

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
*«Ολοκληρωμένη Διαχείριση Παραγωγής Γάλακτος και Γαλακτοκομικών
Προϊόντων»*

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΚΑΖΕΙΝΙΚΗΣ ΜΗΤΡΑΣ
ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΚΑΤΗΓΟΡΙΩΝ ΤΥΡΙΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗ
ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ ΤΟΥΣ

ΜΑΡΙΑ ΠΑΝΤΕΛΗ

Γεωπόνος

Επιβλέπουσα : Γ. Μοάτσου, Επίκουρος καθηγήτρια ΤΕΤΤ, ΓΠΑ

Εξεταστική Επιτροπή : Α. Μοσχοπούλου, Λέκτορας ΤΕΤΤ, ΓΠΑ

Μ. Χαρισμιάδου, Λέκτορας ΤΕΖΠΥ, ΓΠΑ

Αθήνα, Μάιος 2011

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
*«Ολοκληρωμένη Διαχείριση Παραγωγής Γάλακτος και Γαλακτοκομικών
Προϊόντων»*

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΚΑΖΕΙΝΙΚΗΣ ΜΗΤΡΑΣ
ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΚΑΤΗΓΟΡΙΩΝ ΤΥΡΙΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗ
ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ ΤΟΥΣ

ΜΑΡΙΑ ΠΑΝΤΕΛΗ

Γεωπόνος

Εξεταστική Επιτροπή :

Γ. Μοάτσου, Επίκουρος καθηγήτρια ΤΕΤΤ, ΓΠΑ

Α. Μοσχοπούλου, Λέκτορας ΤΕΤΤ, ΓΠΑ

Μ. Χαρισμιάδου, Λέκτορας ΤΕΖΠΥ, ΓΠΑ

Αθήνα, Μάιος 2011

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γαλακτοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστήμιου Αθηνών τη χρονική περίοδο Οκτώβριος 2010 - Απρίλιος 2011. Μέσα από αυτή τη σελίδα θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους που συνέβαλαν με οποιοδήποτε τρόπο στην ολοκλήρωση της μελέτης.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην επιβλέπουσα καθηγήτρια μου, κ. Γ. Μοάτσου, για την υπομονή, τη βοήθεια και τη καθοδήγησή της σε όλη τη διάρκεια της μελέτης. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τη κ. Α. Μοσχοπούλου για τη σημαντική βοήθεια που μου παρείχε κατά τη διενέργεια του πειραματικού μέρους της μελέτης. Θα ήταν παράλειψη μου να μην αναφέρω την πολύτιμη βοήθεια και στήριξη της κ. Ε. Ζωίδου και ιδιαίτερα την καθοδήγησή της στις αναλύσεις με τη μέθοδο της ατομικής απορρόφησης. Επιπλέον, ευχαριστώ την κ. Μ. Χαρισμιάδου για τις χρήσιμες παρατηρήσεις της.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου της Γαλακτοκομίας που με βοήθησαν κατά τη παραμονή μου σε αυτό.

Αθήνα, Μάιος 2011

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΚΑΖΕΪΝΙΚΗΣ ΜΗΤΡΑΣ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΚΑΤΗΓΟΡΙΩΝ ΤΥΡΙΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ ΤΟΥΣ

ΜΑΡΙΑ ΠΑΝΤΕΛΗ

*Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Εργαστήριο Γαλακτοκομίας, Ιερά
Οδός 75, Αθήνα, 118 55*

Περίληψη

Η παρούσα εργασία είναι μία μελέτη του παρακαζεϊνικού κλάσματος διαφορετικών τύπων τυριού από πρόβειο γάλα. Αποτελείται από δύο επιμέρους συγκριτικές μελέτες του καζεϊνικού και ανόργανου κλάσματος διαφορετικών τυριών, με σκοπό να μελετηθεί σε βάθος η επίδραση της τεχνολογίας στον «κορμό» τους που αποτελείται από την καζεΐνη και τα κλάσμα των κολλοειδών αλάτων. Η πρώτη αφορά στην σύγκριση δύο τυριών από πρόβειο γάλα που έχουν εντελώς διαφορετικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, όπως η Φέτα και η Γραβιέρα, ενώ η δεύτερη αφορά στην επίδραση της επεξεργασίας με υπερυψηλή πίεση στη Φέτα. Για το σκοπό αυτό αναλύθηκαν το καζεϊνικό και το ανόργανο κλάσμα των τυριών μετά από κατεργασία με διαφορετικές συγκεντρώσεις ουρίας 0-6 Μ και EDTA 0-150 mM.

Αποδείχθηκε ότι παρότι η επεξεργασία με 6 Μ ουρία προκαλεί πολύ εκτεταμένη αποδιοργάνωση της παρακαζεΐνης, ένα μικρό μέρος των μεμονωμένων καζεϊνών που την απαρτίζουν παραμένει συνδεδεμένο ισχυρά με το κολλοειδές φωσφορικό ασβέστιο. Αυτές οι ισχυρές αλληλεπιδράσεις δεν επηρεάζονται από την προσθήκη ουρίας. Επιπλέον, οι πρωτεολυτικοί παράγοντες που δραστηριοποιούνται κατά την ωρίμανση και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά διαφορετικών κατηγοριών τυριών επηρεάζουν τη σύσταση της παρακαζεΐνης και την επίδραση της ουρίας σε αυτή. Η απελευθέρωση καζεϊνών που επιτυγχάνεται είτε με ουρία, είτε με EDTA είναι επιλεκτική και ακολουθεί διαφορετικό πρότυπο στα δύο τυριά. Η παρακαζεΐνη όξινων τυριών διαμορφώνεται από υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις, δεσμούς υδρογόνου και το ασβέστιο που συνδέεται με αυτή, ενώ στα τυριά τύπου Γραβιέρα σημαντικό ρόλο παίζει το κολλοειδές φωσφορικό ασβέστιο. Από τη μελέτη των τυριών τύπου Φέτας που είχαν δεχθεί επεξεργασία με ΥΥΠ προέκυψε ότι η αύξηση του pH των τυριών που προκαλεί η ΥΥΠ ενισχύει τις αλληλεπιδράσεις στην παρακαζεϊνική μήτρα του τυριού. Οι

διαφορές αυτές αποκαθίστανται καθώς η ωρίμανση προχωρά, ενώ μετά από ωρίμανση για > 6 μήνες η συμπεριφορά της παρακαζείνης των τυριών που επεξεργάστηκαν στα 500 MPa διαφοροποιείται.

STUDY OF PARACASEIN MATRIX OF VARIOUS CHEESE VARIETIES DURING RIPENING

MARIA PANTELI

*Department of Food Science and Technology, Laboratory of Dairy Research, Iera
Odos 75, Athens, 118 55*

Abstract

The present work is a study of paracasein fraction of various cheese varieties from ovine milk. It is composed of two comparative studies of casein and mineral fractions of different cheeses with the aim to study in depth the effect of technology in their matrix which is composed from casein and colloidal minerals. The first one is a comparison of two cheeses that are made from ovine milk and have totally different physicochemical characteristics, like Feta and Graviera. The latter concerns the effect of treatment with ultrahigh pressure of Feta. For this purpose, the casein and mineral fraction of the cheeses were analyzed after treatment with different concentrations of urea 0-6 M and EDTA 0-150 mM.

It has been proved that treatment with 6 M urea causes very extensive disarrangement of paracasein while a small part of individual caseins, from which paracasein is composed, remains strongly connected with colloidal calcium phosphate. These strong interactions were not affected by the addition of urea. Moreover, the proteolytic factors which are active during ripening and the physicochemical characteristics of different cheese varieties affected the composition of paracasein and the effect of urea to paracasein. The release of casein accomplished either with urea or EDTA was selective following different model in two cheeses. Paracasein of acid cheeses is formed by hydrophobic interactions and hydrogen bonds and the calcium is related to paracasein, while in cheeses like Graviera colloidal calcium phosphate plays an important role. From the study of Feta-type cheeses treated with ultrahigh pressure came out that the resulting increase of cheese pH increases the interactions of paracasein matrix of cheese. These differences were not evident as the ripening proceeded, however after a ripening period of > 6 months the paracasein behavior of the cheese treated at 500 MPa was differentiated.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος

Κεφάλαιο 1^ο : Οι καζεΐνες του γάλακτος

1.1 Σύσταση, ιδιότητες και δομή των καζεϊνικών μικκυλίων.....	12
1.2 Σταθερότητα των καζεϊνικών μικκυλίων.....	18
1.3 Αποδιοργάνωση των καζεϊνικών μικκυλίων.....	20
1.4 Μηχανισμός πήξης του γάλακτος – Σχηματισμός παρακαζεΐνης.....	21

Κεφάλαιο 2^ο : Επίδραση της ωρίμανσης των τυριών στα χαρακτηριστικά τους

2.1 Χρήση του τυριού ως συστατικό τροφίμων.....	24
2.1.1 Λειτουργικότητα του τυριού.....	25
2.1.1.1 Παράμετροι που επηρεάζουν τη λειτουργικότητα του τυριού.....	25
2.1.1.2 Λειτουργικότητα και συμπεριφορά τυριού που δε λειώνει.....	26
2.1.1.3 Ιδιότητες μαγειρέματος και ικανότητα τήξης.....	27
2.1.2 Ρόλος του αδιάλυτου ασβεστίου στη λειτουργικότητα και υφή του τυριού.....	28
2.2 Ασβέστιο: καθοριστικός παράγοντας στον έλεγχο της λειτουργικότητας του τυριού.....	31
2.2.1 Σημασία του σημείου διαλυτοποίησης του ασβεστίου στη διαδικασία παραγωγής τυριού.....	31
2.2.2 Αλλαγές στην αναλογία ασβεστίου κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του τυριού.....	34
2.3 Μέθοδοι υπολογισμού των αλλαγών στις ποσότητες διαλυτού και αδιάλυτου ασβεστίου κατά την ωρίμανση του τυριού Cheddar.....	37

Κεφάλαιο 3^ο : Υλικά και μέθοδοι

3.1 Συγκριτική μελέτη Φέτας και Γραβιέρας.....	41
3.1.1 Φέτα.....	41
3.1.2 Γραβιέρα Κρήτης.....	42

3.2 Μελέτη της επίδρασης υπερυψηλής πίεσης σε τυριά τύπου Φέτα.....	44
3.2.1 Τυροκομήσεις.....	44
3.3 Προετοιμασία δείγματος.....	45
3.3.1 Διαχωρισμός της διαλυτής καζεΐνης από τη παρακαζεϊνική μήτρα των τυριών.....	45
3.3.2 Χρωματογραφική ανάλυση των καζεϊνών.....	47
3.4 Προσδιορισμός της τέφρας των τυριών.....	49
3.5 Προσδιορισμός των στοιχείων ασβεστίου, μαγνησίου, καλίου και νατρίου.....	49
3.5.1 Προσδιορισμός ασβεστίου, μαγνησίου, καλίου και νατρίου στην τέφρα των τυριών.....	49
3.5.2 Προσδιορισμός ασβεστίου, μαγνησίου, καλίου και νατρίου στα υπερκείμενα.....	50

Κεφάλαιο 4^ο : Αποτελέσματα και συζήτηση

4.1 Σύγκριση Φέτας και Γραβιέρας.....	53
4.1.1. Καζεϊνικά κλάσματα.....	53
4.1.2 Ανόργανα στοιχεία	69
4.2 Μελέτη της επίδρασης υπερυψηλής πίεσης (ΥΥΠ) σε τυριά τύπου Φέτα.....	71

Κεφάλαιο 5^ο : Συμπεράσματα

Συμπεράσματα.....	82
-------------------	----

Βιβλιογραφία.....	84
--------------------------	-----------

Παράρτημα (επισυνάπτεται σε ηλεκτρονική μορφή)

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Τα τυριά, λόγω υψηλής διατροφικής αξίας και εξαιρετικών οργανοληπτικών χαρακτηριστικών αποτελούν ένα από τα σπουδαιότερα γαλακτοκομικά προϊόντα. Εκατοντάδες είδη τυριών παράγονται σε παγκόσμια κλίμακα, τα οποία διαφοροποιούνται ως προς την τεχνολογία παρασκευής τους. Στην Ελλάδα, η παραγωγή τυριών αποτελεί πολύ αξιόλογο κλάδο των τροφίμων και βέλτιστο τρόπο αξιοποίησης των μεγάλων ποσοτήτων πρόβειου και αίγειου γάλακτος που παράγονται στη χώρα μας. Το σημαντικότερο Ελληνικό τυρί, από άποψη παραγωγής αλλά και παράδοσης, είναι η Φέτα, τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της οποίας εκτιμώνται από τους καταναλωτές σε διεθνές επίπεδο. Σύμφωνα με τις προδιαγραφές που αναφέρονται στον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών για τη παραγωγή της, παρασκευάζεται από πρόβειο γάλα ή από μίγμα του με αίγιο, με συμμετοχή του δεύτερου σε ποσοστό μέχρι 30%. Σκληρά τυριά, όπως η Γραβιέρα Κρήτης, είναι επίσης δημοφιλή εξαιτίας των εξαιρετικών οργανοληπτικών τους χαρακτηριστικών. Σε αντίθεση με άλλα τυριά τύπου Γραβιέρας, παράγονται σε μεγαλύτερο ποσοστό από πρόβειο ή αιγοπρόβειο γάλα.

Το πιο σημαντικό από τα συστατικά του γάλακτος θεωρείται από τους περισσότερους ερευνητές οι πρωτεΐνες του. Είναι κύριο συστατικό του γάλακτος, η σταθερότητα του οποίου είναι αποτέλεσμα της μικκυλιακής δομής των καζεϊνών. Οι πρωτεΐνες του γάλακτος εκτός από τη διατροφική τους σημασία, έχουν μοναδικές ιδιότητες που επιτρέπουν τη μετατροπή του γάλακτος σε προϊόντα με εντελώς διαφορετικές ιδιότητες, όπως το τυρί. Συγκεκριμένα, η κ-καζεΐνη που σταθεροποιεί τις υπόλοιπες καζεΐνες έναντι του ασβεστίου, χάνει την ιδιότητά της αυτή όταν υδρολυθεί ο πολύ ευαίσθητος στη χυμοσίνη δεσμός Phe105-Met106, που έχει ως αποτέλεσμα την αποσταθεροποίηση των καζεϊνικών μικκυλίων και το σχηματισμό πήγματος παρουσία ιόντων ασβεστίου. Έτσι μετά την υδρόλυση της κ-καζεΐνης με πτυιά, προκύπτει η παρακαζεΐνη, δηλαδή η τροποποιημένη καζεΐνη που παραμένει στο τυρόπηγμα και το μακροπεπτίδιο που απομακρύνεται με το τυρόγαλα.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε το παρακαζεϊνικό κλάσμα διαφορετικών τύπων τυριού από πρόβειο γάλα. Τα τυριά που μελετήθηκαν σε διάφορα στάδια της ωρίμανσης ήταν Φέτα και Γραβιέρα Κρήτης.

Η παρούσα μελέτη αποτελείται από δύο επιμέρους συγκριτικές μελέτες του καζεϊνικού και ανόργανου κλάσματος διαφορετικών τυριών, με σκοπό να μελετηθεί σε

βάθος η επίδραση της τεχνολογίας στον «κορμό» τους που αποτελείται από την καζεΐνη και το κλάσμα των κολλοειδών αλάτων. Η πρώτη αφορά στη σύγκριση δύο τυριών από πρόβειο γάλα που έχουν εντελώς διαφορετικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, όπως η Φέτα και η Γραβιέρα, ενώ η δεύτερη αφορά στην επίδραση της επεξεργασίας με υπερυψηλή πίεση στη Φέτα. Στο εισαγωγικό-βιβλιογραφικό μέρος της μελέτης μετά από το κεφάλαιο σχετικά με τις ιδιότητες των καζεϊνών επιλέχθηκε να παρουσιασθεί μία ανασκόπηση της σύγχρονης βιβλιογραφίας σχετικά με τα φυσικά χαρακτηριστικά και τη λειτουργική συμπεριφορά των τυριών, τα οποία σχετίζονται άμεσα με τις αλληλεπιδράσεις καζεΐνης-αλάτων. Παρόμοιες συγκριτικές μελέτες δεν έχουν παρουσιασθεί στη βιβλιογραφία και τα αποτελέσματα αναμένεται να αποτελέσουν μεταξύ άλλων και ένα χρήσιμο εργαλείο για το σχεδιασμό νέων τεχνολογικών επεμβάσεων στην τυροκομία.

Ι. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο : ΟΙ ΚΑΖΕΪΝΕΣ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

Η καζεΐνη είναι χαρακτηριστική ομάδα πρωτεϊνών, που σε αντίθεση με άλλες πρωτεΐνες όπως οι πρωτεΐνες ορού, βρίσκονται στο γάλα όχι ως μεμονωμένες μοριακές δομές αλλά υπό μορφή κολλοειδούς φωσφοροκαζεϊνικού ασβεστίου (Fox & McSweeney, 2003). Χαρακτηριστικό των καζεϊνών είναι ότι καταβυθίζονται σε pH 4,6 στους 20°C και αποτελούν το 80% του συνόλου των πρωτεϊνών. Εδώ και πολλές δεκαετίες είναι γνωστό ότι υπάρχουν πολλά κλάσματα καζεΐνης που διαφέρουν μεταξύ τους στη δομή, στην ηλεκτροφορητική κινητικότητα αλλά και ως προς τη τεχνολογική τους συμπεριφορά. Αργότερα διαπιστώθηκε και η ύπαρξη γενετικών παραλλαγών τους (Ανυφαντάκης, 2004). Τα κύρια καζεϊνικά κλάσματα είναι τέσσερα (α_{s1} -, α_{s2} -, β - και κ -καζεΐνες), καθένα από τα οποία παρουσιάζει γενετικές παραλλαγές. Ο γενετικός πολυμορφισμός τους παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον κατά την τυροκόμηση, αφού σχετίζεται με τη συνεκτικότητα του πηγματος, το χρόνο πήξης, τη περιεκτικότητα του πηγματος σε καζεΐνη και την απόδοση σε τυρί (Moatsou *et al.*, 2008).

1.1 Σύσταση, ιδιότητες και δομή των καζεϊνικών μικκυλίων

Στο γάλα το 95% περίπου της καζεΐνης απαντάται ως σωματίδια κολλοειδών διαστάσεων, γνωστά ως καζεϊνικά μικκύλια. Η ξηρή ουσία των μικκυλίων είναι 94% πρωτεΐνη και 6% σωματίδια χαμηλής μοριακής μάζας, αναφερόμενα συλλογικά ως κολλοειδές φωσφορικό ασβέστιο που αποτελείται κυρίως από ασβέστιο και φώσφορο με μικρές ποσότητες μαγνησίου και οργανικών κιτρικών αλάτων καθώς και μικροποσότητες άλλων στοιχείων. Τα μικκύλια είναι ενυδατωμένα, συγκρατώντας ~2,0 g H₂O/ g πρωτεΐνης. Μερικές από τις κυριότερες ιδιότητες περιλαμβάνονται στον Πίνακα 1.1 (Fox & McSweeney, 2003).

Επίσης στο γάλα υπάρχουν προϊόντα πρωτεόλυσης των τεσσάρων βασικών καζεϊνών. Οι γ -καζεΐνες και ορισμένες πρωτεόζες-πεπτόνες είναι κλάσματα της β -καζεΐνης, που προέρχονται από τη δράση της πλασμίνης. Οι πρώτες περιλαμβάνονται στο καζεϊνικό κλάσμα ενώ οι δεύτερες στο κλάσμα των πρωτεϊνών του ορού (Walstra *et al.*, 2006).

Πίνακας 1.1 Κυριότερα χαρακτηριστικά των καζεϊνικών μικκυλίων αγελαδινού γάλακτος (Fox & McSweeney, 2003)

Χαρακτηριστικά	Ενδεικτική μέση τιμή
Διάμετρος	130-160 nm
Επιφάνεια	$8 \times 10^{-10} \text{ cm}^2$
Όγκος	$2,1 \times 10^{-15} \text{ cm}^3$
Ποκνότητα (ενυδατωμένη μορφή)	$1,0632 \text{ g/cm}^3$
Μάζα	$2,2 \times 10^{-15} \text{ g}$
Περιεκτικότητα σε νερό	63%
Ενυδάτωση	3,7g νερού / g πρωτεΐνης
Υδροδυναμικός όγκος	$4,4 \text{ cm}^3/\text{g}$
Μοριακή μάζα (ενυδατωμένη)	$1,3 \times 10^9 \text{ Da}$
Μοριακή μάζα (αφυδατωμένη)	$5 \times 10^4 \text{ Da}$
Αριθμός πεπτιδικών αλυσίδων (MB : 30.000Da)	10^4
Αριθμός μικκυλίων ανά ml γάλακτος	$10^{14}-10^{16}$
Επιφάνεια μικκυλίων ανά ml γάλακτος	$5 \times 10^4 \text{ cm}^2$
Απόσταση μεταξύ των μικκυλίων	240 nm

Στον Πίνακα 1.2 παρουσιάζεται η κατανομή των μεμονωμένων καζεϊνικών κλασμάτων σε νοπό αγελαδινό, πρόβειο και αίγειο γάλα. Η πιο αξιοσημείωτη διαφορά είναι το εξαιρετικά χαμηλό ποσοστό της α_{s1} -καζεΐνης του αίγειου γάλακτος συγκριτικά με το αγελαδινό και το πρόβειο γάλα. (Huppertz *et al.*, 2006).

Πίνακας 1.2 Αναλογία των κλασμάτων καζεΐνης σε νοπό αγελαδινό, πρόβειο και αίγειο γάλα (Moatsou *et al.* 2004, 2008)

Είδος γάλακτος	Αγελαδινό γάλα	Πρόβειο γάλα	Αίγειο γάλα ^γ
Ολική πρωτεΐνη ^α	3,6	5,5	3,1
α_{s1} -καζεΐνη ^β	38	37	13-16
α_{s2} -καζεΐνη ^β	10	14	13-16
β -καζεΐνη και γ -καζεΐνες ^β	39	39	13-24
κ -καζεΐνη ^β	13	10	50-55

^α g/100g γάλακτος

^β % της ολικής καζεΐνης

^γ εξαρτάται από τη φυλή

Το 95% της καζεΐνης απαντά στο γάλα σε μορφή μικκυλίων ενώ το υπόλοιπο 5% είναι σε διαλυτή μορφή. Μεταξύ των δύο μορφών υπάρχει δυναμική σχέση που επηρεάζεται από την ποσότητα των ιόντων ασβεστίου και φωσφόρου του γάλακτος. Με

αυξομείωση των τελευταίων είναι δυνατόν να αυξομειωθεί η μία μορφή καζεΐνης έναντι της άλλης, διότι το φαινόμενο είναι αντιστρεπτό. Εάν μειωθεί η συγκέντρωση των ιόντων ασβεστίου, για παράδειγμα, μειώνεται το μέγεθος των μικκυλίων και αυξάνεται η περιεκτικότητα του γάλακτος σε διαλυτή καζεΐνη. Το αντίθετο συμβαίνει με την αύξησή τους (Μοάτσου Γ., 2009). Στο Πίνακα 1.3 παρουσιάζεται η κατανομή του ασβεστίου και του φωσφόρου μεταξύ της διαλυτής και της κolloειδούς φάσης στο αγελαδινό, πρόβειο και αίγιο γάλα.

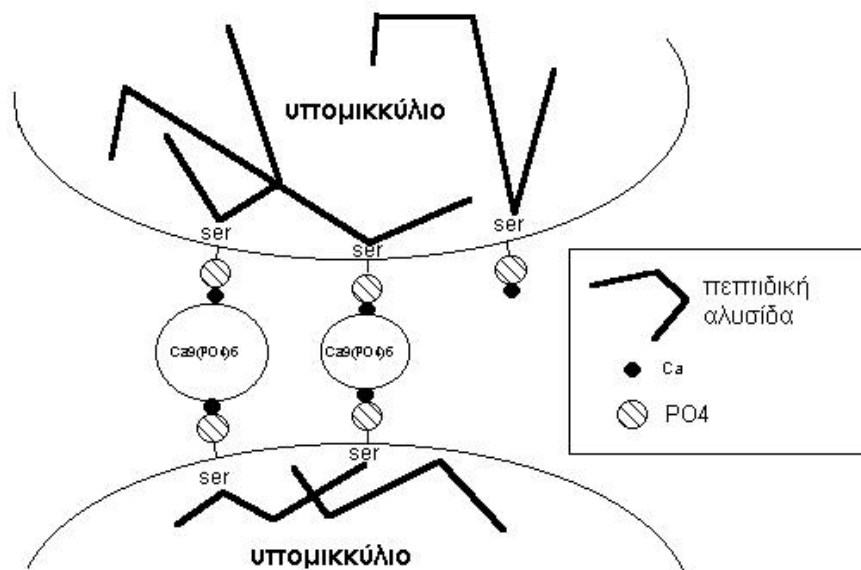
Πίνακας 1.3 Κατανομή του ασβεστίου και του φωσφόρου (%) μεταξύ διαλυτής και κolloειδούς φάσης στο αγελαδινό, πρόβειο και αίγιο γάλα (Huppertz *et al.*, 2006)

Είδος γάλακτος	Ασβέστιο		Φώσφορος	
	Διαλυτή	Κolloειδής	Διαλυτή	Κolloειδής
Αγελαδινό	32	68	53	47
Πρόβειο	20	80	39	61
Αίγιο	34	66	41	59

Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο τα καζεϊνικά μικκύλια εμφανίζονται σφαιρικά με διάμετρο που κυμαίνεται από 50 μέχρι 500 nm (μέσος όρος ~150 nm) και μοριακή μάζα από 10^6 μέχρι 3×10^9 Da (μέσος όρος $\sim 10^8$ Da). Επειδή τα μικκύλια έχουν κolloειδείς διαστάσεις, είναι ικανά να σκεδάζουν το φως και το λευκό χρώμα του γάλακτος οφείλεται σημαντικά στο σκεδασμό του φωτός από τα καζεϊνικά μικκύλια. Το λευκό χρώμα χάνεται αν διαταραχθεί η δομή των μικκυλίων, διαλύοντας το κolloειδές φωσφορικό ασβέστιο με τη προσθήκη για παράδειγμα κιτρικού, EDTA ή οξαλικού, με αύξηση του pH, ή με προσθήκη ουρίας (>5 M) ή αιθανόλης (~35% σε 70°C).

Στο πρόβειο γάλα ο μέσος όρος του μεγέθους των καζεϊνικών μικκυλίων είναι χαμηλότερος (Buchhein *et al.*, 1989; Richardson *et al.*, 1974), η ενυδάτωση των μικκυλίων είναι χαμηλότερη (Sood *et al.*, 1979) και το περιεχόμενο κolloειδές φωσφορικό ασβέστιο των μικκυλίων είναι υψηλότερο (O'Connor & Fox, 1977) σε σύγκριση με το αγελαδινό γάλα. Στο αίγιο γάλα, ο μέσος όρος του μεγέθους των καζεϊνικών μικκυλίων είναι υψηλότερος από ό,τι στο αγελαδινό γάλα (Buchhein *et al.*, 1989), η ενυδάτωση των μικκυλίων είναι ελαφρώς χαμηλότερη (Sood *et al.*, 1979) και το περιεχόμενο κolloειδές φωσφορικό ασβέστιο των μικκυλίων είναι υψηλότερο (O'Connor & Fox, 1977).

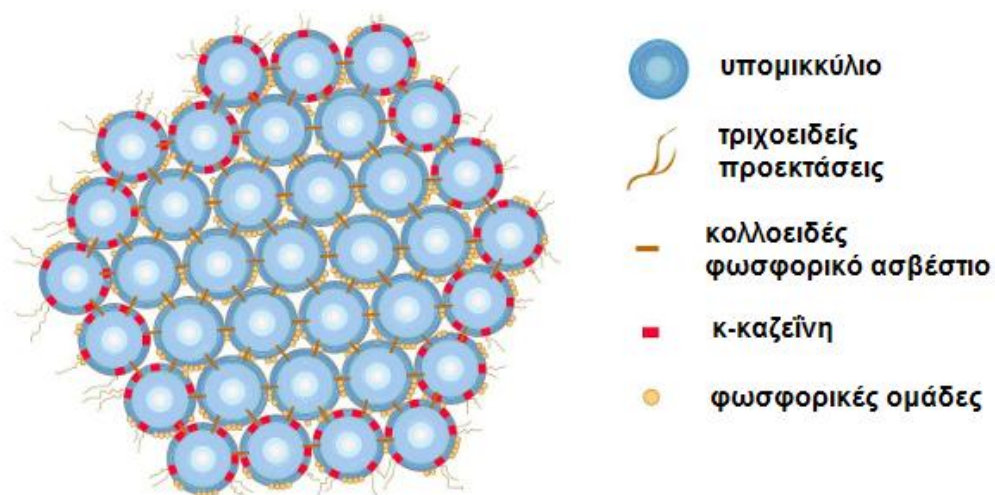
Ο μεγάλος όγκος των μικκυλίων οφείλεται στην ενυδάτωση των υπομικκυλίων, που αποτελούν τις υδρόφιλες ομάδες των καζεϊνών στην επιφάνεια των μικκυλίων και στην ανώμαλη επιφάνεια των τελευταίων (Walstra *et al.*, 2006; Fox & McSweeney, 2003). Κάθε καζεϊνικό μικκύλιο αποτελείται από υπομικκύλια, τα οποία συγκρατούνται μεταξύ τους με γέφυρες κολλοειδούς φωσφορικού ασβεστίου, υδρόφοβες και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και δεσμούς υδρογόνου (Fox & McSweeney, 2003; Fox & Brodtkorb, 2008). Όσον αφορά τις γέφυρες κολλοειδούς φωσφορικού ασβεστίου, φαίνεται ότι πρόκειται για ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αρνητικά φορτισμένων φωσφορικών ομάδων της καζεΐνης και των συσσωματωμάτων $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$, τα οποία φορτίζονται θετικά προσροφώντας δύο Ca^{2+} από το περιβάλλον (Εικόνα 1.1). Όταν πάνω από το 22% των φωσφοεστερικών ομάδων έχουν συνδεθεί ανά δύο με τον τρόπο αυτό, σχηματίζονται τα μικκύλια. Υπάρχουν περίπου 25.000 φωσφορικά υπολείμματα ανά μικκύλιο, από τα οποία το 40% περίπου φαίνεται ότι συνδέεται σε ζεύγη μέσω $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.1 (Oaeckfull *et al.*, 1997).



Εικόνα 1.1 Σχηματικό διάγραμμα της ένωσης δύο υπομικκυλίων με ομάδες $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$ (Schmidt, 1982)

Τα υπομικκύλια (Εικόνα 1.2) αποτελούνται από 10-100 μόρια καζεϊνών, έχουν σφαιρική μορφή, διάμετρο 5-25 nm και μοριακό βάρος που μπορεί να φτάνει μέχρι 250.000 Da. Στο σχηματισμό τους συμμετέχουν όλα τα καζεϊνικά κλάσματα. Περιλαμβάνουν έναν υδρόφοβο πυρήνα, πλούσιο σε α_{s1} -, α_{s2} και β -καζεΐνες, που

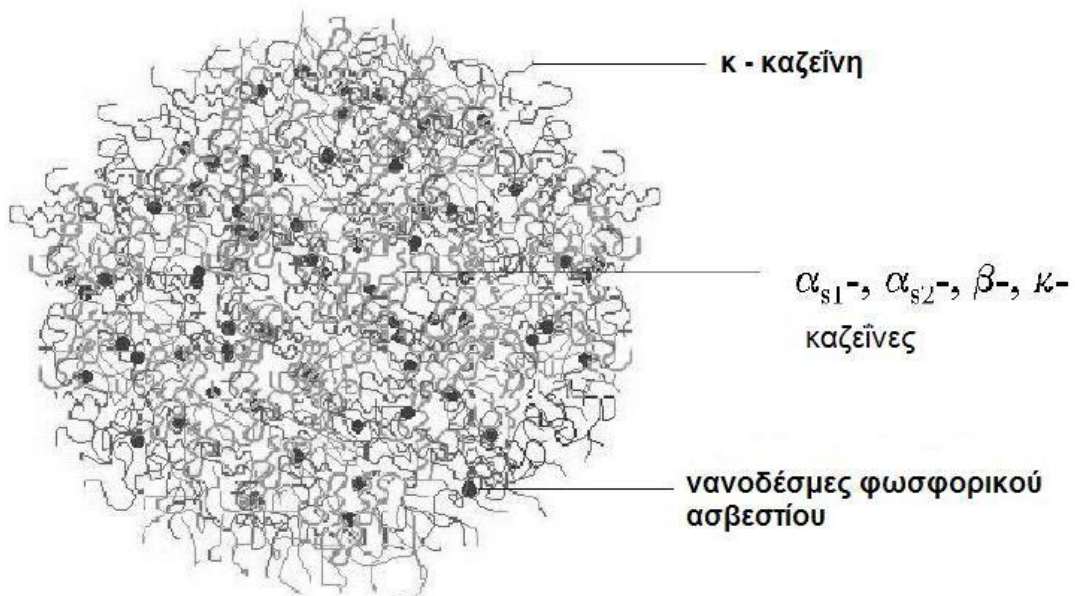
καλύπτεται από έναν υδρόφιλο φλοιό, στον οποίο συμμετέχει οπωσδήποτε η κ-καζεΐνη (Μοάτσου Γ., 2009). Η κ-καζεΐνη, που αποτελεί το 12% της ολικής καζεΐνης, μπορεί να σταθεροποιήσει ευαίσθητες στα Ca^{2+} καζεΐνες, που αντιστοιχούν στο δεκαπλάσιο της μάζας της (Fox & Brodtkorb, 2008). Πολλές εκατοντάδες ή και χιλιάδες υπομικκυλίων ενώνονται μεταξύ τους με γέφυρες κολλοειδούς φωσφορικού ασβεστίου και δημιουργούν τα μικκύλια (Ανυφαντάκης, 2004). Πιθανότατα η παρουσία φωσφορικού ασβεστίου μειώνει το ηλεκτρικό φορτίο των υπομικκυλίων και τα σταθεροποιεί περισσότερο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, να έλκουν το ένα το άλλο και τελικά να συνενώνονται. Όταν η πεπτιδική αλυσίδα της κ-καζεΐνης δύο υπομικκυλίων που πλησιάζουν το ένα το άλλο, προεξέχει τουλάχιστον στο ένα από τα δύο και, βρίσκεται ανάμεσα τους, παρεμποδίζεται η συνένωση τους (Walstra *et al.*, 1999). Η συνένωση αυτή διευκολύνεται από τη παρουσία θέσεων φωσφοσερίνης στην πεπτιδική αλυσίδα των καζεϊνών. Όταν καλυφθεί ολόκληρη η επιφάνεια τους, σταματά η ανάπτυξη του μικκυλίου (Ανυφαντάκης, 2004). Επομένως η συσσωμάτωση των υπομικκυλίων συνεχίζεται μέχρι να σχηματιστεί ένα σχεδόν σφαιρικό συσσωμάτωμα και κατά τέτοιο τρόπο ώστε αυτά που περιέχουν περισσότερη κ-καζεΐνη να συγκεντρώνονται στην επιφάνεια των μικκυλίων ενώ αυτά που υπολείπονται σε κ-καζεΐνη, να βρίσκονται στο εσωτερικό τους (Fox & McSweeney, 2003).



Εικόνα 1.2 Δομή μικκυλίου καζεΐνης (Walstra *et al.*, 1999)

Στην τελευταία δεκαετία, πολλοί ερευνητές βασιζόμενοι σε ευρήματα της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας έχουν εκφράσει επιφυλάξεις για το μοντέλο των

υπομικκυλίων και έχουν προτείνει εναλλακτικά μοντέλα. Ο Holt (1992), όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.3, πρότεινε ένα μοντέλο καζεϊνικού μικκυλίου στο οποίο δεν υπάρχουν υπομονάδες. Σε αυτό το μοντέλο, οι ευαίσθητες στο ασβέστιο καζεΐνες συνδέονται με νανοδέσμες φωσφορικού ασβεστίου, καταλήγοντας σε απεικόνιση του μικκυλίου ως ένα μπερδεμένο δίκτυο από καζεϊνικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες που διασταυρώνονται με φωσφορικό ασβέστιο. Οι νανοδέσμες αυτές αποτελούνται από κολλοειδές φωσφορικό ασβέστιο, αλλά και από οργανικό φώσφορο των φωσφοσερινών και πιθανόν από τα υπολείμματα γλουταμικού οξέος. Επομένως διαφέρουν από το κολλοειδές φωσφορικό ασβέστιο επειδή περιέχουν και συστατικά πρωτεϊνικής φύσης (Fox & McSweeney, 2003).



Εικόνα 1.3 Δομή του καζεϊνικού μικκυλίου (Holt, 1992)

Πιο πρόσφατα, ο Dalgleish και οι συνεργάτες του (2004) πρότειναν, εφαρμόζοντας μια καταλληλότερη προετοιμασία του δείγματος πριν την ηλεκτρονική μικροσκοπία, ότι τα καζεϊνικά μικκύλια απαρτίζονται από μικρούς σωληνίσκους διαμέτρου περίπου 20 nm και η επιφάνεια των καζεϊνικών μικκυλίων είναι πιο πολύπλοκη από ό,τι υποστηριζόταν μέχρι πρόσφατα. Τα άκρα των μικρών σωληνίσκων εξέχουν από το εσωτερικό της δομής και αντιστοιχούν στις νανοδέσμες φωσφορικού ασβεστίου/καζεΐνης που αναφέρονται στο προηγούμενο πρότυπο (Εικόνα 1.4). Η κ-καζεΐνη βρίσκεται στα άκρα των σωληνίσκων. Το μικκύλιο έχει μία εύκαμπτη

εξωτερική επιφάνεια, η οποία απαρτίζεται από επιμέρους επιφάνειες που μοιάζουν με μικρές βούρτσες.



Εικόνα 1.4 Σκαρίφημα ηλεκτρονικής μικρογραφίας ενός καζεϊνικού μικκυλίου (Dalglish *et al.*, 2004)

1.2 Σταθερότητα των καζεϊνικών μικκυλίων

Η σταθερότητα των καζεϊνικών μικκυλίων σε διάφορες διαδικασίες που υποβάλλεται το γάλα έχει απασχολήσει πολλούς ερευνητές. Τα καζεϊνικά μικκύλια, παρά τις διαστάσεις τους, είναι σταθερά στις συνθήκες που επικρατούν στο γάλα, κυρίως εξαιτίας του καθαρού τους φορτίου και του βαθμού ενυδάτωσής τους. Συγκεκριμένα, όπως συνοπτικά παρουσιάζεται από τους Fox & McSweeney (2003):

- Είναι πολύ σταθερά σε υψηλές θερμοκρασίες, συσσωματώνονται μόνο στους 140°C για 15-20 min στο κανονικό pH του γάλακτος. Αυτή η θρόμβωση δεν οφείλεται στη μετουσίωση των πρωτεϊνών αλλά σε σημαντικές αλλαγές που συμβαίνουν στο γάλα λόγω της υψηλής θέρμανσης, για παράδειγμα μείωση του pH λόγω της πυρόλυσης της λακτόζης σε διάφορα οξέα, αποφωσφορυλίωση των καζεϊνών, διάσπαση του καρβοξυλικού μέρους της κ-καζεΐνης, μετουσίωση των πρωτεϊνών του ορού και καθίζησή τους στα καζεϊνικά μικκύλια, καθίζηση του διαλυτού φωσφορικού ασβεστίου στα μικκύλια σε υψηλότερες θερμοκρασίες.
- Είναι σταθερά σε συμπίεση, για παράδειγμα μπορούν να γίνουν ίζημα με υπερφυγοκέντρηση και να διασκορπιστούν εύκολα με ήπια ανάδευση.

- Είναι σταθερά στη συνηθισμένη ομογενοποίηση.
- Είναι σταθερά σε υψηλά επίπεδα $[Ca^{2+}]$, τουλάχιστον μέχρι 200 mM σε θερμοκρασίες μέχρι 50°C.
- Οι καζεΐνες συσσωρεύονται και κατακρημνίζονται από το διάλυμα όταν το pH μειώνεται στο ισοηλεκτρικό σημείο των καζεϊνών (4,6). Η κατακρήμιση σε αυτό το pH εξαρτάται από τη θερμοκρασία (παράδειγμα δεν συμβαίνει σε θερμοκρασίες <5-8°C και συμβαίνει σε μεγάλο εύρος pH, πιθανώς 3-5,5 σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Τα μικκύλια αποδιοργανώνονται σε $pH \leq 5$ εξαιτίας κυρίως της διαλυτοποίησης του κολλοειδούς φωσφορικού ασβεστίου.
- Όσο το pH του γάλακτος μειώνεται, το κολλοειδές φωσφορικό ασβέστιο διαλυτοποιείται και διαλυτοποιείται πλήρως σε $pH < 4,9$. Στη πραγματικότητα, οξίνιση κρύου γάλακτος (4°C) σε pH 4,6, που ακολουθείται από διαπίδυση έναντι γάλακτος μεγάλης ανάμιξης είναι μία χρησιμοποιούμενη μέθοδος για διαφοροποίηση του περιεχομένου κολλοειδούς φωσφορικού ασβεστίου του γάλακτος. Αν το pH του οξινισμένου κρύου γάλακτος ρυθμιστεί στο φυσιολογικό pH 6,7, τα μικκύλια επανασχηματίζονται εφόσον το pH δεν μειωθεί κάτω από 5,2. Αυτή η ιδιότητα δείχνει ότι το περισσότερο από το κολλοειδές φωσφορικό ασβέστιο μπορεί να διαλυτοποιηθεί χωρίς να καταστραφεί η δομή των μικκυλίων.
- Μερικές πρωτεΐνες καταλύουν ένα συγκεκριμένο δεσμό της κ-καζεΐνης, ως αποτέλεσμα η καζεΐνη να πέφτει ως ίζημα ή να γίνεται πηκτή παρουσία ιόντων Ca^{2+} ή άλλων ιόντων. Αυτό είναι κλειδί στη παραγωγή πολλών κατηγοριών τυριού.
- Οι καζεΐνες κατακρημνίζονται με 40% αιθανόλη σε pH 6,7 και με χαμηλότερες συγκεντρώσεις αν το pH μειωθεί. Ωστόσο, αν το σύστημα θερμανθεί σε τουλάχιστον 60°C, προτιμότερα 70°C, το ίζημα επαναδιαλύεται και το σύστημα γίνεται ημιδιαφανές. Όταν το σύστημα ψυχθεί ξανά, επανακτάται η λευκή εμφάνιση του γάλακτος και δημιουργείται ένα πήγμα αν το μίγμα αιθανόλης-γάλακτος διατηρηθεί στους 4°C, ειδικά αν χρησιμοποιήθηκε συμπυκνωμένο (>2x) γάλα. Αν απομακρυνθεί η αιθανόλη με εξάτμιση, θα δημιουργηθούν πολύ μεγάλα συσσωματώματα με πολύ διαφορετικές ιδιότητες από τα φυσικά μικκύλια. Η επίδραση της αιθανόλης προάγεται με αύξηση του pH (35% αιθανόλη προκαλεί διάλυση στους 20°C σε pH 7,3) ή με προσθήκη NaCl. Η μεθανόλη και η ακετόνη έχουν παρόμοια επίδραση με την αιθανόλη αλλά η προπανόλη προκαλεί διάλυση στους 25°C.
- Τα μικκύλια επίσης αποδιοργανώνονται με ουρία (>4M), με SDS ή αυξάνοντας το pH σε >9. Κάτω από αυτές τις συνθήκες πολύ υψηλού pH, το κολλοειδές

φωσφορικό ασβέστιο δεν διαλυτοποιείται και στη πραγματικότητα αυξάνοντας το pH αυξάνεται το κολλοειδές φωσφορικό ασβέστιο. Στην περίπτωση αποδιοργάνωσης με ουρία, όταν αυτή απομακρυνθεί με διαπίδυση έναντι μεγάλης ποσότητας γάλακτος μεγάλης ανάμιξης, τα μικκύλια μορφοποιούνται πάλι.

- Τα μικκύλια αποσταθεροποιούνται με τη κατάψυξη, λόγω της μείωσης του pH και της αύξησης των ιόντων Ca^{2+} στη φάση του γάλακτος που δεν έχει καταψυχθεί. Η συμύκνωση του γάλακτος αυξάνει την ευαισθησία του στην αποσταθεροποίηση λόγω κατάψυξης. Η καζεΐνη που προκύπτει με αυτό τον τρόπο μπορεί να διαλυθεί σε νερό και να δώσει σωματίδια με ιδιότητες όμοιες με τα μικκύλια, αλλά που δεν έχουν ακόμα χαρακτηριστεί πλήρως.

1.3 Αποδιοργάνωση των καζεϊνικών μικκυλίων

Εκτεταμένη αποδιοργάνωση των καζεϊνικών μικκυλίων μπορεί να επιτευχθεί (McGann & Fox, 1974, Holt *et al.* 1986, Holt, 1992, Griffin *et al.*, 1988):

- Με οξίνιση σε pH ~5,0. Η επίδραση της οξίνισης στα καζεϊνικά μικκύλια εξαρτάται από το pH, την ιοντική ισχύ και τη θερμοκρασία. Σε όξινες συνθήκες μάλιστα παρατηρείται πιο εκτεταμένη διαλυτοποίηση της β-καζεΐνης σε σχέση με τις άλλες καζεΐνες (Holt *et al.* 1986, Dalglish & Law, 1988).
- Με διαπίδυση έναντι ρυθμιστικών διαλυμάτων ελεύθερων Ca^{2+}
- Με προσθήκη ουρίας. Η ουρία χρησιμοποιείται ευρέως για την αποδιοργάνωση των πρωτεϊνών κι επομένως και των καζεϊνών, όπως εφαρμόστηκε από τον Hipp (1952). Οι McGann & Fox (1974) απέδειξαν ότι με την παρουσία συγκεντρώσεων ουρίας 2-8 M η συγκέντρωση του κολλοειδούς φωσφορικού ασβεστίου στην καζεΐνη (mg/g καζεΐνης) ουσιαστικά δεν μεταβάλλεται. Εφόσον η ουρία αποδιοργανώνει τους υδροφοβικούς δεσμούς και τους δεσμούς υδρογόνου, αποδεικνύεται ότι αποδιοργάνωση του μικκυλίου μπορεί να συμβεί χωρίς να επηρεασθούν οι καζεΐνες-φωσφορικού ασβεστίου και καταδεικνύει τη σημασία αυτού του είδους των δεσμών στη συγκρότηση του μικκυλίου. Επιπλέον, σύμφωνα με τους Ali *et al.* (1980), η προσθήκη μικρής ποσότητας ουρίας στο γάλα (~100 mg/100 ml) διαλυτοποιεί επιλεκτικά μικρές ποσότητες β-καζεΐνης.
- Με προσθήκη Ca-χηλωτικών παραγόντων, EDTA ή οξαλικού, κιτρικού ή ορθοφωσφορικών (Holt *et al.* 1986, Aoki *et al.* 1986). Η προσθήκη EDTA στο

αγελαδινό γάλα σε συγκέντρωση 1,5 g/100 ml προκαλεί διαλυτοποίηση του 83% της καζεΐνης, στην οποία περιέχεται το 89% της β-καζεΐνης και μόνο το 75% των α_{s1}- και κ-καζεϊνών (Ali *et al.*, 1980). Η προσθήκη 10 mM EDTA σε ανασυσταμένη σκόνη γάλακτος χαμηλής θέρμανσης διπλασιάζει την ποσότητα διαλυτής πρωτεΐνης και ειδικότερα τετραπλασιάζει τη διαλυτή καζεΐνη, αποδιοργανώνοντας το 1/3 της αρχικής καζεΐνης, παρουσιάζοντας μάλιστα εντονότερη επίδραση στη β-καζεΐνη (Ward *et al.*, 1997). Η προσθήκη EDTA ή κιτρικών μειώνει την ενεργότητα των Ca²⁺ και αυξάνει τη διαλυτή καζεΐνη και τα διαλυτά Ca, Pi και Mg. Μάλιστα το EDTA είναι περισσότερο δραστικό σε σχέση με τα κιτρικά. Πιο συγκεκριμένα, αναφέρεται ότι η προσθήκη 5 mM EDTA σε pH 6,65 μετακινεί το 20% του Ca, το 22% του Pi και μόλις το 5% των καζεϊνών από τη μη-διαλυτή φάση του γάλακτος. Παρουσία 10 mM EDTA παρατηρείται διαλυτοποίηση του 44% του Ca, του 46% του Pi και απελευθέρωση του 30% των καζεϊνών από τη μη-διαλυτή φάση. Προσθήκη 20 mM EDTA έχει ως αποτέλεσμα τη διαλυτοποίηση του 90% του Ca και του 95% του Pi, ενώ παρουσία 50 mM EDTA το γάλα αποκτά υπο-πράσινη θαμπή εμφάνιση εξαιτίας της πλήρους αποδιοργάνωσης των μικκυλίων (Udabage *et al.*, 2000). Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώνουν τα ευρήματα των Griffin *et al.* (1988), οι οποίοι αναφέρουν ότι καθώς η συγκέντρωση EDTA στο γάλα αυξάνει, η αναλογία ασβεστίου και φωσφόρου ως προς τις καζεΐνες που παραμένουν στο μικκύλιο μειώνεται. Επιπλέον, οι ίδιοι ερευνητές αναφέρουν ότι η περιεκτικότητα των μικκυλίων σε μεμονωμένες καζεΐνες δεν επηρεάζεται από τη συγκέντρωση του EDTA.

- Με προσθήκη διαλυμάτων αλάτων όπως τα CaCl₂, MgCl₂ και NaCl. Τα Ca²⁺, Mg²⁺ και Na⁺ συνδέονται με τις φωσφορικές και καρβοξυλικές ομάδες της καζεΐνης αυξάνοντας τη συγκέντρωση H⁺ και μειώνοντας την απόθεση μεταξύ των καζεϊνικών μικκυλίων. Έτσι προκαλείται συσσωμάτωση καθώς τα H⁺ αντικαθιστούν τα Ca²⁺, Mg²⁺ και Na⁺ στα καζεϊνικά μικκύλια. Ιόντα Cl, NO₃, Br και SCN προσδένονται στις ομάδες λυσίνης, αργινίνης και ιστιδίνης μειώνοντας επίσης την απόθεση μεταξύ των μικκυλίων (Bringe & Kinsella, 1991).

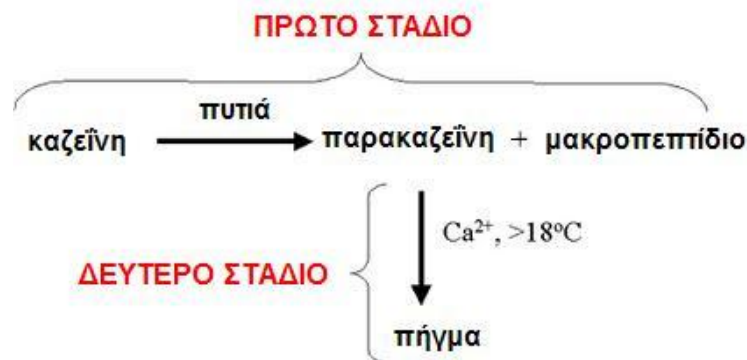
1.4 Μηχανισμός πήξης του γάλακτος – Σχηματισμός παρακαζεΐνης

Με τον όρο πήξη του γάλακτος εννοούμε μία σειρά αλλαγών στις φυσικοχημικές του ιδιότητες, οι οποίες υπό ορισμένες συνθήκες, προκαλούν μεταβολές στα μικκύλια

των καζεϊνών του που οδηγούν τελικά στη δημιουργία του τυροπήγματος. Οι αλλαγές αυτές είναι δυνατόν να προκληθούν είτε με οξίνιση είτε με χρήση πρωτεολυτικών ενζύμων που περιέχονται στη πυτιά (Μοάτσου, 2009). Η προσθήκη χυμοσίνης στο γάλα, επιφέρει στην αρχή περιορισμένες αλλαγές στα καζεϊνικά μικκύλια και στη συνέχεια το γάλα πήζει ταχύτατα (Dalglish, 1999).

Η διαδικασία του σχηματισμού πήγματος χωρίζεται σε τρία στάδια. Στο πρώτο στάδιο, η κ-καζεΐνη των μικκυλίων, δέχεται την πρωτεολυτική δράση των πρωτεασών της πυτιάς και η διάσπασή της δίνει δύο πεπτίδια με διαφορετικές ιδιότητες, το μακροπεπτίδιο και τη παρακαζεΐνη. Η προοδευτική υδρόλυση της κ-καζεΐνης κατά το πρώτο στάδιο, οδηγεί σε μεταβολή των ιδιοτήτων των μικκυλίων, έτσι ώστε αυτά να μπορούν να συσσωματωθούν. Η φάση της συσσωμάτωσης αποτελεί το δεύτερο στάδιο (Dalglish, 1982). Επειδή το γάλα αρχίζει να πήζει πριν η ενζυμική υδρόλυση της κ-καζεΐνης ολοκληρωθεί (Dalglish, 1999), είναι σημαντικό να καθοριστεί η έκταση της υδρόλυσης της κ-καζεΐνης ώστε να παρατηρηθεί αποτελεσματική συσσωμάτωση. Έχει βρεθεί ότι μέχρι να υδρολυθεί το 80% της κ-καζεΐνης, ο ρυθμός της συσσωμάτωσης είναι αμελητέος. Αφού υδρολυθεί το 80% η συσσωμάτωση των καζεϊνών αυξάνεται ταχύτατα για να φτάσει σε ένα μέγιστο όταν όλες οι κ-καζεΐνες έχουν υδρολυθεί. Φαίνεται ότι υπάρχει μια οριακή τιμή της κ-καζεΐνης που έχει υδρολυθεί κάτω της οποίας τα μικκύλια δεν μπορούν να συσσωματωθούν. Το τρίτο στάδιο αυτής της δράσης περιλαμβάνει διαδικασίες όπως είναι η συναίρεση (έξοδος ορού από το τυρόπηγμα) και μη συγκεκριμένες πρωτεολύσεις των πρωτεϊνών στο πήγμα (Dalglish, 1982).

Στη πράξη η ενζυμική πήξη του γάλακτος χωρίζεται σε δύο φάσεις, την ενζυμική που αφορά την υδρόλυση της σταθεροποιητικής κ-καζεΐνης και τη μη-ενζυμική που αφορά τη δημιουργία ενός συνεκτικού δικτύου τροποποιημένων μικκυλίων που συνδέονται με γέφυρες ασβεστίου (Μοάτσου, 2009), όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.5.



Εικόνα 1.5 Σχηματική παράσταση της πήξης του γάλακτος με πυτιά

Το δίκτυο αυτό των συσσωματωμάτων τροποποιημένων καζεϊνικών μικκυλίων που αποτελείται από τις καζεΐνες και το κολλοειδές ανόργανο κλάσμα αποτελεί την παρακαζεϊνική μήτρα των τυριών εντός της οποίας περικλείονται τα λιποσφαίρια και ο ορός του γάλακτος. Εντελώς σχηματικά το δίκτυο αυτό που προκύπτει από την ενζυμική πήξη μπορεί να θεωρηθεί ότι διαμορφώνεται από νημάτια πάχους 3 και μήκους 10 επιμέρους σωματιδίων, ενώ σε αρκετά σημεία παρεμβαίνουν «μεγαλύτερα συσσωματώματα». Ως αποτέλεσμα δημιουργούνται πόροι με διάμετρο αρκετών μm στους οποίους περικλείονται τα λιποσφαίρια και ο ορός του γάλακτος. Οι ιδιότητες αυτής της μήτρας καθορίζουν ουσιαστικά την ταυτότητα κάθε είδους τυριού και διαμορφώνονται κυρίως από τις συνθήκες τυροκόμησης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο : ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ ΤΩΝ ΤΥΡΙΩΝ ΣΤΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥΣ

2.1 Χρήση του τυριού ως συστατικό τροφίμων

Σύμφωνα με τον Lucey (2008), τις τελευταίες δεκαετίες, έχει αυξηθεί το ενδιαφέρον της βιομηχανίας τροφίμων για το τυρί, λόγω της χρήσης του ως συστατικό σε διάφορα τρόφιμα όπως, πίτσα, ορεκτικά, σούπες, σάλτσες, κράκερ, γέμιση σε ζυμαρικά, πίτες, φέτες σε χάμπουργκερ και κρύα σάντουιτς. Για τυριά που χρησιμοποιούνται ως συστατικά τροφίμων, όπως Mozzarella, έχει ερευνηθεί η επίδραση της τροποποίησης της σύστασης του γάλακτος, των συνθηκών παραγωγής και του τύπου καλλιέργειας στις λειτουργικές ιδιότητες που είναι σημαντικές για τη χρήση του ως συστατικό, για παράδειγμα ιδιότητες τεμαχισμού και ικανότητα τήξης. Είναι αναγνωρισμένο ότι το αδιάλυτο ασβέστιο που συνδέεται με τις καζεΐνες στο τυρί παίζει σημαντικό ρόλο στην υφή του τυριού, συμπεριλαμβανομένης της ικανότητας τήξης. Το περιεχόμενο ολικό και αδιάλυτο ασβέστιο μπορεί να ελεγχθεί με αλλαγή της τιμής pH κατά τη παραγωγή, τη πήξη ή τη στράγγιση. Οι αλλαγές μετά τη παραγωγή στις ποσότητες αδιάλυτου/διαλυτού ασβεστίου είναι κατά κύριο λόγο υπεύθυνες για τις περισσότερες πρωταρχικές αλλαγές στην υφή του τυριού και όχι η πρωτεόλυση, όπως πιστευόταν μέχρι πρόσφατα. Οι τελικοί χρήστες του τυριού σε διάφορα τρόφιμα απαιτούν σταθερή λειτουργικότητα στη διάρκεια ζωής του προϊόντος στο ράφι και το τυρί πρέπει να ικανοποιεί συγκεκριμένους στόχους, παράδειγμα χρώμα και ικανότητα ροής. Ο Lucey (2008) περιγράφει δοκιμές για τροποποίηση του περιεχόμενου αδιάλυτου ασβεστίου στο τυρί και παρουσιάζει ένα πλαίσιο που επιτρέπει την υφή του τυριού και τις λειτουργικές ιδιότητες να περιγραφούν σε όρους συγκεκριμένων μοριακών αλληλεπιδράσεων των καζεϊνών.

Το τυρί είναι ένα ευέλικτο τρόφιμο που έχει μεγάλη ποικιλία υφών, αρωμάτων και τελικής χρήσης. Η υφή και δομή των διαφόρων ποικιλιών τυριού κυμαίνονται από μαλακό σε σκληρό, μαλακό/κρεμώδες σε πηχτό, από εύθρυπτο σε συμπαγές, με σχισμές ή στρογγυλές ομοιόμορφες τρύπες. Οι φυσικές ιδιότητες του τυριού καθορίζονται από την περιεχόμενη καζεΐνη, από το τύπο, αριθμό και ένταση των αλληλεπιδράσεων της καζεΐνης, τη σύσταση του τυριού και τις βιοχημικές διεργασίες της ωρίμανσης (Horne, 1998; Lucey *et al.*, 2003). Το κόστος είναι επίσης μία άλλη σημαντική παράμετρος αφού το τυρί είναι το πιο ακριβό συστατικό σε ένα τρόφιμο.

2.1.1 Λειτουργικότητα του τυριού

Υπάρχει ένας αριθμός παραγόντων που ελέγχουν τη λειτουργικότητα του τυριού. Αυτές οι παράμετροι συνήθως στοχεύουν σε συστατικά τροφίμων όπως Mozzarella, αλλά μπορούν να αξιολογηθούν και σε άλλους τύπους τυριών.

2.1.1.1 Παράμετροι που επηρεάζουν τη λειτουργικότητα του τυριού

1. Σύσταση : Τυριά με υψηλότερη υγρασία είναι πιο μαλακά, πιο λεία και λιώνουν πιο εύκολα (ηλικία, pH, περιεχόμενο ασβέστιο) από τυριά με χαμηλή υγρασία. Τυριά με χαμηλά λιπαρά τείνουν να είναι πιο σκληρά και να λειώνουν λιγότερο από τυριά με περισσότερα λιπαρά (Fife *et al.*, 1996) εκτός εάν γίνουν διορθωτικές ενέργειες από τον παραγωγό για διαφοροποίηση αυτών των χαρακτηριστικών (αυξάνοντας τη περιεχόμενη υγρασία). Μείωση του περιεχόμενου λίπους ή μείωση του περιεχόμενου ασβεστίου του τυριού έχει ως αποτέλεσμα τη ποσοτική αύξηση της πρωτεΐνης και της υγρασίας. Τυριά με ίδιο περιεχόμενο πρωτεΐνης αλλά με υψηλότερη αναλογία α_3 -καζεΐνης προς β -καζεΐνη έχουν μεγαλύτερη ικανότητα τήξης (O'Mahony *et al.*, 2008).

2. pH (οξύτητα) : Το γάλα είναι ένα σταθερό προϊόν λόγω του αρνητικού φορτίου των καζεϊνών. Ακόμα και εάν το γάλα πήξει και παραχθεί φρέσκο τυρί χωρίς σημαντική ανάπτυξη οξύτητας, το τυρόπηγμα δε λιώνει και δε ρέει λόγω της ισχυρής σύνδεσης του φωσφορικού ασβεστίου των καζεϊνών. Η οξίνιση απομακρύνει κολλοειδές φωσφορικό ασβέστιο από τα καζεϊνικά μικκύλια και κάνει το τυρί πιο ελαστικό (Lucey & Fox, 1993; Lucey *et al.*, 2003). Σε τυριά, όπως Mozzarella, υιοθετείται συγκεκριμένος βαθμός οξίνισης ώστε να έχει την επιθυμητή ικανότητα τήξης, ελαστικότητα και ικανότητα ροής. Αν γίνεται υπερβολική οξίνιση (pH < 4,9, παράδειγμα Φέτα) το τυρόπηγμα χάνει τα χαρακτηριστικά τήξης και ελαστικότητας λόγω της υπερβολικής πρωτεϊνικής επίδρασης (ηλεκτροστατική και υδρόφοβη) μεταξύ των καζεϊνών (Lucey *et al.*, 2003). Το ποσοστό και η έκταση ανάπτυξης οξύτητας κατά την παραγωγή τυριού ελέγχει το περιεχόμενο ασβέστιο του τυριού και αυτό το ποσοστό μπορεί να αλλάξει τροποποιώντας το pH σε κρίσιμα σημεία κατά την παραγωγή (Lucey & Fox, 1993), ή προσθέτοντας οξέα που εκχυλίζουν το ασβέστιο (κιτρικό οξύ) (Keller *et al.*, 1974) ή εφαρμόζοντας πλύσιμο ή διάλυση του τυρογάλακτος για απομάκρυνση λακτόζης/αλάτων (παράδειγμα τυρί Colby, Swiss ή Gouda).

3. Θερμοκρασία : Η θερμοκρασία επηρεάζει την επαφή μορίων καζεΐνης. Η διάμετρος τους αυξάνει σε χαμηλή θερμοκρασία λόγω της εξασθένησης των

υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Οι χαμηλές θερμοκρασίες προκαλούν επομένως αυξημένη επιφάνεια επαφής μεταξύ των καζεϊνών και αυτό αυξάνει τη συνεκτικότητα. Οι καζεΐνες συστέλλονται με αύξηση της θερμοκρασίας λόγω ενίσχυσης υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων άρα η συνεκτικότητα μειώνεται (Lucey *et al.*, 2003). Η θέρμανση έχει ως αποτέλεσμα τη κατάρρευση του δικτύου του τυριού και την εμφάνιση ελεύθερου λίπους.

4. Θέρμανση του γάλακτος : Θέρμανση του γάλακτος σε υψηλές θερμοκρασίες προκαλεί έντονες αλλαγές στις πρωτεΐνες τυρογάλακτος. Οι πρωτεΐνες αυτές αλληλεπιδρούν με τις καζεΐνες και ως αποτέλεσμα το τυρί παρουσιάζει περιορισμένη ικανότητα τήξης και ροής. Η προσθήκη οξέος σε θερμό γάλα χρησιμοποιείται για τη παρασκευή πολλών φρέσκων τυριών. Αυτά τα τυριά δε λειώνουν λόγω του σχηματισμού ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ των πρωτεϊνών (καζεΐνες και πρωτεΐνες ορού) οι οποίοι κρατούν το πλέγμα του τυριού συμπαγές ακόμα και σε υψηλές θερμοκρασίες. Αντίθετα επιδρώντας σε άλλες αλληλεπιδράσεις επιτυγχάνουμε μεγαλύτερη κινητικότητα που καταλήγει σε ικανότητα τήξης και ροής.

2.1.1.2 Λειτουργικότητα και συμπεριφορά τυριού που δε λειώνει

Τα τυριά που δε λειώνουν χρησιμοποιούνται ευρέως ως συστατικά σε διάφορα τρόφιμα και πωλούνται στο λιανικό εμπόριο. Υπάρχει ένας αριθμός λειτουργικών ιδιοτήτων που είναι σημαντικές για αυτές τις χρήσεις των τυριών, όπως:

1. Σταθερότητα και σκληρότητα : Η σταθερότητα του τυριού αυξάνεται με χαμηλή υγρασία ή χαμηλή περιεκτικότητα σε λίπος και μειώνεται με χαμηλή αναλογία αδιάλυτου ασβεστίου προς πρωτεΐνη ή χαμηλή αναλογία καζεΐνης προς λίπος στο τυρόγαλα. Για το Cheddar (και άλλα τυριά μέσης έως χαμηλής υγρασίας) η σταθερότητα δεν αλλάζει σημαντικά κατά την ωρίμανση σε σύγκριση με τυριά υψηλότερης υγρασίας (παράδειγμα Mozzarella), που γίνονται πιο μαλακά και κολλώδη με την ηλικία.

2. Ευθρυπτότητα : Η ευθρυπτότητα μπορεί να οφείλεται σε χαμηλό pH (παράδειγμα Φέτα), υψηλή περιεκτικότητα σε άλατα, χαμηλό περιεχόμενο ασβέστιο, υπερβολική πρωτεόλυση (παράδειγμα πολύ ώριμο τυρί Cheddar) ή χαμηλή υγρασία. Η παρουσία υψηλών ποσοτήτων μετουσιωμένων πρωτεϊνών ορού που εμπλέκονται με τις καζεΐνες στο τυρί μπορούν επίσης να κάνουν το τυρί πιο μαλακό. Η δομή τυριών με

φλοιό (π.χ. Gouda) γίνεται πιο αδύνατη και εύθρυπτη με την ηλικία λόγω της απώλειας υγρασίας.

3. «Κατεργασιμότητα» : Με τον όρο αυτό χαρακτηρίζεται η ιδιότητα των τυριών να τεμαχίζονται, να ψιλοκόβονται με ειδικά μηχανήματα (κοπτικά εργαλεία). Αυτή η ιδιότητα επηρεάζεται από την σκληρότητα (μέση προς υψηλή), ευθρυπτότητα και τη χαμηλή συγκολλητικότητα. Η κατεργασιμότητα επηρεάζεται από τη σύσταση του τυριού, το pH, τη διάλυση των καζεϊνών και τη θερμοκρασία κατά τη διαδικασία. Οι περισσότερες διαδικασίες κοπής πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ το τυρί μπορεί να είναι πιο κρύο, για παράδειγμα αν το τυρί είναι μαλακό, ψύχεται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες για να αυξηθεί η σταθερότητά του. Μερικά είδη τυριών όπως η Φέτα είναι δύσκολο να τεμαχιστούν λόγω της μικρής, εύθρυπτης δομής τους. Τα θρύμματα του τυριού όμως είναι κατάλληλα για πασπάλισμα σε σαλάτες ή ψημένες πίτσες.

2.1.1.3 Ιδιότητες μαγειρέματος και ικανότητα τήξης

Τα τυριά που λειώνουν χρησιμοποιούνται σε διάφορα τρόφιμα όπως πίτσες, χάμπουργκερ, σάντουιτς και σάλτσες. Οι τελικοί χρήστες του τυριού έχουν συγκεκριμένες απαιτήσεις για το προϊόν που θα χρησιμοποιήσουν. Οι λειτουργικές ιδιότητες των τυριών αυτών είναι πολύπλοκες, για παράδειγμα ικανότητα ροής, μαλάκωμα, ικανότητα τεμαχισμού, ελαστικότητα, τέντωμα και δυσχρωματισμός κατά τη θέρμανση.

1. Ικανότητα ροής : Η ικανότητα ροής αυξάνεται με την ηλικία (λόγω της πρωτεόλυσης και απώλειας αδιάλυτου ασβεστίου από τα καζεϊνικά μικκύλια) και με αύξηση στην υγρασία ή στο λίπος. Είναι πολύ μικρή σε τυριά με χαμηλό pH (<4,9) για παράδειγμα cottage ή Φέτα και αυξάνεται με μείωση του περιεχόμενου ασβεστίου. Οι διάφορες κατηγορίες τυριών έχουν πολύ διαφορετική δομή και ρεολογικές ιδιότητες. Οι ρεολογικές κατατομές διαφόρων τύπων τυριού κατά τη θέρμανση έχουν απασχολήσει πολλούς ερευνητές (Guinee *et al.*,1999; Reparet & Noël, 2003). Έχει προταθεί ότι αλλαγές στη διάλυση ή αφυδάτωση της καζεϊνης είναι κλειδί για την ικανότητα τήξης/ροής αλλά όπως αναφέρουν οι Lucey *et al.* (2003), το τυρί έχει πολύ υψηλή ικανότητα συγκράτησης νερού και γίνεται πολύ γρήγορη ανταλλαγή μορίων νερού από το εσωτερικό των καζεϊνών προς τον ορό. Οι αλλαγές που παρατηρούνται στον εξερχόμενο ορό κατά την ωρίμανση σε μερικά τυριά υψηλής υγρασίας, όπως

Mozzarella, οφείλονται στη διαλυτοποίηση κολλοειδούς φωσφορικού ασβεστίου και στην απορρόφηση της άλμης από το τυρί.

2. Μαλάκωμα κατά τη θέρμανση : Αυτό συμβαίνει σε όλα τα τυριά, η έκταση όμως εξαρτάται από τη σύσταση, την ηλικία και το pH. Το μαλάκωμα προκαλείται από τη μείωση της δύναμης των αλληλεπιδράσεων των καζεϊνών με την αύξηση της θερμοκρασίας και συστολή του δικτύου (Guinee *et al.*, 1999).

3. Ικανότητα τεμαχισμού μετά τη θέρμανση : Αναφέρεται σε μεμονωμένα κομμάτια που είναι ορατά μετά το ψήσιμο και οφείλονται στην έλλειψη μαλακώματος και ειδικά ικανότητας ροής. Είναι πρόβλημα λιγότερο συχνό σε ώριμα τυριά αφού η ικανότητα ροής αυξάνεται με την ηλικία. Χαμηλής υγρασία τυριά όπως η Παρμεζάνα μπορεί να κομματιαστούν μετά τη θέρμανση (συνήθως χρησιμοποιείται τριμμένη ή φιλοαλεσμένη Παρμεζάνα αντί για τεμάχια).

4. Ελαστικότητα του πήγματος κατά τη παραγωγή τυριού : Το πήγμα είναι ελαστικό όταν χάνεται επαρκές ασβέστιο από τις καζεΐνες κατά τη παραγωγή του τυριού (Lucey & Fox, 1993). Το pH στο οποίο το πήγμα γίνεται ελαστικό εξαρτάται από την έκταση της αφαλάτωσης και τη περιεκτικότητα σε λίπος και καζεΐνη. Όταν το γάλα έχει χαμηλά λιπαρά ή υψηλή περιεκτικότητα σε καζεΐνη απαιτείται χαμηλότερο pH κατά τη προσθήκη της πυτιάς ή χαμηλότερο τελικό pH.

5. Απόκτηση καστανού χρώματος λόγω θέρμανσης : Κατά τη θέρμανση, το χρώμα μερικών τυριών σκουραίνει λόγω της αντίδρασης Maillard μεταξύ των αναγόντων σακχάρων (παράδειγμα λακτόζη) και πρωτεϊνών (ειδικά των αμινοξέων). Το χρώμα παραλλάσει ανάλογα τη συγκέντρωση των αναγόντων σακχάρων και το φούρνο που χρησιμοποιείται. Το καστανό χρώμα μπορεί να ελαττωθεί με πλύσιμο του τυροπήγματος στο στάδιο της τυροκόμησης αφού μειώνεται η περιεχόμενη λακτόζη και με επιλογή κατάλληλων καλλιεργειών εκκίνησης έτσι ώστε να μεταβολίζονται όλα τα υπολειπόμενα σάκχαρα (συμπεριλαμβανομένης της γαλακτόζης).

2.1.2 Ρόλος του αδιάλυτου ασβεστίου στη λειτουργικότητα και υφή του τυριού

Η σπουδαιότητα των αλληλεπιδράσεων του ασβεστίου και του φωσφόρου στην υφή του τυριού έχουν μελετηθεί από πολλούς ερευνητές (Johnson & Lucey, 2006; Lucey & Fox, 1993; Lucey *et al.*, 2003; McMahon & Oberg, 1998).

Οι Van Slyke L.L. και Bosworth A.W. ήταν οι πρώτοι ήδη από το 1907 που μελέτησαν τη κατάσταση του ασβεστίου στο τυρί και αιτιολόγησαν το σχηματισμό

«υδατοδιαλυτού ασβεστίου» στο τυρί Cheddar με την οξύτητα που αναπτύχθηκε. Διέλυσαν τυρί Cheddar με νερό για να βρουν την ποσότητα υδατοδιαλυτού ασβεστίου και ανέφεραν ότι αυξανόταν κατά τις δύο πρώτες εβδομάδες της ωρίμανσης και το 80% του ασβεστίου και όλος ο φώσφορος γίνονταν διαλυτά (Van Slyke and Bosworth, 1907). Ο σημαντικός ρόλος των κιτρικών και φωσφορικών αλάτων στην επιτυχημένη παραγωγή τυριού κατέδειξε επίσης τη καθοριστική σημασία που παίζει το ασβέστιο στην υφή του τυριού.

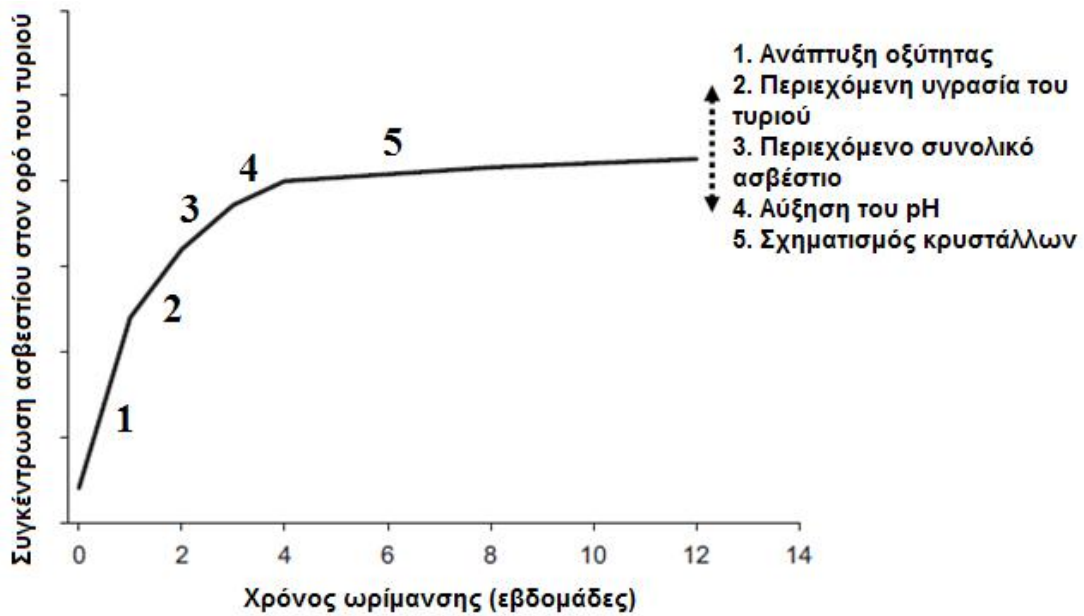
Το 1930 και στις αρχές του 1940 αποδείχθηκε (Moir, 1931; Dolby 1941) ότι η οξύτητα του τυρογάλακτος κατά τη στράγγιση και το ποσοστό ανάπτυξης της οξύτητας είναι σημαντικοί παράγοντες που καθορίζουν τη περιεκτικότητα σε άλατα, την οξύτητα και τη ποιότητα του τυριού. Οι παραγωγοί τυριού αργότερα αναγνώρισαν ότι η ανάπτυξη οξύτητας επηρέαζε άμεσα το περιεχόμενο ασβέστιο του τυριού και ότι η συνολική περιεκτικότητα σε ασβέστιο καθορίζει την υφή του τυριού (Lawrence *et al.*, 1983). Οι Lawrence *et al.* (1983) υποστήριξαν ότι το κάθε τυρί έχει συγκεκριμένα επίπεδα ασβεστίου και ότι η ανάπτυξη οξύτητας κατά την παρασκευή του καθορίζει την απώλεια ασβεστίου που στη συνέχεια καθορίζει τη βασική υφή του τυριού, ενώ η πρωτεόλυση είναι υπεύθυνη για αλλαγές στην υφή κατά την ωρίμανση. Επίσης πρότειναν ότι το περισσότερο ασβέστιο (>85%) στο τυρί ήταν σε διαλυτή μορφή σε pH 5,0.

Τέλος του 1980 και αρχές 1990, διαπιστώθηκε ότι τα τυριά που πήζουν με χρήση πυτιάς, όπως Cheddar και Emmental, περιείχαν υψηλή συγκέντρωση αδιάλυτου ασβεστίου (Lucey & Fox, 1993; Morris *et al.*, 1988). Οι Morris *et al.* (1988) πρότειναν ότι κατά τη παρασκευή και ωρίμανση του τυριού το κολλοειδές φωσφορικό ασβέστιο διαλύεται και ο ορός του τυριού γίνεται υπερκορεσμένος σε ασβέστιο και φώσφορο, καταλήγοντας στη δημιουργία και ανάπτυξη κρυστάλλων φωσφορικού ασβεστίου που παρατηρούνται στο τυρί.

Στο γάλα σε χαμηλές τιμές pH ($\leq 5,2$), το κολλοειδές φωσφορικό ασβέστιο διαλυτοποιείται εκτεταμένα, όμως αρκετό από αυτό φαίνεται να παραμένει αδιάλυτο στο τυρί. Όταν η ανάπτυξη οξύτητας στη παραγωγή τυριού εμφανίζεται πριν από τη στράγγιση του ορού, η υγρασία του πήγματος είναι υψηλή και η διαλυτότητα του κολλοειδούς φωσφορικού ασβεστίου ως συνάρτηση του pH είναι παρόμοια με αυτή στο γάλα. Όταν η ανάπτυξη οξύτητας εμφανιστεί αργότερα στη διαδικασία, φαίνεται ότι είναι πιο δύσκολο να διαλυτοποιηθεί το κολλοειδές φωσφορικό ασβέστιο. Αυτό μπορεί

να είναι η εξήγηση του ρόλου κλειδί που έχει το pH κατά την προσθήκη της πυτιάς στο περιεχόμενο συνολικό ασβέστιο του τυριού (Lucey & Fox, 1993).

Σε μερικές μελέτες, εκτιμήθηκε ότι η χαμηλή περιεκτικότητα σε συνολικό ασβέστιο στο τυρί σήμαινε επίσης ότι θα υπήρχε χαμηλή περιεκτικότητα σε αδιάλυτο ασβέστιο (Joshi *et al.*, 2002). Κατά τις πρώτες εβδομάδες μετά τη παραγωγή τυριού, και ειδικά τις πρώτες μέρες, παρατηρείται μείωση στη ποσότητα αδιάλυτου ασβεστίου σε συνάρτηση με το συνολικό ασβέστιο του τυριού Cheddar από $\geq 70\%$ τη 1^η ημέρα μέχρι $\sim 60\%$ μετά από τέσσερις εβδομάδες (Hassan *et al.*, 2004). Μεταβολές στην ισορροπία ασβεστίου έχουν παρατηρηθεί σε διάφορα είδη τυριού όπως Mozzarella. Αν το τυρί γίνει πολύ όξινο, παράδειγμα pH 4,7, τότε το αδιάλυτο ασβέστιο του Cheddar μειώνεται κατά την ωρίμανση αλλά τα επίπεδα παραμένουν $\geq 40\%$ (Lee *et al.*, 2005). Φαίνεται ότι η διαλυτοποίηση του αδιάλυτου ασβεστίου στο τυρί προκαλεί ταχεία αύξηση στο περιεχόμενο ασβέστιο του ορού μέχρι μία μέγιστη συγκέντρωση (Lee *et al.*, 2005). Όταν το περιεχόμενο ασβέστιο του ορού είναι πολύ υψηλό (> 800 mg/100g) μπορεί να παρατηρηθεί καθίζηση του φωσφορικού ασβεστίου (O'Mahony *et al.*, 2006). Αυτός ο πιθανός μηχανισμός φαίνεται στο σχήμα 2.1. Χαμηλότερη συγκέντρωση ασβεστίου στον ορό (~ 700 mg/100g) έχει αναφερθεί σε τυριά Cheddar με πολύ χαμηλό pH (Lee *et al.*, 2005). Προφανώς το pH και η υγρασία του τυριού επηρεάζουν τη μέγιστη συγκέντρωση ασβεστίου του ορού πιθανώς πριν εμφανιστεί η καθίζηση και επομένως η περαιτέρω διαλυτοποίηση του αδιάλυτου ασβεστίου είναι δυσμενής. Οι O'Mahony *et al.* (2006) κατάφεραν να αυξήσουν το συνολικό και αδιάλυτο ασβέστιο του τυριού με επώασή του σε διαλύματα που περιείχαν περισσότερο ασβέστιο σε σχέση με αυτό στην υδατική φάση του τυριού. Αυτό ήταν πιθανό διότι υπήρχε μεγάλη αύξηση στην υγρασία των τυριών που επωάζονταν σε αυτά τα διαλύματα. Στις μέρες μας, ορισμένοι ερευνητές και βιομηχανίες γάλακτος ελέγχουν το περιεχόμενο αδιάλυτο ασβέστιο του τυριού κατά την ωρίμανση για να ελέγχουν με αυτό τον τρόπο τη λειτουργικότητα του τυριού.



Σχήμα 2.1 Πιθανοί παράγοντες που επηρεάζουν την ισορροπία του ασβεστίου στον ορό του τυριού (Lucey, 2008)

2.2 Ασβέστιο: καθοριστικός παράγοντας στον έλεγχο της λειτουργικότητας του τυριού

Οι Johnson & Lucey (2006) αναφέρουν ότι η ποσότητα και η κατάσταση του ασβεστίου που συγκρατείται επηρεάζει τα φυσικά χαρακτηριστικά του τυριού κατά την ωρίμανση. Το ασβέστιο επίσης επηρεάζει τις λειτουργικές ιδιότητες του τυριού κατά τη θέρμανσή του. Αλλαγές στις φυσικές ιδιότητες του τυριού κατά την ωρίμανση εμφανίζονται σε δύο στάδια. Το 1^ο στάδιο επηρεάζεται από το pH και τις αλλαγές στη ποσότητα αδιάλυτου ασβεστίου και για να πραγματοποιηθεί απαιτεί ώρες, ημέρες ή εβδομάδες, ενώ το 2^ο στάδιο καθορίζεται από την έκταση της πρωτεόλυσης της άθικτης καζεΐνης που παρατηρείται κατά τη διάρκεια ωρίμανσης του τυριού.

2.2.1 Σημασία του σημείου διαλυτοποίησης του ασβεστίου στη διαδικασία παραγωγής τυριού

Η οξύτητα του γάλακτος κατά τη πήξη με πυτιά και το ποσοστό οξίνισης κατά τα αρχικά στάδια της συναίρεσης (ενώ συμβαίνει ακόμα αποβολή υγρασίας στο τυρόπηγμα) έχουν σημαντική επίδραση στη ποσότητα και στην έκταση απώλειας ασβεστίου από τη καζεΐνη. Η παραγωγή τυριού με σταθερότερη δομή ή σκληρότερου

με περιορισμένη ικανότητα τήξης ή ελαστικότητα μπορεί να επιτευχθεί είτε με την ανάπτυξη περισσότερης οξύτητας πριν από τη προσθήκη της πυτιάς είτε με χαμηλότερο pH στο τελικό τυρί. Το τελευταίο, ενώ είναι αποτελεσματικό, μερικές φορές δεν είναι εύκολο να ελεγχθεί. Έτσι για να έχει το τυρί την επιθυμητή δομή και ταυτόχρονα να επιτευχθεί η επιθυμητή περιεκτικότητα σε υγρασία πρέπει να ελεγχθεί η οξύτητα κατά την προσθήκη της πυτιάς.

Οι Lawrence & Gilles (1987) παρατήρησαν ότι στο 1^ο στάδιο ωρίμανσης (νεαρά τυριά) με ίδιο τελικό pH δεν είχαν πάντα τα ίδια χαρακτηριστικά δομής και τις ίδιες λειτουργικές ιδιότητες. Αυτό αμφισβητούσε το θέμα της σημασίας της ανάπτυξης οξύτητας και του pH. Ωστόσο, το pH είναι ένα εργαλείο που χρησιμοποιείται για να εκτιμηθεί έμμεσα η πιθανή απώλεια ασβεστίου από τη καζεΐνη και το pH χάνει την αξία του εάν ο παραγωγός δε λάβει υπόψη του τη σύσταση του γάλακτος και το ποσοστό και έκταση της ανάπτυξης οξύτητας κατά τη διάρκεια της παραγωγής αλλά και της ωρίμανσης του τυριού.

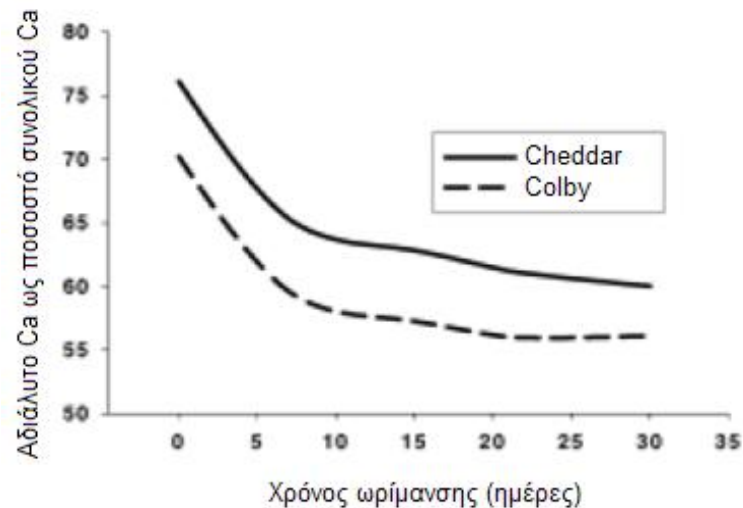
Το ασβέστιο διαλυτοποιείται πιο εύκολα κατά την οξίνιση πριν από τη διαίρεση του τυροπήγματος (Lucey & Fox 1993). Μετά τη διαίρεση, ο ορός περιέχει διαλυτό ασβέστιο που εύκολα αποβάλλεται από το τυρόπηγμα κατά τη συναίρεση. Ωστόσο, αυτό αφήνει το τυρόπηγμα με λιγότερο ορό αλλά με επαρκή ποσότητα αδιάλυτου ασβεστίου (εξαρτάται από το ποσοστό και την έκταση της ανάπτυξης οξύτητας). Η οξίνιση μετά την αποβολή του περισσότερου ορού από το τυρόπηγμα έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση διαλυτοποιημένου ασβεστίου μέσα στον ορό του τυροπήγματος. Έτσι η συγκέντρωση του ασβεστίου στον απομείναντα ορό αυξάνει μέσα στα σωματίδια τυροπήγματος πριν από τη στράγγιση. Η διαλυτοποίηση του κολλοειδούς φωσφορικού ασβεστίου μπορεί επίσης να εξαρτάται από την περιεχόμενη υγρασία του γάλακτος ή του τυροπήγματος. Η μείωση της υγρασίας στα σωματίδια του τυροπήγματος πριν από τη στράγγιση του ορού μειώνει το διαθέσιμο νερό για διαλυτοποίηση του κολλοειδούς φωσφορικού ασβεστίου και αυτό μπορεί να μετατοπίσει τη ψευδο-αναλογία προς το αδιάλυτο κολλοειδές φωσφορικό ασβέστιο. Το αποτέλεσμα είναι ότι επιβραδύνεται η απώλεια του πρόσθετου ασβεστίου από τη καζεΐνη στο τυρόπηγμα. Στο τυρόπηγμα υιοθετείται ένα είδος ψευδο-αναλογίας μεταξύ διαλυτού και αδιάλυτου ασβεστίου (Lee et al. 2005). Αυτή η ψευδο-αναλογία επηρεάζεται σημαντικά από το pH και απαιτεί μεγαλύτερη ανάπτυξη οξύτητας για να διαλυτοποιηθεί περισσότερο ασβέστιο από ό,τι συμβαίνει στο γάλα. Επιπλέον, διαίρεση του τυροπήγματος σε pH 6,1 έχει ως αποτέλεσμα λιγότερο αδιάλυτο ασβέστιο σε σχέση

με τυρόπηγμα που διαιρείται σε pH 6,5, παρά το γεγονός ότι και οι δύο τύποι τυριού μπορούν τελικά να φτάσουν pH 5,2.

Υπάρχουν άλλες επιπτώσεις της ανάπτυξης περισσότερης οξύτητας πριν από τη διαίρεση και στην αρχή της συναίρεσης (Lucey and Fox 1993). Μετακίνηση του αδιάλυτου φωσφορικού ασβεστίου επίσης σημαίνει ότι η ρυθμιστική ικανότητα του τυροπήγματος μειώνεται και μπορεί να παρατηρηθεί ανεξέλεγκτη και ανεπιθύμητη πτώση του pH (Lee et al. 2005). Αυτό είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον σε τυριά υψηλής υγρασίας, αφού όσο η περιεκτικότητα σε υγρασία αυξάνεται, αυξάνεται επίσης η ποσότητα της λακτόζης και μπορεί ενδεχόμενα να ζυμωθεί σε γαλακτικό οξύ. Τρόποι για να αποφευχθεί η υπερβολική οξύτητα είναι η χρήση καλλιεργείων ευαίσθητων στο pH, στα άλατα ή στη θερμοκρασία, έτσι ώστε να σταματήσει η ζύμωση κάτω από συνθήκες χαμηλού pH, υψηλών αλάτων ή χαμηλής θερμοκρασίας. Μία άλλη μέθοδος είναι να αραιωθεί ο ορός ή να ξεπλυθεί το τυρόπηγμα. Και τα δύο μειώνουν την υπολειμματική λακτόζη στο τυρόπηγμα, που κατά συνέπεια μειώνει τη ποσότητα γαλακτικού οξέος που μπορεί να παραχθεί στην ωρίμανση, ανεξάρτητα από τα χαρακτηριστικά της καλλιέργειας. Η διάλυση του ορού ή το ξέπλυμα του τυροπήγματος απομακρύνουν επίσης άλλα διαλυτά συστατικά, συμπεριλαμβανομένου του διαλυτοποιημένου ασβεστίου (Σχήμα 2.2). Κατά συνέπεια, η αναλογία μεταξύ αδιάλυτου και διαλυτού ασβεστίου μετακινείται προς την αύξηση της ποσότητας αδιάλυτου ασβεστίου που διαλυτοποιείται. Οι επιπτώσεις στη δομή και στις λειτουργικές ιδιότητες του τυριού είναι σημαντικές. Το τυρί γίνεται πιο μαλακό, λιγότερο κοκκώδες, λιώνει πιο εύκολα, αλλά έχει επίσης υψηλότερο pH (παράδειγμα το τυρί Colby).

Σε πολλές χώρες γίνεται τυποποίηση του γάλακτος αυξάνοντας τη συνολική ποσότητα της καζεΐνης στο γάλα για να αυξηθεί η απόδοση ή για να δημιουργηθεί η σωστή αναλογία καζεΐνης προς λίπος με σκοπό να παραχθεί τυρί με την επιθυμητή σύσταση στερεών. Η αύξηση της συγκέντρωσης καζεΐνης στο γάλα της τυροκόμησης μειώνει την υγρασία στο τυρόπηγμα αμέσως μετά τη διαίρεση και επηρεάζει την αναλογία ασβεστίου και τελικά τα φυσικά χαρακτηριστικά του τυριού. Η υψηλότερη συγκέντρωση καζεΐνης και το σχετιζόμενο κολλοειδές φωσφορικό ασβέστιο απαιτούν περισσότερη οξύτητα πριν από τη διαίρεση του πηγματος (ή στο τελικό τυρί) για να αποκτηθεί τυρί με παρόμοιες ιδιότητες συγκριτικά με τυρί που παρασκευάζεται με γάλα που έχει λιγότερη καζεΐνη. Ωστόσο, υπάρχει απροθυμία από τους παραγωγούς να επιμηκύνουν τους χρόνους παρασκευής για να επιτρέψουν την ανάπτυξη επιθυμητής

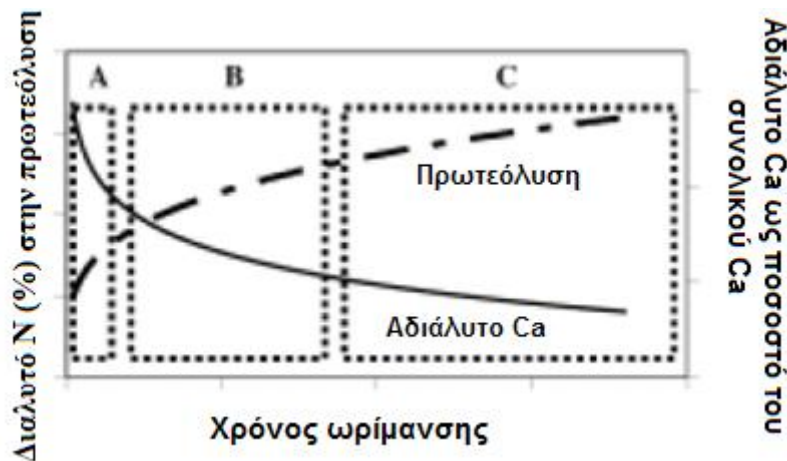
οξύτητας. Έτσι, συχνά γίνεται προσθήκη αραιών οξέων. Προστίθενται αραιωμένα γαλακτικό ή οξικό οξύ ή γίνεται προσθήκη δευτερευουσών καλλιέργειών, με τις οποίες το γαλακτικό οξύ δεν εξουδετερώνεται κατά τη ζύμωση. Η πρακτική της άμεσης προσθήκης οξέος στο γάλα από το να αναμένεται από τη καλλιέργεια να παράγει αρκετό οξύ καλείται προ-οξίνιση και αυτή η πρακτική είναι κοινή για πολλά τυριά με αυξημένο περιεχόμενο καζεΐνης.



Σχήμα 2.2 Αλλαγές στο περιεχόμενο αδιάλυτο ασβέστιο ως ποσοστό του συνολικού ασβεστίου κατά την ωρίμανση τυριών Cheddar και Colby (Johnson & Lucey, 2006)

2.2.2 Αλλαγές στην αναλογία ασβεστίου κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του τυριού

Οι Lucey *et al.* (2003) πρότειναν ότι κατά τη διάρκεια ωρίμανσης του τυριού η πρωτεόλυση και η διαλυτοποίηση μέρους του υπολειμματικού αδιάλυτου κolloειδούς φωσφορικού ασβεστίου είναι υπεύθυνα για την αλλαγή του αρχικού ελαστικού πήγματος στη μαλακή υφή ενός ώριμου τυριού. Οι αλλαγές στο αδιάλυτο ασβέστιο, όπως επίσης και η επερχόμενη πρωτεόλυση, μεταβάλλουν τη λειτουργική συμπεριφορά του τυριού κατά την ωρίμανση (Σχήμα 2.3). Η αλλαγή στις ιδιότητες τήξης και ελαστικότητας νεαρών τυριών και προσρόφηση του ελεύθερου ορού είναι σε συμφωνία με αυτό το πρότυπο.

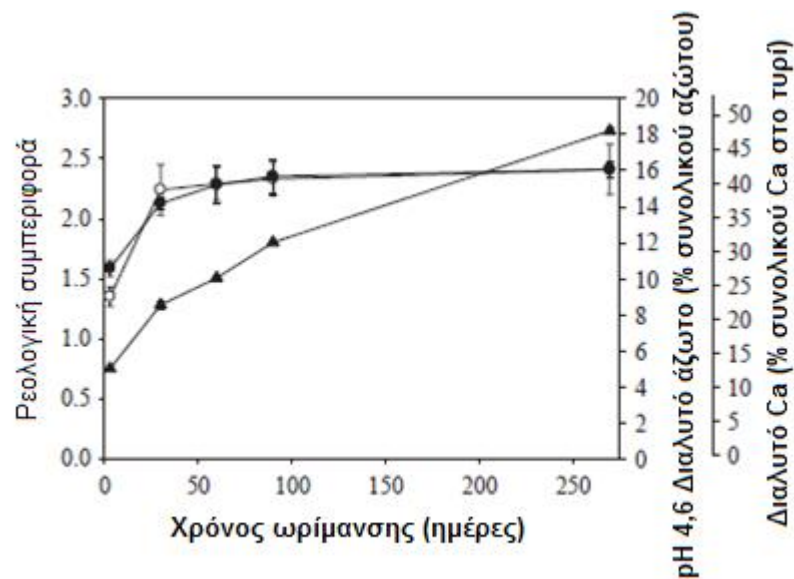


Σχήμα 2.3 Αλλαγές στη συμπεριφορά του τυριού κατά την ωρίμανση οφείλονται σε αλλαγές στο ασβέστιο και στη πρωτεόλυση. Κατά την ωρίμανση μειώνεται το περιεχόμενο αδιάλυτο ασβέστιο ως ποσοστό του συνολικού ασβεστίου και αυξάνει η πρωτεόλυση. Για τυρί όπως η Mozzarella, αυτά τα γεγονότα καταλήγουν σε τρεις ζώνες λειτουργικής συμπεριφοράς: (Α) το νεαρό τυρί είναι σκληρό και δε λιώνει, (Β) αποδεκτή συμπεριφορά (καλή ικανότητα τήξης, ελαστικότητα και τεμαχισμό), (Γ) μη αποδεκτή συμπεριφορά (το τυρί γίνεται πολύ μαλακό και κολλώδες).

Στο σχήμα 2.4 αποδεικνύεται ότι οι αλλαγές στο διαλυτό ασβέστιο σχετίζονται περισσότερο με τις αρχικές αλλαγές στην υφή παρά στη πρωτεόλυση. Σε πρόσφατη έρευνα, η δραστηριότητα της χυμοσίνης στο τυρί Cheddar παρεμποδίστηκε από τον αναστολέα pepstatin (O'Mahony et al. 2005). Η υφή του τυριού συνέχισε να αλλάζει κατά την αρχική περίοδο της ωρίμανσης ακόμα και με περιορισμένη δραστηριότητα πυτιάς. Ως αποτέλεσμα, έχει προταθεί ότι είναι κυρίως η απώλεια του κολλοειδούς φωσφορικού ασβεστίου από τη καζεΐνη που είναι υπεύθυνη για αλλαγές στην υφή που εμφανίζονται σε νεαρά τυριά (O'Mahony et al. 2005).

Υπάρχουν αναφορές που δείχνουν ότι αύξηση στην υγρασία βοηθά στην αύξηση της ικανότητας τήξης. Βέβαια, η αύξηση της υγρασίας έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της αναλογίας καζεΐνη/πρωτεΐνη στο σύμπλεγμα, που πιθανόν βελτιώνει την ικανότητα τήξης. Δεν είναι η περιεχόμενη υγρασία στο τυρί που επηρεάζει την ικανότητα τήξης ενός νεαρού τυριού, για παράδειγμα το τυρί cottage έχει 80% υγρασία και δε λιώνει. Η ικανότητα τήξης εξαρτάται πολύ από το pH και το επίπεδο αδιάλυτου κολλοειδούς φωσφορικού ασβεστίου (Σχήμα 2.4). Όπως προαναφέρθηκε, το ποσοστό των αλλαγών στο σώμα του τυριού και στα φυσικά χαρακτηριστικά επηρεάζεται σημαντικά από την έκταση της οξύτητας στα νεαρά τυριά. Για την παραγωγή πιο μαλακού τυριού με

αυξημένη ικανότητα τήξης, απαιτείται αύξηση του ποσοστού και της έκτασης της διαλυτοποίησης κolloειδούς φωσφορικού ασβεστίου. Αυτό επιτυγχάνεται ή με αύξηση της ανάπτυξης οξύτητας στο τυρόπηγμα ή με αύξηση της οξύτητας κατά τη διαίρεση. Μπορεί όμως να συμβεί ανεπιθύμητη απώλεια αδιάλυτου ασβεστίου. Απώλεια κolloειδούς φωσφορικού ασβεστίου από τις καζεΐνες αυξάνει το ποσοστό πρωτεόλυσης (Fox, 1970) με αποτέλεσμα να επέρχονται αλλαγές στο χαρακτήρα του τυριού και στη δομή που προκαλούν αύξηση στην ικανότητα τήξης (Guinee *et al.*, 2002; Joshi *et al.*, 2003). Υπερβολική πρωτεόλυση καταλήγει σε υπερβολική τήξη και μαλάκωμα του τυριού, απώλεια ελαστικότητας και αυτό επιτείνεται από την απώλεια αδιάλυτου ασβεστίου. Επιπλέον, στην ανάπτυξη ενός τυριού με τις επιθυμητές λειτουργικές ιδιότητες, ο παραγωγός ή ο αγοραστής πρέπει να είναι γνώστης των απαιτήσεων και των λειτουργικών ιδιοτήτων του τυριού αλλά και της πιθανής επίπτωσης πως η απόκτηση αυτών των ιδιοτήτων νωρίς στην ηλικία του τυριού μπορεί να μειώσει τη συνολική διάρκεια ζωής του τυριού στο ράφι λόγω υπερβολικής τήξης και μαλακώματος.



Σχήμα 2.4 Αλλαγές στο διαλυτό ασβέστιο (% του συνολικού ασβεστίου στο τυρί) (●), ικανότητα τήξης και έκτασης (○) και pH 4,6 διαλυτό άζωτο (% του συνολικού αζώτου) (▲) (Lucey *et al.*, 2005)

2.3 Μέθοδοι υπολογισμού των αλλαγών στις ποσότητες διαλυτού και αδιάλυτου ασβεστίου κατά την ωρίμανση του τυριού Cheddar

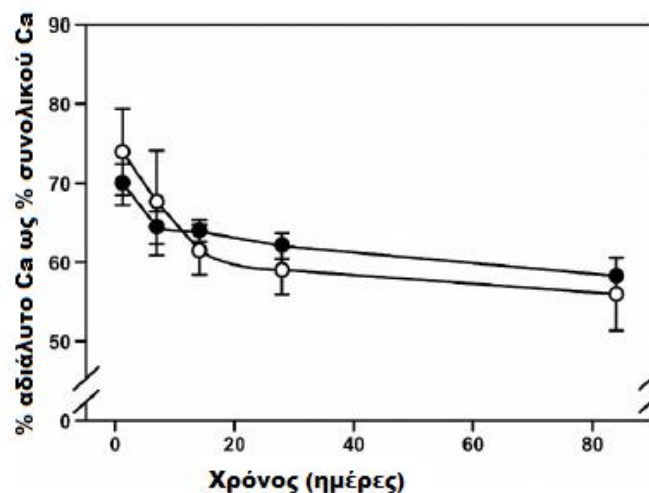
Ο Hassan και οι συνεργάτες του (2004) χρησιμοποίησαν δύο μεθόδους για το καθορισμό των ποσοτήτων διαλυτού και αδιάλυτου ασβεστίου στο τυρί Cheddar κατά τον τέταρτο μήνα της ωρίμανσης του. Η πρώτη μέθοδος βασιζόταν σε καμπύλες ρυθμιστικών διαλυμάτων οξέος-βάσης του τυριού και η δεύτερη βασιζόταν στην εξαγωγή της υδατικής φάσης («χυμός») του τυριού κάτω από υψηλή πίεση και καθορισμό της συγκέντρωσης διαλυτού ασβεστίου στο χυμό χρησιμοποιώντας ατομική απορρόφηση. Οι δύο αυτές μέθοδοι είναι χρήσιμες για τη μελέτη του ρόλου του ασβεστίου στη δομή και λειτουργικότητα του τυριού.

Οι συστάσεις των γαλάτων των τυριών Cheddar ήταν παρόμοιες καθώς επίσης παρόμοια ήταν η υγρασία και οι τιμές pH στα τυριά. Υπήρχε μία μικρή αύξηση στο pH κατά τη 12μηνη περίοδο ωρίμανσης του τυριού, που είναι παρόμοια με ό,τι παρατηρείται κανονικά για το τυρί Cheddar. Η συνολική περιεκτικότητα ασβεστίου στα τυριά ήταν στα όρια που αναμένονται για το τυρί Cheddar (Lucey & Fox, 1993).

Παρατηρήθηκε μείωση στο αδιάλυτο ασβέστιο τις πρώτες 3 εβδομάδες. Αυτό υποδεικνύει ότι κατά τη διάρκεια ωρίμανσης του τυριού, υπήρχε μετατροπή του αδιάλυτου σε διαλυτό ασβέστιο. Το ποσοστό αδιάλυτου ασβεστίου ως ποσοστό του συνολικού ασβεστίου στο τυρί μειωνόταν κατά την ωρίμανση και με τις δύο μεθόδους αξιολόγησης (Σχήμα 2.5). Δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές στο περιεχόμενο αδιάλυτου ασβεστίου στα τυριά μεταξύ των δύο μεθόδων σε καμία περίοδο ωρίμανσης. Και οι δύο μέθοδοι απεικονίζουν ότι οι μεγάλες αλλαγές στην ισορροπία ασβεστίου πραγματοποιήθηκαν κατά τις πρώτες τέσσερις εβδομάδες. Οι ποσότητες του διαλυτού ασβεστίου στο τυρί Cheddar ήταν 24-30% και 42% την πρώτη μέρα και 12^η εβδομάδα, αντίστοιχα και συμφωνούν με τις τιμές που έχουν προηγουμένως αναφερθεί για το τυρί Cheddar. Δεν υπήρχαν προηγούμενες μελέτες για τις αλλαγές στην ισορροπία του ασβεστίου του τυριού Cheddar που σχετίζονται με την ηλικία.

Ένα πλεονέκτημα της μεθόδου τιτλοδότησης είναι η ικανότητα ελέγχου διαφόρων μερών του τυριού (παράδειγμα το εσωτερικό, το οποίο θα ήταν χρήσιμο σε τυρί όπως Camembert όπου υπάρχει κλιμάκωση συγκέντρωσης ασβεστίου μεταξύ επιφάνειας και του εσωτερικού). Η μεγάλη ποσότητα δείγματος που απαιτείται για τη μέθοδο του «χυμού» την καθιστά πιο βραδυκίνητη για αυτό τον τύπο έρευνας. Θεωρήθηκε ότι η μέθοδος τιτλοδότησης μπορεί να δίνει χαμηλότερες τιμές για το

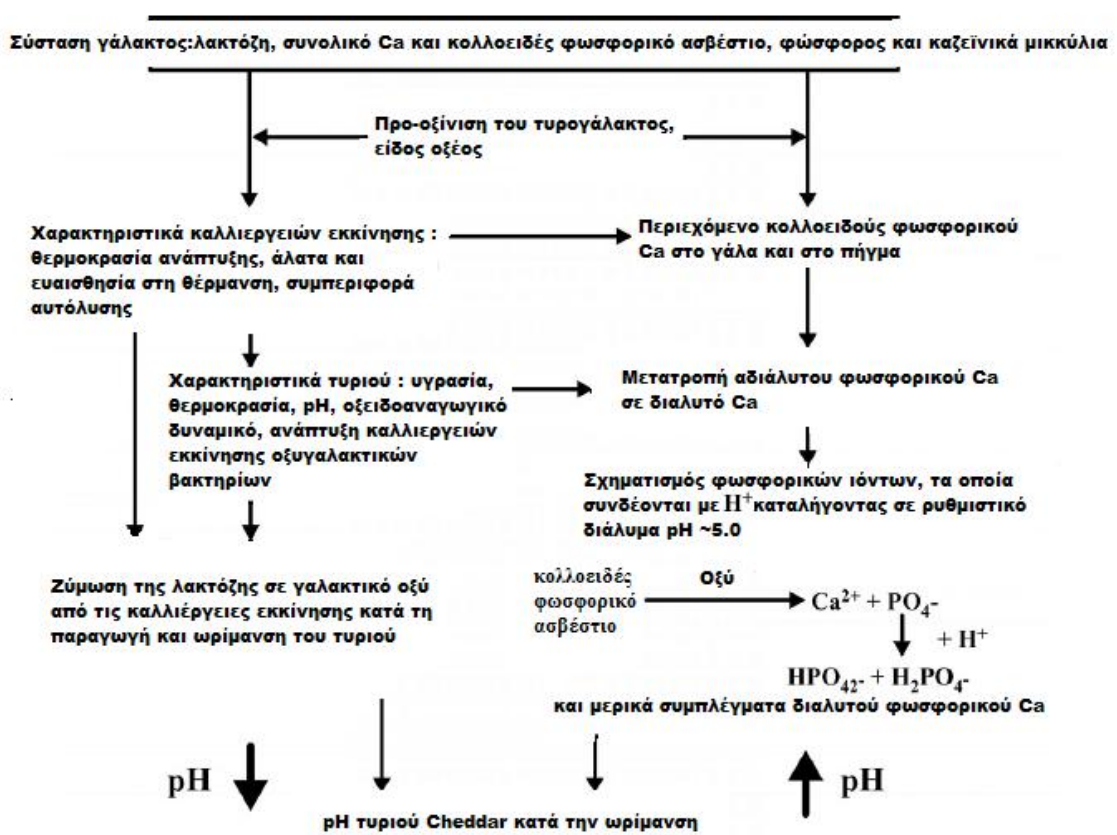
περιεχόμενο αδιάλυτο ασβέστιο λόγω της προετοιμασίας του δείγματος (διαλυτοποίηση του τυριού κατά τη προετοιμασία του ομογενοποιημένου τυριού, το οποίο διαλυτοποιεί και κάποια ποσότητα κολλοειδούς φωσφορικού ασβεστίου). Από την άλλη πλευρά, υπήρχε μια μικρή αύξηση στο pH όταν το τυρί διαλύθηκε σε υπερκάθαρο νερό, που ενισχύει μια λίγο υψηλότερη τιμή αδιάλυτου ασβεστίου, που αποκτήθηκε από τη μέθοδο τιτλοδότησης σε σύγκριση με τη μέθοδο του χυμού. Σε αυτή τη μελέτη, δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεθόδων.



Σχήμα 2.5 Αλλαγές στο % αδιάλυτου ασβεστίου (εκφρασμένο ως % του συνολικού Ca) σε συνάρτηση με το χρόνο ωρίμανσης του τυριού Cheddar καθορισμένο από τη μέθοδο τιτλοδότησης (○) και τη μέθοδο «χυμού» του τυριού (●) (Hassan *et al.*, 2004)

Οι μετρήσεις pH του τυριού δείχνουν ότι υπάρχει μικρή αύξηση στο pH από 5,06 σε 5,14 κατά την ωρίμανση. Αναμένεται ότι οποιαδήποτε αύξηση στο pH ενισχύει το σχηματισμό περισσότερου αδιάλυτου ασβεστίου. Όμως, η μικρή αύξηση του pH δεν ήταν υπεύθυνη για τις αλλαγές που παρατηρήθηκαν στην ισορροπία του αδιάλυτου ασβεστίου στο τυρί σε συνάρτηση με το χρόνο. Η παρατηρούμενη αύξηση στο pH μπορεί να προκλήθηκε από την αργή διαλυτοποίηση του κολλοειδούς φωσφορικού ασβεστίου καθώς μικρή αύξηση του pH του γάλακτος μπορεί να εμφανιστεί όταν το γάλα οξιnistεί σε pH ~5. Ωστόσο, οι αλλαγές στο pH του τυριού που παρατηρούνται κατά τις πρώτες εβδομάδες της ωρίμανσης του τυριού Cheddar μπορεί να οφείλονται σε δύο παράγοντες, (Σχήμα 2.6) βιοχημικές αλλαγές (μεταβολισμός μεγάλης ποσότητας της υπολειμματικής λακτόζης ~10 g/kg τυριού σε γαλακτικό οξύ) και αλλαγές στη χημική ισορροπία (μετατροπή αδιάλυτου σε διαλυτό ασβέστιο).

Η διαλυτοποίηση του κolloειδούς φωσφορικού ασβεστίου ήταν έντονη κατά τις πρώτες τέσσερις εβδομάδες ωρίμανσης με μόνο μικρές διαφορές να εμφανίζονται αργότερα. Εκτιμήθηκε ότι αυτό αντανάκλα την αργή πραγματοποίηση μιας ψευδο-ισορροπίας, καθώς το φωσφορικό ασβέστιο στο γάλα (και το τυρί) δεν είναι στην πραγματική ισορροπία λόγω της παρουσίας παρεμποδιστών, παράδειγμα καζεΐνης και άλλων παραγόντων, όπως υψηλή ιονική ισχύ του πηγματος. Οι ποσότητες του αδιάλυτου ασβεστίου στο τυρί μειώθηκαν από ~73 σε ~58% από την 1^η μέρα μέχρι το 4^ο μήνα.



Σχήμα 2.6 Σχηματική παράσταση της πιθανής σχέσης μεταξύ του μεταβολισμού της λακτόζης, διαλυτοποίησης του κolloειδούς φωσφορικού ασβεστίου και των αλλαγών pH κατά την ωρίμανση του τυριού Cheddar (Hassan *et al.*, 2004)

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο : ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Οι τυροκομήσεις των τυριών που μελετήθηκαν δεν έγιναν στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, αλλά στα πλαίσια άλλων ερευνητικών έργων του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας. Στην παρούσα μελέτη αναλύθηκαν τα δείγματα που προέκυψαν από αυτά τα πειράματα.

3.1 Συγκριτική μελέτη Φέτας και Γραβιέρας

3.1.1 Φέτα

- Γάλα, πρόβειο, παστεριωμένο (68 °C/ 10 min) με λίπος 5,30% ±0,03, πρωτεΐνη 5,27% ±0,08, λακτόζη 4,83% ±0,07.
- Προσθήκη σε θ^α=35-36°C 10 g CaCl₂ ανά 100 kg γάλακτος για την υποβοήθηση της πήξης.
- Προσθήκη καλλιέργειας-εκκίνησης σε θ^α=35-36°C. Χρησιμοποιήθηκε οξυγαλακτική καλλιέργεια τύπου DVI, με σύνθεση: 60% *Lactococcus lactis* + 40% θερμοφιλα στελέχη (*S. thermophilus*:*Lb. bulagricus*, 3:1). Η συνιστώμενη από τον παρασκευαστή δόση καλλιέργειας διαλυόταν στο παστεριωμένο γάλα της τυροκόμησης.
- Η πήξη γινόταν ~15 min μετά την προσθήκη της καλλιέργειας σε pH 6,31±0.10 και θ^α=38°C. Χρησιμοποιήθηκε μοσχαρίσια πυτιά με περιεκτικότητα σε χυμοσίνη 90% (Naturen, Chr. Hansen's) σε αναλογία ~3000 IMCU σε 100 kg γάλα.
- Ο μέσος χρόνος πήξης ήταν 9,0±1,7 min.
- Η διαίρεση σε κύβους 2×2×2 cm γινόταν σε 36,7±5,7 min, μετά την προσθήκη πυτιάς

Το διαιρεμένο τυρόπηγμα παρέμενε σε ακινησία ~15 min, πριν μεταφερθεί στα καλούπια, όπου παρέμενε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος με επιφανειακή προσθήκη ξηρού αλατιού μέχρι το πρωί της επόμενης ημέρας. Την επόμενη ημέρα γινόταν προσωρινή συσκευασία των κομματιών του φρέσκου τυριού και το αλάτισμα συνεχιζόταν μέχρι περίπου την 15^η ημέρα σε θάλαμο θερμοκρασίας ~18-20 °C (1^η φάση ωρίμανσης). Στο σημείο αυτό τα κομμάτια του τυριού, διαιρούνταν σε

παραλληλόγραμμα έτσι ώστε να συσκευαστούν σε πλαστικούς περιέκτες των 400 g με άλμη (οριστική συσκευασία) και μεταφέρονταν στους 4 °C για να ολοκληρώσουν την ωρίμανσή τους μέχρι τις 60 ημέρες (2^η φάση ωρίμανσης).

Δείγματα λαμβάνονταν στις 15, 60, 120 και 300 ημέρες μετά την παρασκευή τους, με σκοπό τη μελέτη των αλλαγών κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης. Κάθε περιέκτης αποτελούσε ένα δείγμα. Τα δείγματα συντηρούνταν στους -25 °C για περαιτέρω αναλύσεις. Στον Πίνακα 3.1 φαίνεται το ποσοστό υγρασίας της Φέτας στις 15, 60 και 120 ημέρες ωρίμανσης.

Πίνακας 3.1 Ποσοστό υγρασίας (%) Φέτας 15, 60 και 120 ημέρες ωρίμανσης

Φέτα	Χρόνος ωρίμανσης (ημέρες)	Υγρασία (%)
	15	50,89
	60	56,11
	120	52,27

3.1.2 Γραβιέρα Κρήτης

- Γάλα: πρόβειο και μικρό ποσοστό αίγειου (~30 kg αίγειο στα 5000 kg τυροκομούμενου γάλακτος), τυποποίηση του λίπους στο 6,5%.
- Θερμική επεξεργασία γάλακτος: 70,5°C / 1,6 s.
- Θερμοκρασία γάλακτος στον τυρολέβητα: 34°C
- Χωρίς προσθήκη CaCl₂
- Καλλιέργεια: DALTON Biotecnologie (STARTER GRAVIERA STRAIN 186, Adams αντιπροσωπείες / Αθήνα): μίγμα *Str. thermophilus*, *Lb. bulgaricus*, και *Lb. helveticus*)
- Πυτιά: 40 g σκόνη σε 1850 kg γάλα (φυσική πυτιά με 95% χυμοσίνη, Danaes/K.Toumpa)
- Χρόνος μεταξύ προσθήκης καλλιέργειας και πυτιάς: 20 min.
- Διαίρεση: 30 min μετά την προσθήκη πυτιάς σε δύο φάσεις.
 - 1η διαίρεση σε μέγεθος κύβων Φέτας, 30 min μετά την προσθήκη πυτιάς.
 - Παραμονή σε ηρεμία για 15 min.
 - Αφαίρεση ~9% του τυρογάλακτος και αντικατάστασή του με H₂O.
 - Ήπια ανάδευση.

- 2η διαίρεση σε μέγεθος κόκκων καλαμποκιού (διάρκεια διαίρεσης 5-7 min).
 - Ήπια ανάδευση για 15 min.
- Έναρξη αναθέρμανσης ~60 min μετά την πήξη.
- Συνθήκες αναθέρμανσης: σε 30 min, η θερμοκρασία φθάνει στους 47°C και κατόπιν παραμονή του διαιρεμένου πήγματος σε ακινησία 15-20 min μέχρι pH ~6,3.
- Πλήρωση καλουπιών για μικρά τεμάχια τυριού (κεφάλια~1 kg τυρί), χωρίς τυρόπανα.
- Πίεση καλουπιών με το τυρόπηγμα με το βάρος τους σε στήλες των 6 καλουπιών για 15 min και στη συνέχεια αναστροφή και πίεση για 15 min επιπλέον.
- Αλάτισμα: Τοποθέτηση των μικρών κεφαλιών σε άλμη 18 Be την επόμενη ημέρα, και παραμονή για ~48 ώρες.
- Μετά την έξοδο από την άλμη, παραμονή των κεφαλιών του τυριού ~ 24 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για να στεγνώσουν.
- Την 5^η ή 6^η ημέρα μετά την τυροκόμηση τοποθέτηση των τυριών στον προθάλαμο ωρίμανσης 13°C.
- Τη 14η ημέρα μετά την τυροκόμηση, μεταφορά τους σε ωριμαντήριο 17°C.
- Την 60^η ημέρα μετά την τυροκόμηση, μεταφορά τους σε ωριμαντήριο 9°C.
- Την 90^η ημέρα μετά την τυροκόμηση μεταφορά των τυριών σε ψυγείο για αποθήκευση.

Ολόκληρα κεφάλια τυριού, βάρους ~1,3 kg (1 παραδοσιακό + 1 με επικάλυψη) σε διάφορα στάδια της ωρίμανσης/σημεία δειγματοληψίας αποτελούσαν τα δείγματα. Τα σημεία δειγματοληψίας ήταν: 8 ημέρες, 2 μήνες (πριν από τη μεταφορά των τυριών σε ωριμαντήριο 9°C), 3 μήνες (αμέσως πριν τη μεταφορά τους στο ψυγείο) και 7 και 12 μήνες κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Στον Πίνακα 3.2 παρουσιάζονται τα ποσοστά υγρασίας, NaCl και pH της Γραβιέρας Κρήτης στις 7, 60, 90 και 210 ημέρες ωρίμανσης.

Πίνακας 3.2 Ποσοστό υγρασίας (%), NaCl (%) και pH Γραβιέρας Κρήτης στις 7, 60, 90 και 210 ημέρες ωρίμανσης

Χρόνος ωρίμανσης (ημέρες)	Υγρασία (%)	NaCl (%)	pH
7	37,89	1,47	5,67
60	33,99	1,87	5,48
90	33,04	1,78	5,61
210	27,68	2,08	5,54

3.2 Μελέτη της επίδρασης υπερυψηλής πίεσης (ΥΥΠ) σε τυριά τύπου Φέτα

3.2.1 Τυροκομήσεις

Χρησιμοποιώντας την ίδια παρτίδα γάλακτος τυροκόμησης προέκυπταν πειραματικά τυριά, τα οποία σημάνθηκαν ως εξής:

- **A:** Φέτα, μάρτυρας
- **A200:** Φέτα που επεξεργάστηκε με ΥΥΠ 200 MPa/ 20 °C/ 15 min, αμέσως μετά την ολοκλήρωση του αλατίσματος, περίπου την 15^η ημέρα.
- **A500:** Φέτα που επεξεργάστηκε με ΥΥΠ 500 MPa/ 20 °C/ 15 min, αμέσως μετά την ολοκλήρωση του αλατίσματος, περίπου την 15^η ημέρα.

Οι συνθήκες τυροκόμησης ήταν:

- Γάλα, πρόβειο, παστεριωμένο (68 °C/ 10 min) με λίπος 6,51% ±0,53, πρωτεΐνη 5,23% ±0,44, λακτόζη 4,86% ±0,17, Σ.Υ. 17,54% ±0,99 και pH 6,47 ±0,0.
- Προσθήκη σε T=35-36°C 10 g CaCl₂ ανά 100 kg γάλακτος για την υποβοήθηση της πήξης.
- Προσθήκη καλλιέργειας-εκκίνησης σε T=35-36°C. Χρησιμοποιήθηκε οξυγαλακτική καλλιέργεια τύπου DVI, με σύνθεση: 60% *Lactococcus lactis* + 40% θερμοφιλά στελέχη (*S. thermophilus*:*Lb. bulagricus*, 3:1). Η συνιστώμενη από τον παρασκευαστή δόση καλλιέργειας διαλυόταν στο παστεριωμένο γάλα της τυροκόμησης. Το 1/4 της διάλυσης αυτής επεξεργαζόταν με ΥΥΠ (200 MPa/ 20 °C/ 15 min).
- Η πήξη γινόταν ~15 min μετά την προσθήκη της καλλιέργειας σε pH 6,40±0.09 και T=35-36°C. Χρησιμοποιήθηκε μοσχαρίσια πυτιά με περιεκτικότητα σε χυμοσίνη 90% (Naturen, Chr. Hansen's) σε αναλογία ~3000 IMCU σε 100 kg γάλα.
- Ο μέσος χρόνος πήξης ήταν 11,3±1,5 min.
- Η διαίρεση σε κύβους 2×2×2 cm γινόταν σε 48,3±4,5 min, μετά την προσθήκη πυτιάς.

Το διαιρεμένο τυρόπηγμα παρέμενε σε ακινησία ~15 min, πριν μεταφερθεί στα καλούπια, όπου παρέμενε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος με επιφανειακή προσθήκη ξηρού αλατιού μέχρι το πρωί της επόμενης ημέρας. Την επόμενη ημέρα γινόταν προσωρινή συσκευασία των κομματιών του φρέσκου τυριού και το αλάτισμα συνεχιζόταν μέχρι περίπου την 15^η ημέρα σε θάλαμο θερμοκρασίας ~18-20 °C (1^η φάση

ωρίμανσης). Στο σημείο αυτό τα κομμάτια του τυριού, διαιρούνταν σε παραλληλόγραμμα 3.5×3.5×8.5 cm. Τα παραλληλόγραμμα κομμάτια (το 1/3 των συνολικών) της Φέτας μάρτυρα (Α) και της Φέτας που έγινε με ΥΥΠ-καλλιέργεια συσκευάστηκαν ανά 4 κομμάτια σε πλαστικούς περιέκτες με άλμη (οριστική συσκευασία) και μεταφέρθηκαν στους 4 °C για να ολοκληρώσουν την ωρίμανσή τους (2^η φάση ωρίμανσης). Τα υπόλοιπα 2/3 των παραλληλόγραμμων κομματιών Φέτας Α επεξεργάστηκαν με ΥΥΠ στις συνθήκες που περιγράφονται παραπάνω, αφού πρώτα συσκευάστηκε το καθένα υπό κενό. Μετά το τέλος της επεξεργασίας συσκευάστηκαν οριστικά ανά τέσσερα με άλμη σε πλαστικούς περιέκτες των 400 g, σημάνθηκαν ως Α200 και Α500 και μεταφέρθηκαν στους 4 °C για να ολοκληρώσουν την ωρίμανσή τους, όπως έγινε με το τυρί Α.

Δείγματα λαμβάνονταν από τις τρεις κατηγορίες τυριών (Α, Α200, Α500) στις 15, 60 και 200 ημέρες μετά την παρασκευή τους, με σκοπό τη μελέτη των αλλαγών κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης. Κάθε περιέκτης αποτελούσε ένα δείγμα. Τα δείγματα συντηρούνταν στους -25 °C για περαιτέρω αναλύσεις. Στον Πίνακα 3.3 παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά της Φέτας και του τυριού τύπου Φέτας επεξεργασμένου με ΥΥΠ.

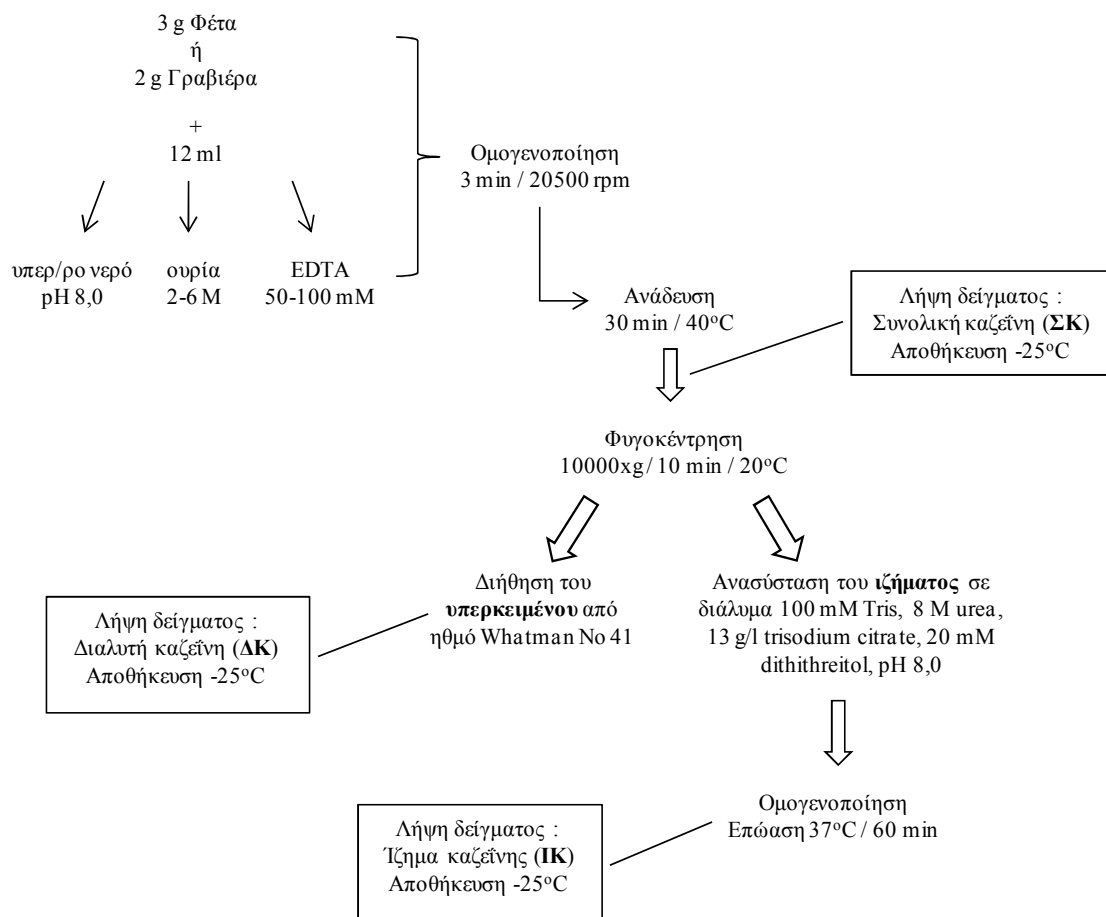
Πίνακας 3.3 Ποσοστό υγρασίας (%) και NaCl (%) Φέτας Μάρτυρα, Φέτας με ΥΥΠ 200 και Φέτας με ΥΥΠ 500, στις 15 και 60 ημέρες ωρίμανσης.

Χρόνος ωρίμανσης (ημέρες)	Υγρασία (%)	NaCl (%)
15 ημερών Μάρτυρας	52,84	3,285
60 ημερών Μάρτυρα	54,13	2,69
15 ημερών με ΥΥΠ 200	51,24	2,552
60 ημερών με ΥΥΠ 200	52,71	3,134
15 ημερών με ΥΥΠ 500	51,02	3,779
60 ημερών με ΥΥΠ 500	49,60	2,824

3.3 Προετοιμασία δείγματος

3.3.1 Διαχωρισμός της διαλυτής καζεΐνης από τη παρακαζεϊνική μήτρα των τυριών

Η διαδικασία διαχωρισμού της διαλυτής καζεΐνης από τη παρακαζεϊνική μήτρα των τυριών περιγράφεται στο σχήμα 3.1.



Εικόνα 3.1 Διαχωρισμός της διαλυτής καζεΐνης από τη παρακαζεϊνική μήτρα των τυριών

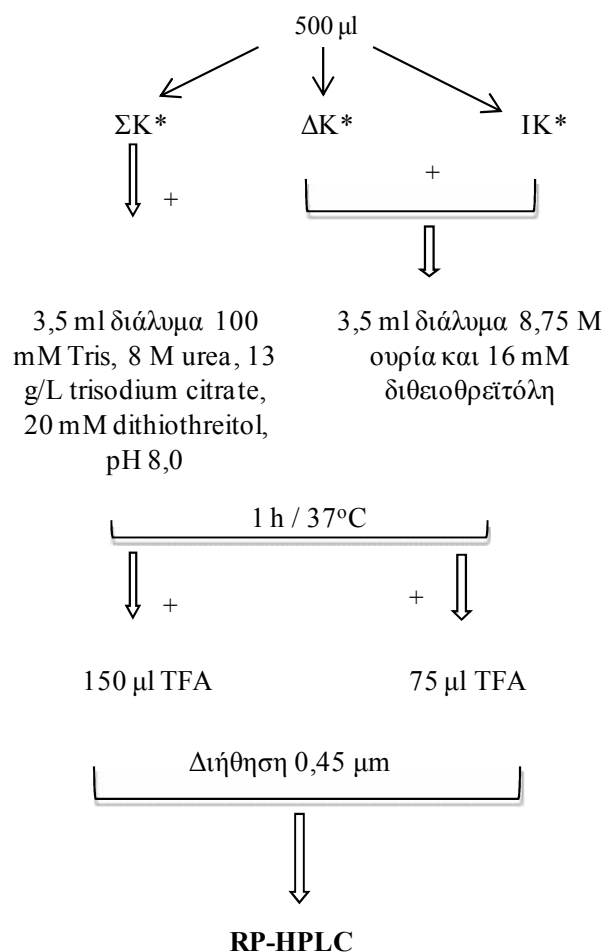
Μετά από απόψυξη σε θερμοκρασία δωματίου, 3 g τριμμένης Φέτας ή 2 g τριμμένης Γραβιέρας Κρήτης διαλύονταν με 12 ml υπερκάθαρου νερού ή με διαλύματα ουρίας (Merck, Nogent sur Marne, France) 2 - 6 M ή EDTA (Fluka, United States) 50 μέχρι 150 mM pH 8,0. Το pH ρυθμιζόταν με προσθήκη διαλύματος NaOH 0,1 N για τα διαλύματα ουρίας και 5 N για τα διαλύματα EDTA. Τα δείγματα αναμιγνύονταν με ομογενοποιητή ultra turrax (Janke & Henkel, Bioblock, Illkirch, France) για 3 min σε 20500 rpm και κατόπιν αναδεύονταν για 30 min στους 40°C. Αντιπροσωπευτικό δείγμα λαμβανόταν από κάθε περίπτωση για μέτρηση της συνολικής καζεΐνης (**ΣΚ**) στα μέσα διασποράς ενώ αναδευόταν συνεχώς. Τα δείγματα υπέστησαν φυγοκέντρηση 10000xg για 10 min στους 20°C για να διαχωριστεί το υπερκείμενο από το ίζημα που περιείχε τη μη διαλυτοποιημένη-παρακαζεϊνική μήτρα. Το υπερκείμενο διηθήθηκε μέσω ηθμού Whatman No 41 και λήφθηκε το δείγμα διαλυτής καζεΐνης (**ΔΚ**) ενώ το ίζημα επαναιωρήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα (100 mM Tris, 8 M Urea, 13 g/l trisodium

citrate και 20 mM dithiothreitol ρυθμισμένο σε pH 8,0 με HCl 2 N) στον ίδιο όγκο όπως το δείγμα πριν από τη φυγοκέντρωση. Τα ιζήματα με το ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποιούνταν πολύ καλά για 2 min με vortex και 2 min με ultra turrax, επωάζονταν στους 37°C για 60 min και λαμβανόταν το δείγμα του ιζήματος καζεΐνης (**IK**). Τα προετοιμασμένα δείγματα αποθηκεύονταν στους -25°C μέχρι περαιτέρω ανάλυση.

3.3.2 Χρωματογραφική ανάλυση των καζεϊνών

Η χρωματογραφική ανάλυση των καζεϊνών πραγματοποιήθηκε με την HPLC ανεστραμμένης φάσης (RP-HPLC: Reversed Phase - High Performance Liquid Chromatography), όπως περιγράφεται από τους Moatsou *et al.* (2008). Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε η στήλη Vydac C4 214 TP 5415 (Separation group, Hesperia, CA 92345, USA). Το σύστημα περιελάμβανε μία αντλία ικανή να αναμιγνύει τέσσερις διαλύτες (Waters 600E, Waters, 34 Marple Street, Milford, MA, 01757, USA), έναν ανιχνευτή (Waters 996, photodiode array detector), απαερωτή ηλίου και ένα σύστημα αυτόματου δειγματολήπτη (Waters 717). Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν με το λογισμικό Millennium v. 3.05.01. (1998, Waters). Ο διαλύτης A περιείχε υπερκάθαρο νερό με 0,1% trifluoroacetic acid (TFA, Serva Electrophoresis GmbH, D-69115, Heidelberg, Carl-Benz Str. 7, Germany) και ο διαλύτης B αποτελούταν από 80% ακετονιτρίλιο (Lichrosolv grade, Merck KGaA, Darmstadt Germany), 20% υπερκάθαρο νερό και 0,1% TFA. Τα διαλύματα φιλτράρονταν με 0,45 μm φίλτρα (Millipore Corporation, Bedford MA 01730, USA).

Οι συνθήκες έκλυσης ήταν: θερμοκρασία περιβάλλοντος, ταχύτητα ροής 1 ml/min και βαθμιδωτή έκλυση ως εξής : ξεκινώντας από 65% διαλύτη A και 35% διαλύτη B, σταδιακά μειώνεται ο A και αυξάνεται ο B μέχρι τα 55 λεπτά που επικρατεί 100% ο B, τελικά αυξάνεται ξανά ο A μέχρι 65% και ο B μέχρι 35% και ακολουθεί η ίδια διαδικασία με το επόμενο δείγμα. Η απορρόφηση του εκλούσματος μετρήθηκε σε μήκος κύματος 214 nm.



Εικόνα 3.2 Προετοιμασία δειγμάτων για χρωματογραφική ανάλυση

(* όπως περιγράφονται στην Εικόνα 3.1).

Προετοιμασία δειγμάτων τυριού για HPLC (Εικόνα 3.2) : 500µl από δείγμα συνολικής καζεΐνης (ΣΚ στην Εικόνα 3.2) αναμιγνύονταν με 3,5 ml ρυθμιστικό διάλυμα με pH 8 (100 mM Tris, 8 M Urea, 13g/l trisodium citrate και 20 mM dithiothreitol ρυθμισμένο σε pH 8,0 με HCl 2N) ενώ 500µl δείγματος διαλυτής καζεΐνης και ιζήματος καζεΐνης (ΔΚ και ΙΚ αντίστοιχα στην Εικόνα 3.2) αναμιγνύονταν με 3,5 ml διάλυμα 8,75 M ουρία με 16 mM διθειοθρεϊτόλη. Ακολουθούσε επώαση στους 37°C για 1 h σε υδατόλουτρο και στη συνέχεια γινόταν προσθήκη 150 µl TFA στα δείγματα με τη συνολική καζεΐνη και 75 µl TFA στα δείγματα με τη διαλυτή και το ίζημα καζεΐνης για να επιτευχθεί pH<3,0. Τα δείγματα, αφού παρέμεναν σε ακινησία για 15 min, διηθούνταν από φίλτρο 0,45 µm και 70µl από το καθένα αναλύονταν με RP-HPLC.

3.4 Προσδιορισμός της τέφρας των τυριών

Ο προσδιορισμός έγινε με αποτέφρωση δειγμάτων τυριού. Κατάλληλα προετοιμασμένες (στεγνές, ξηρές από κλίβανο ξήρανσης και ψυγμένες σε ξηραντήριο) κάψες πορσελάνης ζυγίζονταν κενές με ακρίβεια 0,1 mg (απόβαρο = βάρος 1). Στη συνέχεια ζυγίζονταν μέσα στη κάθε κάψα με ακρίβεια mg ~3,0 g του τυριού. Λαμβανόταν με ακρίβεια mg το απόβαρο της κάψας και του περιεχομένου της (μικτό βάρος = βάρος 2) και οι κάψες τοποθετούνταν στον κλίβανο ξήρανσης στους 105°C για μία ημέρα. Το δείγμα τυριού αποξηραινόταν και απανθρακωνόταν πάνω από λύχνο Bunsen. (Η ανάφλεξη γινόταν προσεκτικά για αποφυγή απώλειας δείγματος και η λυχνία απομακρυνόταν καθώς το λίπος καιγόταν). Όταν η φλόγα έσβηνε, ολοκληρωνόταν η τεφροποίηση στο φούρνο αποτέφρωσης στους 550°C για 5,5 ώρες μέχρι να απομείνει άσπρη τέφρα. Μετά την αποτέφρωση, οι κάψες ψύχονταν στο ξηραντήριο μέχρι να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούσε ζύγιση της κάψας και του περιεχομένου της σε ζυγό ακριβείας (μικτό βάρος = βάρος 3). Για το κάθε δείγμα τυριού οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν (Παράρτημα, σελ. XXXVI).

3.5 Προσδιορισμός των στοιχείων ασβεστίου, μαγνησίου, καλίου και νατρίου

Για τους σχετικούς υπολογισμούς ελήφθησαν υπόψη η περιεκτικότητα του κάθε δείγματος τυριού σε τέφρα καθώς και οι αραιώσεις που ακολούθησαν (Παράρτημα σελίδες XXXVI και XXXVII). Ειδικά για τους προσδιορισμούς στα υπερκείμενα ελήφθη υπόψη και η αραιώση που εφαρμόστηκε κατά τις διάφορες κατεργασίες (Εικόνα 3.1).

3.5.1 Προσδιορισμός ασβεστίου, μαγνησίου, καλίου και νατρίου στην τέφρα των τυριών

Ο προσδιορισμός έγινε με φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης με τη τεχνική ατμοποίησης με φλόγα μίγματος C₂H₂ / αέρα (Shimadzu AA-6800 Atomic absorption spectrophotometer εφοδιασμένο με αυτόματο δειγματολήπτη Shimadzu ASC-6100 και το λογισμικό WizAArd v. 2.30). Η απορρόφηση των Ca, Mg, K και Na μετρήθηκε στα ακόλουθα μήκη κύματος: Ca: 422,7 nm, Mg: 285,2 nm, K: 766,5 nm

και Na: 589nm. Οι αραιώσεις για τον προσδιορισμό και των τεσσάρων στοιχείων ξεκινούσαν από ένα μητρικό διάλυμα τέφρας που παρασκευαζόταν ως εξής: ζυγίζονταν με ακρίβεια 40 mg από την τέφρα του κάθε τυριού, τα οποία αφού διαλύονταν με 1 ml νιτρικού οξέος 25% (v/v) μεταφέρονταν με προσοχή σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml και συμπληρωνόταν ο όγκος με ακρίβεια με δισαπεσταγμένο νερό.

Ο προσδιορισμός του ασβεστίου έγινε σε διάλυμα το οποίο περιείχε 5,10 ή 3,5 ml μητρικού διαλύματος A (για τη Φέτα και τη Γραβιέρα Κρήτης αντίστοιχα) και 10 ml οξειδίου του λανθανίου 1% (w/v) αραιωμένα με ακρίβεια στα 100 ml με δισαπεσταγμένο νερό, με τη βοήθεια αντίστοιχης καμπύλης αναφοράς (από 1-5 ppm Ca). Το διάλυμα λανθανίου εξουδετερώνει τις παρεμβολές από ιόντα άλλων στοιχείων.

Ο προσδιορισμός του μαγνησίου και του καλίου έγινε σε διάλυμα το οποίο περιείχε 10,5 ή 5 ml μητρικού διαλύματος A (για τη Φέτα και τη Γραβιέρα Κρήτης αντίστοιχα) και 10 ml οξειδίου του λανθανίου 1% αραιωμένα με ακρίβεια στα 100 ml με δισαπεσταγμένο νερό, με τη βοήθεια αντίστοιχων καμπυλών αναφοράς (από 0,1-0,5 ppm Mg και 0,2-1 ppm K).

Ο προσδιορισμός του νατρίου έγινε σε διάλυμα το οποίο περιείχε 0,3 ml μητρικού διαλύματος A και 10 ml οξειδίου του λανθανίου 1% αραιωμένα με ακρίβεια στα 100 ml με δισαπεσταγμένο νερό, με τη βοήθεια αντίστοιχων καμπυλών αναφοράς (από 0,2-1 ppm Na).

3.5.2 Προσδιορισμός ασβεστίου, μαγνησίου, καλίου και νατρίου στα υπερκείμενα

Αρχικά, λαμβάνονταν 500 μl από το κάθε υπερκείμενο με νερό, ουρία ή EDTA των διάφορων δειγμάτων και αναμιγνύονταν με 500 μl TCA 25%. Τα δείγματα ψύχονταν για 2 ώρες και φυγοκεντρούνταν σε 12500xg για 5 min. Λαμβάνονταν 600 μl από το διήθημα, διαλύονταν σε 1 ml νιτρικό οξύ 25% και μεταφέρονταν σε ογκομετρική φιάλη των 10 ml όπου συμπληρωνόταν με ακρίβεια με δισαπεσταγμένο νερό. Αυτό αποτελούσε το μητρικό διάλυμα A από το οποίο προέκυπταν οι αραιώσεις για το προσδιορισμό όλων των στοιχείων.

Ο προσδιορισμός ασβεστίου, μαγνησίου και καλίου έγινε σε διάλυμα το οποίο περιείχε 9 ml μητρικού διαλύματος A και 10 ml οξειδίου του λανθανίου 1% (w/v) αραιωμένα με ακρίβεια στα 100 ml με δισαπεσταγμένο νερό, με τη βοήθεια αντίστοιχης καμπύλης αναφοράς του κάθε στοιχείου.

Ο προσδιορισμός του νατρίου έγινε σε διάλυμα το οποίο περιείχε 0,6, 0,3, 0,2 ή 0,1 ml μητρικού διαλύματος Α (ανάλογα το είδος τυριού, την ωρίμανση και το διάλυμα που προστίθεται) και 10 ml οξειδίου του λανθανίου 1% αραιωμένα με ακρίβεια στα 100 ml με δισαπεσταγμένο νερό, με τη βοήθεια αντίστοιχων καμπυλών αναφοράς.

Πίνακας 4. Κωδικοποίηση των εκχυλισμάτων που μελετήθηκαν

ΣΚ-N : Συνολική καζεΐνη -Νερό	Φ15 : Φέτα 15 ημερών
ΣΚ-U2 : Συνολική καζεΐνη – Ουρία 2 M	Φ60 : Φέτα 60 ημερών
ΣΚ-U4 : Συνολική καζεΐνη – Ουρία 4 M	Φ120 : Φέτα 120 ημερών
ΣΚ-U6 : Συνολική καζεΐνη – Ουρία 6 M	Φ300 : Φέτα 300 ημερών
ΣΚ-E50 : Συνολική καζεΐνη –EDTA 50 mM	Γ7 : Γραβιέρα Κρήτης 7 ημερών
ΣΚ-E100 : Συνολική καζεΐνη –EDTA 100 mM	Γ60 : Γραβιέρα Κρήτης 60 ημερών
ΣΚ-E150 : Συνολική καζεΐνη –EDTA 150 mM	Γ90 : Γραβιέρα Κρήτης 90 ημερών
ΔΚ-N : Διαλυτή καζεΐνη -Νερό	Γ210 : Γραβιέρα Κρήτης 210 ημερών
ΔΚ-U2 : Διαλυτή καζεΐνη – Ουρία 2 M	Φ15M : Φέτα 15 ημερών Μάρτυρας (πριν ΥΥΠ)
ΔΚ-U4 : Διαλυτή καζεΐνη – Ουρία 4 M	Φ60M : Φέτα 60 ημερών Μάρτυρας (πριν ΥΥΠ)
ΔΚ-U6 : Διαλυτή καζεΐνη – Ουρία 6 M	Φ200M : Φέτα 200 ημερών Μάρτυρας (πριν ΥΥΠ)
ΔΚ-E50 : Διαλυτή καζεΐνη –EDTA 50 mM	Φ15/200 : Φέτα 15 ημερών με ΥΥΠ 200 MPa
ΔΚ-E100 : Διαλυτή καζεΐνη –EDTA 100 mM	Φ60/200 : Φέτα 60 ημερών με ΥΥΠ 200 MPa
ΔΚ-E150 : Διαλυτή καζεΐνη –EDTA 150 mM	Φ200/200 : Φέτα 200 ημερών με ΥΥΠ 200 MPa
ΙΚ-N : Ίζημα καζεΐνης -Νερό	Φ15/500 : Φέτα 15 ημερών με ΥΥΠ 500 MPa
ΙΚ-U2 : Ίζημα καζεΐνης – Ουρία 2 M	Φ60/500 : Φέτα 60 ημερών με ΥΥΠ 500 MPa
ΙΚ-U4 : Ίζημα καζεΐνης – Ουρία 4 M	Φ200/500 : Φέτα 200 ημερών με ΥΥΠ 500 MPa
ΙΚ-U6 : Ίζημα καζεΐνης – Ουρία 6 M	
ΙΚ-E50 : Ίζημα καζεΐνης –EDTA 50 mM	
ΙΚ-E100 : Ίζημα καζεΐνης –EDTA 100 mM	
ΙΚ-E150 : Ίζημα καζεΐνης –EDTA 150 mM	

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

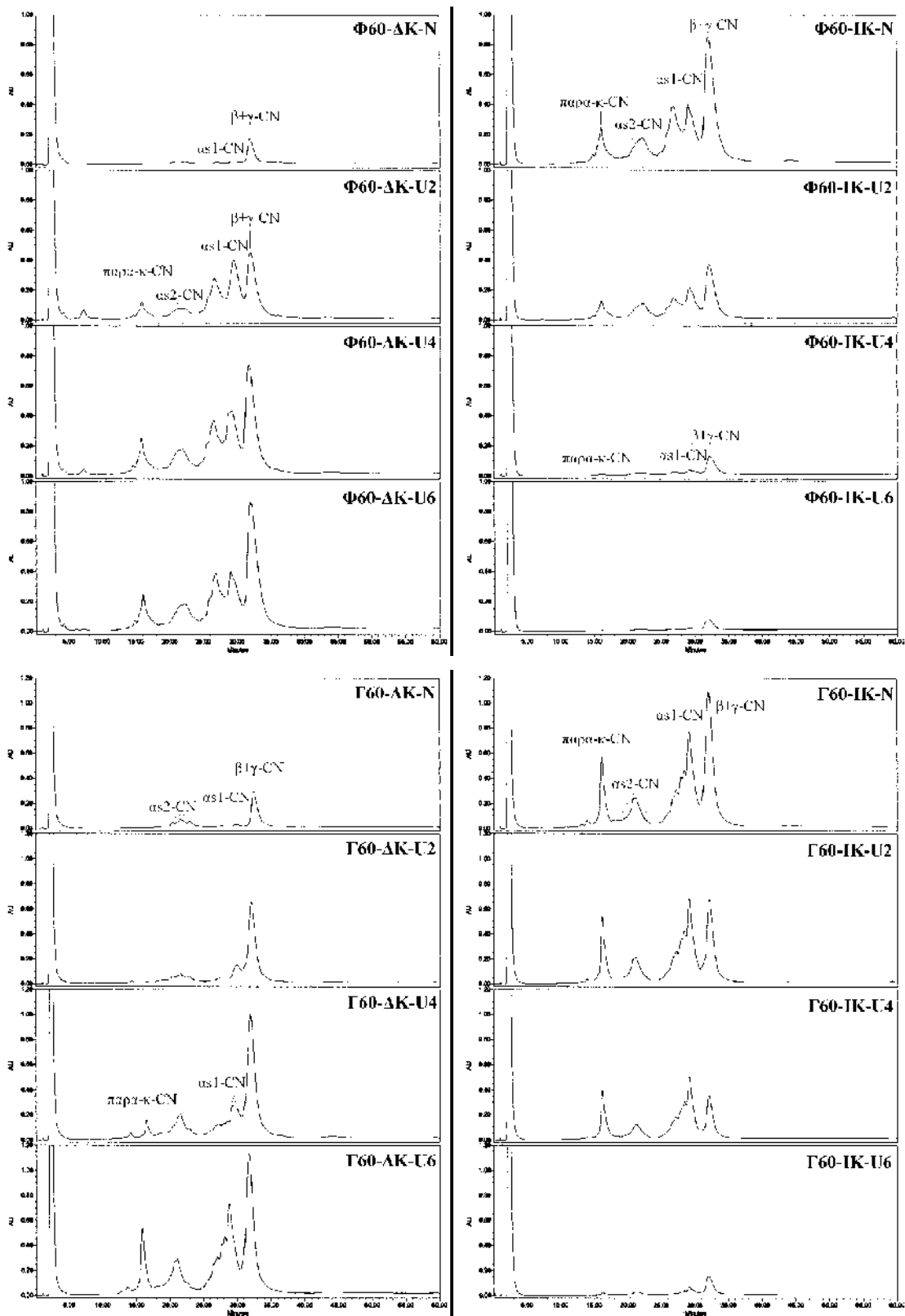
4.1. Σύγκριση Φέτας και Γραβιέρας

4.1.1. Καζεϊνικά κλάσματα

Για λόγους διευκόλυνσης της συζήτησης στο τμήμα αυτό παρουσιάζεται μόνο ένα μέρος των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας, ενώ η λεπτομερής παρουσίαση τους υπάρχει στο Παράρτημα.

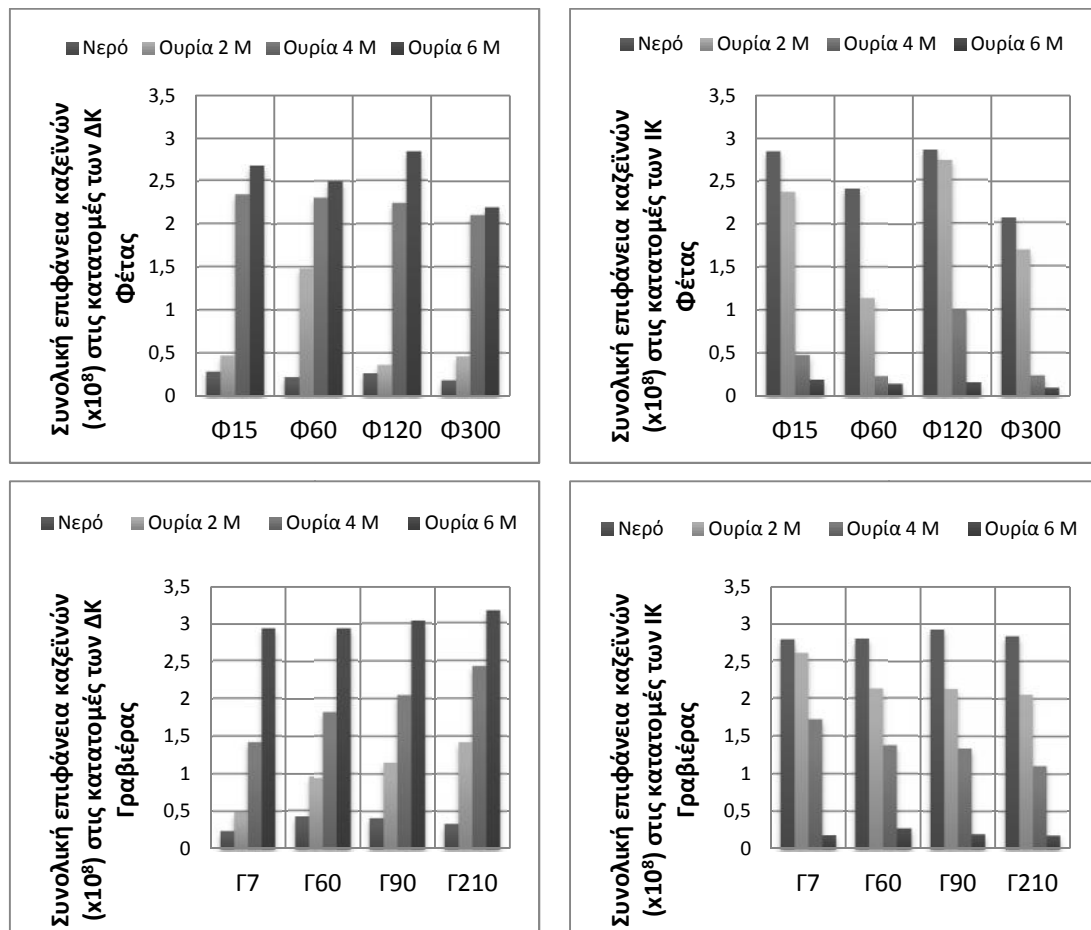
Τα τυριά Φέτα και Γραβιέρα ανήκουν σε δυο εντελώς διαφορετικές κατηγορίες, όχι μόνο σε ότι αφορά τη γενική τους σύσταση, αλλά και ως προς τα υπόλοιπα φυσικοχημικά και ρεολογικά χαρακτηριστικά τους. Το pH της Φέτας είναι 4,6, ενώ αντίθετα το pH της Γραβιέρας είναι ~5,6, η περιεκτικότητα σε αλάτι διαφέρει επίσης σημαντικά 2,9% και 1,8% αντίστοιχα (Πίνακες 3.2 και 3.3). Τα χαρακτηριστικά αυτά είναι αποτέλεσμα της διαφορετικής τεχνολογίας που ακολουθείται σε κάθε περίπτωση (Κεφάλαιο 3.1). Για παράδειγμα η έντονη οξίνιση του τυροπήγματος της Φέτας είναι αποτέλεσμα του τρόπου διαίρεσης και της απουσίας αναθέρμανσης καθώς έτσι ευνοείται η συγκράτηση μεγάλου ποσοστού υγρασίας άρα και λακτόζης που είναι διαθέσιμη ως υπόστρωμα για τη δράση των οξυγαλακτικών μικροοργανισμών. Όπως έχει διεξοδικά αναφερθεί στην βιβλιογραφική ανασκόπηση (Κεφάλαιο 2^ο) οι συνθήκες αυτές διαμορφώνουν τα ρεολογικά χαρακτηριστικά του τυροπήγματος, καθώς συνδέονται άμεσα με τη περιεκτικότητα, αλλά και τη κατανομή του ασβεστίου μεταξύ της κolloειδούς και της διαλυτής φάσης των τυριών.

Στην Εικόνα 4.1 φαίνεται μια χαρακτηριστική συγκριτική παρουσίαση των κατατομών των διαλυτοποιημένων και μη διαλυτοποιημένων καζεϊνών τυριών Φέτα και Γραβιέρα σε διάφορα διαλύματα ουρίας στην ηλικία των 60 ημερών (Εικόνα 3.1). Ο χρόνος έκλουσης των μεμονωμένων καζεϊνών βασίζεται σε αναλύσεις που έχουν γίνει στο Εργαστήριο Γαλακτοκομίας με καθαρές καζεΐνες από πρόβειο γάλα πριν και μετά την υδρόλυσή τους με πυτιά. Από την εικόνα είναι εμφανές ότι συγκέντρωση ουρίας > 4 M απαιτείται για τη διαλυτοποίηση των καζεϊνών από τη παρακαζεϊνική μήτρα και των δύο τύπων τυριών.



Εικόνα 4.1 Συγκριτική παρουσίαση των κατατομών των διαλυτοποιημένων (ΔΚ) και μη διαλυτοποιημένων καζεϊνών (ΙΚ) τυριών Φέτα και Γραβιέρα σε διάφορα διαλύματα ουρίας στην ηλικία των 60 ημερών.

Τα μικκύλια μπορούν να αποδιοργανωθούν παρουσία ουρίας, γεγονός που καταδεικνύει τη συμμετοχή δεσμών υδρογόνου και υδρόφοβων δεσμών στη διαμόρφωση του καζεϊνικού μικκυλίου. Παράλληλα έχει αποδειχθεί ότι παρότι η επεξεργασία με 6 M ουρία προκαλεί εκτεταμένη αποδιοργάνωσή τους, ένα μικρό μέρος τους παραμένει συνδεδεμένο ισχυρά με το κολλοειδές φωσφορικό ασβέστιο. Αυτές οι ισχυρές αλληλεπιδράσεις δεν επηρεάζονται από την προσθήκη ουρίας (Aoki *et al.*, 1986, Gagnaire *et al.*, 2002). Τα παραπάνω επιβεβαιώθηκαν από το γεγονός ότι ακόμη και εκχύλιση με ουρία 6 M δεν ήταν επαρκής για τη πλήρη διαλυτοποίηση της β-καζεΐνης των τυριών της παρούσας μελέτης. Σημαντικό είναι επίσης το εύρημα ότι η συμπεριφορά αυτή παρατηρείται σε όλη τη διάρκεια της ωρίμανσης (Εικόνα 4.2).



Εικόνα 4.2 Συγκριτική παρουσίαση της συνολικής επιφάνειας των καζεϊνών των κατατομών (παρα-κ-, α_{s2} -, α_{s1} -I f23-199, α_{s1} - και β + γ -καζεϊνών) των διαλυτοποιημένων (ΔΚ) και μη διαλυτοποιημένων καζεϊνών (ΙΚ) τυριών Φέτα και Γραβιέρα σε διάφορα διαλύματα ουρίας κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης.

Για την καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών εκχύλισης με ουρία υπολογίστηκαν οι αναλογίες των επιμέρους καζεϊνών ως προς την παρα-κ-καζεΐνη με βάση τα αποτελέσματα των Εικόνων 4.2 και 4.3 και των Πινάκων 4.1 και 4.2. Οι αναλογίες αυτές παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.3.

Καθώς η ωρίμανση της Φέτας προχωρά η συμμετοχή της α_{s1} -καζεΐνης μειώνεται προφανώς εξαιτίας της πρωτεόλυσης και ειδικά της επίδρασης της υπολειμματικής χυμοσίνης στη καζεΐνη αυτή. Αντίθετα όπως φαίνεται από τη σχετική κατανομή των καζεϊνών η β -καζεΐνη δεν επηρεάζεται από την ωρίμανση και παραμένει η κυρίαρχη καζεΐνη ιδιαίτερα μετά τις 120 ημέρες. Το φαινόμενο αυτό επιβεβαιώνεται και από τα αντίστοιχα χρωματογραφήματα της Εικόνας 4.1.

Πίνακας 4.1 Σχετική συμμετοχή των επιμέρους καζεϊνών εκφρασμένη ως ποσοστό του συνόλου της επιφάνειας των παρα-κ, α_{s1} - και β -καζεϊνών μετά από επεξεργασία με διαλύματα ουρίας 2-6 Μ, κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης της Φέτας.

Καζεΐνες		Νερό			Ουρία 2 Μ			Ουρία 4 Μ			Ουρία 6 Μ		
		ΣΚ	ΔΚ	ΙΚ	ΣΚ	ΔΚ	ΙΚ	ΣΚ	ΔΚ	ΙΚ	ΣΚ	ΔΚ	ΙΚ
Ποσοστά παρα-κ- καζεΐνης	Φ15	13	1	14	15	3	15	14	12	9	14	11	5
	Φ60	13	1	13	14	9	15	14	12	5	13	11	5
	Φ120	15	1	11	13	5	12	13	11	13	12	12	5
	Φ300	11	0	12	11	4	13	11	10	10	11	10	4
Ποσοστά α_{s1} -καζεΐνης	Φ15	26	9	19	39	59	20	39	39	20	24	25	16
	Φ60	27	13	23	40	41	31	31	32	20	24	24	7
	Φ120	18	10	17	38	46	18	37	37	21	21	20	14
	Φ300	17	7	17	27	53	18	33	33	15	20	20	14
Ποσοστά $\beta+\gamma$ -καζεϊνών	Φ15	61	90	68	46	39	65	47	49	72	62	64	78
	Φ60	60	86	64	46	50	53	55	56	75	63	65	88
	Φ120	66	89	72	48	48	71	50	53	67	66	68	82
	Φ300	72	93	71	61	43	69	56	57	75	70	70	82

Πίνακας 4.2 Σχετική συμμετοχή των επιμέρους καζεϊνών εκφρασμένη ως ποσοστό του συνόλου της επιφάνειας των παρα-κ, α_{s1} - και β -καζεϊνών μετά από επεξεργασία με διαλύματα ουρίας 2-6 Μ, κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης της Γραβιέρας.

Καζεΐνες		Νερό			Ουρία 2 Μ			Ουρία 4 Μ			Ουρία 6 Μ		
		ΣΚ	ΔΚ	ΙΚ	ΣΚ	ΔΚ	ΙΚ	ΣΚ	ΔΚ	ΙΚ	ΣΚ	ΔΚ	ΙΚ
Ποσοστά παρα-κ- καζεΐνης	Γ7	17	1	15	14	1	16	16	6	21	14	14	6
	Γ60	17	2	16	6	2	22	17	6	28	17	15	8
	Γ90	19	1	16	4	2	22	17	7	28	17	16	6
	Γ210	19	0	17	6	3	26	18	9	34	17	18	1
Ποσοστά α_{s1} -καζεΐνης	Γ7	40	10	34	38	32	33	38	22	38	35	33	20
	Γ60	32	9	29	29	18	34	32	19	37	30	28	24
	Γ90	33	12	29	22	18	36	31	21	39	30	28	19
	Γ210	29	14	27	24	20	36	27	23	35	27	26	25
Ποσοστά $\beta+\gamma$ -καζεϊνών	Γ7	44	89	52	48	67	52	46	72	41	51	53	74
	Γ60	51	89	55	65	80	44	52	74	35	53	57	68
	Γ90	48	87	55	73	80	42	52	73	33	53	55	74
	Γ210	52	86	56	70	77	39	55	68	30	56	57	74

Η εκχύλιση με νερό πρακτικά δεν διαλυτοποιεί τη παρακαζεϊνική μήτρα των τυριών και πρακτικά εκχυλίζει μικρές ποσότητες της πιο άφθονης β-καζεΐνης, χωρίς αξιόλογη επίδραση της ηλικίας του τυριού στο φαινόμενο αυτό.

Η προσθήκη ουρίας 2 Μ στη Φέτα εκχυλίζει περισσότερη παρα-κ-καζεΐνη σε σχέση με τη β-καζεΐνη όπως φαίνεται από τις αναλογίες β+γ-καζεΐνη/παρα-κ-καζεΐνη για το νερό και την ουρία 2 Μ. Στο διαλυτοποιημένο εκχύλισμα ΔΚ η α_{s1} -καζεΐνη όλων των σημείων ωρίμανσης είναι το 50% κατά μέσο όρο των τριών πρωτεϊνών έναντι 10% κατά την εκχύλιση με νερό. Παρόμοια επίδραση έχει η ουρία 2 Μ στην παρα-κ-καζεΐνη, για την οποία παρατηρείται πενταπλασιασμός της σχετικής της αναλογίας στο ΔΚ. Επομένως η ουρία 2 Μ έχει εντονότερη επίδραση στις α_{s1} - και παρα-κ-καζεΐνες παρά στην εξαιρετικά υδρόφοβη β-καζεΐνη (συγκεκριμένα η β-καζεΐνη περιέχει 29% υδρόφοβες πλευρικές ομάδες αμινοξέων έναντι του 22% που περιέχει η παρα-κ-καζεΐνη [Brule et al., 1997](#), [Walstra et al., 2006](#))).

Η προσθήκη ουρίας 4 Μ ευνόησε σημαντικά τη διαλυτοποίηση της παρα-κ-καζεΐνης σε σχέση με τις άλλες δύο που ελήφθησαν υπόψη και υπερδιπλασίασε κατά μέσο όρο τη συμμετοχή της στις χρωματογραφικές κατατομές των ΔΚ.

Η ουρία 6 Μ αποδιοργανώνει σαφώς μεγαλύτερο μέρος της β-καζεΐνης σε σχέση με τις άλλες δύο, γεγονός που οφείλεται στη μείωση των υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων που προκαλούνται από τη προσθήκη τόσο υψηλών συγκεντρώσεων ουρίας. Όμως, στο ΙΚ που όπως προαναφέρθηκε περιέχει παρόλα αυτά αδιάλυτη καζεΐνη, η β-καζεΐνη κυριαρχεί.

Οι παρα-κ- και α_{s1} -καζεΐνες στη Γραβιέρα έχουν γενικά μεγαλύτερη συμμετοχή στο σύνολο αυτών των τριών καζεϊνών. Το αντίθετο ισχύει για τη β-καζεΐνη καθώς οι συνθήκες (αναθέρμανση, pH, χαμηλό NaCl) είναι ευνοϊκές για τη δράση της πλασμίνης. Παράλληλα εξαιτίας αυτών των συνθηκών η δραστηριότητα υπολειμματικής χυμοσίνης δεν αναμένεται. Είναι χαρακτηριστικό ότι η συμμετοχή της β-καζεΐνης στις κατατομές των δύο τυριών στη διάρκεια της ωρίμανσης είναι εντελώς αντίθετη. Στα πολύ ώριμα τυριά Φέτα η β-καζεΐνη κυριαρχεί ενώ η σχετική της συμμετοχή υποχωρεί στη περίπτωση της Γραβιέρας.

Πίνακας 4.3 Αναλογία των επιμέρους καζεϊνικών κλασμάτων ως προς τη παρα-κ-καζεΐνη στα διάφορα εκχυλίσματα Φέτας και Γραβιέρας με ουρία.

Αναλογίες	Τυριά	Νερό			Ουρία 2 Μ			Ουρία 4 Μ			Ουρία 6 Μ		
		ΣΚ	ΔΚ	ΙΚ	ΣΚ	ΔΚ	ΙΚ	ΣΚ	ΔΚ	ΙΚ	ΣΚ	ΔΚ	ΙΚ
α_{s1} -CN / παρα-κ- CN	Φ15	2,0	9,0	1,4	2,6	19,7	1,3	2,9	3,3	2,2	1,7	2,2	3,2
	Φ60	2,1	13	1,8	2,9	4,6	2,1	2,2	2,7	4,0	1,8	2,2	1,4
	Φ120	1,2	10	1,5	2,9	9,2	1,5	2,8	3,4	1,6	1,8	1,7	2,8
	Φ300	1,5	-	1,4	2,5	13,3	5,0	3,0	3,3	1,5	1,8	2,0	3,5
$\beta+\gamma$ -CN / παρα-κ- CN	Φ15	4,7	90	4,9	3,1	13	4,3	3,4	4,1	8,0	4,4	5,8	15,6
	Φ60	4,6	86	4,9	3,3	5,6	3,5	3,9	4,7	15	4,8	5,9	17,6
	Φ120	4,4	89	6,5	3,7	9,6	5,9	3,8	4,8	5,2	5,5	5,6	16,4
	Φ300	6,5	-	5,9	5,5	10,6	5,3	5,1	5,7	7,5	6,4	7,0	20,5
α_{s1} -CN / παρα-κ- CN	Γ7	2,4	10	2,3	2,7	32	2,1	2,4	3,7	1,8	2,5	2,4	3,3
	Γ60	1,9	4,5	1,8	4,8	9,0	1,5	1,9	3,2	1,3	1,8	1,9	3,0
	Γ90	1,7	12	1,8	5,5	9,0	1,6	1,8	3,0	1,4	1,8	1,8	3,2
	Γ210	1,5	-	1,6	4,0	6,7	1,4	1,5	2,6	1,0	1,6	1,4	25
$\beta+\gamma$ -CN / παρα-κ- CN	Γ7	2,6	89	3,5	3,4	67	3,3	2,9	12	1,95	3,6	3,8	12,3
	Γ60	3,0	44,5	3,4	10,8	40	2,0	3,1	12,3	1,3	3,1	3,8	8,5
	Γ90	2,5	87	3,4	18,3	40	1,9	3,1	10,4	1,2	3,1	3,4	12,3
	Γ210	2,7	-	3,3	11,7	25,7	1,5	3,1	7,6	0,9	3,3	3,2	74

Στην περίπτωση της Γραβιέρας η κατεργασία με 2 Μ ουρία διπλασιάζει την εκχύλιση των α_{s1} - και παρα-κ-καζεϊνών δηλαδή η επίδραση της δεν είναι τόσο έντονη όσο στην περίπτωση της Φέτας. Η συμπεριφορά αυτή προφανώς συνδέεται με το pH. Το χαμηλότερο pH της έχει ευνοήσει την απομάκρυνση του κολλοειδούς φωσφορικού ασβεστίου από τη παρακαζεϊνική μήτρα και η επίδραση αυτή προστίθεται στην επίδραση ενός σχετικά αραιού διαλύματος ουρίας. Η διαλυτοποίηση της παρα-κ-καζεΐνης στη Γραβιέρα ενισχύεται με αύξηση της συγκέντρωσης στα 4 Μ και μάλιστα πολύ πιο έντονα από ότι στην περίπτωση της Φέτας. Παρόλα αυτά η διαλυτοποίηση που επιτυγχάνεται συνολικά με κατεργασία με ουρία 4 Μ είναι πολύ πιο περιορισμένη.

Αντίθετα με τη Φέτα, καθώς η ωρίμανση προχωρά (210 ημέρες) η επίδραση της ουρίας 6 Μ διαφοροποιείται και το κλάσμα που μένει αδιάλυτο (ΙΚ) αποτελείται αποκλειστικά από β - και α_{s1} -καζεΐνες. Επομένως φαίνεται ότι στην περίπτωση της Γραβιέρας η πρωτεόλυση τροποποιεί και δομικά χαρακτηριστικά της παρακαζεΐνης.

Η ουρία διασπά τους ενδομοριακούς Η-δεσμούς των πρωτεϊνών και εξασθενεί τις υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις (Nozaki & Tanford, 1963). Η απελευθέρωση καζεϊνών που παρατηρείται με την επίδραση διαλυμάτων ουρίας αποδεικνύει ότι η παρακαζεϊνική μήτρα και των δύο αυτών τύπων τυριών διαμορφώνεται με υδροφοβικούς και Η-

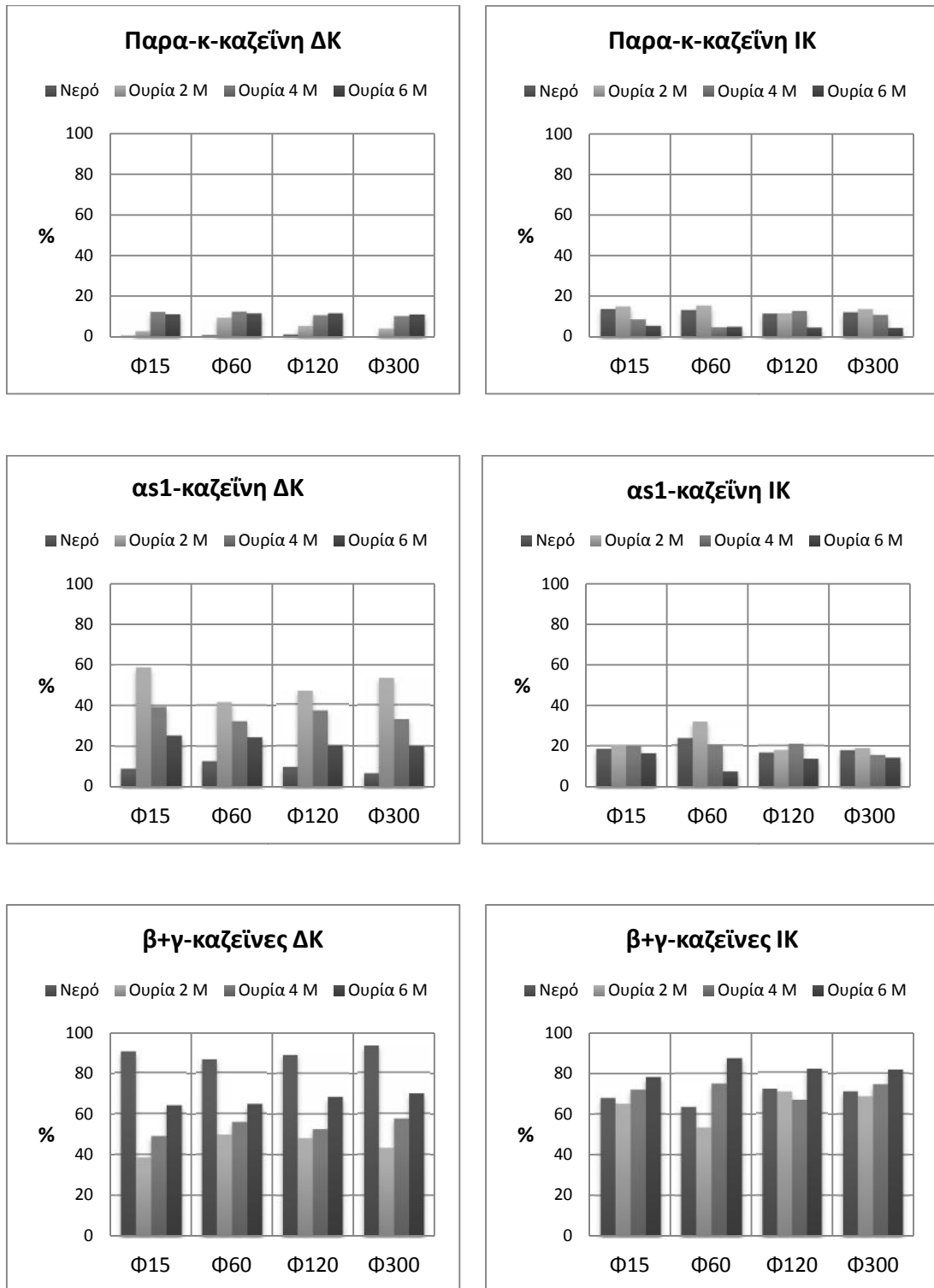
δεσμούς. Όπως έχει αναφερθεί από τους Lefebvre-Cases *et al.* (1998), η συμμετοχή των Η-δεσμών είναι μικρή.

Η επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων ουρίας στην αποδιοργάνωση των υδροφοβικών και δεσμών υδρογόνου της παρακαζεΐνης φάνηκε να επηρεάζεται από το pH του τυριού. Σύμφωνα με τα παραπάνω ευρήματα, ακόμα και η επεξεργασία με 6 M ουρία δεν διαλυτοποιεί πλήρως τη παρακαζεϊνική μήτρα των τυριών. Οι Lefebvre-Cases *et al.* (1998) αναφέρουν ότι η κατεργασία ενζυμικού πήγματος αγελαδινού γάλακτος με 6 M ουρία προκάλεσε διαλυτοποίηση του 64% της παρακαζεΐνης. Περιορισμένη απελευθέρωση καζεΐνης στη διαλυτή φάση επιτυγχάνεται ακόμη και με τη χαμηλή συγκέντρωση ουρίας 2 M.

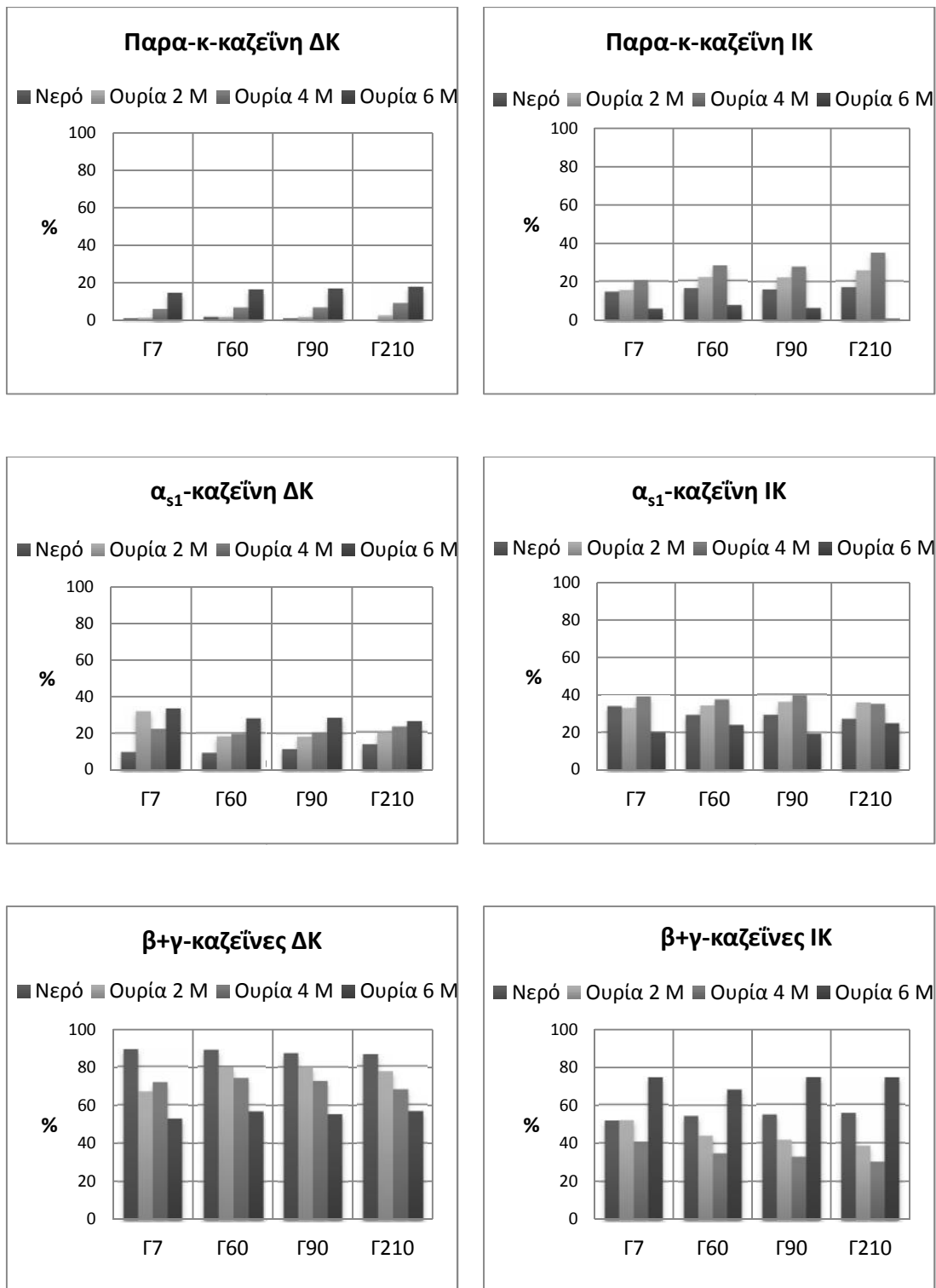
Πρέπει να σημειωθεί ότι οι Gagnaire *et al.* (2002) αναφέρουν ότι δεν παρατήρησαν ουσιαστική απελευθέρωση καζεΐνης μετά από κατεργασία με 2 M ουρία τυριού Emmental. Αντίθετα στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε απελευθέρωση, η οποία ήταν εντονότερη στο τυρί με το χαμηλότερο pH. Το γεγονός ότι το pH του Emmental είναι κοντά στο 6,0 ενισχύει τα παρόντα ευρήματα.

Επομένως, οι αλληλεπιδράσεις στην παρακαζεϊνική μήτρα επηρεάζονται από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του τυριού και εξασθενούν όταν το τυρί είναι αποτέλεσμα ωρίμανσης περισσότερο οξιτισμένου τυροπήγματος, όπως και στην περίπτωση της Φέτας. Τέλος, οι πρωτεολυτικοί παράγοντες που δραστηριοποιούνται κατά την ωρίμανση και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά διαφορετικών κατηγοριών τυριών επηρεάζουν τη σύσταση της παρακαζεΐνης και την επίδραση της ουρίας σε αυτή.

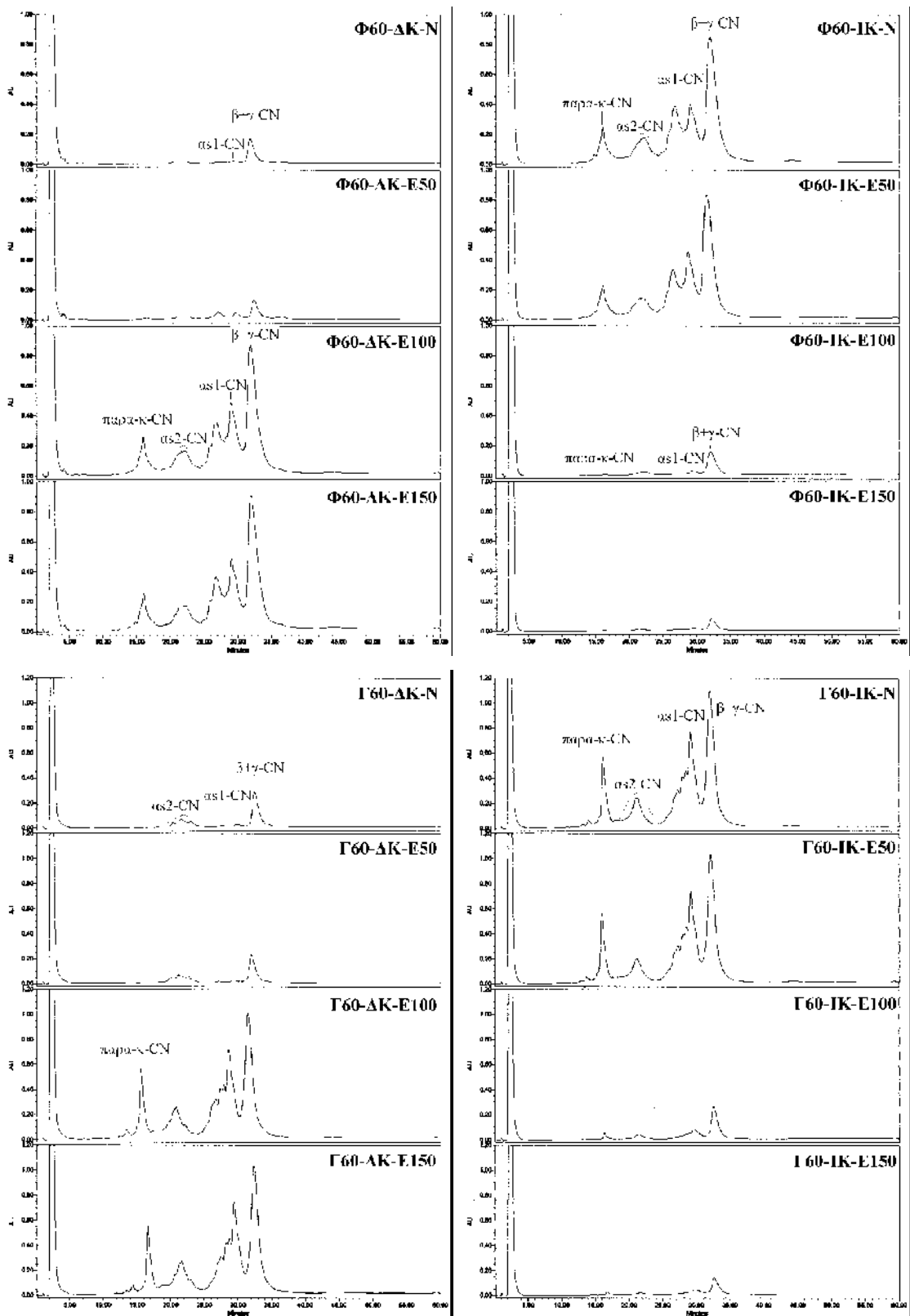
Είναι πολύ ενδιαφέρον ότι η σχετική κατανομή των α_{s1} - και β -καζεϊνών στα ΔΚ των διαφορετικών συγκεντρώσεων ουρίας (Εικόνα 4.3, Πίνακας 4.3) είναι διαφορετική για τα δύο τυριά. Η αύξηση της συγκέντρωσης ουρίας αυξάνει τη διαλυτοποίηση της β -καζεΐνης στη Φέτα μειώνοντας τη σχετική συμμετοχή της α_{s1} -καζεΐνης. Το αντίθετο παρατηρείται στη Γραβιέρα. Επομένως, η β -καζεΐνη είναι συνδεδεμένη κυρίως μέσω υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων στην παρακαζεϊνική μήτρα της Φέτας. Προφανώς σε αυτή τη διαμόρφωση που την κάνει «δυσπρόσιτη» οφείλεται η ανθεκτικότητά της στην υδρόλυση από την υπολειμματική χυμοσίνη που αναφέρεται για αυτό το τυρί.



Εικόνα 4.3. Συγκριτική παρουσίαση της συμμετοχής των τριών κύριων μεμονωμένων καζεϊνικών κλασμάτων στις κατατομές των διαλυτοποιημένων (ΔΚ) και μη διαλυτοποιημένων καζεϊνών (ΙΚ) τυριών Φέτα και Γραβιέρα σε διάφορα διαλύματα ουρίας κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης. Το σύνολο της επιφάνειας των α_{s1} -, β + γ - και παρα-κ-καζεϊνών έχει θεωρηθεί ως 100 (συνέχεια επόμενη σελίδα),



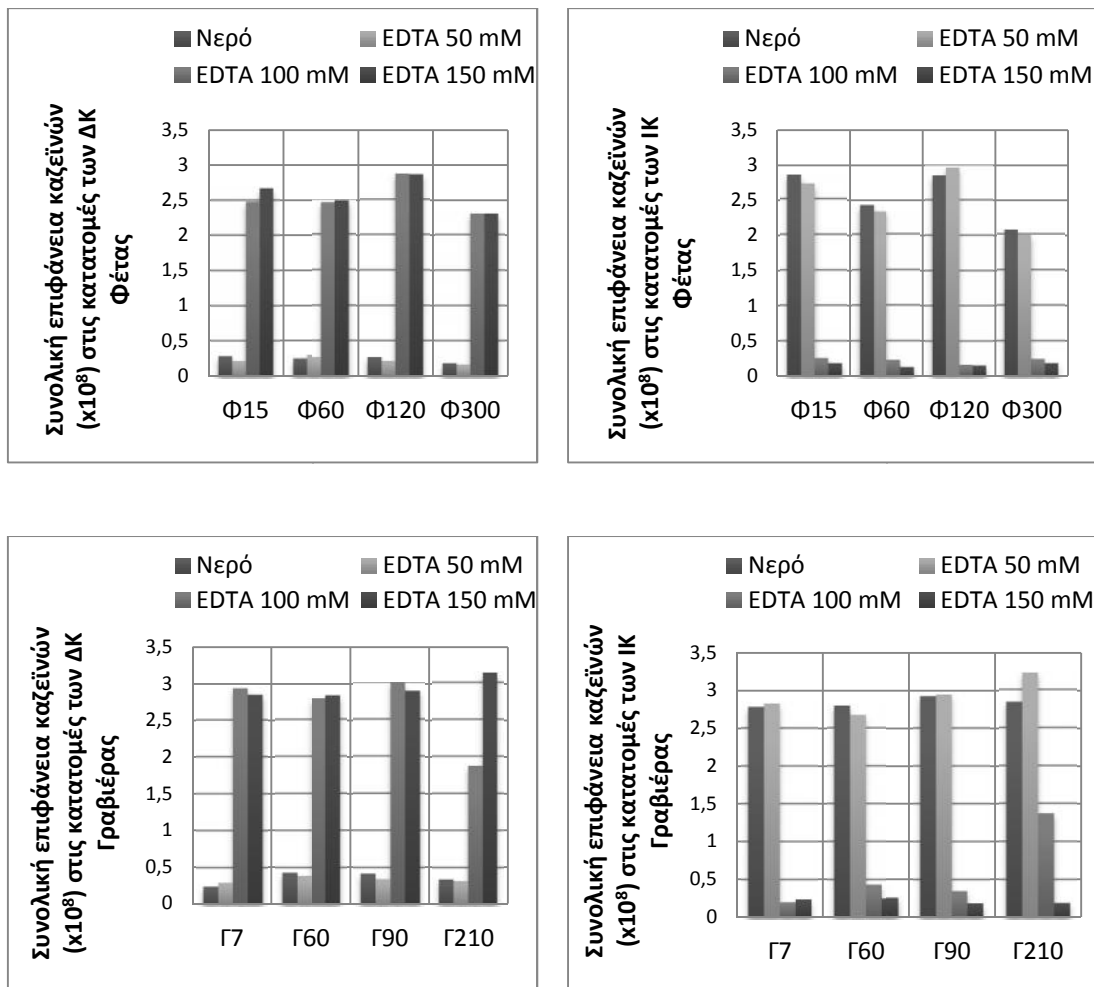
Εικόνα 4.3 (συνέχεια). Συγκριτική παρουσίαση της συμμετοχής των τριών κύριων μεμονωμένων καζεϊνικών κλασμάτων στις κατατομές των διαλυτοποιημένων (ΔΚ) και μη διαλυτοποιημένων καζεϊνών (ΙΚ) τυριών Φέτα και Γραβιέρα σε διάφορα διαλύματα ουρίας κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης.



Εικόνα 4.4 Συγκριτική παρουσίαση των κατατομών των διαλυτοποιημένων (ΔΚ) και μη διαλυτοποιημένων καζεϊνών (ΙΚ) τυριών Φέτα και Γραβιέρα σε διάφορα διαλύματα EDTA στην ηλικία των 60 ημερών.

Το EDTA είναι ισχυρά συμπλεκτικό μόριο που μπορεί να δεσμεύει περιβάλλοντας σαν «κλωβός» κατιόντα μετάλλων όπως τα Ca^{2+} . Η αποδιοργάνωση των μικκυλίων που συμβαίνει με τη προσθήκη του EDTA οφείλεται στο γεγονός ότι το EDTA «αδειάζει» την υδατική φάση των τυριών από Ca^{2+} με αποτέλεσμα τη διαλυτοποίηση του κολλοειδούς φωσφορικού ασβεστίου. Επομένως, διαταράσσει την ένωση του ασβεστίου με τις καζεΐνες στην παρακαζεϊνική μήτρα.

Όπως είναι φανερό από την Εικόνα 4.5 που παρουσιάζει συγκριτικά την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων EDTA στη διαλυτοποίηση του συνόλου των καζεϊνών η επίδραση 50 mM EDTA είναι πρακτικά μηδαμινή. Αντίθετα, παρουσία 50 mM EDTA παρατηρείται πλήρης αποδιοργάνωση των καζεϊνικών μικκυλίων στο γάλα (Udabage et al. 2000). Η διαφορετική αυτή συμπεριφορά οφείλεται προφανώς στη διαφορά συγκέντρωσης του ασβεστίου στο τυρί και στο γάλα, αφού 1 mol Ca δεσμεύεται στοιχειομετρικά από 1 mol EDTA. Επίσης είναι εμφανές ότι η αύξηση από τα 100 στα 150 mM EDTA δεν έχει ιδιαίτερη επίδραση στο σύνολο των απελευθερωμένων καζεϊνών με εξαίρεση τη Γραβιέρα 210 ημερών. Για το τυρί Emmental, το οποίο έχει υψηλότερο pH αναφέρεται ότι είναι απαραίτητη συγκέντρωση 150 mM EDTA. Οι παρατηρήσεις αυτές ισχύουν και για τις δύο διαφορετικές κατηγορίες τυριών που μελετήθηκαν. Και σε αυτή τη περίπτωση όπως και στη κατεργασία με ουρία ακόμη και τα 150 mM EDTA δεν είναι αρκετά για τη πλήρη αποδέσμευση όλων των καζεϊνών από τη παρακαζεϊνή των τυριών.



Εικόνα 4.5 Συγκριτική παρουσίαση της συνολικής επιφάνειας των καζεϊνών των κατατομών (παρα-κ-, α_{s2-} , α_{s1-I} f23-199, α_{s1-} και $\beta+\gamma$ - καζεϊνών) των διαλυτοποιημένων (ΔΚ) και μη διαλυτοποιημένων καζεϊνών (ΙΚ) τυριών Φέτα και Γραβιέρα σε διάφορα διαλύματα EDTA κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης.

Η διαλυτοποίηση που προκαλείται από το EDTA, έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει με την αύξηση του pH και της ιοντικής ισχύος του εκχυλίσματος, η οποία προκαλείται από το ίδιο το EDTA, καθώς οι δύο αυτοί παράγοντες αυξάνουν την απόθεση μεταξύ των μικκυλίων (Gagnaire et al. 2002). Από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων που παρουσιάζεται στον Πίνακα 4.6 και λαμβάνοντας υπόψη και τις κατατομές της Εικόνας 4.4, η προσθήκη EDTA ≥ 100 mM απελευθερώνει και στα δύο τυριά περίπου έξι φορές εντονότερα τη παρα-κ-καζεΐνη σε σχέση με την α_{s1} -καζεΐνη στο ΔΚ. Επιπλέον, απελευθερώνει περίπου 15 και 22 φορές περισσότερη παρα-κ-καζεΐνη σε σχέση με τη β -καζεΐνη στη Φέτα και στη Γραβιέρα αντίστοιχα. Το εύρημα αυτό έρχεται σε αντίθεση με ότι συμβαίνει στο γάλα για το οποίο αναφέρεται ότι η περιεκτικότητα των μικκυλίων σε μεμονωμένες καζεΐνες δεν επηρεάζεται από τη συγκέντρωση του EDTA (Griffin et

al. 1988). Η διαφορετική αυτή συμπεριφορά προφανώς συνδέεται με τη διαφορετική φύση της καζεΐνης και της παρακαζεΐνης.

Η διαφορετική συμπεριφορά των καζεϊνών με ουρία και EDTA στα δύο τυριά αποδεικνύει πως οι διαφορετικές συνθήκες διαμορφώνουν ένα παρακαζεϊνικό δίκτυο με διαφορετικά χαρακτηριστικά. Αυτά τα χαρακτηριστικά προφανώς αντανακλώνται στα ρεολογικά χαρακτηριστικά και τη λειτουργική συμπεριφορά των δύο αυτών κατηγοριών τυριών.

Πίνακας 4.4 Σχετική συμμετοχή των επιμέρους καζεϊνών εκφρασμένη ως ποσοστό του συνόλου της επιφάνειας των παρα-κ, α_{s1} - και β -καζεϊνών μετά από επεξεργασία με διαλύματα EDTA 50-150 mM, κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης της Φέτας.

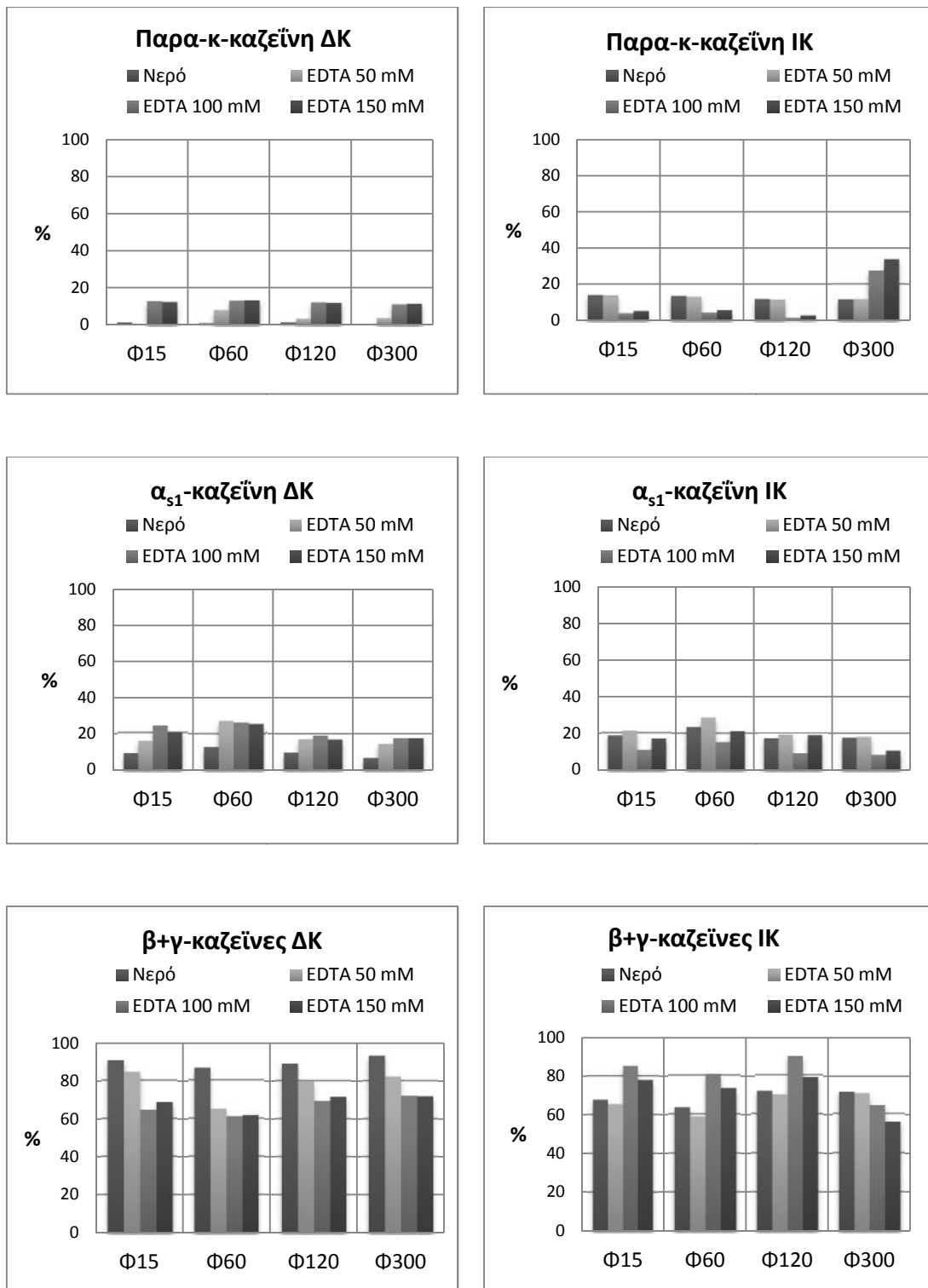
Καζεΐνες		Νερό			EDTA 50 mM			EDTA 100 mM			EDTA 150 mM		
		ΣΚ	ΔΚ	ΙΚ	ΣΚ	ΔΚ	ΙΚ	ΣΚ	ΔΚ	ΙΚ	ΣΚ	ΔΚ	ΙΚ
Ποσοστά παρα-κ- καζεΐνης	Φ15	13	1	14	12	0	13	12	12	4	11	11	5
	Φ60	13	1	13	12	8	13	12	13	4	12	13	6
	Φ120	15	1	11	12	3	11	12	12	1	12	12	3
	Φ300	11	0	12	11	4	12	11	11	27	11	11	34
Ποσοστά α_{s1}-καζεΐνης	Φ15	26	9	19	22	16	21	24	24	11	21	20	17
	Φ60	27	13	23	33	27	28	29	26	15	29	25	21
	Φ120	18	10	17	22	17	19	20	19	9	18	17	18
	Φ300	17	7	17	17	14	18	18	17	8	18	17	11
Ποσοστά β+γ-καζεϊνών	Φ15	61	90	68	67	84	66	64	65	85	67	69	78
	Φ60	60	86	64	55	65	59	58	61	81	59	62	73
	Φ120	66	89	72	66	80	70	68	69	90	70	72	79
	Φ300	72	93	71	72	82	71	72	72	64	72	72	56

Πίνακας 4.5 Σχετική συμμετοχή των επιμέρους καζεϊνών εκφρασμένη ως ποσοστό του συνόλου της επιφάνειας των παρα-κ, α_{s1} - και β -καζεϊνών μετά από επεξεργασία με διαλύματα EDTA 50-150 mM, κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης της Γραβιέρας.

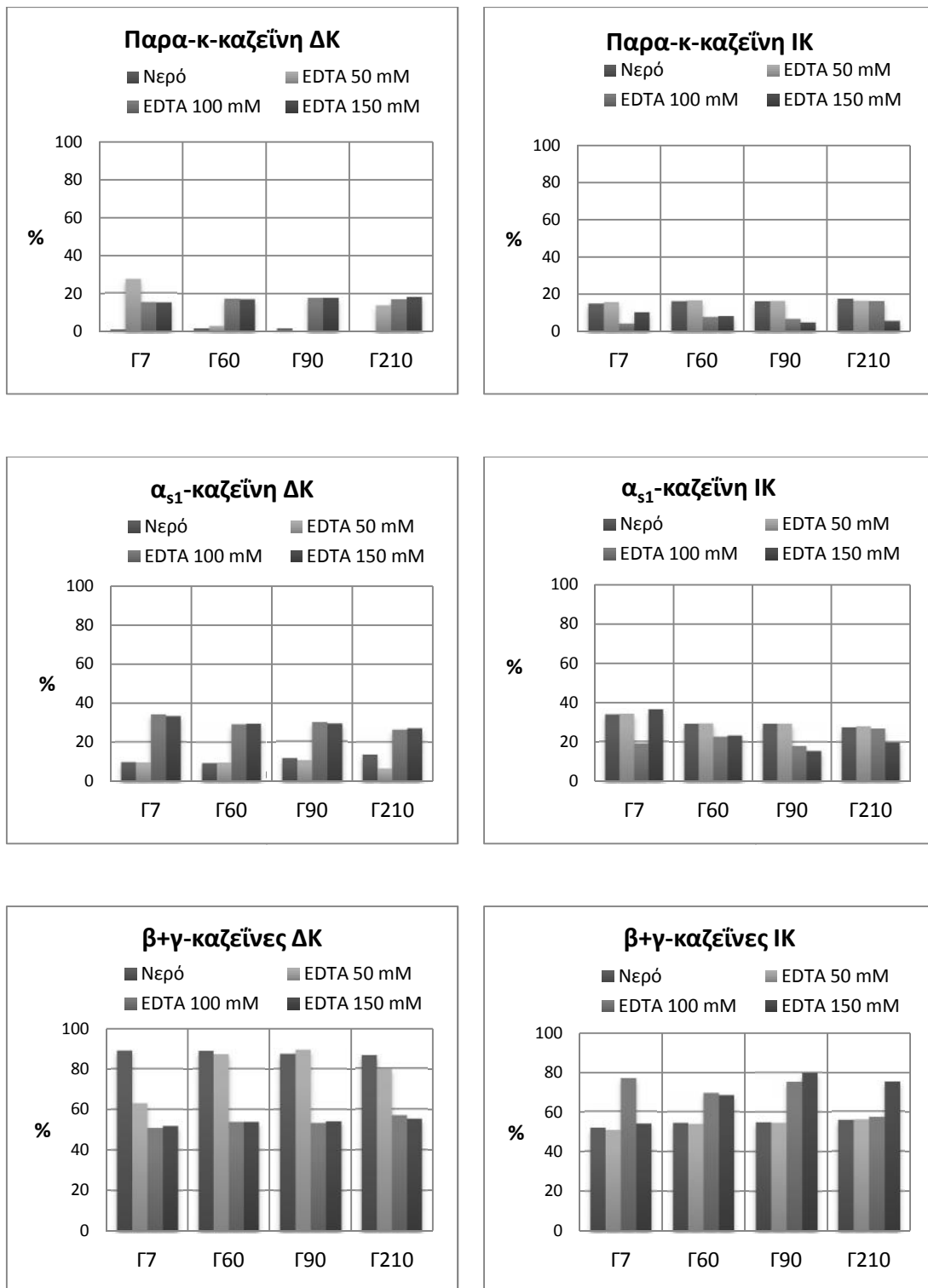
Καζεΐνες		Νερό			EDTA 50 mM			EDTA 100 mM			EDTA 150 mM		
		ΣΚ	ΔΚ	ΙΚ	ΣΚ	ΔΚ	ΙΚ	ΣΚ	ΔΚ	ΙΚ	ΣΚ	ΔΚ	ΙΚ
Ποσοστά παρα-κ- καζεΐνης	Γ7	17	1	15	14	27	15	16	15	4	15	15	10
	Γ60	17	2	16	17	3	17	17	17	8	17	17	8
	Γ90	19	1	16	17	0	16	17	17	7	17	17	5
	Γ210	19	0	17	18	14	16	18	17	16	18	18	6
Ποσοστά α_{s1}-καζεΐνης	Γ7	40	10	34	36	10	34	36	34	19	35	33	36
	Γ60	32	9	29	31	10	29	31	29	23	31	29	23
	Γ90	33	12	29	31	11	29	30	29	18	30	29	15
	Γ210	29	14	27	28	6	28	28	26	27	27	27	20
Ποσοστά β+γ-καζεϊνών	Γ7	44	89	52	50	63	51	48	51	77	50	52	54
	Γ60	51	89	55	52	87	54	53	54	69	53	54	68
	Γ90	48	87	55	52	89	55	52	53	75	53	54	80
	Γ210	52	86	56	54	80	56	55	57	57	55	55	75

Πίνακας 4.6 Αναλογία των επιμέρους καζεϊνικών κλασμάτων ως προς την παρα-κ-καζεΐνη στα διάφορα εκχυλίσματα τυριού με EDTA που μελετήθηκαν

Αναλογίες	Τυριά	Νερό			EDTA 100 mM		
		ΣΚ	ΔΚ	ΙΚ	ΣΚ	ΔΚ	ΙΚ
α_{s1} -CN / παρα-κ-CN	Φ15	2,0	9,0	1,4	2,0	2,0	2,8
	Φ60	2,1	13	1,8	2,4	2,0	3,8
	Φ120	1,2	10	1,5	1,7	1,6	9,0
	Φ300	1,6	-	1,4	1,6	1,6	0,3
β + γ -CN / παρα-κ-CN	Φ15	4,7	90	4,9	5,3	5,4	21,3
	Φ60	4,6	86	4,9	4,8	4,7	20,3
	Φ120	4,4	89	6,5	5,7	5,8	90
	Φ300	6,5	-	5,9	6,6	6,6	2,4
α_{s1} -CN / παρα-κ-CN	Γ7	2,4	10	2,3	2,3	2,3	4,8
	Γ60	1,9	4,5	1,8	1,8	1,7	2,9
	Γ90	1,7	12	1,8	1,8	1,7	2,6
	Γ210	1,5	-	1,6	1,6	1,5	1,7
β + γ -CN / παρα-κ-CN	Γ7	2,6	89	3,5	3,0	3,4	3,3
	Γ60	3	44,5	3,4	3,1	3,2	3,1
	Γ90	2,5	87	3,4	3,1	3,1	3,1
	Γ210	2,7	-	3,3	3,1	3,4	3,1



Εικόνα 4.6 Συγκριτική παρουσίαση της συμμετοχής των τριών κύριων μεμονωμένων καζεϊνικών κλασμάτων στις κατατομές των διαλυτοποιημένων (ΔΚ) και μη διαλυτοποιημένων καζεϊνών (ΙΚ) τυριών Φέτα και Γραβιέρα σε διάφορα διαλύματα EDTA κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης. Το σύνολο της επιφάνειας των α_{s1}-, β+γ- και παρα-κ-καζεϊνών έχει θεωρηθεί ως 100 (συνέχεια επόμενη σελίδα),



Εικόνα 4.6 (συνέχεια). Συγκριτική παρουσίαση της συμμετοχής των τριών κύριων μεμονωμένων καζεϊνικών κλασμάτων στις κατατομές των διαλυτοποιημένων (ΔΚ) και μη διαλυτοποιημένων καζεϊνών (ΙΚ) τυριών Φέτα και Γραβιέρα σε διάφορα διαλύματα EDTA κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης.

4.1.2 Ανόργανα στοιχεία

Η περιεκτικότητα των υπερκειμένων (ΔΚ) σε ασβέστιο και μαγνήσιο (διαλυτό ασβέστιο και διαλυτό μαγνήσιο) μετά από επεξεργασία των τυριών με ουρία και EDTA παρουσιάζονται στο Πίνακα 4.7. Η ανάλυση και ο υπολογισμός των συγκεντρώσεων έγινε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.5.

Καταρχήν η ωρίμανση της Φέτας και της Γραβιέρας προκαλεί απελευθέρωση ασβεστίου με σχετικά αργό ρυθμό (> 60 ημέρες) στο υδατικό εκχύλισμα γεγονός που οφείλεται στην υδρόλυση της παρακαζεΐνης. Παρόμοιες μεταβολές έχουν αναφερθεί και για το τυρί Cheddar (Hassan *et al.*, 2004). Η αναλογία διαλυτό/ολικό ασβέστιο στη Γραβιέρα είναι πολύ χαμηλότερη, μόλις το 1/3 της Φέτας σε όλη τη διάρκεια της ωρίμανσης.

Η επεξεργασία με ουρία 2-6 M πριν τους 2 μήνες είχε μία σχετική επίδραση προφανώς στο διαλυτό ασβέστιο της Φέτας εξαιτίας της αποδιοργάνωσης της παρακαζεΐνικής μήτρας που αναφέρθηκε προηγουμένως και η οποία διαλυτοποιεί κολλοειδές φωσφορικό ασβέστιο.

Αντίθετα η ουρία ακόμη και από συγκέντρωση 2 M αύξησε σημαντικά το διαλυτό ασβέστιο στη Γραβιέρα σε όλη τη διάρκεια της ωρίμανσης, το οποίο υπερτριπλασιαζόταν στο νεαρό τυρί μετά την κατεργασία με 6 M. Τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι στο τυρί το μεγαλύτερο μέρος του ασβεστίου είναι κολλοειδές ασβέστιο (κολλοειδές φωσφορικό ασβέστιο) που συμμετέχει στη δομή της παρακαζεΐνικής μήτρας. Η κατεργασία με EDTA σε τυρί όπως η Φέτα με χαμηλό pH δεν είχε σημαντική επίδραση στο κλάσμα του διαλυτού ασβεστίου. Προφανώς δεν προκαλούσε επιπλέον απελευθέρωση ασβεστίου από τη παρακαζεΐνη, καθώς αυτό αναμενόταν να είχε ήδη διαλυτοποιηθεί εξαιτίας του χαμηλού pH του τυριού αυτού.

Το αντίθετο παρατηρήθηκε στη Γραβιέρα. Στη περίπτωση αυτή συγκέντρωση 50-150 mM είχαν πρακτικά την ίδια επίδραση. Το διαλυτό ασβέστιο αυξήθηκε κατά 3,2-3,6 φορές με κατεργασία με 50 mM EDTA σε όλα τα στάδια της ωρίμανσης. Επομένως, στο τυρί αυτό με το υψηλότερο pH ακόμη και η εκτεταμένη διαλυτοποίηση του ασβεστίου που φαίνεται ότι επιτυγχάνεται ήδη από τα 50 mM EDTA δεν είναι αρκετή για την αποδιοργάνωση της παρακαζεΐνικής μήτρας (Εικόνα 4.6, Πίνακας 4.5) Συμπερασματικά, η παρακαζεΐνική μήτρα όξινων τυριών διαμορφώνεται από υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις, δεσμούς υδρογόνου και το ασβέστιο που συνδέεται με

αυτή, ενώ στα τυριά τύπου Γραβιέρα σημαντικό ρόλο παίζει το κολλοειδές φωσφορικό ασβέστιο.

Πίνακας 4.7 Περιεκτικότητα των υπερκειμένων (ΔΚ) σε ασβέστιο και μαγνήσιο μετά από επεξεργασία των τυριών με ουρία και EDTA, εκφρασμένη ως ποσοστό της αντίστοιχης συνολικής περιεκτικότητας (υπολογισμοί όπως περιγράφονται στην παράγραφο 3.5.

Φέτα		%						
		N	U2	U4	U6	E50	E100	E150
Ca	Φ15	55,2	61,7	64,1	65,2	59,5	55,8	58,5
	Φ60	53,4	61,1	68,0	70,6	58,5	61,1	67,1
	Φ120	75,7	75,7	75,1	73,4	63,0	60,1	50,1
	Φ300	78,5	80,7	76,2	72,9	81,2	71,8	67,4
Mg	Φ15	84,4	84,4	84,4	87,5	84,4	84,4	87,5
	Φ60	75,0	75,0	82,1	78,6	67,9	78,6	82,1
	Φ120	88,9	83,3	83,3	77,8	77,8	83,3	77,8
	Φ300	81,0	81,0	81,0	76,2	90,5	85,7	85,7
Γραβιέρα								
Ca	Γ7	15,9	18,4	24,4	50,6	54,4	51,5	48,3
	Γ60	22,6	29,7	36,6	51,3	75	72,9	70,4
	Γ90	23,7	30,7	41,6	55,9	86,2	80,8	75,9
	Γ210	24,9	34,2	42,5	48,3	77,6	77,7	72,6
Mg	Γ7	67,1	58,6	80,1	98,6	104,3	100	95,7
	Γ60	71,6	72,8	81,5	86,4	98,8	100	100
	Γ90	80,0	88,8	95,0	98,8	102,5	102,5	97,5
	Γ210	75,6	82,6	93,0	93,0	91,9	95,4	93,0

4.2 Μελέτη της επίδρασης υπερυψηλής πίεσης (ΥΥΠ) σε τυριά τύπου Φέτα

Η επεξεργασία των τροφίμων με ΥΥΠ είναι μία τεχνολογία εναλλακτική της θερμικής επεξεργασίας, η οποία δεν επηρεάζει τα διατροφικά τους χαρακτηριστικά. Εκτός από την αντιμικροβιακή της επίδραση, η ΥΥΠ μπορεί να προκαλέσει αντιστρεπτές και μη-αντιστρεπτές αλλαγές στα συστατικά του γάλακτος (Considine *et al.*, 2006; Hupperzt *et al.*, 2006c; López-Fandiño, 2006). Συνοπτικά, οι αλλαγές αυτές είναι η μετουσίωση των πρωτεϊνών του ορού, η διαλυτοποίηση κolloειδούς φωσφορικού ασβεστίου που επιφέρει με τη σειρά της αλλαγές στα καζεϊνικά μικκύλια, η μεταβολή της δραστηριότητας των ενδογενών ενζύμων και η συμπεριφορά κατά την πήξη με πυτιά. Στα τυριά έχουν γίνει αρκετές ερευνητικές εργασίες με αντικείμενο τη δυνατότητα της ΥΥΠ να επιταχύνει την ωρίμανση (π.χ. Saldo *et al.* 2002, O'Reilly *et al.* 2003, Juan *et al.* 2004, 2008, Sheehan *et al.* 2006) ή να μεταβάλλει τις ρεολογικές τους ιδιότητες (π.χ. Johnston & Darcy 2000, O'Reilly *et al.* 2002, Johnston *et al.* 2002).

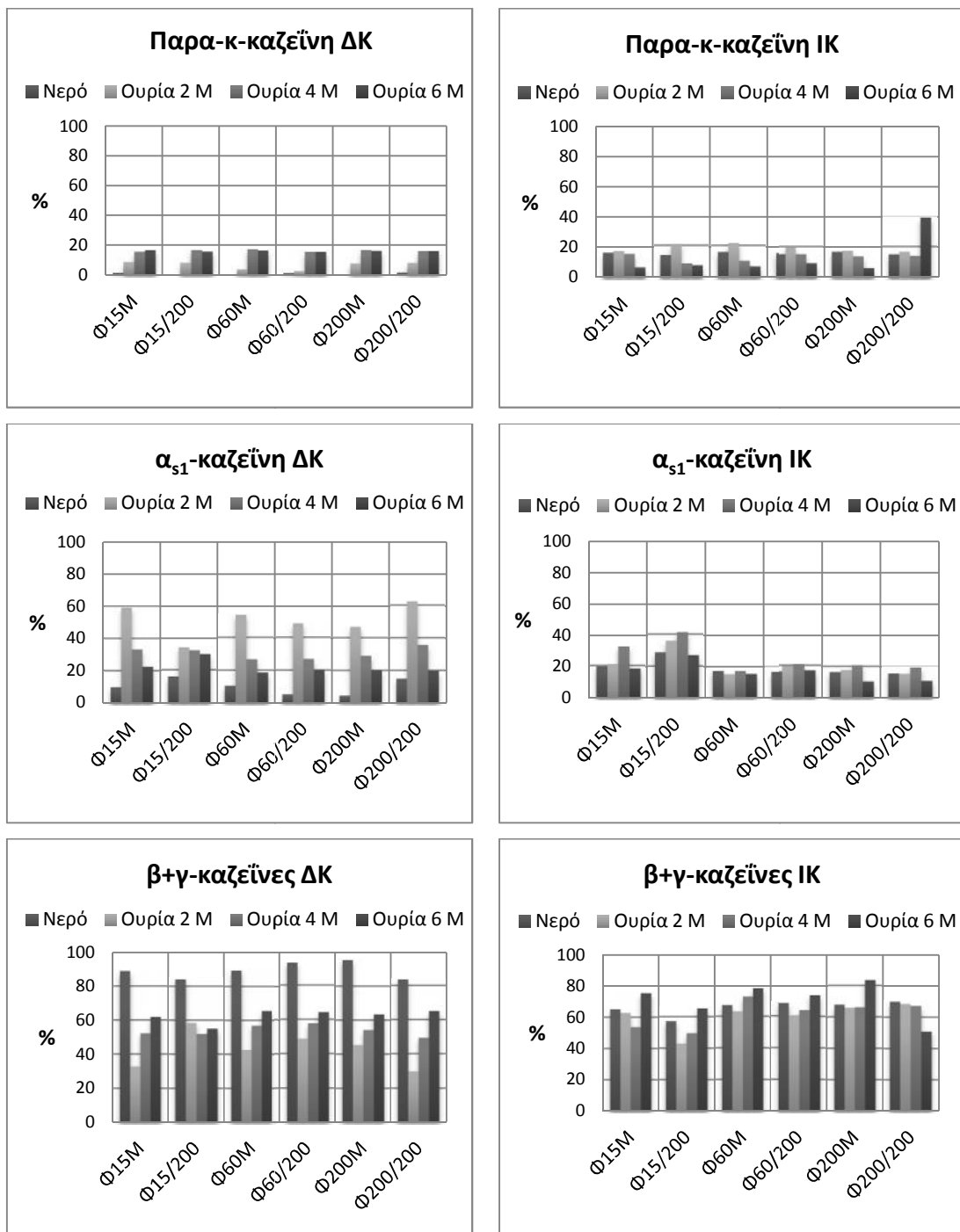
Η επίδραση της ουρίας 2-6 M και των διαλυμάτων EDTA 50-100 mM στην απελευθέρωση μεμονωμένων καζεϊνών παρουσιάζεται στους Πίνακες 4.8 και 4.9 και στις Εικόνες 4.7-4.10. Οι χρωματογραφικές κατατομές παρουσιάζονται στο Παράρτημα. Η επεξεργασία με Υπερυψηλή πίεση 200-500 MPa δεν επηρέασε ουσιαστικά τα ποσοστά των επιμέρους καζεϊνών στα ΔΚ για όλες τις συγκεντρώσεις και για όλες τις ηλικίες που μελετήθηκαν. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν όσα αναφέρθηκαν στο προηγούμενο τμήμα της μελέτης σχετικά με την παρακαζεϊνική μήτρα της Φέτας.

Πίνακας 4.8 Σχετική αναλογία παρα-κ-, α_{s1} - και $\beta+\gamma$ -καζεϊνών στα χρωματογραφήματα που προέκυψαν από επεξεργασία με διαφορετικές συγκεντρώσεις ουρίας 2 – 6 Μ.

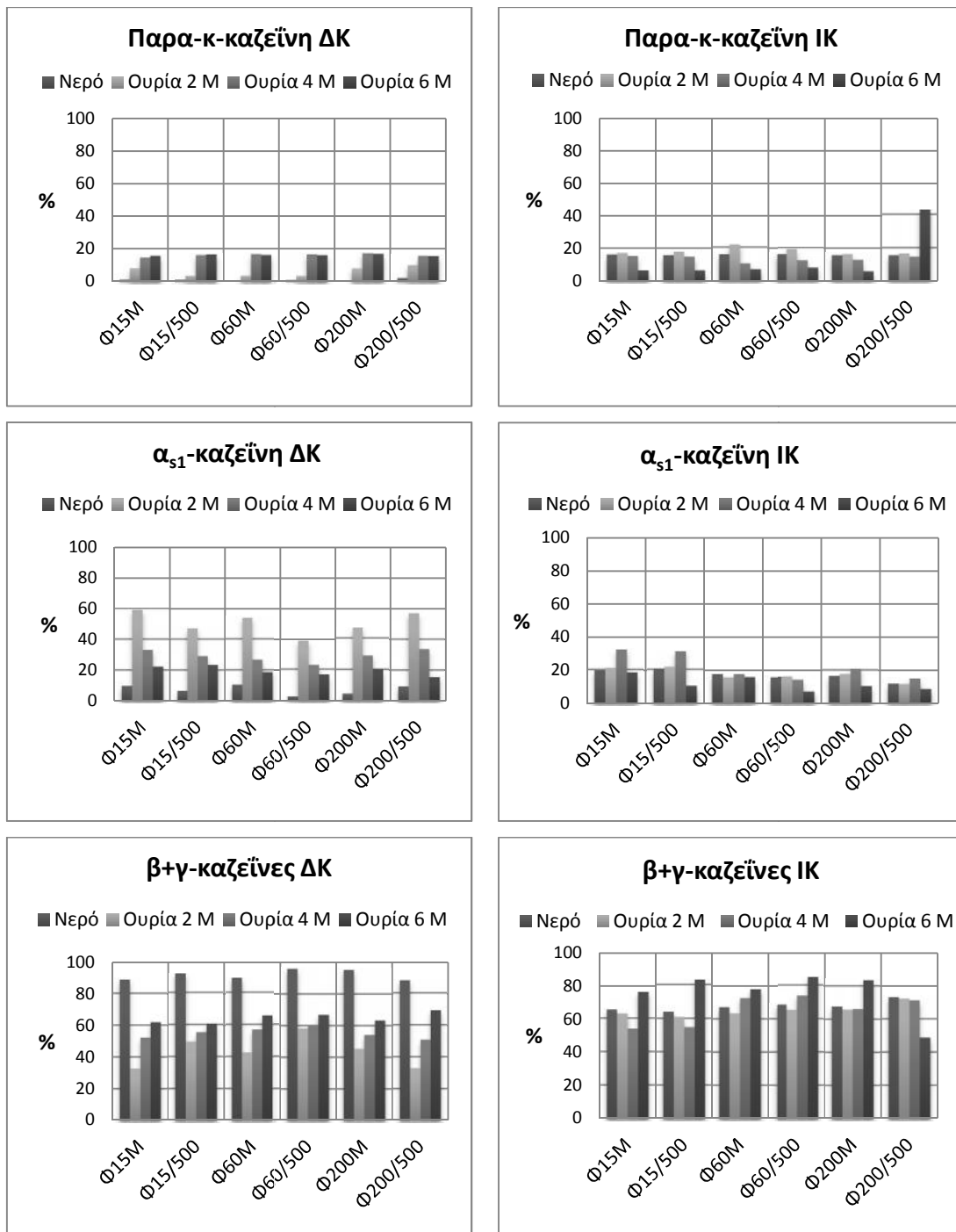
Καζεΐνες	Τυριά	N		U2		U4		U6	
		ΣΚ	ΔΚ	ΣΚ	ΔΚ	ΣΚ	ΔΚ	ΣΚ	ΔΚ
παρα-κ- CN	Φ15Μ	16	1	17	8	16	15	15	16
	Φ15/200	14	0	16	8	15	16	16	15
	Φ15/500	16	1	17	3	16	15	16	16
	Φ60Μ	18	0	18	4	14	16	16	16
	Φ60/200	16	1	17	3	16	15	16	15
	Φ60/500	15	1	15	4	15	17	14	16
	Φ200Μ	17	0	17	8	17	17	16	16
	Φ200/200	17	2	18	8	17	15	16	15
	Φ200/500	17	2	19	10	17	15	16	15
α_{s1} -CN	Φ15Μ	20	10	29	59	32	33	23	22
	Φ15/200	34	16	44	34	34	32	29	30
	Φ15/500	21	7	36	47	31	29	23	23
	Φ60Μ	16	11	30	54	28	27	20	19
	Φ60/200	17	5	29	49	26	27	20	20
	Φ60/500	16	3	24	38	24	23	18	17
	Φ200Μ	16	5	24	47	28	29	17	20
	Φ200/200	14	15	27	62	31	36	19	20
	Φ200/500	13	10	24	57	29	34	16	16
$\beta+\gamma$ - CN	Φ15Μ	64	89	54	33	51	52	61	62
	Φ15/200	52	84	41	58	52	52	55	55
	Φ15/500	63	92	47	49	53	55	61	61
	Φ60Μ	66	89	52	43	57	57	64	66
	Φ60/200	67	93	53	49	57	58	64	64
	Φ60/500	69	96	62	58	61	61	68	67
	Φ200Μ	67	95	59	45	55	54	67	63
	Φ200/200	69	83	55	30	53	49	65	65
	Φ200/500	70	78	57	33	54	51	68	69

Πίνακας 4.9 Σχετική αναλογία παρα-κ-, α_{s1} - και $\beta+\gamma$ -καζεϊνών στα χρωματογραφήματα που προέκυψαν από επεξεργασία με 50-150 mM EDTA.

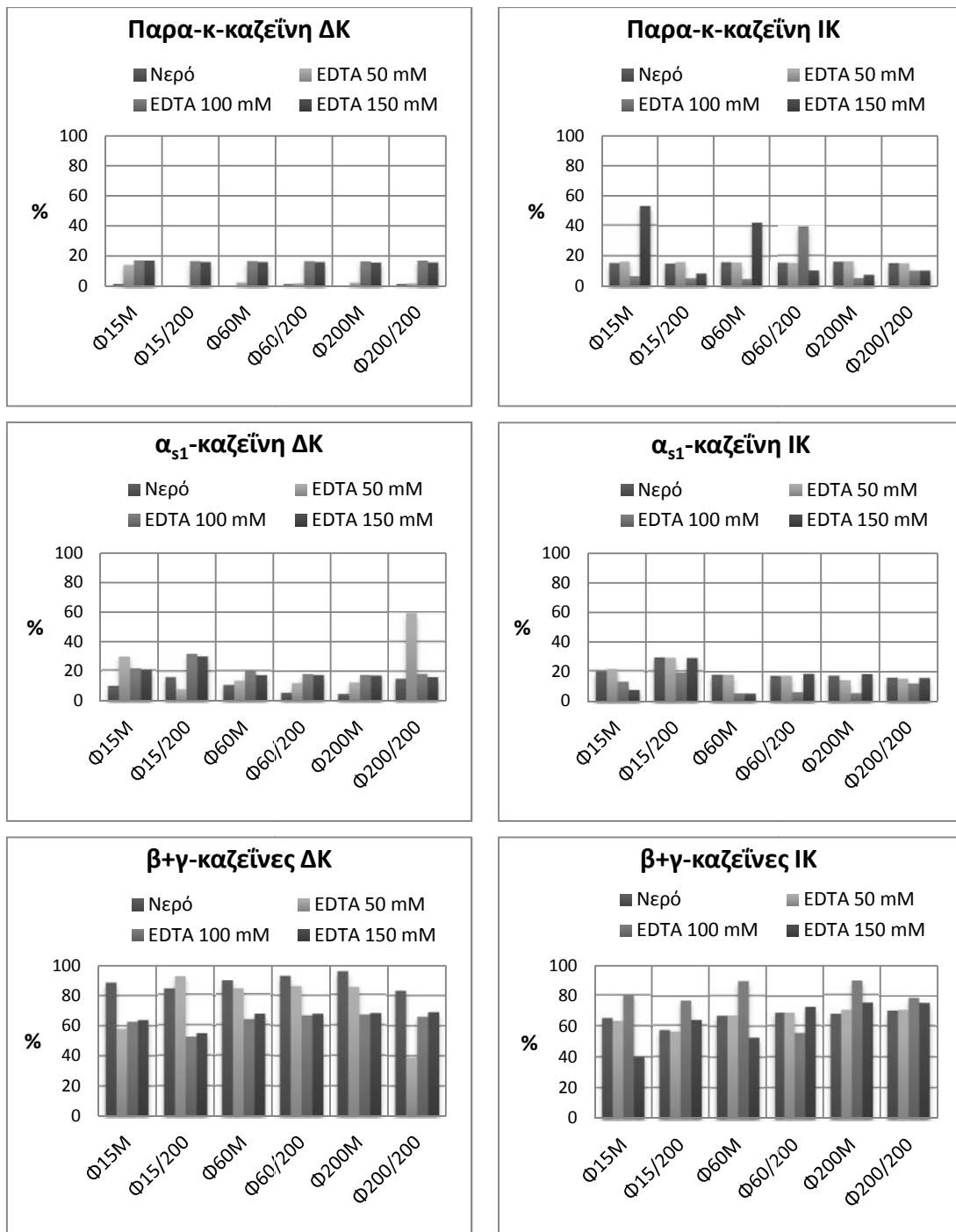
Καζεΐνες	Τυριά	N		E50		E100		E150	
		ΣΚ	ΔΚ	ΣΚ	ΔΚ	ΣΚ	ΔΚ	ΣΚ	ΔΚ
παρα-κ- CN	Φ15M	16	1	16	13	16	16	15	16
	Φ15/200	14	0	16	2	16	16	16	16
	Φ15/500	16	1	14	0	16	16	16	16
	Φ60M	18	0	17	3	17	16	17	16
	Φ60/200	16	1	14	2	15	17	15	16
	Φ60/500	15	1	16	2	16	16	16	15
	Φ200M	17	0	15	3	16	16	16	15
	Φ200/200	17	2	17	3	16	16	16	16
	Φ200/500	17	2	16	2	16	16	16	15
α_{s1} -CN	Φ15M	20	10	27	29	22	21	21	20
	Φ15/200	34	16	24	15	24	23	22	22
	Φ15/500	21	7	29	8	31	32	30	30
	Φ60M	16	11	16	14	18	20	16	17
	Φ60/200	17	5	16	19	17	16	16	15
	Φ60/500	16	3	16	12	17	17	16	17
	Φ200M	16	5	15	12	16	17	16	17
	Φ200/200	14	15	13	13	15	15	14	15
	Φ200/500	13	10	16	59	18	18	16	16
$\beta+\gamma$ - CN	Φ15M	64	89	57	58	62	63	63	64
	Φ15/200	52	84	60	83	60	61	62	62
	Φ15/500	63	92	57	92	53	52	54	55
	Φ60M	66	89	67	84	65	64	67	67
	Φ60/200	67	93	70	89	69	68	69	68
	Φ60/500	69	96	68	86	67	67	68	68
	Φ200M	67	95	69	85	68	67	68	68
	Φ200/200	69	83	70	83	68	68	69	69
	Φ200/500	70	78	68	39	66	66	68	69



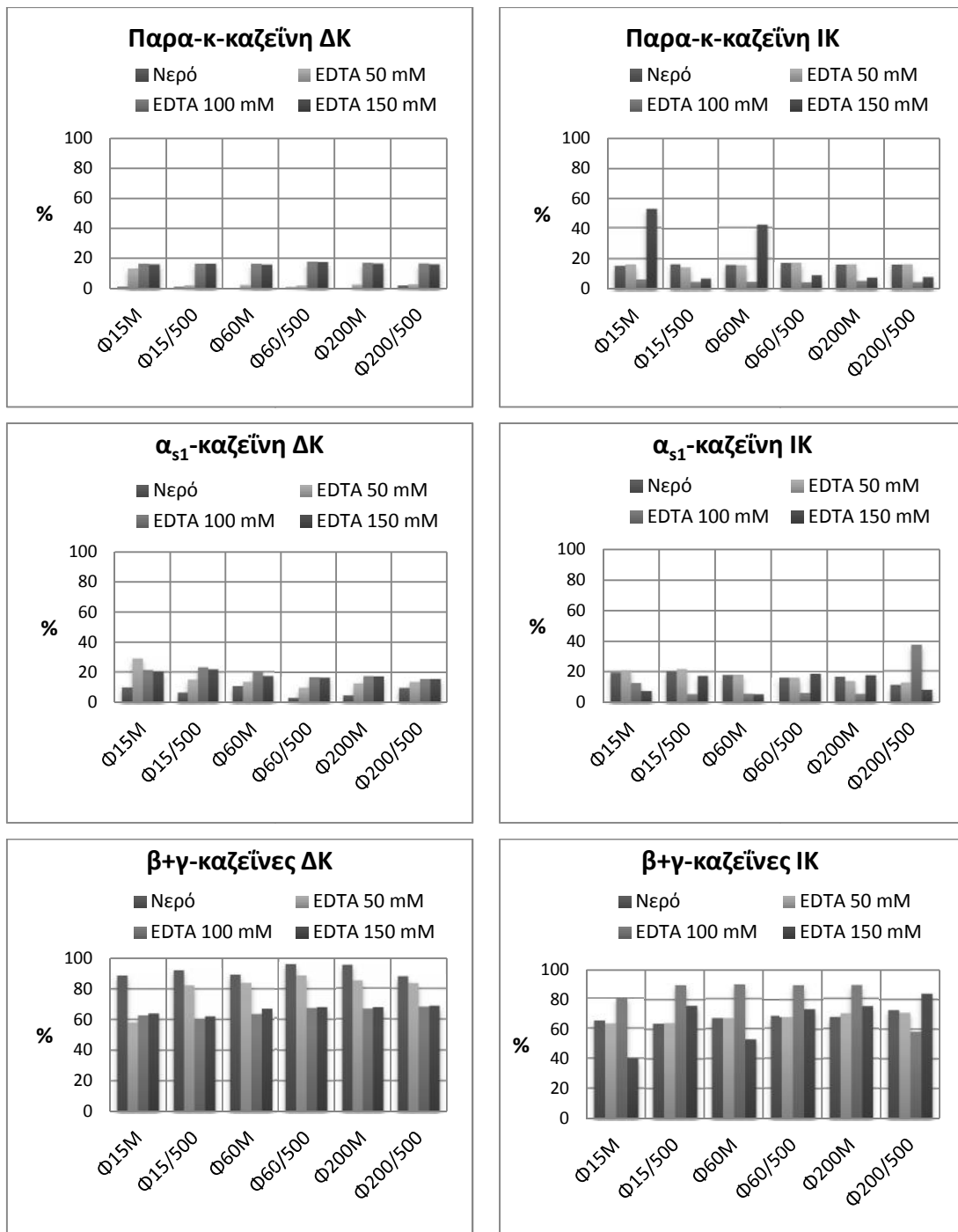
Εικόνα 4.7 Συγκριτική παρουσίαση της συμμετοχής των τριών κύριων μεμονωμένων καζεϊνικών κλασμάτων στις κατατομές των διαλυτοποιημένων (ΔΚ) και μη διαλυτοποιημένων καζεϊνών (ΙΚ) τυριών Φέτα και τύπου Φέτας επεξεργασμένου με Υπερυψηλή πίεση 200 MPa σε διάφορα διαλύματα ουρίας κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης. Το σύνολο της επιφάνειας των α_{s1}-, β+γ- και παρα-κ-καζεϊνών έχει θεωρηθεί ως 100.



Εικόνα 4.8 Συγκριτική παρουσίαση της συμμετοχής των τριών κύριων μεμονωμένων καζεϊνικών κλασμάτων στις κατατομές των διαλυτοποιημένων (ΔΚ) και μη διαλυτοποιημένων καζεϊνών (ΙΚ) τυριών Φέτα και τύπου Φέτας επεξεργασμένου με Υπερυψηλή πίεση 500 MPa σε διάφορα διαλύματα ουρίας κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης. Το σύνολο της επιφάνειας των α_{s1}-, β+γ- και παρα-κ-καζεϊνών έχει θεωρηθεί ως 100.



Εικόνα 4.9 Συγκριτική παρουσίαση της συμμετοχής των τριών κύριων μεμονωμένων καζεϊνικών κλασμάτων στις κατατομές των διαλυτοποιημένων (ΔΚ) και μη διαλυτοποιημένων καζεϊνών (ΙΚ) τυριών Φέτα και τύπου Φέτας επεξεργασμένου με Υπερυψηλή πίεση 200 MPa σε διάφορα διαλύματα EDTA κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης. Το σύνολο της επιφάνειας των α_{s1}-, β+γ- και παρα-κ-καζεϊνών έχει θεωρηθεί ως 100.



Εικόνα 4.10 Συγκριτική παρουσίαση της συμμετοχής των τριών κύριων μεμονωμένων καζεϊνικών κλασμάτων στις κατατομές των διαλυτοποιημένων (ΔΚ) και μη διαλυτοποιημένων καζεϊνών (ΙΚ) τυριών Φέτα και τύπου Φέτας επεξεργασμένου με Υπερυψηλή πίεση 500 MPa σε διάφορα διαλύματα EDTA κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης. Το σύνολο της επιφάνειας των α_{s1} -, $\beta+\gamma$ - και παρα-κ-καζεϊνών έχει θεωρηθεί ως 100.

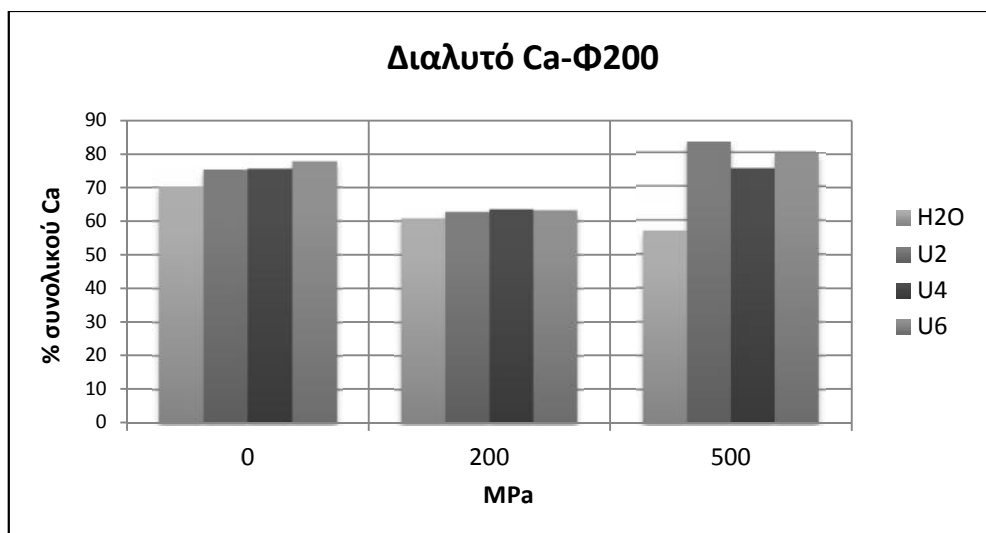
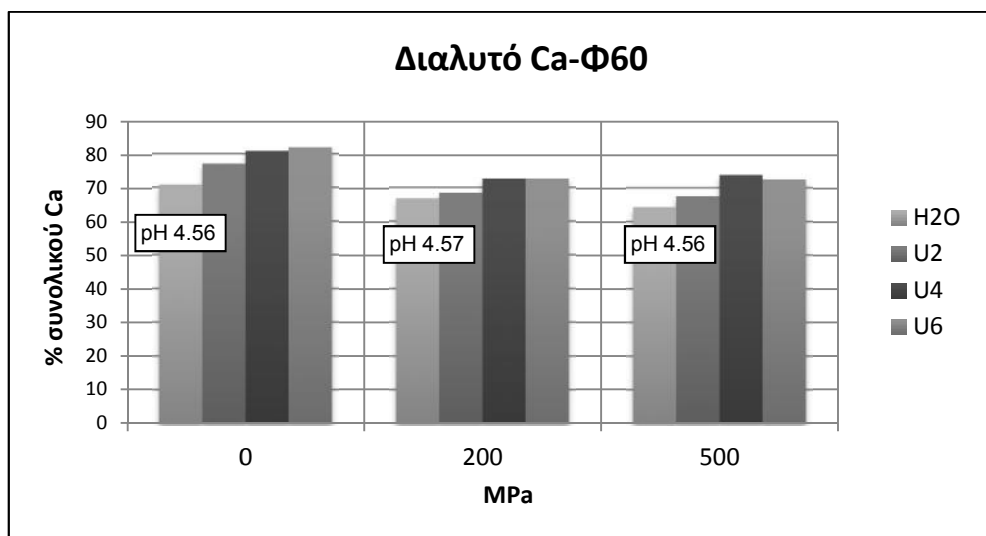
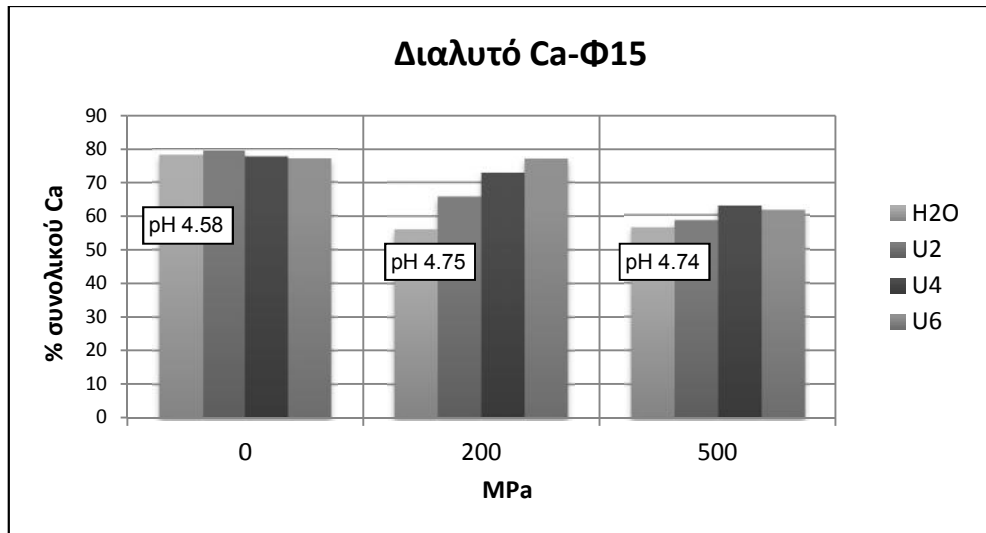
Όπως φαίνεται στον Πίνακα 4.10 και στην Εικόνες 4.11 και 4.12, το pH των τυριών που είχαν επεξεργασθεί με ΥΥΠ ήταν υψηλότερο από του μάρτυρα. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να αποδοθεί σε αντιστρεπτή μεταφορά του κολλοειδούς φωσφορικού ασβεστίου στον ορό του τυριού (Messens *et al.*, 1999), η οποία έχει αναφερθεί και για άλλα τυριά (Saldo *et al.*, 2002; Garde *et al.*, 2007).

Τόσο η ουρία όσο και το EDTA είχαν διαφορετική επίδραση στην περαιτέρω διαλυτοποίηση ασβεστίου από την παρακαζεϊνική μήτρα στο τυρί 15 ημερών, δηλαδή αμέσως μετά την εφαρμογή της ΥΥΠ στο επίπεδο των 200 MPa. Προφανώς η επίδραση της επεξεργασίας αυτής στην παρακαζεϊνική μήτρα σχετίζεται με ενίσχυση υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων αφού η παρουσία ουρίας προκάλεσε πολύ έντονη απελευθέρωση ασβεστίου σε σχέση με το μάρτυρα. Στις 60 ημέρες, η συμπεριφορά των ΥΥΠ τυριών και του μάρτυρα ήταν παρόμοιες, προφανώς εξαιτίας της αποκατάστασης ισορροπίας μεταξύ της τυρομάζας και της άλμης συντήρησης. Μετά από παρατεταμένη συντήρηση των τυριών ΥΥΠ 500 MPa μέχρι τις 200 ημέρες, η συμπεριφορά τους αλλάζει και χαμηλές συγκεντρώσεις ουρίας και EDTA προκαλούν περαιτέρω απελευθέρωση ασβεστίου από την παρακαζεϊνική μήτρα τους. Επομένως κάτω από αυτές τις συνθήκες είχαν ενισχυθεί οι δυνάμεις που καθορίζουν τη συγκρότηση της παρακαζεΐνης.

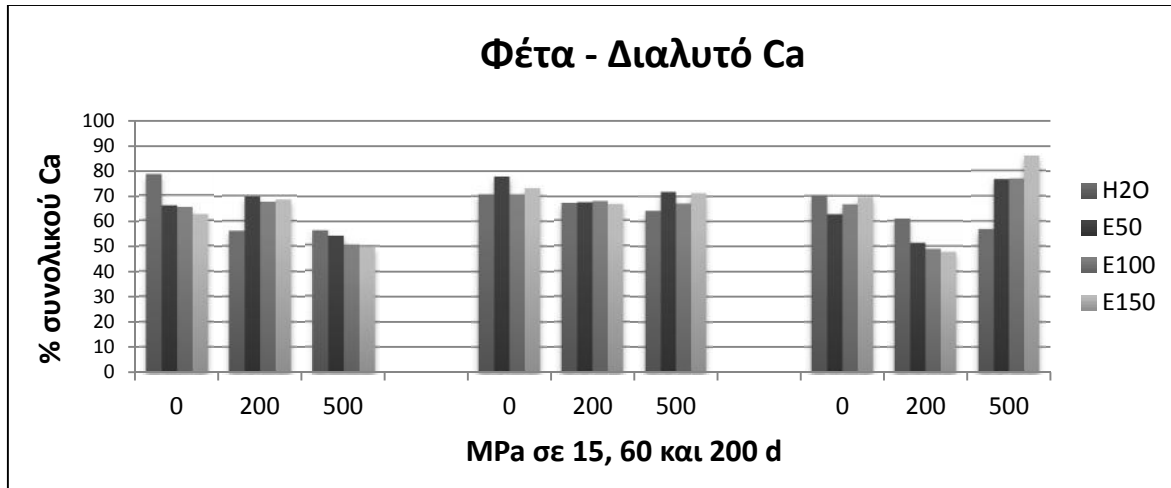
Τα παραπάνω είναι σε συμφωνία με τις τιμές του διαλυτού μαγνησίου, οι οποίες είναι σαφώς χαμηλότερες στα τυριά ΥΥΠ 500 MPa, γεγονός που δείχνει ότι η κολλοειδής φάση των αλάτων σε αυτά τα τυριά είναι περισσότερη από αυτή του μάρτυρα.

Πίνακας 4.10 Περιεκτικότητα των υπερκειμένων (ΔΚ) σε ασβέστιο και μαγνήσιο μετά από επεξεργασία των τυριών με ουρία και EDTA, εκφρασμένη ως ποσοστό της αντίστοιχης συνολικής περιεκτικότητας (υπολογισμοί όπως περιγράφονται στην παράγραφο 3.5.

Φέτα		%						
		N	U2	U4	U6	E50	E100	E150
Ca	Φ15M	78,2	79,4	77,7	77,1	65,9	65,3	62,4
	Φ15/200	56,1	65,9	72,9	77,1	69,6	67,6	68,4
	Φ15/500	56,4	58,5	62,8	61,6	54,2	50,7	49,9
	Φ60M	70,8	77,0	80,8	81,9	77,7	70,8	73,2
	Φ60/200	66,8	68,4	72,6	72,6	67,1	67,5	66,4
	Φ60/500	64,3	67,5	73,8	72,5	71,7	67,2	71,2
	Φ200M	70,3	75,3	75,6	77,8	62,7	66,7	69,5
	Φ200/200	60,9	62,8	63,6	63,3	51,4	48,9	47,8
	Φ200/500	56,9	83,1	75,3	79,7	76,6	76,9	85,9
Mg	Φ15M	125	118,8	125	118,8	118,8	118,8	112,5
	Φ15/200	97,5	102,5	105	105	97,5	102,5	110
	Φ15/500	85,2	88,9	96,3	96,3	92,6	92,6	92,6
	Φ60M	105,9	102,9	105,9	105,9	100	100	102,9
	Φ60/200	103,3	93,3	96,7	93,3	96,7	100	96,7
	Φ60/500	85,2	88,9	96,3	96,3	92,6	92,6	92,6
	Φ200M	116	120	120	116	108	116	124
	Φ200/200	100	100	103,7	103,7	100	100	107,4
	Φ200/500	96,3	96,3	85,2	92,6	92,6	92,6	96,3



Εικόνα 4.11 Διαλυτό ασβέστιο σε τυριά τύπου Φέτας επεξεργασμένα με ΥΥΠ μετά από επεξεργασία με διαλύματα ουρίας 2-6 Μ σε διάφορα στάδια της ωρίμανσης.



Εικόνα 4.12 Διαλυτό ασβέστιο σε τυριά τύπου Φέτας επεξεργασμένα με ΥΥΠ μετά από επεξεργασία με διαλύματα EDTA 50-150 mM σε διάφορα στάδια της ωρίμανσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο : ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Η μελέτη των παρακαζεϊνικής μήτρας των τυριών προϋποθέτει: α) την εξασθένηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μεμονωμένων καζεϊνών που μπορεί να επιτευχθεί με επεξεργασία της τυρομάζας με διαφορετικές συγκεντρώσεις ουρίας, και β) την διαλυτοποίηση του κολλοειδούς φωσφορικού ασβεστίου που μπορεί να γίνει με δέσμευση του ασβεστίου με EDTA.
- Οι προσδιορισμοί των απελευθερωμένων καζεϊνών και του διαλυτού ασβεστίου μετά από αυτές τις επεξεργασίες είναι πολύτιμα εργαλεία για τις μελέτες αυτού του τύπου.
- Αποδείχθηκε ότι παρότι η επεξεργασία με 6 M ουρία προκαλεί πολύ εκτεταμένη αποδιοργάνωση της παρακαζεϊνης, ένα μικρό μέρος των μεμονωμένων καζεϊνών που την απαρτίζουν παραμένει συνδεδεμένο ισχυρά με το κολλοειδές φωσφορικό ασβέστιο. Αυτές οι ισχυρές αλληλεπιδράσεις δεν επηρεάζονται από την προσθήκη ουρίας.
- Οι πρωτεολυτικοί παράγοντες που δραστηριοποιούνται κατά την ωρίμανση και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά διαφορετικών κατηγοριών τυριών επηρεάζουν τη σύσταση της παρακαζεϊνης και την επίδραση της ουρίας σε αυτή.
- Η απελευθέρωση καζεϊνών που επιτυγχάνεται είτε με ουρία, είτε με EDTA είναι επιλεκτική και ακολουθεί διαφορετικό πρότυπο στα δύο τυριά.
- Η αναλογία διαλυτό/ολικό ασβέστιο στη Γραβιέρα είναι πολύ χαμηλότερη, μόλις το 1/3 της Φέτας σε όλη τη διάρκεια της ωρίμανσης.
- Οι αλληλεπιδράσεις στην παρακαζεϊνική μήτρα επηρεάζονται από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του τυριού και εξασθενούν όταν το τυρί είναι αποτέλεσμα ωρίμανσης περισσότερο οξινομένου τυροπήγατος.
- Η παρακαζεϊνή όξινων τυριών διαμορφώνεται από υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις, δεσμούς υδρογόνου και το ασβέστιο που συνδέεται με αυτή, ενώ στα τυριά τύπου Γραβιέρα σημαντικό ρόλο παίζει το κολλοειδές φωσφορικό ασβέστιο.
- Η β-καζεϊνη είναι συνδεδεμένη κυρίως μέσω υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων στην παρακαζεϊνική μήτρα της Φέτας. Προφανώς σε αυτή τη διαμόρφωση που την κάνει «δυσπρόσιτη» οφείλεται η ανθεκτικότητά της στην υδρόλυση από την υπολειμματική χυμοσίνη που αναφέρεται για αυτό το τυρί.
- Η διαφορετική συμπεριφορά των καζεϊνών με ουρία και EDTA στα δύο τυριά αποδεικνύει πως οι διαφορετικές συνθήκες διαμορφώνουν ένα παρακαζεϊνικό δίκτυο με

διαφορετικά χαρακτηριστικά. Αυτά τα χαρακτηριστικά προφανώς αντανακλώνται στη ρεολογική και λειτουργική συμπεριφορά των δύο αυτών κατηγοριών τυριών.

● Από τη μελέτη των τυριών τύπου Φέτας που είχαν δεχθεί επεξεργασία με ΥΥΠ προέκυψε ότι η αύξηση του pH των τυριών που προκαλεί η ΥΥΠ ενισχύει τις αλληλεπιδράσεις στην παρακαζεϊνική μήτρα του τυριού. Οι διαφορές αυτές αποκαθίστανται καθώς η ωρίμανση προχωρά, ενώ μετά από ωρίμανση για > 6 μήνες η συμπεριφορά της παρακαζεΐνης των τυριών που επεξεργάσθηκαν στα 500 MPa διαφοροποιείται.

● Η συγκριτική αυτή μελέτη συμβάλλει στην καλύτερη κατανόηση της επίδρασης των διαφόρων επεξεργασιών του τυροπήγματος καθώς και της ωρίμανσης στα χαρακτηριστικά και τη συμπεριφορά των τυριών, ενώ παράλληλα, μπορεί να βοηθήσει στο σχεδιασμό νέων τεχνολογικών παρεμβάσεων.

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ali A.E. Andrews A.T., Cheeseman G.C., (1980). Factors influencing casein distribution in cold-stored milk and their effects on cheese-making parameters. *J. Dairy Research*, 47, 383-391.
- Aoki T., Yamada N., Kako Y., Imamura T. (1986). Dissociation during dialysis of casein aggregates cross-linked by colloidal calcium phosphate in bovine casein micelles.
- Bringe N.A., Kinsella J.A., (1991). Effects of cations on the rate of acidic coagulation of casein micelles : the possible roles of different forces. *J Dairy Research*, 58, 195-209.
- Brullè G., Lenoir J. & Remeuf F. (1997). La micelle de la caséine et la coagulation du lait. In : *Le Fromage*, A. Eck and J.-C. Gillis (editors), Lavoisier Tec & Doc, pp. 7-41.
- Buchheim W., Lund S. and Scholtissek J., (1989). Vergleichende Untersuchungen zur Struktur und Grösse von Caseinmicellen in der Milch verschiedener Species. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 41: 253-265.
- Considine T., Patel H.A., Anema S.G., Singh H., & Creamer L.K. (2007). Interactions of milk proteins during heat and high hydrostatic pressure treatment-A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8: 1-23.
- Dalgleish D.G., (1982). The enzymatic coagulation of milk. *Developments in Dairy Chemistry. Vol.1, Proteins* (ed P.F.Fox), Appl. Sci. Publ., London, p.169.
- Dalgleish D.G., Law A.J.R., (1988). pH-induced dissociation of bovine casein micelles. I. Analysis of liberated caseins. *J. Dairy Research*, 55, 529-538.
- Dalgleish D.G., (1999). The enzymatic coagulation of milk. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol.1, 2nd ed.* (ed P.F. Fox), Chapman and Hall, London, 69-100.
- Dalgleish D.G., Spagnuolo P.A. and Goff H.D., (2004). A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field-emission scanning electron microscopy. *International Dairy Journal*, 14: 1025-1031.
- Dolby, R.M. (1941). The control of acid development in Cheddar cheesemaking. *N.Z.J. Dairy Sci. Technol.*, 22: 289A-302A.
- Fife R.L., McMahon D.J., Oberg C.J., (1996). Functionality of low fat Mozzarella cheese. *J. Dairy Sci.*, 79: 1903–1910.
- Fox, P.F. (1970). Influence of aggregation on the susceptibility of casein to proteolysis. *J. Dairy Res.*, 37: 173-180.

- Fox P.F., McSweeney P.L.H., (2003). Advanced dairy chemistry (Vol.1), Proteins (3rded.) New York, NY, USA: Kluwer Academic-Plenum Publishers.
- Fox P.F. and Brodkorb A., (2008). The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. *International Dairy Journal*, 18: 677-684.
- Gagnaire, V., Pierre, A., Mollè, D., & Lèonil, J. (1996). Phosphopeptides interacting with colloidal calcium phosphate isolated by tryptic hydrolysis of bovine casein micelles. *Journal of Dairy Research*, 63: 405–422.
- Gagnaire V., Tritel E., Le Graët Y. & Lèonil J. (2002). Role of electrostatic interactions in the curd of Emmental cheese. *International Dairy Journal*, 12: 601-608.
- Garde S., Arques J.L., Gaya P., Medina M., Nunez M. (2007). Effect of high-pressure treatments on proteolysis and texture of ewes' raw milk La Serena cheese. *International Dairy Journal*, 17: 1424-1433.
- Griffin M.C.A., Lyster R.L.J., Price J.C., (1988). The disaggregation of calcium-depleted casein micelles. *European Journal of Biochemistry*, 174: 339-343.
- Guinee T.P., Auty M.A.E., Mullins C., (1999). Observations on the microstructure and heat-induced changes in the viscoelasticity of commercial cheeses. *Aust. J. Dairy Technol.*, 54: 84–89.
- Guinee, T.P., Feeney, E.P., Auty, M.A.E. and Fox, P.F. (2002). Effect of pH and calcium concentration on some textural and functional properties of Mozzarella cheese. *J. Dairy Sci.*, 85: 1655-1669.
- Hassan A., Johnson M.E., Lucey J.A., (2004). Changes in the proportions of soluble and insoluble calcium during ripening of Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.*, 87: 854–862.
- Hipp N.J., Groves M.L., Custer J.H., McMeekin T.L., (1952). Separation of α - β - and γ -casein. *J. Dairy Sci.*, 35, 272-281.
- Holt C., Davies D.T., Law A.J.R., (1986). Effects of colloidal calcium phosphate content and free calcium ion-concentration in the milk serum on the dissociation of bovine casein micelles. *J. Dairy Research*, 53, 557-571.
- Holt C., (1992). Structure and stability of bovine casein micelles. *Advances in Protein Chemistry*, 43: 63-153.
- Horne D.S., (1998). Casein interactions: Casting light on the black boxes, the structure in dairy products. *Int. Dairy J.*, 8: 171–177.
- Huppertz T., Smiddy M.A., Upadhyay V.K., & Kelly A.L. (2006). High-pressure-induced changes in bovine milk: a review. *International Journal of Dairy Technology*, 59: 58-66.

- Huppertz T., Upandhyay V.K., Kelly A.L. and Tamime A.Y., (2006). Constituents and Properties of Milk from Different Species. Brined cheeses, (edr A.Y. Tamime), Blackwell Publishing Ltd, 1-42.
- Johnson M.E., Lucey J.A., (2006). Calcium: A key factor in controlling cheese functionality. *Aust. J. Dairy Technol.*, 61: 147–153.
- Johnston D.E., & Darcy P.C. (2000). The effects of high pressure treatment on immature Mozzarella cheese. *Milchwissenschaft*, 55: 617-620.
- Johnston D.E., O’ Hagan M., & Balmer D.W. (2002). Effects of high pressure treatment on the texture and cooking performance on half-fat Cheddar cheese. *Milchwissenschaft*, 57: 198-201.
- Joshi, N.S., Muthukumarappan, K. and Dave, R.I. (2002). Role of soluble and colloidal calcium contents on functionality of salted and unsalted part-skim Mozzarella cheese. *Aust. J. Dairy Technol.*, 57: 203-210.
- Joshi, N.S., Muthukumarappan, K. and Dave, R.I. (2003). Understanding the role of calcium in functionality of part skim Mozzarella cheese. *J. Dairy Sci.*, 86: 1918-1926.
- Juan B., Ferragut V., Guamis B., Buffa M., & Trujillo A. J. (2004). Proteolysis of a high pressure-treated ewe’s milk cheese. *Milchwissenschaft*, 59: 616-619.
- Juan B., Ferragut V., Guamis B., & Trujillo A.J. (2008). The effect of high-pressure treatment at 300 MPa on ripening of ewes’ milk cheese. *International Dairy Journal*, 18: 129-138.
- Keller B., Olson N.F., Richardson T., (1974). Mineral retention and rheological properties of Mozzarella cheese made by direct acidification. *J. Dairy Sci.*, 57: 174–180.
- Lawrence R.C., Gilles J., Creamer L.K., (1983). The relationship between cheese texture and flavor. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.*, 18: 175–190.
- Lawrence, R.C. and Gilles, J. (1987). Cheddar cheese and related dry-salted cheese varieties. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (Ed. P.F. Fox). London, Elsevier Applied Science, pp 1-44.
- Lee M.-R., Johnson M.E., Lucey J.A., (2005). Impact of modifications in acid development on the insoluble Ca content and rheological properties of Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.*, 88: 3798–3809.
- Lefebvre-Cases E., Gastaldi E., Vidal V., Marchesseau S., Lagaube a., Cuq J.L., traodo de la Fuente B. (1998). Identification of interactions among casein gels using dissociating chemical agents. *Journal of Dairy Science*, 81: 932-938.

- López-Fandiño, R. (2006). High pressure-induced changes in milk proteins and possible applications in dairy technology. *International Dairy Journal*, 16: 1119-1131.
- Lucey J.A., Fox P.F., (1993). Importance of calcium and phosphate in cheese manufacture: A review. *J. Dairy Sci.*, 76: 1714–1724.
- Lucey A.J., Johnson M.E., Horne D.S., (2003). Perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. *J. Dairy Sci.*, 86: 2725–2743.
- Lucey, J. A., Mishra, R., Hassan, A. and Johnson, M.E. (2005). Rheological and calcium equilibrium changes during the ripening of Cheddar cheese. *Int. Dairy J.*, 15: 645-653.
- Lucey A.J., (2008). Some perspectives on the use of cheese as a food ingredient. *Dairy Science Technology*, 88: 573-594.
- McGann T.C.A., Fox P.F., (1974). Physicochemical properties of casein micelles reformed from urea-treated milk. *J. Dairy Research*, 41, 45-53.
- McMahon D.J., Oberg C.J., (1998). Role of calcium and sodium in functionality of Mozzarella cheese, in: Proceedings 35th Annual Marschall Italian & Specialty Cheese Seminar, Sept. 16–17, Madison, WI, USA, pp. 1–9.
- Messens W., Estepar-Garcia J., Dewettinck K., & Huygherbaert A. (1999). Proteolysis of high-pressure-treated Gouda cheese. *International Dairy Journal*, 9: 775-782.
- Moatsou G., Samolada M., Katsabeki A. & Anifantakis E. (2004). Casein fraction of orine milk from indigenous Greek breeds. *Le Lait*, 84, 285-296.
- Moatsou G., Moschopoulou E., Mollè D., Gagnaire V., Kandarakis I. and Léonil J., (2008). Comparative study of the protein fraction of goat milk from the indigenous breed and from international breeds. *Food chemistry*, 106: 509-520.
- Moir, G.M. (1931). Pasteurized milk for Cheddar cheesemaking. II. The mineral content of Cheddar cheese. *J. Dairy Res.*, 2: 176-178.
- Morris H.A., Holt C., Brooker B.E., Banks J.M., Manson W., (1988). Inorganic constituents of cheese: analysis of juice from one-month old Cheddar cheese and the use of light and electron microscopy to characterize the crystalline phases. *J. Dairy Res.*, 55: 255–268.
- Nozali Y. and Tanford C. (1963). The solubility of amino acids and related compounds in aqueous urea solutions. *Journal Of Biological Chemistry*, 238: 4074-4081.
- Oakenfull D., Pearce T. and Barley W.R. (1997). Protein gelation. *Food Proteins And Their Applications*. (Eds S. Damodaran & A. Paraf). Marcel Dekker, Inc., New York, 111-142.

- O'Connor P. and Fox P.F., (1977). The proteins and salts of some non-bovine milk. *Journal of Dairy Research*, 44: 607-609.
- O'Mahony, J.A., Lucey, J.A. and McSweeney, P.L.H. (2005). Chymosin-mediated proteolysis, calcium solubilization, and texture development during the ripening of Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.*, 88: 3101-3114.
- O'Mahony J.A., McSweeney P.L.H., Lucey J.A., (2006). A model system for studying the effects of colloidal calcium phosphate concentration on the rheological properties of Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.*, 89: 892–904.
- O'Mahony J.A., McSweeney P.L.H., Lucey J.A., (2008). Observations on the rheological and functional properties of model cheeses made using milk protein concentrate solutions with different ratios of α s1- β -casein. *Milchwissenschaft*, 63: 145–148.
- Orlien V., Boserup L., Olsen K., (2010). Casein micelle dissociation in skim milk during high-pressure treatments : Effects of pressure, pH and temperature. *J Dairy Search*, 93, 12-18.
- O'Reilly C.E., Murphy P.M., Kelly A.L., Guinee T .P., Auty M.A.E., Beresford T.P. (2002). The effect of high pressure treatment on the functional and rheological properties of Mozzarella cheese. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 3(1): 3-9.
- O'Reilly C.E., Kelly A. L., Oliveira J. C., Murphy P. M., Auty M. A. E., & Beresford T. P. (2003). Effect of varying high-pressure treatment conditions on acceleration of ripening of cheddar cheese. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 4: 277-284.
- Saldo J., McSweeney P.L.H., Sendra E., Kelly A. L., & Guamis B. (2002). Proteolysis in caprine milk cheese treated by high pressure to accelerate cheese ripening. *International Dairy Journal*, 12: 35-44.
- Schmidt D.G., (1982). Association of caseins and casein micelle structure. Developments of Dairy Chemistry (Vol.1), Proteins (edr P.F. Fox) Applied Science Publishers LTD, Essex, England, 61-86.
- Sheehan, J.J., Oliveira, J.C., Kelly, A.L., McSweeney, P.L.H. (2006). Effect of cook temperature on primary proteolysis and predicted residual chymosin activity of a semi-hard cheese manufactured using thermophilic cultures. *International Dairy Journal*, 17: 826-834.

- Sood S.M., Sidhu K.S. and Dewan R.K. (1979). Heat stability and the voluminosity and hydration of casein micelles from milks of different species. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 14: 217-225.
- Reparet J.-M., Noël Y., (2003). Relation between a temperature-sweep dynamic shear test and functional properties of cheeses. *Lait*, 83: 321–333.
- Richardson B.C., Creamer L.K., Pearce K.N. and Munford R.E., (1974). Comparative micelle structure. II. Structure and composition of casein micelles in ovine and caprine milk as compared to those in bovine milk. *Journal of Dairy Research*, 41: 239-247.
- Udabage P., McKinnon I.R., Augustin M.A., (2000). Mineral and casein equilibria in milk : effects of added salts and calcium-chelating agents. *J. Dairy Research*, 67, 361-370.
- Van Slyke, L.L. and Bosworth, A.W. (1907). I. Some of the first chemical changes in Cheddar cheese. II. The acidity of the water-extract of Cheddar cheese. Tech. Bull. New York State Agric. Exp. Stat. 4, 1-22.
- Walstra P., Guerts T.J., Noomen A., Jellema A. and van Boekel M.A.J.S., (1999). Dairy Technology – Principles of Milk Properties and Processes. Marcal Dekker Inc., New York.
- Walstra P., Wouters J. T. M. and Guerts T.J., (2006). Dairy Science and Technology, (2nd edition), Boca Raton FL, USA: CRC Press.
- Ward B.R., Goddard S.J., Augustin M.A., McKinnon I.R., (1997). EDTA- induced dissociation of casein micelles and its effect on foaming properties of milk. *J. Dairy Research*, 64, 495-504.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ανυφαντάκης Ε.Μ. (2004). Τυροκομία. Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα.
- Μοιάτσου Γ., Καμιναρίδης Σ. (2009). Γαλακτοκομία. Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Χρωματογραφήματα :

Φέτας (σελίδες II – IX)

Γραβιέρας Κρήτης (σελίδες X – XVII)

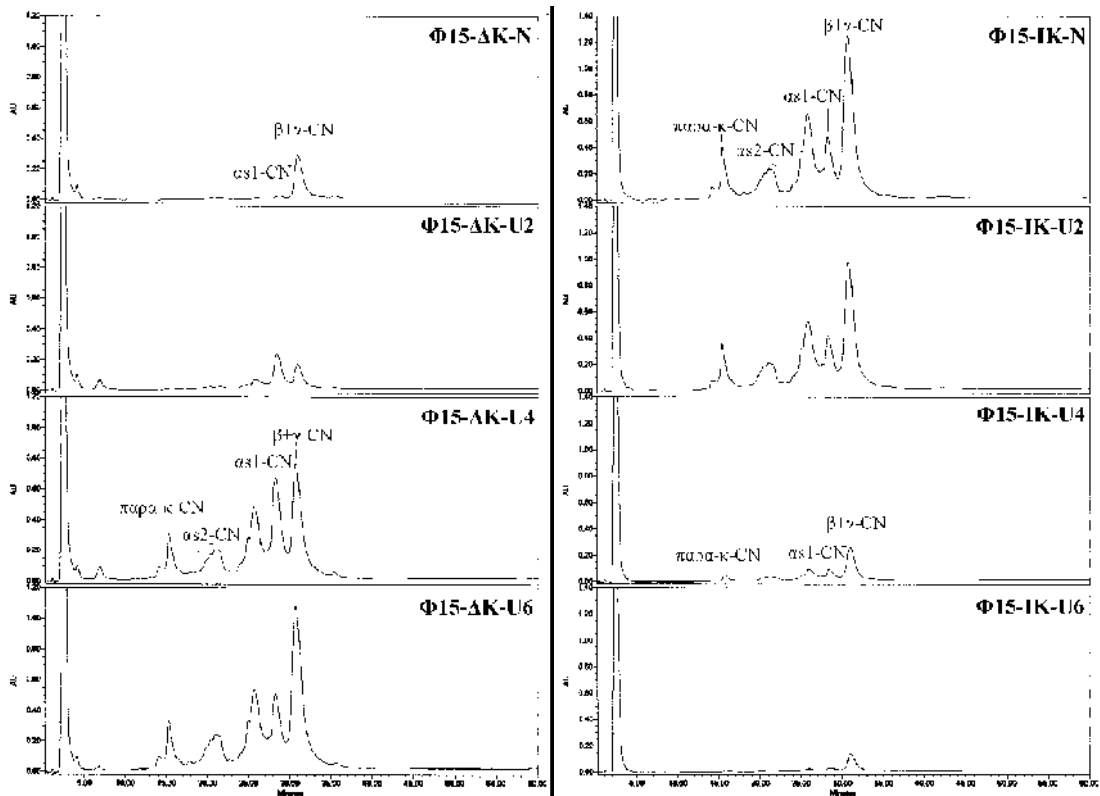
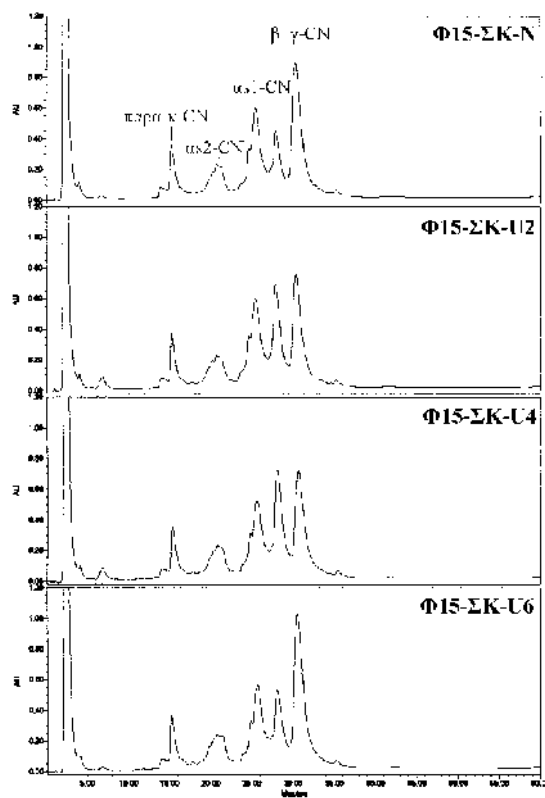
Φέτας Μάρτυρα πριν ΥΥΠ (σελίδες XVIII – XXIII)

Φέτας με ΥΥΠ 200 MPa (σελίδες XXIV – XXIX)

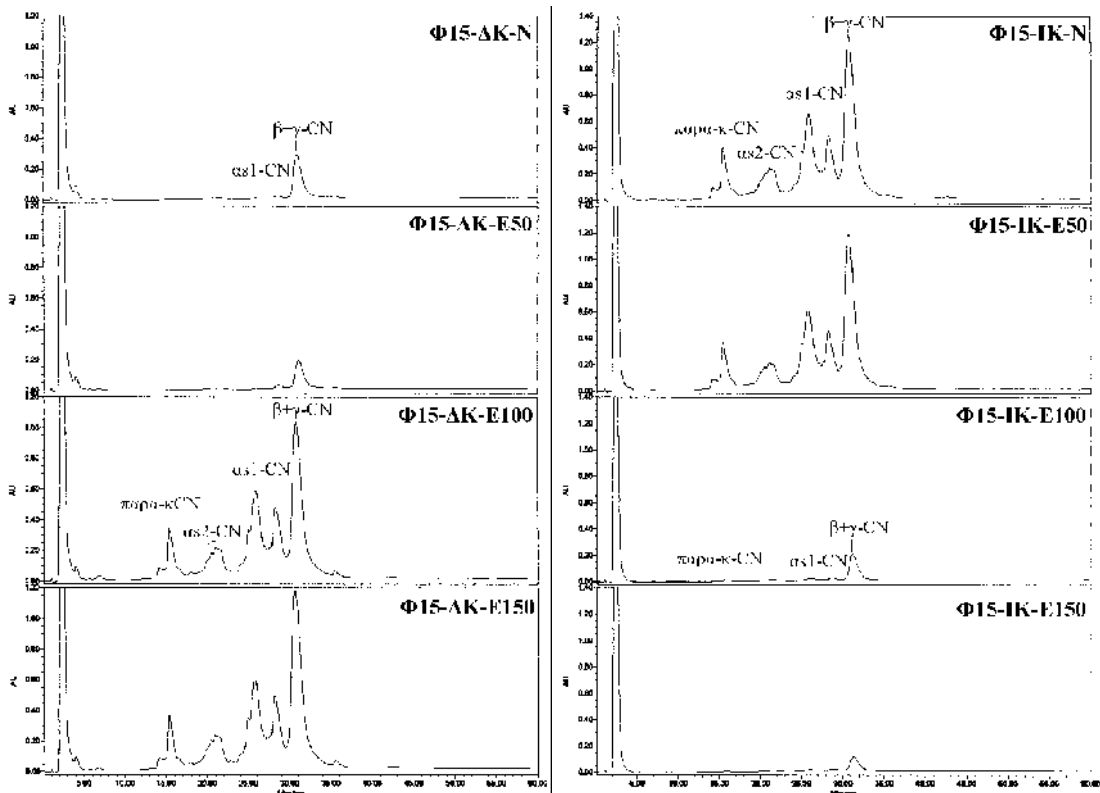
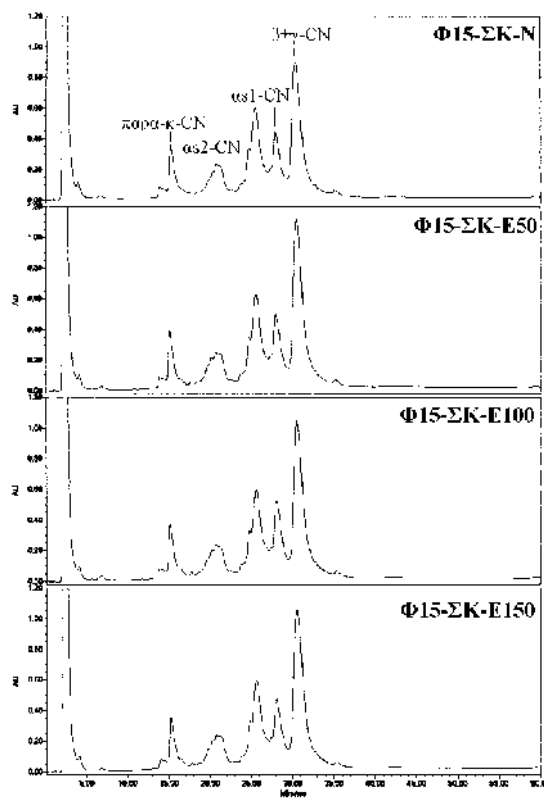
Φέτας με ΥΥΠ 500 MPa (σελίδες XXX – XXXV)

Υπολογισμός και τιμές τέφρας (σελίδα XXXVI)

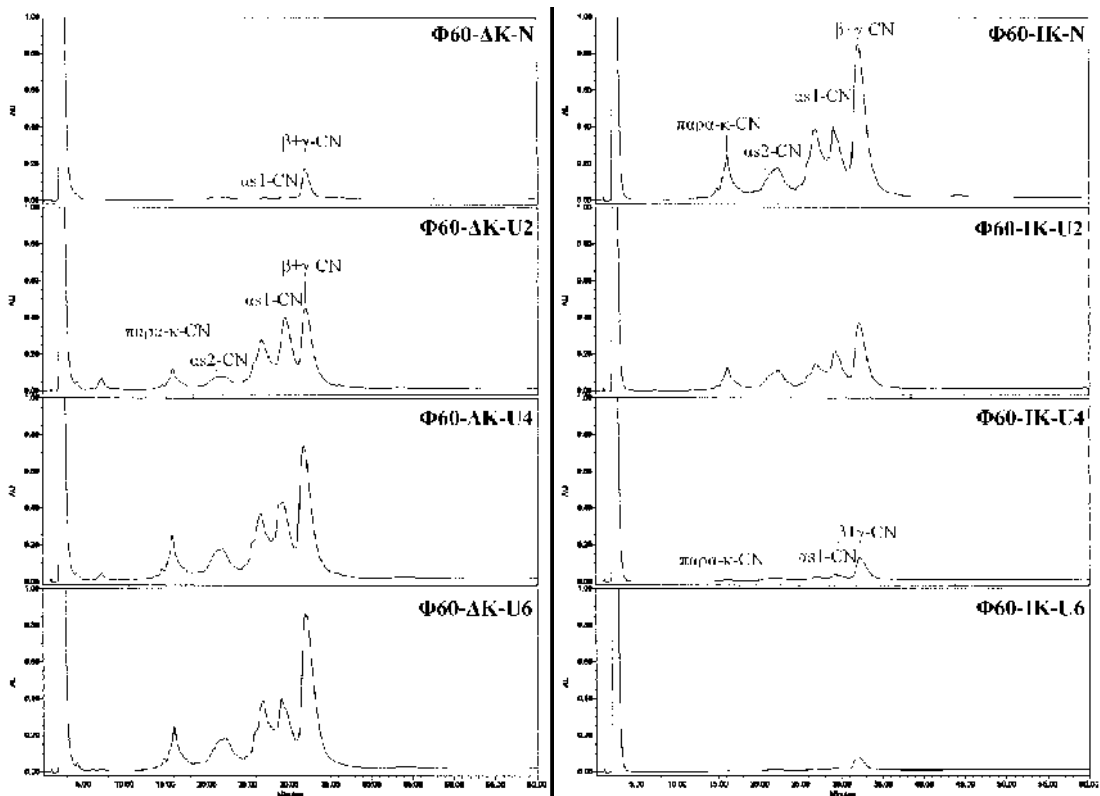
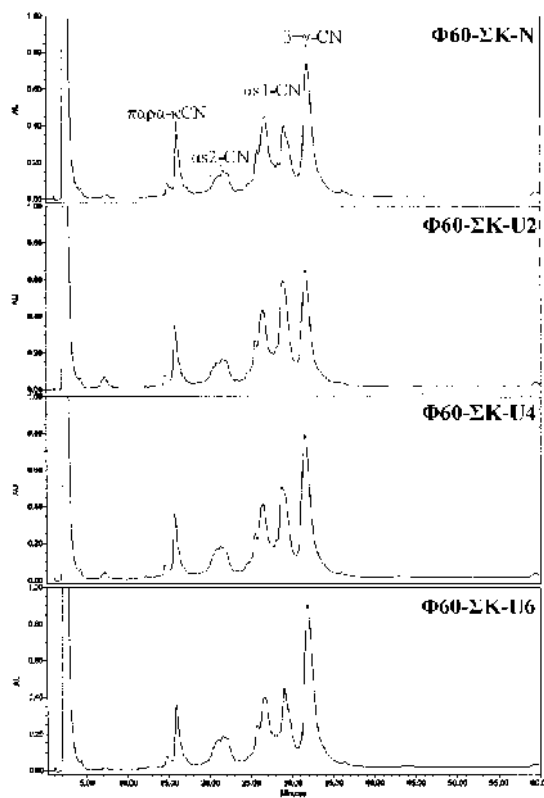
Πραγματική συγκέντρωση στοιχείων Ca, Mg, K και Na (σελίδα XXXVII)



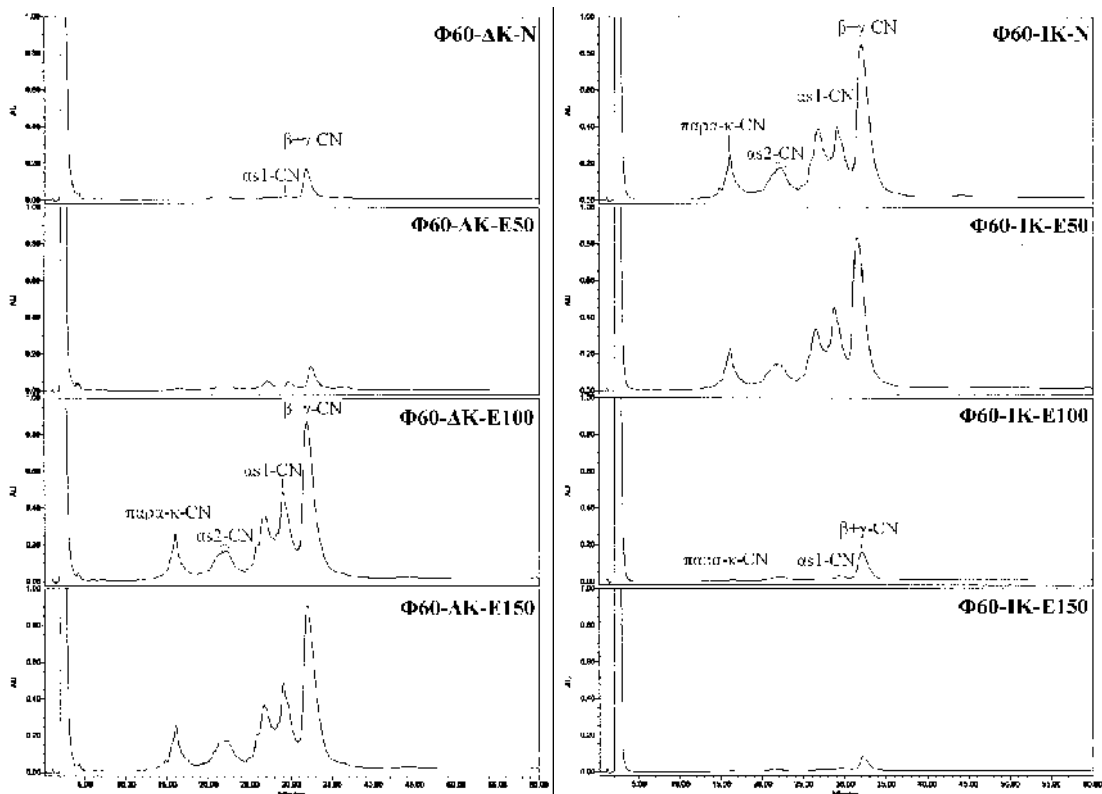
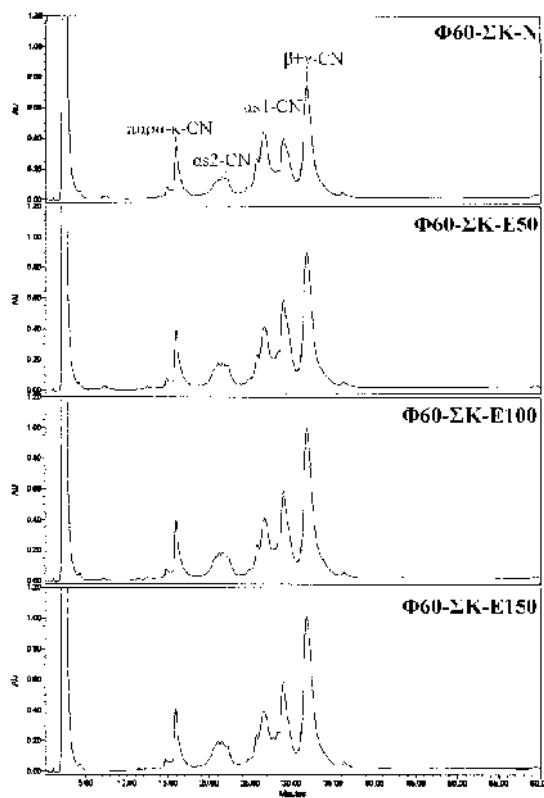
Εικόνα 1. Σύγκριση χρωματογραφημάτων συνολικής καζεΐνης, διαλυτής καζεΐνης και ιζήματος καζεΐνης Φέτας 15 ημερών με νερό και συγκεντρώσεις ουρίας 2, 4 και 6 Μ.



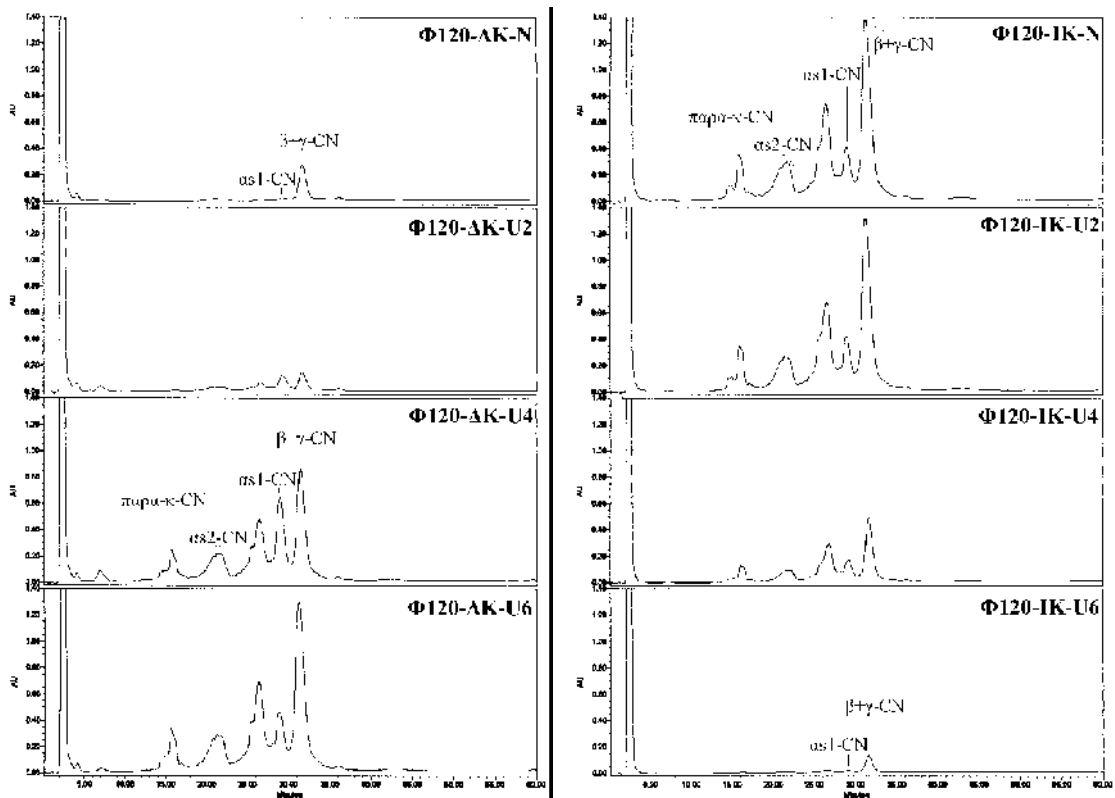
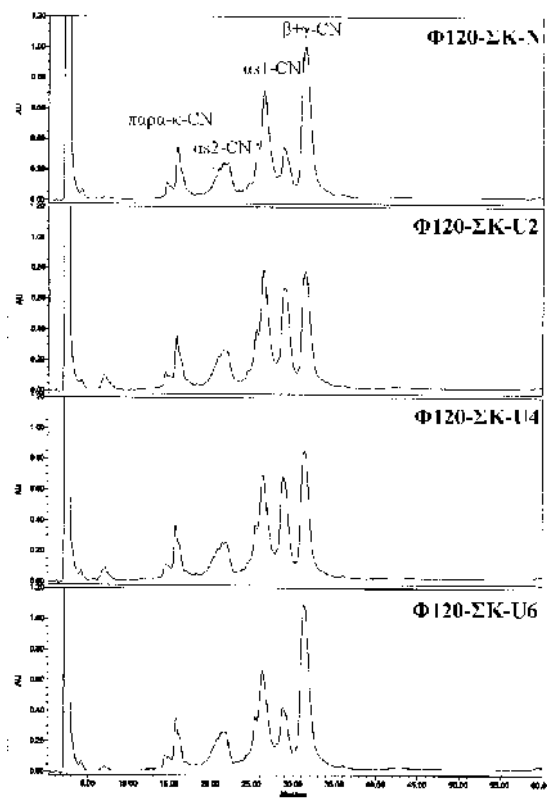
Εικόνα 2. Σύγκριση χρωματογραφημάτων συνολικής καζεΐνης, διαλυτής καζεΐνης και ιζήματος καζεΐνης Φέτας 15 ημερών με νερό και συγκεντρώσεις EDTA 50, 100 και 150 mM.



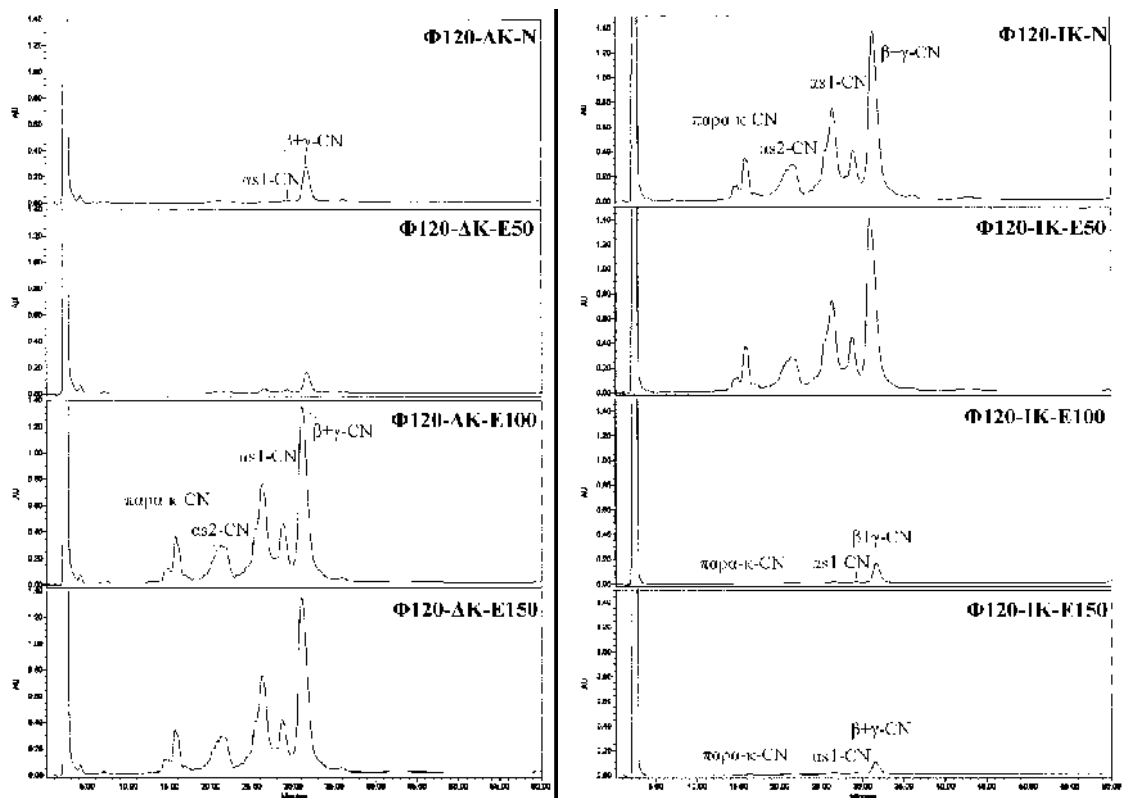
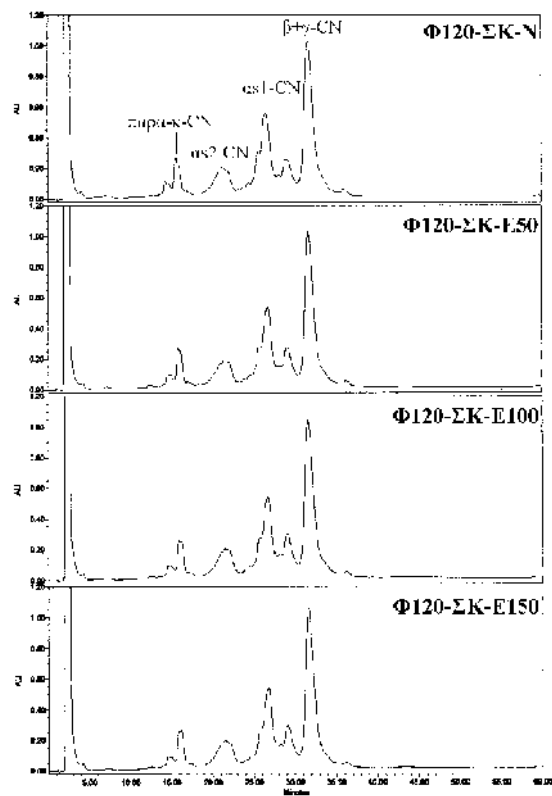
Εικόνα 3. Σύγκριση χρωματογραφημάτων συνολικής καζεΐνης, διαλυτής καζεΐνης και ιζήματος καζεΐνης Φέτας 60 ημερών με νερό και συγκεντρώσεις ουρίας 2, 4, και 6 Μ.



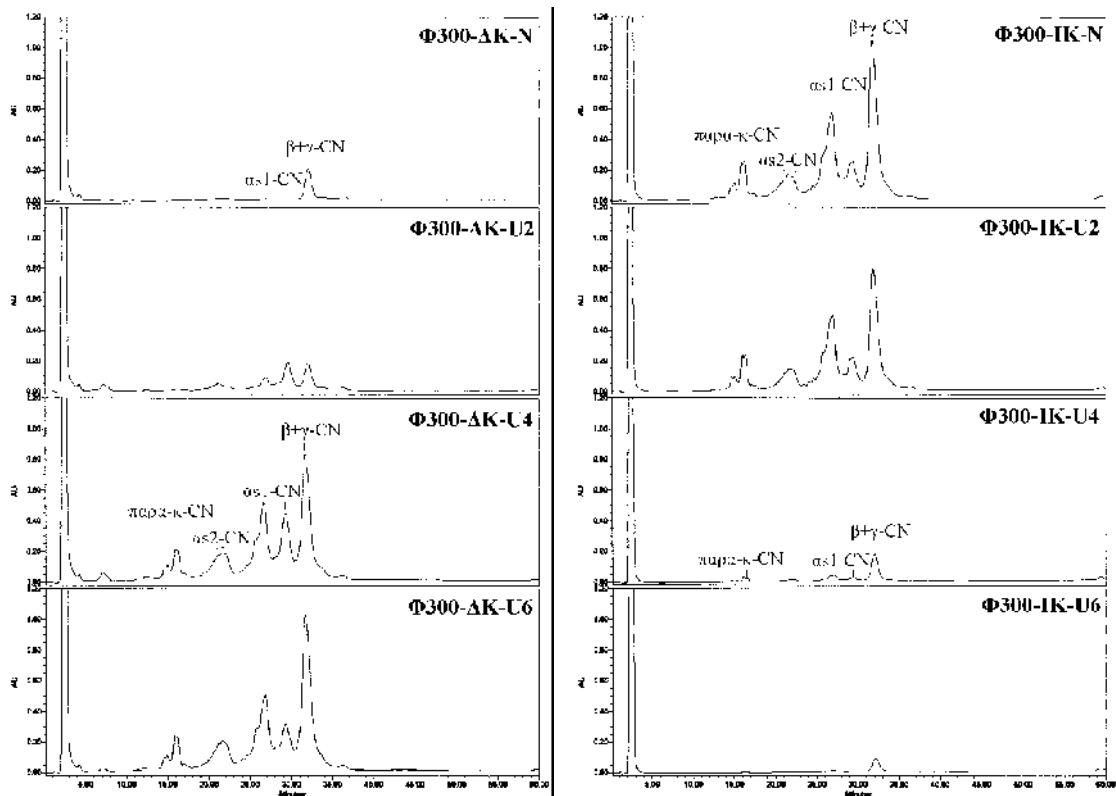
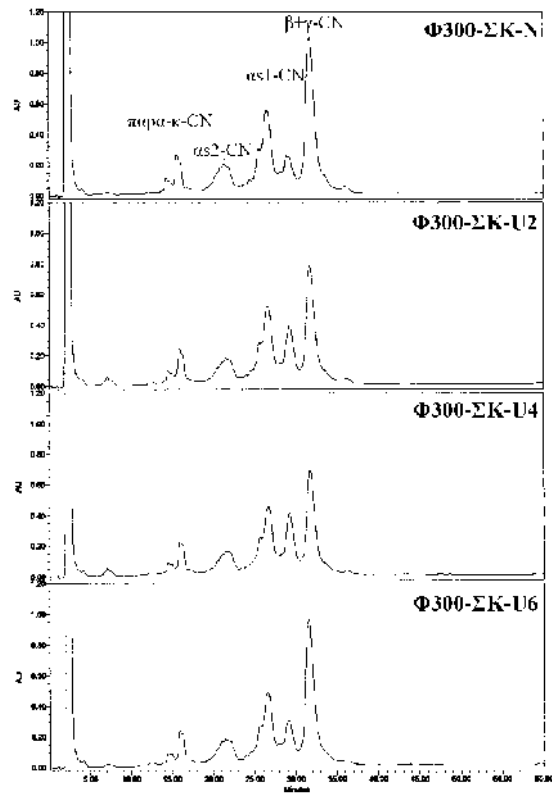
Εικόνα 4. Σύγκριση χρωματογραφημάτων συνολικής καζεΐνης, διαλυτής καζεΐνης και ιζήματος καζεΐνης Φέτας 60 ημερών με νερό και συγκεντρώσεις EDTA 50, 100 και 150 mM.



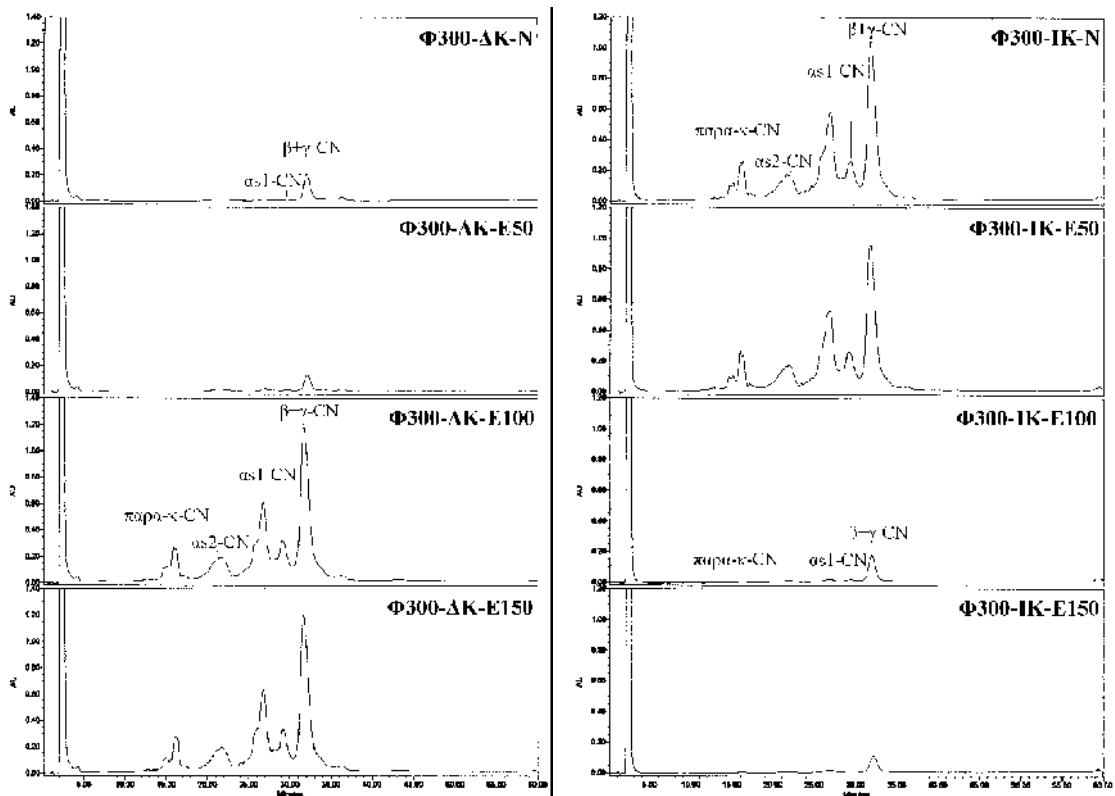
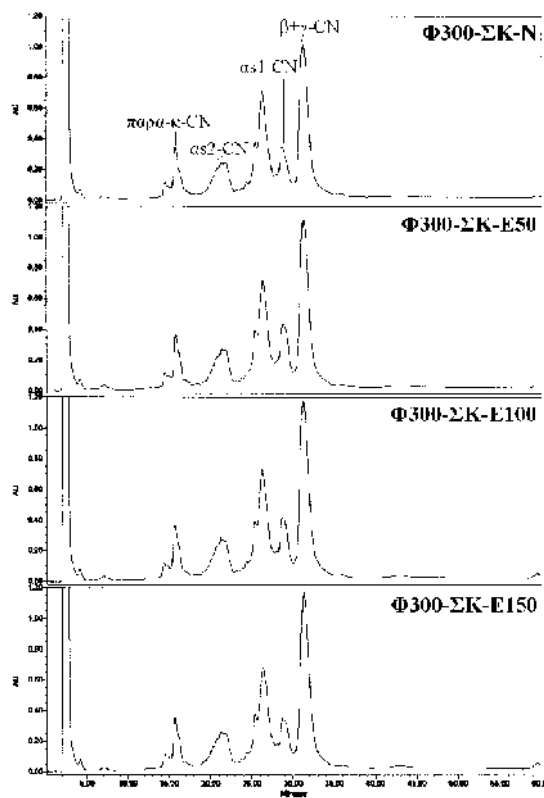
Εικόνα 5. Σύγκριση χρωματογραφημάτων συνολικής καζεΐνης, διαλυτής καζεΐνης και ιζήματος καζεΐνης Φέτας 120 ημερών με νερό και συγκεντρώσεις ουρίας 2, 4, και 6 Μ.



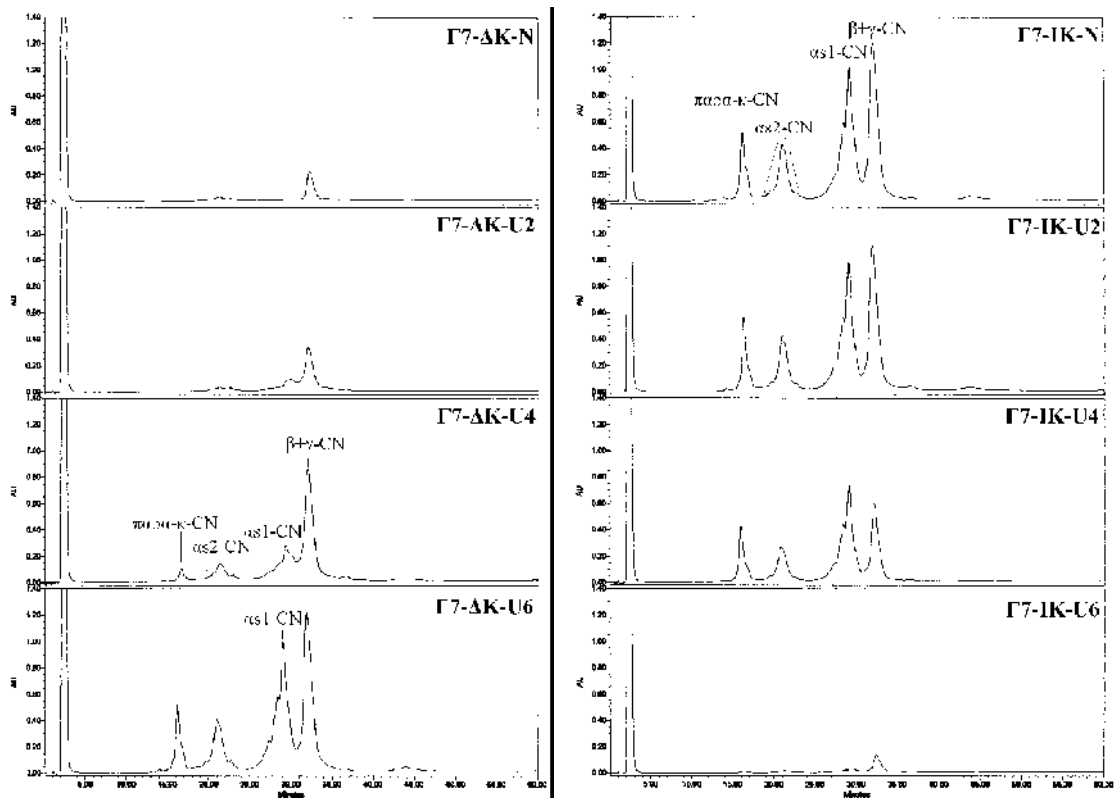
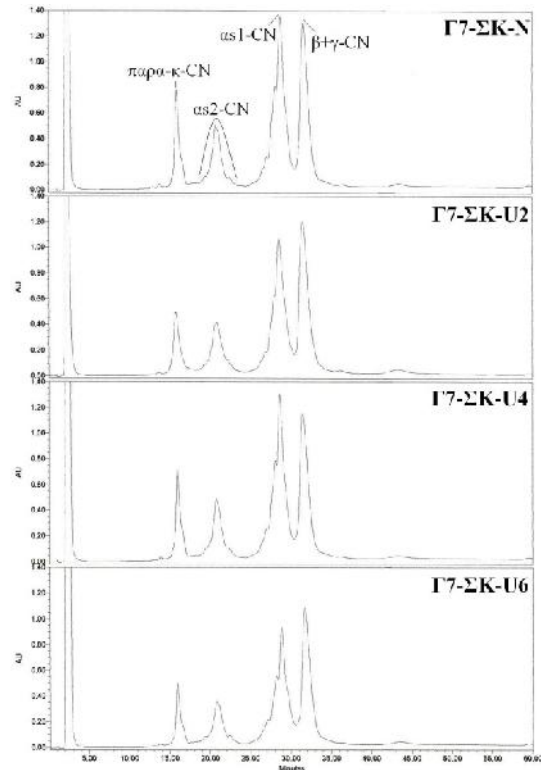
Εικόνα 6. Σύγκριση χρωματογραφημάτων συνολικής καζεΐνης, διαλυτής καζεΐνης και ιζήματος καζεΐνης Φέτας 120 ημερών με νερό και συγκεντρώσεις EDTA 50, 100 και 150 mM.



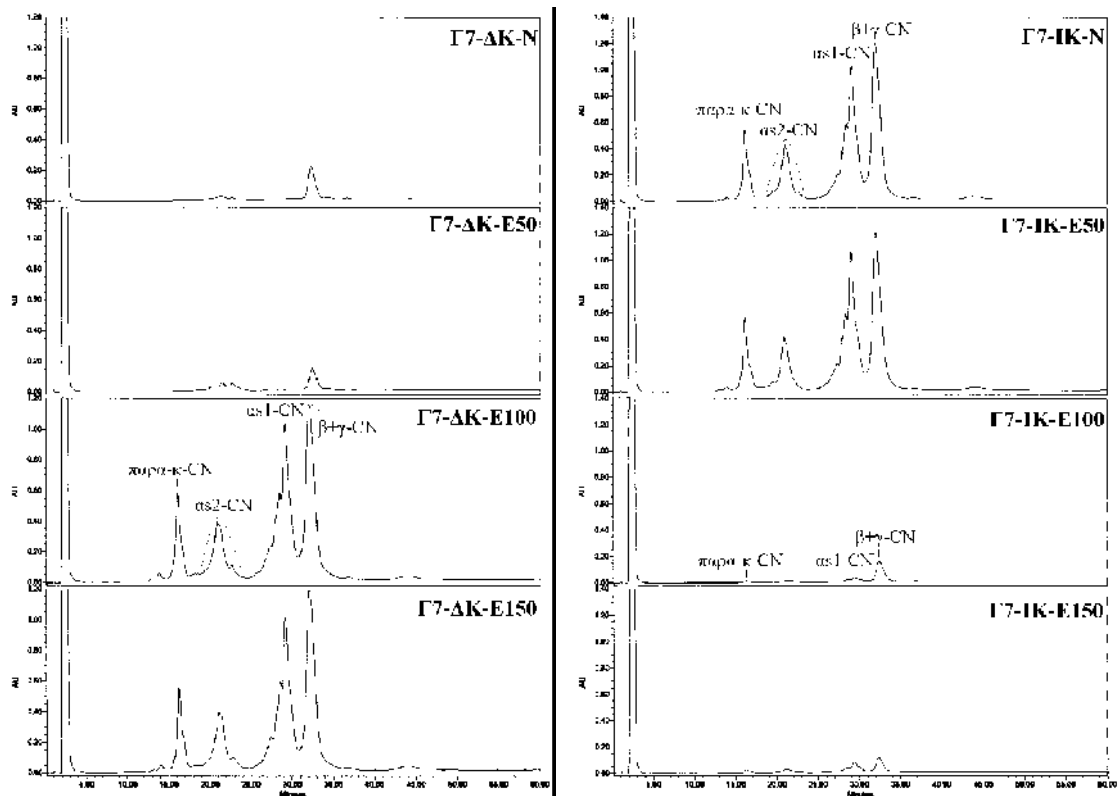
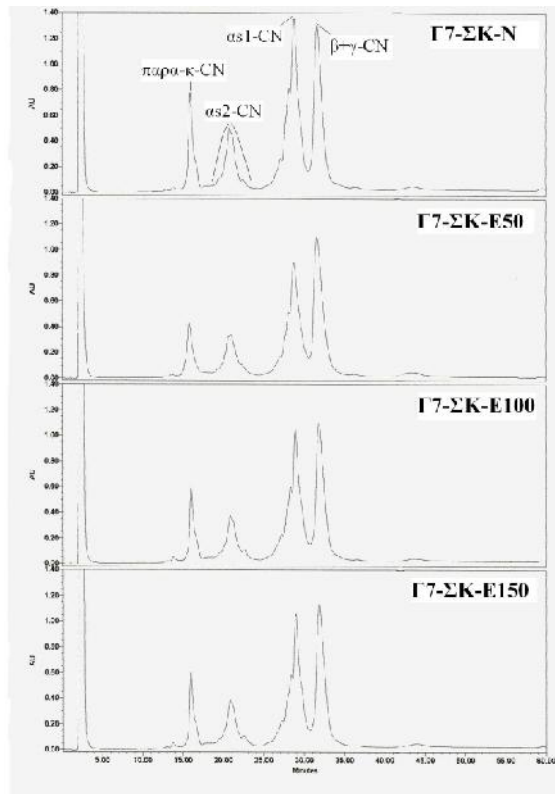
Εικόνα 7. Σύγκριση χρωματογραφημάτων συνολικής καζεΐνης, διαλυτής καζεΐνης και ιζήματος καζεΐνης Φέτας 300 ημερών με νερό και συγκεντρώσεις ουρίας 2, 4, και 6 Μ.



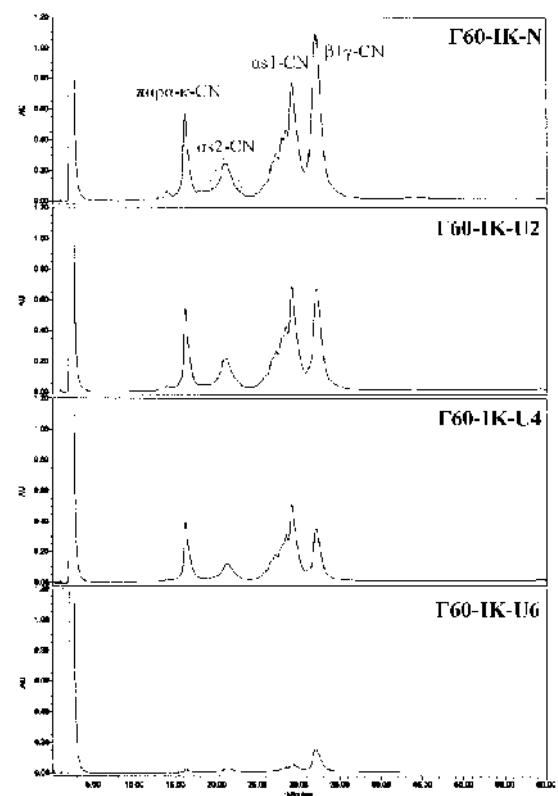
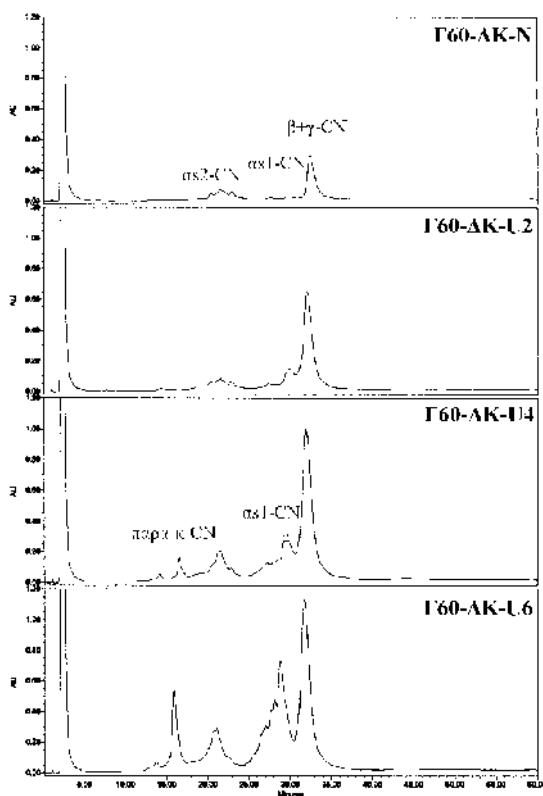
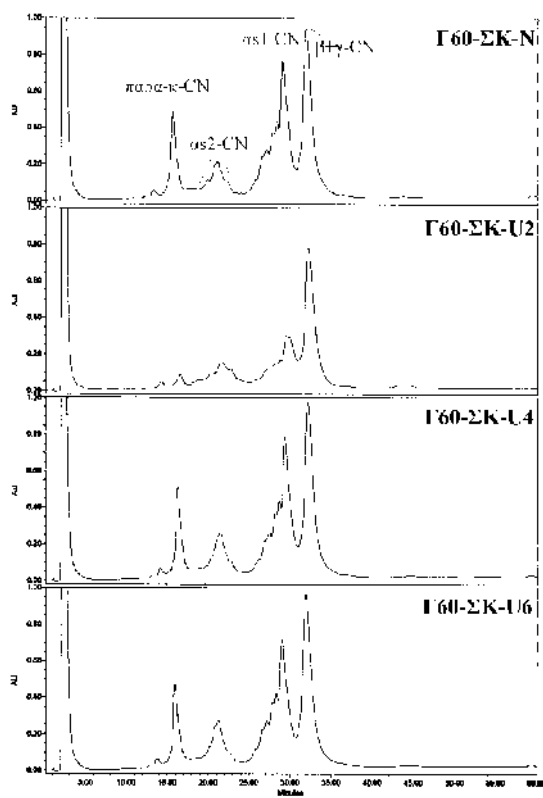
Εικόνα 8. Σύγκριση χρωματογραφημάτων συνολικής καζεΐνης, διαλυτής καζεΐνης και ιζήματος καζεΐνης Φέτας 300 ημερών με νερό και συγκεντρώσεις EDTA 50, 100 και 150 mM.



Εικόνα 9. Σύγκριση χρωματογραφημάτων συνολικής καζεΐνης, διαλυτής καζεΐνης και ιζήματος καζεΐνης Γραβιέρας Κρήτης 7 ημερών με νερό και συγκεντρώσεις ουρίας 2, 4, και 6 Μ.

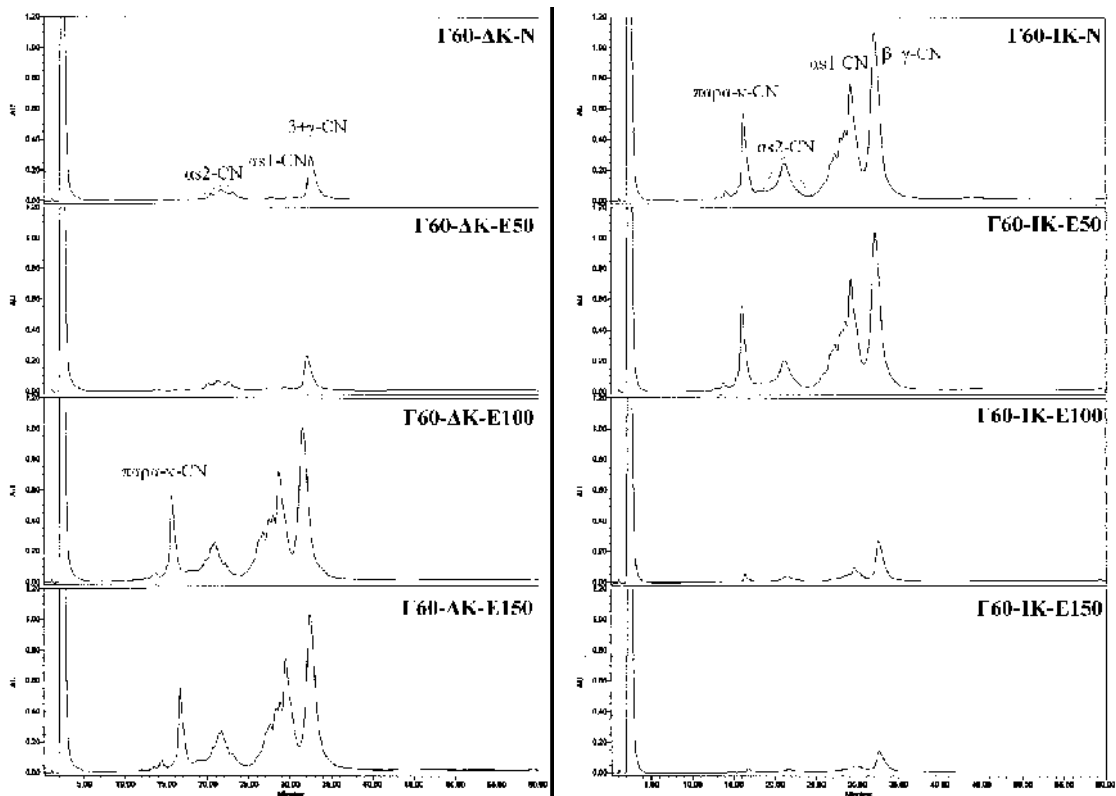
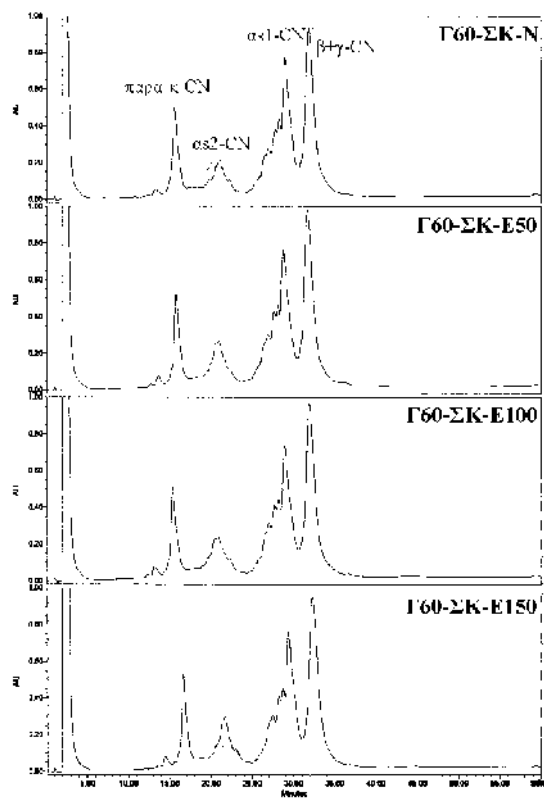


Εικόνα 10. Σύγκριση χρωματογραφημάτων συνολικής καζεΐνης, διαλυτής καζεΐνης και ιζήματος καζεΐνης Γραβιέρας Κρήτης 7 ημερών με νερό και συγκεντρώσεις EDTA 50, 100 και 150 mM.

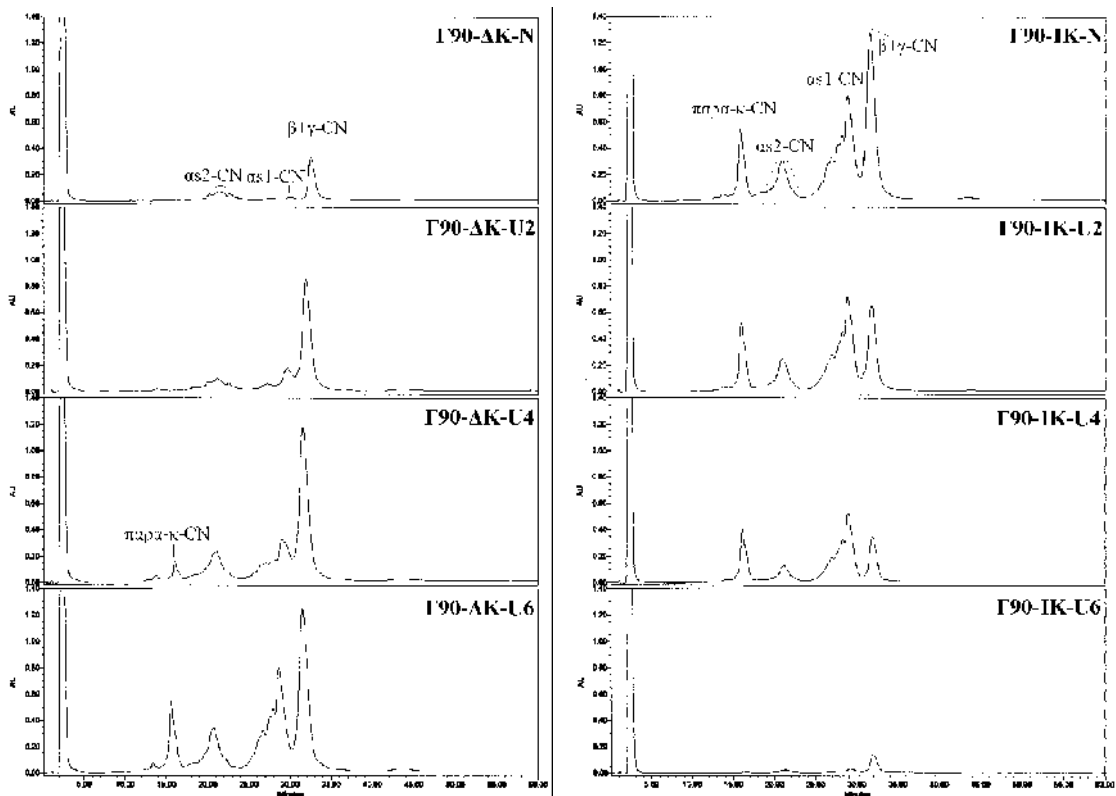
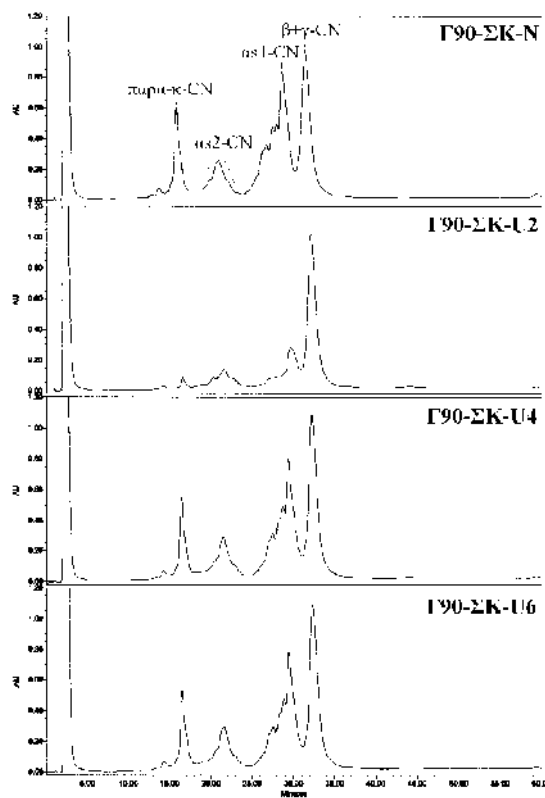


Εικόνα 11. Σύγκριση χρωματογραφημάτων συνολικής καζεΐνης, διαλυτής καζεΐνης και ιζήματος καζεΐνης Γραβιέρας Κρήτης 60 ημερών με νερό και συγκεντρώσεις ουρίας 2, 4, και 6

M.

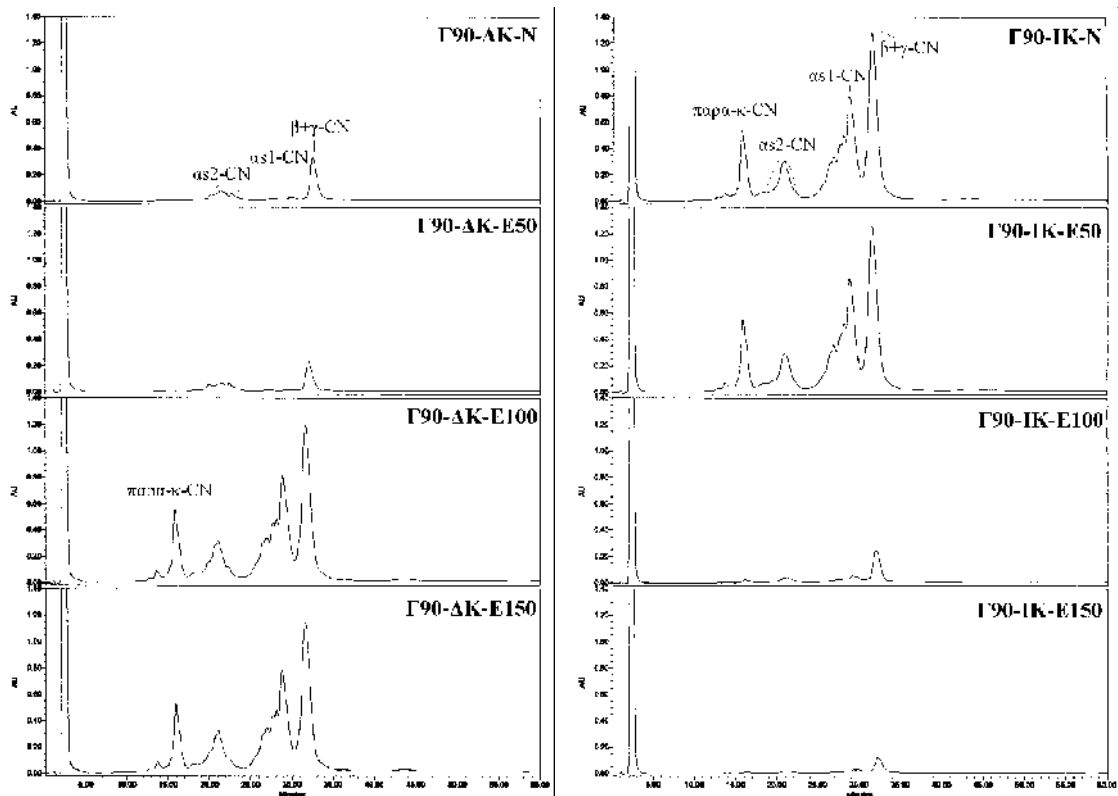
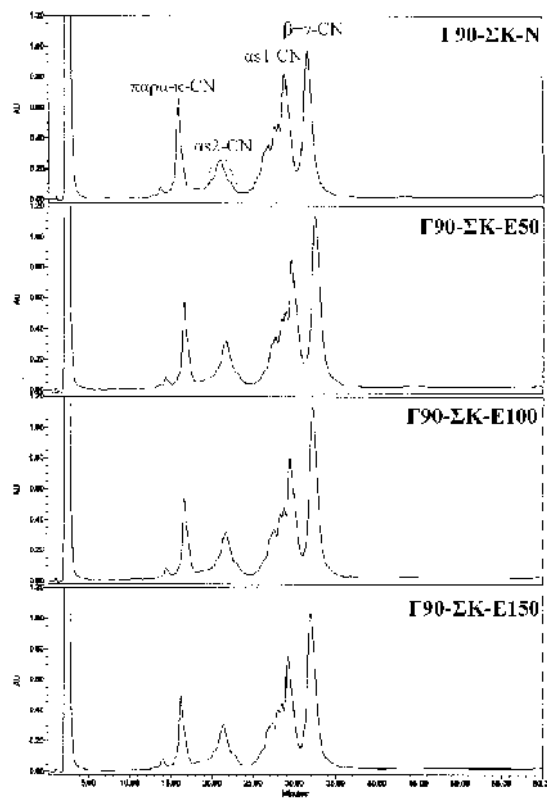


Εικόνα 12. Σύγκριση χρωματογραφημάτων συνολικής καζεΐνης, διαλυτής καζεΐνης και ιζήματος καζεΐνης Γραβιέρας Κρήτης 60 ημερών με νερό και συγκεντρώσεις EDTA 50, 100 και 150 mM.

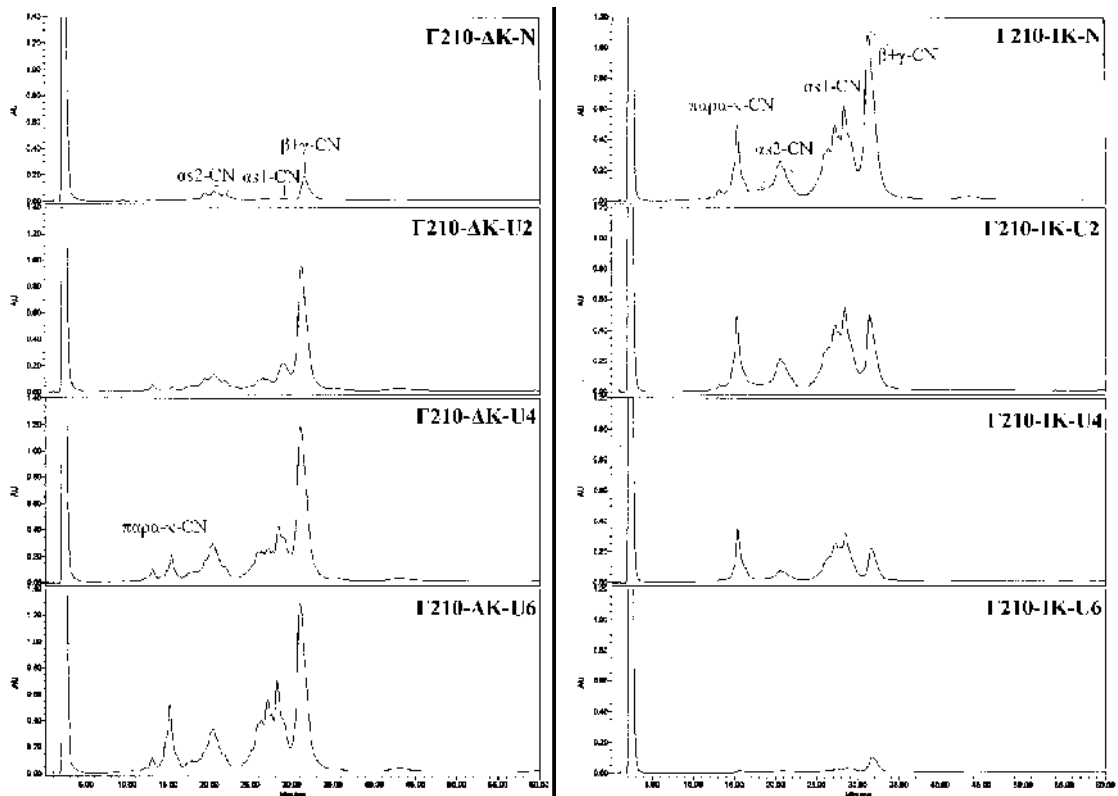
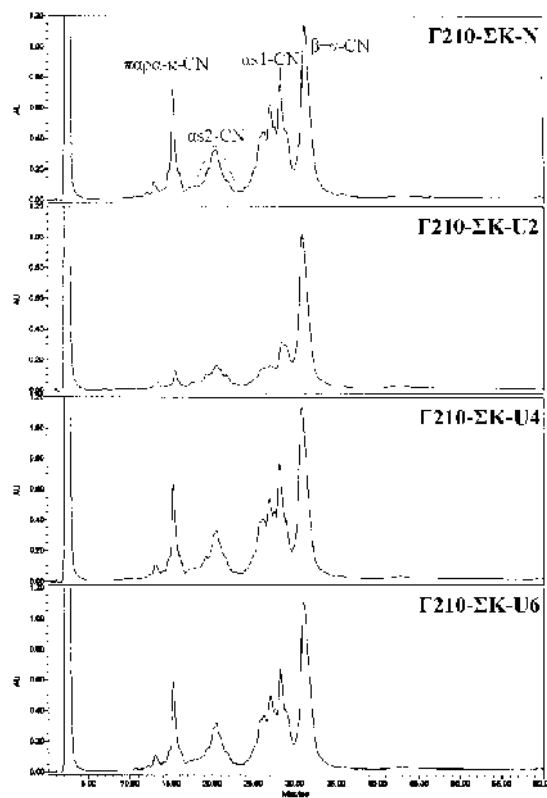


Εικόνα 13. Σύγκριση χρωματογραφημάτων συνολικής καζεΐνης, διαλυτής καζεΐνης και ιζήματος καζεΐνης Γραβιέρας Κρήτης 90 ημερών με νερό και συγκεντρώσεις ουρίας 2, 4, και 6

M.

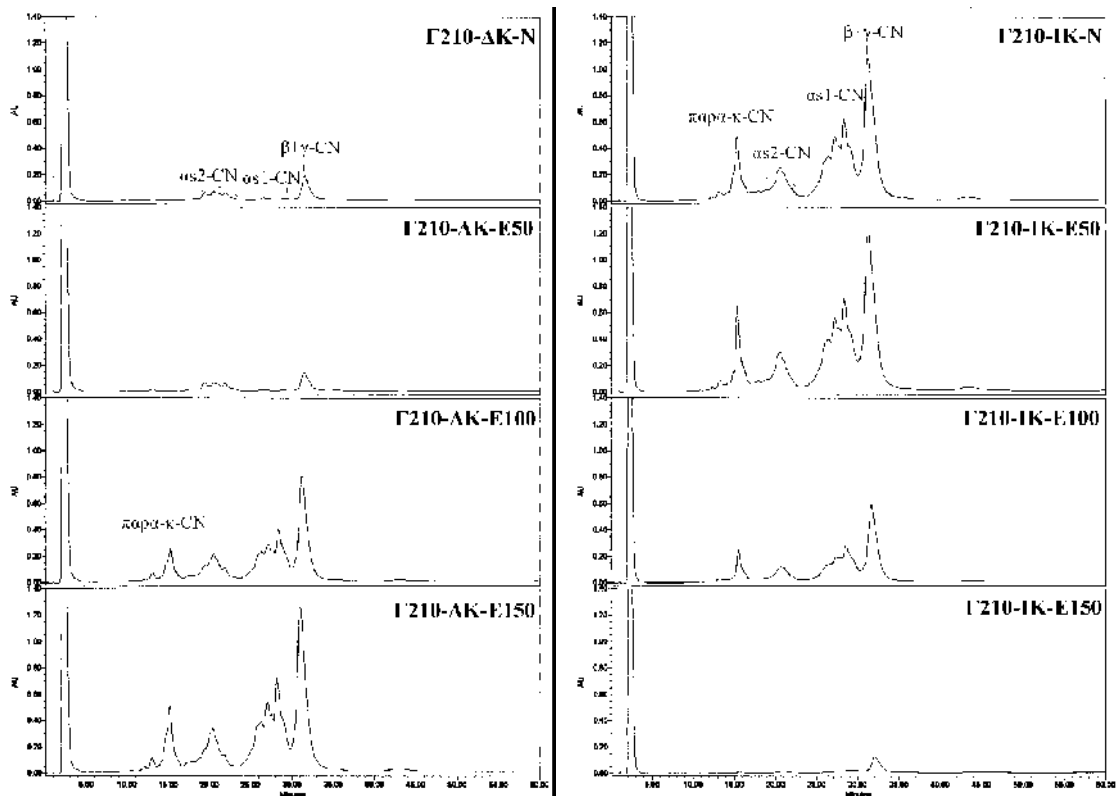
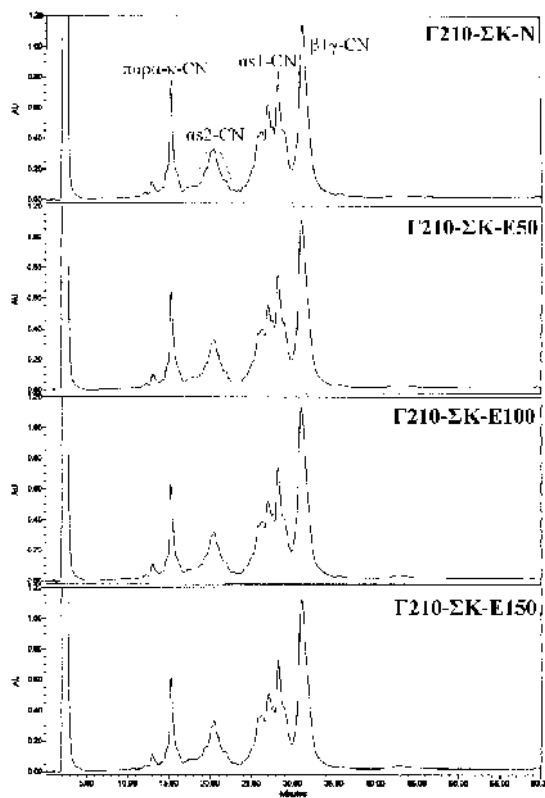


Εικόνα 14. Σύγκριση χρωματογραφημάτων συνολικής καζεΐνης, διαλυτής καζεΐνης και ιζήματος καζεΐνης Γραβιέρας Κρήτης 90 ημερών με νερό και συγκεντρώσεις EDTA 50, 100 και 150 mM.

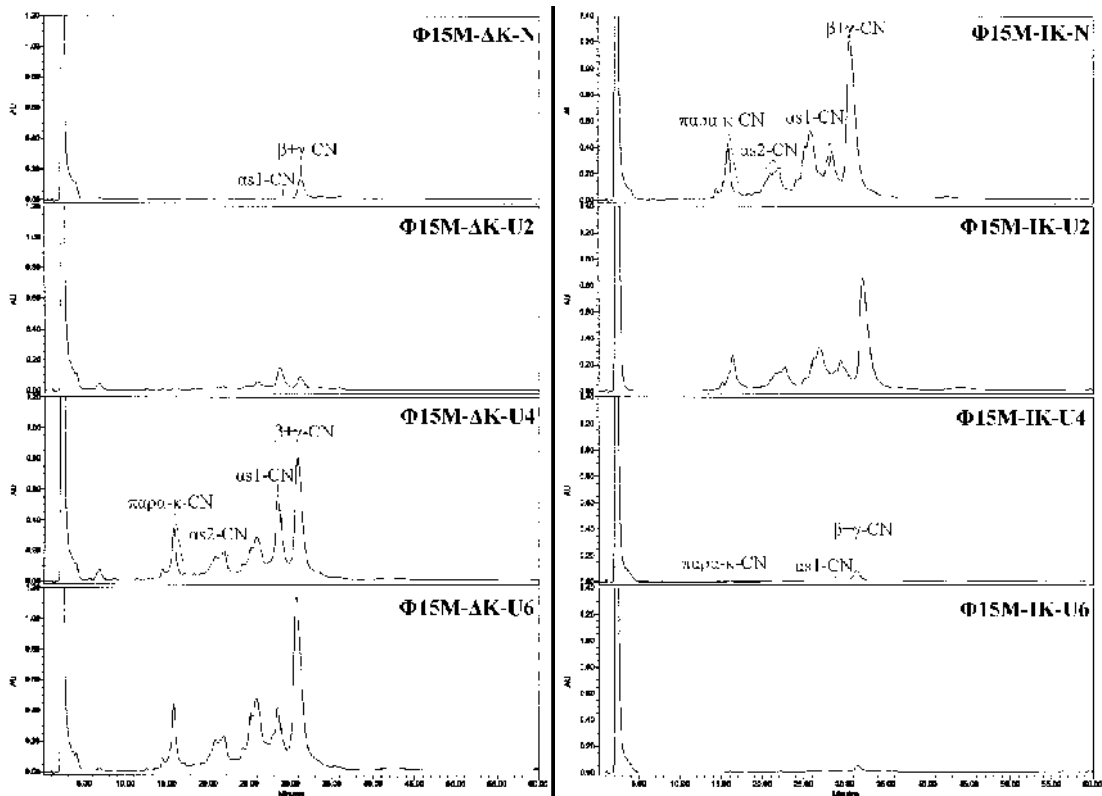
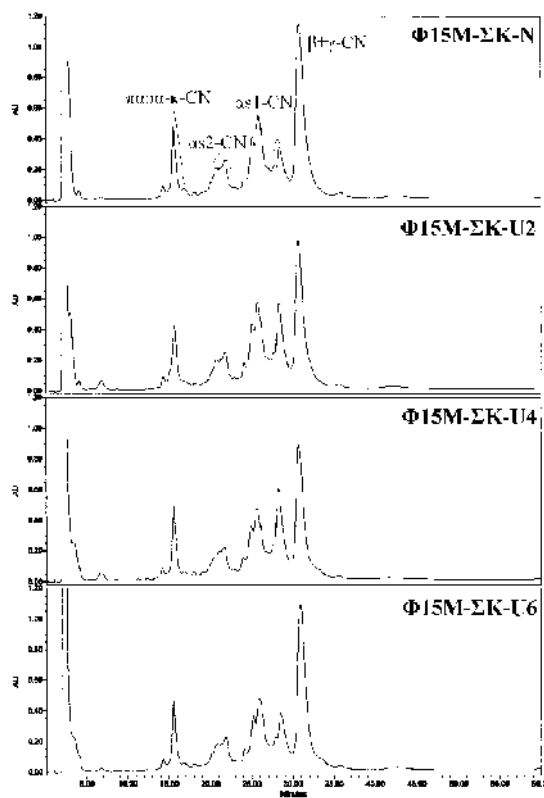


Εικόνα 15. Σύγκριση χρωματογραφημάτων συνολικής καζεΐνης, διαλυτής καζεΐνης και ιζήματος καζεΐνης Γραβιέρας Κρήτης 210 ημερών με νερό και συγκεντρώσεις ουρίας 2, 4, και 6

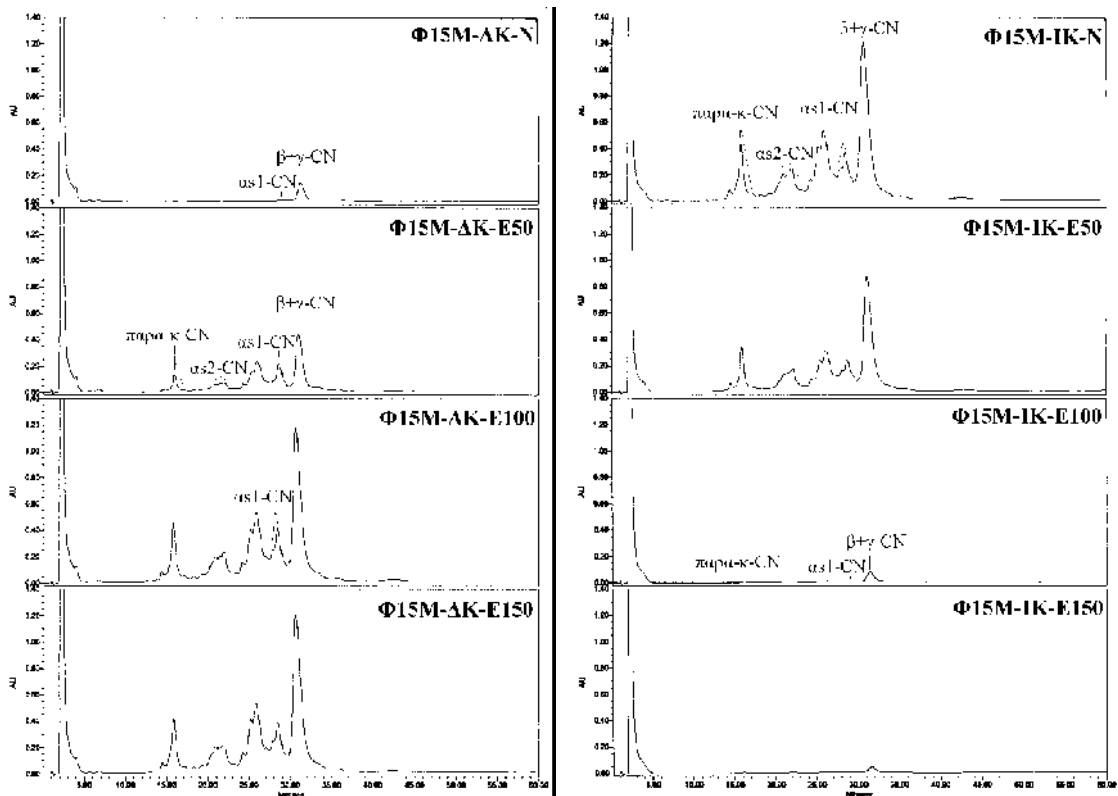
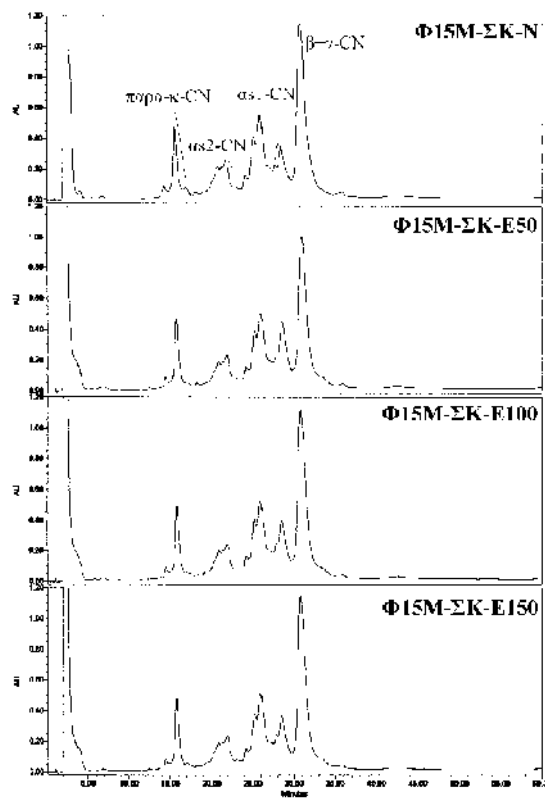
M.



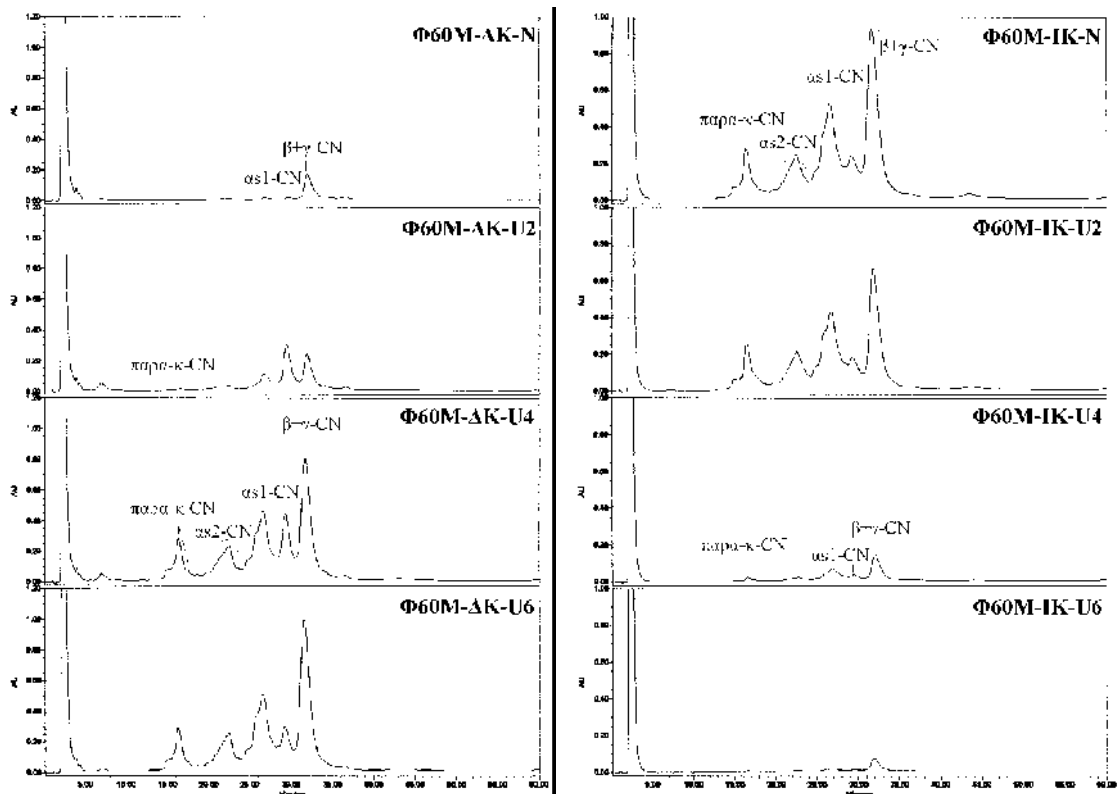
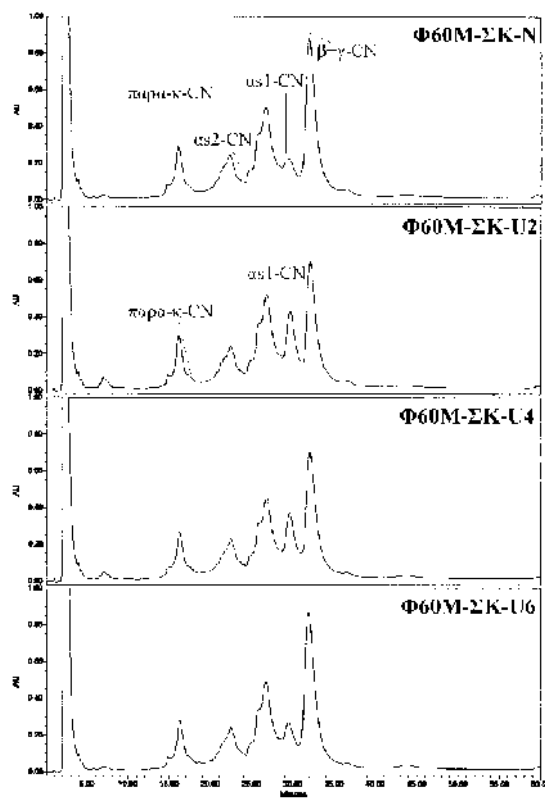
Εικόνα 16. Σύγκριση χρωματογραφημάτων συνολικής καζεΐνης, διαλυτής καζεΐνης και ιζήματος καζεΐνης Γραβιέρας Κρήτης 210 ημερών με νερό και συγκεντρώσεις EDTA 50, 100 και 150 mM.



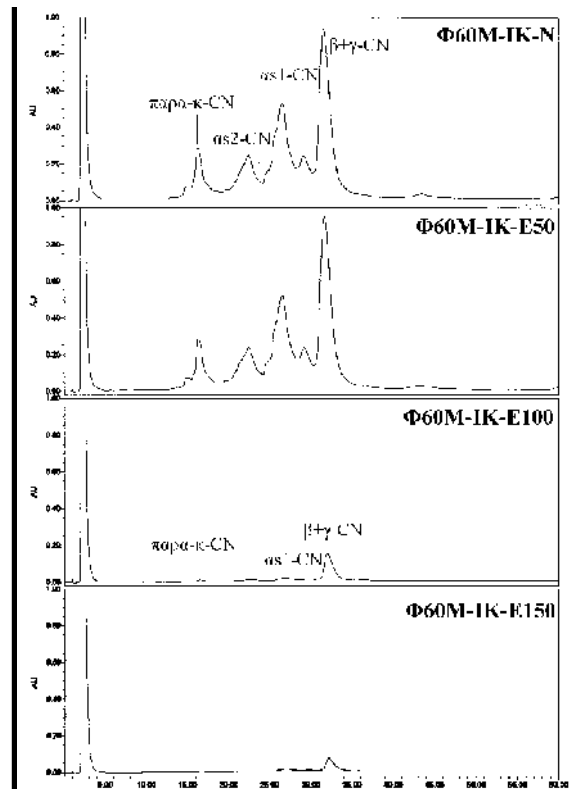
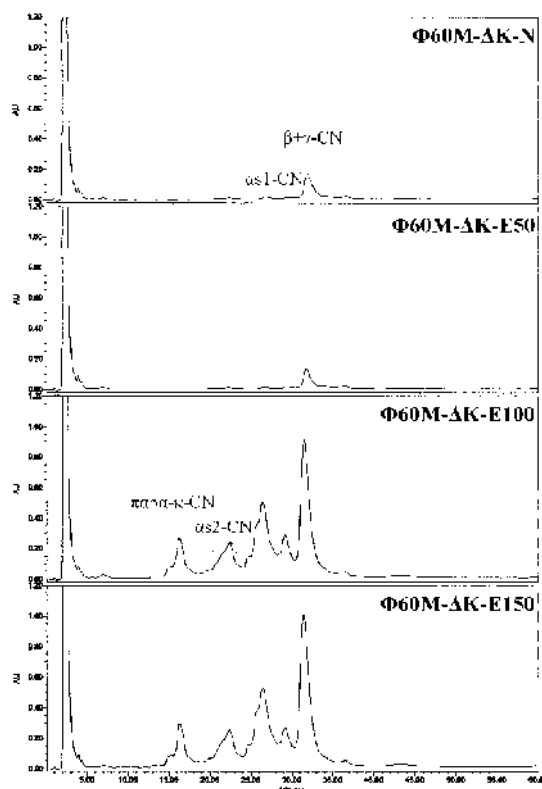
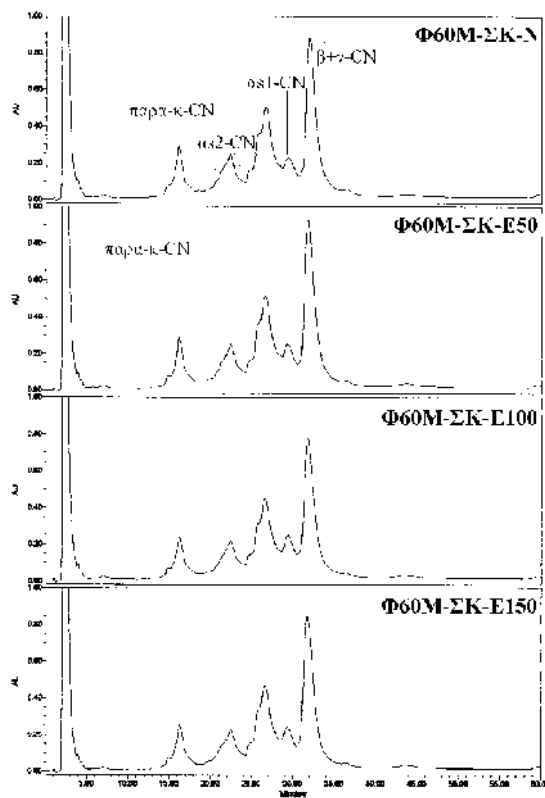
Εικόνα 17. Σύγκριση χρωματογραφημάτων συνολικής καζεΐνης, διαλυτής καζεΐνης και ιζήματος καζεΐνης Φέτας 15 ημερών Μάρτυρα με νερό και συγκεντρώσεις ουρίας 2, 4 και 6 Μ.



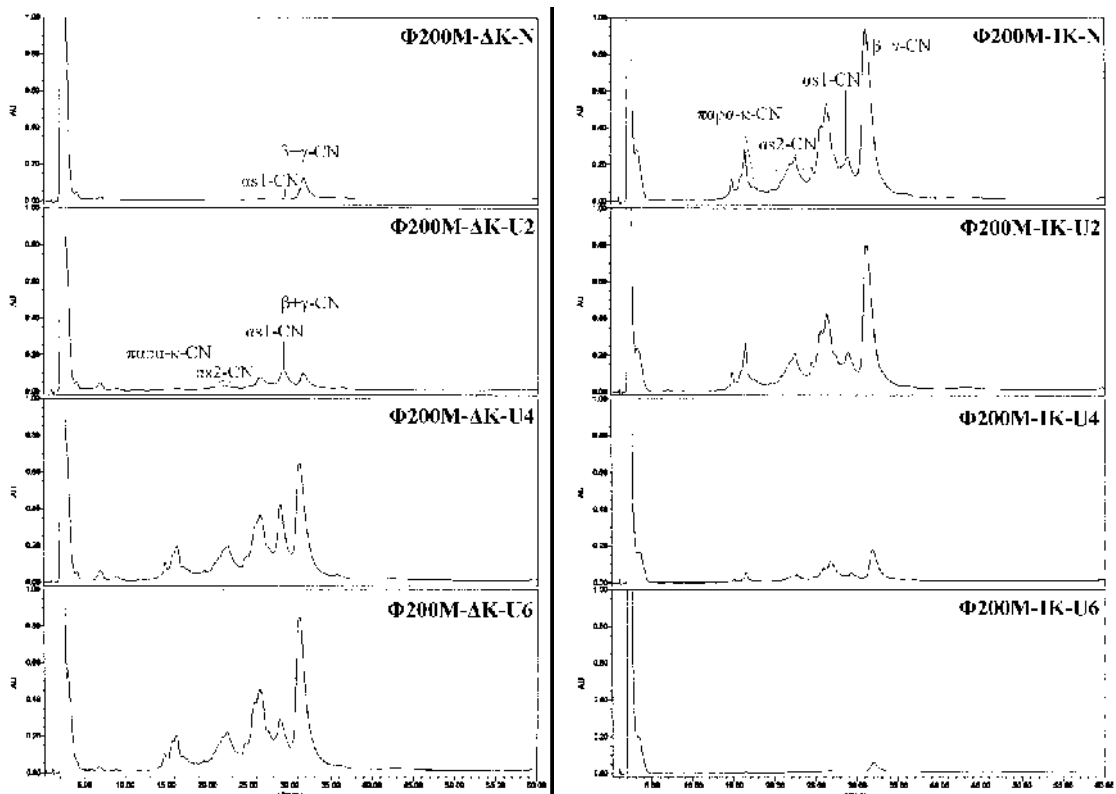
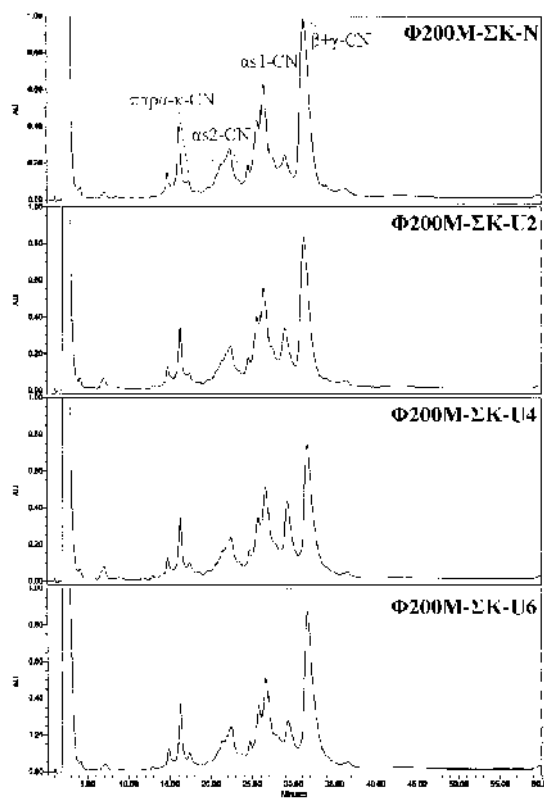
Εικόνα 18. Σύγκριση χρωματογραφημάτων συνολικής καζεΐνης, διαλυτής καζεΐνης και ιζήματος καζεΐνης Φέτας 15 ημερών Μάρτυρα με νερό και συγκεντρώσεις EDTA 50, 100 και 150 mM.



Εικόνα 19. Σύγκριση χρωματογραφημάτων συνολικής καζεΐνης, διαλυτής καζεΐνης και ιζήματος καζεΐνης Φέτας 60 ημερών Μάρτυρα με νερό και συγκεντρώσεις ουρίας 2, 4 και 6 Μ.

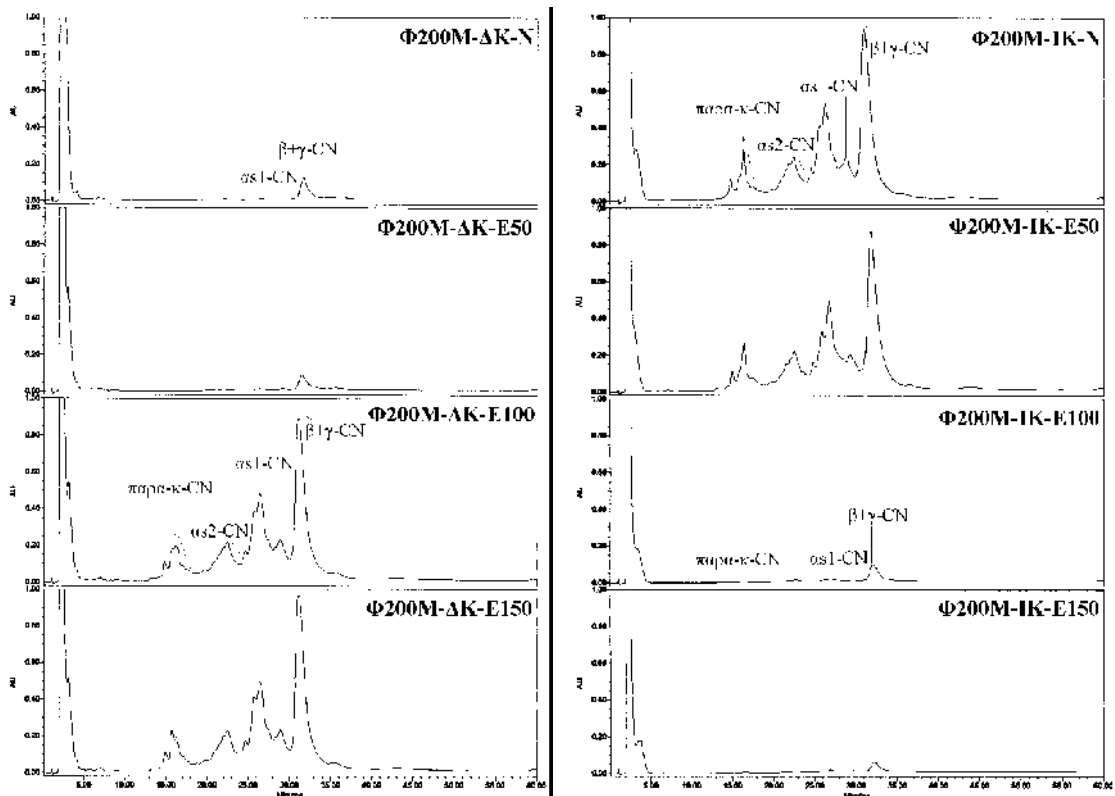
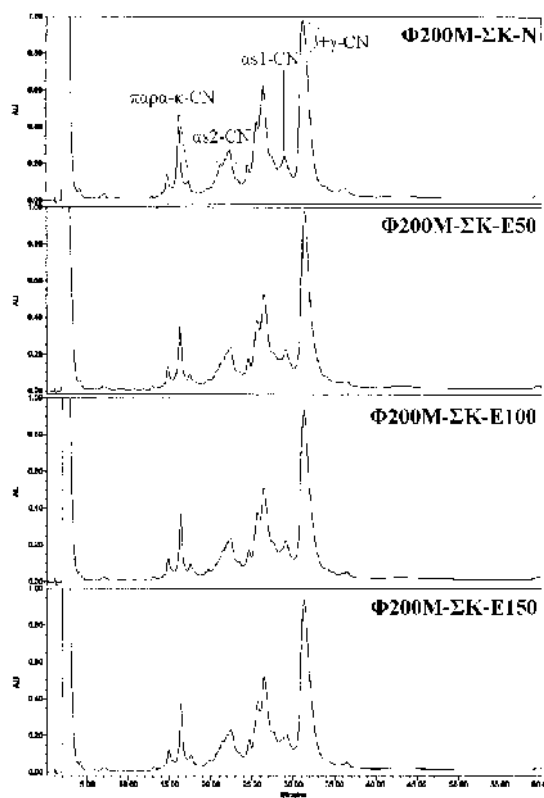


Εικόνα 20. Σύγκριση χρωματογραφημάτων συνολικής καζεΐνης, διαλυτής καζεΐνης και ιζήματος καζεΐνης Φέτας 60 ημερών Μάρτυρα με νερό και συγκεντρώσεις EDTA 50, 100 και 150 mM.

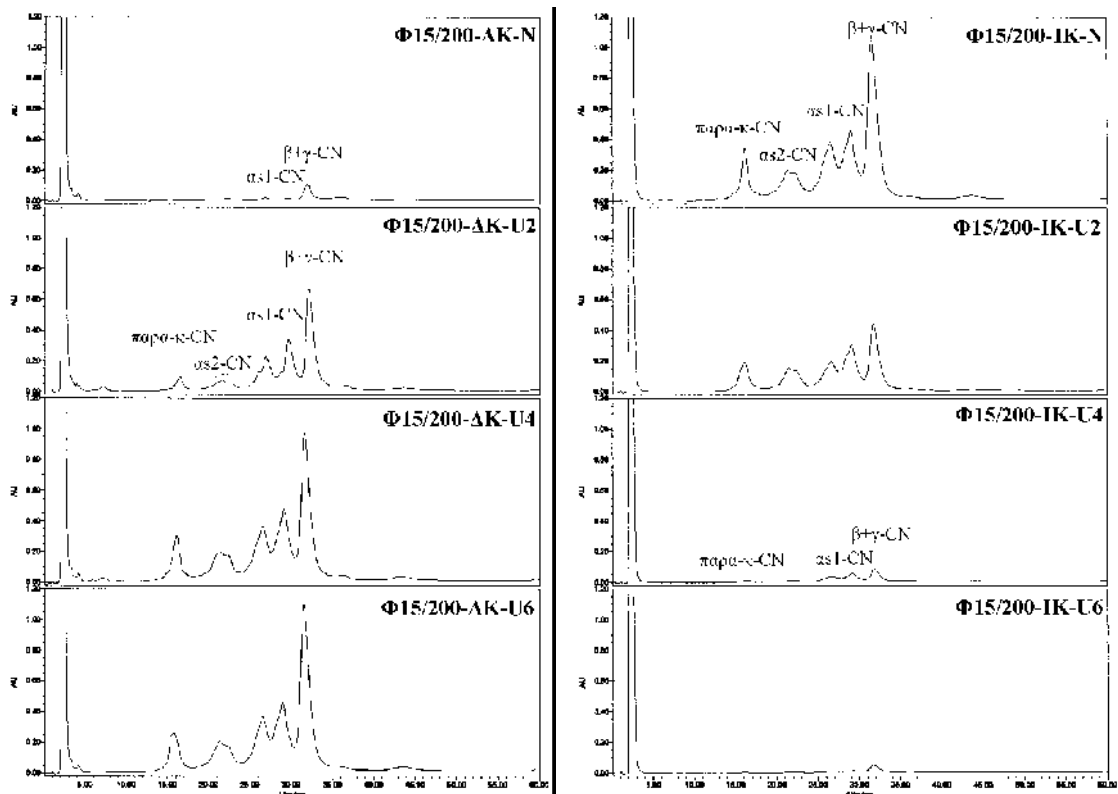
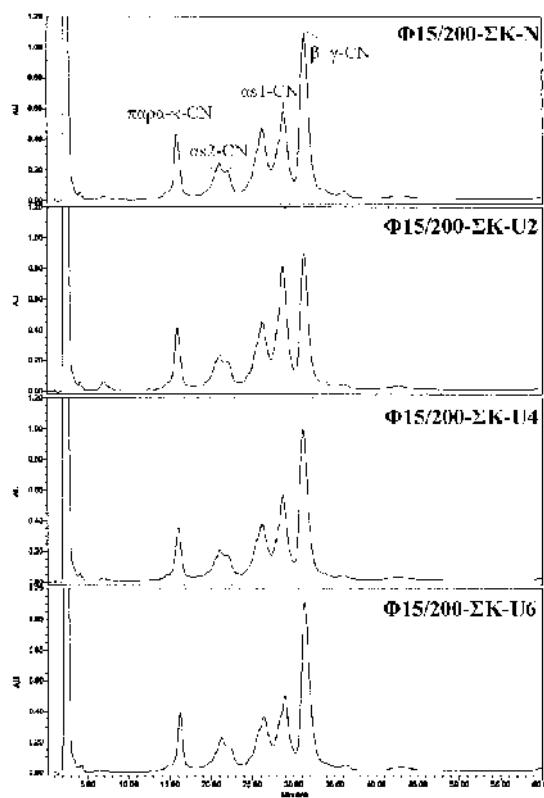


Εικόνα 21. Σύγκριση χρωματογραφημάτων συνολικής καζεΐνης, διαλυτής καζεΐνης και ιζήματος καζεΐνης Φέτας 200 ημερών Μάρτυρα με νερό και συγκεντρώσεις ουρίας 2, 4 και 6

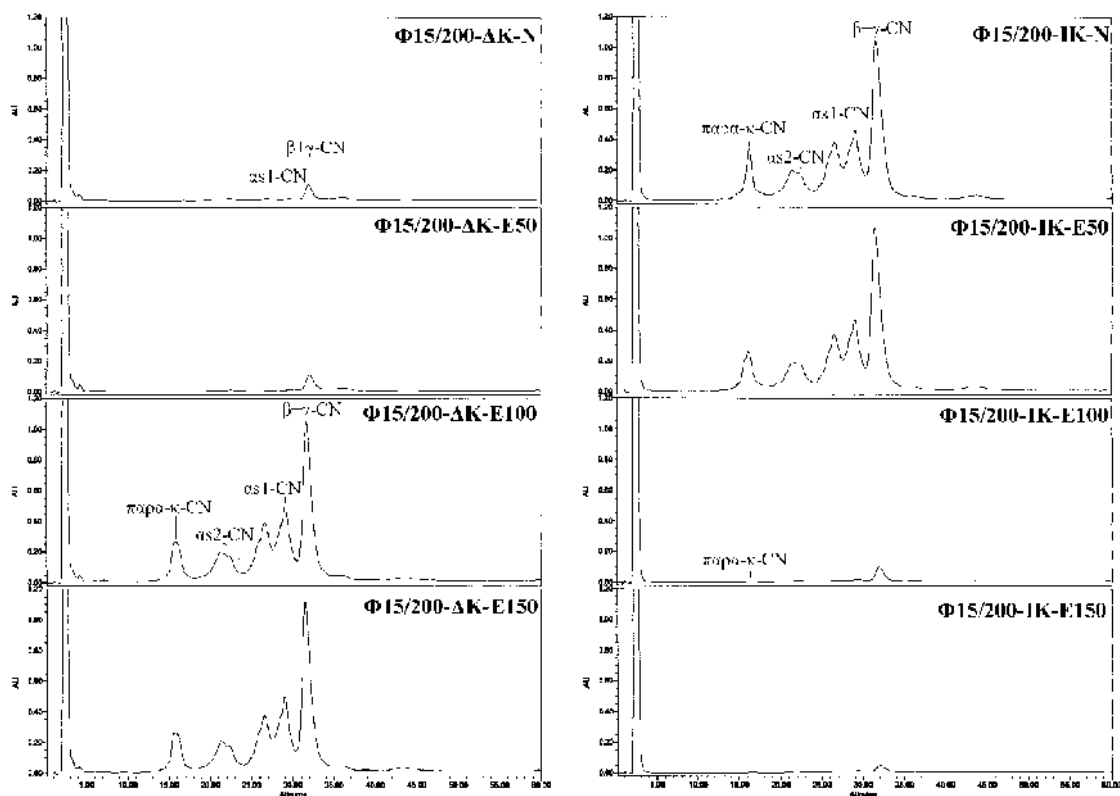
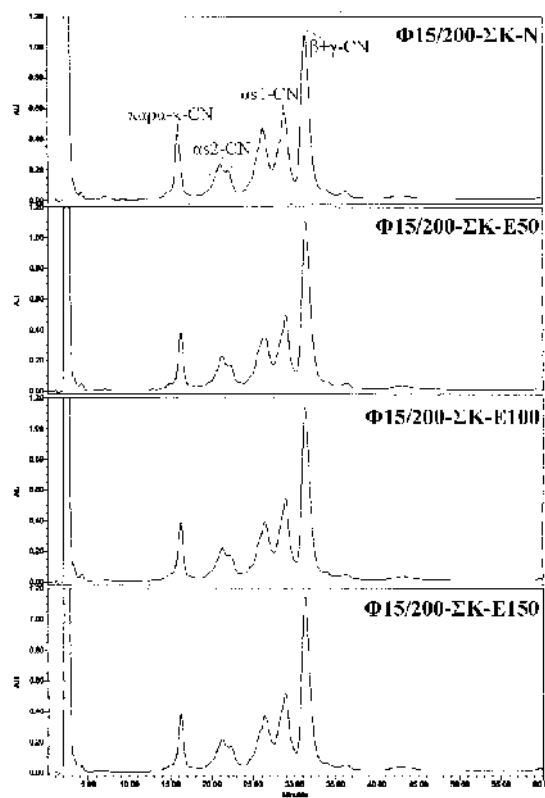
M.



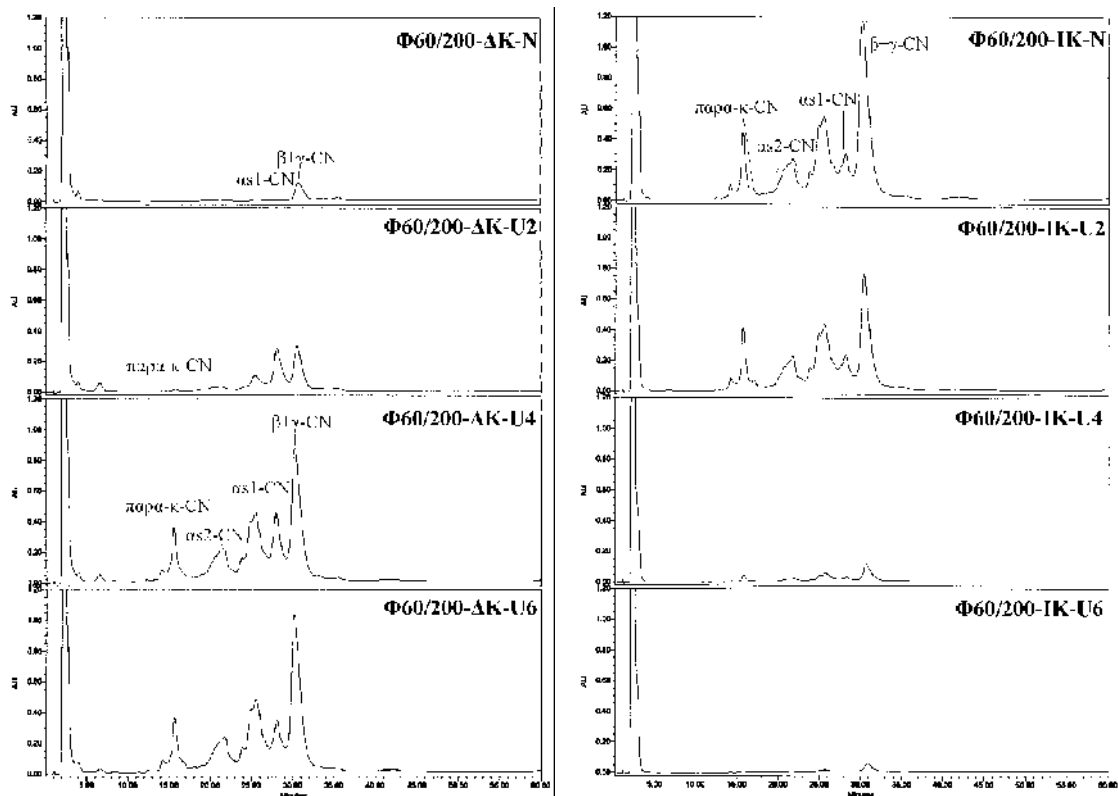
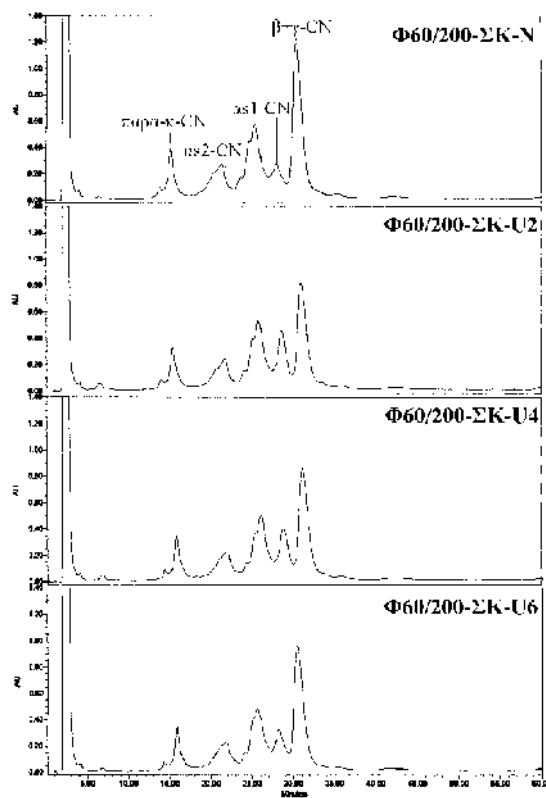
Εικόνα 22. Σύγκριση χρωματογραφημάτων συνολικής καζεΐνης, διαλυτής καζεΐνης και ιζήματος καζεΐνης Φέτας 200 ημερών Μάρτυρα με νερό και συγκεντρώσεις EDTA 50, 100 και 150 mM.



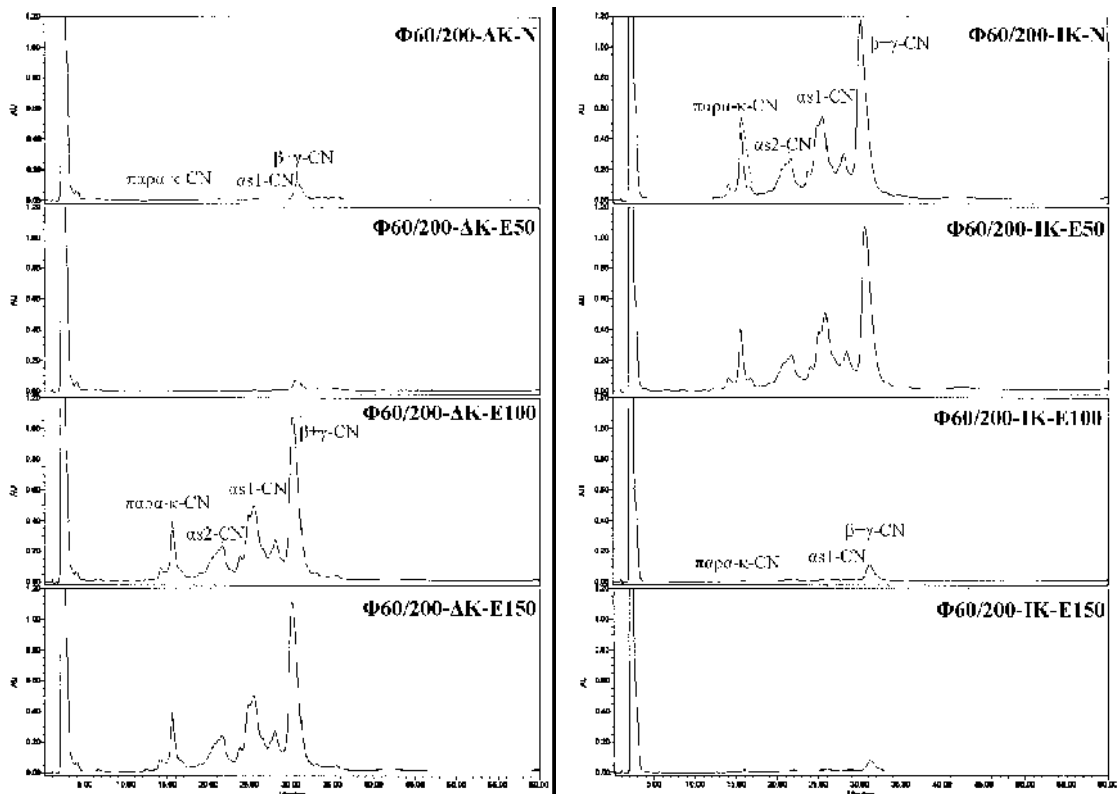
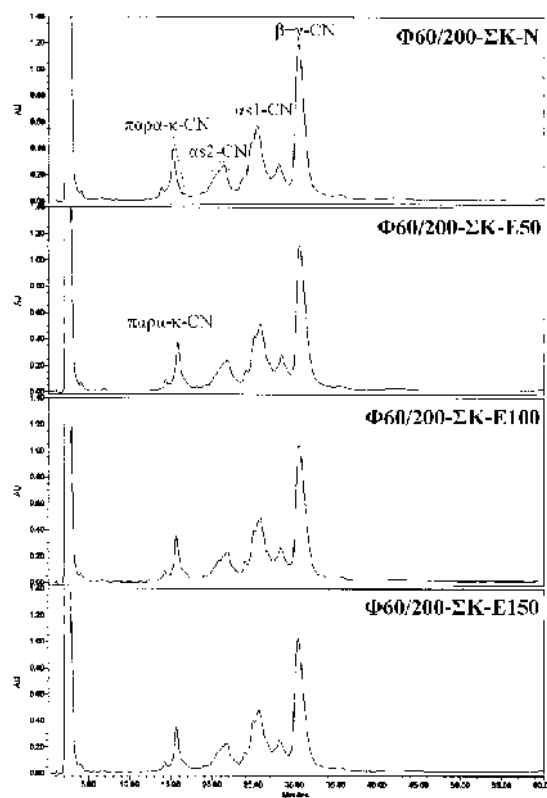
Εικόνα 23. Σύγκριση χρωματογραφημάτων συνολικής καζεΐνης, διαλυτής καζεΐνης και ιζήματος καζεΐνης τυριού τύπου Φέτας 15 ημερών επεξεργασμένου με Υπερυψηλή πίεση 200 MPa με νερό και συγκεντρώσεις ουρίας 2, 4 και 6 M.



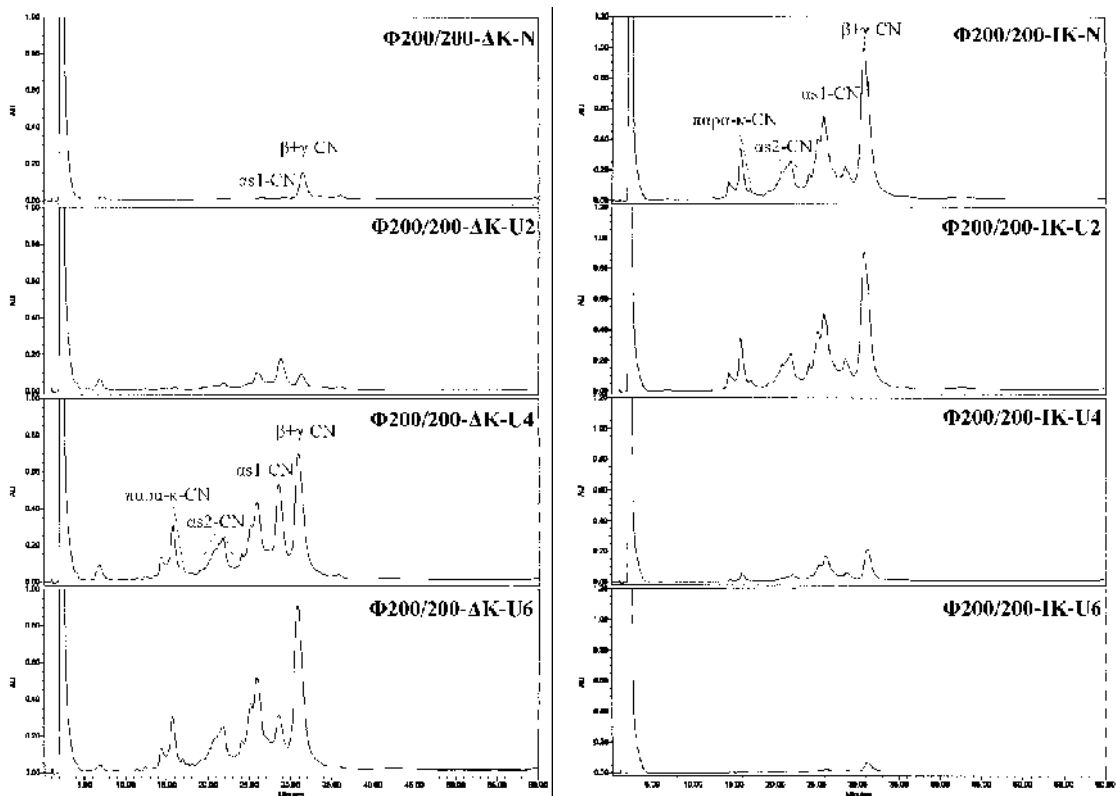
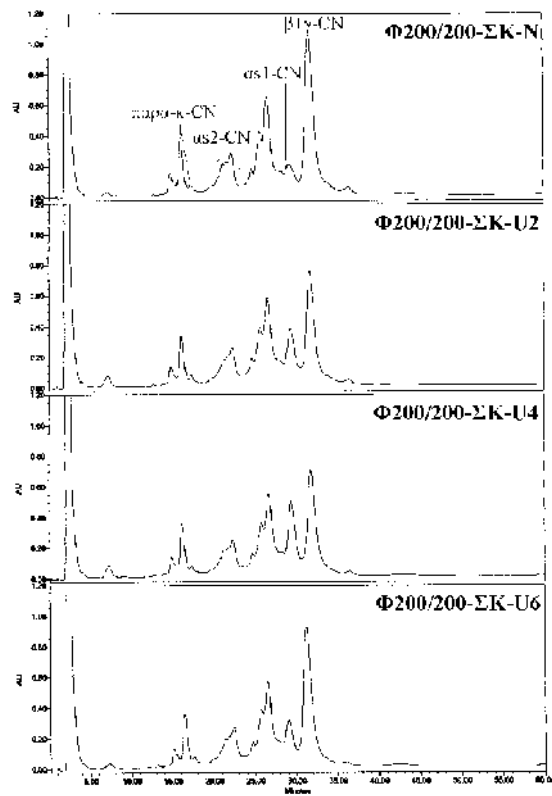
Εικόνα 24. Σύγκριση χρωματογραφημάτων συνολικής καζεΐνης, διαλυτής καζεΐνης και ιζήματος καζεΐνης τυριού τύπου Φέτας 15 ημερών επεξεργασμένου με Υπερυψηλή πίεση 200 MPa με νερό και συγκεντρώσεις EDTA 50, 100 και 150 mM.



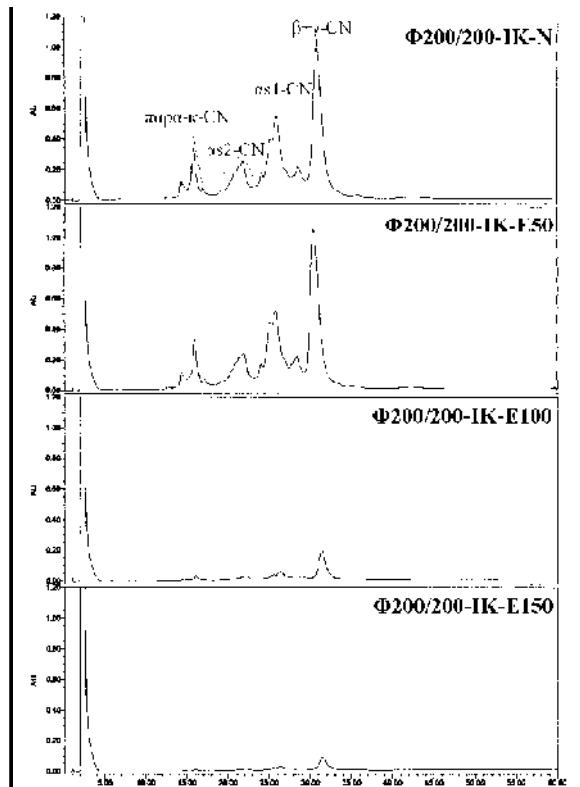
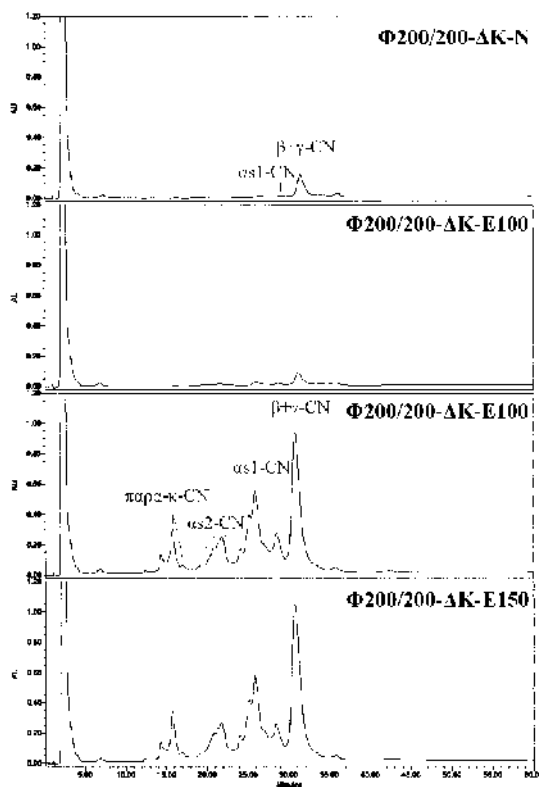
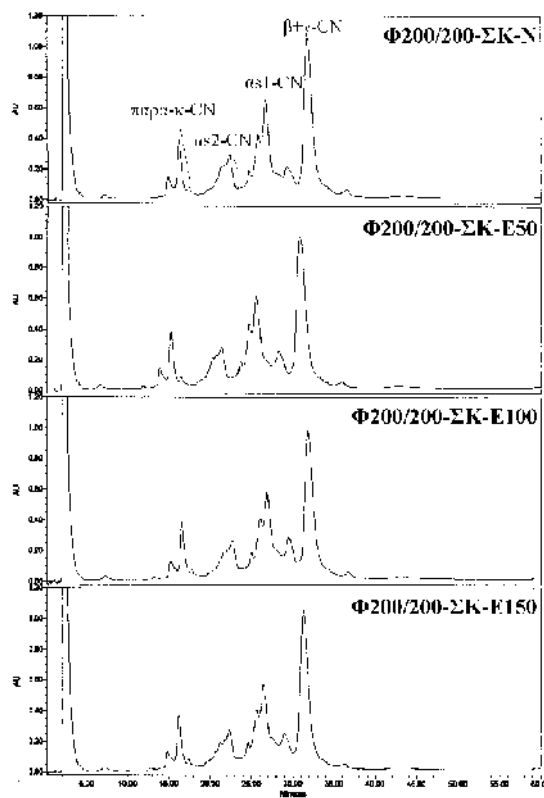
Εικόνα 25. Σύγκριση χρωματογραφημάτων συνολικής καζεΐνης, διαλυτής καζεΐνης και ιζήματος καζεΐνης τυριού τύπου Φέτας 60 ημερών επεξεργασμένου με Υπερυψηλή πίεση 200 MPa με νερό και συγκεντρώσεις ουρίας 2, 4 και 6 Μ.



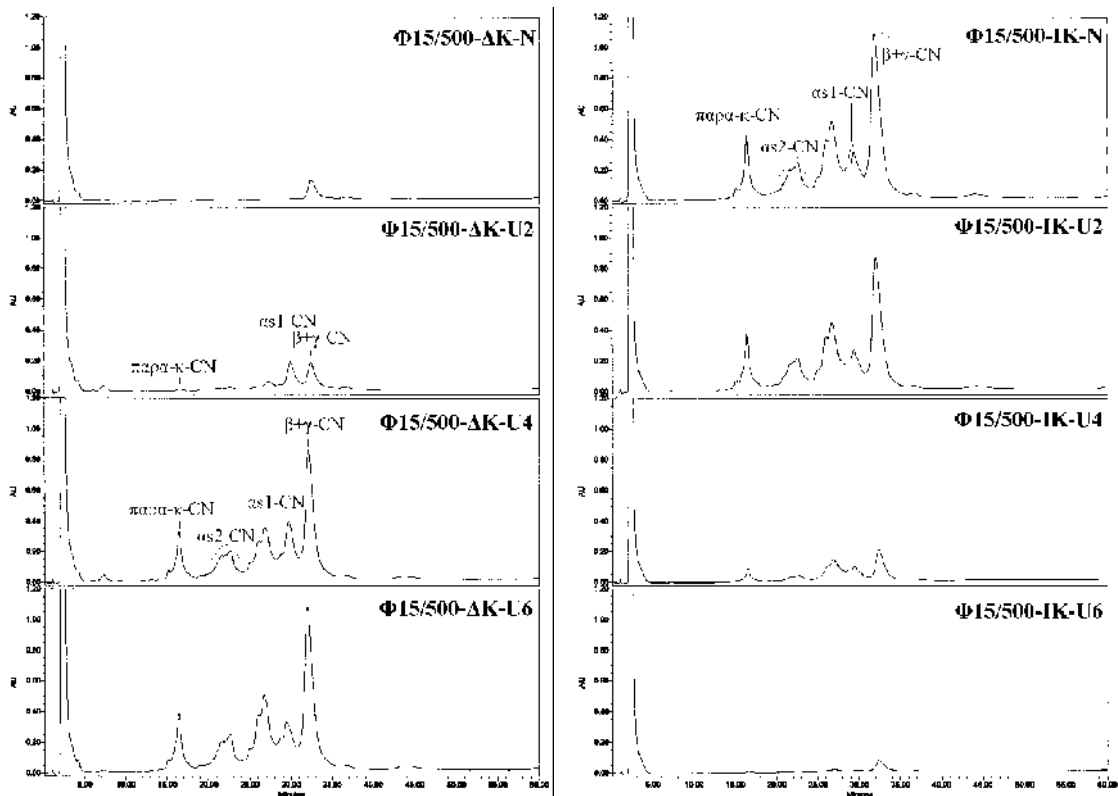
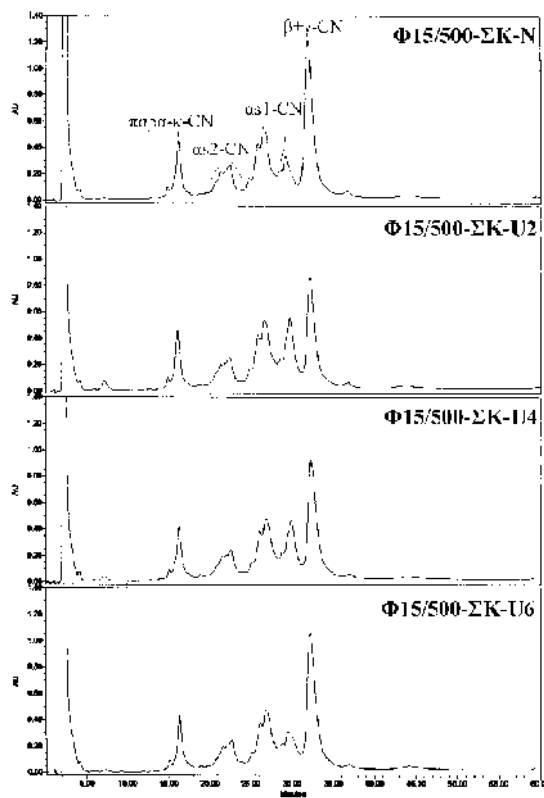
Εικόνα 26. Σύγκριση χρωματογραφημάτων συνολικής καζεΐνης, διαλυτής καζεΐνης και ιζήματος καζεΐνης τυριού τύπου Φέτας 60 ημερών επεξεργασμένου με Υπερυψηλή πίεση 200 MPa με νερό και συγκεντρώσεις EDTA 50, 100 και 150 mM.



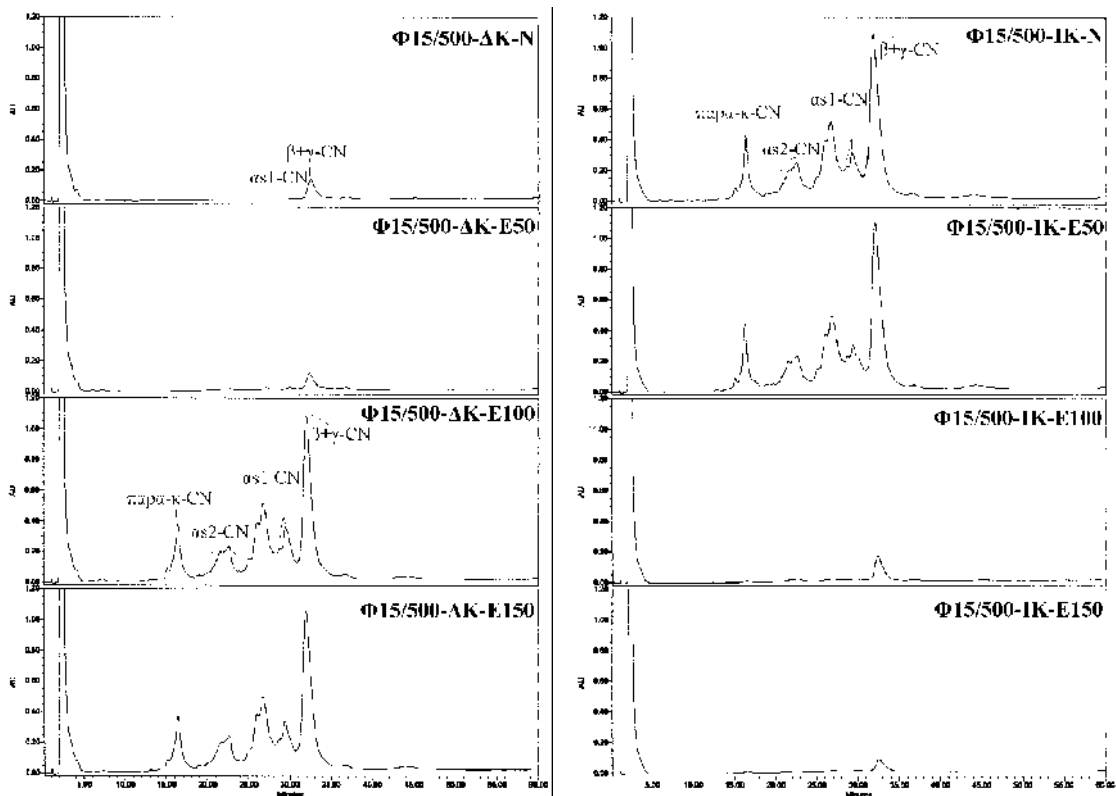
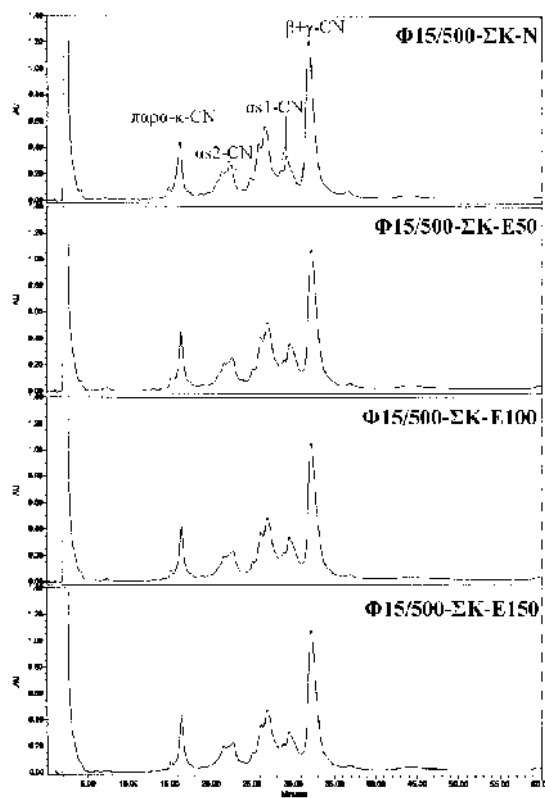
Εικόνα 27. Σύγκριση χρωματογραφημάτων συνολικής καζεΐνης, διαλυτής καζεΐνης και ιζήματος καζεΐνης τυριού τύπου Φέτας 200 ημερών επεξεργασμένου με Υπερυψηλή πίεση 200 MPa με νερό και συγκεντρώσεις ουρίας 2, 4 και 6 Μ.



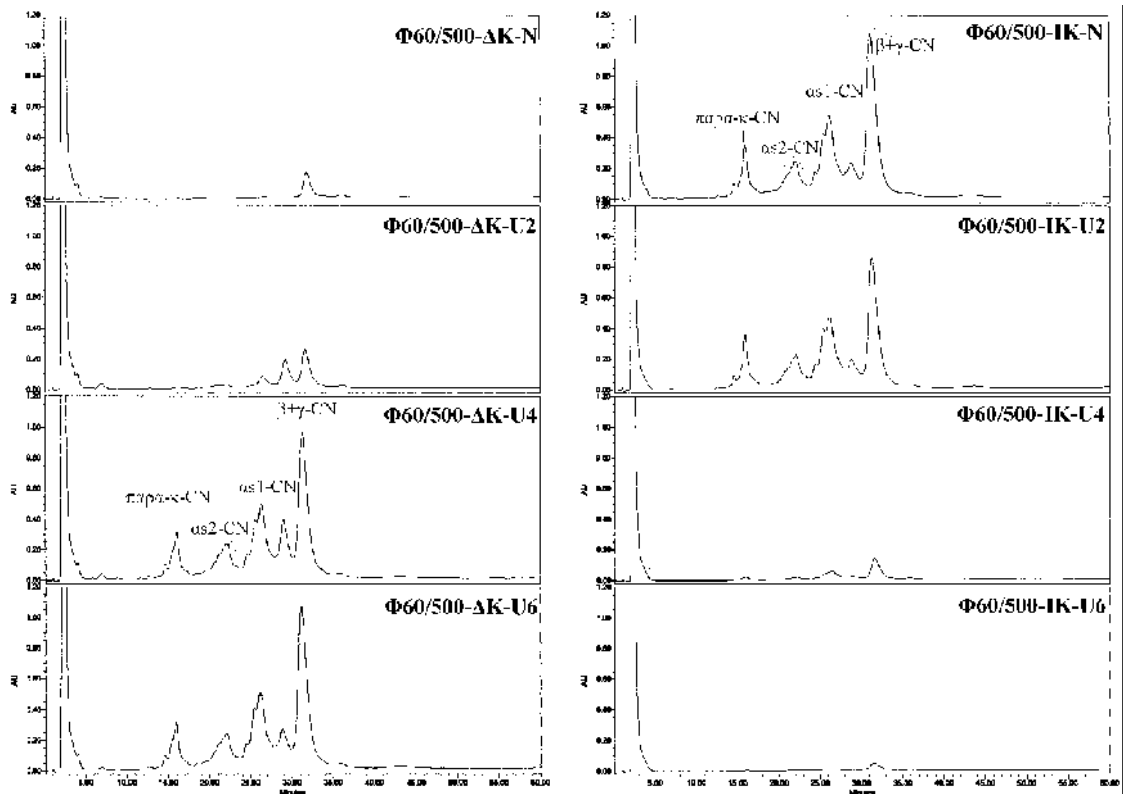
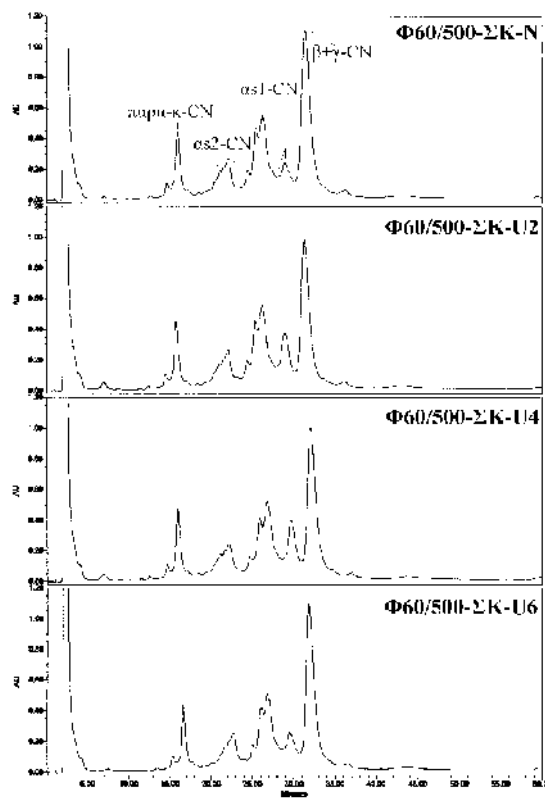
Εικόνα 28. Σύγκριση χρωματογραφημάτων συνολικής καζεΐνης, διαλυτής καζεΐνης και ιζήματος καζεΐνης τυριού τύπου Φέτας 200 ημερών επεξεργασμένου με Υπερυψηλή πίεση 200 MPa με νερό και συγκεντρώσεις EDTA 50, 100 και 150 mM.



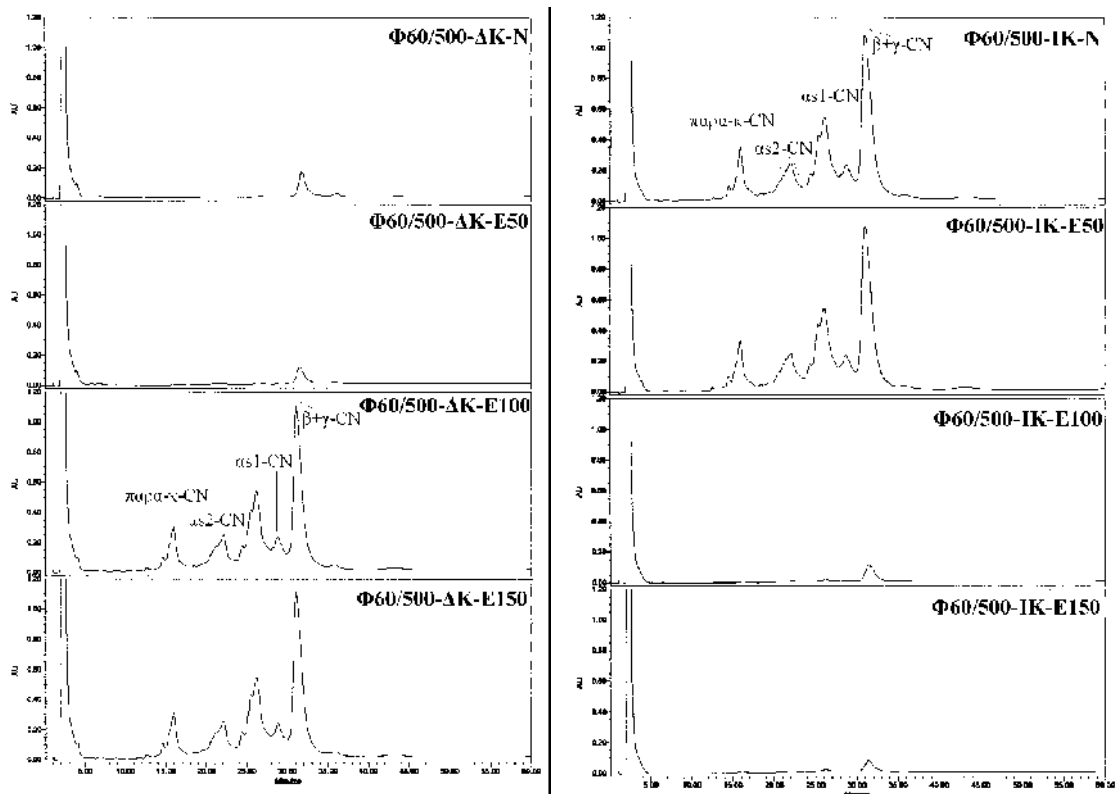
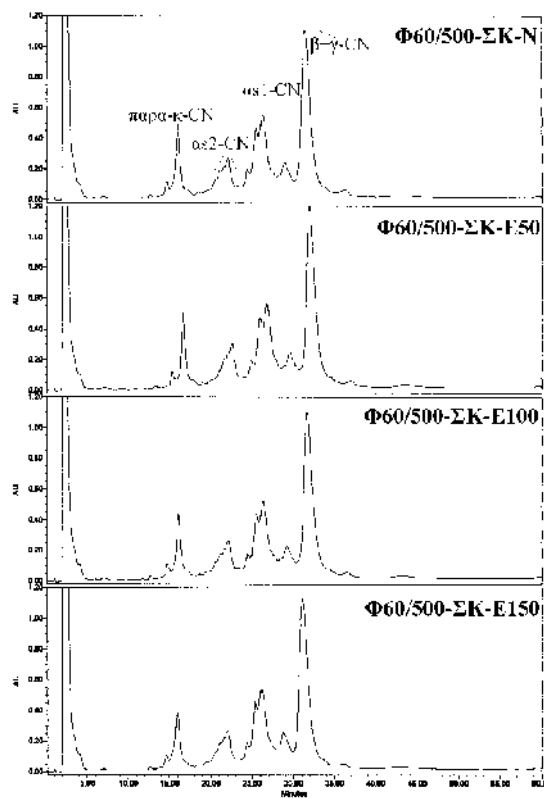
Εικόνα 29. Σύγκριση χρωματογραφημάτων συνολικής καζεΐνης, διαλυτής καζεΐνης και ιζήματος καζεΐνης τυριού τύπου Φέτας 15 ημερών επεξεργασμένου με Υπερυψηλή πίεση 500 MPa με νερό και συγκεντρώσεις ουρίας 2, 4 και 6 Μ.



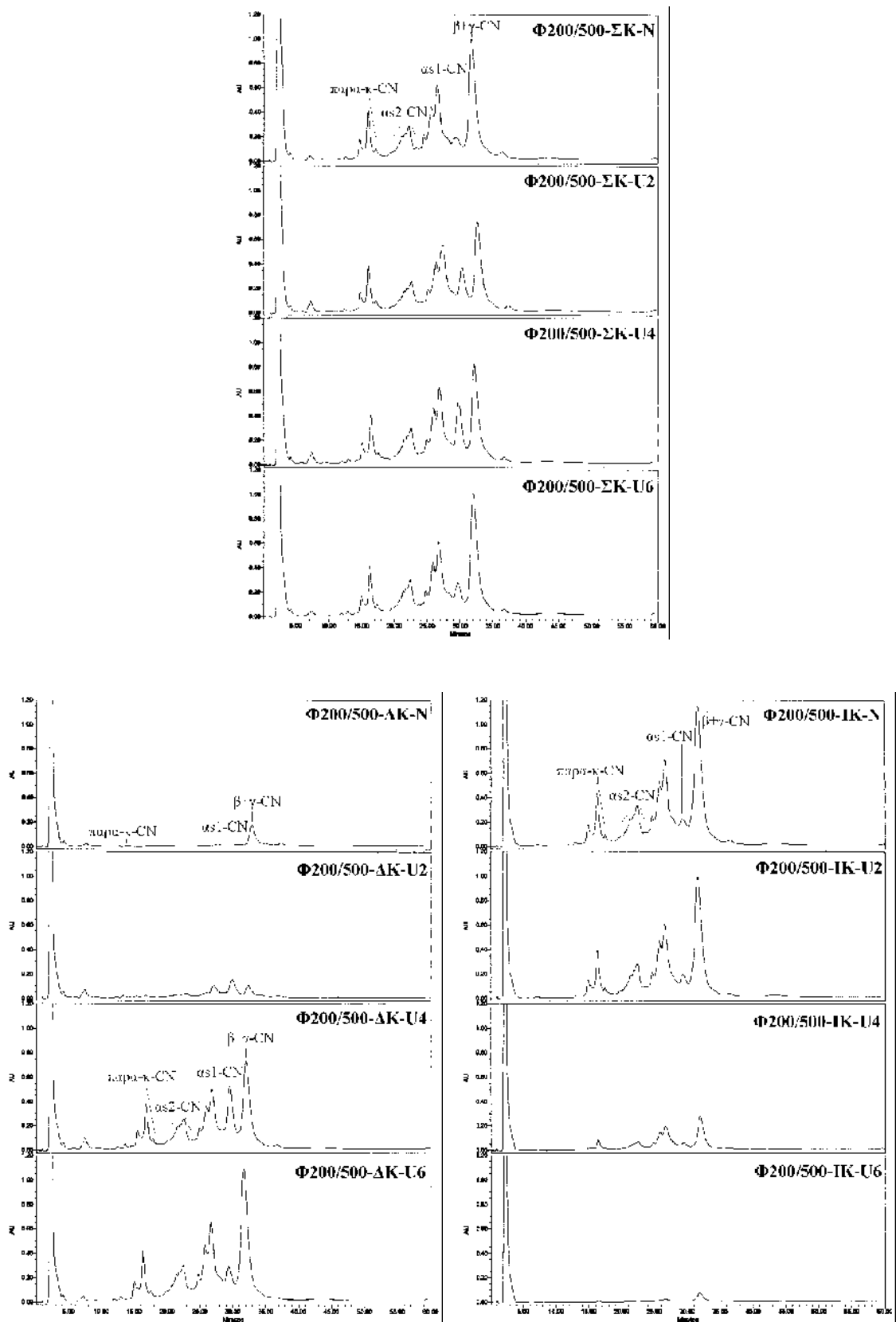
Εικόνα 30. Σύγκριση χρωματογραφημάτων συνολικής καζεΐνης, διαλυτής καζεΐνης και ιζήματος καζεΐνης τυριού τύπου Φέτας 15 ημερών επεξεργασμένου με Υπερυψηλή πίεση 500 MPa με νερό και συγκεντρώσεις EDTA 50, 100 και 150 mM.



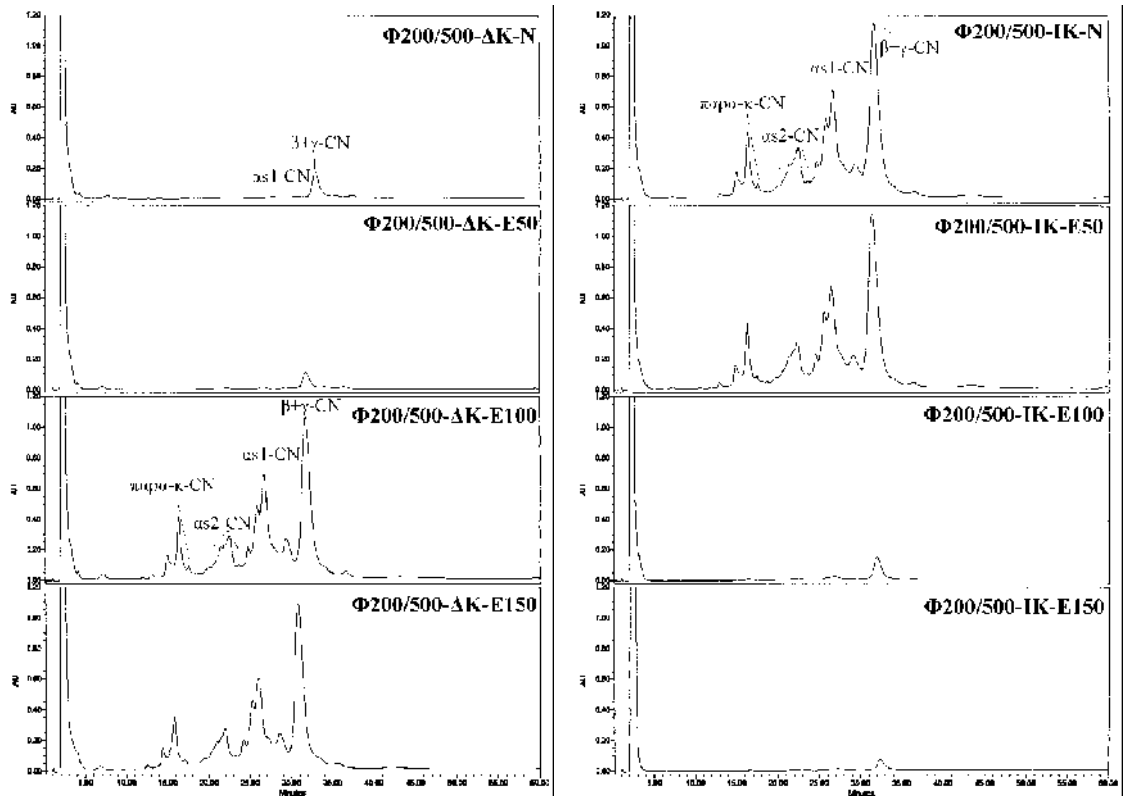
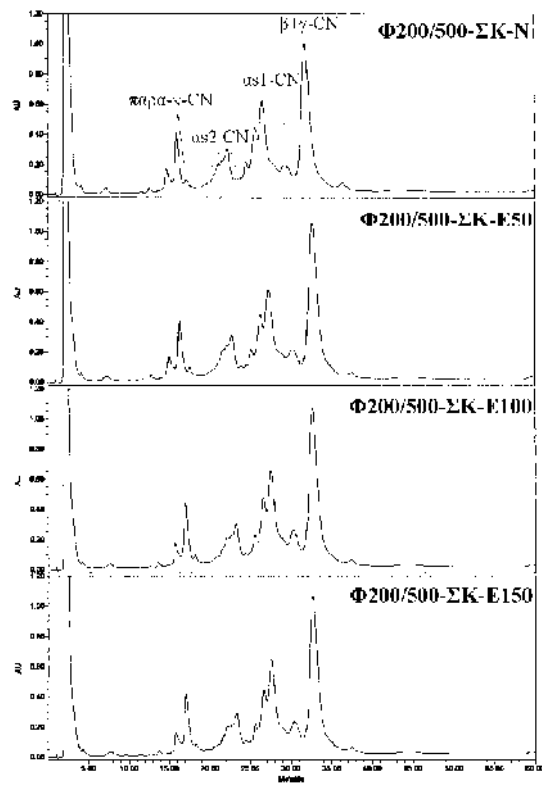
Εικόνα 31. Σύγκριση χρωματογραφημάτων συνολικής καζεΐνης, διαλυτής καζεΐνης και ιζήματος καζεΐνης τυριού τύπου Φέτας 60 ημερών επεξεργασμένου με Υπερυψηλή πίεση 500 MPa με νερό και συγκεντρώσεις ουρίας 2, 4 και 6 M.



Εικόνα 32. Σύγκριση χρωματογραφημάτων συνολικής καζεΐνης, διαλυτής καζεΐνης και ιζήματος καζεΐνης τυριού τύπου Φέτας 60 ημερών επεξεργασμένου με Υπερυψηλή πίεση 500 MPa με νερό και συγκεντρώσεις EDTA 50, 100 και 150 mM.



Εικόνα 33. Σύγκριση χρωματογραφημάτων συνολικής καζεΐνης, διαλυτής καζεΐνης και ιζήματος καζεΐνης τυριού τύπου Φέτας 200 ημερών επεξεργασμένου με Υπερυψηλή πίεση 500 MPa με νερό και συγκεντρώσεις ουρίας 2, 4 και 6 Μ.



Εικόνα 34. Σύγκριση χρωματογραφημάτων συνολικής καζεΐνης, διαλυτής καζεΐνης και ιζήματος καζεΐνης τυριού τύπου Φέτας 200 ημερών επεξεργασμένου με Υπερυψηλή πίεση 500 MPa με νερό και συγκεντρώσεις EDTA 50, 100 και 150 mM.

Η περιεκτικότητα σε τέφρα, αφού συλλεγούν τα αντίστοιχα βάρη 1, 2 και βάρος 3 (Κεφάλαιο 3.4) υπολογίστηκε από τον τύπο :

$$\% \text{ τέφρα} = 100 \cdot \frac{\text{βάρος τέφρας (βάρος 3-βάρος 1)}}{\text{βάρος δείγματος (βάρος 2- βάρος 1)}}$$

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν για το κάθε τυρί παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Μέσος όρος τέφρας (%) για τη Φέτα και τη Γραβιέρα

Τυριά	Μέσος όρος τέφρας (%)
Φέτα 15 ημερών	4,13
Φέτα 60 ημερών	6,4
Φέτα 120 ημερών	4,43
Φέτα 300 ημερών	5,99
Φέτα 15 ημερών Μάρτυρας	3,57
Φέτα 60 ημερών Μάρτυρας	3,75
Φέτα 200 ημερών Μάρτυρας	3,69
Φέτα 15 ημερών ΥΥΠ 200	5,27
Φέτα 60 ημερών ΥΥΠ 200	4,17
Φέτα 200 ημερών ΥΥΠ 200	3,75
Φέτα 15 ημερών ΥΥΠ 500	3,95
Φέτα 60 ημερών ΥΥΠ 500	3,79
Φέτα 200 ημερών ΥΥΠ 500	3,56
Γραβιέρα 7 ημερών	4,05
Γραβιέρα 60 ημερών	4,88
Γραβιέρα 90 ημερών	4,81
Γραβιέρα 210 ημερών	4,99

Η τιμή της τέφρας είναι απαραίτητη για τον υπολογισμό της πραγματικής συγκέντρωσης των στοιχείων ασβέστιο, μαγνήσιο, κάλιο και νάτριο στα τυριά.

Η πραγματική συγκέντρωση των στοιχείων ασβεστίου, μαγνησίου, καλίου και νατρίου σε mg/100g τυριού υπολογίζεται από τον τύπο :

$$\text{Actual Concentration} = (V_f * D_f * C_f * \text{Conc.}) / W_f * 10 \text{ όπου,}$$

W_f = βάρος τέφρας που ζυγίζεται για ανάλυση, δηλαδή 0,04 g τυριού,

V_f = τα ml που γίνεται η πρώτη αραιώση, δηλαδή 100

D_f = οι απαιτούμενες αραιώσεις μετά την 1^η αραιώση του δείγματος

C_f = (μ.ο. τέφρας / μ.ο. βάρους δείγματος)

Conc. = η απορρόφηση από την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης που εκφράζεται σε ppm (mg/l).

Οι τιμές της πραγματικής συγκέντρωσης των στοιχείων ασβεστίου, μαγνησίου, καλίου και νατρίου σε mg/100g τυριού παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

Τυριά	Actual Conc. mg / 100 g τυριού			
	Ca	Mg	K	Na
Φ15	420	32	97	1652
Φ60	316	28	89	3033
Φ120	173	18	64	2166
Φ300	181	21	63	3210
Φ15M	170	16	58	1452
Φ60M	452	34	105	1403
Φ200M	279	25	79	1260
Φ15/200	490	40	139	2076
Φ60/200	434	30	105	1355
Φ200/200	368	27	88	1523
Φ15/500	349	27	79	1711
Φ60/500	378	28	97	1434
Φ200/500	320	27	89	1575
Γραβιέρα				
Γ7	811	70	111	848
Γ60	927	81	170	1088
Γ90	887	80	152	1049
Γ210	968	86	173	1353