

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
*ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ  
ΑΝΘΡΩΠΟΥ*

Μελέτη της σύνθεσης της λιπαρής φάσης γαλακτοκομικών  
προϊόντων χαμηλής και μειωμένης λιποπεριεκτικότητας

ΣΤΡΑΤΑΚΗΣ ΝΕΚΤΑΡΙΟΣ  
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: Θ. ΜΑΣΟΥΡΑΣ (ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ)

ΜΕΛΗ: Ελ. ΔΡΟΣΙΝΟΣ (ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ)

Στ. ΚΑΜΙΝΑΡΙΔΗΣ (ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ)

ΑΘΗΝΑ 2011

## *Ευχαριστίες*

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Θεόφιλο Μασούρα για την ανάθεση της εργασίας αυτής, τις πολύτιμες υποδείξεις και για την συνεχή βοήθεια που μου παρείχε για την ολοκλήρωση της.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον ερευνητή και καθηγητή κ. Παναγιώτη Ζουμπουλάκη του εργαστηρίου Μοριακής Ανάλυσης του Ινστιτούτου Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας (E.I.E) για την άριστη συνεργασία μας στην διεξαγωγή των πειραμάτων NMR. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για τις γνώσεις που μου προσέφερε στην φασματοσκοπική τεχνική NMR, την βοήθεια και τις υποδείξεις καθ' όλη την διάρκεια εκτέλεσης των πειραμάτων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω το επιστημονικό προσωπικό του εργαστηρίου Μοριακής Ανάλυσης για τις πολύτιμες συμβουλές για τα πειράματα NMR.

<b>Περιεχόμενα</b>	3
<b>Περίληψη</b>	6
<b>Summary</b>	7
<b><u>Θεωρητικό μέρος</u></b>	8
<b><u>Κεφάλαιο 1</u></b>	
<b>Λιπίδια γάλακτος</b>	9
1.1. Γενικά	9
1.2. Το λίπος του γάλακτος	10
1.3. Τα λιποσφαίρια	11
1.4. Λιπαρά οξέα	17
1.4.1. Κορεσμένα λιπαρά οξέα	18
1.4.2. Ακόρεστα λιπαρά οξέα	19
1.4.2.1. Cis–Ακόρεστα λιπαρά οξέα	19
1.4.2.2. Trans–Ακόρεστα λιπαρά οξέα	20
1.5. Τριγλυκερίδια	21
1.6. Διγλυκερίδια	22
1.7. Στερόλες	23
<b><u>Κεφάλαιο 2</u></b>	
<b>Γαλακτοκομικά προϊόντα χαμηλής και μειωμένης λιποπεριεκτικότητας</b>	24
2.1. Εισαγωγή	24
2.2. Νομοθεσία	25
2.3. Προβλήματα γαλακτοκομικών προϊόντων με μειωμένη και χαμηλή λιποπεριεκτικότητα	28
2.4. Βελτίωση της ποιότητας των γαλακτοκομικών προϊόντων μειωμένης και χαμηλής λιποπεριεκτικότητας	30

## **Κεφάλαιο 3**

### **Προσδιορισμός της σύνθεσης λιπαρής φάσης με την φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ και την Αέρια Χρωματογραφία GC**

<b><u>Αέρια Χρωματογραφία</u></b>	34
3.1. Εισαγωγή	34
3.2. Είδη Αέριας Χρωματογραφίας	34
3.3. Περιγραφή του Αέριου Χρωματογράφου	35
<b><u>Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός</u></b>	37
3.4. Εισαγωγή	37
3.5. Η φύση των απορροφήσεων NMR	38
3.5.1. Διαλύτες για φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$	39
3.5.2. Πυρήνες που μπορούν να μελετηθούν με NMR	39
3.6. Χαρακτηριστικές παράμετροι του NMR	40
3.6.1. Χημική Μετατόπιση	40
3.6.2. Ένταση Κορυφής	41
3.6.3. Σχάση σπιν-σπιν	41
3.7. Εφαρμογή φασματοσκοπίας NMR στο γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα	42

<b><u>Πειραματικό μέρος</u></b>	44
<b>Σκοπός της μελέτης</b>	45
<b><u>Κεφάλαιο 4</u></b>	
<b>Υλικά και Μέθοδοι</b>	46
<b>4.1. Υλικά και Συσκευές</b>	46
<b>4.1.1. Δείγματα γαλακτοκομικών προϊόντων μειωμένης και χαμηλής λιποπεριεκτικότητας</b>	46
<b>4.1.2. Αντιδραστήρια και πρότυπες ουσίες</b>	52
<b>4.1.3. Όργανα και Σκεύη</b>	52
<b>4.2. Μέθοδοι Ανάλυσης</b>	53
<b>4.2.1 Μέθοδος της Αέριας Χρωματογραφίας</b>	53
<b>4.2.1.1. Διαδικασία απομόνωσης του λίπους</b>	53
<b>4.2.1.2. Μετατροπή του λίπους σε μεθυλεστέρες</b>	54
<b>4.2.1.3. Προσδιορισμός της σύνθεσης λιπαρών οξέων με Αέρια Χρωματογραφία</b>	54
<b>4.2.2. Μέθοδος του Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού</b>	55
<b>4.2.2.1. Διαδικασία απομόνωσης του λίπους</b>	55
<b>4.2.2.2. Προσδιορισμός της σύνθεσης λιπαρής φάσης με φασματοσκοπία <math>^1\text{H-NMR}</math></b>	55
<b><u>Κεφάλαιο 5</u></b>	
<b>Αποτελέσματα και Συζήτηση</b>	56
<b>5.1. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός της σύνθεσης λιπαρών οξέων με Αέρια Χρωματογραφία</b>	56
<b>5.2. Φάσματα <math>^1\text{H-NMR}</math> για τον ποιοτικό προσδιορισμό της σύνθεσης λιπαρής φάσης</b>	66
<b>5.3. Ποσοτικός προσδιορισμός της σύνθεσης λιπαρής φάσης με φασματοσκοπία <math>^1\text{H-NMR}</math></b>	71
<b>5.4. Σύγκριση αποτελεσμάτων των μεθόδων (GC-NMR)</b>	84
<b>5.5. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων</b>	89
<b>5.6. Συμπεράσματα για τον ποιοτικό και ποσοστικό προσδιορισμό στη σύνθεση λιπαρής φάσης των γαλακτοκομικών προϊόντων</b>	98
<b>5.7. Γενικά συμπεράσματα</b>	99
<b>5.8. Βιβλιογραφία</b>	100

## Περίληψη

Σκοπό της μελέτης αποτέλεσε ο προσδιορισμός της σύνθεσης της λιπαρής φάσης γαλακτοκομικών προϊόντων που φέρουν την ένδειξη ή τον ισχυρισμό χαμηλή ή μειωμένη λιποπεριεκτικότητα ή “ελαφρύ σε λιπαρά ή θερμίδες” με χρήση φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού και Αέρια Χρωματογραφία. Η συλλογή δειγμάτων των γαλακτοκομικών προϊόντων πραγματοποιήθηκε μετά από έρευνα στην Ελληνική αγορά.

Ο προσδιορισμός της σύνθεσης της λιπαρής φάσης πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφικές (GC) και φασματοσκοπικές τεχνικές ( $^1\text{H-NMR}$ ). Με την κλασική μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας έγινε προσδιορισμός (ποιοτικός-ποσοτικός) της σύνθεσης των κυριότερων λιπαρών οξέων C4-C18, δίνοντας έμφαση και στα λιπαρά οξέα με ιδιαίτερη διατροφική αξία (CLA). Σε όλα τα δείγματα, παρατηρήθηκε ότι δεν υπάρχει μεγάλη διακύμανση τιμών στο προφίλ των λιπαρών οξέων C4-C18, ενώ παρατηρήθηκε υψηλή συγκέντρωση σε κορεσμένα λιπαρά οξέα (SFA), συγκριτικά με τα μονοακόρεστα (MUFA) και τα πολυακόρεστα (PUFA).

Η φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού ( $^1\text{H-NMR}$ ) αποτέλεσε μια νέα και πιο γρήγορη τεχνική με σκοπό τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό της σύνθεσης της λιπαρής φάσης των δειγμάτων που μελετήθηκαν. Με την μέθοδο αυτή, πραγματοποιήθηκε ο ποιοτικός προσδιορισμός των συνολικών κορεσμένων και ακόρεστων λιπαρών οξέων, της χοληστερόλης, των διγλυκεριδίων, των υπεροξειδίων και των ελεύθερων λιπαρών οξέων. Με αποτίμηση των κορυφών ολοκλήρωσης του φάσματος λίπους και με την χρήση εξισώσεων από την βιβλιογραφία, πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός των ακόλουθων λιπαρών οξέων: Λινελαϊκό, Λινολενικό, Βουτυρικό, Κορεσμένα, Ακόρεστα, Πολυακόρεστα και Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα.

Με συνδυασμό των μεθόδων επιτεύχθηκε ο ποσοτικός προσδιορισμός των επιμέρους λιπαρών οξέων καθώς και η ταυτοποίηση χοληστερόλης, διγλυκεριδίων και υπεροξειδίων. Άρα οι δύο αυτές μέθοδοι (NMR, GC), αποδείχτηκε ότι είναι συμπληρωματικές.

**Λέξεις-Κλειδιά:** Σύνθεση Λιπαρής Φάσης, Γαλακτοκομικά Προϊόντα Μειωμένης Λιποπεριεκτικότητας, Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός, Αέρια Χρωματογραφία

## Summary

This study aims to determine the composition of the lipid fraction of dairy products bringing the label of the three above mentioned categories using Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR) and Gas Chromatography (GC). The selection of these samples was carried out through research in the Greek market.

The determination of the composition of the lipid fraction materialized using Chromatography (GC) and Spectroscopy techniques ( $^1\text{H-NMR}$ ). Based on the classic method of Gas Chromatography, a determination (qualitative and quantitative) of the synthesis of the major fatty acids, C<sub>4</sub>-C<sub>18</sub>, was materialized.. In all samples, the profile of C<sub>4</sub>-C<sub>18</sub> fatty acids remained almost constant with not statistically important differences. Nevertheless, a high concentration in saturated fatty acids (SFA) was observed comparatively to monounsaturated fatty acids (MUFA) and polyunsaturated fatty acids (PUFA).

$^1\text{H-NMR}$  spectroscopy was implemented as a fast technique aiming at the qualitative and quantitative determination of the TAG fraction of the studied samples. Applying this method, it was easy to realise the qualitative determination of the total saturated and unsaturated acids, the cholesterol, the diglycerols, the peroxides and the free fatty acids. The quantitative determination of the fatty acid composition (linolenic, linoleic, butyric as well as SFA, unsaturated, MUFA and PUFA) was determined by calculating specific areas of relevant NMR signals and by using equations from the bibliography.

Combining both methods the quantitative determination of the individual fatty acids as well as the identification of cholesterol, diglycerols and peroxides were achieved. In conclusion, these two methods (NMR, GC), provided complementary results.

**Key Words:** Lipid Fraction Determination, Low Fat Dairy Products, Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, Gas Chromatography

# Θεωρητικό μέρος



## Κεφάλαιο 1

### Λιπίδια γάλακτος

#### 1.1. Γενικά

Ως **λιπίδια** χαρακτηρίζονται οι οργανικές ενώσεις κυρίως υδρόφοβες που σχηματίζονται στον βιολογικό κύκλο κάθε ζωικού ή φυτικού οργανισμού. Είναι ενώσεις που περιέχουν στα μόρια τους τμήματα υδρογονανθράκων μακριάς αλυσίδας και είναι αδιάλυτες στο νερό και διαλυτές σε συνήθεις οργανικούς διαλύτες. Παραλαμβάνονται από κύτταρα και ιστούς με τη χρήση μη πολικών οργανικών διαλυτών (Σφλώμος Σ., 2010).

Στα λιπίδια περιλαμβάνονται πολλές διαφορετικές χημικές ενώσεις οι οποίες κατηγοριοποιούνται σε υδρογονάνθρακες μακριάς αλυσίδας, λιπαρές αλκοόλες, λιπαρά οξέα και παράγωγα όπως φωσφολιπίδια, γλυκολιπίδια και σουλφολιπίδια (Σφλώμος Σ., 2010). Τα γνωστότερα και συχνότερα ευρισκόμενα στα τρόφιμα λιπίδια είναι τα λίπη και τα έλαια τα οποία αποτελούνται κυρίως από γλυκερίδια, δηλαδή εστέρες της τρισθενούς αλκοόλης γλυκερόλης με λιπαρά οξέα. Στη φύση απαντούν σε μεγαλύτερη αναλογία τα τριγλυκερίδια, δηλ. ενώσεις στις οποίες και τα τρία υδροξύλια της αλκοόλης είναι εστεροποιημένα. Τα τρία μόρια του λιπαρού οξέος μπορεί να είναι όμοια μεταξύ τους ή διαφορετικά. Έτσι τα γλυκερίδια διακρίνονται σε απλά και μικτά (Μπόσκου, Δ., 2004). Στα φυσικά προϊόντα σε μεγαλύτερη αφθονία βρίσκονται τα μικτά.

Επίσης, στα λιπίδια περιλαμβάνονται ουσίες που συνήθως είναι συνδεδεμένες σε κυτταρικές μεμβράνες και παραλαμβάνονται μαζί με τα φωσφολιπίδια και τα ουδέτερα λιπίδια κατά την εκχύλιση ιστών με κατάλληλο σύστημα διαλυτών. Τέτοιες ουσίες είναι και οι λιποδιαλυτές βιταμίνες A,D, E και K, τα καροτενοειδή, οι στερόλες και οι εστέρες στερολών (Σφλώμος Σ., 2010).

Τα λιπίδια έχουν μεγάλη σημασία για τη δομή, τη σύσταση και διαπερατότητα των μεμβρανών των τοιχωμάτων των κυττάρων. Χρησιμεύουν ως αποθέματα ενέργειας σε σπέρματα, φρούτα, φυτά και ζώα. Αποτελούν τέλος, το κυριότερο συστατικό του λιπώδους ιστού που μονώνει θερμικά το σώμα και προστατεύει τα εσωτερικά όργανα από εξωτερικά «σοκ» (Μπόσκου, Δ., 2004).

## 1.2. Το λίπος του γάλακτος

Το γάλα όλων των θηλαστικών περιέχει λιπίδια, αλλά η λιποπεριεκτικότητα τους διαφέρει πολύ μεταξύ των ειδών (Πίνακας 1). Στη λιπαρή φάση του γάλακτος περιλαμβάνονται κυρίως τρεις κατηγορίες ενώσεων: τα ουδέτερα λίπη (τριγλυκερίδια, διγλυκερίδια, μονογλυκερίδια), τα πολικά λιπίδια (φωσφολιπίδια, γλυκολιπίδια), τα ασαπωνοποίητα συστατικά (στερόλες, λιποδιαλυτές βιταμίνες, καροτενοειδή), που απαντούν σε αναλογία περίπου 98%, 1% και 1%, αντίστοιχα (Ανυφαντάκης, 2004).

**Πίνακας 1** Λιποπεριεκτικότητα του γάλακτος μερικών θηλαστικών

Είδος Θηλαστικού	% Λιποπεριεκτικότητα
Αγελάδα	3.5
Πρόβατο	7.8
Κατσίκα	4.2
Βούβαλος	6.8
Καμήλα	4.0
Κουνέλι	18.3
Φώκια	42.1
Γουρούνι	6.8
Άνθρωπος	3.8

MacGibbon, A.H.K., Taylor, M.W. 2006

Αναλυτικότερα το γαλακτικό λίπος, αποτελείται κυρίως από τριγλυκερίδια, περίπου 98%, ενώ άλλα λιπίδια γάλακτος είναι τα διγλυκερίδια (περίπου 2% των λιπιδίων), χοληστερόλη (λιγότερο από 0.5%), φωσφολιπίδια (περίπου 1%) και ελεύθερα λιπαρά οξέα (Free Fatty Acid, FFA), (περίπου 0.1%) (Jensen, R. G., and D. S. Newberg. 1995).

**Πίνακας 2** Κυριότερες κατηγορίες λιπιδίων του αγελαδινού γάλακτος

Λιπίδια	(%w/w)
Τριγλυκερίδια	98
Διγλυκερίδια	0.25-0.48
Μονοακυλογλυκερίδια	0.02-0.04
Φωσφολιπίδια	0.6-1.0
Χοληστερόλη	0.2-0.4
Γλυκολιπίδια	0.006
Ελεύθερα λιπαρά οξέα	0.1-0.4

Wertelecki, T.J. and Bodarski, R.K., 2003

Τα χαρακτηριστικά του λίπους του γάλακτος είναι τα εξής:

- Η μεγάλη ποικιλία των λιπαρών οξέων (>250 είδη), τα περισσότερα από τα οποία βρίσκονται σε πολύ μικρές ποσότητες. Κυριαρχούν αυτά με 4-18 αριθμό ατόμων άνθρακα.
- Χαρακτηριστικό του λίπους των μηρυκαστικών είναι η μεγάλη περιεκτικότητα σε μικρού μοριακού βάρους (M.B.) λιπαρά οξέα (14-18% του λίπους). Ιδιαίτερα το βουτυρικό οξύ είναι χαρακτηριστικό του γάλακτος των μηρυκαστικών και δεν υπάρχει σε άλλο φυσικό λίπος, έτσι ο αριθμός σαπωνοποίησης του λίπους του γάλακτος είναι μεγάλος.
- Η αναλογία κορεσμένων λιπαρών οξέων είναι υψηλή, περίπου 63% του λίπους του γάλακτος αποτελείται από κορεσμένα λιπαρά οξέα.
- Το ελαϊκό οξύ είναι το 70% των ακόρεστων λιπαρών οξέων του γάλακτος. Τα άλλα ακόρεστα λιπαρά οξέα διαφέρουν ως προς τον αριθμό ατόμων C, τη θέση και τη διαμόρφωση των διπλών δεσμών (περίπου 5% όλων των δ.δ. είναι trans).
- Τα τριγλυκερίδια του λίπους του γάλακτος υδρολύονται ενζυμικά με αποτέλεσμα την απελευθέρωση ελεύθερων λιπαρών οξέων. Όταν στα ελεύθερα λιπαρά οξέα κυριαρχούν τα μικρού M.B., κυρίως το βουτυρικό και το καπροϊκό, δημιουργούνται δυσάρεστες ταγγές γεύσεις.
- Η κατανομή των λιπαρών οξέων στο μόριο του τριγλυκεριδίου δεν είναι τυχαία αλλά ακολουθεί ένα πρότυπο, π.χ. στη θέση 1 βρίσκονται κυρίως λιπαρά οξέα μεγάλου M.B., ενώ στη θέση 3 βρίσκονται συνήθως μικρού M.B. λιπαρά οξέα (το 97% του βουτυρικού βρίσκεται στη θέση 3) και ακόρεστα λιπαρά οξέα.
- Το πρόβειο και γίδινο γάλα περιέχουν μεγαλύτερη αναλογία λιπαρών οξέων C4:0-C14:0 σε σχέση με το αγελαδινό (Μοάτσου, 2009).
- Περιέχει αυξημένη αναλογία πτητικών λιπαρών οξέων μικρού μοριακού βάρους (C4:0-C14:0), (Ανυφαντάκης, 2004).

Το λίπος του γάλακτος είναι πολύ σημαντικό συστατικό, καθώς:

- Ο πρωταρχικός του ρόλος είναι να αποτελεί πηγή ενέργειας και βασικών δομικών υλών για τις κυτταρικές μεμβράνες των νεογέννητων όλων των θηλαστικών.
- Είναι πηγή απαραίτητων λιπαρών οξέων που δεν μπορούν να συντεθούν από τα ανώτερα ζώα (π.χ. λινελαϊκό οξύ, C18:2) και λιποδιαλυτών βιταμινών (A, D, E, K).
- Διαμορφώνει τα ρεολογικά και τα γευστικά χαρακτηριστικά των γαλακτοκομικών προϊόντων, καθώς είναι το πιο εύγευστο φυσικό λίπος.
- Έχει οικονομική σημασία, αφού είναι ένα από τα κύρια συστατικά και η περιεκτικότητά σ' αυτό καθορίζει την τιμή του γάλακτος (Μοάτσου, Γκ., 2009).

Η υψηλότερη συγκέντρωση του λίπους παρατηρείται στο πρόβειο γάλα, σε αντίθεση με το γάλα των φοράδων. Το αγελαδινό γάλα έχει λιποπεριεκτικότητα 3.2 - 4% (Πίνακας 3).

**Πίνακας 3** Χημική σύσταση γάλακτος γαλακτοπαραγωγών ζώων

Είδος	Νερό(%)	Πρωτεΐνες(%)	Λίπος(%)	Λακτόζη(%)
Αγελάδα	87	3-3.6	3.2-4.4	4.5-4.9
Αίγα	84-87	3.6-4.3	4-7	4.6-5.0
Πρόβατο	80-84	5.2-6.5	4.6-8.3	4.0-4.6
Φοράδα	91	2	1.1-1.6	5.7-6.4
Τάρανδος	68	10.5	17-19	2-2.8

Wertelecki, T.J. and Bodarski, R.K., 2003

### 1.3. Τα λιποσφαίρια

Η λιπαρή φάση του γάλακτος υπάρχει διασκορπισμένη σ' αυτό υπό μορφή μικροσκοπικών σφαιρών που καλούνται **λιποσφαίρια** (fat globule), (Ανυφαντάκης, Ε., Καλαντζόπουλος, Γ., 1993).

#### Μέγεθος-Αριθμός στο γάλα

Το μέγεθος των λιποσφαιρίων γάλακτος (milk fat globule, MFG) αυξάνεται με την αυξανόμενη περιεκτικότητα σε λίπος στο γάλα (Wiking, L., et al, 2004). Ο αριθμός των λιποσφαιρίων είναι περίπου  $10^{10}$  ανά mL με μια συνολική έκταση 700  $\text{cm}^2$  ανά mL γάλακτος (Walstra, P., et al 1999). Το μέγεθος των λιποσφαιρίων έχει σημαντική επιρροή στη σταθερότητα και στις τεχνολογικές ιδιότητες του γάλακτος. Τα λιποσφαίρια του γάλακτος είναι ανθεκτικά στην παγκρεατική λιπόλυση στο λεπτό έντερο (Noble, R.C., 1978).

Το μέγεθος των λιποσφαιρίων εξαρτάται από το είδος του γάλακτος, τη φυλή του ζώου, το στάδιο της γαλακτικής περιόδου και το στάδιο του αρμέγματος (Ανυφαντάκης, Ε., Καλαντζόπουλος, Γ., 1993).

#### - Είδος Γάλακτος

Τα λιποσφαίρια των θηλαστικών παρουσιάζουν αξιοσημείωτες διαφορές στην διάμετρο τους η οποία κυμαίνεται μεταξύ  $<1\mu\text{m}$  και  $18\mu\text{m}$ . Συγκεκριμένα, τα λιποσφαίρια του γαλακτικού λίπους βουβάλου έχουν την μεγαλύτερη διάμετρο ( $8.7\mu\text{m}$ ) σε σύγκριση με τα λιποσφαίρια της αγελάδας ( $3.95\mu\text{m}$ ), προβάτου ( $3.78\mu\text{m}$ ), κατσίκας ( $3.2\mu\text{m}$ ) και καμήλας ( $2.99\mu\text{m}$ ) (Hoda, M. El-Zeini., 2006).

#### - Στάδιο Γαλακτικής Περιόδου

Κατά την διάρκεια της γαλακτικής περιόδου παρουσιάζονται μεταβολές όσον αφορά το μέγεθος και τον αριθμό των λιποσφαιρίων (καθώς η γαλακτική περίοδος προχωρεί τα λιποσφαίρια γίνονται σχετικά μικρότερα και αυξάνεται ο αριθμός τους).

#### - Στάδιο του αρμέγματος

Στην αρχή του αρμέγματος το γάλα περιέχει λιγότερα και μικρότερα λιποσφαίρια από ότι το γάλα που λαμβάνεται κατά το τέλος του. Η σημαντική αύξηση του μεγέθους των λιποσφαιρίων προς το τέλος του αρμέγματος αντανακλά σε μια αυξημένη λιποπεριεκτικότητα του γάλακτος.

#### - Διατροφή Ζώων

Η ξηρά τροφή θεωρείται ότι ευνοεί την παραγωγή μικρών λιποσφαιρίων ενώ οι χυμώδεις τροφές μεγάλων λιποσφαιρίων. Τραυματισμοί, ασθένειες και μεταβολές στις συνθήκες διαβίωσης συνοδεύονται από σημαντική αύξηση του μεγέθους των λιποσφαιρίων.

Χαρακτηριστικό των λιποσφαιρίων είναι ότι συνήθως βρίσκονται στο γάλα, σε συσσωματώματα ανά πολλές εκατοντάδες. Το μέγεθος των λιποσφαιρίων και η τάση που έχουν να δημιουργούν συσσωματώματα παρουσιάζει πρακτικό ενδιαφέρον σε περιπτώσεις μεταφοράς γάλακτος, αποκορυφώσεως, παρασκευής βουτύρου και τυριών (Ανυφαντάκης, Ε., Καλαντζόπουλος, Γ., 1993).

## Σύσταση και Δομή της μεμβράνης των λιποσφαιρίων του γάλακτος

Τα λιποσφαίρια αποτελούνται από έναν ετερογενή πυρήνα τριγλυκεριδίων που περιβάλλεται από ένα πολύ λεπτό στρώμα, πρωτεϊνικής κυρίως φύσεως, που ονομάζεται μεμβράνη των λιποσφαιρίων (Ανυφαντάκης, 2004). Η μάζα της μεμβράνης των λιποσφαιρίων αποτελεί περίπου το 2-6% της μάζας του λιποσφαιρίου (Evers, JM., 2004, Keenan, TW., Mather, IH., 2003. Singh, 2006). Η σύνθεση και η δομή της μεμβράνης των λιποσφαιρίων του γάλακτος (milk fat globule membrane, MFGM) δεν είναι γνωστή λεπτομερώς αλλά κυρίως αποτελείται από πολικά λιπίδια και πρωτεΐνες. Δεδομένου ότι η μεμβράνη των λιποσφαιρίων είναι μια βιολογική μεμβράνη αποτελείται κυρίως από τις πρωτεΐνες, τα φωσφολιπίδια, γλυκοπρωτεΐνες, τα ουδέτερα λιπίδια, τα ένζυμα και άλλα δευτερεύοντα συστατικά (Danthine S. et al., 2000).

Η σύνθεση της μεμβράνης των λιποσφαιρίων μπορεί να ποικίλει ευρέως ανάλογα με πολλούς παράγοντες όπως την λιποπεριεκτικότητα, το μέγεθος τους, την διατροφή, την υγεία και το στάδιο της γαλακτικής περιόδου (Singh, 2006).

### A) Λιπιδική σύσταση της μεμβράνης των λιποσφαιρίων του γάλακτος

Τα ουδέτερα λιπίδια αποτελούν περίπου το 56-80% των συνολικών λιπιδίων της μεμβράνης των λιποσφαιρίων. Τα τριγλυκερίδια αποτελούν το σημαντικότερο μέρος των ουδέτερων λιπιδίων (37-68% των συνολικών λιπιδίων). Τα άλλα ουδέτερα λιπίδια είναι: διγλυκερίδια (9%), μονογλυκερίδια (0.7%), εστέρες (0.1-0.8%) και χοληστερόλη (0.2-6.1%) (% των συνολικών λιπιδίων), (Danthine S. et al., 2000).

Τα πολικά λιπίδια αποτελούνται από τα φωσφολιπίδια και τα σφιγγολιπίδια και αποτελούν περίπου το 15-43% των συνολικών λιπιδίων της μεμβράνης των λιποσφαιρίων (Danthine et al., 2000). Σε μεγάλες ποσότητες απαντούν τα πολικά λιπίδια: φωσφατιδυλοχολίνη (PC), και φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE), (35 και 30% αντίστοιχα).

Σε αντίθεση, τα ακόλουθα ανιονικά φωσφολιπίδια: φωσφατιδυλοinositol (phosphatidylinositol, PI) και φωσφατιδυλοσερίνη (phosphatidylse, CP) βρίσκονται σε χαμηλότερα ποσά στην μεμβράνη (5 και 3% αντίστοιχα), (Dewettinck et al., 2008). Η σφιγγομυελίνη (sphingomyeline, SM) βρίσκεται σε ποσοστό 22%. Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα βρίσκονται επίσης στη μεμβράνη ως δευτερεύοντα συστατικά.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται η λιπιδική σύσταση της μεμβράνης των λιποσφαιρίων του αγελαδινού γάλακτος.

**Πίνακας 4** Σύσταση λιπιδίων της μεμβράνης λιποσφαιρίων αγελαδινού γάλακτος

Είδος Λιπιδίου	% συνολικών λιπιδίων
Τριγλυκερίδια	62
Διγλυκερίδια	9
Μονογλυκερίδια	0-0.5
Στερόλες	0.2-2.0
Εστέρες Στερολών	0.1-0.3
Υδρογονάνδρακες	1.2
Μη εστεροποιημένα Λιπαρά οξέα	0.6-6.0
<b>Φωσφολιπίδια</b>	<b>26-31</b>
Σφιγγομυελίνη	22%
Φωσφατιδυλοχολίνη	36%
Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη	27%
Φωσφατιδυλοινωσιτόλη	11%
Φωσφατιδυλοσερίνη	4%
Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη	2%

Keenan, T W., Mather, I H., 2002

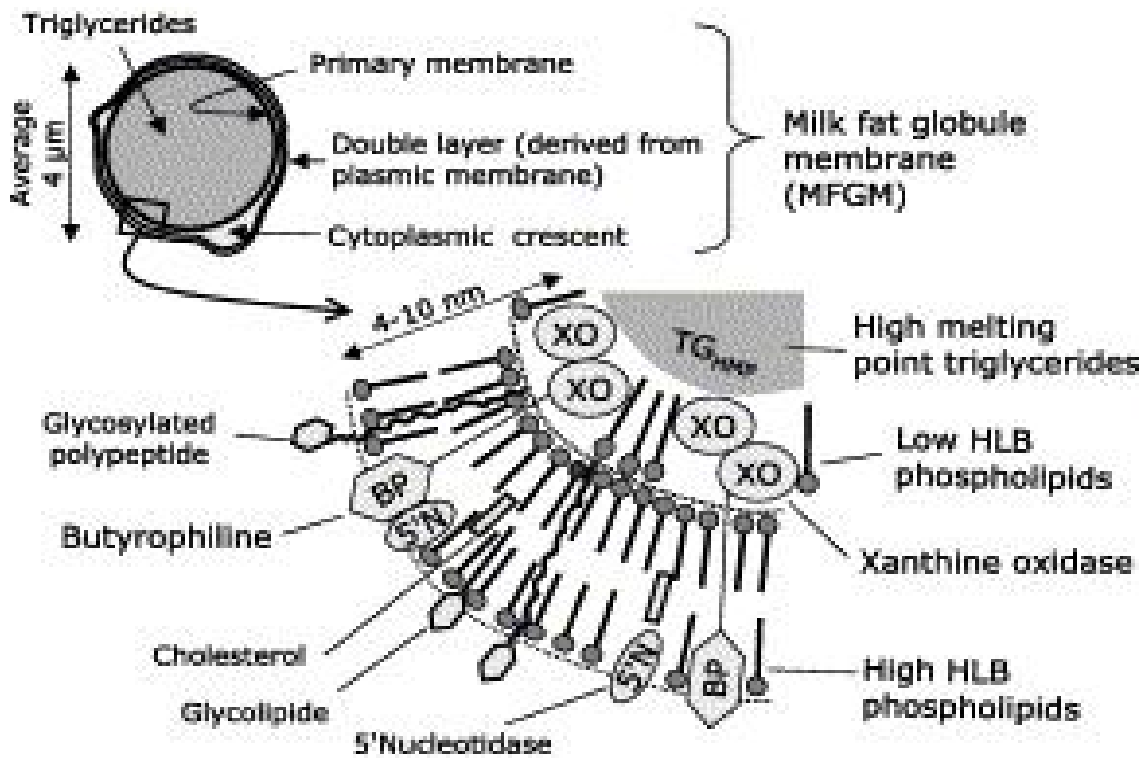
Το κλάσμα των λιπιδίων αποτελεί περίπου το 30% της μάζας του υλικού των μεμβρανών. Το υπόλοιπο 70% της μάζας του υλικού των μεμβρανών είναι πρωτεΐνες, πολλές από τις οποίες είναι ένζυμα (Mather, I H., 2000). Οι πρωτεΐνες της μεμβράνης αντιπροσωπεύουν μόνο το 1-4% της συνολικής πρωτεΐνης γάλακτος.

#### B) Δομή της μεμβράνης των λιποσφαιρίων

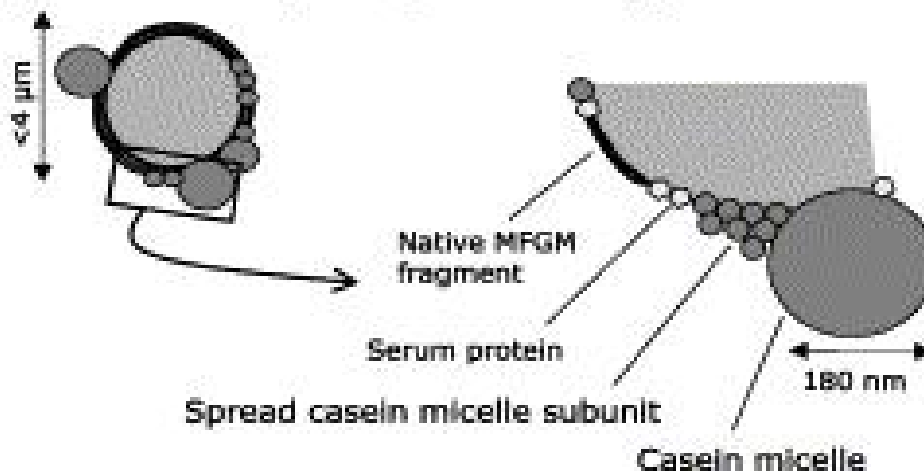
Η δομή της μεμβράνης των λιποσφαιρίων του γάλακτος αντιπροσωπεύεται σχηματικά στο σχήμα 1. Η μεμβράνη αποτελείται από μια δομή τριών στρωμάτων. Στο εσωτερικό στρώμα, οι υδροφοβικές ουρές των πολικών λιπιδίων είναι σε επαφή με τον πυρήνα των τριγλυκεριδίων. Αφετέρου, στο εξωτερικό στρώμα, οι υδρόφιλες ομάδες των ακραίων πολικών λιπιδίων βρίσκονται σε επαφή με την υδάτινη φάση γάλακτος.

Σχετικά με τα λιπίδια, ο Deeth (1997) πρότεινε ότι τα πολικά λιπίδια στην μεμβράνη των λιποσφαιρίων έχουν μια ασύμμετρη κατανομή όπως άλλες βιολογικές μεμβράνες. Η εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης αποτελείται κυρίως από τη φωσφατιδυλοχολίνη (PC) και τη σφιγγομυελίνη (SM), ενώ η εσωτερική επιφάνεια αποτελείται κυρίως από τη φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE), τη φωσφατιδυλοσερίνη (CP) και τη φωσφατιδυλοινωσιτόλη (PI).

**(A) Natural milk fat globule**



**(B) Mechanically disrupted milk fat globule**



**Σχήμα1** Μεμβράνη Λιποσφαιρίου



#### 1.4. Λιπαρά οξέα

Σε ένα μόριο λιπαρού οξέος του γάλακτος υπάρχουν 4-20 άτομα άνθρακα. Στα κατοικίδια ζώα οι λιπαρές ουσίες του γάλακτος που υπερισχύουν είναι τα λιπαρά οξέα: παλμιτικό (C16:0), ελαϊκό (C18:1), μυριστικό (C14:0), και σε μικρότερη συγκέντρωση το καπρικό οξύ (C:10), (στα μικρά μηρυκαστικά). Από τα ακόρεστα λιπαρά οξέα, το λινελαϊκό (C18:2) και το λινολενικό (C18:3), έχουν σημαντική θέση στις λιπαρές ουσίες γάλακτος, αλλά η αναλογία μεταξύ αυτών των οξέων εξαρτάται από τη διατροφή των ζώων (Wertelecki, T.J. and Bodarski, R.K., 2003), (Πίνακας 5).

**Πίνακας 5** Κυριότερα λιπαρά οξέα του λίπους διαφόρων γαλακτοπαραγωγών ζώων

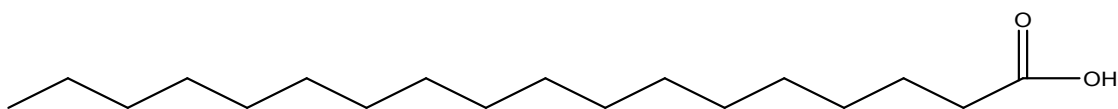
Λιπαρά Οξέα	Αγελάδα	Πρόβατο	Αίγα	(mol%)
<b>Μικρής-Αλύσου</b>				
C4:0 (Βουτυρικό)	11	8	8	
C6:0 (Καπροϊκό)	5	5	5	
C8:0 (Καπριλικό)	1	4	4	
C10:0 (Καπρικό)	3	6	13	
<b>Μεσαίας-Αλύσου</b>				
C12:0 (Λαουρικό)	3	5	7	
C14:0 (Μυριστικό)	10	10	1	
C16:0 (Παλμιτικό)	23	22	24	
<b>Μακρίας-Αλύσου</b>				
C18:0 (Στεατικό)	10	10	12	
C18:1 (Ελαϊκό)	29	22	17	
C18:2 (Λινελαϊκό)	2	4	3	
C18:3 (Λινολενικό)	<1	<1	<1	

Wertelecki, T.J. and Bodarski, R.K., 2003

### 1.4.1. Κορεσμένα λιπαρά οξέα

Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα που είναι παρόντα σε σημαντικές ποσότητες στο γαλακτικό λίπος είναι μόρια με μη-κυκλικές αλυσίδες υδρογονανθράκων, οι οποίες ποικίλλουν στο μήκος από 4 έως 18 άτομα άνθρακα (σχήμα 2), (Πίνακας 6). Αυτά τα λιπαρά οξέα αποτελούν περίπου το 70% με 75% των συνολικών λιπαρών οξέων.

Το σημαντικότερο λιπαρό οξύ από ποσοτική άποψη είναι το παλμιτικό οξύ (C16:0) που αποτελεί περίπου το 25% με 30% των συνολικών λιπαρών οξέων, ενώ δύο άλλα λιπαρά οξέα, το μυριστικό (14:0) και το στεατικό (18:0) αποτελούν περίπου το 10% με 13% των συνολικών λιπαρών οξέων (MacGibbon, A.H.K., Taylor, M.W. 2006). Από τα κορεσμένα λιπαρά οξέα, περίπου το 11% είναι μικρής αλύσου (short-chain) λιπαρά οξέα (C4:0–C10:0). Τα ποσά του βουτυρικού (4:0) και καπροϊκού οξέος (6:0) αποτελούν το 2-5% και 1-5% των συνολικών λιπαρών οξέων, αντίστοιχα (Πίνακας 6). Αυτά τα ποσά είναι υψηλότερα όταν εκφράζονται οι αναλογίες τους ως μοριακά ποσοστά, περίπου 10% και 5%, αντίστοιχα (MacGibbon, A.H.K., Taylor, M.W. 2006), (Πίνακας 5).



**Σχήμα 2** Κορεσμένο Λιπαρό Οξύ

Τα μικρής-αλύσου (Short-chain) και μεσαίας-αλύσου (medium-chain) λιπαρά οξέα, αντίθετα από τα μακράς-αλύσου (long-chain) λιπαρά οξέα, απορροφώνται όπως τα μη-εστεροποιημένα λιπαρά οξέα στην κυκλοφορία του αίματος και μεταβολίζονται γρήγορα στο συκώτι (Noble, 1978).

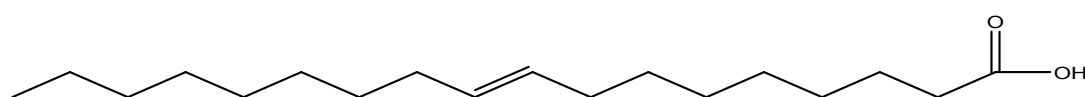
**Πίνακας 6** Κυριότερα κορεσμένα λιπαρά οξέα στο λίπος του γάλακτος

Λιπαρά Οξέα	(wt%)
4:0 Βουτυρικό	2–5
6:0 Καπροϊκό	1–5
8:0 Καπρυλικό	1–3
10:0 Καπρικό	2–4
12:0 Λαουρικό	2–5
14:0 Μυριστικό	8–14
15:0 Πενταδεκανοϊκό	1–2
16:0 Παλμιτικό	22–35
17:0 Μαργαρικό	0.5–1.5
18:0 Στεατικό	9–14

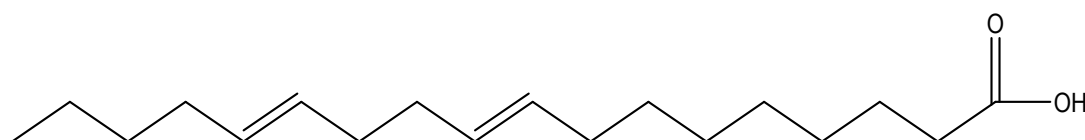
Kaylegian-Lindsay, 1995

### 1.4.2. Ακόρεστα λιπαρά οξέα

Περίπου το 25% των λιπαρών οξέων του γαλακτικού λίπους είναι **μόνο-ακόρεστα**, όπου το ελαϊκό οξύ (9c-18:1) αποτελεί το μεγαλύτερο ποσοστό των συνολικών ακόρεστων λιπαρών οξέων. Τα **πολυακόρεστα** λιπαρά οξέα αποτελούν περίπου το 2-4% των συνολικών λιπαρών οξέων και τα κύρια πολυακόρεστα λιπαρά οξέα είναι το λινελαϊκό (18:2) και το α-λινολενικό οξύ (18:3) που αποτελούν περίπου το 1-3% και 0,5-2% των συνολικών λιπαρών οξέων, αντίστοιχα.



Μόνο-ακόρεστο



Πολύ-ακόρεστο

**Σχήμα 3** Ακόρεστα Λιπαρά Οξέα

#### 1.4.2.1. Cis-Ακόρεστα λιπαρά οξέα

Το περιεχόμενο των cis-μονοενικών οξέων στο γαλακτικό λίπος είναι περίπου 18 έως 24%. Το ελαϊκό οξύ (9c-18:1) είναι το κυρίαρχο cis-μονοακόρεστο λιπαρό οξύ, σε ποσοστό 15-21% του συνόλου. Υπάρχει ένα μικρό ποσοστό 0.5% ενός cis-μονοακόρεστου λιπαρού οξέος (11c-18:1n9), ενώ τα ποσοστά άλλων ισομερών (cis-18:1) είναι μικρά. Επίσης, υπάρχει σχετικά μικρή, αλλά σημαντική συνεισφορά από άλλα cis-μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, όπως το μυριστελαϊκό C14:1 (περίπου 1.0%) και το παλμιτοελαϊκό C16:1 (περίπου 1.5%), (MacGibbon, A.H.K., Taylor, M.W. 2006).

Τα cis-πολυενικά οξέα είναι παρόντα σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις στο γαλακτικό λίπος. Αυτά τα οξέα αποτελούνται σχεδόν αποκλειστικά από το **λινελαϊκό οξύ** (9c,12c-18:2n6) και το **α-λινολενικό οξύ (ALA)**, (9c, 12c, 15c-18:3n3). Αυτά τα δύο λιπαρά οξέα είναι **«απαραίτητα»** λιπαρά οξέα τα οποία δεν μπορούν να συντεθούν μέσα στο σώμα και πρέπει να ληφθούν από τη διατροφή. Τα τελευταία χρόνια, η χρήση του όρου «απαραίτητα» έχει επεκταθεί για να συμπεριλάβει τα παράγωγα αυτών των λιπαρών οξέων, τα οποία δεν είναι συντεθειμένα σε σημαντικές ποσότητες π.χ. εικοσαπενταενοϊκό οξύ C20:5. Το α-λινολενικό οξύ εμφανίζεται σε υψηλότερη συγκέντρωση στο γαλακτικό λίπος, όταν η διατροφή των ζώων στηρίζεται στην ελεύθερη βόσκηση στο λιβάδι από ότι στο λίπος που προέρχεται από ζώα που τρέφονται με ξηρά νομή (Hebeisen et al., 1993; WolV et al.,1995).

#### 1.4.2.2. Trans–Ακόρεστα λιπαρά οξέα

Η παρουσία των trans-οκταδεκαενικών οξέων στο γαλακτικό λίπος είναι το αποτέλεσμα της ελλιπούς βιουδρογόνωσης των ακόρεστων λιπιδίων στο στομάχι των μηρυκαστικών. Αυτά τα λιπαρά οξέα έχουν προσελκύσει την προσοχή, λόγω των δυσμενών αποτελεσμάτων τους στην υγεία. Κλινικές δοκιμές έχουν δείξει ότι τα trans-οκταδεκαενικά οξέα, σχετικά με τα cis ισομερές, μπορούν να αυξήσουν την LDL-χοληστερόλη και να μειώσουν την HDL-χοληστερόλη, προκαλώντας δυσμενές αποτέλεσμα στην αναλογία LDL:HDL (Mensink και Katan, 1993).

Περίπου το 2,7% λιπαρών οξέων στο γάλα είναι trans λιπαρά οξέα με έναν ή περισσότερους trans-διπλούς δεσμούς (Precht, D., Molkentin, J. 1995). Το βασσενικό οξύ (Vaccenic acid), 11t-18:1, είναι το σημαντικότερο trans ισομερές με τιμές που κυμαίνονται περίπου από 30 ως 60% του συνόλου των trans-18:1 ισομερών.

Οι Precht και Molkentin (1997) προσδιόρισαν μερικά trans-οκταδεκαδιενικά οξέα στο λίπος, που περιέχουν έναν ή δύο trans διπλούς δεσμούς. Τα περισσότερα από αυτά τα οξέα βρίσκονται σε μικρή συγκέντρωση στο λίπος, και μόνο τα οξέα 11t,15c-18:2 (0.33%) και 9c,11t-18:2 (0.85%) έχουν μέση συγκέντρωση πάνω από 0.30%.

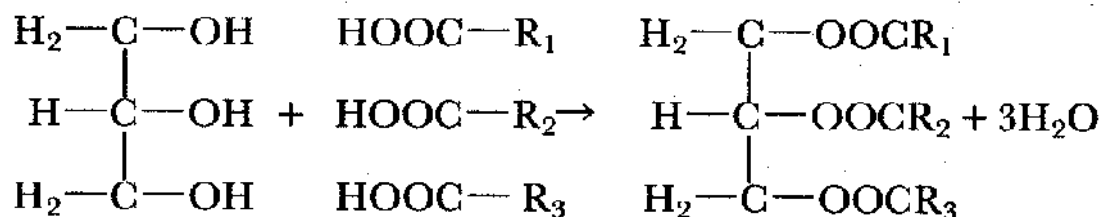
Το λίπος γάλακτος περιέχει **συζευγμένο λινελαϊκό οξύ** (conjugated linoleic acids, **CLA**), με πολλά διαφορετικά ισομερή. Το 9c,11t-18:2 (rumenic acid) είναι το κύριο ισομερές του συζευγμένου λινελαϊκού οξέος (CLA), αποτελώντας περίπου το 75-90% του συνολικού CLA (Parodi, 1977; Precht, D., Molkentin, J. 1995).

Ο όρος CLA αναφέρεται σε ένα μίγμα ισομερών (γεωμετρίας και θέσεως) του trans-οκταδεκαδιενικού οξέος με συζευγμένους τους δύο διπλούς δεσμούς (π.χ., 10t, 12c-18:2, 10t,12t-18:2). Το περιεχόμενο σε CLA του γαλακτικού λίπους προέρχεται από δύο πηγές. Κατ' αρχάς, το ισομερές 9c,11t-18:2 είναι ένα ενδιάμεσο προϊόν της βιουδρογόνωσης των λιπαρών οξέων στο στομάχι. Επιπλέον, το 11t-18:1 (Vaccenic acid) μπορεί να μετατραπεί σε 9c,11t-18:2 στο μαστικό αδένα από τη δράση του ενζύμου stearoyl-CoA desaturase (SCD), (Bauman, DE., Lock, AL. 2006). Μελέτες έχουν επιβεβαιώσει τη βιομετατροπή του βασσενικού οξέος (VA) σε CLA (Mosley et al., 2006; Turpeinen et al., 2002). Το γάλα, τα γαλακτοκομικά προϊόντα και το βοοειδές κρέας αποτελούν τις κύριες πηγές του 9c,11t-18:2 (rumenic acid) (Wahle, KW., Heys, SD., Rotondo, D. 2004).

Γενικά, η συγκέντρωση του CLA στο γάλα είναι υψηλότερη σε ζώα που διατρέφονται με χλωρά νομή ή βόσκουν ελεύθερα στα βοσκοτόπια, σε σχέση με εκείνα που διατρέφονται με ξηρά νομή.

## 1.5. Τριγλυκερίδια

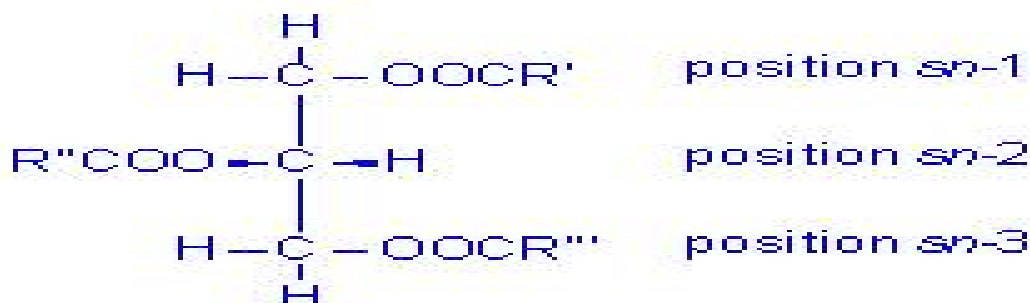
Τα τριγλυκερίδια, από ποσοτική άποψη, είναι η σημαντικότερη κατηγορία ενώσεων που ανήκουν στο λίπος γάλακτος, διότι αποτελούν το 98% του συνολικού λίπους. Τα τριγλυκερίδια είναι σχετικά απλά, μη πολικά μόρια, αποτελούμενα από τη γλυκερίνη (ως σκελετό) στην οποία είναι εστεροποιημένα τρία μόρια λιπαρού οξέος (MacGibbon, A.H.K., Taylor, M.W. 2002) (σχήμα 4).



Γλυκερόλη + Λιπαρό οξύ → Τριγλυκερίδιο (λίπος) + νερό

**Σχήμα 4** Δομή Τριγλυκεριδίου

Τα λιπαρά οξέα δεν εστεροποιούνται με τυχαίο τρόπο στις τρεις θέσεις των μορίων των τριγλυκεριδίων (MacGibbon, A.H.K., Taylor, M.W. 2006). Τα μικρής-αλύσου (short-chain) λιπαρά οξέα (βουτυρικό και καπροϊκό) εστεροποιούνται σχεδόν εξ'ολοκλήρου στη θέση *sn*-3. Τα λιπαρά οξέα (C8:0–C14:0) καθώς επίσης και το C16:0 εστεροποιείται κατά προτίμηση στις θέσεις *sn*-1 και *sn*-2. Το στεατικό οξύ (C18:0) τοποθετείται επιλεκτικά στη θέση *sn*-1, ενώ το ελαϊκό (C18:1) παρουσιάζει προτίμηση για τις θέσεις *sn*-1 και *sn*-3 (MacGibbon, A.H.K., Taylor, M.W. 2002) (σχήμα 5).



**Σχήμα 5** Απεικόνιση Τριγλυκεριδίων με το σύστημα στερεοειδικής αρίθμησης (*sn*)

Ο παρακάτω πίνακας παρουσιάζει τα λιπαρά οξέα σε κάθε θέση του τριγλυκεριδίου στο γάλα διάφορων γαλακτοπαραγωγών ζώων.

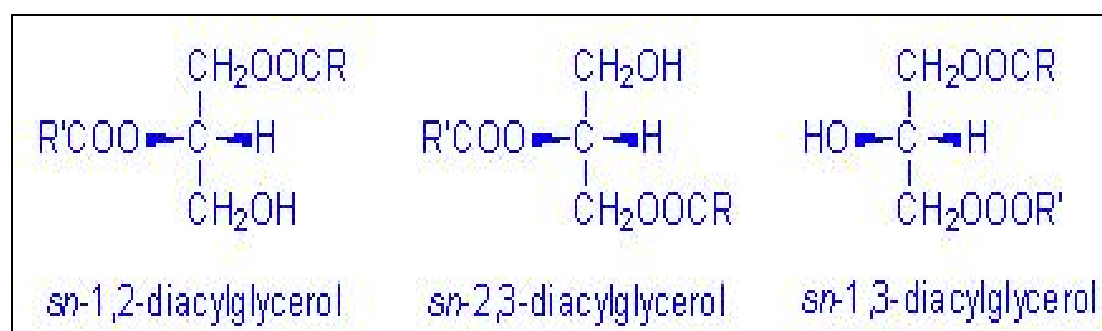
**Πίνακας 7** Κατανομή λιπαρών οξέων (εστεροποιημένα) στο μόριο του τριγλυκεριδίου γαλακτοπαραγωγών ζώων

	Σύσταση λιπαρών οξέων (mol% συνολικών λιπαρών οξέων)									
	Αγέλαδα			Πρόβατο			Αίγα			
	sn-1	sn-2	sn-3	sn-1	sn-2	sn-3	sn-1	sn-2	sn-3	
C4:0		0.4	30.6			10.8			13.2	
C6:0		0.7	13.8			10.4			10.6	
C8:0	0.3	3.5	4.2	0.3	2.0	4.4	1.7	1.2	4.6	
C10:0	1.4	8.1	7.5	1.4	5.2	10.3	3.3	6.9	12.2	
C12:0	3.5	9.5	4.5	2.2	4.7	3.5	4.0	4.6	1.2	
C14:0	13.1	25.6	6.9	8.2	17.6	5.3	8.4	20.3	2.7	
C16:0	43.8	38.9	9.3	38.0	23.8	2.5	43.6	33.9	3.4	
C18:0	17.6	4.6	6.0	19.1	12.6	9.1	15.3	6.3	7.7	
C18:1	19.7	8.4	17.1	18.7	19.3	27.2	16.1	16.1	30.2	
C18:2					2.7	4.2	6.0	0.3	2.5	4.5
C18:3					2.2	1.7	4.4			

Cow, (Parodi, 1979); Sheep and Goat, (Kuksis et al., 1973)

## 1.6. Διγλυκερίδια

Οι διακυλογλυκερόλες ή διγλυκερίδια (DG) αποτελούν ένα μικρό ποσοστό από τα συστατικά του λίπους στα τρόφιμα, καθώς και σε άλλους ιστούς (Πίνακας 3). Στο γαλακτικό λίπος απαντώνται δύο κατηγορίες διγλυκεριδίων: τα 1,2 διγλυκερίδια (1,2-DG) και τα 1,3 διγλυκερίδια (1,3-DG).



**Σχήμα 6** Απεικόνιση Διγλυκεριδίων με το σύστημα στερεοειδικής αριθμησης (sn)

## 1.7. Στερόλες

Οι στερόλες είναι δευτερεύοντα συστατικά των λιπιδίων του γάλακτος, και αποτελούν το 0.2-0.4% του συνολικού λίπους (πίνακας 1). Το γάλα περιέχει 10 έως 20 mg χοληστερόλης/dl γάλακτος ή 308 έως 606 mg χοληστερόλης/100g λίπους του πλήρες γάλακτος με λιποπεριεκτικότητα 3.3% (Jensen and Newberg, 1995). Η ποσότητα της χοληστερόλης συσχετίζεται θετικά με την λιποπεριεκτικότητα του γαλακτοκομικού προϊόντος όπως παρουσιάζεται στον πίνακα 8 (USDA, Nutrient Database 1999).

Η χοληστερόλη είναι η σημαντικότερη στερόλη, αποτελεί το 95% του συνόλου των στερολών, και βρίσκεται συνήθως στην μεμβράνη των λιποσφαιρίων (Jensen and Newberg, 1995). Μερικές από τις στερόλες είναι συνδεδεμένες στη β-λακτογλοβουλίνη (Wang et al., 1997). Περίπου το 10% της χοληστερόλης βρίσκεται εστεροποιημένη. Μικρές ποσότητες άλλων στερολών έχουν ανιχνευθεί στο γαλακτικό λίπος, π.χ. 7-διϋδροχοληστερόλης (IDF, 1992), η καμφοστερόλη, η στιγμαστερόλη και η β-σιτοστερόλη (Mincione et al., 1977).

**Πίνακας 8** Συγκέντρωση χοληστερόλης σε γαλακτοκομικά προϊόντα

Είδος Προϊόντος	% Λιπαρά	Χοληστερόλη(mg/100g)
Skim milk	0.25	2
Whole milk	3.34	14
Light cream	19.31	66
Medium cream	25.00	88
Cottage cheese	4.51	15
Cream cheese	34.87	110
Cheddar	33.14	105
Mozarella, whole milk	21.60	78
Butter	81.11	219

Jensen and Newberg (1995); USDA Nutrient Data Base (1999)

## **Κεφάλαιο 2**

### **Γαλακτοκομικά προϊόντα χαμηλής και μειωμένης λιποπεριεκτικότητας**

#### **2.1. Εισαγωγή**

Η μεγάλη κατανάλωση λίπους από τον άνθρωπο έχει συνδεθεί με αυξημένο κίνδυνο παχυσαρκίας, αθηροσκλήρωση, στεφανιαία νόσο, αυξημένη αρτηριακή πίεση και ορισμένες μορφές καρκίνου (Κατσιαρή Μ. & Βουτσινάς Λ., 2002).

Το τυρί έχει συνήθως αυξημένη λιποπεριεκτικότητα, πολλές θερμίδες και λίπος με μεγάλη αναλογία κορεσμένων λιπαρών οξέων και χοληστερόλη. Τούτο σημαίνει ότι από την άποψη αυτή δεν είναι ότι καλύτερο για την διατροφή ατόμων παχύσαρκων και με αυξημένη χοληστερόλη αίματος (Ανυφαντάκης, 2004).

Έτσι προέκυψε η ανάγκη να παράγονται τυριά με χαμηλή περιεκτικότητα σε λίπος και κατ' ακολουθία και σε θερμιδική αξία. Τα τρόφιμα αυτά καθιερώθηκαν διεθνώς με το χαρακτηρισμό «light» αν και ο χαρακτηρισμός αυτός αναφέρεται σε τρόφιμα με χαμηλή περιεκτικότητα σ' ένα ή περισσότερα χαρακτηριστικά όπως λίπος, χοληστερίνη, αλάτι, πρόσθετες ουσίες κλπ ή άλλα χαρακτηριστικά όπως θερμίδες, χρώμα.

Τα τελευταία χρόνια, το ενδιαφέρον των καταναλωτών για τα γαλακτοκομικά προϊόντα με χαμηλή λιποπεριεκτικότητα είναι έντονα. Για να ικανοποιηθεί πλήρως η νέα αυτή απαίτηση του καταναλωτικού κοινού, πανεπιστήμια, ερευνητικά ιδρύματα και βιομηχανίες κατέβαλαν πολυάριθμες προσπάθειες για τη δημιουργία μιας νέας σειράς προϊόντων, με λιποπεριεκτικότητα μειωμένη σε διάφορα επίπεδα (Κατσιαρή Μ. & Βουτσινάς Λ., 2002).

Τα τυριά έχουν ένα αρκετά μεγάλο ποσοστό λίπους, το οποίο κυμαίνεται από 20% έως 70% επί ξηρής ουσίας. Η παραγωγή τυριών με χαμηλή λιποπεριεκτικότητα σε λίπος ή και χωρίς λίπος παρουσιάζει σημαντικά προβλήματα διότι τα παραγόμενα προϊόντα δεν έχουν τα απαραίτητα οργανοληπτικά συστατικά για να είναι αποδεκτά από τον καταναλωτή. Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τις αναλογίες των κύριων συστατικών του τυριού (πρωτεΐνη, λίπος, νερό), την τεχνολογία παραγωγής και τις συνθήκες ωρίμανσης και διατήρησης του.



## 2.2. Νομοθεσία

Τα γαλακτοκομικά προϊόντα μειωμένης λιποπεριεκτικότητας αποτελούν την εξέλιξη των τελευταίων δεκαετιών. Αφορούν, κατά κύριο λόγο, τους κατοίκους των αναπτυγμένων χωρών που έχουν την οικονομική δυνατότητα αλλά και ανάγκη, ως εκ του τρόπου ζωής τους, να ασχολούνται με δίαιτες και υγιεινή διατροφή. Σε πολλές χώρες έχει διαμορφωθεί ήδη το απαραίτητο νομικό πλαίσιο για την παραγωγή και τον έλεγχο των προϊόντων αυτών, ενώ σε άλλες η προσπάθεια αυτή βρίσκεται σε εξέλιξη (Ανυφαντάκης, 2004).

Επειδή τα τρόφιμα με μικρότερη του συνήθους περιεκτικότητα σε λίπος είναι πλέον διαδεδομένα, η νομοθεσία των διαφόρων χωρών καθόρισε τις λεπτομέρειες των χαρακτηριστικών τους.

Η αρμόδια επιτροπή της Ευρωπαϊκής Ένωσης προσδίδει τους εξής ορισμούς στους διατροφικούς ισχυρισμούς που αφορούν το λίπος (REGULATION (EC) No 1924/2006 ; GUIDANCE ON THE IMPLEMENTATION OF REGULATION N° 1924/2006):

A) Ως τρόφιμα **“μειωμένου λίπους” (reduced fat)** χαρακτηρίζονται εκείνα όπου το λίπος έχει υποστεί μια μείωση τουλάχιστον 30% σε σχέση με το συνολικό λίπος του αντίστοιχου προϊόντος πλήρους λιποπεριεκτικότητας.

B) Ως τρόφιμα **“Light”** χαρακτηρίζονται εκείνα όπου το λίπος έχει υποστεί μια μείωση τουλάχιστον 30% σε σχέση με το συνολικό λίπος του αντίστοιχου προϊόντος πλήρους λιποπεριεκτικότητας, με αναφορά σε ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του τροφίμου π.χ. θερμίδες, λίπος κ.λ.π.

Γ) Ο όρος **τρόφιμα “χαμηλού λίπους” (low fat)** χαρακτηρίζει τα τρόφιμα τα οποία περιέχουν λίπος όχι περισσότερο από 3%.

Δ) Ο όρος τρόφιμα **“χωρίς λίπος” (fat-free)** χαρακτηρίζει τα τρόφιμα τα οποία περιέχουν λίπος όχι περισσότερο από 0,5 g / 100 g.

Η νομοθεσία των ΗΠΑ, χρησιμοποιεί τους εξής ορισμούς στους ισχυρισμούς που αφορούν το λίπος (NDC, 2009):

A) Ο όρος **τρόφιμα “χαμηλού λίπους” (low fat)** χαρακτηρίζει τα τρόφιμα τα οποία περιέχουν λίπος μέχρι 3g ανά μερίδα αναφοράς (η οποία είναι η συνήθης ποσότητα που καταναλώνεται και αντιστοιχεί σε πάνω από 30g). Όταν το μέγεθος της μερίδας αναφοράς είναι  $\leq 30g$  τότε το τρόφιμο μπορεί να οριστεί ως χαμηλού λίπους εφόσον έχει μέχρι 3g λίπος στα 50g τροφίμου.

B) Ως τρόφιμα **“μειωμένου λίπους” (reduced fat)** χαρακτηρίζονται εκείνα όπου το λίπος έχει υποστεί μια μείωση τουλάχιστον 25% σε σχέση με το συνολικό λίπος του αντίστοιχου προϊόντος πλήρους λιποπεριεκτικότητας. Ο ισχυρισμός δεν μπορεί να γίνει για τα τρόφιμα που χαρακτηρίζονται ως τρόφιμα **“χαμηλού λίπους”**.

Γ) Ως τρόφιμα **“light for fat or calories”** ορίζονται εκείνα τα τρόφιμα όπου εάν λιγότερο του 50% των θερμίδων τους προέρχεται από το λίπος, η περιεκτικότητα σε λίπος πρέπει να μειωθεί τουλάχιστον κατά 1/3 ανά μερίδα αναφοράς σε σχέση με αντίστοιχα συγκρίσιμα τρόφιμα. Ο ισχυρισμός δεν μπορεί να γίνει εάν τα τρόφιμα σύγκρισης ορίζονται ως τρόφιμα χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά “low fat” ή λίγων θερμίδων “low calorie”.

Εάν το 50% ή περισσότερο των θερμίδων τους προέρχεται από το λίπος, η περιεκτικότητα σε λίπος πρέπει να μειωθεί κατά 50% ή περισσότερο ανά μερίδα αναφοράς έναντι κατάλληλων τροφίμων σύγκρισης. Ο ισχυρισμός δεν μπορεί να γίνει εάν τα τρόφιμα σύγκρισης ορίζονται ως τρόφιμα χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά “low fat” ή λίγων θερμίδων “low calorie”.

Ο Codex Alimentarius ορίζει ως "ισχυρισμό" στις γενικές οδηγίες (CAL/GL 1-1979 (Rev. 1-1991)):

“Οποιαδήποτε αντιπροσώπευση που δηλώνει, προτείνει ή υπονοεί ότι τα τρόφιμα έχουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά σχετικά με την προέλευση, τις θρεπτικές ιδιότητες, την φύση, την παραγωγή, την επεξεργασία, την σύνθεση, ή οποιαδήποτε άλλη ποιότητα” (SANCO/1341/2001). Σύμφωνα με τον Codex Alimentarius ισχύουν τα ακόλουθα:

A) Ο όρος **τρόφιμα “χαμηλού λίπους” (low fat)** χαρακτηρίζει τα τρόφιμα τα οποία περιέχουν λίπος όχι περισσότερο από 3g/100g τροφίμου.

B) Ως τρόφιμα **“μειωμένου λίπους” (reduced fat)** χαρακτηρίζονται εκείνα όπου το λίπος έχει υποστεί μια μείωση τουλάχιστον 25% σε σχέση με το συνολικό λίπος του αντίστοιχου προϊόντος πλήρους λιποπεριεκτικότητας.

Η λιποπεριεκτικότητα του γάλακτος θα δηλωθεί με έναν τρόπο που είναι αποδεκτός στη χώρα πώλησης του τελικού καταναλωτή, είτε (i) ως ποσοστό από τη μάζα του προϊόντος, (ii) ως ποσοστό του λίπους σε ξηρή ουσία (Πίνακας 8), είτε (iii) σε γραμμάρια ανά μερίδα αναφοράς όπως ποσολογείται στην ετικέτα υπό τον όρο ότι η μερίδα αναφοράς δηλώνεται (CODEX STAN 283-1978).

### Πίνακας 9 Λιποπεριεκτικότητα εκφρασμένη επί % της ξηρής ουσίας

<b>Υψηλής Λιποπεριεκτικότητας:</b> Εάν το λίπος επί ξηρού είναι $\geq 60\%$
<b>Πλήρους:</b> Εάν το λίπος επί ξηρού είναι $\geq 45\%$ και $< 60\%$
<b>Μέσης:</b> Εάν το λίπος επί ξηρού είναι $\geq 25\%$ και $< 45\%$
<b>Μερικώς αποκορυφωμένο:</b> Εάν το λίπος επί ξηρού είναι $\geq 10\%$ και $< 25\%$
<b>Άπαχο:</b> Εάν το λίπος επί ξηρού είναι $< 10\%$

Σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών της Ελλάδος, δίνονται οι ακόλουθοι ορισμοί για τα είδη γάλακτος (Κεφάλαιο ΙΧ, άρθρο 80):

«**Γάλα Αποβουτυρωμένο**» χαρακτηρίζεται το προϊόν που απομένει από το νωπό γάλα, μετά την αφαίρεση του λίπους από αυτό με μηχανική κατεργασία και χωρίς καμία προσθήκη. Αυτό πρέπει να περιέχει λίπος σε ποσοστό 0,5% (ανώτατο όριο).

«**Γάλα Ημιαποβουτυρωμένο**» χαρακτηρίζεται το προϊόν που απομένει από το νωπό γάλα μετά την αφαίρεση, όπως πιο πάνω, μέρους από το λίπος του, χωρίς οποιαδήποτε προσθήκη, το οποίο πρέπει να περιέχει λίπος σε ποσοστό 1,5-1,8%.

«**Γάλα μερικώς αποβουτυρωμένο**» χαρακτηρίζεται το προϊόν του οποίου η λιποπεριεκτικότητα είναι ανώτερη από 1,8% και κατώτερη του 3,5% και αναγράφεται υποχρεωτικά στη συσκευασία.

Σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών, η λιποπεριεκτικότητα επί ξηρής ουσίας των τυριών που χαρακτηρίζονται ως «**μερικώς αποβουτυρωμένα**» είναι περίπου η μισή από εκείνη των τυριών πλήρους λιποπεριεκτικότητας ενώ για την υγρασία προβλέπεται να είναι ίδια είτε ελαφρώς αυξημένη, πάντως δυσανάλογη με τη μείωση του λίπους (Κεφάλαιο ΙΧ, άρθρο 83).

Τα τυριά με μειωμένο ή και χωρίς λίπος μπορούν να χαρακτηριστούν ως «**διαιτητικά**» ή «**διαίτης**» (Κεφάλαιο 1, άρθρο 6). Επιτρέπεται η δήλωση ή διαφήμιση τροφίμου «**με μειωμένες θερμίδες**» μόνον εφόσον, οι περιεχόμενες θερμίδες του είναι ελλατωμένες τουλάχιστον κατά 30% σε σύγκριση με το αρχικό, το τυπικό τρόφιμο ή με παρεμφερές προϊόν (Κεφάλαιο 1, άρθρο 10). Στις διατάξεις της παραγράφου αυτής είναι δυνατόν να υπαχθούν κατηγορίες προϊόντων, για τα οποία χαρακτηρισμοί όπως «light», «ελαφρύ», «lite», «slim» ή αποτελούν μέρος της ονομασίας τους, ή μέρος του εμπορικού σήματος μιας ομάδας προϊόντων.

Ο Κώδικας Τροφίμων και Ποτών ορίζει ως «**ανακατεργασμένα** (processed cheese) ή **τηγμένα τυριά**» και «**ανακατεργασμένα με αλοιφώδη υφή** (spreadable processed cheese) ή **τηγμένα με αλοιφώδη υφή**» τα προϊόντα που παρασκευάζονται με άλεση, ανάμιξη, τήξη και γαλακτοματοποίηση διαφόρων τυριών με θέρμανση και προσθήκη γαλακτοματοποιητών και με ή χωρίς την προσθήκη προϊόντων γάλακτος και άλλων τροφίμων (Κεφάλαιο ΙΧ, άρθρο 83).

### **2.3. Προβλήματα γαλακτοκομικών προϊόντων με μειωμένη και χαμηλή λιποπεριεκτικότητα**

Το λίπος και η υγρασία, είναι τα βασικά συστατικά τα οποία χαρακτηρίζουν την ποιότητα ενός τυριού. Το λίπος επηρεάζει τη γεύση, το άρωμα, τις μηχανικές ιδιότητες και την εμφάνιση τους (Ανυφαντάκης, 2004).

#### **2.3.1. Χαρακτηριστικά γεύσης και αρώματος**

Το γαλακτικό λίπος αναγνωρίζεται ως ένα πολύ σημαντικό συστατικό, το οποίο επηρεάζει τη γεύση και το άρωμα του τυριού.

##### Έλλειψη αρώματος

Ένας μηχανισμός με τον οποίο το λίπος συνεισφέρει στη γεύση-άρωμα είναι η αποικοδόμηση των τριγλυκεριδίων του λίπους. Ανάλογα με το είδος του τυριού, τα προϊόντα αποικοδόμησης των τριγλυκεριδίων του λίπους και ιδίως ορισμένα λιπαρά οξέα, επηρεάζουν και συνεισφέρουν σημαντικά στα χαρακτηριστικά της γεύσης-αρώματος. Η έλλειψη αρώματος σε τυριά χαμηλής λιποπεριεκτικότητας δεν πρέπει να συνδέεται μόνο με την απουσία επαρκών λιπαρών οξέων διότι με την προσθήκη λιπασών μπορούν και σ' αυτά τα τυριά να σχηματισθούν τα επιθυμητά λιπαρά οξέα, χωρίς να αναπτυχθεί το άρωμα και η γεύση του κανονικού τυριού. Το πρόβλημα έγκειται στην έλλειψη αρκετής επιφάνειας επαφής λίπους-πρωτεϊνών αλλά και στην ανεπαρκή συνολική επιφάνεια της λιπαρής ουσίας (Ανυφαντάκης, 2004 ; Βάμβακας, Κ. & Ζερφυρίδης, Γρ., 2002).

Ένας άλλος μηχανισμός με τον οποίο το λίπος συνεισφέρει στη γεύση-άρωμα οφείλεται στην ικανότητα του να διατηρεί τις αρωματικές ενώσεις. Τα λιποσφαίρια λειτουργούν ως αποθήκες αρωματικών ουσιών που παράγονται από τη διάσπαση του λίπους και των πρωτεϊνών των τυριών κατά την ωρίμαση τους, τις οποίες διατηρούν και απελευθερώνουν κατά την κατανάλωση τους. Τυριά με μικρή λιποπεριεκτικότητα περιέχουν λιγότερα λιποσφαίρια με συνέπεια την αναποτελεσματική προστασία των αρωματικών συστατικών τους από το λίπος (Ανυφαντάκης, 2004).

##### Δυσάρεστη οσμή

Το υψηλό ποσοστό υγρασίας που είναι επιθυμητό στα τυριά μειωμένης και χαμηλής λιποπεριεκτικότητας, συμβάλλει στην ανεξέλεγκτη αύξηση των βακτηρίων της καλλιέργειας και της δευτερεύουσας μικροχλωρίδας και στην τροποποίηση της πρωτεόλυσης, εξαιτίας των επιδράσεων της υψηλότερης τιμής της υγρασίας στην άνευ λίπους ουσία (ΥΑΛΟ) και της χαμηλότερης τιμής του αλατιού στην υγρή φάση (A/Y), και οδηγεί σε διάφορα ελαττώματα γεύσης-αρώματος, όπως ζωμού κρέατος, πικρίλα και άλλα. Έχει αναφερθεί ότι οι υδρόφοβες ενώσεις, που παράγονται από την πρωτεόλυση των τυριών, προσροφώνται από το λίπος και επικαλύπτονται στο τυρί κανονικής λιποπεριεκτικότητας, ενώ στα τυριά χαμηλής λιποπεριεκτικότητας είναι ελεύθερες και γίνονται αισθητές ως πικρές ενώσεις (Κατσιαρή Μ. & Βουτσινάς Λ., 2002).

### 2.3.2. Μηχανικά χαρακτηριστικά

Η αφαίρεση σημαντικής ποσότητας του λίπους επηρεάζει, σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό, πολλές από τις μηχανικές ιδιότητες των τυριών, μεταξύ των οποίων την σκληρότητα, την ελαστικότητα, την προσκόλληση, την συνεκτικότητα, την ευθραυστότητα, και τον κολλώδη χαρακτήρα τους (Ανυφαντάκης, 2004).

Τα τυριά με μειωμένα επίπεδα λίπους είναι, συνήθως, υπερβολικά σκληρά και ελαστικά ή μπορεί να είναι στεγνά και κοκκώδη. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ωρίμανσης η διάσπαση της δομής αυτών των τυριών είναι βραδεία και τα τυριά παραμένουν λαστιχώδη (εξαιτίας του κυρίαρχου ρόλου των καζεϊνών στη δομή των τυριών χαμηλής λιποπεριεκτικότητας) (Κατσιαρή Μ. & Βουτσινάς Λ., 2002).

Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη είναι ο κυριότερος παράγοντας που επηρεάζει την ελαστικότητα στα διάφορα είδη τυριών. Ωστόσο το λίπος παίζει τον κυριότερο ρόλο σ' αυτήν την ρεολογική ιδιότητα. Το λίπος διασπά το πλέγμα της καζεΐνης και παίζει το ρόλο λιπαντικού για να εξασφαλίσει τη λεία υφή που χαρακτηρίζει τα τυριά κανονικής λιποπεριεκτικότητας. Στο τυρί χαμηλής λιποπεριεκτικότητας υπάρχουν λιγότερα λιποσφαίρια διαθέσιμα για να διασπάσουν το πλέγμα της καζεΐνης και γι' αυτό το λόγο κυριαρχούν τα δομικά χαρακτηριστικά της καζεΐνης (ελαστικότητα και σκληρότητα) (Κατσιαρή Μ. & Βουτσινάς Λ., 2002).

Προβλήματα ρεολογικών χαρακτηριστικών έχουν αναφερθεί στα εξής τυριά μειωμένης περιεκτικότητας :

A) Σε τυριά τύπου Cheddar παρατηρήθηκαν μειονεκτήματα ως προς την σκληρότητα και την ελαστικότητα, όταν το λίπος μειωνόταν κάτω από το μισό της κανονικής λιποπεριεκτικότητας.

B) Τα σκληρά τυριά που προορίζονται για τρίψιμο γίνονται ακόμα σκληρότερα όταν μειώνεται η περιεκτικότητα σε λίπος.

Γ) Σε τυριά τύπου Gouda και Edam, παρουσιάζονται ελαττώματα στην δομή όταν η λιποπεριεκτικότητά τους μειώνεται σημαντικά.

Δ) Τα τυριά Ελβετικού τύπου επηρεάζονται περισσότερο ως προς τη δομή παρά ως προς τη γεύση τους (Βάμβακας, Κ. & Ζερφυρίδης, Γρ., 2002).

## **2.4. Βελτίωση της ποιότητας των γαλακτοκομικών προϊόντων μειωμένης και χαμηλής λιποπεριεκτικότητας**

Για την αντιμετώπιση των προβλημάτων που επηρεάζουν αρνητικά τις μηχανικές ιδιότητες και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των προϊόντων μειωμένης λιποπεριεκτικότητας, προτείνονται διάφορες τροποποιήσεις ως προς την τεχνολογία παρασκευής τους, ενώ μπορούν να χρησιμοποιηθούν πρόσθετα στο γάλα για να αντικαταστήσουν το λίπος ως προς τις λειτουργικές του ιδιότητες. Οι τροποποιήσεις αυτές αφορούν την προετοιμασία του γάλακτος προς τυροκόμηση, το αλάτισμα, τις οξυγαλακτικές καλλιέργειες και τέλος την ωρίμανση και διατήρηση του τυριού.

### **2.4.1. Προετοιμασία του γάλακτος**

#### **2.4.1.1. Παστερίωση**

Όταν το γάλα παστεριώνεται σε υψηλότερη θερμοκρασία από την κανονική η δράση της πυτιάς μειώνεται και το πήγμα γίνεται μαλακότερο όπως και το τυρί που προκύπτει από αυτό. Αυτό είναι επιθυμητό για γάλα μειωμένης περιεκτικότητας σε λίπος για να μην γίνει το τυρί σκληρό αλλά δεν πρέπει να ξεπεραστούν κάποια όρια θέρμανσης.

#### **2.4.1.2. Ομογενοποίηση**

Η ομογενοποίηση του γάλακτος της τυροκόμησης ή της κρέμας πριν την τυροκόμηση έχει προταθεί από ορισμένους ερευνητές για βελτίωση της συγκράτησης υγρασίας και υφής-δομής των τυριών μειωμένης και χαμηλής λιποπεριεκτικότητας (Κατσιαρή Μ. & Βουτσινάς Λ., 2002). Η λιποπεριεκτικότητα του γάλακτος, οι συνθήκες ομογενοποίησης του, το είδος του τυριού και η τεχνολογία παρασκευής του, επηρεάζουν το τελικό αποτέλεσμα.

Η ομογενοποίηση του γάλακτος συμβάλλει στην συγκράτηση της υγρασίας λόγω της επιβράδυνσης του φαινομένου της συναίρεσης. Ο ρυθμός της συναίρεσης μειώνεται ως εξής: μη ομογενοποιημένο γάλα, επιμέρους ομογενοποίηση της κρέμας, ομογενοποίηση σε πλήρες γάλα. Η κλιμάκωση αυτή αποδόθηκε στη διαφορετική διάταξη των πρωτεϊνών και του λίπους μέσα στο γάλα και στο γεγονός ότι αυξάνει την επιφάνεια των λιποσφαιρίων περίπου 4-10 φορές, οπότε η μεγαλύτερη επιφάνεια του λίπους παρέχει καλύτερη λίπανση του πρωτεϊνικού πλέγματος και επομένως βελτιώνει τη δομή και υφή στο τυρί μειωμένης λιποπεριεκτικότητας (Βάμβακας, Κ. & Ζερφυρίδης, Γρ., 2002).

#### **2.4.1.3. Συμπύκνωση**

Κατά την τυροκόμηση του γάλακτος με χαμηλή λιποπεριεκτικότητα, συχνά χρησιμοποιούνται μικρές ποσότητες συμπυκνωμένου αποβουτυρωμένου γάλακτος ή αποβουτυρωμένης σκόνης γάλακτος για να ενισχυθεί το αποβουτυρωμένο γάλα, έτσι ώστε να αποφευχθούν προβλήματα κατά το πήξιμο και το χειρισμό του πήγματος και από την αυξημένη περιεκτικότητα λακτόζης στο τυρί. Αποδείχθηκε στην πράξη ότι η αύξηση του ΣΥΑΛ (Στερεό Υπόλλειμα Άνευ λίπους) του μερικού άπαχου γάλακτος για τυροκόμηση, στο 10,5-11% επιδρά θετικά στην ποιότητα των τυριών. Η βελτίωση της ποιότητας αποδίδεται στο ότι ελαχιστοποιείται η δυνατότητα ανάπτυξης υψηλής οξύτητας και η πιθανότητα παρουσίας πικρών γεύσεων.

#### **2.4.1.4. Υπερδιήθηση**

Τα τυριά που παρασκευάζονται από υπερδιηθημένο γάλα μειωμένου λίπους έχουν υψηλότερη υγρασία και ολική πρωτεΐνη απ' ό,τι το τυρί μειωμένου λίπους χωρίς υπερδιήθηση. Η υψηλότερη ολική πρωτεΐνη δείχνει ότι ένα μέρος από τις πρωτεΐνες του ορού παραμένουν στο τυρί που παρασκευάζεται από υπερδιηθημένο γάλα χαμηλής λιποπεριεκτικότητας. Το υψηλότερο ποσοστό της πρωτεΐνης πιθανώς αυξάνει την ικανότητα συγκράτησης νερού κι έτσι συμβάλλει στην αύξηση υγρασίας του τυριού. Η αύξηση της υγρασίας βελτιώνει τη σκληρή δομή, η οποία είναι βασικό χαρακτηριστικό στα τυριά μειωμένου λίπους.

#### **2.4.1.5. Βουτυρόγαλα**

Η αφαίρεση λίπους από το γάλα της τυροκόμησης συνεπάγεται αντίστοιχη μείωση της περιεκτικότητας του σε μεμβράνη των λιποσφαιρίων. Η μεμβράνη αυτή, η οποία περιέχει τασενεργούς παράγοντες, συμβάλλει τόσο στη δομή και σύσταση των προϊόντων όσο και στην ανάπτυξη των γευστικών τους χαρακτηριστικών. Η έλλειψη αυτή μπορεί να καλυφθεί εάν στο γάλα προς τυροκόμηση προστεθεί μικρή ποσότητα βουτυρογάλακτος, το οποίο ως υποπροϊόν από την παραγωγή βουτύρου περιέχει σημαντική ποσότητα από μεμβράνες λιποσφαιρίων.

#### **2.4.2. Αλάτισμα**

Με αύξηση του ποσοστού άλατος στην υγρή φάση του τυριού αποφεύγονται οι ανεπιθύμητες γεύσεις που αναπτύσσονται στα χαμηλής λιποπεριεκτικότητας τυριά όταν έχουν υψηλό ποσοστό υγρασίας. Όμως η υψηλή υγρασία ευνοεί την γρήγορη απορρόφηση άλατος με συνέπεια τα τυριά να γίνονται υπέρμετρα αλμυρά γι' αυτό χρειάζεται λιγότερος χρόνος παραμονής του τυριού σε άλμη ή και ξηρού αλατίσματος (Βάμβακας, Κ. & Ζερφυρίδης, Γρ., 2002).

### 2.4.3. Χρήση πρόσθετων και ειδικών γαλακτικών καλλιέργειών

Η ποιότητα των τυριών μειωμένου λίπους επηρεάζεται από την επιλογή της καλλιέργειας, τον έλεγχο της υγρασίας και τον έλεγχο παραγωγής γαλακτικού οξέος στα τυριά.

Οι πρόσθετες καλλιέργειες μπορούν να βελτιώσουν τη γεύση των τυριών με μειωμένη και χαμηλή λιποπεριεκτικότητα μέσω της αυξημένης πρωτεόλυσης, η οποία μειώνει την πικρίλα και αυξάνει τις συγκεντρώσεις των επιθυμητών αρωματικών πεπτιδίων και των πρόδρομων ουσιών των αρωματικών πτητικών ενώσεων. Οι συνηθέστερα πρόσθετες καλλιέργειες είναι διάφοροι λακτοβάκιλλοι, όπως *L. casei*, *L. Helveticus* και *L. bulgaricus*.

Η επιλογή κατάλληλης οξυγαλακτικής καλλιέργειας είναι σημαντική για όλα τα τυριά, αλλά ιδιαίτερα για τα τυριά μειωμένης και χαμηλής λιποπεριεκτικότητας. Τα επιθυμητά χαρακτηριστικά των οξυγαλακτικών καλλιέργειών είναι τα ακόλουθα:

- Να παράγουν γαλακτικό οξύ με βραδύ ρυθμό, ώστε να διατηρείται μια ρυθμιστική ικανότητα στο τυρί και να εμποδίζεται η δημιουργία έντονων όξινων γεύσεων.
- Να είναι ικανές να υποστούν αυτόλυση σε χαμηλές θερμοκρασίες παρασκευής και στην υψηλή υγρασία του τυριού.
- Να έχουν χαμηλή πρωτεολυτική και υψηλή πεπτιδολυτική ενεργότητα (Κατσιαρή Μ. & Βουτσινάς Λ., 2002).

### 2.4.4. Συγκράτηση υγρασίας στο τυρί

Κατά την αφαίρεση λίπους επικρατούν οι πρωτεΐνες ως προς τα λοιπά στερεά συστατικά του τυριού. Κατά την διατήρηση του, τόσο η δομή-υφή όσο και η γεύση-άρωμα χειροτερεύουν γρηγορότερα από το αντίστοιχο κανονικό τυρί (Βάμβακας, Κ. & Ζερφυρίδης, Γρ., 2002).

Ένας παράγοντας ώστε να διατηρήσει το τυρί μειωμένης λιποπεριεκτικότητας, φυσικές ιδιότητες παρόμοιες με το αντίστοιχο παραδοσιακό τυρί είναι απαραίτητο η σχέση της υγρασίας ως προς το σύνολο των συστατικών του τυριού άνευ λίπους (ΥΑΛΟ), να βρίσκεται εντός επιθυμητού εύρους. Στα χαμηλής λιποπεριεκτικότητας τυριά, η επιθυμητή ΥΑΛΟ για να επιτευχθούν άριστα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά συνήθως θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη των αντίστοιχων κανονικών τυριών. Αυτό υπερνικά την αυξημένη σκληρότητα και ελαστικότητα που οφείλονται στη μερική αντικατάσταση του λίπους από την πρωτεΐνη (Κατσιαρή Μ. & Βουτσινάς Λ., 2002).



Διάφοροι εναλλακτικοί τρόποι για αύξηση της υγρασίας, τροποποιώντας τη συμβατική τεχνολογία τυροκόμησης, είναι οι ακόλουθοι:

- Η μικρότερη ποσότητα ενζύμων και η χαμηλότερη θερμοκρασία πήξης του γάλακτος. Η αυξημένη παρουσία πυτιάς και πρωτεΐνης κάνουν τα τυριά χαμηλής λιποπεριεκτικότητας πιο επιρρεπή στη δημιουργία πικρής γεύσης, αν και κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε σε Κεφαλογραβιέρα.
- Συγκράτηση pH σε υψηλότερα επίπεδα κατά την διάρκεια επεξεργασίας του γάλακτος και στράγγισης του τυροπήγματος.
- Για τα αναθερμαινόμενα τυριά, η θερμοκρασία και χρόνος αναθέρμανσης καθώς, η ανάδευση και η πίεση διατηρούνται σε χαμηλότερα επίπεδα.
- Γίνεται πλύσιμο του τυροπήγματος για απομάκρυνση μέρους της λακτόζης και του γαλακτικού οξέος. Έτσι προλαμβάνεται η ταχεία πτώση του pH, η αποβολή υπερβολικής υγρασίας, η ανάπτυξη ανεπιθύμητων οσμών και γεύσεων και επιτυγχάνεται αριστοποίηση των οργανοληπτικών ιδιοτήτων των τυριών με μειωμένη και χαμηλή λιποπεριεκτικότητα. Ειδικότερα όταν το γαλακτικό οξύ δεν είναι μειωμένο στα τυριά με υψηλή υγρασία, τότε τα τυριά γίνονται ξινά, με ασθενές και ζυμαρώδες σώμα με το πέρασμα του χρόνου.
- Η χαμηλότερη θερμοκρασία στράγγισης

#### 2.4.5. Υποκατάσταση Λίπους

Η ιδανική ουσία για αντικατάσταση του λίπους θα πρέπει να έχει παρόμοια χημική δομή και φυσικές ιδιότητες με το λίπος, να αντιστέκεται στην υδρόλυση από τα πεπτικά ένζυμα ώστε να παρέχει λίγες θερμίδες στον ανθρώπινο οργανισμό ή και καθόλου.

Ορολογίες που χρησιμοποιούνται για να περιγράψουν τις ουσίες που μπορούν να αντικαταστήσουν το λίπος ορίζονται ως ακολούθως:

- **Αντικατάστατο λίπους (fat replacer):** Γενικός όρος, που χρησιμοποιείται για οποιαδήποτε ουσία η οποία χρησιμοποιείται για αντικατάσταση λίπους.
- **Υποκατάστατο λίπους (fat substitute):** Συνθετική ένωση σχεδιασμένη για να αντικαταστήσει το λίπος σε αναλογία βάρους προς βάρους.
- **Μιμητικό λίπους (fat mimetic):** Μιμείται μερικά από τα φυσικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τα οποία προσδίδει το λίπος στο τρόφιμο. Χρειάζεται υψηλό ποσοστό νερού για να αναπτύξει τις λειτουργικές του ιδιότητες.
- **Λίπος ολίγων θερμίδων (low-calorie-fat):** Συνθετικά τριγλυκερίδια, συνδυασμένα με μη συμβατικά λιπαρά οξέα για την εστεροποίηση της γλυκερόλης, με αποτέλεσμα την μείωση της θερμιδικής αξίας (Βάμβακας, Κ. & Ζερφυρίδης, Γρ., 2002).

## Κεφάλαιο 3

### **Προσδιορισμός της σύνθεσης λιπαρής φάσης με φασματοσκοπικές και χρωματογραφικές τεχνικές**

#### **Αέρια Χρωματογραφία (GC)**

##### **3.1. Εισαγωγή**

Η αέρια χρωματογραφία αναπτύχθηκε ως αναλυτική τεχνική τα τελευταία σαράντα χρόνια. Η τεχνική αυτή είναι σχετικά απλή και χρησιμοποιείται για την ανάλυση **πτητικών ουσιών**.

Στην περίπτωση **μη πτητικών ενώσεων** προηγείται η παραγωγοποίησή (derivatization), ώστε να μετατραπούν σε πτητικά παράγωγα. Οι αντιδράσεις αυτές περιλαμβάνουν: σιλυλίωση (π.χ. για τα σάκχαρα), αλκυλίωση (π.χ. μεθυλίωση, όπως στην περίπτωση των λιπαρών οξέων), ακυλίωση κ.α.

Εφαρμογές στα τρόφιμα:

Λιπίδια, αρωματικές ουσίες, υπολείμματα φυτοφαρμάκων, αλκοόλες κ.α.

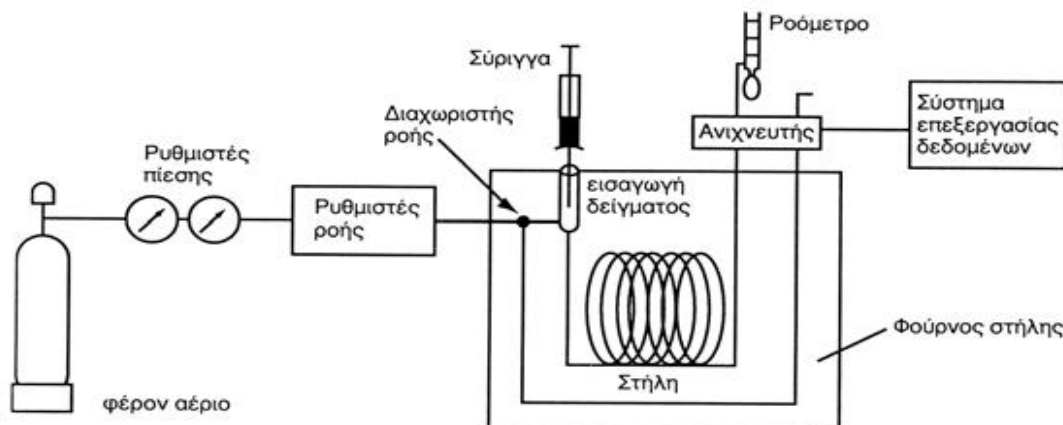
##### **3.2. Είδη Αέριας Χρωματογραφίας**

**(α) Στερεά Αέρια Χρωματογραφία:** Το υλικό πλήρωσης της στήλης είναι μια στερεά φάση με ενεργή επιφάνεια. Ο διαχωρισμός των συστατικών του μίγματος οφείλεται στην προσρόφηση αυτών πάνω στην ενεργή επιφάνεια της στερεάς φάσης, π.χ. Silica gel, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, μοριακά κόσκινα κ.α.

**(β) Υγρή Αέρια Χρωματογραφία:** Η στατική φάση είναι ένα στερεό (κόκκοι) καλυμμένο με λεπτή στοιβάδα υγρού. Ο διαχωρισμός των συστατικών του μίγματος οφείλεται στη διαφορά των συντελεστών κατανομής τους ανάμεσα στην υγρή και στην αέρια φάση. Όσο μεγαλύτερη χημική συγγένεια υπάρχει ανάμεσα στα συστατικά του αερίου μίγματος και στην υγρή επικάλυψη της στερεάς φάσης, τόσο ο χρόνος συγκράτησής του στη στήλη είναι μεγαλύτερος.

### 3.3. Περιγραφή του Αέριου Χρωματογράφου

Η διάταξη ενός αέριου χρωματογράφου δίνεται στο παρακάτω σχήμα:



**Σχήμα 9** Οργανολογία ενός αέριου χρωματογράφου

Αρχή της μεθόδου: Ο διαχωρισμός των συστατικών ενός μίγματος γίνεται μέσω εκλεκτικών προσροφήσεων ή κατανομών τους μεταξύ μιας υγρής ή στερεάς στατικής φάσης και μιας αέριας κινούμενης φάσης μέσα στη στήλη της χρωματογραφίας.

Το φέρον αέριο (αδρανές, απαλλαγμένο από προσμίξεις), που είναι συνήθως  $N_2$ ,  $H_2$ , ή  $Ar$ , οδηγείται από τη φιάλη υψηλής πίεσης μέσα στη στήλη. Η παροχή του αερίου ρυθμίζεται με ειδικές βαλβίδες και ροόμετρα.

Το φέρον αέριο δεν πρέπει να περιέχει οξυγόνο, γιατί οξειδώνει τη στατική φάση και αυτό σημαίνει καταστροφή της στήλης, ιδιαίτερα όταν αυτή είναι τριχοειδής και η ποσότητα της στατικής φάσης είναι ελάχιστη. Ίχνη υγρασίας απενεργοποιούν τη στατική φάση, για αυτό το φέρον αέριο πρέπει να είναι απαλλαγμένο από υγρασία. Η επιλογή του φέροντος αερίου εξαρτάται κυρίως από τον τύπο του ανιχνευτή που χρησιμοποιείται.

Η εισαγωγή του δείγματος (συνήθως όγκου  $1\mu L$ ) γίνεται με μικροσύριγγα στη βαλβίδα εισαγωγής του δείγματος στην κορυφή της στήλης διαμέσου μιας ελαστικής πλακέτας ή διαφράγματος (septum). Τα συστατικά του δείγματος συμπαρασύρονται από το φέρον αέριο κατά μήκος της στήλης και διαχωρίζονται. Τα κλάσματα στη συνέχεια ανιχνεύονται στον ανιχνευτή, ο οποίος τοποθετείται στο τέλος της στήλης.

Η καρδιά του χρωματογράφου είναι η στήλη. Υπάρχουν δύο είδη στηλών :

### **Πληρωμένες στήλες**

Αποτελούνται από έναν μεταλλικό ή γυάλινο σωλήνα (μήκους 1-10 m, διαμέτρου 2-9 mm) πληρωμένο με ένα κοκκώδες αδρανές υλικό (φορέας) το οποίο επικαλύπτεται με λεπτό υμένιο μη πτητικού υγρού (στατική φάση).

### **Τριχοειδής στήλες**

Οι τριχοειδείς στήλες είναι σωλήνες πολύ μικρής διαμέτρου (0,1-0,5 mm) και μεγάλου μήκους (10-60m), συνήθως πολυμερούς υλικού, τα εσωτερικά τοιχώματα των οποίων επικαλύπτονται με τη στατική φάση. Δεν υπάρχει υλικό πληρώσεως.

Η ταχύτητα και η ικανότητα διαχωρισμού εξαρτώνται από τη θερμοκρασία:

- Ισόθερμο πρόγραμμα κλιβάνου (Η θερμοκρασία παραμένει σταθερή κατά τη διάρκεια της ανάλυσης)
- Διαβαθμισμένο πρόγραμμα κλιβάνου (Η θερμοκρασία αυξάνεται σταδιακά κατά τη διάρκεια της ανάλυσης)

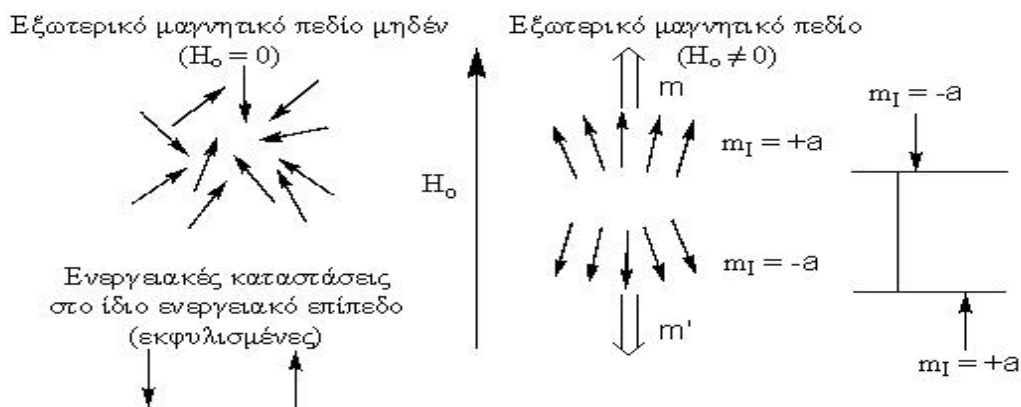
## Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR)

### 3.4. Εισαγωγή

Η φασματοσκοπία NMR, αποτελεί φαινόμενο κατά το οποίο οι πυρήνες ατόμων με αυτοστροφορμή (σπιν) υπό την επίδραση ισχυρού στατικού μαγνητικού πεδίου, όταν ακτινοβολούνται διεγείρονται και κατά την αποδιέγερση τους δίνουν σήμα. Στηρίζεται στην απορρόφηση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στην περιοχή των βραχέων ραδιοκυμάτων (102 MHz), (η απορροφούμενη ενέργεια οδηγεί σε μεταβολή του πυρηνικού spin).

Το spin αποτελεί θεμελιώδη ιδιότητα όπως η μάζα, το ηλεκτρικό φορτίο. Είναι πολλαπλάσια του  $\frac{1}{2}$  και μπορεί να είναι είτε  $-$  ή  $+$ . Όπως η περιστροφή του ηλεκτρονίου δημιουργεί το spin του, έτσι και οι πυρήνες διαφόρων στοιχείων έχουν πυρηνικό spin  $I$ , λόγω αυτοπεριστροφής. Το πυρηνικό spin, λόγω του φορτίου του πυρήνα δημιουργεί μαγνητικό δίπολο, του οποίου το μέγεθος εκφράζεται από τη μαγνητική ροπή  $\mu$  (Βαρβόγλη Α.Γ., Αλεξάνδρου Α.Γ., 1986).

Τα πυρηνικά spin των μαγνητικών πυρήνων προσανατολίζονται, απουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, κατά τυχαίο τρόπο (Σχήμα 7) (Βαλανίδης Αθ.Π., 2006). Αν ένας πυρήνας με  $spin \neq 0$  βρεθεί σε μαγνητικό πεδίο εντάσεως  $H_0$ , το διάλυμα της στροφικής ορμής του πυρήνα παίρνει  $(2I+1)$  προσανατολισμούς ως προς την διεύθυνση του πεδίου και σε κάθε προσανατολισμό αντιστοιχεί μια ορισμένη τιμή ενέργειας  $E$  (Βαρβόγλη Α.Γ., Αλεξάνδρου Α.Γ., 1986). Ο πυρήνας του  $^1H$  (πρωτόνιο) έχει  $I=1/2$  και μπορεί να προσανατολιστεί παράλληλα ( $I=+1/2$ ) και αντιπαράλληλα ( $I=-1/2$ ). Ο παράλληλος προσανατολισμός αποτελεί την βασική κατάσταση της χαμηλής ενέργειας, ενώ ο αντιπαράλληλος τη διεργεμένη κατάσταση αυξημένης ενέργειας (Βαρβόγλη Α.Γ., Αλεξάνδρου Α.Γ., 1986).



**Σχήμα 7** Ενεργειακά επίπεδα spin χωρίς εξωτερικό μαγνητικό πεδίο και μέσα σε εξωτερικό μαγνητικό πεδίο

Αν οι προσανατολισμένοι πυρήνες ακτινοβοληθούν με κατάλληλης συχνότητας ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, λαμβάνει χώρα απορρόφηση ενέργειας και η κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας (βασική κατάσταση) αλλάζει φορά προς την κατάσταση υψηλότερης ενέργειας (διεργεμένη κατάσταση) (αναστροφή spin). Όταν πραγματοποιηθεί αυτή η αναστροφή, λέγεται ότι οι πυρήνες έχουν συντονιστεί με την

εφαρμοζόμενη ακτινοβολία, εξού και ο όρος **πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός** (McMURRY, J. 2005).

Η ακριβής συχνότητα που απαιτείται για τον συντονισμό εξαρτάται από την **ισχύ του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου** και από το **είδος του πυρήνα**. Αν χρησιμοποιηθεί πολύ ισχυρό μαγνητικό πεδίο, η ενεργειακή διαφορά μεταξύ των δύο καταστάσεων σπιν είναι μεγάλη, οπότε απαιτείται ακτινοβολία υψηλότερης συχνότητας (υψηλότερης ενέργειας) για να επιτευχθεί αναστροφή του σπιν. Αν χρησιμοποιηθεί ασθενέστερο μαγνητικό πεδίο, απαιτείται λιγότερη ενέργεια για να πραγματοποιηθεί η αναστροφή (McMURRY, J. 2005).

### 3.5. Η φύση των απορροφήσεων NMR

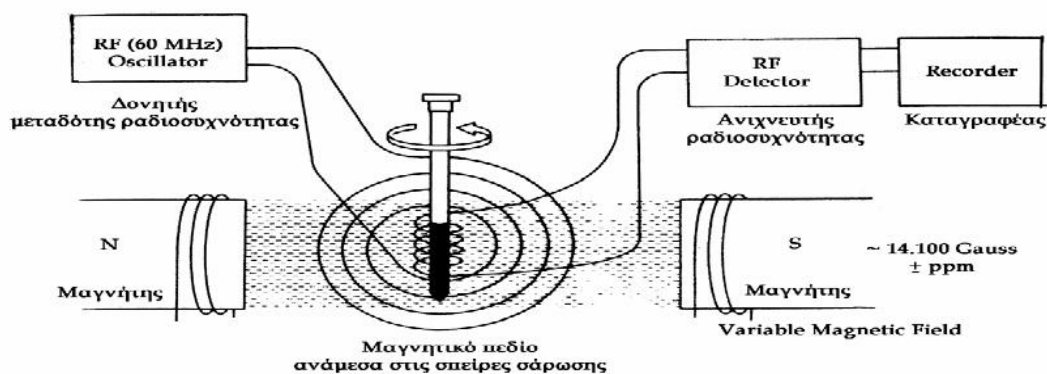
Η μεγάλη χρησιμότητα της φασματοσκοπίας NMR στη διερεύνηση της δομής των οργανικών ενώσεων έγκειται στο ότι όλοι οι ομοειδείς πυρήνες σε ένα μόριο δεν συντονίζονται ακριβώς στην ίδια συχνότητα, αλλά υπάρχει μεταξύ τους μια μικρή διαφορά οφειλόμενη στο διαφορετικό χημικό περιβάλλον του καθενός.

Κάθε πυρήνας δεν δέχεται μόνο την επίδραση του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου  $H_0$  αλλά δέχεται και την επίδραση του αντίθετου εξ επαγωγής μαγνητικού πεδίου που προκαλείται από τα ηλεκτρόνια που τον περιβάλλουν:

**Ηπραγματικό=Ηεφαρμοζόμενο-Ητοπικό ( $e^-$ )**

Οι πυρήνες προστατεύονται από την πλήρη επίδραση του εφαρμοζόμενου πεδίου λόγω των ηλεκτρονίων που τους περιβάλλουν. Όμως η ηλεκτρονιακή πυκνότητα γύρω από κάθε πυρήνα εξαρτάται από το είδος των ατόμων και των δεσμών στο γειτονικό περιβάλλον, με αποτέλεσμα κάθε πυρήνας να έχει μια ελαφρά διαφορετική συχνότητα συντονισμού (Μαγιάτης, Π.). Εάν το όργανο του NMR είναι αρκετά ευαίσθητο, οι μικροδιαφορές του πραγματικά εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου που γίνονται αισθητές σε κάθε πυρήνα είναι δυνατό να ανιχνευθούν, οπότε λαμβάνουμε διαφορετικό σήμα NMR για κάθε διακριτό πυρήνα άνθρακα ή υδρογόνου κάποιου μορίου. Έτσι το φάσμα NMR μιας οργανικής ένωσης «**χαρτογραφεί**» αποτελεσματικά το δίκτυο σύνδεσης C-H (McMURRY, J. 2005).

Ο οριζόντιος άξονας καταγράφει το πραγματικά εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο που υφίσταται οι πυρήνες, ενώ ο κατακόρυφος άξονας δείχνει την ένταση απορρόφησης της ενέργειας. Κάθε κορυφή στο NMR αντιστοιχεί σ' ένα χημικά διακριτό πυρήνα του μορίου (McMURRY, J. 2005). Η αρχή λειτουργίας ενός τυπικού φασματόμετρου NMR απεικονίζεται στο σχήμα 8.



**Σχήμα 8** Φασματοόμετρο Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR).

Το δείγμα υπό μορφή διαλύματος σε κατάλληλο δευτεριωμένο διαλύτη μεταφέρεται με ένα μικρό σιφόνιο σε ένα γυάλινο σωλήνα NMR (διάμετρος 5 mm) με ομοιογενή τοιχώματα και τοποθετείται σε ένα μεταλλικό κάθετο σωλήνα που βρίσκεται μεταξύ των πόλων του μαγνήτη. Η ακτινοβολία ραδιοσυχνοτήτων (RF) εκπέμπεται από ένα πηνίο που είναι περιτυλιγμένο γύρω από το δείγμα και μετά την απορρόφηση ενέργειας καταγράφει το ίδιο το σήμα (single-coil spectrometer) ή άλλο πηνίο (cross-coil spectrometer). Για να επιτευχθεί συντονισμός, η ακτινοβολία ραδιοσυχνοτήτων (RF) μεταβάλλεται σιγά-σιγά κατά τη **σάρωση**. Το σήμα της απορρόφησης RF συλλαμβάνεται από τον ανιχνευτή, ενισχύεται και καταγράφεται. Το φασματογραφικό χαρτί NMR είναι ειδικά βαθμολογημένο και η καταγραφή του φάσματος γίνεται αφού προηγουμένως ρυθμιστεί το 'μηδέν' με μία ουσία αναφοράς, συνήθως το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS) (Βαλανίδης Αθ.Π., 2006).

### 3.5.1. Πυρήνες που μπορούν να μελετηθούν με NMR

Στον Πυρηνικό Μαγνητικό Συντονισμό μόνο τα ασύζευκτα πυρηνικά spin παίζουν ρόλο. Πυρήνες με μηδενικό πυρηνικό spin δεν δίνουν φάσματα NMR. Πυρηνικό spin  $I \neq 0$  έχουν όλοι οι πυρήνες με περιττό μαζικό αριθμό ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$  κ.λ.π.), καθώς και οι πυρήνες με άρτιο μαζικό αριθμό και περιττό ατομικό αριθμό (π.χ.  $^2\text{H}$ ,  $^{14}\text{F}$ ) (Βαρβόγλη Α.Γ., Αλεξάνδρου Α.Γ., 1986).

### 3.5.2. Διαλύτες για φασματοσκοπία $^1\text{H}$ -NMR

Για τα φάσματα  $^1\text{H}$ -NMR χρησιμοποιούνται δευτεριωμένοι (98-99%) διαλύτες που δεν παρουσιάζουν ταινίες απορρόφησης πρωτονίου. Τέτοιοι διαλύτες είναι:  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ , δευτεριωμένο νερό  $\text{D}_2\text{O}$  κ.λπ. Επίσης, χρησιμοποιούνται διαλύτες που δεν περιέχουν πρωτόνια όπως:  $\text{CCl}_4$ ,  $\text{CS}_2$ , κυκλοεξάνιο  $\text{C}_6\text{H}_{12}$ , κ.λπ., με γνωστές απορροφήσεις (ΒΑΛΑΒΑΝΙΔΗΣ ΑΘ.Π., 2006).

### 3.6. Χαρακτηριστικές παράμετροι του NMR

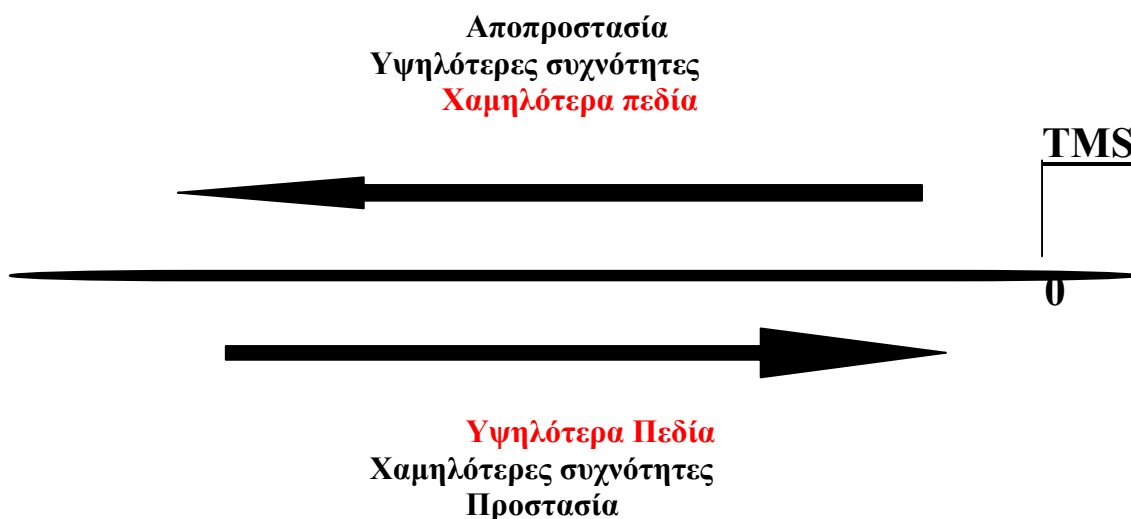
#### 3.6.1. Χημική Μετατόπιση

Τα φάσματα NMR αποτυπώνονται σε γραφήματα, που εμφανίζουν την ισχύ του εφαρμοζόμενου πεδίου να αυξάνεται από τα αριστερά προς τα δεξιά. Για να προσδιορίσουμε τη θέση μιας απορρόφησης, το γράφημα του NMR βαθμολογείται χρησιμοποιώντας μια αυθαίρετη κλίμακα, που ονομάζεται **κλίμακα δέλτα ( $\delta$ )**. Μια μονάδα δέλτα ισούται με ένα μέρος στο εκατομμύριο (ppm) της συχνότητας λειτουργίας του φασματομέτρου.

Η θέση στο γράφημα, όπου ένας πυρήνας απορροφά, καλείται **χημική μετατόπιση**. Η χημική μετατόπιση του TMS (σημείο αναφοράς) ορίζεται κατά σύμβαση ως ίση με το μηδέν ( $\delta = 0$  ppm). Η ουσία αυτή είναι χημικά ανενεργή, απομακρύνεται εύκολα καθότι έχει χαμηλό σ.ζ, και δίνει στα φάσματα μια απλή κορυφή σε συχνότητα συντονισμού που δεν επικαλύπτει τα σήματα των συνήθων οργανικών ενώσεων (Μαγιάτης, Π.).

Οι πυρήνες που **προστατεύονται καλύτερα** από τα ηλεκτρόνια χρειάζονται ισχυρότερο μαγνητικό πεδίο για να συντονιστούν και επομένως απορροφούν στη δεξιά πλευρά του γραφήματος NMR. Οι πυρήνες που **προστατεύονται λιγότερο** αποτελεσματικά χρειάζονται ασθενέστερο εφαρμοζόμενο πεδίο για να συντονιστούν και συνεπώς απορροφούν στην αριστερή πλευρά του γραφήματος NMR (McMURRY, J. 2005).

#### Προστασία, Αποπροστασία και Χημική μετατόπιση (Νταής, Φ.)



#### Προστασία

Χαμηλότερες συχνότητες  
Υψηλότερα πεδία  
Μικρότερες χημικές μετατοπίσεις

#### Αποπροστασία

Υψηλότερες συχνότητες  
Χαμηλότερα πεδία  
Μεγαλύτερες χημικές μετατοπίσεις



## Χημική μετατόπιση πρωτονίων ( $^1\text{H}$ )

Το πρωτόνιο είναι ειδική περίπτωση πυρήνα, γιατί χωρίς p ηλεκτρόνια στερείται παραμαγνητικών ιδιοτήτων. Αυτός είναι και ο λόγος που η χημική μετατόπιση του  $^1\text{H}$  στις διάφορες οργανικές ενώσεις περιορίζεται στην περιοχή των 10 ppm, ενώ οι άλλοι πυρήνες παρουσιάζουν χημικές μετατοπίσεις μέχρι 200 ppm. Ο βαθμός θωράκισης εξαρτάται από την ηλεκτρονική πυκνότητα, έτσι οι χημικές μετατοπίσεις της  $\text{CH}_3\text{X}$ , όπου X είναι ηλεκτραρνητικό στοιχείο, μετατοπίζονται προς χαμηλά μαγνητικά πεδία καθώς αυξάνεται ηλεκτραρνητικότητα (Βαλανίδης Αθ.Π., 2006).

### 3.6.2. Ένταση Κορυφής

Ένα πολύ σημαντικό στοιχείο που προκύπτει από τη μελέτη των φασμάτων NMR είναι η ολοκλήρωση. Ορίζεται ως **ένταση κορυφών** το εμβαδόν της επιφάνειας που περικλείεται από μια κορυφή (McMURRY, J. 2005).

Όλα τα πρωτόνια ενός μορίου που έχουν το ίδιο χημικό περιβάλλον (δηλ. εμφανίζονται στην ίδια χημική μετατόπιση) ανήκουν στην ίδια κορυφή (Βαλανίδης Αθ.Π., 2006).

### 3.6.3. Σχάση σπιν-σπιν

Πολύ σημαντικά στοιχεία για τη δομή μιας ουσίας μας δίνει και το φαινόμενο της σύζευξης (spin-spin coupling). Σε ένα φάσμα NMR μια κορυφή που αντιστοιχεί σε ένα είδος πυρήνων (με το ίδιο χημικό περιβάλλον) μπορεί να είναι πολλαπλή. Αυτό οφείλεται στην αλληλεπίδραση των spin γειτονικών πυρήνων (μέσω των δεσμών). Ο αριθμός της πολλαπλότητας μιας κορυφής είναι  $n+1$ , όπου  $n$ , ο αριθμός των ισοδύναμων γειτονικών πυρήνων. Χαρακτηρίζεται από τη **σταθερά σύζευξης J**, η οποία ορίζεται ως η απόσταση μεταξύ των υποκορυφών που συνιστούν μια πολλαπλή κορυφή και μετράται σε μονάδες Hz. Η τιμή του J είναι ανεξάρτητη του  $H_0$  και εξαρτάται από το είδος των πυρήνων που αλληλεπιδρούν, από την απόσταση τους σε δεσμούς, από το χημικό τους περιβάλλον και από τη μεταξύ τους γωνία (Μαγιάτης, Π.).

Επειδή η σταθερά σύζευξης έχει ακριβώς την ίδια αριθμητική τιμή μόνο για τους πυρήνες που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, μπορούμε από τη μελέτη των σταθερών σύζευξης να βρούμε ποιοι πυρήνες γειτνιάζουν με ποιους (Μαγιάτης, Π.).

Όταν ένα είδος πυρήνων δεν έχει δίπλα του γειτονικούς πυρήνες με τους οποίους να μπορεί να αλληλεπιδράσει τότε εμφανίζεται ως απλή κορυφή. Δυο πυρήνες ονομάζονται **χημικά ισοδύναμοι** όταν έχουν το ίδιο χημικό περιβάλλον και την ίδια χημική μετατόπιση, ενώ **μαγνητικά ισοδύναμοι** εκείνοι που έχουν τις ίδιες σταθερές σύζευξης με όλους τους γειτονικούς πυρήνες. Όταν έχουμε μια πολλαπλή κορυφή, η χημική μετατόπιση θεωρούμε ότι αντιστοιχεί ακριβώς στο μέσο της (Μαγιάτης, Π.).

### 3.7. Εφαρμογή της φασματοσκοπίας NMR στο γάλα και στα γαλακτοκομικά προϊόντα

Από το 1945 που ο Bloch και οι συνεργάτες του ανίχνευσαν για πρώτη φορά σήματα NMR, η φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR), έχει εξελιχθεί ραγδαία, καθιστώντας την εφαρμόσιμη σε όλα τα πεδία. Σήμερα, αποτελεί μια μέθοδο με πολλές δυνατότητες στο χώρο της Χημείας Τροφίμων, τόσο για τη μοναδικότητα των πληροφοριών που μπορεί να παρέχει όσο και για την ταχύτητα με την οποία παρέχει πληροφορίες και την προσαρμοστικότητα του οργάνου. Εξαιτίας, όμως του υψηλού κόστους, δεν είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη τεχνική στο χώρο της Χημείας Τροφίμων.

Τα κυριότερα πλεονεκτήματα της φασματοσκοπίας NMR είναι: Δεν καταστρέφει το δείγμα, γεγονός που επιτρέπει να διεξαχθούν διαφορετικές αναλύσεις στο ίδιο δείγμα και να εξαχθούν συμπεράσματα για την επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων. Δίνει ποιοτικά και ποσοτικά αποτελέσματα. Επιτρέπει την άμεση και γρήγορη ανάλυση του δείγματος. Είναι ταχεία μέθοδος και δεν απαιτεί πολύπλοκη προετοιμασία του δείγματος. Δεν απαιτεί βαθμονόμηση με πρότυπες ουσίες.

Οι πυρήνες  $^{31}\text{P}$ ,  $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$  έχουν χρησιμοποιηθεί στον τομέα των γαλακτοκομικών προϊόντων. Για το ίδιο δείγμα ο ερευνητής μπορεί να επιλέξει μεταξύ διαφορετικών πυρήνων ώστε να προσδιορίσει διαφορετικά χαρακτηριστικά, ή να βελτιώσει τα αποτελέσματα της ανάλυσης. Για παράδειγμα, το γαλακτικό λίπος μπορεί να αναλυθεί είτε από ένα φάσμα  $^1\text{H}$  είτε από ένα φάσμα  $^{13}\text{C}$ , όπου το τελευταίο δίνει καλύτερα αποτελέσματα αν και απαιτείται περισσότερος χρόνος για τη λήψη ενός φάσματος με υψηλό S/N. Ένα απλό συστατικό μπορεί να δώσει κορυφές με πολλές και διαφορετικές χημικές μετατοπίσεις σε ένα φάσμα  $^1\text{H}$ , διότι περιέχονται περισσότερα του ενός είδους πρωτόνια στη δομή του. Διαφορετικές δομές του ίδιου συστατικού μπορούν να δώσουν κορυφές με διαφορετική χημική μετατόπιση. Τα μονοδιάστατα φάσματα  $^1\text{H}$ , σε πολύπλοκα μίγματα, όπως το γάλα, είναι δύσκολη η ανάλυση τους, επειδή παρατηρείται επικάλυψη κορυφών στο φάσμα. Η χρήση άλλων πυρήνων, η εφαρμογή τεχνικών δύο διαστάσεων, η κλασματοποίηση του δείγματος πριν την ανάλυση μπορεί να βοηθήσουν στην αντιμετώπιση του παραπάνω προβλήματος.

Οι πυρήνες μπορούν να «επικοινωνούν» μεταξύ τους και το γεγονός αυτό, αποτελεί τη βάση για την εφαρμογή δύο διαστάσεων (2D) φασματοσκοπίας. Τα φάσματα 2D δίνουν πληροφορίες για το “δέσιμο” μεταξύ διαφορετικών πυρήνων (π.χ. COSY, NOESY). Τα φάσματα αυτού του είδους έχουν χρησιμοποιηθεί για τον χαρακτηρισμό της δομής μεγάλου αριθμού μορίων που απαντούν στα γαλακτοκομικά προϊόντα.

Παραπάνω, περιγράφηκαν όλα τα χαρακτηριστικά της φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού τα οποία μπορούν να εφαρμοστούν σε γαλακτοκομικά δείγματα προκειμένου να επιτευχθούν διαφορετικοί στόχοι. Μερικοί από τους στόχους αυτούς περιγράφονται παρακάτω:

## **1. Ποιοτική – Ποσοτική Ανάλυση**

Η φασματοσκοπία NMR μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένα απλό αναλυτικό εργαλείο, με την ικανότητα να ανιχνεύει διαφορετικά συστατικά. Για την ανάλυση της λιπιδικής σύστασης του γάλακτος έχουν χρησιμοποιηθεί οι πυρήνες  $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$ -NMR, παρέχοντας ποσοτικές πληροφορίες για τα μοριακά κλάσματα διαφόρων οξέων και τριγλυκεριδίων. Κάποια ισομερή θέσης των τριγλυκεριδίων έχουν μεγάλη θρεπτική αξία και, έχει προσδιοριστεί η κατανομή των άκυλο ομάδων ανάμεσα στις θέσεις sn-1(3) και sn-1(2) των τριγλυκεριδίων.

## **2. Παρακολούθηση αντιδράσεων «in vivo»**

Οι βιολογικοί μετασχηματισμοί που προκαλούνται από μικροοργανισμούς, επηρεάζουν την ανάπτυξη των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών. Η φασματοσκοπία NMR ως μια μη καταστρεπτική μέθοδος και επομένως επιτρέπει την παρακολούθηση βιολογικών αντιδράσεων «in vivo». Οι μικροοργανισμοί επωάζονται στα σωληνάκια του NMR, και η μεταβολή που μας ενδιαφέρει μπορεί να παρακολουθηθεί με τη λήψη φασμάτων του δείγματος σε διαφορετικούς χρόνους.

## **4. Ισοτοπική Ανάλυση**

Η φυσική κατανομή ισοτόπων είναι ένα ισχυρό εργαλείο για την επικύρωση της αυθεντικότητας των τροφίμων, δεδομένου ότι τα ίδια χημικά είδη με διαφορετική προέλευση μπορούν να διακριθούν.

# Πειραματικό μέρος

## **Σκοπός της μελέτης**

Ο προσδιορισμός της σύνθεσης της λιπαρής φάσης γαλακτοκομικών προϊόντων που φέρουν την ένδειξη ή τον ισχυρισμό χαμηλή ή μειωμένη λιποπεριεκτικότητα ή “light for fat or calories” με χρήση φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού και Αέρια Χρωματογραφία.

## **Κεφάλαιο 4**

### **Υλικά και Συσκευές**

#### **4.1. Υλικά και Συσκευές**

##### **4.1.1. Δείγματα γαλακτοκομικών προϊόντων μειωμένης και χαμηλής λιποπεριεκτικότητας**

Η προμήθεια των δειγμάτων γαλακτοκομικών προϊόντων που φέρουν την ένδειξη ή τον ισχυρισμό χαμηλή ή μειωμένη λιποπεριεκτικότητα ή “light” έγινε μετά από έρευνα αγοράς στην Αθήνα και συγκεκριμένα από τα Super Market: AB Βασιλόπουλος, Βερόπουλος, MARKET IN, MY MARKET, CARREFOUR και Σκλαβενίτης.

Στον πίνακα 10 παρουσιάζεται η διατροφική επισήμανση των δειγμάτων (συνολικά 38 δείγματα) τα οποία είναι ταξινομημένα με βάση την ένδειξη της ετικέτας σε τρεις κατηγορίες:

- A) Χαμηλά λιπαρά (Low-Fat)
- B) Μειωμένα ή λιγότερα λιπαρά (Reduced-Fat)
- Γ) Ελαφρύ σε λιπαρά ή θερμίδες (Light for fat or calories)

**Πίνακας 10** Παρουσίαση της διαθρεπτικής επισήμανσης των γαλακτοκομικών προϊόντων

<b>Γαλακτοκομικά Προϊόντα</b>	<b>Συστατικά</b>	<b>Ελάχιστη Λιπαρά επί Ξηρού Μέγιστη Υγρασία</b>	<b>Διατροφική αξία (Μέση αξία ανά 100g)</b>	<b>Διατροφικοί Ισχυρισμοί</b>
<b>Red-Fat</b>	Μερικώς αποβουτ/μένο αιγοπρόβειο γάλα	27% 52%	<b>Λιπαρά 15g</b> Πρωτεΐνες 32g Υδατάνθρακες 0,2g	Περιέχει 40% λιγότερα λιπαρά, περίπου από γραβιέρες Π.Ο.Π.
<b>Lig-Fat</b>	95%Αγελαδινό και 5% αιγοπρόβειο γάλα (μερικώς αποβουτυρωμένο)	21% 52,40%	<b>Λιπαρά 10g</b> Πρωτεΐνες 36g Υδατάνθρακες 0g	Μόνο 10% Λιπαρά Υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη
<b>Lig-Fat</b>	100% φρέσκο αγελαδινό γάλα (μερικώς αποβουτυρωμένο)	24% 58%	<b>Λιπαρά 13,5g</b> Πρωτεΐνες 25g Υδατάνθρακες 0,06g	Χαμηλά λιπαρά και θερμίδες Πλούσια γεύση Μόνο με 13,5 % λιπαρά
<b>Lig-Fat</b>	Μερικώς αποβουτ/μένο αγελαδινό γάλα	22,3% 53%	<b>Λιπαρά 11g</b> Πρωτεΐνες 31g Υδατάνθρακες 0g	Μόνο 11% λιπαρά Υψηλή θρεπτική αξία με αυθεντική γεύση
<b>Red-Fat</b>	Μερικώς αποβουτ/μένο αγελαδινό γάλα Πυτιά, Αλάτι, Καλλιέργεια μικροοργανισμών	20% 54%	<b>Λιπαρά 10g</b> Πρωτεΐνες 32g Υδατάνθρακες 1,5g	Δεν υπάρχει κίτρινο τυρί με λιγότερα λιπαρά
<b>Lig-Fat</b>	Μερικώς αποβουτ/μένο αγελαδινό γάλα Αλάτι, Καλλιέργεια βακτηρίων, πυτιά για χορτοφάγους	30% 49%	<b>Λιπαρά 17g</b> Πρωτεΐνες 30g Υδατάνθρακες <0,5g	Πλούσιο σε ασβέστιο Περιέχει 39% λιγότερα λιπαρά
<b>Lig-Fat</b>	Παστεριωμένο αγελαδινό γάλα, Αλάτι, Πυτιά Οξυγαλακτική καλλιέργεια, Χρώμα: άννατο Συντηρητικό: λυσοζύμη	30% 51%	<b>Λιπαρά 17,5g</b> Πρωτεΐνες 27,7g Υδατάνθρακες 0g	Πλούσιο σε ασβέστιο Χαμηλά λιπαρά και θερμίδες
<b>Lig-Fat</b>	Ημιαποβουτυρωμένο αγελαδινό γάλα	27% 44%	<b>Λιπαρά 16g (κορεσμένα 9,92g)</b> Πρωτεΐνες 34g Υδατάνθρακες <0,2g	Το μόνο σκληρό τυρί χαμηλών λιπαρών στην Ελλάδα

Γαλακτοκομικά Προϊόντα	Συστατικά	Ελάχιστα Λιπαρά επί Ξηρού Μέγιστη Υγρασία	Διατροφική αξία (Μέση αξία ανά 100g)	Διατροφικοί Ισχυρισμοί
Low-Fat	Αγελαδινό γάλα (μερικώς αποβουτυρωμένο)	24% 49%	Λιπαρά 14g (κορεσμένα 10,4g) Πρωτεΐνες 28g Υδατάνθρακες 0g	Το μόνο καπνιστό τυρί για τoστ με χαμηλά λιπαρά Υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη και ασβέστιο Κατάλληλο για χορτοφάγους (χωρίς ζωική πυτιά)
Low-Fat	Αγελαδινό αποβουτυρωμένο γάλα (μερικώς αποβουτυρωμένο)	24% 49%	Λιπαρά 14g (κορεσμένα 10,4g) Πρωτεΐνες 28g Υδατάνθρακες 0g	Υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη και ασβέστιο Κίτρινο τυρί με χαμηλά λιπαρά Με λιπαρά 2,8 gr ανά φέτα (20 gr)
Lig-Fat	Ημιαποβουτυρωμένο παστεριωμένο αγελαδινό γάλα, Αλάτι, Καλλιέργεια, Πυτιά	30% 46%	Λιπαρά 13,5g Πρωτεΐνες 24,5g Υδατάνθρακες 0,2g	Ιδανικό για δίαιτα Το παραδοσιακό με χαμηλά λιπαρά
Low-Fat	50% αγελαδινό γάλα και 50% πρόβειο γάλα (μερικώς αποβουτυρωμένο)	30% 50%	Λιπαρά 17g Πρωτεΐνες 32g Υδατάνθρακες 0g	Το πρώτο τυρί με χαμηλά λιπαρά με 50% αγελαδινό και 50% πρόβειο γάλα Μόλις 17% λιπαρά
Low-Fat	Αγελαδινό γάλα	21% 52,4%	Λιπαρά 10g Πρωτεΐνες 36g Υδατάνθρακες 0g	Υψηλή περιεκτικότητα σε ασβέστιο, πρωτεΐνες Με μόνο 10% λιπαρά συνοδεύει τα σάντουιτς
Low-Fat	Αγελαδινό γάλα	– –	Λιπαρά 8,5 g Πρωτεΐνες 20g Υδατάνθρακες 0g	Με χαμηλά λιπαρά
Red-Fat	Παστεριωμένο γάλα αγελαδος, Γαλακτικές, Αλάτι, Πτυτιά, Αντισυσσωματικό: Μεθυλοκυτταρίνη, ζύμες	29% 48%	Λιπαρά 15g Πρωτεΐνες 32g Υδατάνθρακες 0g	Με λιγότερα λιπαρά
Red-Fat	Παστεριωμένο αγελαδινό γάλα, Αλάτι Πτυτιά, Καλλιέργεια	– –	Λιπαρά 16g Πρωτεΐνες 32g Υδατάνθρακες 0,5g	40% Λιγότερα λιπαρά



Γαλακτοκομικά Προϊόντα	Συστατικά	Ελάχιστα Λιπαρά επί Ξηρού	Διατροφική αξία (Μέση αξία ανά 100g)	Διατροφικοί Ισχυρισμοί
		Μέγιστη Υγρασία		
<b>Red-Fat</b>	Παστεριωμένο αγελαδινό γάλα, μερικώς αποβουτυρωμένο	30% 50%	<b>Λιπαρά 16g</b> Πρωτεΐνες 23,5g Υδατάνθρακες <0,1g	Απόλαυση με μόνο 16% λιπαρά
<b>Lig-Fat</b>	Μερικώς αποβουτυρωμένο αγελαδινό γάλα	30% 49,5%	<b>Λιπαρά 18g</b> Πρωτεΐνες 28g Υδατάνθρακες 0g	Μόνο 11% λιπαρά Υψηλή θρεπτική αξία με αυθεντική γεύση
<b>Red-Fat</b>	Μερικώς αποβουτυρωμένο Ελληνικό αιγοπρόβειο γάλα	28,60% 68%	<b>Λιπαρά 12g</b> Πρωτεΐνες 20g Υδατάνθρακες 0,6g	Περιέχει 40% λιγότερα λιπαρά, από παρεμφερή προϊόντα Λιγότερο αλάτι 2,6-2,7g/100g
<b>Lig-Fat</b>	Μερικώς αποβουτυρωμένο αγελαδινό γάλα	Μέγιστη 30% 46%	<b>Λιπαρά 17g</b> Πρωτεΐνες 27g Υδατάνθρακες 0,2g	Το μοναδικό Τριμμένο Τυρί με 10% λιπαρά Από ημίσκληρο τυρί Αυθεντικό ελληνικό προϊόν
<b>Lig-Fat</b>	Γάλα μερικώς αποβουτυρωμένο, Αλάτι Μαγιά γάλακτος, Πυτιά	30% □	<b>Λιπαρά 10g</b> Πρωτεΐνες 19g Υδατάνθρακες 1,5g	— — —
<b>Lig-Fat</b>	Τυρί, Νερό, Απαχο αγελαδινό γάλα Γαλακτωματοποιητές, Αλάτι	20% —		Φυσική πηγή Καλίου Μονο 8% λιπαρά
<b>Lig-Fat</b>	Παστεριωμένο αγελαδινό γάλα, αλάτι, Γαλακτικές ζύμες	30% 42%	<b>Λιπαρά 17,4g</b> Πρωτεΐνες 30g Υδατάνθρακες 0g	Ημίσκληρο κίτρινο τυρί, με 30% λιγότερα λιπαρά
<b>Low-Fat</b>	100% ελληνικό, μερικώς αποβουτυρωμένο, Γαλακτικές ζύμες, Πυτιά, Φυσική χρωστική, Καροτένια, Συντηρητικό: Νιτρικό Νάτριο	— —	<b>Λιπαρά 12 (κορεσμένα 7g)</b> Πρωτεΐνες 19g Υδατάνθρακες 0g	Υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη και ασβέστιο Κατάλληλο για χορτοφάγους (χωρίς ζωική πυτιά) Μόλις 12% Λιπαρά, αλλά με πλούσια γεύση

Γαλακτοκομικά Προϊόντα	Συστατικά	Ελάχιστα Λιπαρά επί Ξηρού Μέγιστη Υγρασία	Διατροφική αξία (Μέση αξία ανά 100g)	Διατροφικοί Ισχυρισμοί
<b>Lig-Fat</b>	100% ελληνικό, μερικώς αποβουτυρωμένο φρέσκο αιγοπρόβειο γάλα, τυτιά, αλάτι, οξυγαλακτική καλλιέργεια	– –	<b>Λιπαρά 17g</b> Πρωτεΐνες 19g Υδατάνθρακες 0g	Μόλις 12% Λιπαρά
<b>Red-Fat</b>	Παστεριωμένο αγελαδινό μερικώς αποβουτυρωμένο γάλα, Πτυτιά, Αλάτι, Χρώμα Συντηρητικό : E251	30% 46%	<b>Λιπαρά 19g</b> Πρωτεΐνες 30,3g Υδατάνθρακες 0g	Περιέχει 40% λιγότερα λιπαρά, από παρεμφερή προϊόντα Λιγότερο αλάτι 1,9g/100g
<b>Red-Fat</b>	Παστεριωμένο αγελαδινό μερικώς αποβουτυρωμένο γάλα, Πτυτιά, Αλάτι, Χρώμα Συντηρητικό, Οξυγαλακτική καλλιέργεια	30% 51%	<b>Λιπαρά 17,5g</b> Πρωτεΐνες 27,7g Υδατάνθρακες 0g	Περιέχει 40% λιγότερα λιπαρά, από παρεμφερή προϊόντα Λιγότερο αλάτι 2g/100g Υψηλή περιεκτικότητα Ca 900mg* (112% ΣΗΠ)
<b>Low-Fat</b>	100% φρέσκο αίγιο παστεριωμένο γάλα Πτυτιά, Αλάτι (0.5%)	14-16% 65%	<b>Λιπαρά 14-16g</b> Πρωτεΐνες 11g Υδατάνθρακες 3g	Νέο γευστικό τυρί με λίγες θερμίδες Κατσικίσιο αλαιοφώδες τυρί με χαμηλά λιπαρά
<b>Low-Fat</b>	Φρέσκο τυρί 80%, Κρέμα γάλακτος 10%, Πρωτεΐνη ορού γάλακτος, Ινουλίνη, Αλάτι, Πυκνωτικό μέσο	– –	<b>Λιπαρά 2,2g (κορεσμένα 1,65g)</b> Πρωτεΐνες 12,9g Υδατάνθρακες 2,9g	Τα χαμηλότερα λιπαρά της κατηγορίας (μόνο 3%) Περιέχει φυτικές ίνες 3,5g
<b>Red-Fat</b>	Ημιαποβουτυρωμένο γάλα Τυρί, Νερό, Ορός γάλακτος Γαλακτοματοποιητικά Άλατα	30% 30%	<b>Λιπαρά 11g</b> Πρωτεΐνες 17g Υδατάνθρακες 1,5g	Περιέχει 40% λιγότερα λιπαρά, από παρεμφερή προϊόντα Λιγότερο αλάτι 1,1g/100g
<b>Low-Fat</b>	Ανθόγαλα, Τυρί cottage, τυτιά, αλάτι Αποβουτυρωμένο παστεριωμένο γάλα	– –	<b>Λιπαρά 3g (κορεσμένα 2,2g)</b> Πρωτεΐνες 14g Υδατάνθρακες 4g	Τα χαμηλότερα λιπαρά της κατηγορίας (μόνο 2,2%) Υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη και ασβέστιο Κατάλληλο για χορτοφάγους (χωρίς ζωική πτυτιά)
<b>Lig-Fat</b>	Φρέσκο παστεριωμένο αγελαδινό γάλα,	25% 48%	<b>Λιπαρά 13,5g</b> Πρωτεΐνες 24g Υδατάνθρακες 0,2g	Ημίσκληρο τυρί με μειωμένες θερμίδες

Γαλακτοκομικά Προϊόντα	Συστατικά	Ελάχιστα Λιπαρά επί Ξηρού	Διατροφική αξία (Μέση αξία ανά 100g)	Διατροφικοί Ισχυρισμοί
		Μέγιστη Υγρασία		
<b>Low-Fat</b>	Πλήρες γάλα, Κρέμα γάλακτος, Αλάτι (0,9%) Πρωτεΐνη γάλακτος, Κρεμμύδι, Σκόρδο, Σταθεροποιητές, Μέσο οξίνισης, Αρωμ/τη Ύλη	- -	<b>Λιπαρά 11,5g</b> Πρωτεΐνες 8g Υδατάνθρακες 4,4g	Μόνο 11..5% λιπαρά
<b>Lig-Fat</b>	Πλήρες γάλα, Κρέμα γάλακτος, Αλάτι (0,7%) Πρωτεΐνη γάλακτος, Σταθεροποιητές Μέσο οξίνισης (κιτρικό οξύ), Γάλα	40,60% 73,50%	<b>Λιπαρά 12g</b> Πρωτεΐνες 9g Υδατάνθρακες 4,1g	36% Λιγότερες θερμίδες Μόνο 12% λιπαρά
<b>Lig-Fat</b>	Αποβουτυρωμένο γάλα, Τυριά Γαλακτωματοποιητές, Αλάτι Πρωτεΐνη γάλακτος	20% -	<b>Λιπαρά 7g</b> Πρωτεΐνες 14g Υδατάνθρακες 6g	Ασβέστιο Ca 360mg* (45% ΣΗΠ) Μόνο 25 θερμίδες ανά μερίδα
<b>Lig-Fat</b>	Αγελαδινό γάλα, Αλάτι, Ένζυμα Μικροβιολογική καλλιέργεια	25% 58%	<b>Λιπαρά 12g</b> Πρωτεΐνες 25,5g Υδατάνθρακες <0,2g	Ενά ποτήρι γάλα 193ml σε κάθε Mini Babybel Γαλλικό τυρί με μειωμένα λιπαρά Ασβέστιο Ca 730mg* (91% ΣΗΠ)
<b>Low-Fat</b>	Συμπυκνωμένο άπαχο αγελαδινό γάλα Άπαχο γάλα αγελάδος, Ανθόγαλα, Αλάτι Σταθεροποιητές, Μέσο οξίνισης, τροπ. Άμυλο	21% 81%	<b>Λιπαρά 4g</b> Πρωτεΐνες 11g Υδατάνθρακες 3g	Μόνο 4% λιπαρά
<b>Lig-Fat</b>	Μερικώς αποβουτυρωμένο παστεριωμένο Αγελαδινό γάλα, Αλάτι, Πυτιά, Συντηρητικό: νιτρικό κάλιο,	30% 50%	Λιπαρά 17g Πρωτεΐνες 5,8g Υδατάνθρακες 0g	Μόνο με 17% λιπαρά

#### 4.1.2. Αντιδραστήρια και πρότυπες ουσίες

Χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια:

- Διαιθυλαιθέρας ( $C_4H_{10}O$ )
- Επτάνιο ( $C_7H_{16}$ )  
n-Heptane 99%, (SDS)
- Αντιδραστήριο μεθυλίωσης  $CH_3OK$  2M  
(μεθανολικό διάλυμα καυστικού καλίου)
- Άνυδρο θειϊκό νάτριο ( $Na_2SO_4$ )
- Δευτεριωμένο Χλωροφόρμιο ( $CDCl_3$ )  
(καθαρότητα 99,8%), (Eurisotop)

Χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω πρότυπες ουσίες:

- Βουτυρικό οξύ
- Στιγμαστερόλη
- Χοληστερόλη
- Συζευγμένο Λινελαϊκό οξύ (cis-9, trans-11), (CLA)
- Τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS),  $(CH_3)_4Si$   
πυκνότητας  $d=0,648$  (SDS)

#### 4.1.3. Όργανα και Σκεύη

- Ποτήρια ζέσεως
- Σιφόνια 1, 10, 25 ml
- Αναλυτικός ζυγός ακριβείας
- Διηθητικό χαρτί
- Γυάλινο χωνί
- Σφαιρικές φιάλες με εσφυρισμένα πώματα
- Συσκευή άλεσης
- Πουάρ
- Δοκιμαστικοί σωλήνες με εσφυρισμένα πώματα
- Πιπέτες Pasterur 1 ml
- Φούρνος
- Φιάλη αερίου αζώτου ( $N_2$ )
- Αναδευτήρας (Votrex)
- Πιπέτες LABATESOFT της εταιρείας HTL
- Σωληνάκια NMR με κωδικό 509 & 600 -Εταιρεία: NORELL
- Μικροσύριγγα
- Μεταλλικές λαβίδες
- Μεταλλικά στατώ
- Σωληνάκια erpedorf
- Συσκευή περιστρεφόμενης απόσταξης (Rotary Evaporator)
- Όργανο αερίου χρωματογράφου  
GC SHIMADZU 17A
- Όργανο Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)  
600 MHz (VARIAN)

## 4.2. Μέθοδοι Ανάλυσης

Για την απομόνωση του λίπους επιλέχτηκε η τεχνική της εκχύλισης. Για την μετατροπή των λιπαρών οξέων του εκχυλισμένου λίπους, σε μεθυλεστέρες (FAMES) επιλέχτηκε το πρότυπο 182:1999 της Διεθνούς Ομοσπονδίας Γάλακτος (IDF).

Ο προσδιορισμός της σύνθεσης λιπαρής φάσης του λίπους έγινε με την Αέρια Χρωματογραφία (GC) και τον Πυρηνικό Μαγνητικό Συντονισμό (NMR).

### 4.2.1. Μέθοδος της Αέριας Χρωματογραφίας

#### 4.2.1.1. Διαδικασία απομόνωσης του λίπους

Αρχικά με βοήθεια συσκευής άλεσης, μετατρέπονται σε τρίμμα, όσα δείγματα είναι σε φέτες ή κεφάλι και εν συνεχεία μεταφέρονται σε γυάλινο ποτήρι ζέσεως.

Σε αναλυτικό ζυγό, ζυγίζονται περίπου 30-40 gr δείγματος και τοποθετούνται σε γυάλινο ποτήρι ζέσεως. Προστίθενται 50 ml διαιθυλαιθέρα και μια κουταλιά σκόνη άνυδρου θειϊκού νατρίου ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). Ακολουθεί ανάδευση και παραμονή σε ηρεμία περίπου για 15 min.

#### Διήθηση

Σε εσφυρισμένη σφαιρική φιάλη, τοποθετείται γυάλινο χωνί στο οποίο προηγουμένως έχει εφαρμοστεί διηθητικό χαρτί σε σχήμα κώνου. Ακολουθεί διήθηση του δείγματος και παραλαβή του διηθήματος μέσα στην εσφυρισμένη σφαιρική φιάλη.

#### Εξάτμιση

Η εσφυρισμένη σφαιρική φιάλη τοποθετείται σε περιστροφικό εξατμιστήρα με ρυθμιζόμενη την θερμοκρασία του υδρόλουτρου στους 60 °C. Ακολουθεί εξάτμιση έως ότου να μην παρατηρείται απόσταξη του διαλύτη στο δοχείο συλλογής. Για την πλήρη απομάκρυνση του διαλύτη χρησιμοποιείται ρεύμα καθαρού αέριου αζώτου.

Τα δείγματα λίπους τοποθετούνται σε σωληνάκια erpedorf και συντηρούνται στο ψυγείο.

#### 4.2.1.2. Μετατροπή του λίπους σε μεθυλεστέρες

Για την μεθυλεστεροποίηση των λιπαρών οξέων των τριγλυκεριδίων έγινε εφαρμογή του προτύπου 182:1999 της Διεθνούς Ομοσπονδίας Γάλακτος (IDF).

Με αυτή τη μέθοδο, πραγματοποιείται μετεστεροποίηση των λιπαρών οξέων των τριγλυκεριδίων μόνο και όχι των ελεύθερων λιπαρών οξέων.

Κάθε δείγμα λίπους που έχει συντηρηθεί στο ψυγείο, τοποθετείται σε φούρνο έτσι ώστε να υγροποιηθεί το λίπος. Με πιπέτα Pasteur μεταφέρονται 4-5 σταγόνες λίπους (περίπου 0,4 gr λίπους) σε δοκιμαστικό σωλήνα με εσφυρισμένο πώμα. Εν συνεχεία, με το σιφώνιο του 1ml προστίθενται 0,5 ml αντιδραστηρίου μεθυλίωσης CH<sub>3</sub>OK 2M και 10 ml n-επτάνιο με το αντίστοιχο σιφώνιο των 10 ml. Έπειτα προστίθενται μικρή ποσότητα σκόνης άνυδρου θειικού νατρίου (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) με σκοπό την προσρόφηση υπάρχουσας υγρασίας του δείγματος. Ακολουθεί ανάδευση του δοκιμαστικού σωλήνα σε Vortex για περίπου 60 sec. Το δείγμα παραμένει σε ηρεμία, μέχρι να γίνει διαυγές (η θολότητα οφείλεται στην καθίζηση της γλυκερίνης).

#### 4.2.1.3. Προσδιορισμός της σύνθεσης λιπαρών οξέων με Αέρια Χρωματογραφία

Η ανάλυση των μεθυλεστεροποιημένων λιπαρών οξέων FAMES (Fatty Acids Methyl Esters) έγινε με χρήση της Αέριας Χρωματογραφίας.

Με μικροσύριγγα απομονώνονται 2 μl δείγματος από το δοκιμαστικό σωλήνα που είχε παραμείνει σε ηρεμία και γίνεται εισαγωγή στον Αέριο Χρωματογράφο.

Οι συνθήκες του Χρωματογράφου GC-17A Shimadzu κατά την διάρκεια της ανάλυσης των μεθυλεστεροποιημένων λιπαρών οξέων (FAMES) είναι οι ακόλουθες:

→ **Στήλη:** SP 2340

- Μήκος στήλης: 30 m
- Στήλη Διαχωρισμού: τριχοειδής

→ **Θερμοκρασία Κλιβάνου**

Οι διαχωρισμοί στην αέρια χρωματογραφία εξαρτώνται άμεσα από τη θερμοκρασία. Επιλέχτηκε το Διαβαθμισμένο πρόγραμμα κλιβάνου (Η θερμοκρασία αυξάνεται σταδιακά κατά τη διάρκεια της ανάλυσης) με το εξής θερμοκρασιακό πρόγραμμα :

- 45 °C για 5 min
- 5 °C/min μέχρι τους 150 °C (παραμονή σε αυτή τη θερμοκρασία για 5 min)
- 7 °C/min μέχρι τους 220 °C (παραμονή σε αυτή τη θερμοκρασία για 20 min)

- **Ανιχνευτής Ιονισμού Φλόγας (FID)**
  - Θερμοκρασία ανιχνευτή : 270 °C
- **Θερμοκρασία εισαγωγής δείγματος** : 250 °C
- **Φέρον αέριο** : ήλιο 2,5 ml/min
- **Συνολικός χρόνος ανάλυσης** : 60 min

Ο προσδιορισμός των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων έγινε με σύγκριση των χρόνων απόκρισης των άγνωστων μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων με πρότυπα μεθυλεστέρων. Οι μεθυλεστέρες εκλύονται από τη στήλη ξεκινώντας από αυτόν με το μικρότερο αριθμό ατόμων άνθρακα, ενώ καθώς αυξάνεται ο αριθμός των διπλών δεσμών στα λιπαρά οξέα παρατηρείται αύξηση του χρόνου κατακράτησης.

Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με το χρωματογραφικό αυτοματοποιημένο λογισμικό πρόγραμμα Chromomelon version 6.80 SP3 Build 2345 (2000-2007).

## **4.2.2. Μέθοδος του Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)**

### **4.2.2.1. Διαδικασία απομόνωσης του λίπους**

Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία που περιγράφηκε στην παράγραφο 4.2.1.1.

### **4.2.2.2. Προσδιορισμός της σύνθεσης λιπαρής φάσης με Φασματοσκοπία <sup>1</sup>H-NMR**

Για τον προσδιορισμό της σύνθεσης λιπαρής φάσης του λίπους με την χρήση του Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

Σε αναλυτικό ζυγό ζυγίζονται σε σωληνάκια erpedorf περίπου 100mg±10% λίπους απ' όλα τα δείγματα. Εν συνεχεία, με πιπέτα (100÷1000μl) προστίθενται 600μl Δευτεριωμένου Χλωροφόρμιου και ακολουθεί ανάδευση στο Votrex. Με πιπέτα, το δείγμα μεταφέρεται ποσοτικά σε σωληνάκια του NMR. Τέλος, με πιπέτα (0,1÷2μl) προστίθενται 1,71μl πρότυπης ουσίας αναφοράς: τετραμεθυλοσιλάνιο. Το δείγμα είναι έτοιμο για εισαγωγή και ανάλυση. Η ανάλυση των φασμάτων <sup>1</sup>H των δειγμάτων λίπους έγινε με το λογισμικό πρόγραμμα MestRec.

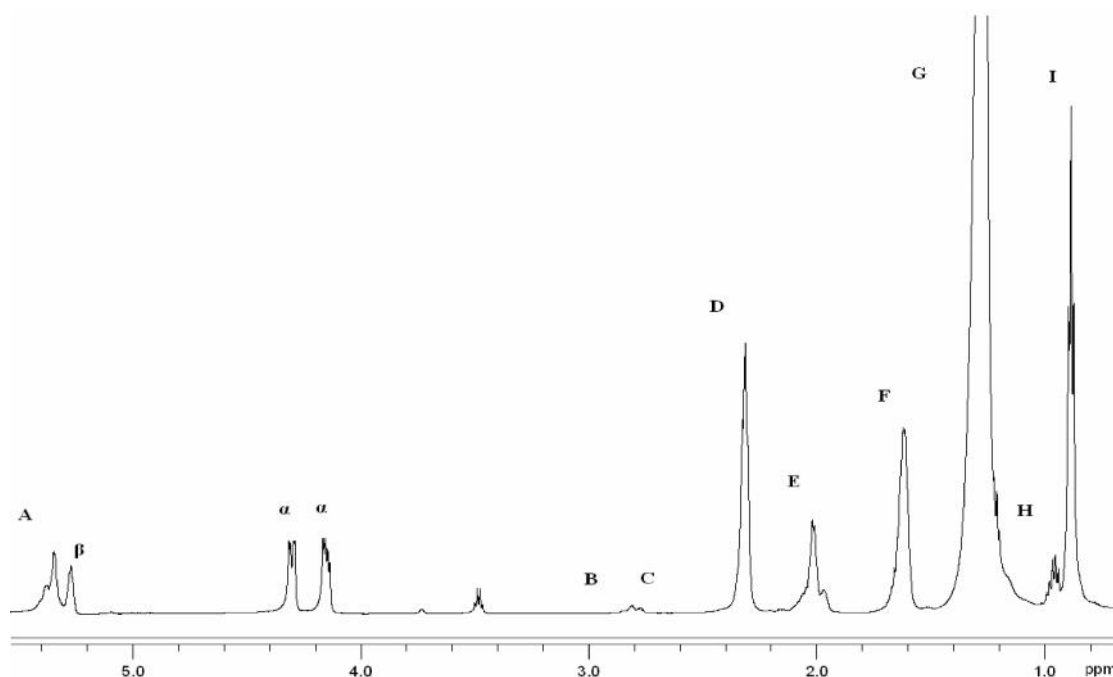
## Κεφάλαιο 5

### Αποτελέσματα και Συζήτηση

#### 5.1. Φάσματα $^1\text{H-NMR}$ για τον ποιοτικό προσδιορισμό της σύνθεσης λιπαρής φάσης γαλακτοκομικών προϊόντων

Η φασματοσκοπική τεχνική  $^1\text{H-NMR}$ , έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για τον προσδιορισμό της σύνθεσης του λίπους του γάλακτος (Brescia, M.A., Sacco A., et al. 2004). Έχει αναφερθεί ότι το μεγαλύτερο ποσοστό του γαλακτικού λίπους αποτελούν τα λιπαρά οξέα που βρίσκονται στα μόρια των γλυκεριδίων (πίνακας 2). Εξαιτίας του μεγάλου αριθμού λιπαρών οξέων στο λίπος, της αλληλοεπικάλυψης των πρωτονίων (λόγω της μεγάλης αφθονίας των πρωτονίων στα λιπαρά οξέα) στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$ , και της σχετικά μικρής περιοχής απορροφήσεων των λιπαρών οξέων στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$ , ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός συγκεκριμένων λιπαρών οξέων είναι περιορισμένος.

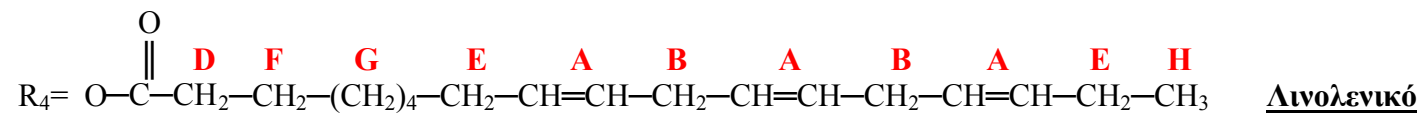
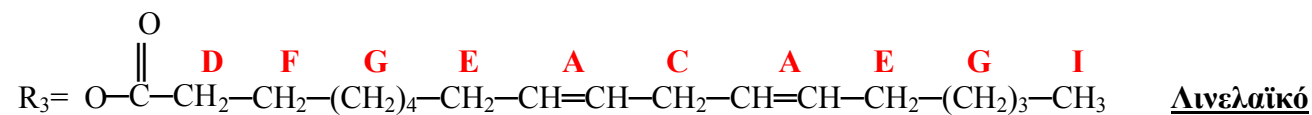
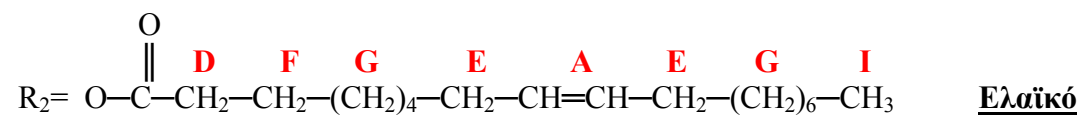
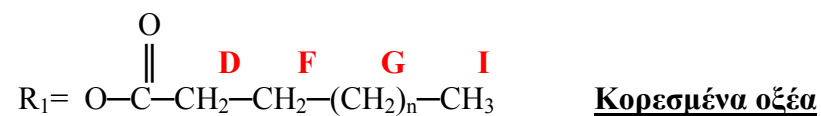
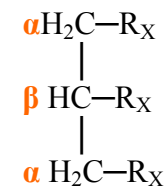
Το σχήμα 10 παρουσιάζει ένα τυπικό φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  στα 600 MHz του λίπους ενός δείγματος τυριού και η ανάθεση των κορυφών (A-I) παρουσιάζεται στον πίνακα 11.



**Σχήμα 10** Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  (στα 600 MHz) δείγματος λίπους



Γλυκερικός σκελετός (X= 1,2,3 ή 4)



**Σχήμα 11** Απεικόνιση-Αρίθμηση υδρογόνων των λιπαρών οξέων στο γλυκερικό σκελετό που εμφανίζονται στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  (σχήμα 9)

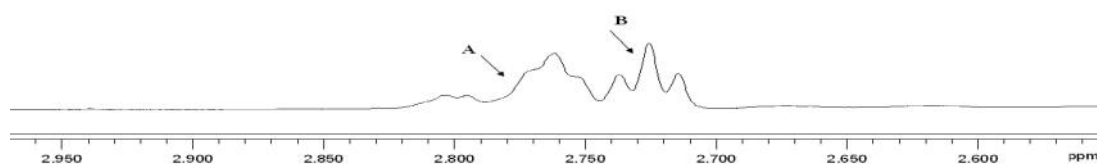
**Πίνακας 11** Χημική μετατόπιση και ανάθεση των κύριων κορυφών του φάσματος  $^1\text{H-NMR}$  του δείγματος λίπους

ΚΟΡΥΦΗ	$\delta$ 1H (ppm)	ΠΡΩΤΟΝΙΑ
I	0.88	$\text{CH}_3\text{FA}$
H	0.96	$\text{CH}_3$ Λινολενικού και βουτυρικού οξέος
G	1.27	$-(\text{CH}_2)_n-$
F	1.62	$-\text{OOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$
E	(1.95-2.00) 1.95 trans $\delta,\delta$ 2.00 cis $\delta,\delta$	$-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$
D	2.30	$-\text{OOC}-\text{CH}_2-$
C	2.73	$-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ Λινελαϊκού οξέος
B	2.79	$-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ Λινολενικού οξέος
$\alpha$	4.15	$\text{CH}_2$ γλυκερόλης
$\alpha$	4.30	$\text{CH}_2$ γλυκερόλης
$\beta$	5.26	$\text{CH}$ γλυκερόλης
A	(5.33-5.37) 5.33 cis $\delta,\delta$ 5.37 trans $\delta,\delta$	$-\text{CH}=\text{CH}-\text{FA}$

Στο σχήμα 11 απεικονίζονται οι κύριες κορυφές του φάσματος  $^1\text{H-NMR}$  του λίπους οι οποίες αντιστοιχούν σε συγκεκριμένα πρωτόνια όλων των λιπαρών οξέων (Πίνακας 12). Πιο αναλυτικά, σε  $\delta$  0.88 ppm συντονίζονται όλα τα μεθυλικά πρωτόνια των ακόρεστων και κορεσμένων οξέων σε αντίθεση με τα μεθυλικά πρωτόνια του λινολενικού και βουτυρικού οξέος που εμφανίζονται σε  $\delta$  0.96 ppm. Τα μεθυλικά πρωτόνια όλων των λιπαρών οξέων συντονίζονται σε  $\delta$  1.27 ppm. Τα μεθυλικά πρωτόνια  $\alpha$ ,  $\beta$  των εστεροποιημένων λιπαρών οξέων των τριγλυκεριδίων συντονίζονται σε  $\delta$  2.30 ppm και  $\delta$  1.62 ppm αντίστοιχα. Τα αλλυλικά πρωτόνια όλων των ακόρεστων λιπαρών οξέων συντονίζονται σε  $\delta$  1.95-2.00 ppm, ενώ σε  $\delta$  2.73 και  $\delta$  2.79 ppm εμφανίζονται τα διαλλυλικά πρωτόνια του λινελαϊκού και λινολενικού οξέος. Τα  $\alpha$ - μεθυλικά πρωτόνια της γλυκερόλης συντονίζονται σε  $\delta$  4.15 και 4.30 ppm και τα  $\beta$ - μεθυλικά πρωτόνια σε  $\delta$  5.26 ppm. Τέλος, τα ολεφινικά πρωτόνια των ακόρεστων λιπαρών οξέων συντονίζονται σε  $\delta$  5.33-5.37 ppm.

Τα φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  (στα 600 MHz) των σχημάτων 12-19, παρουσιάζουν επιλεγμένες περιοχές του φάσματος για τον ποιοτικό προσδιορισμό λιπαρών ενώσεων στο λίπος των δειγμάτων.

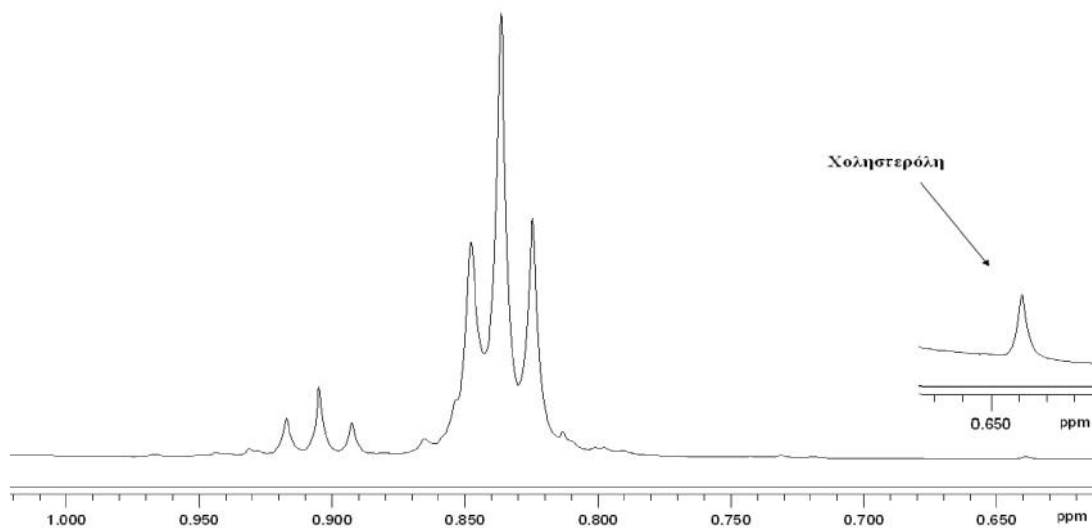
Πιο συγκεκριμένα το σχήμα 12 παρουσιάζει τα διαλλυτικά πρωτόνια των ακόρεστων λιπαρών οξέων (λινελαϊκό και λινολενικό οξύ) να έχουν χημική μετατόπιση σε  $\delta$  2.73 (κορυφή B) και  $\delta$  2.79 (κορυφή A) ppm αντίστοιχα (Brescia. M.A., Sacco A., et al. 2004 ; Sacchi, R., et al, 1993 ; Faulh, C., F. Reniero, and C. Guillou, 2000). Η διαμόρφωση στο χώρο των πρωτονίων του διπλού δεσμού θεωρητικά μπορεί να προσδιοριστεί με την σταθερά σύζευξης που είναι μεγαλύτερη για τους trans δεσμούς (12-15 Hz) από ότι για τους cis (οξύτερο σήμα, 9-11 Hz). Με την βοήθεια COSY και  $^1\text{H-NMR}$  φάσματος βρέθηκε ότι η σταθερά σύζευξης (j-coupling) έχει τιμή 4 Hz στην περιοχή  $\delta$  5.33 ppm ( $-\text{CH}=\text{CH}-\text{FA}$ ), και τιμή 5 Hz στην περιοχή  $\delta$  2.00 ppm ( $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ ) και επιβεβαιώθηκε ότι οι διπλοί δεσμοί είναι cis, οπότε πρόκειται για τα C18:3n3a και C18:2n6 λιπαρά οξέα.



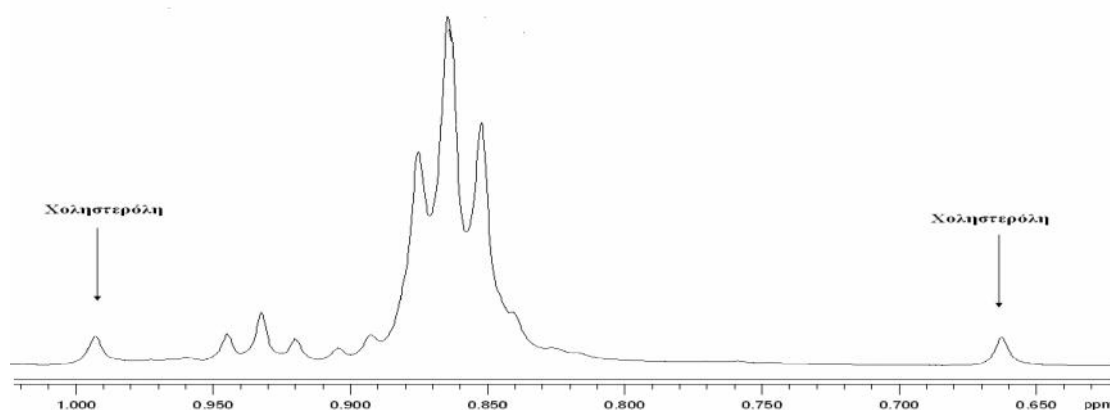
**Σχήμα 12** Ανάθεση κορυφών (A,B) των διαλλυτικών πρωτονίων του λινελαϊκού και λινολενικού οξέος σε δείγμα λίπους

Επίσης η κορυφή στα 0.96 ppm αντιστοιχεί στα μεθυλικά πρωτόνια  $\text{CH}_3$  του λινολενικού C18:3n3a (Sacchi, R., I. Medina, L. Paolillo, and F. Addeo, 1993 ; Shiao T.Y, 1989 ; Sacchi, R., M. Patumi, 1996) και βουτυρικού οξέος ( Brescia. M.A., Sacco A., et al. 2004).

Στα σχήματα 13 και 14 προσδιορίζεται η χοληστερόλη στο λίπος των γαλακτοκομικών προϊόντων χαμηλής και μειωμένης λιποπεριεκτικότητας. Η κορυφή που οφείλεται στα υδρογόνα του μεθυλίου  $\text{CH}_3$  στη θέση 18 του μορίου της χοληστερόλης, συντονίζεται μεταξύ 0.6 και 0.7 ppm σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα (Brescia, M.A., Sacco, A. 2008; Mannina, L., Segre A. 2002; Dais, P., 2010; Yoshioka, Y., Sasaki, J., Yamamoto M., et al 2000). Η ανάθεση της κορυφής έγινε και με τη βοήθεια πρότυπης ουσίας χοληστερόλης, λαμβάνοντας φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της πρότυπης ένωσης χοληστερόλης καθώς και φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  με προσθήκη χοληστερόλης σε λίπος δείγματος (σχήμα 14).



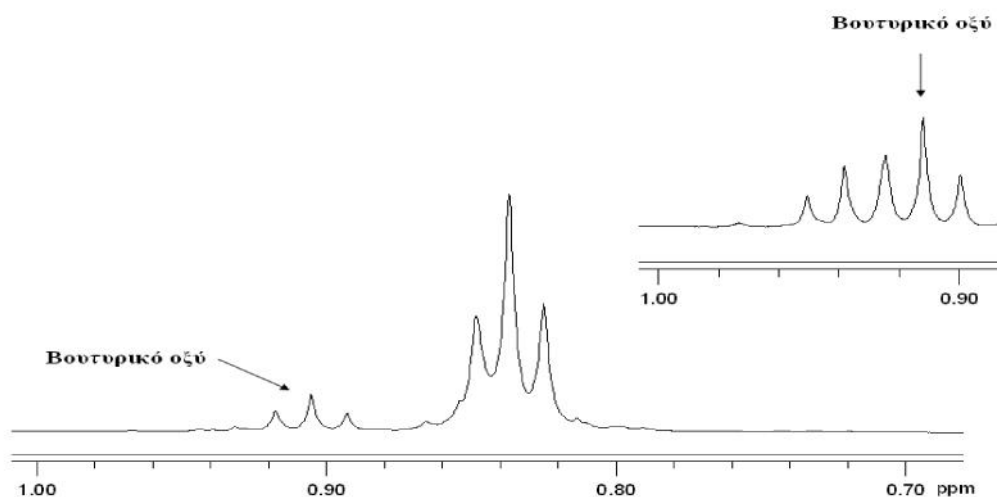
**Σχήμα 13** Ανάθεση κορυφής της χοληστερόλης σε λίπος δείγματος ( $\delta$  0.648 ppm)



**Σχήμα 14** Προσθήκη πρότυπης ένωσης Χοληστερόλης σε λίπος δείγματος

Από το σχήμα 14, φαίνεται πιο έντονα η απορρόφηση των υδρογόνων του μεθυλίου  $\text{CH}_3$  στη θέση 18 του μορίου της χοληστερόλης, σε  $\delta$  0.6-0.7 ppm (σε σύγκριση με το σχήμα 13). Σε όλα τα εμπορικά δείγματα των γαλακτοκομικών προϊόντων προσδιορίστηκε χοληστερόλη.

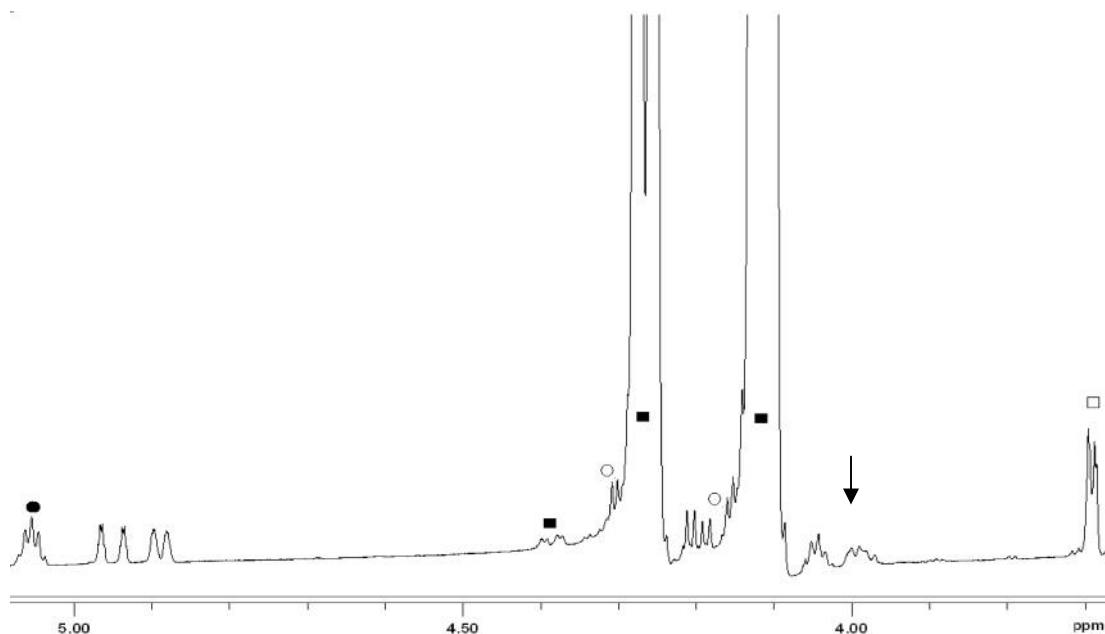
Για τον ποιοτικό προσδιορισμό του βουτυρικού οξέος χρησιμοποιήθηκε πρότυπη ένωση βουτυρικού οξέος, λαμβάνοντας φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της πρότυπης ένωσης βουτυρικού οξέος καθώς και φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  με προσθήκη πρότυπου βουτυρικού οξέος σε λίπος δείγματος (σχήμα 15).



**Σχήμα 15** Περιοχή απορρόφησης μεθυλικών πρωτονίων  $\text{CH}_3$  του βουτυρικού οξέος σε λίπος δείγματος (κάτω) και περιοχή απορρόφησης πρωτονίων  $\text{CH}_3$  βουτυρικού οξέος σε φάσμα λίπους στο οποίο έγινε προσθήκη πρότυπου βουτυρικού οξέος (άνω).

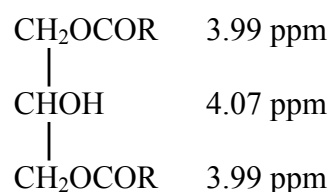
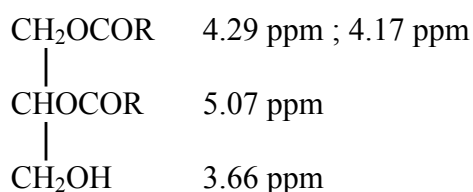
Στο παραπάνω σχήμα παρατηρείται μια τριπλή κορυφή σε  $\delta$  0.94ppm που οφείλεται στα μεθυλικά πρωτόνια  $\text{CH}_3$  του βουτυρικού οξέος. Με προσθήκη πρότυπου βουτυρικού οξέος στο λίπος δείγματος η τριπλή κορυφή μετατράπηκε σε 5πλή κορυφή. Η ανάθεση της κορυφής έγινε και με τη βοήθεια πληροφοριών από τη βιβλιογραφία (Brescia. M.A., Mazzilli. V., Sgaramella. A., Ghelli. S., Fanizzi. F.P., and Sacco A. 2004).

Το παρακάτω σχήμα αποδεικνύει την ύπαρξη διγλυκεριδίων στο λίπος των γαλακτοκομικών προϊόντων.



**Σχήμα 16** Φάσμα  $^1\text{H}$  στα 600 MHz, στην περιοχή απορρόφησης πρωτονίων σε  $\delta$  3.5-5.3 ppm

Η παρουσία των sn-1,2 και sn-1,3 διγλυκεριδίων μπορεί να ελεγχθεί εύκολα από την παρατήρηση μικρών διπλών κορυφών κοντά στα σήματα των  $\alpha$ -υδρογόνων της γλυκερίνης, περίπου σε 4.12 και 4.27 ppm, ορατή μόνο όταν διευρύνεται πολύ το φάσμα (Barison, A., et al, 2010).

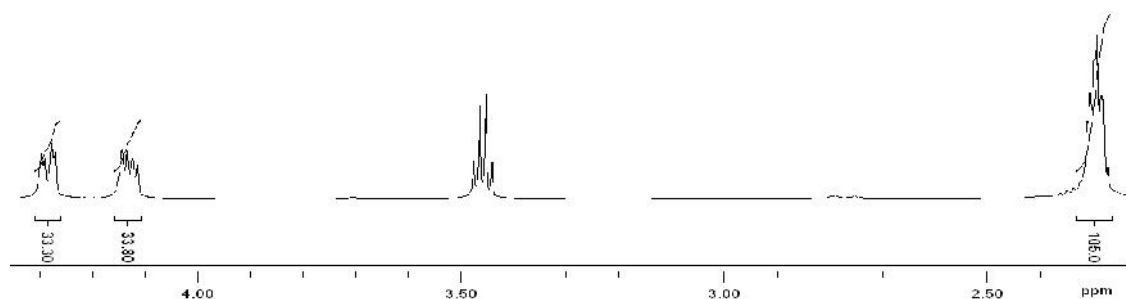


#### sn-1,2 διγλυκερίδια

#### sn-1,3 διγλυκερίδια

Η κορυφή σε  $\delta$  5.07 ppm αντιστοιχεί στο μεθυλικό πρωτόνιο CH του sn-1,2 διγλυκεριδίου. Σε  $\delta$  4.29 και 4.17 ppm συντονίζονται τα μεθυλικά πρωτόνια  $\alpha$ - $\text{CH}_2$  των sn-1,2 διγλυκεριδίων (ανοιχτό κύκλο). Η χημική μετατόπιση σε  $\delta$  4.00 ppm δείχνει τα μεθυλικά πρωτόνια  $\text{CH}_2$  των sn-1,3 διγλυκεριδίων. Τα πρωτόνια  $\alpha'$ - $\text{CH}_2$  των sn-1,2 διγλυκεριδίων δίνουν κορυφή σε  $\delta$  3.66 ppm. Τέλος, σε 4.12 και 4.17 ppm συντονίζονται τα  $\alpha$ ,  $\alpha'$ - $\text{CH}_2$  πρωτόνια των τριγλυκεριδίων (Sacchi, R., Patumi, M., et al. 1996; Mannina, L., Segre A. 2002). Σε όλα τα δείγματα προσδιορίστηκαν διγλυκερίδια εκτός από 2 δείγματα.

Ο προσδιορισμός των ελεύθερων λιπαρών οξέων στο λίπος βασίστηκε στην ακόλουθη μέθοδο: Το μόριο της γλυκερόλης είναι εστεροποιημένο με τρία μόρια λιπαρού οξέος (τριγλυκερίδια). Σε  $\delta$  2.25 ppm περίπου, συντονίζονται τα πρωτόνια  $\alpha'$ -CH<sub>2</sub>COOH των λιπαρών οξέων (συνολικά 6) που είναι εστεροποιημένα στο μόριο της γλυκερόλης. Τα τέσσερα πρωτόνια  $\alpha'$ -CH<sub>2</sub> της γλυκερόλης συντονίζονται σε  $\delta$  4.14 (2 πρωτόνια) και 4.3 ppm (2 πρωτόνια) περίπου, ενώ το πρωτόνιο  $\beta'$ -CH της γλυκερόλης συντονίζεται σε  $\delta$  5.2 ppm. Η αναλογία πρωτονίων γλυκερόλης προς πρωτονίων  $\alpha'$ -CH<sub>2</sub> των λιπαρών οξέων είναι 5:6. Θέτοντας ως τιμή ολοκλήρωσης ίσον με 33.3 (αντιστοιχεί η τιμή 16.67 για κάθε πρωτόνιο) σε μία από τις δύο κορυφές των πρωτονίων  $\alpha'$ -CH<sub>2</sub> της γλυκερόλης, η τιμή της ολοκλήρωσης του σήματος σε  $\delta$  2.25 ppm θα δείξει εάν υπάρχουν ελεύθερα λιπαρά οξέα στο λίπος ή όχι. Η τιμή ίσον με 100 δείχνει ότι δεν υπάρχουν ελεύθερα λιπαρά οξέα (δηλαδή είναι εστεροποιημένα στο γλυκερικό σκελετό) ενώ τιμή μεγαλύτερη των 100 αποτελεί ένδειξη ύπαρξης ελεύθερων λιπαρών οξέων στο λίπος (Barison, A., et al, 2010).



**Σχήμα 17** Φάσμα <sup>1</sup>H στα 600 MHz δείγματος λίπους που αποδεικνύει την παρουσία ελεύθερων λιπαρών οξέων

Στον παρακάτω πίνακα, φαίνεται ποια γαλακτοκομικά προϊόντα περιέχουν ελεύθερα λιπαρά οξέα.

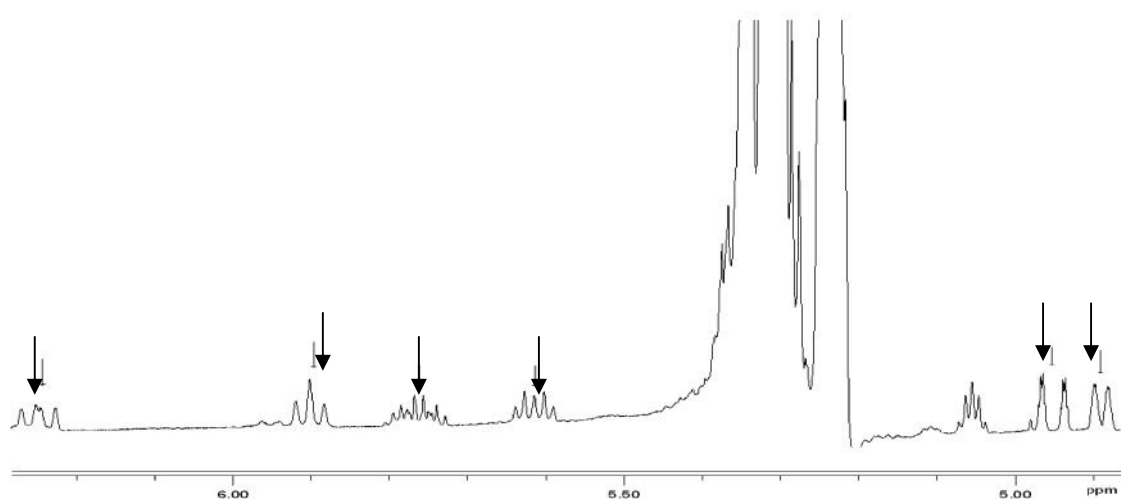
**Πίνακας 12** Συγκεντρώσεις ελεύθερων λιπαρών οξέων στο λίπος των γαλακτοκομικά προϊόντα

Γαλακτοκομικά Προϊόντα	Ελεύθερα Λιπαρά οξέα	Γαλακτοκομικά Προϊόντα	Ελεύθερα Λιπαρά οξέα
Red-Fat	100,19	Lig-Fat	99,92
Lig-Fat	100,15	Lig-Fat	99,18
Lig-Fat	100,59	Red-Fat	99,18
Low-Fat	100,57	Lig-Fat	99,63
Lig-Fat	100,32	Lig-Fat	99,71
Red-Fat	100,79	Red-Fat	99,17
Lig-Fat	100,48	Lig-Fat	99,27
Low-Fat	100,36	Low-Fat	99,53
Red-Fat	100,45	Low-Fat	99,34
Low-Fat	100,26	Low-Fat	99,82
Lig-Fat	105,60	Red-Fat	99,97
Low-Fat	101,50	Lig-Fat	98,97
Lig-Fat	101,60	Red-Fat	98,04
Lig-Fat	101,56	Low-Fat	90,00
Lig-Fat	101,70	Low-Fat	98,52
Lig-Fat	102,29	Low-Fat	98,28
Low-Fat	103,35	Lig-Fat	97,10
Lig-Fat	103,52	Lig-Fat	95,00
Red-Fat	108,45	Lig-Fat	96,53

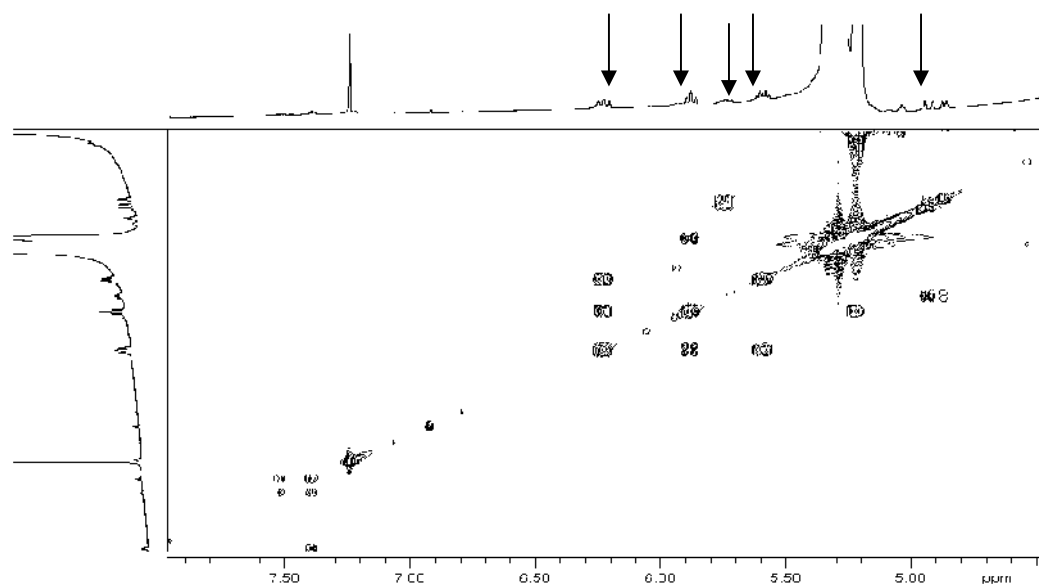
Η τιμή  $\leq 100$  δείχνει ότι δεν υπάρχουν ελεύθερα λιπαρά οξέα (δηλαδή είναι εστεροποιημένα στο γλυκερικό σκελετό) ενώ τιμή μεγαλύτερη των 100 αποτελεί ένδειξη ύπαρξης ελεύθερων λιπαρών οξέων στο λίπος (Barison, A., et al, 2010). Από τον παραπάνω πίνακα παρατηρείται ότι τα περισσότερα δείγματα έχουν τιμή ολοκλήρωσης  $\leq 100$ .



Επίσης στο λίπος όλων των δειγμάτων ανιχνεύθηκαν υπεροξειδία ως προϊόντα της οξείδωσης του λίπους (Brescia. M.A., Mazzilli. V., Sgaramella. A., Ghelli. S., Fanizzi. F.P., and Sacco A. 2004) (σχήμα 18).



**Σχήμα 18** Φάσμα  $^1\text{H}$  στα 600 MHz δείγματος λίπους που δείχνει την περιοχή απορρόφησης πρωτονίων των υπεροξειδίων (4.9-6.3) ppm



**Σχήμα 19** Φάσμα  $^1\text{H}$  COSY στα 600 MHz δείγματος λίπους

Για την ταυτοποίηση των υπεροξειδίων λήφθηκε και ομοπυρηνικό φάσμα δύο διαστάσεων COSY (συσχετίζει τα υδρογόνα γειτονικών ανθράκων).

## 5.2. Ποσοτικός προσδιορισμός της σύνθεσης της λιπαρής φάσης με $^1\text{H}$ - NMR

Η σύνθεση των λιπαρών οξέων στο λίπος πραγματοποιήθηκε, εκτιμώντας τις περιοχές ολοκλήρωσης των κορυφών A-I του φάσματος  $^1\text{H}$ - NMR (σχήμα 9).

Με την φασματοσκοπική τεχνική  $^1\text{H}$ - NMR ταυτοποιήθηκαν τρία λιπαρά οξέα: το βουτυρικό, το λινελαϊκό και το λινολενικό οξύ. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του λινολενικού, λινελαϊκού και βουτυρικού, χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες εξισώσεις με βάση την βιβλιογραφία (Brescia. M.A., Sacco A., et al. 2004):

$$\text{Λινελαϊκό οξύ (mol\%)} = 3C/2(H + I)$$

$$\text{Λινολενικό οξύ (mol\%)} = 3B/4(H + I)$$

$$\text{Βουτυρικό οξύ (mol\%)} = H/(H + I) - 3B/2(H + I)$$

Για τον υπολογισμό των ακόρεστων, κορεσμένων, μόνο- και πολύ-ακόρεστων λιπαρών οξέων χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες εξισώσεις (Brescia. M.A., Sacco A., et al. 2004):

$$\text{Ακόρεστα λιπαρά οξέα (mol\%)} = \text{MUFA} + \text{Λινολενικό} + \text{Λινελαϊκό} = E/2D$$

$$\text{Κορεσμένα λιπαρά οξέα (mol\%)} = I/(H + I) + H/(H + I) - E/2D$$

$$\text{Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (mol\%)} = E/2D - (\text{Λινολενικό} + \text{Λινελαϊκό οξύ})$$

$$\text{Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (mol\%)} = \text{Ακόρεστα λιπαρά οξέα} - \text{MUFA}$$

Τα αποτελέσματα των ανωτέρω υπολογισμών παρατίθεται στους Πίνακες 13 και 14.

**Πίνακας 13** Περιεκτικότητα λιπαρών οξέων (% , mole fraction) στο λίπος των γαλακτοκομικών προϊόντων

<b>Γαλακτοκομικά Προϊόντα</b>	<b>C18:2n6 Λινελαϊκό οξύ</b>	<b>C18:3n3a Λινολενικό οξύ</b>	<b>Βουτυρικό οξύ</b>	<b>ω6/ω3</b>
Lig-Fat	0,97	0,73	10,18	1,33
Lig-Fat	1,68	1,17	7,49	1,44
Lig-Fat	1,16	0,91	9,2	1,27
Lig-Fat	1,6	0,96	9,63	1,67
Lig-Fat	1,46	0,81	9,06	1,80
Lig-Fat	1,08	1	11,89	1,08
Lig-Fat	1,96	0,82	8,37	2,39
Lig-Fat	1,12	0,72	9,68	1,56
Lig-Fat	2,35	0,75	8,77	3,13
Lig-Fat	2,04	0,85	8,72	2,40
Lig-Fat	3,64	2,09	8,67	1,74
Lig-Fat	2,1	1,13	9,04	1,86
Lig-Fat	1,69	0,93	8,03	1,82
Lig-Fat	2,4	0,96	8,31	2,50
Lig-Fat	1,52	0,84	8,77	1,81
Lig-Fat	1,69	1,1	8,95	1,54
Lig-Fat	2,49	1,33	8,83	1,87
Lig-Fat	1,6	0,88	9,35	1,82
Red-Fat	2,21	1,42	8,4	1,56
Red-Fat	1,52	0,84	9,35	1,81
Red-Fat	1,45	0,8	9,42	1,81
Red-Fat	2,22	1,02	9,21	2,18
Red-Fat	1,12	0,72	9,62	1,56
Red-Fat	1,79	1,14	10,17	1,57
Red-Fat	1,12	0,8	9,28	1,40
Red-Fat	1,27	0,72	9,16	1,76
Red-Fat	1,49	0,83	9,36	1,80
Low-Fat	1,63	0,89	12,56	1,83
Low-Fat	1,32	0,74	12,36	1,78
Low-Fat	1,78	0,82	11,74	2,17
Low-Fat	1,22	0,84	12,81	1,45
Low-Fat	1,06	0,45	10,29	2,36
Low-Fat	1,53	0,93	8,2	1,65
Low-Fat	3,22	1,27	7,07	2,54
Low-Fat	3,27	1,95	7,01	1,68
Low-Fat	1,29	0,64	9,12	2,02
Low-Fat	1,1	0,95	9,24	1,16
Low-Fat	1,99	0,83	8,4	2,40

**Πίνακας 14** Αποτελέσματα του συνόλου κορεσμένων, μόνο- και πολύ- ακόρεστων λιπαρών οξέων (% , mole fraction) στο λίπος των γαλακτοκομικών προϊόντων

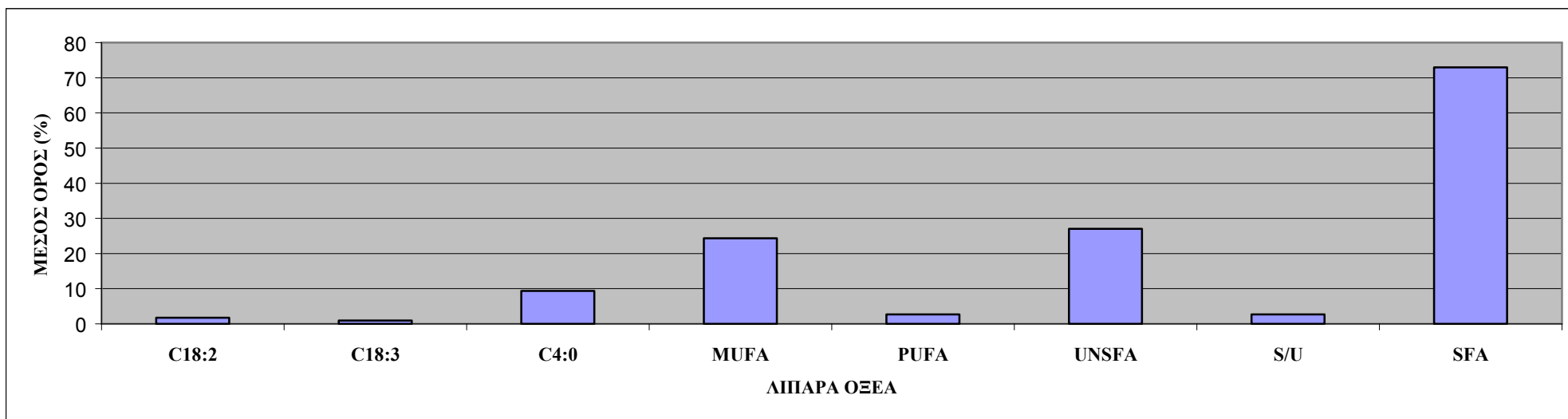
<b>Γαλακτοκομικά Προϊόντα</b>	<b>Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα</b>	<b>Πολυακόρεστα Λιπαρά οξέα</b>	<b>Ακόρεστα λιπαρά</b>	<b>s/u</b>	<b>Κορεσμένα λιπαρά οξέα</b>
Lig-Fat	25,22	1,7	26,92	2,71	73,08
Lig-Fat	24,16	2,85	27,01	2,70	72,99
Lig-Fat	22,34	2,06	24,4	3,10	75,59
Lig-Fat	23,47	2,57	26,04	2,84	73,96
Lig-Fat	23,41	2,27	25,68	2,89	74,32
Lig-Fat	33,07	2,09	35,16	1,84	64,85
Lig-Fat	24,25	2,77	27,02	2,70	72,98
Lig-Fat	21,99	1,84	23,83	3,19	76,16
Lig-Fat	26,59	3,1	29,69	2,37	70,31
Lig-Fat	25,02	2,89	27,91	2,58	72,09
Lig-Fat	23,04	5,73	28,77	2,48	71,24
Lig-Fat	24,79	3,23	28,02	2,57	71,98
Lig-Fat	23,64	2,61	26,25	2,81	73,74
Lig-Fat	26,51	3,35	29,86	2,35	70,13
Lig-Fat	24,16	2,36	26,52	2,77	73,48
Lig-Fat	28,14	2,79	30,93	2,23	69,07
Lig-Fat	21,4	3,82	25,22	2,97	74,78
Lig-Fat	24,74	2,48	27,22	2,67	72,77
Red-Fat	23,74	2,92	26,66	2,75	73,33
Red-Fat	22,23	1,99	24,22	3,13	75,78
Red-Fat	21,7	2,31	24,01	3,16	75,99
Red-Fat	24,84	1,92	26,76	2,74	73,24
Red-Fat	22,03	3,62	25,65	2,90	74,35
Red-Fat	23,43	2,36	25,79	2,88	74,2
Red-Fat	24,82	2,25	27,07	2,69	72,93
Red-Fat	24,82	3,24	28,06	2,56	71,94
Red-Fat	24,17	1,83	26	2,85	74
Low-Fat	22,37	2,46	24,83	3,03	75,17
Low-Fat	22,82	4,5	27,32	2,66	72,68
Low-Fat	20,07	5,22	25,29	2,95	74,71
Low-Fat	23,68	2,05	25,73	2,89	74,27
Low-Fat	23,83	1,93	25,76	2,88	74,23
Low-Fat	24,07	2,82	26,89	2,72	73,12
Low-Fat	22,72	2,52	25,24	2,96	74,76
Low-Fat	27,96	2,06	30,02	2,33	69,98
Low-Fat	25,83	2,6	28,43	2,52	71,57
Low-Fat	28	2,07	30,07	2,33	69,93
Low-Fat	25,4	1,51	26,91	2,72	73,09

Από τον πίνακα 13 παρατηρείται ότι τρία δείγματα παρουσιάζουν μεγάλη περιεκτικότητα σε λινελαϊκό οξύ (C18:2n6) ενώ η περιεκτικότητα όλων των υπόλοιπων δειγμάτων σε λινελαϊκό οξύ κυμαίνεται σε περιεκτικότητες 0,97-3,64%. Το λινολενικό οξύ (C18:3) εμφανίζεται σε μικρότερη περιεκτικότητα (0,64-1,42%). Το βουτυρικό οξύ κυμαίνεται σε περιεκτικότητες (7.01-12.81%). Οι τιμές της σχέσης ω-6/ω-3, κυμαίνεται από 1,08 έως 3,13 (επιθυμητή αναλογία).

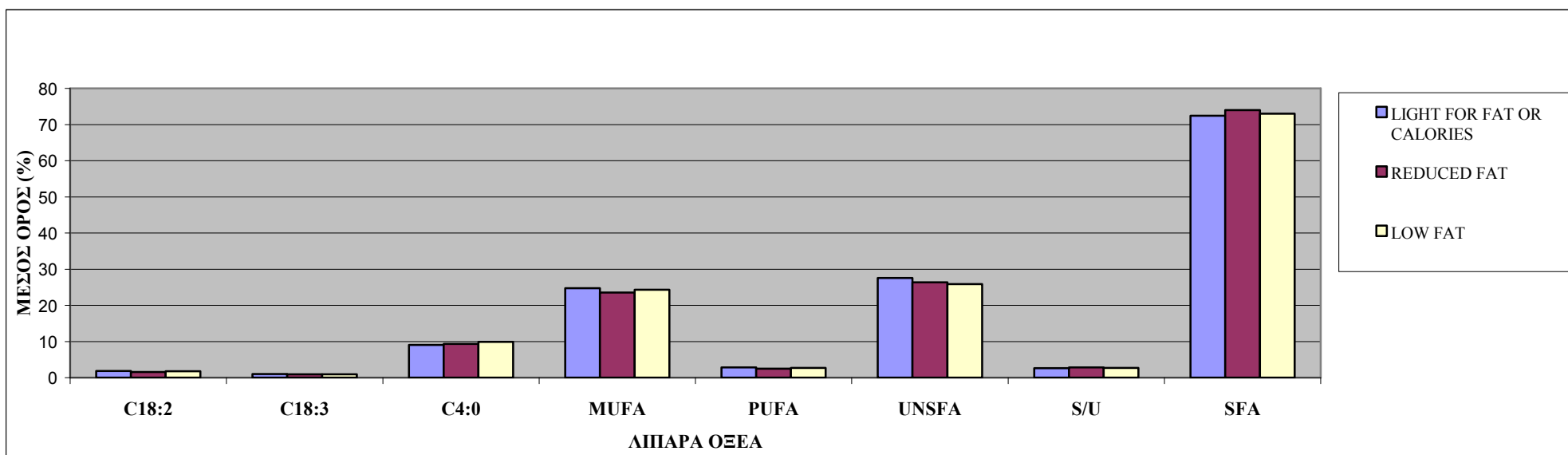
Από τον πίνακα 14 φαίνεται ότι η περιεκτικότητα σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFA) (κυρίως C18:1) κυμαίνεται από 20.07% έως και 33.07%. Όσον αφορά τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) η περιεκτικότητα τους κυμαίνεται από 1.51% έως 3.5%, με δύο δείγματα να εμφανίζουν υψηλότερες τιμές (5,22 και 5,73% αντίστοιχα). Επίσης η περιεκτικότητα σε κορεσμένα λιπαρά οξέα κυμαίνεται μεταξύ 64.85-76.16%.

Η γραφική παράσταση των μέσων όρων των λιπαρών οξέων για τα δείγματα που εξετάστηκαν φαίνεται με τη μορφή ραβδόγραμματος στο γράφημα 1. Από τα αποτελέσματα και το ραβδόγραμμα παρατηρείται η υψηλή συγκέντρωση των κορεσμένων λιπαρών οξέων (72,97%) καθώς επίσης η μεγάλη διαφορά μεταξύ μονοακόρεστων (24,33%) και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (2,7%). Επίσης η περιεκτικότητα σε λινελαϊκό οξύ (C18:2n6) κυμαίνεται από 1,5-2% σε σύγκριση με το Λινολενικό οξύ (C18:3) περίπου στο 1%.

Από τα αποτελέσματα και το ραβδόγραμμα 2 φαίνεται ότι οι τρεις κατηγορίες με ένδειξη ετικέτας “light for fat or calories”, “low fat” ή “reduced fat” δεν έχουν σημαντικές διαφορές ως προς την περιεκτικότητα σε λιπαρά οξέα. Τα γαλακτοκομικά προϊόντα “reduced fat” έχουν την υψηλότερη συγκέντρωση σε κορεσμένα λιπαρά οξέα.



Γράφημα 1 Μέσοι όροι λιπαρών οξέων σε γαλακτοκομικά προϊόντα



Γράφημα 2 Μέσοι όροι λιπαρών οξέων σε ομαδοποιημένα γαλακτοκομικά προϊόντα

### 5.3. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός της σύνθεσης λιπαρών οξέων με Αέρια Χρωματογραφία

Με την εφαρμογή της αέριας χρωματογραφίας, έγινε ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός της σύνθεσης λιπαρών οξέων του λίπους των 38 εμπορικών δειγμάτων των γαλακτοκομικών προϊόντων (Πίνακες 16-18).

Πιο συγκεκριμένα, στους Πίνακες 15-17 παρουσιάζεται το προφίλ λιπαρών οξέων (w/w %) του λίπους των γαλακτοκομικών προϊόντων που φέρουν την ένδειξη στην ετικέτα “light for fat or calories”, “low fat” ή “reduced fat” .

Ο πίνακας 18 αναφέρεται στα αποτελέσματα των λιπαρών οξέων:

- A) Μικρής αλύσου (SCFA)
- B) Μεσαίας αλύσου (MCFA)
- Γ) Μακράς αλύσου (LCFA)

Οι πίνακες 19-20 αναφέρονται στα αποτελέσματα του συνόλου ακόρεστων, κορεσμένων, μονοακόρεστων και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων.

Τέλος, στον πίνακα 21 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των ακόλουθων δεικτών:

#### A) Δείκτη αθηρωμάτωσης

$$AI = \frac{C12 + (4 * C14) + C16:O}{MUFA + PUFA}$$

Υπολογίστηκε βάση της σχέσης των Uibricht & Southgate (1991). Σύμφωνα με τους ερευνητές, όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή του δείκτη, τόσο μεγαλύτερες είναι οι πιθανότητες πρόκλησης στον άνθρωπο καρδιαγγειακών νοσημάτων ως αποτέλεσμα της κατανάλωσης μεγάλων ποσοτήτων του τροφίμου.

**Πίνακας 15** Προφίλ λιπαρών οξέων ( w/w % ) του λίπους των γαλακτοκομικών προϊόντων

<b>ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ</b>	<b>Lig-Fat</b>	<b>Lig-Fat</b>	<b>Lig-Fat</b>	<b>Lig-Fat</b>	<b>Lig-Fat</b>	<b>Lig-Fat</b>	<b>Lig-Fat</b>	<b>Lig-Fat</b>	<b>Lig-Fat</b>	<b>Lig-Fat</b>	<b>Lig-Fat</b>	<b>Lig-Fat</b>
<b>C4:0</b>	2,48	2,59	6,33	4,76	6,97	4,48	3,1	3,36	5,04	5,66	4,65	5,28
<b>C6:0</b>	2,84	3,58	3,99	3,54	4,3	2,91	2,42	2,56	2,66	4,04	2,93	3,62
<b>C8:0</b>	2,55	3,7	3,14	2,74	2,82	2,22	2,09	2,17	2,14	2,91	2,46	2,71
<b>C10:0</b>	9,18	14,97	8,06	6,73	6,22	5	6,39	4,91	4,56	6,13	5,92	7,12
<b>C12:0</b>	8,12	8,36	8,96	7,11	6,6	5,13	6,06	6,1	4,57	5,94	6,23	7,07
<b>C14:0</b>	11,5	8,15	16,07	15,13	17,17	13,36	13,06	14,96	12,92	14,96	15,75	16,81
<b>C14:1</b>	1,3	0,34	2,62	1,91	1,48	1,3	1,56	1,9	1,42	1,62	1,95	1,79
<b>C15:0</b>	1,21	0,94	1,15	1,03	1,43	1,21	1,43	1,24	1,45	1,33	1,37	0,94
<b>C16:0</b>	27,19	27,45	28,83	30,53	30,73	28,26	31,33	34,05	30,06	29,37	29,86	31,13
<b>C16:1</b>	0,97	1,76	1,57	2,02	1,97	2,16	0,88	1,94	2,1	1,85	1,7	1,89
<b>C17:0</b>	0,12	0,13	0,19	0,27	0,25	0,44	0,29	0,32	0,28	0,3	0,3	0,1
<b>C18:0</b>	7,14	5,14	4,73	5,97	4,79	8,38	7,19	7,31	8,48	6,39	7,08	4,84
<b>C18:1</b>	22,19	19,41	11,56	16,09	13,64	22,2	18,48	17,22	20,96	17,32	17,28	14,14
<b>C18:2</b>	2,37	2,16	2,42	1,55	1,18	1,69	4,87	1,1	2,48	1,43	1,4	1,59
<b>C18:3</b>	0,34	0,1	0,26	0,04	0,04	0,04	0,04	0,07	0,1	0,07	0,08	0,14
<b>C18:2<sup>conj</sup></b>	0,49	1,22	0,14	0,55	0,43	1,19	0,82	0,77	0,78	0,65	1,05	0,82



**Πίνακας 16** Προφίλ λιπαρών οξέων ( w/w % ) του λίπους των γαλακτοκομικών προϊόντων

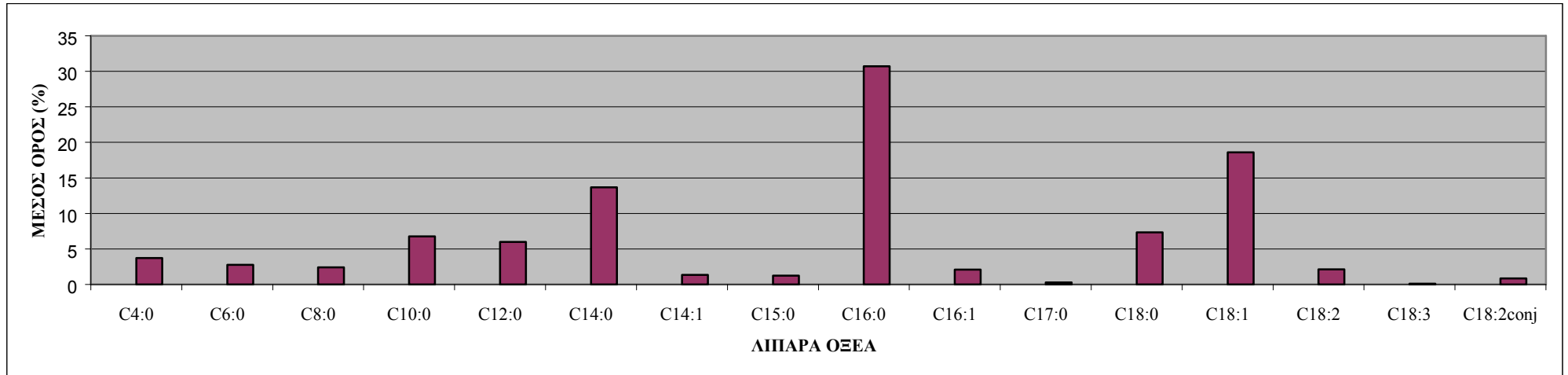
<b>ΛΗΠΑΡΑ ΟΞΕΑ</b>	<b>Lig-Fat</b>	<b>Lig-Fat</b>	<b>Lig-Fat</b>	<b>Lig-Fat</b>	<b>Lig-Fat</b>	<b>Lig-Fat</b>	<b>Red-Fat</b>	<b>Red-Fat</b>	<b>Red-Fat</b>	<b>Red-Fat</b>	<b>Red-Fat</b>	<b>Red-Fat</b>
<b>C4:0</b>	2,81	3,61	3,28	3,89	3,36	3,32	3,45	5,01	4,91	3,24	3,66	4,05
<b>C6:0</b>	2,63	2,18	2,11	2,44	2,24	2	2,97	2,8	4,08	3,3	2,31	3,24
<b>C8:0</b>	3,25	1,79	1,79	1,87	1,98	1,87	3,13	2,54	2,72	4,05	1,96	2,6
<b>C10:0</b>	10,76	4,62	4,11	4,26	4,56	4,58	11,03	6,03	5,87	12,72	5,79	6,01
<b>C12:0</b>	6,03	4,53	4,88	4,51	5,11	5,03	6,78	6,14	5,58	5,79	6,5	6,68
<b>C14:0</b>	13,01	12,83	13,95	13,01	14,34	14,08	15,14	14,56	14,77	11,73	12,91	15,1
<b>C14:1</b>	0,52	1,25	1,57	1,47	1,62	1,44	0,63	1,49	1,44	0,76	1,44	2,01
<b>C15:0</b>	1,24	1,29	1,37	1,43	1,38	1,18	1,44	1,08	0,98	1	1,12	1,29
<b>C16:0</b>	26,55	32,15	34,42	30,69	36,23	32,92	26,23	32,15	29,47	24,69	30,48	30,93
<b>C16:1</b>	1,44	1,95	2,08	2,02	2,01	1,85	1,59	1,84	1,55	1,11	4,74	3,08
<b>C17:0</b>	0,29	0,27	0,32	0,36	0,32	0,27	0,26	0,24	0,23	0,23	0,21	0,3
<b>C18:0</b>	8,27	8,93	7,82	8,71	6,74	8,71	7,49	6,98	8,48	9,61	6,9	6,19
<b>C18:1</b>	19,36	21,18	19,77	21,44	17,53	19,6	17,63	16,78	18,03	18,26	15,93	16,12
<b>C18:2</b>	2,33	2,6	1,53	2,24	1,7	2,14	1,33	1,72	1,28	2,02	5,61	1,69
<b>C18:3</b>	0,2	0,1	0,1	0,1	0,09	0,1	0,18	0,06	0,09	0,13	0,26	0,05
<b>C18:2<sup>conj</sup></b>	1,31	0,73	0,9	1,56	0,79	0,92	0,72	0,59	0,53	1,35	0,24	0,66

**Πίνακας 17** Προφίλ λιπαρών οξέων ( w/w % ) του λίπους των γαλακτοκομικών προϊόντων

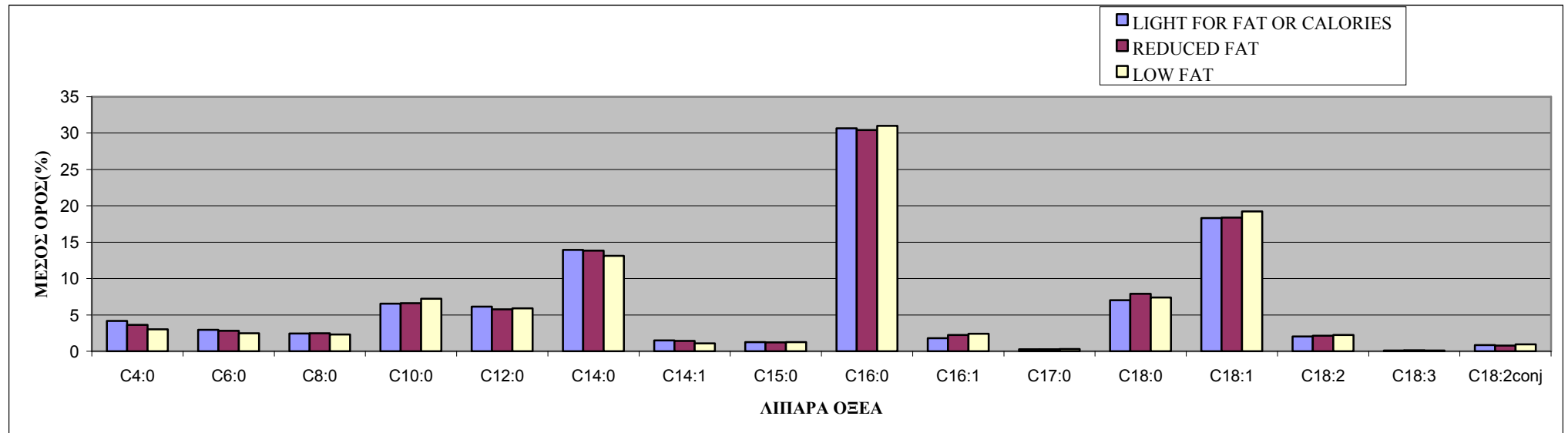
<b>ΔΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ</b>	<b>Red-Fat</b>	<b>Red-Fat</b>	<b>Red-Fat</b>	<b>Low Fat</b>	<b>Low Fat</b>	<b>Low Fat</b>	<b>Low Fat</b>	<b>Low Fat</b>	<b>Low Fat</b>	<b>Low Fat</b>	<b>Low Fat</b>	<b>Low Fat</b>	<b>Low Fat</b>	<b>Low Fat</b>
<b>C4:0</b>	2,57	2,75	3,04	3,43	5,29	2,41	2,88	2,43	2,65	3,03	2,95	4,16	2,94	1,2
<b>C6:0</b>	1,93	2,06	2,67	2	4,24	2,57	2,32	2,17	3,01	2,82	1,95	2,51	2,11	1,37
<b>C8:0</b>	1,57	1,85	1,92	1,93	3,32	2,78	2,15	1,54	3,48	3,55	1,61	2,22	1,68	1,19
<b>C10:0</b>	3,64	4,23	4,18	5,31	7,35	9,34	5,22	4,13	11,58	10,81	3,94	5,8	3,9	12,13
<b>C12:0</b>	4,17	5,22	4,99	5,74	7,06	6,13	4,78	4,48	6,57	5,89	4,34	6,19	4,95	8,77
<b>C14:0</b>	12,74	14,02	13,47	14,83	15,93	13,63	12,83	11,98	13,75	12,3	13,51	15,09	13,95	6,51
<b>C14:1</b>	1,65	1,77	1,48	1,45	1,41	0,69	1,68	1,36	0,51	0,25	1,21	1,34	1,48	0,65
<b>C15:0</b>	1,73	1,21	1,23	1,44	1,28	1,23	1,28	1,23	1,25	0,83	1,5	1,51	1,35	0,75
<b>C16:0</b>	32,67	34,5	32,59	33,53	29,41	29,45	30,53	34,56	26,18	24,55	34,32	31,15	34,56	32,8
<b>C16:1</b>	2,25	1,95	1,98	2,24	1,72	1,57	1,97	3,78	1,22	4,75	1,86	3,65	1,94	1,87
<b>C17:0</b>	0,41	0,3	0,33	0,3	0,26	0,29	0,35	0,31	0,25	0,3	0,36	0,3	0,32	0,14
<b>C18:0</b>	8,44	8,2	8,88	6,81	5,77	7,26	8,28	8,01	7,58	6,87	8,68	6,58	8,24	7,17
<b>C18:1</b>	22,87	19,38	20,37	18,19	15,33	19,04	22,71	20,21	18,37	19,68	20,34	15,55	19,86	22,25
<b>C18:2</b>	2,14	1,71	1,72	2,19	1,05	2,5	1,53	2,91	2,12	3,78	1,96	2,91	1,76	1,82
<b>C18:3</b>	0,12	0,08	0,1	0,07	0,05	0,15	0,1	0,1	0,14	0,1	0,12	0,05	0,1	0,1
<b>C18:2<sup>conj</sup></b>	1,1	0,76	1,06	0,54	0,53	0,97	1,38	0,8	1,33	0,51	1,35	0,99	0,85	1,28

Από τους πίνακες 15-17 παρατηρείται ότι η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε Συζευγμένο Λινελαϊκό οξύ (9cis,11trans, C18:2<sup>conj</sup>) κυμαίνεται από 0,14-1,38%. Η περιεκτικότητα στο λιπαρό οξύ C18:2 σε δύο δείγματα εμφανίζει υψηλές τιμές (4,87 και 5,61%) ενώ στα υπόλοιπα δείγματα κυμαίνεται μεταξύ 1,5-2,5%. Το λιπαρό οξύ C18:3 εμφανίζεται σε ιδιαίτερα χαμηλή περιεκτικότητα (0,05-0,34%).

Η γραφική παράσταση των μέσων όρων των λιπαρών οξέων για τα δείγματα που εξετάστηκαν, φαίνεται παρακάτω με τη μορφή ραβδογράμματος στο γράφημα 3. Από τα αποτελέσματα και το ραβδόγραμμα 4 παρατηρείται ότι οι τρεις κατηγορίες δειγμάτων με ένδειξη “light”, “Low fat” ή “Reduced fat” δεν έχουν σημαντικές διαφορές ως προς την περιεκτικότητα τους σε λιπαρά οξέα. Τα γαλακτοκομικά προϊόντα “Low fat” εμφανίζουν την υψηλότερη περιεκτικότητα σε 9cis,11trans C18:2<sup>conj</sup> (0,957%), σε ελαϊκό οξύ (19,230%) και σε C18:2 (2,23%). Επίσης από τα αποτελέσματα και τα ραβδογράμματα παρατηρείται η μεγάλη περιεκτικότητα των δειγμάτων σε παλμιτικό οξύ (30,7%).



**Γράφημα 3** Προφίλ λιπαρών οξέων των γαλακτοκομικών προϊόντων



**Γράφημα 4** Προφίλ λιπαρών οξέων των ομαδοποιημένων γαλακτοκομικών προϊόντων

Το σύνολο λιπαρών οξέων μικρής (SCFA), μεσσαίας (MCFA) και μακράς αλύσου (LCFA) αναφέρονται στον πίνακα 18. Ως SCFA ορίζεται το άθροισμα C4:0 - C10:0 των κορεσμένων λιπαρών οξέων. Ως MCFA ορίζεται το άθροισμα C12:0, C14:0, C15:0, C16:0, C17:0 των κορεσμένων λιπαρών οξέων. Ως LCFA ορίζεται το άθροισμα του στεατικού οξέος (C 18:0). Η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε SCFA κυμαίνεται από 9,71 έως 24,84% με τρία δείγματα να εμφανίζουν μεγαλύτερη συγκέντρωση, σε MCFA από 43,21 έως 57,06% και σε LCFA μεταξύ 4,73-8,93%.

Το σύνολο κορεσμένων λιπαρών οξέων (SFA), ακόρεστων λιπαρών οξέων και η σχέση Κορεσμένα/Ακόρεστα (S/U) αναφέρονται στον πίνακα 19. Ως SFA ορίζεται το άθροισμα C4:0-C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, και C18:0. Ως ακόρεστα λιπαρά οξέα ορίζεται το σύνολο C14:1, C15:1, C16:1, C18:1, C18:2, C18:3 και CLA. Η σχέση Κορεσμένα/Ακόρεστα (S/U) ορίζεται ως (SCFA+MCFA+LCFA) / (MUFA + PUFA). Η περιεκτικότητα σε κορεσμένα λιπαρά οξέα κυμαίνεται σε υψηλά επίπεδα από 69,87 έως 81,45% με μέσο όρο 74,89%, σε ακόρεστα από 18,57 έως 30,13% και στη σχέση S/U μεταξύ 2,31-4,38%.

Στον πίνακα 20 παρουσιάζεται το σύνολο των μονοακόρεστων (MUFA) και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA). Ως MUFA ορίζεται το άθροισμα των C14:1, C15:1, C16:1, C18:1. Ως PUFA ορίζεται το άθροισμα των C18:2, C18:3, CLA. Η περιεκτικότητα σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (κυρίως C18:1) παρουσιάζει εύρος τιμών 20,1-26,77% για όλα τα δείγματα, εκτός τεσσάρων δειγμάτων που έχουν περιεκτικότητα σε ποσοστό <20%. Επίσης, σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα κυμαίνεται μεταξύ 1.7-3.5%, ενώ τρία δείγματα εμφανίζουν υψηλότερη συγκέντρωση (5,73%, 6,11%, 4,39%).

Από τον υπολογισμό του Αθρωματικού Δείκτη (A/I) προκύπτει ότι όλα τα δείγματα παρουσιάζουν ιδανικές τιμές (< 4,5) και μόνο τέσσερα δείγματα εμφανίζουν τιμές μεγαλύτερες του 5.

**Πίνακας 18** Περιεκτικότητα λιπαρών οξέων ( % των ολικών λιπαρών οξέων) μικρής (SCFA), μεσσαίας (MSFA) και μακράς (LSFA) αλύσου

<b>Γαλακτοκομικά Προϊόντα</b>	<b>Μικρής αλύσου Λιπαρά οξέα</b>	<b>Μεσσαίας αλύσου Λιπαρά οξέα</b>	<b>Μακράς αλύσου Λιπαρά οξέα</b>
Lig-Fat	17,05	48,14	7,14
Lig-Fat	24,84	45,03	5,14
Lig-Fat	21,52	55,2	4,73
Lig-Fat	17,77	54,07	5,97
Lig-Fat	20,31	56,18	4,79
Lig-Fat	14,61	48,4	8,38
Lig-Fat	14	52,17	7,19
Lig-Fat	13	56,67	7,31
Lig-Fat	14,4	49,28	8,48
Lig-Fat	18,74	51,9	6,39
Lig-Fat	15,96	53,51	7,08
Lig-Fat	18,73	56,05	4,84
Lig-Fat	19,45	47,12	8,27
Lig-Fat	11,77	53,46	8,71
Lig-Fat	12,2	51,12	8,93
Lig-Fat	11,29	54,9	7,82
Lig-Fat	12,46	49,94	8,71
Lig-Fat	12,14	57,36	6,74
Red-Fat	17,58	51,03	8,48
Red-Fat	9,71	51,72	8,44
Red-Fat	15,9	54,3	6,19
Red-Fat	20,58	49,85	7,49
Red-Fat	16,38	54,17	6,98
Red-Fat	23,31	43,44	9,61
Red-Fat	13,72	51,22	6,9
Red-Fat	10,89	55,25	8,2
Red-Fat	11,81	52,69	8,88
Low-Fat	12,67	55,84	6,81
Low-Fat	20,2	53,94	5,77
Low-Fat	17,1	50,73	7,26
Low-Fat	12,57	49,77	8,28
Low-Fat	10,27	52,56	8,01
Low-Fat	20,72	48	7,58
Low-Fat	10,63	55,04	8,24
Low-Fat	20,21	43,87	6,87
Low-Fat	10,45	53,9	8,68
Low-Fat	14,69	54,24	6,58
Low-Fat	15,89	48,93	7,17

**Πίνακας 19** Περιεκτικότητες (% των ολικών λιπαρών οξέων) των ακόρεστων και κορεσμένων λιπαρών οξέων

<b>Γαλακτοκομικά Προϊόντα</b>	<b>Κορεσμένα λιπαρά οξέα</b>	<b>Ακόρεστα λιπαρά οξέα</b>	<b>Κορεσμένα/ Ακόρεστα (S/U)</b>
Lig-Fat	72,33	27,66	2,61
Lig-Fat	75,01	24,99	3
Lig-Fat	81,45	18,57	4,38
Lig-Fat	77,81	22,16	3,5
Lig-Fat	81,28	18,74	4,32
Lig-Fat	71,39	28,58	2,48
Lig-Fat	73,36	26,65	2,74
Lig-Fat	76,98	23	3,33
Lig-Fat	72,16	27,84	2,58
Lig-Fat	77,03	22,94	3,34
Lig-Fat	76,55	23,46	3,25
Lig-Fat	79,62	20,37	3,9
Lig-Fat	74,84	25,16	2,96
Lig-Fat	72,2	27,81	2,59
Lig-Fat	74,05	25,95	2,84
Lig-Fat	71,17	28,83	2,46
Lig-Fat	76,26	23,74	3,2
Lig-Fat	73,96	26,05	2,83
Red-Fat	77,92	22,08	3,52
Red-Fat	77,53	22,48	3,44
Red-Fat	71,84	28,22	2,54
Red-Fat	74,34	25,65	2,89
Red-Fat	73,3	26,71	2,73
Red-Fat	76,36	23,63	3,22
Red-Fat	77,09	22,92	3,35
Red-Fat	69,87	30,13	2,31
Red-Fat	76,39	23,61	3,22
Low-Fat	75,32	24,68	3,04
Low-Fat	79,91	20,09	3,96
Low-Fat	75,09	24,92	3
Low-Fat	70,62	29,37	2,39
Low-Fat	70,84	29,16	2,42
Low-Fat	76,3	23,69	3,21
Low-Fat	70,95	29,07	2,43
Low-Fat	73,16	26,84	2,71
Low-Fat	75,51	24,49	3,07
Low-Fat	72,03	27,97	2,57
Low-Fat	74	25,99	2,83

**Πίνακας 20** Αποτελέσματα του συνόλου μονοακόρεστων και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων

<b>Γαλακτοκομικά</b>	<b>Μονοακόρεστα</b>	<b>Πολυακόρεστα</b>
<b>Προϊόντα</b>	<b>λιπαρά οξέα</b>	<b>λιπαρά οξέα</b>
Lig-Fat	24,46	3,2
Lig-Fat	21,51	3,48
Lig-Fat	15,75	2,82
Lig-Fat	20,02	2,14
Lig-Fat	17,09	1,65
Lig-Fat	25,66	2,92
Lig-Fat	20,92	5,73
Lig-Fat	21,06	1,94
Lig-Fat	24,48	3,36
Lig-Fat	20,79	2,15
Lig-Fat	20,93	2,53
Lig-Fat	17,82	2,55
Lig-Fat	21,32	3,84
Lig-Fat	24,38	3,43
Lig-Fat	23,42	2,53
Lig-Fat	24,93	3,9
Lig-Fat	21,16	2,58
Lig-Fat	22,89	3,16
Red-Fat	19,85	2,23
Red-Fat	20,11	2,37
Red-Fat	21,02	1,9
Red-Fat	26,77	3,36
Red-Fat	21,21	2,4
Red-Fat	20,13	3,5
Red-Fat	22,11	6,11
Red-Fat	23,1	2,55
Red-Fat	23,83	2,88
Low-Fat	21,88	2,8
Low-Fat	18,46	1,63
Low-Fat	21,3	3,62
Low-Fat	26,36	3,01
Low-Fat	25,35	3,81
Low-Fat	20,1	3,59
Low-Fat	24,68	4,39
Low-Fat	23,41	3,43
Low-Fat	20,54	3,95
Low-Fat	23,28	2,71
Low-Fat	24,77	3,2

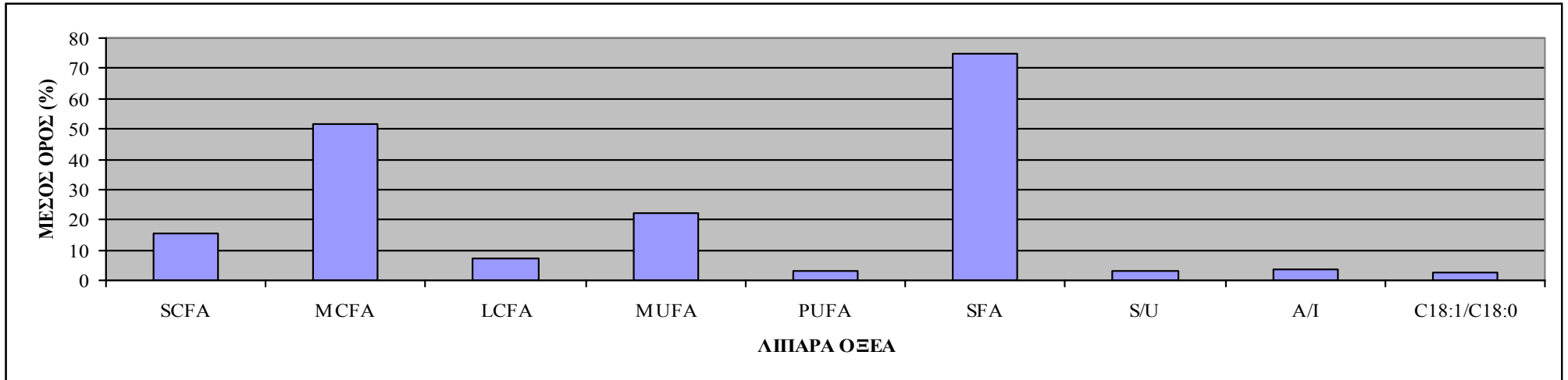


**Πίνακας 21** Τιμές Αθρωματικού Δείκτη (A/I)

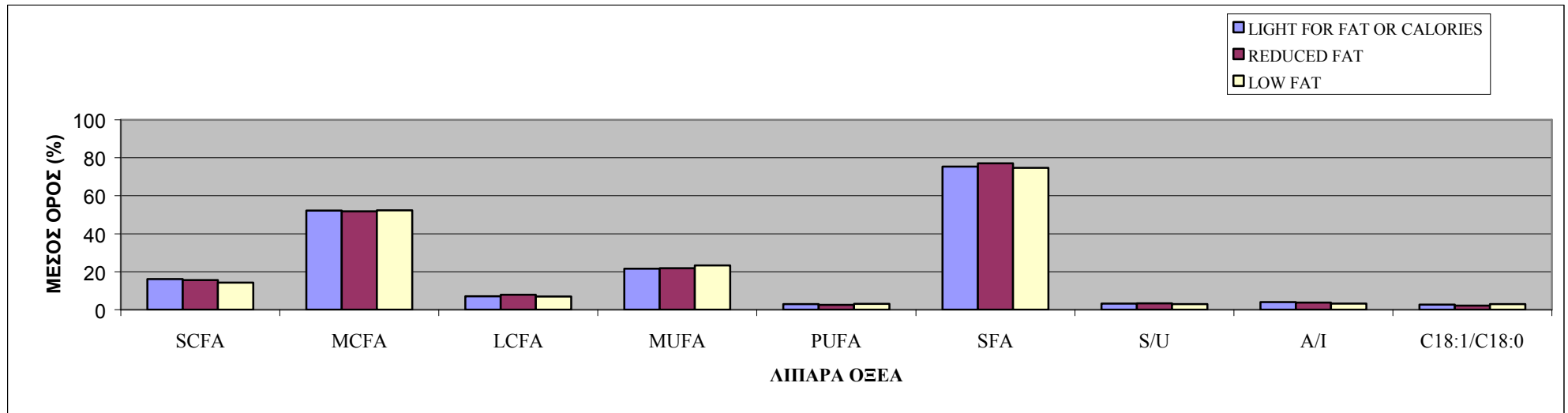
Γαλακτοκομικά Προϊόντα	Αθρωματικός Δείκτης
Lig-Fat	2,94
Lig-Fat	2,74
Lig-Fat	5,5
Lig-Fat	4,43
Lig-Fat	5,66
Lig-Fat	3,04
Lig-Fat	3,36
Lig-Fat	4,58
Lig-Fat	3,42
Lig-Fat	4,44
Lig-Fat	4,51
Lig-Fat	5,66
Lig-Fat	3,74
Lig-Fat	3,16
Lig-Fat	3,66
Lig-Fat	3,03
Lig-Fat	4,16
Lig-Fat	3,62
Red-Fat	3,97
Red-Fat	4,02
Red-Fat	3,42
Red-Fat	4,24
Red-Fat	4,29
Red-Fat	4,37
Red-Fat	3,15
Red-Fat	4,48
Red-Fat	3,6
Low-Fat	3,99
Low-Fat	4,99
Low-Fat	3,62
Low-Fat	2,98
Low-Fat	2,95
Low-Fat	4,09
Low-Fat	3,16
Low-Fat	3,45
Low-Fat	3,99
Low-Fat	3,67
Low-Fat	2,42

Η γραφική παράσταση των μέσων όρων ομαδοποιημένων λιπαρών οξέων για τα δείγματα που εξετάστηκαν φαίνεται με τη μορφή ραβδόγραμματος στο γράφημα 6. Από τα αποτελέσματα και το ραβδόγραμμα φαίνεται η μεγάλη περιεκτικότητα των δειγμάτων σε κορεσμένα λιπαρά οξέα, σε σχέση με τα μονοακόρεστα και τα πολυακόρεστα.

Στο γράφημα 7 απεικονίζονται οι μέσοι όροι των ομαδοποιημένων δειγμάτων σε τρεις κατηγορίες. Από τα αποτελέσματα και το ραβδόγραμμα φαίνεται ότι μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε κορεσμένα λιπαρά οξέα εμφανίζουν τα δείγματα “Reduced fat”, σε μονοακόρεστα τα “Low fat” και σε πολυακόρεστα τα “Light for fat or calories” και “Low fat”.



Γράφημα 6 Μέσοι όροι ομαδοποιημένων λιπαρών οξέων



Γράφημα 7 Μέσοι όροι ομαδοποιημένων λιπαρών οξέων σε κατηγοριοποιημένα γαλακτοκομικά προϊόντα

#### 5.4. Σύγκριση αποτελεσμάτων των μεθόδων <sup>1</sup>H-NMR-GC

Γενικά, τα αποτελέσματα των δύο μεθόδων δεν αποκλίνουν σε μεγάλο βαθμό. Τα αποτελέσματα της αέριας χρωματογραφίας εκφράζονται σε w/w%, ενώ της φασματοσκοπικής τεχνικής <sup>1</sup>H-NMR σε mol%. Στους πίνακες 22-23 γίνεται σύγκριση των αποτελεσμάτων τους. Η περιεκτικότητα σε μονοακόρεστα κυμαίνεται σε 20,07-33,07% και 15,75-26,36% με την μέθοδο <sup>1</sup>H-NMR και GC αντίστοιχα. Η περιεκτικότητα σε πολυακόρεστα κυμαίνεται σε 1,51-5,75% και 1,63-6,11% με την μέθοδο <sup>1</sup>H-NMR και GC αντίστοιχα. Για τα κορεσμένα κυμαίνεται σε 64,85-76,16% και 69,87-81,45% με την μέθοδο <sup>1</sup>H-NMR και GC αντίστοιχα. Τέλος, για τα ακόρεστα κυμαίνεται σε 23,84-35,15% και 18,57-29,37% με την μέθοδο <sup>1</sup>H-NMR και GC αντίστοιχα.

Στα ραβδογράμματα 10-11 παρουσιάζεται ο μέσος όρος των ομαδοποιημένων λιπαρών οξέων (PUFA, MUFA, SFA, UNSATURATED) με την μέθοδο <sup>1</sup>H-NMR και GC. Από τα αποτελέσματα στο ραβδόγραμμα 11 φαίνεται ότι ο μέσος όρος σε κορεσμένα είναι 72,97% και 74,89% με την μέθοδο <sup>1</sup>H-NMR και GC αντίστοιχα. Σε μονοακόρεστα 26,26% και 25,16% με την μέθοδο <sup>1</sup>H-NMR και GC αντίστοιχα. Όλα τα μονοακόρεστα υπολογίστηκαν βάση της εξίσωσης: «Ακόρεστα λιπαρά οξέα = MUFA + Λινολενικό + Λινελαϊκό = E/2D», θεωρώντας ως βασικά πολυακόρεστα μόνο δύο λιπαρά οξέα ενώ με την μέθοδο GC υπολογίστηκαν τα μονοακόρεστα C14:1, C16:1, C18:1. Ο μέσος όρος σε πολυακόρεστα είναι 1,7% και 3,2% με την μέθοδο <sup>1</sup>H-NMR και GC αντίστοιχα. Πρέπει να σημειωθεί ότι με την μέθοδο GC υπολογίστηκαν τα πολυακόρεστα C18:2, C18:3 και CLA, ενώ με την μέθοδο <sup>1</sup>H-NMR τα πολυακόρεστα C18:2n6 και C18:3n3a. Τέλος, ο μέσος όρος σε ακόρεστα λιπαρά οξέα είναι 26,26% και 25,16% με την μέθοδο <sup>1</sup>H-NMR και GC αντίστοιχα. Με την μέθοδο GC υπολογίστηκαν τα ακόρεστα C14:1, C16:1, C18:1, C18:2, C18:3, CLA, ενώ με την μέθοδο <sup>1</sup>H-NMR συμπεριλήφθηκαν βάση εξίσωσης όλα τα ακόρεστα λιπαρά οξέα.

Οι παράγοντες που συμβάλλουν στην απόκλιση των τιμών μεταξύ των δύο μεθόδων είναι οι ακόλουθοι:

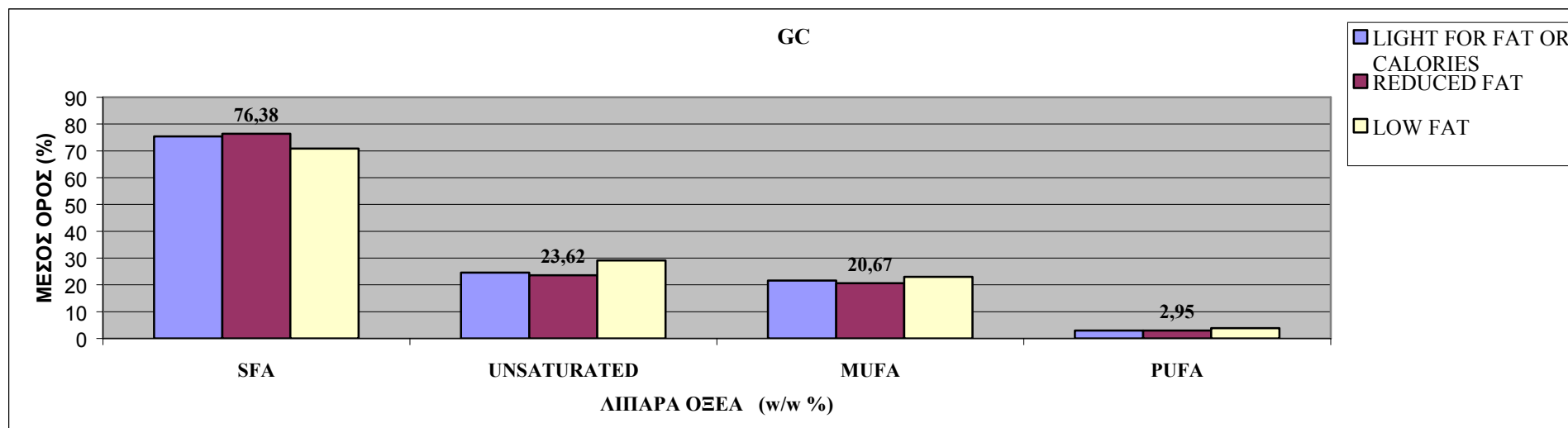
- α) Διαφορετική μονάδα μέτρησης
- β) Το διαφορετικό περιεχόμενο των mufa, pufa, sfa
- γ) Η ευαισθησία της ολοκλήρωσης στη μέθοδο NMR
- δ) Η αλληλοεπικάλυψη κορυφών

**Πίνακας 22** Σύγκριση ως προς τα μονοακόρεστα και πολυακόρεστα

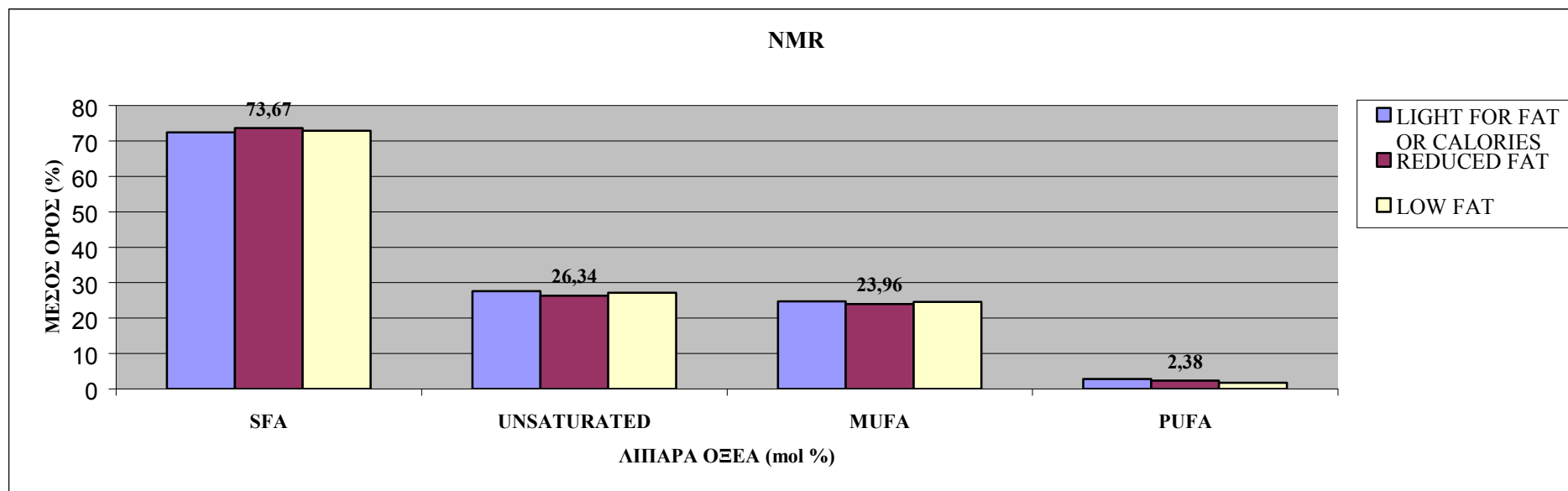
Γαλακτοκομικά Προϊόντα	Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα		Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα	
	NMR	GC	NMR	GC
Lig-Fat	25,22	24,46	1,7	3,2
Lig-Fat	23,74	21,51	3,27	3,48
Lig-Fat	22,34	15,75	2,06	2,82
Lig-Fat	23,47	20,02	2,57	2,14
Lig-Fat	23,41	17,09	2,27	1,65
Lig-Fat	33,07	25,66	2,09	2,92
Lig-Fat	24,25	20,92	2,77	5,73
Lig-Fat	21,99	21,06	1,84	1,94
Lig-Fat	26,59	24,48	3,1	3,36
Lig-Fat	25,02	20,79	2,88	2,15
Lig-Fat	23,04	20,93	5,73	2,53
Lig-Fat	24,79	17,82	3,23	2,55
Lig-Fat	23,64	21,32	2,61	3,84
Lig-Fat	26,51	24,38	3,35	3,43
Lig-Fat	24,16	23,42	2,36	2,53
Lig-Fat	28,14	24,93	2,79	3,9
Lig-Fat	21,4	21,16	3,82	2,58
Lig-Fat	24,74	22,89	2,48	3,16
Red-Fat	23,74	20,13	2,92	3,5
Red-Fat	22,23	22,11	1,99	6,11
Red-Fat	21,7	23,1	2,31	2,55
Red-Fat	24,84	23,83	1,92	2,88
Red-Fat	21,4	19,85	4,25	2,23
Red-Fat	23,43	20,11	2,36	2,37
Red-Fat	24,82	21,02	2,25	1,9
Red-Fat	24,82	26,77	3,24	3,36
Red-Fat	24,17	21,21	1,83	2,4
Low-Fat	23,68	20,54	2,05	3,95
Low-Fat	24,07	24,77	2,82	3,2
Low-Fat	23,83	23,28	1,93	2,71
Low-Fat	22,37	20,1	2,46	3,59
Low-Fat	22,82	24,68	4,5	4,39
Low-Fat	20,07	23,41	5,22	3,43
Low-Fat	22,72	21,88	2,52	2,8
Low-Fat	27,96	18,46	2,06	1,63
Low-Fat	25,83	21,3	2,6	3,62
Low-Fat	28	26,36	2,07	3,01
Low-Fat	25,4	25,35	1,51	3,81

**Πίνακας 23** Σύγκριση ως προς τα κορεσμένα και ακόρεστα λιπαρά οξέα

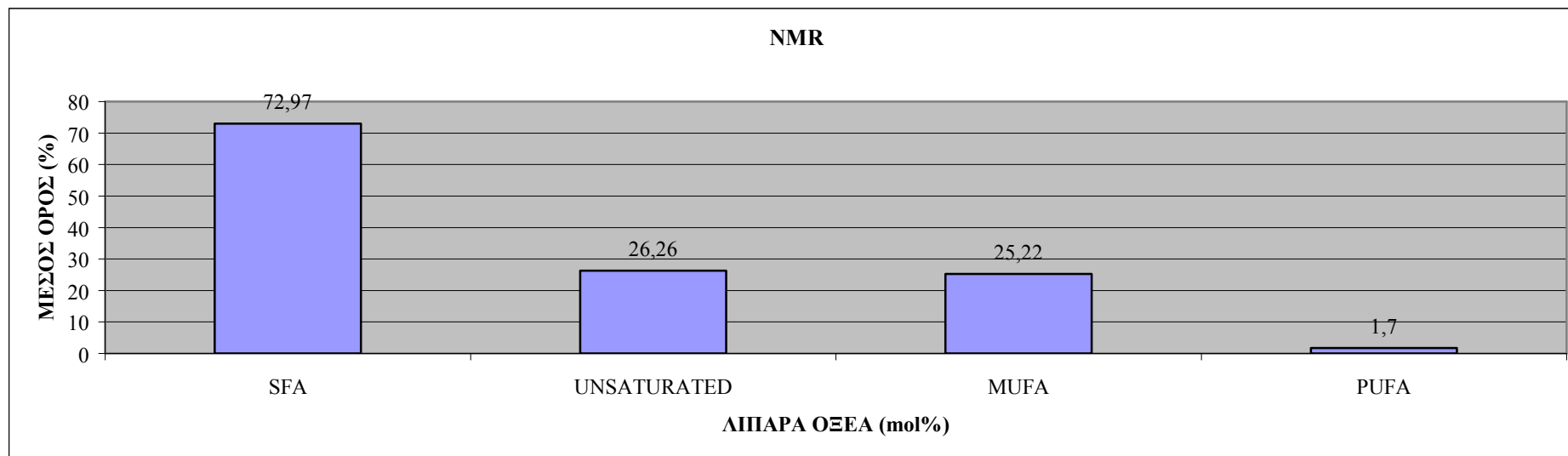
Γαλακτοκομικά Προϊόντα	Κορεσμένα λιπαρά οξέα		Ακόρεστα λιπαρά οξέα	
	NMR	GC	NMR	GC
Lig-Fat	73,74	74,84	26,26	25,16
Lig-Fat	73,08	72,33	26,92	27,66
Lig-Fat	72,99	75,01	27,01	24,99
Lig-Fat	75,59	81,45	24,41	18,57
Lig-Fat	76,16	76,98	23,84	23
Lig-Fat	73,96	77,81	26,04	22,16
Lig-Fat	74,32	81,28	25,68	18,74
Lig-Fat	64,85	71,39	35,15	28,58
Lig-Fat	70,13	72,2	29,87	27,81
Lig-Fat	72,77	73,96	27,23	26,05
Lig-Fat	72,98	73,36	27,02	26,65
Lig-Fat	70,31	72,16	29,69	27,84
Lig-Fat	72,09	77,03	27,91	22,94
Lig-Fat	71,24	76,55	28,76	23,46
Lig-Fat	71,98	79,62	28,02	20,37
Lig-Fat	73,48	74,05	26,52	25,95
Lig-Fat	69,07	71,17	30,93	28,83
Lig-Fat	74,78	76,26	25,22	23,74
Red-Fat	73,33	76,36	26,67	23,63
Red-Fat	73,24	73,3	26,76	26,71
Red-Fat	75,78	71,84	24,22	28,22
Red-Fat	75,99	74,34	24,01	25,65
Red-Fat	74,35	77,92	25,65	22,08
Red-Fat	74,2	77,53	25,8	22,48
Red-Fat	72,93	77,09	27,07	22,92
Red-Fat	71,94	69,87	28,06	30,13
Red-Fat	74	76,39	26	23,61
Low-Fat	72,68	70,95	27,32	29,07
Low-Fat	74,71	73,16	25,29	26,84
Low-Fat	75,17	76,3	24,83	23,69
Low-Fat	74,27	75,51	25,73	24,49
Low-Fat	73,12	72,03	26,88	27,97
Low-Fat	74,23	74	25,77	25,99
Low-Fat	74,76	75,32	25,24	24,68
Low-Fat	69,98	79,91	30,02	20,09
Low-Fat	71,57	75,09	28,43	24,92
Low-Fat	69,93	70,62	30,07	29,37
Low-Fat	73,09	70,84	26,91	29,16



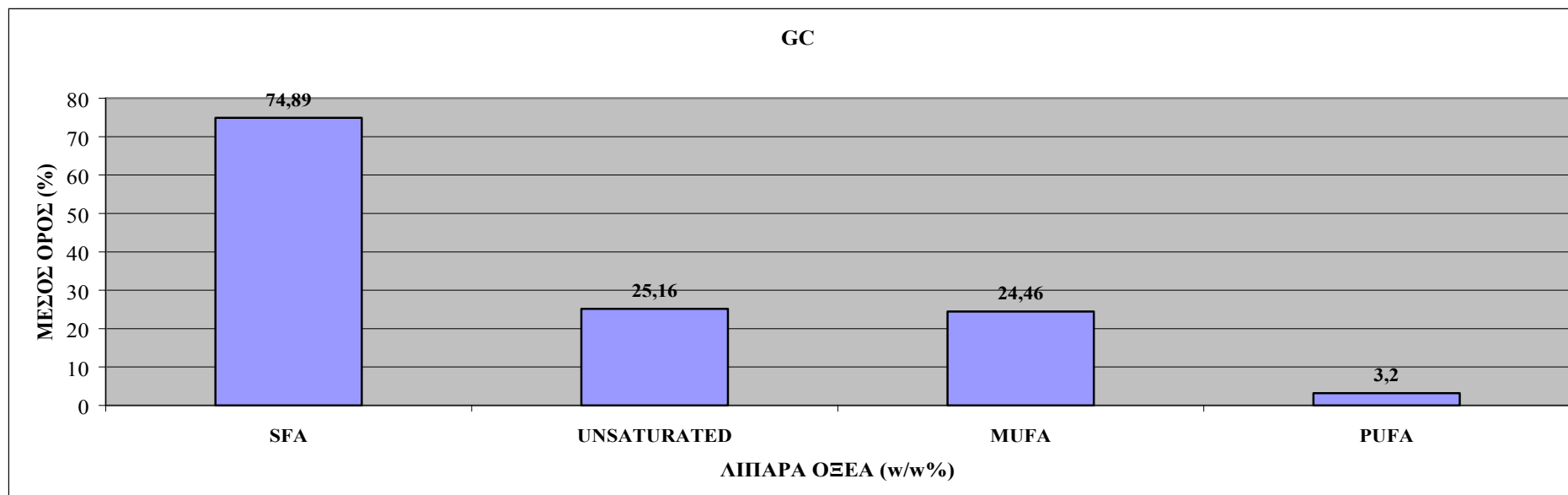
**Γράφημα 8** Αποτελέσματα ομαδοποιημένων λιπαρών οξέων με την αέρια χρωματογραφία



**Γράφημα9** Αποτελέσματα ομαδοποιημένων λιπαρών οξέων με την μέθοδο <sup>1</sup>H-NMR



**Γράφημα 10** Αποτελέσματα ομαδοποιημένων λιπαρών οξέων με την μέθοδο  $^1\text{H-NMR}$



**Γράφημα 11** Αποτελέσματα ομαδοποιημένων λιπαρών οξέων με την αέρια χρωματογραφία



## 5.5. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Έγινε στατιστική επεξεργασία για να διαπιστωθεί εάν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στη σύνθεση της λιπαρής φάσης των 38 δειγμάτων των γαλακτοκομικών προϊόντων. Τα δείγματα ταξινομήθηκαν με βάση την ένδειξη στην ετικέτα “light”, “Χαμηλά λιπαρά” και “μειωμένα ή λιγότερα λιπαρά” σε 3 κατηγορίες (Lig-Fat, Red-Fat και Low-Fat) και με βάση τη λιποπεριεκτικότητα του γάλακτος (πλήρες, μερικώς αποβουτυρωμένο, ημιαποβουτυρωμένο, αποβουτυρωμένο, άπαχο γάλα) σε 2 κατηγορίες (δείγματα από μερικώς αποβουτυρωμένο γάλα και δείγματα με διαφορετική λιποπεριεκτικότητα). Από τα αποτελέσματα που παρατίθενται αναλυτικά στη συνέχεια προέκυψε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στη σύνθεση της λιπαρής φάσης των δειγμάτων ως προς τον ένδειξη ετικέτας, σε αντίθεση με την λιποπεριεκτικότητα του γάλακτος των δειγμάτων που αναλύθηκαν.

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας έγινε με τη χρήση του προγράμματος JMP 8. Για να βρεθεί εάν υπάρχει στατιστικά σημαντική διάφορα έγινε έλεγχος “Oneway Anova” (σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha=0.05$ ). Απαραίτητη προϋπόθεση για την εκτέλεση του ελέγχου είναι τα δείγματα να προέρχονται από πληθυσμούς με κανονική κατανομή και να έχουν ίσες διακυμάνσεις μεταξύ τους. Επίσης, εφαρμόστηκε “PCA” (Ανάλυση Κύριων Συνιστώσων) για να απεικονιστεί ο διαχωρισμός των διαφορετικών κατηγοριών σε διαφορετικές Κύριες Συνιστώσες με βάση διάφορα χαρακτηριστικά.

### 5.5.1. Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων της Αέριας Χρωματογραφίας

#### 5.5.1.1. “Oneway Anova”

##### A) Ταξινόμηση δειγμάτων με βάση την λιποπεριεκτικότητα του γάλακτος

Τα 38 δείγματα με βάση το είδος γάλακτος ταξινομήθηκαν σε 2 κατηγορίες (18 δείγματα από μερικώς αποβουτυρωμένο γάλα και 20 δείγματα με διαφορετική λιποπεριεκτικότητα).

#### Έλεγχος για τα Μικρής Αλύσου Λιπαρά οξέα (SCFA)

Με έλεγχο της κανονικότητας διαπιστώθηκε ότι  $\text{Prob}<W=0,1174>0,05$  οπότε υπάρχει κανονική κατανομή. Με έλεγχο της ομοιογένειας βρέθηκε ότι  $\text{Prob}>F$  των Obrient, Brown-Forsythe, Levene, Barlett είναι  $>0,05$  οπότε οι διασπορές έχουν ομοιογένεια. Με “Oneway Anova” διαπιστώθηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων των δύο κατηγοριών δειγμάτων ως προς τα Μικρής Αλύσου Λιπαρά οξέα ( $\text{Prob}>F=0,0041<0,05$ ). Έγινε σύγκριση μέσω των όρων με το **Each Pair, Student’s t** με το οποίο επιβεβαιώνεται η διαφορά μεταξύ μέσων όρων.

#### Έλεγχος για τα Μεσσαΐας αλύσου Λιπαρά οξέα (MCFA)

Με έλεγχο της κανονικότητας διαπιστώθηκε ότι  $\text{Prob}<W=0,097>0,05$  οπότε υπάρχει κανονική κατανομή. Επίσης βρέθηκε ότι υπάρχει ομοιογένεια των διασπορών. Με “**Oneway Anova**” διαπιστώθηκε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων των δειγμάτων από μερικώς αποβουτυρωμένο γάλα και δειγμάτων με διαφορετική λιποπεριεκτικότητα ως προς τα Μεσσαΐας αλύσου λιπαρά οξέα ( $\text{Prob}>F=0,5120>0,05$ ).

#### Έλεγχος για τα Μακράς αλύσου Λιπαρά οξέα (LCFA)

Με έλεγχο της κανονικότητας διαπιστώθηκε ότι  $\text{Prob}<W=0,1045>0,05$  οπότε υπάρχει κανονική κατανομή. Επίσης βρέθηκε ότι υπάρχει ομοιογένεια των διασπορών. Με “**Oneway Anova**” διαπιστώθηκε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά των μέσων όρων μεταξύ δειγμάτων από μερικώς αποβουτυρωμένο γάλα και δειγμάτων με διαφορετική λιποπεριεκτικότητα γάλακτος ως προς LCFA ( $\text{Prob}>F=0,2857>0,05$ ).

#### Έλεγχος για τα κορεσμένα λιπαρά οξέα (SFA)

Με έλεγχο της κανονικότητας διαπιστώθηκε ότι  $\text{Prob}<W=0,3387>0,05$  οπότε το δείγμα ακολουθεί την κανονική κατανομή. Επίσης βρέθηκε ότι υπάρχει ομοιογένεια των διασπορών. Με “**Oneway Anova**” διαπιστώθηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά των μέσων όρων των δειγμάτων από μερικώς αποβουτυρωμένο γάλα και δειγμάτων με διαφορετική λιποπεριεκτικότητα γάλακτος ως προς SFA ( $\text{Prob}>F=0,017<0,05$ ). Με το **Each Pair, Student’s t** επιβεβαιώνεται η διαφορά μεταξύ μέσων όρων.

#### Έλεγχος για τα ακόρεστα λιπαρά οξέα

Με έλεγχο της κανονικότητας διαπιστώθηκε ότι  $\text{Prob}<W=0,3364>0,05$  οπότε υπάρχει κανονική κατανομή. Επίσης βρέθηκε ότι υπάρχει ομοιογένεια των διασπορών. Με “**Oneway Anova**” διαπιστώθηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο κατηγοριών ως προς τα ακόρεστα λιπαρά οξέα ( $\text{Prob}>F=0,0114<0,05$ ). Με το **Each Pair, Student’s t** επιβεβαιώνεται η διαφορά μεταξύ μέσων όρων.

#### Έλεγχος για τη σχέση ΚΟΡΕΣΜΕΝΑ/ΑΚΟΡΕΣΤΑ (S/U)

Με έλεγχο της κανονικότητας διαπιστώθηκε ότι  $\text{Prob}<W$  έχει τιμή  $<0,05$  οπότε έγινε λογαρίθμηση των δεδομένων και βρέθηκε  $\text{Prob}<W$  με τιμή  $0,1736$  που είναι  $>0,05$  οπότε υπάρχει κανονική κατανομή. Επίσης βρέθηκε ότι υπάρχει ομοιογένεια των διασπορών. Με “**Oneway Anova**” διαπιστώθηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο κατηγοριών ως προς την σχέση S/U ( $\text{Prob}>F=0,0150<0,05$ ). Με το **Each Pair, Student’s t** επιβεβαιώνεται η διαφορά μεταξύ μέσων όρων.

#### Έλεγχος για τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFA)

Με έλεγχο της κανονικότητας διαπιστώθηκε ότι  $\text{Prob}<W=0,4874>0,05$  (κανονική κατανομή). Επίσης βρέθηκε ότι υπάρχει ομοιογένεια των διασπορών. Με “**Oneway Anova**” διαπιστώθηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά των μέσων όρων μεταξύ των δύο κατηγοριών ως προς τα μονοακόρεστα ( $\text{Prob}>F=0,02<0,05$ ). Με το **Each Pair, Student’s t** επιβεβαιώνεται η διαφορά μεταξύ μέσων όρων.

#### Έλεγχος για τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA)

Με έλεγχο της κανονικότητας διαπιστώθηκε ότι  $\text{Prob}<W$  έχει τιμή  $<0,05$  οπότε με λογαρίθμηση των δεδομένων βρέθηκε  $\text{Prob}<W=0,6565>0,05$  (κανονική κατανομή). Επίσης βρέθηκε ότι υπάρχει ομοιογένεια των διασπορών. Με “**Oneway Anova**” διαπιστώθηκε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά των μέσων όρων των δύο κατηγοριών ως προς PUFA ( $\text{Prob}>F=0,4889>0,05$ ).

#### Έλεγχος για το Συζευγμένο Λινολενικό οξύ (CLA)

Με έλεγχο της κανονικότητας διαπιστώθηκε ότι  $\text{Prob}<W=0,7192>0,05$  (κανονική κατανομή). Επίσης βρέθηκε ότι υπάρχει ομοιογένεια των διασπορών. Με “**Oneway Anova**” διαπιστώθηκε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά των μέσων όρων μεταξύ των δύο κατηγοριών ως προς το CLA ( $\text{Prob}>F=0,3977>0,05$ ).

#### Έλεγχος Αθρωματικού Δείκτη (A/I)

Με έλεγχο της κανονικότητας διαπιστώθηκε ότι  $\text{Prob}<W=0,2207>0,05$  (κανονική κατανομή). Επίσης βρέθηκε ότι υπάρχει ομοιογένεια των διασπορών. Με “**Oneway Anova**” διαπιστώθηκε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά των μέσων όρων των δύο κατηγοριών ως προς τον Αθρωματικό δείκτη ( $\text{Prob}>F=0,4698>0,05$ ).

**B) Ταξινόμηση δειγμάτων με βάση την ένδειξη στην ετικέτα “light”, “χαμηλά λιπαρά” και “μειωμένα ή λιγότερα λιπαρά”**

Τα δείγματα ταξινομήθηκαν με βάση την ένδειξη στην ετικέτα “light”, “χαμηλά λιπαρά” και “μειωμένα λιπαρά” σε 3 κατηγορίες.

Έλεγχος για τα Μικρής Αλύσου Λιπαρά οξέα (SCFA)

Με έλεγχο της κανονικότητας διαπιστώθηκε ότι  $\text{Prob}<W=0,1174>0,05$  (κανονική κατανομή). Επίσης βρέθηκε ότι υπάρχει ομοιογένεια των διασπορών. Με “**Oneway Anova**” διαπιστώθηκε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά των μέσων όρων των τριών κατηγοριών ως προς τα SCFA ( $\text{Prob}>F=0,7825>0,05$ ).

Έλεγχος για τα Μεσσαίας αλύσου Λιπαρά οξέα (MCFA)

Με έλεγχο της κανονικότητας διαπιστώθηκε ότι  $\text{Prob}<W=0,097>0,05$  (κανονική κατανομή). Επίσης βρέθηκε ότι υπάρχει ομοιογένεια των διασπορών. Με “**Oneway Anova**” διαπιστώθηκε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά των μέσων όρων μεταξύ των τριών κατηγοριών ως προς τα MCFA. ( $\text{Prob}>F=0,8260>0,05$ ).

Έλεγχος για τα Μακράς αλύσου Λιπαρά οξέα (LCFA)

Με έλεγχο της κανονικότητας διαπιστώθηκε ότι  $\text{Prob}<W=0,1045>0,05$  (κανονική κατανομή). Επίσης βρέθηκε ότι υπάρχει ομοιογένεια των διασπορών. Με “**Oneway Anova**” διαπιστώθηκε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά των μέσων όρων μεταξύ των τριών κατηγοριών ως προς τα LCFA ( $\text{Prob}>F=0,2317>0,05$ ).

Έλεγχος για τα Κορεσμένα Λιπαρά οξέα (SFA)

Με έλεγχο της κανονικότητας διαπιστώθηκε ότι  $\text{Prob}<W=0,3387>0,05$  (κανονική κατανομή). Επίσης βρέθηκε ότι υπάρχει ομοιογένεια των διασπορών. Με “**Oneway Anova**” διαπιστώθηκε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά των μέσων όρων μεταξύ των τριών κατηγοριών ως προς τα SFA ( $\text{Prob}>F=0,4660>0,05$ ).

#### Έλεγχος για τη σχέση ΚΟΡΕΣΜΕΝΑ/ΑΚΟΡΕΣΤΑ (S/U)

Με έλεγχο της κανονικότητας διαπιστώθηκε ότι  $P=0,0167 < 0,05$  άρα τα δεδομένα δεν έχουν κανονική κατανομή. Έγινε λογαριθμικός μετασχηματισμός (log) και βρέθηκε  $P' > 0,1736$  το οποίο είναι  $> 0,05$ . Επίσης βρέθηκε ότι υπάρχει ομοιογένεια των διασπορών. Με **“Oneway Anova”** διαπιστώθηκε ότι  $\text{Prob}>F=0,4579 > 0,05$ .

#### Έλεγχος για τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFA)

Με έλεγχο της κανονικότητας διαπιστώθηκε ότι  $\text{Prob}<W=0,4874 > 0,05$  (κανονική κατανομή). Επίσης βρέθηκε ότι υπάρχει ομοιογένεια των διασπορών. Με **“Oneway Anova”** διαπιστώθηκε ότι  $\text{Prob}>F=0,5126 > 0,05$ .

#### Έλεγχος για το Συζευγμένο Λινολενικό οξύ (CLA)

Με έλεγχο της κανονικότητας διαπιστώθηκε ότι  $\text{Prob}<W=0,5903 > 0,05$  (κανονική κατανομή). Επίσης βρέθηκε ότι υπάρχει ομοιογένεια των διασπορών. Με **“Oneway Anova”** διαπιστώθηκε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά των μέσων όρων μεταξύ των τριών κατηγοριών ως προς τα MUFA ( $\text{Prob}>F=0,4876 > 0,05$ ).

#### Έλεγχος για τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA)

Με έλεγχο της κανονικότητας διαπιστώθηκε ότι  $\text{Prob}<W$  έχει τιμή  $0,0057 < 0,05$  οπότε έγινε λογαρίθμηση των δεδομένων και βρέθηκε  $\text{Prob}<W$  με τιμή  $0,6565$  που είναι  $> 0,05$  (κανονική κατανομή). Επίσης βρέθηκε ότι υπάρχει ομοιογένεια των διασπορών. Με **“Oneway Anova”** διαπιστώθηκε ότι  $\text{Prob}>F=0,6085 > 0,05$ .

#### Έλεγχος Αθρωματικό Δείκτη (A/I)

Με έλεγχο της κανονικότητας διαπιστώθηκε ότι  $\text{Prob}<W=0,1548 > 0,05$  (κανονική κατανομή). Επίσης βρέθηκε ότι υπάρχει ομοιογένεια των διασπορών. Με **“Oneway Anova”** διαπιστώθηκε ότι  $\text{Prob}>F=0,3800 > 0,05$ .

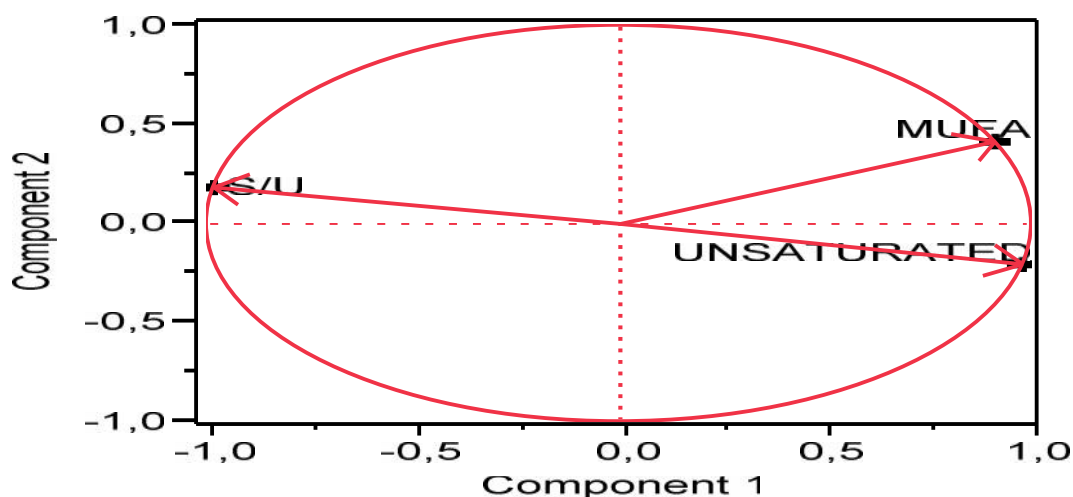
### 5.5.1.2. “PCA”

#### A) “PCA” για την απεικόνιση δειγμάτων με βάση την διαφορετική λιποπεριεκτικότητα του γάλακτος

Η «Ανάλυση Κύριων Συνιστώσων» εφαρμόστηκε με σκοπό να απεικονιστεί ο διαχωρισμός των διαφορετικών δειγμάτων (δείγματα από μερικώς αποβουτυρωμένο γάλα και δείγματα με διαφορετική λιποπεριεκτικότητα γάλακτο) σε διαφορετικές κύριες συνιστώσες με βάση τις μεταβλητές mufa, unsaturataed, s/u.

Στην 1<sup>η</sup> κύρια συνιστώσα συγκεντρώνονται οι μεταβλητές που προκαλούν το 91,493 της παραλλακτικότητας. Στην 2<sup>η</sup> κύρια συνιστώσα συγκεντρώνονται οι μεταβλητές που προκαλούν το 8,154 της παραλλακτικότητας (**Loading Plot**).

#### Loading Plot

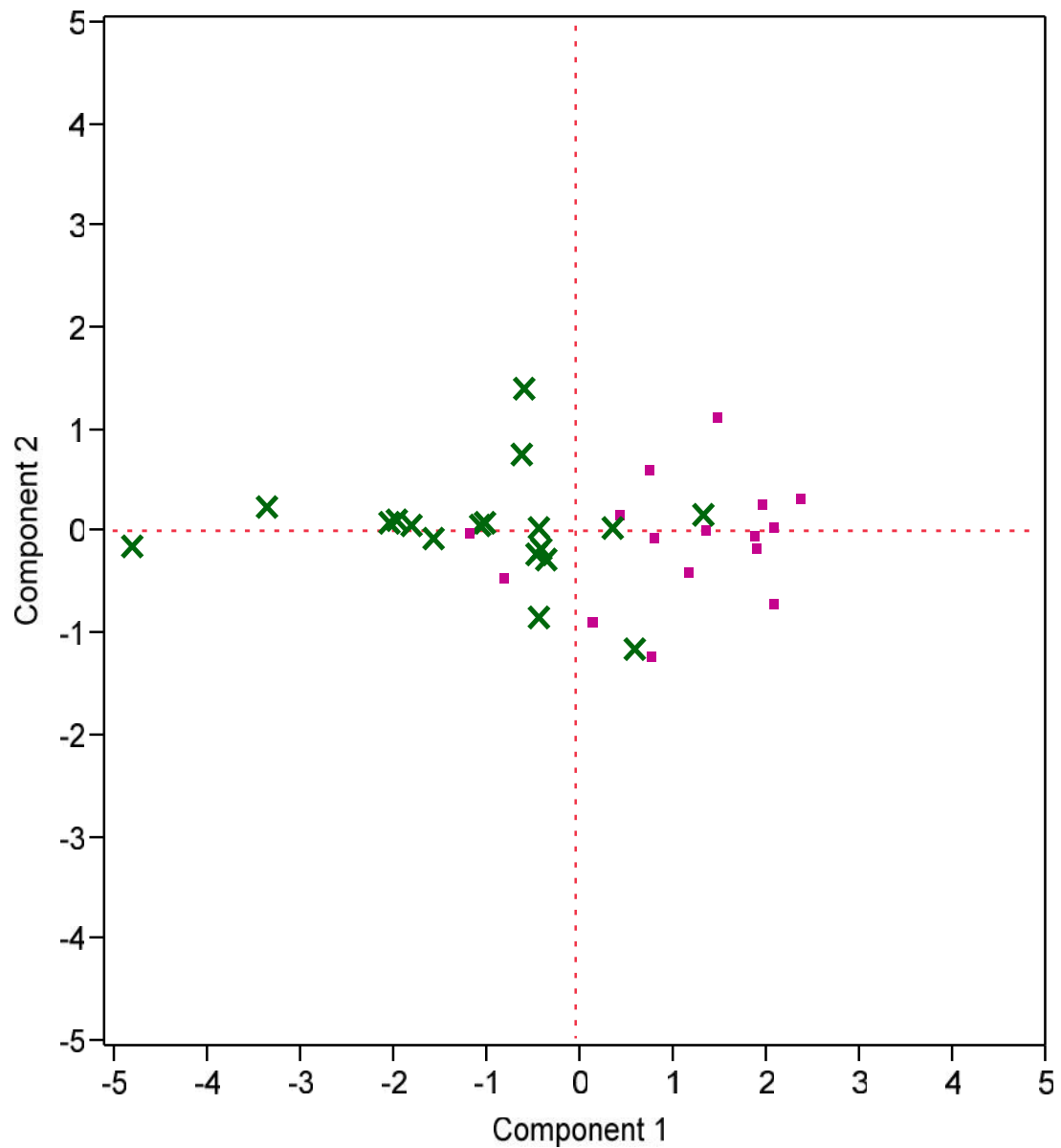


Στο Score Plot απεικονίζεται ο διαχωρισμός των δειγμάτων:

■ Δείγματα διαφορετικής λιποπεριεκτικότητας (πλήρες, άπαχο, ημιαποβουτυρωμένο, αποβουτυρωμένο) γάλακτος

× Δείγματα από μερικώς αποβουτυρωμένο γάλα

### Score Plot

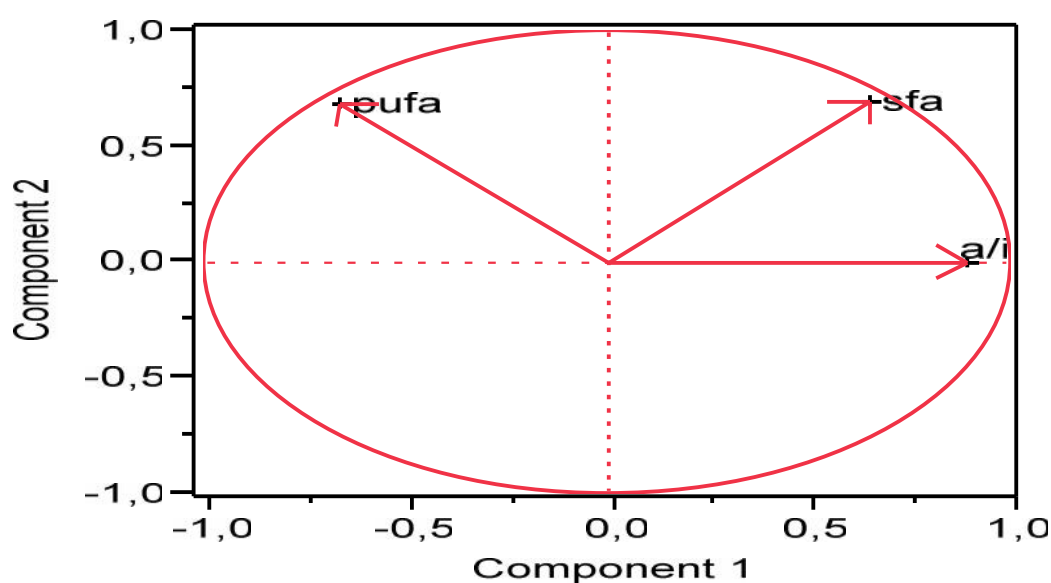


## B) “PCA” για την απεικόνιση των δειγμάτων Low fat, Reduced fat

Με την “PCA” απεικονίστηκε ο διαχωρισμός των διαφορετικών δειγμάτων (Low fat, Reduced fat) σε διαφορετικές κύριες συνιστώσες με βάση τις μεταβλητές PUFA, A/I, SFA.

Στην 1<sup>η</sup> κύρια συνιστώσα συγκεντρώνονται οι μεταβλητές που προκαλούν το 55,270 της παραλλακτικότητας. Στην 2<sup>η</sup> κύρια συνιστώσα συγκεντρώνονται οι μεταβλητές που προκαλούν το 31,485 της παραλλακτικότητας (**Loading Plot**).

### Loading Plot

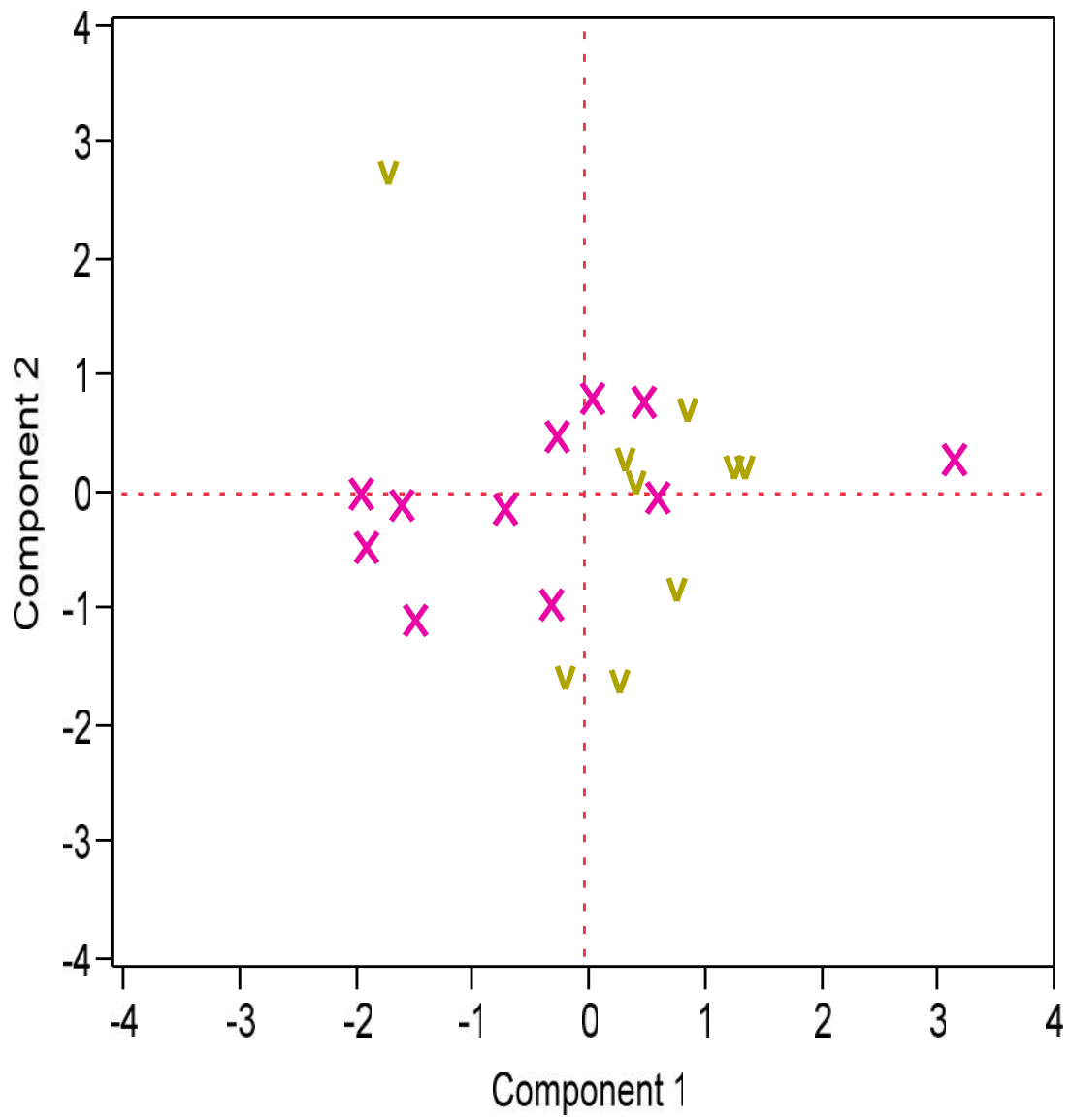


Στο Score Plot απεικονίζεται ο διαχωρισμός των δειγμάτων:

- ✖ Δείγματα με ένδειξη ή ισχυρισμό “Low fat”
- ✓ Δείγματα με ένδειξη ή ισχυρισμό “Reduced fat”



Score Plot



## 5.6. Συμπεράσματα για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό της σύνθεσης της λιπαρής φάσης γαλακτοκομικών προϊόντων

Το λίπος του γάλακτος, αποτελείται κυρίως από τριγλυκερίδια, διγλυκερίδια, χοληστερόλη, φωσφολιπίδια και ελεύθερα λιπαρά οξέα.

Η ανάλυση του φάσματος  $^1\text{H-NMR}$  έδειξε ότι εξαιτίας του μεγάλου αριθμού λιπαρών οξέων στο γαλακτικό λίπος, της αλληλοεπικάλυψης των πρωτονίων (λόγω της μεγάλης αφθονίας των πρωτονίων στα λιπαρά οξέα) και της σχετικά μικρής περιοχής απορροφήσεων των λιπαρών οξέων, ο ποιοτικός και περαιτέρω ποσοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων είναι περιορισμένος. Ωστόσο η μέθοδος  $^1\text{H-NMR}$  αποδείχτηκε απλή και γρήγορη μέθοδος στον ποσοτικό προσδιορισμό των συνολικών κορεσμένων και ακόρεστων λιπαρών οξέων. Επίσης, οι κορυφές που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένα λιπαρά οξέα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση (με τη βοήθεια πρότυπων ουσιών) και ποσοτικό προσδιορισμό αυτών. Συγκεκριμένα η κορυφή σε  $\delta$  0.96 ppm αντιστοιχεί στα μεθυλικά πρωτόνια του βουτυρικού και λινολενικού οξέος καθώς και οι κορυφές 2.73 και 2.79 ppm στα μεθυλενικά πρωτόνια του λινολεϊκού και λινολενικού οξέος. Μ' αυτόν τον τρόπο, με ολοκλήρωση των συγκεκριμένων κορυφών και την χρήση κατάλληλων εξισώσεων έγινε ποσοτικός προσδιορισμός.

Επιπλέον, η ανάλυση του φάσματος  $^1\text{H-NMR}$  έδωσε πληροφορίες για την ταυτοποίηση της χοληστερόλης (τα μεθυλικά πρωτόνια του C18 του μορίου της χοληστερόλης συντονίζονται σε  $\delta$  0.6-0.7 ppm), των διγλυκεριδίων (κοντά στα σήματα των  $\alpha$ -υδρογόνων της γλυκερίνης, περίπου σε 4.12 και 4.27 ppm, ορατή μόνο όταν διευρύνεται πολύ το φάσμα), των ελεύθερων λιπαρών οξέων και των υπεροξειδίων στο λίπος.

Προφανώς, η τεχνική  $^1\text{H-NMR}$  δεν έδωσε λεπτομερές πληροφορίες για το μοριακό ποσοστό κάθε λιπαρού οξέος που είναι εστεροποιημένο στο μίγμα των τριγλυκεριδίων. Η ακριβής σύνθεση των λιπαρών οξέων πραγματοποιήθηκε με αέρια χρωματογραφία (GC). Όμως, ένα σημαντικό πλεονέκτημα της φασματοσκοπίας  $^1\text{H-NMR}$  (σε αντίθεση με την αέρια χρωματογραφία) είναι ότι συνέβαλε στην ταυτοποίηση των ισομέρων θέσης των διπλών δεσμών των C18:2n6, C18:3n3a.

Απόκλιση στους υπολογισμούς ενός λιπαρού οξέος με την μέθοδο  $^1\text{H-NMR}$  μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι το γαλακτικό λίπος περιέχει μικρά ποσά από πολλά κορεσμένα και ακόρεστα λιπαρά οξέα που μπορεί να έχουν ίδια χημική μετατόπιση με το οξύ που πρόκειται να υπολογιστεί βάση εξίσωσης. Για παράδειγμα, η πολλαπλή κορυφή σε  $\delta$  0.96 ppm ανήκει στα μεθυλικά πρωτόνια του βουτυρικού και λινολενικού οξέος. Επίσης, αιτία του πειραματικού λάθους στον προσδιορισμό της σύνθεσης των λιπαρών οξέων αποτελεί η ακρίβεια της ολοκλήρωσης.

Συμπερασματικά, με συνδυασμό των δύο μεθόδων επιτεύχθηκε τόσο ο ποσοτικός προσδιορισμός των επιμέρους λιπαρών οξέων καθώς και η ταυτοποίηση χοληστερόλης, διγλυκεριδίων και υπεροξειδίων. Άρα οι δύο αυτές μέθοδοι (NMR, GC), αποδείχτηκε ότι είναι συμπληρωματικές.

## 5.7. Γενικά συμπεράσματα

Με την παραπάνω μελέτη, προσδιορίστηκε η σύνθεση της λιπαρής φάσης γαλακτοκομικών προϊόντων με την φασματοσκοπική τεχνική  $^1\text{H-NMR}$  και την αέρια χρωματογραφία. Από την μελέτη προκύπτουν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

► Παρατηρήθηκε ότι δεν υπάρχει μεγάλη διακύμανση τιμών στο προφίλ των λιπαρών οξέων C4-C18 των δειγμάτων.

► Με τον έλεγχο "Oneway Anova" βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε κορεσμένα, ακόρεστα, κορεσμένα/ακόρεστα, μονοακόρεστα και μικρής αλύσου λιπαρά οξέα μεταξύ δειγμάτων από μερικώς αποβουτυρωμένο γάλα και δειγμάτων με διαφορετική λιποπεριεκτικότητα γάλακτος. Η πρώτη κατηγορία δειγμάτων εμφάνισε υψηλότερη συγκέντρωση σε μικρής αλύσου, κορεσμένα και κορεσμένα/ακόρεστα λιπαρά οξέα ενώ αντίθετα εμφάνισε χαμηλότερη συγκέντρωση σε μονοακόρεστα.

► Αντίθετα, δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών κατηγοριών δειγμάτων με ένδειξη "light for fat or calories", "low fat" και "reduced fat" ως προς τα ομαδοποιημένα λιπαρά οξέα (SCFA, MCFA, LCFA, SFA, PUFA, MUFA, UNSATURATED, S/U).

► Η συγκέντρωση του 9cis,11trans CLA δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών κατηγοριών δειγμάτων "light for fat or calories", "low fat" και "reduced fat" καθώς και μεταξύ δειγμάτων από μερικώς αποβουτυρωμένο γάλα και δειγμάτων με διαφορετική λιποπεριεκτικότητα γάλακτος.

► Από τα ραβδογράμματα, παρατηρήθηκε υψηλή συγκέντρωση σε κορεσμένα λιπαρά οξέα (SFA), συγκριτικά με τα μονοακόρεστα (MUFA) και τα πολυακόρεστα (PUFA).

► Η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε κορεσμένα λιπαρά οξέα κυμαίνεται σε υψηλά επίπεδα, με την μεγαλύτερη συγκέντρωση (χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά) να εμφανίζουν τα γαλακτοκομικά προϊόντα με ένδειξη "Reduced fat".

► Η σχέση A/I βρίσκεται εντός ιδανικών τιμών (2-4,5) καθώς και ο λόγος  $\omega 6/\omega 3$  (1/1 έως 4/1).

► Σε όλα τα δείγματα έγινε ταυτοποίηση της χοληστερόλης, των διγλυκεριδίων και υπεροξειδίων.

## ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Barison, A. 2010.** A simple methodology for the determination of fatty acid composition in edible oils through <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Magn. Reson. Chem*, 48, 642–650
- Bauman, DE., Lock, AL. 2006.** Conjugated linoleic acid: biosynthesis and nutritional significance Advanced dairy chemistry. Fox PFMc Sweeney PLH New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 93–136.
- BELLOQUE, J., RAMOS, M. 1999.** Application of NMR spectroscopy to milk and dairy products. *Trends Food Sci. Tech.* 10 313-320.
- Brescia, M.A., Sacco, A. 2008.** High-Resolution <sup>1</sup>H Nuclear Magnetic Resonance in the Study of Oils, 1645-1650.
- Brescia, M.A., Mazzilli, V., Sgaramella, A., Ghelli, S., Fanizzi, F.P., and Sacco A. 2004.** <sup>1</sup>H NMR Characterization of Milk Lipids: A Comparison Between Cow and Buffalo Milk. *JAOCS*, Vol. 81, no. 5, 431-436.
- CODEX GENERAL STANDARD FOR CHEESE (CODEX STAN 283-1978).**
- Creamer, L.K., MacGibbon, A.K.H. 1996.** Some recent advances in the basic chemistry of milk proteins and lipids. *Int. Dairy J.*, 6, 539–568.
- Dais, P., 2010.** NMR measurement of free and esterified sterols. *Lipid Technology*, Vol 22, No. 12.
- Danthine S. et al., 2000.** Évolution des connaissances sur la membrane du globule gras du lait : synthèse bibliographique. *Lait*, 80, 209-222.
- Deeth H., 1997.** The role of phospholipids in the stability of milk fat globules. *Austr. J. Dairy Technol.*, 52, 44-46.
- Dewettinck K. et al., 2008.** Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. *Int. Dairy J.*, 18, 436-457.
- Evers, JM. 2004.** The milk fat globule membrane-composition and structural changes post secretion by the mammary secretory cell. *Int Dairy J*; 14: 661–74.
- Fauhl, C., F. Reniero, and C. Guillou, 2000.** <sup>1</sup>H-NMR as a Tool for the Analysis of Mixtures of Virgin Olive Oil with Oils of Different Botanical Origin, *Mag. Res. Chem.* 38:436–443.
- GUIDANCE ON THE IMPLEMENTATION OF REGULATION N° 1924/2006 ON NUTRITION AND HEALTH CLAIMS MADE ON FOODS CONCLUSIONS OF THE STANDING COMMITTEE ON THE FOOD CHAIN AND ANIMAL HEALTH.**
- Glass, R.L., Troolin, H.A., Jenness, R. 1967.** Comparative biochemical studies of milk – IV. Constituent fatty acids of milk fats. *Comp. Biochem. Physiol.*, 22, 415–425.

- Gnan, S.O., Sheriha, A.M. 1981.** Composition of Libyan camel's milk. *Aust. J. Dairy Technol.*, 41, 33–35.
- Hebeisen, D.F., HoeXin, F., Reusch, H.P., Junker, E., Lauterburg, B.H. 1993.** Increased concentrations of omega-3 fatty acids in milk and platelet rich plasma of grass-fed cows. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 63, 229–233.
- Hoda, M. El-Zeini. 2006.** MICROSTRUCTURE, RHEOLOGICAL AND GEOMETRICAL PROPERTIES OF FAT GLOBULES OF MILK FROM DIFFERENT ANIMAL SPECIES. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* Vol. 15/56, No 2, pp. 147–154.
- IDF. International Dairy Federation. 1992.** Milkfat and Milkfat Products. Determination of cholesterol contents. IDF Std. 159:1992, Brussels, Belgium.
- Jensen, R. G., and D. S. Newberg. 1995.** Bovine milk lipids. Pages 543–575 in *Handbook of Milk Composition*. R. G. Jensen, ed. Academic Press, San Diego, CA.
- Keenan, T W., Mather, I H., 2002.** LIPIDS. Milk Fat Globule Membrane.
- Keenan, TW., Mather, IH. 2003.** Milk fat globule membrane *Encyclopedia of dairy sciences*. Roginski HFuquay JWFox PFLondon: Academic Press; 1568–76.
- Kuksis, A., Marai, L., Myher, J.J. 1973.** Triglyceride structure of milk fats. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 50, 193–201.
- Landmark Manson, H. 2001.** Composition of Swedish dairy milk. Report Nr 7025-P (In Swedish), Swedish Dairy Association; 2003.
- MacGibbon, A.H.K., Taylor, M.W. 2006.** Composition and structure of bovine milk lipids. *Advanced dairy chemistry*. 1–42.
- MacGibbon, A.H.K., Taylor, M.W. 2002.** LIPIDS./Triacylglycerols. Elsevier Science Ltd, 1555-1559.
- Mannina, L., Segre A. 2002.** High resolution nuclear magnetic resonance: from chemical structure to food authenticity. *Grasas y Aceites* 53, 22–33.
- Mather, IH. 2000.** A review and proposed nomenclature for major proteins of the milk-fat globule membrane. *J Dairy Sci*; 83: 203–47
- Mincione, B., Spagna Musso, S., De Franciscus, G. 1977.** Studies on the different species. Sterol content of cow's milk. *Milchwissenschaft*, 32, 599–603
- Mosley EE, McGuire MK, Williams JE, McGuire MA. 2006.** Cis-9, Trans-11 conjugated linoleic acid is synthesized from vaccenic acid in lactating women. *J Nutr*; 136: 2297–301.
- National Dairy Council® (NDC) 2009.** Quick-Reference Guide to Nutrition Claims for Dairy Products. page 12,18.

**Noble, RC. 1978.** Digestion, absorption and transport of lipids in ruminant animals. *Prog Lipid Res*; 17: 55–91

**Noble, R.C. 1978.** Digestion, absorption and transport of lipids in ruminant animals. *Prog. Lipid Res.*, 17, 55–91.

**NUTRITION CLAIMS AND FUNCTIONAL CLAIMS. SANCO/1341/2001. REGULATION (EC) No 1924/2006 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 20 December 2006 on nutrition and health claims made on foods.**

**Sacchi, R., M. Patumi, G. Fontanazza, P. Barone, P. Fiordiponti, L. Mannina, E. Rossi, and A.L. Segre, 1996.** A High-Field <sup>1</sup>H Nuclear Magnetic Resonance Study of the Minor Components in Virgin Olive Oils, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73:747–758.

**Sacchi, R., I. Medina, L. Paolillo, and F. Addeo, 1993.** Proton Nuclear Magnetic Resonance Rapid and Structure-Specific Determination of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Fish Lipids, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 70:225-228.

**Shiao T.Y, 1989.** Determination of fatty acid composition of triacylglycerols by high resolution NMR spectroscopy, *Bot. Bull. Academia Sinica* 30: 191-199.

**Singh H., 2006.** The milk fat globule membrane-A biophysical system for food applications. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 11, 154-163.

**Turpeinen, AM., Mutanen, M., Aro, A., Salminen, I., Basu, S., Palmquist, DL., et al. 2002.** Bioconversion of vaccenic acid to conjugated linoleic acid in humans. *Am J Clin Nutr*; 76: 504–10.

**Parodi, P.W. 1977.** Conjugated octadecadienoic acids of milk fat. *J. Dairy Sci.*, 60, 1150–1153.

**Parodi, P.W. 1979.** Stereospecific distribution of fatty acids in bovine milk fat triglycerides. *J. Dairy Res.*, 46, 75–81.

**Parodi, P. 2004.** Milk fat in human nutrition. *Australian J Dairy Technol*; 59: 3–59.

**Posati, L.P., Orr, M.L. 1976.** Composition of foods. Dairy and Egg products. USDA-ARS, Consumer and Food Economics Inst., Agric. Handbook, Washington D.C. No. 8-1, pp. 77–109.

**Precht, D., Molkentin, J. 1995** Trans fatty acids: implications for health, analytical methods, incidence in edible fats and intake (a review). *Nahrung* 39: 343–74.

**Precht, D., Molkentin, J. 1997.** Trans-geometrical and positional isomers of linoleic acid including conjugated linoleic acid (CLA) in German milk and vegetable fats. *Fett / Lipid*, 99, 319–326.

**Precht, D., Molkentin, J. 2000.** Trans unsaturated fatty acids in bovine milk fat and dairy products. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 102, 635–639.

**USDA Nutrient Database for Standard Reference, Release 13 (Nov 1999).**

**Wahle, KW., Heys, SD., Rotondo, D. 2004** Conjugated linoleic acids: are they beneficial or detrimental to health?. *Prog Lipid Res*; 43: 553–87.

**Walstra, P., Geurts, TJ., Noomen, A., Jellema, A., van Boekel. MAJS. 1999.** Dairy technology: principles of milk properties and processes. New York: Marcel Dekker, Inc;

**Wertelecki, TJ. and Bodarski, RK., 2003.** FATS. Production of Animal Fats. Wroclaw Agricultural University, Wroclaw, Poland. Elsevier Science Ltd 2261-2270.

**WolV, R.L., Bayard, C.C., Fabien, R.J. 1995.** Evaluation of sequential methods for the determination of butterfat fatty acid composition with emphasis on trans-18:1 acids: Application to the study of seasonal variations in French butters. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 72, 1471–1483.

**Wang, W., J. C. Allen, and H. E. Swaisgood. 1997.** Binding of vitamin D and cholesterol to  $\beta$ -lactoglobulin. *J. Dairy Sci.* 80:1054–1059.

**Wiking, L., Stagsted, J, Bjorck L., Nielsen, JH., 2004.** Milk fat globule size is affected by fat production in dairy cows. *Int Dairy J*; 14: 909–13.

**Yoshioka, Y., Sasaki, J., Yamamoto M., et al 2000.** Quatitation by <sup>1</sup>H-NMR of dolichol, cholesterol and choline-containing lipids in extracts of normal and phathological thyroid tissue. *NMR Biomed*, 13: 377-383.

## **ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

**Ανυφαντάκης, Ε.Μ.**, Τυροκομία. Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης. Αθήνα 2004.

**Ανυφαντάκης, Ε., Καλαντζόπουλος, Γ.**, Γαλακτοκομία. Τόμος Πρώτος. Εκδόσεις Σταμούλης. Αθήνα-Πειραιάς 1993.

**Βαλανίδης Αθ.Π.** Φασματοσκοπία Οργανικών Ενώσεων. Τμήμα Χημείας. Πανεπιστήμιο Αθηνών. 2006.

**Βάμβακας,Κ. & Ζερφυρίδης, Γρ.** Τυριά με μειωμένη και χαμηλή λιποπεριεκτικότητα (σελ. 59-82). Επιστήμη και Τεχνολογία Γάλακτος. Εθνική Επιτροπή Γάλακτος Ελλάδος 2002.

**Βαρβόγλη Α.Γ., Αλεξάνδρου Α.Γ., 1986.** Οργανική Χημεία

**Κατσαριή Μ. & Βουτσινάς Λ.** Νέες τάσεις στην παραγωγή τυροκομικών προϊόντων. Πρακτικά επιμορφωτικού σεμιναρίου στη Γαλακτοκομία. Εθνική Επιτροπή Γάλακτος Ελλάδος. ΛΑΡΙΣΑ 2002.

**Κώδικας Τροφίμων και Ποτών.** Γενικό Χημείο του Κράτους. Αθήνα 2003.

**Μαγιάτης, Π.** Ενόργανες τεχνικές ποιοτικής και ποσοτικής ανάλυσης δρόγων

**Μοάτσου, Γκ.,** Γεωργικές Βιομηχανίες-Γαλακτοκομία. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Αθήνα 2009.

**Μπόσκου, Δ.,** Χημεία Τροφίμων. Εκδόσεις Γαργατάνη. Θεσσαλονίκη 2004.

**McMURRY, J.** ΟΡΓΑΝΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ. ΤΟΜΟΣ 1. ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΚΡΗΤΗΣ 2005.

**Νταής, Φ.** Βασικές αρχές της Φασματοσκοπίας NMR. Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης, Τμήμα Χημείας.

**Σφλώμος, Σ.** Χημεία Τροφίμων με Στοιχεία Διατροφής. Τόμος 1. Αθήνα 2010.