

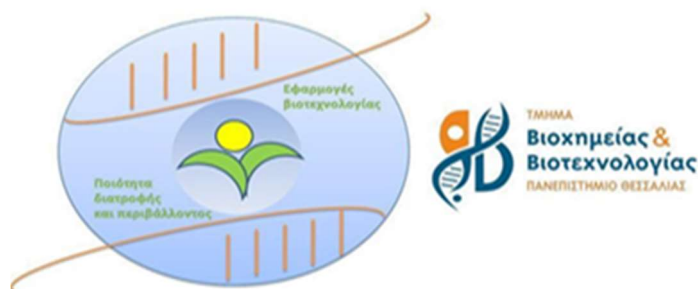
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
«Βιοτεχνολογία - Ποιότητα Διατροφής και Περιβάλλοντος»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
«Κινητική μελέτη απενεργοποίησης της αλκαλικής φωσφατάσης σε μη
αγελαδινά γάλατα»

Αναστασία Α. Τζερεμέ
Τεχνολόγος Τροφίμων
Α.Τ.Ε.Ι Θεσσαλονίκης

ΛΑΡΙΣΑ, 2022



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

«Βιοτεχνολογία- Ποιότητα Διατροφής και Περιβάλλοντος»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Κινητική μελέτη απενεργοποίησης της αλκαλικής φωσφατάσης σε μη
αγελαδινά γάλατα»

«Kinetic study of alkaline phosphatase inactivation in non-bovine milks»

Αναστασία Α. Τζερεμέ

Τεχνολόγος Τροφίμων

Α.Τ.Ε.Ι Θεσσαλονίκης

ΛΑΡΙΣΑ, 2022

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

1. **Αθανάσιος Μανούρας:** Καθηγητής, Τμήμα Διαιτολογίας και Διατροφολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **επιβλέπων**
2. **Ελένη Μαλισσιόβα:** Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **μέλος τριμελούς επιτροπής**
3. **Ελένη Γώγου** Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής , Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **μέλος τριμελούς επιτροπής**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η εξέλιξη των τροφίμων στον τομέα της ασφάλειας και της ποιότητας και ιδιαίτερα ο κλάδος των γαλακτοκομικών προϊόντων αποτελεί ένα μείζον θέμα για τον επιστημονικό κόσμο δεδομένου ότι οι ανάγκες των καταναλωτών αλλάζουν συνεχώς. Ο άνθρωπος χρησιμοποιεί εκτός από το γάλα των αγελάδων που είναι τα κύρια γαλακτοπαραγωγικά ζώα σήμερα, και το γάλα άλλων θηλαστικών αλλά και προβάτων, αιγών, βουβαλιών, ονόγαλα κ.α. Αυτό έχει ως συνέπεια να καθιστά αναγκαία την μελέτη και την περαιτέρω ανάπτυξη των ήδη γνωστών μεθόδων θερμικής επεξεργασίας, όπως η παστερίωση, για την ασφαλή κατανάλωση όλων αυτών των ειδών γάλακτος. Οι κατάλληλες συνθήκες παστερίωσης σε ότι αφορά την θερμοκρασία και τον χρόνο καθορίζονται από τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό EC 2074/2005. Η θερμική απενεργοποίηση της αλκαλικής φωσφατάσης (alkaline Phosphatase ALP) σε διεργασίες παστερίωσης γάλακτος αναγνωρίζεται και είναι αποδεκτή ως δείκτης επικύρωσης της αποτελεσματικότητας της παστερίωσης του αγελαδινού γάλακτος όμως δεν ισχύει το ίδιο για τα μη αγελαδινά γάλατα καθώς υπάρχουν δεδομένα στην βιβλιογραφία όπως σε μια πρόσφατη έκθεση της Ευρωπαϊκής Αρχής για την ασφάλεια των τροφίμων (European Food Safety Authority-EFSA), τέθηκε το ερώτημα <ποια είναι η χρήση και ποιοι είναι οι περιορισμοί της δοκιμής ALP για την επαλήθευση της θερμότητας παστερίωσης γάλακτος από αιγοπρόβατα και άλλα είδη, που παράγουν τέτοια προϊόντα για ανθρώπινη κατανάλωση> σε σύγκριση με τα βοοειδή, διότι πιθανόν να μην επαρκεί ο συγκεκριμένος έλεγχος λόγω διαφορών της θερμοανθεκτικότητας και της κινητικής απενεργοποίησης της (ALP) στα διάφορα είδη γάλακτος. Έτσι συνίσταται μια πιο βαθιά τεκμηριωμένη μελέτη της κινητικής θερμικής απενεργοποίησης σε διαφορετικά είδη γάλακτος ώστε να υπάρχουν αξιόπιστα δεδομένα για την εύρεση των τιμών D (ο χρόνος που απαιτείται για μείωση κατά μία τάξη μεγέθους δηλαδή από 100% στο 10% και μετράτε σε χρόνο) και z (ο αριθμός των βαθμών °C που απαιτούνται για να μειωθεί η παράμετρος D κατά μια τάξη μεγέθους) της απενεργοποίησης ALP στο γάλα που προέρχεται από διάφορα ζωικά είδη. Μια τυπική πρακτική για την αξιολόγηση της αλκαλικής φωσφατάσης σε μη αγελαδινά γάλατα είναι η κινητική μελέτη απενεργοποίησης της ALP. Η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε στην κινητική μελέτη της θερμικής απενεργοποίησης της ALP σε 6 είδη γάλακτος: αγελαδινό, πρόβειο, γίδινο, ονόγαλα, βουβαλιού και καμήλας με στόχο να προσδιοριστούν οι κινητικές παράμετροι οι οποίες μπορούν στη συνέχεια να αξιολογηθούν ως προς τη δυνατότητα χρήσης της ALP ως δείκτη παστερίωσης και σε μη αγελαδινά γάλατα. Η κινητική μελέτη πραγματοποιήθηκε στο θερμοκρασιακό εύρος 63-75°C. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα η θερμική απενεργοποίηση της ALP σε όλα τα υπό μελέτη είδη γάλακτος ακολουθεί κινητική 1ης τάξης. Στη συνέχεια κατασκευάστηκε το πρωτογενές και δευτερογενές μαθηματικό μοντέλο θερμικής απενεργοποίησης της ALP από όπου και προσδιορίστηκαν οι κινητικές παράμετροι του χρόνου υποδεκαπλασιασμού (D-value) και της θερμικής αντίστασης (z-value). Παρατηρήθηκε ότι οι τιμές D_{63°C} της ALP στο αγελαδινό και πρόβειο γάλα ήταν παρόμοιες ενώ στα υπόλοιπα είδη γάλακτος (γίδινο,

καμήλας, ονόγαλα και βουβάλι) η ALP παρουσίασε μικρότερους χρόνους υποδεκαπλασιασμού από αυτούς του αγελαδινού γάλακτος. Όσον αφορά τις τιμές z-value παρατηρήθηκε ότι αυτές κυμάνθηκαν από 5,9 έως 7,6 με το αγελαδινό γάλα να παρουσιάζει τη μικρότερη τιμή z-value, που σημαίνει ότι η ALP είναι περισσότερο θερμοευαίσθητη στο αγελαδινό γάλα σε σύγκριση με τα υπόλοιπα είδη γάλατος. Συγκεκριμένα δίνεται η φθίνουσα σειρά των τιμών του z-value: ΖΚΑΜΗΛΑ>ΖΒΟΥΒΑΛΙ>ΖΠΡΟΒΕΙΟ>ΖΓΙΔΙΝΟ>ΖΓΑΪΔΟΥΡΑΣ>ΖΑΓΕΛΑΔΑ. Συμπερασματικά, διαπιστώθηκε ότι οι κινητικές παράμετροι της θερμικής απενεργοποίησης της ALP στα διαφορετικά είδη γάλακτος διαφέρουν με αυτές της ALP στο αγελαδινό γάλα το οποίο και παρουσίασε την μεγαλύτερη θερμοευαισθησία ενώ η ALP στο γάλα καμήλας παρουσίασε τη μικρότερη θερμοευαισθησία. Αυτά τα ευρήματα εντείνουν τους προβληματισμούς που έχουν αναγνωριστεί από την ακαδημαϊκή κοινότητα και το σχετικό ερώτημα της EFSA (2021) για το εάν η δοκιμή της αλκαλικής φωσφατάσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αξιόπιστος δείκτης επικύρωσης των διεργασιών παστερίωσης του γάλατος και σε άλλα είδη πέραν του αγελαδινού. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας μπορούν να αξιοποιηθούν ως πολύτιμα εργαλεία για την περαιτέρω μελέτη της ταυτόχρονης κινητικής μελέτης της απενεργοποίησης της ALP σε σύγκριση με την καταστροφή μικροβιακών πληθυσμών ενδιαφέροντος σε διεργασίες παστερίωσης γάλακτος σε άλλα είδη.

Λέξεις- κλειδιά: αλκαλική φωσφατάση (ALP), παστερίωση, αγελαδινό γάλα, πρόβειο γάλα, γάλα, βουβαλίσιο γάλα, γάλα ονόγαλα, γάλα καμήλας, κινητική μελέτη θερμικής απενεργοποίησης ALP.

ABSTRACT

The evolution of food safety and quality and especially the dairy sector is a major topic for the scientific world as the needs are constantly changing. In addition to, the milk of cows, which are the main dairy animals today, people uses the milk of other mammals as well as sheep, goats, buffaloes, donkeys, etc. This has the consequence of necessitating the study and further development of the already known heat treatment methods, such as pasteurization, for the safe consumption of all these types of milk. The appropriate pasteurization conditions in terms of temperature and time are determined by European Regulation EC 2074/2005. Thermal inactivation of alkaline phosphatase (ALP) in milk pasteurization processes is recognized and accepted as a validating indicator of the pasteurization efficiency of cow's milk but the same is not true for non-cow's milk as there are data in the literature as in a recent report of the European Food Safety Authority (EFSA), the question was asked <what is the use and what are the limitations of the ALP test for verifying the heat pasteurization of milk from goats and sheep and other species that produce such products for human consumption> compared to cattle, because specific control may not be sufficient due to differences in heat resistance and alkaline phosphatase (ALP) inactivation kinetics in different types of milk. Thus a deeper documented study of the thermal inactivation kinetics in different types of milk is recommended so that there are reliable data to find the D values (the time required to decrease by one order of magnitude i.e. from 100% to 10% and you measure in time) and z (the number of degrees °C required to decrease the D parameter by an order of magnitude) of ALP inactivation in milk derived from various animal species. A standard practice for the assessment of alkaline phosphatase in non-bovine milks is the alkaline phosphatase inactivation kinetic study. The present study focused on the kinetic study of the thermal inactivation of ALP in 6 types of milk: cow, sheep, goat, donkey, buffalo and camel with the aim of determining the kinetic parameters which can then be evaluated for the possibility of using ALP as pasteurization index in non-cow milks as well. The kinetic study was performed in the temperature range of 63-75°C. According to the results, the thermal deactivation of ALP in all studied types of milk follows 1st order kinetics. Then, the primary and secondary mathematical model of thermal inactivation of ALP was constructed from which the kinetic parameters of the sub-tenuplication time (D-value) and the thermal resistance (z-value) were determined. It was observed that the D_{63°C} values of ALP in cow's and sheep's milk were similar while in the other types of milk (goat, camel, donkey and buffalo) ALP showed shorter subtenfold times than those of cow's milk. Regarding the z-values it was observed that these ranged from 5.9 to 7.6 with cow's milk showing the lowest z-value, which means that ALP is more heat sensitive in cow's milk compared to the rest of the milk types. Specifically, the descending order of the z-value is given: z_{CAMEL}>z_{BUFFALO}>z_{BOVINE}>z_{GOAT}>z_{DOCK}>z_{COW}. In conclusion, it was found that the kinetic parameters of the thermal inactivation of ALP in the different types of milk differ with those of ALP in cow's milk which showed the greatest thermosensitivity while

ALP in camel milk showed the least thermosensitivity. These findings add to the concerns recognized by the academic community and the related question of EFSA (2021) whether the alkaline phosphatase test can be used as a reliable indicator to validate milk pasteurization processes in species other than bovine. The results of the present work can be exploited as valuable tools for the further study of the simultaneous kinetic study of ALP inactivation compared to the destruction of microbial populations of interest in milk pasteurization processes in other species

Keywords: alkaline phosphatase, pasteurization, cow's milk, sheep's milk, goat's milk, buffalo milk, donkey milk, camel milk, ALP activity, kinetic study.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση	14
2.1 Ορισμός γάλακτος- Γενικά στοιχεία για την χημική σύσταση του γάλακτος	14
2.2 Γενικά στοιχεία της Θερμικής επεξεργασίας γάλακτος	15
2.2.1 Θέρμιση ή Θέρμισμα	15
2.2.2. Παστερίωση	15
2.2.3. Υψηλή παστερίωση	16
2.2.4. Επεξεργασία παρατεταμένης διάρκειας ζωής (ESL).....	16
2.2.5. Επεξεργασία UHT (Ultra High Temperature)	17
2.2.6. Αποστείρωση	17
2.3 Γενικές πληροφορίες για την Αλκαλική φωσφατάση (ALP).....	18
2.3.1 Δραστηκότητα της Αλκαλικής φωσφατάσης (ALP)	19
2.3.2 Επίδραση του λίπους του γάλακτος.....	20
2.3.3 Όρια ALP στο μη αγελαδινό παστεριωμένο γάλα	20
2.3.4 Επανενεργοποίηση ALP	20
2.4 Θερμική σταθερότητα της ALP σε γάλα διαφορετικών ειδών	21
2.5 Μέθοδοι προσδιορισμού ALP	23
2.5.1 Χρωματομετρικές τεχνικές	23
2.5.2 Φθορισμομετρικές τεχνικές	24
2.5.3 Τεχνικές Χημειοφωταύγειας	24
2.5.4 Ανοσοχημικές τεχνικές	25
2.6 Κινητική αλκαλικής φωσφατάσης.....	25
3. Μεθοδολογία	28
3.1 Δειγματοληψία	28
3.2 Πειραματική πορεία	29
3.2.1 Προκαταρκτικές δοκιμές	29
3.2.2 Θερμική επεξεργασία δειγμάτων	30
3.2.3 Προσδιορισμός εναπομένουσας ενζυμικής ενεργότητας αλκαλικής φωσφατάσης (ALP)	31
3.2.4 Εφαρμογή μοντέλων κινητικής –Βασικές αρχές κινητικής	33
5. Συμπεράσματα	52
6. Βιβλιογραφία	54

Περιεχόμενα πινάκων

Πίνακας 1: Χημική σύσταση διαφορετικών ειδών γάλακτος.....	14
Πίνακας 2: .Κινητικές παράμετροι D και z για συγκεκριμένους μικροοργανισμούς στο γάλα.....	28
Πίνακας 3: Είδος γάλακτος και αντίστοιχη αραίωση.....	30
Πίνακας 4: Θερμοκρασίες παστερίωσης όλων των ειδών γάλακτος σε διαφορετικές χρονικές στιγμές.....	31
Πίνακα 5: οι τιμές θερμικής απενεργοποίησης k (min^{-1}) για το κάθε είδος γάλακτος χωριστά και οι αντίστοιχες θερμοκρασίες.....	40
Πίνακας 6: ο χρόνος υποδεκαπλασιασμού της αλκαλικής φωσφατάσης D στις θερμοκρασίες παστερίωσης.....	43
Πίνακας 7 : τιμές θερμικής αντίστασης z -value για κάθε είδος γάλακτος.....	48

Περιεχόμενα διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Καμπύλη TDT (thermal death time).....	26
Διάγραμμα 2: Γραφική παράσταση απορρόφησης σε συνάρτηση με τις αραιώσεις στο γάλα καμήλας.....	30
Διάγραμμα 3: Τυπικό διάγραμμα εξάρτησης του χρόνου υποδεκαπλασιασμού από τη θερμοκρασία.....	34
Διάγραμμα 4: εκθετική μείωση της εναπομένουσας ενζυμικής ενεργότητας για το γάλα καμήλας σε συνάρτηση με τους χρόνους παστερίωσης σε θερμοκρασία 68°C	35
Διάγραμμα 5: Θερμική απενεργοποίηση της ALP σε θερμοκρασία 63°C σε (α) αγελαδινό γάλα, (β) πρόβειο γάλα, (γ) γίδινο γάλα, (δ) γάλα ονόγαλα, (ε) γάλα καμήλας, και (στ) βουβαλίσιο γάλα.....	36
Διάγραμμα 6: Θερμική απενεργοποίηση της ALP σε θερμοκρασία 68°C σε (α) αγελαδινό γάλα, (β) πρόβειο γάλα, (γ) γίδινο γάλα, (δ) γάλα ονόγαλα, (ε) γάλα καμήλας, και (στ) βουβαλίσιο γάλα.....	37
Διάγραμμα 7: Θερμική απενεργοποίηση της ALP σε θερμοκρασία 72°C σε (α) αγελαδινό γάλα, (β) πρόβειο γάλα, (γ) γίδινο γάλα, (δ) γάλα ονόγαλα, (ε) γάλα καμήλας, και (στ) βουβαλίσιο γάλα.....	38
Διάγραμμα 8: Θερμική απενεργοποίηση της ALP σε θερμοκρασία 75°C σε (α) αγελαδινό γάλα, (β) πρόβειο γάλα, (γ) γίδινο γάλα, (δ) γάλα ονόγαλα, (ε) γάλα καμήλας, και (στ) βουβαλίσιο γάλα.....	39

Διάγραμμα 9: θερμική απενεργοποίηση για θερμοκρασίες 63,68,72 και 75°C για γάλα αγελάδος.....	40
Διάγραμμα 10: θερμική απενεργοποίηση για θερμοκρασίες 63,68,72 και 75°C για πρόβειο γάλα.....	41
Διάγραμμα 11: θερμική απενεργοποίηση για θερμοκρασίες 63,68,72 και 75°C σε γίδινο γάλα	41
Διάγραμμα 12: θερμική απενεργοποίηση για θερμοκρασίες 63,68,72 και 75°C σε γάλα ονόγαλα.	42
Διάγραμμα 13: θερμική απενεργοποίηση σε θερμοκρασίες 63,68,72 και 75°C σε γάλα καμήλας.....	42
Διάγραμμα 14: θερμική απενεργοποίηση για θερμοκρασίες 63,68,72 και 75°C σε γάλα βουβαλιού.....	43
Διάγραμμα 15: ο λογάριθμος των τιμών D σε συνάρτηση της θερμοκρασίας σε γάλα αγελάδος.....	44
Διάγραμμα 16: ο λογάριθμος των τιμών D σε συνάρτηση της θερμοκρασίας σε γάλα πρόβειο.....	45
Διάγραμμα 17: ο λογάριθμος των τιμών D σε συνάρτηση της θερμοκρασίας σε γάλα γίδινο.....	45
Διάγραμμα 18: ο λογάριθμος των τιμών D σε συνάρτηση της θερμοκρασίας σε γάλα ονόγαλα.....	46
Διάγραμμα 19: ο λογάριθμος των τιμών D σε συνάρτηση της θερμοκρασίας σε γάλα καμήλας.....	46
Διάγραμμα 20: ο λογάριθμος των τιμών D σε συνάρτηση της θερμοκρασίας σε γάλα βουβάλι.....	48
Διάγραμμα 21: Συγκριτικό διάγραμμα θερμικής απενεργοποίησης ALP στους 63 °C στα έξι υπό μελέτη είδη γάλακτος.....	51
Διάγραμμα 22: Συγκριτικό διάγραμμα θερμικής απενεργοποίησης ALP στους 68 °C στα έξι υπό μελέτη είδη γάλακτος.....	51
Διάγραμμα 23: Συγκριτικό διάγραμμα θερμικής απενεργοποίησης ALP στους 72 °C στα έξι υπό μελέτη είδη γάλακτος.....	52
Διάγραμμα 24: Συγκριτικό διάγραμμα θερμικής απενεργοποίησης ALP στους 75 °C στα έξι υπό μελέτη είδη γάλακτος.....	52

Περιεχόμενα εικόνων

Εικόνα 1: Αντιδραστήρια Tris HCl και Disodium 4-Nitrophenyl Phosphate Hexahydrate.....	31
Εικόνα 2: Φασματοφωτόμετρο UV /VIS και υδατόλουτρο.....	32
Εικόνα 3: οι γυάλινοι φυγοκεντρικοί δοκιμαστικοί σωλήνες με τα αντίστοιχα διαλύματα και δείγματα.....	33

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Χημείας, Βιοχημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του τμήματος *Διαιτολογίας και Διατροφολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας* και ένα μέρος αυτού επίσης στο εργαστήριο Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης του τμήματος *Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας*. Εκφράζω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον επιβλέπων καθηγητή μου τον **κ. Μανούρα Αθανάσιο**, καθηγητή του τμήματος Διαιτολογίας και Διατροφολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την βοήθεια, την καθοδήγηση και την πολύτιμη στήριξη που μου προσέφερε καθώς επίσης και την άριστη συνεργασία που είχαμε στα πλαίσια εκπόνησης αυτής της εργασίας. Επίσης οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην **κ. Μαλισσιόβα Ελένη**, επίκουρη καθηγήτρια, του τμήματος Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για τον πολύτιμο χρόνο και βοήθεια που πρόθυμα μου διέθεσε για να μου δώσει στοιχεία και γνώσεις για το θέμα της εργασίας μου. Η ολοκλήρωση αυτής της πτυχιακής θα ήταν αδύνατη χωρίς την πολύτιμη βοήθεια της **κ. Γώγου Ελένης**, επίκουρη καθηγήτρια του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και της εκφράζω ένα βαθύ ευχαριστώ για όλη την βοήθεια που μου προσέφερε όλο αυτό το διάστημα. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τα παιδιά μου και τον άντρα μου για την υπομονή και την στήριξη που είχα μέχρι την ολοκλήρωση της εργασίας μου.

1. Εισαγωγή

Η παγκόσμια παραγωγή γάλακτος βασίζεται στα βοοειδή (85%) που είναι καθοριστικής σημασίας πρώτη ύλη για την επεξεργασία προϊόντων στο χώρο της βιομηχανίας τροφίμων και επίσης αντιπροσωπεύεται και από άλλα πέντε είδη γάλακτος που σύμφωνα με μελέτες είναι το βουβαλίσιο γάλα (11%), το κατσικίσιο (2,3%), το πρόβειο (1,4%), το γάλα καμήλας (0,2%) (Gerosa et al.2012) και το γάλα αλόγου και ονόγαλα(<0,1%) (Faye et al.2012). Επιπλέον, οι πληροφορίες και η γνώση για το αγελαδινό γάλα και την επεξεργασία του είναι πιο ολοκληρωμένη, καθώς αυτό το γάλα έχει μεγάλη σημασία στη διατροφή του ανθρώπου. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε ορισμένες περιοχές του κόσμου υπάρχουν κάποιες συνθήκες που αποκλείουν τη γαλακτοκομική χρήση των βοοειδών και το γάλα λαμβάνεται από άλλα είδη ζώων και αποτελεί την κατάλληλη πηγή πρόσληψης πολύτιμων συστατικών για τους κατοίκους αυτών των περιοχών. Γιαυτό τον λόγο η θερμική απενεργοποίηση της ALP σε διεργασίες παστερίωσης γάλακτος αναγνωρίζεται και είναι αποδεκτή ως δείκτης επικύρωσης της αποτελεσματικότητας της παστερίωσης του αγελαδινού γάλακτος όμως δεν ισχύει το ίδιο για τα μη αγελαδινά γάλατα. Σε πρόσφατη έκθεση της Ευρωπαϊκής Αρχής για την ασφάλεια των τροφίμων (European Food Safety Authority-EFSA), τέθηκε το ερώτημα ότι πιθανόν να μην επαρκεί ο έλεγχος της αλκαλικής φωσφατάσης λόγω διαφορών στην θερμοανθεκτικότητα και την κινητική απενεργοποίησης της αλκαλικής φωσφατάσης (ALP) στα διάφορα είδη γάλακτος. Σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 852/2004 του Ευρωπαϊκού κοινοβουλίου και του συμβουλίου της 29ης Απριλίου 2004 για την υγιεινή των τροφίμων αναφέρεται ότι για την διασφάλιση ποιότητας γάλακτος η κατάλληλη θερμοκρασία παστερίωσης για να έχουμε ανενεργή αλκαλική φωσφατάση (ALP) είναι 72°C για 15 sec χωρίς όμως αυτή η πληροφορία να εξειδικεύεται σε όλα τα είδη γάλακτος. Η δοκιμή της αλκαλικής φωσφατάσης είναι μια δοκιμή ελέγχου επιτυχούς παστερίωσης γάλακτος η οποία χρησιμοποιείται στα αγελαδινά γάλατα με επιτυχία αλλά και στα μη αγελαδινά. Όμως σύμφωνα με δημοσίευμα της (EFSA, 2021) συνίσταται μια σε βάθος μελέτη κινητικής θερμικής απενεργοποίησης σε γάλα από διάφορα ζωικά είδη για την λήψη αξιόπιστων δεδομένων. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να επικεντρωθεί στην κινητική μελέτη της θερμικής απενεργοποίησης της ALP σε 6 είδη γάλακτος: αγελαδινό, πρόβειο, γίδινο, ονόγαλα, βουβαλιού και καμήλας με στόχο να προσδιοριστούν οι κινητικές παράμετροι οι οποίες μπορούν στη συνέχεια να αξιολογηθούν ως προς τη δυνατότητα χρήσης της ALP ως δείκτη παστερίωσης και σε μη αγελαδινά γάλατα.

2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση

2.1 Ορισμός γάλακτος- Γενικά στοιχεία για την χημική σύσταση του γάλακτος

Το γάλα είναι ένα σύνθετο βιολογικό έκκριμα των μαστών των θηλαστικών συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπινου είδους, και αποτελείται από διάφορους βιοενεργούς παράγοντες. Το ανθρώπινο γάλα αντιπροσωπεύει μια μοναδική πηγή θρεπτικών συστατικών που προσαρμόζεται κατά τη γαλουχία στις συγκεκριμένες ανάγκες του αναπτυσσόμενου βρέφους(Dayon et al. 2021). Σύμφωνα με τον ελληνικό Κώδικα Τροφίμων και Ποτών ,(2003), γάλα ονομάζεται το απαλλαγμένο από πρωτόγαλα προϊόν της ολοσχερούς και χωρίς διακοπή άλμεξης υγιούς γαλακτοφόρου ζώου, που ζει και τρέφεται υπό υγιεινούς όρους και δεν βρίσκεται σε κατάσταση υπερκόπωσης.

Το γάλα όλων των θηλαστικών αποτελείται από τα ίδια κύρια συστατικά, δηλαδή νερό, πρωτεΐνες, λίπη, υδατάνθρακες, βιταμίνες και μέταλλα. Η σύνθεση του γάλακτος μπορεί να διαφέρει σημαντικά ,Κώδικας Τροφίμων και Ποτών (2003) , ακόμη και ανάμεσα σε ένα ίδιο είδος, λόγω της επίδρασης διαφόρων παραγόντων όπως :

- α) γενετικών (είδος, φυλή),
- β) φυσιολογικών (στάδιο γαλουχίας, διάστημα αρμέγματος),
- γ) διατροφικών (ενεργειακή αξία, σύνθεση θρεπτικών συστατικών)
- δ) περιβαλλοντικών συνθηκών (τοποθεσία, εποχή)

Στον παρακάτω πίνακα περιγράφονται τα βασικά χημικά χαρακτηριστικά του γάλακτος του κάθε είδους ζώου.

Πίνακας 1: Χημική σύσταση διαφορετικών ειδών γάλακτος .

	Γαϊδούρα	Αγελάδα	Πρόβατο	Αίγα	Βουβάλι	Καμήλα
Ολικά στερεά (g/l)	88-117	118-130	181-200	119-163	157-172	119-150
Πρωτεΐνες (g/l)	14-20	30-39	45-70	30-52	27-47	24-42
Καζεΐνη/ορός γάλακτος	1,28	4,7	3,1	3,5	4,6	2,7-3,2
Λίπος (g/l)	3-18	33-54	50-90	30-72	53-90	20-60
Λακτόζη (g/l)	58-74	44-56	41-59	32-50	32-49	35-51
Τέφρα (g/l)	3-5	7-8	8-10	7-9	8-9	6,9-9
Ενέργεια (KJ/l)	1705	2709-2843	4038-4439	2802-2894	4244-4779	2848

Βιβλιογραφικές πηγές : Arman, Kay, Goodall, & Sharman, 1974;11) Guo et al. 2007; Hassan et al. 2009; Malacarne et al. 2002; Medhammar et al. 2012; Mittaine, 1962; Naert et al, 2013; Park et al. 2007; Poto_cnik et al. 2011; Salimei & Fantuz, 2012;10) Shamsia, 2009; Souci, Fachmann, & Kraut, 2008 , Uniacke-Lowe, 2011)

2.2 Γενικά στοιχεία της Θερμικής επεξεργασίας γάλακτος

Έρευνες έχουν δείξει ότι υπάρχει επιτακτική ανάγκη εξυγίανσης του νωπού γάλακτος καθώς αυτό είναι ένα μέσο μεταφοράς παθογόνων μικροοργανισμών και, κατά συνέπεια, η υποχρεωτική παστερίωση είναι απαραίτητη για την ασφάλεια των τροφίμων. Επιπλέον, με τη διαδικασία της παστερίωσης επιτυγχάνεται η αύξηση του χρόνου συντήρησης των γαλακτοκομικών προϊόντων (Lewis & Deeth et al.2009).

Τα κυριότερα παθογόνα μικρόβια του γάλακτος είναι: *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella spp.*, *Aeromonas Hydrophila*, *Brucella spp.*, *Mycobacterium bovis* ή *tuberculosis*, Εντεροπαθογόνα και βεροτοξινογόνα στελέχη *E. coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, παθογόνοι στρεπτόκοκκοι και θειοαναγωγικά κλωστηρίδια (Pino et al.2018).

Έτσι, για την κατανάλωση ασφαλούς προϊόντος, το γάλα υφίσταται διάφορες θερμικές επεξεργασίες ώστε το προϊόν να είναι πιο ασφαλές και να υπάρχει μεγαλύτερη διάρκεια ζωής. Κατά την διάρκεια των θερμικών επεξεργασιών οι συνθήκες θερμοκρασίας και χρόνου καθορίζονται σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό (EC 2074/2005). Οι διάφορες θερμικές επεξεργασίες που λαμβάνουν χώρα ανάλογα με την ένταση είναι η Θέρμιση ή Θέρμισμα, η παστερίωση, η υψηλή παστερίωση, η επεξεργασία παρατεταμένης διάρκειας ζωής (ESL), η επεξεργασία UHT (Ultra High Temperature) και η αποστείρωση σε περιέκτη (EFSA, 2021).

2.2.1 Θέρμιση ή Θέρμισμα

Η διαδικασία θερμίματος (υποπαστερίωση) χρησιμοποιείται για την διατήρηση του νωπού γάλακτος όταν αυτό πρέπει να διατηρηθεί κρύο για ένα διάστημα πριν υποβληθεί σε κάποια επεξεργασία. Η θέρμανση του γάλακτος γίνεται στους 57–68°C για 5–20 δευτερόλεπτα η οποία έχει ως στόχο στο να εμποδίσει την ανάπτυξη ψυχρότροφων βακτηρίων που δεν σχηματίζουν σπόρια, τα οποία μπορεί, εάν αφεθούν να φτάσουν σε υψηλά επίπεδα και να απελευθερώσουν ανθεκτικές στη θερμότητα πρωτεάσες και λιπάσες στο γάλα (Deeth & Lewis, 2017). Επίσης, η θερμοποίηση δεν απενεργοποιεί την αλκαλική φωσφατάσης (ALP) και το γάλα μπορεί να διατηρηθεί στο ψυγείο έως και τρεις ημέρες. (EFSA, 2021).

2.2.2.Παστερίωση

Υπάρχουν πολλά κρίσιμα σημεία όπου μπορεί να εμφανισθεί μόλυνση του γάλακτος από βακτήρια. Τα πιο σημαντικά από αυτά είναι κατά τη διαδικασία του αρμέγματος, κατά την διάρκεια μεταφοράς του γάλακτος ή ακόμη και από τον εξοπλισμό και τον χώρο επεξεργασίας αυτού. Επειδή το γάλα είναι ένα μέσο ανάπτυξης βακτηρίων και ο πληθυσμός αυτών μπορεί να διπλασιασθεί κάθε μισή ώρα σε συνθήκες 25°C και pH 6,0-6.5, αρχικά, υποβάλλεται σε μια ήπια θερμική επεξεργασία (± 10 s, 65°C) αμέσως μετά

την άφιξη στο εργοστάσιο και πριν την αποθήκευση και επεξεργασία αυτού (Millogo et al.2010).

Η παστερίωση είναι η θέρμανση του γάλακτος και των υγρών προϊόντων αυτού που έχει ως στόχο τη μείωση του αριθμού ανθεκτικών στην θερμότητα παθογόνων μικροοργανισμών που δεν σχηματίζουν σπόρια, σε βαθμό τέτοιο ώστε να μην αποτελεί κίνδυνο για την υγεία του καταναλωτή και συμβάλει επίσης στην παράταση της διάρκειας του προϊόντος (CAC, 2004). Είναι μια ήπια θερμική επεξεργασία χωρίς ιδιαίτερη επίδραση στις φυσικοχημικές ιδιότητες αλλά και σε ότι έχει σχέση με τα θρεπτικά συστατικά του γάλακτος (Bylund 1995, Deeth HC 2006). Επιπλέον για να διασφαλισθεί η μεγαλύτερη διάρκεια ζωής του παστεριωμένου γάλακτος ακόμη και σε κλειστές συσκευασίες χρειάζεται να γίνει ψύξη αυτού.

Οι συνηθισμένες συνθήκες παστερίωσης είναι:

α) Η βραδεία παστερίωση (Low-Temperature, Long-Time, LTLT), όπου οι συνθήκες παστερίωσης είναι στους 63° C για 30 λεπτά

β) Η ταχεία παστερίωση (High-Temperature, Short-Time, HTST), όπου οι συνθήκες παστερίωσης είναι στους 72° C για 15 δευτερόλεπτα

γ) Οποιοσδήποτε άλλος συνδυασμός με στόχο την επίτευξη του ίδιου αποτελέσματος δηλαδή τα προϊόντα να εμφανίζουν αρνητική αντίδραση σε αλκαλική φωσφατάση (ALP) που σημαίνει όχι μεγαλύτερη από 350 mU/L. (EFSA, 2021).

Συνήθως ο χρόνος ζωής ενός σωστά παστεριωμένου γάλακτος, διαφοροποιείται ανάλογα με το είδος και την χώρα προέλευσης αυτού .(Deeth & Lewis 2017, EFSA,2021).

2.2.3.Υψηλή παστερίωση

Η υψηλή παστερίωση επιτυγχάνεται σε συνθήκες 85-87 °C για 1-4 δευτερόλεπτα. Καταστρέφονται έτσι όλα τα βακτήρια που δεν σχηματίζουν σπόρια και τα περισσότερα από τα σπόρια των ψυχρότροφων και μεσόφιλων βακτηρίων. Επίσης απενεργοποιείται η δραστηριότητα της ALP, η λιπάση και το LPO γάλακτος αλλά όχι η πλασμίνη ή οι βακτηριακές πρωτεάσες/λιπάσες. Διατηρείται στο ψυγείο για 4-8 εβδομάδες ανάλογα με τις συνθήκες επεξεργασίας. (EFSA, 2021).

2.2.4. Επεξεργασία παρατεταμένης διάρκειας ζωής (ESL).

Για να παραχθεί γάλα παρατεταμένης διάρκειας ζωής (Extended Shelf-Life,ESL) μπορεί να επιτευχθεί με δύο κύριες τεχνολογίες:

1) με θερμική επεξεργασία σε συνθήκες (85°– 127°C) με τέτοιο συνδυασμό θερμοκρασίας-χρόνου ώστε να είναι αρνητική η δοκιμή υπεροξειδάσης, ενώ ακολουθεί άμεση ψύξη σε θερμοκρασία που δεν υπερβαίνει τους 6°C (δηλαδή ανάμεσα από την

High-Temperature, Short-Time, (HTST) παστερίωση και σε πιο ήπιες από την επεξεργασία Ultra High Temperature(UHT))

2) συνδυάζοντας μη θερμικές διεργασίες (μικροδιήθηση ή βακτοφυγοκέντρωση), με μια τελική θερμική επεξεργασία παστερίωσης ώστε να ανταπεξέρχεται στις νόμιμες απαιτήσεις(Deeth & Lewis,2017). Ο συνδυασμός θερμοκρασίας χρόνου για το γάλα ESL κυμαίνονται από 123–145°C για 1–5 δευτερόλεπτα. Γίνεται καταστροφή των βακτηρίων που δεν περιέχουν σπόρια και των σπόριων των ψυχροτροφικών και μεσόφιλων βακτηρίων. Απενεργοποιείται η ALP ,η λιπάση και το LPO γάλακτος αλλά όχι η πλασμίνη ή οι βακτηριακές πρωτεάσες/λιπάσες .Η διάρκεια διατήρησης αυτού είναι 4-13 εβδομάδες στο ψυγείο(EFSA, 2021).

2.2.5. Επεξεργασία UHT (Ultra High Temperature)

Η θερμική επεξεργασία UHT στοχεύει στο να παραχθεί προϊόν που οι μικροοργανισμοί του δεν αναπτύσσονται σε κανονικές συνθήκες αποθήκευσης. Η επεξεργασία UHT χρησιμοποιείται για την αποστείρωση γάλακτος ή γαλακτοκομικών προϊόντων σε συνθήκες θέρμανσης στους 135–145°C για 2–5 δευτερόλεπτα. Καταστρέφει όλα τα βακτήρια που δεν σχηματίζουν σπόρια με εξαίρεση τα εξαιρετικά ανθεκτικά στην θερμότητα σπόρια. Επιπλέον απενεργοποιεί την ALP ,την λιπάση, το LPO και την περισσότερη πλασμίνη αλλά όχι όλες τις βακτηριακές πρωτεάσες/λιπάσες, στο γάλα. Η διαδικασία επεξεργασίας UHT επιτυγχάνεται σε κλειστό περιβάλλον με θέρμανση και κατόπιν σε συνεχή ροή με αποτέλεσμα την αποφυγή μόλυνσης του προϊόντος από μεταφερόμενους από τον αέρα μικροοργανισμούς. Η δε άσηπτη διαδικασία γίνεται για να αποφευχθεί η επαναμόλυνση του προϊόντος με αποτέλεσμα να υπάρχει μεγάλη διάρκεια ζωής του προϊόντος 6-9 μήνες σε θερμοκρασία δωματίου (Bylund 1995, Deeth and Lewis 2017 , EFSA 2021).

2.2.6.Αποστείρωση

Το γάλα αποστειρώνεται σε μπουκάλια ή σφραγισμένα δοχεία σε συνθήκες 115–120°C για 20–30 λεπτά .Με αυτόν τον τρόπο απενεργοποιούνται όλα τα ένζυμα και καταστρέφονται όλα τα βακτήρια που δεν σχηματίζουν σπόρια και όλα τα σπόρια εκτός από κάποιες εξαιρέσεις που σπάνια μπορεί να υπάρξουν. Η διατήρηση των προϊόντων αυτών υπολογίζεται έως έξι μήνες σε θερμοκρασία δωματίου(EFSA, 2021).

Έτσι λοιπόν, ένας σημαντικός τρόπος για την διασφάλιση της αποτελεσματικότητας της παστερίωσης του γάλακτος είναι η απενεργοποίηση του ενζύμου της αλκαλικής φωσφατάσης (ALP). Από μελέτες που έχουν γίνει έχει διαπιστωθεί ότι η ALP μπορεί να καταστραφεί σε παρόμοια θερμοκρασία με την θερμοκρασία θανάτωσης των παθογόνων μικροοργανισμών με αποτέλεσμα στο παστεριωμένο γάλα να παρατηρείται απουσία αυτής(Rankin et al. 2010).

Η υπολειμματική δραστικότητα της αλκαλικής φωσφατάσης (ALP) έχει χρησιμοποιηθεί ιστορικά για την επαλήθευση της επάρκειας της παστερίωσης του αγελαδινού γάλακτος.

Ωστόσο, υπάρχει αβεβαιότητα για το πόσο κατάλληλος δείκτης είναι για άλλα είδη γάλακτος όπως το πρόβειο, το γίδινο, το γάλα ονόγαλα, καμήλας και του βουβαλίσιου όπως και προϊόντων αυτών, λόγω του ότι το ένζυμο της αλκαλικής φωσφατάσης υπάρχει σε διαφορετικά επίπεδα στα είδη αυτά σε σχέση με το αγελαδινό γάλα_ (Klotz et al. 2008)

2.3 Γενικές πληροφορίες για την Αλκαλική φωσφατάση (ALP)

Η αλκαλική φωσφατάση (Alkaline Phosphatase, ALP) είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που για πρώτη φορά περιγράφηκε από τον Suzuki (1907). Είναι μια μεμβρανο--δεσμευτική γλυκοπρωτεΐνη η οποία καταλύει την υδρόλυση μονοεστέρων του φωσφορικού οξέος (σε αλκαλικό pH), αποδίδοντας φωσφορικά άλατα και την αντίστοιχη αλκοόλη (Junior et al. ,2008). Βρίσκεται σε αφθονία στην φύση και στους ιστούς του ανθρώπινου σώματος, στα νεφρά, στα οστά και στα κύτταρα του αίματος καθώς επίσης στο γάλα και σε άλλα σωματικά υγρά. (Shakeel-Ur Rehman et al. 2003). Η αλκαλική φωσφατάση είναι ένα από τα περίπου εξήντα ενδογενή ένζυμα που βρίσκονται στο νωπό γάλα (Schlimme et al. 1997). Η ALP του αγελαδινού γάλακτος βρέθηκε να έχει μοριακή μάζα 187 kDa και ισοηλεκτρικό σημείο που κυμαίνεται από pH 5,4 έως 6,0 45) (Vega-Warner et al. 1999). Η δραστηριότητα της ALP εκφράζεται ως mU/L. Μία μονάδα δραστηριότητας ALP είναι η ποσότητα του ενζύμου ALP που καταλύει τον μετασχηματισμό μικρογραμμομόριου υποστρώματος ανά λεπτό. Μια δοκιμή της ALP θεωρείται ότι δίνει αρνητικό αποτέλεσμα εάν η μετρούμενη δραστηριότητα στο αγελαδινό γάλα δεν είναι μεγαλύτερη από 350 mU/L.

Η ALP διακρίνεται σε τέσσερα ισοένζυμα ανάλογα με τον ιστό στον οποίο βρίσκεται και μπορεί να είναι εντερική ALP ή ALP του πλακούντα, ή ALP των μικροβιακών κυττάρων, ή η ALP ήπατος ή οστού ή νεφρού. Από τις παραπάνω ALP ,η εντερική ALP βρίσκεται σε υψηλή συγκέντρωση στους εντερικούς ιστούς και είναι το πιο θερμοανθεκτικό και θερμο-σταθερό ένζυμο .Επειδή το έντερο και ο πλακούντας είναι τα όργανα τα οποία περιέχουν τα περισσότερα ένζυμα η ALP των θηλαστικών προέρχεται κυρίως από τα όργανα αυτά. (Sharma et al., 2014). Επιπλέον η θερμική απενεργοποίηση της αλκαλικής φωσφατάσης βρέθηκε ότι ακολουθεί την κινητική πρώτης τάξης και το μέσο σημείο απενεργοποίησης της έχει ληφθεί στους 56 °C με θέρμανση 30 λεπτών (Marchand et al. 2009). Σε μια δημοσίευση της Ευρωπαϊκής Αρχής για την Ασφάλεια των Τροφίμων (European Food Safety Authority, EFSA) σε ότι είχε να κάνει με την δραστηριότητα της ALP και την αξιολόγηση της παστερίωσης σε μη αγελαδινό γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα, διατυπώθηκε ότι η ποσότητα της ALP ήταν διαφορετική ανάλογα με το είδος του γάλακτος και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Επίσης, η δραστηριότητα της ALP εξαρτάται και από το ποσοστό λίπους, την πιθανότητα επανενεργοποίησής της, καθώς και τη μέθοδο και τον συνδυασμό χρόνου και θερμοκρασίας της παστερίωσης. (EFSA, 2021).

Η σημασία της βόειας ALP για τη γαλακτοκομική βιομηχανία σχετίζεται με τις ιδιότητες θερμικής απενεργοποίησης της. Επειδή είναι ελαφρώς πιο θερμοάντοχη σε σχέση με τα βακτηριακά παθογόνα όπου βασίζονται οι διαδικασίες παστερίωσης, η θερμική απενεργοποίηση της ALP γάλακτος έχει καλή συσχέτιση με τον θερμικά επαγόμενο βακτηριακό θάνατο (Van Bever, 1943). Αυτός ο συσχετισμός οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η ανάλυση ALP θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως κριτήριο για την επαλήθευση παστερίωσης (Sanders and Sager, 1948).

2.3.1 Δραστικότητα της Αλκαλικής φωσφατάσης (ALP)

Όπως προαναφέρθηκε, η αλκαλική φωσφατάση (ALP) είναι ένας θερμικός δείκτης για την παστερίωση του βόειου γάλακτος και υπάρχει στο γάλα που προέρχεται από όλα τα θηλαστικά. Περίπου το 30-40% της δραστικότητας της ALP βρίσκεται στη μεμβράνη των σφαιριδίων του λίπους. Η δραστικότητα ALP είναι συνεπώς χαμηλότερη στο ωμό αποβουτυρωμένο από ότι στο ωμό πλήρες γάλα (Claeys et al.2002a). Ωστόσο, υπάρχουν διαφορές στην δραστικότητα της (ALP) μεταξύ των άλλων ειδών γάλακτος .Η δραστικότητα της ALP στο πρόβειο γάλα φαίνεται να είναι περίπου τρεις φορές υψηλότερη και στο γίδινο γάλα περίπου πέντε φορές χαμηλότερη σε σύγκριση με το αγελαδινό γάλα. Μάλιστα οι διαφορές στα επίπεδα της ALP στο νωπό αγελαδινό γάλα εξαρτώνται από τις διαφορές ανάμεσα στις φυλές, από την εποχή κατά τη διάρκεια του έτους (χαμηλότερες την άνοιξη και το υψηλότερες καλοκαίρι, καθώς και από το στάδιο της γαλουχίας (που επηρεάζει τη σύνθεση και την απόδοση του γάλακτος) (Scintu et al., 2000 , Berger et al. 2008 ,Williams 1986). Επίσης ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει την δραστικότητα της ALP είναι η παρουσία λοίμωξης όπου βρέθηκε να αυξάνει τη δραστικότητα της ALP στα αιγοπρόβατα (Katsoulos et al. 2010, Narenji Sani et al. 2018). Παρομοίως, οι Patil et al.(2015) βρήκαν υψηλότερα επίπεδα ALP στο γάλα από βουβάλι και οι Ali et al.(2016) βρήκαν αυξημένα επίπεδα στο γάλα από καμήλες με λοιμώξεις από μαστίτιδα. Όσον αφορά το γάλα αλόγου η δραστικότητα της ALP είναι 35 έως 350 φορές χαμηλότερη σε σύγκριση με το αγελαδινό γάλα και αυξάνεται κατά την διάρκεια της γαλουχίας. Το γάλα καμήλας περιέχει επίσης χαμηλά επίπεδα δραστικότητας σε σχέση με το αγελαδινό γάλα (EFSA, 2021). Για το γάλα από βουβάλι μελέτες έδειξαν ότι η δραστικότητα της ALP είναι γενικά λίγο μικρότερη σε σχέση με το αγελαδινό και ότι η ALP συγκεντρώνεται στην κρέμα (Sharma et al.1974) .

Αναφορικά με τη θερμική απενεργοποίηση της ALP, αυτή γίνεται πιο αργά στο γίδινο και πρόβειο γάλα και πιο γρήγορα στο γάλα αλόγου σε σύγκριση με το αγελαδινό γάλα με αποτέλεσμα το αρνητικό τεστ ALP για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της παστερίωσης να μην είναι καθολικά εφαρμόσιμο (Lorenzen et al. 2010, Marchand et al.2009 ,Raynal-Ljutova, 2007c, Park et al. 2007).

2.3.2 Επίδραση του λίπους του γάλακτος

Η αλκαλική φωσφατάση απορροφάτε εύκολα από τα σφαιρίδια λίπους, που περιέχονται στο γάλα, με αποτέλεσμα η περιεκτικότητα σε λίπος στο προϊόν να επηρεάζει τη δραστικότητα του ενζύμου CAC (2004). Αποδείχθηκε ότι όσο -αυξημένα είναι τα επίπεδα λίπους τόσο αυξάνεται και η υπολειμματική δραστικότητα της αλκαλικής φωσφατάσης (Painter et al. 1997). Η λιποπεριεκτικότητα έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται θετικά με τα επίπεδα της ALP στο πρόβειο γάλα και στο παστεριωμένο αιγοπρόβειο γάλα. Όσον αφορά το αιγοπρόβειο γάλα πρέπει να σημειωθεί ότι η λιποπεριεκτικότητα ποικίλει ανάλογα με την φάση της γαλουχίας (Anifantakis & Rosakis, 1983). Αντιθέτως στο γάλα αλόγου δεν σχετίζεται η ALP με το κλάσμα λίπους ή με την σφαιρική μεμβράνη (Marchand et al. 2009)

2.3.3 Όρια ALP στο μη αγελαδινό παστεριωμένο γάλα

Έχει αναφερθεί παραπάνω ότι το γάλα αγελάδος θεωρείται παστεριωμένο όταν η μέτρηση της δραστικότητας της ALP είναι μικρότερη ή ίση του 350 (mU/L) χρησιμοποιώντας το πρότυπο ISO 11816-1. Ωστόσο, παρατηρήθηκε ότι παρόλο που η παστερίωση μειώνει την δραστικότητα της ALP σε άλλα είδη γάλακτος, όπως γίδινο και πρόβειο, δεν είναι απαραίτητα κάτω από το όριο 350 (mU/L) και έτσι θα πρέπει να γίνει προσαρμογή του ορίου αυτού ώστε η δραστικότητα της ALP να είναι χρήσιμη ως δείκτης παστερίωσης τόσο στο κατσικίσιο όσο και στο πρόβειο γάλα. (Berger et al. 2008, Klotz et al. 2008, Vamvakaki et al. 2006, Banks et al. 2002).

Έχουν προταθεί κάποια όρια σχετικά με τη δραστικότητα της ALP σε κάθε τύπο γάλακτος. Συγκεκριμένα, στο βουβαλίσιο γάλα να είναι μικρότερο ή ίσο του 380 mU/L, στο κατσικίσιο μικρότερο ή ίσο του 330 mU/L και στο πρόβειο μικρότερο ή ίσο του 530 mU/L (IZSLT, 2020). Επίσης επειδή στο νωπό γάλα αλόγου και καμήλας η δραστικότητα που μετράτε είναι πολύ χαμηλή η ALP δεν φαίνεται να είναι καλός δείκτης για την παστερίωση (Marchand et al. 2009, Lorenzen et al. 2011a). Επιπρόσθετα όσον αφορά το γάλα καμήλας έχει διαπιστωθεί ότι το ενδογενές ένζυμο ALP δεν είναι κατάλληλος δείκτης για την επιβεβαίωση της παστερίωσης. Χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα διαφορετικά συστήματα δοκιμών (φθορισμομετρική, φωτομετρική και δύο χρωματομετρικές μέθοδοι) και διαπιστώθηκε ότι και στις τέσσερις δοκιμές η ALP δεν απενεργοποιείται πλήρως στους 72°C, η οποία είναι η αποδεκτή θερμοκρασία για την ταχεία παστερίωση (High-Temperature, Short-Time, HTST) (Wernery et al., 2006)

2.3.4 Επανενεργοποίηση ALP

Οι Wright & Tramer (1953) ήταν οι πρώτοι επιστήμονες που ασχολήθηκαν με την ενεργοποίηση της ALP και ανέφεραν ότι στο παστεριωμένο γάλα μπορεί να παρατηρηθεί θετική δραστικότητα όταν αποθηκεύεται σε συνθήκες 22-37°C, Αν και δεν φαίνεται να

υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των συνθηκών χρόνου/θερμοκρασίας ή χρόνου/αποθήκευσης και της επανενεργοποίησής της ALP, ωστόσο, διαπιστώθηκε ότι παστεριώνοντας το γάλα σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 71,7°C ήταν πιο ευαίσθητο στην επανενεργοποίησής της ALP. Επίσης διαπιστώθηκε ότι τα μεταλλικά ιόντα (π.χ. οξικό μαγνήσιο) παίζουν ρόλο στην επανενεργοποίηση της ALP (Richardson et al., 1964, (Kuzuya et al., 1982) με τα ιόντα Mg^{2+} και Zn^{2+} να προκαλούν την επανενεργοποίηση της ALP και έχει ανακαλυφθεί ότι κυρίως η ALP του αγελαδινού και του πρόβειου γάλακτος διεγείρονται έντονα από την παρουσία μαγνησίου (Linden & Alais, 1978) σε αντίθεση με τα ιόντα Co^{2+} , Cu^{2+} , EDTA και Sn^{2+} τα οποία μπορούν να αναστείλουν την επανενεργοποίηση της ALP (Sharma et al., 1974, Linden et al., 1977, Linden 1979, Murthy & Peeler 1979, Fox & Kelly, 2006, EFSA 2021). Τέλος η επανενεργοποίηση της ALP έχει βρεθεί και μετά από επεξεργασία με Ultra High Temperature (UHT) και επομένως, παρόλο που η ALP είναι αρνητική σε γάλα με επεξεργασία (UHT), μπορεί στη συνέχεια να είναι θετική κατά την αποθήκευση αυτού (Deeth et & Lewis, 2017). Άλλες ενδείξεις ύπαρξης αυξημένων επιπέδων ALP είναι είτε η ύπαρξη βακτηριακής ALP ή από μόλυνση παστεριωμένου προϊόντος με νωπό προϊόν, είτε από τον λάθος χειρισμό του εξοπλισμού παστερίωσης, είτε από κακή μεταχείριση των νωπών και επεξεργασμένων προϊόντων (Harding, 1991).

2.4 Θερμική σταθερότητα της ALP σε γάλα διαφορετικών ειδών

Η ALP είναι ένας ένζυμο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης TTIs (Time temperature integrator). Επιπλέον, λόγω της υψηλής ευαισθησίας της ALP στην επίδραση θερμότητας θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως εγγενής δείκτης χρόνου-θερμοκρασίας (TTI) για ήπια θερμική επεξεργασία. Ως (TTI) ορίζουμε τα θερμοευαίσθητα συστατικά που υπάρχουν ή σχηματίζονται μη αναστρέψιμα στο προϊόν κατά τη θερμική επεξεργασία. Πρέπει να εξαρτώνται από το χρόνο και τη θερμοκρασία, να μετρώνται εύκολα και να συσχετίζονται στενά με την αλλαγή ενός χαρακτηριστικού στόχου (ένα χαρακτηριστικό ασφάλειας ή ποιότητας) ενός τροφίμου που υφίσταται την ίδια επεξεργασία (Levieux et al., 2007) Αν και η ALP χρησιμοποιείται ευρέως ως δείκτης παστερίωσης για το αγελαδινό γάλα, έχουν δημοσιευτεί μόνο μερικές κινητικές μελέτες σχετικά με τη θερμική αδρανοποίηση της ALP για μη αγελαδινά γάλατα. Μελέτες κινητικής χρησιμοποιούνται για να περιγράψουν τον τρόπο με τον οποίο εξελίσσεται μια αντίδραση (απενεργοποίηση, μετουσίωση) σε συνάρτηση με το χρόνο. Η μαθηματική μορφή του μοντέλου κινητικής εκφράζει πώς εξελίσσεται η αντίδραση ενώ ο ρυθμός της αντίδρασης αντιπροσωπεύεται από κινητικές παραμέτρους μοντέλου. Έτσι, η ακριβής πρόβλεψη της θερμικής συμπεριφοράς ενός TTI εξαρτάται από την ανάπτυξη ενός μοντέλου ακριβούς κινητικής (Claeys et al., 2001)

Σύμφωνα με την δημοσίευση της EFSA (2021), παρόλο που η ALP χρησιμοποιείται ευρέως ως δείκτης σωστής παστερίωσης, έχουν δημοσιευθεί μόνο λίγες μελέτες για την θερμική σταθερότητα της δραστηριότητας της ALP στο νωπό γάλα που προέρχεται από πρόβατα και κατσίκες. Τα μαθηματικά μοντέλα θερμικής απενεργοποίησης τόσος σε ένζυμο όσο και σε μικροοργανισμούς εκφράζονται από τις τιμές D (ορίζεται ο χρόνος

που απαιτείται για μείωση κατά μία τάξη μεγέθους δηλαδή από 100% στο 10% και μετράτε σε χρόνο) και Z(ορίζεται ο αριθμός των βαθμών °C που απαιτούνται για να μειωθεί η παράμετρος D κατά μια τάξη μεγέθους) και υπολογίζονται ώστε να διαπιστωθεί το πόσο μεταβλητή είναι η απενεργοποίηση της ALP ανάμεσα στα είδη αυτά. Η θερμική απενεργοποίηση της ALP ακολουθεί κινητικές πρώτης τάξης. Οι Vamvakaki et al.(2006), διαπιστώσαν ότι η απενεργοποίηση της ALP στο βόειο γάλα ήταν πιο αργή σε σύγκριση με αυτή του αιγοπρόβειου γάλακτος έπειτα από θερμική επεξεργασία στους 59°C για 5-80 λεπτά με τη χρήση της φθοριομετρικής μεθόδου. Μια άλλη μελέτη από τους Wilíńska et al. (2007) έδειξε υψηλότερη σταθερότητα του ενζύμου γάλακτος βοοειδούς σε σύγκριση με το ένζυμο του κατσικίσιου γάλακτος. Η θερμική απενεργοποίηση της ALP έγινε σε θερμοκρασία 54–69°C για 1–180 λεπτά χρησιμοποιώντας έναν θερμοστατικό εργαστηριακό αντιδραστήρα εξοπλισμένο με αναδευτήρα. Επίσης οι Dumitraşcu et al. (2014) χρησιμοποίησαν την κινητική μελέτη με την τεχνική φθορισμού σε συνθήκες 60-72,5 °C για 0–40 λεπτά και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι υπήρξε μεγάλη μείωση της δραστηριότητας της ALP με την αύξηση της θερμοκρασίας. Επιπλέον σε χαμηλότερες θερμοκρασίες η απενεργοποίηση της ALP επηρεάστηκε από την περιεκτικότητα σε λίπος. Δηλαδή η υπολειμματική δραστηριότητα σε ALP ήταν υψηλότερη στο κατσικίσιο μετά στο αγελαδινό και τέλος στο πρόβειο σε συνθήκες 60°C για 30 λεπτά. Οι Lorenzen et al. (2010) εξέτασαν την υπολειμματική δραστηριότητα της ALP στο αγελαδινό, το πρόβειο και το γίδινο γάλα και η ALP έδειξε ότι έχει χαμηλότερη θερμική σταθερότητα στο αγελαδινό γάλα από ό,τι στο πρόβειο ή γίδινο γάλα. Όμως σε θερμοκρασία 75°C για 90 δευτερόλεπτα βρέθηκαν πολύ μικρές υπολειμματικές δραστηριότητες, και η θέρμανση με HTST (75°C για 28 δευτερόλεπτα) που πραγματοποιήθηκε σε αυτή τη μελέτη είχε ως αποτέλεσμα 99,99% απενεργοποίηση της ALP στο αγελαδινό και πρόβειο γάλα και 99,90% απενεργοποίηση στο γίδινο γάλα. Γενικά από τα αποτελέσματα διαπιστώνεται ότι η θερμική απενεργοποίηση της ALP από αγελαδινό, γίδινο και πρόβειο γάλα είναι σχεδόν όμοια.

Σχετικά με το γάλα αλόγου, όταν αξιολογήθηκε η κινητική αδρανοποίησής της ALP με φθοριομετρική φάνηκε ότι αδρανοποιείται πιο εύκολα σε σύγκριση με το γάλα των βοοειδών, και σε συνδυασμό με το γεγονός ότι το επίπεδο της ALP είναι χαμηλό κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η ALP του αλόγου δεν είναι κατάλληλος δείκτης παστερίωσης(Marchand et al.2009). Ορισμένες μελέτες επίσης έχουν αξιολογήσει τη θερμική σταθερότητα της ALP σε ωμό και παστεριωμένο γάλα καμήλας με την μέθοδο του εναλλάκτη θερμότητας πλάκας χωρητικότητας 3000 L/h (Lorenzen et al.,2011a). Τα ποσοστά απενεργοποίησης λόγω παστερίωσης γίνανε με φθοριομετρικές και χρωματομετρικές μεθόδους και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η υπολειμματική δραστηριότητα της ALP στο παστεριωμένο γάλα αποκάλυψε ότι η ALP δεν είναι κατάλληλη για την επαλήθευση της αποτελεσματικής παστερίωσης του γάλακτος καμήλας.

Επίσης, οι Wernery et al.(2006) χρησιμοποίησαν τέσσερα διαφορετικά συστήματα δοκιμών (φθοριομετρική, φωτομετρική και δύο χρωματομετρικές μεθόδους). Και οι

τέσσερις δοκιμές έδειξαν ότι η ALP δεν απενεργοποιείται πλήρως στους 72°C, την αποδεκτή θερμοκρασία για την παστερίωση HTST. Καταλήγοντας πάλι στο ίδιο συμπέρασμα διότι χρειάζονται πιο μεγάλες θερμοκρασίες για την απενεργοποίηση της ALP σε σχέση με το αγελαδινό γάλα. Ωστόσο, απαιτείται μεγαλύτερη διερεύνηση των επιπέδων της ALP μεταξύ των ειδών. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί σε διαφορετικά είδη γάλακτος για την λήψη δεδομένων για την εξαγωγή των τιμών D και z της απενεργοποίησης ALP στο γάλα αυτών των ειδών. Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση της δραστηριότητας ALP μπορούν να ταξινομηθούν ευρέως σε 4 τύπους: χρωματομετρικές, φθοριομετρικές, χημειοφωταύγειας και ανοσοχημικές μεθόδους. Αυτές οι μέθοδοι έχουν υιοθετηθεί για χρήση εδώ και πολλά χρόνια. Ωστόσο, μόνο οι χρωματομετρικοί, φθοριομετρικοί και χημειοφωταυγείς τύποι έχουν αναγνωρισθεί ως επικυρωμένες μέθοδοι για την επαλήθευση παστερίωσης στη γαλακτοβιομηχανία (Rankin et al., 2010)

2.5 Μέθοδοι προσδιορισμού ALP

2.5.1 Χρωματομετρικές τεχνικές

Ο προσδιορισμός της ALP βασίστηκε σε αντιδράσεις ικανών να παράγουν χρωμογόνα προϊόντα. Οι χρωματομετρικές τεχνικές βασίζονται στο ότι η φαινόλη απελευθερώνεται από νατριούχο υπόστρωμα φωσφορικού φαινυλίου και κατά το πέρας της αντίδρασης έχουμε εμφάνιση χρώματος. Όμως αυτές οι τεχνικές έχουν μικρή ευαισθησία και απαιτούνται 18-24 ώρες για να διεξαχθεί αποτέλεσμα και συνεπώς θεωρούνται χρονοβόρες. (Kay & Graham, 1935). Ορισμένες από τις μεθόδους είναι:

Η Scharer's Rapid Phosphatase Test: η οποία βασίζεται στο γεγονός ότι η ALP διασπά μια φωσφορική ομάδα από το προστιθέμενο υπόστρωμα που είναι το φαινυλο-φωσφορικό (π.χ. disodium phenyl phosphate). Το τελικό αποτέλεσμα της αντίδρασης είναι ο σχηματισμός της ένωσης ινδοφαινόλης, η οποία παράγει μπλε χρώμα. Όσο πιο έντονο μπλε χρώμα δημιουργείται, τόσο πιο μεγάλη είναι η δραστηριότητα της ALP στο δείγμα γάλακτος. Αντιθέτως, όταν έχει επιτευχθεί σωστή παστερίωση και συνεπώς η δραστηριότητα της ALP στο γάλα είναι μικρότερη, δημιουργείται ένα γκρι έως καφέ χρώμα στο δείγμα. Ο τόνος του χρώματος διαβάζεται είτε οπτικά εν συγκρίσει με κάποια πρότυπα είτε με την βοήθεια φασματοφωτόμετρου. Όμως έχει αναξιόπιστα αποτελέσματα κοντά στο όριο ανίχνευσης λόγω του ότι βασίζεται σε οπτικές εκτιμήσεις (Scharer's 1938, Rankin et al. 2010).

Το Aschaffenburg and Mullen Test: όπου χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα το φωσφορικό ρ-νιτροφαινόλιο και αναπτύσσεται ένα κίτρινο χρώμα που χρησιμοποιείται ως δείκτης της απελευθερούμενης νιτροφαινόλης. Αυτή η μέθοδος παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία και είναι αποδεκτή στο Ηνωμένο Βασίλειο (Aschaffenburg & Mullen, 1949)

Η Official Canadian Method (MFO-3): στον Καναδά συναντάται και η Επίσημη Καναδική Μέθοδος MFO-3 (Official Canadian Method, MFO-3). όπου διαφέρει από τις προηγούμενες στο ότι βασίζεται στην δράση της της αλκαλικής φωσφατάσης στο φωσφορικό φαινύλιο και κάνει ανίχνευση φαινολικών που προκύπτουν από τη δράση. Η ποσότητα των φαινολικών που απελευθερώνονται (σε μικρογραμμάρια) στη μονάδα χρόνου (1 ώρα) χρησιμοποιείται αναλογικά για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης στο αρχικό δείγμα (Klotz et al., 2008).

2.5.2 Φθορισμομετρικές τεχνικές

Η ιδιότητα των μορίων να φθορίζουν δίνουν την δυνατότητα στις διάφορες επιστήμες χημείας και βιολογίας να την χρησιμοποιούν ως αρχή και να βασίζονται πάνω σε αυτή. Οι Fernley & Walker (1965) ήταν από τους πρώτους που δημοσίευσαν αναλύσεις φθορισμομετρίας σε γάλα βοοειδών που βασίζονταν στην ενδιάμεση απελευθέρωση ALP από μια φωσφορική ρίζα από ένα ενδεικτικό υπόστρωμα, προς το σχηματισμό ενός προϊόντος υψηλού φθορισμού, η οποία έχει βέλτιστο φθορισμό σε pH 14 (Yoshitomi et al., 2004). Χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα φθορισμογόνος αρωματικός ορθοφωσφορικός εστέρας Fluorophos και στη συνέχεια αναλύεται χρησιμοποιώντας φθορισμομετρική μέθοδο. Αναφέρθηκε ότι αυτός ο προσδιορισμός ήταν πιο ευαίσθητος, πιο γρήγορος και πιο απλός από τις χρωματογραφικές αναλύσεις (Rankin et al., 2010). Αξίζει να αναφερθεί ότι με αυτή την μέθοδο επιτράπη η ακριβής μέτρηση για το νόμιμο όριο του 350 mU/L καθώς επίσης για τιμές άνω των 100 mU/L με αποτέλεσμα να διερευνηθούν ενδεικτικά πιθανά προβλήματα στα συστήματα παστερίωσης. (Micciche . 2005).

2.5.3 Τεχνικές Χημειοφωταύγειας

Η τεχνική της χημειοφωταύγειας βασίζεται στην αποφωσφορυλίωση των υποστρωμάτων αδαμαντυλικής 1,2-διοξετάνης, όπου καταλύεται από την αλκαλική φωσφατάση. Η μεθοδολογία αυτή απαιτεί έναν απλό προσδιορισμό ενός αντιδραστηρίου δηλαδή μια απλή αντίδραση, με όριο ανίχνευσης το 1 μmol (603 μόρια) του ενζύμου (Kricka, L. J. 2003). Η ομάδα Girotti, ανέπτυξε μια ανάλυση χημειοφωταύγειας, για να προσδιορίσει την συγκέντρωση της ALP στο γάλα, με παρόμοιους βαθμούς ευαισθησίας και χρόνους ανάλυσης με τις μεθόδους φθορισμού. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν ήταν ποσοτικά και χωρίς ιδιαίτερη προετοιμασία δειγμάτων. Αξίζει να σημειωθεί επίσης ότι ήταν σύμφωνα με τα αποτελέσματα που πάρθηκαν από την ποιοτική και ποσοτική φασματομετρία απορρόφησης για την ALP (Girotti et al. 1994).

Στις μεθόδους προσδιορισμού EPAS η αλκαλική φωσφατάση αφού υδρολύσει τα οργανοφωσφορικά από το υπόστρωμα παράγει ένα φωτοενεργοποιημένο προϊόν και το ανιχνεύει ενόργανα. Τις μεθόδους αυτές τις εφαρμόζουμε στη χημειοφωταύγεια αλλά και στη φθορισμομετρία. Ως μονάδα μέτρησης του ενζύμου είναι τα miliunits/λίτρο γάλακτος (mU/L). Κάθε miliunit εκφράζει την ποσότητα του ενζύμου που καταλύει 1 ng

του ειδικού υποστρώματος που υδρολύεται ανά λίτρο του διαλύματος και ανά λεπτό (Albillos et al., 2011). Καταλήγουμε λοιπόν στο ότι οι μέθοδοι EPAS φθορισμού και χημειοφωταύγειας έχουν περίπου την ίδια επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα σε αναλύσεις για πλήρες γάλα διαφόρων ειδών οι οποίες ισχύουν για χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσης ALP για τη δημόσια ασφάλεια που έχουν υιοθετηθεί στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, και προτείνονται στην Ευρωπαϊκή Ένωση. Επιπρόσθετα χαμηλότερα όρια ελέγχου είναι εφικτά στα 50 και 100 mU / L (Salter & Fitchen, 2006).

2.5.4 Ανοσοχημικές τεχνικές

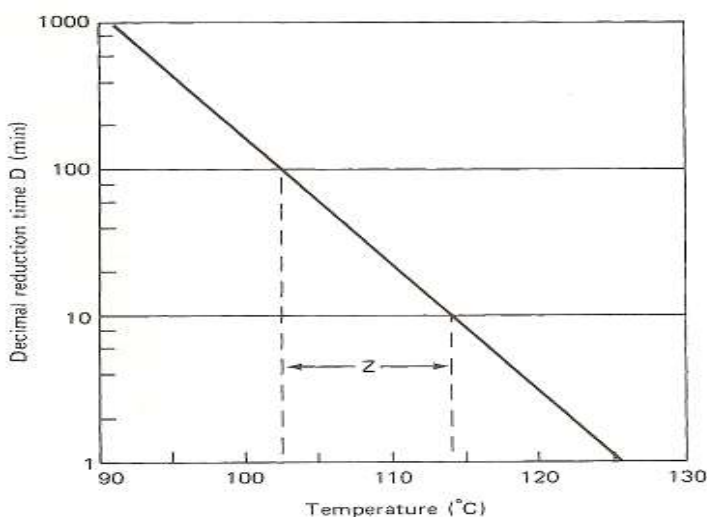
Ο ενζυματικός ανοσοπροσροφητικός προσδιορισμός (ELISA) πλεονεκτεί έναντι της αυξημένης ευαισθησίας και της εξειδίκευσης που έχει. Έτσι λοιπόν στηριζόμενη στην αντιγονική φύση του μορίου της ALP, η έμμεση μέθοδος (CI) ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) έχει την δυνατότητα να κάνει διάκριση μεταξύ της μικροβιακής ALP και της ALP γάλακτος, πράγμα που δεν χαρακτηρίζει τις άλλες μεθόδους που αναφέρθηκαν. Ωστόσο, η έμμεση μέθοδος CI-ELISA έχει δοκιμαστεί σε ένα σχετικά απλό μοντέλο συστημάτων και δεν έχει ακόμη επικυρωθεί σε πραγματικά τρόφιμα όπως το γάλα. Η τεχνολογία CI-ELISA χρησιμοποιεί αντισώματα ειδικά για την αλκαλική φωσφατάση αγελαδινού γάλακτος. (Vega-Warner et al., 2000) Με τη λήψη μιας ανοσοσφαιρίνης, ειδικής για το αγελαδινό γάλα (BM-ALP), η CI-ELISA αποδείχθηκε αποτελεσματική στη διαφοροποίηση μεταξύ BM-ALP και την ALP του βακτηρίου *E. Coli*. Επίσης μπορούσε να γίνει ποσοτικοποίηση του BM-ALP, σε αυτές τις συνθήκες. Μέχρι τώρα δεν υπάρχει κάποια ανοσοχημική δοκιμασία που να εγκρίνεται για την αξιολόγηση της δραστηριότητας ALP στο γάλα ή στα γαλακτοκομικά προϊόντα (Rankin et al., 2010).

Είναι αναγκαία μια άλλη μελέτη κινητικής θερμικής απενεργοποίησης με διαφορετικά είδη γάλακτος ώστε να υπάρξουν δεδομένα για την εξαγωγή τιμών D και Z της απενεργοποίησης ALP στο γάλα από διάφορα ζωικά είδη. Αυτή η μελέτη θα πρέπει να πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας μια μέθοδο που επιτρέπει σχεδόν στιγμιαία θέρμανση στην ισοθερμική θερμοκρασία και ψύξη στη συνέχεια, στην οποία συνιστάται ο προσδιορισμός των τιμών D σε πέντε έως έξι διαφορετικές θερμοκρασίες μεταξύ 55°C και 70°C. Σε οποιαδήποτε επιλεγμένη θερμοκρασία, θα πρέπει να υπάρχουν τουλάχιστον 5 σημεία (χρόνοι επώασης) στο γραμμικό τμήμα της καμπύλης για να παρέχονται έγκυρα αποτελέσματα.

2.6 Κινητική αλκαλικής φωσφατάσης

Οι Claeys et al. (2001) ανέφεραν ότι η θερμική απενεργοποίηση της αλκαλικής φωσφατάσης ALP ακολουθεί κινητική πρώτης τάξης. Πρώτο βήμα της ανάλυσης είναι να

ληφθεί ένα μοντέλο που μπορεί να περιγράψει την συμπεριφορά της αλκαλικής φωσφατάσης. Για το σκοπό αυτό παρουσιάζονται το προφίλ της κινητικής πρώτης τάξης παρακάτω. Στην κινητική 1ης τάξης τα D και k σχετίζονται άμεσα. Η εξάρτηση από τη θερμοκρασία της τιμής D χαρακτηρίζεται από την τιμή z , η οποία είναι η αύξηση της θερμοκρασίας που απαιτείται για να επιτευχθεί μια δεκαπλάσια μείωση του D . Ο χρόνος που χρειάζεται για να αποστειρωθεί ένα τρόφιμο εξαρτάται ως επί το πλείστον από την θερμοανθεκτικότητα των μικροοργανισμών και των ενζύμων. Η θερμοανθεκτικότητα των μικροοργανισμών και των ενζύμων χαρακτηρίζεται από τις παραμέτρους D και Z όπου χρησιμοποιούνται ως τρόπος χαρακτηρισμού θερμοανθεκτικότητας ενός μικροοργανισμού καθώς και για να δούμε την θερμοανθεκτικότητα σε συνάρτηση με τον χρόνο. Ως παράμετρος D ορίζεται ο χρόνος που απαιτείται για μείωση κατά μία τάξη μεγέθους δηλαδή από 100% στο 10% και μετράτε σε χρόνο. Επειδή η καταστροφή των μικροοργανισμών εξαρτάται από την θερμοκρασία τα κύτταρα πεθαίνουν πιο γρήγορα σε υψηλές θερμοκρασίες. Η γραφική παράσταση της παραμέτρου D σε συνάρτηση με την θερμοκρασία ονομάζεται TDT (Thermal death time) και η κλίση της καμπύλης αυτής είναι η τιμή Z . (Διάγραμμα 1) Τιμή z -value ορίζεται ο αριθμός των βαθμών $^{\circ}\text{C}$ που απαιτούνται για να μειωθεί η παράμετρος D κατά μια τάξη μεγέθους. Στον τομέα της επεξεργασίας και της συντήρησης τροφίμων, οι κινητικές 1ης τάξης περιγράφονται συχνά από το μοντέλο Θερμικού Χρόνου Θανάτου (TDT) (Bigelow W, 1921). Μια άλλη παράμετρος που συναντάται συχνά στη βιβλιογραφία της επιστήμης των τροφίμων είναι η Q_{10} , μια τιμή που περιγράφει την εξάρτηση από τη θερμοκρασία μιας αντίδρασης ως τον παράγοντα με τον οποίο ο ρυθμός αντίδρασης αλλάζει όταν η θερμοκρασία μεταβάλλεται κατά 10°C .



(Διάγραμμα 1). Καμπύλη TDT (thermal death time)

Η αλκαλική φωσφατάση (ALP) είναι ιδιαίτερα σταθερή σε υψηλές θερμοκρασίες. Οι έρευνες αποδεικνύουν ότι η ίδια καταστρέφεται σε θερμοκρασία περίπου ίδια με τη

θερμοκρασία θανάτωσης των παθογόνων μικροοργανισμών (Rankin et al., 2010). Η θερμοανθεκτικότητα κάποιων σπορογόνων βακτηρίων χρησιμοποιείται ως βάση για την αποστείρωση χαμηλής οξύτητας τροφίμων. Τα δεδομένα της κινητικής απενεργοποίησης, σε συνδυασμό με τον προσδιορισμό της αρχικής ενζυμικής δραστηριότητας, παρέχει αποτελέσματα για την αλκαλική φωσφατάση ώστε να χρησιμοποιηθεί για την εγγύηση της απενεργοποίησης παθογόνων βακτηρίων που έχει ως συνέπεια την σωστή παστερίωση αυτού (Wernery et al., 2006)

Τα πιο πολλά θερμοανθεκτικά σπόρια έχουν τιμές z γύρω στους $10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Κάποιες κινητικές παράμετροι θερμικής απενεργοποίησης D και z για συγκεκριμένους μικροοργανισμούς στο γάλα φαίνονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2: .Κινητικές παράμετροι D και z για συγκεκριμένους μικροοργανισμούς στο γάλα

Micro-organism	T_{ref} (°C)	D_{ref} (min)	z (°C)	Ref.
<i>Aeromonas</i>	48	3.2–6.2	5.5–7.7	Roberts et al., 1996
<i>Bacillus cereus</i>	95	1.8	9.4	Roberts et al., 1996
<i>Bacillus cereus</i> spores	121	0.04	9.55	Walstra et al., 1999
<i>Bacillus licheniformis</i>	111	0.48	8	Walstra et al., 1999
<i>Bacillus stearothermophilus</i> spores	121	5.5	9.5	Walstra et al., 1999
<i>Campylobacter jejuni</i>	50	4.5	7	Walstra et al., 1999
<i>Clostridium botulinum</i>	115	0.21–0.3	7.9	Roberts et al., 1996
<i>Clostridium botulinum</i> spores	110	0.85	9.5	Walstra et al., 1999
<i>Escherichia coli</i>	62.8	0.13	4.6	Walstra et al., 1999
<i>Listeria monocytogenes</i>	65	0.1	6.6	Eckner, 1992 , Walstra et al., 1999
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	60	3.2	7.5	Walstra et al., 1999
<i>Pseudomonas fragi</i>	49	7–9	10–12	Walstra et al., 1999
<i>Salmonella</i> (6 spp.)	62.8	3	4.6	Walstra et al., 1999
<i>Staphylococcus aureus</i>	62.8	18.5	5.1	Walstra et al., 1999
	60	0.9	9.5	Roberts et al., 1996
<i>Yersinia enterocolitica</i>	58	1.6	4.26	Eckner, 1992

Βιβλιογραφική πηγή : Claeys et al., (2002).

3. Μεθοδολογία

3.1 Δειγματοληψία

Αρχικά συλλέχθηκαν έξι είδη γάλακτος αγελαδινό, πρόβειο, γίδινο από φάρμες της ορεινής περιοχής της Πίνδου ,βουβαλίσιο από φάρμα της περιοχής της λίμνης Κερκίνης ,ονόγαλα και καμήλας από φάρμες της Κύπρου. Μεταφέρθηκαν σε συνθήκες κατάψυξης

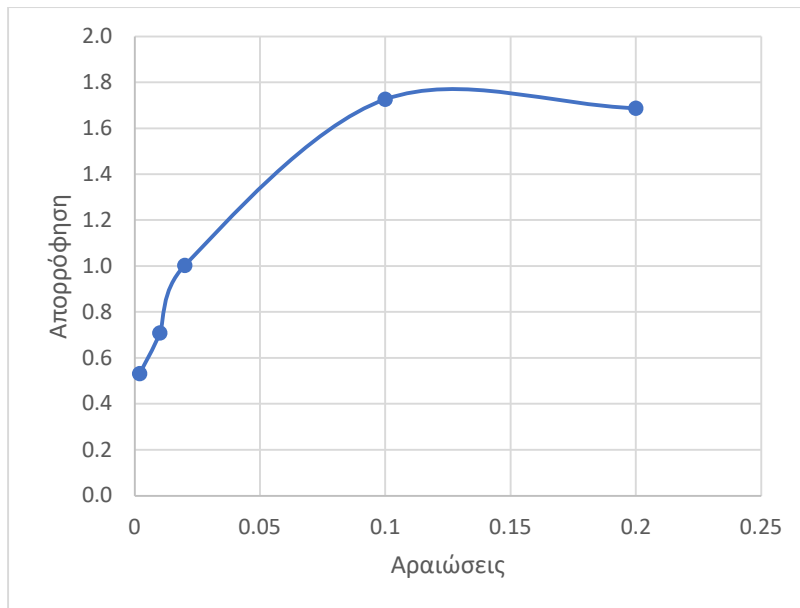
(-18 °C) σε ειδικά ψυγεία στο εργαστήριο Χημείας Βιοχημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του τμήματος Διαιτολογίας και Διατροφολογίας και στο εργαστήριο Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης του τμήματος Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας όπου και διατηρήθηκαν σε αυτές τις συνθήκες μέχρι και την ανάλυσή τους .

3.2 Πειραματική πορεία

Τα έξι είδη γάλακτος αρχικά επεξεργάστηκαν ως προς την διασφάλιση της εγκυρότητας του πρωτοκόλλου της μεθόδου το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την κινητική μελέτη της αλκαλικής φωσφατάσης (ALP) αυτών και στην συνέχεια παστεριώθηκαν σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και χρόνου ώστε να διασφαλίσουμε κατάλληλα δεδομένα για την αξιολόγηση της δυνατότητας της χρήσης της αλκαλικής φωσφατάσης (ALP) ως δείκτη παστερίωσης και σε μη αγελαδινά γάλατα.

3.2.1 Προκαταρκτικές δοκιμές

Στο πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε η ενόργανη μέτρηση προσδιορισμού της εναπομένουσας ενεργότητας ALP ήταν η απορρόφηση με την βοήθεια ενός φασματοφωτόμετρου UV /VIS στα 405 nm. Πραγματοποιήθηκαν προκαταρκτικές δοκιμές για την επαλήθευση της εγκυρότητας του πρωτοκόλλου. Διαπιστώθηκε ότι οι αρχικές τιμές απορρόφησης σε όλα τα είδη γάλακτος ήταν πολύ υψηλές και μάλιστα στο άνω όριο χρήσης της συγκεκριμένης μεθόδου. Αυτό απεικονίζεται στο Διάγραμμα 2 ως παράδειγμα αλλά το ίδιο ίσχυε και σε όλα τα είδη γάλακτος. Είναι σημαντικό για την εγκυρότητα του έμμεσου προσδιορισμού της ενζυμικής ενεργότητας της ALP στο γάλα οι τιμές απορρόφησης που καταγράφονται να μην είναι στο εύρος τιμών που παρουσιάζουν ένα πλατό (για τιμές απορρόφησης άνω του 1,6 στο Διάγραμμα 2) όπως απεικονίζεται στο αντίστοιχο διάγραμμα. Για να διαπιστωθεί σε όλα τα είδη γάλακτος πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις σε όλα τα είδη άρα και στο περιεχόμενο του υπάρχοντος ενζύμου και αποφασίστηκε η σωστή αραιώση των δειγμάτων έτσι ώστε οι μετρήσεις να βρίσκονται στο πρώτο γραμμικό κομμάτι και όχι στο πάνω.



Διάγραμμα 2: Γραφική παράσταση απορρόφησης σε συνάρτηση με τις αραιώσεις στο γάλα καμήλας.

Επομένως τα δείγματα γάλακτος που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα θερμικής απενεργοποίησης ήταν σε επιλεγμένες αραιώσεις όπως φαίνονται στον Πίνακα 2:

Πίνακας 3: Είδος γάλακτος και αντίστοιχη αραιώση.

Είδος γάλακτος	Αραιώση
Αγελαδινό	1/10
Πρόβειο	1/10
Γίδινο	1/10
Καμήλας	1/10
Βουβαλίσιο	1/100
Ονόγαλα	1/10

3.2.2 Θερμική επεξεργασία δειγμάτων

Στα έξι είδη νωπού γάλακτος που χρησιμοποιήθηκε αγελαδινό, πρόβειο, γίδινο, βουβαλιού, καμήλας, και ονόγαλα επιλέχθηκε μια σειρά συνδυασμένων συνθηκών παστερίωσης (θερμοκρασία-χρόνος), δηλαδή τέσσερις θερμοκρασίες μεταξύ 63-75°C και τέσσερις διαφορετικοί χρόνοι συμπεριλαμβανομένης και της χρονικής στιγμής μηδέν κατά την οποία ξεκινούσε η παστερίωση σύμφωνα με τον Πίνακα 3:

Πίνακας 4: Θερμοκρασίες παστερίωσης όλων των ειδών γάλακτος σε διαφορετικές χρονικές στιγμές

Θερμοκρασία (° C)	Χρονική στιγμή				
	0	5 min	10 min	20 min	30 min
63	0	5 min	10 min	20 min	30 min
68	0	2 min	5 min	8 min	12 min
72	0	30 sec	60 sec	90 sec	120 sec
75	0	5 sec	10 sec	15 sec	20 sec

3.2.3 Προσδιορισμός εναπομένουσας ενζυμικής ενεργότητας αλκαλικής φωσφατάσης (ALP)

Για τον προσδιορισμό της εναπομένουσας ενζυμικής ενεργότητας αλκαλικής φωσφατάσης (ALP) ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο μιας μεθόδου όπου έγινε προσδιορισμός της εναπομένουσας ALP όπως αναλύεται παρακάτω.

3.2.3.1 Αντιδραστήρια

- Tris HCl 0,5M {Tris (hydroxymethyl) amino-methane Hydrochloride} (TCI Lot UIBYA-SB ACS reagent, ≥99.8%) (διαλύθηκαν 7.88 Tris HCl gr σε 100 ml H₂O και στην συνέχεια το διάλυμα εξουδετερώθηκε με NaOH 0.1M μέχρι pH=9)
- Disodium 4-Nitrophenyl Phosphate Hexahydrate (PNPP)(TCI Purity: >98.0%(T) (HPLC) 5Mm (διαλύθηκαν 0.132 gr σε 100 ml H₂O)

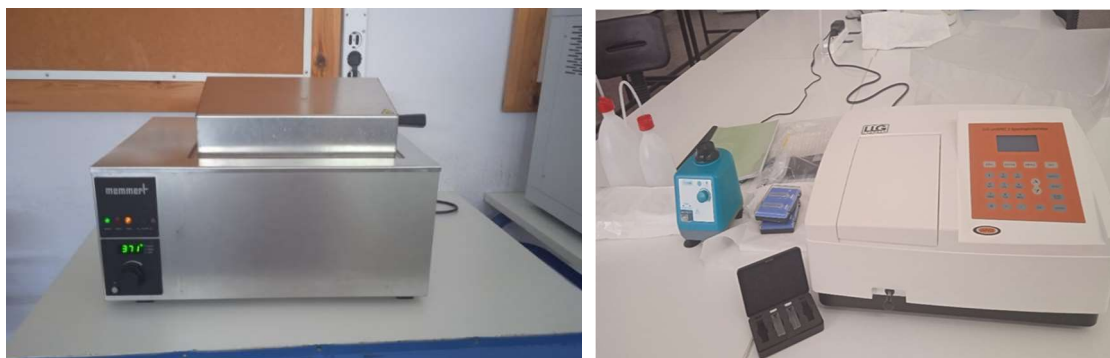


Εικόνα 1: Αντιδραστήρια Tris HCl και Disodium 4-Nitrophenyl Phosphate Hexahydrate

3.2.3.2 Εξοπλισμός

Για το πειραματικό μέρος της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες των 10 ml, φυγοκεντρικοί γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες των 5 ml, Στατώ δοκιμαστικών

σωλήνων, γυάλινες βαθμονομημένες πιπέτες των 10 ml, αυτόματες πιπέτες των 100-1000 μl, ακροφύσια, αναδευτήρας τύπου VORTEX, χρονόμετρο, υδατόλουτρο (memmert Τυρ:WB 14 German), ηλεκτρονικό θερμομέτρο (Digital thermometer accuracy -50 to +200°C /-58°F +392°F England) και Φασματοφωτόμετρο UV /VIS (Model LLG –unispec 2 accuracy±0,003A or±0,5% T Germany) .



Εικόνα 2: Φασματοφωτόμετρο UV /VIS και υδατόλουτρο

3.2.3.2 Διαδικασία ανάλυσης –Τεχνική

Για τις μετρήσεις στο ένζυμο, η πηγή του οποίου ήταν τα έξι είδη γάλακτος, χρησιμοποιήθηκε ένα πρωτόκολλο μιας μεθόδου προσδιορισμού της εναπομένουσας ALP (Levieux 2007, Uradhyay 2015). Για να επιτευχθεί η βέλτιστη απόδοση στη δραστηριότητα της ALP πρέπει να χρησιμοποιηθούν κατάλληλο υπόστρωμα και ρυθμιστικό διάλυμα. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η χρήση Tris HCl ως ρυθμιστικού διαλύματος σε pH 9, διασφαλίζει την ενζυμική μετατροπή του υποστρώματος p-νιτροφαινόλη (pNPP) σε φαινόλη και φωσφορικά με την υψηλότερη δραστηριότητα της ALP (Puttig & Nooralabettu 2011, Chaudhuri 2013).

Χρησιμοποιήθηκαν πέντε διαφορετικοί γυάλινοι φυγοκεντρικοί δοκιμαστικοί σωλήνες, στους οποίους τοποθετήθηκαν 2 ml από κάθε είδος γάλακτος ξεχωριστά. Στην συνέχεια οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο στην επιθυμητή θερμοκρασία παστερίωσης (σύμφωνα με τον Πίνακα 3). Ταυτόχρονα γινόταν μέτρηση της θερμοκρασίας με ηλεκτρονικό θερμομέτρο και μόλις τα δείγματα φτάνανε στην επιλεγόμενη θερμοκρασία παστερίωσης, ακολουθούσε μέτρηση του αντίστοιχου επιθυμητού χρόνου παστερίωσης με χρήση χρονομέτρου και γρήγορη ψύξη αυτών σε παγωμένο νερό για να σταματήσει η θερμική απενεργοποίηση της ALP. Ακολούθησε αραιώση των δειγμάτων 1/10 για τα γάλατα πρόβειο, γίδινο, καμήλας και ονόγαλα και για το βουβαλίσιο γάλα πραγματοποιήθηκε αραιώση 1/100 με διάλυμα Tris HCl 0,5M (σύμφωνα με τον πίνακα 2), σε αντίστοιχους δοκιμαστικούς σωλήνες των 10 ml για όλες τις συνθήκες θερμοκρασίας-χρόνου και ακολούθησε ανάδευση αυτών με αναδευτήρα τύπου VORTEX .

Στην συνέχεια σε ένα στατώ τοποθετήθηκαν για κάθε είδος γάλακτος και για κάθε χρόνο παστερίωσης χρησιμοποιήθηκαν εις τριπλούν τρεις γυάλινοι φυγοκεντρικοί δοκιμαστικοί σωλήνες αντίστοιχα (συνολικά 90 σωλήνες σύμφωνα με τις συνθήκες θερμοκρασίας-χρόνου) Οι δοκιμαστικοί σωλήνες περιείχαν 400 μl ρυθμιστικού διαλύματος Tris HCl 0,5M, 300 μl Disodium 4-Nitro phenyl Phosphate Hexahydrate (PNPP) 5Mm ως υπόστρωμα και 300 μl από τα αντίστοιχα αραιωμένα δείγματα στις αντίστοιχες συνθήκες παστερίωσης. Ακολούθησε μικρή ανάδευση αυτών.



Εικόνα 3: οι γυάλινοι φυγοκεντρικοί δοκιμαστικοί σωλήνες με τα αντίστοιχα διαλύματα και δείγματα

Έγινε επώαση σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 37°C για 30 λεπτά. Ακολούθησε καλή ανάδευση όλων των δειγμάτων με αναδευτήρα τύπου VORTEX. Παράχθηκε κίτρινος χρωματισμός ο οποίος μετρήθηκε φασματοφωτομετρικά με φασματοφωτόμετρο UV /VIS στα 405 nm. Για κάθε προσδιορισμό πραγματοποιήθηκαν τρεις μετρήσεις και ο μέσος όρος χρησιμοποιήθηκε ως τελικό αποτέλεσμα.

3.2.4 Εφαρμογή μοντέλων κινητικής –Βασικές αρχές κινητικής

Σύμφωνα με τους Claeys et al. (2001) η κινητική περιγράφει την εξέλιξη μιας αντίδρασης (απενεργοποίηση, μετουσίωση, παραγωγή) ως συνάρτηση του χρόνου. Γενικά, ο ρυθμός μιας χημικής αντίδρασης μπορεί να περιγραφεί από την Εξίσωση 1.

$$v = dx/dt = -kx^n \text{ (Εξίσωση 1)}$$

Όπου: v : ο ρυθμός της αντίδρασης, X : η δραστικότητα ή η συγκέντρωση της ένωσης ενδιαφέροντος στο χρόνο επεξεργασίας t , K : η σταθερά του ρυθμού αντίδρασης στη θερμοκρασία που μελετήθηκε και n : η σειρά της αντίδρασης.

Η θερμική απενεργοποίηση στα περισσότερα ενδογενή ένζυμα τροφίμων ακολουθεί κινητική πρώτης τάξης. Όταν η κινητική μελέτη απενεργοποίησης ενός ενζύμου πραγματοποιείται σε ισοθερμοκρασιακές συνθήκες, η εναπομένουσα ενζυμική

ενεργότητα (πρώτης τάξης) συναρτήσει του χρόνου θερμικής επεξεργασίας περιγράφεται από την Εξίσωση 2 ή την γραμμικοποιημένη μορφή της όπως δίνεται στην Εξίσωση 3.

$$\frac{A}{A_0} = \exp(-kt) \text{ (Εξίσωση 2)} \quad \text{ή} \quad \ln\left(\frac{A}{A_0}\right) = -kt \text{ (Εξίσωση 3)}$$

Όπου: A η ενζυμική ενεργότητα (U/ml), A₀ η αρχική ενζυμική ενεργότητα (U/ml) (A/A₀ εναπομένουσα ενζυμική ενεργότητα), k=ο ρυθμός θερμικής απενεργοποίησης στη σταθερή θερμοκρασία (min⁻¹), t ο χρόνος θερμικής επεξεργασίας (min).

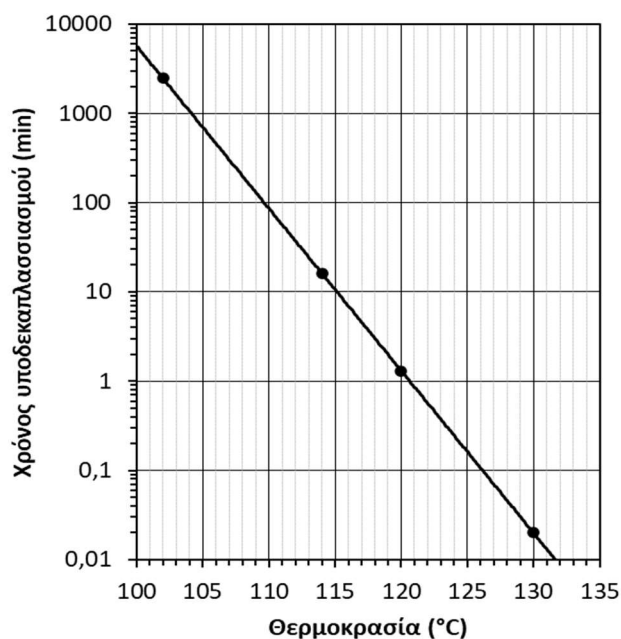
Σύμφωνα με τη θερμοβακτηριολογική προσέγγιση ο χρόνος υποδεκαπλασιασμού ενός μικροοργανισμού ή ενζύμου μπορεί να υπολογιστεί από την Εξίσωση 4.

$$D = \frac{\ln(10)}{k} \text{ (Εξίσωση 4)}$$

Η εξάρτηση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού από τη θερμοκρασία δίνεται από την Εξίσωση 5 από όπου και υπολογίζεται η θερμική αντίσταση, z.

$$D = D_{T_{ref}} \cdot 10^{\left(\frac{T_{ref}-}{z}\right)} \text{ (Εξίσωση 5)}$$

Όπου: D ο χρόνος υποδεκαπλασιασμού (min), D_{T_{ref}} ο χρόνος υποδεκαπλασιασμού σε μια θερμοκρασία αναφοράς T_{ref} (min) και z η θερμική αντίσταση (°C).

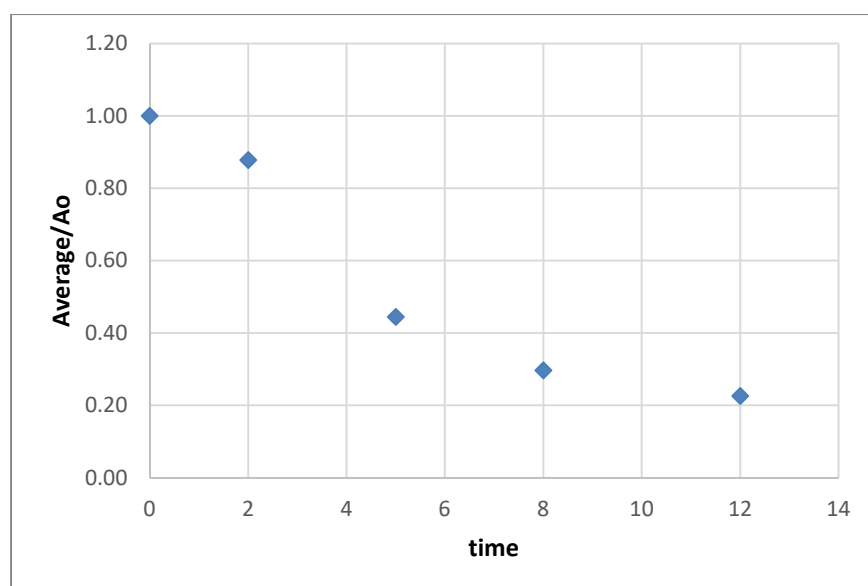


Διάγραμμα 3. Τυπικό διάγραμμα εξάρτησης του χρόνου υποδεκαπλασιασμού από τη θερμοκρασία.

4. Αποτελέσματα & Συζήτηση

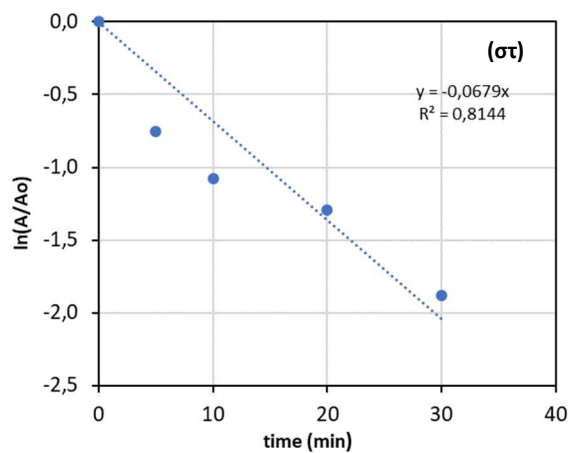
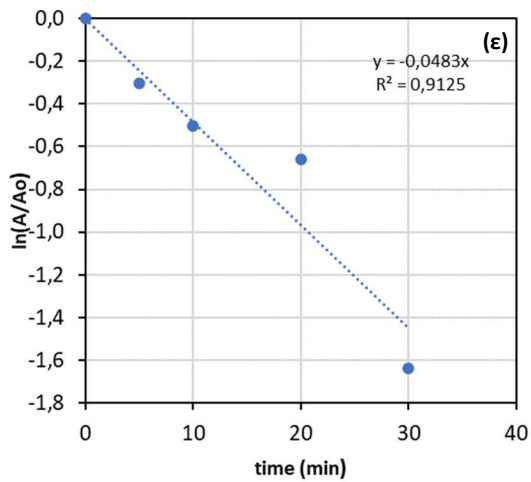
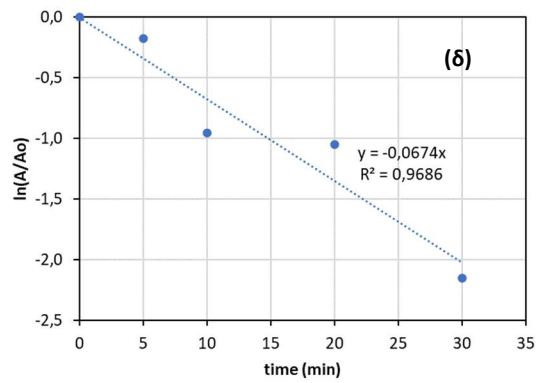
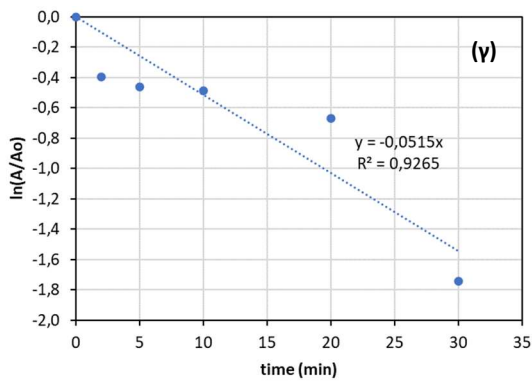
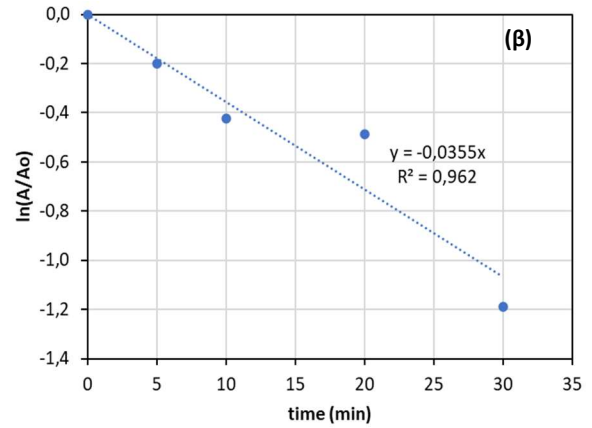
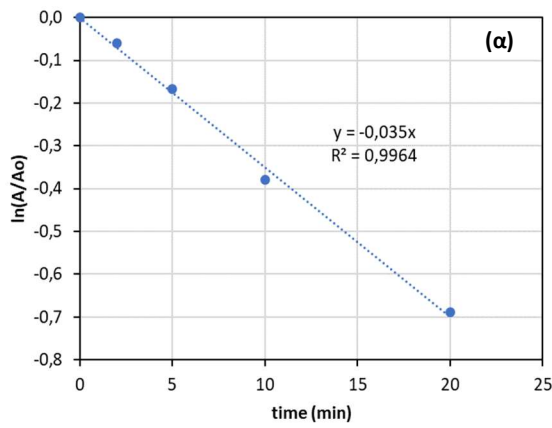
Για τις ανάγκες της κινητικής μελέτης και εφόσον εξασφαλίστηκαν η γραμμικότητα απορρόφησης και συγκέντρωσης ενζύμου δεν ήταν απαραίτητος ο προσδιορισμός της απόλυτης τιμής της ενεργότητας του ενζύμου σε U/L, αλλά η εναπομένουσα ενζυμική ενεργότητα. Παρόλαυτα από την σύγκριση των τιμών απορρόφησης και την ίδια αραιώση σε όλα τα είδη γάλακτος διαπιστώθηκε ότι η περιεχόμενη ενεργότητα στα γάλατα κατά φθίνουσα σειρά είναι η εξής: ΖΚΑΜΗΛΑ>ΖΒΟΥΒΑΛΙ>ΖΠΡΟΒΕΙΟ>ΖΓΙΔΙΝΟ>ΖΓΑΪΔΟΥΡΑΣ>ΖΑΓΕΛΑΔΑ.

Ενδεικτικά, στο Διάγραμμα 4 απεικονίζεται η μείωση της εναπομένουσας ενεργότητας ALP στο γάλα καμήλας σε θερμοκρασία 68°C, όπου φαίνεται η εκθετική μείωση της εναπομένουσας ενζυμικής ενεργότητας με το χρόνο θερμικής επεξεργασίας, οπότε και επιβεβαιώθηκε ότι η θερμική απενεργοποίηση της ALP ακολουθεί κινητική πρώτης τάξης.

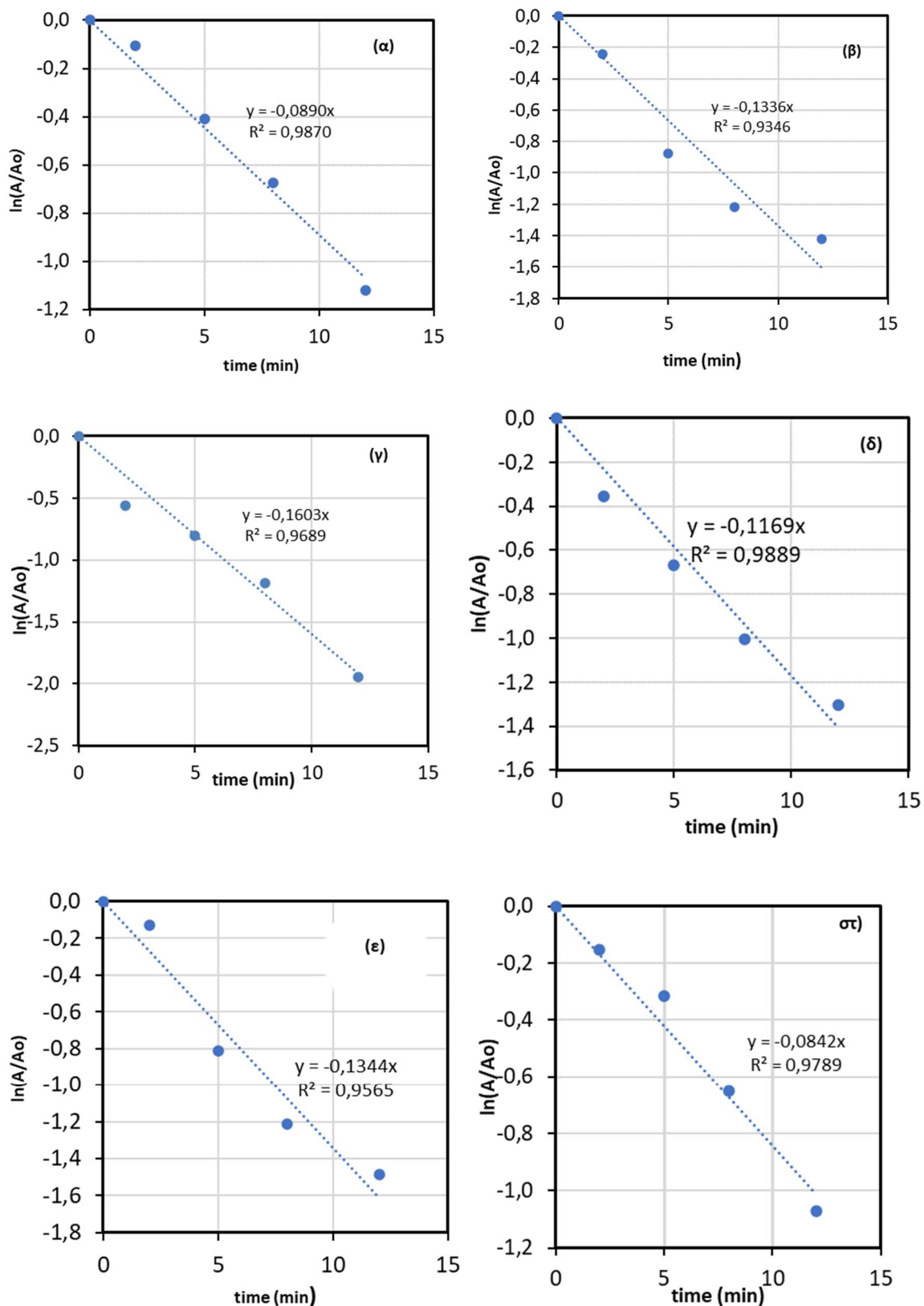


Διάγραμμα 4: εκθετική μείωση της εναπομένουσας ενζυμικής ενεργότητας για το γάλα καμήλας σε συνάρτηση με τους χρόνους παστερίωσης σε θερμοκρασία 68°C .

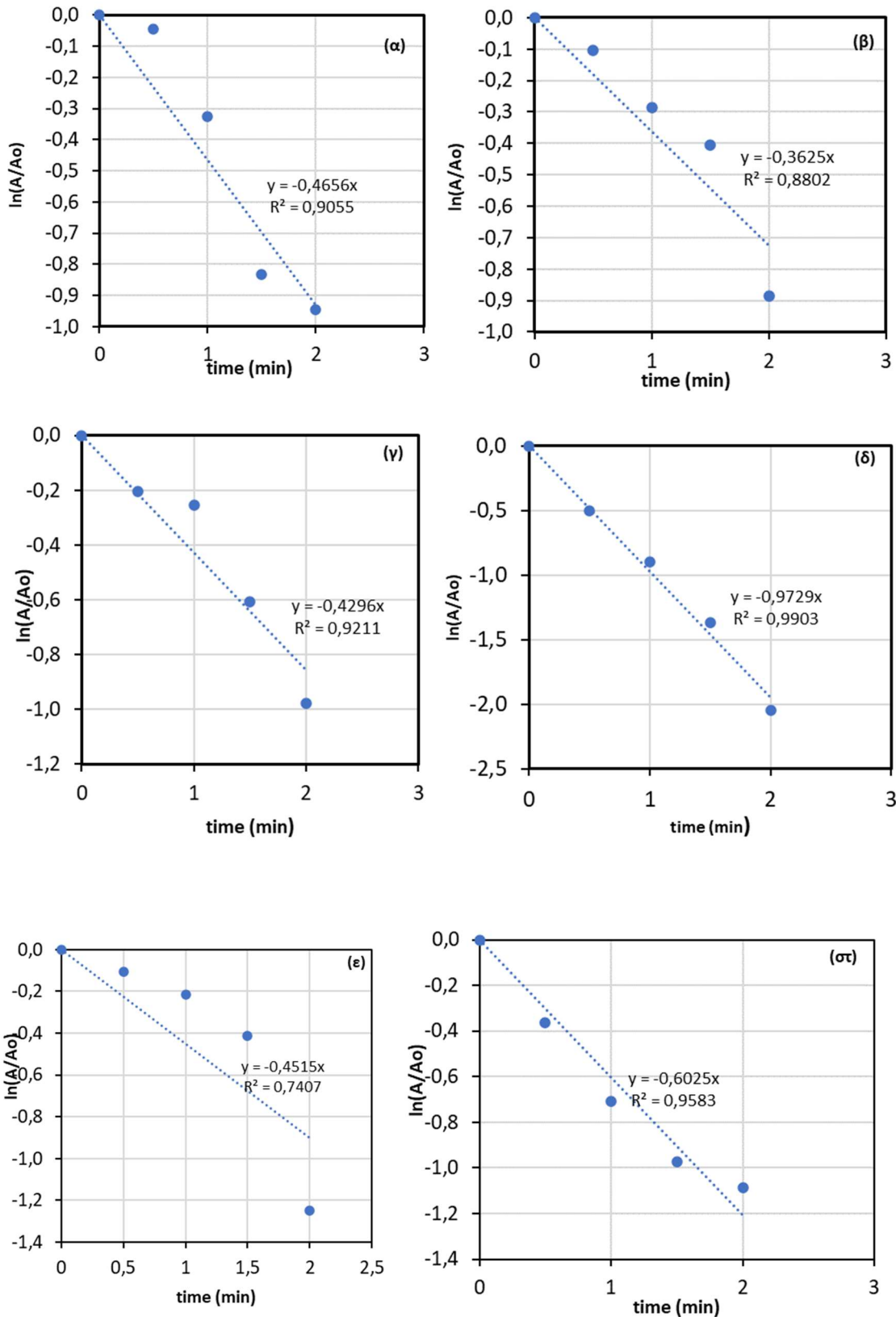
Στην συνέχεια για την εύρεση του ρυθμού θερμικής απενεργοποίησης μέσω της γραμμικής παλινδρόμησης χρησιμοποιήθηκε η Εξίσωση 3. Η σταθερά (k) προήλθε από την κλίση της γραμμής που λήφθηκε από την γραφική παράσταση του φυσικού λογαρίθμου της εναπομένουσας ενεργότητας ALP σε συνάρτηση με τον χρόνο θερμικής επεξεργασίας (t) σύμφωνα με την Εξίσωση 3. Τα αποτελέσματα για κάθε είδος γάλακτος για την εύρεση του ρυθμού θερμικής απενεργοποίησης σε όλες τις μελετώμενες θερμοκρασίες δίνονται στα παρακάτω διαγράμματα:



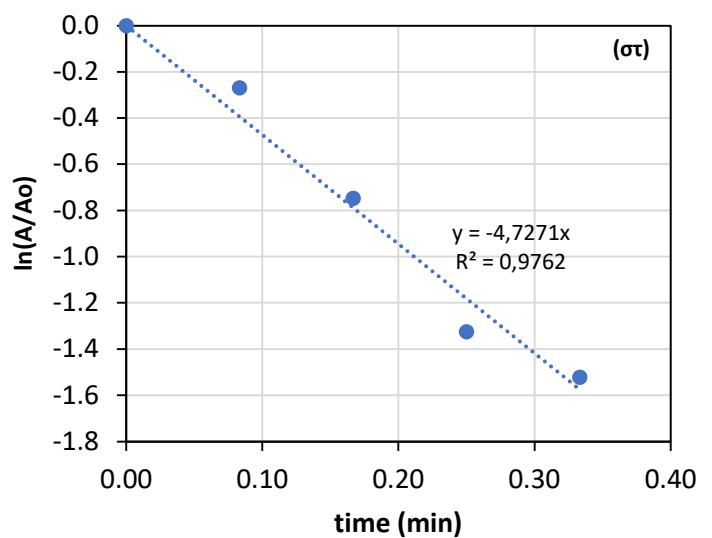
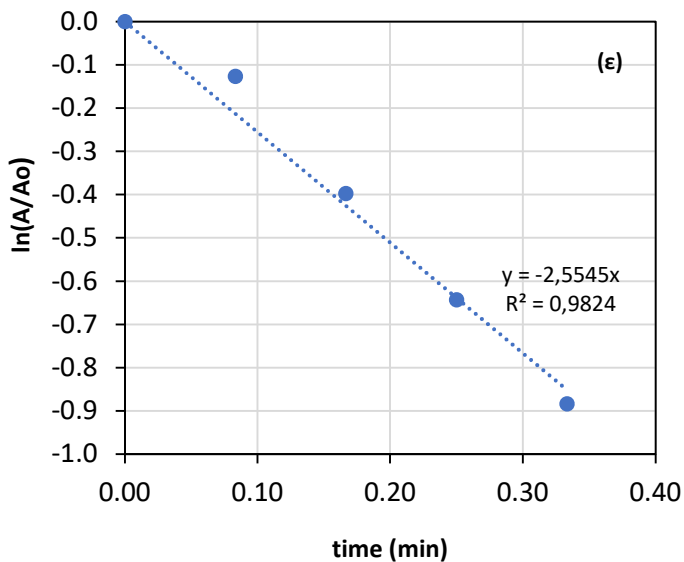
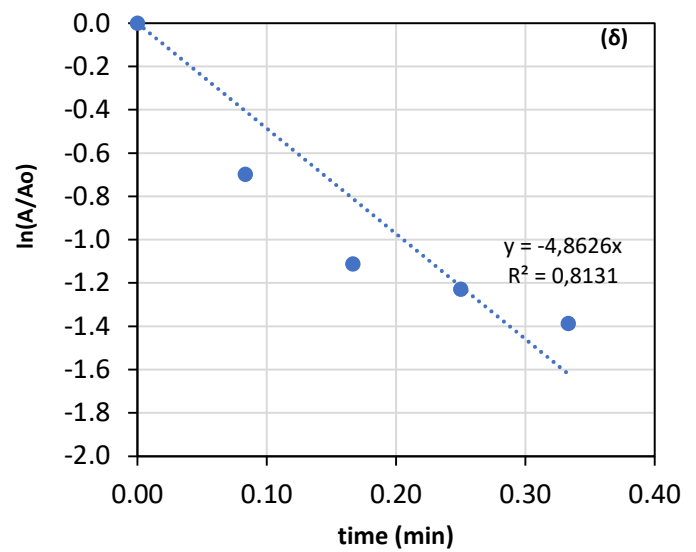
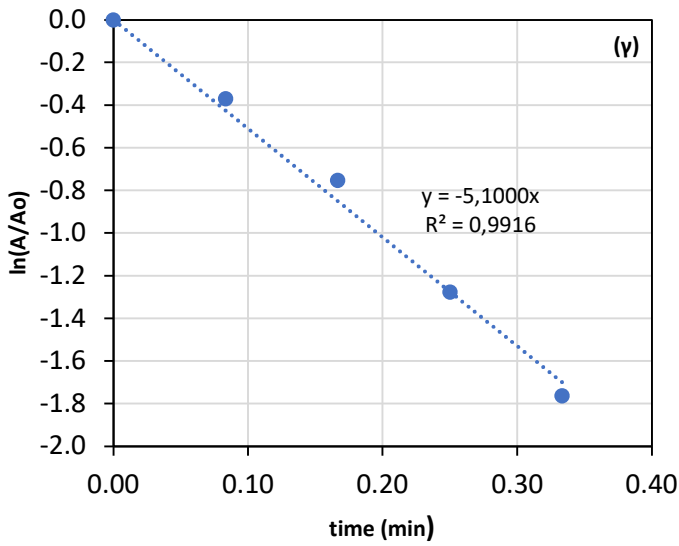
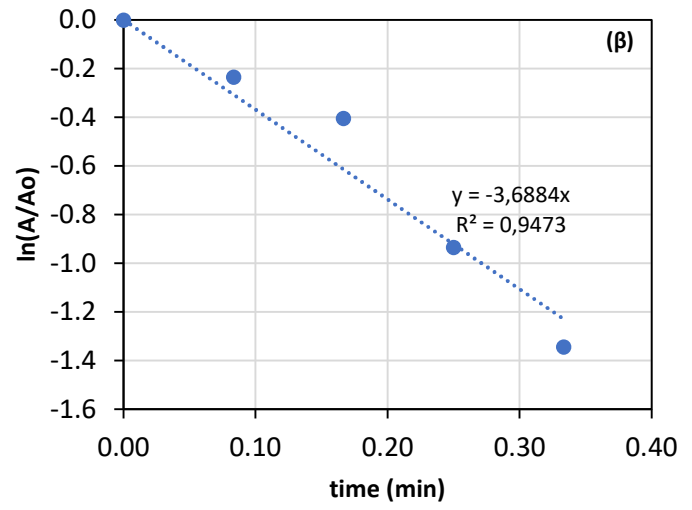
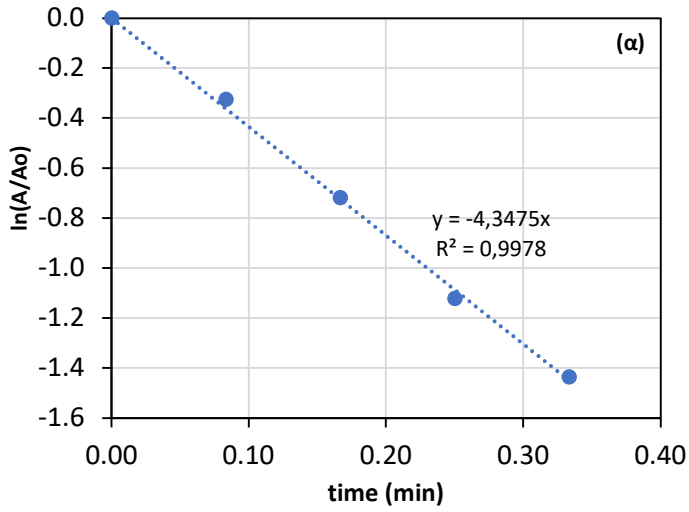
Διάγραμμα 5: Θερμική απενεργοποίηση της ALP σε θερμοκρασία 63 ° C σε (α) αγελαδινό γάλα, (β) πρόβειο γάλα, (γ) γίδινο γάλα, (δ) γάλα ονόγαλα, (ε) γάλα καμήλας, και (στ) βουβαλίσιο γάλα



Διάγραμμα 6: Θερμική απενεργοποίηση της ALP σε θερμοκρασία 68 ° C σε (α) αγελαδινό γάλα, (β) πρόβειο γάλα, (γ) γίδινο γάλα, (δ) γάλα ονόγαλα, (ε) γάλα καμήλας, και (στ) βουβαλίσιο γάλα



Διάγραμμα 7: Θερμική απενεργοποίηση της ALP σε **θερμοκρασία 72 ° C** σε (α) αγελαδινό γάλα, (β) πρόβειο γάλα, (γ) γίδινο γάλα, (δ) γάλα ονόγαλα, (ε) γάλα καμήλας, και (στ) βουβαλίσιο γάλα



Διάγραμμα 8: Θερμική απενεργοποίηση της ALP σε **θερμοκρασία 75 ° C** σε (α) αγελαδινό γάλα, (β) πρόβειο γάλα, (γ) γίδινο γάλα, (δ) γάλα ονόγαλα, (ε) γάλα καμήλας, και (στ) βουβαλίσιο γάλα

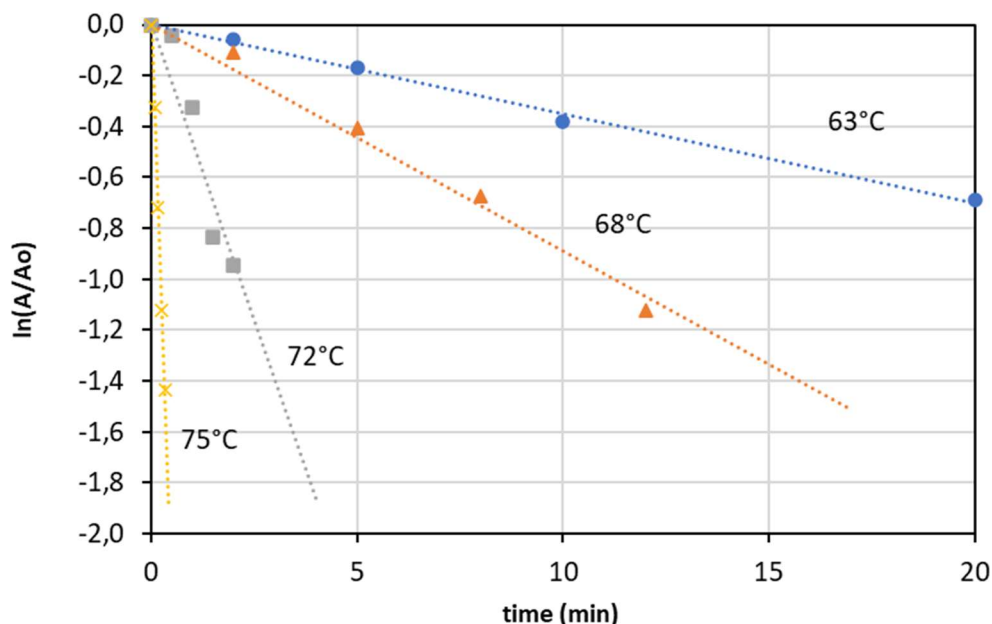
Στον πίνακα 4 που ακολουθεί συνοψίζονται στις οι τιμές θερμικής απενεργοποίησης k (min^{-1}) για το κάθε είδος γάλακτος χωριστά και στις αντίστοιχες θερμοκρασίες.

Πίνακα 5: οι τιμές θερμικής απενεργοποίησης k (min^{-1}) για το κάθε είδος γάλακτος χωριστά και οι αντίστοιχες θερμοκρασίες

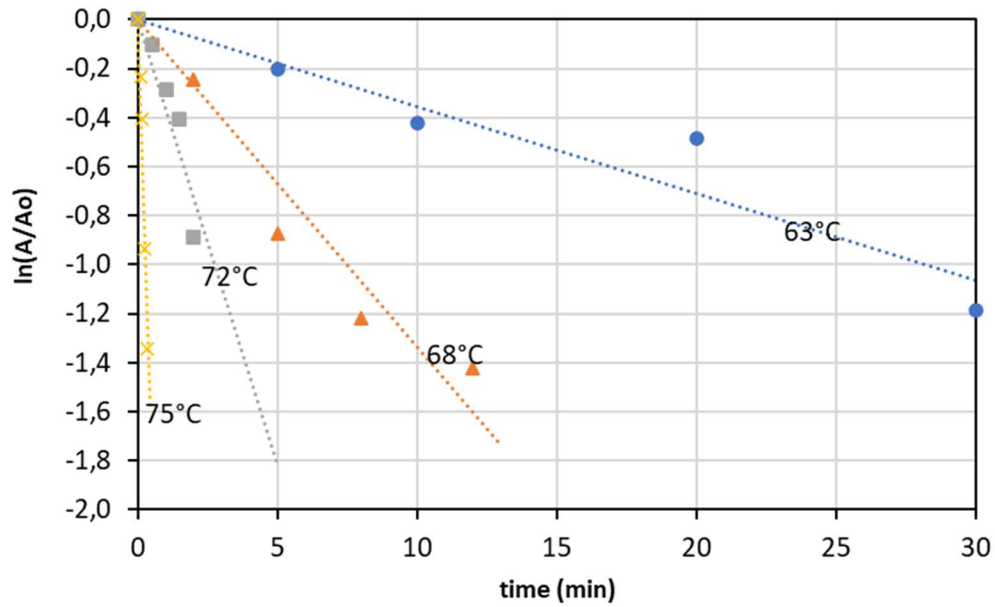
	Αγελαδινό	Πρόβειο	Γίδινο
T (°C)	k (min^{-1})	k (min^{-1})	k (min^{-1})
63	0,0350 ± 0,0012	0,0355 ± 0,0035	0,0515 ± 0,0065
68	0,0890 ± 0,0034	0,1336 ± 0,0102	0,1603 ± 0,0083
72	0,4656 ± 0,0494	0,2702 ± 0,0108	0,4296 ± 0,0396
75	4,3475 ± 0,0590	3,6884 ± 0,2750	5,1000 ± 0,1410

	Γαϊδούρα	Βουβάλι	Καμήλα
T (°C)	k (min^{-1})	k (min^{-1})	k (min^{-1})
63	0,073 ± 0,0061	0,0679 ± 0,0079	0,0483 ± 0,0049
68	0,117 ± 0,0062	0,0842 ± 0,0041	0,1344 ± 0,0089
72	0,973 ± 0,0283	0,6025 ± 0,0333	0,2538 ± 0,0170
75	4,863 ± 0,5274	4,7271 ± 0,2216	2,5545 ± 0,1054

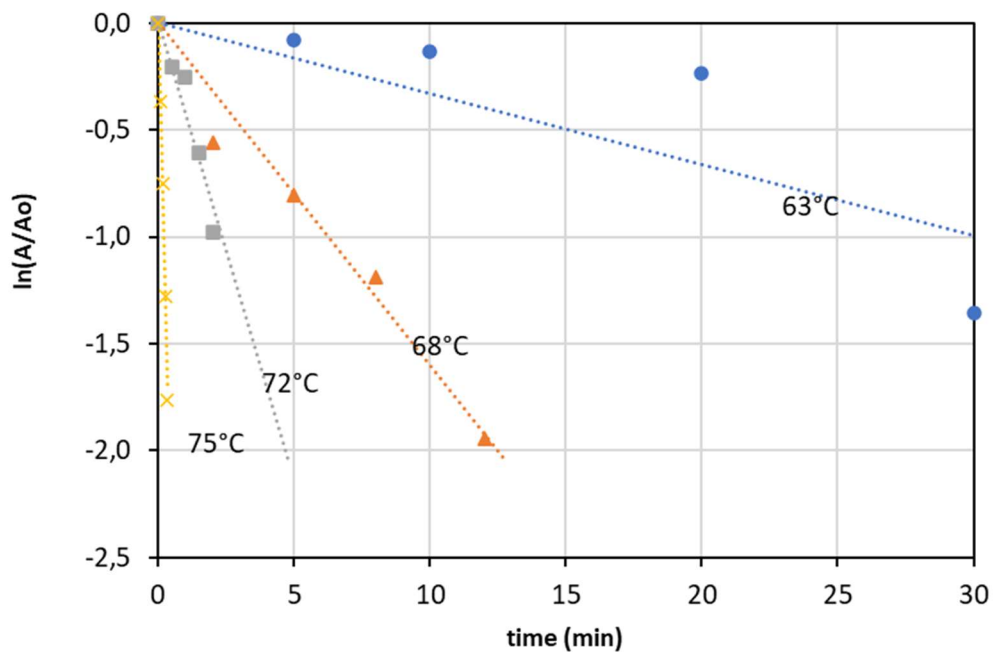
Για την συγκριτική απεικόνιση της εξάρτησης του ρυθμού θερμικής απενεργοποίησης από τις διαφορετικές θερμοκρασίες κατασκευάστηκαν τα διαγράμματα 9,10,11,12,13,14.



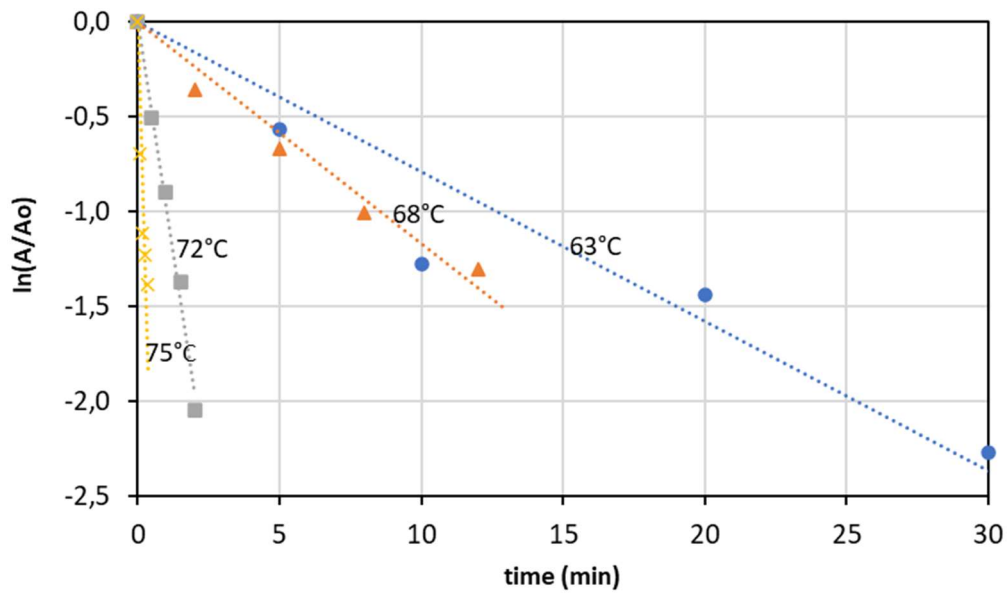
Διάγραμμα 9: θερμική απενεργοποίηση για θερμοκρασίες 63,68,72 και 75°C για γάλα αγελάδος.



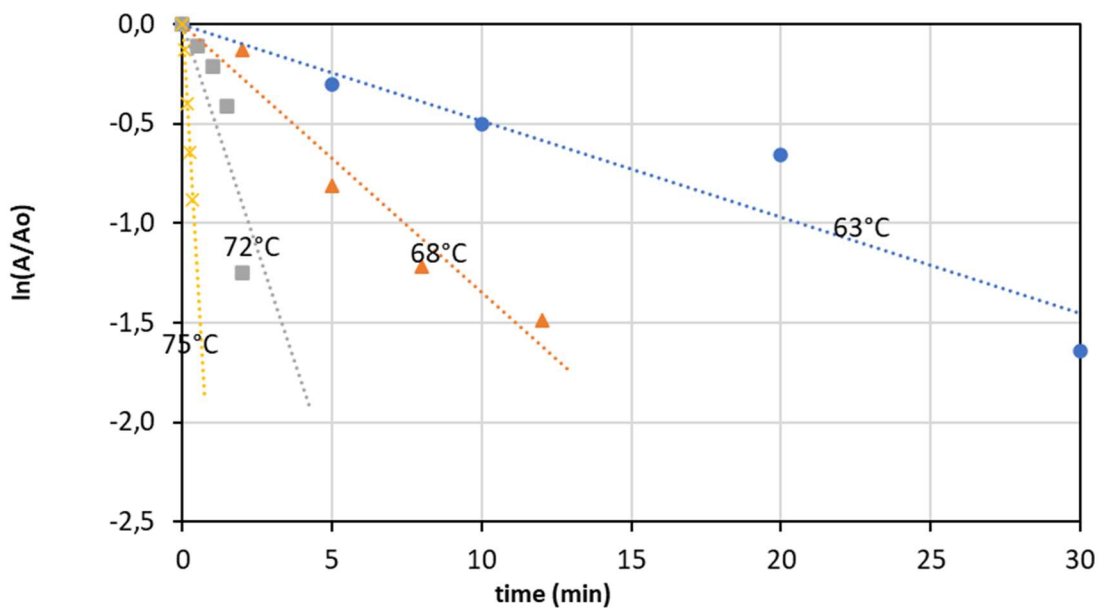
Διάγραμμα 10: Θερμική απενεργοποίηση για θερμοκρασίες 63,68,72 και 75°C για πρόβειο γάλα.



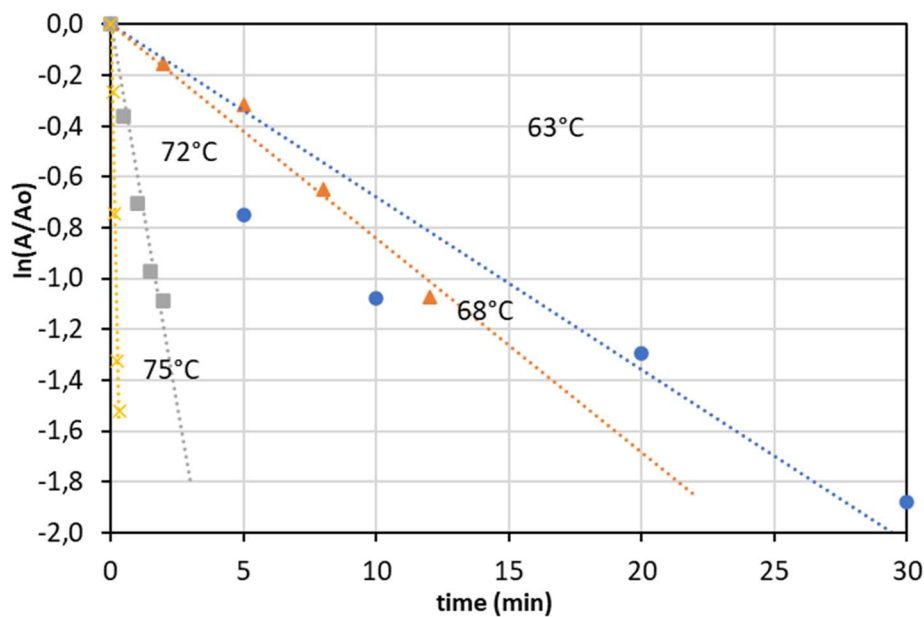
Διάγραμμα 11: Θερμική απενεργοποίηση για θερμοκρασίες 63,68,72 και 75°C σε γίδινο γάλα .



Διάγραμμα 12: Θερμική απενεργοποίηση για θερμοκρασίες 63,68,72 και 75°C σε γάλα ονόγαλα.



Διάγραμμα 13: Θερμική απενεργοποίηση σε θερμοκρασίες 63,68,72 και 75°C σε γάλα καμήλας.



Διάγραμμα 14: θερμική απενεργοποίηση για θερμοκρασίες 63,68,72 και 75°C σε γάλα βουβαλιού.

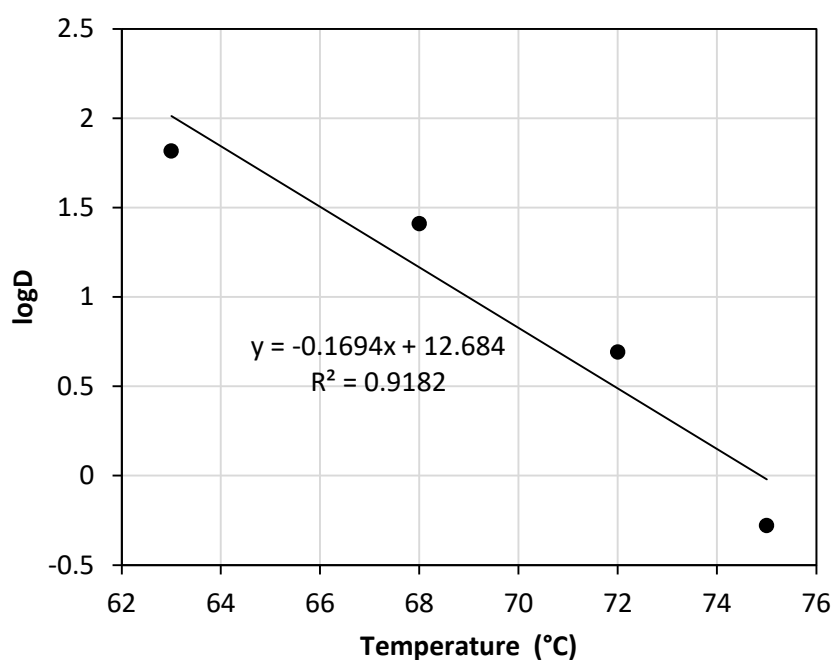
Στην συνέχεια υπολογίστηκε ο χρόνος υποδεκαπλασιασμού της αλκαλικής φωσφατάσης D σύμφωνα με την εξίσωση 4 και τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 5 .

Πίνακας 6: ο χρόνος υποδεκαπλασιασμού της αλκαλικής φωσφατάσης D στις θερμοκρασίες παστερίωσης

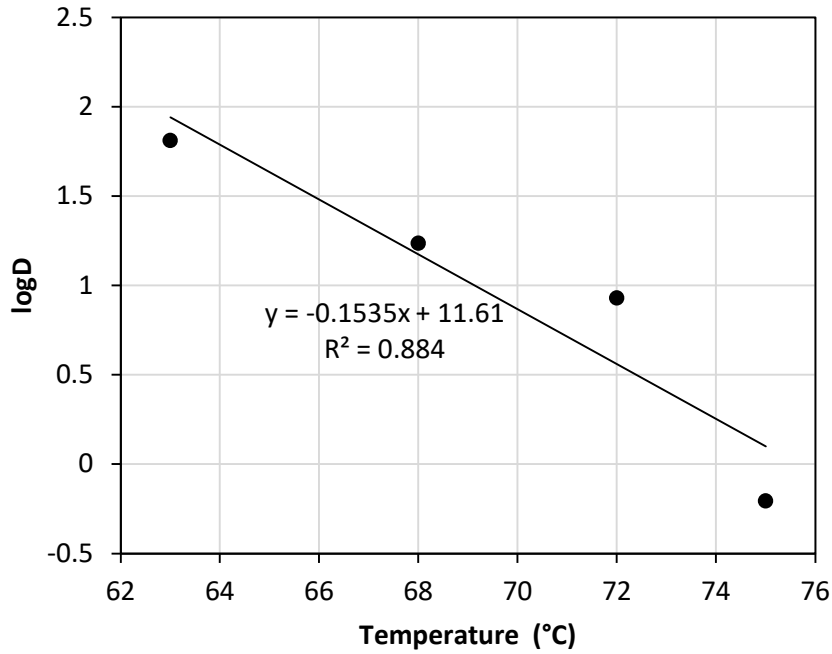
	Αγελαδιό	Πρόβειο	Γίδινο
T (°C)	D (min)	D (min)	D (min)
63	65,79 ± 2,21	64,86 ± 6,46	44,71 ± 5,73
68	25,87 ± 0,99	17,23 ± 1,32	14,36 ± 0,75
72	4,95 ± 0,53	8,52 ± 0,34	5,36 ± 0,50
75	0,53 ± 0,01	0,62 ± 0,05	0,45 ± 0,01

	Γαϊδούρα	Βουβάλι	Καμήλα
T (°C)	D (min)	D (min)	D (min)
63	31,48 ± 2,64	33,91 ± 4,00	47,67 ± 4,89
68	19,70 ± 1,05	27,35 ± 1,33	17,13 ± 1,14
72	2,37 ± 0,07	3,82 ± 0,21	9,07 ± 0,61
75	0,47 ± 0,05	0,49 ± 0,02	0,90 ± 0,04

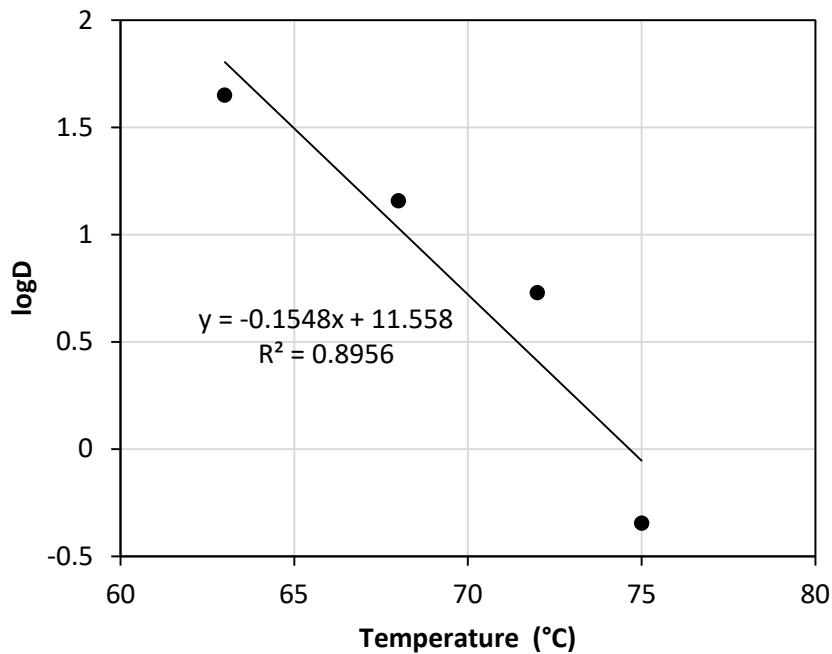
Επειδή η εξάρτηση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού σε συνάρτηση με την θερμοκρασία δίνεται από την Εξίσωση 5 από όπου και προσδιορίζεται η θερμική αντίσταση, z (αριθμός των βαθμών °C που απαιτούνται για 10πλάσια μείωση στο D) με ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης, ως το αντίστροφο της κλίσης της ευθείας που προκύπτει από τα παρακάτω διαγράμματα 15,16,17,18,19,20 δίνονται τα διαγράμματα του log D σε συνάρτηση με την θερμοκρασία T °C για όλα τα είδη γάλακτος που χρησιμοποιήθηκαν.



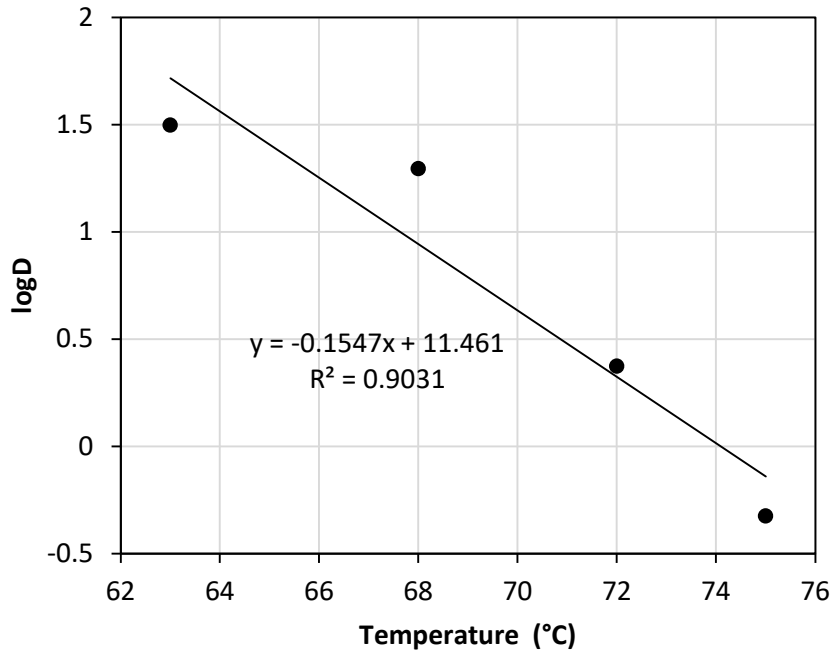
Διάγραμμα 15: ο λογάριθμος των τιμών D σε συνάρτηση της θερμοκρασίας σε γάλα αγελάδος



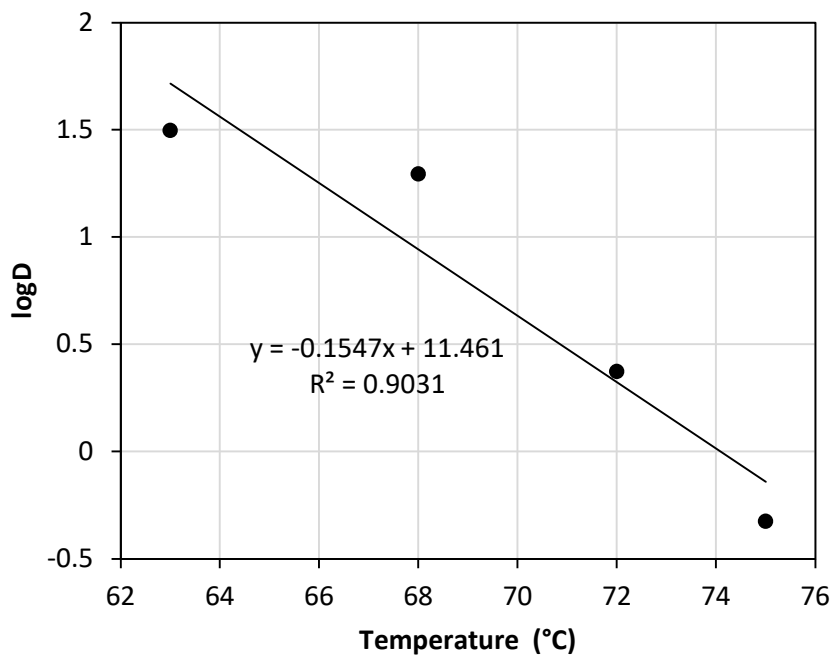
Διάγραμμα 16: ο λογάριθμος των τιμών D σε συνάρτηση της θερμοκρασίας σε γάλα πρόβειο



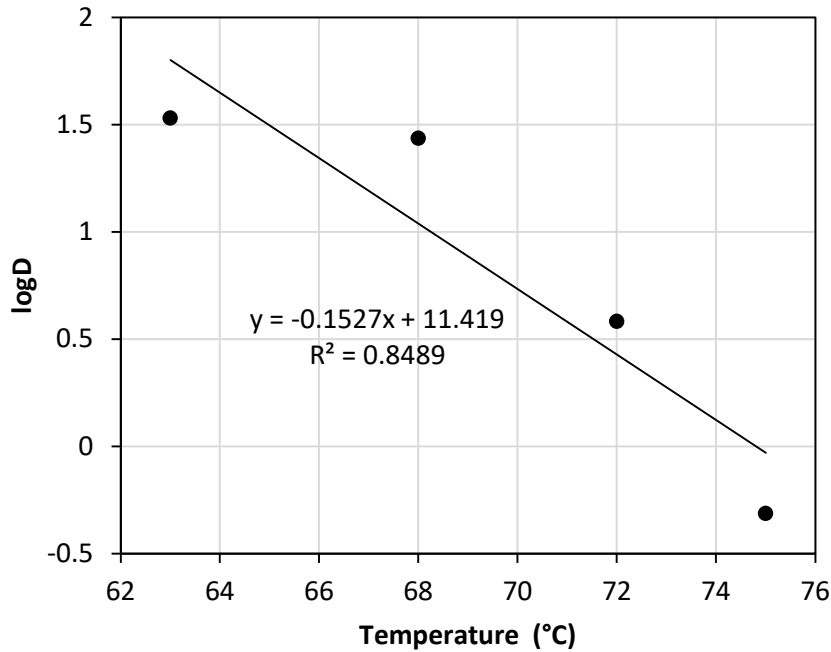
Διάγραμμα 17: ο λογάριθμος των τιμών D σε συνάρτηση της θερμοκρασίας σε γάλα γίδινο



Διάγραμμα 18: ο λογάριθμος των τιμών D σε συνάρτηση της θερμοκρασίας σε γάλα ονόγαλα



Διάγραμμα 19: ο λογάριθμος των τιμών D σε συνάρτηση της θερμοκρασίας σε γάλα καμήλας



Διάγραμμα 20: ο λογάριθμος των τιμών D σε συνάρτηση της θερμοκρασίας σε γάλα βουβάλι

Με την θερμική αντίσταση z μπορούμε να καταλάβουμε πόσο θερμοευαίσθητη είναι η ALP στην αντίστοιχη θερμοκρασία σε κάθε είδος γάλακτος. Όσο πιο μικρό z -value έχουμε τόσο πιο θερμοευαίσθητη είναι η ALP του γάλακτος. Από την εξίσωση (5) $a = \frac{1}{z} \Rightarrow z = \frac{1}{a}$ (εξίσωση 5) όπου :

z η τιμή θερμικής αντίστασης

a είναι η κλίση της καμπύλης στο κάθε διάγραμμα

Στον παρακάτω Πίνακα 6 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα των τιμών της θερμικής αντίστασης z -value (αριθμός των βαθμών °C που απαιτούνται για 10πλάσια μείωση στο D) για κάθε είδος γάλακτος ξεχωριστά :

Πίνακας 7 : τιμές θερμικής αντίστασης z-value για κάθε είδος γάλακτος

Είδος γάλακτος	z-value (°C)
Αγελαδινό	5,90 ± 1,30
Πρόβειο	6,51 ± 1,78
Γίδινο	6,5 ± 1,70
Ονόγαλα	6,46 ± 1,58
Καμήλας	7,63 ± 2,67
Βουβάλι	6,55 ± 2,14

Σύμφωνα με τους Claeys et al. (2002), οι εκτιμώμενες τιμές z- values κυμαίνονται από 5-6,7°C και 8,5-9,5 °C ανάλογα με το είδος γάλακτος. Οι Wilińska et al. (2007) διερεύνησαν τη θερμική αδρανοποίηση της ALP στο νωπό αγελαδινό και γίδινο γάλα σε συνθήκες θερμοκρασίας - χρόνου 54–69°C για 1–180 λεπτά αντίστοιχα .Υπολογίστηκαν οι τιμές D54, D58, D61, D65 και D69 για το βόειο και το γίδινο γάλα. Οι τιμές D ήταν χαμηλότερες για το κατσικίσιο γάλα (112, 22,5, 6,1, 1,5 και 0,37 min) σε σύγκριση με το αγελαδινό γάλα (233, 50,2, 10,8, 2,4 και 0,25 min) και η τιμή z ήταν υψηλότερη για το αγελαδινό γάλα (6,0°C) σε σύγκριση με το γίδινο γάλα (5,6°C).

Οι Dumitrașcu et al. (2014) πραγματοποίησαν μια κινητική μελέτη της θερμικής αδρανοποίησης της ALP χρησιμοποιώντας μια φθοριομετρική τεχνική σε αποβουτυρωμένο γάλα και πλήρες γάλα από αγελάδες, πρόβατα και κατσίκες σε συνθήκες 60–72.5°C για 0–40 min. Σε υψηλές θερμοκρασίες, η αδρανοποίηση της ALP δεν επηρεάστηκε από την περιεκτικότητα σε λιπαρά, αλλά η ALP αποδείχθηκε πιο ανθεκτική στο αγελαδινό γάλα σε σύγκριση με το κατσικίσιο και το πρόβειο γάλα.

Οι Giacometti et al. (2016) διαπίστωσαν ότι η δραστηριότητα της ALP στο γάλα ονόγαλα είναι παρόμοια με αυτή που αναφέρεται στο γάλα αλόγου. Επίσης οι Marchand et al.(2009) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η ALP στο γάλα ονόγαλα αδρανοποιείται πιο εύκολα από την ALP στο αγελαδινό και διαπιστώθηκε ότι η θερμική απενεργοποίηση της ALP υποειδών στο νωπό γάλα στους 48–64 °C θα μπορούσε να περιγραφεί με ακρίβεια από ένα κινητικό μοντέλο πρώτης τάξης για τις διαφορετικές θερμοκρασίες 48, 52, 56, 60 και 64 °C και οι εκτιμώμενες τιμές D ήταν 998, 211, 47.8, 7.77 και 1.24 min, αντίστοιχα με υπολογιζόμενη τιμή z για την ALP υποειδούς ήταν 5,31 °C .

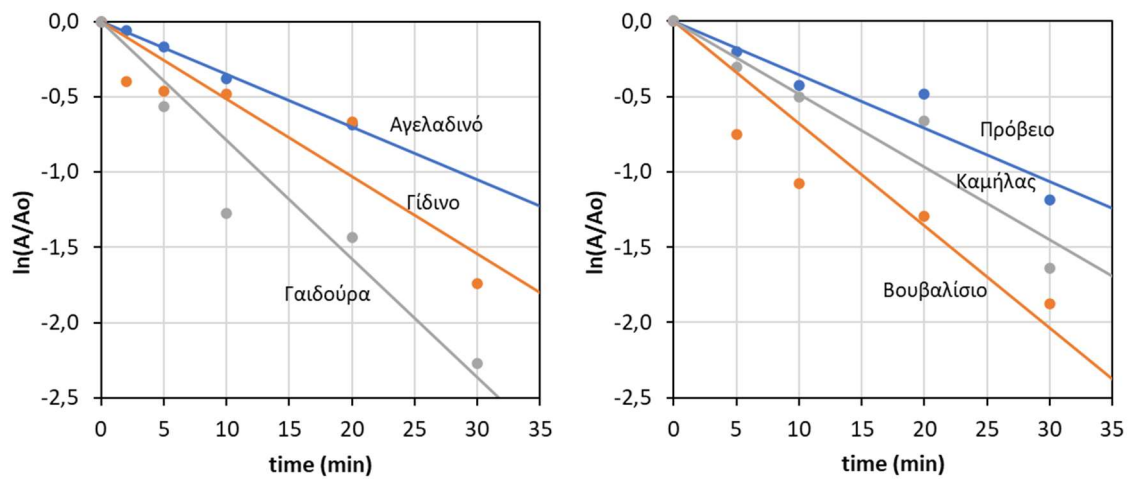
Μια άλλη μελέτη που έγινε για το βουβαλίσιο γάλα έδειξε ότι η δραστηριότητα ALP είναι γενικά ελαφρώς μικρότερη σε σχέση με το βόειο γάλα και τα ποσοστά επανενεργοποίησης είναι παρόμοια με το αγελαδινό γάλα (Sharma & Ganguli,

1974).Επίσης οι Lombardi et al.(2000) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η θέρμανση που έγινε σε γάλα βουβαλιού στους 50°C για 1 έως 30 λεπτά δεν είχε αποτέλεσμα στη δραστικότητα της ALP ενώ στους 60°C έδειξε την υψηλότερη ευαισθησία σε θερμική απενεργοποίηση εν αντιθέσει στους 70° όπου η δραστικότητα της ALP καταστράφηκε εντελώς μετά από 1 λεπτό.

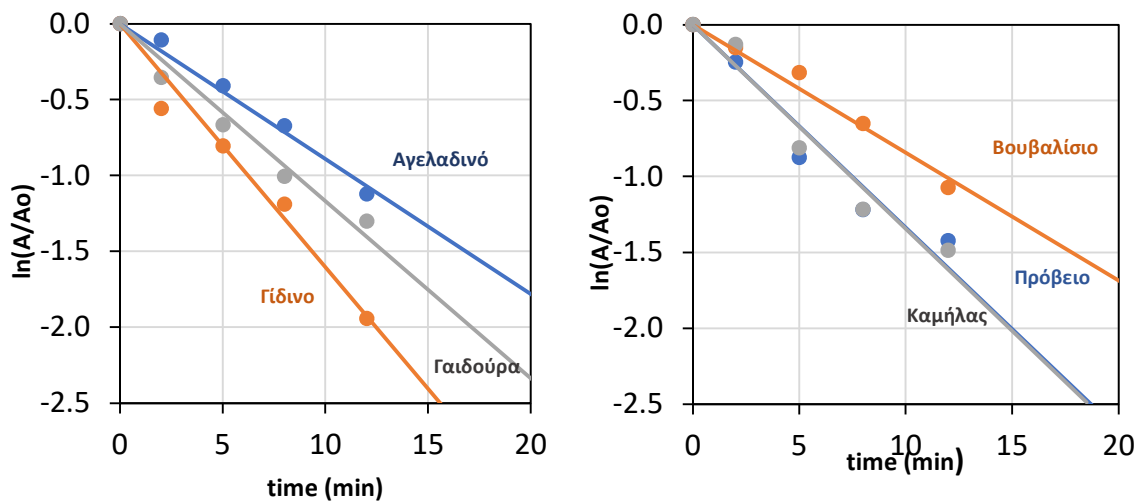
Όσον αφορά το γάλα καμήλας οι Lorenzen et al. (2011a) αξιολόγησαν την υπολειμματική δραστικότητα της ALP σε θερμοκρασία παστερίωσης, 75±1°C και για χρόνους 15–30 s και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι σύμφωνα με την υπολειμματική δραστικότητα της ALP το ενδογενές ένζυμο της αλκαλικής φωσφατάσης ALP δεν είναι ενδεικτικός δείκτης για την επιβεβαίωση της παστερίωσης του γάλακτος καμήλας .Επιπλέον οι Wernery et al. (2006) με διάφορες δοκιμές που έκαναν απέδειξαν ότι η ALP δεν είναι εντελώς αδρανοποιημένη στους 72°C, την αποδεκτή θερμοκρασία για παστερίωση HTST και γενικά έχει μια θερμοσταθερή μορφή. Επίσης συγκρίνοντας την απενεργοποίηση της ALP στο γάλα καμήλας και αγελάδας, επιβεβαιώθηκε ότι η ALP δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της σωστής παστερίωσης του γάλακτος καμήλας και απαιτούνται μεγαλύτερες θερμοκρασίες από αυτές που απαιτούνται για την απενεργοποίηση της ALP στο αγελαδινό γάλα Wernery et al. (2008).

Τα αποτελέσματά μας συγκρίθηκαν με την διεθνή βιβλιογραφία και βλέπουμε ότι ο ρυθμός θερμικής απενεργοποίησης k δηλαδή ο ρυθμός με τον οποίο απενεργοποιείται η ALP στις διάφορες θερμοκρασίες θερμικής επεξεργασίας δείχνει ότι όσο μεγαλύτερο k έχουμε τόσο μικρότερος θα είναι ο χρόνος υποδεκαπλασιασμού D - value και άρα τόσο πιο θερμοευαίσθητη θα είναι η ALP .Σύμφωνα με τον Πίνακα 4 διαπιστώνεται ότι στους 63 °C το αγελαδινό γάλα έχει τον χαμηλότερο ρυθμό θερμικής απενεργοποίησης k και το γάλα ονόγαλα έχει τον μικρότερο. Ενώ αυξανόμενης της θερμοκρασίας τον μεγαλύτερο ρυθμό θερμικής απενεργοποίησης k τον έχει το γίδινο γάλα και τον μικρότερο το γάλα καμήλας. Ο ρυθμός θερμικής απενεργοποίησης k εκφράζεται με έναν χρόνο υποδεκαπλασιασμού D -value και βλέπουμε ότι όσο πιο μικρό ρυθμό θερμικής απενεργοποίησης k έχουμε τόσο πιο μεγάλο χρόνο υποδεκαπλασιασμού D - value έχουμε. Σύμφωνα με τον Πίνακα 5 αυξάνοντας την θερμοκρασία θερμικής επεξεργασίας μειώνεται ο χρόνος υποδεκαπλασιασμού D - value και διαπιστώνεται ότι την πιο μικρή τιμή την έχει το γίδινο γάλα και την μεγαλύτερη το γάλα καμήλας. Δηλαδή ο χρόνος υποδεκαπλασιασμού D - value αλλάζει και όσο πιο μικρό D - value έχουμε τόσο πιο θερμοευαίσθητη είναι η ALP του γάλακτος. Συνεπώς το γίδινο γάλα είναι πιο θερμοευαίσθητο σε σχέση με τα άλλα είδη γάλακτος σε υψηλές θερμοκρασίες θερμικής επεξεργασίας .Επίσης ο χρόνος υποδεκαπλασιασμού εκφράζεται καλύτερα το z -value (θερμοκρασία που απαιτείται για μείωση του D - value κατά μια τάξη μεγέθους) και σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης βλέπουμε ότι το γάλα αγελάδος έχει το μικρότερο z -value σε αντίθεση με το γάλα καμήλας που έχει τον μεγαλύτερο.

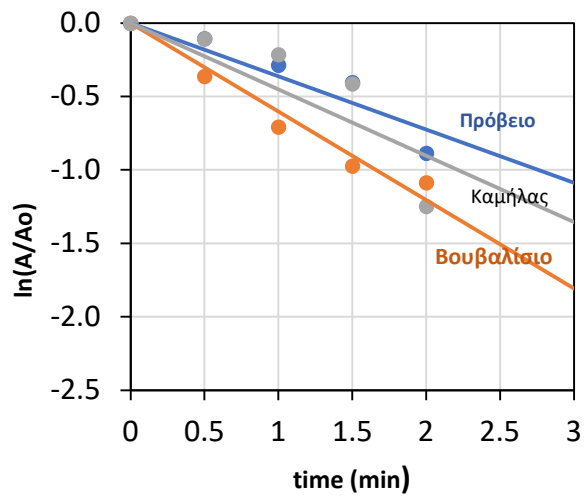
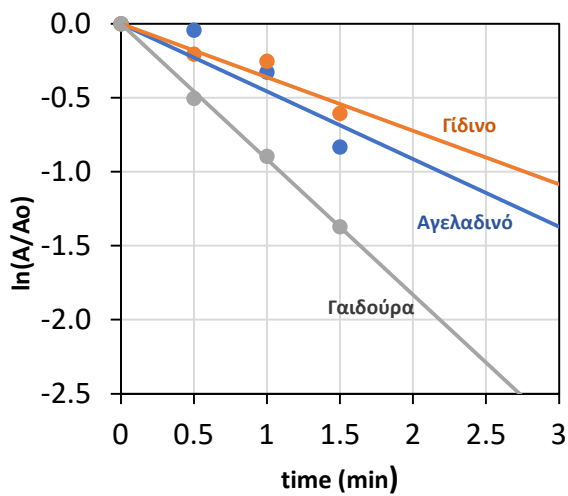
Για την συγκριτική απεικόνιση της εξάρτησης του ρυθμού θερμικής απενεργοποίησης ALP στα έξι υπό μελέτη είδη γάλακτος και για κάθε θερμοκρασία χωριστά κατασκευάστηκαν τα διαγράμματα 21,22,23,24



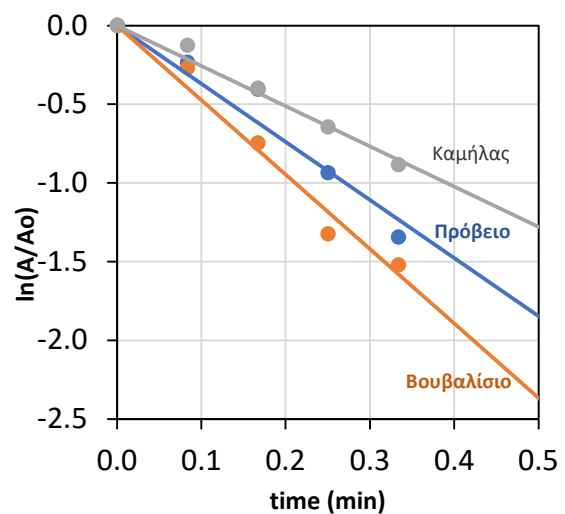
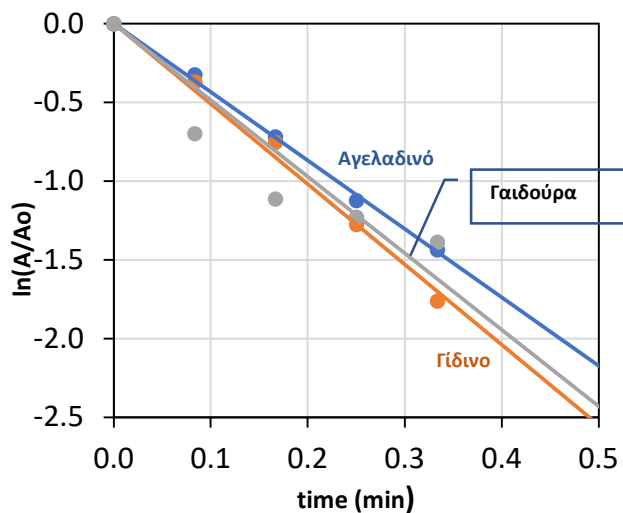
Διάγραμμα 21: Συγκριτικό διάγραμμα θερμικής απενεργοποίησης ALP στους 63 °C στα έξι υπό μελέτη είδη γάλακτος.



Διάγραμμα 22: Συγκριτικό διάγραμμα θερμικής απενεργοποίησης ALP στους 68 °C στα έξι υπό μελέτη είδη γάλακτος



Διάγραμμα 23: Συγκριτικό διάγραμμα θερμικής απενεργοποίησης ALP στους 72 °C στα έξι υπό μελέτη είδη γάλακτος



Διάγραμμα 24: Συγκριτικό διάγραμμα θερμικής απενεργοποίησης ALP στους 75 °C στα έξι υπό μελέτη είδη γάλακτος

5. Συμπεράσματα

Από τις λίγες μελέτες που έχουν γίνει φαίνεται ότι η θερμική απενεργοποίηση της αλκαλικής φωσφατάσης στο αγελαδινό, πρόβειο και γίδινο γάλα είναι περίπου παρόμοια, ενώ στο γάλα ονόγαλα είναι πιο ευαίσθητο στην θερμότητα με αποτέλεσμα σε αυτά τα είδη γάλακτος η απενεργοποίηση της αλκαλική φωσφατάση δεν είναι κατάλληλος δείκτης παστερίωσης. Σε υψηλές θερμοκρασίες έχουμε μείωση της δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης ενώ σε χαμηλότερες θερμοκρασίες η απενεργοποίηση της ALP επηρεάζεται από την περιεκτικότητα σε λιπαρά. (Dumitrascu et al. 2014). Ως εκ τούτου η μελέτη κινητικής θερμικής απενεργοποίησης που έγινε ήταν κινητική 1^{ης} τάξης, σε έξι διαφορετικά είδη γάλακτος ,για την διεξαγωγή των τιμών D και z ώστε να μπορούμε να εξηγήσουμε την μεταβλητότητα της αλκαλικής φωσφατάσης στο κάθε είδος γάλακτος και να υπάρχουν κατάλληλα στοιχεία και περιορισμούς για να μπορούμε να πούμε ότι το συγκεκριμένο ένζυμο θα μπορούσε να εγγυηθεί την απενεργοποίηση των παθογόνων βακτηρίων και κατεπέκταση ότι είναι ένας καλός δείκτης παστερίωσης του γάλακτος (EFSA, 2021).

Συμπερασματικά λοιπόν η κινητική 1^{ης} τάξης μπορεί να εφαρμοστεί σε όλα τα είδη γάλακτος .Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της έρευνας που έγινε οι χρόνοι υποδεκαπλασιασμού είναι διαφορετικοί σε κάθε είδος γάλακτος και σε κάθε θερμοκρασία παστερίωσης που χρησιμοποιήσαμε. Παρατηρήθηκε επίσης σύμφωνα με τον Πίνακα 5 ότι οι τιμές $D_{63^{\circ}\text{C}}$ στο αγελαδινό γάλα σε σχέση με τα υπόλοιπα (πρόβειο, γίδινο, καμήλας, ονόγαλα και βουβάλι) ήταν μεγαλύτερος άρα η αλκαλική φωσφατάση απενεργοποιείται με μεγαλύτερο ρυθμό στα υπόλοιπα είδη γάλακτος, σε θερμική επεξεργασία 63°C . Δηλαδή, σε πιθανό έλεγχο του ενζύμου της αλκαλικής φωσφατάσης σε παστερίωση (στους 63°C) μη-αγελαδινών ειδών γάλακτος θα έχουμε αρνητικό αποτέλεσμα, σε πιο ήπιες συνθήκες επεξεργασίας από τις προτεινόμενες. Όσον αφορά τις τιμές z σύμφωνα με τον Πίνακα 6 βλέπουμε ότι έχουν γίνει και συγκεκριμένα στο αγελαδινό στο πρόβειο και το γίδινο γάλα καθώς στα δεν διαφέρουν πολύ μεταξύ τους και κάποια αποτελέσματα συμβαδίζουν με άλλες μελέτες που άλλα είδη δεν υπάρχουν πολλές βιβλιογραφικές αναφορές. Όσον αφορά τις τιμές z-value παρατηρήθηκε ότι αυτές κυμάνθηκαν από 5,9 έως 7,6 με το αγελαδινό γάλα να παρουσιάζει τη μικρότερη τιμή z-value, που σημαίνει ότι η ALP είναι περισσότερο θερμοευαίσθητη στο αγελαδινό γάλα σε σύγκριση με τα υπόλοιπα είδη γάλακτος. Συγκεκριμένα δίνεται η φθίνουσα σειρά των τιμών του z-value: ΖΚΑΜΗΛΑΣ>ΖΒΟΥΒΑΛΙ>ΖΠΡΟΒΕΙΟ>ΖΓΙΔΙΝΟ>ΖΓΑΪΔΟΥΡΑΣ>ΖΑΓΕΛΑΔΑ .Καταλήγοντας διαπιστώθηκε διαφέρουν με αυτές της ALP στο αγελαδινό γάλα το οποίο και παρουσίασε την μεγαλύτερη θερμοευαισθησία ενώ η ότι οι κινητικές παράμετροι της θερμικής απενεργοποίησης της ALP στα διαφορετικά είδη γάλακτος ALP στο γάλα καμήλας παρουσίασε τη μικρότερη θερμοευαισθησία. Αυτά τα ευρήματα εντείνουν τους προβληματισμούς που έχουν αναγνωριστεί από την ακαδημαϊκή κοινότητα και το σχετικό ερώτημα της EFSA (2021) για το εάν η δοκιμή της αλκαλικής φωσφατάσης μπορεί

να χρησιμοποιηθεί ως αξιόπιστος δείκτης επικύρωσης των διεργασιών παστερίωσης του γάλατος και σε άλλα είδη πέραν του αγελαδινού.

Επίσης, δεδομένου του ότι η δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφατάσης επηρεάζεται από την εποχή, το στάδιο γαλουχίας, το είδος των φυλών την περιεκτικότητα σε λίπος και άλλες παραμέτρους, θα ήταν επιστημονικά ενδιαφέρον να μελετηθεί σε μελλοντικές εργασίες η πιθανή επίδραση αυτών των παραμέτρων στις κινητική θερμικής απενεργοποίησης της ALP. Για παράδειγμα να συλλεχθεί μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων από διαφορετικές φυλές ή ακόμη ανάμεσα από την ίδια φυλή είτε σε διαφορετική εποχή κατά την διάρκεια του έτους. Επίσης, σε μελλοντικές μελέτες προτείνεται η ανάπτυξη και χρήση πρωτοκόλλων για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της ALP αλλά και άλλων ενζύμων ενδιαφέροντος στο γάλα (όπως η υπεροξειδάση) σε διαφορετικά είδη γάλακτος. Τέλος, τα κινητικά μοντέλα τα οποία αναπτύχθηκαν σε ισοθερμοκρασιακές συνθήκες θερμικής απενεργοποίησης ALP, χρήζουν επικύρωσης και επαλήθευσης σε μη-ισοθερμοκρασιακές συνθήκες προσομοιάζοντας τις πραγματικές θερμοκρασιακές συνθήκες παστερίωσης σε βιομηχανική κλίμακα.

6. Βιβλιογραφία

Albillos, S. M., Reddy, R., & Salter, R. (2011). Evaluation of alkaline phosphatase detection in dairy products using a modified rapid chemiluminescent method and official methods. *Journal of food protection*, 74(7), 1144-1154.

Ali F, Hussain R, Qayyum A, Gul ST, Iqbal Z and Hassan MF,(2016). Milk somatic cell counts and some hemato-biochemical changes in sub-clinical mastitic dromedary She-Camels (*Camelus dromedarius*). *Pakistan Veterinary Journal*, 36, 405–408

Anifantakis, E. M., & Rosakis, P. S. (1983). Alkaline phosphatase activity of sheep's milk and some factors affecting it. *Egyptian journal of dairy science*.

Banks, J., & Muir, D. (2004). Variability of alkaline phosphatase in goat milk in relation to its use as an effective index of pasteurisation. *Project S01003. Hannah Research Institute, Ayr, Scotland*.

Berger TM, Maurer J, Schaeren W and Egger L,(2008). Alkaline phosphatase activity in Swiss ewe's and goat's milk.

Bigelow, W. (1921). The logarithmic nature of thermal death time curves. *The Journal of Infectious Diseases*, 528-536.

Bylund, G. (1995). Dairy processing handbook: Tetra Pak Processing Systems AB. *Sweden, AB: Lund, Sweden*, 13-36.

CAC (Codex Alimentarius Commission.) (2004). Draft code of hygienic practice for milk and milk products at step 8, Report of the thirty-sixth session of the codex committee on food hygiene. *Codex Alimentarius Commission Twenty-seventh Session, 2004*, 44-82.

Chaudhuri, G., Dey, P., Dalal, D., Venu-Babu, P., & Thilagaraj, W. R. (2013). A novel approach to precipitation of heavy metals from industrial effluents and single-ion solutions using bacterial alkaline phosphatase. *Water, Air, & Soil Pollution*, 224(7), 1-11.

Claeys WL, AM vanLoey, ME Hendrickz (2002). Kinetics of alkaline phosphatase and lacto peroxidase inactivation, and of β -lacto globulin denaturation in milk with different fat content. *J Dairy Res* 69(4):541-553.

Claeys, W, Ludikhuyze, L, Van Loey, A & Hendricckx, M(2001) Inactivation kinetics of alkaline phosphatase and lactoperoxidase, and denaturation kinetics of β -lactoglobulin in raw milk under isothermal and dynamic temperature conditions. *Journal of Dairy Research* 68

Claeys, W. L., Verraes, C., Cardoen, S., De Block, J., Huyghebaert, A., Raes, K., ... & Herman, L. (2014). Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits. *Food control*, *42*, 188-201.

Dayon, L., Macron, C., Lahrichi, S., Núñez Galindo, A., & Affolter, M. (2021). Proteomics of human milk: definition of a discovery workflow for clinical research studies. *Journal of Proteome Research*, *20*(5), 2283-2290.

Deeth HC and Lewis MJ, (2017). High temperature processing of milk and milk products. John Wiley and Sons Ltd. 574 pp.

Deeth HC, (2006). Lipoprotein lipase and lipolysis in milk. *International Dairy Journal*, *16*, 555–562.

Dumitras_cu L, St_anciuc N, Stanciu S and R^apeanu G, 2014. Inactivation kinetics of alkaline phosphatase from different species of milk using quinolyl phosphate as a substrate. *Food Science and Biotechnology*, *23*, 1773–1778

European Food Safety Authority (EFSA), Clawin-Rädecker, I., De Block, J., Egger, L., Willis, C., Da Silva Felicio, M. T., & Messens, W. (2021). The use of alkaline phosphatase and possible alternative testing to verify pasteurisation of raw milk, colostrum, dairy and colostrum-based products. *EFSA Journal*, *19*(4), e06576.

Fantuz, F., Ferraro, S., Todini, L., Piloni, R., Mariani, P., & Salimei, E. (2012). Donkey milk concentration of calcium, phosphorus, potassium, sodium and magnesium. *International Dairy Journal*, *24*(2), 143-145.

Faye, B., & Konuspayeva, G. (2012). The sustainability challenge to the dairy sector—The growing importance of non-cattle milk production worldwide. *International dairy journal*, *24*(2), 50-56.

Fernley HN and Walker PG, 1965. Kinetic behaviour of calf-intestinal alkaline phosphatase with 4-methylumbelliferyl phosphate. *Biochemical Journal*, *97*, 95–103.

Fox PF and Kelly AL, 2006. Indigenous enzymes in milk: overview and historical aspects—part 2. *International Dairy Journal*, *16*, 517–532.

Gerosa, S., & Skoet, J. (2012). Milk availability: trends in production and demand and medium-term outlook. ESA Working paper No. 12-01 Agricultural Development Economics Division Food and Agriculture Organization of the United Nations www.fao.org/economic/esa

Giacometti, F., Bardasi, L., Merialdi, G., Morbarigazzi, M., Federici, S., Piva, S., & Serraino, A. (2016). Shelf life of donkey milk subjected to different treatment and storage conditions. *Journal of Dairy Science*, *99*(6), 4291-4299.

Girotti, S., Ferri, E., Ghini, S., Budini, R., & Roda, A. (1994). Chemiluminescent assay of alkaline phosphatase in milk. *Nederlands melk en Zuiveltijdschrift*, 48(4), 213-224.

Guo, H. Y., Pang, K., Zhang, X. Y., Zhao, L., Chen, S. W., Dong, M. L., & Ren, F. Z. (2007). Composition, physicochemical properties, nitrogen fraction distribution, and amino acid profile of donkey milk. *Journal of dairy science*, 90(4), 1635-1643.

Harding, F. (1991). Alkaline phosphatase test as a measure of correct pasteurization. *Bulletin of the IDF*, 262, 33-34.

IZSLT (Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana“M. Aleandri”), (2020). Sintesi – Attività della fosfatasi alcalina nel latte di pecora, capra e bufala in relazione al trattamento termico di pastorizzazione: studio sperimentale per un limite di conformità

Junior AB, GuimarAes LHS, Terenzi HF et al (2008). Purification and biochemical characterization of thermostable alkaline phosphatases produced by *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*. *Folia Microbiol (Praha)* 53:509–516.

Kathyayani Puttige, Krishna Prasad Nooralabettu 2011. Alkaline Phosphatase Activity during Homogenisation of Hepatopancreatic Tissues of Shrimps using Sodium acetate, KCl solution, Tris-HCl and Glycine-NaOH buffer. *International Journal of Scientific & Engineering Research* Volume 2, Issue10, Oct-2011 1ISSN 2229-5518 IJSER © 2011 <http://www.ijser.org>

Katsoulos PD, Christodoulopoulos G, Minas A, Karatzia MA, Pourliotis K and Kritas SK, (2010). The role of lactate dehydrogenase, alkaline phosphatase and aspartate aminotransferase in the diagnosis of subclinical intramammary infections in dairy sheep and goats. *Journal of Dairy Research*, 77, 107–111.

Kay, H. D. ; Graham, W. R., Jr. Journal article Journal of Dairy Research 1935 Vol.6 pp.191-203 The Phosphatase Test for Pasteurized Milk.Author(s)

Klotz, V., Hill, A., Warriner, K., Griffiths, M., & Odumeru, J. (2008). Assessment of the colorimetric and fluorometric assays for alkaline phosphatase activity in cow's, goat's, and sheep's milk. *Journal of food protection*, 71(9), 1884-1888.

Kricka, L. J. (2003). Clinical applications of chemiluminescence. *Analytica chimica acta*, 500(1-2), 279-286.

Kuzuya Y, Kanamaru Y and Tanahashi T, 1982. Purification of bovine milk alkaline phosphatase with affinity chromatography and effect of flavonoids and saccharides on the enzyme activities. *Nihon Chikusan Gakkaiho*,53, 45–49.

Laidler, K. J. (1984). The development of the **Arrhenius** equation. *Journal of chemical Education*, 61(6), 494.

Levieux, D., Geneix, N., & Levieux, A. (2007). Inactivation-denaturation kinetics of bovine milk alkaline phosphatase during mild heating as determined by using a monoclonal antibody-based immunoassay. *Journal of dairy research*, 74(3), 296-301.

Levieux, D., Geneix, N., & Levieux, A. (2007). Inactivation-denaturation kinetics of bovine milk alkaline phosphatase during mild heating as determined by using a monoclonal antibody-based immunoassay. *Journal of dairy research*, 74(3), 296-301.

Lewis, M. J., & Deeth, H. C. (2009). Heat Treatment of Milk 'Milk Processing and Quality Management' Wiley.

Linden G, Chappelet-Tordo D and Lazdunski M, 1977. Milk alkaline phosphatase. Stimulation by Mg²⁺ and properties of the Mg²⁺ site. *Biochimica et Biophysica Acta*, 483, 100–106.

Linden, G., & Maraval, B. (1979). Colostrum de vache: composition minérale et activité de la phosphatase alcaline. In *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique* (Vol. 19, No. 2A, pp. 337-341). EDP Sciences.

Lombardi P., L. Avallone, AD Angelo, TM, E Bogin, (2000). Buffalo milk enzyme levels, their sensitivity to heat reactivation, and their possible use as markers for pasteurization. *J Food Prot.* 63(7):970-973.

Lorenzen PC, Wernery R, Johnson B, Jose S and Wernery U, 2011a. Evaluation of indigenous enzyme activities in raw and pasteurised camel milk. *Small Ruminant Research*, 97, 79–82.

Lorenzen, P. C., Martin, D., Clawin-Rädecker, I., Barth, K., & Knappstein, K. (2010). Activities of alkaline phosphatase, γ -glutamyltransferase and lactoperoxidase in cow, sheep and goat's milk in relation to heat treatment. *Small Ruminant Research*, 89(1), 18-23.

Lorenzen, P., Martin, D., Clawin-Rädecker, I., Barth, K., & Knappstein, K. (2010). Activities of alkaline phosphatase, γ - glutamyl transferase and lactoperoxidase in cow, sheep and goats milk in relation to heat treatment. *Small Ruminant Research*, 89, 18-23.

Malacarne, M., Martuzzi, F., Summer, A., & Mariani, P. (2002). Review: protein and fat composition of mare's milk: some nutritional remarks with reference to human and cow's milk. *International Dairy Journal*, 12, 869-877.

Marchand, S., Merchiers, M., Messens, W., Condijer, K., & De Block, J. (2009). Thermal inactivation kinetics of alkaline phosphatase in equine milk. *International Dairy Journal*, 19, 763-767.

Medhammar, E., Wijesinha-Bettoni, R., Stadlmayr, B., Nilsson, E., Charrondiere, U. R., & Burlingame, B. (2012). Composition of milk from minor dairy animals and buffalo breeds: a biodiversity perspective. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(3), 445-474.

MICCICHE, K. (2005). Regulation & pasteurisation. Dairy industries international, 70(11), 44-45.

Millogo, V., Sjaunja, K. S., Ouédraogo, G. A., & Agenäs, S. (2010). Raw milk hygiene at farms, processing units and local markets in Burkina Faso. *Food control*, 21(7), 1070-1074.

Mittaine, J. (1962). Milk other than cows' milk. 48. *Milk hygiene, World Health Organization monograph*, 681e694.

Murthy GK and Peeler JT, 1979. Rapid methods for differentiating reactivated from residual phosphatase in milk and cream: collaborative study. *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, 62, 822-827

Naert, L., Verhoeven, G., Duchateau, L., De Smet, S., & Coopman, F. (2013). Assessing heterogeneity of the composition of mare's milk in Flanders. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 82(1).

Narenji Sani R, Hajigolikhani B, Ahmadi-Hamedani M and Kafshdouzan K, (2018). Diagnostic evaluation of milk lactate dehydrogenase and alkaline phosphatase activities by receiver operating characteristic analysis curve in early lactation of ewes with subclinical mastitis. *Veterinary Research Forum*, 9, 343-348.

Painter CJ and Bradley Jr RL, 1997. Residual alkaline phosphatase activity in milks subjected to various timetemperature treatments. *Journal of Food Protection*, 60, 525-530.

Park, Y. W., Juárez, M., Ramos, M., & Haenlein, G. F. W. (2007). Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small ruminant research*, 68(1-2), 88-113.

Patil MP, Nagvekar AS, Ingole SD, Bharucha SV and Palve VT,(2015). Somatic cell count and alkaline phosphatase activity in milk for evaluation of mastitis in buffalo. *Veterinary World*, 8, 363-366.

Pino, A., Liotta, L., Randazzo, C. L., Todaro, A., Mazzaglia, A., De Nardo, F., ... & Caggia, C. (2018). Polyphasic approach to study physico-chemical, microbiological and sensorial characteristics of artisanal Nicastrese goat's cheese. *Food microbiology*, 70, 143-154.

Potocnik, K., Gantner, V., Kuterovac, K., & Cividini, A.,(2011). Mare's milk: composition and protein fraction in comparison with different milk species. *Mljekarstvo*,61.

R. Aschaffenburg and J. E. C. Mullen Published online by Cambridge University Press: 01 June 2009 , A rapid and simple phosphatase test for milk

- Rankin, S. A., Christiansen, A., Lee, W., Banavara, D. S., & Lopez-Hernandez, A. (2010).** Invited review: The application of alkaline phosphatase assays for the validation of milk product pasteurization. *Journal of Dairy Science*, 93(12), 5538-5551.
- Raynal-Ljutovac, K., Park, Y. W., Gaucheron, F., & Bouhallab, S. (2007).** Heat stability and enzymatic modifications of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68(1-2), 207-220.
- Richards EL and Chandrasekhara MR, 1960.** Chemical changes in dried skim-milk during storage. *Journal of Dairy Research*, 27, 59–66.
- Salter, R. S., & Fitchen, J. (2006).** Evaluation of a Chemiluminescence Method for Measuring Alkaline Phosphatase Activity in Whole Milk of Multiple Species and Bovine Dairy Drinks: Interlaboratory Study. *Journal of AOAC International*, 89(4), 1061-1070.
- Sanders, G. P., & Sager, O. S. (1948).** Heat inactivation of milk phosphatase in dairy products. *Journal of Dairy Science*, 31(10), 845-857.
- Scharer H, 1938.** A rapid phosphomonoesterase test for control of dairy pasteurization. *Journal of Dairy Science*, 21, 21–34.
- Schlimme, E., Kiesner, C., Lorenzen, P. C., & Martin, D., (1997).** Chemical process parameters for thermal inactivation of alkaline phosphatase in milk. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 49(3), 207-219.
- Scintu M.F.Daga E.Ledda . (2000)** A.Evaluation of spectrophotometric and fluorometric methods for alkaline phosphatase activity determination in ewe's milk. *J. Food Prot*; 63: 1258-1261
- Shakeel Ur Rehman, Fleming CM, Farkye NY, Fox PF (2003).** Indigenous phosphatases in milk. In. *Advanced Dairy Chemistry*, pp. 523-544.
- Shamsia, S. M. (2009).** Nutritional and therapeutic properties of camel and human milks. *International Journal of Genetics and Molecular Biology*, 1(2), 52-58.
- Sharma RS, Ganguli N C., (1974).** Purification and properties of reactivated alkaline phosphatase from buffalo milk. *Milchwissenschaft* 29: 79-84.
- Sharma, U., Pal, D., & Prasad, R. (2014).** Alkaline phosphatase: an overview. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 29(3), 269-278.
- Souci, S. W., Fachmann, W., & Kraut, H. (2008).** Food composition and nutrition tables. Die Zusammensetzung der Lebensmittel, Nährwert-Tabellen. *Aufl. Medpharm Scientific, Stuttgart*, 102.

Suzuki, U., Yoshimura, K., & Takaishi, M. (1907). Ueber ein Enzym "Phytase" das "Anhydro-oxy-methylen diphosphorsaure" Spaltet. *Bull. Coll. Agric. Tokyo Imp. Univ*, 7, 503-512.

Thomas Berger, Jürg Maurer, Walter Schaeren, Lotti Egger 09. October 2008 Alkaline Phosphatase Activity in Swiss Ewe's and Goat's Milk

Ülbegi-Mohyla, H., Hassan, A. A., Kanbar, T., Alber, J., Lämmli, C., Prenger-Berninghoff, E., ... & Zschöck, M. (2009). Synergistic and antagonistic hemolytic activities of bacteria of genus *Arcanobacterium* and CAMP-like hemolysis of *Arcanobacterium phocae* and *Arcanobacterium haemolyticum* with *Psychrobacter phenylpyruvicus*. *Research in veterinary science*, 87(2), 186-188.

Uniacke-Lowe, T., (2011). Studies on equine milk and comparative studies on equine and bovine milk systems. PhD thesis. Cork: University College Cork.

Upadhyay, L. S. B., & Verma, N. (2015). A three step approach for the purification of alkaline phosphatase from non-pasteurized milk. *Journal of Food Science and Technology*, 52(5), 3140-3146.

Vamvakaki, A. N., Zoidou, E., Moatsou, G., Bokari, M., & Anifantakis, E. (2006). Residual alkaline phosphatase activity after heat treatment of ovine and caprine milk. *Small Ruminant Research*, 65, 237-241.

Van Bever, A. K. (1943). The influence of temperature and pasteurizing-time upon the enzymes and bacteria in milk. *Enzymologia*, 11, 7-18.

Vega-Warner AV, Wang CH, Smith DM, Ustunol Z (1999). Milk alkaline phosphatase purification and production of poly-clonal antibodies. *J FoodSci* 64(4):601-605.

Vega-Warner, A. V., Wang, C. H., Smith, D. M., & Ustunol, Z. (1999). Milk alkaline phosphatase purification and production of polyclonal antibodies. *Journal of food science*, 64(4), 601-605.

Wernery U, Maier U, Johnson B, George RM and Braun F, 2006. Comparative study on different enzymes evaluating heat treatment of dromedary milk. *Milchwissenschaft-Milk Science International*, 61, 281–285.

Wernery, U., Fischbach, S., Johnson, B., & Jose, S. (2008). Evaluation of alkaline phosphatase (ALP), γ -glutamyl transferase (GGT) and lactoperoxidase (LPO) activities for their suitability as markers of camel milk heat inactivation. *Milchwissenschaft*, 63(3), 265-267.

Wilinska A, Bryjak J, Illeov_a V and Polakovi_c M, 2007. Kinetics of thermal inactivation of alkaline phosphatase in bovine and caprine milk and buffer. *International Dairy Journal*, 17, 579–586

Williams, D. J. (1986). A modification to the Aschaffenburg and Mullen alkaline phosphatase test suitable for goat's milk. *Australian Journal of Dairy Technology*, 41(1), 28

Wright RC and Tramer J, 1953. Reactivation of milk phosphatase following heat treatment. *Journal of Dairy Research*, 20, 177–188.

Yoshitomi, K. (2004). Alkaline phosphatase activity in cheeses measured by fluorometry. *International journal of food science & technology*, 39(3), 349-353

Κώδικας Τροφίμων και Ποτών (2003), Άρθρο 7. Π.Δ. 56/21-2-1995 «Συμμόρφωση της Ελληνικής νομοθεσίας προς τις Οδηγίες 92/46/ΕΟΚ και 92/47/ΕΟΚ του Συμβουλίου περί των υγειονομικών κανόνων που διέπουν την παραγωγή και εμπορία γάλακτος και προϊόντων με βάση το γάλα» (ΦΕΚ 45/27-2-95 τ. Α).