



Σχολή Θετικών Επιστημών και Τεχνολογίας
Χημική και Βιομοριακή Ανάλυση

Διπλωματική εργασία

Αναλυτικές Μέθοδοι Ανίχνευσης και Ποσοτικοποίησης της Νοθείας
στο Γάλα με Φυτικά Έλαια

Αναστασία Καραναστάση

Επιβλέπων καθηγητής: Χρήστος Κοντογιάννης

Πάτρα, Φεβρουάριος 2025

Η παρούσα εργασία αποτελεί πνευματική ιδιοκτησία του/της φοιτητή/φοιτήτριας («συγγραφέας/δημιουργός») που την εκπόνησε. Στο πλαίσιο της πολιτικής ανοικτής πρόσβασης ο συγγραφέας/δημιουργός εκχωρεί στο ΕΑΠ, μη αποκλειστική άδεια χρήσης του δικαιώματος αναπαραγωγής, προσαρμογής, δημόσιου δανεισμού, παρουσίας στο κοινό και ψηφιακής διάχυσής τους διεθνώς, σε ηλεκτρονική μορφή και σε οποιονδήποτε μέσο, για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, άνευ ανταλλάγματος και για όλο το χρόνο διάρκειας των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας. Η ανοικτή πρόσβαση στο πλήρες κείμενο για μελέτη και ανάγνωση δεν σημαίνει καθ' οιονδήποτε τρόπο παραχώρηση δικαιωμάτων διανοητικής ιδιοκτησίας του συγγραφέα/δημιουργού ούτε επιτρέπει την αναπαραγωγή, αναδημοσίευση, αντιγραφή, αποθήκευση, πώληση, εμπορική χρήση, μετάδοση, διανομή, έκδοση, εκτέλεση, «μεταφόρτωση» (downloading), «ανάρτηση» (uploading), μετάφραση, τροποποίηση με οποιονδήποτε τρόπο, τμηματικά ή περιληπτικά της εργασίας, χωρίς τη ρητή προηγούμενη έγγραφη συναίνεση του συγγραφέα/δημιουργού. Ο συγγραφέας/δημιουργός διατηρεί το σύνολο των ηθικών και περιουσιακών του δικαιωμάτων.

Αναλυτικές Μέθοδοι Ανίχνευσης και Ποσοτικοποίησης της Νοθείας στο Γάλα με Φυτικά Έλαια

Αναστασία Καραναστάση

Επιτροπή Επίβλεψης Διπλωματικής Εργασίας

:

Επιβλέπων Καθηγητής: Χρήστος Κοντογιάννης
Καθηγητής Τμήματος Φαρμακευτικής
Πανεπιστημίου Πατρών

Συν-Επιβλέπων Καθηγητής: Μαλβίνα Όρκουλα
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμήματος Φαρμακευτικής
Πανεπιστήμιο Πατρών.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Χρήστο Κοντογιάννη για την επιλογή του θέματος της διπλωματικής εργασίας, και την καθοδήγηση του κατά την διάρκεια της συγγραφής της. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την οικογένειά μου.

Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια, η παραγωγή και η κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων σημειώνουν σημαντική αύξηση σε παγκόσμιο επίπεδο. Λόγω της υψηλής διατροφικής τους αξίας, τα γαλακτοκομικά προϊόντα, είτε ως νωπό γάλα είτε ως παράγωγα, είναι ιδιαίτερα ευάλωτα σε πρακτικές παραποίησης και απάτης. Η νοθεία στο γάλα περιλαμβάνει συχνά την προσθήκη φθηνών ή χαμηλής ποιότητας υποκατάστατων, με στόχο την αύξηση του βάρους ή του όγκου του προϊόντος. Το οικονομικό κέρδος αποτελεί έναν από τους κύριους λόγους για τέτοιες πρακτικές. Οποιαδήποτε μορφή νοθείας που υφίσταται το γάλα μπορεί να επιφέρει σοβαρές συνέπειες στην δημόσια υγεία και γι' αυτό το λόγο καθίσταται αναγκαία η εύρεση μεθόδων για την ανίχνευση και ποσοτικοποίησης της εκάστοτε. Η συγκεκριμένη εργασία εμβαθύνει στη νοθεία του γάλακτος που προκύπτει από τη προσθήκη φυτικών ελαίων και στόχος της είναι να παρουσιάσει τις αναλυτικές μεθόδους βάσει των οποίων θα γίνει η ποσοτικοποίηση της συγκεκριμένης νοθείας. Στην εισαγωγή, περιγράφεται αναλυτικά η σύσταση του γάλακτος, καθώς και η βιοσύνθεση των συστατικών του. Στο δεύτερο κεφάλαιο, αναφέρονται τα είδη νοθείας που συναντώνται στο γάλα και δίνεται έμφαση στη νοθεία από φυτικά έλαια. Στο τρίτο κεφάλαιο, αναφέρονται οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται γενικά για την ανίχνευση της νοθείας του γάλακτος, καθώς και μελέτες που αφορούν αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ποσοτικοποίηση της νοθείας με φυτικά έλαια. Τέλος, γίνεται μια σύγκριση των μεθόδων που αναφέρθηκαν.

ANALYTICAL METHODS FOR THE DETECTION AND QUANTIFICATION OF ADULTERATION IN MILK WITH VEGETABLES OILS

ANASTASIA KARANASTASI

Abstract

In recent years, the production and consumption of dairy products have increased significantly worldwide. Due to their high nutritional value, dairy products, whether as raw milk or as derivatives, are particularly vulnerable to adulteration and fraud practices. Adulteration of milk often involves the addition of cheap or low-quality substitutes, with the aim of increasing the weight or volume of the product. Financial gain is one of the main reasons for such practices. Any form of adulteration of milk can have serious consequences for public health and for this reason it is necessary to find methods for its detection and quantification. This specific work delves into the adulteration of milk resulting from the addition of vegetable oils and its aim is to present the analytical methods based on which the quantification of this adulteration will be carried out. In the introduction, the composition of milk is described in detail, as well as the biosynthesis of its components. In the second chapter, the types of adulteration found in milk are mentioned, with emphasis on adulteration by vegetable oils. In the third chapter, the methods generally used for the detection of milk adulteration are mentioned, as well as studies concerning analytical techniques used for the quantification of adulteration with vegetable oils. Finally, a comparison of the methods mentioned is made.

Περιεχόμενα

Περίληψη	5
Abstract	6
Περιεχόμενα	7

Κατάλογος Σχημάτων/Εικόνων	9
Κατάλογος Πινάκων	10
1. Εισαγωγή	11
1.1 Ορισμός του γάλακτος	11
1.2 Η σύσταση του γάλακτος	12
1.3 Σχηματισμός του γάλακτος - Βιοσύνθεση των συστατικών του	15
1.3.1 Πρωτεΐνες	15
1.3.2 Λιπίδια	16
1.3.3 Λακτόζη	17
1.4 Έλεγχος χημικής σύστασης του γάλακτος	18
1.4.1 Λίπος	18
1.4.2 Αζωτούχες Ενώσεις	20
1.4.3 Στερεό υπόλειμμα άνευ λίπους (ΣΥΑΛ)	22
1.4.4 Λακτόζη	22
2. Νοθεία στο γάλα	23
2.1 Είδη νοθείας στο γάλα	24
2.1.1 Προσθήκη νερού	24
2.1.2 Μείωση λιποπεριεκτικότητας	26
2.1.3 Ταυτόχρονη προσθήκη και αφαίρεση λίπους (διπλή νοθεία)	27
2.1.4 Παραπλανητική ένδειξη ως προς το είδος γάλακτος	28
2.1.5 Περισσότερα είδη νοθείας	29
2.2. Νοθεία στο γάλα με φυτικά έλαια	30
2.2.1 Λίπος γάλακτος	31
2.2.2 Φυτικά έλαια	34
3. Μέθοδοι ανίχνευσης νοθείας στο γάλα	37
3.1 Τεχνικές ανίχνευσης νοθείας με ανάμιξη γάλακτος διαφορετικών ειδών	37
3.2 Τεχνικές ηλεκτρομετανάστευσης	39
3.2.1 Ηλεκτροφόρηση	40
3.2.2 Ισοηλεκτρική εστίαση (IEF)	40
3.2.3 Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (CE)	41
3.3 Ανοσοχημικές μέθοδοι	42

3.4 Τεχνικές βασισμένες στην ανάλυση DNA	44
3.5 Χρωματογραφικές τεχνικές	44
3.5.1 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)	46
3.5.2 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης(RP-HPLC)..	48
3.5.3 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ανταλλαγής ιόντων (IEHPLC)....	49
3.5.4 Υγρή χρωματογραφία (LC)	50
3.5.5 Αέρια χρωματογραφία (GC)	50
3.6 Οργανοληπτικός έλεγχος	52
3.7 Μέθοδοι φασματοσκοπίας	54
3.7.1 Φασματοσκοπία φθορισμού	55
3.7.2 Φασματοσκοπία υπερύθρου	58
3.7.3 Ολική ανάκλαση και ανάλυση ελαχίστων τετραγώνων	62
3.7.4 Τεχνικές φασματοσκοπίας και χημειομετρίας	63
3.7.5 Σύγκριση φασματοσκοπικών τεχνικών και HPLC	63
3.8 Φασματομετρία μάζας	64
3.8.1 Φασματομετρία μάζας με ηλεκτροψεκασμό	65
3.8.2 Εκρόφηση/ιονισμός λέιζερ υποβοηθούμενη μήτρα (MALDI)	67
3.9. Επισκόπηση μεθόδων ανίχνευσης φυτικών ελαίων	70
4. Σύγκριση αναλυτικών τεχνικών για ανίχνευση νοθείας με φυτικά έλαια	80
4.1 Μελλοντικές προοπτικές	83

Κατάλογος Σχημάτων/Εικόνων

Σχήμα 2-1 Καμπύλη υπέρψυξης του νερού	26
Σχήμα 2-2 Συσκευή κρυοσκοπίου	26
Σχήμα 3-1 Διάταξη υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)	48
Σχήμα 3-2 Αέριος χρωματογράφος	51
Σχήμα 3-3 Ποτενσιομετρική συσκευή	54

Σχήμα 3-4	Διάγραμμα διέγερσης και αποδιέγερσης ηλεκτρονίων	56
Σχήμα 3-5	Διάγραμμα απεικόνισης φθορισμού και διέγερσης	56
Σχήμα 3-6	Διάγραμμα φασμάτων απορρόφησης και εκπομπής	57
Σχήμα 3-7	Διαγραμματική απεικόνιση φθορισμόμετρου	57
Σχήμα 3-8	Διάγραμμα φασματοφωτομέτρου υπερύθρου διπλής δέσμης	59
Σχήμα 3-9	Η φασματομετρία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR).....	60
Σχήμα 3-10	Φάσματα NIR νοθευμένου και καθαρού γάλακτος	61
Σχήμα 3-11	Μονοδιάστατα φάσματα NIR νοθευμένου και καθαρού γάλακτος	62
Σχήμα 3-12	Απεικόνιση διαγράμματος φασματοφωτομέτρου μαζών	67
Σχήμα 3-13	Διάγραμμα οργάνου MALDI TOF	69

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1-1	Κύρια και δευτερεύοντα συστατικά του αγελαδινού γάλακτος.....	13
Πίνακας 1-2	Μέση σύσταση των κυριότερων συστατικών του γάλακτος στο αγελαδινό, στο ανθρώπινο, στο γίδινο και στο πρόβειο	14
Πίνακας 2-1	Μεταβολές των ιδιοτήτων του γάλακτος και των χαρακτηριστικών του	

κατά τη νοθεία	27
Πίνακας 2-2 Σύνθεση λιπαρών οξέων σε γάλα τριών ειδών ζώων γαλακτοπαραγωγής.....	32
Πίνακας 2-3 Ετήσια μέση παραγωγή 17 ελαίων και λιπών σε επιλεγμένες περιόδους πενταετίας	35
Πίνακας 3-1 Τεχνικές που χρησιμοποιούνται για ανίχνευση διαφόρων πρωτεϊνών μεταξύ διαφορετικών είδη ζώων	39
Πίνακας 3-2 Χρωματογραφικές τεχνικές: Αρχή τεχνικής και παραδείγματα εφαρμογών	46
Πίνακας 4-1 Αναλυτικές τεχνικές ανίχνευσης φυτικών ελαίων	81

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

Το γάλα αποτελεί προϊόν έκκρισης του μαστικού αδένος των θηλαστικών, το οποίο προορίζεται για τη διατροφή του νεογέννητου, αποτελώντας τη μοναδική του τροφή μέχρι μια συγκεκριμένη ηλικία. Για τον άνθρωπο όμως, το γάλα παραμένει μέρος της καθημερινής διατροφής του, είτε αυτούσιο αφού υποστεί κάποια κατεργασία (ομογενοποίηση, παστερίωση) είτε με τη μορφή γαλακτοκομικών προϊόντων (βούτυρο, τυριά, γιαούρτη κλπ.), για όλη τη

διάρκεια της ζωής του, καθώς του παρέχει ενέργεια, πρωτεΐνες υψηλής βιολογικής αξίας, καθώς και ζωτικές βιταμίνες και μέταλλα. [1]

Σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών “γάλα είναι το απαλλαγμένο από πρωτόγαλα προϊόν του ολοσχερούς, χωρίς διακοπή αρμέγματος υγιούς γαλακτοφόρου ζώου, που ζει και τρέφεται υπό υγιεινούς όρους και που δεν βρίσκεται σε κατάσταση υπερκόπωσης”, ενώ “νωπό γάλα νοείται το γάλα που εκκρίνεται από τους μαστικούς αδένες μιας ή περισσότερων αγελάδων, προβατινών, αιγών ή βουβαλίδων το οποίο δεν έχει θερμανθεί πέραν των 40°C, ούτε έχει υποβληθεί σε επεξεργασία με ισοδύναμο αποτέλεσμα”. [2]

Σύμφωνα με τον ορισμό του Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών και του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (Food and Agriculture Organization of the United Nations και World Health Organization, FAO/WHO) “γάλα είναι το φυσιολογικό έκκριμα του μαστού που παίρνεται από μία από μία ή δύο αμέλξεις χωρίς να προστεθεί ή να αφαιρεθεί τίποτε”. [3]

Από ιστορική άποψη δεν είναι σαφές πότε χρησιμοποιήθηκε από τον άνθρωπο για πρώτη φορά το γάλα των ζώων ως τροφή. Είναι πιθανό η χρησιμοποίηση του γάλακτος να συνέπεσε με την εξημέρωση των γαλακτοπαραγωγών ζώων. Από εκείνους τους χρόνους (προϊστορία) ο άνθρωπος κατάφερε και την παρασκευή ορισμένων γαλακτοκομικών προϊόντων (βούτυρο, ξινόγαλα, γιαούρτη, τυριά) με εμπειρικές μεθόδους, στα πλαίσια της οικιακής οικονομίας. Η γαλακτοκομία άρχισε σιγά σιγά να αναπτύσσεται ως επιστήμη μετά το 13ο αιώνα, όμως τον 20ο αιώνα μαζί με την επιστήμη της ζωοτεχνίας σημείωσαν, αλματώδη εξέλιξη. [4]

1.2 ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

Το γάλα αποτελεί ένα κολλοειδές εναιώρημα, το οποίο απαρτίζεται από γαλακτοποιημένα σφαιρίδια λίπους διαμέτρου 1-5μm, μια ετερογενή ομάδα πρωτεϊνών, τη λακτόζη, βιταμίνες, άλατα και ένζυμα. Το λίπος και η λακτόζη αποτελούν τα κύρια συστατικά του και βάση αυτών προσδιορίζεται η διατροφική και η εμπορική του αξία. Εκτός από τα κύρια αυτά συστατικά του, το γάλα περιέχει και εκατοντάδες άλλα συστατικά σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, όπως βιταμίνες, άλατα, ένζυμα και ιχνοστοιχεία, τα οποία καθορίζουν τις βιολογικές και τεχνολογικές του ιδιότητες. Μέχρι σήμερα, τα γάλατα των θηλαστικών που έχουν μελετηθεί

έχουν παρόμοια γενικά χαρακτηριστικά και αποτελούνται από ένα πλήθος όμοιων συστατικών σε διαφορετικές αναλογίες. Το αγελαδινό είναι το είδος γάλακτος που έχει μελετηθεί περισσότερο από όλα, καθώς παράγεται σε μεγάλες ποσότητες, κυρίως σε χώρες οικονομικά και τεχνολογικά ανεπτυγμένες. [5]

Το νερό είναι το συστατικό που βρίσκεται σε μεγαλύτερη αφθονία στο γάλα, το οποίο περιέχει και όλα τα στερεά του συστατικά στο σύνολο τους. Το λίπος αποτελείται από τριγλυκερίδια, τα λιπαρά οξέα των οποίων διαφέρουν αρκετά ως προς τον αριθμό των διπλών δεσμών και το μέγεθος (2-20 άτομα C). Διάφορα άλλα λιπίδια όπως φωσφολιπίδια, ελεύθερα λιπαρά οξέα, φωσφολιπίδια και διγλυκερίδια απαντώνται σε μικρότερες ποσότητες. [6]

Η λακτόζη, ο αναγωγικός αυτός δισακχαρίτης που αποτελείται από γλυκόζη και γαλακτόζη αποτελεί τον χαρακτηριστικό υδατάνθρακα του γάλακτος. Ο υδατάνθρακας αυτός απαντάται σε δύο ισομερείς μορφές, την α- και β- λακτόζη, οι οποίες διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την γλυκύτητα και άλλες φυσικές ιδιότητες όπως την στροφική ικανότητα, την διαλυτότητα κ.ά. [7]

Η καζεΐνη αποτελεί περίπου το 80% των πρωτεϊνών του γάλακτος, ενώ το υπόλοιπο 20% αποτελείται από τις πρωτεΐνες του ορού και από διάφορες άλλες πρωτεΐνες. Απαντάται στο γάλα με τη μορφή κολλοειδών συσσωματωμάτων μέσου μεγέθους και αποτελεί μια σύνθετη πρωτεΐνη που περιέχει στο μόριο της ασβέστιο, φωσφορικό οξύ και μια μικρή ποσότητα υδατανθράκων. Η καζεΐνη συναντάται στο γάλα με τη μορφή καζεϊνικού ασβεστίου και καταβυθίζεται στο ισοηλεκτρικό σημείο που βρίσκεται στο pH=4,6. [7,8]

Από τα συστατικά του γάλακτος που βρίσκονται σε μικρότερες ποσότητες, τα άλατα είναι στην πλειονότητα τους φωσφορικά, χλωριούχα, ανθρακικά, θειικά και δισανθρακικά άλατα των K, Na, Ca, Mg, και οι βιταμίνες χωρίζονται στις λιποδιαλυτές (βρίσκονται στο λίπος του γάλακτος) και στις βιταμίνες B και C (βρίσκονται στην υδατική του φάση). [6]

Συστατικά	Περιεκτικότητα
Κύρια συστατικά (%)	
Νερό	87,60
Στερεά συστατικά άνευ λίπους	8,65
Λακτόζη	4,75
Λίπος	3,75
Πρωτεΐνες	3,25

Μεταλλικά στοιχεία	0,65
Οργανικά Οξέα	0,18
Διάφορα άλλα συστατικά	0,14
Μεταλλικά στοιχεία (mg/l)	
Ασβέστιο	1250
Φώσφορος	1000
Κάλιο	1500
Νάτριο	440
Χλώριο	1050
Μαγνήσιο	130
Ψευδάργυρος	3,9
Σίδηρος	0,2
Βιταμίνες (mg/l)	
Βιταμίνη Α	0,4
Βιταμίνη D	0,0006
Βιταμίνη Ε	0,98
Θειαμίνη, Β1	0,44
Ριβοφλαβίνη, Β2	1,75
Νιασίνη	0,94
Παντοθενικό οξύ	3,46
Βιταμίνη Β6	0,64
Βιοτίνη	0,031
Φυλλικό οξύ	0,050
Βιταμίνη Β12	0,0043
Βιταμίνη C	21,1

Πίνακας 1-1. Κύρια και δευτερεύοντα συστατικά του αγελαδινού γάλακτος.

Τα κύρια αλλά και τα δευτερεύοντα συστατικά του γάλακτος παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές ανάλογα με το είδος του ζώου από το οποίο προέρχονται. Ωστόσο ακόμα και ανάμεσα στο ίδιο είδος ζώου υπάρχουν αποκλίσεις στις τιμές των συστατικών του γάλακτος γεγονός που οφείλεται σε ποικίλους παράγοντες όπως στη διατροφή του ζώου, στη φυλή στην οποία ανήκει, στον τόπο διαβίωσης του, στην ηλικία του κ.ά. [6]
Στον πίνακα 1-2 παραθέτονται συγκριτικά κάποια συστατικά του γάλακτος από 4 διαφορετικά είδη ζώου.

Σύσταση	Αγελαδινό	Ανθρώπινο	Γίδινο	Πρόβειο
Λίπος (%)	3,8	4,0	3,8	7,9

Στερεό υπόλειμμα άνευ λίπους (%)	8,6	8,9	8,9	12,0
Λακτόζη (%)	4,7	6,9	4,1	4,9
Πρωτεΐνη (%)	3,2	1,2	3,4	6,3
Καζεΐνη (%)	2,6	0,4	2,4	4,2
Αλβουμίνη, γλοβουλίνη (%)	0,6	0,7	0,6	1,0
Μη πρωτεϊνικό άζωτο (%)	0,2	0,5	0,4	0,8
Τέφρα (%)	0,7	0,3	0,8	0,9
Θερμίδες/100ml	69	68	70	105

Πίνακας 1-2. Μέση σύσταση των κυριότερων συστατικών του γάλακτος στο αγελαδινό, στο ανθρώπινο, στο γίδινο και στο πρόβειο.

1.3 ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ - ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ

Το γάλα σχηματίζεται στο αδενικό επιθήλιο του μαστικού αδένος, ο οποίος είναι εξαιρετικά οργανωμένος και διαθέτει εντυπωσιακή ικανότητα να μετατρέπει τα θρεπτικά συστατικά που κυκλοφορούν στο αίμα σε συστατικά του γάλακτος. Συγκεκριμένα, το αίμα μεταφέρει στον μαστό τις απαραίτητες δομικές ουσίες, όπου τα επιθηλιακά κύτταρα του είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση των βασικών συστατικών του γάλακτος, όπως πρωτεΐνες, λιπίδια και λακτόζη. Ορισμένα από αυτά τα συστατικά περνούν στο γάλα χωρίς καμία μετατροπή στον μαστικό αδένος, παραμένοντας στην ίδια μορφή όπως στο αίμα [1].

1.3.1 ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Οι κύριες πρωτεΐνες του γάλακτος, όπως οι καζεΐνες, η α-γαλακταλβουμίνη και η β-γαλακτοσφαιρίνη, που αποτελούν πάνω από το 90% της συνολικής περιεκτικότητας, συντίθενται στον μαστικό αδένα. Η σύνθεσή τους γίνεται στα ριβοσώματα του ενδοπλασματικού δικτύου, όπου τα αμινοξέα, που μεταφέρονται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, χρησιμοποιούνται για την παραγωγή νηματοειδών πολυπεπτιδίων. Παρότι ο μηχανισμός δεν είναι πλήρως κατανοητός, αυτά τα πολυπεπτίδια μεταφέρονται στη συσκευή Golgi, όπου συνδυάζονται για να σχηματίσουν πρωτεϊνικά μόρια. Στη συνέχεια, τα πρωτεϊνικά μόρια συμπυκνώνονται σε κοκκία, που περιέχουν πολλαπλά μόρια πρωτεϊνών. Αυτά τα κοκκία, που έχουν σφαιρικό σχήμα με διάμετρο 50-600 nm, χαρακτηρίζονται ως μικκύλια στην περίπτωση των καζεϊνών. [9, 10]

Τα πρωτεϊνικά κοκκία, μαζί με συστατικά του γάλακτος όπως η λακτόζη και το νερό, περιβάλλονται από κυτταροπλασματική μεμβράνη. Κατά την ωρίμανση τους, μετατρέπονται σε εκκριτικά κοκκία, τα οποία μετακινούνται προς την κορυφαία μεμβράνη του κυττάρου και χάρη στον μηχανισμό της εξωκύττωσης εκκρίνονται στην εκκριματοδόχο κοιλότητα [11].

Όσον αφορά άλλες πρωτεΐνες του γάλακτος, στα μηρυκαστικά, η γαλακτοσιδηρίνη και η οροαλβουμίνη δεν σχηματίζονται στον μαστό αλλά προέρχονται από το αίμα [10].

Οι ανοσοσφαιρίνες, από την άλλη, προέρχονται κυρίως από το αίμα, ενώ παράγονται επίσης στον μαστό από τοπικά πλασματοκύτταρα. Στα βοοειδή, τα πλασματοκύτταρα στον μαστικό αδένα κατά τη γαλακτική περίοδο συνθέτουν μικρές ποσότητες ανοσοσφαιρινών IgG, IgA και IgM. Στο πρωτόγαλα (έκκριμα του μαστού των γαλακτοπαραγωγών ζώων των πρώτων 3-5 ημερών μετά τον τοκετό), το ποσοστό της IgG που παράγεται από πλασματοκύτταρα είναι σε πολύ μικρότερη ποσότητα από εκείνη που προέρχεται από το αίμα. Αντιθέτως, μεγάλο μέρος της IgA και IgM, που βρίσκεται στα πρωτόγαλα, παράγεται από τα πλασματοκύτταρα. [12]

Οι ανοσοσφαιρίνες IgG και IgM στο γάλα παρουσιάζονται όπως και στο αίμα, σε μονομερή ή πολυμερή μορφή, αντίστοιχα. Αντίθετα, η IgA στη γάλα διαφοροποιείται από αυτήν του αίματος, καθώς εντοπίζεται κυρίως σε πολυμερή μορφή (διμερή ή τετραμερή) [15]. Στην πολυμερή IgA συνδέεται το ελεύθερο εκκριτικό συστατικό ή FSC (Free Secretory Component), το οποίο παράγεται από τα επιθηλιακά κύτταρα του μαστού, και ενός ακόμη συστατικού, που ονομάζεται J-άλυσος (J-chain). Το FSC και η J-άλυσος κατέχουν σημαντικό

ρόλο ζωτικής σημασίας, καθώς αποτρέπουν την πέψη της IgA στο στόμαχο του νεογνού, γεγονός το οποίο έχει επιβεβαιωθεί για το γάλα του ανθρώπου. [13]

1.3.2 ΛΙΠΙΔΙΑ

Η σύνθεση των λιπιδίων διεξάγεται στο εργοστόπλασμα, όπου τα λιπαρά οξέα εστεροποιούνται προς γλυκερίδια, κυρίως τριγλυκερίδια. Τα λιπαρά οξέα είτε συντίθενται στο μαστό, είτε προέρχονται από τα γλυκερίδια του αίματος, χάρη στην υδρόλυση τους στο μαστικό αδένα με τη βοήθεια του ενζύμου λιποπρωτεϊνική λιπάση. Στο αίμα, τα γλυκερίδια κυκλοφορούν υπό μορφή λιποπρωτεϊνών, κυρίως λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (Low Density Lipoproteins - LDL), για να αυξηθεί η διαλυτότητα τους στη υδατινή φάση. Στα μηρυκαστικά, τα λιπαρά οξέα που παράγονται στα επιθηλιακά κύτταρα του μαστού είναι κυρίως αυτά με 4 έως 14 άτομα άνθρακα, ενώ περίπου το 50% των λιπαρών οξέων με 16 άτομα άνθρακα παράγεται επίσης στο μαστό. Το υπόλοιπο 50% αυτών των λιπαρών οξέων, καθώς και τα μεγαλύτερης αλύσου λιπαρά οξέα, όπως το παλμιτικό, το στεατικό και το ελαϊκό προέρχονται από το αίμα. [14]

Τα λιπίδια, με μορφή λιποσταγονιδίων εμφανίζονται στις δεξαμενές του ενδοπλασματικού δικτυωτού. Στη συνέχεια, τα λιποσταγονίδια μετακινούνται προς την κορυφαία μεμβράνη των κυττάρων της αδενοκυψέλης, αυξάνοντας το μέγεθός τους μέσω της ένωσής τους με άλλα λιποσταγονίδια. Έτσι σχηματίζονται τα λιποσφαίρια, τα οποία έχουν μέγεθος που κυμαίνεται από 0,1 έως 22 μm , και εκκρίνονται στην εκκριματοδόχο κοιλότητα. Κατά την αποβολή τους, τα λιποσφαίρια περιβάλλονται από κυτταροπλασματική μεμβράνη, η οποία προέρχεται είτε από ολόκληρο τμήμα της κορυφαία μεμβράνης του κυττάρου είτε από μεγάλο μέρος της μεμβράνης των εκκριτικών κυστιδίων. Τα εκκριτικά κυστίδια συμβάλλουν στην αποβολή των λιποσφαιρίων και συναποβάλλουν ταυτόχρονα το δικό τους περιεχόμενο. [15]

1.3.3 ΛΑΚΤΟΖΗ

Η λακτόζη, το σάκχαρο του γάλακτος των θηλαστικών, παράγεται αποκλειστικά στα επιθηλιακά κύτταρα του μαστού. Η βιοσύνθεση της γίνεται στη συσκευή Golgi,

χρησιμοποιώντας γλυκόζη που φτάνει στο μαστό μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. Ένα μόριο γλυκόζης μετατρέπεται σε uridine diphosphate (UDP) γαλακτόζη, η οποία στη συνέχεια ενώνεται με ένα μόριο γλυκόζης, με την δράση του ενζύμου λακτόζη-συνθετάση (lactose synthase), ενός συμπλόκου που αποτελείται από β-1,4-γαλακτοζυλτρανσφεράση (β-1,4-galaktosyltransferase) και την α-γαλακταλβουμίνη. Η α-γαλακταλβουμίνη είναι μια πρωτεΐνη μοναδική για το γάλα, η οποία τροποποιεί τη λειτουργία της γαλακτοζυλτρανσφεράσης ώστε να καταλύει το σχηματισμό της λακτόζης από ένα μόριο γλυκόζης και ένα μόριο UDP γαλακτόζης. Εν συνεχεία, η λακτόζη ελευθερώνεται με τα εκκριτικά κοκκία σε συνδυασμό με τις πρωτεΐνες. [9,16,17]

1.4 ΕΛΕΓΧΟΣ ΧΗΜΙΚΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ

Ο έλεγχος της χημικής σύστασης του νωπού γάλακτος αφορά κυρίως τον προσδιορισμό των κυρίων συστατικών του, όπως το λίπος, τις συνολικές αζωτούχες ενώσεις (κυρίως πρωτεΐνες), το στερεό υπόλειμμα χωρίς λίπος (ΣΥΑΛ) και την λακτόζη. Η γνώση αυτών των χημικών χαρακτηριστικών είναι τόσο απαραίτητη για την επαλήθευση της ποιότητας του γάλακτος ανάλογα με το είδος του ζώου, όσο και για την αξιολόγηση της αποδοτικότητάς του στη μεταποίηση σε γαλακτοκομικά προϊόντα. Στη σύγχρονη γαλακτοβιομηχανία, ο προσδιορισμός των χημικών παραμέτρων γίνεται με τη χρήση αυτομάτων αναλυτικών συσκευών που αξιοποιούν την τεχνολογία υπέρυθρης ανάλυσης, επιτρέποντας την επεξεργασία πολλών δειγμάτων ανά ώρα. Στην αγορά, διατίθενται συσκευές που μπορούν να μετρήσουν είτε μία είτε πολλές παραμέτρους. [1]

1.4.1 ΛΙΠΟΣ

Η περιεκτικότητα σε λίπος παρουσιάζει τη μεγαλύτερη διαφοροποίηση, τόσο μεταξύ των διαφορετικών ειδών γάλακτος όσο και εντός του ίδιου είδους, καθώς είναι το συστατικό του γάλακτος με τις πιο έντονες διακυμάνσεις. Το γάλα όλων των γαλακτοπαραγωγών ζώων αποτελείται κυρίως από τριγλυκερίδια (~98%). Η δομή των τριγλυκεριδίων του γάλακτος συνδέεται με τα ρεολογικά χαρακτηριστικά του λίπους του γάλακτος και με τα φαινόμενα κρυστάλλωσης και τήξης του. Η σύνθεση των τριγλυκεριδίων μπορεί να αξιοποιηθεί για τον έλεγχο της προέλευσης του λίπους στο γάλα. Το ασαπωνοποίητο κλάσμα του κατσίκισιου και του αγελαδινού γάλακτος παρουσιάζει μικρές διαφορές. Ωστόσο, το κατσίκισιο γάλα έχει χαμηλότερο αριθμό ιωδίου, γεγονός που υποδηλώνει υψηλότερη περιεκτικότητα σε ακόρεστα λιπαρά. Επιπλέον, ο αριθμός σαπωνοποίησης και ο δείκτης διάθλασης του αγελαδινού γάλακτος είναι ελαφρώς υψηλότεροι από εκείνους του κατσίκισιου, κάτι που αποδίδεται στις μεγαλύτερες ανθρακικές αλυσίδες που περιέχει. Το γάλα, πέρα από τα τριγλυκερίδια που αποτελούν περίπου το 98% του συνόλου των λιπιδίων, περιέχει και φωσφολιπίδια σε μικρή αναλογία, μόλις 1%. Τα κυριότερα φωσφολιπίδια είναι η λεκιθίνη, η κεφαλίνη και η σφιγγομυελίνη. Το τρίτο βασικό είδος λιπιδίων είναι οι στερόλες, που αντιστοιχούν περίπου στο 0,35% των λιπιδίων και περιλαμβάνουν τη χοληστερόλη και τους εστέρες της. Επιπλέον, σε μικρότερες ποσότητες, απαντώνται κερεβροζίδες (γλυκολιπίδια), ελεύθερα λιπαρά οξέα και καροτενοειδή. Τα λιπαρά οξέα του γάλακτος είναι κατά τα δύο τρίτα κορεσμένα, με τα κυριότερα να περιλαμβάνουν το παλμικό οξύ (25-30%), το στεατικό (7%), το μυριστικό (7-11%), το βουτυρικό (5-6%).), καθώς και το καπρυλικό και το λαυρικό. Το υπόλοιπο ένα τρίτο αποτελείται από ακόρεστα λιπαρά οξέα, με πιο σημαντικά το ελαϊκό (25%), το λινελαϊκό, το λινολενικό και το αραχιδονικό οξύ. [18,19]

Ο προσδιορισμός του λίπους είναι μια σημαντική χημική ανάλυση για την αξιολόγηση της κανονικότητας και της ποιότητας του γάλακτος. Παραδοσιακά, εφαρμόζεται με την κλασική μέθοδο Gerber (οξέο-βουτυρομετρική). Η μέθοδος αυτή είναι εύκολη στην εφαρμογή της και λιγότερο χρονοβόρα συγκριτικά με διάφορες άλλες μεθόδους που βασίζονται στην ανάκτηση του λίπους με εκχύλιση. Η μέθοδος βασίζεται στο γεγονός ότι, με την προσθήκηθειϊκού οξέος στο γάλα, διασπώνται όλα τα συστατικά του εκτός από το λίπος. Το λίπος, μετά την καταστροφή της μεμβράνης των λιποσφαιριδίων, απελευθερώνεται και διαχωρίζεται από τα υπόλοιπα συστατικά με τη χρήση αμυλικής αλκοόλης κατά την φυγοκέντρωση. Ο υπολογισμός της λιποπεριεκτικότητας του γάλακτος γίνεται με ανάγνωση στην ειδικά βαθμονομημένη κλίμακα του βουτυρόμετρου. [4]

Στις μέρες μας, όμως οι όλο και αυξανόμενες ανάγκες της βιομηχανίας γάλακτος για μείωση του κόστους και του χρόνου ανάλυσης με την παράλληλη απαίτηση για βελτίωση της επαναληψιμότητας οδήγησαν στη χρήση αυτοματοποιημένων συσκευών για τον προσδιορισμό του λίπους. Η χρήση της υπέρυθρης φασματοσκοπίας και της αυτοματοποιημένης συσκευής νεφελομετρίας αποτελούν δύο σύγχρονες αυτοματοποιημένες μεθόδους στην ανίχνευση του λίπους που χρησιμοποιούνται ευρέως. [20]

Η μέθοδος της υπέρυθρης φασματοσκοπίας στηρίζεται στο ότι τα βασικά συστατικά του γάλακτος διαθέτουν χαρακτηριστικές ομάδες που απορροφούν σε συγκεκριμένα μήκη κύματος. Κάθε φορά επιτρέπεται να περάσει το κατάλληλο μήκος κύματος για κάθε συστατικό, γεγονός που επιτυγχάνεται με την βοήθεια ενός περιστρεφόμενου εξαρτήματος με φίλτρα που βρίσκεται ανάμεσα στο προς μέτρηση δείγμα γάλακτος και της πηγής υπέρυθρων ακτίνων. Η ενέργεια αυτή που ανιχνεύεται μετατρέπεται σε μια ψηφιακή ένδειξη. Η αρχή αυτής της μεθόδου βασίζεται στη σχέση που συνδέει την ενέργεια από απορροφάται από το προς ανάλυση δείγμα και την συγκέντρωση του κύριου συστατικού που προσδιορίζεται και ορίζεται από το νόμο του Lambert-Beer [9]:

$$A = e \times l \times c = \log I_0/I$$

Οπου: A= απορρόφηση, e= συντελεστής απορρόφησης, l= μήκος κυψελίδας, c= μοριακή συγκέντρωση, I_0 = ένταση προσπίπτουσας ακτινοβολίας, I= ένταση εξερχόμενης ακτινοβολίας μετά τη διέλευση της από το δείγμα. [9]

Στη σύγχρονη βιομηχανία γάλακτος οι αυτοματοποιημένες συσκευές που χρησιμοποιούνται και βασίζονται στην αρχή της υπέρυθρης φασματοσκοπίας είναι: Milko-Scan, Multispec, Infrared Milk Analyzer(IRMAA). [4]

Η αρχή λειτουργίας της αυτοματοποιημένης συσκευής νεφελομετρίας αξιοποιεί την ικανότητα που έχουν τα λιποσφαιρίδια του λίπους, αντίστοιχα με τον αριθμό τους στο εξεταζόμενο δείγμα, να διαχέουν το φως. Αφού το δείγμα γάλακτος ομογενοποιηθεί, θερμανθεί και αναμειχθεί με διάλυμα το οποίο καταστρέφει τις πρωτείνες για να μην επηρεάσουν τις μετρήσεις, τοποθετείται σε κυψελίδα, η οποία βρίσκεται ανάμεσα από ένα φωτοκύτταρο και μια φωτεινή πηγή. Οι ενδείξεις μέσω του γαλβανομέτρου φτάνουν στην κλίμακα της συσκευής και δίνεται η επι τοις εκατό λιποπεριεκτικότητα του γάλακτος. [18]

1.4.2 ΑΖΩΤΟΥΧΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

Οι συνολικές αζωτούχες ουσίες, από πρακτική άποψη, ταυτίζονται με τις πρωτεΐνες του γάλακτος. Ως εκ τούτου, η υψηλή περιεκτικότητά τους υποδηλώνει μεγαλύτερη βιολογική αξία και αυξημένη απόδοση κατά τη βιομηχανική επεξεργασία του γάλακτος. Οι πρωτεΐνες διαθέτουν μια σειρά από φυσικές και χημικές ιδιότητες, αποτελώντας αντικείμενο για την ανάπτυξη μεθόδων ταυτοποίησης και μέτρησης. Στην περίπτωση του γάλακτος, εκτός από τις πρωτεΐνες, υπάρχουν και άλλες αζωτούχες ουσίες - τόσο οργανικές όσο και ανόργανες - που συχνά προσδιορίζονται παράλληλα με τις πρωτεΐνες. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι αζωτούχες ενώσεις του γάλακτος κατανέμονται σε δύο κύριες κατηγορίες: 95% πρωτεΐνες και 5% μη πρωτεϊνικό άζωτο. [19,20,21]

Τα διάφορα κλάσματα των αζωτούχων ενώσεων μπορούν να προσδιοριστούν ως εξής:

- Ολικό άζωτο (Total nitrogen –TN-): Προσδιορίζεται ακριβώς στο γάλα ή τα παράγωγά του. Για να υπολογιστεί η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη, το ποσοστό του ολικού αζώτου πολλαπλασιάζεται με συντελεστή 6,38.
- Άζωτο διαλυτό σε 12% τριχλωροοξικό οξύ (TCAN), το οποίο παλαιότερα αναφέρεται ως πρωτεϊνικό άζωτο (Nonprotein nitrogen –NPN-).
- Ολικό πρωτεϊνικό άζωτο (TPN): Υπολογίζεται αφαιρώντας το TCA από το συνολικό άζωτο (TN).
- Μη καζεϊνικό άζωτο (Non casein nitrogen –NCN-): Προσδιορίζεται στο διήθημα μετά την καθίζηση των πρωτεϊνών σε pH 4,6.
- Καζεϊνικό άζωτο (Casein nitrogen –CN-): Προκύπτει αφαιρώντας το μη καζεϊνικό άζωτο (NCN) από το συνολικό άζωτο (TN).
- Πρωτεΐνες ορού (Whey protein –WP-): Υπολογίζονται πολλαπλασιάζοντας επί 6,38 τη διαφορά μεταξύ μη καζεϊνικού αζώτου (NCN) και αζώτου διαλυτού σε τριχλωροοξικό οξύ (TCAN). [19,20,21]

Η μέθοδος Kjeldahl παραμένει η πλέον καθιερωμένη και αξιόπιστη μέθοδος προσδιορισμού πρωτεϊνών στο γάλα, αποτελώντας το σημείο αναφοράς για όλες τις τεχνικές. Παράλληλα, έχουν αναπτυχθεί και εναλλακτικές μέθοδοι, μία από τις πιο διαδεδομένες είναι η μέθοδος με τη χρωστική Amido Black, η οποία βασίζεται στην αντίδραση της χρωστικής με τα αμινοξέας

των πρωτεϊνών. Σε αυτή τη διαδικασία, σχηματίζεται ένα αδιάλυτο σύμπλοκο που απομακρύνεται με διήθηση, ενώ το χρώμα που παραμένει ελεύθερο στο διήθημα μετράται φωτομετρικά. Άλλες χρησιμοποιούμενες τεχνικές περιλαμβάνουν τη μέθοδο φορμαλδεΰδης, διάφορες φωτομετρικές προσεγγίσεις και την αυτοματοποιημένη μέθοδο της υπέρυθρης φασματοσκοπίας. [6]

1.4.3 ΣΤΕΡΕΟ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑ ΑΝΕΥ ΛΙΠΟΥΣ (ΣΥΑΛ)

Το ΣΥΑΛ αντιπροσωπεύει το σύνολο των στερεών συστατικών του γάλακτος, εξαιρουμένου του λίπους. Το ΣΥΑΛ υπολογίζεται με την αφαίρεση του λίπους (%) από το στερεό υπόλειμμα (%):

$$\text{ΣΥΑΛ (\%)} = \text{ΣΥ (\%)} - \text{ΛΙΠΟΣ (\%)}$$

Το λίπος επί ξηρού εκφράζει την αναλογία λίπους στην ξηρή ουσία και υπολογίζεται ως εξής:

$$\text{ΛΙΠΟΣ ΕΠΙ ΞΗΡΟΥ (\%)} = \frac{\text{ΛΙΠΟΣ (\%)}}{\text{Σ.Υ. (\%)}} \times 100$$

Η τιμή του καθορίζεται κυρίως από τις αζωτούχες ουσίες και τη λακτόζη, καθιστώντας τον έναν πιο σημαντικό δείκτη από το λίπος για την αξιολόγηση της χημικής ποιότητας του γάλακτος. [21]

1.4.4 ΛΑΚΤΟΖΗ

Η λακτόζη αποτελεί τον μοναδικό υδατάνθρακα του γάλακτος. Ο όρος περιεκτικότητα σε λακτόζη αφορά το επί τοις εκατό ποσοστό της μόνυδρης λακτόζης εκφρασμένο κατά βάρος. Επίσης, αποτελεί το το βασικότερο συστατικό του άνευ λίπους ξηρού υπολείμματος. Ο προσδιορισμός της λακτόζης μπορεί να γίνει με τους ακόλουθους τρόπους: [22]

- Με οξειδοαναγωγική ή ιωδιομετρική μέθοδο. Αποτελεί μέθοδο που εφαρμόζεται στο νωπό γάλα, σύμφωνα με την οποία η περιεκτικότητα του γάλακτος σε λακτόζη υπολογίζεται έμμεσα με ογκομετρικό προσδιορισμό του ιωδίου με διάλυμα θειοθειικού νατρίου. Προηγείται η αντίδραση της λακτόζης και χλωραμίνης T-ιωδιούχου καλίου και η απομάκρυνση των πρωτεϊνών. [6]
- Με υπέρυθρη φασματοσκοπία, καθώς η λακτόζη απορροφά ενέργεια σε συγκεκριμένο μήκος κύματος (δεσμός C-OH στα 9,55μm). [6]
- Ενζυμική μέθοδος. Αποτελεί μία ευαίσθητη μέθοδο, ιδιαίτερα ακριβή όταν υπάρχει ένας μικρός αριθμός δειγμάτων. Η γαλακτόζη που παράγεται από την υδρόλυση της λακτόζης παρουσία του ενζύμου β-γαλακτοζιδάση, οξειδώνεται προς γαλακτονικό οξύ, παρουσία της γαλακτοζο-αφυδρογονάσης και παράγεται NADH. Το NADH προσδιορίζεται φωτομετρικά με την αύξηση της απορρόφησης, η οποία είναι νάλογη με την ποσότητα της β-γαλακτόζης. [6]
- Φωτομετρικός προσδιορισμός. Η λακτόζη αντιδρά με φαινόλη σε όξινο περιβάλλον παρουσία θειικού οξέος, κατά τη θέρμανση, σχηματίζοντας ένα πορτοκαλί σύμπλοκο, το οποίο μπορεί να προσδιοριστεί φωτομετρικά στα 490nm. Ειδική πρότυπη καμπύλη βοηθά στο να γίνει ο ποσοτικός προσδιορισμός της λακτόζης βάσει διαφόρων συγκεντρώσεων διαλυμάτων λακτόζης. [6]
- Μέθοδος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Το εσωτερικό πρότυπο και η λακτόζη διαχωρίζονται σε στήλη ιοντοανταλλαγής και ο προσδιορισμός γίνεται με διαφορικό διαθλασιμόμετρο ή άλλο ανιχνευτή. Υπερ-καθαρό νερό κατάλληλο για HPLC χρησιμοποιείται για κινητή φάση. [23]

2. ΝΟΘΕΙΑ ΣΤΟ ΓΑΛΑ

Η νοθεία στα τρόφιμα περιλαμβάνει ένα ευρύ φάσμα αθέμιτων πρακτικών, στις οποίες μπορούν να συμμετέχουν κάποιοι ή όλοι οι εμπλεκόμενοι στην αλυσίδα διακίνησης των

τροφίμων, από τα παράγωγα έως τον τελικό μεταποιητή ή τον πωλητή. Ο όρος "νοθεία" δεν περιορίζεται αποκλειστικά στην αλλοίωση του ίδιου του τροφίμου, αλλά περιλαμβάνει επίσης την παραποίηση ή την πλαστογράφηση εγγράφων που συνοδεύουν τα προϊόντα κατά τη διακίνησή τους, τη χρήση απαγορευμένων μεθόδων, καθώς και την αφαίρεση ή την αντικατάσταση συστατικών του κατά τη σύνθεση του τροφίμου, οδηγώντας σε παραπλανητική επισήμανση. [24]

Τα τελευταία χρόνια, η παραγωγή και η κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων σημειώνει σημαντική αύξηση σε παγκόσμιο επίπεδο. Λόγω της υψηλής διατροφικής τους αξίας, τα γαλακτοκομικά προϊόντα, είτε ως νωπό γάλα είτε ως παράγωγα, είναι ιδιαίτερα ευάλωτα σε πρακτικές παραποίησης και απάτης. Η νοθεία στο γάλα περιλαμβάνει συχνά την προσθήκη φθηνών ή χαμηλής ποιότητας υποκατάστατων, με στόχο την αύξηση του βάρους ή του όγκου του προϊόντος. Το οικονομικό κέρδος αποτελεί έναν από τους κύριους λόγους για τέτοιες πρακτικές, ενώ η δυσκολία στον επαρκή εφοδιασμό του συνεχώς αυξανόμενου πληθυσμού συνιστά έναν ακόμη παράγοντα για την σκόπιμη αυτή παραποίηση. Η κατανάλωση νοθευμένου γάλακτος μπορεί να επιφέρει σοβαρές συνέπειες στην υγεία, ιδιαίτερα στα παιδιά, καθώς μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στη φυσιολογική τους ανάπτυξη. Ως εκ τούτου, καθίσταται αναγκαία η αυστηρή εποπτεία της διατροφικής αλυσίδας, μέσω της παρακολούθησης των αλλαγών στα συστατικά και των στοιχείων του γάλακτος, καθώς και των νομικών μέτρων για τη διασφάλιση της δημόσιας υγείας. [24]

2.1 ΕΙΔΗ ΝΟΘΕΙΑΣ ΣΤΟ ΓΑΛΑ

Η νοθεία στο γάλα αποτελεί συχνό φαινόμενο, καθώς η φυσικοχημική του σύσταση διευκολύνει την απόκρυψη οποιασδήποτε τροποποίησης. Ένα από τα συνηθέστερα είδη νοθείας περιλαμβάνει την προσθήκη υλικών χαμηλότερης αξίας, όπως νερό, αποβουτυρωμένο γάλα ή γάλα από άλλο είδος ζώου, όπως την προσθήκη αγελαδινού σε κατσικίσιο γάλα. Η αύξηση του κέρδους μπορεί να πραγματοποιηθεί παράλληλα με την αφαίρεση συστατικών υψηλής οικονομικής αξίας, όπως το λίπος και οι πρωτεΐνες του γάλακτος. [21,25]

Για να αντισταθμιστούν οι αλλαγές που προκαλούν αυτές οι τροποποιήσεις, συχνά προστίθενται ουσίες όπως συντηρητικά, φυτικά έλαια, γλυκόζη, πηκτικές και χρωστικές ουσίες. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις, η υπερβολική απληστία οδηγεί στη χρήση

επικίνδυνων ουσιών, όπως μελαμίνη, ουρία, φορμόλη, απορρυπαντικά, θειικό αμμώνιο, βορικό οξύ, καθώς και οξέα όπως το βενζοϊκό και το σαλικυλικό. [25]

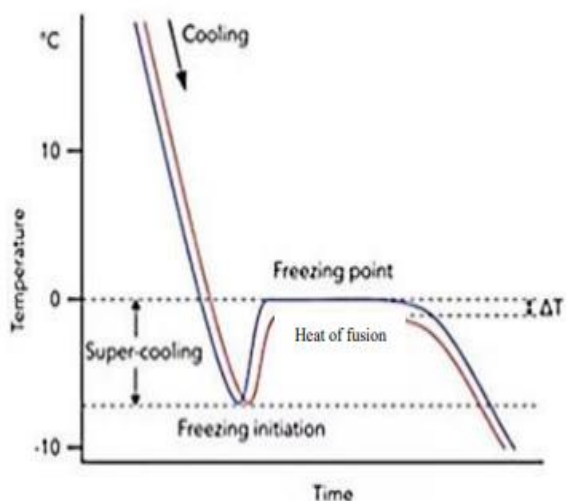
2.1.1 ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΝΕΡΟΥ

Η παλαιότερη μέθοδος νοθείας του γάλακτος είναι η προσθήκη νερού. Πρακτικά η σκόπιμη αρραίωση του γάλακτος με νερό, μπορεί να αναγνωριστεί από την μεταβολή της εμφάνισής του γάλακτος και ορισμένων φυσικών ιδιοτήτων όπως είναι η πυκνότητα και το ιξώδες. Η προσθήκη αυτή επηρεάζει και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του γάλακτος, προκαλώντας μείωση του ειδικού βάρους, της περιεκτικότητας σε λίπος και του ΣΥΑΛ, καθώς και ελαφρά αύξηση του σημείου πήξης του γάλακτος. Το σημείο πήξης του γάλακτος εξαρτάται κυρίως από τη συγκέντρωση της λακτόζης. Επομένως, όταν προστίθεται νερό, η λακτόζη αραιώνεται σε μεγαλύτερη ποσότητα διαλύτη, με αποτέλεσμα το σημείο πήξης να σημειώνει αύξηση. [25]

Η ανίχνευση της προσθήκης νερού στο γάλα γίνεται στην πράξη είτε μέσω μαθηματικού υπολογισμού του ΣΥΑΛ είτε με τη χρήση ευαίσθητων αναλυτικών οργάνων, όπως τα κρυοσκοπία, τα οποία μετρούν την αύξηση του σημείου πήξης του γάλακτος. Τα κρυοσκοπία αποτελούν συσκευές σχετικά χαμηλού κόστους και πραγματοποιούν αναλύσεις σε σύντομους χρόνους, γεγονότα που τα καθιστούν απαραίτητες συσκευές στις βιομηχανίες γάλακτος. [21,25]

Στο παρελθόν, για τον προσδιορισμό του σημείου πήξης του γάλακτος χρησιμοποιήθηκε η κρυοσκοπική συσκευή Hortvet. Η αρχή λειτουργίας της αποτέλεσε τη βάση για την ανάπτυξη ημιαυτόματων και άλλων σύγχρονων συσκευών, οι οποίες διευκολύνουν την ανάλυση του μεγάλου αριθμού δειγμάτων ανά ώρα. Ως επί το πλείστον, τα σύγχρονα κρυοσκοπικά όργανα λειτουργούν ως εξής: το δείγμα τοποθετείται σε συνδυασμό ψύξης και υπερψύχεται, χωρίς ανάδευση, με ελεγχόμενο ρυθμό, φτάνοντας σε προκαθορισμένη θερμοκρασίες κάτω από το σημείο κατάψυξης του (5-7°C). Κατά τη διαδικασία της υπέρψυξης, το διάλυμα παραμένει σε υγρή μορφή ενώ τα μόρια του αναδιοργανώνονται για να σχηματίσουν πυρήνες κρυστάλλωσης. Στη συνέχεια, η στιγμιαία κρυστάλλωση προκαλείται μέσω έντονης ανάδευσης (μηχανική δόνηση), πιθανότατα λόγω της ομοιόμορφης διασποράς των πυρήνων κρυστάλλωσης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την άνοδο της θερμοκρασίας ως το σημείο πήξεως του γάλακτος, το οποίο ισοδυναμεί με το σημείο όπου η θερμότητα κρυστάλλωσης

εξισορροπείται από την θερμότητα που αποβάλλει το δείγμα κατά την διαδικασία της υπέρψυξής του. [25]



Εικόνα 2-1. Καμπύλη υπέρψυξης του νερού (μπλε χρώμα) και του γάλακτος (κόκκινο χρώμα)



Εικόνα 2-2. Συσκευή κρυοσκοπίου.

2.1.2 ΜΕΙΩΣΗ ΛΙΠΟΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Η συγκεκριμένη νοθεία πραγματοποιείται είτε με προσθήκη άπαχου γάλακτος σε πλήρες γάλα είτε με αποβουτύρωση (αφαίρεση λίπους) πλήρους γάλακτος. Η μείωση της λιποπεριεκτικότητας του γάλακτος υπολογίζεται με μαθηματικούς τύπους, αφού πρώτα έχουν προσδιοριστεί η λιποπεριεκτικότητα και το ΣΥΑΛ του εξεταζόμενου γάλακτος, λαμβάνοντας υπόψη τις πρότυπες τιμές αυτών των παραμέτρων στο γάλα του παραγωγού. [25,26]

2.1.3 ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗ ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΝΕΡΟΥ ΚΑΙ ΑΦΑΙΡΕΣΗ ΛΙΠΟΥΣ (ΔΙΠΛΗ ΝΟΘΕΙΑ)

Η ταυτόχρονη προσθήκη νερού και αφαίρεση λίπους σε μια παρτίδα νωπού γάλακτος δεν στοχεύει μόνο στην αύξηση του παρανόμου κέρδους, αλλά και στην παραπλάνηση των αρμόδιων αρχών, καθώς οι δύο αυτές πρακτικές έχουν αντίθετα αποτελέσματα στη μεταβολή του ειδικού βάρους του γάλακτος. [26]

Ως αποτέλεσμα, μια παρτίδα γάλακτος που έχει υποστεί διπλή νοθεία μπορεί να έχει ειδικές τιμές βάρους εντός των "φυσιολογικών" ορίων. Ωστόσο, ο προσδιορισμός της λιποπεριεκτικότητας του γάλακτος, σε συνδυασμό με την ανάλυση του ΣΥΑΛ και τη σύγκρισή τους με τις πρότυπες τιμές αυτών των παραμέτρων στο γάλα του παραγωγού, μπορεί να επιτρέψει την διαπίστωση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των εν λόγω νοθειών. [26]

Είδος νοθείας	Οξύτητα (%)	Λίπος (%)	Λίπος επί ξηρού (%)	Στερεό υπόλειμμα (%)	Στερεό υπόλειμμα άνευ λίπους (%)	Ειδικό βάρος	Σημείο πήξης
Προσθήκη νερού	-	-	=	-	-	-	+
Αφαίρεση λίπους	=	-	-	-	=	+	=
Διπλή νοθεία	-	-	-	-	-	±/=	+

Η έννοια των συμβόλων είναι η εξής: - (ελαττώνεται), + (αυξάνεται), =(αμετάβλητο)
Εικόνα 2-1. Μεταβολές των ιδιοτήτων του γάλακτος και των χαρακτηριστικών του κατά τη νοθεία.

2.1.4 ΠΑΡΑΠΛΑΝΗΤΙΚΗ ΕΝΔΕΙΞΗ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΕΙΔΟΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

Εξαιτίας της εποχικότητας της παραγωγής γίδινου και πρόβειου γάλακτος, καθώς και της υψηλότερης τιμής τους σε σύγκριση με το αγελαδινό γάλα, υπάρχει οικονομικό κίνητρο για την προσθήκη αγελαδινού γάλακτος σε γίδινο ή πρόβειο γάλα χωρίς να δηλωθεί αυτή η προσθήκη. Επιπλέον, η χαμηλότερη τιμή του γίδινου γάλακτος σε σχέση με το πρόβειο μπορεί να αποτελεί κίνητρο για την ανάμειξή τους από ορισμένους παραγωγούς. [26,27]

Μια τέτοια πρακτική έχει αρνητικές συνέπειες τόσο για την παραπλάνηση του καταναλωτή, λόγω των μη τυπικών οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του τελικού προϊόντος, όσο και για τη γνώση/αυθεντικότητα των τυριών ΠΟΠ. Για παράδειγμα, κάποια τυριά ΠΟΠ πρέπει να παρασκευάζονται αποκλειστικά από πρόβειο ή γίδινο γάλα και όχι από αγελαδινό (π.χ. Γαλοτύρι), ενώ σε άλλα, η προσθήκη γίδινου γάλακτος στο πρόβειο δεν πρέπει να υπερβαίνει ένα συγκεκριμένο ποσοστό (π.χ. 30 % στη Φέτα). Επιπλέον, τέτοιες νοθείες ενδέχεται να προκαλέσουν δυνητικούς κινδύνους για τη Δημόσια Υγεία, όπως αλλεργίες σε πρωτεΐνες ή άλλα συστατικά του μη δηλωθέντος γάλακτος. [25]

Για τον προσδιορισμό της γνησιότητας του γάλακτος, έχουν αναπτυχθεί διάφορες αναλυτικές μέθοδοι κατά τη διάρκεια των ετών. Οι αρχικές μέθοδοι βασίζονταν στον προσδιορισμό των συστατικών του λίπους (λιπαρών οξέων ή τριγλυκεριδίων), αλλά ήταν χρονοβόρες και επίπονες, ενώ είχαν περιορισμούς, καθώς οι παράμετροι επηρεάζονται από παράγοντες όπως η φυλή και η διατροφή των γαλακτοπαραγωγών ζώων. Τα τελευταία χρόνια, η ανίχνευση προσθήκης αγελαδινού γάλακτος πραγματοποιείται κυρίως μέσω αναλύσεων που αφορούν τον προσδιορισμό πρωτεϊνικών κλασμάτων, χρησιμοποιώντας μεθόδους χρωματογραφικές ή ανοσοβιολογικές αλλά και μεθόδους ηλεκτροφόρησης. Η επιλογή της μεθόδου και της πρωτεΐνης/πρωτεϊνικού κλάσματος-στόχου (βιοδείκτης) εξαρτάται από το είδος του γαλακτοκομικού προϊόντος που εξετάζεται. Αυτό συμβαίνει λόγω του γεγονότος ότι οι πρωτεΐνες του γάλακτος διαφέρουν ως προς τη σταθερότητά τους σε θερμικές επεξεργασίες, αλλά και στη δράση των διάφορων ενδογενών ή μικροβιακών πρωτεολυτικών ενζύμων. [27]

Για τον προσδιορισμό τόσο της γνησιότητας του γάλακτος όσο και των προϊόντων του, τα τελευταία χρόνια πέρα από τις μεθόδους που προαναφέρθηκαν χρησιμοποιούνται και μοριακές μέθοδοι που βασίζονται στην ανάλυση του DNA των σωματικών κυττάρων του γάλακτος. [26,27]

2.1.5 ΠΕΡΙΣΣΟΤΕΡΑ ΕΙΔΗ ΝΟΘΕΙΑΣ

- Η νοθεία του λίπους του γάλακτος με την προσθήκη ζωικών ή φυτικών λιπών αποτελεί μία συχνή παραποίηση, όπου το λίπος του γάλακτος αντικαθίσταται ή ενισχύεται με λιπαρές ουσίες ζωικής (π.χ. λαρδί), με σκοπό την παράνομη οικονομική κερδοφορία. Η εν λόγω νοθεία μπορεί να ανιχνευτεί με διάφορες φυσικοχημικές μεθόδους, με τις χρωματογραφικές τεχνικές σε συνδυασμό με την φασματοσκοπία μαζών να θεωρούνται οι πιο αξιόπιστες. Μέσω αυτών των μεθόδων, μπορεί να γίνει ποσοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων ή στερολών φυτικής προέλευσης (π.χ. ανίχνευση και ποσοτικός προσδιορισμός της β-σιτοστερόλης) στο υπό εξέταση δείγμα γάλακτος.[21,28]

- Η προσθήκη πρωτεϊνών φυτικής προέλευσης (πχ. Πρωτεΐνες σόγιας) σε γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα. Για την εξακρίβωση αυτής της νοθείας χρησιμοποιούνται χρωματογραφικές, ηλεκτροφορητικές και ανοσοχημικές μέθοδοι. [29,30,31,32]

- Η προσθήκη σκόνης γάλακτος σε γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα. Ο προσδιορισμός της νοθείας αυτής βασίζεται σε συστατικά του γάλακτος (λακτόζη, πρωτεΐνες) τα οποία υπόκεινται σε βιοχημικές μεταβολές λόγω της θερμικής επεξεργασίας που πραγματοποιείται κατά τη διαδικασία παραγωγής σκόνης γάλακτος. Χρησιμοποιείται συνήθως ο προσδιορισμός της φουροσίνης και της υδροξυμεθυλ-φουρφουράλης. Στη βιβλιογραφία υπάρχουν πολλές προτεινόμενες προσεγγίσεις για την επιλογή πρωτεϊνών-στόχων για τη διαπίστωση του βαθμού θερμικής επεξεργασίας του γάλακτος. [32]

- Η προσθήκη στερεών (σκόνης) τυρογάλακτος σε γάλα ή σκόνη γάλακτος αποτελεί μια αθέμιτη πρακτική, δεδομένη της υπερβολικής ποσότητας και της χαμηλής τιμής του τυρογάλακτος. Αυτή η διαδικασία θεωρείται αρκετά «ελκυστική» από οικονομική άποψη. Για την ανίχνευση αυτής της νοθείας πραγματοποιείται χρωματογραφικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης του γλυκομακροπεπτιδίου (caseinomacropetide), το οποίο αποτελεί τμήμα της κ-καζεΐνης του γάλακτος (αμινοξέα 106-169). Το γλυκομακροπεπτίδιο παράγεται κατά την ενζυμική πήξη του γάλακτος με την πυτιά (τυροκόμηση) και απομακρύνεται στο τυρόγαλα. Εκτός του γλυκομακροπεπτιδίου UHT έχει χρησιμοποιηθεί ο ποσοτικός προσδιορισμός και η επί μέρους αναλογίες διαφόρων άλλων μακροπεπτιδίων του γάλακτος. [33,34]

- Η εμπορία γάλακτος υψηλής θερμικής επεξεργασίας ως παστεριωμένο γάλα. Για να διαπιστωθεί ο βαθμός θέρμανσης του γάλακτος χρησιμοποιείται ο ενζυμικός ποσοτικός προσδιορισμός της λακτουλόζης, η οποία είναι ισομερές της λακτόζης που παράγεται στο γάλα όταν αυτό υφίσταται θερμική επεξεργασία εκείνης της HTST (High Temperature

Short Time) παστερίωσης. Επίσης, το γάλα υψηλής θερμικής επεξεργασίας, εν αντιθέσει με το παστεριωμένο γάλα, δίνει αρνητική τη δοκιμή γαλακτοϋπεροξειδάσης. [21]

2.2 ΝΟΘΕΙΑ ΣΤΟ ΓΑΛΑ ΜΕ ΦΥΤΙΚΑ ΕΛΑΙΑ

Το λίπος του γάλακτος αποτελεί σημαντικό συστατικό των τροφίμων και έχει καθοριστικό ρόλο στην οικονομία, τη διατροφή, καθώς και στις φυσικές και χημικές ιδιότητες του γάλακτος και των προϊόντων του. Είναι επίσης πηγή λιποδιαλυτών βιταμινών και απαραίτητων λιπαρών οξέων (FA). Εξαιτίας της αυξημένης ζήτησης, το λίπος του γάλακτος έχει γίνει στόχος δόλιων πρακτικών, όπως η αντικατάστασή του με φθηνότερα ή πιο ευρέως διαθέσιμα μη γαλακτοκομικά λίπη φυτικής προέλευσης. Η αντικατάσταση του λίπους του γάλακτος με λίπη φυτικής προέλευσης δεν συνιστά μόνο οικονομική απάτη, αλλά μπορεί επίσης να θέσει σε κίνδυνο την δημόσια υγεία. [35]

Η ανάγκη λοιπόν για αναγνώριση και ποσοτικοποίηση της νοθείας του γάλακτος που προκύπτει από την προσθήκη λιπών φυτικής προέλευσης είναι μεγάλη. Όπως και στα άλλα είδη νοθείας, έτσι και στο συγκεκριμένο είδος οι αναλυτικές τεχνικές μπορούν να αποτελέσουν ένα ισχυρό εργαλείο στα χέρια των επιστημόνων για την εξακρίβωση και ποσοτικοποίηση αυτής. [35]

2.2.1 ΛΙΠΟΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

Το γάλα είναι ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα γαλακτώματος τύπου έλαιο σε νερό (oil-in-water). Το λίπος που περιέχει είναι εξαιρετικά ομοιόμορφα κατανεμημένο στον ορό του. Τα λιποσφαιρίδια του γάλακτος έχουν διάμετρο που κυμαίνονται από 0,1 μέχρι 10μm. Τα λιποσφαίρια καλύπτονται από μια μεμβράνη πάχους 10 νανομέτρων, η οποία περιλαμβάνει διάφορα συστατικά, με τα πιο σημαντικά να είναι τα φωσφολιπίδια και οι λιποπρωτεΐνες. Τα φωσφολιπίδια τοποθετούνται στην επιφάνεια του λιποσφαιρίου με τέτοιο τρόπο ώστε η υδρόφιλη τους ομάδα να κατευθύνεται προς την υδάτινη φάση. [36]

Οι πρωτεΐνες της μεμβράνης του λιποσφαιρίου συνδέονται με την υδρόφιλη ομάδα των φωσφολιπιδίων. Αυτή η δομή παραμένει αμετάβλητη κατά την ομογενοποίηση. Κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης το γάλα θερμαίνεται στους 50-70°C υπό πίεση 35 MPa, μέσω στενών διαύλων. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, ανάλογα με την πίεση, την μείωση της διαμέτρου των λιποσφαιρίων σε <1μm. Το 85% του λίπους αποτελείται από τα λιπαρά οξέα που περιέχονται στο μόριο των γλυκεριδίων. Το κλάσμα των στερολών αποτελείται σχεδόν αποκλειστικά από χοληστερόλη, ενώ σε μικρότερα ποσοστά περιέχει λανοστερόλη, β-σιτοστερόλη και διϋδορξυλανοστερόλη. Το 70% της χοληστερόλης εντοπίζεται στην πυρήνα του λιποσφαιρίου, το 10% στη μεμβράνη του και το υπόλοιπο ποσοστό στην υδάτινη φάση. [36]

Τα λιπαρά οξέα αποτελούνται από αλυσίδες που κυμαίνονται από 4 έως 26 άτομα. Τα πιο συνηθισμένα είναι με 4-10 άτομα αυτά, καθώς και τα 16 και 18 άτομα. Η πλειονότητα αυτών των οξέων είναι κορεσμένα. Το βουτυρικό οξύ καταλαμβάνει σημαντικό ποσοστό στη σύνθεση. (8-12%). Τα λιπαρά οξέα που περιέχουν μέχρι 12 άτομα άνθρακα είναι πτητικά. Το βουτυρικό και το καπρονικό οξύ παραμένουν υγρά σε θερμοκρασία δωματίου και μεταβάλλουν το σημείο τήξης του βουτύρου. Τα καπρυλικό και καπρινικό οξύ προσδίδουν ιδιαίτερη γεύση και άρωμα τόσο στο γίδινο όσο και στο πρόβειο γάλα. [37]

Fatty acid	Cow	Sheep	Goat
Short chain			
C4:0	11	8	8

C6:0	5	5	5
C8:0	1	4	4
Medium chain			
C10:0	3	6	13
C12:0	3	5	7
C14:0	10	10	12
Long chain			
C16:0	23	22	24
C18:0	10	10	12
C18:1	29	22	17
C18:2	2	4	3
C18:3	<1	<1	<1

Πίνακας 2-2. Σύνθεση λιπαρών οξέων σε γάλα τριών ειδών ζώων γαλακτοπαραγωγής. [36]

Το λίπος επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες και συνθήκες, οι σημαντικότεροι από τους οποίους είναι:

- **Φυλή** : Η γενετική προδιάθεση παίζει καθοριστικό ρόλο.
- **Πληρότητα Άλμεξης** : Η σωστή εκκένωση του μαστού συμβάλλει στην αύξηση της λιποπεριεκτικότητας.
- **Διατροφή** : Η χορήγηση ζωοτροφών πλούσιων σε ίνες και χλόη υψηλής ποιότητας σε σωστές είναι κρίσιμες.
- **Στάδιο Γαλακτικής Περιόδου** : Το ποσοστό λίπους μεταβάλλεται ανάλογα με την καμπύλη γαλακτοπαραγωγής.
- **Σωματική Κατάσταση** : Ζώα σε καλή φυσική κατάσταση κατά τον τοκετό έχουν βέλτιστα επίπεδα λιποπεριεκτικότητας.
- **Υγεία** : Η γενική υγεία του ζώου επηρεάζει τη σύνθεση του γάλακτος. [22]

Ο βασικός στόχος κάθε γαλακτοπαραγωγού κτηνοτρόφου είναι η εφαρμογή υψηλών αποδόσεων γάλακτος με αυξημένη περιεκτικότητα σε λίπος. Η διατροφή των ζώων αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για την εφαρμογή αυτού του στόχου. Θα πρέπει να είναι πλήρως ισορροπημένη, καλύπτοντας τις καθημερινές ενεργειακές απαιτήσεις και τις ανάγκες σε θρεπτικά στοιχεία. Παράλληλα, θα πρέπει να διασφαλίζει την ομαλή λειτουργία των προστομάχων των μηρυκαστικών μέσω της υποστήριξης των συμβιωτικών φαινομένων. [38]

Η τροφή των μηρυκαστικών αποτελείται από υδατάνθρακες, λίπη, πρωτεΐνες, ανόργανα στοιχεία και βιταμίνες και χωρίζεται σε δύο βασικές κατηγορίες: τη χονδροειδή ζωοτροφή και τη συμπυκνωμένη. Οι χονδροειδείς ζωοτροφές είναι πλούσιες σε ίνες, υδατάνθρακες, κυτταρίνη και ημικυτταρίνες. Από την άλλη, οι σύνθετες ζωοτροφές περιέχουν κυρίως πολυσακχαρίτες, όπως το άμυλο. Οι υδατάνθρακες της τροφής, όπως οι φρουκτάνες, οι πηκτίνες, η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη, το άμυλο, οι ολιγοσακχαρίτες και άλλοι πολυσακχαρίτες, διασπώνται από τα πεπτικά ένζυμα και τον μικροβιακό πληθυσμό των προστομιών. Αυτή η διάσπαση οδηγεί στην παραγωγή τελικών προϊόντων του μεταβολισμού των υδατανθράκων, τα οποία είναι απαραίτητα για τον οργανισμό. Τα κύρια τελικά προϊόντα του μεταβολισμού των υδατανθράκων στα μηρυκαστικά είναι τα πτητικά λιπαρά οξέα: το οξικό, το προπιονικό, το βουτυρικό και το γαλακτικό οξύ. Σε αντίθεση με αυτά, στα μονογαστρικά ζώα το τελικό προϊόν είναι η γλυκόζη, ένα απλό σάκχαρο. Κατά τον μεταβολισμό των υδατανθράκων στους προστομάχους των μηρυκαστικών, δεν είναι σημαντική μόνο η ποσότητα των παραγόμενων πτητικών λιπαρών οξέων, αλλά και η αναλογία οξικού οξέος προς προπιονικό οξύ, καθώς αυτή η ισορροπία επηρεάζει καθοριστικά τη διαδικασία. [38]

Το σιτηρέσιο (ημερήσια ποσότητα τροφής που πρέπει να καταναλώνεται από το ζώο, με σκοπό να καλύπτονται όλες του οι ανάγκες) είναι απαραίτητο να περιλαμβάνει όχι μόνο χλωρή νομή, όπως χόρτα, μηδική και τριφύλλι, αλλά και μια κατάλληλη ποσότητα αχύρου. Το άχυρο συμβάλλει στη ρύθμιση της περιεκτικότητας σε ινώδεις ουσίες και ξηρή ουσία, ενώ παράλληλα προσφέρει την υφή στη σύνθεση του σιτηρεσίου. Τα υψηλά επίπεδα των λιπαρών στο γάλα μπορούν να επιτευχθούν με την χρήση καλής ποιότητας σανού. [38]

2.2.2 ΦΥΤΙΚΑ ΕΛΑΙΑ

Τα φυτικά έλαια, γνωστά και ως φυτικά λίπη, προέρχονται από τη συμπίεση σπόρων ή άλλων τμημάτων φρούτων. Τα φυτικά λίπη, όπως και τα λίπη από ζωικά προϊόντα, αποτελούνται κυρίως από τριγλυκερίδια. Παραδείγματα φυτικών ελαίων από σπόρους είναι το σογιέλαιο και το βούτυρο κακάο, ενώ το ελαιόλαδο, το φοινικέλαιο και το λάδι ρυζιού προέρχονται από άλλα μέρη των φρούτων. Στην καθημερινή γλώσσα, ο όρος "φυτικό λάδι" συνήθως αναφέρεται σε έλαια που παραμένουν υγρά σε θερμοκρασία δωματίου. Αυτά τα έλαια είναι συνήθως κατάλληλα για κατανάλωση. Τα ακόρεστα φυτικά έλαια μπορούν να μετατραπούν σε ελαιώδη προϊόντα με υψηλότερο σημείο τήξης μέσω της διαδικασίας της υδρογόνωσης. Ορισμένα από αυτά τα προϊόντα, όπως η μαργαρίνη, παραμένουν στερεά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα φυτικά έλαια χρησιμοποιούνται: [38,39,40]

- Στην μαγειρική. Πολλά φυτικά έλαια καταναλώνονται είτε άμεσα είτε χρησιμοποιούνται ως συστατικά σε διάφορα τρόφιμα, παρόμοια με ορισμένα ζωικά λίπη, όπως το βούτυρο και το λαρδί. Τα έλαια μπορούν να θερμανθούν σε θερμοκρασίες πολύ πιο υψηλές από το σημείο βρασμού του νερού, γεγονός που τα καθιστά ιδανικά για τηγάνισμα. Για αυτήν τη χρήση, απαιτείται να έχουν υψηλό σημείο ανάφλεξης. Παραδείγματα τέτοιων ελαίων αποτελούν τα κύρια μαγειρικά έλαια, όπως από σόγια, ελαιοκράμβη, ηλίανθο, φυστίκι, βαμβακόσπορο κ.λπ., καθώς και τροπικά έλαια από καρύδα, φοίνικα και ρύζι, τα οποία είναι ιδιαίτερα δημοφιλή στους ασιατικούς πολιτισμούς λόγω των υψηλών σημείων ανάφλεξής τους που τα καθιστούν κατάλληλα για μαγείρεμα σε υψηλές θερμοκρασίες. [38,39,40]
- Στη βιομηχανία. Τα φυτικά έλαια χρησιμοποιούνται ευρέως ως συστατικά σε διάφορα βιομηχανικά προϊόντα. Πολλά από αυτά τα έλαια αξιοποιούνται στην παραγωγή σαπουνιών, προϊόντων περιποίησης δέρματος, αρωμάτων, κεριών και άλλων καλλυντικών και προϊόντων προσωπικής φροντίδας. Ορισμένα έλαια είναι κατάλληλα ως ξηραντικά λάδια και χρησιμοποιούνται και στην παραγωγή χρωμάτων. [38,39,40]
- Στα καύσιμα. Τα φυτικά έλαια χρησιμοποιούνται επίσης στην παραγωγή βιοντίζελ, το οποίο μπορεί να αντικαταστήσει το συμβατικό ντίζελ. Ορισμένα μείγματα φυτικών ελαίων είναι κατάλληλα για χρήση σε μη τροποποιημένα οχήματα, ενώ το καθαρό φυτικό έλαιο απαιτεί ειδικά διαμορφωμένα οχήματα, τα οποία διαθέτουν σύστημα θέρμανσης για να μειώσουν το ιξώδες του λαδιού. Η χρήση φυτικών ελαίων ως πηγή εναλλακτικής ενέργειας συνεχώς αυξάνεται, όπως και η διαθεσιμότητα του βιοντίζελ παγκοσμίως. [38]

	1976/80	1986/90	1996/00	2006/10	2016/20
World total	52.65	75.66	105.06	165.65	184.77
Soybean oil	11.23	15.28	23.14	33.60	41.12
Cottonseed oil	2.83	3.64	4.00	5.35	6.51
Groundnut oil	3.01	3.70	4.55	5.72	6.38
Sunflowerseed oil	4.21	7.25	9.11	12.43	16.97
Rapeseed oil	3.01	7.51	12.64	17.72	22.69
Sesameseed oil	0.51	0.64	0.70	0.86	0.96
Corn oil	0.83	1.35	1.91	2.49	3.16
Olive oil	1.68	1.80	2.47	2.75	2.98
Palm oil	3.69	9.22	18.72	31.43	43.36
Palmkernel oil	0.46	1.21	2.34	3.84	5.28
Coconut oil	2.85	3.07	3.01	3.70	4.55
Butter	5.60	6.35	5.81	6.93	7.99
Lard	4.25	5.17	6.38	7.93	9.14
Fish oil	1.13	1.53	1.25	1.18	11.59
Linseed oil	0.79	0.73	0.70	0.81	0.97
Castorseed oil	0.32	0.40	0.46	0.71	0.78
Tallow	6.24	6.79	7.85	10.06	10.76

Πίνακας 2-3. Ετήσια μέση παραγωγή 17 ελαίων και λιπών σε επιλεγμένες περιόδους πενταετίας. [38]

Η παραγωγή φυτικού ελαίου περιλαμβάνει την εξαγωγή του λαδιού από φυτικά μέρη, κυρίως από σπόρους. Αυτή η διαδικασία μπορεί να πραγματοποιηθεί με μηχανική εκχύλιση μέσω ελαιοτριβείου ή με χημική εκχύλιση χρησιμοποιώντας διαλύτες. Το εξαγόμενο έλαιο μπορεί στη συνέχεια να υποβληθεί σε διαδικασία καθαρισμού και, εφόσον είναι απαραίτητο, να υποστεί εξευγενισμό ή χημικές τροποποιήσεις. [38]

Η διαδικασία της μηχανικής διαδικασίας, η οποία ονομάζεται και «θρυμματισμός», «σπάσιμο» ή «άλεση», χρησιμοποιείται συνήθως για την παραγωγή παραδοσιακών ελαίων, όπως το ελαιόλαδο και το λάδι καρύδας, και προτιμάται από πολλούς καταναλωτές που ακολουθούν υγιεινή διατροφή, ιδιαίτερα στις Ηνωμένες Πολιτείες και στην Ευρώπη. Υπάρχουν διάφοροι τύποι μηχανικής εξαγωγής. Μία συνηθισμένη μέθοδος είναι η εκχύλιση μέσω πίεσης, αλλά χρησιμοποιούνται επίσης η πρέσα με κοχλία, η απλή πρέσα και το γκάνι (ηλεκτροκίνητο γουδί). Στις αναπτυσσόμενες χώρες, τα πιεστήρια ελαιούχων σπόρων χρησιμοποιούνται συχνά, καθώς άλλες μέθοδοι εκχύλισης θα ήταν οικονομικά ασύμφωρες. Το

γκάνι χρησιμοποιείται κυρίως στην Ινδία. Η επεξεργασία φυτικού ελαίου σε εμπορική κλίμακα συνήθως πραγματοποιείται μέσω χημικής εκχύλισης, χρησιμοποιώντας διαλύτες για την εξαγωγή του λαδιού, μια μέθοδος που προσφέρει υψηλότερες αποδόσεις και είναι πιο γρήγορη και οικονομική. Ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος διαλύτης είναι το εξάνιο, το οποίο προέρχεται από το πετρέλαιο. Αυτή η τεχνική εφαρμόζεται κυρίως για τα πιο σύγχρονα βιομηχανικά έλαια, όπως το λάδι σόγιας και καλαμποκιού. Μετά την εκχύλιση, ο διαλύτης εξατμίζεται, θερμαίνοντας το μείγμα στους 300 °F (149 °C) περίπου. [40]

Τα έλαια μπορούν να υποβληθούν σε μερική υδρογόνωση για να παραχθούν διάφοροι τύποι ελαίων με διαφορετικά χαρακτηριστικά. Τα ελαφρώς υδρογονωμένα έλαια έχουν φυσικά χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά του κανονικού σογιέλαιου, αλλά είναι πιο ανθεκτικά στην οξείδωση και το τάγγισμα. Όσον αφορά τα λάδια μαργαρίνης, πρέπει να είναι κυρίως στερεά στους 32 °C (90 °F) για να μην λιώσουν σε ζεστά δωμάτια, ενώ στους 37 °C (98 °F) πρέπει να παραμένουν εντελώς ρευστά, προκειμένου να αποφευχθεί η αίσθηση λιπαρότητας στο στόμα. [38]

3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΝΟΘΕΙΑΣ ΣΤΟ ΓΑΛΑ

Ο ποιοτικός προσδιορισμός της νοθείας στο γάλα είναι σχετικά απλή διαδικασία μέσω χημικών αντιδράσεων. Αντίθετα, η ποσοτική ανίχνευση της νοθείας παρουσιάζει σημαντικές προκλήσεις, καθώς η ακριβής μέτρηση της ποσότητας του νοθεύματος εξαρτάται άμεσα από το είδος της ξένης ουσίας που έχει προστεθεί. Οι μέθοδοι ποσοτικής ανάλυσης πρέπει να διαθέτουν υψηλή εξειδίκευση και ταχύτητα, προκειμένου να αποφευχθούν περιπτώσεις που θα

μπορούσαν να οδηγήσουν σε λανθασμένη αθώωση αποκλίνουσας συμπεριφοράς. Ανάλογα με το είδος νοθείας ποικίλλει και η τεχνική ανίχνευσης αυτής. Οι τεχνικές ανίχνευσης νοθείας χωρίζονται σε:

- Τεχνικές ηλεκτρομετανάστευσης
- Ανοσοχημικές μεθόδους
- Τεχνικές βασισμένες στην ανάλυση DNA
- Χρωματογραφικές
- Οργανοληπτικός έλεγχος
- Φασματοσκοπικές. [24]

3.1 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΝΟΘΕΙΑΣ ΜΕ ΑΝΑΜΙΞΗ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΕΙΔΩΝ

Στον τομέα της ανίχνευσης νοθείας με ανάμιξη γάλακτος από διαφορετικά είδη ζώων, δύο τεχνικές έχουν αναδειχθεί ιδιαίτερος σημαντικές: η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (PAGE). Ωστόσο, η ακριβής ποσοτική ανάλυση της νοθείας παρουσιάζει προκλήσεις λόγω του γενετικού και μη πολυμορφισμού, καθιστώντας τη διαδικασία πιο σύνθετη. Για τον εντοπισμό νοθείας ενός τύπου γάλακτος με ένα άλλο, επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθούν οι ακόλουθες μέθοδοι: ισοηλεκτρική εστίαση (IEF), τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (CE), αντίστροφης φάσης υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (RP HPLC) και ιοντοανταλλακτική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (IE HPLC), υδρόφοβη διαδραστική χρωματογραφία (HIC), ανοσοχημικές μέθοδοι (ELISA), τεχνικές PCR και φασματομετρία μάζας. Επιστημονικές έρευνες έχουν καταδείξει την αποτελεσματικότητα των μεθόδων της ανοσοχημικής τεχνικής ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) η οποία έχει αποδειχθεί ιδιαίτερος χρήσιμη στον εντοπισμό παραποίησης κατσικίσιου γάλακτος με αγελαδινό, πρόβειο και βουβαλίσιο γάλα. Επίσης, η μέθοδος PCR έχει επιτύχει την ανίχνευση της νοθείας αιγοπρόβειου γάλακτος με αγελαδινό γάλα και της ανίχνευσης αγελαδινού γάλακτος σε πρόβειο. Ο συνδυασμός των μεθόδων της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης και της φασματομετρίας μάζας με

ηλεκτροψεκασμό (HPLC/ESIMS) έχει χρησιμοποιηθεί για την πρακτική ανίχνευση της ποσότητας αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο, μέσω του προσδιορισμού των μοριακών μαζών διαφόρων πρωτεϊνών. [24,31]

Techniques	Marker components	References
Electro-migration		
Electrophoresis	bovine para-κ-casein bovine α ₅₁ –casein bovine α-casein	KAMINARIDES & KOUKIASSA (2002) TAMINE et al. (1999) VELOCO et al. (2002)
Isoelectric focusing	bovine γ ₂ and γ ₃ -caseins reference method EU goat and ewe para-κ-casein	ANONYM (2001) MAYER et al. (1997) CARTONI et al. (199)
Capillary electrophoresis	goat α-lactalbumin and bovine β-lactoglobulin A complete analysis of bovine caseins and whey proteins complete analysis of bovine, ewe and goat caseins and whey proteins bovine α ₅₁ -casein	HERRERO-MARTINEZ et al. (2000) DE JONG et al. (1993) LEE et al. (2001) CATTANEO et al. (1996)
Immunochemical methods		
Indirect ELISA	bovine κ-casein bovine immunoglobuline G goat α ₅₂ -casein bovine β-casein bovine α ₅₁ -casein	BITRI et al. (1993) HURLEY et al. (2004) HAZA et al. (1996) PIZZANO et al. (2000) ROLLAND et al. (1995)
Sandwich ELISA	bovine β-casein goat whey proteins bovine β-lactoglobulin	ANGUITA et al. (1997) GARCIA et al. (1993) LEVIEUX & VENIEN (1994)
Chromatography		
RP HPLC	bovine, goat and ewe β- lactoglobulins bovine α-lactalbumin and β- lactoglobulin B bovine α-casein	FERREIRA & CACOTE (2003) ROMERO et al. (1996) VELOSO et al. (2002)
HIC	bovine, goat and ewe α ₅₄ -, α ₅₂ , β- and κ-caseins	BRAMANTI et al. (2003)
Mass spectrometry		
MALDI MS	bovine α-lactalbumin, β- lactoglobulin A and B	COZZOLINO et al. (2001)

Πίνακας 3-1. Τεχνικές που χρησιμοποιούνται για ανίχνευση διαφόρων πρωτεϊνών μεταξύ διαφορετικών είδη ζώων. [41]

3.2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΗΛΕΚΤΡΟΜΕΤΑΝΑΣΤΕΥΣΗΣ

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών του γάλακτος με διάφορες τεχνικές ηλεκτροφόρησης αποτελεί μια από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους για την επαλήθευση της αυθεντικότητας, ακόμη και σε πολύ χαμηλά επίπεδα νοθείας, όπως η περιεκτικότητα 1% αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο. Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (PAGE) βοηθά στην ανίχνευση ξένων πρωτεϊνών, βασιζόμενη στις διαφορές στη μοριακή μάζα και τη διαμόρφωση πρωτεϊνών που προέρχονται από διάφορα είδη γαλακτοφόρων ζώων. Με αυτή τη μέθοδο έχει επιβεβαιωθεί η παρουσία αγελαδινού γάλακτος σε αιγοπρόβριο γάλα σε ποσοστό 25%. Επιπλέον, η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση καζεϊνών και πρωτεϊνών του ορού γάλακτος καθιστά εφικτή την ανίχνευση νοθείας με αγελαδινό γάλα σε συγκεντρώσεις 1-2%. Η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση αποτελεί μια γρήγορη και αξιόπιστη τεχνική υψηλής ανάλυσης, η οποία απαιτεί ελάχιστη ποσότητα δείγματος και παρέχει ακριβείς ποσοτικούς προσδιορισμούς. Επιπλέον, η ανάλυση κόστους παραμένει χαμηλή, καθώς δεν απαιτείται η χρήση επικαλυμμένων τριχοειδών σύμφωνα με τα πρωτόκολλα. Παρ' όλα αυτά, η μέθοδος παρουσιάζει χαμηλή αναπαραγωγιμότητα, περιορισμένη απόδοση και μικρή ικανότητα φόρτωσης δειγμάτων, λόγω της αναποτελεσματικότητας των διεπιφανειών μεταξύ των δύο διαχωριστικών διαστάσεων. Οι δύο διαστάσεις διαχωρισμού συνήθως αναφέρονται σε διαφορετικές πτυχές της ανάλυσης, οι οποίες συχνά περιλαμβάνουν τον ταυτόχρονο διαχωρισμό μορίων με βάση διαφορετικές ιδιότητες. Αυτές οι διακρίσεις μπορούν να αντιπροσωπεύουν διαφορετικές ιδιότητες, όπως το μέγεθος του μορίου, το φορτίο και άλλα χαρακτηριστικά ανάλογα με τους στόχους που έχουμε θέσει. [43]

3.2.1 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Η ηλεκτροφόρηση παίζει σημαντικό ρόλο στην έρευνα για τις πρωτεΐνες του γάλακτος καθώς και για τις γενετικές παραλλαγές των κύριων συστατικών πρωτεΐνης γάλακτος. Η ταξινόμηση των καζεϊνών έγινε μέσω ηλεκτροφορητικής ανάλυσης όπου βρέθηκαν δευτερεύοντα συστατικά καζεΐνης γ_1 , γ_2 , γ_3 και παρα-κ καζεΐνες. Η ηλεκτροφόρηση γέλης πολυακρυλαμιδίου (PAGE) αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για την ανάλυση των πρωτεϊνών του γάλακτος. Η μέθοδος διαχωρίζει τα μόρια ανάλογα με το ηλεκτρικό τους φορτίο και το μέγεθος τους. Κατά την PAGE, οι πρωτεΐνες είναι θετικά ή αρνητικά φορτισμένες, ανάλογα

με τις συνθήκες buffer και μεταναστεύουν με ταχύτητα με βάση τη φόρτισή τους και μέγεθος τους. Το πλεονέκτημα αυτής της τεχνικής έγκειται στο γεγονός ότι οι επιμέρους ομάδες πρωτεϊνών γάλακτος είναι καλά διαχωρισμένες. Είναι γεγονός ότι έχει πιστοποιηθεί η προσθήκη του βόειου γάλακτος (25% και περισσότερο) στο κατσικίσιο Kish προϊόν με τη βοήθεια της τεχνικής PAGE. Η ανάλυση στηρίχθηκε στην κινητικότητα της αS1-καζεΐνης βοοειδών. [41,42]

3.2.2 ΙΣΟΗΛΕΚΤΡΙΚΗ ΕΣΤΙΑΣΗ (IEF)

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών σύμφωνα με τα ισοηλεκτρικά τους σημεία είναι ιδιαίτερα κατάλληλος για την ανάλυση των καζεϊνών που σχηματίζουν πολλές γενετικές παραλλαγές. Για παράδειγμα, χρησιμοποιώντας το IEF αντί για ηλεκτροφόρηση PAGE για την ανάλυση των γενετικών παραλλαγών της β-καζεΐνης βοοειδών, η διαδικασία γίνεται πιο εύκολη. Αν για το ίδιο προσδιορισμό εφαρμοστεί η ηλεκτροφόρηση PAGE, πρέπει να γίνει τόσο σε αλκαλικό όσο και σε όξινο περιβάλλον για την διαφοροποίηση των παραλλαγών Α από Β, Γ και Δ, και για τις παραλλαγές Α1, Α2 και Α3. [43]

Η μέθοδος IEF αποτελεί τεχνική αναφοράς της Ευρωπαϊκής Ένωσης για την ανίχνευση της παρουσίας αγελαδινού γάλακτος και καζεϊνικού άλατος σε τυριά που παράγονται από πρόβειο, κατσικίσιο ή βουβαλίσιο γάλα, καθώς και από τα μείγματά τους. Η τεχνική βασίζεται στην αναγνώριση των γ-καζεϊνών μετά από πλασμινόλυση. Είναι κατάλληλη για την ευαίσθητη και εξειδικευμένη ανίχνευση τόσο ακατέργαστου όσο και θερμικά επεξεργασμένου αγελαδινού γάλακτος σε φρέσκα και ώριμα τυριά από πρόβειο, κατσικίσιο ή βουβαλίσιο γάλα ή τα μείγματά τους. Η ανίχνευση πραγματοποιείται μέσω του προσδιορισμού των γ2- και γ3-καζεϊνών. [44]

Τα ισοηλεκτρικά σημεία εντοπίζονται σε pH μεταξύ 6,5 και 7,5. Με τη χρήση δύο προτύπων αναφοράς γάλακτος (με περιεκτικότητα 0% και 1% αγελαδινού γάλακτος), είναι δυνατή η ανίχνευση της παρουσίας αγελαδινού γάλακτος στα δείγματα. Εάν οι ποσότητες της βόειας γ2-καζεΐνης και γ3-καζεΐνης είναι ίσες ή μεγαλύτερες από εκείνες που βρίσκονται στο πρότυπο 1%, τότε επιβεβαιώνεται η παρουσία αγελαδινού γάλακτος. Η μέθοδος αυτή μπορεί να ανιχνεύσει προσθήκη αγελαδινού γάλακτος σε ποσοστό 0,5%. Ωστόσο, ένα μειονέκτημα της μεθόδου είναι η αδυναμία προσδιορισμού νοθείας κατσικίσιου γάλακτος σε πρόβειο γάλα ή το

αντίστροφο. Αυτό μπορεί να αντιμετωπιστεί με την επιλογή ενός κατάλληλου δείκτη ανάλυσης, όπως η παρα-κ-καζεΐνη. [44,45]

3.2.3 ΤΡΙΧΟΕΙΔΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ (CE)

Η τριχοειδική ηλεκτροφόρηση αποτελεί μια παραλλαγή της ηλεκτροφόρησης, η οποία πραγματοποιείται ως ηλεκτροφόρηση χωρίς φορέα μέσω ελεύθερου τριχοειδούς. Πρόκειται για μια ταχέως εξελισσόμενη τεχνική που επιτρέπει τον γρήγορο διαχωρισμό καζεϊνών και πρωτεϊνών ορού γάλακτος με υψηλή ανάλυση και αξιόπιστη ποσοτικοποίηση. Η εφαρμογή της CE συνέβαλε στην ανάπτυξη αποδοτικών και αυτοματοποιημένων αναλύσεων, οι οποίες προσφέρουν εξαιρετική ανάλυση και απαιτούν μόνο ελάχιστες ποσότητες δειγμάτων και ρυθμιστικών διαλυμάτων. Έχει πραγματοποιηθεί πλήρης ανάλυση των καζεϊνών και των πρωτεϊνών ορού γάλακτος σε αγελαδινό, πρόβειο και κατσικίσιο γάλα μέσω τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης. Με βάση τα αποτελέσματα διαφόρων αναλύσεων, επιτεύχθηκε η ανίχνευση σε νοθείες (από 1%) σε αγελαδινό, πρόβειο και κατσικίσιο γάλα σε κάθε είδος μείγματος γάλακτος. [44,46]

3.3 ΑΝΟΣΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Σε μια τυπική ανοσοανάλυση (Immunoassay), χρησιμοποιείται ένα εξαιρετικά εξειδικευμένο αντίσωμα (Ab) για την ανίχνευση του αντιγόνου (Ag) ή του αντισώματος που βρίσκεται υπό μελέτη. Η υψηλή εξειδίκευση και συγγένεια του αντισώματος προς το συγκεκριμένο αντιγόνο επιτρέπει την ακριβή ταυτοποίηση και ποσοτική ανάλυση συγκεκριμένων μορίων με πολύ μεγάλη αναλυτική ευαισθησία. Η σύνδεση αντιγόνου-αντισώματος βασίζεται σε διαμοριακές δυνάμεις, όπως οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, οι δυνάμεις Van der Waals και οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Οι τεχνικές ανοσοανάλυσης διακρίνονται συνήθως σε δύο βασικές κατηγορίες: τις συναγωνιστικές και τις μη συναγωνιστικές. Στις συναγωνιστικές ανοσοαναλύσεις, το αντιγόνο του δείγματος

αναμειγνύεται με σημασμένο αντιγόνο παρουσία περιορισμένης ποσότητας αντισώματος. Αντίθετα, στις μη συναγωνιστικές ανοσοανάλυσεις, χρησιμοποιείται περίσσεια αντισώματος, ώστε να διασφαλιστεί ότι όλο το αντιγόνο δεσμεύεται από τα αντισώματα. Ένας ακόμη διαχωρισμός των ανοσοανάλυσεων είναι αυτός σε ετερογενείς και ομογενείς αναλύσεις. Στις ετερογενείς αναλύσεις είναι αναγκαίος ο διαχωρισμός των ελεύθερων αντιδρώντων μορίων από τα σχηματιζόμενα ανοσοσύμπλοκα, ενώ στις ομογενούς τύπου ανοσοανάλυσεις, οι μεταβολές που παρατηρούνται στο σήμα προκύπτουν από την ανοσοαντίδραση και επομένως ελέγχετε το ίδιο το ανοσοσύμπλοκο, χωρίς να είναι απαραίτητος ο διαχωρισμός του προσδεδεμένου από το ελεύθερο αντιγόνο. [47,48]

Οι ανοσοχημικές μέθοδοι είναι ιδανικές για την ανίχνευση συγκεκριμένων πρωτεϊνικών κλασμάτων από αγελαδινό, πρόβειο ή κατσικίσιο γάλα. Η βασική αρχή αυτών των μεθόδων βασίζεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ αντιγόνου (πρωτεΐνη γάλακτος) και αντισώματος. Στις ανοσοανάλυσεις χρησιμοποιούνται εξειδικευμένα μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά αντισώματα, τα οποία αντιδρούν με πρωτεΐνες του ορού γάλακτος, επιμέρους κλάσματα καζεΐνης και πεπτιδικά θραύσματα καζεϊνών. Αντιδράσεις αντισωμάτων έχουν περιγραφεί με διάφορες πρωτεΐνες, όπως η βόεια β-λακτοσφαιρίνη, η βόεια IgG, η βόεια κ-καζεΐνη, η βόεια β-καζεΐνη, η βόεια αS1-καζεΐνη, και οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος του κατσικίσιου γάλακτος. Μέσα από διασταυρούμενες δοκιμές με διαφορετικές πρωτεΐνες γάλακτος, αποδείχθηκε ότι τα αντισώματα έχουν πολύ υψηλή εξειδίκευση και παρουσιάζουν ελάχιστες διασταυρούμενες αλληλεπιδράσεις. Οι μέθοδοι αυτές χαρακτηρίζονται από εξαιρετική ευαισθησία, επιτρέποντας την ανίχνευση νοθεύσεων σε ποσοστά μικρότερα του 0,5%. [47]

Η μέθοδος ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) αποτελεί μια ετερογενή ανοσοχημική τεχνική με υψηλή εξειδίκευση. Η ποσότητα του συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος προσδιορίζεται από την προσθήκη κατάλληλου υποστρώματος, το προϊόν της αντίδρασης του οποίου, με τη βοήθεια ενζύμου, δίνει έγχρωμο προϊόν ή φως. Η μέτρηση της έντασης του χρώματος ή του φωτός, σε ειδικά φωτόμετρα ή λουμινόμετρα, δίνει πληροφορίες για τον αριθμό των σημασμένων συμπλόκων και κατ'έκταση, για τη ποσότητα του αντιγόνου ή αντισώματος που θέλουμε να ανιχνεύσουμε στο αρχικό δείγμα. Η ποσοτικοποίηση γίνεται με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης αναφοράς. [48]

Υπάρχουν διάφορες μελέτες που αποδεικνύουν τη χρήση αυτής της μεθόδου για την ανίχνευση νοθείας στο γάλα. Τόσο η έμμεση (ανταγωνιστική) όσο και η σάντουιτς (μη ανταγωνιστική) ELISA έχουν εφαρμοστεί για αυτόν τον σκοπό. Η μέθοδος ELISA έχει

χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο, πρόβειο και βουβαλίσιο γάλα. Επιπλέον, έχει εφαρμοστεί και για την ανίχνευση κατσικίσιου γάλακτος σε πρόβειο γάλα. Για την ανίχνευση γαλάτων με παρόμοια χαρακτηριστικά, όπως το αγελαδινό και το βουβαλίσιο, η χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων κατά της βόειας ανοσοσφαιρίνης G φαίνεται να είναι μια πιθανή και αποτελεσματική επιλογή. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι οι ανοσοσφαιρίνες δεν οδηγούνται με έναν εύκολο τρόπο σε πρωτεόλυση και είναι αρκετά πιο ισχυρά ανοσογόνα σε σύγκριση με τις καζεΐνες και άλλες πρωτεΐνες του ορού γάλακτος. Όταν εφαρμόστηκε αυτή η μέθοδος ανίχνευσης αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο, πρόβειο και βουβαλίσιο γάλα μέσω έμμεσης ELISA εντοπίστηκαν έως και 0,1% βόειων IgG σε όλα τα είδη γάλακτος. Το τεστ αυτό είναι κατάλληλο τόσο για νωπό όσο και για παστεριωμένο ή κατεψυγμένο γάλα. Ωστόσο, δεν ενδείκνυται για γάλα UHT ή αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη, λόγω της μετουσίωσης των βόειων IgG που συμβαίνει κατά τη θερμική επεξεργασία. [49,50]

3.4 ΤΕΧΝΙΚΗ ΒΑΣΙΣΜΕΝΗ ΣΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ DNA

Η μέθοδος της PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης) αφορά τον πολλαπλασιασμό συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA που προέρχονται από το γενετικό υλικό διαφόρων ειδών. Μέσω της τεχνικής αυτής, είναι εφικτός ο ακριβής εντοπισμός νοθείας που προκύπτει από την ανάμειξη γάλακτος διαφορετικής προέλευσης. Για παράδειγμα, έχουν ανιχνευθεί β-καζεΐνες από αγελαδινό ή βουβαλίσιο γάλα σε κατσικίσιο και πρόβειο γάλα, χρησιμοποιώντας την ειδική για την αλληλουχία επιβράδυνση που επιτυγχάνεται μέσω ενός παρεμβαλλόμενου παράγοντα κατά την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης. Επιπλέον, η PCR έχει επιτρέψει τη μελέτη της πρόσμιξης αγελαδινού γάλακτος με βουβαλίσιο σε συγκεντρώσεις έως 0,5%, κάνοντας χρήση εκκινητών που στοχεύουν σε μιτοχονδριακά γονίδια 12S rRNA της αγελάδας. Παράλληλα, η τεχνική διπλής PCR, όπου εφαρμόζονται δύο ζεύγη εκκινητών που επικεντρώνονται στην περιοχή του μιτοχονδριακού βρόχου D, έχει αποδειχθεί αποτελεσματική

για την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε κατσίκισιο έως και σε ποσοστό 1%. Οι μέθοδοι ανάλυσης DNA χαρακτηρίζονται από χρονοβόρα διαδικασία, υψηλό κόστος και απαιτητικές διαδικασίες, καθώς και απαιτούμενη ειδική προετοιμασία του δείγματος. Παρόλα αυτά, διαθέτουν μεγαλύτερη ευαισθησία και αξιοπιστία σε σύγκριση με τις τεχνικές ανάλυσης πρωτεϊνών ή λιπαρών οξέος, διότι το γενετικό υλικό παραμένει ακέραιο έπειτα από χημικές και θερμικές επεξεργασίες που έχει υποστεί. Ωστόσο, οι απαιτούμενες λεπτομερείς μεθόδους προετοιμασίας των δειγμάτων, είναι δαπανηρές, καταστροφικές για τα δείγματα, και χρονοβόρες, ενώ απαιτείται και κατάλληλα εκπαιδευμένο προσωπικό. [34,51,52]

3.5 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ

Στην χημική ανάλυση περιλαμβάνονται διάφορες διαδικασίες μέτρησης, όπως η ζύγιση, η μέτρηση όγκου πρότυπου διαλύματος, απορρόφησης ή ακόμη και δυναμικού. Σε ορισμένες αναλυτικές μεθόδους, είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί η απαιτούμενη μέτρηση για τον προσδιορισμό ενός συστατικού, ακόμη και με τη παρουσία άλλων ουσιών, επειδή αυτές οι μέθοδοι είναι είτε εκλεκτικές είτε, σε σπάνιες περιπτώσεις, απόλυτα εξειδικευμένες (όπως οι ανοσοχημικές μέθοδοι). Ωστόσο, στις περισσότερες περιπτώσεις, η μέτρηση εμποδίζεται από τις συνυπάρχουσες ουσίες, γι' αυτό προηγείται το στάδιο του διαχωρισμού πριν τη μέτρηση. [53]

Οι τεχνικές διαχωρισμού μπορούν να καταταχθούν σε τρεις βασικές κατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία περιλαμβάνονται μέθοδοι που αξιοποιούν τις διαφορές στις ιδιότητες των ουσιών που συνυπάρχουν στην αρχική και μοναδική φάση, όπως η υπερδιήθηση, η διαπίδυση και η ηλεκτροδιαπίδυση. Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει τεχνικές όπου δημιουργείται μια δεύτερη φάση με διαφορετική, όσο το δυνατόν, συγκέντρωση της επιθυμητής ουσίας. Αυτές οι τεχνικές, που είναι και οι πιο διαδεδομένες, συνήθως περιλαμβάνουν δύο στάδια:

- Σχηματισμός συστήματος δύο φάσεων, όπου η μία περιέχει την παρεμποδίζουσα ουσία (ή ουσίες) και η άλλη την ουσία που προσδιορίζεται. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω διαδικασιών όπως η καθίζηση, η εκχύλιση ή η απόσταξη.
- Μηχανικός διαχωρισμός των φάσεων, για παράδειγμα, με διήθηση, φυγοκέντρωση ή τη χρήση διαχωριστικής χοάνης, λαμβάνοντας μέριμνα για την ποσοτική παραλαβή της

φάσης που περιέχει την προσδιοριζόμενη ουσία προς ανάλυση. Οι δύο φάσεις μπορεί να είναι αέρια, υγρή ή στερεή. [53,54]

Στην τρίτη κατηγορία ανήκουν οι χρωματογραφικές τεχνικές, όπου ο διαχωρισμός των συστατικών ενός μείγματος βασίζεται στην κατανομή τους μεταξύ δύο φάσεων: μιας στατικής (στερεής ή υγρής) και μιας κινητής (υγρής ή αέριας). Η κινητική φάση, καθώς περνά μέσα από τη στατική φάση, προκαλεί τη διαφορετική μετατόπιση των συστατικών του μείγματος στη στατική φάση. Οι χρωματογραφικές τεχνικές, όταν συνδυάζονται με κατάλληλα συστήματα ανίχνευσης και μέτρησης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο για τον ποιοτικό όσο και για τον ποσοτικό προσδιορισμό των συστατικών ενός δείγματος, αποτελώντας σύγχρονες ενόργανες τεχνικές ανάλυσης. [53,54]

Οι χρωματογραφικές τεχνικές εφαρμόζονται για την ποιοτική αξιολόγηση και την ποσοτική μέτρηση μεμονωμένων συστατικών σε σύνθετα μείγματα, μέσω της χρήσης μιας στατικής και μιας κινητής φάσης. Εφαρμόζονται για την ποσοτική εκτίμηση μειγμάτων που προκύπτουν από την ανάμιξη γάλακτος διαφορετικών προελεύσεων, καθώς και ξένων ουσιών που προστίθενται εσκεμμένα στη γάλα και τα προϊόντα του, όπως αντιβιοτικά, εντομοκτόνα και διάφορα πρόσθετα. Οι καθιερωμένες χρωματογραφικές τεχνικές χαρακτηρίζονται από υψηλή ευαισθησία, δυνατότητα ανάλυσης σύνθετων δειγμάτων και παραγωγής αξιόπιστων αποτελεσμάτων. Επιπλέον, έχουν τη δυνατότητα αναγνώρισης και ταυτοποίησης ευρέος φάσματος ενώσεων. Στον πίνακα 3-2 αναφέρονται ονομαστικά χρωματογραφικές τεχνικές, η αρχή στην οποία βασίζονται αλλά και παραδείγματα εφαρμογής αυτών. [55]

Τεχνική	Αρχή τεχνικής	Παραδείγματα εφαρμογής
Χρωματογραφία προσροφήσεως σε στήλη	Διαφορές στην προσρόφηση ουσιών σε στερεά	Διαχωρισμός μείγματος γλυκοσιδών από φύλλα δακτυλίτιδας
Χρωματογραφία κατανομής σε στήλη	Κατανομή ουσιών μεταξύ δύο υγρών σε στήλη	Διαχωρισμός μείγματος φαρμάκων (φαινοθειαζίνη, διφαινυλαμίνη, καρβαζόλη)
Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας	Προσρόφηση (ή κατανομή) σε λεπτή στιβάδα	Διαχωρισμός αμινοξέων, σακχάρων, λιπαρών οξέων, προσμείξεων σε φαρμακευτικές πρώτες ύλες

Χρωματογραφία κατανομής σε χάρτη	Κατανομή ουσιών μεταξύ δύο υγρών σε φύλλο χάρτη	Διαχωρισμός αμινοξέων, οργανικών οξέων, αλκαλοειδών
Υγρή χρωματογραφία υψηλής αποδόσεως	Υγρή χρωματογραφία στήλης υπό υψηλή πίεση	Διαχωρισμός μείγματος φαρμάκων σε σκευάσματα, νουκλεοτιδίων
Χρωματογραφία ιονανταλλαγής σε στήλη	Ανταλλαγή ιόντων	Διαχωρισμός κατιόντων ή ανιόντων
Αέρια χρωματογραφία	Κατανομή αερίου μεταξύ μιας αέριας και μιας υγρής στερεής φάσεως	Διαχωρισμός μείγματος αλκοολών
Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού	Μέγεθος μορίων μείγματος ουσιών	Διαχωρισμός μείγματος ουσιών διαφορετικού μοριακού βάρους

Πίνακας 3-2. Χρωματογραφικές τεχνικές: Αρχή τεχνικής και παραδείγματα εφαρμογών. [55]

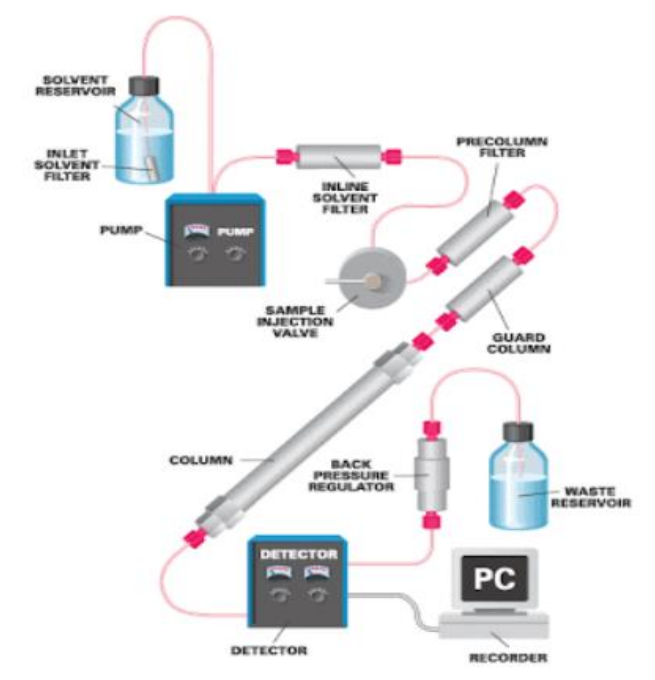
3.5.1 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)

Η χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) είναι μία από τις τεχνικές χρωματογραφίας, όπου ο διαχωρισμός των ουσιών επιτυγχάνεται μέσω της αλληλεπίδρασης μιας στατικής και μιας κινητής φάσης. Στη διαδικασία HPLC, το δείγμα εισάγεται στην κορυφή της στήλης και τα συστατικά του προωθούνται μέσω της κινητής φάσης, σχηματίζοντας ζώνες που διαχωρίζονται και εκκλύονται διαδοχικά. Ο διαχωρισμός των αναλυόμενων ουσιών οφείλεται στην κατανομή τους ανάμεσα στη στατική και την κινητή φάση, γεγονός που οδηγεί στη διαφορετική ταχύτητα μετακίνησής τους κατά μήκος της στήλης. Στην HPLC, είναι δυνατό να αξιοποιηθούν και να εφαρμοστούν όλοι οι τύποι διαχωρισμών που πραγματοποιούνται στη χρωματογραφία, μέσω της κατάλληλης επιλογής του υλικού πλήρωσης της στήλης και του διαλύτη που χρησιμοποιείται για την έκλυση. [55,56]

Ένα σύστημα HPLC αποτελείται από τα εξής μέρη:

- Φιάλες αποθήκευσης για τους διαλύτες.
- Αντλία που μπορεί να λειτουργεί σε σταθερή ροή ή σταθερή πίεση.
- Μονάδα εισαγωγής δείγματος, η οποία περιλαμβάνει είτε βαλβίδα εισαγωγής είτε αυτόματο δειγματολήπτη.
- Χρωματογραφική στήλη.
- Ανιχνευτή.
- Σύστημα καταγραφής. [55]

Η αναλυτική στήλη είναι το σημείο όπου πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος, ενώ η αντλία είναι υπεύθυνη για την κίνηση της κινητής φάσης μέσα από τη στήλη. Η διαδικασία του διαχωρισμού ξεκινά με την εισαγωγή του δείγματος στη χρωματογραφική στήλη. [55]



Εικόνα 3-1. Διάταξη υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)

Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται εκτενώς για την απομόνωση πρωτεϊνών γάλακτος. Το πλεονέκτημα της τεχνικής HPLC έγκειται στην ταχύτητά της, την απλότητα και τη δυνατότητα αυτοματισμού. Η ανάλυση των πρωτεϊνών γάλακτος μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορους τύπους

χρωματογραφίας, όπως αντίστροφη φάση, αλλαγή ιόντων (τόσο ανιόντων όσο και κατιόντων), μοριακό αποκλεισμό και υδρόφοβη υγρή χρωματογραφία. [57,58]

3.5.2 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΦΑΣΗΣ (RP-HPLC)

Η χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (RP-HPLC) αποτελεί μια μέθοδο χρωματογραφικού διαχωρισμού που βασίζεται στην υδροφοβική φύση των ουσιών που υποβάλλεται σε ανάλυση. Η αντίστροφη φάση στη υγρή χρωματογραφία (RP-LC) αποτελεί μια μέθοδο υγρής χρωματογραφίας που χρησιμοποιεί μη πολικές στατικές φάσεις και πολικές κινητές φάσεις για την ανάλυση και τον διαχωρισμό οργανικών ενώσεων. Τα τελευταία χρόνια, η πλειονότητα των διαχωρισμών και αναλύσεων μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) πραγματοποιείται με αυτή την προσέγγιση. Στην αντίστροφη φάση, η κατακράτηση των συστατικών του δείγματος στο χρωματογραφικό σύστημα εξαρτάται από τον βαθμό υδροφοβικότητάς τους – όσο πιο υδρόφοβο είναι ένα συστατικό, τόσο περισσότερο διατηρείται. [59,60]

Ο συνδυασμός της χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης με υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (LC-MS) έχει χρησιμοποιηθεί για τον ποσοτικό καθορισμό και τη δομική ανάλυση των γλυκομακροπεπτιδίων (GMPs) με υψηλότερο επίπεδο ακρίβειας και αξιοπιστίας. Επιπλέον, η ίδια προσέγγιση έχει αξιοποιηθεί για την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο και πρόβειο γάλα, μέσω της ανάλυσης πρωτεϊνών του ορού διαφόρων ειδών (a-La, b-Lg). Η ανίχνευση των νοθευτών βασίστηκε στους χρόνους κατακράτησης των πρωτεϊνών ορού γάλακτος και τις γενετικές παραλλαγές. Αυτή η τεχνική επέτρεψε την ανίχνευση νοθευμάτων σε μικρότερες ποσότητες του 1%. Ένα μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι δεν διακρίνει το κατσικίσιο από το πρόβειο γάλα, λόγω της ομοιότητας στους χρόνους των πρωτεϊνών του ορού των συγκεκριμένων ειδών κατά την διαδικασία της κατακρήμνισης [59,60]

Επίσης, με RP- HPLC ανιχνεύθηκε και ποσοτικοποιήθηκε η προσθήκη βοείου γάλακτος στο κατσικίσιο γάλα μόνο όταν αυτή ξεπερνούσε το 5%. Η ανίχνευση βασίστηκε στην παρουσία της κορυφής της α-καζεΐνης. [59,60]

3.5.3 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΑΝΤΑΛΛΑΓΗΣ ΙΟΝΤΩΝ (ΙΕ HPLC)

Η ιοντοανταλλακτική χρωματογραφία βασίζεται στο διαχωρισμό ιόντων μέσω ανταλλαγής μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης. Για τον προσδιορισμό της αυθεντικότητας του προϊόντος κατσίκας Kish, χρησιμοποιήθηκε FPLC προσδιορισμός ανιόντων (ταχεία υγρή χρωματογραφία πρωτεΐνης). Αυτή η τεχνική είναι ικανή να αναγνωρίσει το βοδινό γάλα στο κατσικίσιο γάλα μέσω της α S1 καζείνης. [52,53]

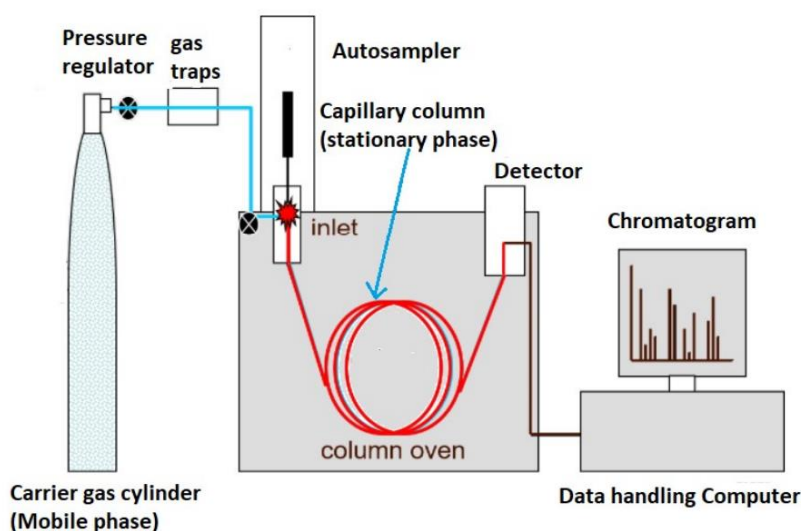
3.5.4 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ (LC)

Στην υγρή χρωματογραφία στήλης (LC), η στατική φάση αποτελείται από στερεό υλικό ή υγρό που είναι καθηλωμένο σε στερεό υπόστρωμα και βρίσκεται συσκευασμένο σε στήλη, ενώ η κινητή φάση είναι υγρό. Η διαβίβαση της υγρής κινητής φάσης μέσω της στατικής φάσης επιτυγχάνεται είτε λόγω βαρύτητας είτε με τη χρήση αντλιών χαμηλής πίεσης, όταν η στατική φάση αποτελείται από σωματίδια σχετικά μεγάλου μεγέθους, τα οποία παρέχουν μικρή αντίσταση (κλασική υγρή χρωματογραφία στήλης). Η LC χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό και την ανάλυση μειγμάτων μοριακών ή ιοντικών ενώσεων με χαμηλές τάσεις ατμών, καθώς και ενώσεις που είναι θερμικά ασταθείς και δεν μπορούν να εξατμιστούν χωρίς να διασπαστούν. Η μέθοδος αυτήν αποτελεί σπουδαίο εργαλείο κυρίως για διαχωρισμούς, ενώ για ποσοτικούς προσδιορισμούς με μικρή ακρίβεια χρησιμοποιείται σπανιότερα. Σε αντίθεση με την LC, η HPLC είναι η πλέον κατάλληλη χρωματογραφική τεχνική για ποσοτική ανάλυση σύνθετων μειγμάτων. Η τεχνική της LC όταν εφαρμοστεί μαζί με την MS, αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο για την αναγνώριση ξένων προστιθέμενων ουσιών σε δείγματα γάλακτος αλλά και για την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο και πρόβιο γάλα (βλέπε 3.5.2) [54,55,61]

3.5.5 ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Η αέρια χρωματογραφία (GC) είναι μια τεχνική ανάλυση που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των συστατικών ενός μείγματος και την ανίχνευση τους, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η παρουσία ή η απουσία αυτών (ποιοτική ανάλυση) ή να προσδιοριστεί η ποσότητα τους (ποσοτική ανάλυση). Για μια σωστά ολοκληρωμένη ανάλυση, τα συστατικά του μείγματος πρέπει να είναι πτητικά, με μοριακό βάρος κάτω από 1250 Da και θερμικά σταθερά, ώστε να μην καταστρέφονται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας. [54,62,63]

Ο διαχωρισμός των συστατικών γίνεται σε μια λεπτή (τριχοειδή) χρωματογραφική στήλη, στην οποία τα συστατικά του μείγματος προσροφώνται σε διαφορετικούς βαθμούς από τη σταθερή φάση. Παράλληλα, παρασύρονται από την αέρια κινητή φάση (όπως He, N₂ ή H₂), με αποτέλεσμα τα συστατικά να εξέρχονται από τη στήλη σε διαφορετικούς χρόνους κατακράτησης (Retention times, Rt). Αφού ανιχνευθούν από ειδικούς ανιχνευτές, τα συστατικά ταυτοποιούνται ή/και προσδιορίζονται ποσοτικά. Το αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι το αεριοχρωματογράφημα. Η ταυτοποίηση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των συστατικών γίνεται με σύγκριση με πρότυπες ουσίες. [54,64,65]



Εικόνα 3-2. Αέριος χρωματογράφος

Η απόδοση της αέριας χρωματογραφίας βελτιώνεται σημαντικά όταν χρησιμοποιείται ένα φασματόμετρο μάζας (mass spectrometer) ως ανιχνευτής για τα συστατικά που εξέρχονται από τη χρωματογραφική στήλη. Σε αυτή την περίπτωση, αναφερόμαστε στην τεχνική αέριας

χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (GC/MS). Το φασματόμετρο μάζας διασπά κάθε συστατικό που εξέρχεται από τη στήλη σε ιόντα και, στη συνέχεια, διαχωρίζει τα ιόντα με βάση τη μάζα και το φορτίο τους. Η καταγραφή των θραυσμάτων που προκύπτουν από κάθε συστατικό αποτελεί το φάσμα μάζας του και μπορεί να θεωρηθεί ως το «δακτυλικό αποτύπωμα» του συστατικού. Η σύγκριση του φάσματος μάζας με τα φάσματα γνωστών ουσιών επιτρέπει την ταυτοποίηση του συστατικού. Αυτή η διαδικασία πραγματοποιείται σήμερα με μεγάλη ταχύτητα χρησιμοποιώντας ηλεκτρονικούς υπολογιστές που περιέχουν βιβλιοθήκες φασμάτων μάζας σε ψηφιακή μορφή. [66,67,68,69]

3.6 ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

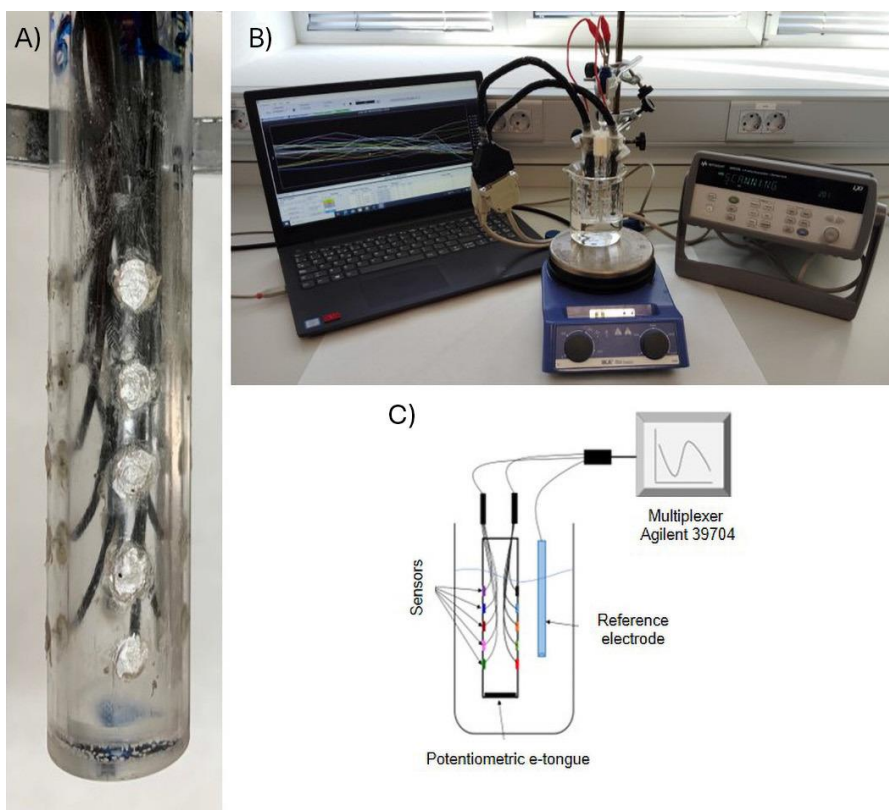
Η αξιολόγηση μέσω των αισθητηριακών οργάνων είναι μία από τις βασικές μεθόδους ποιοτικού ελέγχου του γάλακτος. Στη διαδικασία αυτή εξετάζονται η εμφάνιση, η γεύση και το άρωμα του προϊόντος, ενώ παράλληλα αναλύονται τα επίπεδα λιπαρών, στερεών και πρωτεϊνών που περιέχει. Ωστόσο, ο αισθητηριακός έλεγχος από μόνος του δεν επαρκεί για την εξασφάλιση αξιόπιστων αποτελεσμάτων, γι' αυτό και συνδυάζεται με εξειδικευμένες τεχνικές που αποσκοπούν στην ανίχνευση νοθείας. Για τον ίδιο λόγο, η επιστημονική κοινότητα έχει αναπτύξει διάφορες τεχνολογίες τεχνητής νοημοσύνης, με την ηλεκτρονική γλώσσα να ξεχωρίζει ως μια από αυτές. Οι ηλεκτρονικές γλώσσες, γνωστές και ως e-tongues, έχουν αναπτυχθεί για την ανάλυση δειγμάτων γάλακτος λόγω της αξιοπιστίας, της απλότητας, της ταχύτητας και του χαμηλότερου κόστους τους σε σύγκριση με άλλες μεθόδους. Στην ίδια κατηγορία αισθητηριακού ελέγχου μαζί με τα e-tongues ανήκουν και τα ηλεκτρονικά συστήματα μύτης (E-nose). Τα e-nose έχουν εμφανιστεί τα τελευταία χρόνια για να εντοπίζουν γρήγορα και με ακρίβεια την παραποίηση προϊόντων τροφίμων και να διασφαλίζουν και αυτά την ποιότητα των τροφίμων. Τα συστήματα ηλεκτρονικής μύτης έχουν την ικανότητα να ανιχνεύουν και να αναγνωρίζουν τεχνητά διαφορετικά αρώματα.

Η αρχή λειτουργίας της ηλεκτρονικής γλώσσας βασίζεται στην ανάλυση φυσικών, χημικών ή/και βιοχημικών χαρακτηριστικών, όπου μέσω των αισθητήρων του δικτύου της, αυτά τα χαρακτηριστικά μετατρέπονται σε αναλυτικά δεδομένα. Οι 36 αισθητήρες, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από υψηλή σταθερότητα και διασταυρούμενη ευαισθησία, με ρυθμιζόμενη εξειδίκευση και εκλεκτικότητα, προκαλεί την επιτυχή αναγνώριση πέντε βασικών γευστικών

προτύπων. Σε συνδυασμό με κατάλληλη στατιστική επεξεργασία, αυτή η μέθοδος προσφέρει ταχείες και εύκολες μετρήσεις. Έρευνες στον τομέα αυτό περιλαμβάνουν τη χρήση διασταυρούμενων ευαίσθητων στερεών ηλεκτροδίων επαφής για την ανίχνευση νοθείας κατσικίσιου γάλακτος με αγελαδινό γάλα, βολταμετρικής ηλεκτρονικής γλώσσας βασισμένης σε ηλεκτροχημικούς αισθητήρες πολυπυρρόλης για τον έλεγχο φρέσκου γάλακτος νοθευμένου με άμυλο, βολταμετρικής ηλεκτρονικής γλώσσας μιας χρήσης για την ανίχνευση νοθείας γάλακτος με υπεροξειδίο του υδρογόνου, φορητής και βολταμετρική ηλεκτρονική γλώσσα αποτελούμενη από μεταλλικά ηλεκτρόδια για τον εντοπισμό υπολειμμάτων διαφορετικών αντιβιοτικών στο αγελαδινό γάλα και την παρατήρηση της ποιότητας και του χρόνου αποθήκευσης για δείγματα παστεριωμένου γάλακτος. [70,71]

Ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα του e-tongue είναι η ικανότητά του να διακρίνει διαφορετικούς τύπους γάλακτος και να ανιχνεύει κοινά νοθεύματα με μεγάλη ακρίβεια. Με τη χρήση μεμβρανών και χημειομετρικών μεθόδων, το σύστημα έχει καταφέρει να ξεχωρίσει το ωμό, το παστεριωμένο, το φαρμακευτικό γάλα αγελάδας και το κατσικίσιο γάλα. Παράλληλα, ανίχνευσε αποτελεσματικά διάφορες νοθείες, όπως η προσθήκη νερού σε γάλα αγελάδας και κατσίκας, καθώς και την παρουσία γάλακτος αγελάδας σε κατσικίσιο γάλα. Επιπλέον, το e-tongue έχει δείξει ενθαρρυντικά αποτελέσματα στη συσχέτιση των αποκρίσεων των αισθητήρων με παραδοσιακές παραμέτρους γάλακτος. Μέσω της συσχέτισης δεδομένων ποτενσιομετρικών αισθητήρων με φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως τα επίπεδα λίπους, πρωτεΐνης και λακτόζης, το σύστημα παρείχε χρήσιμες πληροφορίες για τη σύσταση του γάλακτος. Τα αναπτυχθέντα μοντέλα παρουσίασαν υψηλή προγνωστική ακρίβεια, αναδεικνύοντας τη δυνατότητα του e-tongue να αξιολογεί γρήγορα την ποιότητα του γάλακτος. [72]

Στο μέλλον, η ενσωμάτωση ενός συστήματος ηλεκτρονικής γλώσσας ή ηλεκτρονικής μύτης με συνεχείς μετρήσεις σε μια βιομηχανική γραμμή παραγωγής θα προσφέρει αρκετά πλεονεκτήματα, όπως η ευκολία παραγωγής και η αυτοματοποίηση της παρακολούθησης της διαδικασίας και της ιχνηλασιμότητας της παραγωγής. [70,71,72]



Εικόνα 3-3 Ποτενσιομετρική συσκευή. (Α) Οι μεμβράνες της συσκευής που χρησιμοποιούνται ως ποτενσιομετρική ηλεκτρονική γλώσσα. (Β) Εικόνα συνδεδεμένης ποτενσιομετρικής συσκευής ηλεκτρονικής γλώσσας με τον πολυπλέκτη Agilent 39704. (C) Απεικόνιση του συστήματος αισθητήρα, του ηλεκτροδίου αναφοράς και της λήψης δεδομένων.

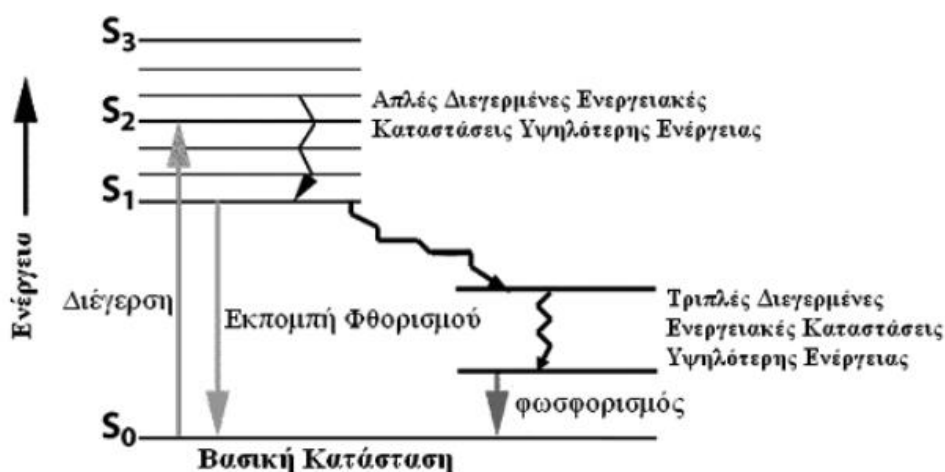
3.7 ΜΕΘΟΔΟΙ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ

Οι φασματοσκοπικές μέθοδοι στηρίζονται στην ικανότητα των υλικών να εκπέμπουν ή να αλληλοεπιδρούν με ακτινοβολίες συγκεκριμένων συχνοτήτων, καθώς και στη μέτρηση φασμάτων που σχετίζονται με το μήκος του κύματος και την ένταση της ακτινοβολίας. Σε αυτές τις τεχνικές, μετρούνται είτε η απορρόφηση (A) είτε η διαπερατότητα (T) του δείγματος, καθώς και η ένταση της ακτινοβολίας. Βάσει αυτών των μετρήσεων πραγματοποιείται ανάλυση τόσο ποιοτική όσο και ποσοτική. Την απεικόνιση της απορρόφησης ή της διαπερατότητας σε συνάρτηση με το μήκος κύματος (λ) ή τον κυματαριθμό (ν) αποδίδει το φάσμα απορρόφησης, το οποίο χρησιμοποιείται για την ανίχνευση χαρακτηριστικών ομάδων, τη διευκρίνιση της δομής της ουσίας, αλλά και για την ταυτοποίηση της. Από την απορρόφηση A μπορεί να υπολογιστεί η συγκέντρωση της ουσίας που απορροφά σύμφωνα με το νόμο του Lambert-Beer. Αντίστοιχες πληροφορίες λαμβάνονται και από τα φάσματα εκπομπής. [73]

Όταν η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία περνά μέσα από την ύλη, προκαλεί δονήσεις ή/και περιστροφές στα μόρια μέσω των δεσμών τους, γεγονός που οδηγεί σε διαφορετική απορρόφηση ενέργειας. Με την ανάλυση της ενέργειας που περιέχει, είναι δυνατόν να καθοριστεί η χημική σύσταση ενός σύνθετου μείγματος. Μεγάλο πλεονέκτημα των φασματοσκοπικών μεθόδων αποτελεί το γεγονός, πως παρέχουν πληροφορίες για τη σύσταση ενός μείγματος μέσα από ένα φάσμα, συνήθως χωρίς την ανάγκη παραγωγοποίησης. [73,74]

3.7.1 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ

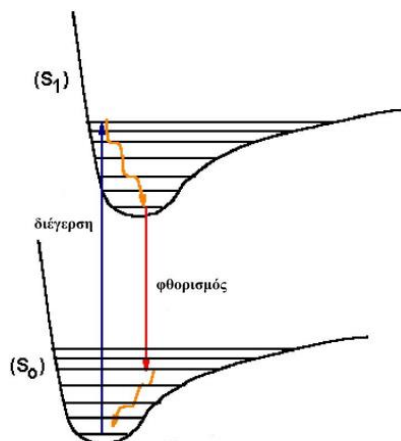
Το φαινόμενο του φθορισμού προκαλείται από την αλληλεπίδραση της ενέργειας, με την οποία ακτινοβολείται ένα μόριο ή σωματίδιο που βρίσκεται σε διάλυμα, με το ίδιο το μόριο ή το σωματίδιο. Ο φθορισμός παρουσιάζεται, όταν το μόριο απορροφά ενέργεια με μορφή φωτονίων, σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος, διεγείρεται και την εκπέμπει σε μεγαλύτερο μήκος κύματος. Ένα ποσοστό της ενέργειας με την οποία ακτινοβολείται το μόριο χάνεται ως θερμότητα εξαιτίας των συγκρούσεων με γειτονικά μόρια. Για τον λόγο αυτόν, η εκπεμπόμενη ακτινοβολία είναι μικρότερης ενέργειας και συνεπώς μεγαλύτερου μήκους κύματος. Ένα απλοποιημένο διάγραμμα που απεικονίζει βασικές διαδικασίες διέγερσης και αποδιέγερσης ηλεκτρονίων παρουσιάζεται παρακάτω. [75,76,77]



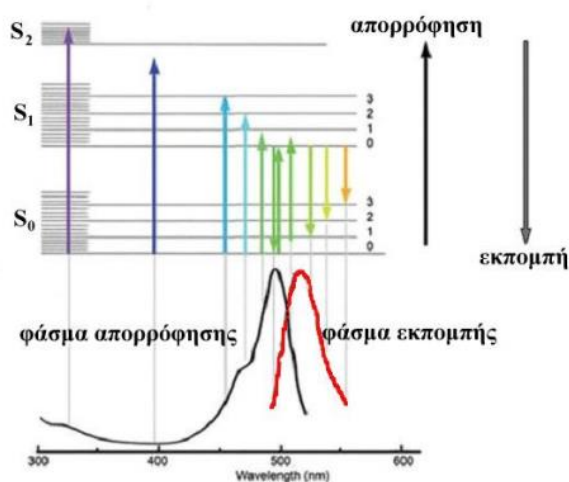
Εικόνα 3-4. Διάγραμμα διέγερσης και αποδιέγερσης ηλεκτρονίων

Το απλοποιημένο διάγραμμα αποτελεί μια παραλλαγή του διαγράμματος Jablonski, όπου απεικονίζονται η θεμελιώδης κατάσταση και οι χαμηλότερες διεγερμένες καταστάσεις, μαζί

με τις αντίστοιχες πολλαπλότητες τους, αλλά και ορισμένες πιθανές διαδρομές που μπορεί να ακολουθήσει ένα ηλεκτρόνιο. Η διέγερση θεωρείται «αδιαβατική», δηλαδή τόσο γρήγορα ώστε το σύστημα δεν προλαβαίνει να τροποποιήσει τις γεωμετρικές του παραμέτρους. Η αποδιέγερση του ηλεκτρονίου μεταξύ διεγερμένων καταστάσεων λαμβάνει χώρα μέσω «μικρών» βημάτων, κατά τη διάρκεια των οποίων χάνεται ένα μικρό μέρος της ενέργειας του. [78,79]

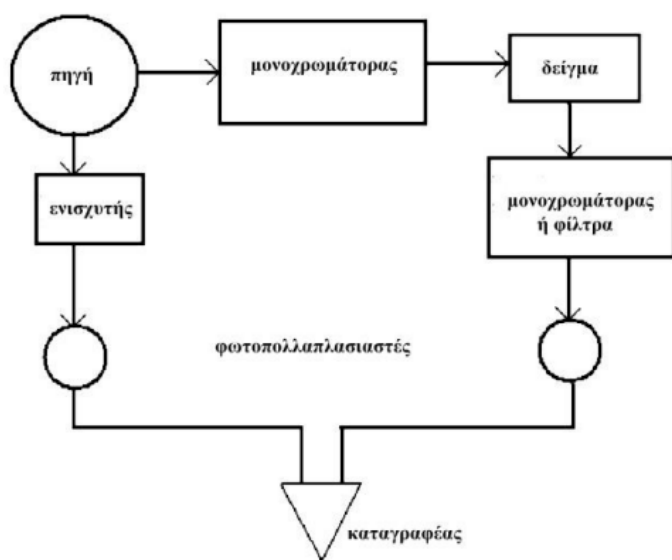


Εικόνα 3-5. Διάγραμμα απεικόνισης φθορισμού και διέγερσης.



Εικόνα 3-6. Διάγραμμα φασμάτων απορρόφησης και εκπομπής.

Για τους φθορισμομετρικούς προσδιορισμούς χρησιμοποιούνται ειδικά όργανα, τα φθορισμόμετρα, με τα οποία ανιχνεύεται το φως που εκπέμπεται από τη φθορίζουσα ουσία. Στα φθορισμόμετρα η προσπίπτουσα δέσμη βρίσκεται σε γωνία 90° ως προς την εκπεμπόμενη, με σκοπό να μειωθεί η πιθανότητα παρεμβολής της στην καταγραφή. [75,80]



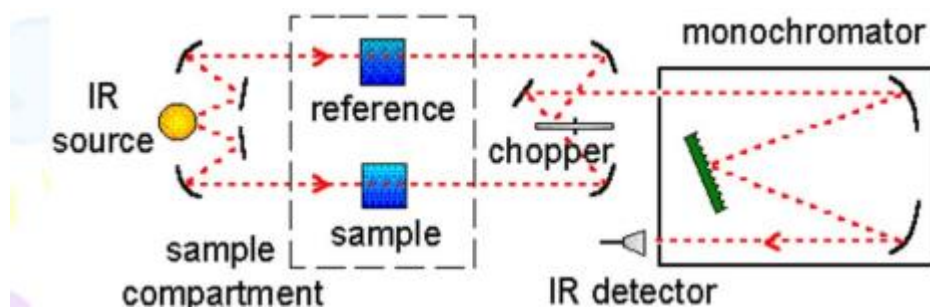
Εικόνα 3-7. Διαγραμματική παράσταση φθορισμομέτρου.

Η φασματοσκοπία φθορισμού έχει αξιοποιηθεί σε διάφορες μελέτες, όμως η χρήση της πολυδιάστατης φασματοσκοπίας φθορισμού στα γαλακτοκομικά προϊόντα έχει διερευνηθεί ελάχιστα, και οι διαθέσιμες πληροφορίες στον τομέα αυτό είναι περιορισμένες. Με τη βοήθεια όμως χημειομετρικών εργαλείων μπορεί να βοηθήσει σημαντικά στην ανίχνευση προστιθέμενων ξένων ουσιών στο λίπος γάλακτος (φυτικά έλαια). [81,82,83,84]

3.7.2 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ

Η απορρόφηση ακτινοβολίας στη περιοχή του υπερύθρου ευθύνεται για διεγέρσεις μεταξύ διαφόρων ενεργειακών σταθμών δόνησεως και περιστροφής του μορίου, ενώ το μόριο δεν μεταβάλλεται από τη θεμελιώδη ηλεκτρονική κατάσταση. Τα λαμβανόμενα φάσματα υπερύθρου αποτελούνται από ταινίες απορροφήσεως μικρού εύρους, σε αντίθεση με τα φάσματα υπεριώδους-ορατού, που προκαλούνται από ηλεκτρονικές μεταπτώσεις και αποτελούνται από ταινίες απορροφήσεως μεγάλου εύρους. Η περιοχή της υπέρυθρης ακτινοβολίας εκτείνεται από το ορατό μέχρι τα μικροκύματα (0,75-1000 μm). Ένα μόριο μπορεί να απορροφήσει υπέρυθρη ακτινοβολία μόνο εάν η διπολική ροπή του αλλάζει κατά τη διάρκεια της δόνησης. Σε αντίθετη περίπτωση, η δόνηση δεν αλληλεπιδρά με την υπέρυθρη ακτινοβολία. Η απορρόφηση γίνεται ισχυρότερη όσο μεγαλύτερη είναι η αλλαγή στην διπολική ροπή. [85,86]

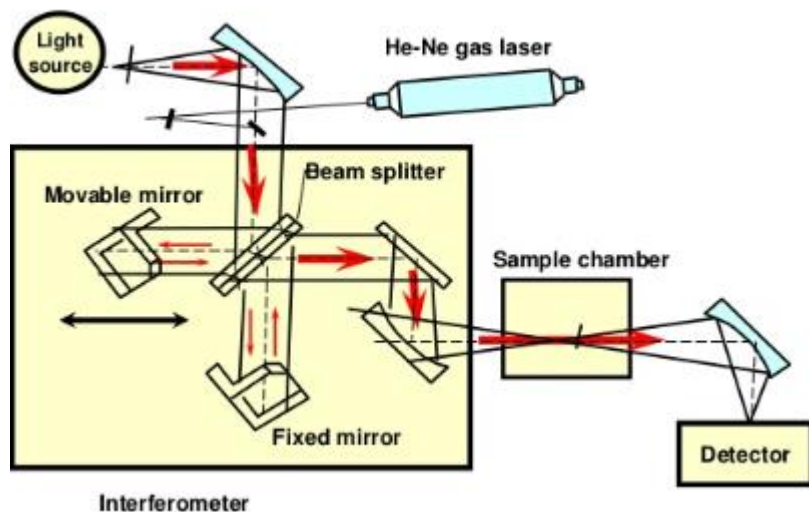
Στα κύρια στοιχεία ενός φασματοφωτόμετρου υπερύθρου διπλής δέσμης (η ακτινοβολία από τη πηγή μετά τη διόδο από το μονοχρωμάτωρα, χωρίζεται σε δύο δέσμες, μια για το διάλυμα του δείγματος και μια για το διάλυμα αναφοράς) περιλαμβάνονται: η πηγή φωτός (λυχνία βοφραμίου, λυχνίες πυρακτώσεως Nerst και Globar), η σχισμή εισόδου, η κυψελίδα δείγματος και αναφοράς, ο μονοχρωμάτωρας, ο ανιχνευτής και το όργανο ανάγνωσης. Η ακτινοβολία που εκπέμπεται από την πηγή κατευθύνεται κατά μήκος του δείγματος και του δείγματος αναφοράς, και στη συνέχεια διασκορπίζεται από το πλέγμα περίθλασης. Το πλέγμα διαχωρίζει το φως σε διαφορετικά μήκη κύματος, τα οποία οδηγούνται με απόλυτη ακρίβεια μέσω μιας στενής σχισμής προς τον ανιχνευτή. Τα μήκη κύματος μετρώνται διαδοχικά, με τη σχισμή να ρυθμίζει το εύρος ζώνης. Ο συνδυασμός του πλέγματος και της σχισμής επιλέγει το μήκος κύματος που μετράται, ενώ ο ανιχνευτής καταγράφει το φάσμα σε διάγραμμα που εμφανίζει τη μετάδοση σε σχέση με τη συχνότητα. [87,88]



Εικόνα 3-8. Διάγραμμα φασματοφωτομέτρου υπερύθρου διπλής δέσμης.

Η χρήση της φασματοσκοπίας υπερύθρου (IR) επιτρέπει την ανάλυση δειγμάτων με ελάχιστη ή μηδαμινή προετοιμασία, εξοικονομώντας χρόνο και πόρους. Η ταχύτητα συλλογής δεδομένων και η ευκολία χρήσης της συμβάλλουν στη μείωση του απαιτούμενου χρόνου. Αυτή η τεχνική χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία και εξειδίκευση, ενώ η δυνατότητά της να λειτουργεί ως μέθοδος «δακτυλικών αποτυπωμάτων» ενισχύει την ευελιξία της. [88,89]

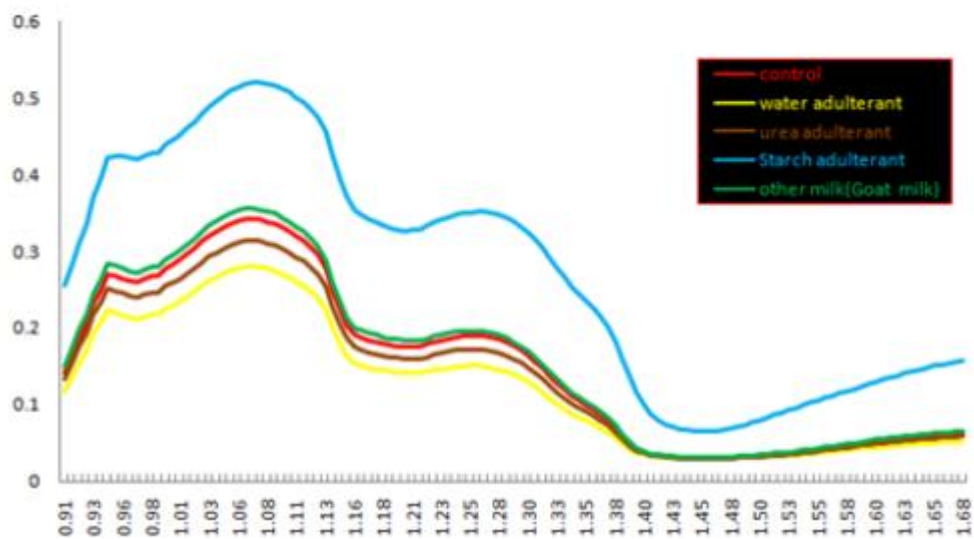
Η φασματοσκοπία μέσου υπερύθρου (MIR) (2500–25.000 nm) και εγγύς υπερύθρου (NIR) (800–2500 nm) χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό διαφόρων χαρακτηριστικών του γάλακτος, όπως ο προσδιορισμός του λίπους, της πρωτεΐνης ή της λακτόζης, την ανίχνευση γάλακτος διαφορετικού από αυτό που αναγράφεται στη συσκευασία. Η φασματομετρία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR), που ανήκει στις τεχνικές ανάλυσης μεσαίου υπερύθρου (MIR), είναι μια προηγμένη μέθοδος που προσφέρει γρήγορη και άμεση καταγραφή ενός πλήρους φάσματος ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων, καλύπτοντας τη ζώνη 4000 cm^{-1} έως 400 cm^{-1} . Τα όργανα που χρησιμοποιούνται στη φασματοφωτομετρία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier δεν έχουν επιλογέα μήκους κύματος. Στα όργανα αυτά, η υπέρυθη ακτινοβολία υφίσταται το φαινόμενο της συμβολής με τη χρήση ενός συμβολομέτρου Michelson (Interferometer), το οποίο αποτελείται από έναν διαιρέτη ακτινοβολίας και δύο κάτοπτρα τοποθετημένα κάθετα το ένα προς το άλλο. Από αυτά, το ένα παραμένει ακίνητο ενώ το άλλο κινείται μέσω ενός εμβόλου. Η υπέρυθη ακτινοβολία που διαμορφώνεται λόγω της συμβολής περνά μέσα από την κυψελίδα του δείγματος και ανιχνεύεται από ένα αερικό κύτταρο Golay. Το συμβολόγραμμα (interferogram) υποβάλλεται σε μετασχηματισμό Fourier με τη βοήθεια υπολογιστή, ώστε να προκύψει το τυπικό φάσμα υπερύθρων. Τα πλεονεκτήματα της τεχνικής FTIR περιλαμβάνουν τον υψηλό λόγο σήματος προς θόρυβο, την εξαιρετική διακριτική ικανότητα, ιδιαίτερα όταν χρησιμοποιείται λείζερ στο συμβολόμετρο, καθώς και την ταχεία σάρωση και καταγραφή του φάσματος. [88,90]



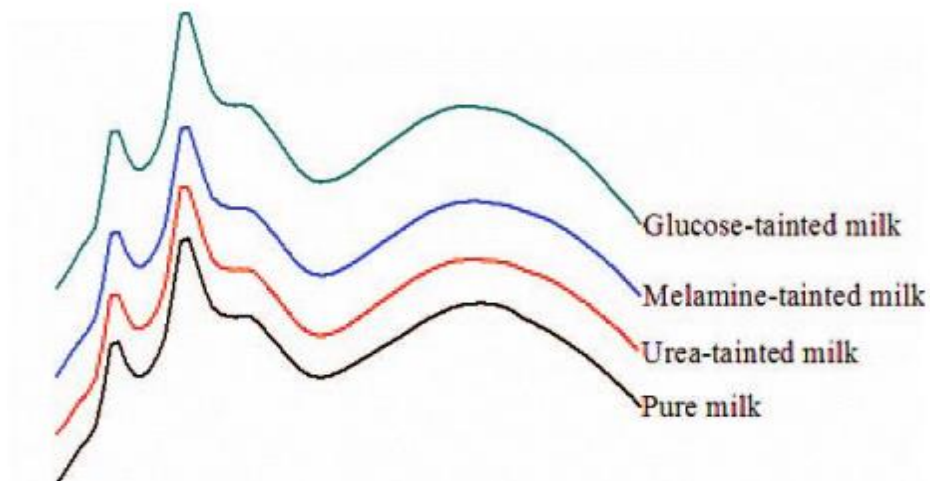
Εικόνα 3-9. Η φασματομετρία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR).

Η συγκεκριμένη τεχνολογία χρησιμοποιείται ευρέως για την ανάλυση γαλακτοκομικών δειγμάτων και την εκτίμηση της περιεκτικότητάς τους σε λιπαρά, πρωτεΐνες και λακτόζη, σύμφωνα με τα πρότυπα που ισχύουν σε διάφορες χώρες. Επιπλέον, η Διεθνής Επιτροπή Γεωργικής Έρευνας της Ινδίας (ICAR) έχει αναγνωρίσει επίσημα τη φασματοφωτομετρία FTIR ως την καθιερωμένη μέθοδο ρουτίνας για την ανάλυση των συστατικών του γάλακτος, επιβεβαιώνοντας την ακρίβεια και την αξιοπιστία της. [89]

Επιπλέον, μέσω του εγγύς υπερύθρου, έχει καταγραφεί η ανίχνευση προσθηκών όπως νερό, ουρία, άμυλο και κατσίκισιο γάλα σε αγελαδινό. Η φασματοσκοπία μέσου υπερύθρου (MIR), σε συνδυασμό με τη δισδιάστατη (2D) συσχέτιση, έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση πιθανών νοθειών στο γάλα, περιλαμβάνοντας ουσίες όπως μελαμίνη, ουρία, γλυκόζη και υδροχλωρική τετρακυκλίνη. Η μέθοδος στοχεύει στον εντοπισμό διακυμάνσεων στα φάσματα που προκύπτουν από τη σύγκριση φυσικού γάλακτος με νοθευμένο. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν μεταβολές στις θέσεις και στα σχήματα των κορυφών των φασμάτων, επιβεβαιώνοντας την αποτελεσματικότητα της μεθόδου στον αξιόπιστο και τον ευαίσθητο εντοπισμό νοθείας στο γάλα. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν στη μελέτη νοθείας με την προσθήκη διττανθρακικού και κιτρικού νατρίου, σε συγκεντρώσεις 0,05% και 0,075% αντίστοιχα. [90,91]



Εικόνα 3-10. Φάσματα NIR νοθευμένου και καθαρού γάλακτος.



Εικόνα 3-11. Μονοδιάστατα φάσματα NIR νοθευμένου και καθαρού γάλακτος.

3.7.3 ΟΛΙΚΗ ΑΝΑΚΛΑΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΛΑΧΙΣΤΩΝ ΤΕΤΡΑΓΩΝΩΝ

Η μελέτη της αποσβένουσας ολικής ανάκλασης (ATR) μέσω υπερύθρου έχει αξιοποιηθεί για την πρόβλεψη της σύστασης των πρωτεϊνών και των ανοργάνων συστατικών του γάλακτος. Επιπλέον, έχουν διερευνηθεί οι ιδιότητες πήξης του γάλακτος, η οξύτητά του, η νοθεία με μελαμίνη και η περιεκτικότητα σε κετονικά σώματα. Η μέθοδος ανάλυσης ολικής ανάκλασης MIRS, σε συνδυασμό με τη διακριτική ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA), έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό νερού και προσμίξεων σε δείγματα γάλακτος. Η τεχνική αυτή έχει εφαρμοστεί επιτυχώς για δείγματα που περιείχαν από έναν έως πέντε τύπους νοθείας, με συγκεντρώσεις από 0,5% έως 10% w/v. Η συγκεκριμένη μέθοδος χαρακτηρίζεται από ταχύτητα και απλότητα, ενώ δεν απαιτείται προηγούμενη επεξεργασία του δείγματος, αντιθέτως, απαιτεί μικρή ποσότητα δείγματος (30 μ L), γεγονός που την καθιστά ιδιαίτερα κατάλληλη και χρήσιμη για εφαρμογή στις γαλακτοβιομηχανίες. Παρά τα πλεονεκτήματά της, όταν το δείγμα αποτελείται κυρίως από νερό, η ανάλυση καθίσταται δύσκολη, καθώς παρατίθενται ψευδώς θετικά και ψευδώς αρνητικά σε ποσοστά 4% και 3,2% αντίστοιχα, στις συνολικές δοκιμές. Αυτές οι αποκλίσεις αποδίδονται στην παρουσία του νερού που υπάρχει φυσικά στο γάλα, καθώς και στις διακυμάνσεις της περιεκτικότητάς του μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων. [91,92]

3.7.4 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΟΜΕΤΡΙΑΣ

Οι τεχνολογικές εφαρμογές στα όργανα φασματοσκοπίας υπερύθρου (IR) σε συνδυασμό με τις χημειομετρικές μεθόδους έχουν αναδείξει τη φασματοσκοπία ως ένα ιδιαίτερα αποτελεσματικό εργαλείο για την παρατήρηση της γνησιότητας του γάλακτος. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται τόσο για την ομαδοποίηση ή κατηγοριοποίηση άγνωστων δειγμάτων με σχεδόν όμοια χαρακτηριστικά όσο και για τον ποσοτικό εντοπισμό νοθευμένων ουσιών σε δείγματα. Λόγω της πολυπλοκότητας των φασμάτων που προκύπτουν από την ανάλυση δειγμάτων, η χημειομετρική ανάλυση παίζει σημαντικό ρόλο στη διευκόλυνση της ερμηνείας των δονητικών φασμάτων. Σύμφωνα με τον Διεθνή Σύνδεσμο Χημειομετρίας (International Chemometrics Society), η χημειομετρία αποτελεί κλάδο της χημείας που βασίζεται σε μαθηματικές και στατιστικές μεθόδους για τον σχεδιασμό ή την επιλογή βέλτιστων διαδικασιών μέτρησης και πειραμάτων. Ο στόχος της είναι να μεγιστοποιήσει την χημική πληροφορία μέσα από την ανάλυση χημικών δεδομένων. [92,93]

3.7.5 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΚΑΙ HPLC

Οι φασματοσκοπικές τεχνικές προσφέρουν εξαιρετικά πλεονεκτήματα στον τομέα της ανίχνευσης νοθευτικών ουσιών, χάρη στην υψηλή ευαισθησία και την επιλεκτικότητά τους. Ειδικότερα, έχουν τη δυνατότητα να ανιχνεύσουν ενώσεις σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις από αυτές που είναι εφικτές μέσω της HPLC (High-Performance Liquid Chromatography). Ένα από τα κύρια πλεονεκτήματα των φασματοσκοπικών τεχνικών είναι η ελάχιστη ή μηδενική απαίτηση για προετοιμασία των δειγμάτων, κάτι που μειώνει τη χρονική ανάλυση και το συνολικό κόστος. Αντίθετα, η HPLC απαιτεί συχνά περίπλοκες διαδικασίες, όπως εκχύλιση και στάδια καθαρισμού, που επιβραδύνουν τη διαδικασία και την καθιστούν πιο δαπανηρή. Επιπλέον, οι φασματοσκοπικές τεχνικές επιτυγχάνουν σημαντικά υψηλότερους ρυθμούς ανάλυσης, διευκολύνοντας τη γρήγορη αξιολόγηση πολλαπλών δειγμάτων. Ακόμη, ένα ιδιαίτερο πλεονέκτημα είναι η δυνατότητα παρακολούθησης σε πραγματικό χρόνο, χωρίς να καταστρέφεται το δείγμα, κάτι που είναι εξαιρετικά χρήσιμο στις βιομηχανικές διαδικασίες και στους ποιοτικούς ελέγχους προϊόντων. Με αυτόν τον τρόπο, οι φασματοσκοπικές αξιολογούν την αποτελεσματικότητα και την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, καθιστώντας τις πρωτοπόρες στην ανάλυση και τον έλεγχο της νοθείας. Η φασματοσκοπία υπερύθρων (IR) ξεχωρίζει ως μια πιο βιώσιμη και προσιτή επιλογή σε σύγκριση με την HPLC, ειδικά όσον αφορά το κόστος ανά ανάλυση και την αρχική επένδυση στον εξοπλισμό. Η IR φασματοσκοπία παρέχει δεδομένα με αυτόματο τρόπο, ελαχιστοποιώντας την ανάγκη για ανθρώπινη παρέμβαση και διασφαλίζοντας την αξιοπιστία και την ταχύτητα της ανάλυσης. Τα φασματικά δεδομένα που συλλέγονται περιέχουν πληροφορίες για πολλές φυσικοχημικές και μοριακές πληροφορίες του δείγματος, καθιστώντας τη φασματοσκοπία IR ένα πολύτιμο εργαλείο που λειτουργεί ως «δαχτυλικό αποτύπωμα». Τα φασματικά δεδομένα μπορούν να αποθηκευτούν και να επανεκτιμηθούν, δίνοντας τη δυνατότητα ανάλυσης ιστορικών πληροφοριών με βάση νέες μετρήσεις. Αυτός ο συνδυασμός ευελιξίας, ακρίβειας και οικονομικής βιωσιμότητας καθιστά τη φασματοσκοπία IR μια πολύτιμη επιλογή για την ανάλυση και τον ποιοτικό έλεγχο. [94,95,96]

3.8 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ

Όταν ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας αλληλοεπιδρούν με μόρια μιας ένωσης σε αέρια φάση και υπό συνθήκες υψηλού κενού, τα μόρια αυτά ιονίζονται, δημιουργώντας ιόντα με θετικό φορτίο. Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας ηλεκτρικά πεδία, τα παραγόμενα ιόντα ευθυγραμμίζονται σε μία δέσμη, η οποία περνά μέσα από ένα ηλεκτρικό ή μαγνητικό πεδίο.

Έτσι, κάθε ιόν, ανάλογα με τον λόγο μάζας προς ηλεκτρικό φορτίο (m/z), αποκλίνει διαφορετικά από το ρεύμα που δημιουργείται από τα ιόντα με άλλους λόγους m/z . Το διάγραμμα που καταγράφει την ένταση του μετρούμενου ρεύματος (σε σχετικές μονάδες) ως συνάρτηση του λόγου m/z , ονομάζεται φάσμα μαζών της ουσίας. Επειδή τα παραγόμενα ιόντα συνήθως έχουν θετικό φορτίο, ο λόγος m/z αντιστοιχεί αριθμητικά στο μοριακό βάρος του ιόντος, το οποίο εκφράζεται σε μονάδες ατομικής μάζας. [97,98,99]

Η τεχνική που χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση και τον προσδιορισμό της αρχικής ουσίας από το φάσμα μαζών της ονομάζεται φασματομετρία μαζών και δεν ανήκει στις φασματοσκοπικές τεχνικές. Το φάσμα μαζών, το οποίο αποκτάται υπό συγκεκριμένες ελεγχόμενες συνθήκες, είναι χαρακτηριστικό για κάθε ουσία και χρησιμοποιείται για την ταυτοποίησή της. Τα κύρια πλεονεκτήματα της φασματομετρίας μαζών είναι η αυξημένη ευαισθησία της σε σχέση με άλλες αναλυτικές μεθόδους και η υψηλή ακρίβεια στην ταυτοποίηση ουσιών ή στην επιβεβαίωση ύποπτων ουσιών. Ωστόσο, η φασματομετρία μαζών ενδέχεται να έχει μειονεκτήματα, όπως το υψηλό κόστος των απαιτούμενων οργάνων, τα έξοδα λειτουργίας και συντήρησης, καθώς και την εξειδίκευση που απαιτείται από τον χρήστη για τον χειρισμό των μηχανημάτων και την ορθή ερμηνεία των φασμάτων. [100,101,102,103]

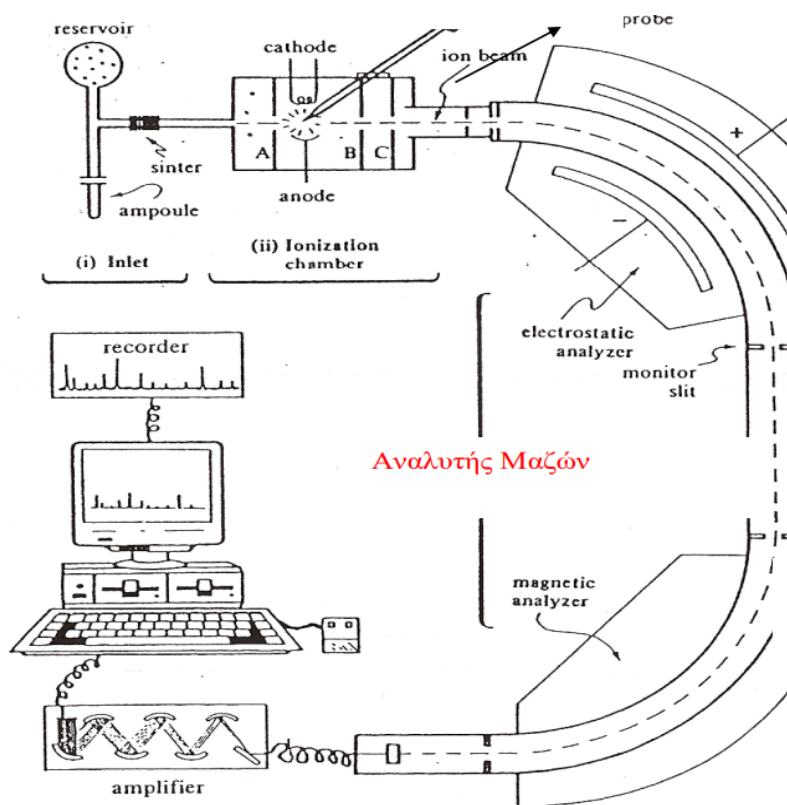
Σήμερα, η φασματομετρία μαζών χρησιμοποιείται εκτενώς, κυρίως για την ανάλυση της δομής οργανικών ενώσεων κατά τη συνθετική διαδικασία και για την αναγνώριση της δομής φυσικών ουσιών. Η φασματομετρία μαζών μπορεί να συνδυαστεί με αέρια χρωματογραφία (GC) ή υγρή χρωματογραφία (LC), παρέχοντας τις συνδυασμένες τεχνικές GC/MS και LC/MS, οι οποίες είναι ευρέως χρησιμοποιούμενες για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση πολύπλοκων οργανικών μειγμάτων. Πιο συγκεκριμένα, η τεχνική της LC/MS, αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο για την αναγνώριση ξένων προστιθέμενων ουσιών σε δείγματα γάλακτος αλλά και για την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο και πρόβειο γάλα (βλέπε 3.5.2) [61,103,104]

3.8.1 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΨΕΚΑΣΜΟ

Η παραγωγή ιόντων που χαρακτηρίζουν την υπό εξέταση ουσία πραγματοποιείται στη πηγή ιόντων, χρησιμοποιώντας είτε μονομοριακές τεχνικές, όπως η πρόσκρουση ηλεκτρονίων ή ο ιονισμός πεδίου, είτε διμοριακές, όπως ο χημικός ιονισμός. Στην περίπτωση της πρόσκρουσης

ηλεκτρονίων (electron impact ή EI), ένα ρεύμα μορίων της ουσίας M εισάγεται στη μονάδα και βομβαρδίζεται με δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής κινητικής ενέργειας, συνήθως περίπου 70eV. Κατά την αλληλεπίδραση των ηλεκτρονίων με τα μόρια της ουσίας, παράγονται θετικά μοριακά ιόντα. Αρχικά, τα παραγόμενα ιόντα κινούνται σε τυχαίες κατευθύνσεις, αλλά το ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο στη μονάδα ιονισμού τα ευθυγραμμίζει σε μια λεπτή δέσμη με ελάχιστη απόκλιση, ώστε να είναι κατάλληλα για ανάλυση στον αναλυτή μαζών. Το ιόν M, γνωστό ως μοριακό ιόν της ένωσης M, περιέχει ασύζευκτο ηλεκτρόνιο, καθιστώντας το ένα ιόν-ρίζα. Σε συνθήκες χαμηλής ενέργειας ιονισμού, παράγονται σχεδόν αποκλειστικά μοριακά ιόντα. Τα μαζικά φάσματα που δημιουργούνται υπό αυτές τις συνθήκες παρουσιάζουν μια έντονη κορυφή του ιόντος M, η οποία είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την ακριβή μέτρηση του μοριακού βάρους της ένωσης. Από το συνολική ποσότητα της ουσίας που εισάγεται στη μονάδα ιονισμού, μόνο ένα μικρό ποσοστό μετατρέπεται σε ιόντα. Οι αντιδράσεις που πραγματοποιούνται, καθώς και το ποσοστό αυτών, εξαρτώνται τόσο από τη χημική φύση της ουσίας όσο και από την ενέργεια ιονισμού. Όσο μεγαλύτερο είναι το μόριο της ένωσης, τόσο περισσότερα και πιο ποικιλόμορφα ιόντα-θραύσματα αναμένεται να παραχθούν. [97,104]

Ο συνδυασμός των μεθόδων της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης και της φασματομετρίας μάζας με ηλεκτροψεκασμό (HPLC/ESIMS) έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την ανίχνευση της ποσότητας αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο, μέσω του προσδιορισμού των μοριακών μαζών διαφόρων πρωτεϊνών. [24]



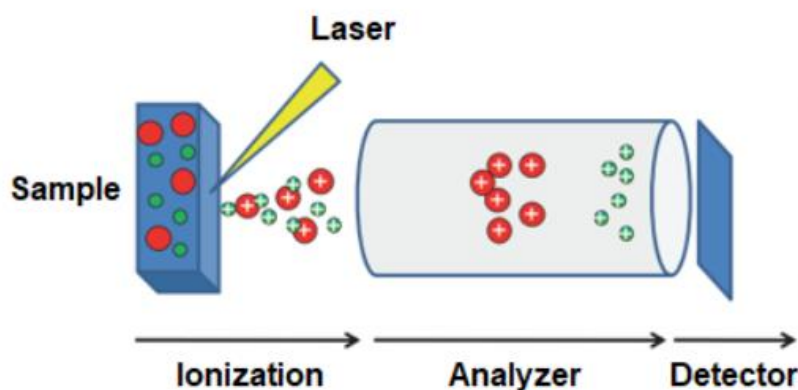
Εικόνα 3-12. Απεικόνιση διαγράμματος φασματοφωτομέτρου μαζών.

3.8.2 ΕΚΡΟΦΗΣΗ/ΙΟΝΙΣΜΟΣ ΛΕΙΖΕΡ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΜΗΤΡΑ (MALDI)

Η φασματομετρία μάζας με εκρόφηση/ιονισμό λέιζερ υποβοηθούμενη από μήτρα (MALDI) είναι μια μέθοδος ιονισμού που αξιοποιεί μια μήτρα η οποία απορροφά την ενέργεια του λέιζερ για τη δημιουργία ιόντων από μεγάλα μόρια, διατηρώντας παράλληλα ελάχιστο κατακερματισμό. Αυτή η τεχνική είναι ιδανική για την ανάλυση βιομορίων, όπως DNA, πρωτεΐνες, πεπτίδια και υδατάνθρακες, καθώς και για οργανικές ενώσεις όπως πολυμερή, δένδριμερή και άλλα μακρομόρια, τα οποία είναι ευαίσθητα και τείνουν να θραύονται υπό πιο παραδοσιακές μεθόδους ιονισμού. Παρόμοια με τον ιονισμό ηλεκτροψεκασμού (ESI), το MALDI χαρακτηρίζεται ως "ήπια" τεχνική, καθώς μειώνει τον κατακερματισμό μεγάλων μορίων. Ωστόσο, συνήθως δημιουργεί λιγότερα πολυφορτισμένα ιόντα σε σύγκριση με τον ESI. Η διαδικασία του MALDI περιλαμβάνει τρία στάδια. Πρώτον, το δείγμα αναμειγνύεται με κατάλληλη μήτρα και τοποθετείται σε μεταλλική πλάκα. Στη συνέχεια, ένα παλμικό λέιζερ ακτινοβολεί το μίγμα, προκαλώντας αφαίρεση και εκρόφηση τόσο του δείγματος όσο και του

υλικού της μήτρας. Τέλος, τα μόρια της αναλυόμενης ουσίας ιονίζονται μέσω πρωτονίωσης ή αποπρωτονίωσης στο θερμό νέφος των εξαιρεωμένων αερίων και στη συνέχεια κατευθύνονται προς το φασματόμετρο μάζας για περαιτέρω ανάλυση. [105,106]

Ο πιο διαδεδομένος τύπος φασματομέτρου μάζας που χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με το MALDI είναι το φασματόμετρο μάζας χρόνου πτήσης (TOF), κυρίως λόγω της ικανότητάς του να καλύπτει μεγάλο εύρος μαζών. Η μέθοδος μέτρησης TOF είναι κατάλληλη για τη διαδικασία ιονισμού MALDI, καθώς η χρήση παλμικού λέιζερ επιτρέπει την καταγραφή διαδοχικών «λήψεων» αντί για συνεχή λειτουργία. Συχνά, τα συστήματα MALDI-TOF διαθέτουν ανακλαστήρα, γνωστό και ως «κάτοπτρο ιόντων», ο οποίος χρησιμοποιεί ηλεκτρικό πεδίο για να ανακλά τα ιόντα. Η ενέργεια ακτινοβολίας προκαλεί την ιονισμό της μήτρας του δείγματος, με αποτέλεσμα την απομάκρυνση του από την επιφάνεια. Στη συνέχεια, το δείγμα μεταφέρεται στον αναλυτή μάζας, όπου πραγματοποιείται η ανίχνευσή του. Αυτή η διαδικασία επιμηκώνει τη διαδρομή πτήσης των ιόντων, ενισχύοντας τον χρόνο πτήσης μεταξύ των ιόντων διαφορετικού λόγου m/z και βελτιώνοντας έτσι τη συνολική ανάλυση. [106,107]



Εικόνα 3-13. Διάγραμμα οργάνου MALDI TOF.

Η φασματομετρία μάζας MALDI-TOFMS μπορεί να βοηθήσει στην αξιολόγηση της παρουσίας αγελαδινού γάλακτος σε δείγματα νωπού πρόβειου και βουβαλίσιου γάλακτος, που χρησιμοποιούνται σε βιομηχανικές διεργασίες, καθώς και για την ανίχνευση προσθήκης γάλακτος σε σκόνη σε δείγματα φρέσκου γάλακτος. Η ανίχνευση νοθείας επιτυγχάνεται μέσω της ανάλυσης πρωτεϊνικών μοτίβων, εστιάζοντας στις πιο άφθονες πρωτεΐνες του ορού γάλακτος, την α -λακταλβουμίνη και τη β -λακτοσφαιρίνη, που λειτουργούν ως μοριακοί δείκτες. Χάρη στην απουσία ανάγκης για προεπεξεργασία των δειγμάτων και στην ευκολία

χρήσης του MALDI-MS, μπορεί να εφαρμοστεί ως καθημερινή πρακτική ρουτίνας για την ανίχνευση πιθανής νοθείας στα δείγματα γάλακτος που παραδίδονται από παραγωγούς στις γαλακτοβιομηχανίες. [97,108]

3.9 ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΦΥΤΙΚΩΝ ΕΛΑΙΩΝ

Το 2013 οι M.P. Ntakatsane, et al στην εργασία τους εξέτασαν τη δυνατότητα χρήσης της φασματοσκοπίας φθορισμού για την ανίχνευση νοθείας στο λίπος γάλακτος με φυτικά έλαια, καθώς και τον χαρακτηρισμό των δειγμάτων ανάλογα με την πηγή του λίπους. Το καθαρό λίπος βουτύρου αναμειχθηκε με διαφορετικά φυτικά έλαια σε συγκεντρώσεις (0, 5, 10, 15, 20, 30 και 40%). Επιπλέον, γάλα με μειωμένα ή μηδενικά λιπαρά εμπλουτίστηκε με φυτικά έλαια για να προσομοιωθεί το γάλα με πλήρη λιπαρά (3,2%). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω 2- και 3-διάστατης front-face φασματοσκοπίας φθορισμού και αέριας χρωματογραφίας για τη λήψη φασμάτων φθορισμού και του προφίλ λιπαρών οξέων, αντίστοιχα. Σε αντίθεση με άλλες τεχνικές, οι φασματοσκοπικές μέθοδοι παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τα συστατικά ενός μείγματος μέσω του φάσματος τους, συνήθως χωρίς την επιτακτική ανάγκη για παραγωγή. Αν και η φασματοσκοπία φθορισμού έχει πρωταγωνιστήσει σε πολλές έρευνες, η εφαρμογή της πολυδιάστατης φασματοσκοπίας φθορισμού σε γαλακτοκομικά προϊόντα δεν έχει μελετηθεί σε βάθος, ενώ οι διαθέσιμες πληροφορίες σε αυτό το πεδίο παραμένουν περιορισμένες. Για αυτόν τον λόγο, η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε στην αξιολόγηση της πιθανής χρήσης της φασματοσκοπίας φθορισμού 2- και 3-διάστατης (3D) front-face. Στα δεδομένα εφαρμόστηκαν ανάλυση κύριων συνιστωσών και τρισδιάστατη ανάλυση παλινδρόμησης ελαχίστων τετραγώνων.

Αφού πρώτα το βούτυρο τήχθηκε στους 60°C, φυγοκεντρήθηκε και διηθήθηκε ήταν έτοιμο για την διαδικασία της νόθευσης. Δημιουργήθηκαν δύο ομάδες στη μία το φιλτραρισμένο λίπος βουτύρου νοθεύτηκε με έλαια canola και ηλιέλαιο σε διάφορες συγκεντρώσεις (0, 5, 10, 15, 20, 30 και 40%). Στην άλλη ομάδα νοθεύτηκε με πίτουρο ρυζιού και έλαια αραβοσίτου για λόγους σύγκρισης. Χρησιμοποιήθηκαν για αέρια χρωματογραφική ανάλυση και για μέτρηση φθορισμού (διαλυμένο σε η-εξάνιο πριν από τη μέτρηση). Στη συνέχεια, οι 2 τύποι νοθευμένων

γαλάκτων παρασκευάστηκαν για να προσομοιώνουν το πλήρες γάλα (3,2%) και τα δείγματα αποτελούνταν από την πλήρη αντικατάσταση και μερική συμπλήρωση του λίπους γάλακτος με φυτικό έλαιο. Το γάλα του εμπορίου από διαφορετικούς παραγωγούς χρησιμοποιήθηκε ως έλεγχος. Για την ανάλυση FA (fatty acids), ο διαχωρισμός του λίπους του γάλακτος έγινε αφού ακολουθήθηκε η ταχεία μέθοδος που αναπτύχθηκε από τους Feng et al., (2004) με μικρές τροποποιήσεις. Τα μίγματα λίπους γάλακτος και φυτικών ελαίων μετατράπηκαν σε μεθυλεστέρες FA χρησιμοποιώντας υδροξείδιο του νατρίου. Για τον ακριβή προσδιορισμό της σύστασης FA των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αέριας χρωματογραφίας. Τα λιπαρά οξέα ταυτοποιήθηκαν συγκρίνοντας τους χρόνους κατακράτησης με τους αντίστοιχους των αυθεντικών δειγμάτων με δεδομένα από τη βιβλιογραφία. Τα αποτελέσματα δόθηκαν ως εκατοστιαία αναλογία κατά βάρος (% wt/wt) της συνολικής FA. Το εμπορικό λίπος γάλακτος ήταν πλούσιο σε SFA (saturated fatty acids) βραχείας έως μεσαίας αλυσίδας, ενώ τα νοθευμένα δείγματα εμφάνιζαν υψηλή συγκέντρωση UFA (unsaturated fatty acids) μακράς αλυσίδας. Η νόθευση γάλακτος με φυτικό έλαιο μείωσε την περιεκτικότητα σε FA και SFA βραχείας αλυσίδας (εκτός από το αραχιδικό οξύ, C20:0), αλλά το αντίθετο συνέβη για την περιεκτικότητα σε UFA. Άρα η συνολική συγκέντρωση SFA και UFA διέκρινε τα καθαρά από τα νοθευμένα δείγματα.

Σχετικά με τα φάσματα φθορισμού, τα κανονικοποιημένα φάσματα της βιταμίνης Α σε δείγματα νοθευμένα με έλαια canola και ηλιέλαιο παρουσίασαν μέγιστα εκπομπής γύρω στα 322 nm. Η αύξηση της περιεκτικότητας σε έλαιο οδήγησε σε μικρές μειώσεις της έντασης του φθορισμού, χωρίς ωστόσο να παρατηρηθούν αξιοσημείωτες μεταβολές στο μέγιστο διέγερσης. Επιπλέον, η συνεχής νοθεία προκάλεσε σταδιακή εξαφάνιση της κορυφής στα 308 nm, η οποία αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα των φασμάτων βιταμίνης Α του λίπους γάλακτος. Παρ' όλα αυτά, τα έλαια canola και ηλιέλαιο φαίνεται να έχουν φθορίζουσες παρόμοιες παρόμοιες με εκείνες του λίπους βουτύρου, δυσχεραίνοντας έτσι την οπτική ανίχνευση της νοθείας χωρίς τη χρήση χημειομετρικών τεχνικών. Από την άλλη πλευρά, η νοθεία του λίπους βουτύρου με έλαια πιτούρου ρυζιού και αραβοσίτου προκάλεσε σημαντικές μεταβολές στα φάσματα, οι οποίες χαρακτηρίστηκαν από τη συνεχή μείωση της έντασης του φθορισμού και την εμφάνιση μιας νέας κορυφής σε μεγαλύτερο μήκος κύματος (352 nm) όσο αυξανόταν η συγκέντρωση. Μετά την ανάλυση των φασμάτων και την εξέταση της γραφικής παράστασης βαθμολογίας από την τριμερή ανάλυση παλινδρόμησης ελαχίστων τετραγώνων, τα συμπεράσματα στα οποία κατέληξαν οι ερευνητές είναι: α) Η φασματοσκοπία φθορισμού ήταν ικανή να ανιχνεύσει νοθεία φυτικού ελαίου στο λίπος βουτύρου σε ποσοστά έως 5% β) η

προβλεψιμότητα των κορεσμένων λιπαρών οξέων ήταν μεγαλύτερη από εκείνη των ακόρεστων ($R = 0,73-0,92$ σε σύγκριση με $0,20-0,65$, αντίστοιχα). Συνολικά, η έρευνα έδειξε τη μεγάλη αποτελεσματικότητα της φασματοσκοπίας φθορισμού για την ταχεία ανίχνευση νοθείας στο λίπος γάλακτος και τη διάκριση μεταξύ εμπορικού βουτύρου και γάλακτος βάσει της πηγής του λίπους.

Το 2002 οι Williband K. et al στην μελέτη τους ασχολήθηκαν με την ταχεία ανίχνευση φυτικών ελαίων στο λίπος γάλακτος με ανάλυση LC-GC (υγρή χρωματογραφία - αέρια χρωματογραφία) χρησιμοποιώντας την β-σιτοστερόλη ως δείκτη. Η διαδικασία περιλαμβάνει τη μετεστεροποίηση του λίπους, τον προκαταρκτικό διαχωρισμό του κλάσματος στερόλης από άλλα λιπιδικά συστατικά και την on-line μεταφορά του στο τριχοειδές σύστημα GC. Με αυτήν την προσέγγιση αποφεύγονται τα χρονοβόρα βήματα προετοιμασίας δείγματος πριν την ανάλυση GC. Η αξιολόγηση της μεθόδου πραγματοποιήθηκε με τη χρήση προσομοιωμένων μειγμάτων λίπους γάλακτος με βαμβακέλαιο και κραμβέλαιο, αποδεικνύοντας τη δυνατότητα ανίχνευσης νοθευμάτων σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Παράλληλα, η μέθοδος προσφέρει τη δυνατότητα ποσοτικού προσδιορισμού της χοληστερόλης στο λίπος γάλακτος. Χάρη στη γρήγορη προετοιμασία του δείγματος, η περιγραφική τεχνική είναι κατάλληλη για τη συζήτηση μεγάλου αριθμού δειγμάτων.

Στην εργασία των Jin-Man K. et al, το 2015 μελετήθηκε ο προσδιορισμός νοθείας λίπους γάλακτος με φυτικά έλαια και ζωικά λίπη με αέρια χρωματογραφική ανάλυση (GC). Καθαρό λίπος γάλακτος (MF) σε ποσοστό 100% αναμείχθηκε με διάφορα φυτικά έλαια και ζωικά λίπη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (0%, 10%, 30%, 50%, 70% και 90%). Μέσω της τεχνικής GC καταγράφηκε στα προφίλ λιπαρών οξέων (FA), τα επίπεδα τριακυλογλυκερόλης (TG) και τα περιεχόμενα χοληστερόλης. Η ανάλυση έδειξε ότι τα καθαρά δείγματα MF και τα νοθευμένα MF μπορούσαν να διαφοροποιηθούν βάσει των συνολικών συγκεντρώσεων κορεσμένων FA (fatty acids), καθώς και των δύο βασικών FA (ελαϊκό οξύ [C18:1n9c] και λινολεϊκό οξύ [C18:2n6c]), TGs (C52 και C54) και των επιπέδων χοληστερόλης. Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν στατιστική ανάλυση και εντοπίστηκαν διαφορές που επέτρεψαν την ανίχνευση νοθείας σε επίπεδα ακόμη και 10%. Η έρευνα κατέδειξε ότι το GC μπορεί να εντοπίσει γρήγορα τη νοθεία του MF με φυτικά και ζωικά λίπη, ενώ διευκολύνει τη διάκριση εμπορικού βουτύρου και γαλακτοκομικών προϊόντων με βάση την προέλευση του λίπους. Η μέθοδος αυτή προσφέρει δυνητικά πολύτιμο εργαλείο για τον εντοπισμό ξένων λιπών σε προϊόντα βουτύρου. Ωστόσο, οι ερευνητές τονίζουν την ανάγκη ανάλυσης πολλαπλών

μεμονωμένων δειγμάτων πριν από την εξασφάλιση ασφαλών συμβουλών για την αυθεντικότητα του MF.

Το 2021 οι Lucas Kolaric et al, ασχολήθηκαν με την μελέτη του ταυτόχρονου προσδιορισμού της περιεκτικότητας σε χοληστερόλη, στιγμαστερόλη και β-σιτοστερόλη σε γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα. Η χοληστερόλη αποτελεί ένα διατροφικό στοιχείο του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων. Η στιγμαστερόλη υπάρχει στο σογιέλαιο και σε άλλα έλαια σόγιας, είτε μόνα τους και είτε συνδυασμένα με μορφή γλυκοσιδίου. Έχει αποδειχθεί ότι το έλαιο σόγιας μπορεί να παρεμποδίσει την απορρόφηση χοληστερόλης και έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του επιπέδου χοληστερόλης στον ορό. Η β-σιτοστερόλη ανήκει στη κατηγορία των φυτικών στερολών και βρίσκεται στα φρούτα, στα λαχανικά και σε σπόρους, ενώ η δομή της είναι παρόμοια με αυτή της χοληστερόλης.

Ο σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης ήταν η ανάπτυξη και η επικύρωση μιας ταχείας και αξιόπιστης μεθόδου HPLC-UV-DAD (High-Performance Liquid Chromatography with UV-Diode Array Detector) για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της χοληστερόλης, της στιγμαστερόλης και της β-σιτοστερόλης σε διάφορες γαλακτοκομικές μήτρες, όπως γάλα, κρέμα, τυρί και βούτυρο. Τα αποτελέσματα της επικύρωσης έδειξαν υψηλή ακρίβεια και αξιοπιστία της μεθόδου, με όρια ανίχνευσης 2,32, 3,29 και 0,99 $\mu\text{g/mL}$ για τη χοληστερόλη, τη στιγμαστερόλη και τη β-σιτοστερόλη, αντίστοιχα. Σύμφωνα με τις συνθήκες της ανάλυσης, φυτοστερόλες εντοπίστηκαν μόνο στα δείγματα βουτύρου, ενώ δεν παρατηρήθηκαν στα υπόλοιπα γαλακτοκομικά προϊόντα. Συμπερασματικά, η προτεινόμενη μέθοδος HPLC είναι κατάλληλη για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της χοληστερόλης και των φυτοστερολών στα γαλακτοκομικά προϊόντα και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο για τον έλεγχο της αυθεντικότητας του λιπιδικού τους προφίλ.

Το 2023 στην μελέτη τους οι Anh Nguyen Van, et al, θέλησαν να μελετήσουν τη μέθοδο για τον γρήγορο προσδιορισμό της νοθείας του λίπους του γάλακτος με το μη γαλακτοκομικό λίπος. Η προσέγγιση βασίστηκε στην ανάλυση χαρακτηριστικών δακτυλικών αποτυπωμάτων του προφίλ των τριακυλογλυκερολών σε συνδυασμό με χημειομετρικές τεχνικές και ένα πολυδιάστατο μοντέλο φορέα. Δεκαεννέα δείγματα λίπους βοείου γάλακτος, 20 δείγματα αγελαδινό τυρί και δέκα δείγματα βουτύρου αγελάδας αναλύθηκαν με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC). Οι περιοχές των 3 κορυφών τριακυλογλυκερόλης με ισοδύναμους αριθμούς άνθρακα 35,6, 46,2 και 47,2 χρησιμοποιήθηκαν για τη διάγνωση της χημειομετρίας και την κατασκευή του μοντέλου

φορέα. Αποδείχθηκε ότι η προτεινόμενη προσέγγιση θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τον γρήγορο προσδιορισμό της νοθείας του λίπους γάλακτος από μη γαλακτοκομικά λιπαρά με συγκέντρωση από 1,5% έως 100%. Η εφαρμογή του μοντέλου φορέα σε 20 δείγματα αγελαδινό τυρί έδειξε ότι τα περισσότερα από αυτά ήταν κατασκευασμένα από αυθεντικό αγελαδινό γάλα. Ωστόσο, το λίπος γάλακτος σε 7 από αυτά τα δείγματα είχε αντικατασταθεί με λίπος μη γάλακτος. Για δέκα δείγματα βουτύρου αγελάδας, μόνο τρία δείγματα παρήχθησαν μόνο από λίπος γάλακτος, ενώ για άλλα δείγματα, το κλάσμα μάζας μη γαλακτοκομικού λίπους, εκφρασμένο ως φοινικέλαιο, προσδιορίστηκε ότι κυμαίνεται μεταξύ 10-90%.

Οι Davood B., et al, το 2017, μελέτησαν την ανάπτυξη μιας απλής και αξιόπιστης μεθόδου που συνδυάζει την εκχύλιση διασποράς μαγνητικής στερεάς φάσης (DMSPE) με τροποποιημένα μαγνητικά νανοσωματίδια, ακολουθούμενη από αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS) για τον προσδιορισμό των στερολών σε δείγματα υγρών γάλακτος, αλλά και την ανίχνευση φοινικελαίου σε λίπος γάλακτος. Τα υδρόφοβα μαγνητικά νανοσωματίδια συντέθηκαν με την ένωση οκταδεκυλοτριμεθοξυσιλανίου (ODTMS) σε μαγνητικά νανοσωματίδια σιδήρου και χρησιμοποιήθηκαν ως προσροφητικά υλικά για τη μέθοδο DMSPE. Η διαδικασία βασίζεται στη σαπωνοποίηση του γάλακτος, ακολουθούμενη από την εκχύλιση των μη σαπωνοποιημένων στερολών μέσω DMSPE και την έκφρασή τους σε ακετονιτρίλιο για ανάλυση με GC-MS. Το κλάσμα μάζας κάθε στερόλης, ως ποσοστό της συνολικής περιεκτικότητας σε στερόλη, βοήθησε στον ποσοτικό προσδιορισμό των στερολών σε δείγματα γάλακτος. Η μελέτη αξιολόγησε τους παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση της εκχύλισης, όπως ο χρόνος εκχύλισης, οι συνθήκες εκρόφησης, ο όγκος του δείγματος, η ποσότητα του μαγνητικού προσροφητικού και οι συνθήκες σαπωνοποίησης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η προσθήκη φοινικελαίου στο γάλα προκάλεσε σημαντικές αλλαγές στη σύνθεση των στερολών, με τα κλάσματα φυτοστερολών (β-σιτοστερόλη, στιγμαστερόλη και κομπεστερόλη) να αυξηθούν καθώς αυξάνονταν τα επίπεδα φοινικελαίου. Με βάση την παρουσία φυτικών στερολών στο καθαρό λίπος γάλακτος, προσδιορίστηκε όριο ανίχνευσης 3% φοινικελαίου στο λίπος γάλακτος. Υπό τις βέλτιστες συνθήκες, η ακρίβεια εντός της ημέρας και η ακρίβεια επανάληψης για τα δείγματα με 3% φοινικέλαιο ήταν μεταξύ 1,1-1,8% και 1,3-1,9%, αντίστοιχα. Επιπλέον, η ικανοποιητική ανάκτηση της ολικής φυτοστερόλης (97-97,2%) δείχνει ότι η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί με επιτυχία για τον προσδιορισμό των φυτοστερολών και την ανίχνευση προσθήκης φοινικελαίου σε δείγματα γάλακτος.

Οι Jerusa Simone G., et al το 2012 ασχολήθηκαν στην εργασία τους με τη νοθεία βοείου γάλακτος σε σκόνη με φυτικά έλαια ή λίπη με τη χρήση MALDI-QTOF MS. Η φασματομετρία

μάζας χρόνου πτήσης εκρόφησης/ιονισμού με υποβοηθούμενη από μήτρα (MALDI-QTOF MS) επέτρεψε την ταχύτητα και αξιόπιστη ανίχνευση νοθείας σε σκόνη βοείου γάλακτος με φυτικά έλαια ή λίπη, απαιτώντας ελάχιστη ανάγκη προετοιμασίας (εκχύλιση) και χωρίς προηγούμενες διαδικασίες διαχωρισμού.

Το 1997 οι L. Alonso, et al, μελέτησαν και αυτοί τη νοθεία με φυτικά έλαια σε λίπος γάλακτος με ανάλυση κλάσματος στερόλης με αέρια χρωματογραφία. Αναλυτικότερα, μελέτησαν τη χρήση της αέριας χρωματογραφίας (GC) για την ανάλυση του συνολικού κλάσματος στερόλης σε φυτικά έλαια, λίπος γάλακτος ή μίγματα, προκειμένου να ανιχνευθούν πιθανές προσβολές ηλιάνθου με ελαιόλαδο καθώς και η προσθήκη φυτικών ελαίων στο λίπος γάλακτος. Η μέθοδος αυτή, η οποία χρησιμοποιείται καταλυόμενη με αλκάλια μετεστεροποίηση με KOH/μεθανόλη, συγκρίθηκε με τις διαδικασίες σαπωνοποίησης με και χωρίς μετατροπή στερολών σε παράγωγα σιλυλίου πριν από την ανάλυση. Η επαναληψιμότητα της μεθόδου ερμηνεύτηκε, με τον συντελεστή διακύμανσης να είναι 6,0% για τη β-σιτοστερόλη σε ελαιόλαδο και 8,0% σε ηλιέλαιο. Η ανάκτηση της β-σιτοστερόλης κυμάνθηκε από 92,6% έως 95,8% και για τα δύο έλαια. Η προτεινόμενη μέθοδος GC απαιτεί σύντομο χρόνο ανάλυσης, περιορίζοντας την ανάγκη για στάδια σαπωνοποίησης, εκχύλισης και παραγωγής. Διασφαλίζει καλή επαναληψιμότητα και ανάκτηση, αποτελώντας μια μέθοδο κατάλληλη για καθημερινή χρήση.

Σε μία πρόσφατη έρευνα το 2024 οι Vivek S. Et al, ασχολήθηκαν με τη χρήση της φασματοσκοπικής μεθόδου ATR-FTIR σε συνδυασμό με χημειομετρικές τεχνικές (PCA, PLS, PCR και SIMCA) για την ανίχνευση νοθείας του vanaspati ghee (πλήρως ή μερικώς υδρογονωμένο φυτικό μαγειρικό έλαιο, που χρησιμοποιείται ως φθηνότερο υποκατάστατο του γκι και του βουτύρου) στο λίπος του γάλακτος. Γεγονός είναι πώς το άνυδρο λίπος γάλακτος, το οποίο αποτελεί βασικό συστατικό στην καθημερινή διατροφή στην Ινδία, κινδυνεύει από νοθεία λόγω του υψηλού κόστους του. Ένα από τα συνηθισμένα νοθευτικά είναι το Vanaspati Ghee, το οποίο έχει εντοπιστεί στο ghee (είδος διαυγασμένου βουτύρου, που προέρχεται από την Ινδία). Η νοθεία του γκι αποτελεί μια συνεχή πρόκληση για τη σύγχρονη γαλακτοκομική βιομηχανία, θέτοντας σε κίνδυνο την υγεία των καταναλωτών και την αξιοπιστία των διατροφικών προϊόντων. Αρκετοί έμποροι συνεχίζουν να αντικαθιστούν το φυσικό λίπος του γάλακτος με υδρογονωμένα φυτικά έλαια. Η παρουσία του Vanaspati Ghee σε άνυδρο λίπος γάλακτος εξετάστηκε στη συγκεκριμένη μελέτη μέσω φασματοσκοπίας ATR-FTIR σε συνδυασμό με χημειομετρικές μεθόδους. Οι φυσικοχημικές μέθοδοι, όπως η τιμή Reichert Meissl και η ένδειξη βουτυροδιαθλασίμετρου, δεν είναι επαρκείς για την ανίχνευση του

vanaspati ghee σε χαμηλά επίπεδα νοθείας στο γκι. Αν και αποτελούν προηγμένες τεχνικές η HPLC, ο συνδυασμός GC-MS, η φασματοσκοπία φθορισμού και οι E-nose-based tests και αποδεικνύονται αποτελεσματικές, είναι δαπανηρές, χρονοβόρες και απαιτούμενες. Απαιτεί ειδικές δεξιότητες. Η φασματοσκοπία FTIR, από την άλλη πλευρά, προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα, όπως υψηλή αναλογία σήματος προς θόρυβο, τη δυνατότητα ταυτόχρονης ανίχνευσης πολλαπλών συχνοτήτων, ταχεία λήψη δεδομένων και μη καταστροφική ανάλυση. Επίσης, απαιτείται ελάχιστη προετοιμασία του δείγματος και δεν χρειάζεται η χρήση τοξικών χημικών ουσιών ή διαλυτών.

Για τη διαδικασία της ανίχνευσης, συλλέχθηκαν φασματικά δεδομένα από δείγματα καθαρού ghee, Vanaspati Ghee και ghee με προσθήκη Vanaspati σε διάφορες συγκεντρώσεις (1%, 3%, 5%, 7%, 9%, 12% και 15%), καλύπτοντας το φάσμα από 4000–500 cm^{-1} . Η ανάλυση με PCA αποκάλυψε σαφή μοτίβα ομαδοποίησης σε συγκεκριμένες περιοχές του φάσματος (1120-1080 cm^{-1} και 985-955 cm^{-1}), με επίπεδο σημαντικότητας 5%, επιτυγχάνοντας την αποτελεσματική διάκριση του καθαρού ghee από τα νοθευμένα δείγματα. Η μέθοδος SIMCA είχε 100% επιτυχία στην ταξινόμηση των καθαρών και Vanaspati ghee δειγμάτων. Επιπλέον, τα μοντέλα PLS και PCR παρουσίασαν υψηλές τιμές R^2 (~1), υποδεικνύοντας ισχυρή προγνωστική ακρίβεια για την ανίχνευση νοθείας Vanaspati ghee. Έτσι, η συνδυασμένη χρήση ATR-FTIR και χημειομετρίας επέτρεψε την επιτυχία της ανίχνευσης του Vanaspati ghee στο λίπος γάλακτος με ευαισθησία έως 1%.

Οι Arun K., et al το 2010 στη μελέτη τους προσπάθησαν να χρησιμοποιήσουν μια μέθοδο κλασματοποίησης, ακολουθούμενη από τη δοκιμή του φαινομένου χρόνου στερεοποίησης (AST), για την ανίχνευση ανάμειξης ξένων ελαίων και λιπών στο λίπος γάλακτος. Οι τιμές AST του στερεού κλάσματος που λήφθηκαν στους 20°C και των στερεών και των υγρών κλασμάτων που λήφθηκαν στους 18°C για το καθαρό λίπος αγελαδινού γάλακτος ήταν 2min30s, 3min21s και 3min31s, αντίστοιχα. Για το λίπος από γάλα βουβαλιού, οι τιμές ήταν 1min58s, 2min47s, και 3min10s, αντίστοιχα. Αυτή η καινοτόμος προσέγγιση επιτρέπει την ανίχνευση συγκεκριμένων μειγμάτων ξένων ελαίων και λιπών στο λίπος αγελαδινού γάλακτος, αλλά δεν είναι εξίσου αποτελεσματική στο λίπος γάλακτος βουβαλιού.

Οι Ayse Ozgur U. et al, το 2020 μελέτησαν την ανάλυση barcode-DNA (τεχνική αναγνώρισης ειδών χρησιμοποιώντας ένα σύντομο τμήμα DNA από ένα συγκεκριμένο γονίδιο) για τον εντοπισμό νοθείας με φυτικά έλαια. Το DNA, παρά την αποικοδόμησή του σε μικρότερα, κυρίως αναλύσιμα θραύσματα, παραμένει ανθεκτικό σε ακραίες συνθήκες

επεξεργασίας τροφίμων, όπως υψηλές θερμοκρασίες, πιέσεις και χημικές επεξεργασίες. Επιπλέον, σε αντίθεση με τους μεταβολικούς δείκτες, οι γενετικές πληροφορίες που αποθηκεύονται στην αλληλουχία του DNA παραμένουν ανεπηρέαστες από περιβαλλοντικές συνθήκες και διαδικασίες. Επίσης, ενώ οι πρωτεΐνες και οι μεταβολές εκφράζονται με εξειδικευμένους τρόπους ανάλογα με τον ιστό, η αλληλουχία του DNA είναι ίδια σε όλα τα κύτταρα ενός οργανισμού. Η ανάλυση κόστους του DNA είναι αντίστοιχη με αυτές των ευρέως χρησιμοποιούμενων χρωματογραφικών μεθόδων για τον έλεγχο της αυθεντικότητας των τροφίμων. Η γονιδιωματική των τροφίμων, που ασχολείται με την ανάλυση του υπολειμματικού DNA σε τρόφιμα, κερδίζει διαρκώς έδαφος στην επιστημονική έρευνα για τα τρόφιμα. Η ενίσχυση συγκεκριμένων στόχων DNA μέσω της μεθόδου PCR αποτελεί έναν απλό τρόπο αξιοποίησης των πληροφοριών αλληλουχίας. Εάν το γαλακτοκομικό λίπος έχει νοθευτεί με φυτικά έλαια, είναι δυνατό να ενισχυθεί μια αλληλουχία DNA ειδική για το φυτό από το νοθευμένο δείγμα. Με βάση αυτή την αρχή, μπορεί να σχεδιαστούν απλές και αποτελεσματικές αναλύσεις PCR που να εξυπηρετούν τον σκοπό. Παρόλα αυτά, δεν υπάρχουν ακόμη δημοσιεύσεις που να περιγράφουν τη χρήση DNA-βασισμένων μεθόδων για την ανίχνευση νοθείας φυτικών ελαίων σε γάλα ή γαλακτοκομικά προϊόντα. Οι υπάρχουσες μελέτες για τη γονιδιωματική αυθεντικότητα στα γαλακτοκομικά επικεντρώνονται στην ταυτοποίηση της προέλευσης του γάλακτος και στηρίζονται κυρίως στην ειδική PCR για το είδος της ανίχνευσης του στοχευόμενου ζωικού είδους. Οι καθολικοί γραμμικοί κώδικες DNA προσφέρουν σημαντικές δυνατότητες ως διαγνωστικοί δείκτες για την αξιολόγηση της αυθεντικότητας και την ανίχνευση νοθείας στα τρόφιμα. Χάρη στις διατηρημένες αλληλουχίες τους, μπορούν να ενισχυθούν και να αναλυθούν από διάφορες ταξινομικές ομάδες, εξαλείφοντας την ανάγκη για εξειδικευμένες δοκιμές για κάθε πιθανό νοθευτικό παράγοντα. Ο γονότυπος γραμμωτού κώδικα αποτελεί μια ευέλικτη προσέγγιση που επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση πολλών παραποιητών. Με την προϋπόθεση ότι έχει επιλεγθεί μια κατάλληλη περιοχή γραμμικού κώδικα για την ανάλυση, είναι δυνατός ο σχεδιασμός των πρακτικών και αξιόπιστων μεθόδων που παρουσιάζουν την ανάλυση του γονότυπου ενός δείγματος τροφίμου με βάση την επιλεγμένη αλληλουχία γραμμωτού κώδικα. Ως αποτέλεσμα, έχουν αναπτυχθεί αναλύσεις γνησιότητας τροφίμων που διαφορετικών μορφών γραμμωτού κώδικα για την ανίχνευση ειδικών για το είδος των παραλλαγών μιας διατηρημένης αλληλουχίας σε μια ποικιλία διατροφικών προϊόντων.

Στην παρούσα μελέτη, εφαρμόστηκε η μέθοδος γονότυπου γραμμωτού κώδικα INDEL για την ανίχνευση της νοθείας φυτικών ελαίων στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα.

Συγκεκριμένα, αναπτύχθηκαν και περιγράφηκαν δύο αναλύσεις γονότυπου γραμμωτού κώδικα βασισμένες στη μεθοδολογία PCR-CE (PCR-τριχοειδής ηλεκτροφόρηση). Οι δύο αυτές μέθοδοι είναι αλληλοσυμπληρούμενες, προσφέροντας υψηλή ευαισθησία και βελτιωμένη ικανότητα διάκρισης μεταξύ διαφορετικών ειδών. Συμπερασματικά, η συγκεκριμένη μελέτη προτείνει το εσώνιο *trnL* (UAA) ως τον κατάλληλο γραμμωτό κώδικα για την ταυτοποίηση του είδους φυτικού ελαίου που χρησιμοποιείται για τη νόθευση γαλακτοκομικών προϊόντων. Η μέθοδος γονότυπου γραμμωτού κώδικα με τριχοειδική ηλεκτροφόρηση δεν εντόπισε μόνο την παρουσία φυτικού υλικού σε δείγματα γαλακτοκομικών προϊόντων, αλλά προσδιόρισε και το είδος από το οποίο προήλθε η νοθεία.

Το 2023 οι Huaixiang T. et al, μελέτησαν την ταχεία αναγνώριση και ποσοτικοποίηση της νοθείας με φυτικά έλαια με τη χρήση ηλεκτρονικής μύτης με αέρια χρωματογραφία flash σε συνδυασμό με μηχανική εκμάθηση. Η μελέτη αυτή δεν χρησιμοποιεί μύτες που βασίζονται σε συμβατικούς αισθητήρες (π.χ αερίων ημιαγωγών οξειδίου), οι οποίοι είναι επιρρεπείς σε μετατόπιση και μόλυνση, με αποτέλεσμα να δίνουν αμφίβολα σήματα λόγω της χαμηλής ευαισθησίας. Αντιθέτως, χρησιμοποιεί μύτες E-χρωματογραφίας flash (FGC), κατά τις οποίες μια αέρια φάση ελήφθη ως εναλλακτική λύση στους αισθητήρες για τη δημιουργία πιο περίπλοκων και ειδικών σημάτων πτητικών ενώσεων, προωθώντας τη βαθύτερη διερεύνηση των γευστικών χαρακτηριστικών τους. Το σύστημα E-nose παράγει έναν μεγάλο όγκο αλληλοκαλυπτόμενων δεδομένων, τα οποία απαιτούν κατάλληλη κατηγοριοποίηση και ανάλυση μέσω εξειδικευμένων τεχνικών μετα-επεξεργασίας. Για την επεξεργασία αυτών των δεδομένων, εφαρμόζεται μέθοδος γενικής ταξινόμησης και αναγνώρισης από τον τομέα της μηχανικής μάθησης, όπως η Ανάλυση Κύριων Συστατικών (PCA), η Ενίσχυση Ακραίας Κλίσης (XGBoost), το τεχνητό νευρωνικό δίκτυο, το Πολυστρωματικό Perceptron (MLP), τα τυχαίο δάσος (RF) και οι μηχανές υποστήριξης διανυσμάτων (SVM).

Στην παρούσα μελέτη πτητικές οργανικές ενώσεις (VOCs) αναλύθηκαν τόσο σε φρέσκο νωπό γάλα όσο και σε γάλα που είχε μολυνθεί με αραβοσιτέλαιο (CO), φοινικέλαιο (PO), σογιέλαιο (SO) ή μείγμα ελαίων (BO). Η δυνατότητα της FGC E-nose να ανιχνεύει το μολυσμένο γάλα αξιολογήθηκε μέσω αλγορίθμων XGBoost, SVM, RF και MLP. Στην ποιοτική ανάλυση, ικανοποιητικά αποτελέσματα, με ακρίβεια 1.000 και 0,9565, και F1-scores 0,9625 και 0,9778 αποκτήθηκαν με τη χρήση μοντέλων μηχανών τυχαίου δάσους (RF) και φορέα υποστήριξης, αντίστοιχα. Στην ποσοτική ανάλυση της συγκέντρωσης PO στο νοθευμένο νωπό γάλα, ο αλγόριθμος RF πέτυχε την βέλτιστη απόδοση ($R^2 = 0,9792$ και ριζικό μέσο τετραγωνικό σφάλμα = 0,2583) από τους τέσσερις αλγόριθμους που δοκιμάστηκαν στο

μοντέλο πρόβλεψης. Τέλος, η αποδοτικότητα της προτεινόμενης μεθόδου επαληθεύτηκε μέσω ανίχνευσης νοθείας φυτικών ελαίων σε πραγματικά δείγματα. Συμπερασματικά, η έρευνα αυτή προσφέρει μια καινοτόμο προοπτική για τη χρήση των FGC E-noses και της μηχανικής μάθησης στην ταχύτητα και την ακριβή αξιολόγηση της ποιότητας του νωπού γάλακτος.

Το 2023 οι Marwa E., et al, ασχολήθηκαν με την επιβεβαίωση των χαμηλών ποσοστών προσθήκης φοινικέλαιου στο γάλα και την επικύρωση διαφόρων μεθόδων ανίχνευσης του, όπως η αέρια χρωματογραφία, η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης και η φασματοσκοπία υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier. Στην έρευνα, παρασκευάστηκαν διαφορετικές ποσότητες φοινικέλαιου σε υγρό γάλα (πέντε δείγματα με διαφορετικές ποσότητες το καθένα) και ένα γαλάκτωμα φοινικέλαιου. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι οι τιμές των αριθμών σαπωνοποίησης μειώθηκαν με την αύξηση της ποσότητας του φοινικέλαιου, χωρίς να παρατηρηθεί μείωση στα όρια των αιγυπτιακών προτύπων μέχρι την προσθήκη 50% φοινικελίου. Ο αριθμός ιωδίου ήταν λιγότερο ευαίσθητος από τον αριθμό σαπωνοποίησης στην ανίχνευση φοινικελαίου. Η ένδειξη διαθλασίμετρου Butyro δεν κατάφερε να ανιχνεύσει το φοινικέλαιο στο γάλα. Το προφίλ λιπαρών οξέων στο γάλα που προσδιορίστηκε μέσω της αέριας χρωματογραφίας είχε καλή συσχέτιση με την προσθήκη φοινικελαίου. Επιπλέον, παρατηρήθηκε θετική σχέση μεταξύ του επιπέδου προσθήκης φοινικελαίου και της περιεκτικότητας σε β-σιτοστερόλη, όπως μετρήθηκε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης. Αντίθετα, δεν εντοπίστηκε καμία σχέση μεταξύ της συμπεριφοράς των φασμάτων που προκύπτουν από τη φασματοσκοπία υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier και της παρουσίας του φοινικέλαιου στο γάλα.

4. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΝΟΘΕΙΑΣ ΜΕ ΦΥΤΙΚΑ ΕΛΑΙΑ

Παραπάνω περιεγράφηκαν αρκετές μελέτες που αφορούν την νοθεία του γάλακτος με φυτικά έλαια. Ορισμένες ήταν αρκετά καινοτόμες και κάποιες άλλες ήρθαν να πιστοποιήσουν την εγκυρότητα μεθόδων που ήδη γνωρίζαμε τον σημαντικό ρόλο που παίζουν στην ανίχνευση αυτού του είδους της νοθείας. Όλες οι μελέτες ωστόσο ήταν ιδιαίτερα ενδιαφέρουσες και άφησαν το στίγμα τους στη γνώση γύρω από τα φυτικά έλαια και την νοθεία του γάλακτος. Αυτές οι μελέτες μας πιστοποίησαν μία πληθώρα μεθόδων που μπορούν να παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της νοθείας με φυτικά έλαια. Οι μέθοδοι αυτές είναι:

χρωματογραφικές (RP-HPLC, GC), φασματοσκοπικές (FTIR, UV), μέθοδοι χημειομετρίας, μέθοδοι φασματομετρία μάζας (MALDI-TOF), μέθοδοι ηλεκτρομεταμόστευσης (τριχοειδής ηλεκτροφόρηση), μέθοδοι βασιζόμενοι στην ανάλυση DNA (PCR) και μέθοδοι που βασίζονται στον οργανοληπτικό έλεγχο (E-nose). Επίσης, γίνεται σαφές πώς για την ανίχνευση της νοθείας σε αρκετές περιπτώσεις είναι αποτελεσματικός ο συνδυασμός δύο ή και περισσότερων μεθόδων (FGC E-nose, PCR-CE, ATR-FTIR, HPLC-UV, LC-MS, GC-MS, MALDIQTOF-MS). Σημαντικό ρόλο παίζουν επίσης και ορισμένες σταθερές, όπως ο αριθμός σαπωνοποίησης, ο αριθμός ιωδίου και ο δείκτης διάθλασης που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση της αντικατάστασης του γάλακτος με φυτικά έλαια.

Μία σύνοψη των όσων παρουσιάστηκαν στις μελέτες, δηλαδή των αναλυτικών τεχνικών, και των χαρακτηριστικών τους, παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

ΜΕΘΟΔΟΣ	ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ
Fluorescence spectroscopy	Ntakatsane et al	Υψηλή αξιοπιστία, Ανίχνευση νοθείας τάξεως 1% Μειονέκτημα: Χρονοβόρα, Δαπανηρή, Απαιτεί ειδικές δεξιότητες
LC-GC	Williband et al	Γρήγορη προετοιμασία δείγματος, Υψηλή αξιοπιστία, Ανίχνευση νοθείας τάξεως 1%
GC	Jin-Man et al, Alonso et al, Marwa et al	Ταχεία μέθοδος Υψηλή επαναληψιμότητα Καλή ανάκτηση Μειονέκτημα: Ανάγκη ανάλυσης πολλαπλών μεμονωμένων δειγμάτων
HPLC-UV-DAD	Kolaric et al	Υψηλή ακρίβεια, Υψηλή αξιοπιστία, Μειονέκτημα: Χρονοβόρα, Δαπανηρή
RP-HPLC	Nguyen Van et al, Marwa et al	Υψηλή ακρίβεια, Υψηλή αξιοπιστία, Ανίχνευση νοθείας τάξεως 1% Μειονέκτημα: Χρονοβόρα, Δαπανηρή, Απαιτεί ειδικές δεξιότητες

ATR-FTIR	Vivek et al	Υψηλή αναλογία σήματος προς θόρυβο, Μη καταστρεπτική ανάλυση, Ταχεία λήψη δεδομένων, Ελάχιστη προετοιμασία δείγματος, Μη χρήση τοξικών ουσιών
MALDI-QTOF MS	Jerusa et al	Ελάχιστη προετοιμασία δείγματος, Ταχεία μέθοδος, Μεγάλη αξιοπιστία Μειονέκτημα: Απαιτεί ειδικές δεξιότητες, Δαπανηρή
GC-MS	Davood et al	Υψηλή αποτελεσματικότητα, Υψηλή ακρίβεια, Ανίχνευση νοθείας τάξεως 1% Μειονέκτημα: Χρονοβόρα, Δαπανηρή, Απαιτεί ειδικές δεξιότητες
AST	Arun et al	Υψηλή αποτελεσματικότητα Μειονέκτημα: Δεν αναγνωρίζει τη νοθεία σε βουβαλίσιο γάλα
PCR-CE	Ozgur et al	Υψηλή ευαισθησία Μειονέκτημα: Απαιτεί ειδικές δεξιότητες, χρονοβόρα
E-nose- FGC	Huaixiang et al	Υψηλή ακρίβεια, Υψηλή αποτελεσματικότητα, Ταχεία μέθοδος Μειονέκτημα: Δεν είναι διαδεδομένη

Πίνακας 4-1. Αναλυτικές τεχνικές ανίχνευσης φυτικών ελαίων.

Όλες οι παραπάνω μέθοδοι έχουν αποδειχθεί πώς έχουν την ικανότητα να ανιχνεύσουν ποιοτικά και ποσοτικά την ύπαρξη νοθείας με φυτικά έλαια. Οι πιο δημοφιλείς φαίνεται να είναι η αέρια χρωματογραφία (GC), η αντίστροφης φάσης υγρή χρωματογραφία υψηλής

απόδοσης (RP-HPLC), αλλά και η φασματομετρία μάζας MS. Οι συγκεκριμένες μέθοδοι παρέχουν ακριβή και αξιόπιστα αποτελέσματα ακόμα και σε περιπτώσεις νοθείας μικρού ποσοστού (τάξεως του 1%). Ενώ οι σταθερές, όπως ο αριθμός σαπωνοποίησης, ιωδίου και ο δείκτης διάθλασης δίνουν έγκυρα αποτελέσματα όταν υπάρχει νοθεία μεγαλύτερη του 25%. Οι προηγμένες τεχνικές της HPLC, ο συνδυασμός GC-MS και η φασματοσκοπία φθορισμού ενώ αποδεικνύονται αποτελεσματικές, είναι δαπανηρές, χρονοβόρες και απαιτούν Απαιτεί ειδικές δεξιότητες. Η φασματοσκοπία FTIR, από την άλλη πλευρά, προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα, όπως υψηλή αναλογία σήματος προς θόρυβο, τη δυνατότητα ταυτόχρονης ανίχνευσης πολλαπλών συχνοτήτων, ταχεία λήψη δεδομένων και μη καταστροφική ανάλυση. Επίσης, απαιτείται ελάχιστη προετοιμασία του δείγματος και δεν χρειάζεται η χρήση τοξικών χημικών ουσιών ή διαλυτών. Η χρήση των E-nose σε συνδυασμό με την αέρια χρωματογραφία φαίνεται πώς αποτελεί έναν αποτελεσματικό καινοτόμο συνδυασμό για την ανίχνευση νοθείας. Η τεχνολογία των E-nose είναι απλή, γρήγορη και αποτελεσματική αλλά η γνώση γύρω από αυτήν την τεχνολογία δεν είναι τόσο διαδεδομένη, γεγονός που αποτελεί κίνητρο για το μέλλον.

4.1 ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Η ανίχνευση νοθείας στο γάλα με φυτικά έλαια αποτελεί μια πολύπλοκη διαδικασία. Πρώτον, οι μέθοδοι επεξεργασίας μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά τη σύνθεση των δευτερευόντων συστατικών, καθιστώντας δύσκολη τη θέσπιση σαφών και αποτελεσματικών προδιαγραφών για τις μεθόδους ελέγχου. Δεύτερον, αρκετοί πια παραγωγοί και πωλητές έχουν αποκτήσει υψηλό επίπεδο εξειδίκευσης στην προσαρμογή των μεθόδων νοθείας, δημιουργώντας μείγματα που προσεγγίζουν αρκετά τη σύνθεση του φυσικού γάλακτος και πληρούν σε μεγάλο βαθμό τις καθιερωμένες απαιτήσεις. Οι πολύ αυστηρές απαιτήσεις μπορούν να οδηγήσουν σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα, γεγονός που αποτελεί πρόσθετη πρόκληση. Η αντιμετώπιση αυτής της πρόκλησης απαιτεί την χρήση απλούστερων, αποδοτικών και αξιόπιστων τεχνικών ανίχνευσης νοθείας, οι οποίες θα διακριθούν για την υψηλή επαναληψιμότητά τους, διασφαλίζοντας ταυτόχρονα την ποιότητα και την αυθεντικότητα του γάλακτος.

Οι μελλοντικές προτάσεις στις αναλυτικές δοκιμές πρέπει να επικεντρωθούν μόνο στη βελτίωση των υφιστάμενων μεθόδων αλλά και στην αναβάθμιση των διαδικασιών προετοιμασίας. Το μέλλον της πιστοποίησης γάλακτος φαίνεται να περιλαμβάνει τη χρήση αυτοματοποιημένων μεθόδων ανάλυσης μιγμάτων, συνδυασμένων με τεχνικές διαχωρισμού, μειώνοντας την ανάγκη για πολύπλοκα πρωτόκολλα προετοιμασίας δειγμάτων. Οι επίσημες μέθοδοι ανάλυσης για να εξελιχθούν, οφείλουν να ενσωματώσουν περισσότερο σύγχρονες τεχνολογίες, όπως η E-nose. Παρότι αυτή η τεχνολογία είναι φθηνή, γρήγορη και εύκολη στη χρήση, εξακολουθεί να αντιμετωπίζει προκλήσεις, όπως η έλλειψη εξειδίκευσης. Εάν επιλυθούν ορισμένα ζητήματα, η τεχνολογία της E-nose μπορεί να γίνει μια βασική τεχνολογία για την πιστοποίηση γνησιότητας και τη διασφάλιση της ποιότητας του γάλακτος. Συνολικά, το μέλλον των αναλυτικών μεθόδων προσανατολίζεται στη δημιουργία ολοκληρωμένων λύσεων που συνδυάζουν προηγμένες συσκευές και εξελιγμένο λογισμικό επεξεργασίας δεδομένων, εξασφαλίζοντας πιο αξιόπιστα και αποτελεσματικά αποτελέσματα.

Βιβλιογραφία

Ακολουθούν οι βιβλιογραφικές αναφορές (πηγές) της Εργασίας.

1. Μάντης Α., Παπαγεωργίου Δ., Φλετούρης Δ., Αγγελίδης Α., Υγιεινή και Τεχνολογία του γάλακτος και των προϊόντων του. Θεσσαλονίκη, 2015, Εκδόσεις Αφοί Κυριακίδη.
2. ΚΤΠ, 2014. Κώδικας Τροφίμων Ποτών και Αντικειμένων Κοινής Χρήσης. Μέρος Α, Τρόφιμα και Ποτά. Άρθρο 80, Είδη Γάλακτος, Εθνικό Τυπογραφείο. Αθήνα.
3. FAO/WHO, 2011. Codex General Standard for the Use of Dairy Terms. Codex STAN 206-1999. In: FAO/WHO Codex Alimentarius, Milk and Milk Products, 2nd Ed. Rome .pp 176-179.

4. Πανέτσος, Α., 1969. Γαλακτοκομία. Θεσσαλονίκη, p. 104.
5. Καλατζόπουλος Γ. Μαθήματα εφαρμοσμένης μικροβιολογίας γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων, Α΄ και Β΄ μέρος, Εκδόσεις Καραμπελόπουλος, Αθήνα
6. Καμινारीδης Σ. και Μοάτσου Γ. (2009). Γαλακτοκομία, σελ. 23-26, 153-154, 212, 273-305, 308-334, 341-373, Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα-Αιγάλεω.
7. National Research Council (US) Committee on Technological Options to Improve the Nutritional Attributes of Animal Products. “Factors Affecting the Composition of Milk from Dairy Cows.” Nih.gov, National Academies Press (US), 2016
8. “Factors Affecting the Composition of Milk from Dairy Cows.” Nih.gov, National Academies Press (US), 2016
9. Walstra, P., Wouters, J.T.M., and Geurts, T.J., 2006. Dairy Science and Technology, 2nd Ed. CRC Press, Taylor & Francis, Boca Raton, USA.
10. Horne, D.S., 2011. Milk proteins. Casein, micellar structure. In: Fuquay, J.W., Fox, P.F., and McSweeney, P.L.H. (eds), Encyclopedia of Dairy Sciences, Vol. 3, 2nd Ed. Elsevier, London, pp. 772-779.
11. Vilotte, J.-L., Chanut, E., Le Provost, F., Whitelaw, C.B.A., Kolb, A., and Shennan, D.B., 2013 Genetics and biosynthesis of milk proteins, In: McSweeney, P.L.H., and Fox, P.F., (eds), Advanced Dairy Chemistry, Vol. 1A: Proteins: Basic Aspects, 4th Ed. Springer, New York. pp. 431-461.
12. Sordillo, L.M., and Nickerson, S.C., 1988. Quantification and immunoglobulin classification of plasma cells in nonlactating bovine mammary tissue. J Dairy Sci. 71:84-91.
13. Hurley, W.L., and Theil, P.K., 2013. Immunoglobulins in mammary secretions. In: McSweeney, P.L.H., and Fox, P.F. (eds), Advanced Dairy Chemistry, Vol. 1A, Proteins: Basic Aspects, 4th Ed. Springer, New York. pp. 275-294.
14. Bauman D.E., McGuire M.A., and Harvatine K.J., Mammary gland, milk biosynthesis and secretion. Milk fat. In: Fuquay J.W., Fox P.F., and McSweeney P.L.H. Encyclopedia of Dairy Sciences, 2011, Vol. 3, 2nd Ed. Elsevier, London, pp. 352-358.
15. Elias-Argote, X., Laubscher, A., and Jimenez-Flores, R., 2013. Dairy ingredients containing milk fat globule membrane: Description, composition, and industrial potential. In:

Smithers, G.W., and Augustin, M.A. (eds), Advanced in Dairy Ingredients. John Wiley & Sons, Inc. and IFT press, Ames, Iowa. pp. 71-98.

16. Holsinger, V.H., 1999. Lactose. In: Marth, E.H. (ed), Fundamentals of Dairy Chemistry, 3rd Ed. Aspen Publishers, Maryland. Pp. 279-342.

17. Crisa, A., 2013. Milk carbohydrates and oligosaccharides. In :Park, Y.W., and Haenlein, G.F.W, (eds), Milk and Dairy Products in Human Nutrition: Production, Composition and Health, 1st Ed. John Wiley & Sons, Ltd., Ames, Iowa, pp. 129-147.

18. Park, Y.W., Juarez M., Ramos, M., % Haenlein, G.F.W. (2007). Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. Small Ruminant Research, 68(1-2), 88-113.

19. APHA (1992). Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 14th edn. American Public Health Association, Washington DC.

20. Lopez Fernandez, Maria Mercedes. (2021). Tecnologia De La Leche Y Prod. Lacteos. Facultad de Veterinaria-Universidad de Leon.

21. Codex Alimentarius, 2009. Code of hygiene practice for milk and milk products. CAC/RCP 57-2004. Amendment 2009.

22. Ανυφαντάκης Ε. (1996). Χημεία και ανάλυση του γάλακτος, Εκδόσεις Σταμούλης, Αθήνα

23. Moatsou G. and Anifantakis E. (2013). Review article: Recent developments in the antibodies-based analytical methods for the differentiation of milk from different species. International Journal of Dairy Technology 56, 133-138

24. Azad, T., Ahmed, S. (2016a). Common milk adulteration and their detection techniques. International Journal of Food Contamination

25. Καμιναρίδης Σ., 2009. Νοθεία γάλακτος. In: Καμιναρίδης, Σ., και Μοάτσου Γ., (eds), Γαλακτοκομία. Εκδόσεις Έμβρυο. Σελ. 353-379.

26. Bintsis, T., Angelidis, A.S., and Psoni, L., 2008. Modern laboratory practices – Analysis of dairy products. In: Britz, T.J., and Robinson, R.K. (eds), Advanced Dairy Science and Technology. Blackwell Publishing, Oxford, U.K., pp. 183-261.

27. Nierman, P., 2004. Methods to detect abnormal milk. In: Wehr, H.M., and Frank, J.F., (eds), *Standard Methods for the examination of dairy products*. 17th edn., American Public Health Association, Washington D.C., pp 281-292.
28. Angelidis, A.S., Farver, T.B. and Cullor, J.S., 1999. Evaluation of the Delvo-X-Press assay for detecting antibiotic residues in milk samples from individual cows. *J.Food Prot.* 62:1183-1190.
29. Krusa, M., Torre, M., and Marina, M.L., 2000. A reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the determination of soya bean proteins in bovine milks. *Anal. Chem.* 72:1814-1818.
30. Sanchez, L., Perez, M.D., Puyol, P., and Calvo, M., 2002. Determination of vegetal proteins in milk powder by enzyme-linked immunosorbent assay: interlaboratory study. *J. AOAC Int.* 85:1390-1397
31. Manso, M.A., Cattaneo, T.M., Barzaghi, S., Olieman, C., and Lopez-Fandino, R., 2002. Determination of vegetal proteins in milk powder by sodium dodecyl sulfate-capillary gel electrophoresis: interlaboratory study. *J. AOAC Int.* 85:1090-1095.
32. Manzo, C., Nicolai, M.A., and Pizzano, R., 2015. Thermal markers arising from changes in the protein component of milk. *Food Control* 51: 251-255.
33. Recio, I., Garcia-Risco, M.R., Lopez-Fandino, R., Olano, A., and Ramos, M., 2000. Detection of rennet whey solids in UHT milk by capillary electrophoresis. *Int. Dairy J.* 10: 333-338.
34. Windarsih, A., Rohman, A., Irnawati & Riyanto, S. (2021). The Combination of Vibrational Spectroscopy and Chemometrics for Analysis of Milk Products Adulteration. *International Journal of Food Science*, 2021.
35. M.P Ntakatsane, X. M. Liu, P, Zhou, Short Communication Rapid detection of milk fat adulteration with vegetable oil by fluorescence spectroscopy, *J. Dairy Science*, 96: 2130-2136.
36. S.Feng, A.L.Lock, P. C. Gansworthy, Technical Note: A Rapid Lipid Separation Method for Determining Fatty Acid Composition of Milk, 2004, *J. Dairy Science*, 87: 3785-3788.

37. Ric R. Grummer, effect of feed on the composition of milk fat, 1991, Journal of Dairy Science, 3244-3257.
38. Frank D. Gunstone, Vegetables oils in food technology, 2002, Blackwell Publishing.
39. Spencer, G.F., Herb, S.F. and Gormisky, P.J., 1976, Fatty acid composition as a basis for identification of commercial fats and oils. 1994, J. Am. Oil Chem. Soc., 94–96
40. Cunnane, S.C. and Thompson, L.U. (eds), Flaxseed in Human Nutrition, 1995, AOCS Press, Champaign, Il.
41. Borkova M., Snaselova J., Possibilities of different animal milk detection in milk and dairy products – a review, 2005, Czech J. Food Science, 23: 41–50.
42. Rolland M.P., Bitri L., Besancon P., Monospecificity of the antibodies to bovine α s1-casein fragment 140-149: application to the detection of bovine milk in caprine dairy products, 1995, Journal Dairy Research, 62: 83–88.
43. Amrita Poonia, Alok Jhan, Rajan Sharma, Harikesh Bahadur Singh, Ashwini Kumar Rai And Nitya Sharma (2016). Detection of adulteration in milk: A review.
44. Recio I., Perez-Rodriguez M.L., Ramos M., Amigo L., Capillary electrophoretic analysis of genetic variants of milk proteins from different species, 1997, Journal of Chromatography A, 768: 47–56
45. Recio I., Amigo L., Lopez-Fandifio R., Assessment of the quality of dairy products by capillary electrophoresis of milk proteins, 1997, Journal of Chromatography B, 697: 231–242
46. Kaminarides S.E., Koukiassa P., Detection of bovine milk in ovine yoghurt by electrophoresis of para- κ -casein, 2002, Food Chemistry, 78: 53–55.
47. Garcia T., Martin R., Morales P, Gonzalez I., Sanz B., Hernandez P., Sandwich ELISA for detection of caprine milk in ovine milk 1993, Milchwissenschaft, 48: 563–566.
48. Ανδρέας Σκορίλας, Κλινική βιοχημεία και μοριακή διαγνωστική - Βασικές αρχές και σύγχρονες προσεγγίσεις, 2020 , Broken Hill Publishers Ltd
49. Levieux D., Vevien A., Rapid, sensitive two-site ELISA for detection of cows' milk in goats "or ewes" milk using monoclonal antibodies, 1994, Journal of Dairy Research, 61: 91–99.

50. Lopez-Calleja I., Gonzales I., Fajardo V., Rodriguez M.A., Hernantez P.E., Garcia T., Matin R., Rapid detection of cows' milk in sheeps' and goats' milk by a species-specific polymerase chain reaction technique, 2004, *Journal of Dairy Science*, 87: 2839–2845.
51. M.Di Domenico, M.Di Juiseppe, J.D. Wicochea Rodriguez, C.Camma, Validation of a fast real-time PCR method to detect fraud and mislabeling in milk and dairy products, 2017, *Journal of Dairy Science*, Elsevier.
52. Klotz A., Einspanier R., Development of a DNAbased screening method to detect cow milk in ewe, goat and buffalo milk and dairy products using PCRLCR-EIA-technique, 2001, *Milchwissenschaft*, 56: 67–70
53. Κουιμτζή Θ.Α., Ενόργανη χημική ανάλυση, 1980, Θεσσαλονίκη
54. Σίσκου Π.Α., Αναλυτικές μέθοδοι διαχωρισμού, 1989, Αθήνα
55. L. Pecsok, L.D. Schields, T. Cairns, I.G. McWilliam, Modern methods of chemical analysis, J. Wiley and Sons, New York, 1976
56. Strange E.D., Malin E.L., Van Hekken D.L., Basch J.J., Chromatographic and electrophoretic methods used for analysis of milk proteins., 1992, *Journal of Chromatography A*, 624: 81–102.
57. Mayer H.K., Heidler D., Rockenbauer C., Determination of the percentages of cows', ewes' and goats' milk in cheese by isoelectric focusing and cationexchange HPLC of γ - and para- κ -caseins, 1997, *International Dairy Journal*, 7: 619–628.
58. . Romero C., Perez-Andujar O., Olmedo A., Jimenez S., Detection of cow's milk in ewe's or goat's milk by HPLC, 1996, *Chromatographia*, 42: 181–184.
59. Ferreira I.M., Oliveira, M.B.P.P, Determination of caseinomacropeptide by an RP-HPLC method and monitoring of the addition of rennet whey to powdered milk, *J. Liq. Chrom Relat Tech.*, 26(1), 99-107
60. Veloso A.C.A., Teixeira N., Ferreira I.M.P.L.V.O., Separation and quantification of the major casein fractions by reverse-phase high-performance liquid chromatography and urea-polyacrylamide gel electrophoresis. Detection of milk adulterations, 2002, *Journal of Chromatography A*, 967: 209–218

61. Molle D. and Leonil J., Quantitative determination of bovine κ-casein macropeptide in dairy products by liquid chromatography/ electrospray coupled to tandem mass spectrometry (LC-ESI/MS) And Liquid Chromatography/Electrospray Coupled to Tandem Mass Spectrometry (LC-ESI/MS/MS), 2005, International Dairy Journal, 15, 419–42
62. G A Eiceman, H H Hill Jr, J Gardea-Torresdey, Gas chromatography, 1998 Jun 15;70 (12) 321R-339R
63. Xiaolei Li et al, Nontargeted Screening Using Gas Chromatography–Atmospheric Pressure Ionization Mass Spectrometry: Recent Trends and Emerging Potential, 2021 Nov 16;26(22):6911
64. Brenner N., Haapala M., Vuorensola K., Kostiainen R. Simple Coupling of Gas Chromatography to Electrospray Ionization Mass Spectrometry. Anal. Chem., 2008, 80:8334–8339.
65. Rocha SM, Caldeira M, Carrola J, Santos M, Cruz N, Duarte IF, Exploring the human urine metabolomic potentialities by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time of flight mass spectrometry, J. Chromatogr. A, 1252 (2012) 155–163
66. Tranchida PQ, Franchina FA, Dugo P, Mondello L, A flow-modulated comprehensive gas chromatography-mass spectrometry method for the analysis of fatty acid profiles in marine and biological samples, 2012, J. Chromatogr. A, 1255 171–176.
67. Jeong J, Zhang X, Shi X, Kim S, Shen C, An efficient post-hoc integration method improving peak alignment of metabolomics data from GC×GC/TOF-MS, 2013, BMC Bioinf, 14 123
68. Wei X, Shi X, Koo I, Kim S, Schmidt RH, Arteel GE, Watson WH, McClain C, Zhang X, Metpp: A computational platform for comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry-based metabolomics, 2013, Bioinformatics, 29 1786–1792.
69. Izadmanesh Y, Garreta-Lara E, Ghasemi JB, Lacorte S, Matamoros V, Tauler R, Chemometric analysis of comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry metabolomics data, 2017, J. Chromatogr. A, 1488 113–125
70. Dave. A., Banwari, D., Srivastava, S., & Sadistap, S. (2016). Optical sensing system for detecting water adulteration in milk.

71. Azad, T., & Ahmed, S. (2016a). Common milk adulteration and their detection techniques. *International Journal of Food Contamination*
72. C. Perez-Gonzalez, C. Carcia-Hernandez, C. Carcia-Caberon, M.L Rodriguez-Mendez, L. Dias, F. Martin-Pedrosa, Analysis of milk adylteration by means of potentiometric electronic tongue, 2024, *Journal of Dairy Science*, Elsevier.
73. L. G Wade, JR., Οργανική χημεία, 7η έκδοση, 2016, Εκδόσεις Τζόλα.
74. Lijuan Du, New insights into raw milk adulterated with milk powder identification: ATR -FTIR spectroscopic fingerprints combined with machine learning and feature selection approaches, 2024, *Journal of Food Composition and Analysis*.
75. Andersen and Mortensen Fluorescence spectroscopy: A rapid tool for analyzing dairy products, *J. Agric. Food Chem*, 56 (2008)
76. Karoui et al., Front face fluorescence spectroscopy coupled with chemometric tools for monitoring the oxidation of semi-hard cheeses throughout ripening, 2007, *Food Chem*, 101
77. Strasburg G.M., Ludescher R. Theory and applications of fluorescence spectroscopy in food research., 1995, *Trends Food Sci. Technol*, 6:69–75.
78. He H.-J., Sun D.-W. Microbial evaluation of raw and processed food products by Visible/Infrared, Raman and Fluorescence spectroscopy., 2015, *Trends Food Sci. Technol*. 46:199–210
79. Ahmad M.H., Sahar A., Hitzmann B. Fluorescence Spectroscopy for the Monitoring of Food Processes. *Meas. Modeling Autom. Adv. Food Processing*.
80. Shaikh S., O'Donnell C. Applications of fluorescence spectroscopy in dairy processing: A review., 2017, *Curr. Opin. Food Sci*. 17:16–24.
81. Liu Z., Zhong Y., Hu Y., Yuan L., Luo R., Chen D., Wu M., Huang H., Li Y. Fluorescence strategy for sensitive detection of adenosine triphosphate in terms of evaluating meat freshness., 2019, *Food Chem*. 270:573–578.
82. Johnson D.W., Callis J.B., Christian G.D. Rapid scanning fluorescence spectroscopy., 1977, *Anal. Chem*. 49:747–757.

83. D'Alfonso L., Collini M., Baldini G. Evidence of heterogeneous 1-anilinonaphthalene-8-sulfonate binding to β -lactoglobulin from fluorescence spectroscopy., 1999, *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1432:194–202.
84. M.P. Ntakatsane * †, X.M. Liu *, P. Zhou *Short communication*: Rapid detection of milk fat adulteration with vegetable oil by fluorescence spectroscopy, 2013, *Journal of Dairy Science*
85. Hannah T., Bernadette B., Sergei G. Kazarian, ATR-FTIR spectroscopy and spectroscopic imaging for the analysis of biopharmaceuticals, 2020, *Sciencedirect, Elsevier*
86. Isaiah Arkin, FTIR spectroscopy is a powerful tool, 2013 oct;1828(10):2255.
87. Sophia V., Kim L., Fourier-Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy for Typing of Clinical *Enterobacter cloacae* Complex Isolates, 2019 Nov 6;10:2582
88. Wenning M., Scherer S., Identification of microorganisms by FTIR spectroscopy: perspectives and limitations of the method. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2013
89. Rabia S., Erik G., Jean-Marie R., Vincent R., ATR-FTIR: A “rejuvenated” tool to investigate amyloid proteins, 2013, *Sciencedirect, Elsevier*
90. Khaled A., Attenuated total reflection-Fourier transform infrared spectroscopy: a universal analytical technique with promising applications in forensic analyses, 2022 Sep 1;136(6):1717–1736
91. Sharma S, Singh R. Detection and discrimination of seminal fluid using attenuated total reflectance Fourier transform infrared (ATR FT-IR) spectroscopy combined with chemometrics, 2019,134:411–432.
92. Wei X, Yu K, Wu D, Huang P, Sun Q, Wang Z.,Species identification of semen stains by ATR-FTIR spectroscopy., 2021, 135:73–80.
93. Dole MN, Patel PA, Sawant SD, Shedpure PS., Advance applications of Fourier transform infrared spectroscopy., 2011, 7:159–166.
94. Bordin G., Cordeiro Raposo, F., De la Calle, B., & Rodriguez, A. R., Identification and quantification of major bovine milk proteins by liquid chromatography, 2001, *Journal of chromatography A*, 928(1), 63-76

95. Jelle D.V, Dwight S., Stephan B., Sebastiaan E., James P G., Advances in ultra-high-pressure and multi-dimensional liquid chromatography instrumentation and workflows, 2021 Mar 16;2(3-4):171–192.
96. Kraiczek KG, Rozing GP, Zengerle R., Relation between chromatographic resolution and signal-to-noise ratio in spectrophotometric HPLC detection., 2013, 85(10):4829-4835. 10.1021/ac4004387
97. Siciliano R.A., Rega B., Amoresano A., Pucci P., Modern mass spectrometric methodologies in monitoring milk quality.,2000, Analytical Chemistry, 72: 408–415.
98. Carlos R B., Bartosz B. et al.,Vibrational Spectroscopic Map, Vibrational Spectroscopy, and Intermolecular Interaction, 2020 Jun 29;120(15):7152–7218
99. Mourad K., Mohammed Alaoui M., Mohammed T., Huiwen Yu, Current Application of Advancing Spectroscopy Techniques in Food Analysis: Data Handling with Chemometric Approaches, 2023 Jul 19;12(14):2753
- 100.Maurer HH. Systematic toxicological analysis of drugs and their metabolites by gas chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 1992, 580:3–41.
- 101.Van Eenoo P, Van Gansbeke W, De Brabanter N, Deventer K, Delbeke FT. A fast, comprehensive screening method for doping agents in urine by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. J Chromatogr A. 2011, 1218:3306–3316
102. Miller KE, Jorgenson JW. Comparison of microcapillary column length and inner diameter investigated with gradient analysis of lipids by ultrahigh-pressure liquid chromatography-mass spectrometry. J Sep Sci. 2020.
103. Yannick D., Allison P. et al, CFM-ID 3.0: Significantly Improved ESI-MS/MS Prediction and Compound Identification, 2019 Apr 13;9(4):72
104. Cozzolino R., Passalacqua S., Salemi S., Malvagna P., Spina E., Garozzo D., 2011, Identification of adulteration in milk by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Journal of Mass Spectrometry, 36: 1031–1037
105. Vlek A., Kolecka A., Khayhan K., Theelen B., Groenewald M., Boel E., Multicenter Study Group. Boekhout T. Interlaboratory comparison of sample preparation methods, database expansions, and cutoff values for identification of yeasts by matrix-assisted laser

desorption ionization-time of flight mass spectrometry using a yeast test panel., 2014, 52:3023–3029

106. Dinkelacker A. G., Vogt S., Oberhettinger P., Mauder N., Rau J., Kostrzewa M., et al. (2018). Typing and species identification of clinical klebsiella isolates by fourier transform infrared spectroscopy and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 56 :e00843-18. 10.1128/JCM.00843-18

107. Laura Darie-Ion, Danielle W., Applications of MALDI-MS/MS-Based Proteomics in Biomedical Research, 2022 Sep 21;27(19):6196

108. Mansoureh V., Teun B., et al, Evaluation of Microsatellite Typing, ITS Sequencing, AFLP Fingerprinting, MALDI-TOF MS, and Fourier-Transform Infrared Spectroscopy Analysis of *Candida auris*, 2020 Aug 25;6(3):14

109. M.P. Ntakatsane, X.M. Liu, P. Zhou, *Short communication*: Rapid detection of milk fat adulteration with vegetable oil by fluorescence spectroscopy, 2013, Journal of Dairy Science

110. Willibald Kamm, et al, Rapid detection of vegetable oils in milk fat by on-line LC-GC analysis of β -sitosterol as marker, 2002, European Journal of Lipid Science and Technology 104(11):756 – 76

111. Jin-Man Kim, et al, Determination of Milk Fat Adulteration with Vegetable Oils and Animal Fats by Gas Chromatographic Analysis, 2015, Journal of food science

112. Lucas Kolaric, et al, Simultaneous determination of cholesterol, stigmasterol, and β -sitosterol content in milk and dairy products, 2021, Journal of food processing and preservation

113. Anh Nguyen Van, et al, Novel approach for determination of milk fat adulteration with non-milk fat by RP-HPLC, 2021, Journal of food composition and analysis 121(1):105419

114. Davood Bigdelifam, et al, Sensitive magnetic dispersive solid-phase extraction using hydrophobic magnetic nanoparticles and GC-MS analysis for determination of sterol composition in milk samples for detection of palm oil, 2017, Analytical methods

115. Jerusa Simone Garcia, et al, Bovine milk powder adulteration with vegetable oils or fats revealed by MALDI-QTOF MS, 2012, Food chemistry 131(2):722-726

116. L. Alonso, et al, Determination of mixtures in vegetable oils and milk fat by analysis of sterol fraction by gas chromatography, 1997, Journal of the American oil chemists' society
117. Vivek S., Kamal G., Akshay R., Rajan S., Raman S., ATR-FTIR coupled with chemometric techniques to detect vanaspati ghee (hydrogenated vegetable oil) adulteration in milk fat, 2024, resylts in chemistry
118. Arun K., et al, Detection of milk fat adulteration with admixture of foreign oils and fats using a fractionation technique and the apparent solidification time test, 2010, International journal of dairy technology
119. Ayse Ozgur U., Ali Tevfik U., A barcode-DNA analysis method for the identification of plant oil adulteration in milk and dairy products, 2020, Food chemistry
120. Huaixiang T., Di W., Bin C., Haibin Y., Haiyan Y., Xinman L., Chen C., Rapid identification and quantification of vegetable oil adulteration in raw milk using a flash gas chromatography electronic nose combined with machine learning, 2023, Food control
121. Marwa E., Sameh A., Amel I. Validation of the Methods for the Non-Milk Fat Detection in Artificially Adulterated Milk with Palm Oil, 2023, Food analytical methods

Υπεύθυνη Δήλωση Συγγραφέα: Δηλώνω ρητά ότι, σύμφωνα με το άρθρο 8 του Ν.1599/1986, η παρούσα εργασία αποτελεί αποκλειστικά προϊόν προσωπικής μου εργασίας, δεν προσβάλλει κάθε μορφής δικαιώματα διανοητικής ιδιοκτησίας, προσωπικότητας και προσωπικών δεδομένων τρίτων, δεν περιέχει έργα/εισφορές τρίτων για τα οποία απαιτείται άδεια των δημιουργών/δικαιούχων και δεν είναι προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον και πληρούν τους κανόνες της επιστημονικής παράθεσης.