



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ *ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ* ΣΠΟΥΔΩΝ (*ΔΙΠΜΣ*)
ΤΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ
ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

*«ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΗ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΚΑΙ
ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ»*

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ «ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΥΡΙΩΝ ΤΥΡΟΓΑΛΑΚΤΟΣ ΜΕΙΩΜΕΝΗΣ ΛΙΠΟΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ»



ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ ΗΛΙΑΣ-ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΣ

Επιβλέπων: Καμναρίδης Σ. Καθηγητής

Συμβουλευτική Εξεταστική Επιτροπή:

Καμναρίδης Σ. Καθηγητής

Μασούρας Θ. Επικ. Καθηγητής

Χαρισμιάδου Μ. Λέκτορας

Αθήνα, Ιούνιος 2013

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου μελέτης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον εισηγητή του θέματος αυτού και επιβλέποντα Καθηγητή κ. Καμιναρίδη Στέλιο για την καθοδήγησή του, κατά τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου εργασίας καθώς και την Γεωπόνο μέλος Ε.Ε.ΔΙ.Π του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας, κ. Ζωίδου Ευαγγελία για την συνεχή καθοδήγηση, πολύτιμη βοήθεια, κόπο και αμέριστη υποστήριξή της για την πραγματοποίηση αυτής της μελέτης. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη ΔΕΠ της εξεταστικής επιτροπής τον Επικ. Καθηγητή Μασούρα Θεοφύλακτο για το χρόνο που διέθεσε για να μελετήσει την εργασία και για τη καθοδήγηση στην ανάλυση των αρωματικών συστατικών με GC-MS καθώς επίσης και την Λέκτορα Χαρισσιάδου Μαρία τόσο για το χρόνο που διέθεσε για να μελετήσει την εργασία, όσο και να υποβάλλει τις πολύτιμες και εύστοχες υποδείξεις της.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας και ειδικότερα την Επικ. Καθηγήτρια Μοάτσου Γκόλφω για την καθοδήγηση και βοήθεια στην ανάλυση των πρωτεϊνών με υγρή χρωματογραφία (HPLC). Επίσης την Γεωπόνο Γεωργαλάκη Μαρίνα και την Βιολόγο Αναστασίου Ουρανία ΠΕ-ΙΔΑΧ, για τη βοήθεια τους στις αναλύσεις των ηλεκτροφορήσεων καθώς και τον Ειδικό Γαλακτοκόμο Τυροκόμο ΔΕ-Ε.Τ.Ε.Π. Πάσχο Θεόδωρο και τον Γεωργοκτηνοτρόφο ΔΕ-Τυροκόμο Γραμματικά Ηλία για τη βοήθεια και άριστη συνεργασία την οποία είχαμε σε όλη τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου στο χώρο του Τυροκομείου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A/A	Τίτλος	Σελίδα
	Περίληψη	6
	Εισαγωγή	8
	<u>Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u>	10
1	Τυρόγαλα	10
1.1	Θρεπτική αξία τυρογάλακτος	10
1.1.2	Στοιχεία τυρογάλακτος στην Ελλάδα	11
1.1.3	Αξιοποίηση Τυρογάλακτος-Διάφορα υποπροϊόντα	12
1.1.3.1	Παραγωγή αιθανόλης	14
1.1.3.2	Μονοκυτταρική πρωτεΐνη (single-cell protein, S.C.P.)	15
1.1.3.3	Παραγωγή γαλακτικού οξέος	15
1.1.3.4	Βιομηχανική παραγωγή ζύμης αρτοποιίας(baker's yeast)	16
1.1.3.5	Λακτόζη και υπόλοιποι ολιγοσακχαρίτες	16
1.1.3.6	Πρωτεΐνες Τυρογάλακτος	18
1.1.4	Η αξιοποίηση του τυρογάλακτος στην Ελλάδα	23
1.2	Τυριά μειωμένης λιποπεριεκτικότητας	27
1.3	Τυριά Τυρογάλακτος	31
1.3.1	Επίδραση της θέρμανσης στις πρωτεΐνες του ορού	32
1.3.2	Αντιδράσεις πρωτεϊνών ορού (WPs)-καζεϊνών (CN) με την επίδραση των υψηλών θερμοκρασιών	34
1.4	Ελληνικά τυριά τυρογάλακτος	37
1.4.1	Μυζήθρα	38
1.4.2	Ανθότυρος	40
1.4.3	Μανούρι (Π.Ο.Π)	40
1.4.4	Ξινομυζήθρα Κρήτης (Π.Ο.Π)	42

1.5	Αγορά τυριών τυρογάλακτος στην Ελλάδα	46
	<u>B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ- ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</u>	50
2.0	Πειραματικός Σχεδιασμός-Δειγματοληψία	50
2.1	Παρασκευή της μυζήθρας	51
2.2	Φυσικοχημικές αναλύσεις	53
2.3	Μικροβιολογικές αναλύσεις	57
2.4	Ρεολογικές αναλύσεις	58
2.5	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών	59
2.6	RP-HPLC ανάλυση του πρωτεϊνικού κλάσματος των τυριών	64
2.7	Προσδιορισμός αρωματικών συστατικών	66
2.8	Οργανοληπτική αξιολόγηση	66
2.9	Στατιστική Ανάλυση	67
	<u>Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ</u>	68
3.1	Σύσταση πρώτης ύλης για την παρασκευή των 3 τύπων Μυζήθρας	68
3.1.2	Απόδοση σε τυρί	68
3.2	Φυσικοχημικές αναλύσεις	70
3.2.1.	Λίπος / υγρασία / πρωτεΐνη	72
3.2.2	Τέφρα	74
3.2.3	pH–Οξύτητα	74
3.2.4	NaCl	75
3.2.5	Ανόργανα στοιχεία	75
3.2.6	Ανάλυση σακχάρων και οργανικών οξέων	76
3.3	Ρεολογικά χαρακτηριστικά	77
3.4	Μικροβιολογικά χαρακτηριστικά	79
3.5	Αρωματικές Ενώσεις	80

3.6	Οργανοληπτική αξιολόγηση	86
3.7	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (PAGE) υπό φυσιολογικές συνθήκες (NATIVE) και παρουσία Sodium dodecyl sulphate (SDS)	88
3.8	Διερεύνηση της δυνατότητας ανάλυσης και μελέτης του πρωτεϊνικού κλάσματος των τυριών με RP-HPLC	93
	<u>Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</u>	101
	<u>Παράρτημα I.1:</u> Αρωματικές Ενώσεις	102
	Βιβλιογραφία	110

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η παρασκευή τυριού Μυζήθρα με μειωμένο λίπος.

Παρασκευάστηκαν τρεις διαφορετικοί τύποι τυριών Μυζήθρας: (1) Μυζήθρες χωρίς πρόσγαλα, (2) με 10% πλήρες πρόσγαλα και (3) με 10% άπαχο πρόσγαλα. Τα τυριά αυτά συγκριθήκαν έναντι τεσσάρων τυριών τυρογάλακτος του εμπορίου από διαφορετικούς παραγωγούς. Σε όλα τα τυριά προσδιορίστηκαν τα φυσικοχημικά, μικροβιολογικά, ρεολογικά και οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά με βάση τα οποία και αξιολογήθηκαν. Σύμφωνα με τη συμβατική τεχνολογία, η Μυζήθρα παρασκευάζεται χωρίς πρόσγαλα ή με προσθήκη μιας ποσότητας πλήρους προσγάλακτος στο τυρόγαλα για να αυξηθεί η απόδοση και να βελτιωθεί η ποιότητα του τυριού. Το προϊόν Μυζήθρας με άπαχο πρόσγαλα απετέλεσε ένα νέο προϊόν.

Από την ανάλυση των πειραματικών δεδομένων προέκυψε ότι η προσθήκη του προσγάλακτος βελτιώνει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και αυξάνει την απόδοση σε τελικό προϊόν, των τυριών Μυζήθρα. Το τυρί με τη προσθήκη άπαχου προσγάλακτος είχε το χαμηλότερο λίπος και λίπος επί ξηρού σε σχέση με τα άλλα τυριά. Η υγρασία (%) στα άνευ λίπους συστατικά δεν επηρεάστηκε από την μείωση του λίπους. Το ίδιο παρατηρήθηκε και για το ποσοστό των ολικών πρωτεϊνών στα πειραματικά τυριά. Στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν στα ανόργανα στοιχεία Ca, Mg και K που βρέθηκαν να έχουν μεγαλύτερες τιμές στο τυρί Μυζήθρα που παρασκευάστηκε από άπαχο πρόσγαλα έναντι των άλλων πειραματικών τυριών. Στα δείγματα του εμπορίου βρέθηκε μικρότερο ποσοστό ολικών πρωτεϊνών. Οι Ξινομυζήθρες παρουσίασαν τη υψηλότερη λιποπεριεκτικότητα (18,22%). Σε όλα τα προϊόντα κυριαρχούσαν οι αλκοόλες, ενώ στα τυριά του εμπορίου και ιδιαίτερα στις Ξινομυζήθρες βρίσκονται και κετόνες σε υψηλές συγκεντρώσεις.

Από τα χρωματογραφήματα της HPLC και την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών καθίστανται δυνατή η διάκριση των τυριών Μυζήθρα στα οποία έχει γίνει προσθήκη προσγάλακτος. Επίσης η SDS-ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών, κάτω από ειδικές συνθήκες προετοιμασίας των δειγμάτων, επέτρεψε το διαχωρισμό των επί μέρους πρωτεϊνών τυρογάλακτος που είχαν υποστεί μετουσίωση και συμπλοκοποίηση κατά τη θερμική επεξεργασία του τυρογάλακτος.

Παρασκευάστηκε μυζήθρα καλής ποιότητας, με μειωμένο λίπος (9,24%) με τη προσθήκη 10% άπαχου προσγάλακτος στο τυρόγαλα. Αυτό το τυρί είχε καλύτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά από τα αντίστοιχα του εμπορίου και δυσδιάκριτες ή ασήμαντες διαφορές στην ύφη και στο άρωμα από το τυρί Μυζήθρα που παρασκευάστηκε με προσθήκη 10% πλήρους προσγάλακτος στο τυρόγαλα.

Λέξεις κλειδιά: Τυριά τυρογάλακτος με χαμηλά λιπαρά, μυζήθρα, πρωτεΐνες ορού, ρεολογικές ιδιότητες, αρωματικά συστατικά, πρόσγαλα

SUMMARY

The purpose of this work was the production of reduced-fat Mizithra cheese.

Three types of Mizithra cheese were made: (1) without milk, (2) with 10% full-fat milk and (3) with 10% defatted milk added to the whey. These products were evaluated against four commercial cheeses from different producers. All cheeses were examined for their physicochemical, microbiological, rheological and organoleptic properties. According to conventional technology, Mizithra is produced with or without the addition of full fat milk to whey; therefore the cheese made with defatted fat milk may be classified as a new low-fat Mizithra cheese.

The results showed that the addition of milk improved the organoleptic properties of Mizithra cheese and led to an increase in yield. The addition of defatted milk to whey resulted in a product with significantly ($P<0.05$) less fat and fat in dry matter (%) than that produced by the addition of full fat milk. The moisture content (%) was not affected by the reduction of fat. No significant ($P>0.05$) difference in total proteins was observed in experimental, while Ca, Mg and K contents were higher in the reduced-fat Mizithra cheese than in the other commercial ones. The commercial Mizithra cheeses were found to have lower protein content than the experimental cheeses. Xinomizithra samples exhibited the highest fat content (18-22%). Alcohols, which are characteristic aroma compounds of fresh cheeses, were present in all products, while commercial Mizithra (particularly Xinomizithra) had a high ketone concentration too.

From HPLC chromatograms and electrophoretic patterns of proteins of Mizithra cheeses revealed the presence of as-CN, thus permitting the detection of milk addition to the whey. Also, SDS-electrophoresis of proteins, under special preparing conditions of Mizithra samples, permitted the separation of whey-cheeses proteins (WP) components, that had been denatured and formed aggregates with κ -CN at the casein micelle during cooking of whey.

Reduced-fat Mizithra cheese of good quality, containing 9.24% fat was produced by adding 10% defatted milk to the whey. This cheese had better organoleptic characteristics than the commercial ones and indistinguishable in appearance-colour, body-texture and flavour from the Mizithra cheese made with 10% full-fat milk added to the whey.

Key words: low-fat whey cheese, whey proteins, mizithra, texture, volatile compounds

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το τυρόγαλα είναι προϊόν που παράγεται κατά τη τυροκόμηση των τυριών. Η θρεπτική αξία του τυρογάλακτος, είναι σημαντική. Περιέχει υψηλής ποιότητας πρωτεΐνες, λακτόζη, ανόργανα άλατα, βιταμίνες και ίχνη του λίπους γάλακτος.

Τις τελευταίες δεκαετίες, οι επιστήμονες ασχολούνται με τη διατροφική αξία των διάφορων συστατικών του ορού γάλακτος και την επίδραση τους στην υγεία του ανθρώπου. Ερευνητικά στοιχεία αποδεικνύουν τα πολυάριθμα οφέλη των συστατικών του τυρογάλακτος για την υγεία, όπως αντιμικροβιακή και αντικαρκινική δράση, τη βελτίωση της μυϊκής δύναμης και την πρόληψη της οστεοπόρωσης (Morris & FitzGerald, 2008). Το τυρόγαλα περιέχει βιοενεργά συστατικά που μπορούν να επηρεάσουν θετικά την καρδιαγγειακή υγεία με την ικανότητά τους να μειώνουν την αρτηριακή πίεση, να αναστέλλουν την συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων, και να μειώνουν τα επίπεδα χοληστερόλης στο αίμα. Δεδομένου ότι η γνώση των πιθανών οφελών για την υγεία του ορού γάλακτος αυξάνεται, όλο και περισσότεροι άνθρωποι χρησιμοποιούν τα προϊόντα ορού γάλακτος στην καθημερινή τους υγιεινή διατροφή. Η χρήση του τυρογάλακτος, διάφορων προϊόντων του, όπως τα συμπληρώματα διατροφής και τα συστατικά σε λειτουργικά τρόφιμα, έχει διευρυνθεί.

Σημαντική πηγή των παραπάνω θρεπτικών συστατικών του ορού του γάλακτος, αποτελούν τα τυριά τυρογάλακτος. Ωστόσο, η περιεκτικότητα διαφέρει σημαντικά μεταξύ των διαφόρων τύπων τυριών τυρογάλακτος, και αυτό οφείλεται κυρίως στη πρώτη υλη και στις πρακτικές που ακολουθούνται κατά τη παρασκευή τους.

Η κατανάλωση τροφών πλούσιων σε λιπαρά ενοχοποιείται για την εμφάνιση πολλών ασθενειών. Τα γαλακτοκομικά προϊόντα μειωμένων λιπαρών βρίσκονται πρώτα στη λίστα προτιμήσεις των καταναλωτών (Drake *et al.*, 1996). Για τον λόγο αυτό σε όλο τον κόσμο, γίνεται προσπάθεια, για την αντικατάσταση των συμβατικών τυριών με διάφορους τύπους τυριών μειωμένης λιποπεριεκτικότητας (Duxbury, 1989; Simard, 1991).

Τα τυριά τυρογάλακτος είναι τυριά που παρουσιάζουν ιδιαίτερο διατροφικό ενδιαφέρον και πολλά από αυτά, όπως η Μυζήθρα, έχουν ταυτόχρονα και χαμηλά λιπαρά. Η Μυζήθρα είναι ένα παραδοσιακό Ελληνικό τυρί που παρασκευάζεται με θέρμανση του τυρογάλακτος σε θερμοκρασίες 85°C έως 90°C. Το πρόβλημα με τα προϊόντα χαμηλών λιπαρών, όπως η Μυζήθρα, είναι ότι συνήθως υστερούν σε γεύση και άρωμα και δεν είναι αποδεκτά από τον καταναλωτή. Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τις αναλογίες των κύριων συστατικών -κυρίως του λίπους- των τυριών, την τεχνολογία και τις συνθήκες ωρίμανσης και διατηρησής τους (Mistry, 2001). Για το λόγο αυτό για την βελτίωση της ποιότητας της Μυζήθρας συνήθως προστίθεται στο τυρόγαλα πλήρες γάλα σε αναλογία 5-10%.

Στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια να παρασκευαστούν τυριά τυρογάλακτος μειωμένων λιπαρών. Για το σκοπό αυτό, παρασκευάστηκαν τυριά Μυζήθρες χωρίς πρόσγαλα, με πλήρες πρόσγαλα σε αναλογία 10% και ένα νέο προϊόν Μυζήθρας με 10% άπαχο πρόσγαλα. Η τυπική σύσταση του τυριού Μυζήθρα χωρίς πρόσγαλα είναι: πρωτεΐνες 12-13%, λίπος 15-19%, λακτόζη 3,5%, ωστόσο τα ερευνητικά δεδομένα για τη Μυζήθρα είναι

ελάχιστα (IDF, Bulletin, 1986; Ανυφαντάκης, 2004) ενώ προϊόν με άπαχο πρόσγαλα παρασκευάζεται για πρώτη φορά.

Στα τυριά που παρασκευάστηκαν προσδιορίστηκαν τα φυσικοχημικά, μικροβιολογικά, ρεολογικά χαρακτηριστικά και έγινε οργανοληπτική αξιολόγηση. Τα πειραματικά τυριά συγκρίθηκαν επίσης, με 4 τυριά τύπου Μυζήθρας του εμπορίου, από διαφορετικούς παρασκευαστές.

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΤΥΡΟΓΑΛΑ

Η τυροκομία κατά πάσα πιθανότητα ξεκινά από την περιοχή της Μεσοποταμίας περίπου 8.000 χρόνια πριν, μετά την παρατήρηση ότι με όξινη πήξη το γάλα χωρίζεται σε τυρόπηγμα και τυρόγαλα. Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στη παρασκευή των πρώτων τυριών, όπου οι αρχικές καλλιέργειες εκκίνησης πιθανότατα αποτελούνταν μερικώς από το τυρόγαλα της προηγούμενης ημέρας της τυροκόμησης. Παρασκευαστές του Parmigiano-Reggiano, Grana Padano, και άλλων τυριών υψηλής θέρμανσης εξακολουθούν και σήμερα να χρησιμοποιούν τη παραπάνω μέθοδο (Fox & McSweeney, 2004). Η αναθέρμανση του τυρογάλακτος και η ανάκτηση των στερεών οδηγούν στη παράγωγη τυριών τυρογάλακτος όπως είναι τα Ελληνικά τυριά Μυζήθρα, Ανθότυρο κ.α. και το ιταλικό τυρί ρικότα (Ricotta).

Τυρόγαλα είναι το υγρό που παράγεται συνήθως σε μεγάλες ποσότητες κατά τη πήξη του γάλακτος. Το «Γλυκό» τυρόγαλα (sweet whey), με pH τουλάχιστον 5,6, προέρχεται από τη παραγωγή τυριών με τη προσθήκη πυτιάς, όπως τα περισσότερα ελληνικά και ξένα τυριά. Το «Όξινο» τυρόγαλα (acid whey), με pH το οποίο δεν υπερβαίνει το 5,1, λαμβάνεται μετά την όξινη πήξη κατά τη παρασκευή τυριών αλοιφώδους υφής, όπως το τυρί Cottage. Περίπου 9 λίτρα τυρογάλακτος παράγονται από την παρασκευή 1 κιλού τυριού. Ένα μεγάλο εργοστάσιο τυροκομικών μπορεί να παράγει πάνω από 1 εκατομμύριο λίτρα τυρογάλακτος ημερησίως (Jelen, 2003).

1.1 Θρεπτική αξία τυρογάλακτος

Το τυρόγαλα χρησιμοποιήθηκε για θεραπευτικούς σκοπούς ήδη από την εποχή του Ιπποκράτη το 460 π.Χ. και στη συνέχεια κατά τη διάρκεια του Μεσαίωνα (Siisli, 1956). Το τυρόγαλα έγινε «μόδα» στις αγγλικές πόλεις στα μέσα του 17^{ου} αιώνα, με αποτέλεσμα το άνοιγμα μαγαζιών όπου εμπορευόταν τυρόγαλα ως ποτό, κάτι ανάλογο με τα καταστήματα του καφέ σήμερα. Τα προϊόντα που παράγονταν από τυρόγαλα ήταν ένα είδος ζωμού (whey-borse), βούτυρο τυρογάλακτος (whey-butter), χυλός τυρογάλακτος (whey-porridge) και ένα αναψυκτικό με τυρόγαλα (whey-whig) (Trelogan, 1970). Το λουτρό σε τυρόγαλα ήταν δημοφιλές σε ιαματικά λουτρά του 19^{ου} αιώνα (Trelogan, 1970), και ως το Β Παγκόσμιο Πόλεμο. Ιαματικά λουτρά της Κεντρικής Ευρώπης σέρβιραν μέχρι 1,5 kg τυρογάλακτος ημερησίως σε ασθενείς που έπασχαν από διάφορες παθήσεις (Holsinger *et al.*, 1974).

Έρευνες για την θρεπτική αξία του τυρογάλακτος άρχισαν τον 19^ο αιώνα. Μέχρι τότε οι πρωτεΐνες γάλακτος ταξινομούσαν ως καζεΐνες ή πρωτεΐνες ορού γάλακτος, και το στερεό που λαμβανόταν από τη θέρμανση του τυρογάλακτος ονομαζόταν γαλαλακταλβουμίνη. Περίπου το 1890, η έρευνα έδειξε ότι ένα ίζημα, που ονομάστηκε λακτοσφαιρίνη, σχηματίστηκε από την προσθήκη του θειικού μαγνησίου ή θειικού αμμωνίου σε χαμηλό pH (Creamer & Sawyer, 2003). Το κλάσμα της λακταλβουμίνης κρυσταλλώθηκε στη δεκαετία του 1930 (Palmer 1934) και οι κύριες πρωτεΐνες που

απομονώθηκαν τελικά ονομάστηκαν β-γαλακτογλοβουλινη (β-Lg) και α-γαλακταλβουμίνη (α-La), οι οποίες και στην ουσία είναι ο «θησαυρός» που κρύβεται στο τυρόγαλα. Αργότερα ανακαλύφθηκαν και οι υπόλοιπες πρωτεΐνες του ορού στις οποίες περιλαμβάνονται η αλβουμίνη (BSA), η λακτοφερίνη (LF), η λακτουπεροξειδάση και πολυάριθμοι τύποι ανοσοσφαιρίνων (Igs) καθώς και άλλες δευτερεύουσες πρωτεΐνες.

Η θρεπτική αξία του τυρογάλακτος οδήγησε στη παρασκευή τυριών τυρογάλακτος, καθώς επίσης και στην παρασκευή μεγάλης ποικιλίας άλλων προϊόντων. Τέτοια προϊόντα είναι οι διάφορες σκόνες τυρογάλακτος (πλήρης σκόνη γλυκιά ή όξινη, αφαλατωμένη μερικά ή ολικά, σκόνη χωρίς ή με μειωμένη λακτόζη, χωρίς πρωτεΐνη και σκόνη χωρίς λίπος), καθώς και τα πρωτεϊνικά συμπυκνώματα ορού (WPCs).

Η τυπική σύσταση διαφόρων τύπων τυρογάλακτος καθώς και προϊόντων τυρογάλακτος παρουσιάζεται στον πίνακα 1.1.

Πινάκας 1.1 Τυπική σύσταση τυρογάλακτος και προϊόντων τυρογάλακτος (Jelen, 2003).

Προϊόν	Πρωτεΐνη	Λακτόζη	Τέφρα
	<i>g/L τυρογάλακτος</i>		
Τυρόγαλα	6-10	46-52	2,5-1,7
Όξινο τυρόγαλα	6-8	44-46	4,3-7,2
UF Τυρόγαλα (Διήθημα)	1	90	9
	<i>g/100g σκόνης</i>		
WPC (whey protein concentrate)	65-80	4-21	3-5
WPC-35	35	50	7.2
WPI (whey protein isolate)	88-92	<1	2-3

Το τυρόγαλα που δεν χρησιμοποιείται για τη διατροφή του ανθρώπου, καταλήγει ως ζωοτροφή χοίρων ή άλλων ζώων, μετατρέπεται σε λίπασμα ή απορρίπτεται. Με την ανάπτυξη συστημάτων διατροφής το τυρόγαλα προστίθεται στα σιτηρέσια υγρής μορφής (liquid feeding) για τη διατροφή απογαλακτισθέντων χοιριδίων και θηλάζουσων χοιρομητέρων στις σύγχρονες χοιροτροφικές μονάδες (Meat and Livestock Commission, 2003). Μια μελέτη που διεξήχθη στις αρχές του 1970 έδειξε ότι ο ψεκασμός τυρογάλακτος στο έδαφος σε βάθος 25 mm βελτίωσε την απόδοση του αραβοσίτου και σανού χωρίς αύξηση της ρύπανσης των υπογείων υδάτων (Watson & Peterson, 1977).

1.1.2 Το τυρόγαλα σαν ρυπογόνος παράγοντας

Το τυρόγαλα είναι ισχυρός ρυπογόνος παράγοντας με BOD (βιολογική ζήτηση οξυγόνου 5 ημερών στους 20°C) 35-45 kg/L. Ενδεικτικά 4000 λίτρα τυρογάλακτος, ποσότητα που διαχειρίζεται περίπου ένα μικρό τυροκομείο, ισοδυναμεί με την επιβάρυνση που προκαλούν τα απόβλητα αποχέτευσης 1900 ατόμων (Marwaha & Kennedy, 1988). Η λακτόζη, το βασικό σάκχαρο του τυρογάλακτος ευθύνεται σε ποσοστό μεγαλύτερο από 90% για το BOD του τυρογάλακτος. Απόρριψη τυρογάλακτος σε ποτάμια πραγματοποιούνταν συχνά στις Ηνωμένες Πολιτείες πριν η πολιτεία θέσει περιβαλλοντικούς κανονισμούς (Cryan, 2001). Το ίδιο συμβαίνει και στην Ελλάδα με

ενδεικτικό παράδειγμα, την περιοχή της Θεσσαλίας όπου υπάρχει περιβαλλοντική επιβάρυνση του ποταμού Πηνειού (εικόνα 1.1) από το παραγόμενο τυρόγαλα των τυροκομείων της περιοχής.

Εικόνα 1.1. Αποβολή τυρογάλακτος στο Ποταμό Πηνειό

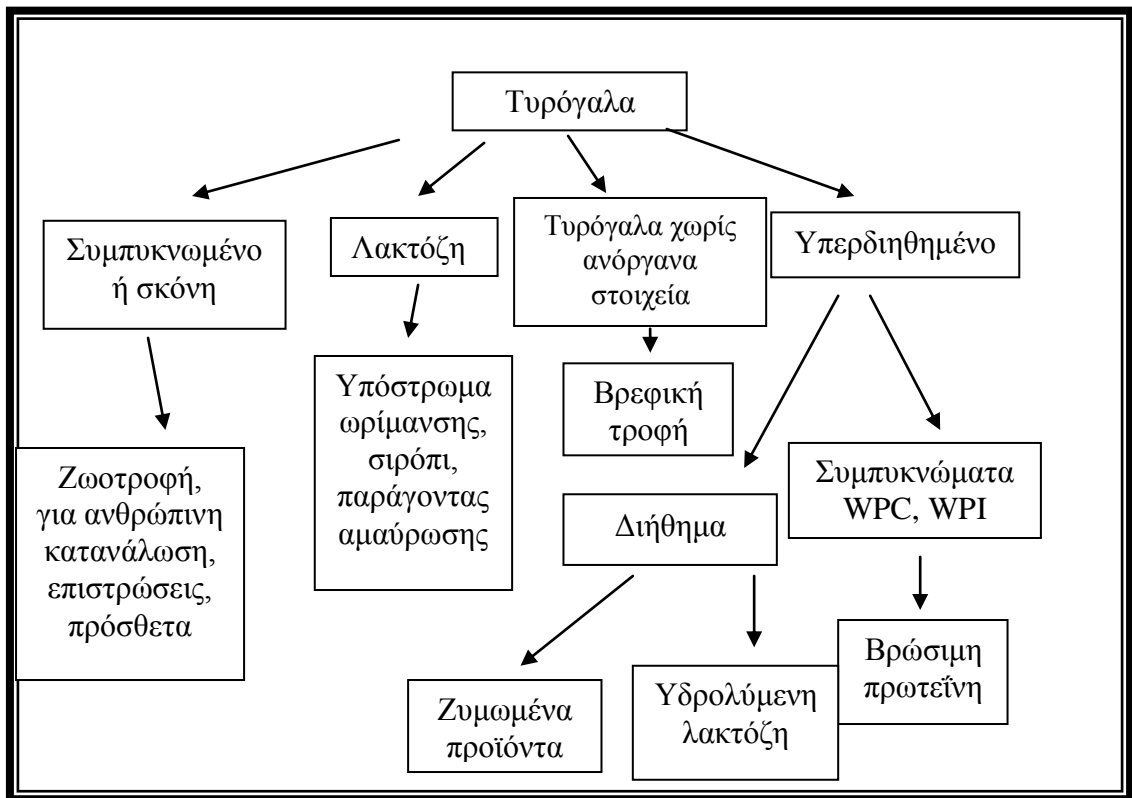


Κανονισμοί που αφορούν τη διάθεση υγρών αποβλήτων (συμπεριλαμβανομένου του τυρογάλακτος) έχουν εισαχθεί σταδιακά και εφαρμόζονται αυστηρά τα τελευταία 25 χρόνια. Χρήσιμα στοιχεία για τη περιβαλλοντική διαχείριση του τυρογάλακτος υπάρχουν στις μελέτες των Marshall & Harper (1984), Siso (1996) και Durham & Hourigan (2007). Οι Ηνωμένες Πολιτείες, ο Καναδάς, η Αυστραλία, η Νέα Ζηλανδία, και οι χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης έχουν θεσπίσει αυστηρή περιβαλλοντική νομοθεσία για την διαχείριση του τυρογάλακτος. Η ρύθμιση αυτή έχει αναγκάσει τις γαλακτοβιομηχανίες να επαναπροσδιορίσουν τη θέση τους όσον αφορά τη διάθεση τυρογάλακτος και σε συνδυασμό με την κοινωνική πίεση, οδηγούνται στη διερεύνηση προσεγγίσεων για τη διαχείριση του. Πράγματι, τα τελευταία χρόνια η αξιοποίηση του τυρογάλακτος εξελίσσεται ραγδαία, γεγονός που αποδεικνύεται από την παρασκευή μεγάλης ποικιλίας προϊόντων από τυρόγαλα με διαφορετικούς τρόπους. Εξάλλου η τυροκομία αναπτύσσεται σε παγκόσμια κλίμακα με ταχύ ρυθμό και οι ποσότητες του αναξιοποίητου τυρογάλακτος αυξάνουν συνεχώς, αξίζει να σημειωθεί ότι η παγκόσμια ετήσια παραγωγή τυρογάλακτος έφτασε το 2012 τους 120.000.000 περίπου τόνους (FAO, 1999; Stiles, 2012).

1.1.3 Αξιοποίηση Τυρογάλακτος-Διάφορα υποπροϊόντα

Το τυρόγαλα τα τελευταία 50 χρόνια λόγω της λακτόζης, των ανόργανων αλάτων και πρωτεϊνών που περιέχει, καθώς και λόγω των λειτουργικών ιδιοτήτων τους που προσδίδουν όταν προστίθενται στα τρόφιμα (Onwulata & Tomasula, 2004), εξελίσσεται σε περιζήτητο παραπροϊόν. Από το τυρόγαλα σήμερα παράγονται πολλά προϊόντα με αυξημένη χρηματική αξία. Ο αριθμός των προϊόντων αυτών και οι χρήσεις τους, αυξάνουν

συνεχώς με την εφαρμογή νέων εξελιγμένων τεχνολογιών. Στο παρακάτω σχήμα (σχήμα 1.1) απεικονίζονται συνοπτικά, τα διάφορα υποπροϊόντα τυρογάλακτος.



Σχήμα 1.1 Αξιοποίηση τυρογάλακτος, διάφορα υποπροϊόντα (Siso, 1996)

Οι πρώτες βιομηχανικές προσπάθειες για την παραγωγή σκόνης τυρογάλακτος έγιναν τη δεκαετία του 1920 και περιελάμβαναν συμπύκνωση και ξήρανση τυρογάλακτος με τέσσερις διαφορετικές μεθόδους:

- συμβατικούς κυλινδρικούς στεγνωτήρες
- με θέρμανση μέχρι την λήψη συμπυκνωμένου υγρού, με ψύξη έπειτα για στερεοποίηση του προϊόντος και στη συνέχεια εξώθηση σε σήραγγα
- δύο στάδια θέρμανσης ατμού και
- συνδυασμός ξήρανσης ψεκασμού (spray drying) και περιστροφικής ξήρανσης με τύμπανο (Gillies 1974).

Το υψηλό κόστος της διαδικασίας και η υγροσκοπική φύση της λακτόζης στο ξηρό προϊόν εμπόδισε τη βελτίωση στις τεχνικές ξήρανσης. Η ξήρανση με χρήση κυλίνδρου, στην οποία το τυρόγαλα ξηραίνεται επί της επιφανείας ενός θερμού τυμπάνου και απομακρύνεται με ένα ξέστρο, εξακολουθεί να χρησιμοποιείται ως μέρος της παραγωγής τυρογάλακτος σε σκόνη.

Οι εξελίξεις στην επεξεργασία του τυρογάλακτος κατά τα τελευταία περίπου 15 χρόνια επικεντρώνονται σε προηγμένες τεχνικές διαχείρισης υγρών με στόχο τη βελτίωση της

ποιότητας και της ασφάλειας, καθώς και σε εξελιγμένες διαχωριστικές και κλασματικές (fractionation) μεθόδους για την παραλαβή των επιμέρους συστατικών του τυρογάλακτος (Huffman & Harper, 1999; De Silva *et al.*, 2003; Etzel, 2004). Ιδιαίτερα πολύτιμη είναι η συμβολή της τεχνολογίας των μεμβρανών. Η αντίστροφη ώσμωση, η υπερδιήθηση και η νανοδιήθηση είναι μέθοδοι που εφαρμόζονται σήμερα ευρύτατα για την παραγωγή νέων προϊόντων από το τυρόγαλα

Η διαδικασία της επεξεργασίας περιλαμβάνει αρχικά τη φυγοκέντρωση του τυρογάλακτος για διαχωρισμό του λίπους και των πηγμάτων που έχουν απομείνει από την τυροκόμηση και στη συνέχεια την παστερίωσή του στους 72-75°C για 15-20sec, ώστε να μειωθεί ο αριθμός των μικροοργανισμών και να αδρανοποιηθεί η φωσφατάση και η ρεννίνη. Στη συνέχεια το τυρόγαλα ψύχεται και αποθηκεύεται. Αν ο στόχος είναι η παραλαβή σκόνης ή συμπύκνωμα τυρογάλακτος, επόμενο στάδιο είναι η συμπύκνωση. Η συμπύκνωση του τυρογάλακτος μπορεί να γίνει είτε με εξάτμιση υπό κενό, είτε με συνδυασμό αντίστροφης ώσμωσης και εξάτμισης υπό κενό. (Ανυφαντάκης, 2004). Αν στόχος είναι η ανάκτηση των επιμέρους συστατικών τότε ακολουθούνται άλλες τεχνικές. Για την ανάκτηση των πρωτεϊνών έμφαση δίνεται στο κόστος και στη διατήρηση όπου είναι δυνατόν, της λειτουργικότητας των πρωτεϊνών. Μία τέτοια τεχνική είναι η συνεχούς διαχωρισμού (CSEP) χρωματογραφική μέθοδος, όπου η τεχνολογία αυτή συνδυάζει τα πλεονεκτήματα των συμβατικών χρωματογραφικών μεθόδων, υιοθετεί όμως και τα ελαττώματά τους (κόστος, πολυπλοκότητα, ελαστικότητα κ.α.) Τα προϊόντα που παράγονται με αυτή τη τεχνική είναι μοναδικά WPIs (εμπλουτισμένα με β-Lg και γλυκομακροπεπίδιο), λακτοφερίνης και βιοενεργών συστατικών από τυρόγαλα (De Silva *et al.*, 2003). Με την εξέλιξη στην τεχνολογία μεμβρανών έχουν κατασκευαστεί ειδικές μεμβράνες (π.χ., ανταλλαγή ιόντων) για την απομόνωση και κλασμάτωση πρωτεϊνών τυρογάλακτος (Kim *et al.*, 2003). Αυτές και άλλες προηγμένες τεχνικές επεξεργασίας έχουν διευκολύνει την παραγωγή τροφίμων ή συμπληρωμάτων υψηλής προστιθέμενης αξίας όπως δεύτερης γενιάς WPIs, καθαρές πρωτεΐνες (ανοσοσφαιρίνες, λακτουπεροξειδάση, αυξητικοί παράγοντες κ.α.) (De Silva *et al.*, 2003; Korhonen & Pihlanto, 2003; Rowney *et al.*, 2005; Chatterton *et al.*, 2006).

Η συνεχόμενη αξία που αποκτούν τα προϊόντα τυρογάλακτος και συγκεκριμένα οι πρωτεΐνες ορού είναι σημαντική, αν αναλογιστούμε ότι το 1960 που παράχθηκαν οι πρώτες σκόνες τυρογάλακτος είχαν αξία 1\$/kg, το 1970 τα πρώτα συμπυκνώματα πρωτεΐνης τυρογάλακτος (WPC-35) κόστιζαν 3\$/kg, το 1980 τα WPC με ποσοστό πρωτεΐνης 75-80% είχαν αξία 6\$/kg, το 1990 τα συμπυκνώματα πρωτεΐνης με ποσοστό πρωτεΐνης το 90% κυμαίνονταν στα 10\$/kg και τη δεκαετία του 2000, τα WPI<90% κόστιζαν 12\$/kg ενώ τα επιμέρους κλάσματα από 15 έως 600 \$/kg (Smithers, 2008).

1.1.3.1 Παραγωγή αιθανόλης

Η παραγωγή αιθανόλης θεωρείται μια εφικτή τεχνική για την ενίσχυση του κέρδους από τα υποπροϊόντα της επεξεργασίας τυρογάλακτος και χρησιμοποιείται για την παραγωγή οινοπνευματωδών ποτών και υγρών καύσιμων. Παραγωγή αιθανόλης μπορεί να

πραγματοποιηθεί με ή χωρίς ενζυμική προκατεργασία. Ενζυμική προεργασία με β-γαλακτοσιδάση απαιτείται επειδή πολλοί μικροοργανισμοί δεν είναι ικανοί για άμεση μετατροπή της λακτόζης σε αιθανόλη. Η ζύμωση γίνεται με *Aspergillus niger* σε pH μεταξύ 3,5 και 4,5 ή *Streptococcus lactis* σε pH που κυμαίνεται από 6-7. Το πρόβλημα της ζύμωσης με ενζυμική προεργασία είναι ότι οι μικροοργανισμοί θα μεταβολίσουν πρώτα τη γλυκόζη, που είναι πιο εύκολο να την διασπάσουν, αντί της γαλακτόζης, η οποία είναι πιο δύσκολο να μεταβολιστεί. Συνεπώς, η απόδοση της ζύμωσης μειώνεται. Η παραγωγή αιθανόλης από τυρόγαλα είναι δυνατή και με στελέχη ζυμών. Στελέχη ζυμών με καλές αποδόσεις αιθανόλης είναι οι *Kluyveromyces marxianus* (*Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*) με μία απόδοση αιθανόλης περίπου 0,5g αιθανόλης/g λακτόζης και ο *Candida pseudotropicalis* (*Candida kefir*) (Pesta et al.,2007).

1.1.3.2 Μονοκυτταρική πρωτεΐνη (single-cell protein, S.C.P.)

Η παραγωγή της SCP, μπορεί να οριστεί, ως η διαδικασία μετατροπής πρώτων υλών όπως το τυρόγαλα σε κυτταρική βιομάζα. Το κόστος παραγωγής εξαρτάται από το κόστος του υποστρώματος, τα λειτουργικά έξοδα και από το μέγεθος του κεφαλαίου που επενδύεται στη μονάδα ζύμωσης. Η αξία της SCP, χρησιμοποιείται ως διατροφικό συμπλήρωμα, στις περιπτώσεις που οι συμβατικές πηγές πρωτεϊνών δεν είναι διαθέσιμες ή είναι οικονομικά ασύμφορες. Η μονοκυτταρική πρωτεΐνη (single-cell protein, S.C.P.) αναφέρεται στις πρωτεΐνες που παραλαμβάνονται από ζυμομύκητες, βακτήρια, μύκητες και άλγη.

Οι ζυμομύκητες, τα άλγη, τα βακτήρια και οι μύκητες περιέχουν πρωτεΐνες σε ποσοστό 45-55%, 47-63%, 50-83% και 31-55% αντιστοίχως. Για παραγωγή S.C.P. προτιμώνται οι ζύμες λόγω της γρήγορης ανάπτυξης και του υψηλού πρωτεϊνικού περιεχομένου. Η παραγωγή SCP από το τυρόγαλα είναι εφικτή μόνο από μικροοργανισμούς που διαθέτουν β-γαλακτοσιδάση ή και από άλλους μικροοργανισμούς, εφόσον έχει προηγηθεί επεξεργασία του τυρογάλακτος με β-γαλακτοσιδάση. Οι περισσότερες μελέτες αφορούν στους μικροοργανισμούς *K. fragilis* και *K. marxianus*, ενώ κάποιες άλλες αναφέρονται σε στελέχη του γένους *Candida* (Κουρέτας, 2007).

Στην Ελλάδα τα τελευταία χρόνια εφαρμόστηκε στην γαλακτοβιομηχανία ΜΕΒΓΑΛ, σύστημα παραγωγής βιομάζας με πρώτη ύλη το τυρόγαλα χρησιμοποιώντας τους κόκκους kefir ως μικροβιακή καλλιέργεια εκκίνησης. Έτσι παρήχθη βιομάζα kefir που εκτός της υψηλής διατροφικής αξίας των πρωτεϊνών της έχει και όλες τις ευεργετικές ιδιότητες του kefir (Κουρέτας, 2007).

1.1.3.3 Παραγωγή γαλακτικού οξέος

Το γαλακτικό οξύ αποτελεί χημική ένωση με πολλές εφαρμογές όπως πρόσθετο στα τρόφιμα ως συντηρητικό ή μέσο οξίνισης, πρώτη ύλη για τη σύνθεση σημαντικών ενώσεων. Από τους 80.000 τόνους της ετήσιας, παγκόσμιας παραγωγής, το 90% παράγεται βιοτεχνολογικά μέσω της γαλακτικής ζύμωσης. Το στέλεχος που έχει

χρησιμοποιηθεί περισσότερο για την παραγωγή γαλακτικού οξέος από το τυρόγαλα είναι το βακτήριο *Lactobacillus delbrueckii* υποείδος *bulgaricus*, ενώ σε πολλές μελέτες έχει χρησιμοποιηθεί ο *Lactobacillus helveticus* και ο *Lactobacillus casei*. Προκειμένου να αυξηθεί η απόδοση της ζύμωσης του τυρογάλακτος, προτείνεται ο εμπλουτισμός του τυρογάλακτος με γλυκόζη και διάφορες αζωτούχες ενώσεις. Επίσης η προσθήκη μαγγανίου υπό την μορφή αλάτων ή εκχυλίσματος ζυμομυκήτων (yeast extract) στο τυρόγαλα που ζυμώνεται από τον *Lactobacillus casei* αυξάνει την απόδοση σε γαλακτικό οξύ. Γαλακτικό οξύ έχει παραχθεί από τυρόγαλα μετά από ζύμωση με χρήση των μικροοργανισμών *Lactobacillus casei* και *Lactococcus lactis*, συνακτινοποιημένους σε διάφορους φορείς ακινητοποίησης όπως σε αλγινικό ασβέστιο (Tejayadi & Cheryan, 1995; Panesar *et al.*, 2007; Panesar *et al.*, 2010).

1.1.3.4 Βιομηχανική παραγωγή ζύμης αρτοποιίας(*baker's yeast*)

Η πιο γνωστή χρήση ζυμών στην βιομηχανία τροφίμων είναι η ζύμη αρτοποιίας *Saccharomyces cerevisiae*, η οποία χρησιμοποιείται παγκοσμίως στην παρασκευή ψωμιού και γενικότερα προϊόντων αρτοποιίας. Η παραγωγή ζύμης αρτοποιίας προέρχεται από την αερόβια ζύμωση διαφόρων υποστρωμάτων σακχάρων, παρουσία αμμωνιακών και φωσφορικών αλάτων.

Ζύμη αρτοποιίας παρήχθη από τυρόγαλα που είχε προηγουμένως υδρολυθεί, καθώς και από τυρόγαλα που είχε υποστεί προκαταρκτική ζύμωση με το μικροοργανισμό *Streptococcus thermophilus*. Η γενετική μηχανική έδωσε μια διαφορετική προσέγγιση στο θέμα. Το γονίδιο για την έκφραση της β-γαλακτοσιδάσης εισήχθη στον ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* από το ζυμομύκητα *Kluveromyces lactis*, με αποτέλεσμα να προκύψει ένα στέλεχος με ανασυνδυασμένο DNA, που έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται στο τυρόγαλα. Αξίζει να αναφερθεί, ότι ήδη από το 1983 λειτουργεί στην πόλη Cincinnati των Η.Π.Α. μονάδα παραγωγής ζύμης αρτοποιίας από το τυρόγαλα (Corning Glass Works and Kroger Co, 1981).

1.1.3.5 Λακτόζη και υπόλοιποι ολιγοσακχαρίτες

Η αξιοποίηση του τυρογάλακτος αναμφισβήτητα άρχισε με προσεγγίσεις στην αξιοποίηση της λακτόζης. Στον Whittier (1944), αναφέρεται ότι πρώτος ο Ettmueler το 1688 απομόνωσε λακτόζη από τυρόγαλα και την «καθάρισε» με επανακρυστάλλωση. Από την βιομηχανία τροφίμων εφαρμόζονται διαφορές τεχνικές για την κρυστάλλωση, απομόνωση, καθαρισμό, υδρόλυση για τη παραγωγή σε διάφορων υποπροϊόντων. Η λακτόζη κυριαρχεί ποσοτικά, αφού στο τυρόπηγμα παραμένει ένα μικρό της ποσοστό, μπορεί να απομονωθεί με διάφορες τεχνικές, όπως τεχνικές μεμβρανών και μετά από ξήρανση να παραχθεί σκόνη στην οποία το ποσοστό είναι της περίπου 70%. Οι αρχές που αφορούν την κρυσταλλοποίηση καθώς και οι παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των κρυστάλλων της λακτόζης έχουν εφαρμοστεί στη βιομηχανία των γαλακτοκομικών προϊόντων. Γενικά η ταχεία κρυστάλλωση παράγει μικρούς κρυστάλλους. Ο καινοτομικός

σχεδιασμός του εξοπλισμού και οι κατάλληλες τεχνικές επεξεργασίας επιτρέπουν τη δημιουργία μικρού μεγέθους κρυστάλλων λακτόζης ώστε να παραχθούν υψηλής ποιότητας προϊόντα. Ένα από τα ελαττώματα υφής σε διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα που μπορεί να εμφανιστεί είναι η αμμώδης υφή λόγω μεγάλου μεγέθους κρυστάλλων λακτόζης, που ανιχνεύονται στο στόμα, δεν υδρολύονται εύκολα και προκαλούν μια τραχιά ή αμμώδη αίσθηση που έχει συμβεί ιδιαίτερα σε παγωτά και στο Νορβηγικό τυρί τυρογάλακτος *mysost*. Η άμορφη λακτόζη είναι σταθερή σε spray dried γάλα και σε σκόνες τυρογάλακτος εάν προστατεύεται από την υγρασία αλλά είναι πολύ υγροσκοπική και προκαλεί συσσωμάτωση και κολλώδη επιφάνεια (Holsinger, 1988; Haque & Roos, 2005; Paterson *et al.*, 2005).

Έχουν γίνει σοβαρές προσπάθειες το τελευταίο διάστημα, που εστιάζονται στην υδρόλυση της λακτόζης και στη παραγωγή σιροπιών με στόχο:

- να χρησιμοποιηθεί η λακτόζη ως υδατάνθρακας για γλυκαντικές ουσίες
- να καταστεί κατάλληλη για ζύμωση από διάφορους μικροοργανισμούς

Η υδρόλυση της λακτόζης στα επιμέρους συστατικά, μονοσακχαρίτες γλυκόζη και γαλακτόζη που είναι ουσίες με μεγαλύτερη γλυκαντική δύναμη, οδηγεί σε παραγωγή σιροπιών που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία παγωτού καθώς και σε άλλα γαλακτοκομικά ή μη προϊόντα. Η υδρολυμένη λακτόζη αυξάνει τη διαθεσιμότητα των άλλων συστατικών του γάλακτος και βελτιώνει τη δυσανεξία στη λακτόζη (Gekas & Lopez-Leiva, 1985; Geilman, 1993).

Η λακτόζη χρησιμοποιείται ως έκδοχο φαρμάκων και τα παράγωγα της (λακτιτόλη, λακτοσουκρόζη, λακτοβιονικό οξύ κ.α.) έχουν επιτυχώς ταυτοποιηθεί και διατίθενται στο εμπόριο (Gaenzle *et al.*, 2008). Στην Ελλάδα τα τελευταία χρόνια, αρκετές βιομηχανίες γάλακτος (ΜΕΒΓΑΛ, ΦΑΓΕ, ΚΡΙ-ΚΡΙ) έχουν στήσει με επιτυχία, μονάδες παραγωγής λακτίνας, που είναι το προϊόν της συμπύκνωσης του αποπρωτεϊνομένου τυρογάλακτος (απόγαλα) με BOD 30000-50000ppm. Η λακτίνα, που έχει την μορφή υποκίτρινης σκόνης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ζωοτροφή, είτε όπως είναι, είτε σε μίγμα με απόβλητα άλλων βιομηχανιών τροφίμων όπως μελάσα ή φλούδες δημητριακών μετά την επεξεργασία αυτών (Κουρέτας Δ., 2007)

Οι ολιγοσακχαρίτες είναι το τρίτο πιο άφθονο συστατικό του ανθρώπινου γάλακτος (12-14 g/L). Επίσης έχουν βρεθεί σε πολύ μικρότερες ποσότητες στο αγελαδινό πρωτόγαλα και γάλα (Gopal & Gill, 2000). Ως γνωστόν οι ολιγοσακχαρίτες του γάλακτος και ειδικά του ανθρώπινου, μπορεί να είναι παράγοντες ανάπτυξης για τη μικροχλωρίδα του εντέρου (*bifidus bacteria*) των θηλαζόμενων βρεφών (Corra *et al.*, 2004). Δεδομένου ότι υπάρχουν κοινά δομικά χαρακτηριστικά των ολιγοσακχαριτών του γάλακτος των ζώων και του μητρικού γίνονται προσπάθειες για να απομονωθούν τα σάκχαρα αυτά και από τυρόγαλα. Από το τυρόγαλα απομονώνονται ολιγοσακχαρίτες, κατά την υπερδιήθηση που πραγματοποιείται για τη παραλαβή του πρωτεϊνικού συμπυκνώματος (WPC) του τυρογάλακτος (παραμείνουν στο διήθημα). Οι Barile *et al.*, (2009) ταυτοποίησαν από υπερδιηθημένο αγελαδινό τυρόγαλα 15 ολιγοσακχαρίτες, από τους οποίους οι 7 έχουν ίδια δομή με αυτούς του μητρικού γάλακτος. Οι ολιγοσακχαρίτες αυτοί δεν προκύπτουν από

τη ζύμωση της λακτόζης, αλλά βρίσκονται αυτούσιοι στο τυρόγαλα και περιέχουν τα σιαλικά οξέα, N-ακετυλο-νευραμινικό οξύ (NeuAc) και N-γλυκονευραμινικό οξύ (NeuGc). Στους ολιγοσακχαρίτες αποδίδονται μια σειρά από ευεργετικές επιδράσεις (Rosenberg, 1995).

1.1.3.6 Πρωτεΐνες Τυρογάλακτος

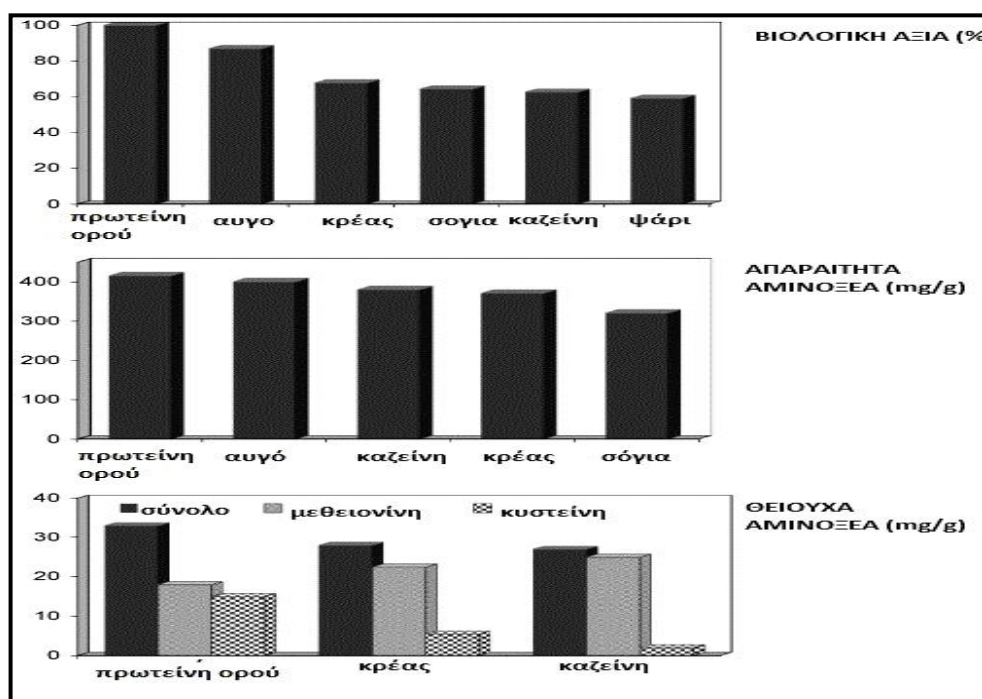
Θρεπτική και Βιολογική αξία

Στο τυρόγαλα δεν συμπεριλαμβάνεται καζεΐνη καθώς αυτή παραμένει στο τυρόπηγμα. Κυριαρχούν όμως η β -Lg, η α -La και οι Igs που αποτελούν το 80,39% των αζωτούχων ουσιών του τυρογάλακτος καθώς και άλλες σε μικρό ποσοστό (Ανυφαντάκης, 2004). Για να οριστεί μια πρωτεΐνη σαν μακροστοιχείο για τη θρέψη, πρέπει να είναι ένα πολυπεπτίδιο με παραπάνω από 50 αμινοξέα και MB πάνω από 6000 Daltons (Bender, 2006). Το σημαντικό για το τυρόγαλα είναι ότι αυτές οι πρωτεΐνες που περιέχει, έχουν τη μεγαλύτερη θρεπτική και ταυτόχρονα βιολογική αξία (BA) από όλες τις εδώδιμες πρωτεΐνες, η οποία υπερβαίνει την αξία των πρωτεϊνών του αυγού κατά περίπου 15%.

Η BA εκφράζει το ποσοστό της απορροφηθείσας πρωτεΐνης της τροφής, μέσω του εντερικού βλεννογόνου, που χρησιμοποιήθηκε από τον οργανισμό για αποκλειστικά δομικούς σκοπούς (Ζέρβας, 2005), δηλαδή πόσο αποτελεσματικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί η πρωτεΐνη. Από αυτή την άποψη, οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος υπερέχουν και χρησιμοποιούνται από αθλητών κ.α. καθώς και εκείνων των οποίων έχουν εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα. Η πρωτεΐνη τυρογάλακτος αποτελείται από τα βασικά διακλαδισμένα αμινοξέα (BCCAs) όπου το ποσοστό της λευκίνης, ισολευκίνης και βαλίνης είναι πάνω από 20% w/w. Θεωρούνται ρυθμιστές του μεταβολισμού στην ομοιόσταση της γλυκόζης, πρωτεΐνης και των λιπιδίων διαδραματίζοντας ρόλο στον έλεγχο του βάρους. (Zemel, 2004; Smilowitz, *et al.*, 2005).

Το τυρόγαλα είναι μία πλούσια και ισορροπημένη πηγή των θειούχων αμινοξέων (μεθειονίνη και κυστεΐνη) τα οποία δρουν ως αντιοξειδωτικά, καθώς είναι πρόδρομοι παράγοντες σχηματισμού της ενδοκυτταρικής γλουταθειόνης (Smithers, 2008). Επίσης οι πρωτεΐνες ορού και τα παραγόμενα πεπτιδιά τους, εμφανίζουν ανοσορρυθμιστική, αντιμικροβιακή και αντιυπερτασική δράση (Shi *et al.*, 2004; Madureira *et al.*, 2010). Στην εικόνα 1.2, δίνεται μια σύγκριση των πρωτεϊνών του ορού σε σχέση με άλλα προϊόντα που περιέχουν εδώδιμες πρωτεΐνες ως προς την βιολογική αξία και την περιεκτικότητα σε απαραίτητα και θειούχα αμινοξέα.

Εικόνα 1.2. Θρεπτική και βιολογική αξία των πρωτεϊνών του ορού (Smithers, 2008)



Τυπική σύσταση και φυσικές ιδιότητες

Τα τελευταία 25 χρόνια, ένας από τους μεγαλύτερους περιορισμούς για την διαδεδομένη χρήση των πρωτεϊνών ορού γάλακτος ήταν η αναξιοπιστία της απόδοσής τους σε συστήματα τροφίμων. Έτσι έπρεπε να κατανοηθεί καλύτερα η μοριακή τους βάση και πολλά ερευνητικά κέντρα που ασχολούνται με γαλακτοκομικά προϊόντα στις Ηνωμένες Πολιτείες, την Αυστραλία, τη Νέα Ζηλανδία και την Ευρώπη έχουν εστιάσει τη προσοχή τους στις συνέπειες της θερμότητας επί των πρωτεϊνών του τυρογάλακτος, τη μελέτη διαφόρων διακυμάνσεων μεταξύ μεγάλων και δευτερευουσών πρωτεϊνών του ορού, τις αλληλεπιδράσεις τους και τη φυσικοχημική συμπεριφορά τους (Harper, 1984; Jelen & Rattray, 1995; Huffman, 1996; Foegeding *et al.*, 2002).

Στο πίνακα 1.2 φαίνεται η σύσταση «γλυκού» τυρογάλακτος στις επιμέρους πρωτεΐνες καθώς και οι φυσικές τους ιδιότητες.

Πίνακας 1.2. Πρωτεΐνες τυρογάλακτος: Τυπική σύσταση και φυσικές ιδιότητες (Etzel, 2004; Kilara and Vaghela, 2004).

Πρωτεΐνη	(%)	(kg/mol)	Ισοηλεκτρικό σημείο
β-γαλακτογλοβουλίνη (β-LG)	48-58	18	5,4
α-λακταλβουμίνη (α-La)	13-19	14	4,4
Γλυκομακροπεπτίδιο(GMP)	12-20	8,6	<3,8
Αλβουμίνη του ορού (BSA)	6	66	5,1

Ανοσοσφαιρίνες (Igs)	8-12	150	5-8
Λακτοφερίνη (LF)	2	77	7,9
Λακτουπεροξειδάση	0,5	78	9,6

α-La

Είναι μια σφαιρική πρωτεΐνη ορού, με MB 14.100 Daltons, που παράγεται στο μαστικό αδέν, ρυθμίζει τη βιοσύνθεση της λακτόζης, δημιουργώντας ένα σύνθετο σύμπλεγμα με την β-1,4 γαλακτοτρασφεράση στο μαστικό αδέν (Ren & Stuart, 1993) και έχει μια τάση να δεσμεύει το ασβέστιο (Brew, 2003).

β-Lg

Η β-Lg, αποτελεί το 48-58% των πρωτεϊνών τυρογάλακτος. Αποτελείται από 178 αμινοξέα με MB 18.4 kDa και υπάρχουν πάρα πολλές γενετικές παραλλαγές. Παράγεται στο μαστικό αδέν. Μόνο τα μηρυκαστικά και κάποια μονογαστρικά (σκύλος, γάτα) μπορούν να την παράγουν. Ο ακριβής βιολογικός της ρόλος δεν είναι εξακριβωμένος αλλά, φαίνεται να δεσμεύει μικρά υδροφοβικά μόρια, όπως την ρετινόλη, αλκένια και φωσφολιπίδια. (Sawyer, 2003).

BSA

Είναι πρωτεΐνη που αποτελείται από 582 αμινοξέα με MB 66.000 Daltons. Δεν συντίθεται στο μαστικό αδέν, αλλά περνά στο γάλα από τα αιμοφόρα αγγεία μέσω παθητικής διάχυσης. Είναι πρωτεΐνη μεταφοράς των αδιάλυτων λιπαρών οξέων (Walsh & Duncan, 2000).

Igs

Είναι ομάδα πρωτεϊνών που προσδίδουν παθητική ανοσία και λειτουργούν ως αντισώματα (Hurley, 2003). Τα MB κυμαίνονται από 22.000-70.000 Daltons και υπάρχουν 4 κατηγορίες Ig στο αγελαδινό γάλα, η IgG1, η IgG2, η IgA και η IgM. Έκτος από τον ανοσολογικό ρόλο, φαίνεται ότι μειώνει τη χοληστερόλη και την αρτηριακή πίεση (Fox, 2003).

Άλλες μικρότερες πρωτεΐνες

Υπόλοιπες πρωτεΐνες σε μικρότερο ποσοστό είναι η λακτοφερίνη (LF), η λακτουπεροξειδάση και οι πρωτεόζες-πεπτόνες (Fox, 2003). Η LF είναι μια πρωτεΐνη μεταφοράς του σιδήρου και έχει MB κοντά στα 80.000 Daltons (Lonnerdal, 2003). Έχει επίσης σημαντικό αντιμικροβιακό ρόλο, αυτή και τα πεπτίδια της και τα τελευταία χρόνια αρκετές μελέτες εστιάζονται σε αυτόν (Ko & Kwak, 2009).

Τεχνολογική σημασία πρωτεϊνών ορού

Οι πρωτεΐνες ορού προσδίδουν λειτουργικές ιδιότητες στα τροφιμα στα οποία προστιθενται. Έχουν γαλακτωματοποιητικές (emulsifying) ιδιότητες και πολλές φορές αντικαθιστούν τις πρωτεΐνες του αυγού, σε προϊόντα ζαχαροπλαστικής (Muschiolik & Draeger, 1993), αρτοποιίας (Duxbury, 1993) και μπορούν να αντικαταστήσουν το γάλα σε διάφορους τύπου παγωτού (Vulink, 1995). Επίσης μπορούν να σχηματίσουν γέλη (gel)

πηκτώματα έπειτα από θερμικές επεξεργασίες, τα οποία ποικίλουν σε άρωμα, σταθερότητα, σκληρότητα, ελαστικότητα κ.α. και οι ιδιότητες τους εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες όπως το pH, την αναλογία των πρωτεϊνών, την προσθήκη αλάτων κ.α. (Kinsella & Whitehead, 1990). Μπορεί να λειτουργήσουν και ως σταθεροποιητές σε διάφορα προϊόντα όπως κέικ, μαρέγκες κ.α. αλλά για να είναι αποτελεσματικές έναντι των πρωτεϊνών του αυγού πρέπει να ερευνηθούν περισσότερο (De Wit, 1998). Whey Protein Concentrate (WPC), συμπυκνωμένες πρωτεΐνες ορού με πρωτεϊνικό περιεχόμενο από 35-85%, χρησιμοποιούνται στα γιαουρτια για τη βελτίωση της συνεκτικότητας. Microparticulated whey proteins, είναι συνήθως WPC 35 ή WPC 55 οι οποίες έχουν υποστεί ειδική επεξεργασία (microparticulation) με σκοπό την παραγωγή συσσωματωμάτων πρωτεϊνών της τάξης του 0,1-3μm και χρησιμοποιούνται σαν υποκατάστατα λιπαρών (fat replacers) καθώς δίνουν μια κρεμώδη αίσθηση όμοια με αυτή του λίπους.

Για να αυξηθεί η χρήση των πρωτεϊνών ορού γάλακτος, χρειάζεται προσπάθεια για να βελτιωθεί η λειτουργικότητά τους, με τη παρουσία άλλων συστατικών όπως άμυλα, άλευρα, και άλλες πρωτεΐνες που προέρχονται από άλλες πηγές. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί πρώτα με τροποποίηση των πρωτεϊνών ορού γάλακτος με μετουσίωση της σφαιρικής τους δομής, ή με αποδιοργάνωση και ανασχηματισμό των πρωτεϊνών με διάφορους μηχανικούς ή χημικούς τρόπους, πριν από την εισαγωγή σε συστήματα άλλων τροφίμων (Onwulata *et al.*, 2003).

Συμπυκνώματα πρωτεϊνών ορού WPC και WPI

Η τεχνολογία των μεμβρανών οδήγησε στη δημιουργία συμπυκνωμάτων των πρωτεϊνών ορού (WPCs με 35%, 75% και 80% πρωτεΐνης) και υψηλής πρωτεϊνοπεριεκτικότητας ορού γάλακτος (WPIs με 85-90% πρωτεΐνη) (Clark, 2005). Τα διάφορα WPCs και WPIs μπορούν να προσδώσουν διάφορες λειτουργικές και θρεπτικές ιδιότητες όταν προστεθούν σε τρόφιμα, αλλά οι επιμέρους πρωτεΐνες του ορού ή τα ενισχυμένα κλασματά τους μπορεί να δώσουν τη δυνατότητα στη βιομηχανία τροφίμων να δημιουργήσει καινούργια προϊόντα με βελτιωμένες ιδιότητες. Σε μεγάλο βαθμό, οι ιδιότητες των WPCs και WPIs προσεγγίζουν τις ιδιότητες της β-LG, δεδομένου ότι αυτή αποτελεί περισσότερο από το ήμισυ των πρωτεϊνών ορού γάλακτος.

Η β-Lg έχει ικανότητα συγκράτησης νερού και γαλακτωματοποιητικές ιδιότητες, όμοιες με εκείνες του αυγού. Σε μία συγκριτική μελέτη, οι Lorenzen & Schrader (2006) ανέφεραν ότι τα συμπυκνώματα WPI ήταν ισχυρότερα και πιο ελαστικά από τα συμπυκνώματα WPC λόγω του υψηλότερου περιεχόμενου σε β-Lg, καθώς και λόγω της αφαίρεσης του μεγαλύτερου μέρους του λίπους, της λακτόζης και των φωσφολιπιδίων. Μείωση των ποσοτήτων του γλυκομακροπεπτιδίου, του μη πρωτεϊνικού αζώτου και των πρωτεοζών-πεπτονών, αποδείχτηκε ευεργετική στην δύναμη του συμπυκνώματος. Η ισχύς αυτή φάνηκε να εξαρτάται από το pH και ισχυρότερη πηκτή ελήφθη με WPI σε pH 6.0. Οι Tomasula & Yee (2001) ανέφεραν ότι ενισχυμένα κλάσματα της β-Lg έδειξαν αυξημένη σταθερότητα και δραστηριότητα γαλακτώματος, σε σχέση με πηκτές από WPC.

Σε ορισμένες περιπτώσεις, είναι η επιθυμητή η αφαίρεση του β-Lg από το τυρόγαλα. Για παράδειγμα, το μητρικό γάλα δεν περιέχει β-Lg. Σε βρεφικά σκευάσματα με βάση το αγελαδινό γάλα η β-Lg αποφεύγεται γιατί θεωρείται αλλεργιογόνο (Chiancone & Gattoni, 1993). Οι Heine *et al.*, (1996) πρότειναν την προσθήκη α-La προκειμένου να υπάρχει μια ισορροπία σε αμινοξέα, όπου με τη προσθήκη της α-La βελτιώνεται η περιεκτικότητα σε κυστεΐνη και τρυπτοφάνη. Η προσθήκη LF, λακτοϋπεροξειδάσης, β-καζεΐνης, και GMP έχουν επίσης προταθεί για τον ίδιο λόγο (Jost *et al.*, 1999).

Επίσης έχει μελετηθεί η βιολογική δραστηριότητα ορισμένων πρωτεϊνών τυρογάλακτος και πεπτιδίων που βρίσκονται σε μικρότερο ποσοστό. Όπως η αντιμικροβιακή δράση της λακτοφερίνης και ορισμένων πεπτιδίων της, κατά ορισμένων Gram (+) βακτηρίων (León-Sicairos *et al.*, 2006; Van der Kraan *et al.*, 2006). Το γλυκομακροπεπτίδιο (GMP) επίσης είναι ένα βιοενεργό πεπτίδιο του οποίου η μοναδική σύνθεση και χαρακτηριστικά προάγουν την υγεία και ως εκ τούτου, το GMP είναι ένα δυναμικό συστατικό για διάφορα λειτουργικά τρόφιμα και φαρμακευτικά προϊόντα (Martin-Diana *et al.*, 2006; Thoma-Worringer *et al.*, 2006).

Τα συστατικά των πρωτεϊνών ορού γάλακτος παρουσιάζουν μεγάλες διαφορές στα μοριακά βάρη (Πίνακας 1.3) και στις διαμορφώσεις τους. Ορισμένες πρωτεΐνες ορού γάλακτος άλλοτε βρίσκονται σαν μονομερή και άλλοτε σαν πολυμερή και αυτό εξαρτάται από το pH, τη θερμοκρασία και τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης. Η β-Lg (MB≈ 18,000 kDa) σε pH κάτω από 3.4 και πάνω από 8.0 υπάρχει σαν μονομερές, μεταξύ pH του 5.2 και 8.0 (στο οποίο κυμαίνεται και το pH του γάλακτος) σχηματίζει σφαιρικά διμερή τα οποία έχουν συνολικό MB≈36.000kDa και διάμετρο περίπου ~18Å. Κοντά στο ισοηλεκτρικό της σημείο (pH 3.5-5.2) σχηματίζει μεγάλα οκταμερή. Η α-La με MB≈14.000kDa σχηματίζει ένα συμπαγή, σφαιρικό και τριτογενή σχηματισμό, που σταθεροποιείται με έναν εσωτερικό ιοντικό δεσμό ασβεστίου που το καθιστά λιγότερο ευαίσθητο σε αλλαγές του pH πάνω από 4.0 (Goff, 1995; Verheul *et al.*, 1999).

Οι πρωτεΐνες ορού διαχωρίζονται με τη προσθήκη αλάτων, με την ρύθμιση του pH οπότε διαχωρίζονται με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο, με την εφαρμογή υψηλών θερμοκρασιών όποτε μετουσιώνονται. Μετά τη δεκαετία του '90 χρησιμοποιείται η υπερδιήθηση (ultrafiltration) κατά την οποία διαχωρίζονται πρωτεΐνες ορού από λακτόζη και πεπτίδια, με μεμβράνες μεγέθους πόρων ≤0,1μm. Η τεχνική αυτή δεν προκαλεί μετουσίωση (Outinen *et al.*, 1996) αλλά λειτουργεί σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με μεθόδους συνδυασμού pH-θερμοκρασίας. Για να βελτιωθεί το αποτέλεσμα, χρησιμοποιούνται οργανικές ή τροποποιημένες ανόργανες μεμβράνες (Lucas *et al.*, 1998), ή ακόμη και μεμβράνες σε συνδυασμό με ενζυμικό αντιδραστήρα (Sannier *et al.*, 2000). Με μέγεθος 10.000 kDa, μεμβράνες κυτταρίνης διατηρούν όλες τις πρωτεΐνες ορού γάλακτος, αφήνοντας λακτόζη και πεπτίδια στο διήθημα. Η επιλεκτικότητα της μεμβράνης για τα πεπτίδια και τη λακτόζη εξαρτάται από το pH (Butylina *et al.*, 2006). Οι Bhattacharjee *et al.*, (2006), σχεδίασαν σε δύο στάδια, μια διαδικασία υπερδιήθησης με 30.000 και 10.000 Da δίσκους μεμβρανών. Η 30-kDa μεμβράνη κατακράτησε BSA, LF, και Igs, ενώ το 10-kDa μεμβράνης διατήρησε τόσο α-La και β-Lg. Με αλλαγή του pH, στη ταχύτητα περιστροφής και στη διαμεμβρανική πίεση, ελήφθη 75% καθαρή β-Lg. Η

νανοδιήθηση μπορεί να προχωρήσει το διαχωρισμό ορού γάλακτος ένα βήμα παραπέρα, με τον διαχωρισμό των απομονωμένων πεπτιδίων από τη λακτόζη, χρησιμοποιώντας ένα 1-kDa μεμβράνη σε διηθήματα που προήλθαν από το στάδιο υπερδιήθησης των 10-kDa.

Η ηλεκτροδιαπίδυση έχει χρησιμοποιηθεί μόνη της ή σε συνδυασμό με υπερδιήθηση (Amundson *et al.*, 1982; Slack *et al.*, 1986). Για παράδειγμα, όταν μια μεμβράνη υπερδιήθησης στοιβάζεται μέσα σε ένα κύτταρο ηλεκτροδιαπίδυσης, επιτρέπει τον επιλεκτικό διαχωρισμό των κατιονικών και ανιονικών πεπτιδίων που λαμβάνονται από την υδρόλυση της β-LG, ενώ ελαχιστοποιείται η «ρύπανση» της μεμβράνης υπερδιήθησης (Poulin *et al.*, 2006). Υπάρχει επίσης και η χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων, όπου αξιοποιώντας τις ιοντικές ιδιότητες των πρωτεϊνών, χρησιμοποιείται μια ρητίνη για την απομόνωση των διαφόρων κλασμάτων της πρωτεΐνης από το υπόλοιπο του ορού. Τα WPIs με περισσότερο από 90% πρωτεΐνη παράγονται εύκολα από τυρόγαλα ή WPC, με λιγότερο από 1% λίπος και λακτόζη και μικρή διακύμανση των ιδιοτήτων τους. Επιπλέον, με μία προσεκτική επιλογή του συστήματος ρητίνης και των ουσιών έκλουσης, α-La και β-Lg μπορούν να διαχωριστούν η μια από την άλλη, με ακόμη μεγαλύτερη ακρίβεια από ό, τι με ηλεκτροφόρηση.

Υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία (HPLC) σε διάφορες στήλες χρησιμοποιήθηκε για έκλυση α-La, ενώ η β-LG προσροφάται. Αυτό το στάδιο, στην συνέχεια ακολουθήθηκε από υπερδιήθηση για καθαρισμό των κλασμάτων (Outinen *et al.*, 1996). Άλλοι μέθοδοι διαχωρισμού όπως διαχωρισμοί που βασίζονται στη συμπλοκοποίηση, στη βιοσυγγένεια, στη κροκίδωση κ.α. αναφέρονται εκτενώς στους Bonnaillie & Tomasula, (2008).

Η ηλεκτροφόρηση χρησιμεύει και αυτή σαν μέθοδος διαχωρισμού και μέσω του μοριακού βάρους και φορτίου των πρωτεϊνών, μπορεί να αναλύσει ποσοτικά και ποιοτικά τις πρωτεΐνες του τυρογάλακτος. Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (PAGE) αποτελεί τη πιο διαδεδομένη και «διάσημη» τεχνική για την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών καθώς και η SDS-PAGE (Darling & Butcher, 1976; De Jong *et al.*, 1993).

1.1.4. Η αξιοποίηση του τυρογάλακτος στην Ελλάδα

Μέχρι το 1998, ο ορός γάλακτος θεωρείτο υποπροϊόν και λίγα δεδομένα είναι διαθέσιμα. Οι Philippopoulos & Papadakis, (2001) αναφέρουν ότι τη περίοδο 1990-1995 ένα ποσοστό περίπου 53% (185.000 τόνοι) από την συνολική παραγωγή τυριών προερχόταν από αιγοπρόβειο γάλα από το οποίο το 50% ήταν φέτα. αυτό είχε σαν αποτέλεσμα να παραχθούν μεγάλες ποσότητες τυρογάλακτος (περίπου 600000 τόνοι). από τους 600.000 τόνους οι 250.000 τόνοι χρησιμοποιήθηκαν για τη παραγωγή τυριών τυρογάλακτος (ποσοστό περίπου 40%), οι 50.000 τόνοι σαν ζωοτροφή και το υπόλοιπο (περίπου 290.000 τόνοι) απορρίφτηκε στο περιβάλλον. Μετά το 1998 η κατάσταση άλλαξε ριζικά όταν η Ελληνική εταιρία «Ελληνικές Πρωτεΐνες Α.Ε». εγκατέστησε στα Γιάννενα μονάδα επεξεργασίας του τυρογάλακτος. Ήδη από το 2001 λειτουργούν ακόμη 3 παρόμοιες μονάδες στην Ελλάδα.

Στον πίνακα 1.3 φαίνεται η σύσταση του τυρογάλακτος που παράγεται μετά την τυροκόμηση διαφόρων ειδών παραδοσιακών Ελληνικών τυριών από αγελαδινό και πρόβειο γάλα (Κουρέτας Δ., 2007).

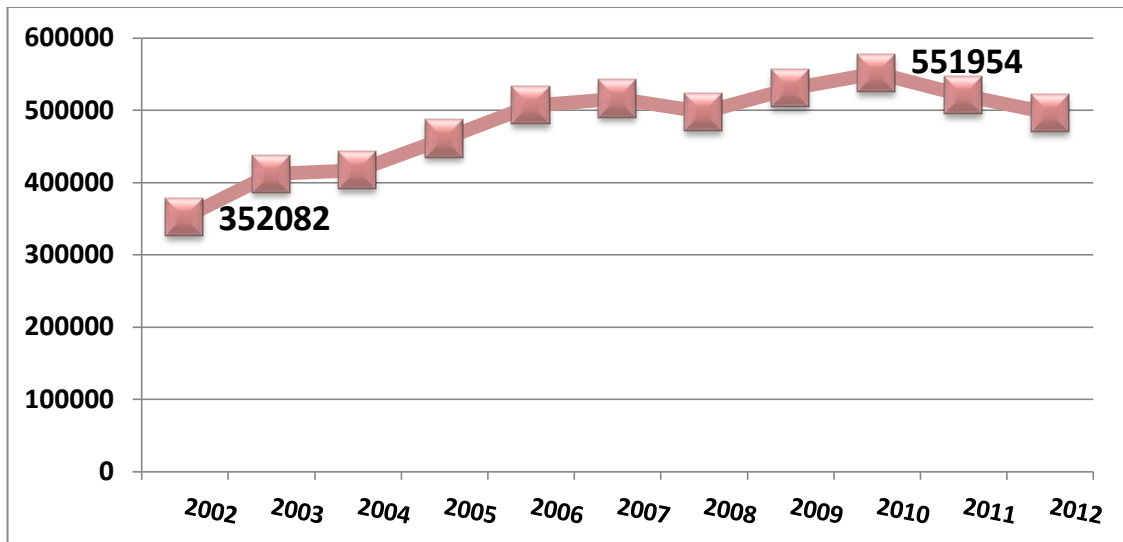
Πίνακας 1.3: Σύσταση τυρογάλακτος από τη παράγωγη διάφορων Ελληνικών τυριών (Κουρέτας Δ., 2007)

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ (%)	ΑΠΟ ΑΓΕΛΑΔΙΝΟ ΓΑΛΑ				ΑΠΟ ΠΡΟΒΕΙΟ ΓΑΛΑ		
	(Φ)	(Τ)	(Γ)	(Κ)	(Φ)	(Γ)	(Κ)
Στερεά Συστατικά	6.32	6.69	6.90	6.55	7.87	8.74	8.10
Υγρασία	93.68	93.31	93.10	93.45	92.13	91.26	92.10
Λίπος	0.25	0.40	0.60	0.40	0.39	1.26	0.80
Ολική Πρωτεΐνη	0.82	0.85	0.90	0.80	1.61	1.52	1.55
Λακτόζη	4.72	4.90	4.90	4.85	5.33	5.27	5.25
Τέφρα	0.49	0.52	0.50	0.50	0.66	0.50	0.50
Οξύτητα (% γαλακτικού οξέος)	0.125	0.115	0.12	0.11	0.14	0.14	0.14
pH	6.63	6.50	6.30	6.40	6.40	6.30	6.20

(Φ)=Φέτα, (Τ)=Τελεμές, (Γ)=Γραβιέρα, (Κ)=Κασέρι

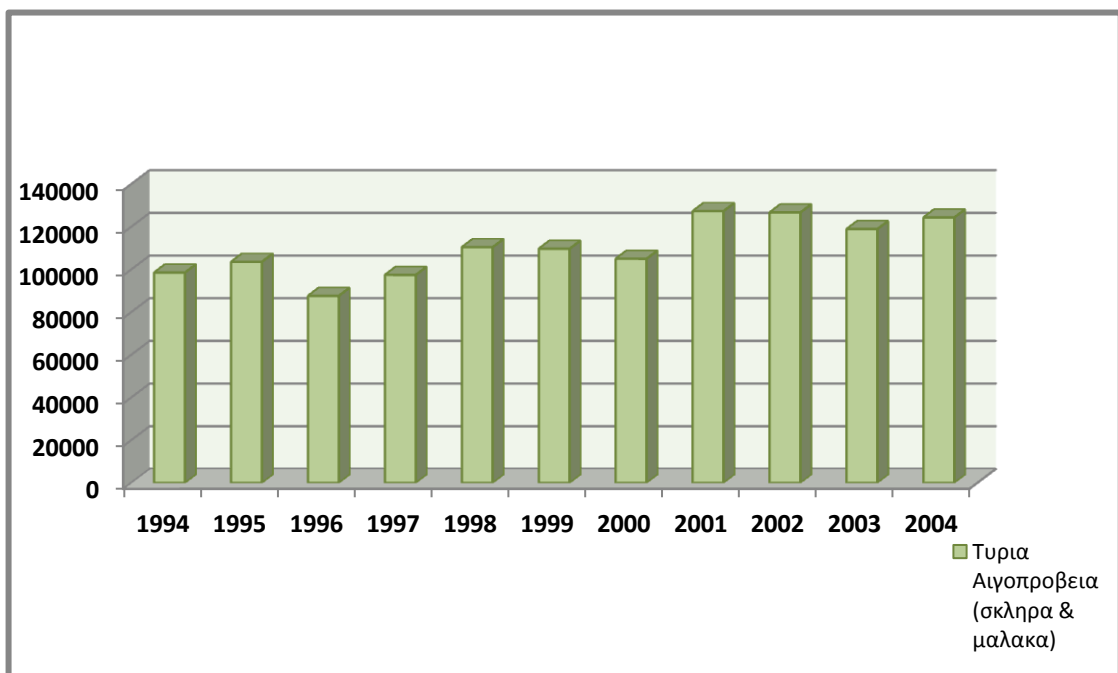
Παραγωγή πρόβειου γάλακτος

Στη χώρα μας τα τελευταία χρόνια η παραγωγή πρόβειου γάλακτος αυξάνεται (ΕΛΟΓΑΚ, 2013, διάγραμμα 1.1). Το μεγαλύτερο ποσοστό του πρόβειου γάλακτος που παράγεται χρησιμοποιείται για την παρασκευή τυριών. (περισσότερο από 80%). Σύμφωνα με στοιχεία της ICAP, (2012), η παραγωγή τυριών από αιγοπρόβειο γάλα παρουσιάζει μια αυξητική τάση (διάγραμμα 1.2). Χαρακτηριστικό είναι ότι το 2011 παρήχθησαν περίπου 160.000 τόνοι τυριών, φέτας, τελεμέ και άλλων λευκών τυριών από αιγοπρόβειο γάλα έναντι των 100.000 τόνων που παρήχθησαν το 2000.



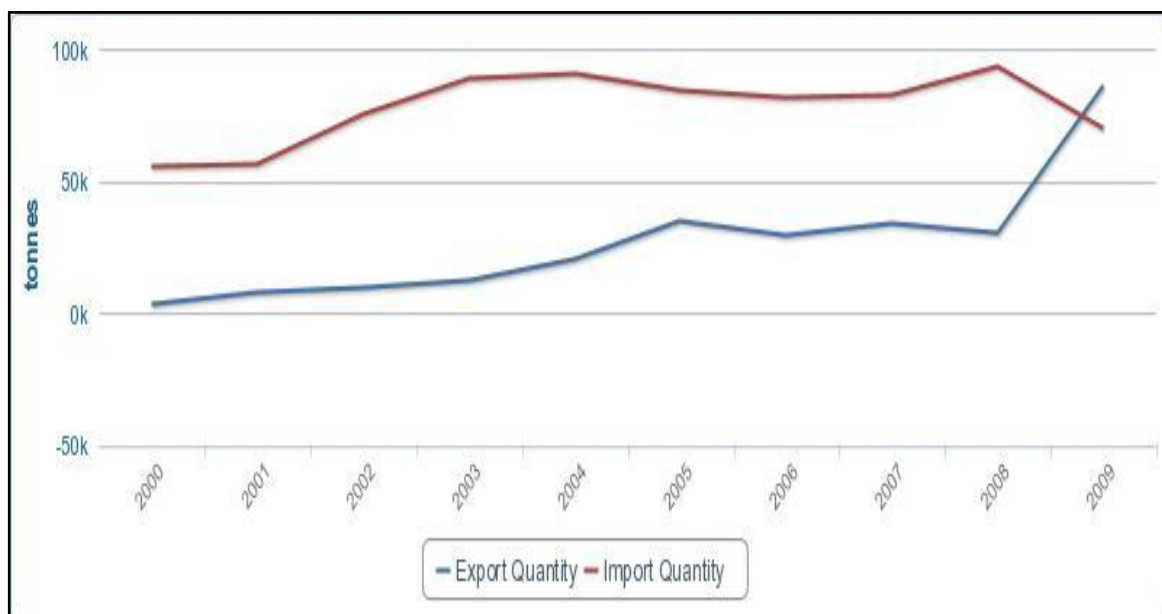
**Διάγραμμα 1.1. Παραγωγή πρόβειου γάλακτος στην Ελλάδα (2002-2012)
(ΕΛΟΓΑΚ, 2013)**

Το Ελληνικό τυρόγαλα προέρχεται σε μεγάλο ποσοστό από αιγοπρόβειο γάλα και γι αυτό το λόγο η περιεκτικότητά του σε στερεά, πρωτεΐνες κ.α., είναι υψηλότερη σε σύγκριση με το τυρόγαλα των ευρωπαϊκών χωρών όπου το γάλα είναι κυρίως αγελαδινό.. Ένα ακόμη σημαντικό στοιχείο είναι, τα συγκριτικά υψηλότερα επίπεδα α-La στο κατσικίσιο τυρόγαλα και β-Lg στο πρόβειο τυρόγαλα (Casper *et al.*, 1999). Επίσης είναι γνωστό ότι το αιγοπρόβειο γάλα παράγεται σε πολύ μεγάλο βαθμό εποχιακά. Όλα τα παραπάνω στοιχεία καθιστούν την αξιοποίηση του τυρογάλακτος αναγκαία με στόχο την παραγωγή ξηρών προϊόντων όπως σκόνες με αυξημένα λειτουργικά χαρακτηριστικά



Διάγραμμα 1.2 Παραγωγή Τυριών σε βιομηχανίες, από αιγοπρόβειο γάλα (ICAP, 2012)

Αποτέλεσμα της προσπάθειας που γίνεται για την αξιοποίηση τυρογάλακτος στον Ελλαδικό χώρο, ήταν η χώρα να έχει θετικό ισοζύγιο εξαγωγών τυρογάλακτος το 2009, (διάγραμμα 1.3). Συγκεκριμένα οι εξαγωγές τυρογάλακτος (φρέσκο, σκόνες, κ.α.) άγγιξαν τους 86.176 τόνους, τη στιγμή που οι εισαγωγές για την ίδια χρονιά ήταν στους 70.385 τόνους.



Διάγραμμα 1.3. Εισαγωγές-Εξαγωγές τυρογάλακτος και προϊόντων τυρογάλακτος (2000-2009) (FAO, 2011)

1.2 Τυριά μειωμένης λιποπεριεκτικότητας

Κλινικές δοκιμές και μελέτες έχουν δείξει ότι η χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (LDL) και η υψηλή χοληστερόλη είναι άμεσα συνδεδεμένες με την εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων (CVD). Παράγοντες κινδύνου θεωρούνται η αυξημένη πρόσληψη των λιπών, ιδιαίτερα των κορεσμένων και trans λιπαρών (Liu *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2000; Kris-Etherton *et al.*, 2002; Fung *et al.*, 2004; Oh *et al.*, 2005).

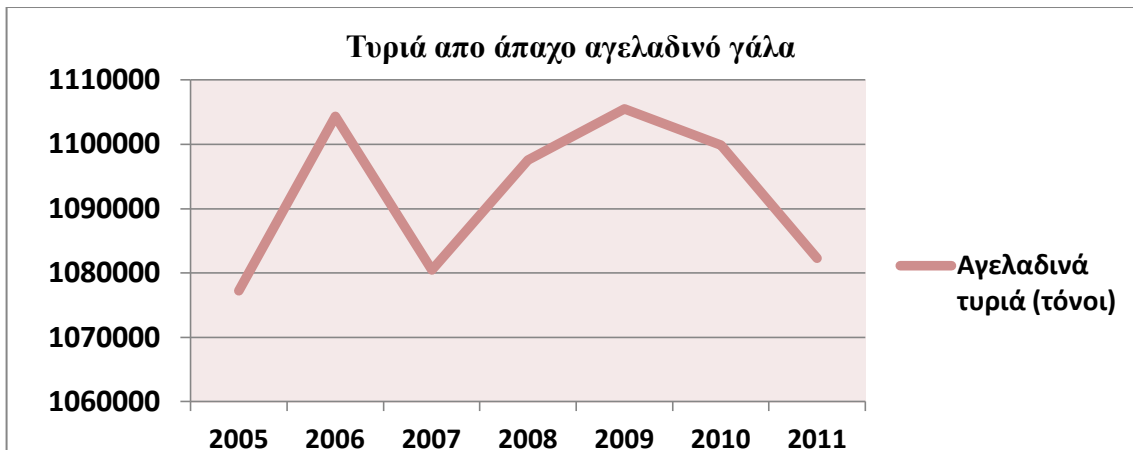
Στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής έχουν εκδώσει διατροφικές οδηγίες και στο μεγαλύτερο μέρος του Δυτικού κόσμου γίνονται συστάσεις για μείωση του συνολικού διατροφικού λίπους στο 30% της καθημερινής προσλαμβανόμενης ενέργειας (McDonald, 2000). Πρέπει να τονιστεί επίσης, ότι από τις κατηγορίες τροφίμων με χαμηλά ή μειωμένα λιπαρά, τα γαλακτοκομικά μειωμένων ή χαμηλών λιπαρών βρίσκονται υψηλά στη λίστα προτίμησης των καταναλωτών (Drake *et al.*, 1996). Για το λόγο αυτό η κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων χαμηλής λιποπεριεκτικότητας αυξάνεται σταθερά τις τελευταίες δεκαετίες (Koca & Metin, 2004).

Η μεγαλύτερη αγορά τροφίμων με χαμηλά λιπαρά είναι οι Ηνωμένες Πολιτείες (Hilliam, 1996), όπου το 1998, οι πωλήσεις τυριών με χαμηλά λιπαρά σε σουπερμάρκετ αντιπροσώπευαν περίπου το 20% των πωλήσεων τυριού (Mistry, 2001). Στην Ευρώπη, η αγορά αυτή είναι σχετικά μικρή. Η μεγαλύτερη ευρωπαϊκή αγορά σε τρόφιμα χαμηλής λιποπεριεκτικότητας είναι το Ηνωμένο Βασίλειο (Hilliam, 1996), όπου η συνολική κατανάλωση είναι μόλις 8%. Στις μεσογειακές χώρες η παραγωγή προϊόντων εστιάζεται στη γεύση και στην αυθεντικότητα παρά στη μείωση των λιπαρών (Hilliam, 1996).

Από διάφορες επιδημιολογικές μελέτες, η κατανάλωση μεγάλης ποσότητας γαλακτοκομικών προϊόντων με αυξημένα λιπαρά έχει συσχετιστεί με τον κίνδυνο στεφανιαίας νόσου (Hu *et al.*, 1999). Ωστόσο οι Thulstrup *et al.* (2006) και Sonestedt *et al.*, (2011) υποστηρίζουν το αντίθετο, ότι δηλαδή σε κάποιες περιπτώσεις (π.χ. ζυμωμένα γάλατα) η κατανάλωση μπορεί ακόμα, να είναι ευεργετική στη πρόληψη της υπέρτασης. Θα πρέπει όμως να διερευνηθεί περαιτέρω και να ληφθούν υπόψη και οι παράγοντες ηλικίας και φύλου.

Πρόσφατες επίσης κλινικές μελέτες, αναφέρουν ότι εκτός από τη μεσογειακή διατροφή (De Lorgeril *et al.*, 1994; 1999) ή κατανάλωση τροφών με χαμηλά λιπαρά (Ornish *et al.*, 1998), εμπόδισε επαναλαμβανόμενες εκδηλώσεις CVD. Ειδικά η κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων με μειωμένα λιπαρά ελάττωσε συνολικά την πίεση του αίματος, με μικρή μείωση της συστολικής πίεσης (Toledo *et al.*, 2009), ενώ η κατανάλωση παρόμοιων προϊόντων δεν επηρέασε τη πίεση σε άτομα με φυσιολογικές τιμές πίεσης, παρά μόνο αύξησε το βάρος τους (Alonso *et al.*, 2009).

Στο διάγραμμα 1.4 αναγράφονται πρόσφατα στοιχεία για την παραγωγή τυριών από άπαχο αγελαδινό γάλα στην Ευρώπη (FAO, 2011) στην οποία υπάρχει μια ασήμαντη διακύμανση, με μέσο όρο τους 1.090.000 τόνους περίπου ετησίως.



Διάγραμμα 1.4. Τυριά από άπαχοαγελαδινό γάλα την επταετία 2005-2011 στην Ε.Ε (FAO, 2011)

Στην βιομηχανία γαλακτοκομικών προϊόντων, οι κατασκευαστές αναπτύσσουν συνεχώς καινούργιους τύπους τυριών με μειωμένα λιπαρά. Ωστόσο, η παραγωγή τυριών με χαμηλή λιποπεριεκτικότητα ή και χωρίς λίπος παρουσιάζει σημαντικά προβλήματα διότι τα προϊόντα αυτά δεν έχουν τα απαραίτητα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά για να είναι αποδεκτά από τον καταναλωτή (Muir *et al.*, 1992; O'Donnell, 1993).

Τα χαρακτηριστικά υφής πιστεύεται ότι είναι σημαντικό κριτήριο για τον προσδιορισμό της ταυτότητας και της ποιότητας ενός τυριού. Αυτά καθορίζονται σε μεγάλο βαθμό από την φύση και τη διάταξη των κύριων συστατικών του τυριού (πρωτεΐνες, λίπος, νερό) οπου το λίπος συμβάλει σημαντικά. Αποτελεί επίσης πρόδρομο ουσία πολλών λιποδιαλυτών ενώσεων γεύσης.

Ένα μεγάλο μειονέκτημα για όλα τα μειωμένης λιποπεριεκτικότητας τυριά είναι ότι είναι πολύ συνεκτικά (firm). Ο λόγος είναι διπλός: πρώτον, το δίκτυο καζεΐνης είναι πολύ συμπυκνωμένο ή συμπαγές και δεύτερον, η αλληλεπίδραση μεταξύ των μορίων καζεΐνης είναι συνεχής, δηλαδή υπάρχουν πολύ λίγα «κενά» μεταξύ των καζεϊνικών μικκυλίων. Η κρίσιμη παράμετρος που καθορίζει τη δομή του τυριού (σταθερότητα, μάσημα) είναι η καζεϊνική πυκνότητα, η οποία σχετίζεται με την υγρασία, το βαθμό της «διατάραξης» της από το λίπος, το pH και το επίπεδο της ανέπαφης καζεΐνης (πρωτεόλυση). Ένας τρόπος για να μειωθεί η πυκνότητα καζεΐνης είναι να αυξηθεί η περιεκτικότητα σε υγρασία. Άλλος, είναι να προστεθεί υλικό πληρώσεως, όπως μετουσιωμένη πρωτεΐνη ορού γάλακτος (Magdy *et al*, 2011), άμυλο ή λίπος μειωμένης θερμιδικής αξίας. Τέτοια πληρωτικά υλικά συχνά οδηγούν σε τυρί με υψηλότερη περιεκτικότητα σε υγρασία. Μια τρίτη μέθοδος είναι να «σπάσει» το υπάρχον λίπος σε μικρότερα λιποσφαίρια (ομογενοποίηση). Η κρέμα πρέπει να ομογενοποιείται και στη συνέχεια, κρέμα και αποβουτυρωμένο γάλα συνδυάζονται ώστε να δώσουν το επιθυμητό ποσοστό λίπους. Η χρήση θερμασμένου γάλακτος πέραν της θερμοκρασίας παστερίωσης, έχει σαν αποτέλεσμα την μετουσίωση των πρωτεϊνών του ορού. Τυριά από γάλα με μετουσιωμένες πρωτεΐνες ορού γάλακτος εμφανίζουν μειωμένη συναίρεση και επομένως υψηλότερη υγρασία.

Άλλα μέσα που χρησιμοποιούνται πιο συχνά για την αύξηση της υγρασίας στο τυρί, είναι (Johnson & Law, 1999):

- μείωση του χρόνου αναδέυσης του τυροπήγματος (ιδιαίτερα μετά την στράγγιση του τυρογάλακτος)
- αύξηση μεγέθους τεμαχιδίων του πήγματος κατά τη κοπή
- χρήση κρύου νερού πριν από το αλάτισμα

Άλλο μεγάλο μειονέκτημα τυριών χαμηλών σε λιπαρά είναι και η έλλειψη γεύσης. Οφείλεται στο ότι υδροφοβικές ενώσεις που παράγονται κατά την πρωτεόλυση και σχετίζονται με την εμφάνιση του πικρού σε τυριά χαμηλών λιπαρών, διακρίνονται εντονότερα σε σύγκριση με τα κανονικά, επειδή αυτές οι ενώσεις απορροφούνται από το λίπος. Επίσης, το λίπος γάλακτος περιέχει λιπαρά οξέα μικρής αλύσου τα οποία όταν ελευθερωθούν με τη δράση της λιπάσης συμβάλλουν στη γεύση του τυριού (Mistry, 2001).

Για να επιτευχθεί το επιθυμητό ποσοστό λίπους στο προϊόν σημαντική είναι η προετοιμασία του γάλακτος με τυποποίηση του λίπους. Επίσης μπορεί να ληφθεί υπόψη η αναλογία καζεΐνη/λίπος. Για τυριά τύπου Cheddar με τα μισά λιπαρά (15,1%) και μειωμένα (20,2%) λιπαρά, έχει προταθεί η αναλογία καζεΐνης-λίπους 2,05 και 1,28 αντίστοιχα (Johnson & Chen, 1991).

Σημαντικό στοιχείο στη παραγωγή τυριών μειωμένων λιπαρών είναι και η σωστή επιλογή των καλλιιεργειών εκκίνησης για τυριά που ωριμάζουν. Στην παραγωγή τυριών με χαμηλά λιπαρά, είναι περισσότερο επιθυμητό να χρησιμοποιούνται αργές καλλιέργειες με βραδεία παραγωγή οξέος. Καθώς τα τυριά μειωμένων και χαμηλών λιπαρών περιέχουν περισσότερη υγρασία, μια αργή διαδικασία στο ρυθμό ανάπτυξης του οξέος κατά τη διάρκεια της τυροκόμησης είναι απαραίτητη, για να διατηρήσει μια ισχυρή ρυθμιστική ικανότητα στο τυρί και να εμποδίσει την ανάπτυξη έντονων όξινων γεύσεων (Drake & Swanson, 1995). Οι καλλιέργειες εκκίνησης που χρησιμοποιούνται για τυριά χαμηλών λιπαρών σε βιομηχανική παρασκευή τυριού, όπου οι θερμοκρασίες παραγωγής διαφέρουν από εκείνες των τυριών με κανονικό λίπος, θα πρέπει να επιλέγονται με βάση την ευαισθησία στην θερμοκρασία, τις αυτολυτικές τους ιδιότητες και την πρωτεολυτική/πεπτιδολυτική τους δραστηριότητα (Ardo, 1997). Η αυτόλυση θα πρέπει να επαχθεί σε χαμηλότερη θερμοκρασία και η καλλιέργεια θα πρέπει να έχει τη τάση να απελευθερώνει ένζυμα στο δίκτυο του τυριού (cheese matrix) σε σχετικά υψηλή υγρασία στη μη λιπαρή φάση (Y/ΣΥΑΛ). Πολλές εταιρίες εμπορεύονται τέτοιου τύπου οξυγαλακτικές καλλιέργειες με αργό ρυθμό ανάπτυξης οξέος και χαμηλή πρωτεολυτική δραστηριότητα (Drake & Swanson, 1995; Katsiari *et al.*, 2002). Χρησιμοποιούνται επίσης οξυγαλακτικές καλλιέργειες, όπως *Lb. helveticus* κ.α, για ενίσχυση της γεύσης και για πιο σωστή ωρίμανση και μείωση των πικρών γεύσεων που συχνά παρατηρούνται στα τυριά χαμηλών λιπαρών (Banks, 2004). Μια διαφορετική προσέγγιση για τη συγκράτηση υγρασίας του τυριού είναι η χρήση καλλιιεργειών εκκίνησης οι οποίες έχουν την ικανότητα να παράγουν εξωπολυσακχαρίτες (Badel *et al.*, 2011; Patel *et al.*, 2012).

Επίσης γίνεται χρήση μιμητών λίπους (fat mimetics) οι οποίοι μιμούνται τις ιδιότητες του λίπους «αιχμαλωτίζοντας» την υγρασία και δίνουν την αίσθηση του κρεμώδους και του ολισθηρού. Οι ουσίες αυτές πρωτεϊνικής ή υδατανθρακικής φύσης δεν μπορούν πλήρως να αντικαταστήσουν τις μη πολικές ιδιότητες του λίπους, όπως την ικανότητα για μεταφορά γεύσης. Εμπορικά σκευάσματα τέτοιου τύπου όπως το NovogelTM, το StellarTM και το Simplese[®] έχουν δοκιμαστεί σε μοτσαρέλα και άλλα τυριά (Banks, 2004).

Τα τυριά χαμηλών λιπαρών εμφανίζουν συνήθως την αίσθηση του πικρού και γεύσεων μη αποδεκτών από τον καταναλωτή. Τα μειονεκτήματα αυτά σχετίζονται με την αυξημένη υγρασία, τη μειωμένη ποσότητα λίπους, τον χαμηλότερο ρυθμό λιπόλυσης (Katsiari & Voutsinas, 1994; Lee & Warthensen, 1996), την αλλαγή του πρωτεϊνικού δικτύου και τον ρυθμό πρωτεόλυσης (Ardo *et al.*, 1993). Επίσης ρόλο στο σχηματισμό ανεπιθύμητων γεύσεων μπορεί να παίζει το pH (Chen *et al.*, 1992) και η ποσότητα αλατιού (Banks *et al.*, 1993; Skeie *et al.*, 1997) Σε τυρί Cheddar χαμηλών λιπαρών η ελαττωματική γεύση έχει αποδοθεί σε ανεπαρκείς ποσότητες σε βουτανοϊκό και εξανοϊκό οξύ (Banks *et al.*, 1989; Dimos *et al.*, 1996) σε καρβοξυλικά οξέα μικρής και μεσαίας αλύσου, ή σε μεθυλ-κετόνες, γ- και σ-λακτόνες (Wijesundra & Watkins, 2000). Υπεύθυνη επίσης μπορεί να είναι και η έλλειψη μεθανεθειόλης (Dimos *et al.*, 1996).

Τα τυριά μειωμένης λιποπεριεκτικότητας αποτελούν εξέλιξη των τελευταίων δεκαετιών. Σε πολλές χώρες έχει ήδη διαμορφωθεί το πλαίσιο για την παραγωγή και τον έλεγχο των προϊόντων αυτών, ενώ σε άλλες η προσπάθεια αυτή βρίσκεται σε εξέλιξη. Υπάρχει προσδοκία ότι θα οριστεί ένα ανώτατο όριο με μείωση 50% του λίπους επί ξηράς ουσίας (Johnson, 2003). Επειδή τα τρόφιμα αυτά είναι πλέον διαδεδομένα, η Ευρωπαϊκή Επιτροπή (Κανονισμός 1924/2006) τα κατατάσσει σε τέσσερις επιμέρους κατηγορίες

- μειωμένου λίπους (reduced-fat)
- “light”
- χαμηλού λίπους (low-fat)
- χωρίς λίπος (fat-free)

Όπως είναι φυσικό, τα μειωμένης λιποπεριεκτικότητας τυριά περιέχουν λιγότερα ολικά και κορεσμένα λιπαρά, καθώς και χαμηλότερη χοληστερόλη. Ανάλογα με την περιεκτικότητά σε λίπος επηρεάζεται και η περιεκτικότητα σε λιποδιαλυτές βιταμίνες, ενώ το ασβέστιο, επειδή δεν μεταφέρεται μαζί με το λίπος, δεν φαίνεται να μεταβάλλεται.

1.3 Τυριά τυρογάλακτος

Οι αλληλεπιδράσεις των WP με άλλα συστατικά, τόσο σε γλυκό όσο και σε οξύ τυρόγαλα, οι οποίες σχετίζονται με διάφορες φυσικοχημικές παραμέτρους όπως η θερμοκρασία και το pH, διευκόλυνε στην ανάπτυξη προϊόντων, προστιθέμενης αξίας, όπως τα τυριά τυρογάλακτος ή ποτά με βάση το τυρόγαλα (Jelen, 1992).

Τα τυριά τυρογάλακτος παρασκευάζονται με θέρμανση του τυρογάλακτος σε θερμοκρασίες άνω των 85°C και με προσθήκη συχνά οργανικού οξέος (π.χ., οξικό, κιτρικό) ή και ανόργανου αλάτος (π.χ., ασβέστιο). Σημασία στη τεχνολογία αυτών των τυριών έχει και ο ρυθμός αύξησης της θερμοκρασίας κατά τη θέρμανση τυρογάλακτος. Ο Ανυφαντάκης, (1998) αναφέρει ότι καλύτερα αποτελέσματα έχουμε όταν ο ρυθμός είναι αργός στην αρχή υπό συνεχή ανάδευση και επιταχύνεται προς το τέλος για τη δημιουργία καλού πήγματος. Άλλοι συγγραφείς (Pereira *et al.*, 1982) αναφέρουν ότι σε τυρί Ricotta, όταν η θερμοκρασία είναι πάνω από 3.5°C/min υπήρχε μια μικρή μείωση στην απόδοση. Για το σχηματισμό σταθερότερου τυροπήγματος μερικές φορές προστίθεται γάλα (πρόσγαλα) στο τυρόγαλα και εφαρμόζεται υπερδιήθηση στον ορό πριν από την θερμική επεξεργασία. Τα τυριά τυρογάλακτος είναι συνήθως τυριά με χαμηλά λιπαρά, διότι το τυρόγαλα περιέχει μέχρι 1% λίπος, αφού το υπόλοιπο παραμένει στο τυρόπηγμα παρασκευάζονται σε όλο το κόσμο, συνήθως σε μικρή κλίμακα, σύμφωνα με παραδοσιακά πρωτόκολλα. Στη Μεσόγειο παρασκευάζονται κυρίως από πρόβειο γάλα, επειδή το πρόβειο παράγεται σε μεγάλες ποσότητες και η υψηλή πρωτεϊνοπεριεκτικότητα του αυξάνει την απόδοση των τυριών σε σχέση με το αγελαδινό και αίγιο γάλα (Pintado *et al.*, 2001).

Η τυπική απόδοση των τυριών τυρογάλακτος είναι περίπου στο 6%. Η προσθήκη γάλακτος, αλάτων ασβεστίου μπορεί να βελτιώσει την απόδοση. Η αυξημένη απόδοση που παρατηρείται κατά την προσθήκη πλήρους γάλακτος οφείλεται στο γεγονός ότι επηρεάζει θετικά τη συνάθροιση των αλλοδομημένων με τη θέρμανση πρωτεϊνών του, σε μεγαλύτερα συσσωματώματα, ενώ αυξάνει και την περιεκτικότητα σε λιπαρά και πρωτεΐνη του τυρογάλακτος. Για μια επιτυχημένη παρασκευή τυριών τυρογάλακτος είναι πολύ σημαντικό όχι μόνο να έχουμε πλήρη αλλοδόμηση των πρωτεϊνών, αλλά και τα σωματίδια που δημιουργούνται από την αλλοδόμηση αυτή, να συσσωματώνονται και να δημιουργούν ένα καλό πήγμα (Ανυφαντάκης, 1998). Διαφορετικά παραμένουν αιωρούμενα στο τυρόγαλα χωρίς να μπορούν να συλλεχθούν. Επίσης η οξίνιση του τυρογάλακτος με οργανικά οξέα πριν τη θέρμανσή του, βοηθά στην ανάκτηση της πρωτεΐνης και συνεπώς στην απόδοση (Pappas & Voutsinas, 1988).

Τυριά τυρογάλακτος με διαφορετικές ονομασίες παράγονται σε διάφορα μέρη του κόσμου (πίνακας 1.4.) . Κοινό γνώρισμα των τυριών αυτών είναι ότι παρασκευάζονται με θέρμανση του τυρογάλακτος σε θερμοκρασίες άνω των 85°C. Ωστόσο λόγω της διαφορετικής πρώτης ύλης και της διαφορετικής τεχνολογίας που εφαρμόζεται, τα τυριά αυτά διαφέρουν σημαντικά ως προς τη χημική τους σύνθεση και τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά. Τυριά τυρογάλακτος που παρασκευάζονται στην Ελλάδα είναι η Μυζήθρα, το Μανούρι, ο Ανθότυρος και η Ξινομυζήθρα και σε άλλες χώρες είναι το

Ricotta στην Ιταλία, Brousse στη Γαλλία, Klila στην Τυνησία, Ziger στη Γερμανία και Ρουμανία, Αναρή στην Κύπρο και άλλα (Πίνακας 1.4). Το Ricotta είναι το σημαντικότερο, και πιο γνωστό, τυρί ορού γάλακτος.

Αυτό το τυρί παρασκευάζεται από τυρόγαλα που λαμβάνεται κατά την τυροκόμηση της Μοτσαρέλας ή του Provolone, είναι λευκού χρώματος και έχει μια λεπτή και κοκκώδη υφή. Το Ricotta έχει μικρό χρόνο συντήρησης και προορίζεται για κατανάλωση αμέσως μετά την παραγωγή του. Άλλα μικρής διάρκειας ζωής τυριά τυρογάλακτος είναι το Requeijao και το Μανούρι, ενώ εκείνα με μεγαλύτερη διάρκεια ζωής περιλαμβάνουν τα Σκανδιναβικά τυριά Gjetost και Mysost, που παρασκευάζονται από ένα πολύ πυκνό τυρόγαλα λακτόζης και μίγμα πρωτεϊνών του ορού (Jelen & Buchheim, 1976).

Η υψηλή υγρασία και το αυξημένο pH του τυρογάλακτος καθώς και η απουσία ή η χαμηλή περιεκτικότητα ευνοούν την μικροβιακή ανάπτυξη (Jelen, 1992; Pintado *et al*, 2001). Για το λόγο αυτό αμέσως μετά τη παρασκευή τους τα τυριά οδηγούνται σε χώρους ψύξης στους 4°C. Οι μικροοργανισμοί που απαντώνται προέρχονται κυρίως από επιμολύνσεις και είναι ζύμες και διάφορα βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae*. Σημαντικό ρόλο παίζει και η συσκευασία. Αεροστεγής συσκευασία με τροποποιημένες ατμόσφαιρες έδειξαν ότι αναστέλλει την μικροβιακή ανάπτυξη για περίπου 1 μήνα στους 5°C σε τυρί Ricotta (Kosikowski & Brown, 1970).

Πίνακας 1.4. Τυριά τυρογάλακτος που παράγονται σε διάφορες χώρες (Pintado *et al*, 2001)

Χώρα	Όνομα Τυριού τυρογάλακτος
Νορβηγία	Mysost, Primost, Gjestost
Ελβετία	Schottenziegr, Hudelziger
Πορτογαλία	Requeijao
Ισπανία	Requesón
Γαλλία	Serac, Brousse, Broccio, Greuil
Ελλάδα	Μανούρι, Μυζήθρα, Ανθότυρος
Ιταλία	Ricotta
Μάλτα	Casio-Ricotta
Κύπρος	Anari
Ρουμανία	Ziger, Urda
πρώην ΕΣΣΔ	Nadigi, Kaukaz
Ισραήλ	Urda
Αργεντινή	Ricotta
Βραζιλία	Requeijao do Norte
Η.Π.Α	Ricotta, Ricotone

1.3.1 Επίδραση της θέρμανσης στις πρωτεΐνες του ορού

Οι πρωτεΐνες ορού είναι υδατοδιαλυτές σε ένα μεγάλο εύρος pH. Παρόλα αυτά, συνδυασμοί pH, θερμοκρασίας και περιεκτικότητας σε ανόργανα στοιχεία, μπορούν να

επιφέρουν επιλεκτική αλλοδομή και τέλος συσσωμάτωση των πρωτεϊνών ορού (Onwulata, 2008).

Οι πρωτεΐνες του ορού έχουν κυρίως δευτεροταγή και τριτοταγή δομή και για το λόγο είναι ευαίσθητες στην αλλοδομή από πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της υψηλής θέρμανσης. Η αλλοδομή τους γίνεται περίπου μεταξύ 64 και 85°C και είναι άμεσα εξαρτημένη από το pH. Οι αλλαγές που συμβαίνουν στην πρωτεϊνική δομή κατά την αλλοδομή στις υψηλές θερμοκρασίες, είναι μη-αντιστρεπτές (Onwulata, 2008) και οδηγούν σε απώλεια της διαλυτότητάς τους. Με βάση την απώλεια της διαλυτότητας η σειρά αντοχής των πρωτεϊνών του ορού στη θέρμανση είναι η εξής: α -La > β -Lg > BSA > Igs (Fox and McSweeney, 1998; Hammershoj *et al.*, 2010). Οι καζεΐνες αντίθετα είναι πολύ ανθεκτικές στη θέρμανση και μόνο σε πολύ έντονη θερμική επεξεργασία υφίστανται κάποιες αλλαγές, όπως αποφωσφορυλίωση, συσσωμάτωση και διάσπαση πεπτιδικών δεσμών (Fox & McSweeney, 1998).

Με την επίδραση της θέρμανσης αρχικά πραγματοποιείται «άνοιγμα» των πεπτιδικών δεσμών των πρωτεϊνών ορού, οπότε αυτές εκτίθενται και αντιδρούν με διάφορους τρόπους μεταξύ τους αλλά και με τα καζεϊνικά μικκύλια. Έτσι σχηματίζονται ομοιοπολικοί δεσμοί διαμέσου αντιδράσεων μεταξύ σουλφυδρικών ομάδων /δισουλφιδικών δεσμών με τελικό αποτέλεσμα τη συσσωμάτωση των πρωτεϊνών και τη δημιουργία συμπλόκων με τις καζεΐνες, οπότε και μειώνεται η διαλυτότητα τους. Οι πρωτεΐνες εμφανίζουν μειωμένη πεπτικότητα και χάνουν τη βιολογική τους αξία, επειδή λόγω της μετουσίωσης μειώνεται η δυνατότητα πρόσφυσης των ειδικών πρωτεολυτικών ενζύμων στις περιοχές υποδοχής τους (Carbonaro *et al.*, 1998; Walstra *et al.*, 2006).

β -γαλακτοσφαρίνη (β -Lg)

Αποτελείται από 162 αμινοξέα και 2 δισουλφιδικές γέφυρες (Cys106-Cys119 και Cys66-Cys160) και μια πολύ ενεργή σουλφυδρική ομάδα (Cys121) που παίζει σημαντικό ρόλο στη συσσωμάτωση με αντιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες ορού που έχουν άλλες δισουλφιδικές ενώσεις (Gunasekaram & Solar, 2012). Σε θέρμανση άνω των 65°C η β -Lg υφίσταται αναστρέψιμη μετουσίωση, αλλά περίπου στους 70°C η μετουσίωση γίνεται μη αναστρέψιμη εξαιτίας μιας σειράς αλλαγών που οδηγούν στη συσσωμάτωση. Αρχικά δημιουργούνται ενδομοριακοί δισουλφιδικοί δεσμοί, μετά μη-ειδικές αλληλεπιδράσεις που περιλαμβάνουν υδροφοβικούς και ηλεκτροστατικούς δεσμούς και τέλος μη-ειδικές αλληλεπιδράσεις που συμβαίνουν όταν οι σουλφυδρικές ομάδες μπλοκάρονται (Fox & McSweeney, 1998). Όσο συνεχίζεται η θέρμανση, η μετουσιωμένη β -Lg αντιδρά με την κ -καζεΐνη (κ -CN), μειώνεται η διαλυτότητα της και το σύμπλοκο καθιζάνει σε χαμηλό pH, ενώ η αντίδραση με τη μεμβράνη των λιποσφαιρίων συμβαίνει σε πολύ μικρότερο βαθμό (Hammershoj *et al.*, 2010). Δύο δισουλφιδικές γέφυρες και μια ελεύθερη σουλφυδρυλομάδα που βρίσκονται στη φυσική δομή της β -Lg εμπλέκονται στην αντιδρασσή της με την κ -καζεΐνη (Considine *et al.*, 2007). Οι Corredig & Dalgleish (1999), εκτός από την άμεση αλληλεπίδραση της β -Lg με την κ -CN παρατήρησαν και μία αντίδραση της α -La και της β -Lg με τις καζεϊνικές μικέλλες μέσω

μιας ενδιάμεσης σύνδεσης που δημιουργήθηκε μεταξύ των δύο διαλυτών πρωτεϊνών. Η λακτόζη φαίνεται να έχει προστατευτική επίδραση έναντι της μετουσίωσης της β-Lg, μέσω της ενίσχυσης της ενυδάτωσης των πρωτεϊνικών μορίων που συμβάλλει στη σταθερότητα τους, αλλά και μέσω της παρεμπόδισης της συσσωμάτωσης με την καζεΐνη λόγω των συμπλόκων με τη λακτόζη, που δημιουργούνται κατά τη θέρμανση (Claeys *et al.*, 2002).

α-γαλακταλβουμίνη (α-La)

Η α-La αποτελείται από 123 αμινοξέα με τέσσερις δισουλφιδικές γέφυρες που αντιδρούν με την ελεύθερη ομάδα της θειόλης της β-Lg (Gunasekaram & Solar, 2012). Είναι η πιο ανθεκτική στη μετουσίωση στη θέρμανση σε σχέση με τις υπολοιπές πρωτεΐνες ορού (Hammershoj *et al.*, 2010). Η μετουσίωση της λαμβάνει χώρα σε μια μεγάλη κλίμακα θερμοκρασιών μεταξύ 70 και 96°C (Jeanson *et al.*, 1999) και προάγεται από την παρουσία της β-Lg (Corredig & Dalgleish, 1999). Η μετουσιωμένη α-La αντιδρά με την α₂-καζεΐνη και σχηματίζει σύμπλοκο (Fox & McSweeney, 1998), ενώ συμβαίνει και αντιδρασή της με τη μεμβράνη των λιποσφαιρίων σε αρκετά υψηλές θερμοκρασίες (Considine *et al.*, 2007). Οι Jeanson *et al.*, (1999) χρησιμοποίησαν μια τεχνική ELISA για την ποσοτικοποίηση της φυσικής και της μετουσιωμένης α-La και κατάφεραν το διαχωρισμό μεταξύ νωπού, παστεριωμένου, UHT και αποστειρωμένου αγελαδινού γάλακτος. Το ποσοστό της μετουσιωμένης πρωτεΐνης ήταν 1.3-3% στο νωπό, 2.9-13.9% στο παστεριωμένο, 59.1-84% στο UHT και 97.1-99.3% στο αποστειρωμένο γάλα.

Αλβουμίνη ορού του αίματος (BSA) και Ανοσοσφαιρίνες (Igs)

Από τις πρωτεΐνες ορού είναι οι πιο ευαίσθητες στη θέρμανση, με τις ανοσοσφαιρίνες να παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη ευαισθησία (Fox & McSweeney, 1998) και η μετουσίωσή τους ξεκινά γύρω στους 65°C (Considine *et al.*, 2007). Κατά τη διαφοροποίηση δειγμάτων αγελαδινού γάλακτος που έχουν υποστεί αποστείρωση η παρουσία της διαλυτής αλβουμίνης ορού του αίματος θα μπορούσε να τυποποιήσει το άμεσα επεξεργασμένο UHT γάλα, ενώ η μετουσίωση των ανοσοσφαιρινών είχε θεωρηθεί ως η καλύτερη παράμετρος ελέγχου των συνθηκών επεξεργασίας του παστεριωμένου γάλακτος. Ο λόγος (Ig+BSA)/β-Lg έχει χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της έκτασης της μετουσίωσης των πρωτεϊνών ορού στο παστεριωμένο γάλα όταν δεν είναι διαθέσιμα για ανάλυση δείγματα του νωπού γάλακτος. Μάλιστα ο ποσοτικός προσδιορισμός αυτών των τριών πρωτεϊνών ορού έχει εφαρμοστεί και για τυποποίηση των σκονών γάλακτος χαμηλής (LH) και πολύ χαμηλής (extra LH) θέρμανσης (Lopez-Fandino & Olano, 1999).

1.3.2 Αντιδράσεις πρωτεϊνών ορού (WPs)-καζεϊνών (CN) με την επίδραση των υψηλών θερμοκρασιών

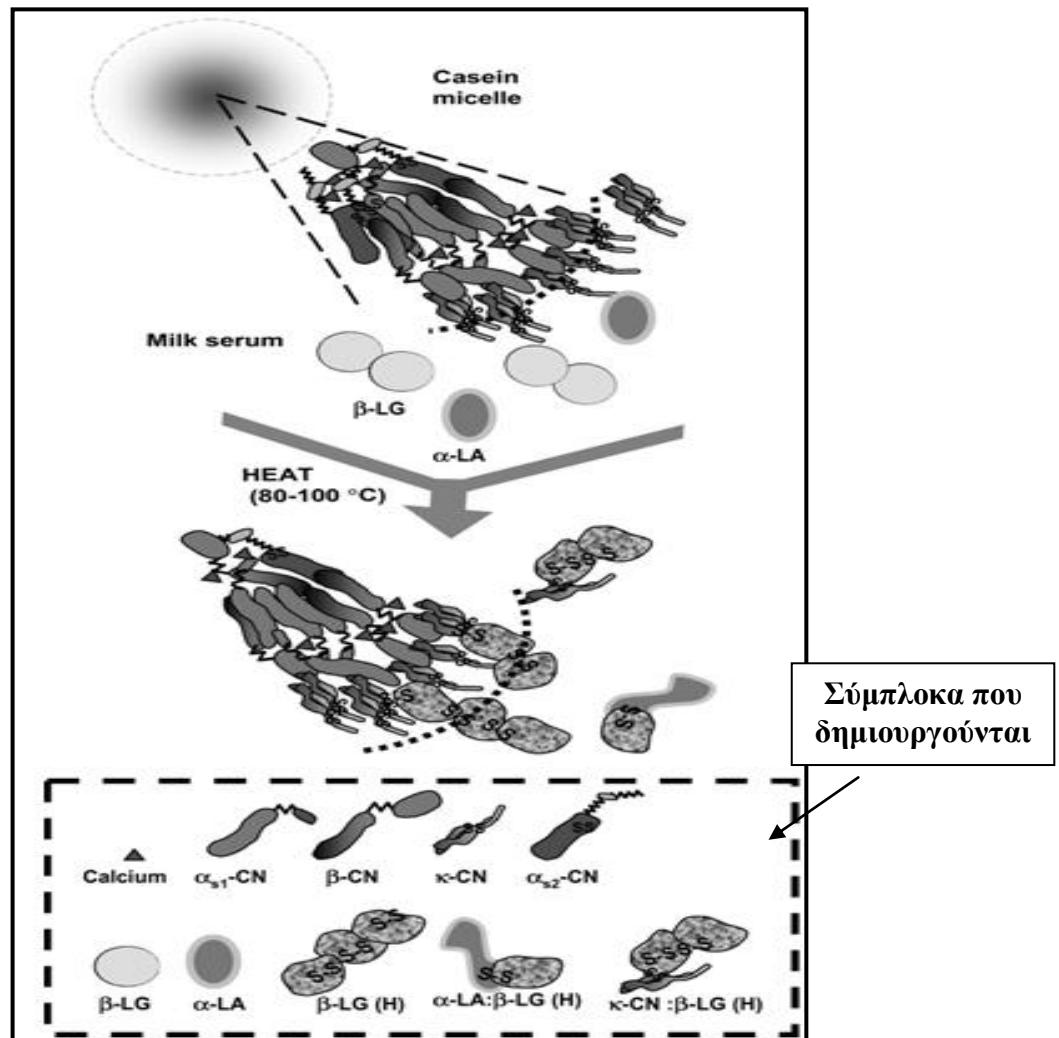
Η μετουσίωση των WPs αρχίζει πάνω από τους 60°C, αλλά υπάρχουν και αναφορές για μετουσίωση από τους 40°C (Parris & Baginski, 1991). Από τους 70°C περίπου αρχίζουν

αλλαγές στην δευτεροταγή και τριτοταγή δομή της β-Lg, συμπεριλαμβανομένου του ξεδιπλώματος και της έκθεσης της ελεύθερης ομάδας της θειόλης στο Cys121, επομένως ξεκινάει η συσσωμάτωση μέσω των αντιδράσεων ανταλλαγής δισουλφιδίων-θειόλης και υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων (Hoffmann & van Mill, 1997; Anema & Li, 2003_a; Anema & Li, 2003_b). Αυτό δεν ισχύει για όλες τις WPs και δεν ακολουθείται πάντα το ίδιο σχέδιο. Οι πρωτεΐνες που περιέχουν κυστεϊνούχα αμινοξέα είναι η as₂-CN, η κ-CN, α-La και η β-Lg, επομένως αυτά τα μόρια είναι που θα αντιδράσουν υπό την επίδραση των υψηλών θερμοκρασιών. Συγκεκριμένα παρατηρείται μια αλληλεπίδραση της κ-CN με τη μετουσιωμένη β-Lg μέσω της ελεύθερης ομάδας της θειόλης και του δισουλφιδικού δεσμού, η οποία είναι και μη-αναστρέψιμη. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των α-La και β-Lg με τις μικέλες των καζεϊνών αυξάνουν συναρτήσει του χρόνου και της θερμοκρασίας όταν το γάλα θερμαίνεται από τους 75°C μέχρι τους 90°C, όπου η α-La δεν αντιδρά αυτή καθ' αυτή με τις CN, αλλά μέσα από το σύμπλοκο α-La/β-Lg που επιτρέπει την αντίδραση με τις μικέλες μέσω της κ-CN, με την τελευταία να έχει ένα μικρό αριθμό διαθέσιμων θέσεων για αντίδραση (binding sites) (Corredig & Dalgleish, 1999). Αυτό συμβαίνει περίπου μέχρι και τους 75°C, αλλά από τους 80°C μέχρι και τους 130°C, ο βαθμός μετουσίωσης της β-Lg είναι τόσο μεγαλύτερος από της α-La οπότε δεν παρατηρείται καμία αντίδραση μεταξύ της α-La και των CN (Oldfield *et al.*, 1998).

Σημαντικό ρόλο σε αυτές τις αλληλεπιδράσεις παίζουν το pH και η συγκέντρωση των πρωτεϊνών. Σε pH μικρότερο από 6,7 μεγαλύτερη ποσότητα WP αλληλεπιδρά με τις CN, ενώ σε pH πάνω από 6,7 το σύμπλοκο β-Lg/κ-CN διαχωρίζεται από την επιφάνεια τις μικέλας λόγω απομάκρυνσης της κ-CN από το καζεϊνικό μικκύλιο. Σε άπαχο γάλα που θερμάνθηκε μεταξύ 70°C και 90°C, η β-Lg αντέδρασε με έναν συγκεκριμένο βαθμό με την κ-CN, αφού η περαιτέρω προσθήκη β-Lg (2 g/L) δεν επηρέασε το βαθμό αλληλεπίδρασης, επαληθεύοντας τη θεωρία ότι η κ-CN έχει συγκεκριμένο αριθμό θέσεων πρόσδεσης για τη β-Lg. Αντίστροφα, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις της α-La (2 g/L), αύξησαν το βαθμό αλληλεπίδρασης με τις μικέλες των CN. Όταν υφίστανται μετουσίωση και οι δύο αυτές πρωτεΐνες είναι σε αναλογία 1:1, δεσμεύονται στη κ-CN, με αποτέλεσμα τη δημιουργία συμπλέγματος που περιέχει από ένα μόριο το καθένα. Επίσης η αναλογία CN:WP φαίνεται να επηρεάζει το βαθμό αυτών των αλληλεπιδράσεων, καθώς όσο μικρότερη είναι αυτή η αναλογία τόσο μεγαλύτερη είναι η ένταση της αλληλεπίδρασής τους (Gunasekaram & Solar, 2012).

Οι Patel *et al.*, (2006) σε εργασία τους, προτείνουν μηχανισμούς αλληλεπίδρασης μεταξύ των πρωτεϊνών του γάλακτος, σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας και πίεσης. Συγκεκριμένα όπως φαίνεται και στην εικόνα 1.3, στα αρχικά στάδια υπάρχει διάσπαση της διμερούς β-Lg και μια ανακατάταξη των δισουλφιδικών δεσμών στα μονομερή της, όπου η αρχική ελεύθερη ομάδα της θειόλης στο Cys121 αλλάζει για να δώσει ένα ελεύθερο Cys160, το οποίο επειδή βρίσκεται κοντά στο C τελικό άκρο της πρωτεΐνης μπορεί και αντιδρά με τους ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς της β-CN ή κ-CN. Αυτή η αντίδραση μπορεί να συμβεί και με την α-La. Το μεγάλο εύρος των πολυμερών που σχηματίζονται από την κ-CN (6-12 μονομερή ανά «σύμπλοκο») ευνοεί την ύπαρξη πολλαπλών ενδομοριακών δισουλφιδικών δεσμών μαζί με το γεγονός ότι αποτελεί το

στοιχείο επιφάνειας του μικκυλίου οπού αντιδρά με τις πρωτεΐνες ορού. Η α_{s2} -CN με θέρμανση κάτω από τους 100°C βρίσκεται σε μονομερή και διμερή μορφή, αλλά παρόλο που έχει μία δισουλφιδική ομάδα μέσα στο καζεϊνικό μικκύλιο, δεν μπορεί να φτάσει την ελεύθερη ομάδα της θειόλης της μετουσιωμένης β -Lg.



Εικόνα 1.3. Σχηματική αναπαράσταση της πιθανής επίδρασης της θερμοκρασίας των 90°C σε γάλα (Patel *et al.*, 2006)

1.4 Ελληνικά τυριά τυρογάλακτος

Σύμφωνα με το Κώδικα Τροφίμων & Ποτών (ΚΠΤ) (άρθρο 83, 2011):

Τυριά τυρογάλακτος χαρακτηρίζονται τα τυριά, τα οποία λαμβάνονται με ισχυρή θέρμανση τυρογάλακτος (με ή χωρίς οξίνιση) και με ή χωρίς προσθήκη:

- α) γάλακτος (πρόσγαλα),*
- β) γάλακτος και κρέμας γάλακτος (αφρόγαλα),*
- γ) βρώσιμου χλωριούχου νατρίου (κ. αλάτι),*

τα οποία μπορούν να διατεθούν νωπά (φρέσκα) [μερικά από αυτά μπορούν να διατεθούν και με μερική αφυδάτωση (ζερά) και άλλα κατόπιν ωρίμανσης] και των οποίων η υγρασία δεν υπερβαίνει το 70%.

Τα τυριά τυρογάλακτος επιτρέπεται να διατίθενται στην κατανάλωση στις πιο ποιότητες που αναφέρονται παρακάτω (Πίνακας 1.5).

Πίνακας 1.5. Ποιότητες τυριών τυρογάλακτος

	Μέγιστη υγρασία	Λίπος επί ξηρού
Εξαιρετική ποιότητα	60%	70%
Πρώτη ποιότητα	65%	65%
Δεύτερη ποιότητα	70%	50%
Μερικώς αποβουτυρωμένα	70%	33,3% (συμπ/νου)- 50% (ή 10% σε τυρί ως έχει)

Η Ευρωπαϊκή Ένωση, αναγνωρίζοντας τη διαφορετικότητα του κάθε κράτους μέλους αναφορικά με τα έθιμα και τις παραδόσεις του, καθώς και κάποια παραδοσιακά προϊόντα διατροφής, εξέδωσε τον κανονισμό 2081/92 βάσει του οποίου προστατεύονται οι ονομασίες των προϊόντων και τροφίμων συγκεκριμένων γεωγραφικών περιοχών. Ο ΕΚ 2081/92 αντικαταστάθηκε στην πορεία από τον κανονισμό 510/2006. Σύμφωνα με τον παραπάνω κανονισμό, ως «Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης» (Π.Ο.Π) θεωρείται το όνομα μίας περιοχής, ενός συγκεκριμένου τόπου ή μιας χώρας, που χρησιμοποιείται για την περιγραφή ενός γεωργικού προϊόντος ή τροφίμου, που προέρχεται από τη συγκεκριμένη περιοχή και του οποίου η ποιότητα και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά οφείλονται είτε εν μέρει, είτε αποκλειστικά, στο συγκεκριμένο περιβάλλον. Η χώρα μας έχει κατοχυρώσει 61 Προστατευόμενες Ονομασίες Προέλευσης, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται και 21 είδη τυριών. Τα συγκεκριμένα τυριά διέπονται από ορισμένες κοινές προδιαγραφές, καθώς παρασκευάζονται με παραδοσιακό τρόπο από γάλα που προέρχεται από φυλές προβάτων, αιγών και αγελάδων, που εκτρέφονται στην οριοθετημένη περιοχή και των οποίων η διατροφή στηρίζεται στην χλωρίδα της συγκεκριμένης περιοχής. Η παρασκευή και η ωρίμανση των τυριών αυτών γίνεται σε ειδικές εγκαταστάσεις εντός της οριοθετημένης περιοχής, ενώ πραγματοποιούνται ειδικοί έλεγχοι ώστε να κατοχυρώνονται οι προδιαγραφές, η ποιότητα και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των τυριών.

Τα τυριά τυρογάλακτος στη χώρα μας θεωρούνται εποχιακά προϊόντα για το λόγο ότι παρασκευάζονται κυρίως από τυρόγαλα πρόβειου και αίγειου γάλακτος, τα οποία είναι επίσης εποχιακά. Παράγονται από Δεκέμβριο έως Ιούνιο και συνήθως καταναλώνονται φρέσκα. Καθώς το pH και η υγρασία των τυριών είναι υψηλά, συνήθως 6,0-6,3 και 50-70% αντίστοιχα και ο χρόνος διατήρησής τους δεν είναι μεγάλος. Τα τυριά στέλνονται στην αγορά μία μόλις ημέρα μετά την παρασκευή τους και η διαθεσή τους πρέπει να γίνεται μέσα σε 2 εβδομάδες, εφ' όσον διατηρούνται στους 4°C. Σήμερα, ο χρόνος διατήρησης των τυριών, Μανούρι και Ανθότυρου μπορεί να επιμηκυνθεί, με συσκευασία υπό κενό. Με την κονιοποίηση του τυρογάλακτος η παρασκευή των τυριών, αναμένεται να επεκταθεί σε ολόκληρο το χρόνο.

Ιδιαίτερης σημασίας όσον αφορά την ποιότητα και την απόδοση των ελληνικών τυριών τυρογάλακτος, έχει η σύσταση του τυρογάλακτος που χρησιμοποιείται για την παρασκευή τους. Μπορούν να παρασκευαστούν από όλα τα είδη τυρογάλακτος αλλά στην Ελλάδα συνήθως γίνονται από τυρόγαλα που προέρχεται από την παρασκευή μαλακών και σκληρών τυριών πρόβειου-αιγοπρόβειου γάλακτος.

1.4.1 Μυζήθρα

Το πιο γνωστό και με τη μεγαλύτερη παραγωγή τυρί τυρογάλακτος στη χώρα μας είναι η **Μυζήθρα**, νωπή και ξηρή (εικόνα 1.4).

Εικόνα 1.4. Μυζήθρα



Τεχνολογία παρασκευής

Η Μυζήθρα είναι ένα παραδοσιακό Ελληνικό τυρί που παρασκευάζεται από τυρόγαλα το οποίο θερμαίνεται στους 88-92°C (Ανυφαντάκης, 1998).

Το τυρόγαλα που προορίζεται για παρασκευή Μυζήθρας πριν από τη χρήση του υποβάλλεται πάντα σε φιλτράρισμα, με σκοπό να απομακρυνθούν οι εναπομείναντες κόκκοι πήγματος. Αν δεν απομακρυνθούν, τότε γίνονται σκληροί κατά τη θέρμανση του τυρογάλακτος και υποβαθμίζουν την ποιότητα της Μυζήθρας.

Μετά το φιλτράρισμα, το τυρόγαλα μπαίνει συνήθως σε κυκλικούς τυρολέβητες χωρητικότητας όχι μεγαλύτερης από 1.000 λίτρα, όπου θερμαίνεται με ατμό ο οποίος είτε κατευθύνεται στα διπλά τοιχώματα του τυρολέβητα είτε εγχύεται απ' ευθείας στη μάζα του τυρογάλακτος. Ο ρυθμός θέρμανσης είναι τέτοιος ώστε να επιτευχθεί η θερμοκρασία των 88-92°C σε 40-45 λεπτά.

Η θέρμανση του τυρογάλακτος γίνεται υπό συνεχή ανάδευση. Όταν η θερμοκρασία πλησιάσει τους 80-82°C, εμφανίζονται τεμαχίδια πήγματος εξαιτίας της αλλοδόμησης των πρωτεϊνών του. Στο στάδιο αυτό, η θέρμανση επιταχύνεται μέχρι το τυρόγαλα να αποκτήσει θερμοκρασία 88-92°C και η ανάδευση επιβραδύνεται σημαντικά μέχρι τελικά να σταματήσει όταν ένα πολύ λεπτό στρώμα πήγματος εμφανιστεί στην επιφάνεια του τυρογάλακτος. Στην περίπτωση που η Μυζήθρα θα καταναλωθεί φρέσκια, το τυρόγαλα θερμαίνεται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες ενώ θερμαίνεται σε υψηλότερες όταν το προϊόν πρόκειται να αφυδατωθεί στη συνέχεια. Στις θερμοκρασίες αυτές, το πήγμα παραμένει για 15-30 λεπτά και κατόπιν τοποθετείται σταδιακά σε ειδικά καλούπια για στράγγιση.

Για Μυζήθρα καλύτερης ποιότητας, πλήρες γάλα σε αναλογία 3-5% προστίθεται στο τυρόγαλα κατά τη θέρμανση, όταν η θερμοκρασία είναι 65-70°C. Καλύτερη ποιότητα τυριού έχουμε όταν χρησιμοποιούμε αίγιο γάλα. Συνήθως στη θερμοκρασία των 73-75°C, προστίθεται αλάτι στο τυρόγαλα σε αναλογία 1,0-1,5%. Το πήγμα που δημιουργείται με τη θέρμανση αποτελεί βάση της παρασκευής Μυζήθρας μεταφέρεται σταδιακά σε τυρόπανα, ή καλούπια κωνικού σχήματος διαμέτρου 12-13 εκατοστών στη βάση και 16-18 εκατοστών στην κορυφή, με τρύπες και ανοίγματα, για στράγγιση. Κατά συνέπεια, το σχήμα της Μυζήθρας εξαρτάται από το μέσο που χρησιμοποιείται για στράγγιση. Η στράγγιση ολοκληρώνεται σε 3-5 ώρες και στη συνέχεια το τυρί μεταφέρεται σε ψυχρούς θαλάμους ως την επομένη οπότε προωθείται στην αγορά.

Για να επιτευχθεί μεγαλύτερος χρόνος διατήρησης, πολλές φορές η Μυζήθρα συσκευάζεται υπό κενό.

Για την παρασκευή "Ξηρής Μυζήθρας", μετά τη στράγγιση της μυζήθρας αυτή αλατίζεται και τοποθετείται σε καλά αεριζόμενους ψυχρούς θαλάμους όπου και παραμένει μέχρι να αποκτήσει υγρασία χαμηλότερη από 40%. Κατά τη διάρκεια αυτής της παραμονής, πλήθος μικροβίων, κυρίως μυκήτων, αναπτύσσεται στην επιφάνεια της, τα οποία απομακρύνονται όταν ολοκληρωθεί η ξήρανση. Όποτε η ξηρή Μυζήθρα καλύπτεται με άσπρη παραφίνη ή συσκευάζεται σε πλαστικές σακούλες και παραδίδεται στην αγορά.

Τυπική σύσταση των τυριών τυρογάλακτος φαίνεται στο πίνακα 1.6.

Πίνακας 1.6. Σύσταση Ελληνικών τυριών τυρογάλακτος (Ανυφαντάκης, 2004)

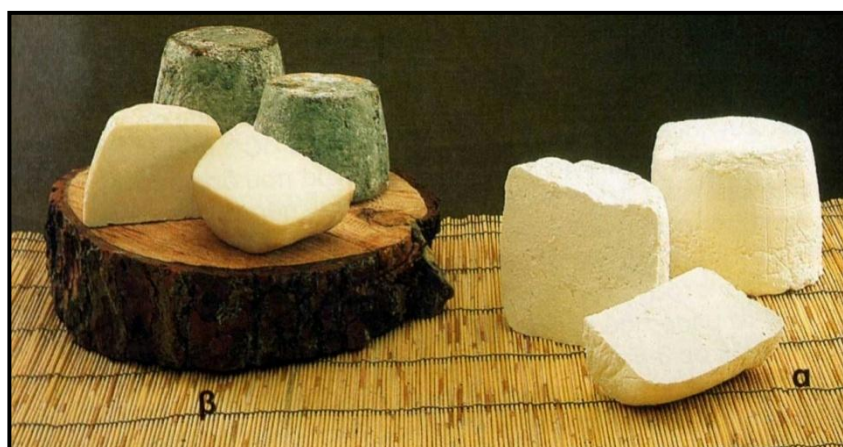
Συστατικά %	Είδη τυριών			
	Μυζήθρα		Ανθότυρο	Μανούρι
	Χωρίς πρόσγαλα	Με πρόσγαλα		
Λίπος	10-12	15-19	20-26	33-37
Πρωτεΐνες	12-14	12-13	10-12	10-11

Λακτόζη	3,5	3,5	3	2,5
Άλατα	1,5	1,5	1,5	1,5
Νερό	70-71	64-66	60-64	48-52

1.4.2 Ανθότυρος

Ο Ανθότυρος (εικόνα 1.5), είναι ένα είδος Μυζήθρας, το οποίο όπως αναφέρεται (Ανυφαντάκης, 1998), αρχικά παρασκευαζόταν μόνο στην Κρήτη από τυρόγαλα Κεφαλοτυριού, που γινόταν αποκλειστικά από πρόβειο και αίγειο γάλα και στο οποίο πάντα πρόσθεταν μια μικρή ποσότητα πρόβειου ή αίγειο γάλακτος. Επειδή το γάλα της περιοχής αυτής είναι πλούσιο σε ολικά στερεά, ιδιαίτερα σε λίπος και το πήγμα για την παρασκευή Κεφαλοτυριού διαιρείται σε μικρά τεμάχια, το τυρόγαλα του είναι ιδιαίτερα πλούσιο σε λιπαρά. Αυτό είχε ως συνέπεια ο Ανθότυρος να έχει περισσότερα λιπαρά σε σχέση με τη Μυζήθρα και πολύ πιο ευχάριστα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Το όνομα Ανθότυρος δόθηκε αρχικά στη ξηρή Μυζήθρα Κρήτης, αλλά σήμερα χρησιμοποιείται και για τη φρέσκια. Η φήμη του Ανθότυρου έχει προ πολλού ξεπεράσει τα όρια του νησιού και εκτιμάται ιδιαίτερα από ένα ευρύ καταναλωτικό κοινό. Όσον αφορά στην τεχνολογία παρασκευής, αυτή δεν διαφέρει από της κοινής Μυζήθρας, εκτός από το είδος του τυρογάλακτος που χρησιμοποιείται, το οποίο είναι πρόβειο ή αίγειο που προέρχεται από την παρασκευή σκληρών τυριών και είναι πλούσιο σε λίπος. Δεν μπορεί να παρασκευασθεί από τυρόγαλα που προέρχεται από μαλακά τυριά, εκτός αν αυτό εμπλουτιστεί με λίπος κατόπιν προσθήκης πλήρους γάλακτος ή κρέμας. Η καλύτερη ποιότητα Ανθότυρου λαμβάνεται από τυρόγαλα με υψηλή λιποπεριεκτικότητα, στο οποίο έχει προστεθεί πλήρες αίγειο γάλα κατά τη διάρκεια της θέρμανσης.

Εικόνα 1.5. Ανθότυρος α: Φρέσκος β: Ξηρός



1.4.3 Μανούρι

Για το μανούρι ο ΚΤΠ αναφέρει:

Η ονομασία «ΜΑΝΟΥΡΙ» (MANOURI) αναγνωρίζεται ως προστατευόμενη ονομασία προέλευσης (Π.Ο.Π.) για το τυρί τυρογάλακτος που παράγεται παραδοσιακά στην Ελλάδα

και συγκεκριμένα στις περιοχές Θεσσαλίας, Κεντρικής και Δυτικής Μακεδονίας, από τυρόγαλα πρόβειου ή αίγειου γάλακτος ή μιγμάτων τους, στο οποίο μπορεί να προστεθεί πρόβειο ή αίγειο γάλα ή κρέμα τους.

Το τυρόγαλα, το πρόσγαλα και η κρέμα που χρησιμοποιούνται για παρασκευή «ΜΑΝΟΥΡΙΟΥ» (MANOURI) πρέπει να πληρούν τις εξής προϋποθέσεις:

α) Η λιποπεριεκτικότητα του τυρογάλακτος πρέπει να είναι τουλάχιστον 2,5% κατά βάρος

β) Η πήξη του γάλακτος από το οποίο προέρχεται το τυρόγαλα πρέπει να γίνεται εντός 48 ωρών από την άμελξη. Το γάλα μέχρι την πήξη διατηρείται σε ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας

γ) Το γάλα από το οποίο προέρχεται το τυρόγαλα, καθώς και το «πρόσγαλα» και η κρέμα πρέπει:

- *Να προέρχονται από φυλές προβάτων και αιγών παραδοσιακά εκτρεφόμενων και προσαρμοσμένων στην περιοχή παρασκευής του «ΜΑΝΟΥΡΙΟΥ» (MANOURI) και η διατροφή τους πρέπει να βασίζεται στη χλωρίδα της περιοχής*
- *Να προέρχονται από αμέλξεις, που γίνονται 10 ημέρες τουλάχιστον μετά τον τοκετό*
- *Να είναι καλής ποιότητας και πλήρες*
- *Να είναι νωπό ή παστεριωμένο*

Τεχνολογία παρασκευής

- ❖ Το τυρόγαλα που προορίζεται για παρασκευή «ΜΑΝΟΥΡΙΟΥ» (MANOURI) υποβάλλεται σε διήθηση ή φυγοκέντρηση για να απομακρυνθούν τυχόν κόκκοι πήγματος και στη συνέχεια εμπλουτίζεται με κρέμα πρόβειου ή αίγειου γάλακτος, ώστε να εξασφαλισθεί λιποπεριεκτικότητα τουλάχιστον 2,5%.
- ❖ Ακολουθεί θέρμανση υπό συνεχή ανάδευση μέχρι τους 88-90⁰ C εντός 40-45' της ώρας. Όταν η θερμοκρασία του τυρογάλακτος φθάσει στους 70 -75⁰ C περίπου, προστίθεται 1% περίπου χλωριούχο νάτριο και πρόβειο ή αίγειο γάλα ή κρέμα τους, σε αναλογία μέχρι 25%.
- ❖ Στους 80⁰ C περίπου, εμφανίζονται οι πρώτες νιφάδες εξαιτίας αλλοδομής των πρωτεϊνών του ορού, οπότε επιβραδύνεται σημαντικά ο ρυθμός ανάδευσης μέχρι πλήρους παύσης. Η θέρμανση εξακολουθεί μέχρι τους 88-90⁰ C. Στη θερμοκρασία αυτή παραμένει το πήγμα για 15-30' της ώρας και στη συνέχεια μεταφέρεται σε υφασμάτινους σάκκους σχήματος κυλίνδρου για στράγγιση. Η στράγγιση διαρκεί 4-5 ώρες.
- ❖ Μετά τη στράγγιση το τυρί μεταφέρεται σε ψυκτικούς θαλάμους συντήρησης, θερμοκρασίας 4-5⁰C, για παραμονή μέχρι τη διάθεσή του.

Χημική σύσταση: Μέγιστη υγρασία: 60%, ελάχιστη λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού: 70%

Τύπος τυριού: Μαλακό τυρί με συμπαγή δομή, Επιδερμίδα: Δεν έχει.

Σχήμα: Συνήθως κυλινδρικό.

Μάζα τυριού: Υφή Συμπαγής μαλακή, χρώματος λευκού, οπές δεν έχει, με ευχάριστη γεύση, γλυκιά με χαρακτηριστικό άρωμα.

1.4.4 Ξινομυζήθρα Κρήτης

Για τη Ξινομυζήθρα Κρήτης ο ΚΤΠ αναφέρει:

Η ονομασία «ΞΥΝΟΜΥΖΗΘΡΑ ΚΡΗΤΗΣ» (XYNOMYZITHRA KRITIS), αναγνωρίζεται ως προστατευόμενη ονομασία προέλευσης (Π.Ο.Π.) για το τυρί τυρογάλακτος που παράγεται παραδοσιακά στην Κρήτη, από γάλα πρόβειο ή αίγειο ή μίγμα αυτών.

Το γάλα το οποίο χρησιμοποιείται για την παρασκευή του τυριού «ΞΥΝΟΜΥΖΗΘΡΑ ΚΡΗΤΗΣ» (XYNOMYZITHRA KRITIS) πρέπει να προέρχεται αποκλειστικά από την περιοχή ΚΡΗΤΗΣ που οριοθετείται από τα διοικητικά όρια των Νομών Χανίων, Ρεθύμνης, Ηρακλείου και Λασιθίου.

Το γάλα από το οποίο προέρχεται το τυρόγαλα για την παρασκευή του τυριού «ΞΥΝΟΜΥΖΗΘΡΑ ΚΡΗΤΗΣ» (XYNOMYZITHRA KRITIS) πρέπει να πληροί της εξής προϋποθέσεις:

α) Να προέρχεται από φυλές αιγών και προβάτων παραδοσιακά εκτρεφόμενων και προσαρμοσμένων στην περιοχή παρασκευής του τυριού αυτού και η διατροφή τους πρέπει να βασίζεται στη χλωρίδα της ίδιας περιοχής.

β) Να προέρχεται από αμέλξεις, που γίνονται 10 ημέρες τουλάχιστον μετά τον τοκετό.

γ) Να είναι καλής ποιότητας, πλήρες νωπό ή παστεριωμένο.

Απαγορεύεται η παρασκευή του τυριού «ΞΥΝΟΜΥΖΗΘΡΑ ΚΡΗΤΗΣ» (XYNOMYZITHRA KRITIS) από τυρόγαλα που προέρχεται από άλλο είδος γάλακτος. Στο προς τυροκόμηση για παρασκευή του τυριού «ΞΥΝΟΜΥΖΗΘΡΑ ΚΡΗΤΗΣ» (XYNOMYZITHRA KRITIS) γάλα και τυρόγαλα απαγορεύεται η συμπίκνωση, η προσθήκη σκόνης ή συμπυκνώματος γάλακτος, πρωτεϊνών γάλακτος, καζεϊνικών αλάτων, χρωστικών, συντηρητικών και αντιβιοτικών ουσιών. Επιτρέπεται η προσθήκη παραδοσιακής πτυιάς ή άλλων ενζύμων με ανάλογη δράση.

Τεχνολογία παρασκευής

- ❖ Το τυρόγαλα που προορίζεται για παρασκευή τυριού «ΞΥΝΟΜΥΖΗΘΡΑ ΚΡΗΤΗΣ» (XYNOMYZITHRA KRITIS) υποβάλλεται σε διήθηση ή φυγοκέντρηση για να απομακρυνθούν τυχόν κόκκοι πήγματος και στη συνέχεια υποβάλλεται σε θέρμανση υπό συνεχή ανάδευση μέχρι τους 92⁰C εντός 30 περίπου λεπτών της ώρας. Όταν η θερμοκρασία του τυρογάλακτος είναι 68-70⁰ C, προστίθεται σε αυτό συνήθως μικρή ποσότητα μέχρι 15% κατά βάρος πλήρους γάλακτος πρόβειο ή αίγειο (πρόσγαλα), προερχόμενου από την περιοχή του άρθρου 1 του ΚΤΠ.
- ❖ Η θέρμανση του τυρογάλακτος γίνεται υπό συνεχή ανάδευση μέχρι τη θερμοκρασία των 80⁰ C οπότε εμφανίζονται νιφάδες πήγματος. Στο σημείο αυτό επιταχύνεται ο ρυθμός θέρμανσης μέχρι τη θερμοκρασία των 92⁰ C, ενώ παράλληλα επιβραδύνεται πολύ ο ρυθμός

ανάδευσης μέχρι πλήρους παύσης. Στις συνθήκες αυτές δημιουργείται ένα παχύ στρώμα πήγματος στην επιφάνεια του θερμού τυρογάλακτος, το οποίο μετά παραμονή σε ακινησία για 30 περίπου λεπτά μεταφέρεται σε καλούπια και στραγγίζει για 3 έως 5 ώρες.

- ❖ Μετά την στράγγιση προστίθεται στο πήγμα 1,5-2,0% αλάτι (βρώσιμο χλωριούχο νάτριο) αναμειγνύεται προσεκτικά για να αποκτήσει ομοιογενή σύσταση, τοποθετείται σε υφασμάτινους σάκους και πιέζεται για μια περίπου εβδομάδα κατά τη διάρκεια της οποίας αυξάνεται η οξύτητά του και αποκτά υπόξινη έως όξινη γεύση. Το πιεσμένο πήγμα τοποθετείται σε βαρέλια με πολύ προσοχή κατά τρόπο ώστε να μην υπάρχουν κενά στη μάζα του και μεταφέρεται σε θαλάμους με θερμοκρασία μικρότερη των 10⁰C, όπου παραμένει για περίοδο δυο τουλάχιστον μηνών να ωριμάσει και στη συνέχεια διατίθεται στο εμπόριο. Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης τα βαρέλια τοποθετούνται ανεστραμμένα στο χώρο ωριμάνσεως με χαλαρά προσαρμοσμένο το κάλυμμα τους, ώστε τυχόν η αποβαλλόμενη υγρασία να μπορεί να απομακρυνθεί.
- ❖ Η παρασκευή και η ωρίμανση του τυριού «ΞΥΝΟΜΥΖΗΘΡΑ ΚΡΗΤΗΣ» (ΧΥΝΟΜΥΖΙΤΗΡΑ ΚΡΙΤΙΣ) πραγματοποιείται σε εγκαταστάσεις που βρίσκονται στην περιοχή που οριοθετείται από τον ΚΤΠ.

Χημική σύσταση: Μέγιστη υγρασία: 55% κατά βάρος και ελάχιστη λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού: 45%

Τύπος τυριού: Μαλακό τυρί με κοκκώδη έως αλοιφώδη υφή. *Επιδερμίδα:* Δεν έχει.

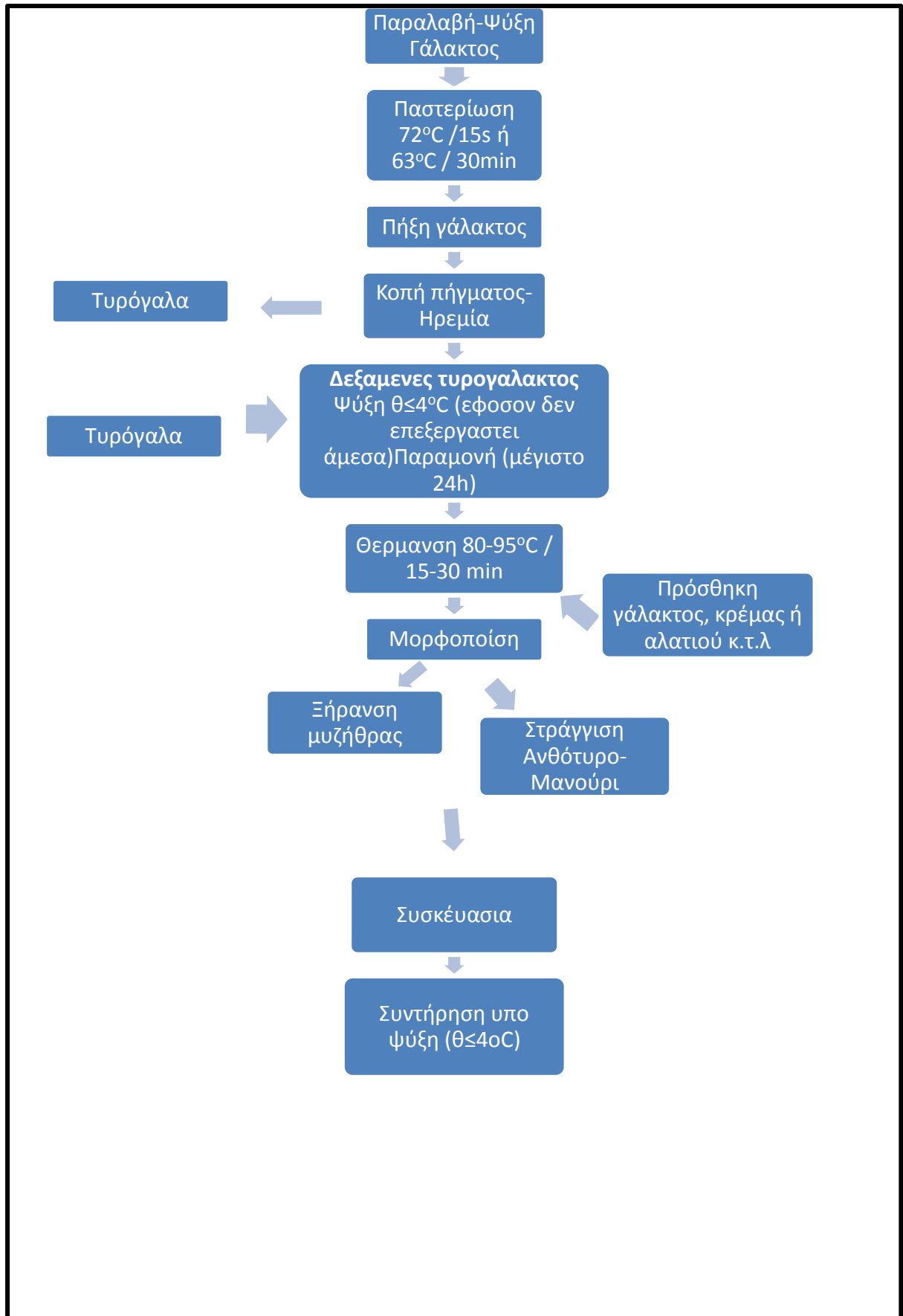
Σχήμα: Άμορφη μάζα

Μάζα τυριού: Υφή μαλακή, κοκκώδης έως αλοιφώδης, χρώματος λευκού ως υπόλευκου, σπές δεν υπάρχουν.

Στον πίνακα 1.7 και το διάγραμμα 1.7, αναφέρονται τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και η τεχνολογία παρασκευής των τυριών τυρογάλακτος (ΕΦΕΤ, 2012).

Πίνακας 1.7. Σύνθεση τυριών τυρογάλακτος και οδηγίες συντήρησης (ΕΦΕΤ, 2012)

Σύνθεση	Αιγοπρόβειο ή αγελαδινό τυρόγαλα, αιγοπρόβειο ή αγελαδινό γάλα ή/και προσθήκη κρέμας, αλάτι		
Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά	Μυζήθρα Ξερή	Ανθότυρος	Μανούρι
Ενέργεια	366 Kcal/100gr	191 Kcal/100gr	374 Kcal/100gr
Πρωτεΐνες	20%	11%	10,50%
Λίπος	30%	19,50%	36%
Υγρασία(μέγιστη)	50%	70%	60%
NaCl (μέγιστο)	1,20%	1,20%	1,40%
Ελάχιστη λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού	70%	70%	70%
Συσκευασία	Ανάλογα με το τύπο τυριού χρησιμοποιείται αεροστεγής συσκευασία των 200g, 1, 1,5, 2 kg		
Συνθήκες Συντήρησης	Διατηρείται σε ψύξη ($\theta \leq 4^{\circ}\text{C}$)		
Συνθήκες Διανομής	Υπό ψύξη ($\theta \leq 4^{\circ}\text{C}$)		
Συνθήκες Χρήσης	Αποτελούν συνοδευτικό γεύματος και μέρος συνταγής		
Χρόνος Ζωής Προϊόντος	ΜΥΖΗΘΡΑ	ΑΝΘΟΤΥΡΟΣ	ΜΑΝΟΥΡΙ
	1 Έτος	30 ημέρες	90 ημέρες

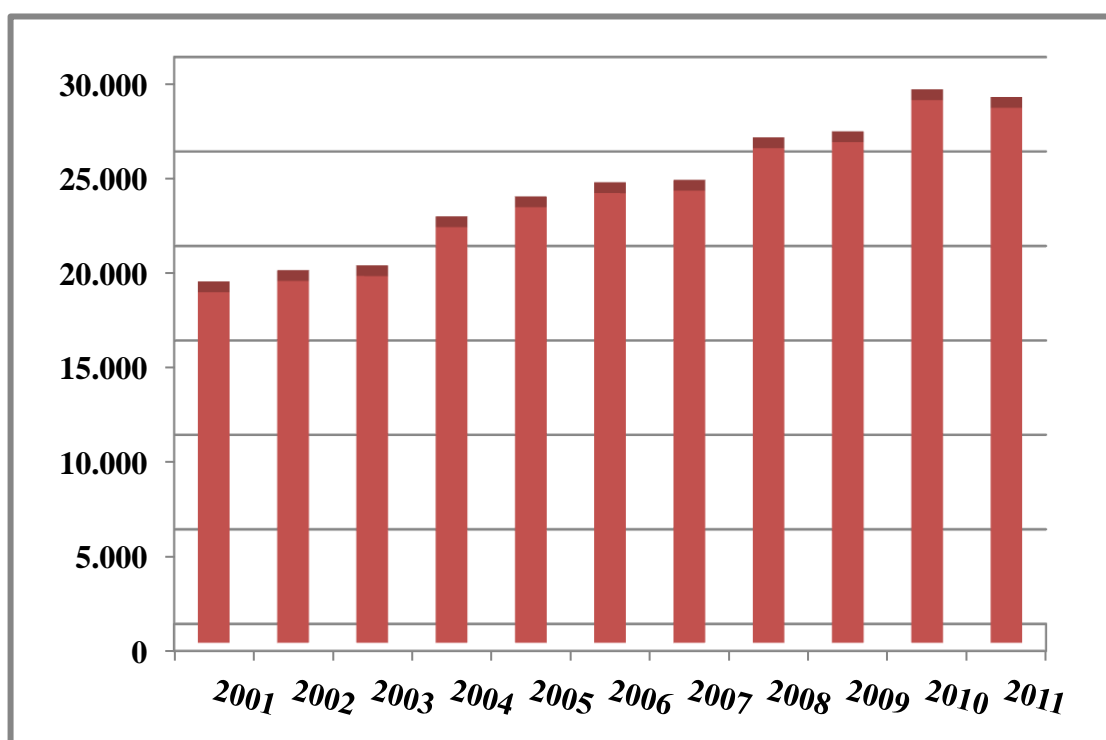


Διάγραμμα 1.5. Παραγωγή τυριών τυρογάλακτος (ΕΦΕΤ, 2012)

1.5 Αγορά τυριών τυρογάλακτος στην Ελλάδα

Το 8μηνο του 2011 η παραγωγή πρόβειου και κατσικίσιου γάλακτος στην Ελλάδα συνολικά, άγγιξε τους 579.187 τόνους (ΕΛΟΓΑΚ). Η συνολικά εγχώρια παραγωγή τυροκομικών προϊόντων παρουσίασε, σε γενικές γραμμές ανοδική πορεία κατά τη περίοδο 1993-2011, με μέσο ετήσιο ρυθμό 2,4%. Η κατηγορία των μαλακών τυριών κατέχει διαχρονικά το μεγαλύτερο μερίδιο στη συνολική παραγωγή τυροκομικών προϊόντων (ICAP, 2012).

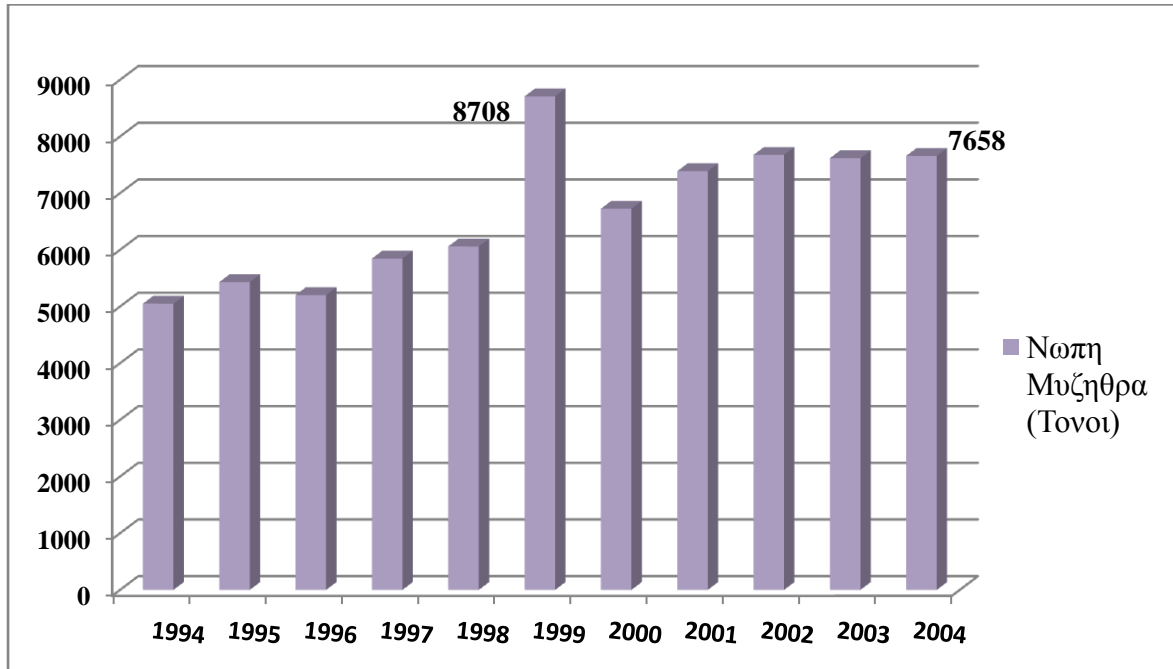
Η κατηγορία των τυριών τυρογάλακτος κατέλαβε μερίδιο παράγωγής 13,5% το 2010 και 13,7% το 2011. Από τις ελληνικές εταιρείες, σημαντικό μερίδιο φαίνεται να καταλαμβάνει η Τυράς Α.Ε (περίπου 10-12%) και η Μεβγάλ Α.Ε (της τάξης του 10%). Η Καράλης Α.Ε απέσπασε ποσοστό της τάξης του 3%. Το μερίδιο της Χώτος Α.Β.Ε.Ε εκτιμάται στο 2% και οι υπόλοιπες βιομηχανίες της περιφέρειας είναι κάτω από το 1,5%. Στο διάγραμμα 1.6 φαίνεται η παραγωγή τυριών τυρογάλακτος τη δεκαετία 2001-2011, η οποία το 2010 έφτασε τους 28.717 τόνους (ICAP, 2012).



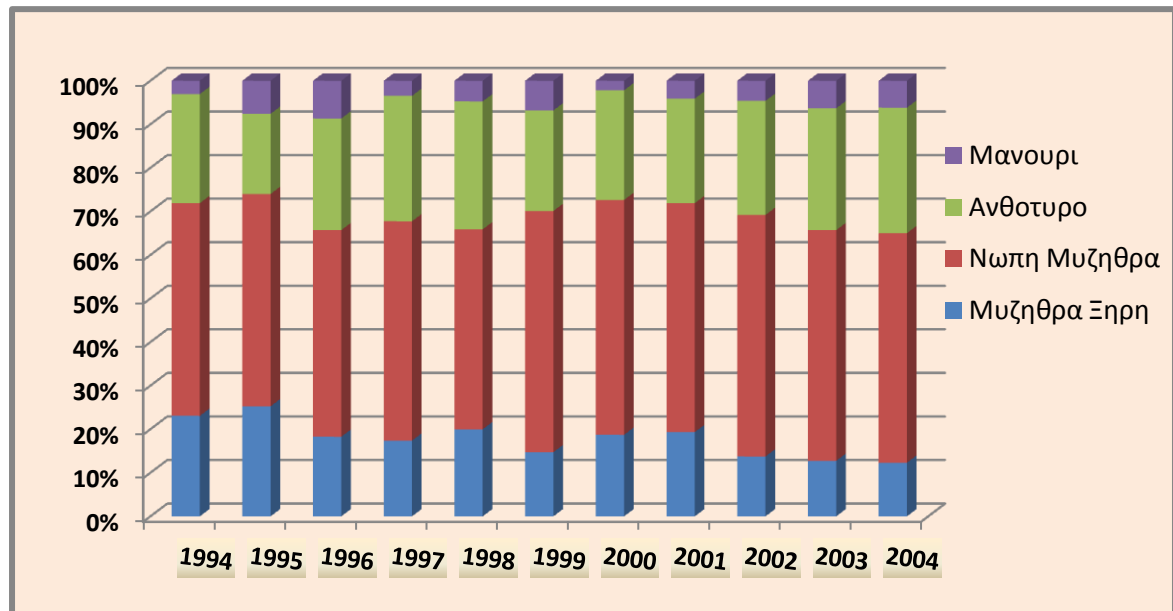
Διαγραμμα 1.6: Παραγωγή Τυριών τυρογάλακτος (Τόνοι)(ICAP, 2012)

Ειδικότερα όσον αφορά την παραγωγή της νωπής μυζήθρας και από τα 3 είδη γάλακτος το 2004 αυτή ήταν 7.658 τόνοι (διάγραμμα 1.7), ενώ της ξηρής ήταν 1.790 τόνοι.

Το μερίδιο συμμετοχής των 4 Ελληνικών τυριών τυρογάλακτος (μανούρι, ανθότυρος, νωπή και ξηρή μυζήθρα) στη συνολική παραγωγή των τυριών τυρογάλακτος απεικονίζεται στο διάγραμμα 1.8.



Διάγραμμα 1.7: Νωπή Μυζήθρα (Τόνοι) (ICAP, 2012)



Διάγραμμα 1.8: Διάρθρωση παραγωγής τυριών τυρογάλακτος στην Ελλάδα (1994-2004) (ICAP, 2012)

Η κατηγορία «φέτα, τελεμές και μαλακά τυριά» καλύπτει το μεγαλύτερο ποσοστό τόσο στην κατανάλωση Ελληνικών τυριών όσο και στο σύνολο της κατανάλωσης (μαζί με τα εισαγόμενα τυριά). Συγκεκριμένα το 2011 κάλυψε το 46,3% της συνολικής εγχώριας κατανάλωσης και το 68,5% της κατανάλωσης των Ελληνικών τυριών. Αντίθετα το ίδιο έτος τα τυριά τυρογάλακτος απέσπασαν μερίδιο 8% στη συνολική κατανάλωση και 11,9% στην κατανάλωση Ελληνικών τυριών. Τα μερίδια της εγχώριας κατανάλωσης για όλες τις κατηγορίες τυροκομικών προϊόντων απεικονίζονται στο διάγραμμα 1.9 (ICAP, 2012).

Διαγραμμα 1.9: Ανάλυση εγχώριας κατανάλωσης τυροκομικών προϊόντων ανά κύρια κατηγορία (2011)



Το 2011, η κατά κεφαλή κατανάλωση τυροκομικών στην Ελλάδα έφτασε, τα 32,65kg/άτομο, καταγράφοντας μια αξιοσημείωτη ανοδική πορεία, αφού το 1995 ήταν 23,27kg/άτομο. Το ίδιο έτος η αντίστοιχη κατανάλωση για τα Ελληνικά τυριά τυρογάλακτος ήταν 2,63kg/άτομο. Η κατά κεφαλή κατανάλωση των Ελληνικών τυριών τυρογάλακτος την τελευταία δεκαετία φαίνεται στο διάγραμμα 1.10

Διαγραμμα 1.10: Κατά κεφαλή κατανάλωση τυριών τυρογάλακτος στην Ελλάδα



Παράδοξο είναι ότι στον Ελλαδικό χώρο παρόλο που η παραγωγή τυρογάλακτος έχει αυξηθεί και έχει αναπτύξει θετικό ισοζύγιο εξαγωγών (διάγραμμα 1.3, παρ. 1.1.2) οι εισαγωγές τυριών τυρογάλακτος κατέχουν ακόμη σημαντικό μερίδιο ακόμη. Στο πίνακα

1.8 απεικονίζονται οι εισαγωγές και στο πίνακα 1.9 οι εξαγωγές των τυριών τυρογάλακτος μαζί με την αξία αγοράς και πώλησης τη πενταετία (2007-2011) (ICAP, 2011).

Πίνακας 1.8 Τυριά τυρογάλακτος (εισαγωγές)

Έτος	Τυριά τυρογάλακτος (εισαγωγές)	
	2007	Αξία
Ποσότητα		6.797
2008	Αξία	24.357.163
	Ποσότητα	8.048
2009	Αξία	20.796.952
	Ποσότητα	8.186
2010	Αξία	18.406.217
	Ποσότητα	7.946
2011	Αξία	21.026.201
	Ποσότητα	8.265

Ποσότητα: σε τόνους

Αξία: σε €

Πίνακας 1.9 Τυριά τυρογάλακτος (εξαγωγές)

Έτος	Τυριά τυρογάλακτος (εξαγωγές, κυρίως ανθότυρο και μυζήθρα)	
	2007	Αξία
Ποσότητα		482
2008	Αξία	1.719.216
	Ποσότητα	407
2009	Αξία	2.030.320
	Ποσότητα	474
2010	Αξία	2.048.572
	Ποσότητα	560
2011	Αξία	1.910.430
	Ποσότητα	569

Ποσότητα: σε τόνους

Αξία: σε €

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ- ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η παραγωγή διαφόρων τύπων Μυζήθρας με χαμηλά λιπαρά και η συγκριτική μελέτη τους με προϊόντα του εμπορίου. Η μυζήθρα με 10% άπαχο πρόσγαλα, απετέλεσε νέο προϊόν και μπορεί να χαρακτηριστεί τυρί μειωμένων λιπαρών με βάση την ελληνική νομοθεσία. Πραγματοποιήθηκαν φυσικοχημικές, μικροβιολογικές, ρεολογικές αναλύσεις και έγινε οργανοληπτική αξιολόγηση των τυριών. Στη συνέχεια έγινε συγκριτική μελέτη των πειραματικών Μυζηθρών. Επιπλέον αναλύθηκαν και συναφή προϊόντα εμπορίου από διάφορους παραγωγούς με στόχο να συγκριθούν με τα τυριά που παρασκευάστηκαν.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.0 Πειραματικός Σχεδιασμός-Δειγματοληψία

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν κατά το χρονικό διάστημα Μάιος-Ιούνιος 2012.

Το γάλα που χρησιμοποιήθηκε στις τυροκομήσεις ήταν πρόβειο γάλα από πρόβατα Καραγκούνικης φυλής του Κτηνοτροφείου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Συνολικά έγιναν 9 τυροκομήσεις για παραγωγή του τυριού Χαλούμι, στο Τυροκομείο του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Από το τυρόγαλα που παρελήφθη παρασκευάστηκαν οι μυζήθρες του πειράματος.

Πραγματοποιήθηκαν 3 επεμβάσεις, για κάθε μια από τις οποίες έγιναν 3 επαναλήψεις. Οι επεμβάσεις αντιστοιχούσαν σε μυζήθρα χωρίς την προσθήκη προσγάλακτος (ΜΧΠ), μυζήθρα με άπαχο πρόσγαλα 10% (ΜΑΠ) και με πλήρες πρόσγαλα 10% (ΜΠΠ).

Τα δείγματα του εμπορίου (συνολικά 4) που αναλύθηκαν προέρχονταν από διαφορετικούς παραγωγούς.

Στο πρόσγαλα και το τυρόγαλα προσδιορίστηκε η φυσικοχημική σύσταση. Σε όλα τα τυριά μετά την παρασκευή τους (φρέσκα τυριά 1^ης ημέρας) προσδιορίστηκαν τα μικροβιολογικά, φυσικοχημικά και ρεολογικά τους χαρακτηριστικά και έγινε οργανοληπτικός έλεγχος.

2.1. Παρασκευή της μυζήθρας

Πρώτες ύλες για την παρασκευή της Μυζήθρας

- **Τυρόγαλα**

Για την παρασκευή των μυζηθρών του πειράματος χρησιμοποιήθηκε το τυρόγαλα που παραλήφθηκε μετά την τυροκόμηση Χαλουμιού (εικόνα 2.1).



Εικόνα 2.1. Παραλαβή τυρογάλακτος

- **Πρόσγαλα**

Το πρόσγαλα που προστέθηκε στο τυρόγαλα για την παρασκευή των μυζηθρών ΜΑΠ και ΜΠΠ ήταν πρόβειο γάλα πρωινής άμελξης από το κτηνοτροφείο του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Για την παρασκευή της μυζήθρας ΜΠΠ χρησιμοποιήθηκε ως είχε (πλήρες πρόσγαλα), ενώ για την παρασκευή της μυζήθρας ΜΑΠ αποκορυφώθηκε πρώτα σε κορυφολόγο (άπαχο πρόσγαλα).

Τεχνολογία παρασκευής της Μυζήθρας

- Τοποθέτηση του τυρογάλακτος (65kg) στον τυρολέβητα, όπου ξεκινούσε η θέρμανσή του με ήπια ανάδευση (εικόνα 2.2). Για την παρασκευή των μυζηθρών ΜΑΠ και ΜΠΠ στους 72°C περίπου γινόταν προσθήκη προσγάλακτος 10% (6,5kg). Στους 80-82°C εμφανίζονταν τα πρώτα πήγματα του τυριού, οπότε σταματούσε ο ρυθμός

ανάδευσης για να διευκολυνθεί η συγκέντρωσή τους στην επιφάνεια. Η θέρμανση συνεχιζόταν έως στους 90°C για μισή ώρα.



Εικόνα 2.2. Τοποθέτηση τυρογάλακτος

- Εξαγωγή της Μυζήθρας με τη βοήθεια διάτρητης μεταλλικής κουτάλας και τοποθέτησή της σε τυρόπανα για 3 ώρες για στράγγισμα στους $25 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ (εικόνα 2.3).



Εικόνα 2.3. Εξαγωγή μυζήθρας σε τυρόπανα

- Μετά τη στράγγιση, γινόταν η τοποθέτηση των τυριών της Μυζήθρας (κεφάλια) (εικόνα 2.4) στο ψυγείο στους 4°C
- Την επομένη ημέρα από την παρασκευή των τυριών, ένα κεφάλι Μυζήθρας~1Kg (εικόνα 2.4) επιλεγόταν για την πραγματοποίηση των αναλύσεων



Εικόνα 2.4. Μυζήθρα

Αναλύσεις

Τα τυριά Μυζήθρας (κεφάλια) του πειράματος είτε τα τυριά Μυζήθρας του εμπορίου τεμαχίζονταν. Ένα κομμάτι χρησιμοποιούταν για τις μικροβιολογικές αναλύσεις και ένα κομμάτι για τις φυσικοχημικές αναλύσεις (προσδιορισμός υγρασίας-ξηράς ουσίας, λίπους, τέφρας, οξύτητας και pH). Το υπόλοιπο τυρί τοποθετούταν σε μικρές συσκευασίες και παρέμενε στη κατάψυξη για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών, της λακτόζης και των αρωματικών συστατικών.

Οι αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στα τυριά μυζηθρών του πειράματος και του εμπορίου ήταν:

2.2 Φυσικοχημικές αναλύσεις

- **Προσδιορισμός της λιποπεριεκτικότητας**

Ο προσδιορισμός του λίπους πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο Gerber-Van Gulik (IDF 222:2008). Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην αρχή ότι όταν θειικό οξύ ορισμένης πυκνότητας (ειδικό βάρος 1,53 στους 15°C) προστεθεί στο τυρί τότε διαλύονται τα συστατικά του πλην του λίπους, εκλύεται θερμότητα η οποία ρευστοποιεί το τελευταίο, που παραμένει αιωρούμενο μέσα στο οξύ, από το οποίο διαχωρίζεται με φυγοκέντρωση. Ο διαχωρισμός του λίπους υποβοηθείται με την προσθήκη μικρής ποσότητας αμυλικής αλκοόλης (ειδικού βάρους 0,815 στους 15°C). Η λιποπεριεκτικότητα εκφράζεται επί τοις εκατό (%) κατά βάρος.

- **Προσδιορισμός της ξηράς ουσίας/υγρασίας**

Ο προσδιορισμός της υγρασίας πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της αποξήρανσης σε κλίβανο στους 102° C μέχρι σταθερού βάρους (IDF 4: 1982).

- **Προσδιορισμός της τέφρας**

Κατά την καύση του τυριού καταστρέφεται η οργανική του ουσία και λαμβάνεται το καθαρά ανόργανο μέρος του, η τέφρα, που κατά κύριο λόγο περιέχει οξείδια καλίου, νατρίου, ασβεστίου, μαγνησίου, χλωρίου, φωσφόρου, θείου και άνθρακα. Ο προσδιορισμός της τέφρας πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο IDF 27:1964. Μετά την αποτέφρωση η τέφρα συλλέχθηκε σε φιαλίδια για τον προσδιορισμό των μεταλλικών στοιχείων Ca, K, Na, Mg με φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης.

- **Προσδιορισμός των ολικών πρωτεϊνών**

Υπολογίστηκε η περιεκτικότητα σε ολικό άζωτο με τη μέθοδο Kjeldahl, (IDF 20B:1993) και έγινε μετατροπή του αζώτου σε πρωτεΐνη, πολλαπλασιάζοντας το άζωτο με το συντελεστή 6,38.

- **Προσδιορισμός υδατοδιαλυτού αζώτου (Water Soluble Nitrogen, WSN)**

Η ανάλυση έγινε σύμφωνα με τους Butikofer & Ruegg, (1993, εργαστηριακός οδηγός Flair/Sens Cost 902). Σε 25g δείγματος προστεθήκαν 100ml απιονισμένου νερού και ομογενοποιήθηκαν σε Stomacher για 5 λεπτά στη μεσαία ταχύτητα. Ακολούθησε επώαση σε υδατόλουτρο στους 40°C για 1 ώρα. Τα δείγματα στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στις 3000rpm , στους 4°C για 30min. Τα ιζήματα διατηρήθηκαν για την ανάλυση με ηλεκτροφόρηση. Τα υπερκείμενα διηθήθηκαν από φίλτρο Whatman No 41 και επειδή ήταν θολά έγινε εκ νέου διήθηση από φίλτρο 0,45μm. 25ml από κάθε διήθημα αναλύθηκαν για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε υδατοδιαλυτό άζωτο με τη μέθοδο Kjeldahl, (IDF 20B:1993). Αναλυτικά η μέθοδος περιελάμβανε τα ακόλουθα στάδια:\

- Προσθήκη 25ml από κάθε διήθημα στους σωλήνες καύσης. Παράλληλα με τα διηθήματα προετοιμάστηκαν και 2 'λευκά' που αντί διήθημα περιείχαν 0,85g σουκρόζη και 5ml H₂O
- Προσθήκη καταλυτών
- Προσθήκη 20ml H₂SO₄
- Προσθήκη 2-3 σταγόνων αντιαφριστικού
- Προσθήκη 5ml H₂O₂
- Ήπια ανάδευση και τοποθέτηση στις θέσεις καύσης (Tecator 2020, Digestor) (εικόνα 2.5)



Εικόνα 2.5. Συσκευή καύσης Kjeldahl

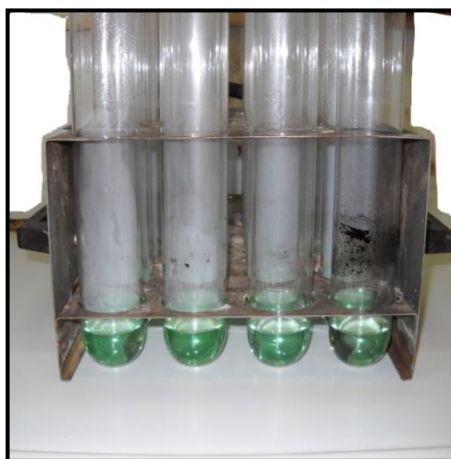
Το πρόγραμμα καύσης φαίνεται στο πίνακα 2.3.

Πίνακας 2.3. Πρόγραμμα καύσης WSN

°C	min
100	30
200	30
220	15
240	15
260	15
280	15
300	15
380	15
410	50

Η καύση θεωρήθηκε επιτυχής όταν τα δείγματα είχαν αποκτήσει ένα διαυγές πρασινωπό χρώμα (εικόνα 2.6)

- Ακολούθησε η απόσταξη στη συσκευή UDK 142, Automatic Distillation Unit, Velp Scientifica (εικόνα 2.7).



Εικόνα 2.6. Δείγματα μετά τη καύση



Εικόνα 2.7. Συσκευή Απόσταξης

- **Προσδιορισμός της οξύτητας**

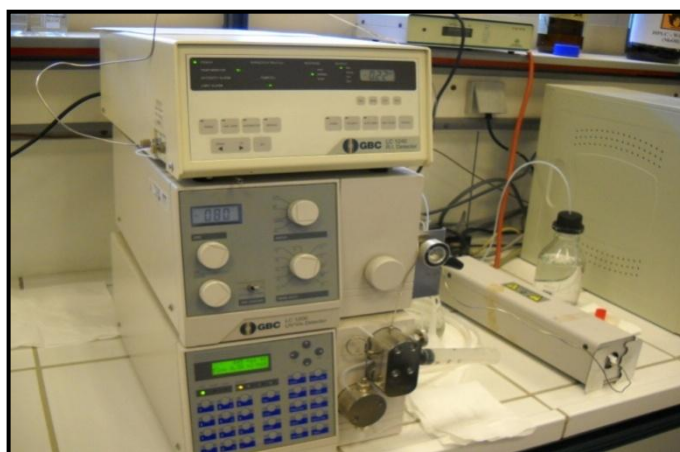
Ο προσδιορισμός της οξύτητας έγινε με την κλασσική μέθοδο τιτλοδότησης (Ανυφαντάκης, 1992). Η μέθοδος βασίζεται στην εξουδετέρωση των οξέων του τυριού με διάλυμα καυστικού νατρίου γνωστής κανονικότητας (0,1N). Η οξύτητα εκφράζεται σε γαλακτικό οξύ %.

- **Προσδιορισμός του pH**

Το pH των τυριών μετρήθηκε με pHμετρο 632, Metrohm.

- **Ανάλυση σακχάρων και οργανικών οξέων**

Ο προσδιορισμός των οργανικών οξέων και των σακχάρων των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με σύστημα HPLC, GBC (Scientific Equipment, Dandenong, Victoria, Australia) με αντλία GBC, LC 1150 και ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (RI) GBC, LC 1240. Ο διαχωρισμός έγινε σε στήλη Aminex HPX-87H cation exchange 300 mm x 7.8 mm, (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) (εικόνα 2.8).



Εικόνα 2.8. Συσκευή HPLC για την ανάλυση σακχάρων

Η προετοιμασία του δείγματος για ανάλυση στο χρωματογράφο έγινε ως εξής: Ζυγίστηκαν 10g τυριού, διαλύθηκαν με νερό (~35°C) και μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 100ml. Στη φιάλη προστέθηκαν 40 ml βολφραμικού οξέος και συμπληρώθηκε ο όγκος με νερό μέχρι τα 100ml. Η φιάλη ανακινήθηκε και αφέθηκε για λίγο σε ηρεμία. Ακολούθησε διήθηση σε φίλτρο Whatman No 40. Στο διήθημα (1ml) προστέθηκε 70% HClO₄ (υπερχλωρικό οξύ) (100μl) και το διάλυμα παρέμεινε για 24h στο ψυγείο. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 12500rpm για 60min στους 4°C σε συσκευή Heraeus Sepatech, Biofuge 22R. Η υπερκείμενη φάση διηθήθηκε από φίλτρο πορώδους 0,22μm. Η ανάλυση με την HPLC έγινε στο διήθημα.

Ο όγκος του διηθήματος που ενέθηκε στη στήλη ήταν 20μl. Η έκλουση έγινε ισοκρατικά με κινητή φάση 5mM H₂SO₄ υπό σταθερή θερμοκρασία 35°C και με ταχύτητα ροής 0,5ml/min. Ο χρόνος ανάλυσης ήταν 30min. Ο ποσοτικός προσδιορισμός

πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς, που έγινε για κάθε ουσία ξεχωριστά με τη χρήση πρότυπων διαλυμάτων (standards).

- **Προσδιορισμός των ανοργάνων στοιχείων Ca, K, Na, Mg**

Ο προσδιορισμός των ανοργάνων στοιχείων έγινε με φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης με φλόγα, μίγματος C_2H_2 /αέρα με χρήση του οργάνου Shimadzu/AA-6800, εφοδιασμένου με αυτόματο δειγματολήπτη Shimadzu/ASC-6100, σύμφωνα με το πρότυπο (IDF 119:2007) (εικόνα 2.9). Η απορρόφηση των Ca, Mg, K, Na πραγματοποιήθηκε σε μήκη κύματος 422,7nm, 285,2nm, 766,5nm και 589nm αντίστοιχα.



Εικόνα 2.9. Συσκευή μέτρησης ανόργανων στοιχείων

Το δείγμα για την ανάλυση προέκυψε από πυκνό διάλυμα της τέφρας των μυζηθρών, το οποίο στη συνέχεια αραιώθηκε κατάλληλα.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των στοιχείων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς που έγινε για κάθε στοιχείο ξεχωριστά με τη χρήση πρότυπων διαλυμάτων (standards).

2.3 Μικροβιολογικές αναλύσεις

- **Μέτρηση της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX):** πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της ενσωμάτωσης, σε θρεπτικό υπόστρωμα PCA και επώαση στους 30°C για 72 h (IDF 100B:1991).

- **Μέτρηση του πληθυσμού των κολοβακτηριοειδών (Coliforms):** πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της ενσωμάτωσης σε θρεπτικό υπόστρωμα VRBA και επώασή στους 37°C για 24 h (IDF 73A:1985).

- **Μέτρηση του πληθυσμού των ζυμών-μυκήτων:** πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της ενσωμάτωσης σε θρεπτικό υπόστρωμα YGC και επώασή στους 25°C για 5 ημέρες (IDF 94B:1991).

2.4 Ρεολογικές αναλύσεις

Η μέτρηση των παραμέτρων έγινε με το όργανο Shimadzu AGS-500NG (Shimadzu Corporation, Japan).

Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε στηρίζεται στη συμπίεση του δείγματος του τυριού με ένα έμβολο, σε δύο κύκλους (δαγκωματιές) (Tensile and Compression Cycle Test). Η δύναμη που ασκείται από το έμβολο στο δείγμα προκαλεί το τυπικό διάγραμμα συμπίεσης (compression curve). Ο υπολογισμός των ρεολογικών χαρακτηριστικών του δείγματος έγινε με βάση την ανάλυση του διαγράμματος δύναμης-παραμόρφωσης.

Υπολογισμός των ρεολογικών χαρακτηριστικών

Από το διάγραμμα συμπίεσης του δείγματος υπολογίστηκαν τα εξής ρεολογικά χαρακτηριστικά:

1.Σκληρότητα: Η απαιτούμενη δύναμη για να συμπιεστεί ένα τρόφιμο μεταξύ των γομφίων του στόματος. (Hardness) (H) (η μέγιστη κορυφή κατά την πρώτη συμπίεση του δείγματος) (N)

2.Συνάφεια ή Προσκολλησιμότητα: Η ενέργεια που απαιτείται για να αποκολληθεί ένα τρόφιμο από μια επιφάνεια. (Adhesiveness) (A_3) (το εμβαδόν της πρώτης αποσυμπίεσης) (N·mm)

3.Ελαστικότητα: Το πόσο ένα συμπιεσμένο τρόφιμο επανέρχεται στην αρχική του κατάσταση, όταν πάψει να υφίσταται το φορτίο. (Elasticity) (L_2/L_1)

4.Συνεκτικότητα: Η δύναμη των δεσμών που συγκρατούν ένα τρόφιμο. (Cohesiveness) A_2/A_1 (ο λόγος του εμβαδού της δεύτερης συμπίεσης προς το εμβαδόν της πρώτης συμπίεσης)

5.Πολτοποιητικότητα ή Κομμώδες: Η ενέργεια που απαιτείται για να διασπαστεί-αποσυντεθεί ένα τρόφιμο, μέχρι να είναι έτοιμο για κατάποση. (Gumminess) $=[H \cdot (A_2/A_1)]$ (το γινόμενο της σκληρότητας επί τη συνεκτικότητα) (N)

6.Μασητικότητα: Η ενέργεια που απαιτείται για να μασηθεί ένα τρόφιμο, μέχρι να είναι έτοιμο για κατάποση. (Chewiness) $H \cdot (A_2/A_1) \cdot (L_2/L_1)$ (το γινόμενο του κομμώδους επί την ελαστικότητα) (N).

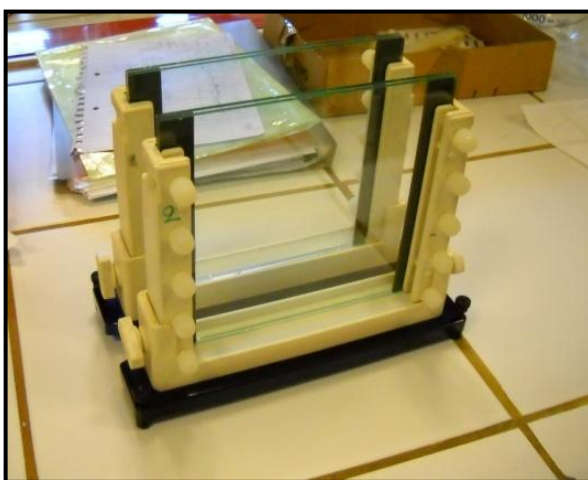
2.5 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης βασίζεται στη δυνατότητα μετακίνησης φορτισμένων μορίων μέσα σε ηλεκτρικά πεδία. Προσφέρει ένα αναλυτικό τρόπο για να διαχωριστούν πρωτεΐνες και άλλα μακρομόρια

Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός γίνεται σε πηκτή. Ένα κλασσικό σύστημα ηλεκτροφόρησης περιλαμβάνει πηκτή, που αποτελείται από δύο ζώνες. Στην κατώτερη ζώνη η πηκτή έχει συγκέντρωση μονομερούς ακρυλαμιδίου και υψηλότερο pH (pH 8,9), και ονομάζεται διαχωριστική πηκτή (separation gel). Στην ανώτερη ζώνη η πηκτή έχει χαμηλότερη συγκέντρωση μονομερούς ακρυλαμιδίου και χαμηλότερο pH (pH 6,9-7,6) και ονομάζεται συγκεντρωτική πηκτή (stacking gel). Τα δείγματα εισάγονται στις θέσεις υποδοχής της πηκτής, στο ανώτερο σημείο του συστήματος, το οποίο βρίσκεται μεταξύ δύο ηλεκτροδίων, τα οποία είναι βυθισμένα σε ρυθμιστικό διάλυμα tris- γλυκίνης με $\text{pH} \approx 8.3$. Μέσω των ηλεκτροδίων εφαρμόζεται διαφορά δυναμικού, με αποτέλεσμα μέσω της πηκτής να διέρχεται ηλεκτρικό ρεύμα.

✚ Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (PAGE) υπό φυσιολογικές συνθήκες (NATIVE PAGE)

Έγινε ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών (NATIVE PAGE) σύμφωνα με τους Kaminarides *et al.*, (1995) για τα δείγματα των μυζηθρών και του εμπορίου σε συσκευή ηλεκτροφόρησης διαστάσεων 18x14 cm με δυνατότητα παρασκευής πηκτής πάχους 2,7mm (εικόνα 2.11).



Εικόνα 2.11. Συσκευή ηλεκτροφόρησης

Συγκεκριμένα τα buffer και οι πηκτές για την ηλεκτροφόρηση παρασκευάστηκαν ως εξής:

- **Buffer Συσκευής:** Ρυθμιστικό διάλυμα που αποτελείται από 0,05M Tris και 0,38M γλυκίνη, με $\text{pH} \approx 8,3$, τελικού όγκου 6lt το οποίο διηθήθηκε από φίλτρα γρήγορης
- **Διάλυμα συγκεντρωτικής πηκτής (stacking gel):** Η συγκεντρωτική πηκτή χαρακτηρίζεται από ολική συγκέντρωση ακρυλαμιδίου 4%, Tris-HCl 0,125M, ουρία 4,5M, υπερθειικό αμμώνιο (APS) 0,15% και N,N,N,N-τετραμεθυλαιθύλενο διαμίνη (TEMED) 0,1%, με τελικό pH 6,8, (ρύθμιση με πυκνό HCl). Το διάλυμα διηθείται από φίλτρο γρήγορης ροής και απαερώνεται με υπερήχους για 5min. Πριν τη

παρασκευή της συγκεντρωτικής πηκτής, προστεθήκαν 0,6ml APS (10%) σε 40ml της πηκτής για το πολυμερισμό της, που διήρκησε 5-10min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος

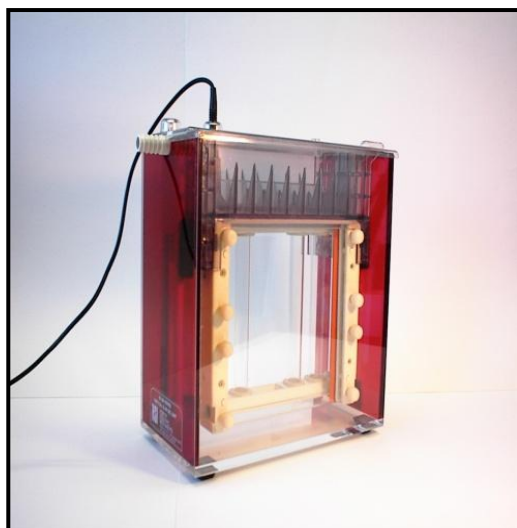
- **Διάλυμα διαχωριστικής πηκτής (separation gel):** Η διαχωριστική πηκτή χαρακτηρίζεται από ολική συγκέντρωση ακρυλαμιδίου 7%, Tris-HCl 0,75M, ουρία 4,5M, APS 0,10% και TEMED 0,05% με τελικό pH 8,9 (ρύθμιση με πυκνό HCl 1N) Το διάλυμα διηθείται από φίλτρο γρήγορης ροής και απαερώνεται με υπερήχους για 5min. Πριν τη παρασκευή του separation gel, προστεθήκαν 0,6ml APS (10%) σε 60ml της πηκτής για το πολυμερισμό της, που διήρκησε 5-10min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος
- **Διάλυμα χρώσης:** Η χρώση της πηκτής έγινε με διάλυμα 0.1% Coomassie Blue R 250 (διάλυση 1g Coomassie Blue R 250 σε διάλυμα 40% αιθανόλης + 10% οξικού οξέος + 50% απεσταγμένου νερού)
- **Διάλυμα απόχρωσης:** Η απόχρωση της πηκτής έγινε με διάλυμα πυκνού οξικού οξέως 10%
- **Τεχνική παρασκευής της πηκτής:** Για κάθε πηκτή χρησιμοποιήθηκε 60 ml διαχωριστικής και 40ml συγκεντρωτικής πηκτής. Το γέμισμα των καλουπιών έγινε με πολλή προσοχή, ώστε να αποφευχθεί η εισαγωγή αέρα στα gel. Για να στεγανοποιηθεί η συσκευή και να μην υπάρχει αποβολή του gel πριν το πολυμερισμό, προστέθηκε μικρή ποσότητα άγαρ περιμετρικά των πλακών. Όταν συμπληρωνόταν η συγκεντρωτική πηκτή, οι πλάκες πληρώθηκαν μέχρι 0,5cm από το άνω μέρος τους και κατόπιν τοποθετήθηκε η κτένα για τη δημιουργία των θέσεων των δειγμάτων. Το γέμισμα των πλακών με το διάλυμα της διαχωριστικής πηκτής ήταν 4,5cm από το άνω μέρος των καλουπιών. Μόλις τελείωσε ο πολυμερισμός οι πλάκες και το buffer συσκευής μεταφερθήκαν στους 4°C. Η ηλεκτροφόρηση έγινε την επόμενη μέρα από τη παρασκευή των πηκτών, οπότε και απομακρύνθηκε η φόρμα ενώ μετά εκπλύθησαν οι σχηματισμένες θέσεις με αποσταγμένο νερό.

Προετοιμασία δειγμάτων

- Ζυγίστηκαν 0,25g δείγματος και προστέθηκαν σε αυτό 10ml ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl με pH 8,9 και 8M ουρίας (23g Tris, 2ml HCl, 240g ουρίας, 1,5ml 2-ME (2-Μερκαπτοαιθανόλη), για τη παρασκευή 500ml διαλύματος)
- Έγινε λειοτρίβιση του τυριού
- Ακολούθησε φυγοκέντρηση του λιωμένου δείγματος σε κωνικούς σωλήνες φυγοκέντρησης των 10ml, στις 10000rpm στους 4°C για 30min
- Στη συνέχεια το υπερκείμενο από κάθε δείγμα συλλέχθηκε για την εισαγωγή του στις θέσεις της πηκτής

Διαδικασία ηλεκτροφόρησης

- Χρησιμοποιήθηκε η συσκευή κατακόρυφης ηλεκτροφόρησης (SE 600 series, Electrophoresis Unit, U.S Patent 4, 224, 134, εικόνα 2.12), χωρητικότητας 5lt, που αποτελούνταν από 2 διαμερίσματα που επικοινωνούν μεταξύ τους μέσω της πηκτής, στα οποία τοποθετήθηκε το buffer συσκευής.
- Η συσκευή συνδέθηκε σε τροφοδοτικό συνεχούς ρεύματος (Electrophoresis Supply Unit EPS 500/400, Pharmacia, εικόνα 2.13) με το οποίο ρυθμίστηκαν οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης
- Μεταφέρθηκαν οι πλάκες στην συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία είχε πληρωθεί από το buffer της συσκευής. Έγινε προηλεκτροφόρηση για 50min περίπου, στους 4°C με τάση σταθερή στα 70V και ένταση ρεύματος 60mA (πραγματική ένταση 26-23mA).



Εικόνα 2.12. Συσκευή ηλεκτροφόρησης



Εικόνα 2.13. Τροφοδοτικό

- Κατόπιν έγινε ο εμβολιασμός κάθε πηκτής με τοποθέτηση 20μl δείγματος σε κάθε θέση υποδοχής
- Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων έγινε στους 4°C για 4-5 h, σε 450V (πραγματικά 230-260) και σταθερή ένταση ρεύματος 90mA
- Για το προσδιορισμό του τέλους του χρόνου της ηλεκτροφόρησης εμβολιάστηκε στη θέση 1 κάθε πλάκας, 6μl διαλύματος 0,05% δείκτη «μπλε της βρωμοφαινόλης» και θεωρήθηκε ότι τελείωσε η ηλεκτροφόρηση όταν ο δείκτης απείχε 1cm από το κάτω μέρος των πλακών
- Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης τοποθετήθηκαν οι πηκτές στο διάλυμα χρώσης για 20min, υπό συνεχή κίνηση για καλύτερη χρώση
- Ακολούθησε αποχρωματισμός στο διάλυμα οξικού οξέος 10%, το οποίο και ανανεώθηκε 2-3 φορές

- Την επόμενη μέρα έγινε ανανέωση του οξικού οξέος και έγινε σαρωσή της

✚ Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (PAGE) παρουσία Sodium dodecyl sulphate (SDS) (SDS-PAGE)

Έγινε ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών κατά Laemmli, (1970) με κάποιες τροποποιήσεις, στην ίδια συσκευή που έγινε και η ηλεκτροφόρηση της NATIVE PAGE.

Παρασκευάστηκαν:

- **Buffer Συσκευής:** Ρυθμιστικό διάλυμα που αποτελείται από 0,025M Tris 1,92M γλυκίνη και 1% δωδεκυλοθειϊκού νατρίου (SDS) με pH≈8,1-8,3, τελικού όγκου 6lt, το οποίο διηθήθηκε από φίλτρα γρήγορης ροής
- **Buffer διαχωριστικής πηκτής:** Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 1,5M που περιείχε 0,4% SDS, τελικού pH 8,8
- **Διάλυμα διαχωριστικής πηκτής (separation gel):** Με 12% ακρυλαμίδιο. Για τη παρασκευή 100ml πηκτής χρησιμοποιήθηκαν 25ml Buffer διαχωριστικής πηκτής, 40ml 30% ακρυλαμιδίου/δισακρυλαμιδίου (29:1) και απεσταγμένο νερό. Έγινε απαέρωση του διαλύματος με υπερήχους για 5min. Πριν από τη παρασκευή του separation gel, προστεθήκαν σε 50ml της πηκτής, για το πολυμερισμό της, 0,5ml APS (10%) και 50μl TEMED
- **Buffer συγκεντρωτικής πηκτής:** Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 0,5M και 0,4% SDS τελικού pH 6,8
- **Διάλυμα συγκεντρωτικής πηκτής (concentration gel):** με 5% ακρυλαμίδιο. Για τη παρασκευή 100ml χρησιμοποιήθηκαν, 25ml Buffer συγκεντρωτικής πηκτής, 16,67ml 30% ακρυλαμιδίου/δισακρυλαμιδίου (29:1) και απεσταγμένο νερό Έγινε απαέρωση του διαλύματος με υπερήχους για 5 λεπτά. Πριν από τη παρασκευή του separation gel, προστεθήκαν σε 60ml της πηκτής για το πολυμερισμό της, προστεθήκαν 0,6ml APS (10%) και 60μl TEMED
- **Διάλυμα χρώσης:** Η χρώση της πηκτής έγινε με διάλυμα 0.1% Coomassie Blue R 250 (διάλυση 1g Coomassie Blue R 250 σε διάλυμα 40% αιθανόλης + 10% οξικού οξέος + 50% απεσταγμένου νερού)
- **Διάλυμα απόχρωσης:** Η απόχρωση της πηκτής έγινε σε υδατικό διάλυμα που περιείχε πυκνό οξικό οξύ 10% + μεθανόλη 10% + αιθανόλη 15%
- **Τεχνική παρασκευής πηκτών:** Η τεχνική παρασκευής είναι ίδια με την NATIVE-PAGE ηλεκτροφόρηση

Προετοιμασία δειγμάτων

- Έγινε πρώτα η παρασκευή διαλύματος sample buffer. Για τη παρασκευή 100ml διαλύματος, σε ογκομετρική φιάλη των 100ml προστέθηκαν 5ml Tris-HCl 1M με τελικό pH 6,8, 2g SDS, 11,5ml γλυκερόλης (10%), 5ml EDTA 0,5M και 48g ουρίας (τελικού pH 8,0 μετά τη ρύθμιση με HCl), 20mg δείκτη μπλε της

βρωμοφαινόλης και 1ml 2-ME και συμπληρώθηκε με απεσταγμένο νερό μέχρι τα 100ml

- Στη συνέχεια 0,1g ιζήματος (το οποίο προήλθε από τη φυγοκέντρηση που έγινε για τον υπολογισμό του υδατοδιαλυτού αζώτου) διαλύθηκαν με vortex σε 10ml sample buffer. Ακολούθησε βρασμός στους 90°C για 5 λεπτά, ψύξη σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και 20μl τοποθετήθηκαν στις θέσεις της πηκτής
- Τοποθετήθηκαν σε θέσεις της πηκτής σαν δείκτες, ισοηλεκτρική καζεΐνη (ISO-CN) πρόβειου γάλακτος και πρωτεΐνες ορού που παραχωρήθηκαν από την κ. Γ. Μοάτσου καθώς και πρωτεϊνικό συμπύκνωμα τυρογάλακτος 65% (WHEYPRO 65) από την εταιρία Ελληνικές Πρωτεΐνες Α.Ε. Στους δείκτες έγινε η ίδια προετοιμασία όπως στα δείγματα στις θέσεις της πηκτής.

Διαδικασία ηλεκτροφόρησης

- Χρησιμοποιήθηκε η ίδια συσκευή ηλεκτροφόρησης και το ίδιο τροφοδοτικό όπως στην NATIVE-PAGE ηλεκτροφόρηση
- Μεταφέρθηκαν οι πλάκες στην συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία είχε πληρωθεί από το buffer της συσκευής. Έγινε προηλεκτροφόρηση για 30min περίπου, στους 4°C με τάση σταθερή στα 70V και ένταση ρεύματος 60mA (πραγματική ένταση 26-23mA).
- Κατόπιν έγινε η τοποθέτηση των δειγμάτων στις θέσεις της πηκτής με (20μl δείγματος ανά θέση)
- Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων έγινε στους 4°C για 4-5 ώρες, σε 450V (πραγματικά 230-260) και σταθερή ένταση ρεύματος 90mA
- Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης τοποθετήθηκαν οι πηκτές στο διάλυμα χρώσης για 30min, υπό συνεχή κίνηση για καλύτερη χρώση
- Ακολούθησε αποχρωματισμός στο διάλυμα απόχρωσης που ανανεώθηκε 2 φορές
- Την επόμενη μέρα έγινε σάρωση της πηκτής

2.6 Ανάλυση του πρωτεϊνικού κλάσματος των τυριών με RP-HPLC

Η ανάλυση του πρωτεϊνικού κλάσματος των τυριών έγινε με υγρή χρωματογραφία (RP-HPLC)

Προετοιμασία δειγμάτων

Αναλύθηκαν τα ιζήματα και τα υπερκείμενα που προέκυψαν από τα δείγματα των τυριών (ΜΑΠ-10%, ΜΧΠ, ΜΠΠ-10%) μετά από φυγοκέντρηση για την ανάλυση του υδατοδιαλυτού αζώτου (προσδιορισμός υδατοδιαλυτού αζώτου, παρ. 2.2) και αναλυθήκαν επίσης δείγματα πρόβειου γάλακτος, μεμονωμένων πρωτεϊνών και ισοηλεκτρικής καζεΐνης. Η προετοιμασία των δειγμάτων περιγράφεται στη συνέχεια.

Προετοιμασία (I)

- Λήφθηκαν 200-250mg από τις τρεις Μυζήθρες (ΜΑΠ-10%, ΜΧΠ, ΜΠΠ-10%), 40-50mg από τα ιζήματα και κατά περίπτωση, 20-25mg ισοηλεκτρικής καζεΐνης (ISO-CN) από δείγματα πρόβειου γάλακτος και 8-10mg μεμονωμένων καζεϊνών και πρωτεϊνών ορού που παραχωρήθηκαν από την κ. Γ. Μοάτσου (Moatsou *et al.*, 2005).
- Έγινε διαλυση τους σε 3ml buffer Ουρίας-DTT (100mM Tris, 8M ουρίας, 13g/L κιτρικού τρινατρίου, 20mM διθειοθρεϊτόλης (DTT), pH≈8)
- Έπειτα τα δείγματα παρέμειναν για 60min στους 37°C
- Μετά την παραμονή τους στους 37°C, προστέθηκαν σε αυτά 10ml διαλύματος ουρίας 6M σε διαλύτη Α (1% Τριφθοροξικό οξύ σε υπερκάθαρο νερό) και γίνονταν καλή ανάδευση
- Κατόπιν, γινόταν προσθήκη στο κάθε δείγμα από 700μl διαλύματος TFA 10% με καλή ανάδευση ώστε το pH να είναι ≤ 3,2
- Τέλος, διηθήθηκαν από φίλτρο 0,45μm και έγινε εισαγωγή τους στα ειδικά φιαλίδια του αυτόματου δειγματολήπτη

Προετοιμασία (II)

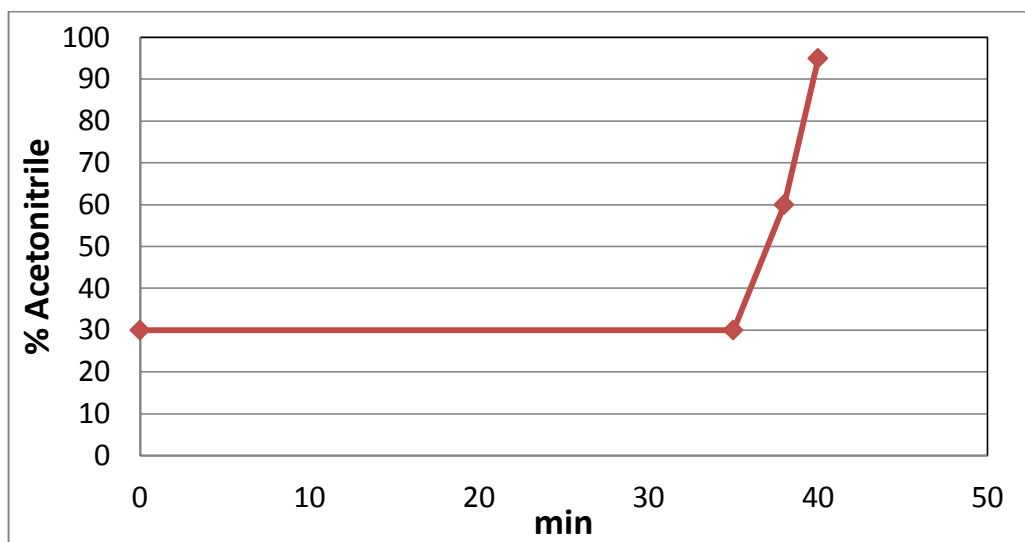
- Λήφθηκαν 200-250mg από τις τρεις Μυζήθρες (ΜΑΠ-10%, ΜΧΠ, ΜΠΠ-10%), 40-50mg από τα ιζήματα και κατά περίπτωση, 20-25mg ισοηλεκτρικής καζεΐνης (ISO-CN) από δείγματα πρόβειου γάλακτος και 8-10mg μεμονωμένων καζεϊνών και πρωτεϊνών ορού (Moatsou *et al.*, 2005)
- Έγινε διαλυση τους σε 3ml buffer Tris/glycine (0,01M Tris/Glycine, pH≈8,3) και στη περίπτωση αυτή προστέθηκε σε καθένα από 100μl 2-ME (2-Μερκαπτοαιθανόλη)
- Έπειτα τα δείγματα παρέμειναν για 60min στους 37°C
- Στη συνέχεια έγινε φυγοκέντρηση στις 3000rpm για 15min στους 4°C
- Τέλος, έγινε διήθηση των υπερκειμένων από φίλτρο 0,45μm και έγινε εισαγωγή τους στα ειδικά φιαλίδια του αυτόματου δειγματολήπτη

Προετοιμασία υπερκειμένων

- Προστέθηκαν 20μl TFA 10% σε 2ml υπερκείμενο
- Παρέμειναν σε ηρεμία για 10-15min
- Έγινε φυγοκέντρηση στις 10000rpm για 15min

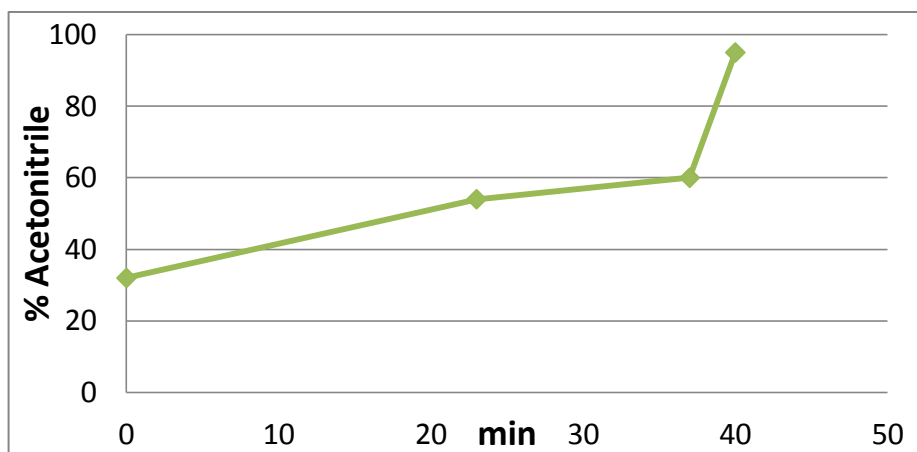
- Τέλος, έγινε παραλαβή του επάνω στρώματος και διήθηση από φίλτρο 0,45μm και εισαγωγή τους στα ειδικά φιαλίδια του αυτόματου δειγματολήπτη.

Χρησιμοποιήθηκε η στήλη Nucleosil 300-5-C8 (4,6 x 250mm) και σύστημα HPLC Waters (αντλία Waters 600, αυτόματος δειγματολήπτης Waters™ 717plus, ανιχνευτής συστοιχίας φωτοδιόδων Waters 996, λογισμικό Millennium 32 και απαέρωση με έγχυση ηλίου). Η ταχύτητα ροής ήταν 1ml/min και η καταγραφή του εκλούσματος γινόταν στα 214nm και αναλύονταν 80-100μl φιλτραρισμένου δείγματος κάθε φορά. Ο διαλύτης A αποτελούνταν από 0,1% Τριφθοροξικό οξύ (TFA) σε υπερκάθαρο νερό και ο διαλύτης B από 0,1% TFA σε διάλυμα ακετονιτριλίου 100%. Η έκλυση του δείγματος διαρκούσε 40 min για κάθε δείγμα. Η βαθμωτή έκλυση ήταν ως εξής: 0-35 min: 30% B, 35-38 min: 60% B, 38-40 min: 95% B (εικόνα 2.14).



Εικόνα 2.14. Συγκέντρωση ακετονιτριλίου (%) κατά διάρκεια της RP-HPLC ανάλυσης

Για να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός άλλαξε η μέθοδος έκλυσης (αποτελέσματα, παρ. 3.8). Η προετοιμασία των δειγμάτων, οι διαλύτες, η ταχύτητα ροής δεν άλλαξαν, η μέθοδος έκλυσης όμως ήταν ως εξής: 0 min: 32% B, 23 min: 54% B, 37 min: 60% B, 40 min: 95% B (εικόνα 2.15).



Εικόνα 2.15. Συγκέντρωση ακετονιτριλίου (%) κατά διάρκεια της RP-HPLC ανάλυσης όταν άλλαξε η μέθοδος έκλυσης

2.7. Προσδιορισμός αρωματικών συστατικών

Ο προσδιορισμός των αρωματικών ουσιών έγινε σε σύστημα Headspace (HS-40, Perkin Elmer, Ueberlingen, Germany) αέριου χρωματογράφου συνδεδεμένο με φασματογράφο μαζών (GC/MS- QP5050, Shimadzu, Kyoto, Japan) (εικόνα 2.10) με την μέθοδο Μικροεκχύλιση Στερεάς Φάσης (SPME) (Adahchour *et al.*, 1999).



Εικόνα 2.10. Συσκευή GC-MS

Η προετοιμασία του δείγματος για ανάλυση στο χρωματογράφο έγινε ως εξής:

Ποσότητα 4g από το κάθε τυρί πολτοποιήθηκαν με την ταυτόχρονη προσθήκη 2 ml κορεσμένου διαλύματος θειικού νατρίου (Na_2SO_4) και απεσταγμένου νερού και 100 ml εσωτερικού πρότυπου κυκλοεξανόνης, συγκέντρωσης 1000ppm. 3g από το παραπάνω μίγμα τοποθετήθηκαν σε ειδικό φιαλίδιο των 22ml (Clear Vial Screw Top Hole Cap with PTFE/Silicone Septa). Στο φιαλίδιο προσαρμόστηκε βελόνα με ίνα, το οποίο τοποθετήθηκε μέσα σε υδατόλουτρο (θερμοκρασίας 50-60°C περίπου) για να απορροφήσει η ίνα τα πτητικά συστατικά (για 25min) που επρόκειτο να αναλυθούν. Η ίνα που χρησιμοποιήθηκε για την απορρόφηση των πτητικών συστατικών από το δείγμα ήταν η 50/30 μm DVB/CAR/PDMS (grey) SUPELCO.

Ο διαχωρισμός των συστατικών στον αέριο χρωματογράφο έγινε με τριχοειδή στήλη, HP-INNOWax (εσωτερική διάμετρος 0,25mm, μήκος 60m και πάχος μεμβράνης 0,25 μm), στις παρακάτω συνθήκες: θερμοκρασία έγχυσης 250° C , ταχύτητα μεταφοράς του φέροντος αερίου 0,4cm/min. Η ταυτοποίηση των ουσιών πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό πακέτο Class 5000, με βάση τη βιβλιοθήκη δεδομένων NIST62. Ο ημιποσοτικός προσδιορισμός έγινε ως προς το εσωτερικό πρότυπο κυκλοεξανόνη με βάση το τύπο ($\text{Area προτύπου}/\text{συγκέντρωση προτύπου}=\text{area ουσίας}/\text{συγκέντρωση ουσίας}$).

2.8 Οργανοληπτική αξιολόγηση

Η οργανοληπτική αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε από ομάδα δοκιμαστών του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας του Γ.Π.Α. Τα δείγματα αξιολογήθηκαν και

βαθμολογήθηκαν ως προς την υφή (κλίμακα 0-10), τη γεύση (κλίμακα 0-10) και το χρώμα (κλίμακα 0-10), σύμφωνα με το παρακάτω δελτίο οργανοληπτικής εξέτασης:

ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	ΜΑΠ	ΜΧΠ	ΜΠΠ
ΥΦΗ Εξαιρετική 9-10 Πολύ καλή 7-8 Καλή 5-6 Μη ικανοποιητική 3-4 Κακή 0-2			
ΓΕΥΣΗ Εξαιρετική 9-10 Πολύ καλή 7-8 Καλή 5-6 Μη ικανοποιητική 3-4 Κακή 0-2			
ΧΡΩΜΑ Εξαιρετικό 9-10 Πολύ καλό 7-8 Καλό 5-6 Μη ικανοποιητικό 3-4 Κακό 0-2			

Στα αποτελέσματα παρουσιάζεται η συνολική αξιολόγηση των τυριών, σύμφωνα με τον υπολογισμό:

$$\text{Βαθμολογία} = (\text{Χρώμα} \times 1) + (\text{Υφή} \times 4) + (\text{Γεύση} \times 5)$$

2.9 Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο StatGraphics Plus for Windows version 4.0 (Copyright 1994-1999, by Statistical Graphics Corp., Manugistics, Inc., Rockville, MD, USA). Η επίδραση των παραγόντων του πειράματος (είδος τυριού, τυροκόμηση) στα φυσικοχημικά, μικροβιολογικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τυριών μελετήθηκε με την ανάλυση παραλλακτικότητας (Analysis of Variance, ANOVA).

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

3.1. Σύσταση πρώτης ύλης για την παρασκευή των 3 τύπων τυριών

- **Τυρόγαλα**

Στον πίνακα 3.2 φαίνεται η μέση σύσταση του τυρογάλακτος που χρησιμοποιήθηκε στη παράγωγη των Μυζηθρών.

- **Πρόσγαλα**

Στον πίνακα 3.1 φαίνεται η σύσταση του προσγάλακτος που προστέθηκε στις μυζήθρες ΜΑΠ-10% και ΜΠΠ. Το πρόσγαλα το οποίο προστέθηκε στη μυζήθρα ΜΑΠ-10% αποκορυφώθηκε και σε σχέση με το πλήρες πρόσγαλα που χρησιμοποιήθηκε στη μυζήθρα ΜΠΠ-10%, όπως ήταν αναμενόμενο, διέφερε στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$) ως προς στο λίπος.

Πίνακας 3.1.

ΣΥΣΤΑΣΗ ΠΡΟΣΓΑΛΑΚΤΟΣ		
	ΜΑΠ 10%	ΜΠΠ 10%
λίπος %	0,13 ^a ± 0,01	4,4 ^b ± 0,06
πρωτεΐνη %	4,85 ^a ± 0,02	4,76 ^a ± 0,03
λακτόζη %	5,32 ^a ± 0,04	5,09 ^a ± 0,04
pH	6,43 ^a ± 0,03	6,38 ^a ± 0,01

Πίνακας 3.2

ΜΕΣΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΥΡΟΓΑΛΑΚΤΟΣ	
λίπος %	0,54 ± 0,18
πρωτεΐνη %	1,67 ± 0,1
λακτόζη %	5,35 ± 0,09
pH	6,43 ± 0,02

3.1.2. Απόδοση σε τυρί

Στον πίνακα 3.3 φαίνεται η απόδοση των 3 τύπων Μυζήθρας (ΜΑΠ-10%, ΜΧΠ, ΜΠΠ-10%), ως έχει αλλά και εκφρασμένη σε σταθερή υγρασία 70%. Όπως αναμενόταν η απόδοση της ΜΧΠ ήταν μικρότερη από τις άλλες 2 μυζήθρες, αφού η προσθήκη επιπλέον στερεών συστατικών στο τυρόγαλα αυξάνει την απόδοση. Το γεγονός επίσης ότι β-Lg δημιουργεί η συμπλοκοποίηση της με την κ-CN (Patel *et al.*, 2006) να συνετέλεσε στην κατακράτηση μεγαλύτερης ποσότητας λίπους.

Μεταξύ των μυζηθρών με πρόσγαλα, τη μεγαλύτερη απόδοση του τυρογάλακτος σε τυρί όχι στατιστικά σημαντική είχε η μυζήθρα ΜΠΠ-10% και οφείλεται στο λίπος του γάλακτος που προστέθηκε.

Πίνακας 3.3

	ΜΧΠ	ΜΑΠ 10%	ΜΠΠ 10%
Απόδοση %	4,88 ^a ± 0,21	6,76 ^b ± 0,19	7,28 ^b ± 0,41
Απόδοση % σε 70% υγρασία	5,1 ^a ± 0,16	6,8 ^b ± 0,17	7,61 ^b ± 0,42

3.2. Φυσικοχημικές αναλύσεις

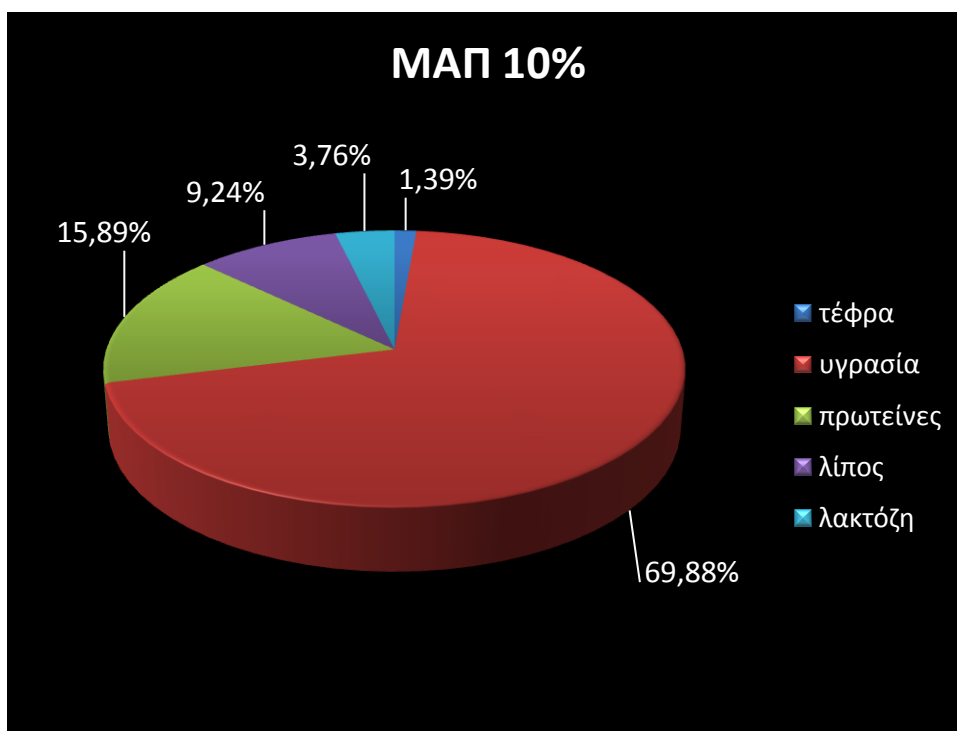
Πίνακας 3.4. Φυσικοχημικά Χαρ/κα των 3 μυζηθρών του πειράματος (ΜΑΠ 10%, ΜΧΠ, ΜΠΠ 10%) και των δειγμάτων του εμπορίου

Φυσικοχημικά Χαρ/κα	ΜΧΠ	ΜΑΠ 10%	ΜΠΠ 10%	ΜΥΖΗΘΡΕΣ ΕΜΠΟΡΙΟΥ	ΞΥΝΟΜΥΖΗΘΡΕΣ ΕΜΠΟΡΙΟΥ
ΞΟ %	32,93 ^b ± 2,21	30,45 ^{a, b} ± 1,04	33,29 ^b ± 0,42	27,34 ^a ± 1,73	32,06 ^b ± 3,07
Τέφρα %	0,81 ^a ± 0,03	1,39 ^c ± 0,02	1,11 ^b ± 0,02	1,71 ^d ± 0,19	2,05 ^c ± 0,13
Υγρασία %	67,06 ^a ± 2,21	69,88 ^a ± 1,04	66,7 ^a ± 0,42	72,66 ^b ± 1,73	67,94 ^a ± 3,07
Υγρασία % στα άνευ λίπους συστατικά (Υ/ΣΥΑΛ)	76,41 ^a ± 0,74	76,98 ^a ± 0,48	77,79 ^a ± 0,9	82,63 ^b ± 1,04	83,03 ^b ± 1,24
Ολικές πρωτεΐνες %	15,61 ^b ± 0,26	15,89 ^b ± 0,39	15,78 ^b ± 0,24	13,25 ^a ± 0,62	13,48 ^a ± 0,79
Υδατοδιαλυτό Άζωτο (WSN)	0,062 ^b ± 0,003	0,076 ^a ± 0,001	0,069 ^{a, b} ± 0,002	0,1 ^d ± 0,004	0,09 ^c ± 0,001
Λίπος επί ξηρού %	37,28 ^{a, b} ± 2,5	30,33 ^a ± 1,94	43,06 ^b ± 0,9	43,41 ^b ± 8,98	56,6 ^c ± 2,31
Λίπος %	12,17 ^{a, b} ± 0,16	9,24 ^a ± 0,59	14,33 ^b ± 0,33	12,02 ^{a, b} ± 3,2	18,22 ^c ± 2,48
% Ca στη ΞΟ άνευ λίπους (Ca/SNFNS)	836,46 ^a ± 170,92	1775,89 ^b ± 94,68	1443,69 ^{b, c} ± 59,12	1418,25 ^{b, c} ± 27,87	1351,36 ^c ± 181,98
Cl %	0,113 ^a ± 0,001	0,112 ^a ± 0,003	0,105 ^a ± 0,005	0,54 ^b ± 0,09	0,79 ^c ± 0,115
%NaCl στην υγρή φάση	0,27 ^a ± 0,003	0,26 ^a ± 0,008	0,25 ^a ± 0,006	1,21 ^b ± 0,23	1,87 ^c ± 0,19
% Οξύτητας (Εκφρασμένη σε γαλακτικό οξύ)	0,06 ^a ± 0,003	0,1 ^a ± 0,01	0,07 ^a ± 0,007	0,45 ^b ± 0,06	1,46 ^c ± 0,13
pH	6,37 ^c ± 0,06	6,36 ^c ± 0,06	6,46 ^c ± 0,04	5,48 ^b ± 0,25	4,13 ^a ± 0,11
Λακτόζη	3,82 ^b ± 0,04	3,76 ^b ± 0,31	3,84 ^b ± 0,03	3,36 ^b ± 0,33	0,16 ^a ± 0,02

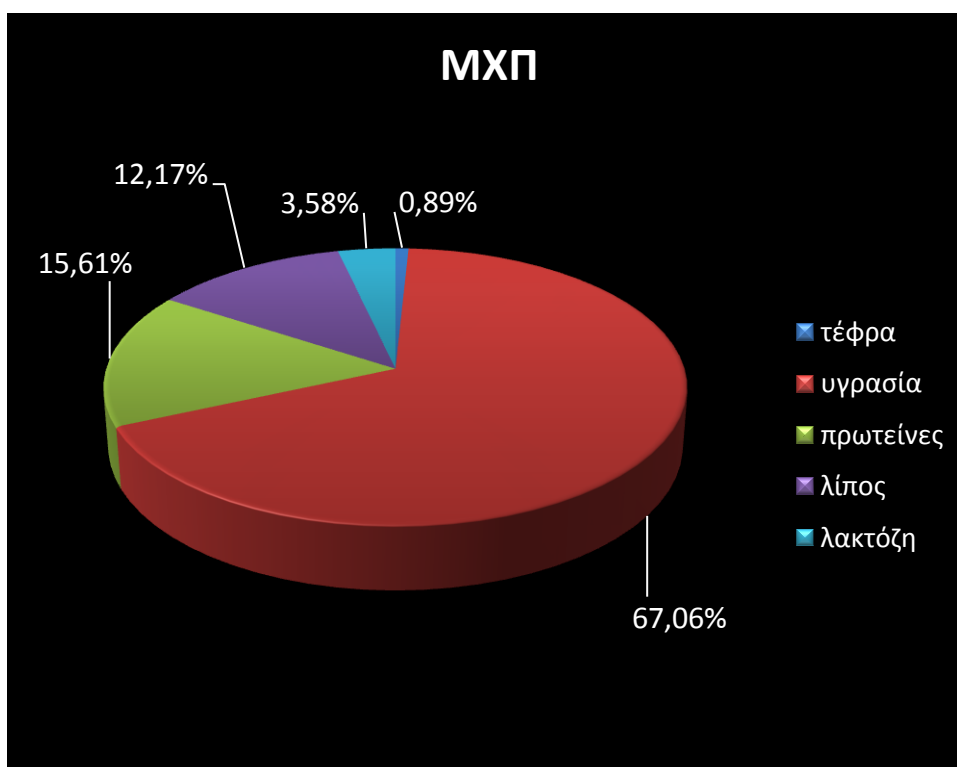
a, b, c, d, e: Μέσοι όροι ευρισκόμενοι στην ίδια σειρά (γραμμή), ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα, δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($P \geq 0,05$)

Στα διαγράμματα 3.1, 3.2 και 3.3 απεικονίζεται η μέση σύσταση των 3 μυζηθρών του πειράματος, στα πέντε κύρια συστατικά του τυριού.

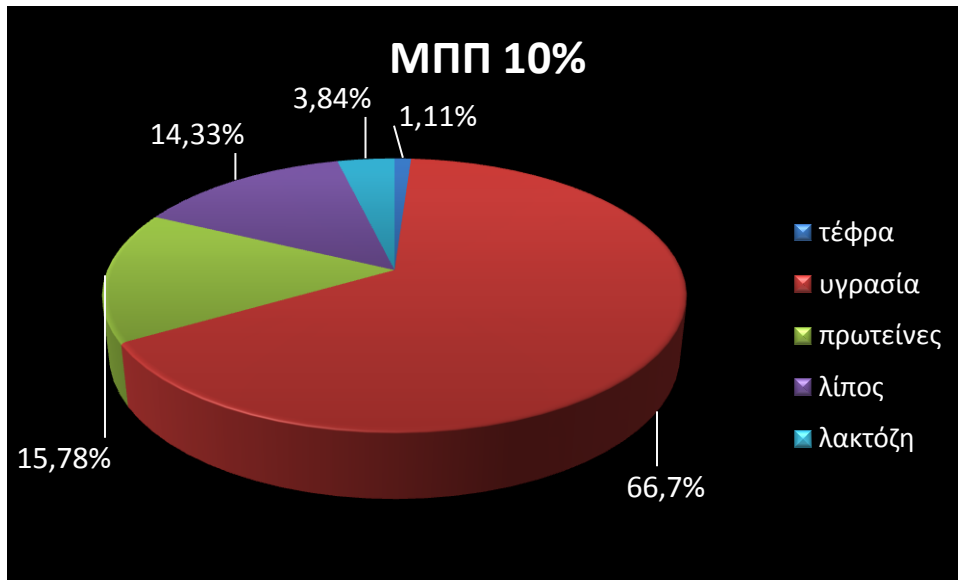
Διάγραμμα 3.1. Σύσταση τυριού ΜΑΠ 10%



Διάγραμμα 3.2 Σύσταση τυριού ΜΧΠ



Διάγραμμα 3.3. Σύσταση τυριού ΜΠΠ 10%



3.2.1 Λίπος / υγρασία / πρωτεΐνη

Η λιποπεριεκτικότητα στα τυριά τυρογάλακτος επηρεάζεται από το χρόνο θέρμανσης και τη θερμοκρασία αλλά και από τη προσθήκη γάλακτος (Pintado *et al.*, 1996). Οι Pereira *et al.*, (1982), επίσης απέδειξαν ότι και η αύξηση του ρυθμού θέρμανσης οδήγησε σε μεγαλύτερη κατακράτηση του λίπους, σε τυριά τυρογάλακτος τύπου Ricotta

Από τα στοιχεία του πίνακα 3.4, προκύπτει ότι η λιποπεριεκτικότητα διέφερε μεταξύ των τριών τύπων τυριών. Χαμηλότερα λιπαρά είχε η ΜΑΠ-10% και ακολουθούσαν κατά σειρά η ΜΧΠ και η ΜΠΠ-10%. Σημαντικά στατιστική διαφορά ($P < 0,05$) όπως αναμενόταν διαπιστώθηκε μεταξύ ΜΑΠ-10% και ΜΠΠ-10% και είχε άμεση σχέση με την λιποπεριεκτικότητα του γάλακτος που προστέθηκε κατά την τυροκόμηση (άπαχο, πλήρες). Πιο συγκεκριμένα το ποσοστό λίπους της μυζήθρας ΜΑΠ-10% κυμαίνονταν στο 9% ενώ της ΜΠΠ-10% στο 14% και της ΜΧΠ στο 12%. Η ίδια τάση παρατηρήθηκε και στο λίπος επί ξηρού. Στα τυριά ΜΠΠ-10% και ΜΧΠ το λίπος επί ξηρού ήταν 37,28% και 43,06% αντίστοιχα.

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα (λίπος και υγρασία) με βάση την Ελληνική Νομοθεσία (ΚΤΠ, 2011) μπορούμε να κατατάξουμε τα τυριά ΜΠΠ-10% και ΜΧΠ στα μερικώς αποβουτυρωμένα τυριά. Αντίθετα το προϊόν που παρασκευάστηκε με προσθήκη άπαχου προσγάλακτος (ΜΑΠ) με λίπος επί ξηρού 30,33%, μπορούμε να το χαρακτηρίσουμε τυρί χαμηλών λιπαρών. Ωστόσο θα πρέπει να σημειωθεί ότι από νομοθετικής πλευράς υπάρχει μια ασάφεια διεθνώς, ως προς το χαρακτηρισμό των τυριών με λιγότερο λίπος. Στην Αμερικανική νομοθεσία και τον Codex Alimentarius (CODEX) είναι αποδεκτό ότι, ως τυρί μειωμένου λίπους (reduced fat), χαρακτηρίζεται εκείνο όπου το λίπος έχει υποστεί μια μείωση τουλάχιστον 25% σε σχέση με το συνολικό λίπος του αντίστοιχου προϊόντος πλήρους λιποπεριεκτικότητας (NDC, 2009). Στην Ευρώπη (Ε.Ε., 1924/2006) ισχύει ότι ως τυριά μειωμένου λίπους (reduced fat) χαρακτηρίζονται εκείνα

όπου το λίπος έχει υποστεί μια μείωση τουλάχιστον 30% σε σχέση με το συνολικό λίπος του αντίστοιχου προϊόντος. Με βάση την Ε.Ε ή έχει λίπος επί ξηρού 10-25% (NDC, 2009). Μια παρατήρηση επίσης που μπορεί να γίνει με βάση τις περιεκτικότητες σε λίπος του τυρογάλακτος/προσγάλακτος και τυριών που προέκυψαν ότι το λίπος μεταφέρθηκε εξ ολοκλήρου στις Μυζήθρες.

Οι Μυζήθρες του εμπορίου δεν είχαν σημαντικές διαφορές με τις Μυζήθρες του πειράματος. Οι Ξινομυζήθρες όμως είχαν αυξημένα λιπαρά ($\approx 18\%$) και διέφεραν στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$) με τις υπόλοιπες Μυζήθρες που μελετήθηκαν.

Η περιεκτικότητα της υγρασίας σε όλα τα τυριά του πειράματος παρέμεινε εντός των ορίων του ΚΤΠ (2011) δηλαδή $< 70\%$ και δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ των τυριών ($P > 0,05$). Παρατηρείται όμως ότι είναι ελαφρά αυξημένη στις Μυζήθρες με τα χαμηλότερα λιπαρά (ΜΧΠ και ΜΑΠ-10%). Σε παρόμοια συμπεράσματα έχουν καταλήξει και οι Lteif *et al.*, (2009); Sanchez-Macias *et al.*, (2010) οι οποίοι μελέτησαν άλλου τύπου τυριά διαφορετικής λιποπεριεκτικότητας. Η υγρασία εκφρασμένη % στα μη λιπαρά συστατικά επίσης δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά, μεταξύ των τυριών, γεγονός που δείχνει ότι δεν επηρεάστηκε από την μείωση του λίπους. Ωστόσο, χαμηλότερα ποσοστά είχαν οι μυζήθρες χωρίς πρόσγαλα και αυτές με το άπαχο πρόσγαλα ΜΑΠ-10% σε σχέση με την αντίστοιχη μυζήθρα με πλήρες πρόσγαλα ΜΠΠ-10%. Στατιστικά σημαντική διαφορά είχαν οι Ξινομυζήθρες του εμπορίου, οι οποίες είχαν και την μεγαλύτερη υγρασία (ξεπερνούσε το 70% σε σχέση με τις υπόλοιπες Μυζήθρες στις όποιες κυμαινόταν μεταξύ 67-70%), (πίνακας 3.4).

Από τα στοιχεία του πίνακα 3.4 επίσης φαίνεται, ότι η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες των τριών Μυζηθρών του πειράματος δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά ($P > 0,05$) με το ποσοστό της πρωτεΐνης να κυμαίνεται στο 15,5-16%. Αντίθετα οι Μυζήθρες και οι Ξινομυζήθρες του εμπορίου είχαν σημαντικά χαμηλότερη πρωτεϊνοπεριεκτικότητα (κατά 2% περίπου). Σε τούρκικα τυριά τυρογάλακτος (Mud cheeses) η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη κυμάνθηκε μεταξύ 7,02% και 15,98%. (Kavas & Kavas, 2011). Οι τιμές του υδατοδιαλυτού αζώτου ήταν χαμηλές (0,061-0,075%) φυσιολογικές για φρέσκα τυριά. Τα επίπεδα του υδατοδιαλυτού κλάσματος πρωτεϊνών σε τυριά τυρογάλακτος από τη Τουρκία (Kavas & Kavas, 2011) κυμαινόταν μεταξύ 0,22-0,82%, τιμές αυξημένες σε σχέση με τις πειραματικές μυζήθρες. Παρόμοια αποτελέσματα με τους Kavas & Kavas, (2011) βρέθηκαν από τους Pintado & Malcatta, (2000) και Papaioannou *et al.*, (2007) κάτι που αποδίδεται στην διαφορετική τεχνολογία και το είδος του γάλακτος.

Αν λάβουμε υπόψη την περιεκτικότητα σε ολικό άζωτο του τυρογάλακτος στην ΜΧΠ ή του μίγματος τυρογάλακτος και προσγάλακτος 10% στις Μυζήθρες ΜΑΠ και ΜΠΠ, παρατηρούμε ότι τα τυριά ΜΧΠ συγκράτησαν τουλάχιστον τις μισές αζωτούχες ουσίες (45% η ΜΧΠ, 54% η ΜΑΠ και 58% η ΜΠΠ).

Οι Μυζήθρες εμπορίου εμφάνισαν το υψηλότερο ποσοστό σε υδατοδιαλυτό άζωτο (0,102%) από το σύνολο των Μυζηθρών που μελετήθηκαν, ενώ ακολούθησαν οι Ξινομυζήθρες με ποσοστό 0,092%.

Επίσης το ποσοστό υδατοδιαλυτού αζώτου επί του ολικού αζώτου που εκφράζεται σαν WSN%/TN, ήταν υψηλότερο στη μυζήθρα ΜΑΠ-10% και διέφερε στατιστικά με αυτό της Μυζήθρας ΜΧΠ ενώ στη ΜΠΠ-10% κυμαίνονταν κάπου ανάμεσα στις 2 αυτές τιμές. Το υδατοδιαλυτό άζωτο εκφρασμένο % του ολικού αζώτου (WSN%/TN) που αποτελεί τον συντελεστή ωρίμανσης είναι χαμηλό, 2,4% για τη μυζήθρα ΜΧΠ, 3% για τη ΜΑΠ-10% και 2,7% για τη ΜΠΠ-10%, που αποδεικνύει ότι τα πειραματικά τυριά δεν υπέστησαν ωρίμαση. Στις Ξινομυζήθρες οι οποίες είχαν υποστεί ελάχιστη ωρίμαση σε σχέση με τις μυζήθρες που παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο, ο συντελεστής ήταν λίγο μεγαλύτερος (4,3%). Οι τιμές αυτές ενδεικτικά, σε ώριμα τυριά Φέτας των 60 ημερών (Mallatou *et al.*, 1994; Kandarakis *et al.*, 2001) ήταν 10,72-16%.

Μέτρηση διαφόρων φυσικοχημικών χαρ/κων σε τυριά Ricotta από αίγαιο γάλα στα οποία δεν είχε προστεθεί πρόσγαλα, έδειξαν ότι το λίπος επί ξηρού κυμάνθηκε στα ίδια επίπεδα με τα πειραματικά τυριά (από 61,63-71,75%) καθώς επίσης και η ξηρά ουσία (από 28,62-32,13%) (Pizzilo *et al.*, 2005). Στην ίδια μελέτη η πρωτεϊνοπεριεκτικότητα ήταν χαμηλότερη (6,29-6,86%) σε σχέση με τις Μυζήθρες του πειράματος.

Επίσης η παραγωγή τυριού Ricotta μετά την προσθήκη σκόνης τυρογάλακτος από υπερδιηθημένο τυρόγαλα και άπαχης σκόνης γάλακτος σε διάφορες ποσότητες, είχε σαν αποτέλεσμα η πρωτεϊνοπεριεκτικότητα να κυμαίνεται στο 17,55% για το τυρί που παράχθηκε με προσθήκη σκόνης τυρογάλακτος και από 19,09-21,30% σε εκείνα που είχαν προστεθεί σκόνη τυρογάλακτος και άπαχη σκόνη γάλακτος (El-Sheikh *et al.*, 2011). Στα τυριά αυτά η απόδοση κυμάνθηκε αρκετά υψηλά από 20,11-29,09% επιβεβαιώνοντας ότι η προσθήκη στερεών συστατικών κατά τη θέρμανση του τυρογάλακτος αυξάνει την απόδοση.

3.2.2 Τέφρα

Στην τέφρα διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0,05$) ανάμεσα και στα 3 τυριά Μυζήθρας και προερχόταν σαφώς από την προσθήκη του προσγάλακτος. Η μυζήθρα ΜΧΠ είχε το χαμηλότερο ποσοστό τέφρας, ενώ το υψηλότερο η ΜΑΠ-10%. Οι 2 κατηγορίες του εμπορίου διέφεραν και αυτές στατιστικά σημαντικά και μεταξύ τους και με τις μυζήθρες που παρήχθησαν στο εργαστήριο ($P < 0,05$) και είχαν τιμές τέφρας αρκετά υψηλότερες. Αυτό αποδίδεται στο ότι το γάλα που πιθανόν χρησιμοποιήθηκε κατά την παρασκευή τους, να ήταν πιο πλούσιο σε στερεά και ανόργανα συστατικά (στην αρχή ή μέση της γαλακτικής περιόδου), και κυρίως στην προσθήκη υψηλής ποσότητας αλατιού. Αντίθετα το γάλα των πειραμάτων προερχόταν από γάλα προβάτων στο τέλος της γαλακτικής περιόδου και στην μυζήθρα δεν έγινε προσθήκη άλατος.

3.2.3 pH-Οξύτητα

Το pH δεν διέφερε στατιστικά ($P > 0,05$) στις Μυζήθρες ΜΑΠ-10%, ΜΧΠ και ΜΠΠ-10% και ήταν υψηλό με τιμές 6,3-6,4 χαρακτηριστικές για τα φρέσκα τυριά και κοντά στην τιμή 6,0 που αναφέρεται στη βιβλιογραφία για τη Μυζήθρα (IDF, Bulletin, 1986). Στο Ricotta οι τιμές του pH κυμάνθηκαν από 6,27-6,43 (Pizzilo *et al.*, 2005) και στο ανθότυρο η μέση τιμή από 50 δείγματα ήταν pH 6,36 (Kalogridou-Vassiliadou *et al.*, 1994). Το pH των Μυζηθρών του εμπορίου αντίθετα ήταν μικρότερο (5,4-5,5), προφανώς

λόγω της μικρής ζύμωσης που είχαν υποστεί κατά την αποθήκευση και μεταφορά. Όμως, αυτή η ζύμωση σε καμία περίπτωση δεν μπορεί να συγκριθεί με τη ζύμωση που είχαν υποστεί οι Ξινομυζήθρες του εμπορίου, οι οποίες σύμφωνα με την τεχνολογία που ακολουθείται (παρ. 1.4.4) παραμένουν για ωρίμανση για μεγάλο χρονικό διάστημα (1-2 μήνες). Πράγματι σε αυτές τις Μυζήθρες το pH ήταν πολύ χαμηλό (pH<4,5), και είχε μια στατιστικά σημαντική διαφορά με τις Μυζήθρες του πειράματος (P<0,05).

Τα ίδια συμπεράσματα βγαίνουν και από την οξύτητα των τυριών, εκφρασμένη σε % γαλακτικού οξέος, όπου οι Μυζήθρες του πειράματος είχαν περίπου 0,1% οξύτητα, οι Μυζήθρες εμπορίου κοντά στο 0,4-0,5% ενώ οι Ξινομυζήθρες στο 1,5% (P<0,05).

3.2.4 NaCl

Κατά τη τυροκόμηση των μυζηθρών του πειράματος δεν προστέθηκε ποσότητα αλατιού και η περιεκτικότητα σε NaCl δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (P>0,05) και ήταν κάτω από 0,2%. Αντίθετα οι Μυζήθρες και Ξινομυζήθρες του εμπορίου είχαν στατιστική διαφορά (P<0,05) με τις μυζήθρες του πειράματος αλλά και μεταξύ τους. Οι Μυζήθρες του εμπορίου είχαν περίπου 0,8% NaCl και οι Ξινομυζήθρες κοντά στο 1,3% το οποίο δείχνει ότι μάλλον ακολουθείται μια παρόμοια τεχνολογία σε αυτές, όπως τηρείται για την Ξινομυζήθρα Κρήτης με προσθήκη 1,5-2% NaCl (τυρί ΠΟΠ).

3.2.5 Ανόργανα στοιχεία

Στο πίνακα 3.5 που ακολουθεί, δίνονται για τις μυζήθρες του πειράματος και του εμπορίου, οι μέσες τιμές συγκέντρωσης ασβεστίου, καλίου, νατρίου, μαγνησίου, σε mg ανά 100g τυριού και ανά 100g επί ξηρού.

Πίνακας 3.5. Ανόργανα στοιχεία των πειραματικών τυριών Μυζήθρας και αυτών του εμπορίου

mg/100g	ΜΧΠ	ΜΑΠ 10%	ΜΠΠ 10%	ΜΥΖΗΘΡΕΣ ΕΜΠΟΡΙΟΥ	ΞΙΝΟΜΥΖΗΘΡΕΣ ΕΜΠΟΡΙΟΥ
Ca	165,93 ^a ± 15,10	378,42 ^d ± 14,58	271 ^c ± 3,56	212,51 ^b ± 27,35	187,37 ^{a, b} ± 14,67
Mg	17,57 ^{a, b} ± 1,78	29,18 ^c ± 0,71	22,67 ^b ± 0,07	21,25 ^b ± 0,19	13,26 ^a ± 6,00
Na	36,87 ^a ± 1,94	41,47 ^a ± 9,78	29,04 ^a ± 1,43	377,93 ^b ± 61,96	377,27 ^b ± 106,20
K	48,41 ^{a, b} ± 1,73	105,46 ^c ± 5,42	23,26 ^b ± 3,04	112,75 ^c ± 7,94	75,51 ^{b, c} ± 31,49
mg επί ξηρού					
Ca	515,17 ^a ± 84,34	1242,04 ^b ± 14,10	814,82 ^c ± 24,75	675,96 ^{a, c} ± 148,89	527,12 ^c ± 262,09
Mg	54,64 ^a ± 9,62	95,87 ^b ± 1,09	68,16 ^{a, b} ± 1,20	66,91 ^{a, b} ± 6,91	43,21 ^a ± 32,05
Na	113,66 ^a ± 12,95	134,96 ^a ± 29,72	87,16 ^a ± 3,2	1206,06 ^b ± 306,66	1152,27 ^b ± 736,24
K	150,75 ^{a, b} ± 28,91	346,97 ^c ± 21,53	69,95 ^b ± 9,12	356,69 ^c ± 58,36	242,77 ^{b, c} ± 175,21

a, b, c, d: Μέσοι όροι ευρισκόμενοι στην ίδια σειρά (γραμμή), ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα, δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (P ≥ 0,05)

Η περιεκτικότητα στα ανόργανα στοιχεία Ca, Mg, στις Μυζήθρες ΜΑΠ-10% και ΜΠΠ-10%, ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με την ΜΧΠ. Η διαφορά αυτή αιτιολογείται από το γάλα που προστέθηκε, το οποίο εμπλούτισε με τα στοιχεία αυτά το προϊόν, τη στιγμή που το πρόβειο γάλα εμφανίζει υψηλή ποσότητα Ca (1950-2000mg/kg), K (1360-

1400mg/kg) και Mg (180-200mg/kg) (Raynal-Ljutovac *et al.*, 2008). Οι μεγαλύτερες τιμές των ανοργάνων αλάτων στη ΜΑΠ-10% σε σχέση με τη ΜΠΠ-10% σχετίζεται με την αντικατάσταση του λίπους με πρωτεΐνες (ισοζύγιο μαζών) και επομένως με το καζεϊνικό Ca.

Από τα αποτελέσματα των ανόργανων στοιχείων (πιν. 3.5) προκύπτει ότι η μυζήθρα ΜΑΠ-10% διαφέρει στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$) από όλες τις υπόλοιπες μυζήθρες σε ασβέστιο ($378,42 \pm 14,58 \text{mg}/100\text{g}$ τυριού) αλλά και επί ξηρού ($1242,04 \pm 14,10 \text{mg}$). Επίσης παρουσιάζει υψηλή περιεκτικότητα σε κάλιο ($105,46 \pm 5,42 \text{mg}/100\text{g}$ τυριού) και έχει στατιστική διαφορά με τις άλλες 2 μυζήθρες του πειράματος (ΜΧΠ, ΜΠΠ-10%) αλλά όχι με τις 2 κατηγορίες του εμπορίου. Η μυζήθρα ΜΑΠ-10% εμφανίζει επίσης και υψηλή περιεκτικότητα σε Mg ($29,18 \pm 0,71 \text{mg}/100\text{g}$ τυριού) από τις άλλες μυζήθρες. Η περιεκτικότητα σε Na δεν διέφερε στατιστικά ανάμεσα στις μυζήθρες του πειράματος αφού δεν είχε γίνει προσθήκη αλατιού αλλά διέφεραν στατιστικά σημαντικά με τις 2 κατηγορίες του εμπορίου όπου είχε γίνει σαφώς προσθήκη αλατιού (1-2%).

3.2.6 Ανάλυση σακχάρων και οργανικών οξέων

Η ζύμωση της λακτόζης είναι η κύρια και η πιο γρήγορη βιοχημική μεταβολή που μπορεί να συμβεί σε ένα τυρί μετά την παρασκευή του, η οποία οδηγεί κυρίως στην παραγωγή γαλακτικού οξέος. Για τη μελέτη της ζύμωσης αυτής στις μυζήθρες, που παρασκευάστηκαν, προσδιορίστηκαν η λακτόζη, το γαλακτικό οξύ, το οξικό οξύ και η αιθανόλη (πίνακας 3.6).

Πίνακας 3.6. Ανάλυση σακχάρων και οξέων των πειραματικών τυριών Μυζήθρας και αυτών του εμπορίου

%	ΜΧΠ	ΜΑΠ 10%	ΜΠΠ 10%	ΜΥΖΗΘΡΕΣ ΕΜΠΟΡΙΟΥ	ΞΙΝΟΜΥΖΗΘΡΕΣ ΕΜΠΟΡΙΟΥ
Λακτόζη	$3,82^b \pm 0,04$	$3,76^b \pm 0,31$	$3,84^b \pm 0,03$	$3,36^b \pm 0,33$	$0,16^a \pm 0,02$
Γαλακτικό οξύ	$0,024^a \pm 0,013$	$0,021^a \pm 0,006$	$0,014^a \pm 0,0001$	$0,29^b \pm 0,1$	$1,6^c \pm 0,06$
Οξικό οξύ	$0,012^a \pm 0,006$	$0,009^a \pm 0,005$	$0,008^a \pm 0,0001$	$0,1^b \pm 0,01$	$0,15^c \pm 0,01$
Αιθανόλη	$0,026^a \pm 0,0003$	$0,013^a \pm 0,0013$	$0,013^a \pm 0,001$	$0,06^a \pm 0,06$	$0,57^b \pm 0,03$

a, b, c: Μέσοι όροι ευρισκόμενοι στην ίδια σειρά (γραμμή), ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα, δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($P \geq 0,05$)

Από τα αποτελέσματα του πίνακα 3.6, δεν προκύπτει στατιστική διαφορά ανάμεσα στις μυζήθρες του πειράματος για την περιεκτικότητα της λακτόζης (3,58-3,84%) αλλά ούτε με τις μυζήθρες του εμπορίου οι οποίες εμφανίζουν λίγο χαμηλότερη από αυτές του πειράματος χωρίς όμως να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($P > 0,05$). Αντίθετα η ξινομυζήθρες εμφάνισαν ελάχιστη περιεκτικότητα σε λακτόζη (0,16%) κάτι που σημαίνει ότι τα συγκεκριμένα τυριά έχουν υποστεί έντονη ζύμωση και διαφέρουν στατιστικά με τις υπόλοιπες μυζήθρες ($P < 0,05$). Επίσης, για τη μυζήθρα χωρίς πρόσγαλα (ΜΧΠ), από τη λακτόζη που περιείχε το τυρόγαλα, απωλέσθη στο απόγαλα, και μόνο ένα μικρό ποσοστό της τάξης 3,5-5% συγκράτησαν οι μυζήθρες του πειράματος. Μέση τιμή λακτόζης

(3,78%) παρουσίασαν τυριά τύπου Ricotta έπειτα από προσθήκη σκόνης τυρογάλακτος (El-Sheikh *et al.*, 2011) ενώ σε άλλη μελέτη, τυριά τύπου Ricotta από αίγαιο γάλα από διάφορες φυλές παρουσίασαν τιμές λακτόζης που κυμαίνονταν από 1,88-3,71% (Pizzilo *et al.*, 2005).

Αξίζει εδώ να σημειωθεί ότι τελικά κατά την παρασκευή των 3 διαφορετικών τυριών Μυζήθρας στο τυρόγαλα μετά την κατεργασία (απόγαλα) απέμειναν κατά μέσο όρο 50% περίπου των αζωτούχων ουσιών και το 96% της λακτόζης. Επιβεβαιώνεται επομένως κάτι που είναι γνωστό, ότι δηλαδή και μετά την αξιοποίηση του τυρογάλακτος για παρασκευή τυριών το πρόβλημα των αποβλητων εξακολουθεί να υφίσταται και επομένως αν δεν υπάρχει η δυνατότητα διάθεσης πρέπει τουλάχιστον να δίνεται λύση με εγκατάσταση βιολογικού καθαρισμού.

Η ποσότητα του γαλακτικού οξέος (0,02% περίπου) επίσης δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά ανάμεσα στις μυζήθρες του πειράματος, αλλά διέφερε με αυτήν των μυζηθρών του εμπορίου (0,29%) αλλά και με αυτήν των ξινομυζήθρων (1,6%) στις οποίες εμφανίζεται και η πιο έντονη παράγωγη γαλακτικού οξέος, που οφείλεται πιθανόν στη ζύμωση της λακτόζης από οξυγαλακτικά βακτήρια.

Το ποσοστό του οξικού οξέος είναι ελάχιστο έως ανύπαρκτο για τις μυζήθρες του πειράματος και δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους αλλά διέφερε με τις δυο κατηγορίες του εμπορίου. Στις μυζήθρες του εμπορίου είναι περίπου 0,1% και στις ξινομυζήθρες 0,15%, με μικρή στατιστική σημαντικά διαφορά ($P < 0,05$) έναντι των άλλων μυζηθρών.

Η περιεκτικότητα αιθανόλης δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά για τις μυζήθρες του πειράματος, καθώς και αυτής των μυζηθρών του εμπορίου, ενώ οι ξινομυζήθρες εμπορίου είχαν 0,57% αιθανόλη όπου παρατηρήθηκε στατιστική διαφορά με τις υπόλοιπες ξινομυζήθρες ($P < 0,05$), πιθανόν λόγω της ζύμωσης της λακτόζης από ετεροζυμωτικούς μικροοργανισμούς.

Επίσης, άλλα οργανικά οξέα και σάκχαρα, όπως το κιτρικό οξύ, η γαλακτόζη κ.α. δε βρέθηκαν ή βρέθηκαν σε ελάχιστη ποσότητα σε μερικά δείγματα.

3.3 Ρεολογικά χαρακτηριστικά

Τα μηχανικά χαρακτηριστικά όπως σκληρότητα, ελαστικότητα, συνεκτικότητα, κομμώδες φαίνονται στον πίνακα 3.7 και δίνουν μια εικόνα για την δομή και υφή των προϊόντων. Από αυτά το σημαντικότερο είναι η σκληρότητα, η οποία εξαρτάται από τις αναλογίες της υγρασίας, της πρωτεΐνης και του λίπους. Την μεγαλύτερη επίδραση όμως έχουν οι ποσότητες και η αναλογία νερού και πρωτεΐνης. Γι αυτό κατά την ανάπτυξη πιο αντικειμενικών μεθόδων για εκτίμηση της σκληρότητας έχει επικρατήσει η αντίληψη να χρησιμοποιείται σαν χαρακτηριστικός δείκτης η σχέση υγρασίας ως προς το σύνολο των συστατικών άνευ λίπους (δείκτης $Y/\Sigma YA\Lambda$ ή MNFS) ο οποίος εκφράζεται σαν $MNFS = H_2O\% / (100 - \text{λίπος}) \times 100$. Ουσιαστικά η σχέση αυτή αντανakλά την αναλογία της υγρασίας προς την πρωτεΐνη. Ρυθμίζοντας το περιεχόμενο λίπος του τυριού μέσα σε ορισμένα όρια και διατηρώντας τη σχέση MNFS είναι δυνατό να παραχθούν τυριά με

χαμηλά λιπαρά που θα έχουν ομοιόμορφη δομή με τα αντίστοιχα «πλήρη». Επειδή στα τυριά που μελετήθηκαν δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές μπορεί να υποτεθεί ότι το νέο προϊόν από άπαχο πρόσγαλα δεν διέφερε ουσιαστικά από άποψη δομής. Ωστόσο το αποτέλεσμα αυτό δεν επιβεβαιώθηκε από την οργανοληπτική αξιολόγηση. Οι τιμές των ρεολογικών παραμέτρων για τις μυζήθρες του πειράματος και του εμπορίου, παρουσιάζονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 3.7).

Πίνακας 3.7. Ρεολογικά χαρ/κα των πειραματικών τυριών Μυζήθρας και αυτών του εμπορίου

	ΜΧΠ	ΜΑΠ 10%	ΜΠΠ 10%	ΜΥΖΗΘΡΕΣ ΕΜΠΟΡΙΟΥ	ΞΙΝΟΜΥΖΗΘΡΕΣ ΕΜΠΟΡΙΟΥ
Σκληρότητα (N)	3,59 ^{b,c} ± 0,43	4,25 ^c ± 0,2	3,22 ^b ± 0,34	1,66 ^a ± 0,06	1,20 ^a ± 0,38
Συνάφεια (N mm)	6,96 ^{a,b} ± 1,66	9,37 ^{a,b} ± 2,37	12,3 ^b ± 1,98	6,01 ^a ± 1,66	6,29 ^a ± 2,05
Ελαστικότητα (mm)	1,10 ^a ± 0,1	1,00 ^a ± 0,001	1,1 ^a ± 0,13	1,33 ^a ± 0,33	0,99 ^a ± 0,0006
Συνεκτικότητα (N mm)	0,37 ^a ± 0,03	0,46 ^b ± 0,02	0,42 ^{a,b} ± 0,01	0,42 ^{a,b} ± 0,02	0,40 ^{a,b} ± 0,0006
Κομμιώδες (N mm)	1,37 ^b ± 0,24	1,95 ^c ± 0,04	1,36 ^b ± 0,17	0,71 ^a ± 0,009	0,49 ^a ± 0,15
Μασητικότητα (N mm)	1,53 ^{a,b} ± 0,31	1,95 ^b ± 0,04	1,48 ^{a,b} ± 0,13	0,94 ^{b,c} ± 0,22	0,49 ^c ± 0,15

a, b, c, d: Μέσοι όροι ευρισκόμενοι στην ίδια σειρά (γραμμή), ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα, δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($P \geq 0,05$)

Οι τιμές της σκληρότητας στις Μυζήθρες κυμάνθηκαν από 3,22-4,25N. Σε ανακατεργασμένο μαλακό τυρί οι Kaminarides *et al.*, (2000) μέτρησαν χαμηλότερες τιμές σκληρότητας, περίπου 1,56 N. Αντίθετα, σε φέτα 60 ημερών οι αντίστοιχες τιμές ήταν από 4,08-4,83kg (Pappas *et al.*, 1996_a), και σε φέτα ίδιας ηλικίας που παρασκευάστηκε με διαφορετική τεχνολογία οι τιμές κυμάνθηκαν από 4,38-6,55kg (Pappas *et al.*, 1996_b). Από αδημοσίευτες εργασίες που έγιναν στο εργαστήριο στη φέτα που οι τιμές αυτές ήταν από 8,5 έως 12N. Η μυζήθρα ΜΑΠ-10% παρουσίασε αυξημένη σκληρότητα και κομμιώδες και συνεπώς στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τις υπόλοιπες δυο μυζήθρες του πειράματος και ακόμα μεγαλύτερη με τις δυο κατηγορίες του εμπορίου ($P < 0,05$). Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην αύξηση της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες και επιβεβαιώνεται και από τη τιμή της υγρασίας επί της μη λιπαρής φάσης. Έτσι υπάρχει αύξηση συμμετοχής στο πρωτεϊνικό πλέγμα όπου δημιουργεί πιο ισχυρή και σταθερή δομή και συνεπώς κάνει το τυρί πιο «σκληρό» (Gunasekaran & Mehmet, 2003). Η προσθήκη πλήρους προσγάλακτος στη μυζήθρα ΜΠΠ-10%. μείωσε τη σκληρότητα, πιθανόν λόγω της αυξημένης ποσότητας λίπους που διείσδυσε στο πρωτεϊνικό πλέγμα των CN (Lucey *et al.*, 2003). Ομοίως, οι δυο κατηγορίες μυζήθρας του εμπορίου είχαν τις μικρότερες τιμές σκληρότητας διότι είχαν αυξημένη λιποπεριεκτικότητα και μειωμένη πρωτεϊνοπεριεκτικότητα με αποτέλεσμα το πρωτεϊνικό σύμπλεγμα να είναι πιο «χαλαρό». Η μυζήθρα ΜΑΠ-10% είχε μεγαλύτερη σκληρότητα ($P < 0,05$), που μπορεί να εξηγηθεί

από το μεγαλύτερο ποσοστό αλάτων και τέφρας (Kaminarides *et al.*, 2000). Επίσης οι Gupta & Reuter, (1993) βρήκαν ότι αυξάνοντας την ποσότητα συμπυκνώματος πρωτεΐνης τυρογάλακτος (WPC) με μερική αντικατάσταση στερεών του τυριού, είχε ως αποτέλεσμα μια αύξηση στη σκληρότητα. Σε παρόμοια αποτελέσματα κατέληξαν και οι Thapa & Gupta, (1992) με τη προσθήκη WPC σε ανακατεργασμένο τυρί.

Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μυζήθρων του πειράματος δεν υπήρξαν στις τιμές της συνάφειας παρόλο που παρουσιάζουν μια μικρή διακύμανση. Μόνο η μυζήθρα ΜΠΠ-10% διαφέρει από τις μυζήθρες των δυο κατηγοριών του εμπορίου και παρουσιάζει την υψηλότερη τιμή (12,3).

Στατιστικά σημαντικές διαφορές δεν υπήρχαν στην ελαστικότητα ανάμεσα σε καμία μυζήθρα που μελετήθηκε ($P > 0,05$). Γενικά, τυριά μειωμένης λιποπεριεκτικότητας εμφανίζουν μεγαλύτερη ελαστικότητα διότι αυξάνει η εκατοστιαία αναλογία των καζεϊνών (Gunasekaran & Mehmet, 2003). Στη συνεκτικότητα διέφεραν στατιστικά ($P < 0,05$) οι μυζήθρες ΜΧΠ και ΜΑΠ-10%.

3.4 Μικροβιολογικά χαρακτηριστικά

Πραγματοποιήθηκαν μικροβιολογικές αναλύσεις στις μυζήθρες του πειράματος και του εμπορίου. Ο πληθυσμός των κολοβακτηριοειδών, της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (OMX) και των ζυμών-μυκήτων στις μυζήθρες καταγράφονται στον πίνακα 3.8.

Πίνακας 3.8. Μικροβιολογικά χαρ/κά των πειραματικών τυριών Μυζήθρας και αυτών του εμπορίου

	ΜΧΠ	ΜΑΠ 10%	ΜΠΠ 10%	ΜΥΖΗΘΡΕΣ ΕΜΠΟΡΙΟΥ	ΞΙΝΟΜΥΖΗΘΡΕΣ ΕΜΠΟΡΙΟΥ
Ομάδες μικροοργανισμών	Πληθυσμός (log₁₀ cfu/g)				
OMX	3,7 ^{a, b} ± 0,16	4,12 ^b ± 0,08	3,48 ^a ± 0,13	7,97 ^c ± 0,52	7,54 ^c ± 0,89
Coliforms	1,57 ^{a, b} ± 0,1	1,33 ^a ± 0,2	1,77 ^b ± 0,1	2,35 ^c ± 0,8	1,31 ^a ± 0,9
Yeasts	1,23 ^a ± 0,07	1,43 ^a ± 0,05	1,18 ^a ± 0,08	1,98 ^b ± 0,4	3,75 ^c ± 0,7

a, b, c: Μέσοι όροι ευρισκόμενοι στην ίδια σειρά (γραμμή), ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα, δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($P \geq 0,05$)

Η OMX διέφερε στατιστικά ανάμεσα στις μυζήθρες ΜΑΠ-10% και ΜΠΠ-10% με 4,12 και 3,48 log₁₀ cfu/g αντίστοιχα, λόγω μάλλον επιμολύνσεων κατά τη διάρκεια της αποκορύφωσης και της προσθήκης του άπαχου προσγάλακτος στη μυζήθρα ΜΑΠ-10%. Η μυζήθρα ΜΧΠ δεν διέφερε με τις άλλες μυζήθρες στατιστικά όσον αφορά την OMX. Γενικότερα θα μπορούσαμε να πούμε ότι τα τυριά αυτά παρόλο που λαμβάνονται μετά από υψηλή θέρμανση του τυρογάλακτος έχουν μεγάλη μικροχλωρίδα που οφείλεται είτε σε μικροοργανισμούς που επιβίωσαν από την ψηλή θερμική επεξεργασία, είτε σε επιμολύνσεις από το πρόσγαλα ή μετά την παρασκευή τους (έκθεση στο περιβάλλον του τυροκομείου κατά τη στράγγιση, στον τρόπο συσκευασίας, κλπ).

Αντίθετα οι Μυζήθρες και Ξινομυζήθρες του εμπορίου εμφάνισαν μεγάλο μικροβιακό φορτίο (7,5-8 log₁₀ cfu/g) που διέφερε στατιστικά σημαντικά από τις μυζήθρες του πειράματος (P<0,05). Η υψηλή θερμοκρασία που εφαρμόζεται κατά τη θέρμανση του τυρογάλακτος καταστρέφει τους περισσότερους μικροοργανισμούς, που σημαίνει ότι τα τυριά αυτά ενδεχομένως ήταν άριστης μικροβιολογικής ποιότητας αμέσως μετά την παραγωγή τους. Η υψηλή υγρασία όμως (67,94 μέχρι 72,66%), το υψηλό pH (5,48) και η υψηλή λακτόζη (3,36%) στις Μυζήθρες εμπορίου φαίνεται ότι ευνόησαν στη συνέχεια την ανάπτυξη των μικροοργανισμών που επέζησαν κατά τη θερμική επεξεργασία ή προήλθαν από επιμολύνσεις και κακή διατήρηση και οδήγησαν στους μεγάλους πληθυσμούς που μετρήθηκαν στο τελικό προϊόν.

Στα ίδια συμπεράσματα καταλήγουμε και για τα κολοβακτηρίδια για τις Μυζήθρες του πειράματος όπου η μυζήθρα ΜΠΠ-10% εμφανίζει αυξημένο αριθμό κολοβακτηριδίων από τις άλλες 2 μυζήθρες καθώς και από τις Ξινομυζήθρες στις οποίες πιθανόν λόγω του χαμηλού τους pH να μην αναπτύχθηκαν πολλές αποικίες κολοβακτηριδίων. Αντίθετα οι Μυζήθρες εμπορίου είχαν τις υψηλότερες τιμές, 2,35 log₁₀ cfu/g, μάλλον λόγω επιμολύνσεων.

Στατιστικά σημαντική διαφορά δεν υπήρχε για το πληθυσμό των ζυμών-μυκήτων στις 3 μυζήθρες του πειράματος (P>0,05) με σχετικά μικρές τιμές (1,23-1,43 log₁₀ cfu/g) λόγω της θερμικής επεξεργασίας. Τα δείγματα του εμπορίου διέφεραν στατιστικά με τις μυζήθρες του πειράματος και ήταν επιβαρυνμένες μικροβιολογικά με τις τιμές να είναι κοντά στα 2 log₁₀ cfu/g και τις ξινομυζήθρες να έχουν αναπτύξει 3,75 log₁₀ cfu/g.

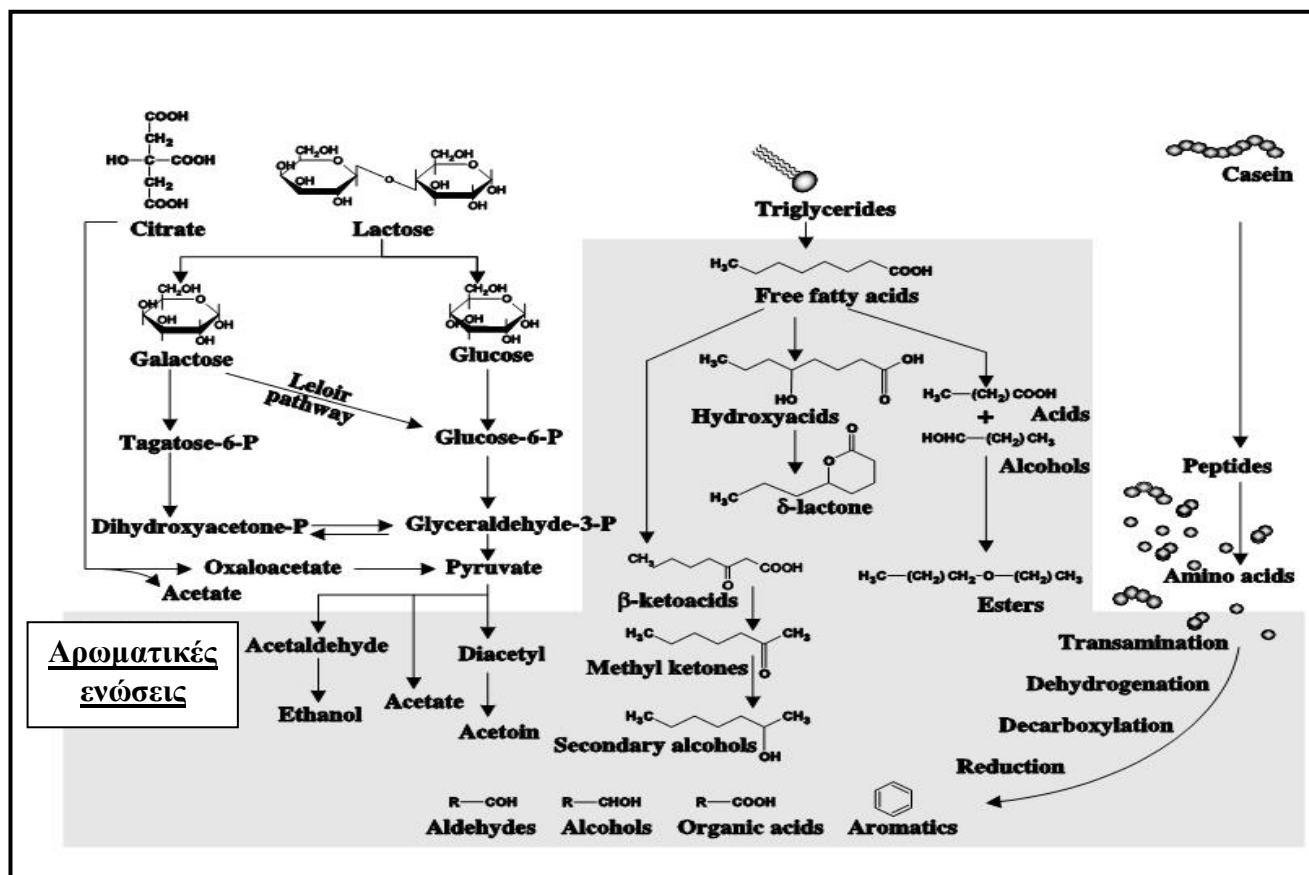
Μετρήσεις σε Μανούρια, που παρασκευάστηκαν από γάλα, που συλλέχθηκε κατά την περίοδο Άνοιξη-Καλοκαίρι, έδειξαν OMX από 4,25-4,91 log₁₀ cfu/g, κολοβακτηρίδια από 0,98-3,06 log₁₀ cfu/g και ζύμες από 2,41-4,9 log₁₀ cfu/g (Litoroulou-Tzanetaki & Tzanetakis, 2011). Μικροβιολογικές μετρήσεις σε τυριά Ανθότυρο εμπορικού τύπου παρουσίασαν υψηλές τιμές μικροβιακών πληθυσμών με μέσες τιμές κολοβακτηριδίων 6,74 log₁₀ cfu/g και ζυμών 5,48 log₁₀ cfu/g (Kalogridou-Vassiliadou *et al.*, 1994).

3.5 Αρωματικές Ενώσεις

Η τεχνική (HEAD) SPACE-SPME εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το 1990 (Arthur & Pawliszyn, 1990). Χρησιμοποιείται αρκετά συχνά στη ανάλυση των αρωματικών συστατικών σε τρόφιμα (Gianneli *et al.*, 2002; Jung *et al.*, 2003; Mallia *et al.*, 2005). Σε τυριά τα οποία έχουν υποστεί ωρίμανση (σκληρά, ημίσκληρα) και σε τυριά γενικά που έχουν προστεθεί καλλιέργειες εκκίνησης, έχουν βρεθεί και ταυτοποιηθεί αρκετές αρωματικές ενώσεις (Bosset & Gauch, 1993; Chin & Rosenberg, 1997) οι οποίες προκύπτουν από τη διάσπαση λίπους, λακτόζης και πρωτεΐνης (εικόνα 3.1). Οι Karagul-Yuceer *et al.*, (2003) προσδιόρισαν αρωματικές ενώσεις σε τυρόγαλα από τυρί Cheddar και βρήκαν ότι ουσίες όπως οι 2,3-βουτανοδιόνη, εξανάλη, 2-ακετυλο-1-πυρρολίνη, μεθειονάλη, (E, E) -2,4-εννεαδιενάλη, (E, E) -2,4-δεκαδιενάλη, και διάφορα βραχείας αλύσου πτητικά οξέα μπορεί να είναι σημαντικές για το άρωμα του τυρογάλακτος. Οι

Whetstine *et al.*, (2003) διαπίστωσαν ότι τυρόγαλα παραγόμενο από διάφορα είδη τυριών έχει διαφορετικές γεύσεις, και ότι η μεταβλητότητα αρώματος υπάρχει εντός του ίδιου είδους τυριού. Οι Tomaino *et al.*, (2004) μελέτησαν τη μεταβλητότητα της γεύσης του τυρογάλακτος που παράγεται από τυρόγαλα εργαστηριακής κλίμακας από τυρί Cheddar με χρήση μεμονωμένων στελεχών του *Lactococcus lactis spp. lactis*. Επιβεβαίωσαν ότι υπήρχαν διαφορές στο τυρόγαλα από διαφορετικές καλλιέργειες εκκίνησης διάφορων στελεχών. Επίσης μελέτες σε σκόνη γλυκού τυρογάλακτος (Mahajan *et al.*, 2004) απέδειξαν την ύπαρξη αρωματικών ενώσεων όπως αρκετά οξέα με κυριότερα τα οξικό, βουτυρικό, 3-μεθυλοβουτανικό, εξανόικό, οκτανόικό, δωδεκανόικό οξέα και 2,4-οκταδιενάλης, εξανάλης, επτανάλης, 2,4-δεκαδιενάλης, 2,4-εννεαδιενάλης, εννεανάλης κ.α. Γενικά η αυτοοξείδωση των λιπιδίων, η καραμελοποίηση των σακχάρων και οι αντιδράσεις Maillard μπορεί να εξηγήσουν την παραγωγή πολλών ενώσεων αρώματος σε τυρόγαλα και προϊόντα τυρογάλακτος λόγω της μεγάλης θερμικής επεξεργασίας που υπόκεινται.

Στις μυζήθρες του πειράματος δεν προστέθηκαν καλλιέργειες μικροοργανισμών και οι αναλύσεις έγιναν στα τυριά 1^{ης} ημέρας. Αναμένεται λοιπόν, σε τέτοιου είδους τυριά να μην ανιχνεύονται πολλές αρωματικές ενώσεις και να βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις. Η τεχνική SPME αποτελεί έτσι ιδανική λύση για προσδιορισμό αρωματικών ουσιών σε χαμηλές συγκεντρώσεις.



Εικόνα 3.1.
Βιοχημικά μονοπάτια αρωματικών ενώσεων (Marilley & Casey, 2004)

Από τον προσδιορισμό των αρωματικών συστατικών στις τρεις Μυζήθρες του πειράματος και τις δυο κατηγορίες του εμπορίου, ανιχνεύθηκαν αρωματικές ουσίες που ανήκουν στις εξής χημικές ομάδες: αλκοόλες, αλδεΐδες, κετόνες, οξέα, υδρογονάνθρακες, φουράνια, εστέρες, αμίνες και λακτόνες. Ο ημιποσοτικός προσδιορισμός τους έγινε με τη βοήθεια του εσωτερικού προτύπου κυκλοεξανόνη. Το σύνολο των αρωματικών συστατικών ανά κατηγορία, φαίνονται στον πίνακα 3.10 και 3.11. Αναλυτικοί πίνακες των ανιχνευθέντων αρωματικών ουσιών παρατίθενται στο παράρτημα Ι.1.

Πίνακας 3.10. Αρωματικά συστατικά των πειραματικών τυριών

Αρωματικές ουσίες	ΜΧΠ	ΜΑΠ-10%.	ΜΠΠ-10%.
	Ppm (n)*		
Αλκοόλες	11,30 (4)	24,41 (8)	32,66 (17)
Αλδεΐδες	0 (0)	1,79 (5)	9,18 (6)
Κετόνες	1,63 (3)	0,41 (3)	5,15 (1)
Οξέα	0,53 (1)	0,24 (1)	0 (0)
Υδρ/κες	3,20 (3)	1,21 (2)	3,48 (8)
Εστέρες	0 (0)	2,00 (2)	0 (0)
Φουράνια	0 (0)	0,03 (1)	0 (0)
Λακτόνες	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Σύνολο αρωματικών ουσιών</i>	16,66 (11)	30,09 (22)	50,47 (32)

* n ο αριθμός των αρωματικών ουσιών

Πίνακας 3.11. Αρωματικά συστατικά των τυριών του εμπορίου

Αρωματικές ουσίες	ΞΙΝΗ ΜΥΖΗΘΡΑ Α	ΞΙΝΗ ΜΥΖΗΘΡΑ Β	ΜΥΖΗΘΡΑ Α	ΜΥΖΗΘΡΑ Β
	(n)*			
Αλκοόλες	927,62 (11)	686,66 (8)	113,91 (22)	63,48 (13)
Αλδεΐδες	1,76 (3)	204,54 (4)	1,64 (1)	1,77 (1)
Κετόνες	43,45 (2)	92,08 (2)	19,89 (4)	11,77 (2)
Οξέα	0,60 (1)	11,88 (3)	13,21 (1)	1,55 (1)
Υδρ/κες	538,73 (4)	176,78 (3)	1,11 (4)	2,57 (2)
Εστέρες	59,76 (4)	11,12 (3)	0 (0)	0,17 (1)
Φουράνια	0 (0)	0 (0)	3,18 (3)	3,24 (1)
Αμίνες	0 (0)	0 (0)	0,86 (1)	0,38 (1)
Λακτόνες	0 (0)	0 (0)	15,76 (1)	0 (0)
<i>Σύνολο αρωματικών ουσιών</i>	1571,32 (25)	1183,06 (23)	169,56 (37)	84,93 (22)

* n ο αριθμός των αρωματικών ουσιών

Αναλυτικότερα:

Αλκοόλες

Οι πρωτοταγείς αλκοόλες προκύπτουν από αναγωγή των αλδεϋδών που σχηματίζονται από μεταβολισμό των αμινοξέων και ελεύθερων λιπαρών οξέων (Barbieri *et al.*, 1992).

Αλκοόλες κυριαρχούν ως αρωματικές ενώσεις σε αρκετά τυριά, συνήθως ωρίμανσης όπως π.χ. παρμεζάνα (Barbieri *et al.*, 1994) και στο πορτογαλικό τυρί Serra da Estrela (Tavaria *et al.*, 2004). Οι πρωτοταγείς και δευτεροταγείς αλκοόλες, μαζί με τις κετόνες θεωρούνται τα σημαντικότερα συστατικά του αρώματος των μαλακών τυριών (Le Quere & Molimard, 2002).

Από την ανάλυση προέκυψε ότι οι αλκοόλες αποτέλεσαν την ομάδα με τις περισσότερες ενώσεις που ανιχνεύτηκαν, συγκριτικά με τις υπόλοιπες ομάδες των αρωματικών ουσιών.

Ανιχνεύτηκαν οκτώ αλκοόλες στη ΜΑΠ-10%, τέσσερις στη ΜΧΠ και 17 στη ΜΠΠ-10%. Στη μυζήθρα ΜΑΠ-10% επικρατούσαν η 3-επτανόλη, 2,6-διμεθυλ- και η 1,4 πενταδιεν-3-όλη. Στη ΜΧΠ επικράτησε η 1-πεντανόλη, 2-μεθυλ- ενώ η ΜΠΠ-10% παρουσίασε περισσότερες αλκοόλες σε αξιόλογη συγκέντρωση με την 1-δεκανόλη να κυριαρχεί και να ακολουθούν η 3,7 οκταδιεν-2,6-διόλη, 2,6-διμεθυλ- και η 1,12-δωδεκανεδιόλη.

Μεγάλες διαφορές όσον αφορά τον αριθμό των αλκοολών ανάμεσα στις παραχθέντες μυζήθρες και τις Μυζήθρες του εμπορίου δεν υπήρχαν. Συγκεκριμένα, στη Μυζήθρα Α εμφανιστήκαν 22 αλκοόλες μεταξύ των οποίων επικρατέστερες ήταν η 3-οκτανόλη, 3,7-διμεθυλ-, η 4-ενανόλη, η κυκλοεξανόλη και η 5-μεθυλ-, 4-οκτανόλη. Στη Μυζήθρα Β εμφανίζονταν 13 αλκοόλες με κύριες την 1,4-πενταδιεν-3-όλη και τη 4-επτανόλη.

Αντίθετα οι Ξινομυζήθρες εμπορίου εμφάνισαν συνολικά μικρότερο αριθμό αλκοολών αλλά πολύ μεγάλη συγκέντρωση σε κάποιες αλκοόλες σε σχέση με όλες τις άλλες μυζήθρες, προφανώς λόγω της εκτεταμένης λιπόλυσης και της ωρίμανσης αυτών των τυριών. Συνεπώς, στη Ξινομυζήθρα Α ανιχνεύτηκαν 11 αλκοόλες ενώ στη Β οκτώ, όπου κυριαρχούσαν σε μεγάλη συγκέντρωση και στα δυο τυριά, η 1,4 πενταδιεν-3-όλη, η 3 επτανόλη-3-μεθυλ και η 4-ενανόλη. Στη Ξινομυζήθρα Α εμφανιστήκαν επίσης σε μεγάλη συγκέντρωση η 2-βουτεν-1-όλη και η 4-οκτανόλη, 7-μεθυλ ενώ στη Β είχαμε τη 1-βουτανόλη 2,2-διμεθυλ- και 3-πεντανόλη, 3-μεθυλ-.

Αλδεΐδες

Οι αλδεΐδες είναι συστατικά που εμφανίζονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις καθώς αποτελούν ενδιάμεσα προϊόντα μεταβολισμού· διατηρούνται ελάχιστα στα τυριά. Ανάγονται σε πρωτοταγείς αλκοόλες ή οξειδώνονται στα αντίστοιχα λιπαρά οξέα (Carbonell *et al.*, 2002).

Στη ΜΧΠ δεν εμφανίστηκε καμία αλδεΐδη, στη ΜΑΠ-10% βρέθηκαν 5 αλδεΐδες σε χαμηλή συγκέντρωση με ενδεικτική την εννεανάλη και τη βενζαλδεΐδη ενώ στη ΜΠΠ-10%. βρέθηκαν 6 κετόνες πάλι με κύριες την βενζαλδεΐδη, την εννεανάλη και τη γλουταράλη.

Στις μυζήθρες εμπορίου βρέθηκαν από μια κετόνη στη καθεμία όπου για την Α, είχαμε τη βενζαλδεΐδη και την εξανάλη, 2-εθυλ για τη Β. Στις ξινομυζήθρες Α και Β βρέθηκαν τρεις και τέσσερις αλδεΐδες αντίστοιχα, με την βενζαλδεΐδη να κυριαρχεί στην Α ενώ στη

Β κυριαρχούσαν η πενταδιενάλη, 2-μεθυλ- και η προπανάλη, 2-μεθυλ-, με τη τελευταία να βρίσκεται σε πάρα πολύ υψηλή συγκέντρωση.

Κορεσμένες αλδεΐδες όπως η επτανάλη, εξανάλη και εννεανάλη ανιχνεύτηκαν σε φρέσκια σκόνη τυρογάλακτος (Mahajan *et al.*, 2004). Επίσης σε τυρόγαλα που προήλθε από τυροκόμηση τυριού Cheddar με τη χρήση καλλιεργειών, βρέθηκαν επίσης εξανάλη, μεθανάλη και εννεανάλη (Karagul-Yuccer *et al.*, 2003).

Κετόνες

Οι κετόνες αποτελούν κοινά πτητικά συστατικά των γαλακτοκομικών προϊόντων. Οι κετόνες με μεγάλο αριθμό ατόμων άνθρακα ευθύνονται για την οσμή καμένου στο γάλα, που έχει υποστεί θερμική επεξεργασία (Contarini *et al.*, 1997).

Ανιχνεύτηκαν τρεις κετόνες στη μυζήθρα ΜΑΠ-10%, τρεις στη ΜΧΠ και μια στη ΜΠΠ-10%. Στη μυζήθρα ΜΑΠ-10% και ΜΧΠ οι κετόνες ήταν σε αρκετά χαμηλή συγκέντρωση ενώ στη ΜΠΠ-10% εντοπίστηκε η 1-προπανόνη, 2-μεθυλ-1-φαινυλ- σε αρκετά υψηλό ποσοστό από τις κετόνες συγκριτικά με τις κετόνες των ΜΑΠ-10% και ΜΧΠ.

Από τα δείγματα του εμπορίου, στη Μυζήθρα Α έχουμε τέσσερις κετόνες με σημαντικότερες την 1,3-κυκλοεξανεδιόνη και τη 3-πεντεν-2-όνη, στη Β έχουμε δυο κετόνες με σημαντικότερη τη 3-βουτεν-2-όνη. Η Ξινομυζήθρα Α είχε δυο κετόνες, με τη 2-βουτανόνη, 3-μεθοξυ-3-μεθυλ να υπάρχει σε μεγάλη συγκέντρωση ενώ η Β είχε δυο κετόνες, με τη 3-βουτεν-2-ονη να παρουσιάζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση από όλες τις κετόνες που βρέθηκαν σε όλα τα δείγματα.

Οξέα

Τα λιπαρά οξέα αποτελούν σημαντικά συστατικά του αρώματος των τυριών. Παράγονται κυρίως από το μεταβολισμό του λίπους, των πρωτεϊνών (αμινοξέα) και από της λακτόζης και από πρόδρομες ουσίες όπως κετόνες, αλδεΐδες και εστέρες μέσω οξειδωσης (Curioni & Bosset, 2002). Τα λιπαρά οξέα μεσαίας και βραχείας αλύσου είναι αυτά τα οποία συμβάλλουν κυρίως στο χαρακτηριστικό άρωμα των τυριών (Quijan *et al.*, 2002).

Στις μυζήθρες (ΜΑΠ-10%, ΜΧΠ, ΜΠΠ-10%) που παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο ανιχνεύτηκαν οξέα μόνο στις 2 (ΜΧΠ και ΜΑΠ-10%) και σε αρκετά χαμηλές συγκεντρώσεις. Οι μυζήθρες εμπορίου δεν παρουσίασαν μεγάλο αριθμό οξέων αλλά αυτά που ανιχνεύτηκαν ήταν σε αρκετά υψηλότερη συγκέντρωση από τις μυζήθρες του εργαστηρίου. Στη Μυζήθρα Α είχαμε το επτανοϊκό οξύ, 2,5-διεθυλ- ενώ στη Β και σε 3 χαμηλή συγκέντρωση το δωδεκανοϊκό οξύ. Στη Ξινομυζήθρα Α ανιχνεύτηκε το εξανοϊκό οξύ, 2-εθυλ- και στη Β εμφανίστηκαν 3 οξέα με σημαντικότερο το εξανοϊκό οξύ, 4-μεθυλ-. Το πρόβειο γάλα βρέθηκε ότι περιέχει σε σημαντικό βαθμό τα οξέα: δεκανοϊκό, οκτανοϊκό και εξανοϊκό (Vagenas & Roussis, 2012).

Εστέρες

Ένας μεγάλος αριθμός εστέρων έχει παρατηρηθεί στα τυριά. Αντιδράσεις εστεροποίησης υφίστανται από τις αλκοόλες που προέρχονται από τη ζύμωση της λακτόζης και από τα βραχεία έως μεσαία αλύσου λιπαρά οξέα (Le Quere & Molimard, 2002). Έχουν φρουτώδες άρωμα και συνεισφέρουν στη γευστική ισορροπία του τυριού ελαχιστοποιώντας τη τραχύτητα των λιπαρών οξέων και των αμινών (Pihno *et al.*, 2003).

Στις μυζήθρες ΜΧΠ, ΜΑΠ-10% και ΜΠΠ-10%. εστέρες εντοπιστήκαν μόνο στη ΜΑΠ-10%. και σε χαμηλή συγκέντρωση. Στη Μυζήθρα Α δεν ανιχνεύτηκαν εστέρες ενώ στη Β βρέθηκε ο μεθυλεστέρας του πεντανοικού οξέος, σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση. Στη Ξινομυζήθρα Α είχαμε 4 εστέρες και σε μεγάλη συγκέντρωση σχέση με τις άλλες μυζήθρες, με τον αιθυλεστέρα του βουτανικού οξέος, τον αιθυλεστέρα του δεκανοικού οξέος και τον αιθυλεστέρα του οκτανικού οξέος να κυριαρχούν. Παράλληλα στη Ξινομυζήθρα Β βρέθηκαν τρεις εστέρες με βασικό το αιθυλεστέρα του δεκανοικού οξέος.

Υδρογονάνθρακες

Παρόλο που οι αλειφατικές αλυσίδες υδρογονανθράκων (αλκάνια, αλκένια, αλκίνια, αλκαδιένια) δε συμβάλλουν άμεσα στο σχηματισμό αρώματος στα τυριά, αλλά και σε όλα τα τρόφιμα γενικότερα, ωστόσο έχουν την ικανότητα να τροποποιούν την πτητικότητα και τις ιδιότητες προσδώσεως αρώματος άλλων πτητικών συστατικών (Ortigosa *et al.*, 2001).

Στη μυζήθρα ΜΑΠ εντοπίστηκαν δυο υδρογονάνθρακες, στη ΜΧΠ τρεις και στη ΜΠΠ-10% 8, αλλά και τα 3 τυριά εμφάνισαν χαμηλές συγκεντρώσεις. Στη ΜΧΠ το εξένιο, 3-μεθυλ είχε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση από τους υδρογονάνθρακες που ανιχνεύτηκαν στα τρία τυριά. Στις μυζήθρες εμπορίου, είχαμε παρόμοια αποτελέσματα με χαμηλές συγκεντρώσεις, όπου στη Μυζήθρα Α είχαμε τέσσερις υδρογονάνθρακες ενώ στη Β δυο. Αντίθετα οι Ξινομυζήθρες εμπορίου εμφάνισαν πάρα πολύ υψηλές συγκεντρώσεις σε δυο υδρογονάνθρακες που ανιχνεύτηκαν, το βουτάνιο, 2-μεθόξυ-2-μεθύλ- και το προπάνιο 2-μεθόξυ-2-μεθύλ.

Φουράνια

Τα φουράνια σχηματίζονται κατά την αντίδραση Maillard. Κύρια πηγή των φουρανίων αποτελεί η θερμική αποικοδόμηση των οργανικών μορίων (Maga, 1979). Δεν βρίσκονται στο νωπό γάλα, αλλά προέρχονται από την αποικοδόμηση και την αφυδάτωση της λακτόζης σε γάλα που θερμαίνεται πάνω από τους 90°C (Shibamoto, 1980). Σημαντικά παράγωγα των φουρανίων ως αρωματικές ενώσεις σε θερμασμένα γάλατα, αποτελούν η φουρφουράλη και υδροξυμεθυλοφουρφουράλη (Burton *et al.*, 1988).

Φουράνια βρέθηκαν μόνο στις Μυζήθρες εμπορίου Α και Β και σε ελαχίστη συγκέντρωση στη ΜΑΠ-10%. Στη Μυζήθρα Α βρέθηκαν τρία φουράνια με το φουράνιο, 2,3-διϋδρο να βρίσκεται στη μεγαλύτερη συγκέντρωση ενώ στη Μυζήθρα Β εμφανίστηκε η 3-φουραμεθανόλη.

Αμίνες

Οι αμίνες είναι αζωτούχες πτητικές ενώσεις, που παράγονται από διάφορες αλληλεπιδράσεις και σχηματίζονται κατά τη μη-ενζυμική αμαύρωση (Calvo *et al.*, 1992).

Στις μυζήθρες ΜΧΠ, ΜΑΠ-10% και ΜΠΠ-10% δεν ανιχνεύτηκαν καθόλου αμίνες. Στις Μυζήθρες του εμπορίου βρέθηκαν σε ελάχιστες συγκεντρώσεις η 1,3-βουτανοδιαμίνη για τη Μυζήθρα Α και η 2-αιθυλπιπεριδίνη για τη Μυζήθρα Β. Στις Ξινομυζήθρες εμπορίου δεν ανιχνεύτηκαν επίσης καθόλου αμίνες.

Λακτόνες

Οι λακτόνες είναι κυκλικοί εστέρες, βρίσκονται στο λίπος του γάλακτος και συναντώνται στα τυριά προσδίδοντας φρουτώδη οσμή και γλυκεία γεύση (Duffose *et al.*, 1994). Η συμβολή τους ωστόσο στο άρωμα των τυριών είναι περιορισμένη όμως (Urbach, 1997). Οι πρόδρομες ουσίες των λακτονών είναι τα δ-υδροξυοξέα από τα κορεσμένα λιπαρά οξέα του γάλακτος ή από θέρμανση αυτών των πρόδρομων ουσιών, παρουσία νερού. Ένας τέτοιος μηχανισμός μπορεί να ευθύνεται για το σχηματισμό λακτονών σε θερμασμένο γάλα, καθώς και σε αποξηραμένα προϊόντα (Calvo *et al.*, 1992).

Μια λακτόνη ανιχνεύτηκε στη Μυζήθρα Α, η παντολακτόνη ενώ στα υπόλοιπα τυριά δεν ανιχνεύτηκε καμιά λακτόνη.

3.6 Οργανοληπτική αξιολόγηση

Πίνακας 3.11. Οργανοληπτικά χαρ/κα των πειραματικών τυριών Μυζήθρας και αυτών του εμπορίου

	ΜΧΠ	ΜΑΠ-10%	ΜΠΠ-10%	ΜΥΖΗΘΡΕΣ ΕΜΠ	ΞΙΝΟΜΥΖΗΘΡΕΣ ΕΜΠ
Χρώμα	9,6 ^{b,c} ± 0,08	9,79 ^c ± 0,1	9,84 ^c ± 0,09	9 ^{a,b} ± 0,001	8,36 ^a ± 0,45
Υφή	34,43 ^{b,c} ± 1,86	30,55 ^{a,b} ± 1,31	36,14 ^c ± 0,93	31,66 ^{a,b} ± 0,38	28,38 ^a ± 1,75
Γεύση	44,68 ^c ± 0,88	38,71 ^a ± 1,61	44,68 ^c ± 0,88	40,83 ^{a,b} ± 1,2	42,17 ^{a,b} ± 0,42
ΣΥΝΟΛΟ	88,71	79,05	90,66	81,49	78,91

a, b, c : Μέσοι όροι ευρισκόμενοι στην ίδια σειρά (γραμμή), ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα, δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($P \geq 0,05$)

Οι υπολογισμοί έγιναν όπως αναφέρθηκε στη παρ. 2.8. Στον πίνακα 3.11 παρουσιάζεται η συνολική βαθμολογία των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, συνολικά.

Η μυζήθρα ΜΑΠ-10% αναφέρθηκε ότι είχε τραχεία και συνεκτική δομή και ήταν λίγο στεγνή με κοκκώδη υφή, πιθανόν λόγω της μεγαλύτερης περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη. Η μυζήθρα ΜΧΠ αντίθετα θεωρήθηκε γαλακτώδης, με γλυκίζουσα γεύση, με λιγότερο τραχεία υφή και πιο εύγεστη από την ΜΑΠ-10%. Η μυζήθρα ΜΠΠ απέσπασε τη μεγαλύτερη βαθμολογία και θεωρήθηκε η καλύτερη από όλες, πιο εύγεστη, πιο εύκολη στη κατάποση και κρεμώδης πιθανόν λόγω της αυξημένης λιποπεριεκτικότητας από το

πλήρες πρόσγαλα που προστέθηκε. Όλες οι μυζήθρες του πειράματος ήταν ανάλατες και τονίστηκε από όλους τους δοκιμαστές η έλλειψη αλατιού.

Σημαντικά Στατιστική διαφορά ($P < 0,05$) παρατηρήθηκε μεταξύ της μυζήθρας ΜΑΠ-10% και ΜΠΠ-10%, κάτι που καθιστά τη μυζήθρα ΜΑΠ-10% με τα χαμηλότερα λιπαρά, υποδεέστερη οργανοληπτικά. Ωστόσο η ΜΑΠ-10% έλαβε αρκετά καλή συνολική βαθμολογία (79% περίπου) και ήταν αποδεκτή από τους δοκιμαστές.

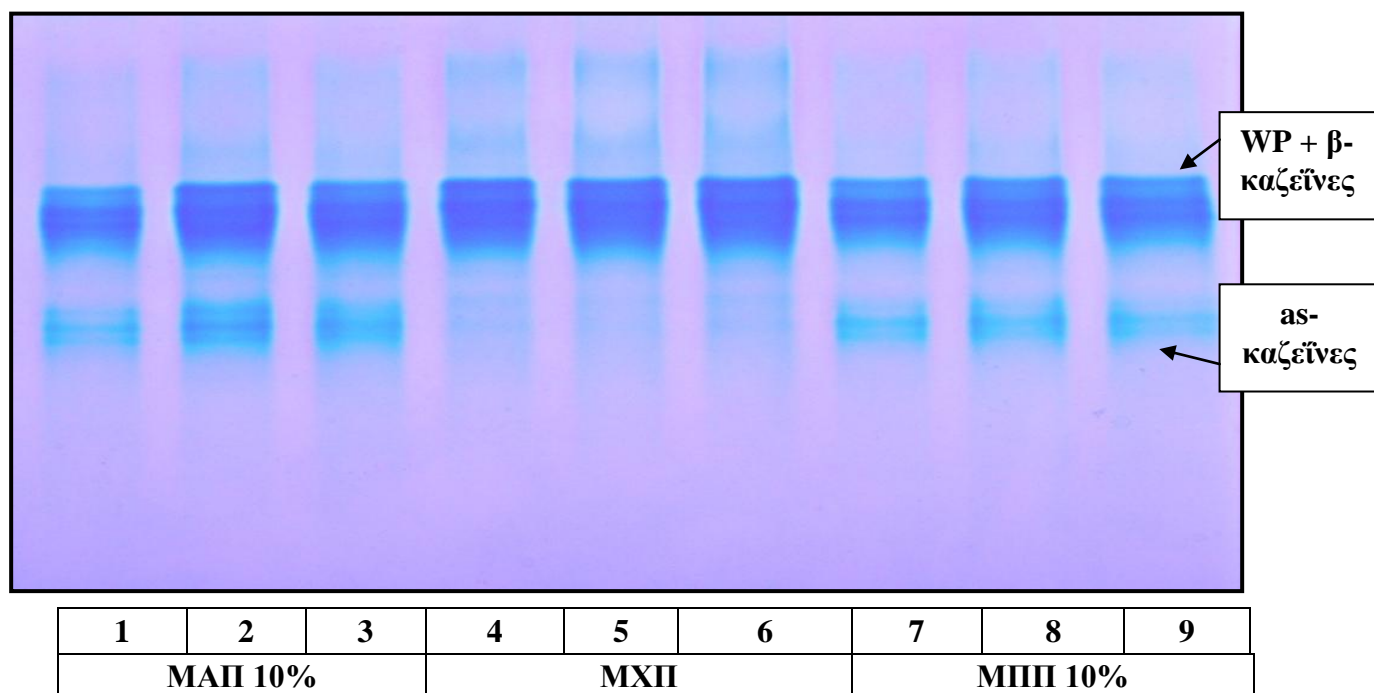
Οι μυζήθρες του εμπορίου υστερούσαν στην γεύση σε σχέση με τις μυζήθρες με πρόσγαλα του πειράματος, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στο χαμηλότερο ποσοστό λίπους (12% έναντι 14% στην ΜΠΠ-10%). Ομοίως οι μυζήθρες αυτές απέσπασαν μικρότερη βαθμολογία όσον αφορά την υφή/δομη και αυτό οφείλεται μάλλον στο χαμηλότερο ποσοστό πρωτεϊνών, κάτι το οποίο επιβεβαιώνεται και από τις τιμές των ρεολογικών όπου οι τιμές σκληρότητας ήταν κατά πολύ χαμηλότερες. Οι μυζήθρες του εμπορίου θεωρήθηκαν γευστικά κατώτερες από τις ξινομυζήθρες, χαρακτηρίστηκαν από τους δοκιμαστές σαν προϊόντα με υπόγλυκη γεύση και ιδιαίτερα αυξημένη υγρασία. Οι Ξινομυζήθρες αντίθετα θεωρήθηκαν νόστιμες, πικάντικες, λίγο ξινές και με αλοιφώδη υφή παρόμοια με αυτή της κοπανιστής.

3.7 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (PAGE) υπό φυσιολογικές συνθήκες (Native) και παρουσία Sodium dodecyl sulphate (SDS)

Στην ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (PAGE) υπό φυσιολογικές συνθήκες (NATIVE) ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται με βάση το φορτίο τους.

Στην ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (PAGE) παρουσία του Sodium dodecyl sulphate (SDS) (ανιονικός μετουσιωτικός παράγοντας) ο τελικός διαχωρισμός εξαρτάται από τις διαφορές στη σχετική μοριακή μάζα των πολυπεπτιδίων. Η προσθήκη του SDS προσδίδει στις πρωτεΐνες αρνητικό φορτίο και έτσι αυτές μεταναστεύουν προς το θετικό πόλο με τις πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους να κινούνται γρηγορότερα. Η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της σχετικής μοριακής μάζας των πρωτεϊνών και για τον προσδιορισμό της κατανομής των πρωτεϊνικών κλασμάτων. Επίσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν διαφορετικές μέθοδοι χρώσης για τον εντοπισμό πρωτεϊνών και για την εύρεση των βιοχημικών ιδιοτήτων τους.

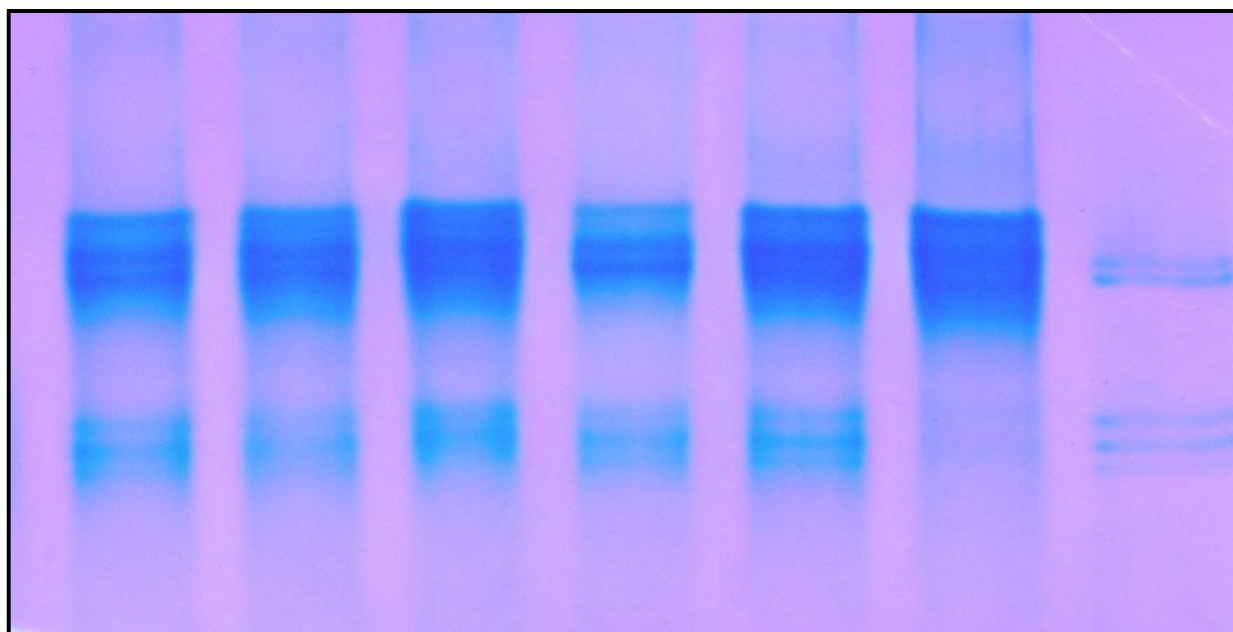
Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνών όλων των μυζηθρών που μελετήθηκαν σε NATIVE-PAGE φαίνονται στις εικόνες 3.1 και 3.2.



Εικόνα 3.1 : Ηλεκτροφορητικό προφίλ NATIVE-PAGE των πρωτεϊνών των πειραματικών Μυζηθρών. Θέσεις 1,2, 3: **ΜΑΠ-10%**, θέσεις 4,5, 6: **ΜΧΠ**., θέσεις 7,8, 9: **ΜΠΠ-10%**

Η πρώτη ζώνη αντιστοιχεί στις β-καζεΐνες και τις πρωτεΐνες του ορού (WP) (Kaminarides *et al.*, 1995). Όπως φαίνεται δεν διαχωρίζονται οι επιμέρους πρωτεΐνες του ορού (WP) πιθανόν λόγω της μετουσίωσής τους κατά τη θέρμανση (Jelen & Rattray, 1995; Walstra *et al.*, 1999) και της δημιουργίας συμπλόκων της β-Lg με την κ-CN και την α-La (Smits & van Brouwershaven, 1980; Haque & Kinsela, 1988; Cho *et al.*, 2003; Patel *et al.*, 2006).

Η δεύτερη ζώνη εμφανίζεται στα τυριά ΜΠΠ-10% και ΜΧΠ και αντιστοιχεί στις ασ-καζεΐνες (Kaminarides *et al.*, 1995). Φαίνεται σαφώς η απουσία προσγάλακτος στα παραπάνω τυριά, διότι στις μυζήθρες ΜΧΠ η ζώνη αυτή απουσιάζει.



1	2	3	4	5	6	7
ΕΙΝΟΜΥΖΗΘΕΡΕΣ ΕΜΠΟΡΙΟΥ		ΜΥΖΗΘΕΡΕΣ ΕΜΠΟΡΙΟΥ		ΜΑΠΙ 10%	ΜΧΠ	ΙΣΟ-CN

Εικόνα 3.2 : Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών NATIVE-PAGE δειγμάτων μυζηθρών. Θέσεις 1,2: **Είνομυζήθρες εμπορίου**, θέσεις 3,4 : **Μυζήθρες εμπορίου**, θέση 5: **ΜΑΠΙ 10%**, θέση 6: **ΜΧΠ**. Στη θέση 7 είναι καθαρή ισοηλεκτρική καζεΐνη πρόβειου γάλακτος (**ΙΣΟ-CN**)

Στην εικόνα 3.2 φαίνεται το ηλεκτροφορητικό προφίλ της NATIVE-PAGE των Μυζηθρών του εμπορίου. Στη θέση 7 τοποθετήθηκε σαν μάρτυρας ταυτοποίησης των πρωτεϊνών, η ισοηλεκτρική καζεΐνη του πρόβειου γάλακτος (ISO-CN), η οποία διαχωρίστηκε στις ασ-καζεΐνες με μεγάλη ηλεκτροφορητική κινητικότητα και στις β-καζεΐνες με μικρότερη ηλεκτροφορητική ικανότητα. Από την εικόνα διαπιστώνεται ότι όλες οι μυζήθρες του εμπορίου παρουσιάζουν τις ζώνες των ασ-καζεϊνών γεγονός που αποδεικνύει την προσθήκη προσγάλακτος.

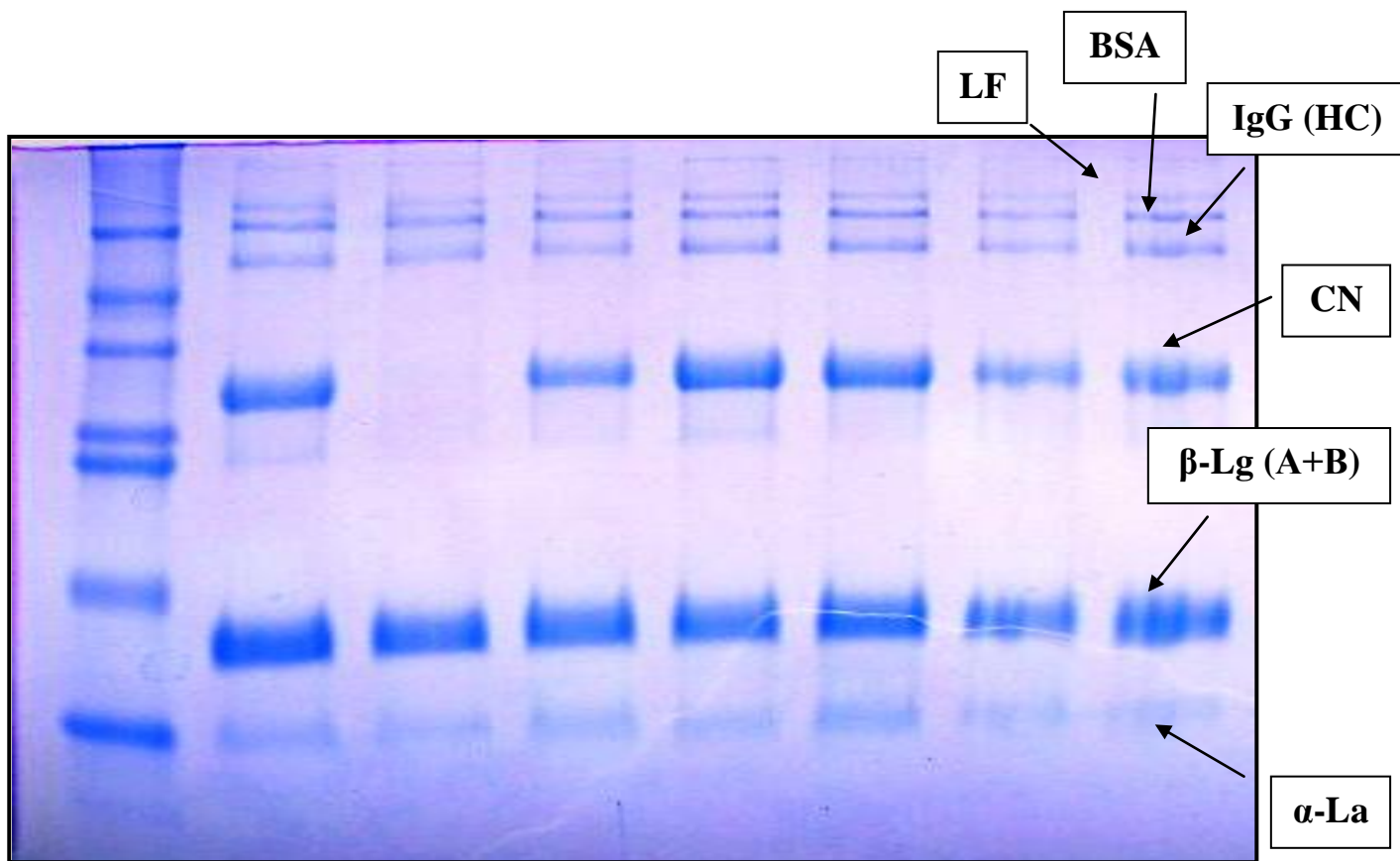
Στις εικόνες 3.3 και 3.4 φαίνεται το ηλεκτροφορητικό προφίλ των πρωτεϊνών σε SDS-PAGE των δειγμάτων και πρότυπων καθαρών πρωτεϊνών αντίστοιχα, όπου οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθος των μορίων τους και στον πίνακα 3.12 δίνονται τα στοιχεία του Marker M7, ο οποίος χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση του MB των πρωτεϊνών.

Στα τυριά τυρογάλακτος όπως αναφέρεται αναλυτικά στις παραγράφους 1.3.1 και 1.3.2., λόγω της θερμικής επεξεργασίας οι πρωτεΐνες του ορού σχηματίζουν σύμπλοκα, είτε μεταξύ τους, είτε με τα καζεϊνικά κλάσματα που είτε έχουν απομείνει στο τυρόγαλα είτε υπάρχουν λόγω της προσθήκης προσγάλακτος. Στόχος λοιπόν της κατεργασίας των

δειγμάτων με SDS ήταν η αποσύνδεση των πρωτεϊνών έτσι ώστε να αποκτηθούν τα συστατικά των πρωτεϊνικών μιγμάτων σε μονομερή μορφή. Το SDS έχει αυτή την ιδιότητα να παρεμποδίζει δηλαδή το σχηματισμό ενδο- και διαμοριακών δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των πρωτεϊνών. Επιπλέον, η παρουσία ουρίας και EDTA σε υψηλή συγκέντρωση (8M) επεκτείνει αυτή τη δράση και στο εσωτερικό των πρωτεϊνικών δομών και συσσωματωμάτων. Προστίθεται επίσης μερκαπτοαιθανόλη που λύει τους δισουλφιδικούς δεσμούς.

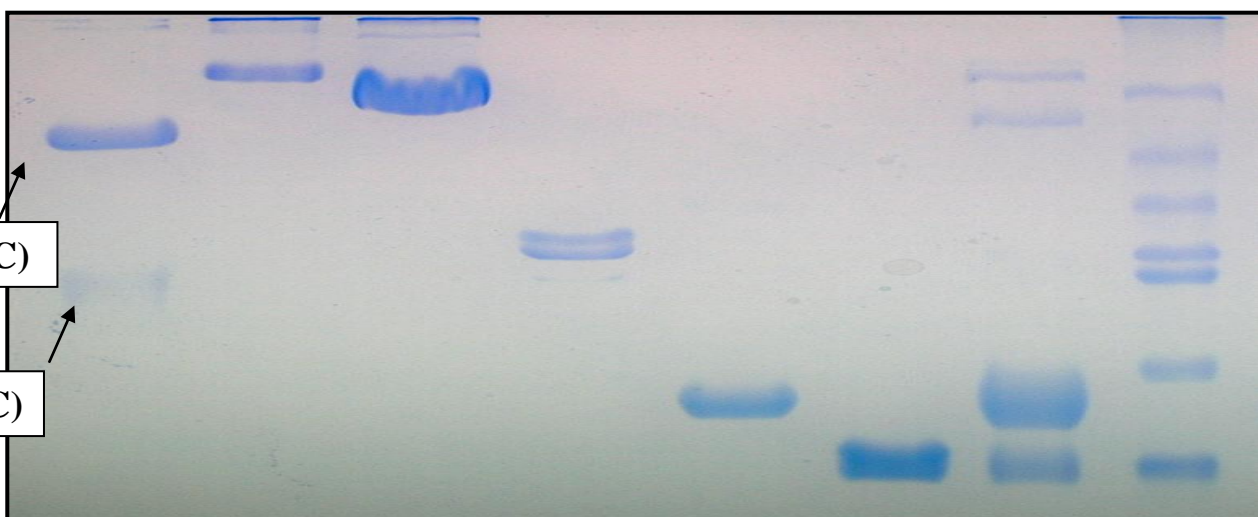
Πίνακας 3.12. Μάρτυρες μοριακών μαζών του Marker M7

Ζώνες Ηλεκτροφόρησης	Πρωτεΐνη-Ένζυμο	MB (Da)
1 ^η ζώνη	<i>Albumin, bovine</i>	66.000
2 ^η ζώνη	<i>Albumin, egg</i>	45.000
3 ^η ζώνη	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase, rabbit muscle</i>	36.000
4 ^η ζώνη	<i>Carbonic Anhydrase, bovine</i>	29.000
5 ^η ζώνη	<i>Trypsinogen, bovine pancreas</i>	24.000
6 ^η ζώνη	<i>Trypsin Inhibitor, soybean</i>	20.000
7 ^η ζώνη	<i>α-Lactalbumin, bovine milk</i>	14.200



1	2	3	4	5	6	7	8
Marker 7	ΜΑΠ 10%	ΜΧΠ	ΜΠΠ 10%	ΞΙΝΟΜΥΖΗΘΡΕΣ ΕΜΠΟΡΙΟΥ		ΜΥΖΗΘΡΕΣ ΕΜΠΟΡΙΟΥ	

Εικόνα 3.3 : Ηλεκτροφόρητικό προφίλ SDS-PAGE των πρωτεϊνών των μυζηθρών που μελετήθηκαν. Θέση 1: Marker M7, θέση 2: ΜΑΠ-10%, θέση 3: ΜΧΠ, θέση 4: ΜΠΠ-10%, θέσεις 5, 6: Ξινομυζήθρες εμπορίου, θέσεις 7, 8: Μυζήθρες εμπορίου



1	2	3	4	5	6	7	8
IgG	LF	BSA	ISO-CN	β-Lg	α-La	WPC 65%	Marker M7

Εικόνα 3.4 : Ηλεκτροφορητικό προφίλ καθάρων προτύπων πρωτεϊνών. Θέσεις 1, 2, 3, 4, 5, 6: IgG, LF, BSA, ISO-CN, β-Lg και α-La, αντίστοιχα, θέση 7: συμπύκνωμα πρωτεϊνών τυρογάλακτος 65% (WPC), θέση 8: Marker M7

Στην εικόνα 3.3 οι 3 μικρές πρώτες ζώνες που εμφανίζονται σε όλα τα δείγματα του τυριού Μυζήθρα (θέσεις 2-8) αντιστοιχούν, κατά σειρά (από πάνω προς τα κάτω) στη λακτοφερίνη (LF), την οροαλβουμίνη (BSA) και τη βαριά αλυσίδα της ανοσογλοβουλίνης IgG. Η οροαλβουμίνη αντιστοιχεί με αυτήν του marker με MB 66.000. Η LF με μεγαλύτερο MB (80.000) βρίσκεται ακριβώς πάνω από την BSA. Είναι γνωστό ότι η IgG υπό την επίδραση της 2-μερκαπτοαιθανόλης (2-ME), διαχωρίζεται στη βαριά και ελαφριά αλυσίδα IgG (IgG- heavy chain (HC) και IgG- light chain (LC)). Το MB της συνολικής IgG είναι 160.000 με τις δυο ελαφριές αλυσίδες (LC) να έχουν MB: 23-25.000 η καθεμία και τις δυο βαριές(HC) να έχουν MB 53.000-55.000 η καθεμία (Guidry *et al.*, 1985; Larson, 1992). Στην εικόνα 3.3 δεν διακρίνεται η ζώνη της ελαφριάς αλυσίδας IgG (LC), ίσως λόγω του ότι το ποσοστό της IgG βρισκόταν σε χαμηλή συγκέντρωση στα δείγματα που μελετήθηκαν. Οι ζώνες των IgG (HC) και IgG (LC) διακρίνονται στην εικόνα 3.4 με τα πρότυπα (θέση 1).

Οι υπόλοιπες ανοσογλοβουλίνες IgA και IgM βρίσκονται σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση στο πρόβειο τυρόγαλα γι αυτό το λόγο δεν σχηματίζουν ζώνες (Butler & Kehrl, 2004).

Στην 4^η ζώνη (εικόνα 3.3) εντοπίζεται η διαφοροποίηση των μυζηθρών σε σχέση με την παρουσία η μη προσγάλακτος-Πράγματι στην κατατομή των πρωτεϊνών της μυζήθρας χωρίς πρόσγαλα (MXII) (θέση 3) απουσιάζει η 4^η ζώνη η οποία είναι έντονη στα υπόλοιπα τυριά που μελετήθηκαν (θέσεις 2,4,5,6,7,8). Επειδή η ζώνη αυτή αντιστοιχεί στις καζεΐνικο κλάσμα (CN) του γάλακτος, σημαίνει ότι στα τυριά αυτά έχει προστεθεί πρόσγαλα.

Στην 5^η κατά σειρά ζώνη (εικόνα 3.3) εντοπίζεται η β-Lg με τις δυο γενετικές παραλλαγές (A+B) (Amigo *et al.*, 2000), με MB 18.400 ανάμεσα στη ζώνη των καζεΐνων (CN) και της α-La. Είναι εύκολο να χαρακτηριστεί γιατί βρίσκεται πιο κάτω από την 6^η ζώνη του marker M7 που αντιστοιχεί στον αναστολέα της θρυψίνης με 20.000 MB. Η α-La με MB 14.000 είναι η τελευταία ζώνη που ταυτίζεται με τη ζώνη της α-La του M7. Είναι φανερό ότι η συγκεκριμένη οροπρωτεΐνη είναι σε μικρότερη συγκέντρωση σε σχέση με τη β-Lg η οποία αποτελεί το 50% περίπου των πρωτεϊνών του ορού στο τυρόγαλα. Σε SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση εμπορικών δειγμάτων α-La, β-Lg, WPI και καζεϊνομακροπεπτιδίου (CMP) που πραγματοποίησαν οι Farias *et al.*, (2010) διαχωρίζονται οι ζώνες τις β-Lg και α-La με παρόμοιο τρόπο με αυτόν, για τα τυριά που μελετήθηκαν.

Το καζεϊνομακροπεπτιδίο (CMP) δεν εμφανίζεται πιθανόν λόγω του χαμηλού μοριακού βάρους που κυμαίνεται για το μη-γλυκοζυλιωμένο CMP (aCMP) μεταξύ 6787 και 6755 Dalton, ανάλογα με τη γενετική παραλλαγή. Για τη μέση μοριακή μάζα του συνόλου του CMP έχουμε τα 7500 Dalton με το υψηλότερο MB να φτάνει τα 9631 Dalton που αντιστοιχεί σε εξαιρετικά γλυκοζυλιωμένα (GCMP) (Molle & Leonil, 2005).

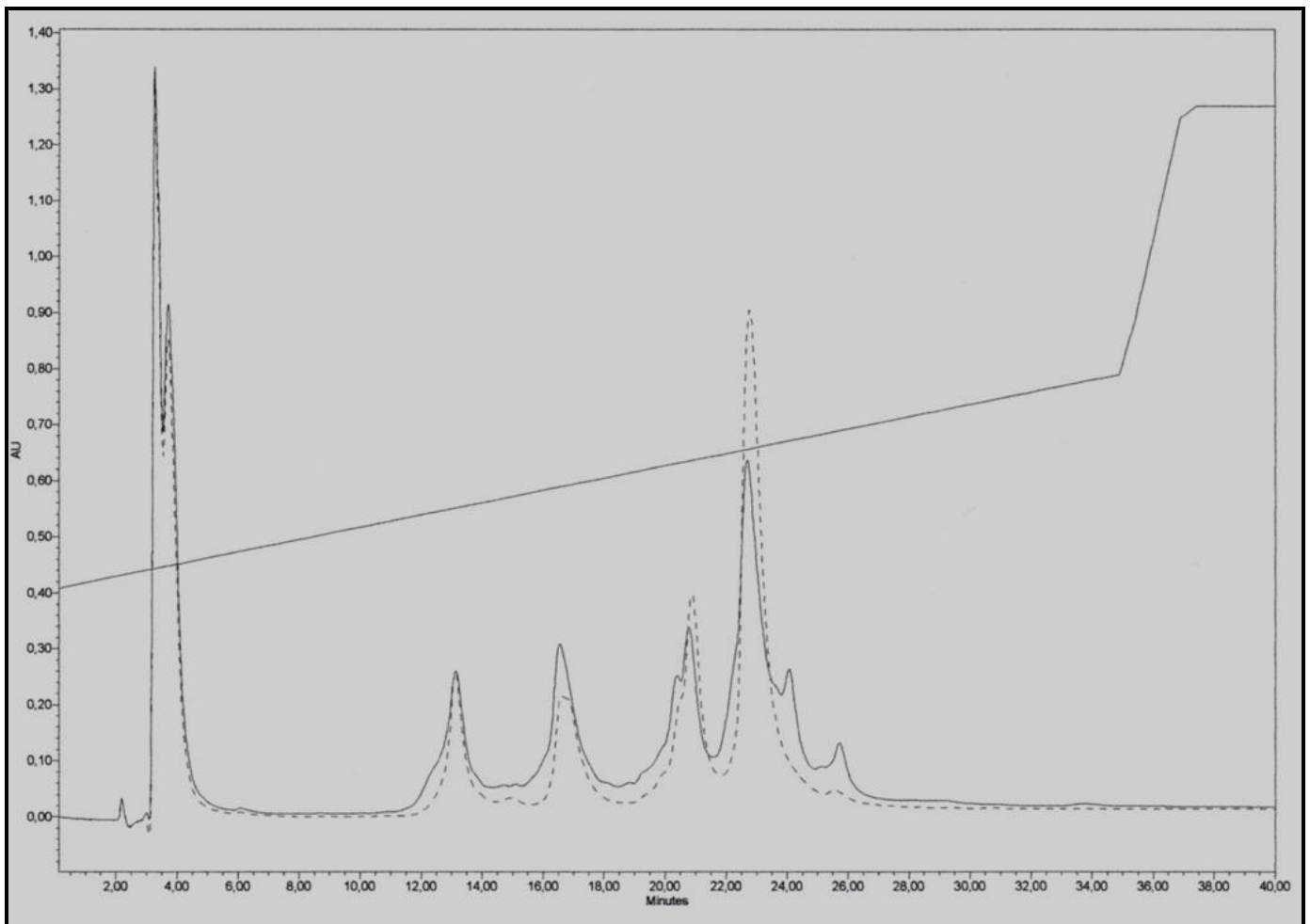
Η εικόνα της SDS-PAGE των πειραματικών τυριών (εικόνα 3.3) είναι παρόμοια με αυτή που δίνουν σε άλλες ερευνητικές εργασίες, στις οποίες μελετήθηκαν οι πρωτεΐνες ορού σε τυρόγαλα, σε WPC και επεξεργασμένα γάλατα (Casper *et al.*, 1998, Basch *et al.*, 1985) και αλλού (Strange *et al.*, 1992; Law *et al.*, 1994).

3.8 Διερεύνηση της δυνατότητας ανάλυσης και μελέτης του πρωτεϊνικού κλάσματος των τυριών με RP-HPLC

Αναλύθηκαν δείγματα ιζημάτων τυριών και υπερκειμένων όπως αναφέρονται στο κεφάλαιο ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ (παρ., 2.6). Διαπιστώθηκε ότι ο διαχωρισμός μεταξύ καζεϊνών και πρωτεϊνών ορού παρατηρήθηκε με την προετοιμασία I των ιζημάτων. Ενδεικτικές κατατομές της μεθόδου έκλουσης που εφαρμόστηκε αρχικά, παριστάνεται στην εικόνα 3.5.

Το πρόβλημα που έπρεπε να αντιμετωπισθεί στην περίπτωση αυτού του τυριού είναι η μετουσίωση των πρωτεϊνών του ορού που συμβαίνει στις πολύ υψηλές θερμοκρασίες που εφαρμόζονται κατά την παρασκευή των τυριών τυρογάλακτος (βλέπε υλικά και μέθοδοι και παρ.1.3). Ενώ οι πρωτεΐνες του ορού είναι διαλυτές σε υδατικά διαλύματα όταν μετουσιωθούν σχηματίζουν συσσωματώματα τα οποία συγκρατούνται με υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις, δεσμούς υδρογόνου, κυρίως δισουλφιδικούς δεσμούς. Επιπλέον συσσωματώνονται παρουσία του ασβεστίου που υπάρχει στο τυρόγαλα, αλλά και στο πρόσγαλα. Η κατάσταση αυτή γίνεται ακόμη πιο περίπλοκη παρουσία προσγάλακτος. Στην περίπτωση αυτή παρουσιάζεται η επιπλέον δυσκολία ότι η μετουσιωμένη β-Lg, η οποία είναι η πιο άφθονη πρωτεΐνη του τυρογάλακτος, συνδέεται με την κ-CN των μικκυλίων με S-S γέφυρες (Καμινारीδης και Μοάτσου, 2009). Σκοπός της προετοιμασίας του δείγματος πριν από τη χρωματογραφική ανάλυση είναι να εξασφαλισθεί ότι τα συστατικά ενός μίγματος πρωτεϊνών, όπως αυτές που βρίσκονται στο τυρί, είναι σε μονομερή μορφή, έτσι ώστε να διαχωριστούν κατά την έκλουση ανάλογα με τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Επομένως, η προετοιμασία αυτών των δειγμάτων θα έπρεπε να εξασφαλίσει τα εξής: α) αποδιοργάνωση των συσσωμάτων των πρωτεϊνών ορού, β) αποδιοργάνωση των μικκυλίων στις περιπτώσεις που προστέθηκε πρόσγαλα, και γ) αποδιοργάνωση των συμπλεγμάτων πρωτεϊνών ορού/μικκυλίων καζεΐνης.

Η ουρία αποδιοργανώνει τους υδροφοβικούς δεσμούς και τους δεσμούς υδρογόνου. Η ουρία διασπά τους ενδομοριακούς Η-δεσμούς των πρωτεϊνών και εξασθενεί τις υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις (Nozaki & Tanford, 1963). Είναι επομένως ένας παράγοντας αποδιοργάνωσης των πρωτεϊνικών δομών. Η διθειοθρεϊτόλη παρεμποδίζει το σχηματισμό ενδο- και διαμοριακών δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των πρωτεϊνών. Επιπλέον, η παρουσία μετουσιωτικών παραγόντων όπως οι υψηλές συγκεντρώσεις ουρίας (8M) εξασφαλίζει ότι αυτή δράση επεκτείνεται και στο εσωτερικό των πρωτεϊνικών δομών ή συσσωματωμάτων (διαδύκτιο, Δ1, 2013). Η μερκαπτοαιθανόλη είναι επίσης παράγοντας αποδιοργάνωσης των δισουλφιδικών δεσμών, έχει φθηνότερο κόστος (αλλά εξαιρετικά δυσάρεστη οσμή) και χρησιμοποιήθηκε στην προετοιμασία II, κατά αναλογία της προετοιμασίας των δειγμάτων για την ηλεκτροφόρηση. Το κιτρικό τρινάτριο χρησιμοποιήθηκε ως χηλωτικός παράγοντας για το ασβέστιο, με τη δέσμευση του οποίου αποδιοργανώνεται η δομή των μικκυλίων αλλά και τα συσσωματώματα των μετουσιωμένων πρωτεϊνών ορού (Μοάτσου, 2012). Επομένως, για όλους του παραπάνω λόγους, η προετοιμασία I αν και περισσότερο επίπονη και χρονοβόρα αποδείχθηκε κατάλληλη για τη συγκεκριμένη περίπτωση.



Εικόνα 3.5. RP-HPLC κατατομές πρόβειου γάλακτος (—) και ισοηλεκτρικής καζεΐνης (---), σε στήλη Nucleosil 300-5 C8 (4,6 x 250 mm). Η προετοιμασία των δειγμάτων έγινε με buffer Ουρίας-DTT όπως περιγράφεται στα υλικά και μέθοδοι (παρ., 2.6)

Μέθοδος έκλουσης:

Διαλύτης A: 0,1% TFA σε ultra H₂O

Διαλύτης B: 0,1% TFA σε ακετονιτρίλιο

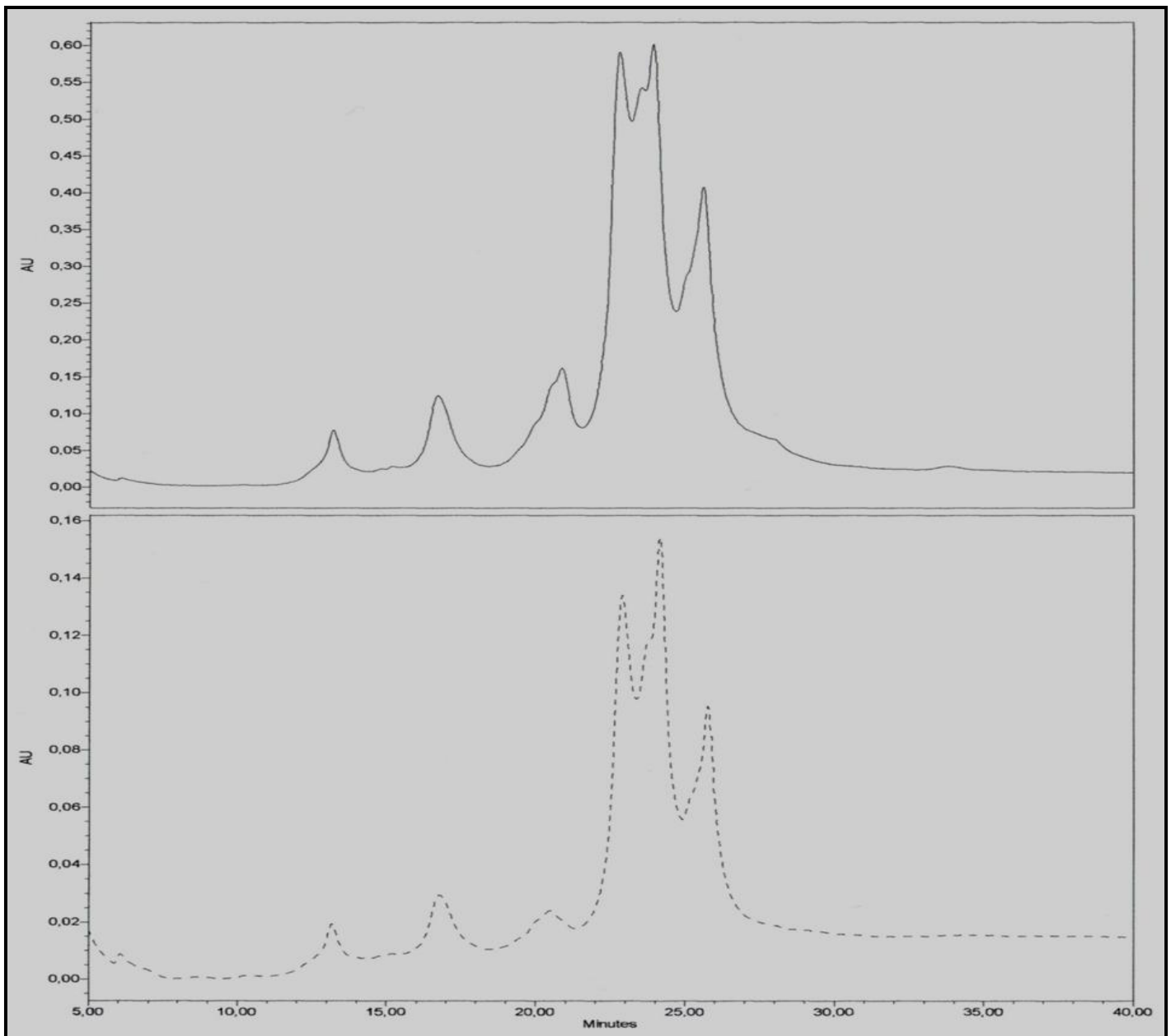
Ταχύτητα ροής 1 ml/ min

0 min: 30% B

35 min: 60% B

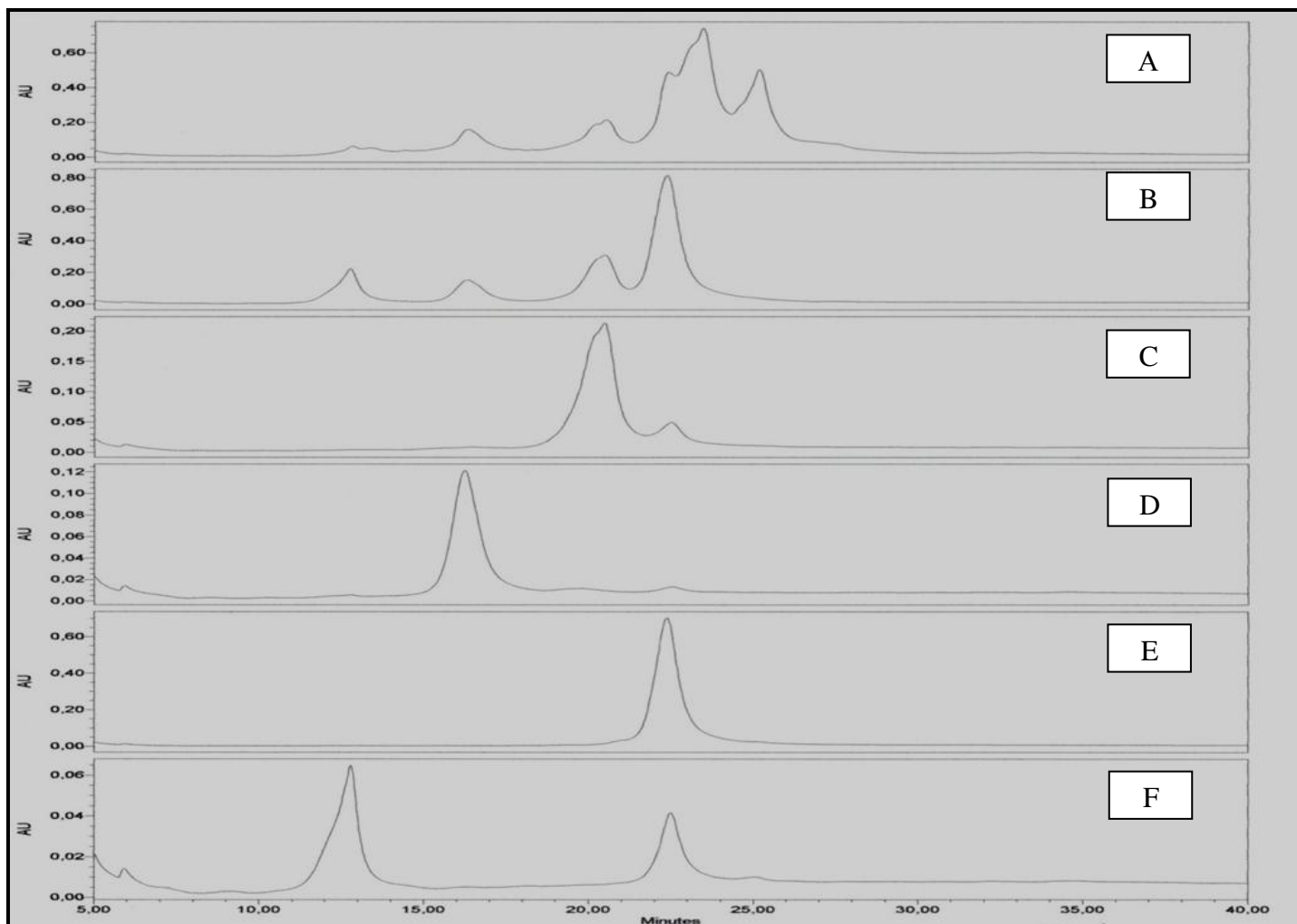
38 min: 95%

Έγιναν προκαταρτικές αναλύσεις, αναλύθηκε το τυρί και το αντίστοιχο ίζημα και αποδείχθηκε ότι οι κατατομές ήταν ίδιες (εικόνα 3.6). Επομένως, οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν κατευθείαν στο τυρί, αφαιρώντας ένα επίπονο στάδιο προετοιμασίας του δείγματος.



Εικόνα 3.6. Χρωματογραφικές κατατομές του τυριού ΜΑΠ (—) και του αντίστοιχου ιζήματος (--). Η προετοιμασία των δειγμάτων και η μέθοδος ανάλυσης όπως περιγράφεται στην εικόνα 3.5.

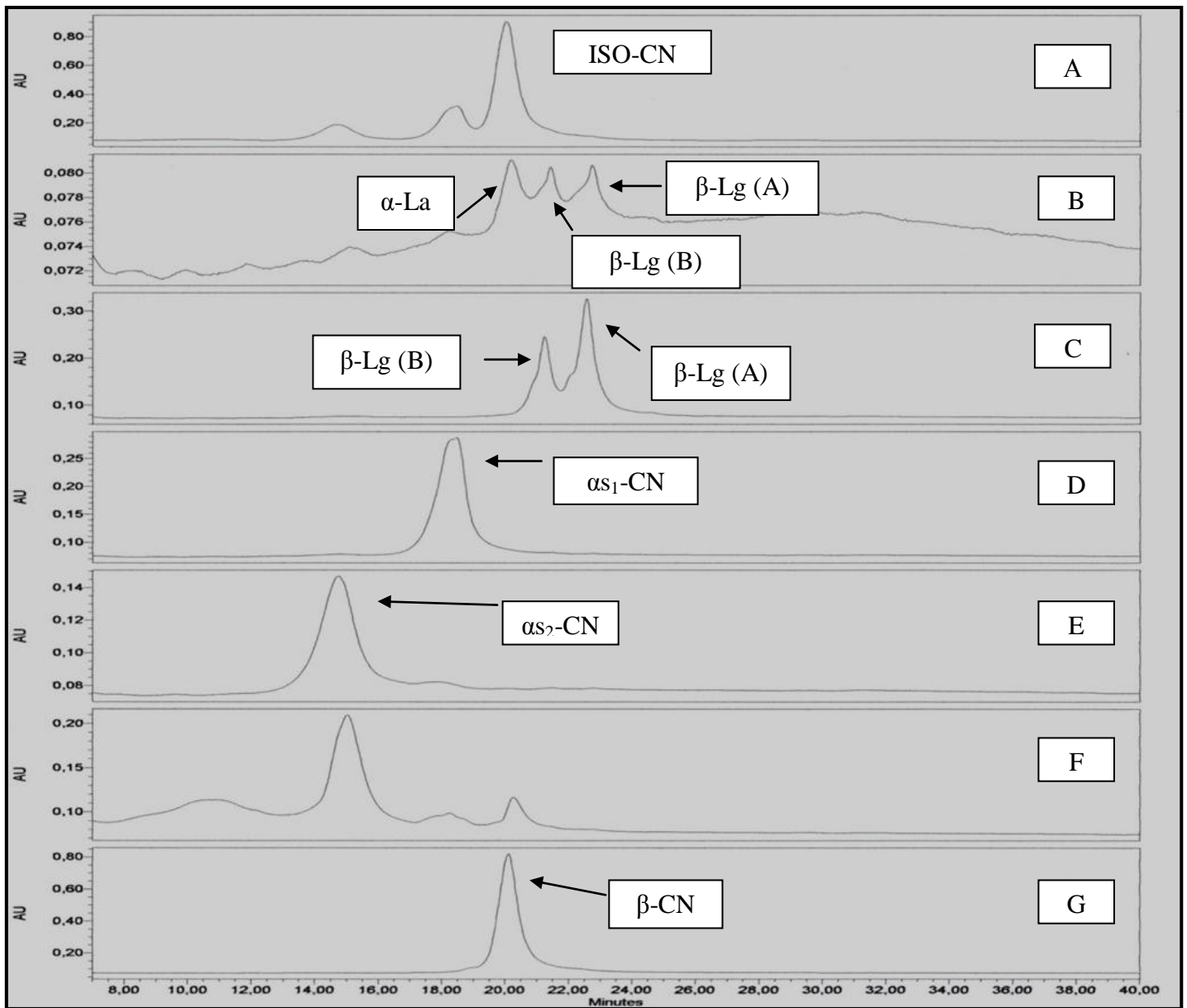
Στη συνέχεια έγινε συγκριτική ανάλυση, τυριού, ισοηλεκτρικής πρόβειας καζεΐνης και μεμονωμένων καζεϊνών, καθαρισμένων από πρόβειο γάλα με στήλη κατιοανταλλαγής που παραχωρήθηκαν από την κ. Γ. Μοάτσου (Moatsou *et al.*, 2004). Οι κατατομές παρουσιάζονται στην εικόνα 3.7. Είναι προφανές ότι το καζεϊνικό «τμήμα» του δείγματος του τυριού ΜΑΠ ξεχωρίζει από το «τμήμα» των άλλων πρωτεϊνών που προέρχεται από το τυρόγαλα. Συγκεκριμένα, μέχρι τα 22,5 min οι κορυφές αντιστοιχούν σε καζεΐνες. Υπάρχει μερική αλληλεπίδραση μεταξύ της β-CN που είναι η πιο υδρόφοβη και άλλων πρωτεϊνών τυρογάλακτος που εκλύονται σε χρόνο >23 min.



Εικόνα 3.7. RP-HPLC κατατομές του τυριού ΜΑΠ, πρόβειας ισηλεκτρικής καζεΐνης και μεμονωμένων καζεϊνών πρόβειου γάλακτος (παραχώρηση από κ. Μοάτσου). Η προετοιμασία των δειγμάτων και η μέθοδος έκλουσης όπως περιγράφεται στην εικόνα 3.5.

- A: ΜΑΠ
- B: ISO-CN
- C: πρόβεια α_1 -CN
- D: πρόβεια α_2 -CN
- E: πρόβεια β -CN
- F: μίγμα πρόβειας κ -CN με β -CN

Για την ενίσχυση του διαχωρισμού μεταξύ β -CN και πρωτεϊνών του ορού, τροποποιήθηκε η μέθοδος έκλουσης όπως περιγράφεται στη λεζάντα της εικόνας 3.8. Το βασικό χαρακτηριστικό αυτής της τροποποίησης είναι ότι η ταχύτητα αλλαγής του οργανικού διαλύτη μειώθηκε πολύ στη περιοχή έκλουσης β -CN –πρωτεϊνών τυρογάλακτος.



Εικόνα 3.8. RP-HPLC κατατομές πρόβειων πρωτεϊνών σε στήλη Nucleosil 300-5 C8 (4,6 x 250mm). Η προετοιμασία των δειγμάτων, οι διαλύτες, η ταχύτητα ροής όπως περιγράφονται στην λεζάντα της εικόνας 3.5.

Μέθοδος έκλουσης

0 min: 32% B,

23 min: 54% B,

37 min: 60% B

40 min: 95% B

A: ISO-CN

B: Μίγμα πρόβειας α-La και β-Lg

C: πρόβεια β-Lg καθαρισμένη με χρωματογραφία μοριακής διήθησης

D: πρόβεια α_{s1}-CN

E: πρόβεια α_{s2}-CN

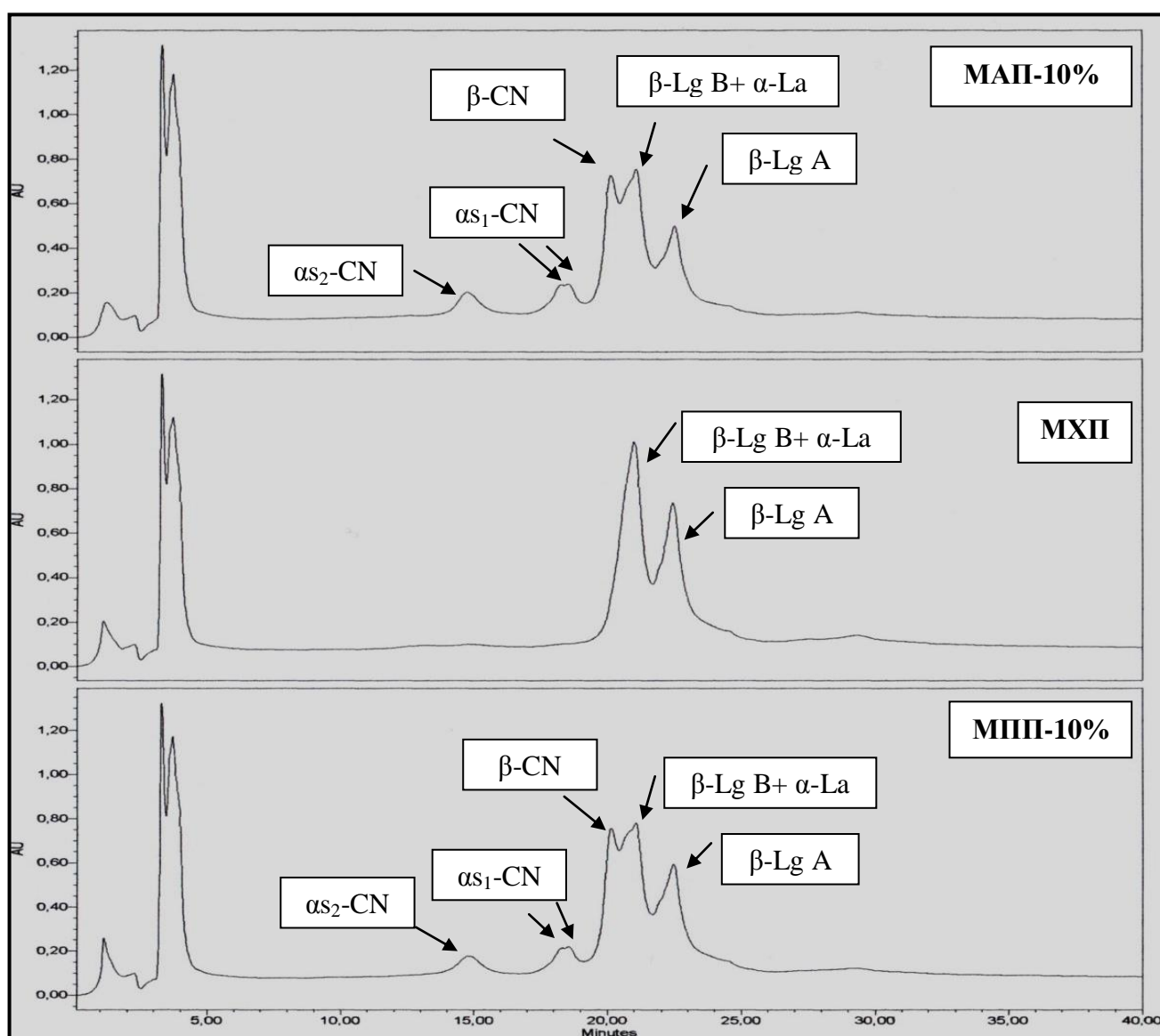
F: Crude παρασκεύασμα πρόβειας κ-CN

G: Πρόβεια β-CN

Παρατηρούμε ότι:

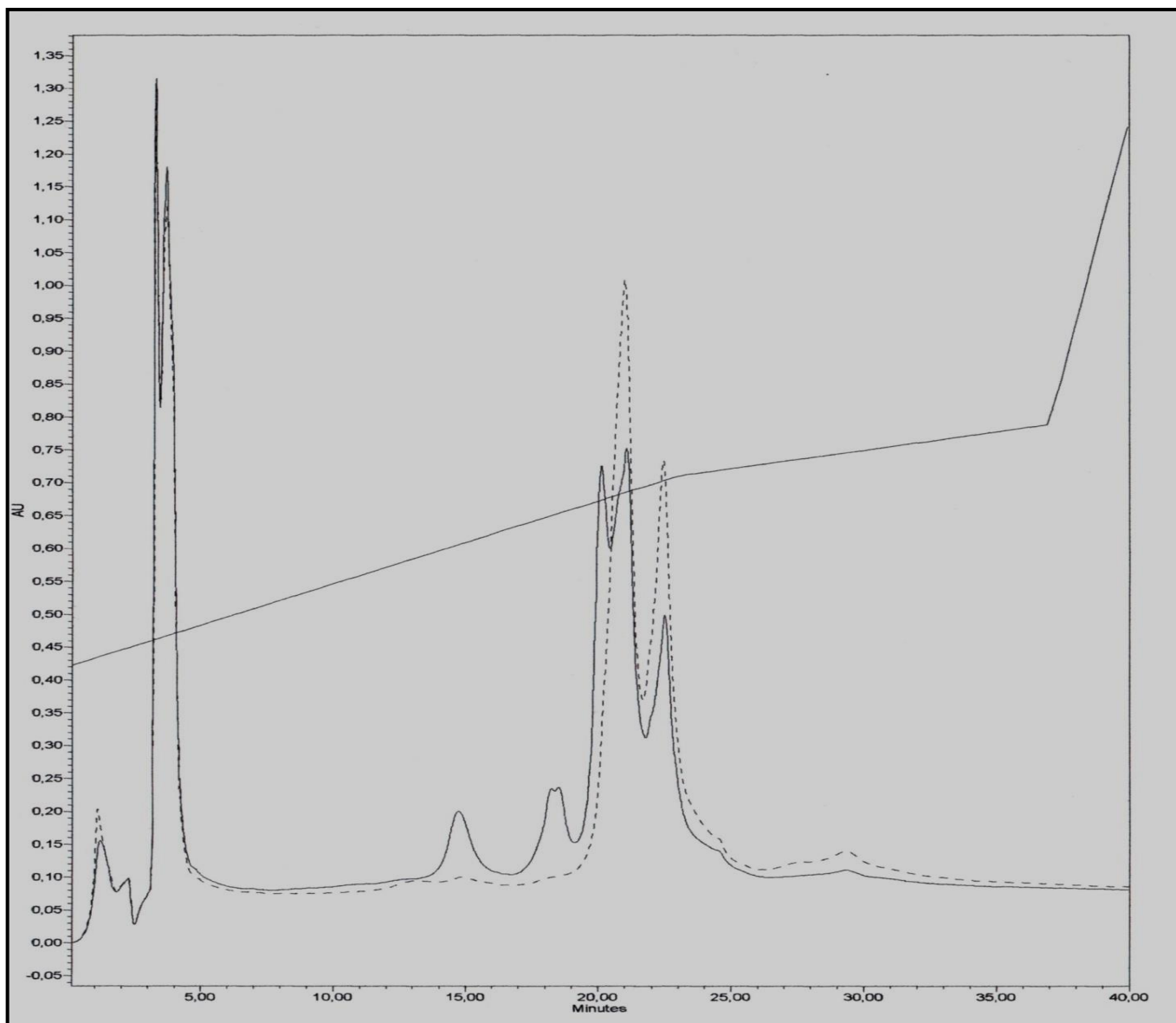
- i. Με αυτή τη μέθοδο έκλουσης δεν μπορεί να εντοπιστεί με σαφήνεια η κ-CN, γιατί μάλλον «διαχέεται» παρά συγκεντρώνεται με τη μορφή συγκεκριμένης κορυφής εξαιτίας της χαμηλής της συγκέντρωσης.
- ii. Η πρόβεια β-Lg (εικόνα 3.8 C) διαχωρίζεται με σαφήνεια από την ισοηλεκτρική καζεΐνη (εικόνα 3.8 A). Όμως δεν ισχύει το ίδιο για την α-La η οποία εκλούεται σχεδόν μαζί με την β-CN (εικόνα 3.8 A, B, G)
- iii. Διαχωρίζονται με σαφήνεια οι 2 γενετικές παραλλαγές της β-Lg (A και B)

Με την ίδια μέθοδο έκλουσης αναλύθηκαν δείγματα των τυριών ΜΧΠ, ΜΑΠ-10% και ΜΠΠ-10% (εικόνα 3.9).



Εικόνα 3.9. RP-HPLC κατατομές των τριών τυριών του πειράματος. Οι συνθήκες ανάλυσης όπως περιγράφονται στην εικόνα 3.8.

Από την μελέτη των εικόνων 3.8 και 3.9 προκύπτει οι το τυρί ΜΧΠ που δεν περιέχει πρόσγαλα έχει χαρακτηριστική κατατομή από την οποία απουσιάζουν σαφώς οι καζεϊνικές κορυφές, ενώ η παρουσία λίπους από το πρόσγαλα δεν επηρέασε τα αποτελέσματα. Επομένως με τη παρούσα μέθοδο υπάρχει σαφής ανίχνευση του προσγάλακτος (εικόνα 3.10).



Εικόνα 3.10. Συγκριτική παρουσίαση των RP-HPLC κατατομών μυζήθρας με (—) και χωρίς (---) πρόσγαλα

Αποδείχθηκε ότι η τεχνική RP-HPLC είναι κατάλληλη για τη μελέτη των πρωτεϊνών του τυριού αυτού και την ανίχνευση προσγάλακτος ακόμη και μετά τη εκτεταμένη μετουσίωση που έχουν υποστεί με την προϋπόθεση ότι έχει εφαρμοσθεί η κατάλληλη προετοιμασία του δείγματος, όπως αυτή που παρουσιάζεται στην παρούσα μελέτη. Με την αλλαγή των συνθηκών έκλουσης επιτεύχθηκε σχετικά καλός διαχωρισμός μεταξύ πρωτεϊνών ορού και β-CN. Οι α-La και β-Lg θα διαχωρίζονταν πιθανόν με τη χρήση

άλλης RP στήλης π.χ. C4 (Moatsou *et al.*, 2003; Moatsou *et al.*, 2004; Moatsou *et al.*, 2005).

Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα τυριά χαμηλής περιεκτικότητας κερδίζουν συνεχώς έδαφος στις προτιμήσεις των καταναλωτών.

Η παρασκευή ενός νέου προϊόντος Μυζήθρας με χαμηλά λιπαρά αλλά και η συγκριτική του μελέτη με άλλα τυριά Μυζήθρας παρόμοιας τεχνολογίας μελετήθηκε σε αυτή την μεταπτυχιακή μελέτη.

Συγκεκριμένα μελετήθηκαν τα φυσικοχημικά, μικροβιολογικά, ρεολογικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των παραπάνω τυριών. Διερευνήθηκε επίσης η δυνατότητα ανάλυσης του πρωτεϊνικού προφίλ των τυριών με ηλεκτροφόρηση και RP-HPLC.

Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι το νέο προϊόν Μυζήθρας μειωμένης λιποπεριεκτικότητας (9,24%) που παρασκευάστηκε με τη προσθήκη 10% άπαχου προσγάλακτος χαρακτηρίζεται από:

- Χαμηλό ποσοστό λίπους
- Υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες ($\approx 16\%$)
- Υψηλή περιεκτικότητα σε ασβέστιο (378,42mg/100g τυριού)
- Χαμηλή μικροβιακή χλωρίδα σε σχέση με τις Μυζήθρες και τις Ξινομυζήθρες εμπορίου
- Ικανοποιητικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Υπερείχε των Μυζηθρών του εμπορίου και δεν διέφερε σημαντικά στην εμφάνιση, υφή και γεύση από το αντίστοιχο προϊόν Μυζήθρας, με πλήρες πρόσγαλα. Συμπερασματικά το νέο προϊόν που παρασκευάστηκε αποτελεί ένα προϊόν εύγευστο, με υψηλή βιολογική και διαιτητική αξία.

Με βάση την ηλεκτροφορητική τεχνική που εφαρμόστηκε και τη μεθοδολογία HPLC, υπάρχει δυνατότητα να ανιχνευτεί πρόσγαλα στα τυριά Μυζήθρα και να διαχωριστούν επίσης ικανοποιητικά τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα που σχηματίζονται.

Επί πλέον φάνηκε, όπως ήταν αναμενόμενο, ότι η προσθήκη του προσγάλακτος βελτιώνει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και αυξάνει την απόδοση σε τελικό προϊόν, των τυριών Μυζήθρα.

Όσον αφορά τα αρωματικά συστατικά, σε όλες τις Μυζήθρες κυριαρχούσαν οι αλκοόλες, χαρακτηριστικές ουσίες των φρέσκων τυριών. Από τα δείγματα του εμπορίου, οι Ξινομυζήθρες περιείχαν εκτός από αλκοόλες και κετόνες σε υψηλές συγκεντρώσεις. Επίσης είχαν υψηλή λιποπεριεκτικότητα (18,22%) και χαρακτηρίζονταν από χαμηλή λακτόζη και μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε γαλακτικό οξύ σε σχέση με τις μυζήθρες του πειράματος, λόγω της ζύμωσης που είχαν υποστεί.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.1
ΑΡΩΜΑΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

Πίνακας 1: Αλκοόλες

ΑΛΚΟΟΛΕΣ							
AROMA COMPOUNDS	ΜΧΠ	ΜΑΠ 10%	ΜΠΠ 10%	Μυζήθρα Α	Μυζήθρα Β	Ξινομυζήθρα Α	Ξινομυζήθρα Β
	Συγκέντρωση (ppm)						
1,12-Dodecanediol	nd	nd	6,35	nd	nd	nd	nd
1,2,6-Hexanetriol	nd	nd	nd	0,20	nd	nd	nd
1,3- Cyclopentanediol	nd	3,32	nd	nd	nd	nd	nd
1,4-Pentadien-3-ol	nd	9,55	nd	nd	14,46	134,22	113,12
1,5-Heptadiene-3,4-diol, 2-methyl	0,03	nd	nd	0,13	nd	nd	nd
1,5-Heptandiene-3,4-diol, 2,5-dimethyl	nd	nd	nd	0,10	nd	nd	nd
1-Butanol 2,2 dimethyl	nd	nd	nd	nd	1,75	nd	36,24
1-Decanol	nd	nd	8,88	2,61	nd	nd	nd
1-decanol, 2-ethyl	nd	nd	0,92	nd	nd	nd	nd
1-hepten-4-ol	nd	nd	nd	nd	nd	4,97	nd
1-Methyl-2-piperidinmethanol	nd	nd	nd	nd	0,28	nd	nd
1-Octanol	nd	nd	0,34	2,48	nd	nd	nd
1-Pentalol, 2-methyl	10,36	nd	nd	nd	nd	nd	nd
1-Pentalol, 3,3,4-trimethyl-	nd	nd	0,47	nd	nd	nd	nd
2,2-Dimethy-Hexen-3-ol	nd	nd	nd	nd	nd	1,11	nd
2-Buten-1-ol	nd	nd	nd	0,19	5,43	179,67	nd
2-Cyclohexen-1-ol, 1-methyl	nd	nd	0,18	nd	nd	nd	nd
2-Methyl-3-decanol	nd	nd	nd	3,15	nd	nd	nd
2-Methyl-3-pentyn-2-ol	nd	nd	nd	nd	4,19	nd	nd
2-Methyl-6hepten-3-ol	nd	nd	nd	0,45	nd	nd	nd

3,7-Octadiene-2,6-diol, 2,6-dimethyl	0,65	nd	5,59	nd	nd	nd	nd
3-Heptanol, 2,6-dimethyl	nd	9,44	nd	0,45	nd	1,58	nd
3-Heptanol, 3-methyl-	nd	nd	nd	nd	5,37	310,16	276,01
3-Hexanol, 2,2-dimethyl	nd	nd	2,42	3,75	nd	nd	1,91
3-Hexanol, 2-methyl-	0,26	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3-Hexanol, 3,5-dimethyl-	nd	nd	nd	5,40	5,31	nd	nd
3-Hexanol, 3-methyl-	nd	nd	1,71	nd	2,20	5,08	nd
3-Hexen-1-ol	nd	nd	nd	0,20	nd	nd	nd
3-Octanol, 3,7-dimethyl-	nd	nd	nd	16,87	nd	nd	nd
3-Octanol, 3-methyl-	nd	nd	nd	nd	nd	10,24	nd
3-Pentanol, 2,3-dimethyl	nd	nd	nd	nd	1,55	nd	nd
3-Pentanol, 2,4-dimethyl	nd	0,53	1,32	9,93	nd	1,41	nd
3-Pentanol, 3-methyl	nd	nd	nd		nd	nd	41,84
3-pentanol, 3-methyl-	nd	nd	0,41	2,41	nd	nd	nd
4,5-Decanediol, 6-ethyl-	nd	nd	nd	0,43	nd	nd	nd
4,5-Octanediol	nd	0,02	nd	nd	nd	nd	nd
4-Heptanol	nd	nd	0,72	nd	17,10	nd	1,00
4-Heptanol, 3-ethyl-	nd	0,22	nd	nd	nd	nd	nd
4-Heptanol, 3-methyl-	nd	nd	0,84	nd	nd	nd	nd
4-Methyl-5-hexen-ol	nd	nd	1,24	nd	0,56	nd	nd
4-nonanol	nd	nd	nd	13,20	4,85	156,81	216,12
4-Octanol, 7-methyl-	nd	nd	nd	nd	nd	122,38	nd
5-Ethyl-4-nonanol	nd	1,01	nd	nd	nd	nd	nd
5-Methyl-1-heptanol	nd	nd	nd	10,40	nd	nd	nd
5-methyl-4-octanol	nd	0,32	0,38	25,74	nd	nd	0,42
5-Nonen-1-ol	nd	nd	nd	0,43	nd	nd	nd
Cyclohexanol	nd	nd	0,50	15,07	nd	nd	nd
DL-4,5-Octanediol	nd	nd	nd	0,32	0,42	nd	nd

Octadecanol	nd	nd	0,39	nd	nd	nd	nd
-------------	----	----	-------------	----	----	----	----

Πίνακας 2: Αλδεΐδες

ΑΛΔΕΪΔΕΣ							
AROMA COMPOUNDS	ΜΧΠ	ΜΑΠ 10%	ΜΠΠ 10%	Μυζήθρα Α	Μυζήθρα Β	Ξινομυζήθρα Α	Ξινομυζήθρα Β
	Συγκέντρωση (ppm)						
Dodecanal	nd	nd	0,06	nd	nd	nd	nd
2-Butenal	nd	0,14	nd	nd	nd	0,06	0,78
3-Furaldehyde	nd	nd	1,67	nd	nd	nd	nd
Benzaldehyde	nd	0,73	3,02	1,64	nd	1,59	1,66
Butanal, 2-ethyl-	nd	0,07	nd	nd	nd	nd	nd
Decanal	nd	nd	0,82	nd	nd	nd	nd
Glutaral	nd	nd	2,36	nd	nd	nd	nd
Hexanal, 2-ethyl-	nd	nd	nd	nd	1,77	nd	nd
Nonanal	nd	0,77	1,24	nd	nd	nd	nd
Pentadienal, 2-methyl-	nd	nd	nd	nd	nd	0,10	6,99
Propanal, 2-methyl-	nd	0,07	nd	nd	nd	nd	195,11

Πίνακας 3: Κετόνες

KETONES							
AROMA COMPOUNDS	MXII	MAII 10%	MIII 10%	Μυζήθρα A	Μυζήθρα B	Ξινομυζήθρα A	Ξινομυζήθρα B
	Συγκέντρωση (ppm)						
1,3-Cyclohexanedione	nd	nd	nd	12,83	nd	nd	nd
1-Propanone, 2-methyl-1-phenyl-	1,57	nd	5,15	nd	nd	nd	nd
2-Butanone, 3-methoxy-3-methyl	0,05	0,06	nd	0,18	1,48	42,23	nd
2-Furanone, 3-methyl-	0,01	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2-Furanone, 5-methyl-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3,50
3-Buten-2-one	nd	0,09	nd	0,23	10,29	1,22	88,58
3-Penten-2-one	nd	nd	nd	6,64	nd	nd	nd
3-Penten-2-one, 4methyl-	nd	0,26	nd	nd	nd	nd	nd

Πίνακας 4: Οξέα

OΞEA							
AROMA COMPOUNDS	MXII	MAII 10%	MIII 10%	Μυζήθρα A	Μυζήθρα B	Ξινομυζήθρα A	Ξινομυζήθρα B
	Συγκέντρωση (ppm)						
Butanedioic acid, methylene-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,09
Butanoic acid, 2-ethyl	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,20
Docecanoic acid	nd	nd	nd	nd	1,55	nd	nd
Heptanoic acid, 2,5-diethyl-	nd	nd	nd	13,21	nd	nd	nd
Hexanoic acid, 2-ethyl-	nd	nd	nd	nd	nd	0,60	nd
Hexanoic acid, 4 methyl-	nd	0,24	nd	nd	nd	nd	9,59
Pentanoic acid, 2-methyl-	0,53	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Πίνακας 5: Εστέρες

ΕΣΤΕΡΕΣ							
AROMA COMPOUNDS	ΜΧΠ	ΜΑΠ 10%	ΜΠΠ 10%	Μυζήθρα Α	Μυζήθρα Β	Ξινομυζήθρα Α	Ξινομυζήθρα Β
-	Συγκέντρωση (ppm)						
2-Propenoic acid, octyl ester	nd	1,62	nd	nd	nd	nd	nd
Butanoic acid, ethyl ester	nd	nd	nd	nd	nd	24,77	nd
Decanoic acid, ethyl ester	nd	nd	nd	nd	nd	16,70	8,93
Hexanoic acid, ethyl ester	nd	nd	nd	nd	nd	5,03	nd
Octanoic acid, ethyl ester	nd	nd	nd	nd	nd	13,26	1,63
Pentanoic acid, methyl ester	nd	nd	nd	nd	0,17	nd	nd
Propanoic acid, 2-methyl-, 2-ethyl-3-hydroxyhexyl ester	nd	0,38	nd	nd	nd	nd	nd
Propanoic acid, 3-(2-propynyloxy)-,ethyl ester	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,56

Πίνακας 6: Υδρογονάνθρακες

ΥΔΡΟΓΟΝΑΝΘΡΑΚΕΣ							
AROMA COMPOUNDS	MXII	MAII 10%	MIII 10%	Μυζήθρα Α	Μυζήθρα Β	Ξινομυζήθρα Α	Ξινομυζήθρα Β
	Συγκέντρωση (ppm)						
1-Butene-3-ethoxy	nd	nd	nd	0,12	nd	nd	nd
1-Hexene, 3,5,5-trimethyl-	nd	0,84	nd	nd	nd	nd	nd
2-Hexene, 3-methyl-	2,54	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2-Pentene, 2-methyl-	nd	nd	nd	0,21	nd	nd	nd
2-Pentene, 3-ethyl-	nd	nd	nd	0,59	nd	8,20	nd
3-Heptene	0,11	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Butane, 2-methoxy-2-methyl-	nd	nd	nd	nd	nd	411,46	135,21
Decane, 2-methyl-	nd	nd	0,45	nd	nd	nd	nd
decane,2,4-dimethyl	nd	nd	0,15	nd	nd	nd	nd
Heptane, 2,3-dimethyl-	nd	nd	nd	nd	0,98	nd	nd
Heptane, 4-ethyl-	0,55	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hexane, 2,3,4-trimethyl-	nd	nd	0,71	nd	nd	nd	nd
Hexane, 2,3,-dimethyl-	nd	nd	0,38	nd	nd	nd	nd
Hexane, 3-ethyl-	nd	nd	0,84	nd	nd	nd	nd
Pentane 2,3,4-trimethyl	nd	0,37	nd	0,19	nd	nd	nd
Pentane, 1-(1-ethoxyethoxy)-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,53
Pentane, 3-ethyl-2,4-dimethyl-	nd	nd	0,06	nd	nd	nd	nd
Pentane, 3-methoxy-	nd	nd	nd	nd	1,59	46,63	nd
Propane, 2-methoxy-2-methyl-	nd	nd	nd	nd	nd	72,44	41,04
Undecane	nd	nd	0,51	nd	nd	nd	nd
Undecane, 2-methyl	nd	nd	0,38	nd	nd	nd	nd

Πίνακας 7: Φουράνια

ΦΟΥΡΑΝΙΑ							
AROMA COMPOUNDS	ΜΧΠ	ΜΑΠ 10%	ΜΠΠ 10%	Μυζήθρα Α	Μυζήθρα Β	Ξινομυζήθρα Α	Ξινομυζήθρα Β
-	Συγκέντρωση (ppm)						
2-Furanol, tetrahydro-2-methyl	nd	0,03	nd	nd	nd	nd	nd
3-Furanmethanol	nd	nd	nd	nd	3,24	nd	nd
Furan, 2-(methyldithio)methyl-	nd	nd	nd	0,06	nd	nd	nd
Furan, 2,3-dihydro	nd	nd	nd	2,83	nd	nd	nd
Furan, 3-ethyl-2,5-dihydro-	nd	nd	nd	0,30	nd	nd	nd

Πίνακας 8: Αμίνες

ΑΜΙΝΕΣ							
AROMA COMPOUNDS	ΜΧΠ	ΜΑΠ 10%	ΜΠΠ 10%	Μυζήθρα Α	Μυζήθρα Β	Ξινομυζήθρα Α	Ξινομυζήθρα Β
-	Συγκέντρωση (ppm)						
1,3-Butanediamine	nd	nd	nd	0,86	nd	nd	nd
2-Ethylpiperidine	nd	nd	nd	nd	0,38	nd	nd

Πίνακας 9: Λακτόνες

ΛΑΚΤΟΝΕΣ							
AROMA COMPOUNDS	ΜΧΠ	ΜΑΠ 10%	ΜΠΠ 10%	Μυζήθρα Α	Μυζήθρα Β	Ξινομυζήθρα Α	Ξινομυζήθρα Β
	Συγκέντρωση (ppm)						
Pantolactone	nd	nd	nd	15,76	nd	nd	nd

nd: non detected, δεν ανιχνεύθηκαν

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ελληνική Βιβλιογραφία

- Ανυφαντάκης Ε.Μ., 1992. «Μέθοδοι εξετάσεως του Γάλακτος και των Προϊόντων του». Εκδόσεις Σταμούλη, Πειραιάς
- Ανυφαντάκης Ε.Μ., 1998. «Ελληνικά Τυριά», Εθνική Επιτροπή Γάλακτος
- Ανυφαντάκης Ε.Μ., 2004. «Τυροκομία». Β Έκδοση, Εκδόσεις Σταμούλης, Αθήνα
- Δ1, Wikipedia 2013: <http://en.wikipedia.org/wiki/Dithiothreitol>
- ΕΦΕΤ, Κεντρική Υπηρεσία ΕΦΕΤ Διεύθυνση Ελέγχων Επιχειρήσεων, 2012. «Γενικός οδηγός Εφαρμογής Συστήματος Βάσει των Αρχών του HACCP σε Μικρές Γαλακτοκομικές Επιχειρήσεις»
- Ζέρβας, Γ., 2005. «Διαιτητική και βιολογική αξία αζωτούχων ουσιών». Φυσιολογία θρέψης Παραγωγικών ζώων, Αθήνα, σελ. 399
- ICAP, Μελέτη «Τυροκομικά προϊόντα», Μάιος 2012
- Καμιναρίδης και Μοάτσου, 2009. «Θερμικές επεξεργασίες του γάλακτος». Στο βιβλίο: «Γαλακτοκομία». Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα, 2009, σελ. 219-240
- Κουρέτας Δ. «Μελέτη για την ρύπανση από τυρόγαλα». Νομαρχία Λάρισας, 2007
- ΚΠΤ, Κώδικας Τροφίμων και Ποτών. Άρθρο 83 «Τυροκομικά Προϊόντα», Μάιος 2011
- Μοάτσου, Γ. (2012). Πρωτεΐνες του γάλακτος. Εργαστηριακές ασκήσεις για τους φοιτητές του ΔΠΜΣ « Ολοκληρωμένη Διαχείριση παράγωγης Γάλακτος και Γαλακτοκομικών Προϊόντων»

Ξένη Βιβλιογραφία

- Adahchour, M., Vreuls R.J., van der Heijden A., Brinkman U.A., 1999. “Trace-level determination of polar flavour compounds in butter by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry”. *J Chromatogr A*, 844 (1-2): 295-305

- Alonso, A., Zozaya C., Vazquez Z., Alfredo Martinez J, Martinez-Gonzalez M.A., 2009. “The effect of low-fat versus whole-fat dairy product intake on blood pressure and weight in young normotensive adults”. *J Hum Nutr Diet*, 22: 336-342
- Amigo, L., Recio I., Ramos M., 2000: “Genetic polymorphism of ovine milk proteins: its influence on technological properties of milk-a review”. *International Dairy Journal*, 10: 135-149
- Amundson, C.H., Watanawanichakorn, S., Hill, G.G.J., 1982. “Production of enriched protein fractions of β -lactoglobulin and α -lactalbumin from cheese whey”. *J. Food Proc. Preserv.*, 6(2): 55-71
- Anema S.G., Li Y.M., 2003_a. “Association of denatured whey proteins with casein micelles in heated reconstituted skim milk and its effect on casein micelle size”. *Journal of Dair Res*, 70: 73-83
- Anema S.G., Li Y.M., 2003_b. “Effect of pH on the association of denatured whey proteins with casein micelles in heated reconstituted skim milk”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 1640-1646
- Ardo, Y., 1993. “Characterizing Ripening in Low-Fat, Semi-Hard Round-Eyed Cheese Made With Undefined Mesophilic DL-Starter”. *Int. Dairy J.*, 3: 343-357
- Ardo, Y., 1997. “Flavour and texture in low fat cheese”. In Law B.A., ed. *Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*, pp 207-218. London: Blackie Academic & Professional
- Arthur, C.L., Pawliszyn J., 1990. “Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers”. *Anal. Chem.*, 66: 2145-2148
- Badel S., T Bernardi T., Michaud P., 2011. “New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides”. *Biotechnology Advances*, 29(1): 54-66
- Banks, J.M., 2004. “The technology of low-fat cheese manufacture”. *Int J Dairy Tech*, 57(4): 199-207
- Banks, J.M., Brechany E., Christie W.W., 1989. “The production of low fat Cheddar type cheeses”. *Journal of the Society of Dairy Technology*, 42: 6-9

- Banks, J.M., Hunter, E.A., Muir, D.D., 1993. "Sensory Properties of Low Fat Cheddar Cheese: Effect of Salt Content and Adjunct Culture". *J. Soc. Dairy Technol.*, 46: 119-123
- Barbieri, G., Bolzoni L., Careri M., Mangia A., Parolari G., Spagnoli S., Virgili R., 1994. "Study of the Volatile Fraction of Parmesan Cheese". *J. Agric. Food Chem.*, 42(5): 1170-1176
- Barbieri, G., Luciana. Bolzoni L., Giovanni. Parolari G., Virgili R., Buttini R., Careri M., Mangia A., 1992. "Flavor compounds of dry-cured ham". *J. Agric. Food Chem.*, 40(12): 2389-2394
- Barile, D., Nannan Tao N., Lebrilla C.B., Coisson J-D., Arlorio M., German J.B., 2009. "Permeate from cheese whey ultrafiltration is a source of milk oligosaccharides". *International Dairy Journal*, 19: 524-530
- Basch, J.J., Douglas F.W., Procino L.G., Holsinger V.H., Farrell H.M., 1985. "Quantification of caseins and whey proteins of processed milks and whey protein concentrates, application of gel electrophoresis, and comparison with Harland-Ashworth procedure". *J. Dairy Sci.*, 68: 23-31
- Bender, D., 2006. Benders "Dictionary of Nutrition and Food Technology. CRC Press, Boca Raton, USA
- Bhattacharjee, S., Ghosh, S., Datta, S., Bhattacharjee, C., 2006. "Studies on ultrafiltration of casein whey using a rotating disk module: Effects of pH and membrane disk rotation". *Desalination*, 195(1-3): 95-108
- Bonnaillie L.M., Tomasula P.M., 2008. "Whey protein Fractionation". *In* *Whey Processing, Functionality and Health Benefits*. Ed Onwulata C.I., Huth P.J., Blackwell Publishing, Iowa, USA
- Bosset, J.O., Gauch R., 1993. "Comparison of the volatile flavour compounds of six european 'AOC' cheeses by using a new dynamic headspace GC-MS method". *International Dairy Journal*, 3(4-6): 359-377

- Brew, K., 2003. "Alpha-lactalbumin". In *Advanced Dairy Chemistry*, Eds., Fox P.F., Mcsweeney, 3rd Edition, Kluwer Academic, New York
- Burton, H., 1988. "Ultra-High Temperature Processing of Milk and Milk Products. Elsevier Applied Science Publishers: New York
- Butikofer U., Ruegg M., 1993 (FLAIR/SENS COST 902). "Determination of Nitrogen Fractions in Cheese: Evaluation of a Collaborative Study". *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie.*, 26: 271-275
- Butler, J.E., Kehrl M.E. Jr., 2004. "Immunocytes and immunoglobulins in milk. In *Mucosal Immunology*, 3rd ed. Ogra P.L., Mestecky J., Lamm M.E., Strober W., McGhee J.R., Bienenstock J., Academic Press, New York NY
- Butylina, S., Luque, S., Nystrom, M. 2006. "Fractionation of whey-derived peptides using a combination of ultrafiltration and nanofiltration". *J. Membr. Sci.*, 280(1-2): 418-426
- Calvo, M.M., Lorenzo de la Hoz, 1992. "Flavour of heated milks. A review". *Int. Dairy Journal*, 2: 69-81
- Carbonaro M., Bonomi F., Iametti S., Cappelloni M., Carnovale E., 1998. "Aggregation of Proteins in Whey from Raw and Heat-Processed Milk: Formation of Soluble Macroaggregates and Nutritional Consequences". *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 31: 522-529
- Carbonell, M., Nunez M., Fernandez-Garcia E., 2002. "Evolution of the volatile components of ewe milk La Serena cheese , during ripening. Correlation with flavour characteristics". *Lait*, 82: 683-698
- Casper J.L., Wendorff W.L., Thomas D. L., 1998. "Seasonal Changes in Protein Composition of Whey from Commercial Manufacture of Caprine and Ovine Specialty Cheeses". *Journal of Dairy Science*, 81: 3117-3122
- Casper J.L., Wendorff W.L., Thomas D.L., 1999. "Functional properties of whey protein concentrates from caprine and ovine speciality cheese wheys". *Journal of Dairy Science*, 82: 265-271

- Chatterton, D.E.W., Smithers, G., Roupas, P., Brodkorb, A., 2006. "Bioactivity of β -lactoglobulin and α -lactalbumin-Technological implications for processing". *International Dairy Journal*, 16: 1229-1240
- Chen, C.M., Johnson, M.E., Olson, N.F., 1992. "Optimizing Manufacturing Parameters in 33% Reduced-Fat Cheddar Cheese". *J. Dairy Sci.*, 75 (Supp. 1), 104 (Abstr.)
- Chiancone, E., and Gattoni, M. 1993. "Selective removal of beta-lactoglobulin directly from cow's milk and preparation of hypoallergenic formulas: a bioaffinity method". *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 18:1-8
- Chin, H., Rosenberg M., 1997. "Accumulation of Some Flavor Compounds in Full- and Reduced-fat Cheddar Cheese Under Different Ripening Conditions". *Journal of Food Science*, 62(3): 468-474
- Cho, Y., Singh, H., Creamer, L.K., 2003. "Heat-induced interactions of β -lactoglobulin A and κ -casein B in a model system". *J. Dairy Res.*, 70: 61-71
- Claeys W.L., Van Loey A.M., Hendrickx, 2002. "Intrinsic time temperature integrators for heat treatment of milk. *Trends in Food Science & Technology*, 13: 293-311
- Clark, P.J., 2005. "Concentrating proteins from milk and meat". *Food Technology*, 59: 80-83
- Codex General Standard for Cheese (CODEX STAN 283-1978, Revision 1999, Amendments 2006, 2008)
- Considine T., Patel H.A., Anema S.G., Singh H., Creamer L.K., 2007. "Interactions of milk proteins during heat and high hydrostatic pressure-treatments. A review". *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8: 1-23
- Contarini, G., Povolò M., Leardi R., Toppino P.M., 1997. "Influence of heat treatment on the volatile compounds of milk". *J. Agric. Food Chem.*, 45: 3171-3177
- Coppa, G.V., Bruni, S., Morelli L., Soldi, S., Gabrielli, O., 2004. "The first prebiotics in humans: human milk oligosaccharides". *Journal of Clinical Gastroenterology*, 38: 80-83
- Corning Glass Works and Kroger Co., 1981. "Corning and Kroger turn whey to yeast". *Chem. Eng. News*, 59(46): 9-10

- Corredig M., Dalgleish D.G., 1999. "The mechanism of the heat induced interaction of whey proteins with casein micelles in milk". *Int Dairy Journal*, 9: 233-236
- Creamer, L.K., Sawyer, L. 2003. Beta-lactoglobulin. *In Encyclopedia of Dairy Sciences*, edited by H. Roginski, J.W. Fuquay, and P.F. Fox, pp. 1932-1939. New York: Academic Press
- Cryan R. 2001. "Whey: Ready for Takeoff?" *U.S. Dairy Mark. Outlook*, 7(3): 1-4
- Curioni, P.M.G., Bosset J.O., 2002. "Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography olfactometry". *International Dairy Journal*, 12(12): 959-984
- Darling, D.F., Butcher, DW., 1976. "Quantification of polyacrylamide gel electrophoresis for analysis of whey proteins". *J. Dairy Sci.*, 59(5): 863-867
- De Jong N., Visser S., Olieman C., 1993. "Determination of milk proteins by capillary electrophoresis". *Journal of Chromatography A*, 652: 207-213
- De Lorgeril, M., Renaud S., Mamelle N., *et al.*, 1994. "Mediterranean alpha-linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease" [published correction appears in *Lancet*. 1995;345:738]. *Lancet*, 343: 1454-1459
- De Lorgeril, M., Salen P., Martin J.L., Monjaud I., Delaye J., Mamelle N., 1999. "Mediterranean diet, traditional risk factors and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study". *Circulation*, 99: 779-785
- De Silva, K.J., Stockmann, R., Smithers, G.W., 2003. "Isolation procedures for functional dairy components-Novel approaches to meeting the challenges". *Australian Journal of Dairy Technology*, 58: 148-152
- De Wit J.N., 1998. "Nutritional and Functional Characteristics of Whey Proteins in Food Products". *J Dairy Sci.*, 81: 597-608
- Dimos, A, Urbach G.E., Miller A.J., 1996. "Changes in flavour and volatiles of full fat and low fat cheeses during maturation". *International Dairy Journal*, 6: 981-995

- Drake, M.A., Herret W., Boylston T.D., Swanson B.G., 1996. "Lecithin improves texture of reduced fat cheeses". *J. Food Sci.*, 61: 639-642
- Drake, M.A., Swanson B.G., 1995. "Reduced and low fat cheese technology: a review". *Trends in Food Science Technology*, 6: 366-369
- Duffose L., Latrasse A., Spinnler H.E., 1994. "Importance des lactones dans les arômes alimentaires: structure, distribution, propriétés sensorielles et biosynthèse". *Science des Aliments*, 14: 17-50 (in French)
- Durham, R.J., Hourigan, J.A., 2007. "Waste management and co-product recovery in dairy processing. In K., Waldron (Ed.), Waste management and co-product recovery in food processing (pp. 332-387). Cambridge, England: Woodhead Publishing
- Duxbury, D.D., 1989. "US domestic cheese trends. Continued market growth encourages cheese technology research". *Food Process*, 50: 3
- Duxbury, D.D., 1993. "New ingredient provides healthy, functional alternative to eggs in bakery goods". *Food Proc.*, 53: 96-98
- El-Sheikh, M., Farrag Atif, Zaghrou A., 2011. "Ricotta Cheese from Whey Protein Concentrate". *Journal of American Science*, 7(1): 40-44
- Etzel, M.R., 2004. "Manufacture and use of dairy protein fractions". *Journal of Nutrition*, 134: 996-1002
- FAO, 1999. Production Year Book, 1998. Vol. 52, pp. 212-216. FAO Statistics Series no 148., Food Agriculture Organization, Rome
- FAO, 2011, <http://faostat3.fao.org/home/index.html#VISUALIZE>
- Farias, M.E., Martinez M.J., Pilosof AM.R., 2010. "Casein glycomacropeptide pH-dependent self-assembly and cold gelation". *International Dairy Journal*, 20: 79-88
- Foegeding, E.A., Davis, J.P., Doucet, D., McGuffey, M.K., 2002. "Advances in modifying and understanding whey protein functionality". *Trends in Food Science and Technology*, 13: 151-159

- Fox P.F., McSweeney P.L.H., 1998. "Dairy Chemistry and Biochemistry", 1st Ed. London, UK: Blackie Academic and Professional, pp. 265-291, 317-345, 347-377
- Fox, P., 2003. "Milk Proteins: General and Historical Aspects". *In* Advanced Dairy Chemistry, Eds., Fox P.F., Mcsweeny, 3rd Edition, Kluwer Academic, New York
- Fox, P.F, McSweeney, P.L.H., 2004. "Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology". Volume I: General Aspects, 3rd Edition., edited by P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, T. Cogan, and T. Guinee, pp. 1-18. London: Elsevier Academic Press
- Fung, T.T., Stampfer M.J., Manson J.E., Rexrode K.M., Willett W.C., Hu F.B., 2004. "Prospective study of major dietary patterns and stroke risk in women". *Stroke*, 35: 2014-2019
- Gaenzle, M.G., Haase, G., Jelen, P. 2008. "Lactose-Crystallization, hydrolysis and value-added derivatives". *International Dairy Journal*, 18: 685-694
- Geilman, W.G., 1993. "Preparation and properties of syrups made by the hydrolysis of lactose". IDF Bulletin 289, pp. 33-37. Brussels, Belgium: International Dairy Federation
- Gekas, V., Lopez-Leiva, M., 1985. "Hydrolysis of lactose-a literature review". *Process Biochemistry*, 20: 2-12
- Gianelli, M.P., Flores M., Toldrá F., 2002. "Optimisation of solid phase microextraction (SPME) for the analysis of volatile compounds in dry-cured ham". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(14): 1703-1709
- Gillies, M.T. 1974. "Whey Processing and Utilization". pp. 24-31. Park Ridge, NJ: Noyes Data Corp
- Goff, D., 1995. "Dairy science and technology, <http://www.foodsci.uoguelph.ca/dairyedu/home.html>". Accessed November 2006. University of Guelph, Canada
- Gopal, P.K., Gill, H.S., 2000. "Oligosaccharides and glycoconjugates in bovine milk and colostrums". *British Journal of Nutrition*, 84: 69-74

- Guidry, A.J., Butler J.E., Pearson R.B., Weinland B.T., 1980. "IgA, IgG1, IgG2, IgM, and BSA in serum and mammary secretion throughout lactation". *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1: 329-341
- Gunasekaram S., Solar O., 2012. "Heat induced Casein-Whey protein interactions" . *In: Food Proteins and Peptides: Chemistry, Functionality, Interactions, and Commercialization.* Eds, Hettiarachchy N.S., CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 199-224
- Gunasekaran, S., Mehmet Ak M., 2003. "Cheese Rheology and Texture". CRC Press, New York, pp 300, 303-304, 312-313, 399
- Gupta, V. K., Reuter H., 1993. "Firmness and melting quality of processed cheese foods with added whey protein concentrates". *Lait*, 73: 381-388
- Hammershoj M., Hougaard A.B., Vestergaard J.S., Poulsen O., Ipsen R.H., 2010. "Instant infusion pasteurization of bovine milk. II. Effects of indigenous milk enzymes activity and whey protein denaturation". *Intern J Dairy Technology*, 63(2): 197-208
- Haque, M.K., Roos, Y.H., 2005. "Crystallization and X-ray diffraction of crystals formed in water-plasticized amorphous spray-dried and freeze-dried lactose/protein mixtures". *Journal of Food Science*, 70: 359-366
- Haque, Z., Kinsella, J., 1988. "Interactions between heated κ -casein and β -lactoglobulin: predominance of hydrophobic interactions in the initial stages of complex formation". *J. Dairy Res.*, 55: 67-80
- Harper, W.J., 1984. "Model food system approaches for evaluating whey protein functionality". *Journal of Dairy Science*, 67: 2745-2756
- Hebert, P.R., Gaziano J.M., Chan K.S., Hennekens C.H., 1997. "Cholesterol lowering with statin drugs, risk of stroke, and total mortality: an overview of randomized trials". *JAMA*, 278: 313-321
- Heine, W, Radke, M., Wietzke, K.D., Polars, E., and Kundt, G. 1996. α -Lactalbumin- enriched low-protein infant formulas: A comparison to breast milk feeding. *Acta Paediatr.* 85:1024-1028
- Hilliam, M., 1996. "Fat substitutes in Europe". *The World of Food Ingredients* Nov-Dec, 15-19

- Hoffmann M.A. M, van Mill, P.J.J.M., 1997. "Heat induced aggregation of beta-lactoglobulin: Role of the free thiol group and disulfide bonds". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 2942-2948
- Holsinger, V.H., 1988. Lactose. In N.P. Wong, R. Jenness, M. Keeney, E.H. Marth (Eds.), *Fundamentals of dairy chemistry*, 3rd edition (pp. 279-342). New York, NY, USA: Van Nostrand Reinhold Co.
- Holsinger, V.H., Posati, L.P., DeVilbiss, E.D. 1974. "Whey beverages: A review". *J. Dairy Sci.*, 57: 849-859
- Hu F.B., Stampfer M.J., Manson J.E., Ascherio A., Colditz G.A., Speizer F.E., Hennekens C.H., Willett W.C., 1999. "Dietary saturated fats and their food sources in relation to the risk of coronary heart disease in women". *Am J Clin Nutr*, 70: 1001-1008
- Huffman, L.M., 1996. "Processing whey protein for use as a food ingredient". *Food Technology*, 50: 49-52
- Huffman, L.M., Harper, W.J., 1999. "Maximizing the value of milk through separation technologies". *Journal of Dairy Science*, 82: 2238-2244
- Hurley, W., 2003. "Immunoglobulins in Mammary Secretions". In *Advanced Dairy Chemistry*, Eds., Fox P.F., Mcsweeny, 3rd Edition, Kluwer Academic, New York
- IDF, 1964. Determination of the ash content of processed cheese products. IDF Standard No. 27. Brussels: International Dairy Federation
- IDF, 1982. Determination of dry matter in cheese and processed cheese. IDF Standard No. 4A. Brussels: International Dairy Federation
- IDF, 1985. Enumeration of coliforms. IDF Standard No. 73A. Brussels: International Dairy Federation
- IDF, 1986. Ewe's & goat's milk & milk products. Bulletin No. 202. Brussels: International Dairy Federation
- IDF, 1991. Enumeration of microorganisms. IDF Standard No. 100B. : International Dairy Federation

- IDF, 1991. Enumeration of yeasts and moulds. IDF Standard No. 94B. Brussels: International Dairy Federation
- IDF, 1993. Milk: Determination of nitrogen content, IDF Standard No. 20B. Brussels: International Dairy Federation
- IDF, 2007. Flame atomic absorption spectrophotometry. IDF Standard No. 119. Brussels: International Dairy Federation
- IDF, 2008. "Cheese-Determination of fat content-Van Gulik method". IDF Standard No. 222. Brussels: International Dairy Federation
- Jeanson S., Dupont D., Grattard N., Rolet-Repecaud O., 1999. "Characterization of the Heat Treatment Undergone by Milk Using Two Inhibition ELISAs for Quantification of Native and Heat Denatured α -Lactalbumin". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 2249-2254
- Jelen, P. 2003. Whey processing: Utilization and products. In *Encyclopedia of Dairy Sciences*, edited by H. Roginski, J.W. Fuquay, and P.F. Fox, pp. 2739-2745. New York: Academic Press.
- Jelen, P., 1992. "Whey Cheeses and Beverages". Chapter 5, *In Whey and Lactose Processing* (J.G. Zadow, Ed.). Elsevier Science Publishers, Barking, UK, 157-193
- Jelen, P., Buchheim, W., 1976. "Norwegian whey cheese". *Food Technology*, 30, 62-74
- Jelen, P., Rattray, W., 1995. "Thermal denaturation of whey proteins". In *Heat-Induced Changes in Milk*. 2nd Ed.; IDF Special Issue 9501; Fox, P.F., Ed.; International Dairy Federation: Brussels, Belgium, pp 66-85
- Johnson M., and Law B.A., 1999. "The origins, development and basic operations of cheesemaking technology". In "Technology of cheesemaking " Ed. Law. B.A., CRC Press
- Johnson M.E., Chen C.M., 1991. "Making quality reduced fat cheese". In *Proceedings of the Cheese Research and Technology Conference*. Madison: University of Wisconsin

- Johnson, M.E., 2003. "Low fat cheese". In Roginski H, Fuquay J., and Fox P.F., eds. The Encyclopedia of Dairy Sciences, London: Academic Press, pp 439-444
- Jost, R., Maire, J.-C, Maynard, F, and Secretin, M.-C. 1999. "Aspects of whey protein usage in infant nutrition, a brief review". *Int. J. Food Sci. Tech.* 34(5-6): 533-542
- Jung, D.M., Susan E., Ebeler S.E., 2003. "Headspace Solid-Phase Microextraction Method for the Study of the Volatility of Selected Flavor Compounds". *J. Agric. Food Chem.*, 51(1): 200-205
- Kalogridou-Vassiliadou, D., Tzanetakis N., Litopoulou-Tzanetaki E., 1994. "Microbiological and physicochemical characteristics of 'Anthotyó', a Greek traditional whey cheese". *Food Microbiology*, 11: 15-19
- Kaminarides S.E., Kandarakis J.G., Moschopoulou E., 1995. "Detection of bovine milk in ovine Halloumi cheese by electrophoresis of α_{s1} -casein". *Aust. J. Dairy Technol.*, 50: 58-61
- Kaminarides, S., Stachriaris S., 2000. "Production of processed cheese using; kasseri cheese and processed analogues incorporatin whey protein concentrate and soybean oil". *International Journal of Dairy Technology*, 53: 69-74
- Kandarakis I., Moatsou G., Georgala A.I.K., Kaminarides S., Anifantakis E., 2001. "Effect of draining temperature on the biochemical characteristics of Feta cheese". *Food Chemistry*, 72(3): 369-378
- Karagül-Yüceer Y., Drake M.A., Cadwallader K.R., 2003. "Aroma-active Components of Liquid Cheddar Whey". *Journal of Food Science*, 68(4): 1215-1219
- Katsiari, M.C., Voutsinas L.P., Kondyli E., 2002. "Improvement of sensory quality of low fat Kefalograviera-type cheese by using commercial special starter cultures". *Journal of Dairy Science*, 85: 2759-2767
- Katsiari, M.C., Voutsinas, L.P., 1994. "Manufacture of Low-Fat Kefalograviera Cheese". *Int. Dairy J.*, 4: 533-553
- Kavas, N., Kavas G., 2011. "Some Properties of Traditional Whey Cheese (Mud Cheese) Produced in Turkey". *Journal of Food Science and Engineering*, 1: 221-225

- Kilara, A., Vaghela, M.N., 2004. "Whey proteins". In *Proteins in Food Processing*, edited by R.Y Yada, pp. 72-99. Cambridge, England: Woodhead Publishing
- Kim, J.I., Choi, D.Y., Row, K.H., 2003. "Separation of whey proteins by anion-exchange membranes". *Korean Journal of Chemical Engineering*, 20: 538-541
- Kinsella J.E., Whitehead D.M., 1990. "Proteins in whey: Chemical, Physical, and Functional properties". In *Advances in Food and Nutrition Research*, vol. 33, pp.370-457
- Ko, S., Kwak H., 2009. "Bioactive Components in Whey products". In *Bioactive Components in Milk and Dairy products*, Park Y., Ed, Wiley Blackwell, Singapore
- Koca, N., Metin M., 2004. "Textural, melting and sensory properties of low-fat fresh Kashar cheese produced by using fat replacers". *Int. Dairy J.*, 14: 365-373
- Korhonen, H., Pihlanto, A., 2003. "Food-Derived bioactive peptides-Opportunities for designing future foods". *Current Pharmaceutical Design*, 9: 1297-1308
- Kosikowski F.V., Brown D.P., 1970. "Growth of spoilage organisms in gas-packed fermented milk products". In: *Proceedings International Dairy Congress*, Sydney, Australia. 1E, p.414
- Kris-Etherton, P.M., Harris W.S., Appel L.J., 2002. American Heart Association Nutrition Committee. "Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease" [published correction appears in *Circulation*. 2003, 107: 512]. *Circulation*, 21: 2747-2757
- Laemmli U.K., 1970. "Cleavage of structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4". *Nature*, 227: 680-686
- Larson, B.L., 1992. "Immunoglobulins of the mammary secretions". In *Advanced Dairy Chemistry-I: Proteins*. P. F. Fox, ed. Elsevier Applied Science, New York, NY, pp. 231-254
- Law, A.J.R., Brown J.R., 1994. "Compositional changes in caprine whey proteins". *Milchwissenschaft*, 49: 674-678

- Le Quere, J.L., Molimard P., 2002. Cheese. Cheese flavor. INRA, Laboratoire de Recherches sur les Aromes, Dijon, France, Elsevier Science Ltd, 330-340
- Lee, K-P.D., Warthesen, J.J., 1996. "Preparative Methods of Isolating Bitter Peptides from Cheddar Cheese". *J. Agr. Food Chem.*, 44: 1058-1063
- Leon-Sicairos, N., Reyes-Lopez, M., Ordaz-Pichardo, C, and de la Garza, M. 2006. "Microbicidal action of lactoferrin and lactoferricin and their synergistic effect with metronidazole in *Entamoeba histolytica*". *Biochem. Cell Biol.*, 84(3): 327-336
- Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetakis N., 2011. "Microbiological characteristics of Greek traditional cheeses". *Small Ruminant Research*, 101: 17- 32
- Liu, S., Manson J.E., Lee I-M., *et al.*, 2000. "Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease: the Women's Health Study". *AmJ Clin Nutr.*, 72: 922-928
- Liu, S., Stampfer M.J., Hu F.B., *et al.*, 1999. "Whole grain consumption and risk of coronary heart disease: results from the Nurses' Health Study". *Am J Clin Nutr.*, 70: 412-419
- Lonnerdal, B., 2003. "Lactoferrin". In *Advanced Dairy Chemistry*, Eds., Fox P.F., Mcsweeny, 3rd Edition, Kluwer Academic, New York
- Lopez-Fandino R., Olano A., 1999. "Review: Selected indicators of the quality of thermal processed milk". *Food Science and Technology International*, 5(2): 121-137
- Lorenzen, P.C., and Schrader, K. 2006. A comparative study of the gelation properties of whey protein concentrate and whey protein isolate. *Lait*, 86(4): 259-271
- Lteif, L., Kebbe Baghdadi O., Toufeili I., 2009. "The characterization of the physicochemical and sensory properties of full-fat, reduced-fat, and low-fat ovine and bovine Halloumi". *Journal of Dairy Science*, 92: 4135-4145
- Lucas, D., Rabiller-Baudry, M., Millesime, L., Chaufer, B., Daufin, G. 1998. "Extraction of α -lactalbumin from whey protein concentrate with modified inorganic membranes". *J. Membr. Sci.*, 148: 1-12
- Lucey, J.A., Johnson M.E., Horne D.S., 2003. "Invited Review: Perspectives on the Basis of the Rheology and Texture Properties of Cheese". *J. Dairy Sci.*, 86: 2725-2743

- Madureira, A., Tavares T., Gomes A., Pintado M., Malcata F., 2010. "Invited review: Physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins". *Journal of Dairy Science*, 93(2): 437-455
- Maga, J.A., 1979. Furans in Foods. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 355-400
- Magdy I., Ammar E-T., Raid E-T., 2011. Improvement of low fat mozzarella cheese properties using denatured whey protein. *International Journal of Dairy Technology*, 64(2): 207-217
- Mahajan S.S., Goddik L., Qian M.C., 2004. "Aroma Compounds in Sweet Whey Powder". *J. Dairy Sci.*, 87: 4057-4063
- Mallatou, H., Pappas C.P., Voutsinas L.P., 1994. "Manufacture of feta cheese from sheep's milk, goats' milk or mixtures of these milks". *International Dairy Journal*, 4(7): 641-664
- Mallia, S., Fernández-García E.F., Bosset J.O., 2005. "Comparison of purge and trap and solid phase microextraction techniques for studying the volatile aroma compounds of three European PDO hard cheeses". *International Dairy Journal*, 15(6-9): 741-758
- Marilley, L., Casey M.G., 2004. "Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains". *International Journal of Food Microbiology*, 90: 139-159
- Marshall, K.R., Harper, W.J., 1984. "The treatment of wastes from the dairy industry". In D. Barnes, S. T. Forster, & S. E. Hurdley (Eds.), *Surveys in industrial wastewater treatment-Food and allied industries*, Vol. 1 (pp. 296-376). London, UK: Pitman Publishing.
- Martin-Diana, A.B., Gomez-Guillen, M.C., Montero, P., Fontecha, J., 2006. "Vis-coelastic properties of caseinmacropeptide isolated from cow, ewe and goat cheese whey". *J. Sci. Food Agric.*, 86(9): 1340-1349
- Marwaha, S.S., and Kennedy, J.F. 1988. Review: "Whey-pollution problem and potential utilization". *Int. J. Food Sci. Technol.*, 23: 323-336

- McDonald B.E., 2000. "Dietary Cholesterol: Is There a Problem?" IDF Bulletin No 353, pp 22-24. Brussels: International Dairy Federation
- Meat and Livestock Commission. 2003. General Guidelines on Liquid Feeding for Pigs. Available at: www.bpex.org/technical/general/pdf/liquidfeeding.pdf Accessed February 12, 2008.
- Mistry, V.V., 2001. "Low fat cheese technology". *International Dairy Journal*, 11: 413-422
- Moatsou, G., Hatzinaki A., Kandarakis I. & Anifantakis E., 2003. "Nitrogenous fractions during the manufacture of whey protein concentrates from Feta cheese whey". *Food Chemistry*, 81: 209-217
- Moatsou, G., Hatzinaki A., Samolada M., Anifantakis E., 2005. "Major whey proteins in ovine and caprine acid wheys from indigenous Greek breeds". *International Dairy Journal*, 15: 123-131
- Moatsou, G., Samolada M., Katsabeki A., Anifantakis E., 2004. Casein fraction of ovine milk from indigenous Greek breeds. *Le Lait*, 84: 285-296
- Molle, D., Leonil, J., 2005. "Quantitative determination of bovine k-casein macropeptide in dairy products by liquid chromatography/electrospray coupled to mass spectrometry (LC-ESI/MS) and liquid chromatography/electrospray coupled to tandem mass spectrometry (LS-ESI/MS/MS)". *International Dairy Journal*, 15: 419-428
- Morris, P.E., FitzGerald R.J., 2008. "Whey proteins and Peptides in Human Health". In *Whey Processing, Functionality and Health Benefits*. Ed Onwulata C.I., Huth P.J., Blackwell Publishing, Iowa, USA, pp 285-385
- Muir, D. D., J. M. Banks, and E. A. Hunter. 1992. Sensory changes during maturation of fat-reduced Cheddar cheese: Effect of addition of enzymatically active attenuated cultures. *Milchwissenschaft*, 47: 218-222
- Muschiolik, G., Draeger S., 1993. "Confectionery gels with whey protein concentrate". *Dtsch. Milchwirtsch.*, 44: 227-229
- National Dairy Council® (NDC), 2009. "Quick-reference to Nutrition Claims for Dairy Products, pp. 12,18

- Nozaki, Y., Tanford C., 1963. "The solubility of amino acids and related compounds in aqueous urea solutions". *Journal of Biological Chemistry*, 238: 4074-4081
- O'Donnell, C. D. 1993. "Cutting the fat". *Dairy Food*, 94: 61-64
- Oh, K., Hu F.B., Manson J.E., Stampfer M.J., Willett W.C., 2005. "Dietary fat intake and risk of coronary heart disease in women: 20 years of follow-up of the Nurses' Health Study". *Am J Epidemiol.*, 161: 672-679
- Oldfield, D.J., Singh H., Taylor M.W., Pearce K.N., 1998. "Kinetics of denaturation and aggregation of whey proteins in skim milk heated in an ultra-high temperature (UHT) pilot, plant. *International Dairy Journal*, 8: 311-318
- Onwulata C.I., 2008. "Milk Whey Processes: Current and Future Trends". In *Whey Processing, Functionality and Health Benefits*. Ed Onwulata C.I., Huth P.J., Blackwell Publishing, Iowa, USA
- Onwulata, C.I., Konstance R.P., Cooke P.H., Farrell H.M.Jr, 2003. "Functionality of Extrusion-Texturized Whey Proteins". *J. Dairy Sci.*, 86: 3775-3782
- Onwulata, C.I., Tomasula, P., 2004. "Whey texturization: A way forward". *Food Technol.*, 58(7): 50-54
- Ornish, D, Scherwitz L.W., Billings J.H., *et al.*, 1998. "Intensive lifestyle changes for reversal of coronary heart disease". *JAMA*, 280: 2001-2007
- Ortigosa, M., Torre P. Izco J.M., 2001. "Effect of pasteurization of ewe's milk and use of a native starter culture on the volatile components and sensory characteristics of Roncal cheese". *Journal of Dairy Science*, 84: 1320-1330
- Outinen, M., Tossavainen, O., Tupasela, T, Koskela, P., Koskinen, H., Rantamaki, P., Syvaaja, E.-L., Antila, P., and Kankare, V., 1996. "Fractionation of proteins from whey with different pilot scale processes". *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 29: 411-417
- Palmer, A.H., 1934. "The preparation of a crystalline globulin from the albumin fraction of cow's milk". *J.Biol. Chem.*, 104: 359-372

- Panesar P.S., John F., Kennedy J.F, Dina N. Gandhi D.N., Bunko K., 2007. "Bioutilisation of whey for lactic acid production". *Food Chemistry*, 105(1): 1-14
- Panesar, P.S., Kennedy J.F., Knill C.J., Kosseva M., 2010. "Production of L(+) lactic acid using *Lactobacillus casei* from whey". *Braz. arch. biol. technol.*, 53(1): 219-226
- Papaioannou, G., Chouliara I., Krataparis A.E., Kontominas M.G., Savvaidis I.N., 2007. "Shelf-life of a Greek whey cheese under modified atmosphere packaging". *Int Dairy J.*, 17: 358-364
- Pappas, C., Voutsinas L., 1988. "Effect of acidification of sheep's cheese whey with organic acids on the retention of protein and on the quality of Myzithra cheese". *Journal of Dairy Research*, 55: 247-254
- Pappas, C.P., Kondyli E., Voutsinas L.P., Mallatou H., 1996_a. "Effects of salting method and storage time on composition and quality of feta cheese". *Journal of the Society of Dairy Technology*, 49: 113-118
- Pappas, C.P., Kondyli E., Voutsinas L.P., Mallatou H., 1996_b. "Effects of starter level, draining time and aging on the physicochemical, organoleptic and rheological properties of feta cheese". *Journal of the Society of Dairy Technology*, 49: 73-78
- Parris, N., Baginski M.A, 1991. "A rapid method for the determination of whey protein denaturation." *Journal of Dairy Science*, 74: 58-64
- Patel, H.A., Singh H., Anema S.G., Creamer L.K., 2006. "Effects of Heat and High Hydrostatic Pressure Treatment on Disulfide Bonding Interchanges among the Proteins in Skim Milk". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 3409-3420
- Patel, S., Majumder A., Goyal A., 2012. "Potentials of Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria". *Indian Journal of Microbiology*, 52(1): 3-12
- Paterson, A.H.J., Brooks, G.F., Bronlund, J.E., Foster, K.D., 2005. "Development of stickiness in amorphous lactose at constant T-T_g levels". *International Dairy Journal*, 15: 513-519

- Pereira, A.J.G., Póvoa M.E.B., Cruz G.R., 1982. “Influencia da velocidade de aquecimento sobre a qualidade do Ricotta”. *VII Congresso Nacional de Lactínicos*, Juiz de Fora, Brazil
- Pereira, A.J.G., Póvoa M.E.B., Cruz G.R., 1982. “Influencia da velocidade de aquecimento sobre a qualidade do ricotta”. *Revista do Instituto de Lactiníons Candido Tostes*, 43: 11-14
- Pesta, G.G., Meyer-Pittroff R., Russ W., 2007. “Utilization of whey”. In *Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry*, 3: 193-207
- Philippopoulos C.D., Papadakis M.T., 2001. “Current trends in whey processing and utilization in Greece”. *Internation Journal of Dairy Technology*, 54: 14-19
- Pihno, O., Peres C., Ferreira I.M., 2003. “Solid phase microextraction of volatile compounds in “Terrincho” ewe cheese. Comparison of different fibers”. *Journal of Chromatography A*, 1011: 1-9
- Pintado, M.E., Lopes da Silva J.A., Malcata F.X., 1996. “Characterization of Requeijao and Technological Optimization of its Manufacturing Process”. *Journal of Food Engineering*, 30: 363-376
- Pintado, M.E., Macedo, A.C., Malcata, F.X., Macedo, A.C., Malcata, F.X., 2001. Review: Technology, chemistry and microbiology of whey cheeses. *Food Science and Technology International*, 7: 105-116
- Pintado, M.E., Malcatta F.X., 2000. “Optimization of modified atmosphere packaging with respect to physicochemical characteristics of Requeijão”. *Food Res Int.*, 33: 821-832
- Pizzillo M., Claps S., Cifuni G.F, Fedele V., Rubino R., 2005. “Effect of goat breed on the sensory, chemical and nutritional characteristics of ricotta cheese”. *Livestock Production Science*, 94: 33-40
- Poulin, J.F., Amiot, J., and Bazinet, L. 2006. “Simultaneous separation of acid and basic bioactive peptides by electrodialysis with ultrafiltration membrane”. *J. Biotechnol.*, 123(3): 314-328

- Quian, M., Nelson C., Bloomer S., 2002. "Evaluation of fat-derived aroma compounds in Blue cheese by dynamic headspace GC/olfactometry-MS". *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 79: 663-667
- Raynal-Ljutovac, K., Lagriffoul G., Paccard P., Guillet I., Chilliard Y., 2008. "Composition of goat and sheep milk products: An update". *Small Ruminant Research*, 79: 57-72
- Ren, J., Stuart D.I., 1993. " α -Lactalbumin possesses a distinct zinc binding site". *The Journal of Biological Chemistry*, 268(26): 19292-19298
- Rosenberg, A., 1995. "Biology of the Sialic Acids". Plenum Press, New York, NY, USA
- Rowney, M., Hobman, P., Read, L., Denichilo, M., 2005. "Commercialisation of whey growth factor extract-A case study". *Australian Journal of Dairy Technology*, 60: 183-184
- Sanchez-Macias, D., Fresno M., Moreno-Indias, Castro N., Morales-delaNuez, Alvarez S., Arguello A., 2010. "Physicochemical analysis of full-fat, reduced-fat, and low-fat artisan-style goat cheese". *Journal of Dairy Science*, 93: 3950-3956
- Sannier, F, Bordenave, S., Piot, J.-M. 2000. "Purification of goat β -lactoglobulin from whey by an ultrafiltration membrane enzymic reactor". *J. Dairy Res.*, 67(1): 43-51
- Sawyer, L., 2003. "Beta-lactoglobulin". In *Advanced Dairy Chemistry*, Eds., Fox P.F., Mcsweeney, 3rd Edition, Kluwer Academic, New York
- Shi, L., Zhang Q., Rui W., Lu M., Jing X., Shang T., Tang J., 2004. "BioDP: a web-based information center for bioactive peptides". *Regulatory Peptides*, 120(1-3): 1-3
- Shibamoto, T., 1980. "Flavor volatiles formed by heated milk:. In *The Analysis and Control of Less Desirable Flavors in Foods and Beverages*: G. Charalambous, Ed: Academic Press: New York, pp 241-265
- Siisli, H. 1956. "Neue Art der Molkenverwertung: Ein Lactominerales Tafelgetränk". In *Proceedings of the 14th International Dairy Congress*, Vol. 1, Part 2, pp. 477-486
- Simard, R. E., 1991. "Evaluation of low-fat cheese problems". Page 37 in *Proc. Cheese Res. Tech. Conf., Ctr. Dairy Res., Madison, WI*

- Siso, M.I.G., 1996. "The biotechnological utilization of cheese whey: A review". *Bioresource Technol.*, 57: 1-11
- Skeie, S., Narvhus, J.A., Ardo, Y., Thorvaldsen, K. and Abrahamsen, R.K., 1997. "The Effect of Reduced Salt Content on the Function of Liposome-Encapsulated Neutrase and Heat-treated lactobacilli in rindless low-fat cheese". *Lait*, 77: 575-585
- Slack, A.W., Amundson, C.H., and Hill, C.G. 1986. "Production of enriched β -lactoglobulin and α -lactalbumin whey protein fractions". *J. Food Proc. Preserv.*, 10: 19-30
- Smilowitz, J.T., Dillard C.J., German J.B., 2005. "Milk beyond essential nutrients: The metabolic food". *Australian Journal of Dairy Technology*, 60: 77-83
- Smithers, G.W., 2008. "Whey and whey proteins-From 'gutter-to-gold". *International Dairy Journal*, 18: 695-704
- Smits, P., van Brouwershaven, J.H., 1980. "Heat-induced association of β -lactoglobulin and casein micelles". *J. Dairy Res.*, 47: 313-325
- Sonestedt, E., Wirfält E., Wallström P., Gullberg B., Melander M.O., Hedblad B., 2011. "Dairy products and its association with incidence of cardiovascular disease: the Malmö diet and cancer cohort". *European Journal of Epidemiology*, 26(8): 609-618
- Stiles, Kevin, 2012. US Dairy Export Council, NCCIA Annual Conference
- Strange, E.D., Malin E.L., Van Hekken D.L., Basch J.J., 1992. "Chromatographic and electrophoretic methods used for analysis of milk proteins". *J. Chromatogr.*, 624: 81-102
- Tavaria, F.K., Ferreira A.C.S., Malcata F.X., 2004. "Volatile Free Fatty Acids as Ripening Indicators for Serra da Estrela Cheese". *Journal of Dairy Science*, 87(12): 4064-4072
- Tejayadi, S., Cheryan M., 1995. "Lactic acid from cheese whey permeate. Productivity and economics of a continuous membrane bioreactor". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43(2): 242-248

- Thapa, T.B., Gupta V.K., 1992. "Changes in sensoric and rheological characteristics during storage of processed cheese foods prepared with added whey protein concentrates". *Indian J. Dairy Sci.*, 45:140-145
- Tholstrup, T., 2006. "Dairy products and cardiovascular disease". *Current Opinion in Lipidology*, 17(1): 1-10
- Thoma-Worringer, C., Sorensen, J., Lopez-Fandino, R., 2006. "Health effects and technological features of caseinomacropptide". *Int. Dairy J.*, 16(11): 1324-1333
- Toledo, E., Delgado-Rodríguez M., Estruch R., Jordi Salas-Salvado J., Dolores Corella D., Enrique Gomez-Gracia E., Fiol M. *et al.*, 2009. "Low-fat dairy products and blood pressure: follow-up of 2290 older persons at high cardiovascular risk participating in the PREDIMED study". *British Journal of Nutrition* , 101: 59-67
- Tomaino, R.T., Parker J.D., Larick D.K., 2004. "The effect of *Lactococcus lactis* starter cultures on the oxidative stability of liquid whey". *J. Dairy Sci.* 87: 300-307
- Tomasula, P.M., Yee, W.C.F., 2001. "Enriched fractions of alpha-lactalbumin (α -La) and beta-lactoglobulin (β -LG) from whey protein concentrate using carbon dioxide. Functional properties in aqueous solution". *J. Food Process. Preserv.* 25(4): 267-282
- Trelogan, H.C., 1970. "Folklore, statistics and economics of whey". *In Proceedings of the First Whey Utilization Conference*, pp. 71-75
- Urbach G., 1997. "The chemical and biochemical basis of cheese and milk aroma". *In Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk*. Law, B.A.: 253-298
- Vagenas G., Roussis I.G., 2012. "Fat-Derived Volatiles of Various Products of Cows', Ewes', and Goats' Milk". *International Journal of Food Properties*, 15:665-682
- Van Der Kraan, M.I.A., Nazmi, K., van 't Hof, W., Amerongen, A.V.N., Veerman, E.C.I., and Bolscher, J.G.M. 2006. "Distinct bactericidal activities of bovine lactoferrin peptides LFampin 268-284 and LFampin 265-284: Asp-Leu-Ile makes a difference". *Biochem. Cell Biol.*, 84(3): 358-362
- Verheul, M., Pedersen, J.S., Roefs, S.P.F.M., and Kruif, K.G.D., 1999. "Association behavior of native β -lactoglobulin". *Biopolymers*, 49(1): 11-20

- Vulink, I.N., 1995. "The use of whey powders in ice cream manufacture". *Confect. Prod.*, 61: 154-155
- Walsh, M., Duncan S., 2000. "Milk". pp 291-310. *In Food Chemistry: Principles and Application*. Christen, Genevieve and Smith, Scott, ed. Science Technology System, West Sacramento
- Walstra, P., Geurts T.J., Noomen A., Jellema A., van Boekel M.A.J.S., 1999. Pp 189-199 *in Dairy Technology: Principles of Milk Properties and Processes*. P. Walstra, T. J. Geurts, A. Noomen, A. Jellema, and M. A. J. S. van Boekel, ed. Marcel Dekker, Inc., New York, NY
- Walstra, P., Wouters J.T.M., Geurts T.J., 2006. "Dairy Science and Technology". 2nd Ed. Boca Raton, USA: CRC Press, pp. 225-272, 421-445
- Watson, K.S., Peterson A.E., 1977. "Benefits of spreading whey on agricultural land". *Water Pollut. Control Fed.*, 49: 24-34
- Whetstine, C., Parker J.D., Drake M.A., Larick D.K., 2003. "Determining flavor and flavor variability in commercially produced liquid Cheddar whey". *J. Dairy Sci.*, 86: 439-448
- Whittier, E.O., 1944. "Lactose and its utilization-a review". *Journal of Dairy Science*, 27: 505-537
- Wijesundra, C., Watkins P., 2000. "Milk fat is essential for development of cheddar cheese flavor". *Australian Journal of Dairy Technology*, 55: 86
- Zemel, M.B., 2004. "Role of calcium and dairy products in energy partitioning and weight management". *American Journal of Clinical Nutrition*, 79(Suppl.): 907-912