

## مروری بر روش‌های ارزیابی کیفیت شیر

نسرین قلعه‌بان، ناهید غضیانی، محمدحسین مجلس‌آرا\*  
گروه فیزیک، واحد کرج، دانشگاه خوارزمی، البرز، ایران

### چکیده

شیر یکی از ارزشمندترین محصولات لبنی در سبد غذایی انسان است و کنترل کیفیت آن از منظر ایمنی، ارزش تغذیه‌ای و سلامت عمومی اهمیت فراوانی دارد. در دهه‌های اخیر، روش‌های طیف‌سنجی به دلیل سرعت بالا، دقت مناسب، عدم نیاز به آماده‌سازی پیچیده نمونه و قابلیت غیرمخرب بودن، جایگاه مهمی در تحلیل کیفی و کمی ترکیبات شیر یافته‌اند. در این مقاله، مروری بر مهم‌ترین روش‌های طیف‌سنجی شامل طیف‌سنجی نوری، رامان و مادون قرمز جهت شناسایی و اندازه‌گیری دقیق چربی، پروتئین، لاکتوز و سایر ترکیبات شیر ارائه شده است. همچنین نقش فناوری نانو در بهبود حساسیت و کارایی این روش‌ها مورد بررسی قرار گرفته است؛ به‌ویژه استفاده از نانو ساختارها به‌عنوان بستری تقویت‌کننده در طیف‌سنجی رامان (SERS) و حسگرهای نانویی در طیف‌سنجی مادون قرمز که امکان تشخیص آلاینده‌ها و تقلبات در غلظت‌های بسیار پایین را فراهم می‌سازند. در بخش پایانی نیز روش‌های پیشرفته‌تری همچون طیف‌سنجی جرمی (MS) و رزونانس مغناطیسی هسته‌ای (NMR) همراه با مزایا و محدودیت‌های آن‌ها معرفی شده‌اند. این مقاله نشان می‌دهد که ترکیب روش‌های طیف‌سنجی با فناوری نانو افق‌های جدیدی را در پایش سریع و دقیق کیفیت شیر گشوده است.

**واژه‌های کلیدی:** شیر، صنایع لبنی، کنترل کیفیت، طیف‌سنجی رامان، مادون قرمز، پروتئین، لاکتوز، نانو ساختارها

نویسنده مسئول: Majlesara@gmail.com

کیفیت‌سنجی شیر و فرآورده‌های حاصل از آن است. [۱]، [۲]، [۳] شیر ترکیبات ساختاری مهمی اعم از آب (حدود % ۹۰-۸۷) و نسبت‌های مختلف لاکتوز، پروتئین، چربی، ویتامین‌ها، کلسیم و سایر مواد معدنی و برخی متابولیت‌ها دارد که باعث می‌شود در هرم غذایی انسان جایگاه ویژه‌ای داشته باشد به همین خاطر جهت پی‌بردن به کیفیت و سالم بودن شیر و فرآورده‌های آن اطلاعات ساختاری بر روی محصولات تجاری ثبت می‌شود. [۲]. بعنوان مثال محصولات شیری خاص مانند محصولات لبنی کم لاکتوز برای افرادی که دچار عدم تحمل لاکتوز هستند، دارای اهمیت بالایی است. [۲]، [۴] چربی و پروتئین بعنوان دو پارامتر اصلی دیگر، اطلاعاتی در مورد کیفیت شیر می‌دهد که براساس آن قیمت محصول، سلامت گله، نحوه جلوگیری از بیماری‌ها و... تعیین می‌گردد. بهترین راه بر نظارت سلامت گاو تجزیه و تحلیل منظم شیر و بررسی نسبت بین چربی و پروتئین برای جلوگیری از مشکلاتی مانند ورم پستان کتوز و اسید شکمبه و... است. [۵] مولکول‌های مختلف زیستی مانند پپتیدها، نوگلوپتیدها، الگوساکاریدها، ایمونوکلوبین‌ها، پروتئین‌های ایمنی و متابولیت‌ها نیز در شیر یافت می‌شوند که نوع رژیم، مرحله شیردهی، تغییرات فصلی عوامل تاثیرگذار بر آن هستند. تعداد سلول‌های سوماتیک و پارامترهای پردازش و غیره عواملی هستند که بر ویژگی‌های فن آوری و فیزیک و شیمیایی مانند پایداری حرارتی، خواص انعقادی، کیفیت تخمیر شیر، جدای از تامین موادغذایی تاثیر می‌گذارد. چندین ارگانسیم موجود در غدد پستان متابولیت‌هایی در شیر تولید

## ۱- مقدمه

به طور کامل شیر به تراوش غدد پستانی حیوانات پستاندار که عاری از کلسیروم (شیری که در روزهای اول تا هفتم بعد از زایش به دست می‌آید). بوده و از دوشش کامل یک یا چند حیوان سالم به دست می‌آید. در میان غذاهای روزانه، شیر مناسب‌ترین و متعادل‌ترین ترکیب را دارد به همین دلیل آن را غذای کامل می‌نامند. شیر در دوران کودکی، نوجوانی، بلوغ و پیری نقش مهمی را در تغذیه انسان دارد. مواد شیر رشد و نمو بافت را در دوران کودکی و نوجوانی تامین می‌کند و در دوران بلوغ و پیری هم منبع نیرو و نشاط بوده و با حفظ قدرت و سلامت عامل موثری در طول عمر می‌باشد. بررسی سازمان ملل نشان می‌دهد که متوسط طول عمر در کشورهایی که مصرف سرانه شیر بالایی دارند بیشتر است.

مواد مغذی که در ساختار شیر وجود دارد، خطر ابتلا شدن به انواع بیماری‌ها مانند پوکی استخوان، فشار خون و سرطان روده و... را کاهش می‌دهد به عنوان مثال پروتئین‌هایی که در شیر وجود دارد، اثرات ضد سرطانی، ضد میکروبی هستند. بنابراین شیر بعنوان یک غذای کامل برای انسان‌ها، نیازمند این است که از نظر کیفیت و ایمنی مورد توجه تولیدکنندگان و مصرف‌کنندگان قرار بگیرد که این عامل با توجه به افزایش جمعیت و افزایش میزان مصرف لبنیات در سطح جهان باعث رقابت تنگاتنگی میان سرمایه‌گذاران و تولیدکنندگان به وجود آید که نتیجه‌ی آن دستیابی به روش‌های متعدد و غیرمخرب و ارزان و سریع برای

می‌کنند که فعالیت متابولیکی از خودشان می‌دهند. حالات التهابی مانند ورم پستان، بارداری و چرخش مسیر پاراسلولی در غدد پستانی را تغییر می‌دهند و در نتیجه مشخصات متابولیت شیر را تغییر می‌دهد. [۶] جدای از ترکیبات شیر، عواملی مانند میکروارگانیزم‌ها، آلاینده‌ها و باقی‌مانده‌های احتمالی موجود در شیر عمدتاً آنتی‌بیوتیک‌ها، هورمون‌ها، آفت‌کش‌ها و مایتوکسین‌ها و یون‌های فلزی مواد تقلبی (مانند ملامین، دی‌سیانیدامید، اوره، سولفات آمونیوم) که بر کیفیت شیر تاثیر گذارند و از پارامترهایی هستند که باید مورد بررسی قرار گیرند. [۷]، [۲] در نتیجه برای تجزیه و تحلیل هر کدام از موارد گفته‌شده روش‌های مختلف طیف‌سنجی مورد بررسی قرار گرفته که هر کدام معایب و مزایای خاص خود را داشته‌اند که هدف کلی رسیدن به روشی با دقت بالا، آسان، سریع، غیرمخرب و کم هزینه است که باعث شده پژوهشگران بررسی و تحقیقات خود را در این زمینه انجام دهند.

## ۲- روش‌های کیفیت‌سنجی شیر

برای بررسی و تجزیه و تحلیل کیفیت شیر از جنبه‌های مختلف مانند ترکیبات شیر (لاکتوز، پروتئین و ...)، باقی‌مانده و آلاینده‌ها و میکروارگانیزم و... از روش‌های گوناگونی استفاده شده است. برای مثال آنالیز وزنی و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا<sup>۱</sup> (HPLC) روش‌هایی هستند که برای بررسی شیر از جمله لاکتوز موجود در شیر استفاده شده‌اند.

(سارتنی و همکارانش ۱۹۹۸ و چاوز-سروین کاستلوت و لویز-ساباتر ۲۰۰۴) که بسیار زمان‌بر و دشوار بوده است. بعدها در سال‌های ۲۰۱۰-۲۰۱۲ از روش‌هایی آسان و سریع و کمی برای تعیین لاکتوز استفاده شده که شامل حسگرهای زیستی آنزیمی و طیف‌سنجی فروسرخ نزدیک بوده که حسگرهای زیستی آنزیمی تحت تاثیر حضور گالاکتوز و گلوکز (قندهایی ساده که به‌عنوان فراروان‌ترین مونوساکارید شناخته می‌شوند و جز کربوهیدرات‌ها به حساب می‌آیند). موجود در شیر و فرآورده‌های حاصل از آن قرار گرفته است و طیف‌سنجی فروسرخ قرمز نزدیک به دلیل تداخل‌های ناشی از جذب آب و محدودیت‌های تراکم طیفی دچار مشکل شده است. روش بعدی روش طیف‌سنجی رامان بوده در این زمینه به کار برده شده است. [۸]، [۲]. صنایع لبنی به دلیل اینکه کیفیت و ایمنی شیر را تضمین کند، پیوسته دنبال روش‌هایی بهتر به جای روش‌های پر زحمت و زمان‌بر که گاهی هم نیاز به مراحل آماده‌سازی نمونه داشته‌اند، بوده است و از سال ۲۰۱۲ پیشرفت‌هایی مشاهده شده است مانند طیف‌سنجی رامان تقویت‌یافته سطحی<sup>۲</sup> (SERS)، طیف‌سنجی رامان تبدیل فوریه<sup>۳</sup> (FT)، طیف‌سنجی رامان فروسرخ نزدیک<sup>۴</sup> (NIR)، میکرو رامان که برای آنالیز ترکیبات شیر، میکروارگانیزم‌ها و باقی‌مانده‌های آنتی‌بیوتیک در شیر و همچنین مواد تقلبی شیر استفاده شده‌اند، با این حال استفاده از طیف‌سنجی رامان در آنالیز شیر، روش متداولی نیست به این دلیل که برای تبدیل شدن به ابزاری

<sup>۳</sup> Fourier transform : FT<sup>۴</sup> Near - infrared : NIR<sup>۱</sup> High performance liquid chromatography : HPLC<sup>۲</sup> Surface enhanced raman spectroscopy : SERS

طیف‌سنجی تشدید مغناطیسی هسته‌ای پروتون با وضوح بالا<sup>۶</sup> ( $^1\text{H NMR}$ )، کروماتوگرافی مایع-طیف‌سنجی جرمی<sup>۷</sup> (LC-MS)، کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی<sup>۸</sup> (GC-MS) و کروماتوگرافی مایع با کارایی فوق‌العاده بالا-طیف‌سنجی زمان پرواز چهار قطبی<sup>۹</sup> (UPLC-QTOFMS) مورد استفاده قرار گرفتند.

رویکردهای متابولیکی برپایه طیف‌سنجی جرمی هستند که برای تشخیص متابولیت‌ها استفاده شده‌اند.<sup>[۶]</sup>

معمول برای صنایع لبنی باید برخی از محدودیت‌های آن برطرف شود.<sup>[۲]</sup> در مواردی مشاهده شده به دلیل بالا بودن ارزش تجاری و غذایی شیر بز، افراد سودجو فرآورده‌های تقلبی در بازار رایج می‌کنند که اولین تقلب در شیر بز و محصولات حاصل از آن جایگزین کردن شیر گاو است که در آن از افزودنی‌های مضر مانند نیتروزن و اوره و ... استفاده می‌کنند که با روش‌هایی مثل کروماتوگرافی مایع، آزمایش‌های ایمونولوژیک برای نوار ایمونواسی و روش‌های سنجش مهار میکروبی و سنجش ایمنی مرتبط با آنزیم<sup>۵</sup> (ELISA) و تکنیک غیرخطی اثرانگشت شیمیایی و طیف‌سنجی فروسرخ شیر گاو را از شیر بز تشخیص داده و میزان ترکیبات چربی و پروتئین و ... را بررسی کرده‌اند.<sup>[۹]</sup> از دیگر مواردی که در شیر مورد بررسی قرار گرفته، متابولیت‌های موجود در شیر است که بررسی‌ها نشان داده حدود ۲۲۳ متابولیت، اعم از لیپیدها، اسید آمینه، کربوهیدرات‌ها، نوکلئوتیدها، متابولیت‌های انرژی، ویتامین‌ها و کوفاکتورها، لیپیدهای کوتاه و ... است. همچنین عملیات‌های فرآوری مختلف مانند سرد کردن، گرم کردن، همگن‌سازی، شفاف‌سازی و بسته‌بندی شیر باعث ایجاد متابولیت‌های مختلف شده و در نتیجه باعث می‌شود کیفیت شیر و وضعیت تغذیه را تعیین کنند. تکنیک‌هایی که جهت بررسی در این زمینه مورد استفاده قرار گرفته‌اند شامل تکنیک‌های متابولیک مانند

<sup>۸</sup> gas chromatography - mass spectrometry : GC-MS

<sup>۹</sup> chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry : UPLC-QTOFMS

<sup>۵</sup> Enzyme linked immunosorbent assay : ELISA

<sup>۶</sup> High-resolution proton nuclear magnetic resonance:  $^1\text{H NMR}$

<sup>۷</sup> Liquid chromatography - mass spectrometry : LC-MS

**جدول ۱- روش‌های کیفیت‌سنجی شیر**

مزایا	معایب	روش‌ها
	زمان بر، دشوار و پیچیده، مخرب	آنالیز وزنی
	زمان بر، دشوار و پیچیده، نامناسب جهت تجزیه و تحلیل در محل، گران قیمت، استفاده از حلال‌های آلی	روش‌های کروماتوگرافی
مقرون به صرفه	نیاز به پرسنل مجرب و تجهیزات ویژه	ELISA
تحت تاثیر قرار گرفتن در برابر گلوکز و گالاکتوز موجود در شیر	آسان و سریع	حسگرهای زیستی آنزیمی
ایجاد تداخل ناشی از جذب آب و داشتن محدودیت تراکم طیفی	آسان و سریع	طیف‌سنجی فرسرخ نزدیک
غیرمخرب، امکان شناسایی نمونه با غلظت کم، جلوگیری از مشکل تداخل آب	گاه‌ها داشتن شدت سیگنال‌های ضعیف	طیف‌سنجی رامان
امکان تقویت شدت سیگنال با یک سری گروه خاص، غیرمخرب، دقت بالا		طیف‌سنجی SERS
داشتن مراحل آماده‌سازی نمونه آسان، امکان تکرارپذیری بالا، امکان تشخیص بالا، دقت بالا، تعیین ساختار متابولیت‌های ناشناخته	کم بودن میزان حساسیت، کم بودن وضوح طیفی، داشتن تفکیک زمانی ضعیف	متابولومیک شیر بر پایه NMR
سریع بودن، داشتن حساسیت و توان عملیاتی بالا	مقادیر انبوه پردازش داده‌ها، شناسایی محدود متابولیت‌ها	متابولومیک‌ها بر اساس MS

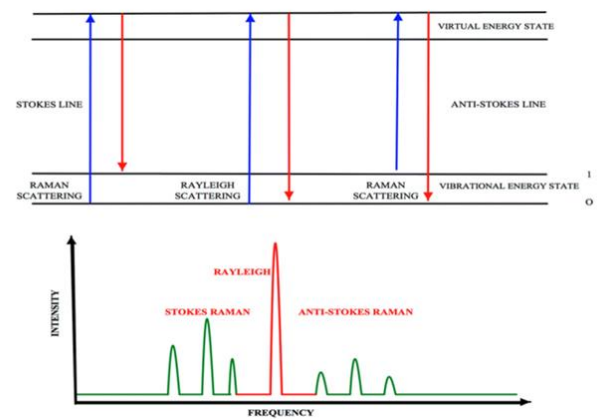
**۳- طیف‌سنجی رامان**

طیف‌سنجی رامان شاخه‌ای از طیف‌سنجی ارتعاشی است و این توانایی ذاتی را دارد که مواد با ساختاری حساس را براساس ویژگی‌های ارتعاشی منحصر به فرد آن شناسایی کند به‌عنوان مثال این امکان را دارد که ملکول‌های شبیه بهم از نظر ساختاری، مانند گلوکز و گالاکتوز را از هم تشخیص دهد. [۸] در واقع پراکندگی رامان یک ابزار طیف‌سنجی رامان است که برای اولین بار توسط اسمکال در سال ۱۹۲۳ و به‌طور تجربی توسط رامان و کریشان در سال ۱۹۲۸ به ثبت رسید. طیف‌سنجی رامان یک تکنیک پراکندگی نور است که وقتی یک نمونه به وسیله‌ی یک منبع لیزر قدرتمند با تابش تکفام، تحت تابش قرار می‌گیرد، در نواحی مرئی فرسرخ نزدیک به دست می‌آید. بیشتر فوتون‌هایی که با نمونه برخورد می‌کنند هیچ تبادل انرژی با مولکول نمونه ندارند و فقط جهت انتشار فوتون را تغییر می‌دهند و در واقع فرکانس یا به عبارتی دیگر طول موج آن با فرکانس و طول موج منبع یکی است به این پراکندگی الاستیک، پراکندگی رایلی گفته می‌شود. از طرفی تعداد کمی از

تغییرات قطبش پذیری قوی تری دارند، می توانند در طیف مشاهده شوند. (دایکستر ۲۰۰۵) در شکل ۲ قوی ترین پیک رامان ملامین، اوره، پنی سیلین G، آمپلی سیلین و لاکتوز به حالت دمش حلقه داخل صفحه II، کشش متقارن N-C-N، حلقه  $\beta$ -لاکتام، حلقه فیل و ارتعاش C-O-C اختصاص داده شده است. طیف رامان را می توان به عنوان اثرانگشت برای ترکیبات مختلف در نظر گرفت و از آن برای آنالیز ساختاری و تحلیل های کیفی استفاده کرد. از طرفی چون طیف سنجی رامان با غلظت مولکول ها رابطه مستقیم دارد و با افزایش غلظت شدت سیگنال رامان افزایش می یابد، در نتیجه با استفاده از آن می توان تحلیل های کمی انجام داد. (یانگ و یینگ ۲۰۱۱). همانطور که در شکل ۲ قابل مشاهده است، شدت پیک رامان شیر آنالیت با غلظت آن متناسب است.

طیف سنجی رامان به عنوان یک فناوری تجزیه و تحلیل کامل، به فناوری های آنالیز مختلفی از جمله طیف سنجی رامان تقویت یافته سطحی (SERS)، طیف سنجی رامان تبدیل فوریه (FT)، طیف سنجی میکرو رامان، طیف سنجی رامان فروسرخ قرمز نزدیک (NIR)، طیف سنجی رامان با انحراف فضایی<sup>۱۰</sup> (SORS) که به تدریج برای تجزیه و تحلیل شیر به کار برده شده است. [۲]

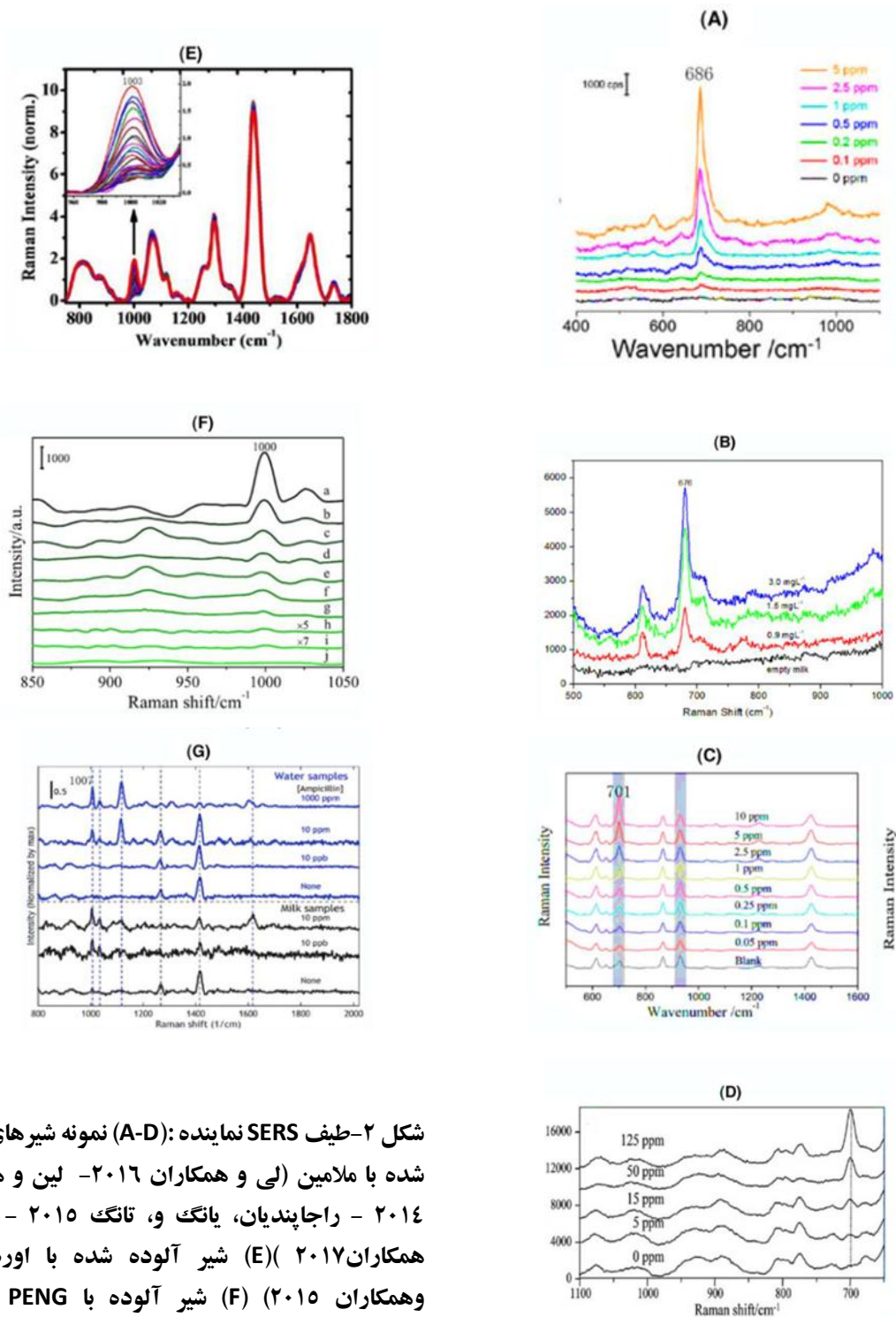
فوتون های پراکنده در حدود ( $10^{-6} \sim 10^{-10}$ ) با مولکول های نمونه برخورد داشته و در نتیجه فرکانس و طول موج آن تغییر می کنند که این نوع پراکندگی غیرالاستیک (غیرکشسان) را پراکندگی رامان می نامند. (شکل ۱)



شکل ۱- سطح انرژی پراکندگی رابلی و رامان

وقتی که فوتون انرژی به دست می آورد یا از دست می دهد به ترتیب طول موج آن کاهش یا افزایش می یابد. (طول موج  $\sim \frac{1}{\text{انرژی}}$ )، خطوط آنتی استوکس و استوکس در طیف ظاهر می شود. اختلاف فرکانس بین نور پراکنده استوکس و (یا آنتی استوکس) با نور فرودی رامان را جابجایی می نامند. معمولاً شدت پراکندگی استوکس بیشتر از غیر استوکس است به همین دلیل از پراکندگی استوکس برای کاربرد طیف سنجی رامان در تجزیه و تحلیل مواد غذایی استفاده می شود. [۱۰]، [۲]

سیگنال رامان گروه های عاملی، به عنوان مثال (C-S، C-C، C-NO<sub>2</sub>، Br، Cl) به دلیل اینکه



شکل ۲- طیف SERS نماینده (A-D) نمونه شیرهای آلوده شده با ملامین (لی و همکاران ۲۰۱۶- لین و همکاران ۲۰۱۴ - راجاپندیان، یانگ و، تانگ ۲۰۱۵ - یانگ و همکاران ۲۰۱۷) (E) شیر آلوده شده با اوره (خان و همکاران ۲۰۱۵) (F) شیر آلوده با PENG (چن و همکاران ۲۰۱۷) (G) آب و شیر و و آمپی سیلین (اندرو و همکاران ۲۰۱۵) (H) شیر آلوده شده با لاکتوز (لی و همکاران ۲۰۱۵)

حساسیتی که دارد بسیار زمان بر می‌باشد [۱۱]. ثابت شده که طیف‌سنجی رامان یک ابزار موثر است. طول موج تحریک با سیگنال رامان نسبت معکوس دارد. طول موج تحریک لیزر کوتاه‌تر، سیگنال‌های رامان قوی‌تری نسبت به طول موج تحریک لیزر بلندتر تولید می‌کنند. در نتیجه انتخاب طول موج برای طیف‌سنجی رامان حائز اهمیت است. در کیفیت‌سنجی شیر طیف‌سنجی رامان پراکنده و طیف‌سنجی رامان تبدیل فوریه (FT) معمولاً برای تشخیص چربی استفاده می‌شود. طیف‌سنجی رامان پراکنده معمولاً برای نمونه‌های فاز آبی مناسب‌تر است. (یانگ و یینگ ۲۰۱۱) [۱۲] العباسی و همکاران. برای تشخیص چربی در شیر مایع از یک نور تابشی ۵۱۴.۵ نانومتری استفاده کردند که در این فرآیند سه نوع پیش تیمار نمونه آماده شد؛ در یک حالت نمونه شیر داخل ظرف آلومینیومی در بسته و در حالت دوم، قطرات شیر روی ظرف شیشه‌ای که پوشیده با آلومینیوم بود، خشک شده بود و در حالت آخر هم شیر مایع داخل کووت‌های کوارتز بود، بررسی شد و مدل حداقل مربعات جزئی<sup>۱۲</sup> (PLS) برای تعیین چربی، در دو حالت اول دارای ضریب همبستگی<sup>۱۳</sup> ( $R^2$ ) بالا و در حالت سوم دارای ( $R^2$ ) کمی بود. در نتیجه مشاهده شد که به دلیل تشکیل لایه کدر و ناهمگن روی دیواره‌های داخلی سیگنال رامان ضعیفی به دست آمد. [۱۳] همچنین العباسی و همکاران طیف‌سنجی مرئی را با لیزر ۵۱۴.۵ نانومتری برای آنالیز درجه غیراشباع چربی شیر در شیر مایع را اثبات کرد. [۱۴] در سال

### ۱-۳ تشخیص ترکیبات شیر با استفاده از طیف‌سنجی رامان

ترکیبات شیر از مهم‌ترین پارامترهایی است که در ارزش غذایی و اقتصادی محصولات لبنی سهم است بنابراین نیاز به روشی سریع و غیرمخرب و آسان است که پارامترهای تغذیه‌ای اصلی شامل چربی‌ها و اسیدهای چرب<sup>۱۱</sup> (FAs)، پروتئین‌ها و لاکتوز و... موجود در شیر برای ارائه اطلاعات ارزش غذایی به مصرف‌کنندگان حائز اهمیت است.

#### ۱-۱-۳ چربی‌ها و اسیدهای چرب

چربی موجود در شیر یکی از پارامترهای مهمی است که حاوی اسیدهای چرب مختلف می‌باشد. اکثر اسیدهای چرب مزایایی برای سلامت انسان دارند: مانند FAهایی با زنجیره کوتاه، C18:2 -trans11 -cis-9، اسید A-linolenic و اسید اولئیک (شینگفیلد و همکاران ۲۰۰۸) در مقابل برخی اسیدهای چرب مضر مانند اسیدهای چرب اشباع با زنجیره متوسط، ترانس -trans10- C18:1 و C18:1-trans9 وجود دارند که برای سلامتی انسان خطر بزرگی محسوب می‌شود. (باچارت و همکاران ۲۰۰۷). در برخی از کشورهای اروپایی ترکیب چربی شیر یکی از عواملی است که بر روی قیمت آن تاثیر می‌گذارد. (کوپا ۲۰۱۴). در نتیجه تعیین دقیق میزان چربی و انواع FA در صنایع لبنی به شدت مهم است [۲]. برای تعیین چربی شیر از روش آزمایشگاهی ژربر استفاده می‌شود که علاوه بر

<sup>13</sup> Correlation coefficient :  $R^2$

<sup>11</sup> Fatty acids : FAs

<sup>12</sup> Partial least squares : PLS

مقاله‌ای در مورد طیف‌سنجی رامان پراکنده با لیزر ۱۰۶۴ نانومتر در آنالیز شیر یافت نشده است. [۲]

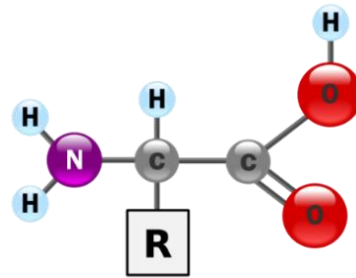
## ۲-۱-۳ پروتئین‌ها

پروتئین‌ها سهم مهمی در رژیم غذایی انسان دارند. در واقع مولکول‌های غول‌آسایی هستند که از واحدهای کوچکتری بنام اسید آمینه ساخته شده‌اند. یک مولکول پروتئینی معمولاً حاوی ۱۰۰-۲۰۰ اتصال اسید آمینه است. وجه تشابه اسید آمینه‌ها ( $\text{NH}_2$ ) و یک گروه کربوکسیل ( $\text{COOH}$ ) در یک مولکول می‌باشد. پروتئین‌ها از اسید آمینه، آلفا آمینو اسید ساخته می‌شود. در آلفا آمینو اسید دو گروه آمین و کربوکسیل، متصل به یک اتم کربن بنام کربن آلفا می‌باشد. اسیدهای آمینه به دسته‌ای از ترکیبات شیمیایی تعلق دارد که قادر هستند در محلول قلیایی یون هیدرونیوم آزاد کنند و در محلول‌های اسیدی، یون هیدرونیوم جذب کنند. این خاصیت را آمفوتر و موادی دارای این خاصیت را آمفولیت می‌نامند. ساختمان پروتئین‌ها، از ۲۰ نوع اسید آمینه تشکیل شده که ۱۸ نوع آن در پروتئین‌های شیر یافت می‌شود. نوع و شکل قرار گرفتن اسیدهای آمینه در مولکول‌های پروتئین، هویت پروتئین را آشکار می‌کنند. شکل ۳ یک نمای اسید آمینه را نشان می‌دهد. [۱۸]

۲۰۱۶ یائو و همکاران برای تعیین سریع اجزای گلبول‌های چربی<sup>۱۴</sup> (MFG) در انواع مختلف شیر مایع، مانند شیر انسان، گاو، بز از طول موج تحریک ۵۳۲ نانومتری استفاده کرد که قبل از تجزیه و تحلیل چربی شیر نیاز به استخراج کل لیپید از شیر داشت. تفاوت بین MGF‌های انسان، بز و گاو با توجه به اندازه MGF‌ها نشان داده شده بوسیله‌ی طیف رامان، سطح غیر اشباع چربی (باند نماینده در  $1658 \text{ cm}^{-1}$  و  $1643 \text{ cm}^{-1}$ ) و کاروتنوئیدها ( $1530 \text{ cm}^{-1}$ ،  $1160 \text{ cm}^{-1}$ ،  $1010 \text{ cm}^{-1}$ ) در لیپیدهای شیر انسان بیشتر از گاو و بز، در حالیکه فسفولیپیدها ( $860 \text{ cm}^{-1}$ ) و کلسترول ( $2850 \text{ cm}^{-1}$ ) کمتر بود. [۱۵] در سال ۲۰۱۶ سیلوپرا و همکارانش طیف‌سنجی رامان با لیزر دیود در ۸۳۰ نانومتری برای پیش بینی کمی چربی در شیر مایع بدون پیش تیمار استفاده کرد که یک مدل خوب برای اندازه‌گیری چربی کل شیر ایجاد شد. [۱۶] بعد ها الا و همکارانش از طیف‌سنجی رامان با دیود ۷۸۵ نانومتری که نور لیزر ساطع می‌کند برای تشخیص جنسیت نوزاد براساس محتوای چربی شیر با مدل‌های PCA<sup>۱۵</sup> استفاده کردند و متوجه‌شدن که شدت سیگنال چربی از گاومیش ماده نسبتاً بالاتر از گاومیش نر است. [۱۷] برای کاهش تداخل فلورسانس هنگام استفاده از طول موج کوتاه‌تر (۵۳۲ و ۵۱۴.۵ نانومتر) نیاز به پیش پردازش خاص نمونه بود. با لیزر ۷۸۵ یا ۸۳۰ نانومتر، سیگنال رامان بهتری بدون پیش پردازش نمونه بدست آمد زیرا توانست تداخل فلورسانس را حذف کند. با این حال هیچ

بالا، طیف‌سنجی جرمی با یونیزاسیون الکترواسپری و طیف‌سنجی فروسرخ (IR)، جهت کیفیت‌سنجی پروتئین استفاده شده‌اند که بسیاری از این روش‌ها نیاز به ابزار دقیق و گران دارد و گروهی نیز نیاز به آماده‌سازی نمونه طولانی دارند. از میان این‌ها روش فروسرخ ساده‌تر می‌باشد اما آن هم به دلیل تداخل با آب دچار محدودیت می‌باشد. [۲۰]

برخی از تکنیک‌های رامان نیز جهت تعیین پروتئین شیر استفاده شده‌اند از جمله طیف‌سنجی پراکنده رامان بهبود یافته سطحی (SERS) که یک روش حساس و غیر مخرب است که بدلیل تداخل کمی که با آب دارد برای آزمایش‌های بیولوژیکی مناسب است و در تشخیص پروتئین بدلیل کونژوگه شدن با گروه‌های خاص مانند هموپروتئین‌ها بدلیل نوارهای بسیار پیشرفته آن گروه‌ها، بسیار مناسب است اما با توجه به اینکه سیگنال رامان گروهی از پروتئین‌ها ضعیف است و تحت تاثیر فلورسانس حاصل از سایر ترکیبات شیر مانند چربی‌ها و کربوهیدرات‌ها قرار می‌گیرد، تشخیص مستقیم پروتئین شیر در محلول آبی با استفاده از SERS کمی دشوار است. [۲۱]، [۲۲] یک سری گروه‌های خاص وجود دارند که می‌توانند سیگنال رامان را تقویت کنند [۲۳]، [۲۴] فسفومولیبدیک اسید<sup>۱۹</sup> (PMA) ماده‌ای بود که بر روی طیف SERS در حین تجزیه و تحلیل پروتئین شیر مورد استفاده قرار گرفت و به‌عنوان گزارشگر SERS برای تشخیص پروتئین در نمونه مایع شناخته شد. کازئین به دلیل اینکه پروتئین اصلی شیر است بعنوان پروتئین مرجع مورد بررسی



شکل ۳- ساختار عمومی اسید آمینه، R محل اتصال مواد آلی به اتم کربن مرکزی است.

پروتئین شیر که از عناصر اصلی سازنده آن است حدود ۳.۵٪ کل شیر را شامل می‌شود که از انواع مختلف پروتئین تشکیل شده است که به دو گروه بزرگ کازئین‌ها و پروتئین‌های آب پنیر تقسیم می‌شود. کازئین‌ها پروتئینی هستند که در ۴.۶ = pH رسوب می‌کنند و تقریباً ۸۰٪ از پروتئین‌های شیر را تشکیل می‌دهند. پروتئین‌های سرم یا آب پنیر، پروتئین‌هایی هستند که رسوب نمی‌کنند و در مایع رویی باقی می‌مانند و حدود ۲۰٪ از کل پروتئین را تشکیل می‌دهند. [۱۹]

برای تعیین پروتئین از روش‌های آزمایشگاهی سنتی مثل لوری<sup>۱۶</sup>، کلدال<sup>۱۷</sup>، دوما<sup>۱۸</sup>، فرمل استفاده می‌شود که روش لوری جدا از حساسیت زیادی که برخوردار است، بسیار زمانبر است. روش کلدال و دوما نیز جدای از اینکه دقیق و قابل تکرار هستند، به ترتیب اولی زمان‌بر و دومی نیاز به آماده‌سازی نمونه پیچیده دارد. [۱۹]، [۵]، [۱۸] تکنیک‌های دیگری مانند کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی، کروماتوگرافی مایع با کارآیی

<sup>18</sup> Dumas

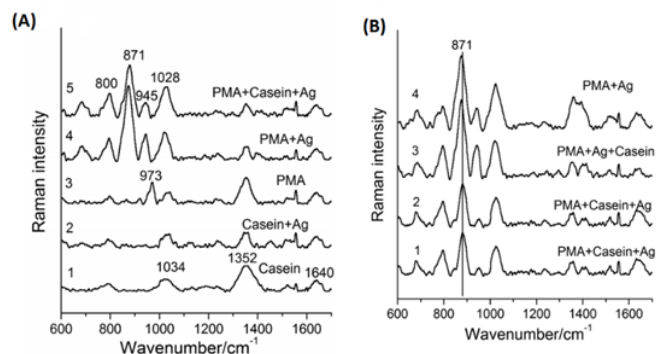
<sup>19</sup> phosphomolybdic acid : PMA

<sup>16</sup> Lowry

<sup>17</sup> kejedal

روش‌هایی استفاده شده که قبلاً به آن اشاره شده است. طیف‌سنجی رامان یکی از تکنیک‌هایی بوده که نسبت به سایر روش‌ها از مزیت‌هایی برخوردار بوده اما گاهی عواملی مانند دستگاه‌ها، قدرت لیزر و طول موج و نمونه‌هایی که مورد استفاده قرار می‌گرفتند باعث تضعیف سیگنال‌های رامان می‌شدند که جهت مواجهه با این مسئله از استانداردهای داخلی مانند تتراکلرید کربن ( $\text{cm}^{-1}$  ۴۵۹) برای محلول‌های غیرآبی و یون نیترات ( $\text{cm}^{-1}$  ۱۰۵۰) و یون پرکلرات ( $\text{cm}^{-1}$  ۹۳۰) برای محلول‌های آبی استفاده شده است. [۲] در سال ۲۰۱۵ لی و همکارانش جهت تعیین کمی لاکتوز موجود در شیر، از کریستال ویولت به‌عنوان استاندارد خارجی در طیف‌سنجی رامان با نور لیزر ۷۸۵ نانومتری استفاده کردند و برای لاکتوز و کریستال ویولت به ترتیب دو پیک در  $\text{cm}^{-1}$  ۱۰۸۵،  $\text{cm}^{-1}$  ۱۱۷۳ بدست آوردند و پس‌زمینه فلورسانسی حذف شد و هیچ تداخلی وجود نداشت و حد تشخیص<sup>۲۰</sup> (LOD) لاکتوز شیر  $0.19 \text{ mol/L}$  به‌دست آمد همچنین لی و همکارانش در این مطالعه به بررسی غلظت‌های مختلف لاکتوز موجود در شیر پرداختند و پی‌بردن نتایجی که از طیف‌سنجی رامان به دست آمد مشابه مقادیری بود که با روش Lane-Eynono و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) به دست آمده بود [۴].

قرار گرفت و با توجه به اینکه تا آن زمان هیچ پیک طیف SERS در بازه  $1700-600 \text{ cm}^{-1}$  برای کازئین پیدا نشده بود، هنگام SERS با استفاده از PMA پیکی در  $871 \text{ cm}^{-1}$  مشاهده شد [۲۰]. (شکل ۴)



شکل ۴- (A): ۱. طیف رامان کازئین ۲. طیف SERS کازئین ۳. طیف رامان PMA ۴. طیف SERS از PMA ۵. طیف SERS از مخلوط از قبل تهیه شده PMA با کازئین ۶. طیف رامان PMA جامد (B): ۱. طیف SERS از مخلوط از قبل تهیه شده PMA با کازئین به مدت ۱۵ ثانیه ۲. طیف SERS مخلوط از قبل تهیه شده PMA با کازئین به مدت ۵ ثانیه ۳. در نهایت طیف SERS از مخلوط PMA با کازئین ۴. طیف SERS از PMA

## ۲-۱-۳ لاکتوز

لاکتوز قندی موجود در شیر است که شامل گروهی از مواد آلی شیمیایی، بنام کربوهیدرات‌ها می‌باشد. کربوهیدرات‌ها منبع مهم انرژی در غذای انسان هستند. لاکتوز یک مولکول دو قندی است که حاوی مولکول گلوکز و گالاکتوز می‌باشد. مقدار لاکتوز در شیر بین ۳.۵-۵.۵٪ متغیر است [۱۸] که در شیر گاو بین ۴-۵٪ را شامل می‌شود [۲۵] جهت آنالیز لاکتوز موجود در شیر از

<sup>20</sup> Limit of detection :LOD

لاکتوز و مالتودکسترین ( $50 \leq \frac{w}{w}$ ) پیک  $cm^{-1}$   $1083^1$  را برای ارتعاش کششی C-O-C لاکتوز نسبت داد که در پودر شیر، کامل ظاهر شد و پیک‌های جدیدی در  $525 cm^{-1}$  و  $424 cm^{-1}$  برای شیر کم لاکتوز مشاهده گردید، همچنین پیک‌های  $481, 856, 940 cm^{-1}$  تنها در شیر مالتودکسترین دیده شد. [۲۷] تورس و همکاران. (۲۰۱۷) اثرات پنج سطح مختلف هیدرولیز لاکتوز آنزیمی را در طول تولید و ذخیره‌سازی پودر شیر با استفاده از طیف‌سنجی رامان همراه با شیمی‌سنجی با موفقیت ارزیابی کرد. نتایج آنها نشان داد که چسبندگی به دیواره داخلی محفظه خشک کردن، با افزایش سرعت هیدرولیز لاکتوز افزایش یافته است که به سطوح بالاتر تجمع ذرات نسبت داده می‌شود. علاوه بر این، با افزایش درجه هیدرولیز لاکتوز، پودر قهوه‌ای بیشتری مشاهده شد، در نتیجه توانایی آبرسانی مجدد کاهش یافت و ریزساختار اصلاح شد. [۲۸]

#### ۴. طیف‌سنجی فروسرخ

امواج الکترومغناطیسی طول موج‌های متفاوتی دارند در نتیجه از انرژی‌های متفاوتی هم برخوردار می‌شوند. هنگامی که پرتو فروسرخ به ماده‌ای تابش داده می‌شود، انرژی نور فروسرخ هنگام برخورد با نمونه، توسط مولکول‌های نمونه جذب می‌شوند که باعث ارتعاش آن‌ها می‌شود. طیف‌سنجی فروسرخ (IR) ارتعاش پیوند کوالانسی در ملکول‌ها بررسی می‌کند و اطلاعاتی کمی را در مورد تمام اجزای تشکیل‌دهنده جذب

#### جدول ۲- غلظت لاکتوز تعیین شده بوسیله طیف‌سنجی رامان در شیر و روش Lane-Eynono و HPLC

HPLC	روش Lane-Eynono	طیف‌سنجی رامان	نمونه
۴.۴۴	۴.۴۶	۴.۵	شیر
۴.۴۵	۶.۴۴	۴.۵۷	شیر + گلوکز
۴.۴۴	۶.۲۷	۴.۴۹	شیر + گالاکتوز

واسکووا و بوکووا در سال ۲۰۱۶ جهت تعیین لاکتوز، فیل آلانین و کریستال ویولت را با هم مقایسه کردند که در نتیجه آن به تفاوت‌هایی بین سه نوع ساکارید (لاکتوز، گلوکز، و گالاکتوز) در طیف رامان جهت تعیین لاکتوز به دست آوردند. برای حالت خمشی C-O-H در  $1087 cm^{-1}$  جهت اندازه‌گیری لاکتوز و پیک  $1173 cm^{-1}$  برای کریستال ویولت و  $1003 cm^{-1}$  برای فیل آلانین انتخاب کردند همچنین نتایج آن‌ها نشان داد که نرمال سازی با فیل آلانین نسبت به کریستال ویولت از دقت بهتری برخوردار بوده است [۲۶].

در عین حال، با ترکیب شیمی‌سنجی و طیف‌سنجی رامان جهت شناسایی محصولات لبنی با مشاهده لاکتوز و در نتیجه بهینه‌سازی لبنیات اطلاعاتی ارائه داده شد که رودریگس جونیو (۲۰۱۶) طی ترکیب‌سازی FT-Raman با آنالیز تمایزی با حداقل مربعات جزئی  $^{21}$ (DLS-DA) جهت آنالیز نمونه‌های مختلف شیر خشک براساس

<sup>21</sup> Partial least discriminant analysis : DLS-DA

مورد بررسی قرار می‌دهد. [۱۹]، [۲۹] تابش NIR از نمونه بیشتر نفوذ می‌کند. بنابراین، نوارهایی که جذب کمتری دارند از تابش MIR تولید می‌شود، جذب پروتئین به دلیل ترکیب ارتعاشات پیوندهای C=O و N-H آמיד I و آמיד II با باندهای جذب FT-NIR مربوطه به ترتیب در ۲۰۰۰ و ۲۲۲۲ نانومتر است. [۲۹]، [۳۱] با این حال، طیف FT-NIR مواد غذایی نشان دهنده جذب سایر پیوندهای شیمیایی، به عنوان مثال، C-H و O-H است که در طیف با هم تداخل دارند که عمدتاً مربوط به رنگ‌ها و ترکیبات حالت ارتعاشی است، که ارتباط فرکانس‌ها با گروه‌های شیمیایی خاص را دشوار می‌کند. در مقابل، طیف‌های FT-MIR می‌توانند ترکیبات شیمیایی خاص را جدا کنند و ارتباطی بین فرکانس‌هایی که تفاوت‌های جزئی در ترکیب نمونه دارند برقرار کنند، در نتیجه امکان تعیین ترکیب و ساختار مولکول‌های شیمیایی را فراهم سازد. در این مورد، پیک‌های حدود ۶۱۰۰ و ۶۵۰۰ نانومتر مربوط به باندهای آמיד I و آמיד II هستند. [۲۹] طیف‌سنجی فروسرخ در صنایع لبنی به‌عنوان ابزاری برای تعیین کمیت بیشتر اجزای شیر و تعیین کیفیت یا اصالت شیر استفاده شده است. [۱۹]

### ۱- بررسی چربی، پروتئین، لاکتوز شیر توسط طیف‌سنجی فروسرخ

برای بررسی محتوای چربی و پروتئین شیر خام با هدف توسعه‌ی یک سیستم ارزان و آنلاین و غیر مخرب، تکنیک‌های اپتیکی ارائه شده است که

تابش IR ارائه می‌دهد. [۲۹]، [۱۹] نواحی فروسرخ به سه دسته تقسیم می‌شود که در طیف‌سنجی کاربرد خاصی دارد. ناحیه اول، فروسرخ نزدیک (Near Infrared (NIR)) که محدوده ۷۸۰ تا ۲۵۰۰ نانومتر، ناحیه دوم فروسرخ میانی (Mid Infrared (Mid-IR)) که محدوده ۲۵۰۰ تا ۵۰۰۰۰ نانومتر و ناحیه سوم فروسرخ دور (Far Infrared (Far-IR)) ۵۰۰۰۰ تا ۱ میلی‌متر را شامل می‌شود. طیف‌سنجی فروسرخ در حالت کلی به دو گروه تقسیم می‌شوند که گروه اول طیف‌سنج‌هایی هستند که ساختار کلی آن‌ها از منبع / تکفام‌ساز یا فیلتر / آشکارسازها تشکیل شده و گروه دوم طیف‌سنج فروسرخ تبدیل فوریه (FT-IR)<sup>22</sup> هستند که ساختار آن از منبع / تداخل‌سنج / آشکارساز تشکیل شده است که تداخل‌سنج نور فروسرخ را در محدوده‌ای از طول موج‌ها تولید و آشکارساز سیگنال‌های ارتعاشات را ثبت می‌کند. یک تابع ریاضی فوریه این سیگنال‌ها را تبدیل می‌کند تا داده‌ها را به صورت یک پاسخ جذب / گذر معنی‌دارتر در قالب فرکانس / طول موج ارائه دهد. امکان اندازه‌گیری همه فرکانس‌ها به صورت هم‌زمان وجود دارد [۲۹]، [۳۰]. در نتیجه برای انجام تحلیل‌های آماری چند متغیره و اعمال روش‌هایی برای همبستگی تغییرات امواج فروسرخ با غلظت مولکول‌های هدف ضرورت دارد. [۲۹] طیف‌سنجی فروسرخ نزدیک تبدیل فوریه (FT-NIR) جذب مولکول را در محدوده nm ۲۵۰۰-۷۸۰ و طیف‌سنج فروسرخ میانی تبدیل فوریه (FT-MIR) در محدوده nm ۲۵۰۰-۳۰۰۰۰

<sup>22</sup> Fourier transform infrared : FT-IR

دنا توره سازی حرارتی پروتئین های آب پنیر که با روش کلدال تعیین می شدند، کالیره شد و به عنوان شاخص حالت نیتروژن در pH برابر با ۴.۶ بیان گردید. [۳۸] در سال ۲۰۰۱، شاشیک و اوزاکی، بررسی را مطرح کردند که در آن نمونه هایی از شیر خام را در بازه ی ۷۰۰ الی ۱۱۰۰ نانومتر (موج کوتاه، فرو سرخ نزدیک (SWNIR)) آنالیز کردند. نویسندگان پتانسیل طول موج (SWNIR) را برای بررسی های کمی و کیفی ارائه کردند. مدل کالیبراسیون PLS جهت پیش بینی چربی، پروتئین و لاکتوز استفاده شد و در نهایت تنها توانستند نتایج که مقادیر قابل اعتمادی را برای چربی و پروتئین به دست آورند. مدل کالیبراسیون چربی در نوار ۹۳۰ nm بهترین عملکرد را از خود نشان داد. کالیبراسیون پروتئین در طول موج های ۱۰۳۲، ۹۶۴، ۹۵۰، ۹۲۶، ۹۰۶ نانومتر نتایج بهتری داشت. [۳۹] در سال ۲۰۰۲ و و همکارانش با استفاده از تکنیک طیف سنجی عبور، یک دستگاه اندازه گیری به اسم MilkSpace-1 ایجاد کرد که با آن محتوای چربی، لاکتوز، پروتئین به صورت غیر مخرب سنجیده می شود. نمونه های شیر گاو به صورت ناهمگن درون لوله های شیشه ای معمولی داخل دستگاه قرار داده شدند. طیف NIR به دست آمده با این دستگاه با تصحیح پراکنندگی ضربی (MSC)<sup>24</sup> و مشتقات به دلیل کاهش اثرات پراکنندگی ناشی از گلبول های چربی و میسل های کازئین، پیش تیمار می شوند. آن ها به تغییرات محتوای چربی در طول موج ۹۲۶ nm در طیف MSC و جذب در nm

اساس آن بر پایه برهم کنش نور و شیر توسط رابطه بین اندازه ذرات معلق و طول موج نور فرودی است. نتایج اصلی هر تکنیک به محدوده طول موج UV، VIS، IR بستگی دارد. [۳۲]، [۳۳]، [۳۴]، [۳۵]

### ۱-۱-۴ تکنیک های مبتنی بر IR

پراکنندگی که توسط طول موج های کوچکتر از گلبول های چربی در ناحیه مرئی رخ می دهد باعث کدر شدن شیر می شود، در حالی که در طول موج های IR مشاهده نمی شود چون طول موج آن ها از قطر گلبول های چربی بزرگ تر می باشد. [۵] بر اساس این فرض گولدن در سال ۱۹۶۴ روشی را برای تجزیه و تحلیل کمی چربی، پروتئین، لاکتوز و کل مواد جامد و جامدات بدون چربی شیر با استفاده از جذب IR بیان کرد [۳۶]. در سال ۱۹۹۳ لوینگ و همکارانش استفاده از تبدیل فوریه (FT) در طیف سنجی فرو سرخ به عنوان جایگزین برای تعیین محتوای لاکتوز و چربی و پروتئین پیشنهاد دادند و بنا به گفته نویسندگان طیف سنجی فرو سرخ FT در ترکیب با روش های رگرسیون مانند PLS یا PCR<sup>23</sup> برای آنالیز در خط چربی، پروتئین و لاکتوز توصیه شده است. [۳۷] سال ۱۹۹۷ پولیو و همکارانش از NIR جهت دنا توره شدن حرارتی (۸۰ °C) هر ۲ دقیقه تا ۱۲۰ دقیقه) کنسانتره پروتئین آب پنیر بدون چربی با استفاده از طیف سنج فرو سرخ نزدیک NIRS 6500 در بازه ۱۱۰۰-۲۵۰۰ nm استفاده کردند. طیف نمونه های مختلف جهت نظارت بر

<sup>24</sup> multiplicative scatter correction : MSC

<sup>23</sup> principal component regression :PCR

طول موج nm ۶۰۰-۱۰۵۰ ارائه دادند. در این سیستم یک نمونه‌ی شیر به مقدار ml ۲۳۰ در محفظه‌ای جمع‌آوری می‌شود که در آن حسگر هر ۱۰ s طیف عبوری را بدست می‌آورد. برای توسعه مدل‌های کالیبراسیون، PLS بدون پیش‌پردازش طیفی، مانند صاف کردن یا مشتقات استفاده شد. ضریب تعیین<sup>26</sup> ( $r^2$ ) و خطای استاندارد پیش‌بینی (SEP)<sup>27</sup> به دست آمده برای چربی، پروتئین و لاکتوز به ترتیب  $r^2 = 0.95$ ،  $SEP = 0.42\%$ ،  $r^2 = 0.91$ ،  $SEP = 0.09\%$  و  $r^2 = 0.94$ ،  $SEP = 0.05\%$  بود. نویسندگان ثابت می‌کنند که برای یک سیستم ارزیابی آنلاین، نیازی به انجام همگن‌سازی و پیش‌درمان طیف‌های به دست آمده نیست. [۴۲]. یک سال پس از آن، کاوازاکی و همکاران یک ربات شیردوش را توسعه دادند که می‌تواند برای تعیین کیفیت شیر در زمان واقعی استفاده شود. نصب شده در سالن شیردوشی، این سیستم دارای یک محفظه شیر مجهز به لامپ، ترموکوپل، فن خنک‌کننده و فیلتر نوری است. جریان پیوسته شیر در حدود ml ۲۳۰ در حالت انتقال با سنسور طیف در محدوده طول موج nm ۶۰۰-۱۰۵۰ اندازه‌گیری می‌شود. این سیستم بر اساس طیف NIR و تجزیه و تحلیل PLS برای توسعه مدل کالیبراسیون است. با این حال، برای حفظ دقت سیستم، به‌روزرسانی مدل‌های ریاضی به صورت دوره‌ای الزامی است و سیستم را به یک روش غیر عملی تبدیل می‌کند [۴۳]. در سال ۲۰۱۱ روش بهتری برای ارزیابی چربی، پروتئین، لاکتوز و اوره موجود در شیر خام بر

۱۰۲۰ از MSC و طیف مشتق دوم مربوط به پروتئین دست‌یافتند. نتایجی که از کالیبراسیون PLS به دست آمد، نشان داد که طیف MSC برای پیش‌بینی چربی و پروتئین به ترتیب ۱۱ و ۱۳ فاکتور و بدون پیش‌تیمار ۱۴ فاکتور برای لاکتوز بهترین است. [۴۰] در سال ۲۰۰۴ اتریون و همکارانش بر اساس اندازه‌گیری جذب در دو محدوده nm ۶۶۶۶-۵۸۸۲ و nm ۹۴۳۳-۹۰۹۰ محتوای پروتئین در شیر خام را اندازه‌گیری کردند. در محدوده‌ی nm ۶۰۹۷ به وجود آب پی‌برند که برای جلوگیری از جذب آب، یک روش خودکار برای جداسازی آب از طیف انجام شد. جهت کمی‌سازی پروتئین، سه روش پردازش انجام شد: ادغام طیف باندهای آمید، PLS، و تجزیه و تحلیل اجزای اصلی (PCA) با شبکه مصنوعی<sup>۲۵</sup> (ANN). روش سوم (PCA) با ANN، بر پایه پارامترهای PCA، محتوای چربی و لاکتوز به عنوان متغیرهای ورودی، و در نتیجه پیش‌بینی پروتئین است. بنابه گفته‌ی نویسندگان با در نظر گرفتن چربی و لاکتوز به عنوان متغیرهای ورودی، خطای پیش‌بینی کاهش می‌یابد. با وجود خطای کم پیش‌بینی کمتر از ۰.۵ درصد، محدوده محتوای پروتئین از نمونه‌های کالیبراسیون ۲.۴۷ تا ۳.۹۵ درصد است. در نتیجه در لحظه اجرا در یک محیط واقعی، نمونه‌های شیر خارج از این محدوده هستند و مدل‌های کالیبراسیون توانایی انجام یک برآورد واقعی را ندارند. [۴۱] سال ۲۰۰۷ کاوامورا و همکاران یک سیستم نظارت برخط را جهت ارزیابی چربی، پروتئین و لاکتوز در محدوده‌ی

<sup>27</sup> standard error of prediction :SEP

<sup>25</sup> Artificial neural network :ANN

<sup>26</sup> coefficient of determination :  $r^2$

در آن طیف از ۸۵۱ nm تا ۱۶۹۴ nm را حین فرآیند شیردوشی تجزیه و تحلیل می‌کند. قبل از اندازه‌گیری نمونه‌های شیر هر گاو، طیف مرجع تیره و سفید نشان داده شده است و در طول فرآیند شیردوشی، طیف‌ها هر ۵۰۰ ms از لایه‌ای که ضخامتش ۳۰ mm بوده چندین بار اندازه‌گیری شده و در نتیجه نویسندگان نشان دادند که طیف در حین فرآیند شیردوشی متغیر بوده و هرچه بازه زمان شیردوشی بیشتر می‌شده است، شدت بازتاب افزایش یافته است که دلیل این متغیر بودن طیف، به اثرات پراکندگی ناشی از اندازه ذرات مربوط بوده است. جهت جلوگیری از تغییر شدت‌ها، طیف‌ها نرمال شدند با این حال، پیش‌پردازش طیف‌ها ممکن بود باعث حذف شدت‌های مهمی شود که حاصل از ترکیبات مورد نظر بود. جدای از این، نتایج قابل قبول مقادیر غلظت پیش‌بینی شده در مقابل مقادیر واقعی از سیستم توسعه یافته، اثرات پراکندگی ارائه شده و با پیش‌تیمار طیف‌ها کاهش می‌یابد. به گفته نویسندگان، سیستم‌های مبتنی بر NIR به دقت توصیه شده برای تجزیه و تحلیل آزمایشگاهی دست پیدا نمی‌کند. [۴۵] سال ۲۰۱۳، فنگ و همکارانش برپایه‌ی طیف‌سنجی غیرپراکنده فروسرخ نزدیک<sup>28</sup> (NDSWNIR) در بازه ۶۰۰-۱۱۰۰ nm و رگرسیون PLS، چربی، پروتئین و لاکتوز شیرخام غیرهموزن را تعیین کرد. تحلیل کننده به صورت یک سیستم اپتیکی تک‌پرتو تشکیل شده که این توانایی را دارد که در مدت زمان ۱ دقیقه ارزیابی را انجام دهد، ۳۰

پایه‌ی طول موج VIS/NIR و دو روش بازتاب و عبور بررسی شدند. نتیجه‌ای که از این پروژه حاصل شد نشان داد که طیف‌های بازتابی برای چربی و پروتئین و عبور برای ارزیابی لاکتوز مناسب و قابل پذیرش هستند و هیچ‌کدام (بازتاب یا عبور) برای ارزیابی اوره مناسب نیستند. نویسندگان تایید کردن محدوده طول موج nm ۴۰۰-۱۰۰۰، جهت پیش‌بینی محتوای چربی اطلاعات دقیقی در اختیار ما قرار نمی‌دهد که دلیل آن ممکن است بخاطر نازک بودن لایه (mm) (۱) باشد. به همین جهت استفاده کردن از این روش برای تحلیل‌های برخط مناسب نمی‌باشد. اساساً، آزمایش بر روی طیف‌های NIR انجام گرفت و برای مدل کالیبراسیون PLS، کل محدوده VIS به دلیل به دست آوردن همبستگی بالا در نظر گرفته نشد. [۴۴] چند ماه بعد مونوز-اوسا و همکارانش حسگری را برپایه‌ی فیبر اپتیکی مخروطی جهت اندازه‌گیری محتوای چربی در شیر تازه توسعه دادند. مخروطی که از یک بخش باریک از فیبر جهت افزایش حساسیت با رسانه تشکیل شده است. قسمت مخروطی در شیر تازه با غلظت‌های متفاوت چربی شناور می‌شود. در نتیجه باعث تجمع میسل‌های چربی در ناحیه مخروطی شده و در نهایت سیگنال قدرت اپتیکی تضعیف می‌شود. با افزایش میزان چربی سیگنال حدود ۰.۰۰۴۲۵mw کاهش پیدا کرد. [۵] در سال ۲۰۱۲، ملفسن و همکارانش جهت پیش‌بینی چربی، پروتئین، لاکتوز، اوره و تعداد سلول‌های سوماتیک سیستم درون خطی را طراحی و ارزیابی کردند که

<sup>28</sup> non-dispersive short-wave near-infrared : NDSWNIR

کدر (در این مورد، شیر خام) ارائه دهد. [۳۲] نیرو و همکارانش در زمینه پیش‌بینی محتوای پروتئین شیر گاو توسط فروسرخ میانی بررسی‌هایی را انجام دادند. نمونه‌ها با یک مخلوط نگهداری و در دمای ۴°C ذخیره شدند. به وسیله ی MilkoScan FT6000، طیف ۱۱۰ نمونه‌ی شیر به دست آمد و جذب را محاسبه کردند و حذف متغییر غیراطلاعاتی و PLS جهت ایجاد مدل‌های کالیبراسیون، حذف طول موج‌هایی که آب نور را جذب می‌کند، استفاده شد. نویسندگان گزارش داده‌اند که بهترین روش برای پیش‌بینی پروتئین کل است اما با این وجود، به عنوان روش تحلیل آفلاین قرار گرفته است. [۴۷] در سال ۲۰۱۶ راگنی و همکارانش سیستمی با قیمت کم و ساده جهت کار کردن براساس نوری که از یک ماده شناسایی شده توسط فوتودیود مشخص که در ناحیه NIR کار می‌کرد، طراحی کردند. لامپ تنگستن شدت خود را بوسیله یک سیگنال دیجیتال به عنوان مرجع تغییر می‌دهد و فوتودیود نوری را که عبور می‌کند به واسطه‌ی نمونه شیر جذب می‌کند. نویسندگان تاثیر قوی محتوای چربی را به اثرات پراکندگی نور نسبت می‌دهند، بهترین ناحیه از ۸۰۰ nm تا ۹۰۰ nm اعلام شده است. همچنین همبستگی خوبی بین محتوای چربی و نور پراکنده به دست آمده است. با افزایش چربی شیر، تابش تشخیص داده شده توسط ردیاب نور کمتر شده و با اضافه کردن یک ANN به سیستم، پیش‌بینی را با  $R^2=0.992$  گزارش دادند. روش پیشنهاد شده در هر دو سیستم آنلاین و آفلاین قابل اجرا می‌باشد.

جهت گرم کردن نمونه شیر و ۳۰ S دیگر جهت اندازه‌گیری زمان می‌برد. این روش از جذب طول موج‌های انتخاب شده با توجه به انتساب باند احتمالی اجزای اصلی شیر استفاده می‌کند که در نهایت منجر به طول موج‌های NIR می‌شود. این تقریب جهت انجام کار به عنوان سیستم آفلاین جهت ارزیابی اجزای اصلی شیر مناسب است. منتها با توجه به اینکه نمونه‌ها نیاز به گرم شدن دارند، زمانبر است. [۴۶] خواص اپتیکی حجیم (BOP) شیر خام با ترکیب آن (چربی، پروتئین، لاکتوز و غیره) و خواص فیزیکی (توزیع گلبول‌های چربی و اندازه میسل‌های کازئین) می‌تواند مرتبط باشد. [۳۲] در سال ۲۰۱۵ ارنوتس و همکارانش سیستم اپتیکی را جهت اندازه‌گیری بازتاب کل و عبور کل از یک نمونه شیر در داخل یک کووت که دارای  $600\text{ }\mu\text{m}$  طول مسیر است و متشکل از یک لیزر ابرپیوسته (۵۰۰-۲۲۵۰ nm) با یک تک‌رنک‌ساز می‌باشد، توسعه دادند. آنها به یک همبستگی ( $r \leq 0.762$ ) بین محتوای چربی و ضریب جذب حجیم ( $q\mu$ ) در طول موج NIR، و همبستگی بالایی ( $r \geq 0.975$ ) بین چربی و ضریب پراکندگی توده ( $\mu_s$ ) در محدوده ۱۴۰۰-۱۳۰۰ nm دست یافتند، به این دلیل که اندازه گلبول‌های چربی کمترین تأثیر را بر  $\mu_s$  در آن محدوده طول موج دارد که اساساً تحت تأثیر محتوای چربی است. علیرغم ضرایب همبستگی پایین، مطالعه BOP می‌تواند اطلاعاتی را برای آزمایش ترکیبات مختلف سیستم حسگر و چگونگی برهم‌کنش بین منبع نور و محیط‌های

فصل، نژاد و غیره می‌توانند باعث خطاهای سیستماتیک در تعیین روش‌های IR شوند. به‌عنوان مثال، کربوکسیلیک اسیدهای تشکیل‌شده در تخمیر لاکتوز باعث جذب تداخلی در طول موج‌هایی می‌شود که پروتئین با آن اندازه‌گیری می‌شود. به همین دلیل، کالیبراسیون سیستم‌های IR به طور مداوم مورد نیاز است. در سیستم‌های مبتنی بر NIR، علاوه بر استفاده از رگرسیون خطی چندگانه<sup>۳۰</sup> (MLR)، PCR یا PLS، کالیبراسیون باید قبل از هر اندازه‌گیری با نمونه‌های معرف و مجموعه دیگری برای اعتبارسنجی انجام شود. [۴۹]

## ۲-۱-۴ طیف‌سنج‌های قابل حمل و دستی NIR و کاربرد آن‌ها در شیر

باتوجه به اینکه میزان مصرف لبنیات روزبه‌روز در سطح جهان افزایش می‌یابد، جهت پاسخ‌گویی به تقاضای روزافزون برای محصولات لبنی با کیفیت بالا، اندازه‌گیری‌های سریع و کنترل کیفیت و تضمین ایمنی از مرحله شیردوشی در مزرعه تا تولید و در نهایت ذخیره‌سازی محصول نهایی، از روش‌های متعددی استفاده شده است. تعداد انتشارات مربوط به "NIR قابل حمل و دستی" از سال ۲۰۰۶ روند افزایشی داشته است. همچنین کاربرد NIR قابل حمل و دستی در رده فناوری علوم غذایی دومین تعداد انتشارات را داشته است. با این وجود، تعداد انتشارات مربوط به محصولات لبنی در رده فناوری علوم غذایی محدود است. با توجه به مفهوم "دامداری دقیق" و

با این وجود، یکی از مشکلات اصلی که می‌تواند تاثیرگذار باشد، اثر دما بر روی سیستم است. از طرفی، مدولاسیون دامنه مورد استفاده در مقاله می‌تواند با بزرگ‌تر شدن لامپ متغیر باشد. به همین دلیل، کالیبراسیون‌های متعددی به طور مداوم باید انجام شود تا زمانی که لامپ تعویض گردد. [۴۸] در همان سال لی و همکارانش تخمین سریعی از چربی و پروتئین شیر خام ارائه دادند و از تکنیک‌های مختلف جهت حذف نویز طیفی برای از بین بردن اثر ذرات جامد، پراکندگی سطحی و تفاوت مسیر اپتیکی؛ حذف نویز مشتق شده به منظور حذف خط مبنا و غلبه بر هم‌پوشانی باندهای طیفی؛ الگوریتم ژنتیک و PLS برای ساخت یک مجموعه کالیبراسیون از نمونه‌های انتخاب شده. تست اعتبارسنجی، برای پروتئین،  $R^2 = 0.8010$  و برای محتوای چربی،  $R^2 = 0.9100$  را نشان می‌دهد. علیرغم نتایج، دامنه ترکیب نمونه‌های پروتئین و چربی کوتاه بود (به ترتیب ۳.۳۹-۲.۸۹ و ۴.۱۸-۳.۲۸)، و طول موج‌هایی که آنها آزمایش را انجام می‌دهند MIDIR از ۲۵۶۴-۲۵۰۰ بود، که در آن طیف تحت تأثیر حضور آب و سایر اجزای شیر خام است. نمونه‌های شیر همگن نشدند و اثرات پراکندگی در نظر گرفته نشد. علاوه بر این، مدولاسیون دامنه می‌تواند با گذشت زمان، به دلیل پیری سیستم روشنایی، خطاهای نسبی ایجاد کند. این روش در فرآیندهای آنلاین قابل اجرا است، اما تحلیلگر طیف اپتیکی هزینه‌ی بالایی دارد. عوامل بیولوژیکی مانند ورم پستان، شیردهی، تغذیه،

<sup>30</sup> Multiple linear regressions :MLS

$(RMSECV)^{34}$  ۰.۰۷۸٪، ۰.۰۸۰٪، ۰.۰۸۱٪ به دست آوردند. نویسندگان عملکرد یک طیف سنج NIR قابل حمل دو کاناله را جهت پیش بینی چربی، کازئین و پروتئین آب پنیر در شیر مایع توسعه دادند. [۵۱] یکی از کانالها جهت به دست آوردن طیف های انتقال و دیگری برای به دست آوردن طیف های پس پراکندگی برای هر نمونه استفاده شد. مدل های کالیبراسیون PLSR فقط بر اساس طیف های انتقال/طیف های پس پراکنده و یا ترکیبی از هر دو توسعه یافتند. نشان داده شده که مدل های پیش بینی با استفاده از طیف های ترکیبی با داشتن ضریب همبستگی کالیبراسیون ( $r^2$ ) را برای چربی، پروتئین، لاکتوز به ترتیب برابر ۰.۸۸، ۰.۸۹، ۰.۹۱ با ریشه میانگین مربعات خطای پیش بینی  $(RMSEP)^{35}$  ۰.۰۰۸٪، ۰.۰۱۳٪، ۰.۰۰۷٪ بهترین نتایج را به دست آوردند. یک دستگاه NIR MicroPhazir دستی جهت توسعه کالیبراسیون برای پروتئین، چربی و مواد جامد بدون چربی  $(SNF)^{36}$  شیر خام مورد بررسی قرار گرفت. [۵۲]

چهار حسگر مختلف NIR دستی (NIRONE 1.4، NIRONE 2.0، NIRONE 2.5 در حالت انتقال و NIRONE 2.0 در حالت بازتاب، از Spectral Engines، فنلاند) برای اندازه گیری چربی، پروتئین و لاکتوز ۲۵۲ نمونه شیر خام مورد آزمایش قرار گرفتند. [۵۳] مدل های PLSR توسعه یافته دارای خطای پیش بینی٪

"کیفیت بر اساس طراحی"  $(QbD)^{31}$ ، ابزارهای قابل حمل، به عبارتی نسخه های کوچک طیف سنج های آزمایشگاهی NIR به طور گسترده مورد استفاده قرار گرفت. این ابزارهای در زمینه های کشاورزی و مواد غذایی تهیه و استفاده شده اند اما در این جمع آوری از میان آنالیزهایی که در زمینه لبنی (شیر، پنیر، پودرهای لبنی و...) استفاده شده اند فقط به مواردی که مربوط به شیر هستند، اشاره شده است. [۱]

ترکیب اصلی شیر:

کالینین و همکارانش برای اندازه گیری چربی، پروتئین کل و لاکتوز شیر مایع، اسپکتروفتومتر NIR قابل حمل (BIKAN-K، وزن ۴.۶ Kg، اندازه گیری در حالت تابش در بازه طول موج (۸۰۰-۱۰۸۰ nm) را پیشنهاد دادند. [۵۰] شصت و پنج نمونه شیر را با چندین ماده دیگر (به عنوان مثال خامه، شیر بدون چربی، لاکتوز) مخلوط کرده و توسط یک فرآیند همگن سازی و استانداردسازی تهیه کردند که در نتیجه آن محتوای چربی شیر در محدوده ۱.۵-۵.۸٪، پروتئین کل ۲.۲-۴.۰٪، لاکتوز ۵.۸-۴ به دست آمد. مدل کالیبراسیون توسعه یافته به وسیله رگرسیون حداقل مربعات جزئی  $(PLSR)^{32}$ ، ضریب همبستگی کالیبراسیون  $(r_c^2)^{33}$  را برای چربی، پروتئین، لاکتوز به ترتیب برابر ۰.۹۸۴، ۰.۹۶۲، ۰.۸۷۸ و میانگین مربعات خطای ریشه برای اعتبارسنجی متقاطع

<sup>34</sup> root mean square error for cross validation : RMSECV

<sup>35</sup> Root mean square error of prediction : RMSEOP

<sup>36</sup> Solids-non-fat : SNF

<sup>31</sup> Quality by design : QbD

<sup>32</sup> partial least square regression : PLSR

<sup>33</sup> correlation coefficient of calibration :  $r_c^2$

تحلیل سریع و قابل اعتمادی برای پیش بینی محتوای چربی (در محدوده ۰.۱-۳.۷٪) و طبقه بندی نمونه شیر (یعنی شیر بدون چربی، نیمه بدون چربی و شیر کامل) ارائه دهند. از آنجایی که NeoSpectra (۷۴۰-۱۰۷۰ nm) و SCiO (۱۳۵۰-۲۵۵۸ nm) مناطق طیفی مختلف را پوشش می دهند، یک مدل PLS همجوشی داده با استفاده از داده های طیفی هر دو سنسور توسعه داده شد. که نتایج بهتری را برای پیش بینی چربی نسبت به مدل های PLS که با استفاده از هر حسگر منفرد ایجاد شده اند، ارائه می کند. [۱]

### ۵. تجزیه و تحلیل متابولومیک شیر

متابولومیک، مولکول های کوچک، واسطه ها و محصولات متابولیسم در یک سیستم بیولوژیکی را مورد مطالعه و بررسی قرار می دهد. [۵۵] در واقع روشی تکرارپذیر است که بر روی ژنومیک تغذیه و کشف و شناسایی نشانگرهای زیستی برای کیفیت سنجی شیر و اطمینان از ایمن بودن آن و فرآورده های شیر مورد استفاده قرار می گیرد. [۵۶] تکنیک های آنالیز متابولومیک در زمینه ارزیابی کیفی شیر و فرآورده های آن موفقیت های زیادی کسب کرده بخصوص در زمینه تشخیص بیماری ها و تشخیص باقی مانده های دارو در شیر و مواد تقلبی بررسی هایی انجام داده است. [۵۷]، [۵۸] متابولومیک ترکیبات با غلظت های مختلف و با ویژگی های فیزیکی و شیمیایی مختلف را بوسیله تکنولوژی های تحلیلی متنوع، مورد ارزیابی قرار می دهد. [۵۹] متابولیت های شیر

۰.۵۴-۰.۵۸ برای چربی، ۰.۳۵-۰.۳۰ برای پروتئین و ۰.۱۹-۰.۱۶ برای لاکتوز بودند. خطای پیش بینی حسگرهای NIRONE با توصیه های بین المللی ICAR (استاندارد جهانی داده های دام) برای آنالیزهای شیر مزرعه (یعنی طیف سنج InGaAs خنک شده Tec5، آنالیز آنالیز شیر AFI) مقایسه شد. داده ها نشان داد که حسگرهای NIRONE دقت پیش بینی بالاتری برای اندازه گیری چربی اما دقت پیش بینی کمتری برای پروتئین و لاکتوز داشتند. عمرو و همکاران استفاده از طیف سنج NIR تبدیل فوریه مبتنی بر MEMS دستی برای نظارت بر محتوای چربی در شیر را بررسی کرد. [۵۴] نمونه های شیر با غلظت های مختلف چربی (۰.۱٪-۶.۵٪) با مخلوط کردن شیر بدون چربی با خامه کامل تهیه شد. طیف سنج در حالت انتقال در محدوده طول موج ۱۳۰۰-۲۵۰۰ نانومتر کار می کرد، نمونه شیر در یک کووت کوارت با طول مسیر ۱ میلی متری برای کسب طیف های انتقال قرار داده شد. یک مدل کالیبراسیون براساس روش رگرسیون مؤلفه اصلی<sup>۳۷</sup> (PCR) ایجاد شد که حداکثر خطای پیش بینی غلظت ۰.۵٪ را ارائه می دهد. نویسندگان تاکید کردند که نتیجه قابل قبول است و می تواند برای تعیین دسته بندی نوع شیر، یعنی شیر بدون چربی، کم چرب، متوسط چربی یا خامه کامل استفاده شود. دو طیف سنج کوچک (SCiO و NeoSpectra) برای تجزیه و تحلیل شیر تجاری خریداری شده از اسپانیا، ایتالیا و سوئیس مقایسه شدند. هر دو طیف سنج دستی می توانند تجزیه و

داشتن تفکیک زمانی ضعیف می‌توان اشاره کرد. [۶۳] طیفسنجی NMR همدوسی کوانتومی تک هسته‌ای <sup>۳۸</sup>(HSQC) برای تعیین کمیت لیپیدها، سیترات، N-استیل کربوهیدرات‌ها، لاکتوز، بوتیرات و تری متیل آمین در شیر و فرآورده‌های شیری به کار گرفته شده است. [۶۴]

## ۲-۱-۵ متابولومیک شیر بر پایه MS

متابولومیک مبتنی بر MS به طور گسترده برای تشخیص متابولیت‌ها در محصولات غذایی استفاده می‌شود. [۵۹] تکنیک‌های بسیاری بر پایه MS در تجزیه و تحلیل متابولومیک شیر و فرآورده‌های شیر به کار گرفته شده‌اند که گروهی شامل تکنیک‌های MS بر پایه جداسازی مانند GC-MS، LC-MS، الکتروفورز مویرگی - طیفسنجی جرمی <sup>۳۹</sup>(CE-MS)، تحرک یونی - طیفسنجی جرمی <sup>۴۰</sup>(IM-MS)، و گروه دیگر، تکنیک‌های MS بدون جداسازی مانند تزریق مستقیم - طیفسنجی جرمی <sup>۴۱</sup>(DI-MS)، یونیزاسیون دفع لیزر به کمک ماتریس - طیفسنجی جرمی <sup>۴۲</sup>(MALDI-MS)، تصویربرداری طیفسنجی جرمی <sup>۴۳</sup>(MSI)، و تجزیه و تحلیل مستقیم در طیفسنجی جرمی زمان واقعی <sup>۴۴</sup>(DART-MS). [۶۵] تکنیک‌های متابولیکی که بر پایه MS می‌باشند دارای مزیت‌هایی هستند، مانند: سریع بودن، داشتن حساسیت و توان عملیاتی بالا. [۶۶] با این وجود،

به طور کلی بوسیله طیفسنجی NMR و کروماتوگرافی مایع - طیفسنجی جرمی (LC-MS)، کروماتوگرافی گازی - طیفسنجی جرمی (GC-MS)، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا - طیفسنجی جرمی زمان پرواز چهار قطبی (UPLC-QTOFMS)، شناسایی شده‌اند. تکنیک‌های متابولیک را می‌توان به دو گروه عمده تقسیم کرد: متابولومیک بر پایه NMR و متابولومیک بر پایه MS.

## ۱-۱-۵ متابولومیک شیر بر پایه NMR

یکی از پرکاربردترین و پیشرفته‌ترین روش‌ها جهت شناسایی متابولیت‌های موجود در شیر که حتی مراحل آماده‌سازی نمونه پیچیده‌ای ندارد، [۶۰]، [۶۱] طیفسنجی NMR می‌باشد. که توانایی مشخص کردن ساختار متابولیت‌ها را دارد. [۵۹] این نوع طیفسنجی از مزایایی برخوردار می‌باشد از جمله: تکرارپذیری بالا در تجزیه و تحلیل داده‌ها، امکان تشخیص بالای ایزوتوپ‌ها در مخلوط‌های پیچیده، امکان آنالیز مناسب از ساختار متابولیت‌ها از سلول به کل ارگانیزم‌ها بدون ایجاد هیچ گونه اثرات مخرب، دقت بالا در کمی‌سازی بدون استاندارد، تعیین ساختار مهم متابولیت‌های ناشناخته. [۶۲] طیفسنجی NMR معایب‌هایی هم دارد که از میان آن‌ها می‌توان به مواردی مانند: کم بودن میزان حساسیت آن نسبت به سایر روش‌های متابولومیک، کم بودن وضوح طیفی،

<sup>42</sup> Matrix-assisted laser desorption ionisation-mass spectrometry: MALDI-MS

<sup>43</sup> Mass spectrometry imaging :MSI

<sup>44</sup> Direct analysis in real time-mass spectrometry : DART-MS

<sup>38</sup> Heteronuclear single quantum coherence : HSQC

<sup>39</sup> Capillary electrophoresis-mass spectrometry : CE-MS

<sup>40</sup> Ion mobility-mass spectrometry : IM-MS

<sup>41</sup> Direct infusion-mass spectrometry : DI-MS

فرآیند مشتق‌سازی ریسمان<sup>۴۵</sup> (TD-LC-MS) به طور قابل توجهی حساسیت LC-MS را ۳.۶-۴۰۰ برابر افزایش داده است. [۵۹] جانگ و همکاران (۲۰۱۸) استفاده از تکنیک‌های متابولومیک LC-MS مبتنی بر برچسب زدن ایزوتوپ‌های شیمیایی را برای تعیین کمیت مقدار نسبتاً زیادی از متابولیت‌ها گزارش کرد. UPLC همراه با QTOF-MS برای تجزیه و تحلیل غلظت کم متابولیت‌های موجود در شیر استفاده شده است. [۷۲] از مزایای UPLC-QTOF-MS می‌توان به سرعت اکتساب بالا، وضوح بالا برای شناسایی و تایید داده‌های طیف‌سنجی جرمی، قابلیت تشخیص گونه‌های کم فراوانی در نمونه‌های پیچیده و دقت کمی اشاره کرد. [۷۳] مزایای تکنیک‌های متابولومیک مبتنی بر MS آنها را به ابزاری عالی برای تجزیه و تحلیل متابولیت‌های شیر تبدیل می‌کند.

## ۵.۲ ارزیابی ترکیبات شیر (لاکتوز، پروتئین، چربی) بوسیله متابولومیک

(ساندکاید و همکاران، ۲۰۱۳) تحلیل و بررسی بوسیله متابولومیک نقش حائز اهمیتی در بررسی کیفیت شیر و محصولات شیر دارد. حدود ۲۵ متابولیت مهم از نظر تغذیه‌ای بوسیله پژوهش‌هایی بر پایه <sup>1</sup>H NMR شناسایی و بررسی شده‌اند که از میان آنها می‌توان به لاکتوز اشاره کرد. [۷۴] (موناخوا و همکارانش ۲۰۱۲) مطالعات متابولومیک بر پایه طیف‌سنجی <sup>1</sup>H NMR برای تایید برچسب‌گذاری در رابطه با تغذیه و ترکیب

معایی مانند، مقادیر انبوه پردازش داده‌ها و شناسایی و کمیت محدود متابولیت‌ها در سطوح ردیابی است. [۶۷] از روش‌های رایج متابولیکی بر اساس MS می‌توان به GC-MS، LC-MS و UPLC-QTOF-MS اشاره کرد. تکنیک GC-MS بیشتر جهت شناسایی و تعیین کمیت متابولیت‌های آبدوست شیر بکار گرفته می‌شود. [۶۸]، [۶۹] تکنیک‌های متابولومیک شیر مبتنی بر GC-MS عمدتاً برای ترکیبات بدون قطب و فرار مناسب هستند. از امتیازات این روش می‌توان به در دسترس بودن اطلاعات ساختاری اشاره کرد که از تجزیه منابع و وجود یک بانک داده جهانی به دست می‌آید، که امکان شفاف‌سازی ساختار را آسان می‌کند. در حالی که معایب GC-MS نیاز به آماده‌سازی نمونه بیشتر، مشتق‌سازی ترکیبات قطبی و تجزیه گسترده‌ای که منجر به مشکلاتی در شناسایی یون‌های مولکولی می‌شود. [۷۰] LC-MS به دلیل ویژگی، حساسیت بالا و توان عملیاتی در بدست آوردن داده، به یکی از پرکاربردترین ابزارها در متابولومیک تبدیل شده است و برای پروفایل متابولیک هدفمند و غیرهدفمند استفاده شده است. [۵۵]، [۷۱] LC-MS مزایای مختلفی مانند مناسب بودن فرآیند برای ترکیبات قطبی و غیرقطبی، حداقل آماده‌سازی نمونه و دسترسی به مولکول دست نخورده را ارائه می‌دهد، در حالی که معایب آن کاهش تکه تکه شدن و نیاز به ستون‌های کروماتوگرافی خاص برای مولکول‌های کوچک و بسیار قطبی است. [۷۰] LC-MS بر اساس

<sup>45</sup> Twine derivatisation process: TD-LC-MS

## ۶. نتیجه گیری

در این بررسی به روش‌هایی که جهت ارزیابی و کیفیت‌سنجی ترکیبات شیر مورد استفاده قرار گرفته‌اند، پرداخته شده، مشاهده می‌شود که هر کدام دارای مزایا و معایبی بوده‌اند، اما در حالت کلی بنظر می‌رسد طیف‌سنجی رامان می‌تواند بوسیله تکنیک‌های SERS روش بهتر و کم‌زحمت‌تری جهت شناسایی نمونه‌ها در غلظت پایین باشد و با مطالعات بیشتر جهت برطرف کردن محدودیت‌ها می‌تواند به ابزاری شناخته‌تر در صنایع لبنی تبدیل شود.

## حمایت کننده:

حمایت مالی سازمان صنایع کوچک و شهرک‌های صنعتی ایران

## ۵. منابع

- [1] Y. Pu, D. Pérez-Marín, N. O'Shea, و A. Garrido-Varo, "Recent Advances in Portable and Handheld NIR Spectrometers and Applications in Milk, Cheese and Dairy Powders," *Foods*, 2021, doi: 10.3390/foods10102377.
- [2] H. He, D.-W. Sun, H. Pu, L. Chen, و L. Lin, "Applications of Raman spectroscopic techniques for quality and safety evaluation of milk: A review of recent developments," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2019, doi: 10.1080/10408398.2018.1528436.
- [3] L. Jiang, M. Hassan, S. Ali, H. Li, R. Sheng, و Q. Chen, "Evolving trends in SERS-

شیر استفاده می‌شود. [۷۵] که (اسوالو، ۲۰۰۳) برای تعیین کمیت سطح لاکتاز، فاکتور تعیین‌کننده متابولیسم لاکتوز، برای افرادی که نسبت به لاکتوز حساسیت دارند و دچار مشکل عدم تحمل لاکتوز هستند مورد استفاده قرار می‌گیرد [۷۶]. این فرآیند نسبت به سایر تکنیک‌های مورد استفاده برای تعیین لاکتوز در شیر و فرآورده‌های شیری دارای مزایایی است. [۷۵] (گارسیا و همکاران ۲۰۱۲) فسفر-۳۱ (P31) در تجزیه و تحلیل فسفولیپیدهای شیر بر پایه NMR به شناسایی و تعیین کمیت ۱۲ گروه مختلف فسفولیپیدها و تفاوت آنها در منشا در شتر، مادیان، گاو و شیر انسان کمک می‌کند. فسفولیپیدها اجزای مهم غشای سلولی و غشای پلاسمایی هستند و نقش‌های فیزیولوژیکی متفاوتی دارند. پروفایل‌های فسفولیپیدی نژادهای مختلف توسط متابولومیک مبتنی بر طیف‌سنجی  $^{31}\text{P}$ -NMR شناسایی شده است و برای فرمولاسیون شیر خشک‌های مختلف نوزاد استفاده می‌شود. [۷۷] چلیارد و همکاران (۲۰۰۶) و آووندو و همکاران (۲۰۱۵) از تجزیه و تحلیل متابولومیک مواد مغذی شیر مانند لاکتوز، چربی، پروتئین و اوره برای تایید رابطه بین ژنوتیپ و ترکیب شیر بز استفاده کرد و گزارش داد که ژنوتیپ نقش مهمی در تعیین ترکیب شیر ایفا می‌کند. [۷۸]، [۷۹] اوسالیوان و همکاران (۲۰۱۳) با استفاده از تجزیه و تحلیل متابولومیک مبتنی بر GC-MS، مقادیر بیشتری از اسیدهای آمینه و الیگوساکاریدها را در شیر انسان گزارش کردند. [۸۰]

- Raman spectroscopy,” *Vib. Spectrosc.*, 2011, doi: 10.1016/j.vibspec.2010.07.001.
- [14] R. M. El-Abassy, P. J. Eravuchira, P. Donfack, B. Von Der Kammer, و A. Materny, “Direct Determination of Unsaturation Level of Milk Fat Using Raman Spectroscopy,” *Appl. Spectrosc.*, 2012, doi: 10.1366/11-06327.
- [15] Y. Yao, et.al, “Milk fat globules by confocal Raman microscopy: Differences in human, bovine and caprine milk,” *Food Res. Int.*, 2016, doi: 10.1016/j.foodres.2015.12.017.
- [16] L. Silveira, E. D. C. M. Motta, R. A. Zângaro, M. T. T. Pacheco, C. J. De Lima, و L. H. Moreira, “Characterization of nutritional parameters in bovine milk by Raman spectroscopy with least squares modeling,” *Instrum. Sci. Technol.*, 2016, doi: 10.1080/10739149.2015.1055578.
- [17] R. Ullah, et.al “Infant gender-based differentiation in concentration of milk fats using near infrared Raman spectroscopy,” *J. Raman Spectrosc.*, 2017, doi: 10.1002/jrs.5047.
- [18] کتاب صنعت شیر، ترجمه فرهاد فرهودی: <https://www.gisoom.com/book/1994057/>
- [19] P. Freire, A. Zambrano, A. Zamora, , M. Castillo, “Thermal Denaturation of Milk Whey Proteins: A Comprehensive Review on Rapid Quantification Methods Being Studied, Developed and Implemented,” 2022, doi: 10.3390/dairy3030036.
- [20] Y. Huang, J. Gu, G. Xiang, J. Xu, S. Fu, H. Gong, “Detection of total protein in milk using phosphomolybdic acid-mediated surface-enhanced Raman spectroscopy: Total protein detection in milk by SERS,” *J. Raman Spectrosc.*, 2016, doi: 10.1002/jrs.4812.
- [21] X. X. Han, B. Zhao, و Y. Ozaki, “Surface-enhanced Raman scattering for protein detection,” *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009 , doi: 10.1007/s00216-009-2702-3.
- [22] L. He ,et.al “Detection of a Foreign Protein in Milk Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Coupled with Antibody-Modified Silver Dendrites,” *Anal. Chem.*, 2011, doi: 10.1021/ac1032353.
- [23] M. Becker, C. Budich, V. Deckert, و D. Janasek, “Isotachophoretic free-flow electrophoretic focusing and SERS detection of myoglobin inside a miniaturized device,” *The Analyst*, 2009, doi: 10.1039/B816717F.
- based techniques for food quality and safety: A review,” *Trends Food Sci. Technol.*, 2021, doi: 10.1016/j.tifs.2021.04.006.
- [4] M. Li, J. Chen, J. Xu, S. Fu, و H. Gong, “Determination of Lactose in Milk by Raman Spectroscopy,” *Anal. Lett.*, 2015, doi: 10.1080/00032719.2014.979358.
- [5] A. Gastélum-Barrios, G. M. Soto-Zarazúa, A. Escamilla-García, M. Toledano-Ayala, G. Macías-Bobadilla, و D. Jauregui-Vazquez, “Optical Methods Based on Ultraviolet, Visible, and Near-Infrared Spectra to Estimate Fat and Protein in Raw Milk: A Review,” *Sensors*, 2020, doi: 10.3390/s20123356.
- [6] C. Sen, P. Ray, و M. Bhattacharyya, “A critical review on metabolomic analysis of milk and milk products,” *Int. J. Dairy Technol.*, 2020, doi: 10.1111/1471-0307.12745.
- [7] M. A. Farag, M. Tanios, S. AlKarimy, H. Ibrahim, و H. A. Guirguis, “Biosensing approaches to detect potential milk contaminants: a comprehensive review,” *Food Addit. Contam. Part A*, 2021, doi: 10.1080/19440049.2021.1914864.
- [8] D. C. S. Z. Ribeiro et.al “Determination of the lactose content in low-lactose milk using Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) and convolutional neural network,” *Heliyon*, 2023, doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e12898.
- [9] W. Li, et.al “Rapid quantification of goat milk adulteration with cow milk using Raman spectroscopy and chemometrics,” 2022, doi: 10.21203/rs.3.rs-1826753/v1.
- [10] P. Rostron ,D. Gerber, “Raman Spectroscopy, a review,” *Int. J. Eng. Tech. Res.*, 2016.
- [11] B. J. S. C. Olson و J. Markwell, “Assays for Determination of Protein Concentration,” *Curr. Protoc. Protein Sci.*, 2007, doi: 10.1002/0471140864.ps0304s48.
- [12] D. Yang ,Y. Ying, “Applications of Raman Spectroscopy in Agricultural Products and Food Analysis: A Review,” *Appl. Spectrosc. Rev.*, 2011, doi: 10.1080/05704928.2011.593216.
- [13] R. M. El-Abassy, P. J. Eravuchira, P. Donfack, B. Von Der Kammer, ,A. Materny, “Fast determination of milk fat content using

<https://www.semanticscholar.org/paper/Theoretical-Study-of-the-Effect-of-Multi-Diameter-Yin-Siqi/2ec9b65c6cf97c43035cfd0ff6f041a4cc625300>

[34] C. L. Crofcheck, F. A. Payne, و M. P. Mengüç, "Characterization of milk properties with a radiative transfer model," *Appl. Opt.*, 2002, doi: 10.1364/AO.41.002028.

[35] C. Crofcheck, J. Wade, J. N. Swamy, M. M. Aslan, و M. P. Mengüç, "EFFECT OF FAT AND CASEIN PARTICLES IN MILK ON THE SCATTERING OF ELLIPTICALLY POLARIZED LIGHT," *Trans. ASAE*, 2005, doi: 10.13031/2013.18488.

[36] J. D. S. Goulden, "Analysis of milk by infra-red absorption," *J. Dairy Res.* 1964, doi: 10.1017/S0022029900018203.

[37] H. J. Luinge, E. Hop, E. T. G. Lutz, J. A. Van Hemert, و E. A. M. De Jong, "Determination of the fat, protein and lactose content of milk using Fourier transform infrared spectrometry," *Anal. Chim. Acta*, 1993, doi: 10.1016/0003-2670(93)85328-H.

[38] M. Pouliot, P. Paquin, R. Martel, S. F. Gauthier, و Y. Pouliot, "Whey Changes during Processing Determined by Near Infrared Spectroscopy," *J. Food Sci.*, 1997, doi: 10.1111/j.1365-2621.1997.tb04409.x.

[39] S. Šašić و Y. Ozaki, "Short-Wave Near-Infrared Spectroscopy of Biological Fluids. 1. Quantitative Analysis of Fat, Protein, and Lactose in Raw Milk by Partial Least-Squares Regression and Band Assignment," *Anal. Chem.*, 2001, doi: 10.1021/ac000469c.

[40] Y.-A. Woo, Y. Terazawa, J. Y. Chen, C. Iyo, F. Terada, و S. Kawano, "Development of a New Measurement Unit (MilkSpec-1) for Rapid Determination of Fat, Lactose, and Protein in Raw Milk Using Near-Infrared Transmittance Spectroscopy," *Appl. Spectrosc.*, 2002, doi: 10.1366/0003702021955150.

[41] Y. Etzion, R. Linker, U. Cogan, I. Shmulevich, "Determination of Protein Concentration in Raw Milk by Mid-Infrared Fourier Transform Infrared/Attenuated Total Reflectance Spectroscopy," *J. Dairy Sci.*, 2004, doi: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73405-0.

[24] Y. Kang, M. Si, Y. Zhu, L. Miao, و G. Xu, "Surface-enhanced Raman scattering (SERS) spectra of hemoglobin of mouse and rabbit with self-assembled nano-silver film," *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2013, doi: 10.1016/j.saa.2013.01.098.

[25] F. Hadizadeh, M. Hassanpour Moghadam, و S. A. Mohajeri, "Application of molecularly imprinted hydrogel for the preparation of lactose-free milk," *J. Sci. Food Agric.*, 2013, doi: 10.1002/jsfa.5757.

[26] H. Vaskova, M. Buckova, "Measuring the lactose content in milk," *MATEC Web Conf.*, 2016, doi: 10.1051/mateconf/20167605011.

[27] P. H. Rodrigues Júnior, et al. "FT-Raman and chemometric tools for rapid determination of quality parameters in milk powder: Classification of samples for the presence of lactose and fraud detection by addition of maltodextrin," *Food Chem.*, 2016, doi: 10.1016/j.foodchem.2015.09.055.

[28] J. K. F. Torres, et al., "Technological aspects of lactose-hydrolyzed milk powder," *Food Res. Int.*, 2017, doi: 10.1016/j.foodres.2017.08.043.

[29] A. Subramanian, V. Prabhakar, L. Rodriguez-Saona, "Analytical Methods: Infrared Spectroscopy in Dairy Analysis," در *Reference Module in Food Science*, Elsevier, 2016, B9780081005965006028. doi: 10.1016/B978-0-08-100596-5.00602-8.

[30] A. A. Bunaciu, H. Y. Aboul-Enein, و V. D. Hoang, "RETRACTED: Vibrational spectroscopy used in milk products analysis: A review," *Food Chem.*, 2016, doi: 10.1016/j.foodchem.2015.10.016.

[31] M. Manley, V. Baeten, "Spectroscopic Technique: Near Infrared (NIR) Spectroscopy," در *Modern Techniques for Food Authentication*, Elsevier, 2018, doi: 10.1016/B978-0-12-814264-6.00003-7.

[32] B. Aernouts, R. Van Beers, R. Watté, T. Huybrechts, J. Lammertyn, و W. Saeys, "Visible and near-infrared bulk optical properties of raw milk," *J. Dairy Sci.*, 2015, doi: 10.3168/jds.2015-9630.

[33] J. Yin, Z. Siqi, H. Yang, Z. Zhou, "Theoretical Study of the Effect of Multi-Diameter Distribution on the Mie Scattering Characteristics of Milk Fat," 2016. 2024:



- TrAC Trends Anal. Chem.*, 2019, doi: 10.1016/j.trac.2019.02.035.
- [51] A. Kalinin, V. Krivtsun, V. Krasheninnikov, S. Sadovskiy, H. Denisovich, H. Yurova, "Calibration Models for Multi-Component Quantitative Analyses of Dairy with the Use of Two Different Types of Portable near Infrared Spectrometer," *J. Infrared Spectrosc.*, 2008
- [52] R. F. Wolffenbittel, "MEMS-based optical mini- and microspectrometers for the visible and infrared spectral range," *J. Micromechanics Microengineering*, 2005, doi: 10.1088/0960-1317/15/7/021.
- [53] P. Llano Suárez, A. Soldado, A. González-Arrojo, F. Vicente, B. De La Roza-Delgado, "Rapid on-site monitoring of fatty acid profile in raw milk using a handheld near infrared sensor," *J. Food Compos. Anal.*, 2018, doi: 10.1016/j.jfca.2018.03.003.
- [54] A. Kalinin, V. Krasheninnikov, S. Sadovskiy, و E. Yurova, "Determining the Composition of Proteins in Milk Using a Portable near Infrared Spectrometer," *J. Infrared Spectrosc.*, 2013
- [55] B. Zhou, J. F. Xiao, L. Tuli, و H. W. Ransom, "LC-MS-based metabolomics," *Mol. Biosyst.*, 2012, doi: 10.1039/C1MB05350G.
- [56] A. Doerr, "Global metabolomics," *Nat. Methods*, 2017, doi: 10.1038/nmeth.4112.
- [57] A. Kaufmann, P. Butcher, K. Maden, S. Walker, , M. Widmer, "Reliability of veterinary drug residue confirmation: High resolution mass spectrometry versus tandem mass spectrometry," *Anal. Chim. Acta*, 2015, doi: 10.1016/j.aca.2014.11.034.
- [58] F. R. Pinu, "Early detection of food pathogens and food spoilage microorganisms: Application of metabolomics," *Trends Food Sci. Technol.*, 2016, doi: 10.1016/j.tifs.2016.05.018.
- [59] S. Li, Y. Tian, P. Jiang, Y. Lin, X. Liu, و H. Yang, "Recent advances in the application of metabolomics for food safety control and food quality analyses," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2021, doi: 10.1080/10408398.2020.1761287.
- [60] J. C. Lindon, E. Holmes, و J. K. Nicholson, "Metabonomics Techniques and Applications to Pharmaceutical Research & Development," *Pharm. Res.*, 2006, doi: 10.1007/s11095-006-0025-z.
- [42] S. Kawamura, M. Kawasaki, H. Nakatsuji, و M. Natsuga, "Near-infrared spectroscopic sensing system for online monitoring of milk quality during milking," *Sens. Instrum. Food Qual. Saf.*, 2007, doi: 10.1007/s11694-006-9001-x.
- [43] M. Kawasaki, S. Kawamura, M. Tsukahara, S. Morita, M. Komiya, , M. Natsuga, "Near-infrared spectroscopic sensing system for on-line milk quality assessment in a milking robot," *Comput. Electron. Agric.*, 2008, doi: 10.1016/j.compag.2008.01.006.
- [44] B. Aernouts, E. Polshin, J. Lammertyn, و W. Saeys, "Visible and near-infrared spectroscopic analysis of raw milk for cow health monitoring: Reflectance or transmittance?," *J. Dairy Sci.*, 2011, doi: 10.3168/jds.2011-4354.
- [45] A. Melfsen, E. Hartung, و A. Hausermann, "Accuracy of in-line milk composition analysis with diffuse reflectance near-infrared spectroscopy," *J. Dairy Sci.*, 2012, doi: 10.3168/jds.2012-5388.
- [46] X. Feng ,*et.al*"Portable analyzer for rapid analysis of total protein, fat and lactose contents in raw milk measured by non-dispersive short-wave near-infrared spectrometry," *Chem. Res. Chin. Univ.*, 2013, doi: 10.1007/s40242-013-2191-y.
- [47] G. Niero, M. Penasa, P. Gottardo, M. Cassandro, و M. De Marchi, "Short communication: Selecting the most informative mid-infrared spectra wavenumbers to improve the accuracy of prediction models for detailed milk protein content," *J. Dairy Sci.*, 2016, doi: 10.3168/jds.2015-10318.
- [48] L. Ragni, E. Iaccheri, C. Cevoli, , A. Berardinelli, "Spectral-sensitive Pulsed Photometry to predict the fat content of commercialized milk," *J. Food Eng.*, 2016, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2015.10.017.
- [49] X. Li, G. Huo, Y. Wang, H. Sun, Q. Kong, "Research on Rapid Detection Method of Protein and Fat in Raw Milk Based on Mid-infrared Spectrum," *Int. J. Multimed. Ubiquitous Eng.*, 2016, doi: 10.14257/ijmue.2016.11.10.12.
- [50] R. Deidda ,*et.al*"Vibrational spectroscopy in analysis of pharmaceuticals: Critical review of innovative portable and handheld NIR and Raman spectrophotometers,"

- [71] Y. Cai و Z.-J. Zhu, "A High-Throughput Targeted Metabolomics Workflow for the Detection of 200 Polar Metabolites in Central Carbon Metabolism," *Microbial Metabolomics*, Methods in Molecular Biology, vol. 1859., New York, NY: Springer New York, 2019., doi: 10.1007/978-1-4939-8757-3\_15.
- [72] C. Jang, L. Chen, J. D. Rabinowitz, "Metabolomics and Isotope Tracing," *Cell*, 2018 doi: 10.1016/j.cell.2018.03.055.
- [73] A. F. Nassar, T. Wu, S. F. Nassar, A. V. Wisnewski, "UPLC-MS for metabolomics: a giant step forward in support of pharmaceutical research," *Drug Discov. Today*, 2017, doi: 10.1016/j.drudis.2016.11.020.
- [74] U. K. Sundekilde, L. B. Larsen, H. C. Bertram, "NMR-Based Milk Metabolomics," *Metabolites*, 2013, doi: 10.3390/metabo3020204.
- [75] Y. B. Monakhova, T. Kuballa, J. Leitz, C. Andlauer, D. W. Lachenmeier, "NMR spectroscopy as a screening tool to validate nutrition labeling of milk, lactose-free milk, and milk substitutes based on soy and grains," *Dairy Sci. Technol.*, 2012, doi: 10.1007/s13594-011-0050-5.
- [76] D. M. Swallow, "Genetics of Lactase Persistence and Lactose Intolerance," *Annu. Rev. Genet.*, 2003, doi: 10.1146/annurev.genet.37.110801.143820.
- [77] C. Garcia, N. W. Lutz, S. Confort-Gouny, P. J. Cozzone, M. Armand, و M. Bernard, "Phospholipid fingerprints of milk from different mammals determined by 31P NMR: Towards specific interest in human health," *Food Chem.*, 2012, doi: 10.1016/j.foodchem.2012.05.111.
- [78] Y. Chilliard, J. Rouel, C. Leroux, "Goat's alpha-s1 casein genotype influences its milk fatty acid composition and delta-9 desaturation ratios," *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2006 doi: 10.1016/j.anifeedsci.2006.05.025.
- [79] M. Avondo, *et.al* "Effect of the  $\alpha$ s1-casein genotype and its interaction with diet degradability on milk production, milk
- [61] D. S. Wishart, "Metabolomics: applications to food science and nutrition research," *Trends Food Sci. Technol.*, 2008, doi: 10.1016/j.tifs.2008.03.003.
- [62] J. L. Markley, *et.al*, "The future of NMR-based metabolomics," *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2017, doi: 10.1016/j.copbio.2016.08.001.
- [63] K. Bingol, L. Bruschiweiler-Li, D. Li, B. Zhang, M. Xie, R. Bruschweiler, "Emerging New Strategies for Successful Metabolite Identification in Metabolomics," *Bioanalysis*, 2016, doi: 10.4155/bio-2015-0004.
- [64] F. Hu, K. Furihata, Y. Kato, M. Tanokura, "Nondestructive Quantification of Organic Compounds in Whole Milk without Pretreatment by Two-Dimensional NMR Spectroscopy," *J. Agric. Food Chem.*, 2007, doi: 10.1021/jf062803x.
- [65] J.-L. Ren, A.-H. Zhang, L. Kong, و X.-J. Wang, "Advances in mass spectrometry-based metabolomics for investigation of metabolites," *RSC Adv.*, 2018, doi: 10.1039/C8RA01574K.
- [66] A.-H. Emwas, *et.al*, "Standardizing the experimental conditions for using urine in NMR-based metabolomic studies with a particular focus on diagnostic studies: a review," *Metabolomics*, 2015, doi: 10.1007/s11306-014-0746-7.
- [67] J. N. Sampson, *et.al* "Metabolomics in Epidemiology: Sources of Variability in Metabolite Measurements and Implications," *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2013, doi: 10.1158/1055-9965.EPI-12-1109.
- [68] M. B. Pisano, P. Scano, A. Murgia, S. Cosentino, و P. Caboni, "Metabolomics and microbiological profile of Italian mozzarella cheese produced with buffalo and cow milk," *Food Chem.*, 2016, doi: 10.1016/j.foodchem.2015.07.061.
- [69] P. Scano, A. Murgia, F. M. Pirisi, P. Caboni, "A gas chromatography-mass spectrometry-based metabolomic approach for the characterization of goat milk compared with cow milk," *J. Dairy Sci.*, 2014, doi: 10.3168/jds.2014-8247.
- [70] F. Courant, J.-P. Antignac, G. Dervilly-Pinel, B. Le Bizec, "Basics of mass spectrometry based metabolomics," *PROTEOMICS*, 2014, doi: 10.1002/pmic.201400255.



quality, metabolic and endocrinal response of Girgentana goats,” *Small Rumin. Res.*, 2015, doi: 10.1016/j.smallrumres.2014.10.015.

[80] O. A “Metabolomic phenotyping validates the infant rhesus monkey as a model of human infant metabolism,” *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 2013 sdoi: 10.1097/MPG.0b013e31827e1f07.