασίζεται στην τεχνολογία παχείας επίστρωσης ή παχέος φιλμ, όπου το πάχος της επίστρωσης είναι $>5 \mu\text{m}$. Το υλικό εκτύπωσης, καλούμενο αλλιώς και ως μελάνι, βρίσκεται σε μορφή παχύρρευστου γαλακτώματος κατάλληλου ιξώδους για την εκάστοτε εφαρμογή. Το μελάνι αυτό έχει την ιδιότητα να γίνεται ρευστό όταν του ασκηθεί επαρκής πίεση ενώ μετά την παύση της εφαρμογής πίεσης επανέρχεται στην αρχική του φυσική κατάσταση. Τα υλικά που φέρουν αυτό το χαρακτηριστικό αποκαλούνται θιξοτροπικά υλικά [73].

Εφαρμόζοντας κατάλληλη πίεση, το μελάνι κινείται με την βοήθεια ελαστικού σαρώθρου (squeegee) διαμέσου ενός πλέγματος-εκμαγείου (screen) και εκτυπώνεται στο επιλεχθέν υλικό στήριξης/υπόστρωμα. Στην συνέχεια, το

εκτυπωμένο πλέον υλικό υφίσταται θέρμανση σε κατάλληλη θερμοκρασία σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας έτσι ώστε να αποκτήσει τις επιδιωκόμενες ιδιότητες. Το εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο θα είναι επίπεδο, μπορεί να έχει οποιοδήποτε σχήμα και μπορεί να αποτελείται από πολλαπλές στρώσεις, για παράδειγμα, στρώση αγωγίμου υλικού, μονωτικό υλικό, διαφορετικό αγωγίμο υλικό κ.ο.κ.

Ένα τυπικό εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο αποτελείται συνήθως από τις εξής στρώσεις:

- Αγωγίμη στρώση γραφίτη, ώστε να επιτρέπεται η ηλεκτρική επαφή του ενεργού υλικού με τον μεταλλάκτη.
- Στρώση γραφίτη (overlay pad), η οποία καλύπτει την προηγούμενη στρώση του γραφίτη στο σημείο που θα εκτυπωθεί η στρώση του ενεργού υλικού.
- Στρώση ενεργού υλικού (working layer), η οποία χαρακτηρίζει το ηλεκτρόδιο εργασίας καθώς επίσης αποτρέπει την επαφή του διαλύματος εργασίας με την στρώση του γραφίτη.
- Στρώση μονωτικού υλικού (dielectric layer), η οποία καλύπτει την υπόλοιπη επιφάνεια της στρώσης του αργύρου εκτός από μια μικρή περιοχή αντιδιαμετρικά της περιοχής του ενεργού υλικού, για να επιτραπεί η σύνδεση του ηλεκτροδίου με την υπόλοιπη ηλεκτροχημική οργάνωση.

Ακολουθώντας αυτήν την τεχνική μπορούν να κατασκευαστούν μεμονωμένα ηλεκτρόδια ή ακόμα και ολόκληρα ηλεκτροχημικά στοιχεία, δηλαδή σε ένα τεμάχιο να περιλαμβάνονται ταυτόχρονα το ηλεκτρόδιο εργασίας, αναφοράς και το βοηθητικό/αντισταθμιστικό ηλεκτρόδιο [73].

Στο εμπόριο, υπάρχουν διαθέσιμα μελάνια με κατάλληλη χημική σύσταση για να παραχθούν εκτυπωμένα ηλεκτρόδια Ag, Au, Pt, Ag/AgCl και άλλα, αντίστοιχα με τα παραδοσιακά ηλεκτρόδια. Σε πειραματικό επίπεδο, μπορεί να γίνει συνδυασμός ενός μελανιού βάσης, για παράδειγμα μελάνι γραφίτη, με

έναν τροποποιητή ή ακόμα και να γίνει εξ' ολοκλήρου παρασκευή εκτυπώσιμων μελανιών [73].

Με την τεχνική της τρισδιάστατης εκτύπωσης μπορούν να κατασκευαστούν διάφορα αντικείμενα σε ποικίλες γεωμετρίες. Η τρισδιάστατη εκτύπωση χρησιμοποιεί κατάλληλα πλαστικά νήματα τα οποία θερμαίνονται και στη συνέχεια εξωθούνται σε ημίρευστη κατάσταση σε κατάλληλη πλατφόρμα όπου στερεοποιούνται, σχηματίζοντας το επιθυμητό αντικείμενο. Η όλη διαδικασία ελέγχεται από υπολογιστή προσφέροντας πλήρη έλεγχο και επαναληψιμότητα. Η σχεδίαση του αντικειμένου γίνεται με κατάλληλο σχεδιαστικό πρόγραμμα, το αρχείο στη συνέχεια μετατρέπεται σε μορφή .STL και εκτυπώνεται από τον τρισδιάστατο εκτυπωτή. Στο εμπόριο υπάρχει πληθώρα από νήματα αγώγιμα και μη αγώγιμα και αποτελούνται κυρίως από πολυλακτικό οξύ (PLA) ή ακρυλονιτρίλιο βουταδιένιο στυρένιο (ABS).

4.4.5 Ηλεκτροχημικός ανοσοαισθητήρας

Στην παρούσα εργασία, ο ηλεκτρικός βιοαισθητήρας που αναπτύχθηκε βασίστηκε στις βολταμετρικές τεχνικές και ειδικότερα, στην αξιοποίηση της ανοδικής αναδιαλυτικής βολταμετρίας (Anodic Stripping Voltammetry, ASV) με στόχο τον προσδιορισμό της νοθείας κατσικίσιου τυριού με αγελαδινό. Κάτι τέτοιο κατέστη εφικτό πραγματοποιώντας βιοτινυλίωση του πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της βόειας κ-καζεΐνης που χρησιμοποιείται κατά τον ενζυμοανοσοχημικό προσδιορισμό νοθείας κατσικίσιου τυριού με αγελαδινό και επισήμανσή του με κβαντικές κουκίδες καδμίου προσδεδμενες με στρεπταβιδίνη. Η μέθοδος της βιοτινυλίωσης του πολυκλωνικού αντισώματος περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 6.2. Το κύριο χαρακτηριστικό των αναδιαλυτικών τεχνικών είναι το στάδιο της προσυγκέντρωσης/απόθεσης του αναλύτη πάνω στο ηλεκτρόδιο εργασίας το οποίο αυξάνει την ευαισθησία της μεθόδου καθώς και μειώνει τα όρια ανίχνευσης.

Για την μέτρηση των δειγμάτων τυριού με αναδιαλυτική βολταμετρία πραγματοποιείται διάλυση των κβαντικών κουκίδων με προσθήκη υδροχλωρικού οξέος 0.1 M και απελευθέρωση ιόντων καδμίου, τα οποία στην

συνέχεια προσυγκεντρώνονται στο ηλεκτρόδιο εργασίας και πραγματοποιείται σάρωση του δυναμικού του ηλεκτροδίου και καταγραφή του βολταμμογραφήματος σε ηλεκτρονικό υπολογιστή.

Οι κβαντικές κουκίδες είναι φθορίζουσες ημιαγωγικές νανοκρυσταλικές δομές οι οποίες έχουν μέγεθος από 1-20 nm [92, 93]. Το μικρό μέγεθος και η μεγάλη δυνατότητα παραμετροποίησης των χαρακτηριστικών τους (αγωγιμότητα, μεταλλικός πυρήνας, ακριβές μέγεθος) ανάλογα με την χρήση τις καθιστά κατάλληλες για την επισήμανση και καταμέτρηση κυττάρων, απεικόνιση βιολογικών δομών *in vivo*, ανίχνευση DNA και άλλα [94]. Στην παρούσα ερευνητική εργασία, χρησιμοποιήθηκαν κβαντικές κουκίδες CdSe/ZnS στις οποίες είχε προσδεθεί χημικά, στρεπταβιδίνη. Αυτό επιτρέπει την σύνδεση των κουκίδων με το βιοτινυλιωμένο πολυκλωνικό αντίσωμα μετά το πέρας την ανοσοαντίδρασης στον ανταγωνιστικού τύπου ενζυμοανοσοχημικό προσδιορισμό νοθείας κασικίσιου τυριού με αγελαδινό. Επομένως, η συγκέντρωση των κβαντικών κουκίδων θα είναι αντιστρόφως ανάλογη της παρουσίας βόειας κ-καζεΐνης/καζεΐνομακροπεπτιδίου στο δείγμα. Αυτό, έχει ως αποτέλεσμα πως στο μέγιστο σήμα θα υπάρχει απουσία νοθείας.

Το 2011, αναπτύχθηκε ηλεκτροχημικός ανοαισθητήρας για τον προσδιορισμό καζεΐνης σε αγελαδινό τυρί με χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της βόειας καζεΐνης βασισμένος σε νανοσωματίδια χρυσού και πολυμερές της L-Arginine και σε ενεργοποιημένη επιφάνεια με πολυτοιχωματικούς νανοσωλήνες άνθρακα [95]. Επιτεύχθηκε δυναμικό εύρος της γραμμικής περιοχής από 10⁻⁷ έως 10⁻⁵ g/mL με συντελεστή γραμμικότητας 0.993 και όριο ανίχνευσης 5*10⁻⁸ g/mL.

Το 2014, αναπτύχθηκε μέθοδος ανίχνευσης νοθείας γάλακτος με μελαμίνη χρησιμοποιώντας ηλεκτρόδιο χαλκού ως ηλεκτροχημικό αισθητήρα [96]. Η ποσοτικοποίηση της μελαμίνης πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της διαφορικής παλμικής βολταμμετρίας. Επιτεύχθηκε δυναμικό εύρος από 5 έως 90 μmol/L, όριο ανίχνευσης 0.85 μmol/L και ένδο-αναλυτική επαναληψιμότητα 1%.

Το 2016, αναπτύχθηκε ηλεκτροχημικός βιοαισθητήρας με μορφή αναδιπλούμενης ολοκληρωμένης συσκευής-εργαστηρίου για τον προσδιορισμό αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο γάλα μέσω ανίχνευσης βόειας καζεΐνης και βόειας ανοσοσφαιρίνης-γ για τις οποίες επιτεύχθηκαν όρια ανίχνευσης 0.04 μg/mL και 0.02 μg/mL αντίστοιχα [97].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΚΟΠΟΣ

Το φαινόμενο της νοθείας στα τρόφιμα είναι υπαρκτό και είναι πολύ σημαντικό να μπορεί να περιοριστεί στον μεγαλύτερο δυνατό βαθμό. Ιδιαίτερα στον τομέα της γαλακτοβιομηχανίας η νοθεία μπορεί να έχει δυσμενείς επιπτώσεις στους καταναλωτές καθώς σε περιπτώσεις προδιάθεσης αλλεργίας σε ένα είδος γάλακτος μπορεί να οδηγήσει σε πολύ σοβαρά προβλήματα υγείας. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο του αιγοπρόβειου γάλακτος για νοθεία με αγελαδινό ενώ είναι αποτελεσματικές είναι συνήθως χρονοβόρες και σχετικά υψηλού κόστους. Λόγω αυτών των περιορισμών δεν είναι εφικτή η ανάλυση δειγμάτων κατά της την παραλαβή των πρώτων υλών ή στο πεδίο. Στα πλαίσια αυτά, σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη ηλεκτροχημικού ανοσοαισθητήρα για την ανίχνευση νοθείας αιγοπρόβειου τυριού με αγελαδινό ο οποίος να είναι μικρού μεγέθους και να παρέχει αξιόπιστα αποτελέσματα σε μικρό χρόνο ώστε να είναι δυνατή η εφαρμογή του για μετρήσεις πεδίου. Για να επιτευχθεί ο στόχος, καταρχήν αναπτύχθηκε ενζυμοανοδοχημικός προσδιορισμός για την ανίχνευση νοθείας αιγοπρόβειου τυριού με αγελαδινό σε φρεάτια μικροπιλοδότησης. Ο ηλεκτροχημικός αισθητήρας κατασκευάστηκε μέσω τρισδιάστατης εκτύπωσης της μικροκυψελίδας, του βοηθητικού ηλεκτροδίου και του ηλεκτροδίου αναφοράς ενώ το ηλεκτρόδιο εργασίας με εκτύπωση μέσω πλέγματος. Ο αισθητήρας βασίστηκε στην αρχή του ανταγωνιστικού ανοσοπροσδιορισμού. Τα ηλεκτρόδια τροποποιήθηκαν με βόριο κ-καζεΐνη ενώ για την ανίχνευση χρησιμοποιήθηκε βιοτινυλιωμένο αντίσωμα έναντι της κ-καζεΐνης σε συνδυασμό με κβαντικές κουκίδες καδμίου οι οποίες διαλυτοποιούνται μετά το τέλος της ανάλυσης και προσδιορίζεται η συγκέντρωση των ιόντων καδμίου μέσω αναδιαλυτικής βολταμετρίας. Βελτιστοποιήθηκαν όλες οι παράμετροι του ηλεκτροχημικού ανοσοπροσδιορισμού και προσδιορίστηκαν τα αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου. Τέλος προσδιορίστηκαν τα επίπεδα νοθείας σε αιγοπρόβειο τυρί και συγκρίθηκαν με τα αποτελέσματα του ενζυμοανοδοχημικού προσδιορισμού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΜΕΘΟΔΟΙ - ΥΛΙΚΑ

6.1 Καταβύθιση κλάσματος γ-σφαιρινών από ορό κουνελιού έναντι βόειας κ-καζεΐνης

ο ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ο καθαρισμός του πολυκλωνικού αντισώματος κουνελιού βασίστηκε στην συνολική καταβύθιση του κλάσματος των ανοσοσφαιρινών Γ (IgG) με χρήση διαλύματος θειικού αμμωνίου ((NH₄)₂SO₄). Το άλας του θειικού αμμωνίου όταν προστίθενται σε υδατικό διάλυμα χωρίζεται στα συστατικά του και αυξάνει την ιοντική ισχύ του διαλύματος. Τα ιόντα του προσκολλώνται στα φορτία των πρωτεϊνών περικλείοντάς τες πράγμα που τις θέτει όλο και λιγότερο διαλυτές στο υδατικό διάλυμα. Όταν η ιοντική ισχύς του διαλύματος φτάσει ένα κατάλληλο επίπεδο τότε οι πρωτεΐνες καταβυθίζονται. Ρυθμίζοντας ακριβώς την περιεκτικότητα σε θειικό αμμώνιο στο πρωτεϊνικό διάλυμα σε σχέση με το κεκορεσμένο διάλυμα θειικού αμμωνίου πραγματοποιείται η κλασματική καταβύθιση των πρωτεϊνών που μας ενδιαφέρουν και η απομόνωσή τους από ένα φορτωμένο, πρωτεϊνικά, διάλυμα.

ο ΥΛΙΚΑ

- Δις απεσταγμένο νερό
- Νερό δικτύου
- Διαφανείς σωλήνες αντίδρασης
- Πάγος
- Κουβάς πέντε (5) λίτρων
- Χλωριούχο Νάτριο NaCl (Sigma, USA)

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0.01M, pH 7.4, 0.9% (β/ο) NaCl
 - Κεκορεσμένο διάλυμα θειικού αμμωνίου (NH₄)₂SO₄
 - Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι βόειας κ-καζεΐνης
- ΟΡΓΑΝΑ
- Αναδευτήρας vortex (Scientific Industries Bohemia N.Y., USA, Model K-550-GE)
 - Μembrάνης διαπίδυσης cut-off MW 12000 (Sigma, St. Louis, Mo., USA)
 - Φασματοφωτόμετρο (PerkinElmer Lambda 35, UV/VIS Spectrometer)
 - Φυγόκεντρος
- ΕΚΤΕΛΕΣΗ

Πραγματοποιείται αραιώση 1:1 του ορού με το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (0.01M, pH 7.4, NaCl 0.9%) και τοποθέτησή του σε πάγο για 10 λεπτά. Προστίθεται κεκορεσμένο διάλυμα θειικού αμμωνίου έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 25% ως προς το κεκορεσμένο διάλυμα και αναδεύεται σε vortex. Ελέγχεται η δημιουργία ιζήματος και εφόσον δεν εμφανιστεί προστίθεται νέα ποσότητα κεκορεσμένου διαλύματος θειικού αμμωνίου έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 40% ως προς το κεκορεσμένο διάλυμα και αναδεύεται σε vortex όπου κατακάθεται ως ίζημα το κλάσμα των ανοσοσφαιρινών. Τοποθετείται για φυγοκέντρωση στα 4000g για 20 λεπτά και στην συνέχεια απομακρύνεται το υπερκείμενο υγρό. Για την έκπλυση του ιζήματος γίνεται προσθήκη κατάλληλου όγκου κεκορεσμένου διαλύματος θειικού αμμωνίου, ανάδευση σε vortex και πραγματοποιείται ξανά φυγοκέντρωση στα 4000g για 20 λεπτά. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και στο ίζημα προστίθεται κατάλληλος όγκος ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (0.01M, pH 7.4, NaCl 0.9%) μέχρις ότου να διαλυθεί. Στην συνέχεια, το διάλυμα διαπιδύεται μέσω μεμβράνης διαπίδυσης υπό ήπια

ανάδευση σε 4 λίτρα του παραπάνω ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (0.01M, pH 7.4, NaCl 0.9%) για μία νύχτα στο ψυγείο (4 °C). Την επόμενη μέρα γίνεται μία αλλαγή του διαλύματος διαπίδωσης με νέο και παραμονή υπό ήπια ανάδευση στο ψυγείο (4 °C) για άλλη μια νύχτα. Έπειτα, αφαίρεση της μεμβράνης από το διάλυμα διαπίδωσης και ζύγιση του διαλύματος. Τέλος, αφαιρείται μία μικρή ποσότητα του διαλύματος η οποία αραιώνεται 10 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (0.01M, pH 7.4, NaCl 0.9%) και μετρείται η απορρόφησή του σε φασματοφωτόμετρο στα 280nm.

6.2 Παρασκευή συζεύγματος πρωτεϊνών με βιοτίνη (μέθοδος βιοτινυλίωσης)

ο ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Για την παρασκευή του συζεύγματος του πολυκλωνικού αντισώματος κουνελιού έναντι της κ-καζεΐνης βοός με την βιοτίνη χρησιμοποιήθηκε το μετά νατρίου άλας του σουλφο-ηλεκτριμιδο εστέρα του 6-[(βιοτινοϋλο)αμινο]εξανοϊκού οξέος (Sulfo-NHS-LC-Biotin). Η σύνθεση του παραγώγου αυτού βασίζεται στον σχηματισμό αμιδικού δεσμού μεταξύ των ελεύθερων αμινομάδων του αντισώματος με την ενεργοποιημένη καρβοξυλομάδα του Sulfo-NHS-LC-Biotin.

ο ΥΛΙΚΑ

- NHS-LC-Biotin
- Διμεθυλοσουλφοξείδιο DMSO (Fischer)
- NaCl
- NaN₃
- Na₂CO₃
- Νερό δικτύου

- Δις απεσταγμένο νερό
- ΟΡΓΑΝΑ
 - Μεμβράνης διαπίδυσης cut-off MW 12000 (Sigma, St. Louis, Mo., USA)
- ΕΚΤΕΛΕΣΗ

Ρυθμίζεται η συγκέντρωση του διαλύματος του αντισώματος στο 1 mg/mL με απεσταγμένο νερό και παρασκευάζεται διάλυμα Sulfo-NHS-LC-Biotin σε DMSO με συγκέντρωση 100 mg/mL. Στο διάλυμα του αντισώματος προστίθεται το 1/3 του όγκου ρυθμιστικού διαλύματος ανθρακικού νατρίου 1M, pH 9.2. Στην συνέχεια, προστίθεται στάγδην και υπό συνεχή ανάδευση το διάλυμα του Sulfo-NHS-LC-Biotin στο διάλυμα του αντισώματος έτσι ώστε η τελική αναλογία κατά βάρος βιοτίνης/αντισώματος να είναι 1,5:1. Ακολουθεί επώαση του διαλύματος για 2 ώρες στο σκοτάδι με την έντονη ανάδευσή του ανά 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα μεταφέρεται το διάλυμα σε μεμβράνη διαπίδυσης και διαπιδύεται ως προς 4 λίτρα ρυθμιστικού διαλύματος ανθρακικών 0.1M, NaN₃ 0.1%, NaCl 0.15M, pH 8.5 στο ψυγείο (4 °C) υπό ήπια ανάδευση. Μετά από τρεις ώρες πραγματοποιείται μία αλλαγή του διαλύματος διαπίδυσης και παραμονή του προς διαπίδυση για μία νύχτα. Την επόμενη μέρα γίνεται άλλη μία αλλαγή του διαλύματος διαπίδυσης και αφήνεται για μία τελευταία νύχτα. Τέλος, συλλέγεται το βιοτινυλιωμένο πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού από την μεμβράνη διαπίδυσης και φυλάσσεται στο ψυγείο (4 °C) σε υάλινο φιαλίδιο μέχρι τη χρήση του.

6.3 Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων

- ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Σε ρυθμιστικό διάλυμα ανοσοαντίδρασης παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης. Για τον προσδιορισμό νοθείας σε μήτρα δείγματος παρασκευάστηκαν μίγματα γάλακτος και τυριού από κατσικίσιο γάλα ή τυρί και μίγμα 50% με αγελαδινό.

6.3.1 Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων βόειας κ-καζεΐνης σε ρυθμιστικό διάλυμα ανοσοαντίδρασης

○ ΥΛΙΚΑ

- Βόεια κ-καζεΐνη γάλακτος, (Sigma-Aldrich Co., Darmstadt, Germany)
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10mM, pH 7.4, 0.5% (β/ο) BSA, 0.9% (β/ο) NaCl, 0.05% (ο/ο) TWEEN20, 0.05% (ο/ο) NaN₃ (διάλυμα ανοσοαντίδρασης)
- Ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών/όξινων ανθρακικών 0.05M, pH 9.25, 0.05% (β/ο) NaN₃ (διάλυμα ακινητοποίησης)
- Δις απεσταγμένο νερό
- Δοκιμαστικοί σωλήνες πολυστυρενίου

○ ΕΚΤΕΛΕΣΗ

Αρχικά, παρασκευάστηκε διάλυμα παρακαταθήκης βόειας κ-καζεΐνης σε διάλυμα ακινητοποίησης σε συγκέντρωση 1 mg/mL από ζύγιση εμπορικά διαθέσιμης λυοφιλοποιημένης κ-καζεΐνης, διάλυσή της στο ρυθμιστικό διάλυμα ακινητοποίησης και φύλαξή του στο ψυγείο (4 °C). Από το διάλυμα παρακαταθήκης και πραγματοποιώντας τις κατάλληλες αραιώσεις με ρυθμιστικό διάλυμα ανοσοαντίδρασης παρασκευάζονται τα πρότυπα της κ-καζεΐνης, σε σωλήνες πολυστυρενίου, στις επιθυμητές συγκεντρώσεις, οι οποίες κυμαίνονταν από 0,01 έως 2 μg/mL.

6.3.2 Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο γάλα

○ ΥΛΙΚΑ

- Κατσικίσιο νωπό γάλα
- Μίγμα 50% (ο/ο) αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο γάλα
- Νερό δικτύου
- Ποτήρι ζέσης
- Δοκιμαστικοί σωλήνες πολυστυρενίου

○ ΟΡΓΑΝΑ

- Λουτρό υπερήχων (Elmasonic S 30 H, Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Germany)
- Φυγόκεντρος
- Αναδευτήρας vortex
- Μικροπιπέτα μεταβλητού όγκου Eppendorf

○ ΕΚΤΕΛΕΣΗ

Δοκιμαστικοί σωλήνες με δείγματα κατσικίσιου γάλακτος και μίγματος 50% αγελαδινού με κατσικίσιο αφαιρούνται από την κατάψυξη (-20 °C) και αποψύχονται σε λουτρό νερού δικτύου σε ποτήρι ζέσης έτσι ώστε να επιτευχθεί η επαναφορά τους σε θερμοκρασία δωματίου. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα οι δοκιμαστικοί σωλήνες αναδεύονται έντονα σε vortex για να υποβοηθείται η απόψυξή τους. Μετά την επαναφορά τους σε θερμοκρασία δωματίου μεταφέρονται σε λουτρό υπερήχων στους 30 °C για 15 λεπτά προκειμένου να ομογενοποιηθούν τα διαλύματα. Έπειτα, μεταφέρονται σε δοχεία κατάλληλα για φυγόκεντρο με μικροπιπέτα όπου και φυγοκεντρούνται

για 10 λεπτά προς απομάκρυνση του βουτύρου από το γάλα. Τα δείγματα παραλαμβάνονται από την φυγόκεντρο και συλλέγεται το υπερκείμενο υγρό σε δοκιμαστικούς σωλήνες πολυστυρενίου. Αυτά τα υπερκείμενα θα χρησιμοποιηθούν ως γάλα για την παρασκευή προτύπων. Μετά από έντονη ανάδευση σε vortex, παρασκευάζονται τα πρότυπα διαλύματα αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο μετά από προσθήκη κατάλληλης ποσότητας αγελαδινού σε κατσικίσιο γάλα. Τέλος, τα πρότυπα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για τον ανοσοχημικό προσδιορισμό νοθείας ανάλογα με την μέθοδο και την συγκεκριμένη δοκιμή.

6.3.3 Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων αγελαδινού σε αιγοπρόβειο τυρί

○ ΥΛΙΚΑ

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10mM, pH 7.4, 0.9% (β/ο) NaCl (διάλυμα έκπλυσης 1)
- Αιγοπρόβειο τυρί παρασκευασμένο στο εργαστήριο
- Μίγμα αγελαδινού γάλακτος σε αιγοπρόβειο τυρί παρασκευασμένο στο εργαστήριο
- Ποτήρια ζέσης
- Σπάτουλες ζύγισης
- Δοκιμαστικοί σωλήνες πολυστυρενίου

○ ΟΡΓΑΝΑ

- Φυγόκεντρος
- Ζυγός

○ ΕΚΤΕΛΕΣΗ

Δείγματα αιγοπρόβειου τυριού και μίγματος αγελαδινού σε αιγοπρόβειο τυρί το οποίο είχε παρασκευαστεί στο εργαστήριο σε αναλογία 1:1 (β/β), αφαιρούνται από την κατάψυξη (-20 °C) και αποψύχονται σε λουτρό νερού δικτύου σε ποτήρι ζέσης έτσι ώστε να επιτευχθεί η επαναφορά τους σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια, ζυγίζεται μια ποσότητα από κάθε δείγμα και μεταφέρεται σε ποτήρι ζέσεως με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης 1 σε αναλογία 1:1 (β/ο) και ακολουθεί ομογενοποίηση των δειγμάτων με σπάτουλα. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται εκχύλιση των πρωτεϊνών του τυριού στο ρυθμιστικό διάλυμα. Στην συνέχεια, μεταφέρονται σε δοχεία φυγοκέντρησης, τα οποία αφού ζυγιστούν για να επιτευχθεί μια ισομερής κατανομή των βαρών των επιμέρους δειγμάτων, φυγοκεντρούνται για 10 λεπτά. Έπειτα, αφαιρούνται από την φυγόκεντρο και συλλέγεται το υπερκείμενο υγρό σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Μετά από έντονη ανάδευση σε vortex παρασκευάζονται τα πρότυπα του τυριού αραιώνοντας καταλλήλως το 50% (β/β) αγελαδινό σε κασικίσιο τυρί με το αιγοπρόβειο τυρί. Στην συνέχεια, τα πρότυπα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για τον ανοσοχημικό προσδιορισμό νοθείας αιγοπρόβειου τυριού με αγελαδινό.

6.4 Ανταγωνιστικού τύπου ενζυμικοί ανοσοχημικοί προσδιορισμοί

ο ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Οι ανταγωνιστικού τύπου ανοσοχημικοί ενζυμικοί προσδιορισμοί βασίζονται στον ανταγωνισμό του ακινητοποιημένου αντιγόνου με το αντιγόνο που υπάρχει στο δείγμα για την πρόσδεσή τους στις θέσεις δέσμησης του αντισώματος. Αρχικά, πραγματοποιείται ακινητοποίηση του αντιγόνου μας σε φρεάτια μικροπιλοδότησης πολυστυρενίου. Έπειτα, τα φρεάτια εκπλένονται και ακολουθεί αποκλεισμός των ελευθέρων θέσεων δέσμησης με μία αδρανή πρωτεΐνη έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθεί η μη ειδική δέσμηση του αντισώματος. Μετά από έκπλυση των φρεατίων προστίθεται μίγμα αντισώματος έναντι του συγκεκριμένου αντιγόνου και προτύπων διαλυμάτων και αφήνονται για επώαση υπό ανάδευση. Αμέσως μετά τα φρεάτια

εκπλένονται και προστίθεται σε αυτά αντίσωμα έναντι των γ-σφαιρινών του ζώου στο οποίο αναπτύχθηκε το ειδικό αντίσωμα, συζευγμένο με υπεροξειδάση της ραπανίδος (Horse Radish Peroxidase, HRP), το οποίο θα δεσμευτεί από το αντίσωμα που βρίσκεται ακινητοποιημένο στο ανοσοσύμπλεγμα. Τέλος, τα φρεάτια εκπλένονται και προστίθεται χρωμογόνο υπόστρωμα ($H_2O_2/ABTS$) και πραγματοποιείται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 405 nm. Στην ανταγωνιστικού τύπου ανοσοανάλυση, η μέγιστη πρόσδεση του αντισώματος και κατ' επέκταση το μέγιστο αναλυτικό σήμα παρατηρείται απουσία του αντιγόνου στο δείγμα (μηδενικό πρότυπο διάλυμα). Αξίζει να σημειωθεί ότι σε αυτό το είδος ανοσοανάλυσης, το αναλυτικό σήμα που λαμβάνεται είναι αντιστρόφως ανάλογο της συγκεντρώσεως του αντιγόνου στο δείγμα. Για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς από τις λαμβανόμενες τιμές απορρόφησης για τα πρότυπα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν συναρτήσει της συγκέντρωσής τους. Για τα άγνωστα δείγματα προσδιορίζεται η συγκέντρωσή τους μέσω της αντιστοίχισης των απορροφήσεών τους στην καμπύλη αναφοράς των προτύπων.

6.4.1 Ανταγωνιστικού τύπου ενζυμικός ανοσοχημικός προσδιορισμός κ-καζεΐνης σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης

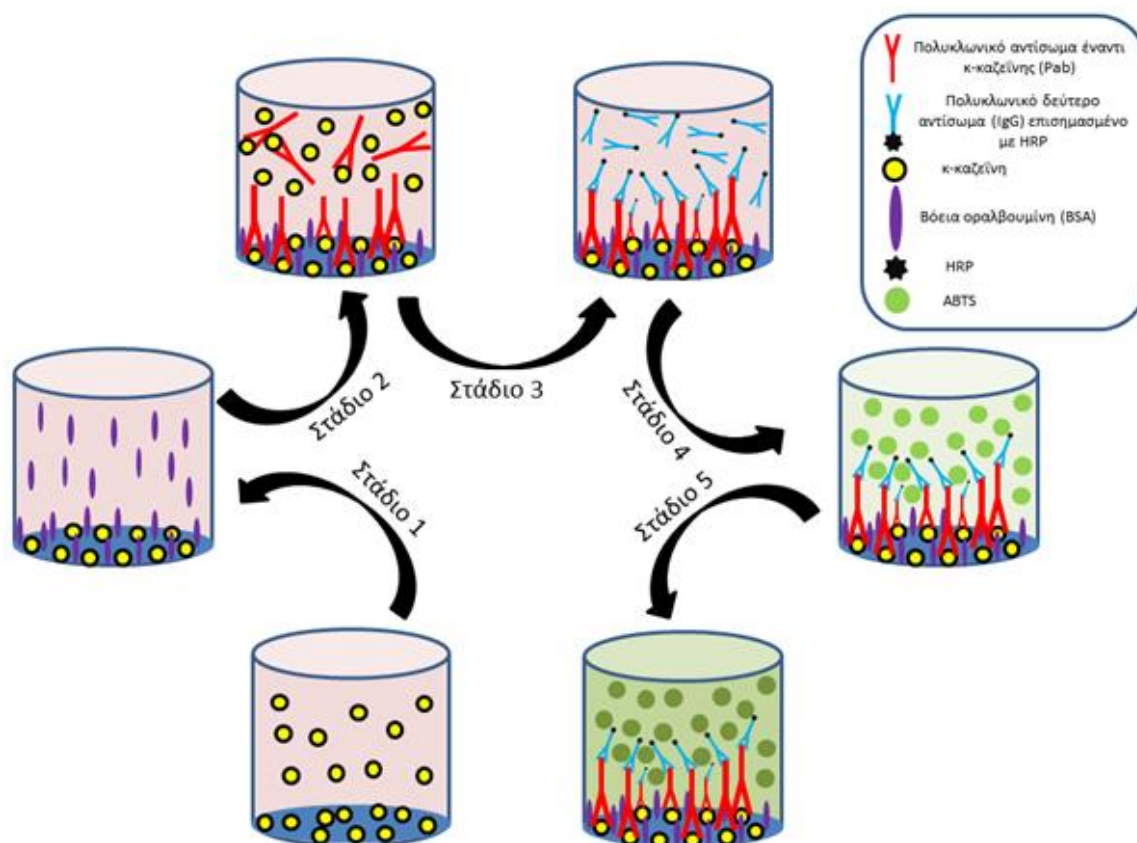
○ ΥΛΙΚΑ

- Πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης
- Διάλυμα ακινητοποίησης: ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών/όξινων ανθρακικών 0.05M, pH 9.25, 0.05% (β/ο) NaN_3
- Διάλυμα αποκλεισμού ελευθέρων θέσεων δέσμευσης: ρυθμιστικό διάλυμα όξινων ανθρακικών 0.1M, pH 8.5, 1% (β/ο) BSA, 0.05% (β/ο) NaN_3

- Διάλυμα ανοσοαντίδρασης: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10mM, pH 7.4, 0.5% (β/ο) BSA, 0,9% (β/ο) NaCl, 0.05% (ο/ο) TWEEN 20, 0.05% (β/ο) NaN₃
 - Διάλυμα δευτέρου αντισώματος/HRP: ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 0.15M, pH 8.25, 0.5% (β/ο) BSA, 0.02% (β/ο) Thimerosal
 - Διάλυμα υποστρώματος HRP: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών/κιτρικών 0.05M, pH 4.4, NaBO₂.H₂O₂.H₂O 3.2mM, ABTS 1,9mM
 - Διάλυμα έκπλυσης 1: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10mM, 0.9% (β/ο) NaCl, pH 7.4
 - Διάλυμα έκπλυσης 2: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10mM, 0.9% (β/ο) NaCl, pH 7.4, 0.05% (ο/ο) TWEEN 20
- ΟΡΓΑΝΑ
- Μικροπιπέτες μεταβλητού όγκου Eppendorf
 - Συσκευή μέτρησης οπτικής απορρόφησης σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης Victor³ Multilabel Readers, (PerkinElmer, USA)
 - Αναδευτήρας vortex
 - Αναδευτήρας πλακών φρεατίων μικροτιτλοδότησης
- ΕΚΤΕΛΕΣΗ

Σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης προστίθενται 100μL διαλύματος κ-καζεΐνης κατάλληλης συγκέντρωσης σε διάλυμα ακινητοποίησης και αφήνεται για προσρόφηση ολονυχτίς. Τα φρεάτια εκπλένονται εις διπλούν με 300 μL διαλύματος έκπλυσης 1 και στην συνέχεια, προστίθενται 300 μL διαλύματος αποκλεισμού ελευθέρων θέσεων δέσμευσης ανά φρεάτιο, τα οποία αφήνονται για επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Παρομοίως με τα προηγούμενο βήμα, εκπλένονται τα φρεάτια και ακολουθεί προσθήκη 100 μL μίγματος προτύπων διαλυμάτων κ-καζεΐνης κατάλληλης συγκέντρωσης και

πολυκλωνικού αντισώματος κουνελιού έναντι της κ-καζεΐνης, σε αναλογία 1:1 και αφήνεται για επώαση υπό ανάδευση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Τα μίγματα αυτά είχαν προεπιπαστεί για 30 λεπτά παράλληλα με το στάδιο αποκλεισμού ελευθέρων θέσεων δέσμευσης. Μετά από έκπλυση των φρεατίων με 300 μL από το διάλυμα έκπλυσης 2 (4 φορές) προστίθενται 100 μL ανά φρεάτιο από το αντίσωμα έναντι των γ -σφαιρινών κουνελιού, επισημασμένο με υπεροξειδάση της ραπανίδος, αραιωμένο 1000 φορές, σε ρυθμιστικό διάλυμα δευτέρου αντισώματος/HRP και αφήνεται να επωαστεί για 40 λεπτά υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, τα φρεάτια εκπλένονται όπως πριν και προστίθενται 100 μL διαλύματος υποστρώματος HRP και τοποθετείται για επώαση υπό ανάδευση στο σκοτάδι για 30 λεπτά. Τέλος, μετρείται η απορρόφηση σε συσκευή μέτρησης οπτικής απορρόφησης φρεατίων μικροπιλοδότησης στα 405 nm.



Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση του ανταγωνιστικού τύπου ανοσοχημικού προσδιορισμού κ-καζεΐνης σε φρεάτια μικροπιλοδότησης.

6.4.2 Ανταγωνιστικού τύπου ενζυμικός ανοσοχημικός προσδιορισμός νοθείας κατσικίσιου τυριού με αγελαδινό

○ ΥΛΙΚΑ

- Πρότυπα διαλύματα τυριού
- Διάλυμα ακινητοποίησης: ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών / όξινων ανθρακικών 0.05M, pH 9.25, 0.05% (β/ο) NaN₃
- Διάλυμα αποκλεισμού ελευθέρων θέσεων δέσμευσης: ρυθμιστικό διάλυμα όξινων ανθρακικών 0.1M, pH 8.5, 1% (β/ο) BSA, 0.05% (β/ο) NaN₃
- Διάλυμα ανοσοαντίδρασης: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10mM, pH 7.4, 0.5% (β/ο) BSA, 0.9% (β/ο) NaCl, 0.05% (ο/ο) TWEEN20, 0.05% (β/ο) NaN₃
- Διάλυμα δευτέρου αντισώματος/HRP: ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 0.15M, pH 8.25, 0.5% (β/ο) BSA, 0.02% (β/ο) Thimerosal
- Διάλυμα υποστρώματος HRP: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών/κιτρικών 0.05M, pH 4.4, NaBO₂.H₂O₂.H₂O 3.2mM, ABTS 1,9mM
- Διάλυμα έκπλυσης 1: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10mM, 0.9% (β/ο) NaCl, pH 7.4
- Διάλυμα έκπλυσης 2: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10mM, 0.9% (β/ο) NaCl, pH 7.4, 0.05% (ο/ο) TWEEN20

○ ΟΡΓΑΝΑ

- Μικροπιπέτες μεταβλητού όγκου Eppendorf
- Συσκευή μέτρησης οπτικής απορρόφησης σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης Victor³ Multilabel Readers, (PerkinElmer, USA)
- Αναδευτήρας vortex

- Αναδευτήρας πλακών φρεατίων μικροτιπλοδότησης

- ΕΚΤΕΛΕΣΗ

Σε φρεάτια μικροτιπλοδότησης προστίθενται 100μL διαλύματος κ-καζεΐνης κατάλληλης συγκέντρωσης σε διάλυμα ακινητοποίησης και αφήνεται για προσρόφηση ολονυχτίς. Τα φρεάτια εκπλένονται εις διπλούν με 300 μL διαλύματος έκπλυσης 1 και στην συνέχεια προστίθενται 300 μL διαλύματος αποκλεισμού ελευθέρων θέσεων δέσμησης ανά φρεάτιο τα οποία αφήνονται για επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Παρομοίως με τα προηγούμενο βήμα εκπλένονται τα φρεάτια και ακολουθεί προσθήκη 100 μL μίγματος, τα οποία έχουν προ επωαστεί για 1 ώρα, 1:1 προτύπων διαλυμάτων νοθευμένου κασικίσιου τυριού με αγελαδινό κατάλληλων συγκεντρώσεων και πολυκλωνικού αντισώματος κουνελιού έναντι της κ-καζεΐνης και αφήνεται για επώαση υπό ανάδευση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Τα πρότυπα διαλύματα τυριού έχουν παρασκευαστεί όπως περιγράφεται στην παράγραφο 6.3.3. Στην συνέχεια, τα φρεάτια εκπλένονται, με 300 μL από το διάλυμα έκπλυσης 2, 4 φορές και στην συνέχεια προστίθενται 100 μL ανά φρεάτιο από το επισημασμένο δεύτερο αντίσωμα έναντι των γ-σφαιρινών κουνελιού σε περίσσεια, αραιωμένο 1000 φορές, σε ρυθμιστικό διάλυμα δευτέρου αντισώματος/HRP και αφήνεται να επωαστεί για 40 λεπτά υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, τα φρεάτια εκπλένονται όπως πριν και προστίθενται 100 μL διαλύματος υποστρώματος HRP και τοποθετείτε για επώαση υπό ανάδευση στο σκοτάδι για 30 λεπτά. Τέλος, μετράται η απορρόφηση σε συσκευή μέτρησης οπτικής απορρόφησης φρεατίων μικροτιπλοδότησης στα 405 nm.

6.5 Προσδιορισμός νοθείας αιγοπρόβειου τυριού με αγελαδινό σε ηλεκτροχημικό βιοαισθητήρα

ο ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

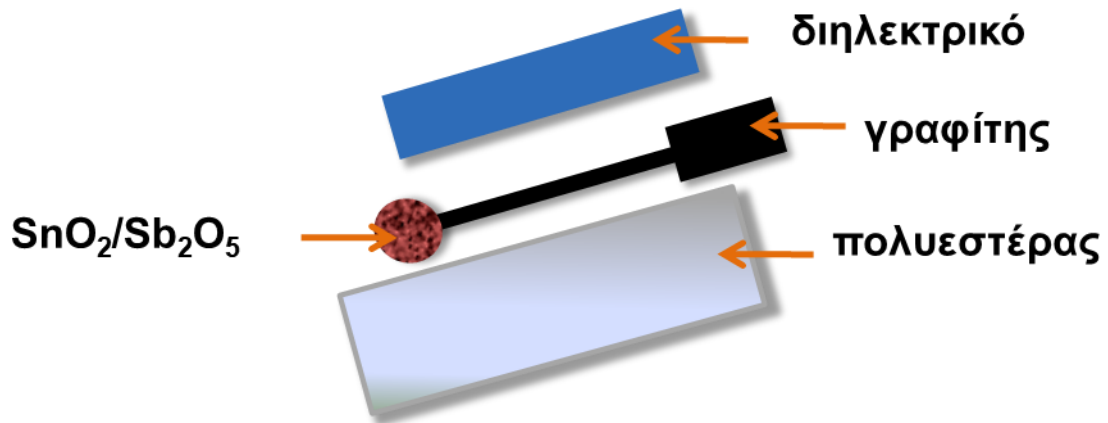
Ο ηλεκτροχημικός βιοαισθητήρας που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της νοθείας αιγοπρόβειου τυριού με αγελαδινό αποτελείται από μια τρισδιάστατα εκτυπωμένη ηλεκτροχημική κυψελίδα μέγιστου όγκου 3 mL, ένα εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο εργασίας από κράμα οξειδίων αντιμονίου και κασσιτέρου, δύο ηλεκτρόδια άνθρακα, τα οποία λειτουργούν ως βοηθητικό και ηλεκτρόδιο αναφοράς (ψευδοαναφοράς), έναν ποτενσιοστάτη και έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή για τον προγραμματισμό, την εκτέλεση των μετρήσεων, την αποθήκευσή τους και την επεξεργασία των δεδομένων της μέτρησης. Η μέτρηση βασίζεται στον ηλεκτροχημικό ποσοτικό προσδιορισμό ιόντων καδμίου τα οποία προέρχονται από την όξινη διαλυτοποίηση των επισημασμένων με στρεπταβιδίνη κβαντικών κουκίδων CdSe/Zn, οι οποίοι συνδέονται με το βιοτινυλιωμένο πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού, το οποίο είναι προσδεμένο επάνω στην κ-καζεΐνη που είναι ακινητοποιημένη επάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Η παρασκευή του βιοτινυλιωμένου αντισώματος περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 6.2.

ο ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΩΝ ΚΑΙ ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΗΣ ΚΥΨΕΛΙΔΑΣ

Τα ηλεκτρόδια εργασίας αποτελούνται από μίγμα οξειδίων αντιμονίου και κασσιτέρου και γραφίτη (4% (β/β)) (Υλικό SnO₂/Sb₂O₅ της Sigma (549541) και αποτελείται από SnO₂ (89-93%) και Sb₂O₅ (7-11%)). Τα εκτυπωμένα ηλεκτρόδια πλέγματος (ηλεκτρόδια εργασίας) κατασκευάστηκαν επάνω σε ένα υπόστρωμα πολυεστέρα (Mac Dermid) χρησιμοποιώντας έναν εκτυπωτή πλέγματος DEK Model 247 και πολυεστερικά πλέγματα 230 mesh για το μελάνι γραφίτη (Electrodag PF-407A, Acheson Colloiden) και 280 για το διηλεκτρικό μελάνι (D2000222D2, Gwent Ltd). Τα μελάνια (που βρίσκονται σε μορφή παχύρευστου υγρού-γαλακτώματος) κινούνται υπό πίεση με την βοήθεια ενός ελαστικού σαρώθρου, μέσω ενός πλέγματος-εκμαγείου (screen) (πάχους 13-20 μm) κατάλληλου σχήματος. Τα ηλεκτρόδια τυπώθηκαν σε σειρές των επτά και αποτελούνταν από τρία επίπεδα με την ακόλουθη σειρά:

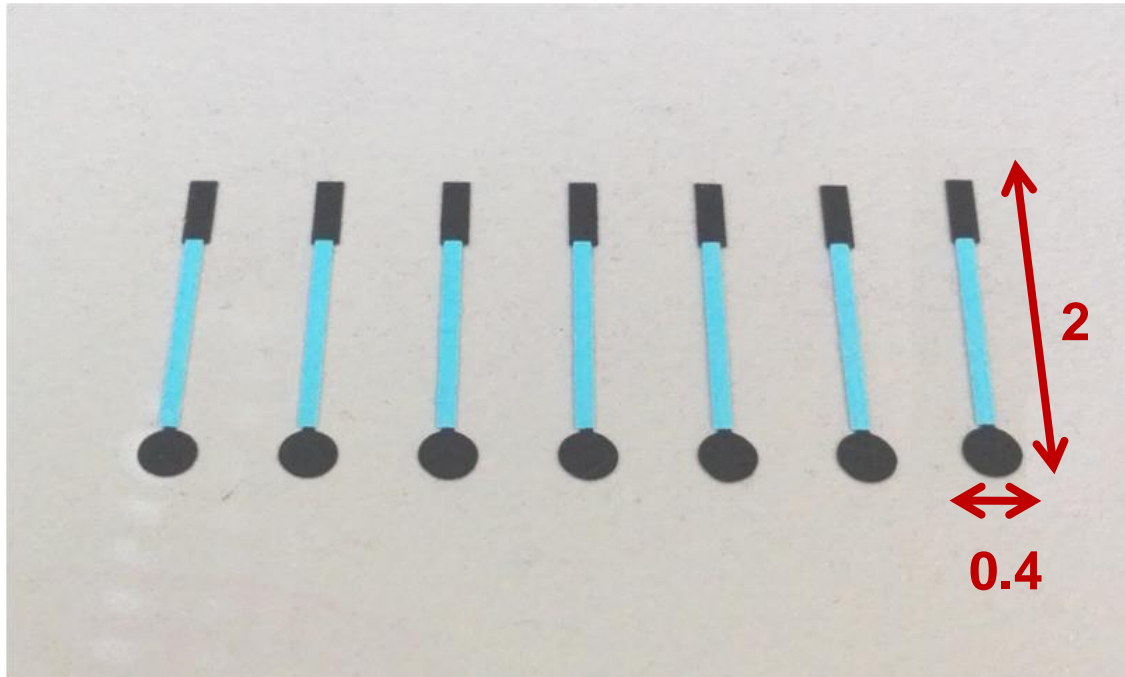
- 1) Ένα επίπεδο από αγωγίμο γραφίτη

- 2) Το επίπεδο του ηλεκτροδίου εργασίας από μίγμα οξειδίων αντιμονίου και κασσιτέρου και γραφίτη
- 3) Και το διηλεκτρικό επίπεδο με εκτεθειμένες περιοχές που να επιτρέπουν την εξωτερική ηλεκτρική επαφή του ενός άκρου με τον αισθητήρα και πρόσβαση στον αναλύτη στο άλλο άκρο



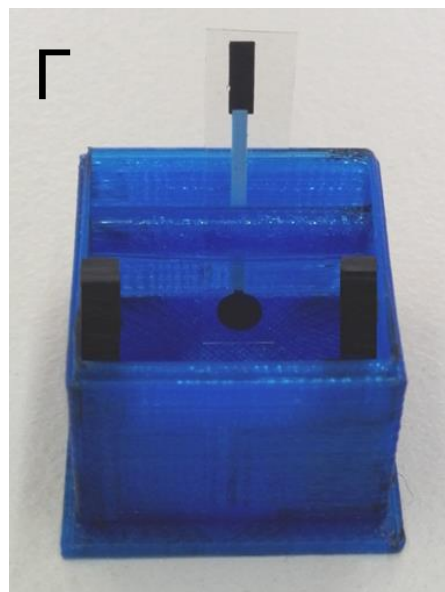
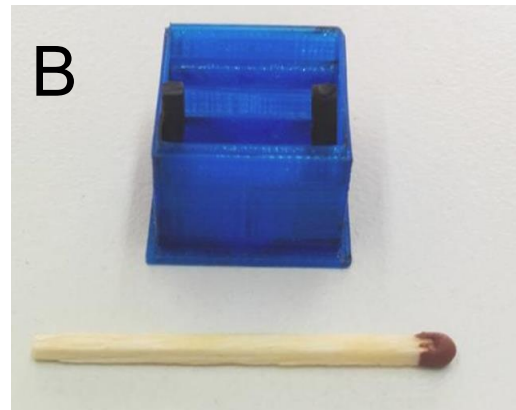
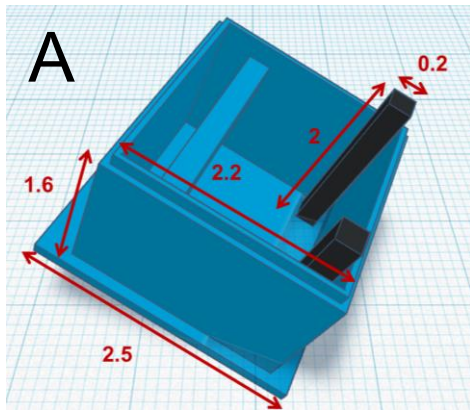
Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση επιπέδων εκτύπωσης ηλεκτροδίου εργασίας

Μετά από την εκτύπωση κάθε επιπέδου, τα ηλεκτρόδια τοποθετήθηκαν στον φούρνο σύμφωνα με τις εξής συνθήκες: το επίπεδο γραφίτη για 30 min στους 90°C, το επίπεδο του ηλεκτροδίου εργασίας για 120 min στους 90°C και το διηλεκτρικό επίπεδο για 30 min στους 60°C.

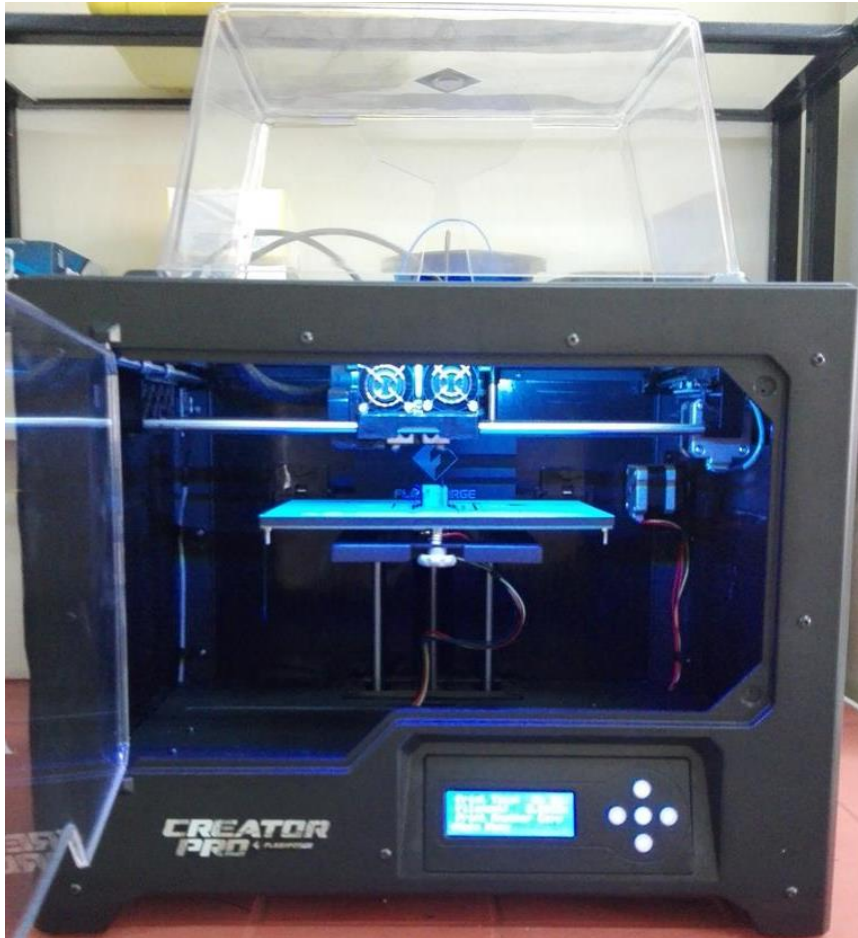


Εικόνα 9: Φωτογραφία σειράς 7 εκτυπωμένων μέσω πλέγματος ηλεκτροδίων εργασίας. Οι διαστάσεις είναι σε cm.

Η μικροκυψελίδα, το βοηθητικό ηλεκτρόδιο και το ψευδοηλεκτρόδιο αναφοράς κατασκευάστηκαν με τρισδιάστατη εκτύπωση χρησιμοποιώντας εκτυπωτή δύο κεφαλών (Creator Pro, Flashforge) και μη αγώγιμο νήμα PLA (3DEdge) για την μικροκυψελίδα και αγώγιμο νήμα PLA τροποποιημένο με άνθρακα (Proto-Pasta). Η κυψελίδα σχεδιάστηκε με την βοήθεια του προγράμματος Tinkercad (δωρεάν πρόγραμμα τρισδιάστατης σχεδίασης στο διαδίκτυο) και το αρχείο σώθηκε σε μορφή .STL. Στη συνέχεια, το αρχείο ανοίχθηκε με το πρόγραμμα Flashprint (δωρεάν πρόγραμμα μέσω της Flashforge) και ορίστηκαν οι συνθήκες της εκτύπωσης (θερμοκρασία πλατφόρμας 105°C, θερμοκρασία κεφαλής έγχυσης για το υλικό PLA 200°C, θερμοκρασία κεφαλής έγχυσης για το υλικό ABS 220°C και ταχύτητα εκτύπωσης 40 mm/s) και σώθηκαν σε μορφή .x3g σε κάρτα SD. Η κάρτα SD στη συνέχεια τοποθετήθηκε στην κατάλληλη θήρα στον τρισδιάστατο εκτυπωτή και ξεκίνησε η εκτύπωση. Οι τελικές διαστάσεις τις κυψελίδας και των ηλεκτροδίων φαίνονται παρακάτω στην εικόνα 11 και ο τρισδιάστατος εκτυπωτής που χρησιμοποιήθηκε στην εικόνα 12.



Εικόνα 10: Τρισδιάστατο σχέδιο ηλεκτροχημικής μικροκυψελίδας με τα ηλεκτρόδια γραφίτη (ηλεκτρόδιο αναφοράς και βοηθητικό ηλεκτρόδιο) (οι εικονιζόμενες διαστάσεις είναι σε cm) (Α), συγκριτικό μέγεθος κυψελίδας και σπέρτου (Β) και φωτογραφία ολοκληρωμένης ηλεκτροχημικής μικροκυψελίδας, ηλεκτροδίων γραφίτη (ηλεκτρόδιο αναφοράς και βοηθητικό ηλεκτρόδιο) και ηλεκτροδίου εργασίας (Γ).



Εικόνα 11: Τρισδιάστατος εκτυπωτής Creator Pro της Flashforge

6.5.1 Ανοσοχημική ενεργοποίηση ηλεκτροδίων και ανάπτυξη ανοσοχημικού προσδιορισμού στα ηλεκτρόδια

ο ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η ανοσοχημική ενεργοποίηση των ηλεκτροδίων είναι απαραίτητη έτσι ώστε να καθίσταται δυνατός ο ανοσοχημικός προσδιορισμός της νοθείας του αιγοπρόβειο τυριού επάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Η ακινητοποίηση της κ-καζεΐνης στην επιφάνεια των ηλεκτροδίων πραγματοποιήθηκε μέσω προσρόφησης και μάλιστα αυστηρά στην κυκλική περιοχή του ηλεκτροδίου. Στην συνέχεια, ακολούθησε αποκλεισμός των ελευθέρων θέσεων δέσμευσης και πραγματοποιήθηκε η ανοσοχημική αντίδραση με το βιοτινυλιωμένο

πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της κ-καζεΐνης. Για την ανίχνευση χρησιμοποιήθηκε ένα σύμπλεγμα στρεπταβιδίνης και κβαντικών κουκίδων καδμίου.

ο ΥΛΙΚΑ

- Δις απεσταγμένο νερό
- Πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης
- Διαλύματα γάλακτος
- Διαλύματα τυριού
- Διάλυμα ακινητοποίησης: διάλυμα ανθρακικών/όξινων ανθρακικών 0.05M, pH 9.25, 0.05% (β/ο) NaN₃
- Διάλυμα αποκλεισμού ελευθέρων θέσεων δέσμησης: ρυθμιστικό διάλυμα όξινων ανθρακικών 0.1M, pH 8.5, 1% (β/ο) BSA, 0.05% (β/ο) NaN₃
- Διάλυμα ανοσοαντίδρασης: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10mM, pH 7.4, 0.5% (β/ο) BSA, 0.9% (β/ο) NaCl, 0.05% (ο/ο) TWEEN20, 0.05% (β/ο) NaN₃
- Διάλυμα αραίωσης κβαντικών κουκίδων: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50mM, pH 6.5, 0.9% (β/ο) NaCl, 1% (β/ο) BSA, 0.02% (β/ο) Thimerosal
- Διάλυμα έκπλυσης 1: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10mM, 0.9% (β/ο) NaCl, pH 7.4
- Δοχεία Eppendorf συνολικού όγκου 1.5 mL
- Κβαντικές κουκίδες CuSe/ZnS Streptavidin Conjugate (Life Sciences)

ο ΕΚΤΕΛΕΣΗ

Τα ηλεκτρόδια αποτελούνται από ένα μακρύ στέλεχος, το οποίο είναι γραφίτης και μία κουκίδα στο κάτω μέρος όπου υπάρχει το μίγμα οξειδίων αντιμονίου και κασσιτέρου και γραφίτη (4% (β/β)). Στην κουκίδα γίνεται εναπόθεση σταγόνας 4 μL διαλύματος κ-καζεΐνης συγκεντρώσεως 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, σε ρυθμιστικό διάλυμα ακινητοποίησης. Ιδιαίτερη προσοχή δίνεται στην κάλυψη της κουκίδας χωρίς να διαχέεται η σταγόνα διαφάνειας γύρω από το ηλεκτρόδιο. Μετά την εναπόθεση, τα ηλεκτρόδια τοποθετούνται σε πλαστικά τρυβλία petri με καπάκι μαζί με ένα βρεγμένο βαμβάκι έτσι ώστε να διατηρείται η κατάλληλη υγρασία εντός του τρυβλίου και να μην στεγνώσει η σταγόνα. Τα τρυβλία παραμένουν ολονυχτίς στο ψυγείο (4 °C). Έπειτα, προστίθεται επαρκής ποσότητα διαλύματος αποκλεισμού των ελεύθερων θέσεων δέσμευσης ώστε να καλυφθεί ολόκληρο το τρυβλίο και να παραμένουν βυθισμένα όλα τα ηλεκτρόδια για χρονικό διάστημα 1 ώρας. Στην συνέχεια, τα ηλεκτρόδια αφού στεγνωθούν σε ρεύμα αζώτου τοποθετούνται σε δοχεία Eppendorf ανά ζευγάρια με τις ενεργές πλευρές τους εκτεθειμένες στο διάλυμα. Τα ηλεκτρόδια εκπλένονται με 600 μL διαλύματος έκπλυσης 1 υπό ήπια ανάδευση για 30 δευτερόλεπτα. Η διαδικασία της έκπλυσης επαναλαμβάνεται άλλη μία φορά και μετά τα ηλεκτρόδια στεγνώνονται σε ρεύμα αζώτου. Σε κάθε δοχείο Eppendorf προστίθενται 200 μL μίγματος πολυκλωνικού βιοτινυλιωμένου αντισώματος έναντι της κ-καζεΐνης συγκεντρώσεως με πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης, γάλακτος ή τυριού, σε αναλογία 1:1 (ο/ο) και αφήνονται να επωαστούν υπό ανάδευση για 1 ώρα. Τα παραπάνω μίγματα έχουν προεπωαστεί για 1 ώρα πριν τοποθετηθούν στα δοχεία. Έπειτα, τα ηλεκτρόδια τοποθετούνται σε νέα δοχεία έκπλυσης και επαναλαμβάνεται η παραπάνω διαδικασία έκπλυσης για 4 φορές. Τα ηλεκτρόδια στεγνώνονται και τοποθετούνται σε νέα δοχεία Eppendorf, τα οποία περιέχουν 100 μL διαλύματος αβιδίνης επισημασμένης με κβαντικές κουκίδες, 200 φορές αραιωμένο με διάλυμα αραιώσης κβαντικών κουκίδων, και αφήνονται για επώαση υπό ανάδευση για 30 λεπτά. Τέλος τα ηλεκτρόδια τοποθετούνται σε νέα δοχεία έκπλυσης και εκπλένονται 4 φορές με την παραπάνω διαδικασία. Σε αυτό το στάδιο στεγνώνονται σε ρεύμα αζώτου και τοποθετούνται ατομικά σε δοχεία Eppendorf στεγνά μέχρις ότου μετρηθούν.



Εικόνα 12: Σχηματική αναπαράσταση πρωτοκόλλου για τον προσδιορισμό νοθείας αιγοπρόβειου τυριού με αγελαδινό στον ηλεκτροχημικό ανοσοαισθητήρα

6.5.2 Διαλυτοποίηση κβαντικών κουκκίδων και ηλεκτροχημική μέτρηση

○ ΥΛΙΚΑ

- Υδροχλώριο 0.1M
- Οξικό οξύ 0.1M
- Απιοντισμένο νερό

○ ΟΡΓΑΝΑ

- Λουτρό υπερήχων
- Ποτενσιοστάτης

○ ΕΚΤΕΛΕΣΗ

Σε κάθε δοχείο Eppendorf, που περιέχει τα ηλεκτρόδια εργασίας στα οποία αναπτύχθηκε η ανοσοδοκιμή, πραγματοποιείται προσθήκη 120μL HCl 0,1M. Τα δοχεία τοποθετούνται σε ποτήρι ζέσεως και αφήνονται σε λουτρό

υπερήχων για 10 λεπτά. Έπειτα, συλλέγεται το υγρό από το κάθε Eppendorf, το οποίο προστίθεται στην μικροκυψελίδα που περιέχει 1500 μL οξικό οξύς 0.1M και τοποθετείται και το ηλεκτρόδιο εργασίας στην κατάλληλη εσοχή.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

Αποτελέσματα

7.1 Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση ανταγωνιστικού τύπου ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού βόειας κ-καζεΐνης σε φρεάτια μικροτιπλοδότησης με καθαρισμένο πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι βόειας κ-καζεΐνης

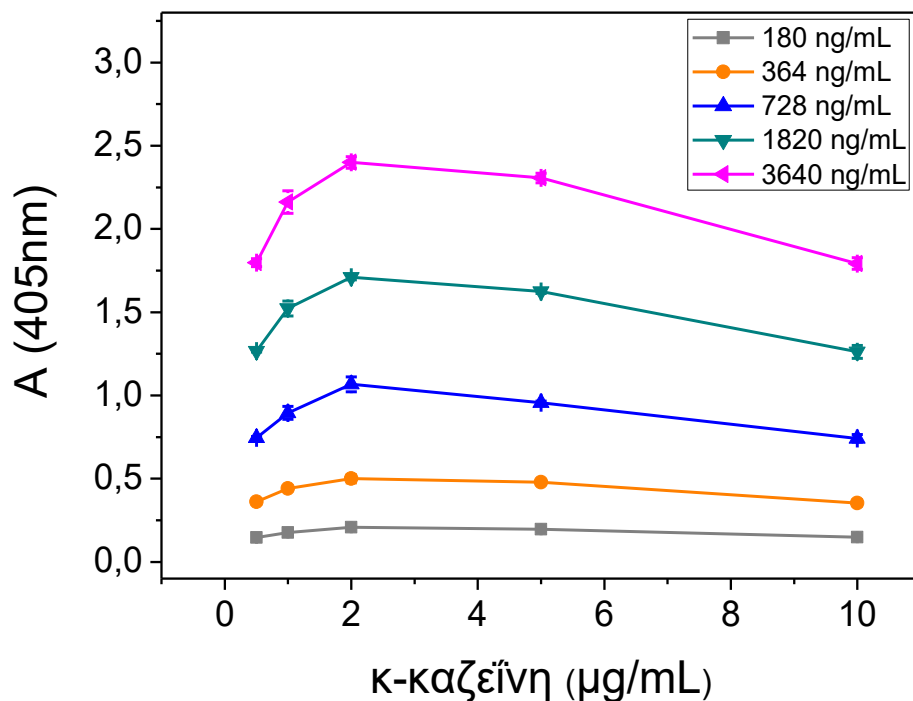
Αρχικά, αναπτύχθηκε ανταγωνιστικός ενζυμοανοσοχημικός προσδιορισμός σε φρεάτια μικροτιπλοδότησης για να μελετηθούν οι συνθήκες και η συμπεριφορά του συγκεκριμένου προσδιορισμού ώστε στην συνέχεια να μεταφερθεί στον ηλεκτροχημικό αισθητήρα και να υπάρχει ως μέτρο σύγκρισης. Για τον λόγο αυτό έγιναν οι εξής μελέτες και βελτιστοποιήσεις:

- Προσδιορισμός βέλτιστης συγκέντρωσης βόειας κ-καζεΐνης για ακινητοποίηση στα φρεάτια μικροτιπλοδότησης και προσδιορισμός βέλτιστης συγκέντρωσης πολυκλωνικού αντισώματος κουνελιού
- Προσδιορισμός βέλτιστης σύστασης διαλυμάτων του ενζυμικού ανοσοχημικού προσδιορισμού σε φρεάτια μικροτιπλοδότησης
- Βελτιστοποίηση χρόνου αντίδρασης του πρώτου και του δεύτερου αντισώματος
- Βελτιστοποίηση χρόνου προεπάσης διαλυμάτων προτύπου-αντισώματος
- Μελέτη ανθεκτικότητας κ-καζεΐνης σε μορφή πρότυπων διαλυμάτων και σε μορφή ακινητοποίησης σε φρεάτια μικροτιπλοδότησης
- Καμπύλη αναφοράς βόειας κ-καζεΐνης στις βέλτιστες συνθήκες

Η βελτιστοποίηση των παραμέτρων πραγματοποιήθηκε με κριτήριο την λήψη επαρκούς σήματος και ικανοποιητικής ευαισθησίας της καμπύλης αναφοράς καθώς επίσης και λαμβάνοντας υπόψιν την όσο το δυνατόν μικρότερη κατανάλωση αντιδραστηρίων και την μείωση του συνολικού χρόνου ανάλυσης.

7.1.1 Έλεγχος και βελτιστοποίηση συγκέντρωσης βόειας κ-καζεΐνης για το διάλυμα ακινητοποίησης σε φρεάτια μικροπιλοδότησης και προσδιορισμός βέλτιστης συγκέντρωσης πολυκλωνικού αντισώματος κουνελιού

Οι κύριοι παράμετροι που επιδρούν στο αναλυτικό σήμα στους ενζυμοανασοχημικούς προσδιορισμούς είναι η συγκέντρωση της ακινητοποιημένης πρωτεΐνης και η συγκέντρωση του ειδικού αντισώματος. Επομένως, οι πρώτες παράμετροι προς βελτιστοποίηση είναι η συγκέντρωση της ακινητοποιημένης κ-καζεΐνης και η συγκέντρωση του αντισώματος. Προτού όμως βελτιστοποιηθεί κάποια παράμετρος έγινε καθαρισμός του πολυκλωνικού αντισώματος κουνελιού όπως περιγράφεται στην παράγραφο 6.1. Έπειτα, χρησιμοποιώντας την μέθοδο ανταγωνιστικού τύπου ενζυμοανασοχημικού προσδιορισμού που περιγράφεται στην παράγραφο 6.4.1 έγινε μελέτη συγκέντρωσης της ακινητοποιημένης κ-καζεΐνης σε φρεάτια μικροπιλοδότησης και του πολυκλωνικού αντισώματος κουνελιού. Για την κ-καζεΐνη ελέγχθηκαν οι συγκεντρώσεις 0.5, 1, 2, 5, και 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ενώ για το αντίσωμα ελέγχθηκαν αρχικά οι συγκεντρώσεις 3640, 1820, 728, 364 και 180 ng/mL . Όπως φαίνεται και στο σχήμα 1, ανεξαρτήτως της συγκεντρώσεως του αντισώματος, η βέλτιστη συγκέντρωση της ακινητοποιημένης κ-καζεΐνης είναι τα 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, οπότε και επιλέγεται αυτή. Όσον αφορά στην συγκέντρωση του ειδικού αντισώματος, είναι επιθυμητό το υψηλότερο σήμα να είναι περίπου ίσο με απορρόφηση 1, λόγω γραμμικότητας της εξίσωσης σύμφωνα με τον νόμο Lambert-Beer. Σύμφωνα με αυτό, επιλέγεται ως βέλτιστη συγκέντρωση πολυκλωνικού αντισώματος κουνελιού τα 728 ng/mL .



Σχήμα 1: Τιμές απορροφήσεως στα 405nm για μηδενικό πρότυπο σε πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις ακινητοποιημένης βόειας κ-καζεΐνης και για πέντε συγκεντρώσεις ειδικού πολυκλωνικού αντισώματος κουνελιού έναντι βόειας κ-καζεΐνης. Οι συγκεντρώσεις του αντισώματος είχαν ως εξής: 180 ng/mL (■), 364 ng/mL (●), 728 ng/mL (▲), 1820 ng/mL (▼), 3640 ng/mL (◄). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων ± τυπική απόκλιση (± SD).

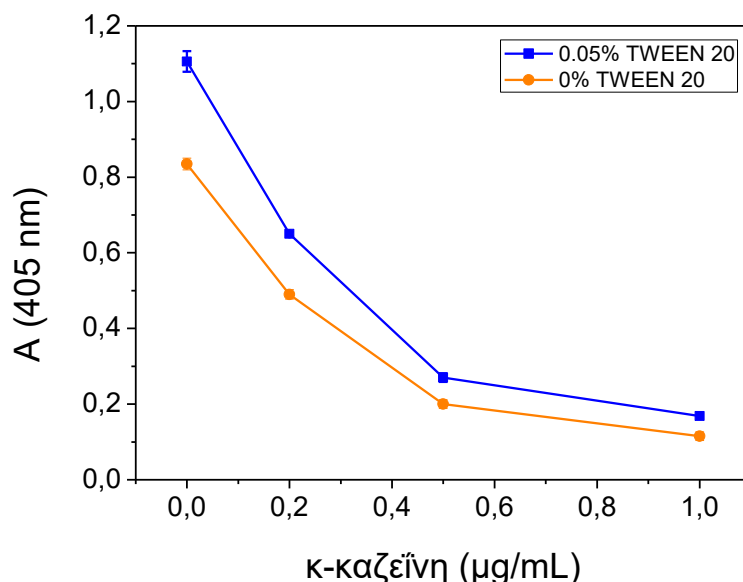
7.1.2 Βελτιστοποίηση σύνθεσης διαλυμάτων του ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού της βόειας κ-καζεΐνης σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης.

Ελέγχθηκε και βελτιστοποιήθηκε η σύσταση των διαλυμάτων ανοσοαντίδρασης, έκπλυσης, ακινητοποίησης, και διαλύματος αποκλεισμού ελευθέρων θέσεων δέσμευσης έτσι ώστε να επιτευχθεί ικανοποιητικό αναλυτικό σήμα ($OD_{405\text{ nm}} \geq 1$) και βέλτιστη ευαισθησία ανίχνευσης.

ο Ρυθμιστικό διάλυμα ανοσοαντίδρασης

Για το διάλυμα ανοσοαντίδρασης χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM, pH 7.4, 0.9% (β/ο) NaCl και ελέγχθηκε η περιεκτικότητά του σε BSA 0.5% (β/ο) και 1% (β/ο) και περιεκτικότητα σε TWEEN 20 0% (ο/ο) και 0.05% (ο/ο). Η επιλογή του διαλύματος φωσφορικών έγινε με βάση την βιβλιογραφία και προηγούμενο έργο του εργαστηρίου. Σε κάθε μία από τις παραπάνω περιπτώσεις το διάλυμα ακινητοποίησης της κ-καζεΐνης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών/όξινων ανθρακικών 0.05 M, pH 9.25, 0.05% (β/ο) NaN₃, ενώ το διάλυμα αποκλεισμού των ελεύθερων θέσεων της επιφάνειας των φρεατίων μικροπιλοδότησης ήταν ρυθμιστικό διάλυμα όξινων ανθρακικών 0.1 M, pH 8.25, 1% (β/ο) BSA.

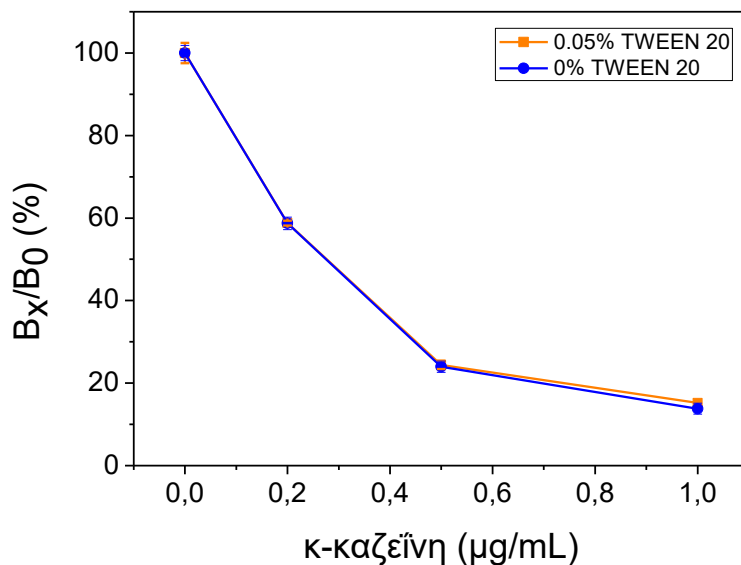
Αρχικά, μελετήθηκε η περιεκτικότητα 0% και 0.05% του επιφανειοδραστικού TWEEN 20 στο διάλυμα ανοσοαντίδρασης (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM, pH 7.4, 0.9% (β/ο) NaCl, 0.5% (β/ο) BSA, 0.05% (β/ο) NaN₃). Όπως φαίνεται στο σχήμα 2, παρατηρείται αύξηση του αναλυτικού σήματος από 32.5% για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα έως 48.9% για το πρότυπο διάλυμα κ-καζεΐνης συγκέντρωσης 1 μg/mL, όταν το διάλυμα περιέχει 0.05% TWEEN 20. Επομένως, επιλέχθηκε ως βέλτιστη περιεκτικότητα το 0.05% TWEEN 20.



Σχήμα 2: Τιμές απορρόφησης στα 405 nm μηδενικού και μη-μηδενικών προτύπων διαλυμάτων κ-καζεΐνη συγκέντρωσης 0.2, 0.5 και 1 μg/mL σε δύο περιεκτικότητες του

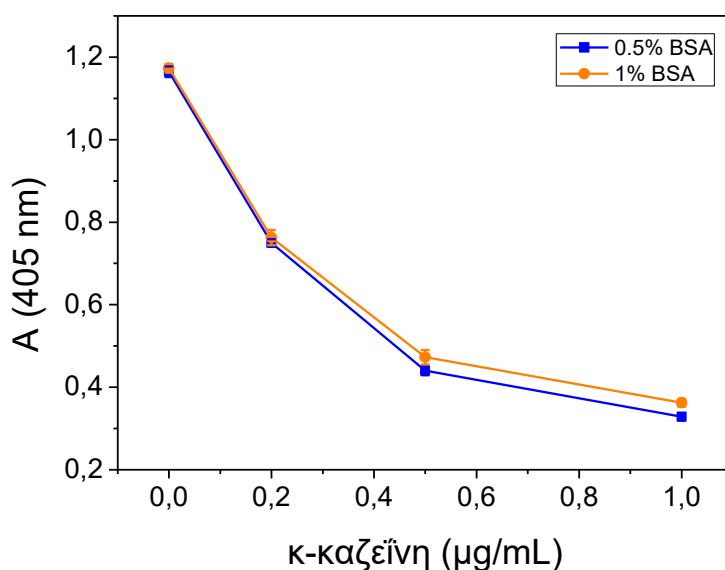
διαλύματος ανοσοαντίδρασης σε TWEEN 20. Καμπύλη προτύπων διαλυμάτων για περιεκτικότητα σε TWEEN 20 0% (●) και 0.05% (■). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών (3) επαναληπτικών μετρήσεων \pm τυπική απόκλιση (\pm SD).

Όπως φαίνεται στο σχήμα 3, η προσθήκη επιφανειοδραστικού σε περιεκτικότητα 0.05% αυξάνει το αναλυτικό σήμα χωρίς να επηρεάζει καθόλου την ευαισθησία της καμπύλης αναφοράς.

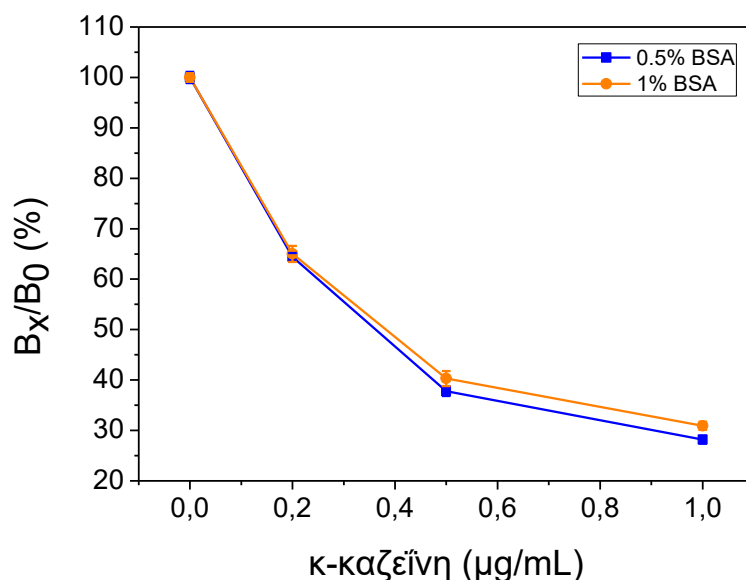


Σχήμα 3: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για το μηδενικό και τα μη-μηδενικά πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης συγκέντρωσης 0,2, 0,5 και 1 μg/mL. Καμπύλη για 0% TWEEN 20 (●) και για 0,05% TWEEN 20 (■). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm σχετική τυπική απόκλιση% (\pm %RSD).

Στην συνέχεια, ελέγχθηκε η βέλτιστη συγκέντρωση της βόειας οραλβουμίνης (BSA) στο διάλυμα ανοσοαντίδρασης. Όπως φαίνεται στο σχήμα 4, όταν το διάλυμα ανοσοαντίδρασης περιέχει 0,5% (β/ο) BSA έναντι 1% (β/ο) έχουμε λίγο μικρότερη απόκριση του σήματος της αντίδρασης στα μεγαλύτερα πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης.



Σχήμα 4: Τιμές απορροφήσεως στα 405 nm μηδενικού και μη-μηδενικών προτύπων διαλυμάτων κ-καζεΐνης συγκέντρωσης 0,2, 0,5 και 1 μg/mL σε δύο περιεκτικότητες του διαλύματος ανοσοαντίδρασης σε BSA. Καμπύλη προτύπων διαλυμάτων για περιεκτικότητα σε 1% (β/ο) BSA (●) και 0,5% (β/ο) BSA (■). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων ± τυπική απόκλιση (±SD).



Σχήμα 5: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για το μηδενικό και τα μη-μηδενικά πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης συγκέντρωσης 0,2, 0,5 και 1 μg/mL.

Καμπύλη για 1% (β/ο) BSA (●) και για 0.5% (β/ο) BSA (■). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων ± σχετική τυπική απόκλιση% ($\pm\%$ RSD).

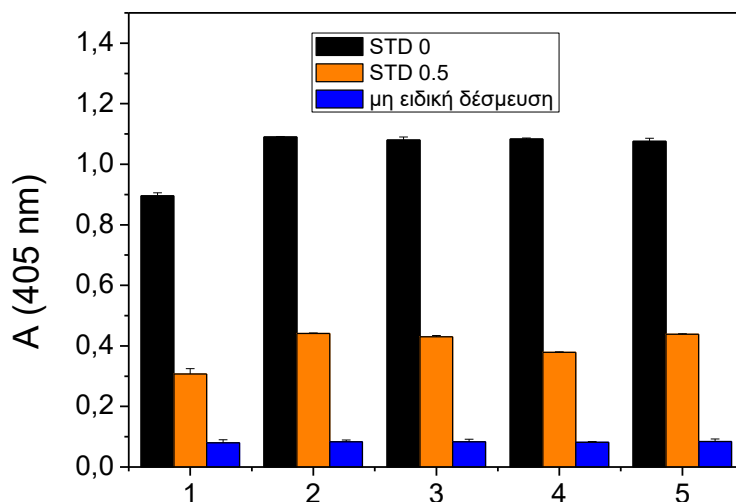
Σύμφωνα με το αποτέλεσμα που προέκυψε από το σχήμα 5, δεν παρατηρήθηκε σημαντική επίδραση της αύξησης της περιεκτικότητας του διαλύματος ανοσοαντίδρασης σε BSA στην ευαισθησία της ανίχνευσης. Επομένως, επιλέχθηκε η περιεκτικότητα 0.5% (β/ο) BSA προκειμένου να μειωθεί το κόστος της ανάλυσης καταναλώνοντας λιγότερη ποσότητα BSA. Τελικά, το διάλυμα ανοσοαντίδρασης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM, pH 7.4, 0.9% (β/ο) NaCl, 0.5% (β/ο) BSA, 0.05% (ο/ο) TWEEN 20.

ο Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης

Η σύσταση του διαλύματος έκπλυσης ελέγχθηκε ως προς την περιεκτικότητά του στο επιφανειοδραστικό TWEEN 20 και συγκεκριμένα η επίδραση της προσθήκης 0.05% (ο/ο) TWEEN 20 σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM, 0.9% (β/ο) NaCl, pH 7.4, στο σήμα του μηδενικού προτύπου και προτύπου διαλύματος κ-καζεΐνης 0.5 μg/mL καθώς και το σήμα της μη ειδικής δέσμευσης. Για τον ενζυμοανοσοχημικό προσδιορισμό τα υπόλοιπα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι αυτά που αναφέρονται παραπάνω.

Για να ελεγχθεί αυτό συγκρίθηκαν οι τιμές σήματος που ελήφθησαν από φρεάτια που είχαν πλυθεί:

- i. σε όλα τα στάδια χωρίς την προσθήκη TWEEN 20
- ii. σε όλα τα στάδια με διάλυμα έκπλυσης 0.05% (ο/ο) TWEEN 20
- iii. σε όλα τα στάδια με διάλυμα έκπλυσης 0.05% (ο/ο) TWEEN 20 μετά τον αποκλεισμό των ελεύθερων θέσεων δέσμευσης
- iv. σε όλα τα στάδια με διάλυμα έκπλυσης 0.05% (ο/ο) TWEEN 20 μετά την ανοσοαντίδραση
- v. σε όλα τα στάδια με διάλυμα έκπλυσης 0.05% (ο/ο) TWEEN 20 μετά την αντίδραση του δευτέρου αντισώματος



Σχήμα 6: Τιμές απορροφήσεως στα 405 nm μηδενικού (■), μη-μηδενικού προτύπου διαλύματος κ-καζεΐνης συγκέντρωσης 0.5 μg/mL (■) και σήματος μη ειδικής δέσμευσης (■) όταν προηγήθηκαν: 1) διάλυμα έκπλυσης χωρίς TWEEN 20 σε όλα τα στάδια του ανοσοχημικού προσδιορισμού κ-καζεΐνης, 2) διάλυμα έκπλυσης με 0.05% (ο/ο) TWEEN 20 σε όλα τα στάδια μετά την ακινητοποίηση της κ-καζεΐνης, 3) διάλυμα έκπλυσης με 0.05% (ο/ο) TWEEN 20 σε όλα τα στάδια μετά τον αποκλεισμό των ελεύθερων θέσεων δέσμευσης των φρεατίων, 4) διάλυμα έκπλυσης με 0.05% (ο/ο) TWEEN 20 σε όλα τα στάδια μετά την ανοσοαντίδραση και 5) διάλυμα έκπλυσης με 0.05% (ο/ο) TWEEN 20 σε όλα τα στάδια μετά την επώαση με των φρεατίων με το δεύτερο αντίσωμα. Κάθε ράβδος αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων + τυπική απόκλιση (+SD).

Από το σχήμα 6 παρατηρήθηκε ότι:

- i. η προσθήκη του επιφανειοδραστικού TWEEN 20 οδήγησε σε αύξηση του αναλυτικού σήματος σε κάθε περίπτωση
- ii. η ευαισθησία της καμπύλης αναφοράς δεν επηρεάζεται στις περιπτώσεις που η έκπλυση με το διάλυμα που περιείχε TWEEN 20 έγινε είτε στα πρώτα δύο στάδια (περιπτώσεις 2 & 3, σχήμα 6) καθώς και στο τελευταίο στάδιο (περίπτωση 5, σχήμα 6)

- iii. υπήρξε αύξηση της ευαισθησίας της καμπύλης αναφοράς όταν η έκπλυση με το διάλυμα που περιείχε 0.05% TWEEN 20 άρχισε αμέσως μετά την ανοσοαντίδραση
- iv. το σήμα μη ειδικής δέσμευσης δεν επηρεάζεται καθόλου από την προσθήκη ή όχι του επιφανειοδραστικού TWEEN 20 στο διάλυμα έκπλυσης

Επομένως, η χρήση διαλύματος έκπλυσης με 0.05% (o/o) TWEEN 20 παρείχε τα καλύτερα αποτελέσματα μετά το στάδιο της ανοσοαντίδρασης καθώς βελτιώνει την ευαισθησία της καμπύλης και αυξάνει κατά περίπου 10% και το αναλυτικό σήμα. Για το λόγο αυτό, ως διάλυμα έκπλυσης χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM, 0.9% (β/o) NaCl, pH 7.4, 0.05% (o/o) TWEEN 20, μετά το στάδιο της ανοσοαντίδρασης, ενώ για τα προηγούμενα στάδια χρησιμοποιήθηκε το ίδιο διάλυμα έκπλυσης χωρίς TWEEN 20.

ο Διάλυμα αποκλεισμού ελεύθερων θέσεων της επιφάνειας των φρεατίων μικροτιτλοδότησης

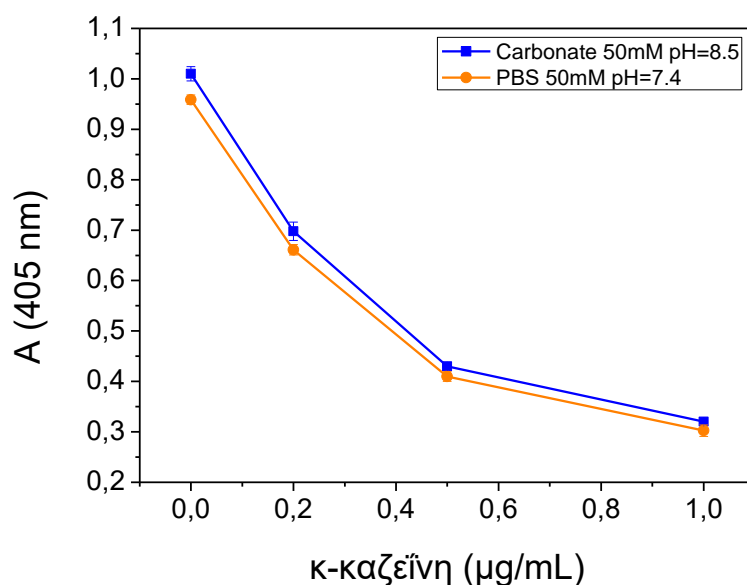
Στο πλαίσιο ανάπτυξης του ανταγωνιστικού τύπου ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού ελέγχθηκε η επίδραση της σύστασης του διαλύματος αποκλεισμού ελευθέρων θέσεων της επιφάνειας των φρεατίων μικροτιτλοδότησης στο σήμα μη ειδικής δέσμευσης όσο και την ευαισθησία της καμπύλης αναφοράς. Τα διαλύματα που ελέγχθηκαν ήταν:

- i. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, pH 7.4, 1% (β/o) BSA
- ii. Ρυθμιστικό διάλυμα όξινων ανθρακικών 100 mM, pH 8.5, 1% (β/o) BSA

Για τον ενζυμοανοσοχημικό προσδιορισμό τα υπόλοιπα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι αυτά που αναφέρονται παραπάνω.

Στο σχήμα 7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης από όπου προκύπτει πως το βέλτιστο ρυθμιστικό διάλυμα αποκλεισμού είναι το δεύτερο, καθώς είχε βέλτιστο αναλυτικό σήμα και καμία επίδραση στο σήμα μη ειδικής δέσμευσης, το οποίο έμεινε ανεπηρέαστο από την επιλογή του διαλύματος

αποκλεισμού. Έτσι επιλέγεται ως διάλυμα αποκλεισμού των ελευθέρων θέσεων της επιφανείας των φρεατίων το ρυθμιστικό διάλυμα όξινων ανθρακικών 100 mM, pH 8.5, 1% (β/ο) BSA.



Σχήμα 7: Τιμές απορροφήσεως στα 405 nm μηδενικού και μη-μηδενικών προτύπων διαλυμάτων κ-καζεΐνης συγκέντρωσης 0,2, 0,5 και 1 μg/mL όταν ως διάλυμα αποκλεισμού ελευθέρων θέσεων δέσμευσης της επιφανείας των φρεατίων είναι ρυθμιστικό διάλυμα όξινων ανθρακικών 100 mM, pH 8.5, 1% (β/ο) BSA (■) ή ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, pH 7.4, 1% (β/ο) BSA (●). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων ± τυπική απόκλιση (±SD).

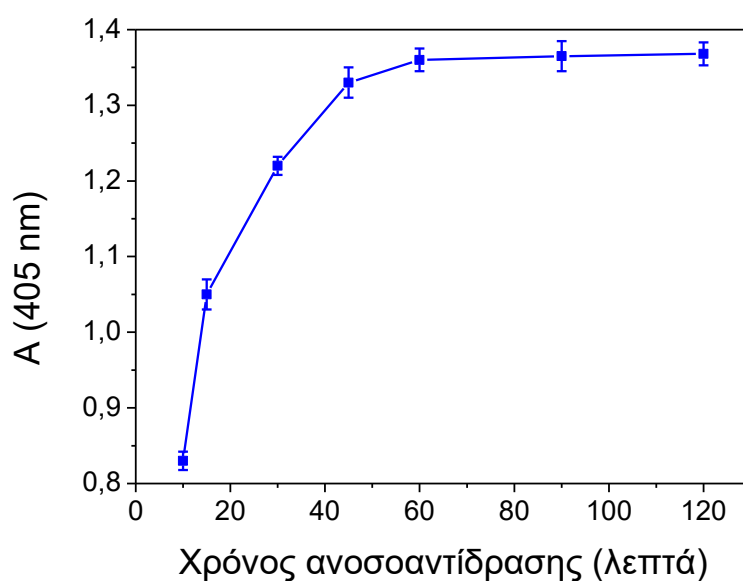
7.1.3 Μελέτη και βελτιστοποίηση χρόνου αντίδρασης ειδικού αντισώματος έναντι βόειας κ-καζεΐνης (πρώτου αντισώματος) και γενικού αντισώματος κατά των γ-σφαιρινών κουνελιού (δεύτερου αντισώματος)

Στο πλαίσιο ανάπτυξης του ανταγωνιστικού τύπου ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού της βόειας κ-καζεΐνης έγινε μελέτη του χρόνου της ανοσοαντίδρασης καθώς και του χρόνου της αντίδρασης του δεύτερου

αντισώματος κατά το στάδιο της επισήμανσης. Για την μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν τα βελτιστοποιημένα διαλύματα όπως περιεγράφηκαν στις παραγράφους 7.1.1 και 7.1.2.

ο Χρόνος αντίδρασης πρώτου αντισώματος

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την χρονική μελέτη του πρώτου αντισώματος ήταν αυτό που περιεγράφηκε στην παράγραφο 6.4.1. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα βέλτιστα από τις παραπάνω παραγράφους. Στα φρεάτια ακινητοποιήθηκε κ-καζεΐνη συγκέντρωσης 2 $\mu\text{g/mL}$, χρησιμοποιήθηκε μόνο μηδενικό πρότυπο, η συγκέντρωση του αντισώματος ήταν 728 ng/mL και το δεύτερο αντίσωμα ήταν σε περίσσεια. Για το δεύτερο αντίσωμα κρατήθηκε χρόνος αντίδρασης 60 min και τα αποτελέσματα της δοκιμής παρουσιάζονται στο σχήμα 8.

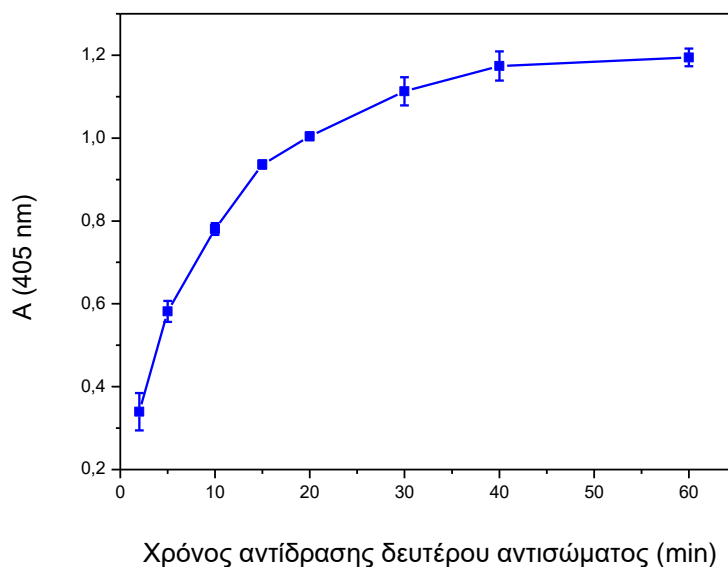


Σχήμα 8: Τιμές απορροφήσεως στα 405 nm μηδενικού προτύπου για χρόνους αντισώματος 10, 15, 30, 45, 60, 90 και 120 min. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm τυπική απόκλιση ($\pm\text{SD}$).

Από το σχήμα 8 παρατηρήθηκε πως μετά την μία ώρα της ανοσοαντίδρασης δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική αύξηση του σήματος. Επομένως, προκειμένου να επιτευχθεί το μεγαλύτερο δυνατό σήμα στον μικρότερο δυνατό χρόνο επιλέγουμε ως βέλτιστο χρόνο αντίδρασης τα 60 min.

ο Χρονική μελέτη αντίδρασης δευτέρου αντισώματος

Παρομοίως, με την χρονική μελέτη του πρώτου αντισώματος ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο ανταγωνιστικού τύπου ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού που περιεγράφηκε στην παράγραφο 6.4.1, τα βέλτιστα διαλύματα που δοκιμάστηκαν στην παράγραφο 7.1.2, ο χρόνος αντίδρασης του πρώτου αντισώματος ήταν τα 60 min όπως επιλέχθηκε προηγουμένως. Η συγκέντρωση της ακινητοποιημένης κ-καζεΐνης ήταν 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, η συγκέντρωση των πρώτου αντισώματος ήταν 728 ng/mL και χρησιμοποιήθηκε μόνο μηδενικό πρότυπο για αυτήν τη μελέτη.



Σχήμα 9: Τιμές απορροφήσεως στα 405 nm μηδενικού προτύπου για χρόνους αντίδρασης δευτέρου αντισώματος 2, 5, 10, 15, 20, 30, 45 και 60 min. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm τυπική απόκλιση ($\pm\text{SD}$).

Από το σχήμα 9 παρατηρείται πως μετά από 40 min ελήφθησαν τιμές οροφής του αναλυτικού σήματος για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα. Η διαφορά του σήματος από τα 30 στα 40 min, λαμβάνοντας υπόψιν και την τυπική απόκλιση των μετρήσεων είναι αμελητέα. Επομένως με κριτήριο το βέλτιστο αναλυτικό σήμα στο συντομότερο δυνατό χρόνο επιλέχθηκαν τα 30 min ως βέλτιστος χρόνος αντίδρασης του δευτέρου αντισώματος.

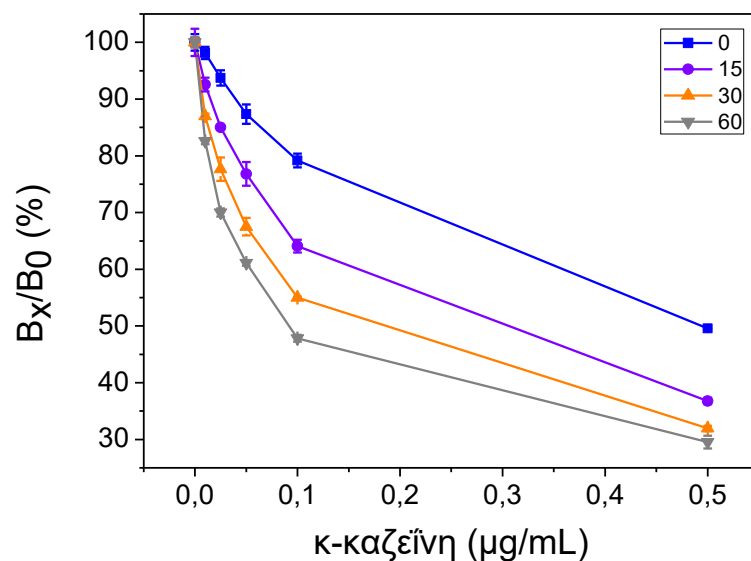
7.1.4 Μελέτη της επίδρασης του χρόνου προεπάσης του μίγματος προτύπου διαλύματος με το ειδικό αντίσωμα (πρώτο αντίσωμα) στην ευαισθησία της καμπύλης αναφοράς

Στο πλαίσιο ανάπτυξης του ανταγωνιστικού τύπου ενζυμικού ανοσοχημικού προσδιορισμού της βόειας κ-καζεΐνης έγινε μελέτη της επίδρασης του χρόνου προεπάσης των μιγμάτων προτύπων διαλυμάτων με το ειδικό (πρώτο) αντίσωμα πριν την προσθήκη στα φρεάτια μικροτιτλοδότησης. Για την μελέτη αυτή ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του ανταγωνιστικού τύπου ενζυμικού ανοσοχημικού προσδιορισμού της βόειας κ-καζεΐνης με καθαρισμένο πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού όπως περιγράφεται στην παράγραφο 6.4.1 και χρησιμοποιήθηκαν τα εξής διαλύματα:

- Διάλυμα ακινητοποίησης: ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών / όξινων ανθρακικών 0.05 M, pH 9.25, 0.05% (β/ο) NaN_3
- Διάλυμα αποκλεισμού ελευθέρων θέσεων δέσμευσης: ρυθμιστικό διάλυμα όξινων ανθρακικών 0.1 M, pH 8.5, 1% (β/ο) BSA, 0.05% (β/ο) NaN_3
- Διάλυμα ανοσοαντίδρασης: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM, pH 7.4, 0.5% (β/ο) BSA, 0.9% (β/ο) NaCl, 0.05% (ο/ο) TWEEN 20, 0.05% (β/ο) NaN_3
- Διάλυμα δευτέρου αντισώματος / HRP: ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 0.15 M, pH 8.25, 0.5% (β/ο) BSA, 0.02% (β/ο) Thimerosal

- Διάλυμα υποστρώματος HRP: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών / κιτρικών 0.05 M, pH 4.4, NaBO₂·H₂O₂·H₂O 3.2 mM, ABTS 1,9 mM
- Διάλυμα έκπλυσης 1: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM, 0.9% (β/ο) NaCl, pH 7.4
- Διάλυμα έκπλυσης 2: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM, 0.9% (β/ο) NaCl, pH 7.4, 0.05% (ο/ο) TWEEN 20

Επιπλέον, ο χρόνος της ανοσοαντίδρασης ήταν 1 ώρα και ο χρόνος του δευτέρου αντισώματος 30 min. Τα μίγματα προεπώασης παρασκευάστηκαν προσθέτοντας σε αναλογία 1:1 (ο/ο) πρότυπο διάλυμα συγκεντρώσεως κ-καζεΐνης 0.5, 0.1, 0.05, 0.02 και 0.01 μg/mL και συγκέντρωση διαλύματος ειδικού (πρώτου) αντισώματος 728 ng/mL, αναδεύτηκαν και παρέμειναν για 0, 15, 30 και 60 min (σχήμα 10).



Σχήμα 10: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για το μηδενικό και τα μη-μηδενικά πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης συγκέντρωσης 0.01, 0.02, 0.05, 0.1 και 0.5 μg/mL. Καμπύλη για χρόνο προεπώασης 60 min (▼), 30 min (▲), 15 min (●) και 0 min (■). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων ± σχετική τυπική απόκλιση% (±%RSD).

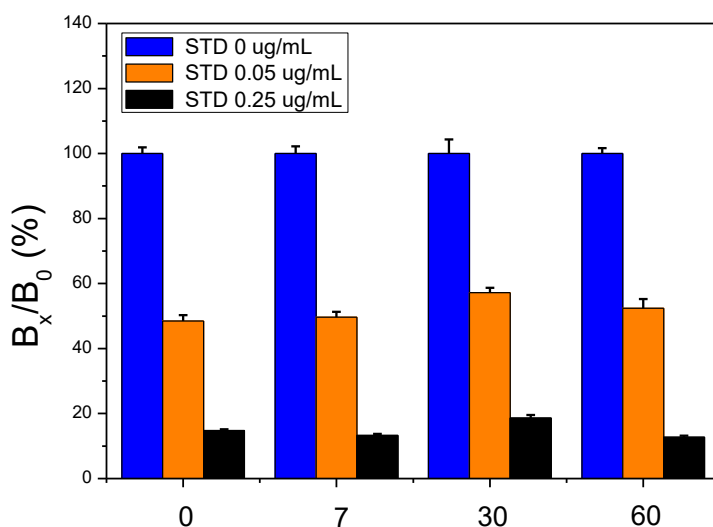
Όπως φαίνεται στο σχήμα 10, υπάρχει σημαντική βελτίωση της ευαισθησίας της καμπύλης αναφοράς από τα 0 στα 60 min. Πιο συγκεκριμένα, η αύξηση

του χρόνου προεπώασης από 0 σε 30 min, βελτίωνε την ευαισθησία ανίχνευσης κατά 14% έως 25%. Αντιθέτως, η αύξηση του χρόνου προεπώασης από 30 σε 60 min δεν παρείχε σημαντική βελτίωση στην ευαισθησία της ανίχνευσης καθώς η επί τοις εκατό ποσοστιαία εκτόπιση που ελήφθη για το πρότυπο διάλυμα συγκεντρώσεως 0,1 µg/mL, ήταν κατά 7% χαμηλότερη όταν ο χρόνος προεπώασης ήταν 30 min από εκείνη που ελήφθη όταν ο χρόνος προεπώασης ήταν 60 min. Επομένως ο χρόνος προεπώασης των 30 λεπτών επιλέχθηκε για το τελικό πρωτόκολλο ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού κ-καζεΐνης σε φρεάτια μικροτιπλοδότησης.

7.1.5 Μελέτη ανθεκτικότητας ακινητοποιημένης βόειας κ-καζεΐνης σε φρεάτια μικροτιπλοδότησης στο ψυγείο (4 βαθμοί Κελσίου) με ξηραντικό

Στα πλαίσια της ανάπτυξης του ανταγωνιστικού τύπου ενζυμικού ανοσοχημικού προσδιορισμού της βόειας κ-καζεΐνης σε φρεάτια μικροτιπλοδότησης μελετήθηκε η σταθερότητα της κ-καζεΐνης ενώ βρίσκεται ακινητοποιημένη στα φρεάτια μικροτιπλοδότησης και φυλάσσεται στο ψυγείο (4 βαθμούς Κελσίου). Οι χρόνοι που ελέγχθηκαν ήταν 0, 7, 30 και 60 ημέρες ελέγχοντας το μηδενικό και δύο πρότυπα κ-καζεΐνης που να είχαν πτώση σήματος περίπου 50% και 10% αντίστοιχα. Για την προετοιμασία των φρεατίων ακολουθήθηκε η μέθοδος του ανταγωνιστικού τύπου ενζυμικού ανοσοχημικού προσδιορισμού όπως περιγράφεται στην παράγραφο 6.4.1 μέχρι το στάδιο της έκπλυσης μετά το στάδιο αποκλεισμού των ελεύθερων θέσεων της επιφάνειας των φρεατίων μικροτιπλοδότησης. Όπως φαίνεται στο σχήμα 11, παρατηρήθηκε πως μέχρι και για 2 μήνες οι επί τοις εκατό ποσοστιαίες εκτοπίσεις του αναλυτικού σήματος των προτύπων διατηρούνται σταθερές. Όμως, το αναλυτικό σήμα που ελήφθη για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα ήταν 40% χαμηλότερο σε σχέση με το αναλυτικό σήμα που ελήφθη όταν τα φρεάτια μικροτιπλοδότησης είχαν παραμείνει στους 4 °C τόσο για μια βδομάδα όσο και για ένα μήνα. Επομένως, τα φρεάτια μικροτιπλοδότησης στα

οποία είχε ακινητοποιηθεί η κ-καζεΐνη ήταν σταθερά για 30 ημέρες, χωρίς να επηρεάζεται το αναλυτικό σήμα και η ευαισθησία της ανίχνευσης.



Σχήμα 11: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για 0, 7, 30 και 60 ημέρες διατήρησης των φρεατίων μικροτιλοδότησης στο ψυγείο στους 4 βαθμούς Κελσίου. Κάθε ράβδος αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm τυπική απόκλιση (\pm SD).

Για την μελέτη αυτή τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι χρόνοι των αντιδράσεων ήταν οι βέλτιστοι όπως επιλέχθηκαν στις προηγούμενες παραγράφους και ήταν τα εξής:

- Διάλυμα ακινητοποίησης: ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών / όξινων ανθρακικών 0.05 M, pH 9.25, 0.05% (β/ο) NaN_3
- Διάλυμα αποκλεισμού ελευθέρων θέσεων δέσμευσης: ρυθμιστικό διάλυμα όξινων ανθρακικών 0.1 M, pH 8.5, 1% (β/ο) BSA, 0.05% (β/ο) NaN_3
- Διάλυμα ανοσοαντίδρασης: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM, pH 7.4, 0.5% (β/ο) BSA, 0.9% (β/ο) NaCl, 0.05% (ο/ο) TWEEN20, 0.05% (β/ο) NaN_3

- Διάλυμα δευτέρου αντισώματος / HRP: ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 0.15 M, pH 8.25, 0.5% (β/ο) BSA, 0.02% (β/ο) Thimerosal
- Διάλυμα υποστρώματος HRP: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών / κιτρικών 0.05 M, pH 4.4, NaBO₂.H₂O₂.H₂O 3.2 mM, ABTS 1,9 mM
- Διάλυμα έκπλυσης 1: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM, 0.9% (β/ο) NaCl, pH 7.4
- Διάλυμα έκπλυσης 2: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM, 0.9% (β/ο) NaCl, pH 7.4, 0.05% (ο/ο) TWEEN20

Χρόνος αντίδρασης του ειδικού αντισώματος ήταν 60 min και του δευτέρου αντισώματος 40 min.

7.1.6 Καμπύλη αναφοράς κ-καζεΐνης στις βελτιστοποιημένες συνθήκες

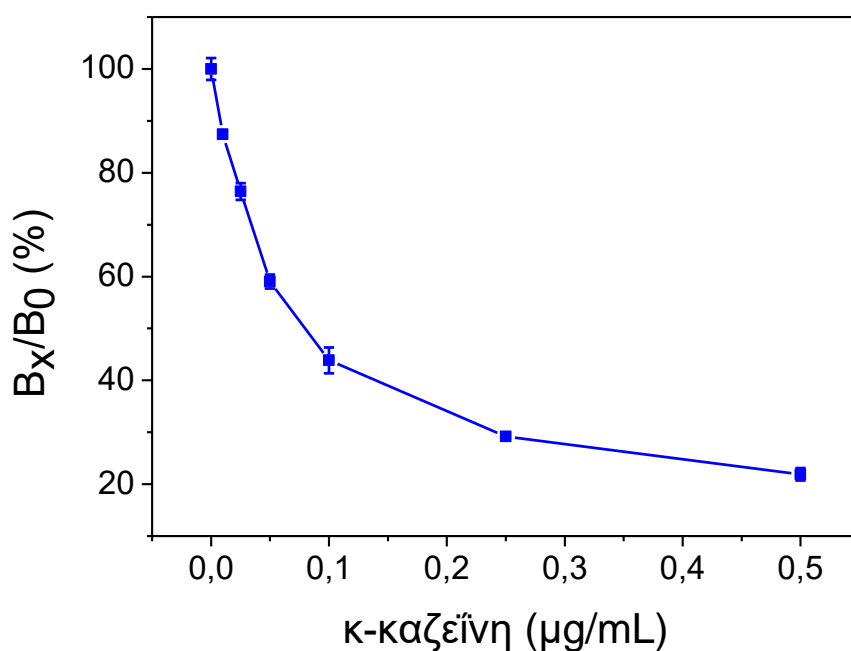
Μετά την βελτιστοποίηση όλων των παραπάνω παραμέτρων κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς βόειας κ-καζεΐνης χρησιμοποιώντας τις συνθήκες και διαλύματα που παρουσιάζονται στον πίνακα 1 και το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε περιγράφεται στην παράγραφο 6.4.1.

Πίνακας 1: Βέλτιστες συνθήκες του ανταγωνιστικού τύπου ενζυμικού ανοσοχημικού προσδιορισμού βόειας κ-καζεΐνης

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	ΒΕΛΤΙΣΤΗ ΣΥΝΘΗΚΗ
Διάλυμα ακινητοποίησης κ-καζεΐνης	Ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών / όξινων ανθρακικών 0.05 M, pH 9.25, 0.05% (β/ο) NaN ₃
Διάλυμα αποκλεισμού ελευθέρων θέσεων δέσμευσης	Ρυθμιστικό διάλυμα όξινων ανθρακικών 0.1 M, pH 8.5, 1% (β/ο) BSA, 0.05% (β/ο) NaN ₃
Διάλυμα ανοσοαντίδρασης	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM, pH 7.4, 0.5% (β/ο) BSA, 0.9% (β/ο) NaCl, 0.05% (ο/ο) TWEEN20, 0.05% (β/ο) NaN ₃

Διάλυμα δευτέρου αντισώματος/HRP	Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 0.15 M, pH 8.25, 0.5% (β/ο) BSA, 0.02% (β/ο) Thimerosal
Διάλυμα υποστρώματος HRP	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών / κιτρικών 0.05 M, pH 4.4, NaBO ₂ .H ₂ O ₂ .H ₂ O 3.2 mM, ABTS 1,9 mM
Διάλυμα έκπλυσης 1	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM, 0.9% (β/ο) NaCl, pH 7.4
Διάλυμα έκπλυσης 2	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM, 0.9% (β/ο) NaCl, pH 7.4, 0.05% (ο/ο) TWEEN20
Χρόνος προεπάσης	Εξήντα (30) min
Χρόνος ανοσοαντίδρασης	Εξήντα (40) min
Χρόνος δευτέρου αντισώματος	Σαράντα (30) min
Χρόνος επώασης υποστρώματος της HRP	Τριάντα (30) min

Η καμπύλη αναφοράς κατασκευάστηκε με πρότυπα διαλύματα που παρασκευάστηκαν όπως περιγράφεται στην παράγραφο 6.3.1 και σε συγκεντρώσεις 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25 και 0.5 µg/mL κ-καζεΐνης.



Σχήμα 12: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων ± σχετική τυπική απόκλιση% ($\pm\%RSD$).

Όπως φαίνεται στο σχήμα 12, επιτεύχθηκε μέγιστη σχετική τυπική απόκλιση 2.5% και οι εκατοστιαίες πτώσεις των προτύπων διαλυμάτων 91%, 76%, 59%, 44%, 29%, και 21% για συγκεντρώσεις προτύπων διαλυμάτων σε βόεια κ-καζεΐνη 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25 και 0.5 μg/mL, αντίστοιχα.

Στον πίνακα 2, παρουσιάζονται τα αναλυτικά χαρακτηριστικά του ανταγωνιστικού τύπου ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού βόειας κ-καζεΐνης. Το όριο ανίχνευσης (Limit Of Detection, LOD) προσδιορίστηκε ως η συγκέντρωση που αντιστοιχεί σε ποσοστιαία πτώση του αναλυτικού σήματος ίση με $(100-3RSD\%) \cdot 20$ επαναληπτικών μετρήσεων του μηδενικού πρότυπου διαλύματος. Το όριο ποσοτικοποίησης (Limit Of Quantitation, LOQ) προσδιορίστηκε ως η συγκέντρωση που αντιστοιχεί σε ποσοστιαία πτώση του αναλυτικού σήματος ίση με $(100-6RSD\%) \cdot 20$ επαναληπτικών μετρήσεων του μηδενικού πρότυπου. Επιπλέον, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση που αντιστοιχεί σε ποσοστιαία πτώση του αναλυτικού σήματος ίση με 50% ως προς το σήμα του μηδενικού πρότυπου, IC₅₀. Για τον προσδιορισμό της επαναληψιμότητας του ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού, η οποία

εκφράζεται ως ο συντελεστής διακύμανσης της μέσης τιμής των μετρήσεων (CV%), παρασκευάστηκαν τρία δείγματα ελέγχου με προσθήκη τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων της βόειας κ-καζεΐνης σε νερό δικτύου. Η ένδο-αναλυτική επαναληψιμότητα προέκυψε από τρεις επαναληπτικές μετρήσεις των δειγμάτων ελέγχου εντός του ίδιου προσδιορισμού ενώ η διαναλυτική επαναληψιμότητα προέκυψε από μέτρηση των δειγμάτων εις διπλούν σε είκοσι διαφορετικές μέρες σε διάστημα δύο μηνών.

Πίνακας 2: Αναλυτικά χαρακτηριστικά ανταγωνιστικού τύπου ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού βόειας κ-καζεΐνης

Αναλυτικά Χαρακτηριστικά	Κ-καζεΐνη
LOD (µg/mL)	0,004
LOQ (µg/mL)	0,007
IC₅₀ (µg/mL)	0,08
Δυναμικό εύρος (µg/mL)	0,007-0,5
Ένδο-αναλυτικό CV (%)	1,3-2,1
Διαναλυτικό CV (%)	1,8-2,4

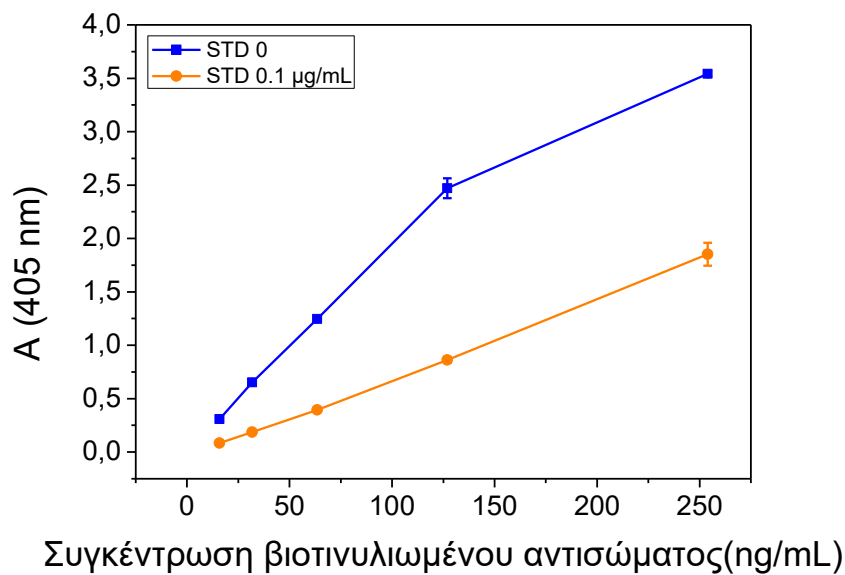
7.2 Ανάπτυξη ανταγωνιστικού τύπου ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού με βιοτινυλιωμένο πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της βόειας κ-καζεΐνης

Μετά την βελτιστοποίηση των συνθηκών για το καθαρισμένο πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της βόειας κ-καζεΐνης πραγματοποιήθηκε η διαδικασία της βιοτινυλίωσης του κλάσματος των γ-σφαιρινών κουνελιού έτσι ώστε να ρυθμιστεί εκ νέου η συγκέντρωση του βιοτινυλιωμένου αντισώματος, η επίδραση της προεπώασης στο σήμα και την ευαισθησία της νέας καμπύλης

αναφοράς κ-καζεΐνης. Στην συνέχεια, θα ακολουθήσει η διερεύνηση επίδρασης της μήτρας αιγοπρόβειου τυριού και η κατασκευή καμπύλης αναφοράς για την νοθεία του αιγοπρόβειου τυριού με αγελαδινό.

7.2.1 Επαναπροσδιορισμός βέλτιστης συγκέντρωσης βιοτινυλιωμένου αντισώματος

Μετά την διαδικασία καθαρισμού του πολυκλωνικού αντισώματος κουνελιού ακολούθησε η διαδικασία συζεύξεώς του με βιοτίνη όπως περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 6.2. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε εκ νέου βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης του βιοτινυλιωμένου πλέον αντισώματος για τον ανταγωνιστικό ενζυμικό ανοσοχημικό προσδιορισμό κ-καζεΐνης σε φρεάτια μικροπιλοδότησης. Ελέγχθηκαν οι συγκεντρώσεις 16, 32, 64, 127 και 254 ng/mL βιοτινυλιωμένου πολυκλωνικού αντισώματος κουνελιού έναντι της κ-καζεΐνης σε μηδενικό πρότυπο διάλυμα πρότυπο διάλυμα κ-καζεΐνης συγκέντρωσης 0.1 μg/mL και κατασκευάστηκε το σχήμα 14. Όλα τα διαλύματα και οι υπόλοιπες συνθήκες της αντίδρασης που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα βέλτιστα όπως βρέθηκαν για τον ανταγωνιστικό ενζυμικό ανοσοχημικό προσδιορισμό κ-καζεΐνης με το καθαρισμένο πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της κ-καζεΐνης. Η μόνη διαφορά σε διάλυμα είναι η χρήση διαλύματος στρεπταβιδίνης επισημασμένης με την υπεροξειδάση της ραπανίδος (HRP) για την ανίχνευση του σήματος από το βιοτινυλιωμένο πολυκλωνικό αντίσωμα. Η επισημασμένη στρεπταβιδίνη διαλύθηκε στο διάλυμα στρεπταβιδίνης-HRP, το οποίο είναι ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, pH 6.5, 0.9% (β/ο) NaCl, 1% (β/ο) BSA, 0.02% (β/ο) Thimerosal και ο χρόνος επώασης της στρεπταβιδίνης ήταν 25 min σύμφωνα με την βιβλιογραφία καθώς είναι αρκετός για την πλήρη αντίδραση της με το σύμπλεγμα του βιοτινυλιωμένου αντισώματος.



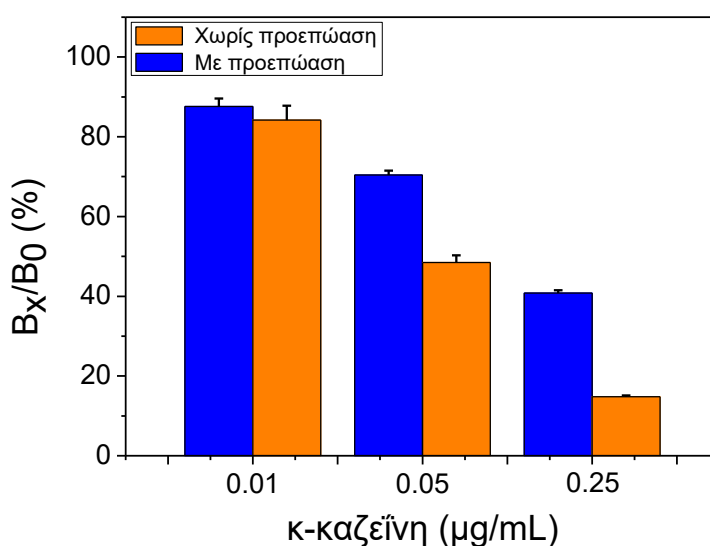
Σχήμα 13: Τιμές απορροφήσεως στα 405 nm μηδενικού προτύπου (■) για συγκεντρώσεις πρώτου ειδικού αντισώματος έναντι κ-καζεΐνης 16, 32, 64, 127 και 254 ng/mL και προτύπου διαλύματος κ-καζεΐνης συγκέντρωσης 0.1 µg/mL (●) για συγκεντρώσεις πρώτου ειδικού αντισώματος έναντι κ-καζεΐνης 16, 32, 64, 127 και 254 ng/mL. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων ± τυπική απόκλιση (±SD).

Όπως φαίνεται και στο σχήμα 13 για τιμές μεγαλύτερες των 64 ng/mL το σήμα του μηδενικού προτύπου ξεφεύγει σε τιμές απορρόφησης μεγαλύτερες του 2 ενώ αντιθέτως σε συγκεντρώσεις μικρότερες το σήμα απορροφήσεως δεν είναι επαρκές καθώς είναι μικρότερο του 0.7. Επομένως με κριτήριο αναλυτικό σήμα μεγαλύτερο ή ίσο του 1, επιλέγεται ως βέλτιστη συγκέντρωση βιοτινυλιωμένου αντισώματος τα 64 ng/mL.

7.2.2 Μελέτη της επίδρασης της προεπώασης του μίγματος προτύπου διαλύματος με το ειδικό βιοτινυλιωμένο αντίσωμα (πρώτο αντίσωμα) στην ευαισθησία της καμπύλης αναφοράς

Μετά από τον προσδιορισμό της βέλτιστης συγκέντρωσης του βιοτινυλιωμένου πολυκλωνικού αντισώματος κουνελιού έναντι της βόειας κ-καζεΐνης ελέγχθηκε αν η προεπώαση επηρεάζει το σήμα και την ευαισθησία της καμπύλης αναφοράς. Για το λόγο αυτό, συγκρίθηκε η καμπύλη αναφοράς,

κατά την οποία τα πρότυπα διαλύματα δεν είχαν προεπωαστεί καθόλου με την καμπύλη αναφοράς, κατά την οποία τα πρότυπα διαλύματα είχαν προεπωαστεί για 30 min. Ο χρόνος της ανοσοαντίδρασης, τα διαλύματα και οι λοιπές συνθήκες είναι οι βέλτιστες που αναπτύχθηκαν πριν την διαδικασία της βιοτινυλίωσης. Τα πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν συγκεντρώσεων 0.01, 0.05 και 0.25 µg/mL. Ο χρόνος ανοσοαντίδρασης ήταν 1 ώρα και ο χρόνος επώασης της στρεπταβιδίνης ήταν 25 min. Η συγκέντρωση του ειδικού αντισώματος ήταν 64 ng/mL και η επισημασμένη στρεπταβιδίνη ήταν σε περίσσεια.

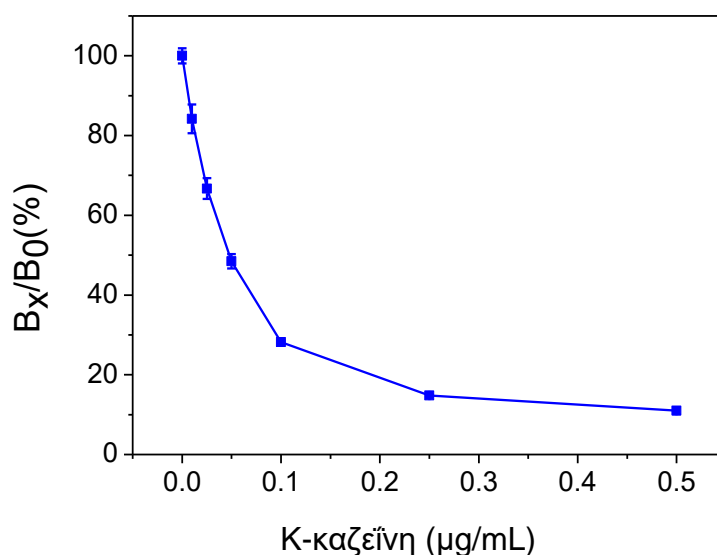


Σχήμα 14: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για το μηδενικό και τα μη-μηδενικά πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης συγκέντρωσης 0.01, 0.05, και 0.25 µg/mL. Καμπύλη με προεπάωση 30 min (■) και χωρίς προεπάωση (■). Κάθε ράβδος αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm τυπική απόκλιση ($\pm\text{SD}$).

Όπως φαίνεται στο σχήμα 14, παρόμοια με το καθαρισμένο αντίσωμα έτσι και στο βιοτινυλιωμένο, η προεπάωση έχει μεγάλη επίδραση στην ευαισθησία της καμπύλης αναφοράς. Για παράδειγμα, για το πρότυπο διάλυμα κ-καζεΐνης 0.25 µg/mL παρατηρήθηκε αύξηση της ποσοστιαίας εκτόπισης του σήματος 23% σε σχέση με το μηδενικό πρότυπο. Επομένως, υιοθετείται η προεπάωση 30 min και για τον προσδιορισμό με το βιοτινυλιωμένο αντίσωμα.

7.2.3 Καμπύλη αναφοράς κ-καζεΐνης με βιοτινυλιωμένο ειδικό πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της κ-καζεΐνης βόως

Στην συνέχεια, ακολούθησε κατασκευή της καμπύλης αναφοράς. Οι πειραματικές συνθήκες και τα διαλύματα είναι τα βέλτιστα που επιλέχθηκαν από τις προηγούμενες παραγράφους. Τα πρότυπα διαλύματα βόειας κ-καζεΐνης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν συγκεντρώσεων 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ καθώς και το μηδενικό πρότυπο διάλυμα. Η καμπύλη παρουσιάζεται στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 15: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για το μηδενικό και τα μη-μηδενικά πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm τυπική απόκλιση ($\pm\text{SD}$).

Στον πίνακα 3, παρουσιάζονται τα αναλυτικά χαρακτηριστικά του ανταγωνιστικού τύπου ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού κ-καζεΐνης με βιοτινυλιωμένο αντίσωμα τα οποία υπολογίστηκαν όπως περιεγράφηκε στην παράγραφο 7.1.6.

Πίνακας 3: Αναλυτικά χαρακτηριστικά ανταγωνιστικού τύπου ενζυμοανασοχημικού προσδιορισμού κ-καζεΐνης με βιοτινυλιωμένο αντίσωμα

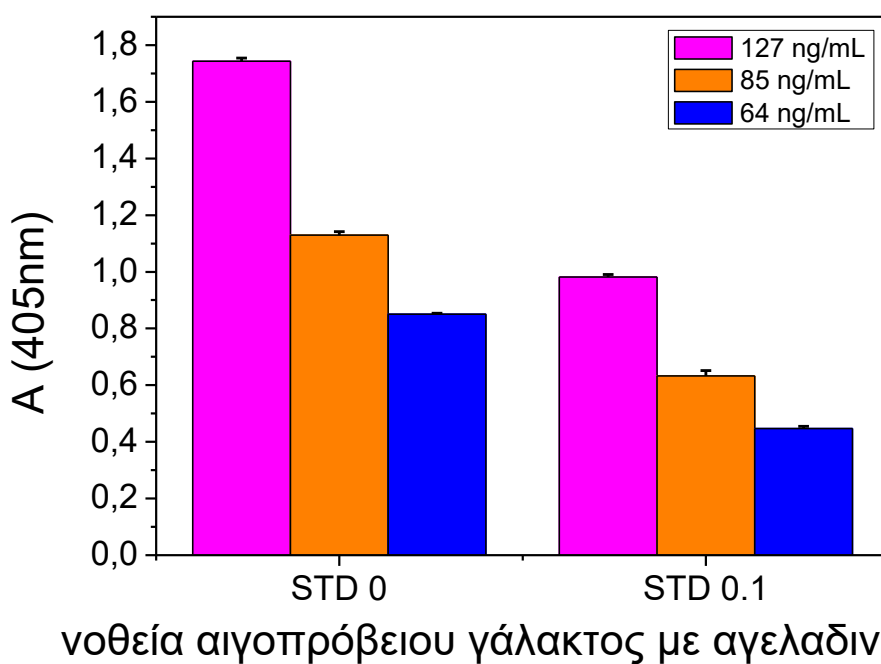
Αναλυτικά Χαρακτηριστικά	Κ-καζεΐνη
LOD (μg/mL)	0,004
LOQ (μg/mL)	0,007
IC ₅₀ (μg/mL)	0,05
Δυναμικό εύρος (μg/mL)	0,007-0,5
Ένδο-αναλυτικό CV (%)	1,4-2,2
Διαναλυτικό CV (%)	1,7-2,8

7.3 Ανάπτυξη ανταγωνιστικού τύπου ενζυμοανασοχημικού προσδιορισμού σε μήτρα τυριού

Μετά την ρύθμιση όλων των απαραίτητων συνθηκών όπως περιεγράφηκαν παραπάνω γίνεται μεταφορά όλων των βέλτιστων διαλυμάτων και συνθηκών στην ανάπτυξη ανταγωνιστικού τύπου ενζυμοανασοχημικού προσδιορισμού νοθείας αιγοπρόβειου τυριού με αγελαδινό. Ο προσδιορισμός αυτός βασίζεται στην ανίχνευση της βόειας κ-καζεΐνης και πιο συγκεκριμένα του καζεΐνομακροπεπτιδίου που βρίσκεται στο αγελαδινό τυρί σε αιγοπρόβειο τυρί. Αρχικά, έγινε προσδιορισμός βέλτιστης συγκέντρωσης του βιοτινυλιωμένου αντισώματος σε δείγματα γάλακτος και τυριού. Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης μήτρας γάλακτος στο σήμα και καμπύλη αναφοράς σε μήτρα γάλακτος. Έπειτα, παρομοίως με τις δοκιμές που έγινε στο γάλα, πραγματοποιήθηκε μελέτη επίδραση μήτρας τυριού και κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς σε δείγματα τυριού.

7.3.1 Βελτιστοποίηση συγκεντρώσεως βιοτινυλιωμένου αντισώματος για τον ανταγωνιστικού τύπου ενζυμοανοσοχημικό προσδιορισμό αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο

Σύμφωνα με τις βέλτιστες συνθήκες που περιγράφονται στην παράγραφο 7.1.2 έγινε επαναπροσδιορισμός της συγκέντρωσης του βιοτινυλιωμένου πολυκλωνικού αντισώματος κουνελιού έναντι βόειας κ-καζεΐνης. Πιο συγκεκριμένα, ελέγχθηκαν οι εξής συγκεντρώσεις πολυκλωνικού αντισώματος: 64, 85 και 127 ng/mL για το μηδενικό πρότυπο αιγοπρόβειου γάλακτος καθώς και για ένα πρότυπο διάλυμα, το οποίο είχε περιεκτικότητα σε αγελαδινό 0.1% (o/o). Τα αποτελέσματα παρατίθενται στο σχήμα 16 υπό την μορφή ραβδογράμματος.



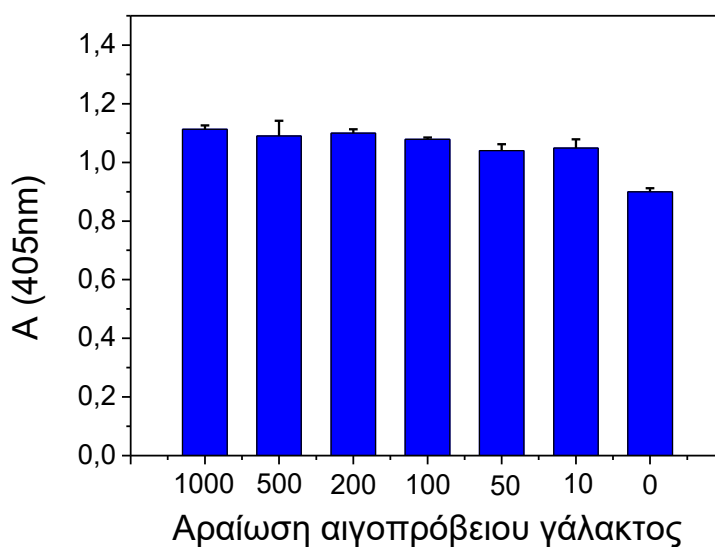
Σχήμα 16: Τιμές απορροφήσεως στα 405 nm για αντίσωμα συγκεντρώσεως 127 ng/mL (■), 85 ng/mL (■) και 64 ng/mL (■) σε μηδενικό πρότυπο αιγοπρόβειου γάλακτος και πρότυπο νοθείας 0.1% (o/o) αιγοπρόβειου γάλακτος με αγελαδινό. Κάθε ράβδος αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων + τυπική απόκλιση (+SD).

Όπως φαίνεται στο σχήμα 16, η συγκέντρωση 64 ng/mL βιοτινυλιωμένου αντισώματος δεν παρείχε επαρκές αναλυτικό σήμα ($A < 1$ για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα), ενώ αντιθέτως για συγκεντρώσεις αντισώματος

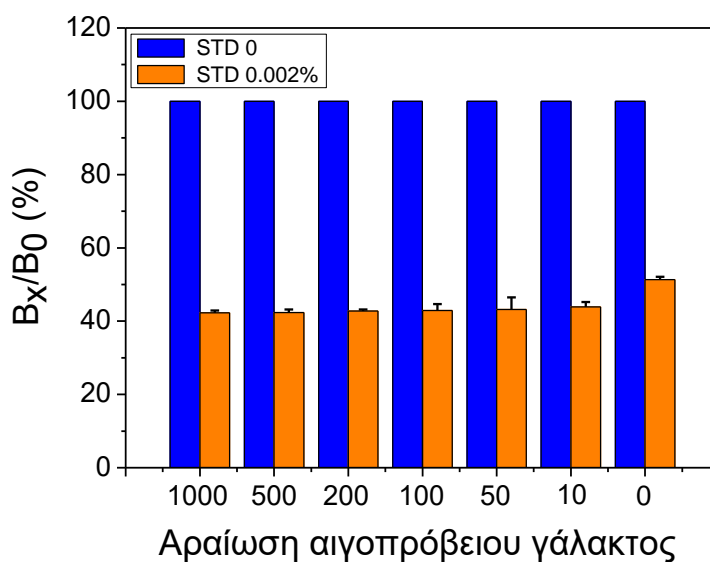
μεγαλύτερες ή ίσες από 85 ng/mL παρείχαν ικανοποιητικό αναλυτικό σήμα ($A \geq 1$). Και για τις τρεις συγκεντρώσεις αντισώματος, η ευαισθησία της καμπύλης δεν μεταβάλλεται καθώς ο λόγος του αναλυτικού σήματος του προτύπου διαλύματος κασικίσιου γάλακτος με περιεκτικότητα 0.1% (o/o) σε αγελαδινό γάλα ως προς το αναλυτικό σήμα του μηδενικού προτύπου διαλύματος, παραμένει σταθερός. Επομένως, επιλέχθηκε η συγκέντρωση 85 ng/mL καθώς παρείχε επαρκές αναλυτικό σήμα ($A \geq 1$) χωρίς να καταναλώνεται μεγάλη ποσότητα αντισώματος και υιοθετήθηκε για το τελικό για τον προσδιορισμό νοθείας αιγοπρόβειου γάλακτος με αγελαδινό.

7.3.2 Μελέτη επίδρασης της μήτρας του γάλακτος στο αναλυτικό σήμα και την ευαισθησία της ανίχνευσης

Ακολουθώντας το πρωτόκολλο που περιεγράφηκε στην παράγραφο 6.4.2, τα βέλτιστα διαλύματα από την παράγραφο 7.1.2, χρόνο ανοσοαντίδρασης 1 ώρα, επώαση επισημασμένης με HRP στρεπταβιδίνης 25 min και χρόνο προεπάσης μίγματος προτύπων διαλυμάτων και αντισώματος 30 min πραγματοποιήθηκε μελέτη επίδρασης της μήτρας του γάλακτος στο αναλυτικό σήμα και την ευαισθησία της καμπύλης αναφοράς. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα παρακάτω ραβδογράμματα.



Σχήμα 17: Τιμές απορροφήσεως στα 405 nm για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα κατσικίσιου γάλακτος σε αραιώσεις της μήτρας 0, 10, 50, 100, 200, 500 και 1000 φορές με διάλυμα ανοσοαντίδρασης. Κάθε ράβδος αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων + τυπική απόκλιση (+SD).



Σχήμα 18: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης για μηδενικό πρότυπο διάλυμα κατσικίσιου γάλακτος καθώς για ένα πρότυπο διάλυμα, το οποίο είχε περιεκτικότητα 0.002% (o/o) σε αγελαδινό γάλα μετά από αραιώση 0, 10, 50, 100, 200, 500 και 1000 φορές με διάλυμα ανοσοαντίδρασης. Κάθε ράβδος αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων + τυπική απόκλιση (+SD).

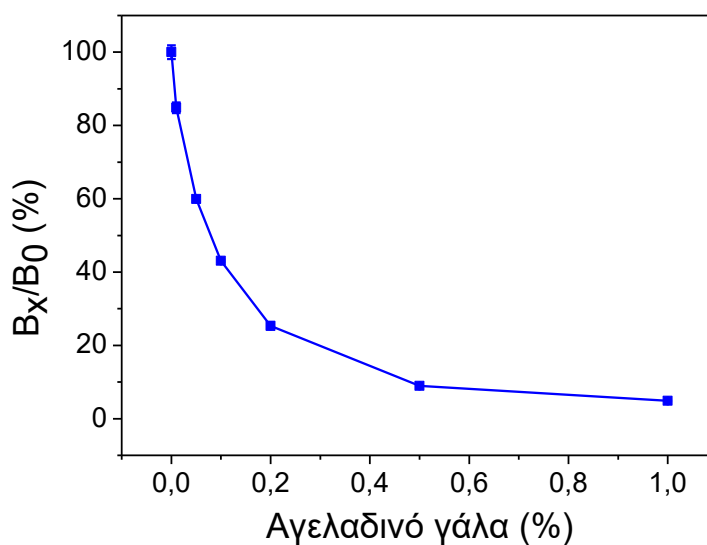
Σύμφωνα με το σχήμα 17, παρατηρείται πως το αναλυτικό σήμα στην μήτρα του γάλακτος είναι μειωμένο κατά ~17% σε σχέση με το διάλυμα ανοσοαντίδρασης ανεξαρτήτως της αραιώσης της μήτρας του γάλακτος. Επιπλέον, παρατηρείται επιπλέον μείωση του σήματος της τάξεως του ~24% όταν το δείγμα γάλακτος δεν αραιωθεί καθόλου σε σχέση με οποιαδήποτε άλλη αραιώση.

Από το σχήμα 18 παρατηρείται πως η ευαισθησία δεν επηρεάζεται από την αραιώση του γάλακτος και είναι όμοια με την ευαισθησία όταν τα πρότυπα είναι παρασκευασμένα απευθείας σε διάλυμα ανοσοαντίδρασης. Μοναδική εξαίρεση η περίπτωση του πυκνού γάλακτος όπου παρατηρείται μείωση της ευαισθησίας της καμπύλης κατά ~7%.

Βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων, επιλέχθηκε η αραιώση 1:50 για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς.

7.3.3 Καμπύλη αναφοράς γάλακτος με το βιοτινυλιωμένο αντίσωμα

Ακολουθώντας το πρωτόκολλο που περιεγράφηκε στην παράγραφο 6.4.2 και τα βέλτιστα διαλύματα από την παράγραφο 7.1.2 και χρόνο ανοσοαντίδρασης 1 ώρα και επώαση επισημασμένης με HRP στρεπταβιδίνης 25 min κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς προτύπων διαλυμάτων αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο γάλα. Τα πρότυπα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: 0%, 0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.5% και 1% (o/o), τα οποία στην συνέχεια αραιώθηκαν 50 φορές με διάλυμα ανοσοαντίδρασης. Η καμπύλη προήλθε από τα προεπωασμένα για 30 min μίγματα προτύπων διαλυμάτων και βιοτινυλιωμένου αντισώματος.



Σχήμα 19: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για τα πρότυπα διαλύματα αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο (ο/ο). Καμπύλη με (ο/ο) προεπώαση 30 min. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων ± τυπική απόκλιση (±SD).

Τα αναλυτικά χαρακτηριστικά της παραπάνω καμπύλης παρουσιάζονται στον πίνακα 4. Ο υπολογισμός τους πραγματοποιήθηκε όπως περιεγράφηκε στην παράγραφο 7.1.6.

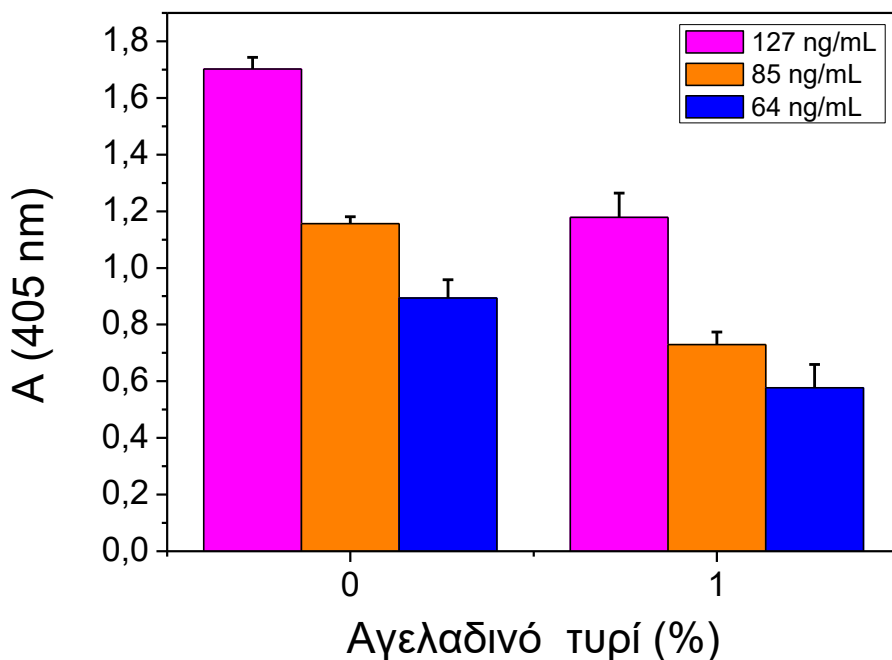
Πίνακας 4: Αναλυτικά χαρακτηριστικά του ανταγωνιστικού τύπου ενζυμοανασοχημικού προσδιορισμού αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο

Αναλυτικά Χαρακτηριστικά	Αγελαδινό γάλα
LOD (%)	0,004
LOQ (%)	0,007
IC ₅₀ (%)	0,08
Δυναμικό εύρος (%)	0,007-0,5
Ένδο-αναλυτικό CV (%)	1,4-2,3

Διαναλυτικό CV (%)	1,9-2,8
--------------------	---------

7.3.4 Βελτιστοποίηση συγκεντρώσεως βιοτινυλιωμένου αντισώματος για τον ανταγωνιστικό ενζυμοανοσοχημικό προσδιορισμό του αγελαδινού τυριού σε αιγοπρόβειο τυρί

Ομοίως με την διαδικασία βελτιστοποίησης της συγκέντρωσης του βιοτινυλιωμένου πολυκλωνικού αντισώματος κουνελιού έναντι της βόειας κ-καζεΐνης για τον προσδιορισμό νοθείας στο γάλα έτσι και στο τυρί ελέγχθηκε εκ νέου η βέλτιστη συγκέντρωση του αντισώματος. Στο σχήμα 19 παρατίθενται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τον τίτλο του βιοτινυλιωμένου αντισώματος, τόσο για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα αιγοπρόβειου τυριού όσο και για ένα πρότυπο διάλυμα περιεκτικότητας 1% (ο/ο) σε αγελαδινό τυρί.



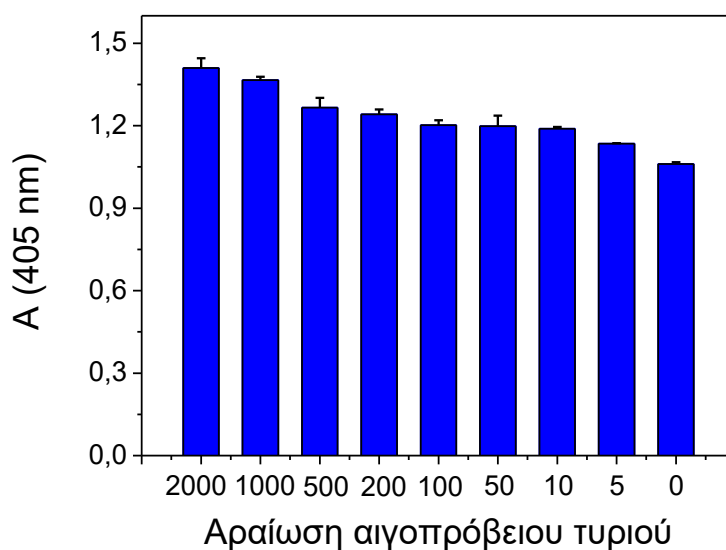
Σχήμα 20: Τιμές απορροφήσεως στα 405 nm για αντίσωμα συγκεντρώσεως 127 ng/mL (■), 85 ng/mL (■) και 64 ng/mL (■) σε μηδενικό πρότυπο αιγοπρόβειου τυριού και

πρότυπο διάλυμα αγελαδινού τυριού περιεκτικότητας 1% (o/o). Κάθε ράβδος αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων + τυπική απόκλιση (+SD).

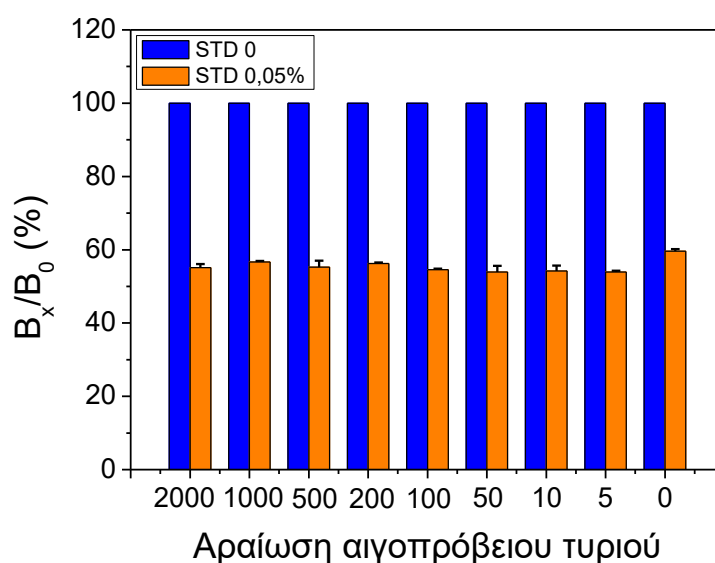
Σύμφωνα με το σχήμα 20, η συγκέντρωση 64 ng/mL βιοτινυλιωμένου αντισώματος δεν παρείχε επαρκές αναλυτικό σήμα ($A < 1$ για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα), ενώ αντιθέτως για συγκεντρώσεις αντισώματος μεγαλύτερες ή ίσες από 85 ng/mL παρείχαν ικανοποιητικό αναλυτικό σήμα ($A \geq 1$). Και για τις τρεις συγκεντρώσεις αντισώματος, η ευαισθησία της καμπύλης δεν μεταβάλλεται καθώς ο λόγος του αναλυτικού σήματος του προτύπου διαλύματος αιγοπρόβειου τυριού με περιεκτικότητα 1% (o/o) σε αγελαδινό τυρί ως προς το αναλυτικό σήμα του μηδενικού προτύπου διαλύματος, παραμένει σταθερός. Επομένως, επιλέχθηκε η συγκέντρωση 85 ng/mL καθώς παρείχε επαρκές αναλυτικό σήμα ($A \geq 1$) χωρίς να καταναλώνεται μεγάλη ποσότητα αντισώματος και υιοθετήθηκε για το τελικό για τον προσδιορισμό νοθείας αιγοπρόβειου τυριού με αγελαδινό.

7.3.5 Μελέτη επίδρασης της μήτρας του τυριού

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιεγράφηκε στην παράγραφο 6.4.2, τα βέλτιστα διαλύματα από την παράγραφο 7.1.2, χρόνο ανοσοαντίδρασης 1 ώρα, επώαση επισημασμένης με HRP στρεπταβιδίνης 25 min και χρόνο προεπάσης μίγματος προτύπων διαλυμάτων και αντισώματος 30 min πραγματοποιήθηκε μελέτη επίδρασης της μήτρας του τυριού στο αναλυτικό σήμα και την ευαισθησία της καμπύλης αναφοράς.



Σχήμα 21: Τιμές απορροφήσεως στα 405 nm για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα αιγοπρόβειου τυριού σε αραιώσεις της μήτρας 0, 10, 50, 100, 200, 500 και 1000 φορές με διάλυμα ανοσοαντίδρασης. Κάθε ράβδος αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων + τυπική απόκλιση (+SD).



Σχήμα 22: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης για μηδενικό πρότυπο διάλυμα αιγοπρόβειου τυριού καθώς για ένα πρότυπο διάλυμα, το οποίο είχε περιεκτικότητα 0.002% (o/o) σε αγελαδινό τυρί μετά από αραιώση 0, 10, 50, 100, 200, 500 και 1000 φορές με διάλυμα ανοσοαντίδρασης. Κάθε ράβδος αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων + τυπική απόκλιση (+SD).

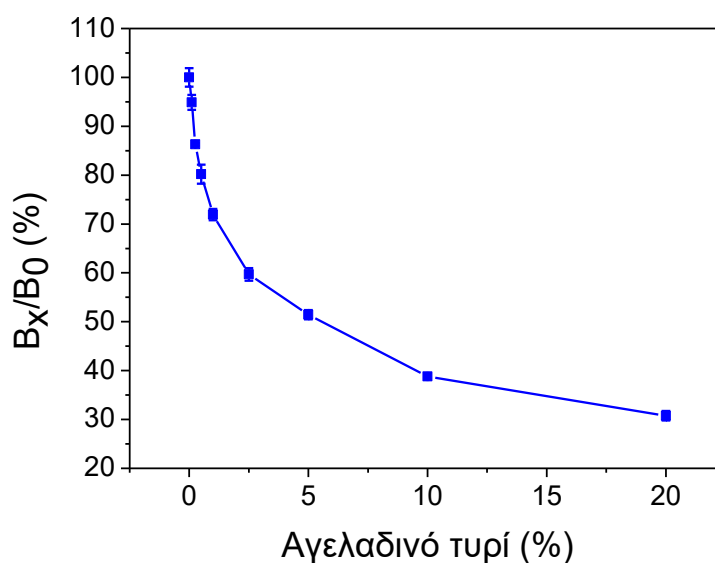
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, παρατηρήθηκε πτώση του αναλυτικού σήματος για όλες τις αραιώσεις του μηδενικού προτύπου διαλύματος αιγοπρόβειου τυριού συγκριτικά με εκείνο που ελήφθη για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα σε διάλυμα ανοσοαντίδρασης. Όπως φαίνεται στο σχήμα 21, το αναλυτικό σήμα του μηδενικού προτύπου διαλύματος αιγοπρόβειου τυριού ήταν σταθερό και παρεμφορές για αραιώσεις 1/10 έως 1/500 ενώ για μεγαλύτερες αραιώσεις παρατηρήθηκε αύξηση του αναλυτικού σήματος έως και 19.5%. Αντίθετα, για αραιώσεις μικρότερες ή ίσες από 1/5 παρατηρήθηκε πτώση του αναλυτικού σήματος έως 10%.

Από το σχήμα 22, παρατηρείται πως η ευαισθησία δεν επηρεάζεται από την αραιώση του γάλακτος. Μοναδική εξαίρεση η περίπτωση του πυκνού γάλακτος (0 φορές αραιώση) όπου παρατηρείται μείωση της ευαισθησίας της καμπύλης κατά ~7%.

Βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων, επιλέχθηκε η αραιώση 1:50 προκειμένου να παρέχεται επαρκές αναλυτικό σήμα και ικανοποιητική ευαισθησία ανίχνευσης ώστε το δυναμικό εύρος της καμπύλης αναφοράς να περιλαμβάνει το όριο συγκεντρώσεως (1%, β/β), πάνω από το οποίο η προσθήκη αγελαδινού τυριού σε αιγοπρόβειο θεωρείται νοθεία.

7.3.6 Καμπύλη αναφοράς τυριού με το βιοτινυλιωμένο αντίσωμα

Ακολουθώντας το πρωτόκολλο που περιεγράφηκε στην παράγραφο 6.4.2, τα βέλτιστα διαλύματα από την παράγραφο 7.1.2, χρόνο προεπώασης μίγματος προτύπων διαλυμάτων και βιοτινυλιωμένου πολυκλωνικού αντισώματος 30 min, χρόνο ανοσοαντίδρασης 1 ώρα και επώαση επισημασμένης με HRP στρεπταβιδίνης 25 min κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς προτύπων διαλυμάτων αιγοπρόβειου τυριού, τα οποία περιείχαν αγελαδινό τυρί σε ποσοστό 0%, 0.1%, 0.25%, 0.5%, 1%, 2.5%, 5%, 10% και 20% (o/o).



Σχήμα 23: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για τα πρότυπα διαλύματα αιγοπρόβειου τυριού με αγελαδινό τυρί. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm τυπική απόκλιση (\pm SD).

Τα αναλυτικά χαρακτηριστικά της καμπύλης αναφοράς παρουσιάζονται στον πίνακα 5 και υπολογίστηκαν όπως περιεγράφηκε στην παράγραφο 7.1.6.

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

Αναλυτικά Χαρακτηριστικά	Αγελαδινό τυρί
LOD (%)	0,004
LOQ (%)	0,007
IC ₅₀ (%)	5,4
Δυναμικό εύρος (%)	0,007-20
Ένδο-αναλυτικό CV (%)	1,5-2,4
Διαναλυτικό CV (%)	1,8-2,9

7.3.7 Μελέτη ανάκτησης και γραμμικότητας αραίωσης της μήτρας του τυριού

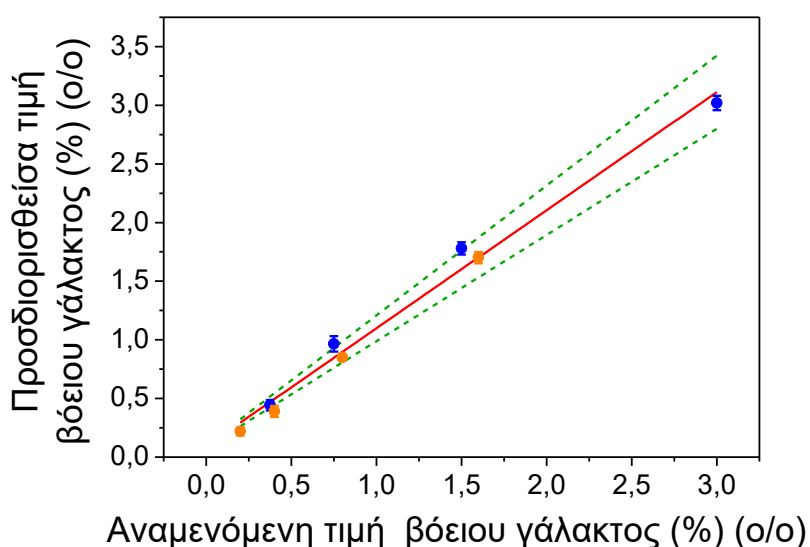
Για την αξιολόγηση της ακρίβειας της αναπτυχθείσας πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανάκτησης και γραμμικότητας αραίωσης δειγμάτων γνωστής συγκεντρώσεως. Για την ανάκτηση χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αιγοπρόβειου τυριού στα οποία προστέθηκε αγελαδινό τυρί σε συγκεντρώσεις 0.25%, 1.25% και 6.25% (β/β) και αναλύθηκαν με την ενζυμοανασοχημική μέθοδο σε φρεάτια μικροτιπλοδότησης. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε έλεγχος του αιγοπρόβειου τυριού και σύμφωνα με το αποτέλεσμα, δεν ανιχνεύθηκε αγελαδινό τυρί σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου. Στον πίνακα 6, παρουσιάζεται η μέση τιμή της περιεκτικότητας που προσδιορίστηκε μετά την προσθήκη αγελαδινού τυριού. Η μέση τιμή προέκυψε από 3 επαναληπτικές μετρήσεις \pm τυπική απόκλιση.

Πίνακας 6: Επί τοις εκατό ανάκτηση αγελαδινού τυριού μετά από προσθήκη γνωστών συγκεντρώσεων σε αιγοπρόβειο τυρί

Προσθεθείσα περιεκτικότητα αγελαδινού τυριού (%)	Προσδιορισθείσα περιεκτικότητα αγελαδινού τυριού (%)	Ανάκτηση (%)
0	<LOD	-
0.25	0.24 \pm 0.01	96
1.25	1.18 \pm 0.03	94
6.25	7.30 \pm 0.11	117

Όπως προκύπτει από τον πίνακα 6 η επί τοις εκατό ανάκτηση κυμαινόταν από 94-117%, καταδεικνύοντας την ακρίβεια των μετρήσεων με την αναπτυχθείσα ενζυμοανασοχημική μέθοδο σε φρεάτια μικροτιπλοδότησης.

Για τον έλεγχο της γραμμικότητας αραίωσης, παρασκευάστηκαν δύο δείγματα με προσθήκη 3% και 1.6% (β/β) αγελαδινού τυριού σε αιγοπρόβειο τυρί, τα οποία στην συνέχεια αραιώθηκαν διαδοχικά έτσι ώστε οι περιεκτικότητες των αραιωμένων δειγμάτων να περιλαμβάνονται στην γραμμική περιοχή απόκρισης της καμπύλης αναφοράς. Στο σχήμα 24, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του πειράματος γραμμικότητας αραίωσης ως συσχέτιση των αναμενόμενων και προσδιορισθέντων τιμών των αρχικών και των αραιωμένων δειγμάτων.



Σχήμα 24: Συσχέτιση των αναμενόμενων με τις προσδιορισθείσες συγκεντρώσεις αγελαδινού γάλακτος σε κατσίκισιο που ελήφθησαν με διαδοχικές αραιώσεις δειγμάτων στα οποία η αρχική προσθήκη ήταν: 3% (ο/ο) (●) και 1.6% (ο/ο) (●). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 7 επαναληπτικών μετρήσεων ± τυπική απόκλιση (±SD).

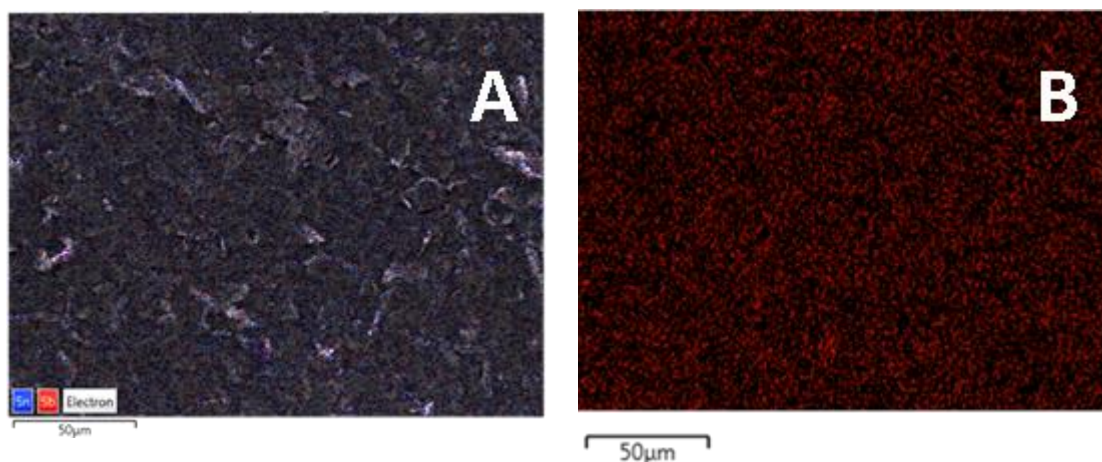
Σύμφωνα με το σχήμα 24, η κλίση της ευθείας (α) είναι $1,011 \pm 0,045$, η τεταγμένη επί την αρχή είναι $0,081 \pm 0,062$ και ο συντελεστής συσχέτισης της ευθείας παλινδρόμησης είναι 0,98. Όπως φαίνεται, η προσδιορισθείσες τιμές ήταν σε πλήρη συμφωνία με τις αναμενόμενες τιμές.

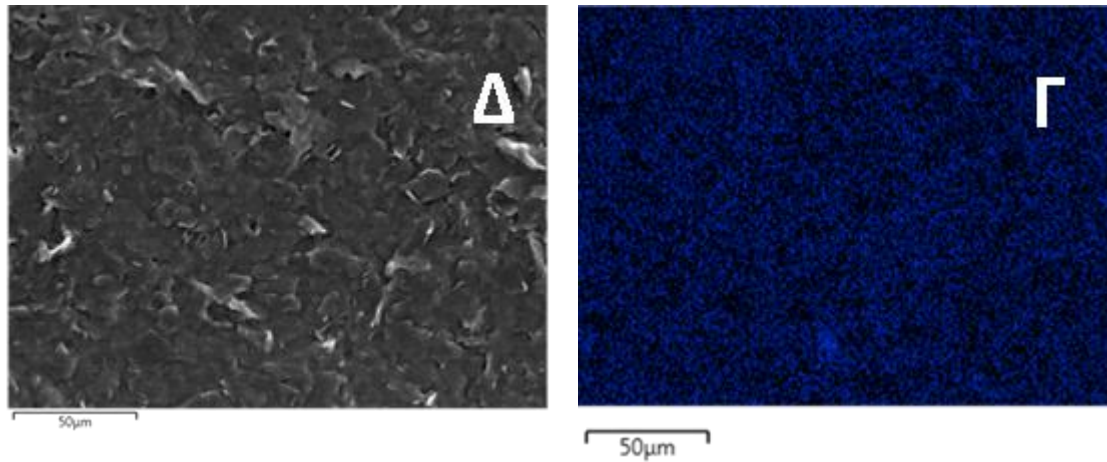
7.4 Ανάπτυξη ανταγωνιστικού τύπου ενζυμικού ανοσοχημικού προσδιορισμού νοθείας αιγοπρόβειου τυριού με αγελαδινό σε ηλεκτροχημικό αισθητήρα

Αφού ολοκληρώθηκε η βελτιστοποίηση της μεθόδου για τον προσδιορισμό νοθείας αιγοπρόβειου τυριού με αγελαδινό σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης ακολούθησε διαδικασία μεταφοράς και εφαρμογής αυτής της μεθόδου στον ηλεκτροχημικό βιοαισθητήρα.

7.4.1 Χαρακτηρισμός επιφανείας ηλεκτροδίων εργασίας του ηλεκτροχημικού ανοσοαισθητήρα

Μελετήθηκε η σύσταση της επιφανείας του ηλεκτροδίου εργασίας από μίγμα οξειδίων αντιμονίου και κασσιτέρου και γραφίτη 4% (β/β). Παρακάτω παρουσιάζονται μια εικόνα SEM (Scanning Electron Microscope, Σάρωση Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου) και μια ανάλυση EDX (Energy-dispersive X-ray spectroscopy).

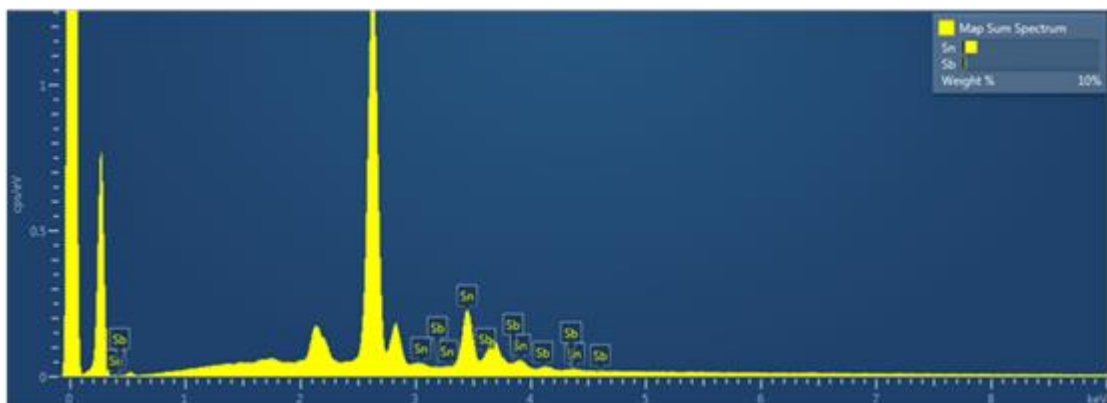




Σχήμα 25: Συνολική εικόνα ανάλυσης με EDX (Α), απεικόνιση EDX μόνο οξειδίων Sb (Β), απεικόνιση EDX μόνο οξειδίων Sn (Γ) και εικόνα SEM (Δ) της επιφάνειας του εκτυπωμένου ηλεκτροδίου.

Όπως παρατηρείται στο σχήμα 25, υπάρχει ομοιόμορφη κατανομή αντιμονίου και κασσιτέρου του στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας χωρίς να εμφανίζονται περιοχές με συσσωματώματα.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε στοιχειακή ανάλυση της επιφάνειας του εκτυπωμένου ηλεκτροδίου εργασίας και παρακάτω παρουσιάζεται το διάγραμμα ενέργειας και τα ατομικά ποσοστά Sb/Sn. Το υλικό που χρησιμοποιήθηκε είναι το $\text{SnO}_2/\text{Sb}_2\text{O}_5$ της Sigma Aldrich (549541) και σύμφωνα με την κατασκευάστρια εταιρία περιέχει SnO_2 (89-93%) και Sb_2O_5 (7-11%).



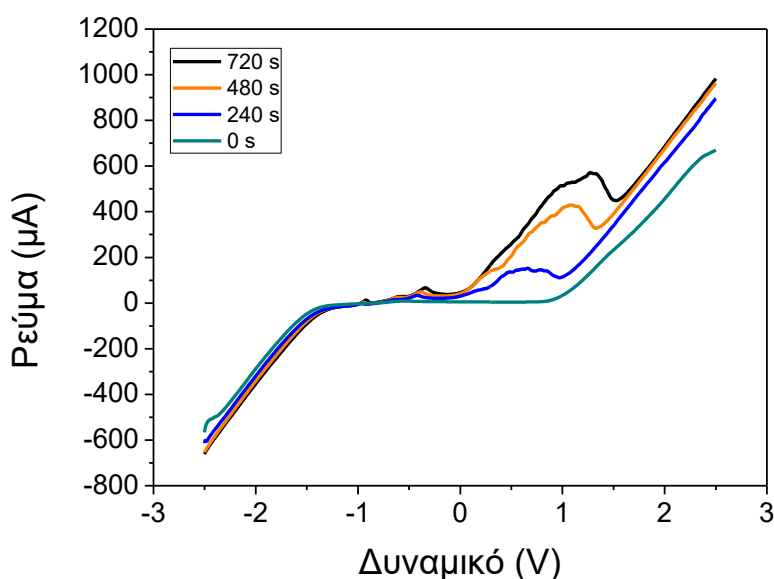
Map Sum Spectrum	Atomic %
Sn	87.90
Sb	12.10
Total	100.00

Σχήμα 26: Διάγραμμα ενέργειας και στοιχειακή ανάλυση εκτυπωμένου ηλεκτροδίου εργασίας.

Σύμφωνα με την στοιχειακή ανάλυση, παρατηρείται πως η αναλογία $\text{SnO}_2/\text{Sb}_2\text{O}_5$ διατηρείται στο τελικό εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο εργασίας.

7.4.2 Μελέτη σχηματισμού μεταλλικού φιλμ στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου

Τα οξειδία SnO_2 Sb_2O_5 που υπάρχουν στο ηλεκτρόδιο εργασίας δρουν ως πρόδρομες ενώσεις που σχηματίζουν κράμα Sn-Sb στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου κατά τη διάρκεια της ηλεκτροχημικής ανάλυσης. Τα οξειδία αυτά κατά το στάδιο της προσυγκέντρωσης των ιόντων καδμίου (που προέρχονται από τις διαλυτοποιημένες κβαντικές κουκκίδες) ανάγονται και μετατρέπονται σε μεταλλικό Sn και Sb. Οπότε ο προσδιορισμός των ιόντων Cd(II) πραγματοποιείται σε επιτόπου σχηματιζόμενο ηλεκτρόδιο φιλμ Sn-Sb, οδηγώντας σε μεγαλύτερη ευαισθησία ανίχνευσης (~5 φορές μεγαλύτερη από αυτή του ηλεκτροδίου σκέτου γραφίτη). Ο χρόνος προσυγκέντρωσης επηρεάζει τη δημιουργία του φιλμ Sn-Sb στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, και για αυτό πραγματοποιήθηκε μελέτη του σχηματισμού φιλμ στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας σε σχέση με τον χρόνο προσυγκέντρωσης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα παρακάτω βολταμμογραφήματα.



Σχήμα 27: Βολταμμογράφημα σχηματισμού φιλμ στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας για χρόνο προσυγκέντρωσης 0s (■), 240s (■), 480s (■) και 720s (■) . Ένταση ρεύματος προς διαφορά δυναμικού.

Όπως παρατηρείται στο σχήμα 27, με την αύξηση του χρόνου προσυγκέντρωσης σχηματίζεται περισσότερο φιλμ Sn-Sb στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου με αποτέλεσμα να λαμβάνονται μεγαλύτερες κορυφές ρεύματος οξειδωσης των Sn-Sb που είχε σχηματιστεί στο ηλεκτρόδιο.

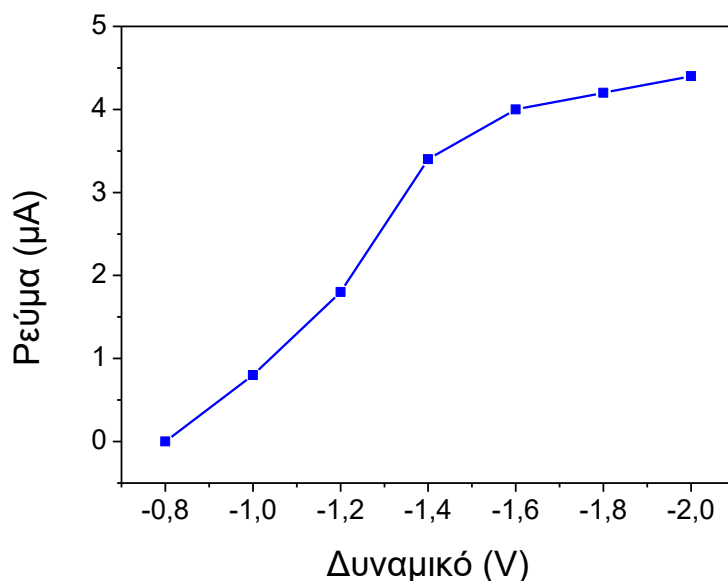
7.4.3 Βελτιστοποίηση συνθηκών ηλεκτροχημικού βιοαισθητήρα

Έπειτα, ακολούθησε μελέτη των συνθηκών του ηλεκτροχημικού αισθητήρα με σκοπό την ικανοποιητική ευαισθησία ανίχνευσης, σύντομο χρόνο ανάλυσης. . Για τον σκοπό αυτό, έλαβαν χώρα οι εξής μελέτες:

- Προσδιορισμός βέλτιστου δυναμικού ηλεκτροχημικής εναπόθεσης
- Προσδιορισμός βέλτιστου χρόνου ηλεκτροχημικής εναπόθεσης
- Καμπύλη αναφοράς προτύπου διαλύματος καδμίου (Cd)

7.4.3.1 Μελέτη του δυναμικού προσυγκέντρωσης

Το δυναμικό προσυγκέντρωσης των ιόντων καδμίου στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας μελετήθηκε σε δυναμικά -2, -1.8, -1.6, -1.4, -1.2, -1 και -0.8 V (σε σχέση με το δυναμικό του ηλεκτροδίου ψευδοαναφοράς). Η ηλεκτροχημική κυψελίδα περιείχε 1.5 mL ρυθμιστικού διαλύματος οξείκου οξέος 0.1 M και 30 μ L διαλύματος καδμίου συγκέντρωσης 10 ppb.



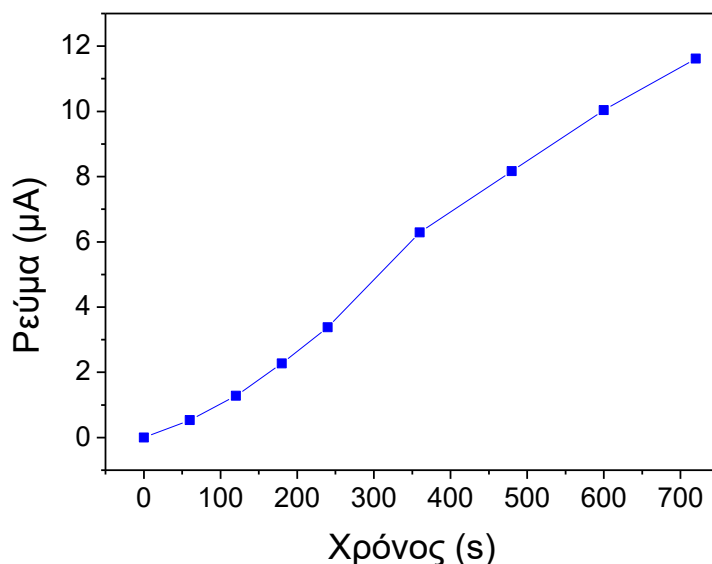
Σχήμα 28: Καμπύλη ύψους έντασης ρεύματος κορυφής καδμίου προς δυναμικό ηλεκτροχημικής εναπόθεσης.

Από το σχήμα 28, παρατηρείται πως μέγιστο σήμα επιτυγχάνεται για δυναμικό ηλεκτροχημικής απόθεσης -2 V το οποίο, επιλέγεται ως βέλτιστο δυναμικό ηλεκτροεναπόθεσης για τον ηλεκτροχημικό ανοσοαισθητήρα.

7.4.3.2 Μελέτη του χρόνου προσυγκέντρωσης

Ο χρόνος προσυγκέντρωσης επηρεάζει τόσο την εναπόθεση των ιόντων καδμίου στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας όσο και για τον σχηματισμό του φιλμ Sn-Sb από την αναγωγή των οξειδίων SnO₂/Sb₂O₅. Μελετήθηκαν τα 0, 60, 120, 180, 240, 360, 480, 600 και 720 s ως χρόνος προσυγκέντρωσης. Η ηλεκτροχημική κυψελίδα περιείχε 1.5 mL ρυθμιστικού

διαλύματος οξεικού οξέος 0.1 M και 30 μL διαλύματος καδμίου συγκέντρωσης 10 ppm και το δυναμικό ηλεκτροαπόθεσης ήταν -2 V.

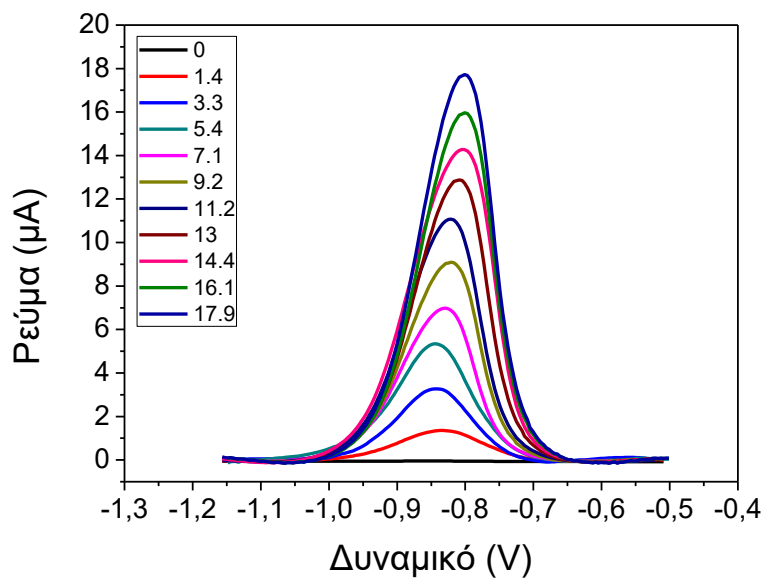


Σχήμα 29: Καμπύλη ύψους κορυφής καδμίου προς χρόνο ηλεκτροαπόθεσης.

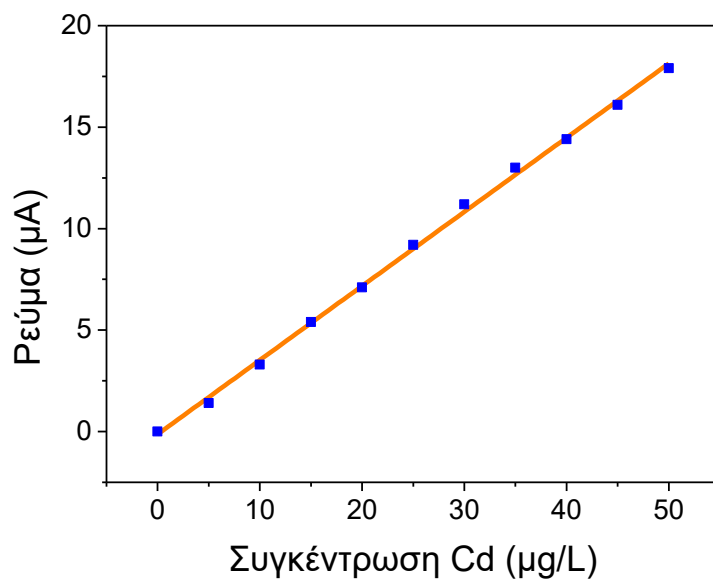
Σύμφωνα με το σχήμα 29, η κλίση της καμπύλης από χρόνο 0 έως και 240 (s) συνεχώς αυξάνει ενώ από τα 360 (s) και έπειτα η κλίση μειώνεται σταδιακά. Τα 240 (s) επιλέγησαν ως ιδανικός χρόνος ηλεκτροχημικής προσυγκέντρωσης για τον ηλεκτροχημικό ανοσοαισθητήρα προσφέροντας ικανοποιητική ευαισθησία και μικρό χρόνο ανάλυσης.

7.4.3.3 Καμπύλη αναφοράς πρότυπου διαλύματος καδμίου (Cd)

Οι κβαντικές κουκίδες που χρησιμοποιήθηκαν ως ιχνηθέτης για τον ενζυμοανοδοχημικό προσδιορισμό της νοθείας αιγοπρόβειου τυριού με αγελαδινό σε ηλεκτροχημικό βιοαισθητήρα αποτελούνται από πυρήνα καδμίου, οπότε κατά την διαλυτοποίησή τους σε HCl ελευθερώνονται ιόντα Cd(II). Για αυτό, ήταν σκόπιμο να μελετηθεί η ικανότητα του αισθητήρα στον προσδιορισμό ιόντων Cd(II). Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε καμπύλη αναφοράς ιόντων Cd(II) σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών 0,1 M με χρόνο προσυγκέντρωσης 240 s και δυναμικό προσυγκέντρωσης τα -2 V.



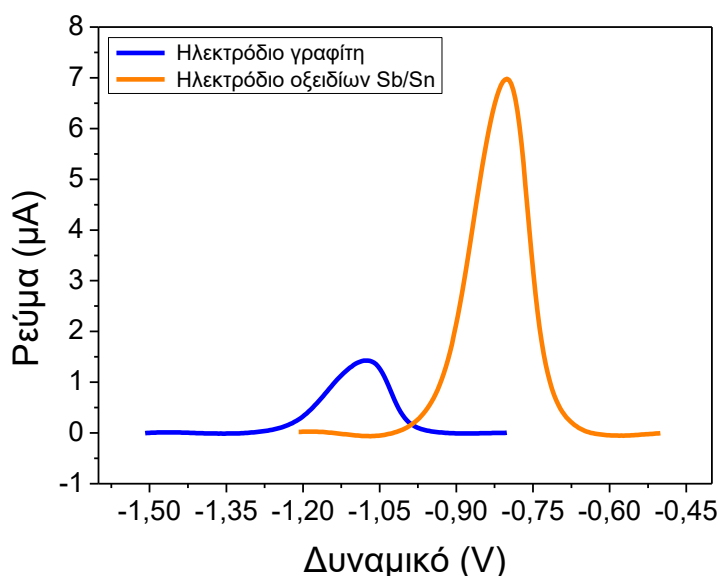
Σχήμα 30: Βολταμογραφήματα καμπύλης καδμίου για συγκεντρώσεις καδμίου 0 (■), 5 (■), 10 (■), 15 (■), 20 (■), 25 (■), 30 (■), 35 (■), 40 (■), 45 (■) και 50 (■) μg/L.



Σχήμα 31: Καμπύλη αναφοράς καδμίου.

Σύμφωνα με τα σχήματα 30 και 31, η κλίση της καμπύλης (α) είναι 0.3653 ± 0.0048 , η τεταγμένη επί την αρχή είναι -0.13 ± 0.14 και ο συντελεστής συσχέτισης της ευθείας παλινδρόμησης είναι 0,998.

Επιπροσθέτως, έγινε σύγκριση του ηλεκτροδίου εργασίας μίγματος οξειδίων αντιμονίου και κασσιτέρου και γραφίτη (4% w/w) με σκέτο ηλεκτρόδιο γραφίτη ως προς την ευαισθησία ανίχνευσης 20 $\mu\text{g/L}$ Cd, εφαρμόζοντας χρόνο προσυγκέντρωσης 240s και δυναμικό προσυγκέντρωσης -2.0V και τα βολταμμογραφήματα παρουσιάζονται στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 32: Ένταση ηλεκτρικού ρεύματος για 20 ppb Cd με ηλεκτρόδιο εργασίας πάστας γραφίτη (■) και πάστας γραφίτη και οξειδίων Sb/Sn (■).

Όπως φαίνεται και στο σχήμα 32, το ηλεκτρόδιο μίγματος οξειδίων αντιμονίου και κασσιτέρου και γραφίτη παρουσιάζει 4.8 φορές μεγαλύτερο ρεύμα κορυφής σε σχέση με το απλό ηλεκτρόδιο γραφίτη.

7.4.4 Επαναπροσδιορισμός βέλτιστων αναλυτικών συνθηκών ενζυμοανοδοχημικού προσδιορισμού για μεταφορά στον ηλεκτροχημικό βιοαισθητήρα

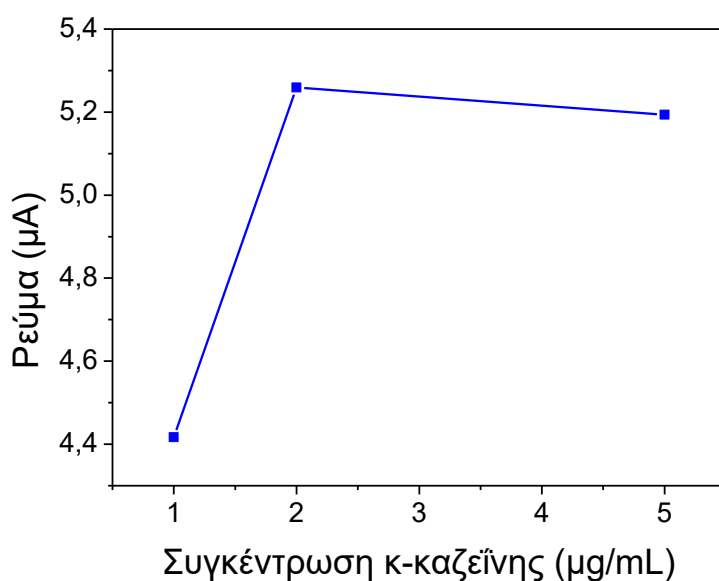
Στην συνέχεια, ήταν αναγκαίο να ελεγχθούν οι βέλτιστες συνθήκες του ενζυμοανοδοχημικού προσδιορισμού για την επίδραση που έχει η αλλαγή του μέσου εκτέλεσης της ανοσοανάλυσης από φρεάτια μικροπιτλοδότησης στα

εκτυπωμένα ηλεκτρόδια μίγματος οξειδίων αντιμονίου και κασσιτέρου και γραφίτη. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν οι εξής μελέτες:

- Προσδιορισμός βέλτιστης συγκέντρωσης ακινητοποίησης κ-καζεΐνης σε μήτρα αιγοπρόβειου τυριού στον ηλεκτροχημικό βιοαισθητήρα
- Προσδιορισμός βέλτιστης συγκέντρωσης βιοτινυλιωμένου πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της βόειας κ-καζεΐνης, σε μήτρα αιγοπρόβειου τυριού στον ηλεκτροχημικό βιοαισθητήρα
- Προσδιορισμός βέλτιστου χρόνου ανοσοαντίδρασης, σε μήτρα αιγοπρόβειου τυριού στον ηλεκτροχημικό βιοαισθητήρα
- Προσδιορισμός βέλτιστου χρόνου επώασης κβαντικών κουκκίδων, σε μήτρα αιγοπρόβειου τυριού στον ηλεκτροχημικό βιοαισθητήρα

7.4.4.1 Προσδιορισμός βέλτιστης συγκέντρωσης ακινητοποίησης κ-καζεΐνης σε αιγοπρόβειο τυρί στον ηλεκτροχημικό ανοσοαισθητήρα

Πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός βέλτιστης συγκέντρωσης ακινητοποίησης βόειας κ-καζεΐνης στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου για τον προσδιορισμό νοθείας αιγοπρόβειου τυριού με αγελαδινό.

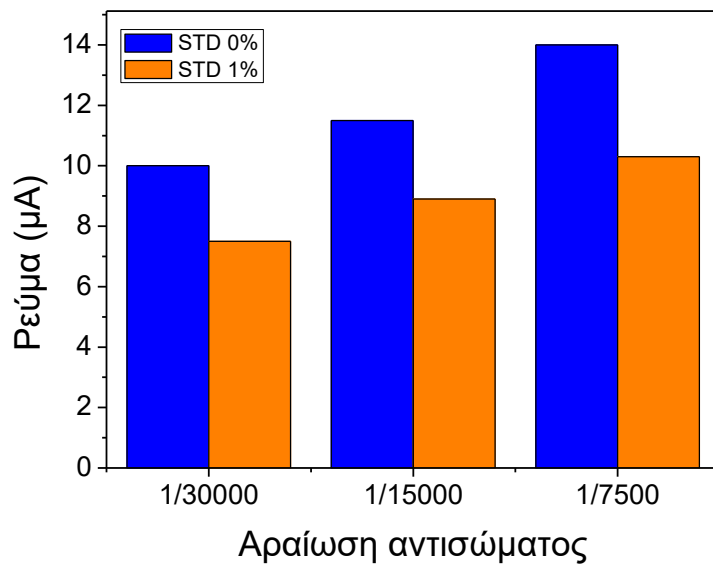


Σχήμα 33: Ένταση ηλεκτρικού ρεύματος που ελήφθη για διαφορετικές συγκεντρώσεις ακινητοποιημένης κ-καζεΐνης στην επιφάνεια των ηλεκτροδίων εργασίας.

Όπως παρατηρήθηκε στο σχήμα 33, μετά την συγκέντρωση 2 μg/mL κ-καζεΐνης παρατηρείται κορεσμός της επιφάνειας του ηλεκτροδίου καθώς με την περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης δεν παρατηρείται αύξηση του αναλυτικού σήματος. Επομένως, ως βέλτιστη συγκέντρωση ακινητοποιημένης κ-καζεΐνης επιλέγονται τα 2 μg/mL.

7.4.4.2 Προσδιορισμός βέλτιστης συγκέντρωσης βιοτινυλιωμένου πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της βόειας κ-καζεΐνης, σε αιγοπρόβειο τυρί στον ηλεκτροχημικό βιοαισθητήρα

Πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση της αραίωσης του βιοτινυλιωμένου πολυκλωνικού αντισώματος κουνελιού έναντι της βόειας κ-καζεΐνης για τον προσδιορισμό νοθείας αιγοπρόβειου τυριού στον ηλεκτροχημικό ανοσοαισθητήρα. Οι τιμές που ελήφθησαν παρατίθενται στο παρακάτω σχήμα.

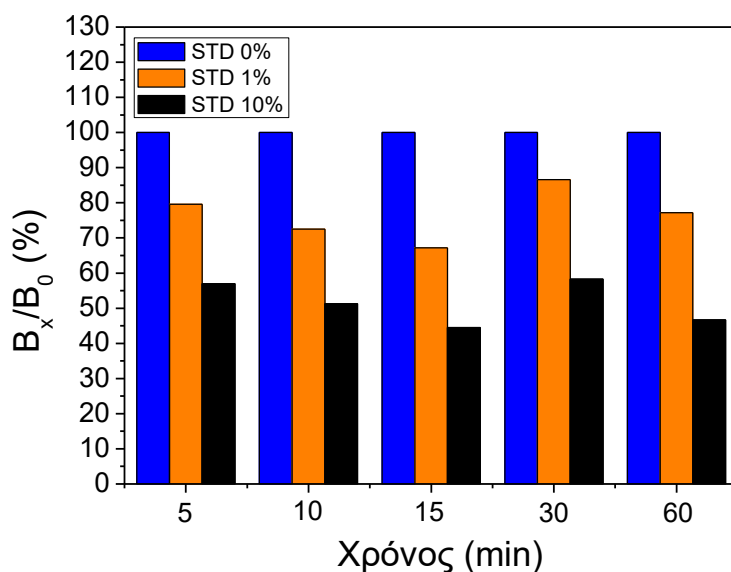


Σχήμα 34: Ένταση ηλεκτρικού ρεύματος που ελήφθη για διαφορετικές αραιώσεις πολυκλωνικού αντισώματος.

Από το σχήμα 34, παρατηρείται πως η αραιώση αντισώματος 1/7500 επιφέρει την μεγαλύτερη εκτόπιση σήματος για το πρότυπο διάλυμα τυριού με 1% (ο/ο) αγελαδινό τυρί. Για αυτό το λόγο επιλέγεται ως βέλτιστη αραιώση αντισώματος για τον ενζυμοανασοχημικό προσδιορισμό νοθείας αιγοπρόβειου τυριού στον ηλεκτροχημικό ανοσοαισθητήρα.

7.4.4.3 Προσδιορισμός βέλτιστου χρόνου ανοσοαντίδρασης, σε αιγοπρόβειο τυρί στον ηλεκτροχημικό βιοαισθητήρα

Στην συνέχεια, ελέγχθηκε ο χρόνος της ανοσοαντίδρασης για τα πρότυπα αιγοπρόβειου τυριού με συγκέντρωση αγελαδινού τυριού 0%, 1% και 10%. Οι χρόνοι που ελέγχθηκαν ήταν τα 5, 10, 15, 30 και 60 min και οι συνθήκες ήταν οι βέλτιστες.



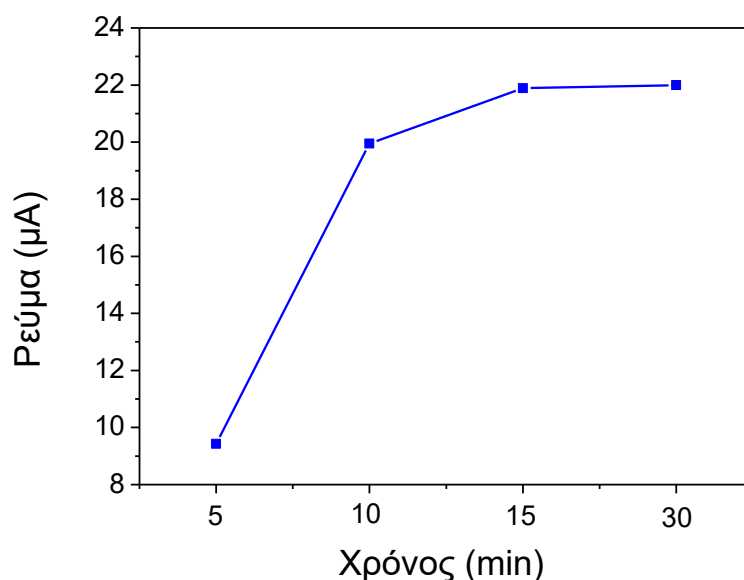
Σχήμα 35: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης αναλυτικού σήματος για πρότυπα διαλύματα αιγοπρόβειου τυριού με 0% (■), 1%(■) και 10% (■) αγελαδινό τυρί για χρόνους ανοσοαντίδρασης 5, 10, 15, 30 και 60 min.

Όπως φαίνεται από το σχήμα 35, με την αύξηση του χρόνου ανοσοαντίδρασης από τα 5 στα 15 min υπάρχει μια αύξηση της ευαισθησίας της καμπύλης (μεγαλύτερες ποσοστιαίες εκτοπίσεις αναλυτικού σήματος) με μέγιστη ευαισθησία να επιτυγχάνεται στα 15 min από όπου και έπειτα παρατηρούμε μια πτώση της ευαισθησίας μέχρι τα 60 min (μείωση της ποσοστιαίας εκτόπισης του αναλυτικού σήματος). Για τον λόγο αυτό επιλέγονται τα 15 min ως βέλτιστος χρόνος ανοσοαντίδρασης για τον προσδιορισμό νοθείας αιγοπρόβειου τυριού με αγελαδινό στην ηλεκτροχημικό ανοσοαισθητήρα.

7.4.4.4 Προσδιορισμός βέλτιστου χρόνου επώασης κβαντικών κουκκίδων, σε αιγοπρόβειο τυρί στον ηλεκτροχημικό ανοσοαισθητήρα

Παρομοίως με τον χρόνο της ανοσοαντίδρασης που ελέγχθηκε στην προηγούμενη παράγραφο, ελέγχθηκε ο χρόνος επώασης των επισημασμένων με στρεπταβιδίνη κβαντικών κουκκίδων στον ηλεκτροχημικό

ανοσοαισθητήρα. Για τον έλεγχο αυτό χρησιμοποιήθηκε μηδενικό πρότυπο διάλυμα αιγοπρόβειου τυριού και οι χρόνοι που ελέγχθηκαν ήταν τα 5, 10, 15 και 30 min. Οι λοιπές συνθήκες του προσδιορισμού ήταν οι βέλτιστες και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο παρακάτω σχήμα.

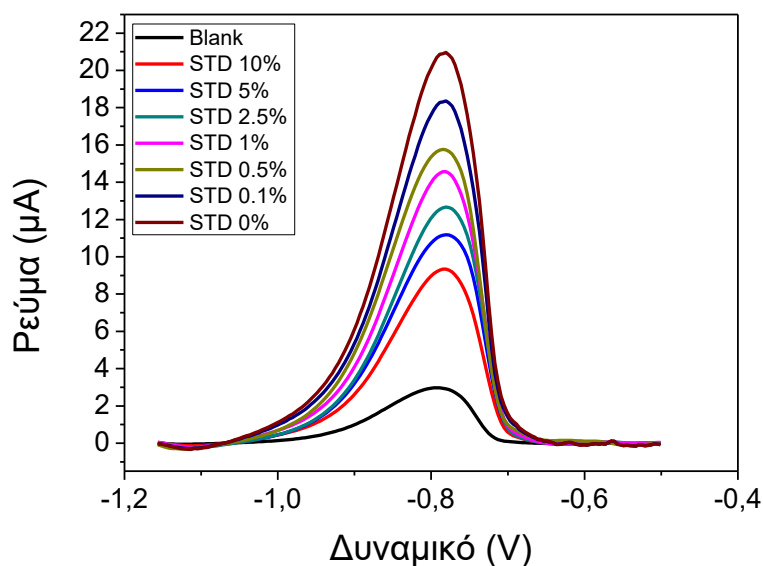


Σχήμα 36: Ένταση ηλεκτρικού ρεύματος για μηδενικό πρότυπο διάλυμα αιγοπρόβειου τυριού για χρόνους επώασης επισημασμένων μεστρεπταβιδίνηκβαντικών κουκκίδων 5, 10, 15 και 30 min.

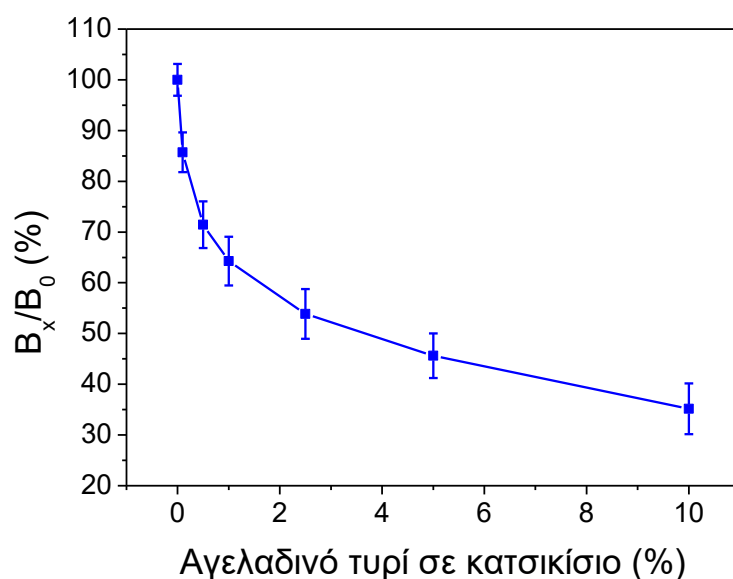
Όπως παρατηρήθηκε στο σχήμα 33, μέχρι τα 15 min παρατηρείται μία συνεχής αύξηση του αναλυτικού σήματος η οποία παρουσιάζει ταβάνι στα 15 min και παραμένει σταθερό το σήμα ακόμα και μετά από 30 min επώασης των κβαντικών κουκκίδων. Καθώς το προσδοκώμενο κατά την βελτιστοποίηση επώασης των κβαντικών κουκκίδων ήταν να ληφθεί το μέγιστο δυνατό σήμα στον ελάχιστο δυνατό χρόνο, επιλέγονται τα 15 min ως βέλτιστος χρόνος επώασης.

7.4.5 Προσδιορισμός νοθείας αιγοπρόβειου τυριού με αγελαδινό (καμπύλη αναφοράς) στον ηλεκτροχημικό ανοσοαισθητήρα

Έπειτα πραγματοποιήθηκε καμπύλη αναφοράς στον ηλεκτροχημικό ανοσοαισθητήρα στις βέλτιστες συνθήκες, όπου χρησιμοποιήθηκαν τα πρότυπα διαλύματα αιγοπρόβειου τυριού 0%, 0.1%, 0.5%, 1%, 2.5%, 5% και 10%. Παρακάτω παρουσιάζονται τα βολταμμογραφήματα και η καμπύλη αναφοράς.



Σχήμα 37: Βολταμμογραφήματα των προτύπων διαλυμάτων της καμπύλης αναφοράς 0% (■), 0.1% (■), 0.5% (■), 1% (■), 2.5% (■), 5% (■), 10% (■) και τυφλού (■).



Σχήμα 38: Καμπύλη αναφοράς προτύπων διαλυμάτων αιγοπρόβειου τυριού με αγελαδινό τυρί. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στον μέσο όρο τριών επαναληπτικών μετρήσεων \pm τυπική απόκλιση (\pm SD).

Στον πίνακα 7, παρουσιάζονται τα αναλυτικά χαρακτηριστικά του ανταγωνιστικού τύπου ενζυμοανασοχημικού προσδιορισμού νοθείας αιγοπρόβειου τυριού με αγελαδινό στον ηλεκτροχημικό ανοσοαισθητήρα. Το όριο ανίχνευσης (Limit Of Detection, LOD) προσδιορίστηκε ως η συγκέντρωση που αντιστοιχεί σε ποσοστιαία πτώση του αναλυτικού σήματος ίση με $(100-3RSD\%) \cdot 20$ επαναληπτικών μετρήσεων του μηδενικού πρότυπου. Το όριο ποσοτικοποίησης (Limit Of Quantitation, LOQ) προσδιορίστηκε ως η συγκέντρωση που αντιστοιχεί σε ποσοστιαία πτώση του αναλυτικού σήματος ίση με $(100-6RSD\%) \cdot 20$ επαναληπτικών μετρήσεων του μηδενικού πρότυπου. Επιπλέον, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση που αντιστοιχεί σε ποσοστιαία πτώση του αναλυτικού σήματος ίση με 50% ως προς το σήμα του μηδενικού πρότυπου, IC50.

Πίνακας 7: Αναλυτικά χαρακτηριστικά του ανταγωνιστικού τύπου ενζυμοανασοχημικού προσδιορισμού νοθείας αιγοπρόβειου τυριού με αγελαδινό στον ηλεκτροχημικό ανοσοαισθητήρα

Αναλυτικά Χαρακτηριστικά	Αγελαδινό τυρί
LOD (%)	0.07
LOQ (%)	0.22
IC₅₀ (%)	3.66

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η νοθεία γαλακτοκομικών προϊόντων έχει βρεθεί κατά καιρούς υπό το φως της δημοσιότητας καθώς προκλήθηκαν σοβαρά προβλήματα στους καταναλωτές των νοθευμένων προϊόντων. Κυριότερο κίνητρο για την νοθεία είναι η αύξηση των κερδών της βιομηχανίας. Ένα παράδειγμα αποτελεί το τεράστιο σκάνδαλο που συνέβη στην περιοχή της Κίνας όπου βρεφικό γάλα είχε νοθευτεί με προσθήκη μη-οργανικού αζώτου (μέσω προσθήκης μελαμίνης) έτσι ώστε να παρουσιάζεται ως γάλα καλύτερης ποιότητας λόγω μεγάλης πρωτεϊνικής περιεκτικότητας. Αυτή η κίνηση των γαλακτοβιομηχανιών είχε ως αποτέλεσμα την ασθένεια πολλών νεογνών και έφτασε ακόμη και σε αρκετούς θανάτους. Παράλληλα, τα νοθευμένα προϊόντα τιμολογούνταν ακριβότερα από τα υπόλοιπα, αποφέροντας στις εταιρείες μεγαλύτερα κέρδη.

Όσον αφορά την νοθεία του γάλακτος και των προϊόντων του ως προς την ζωική προέλευση του γάλακτος, παραμονεύουν άλλου είδους κίνδυνοι για τους καταναλωτές καθώς η αλλεργία στο αγελαδινό γάλα μπορεί να οδηγήσει μέχρι και σε θάνατο. Η νοθεία ενός προϊόντος κατσικίσιου γάλακτος δεν αφορά όμως μόνο τους ανθρώπους που πάσχουν από δυσανεξίες και αλλεργίες στο αγελαδινό, αλλά και μεγάλες ομάδες ανθρώπων που είτε για θρησκευτικούς είτε για κοινωνικοπολιτικούς λόγους δεν επιθυμούν να καταναλώνουν ορισμένα ζώα και κατ' επέκταση τα προϊόντα που παράγονται από αυτά. Φαίνεται λοιπόν, πόσο σημαντικό είναι να εξαλειφθεί η νοθεία των γαλακτοκομικών προϊόντων μέσω του καλύτερου ελέγχου και ανίχνευσής της.

Στην βιβλιογραφία αναφέρονται μέθοδοι ανίχνευσης νοθείας για τα διάφορα χαρακτηριστικά του γάλακτος που μπορούν να νοθευτούν, όπως είναι τα περιεχόμενα λιπαρά συστατικά, το μη οργανικό Άζωτο, οι διαλύτες και τα συντηρητικά. Στα πλαίσια αυτής της εργασίας, υπό έλεγχο τέθηκε η νοθεία του αιγοπρόβειου τυριού με αγελαδινό.

Για τον σκοπό αυτό έγινε προκαταρκτική μελέτη νοθείας αιγοπρόβειου γάλακτος με αγελαδινό με χρήση μεθόδου ανταγωνιστικής ELISA σε πλάκες με φρεάτια μικροπιλοδότησης. Μέχρι στιγμής, οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στην βιβλιογραφία για την ανίχνευση νοθείας του γάλακτος ενώ επιτυγχάνουν ικανοποιητικά επίπεδα ανίχνευσης και αξιοπιστίας, απαιτούν εξειδικευμένο προσωπικό για την εκτέλεσή τους, ακριβό εργαστηριακό εξοπλισμό, μεγάλους χρόνους ανάλυσης και δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για επί τόπου ανάλυση στο πεδίο.

Για την επιτέλεση του σκοπού της εργασίας, αναπτύχθηκε ηλεκτροχημικός ανοσοαισθητήρας για την ανίχνευση νοθείας αιγοπρόβειου τυριού με αγελαδινό. Το ηλεκτρόδιο αναφοράς και το βοηθητικό ηλεκτρόδιο εκτυπώθηκαν με τρισδιάστατο εκτυπωτή από αγώγιμο νήμα PLA τροποποιημένου με άνθρακα, ενώ το ηλεκτρόδιο εργασίας που χρησιμοποιήθηκε και ως επιφάνεια για την ανάπτυξη της ανοσοδοκιμής ήταν εκτυπωμένο μέσω πλέγματος και αποτελούταν από μίγμα οξειδίων αντιμονίου, κασσιτέρου και γραφίτη. Η ηλεκτροχημική μικροκυψελίδα εκτυπώθηκε με τρισδιάστατο εκτυπωτή από μη αγώγιμο νήμα PLA και περιείχε ενσωματωμένα τα ηλεκτρόδια ψευδοαναφοράς και βοηθητικό καθώς και ειδική εσοχή για την τοποθέτηση του ηλεκτροδίου εργασίας και ο όγκος του διαλύματος εργασίας ήταν 1.5 mL. Ο ποτενσιοστάτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν φορητού τύπου και η ρύθμιση και η επεξεργασία του σήματος πραγματοποιείτο μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή. Η ανοσοαντίδραση πραγματοποιείτο πάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, το οποίο στην συνέχεια χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση.

Ως πρώτο στάδιο, αναπτύχθηκε ανταγωνιστικού τύπου ενζυμοανοσοχημικός προσδιορισμός βόειας κ-καζεΐνης σε πρότυπα διαλύματα αιγοπρόβειου γάλακτος σε φρεάτια μικροπιλοδότησης έτσι ώστε να μελετηθεί η συμπεριφορά του προσδιορισμού και των αντιδραστηρίων πριν την εφαρμογή του στον ηλεκτροχημικό ανοσοαισθητήρα. Μετά την βελτιστοποίηση των συγκεντρώσεων της ακινητοποιημένης βόειας κ-καζεΐνης, του ειδικού πολυκλωνικού αντισώματος κουνελιού έναντι της βόειας κ-καζεΐνης, των διαλυμάτων έκπλυσης, ανοσοαντίδρασης και ακινητοποίησης καθώς και

έπειτα από την βελτιστοποίηση του χρόνου διάρκειας της ανοσοαντίδρασης και του σταδίου της επισήμανσης, ο προσδιορισμός αυτός μεταφέρθηκε σε δείγμα αιγοπρόβειου τυριού. Για το σκοπό αυτό, ήταν απαραίτητο να μελετηθεί η επίδραση της μήτρας του γάλακτος και του τυριού στο αναλυτικό σήμα. Βρέθηκε ότι για αραιώσεις της μήτρας του τυριού από 1/10 έως 1/500 σε διάλυμα ανοσοαντίδρασης, το αναλυτικό σήμα ήταν σταθερό. Επομένως, επιλέχθηκε η αραιώση 1/50 προκειμένου να εξασφαλίζεται ικανοποιητικό αναλυτικό σήμα και ταυτόχρονα να περιλαμβάνεται στην δυναμική περιοχή της καμπύλης βαθμονόμησης η περιεκτικότητα 1% (β/β) πάνω από την οποία το προϊόν θεωρείται νοθευμένο.

Σύμφωνα με τις βέλτιστες συνθήκες του ανοσοπροσδιορισμού σε φρεάτια μικροπιλοδότσης, επετεύχθη όριο ανίχνευσης 0,004%, όριο ποσοτικοποίησης 0.007% και δυναμικό εύρος από 0.007% έως 10%. Η ενδο- και δι-επιαναληψιμότητα της μεθόδου ήταν 1.5 έως 2.4 και 1.8 έως 2.9 αντίστοιχα. Ο συνολικός χρόνος του ανοσοπροσδιορισμού ήταν 3.5 ώρες.

Προκειμένου να εφαρμοστεί η μέθοδος για την ανίχνευση νοθείας αιγοπρόβειου τυριού με αγελαδινό από τα φρεάτια μικροπιλοδότσης στον ηλεκτροχημικό ανοσοαισθητήρα πραγματοποιήθηκε βιοτινυλίωση του ειδικού πολυκλωνικού αντισώματος κουνελιού έναντι της βόειας κ-καζεΐνης καθώς και να χρησιμοποιηθεί κατάλληλος ιχνηθέτης που είναι ηλεκτροχημικά ενεργός. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν κβαντικές κουκκίδες Cd, οι οποίες μετά το πέρας της ανοσοαντίδρασης και πριν την ηλεκτροχημική μέτρηση διαλύονται με χρήση HCl. Έτσι απελευθερώνονται ιόντα Cd(II), τα οποία στην συνέχεια ποσοτικοποιούνται με ανοδική αναδιαλυτική βολταμμετρία στην ηλεκτροχημική μικροκυψελίδα. Καθώς ο ανοσοχημικός προσδιορισμός είναι ανταγωνιστικού τύπου η ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος είναι αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης της βόειας κ-καζεΐνης στο δείγμα. Επιπλέον, ελέγχθηκαν και βελτιστοποιήθηκαν η συγκέντρωση της βόειας κ-καζεΐνης για ακινητοποίηση στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, η συγκέντρωση του πολυκλωνικού αντισώματος για τον ανοσοπροσδιορισμό, ο χρόνος της ανοσοανάλυσης καθώς και ο χρόνος του σταδίου επώασης του ανοσοσυμπλέγματος με τις κβαντικές κουκκίδες καδμίου.

Η επιλογή της βέλτιστης συγκέντρωσης της βόειας κ-καζεΐνης για ακινητοποίηση πραγματοποιήθηκε μετά από πειράματα που έγιναν στην επιφάνεια διαφορετικών ηλεκτροδίων, στα οποία πραγματοποιήθηκε εναπόθεση μικροκυλίδας διαφορετικών συγκεντρώσεων διαλύματος κ-καζεΐνης. Βρέθηκε ότι με χρήση του διαλύματος συγκέντρωσης 2 $\mu\text{g/mL}$ βόειας κ-καζεΐνης επετεύχθησαν υψηλές τιμές ρεύματος κορυφής.

Η επόμενη παράμετρος που μελετήθηκε ήταν η βέλτιστη συγκέντρωση του αντισώματος για τον ανοσοπροσδιορισμό. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, ικανοποιητικές τιμές ρεύματος κορυφής σε συνδυασμό με την βέλτιστη ευαισθησία ανίχνευσης ελήφθησαν για συγκέντρωση αντισώματος 85 ng/mL (ή 1/7500 αραιώση).

Επιπλέον δύο ακόμα σημαντικές παράμετροι οι οποίες ελέγχθηκαν ήταν ο χρόνος της ανοσοαντίδρασης και ο χρόνος επώασης του ανοσοσυμπλέγματος με τις κβαντικές κουκκίδες. Βρέθηκε ότι ο βέλτιστος χρόνος και για τα δύο στάδια ήταν τα 15 min.

Η καινοτομία του προτεινόμενου αισθητήρα έχει να κάνει με την χρήση ηλεκτροδίου εργασίας μίγματος μικτών οξειδίων αντιμονίου, κασσιτέρου και γραφίτη, το οποίο για πρώτη φορά χρησιμοποιείται ως ηλεκτροχημικός βιοαισθητήρας. Το σημαντικό πλεονέκτημα του συγκεκριμένου ηλεκτροδίου εργασίας είναι ότι τα οξείδια αυτά κατά το στάδιο της προσυγκέντρωσης των ιόντων καδμίου (που προέρχονται από τις διαλυτοποιημένες κβαντικές κουκκίδες) ανάγονται και μετατρέπονται σε μεταλλικό Sn και Sb. Οπότε ο προσδιορισμός των ιόντων Cd(II) πραγματοποιείται σε επιτόπου σχηματιζόμενο ηλεκτρόδιο φιλμ Sn-Sb, οδηγώντας σε μεγαλύτερη ευαισθησία ανίχνευσης (~5 φορές μεγαλύτερη από αυτή του απλού ηλεκτροδίου γραφίτη) Επιπλέον, πλεονεκτήματα του ηλεκτροχημικού ανοσοαισθητήρα είναι ο μικρός χρόνος ανάλυσης, η φορητότητα της συσκευής, η απλότητα χρήσης (δεν απαιτείται εξειδικευμένο προσωπικό για την εκτέλεση της ανάλυσης και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων) και το μικρό κόστος του εξοπλισμού. Τα χαρακτηριστικά αυτά καθιστούν τον προτεινόμενο ανοσοαισθητήρα κατάλληλο για επιτόπιες αναλύσεις στο πεδίο δειγματοληψίας, κάτι ιδιαίτερα χρήσιμο στις γαλακτοβιομηχανίες.

Το νομοθετικό όριο που έχει τεθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση για την νοθεία του τυριού είναι 1%. Με την μέθοδο που αναπτύχθηκε επετεύχθη όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης (αγελαδινού τυριού σε αιγοπρόβειο) 0.07% (ο/ο) και 0.22% (ο/ο) αντίστοιχα ενώ ο χρόνος ανάλυσης του δείγματος ήταν 5 min.

Σύμφωνα με την βιβλιογραφική μελέτη, έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι που βασίζονται σε DNA με LOD που κυμαίνεται από 0.1% (ο/ο) έως 0.5% (ο/ο), ανοσοχημικές μέθοδοι όπως ταινίες εμβάπτισης με LOD 1% (β/β) και υγροχρωματογραφίας σε συνδυασμό με ηλεκτροφόρηση γέλης πολυακρυλαμιδίου ή φασματομετρία μάζας με LOD 5% (ο/ο) και για τις δύο.

Στην βιβλιογραφία δεν έχει αναπτυχθεί έως σήμερα ηλεκτροχημικός ανοσοαισθητήρας για την ανίχνευση νοθείας αιγοπρόβειου τυριού με αγελαδινό.

Έχουν αναπτυχθεί αισθητήρες τόσο οπτικοί όσο και ηλεκτροχημικοί για την ανίχνευση νοθείας στο γάλα [61-65]. Οι οπτικοί αισθητήρες ήταν βασισμένοι σε συντονισμό επιφανειακών πλάσμονίων και είχαν χρόνους ανάλυσης από 5 έως 10 min και όρια ανίχνευσης από 10 έως 85 ng/mL.

Συμπερασματικά, ο αισθητήρας που αναπτύχθηκε θα μπορούσε σε μελλοντική εφαρμογή να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω και για την ανίχνευση νοθείας αιγοπρόβειου γάλακτος με αγελαδινό.

Πίνακας 8: Αναλυτικές τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί στην βιβλιογραφία για την ανίχνευση νοθείας τυριού

Αναλυτική τεχνική	Δείγμα	Νοθεία με	Όριο ανίχνευσης	Αναφορές
MS	βουβαλίσιο πρόβειο ή κατσικίσιο τυρί	Αγελαδινό τυρόγαλο	0.5% (ο/ο)	26

PCR	βουβαλίσιο τυρί	Αγελαδινό γάλα	0.5% (ο/ο)	20
SDS-PAGE/ RP-HPLC	Mozzarella βουβαλίσια	Αγελαδινό γάλα	5% (β/β)	17
LC-MS	Mozzarella βουβαλίσια	Αγελαδινό γάλα	5% (β/β)	18
MALDI-TOF MS	βουβαλίσιο και πρόβειο τυρί	Αγελαδινό γάλα	-	25
Duplex PCR (διπλή)	κατσικίσιο τυρί	Αγελαδινό γάλα	0.5% (ο/ο)	21
qPCR (τετραπλή)	βουβαλίσιο, πρόβειο ή κατσικίσιο τυρί και γάλα	Αγελαδινό γάλα	0.1% (ο/ο)	22
Sandwich ELISA	βουβαλίσιο πρόβειο και κατσικίσιο τυρί και γάλα	Αγελαδινό γάλα	0.001% (ο/ο) – 0.01% (ο/ο)	29

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ - ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ - ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Πίνακας 9: Ακρωνύμια και η ανάπτυξή τους

ALA	α -Lactalbumin
β -LG	β -Lactoglobulin
γ -LG	γ -Lactoglobulin
BSA	Bovine Serum Albumin
IgG	Immunoglobulin γ
G(C)MP	Glyco(caseino)MacroPeptide
DNA	DeoxyriboNucleic Acid
PCR	Polymerase Chain Reaction
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
Ag	Antigen
Ab	Antibody
PVDF	PolyVinyliDene Dluoride
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
SPR	Surface Plasmon Resonance
CPE	Carbon Paste Electrode
BiFE	Bismuth-Film Electrodes
ΗΛΣΒ	Ηλεκτρόδια λεπτού στρώματος

	Βισμούθιου
ASV	Anodic Stripping Voltammetry

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. B. Walther, A. Schmid, R. Sieber, K. Wehrmüller, Cheese in nutrition and health, *Dairy Science & Technology*, 2008, 88, 389-405.
2. P. F. Fox, T. P. O'Connor, P. L. H. McSweeney, T. P. Guinee, N. M. O'Brien, Cheese: physical, biochemical, and nutritional aspects, *Advances in Food Nutrition Research*, 1996, 39, 163–328.
3. www.cheese.com (visited September, 2019).
4. P. F. Fox, T. Uniacke-Lowe, P. L. H. McSweeney, J. A. O'Mahony, Dairy Chemistry and Biochemistry, Book, Second Edition, *Springer*, 2015.
5. H. Matsuo, T. Yokooji, T. Taogoshi, Common food allergens and their IgE-binding epitopes, *Allergology International*, 2015, 64, 332–343.
6. C. Villa, J. Costa, M. B. P. P. Oliveira, I. Mafrá, Bovine Milk Allergens: A Comprehensive Review, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2017, 17, 137-164.
7. L. Monaci, V. Tregoeat, A. J. van Hengel, E. Anklam, Milk allergens, their characteristics and their detection in food: A review, *European Food Research and Technology*, 2006, 223, 149-179.
8. L. K. Creamer, J. E. Plowman, M. J. Liddell, M. H. Smith, J. P. Hill, Micelle Stability: κ -Casein Structure and Function, *Journal of Dairy Science*, 1998, 81, 3004-3012.
9. C. Thoma-Worringer, J. Sørensen, R. Lopez-Fandino, Health effects and technological features of caseinomacropeptide, *International Dairy Journal*, 2006, 16, 1324-1333.
10. Neelima, R. Sharma, Y. S. Rajput, B. Mann, Chemical and functional properties of glycomacropeptide (GMP) and its role in the detection of cheese whey adulteration in milk: a review, *Dairy Science & Technology*, 2013, 93, 21-43.
11. European Parliament and Council, Off. J. Eur. Communities, 2000, L109:29-42.
12. European Parliament and Council, Off. J. Eur. Communities, 2003, L308:15-18.
13. C. Maudet, P. Taberlet, Detection of cows' milk in goats' cheeses inferred from mitochondrial DNA polymorphism, *Journal of Dairy Research*, 2001, 68, 229-235.
14. B. Shatenstein, P. Ghadirian, Influences on diet, health behaviours and their outcome in select ethnocultural and religious groups, *Nutrition*, 1998, 14, 223-230.
15. R. Malviya, V. Bansal, O. P. Pal, P. K. Sharma, High performance liquid chromatography: a short review, *Journal of Global Pharma Technology*, 2010, 2, 22-26.

16. T. M. Campos Motta, R. B. Hoff, F. Barreto, R. B. S. Andrade, D. M. Lorenzini, L. Z. Meneghini, T. M. Pizzolato, Detection and confirmation of milk adulteration with cheese whey using proteomic-like sample preparation and liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry analysis, *Talanta*, 2014, 120, 498-505.
17. B.-H. R. F. Goncalves, G. de J. Silva, S. F. O. Pontes, R. da C. I. Fontan, A. S. do Egito, S. P. B. Ferrao, Evaluation of the peptide profile with a view to authenticating buffalo mozzarella cheese, *International Journal of Food Science and Technology*, 2016, 51, 1586-1593.
18. C. Dal Bosco, S. Panero, M. A. Navarra, P. Tomai, R. Curini, A. Gentili, Screening and assessment of low-molecular-weight biomarkers of milk from cow and water buffalo: an alternative approach for the rapid identification of adulterated water buffalo mozzarellas, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66, 5410-5417.
19. R. E. Poms, E. Anklam, M. Kuhn, Polymerase chain reaction techniques for food allergen detection, *Journal of AOAC International*, 2004, 87, 1391-1397.
20. M. Feligini, I. Bonizzi, V. C. Curik, P. Parma, G. F. Greppi, G. Enne, Detection of adulteration in Italian mozzarella cheese using mitochondrial DNA templates as biomarkers, *Food Technology and Biotechnology*, 2005, 43, 91-95.
21. L. P. Golinelli, A. C. Carvalho, R. S. Casaes, C. S. C. Lopes, R. Deliza, V. M. F. Paschoalin, J. T. Silva, Sensory analysis and species-specific PCR detect bovine milk adulteration of frescal (fresh) goat cheese, *Journal of Dairy Science*, 2014, 97, 6693-6699.
22. C. Agrimonti, A. Pirondini, M. Marmiroli, N. Marmiroli, A quadruplex PCR (qPCR) assay for adulteration in dairy products, *Food Chemistry*, 2015, 187, 58-64.
23. A. K. Seckin, B. Yilmaz, H. Tosun, Real-time PCR is a potential tool to determine the origin of milk used in cheese production, *LWT - Food Science and Technology*, 2017, 77, 332-336.
24. A. El-Aneed, A. Cohen, J. Banoub, Mass spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI and commonly used mass analyzers, *Applied Spectroscopy Reviews*, 2009, 44, 210-230.
25. R. Cozzolino, S. Passalacqua, S. Salemi, D. Garozzo, Identification of adulteration in water buffalo mozzarella and in ewe cheese by using whey protein as biomarkers and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry*, 2002, 37, 985-991.
26. S. Camerini, E. Montepeloso, M. Casella, M. Crescenzi, R. M. Marianella, F. Fuselli, Mass spectrometry detection of fraudulent

- use of cow whey in water buffalo, sheep, or goat Italian ricotta cheese, *Food Chemistry*, 2016, 197, 1240-1248.
27. D. Nardiello, A. Natale, C. Palermo, M. Quinto, D. Centonze, Milk authenticity by ion-trap proteomics following multi-enzyme digestion, *Food Chemistry*, 2018, 244, 317-323.
 28. S. Aydin, A short history, principles and types of ELISA and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA, *Peptides*, 2015, 72, 4-15.
 29. 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, 805-812.
 30. N. A. Chavez, J. Jaurequi, L. A. Palomares, K. E. Macias, M. Jimenez, E. Salinas, A highly sensitive sandwich ELISA for the detection of glycomacropeptide to detect liquid whey in raw milk, *Dairy Science & Technology*, 2012, 92, 121-132.
 31. 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, *Z. Lebensm Unters Forsch A*, 1997, 204, 21-26.
 32. H. Song, H. Xue, Y. Han, Detection of cow's milk in Shaanxi goat's milk with an ELISA assay, *Food Control*, 2011, 22, 883-887.
 33. N. S. Sava, G. Rapeanu, Identification of adulterated sheep and goat cheeses marketed in Romania by immunochromatographic assay, *Food and Agricultural Immunology*, 2010, 21, 157-164.
 34. P. Galan-Malo, I. Mendiara, P. Razquin, L. Mata, Validation of a rapid lateral flow method for the detection of cows' milk in water buffalo, sheep or goat milk, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2018, 35, 599-604.
 35. W. N. Burnette, "Western Blotting": Electrophoretic Transfer of Proteins from Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gels to Unmodified Nitrocellulose and Radiographic Detection with Antibody and Radioiodinated Protein A, *Analytical Biochemistry*, 1981, 112, 195-203.
 36. N. A. Chavez, E. Salinas, J. Jaurequi, L. A. Palomares, K. Macias, Detection of bovine milk adulterated with cheese whey by western blot immunoassay, *Food and Agricultural Immunology*, 2008, 19, 265-272.
 37. B. Nagel, H. Dellweg, L. M. Gierasch, Glossary for chemists of terms used in biotechnology, *Pure & Applied Chemistry*, 1992, 64, 143-168.
 38. P. S. Petrou, D. Ricklin, M. Zavali, I. Raptis, S. E. Kakabakos, K. Misiakos, J. D. Lambris, Real-time label-free detection of complement activation products in human serum by white light

- reflectance spectroscopy, *Biosensors & Bioelectronics*, 2009, 24, 3359-3364.
39. H. Nakamura, I. Karube, Current research activity in biosensors, *Analytical & Bioanalytical Chemistry*, 2003, 377, 446-468.
 40. N. Bhalla, P. Jolly, N. Formisano, P. Estrela, Introduction to biosensors, *Essays in Biochemistry*, 2016, 60, 1-8.
 41. W. S. Hughes, The potential difference between glass and electrolytes in contact with the glass, *Journal of the American Chemical Society*, 1992, 44, 2860-2867.
 42. W. R. Heineman, W. B. Jensen, Leland C. Clark Jr. (1918-2005), *Biosensors & Bioelectronics*, 21, 1403-1404.
 43. G. G. Guilbault, J. G. Montalvo Jr., Urea-specific enzyme electrode, *Journal of the American Chemical Society*, 1969, 91, 2164-2165.
 44. P. Bergveld, Development of an Ion-Sensitive Solid-State Device for Neurophysiological Measurements, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 1970, BME-17, 70-71.
 45. E.-H. Yoo, S.-Y. Lee, Glucose Biosensors: an overview of use in clinical practice, *Sensors*, 2010, 10, 4558-4576.
 46. S. Suzuki, F. Takahashi, I. Satoh, N. Sonobe, Ethanol and Lactic Acid Sensors Using Electrodes Coated with Dehydrogenase-Collagen Membranes, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 1975, 48, 3246-3249.
 47. US4344438, *United States Patent*, 1982.
 48. B. Liedberg, C. Nylander, I. Lundstrom, Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing, *Sensors and Actuators*, 1983, 4, 299-304.
 49. D. R. Thevenot, K. Toth, R. A. Durst, G. S. Wilson, Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification, *Biosensors & Bioelectronics*, 2001, 16, 121-131.
 50. A. F. Collings, F. Caruso, Biosensors: recent advances, *Rep. Prog. Phys.*, 1997, 60, 1397-1445.
 51. X. Fan, I. M. White, S. I. Shopova, H. Zhu, J. D. Suter, Y. Sun, Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review, *Analytica Chimica Acta*, 2008, 620, 8-26.
 52. P. D'Orazio, Biosensors in clinical chemistry, *Clinica Chimica Acta*, 2003, 334, 41-69
 53. R. A. Potyrailo, S. E. Hobbs, G. M. Hieftje, Optical waveguide sensors in analytical chemistry: today's instrumentation, applications and trends for future development, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 1998, 362, 349-373.
 54. L. Polerecky, J. Hamrle, B. D. MacCraith, Theory of the radiation of dipoles placed within a multilayer system, *Applied Optics*, 2000, 39, 3968-3977.

55. C. R. Taitt, G. P. Anderson, F. S. Ligler, Evanescent wave fluorescence biosensors: Advances of the last decade, *Biosensors & Bioelectronics*, 2016, 76, 103-112.
56. W. Lukosz, Principles and sensitivities of integrated optical and surface plasmon sensors for direct affinity sensing and immunosensing, *Biosensors & Bioelectronics*, 1991, 6, 215-225.
57. D.-K. Kim, K. Kerman, M. Saito, R. R. Sathuluri, T. Endo, S. Yamamura, Y.-S. Kwon, E. Tamiya, Label-free DNA biosensor based on localized surface plasmon resonance coupled with interferometry, *Analytical Chemistry*, 2007, 79, 1855-1864.
58. P. Kozma, F. Kehl, E. Ehrentreich-Forster, C. Stamm, F. F. Bier, Integrated planar optical waveguide interferometer biosensors: a comparative review, *Biosensors & Bioelectronics*, 2014, 58, 287-307.
59. K. Misiakos, I. Raptis, A. Salapatas, E. Makarona, A. Botsialas, M. Hoekman, R. Stoffer, G. Jobst, Broad-band Mach-Zehnder interferometers as high performance refractive index sensors: Theory and monolithic implementation, *Optics Express*, 2014, 22, 8856-8870.
60. A. Ymeti, J. Greve, P. V. Lambeck, T. Wink, van Hovell, Beumer, R. R. Wijn, R. G. Heiderman, V. Subramaniam, J. S. Kanger, Fast, ultrasensitive virus detection using a yound interferometer sensor, *Nano Letters*, 2007, 7, 394-397.
61. S. Muller-Renaud, D. Dupont, P. Dulieu, Quantification of κ -casein in milk by an optical immunosensor, *Food and Agricultural immunology*, 2003, 15, 265-277.
62. S. Muller-Renaud, D. Dupont, P. Dulieu, Quantification of β -casein in milk and cheese using an optical immunosensor, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52, 659-664.
63. W. Haasnoot, N. G. E. Smits, A. E. M. Kemmers-Voncken, M. G. E. G. Bremer, Fast biosensor immunoassays for the detection of cows' milk in the milk of ewes and goats, *Journal of Dairy Research*, 2004, 71, 322-329.
64. W. Haasnoot, G. R. Marchesini, K. Koopal, Spreeta-Based biosensor Immunoassays to detect fraudulent adulteration in milk and milk powder, *Journal of AOAC International*, 2006, 89, 849-855.
65. H. M. Hiep, T. Endo, K. Kerman, M. Chikae, D.-K. Kim, S. Yamamura, Y. Takamura, E. Tamiya, A localized surface plasmon resonance based immunosensor for the detection of casein in milk, *Science and Technology of Advanced Materials*, 2007, 8, 331-338.
66. M. Angelopoulou, A. Botsialas, A. Salapatas, P. S. Petrou, W. Haasnoot, E. Makarona, G. Jobst, D. Goustouridis, A. Siafaka-Kapadai, I. Raptis, K. Misiakos, S. E. Kakabakos, Assessment of goat milk adulteration with a label-free monolithically integrated

- optoelectronic biosensor, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2015, 407, 3995-4004.
67. S. Viswanathan, H. Radecka, J. Radecki, Electrochemical biosensors for food analysis, *Monatsh Chem*, 2009, 140, 891-899.
 68. D. Grieshaber, R. MacKenzie, J. Voros, E. Reimhult, Electrochemical biosensors - Sensor Principles and Architectures, *Sensors*, 2008, 8, 1400-1458.
 69. M. Diaz-Gonzalez, M. B. Gonzalez-Garcia, A. Costa-Garcia, Recent advances in electrochemical enzyme immunoassays, *Electroanalysis*, 2005, 17, 1901-1916.
 70. J. Heyrovsky, Elektrolýsa se rtufovou kapkovou kathodou, *Chemické Listy*, 1922, 16, 256-264.
 71. J. B. Flato, The renaissance in polarographic and voltammetric analysis, *Analytical Chemistry*, 1972, 44, 75-87.
 72. J. Wang, Chapter : Stripping Analysis, Bard AJ, ed. Encyclopedia of Electrochemistry, 2007, 125-133.
 73. Μάμαντος Προδρομίδης, Ηλεκτροχημικοί αισθητήρες και βιοαισθητήρες, Εκδόσεις Κωσταράκη, 2017.
 74. R. N. Adams, Carbon paste electrodes, *Analytical Chemistry*, 1958, 30, p. 1576.
 75. Y. Bonfil, E. Kirowa-Eisner, Determination of nanomolar concentrations of lead and cadmium by anodic-stripping voltammetry at the silver electrode, *Analytica Chimica Acta*, 2002, Vol, 457, 285-296.
 76. Παναγιώτης Δημοβασίλης, Ανάπτυξη χημικών αισθητήρων ραδιονουκλιδίων και βαρέων μετάλλων πάνω σε τροποποιημένα ηλεκτρόδια στερεάς κατάστασης και εκτυπωμένα ηλεκτρόδια πλέγματος, Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 2013. .
 77. J. Wang, B. Tian, Mercury-Free disposable lead sensors based on potentiometric stripping analysis at gold-coated screen-printed electrodes, *Analytical Chemistry*, 1993, 65, 1529-1532.
 78. J. Wang, J. Lu, S. B. Hocevar, P. A. M. Farias, bismuth-coated carbon electrodes for anodic stripping voltammetry, *Analytical Chemistry*, 2000, 72, 3218-3222.
 79. J. Wang, J. Lu, U. A. Kirgoz, S. B. Hocevar, B. Ogorevc, Insights into the anodic stripping voltammetric behavior of bismuth film electrodes, *Analytica Chimica Acta*, 2001, 434, 29-34.
 80. G. Kefala, A. Economou, A. Voulgaropoulos, M. Sofoniou, A study of bismuth-film electrodes for the detection of trace metals by anodic stripping voltammetry and their application to the determination of Pb and Zn in tapwater and human hair, *Talanta*, 2003, 61, 603-610.
 81. A. Krollicka, A. Bobrowski, K. Kalcher, J. Mocak, I. Svancara, K. Vytras, Study on catalytic adsorptive stripping voltammetry of trace

- cobalt at bismuth film electrodes, *Electroanalysis*, 2003, 15, 1859-1863.
82. S. Legeai, O. Vittori, A Cu/Nafion/Bi electrode for on-site monitoring of trace heavy metals in natural waters using anodic stripping voltammetry: an alternative to mercury-based electrodes, *Analytica Chimica Acta*, 2006, 560, 184-190.
 83. J. Wang, J. Lu, S. B. Hocevar, B. Ogorevc, Bismuth-coated screen-printed electrodes for stripping voltammetric measurements of trace lead, *Electroanalysis*, 2001, 13, 13-16.
 84. U. A. Kirgoz, S. Marin, M. Pumera, A. Merkoci, S. Alegret, Stripping voltammetry with bismuth modified graphite-epoxy composite electrodes, *Electroanalysis*, 2005, 17, 881-886.
 85. N. Lezi, A. Economou, P. A. Dimovasilis, P. N. Trikalitis, M. I. Prodromidis, Disposable screen-printed sensors modified with bismuth precursor compounds for the rapid voltammetric screening of trace Pb(II) and Cd(II), *Analytica Chimica Acta*, 2012, 728, 1-8.
 86. J. Kruusma, C. E. Banks, R. G. Compton, Mercury-free sono-electroanalytical detection of lead in human blood by use of bismuth-film-modified boron-doped diamond electrodes, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2004, 379, 700-706.
 87. L. Baldrianova, I. Svancara, A. Economou, S. Sotiropoulos, Anodic stripping voltammetry at in situ bismuth-plated carbon and gold microdisc electrodes in variable electrolyte content unstirred solutions, *Analytica Chimica Acta*, 2006, 580, 24-31.
 88. S. B. Hocevar, B. Ogorevc, J. Wang, B. Pihlar, A study on operational parameters for advanced use of Bismuth film electrode in anodic stripping voltammetry, *Electroanalysis*, 2002, 14, 1707-1712.
 89. R. T. Kachoosangi, C. E. Banks, X. Ji, R. G. Compton, Electroanalytical determination of Cadmium(II) and Lead(II) using an in-situ Bismuth film modified edge plane pyrolytic graphite electrode, *Analytical Sciences*, 2007, 23, 283-289.
 90. A. Krolicka, R. Pauliukaite, I. Svancara, R. Metelka, A. Bobrowski, E. Norkus, K. Kalcher, K. Vytras, Bismuth-film-plated carbon paste electrodes, *Electrochemistry Communications*, 2002, 4, 193-196.
 91. J. Wang, Stripping analysis at bismuth electrodes: a review, *Electroanalysis*, 2005, 17, 1341-1346.
 92. Z. Farka, T. Jurik, D. Kovar, L. Trnkova, P. Skladal, Nanoparticle-based immunochemical biosensors and assays: recent advances and challenges, *Chemical Reviews*, 2017, 117, pp, 9973-10042.
 93. P. Alivisatos, The use of nanocrystals in biological detection, *Nature Biotechnology*, 2004, 22, 47-52.
 94. Q. Cao, H. Zhao, Y. Yang, Y. He, N. Ding, J. Wang, Z. Wu, K. Xiang, G. Wang, Electrochemical immunosensor for casein based on gold nanoparticles and poly(L-Arginine)/multi-walled carbon

- nanotubes composite film functionalized interface, *Biosensors & Bioelectronics*, 2011, 26, 3469-3474.
95. W. R. de Araujo, T. R. L. C. Paixao, Use of copper electrode for melamine quantification in milk, *Electrochimica Acta*, 2014, 117, 379-384.
 96. C. Kokkinos, M. Angelopoulou, A. Economou, M. Prodromidis, A. Florou, W. Haasnoot, P. Petrou, S. Kakabakos, Lab-on-a-Membrane foldable devices for duplex drop-volume electrochemical biosensing using quantum dot tags, *Analytical Chemistry*, 2016, 88, 6897-6904.
 97. K. Rovina, S. Siddiquee, Electrochemical sensor based rapid determination of melamine using ionic liquid/zinc oxide nanoparticles/chitosan/gold electrode, *Food Control*, 2016, 59, 801-808.