



**ΑΝΩΤΑΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ  
ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ  
ΣΧΟΛΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ &  
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**«ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΚΑΙ ΤΑΧΕΙΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΙΟΤΙΚΟ  
ΕΛΕΓΧΟ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ  
ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ»**

---

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**

**ΔΡΑΚΟΠΟΥΛΟΥ ΙΩΑΝΝΑ**



**ΚΑΛΑΜΑΤΑ**

**2016**

**ΑΝΩΤΑΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ  
ΠΕΛΟΠΟΝΗΣΟΥ**

**ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ &  
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**«ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΚΑΙ ΤΑΧΕΙΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΙΟΤΙΚΟ  
ΕΛΕΓΧΟ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ  
ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ»**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**

**ΔΡΑΚΟΠΟΥΛΟΥ ΙΩΑΝΝΑ**

**ΚΑΛΑΜΑΤΑ**

**2016**

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Για την πραγμάτωση της πτυχιακής μου μελέτης συνέβαλλαν κάποιοι άνθρωποι που χωρίς την πολύτιμη βοήθειά τους δεν θα μπορούσα να την ολοκληρώσω. Κατά κύριο λόγο, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της πτυχιακής μου, κ. Γεώργιο Ζακυνθινό, διότι με συμβούλευε και με καθοδηγούσε καθ' όλη τη διάρκεια της διεκπόνησής της. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Γεώργιο Καραγγελή, για τη συνολική συμβολή του. Τέλος, ευχαριστώ ιδιαίτερα την οικογένεια και τους φίλους μου για την στήριξη και την κατανόησή τους.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα πτυχιακή μελέτη, αναφέρονται οι διάφορες μικροβιολογικές, φυσικοχημικές, ανοσοβιολογικές, χρωματογραφικές και φωτομετρικές μεθόδους, οι οποίες εφαρμόζονται για την ανάλυση του γάλακτος.

Αρχικά, γίνεται λόγος για τους μικροοργανισμούς, κυρίως τα βακτήρια, οι οποίοι είτε αποτελούν φυσιολογική μικροχλωρίδα του γάλακτος, είτε, ύστερα από την άμελξη, μπορεί να εντοπιστούν σε αυτό προκαλώντας αλλοιώσεις του γάλακτος και ασθένειες στον άνθρωπο και στα ζώα.

Στην συνέχεια, καταγράφονται οι μέθοδοι προσδιορισμού του πληθυσμού των μικροοργανισμών που υπάρχουν στο γάλα καθ' όλα τα στάδια διαχείρισής του μέχρι αυτό να καταναλωθεί. Σε περίπτωση προσβολής των παραγωγικών ζώων από παθογόνους μικροοργανισμούς, χορηγούνται, συνήθως, αντιβιοτικά. Η χρήση αυτών, επηρεάζοντας τη σύσταση και την ποιότητα του παραγόμενου γάλακτος, δημιουργεί την ανάγκη εφαρμογής μεθόδων ανίχνευσης των αντιβιοτικών. Επιπλέον, όσον αφορά τις ασθένειες που προσβάλλουν τα παραγωγικά ζώα, η πιο καταστροφική είναι η μαστίτιδα, καθώς προσβάλλει το μαστό του ζώου και καθιστά το μαστιτικό γάλα ακατάλληλο προς κατανάλωση.

Επιπρόσθετα, ο προσδιορισμός των συστατικών του γάλακτος, όπως το λίπος, η λακτόζη, οι πρωτεΐνες και το στερεό υπόλειμμα άνευ λίπους, κρίνεται απαραίτητος για τις γαλακτοβιομηχανίες, καθώς με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατή η αξιολόγηση του γάλακτος ως προς τη θρεπτική και οικονομική του αξία. Αξίζει να σημειωθεί η σημασία του ελέγχου πιθανών μεταβολών των ιδιοτήτων του γάλακτος. Τέτοιες μεταβολές αφορούν τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά, όπως το pH, η οξύτητα, το ειδικό βάρος και το σημείο πήξεως.

Συν τοις άλλοις, για λόγους οικονομικούς και συμφερόντων εις βάρος του καταναλωτή εγκριμωεί ο κίνδυνος της νοθείας. Με την εξέταση των μεταβολών που προκαλούνται στα συστατικά και τις ιδιότητες του γάλακτος, αλλά και το συνδυασμό διαφόρων μεθόδων, είναι δυνατόν να εντοπιστεί πιθανή νοθεία.

Συμπερασματικά, το γάλα, από την άμελξη μέχρι την κατανάλωσή του, υπόκειται σε διάφορες αναλύσεις ποιότητας και ποσοτικού προσδιορισμού των συστατικών του, έτσι ώστε να αποτελέσει ένα ασφαλές και ποιοτικό προϊόν για τον καταναλωτή.

**Λέξεις κλειδιά:** αντιβιοτικά, μαστίτιδα, λίπος, λακτόζη, στερεό υπόλειμμα άνευ λίπους, νοθεία.

## **ABSTRACT**

This study refers to the various microbiological, physicochemical, chromatographic and photometric methods and immunoassays which are applied for milk analysis. Initially, the microorganisms, mainly bacteria, are mentioned which are normal microflora of milk, or can be found in this milk after milking, because of deteriorations and diseases in humans and animals. Then, until the milk can be consumed, the identification methods of the population of microorganisms in the milk are related during the management stages. In case of infection of producing animals by pathogenic microorganisms, antibiotics will be granted. The use of these, creates the need for methods of detection of antibiotics because is affecting the composition and quality of milk. Moreover, as regards the diseases which can cause alteration in producing animals, the most devastating disease is mastitis, as it is affecting the udder and makes milk unsuitable for consumption. Additionally, the determination of milk components, such as fat, lactose, protein and free fat dry extract, is necessary for the dairies because in this way it is possible the valuation of the nutritional or economic value . It is worth noting the importance of testing for possible changes in milk characteristics. Such changes concern the organoleptic characteristics, such as pH, acidity, density and freezing point. Furthermore, there is always the possibility of adulteration cause of economic reasons. It is possible to detect adulteration with the combination of different methods and testing for the changes which could be induced in the components and properties of milk. In conclusion, milk, from milking til its consumption, passes through several quality analysis and quantification of its components to be considered as a safe and quality product for the consumers.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	3
ABSTRACT .....	4
ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ .....	10
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΙΝΑΚΩΝ .....	13
ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	14
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ .....	16
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΝΩΠΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ .....	18
2.1. Γενικά .....	18
2.2. Οικογένεια <i>Pseudomonaceae</i> .....	19
2.2.1. Γένος <i>Pseudomonas</i> .....	19
2.2.2. Γένος <i>Brucella</i> .....	20
2.3. Οικογένεια <i>Enterobacteriaceae</i> .....	21
2.3.1. Γένος <i>Esherichia</i> .....	23
2.3.3. Γένος <i>Enterobacter</i> .....	24
2.3.4. Γένος <i>Yersinia</i> .....	25
2.4. Οικογένεια <i>Vibrionaceae</i> .....	26
2.5. Οικογένεια <i>Neisseriaceae</i> .....	27
2.6. Οικογένεια <i>Micrococcaceae</i> .....	27
2.6.1. Γένος <i>Micrococcus</i> .....	28
2.6.2. Γένος <i>Staphylococcus</i> .....	28
2.7. Οικογένεια <i>Streptococcaceae</i> .....	29
2.7.1. Γένος <i>Streptococcus</i> .....	30
2.7.2. Γένος <i>Leuconostoc</i> .....	31
2.8. Οικογένεια <i>Bacillaceae</i> .....	32
2.8.1. Γένος <i>Bacillus</i> .....	32
2.8.2. Γένος <i>Clostridium</i> .....	34
2.9. Οικογένεια <i>Lactobacillaceae</i> .....	35
2.9.1. Γένος <i>Lactobacillus</i> .....	36
2.9.2. Γένος <i>Listeria</i> .....	37
2.10. Οικογένεια <i>Propionibacteriaceae</i> .....	38

2.11. Οικογένεια <i>Mycobacteriaceae</i> .....	38
2.11.1. Γένος <i>Mycobacterium</i> .....	38
2.12. Οικογένεια <i>Rickettsiaceae</i> .....	39
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ.....	40
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΕΛΕΓΧΟΙ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ.....	42
4.1. Γενικά.....	42
4.2. Εφαρμογή του Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) Ανάλυση Κινδύνων & Κρίσιμα Σημεία Ελέγχου .....	42
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	44
5.1. Προσδιορισμός του μικροβιακού φορτίου με τις έμμεσες μεθόδους αναγωγής χρωστικών .....	44
5.1.1. Γενικά .....	44
5.1.2. Μέθοδος αναγωγής του κυανού του μεθυλενίου .....	44
5.1.3. Μέθοδος αναγωγής της ρεζαζουρίνης.....	45
5.2. Αρίθμηση του συνολικού αριθμού μικροοργανισμών .....	46
5.2.1. Γενικά .....	46
5.2.2. Προσδιορισμός του συνολικού αριθμού μικροοργανισμών.....	47
5.2.3. Μέθοδος των τρυβλίων ή της διασποράς ή της μέτρησης αποικιών.....	47
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ.....	49
6.1. Γενικά.....	49
6.2. Μέθοδοι διάχυσης των αντιβιοτικών σε στερεό υπόστρωμα.....	50
6.2.1. Γενικά .....	50
6.2.2. Μέθοδος Galesloot-Hassing ή των δίσκων σε τρυβλίο.....	50
6.3. Μέθοδοι της παρεμπόδισης της οξίνισης και της μη αλλαγής χρωματισμού ενός δείκτη σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα .....	51
6.3.1. Γενικά .....	51
6.3.3. Μέθοδος δοκιμαστικής πήξης του γιαουρτιού .....	51
6.3.4. Μέθοδος αναγωγής του δείκτη T.T.C. ....	52
6.3.5. Μέθοδος οξίνισης.....	52
6.4. Ταχείες μέθοδοι προσδιορισμού των αντιβιοτικών .....	53
6.4.1. Μέθοδος του «άνοσο-υποδοχέα», που αποτελεί μια παραλλαγή του ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) .....	53

6.4.2. Το Penzym test (UCB Bioproducts, Belgium) .....	53
6.4.3. Το beta STAR test (UCB Bioproducts, Belgium) .....	54
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΜΑΣΤΙΤΙΔΑΣ .....	54
7.1. Γενικά .....	54
7.2. Τεχνικές προσδιορισμού μαστίτιδας .....	55
7.2.1. Γενικά .....	55
7.2.2. Δοκιμή της Καλιφόρνιας (California Mastitis Test –CMT) ή δοκιμή Schalm.....	56
7.2.3. Προσδιορισμός χλωρίου .....	57
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8. ΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	57
8.1. Προσδιορισμός του λίπους.....	57
8.1.1. Γενικά .....	57
8.1.2. Προσδιορισμός λίπους με ογκομετρικές μεθόδους .....	59
8.1.3. Προσδιορισμός λίπους με σταθμικές μεθόδους .....	60
8.1.4. Προσδιορισμός λίπους με αυτοματοποιημένες μεθόδους.....	62
8.2. Προσδιορισμός της λακτόζης.....	65
8.2.1. Γενικά .....	65
8.2.2. Προσδιορισμός της λακτόζης με οξειδοαναγωγική ή ιωδιομετρική μέθοδο .....	66
8.2.3. Προσδιορισμός λακτόζης με υπέρυθη φασματοσκοπία .....	67
8.2.4. Προσδιορισμός της λακτόζης με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης.....	67
8.2.5. Ενζυμικός προσδιορισμός της λακτόζης .....	68
8.2.6. Φωτομετρικός προσδιορισμός της λακτόζης.....	69
8.3. Προσδιορισμός των πρωτεϊνών.....	69
8.3.1. Γενικά .....	69
8.3.2. Προσδιορισμός του ολικού αζώτου / πρωτεΐνης με τη μέθοδο Kjeldahl .....	71
8.3.3. Προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο της φορμαλδεύδης.....	73
8.3.4. Προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο σχηματισμού συμπλόκου πρωτεΐνης και χρωστικής Amido Black.....	74
8.3.5. Προσδιορισμός πρωτεϊνών με αυτοματοποιημένη μέθοδο της υπέρυθρης φασματοσκοπίας.....	74
8.3.6. Προσδιορισμός πρωτεϊνών με φωτομετρικές μεθόδους.....	75
8.4. Προσδιορισμός του στερεού υπολείμματος.....	75



8.4.1. Γενικά .....	75
8.4.2. Προσδιορισμός του στερεού υπολείμματος με ξήρανση .....	76
8.4.3. Ταχείες ή έμμεσες μέθοδοι προσδιορισμού του στερεού υπολείμματος.....	77
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9. ΕΛΕΓΧΟΣ ΜΕΤΑΒΟΛΩΝ ΣΤΑ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ</b>	<b>79</b>
9.1. Γενικά.....	79
9.2. Έμμεση τρόποι προσδιορισμού της οξύτητας.....	80
9.2.1. Δοκιμή βρασμού.....	80
9.2.2. Δοκιμή της αλκοόλης .....	80
9.2.3. Προσδιορισμός του pH.....	81
9.3. Προσδιορισμός ειδικού βάρους .....	83
9.3.1. Γενικά .....	83
9.3.2. Μέθοδος της ληκύθου (Άμεσα μέθοδος).....	83
9.3.3. Μέθοδος ζυγού Westphal (Έμμεση μέθοδος) .....	83
9.3.4. Μέθοδος γαλακτομέτρου (Έμμεση μέθοδος).....	84
9.4. Προσδιορισμός του σημείου πήξης.....	85
9.4.1. Γενικά .....	85
9.4.2. Τεχνικές προσδιορισμού του σημείου πήξης με κρυσκοπικό Hortvet .....	86
9.4.3. Μέθοδος προσδιορισμού του σημείου πήξης με κρυσκόπιο θερμίστορα .....	86
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10. ΕΛΕΓΧΟΣ ΓΙΑ ΝΟΘΕΙΑ</b> .....	<b>87</b>
10.1. Γενικά.....	87
10.2. Νοθεία με προσθήκη νερού.....	88
10.3. Νοθεία γάλακτος με μείωση λίπους.....	89
10.3.1. Γενικά .....	89
10.3.2. Προσδιορισμός νοθείας με αποκορύφωση .....	89
10.3.3. Προσδιορισμός νοθείας με προσθήκη αποκορυφωμένου γάλακτος .....	89
10.4. Διπλή νοθεία γάλακτος με ταυτόχρονη προσθήκη νερού και αφαίρεση λίπους.....	90
10.4.1. Νερό που προστέθηκε (N).....	90
10.4.2. Λίπος που αποκορυφώθηκε (A) .....	90
10.5. Ανάμειξη διαφόρων ειδών γάλακτος .....	90
10.5.1. Γενικά .....	90
10.5.2. Ηλεκτροφορικές μέθοδοι.....	91

10.5.3. Χρωματογραφικές μέθοδοι.....	92
10.5.4. Ανοσοβιολογικές μέθοδοι .....	93
10.5.5. Τεχνικές που βασίζονται στην ανάλυση του DNA .....	94
10.6. Νοθεία του λίπους του γάλακτος από φυτικά και ζωικά λίπη .....	95
10.6.1. Γενικά .....	95
10.6.2. Μέθοδοι προσδιορισμού της νοθείας του λίπους του γάλακτος .....	96
10.7. Προσδιορισμός σκόνης γάλακτος σε γάλα και γάλακτοκομικά προϊόντα.....	98
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	100

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

ΕΙΚΟΝΑ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ	ΣΕΛΙΔΑ
1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
2	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	
3	<i>Pseudomonas maltophilia</i>	
4	<i>Brucella abortus</i>	
5	<i>Brucella melitensis</i>	
6	<i>Escherichia coli</i>	
7	<i>Salmonella</i>	
8	<i>Enterobacter Cloacae</i>	
9	<i>Enterobacter Aerogenes</i>	
10	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	
11	<i>Yersinia enterocolitica</i>	
12	Γένος <i>Flavobacterium</i>	
13	Γένος <i>Moraxella</i>	
14	<i>Micrococcus luteus</i>	
15	<i>Staphylococcus aureus</i>	
16	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
17	<i>Streptococcus thermophilus</i>	
18	<i>Streptococcus cremoris</i>	
19	<i>Streptococcus agalactiae</i>	
20	<i>Streptococcus pyogenes</i>	
21	<i>Leuconostoc Mesenteroides</i>	
22	<i>Bacillus cereus</i>	
23	<i>Bacillus subtilis</i>	

24	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	
25	<i>Clostridium butulinum</i>	
26	<i>Lactobacillus lactis</i>	
27	<i>Lactobacillus casei</i>	
28	<i>Listeria monocytogenes</i>	
29	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
30	Penzym test	
31	Επιτραπέζια συσκευή φυγοκέντρωσης με τη μέθοδο Gerber	
32	Αυτοματοποιημένη συσκευή Milko-Tester	
33	Βουτυρόμετρο Babcock	
34	Φιάλη Mojonnier	
35	Αυτοματοποιημένη συσκευή Milk Checker	
36	Αυτοματοποιημένη συσκευή Anritsu-Milk	
37	Αυτοματοποιημένη συσκευή Anritsu-Milk	
38	Συσκευή Multispec	
39	Infr-red Milk Analyzer (IRMA)	
40	Συσκευή υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)	
41	Automatic kjeldahl nitrogen analyzer	

42	Δείκτης Amido Black	
43	Υδατόλουτρο Memmert	
44	Κλίβανος ξήρανσης	
45	Ογκομέτρηση με τη μέθοδο Dornic	
46	Γαλακτόμετρο με θερμόμετρο τύπου Quevenne	
47	Κρυοσκόπιο με θερμίστορα	
48	Συσκευή φυγοκέντρωσης	

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ	ΣΕΛΙΔΑ
1	Ποσοστά καλυπτόμενων ημερήσιων αναγκών με την κατανάλωση 500 γραμμαρίων αγελαδινού γάλακτος.	11
2	Κύρια και δευτερεύοντα συστατικά του αγελαδινού γάλακτος, σημαντικά για την διατροφή του ανθρώπου (ενδεικτική περιεκτικότητα).	13
3	Όρια φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των ειδών γάλακτος που παράγονται στην Ελλάδα.	
4	Λιποπεριεκτικότητα γάλακτος από διάφορα είδη ζώων.	
5	Περιεκτικότητα λακτόζης σε διάφορα είδη ζώων.	
6	Κατώτατα νομοθετικά όρια του στερεού υπολείμματος άνευ λίπους στα τρία είδη γάλακτος, σύμφωνα με τον Ελληνικό Κώδικα Τροφίμων.	
7	Σύσταση του γάλακτος που παράγεται στην περιοχή της Ηπείρου.	

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το γάλα είναι χαρακτηριστική έκκριση του μαστού των θηλαστικών ζώων και προορίζεται, από τη φύση, να αποτελέσει τη μοναδική τροφή των νεογνών τους στα πρώτα στάδια της ζωής τους. Περισσότερα από 4000 είδη θηλαστικών παράγουν γάλα με χημική σύσταση προσαρμοσμένη στις διατροφικές ανάγκες του νεογνού τους. Επομένως, το γάλα αποτελεί την πιο πλήρη, απλή και φυσική τροφή, επειδή περιέχει συστατικά που εφοδιάζουν τον οργανισμό με ενέργεια (λίπος, λακτόζη), με δομικά συστατικά (πρωτεΐνες, ανόργανα άλατα) και με επαρκείς ποσότητες βιταμινών και ιχνοστοιχείων για την πραγματοποίηση των βιοχημικών διεργασιών που είναι απαραίτητες για τη ζωή. [4]

Συγκεκριμένα, περιέχει όλα τα συστατικά που χρειάζονται τα παιδιά, εκτός από το σίδηρο που βρίσκεται σε ίχνη. Οι πρωτεΐνες του γάλακτος είναι υψηλής βιολογικής αξίας. Οι υδατάνθρακες είναι εύπεπτοι, χωρίς να ερεθίζουν το πεπτικό σύστημα, και έχουν καταπραυντικές ιδιότητες. Τα λιπαρά, σε μορφή γαλακτώματος, είναι από τις πιο εύληπτες λιπαρές ουσίες. Τα μικροθρεπτικά στοιχεία που περιέχονται στο γάλα, κυρίως το ασβέστιο και ο φώσφορος, αποτελούν δομικά υλικά για τον οργανισμό. Επίσης, περιέχει ικανοποιητικές ποσότητες μαγνησίου και καλίου και είναι πλούσιο σε βιταμίνες A, D και B. [2]

Σύμφωνα με τον Codex Alimentarius του FAO (Food and Agriculture Organization of the United States), ως γάλα ορίζεται η φυσιολογική έκκριση του μαστού που λαμβάνεται από μία ή περισσότερες αμέλξεις, χωρίς καμία προσθήκη ή αφαίρεση, η οποία προορίζεται να καταναλωθεί ως πόσιμο γάλα ή για περαιτέρω επεξεργασία.

Σύμφωνα με τον ελληνικό Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (2003), γάλα είναι το απαλλαγμένο από πρωτόγαλα προϊόν της ολοσχερούς, χωρίς διακοπή άλμεξης υγιούς γαλακτοφόρου ζώου, που ζει και τρέφεται υπό υγιεινούς όρους και που δεν βρίσκεται σε κατάσταση υπερκόπωσης. Με τον όρο «γάλα» απλά, χωρίς να συνοδεύεται από κάποιο επίθετο, νοείται αποκλειστικά και μόνο το γάλα το οποίο:

- Προέρχεται από αγελάδα,
- Είναι νωπό,
- Είναι πλήρες,
- Δεν έχει υποστεί αφυδάτωση ή συμπύκνωση και

- Δεν περιέχει άλλες πρόσθετες ύλες. [7]

Ως «νωπό γάλα», θεωρείται το γάλα που εκκρίνεται από τους μαστικούς αδένες μιας ή περισσότερων αγελάδων, προβατινών, αίγων και βουβαλίδων, το οποίο δεν έχει θερμανθεί, πέραν των 40°C, ούτε έχει υποβληθεί σε επεξεργασία με ισοδύναμο αποτέλεσμα. [4]

Η θρεπτική του αξία, σε συνδυασμό με την μεγάλη ποικιλία των προϊόντων στα οποία βρίσκεται, μπορεί να προσεγγίσει και τον πιο δύσκολο και απαιτητικό καταναλωτή. Τα ποσοστά καλυπτόμενων ημερήσιων αναγκών με την κατανάλωση 500 gr. αγελαδινού γάλακτος παρουσιάζονται στον ΠΙΝΑΚΑ 1.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Ποσοστά καλυπτόμενων ημερήσιων αναγκών με την κατανάλωση 500 γραμμαρίων αγελαδινού γάλακτος. [5]

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΠΑΙΔΙ 4-6 ΕΤΩΝ (%)	ΑΝΔΡΑΣ 23-50 ΕΤΩΝ (%)	ΓΥΝΑΙΚΑ 23-50 ΕΤΩΝ (%)
ΕΝΕΡΓΕΙΑ	18	12	16
ΠΡΩΤΕΙΝΗ	58	31	38
ΑΣΒΕΣΤΙΟ	74	74	74
ΦΩΣΦΟΡΟΣ	58	58	58
ΣΙΔΗΡΟΣ	0	0	0
ΒΙΤΑΜΙΝΗ Α	28	14	18
ΘΕΙΑΜΙΝΗ	17	11	17
ΡΙΒΟΦΛΑΒΙΝΗ	77	53	71
ΝΙΑΣΙΝΗ	4	3	4
ΒΙΤΑΜΙΝΗ C	12	11	11



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

Το γάλα μπορεί να περιγραφεί, ως ένα κολλοειδές εναιώρημα που περιέχει γαλακτοματοποιημένα σφαιρίδια λίπους, μια ετερογενή ομάδα πρωτεϊνών, τη λακτόζη, άλατα, βιταμίνες και ένζυμα. Τα γάλατα των θηλαστικών, που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα, έχουν παρόμοια γενικά χαρακτηριστικά και περιέχουν μια μεγάλη ποικιλία όμοιων συστατικών, σε σημαντικά διαφορετικές, όμως, αναλογίες. Το είδος γάλακτος που έχει μελετηθεί περισσότερο είναι το αγελαδινό, γιατί παράγεται σε μεγάλες ποσότητες, κατά κύριο λόγο, σε χώρες οικονομικά και τεχνολογικά προηγμένες.

Αν και το αγελαδινό πλήρες γάλα είναι υγρή τροφή, περιέχει, κατά μέσο όρο, περίπου, 12% στερεά συστατικά, από τα οποία το 8,6% είναι στερεά συστατικά άνευ λίπους. Περιέχει σε μεγάλη, σχετικά, αναλογία, πρωτεΐνες, λίπος και λακτόζη που μαζί με άλατα αποτελούν τα κύρια συστατικά του και προσδιορίζουν τη διατροφική και εμπορική του αξία. Εκτός από τα κύρια συστατικά του περιέχει και εκατοντάδες άλλα συστατικά σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, π.χ. βιταμίνες, ιχνοστοιχεία και ένζυμα, που καθορίζουν τις βιολογικές και τεχνολογικές του ιδιότητες.

Στον ΠΙΝΑΚΑ 2. παρουσιάζεται, ενδεικτικά, η σύσταση του αγελαδινού γάλακτος σε κύρια και σε ορισμένα δευτερεύοντα συστατικά που είναι σημαντικά για τη διατροφή του ανθρώπου. Το συστατικό που βρίσκεται σε μεγαλύτερη αφθονία στο γάλα είναι το νερό, μέσα στο οποίο βρίσκονται σε διασπορά όλα τα άλλα συστατικά του, τα οποία αποτελούν το σύνολο των στερεών του συστατικών. Η λακτόζη είναι ο χαρακτηριστικός υδατάνθρακας του γάλακτος, όπου είναι αναγωγικός δισακχαρίτης που αποτελείται από γλυκόζη και γαλακτόζη. Το λίπος του γάλακτος αποτελείται από τριγλυκερίδια, τα λιπαρά οξέα των οποίων διαφέρουν πολύ ως προς το μέγεθος (2-20 άτομα C) και τον αριθμό των διπλών δεσμών (0-4 δ.δ.). σε μικρότερες συγκεντρώσεις απαντώνται και άλλα λιπίδια, όπως φωσφολιπίδια, χοληστερόλη, ελεύθερα λιπαρά οξέα και διγλυκερίδια. Το 80% των πρωτεϊνών του γάλακτος αποτελεί την καζεΐνη, η οποία είναι μίγμα, περίπου, 10 διαφορετικών συστατικών και είναι αδιάλυτη σε pH 4,6. Το υπόλοιπο 20% των πρωτεϊνών, που είναι διαλυτό σε pH 4,6, αποτελείται από τις πρωτεΐνες του ορού και από πολυάριθμες άλλες πρωτεΐνες, όπως είναι τα ένζυμα, τα οποία αν και βρίσκονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις έχουν σημαντική δραστηριότητα στο γάλα. Και, τέλος, τα άλατα του γάλακτος είναι, κυρίως, απλά ή σύμπλοκα, ιονισμένα κατά ένα μέρος. Στην

πλειονότητά τους είναι φωσφορικά, κιτρικά, χλωριούχα, θειικά, ανθρακικά και δισανθρακικά άλατα των K, Na, Ca, Mg. Τα άλατα του γάλακτος δεν περιγράφονται, απολύτως με τους όρους «μεταλλικά» ή «ανόργανα» συστατικά, αφού πολλά από αυτά είναι οργανικά, όπως π.χ. τα κιτρικά. [5]

Επιπλέον, το γάλα αποτελεί πλούσιο θρεπτικό υπόστρωμα για ποικίλους μικροοργανισμούς, οι οποίοι μπορούν να προκαλέσουν αλλοίωσή του. Στο γάλα περιέχονται, επίσης, και σωματικά κύτταρα που προέρχονται από το ανοσοποιητικό σύστημα των ζώων με διάμετρο ~10μm, τα οποία, όμως, δε θεωρούνται συστατικά του γάλακτος με τη στενή έννοια. Σε γάλα υγιών ζώων ο αριθμός τους είναι ~100000/ml. Ο αριθμός αυτός αυξάνεται όταν το ζώο πάσχει από μολύνσεις του μαστού (μαστίτιδες). [4]

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Κύρια και δευτερεύοντα συστατικά του αγελαδινού γάλακτος, σημαντικά για την διατροφή του ανθρώπου (ενδεικτική περιεκτικότητα) [5]

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ
<b>Κύρια συστατικά (%)</b>	
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
<b>Μεταλλικά στοιχεία (mg/l)</b>	
Ασβέστιο	1250
Φώσφορος	1000
Κάλιο	1500
Νάτριο	440
Χλώριο	1050
Μαγνήσιο	130
Ψευδάργυρος	3,9

Σίδηρος	0,2
<b>Βιταμίνες (mg/l)</b>	
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

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΝΩΠΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

### 2.1. Γενικά

Ακόμα και αν το γάλα προέρχεται από υγιή ζώα και παραλαμβάνεται με προφυλάξεις από το μαστό των ζώων αυτών, περιέχει μικρόβια, που ο αριθμός τους ανέρχεται σε μερικές εκατοντάδες ανά ml και εισέρχονται στο γάλα από τη θηλή του μαστού και από τους γαλακτοφόρους αγωγούς. Οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι, κατά κύριο, λόγο μη παθογόνοι και ανήκουν, κυρίως, στα γένη *Lactococcus* και *Micrococcus*. Η μικροχλωρίδα αυτή, αλλάζει σε περίπτωση λοιμώξεων του μαστού και του ζώου και είναι δυνατόν να περιέχει μεγάλο πληθυσμό μικροβίων.

Μετά την απομάκρυνση του γάλακτος από το μαστό, αυτό εμπλουτίζεται με μικρόβια που προέρχονται από το μαστό και το σώμα του ζώου, τα κόπρανα, το τρίχωμα του, το προσωπικό, το χρησιμοποιούμενο νερό, τα σκεύη άμελης, τις τροφές, τα έντομα, τη σκόνη και, γενικά, το χώρο του βουστασίου, τη διακίνηση του γάλακτος, τη διατήρηση και την επεξεργασία του. Ο αριθμός και το είδος των μικροβίων διαφέρει ανάλογα με τις συνθήκες υγιεινής και θερμοκρασίας που επικρατούν κατά την άμελη, τη συλλογή, τη μεταφορά, τη συντήρηση και

την μεταποίησή του. Το μεγαλύτερο μέρος των μικροοργανισμών που απαντώνται στο γάλα είναι βακτήρια. Υπάρχουν, βέβαια, ζύμες, μύκητες και ιοί, αλλά σε πολύ μικρό αριθμό σε σχέση με τα βακτήρια. Εντοπίζονται περισσότερο στα όξινα είδη του γάλακτος και ακόμα πιο συχνά στα τυριά. Στα τυριά, ιδιαίτερα με επιφανειακή μούχλα, δίνουν χαρακτηριστική γεύση και άρωμα. Άρα, από τους μικροοργανισμούς αυτούς, άλλοι είναι αλλοιογόνοι και επιβλαβείς, άλλοι ωφέλιμοι και μερικοί παθογόνοι για τον άνθρωπο ή τα ζώα. [5]

## 2.2. Οικογένεια *Pseudomonaceae*

Το κυριότερο γένος της οικογένειας είναι το *Pseudomonas*. Στην οικογένεια αυτή, κατατάσσεται και το γένος *Brucella* που παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, αν και υπάρχουν αμφιβολίες για την συγγένεια του με την οικογένεια αυτή. Τα γένη της οικογένειας αυτής είναι αρνητικά κατά Gram, ραβδία ευθύγραμμη ή καμπυλοειδή και αποκλειστικά αερόβια.

### 2.2.1. Γένος *Pseudomonas*

Τα σπουδαιότερα είδη του γένους *Pseudomonas* είναι:

- *Pseudomonas aeruginosa*. Μπορεί να προκαλέσει μαστίτιδα, είναι υποχρεωτικά αναερόβιο έχοντας άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37°C και αναπτύσσεται στους 42 °C.



EIKONA 1. *Pseudomonas aeruginosa*

Πηγή: <http://www.pixgood.com/>

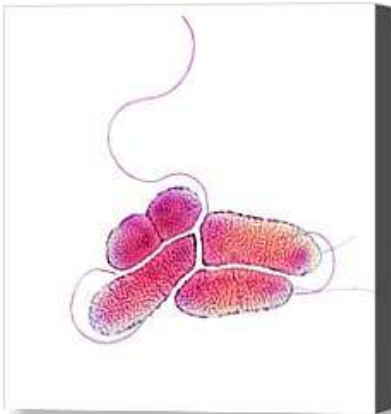
- *Pseudomonas fluorescens*. Είναι υποχρεωτικά αερόβιο, αλλοιώνει τα τρόφιμα που διατηρούνται σε θερμοκρασία ψυγείου και έχει άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 25-30°C. Μπορεί να αναπτυχθεί και στους 4°C, αλλά όχι στους 42°C.



ΕΙΚΟΝΑ 2. *Pseudomonas fluorescens*

Πηγή: <http://www.dir.indiamart.com/>

- ***Pseudomonas putida***. Είναι υποχρεωτικά αερόβιο, έχει άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 25-30°C και αναπτύσσεται, επίσης, στους 4°C, αλλά όχι στους 42°C.
- ***Pseudomonas maltophilia***. Τα περισσότερα στελέχη είναι υποχρεωτικά αερόβια, έχει άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης στους 35°C, δεν αναπτύσσεται στους 4°C, αλλά μπορεί να αναπτυχθεί στους 42°C.



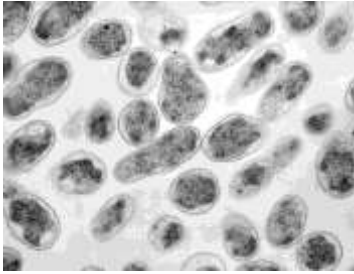
ΕΙΚΟΝΑ 3. *Pseudomonas maltophilia*

Πηγή: <http://www.fineartamerica.com>

### 2.2.2. Γένος *Brucella*

Το γένος αυτό περιλαμβάνει δύο είδη που είναι παθογόνα για τα ζώα και τον άνθρωπο. Προκαλούν την γνωστή αρρώστια βρουκέλλωση (μελιταιός πυρετός) που είναι αρκετά διαδεδομένη στην χώρα μας. Η διάρκεια επώασης του μικροοργανισμού είναι 2-4 εβδομάδες. Πρόκειται για μια σοβαρή αρρώστια που σε ποσοστό 2% είναι θανατηφόρα. Τα σπουδαιότερα είδη του γένους *Brucella* είναι τα εξής:

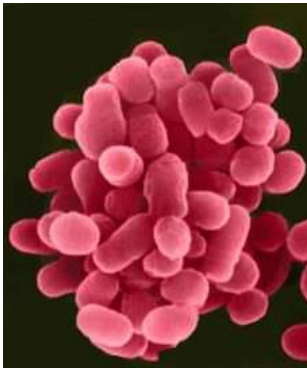
- ***Brucella abortus***. Συνήθως είναι παθογόνος, προκαλεί αποβολή των αγελάδων, έχει άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37°C και εύρος από 20-40°C.



ΕΙΚΟΝΑ 4. *Brucella abortus*

Πηγή: <http://www.Kodomo.cmm.msu.ru/>

- ***Brucella melitensis***. Συνήθως είναι παθογόνος, προκαλεί αποβολή των προβάτων και των κατσικιών, έχει άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37°C και εύρος από 20-40°C. [4]



ΕΙΚΟΝΑ 5. *Brucella melitensis*

Πηγή: <http://biogefahr.shopkeeper.de/>

### 2.3. Οικογένεια **Enterobacteriaceae**

Τα βακτήρια αυτής της οικογένειας είναι αρνητικά κατά Gram, διαστάσεων 0,3-1,0×1,0-6,0 μm, ευθεία ραβδία και είναι κινητά εφόσον έχουν περίτριχες βλεφαρίδες. Είναι ασποριογόνα με κάψα ή όχι και ο μεταβολισμός τους είναι ζυμωτικός και οξειδωτικός. [9] Χαρακτηρίζονται αερόβια ή ελαφρώς αναερόβια, με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37°C. Τα περισσότερα γένη ζουν στο πεπτικό σύστημα των ζώων και του ανθρώπου, μερικά, μάλιστα, από αυτά προκαλούν εντερικές διαταραχές. Μερικά, επίσης, γένη είναι παθογόνα των φυτών και κάποια

άλλα σαπρόφυτα. Δεν χαρακτηρίζονται για την θερμοανθεκτικότητά τους και καταστρέφονται με την παστερίωση.

Κάποια από αυτά χαρακτηρίζονται διεθνώς με τον όρο «κολοβακτήρια» (Coliform) και ορίζονται ως αρνητικά κατά Gram, αρνητικά στην οξειδάση βακτήρια, μη σποριογόνα που αναπτύσσονται σε άγαρ με χολικά άλατα, που δεν επιτρέπουν την ανάπτυξη θετικών κατά Gram βακτηριών, αλλά ευνοούν την ανάπτυξη των κολοβακτηριοειδών, και ζυμώνουν τη λακτόζη σε 48 ώρες στους 37°C παράγοντας οξύ και αέριο.

Ο έλεγχος για την παρουσία των γενών της οικογένειας αυτής στο νωπό γάλα δεν έχει νόημα, γιατί πάντα το νωπό γάλα επιμολύνεται από αυτά, δεδομένου ότι αφθονούν στο πεπτικό σύστημα και το εντερικό σωλήνα των ζώων. Δεδομένου, ακόμα, ότι όλα τα γένη καταστρέφονται με την παστερίωση, τυχόν παρουσία τους στο παστεριωμένο γάλα δείχνει επιμόλυνση μετά το στάδιο της παστερίωσης. Για το λόγο αυτό, ο έλεγχος για την παρουσία κολοβακτηριών έχει μεγάλη σημασία στο παστεριωμένο γάλα. [4] Κατά τις κλείδες Bergey διακρίνονται στα εξής 14 γένη:

- *Esherichia*
- *Edwardsiella*
- *Citrobacter*
- *Salmonella*
- *Shigella*
- *Klebsiella*
- *Enterobacter*
- *Hafnia*
- *Serratia*
- *Proteus*
- *Yersinia*
- *Erwinia*
- *Providencia*
- *Morganella* [9]

Ο προσδιορισμός με το σύστημα API είναι ικανοποιητικός. Επίσης, είναι δυνατός ο προσδιορισμός τους με βάση ορολογικές αντιδράσεις, διότι έχουν αντιγόνο δράση στα ζώα και στον άνθρωπο, εξαιτίας της παρουσίας συμπλόκων πολυσακχαρίτων στα τοιχώματά τους.

Αυτές οι αντιγονικές ιδιότητες των εντεροβακτηρίων συνδέονται άμεσα, ανάλογα με τον τύπο, με την προσβολή του ανθρώπου από μεταδοτικές αρρώστιες. Έτσι, η *Salmonella* που προκαλεί τον τύφο και τον παράτυφο στον άνθρωπο, προκαλεί μια γενική προσβολή μετά από 14 ημέρες, διότι οι παθογόνοι μικροοργανισμοί που εισέρχονται στο ζώο από το στόμα του, περνούν, στη συνέχεια, από τα έντερα του και καταλήγουν στο γάλα. Γενικά, είναι πιθανή μια πρώτη προσβολή από τα ζώα ή τα φυτά και μια δεύτερη στον άνθρωπο.

Τα μέτρα που λαμβάνονται για την διασφάλιση της δημόσιας υγείας, είναι η υποχρεωτική παστερίωση του γάλακτος για οποιαδήποτε χρήση κι αν προορίζεται. Από την άλλη στα τυριά η επιβίωση τους είναι χρονικά περιορισμένη. Για την διαφύλαξή τους, όμως, από τυχόν επιμολύνσεις, καθορίζετε ελάχιστος χρόνος ωρίμανσης μετά το πέρας του οποίου διατίθενται, ώστε να μην εγγυμωνει κανένας κίνδυνος για τους καταναλωτές.

Τα σπουδαιότερα γένη της οικογένειας *Enterobacteriaceae* που έχουν κάποιο ενδιαφέρον όσον αφορά τη μικροβιολογία του γάλακτος είναι τα εξής:

### **2.3.1. Γένος *Esherichia***

Το γένος αυτό περιλαμβάνει μόνο ένα είδος, την *Esherichia coli* που δημιουργεί προβλήματα στο γάλα και τα προϊόντα, λόγω της παραγωγής αερίων και οργανικών οξέων. [4] Οι διαστάσεις των κυττάρων της είναι 1,1-1,5×2,0-6,0 μm, είναι ευθέα ραβδία και κινούνται με περίτριχες βλεφαρίδες ή είναι ανίκανα για κίνηση. [9] Σε μερικές περιπτώσεις αυξάνει το ιξώδες του γάλακτος προκαλώντας το γνωστό σχοινιάσμα. Τα στελέχη της *E.coli*, που έχουν συνδεθεί με το ελάττωμα αυτό, φέρουν κάψουλες. Μερικά στελέχη της *E.coli*, επίσης, παράγουν τοξίνες, αντιβιοτικά ή προκαλούν μαστίτιδα.





ΕΙΚΟΝΑ 6. *Esherichia coli*

Πηγή: <http://www.cdc.gov/ecoli/>

### 2.3.2. Γένος *Salmonella*

Περιλαμβάνει παθογόνους μικροοργανισμούς για τον άνθρωπο και τα ζώα. Οι μικροοργανισμοί του γένους αυτού, παράγουν εντεροτοξίνη και μολύνουν το γάλα, είτε μέσω του εντερικού συστήματος, είτε κατευθείαν από τα κόπρανα. Οι τροφικές δηλητηριάσεις που μπορεί να προκληθούν έχουν, συνήθως, τη μορφή της εντερίτιδας και οφείλονται στο *S.typhimurium*, ενώ, σπανιότερα, εκδηλώνονται με τη μορφή του τυφοειδούς πυρετού, γεγονός που αποδίδεται στο *S.typhi*. Ο *S.typhi* διαφέρει από τα άλλα είδη του γένους, και της οικογένειας γενικότερα, στο ότι δεν παράγει ποτέ αέρια.

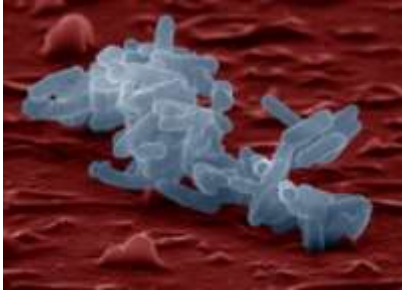


ΕΙΚΟΝΑ 7. *Salmonella*

Πηγή: <http://en.wikipedia.org/wiki/Salmonella>

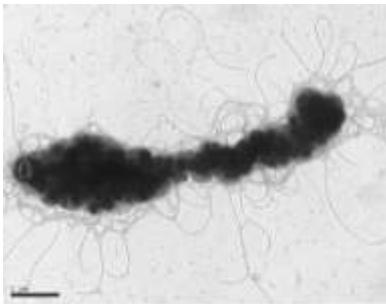
### 2.3.3. Γένος *Enterobacter*

Τα κυριότερα είδη του γένους αυτού είναι τα *E.Cloacae* και *E. Aerogenes*. Παράγουν μεγάλες ποσότητες αερίων δημιουργώντας προβλήματα στο γάλα και τα προϊόντα του. Μερικά, επίσης, στελέχη του *E. aerogenes* έχουν κάψουλες και προκαλούν σχοινίασμα στο γάλα. Δεν θεωρούνται, όμως, παθογόνα, αν και έχουν εκφραστεί υποψίες για μερικά είδη. [4]



ΕΙΚΟΝΑ 8. *Enterobacter Cloacae*

Πηγή: <https://www.motherjones.com/>



ΕΙΚΟΝΑ 9. *Enterobacter Aerogenes*

Πηγή: <http://www.bioquell.com/en-us/resources-and-support/microbiology/enterobacter-aerogenes/>

#### 2.3.4. Γένος *Yersinia*

Τα κυριότερα είδη του γένους είναι το *Yersinia pestis*, το *Yersinia pseudotuberculosis* και το *Yersinia enterocolitica*. [4] Τα βακτήρια αυτά είναι μορφής ευθέων ραβδίων ή κοκκοβακίλλων με μέσες διαστάσεις  $0,5-0,8 \mu\text{M} \times 1,0-3,0 \mu\text{m}$ . Είναι ασποριογόνα χωρίς κάψα (έλυτρο), αρνητικά κατά Gram και ακίνητα στη θερμοκρασία των  $37^\circ\text{C}$ . Βέβαια, μπορούν με τη βοήθεια περίτριχων βλεφαρίδων να κινηθούν όταν αναπτύσσονται σε θερμοκρασία  $30^\circ\text{C}$  ή κατώτερη. [9] Τα είδη αυτά είναι παθογόνα στον άνθρωπο και τα ζώα, η, δε, *Y. enterocolitica*, σε αρκετές περιπτώσεις, έχει συνδεθεί με τροφικές δηλητηριάσεις υπό τη μορφή της γαστρεντερίτιδας. Η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης των μικροοργανισμών του γένους αυτού είναι οι  $37-45^\circ\text{C}$ . Η *Y. enterocolitica* θεωρείται, βέβαια, ψυχρότροφος μικροοργανισμός. [3]



EIKONA 10. *Yersinia pseudotuberculosis*

Πηγή: <http://www.lookfordiagnosis.com/>

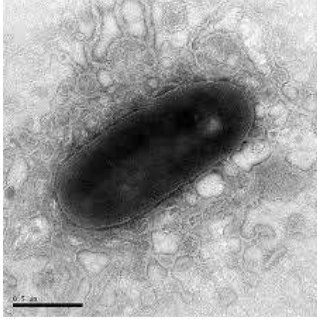


EIKONA 11. *Yersinia enterocolitica*

Πηγή: <https://www.pathologyoutlines.com/>

#### **2.4. Οικογένεια *Vibrionaceae***

Από τα γένη της οικογένειας αυτής (14 συνολικά, εκ των οποίων τα 5 είναι πραγματικά και τα υπόλοιπα 9 είναι αμφιβόλου συγγένειας) μόνο τα εξής τέσσερα έχουν βρεθεί στο γάλα και σε γαλακτοκομικά προϊόντα: το *Aeromonas*, το *Flavobacterium*, το *Chromobacterium* και το *Vibrio*. Τα γένη αυτά έχουν κύτταρα σε σχήμα ραβδίου, είναι αρνητικά κατά Gram, είναι μεσόφιλα ή ψυχρότροφα και προέρχονται από το έδαφος ή το νερό. Μερικά παράγουν εξωκυτταρικά ένζυμα θερμοάντοχα και συνδέονται με αλλοιώσεις γάλακτος και προϊόντα με ανάπτυξη των ψυχρότροφων αυτών μικροοργανισμών. Επιπλέον, το *Flavobacterium* έχει συνδεθεί με την αύξηση του ιζώδους του γάλακτος μετά την διατήρησή του στους 4°C. [4]

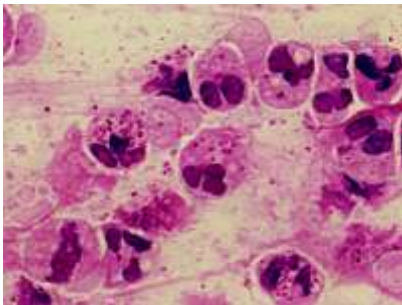


ΕΙΚΟΝΑ 12. Γένος *Flavobacterium*

Πηγή: <https://www.sgmjournals.org/>

## 2.5. Οικογένεια *Neisseriaceae*

Από τα γένη αυτής της οικογένειας ενδιαφέρον παρουσιάζει το γένος *Acinetobacter* και μια κατηγορία μικροοργανισμών γνωστή με το όνομα *Moraxella*, που διαφέρει σε μερικά χαρακτηριστικά από αυτά που έχουν τα είδη του γένους *Acinetobacter*. Από πλευράς μορφολογίας τα κύτταρα των γενών της οικογένειας αυτής είναι ραβδόμορφα. Είναι αρνητικά κατά Gram, αερόβια, μεσόφιλα ή ψυχρότροφα και προέρχονται από το νερό. Η κατηγορία των *Moraxella* περιλαμβάνει παθογόνους μικροοργανισμούς για τον άνθρωπο, ενώ τα είδη του *Acinetobacter* έχουν συνδεθεί με αλλοιώσεις λόγω της ανάπτυξής τους σε θερμοκρασία ψυγείου και την παραγωγή ενζύμων που διασπούν τα συστατικά του γάλακτος. Τέλος, το είδος *Acinetobacter viscolactis* έχει συνδεθεί με την αύξηση του ιξώδους του γάλακτος. [4]



ΕΙΚΟΝΑ 13. Γένος *Moraxella*

Πηγή: <https://hira-tan.com/>

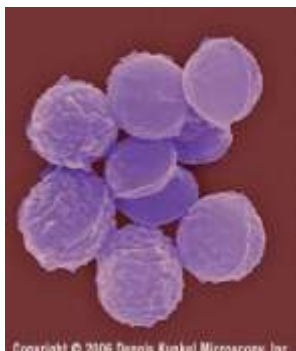
## 2.6. Οικογένεια *Micrococcaceae*

Από τα γένη αυτής της οικογένειας δύο παρουσιάζουν σημαντικό ενδιαφέρον για το γάλα, το *Micrococcus* και το *Staphylococcus*. Έχουν σφαιρικό σχήμα, είναι θετικά κατά Gram, αερόβια ή προαιρετικά αναερόβια. Τα είδη του γένους *Micrococcus* διαφοροποιούνται από

εκείνα του γένους *Staphylococcus*, λόγω της ικανότητας των σταφυλόκοκκων να ζυμώνουν τη γλυκόζη. Ωστόσο, οι σταφυλόκοκκοι, με αρνητική αντίδραση *Coagulase*, είναι δύσκολο να διακριθούν από τα είδη των *Micrococcus* με βάση μόνο αυτό το κριτήριο. Το πρόβλημα της διαφοροποίησης, στην περίπτωση αυτή, μπορεί να λυθεί με άλλους ελέγχους που βασίζονται στα χαρακτηριστικά των κυτταρικών τοιχωμάτων. [4]

### 2.6.1. Γένος *Micrococcus*

Συνήθως, είναι αερόβιοι, υπάρχουν, όμως, και αναερόβιοι, που ζυμώνουν τη γλυκόζη, τη διασπούν κατά τρόπο οξειδωτικό και δεν προκαλούν την παρά μικρή πτώση του pH 5-5,5. Δεν είναι παθογόνοι και αποτελούν μέρος της συνηθισμένης μικροχλωρίδας του γάλακτος μετά την άμελξη. Επειδή έχουν, σχετικά, υψηλή άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης στους 37°C και μειωμένη ενζυμική ικανότητα, δεν μπορούν να δημιουργήσουν σοβαρά προβλήματα τόσο στην συντήρηση, όσο και στην επεξεργασία του γάλακτος. Μερικά είδη έχουν την πρωτεολυτική ικανότητα να ανεβάσουν το pH του μέσου, γεγονός που έχει ιδιαίτερη σημασία στην ωρίμανση του προς τυροκόμηση γάλακτος. Δεδομένου ότι αναπτύσσονται από τους 10°C έως τους 37°C, επηρεάζουν τις δοκιμές της εκτίμησης της ποιότητας του γάλακτος. Τα είδη που εντοπίζονται, συνήθως, στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι τα εξής: *M.luteus*, *M.varians* και *M.freudenreichii*. [4]



ΕΙΚΟΝΑ 14. *Micrococcus luteus*

Πηγή: <https://www.denniskunkel.com/>

### 2.6.2. Γένος *Staphylococcus*

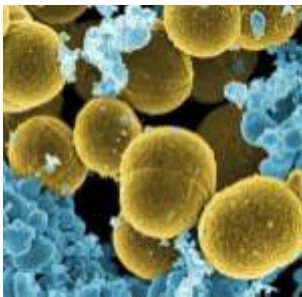
Τα είδη του γένους αυτού περιλαμβάνουν παθογόνους μικροοργανισμούς για τον άνθρωπο και τα ζώα. Τα κύτταρά του είναι σφαιρικά, έχουν διάμετρο 0,5-1,5 μm και είναι θετικά κατά Gram. [9] Από αυτά τα παθογόνα είδη το πιο γνωστό είναι το *S.aureus* που

συνδέεται με τροφικές δηλητηριάσεις. Το συγκεκριμένο είδος παράγει θερμοανθεκτική εντεροτοξίνη τα συμπτώματα της οποίας εκδηλώνονται στον άνθρωπο μετά από 2-6 ώρες από τη λήψη της τοξίνης. Ο *S.aureus* είναι προαιρετικά αναερόβιος και αναπτύσσεται σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών που κυμαίνονται από 6-49°C με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης από 30-37°C. Εντοπίζεται στις ρινικές κοιλότητες και στην επιδερμίδα του ανθρώπου και των ζώων. Από τα άλλα είδη του γένους *Staphylococcus* στο γάλα έχουν βρεθεί ο *S.epidermidis* (παθογόνος) και ο *S.saprophyticus* (μη παθογόνος).



ΕΙΚΟΝΑ 15. *Staphylococcus aureus*

Πηγή: <https://www.micronaut.ch>



ΕΙΚΟΝΑ 16. *Staphylococcus epidermidis*

Πηγή: <https://staphylococcusepidermidis.org/>

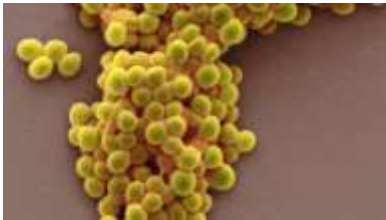
## 2.7. Οικογένεια *Streptococcaceae*

Από την συγκεκριμένη οικογένεια για την γαλακτοκομία παρουσιάζουν ενδιαφέρον τα γένη *Streptococcus* και *Leuconostoc*. Χαρακτηρίζονται από σφαιρικά ή ωσειδή κύτταρα, σε δυάδες, τετράδες ή αλυσίδες. Είναι θετικά κατά Gram και προαιρετικά αναερόβια. Η οικογένεια αυτή, περιλαμβάνει μικροοργανισμούς χρήσιμους για την παρασκευή ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων, αλλά επιβλαβείς και παθογόνους με σημαντικές επιπτώσεις στην υγεία των ζώων (μαστίτιδα) και στην παραγωγή του γάλακτος. [4]

### 2.7.1. Γένος *Streptococcus*

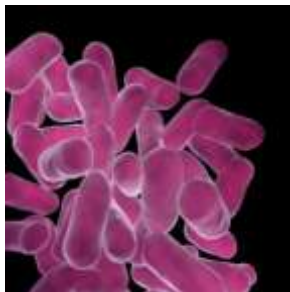
Περιλαμβάνει γένη που χαρακτηρίζονται από σφαιρικά ή ωοειδή κατά ζεύγη, τετράδες ή αλυσίδες διαφόρων μεγεθών. Είναι θετικά κατά Gram, προαιρετικά αναερόβια και όλα αρνητικά στην καταλάση. Τα κυριότερα είδη με ενδιαφέρον είναι τα εξής:

- Το *S.thermophilus*, το *S.lactis*, το *S.cremoris* και το *S.lactis* *subsp. Diacetylactis* που χρησιμοποιούνται σαν καλλιέργειες για την παραγωγή ζυμώμενων γαλακτοκομικών προϊόντων.



ΕΙΚΟΝΑ 17. *Streptococcus thermophilus*

Πηγή: <https://footage.framepool.com/>



ΕΙΚΟΝΑ 18. *Streptococcus cremoris*

Πηγή: <https://pixshark.com/>

- Το *S.agalactiae* που είναι ο σπουδαιότερος μικροοργανισμός της μαστίτιδας που οδηγεί στην καταστροφή του μαστού, το *S.dysgalactiae* και το *S.uberis*, το οποίο προκαλεί ένα είδος μαστίτιδας του χειμώνα.





ΕΙΚΟΝΑ 19. *Streptococcus agalactiae*

Πηγή: <https://www.pregnancylab.net/>

- Το *S.pyogenes* και το *S.equisimilis*, οι οποίοι είναι παθογόνοι για τον άνθρωπο και τα ζώα.



ΕΙΚΟΝΑ 20. *Streptococcus pyogenes*

Πηγή: <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/568831/Streptococcus-pyogenes/>

- Το *S.bovis* και το *S.faecalis* που υπάρχουν στα κόπρανα και είναι δείκτες επιμόλυνσης.

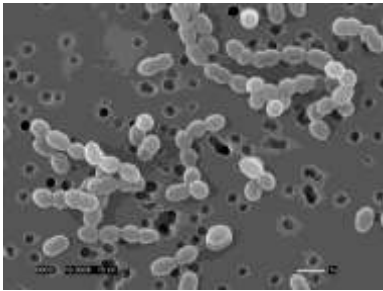
### 2.7.2. Γένος *Leuconostoc*

Το γένος αυτό περιλαμβάνει είδη που χρησιμοποιούνται ως οξυγαλακτικές καλλιέργειες στην παραγωγή ζυμώμενων γαλακτοκομικών προϊόντων, όπως το *L.lactis* και το *cremoris*. Σημαντικό ενδιαφέρον, επίσης, παρουσιάζουν για τις ζυμώσεις φρούτων και λαχανικών. Όλα τα είδη είναι ετεροζυμωτικά και παράγουν οξύ, αιθανόλη και CO<sub>2</sub>. Αναπτύσσονται στους 20-30°C, έχουν μεγάλες θρεπτικές απαιτήσεις και δεν είναι παθογόνοι. Τα κυριότερα είδη είναι τα εξής:

- Το *L.Mesenteroides*, το οποίο βρίσκεται στα γαλακτοκομικά προϊόντα και τα φρούτα. Χαρακτηριστικό του είναι ότι παράγει από τη ζαχαρόζη δεξτράνη, σε θερμοκρασία 20-25°C, με αποτέλεσμα ιξώδη υφή. Είναι πολύ ευαίσθητος μικροοργανισμός στις υψηλές θερμοκρασίες και αναπτύσσεται από τους 10-37°C με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 20-30°C. Αν και δεν είναι θερμοάντοχος μικροοργανισμός, εντούτοις στελέχη με



ικανότητα παραγωγής αυξημένων ποσοτήτων δεξτράνης μπορούν να αντέξουν στους 80-85°C.



ΕΙΚΟΝΑ 21. *Leuconostoc Mesenteroides*

Πηγή: <https://www.genome.jgi-psf.org/>

- Το *L.Dexteranicum*, το οποίο παράγει, επίσης, δεξτράνη, αλλά σε μικρότερες ποσότητες από το *L.mesenteroides*.
- Το *L.paramesenteroides*, το *L.lactis* και το *L.cremoris*, τα οποία δεν παράγουν δεξτράνη.

## 2.8. Οικογένεια *Bacillaceae*

Από τα γένη της οικογένειας αυτής, ενδιαφέρον για την γαλακτοκομία παρουσιάζουν τα γένη *Bacillus* και *Clostridium*. [4] Τα γένη αυτά μπορεί να είναι αερόβια, προαιρετικά αναερόβια ή αναερόβια, ραβδία, διαστάσεων 0,3-2,2×1,2-7,0 μm. [9] Είναι θετικά κατά Gram, αν και η συμπεριφορά τους στη χρώση Gram αλλάζει με την αύξηση της ηλικίας των κυττάρων. Τα κύτταρα έχουν σχήμα ραβδίου και μπορεί να εμφανιστούν μεμονωμένα, διπλά ή σε αλυσίδες. Βέβαια, το ενδιαφέρον των μικροοργανισμών της οικογένειας αυτής για την γαλακτοκομία έχει σχέση με:

- Την θερμοανθεκτικότητα τους, λόγω παραγωγής σπορίων
- Την ανάπτυξή τους σε θερμοκρασία ψυγείου (ψυχρότροφα)
- Και την ικανότητα ανάπτυξης τους σε αναερόβιο περιβάλλον (γάλα σε κουτιά και σε τυριά) [4]

### 2.8.1. Γένος *Bacillus*

Τα είδη αυτού του γένους βρίσκονται στο έδαφος, στο νερό και τον αέρα. Σε αερόβιο περιβάλλον είναι σε θέση να παράγουν σπόρια. Τα κυριότερα είδη είναι τα εξής:

- Το *B.cereus*. Τα κύτταρα είναι ραβδία μεγάλου μεγέθους, διαστάσεων 1,0-2,5×4 μm και κινούνται δραστήρια. [9] Μερικά στελέχη του παράγουν τοξίνη και συνδέονται με τροφικές δηλητηριάσεις, συνήθως όχι μόνο στο γάλα. Το ενδιαφέρον του είδους αυτού, από πλευράς γαλακτοκομίας έχει σχέση με την παραγωγή εξωκυτταρικής πρωτεάσης και λεκιθινάσης που, σε συνδυασμό με το σχηματισμό των σπορίων, αποτελεί αιτία για την γλυκειά πήξη του παστεριωμένου γάλακτος, την πικρή γεύση της κρέμας και τις αλλοιώσεις του μακράς διάρκειας γάλακτος (UHT). Το είδος αυτό αναπτύσσεται σε θερμοκρασία που κυμαίνεται από 20-35°C, αλλά όχι σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 10°C. [22]



ΕΙΚΟΝΑ 22. *Bacillus cereus*

Πηγή: <https://www.bacillus-cereus.blogspot.com/>

Το *B.subtilis* σε πολλά χαρακτηριστικά μοιάζει με τον *B.cereus*, καθώς προκαλεί γλυκειά πήξη του γάλακτος. Η γλυκειά πήξη προκαλείται από την παραγωγή διαφόρων εξωκυτταρικών ενζύμων με έντονες πρωτεολυτικές ικανότητες και την παραγωγή λεβανών και αντιβιοτικών. Σε πολλές, δε, περιπτώσεις έχει προκαλέσει αύξηση του ιξώδους προκαλώντας σχοινιάσμα σε νωπό και παστεριωμένο γάλα.



ΕΙΚΟΝΑ 23. *Bacillus subtilis*

Πηγή: <https://trade.indiamart.com/>

Το *B.stearothermophilus*. Κυρίως είναι γνωστός για τα προβλήματα που δημιουργεί στα κονσερβοποιημένα φρούτα και λαχανικά. Στο νωπό ή παστεριωμένο γάλα δε δημιουργεί προβλήματα, μπορεί να προκαλέσει όμως αλλοιώσεις στο γάλα που βρίσκεται σε κουτιά. Ο μικροοργανισμός αυτός, επίσης, είναι γνωστός για την ευαισθησία του στα αντιβιοτικά. Για τον λόγο αυτο, έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι αντιβιοτικών που βασίζονται σε αυτόν. Είναι θερμόφιλος μικροοργανισμός και τα σπόριά του αντέχουν περισσότερο από τα σπόρια που παράγονται από μεσόφιλους μικροοργανισμούς. Δύο χαρακτηριστικά γνωρίσματα του είδους αυτού είναι τα εξής:

- Μπορεί να αναπτυχθεί σε θερμοκρασία 65°C, αλλά όχι σε μικρότερη των 30°C.
- Είναι ανίκανο να αναπτυχθεί σε προϊόντα με pH μικρότερο του 5,0.

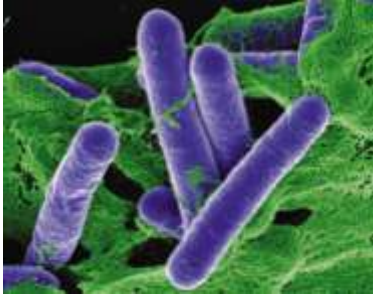


ΕΙΚΟΝΑ 24. *Bacillus stearothermophilus*

Πηγή: <https://www.nadidem.net/>

### 2.8.2. Γένος *Clostridium*

Τα είδη του γένους αυτού υπάρχουν σε αφθονία στο έδαφος και στα κόπρανα του ανθρώπου και των ζώων. Αναπτύσσονται, αποκλειστικά, κάτω από αναερόβιες συνθήκες και σε αναερόβιο περιβάλλον και σχηματίζουν σπόρια. Το γένος αυτό περιλαμβάνει και τα γνωστά παθογόνα είδη *C.perfigens* και *C.butulinum*, τα οποία, όμως, δεν έχουν συνδεθεί με τροφικές δηλητηριάσεις στο γάλα και τα γαλακτοκομικά του προϊόντα. Τα είδη αυτά προκαλούν, κυρίως, προβλήματα στο κονσερβοποιημένο γάλα και στα τυριά.



ΕΙΚΟΝΑ 25. *Clostridium butulinum*

Πηγή: <https://www.paulahp.blogspot.com/>

Τα κυριότερα είδη είναι τα εξής:

Το *C.butyricum*, το οποίο μπορεί να προκαλέσει φούσκωμα σε ώριμα τυριά (1-2 μήνες μετά την παρασκευή τους) και συνδέονται με την επιμόλυνση του γάλακτος από ζωοτροφές. Μερικοί παράγοντες που έχουν σχέση με την εμφάνιση αυτού του ελαττώματος σε περίπτωση που το γάλα είναι επιμολυσμένο είναι οι εξής:

- Ο αριθμός των σπορίων στο γάλα,
- Το pH των τυριών,
- Η περιεκτικότητα σε αλάτι,
- Ο βαθμός αναεροβίωσης στο τυρί και
- Το είδος του τυριού.

Το *C.tyrobutyricum* είναι ικανό για το φούσκωμα και το σκάσιμο των τυριών και συνδέεται, όπως και το προηγούμενο είδος, με την επιμόλυνση του γάλακτος από ενσιρωμένες τροφές. Διαφέρει, βέβαια, στο ότι το *C.tyrobutyricum* είναι πιο ανθεκτικό στην οξύτητα και το αλάτι από το προηγούμενο.

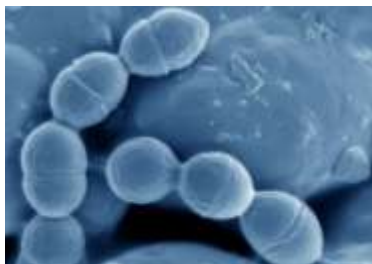
## 2.9. Οικογένεια *Lactobacillaceae*

Από τα γένη αυτής της οικογένειας ενδιαφέρον για το γάλα παρουσιάζει, κυρίως, το γένος *Lactobacillus* και, δευτερευόντως, το γένος *Listeria*, το οποίο είναι αμφιβόλου συγγένειας με αυτή την οικογένεια. Τα συγκεκριμένα γένη είναι θετικά κατά Gram, με κύτταρα ευθύγραμμου ή καμπυλοειδούς ραβδίου και είναι αερόβια ή προαιρετικά αερόβια.

### 2.9.1. Γένος *Lactobacillus*

Τα είδη του γένους αυτού χρησιμοποιούνται στην παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων. Τα κυριότερα είδη είναι τα εξής:

- Το *L.lactis*, το οποίο είναι θερμοφίλο, με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης 40-43°C και χρησιμοποιείται, σε συνδυασμό με άλλους μικροοργανισμούς στην παρασκευή ελβετικού τύπου τυριού και ιταλικών σκληρών τυριών.



ΕΙΚΟΝΑ 26. *Lactobacillus lactis*

Πηγή: <https://textbookofbacteriology.net/>

- Το *L.bulgaricus*, το οποίο είναι θερμοφίλο, με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης 40°C και χρησιμοποιείται, και αυτό, σε συνδυασμό με άλλους μικροοργανισμούς, στην παρασκευή γιαούρτης, ελβετικού τύπου τυριού και του ιταλικού τυριού Grana.
- Το *L.helveticus*, το οποίο είναι θερμοφίλο, με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης 40-42°C, χρησιμοποιείται, σε συνδυασμό με άλλους μικροοργανισμούς, στην παρασκευή ελβετικού τυριού και ιταλικών σκληρών τυριών.
- Το *L.acidophilus*, όπου είναι θερμοφίλο, με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης 35-38°C και χρησιμοποιείται, σε συνδυασμό με άλλους μικροοργανισμούς, στην παρασκευή ζυμωθέντος γάλακτος με το όνομα *Acidophilus*, καθώς, και στην παρασκευή του κεφίρ.
- Το *L.brevis* είναι μεσόφιλο με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 30°C και χρησιμοποιείται, εξίσου, στην παραγωγή του κεφίρ.
- Το *L.jugurtii* είναι θερμοφίλο, πολλά στελέχη του αναπτύσσονται στους 45°C και χρησιμοποιείται σαν καλλιέργεια στην παρασκευή ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων.

- Το *L.fermentum* είναι και αυτό θερμόφιλο με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 41-42°C και χρησιμοποιείται σαν καλλιέργεια στην παρασκευή ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων.
- Το *L.casei* είναι μεσόφιλο και δεν μπορεί να αναπτυχθεί σε θερμοκρασία 45°C, χρησιμοποιείται, όμως, στην παρασκευή ορισμένων γαλακτοκομικών προϊόντων, ένα από τα οποία είναι το Yakult.



ΕΙΚΟΝΑ 27. *Lactobacillus casei*

Πηγή: <http://www.fineartamerica.com>

- Τέλος, το *L.plantarum* και το *L.curvatos*, που έχουν άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης 30-37°C, έχουν απομονωθεί από γαλακτοκομικά προϊόντα και βρίσκονται στον αέρα και τις ενσιρώμενες τροφές. [4]

### 2.9.2. Γένος *Listeria*

Περιλαμβάνει το είδος *Listeria monocytogenes*, το οποίο είναι μικρός ασποριογόνος θετικός κατά Gram βάκιλλος, που εγγίζει τα όρια του κόκκου (κοκκοβάκιλλος). Οι διαστάσεις του είναι 0,4-0,5×0,5-2,0 μm και φέρει μία βλεφαρίδα στον έναν πόλο (όταν αναπτύσσεται σε θερμοκρασία 37°C) με τη βοήθεια της οποίας κινείται. [9] Είναι παθογόνο για τον άνθρωπο, προκαλώντας μηνιγγίτιδα, και για τις αγελάδες, προκαλώντας αποβολή. Ο μικροοργανισμός αυτός παρουσιάζει ενδιαφέρον λόγω των τροφικών δηλητηριάσεων που μπορεί να προκαλέσει, κυρίως μετά την κατανάλωση μαλακών τυριών που παρασκευάζονται από απαστερίωτο γάλα. Μετά από σειρά ερευνών, αναθεωρήθηκαν πολλές απόψεις για τον μικροοργανισμό αυτό. Παρόλο που καταστρέφεται μετά την παστερίωση, εντούτοις υπάρχουν ενδείξεις ότι μπορεί και να επιβιώσει όταν βρίσκεται εντός σωματικών κυττάρων από προσβεβλημένο μαστό. Επιπλέον, παρόλο που πίστευαν ότι σε pH μικρότερο του 5,6 δεν μπορεί να επιβιώσει, τελικά βρέθηκε και

σε προϊόντα με pH μικρότερο του 5,0. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά του *L.monocytogenes* σε συνδυασμό με την μεγάλη του αντοχή σε υψηλές συγκεντρώσεις αλατιού, καθώς είναι ικανό να αναπτυχθεί σε 10% NaCl και να επιβιώσει ακόμα και σε 16% NaCl, και την δυνατότητα ανάπτυξης σε θερμοκρασίες ψυγείου, καθιστούν τον μικροοργανισμό αυτό ιδιαίτερα επικίνδυνο με την παρουσία του σε φρέσκα τυριά και άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα. [4]



ΕΙΚΟΝΑ 28. *Listeria monocytogenes*

Πηγή: <http://www.foodsafety.asn.au/resources/listeria-monocytogenes/>

## 2.10. Οικογένεια *Propionibacteriaceae*

Από τα γένη αυτής της οικογένειας, μόνο το γένος της *Propionibacterium* αποκτά ενδιαφέρον για το γάλα και τα προϊόντα του. Το είδος *P.shermanii* χρησιμοποιείται, σε συνδυασμό με είδη του γένους *Lactobacillus* στην παρασκευή ελβετικού τύπου τυριού. Στο τυρί βοηθάει στο σχηματισμό οπών με την παραγωγή CO<sub>2</sub>. Είναι θετικό κατά Gram, προαιρετικώς αναερόβιο και έχει άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 30-37°C. [4]

## 2.11. Οικογένεια *Mycobacteriaceae*

Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει μόνο ένα γένος, το *Mycobacterium*. Δεν χρωματίζεται εύκολα με τη χρώση κατά Gram, αλλά συνήθως θεωρούνται θετικά κατά Gram. Είναι αερόβια, διαστάσεων 0,2-0,7×1,0-10,0 και το σχήμα τους εμφανίζεται ως κοκκοειδές ή νηματώδες. [9]

### 2.11.1. Γένος *Mycobacterium*

Περιλαμβάνει παθογόνους μικροοργανισμούς τόσο για τον άνθρωπο όσο και για τα ζώα που μπορούν να προκαλέσουν τη γνωστή φυματίωση και είναι τα εξής τρία είδη:

- *Mycobacterium tuberculosis*

- *Mycobacterium bovis*
- *Mycobacterium africanum*

Το είδος *Mycobacterium tuberculosis* είναι υπεύθυνο για την φυματίωση του ανθρώπου, αλλά δεν θεωρείται παθογόνο για τα ζώα. Τάσσεται στην τάξη των *Actinomycetales* και βάφεται με την τεχνική Ziehl-Neelsen. Τα χρωματισμένα βακτήρια δεν αποδίδουν τη χρωστική, αν τύχουν κατεργασίας με οξινομένη αιθανόλη και είναι γνωστά ως οξύαντοχα σε ό,τι αφορά τη χρώση. Πηγή του παθογόνου αυτού μικροοργανισμού είναι φυματικά άτομα που συσκευάζουν ή διακινούν τρόφιμα, είτε παραγωγικά ζώα, τα οποία έχουν προσβληθεί από φυματίωση και παράγουν μολυσμένο γάλα η αποδίδουν σφαζόμενα μολυσμένο, με Βάκιλλο της φυματίωσης, κρέας.

Το παστεριωμένο γάλα είναι πρακτικά απαλλαγμένο από το Βάκιλλο της φυματίωσης, λόγω της ευαισθησίας που παρουσιάζει στη θέρμανση. Άλλωστε ο αρχικός στόχος της παστερίωσης του γάλακτος, ήταν η εξόντωση των μικροβίων *Mycobacterium tuberculosis* και *Coxiella burnetii*, παθογόνου του πυρετού Q που θα γίνει λόγος παρακάτω. [9]



ΕΙΚΟΝΑ 29. *Mycobacterium tuberculosis*

Πηγή: <http://www.bioquell.asia/technology/microbiology/mycobacterium-tuberculosis/>

## 2.12. Οικογένεια *Rickettsiaceae*

Στην οικογένεια αυτή ανήκει το γένος *Coxiella* που περιλαμβάνει το είδος *C.burnetii*, το οποίο είναι παράσιτο, κυρίως, των τσιμπουριών και μεταδίδεται, στη συνέχεια, και στα ζώα. Είναι παθογόνο και στον άνθρωπο και είναι ικανό να προκαλέσει τον πυρετό Q που σπάνια είναι θανατηφόρος. Το *C.burnetii* συνδέθηκε με την εξέλιξη της παστερίωσης του γάλακτος, λόγω της



μεγαλύτερης ανθεκτικότητάς του στη θέρμανση από τους μικροοργανισμούς της φυματίωσης.  
[4]

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ**

Ποιότητα, με απλά λόγια, είναι το μέτρο ικανοποίησης των προσδοκιών του καταναλωτή ή, διαφορετικά, η ικανότητα της βιομηχανίας να ικανοποιεί τις ανάγκες του καταναλωτή.

Με τον όρο «ποιότητα του γάλακτος» εννοούμε το σύνολο των ιδιοτήτων του που αναφέρονται στο πλήθος και την ποικιλομορφία των μικροοργανισμών, στην χημική του σύσταση, την παρουσία αντιβιοτικών, εντομοκτόνων, μυκοτοξινών και άλλων ανεπιθύμητων ουσιών, στην ύπαρξη γευστικών ανωμαλιών και ξένων σωμάτων.

Στο σύγχρονο, διεθνοποιημένο και άκρως ανταγωνιστικό επιχειρηματικό περιβάλλον, οι επιχειρήσεις που δραστηριοποιούνται στον κλάδο της γαλακτοβιομηχανίας, επιδιώκουν την παραγωγή κορυφαίων προϊόντων που να ανταποκρίνονται στις ανάγκες των καταναλωτών και να τηρούν αυστηρές προδιαγραφές διασφάλισης της ποιότητας. Για να συμβεί αυτό, πρέπει να εξασφαλιστεί πώς η κυριότερη πρώτη ύλη, που θα χρησιμοποιηθεί στις διαφορες επεξεργασίες των γαλακτοβιομηχανιών, δηλαδή το νωπό γάλα, θα είναι άριστης ποιότητας. [3]

Η ευρωπαϊκή και ελληνική νομοθεσία καθορίζουν τα κατώτερα όρια συγκεκριμένων χαρακτηριστικών του νωπού γάλακτος, προκειμένου αυτό να είναι αποδεκτό για περαιτέρω επεξεργασία. Πιο συγκεκριμένα, γάλα καλής ποιότητας θεωρείται το γάλα που είναι καθαρό, έχει κανονική σύσταση, χρώμα και γεύση, περιορισμένο αριθμό μικροβίων και δεν περιέχει καθόλου παθογόνα μικρόβια.

Κανονική χημική σύσταση για το αγελαδινό γάλα:

- max Σ.Π.: -0.520,
- min E.B.: 1,028 και
- min Σ.Υ.Α.Λ.: 8,5%.

Περιορισμένος αριθμός μικροβίων: <100000 μικρόβια/ml στους 30°C για το αγελαδινό και <1500000 μικρόβια /ml στους 30°C για το αιγοπρόβειο γάλα.

Περιορισμένος αριθμός σωματικών κυττάρων: <400000 για το αγελαδινό γάλα. [6]

Επιπλέον, στον ΠΙΝΑΚΑ 3. Παρουσιάζονται τα όρια των φυσικών και χημικών σταθερών των ειδών του γάλακτος που παράγονται στην Ελλάδα σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3. Όρια φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των ειδών γάλακτος που παράγονται στην Ελλάδα [8]

<b>ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΓΑΛΑΚΤΟΣ</b>	<b>ΕΙΔΙΚΟ ΒΑΡΟΣ (ΕΒ) ΣΤΟΥΣ 15°C</b>	<b>ΛΙΠΟΣ (%) (ΕΛΑΧΙΣΤΟ)</b>	<b>ΣΤΕΡΕΟ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑ ΑΝΕΥ ΛΙΠΟΥΣ (Σ.Υ.Α.Λ.) (%)</b>
<b>Αγελάδας</b>	1,028	3,5	8,50
<b>Κατσίκα</b>	1,032	4,0	9,00
<b>Προβάτου</b>	1,035	6,0	10,20
<b>Βουβάλου</b>	1,033	6,0	9,70

Παλαιότερα, η βασική πολιτική της ποιότητας του γάλακτος στηριζόταν μόνο στον έλεγχο του τελικού προϊόντος. Όμως, λόγω της μεγάλης ευαισθησίας που παρουσίαζε το προϊόν, ευαισθησία που οφείλεται στο γεγονός πως το γάλα είναι πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά που αποτελούν άριστο υπόστρωμα για την ανάπτυξη αρκετών μικροοργανισμών, η βιομηχανία για να εξασφαλίσει την εμπιστοσύνη των καταναλωτών έπαιρνε πάντα μέτρα που άρχιζαν από την εκτροφή της αγελάδας και έφταναν στη διασφάλιση της υγείας και της ικανοποίησης του καταναλωτή.

Δεν θα ήταν υπερβολή να τονιστεί πως όλη η δομή, η οργάνωση και η αποτελεσματική λειτουργία των σύγχρονων γαλακτοβιομηχανιών παγκοσμίως στηρίζεται, κυριολεκτικά, στην παραγωγή και παραλαβή νωπού γάλακτος άριστης ποιότητας. Για να εξασφαλιστεί, λοιπόν, η άριστη ποιότητα του νωπού γάλακτος καταβάλλονται ιδιαίτερες φροντίδες από τους παραγωγούς και τις γαλακτοβιομηχανίες, ενώ οι κρατικοί φορείς λαμβάνουν μια σειρά μέτρων.

Έτσι, στα πλαίσια αυτά απαραίτητοι είναι κάποιοι εργαστηριακοί έλεγχοι του νωπού γάλακτος οι οποίοι να δίνουν μια σαφή και πλήρη γνώση των συστατικών του. Οι έλεγχοι αυτοί

πρέπει να είναι συνεχείς, ενδεδειγμένες και αξιόπιστοι, ώστε να εξασφαλίζουν αφ'ενός πως θα φτάσει στο πιάτο του καταναλωτή ένα θρεπτικό, ποιοτικό και, πάνω από όλα, ασφαλές προϊόν, αφ'ετέρου πως δεν θα προκύψουν τεχνολογικά προβλήματα κατά την επεξεργασία του γάλακτος σε όλα τα στάδια της παραγωγικής του διαδικασίας. [3]

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΕΛΕΓΧΟΙ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ**

### **4.1. Γενικά**

Κατά την παραλαβή του γάλακτος στο εργαστήριο, γίνεται ο έλεγχος της ποιότητάς του με κλασικές ή αυτοματοποιημένες τεχνικές. Ο έλεγχος αυτός, γίνεται για να εξακριβωθεί κατά πόσον το γάλα που παραλαμβάνεται για επεξεργασία έχει τις προδιαγραφές, που ορίζει η νομοθεσία, σε ό,τι αφορά στη χημική του σύσταση και την μικροβιολογική του ποιότητα.

Η ποιότητα του γάλακτος έχει μεγάλη σημασία για τον καταναλωτή και τις μονάδες επεξεργασίας, επειδή το γάλα καλής ποιότητας:

- δεν εγκυμονεί κινδύνους για τον καταναλωτή,
- έχει χαμηλότερο κόστος επεξεργασίας, η διάρκεια συντήρησής του, είτε ως νωπό, είτε ως παστεριωμένο είναι αυξημένη και
- είναι κατάλληλο για την παρασκευή ποιοτικών προϊόντων. [5]

### **4.2. Εφαρμογή του Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) Ανάλυση Κινδύνων & Κρίσιμα Σημεία Ελέγχου**

Για την διατήρηση και διασφάλιση της ποιότητας και ασφάλειας των γαλακτοκομικών προϊόντων, είναι απαραίτητη η υιοθέτηση του HACCP από όλες τις γαλακτοβιομηχανίες, ως εργαλείου διαχείρισης της ποιότητάς τους, στα πρότυπα ISO 9001/2.

Το HACCP είναι, καταρχήν, μία μέθοδος αναγνώρισης όλων των κινδύνων (Hazard Analysis) που αφορούν στην ποιότητα, από το ακατέργαστο γάλα έως το συσκευασμένο γαλακτοκομικό προϊόν. Στην συνέχεια, εκτιμά τους σχετικούς κινδύνους (Critical Control Point ή CCP) και προσδιορίζει τις λειτουργίες όπου ο έλεγχος της παραγωγικής διαδικασίας θα είναι αποδοτικός.

Σε αυτό το σύστημα διασφάλισης της ποιότητας περιλαμβάνονται οι παρακάτω 7 βασικές αρχές, οι οποίες μπορούν να δώσουν τη βάση εφαρμογής του συστήματος, από την παραγωγή στην κατανάλωση:

- 1) Δημιουργία διαγράμματος ροής για κάθε διαδικασία με αναγνώριση των δυνητικών κινδύνων. Οι ενδεχόμενοι κίνδυνοι ασφάλειας του προϊόντος (χημικοί, μικροβιακοί, φυσικοί) σημειώνονται πάνω στο διάγραμμα.
- 2) Καθορισμός κρίσιμων σημείων ελέγχου (CCP). Είναι οποιοδήποτε σημείο ή επεξεργασία όπου απαιτείται έλεγχος ώστε να ελαχιστοποιηθεί ή να αποφευχθεί ένας κίνδυνος
- 3) Καθορισμός κρίσιμων ορίων (Critical Limits)
- 4) Καθορισμός διαδικασιών παρακολούθησης και ελέγχου των κρίσιμων σημείων (Monitoring). Τα κρίσιμα σημεία ελέγχου μπορεί να είναι η ενεργότητα νερού, η υγρασία, ο χρόνος, η θερμοκρασία κ.λπ.
- 5) Καθορισμός διορθωτικών ενεργειών όταν παρατηρείται παρέκκλιση από τα κρίσιμα όρια, με στόχο την επανόρθωσή τους (Correction).
- 6) Καθορισμός διαδικασίας επαλήθευσης (Verification) που περιλαμβάνει μεθόδους και διαδικασίες που χρησιμοποιούνται για να προσδιορίσουν ότι το σύστημα είναι σε συμφωνία με το σχέδιο.
- 7) Καθορισμός διαδικασιών καταγραφής του σχεδίου HACCP, σε ειδικά έγγραφα, και αρχειοθέτησης του συστήματος για να είναι διαθέσιμο στους επίσημους επιθεωρητές (Documentation).

Για να εφαρμοστεί επιτυχώς το HACCP υπάρχουν μερικές προαπαιτήσεις, τις οποίες πρέπει να λάβουν υπόψη τους οι βιομηχανίες. Συγκεκριμένα, η εφαρμογή του συστήματος πρέπει να καθοδηγείται μέσα από την εταιρεία και θα πρέπει να ελέγχεται όλη η διαδικασία, από την παραγωγή ως την κατανάλωση. Τέλος, όλο το προσωπικό θα πρέπει να γνωρίζει τη σημασία της ποιότητας και το ρόλο της στην επίτευξη των στόχων της εταιρείας, οι οποίοι συνοψίζονται στο να είναι τα προϊόντα της ανταγωνιστικά, να έχουν μεγάλη διάρκεια ζωής, να είναι μικροβιολογικά σταθερά και να χαίρουν μεγάλης εκτίμησης από το καταναλωτικό κοινό. Επομένως, απαιτείται σωστή εκπαίδευση της ομάδας HACCP, της οποίας ο ρόλος στην εφαρμογή του συστήματος αυτού είναι ιδιαίτερα κρίσιμος.

Συμπερασματικά, η εφαρμογή του HACCP από τις γαλακτοβιομηχανίες παρέχει άμεσα τα εξής οφέλη: μελετά, προλαμβάνει, ελέγχει και ελαχιστοποιεί την πιθανότητα παρουσίας κινδύνων για την υγεία των καταναλωτών από την κατανάλωση των προϊόντων, μειώνει τα παράπονα των πελατών και εξασφαλίζει διαρκή βελτίωση της ποιότητας του τελικού προϊόντος. [2]

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **5.1. Προσδιορισμός του μικροβιακού φορτίου με τις έμμεσες μεθόδους αναγωγής χρωστικών**

#### **5.1.1. Γενικά**

Αποτέλεσμα της μεταβολικής δραστηριότητας των μικροοργανισμών στο γάλα είναι μια σειρά από αντιδράσεις οξειδοαναγωγής που συμβαίνουν σε αυτό με αμφίδρομη μεταφορά ηλεκτρονίων. Στις αντιδράσεις αυτές, έχουμε δέσμευση του υπάρχοντος οξυγόνου και απελευθέρωση ενέργειας, την οποία χρησιμοποιούν οι μικροοργανισμοί, ενώ συγχρόνως εμφανίζεται μείωση του δυναμικού οξειδοαναγωγής (redox potential) του γάλακτος. Το γάλα στο μαστό έχει σχετικά υψηλό δυναμικό οξειδοαναγωγής. Μάλιστα, η ενσωμάτωση οξυγόνου κατά την άμελξή του αυξάνει την τιμή του. Οι μικροοργανισμοί που μολύνουν το γάλα, σε πρώτη φάση, δεν επηρεάζουν την τιμή του οξειδοαναγωγικού δυναμικού, αλλά μόλις αρχίζει ο πολλαπλασιασμός τους η τιμή του μειώνεται και αυξάνει ο σχηματισμός αναγωγικών ουσιών. Η μείωση του δυναμικού οξειδοαναγωγής του γάλακτος χρονικά αποτελεί συνάρτηση του αρχικού πληθυσμού των μικροοργανισμών.

Η μεταβολική αυτή δραστηριότητα των μικροοργανισμών, που αναπτύσσονται στο γάλα, άρα και ο πληθυσμός των βακτηρίων, εκτιμάται με διάφορους τρόπους, μεταξύ των οποίων είναι και η μέθοδος αναγωγής χρωστικών. Με τη μέθοδο αυτή, χρησιμοποιούνται ειδικοί δείκτες που μεταβάλλουν το χρώμα τους ανάλογα με τη μεταβολή του δυναμικού οξειδοαναγωγής του μέσου που βρίσκονται. Τέτοιοι δείκτες είναι το κυανούν του μεθυλενίου και η ρεζαζουρίνη.

#### **5.1.2. Μέθοδος αναγωγής του κυανού του μεθυλενίου**

##### **Αρχή της μεθόδου**

Η προσθήκη του δείκτη αυτού σε δείγμα φρέσκου γάλακτος, το οποίο έχει υψηλή τιμή οξειδοαναγωγικού έχει ως αποτέλεσμα τον κυανό χρωματισμό του δείγματος. Μόλις αρχίσει ο πολλαπλασιασμός των μικροοργανισμών, το δυναμικό οξειδοαναγωγής μειώνεται και ο δείκτης ανάγεται και αποχρωματίζεται.

Παράγοντες συσχέτισης στις αντιδράσεις οξειδοαναγωγής είναι ο χρόνος και ο αριθμός των μικροοργανισμών. Οι δύο αυτοί παράγοντες είναι μεταξύ τους αντιστρόφως ανάλογοι. Ο αποχρωματισμός, λοιπόν, της χρωστικής, οφείλεται, κυρίως, στη μείωση του δυναμικού οξειδοαναγωγής, λόγω της κατανάλωσης του οξυγόνου από τα βακτήρια που πολλαπλασιάζονται. Από σειρά πειραματισμών, έχει διαπιστωθεί η συσχέτιση της ποιότητας του γάλακτος, και επομένως και του αρχικού αριθμού των μικροοργανισμών του, με το χρόνο αποχρωματισμού του μίγματος γάλακτος-χρωστικής. Για αυτό, η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται στην Ελλάδα και σε πολλές χώρες ως ταχεία μέθοδος μικροβιολογικής ποιοτικής διαβάθμισης του γάλακτος στο επίπεδο παραγωγής και συγκέντρωσης αυτού.

### **Πλεονεκτήματα της μεθόδου**

- Η μέθοδος είναι πολύ απλή και μπορεί εύκολα να εφαρμοστεί,
- Έχει μικρό κόστος και
- Δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα.

### **Μειονεκτήματα της μεθόδου**

- Όταν το γάλα είναι καλής ποιότητας απαιτείται μεγαλύτερος χρόνος για τη λήψη των αποτελεσμάτων, σε σχέση με τη μέθοδο της ρεζαζουρίνης και
- Η παρουσία αντιβιοτικών αλλοιώνει τα αποτελέσματα.

### **5.1.3. Μέθοδος αναγωγής της ρεζαζουρίνης**

#### **Αρχή της μεθόδου**

Η ρεζαζουρίνη είναι, όπως και το κυανού του μεθυλενίου, δείκτης οξειδοαναγωγής, επομένως στηρίζεται στην ίδια αρχή με αυτή της προηγούμενης μεθόδου. Με τη ρεζαζουρίνη το γάλα, αρχικά, χρωματίζεται μπλε αλλά κατά την πορεία της αντίδρασης, πριν αποχρωματιστεί, αλλάζει διάφορους χρωματισμούς. Αυτό οφείλεται στο γεγονός, ότι η αναγωγή της ρεζαζουρίνης γίνεται σε δύο φάσεις. Η πρώτη είναι μονόδρομος και μετατρέπεται σε ρεζαρουφίνη (resorufin).

Η φάση αυτή είναι εξαιρετικά ευαίσθητη στο φως και δεν επηρεάζεται από την παρουσία οξυγόνου. Η αντίδραση αυτή, γίνεται αντιληπτή με την αλλαγή του χρώματος, το οποίο, αρχικά, είναι μπλε ή μωβ και γίνεται ρόδινο. Ακολουθεί, η δεύτερη φάση, κατά την οποία η ρεζαρουφίνη μετατρέπεται σε διυδρορεζαρουφίνη (dihydroresorufin), που είναι άχρωμη. Η αντίδραση αυτή είναι ευαίσθητη στο φως και στον ατμοσφαιρικό αέρα.

### **Πλεονεκτήματα της μεθόδου**

- Απαιτεί σταθερό και μικρότερο χρόνο από το κυανούν του μεθυλενίου για τη λήψη αποτελεσμάτων

### **Μειονεκτήματα της μεθόδου**

- Η διαπίστωση του χρώματος, κυρίως όταν δεν χρησιμοποιείται η συσκευή Lovibond, δηλιουργεί προβλήματα, ιδιαίτερα όταν το προσωπικό δεν είναι ειδικευμένο.
- Κάθε φορά που γίνεται η σύγκριση είναι απαραίτητη η ίδια πηγή φωτός. [13]

## **5.2. Αρίθμηση του συνολικού αριθμού μικροοργανισμών**

### **5.2.1. Γενικά**

Για τον έλεγχο της μικροβιακής κατάστασης του γάλακτος, ο πιο συνηθισμένος και καθιερωμένος έλεγχος είναι της Ολικής Μικροβιακής Χλωρίδας (OMX), αφού δίνει μια γενική εικόνα των συνθηκών παραγωγής. Είναι γεγονός ότι όσο χαμηλότερη είναι η OMX του νοπού γάλακτος, τόσο μικρότεροι θα είναι οι κίνδυνοι για τη δημόσια υγεία, τα γαλακτοκομικά προϊόντα θα είναι καλύτερα ποιοτικά και θα μπορούν να συντηρηθούν για περισσότερο χρονικό διάστημα. Με την παστερίωση του γάλακτος, παρόλο που καταστρέφονται οι παθογόνοι μικροοργανισμοί και ελαττώνεται σημαντικά η OMX, εντούτοις δεν εξουδετερώνονται οι μεταβολές που έχουν ήδη γίνει από τους μικροοργανισμούς στα συστατικά τους γάλακτος, καθώς και τυχόν θερμοανθεκτικές τοξίνες ή θερμοανθεκτικά ένζυμα που έχουν παραχθεί.

Στην OMX του γάλακτος περιλαμβάνονται μικροοργανισμοί που αλλοιώνουν το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα, μικροοργανισμοί παθογόνοι για τα ζώα, και σε αρκετές περιπτώσεις, και για τον άνθρωπο, καθώς και μικροοργανισμοί που μπορεί να αλλοιώνουν το γάλα και να είναι ανεπιθύμητοι, όταν όμως χρησιμοποιηθούν κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες (ως οξυγαλακτικές καλλιέργειες) συμμετέχουν στην παραγωγή ζυμώμενων γαλακτοκομικών

προϊόντων. Επίσης, οι ψυχρότροφοι μικροοργανισμοί που παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, λόγω της διάδοσης της συντήρησης του γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων με ψύξη, καθώς και μικροοργανισμοί θερμοάντοχοι (που επιβιώνουν χωρίς όμως να πολλαπλασιάζονται στη θερμοκρασία παστερίωσης) και θερμοφιλοι (που αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες 55°C ή σε ορισμένες περιπτώσεις και των 70 °C) που δημιουργούν προβλήματα κατά την θερμική επεξεργασία, λόγω της ιδιαίτερης συμπεριφοράς τους κατά τη θερμική επεξεργασία. [5]

### **5.2.2. Προσδιορισμός του συνολικού αριθμού μικροοργανισμών**

#### **Κλασικές μέθοδοι**

- Μέθοδος των τρυβλίων.
- Μέθοδος του μικροσκοπίου ( Μέθοδος Breed).
- Σπειροειδής μέθοδος (Spiral plate).
- Μέθοδος εμβολιασμού με βαθμολογημένο κρίκο (Plate loop method)
- Μέθοδος του περιστρεφόμενου σωλήνα (Roll tube method).
- Μέθοδος του φθορίζοντος φίλτρου (Epifluorescent filter technique)
- Μέθοδοι που προσδιορίζουν τη μικροβιακή δραστηριότητα. [6]

### **5.2.3. Μέθοδος των τρυβλίων ή της διασποράς ή της μέτρησης αποικιών**

#### **Γενικά**

Η αρίθμηση των μικροοργανισμών, που αναπτύσσονται, σχετικά εύκολα, σε ορισμένο στερεό υπόστρωμα (Standard Plate Count Agar) και θερμοκρασία 30°C, στηρίζεται στη μέτρηση των μονάδων σχηματισμού αποικιών (colony forming unit, cfu) των μικροοργανισμών σε τρυβλία. Είναι η κυριότερη μέθοδος που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση των ζωντανών μικροοργανισμών στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Η μέθοδος αυτή έχει γίνει αποδεκτή στις περισσότερες χώρες, ως επίσημη μέθοδος για τη μικροβιολογική εξέταση του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων, και χρησιμοποιείται ως μέθοδος αναφοράς.

#### **Αρχή της μεθόδου**

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην αρίθμηση των ορατών, με γυμνό οφθαλμό, αποικιών που δημιουργούν τα βακτήρια του γάλακτος σε θρεπτικό υπόστρωμα που βρίσκεται σε τρυβλία. Ένας καθορισμένος όγκος του δείγματος γάλακτος μετά από κατάλληλη αραιώση



αναμειγνύονται με ρευστό θρεπτικό υπόστρωμα (Standard Plate Count Agar) σε τρυβλία petri και επωάζονται στους 30°C για 3 ημέρες. Οι αποικίες αριθμούνται και υπολογίζεται ο αριθμός των ζωντανών μικροοργανισμών ανά ml γάλακτος, με τη συμβατική παραδοχή ότι κάθε ζωντανό κύτταρο δίνει μια ορατή αποικία. Ο αριθμός των ζωντανών βακτηρίων ανά ml γάλακτος υπολογίζεται με τη σχέση:

$$cfu/ml = \frac{\Sigma C}{(n_1 + 0,1n_2)d}$$

Όπου,

$\Sigma C$ : Το άθροισμα των αποικιών που καταμετρήθηκαν σε όλα τα επιλεγόμενα για καταμέτρηση τρυβλία.

$n_1$ : Ο αριθμός των τρυβλίων που καταμετρήθηκαν στην πρώτη αραιώση.

$n_2$ : Ο αριθμός των τρυβλίων που καταμετρήθηκαν στη δεύτερη αραιώση.

$d$ : Η δεκαδική αραιώση που ανταποκρίνεται στην πρώτη αραιώση των τρυβλίων που μετρήθηκαν.

### **Πλεονεκτήματα της μεθόδου**

- Ο αριθμός των μικροοργανισμών που αριθμήτε ανταποκρίνεται προς το σύνολο των ζώντων μικροοργανισμών του γάλακτος, εφόσον είναι σωστή η εκτέλεση της τεχνικής.
- Η απλότητα της μεθόδου και η ευκολία στην εφαρμογή της.
- Διαφορετικές κατηγορίες μικροοργανισμών, είναι δυνατόν να αναγνωριστούν από εξειδικευμένο προσωπικό με βάση τη μορφή των αποικιών.
- Εφόσον, όλοι οι χειρισμοί γίνονται με σχολαστική ακρίβεια, η μέθοδος έχει ικανοποιητικά αποτελέσματα.

### **Μειονεκτήματα της μεθόδου**

- Παρουσιάζεται, συχνά, στατιστική διακύμανση μεταξύ αποικιών της ίδιας αραιώσης ή διαφορετικών. Για αυτό είναι απαραίτητη η πολλαπλή επανάληψη κάθε αραιώσης.

- Το χρησιμοποιούμενο θρεπτικό υπόστρωμα, όπως και η θερμοκρασία επώασης, δεν καλύπτει την ανάπτυξη όλων των μικροοργανισμών, αλλά του μεγαλύτερου μέρους τους.
- Απαιτείται ένα 48ωρο, τουλάχιστον, για την ένδειξη αποτελεσμάτων
- Μία αποικία είναι δυνατόν να προέρχεται από ένα μικροοργανισμό ή μια αλυσίδα ή συσσωμάτωμα μικροοργανισμών
- Δυνατότητα εξέτασης περιορισμένου αριθμού δειγμάτων
- Έχει υψηλό κόστος υλικών και εργασίας. [12]

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ

### 6.1. Γενικά

Ο έλεγχος των ουσιών που αναστέλλουν, ή αλλιώς παρεμποδίζουν, τη δράση των μικροοργανισμών (αντιμικροβιακοί παράγοντες) έχουν ξεχωριστή σημασία για το γάλα και τα γαλακτοκομικά του προϊόντα. Σε περίπτωση που ένα γάλα, που περιέχει αντιμικροβιακούς παράγοντες, χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή ζυμώμενων προϊόντων, θα παρεμποδιστεί η ανάπτυξη των καλλιιεργειών, έχοντας τις επακόλουθες αρνητικές συνέπειες.

Από τους ανασταλτικούς-αντιμικροβιακούς παράγοντες που μπορεί να βρεθούν στο γάλα, μερικοί υπάρχουν φυσιολογικά σε αυτό (φυσικοί μικροβιακοί παράγοντες), άλλοι εμφανίζονται όταν τα ζώα είναι ασθενή (αντισώματα) και άλλοι εντοπίζονται σε ουσίες που χορηγούνται στα ζώα και τελικά εκκρίνονται στο γάλα (αντιβιοτικά). Από τους παραπάνω ανασταλτικούς παράγοντες, ο έλεγχος των αντιβιοτικών έχει τη μεγαλύτερη σπουδαιότητα, αφενός επειδή πρόκειται για έναν εξωγενή παράγοντα που δεν καταστρέφεται με τη συνηθισμένη θερμική επεξεργασία που υπόκειται το γάλα (οι φυσιολογικά υπάρχουσες αντιμικροβιακές ουσίες, σε αντίθεση με τα αντιβιοτικά, καταστρέφονται με τη θερμική επεξεργασία) και αφετέρου επειδή δημιουργούν προβλήματα στα ζυμώμενα γαλακτοκομικά προϊόντα, προκαλούν αλλεργία σε ορισμένους ανθρώπους, αλλαγές στην εντερική χλωρίδα και συμβάλλουν στη δημιουργία ανθεκτικών παθογόνων. [4]

Ο προσδιορισμός των αντιβιοτικών στο γάλα γίνεται με διάφορες μεθόδους που θα μπορούσαν να διακριθούν σε φυσικοχημικές, μικροσκοποίου, μικροβιολογικές και ανοσοβιολογικές. Οι φυσικοχημικές μέθοδοι, όπως είναι οι χρωματογραφικές και οι

φωτομετρικές, βασίζονται σε διάφορες εξειδικευμένες αντιδράσεις των αντιβιοτικών, είναι περίπλοκες και παρουσιάζουν μικρή ευαισθησία. Η μέθοδος του μικροσκοπίου, που στηρίζεται σε μορφολογικές μεταβολές που υφίστανται τα μικροβιακά κύτταρα από τη δράση των αντιβιοτικών σε αυτά, είναι τεχνική ανίχνευσης των αντιβιοτικών. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των αντιβιοτικών με τη μέθοδο αυτή δεν είναι εύκολος. Αντίθετα, οι μικροβιολογικές και οι γρήγορες ανοσοβιολογικές μέθοδοι είναι αυτές που εφαρμόζονται στην πράξη.

Οι μικροβιολογικές μέθοδοι χρησιμοποιούν έναν ευαίσθητο στα αντιβιοτικά μικροοργανισμό, ο οποίος παρουσιάζει διαφορετικό βαθμό ευαισθησίας ανάλογα με το είδος του αντιβιοτικού. Ο πιο ευαίσθητος μικροοργανισμός στην πενικιλίνη είναι ο *Bacillus stearothermophilus* var. *Calidolactis* και ακολουθεί ο *Streptococcus thermophilus*. Πιο ευαίσθητος στη χλωραμφαινικόλη, χλωροτετρακυκλίνη, οξυτετρακυκλίνη και στις σουλφοναμίδες είναι ο *Streptococcus thermophilus*. Επίσης, ευαίσθητος στην χλωραμφαινικόλη και στις σουλφοναμίδες είναι ο *Bacillus megaterium*, ενώ στα μακρολίδια ο *Bacillus subtilis*. Οι μικροβιολογικές μέθοδοι διακρίνονται σε μεθόδους διάχυσης των αντιβιοτικών σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα και σε μεθόδους παρεμπόδισης της οξίνισης ή αλλαγής χρωματισμού ενός δείκτη pH σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα. [5]

## **6.2. Μέθοδοι διάχυσης των αντιβιοτικών σε στερεό υπόστρωμα**

### **6.2.1. Γενικά**

Οι μέθοδοι αυτές στηρίζονται στη διάχυση των αντιβιοτικών του γάλακτος μέσα σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα και στη δημιουργία ζωνών αναστολής ανάπτυξης των ευαίσθητων στα αντιβιοτικά μικροοργανισμών. Στις μεθόδους αυτές υπάγεται η μέθοδος των δίσκων και η μέθοδος των οπών όπου αντί το δείγμα του γάλακτος να βρίσκεται σε δίσκο απορροφητικού χαρτιού τοποθετείται μέσα σε φρεάτια και διαχέεται σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα. [5]

### **6.2.2. Μέθοδος Galesloot-Hassing ή των δίσκων σε τρυβλίο**

#### **Αρχή της μεθόδου**

Δίσκος απορροφητικού χαρτιού διαποτισμένος με το προς εξέταση γάλα τοποθετείται στην επιφάνεια του θρεπτικού υποστρώματος με άγαρ εμβολιασμένου με το *Bacillus stearothermophilus* var. *Calidolactis*. Επακολουθεί επώαση σε κλίβανο με θερμοκρασία 55°C/2,5h, η οποία οδηγεί στην ανάπτυξη του βακίλλου που προκαλεί το θόλωμα του στερεού

υποστρώματος. Η παρουσία αντιβιοτικών στο γάλα υποδηλώνεται από μιά διαυγή ζώνη >10mm χωρίς μικροβιακή ανάπτυξη γύρω από το δίσκο, λόγω διάχυσης στην περιοχή αυτή των αντιβιοτικών. Η διάμετρος της ζώνης εξαρτάται από τη συγκέντρωση και το είδος του αντιβιοτικού.

Είναι δυνατόν, κατά συνέπεια, να πραγματοποιηθεί με τη μέθοδο αυτή και ποσοτικός προσδιορισμός των αντιβιοτικών, υπό την προϋπόθεση ότι έχει προηγουμένως χαραχθεί πρότυπη καμπύλη με βάση τη διάμετρο των ζωνών ανασχεσης, που λαμβάνονται με γνωστές συγκεντρώσεις αντιβιοτικών. [14]

### **6.3. Μέθοδοι της παρεμπόδισης της οξίνισης και της μη αλλαγής χρωματισμού ενός δείκτη σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα**

#### **6.3.1. Γενικά**

Οι μέθοδοι αυτές στηρίζονται στην αρχή της αναστολής ανάπτυξης των ευαίσθητων στα αντιβιοτικά μικροοργανισμών και της παρεμπόδισης της οξίνισης και της μη αλλαγής χρωματισμού ενός δείκτη σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα.

#### **6.3.2. Μέθοδος Delvotest του Ολλανδικού οίκου Gist-Brocades BV**

##### **Αρχή της μεθόδου**

Στηρίζεται στην ευαισθησία που δείχνει ο *Bacillus stearothermophilus var. calidolactis* στα αντιβιοτικά και ιδιαίτερα στην πενικιλίνη (ευαισθησία της τάξης του 0,006 IU πενικιλίνης G/ml γάλακτος) κατά την ανάπτυξή του σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα, παρουσία χρωστικής πορφυρού της βρωμοκρεζόλης. Ένα αρνητικό αποτέλεσμα στα αντιβιοτικά εμφανίζεται με μια αλλαγή χρωματισμού από το ιώδες στο κίτρινο, ως αποτέλεσμα της οξίνισης από την ανάπτυξη του *Bacillus stearothermophilus var. calidolactis* στο θρεπτικό υπόστρωμα, κατά τη διάρκεια της επώασής του στους 64°C για 2,5 ώρες.

#### **6.3.3. Μέθοδος δοκιμαστικής πήξης του γιαουρτιού**

##### **Αρχή της μεθόδου**

Στηρίζεται στην ευαισθησία που δείχνουν τα βακτήρια του γιαουρτιού και ιδιαίτερα ο *Streptococcus thermophilus* στα αντιβιοτικά. Σύμφωνα με αυτήν, θα πρέπει να παρασκευαστεί από το δείγμα γάλακτος γιαούρτι. Ταυτόχρονα, παρασκευάζεται γιαούρτι και από γάλα που δεν περιέχει αντιβιοτικά (μάρτυρας) και γίνεται σύγκριση του χρόνου πήξης του γιαουρτιού στις δύο περιπτώσεις. Σε περίπτωση που καθυστερήσει, σημαντικά, η πήξη του δείγματος σε σύγκριση με το μάρτυρα, θεωρείται ότι περιέχει αντιβιοτικά.

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται ευρύτατα στη χώρα μας, επειδή είναι απλή στην εφαρμογή της.

#### **6.3.4. Μέθοδος αναγωγής του δείκτη T.T.C.**

##### **Αρχή της μεθόδου**

Κατά τη μέθοδο αυτή, ο ευαίσθητος στα αντιβιοτικά *Streptococcus thermophilus* εμβολιάζεται σε ορισμένη αναλογία στο εξεταζόμενο δείγμα γάλακτος. Η ανάπτυξή του, παρακολουθείται κατά την επώαση του δείγματος στους 45°C για 2,5 ώρες από την αλλαγή χρωματισμού του δείκτη T.T.C. που είναι αποτέλεσμα της αναγωγής του οξέος. Σε ευνοϊκές συνθήκες ανάπτυξης του μικροοργανισμού, ανάγεται η χρωστική και προσδίδει στο γάλα, που δεν περιέχει αντιβιοτικά, ένα ρόδινο χρωματισμό – Formasan. Αντίθετα, αν το γάλα περιέχει αντιβιοτικά ο *Streptococcus thermophilus* δεν αναπτύσσεται και ο λευκός χρωματισμός του γάλακτος διατηρείται.

#### **6.3.5. Μέθοδος οξίνισης**

##### **Αρχή της μεθόδου**

Κατά τη μέθοδο αυτή, ο ευαίσθητος στα αντιβιοτικά *Streptococcus thermophilus* εμβολιάζεται σε ορισμένη αναλογία (2%) στο εξεταζόμενο βρασμένο δείγμα γάλακτος. Η ανάπτυξή του παρακολουθείται κατά την επώαση του δείγματος στους 45°C για 2,5 ώρες, από την αλλαγή χρωματισμού του δείκτη πορφυρό της βρωμοκρεζόλης που είναι αποτέλεσμα της παραγωγής οξέος. Αν το γάλα περιέχει αντιβιοτικά, *Streptococcus thermophilus* δεν αναπτύσσεται και το πορφυρό χρώμα του γάλακτος με το δείκτη διατηρείται. Αντίθετα, αν το γάλα δεν περιέχει αντιβιοτικά ο *Streptococcus thermophilus* αναπτύσσεται και το χρώμα του γάλακτος, με το δείκτη, από πορφυρό (μωβ) αλλάζει σε κίτρινο, που σημαίνει ότι το pH του γάλακτος είναι  $\leq 5,2$ .

## 6.4. Ταχείες μέθοδοι προσδιορισμού των αντιβιοτικών

### 6.4.1. Μέθοδος του «άνοσο-υποδοχέα», που αποτελεί μια παραλλαγή του ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

#### Αρχή της μεθόδου

Είναι μια ανοσοβιολογική μέθοδος που βασίζεται στην αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος. Μια συγκεκριμένη ομάδα αντιβιοτικών δεσμεύεται από ακινητοποιημένα αντισώματα. Το σύμπλεγμα αντισώματος-αντιβιοτικού, συνήθως, συνδέεται με ένα ένζυμο που καταλύει ένα χρώμα ή μια αντίδραση φθορισμού. Η σύγκριση της έντασης του χρώματος ή φθορισμού με αυτήν ενός «μάρτυρα» προσδιορίζει αν το τεστ είναι θετικό ή αρνητικό. Χαμηλή ένταση, συνήθως, σημαίνει θετικό, ενώ μια υψηλή ένταση θεωρείται αρνητικό.

### 6.4.2. Το Penzym test (UCB Bioproducts, Belgium)

#### Αρχή της μεθόδου

Το τεστ αυτό ανιχνεύει αντιβιοτικά της ομάδας β-lactams, τα οποία έχουν στο μόριό τους β-λακταμικό δακτύλιο. Βασίζεται στην αρχή ότι τα αντιβιοτικά αυτά στο γάλα εμποδίζουν τη δραστηριότητα του ενζύμου D-αλανίνη-καρβοξυπεπτιδάση. Κατά τη διάρκεια του τεστ, εάν το δείγμα δεν περιέχει αντιβιοτικό, η δραστηριότητα της D-αλανίνη-καρβοξυπεπτιδάσης απελευθερώνει την D-αλανίνη από ένα συνθετικό υπόστρωμα, η οποία διαπιστώνεται με μια αλλαγή χρώματος ενός χρωμογόνου. Με την παρουσία αντιβιοτικού στο δείγμα, η D-αλανίνη δεν μπορεί να ελευθερωθεί και καμία αλλαγή χρωματισμού δε συμβαίνει.



ΕΙΚΟΝΑ 30. Penzym test

Πηγή: <http://www.bge.com.twpenzympenzym100.htm/>

### 6.4.3. Το beta STAR test (UCB Bioproducts, Belgium)

#### Γενικά

Η δοκιμή αυτή ανιχνεύει πενικιλίνες και κεφαλοσπορίνες σε χρονικό διάστημα 5 λεπτών, αν και επέκταση της επώασης σε 8 λεπτά κάνει το τεστ πιο ευαίσθητο.

#### Αρχή της μεθόδου

Περιλαμβάνει έναν ειδικό υποδοχέα β-lactam, συνδεδεμένο σε ψήγματα χρυσού. Το δείγμα γάλακτος προστίθεται σε ένα φιαλίδιο που περιέχει το λυοφιλωμένο υποδοχέα και προεπωάζεται στους 47,5°C για 3 λεπτά. Στη συνέχεια, εμβαπτίζεται η ανοσοχρωματική ταινία της δοκιμής (dipstick test) και συνεχίζεται η επώαση για 2 λεπτά. Στη δεύτερη φάση το διάλυμα μεταφέρεται στην ανοσοχρωματική ταινία μαζί με μια ερυθρή ζώνη μεταβλητής έντασης του υπό εξέταση δείγματος και η τελευταία συγκρίνεται οπτικά με την πρώτη. Αν η πρώτη ζώνη του υπό εξέταση δείγματος είναι πιο αδύνατη από τη ζώνη του «μάρτυρα» το αποτέλεσμα είναι θετικό, ενώ αν η ζώνη του «μάρτυρα» δώσει ισχυρότερη αντίδραση, το αποτέλεσμα είναι αρνητικό. [5]



ΕΙΚΟΝΑ 31. beta STAR test

Πηγή: [http:// www.atropos.gr](http://www.atropos.gr)

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΜΑΣΤΙΤΙΔΑΣ

### 7.1. Γενικά

Η μαστίτιδα είναι η συχνότερη πάθηση του μαστού του ζώου και οφείλεται στην προσβολή του μαστού από παθογόνους μικροοργανισμούς, με εμφανείς ή μη εμφανείς συνέπειες στην όψη του. Η σοβαρότερη συνέπεια είναι η απώλεια της γαλακτοπαραγωγής, επειδή ο ιστός που παράγει το γάλα καταστρέφεται από τη μόλυνση, και η αλλοίωση της συνθεσης του παραγόμενου γάλακτος. Σε πολλές περιπτώσεις, η μείωση της γαλακτοπαραγωγής μπορεί

ναφτάσει και το 50%. Είναι, ακόμα, πιθανό να παρατηρηθεί και σημαντική απώλεια βάρους του ζώου που μπορεί να κυμανθεί μεταξύ 7-12,5%. Η μαστίτιδα προκαλεί μείωση της γονιμότητας στα ζώα και αναβολή της έναρξης της περιόδου αναπαραγωγής τους. Αποτελέσματα ερευνών, έδειξαν πως τα αυξημένα επίπεδα ανασυνδυασμένης αυξητικής ορμόνης στις αγελάδες οδηγούν με τη σειρά τους σε αυξημένα ποσοστ μαστίτιδας. Για την αντιμετώπισή της απαιτούνται αυξημένες ποσότητες αντιβιοτικών που έχουν με τη σειρά τους ως αποτέλεσμα περισσότερα κατάλοιπα αντιβιοτικών στο παραγόμενο γάλα. Το μαστιτικό γάλα περιέχει αυξημένα, επίσης, ποσοστά λιπολυτικών και πρωτεολυτικών ενζύμων που κατά την παραγωγή τυριού έχουν αρνητική επίδραση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος.

Δεν είναι, βέβαια, μόνο αυτές οι αρνητικές συνέπειες της μαστίτιδας. Με την προσβολή και των τραυματισμό των κυττάρων, αυξάνεται ο αριθμός των σωματικών κυττάρων για την αντιμετώπιση και εξουδετέρωση του παθογόνου παράγοντα. Μερικά από τα κύτταρα αυτά μεταφέρονται στο γάλα έχοντας ως άμεση συνέπεια την αύξηση των σωματικών κυττάρων στο γάλα των προσβεβλημένων ζώων από μαστίτιδα. το επίπεδο αυτών των κυττάρων έχει μεγάλη σημασία στην ανάκτηση των βασικών συστατικών του γάλακτος.

Τα σωματικά κύτταρα, λοιπόν, εκτός του ότι μεταβάλλουν τη σύνθεση του γάλακτος, μειώνουν, επίσης, και τη θρεπτική του αξία. Η λακτόζη μειώνεται από 5-20%, η συνολική περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες μειώνεται ελάχιστα, γιατί αυξάνονται οι υδατοδιαλυτές, ενώ η καζεΐνη ελαττώνεται από 6-18%. Σημαντική αύξηση παρατηρείται στα χλωριούχα άλατα, ενώ το pH μπορεί να γίνει μεγαλύτερο του 7,0. Κατά συνέπεια, το μαστιτικό γάλα δεν είναι κατάλληλο για την παρασκευή γαλακτοκομικών προϊόντων, καθώς δημιουργούνται προβλήματα στη θερμική επεξεργασία, πηζοντας το γάλα με την παστερίωση, οι αποδόσεις σε τυρί είναι μικρότερες, εξαιτίας της χαμηλής περιεκτικότητας σε καζεΐνη, την αυξημένη πρωτεόλυση της καζεΐνης και υδρόλυσης του λίπους και περιέχει αυξημένα ποσοστά σε κάλιο και χλώριο που επιμηκώνουν το χρόνο πήξης του γάλακτος. [3]

## **7.2. Τεχνικές προσδιορισμού μαστίτιδας**

### **7.2.1. Γενικά**

Υπάρχουν πολλές μέθοδοι για τη διάγνωση των μαστίτιδων, οι οποίες στηρίζονται στις αλλαγές της σύστασης του γάλακτος όπως η αρίθμηση των σωματικών κυττάρων στο γάλα, η



περιεκτικότητα του γάλακτος σε χλώριο και ιδιαίτερα η σχέση χλωρίου προς λακτόζη, η ηλεκτρική αγωγιμότητα του γάλακτος, ο προσδιορισμός του pH του γάλακτος κ.ά..

Ο προσδιορισμός του αριθμού των σωματικών κυττάρων στο γάλα θεωρείται η πιο αξιόπιστη τεχνική για τη διάγνωση. Οι τεχνικές προσδιορισμού που χρησιμοποιούνται είναι η άμεση μικροσκοπική μέτρηση των σωματικών κυττάρων (Microscopic count of somatic cells), η αυτοματοποιημένη γρήγορη φθορισμο-οπτικο-ηλεκτρική μέθοδος (Fluoro-Opti-Electronic method) και η δοκιμή της Καλιφόρνιας. Η μέθοδος του μικροσκοπίου είναι η μέθοδος αναφοράς και προτεινόμενη μέθοδος της Διεθνούς Ομοσπονδίας Γάλακτος. [13] Βασίζεται στη χρώση του πυρήνα των σωματικών κυττάρων με κυανού του μεθυλενίου και στην καταμέτρησή τους με μικροσκόπιο. Η μέθοδος αυτή είναι χρονοβόρα, προσφέρεται για μικρό αριθμό δειγμάτων και απαιτεί μεγάλη εμπειρία κατά την εκτέλεσή της. Επίσης, προτεινόμενη μέθοδος της IDF είναι η αυτοματοποιημένη γρήγορη φθορισμο-οπτικο-ηλεκτρική μέθοδος, που βασίζεται στη χρώση του DNA του πυρήνα των σωματικών κυττάρων με φθορίζουσα χρωστική (βρωμιούχο αιθύλιο), σε υπεριώδες φως. Η μέθοδος αυτή, εφαρμόζεται από τις πιο μεγάλες βιομηχανίες με τη χρήση σύγχρονων συσκευών, όπως η συσκευή Fossomatic. Η απόδοση της συσκευής αυτής είναι 180 δείγματα/h. Στις κτημοτροφικές εκμεταλλεύσεις και στις μικρές μονάδες μεταποίησης του γάλακτος εφαρμόζεται η δοκιμή της Καλιφόρνιας. [5]

### **7.2.2. Δοκιμή της Καλιφόρνιας (California Mastitis Test –CMT) ή δοκιμή Schalm**

Επιτρέπει την εκτίμηση των σωματικών κυττάρων στα δείγματα γάλακτος στο σύνολο της γαλακτοπαραγωγής ή στα δείγματα γάλακτος σε κάθε τεταρτημόριο του μαστού της αγελάδας χωριστά. Είναι απλή και έμμεση μέθοδος ανάλυσης, η οποία παραγματοποιείται κυρίως στον στάβλο.

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος στηρίζεται στην τάση του ανιονικού αντιδραστηρίου Alkyl aryl sulfonate με δείκτη πορφυρής βρωμοκρεζόλης να πήζει το γάλα όταν αυτό περιέχει σωματικά κύτταρα. Ο βαθμός πήξης είναι ανάλογος του αριθμού των σωματικών κυττάρων που περιέχονται σε αυτό. Επίσης, η χρήση αυτού του δείκτη μας βοηθά να εκτιμήσουμε το pH του γάλακτος. Χρώμα μωβ σημαίνει ότι το pH είναι ίσο ή μεγαλύτερο του 6,8. Η αντίδραση γίνεται σε ένα πλαστικό δίσκο

που έχει 4 μικρά φρεάτια, τα οποία επιτρέπουν να εφαρμοστεί και στο στάβλο για τον έλεγχο των 4 τετάρτων του μαστού. [11]

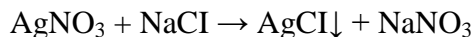
### 7.2.3. Προσδιορισμός χλώριου

#### 7.2.3.1. Γενικά

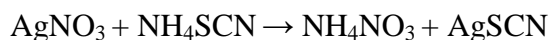
Το χλώριο του φυσιολογικού γάλακτος κυμαίνεται από 0,07-0,1%. Στο γάλα που προέρχεται από μαστό ζώου που έχει προσβληθεί από μαστίτιδα, παρατηρείται αύξηση της περιεκτικότητάς του σε χλώριο και αντιστοιχεί πτώση της περιεκτικότητάς τους σε λακτόζη. Αυτό γίνεται για να διατηρηθεί σταθερή η ωσμωτική πίεση. Όταν η περιεκτικότητα του γάλακτος σε χλώριο είναι μεγαλύτερη από 0,14%, αποτελεί κριτήριο ότι προέρχεται από ζώο προσβεβλημένο από μαστίτιδα. Ως κριτήριο για την ύπαρξη μαστίτιδας μπορεί να χρησιμοποιηθεί και η σχέση: (% χλώριο × 100)/% λακτόζη. Η τιμή σε ένα φυσιολογικό γάλα είναι μικρότερη του 3. Σε αντίθετη περίπτωση το γάλα κρίνεται μαστιτικό (αριθμός Koestler).

#### 7.2.3.2. Μέθοδος Davis

Στη μέθοδο αυτή η οργανική ουσία του γάλακτος καταστρέφεται με  $\text{KMnO}_4$  και πυκνό  $\text{HNO}_3$ . Το χλώριο του γάλακτος αντιδρά με  $\text{AgNO}_3$  που προστίθεται με περίσσεια και σχηματίζει ίζημα  $\text{AgCl}$  κατά την αντίδραση:



Το όξινο περιβάλλον παρεμποδίζει τη δημιουργία αλάτων αργύρου με άλλα ανιόντα. Η περίσσεια του νιτρικού αργύρου τιτλοδοτείται, στη συνέχεια, μεθειοκυανιούχο αμμώνιο, οπότε γίνεται η αντίδραση:



Με τη μέθοδο αυτή υπολογίζεται έμμεσα το χλώριο του γάλακτος. [5]

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8. ΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 8.1. Προσδιορισμός του λίπους

#### 8.1.1. Γενικά

Το λίπος είναι από τα πιο ενδιαφέροντα συστατικά τους γάλακτος. Από διαιτητικής άποψης αποτελεί σημαντική πηγή ενέργειας, είναι φορέας των λιποδιαλυτών βιταμινών A, D, E και K και περιέχει αξιόλογη ποσότητα απαραίτητων λιπαρών οξέων. Ο πιο σημαντικός ρόλος του λίπους του γάλακτος αφορά στη διαμόρφωση του αρώματος των γαλακτοκομικών του προϊόντων. Το πλούσιο και ευχάριστο αρώμα του είναι ασυναγώνιστο από οποιοδήποτε άλλο είδος λίπους. Στο γάλα από διάφορα είδη ζώων παρατηρούνται μεγάλες διαφορές σε ότι αφορά

την λιποπεριεκτικότητα. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται η λιποπεριεκτικότητα σε διάφορα είδη ζώων.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4. Λιποπεριεκτικότητα γάλακτος από διάφορα είδη ζώων

<b>ΕΙΔΟΣ</b>	<b>ΛΙΠΟΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ g/l<sup>t</sup></b>
ΑΓΕΛΑΔΑΣ	33-47
ΒΟΥΒΑΛΟΥ	47
ΠΡΟΒΑΤΟΥ	40-99
ΓΙΔΑΣ	4-45
ΓΥΝΑΙΚΑΣ	38

Το λίπος του γάλακτος αποτελείται, σχεδόν αποκλειστικά, από τριγλυκερίδια. Τα τριγλυκερίδια αποτελούν, σε όλα τα είδη γάλακτος, τη βασικότερη κατηγορία λιπιδίων και καταλαμβάνουν το 97-98% των ολικών λιπιδίων.

Ο προσδιορισμός του λίπους είναι πολύ σημαντικός στη βιομηχανία γάλακτος για τους εξής λόγους:

- Βάσει του ποσοστού του στο γάλα πληρώνονται οι παραγωγοί,
- Παίζει καθοριστικό ρόλο στην απόδοση του γάλακτος σε τυρί,
- Ελέγχεται αν έχει, τυχόν, νοθεία στο γάλα με αφαίρεση λίπους ή/και προσθήκη,
- Και συμβάλλει στην τυποποίηση του γάλακτος, καθώς, αυτή είναι απαραίτητη πριν την τυροκόμηση, ώστε το τελικό προϊόν να είναι σύμφωνο με τα κατάλληλα επίπεδα σε λίπος.

Από τις πιο συνηθισμένες μορφές νοθείας του γάλακτος είναι με την αφαίρεση λίπους. Η αφαίρεση λίπους μειώνει την λιποπεριεκτικότητα, το ξηρό υπόλειμμα και το λίπος επί ξηρού του γάλακτος, αυξάνει το ειδικό βάρος, ενώ δεν μεταβάλλει σημαντικά το ξηρό υπόλειμμα άνευ λίπους και το σημείο πήξεως. [1]

## 8.1.2. Προσδιορισμός λίπους με ογκομετρικές μεθόδους

### 8.1.2.1 Γενικά

Οι ογκομετρικές μέθοδοι παρουσιάζουν το πλεονέκτημα ότι δεν είναι χρονοβόρες και είναι εύκολες στην εφαρμογή τους. Για το λόγο αυτό εφαρμόζονται ως μέθοδοι ρουτίνας από τις γαλακτοβιομηχανίες και ιδιαίτερα σε αυτές μικρής δυναμικότητας, που χρειάζονται στοιχεία για τη λιποπεριεκτικότητα του γάλακτος σε σύντομο χρονικό διάστημα. Οι πιο γνωστές μέθοδοι είναι η μέθοδος Gerber που είναι περισσότερο διαδεδομένη στην Ευρώπη και η μέθοδος Babcock που είναι διαδεδομένη στις ΗΠΑ.

### 8.1.2.2. Μέθοδος Gerber

Αρχή της μεθόδου

Όταν στο βουτυρόμετρο προστεθεί γάλα και μετά θειικό οξύ ειδικού βάρους 1,82, τότε όλα τα συστατικά του γάλακτος εκτός του λίπους διαλύονται και εκλύεται θερμότητα η οποία ρευστοποιεί το λίπος που παραμένει αιωρούμενο μέσα στο οξύ, από το οποίο διαχωρίζεται με φυγοκέντρηση. Ο διαχωρισμός του λίπους διευκολύνεται με την προσθήκη μικρής ποσότητας ισοαμυλικής αλκοόλης. Ο υπολογισμός της λιποπεριεκτικότητας του γάλακτος γίνεται με ανάγνωση στην ειδικά βαθμολογημένη κλίμακα του βουτυρόμετρου.



ΕΙΚΟΝΑ 32. Επιτραπέζια συσκευή φυγοκέντρησης με τη μέθοδο Gerber

Πηγή: <http://www.progensci.co.uk/>

### 8.1.2.3. Μέθοδος Babcock

Αρχή της μεθόδου

Στηρίζεται στην ίδια αρχή με την Gerber. Διαφέρει, όμως, στο είδος του βουτυρόμετρου, την ποσότητα του γάλακτος και του θειικού οξέος και στη θερμοκρασία μέτρησης του λίπους.



ΕΙΚΟΝΑ 33. Βουτυρόμετρο Babcock

### **8.1.3. Προσδιορισμός λίπους με σταθμικές μεθόδους**

#### **8.1.3.1. Γενικά**

Οι σταθμικές μέθοδοι βασίζονται στην ανάκτηση του λίπους από το γάλα, μετά από μια διαδικασία εκχύλισης του. Ξεκινούν από ένα ορισμένο βάρος γάλακτος και καταλήγουν σε ένα βάρος λίπους. Οι μέθοδοι αυτοί είναι μεγάλης ακρίβειας και χρησιμοποιούνται ως μέθοδοι αναφοράς, απαιτούν πολύ χρόνο, πράγμα που τις κάνει δύσχρηστες στην κατηγορία των σταθμικών μεθόδων ανήκει η μέθοδος Rose-Gottlied (RG), η μέθοδος Mojonnier και η μέθοδος Schmid-Bondzynski-ratzlaff (SBR). [5]

#### **8.1.3.2. Μέθοδος Rose-Gottlied**

##### **Αρχή της μεθόδου**

Γίνεται εκχύλιση του λίπους μιας ποσότητας γάλακτος (10 ml), με διαιθυλεθέρα και πετρελαϊκό αιθέρα. Επειδή τα λιποσφαιρίδια του γάλακτος φέρουν εξωτερικά προστατευτική μεμβράνη που εμποδίζει την ανάμειξη τους με τον αιθέρα, χρησιμοποιείται αφενός η αμμωνία για τη διάσπαση της μεμβράνης των λιποσφαιρίων, αφετέρου η αλκοόλη για τη διευκόλυνση της εισόδου του λίπους από την υδατή φάση που βρίσκεται στο γάλα, στη φάση των οργανικών διαλυτών. Στη συνέχεια, γίνεται απομάκρυνση των διαλυτών με απόσταξη ή εξάτμιση, ζυγίζεται το λίπος και προσδιορίζεται % η μάζα του εκχυλισθέντος λίπους στους αιθέρες. [18]

### 8.1.3.3. Μέθοδος Mojonnier

Αποτελεί τροποποίηση της μεθόδου Rose-Gottfried και βασίζεται στην ίδια αρχή. Με τη μέθοδο αυτή προβλέπεται η χρήση ειδικής φιάλης. Με τη φιάλη αυτή ελαττώνεται ο χρόνος των αναλύσεων λόγω της χρήσης φυγόκεντρου για το διαχωρισμό των δύο φάσεων. Η προσθήκη αιθανόλης πριν τη δεύτερη εκχύλιση βελτιώνει ξεκάθαρα την ακρίβεια της μεθόδου και οδηγεί στη μείωση της πιθανότητας δημιουργίας παχύρρευστου ή ζελατινοποιημένου υδάτινου στρώματος, ειδικά στην περίπτωση προϊόντων που περιέχουν σακχαρόζη (π.χ. ζαχαρούχο συμπυκνωμένο γάλα, παγωτά γάλακτος). [19]



ΕΙΚΟΝΑ 34. Φιάλη Mojonnier

Πηγή: [http:// www.jaytecglass.co.uk/](http://www.jaytecglass.co.uk/)

### 8.1.3.4. Μέθοδος Schmid-Bondzynski-ratzlaff (SBR)

Γενικά

Αποτελεί, επίσης, τροποποίηση της γνωστής μεθόδου Rose-Gottfried, η οποία περιλαμβάνει πέψη της οργανικής ουσίας του γάλακτος με υδρολυτικά οξέα.

Αρχή της μεθόδου

Σε μία ποσότητα δείγματος προστίθεται, αρχικά, υδροχλωρικό οξύ και στη συνέχεια αιθανόλη. Το διάλυμα οξέος-αιθανόλης αποστάζεται κατόπιν με διαιθυλεθέρα και πετρελαϊκό αιθέρα και απομακρύνονται οι διαλύτες με απόσταξη ή εξάτμιση. Η μάζα των ουσιών που απομένουν, μετά την απομάκρυνση των διαλυτών, προσδιορίζεται ως μάζα του λίπους και εκφράζεται %.

#### **8.1.4. Προσδιορισμός λίπους με αυτοματοποιημένες μεθόδους**

##### **8.1.4.1. Γενικά**

Οι ανάγκες της σύγχρονης τεχνολογίας γάλακτος για μείωση του κόστους και του χρόνου ανάλυσης μαζί με την αναζήτηση βελτίωσης της επαναληψιμότητας οδήγησαν στη διαμόρφωση αυτοματοποιημένων συσκευών που προσδιορίζουν το λίπος του γάλακτος. Αξίζει να αναφερθεί ότι οι αυτόματες αυτές συσκευές ρυθμίζονται με βάση τα αποτελέσματα αναλύσεων με κλασικές μεθόδους αναφοράς και κατά τακτά διαστήματα επιβάλλεται να γίνεται έλεγχος της πιστότητας τους. [5]

##### **8.1.4.2. Προσδιορισμός λίπους με νεφελόμετρα**

Αρχή της μεθόδου

Η αρχή λειτουργίας της αυτοματοποιημένης συσκευής νεφελομετρίας βασίζεται στην ιδιότητα των λιποσφαιρίων του γάλακτος να διαχέουν το φως ανάλογα με τον αριθμό τους στο δείγμα. Η μέτρηση γίνεται σε μια κυψελίδα που είναι τοποθετημένη μεταξύ μιας φωτεινής πηγής και ενός φωτοκυττάρου. Έπειτα, οι ενδείξεις αυτές μεταβιβάζονται με τη βοήθεια ενός γαλβανομέτρου στην κλίμακα της συσκευής, ο δείκτης της οποίας δίνει απευθείας τη λιποπεριεκτικότητα του γάλακτος επί τοις εκατό.

Για να πραγματοποιηθεί ο προσδιορισμός του λίπους απαιτείται θέρμανση του γάλακτος και κατόπιν ομογενοποίησή του. Στη συνέχεια, μια ποσότητα ομογενοποιημένου γάλακτος αναμιγνύεται με ένα ειδικό διάλυμα το οποίο καταστρέφει τις πρωτεΐνες για να μην παρεμβληθούν στον προσδιορισμό. Υπάρχουν διάφοροι εμπορικοί τύποι αυτοματοποιημένων συσκευών που η λειτουργία τους στηρίζεται στη μέθοδο αυτή (Milko-Tester, Milk-Checker, Anritsu-Milk) και έχουν δυνατότητα αναλύσεως από 80-120 δείγματα ανά ώρα.



ΕΙΚΟΝΑ 35. Αυτοματοποιημένη συσκευή Milko-Tester

Πηγή: <http://www.dairyplantequipment.in/>



ΕΙΚΟΝΑ 36. Αυτοματοποιημένη συσκευή Milk Checker

Πηγή: <http://www.hyserve.com/>



ΕΙΚΟΝΑ 37. Αυτοματοποιημένη συσκευή Anritsu-Milk

Πηγή: <http://www.alibaba.com/>



### 7.1.4.3. Προσδιορισμός λίπους με αυτοματοποιημένη μέθοδο υπέρυθρης φασματοσκοπίας

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται, γενικότερα, για τον προσδιορισμό των κυριότερων συστατικών του γάλακτος. Βασίζεται στο γεγονός ότι τα κύρια συστατικά έχουν χαρακτηριστικές ομάδες που απορροφούν σε συγκεκριμένα μήκη κύματος. Μεταξύ πηγής υπέρυθρων ακτίνων και δείγματος γάλακτος υπάρχει ένα περιστρεφόμενο εξάρτημα με φίλτρα που επιτρέπει να περνά το κατάλληλο, κάθε φορά, μήκος κύματος για κάθε συστατικό. Το λίπος απορροφά ενέργεια στο δεσμό C=O του τριγλυκεριδίου, σε μήκος κύματος 5,73 μm της υπέρυθρης ακτινοβολίας. Η ενέργεια που ανιχνεύεται, ενισχύεται και μετά από μικροπολογιστική επεξεργασία μετατρέπεται σε ψηφιακή ένδειξη. Η σχέση που συνδέει την ενέργεια που απορροφάται από το δείγμα γάλακτος και τη συγκέντρωση του συστατικού που προσδιορίζεται, ορίζεται από το νόμο του Lambert-Beer, ο οποίος εκφράζεται μαθηματικά από τον ακόλουθο τύπο:

$$A = e \cdot I \cdot c = \log I_0/I$$

Όπου,

A = Απορρόφηση (absorption)

e = Συντελεστής απόσβεσης (extinction coefficient)

I = Μήκος κυψελίδας (cell length)

c = Μοριακή συγκέντρωση (concentration of the solute)

$I_0$  = Ένταση προσπίπτουσας ακτινοβολίας

I = Ένταση εξερχόμενης ακτινοβολίας μετά τη διέλευση της μέσα από το δείγμα.

Υπάρχουν διάφοροι εμπορικοί τύποι αυτοματοποιημένων συσκευών που η λειτουργία τους στηρίζεται στη μέθοδο υπέρυθρης φασματοσκοπίας, όπως Milko-Scan, Multispec, Infr-red Milk Analyzer (IRMA). [17]



ΕΙΚΟΝΑ 38. Συσκευή Multispec

Πηγή: <http://www.scientific-equipment.com>



ΕΙΚΟΝΑ 39. Infr-red Milk Analyzer (IRMA)

Πηγή: <http://www.metroninstruments.com/>

## 8.2. Προσδιορισμός της λακτόζης

### 8.2.1. Γενικά

Η λακτόζη είναι, πρακτικά, ο μόνος υδατάνθρακας που υπάρχει στο γάλα. Είναι δισακχαρίτης που σχηματίζεται από την ένωση ενός μορίου D-γλυκόζης και ενός μορίου D-γαλακτόζης. Το κανονικό γάλα περιέχει, συνήθως, 4,4-5,2% και κτά μέσο όρο 4,8% λακτόζη, που αντιπροσωπεύει το 50-52% των στερεών συστατικών του άπαχου γάλακτος. Με τον όρο περιεκτικότητα σε λακτόζη νοείται το επί τοις εκατό ποσοστό της μόνυδρης λακτόζης εκφρασμένο κατά βάρος. Είναι το κυριότερο συστατικό του άνευ λίπους ξηρού υπολείμματος. Στον ΠΙΝΑΚΑ 5. αναφέρεται η περιεκτικότητά της σε διάφορα είδη ζώων.

ΠΙΝΑΚΑΣ 5. Περιεκτικότητα λακτόζης σε διάφορα είδη ζώων. [1]

ΕΙΔΗ ΖΩΩΝ	ΛΑΚΤΟΖΗ	ΛΙΠΟΣ	ΠΡΩΤΕΙΝΗ
ΕΛΕΦΑΝΤΑΣ	7,4	22,1	3,2
ΧΙΜΠΑΝΤΖΗΣ	7,0	3,7	1,2
ΑΝΘΡΩΠΟΣ	6,5	4,0	1,3
ΑΛΟΓΟ	6,2	1,6	2,7
ΠΡΟΒΑΤΟ	4,6	9,0	4,7
ΖΕΒΡΑ	5,3	4,8	3,0
ΚΑΜΗΛΑ	5,1	5,4	3,8
ΓΟΥΡΟΥΝΙ	5,0	5,0	3,7
ΓΑΤΑ	4,9	5,0	7,2
ΑΓΕΛΑΔΑ	4,8	3,7	3,3
ΚΑΓΚΟΥΡΟ	4,7	4,0	3,9
ΚΑΤΣΙΚΑ	4,2	4,1	3,7
ΣΚΥΛΟΣ	3,3	11,8	8,7
ΠΟΛΙΚΗ ΑΡΚΟΥΔΑ	3,0	9,5	9,6
ΓΚΡΙ ΦΩΚΙΑ	2,6	53,2	11,2
ΚΑΣΤΟΡΑΣ	2,2	19,8	9,0
ΛΑΓΟΣ	2,0	10,5	15,5
ΔΕΛΦΙΝΙ	0,9	34,9	10,6

Η παρουσία της λακτόζης στο γάλα και στα προϊόντα του παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον επειδή:

- Είναι πρωταρχικός παράγοντας στον έλεγχο των ζυμώσεων σε διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα,
- Προσδίδει θρεπτική αξία στο γάλα και στα γαλακτοκομικά του προϊόντα,
- Η γεύση και η διαλυτότητα αποθηκευμένων γαλακτοκομικών προϊόντων επηρεάζονται από αυτήν,
- Παίζει βασικό ρόλο στην εμφάνιση του χρώματος και της γεύσης στα υπερθερμασμένα γαλακτοκομικά προϊόντα και
- Για τον άνθρωπο και αρκετά ζώα δεν αποτελεί μόνο πηγή ενέργειας αλλά και πηγή γαλακτόζης, βασικό συστατικό των νευρικών ιστών.[1]

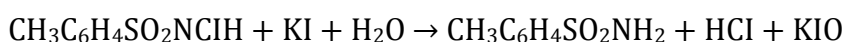
### 8.2.2. Προσδιορισμός της λακτόζης με οξειδοαναγωγική ή ιωδιομετρική μέθοδο

Η μέθοδος εφαρμόζεται στο νοπό γάλα.

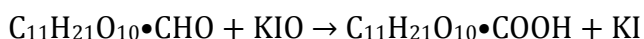
Αρχή της μεθόδου

Μετά την αποπρωτεϊνοποίηση (απομάκρυνση των πρωτεϊνών) του γάλακτος, η περιεκτικότητα αυτού σε λακτόζη υπολογίζεται έμμεσα με ογκομετρικό προσδιορισμό του ιωδίου με διάλυμα θειοθειικού νατρίου, μετά την αντίδραση λακτόζης και χλωραμίνης T-ιωδιούχου καλίου. Αναλυτικά οι αντιδράσεις είναι:

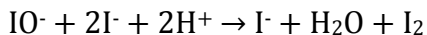
- Οξείδωση του KI σε KIO (υποϊωδιούχο κάλιο) από τη χλωραμίνη-T:



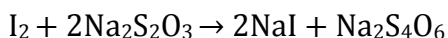
- Οξείδωση της λακτόζης σε λακτοβιονικό οξύ:



- Οξείδωση του υποϊωδίου σε ιώδιο:



- Το I<sub>2</sub> τιτλοδοτείται με διάλυμα θειοθειικού νατρίου (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>):



### 8.2.3. Προσδιορισμός λακτόζης με υπέρυθρη φασματοσκοπία

Αρχή της μεθόδου

Η λακτόζη απορροφά ενέργεια σε μήκος κύματος 9,55 μm της υπέρυθρης ακτινοβολίας στο δεσμό C-OH. [5]

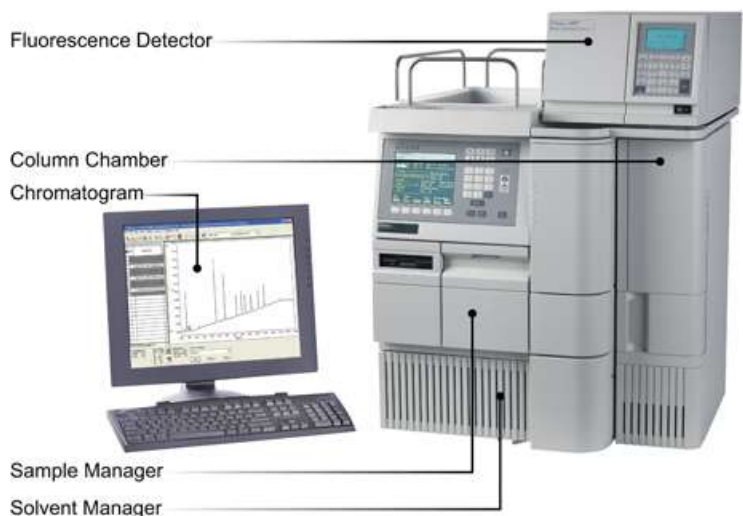
### 8.2.4. Προσδιορισμός της λακτόζης με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης.

Η μέθοδος εφαρμόζεται σε νωπό και θερμικά επεξεργασμένο γάλα, καθώς και σε σκόνη γάλακτος.

Αρχή της μεθόδου

Η ανίχνευση και ο προσδιορισμός της λακτόζης στο γάλα γίνεται με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Σε ορισμένο βάρος γάλακτος, καθώς και σε πρότυπα διαλύματα λακτόζης προστίθεται ως εσωτερικό πρότυπο η D(+) μελεζιτόλη. Στη συνέχεια, προστίθεται το αντιδραστήριο Biggs-Szjarto για την κατακρήμνιση του λίπους και των πρωτεϊνών του γάλακτος. Το δείγμα φιλτράρεται, καταρχήν, με χάρτινο φίλτρο και κατόπιν

με νάυλον φίλτρο σύριγγος πορώδους 0,45μm. Η λακτόζη και το εσωτερικό πρότυπο διαχωρίζονται σε στήλη ιοντοαλλαγής και προσδιορίζονται με διαφορικό διαθλασίμετρο ή άλλο κατάλληλο ανιχνευτή. Ως κινητή φάση χρησιμοποιείται υπερ-καθαρό νερό κατάλληλο για HPLC. [20]



ΕΙΚΟΝΑ 40. Συσκευή υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)

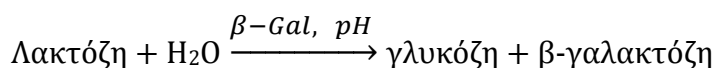
Πηγή: [http:// www.waters.com](http://www.waters.com)

### 8.2.5. Ενζυμικός προσδιορισμός της λακτόζης

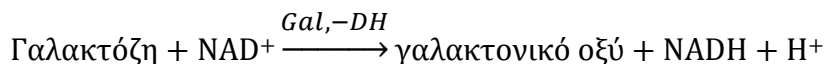
Ο ενζυμικός προσδιορισμός της λακτόζης είναι μια πολύ ευαίσθητη μέθοδος, μάλλον ακριβή, ιδιαίτερα όταν εφαρμόζεται σε μικρό αριθμό δειγμάτων.

Αρχή της μεθόδου

Η λακτόζη που υπάρχει στο διήθημα, μετά την απομάκρυνση των πρωτεϊνών και του λίπους του γάλακτος με διήθηση υδρολύεται σε γλυκόζη παρουσία του ενζύμου β-γαλακτοζιδάση (β-Gal) ως εξής:



Η γαλακτόζη, στη συνέχεια, οξειδώνεται παρουσία της γαλακτοζο-αφυδρογονάσης (Gal-DH) προς γαλακτονικό οξύ ως εξής:



Το NADH που παράγεται προσδιορίζεται φωτομετρικά με αύξηση της απορρόφηση στα 340 ή 365 nm, που είναι ανάλογη με την ποσότητα της β-γαλακτόζης.

### 8.2.6. Φωτομετρικός προσδιορισμός της λακτόζης

Αρχή της μεθόδου

Η λακτόζη αντιδρά εν βρασμό με φαινόλη σε ισχυρά όξινη διάλυση με θειικό οξύ και σχηματίζει πορτοκαλί σύμπλοκο, το οποίο προσδιορίζεται φωτομετρικά στα 490 nm. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της λακτόζης γίνεται με τη βοήθεια ειδικής πρότυπης καμπύλης που χαράσσεται με βάση διαφορές συγκεντρώσεις διαλυμάτων λακτόζης. [5]

## 8.3. Προσδιορισμός των πρωτεϊνών

### 8.3.1. Γενικά

Οι πρωτεΐνες του γάλακτος διακρίνονται σε δύο, κυρίως, κατηγορίες, τις καζεΐνες, που καλύπτουν το 80% των συνολικών πρωτεϊνών του γάλακτος, και τις πρωτεΐνες ορού, που καλύπτουν αντίστοιχα το υπόλοιπο 20%. Οι καζεΐνες κατακρημνίζονται σε θερμοκρασία 20°C και σε pH 4, δεν επηρεάζονται σημαντικά από την θερμοκρασία, συντίθενται στο μαστό και είναι φωσφοροπρωτεΐνες. Αντίθετα, οι πρωτεΐνες ορού δεν κατακρημνίζονται, είναι θερμοευαίσθητες και μερικές από αυτές συντίθενται στο μαστό και άλλες υπάρχουν στο αίμα, όπου διαμέσου του μαστού μεταφέρονται στο γάλα.

Οι πρωτεΐνες του γάλακτος απαντούν σε υψηλή αναλογία σε αυτό, προσδιορίζουν σε μεγάλο βαθμό τις φυσικοχημικές του ιδιότητες, ειδικότερα σε αυτές που σχετίζονται με την σταθερότητά του, και θεωρούνται από τα πιο σημαντικά θρεπτικά συστατικά του.

Εκτός από τις παραπάνω δύο κατηγορίες έχει διαπιστωθεί ότι το γάλα περιέχει πολλές ανόμοιες πρωτεΐνες οι οποίες κατατάσσονται, ανάλογα με την συμπεριφορά τους στα διάφορα μέσα καθίζησης, σε καζεΐνη, γαλακταλβουμίνη, γαλακτοβουλίνη, και πρωτεόζες-πεπτόνες. Οι πρωτεΐνες αυτές δεν είναι ομοιογενείς.

Θα πρέπει, επιπρόσθετα, να τονισθεί πως από άποψη τυροκομίας ενδιαφέρον παρουσιάζουν, κατά σειρά, η καζεΐνη, η γαλακταλβουμίνη και η γαλακτογλοβουλίνη. Η πρώτη,

γιατί αποτελεί βασικό συστατικό των τυριών, και οι άλλες δύο, γιατί είναι δυνατό να ληφθούν από το τυρόγαλα μετά από οξίνιση και θέρμανση του και να παρασκευασθούν διάφοροι ειδικοί τύποι τυριών, όπως είναι η μυζήθρα και το μανούρι. [1]

Επιπλέον, οι πρωτεΐνες έχουν φυσικές και χημικές ιδιότητες, μερικές από τις οποίες αποτέλεσαν αντικείμενο ανάπτυξης μεθόδων προσδιορισμού τους. Το γάλα, εκτός από τις πρωτεΐνες, περιέχει και άλλες αζωτούχες ενώσεις, οργανικές και ανόργανες, που προσδιορίζονται συγχρόνως με τις πρωτεΐνες σε αρκετές από τις μεθόδους προσδιορισμού των τελευταίων. Για το λόγο αυτό, καθώς και για τις περιπτώσεις που χρειάζεται να προσδιορισθούν ορισμένα μόνο κλάσματα των πρωτεϊνών πρέπει να είναι γνωστό πως οι αζωτούχες ενώσεις του γάλακτος χωρίζονται σε 95% πρωτεΐνες και 5% μη πρωτεϊνικό άζωτο. Τα κλάσματα των αζωτούχων ενώσεων είναι δυνατόν να προσδιοριστούν και να υπολογιστούν ως εξής:

- Ολικό άζωτο (Total nitrogen –TN-): προσδιορίζεται κατευθείαν στο γάλα ή τα προϊόντα του. Το ποσοστό του ολικού αζώτου μετατρέπεται στην περίπτωση του γάλακτος σε πρωτεΐνη, εάν πολλαπλασιαστεί με το συντελεστή 6,38.
- Άζωτο διαλυτό σε 12% τριχλωροοξικό οξύ (TCAN). Παλαιότερη ορολογία με πρωτεϊνικό άζωτο (Nonprotein nitrogen –NPN-)
- Ολικό πρωτεϊνικό άζωτο (TPN): Προκύπτει από την αφαίρεση από το (TN) του TCA.
- Μη καζεϊνικό άζωτο (Non casein nitrogen –NCN-): προσδιορίζεται στο διήθημα που λαμβάνεται μετά από την καθίζηση των πρωτεϊνών του γάλακτος σε pH 4,6.
- Καζεϊνικό άζωτο (Casein nitrogen -CN-): προκύπτει από την αφαίρεση από το (TN) του (NCN).
- Πρωτεΐνες ορού (Whey protein -WP-) =  $6,38 \times (NCN - TCAN)$

Η μέθοδος Kjeldahl έχει χρησιμοποιηθεί περισσότερο από κάθε άλλη για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών του γάλακτος και αποτελεί πάντοτε τη μέθοδο αναφοράς. Η Διεθνής Ομοσπονδία Γάλακτος έχει διαμορφώσει μεθόδους που στηρίζονται στη μέθοδο Kjeldahl για τον προσδιορισμό τόσο του ολικού αζώτου όσο και της καζεΐνης, στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Οι άλλες μέθοδοι στερούνται ακριβείας και είναι ανάγκη να γίνεται αναφορά με βάση τη μέθοδο Kjeldahl. Από τις μεθόδους αυτές, η μέθοδος που στηρίζεται στην αρχή της αντίδρασης των πρωτεϊνών του γάλακτος με τη χρωστική Amido Black έχει

χρησιμοποιηθεί συχνά και μάλιστα έχει αυτοματοποιηθεί σε αρκετές περιπτώσεις για να καταστεί δυνατός ο έλεγχος μεγάλου αριθμού δειγμάτων. Η μέθοδος αυτή, βασίζεται στην αντίδραση της χρωστικής με τα αμινοξέα των πρωτεϊνών και το σχηματισμό ενός αδιάλυτου συμπλόκου. Το σύμπλοκο αυτό απομακρύνεται με διήθηση και μετράται φωτομετρικά το χρώμα που παραμένει ελεύθερο στο διήθημα, οι διάφορες, όμως, πρωτεΐνες έχουν διαφορετική δεσμευτική ικανότητα και για αυτό χρειάζεται διαφορετική καμπύλη αναφοράς. Άλλες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι της φορμαλδεΰδης, διάφορες φωτομετρικές μέθοδοι και η αυτοματοποιημένη μέθοδος της υπέρυθρης φασματοσκοπίας. [5]



ΕΙΚΟΝΑ 41. Automatic kjeldahl nitrogen analyzer

Πηγή: <http://www.lab-kits.com/>

### **8.3.2. Προσδιορισμός του ολικού αζώτου / πρωτεΐνης με τη μέθοδο Kjeldahl**

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος Kjeldahl περιλαμβάνει τρία στάδια: την καύση του δείγματος, την απόσταξη και την τιτλοδότηση.

1<sup>ο</sup> στάδιο: Καύση δείγματος

Ποσότητα δείγματος, ζυγισμένη με μεγάλη ακρίβεια, θερμαίνεται για αρκετό χρονικό διάστημα μέσα σε συσκευή καύσης με ένα μίγμα πυκνού θειικού οξέος που δρα ως οξειδωτικός παράγοντας, με θειικό κάλιο για την ανύψωση του σημείου ζέσεως του μλιγματος και παρουσία ορισμένων καταλυτών για την επιτάχυνση της οξείδωσης του δείγματος, όπως υπεροξειδίου του υδρογόνου, υπεροξειδίου του τιτανίου και θειικού χαλκού. Σκοπός είναι η καύση των

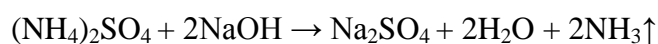


οργανικών ουσιών του δείγματος και η μετατροπή του οργανικού αζώτου σε θειικό αμμώνιο και του άνθρακα και του υδρογόνου σε CO<sub>2</sub> και H<sub>2</sub>O. Η θέρμανση του δείγματος γίνεται σε ειδικούς σωλήνες της μονάδας της συσκευής Kjeldahl. Η αντίδραση που πραγματοποιείται στο στάδιο αυτό είναι:

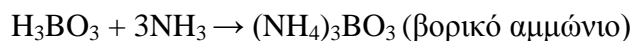


2<sup>ο</sup> στάδιο: Απόσταξη

Στη συνέχεια, στους σωλήνες καύσης, με το κρύο προϊόν του θειικού αμμωνίου, προσθέτουμε περίσσεια καυστικού νατρίου προς απελευθέρωση της αμμωνίας. Ακολουθεί απόσταξη της αμμωνίας με ατμό σε ημιαυτόματη ή αυτόματη μονάδα απόσταξης της συσκευής Kjeldahl.



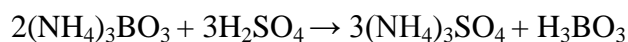
Η αμμωνία, ως πτητική, μεταφέρεται με το ρεύμα υδρατμών στον ψυκτήρα, όπου υγροποιείται και, στη συνέχεια, πέφτει σταγόνα σταγόνα, με τη μορφή υδατικού διαλύματος, μέσα σε κωνική φιάλη με περίσσεια διαλύματος βορικού οξέος, όπου δεσμεύεται και συλλέγεται ως βορικό αμμώνιο.



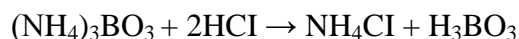
Η αμμωνία δεν μπορεί να συλλεχθεί σε νερό χωρίς απώλειες, λόγω της μεγάλης πτητικότητάς της. Για να αποφευχθούν, λοιπόν, οι απώλειες της αποσταζόμενης αμμωνίας, συλλέγεται σε διάλυμα βορικού οξέος.

3<sup>ο</sup> στάδιο: τιτλοδότηση

Το βορικό αμμώνιο που σχηματίστηκε κατά το στάδιο της απόσταξης τιτλοδοτείται με πρότυπο διάλυμα θειικού οξέος ή υδροχλωρικού οξέος. Αν για την τιτλοδότηση χρησιμοποιηθεί θειικό οξύ η αντίδραση είναι η εξής:



Αν για την τιτλοδότηση χρησιμοποιηθεί υδροχλωρικό οξύ η αντίδραση είναι η εξής:



Η ανίχνευση του τελικού σημείου της τιτλοδότησης γίνεται με συσκευή pHμετρού ή με αλλαγή χρώματος δείκτη ειδικών, για αυτή την περίπτωση, χρωστικών. Παράλληλα πραγματοποιείτε λευκός προσδιορισμός ακολουθώντας την ίδια διαδικασία όπως και στο δείγμα, χρησιμοποιώντας όμως αντί για γάλα νερό και 0,85gr σακχαρόζης.

Υπολογισμός

Ο υπολογισμός του περιεχόμενου αζώτου από την ποσότητα της παραγόμενης αμμωνίας δίνεται από τον τύπο:

$$\text{Nολ. \%} = \frac{1,4007 \times N(V_s - V_b)}{W}$$

Όπου,

$V_s$  = Η κατανάλωση σε ml 0,1N HCl ή  $\text{H}_2\text{SO}_4$  για την τιτλοδότηση του δείγματος του γάλακτος,

$V_b$  = Η κατανάλωση σε ml 0,1 N HCl ή  $\text{H}_2\text{SO}_4$  που χρησιμοποιήθηκε για την τιτλοδότηση του λευκού,

N = Η κανονικότητα του διαλύματος HCl ή  $\text{H}_2\text{SO}_4$  που χρησιμοποιήθηκε για την τιτλοδότηση και

W = Το βάρος σε gr του δείγματος του γάλακτος.

Το αποτέλεσμα καταγράφεται με ακρίβεια 0,001%

Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη εκφράζεται ως ποσοστό % και υπολογίζεται πολλαπλασιάζοντας το ολικό άζωτο με το συντελεστή 6,38, δηλαδή

$$\text{Πρωτεϊνικές ολικές \%} = \text{Nολ. \%} \times 6,38$$

### 8.3.3. Προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο της φορμαλδεΐδης

Η μέθοδος αυτή είναι απλή και εφαρμόζεται στο νωπό γάλα σε περιπτώσεις που επιδιώκεται ταχύτητα σε βάρος της ακρίβειας.

Αρχή της μεθόδου

Όταν σε εξουδετερωμένο γάλα προστεθεί εξουδετερωμένη φορμαλδεύδη τα λευκώματα αποκτούν όξινη αντίδραση επειδή η φορμαλδεύδη δεσμεύει την αμινική ομάδα και σχηματίζονται όξινες μεθυλοενώσεις. Η όξινη αντίδραση εξουδετερώνεται με καυστικό νάτριο, το οποίο δίνει έμμεσα την περιεκτικότητά του σε λευκώματα, τα οποία μπορούν να ογκομετρηθούν με το καυστικό νάτριο.

#### **8.3.4. Προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο σχηματισμού συμπλόκου πρωτεΐνης και χρωστικής Amido Black**

Οι πρωτεΐνες αναμιγνύονται με περίσσεια όξινης διάλυσης ανιονικής χρωστικής Amido Black μρ pH 2,5, οπότε τα θετικά φορτισμένα μόριά τους δεσμεύουν τα αρνητικά μόρια της χρωστικής και κατακρημνίζονται. Η ποσότητα της χρωστικής που παραμένει στη διάλυση είναι αντιστρόφως ανάλογη της ποσότητας της πρωτεΐνης του γάλακτος, μετράται με φωτοκύτταρο στα 610 nm και μετατρέπεται απευθείας από το όργανο σε % πρωτεΐνη, αφού απομακρυνθεί το σύμπλοκο πρωτεΐνης και χρωστικής με διήθηση. Έτσι, ο προσδιορισμός της πρωτεΐνης γίνεται έμμεσα, με το χρωματομετρικό προσδιορισμό της περίσσειας της χρωστικής. Η μέθοδος αυτή έχει αυτοματοποιηθεί για να είναι δυνατός ο έλεγχος μεγάλου αριθμού δειγμάτων.



ΕΙΚΟΝΑ 42. Δείκτης Amido Black

Πηγή: <http://www.code3tactical.com/>

#### **8.3.5. Προσδιορισμός πρωτεϊνών με αυτοματοποιημένη μέθοδο της υπέρυθρης φασματοσκοπίας**

Αρχή της μεθόδου

Οι πρωτεΐνες απορροφούν ενέργεια σε μήκος κύματος 6,4 μm της υπέρυθρης ακτινοβολίας στο δεσμό N-H του πεπτιδικού δεσμού.

### 8.3.6. Προσδιορισμός πρωτεϊνών με φωτομετρικές μεθόδους

Για το γρήγορο και χωρίς μεγάλη ακρίβεια προσδιορισμό μικροποσοτήτων υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται ειδικές φωτομετρικές μέθοδοι, όπως Lowry, νινυδρίτης, biuret κ.ά.. επιπλέον, τα αμινοξέα με αρωματικό δακτύλιο (τυροσίνη, τρυπτοφάνη και φαινυλαλανίνη) απορροφούν στην υπεριώδη περιοχή, με  $\lambda_{\max}$  250-280nm.

Η μέθοδος Lowry στηρίζεται σε δύο διαδοχικές αντιδράσεις, την αντίδραση της πρωτεΐνης με τα ιόντα χαλκού σε αλκαλικό περιβάλλον, οπότε ο χαλκός δεσμεύεται χηλικά με την πρωτεΐνη, και την αναγωγή των οξέων του αντιδραστήριου Folin (φωσφορομολυβδαινικό και φωσφοροβολφραμικό οξύ) από το σύμπλοκο της πρωτεΐνης με το χαλκό, επειδή ο  $\text{Cu}^{2+}$  διευκολύνει τη μεταφορά των ηλεκτρονίων στο μίγμα των οξέων. Από την αναγωγή αυτή προκύπτει ένα μπλε χρώμα και έτσι η πρωτεΐνη προσδιορίζεται χρωματομετρικά στην ορατή περιοχή με  $\lambda_{\max}$  700-750nm. Η μέθοδος παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία στις πρωτεΐνες που περιέχουν στο μόριό τους αμινοξέα με αρωματικό δακτύλιο.

Η μέθοδος νινυδρίνης στηρίζεται στο μπλε χρώμα που εμφανίζεται κατόπιν βρασμού ουδέτερου διαλύματος πρωτεΐνης με μικρή ποσότητα νινυδρίνης. Την αντίδραση αυτή δίνουν τα πεπτίδια, οι πρωτεόζες-πεπτόνες, τα αμινοξέα, εκτός της προλίνης, αλλά και άλλες ενώσεις, όπως αμίνες, αμμωνιακά άλατα κ.λπ.. [5]

## 8.4. Προσδιορισμός του στερεού υπολείμματος

### 8.4.1. Γενικά

Το στερεό υπόλειμμα του γάλακτος λαμβάνεται όταν το γάλα θερμανθεί και εξατμιστεί το νερό που περιέχεται σε αυτό. Η ξηρά ουσία που παραμένει ονομάζεται στερεό υπόλειμμα. Το στερεό υπόλειμμα, λοιπόν, κυμαίνεται κατά τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου και είναι, συνήθως, μεγαλύτερη του 12%. Ο προσδιορισμός του στερεού υπολείμματος χρησιμοποιείται κατά τον έλεγχο για, τυχόν, νοθεία στο γάλα. [1] Οι διάφορες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό του στερεού υπολείμματος ταξινομούνται σε άμεσες και έμμεσες. Οι πρώτες χρησιμοποιούνται, συνήθως, στο εργαστήριο και έχουν μεγάλη ακρίβεια, ενώ οι δεύτερες είναι οι ταχύτερες. Από τις διάφορες άμεσες μεθόδους που υπάρχουν, η μέθοδος με ξήρανση του γάλακτος σε κλίβανο θερμοκρασίας  $102 \pm 2^\circ\text{C}$  μέχρι σταθερού βάρους αποτελεί τη μέθοδο αναφοράς για τον προσδιορισμό των ολικών στερεών στο γάλα. Αυτή η μέθοδος, όμως είναι

αρκετά χρονοβόρα. Συχνά το στερεό υπόλειμμα του γάλακτος υπολογίζεται με μικρότερη ακρίβεια αλλά ταχύτερα, με βάση το ειδικό βάρος και την λιποπεριεκτικότητά του.

#### **8.4.2. Προσδιορισμός του στερεού υπολείμματος με ξήρανση**

##### **Ορισμός**

Το στερεό υπόλειμμα είναι η κατά βάρος περιεκτικότητα των ουσιών, οι οποίες, απομένουν έπειτα από την ξήρανση αυτού στους  $102 \pm 2^\circ\text{C}$ , μέχρι σταθερού βάρους. Εκφράζεται ως ποσοστό επί τοις εκατό της μάζας του δείγματος γάλακτος.

##### **Αρχή της μεθόδου**

Το δείγμα προς εξέταση ξηραίνεται σε υδατόλουτρο στους  $100^\circ\text{C}$  και ακολουθεί εξάτμιση του εναπομείναντος νερού σε κλίβανο ξήρανσης σε θερμοκρασία  $102 \pm 2^\circ\text{C}$ , μέχρι σταθερού βάρους.



ΕΙΚΟΝΑ 43. Υδατόλουτρο Memmert

Πηγή: <http://www.memmert.com/>



ΕΙΚΟΝΑ 44. Κλίβανος ξήρανσης

Πηγή: <http://www.analytika.gr/>

Υπολογισμός

Τα ολικά στερεά εκφράζονται σε εκατοστιαίο ποσοστό επί της μάζας

$$\frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100$$

Όπου,

$m_0$ = μάζα σε g της κάνας μαζί με το καπάκι,

$m_1$ = μάζα σε g της κάνας μαζί με το καπάκι και το δείγμα,

$m_2$ = μάζα σε g της κάνας μαζί με το καπάκι και την αποξηραμένη ποσότητα του δείγματος.

Η μέτρηση χρησιμοποιείται με ακρίβεια 0,01%.

### 8.4.3. Ταχείες ή έμμεσες μέθοδοι προσδιορισμού του στερεού υπολείμματος

#### 8.4.3.1. Υπολογιστικά

Σύμφωνα με τον τύπο Fleischman, το στερεό υπόλειμμα του γάλακτος είναι δυνατό να υπολογιστεί από το λίπος και το ειδικό του βάρος, ως εξής:

$$\% \text{ στερεό υπόλειμμα} = 1,2 \times \Lambda + \frac{2,665 (EB-1) \times 100}{EB}$$

Όπου,  $\Lambda$ = % λιποπεριεκτικότητα του γάλακτος και

EB= ειδικό βάρος στους 15°C [25]

Κατά τον έλεγχο της νοθείας του γάλακτος χρησιμοποιείται σαν κριτήριο το Στερεό Υπόλειμμα Άνευ Λίπους (Σ.Υ.Α.Λ.), διότι παρουσιάζει μεγαλύτερη σταθερότητα, μιας και δεν συμπεριλαμβάνεται σε αυτό το λίπος, που είναι επό τα κύρια συστατικά του γάλακτος που μεταβάλλεται περισσότερο κατά τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου. Στον ΠΙΝΑΚΑ 6. φαίνονται τα κατώτατα νομοθετικά όρια, όπως αυτά καθορίζονται από τον Ελληνικό Κώδικα Τροφίμων, Ποτών και Αντικειμένων. [8]

Για την ταχύτερη διενέργεια των υπολογισμών χρησιμοποιείται ο δίσκος του Ackermann, ο οποίος φέρει τρεις κλίμακες, του ειδικού βάρους, του λίπους και του στερεού υπολείμματος, και επιτρέπει την απευθείας ανάγνωση του στερεού υπολείμματος ενός δείγματος γάλακτος, όταν είναι γνωστό το ειδικό βάρος και η λιποπεριεκτικότητά του. Τέλος υπάρχουν και πίνακες που δίνουν το στερεό υπόστρωμα με την ίδια λογική. [25]

ΠΙΝΑΚΑΣ 6. Κατώτατα νομοθετικά όρια του στερεού υπολείμματος άνευ λίπους στα τρία είδη γάλακτος, σύμφωνα με τον Ελληνικό Κώδικα Τροφίμων (2003). [8]

<b>ΕΙΔΟΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ</b>	<b>ΚΑΤΩΤΑΤΑ ΝΟΜΟΘΕΤΙΚΑ ΟΡΙΑ Σ.Υ.Α.Λ. (%)</b>
Αγελαδινό	8,46
Αίγιο (Εγγώριες φυλές)	9,00
Πρόβειο	10,20

#### **8.4.3.2. Χρήση συσκευών υπέρυθρων ακτίνων**

Οι συσκευές αυτές φέρουν, συνήθως, ένα ζυγό που επιτρέπει τη ζύγιση, σε ειδικό υποδοχέα, μικρής ποσότητας γάλακτος 2,5 ή 5,0 gr. Υπεράνω του υποδοχέα είναι στερεωμένη λυχνία υπέρυθρων ακτίνων η οποία θερμαίνει και αποξηραίνει το ζυγισμένο γάλα. Η κλίμακα του ζυγού είναι βαθμολογημένη κατά τέτοιο τρόπο ώστε η ανάγνωση μετά την ξήρανση του γάλακτος να αποτελεί την % περιεκτικότητά του σε ξηρά ουσία. [5]

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9. ΕΛΕΓΧΟΣ ΜΕΤΑΒΟΛΩΝ ΣΤΑ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

### 9.1. Γενικά

Ο έλεγχος των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, όπως για όλα τα τρόφιμα αλλά και για το γάλα ειδικότερα, είναι ιδιαίτερα σημαντικός. Εντούτοις, το νωπό γάλα, σε καμία περίπτωση, δεν πρέπει να δοκιμάζεται γευστικά. Εκείνο που επιβάλλεται να αξιολογείται πριν την παραλαβή του είναι η οσμή. Η οσμή του νωπού γάλακτος είναι σχετικά ουδέτερη, δεν είναι έντονη και για αυτό το λόγο, γενικά, το γάλα χαρακτηρίζεται άοσμο. Κάθε απόκλιση από τη φυσιολογική του οσμή είναι ανεπιθύμητη. Η ανεπιθύμητη οσμή του γάλακτος μπορεί να οφείλεται σε αυξημένη οξύτητα, σε οσμές από ζωοτροφές και από το χώρο του βουστασίου. Επειδή στις χαμηλές θερμοκρασίες όπου διατηρείται το γάλα είναι δυνατόν να καλυφθούν μερικές ανεπιθύμητες οσμές, συνίσταται, σε περίπτωση αμφιβολίας για την κανονικότητα, να λαμβάνεται δείγμα και να αξιολογείται μετά από θέρμανση στους 30-35°C. Παράλληλα με την αξιολόγηση της οσμής, πρέπει να εξετάζεται και η κανονικότητα ή μη της εμφάνισης του γάλακτος. Η μη κανονική εμφάνιση μπορεί να συσχετίζεται με την παρουσία κροκιδωμάτων, πήγματος ή ακαθαρσιών.

Όσον αφορά τις τιμές που λαμβάνονται από την μέτρηση του pH και της ογκομετρούμενης οξύτητας παρουσιάζουν αντιστοιχία, δηλαδή όταν αυξάνεται η οξύτητα μειώνεται το pH, όμως αυτό δεν συμβαίνει πάντοτε αναλογικά, αφού δεν μετράμε ακριβώς το ίδιο χαρακτηριστικό.

Στην περίπτωση του pH, όπου εκφράζεται ως ο αρνητικός λογάριθμος της συγκέντρωσης των ιόντων υδρογόνου, δηλαδή  $\text{pH} = -\log[\text{H}^+]$ , προσδιορίζουμε την ένταση της οξύτητας, ενώ με την ογκομέτρηση με τη βοήθεια αλκάλειος υπολογίζεται η ποσότητα της οξύτητας. Το pH που προσδιορίζει το βαθμό ιονισμού ενός διαλύματος επηρεάζει τη βιολογική και βιοχημική συμπεριφορά του διαλύματος. Για το λόγο αυτό η μέτρησή του έχει περισσότερο ενδιαφέρον για τα βιολογικά συστήματα, όπως αυτό του γάλακτος.

Αντίθετα, η οξύτητα είναι μια φυσικοχημική ιδιότητα του γάλακτος με ιδιαίτερη σημασία για τον έλεγχο της ποιότητάς του. Ο πιο συνηθισμένος τρόπος για τον προσδιορισμό της οξύτητας είναι η εξουδετέρωση των οξέων του με διάλυμα καυστικού νατρίου γνωστής κανονικότητας. Οι τεχνικές που στηρίζονται στην παραπάνω αρχή λέγονται ογκομετρικές και η μέθοδος που εφαρμόζεται, κυρίως στην Ευρώπη είναι η μέθοδος Dornic. Κυμαίνεται από 0,12-



0,17 εκφρασμένη επί τοις εκατό σε γαλακτικό οξύ, παρόλου που το γάλα περιέχει και άλλα οξέα. Αυτό γίνεται για την απλούστευση της όλης διαδικασίας και τη διευκόλυνση της σύγκρισης μεταξύ διαφόρων δειγμάτων γάλακτος. Η οξύτητα του αγείου γάλακτος κυμαίνεται από 0,14-0,23%, ενώ του πρόβειου από 0,20-0,25%. Με τη ζύμωση του γάλακτος το κυριότερο οξύ που σχηματίζεται είναι το γαλακτικό οξύ. Για αυτό το λόγο, λοιπόν, η οξύτητα του γάλακτος, ακόμα και η αρχική του νωπού, υπολογίζεται σε γαλακτικό οξύ. [3]



ΕΙΚΟΝΑ 45. Ογκομέτρηση με τη μέθοδο Dornic

<https://www.emeequipment.com/>

## 9.2. Έμμεση τρόποι προσδιορισμού της οξύτητας

### 9.2.1. Δοκιμή βρασμού

Όταν η οξύτητα είναι μεγαλύτερη από 25% σε γαλακτικό οξύ, τότε το γάλα πήζει κατά το βρασμό, σε αντίθεση με το κανονικό που δεν πήζει. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι πολύ απλή. Τοποθετούνται περίπου 5 ml γάλακτος σε δοκιμαστικό σωλήνα και θερμαίνουμε πάνω από ανοικτή φλόγα βρασμού. Εάν το γάλα πήζει κρίνεται ακατάλληλο για επεξεργασία και δεν παραλαμβάνεται. Η οξύτητα του στην περίπτωση αυτή θεωρείται ότι είναι μεγαλύτερη του 0,25% σε γαλακτικό οξύ.

### 9.2.2. Δοκιμή της αλκοόλης

Αγελαδινό γάλα με οξύτητα μεγαλύτερη του 0,22% σε γαλακτικό οξύ πήζει όταν αναμιχθεί με ίση ποσότητα αιθυλικής αλκοόλης 68%. Με την τεχνική αυτή αναμιγνύονται, μέσα σε ειδική συσκευή, 5 ml γάλακτος με 5ml αιθυλικής αλκοόλης 68% και παρατηρούμε τα τοιχώματα του σωλήνα. Εάν το γάλα πήξει η οξύτητα του είναι μεγαλύτερη από 0,22%. Το γάλα αυτό ενδέχεται να «κόψει» κατά την παστερίωση.

Η δοκιμή της αλκοόλης πλεονεκτεί έναντι εκείνης του βρασμού γιατί εκτός του γεγονότος ότι ανιχνεύει μικρότερη οξύτητα, δίνει πληροφορίες και για άλλες ανωμαλίες του. Το γάλα πήζει κατά τη δοκιμή, έστω και αν η οξύτητα του είναι κανονική, αν περιέχει πρωτόγαλα, αν παρουσιάζει ανισορροπία αλάτων, αν τα ζώα έχουν προσβληθεί από μαστίτιδα ή βρίσκονται στο τέλος της γαλακτικής περιόδου, η δοκιμή της αλκοόλης δεν ισχύει για το πρόβειο γάλα.

### **9.2.3. Προσδιορισμός του pH**

#### **9.2.3.1. Χρωματομετρικός προσδιορισμός του pH του γάλακτος**

Χρησιμοποιούνται ταινίες χάρτου εμποτισμένες με δείκτη (κυανού της βρωμοθυμόλης ή αλιζαρόλης ή άλλος). Αυτές, ανάλογα με το pH του γάλακτος αποκτούν συγκεκριμένο χρωματισμό. Ο τρόπος αυτός μέτρησης του pH δεν είναι πολύ ακριβής, όμως δίνει πληροφορίες αμέσως και δεν χρειάζονται άλλα μέσα για την εφαρμογή του. Συνίσταται, ιδιαίτερα, για δοκιμές δειγμάτων που λαμβάνονται από ζώα ή ακόμα και από τεταρτημόρια μαστού για την διαπίστωση προσβολής τους από μαστίτιδα. Εμβαπτίζεται η εμποτισμένη ταινία με δείκτη στο γάλα, απομακρύνεται και εκτινάσσεται με δύναμη, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσειά του. Στη συνέχεια, συγκρίνουμε το χρώμα της με πρότυπα που υπάρχουν και των οποίων κάθε χρωματισμός αντιστοιχεί προς ένα pH. Ο χρωματισμός του πρότυπου που πλησιάζει ή ταυτίζεται με εκείνο της ταινίας δείχνει το pH του γαλάκτος.

#### **9.2.3.2. Ηλεκτρομετρικός προσδιορισμός του pH του γάλακτος**

Για τη μέτρηση του χρησιμοποιούνται όργανα γνωστά ως πεχάμετρα. Αυτά συνδυάζονται με τον κατάλληλο, κατά περίπτωση, ηλεκτρόδιο και επιτρέπουν τη μέτρηση του pH. Η μέθοδος αυτή χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη ακρίβεια από ότι η χρωματομετρική και προσδιορίζει το pH, επίσης, σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα. Υπάρχουν διάφοροι τύποι πεχαμέτρων, όμως οι γαλακτοβιομηχανίες, συνήθως, χρησιμοποιούν τα φορητά πεχάμετρα. [5]

Το pH του φυσιολογικού και φρέσκου αγελαδινού γάλακτος παρουσιάζει, σχετικά, μικρή διακύμανση και κυμαίνεται από 6,5-6,8 με μέση τιμή 6,6. Σε παραπλήσια επίπεδα, πάλι, κυμαίνεται και το pH του γίδινου γάλακτος. Πτώση στην τιμή του pH είναι δυνατό να προκληθεί από την ανάπτυξη οξυγαλακτικών βακτηρίων ή από μεταβολές στη σύνθεση του γάλακτος για διάφορους λόγους. Το pH του γάλακτος μεταβάλλεται, επίσης, κατά τη γαλακτική περίοδο και αυξάνεται κατά τη διάρκειά της. Το pH του πρωτογάλακτος μπορεί να φτάσει την τιμή 6,0 και του μαστιτικού την τιμή 7,5. Μεταβολές στην τιμή του pH μπορεί να παρατηρηθούν και κατά

την επεξεργασία του γάλακτος. Με τον έλεγχο, εν τέλει, του pH μπορούν να διαπιστωθούν μη φυσιολογικές αποκλίσεις στις τιμές του.

Επιπλέον, το pH και η οξύτητα του γάλακτος επηρεάζονται από την αραίωση του γάλακτος με νερό ή με την συμπύκνωσή του. Η αραίωση με νερό έχει ως αποτέλεσμα την ανύψωση του pH και την πτώση της οξύτητας. Το αντίθετο συμβαίνει στην περίπτωση που το γάλα συμπυκνωθεί. Οι επιδράσεις της αραίωσης και της συμπύκνωσης οφείλονται, κυρίως, στις αλλαγές που πραγματοποιούνται στην κατανομή του ασβεστίου και του φωσφόρου μεταξύ της διαλυτής και της κολλοειδούς φάσης. Με την συμπύκνωση του γάλακτος το διαλυτό ασβέστιο και ο φώσφορος μεταφέρονται στην κολλοειδή φάση με παράλληλη απελευθέρωση ιόντων υδρογόνου. Το αντίθετο, εύλογα, συμβαίνει με την αραίωση του γάλακτος με νερό. Στον ΠΙΝΑΚΑ 7. παρουσιάζονται οι διαφορές στο pH, στην οξύτητα και το ειδικό βάρος σε τρία είδη γάλακτος που παράγονται στην περιοχή της Ηπείρου. [1]

ΠΙΝΑΚΑΣ 7. Σύσταση του γάλακτος που παράγεται στην περιοχή της Ηπείρου [1]

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ (%)	ΕΙΔΟΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ		
	ΑΓΕΛΑΔΙΝΟ	ΠΡΟΒΕΙΟ	ΓΙΔΙΝΟ
Ph	6,60	6.58	6.54
ΟΞΥΤΗΤΑ (DORNIC)	16	22	17
ΕΙΔΙΚΟ ΒΑΡΟΣ	1,031	1,036	1,030

Ένας άλλος παράγοντας που έχει σημαντική επίδραση στο pH και την οξύτητα είναι η θερμική επεξεργασία του γάλακτος. Κατά τη θερμική επεξεργασία του γάλακτος συμβαίνουν τα εξής:

- Απώλεια του CO<sub>2</sub>, που προκαλεί ελάττωση της οξύτητας και αύξηση, αντίστοιχα του pH,
- Γίνεται μεταφορά του ασβεστίου και του φωσφόρου από τη διαλυτή στην κολλοειδή κατάσταση, γεγονός που προξενεί ελαφρά αύξηση της οξύτητας και ελάττωση του pH (μετά τη θερμική επεξεργασία, ωστόσο η επίδραση γίνεται αντιστρεπτή) και
- Μετά από έντονη θερμική επεξεργασία είναι πιθανός ο σχηματισμός οξέων από τη διάσπαση της λακτόζης.[7]

### 9.3. Προσδιορισμός ειδικού βάρους

#### 9.3.1. Γενικά

Ο προσδιορισμός του ειδικού βάρους του γάλακτος έχει ιδιαίτερη σημασία για τις γαλακτοβιομηχανίες σε ό,τι αφορά τον ποιοτικό του έλεγχο, διότι δίνει μια γρήγορη εικόνα της περιεκτικότητας του σε στερεά συστατικά. Σε συνδυασμό, ακόμα, με την λιποπεριεκτικότητα επιτρέπει τον υπολογισμό των στερεών συστατικών του και εμμέσως ελέγχεται τυχόν νοθεία με προσθήκη νερού. Οι τιμές του ειδικού βάρους νοούνται στη θερμοκρασία των 15°C. Σε περίπτωση που οι τιμές του ειδικού βάρους κυμανθούν σε επίπεδα χαμηλότερα του 1,030 τότε, είτε έχει προηγηθεί προσθήκη νερού, είτε το γάλα για οποιονδήποτε άλλο λόγο δεν έχει φυσιολογική σύσταση. [7]

#### 9.3.2. Μέθοδος της ληκύθου (Άμεσα μέθοδος)

Βασίζεται στη μέτρηση των σχετικών βαρών γάλακτος και νερού που καταλαμβάνουν ίσους όγκους σε ορισμένη θερμοκρασία. Η μέθοδος χρησιμοποιεί ειδικούς γυάλινους υποδοχείς με καθορισμένη χωρητικότητα (25-50 ml), τις ληκύθους.

Στη διαδικασία της μέτρησης η λήκυθος καθαρίζεται, σκουπίζεται και ζυγίζεται κενή (Bκ). Κατόπιν, γεμίζεται με αποσταγμένο νερό, κλείνεται και εμβαπτίζεται σε υδατόλουτρο 15°C. Ύστερα από 5 λεπτά πιέζεται το πάμα και απομακρύνεται το επιπλέον νερό από το αυλάκι που υπάρχει στο πάμα, σκουπίζεται η λήκυθος και ζυγίζεται με το νερό (Bν). Στη συνέχεια, η λήκυθος αδειάζεται, ξεπλένεται με το προς εξέταση γάλα και αφού γεμιστεί με αυτό, θερμοστατείται στους 15°C, σκουπίζεται και ζυγίζεται (Bγ). Απαιτείται, βέβαια, προσοχή, διότι προκύπτουν σφάλματα στη ζύγιση εξαιτίας των διακυμάνσεων της θερμοκρασίας και τυχόν εξατμίσης του δείγματος. Το ειδικό βάρος του γάλακτος υπολογίζεται από τον τύπο:

$$EB = \frac{B\gamma - B\kappa}{B\nu - B\kappa}$$

#### 9.3.3. Μέθοδος ζυγού Westphal (Εμμεση μέθοδος)

Η μέθοδος χρησιμοποιεί ειδικό ζυγό, ο οποίος αποτελείται από κατακόρυφη βάση και οριζόντιο βαθμολογημένο βραχίονα, στο άκρο του οποίου εξαρτάται ένας πλωτήρας, ένας γυάλινος κύλινδρος και μια σειρά από ειδικά βάρη (X, 0,1X, 0,01X και 0,001X). Αν το βάρος X

προσαρτυθεί στην τελευταία ένδειξη 10 του βραχίονα του ζυγού, επαναφέρει της ισορροπία του όταν ο πλωτήρας είναι εμβαπτισμένος σε αποσταγμένο νερό θερμοκρασίας 15°C.

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην αρχή του Αρχιμήδη, σύμφωνα με την οποία κάθε σώμα που βυθίζεται σε υγρό υφίσταται άνωση ίση προς το βάρος του εκτοπιζόμενου υγρού, που, στην περίπτωση αυτή είναι ίσο με το βάρος X. Εάν ο πλωτήρας βυθιστεί στο γάλα, τότε το βάρος X αναρτημένο στην ένδειξη 10 του βραχίονα του ζυγού δεν επαρκεί για την εξισορρόπηση του. Στη συνέχεια, προστίθενται και τα άλλα σταθμά στις θέσεις που απαιτείται για να ισορροπήσει ο βραχίονας. Εάν προστεθεί εκτός από το βάρος X. Το βάρος 0,01X στην ένδειξη 3 και το βάρος 0,001X στην ένδειξη 2 για να ισορροπήσει ο βραχίονας, τότε το ειδικό βάρος υπολογίζεται από τον τύπο:

$$EB = \frac{B\gamma}{B\nu} = \frac{1,032X}{X} = 1,032$$

#### **9.3.4. Μέθοδος γαλακτομέτρου (Εμμεση μέθοδος)**

Το γαλακτόμετρο είναι ένα πυκνόμετρο ειδικά κατασκευασμένο για τον προσδιορισμό του ειδικού βάρους του γάλακτος. Στο κάτω μέρος φέρει σφαιρική απόληξη που περιέχει Hg, ο οποίος λόγω υψηλού ειδικού βάρους διατηρεί το γαλακτόμετρο κατακόρυφο όταν βυθίζεται στο γάλα. Στο πάνω μέρος φέρει θερμοόμετρο και ένα βαθμολογημένο στέλεχος με υποδιαίρεσεις από 15 ή 20 έως 40. Η κλίμακα αυτή αντιστοιχεί προς ειδικά βάρη από 1,015 ή 1,020 έως 1,040 αντίστοιχα. Δηλαδή, αντί να γράφονται 4 ψηφία σε ένα λεπτό στέλεχος γράφονται μόνο τα δύο τελευταία.

Στηρίζεται και αυτό στην αρχή του Αρχιμήδη, σύμφωνα με την οποία ένα σώμα εκτοπίζει ίσα βάρη σε όλα τα υγρά εντός των οποίων επιπλέει και βρίσκεται σε κατάσταση ισορροπίας. Οι εκτοπιζόμενοι όγκοι είναι ανάλογοι του βάθους βύθισης του γαλακτομέτρου. Έτσι, το ειδικό βάρος συνδέεται άμεσα με το βάθος στο οποίο βυθίζεται ο πλωτήρας του γαλακτομέτρου μέσα στο προς εξέταση γάλα. Εάν το γάλα είναι αραιωμένο με νερό, τότε το γαλακτόμετρο βυθίζεται περισσότερο στο γάλα και η τιμή είναι μικρότερη από την τιμή του μη αραιωμένου γάλακτος. [5]



ΕΙΚΟΝΑ 46. Γαλακτόμετρο με θερμοόμετρο τύπου Quevenne

Πηγή: <http://ktiniatros.gr/>

## 9.4. Προσδιορισμός του σημείου πήξης

### 9.4.1. Γενικά

Το σημείο πήξεως αποτελεί μία από τις πιο σταθερές φυσικές ιδιότητες του γάλακτος και έναν ακριβέστερο και αποτελεσματικό τρόπο για τον εντοπισμό της νοθείας τους γάλακτος με προσθήκη νερού. Το σημείο πήξεως, λοιπόν, εξαρτάται από την ποσότητα των συστατικών του που βρίσκονται εν διαλύσει και είναι πάντοτε χαμηλότερο του διαλύτη. Αυξάνοντας την ποσότητα των διαλυτών συστατικών το σημείο πήξεως κατέρχεται. Από τα συστατικά του γάλακτος που επηρεάζουν σε σημαντικό βαθμό το σημείο πήξεως είναι η λακτόζη και το χλώριο. Η συμμετοχή μόνο αυτών των δύο συστατικών στη διαμόρφωση της τιμής του σημείου πήξεως είναι της τάξης του 75%. Τα δύο αυτά συστατικά εμφανίζουν μεγάλο αρνητικό συντελεστή συσχέτισεως, καθώς όταν αυξάνεται η ποσότητα της λακτόζης, μειώνεται εκείνη του χλωρίου και αντίστροφα. Το λίπος και η καζεΐνη έχουν μηδαμινή επίδραση στη διαμόρφωση της τιμής του σημείου πήξεως. Το υπόλοιπο 25% που οφείλεται στην διαμόρφωση της τιμής της συγκεκριμένης σταθεράς είναι τα υπόλοιπα συστατικά του γάλακτος.

Αν και ποικίλουν οι απόψεις, όσον αφορά τη μέση τιμή του σημείου πήξεως για το αγελαδινό γάλα, οι περισσότεροι επιστήμονες συγκλίνουν στην τιμή των  $-0,550^{\circ}\text{C}$ . Τιμές, λοιπόν, υψηλότερες του  $-0,525^{\circ}\text{C}$  αποτελούν ένδειξη νοθείας. Η προσθήκη νερού σε ποσοστό 2% αυξάνει το σημείο πήξεως κατά  $0,01^{\circ}\text{C}$ . Στη χώρα μας, σε διάφορες φυλές, μελετήθηκε πως το σημείο πήξεως του πρόβειου γάλακτος κυμαίνεται από  $-0,560$  έως  $-0,0580^{\circ}\text{C}$ .

Το σημείο πήξεως κυμαίνεται πολύ λίγο κατά τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου. Στην αρχή και στο τέλος της είναι χαμηλότερο και υψηλότερο στο μέσο της. Για αυτό το λόγο, συνίσταται ο προσδιορισμός μιας μέσης τιμής κατά περιοχή και έτος. [7]

#### **9.4.2. Τεχνικές προσδιορισμού του σημείου πήξης με κρυοσκοπικό Hortvet**

Με την κρυοσκοπική συσκευή Hortvet επιδιώκεται η βραδεία ψύξη του γάλακτος μέχρι θερμοκρασίας  $-1,7^{\circ}\text{C}$ , την υποβοήθηση της πήξης του με προσθήκη λίγων κρυστάλλων πάγου και τελικά την ανάγνωση της θερμοκρασίας πήξης με ειδικό θερμόμετρο. Για τη διευκόλυνση της κατανόησης της μεθόδου κρίνεται σκόπιμο να αναφερθούν δύο βασικές αρχές της κρυοσκοπίας.

- Κατά την ψύξη οποιουδήποτε διαλύματος παρατηρείται το φαινόμενο της υπέρτηξης, κατά το οποίο η θερμοκρασία αυτού κατέρχεται του σημείου πήξης και μετά επανέρχεται σε αυτό, όποτε και παρατηρείται η πήξη. Αυτό συμβαίνει, επειδή τα υγρά έχουν μια λανθάνουσα θερμότητα, την οποία αποβάλλουν.
- Κατά τη διάρκεια της πήξης η θερμοκρασία παραμένει σταθερή για μικρό χρονικό διάστημα.

Η θερμοκρασία διαλύματος κατέρχεται, αρχικά, εκείνης του σημείου πήξης, στην οποία επανέρχεται και διατηρείται σταθερή για μικρό χρονικό διάστημα. Η περιοχή οριζοντιοποίησης αποδίδει το σημείο πήξης του γάλακτος σε βαθμούς Κελσίου ( $^{\circ}\text{C}$ ). Υπό την επίδραση της ψύξης παρατηρείται νέα πτώση της θερμοκρασίας, γιατί όσο προχωρεί η πήξη και στερεοποιείται ο διαλύτης, η συγκέντρωση του υπόλοιπου διαλύματος αυξάνει αντίστοιχα και ελαττώνεται το σημείο πήξης.

#### **9.4.3. Μέθοδος προσδιορισμού του σημείου πήξης με κρυοσκόπιο θερμίστορα**

Το κρυοσκόπιο αυτό, αποτελείται από από ένα θερμοστατικά ελεγχόμενο λουτρό ψύξης με ψυκτικό υγρό, υδάτινο διάλυμα 33% αιθυλενογλυκόλης, ένα θερμίστορα συνδεδεμένο σε κύκλωμα με γαλβανόμετρο και διάταξη ανάγνωσης, ένα αναδευτήρα δείγματος και σωλήνα υποδοχής του δείγματος. [5]



ΕΙΚΟΝΑ 47. Κρυοσκόπιο με θερμίστορα

Πηγή: [http:// www.abcfoodlaw.co.uk/](http://www.abcfoodlaw.co.uk/)

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10. ΕΛΕΓΧΟΣ ΓΙΑ ΝΟΘΕΙΑ**

### **10.1. Γενικά**

Η νοθεία του γάλακτος αποτελούσε ανέκαθεν ένα σοβαρό πρόβλημα για τις βιομηχανίες γάλακτος παρόλο που έχουν, κατά καιρούς, καταβληθεί σοβαρές προσπάθειες για τον περιορισμό της, το πρόβλημα εξακολουθεί να υπάρχει. Παράλληλα, υπάρχει και το πρόβλημα της νοθείας εκ μέρους των βιομηχανιών εις βάρος του καταναλωτή.

Η πιο συνηθισμένη μορφή νοθείας στο γάλα, πραγματοποιείται με την προσθήκη νερού. Η προσθήκη αυτή έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της λιποπεριεκτικότητας, του ειδικού βάρους, του ξηρού υπολείμματος και του άνευ λίπους ξηρού (λιποπεριεκτικότητα εκφρασμένη σαν ποσοστό επί της ξηράς ουσίας του γάλακτος), όπως έχει προαναφερθεί και παραπάνω. Η διπλή νοθεία, δηλαδή η αφαίρεση λίπους και προσθήκη νερού είναι πιθανό να μη μεταβάλλει το ειδικό βάρος, ενώ προκαλεί μείωση των τιμών που αναφέρονται σε όλες τις άλλες ιδιότητες.

Ο προσδιορισμός μιας μόνο ιδιότητας του γάλακτος δεν είναι δυνατόν να αποτελέσει κριτήριο για να αποφανθεί κανείς, με βεβαιότητα, σε όλες τις περιπτώσεις, κατά πόσο το εξεταζόμενο γάλα είναι νοθευμένο ή όχι. Ο υπολογισμός του σημείου πήξεως, για παράδειγμα, επιτρέπει τη διαπίστωση νοθείας με νερό, ακόμα και σε μικρό ποσοστό, δεν επισημαίνει όμως την αφαίρεση του λίπους, δεδομένου ότι εξαρτάται μόνο από τα διαλυτά συστατικά του γάλακτος. Κατά συνέπεια η αφαίρεση λίπους δεν το επηρεάζει.



Ασφαλέστερα συμπεράσματα εξάγονται αν προσδιοριστούν οι τιμές δύο ή περισσότερων ιδιοτήτων του γάλακτος. Πρέπει, ακόμα, να σημειωθεί πως υπάρχουν περιπτώσεις στις οποίες το γάλα εμφανίζει τιμές εκτός των συνηθισμένων ορίων, γεγονός που μπορεί να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες, όπως στην φυλή του ζώου, στη διατροφή του και το στάδιο της γαλακτικής περιόδου. [3]

## 10.2. Νοθεία με προσθήκη νερού

Η προσθήκη νερού προκαλεί μείωση της οξύτητας, της λιποπεριεκτικότητας, του στερεού υπολείμματος άνευ λίπους, του ειδικού βάρους του γάλακτος και αύξηση της τιμής του σημείου πήξης, ενώ δεν επιδρά επί της τιμής του λίπους επί ξηρού. Ο προσδιορισμός της νοθείας του γάλακτος με προσθήκη νερού γίνεται με βάση το σημείο πήξης ή το στερεό υπόλειμμα άνευ λίπους (ΣΥΑΛ). Η νοθεία με βάση το ΣΥΑΛ του γάλακτος υπολογίζεται ως εξής:

$$N = \frac{(\Sigma\kappa - \Sigma\nu) - 100}{\Sigma\kappa}$$

Όπου,

N= η ποσότητα νερού που προστέθηκε σε 100 μέρη γάλακτος,

Σκ= το στερεό υπόλειμμα άνευ λίπους του κανονικού γάλακτος,

Σν= το ΣΥΑΛ του νοθευμένου γάλακτος.

Ο υπολογισμός του νερού που προστέθηκε στο νοθευμένο γάλα είναι δυνατό να υπολογιστεί και με βάση το σημείο πήξης από τον τύπο;

$$N = \frac{(\Sigma\Pi\kappa - \Sigma\Pi\nu) \times 100}{\Sigma\Pi\kappa}$$

Όπου,

N= η ποσότητα νερού που προστέθηκε σε 100 μέρη γάλακτος,

ΣΠκ= το σημείο πήξης του κανονικού γάλακτος,

ΣΠν= το σημείο πήξης του νοθευμένου γάλακτος.

Η παραπάνω μέθοδος είναι αρκετά ευαίσθητη. Γενικά, η προσθήκη νερού οδηγεί σε αύξηση του σημείου πήξης κατά 0,0055°C, η οποία μπορεί να προσδιοριστεί με κρυσκόπιο.

### **10.3. Νοθεία γάλακτος με μείωση λίπους**

#### **10.3.1. Γενικά**

Η νοθεία στη συγκεκριμένη περίπτωση παραγματοποιείται είτε με αποκορύφωση του γάλακτος είτε με προσθήκη αποκορυφωμένου γάλακτος στο πλήρες, οπότε επέρχεται μείωση της λιποπεριεκτικότητας.

#### **10.3.2. Προσδιορισμός νοθείας με αποκορύφωση**

Αποκορύφωση ονομάζεται η διαδικασία κατά την οποία λαμβάνει χώρα η παραλαβή της κορυφής ή κρέμας του γάλακτος με φυσικό τρόπο (φυσική αποκορύφωση) ή με χρήση ειδικών φυγοκεντρικών διαχωριστήρων (μηχανική αποκορύφωση). Το ποσοστό αποκορύφωσης υπολογίζεται από τον τύπο:

$$A = \frac{(\Lambda\kappa - \Lambda\nu) \times 100}{\Lambda\kappa}$$

Όπου,

A= ποσοστό αποκορύφωσης %

$\Lambda\kappa$ = % λιποπεριεκτικότητα κανονικού γάλακτος

$\Lambda\nu$ = % λιποπεριεκτικότητα νοθευμένου γάλακτος.

#### **10.3.3. Προσδιορισμός νοθείας με προσθήκη αποκορυφωμένου γάλακτος**

Η ποσότητα του αποκορυφωμένου γάλακτος που προστέθηκε μπορεί να υπολογιστεί από τον εξής τύπο:

$$E = \frac{(\Lambda\kappa - \Lambda\nu) \times 100}{\Lambda\nu}$$

Όπου,

E= η ποσότητα του αποκορυφωμένου γάλακτος που προστέθηκε σε 100 μέρη κανονικού

$\Lambda\kappa$ = % λιποπεριεκτικότητα κανονικού γάλακτος

$\Lambda\nu$ = % λιποπεριεκτικότητα νοθευμένου γάλακτος

#### **10.4. Διπλή νοθεία γάλακτος με ταυτόχρονη προσθήκη νερού και αφαίρεση λίπους**

Στην περίπτωση αυτή ο βαθμός νοθείας υπολογίζεται ως εξής:

##### **10.4.1. Νερό που προστέθηκε (N)**

$$N = \left(1 - \frac{\Sigma\nu}{\Sigma\kappa}\right) \times 100$$

$N$ = % η ποσότητα νερού που προστέθηκε

$\Sigma\nu$ = το ΣΥΑΛ του νοθευμένου γάλακτος

$\Sigma\kappa$ = το ΣΥΑΛ του κανονικού γάλακτος.

Λίπος που μειώθηκε λόγω προσθήκης νερού και αποκορύφωσης ( $M$ )

$$M = \left(1 - \frac{\Lambda\nu}{\Lambda\kappa}\right) \times 100$$

Όπου,

$M$ = % συνολική μείωση της λιποπεριεκτικότητας του νοθευμένου γάλακτος

$\Lambda\nu$ = % λίπος του νοθευμένου γάλακτος

$\Lambda\kappa$ = % λίπος του κανονικού γάλακτος

##### **10.4.2. Λίπος που αποκορυφώθηκε (A)**

$$A = M - N$$

#### **10.5. Ανάμειξη διαφόρων ειδών γάλακτος**

##### **10.5.1. Γενικά**

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι προσδιορισμού της γνησιότητας του γάλακτος και των προϊόντων του. Οι μέθοδοι αυτές στηρίχθηκαν στις ιδιότητες και ιδιαιτερότητες που χαρακτηρίζουν ορισμένα συστατικά διαφόρων ειδών γάλακτος. Οι μέθοδοι που εφαρμόστηκαν αρχικά ήταν οι χρωματογραφίες (χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας-TLC) και η αέριος υγρή

χρωματογραφία –GLC) και βασίστηκαν κυρίως στον προσδιορισμό της σύστασης των λιπαρών οξέων ή των τριγλυκεριδίων ή των καροτενίων του λίπους του γάλακτος. Οι αναλύσεις αυτές βασίζονταν στη σύσταση των λιπαρών οξέων ή των τριγλυκεριδίων, τα οποία παρουσίαζαν σημαντικές διαφορές στα διάφορα είδη γάλακτος. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι το β- καροτένιο υπάρχει μόνο στο αγελαδινό γάλα. Οι μέθοδοι αυτές παρουσιάζουν όμως και πολλά μειονεκτήματα, επειδή απαιτούν πολύπλοκες και χρονοβόρες αναλύσεις, δεν ανιχνεύουν την προσθήκη αποβουτυρωμένου γάλακτος, υψηλό ελάχιστο όριο ανίχνευσης, υψηλό κόστος και επηρεάζονται από τη διατροφή των ζώων. Έτσι, δεν έτυχαν ευρείας εφαρμογής και εγκαταλείφθηκαν. Σήμερα, η πλειοψηφία των σύγχρονων μεθόδων ανίχνευσης και προσδιορισμού του αγελαδινού γάλακτος βασίζονται στην ανάλυση των πρωτεϊνών και οι σημαντικότερες είναι οι ηλεκτροφορικές μέθοδοι, οι χρωματογραφικές μέθοδοι, οι ανοσοβιολογικές μέθοδοι, οι μέθοδοι που βασίζονται στον υβριδισμό των ιχνηθετών του DNA και οι συνδυασμοί τους.

## **10.5.2. Ηλεκτροφορικές μέθοδοι**

### **10.5.2.1. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (PAGE)**

Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών του γάλακτος σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου αποτελεί έναν τρόπο διαχωρισμού τους και μια μέθοδο ανίχνευσης του αγελαδινού γάλακτος σε μίγματά του με πρόβειο και αίγιο γάλα. Τα καζεϊνικά συστατικά των διαφόρων ειδών γάλακτος σε αλκαλική ασυνεχή ηλεκτροφόρηση ουρίας-πολυακρυλαμιδίου, υπό την επίδραση ισχυρού ηλεκτρικού πεδίου κινούνται στην πηκτή με διαφορετική ταχύτητα και διαχωρίζονται ανάλογα με το φορτίο και το μοριακό βάρος που έχουν. Στις συνθήκες αυτές της ηλεκτροφόρησης η ηλεκτροφορητική κινητικότητα της αγελαδινής  $\alpha_{s1}$ -καζεΐνης είναι ταχύτερη από τις αντίστοιχες των άλλων ειδών γάλακτος. Αυτό επιτρέπει να χρησιμοποιηθεί η αγελαδινή  $\alpha_{s1}$ -καζεΐνη ως κριτήριο για τον προσδιορισμό της παρουσίας αγελαδινού γάλακτος στο αιγοπρόβειο γάλα και τα προϊόντα του.

### **10.5.2.2. Ισοηλεκτρικός εστιασμός (IEF)**

Μια άλλη τεχνική προσδιορισμού της νοθείας των τυριών πρόβειο και αίγιου γάλακτος με αγελαδινό είναι αυτή του ισοηλεκτρικού εστιασμού. Στην περίπτωση αυτή το προς εξέταση δείγμα πρωτεϊνών του τυριού κινείται υπό επίδραση ηλεκτρικού πεδίου σε ένα χαλαρό υπόστρωμα ακρυλαμιδίου με βαθμίδωση του pH, το οποίο διαμορφώνεται με χρήση αμφολυτών

που προστίθενται στο διάλυμα πηκτής. Καθώς καθεμία από τις πρωτεΐνες του δείγματος συναντούν το ισοηλεκτρικό τους σημείο, το φορτίο τους μηδενίζεται και σταθεροποιούνται σε μορφή ζώνης. Με χρώση των ζωνών αυτών και μέτρηση της οπτικής τους πυκνότητας είναι δυνατός ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνικών κλασμάτων.

### **10.5.2.3. Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση**

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται με επιτυχία τα τελευταία χρόνια. Τα πλεονεκτήματά της είναι ότι απαιτούνται μικρές ποσότητες δείγματος, η όλη εργασία είναι πλήρως αυτοματοποιημένη και ολοκληρώνεται σε λίγα μόνο λεπτά. Το μίγμα των πρωτεϊνών κινείται σε υπόβαθρο ηλεκτρολυτών κατάλληλου και σταθερού pH, που δημιουργείται από την επίδραση ηλεκτρικού ρεύματος υψηλής τάσης στην τριχοειδή στήλη. Η στήλη αυτή έχει διάμετρο 10-100μm και η ανίχνευση των πρωτεϊνικών κλασμάτων γίνεται με συνεχή φωτομέτρηση των εκλουσμάτων κατά την έξοδό τους από τη στήλη. Η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση έχει χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό και την ανάλυση του κλάσματος των καζεϊνών σε μίγματα αγελαδινού, αίγιου και πρόβειου γάλακτος και στα αντίστοιχα τυριά.

### **10.5.3. Χρωματογραφικές μέθοδοι**

Τα τελευταία χρόνια η τεχνική της χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) και η τεχνική της χρωματογραφίας ταχείας απόδοσης (FPLC) βρίσκουν εφαρμογή στον προσδιορισμό της ανίχνευσης αγελαδινού γάλακτος σε μίγματά του με άλλα είδη γάλακτος. Οι μέθοδοι, κυρίως με τις μορφές της ανταλλαγής ιόντων και ανεστραμμένης φάσης, έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία. Η ανίχνευση (laezza) με βάση το χρόνο έκλουσης των πρωτεϊνικών κλασμάτων ή των πρωτεϊνών του ορού ή των παρα-κ-καζεϊνών των τριών ειδών γάλακτος. Η διαφορά αυτή αποδίδεται στο διαφορετικό φορτίο ή στις διαφορές υδροφοβίας που έχουν οι πρωτεΐνες των διαφόρων ειδών γάλακτος.

Το πλεονέκτημά τους σε σύγκριση με τις ηλεκτροφορητικές μεθόδους είναι ότι έχουν τη δυνατότητα να διαχωρίζουν τις πρωτεΐνες του γάλακτος σε 40 λεπτά, είναι πιο κατάλληλες για αυτοματοποίηση και επιπλέον είναι αρκετά απλές. Το μοναδικό πρόβλημα που μπορεί να εμφανιστεί είναι η αδυναμία ανίχνευσης χαμηλών επιπέδων αγελαδινού γάλακτος που βρίσκεται σε τυριά που παρασκευάζονται από πρόβειο γάλα, κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των τυριών αυτών. [21]

#### 10.5.4. Ανοσοβιολογικές μέθοδοι

Οι ανοσοβιολογικές μέθοδοι βασίζονται στην αντίδραση καθίζησης αντιγόνου-αντισώματος. Υπάρχουν διάφορες ανοσοβιολογικές μέθοδοι. Οι πιο βασικές είναι η διπλή ανοσοδιάχυση, η κυκλική ανοσοδιάχυση και η μέθοδος ELISA.

Η κυκλική ανοσοδιάχυση είναι δυνατό να εφαρμοστεί σε νωπό γάλα ή γάλα που δεν έχει θερμανθεί σε υψηλές θερμοκρασίες. Η τεχνική της ακτινωτής ανοσοδιάχυσης, εμφανίζεται με την ονομασία CV TEST II όταν χρησιμοποιείται αντιορός αγελαδινού γάλακτος (vache) για την ανίχνευση της νοθείας του πρόβειου και αίγειου γάλακτος (chevre) με αγελαδινό και BC TEST II όταν χρησιμοποιείται ορός αίγειου γάλακτος για την ανίχνευση νοθείας του πρόβειου γάλακτος (brebis) με αίγειο. Η μέθοδος της ακτινωτής ανοσοδιάχυσης είχε επίσημα αναγνωριστεί από την Ε.Ε. και μπορεί να εφαρμοστεί σε νωπό γάλα ή προϊόντα του που δεν έχουν θερμανθεί σε υψηλές θερμοκρασίες ή δεν έχουν απολέσει πρωτεΐνες ορού. Με βάση την τεχνική αυτή μικρή ποσότητα δείγματος ορού γάλακτος που περιέχει την αγελαδινή ανοσοβουλίνη IgG, (αντιγόνο) τοποθετείται σε μικρή κοιλότητα που έχει δημιουργηθεί σε άγαρ ενός τρυβλίου, το οποίο περιέχει ειδικό αντιορό (αντίσωμα) και κατακρημνίζεται από την ποσότητα του αγελαδινού γάλακτος. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του βαθμού νοθείας του πρόβειου ή αίγειου γάλακτος με αγελαδινό ετοιμάζεται προηγουμένως τυπική καμπύλη με γνωστά δείγματα νοθείας. [22]

Από το 1990, η ELISA αποτελεί την πιο συχνή ανοσοενζυμική μέθοδο για την ανίχνευση γάλακτος από διαφορετικά είδη ζώων. Είναι μια απλή, ευαίσθητη, γρήγορη, αξιόπιστη και ευπροσάρμοστη μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό των αντιγόνων και των αντισωμάτων. Βασίζεται στην ενζυμική ανοσοαντίδραση αντιγόνου-αντισώματος με το υπόστρωμα, όπου έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία υποστρώματος με χαρακτηριστικό χρώμα. Η μέθοδος αυτή έχει μεγάλη ευαισθησία, με όριο ανίχνευσης 0,1% αγελαδινού γάλακτος σε πρόβειο και βουβαλινό γάλα και δυνατότητα μεγάλου αριθμού ταυτόχρονων αναλύσεων. [23]



ΕΙΚΟΝΑ 48. Συσκευή φυγοκέντρησης

Πηγή: [http:// www.sgrs.ie](http://www.sgrs.ie)

#### **10.5.5. Τεχνικές που βασίζονται στην ανάλυση του DNA**

Την τελευταία δεκαετία το DNA χρησιμοποιείται παράλληλα με τις πρωτεΐνες ως δείκτης για τον προσδιορισμό των ειδών του γάλακτος που υπάρχουν σε ένα μίγμα. Αυτό οφείλεται στη σταθερότητα του DNA σε υψηλές θερμοκρασίες και στο ότι το γονιδιακό DNA των σωματικών κυττάρων δεν υφίσταται δομικές αλλαγές και παραμένει στο τυρί ακόμα και κατά την ωρίμανσή τους. Η παρουσία διαφόρων στην αλληλουχία του DNA των σωματικών κυττάρων (λευκοκύτταρα και επιθηλιακά κύτταρα) που υπάρχουν στο γάλα μπορεί να προσδιοριστεί με τη βοήθεια μοριακών αναλύσεων. Τα βασικά βήματα της μεθόδου αυτής είναι:

- Η απομόνωση του DNA
- Πολλαπλοί κύκλοι της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Polymerase chain reaction – PCR-). Σε κάθε κύκλο υπάρχουν οι φάσεις της μετουσίωσης του DNA (denaturation), της υβριδίωσης ή προσαρμογής στο DNA εκμάγειο (annealing), των εκκινητήρων ή πριμοδοτών (primers) και της επέκτασης των εκκινητήρων (extension).
- Η πέψη των πρωτεϊνών της PCR με κατάλληλες ενδονουκλεάσες περιορισμού.
- Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός σε πήκτωμα αγαρόζης και χρώση του πηκτώματος.

Η ανίχνευση της ανάμειξης των διαφόρων ειδών γάλακτος με βάση το DNA μπορεί να δώσει αξιόπιστα αποτελέσματα για τον εντοπισμό της νοθείας. Αυτό επιτυγχάνεται γνωρίζοντας την αλληλουχία του DNA και την παραλλακτικότητά του στα νουκλεοτίδια των διάφορων ειδών. Βέβαια, υπάρχουν προβλήματα σε ότι αφορά στη χρήση της PCR και εφαρμόζεται για ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε πρόβειο και αίειο φρέσκο, παστεριωμένο και αποστειρωμένο γάλα, καθώς και σε τυριά.

Τέλος, για την ανίχνευση της νοθείας του γάλακτος χρησιμοποιούνται συνδυασμοί μεθόδων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν η μέθοδος της ανοσοηλεκτροφόρησης, η PCR-LCR (PCR-Ligase Chain Action), η IEF/Immunoblotting κ.ά. [5]

## **10.6. Νοθεία του λίπους του γάλακτος από φυτικά και ζωικά λίπη**

### **10.6.1. Γενικά**

Η νοθεία του λίπους του γάλακτος γίνεται με την αντικατάστασή του με άλλα φυτικά και ζωικά λίπη ή με την προσθήκη φυτικών ή με την προσθήκη αυτών. Χαρακτηριστικό του λίπους του γάλακτος των μηρυκαστικών είναι η μεγάλη περιεκτικότητά του σε μικρού μοριακού βάρους λιπαρά οξέα (~10-25% του συνόλου των λιπαρών οξέων ου λίπους) και ιδιαίτερα σε βουτυρικό οξύ, το οποίο δεν υπάρχει σε άλλο φυτικό λίπος. Έτσι, ο αριθμός Reichert-Meissl (R-M) του λίπους του γάλακτος είναι μεγαλύτερος των άλλων λίπων. Οι κυριότερες φυσικοχημικές ιδιότητες του λίπους του γάλακτος που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση της αυθεντικότητας του είναι οι αριθμοί Reichert-Meissl (R-M), Polenske, ιωδίου και σαπωνοποίησης και οι τιμές τους είναι οι εξής:

- Αριθμός Reichert-Meissl (R-M) = 26-35
- Αριθμός Polenske = 3-10
- Αριθμός ιωδίου = 26-35
- Αριθμός σαπωνοποίησης = 227-233

Ο αριθμός Reichert-Meissl είναι τα ml διαλύματος N/10 NaOH που απαιτούνται για την εξουδετέρωση των διαλυμάτων στο νερό πτητικών λιπαρών οξέων που αποστάζονται σε ειδική συσκευή από 5 gr λίπους, κάτω από ορισμένες συνθήκες. Αναφέρεται, κυρίως, στα κατώτερα πτητικά λιπαρά οξέα και κατά κύριο λόγο στο βουτυρικό οξύ, το οποίο είναι ευδιάλυτο στο νερό. Ο προσδιορισμός αυτού του αριθμού θα πρέπει να γίνεται με μεγάλη ακρίβεια και προσοχή, γιατί είναι συμβατικός και εξαρτάται από τις συνθήκες κάτω από τις οποίες πραγματοποιείται η δοκιμή αυτή. Σε περίπτωση που ο αριθμός αυτός είναι μικρότερος από 24, τότε θεωρούμε ότι υπάρχει νοθεία με άλλα εδάδιμα λίπη, αφού αυτά έχουν πολύ μικρότερο αριθμό Reichert-Meissl. Η μέθοδος Reichert-Meissl Value θεωρείται ως επίσημη μέθοδος του AOAC για τον προσδιορισμό των φυτικών λίπων στο γάλα.



Ο αριθμός Polenske αντιστοιχεί στον αριθμό των ml διαλύματος N/10 NaOH που απαιτούνται για την εξουδετέρωση των αδιάλυτων στο νερό πτητικών λιπαρών οξέων, που αποστάζονται από 5gr λίπους στην ειδική συσκευή, κάτω από ορισμένες συνθήκες. Ο αριθμός αυτός αναφέρεται στα αδιάλυτα στο νερό λιπαρά οξέα, καπρονικό, καπρυλικό και καπρινικό οξύ, το λίπος τους γάλακτος δεν περιέχει πολλά από αυτά τα αδιάλυτα μικρομοριακά πτητικά λιπαρά οξέα, έτσι ο αριθμός Polenske σε αυτό κυμαίνεται σε χαμηλές τιμές, από 2,5 ως 6.

Ο αριθμός ιωδίου αντιστοιχεί στο % κατά βάρος ιώδιο, εφρασμένο σε gr, που απαιτείται για κορεσμό των ακόρεστων λιπαρών οξέων 100 gr λίπους. Το μέγεθος του αριθμού ιωδίου μιας λιπαρής ουσίας εξαρτάται από την περιεκτικότητά της σε ακόρεστα λιπαρά οξέα και στηρίζεται στη μέτρηση των ολικών ακόρεστων λιπαρών οξέων που περιέχει το εξεταζόμενο λίπος.

Ο αριθμός σαπωνοποίησης παρέχει τα mg KOH που απαιτούνται για την πλήρη σαπωνοποίηση 1g λίπους. Το KOH επιδρά επί του λίπους στους 100°C, με αποτέλεσμα την υδρόλυσή του προς σάπωνα και γλυκερόλη. Με τη μέθοδο της σαπωνοποίησης, είναι προφανές ότι οι εστέρες των χαμηλού μοριακού βάρους λιπαρών οξέων απαιτούν σε αναλογία με το βάρος τους μεγαλύτερη ποσότητα KOH για τη σαπωνοποίησή τους από ότι εκείνοι των υψηλού μοριακού βάρους λιπαρών οξέων. [10]

#### **10.6.2. Μέθοδοι προσδιορισμού της νοθείας του λίπους του γάλακτος**

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι προσδιορισμού της γνησιότητας του λίπους του γάλακτος. Οι μέθοδοι αυτές στηρίζονται στις φυσικοχημικές σταθερές, στον προσδιορισμό της σύστασης των λιπαρών οξέων ή των τριγλυκεριδίων ή των ασαπωνοποίητων συστατικών του λίπους του γάλακτος. Ασαπωνοποίητα συστατικά μιας λιπαρής ύλης χαρακτηρίζονται τα συστατικά εκείνα που είναι αδιάλυτα στο νερό, μη πτητικά στους 100°C, δεν περιέχουν το μόριό τους λιπαρά οξέα και δεν σαπωνοποιούνται κατά την αλκαλική επεξεργασία τους στους 100°C. Το ασαπωνοποίητο κλάσμα του λίπους του γάλακτος αποτελεί το 1% κ.β. του λίπους και αποτελείται από στερόλες, λιποδιαλυτές βιταμίνες και καροτενοειδή.

Μια φυσική μέθοδος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην ταυτοποίηση διαφόρων λιπών είναι ο προσδιορισμός του σημείου τήξης του λίπους με ειδικές συσκευές και σωλήνες που τοποθετούνται στο λουτρό της συσκευής σημείου τήξης. Ως σημείο τήξης του λίπους λαμβάνεται η θερμοκρασία στην οποία επιτυγχάνεται πλήρης τήξη του δείγματος.

Άλλη μέθοδος είναι ο προσδιορισμός του δείκτη διάθλασης. Ο δείκτης διάθλασης είναι μια φυσική σταθερά της λιπαρής ύλης ορισμένης προέλευσης και για το λόγο αυτό μπορεί εξίσου να χρησιμοποιηθεί για ταυτοποίηση διάφορων λιπών.

Εκτός από τις φυσικοχημικές σταθερές του λίπους του γάλακτος που αναφέρθηκαν παραπάνω για τη διαπίστωση τυχόν νοθείας του, χρησιμοποιούνται και διάφορες χρωστικές αντιδράσεις που εφαρμόζονται πολλές φορές γιατί είναι εύκολες στην εκτέλεση, δίνουν γρήγορα αποτελέσματα και συνάγονται συμπεράσματα για την ταυτότητα της εξεταζόμενης λιπαρής ύλης. Ωστόσο, η αξία τους είναι αμφίβολη. Οι σπουδαιότερες χρωστικές αντιδράσεις είναι οι Baudouin, Halphen, Bellier κ.ά..

Η ανίχνευση των λιπαρών ουσιών στις μέρες μας γίνεται, συνήθως, με τη χρήση αέριου χρωματογράφου και λιγότερο με τις διάφορες χημικές δοκιμές. Με τον προσδιορισμό των λιπαρών οξέων επιτυγχάνεται ανίχνευση της νοθείας του λίπους του γάλακτος, καθώς η αναλογία λιπαρών οξέων διαφέρει στα διαφορετικά είδη λίπους. Για την εφαρμογή της τριχοειδούς αέριας χρωματογραφίας (capillary gas-liquid chromatography) θα πρέπει πρώτα να γίνει εξαγωγή των λιποδιαλυτών ουσιών του με διαλύτες και ακολουθεί η διαδικασία μεθυλεστεροποίησης των λιπαρών οξέων του γάλακτος.

Η διάκριση των ζωικών και φυτικών λιπών μπορεί, επίσης, να γίνει με βάση τις στερόλες που περιέχουν. Οι ζωικές λιπαρές ύλες περιέχουν μόνο χοληστερόλες, ενώ οι φυτικές μόνο φυτοστερόλες. Η ανάμειξη, συνεπώς, φυτικών λιπαρών υλών στο λίπος του γάλακτος μπορεί να διαπιστωθεί κατόπιν ανίχνευσης των φυτοστερολών. Η μέθοδος του Προτύπου 54 της IDF (1970) που είναι συμπληρωματική του Προτύπου 32 της IDF (1965), ανιχνεύει, κυρίως, τη β-σιτοστερόλη, η οποία αποτελεί την κύρια φυτική λιπαρή ουσία από τις φυτοστερόλες. Μετά από σαπωνοποίηση του λίπους, προετοιμάζεται αλκοολικό διάλυμα διγιτονίνης (digitonin) που καταβυθίζει τις στερόλες οι οποίες διαλύονται με τη βοήθεια ενός μίγματος φορμαμιδίου και δι-μέθυλο-φορμαμιδίου. Οι στερόλες που ελευθερώνονται εκχυλίζονται με πεντάνιο και στη συνέχεια διαχωρίζονται με την αέρια χρωματογραφία. Επειδή είναι γνωστός ο χρόνος έκλυσης της β-σιτοστερόλης, εντοπίζεται με σιγουριά η κορυφή της και ανιχνεύονται με βάση το χρόνο αυτό οι φυτικές στερόλες στο νοθευμένο λίπος του γάλακτος.

Τέλος, η αέρια χρωματογραφία μπορεί να συνδυαστεί και με άλλες τεχνικές, όπως η φασματοσκοπία μαζών (Mass Spectroscopy –MS-), ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (Nuclear Magnetic Resonance –NMR-) κ.ά. για τον προσδιορισμό των λιπαρών ουσιών που περιέχονται στο γάλα. [5]

### **10.7. Προσδιορισμός σκόνης γάλακτος σε γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα**

Οι μέθοδοι προσδιορισμού της σκόνης γάλακτος στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα βασίζονται σε κάποια συστατικά του γάλακτος, κυρίως πρωτεΐνες και λακτόζη, στα οποία συμβαίνουν χημικές και βιοχημικές αλλαγές κατά την παρασκευή της σκόνης, που αποτελούν δείκτες νοθείας. Τέτοιες μεταβολές είναι τα προϊόντα της αντίδρασης Maillard (MR), οι αλληλεπιδράσεις της κ-καζείνης και της β-γαλακτογλοβουλίνης και η αλλοδομή των ευαίσθητων στη θερμότητα πρωτεϊνών του ορού, σε έκταση ανάλογη των ερμokraσιών θέρμανσης που έχουν εφαρμοστεί κατά την αποξήρανση του γάλακτος. Μεταξύ των προϊόντων της αντίδρασης Maillard, που είναι η αντίδραση της αλδεϋδικής ομάδας της λακτόζης με τις ελεύθερες αμινομάδες των αμινοξέων των πρωτεϊνών του γάλακτος και κυρίως της λυσίνης, είναι και η παραγωγή της φουροσίνης (ε-φουρυλμεθυλ-L-λυσίνη ή ε-δεοξυλακτουλοζυλ-L-λυσίνη) και της υδροξυ-μεθυλ-φουρφοϋράλης (HMF). Το νωπό γάλα περιέχει σταθερές συγκεντρώσεις φουροσίνης και κυμαίνεται από 3,8-4,8 mg/100g πρωτεΐνης. Το παστεριωμένο γάλα, θετικό στην υπεροξειδάση και χωρίς την προσθήκη σκόνης γάλακτος, μπορεί να περιέχει μέχρι 7 mg φουροσίνης/100g πρωτεΐνης. Η αντίδραση Maillard εντείνεται κατά τη θερμική επεξεργασία του γάλακτος και μπορεί να εξελίσσεται όταν η ενεργότητα νερού είναι χαμηλή ( $a_w = 0,6-0,7$ ). Πράγματι, κατά την παρασκευή σκόνης άπαχου γάλακτος σε συνθήκες χαμηλής θέρμανσης (extra low heat skim milk powder), σχηματίζονται τουλάχιστον 60 mg φουροσίνης/100gr πρωτεΐνης. Επίσης, οι σκόνες γάλακτος έχουν υψηλά επίπεδα φουροσίνης, που κυμαίνονται από 65-500 mg φουροσίνης/100gr πρωτεΐνης. Έτσι η φουροσίνη θεωρείται κατάλληλη για χρήση ως δείκτης ανίχνευσης της προσθήκης σκόνης γάλακτος σε γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα. [26]

Επιπλέον, η υδροξυ-μεθυλ-φουρφοϋράλη (HMF) έχει χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για τον προσδιορισμό σκόνης γάλακτος που έχει προστεθεί σε γάλα. Η συγκέντρωση HMF στο νωπό γάλα που δεν έχει θερμανθεί, είναι χαμηλή. Αντίθετα, η αντίστοιχη τιμή για τη σκόνη πλήρους γάλακτος είναι 5,5 φορές υψηλότερη από αυτή του νωπού γάλακτος και η

συγκέντρωση της HMF στη σκόνη του άπαχου γάλακτος είναι ακόμη πιο υψηλή και από αυτή του πλήρους γάλακτος. Επομένως, η προσθήκη ανασυσταμένου γάλακτος από σκόνη σε γάλα παρουσιάζει σημαντική αύξηση σε σχέση με τη συγκέντρωσή της στο ανόθευτο γάλα.

Για την ανίχνευση προσθήκης ανασυσταμένου γάλακτος από σκόνη σε γάλα, χρησιμοποιούνται εκτός των παραπάνω δεικτών και άλλοι δείκτες όπως:

- Ο φθορισμός των προϊόντων πυρόλη και ιμιδαζόλη που σχηματίζονται στα τελευταία στάδια της αντίδρασης Maillard (advanced Maillard products –AMP-). Τα προϊόντα αυτά απορροφούν στα 330/420 nm και ο φθορισμός τους συμβολίζεται με  $F_{AMP}$ .
- Ο φθορισμός της διαλυτής τρυπτοφάνης σε pH 4,6 που απορροφά στα 290/340 nm. Ο φθορισμός αυτός είναι ένας τρόπος εκτίμησης της αλλοδομής των πρωτεϊνών του ορού και συμβολίζεται με  $F_{Trp}$ . Ο βαθμός αλλοδομής των πρωτεϊνών του ορού εξαρτάται από την ένταση της θερμικής επεξεργασίας που έχει εφαρμοστεί κατά την Παρασκευή της σκόνης γάλακτος.
- Ο δείκτης FAST (Fluorescence of Advanced Maillard products and Soluble Tryptophan), ο οποίος συνδυάζει τους παραπάνω δείκτες και ορίζεται ο λόγος  $F_{AMP}/F_{Trp} \times 100$ . [27]

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

### **Ελληνική**

1. Ανυφαντάκης Ε. (1986). Χημεία και ανάλυση του γάλακτος, Εκδόσεις Σταμούλης, Αθήνα
2. Αρβανιτογιάννης Ι.Σ., Σάνδρου Δ. και Κούρτης Λ. (2001). Ασφάλεια Τροφίμων, Εφαρμογή της Ανάλυσης Επικινδυνότητας και Κρίσιμων Σημείων Ελέγχου (HACCP) στις βιομηχανίες Τροφίμων και Ποτών, σελ. 76-78, Εκδόσεις University Studio Press, Θεσσαλονίκη
3. Καλατζόπουλος Γ. (1994). Η σημασία της ποιότητας του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων, Πρακτικά επιμορφωτικού σεμιναρίου στην Γαλακτοκομία της Εθνικής Επιτροπής Γάλακτος, Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα
4. Καλατζόπουλος Γ. Μαθήματα εφαρμοσμένης μικροβιολογίας γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων, Α΄ και Β΄ μέρος, Εκδόσεις Καραμπελόπουλος, Αθήνα
5. Καμιναρίδης Σ. και Μοάτσου Γ. (2009). Γαλακτοκομία, σελ. 23-26, 153-154, 212, 273-305, 308-334, 341-373, Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα-Αιγάλεω.
6. Κανονισμός Processing (ΕΚ) αριθμ. 1662/2006 της Επιτροπής για τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθμ. 853/2004 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου για τον καθορισμό ειδικών κανόνων υγιεινής για τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης.
7. Κεχαγιάς Χ. (2003). Εργαστηριακές ασκήσεις στην Τεχνολογία και Ποιότητα Γάλακτος και Γαλακτοκομικών Προϊόντων, ΑΤΕΙ Αθήνας, Αθήνα
8. Κώδικας Τροφίμων, Ποτών και Αντικειμένων Κοινής χρήσης (2003). Μέρος Α΄ - Τρόφιμα & Ποτά, Τόμος 2. Ελληνική Δημοκρατία, Υπουργείο Οικονομίας και Οικονομικών, Γενικό Χημείο του Κράτους, Εθνικό τυπογραφείο, Αθήνα
9. Μπαλατσούρας Γ. (2006). Μικροβιολογία Τροφίμων, σελ 150, 157, 162, 167, 169, 229 Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα-Αιγάλεω Διεθνής

## Βιβλιογραφία

10. APHA (1992). Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 14<sup>th</sup> edn. American Public Health Association, Washington DC.
11. IDF (1970). Determination of penicillin in milk by a disk assay. Standard 57. Brussel, Belgium: International Dairy Federation
12. IDF (1991). Milk & Milk products, Enumeration of microorganisms, Standard 100B. Brussels, Belgium: International Dairy Federation
13. IDF (1995). Milk, Enumeration of somatic cells (Standard No. 148A). Brussels, International Dairy Federation, Belgium
14. IDF (1995)/ISO14156. Milk & Milk products. Extraction methods for lipids and liposoluble compounds, Standard 172, Brussels, Belgium: International Dairy Federation
15. IDF (1996) Milk – Determination of fat content. Rose – Gottlieb – gravimetric method Standard 1D. Brussels, Belgium: International Dairy Federation
16. IDF (2006) 219/ISO 3889, Milk & Milk products – Determination of fat content – Mojonnier – type fat extraction flasks. Standard 219. Brussels, Belgium: International Dairy Federation
17. IDF (2007) 198/ ISO 22662. Milk & Milk products – Determination of lactose content by high – performance liquid chromatography (Reference method), Standard 198. Brussels, Belgium: International Dairy Federation
18. Laezza P., Nota G. and Addeo F. (1991). Determination of bovine and ovine milk in mixtures by fast – ion exchange chromatography of whey proteins. *Milchwissenschaft*, 46, 559-561
19. Levieux D. and Venien A. (1994). Rapid, Sensitive 2 – Site Elisa for Detection of Cows Milk in Goats or Ewes Milk Using Monoclonal-Antibodies. *J.Dairy Res.* 61, 91-99
20. Moatsou G. and Anifantakis E. (2003). 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
21. Naclerio, Gino, Ricca E., Sacco M. and de Felica M., (1993). Antimicrobial activity of a newly identified bacteriocin of *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 12: 4313 - 4316

22. Rehman Z., Saeed A. and Zafar S.I., (2000). Hydroxymethylfurfural as an indicator for the detection of dried powder in liquid milk. *Milchwissenschaft*, pp 256-257
23. Resmini P., Pellegrino L. and Masotti F. (1992a) Evaluation of the extent of the Maillard reaction for the quality control of low – heat – treated dairy products. *IDF Special Issue N. 9303*: 153
24. Resmini P. and Pellegrino L. (1994) HPLC of furosine for evaluating Maillard reaction damage in skim milk powders during processing and storage. *Ital. J. Food Sci.* Volume 15, Issue 4, pp. 473 - 484