

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΣΕ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
« *ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΗ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ
ΚΑΙ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ* »

ΠΑΔΙΔΕΚΑ ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: ΓΚΟΛΦΩ ΜΟΑΤΣΟΥ Επίκουρος Καθηγήτρια ΤΕΤΤ-ΓΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

ΙΩΑΝΝΗΣ ΠΟΛΙΤΗΣ, Καθηγητής ΤΕΖΠΥ- ΓΠΑ

ΓΚΟΛΦΩ ΜΟΑΤΣΟΥ, Επίκουρος Καθηγήτρια ΤΕΤΤ-ΓΠΑ

ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΜΟΣΧΟΠΟΥΛΟΥ, Λέκτορας ΤΕΤΤ-ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ 2012

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Σε αυτή την ηλικία είναι δύσκολο να ξεκινάς να κάνεις πράγματα που έπρεπε να τα είχες κάνει δεκαετίες πριν... Όταν όμως συναντάς τους ανθρώπους που γνώρισα στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθήνας όλα τα εμπόδια υπερνικούνται και γίνονται βατά.

Αισθάνομαι λοιπόν την ανάγκη να πω ένα μεγάλο Ευχαριστώ στην επιβλέπουσα Επίκουρη Καθηγήτρια κυρία Γκόλφω Μοάτσου για την μετάδοση της γνώσης, για την πολύτιμη βοήθεια και την άμεση επίλυση διάφορων προβλημάτων που παρουσιάστηκαν, για το πολύτιμο χρόνο που μου αφιέρωσε καθώς και την πολύ αποδοτική συνεργασία.

Θέλω ακόμη να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Καθηγητή κύριο Ιωάννη Πολίτη για τη δυνατότητα που μου έδωσε να πραγματοποιήσω το συγκεκριμένο μεταπτυχιακό αλλά και για το διαρκές ενδιαφέρον του και τη συνεχή βοήθειά του με τις γνώσεις που μου μετέδωσε και τις παρατηρήσεις του.

Θέλω να ευχαριστήσω τη Λέκτορα κυρία Αικατερίνη Μοσχοπούλου για τη συμμετοχή της στην επιτροπή και τη συνεχή βοήθεια και το ενδιαφέρον της κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας μου.

Οφείλω ακόμα να ευχαριστήσω την κυρία Ευαγγελία Ζωΐδου, τον κύριο Γιώργο Θεοδώρου και τον Λάμπρο Σακκά για την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφεραν στην ολοκλήρωση των πειραμάτων για τη μελέτη μου, καθώς επίσης όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας και του εργαστηρίου Ζωοτεχνίας για τη βοήθεια τους.

Θέλω επίσης να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στις «συμφοιτήτριες μου» Βιταλιώτη Πόπη και Παγώνα Βανέσα που παρά τη διαφορά ηλικίας ήταν πάντα κοντά μου και μου έδιναν κουράγιο.

Ένα μεγάλο Ευχαριστώ στην οικογένεια μου, τους φίλους μου και τους συναδέλφους μου στη ΔΕΛΤΑ, που για όλο αυτό το διάστημα ανέχτηκαν το περίεργο πρόγραμμα μου και τις ιδιορρυθμίες μου αλλά πάντα στέκονταν δίπλα μου. Τέλος θέλω να πω πόσο τυχερή και ευτυχισμένη νιώθω που όλη αυτή η προσπάθεια συνετέλεσε ώστε η μεγάλη μου κόρη να αγαπήσει αυτή την επιστήμη και να φοιτεί πλέον και η ίδια στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών και να ευχηθώ καλή επιτυχία και στα δύο μικρότερα παιδιά μου...

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο προσδιορισμός υπολειμματικών ενεργοτήτων ενδογενών πρωτεασών σε θερμικά επεξεργασμένο γάλα που επεξεργάστηκε σε πιλοτική κλίμακα (σωληνωτός εναλλάκτης θερμότητας), σε δείγματα του εμπορίου, σε δείγματα ανασυσταμένης σκόνης γάλακτος (χαμηλής, μεσαίας και υψηλής θέρμανσης) και σε δείγματα ανασυσταμένου συμπυκνωμένου γάλακτος, το οποίο προορίζεται για βιομηχανική χρήση. Μελετήθηκε η συμπεριφορά της λυσισωμικής πρωτεάσης καθεψίνης D και των ενζύμων πλασμίνης, πλασμινογόνου και ενεργοποιητή του πλασμινογόνου.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, θερμοκρασίες >90 °C (3 s) στο έμμεσο σύστημα θέρμανσης που χρησιμοποιήθηκε, αδρανοποίησαν την καθεψίνη D στο φυσικό pH του γάλακτος, είτε επρόκειτο για γάλα, είτε για τα ανασυσταμένα προϊόντα. Η ενεργότητα αυτή παρατηρήθηκε στο παστεριωμένο γάλα και μάλιστα σε αξιοσημείωτα επίπεδα, 54% αυτής που παρατηρήθηκε στο θερμισμένο. Όμως, ενεργότητες που αντιστοιχούν σε άλλου τύπου λυσισωμικές πρωτεάσες δεν εμφανίσθηκαν, υποδεικνύοντας ότι τα ένζυμα αυτά αδρανοποιούνται με την παστερίωση. Στα δείγματα υψηλής παστερίωσης και UHT του εμπορίου η καθεψίνη D είχε αδρανοποιηθεί. Υπολειμματική ενεργότητα καθεψίνης D παρατηρήθηκε στην χαμηλής θέρμανσης (LH) σκόνη. Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις, η ενεργότητα αυτή συσχετιζόταν θετικά και στατιστικά σημαντικά με τη συγκέντρωση της υπολειμματικής β-LG. Παρατηρήθηκε ότι όταν η φυσική μη-μετουσιωμένη β-LG είναι <2600 mg/L το ένζυμο αυτό δεν ήταν ενεργό.

Τα αποτελέσματα σχετικά με την πλασμίνη επιβεβαίωσαν τη θερμοανθεκτικότητα των ενζύμων που απαρτίζουν το σύστημα αυτό (PL, PG, UPA). Παρότι, το σύστημα παρέμεινε ενεργό ακόμη και μετά από τις έντονες συνθήκες επεξεργασίας, παρατηρήθηκε αλλαγή στην αναλογία μεταξύ των επιμέρους ενεργοτήτων. Η ενεργότητα της πλασμίνης είχε τις χαμηλότερες τιμές στα γάλατα UHT και ορισμένα υψηλής παστερίωσης (HP), τα οποία είχαν και χαμηλή περιεκτικότητα σε φυσική β-LG. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τον στατιστικά σημαντικά υψηλότερο λόγο PG/PL, ο οποίος ήταν κατά >60% υψηλότερος από αυτόν των παστεριωμένων. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι το σύστημα πλασμίνης συσχετίσθηκε στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$) με τη συγκέντρωση της φυσικής β-LG, ειδικά η PL και το UPA. Ο λόγος PG/PL ήταν εξαιρετικά υψηλός στις θερμασμένες υψηλής θέρμανσης (HH) σκόνες, κατά πολύ υψηλότερος από αυτόν που παρατηρήθηκε στα UHT γάλατα και το ίδιο παρατηρήθηκε για το UPA.

Η ανάλυση των κυρίων συνιστωσών (PCA), έδειξε ότι μπορεί να γίνει ομαδοποίηση των δειγμάτων. Σε ότι αφορά στα πειραματικά γάλατα, μόνο τα δείγματα των 80 °C αποτελούσαν διακριτή ομάδα, καθώς τα υπόλοιπα είναι δύσκολο να διακριθούν μεταξύ τους με βάση την PCA. Όμως, με την ίδια ανάλυση διαχωρίστηκαν με σαφήνεια γάλατα που είχαν δεχθεί «χαμηλής» έντασης θερμική επεξεργασία (παστερίωση) από τα αυτά που έχουν υποστεί UHT ή παρόμοια επεξεργασία. Ήταν επίσης εμφανές ότι τα γάλατα υψηλής παστερίωσης της αγοράς είναι μία ανομοιογενής ομάδα, η οποία συχνά δεν διαχωρίζεται από αυτή των UHT.

ABSTRACT

The purpose of the present work was the determination of residual protease activities in heat treated milks that have been processed in pilot scale tubular heat-exchanger. Samples of experimentally processed raw milk, reconstituted skim milk powders (low, medium and high-heat) and reconstituted concentrated milks for industrial use along with commercial milks were analyzed in respect to cathepsin D, plasmin (PL), plasminogen (PG) and plasminogen activator (UPA) activities.

According to the results, treatments at $>90^{\circ}\text{C}$ (3 s) using the pilot system of the experiment inactivated cathepsin D at milk pH, in milk and in both reconstituted products. This type of activity was observed in pasteurized milk in substantial level that was 54% of that of thermalized milk. However, activities assigned to other lysosomal proteases were not observed, indicating that these enzymes did not survive pasteurization. Cathepsin D was inactivated in the high-pasteurized (HP) and UHT commercial milks. Residual activity was detected in the low-heat reconstituted powders. In all cases, cathepsin D activity was significantly positively correlated with the concentration of native β -LG and it was not detectable when β -LG <2600 mg/L.

Results about plasmin and related enzymes confirmed the thermostability of the system in milk. Although, the system had been active even after intense heat treatments, changes in the ratios of the individual activities (PL, PG, UPA) took place. The lowest PL values were found in the UHT milks and in some HP milks with very low residual β -LG content. As a consequence, the PG/PL ratio was 60% higher compared to pasteurized milks. In most cases, statistical analysis showed that plasmin system was significantly ($P<0.05$) affected by native β -LG concentration, especially PL and UPA. The ratio PG/PL was very high in high-heat powders, much higher than that in UHT milks and the same was also true for UPA activity.

Grouping of both experimental and market milk samples was achieved by means of principal component analysis (PCA). Regarding experimental milks, only $80^{\circ}\text{C}/3$ s milks consisted a separate group. Following the same procedure, market milks of low heat-treatment (pasteurization) were clearly separated from UHT or similarly treated milks. Finally, PCA showed that HP market milks could not be separated as a consistent group and many of these milks could be classified as UHT.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	5
1. ΘΕΡΜΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ	6
1.1. ΤΥΠΟΙ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ.....	7
1.2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΑΝΣΗΣ ΣΤΑ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ.....	13
2. ΠΛΑΣΜΙΝΗ	20
2.1. ΣΥΣΤΗΜΑ ΠΛΑΣΜΙΝΗΣ.....	20
2.2. ΣΥΣΤΗΜΑ ΠΛΑΣΜΙΝΗΣ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΕΣ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ.....	23
2.2.1. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΣΤΙΣ ΕΝΖΥΜΙΚΕΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΠΛΑΣΜΙΝΗΣ.....	24
2.3. ΠΛΑΣΜΙΝΗ ΚΑΙ ΘΕΡΜΙΚΑ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΜΕΝΟ ΓΑΛΑ.....	27
3. ΚΑΘΕΨΙΝΗ-D	29
4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	33
4.1. ΘΕΡΜΙΚΕΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΕΣ ΚΑΙ ΔΕΙΓΜΑΤΑ.....	33
4.1.1 ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΝΩΠΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΠΟΥ ΔΕΧΘΗΚΑΝ ΕΜΜΕΣΗ ΘΕΡΜΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ.....	33
4.1.2. ΕΜΠΟΡΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΘΕΡΜΙΚΑ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΜΕΝΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ.....	33
4.1.3 ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΝΑΣΥΣΤΑΜΕΝΗΣ ΣΚΟΝΗΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΠΟΥ ΔΕΧΘΗΚΑΝ ΕΜΜΕΣΗ ΘΕΡΜΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ.....	35
4.1.4. ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΣΥΜΠΥΚΝΩΜΕΝΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΠΟΥ ΔΕΧΘΗΚΑΝ ΕΜΜΕΣΗ ΘΕΡΜΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ.....	35
4.2. ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΚΑΘΕΨΙΝΗΣ D.....	35
4.3. ΕΝΖΥΜΙΚΕΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΠΛΑΣΜΙΝΗΣ.....	37
4.4. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ	38

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	40
5.1. ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΝΩΠΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΠΟΥ ΔΕΧΘΗΚΑΝ ΕΜΜΕΣΗ ΘΕΡΜΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ.....	40
5.2. ΕΜΠΟΡΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΘΕΡΜΙΚΑ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΜΕΝΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ.....	50
5.3 ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΝΑΣΥΣΤΑΜΕΝΗΣ ΣΚΟΝΗΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΠΟΥ ΔΕΧΘΗΚΑΝ ΕΜΜΕΣΗ ΘΕΡΜΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ.....	58
5.4. ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΣΥΜΠΥΚΝΩΜΕΝΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΠΟΥ ΔΕΧΘΗΚΑΝ ΕΜΜΕΣΗ ΘΕΡΜΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ.....	64
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	67
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	69
8. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	76

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η θερμική επεξεργασία αποτελεί βασική και απαραίτητη επεξεργασία για την παραγωγή όλων των γαλακτοκομικών προϊόντων. Κύριος σκοπός της είναι η εξασφάλιση της ασφάλειας του καταναλωτή μέσω της εξάλειψης των παθογόνων μικροοργανισμών. Επιπλέον, ανάλογα με την έντασή της αυξάνει το χρόνο συντήρησης των προϊόντων αδρανοποιώντας αλλοιογόνους, μη παθογόνους μικροοργανισμούς και διαμορφώνει τα ρεολογικά χαρακτηριστικά ζυμωμένων προϊόντων γάλακτος επιδρώντας στο πρωτεϊνικό κλάσμα του γάλακτος. Παράλληλα, προκαλεί οργανοληπτικές και φυσικοχημικές αλλαγές στο γάλα που είναι αποτέλεσμα των χημικών αντιδράσεων, οι οποίες οφείλονται στη θερμική επεξεργασία και στην πολυπλοκότητα της σύστασης του γάλακτος. Το θέμα αυτό, εξαιτίας της μεγάλης τεχνολογικής του σημασίας, έχει μελετηθεί εκτεταμένα. Η εκτίμηση της έντασης της θερμικής επεξεργασίας που έχει δεχθεί ένα γαλακτοκομικό προϊόν προσδιορίζεται με την συνδυασμένη ανάλυση συστατικών-δεικτών. Τα συστατικά αυτά είτε είναι φυσικά συστατικά του γάλακτος (πρωτεΐνες, ενδογενή ένζυμα), είτε είναι νέα συστατικά (φουροζίνη, λακτουλόζη), τα οποία δημιουργούνται κατά τη θερμική του επεξεργασία. Παρόλα αυτά, υπάρχουν ακόμη πολλές παράμετροι, οι οποίες δεν έχουν πλήρως αποσαφηνιστεί, με αποτέλεσμα η έρευνα σε αυτό το πεδίο να είναι συνεχής.

Πέραν των αλλαγών που συμβαίνουν στους διάφορους τύπους θερμικά επεξεργασμένου γάλακτος, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει και η σταθερότητα αυτών των προϊόντων κατά τη διάρκεια συντήρησής τους. Το σημαντικότερο ρόλο σε αυτή την περίπτωση έχει αποδειχθεί ότι παίζουν τα ενδογενή ένζυμα του γάλακτος, μερικά από τα οποία παρουσιάζουν αξιοσημείωτη αντοχή στις θερμικές επεξεργασίες. Έτσι, το αντικείμενο της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της υπολειμματικής ενεργότητας δύο πρωτεολυτικών ενδογενών ενζύμων του γάλακτος, της πλασμίνης και της καθειψίνης D σε διάφορους τύπους πόσιμου γάλακτος, και σε γάλα και διάφορους τύπους ανασυσταμένης σκόνης γάλακτος που δέχθηκαν ειδική θερμική επεξεργασία σε πιλοτική κλίμακα. Ειδικότερα, μελετήθηκαν οι ενεργότητες όλων των ενζύμων που απαρτίζουν το σύστημα πλασμίνης στο γάλα και η ενεργότητα της καθειψίνης D στον ορό. Η παρούσα εργασία αποτελεί συνέχεια προηγούμενης ερευνητικής προσπάθειας που πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γαλακτοκομίας του Γ.Π.Α. σχετικά με τους δείκτες θερμικής επεξεργασίας του γάλακτος, η οποία είχε ως στόχο τη μελέτη της υπολειμματικής β-γαλακτογλοβουλίνης, της λακτουλόζης και της φουροζίνης, στα πλαίσια μιας μεταπτυχιακής (Σακκάς, 2011) και μιας πτυχιακής μελέτης (Μουτάφη, 2010). Οι πειραματικές πιλοτικές θερμικές επεξεργασίες πραγματοποιήθηκαν στον ειδικό εξοπλισμό του τμήματος R&D της ΔΕΛΤΑ Α.Ε. σε συνεργασία με την ομάδα αυτού του τμήματος (κ. Α. Χατζηγεωργίου, δ/ντρια, Γ. Κουμούτσος και Μ. Κωσταρίδου).

1. ΘΕΡΜΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

Το γάλα θεωρείται η πιο πλούσια τροφή της φύσης που εφοδιάζει τον οργανισμό των ανθρώπων και των ζώων με απαραίτητα θρεπτικά συστατικά. Αποτελεί αναπόσπαστο τμήμα της καθημερινής ανθρώπινης διατροφής με τη μορφή διαφόρων τύπων γαλακτοκομικών προϊόντων. Βασικές τεχνολογίες τροφίμων εφαρμόζονται στο νωπό γάλα για την παραγωγή των γαλακτοκομικών προϊόντων, όπως π.χ. η θερμική επεξεργασία (πόσιμο γάλα), η ζύμωση (γιαούρτι, τυριά), η συμπύκνωση, η αποξήρανση (σκόνες γάλακτος). Πρέπει να σημειωθεί ότι το γάλα που δέχεται θερμική επεξεργασία με σκοπό να καταναλωθεί ως πόσιμο από τον άνθρωπο είναι σε παγκόσμια κλίμακα κυρίως το αγελαδινό.

Το μόνο μειονέκτημα που παρουσιάζει το γάλα είναι ότι εξαιτίας της πλούσιας σύστασής του είναι υπόστρωμα που ευνοεί την ταχύτατη ανάπτυξη μικροοργανισμών εάν δεν ληφθούν τα κατάλληλα μέτρα. Οι μικροοργανισμοί επιμολύνουν το γάλα κατά τη διάρκεια της άμελης, της συλλογής και της συντήρησής του πριν από την επεξεργασία και προέρχονται από το ζώο και το περιβάλλον του, τα σκεύη και τις εγκαταστάσεις συλλογής και συντήρησης καθώς και από τους ανθρώπους που χειρίζονται τα ζώα και το σχετικό εξοπλισμό. Όλες οι κατηγορίες των μικροοργανισμών μπορούν να αναπτυχθούν στο γάλα, οι οποίες ομαδοποιούνται ως παθογόνοι και ως αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχουν επίσης οι επιμέρους κατηγορίες των σπορογόνων μικροοργανισμών, τα θερμοάντοχα (ενδο)σπόρια των οποίων έχουν πολύ μεγάλη σημασία για τα θερμικά επεξεργασμένα προϊόντα. Στο νωπό γάλα μπορούν να αναπτυχθούν παθογόνα για τον άνθρωπο μικρόβια, π.χ. *Mycobacterium tuberculosis*, *Coxiella burnetti*, ο εντεροπαθογόνος *E. coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* και *Campylobacter jejuni*. Για την εξασφάλιση της υγείας των καταναλωτών οι διάφοροι τύποι θερμικής επεξεργασίας που εφαρμόζονται, για την παραγωγή πόσιμου γάλακτος πρέπει να εξασφαλίζουν την πλήρη αδρανοποίηση αυτής της κατηγορίας των μικροοργανισμών. Ταυτόχρονα, η θερμική επεξεργασία ανάλογα με τον τύπο της, συντελεί στη σημαντική μείωση έως και στην εξάλειψη των πληθυσμών των αλλοιογόνων μη παθογόνων μικροοργανισμών καθώς και στην αδρανοποίηση των ενδογενών και μικροβιακών ενζύμων, με αποτέλεσμα την αύξηση του χρόνου συντήρησης των εμπορικών προϊόντων πόσιμου γάλακτος.

Εξαιτίας της τεράστιας σημασίας της μικροβιολογικής ποιότητας του νωπού γάλακτος για την ασφάλεια των καταναλωτών και την περαιτέρω επεξεργασία, σε όλες τις αναπτυγμένες χώρες του κόσμου εφαρμόζονται αυστηροί νομοθετικοί κανονισμοί σχετικά με τις συνθήκες παραγωγής, αποθήκευσης και διακίνησης του νωπού γάλακτος. Σχετικός με το θέμα της πρωτογενούς παραγωγής είναι ο Κανονισμός 853/2004 της Ε.Ε. (European Union, 2004). Τα ειδικά κριτήρια ποιότητας για το νωπό γάλα ορίζονται στον κανονισμό 1662/2006 (European

Union, 2006). Σύμφωνα με αυτόν, ο κυλιόμενος γεωμετρικός μέσος όρος της περιεκτικότητας σε μικρόβια στους 30°C του νωπού αγελαδινού γάλακτος πρέπει να είναι ≤ 100.000 cfu/ml, κατά τη διάρκεια μιας περιόδου δύο μηνών με δύο τουλάχιστον δείγματα μηνιαίως. Επιπλέον, ορίζεται ότι όταν το νωπό αγελαδινό γάλα προορίζεται για την παρασκευή προϊόντων θα πρέπει αμέσως πριν από την επεξεργασία να περιέχει ≤ 300.000 cfu/ml στους 30°C. Ο κυλιόμενος γεωμετρικός μέσος όρος των σωματικών κυττάρων κατά τη διάρκεια μιας περιόδου τριών μηνών με ένα τουλάχιστον δείγμα μηνιαίως πρέπει να είναι ≤ 400.000 scc/ml. Για το νωπό γάλα άλλων ειδών (πρόβειο, αίγιο) το παραπάνω μικροβιολογικό όριο είναι 1.500.000 cfu/ml, εάν όμως το νωπό αυτό γάλα πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για παρασκευή προϊόντων χωρίς προηγούμενη θερμική επεξεργασία το όριο είναι 500.000 cfu/ml.

Διάφοροι τύποι θερμικών επεξεργασιών έχουν αναπτυχθεί για την παραγωγή του πόσιμου γάλακτος, το οποίο είναι το αντικείμενο αυτής της μελέτης. Διαφοροποιούνται ως προς το επίπεδο θερμοκρασίας, τη διάρκεια θέρμανσης και την τεχνολογία που εφαρμόζεται για τη μεταφορά θερμότητας στο προϊόν. Η αποτελεσματικότητα της θερμικής επεξεργασίας επηρεάζεται εκτός από τα παραπάνω και από την προηγούμενη μεταχείριση του γάλακτος. Επεξεργασίες του γάλακτος που εξασφαλίζουν τη θανάτωση όλων των μικροοργανισμών και των σπορίων τους, καθώς και των ενδογενών και μικροβιακών ενζύμων είναι ιδανικές από την άποψη της ασφάλειας. Όμως η εφαρμογή αντίστοιχων συνδυασμών θερμοκρασίας/χρόνου προκαλεί ανεπιθύμητες χημικές αντιδράσεις, οι οποίες επηρεάζουν δραματικά τα διατροφικά και τεχνολογικά χαρακτηριστικά του προϊόντος.

Στην ενότητα αυτή θα γίνει μία σύντομη παρουσίαση των θερμικών επεξεργασιών που εφαρμόζονται στο γάλα και της επίδρασής τους στα φυσικοχημικά και βιοχημικά του χαρακτηριστικά, καθώς και σχετικών νομοθετικών απαιτήσεων.

1.3. ΤΥΠΟΙ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

Οι ορισμοί που ακολουθούν σχετικά με το νωπό και επεξεργασμένο γάλα προέρχονται από τον Ελληνικό Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (2009). Στον Πίνακα 1.1. παρουσιάζονται οι τύποι γάλακτος που προορίζεται να καταναλωθεί ως πόσιμο και στον Πίνακα 1.2 συνοπτικά οι μέθοδοι θέρμανσης που εφαρμόζονται κατά την επεξεργασία του γάλακτος που πρόκειται να καταναλωθεί ως πόσιμο.

Νωπό γάλα χαρακτηρίζεται το γάλα που εκκρίνεται από τους μαστικούς αδένες μιας ή περισσότερων αγελάδων, το οποίο δεν έχει θερμανθεί σε θερμοκρασία μεγαλύτερη των 40°C, ούτε έχει υποβληθεί σε επεξεργασία με ισοδύναμο αποτέλεσμα. Επισημαίνεται ότι απαγορεύεται η προσφορά και η πώληση νωπού γάλακτος, για λόγους μικροβιολογικής ασφάλειας.

Θερμικά επεξεργασμένο γάλα χαρακτηρίζεται γάλα κατάλληλο για ανθρώπινη κατανάλωση που παράγεται άμεσα και αποκλειστικά από νωπό γάλα, με θερμική επεξεργασία (παστερίωση, υψηλή παστερίωση, αποστείρωση, UHT).

Θερμική επεξεργασία νοείται κάθε επεξεργασία με θέρμανση που έχει ως αποτέλεσμα, αμέσως μετά την εφαρμογή της, αρνητική αντίδραση στη δοκιμή της φωσφατάσης.

Κύριος στόχος της θερμικής επεξεργασίας είναι η θανάτωση των παθογόνων μικροοργανισμών, η αδρανοποίηση όλων ή μεγάλου μέρους των βακτηρίων (μικροβίων) και ενζύμων και η επίτευξη διαφόρων χημικών μεταβολών επιθυμητών ή μη. Πριν από τη θερμική επεξεργασία πραγματοποιείται καθαρισμός πιθανόν βακτηριοκάθαρση (bactofugation), αποκορύφωση, τυποποίηση του γάλακτος και ομογενοποίηση ανάλογα με τη περαιτέρω επεξεργασία του (Καμιναρίδης και Μοάτσου, 2009).

Οι βασικές θερμικές επεξεργασίες στις οποίες υποβάλλεται το γάλα είναι (Πίνακας 1.1):

ΘΕΡΜΙΣΜΑ. Επεξεργασία του γάλακτος στους 63-65°C για 15 s ή ισοδύναμος συνδυασμός θερμοκρασίας – χρόνου, ώστε το γάλα να είναι θετικό στη δοκιμή της αλκαλικής φωσφατάσης (Dairy Processing Handbook, 1995). Οι πιο συνήθεις συνδυασμοί που χρησιμοποιούνται για το θέρμισμα είναι 57-68°C/15 s (Lewis, 2003) ή 60-69°C/20 s (Walstra et al., 2006). Σκοπός του θερμίσματος είναι η παράταση του χρόνου συντήρησης του νωπού γάλακτος, καθώς στις περισσότερες περιπτώσεις δεν είναι δυνατή η άμεση θερμική επεξεργασία, αμέσως μετά τη συλλογή του από τις κτηνοτροφικές μονάδες. Η μεταφορά του και η αποθήκευση στις γαλακτοβιομηχανίες μπορεί να διαρκέσει από μερικές ώρες έως μερικές ημέρες με αποτέλεσμα την υποβάθμιση της ποιότητάς του.

Το θέρμισμα μειώνει τους πληθυσμούς των αλλοιογόνων βακτηρίων και κυρίως των ψυχροτρόφων. Οι αυξημένοι πληθυσμοί ψυχροτρόφων είναι χαρακτηριστικό του γάλακτος που συντηρείται σε ψύξη και μπορούν να υδρολύσουν τα κύρια συστατικά του. Η αλλοίωση αυτή προκαλείται από τις θερμοανθεκτικές λιπάσες και πρωτεϊνάσες που παράγουν τα ψυχρότροφα βακτήρια όταν ξεπεράσουν τις 10^5 cfu/ml, οι οποίες μπορούν να επιζούν ακόμη και της UHT επεξεργασίας (υπερψηλή θέρμανση). Το θέρμισμα σε σχετικά υψηλές θερμοκρασίες (π.χ. 67,5°C για 20 s), προκαλεί αδρανοποίηση της ενδογενούς λιποπρωτεϊνικής λιπάσης του γάλακτος κατά 50% και επιτρέπει τη χρήση σχετικά χαμηλότερης θερμοκρασίας κατά την ομογενοποίηση του γάλακτος πριν από τη θερμική επεξεργασία. Δεν προκαλεί μη αναστρέψιμες αλλαγές στο γάλα, δεν επηρεάζει τη διατροφική του αξία και παρατείνει το χρόνο αποθήκευσης του νωπού γάλακτος έως 3 ημέρες σε θερμοκρασία $\leq 8^\circ\text{C}$ (Wilbey, 1996, Sørhaug and Sterpaniak, 1997, Walstra et al., 2006).

ΠΑΣΤΕΡΙΩΣΗ: Θερμική επεξεργασία του γάλακτος στους 72-75°C για 15-20 s ή ισοδύναμους συνδυασμούς θερμοκρασίας – χρόνου (Dairy Processing Handbook

1995). Το παστεριωμένο γάλα διατηρείται σε θερμοκρασία ψύξης $\leq 6^{\circ}\text{C}$ συνήθως για 5-7 ημέρες. Το γάλα αυτό αναφέρεται στη συσκευασία ως «φρέσκο». Σε μερικές περιπτώσεις η διάρκεια ζωής του μπορεί να είναι και δύο εβδομάδες, υπό προϋποθέσεις που σχετίζονται με τη μικροβιολογική ποιότητα της πρώτης ύλης, το σχεδιασμό της θερμικής επεξεργασίας, της συσκευασίας και τα χαρακτηριστικά της ψυκτικής αλυσίδας κατά τη διακίνηση του προϊόντος (Πίνακας 1.1).

Με την παστερίωση θανατώνονται όλοι οι παθογόνοι μικροοργανισμοί που υπάρχουν στο γάλα, έτσι ώστε αυτό να καταστεί ασφαλές για ανθρώπινη κατανάλωση. Εκτός όμως από τα παθογόνα μικρόβια υπάρχουν και άλλοι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί, ενδογενή και μη ένζυμα που ευτυχώς θανατώνονται ή αδρανοποιούνται με την παστερίωση καθώς εάν παρέμεναν θα υποβάθμιζαν την ποιότητα του γάλακτος και θα μείωναν τη διατηρησιμότητα του (Walstra *et al.*, 2006). Στόχος λοιπόν της παστερίωσης εκτός από την ασφάλεια του καταναλωτή είναι και η αύξηση του χρόνου ζωής του προϊόντος.

Η θέρμανση κατά την παστερίωση είναι συνεχής και προκαλεί ελάχιστες χημικές, φυσικές και οργανοληπτικές αλλαγές στο προϊόν (Wilbey, 1996). Η παστερίωση μπορεί να γίνει σε ανοικτού τύπου λέβητες ως ασυνεχής LTLT (LOW TEMPERATURE - LONG TIME), στους 63°C για 30 min. Η συνεχής διαδικασία HTST (HIGH TEMPERATURE - SHORT TIME) στους 72°C για 15 s είναι όμως ο κυρίαρχος τρόπος θερμικής επεξεργασίας του γάλακτος. Με την παστερίωση δεν επέρχονται αλλαγές στο χρώμα, την οσμή, τη γεύση και τη δομή του γάλακτος (Lewis, 2003). Η θέρμανση του γάλακτος κατά την HTST παστερίωση γίνεται έμμεσα (Indirect Heating) σε πλακοειδείς (Plate Heat Exchangers) ή σε σωληνοειδείς εναλλάκτες (Tubular Heat Exchangers) (Πίνακας 1.2). Στην έμμεση θερμική επεξεργασία το γάλα και το μέσο θέρμανσης, συνήθως νερό, δεν έρχονται σε άμεση επαφή. Τα δύο υγρά κυκλοφορούν σε εφαιπτόμενα αλλά σε διαφορετικά χωριζόμενα μεταξύ τους διαμερίσματα (Hougaard *et al.*, 2009).

Η συσκευασία του παστεριωμένου γάλακτος γίνεται είτε σε πλαστικά μπουκάλια που κατασκευάζονται από πολυαιθυλένιο ή πολυπροπυλένιο, είτε σε χάρτινες συσκευασίες επικαλυμμένες με πολυαιθυλένιο που μπορεί να περιέχουν και φύλλο αλουμινίου, είτε σε γυάλινα μπουκάλια. Η τελική σφράγιση των προϊόντων γίνεται με καπάκια ή πώματα ή με θερμικό κλείσιμο σε υψηλές θερμοκρασίες περίπου 250°C .

ΥΨΗΛΗ ΠΑΣΤΕΡΙΩΣΗ: Θερμική επεξεργασία του γάλακτος στους $125-138^{\circ}\text{C}$ για 2-4 s, συνηθέστερα στους $115-120^{\circ}\text{C}$ για 2-5 s ή σε ισοδύναμο συνδυασμό θερμοκρασίας - χρόνου. Το γάλα ψύχεται αμέσως μετά τη θερμική επεξεργασία, διατηρείται σε θερμοκρασία ψύξης $\leq 6^{\circ}\text{C}$ και η διάρκεια ζωής του είναι από 10 έως 30 ημέρες ή και περισσότερο, ανάλογα με τον τύπο συσκευασίας που εφαρμόζεται, π.χ. η ασηπτική συσκευασία παρατείνει σημαντικά τη διάρκεια ζωής. Στη συσκευασία αναγράφονται σε εμφανές σημείο οι λέξεις «Γάλα» και «Υψηλής Παστερίωσης». Απαγορεύεται σε οποιοδήποτε σημείο της συσκευασίας η

αναγραφή των λέξεων «φρέσκο» και «παστεριωμένο». Οι δοκιμασίες της φωσφατάσης και της υπεροξειδάσης πρέπει να έχουν αρνητική αντίδραση (Dairy Processing Handbook, 1995, Ulberth, 2003, Rysstad and Kolstad, 2006).

Κατά την υψηλή παστερίωση καταστρέφονται όλοι οι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί, αλλά όχι τα σπόρια τους και τα περισσότερα ένζυμα αδρανοποιούνται. Εκτός από αυτές τις αλλαγές, η υψηλή παστερίωση επιδρά και σε άλλα συστατικά του γάλακτος όπως στις πρωτεΐνες του ορού και στις πρωτεΐνες της μεμβράνης των λιποσφαιρίων, προκαλώντας μετουσίωση καθώς και αντιδράσεις των πρωτεϊνών ορού μεταξύ τους και με τις καζεΐνες και επακόλουθη δημιουργία συμπλόκων. Ως αποτέλεσμα παρατηρούνται αλλαγές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του γάλακτος όπως ελαφριά γεύση βρασμένου γάλακτος. Επιπλέον, σε τέτοιου τύπου θερμικές επεξεργασίες (>100°C) μπορεί να επηρεασθούν και ορισμένες βιταμίνες, κυρίως υδατοδιαλυτές εκτός από το ασκορβικό οξύ, το οποίο επηρεάζεται ήδη από τις συνθήκες της κλασικής παστερίωσης (Fox and McSweeney, 1998, Walstra *et al.*, 2006, Καμιναρίδης και Μοάτσου, 2009).

Η υψηλή παστερίωση αντιστοιχεί σε ποικίλους συνδυασμούς θερμοκρασίας χρόνου που επιτυγχάνονται με διάφορους τύπους θέρμανσης (Πίνακας 1.2). Μπορεί να γίνει είτε με έμμεση θέρμανση συνήθως σε σωληνοειδείς εναλλάκτες, ή συνηθέστερα με άμεση θέρμανση για την αποφυγή των επικαθίσεων (fouling) στις επιφάνειες του εναλλάκτη που ενισχύονται σε θερμοκρασίες > 85°C. Η άμεση θέρμανση γίνεται συνήθως με δύο τρόπους: με έγχυση ατμού στο γάλα (Direct Injection) ή με έγχυση γάλακτος σε ατμό (Direct Infusion). Με την άμεση θέρμανση μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολύ υψηλές θερμοκρασίες για σύντομο χρονικό διάστημα, έτσι ώστε να ελαχιστοποιούνται οι ανεπιθύμητες επιδράσεις στα συστατικά του γάλακτος. Μάλιστα η χρήση της τεχνολογίας Direct Infusion είναι η καλύτερη επιλογή για την παραγωγή γάλακτος μακράς διάρκειας με οργανοληπτικές ιδιότητες παρόμοιες με αυτές του παστεριωμένου.

Ο τύπος θέρμανσης σε συνδυασμό με τον τύπο της συσκευασίας παίζουν σημαντικό ρόλο για τη διάρκεια ζωής και την οργανοληπτική ποιότητα του προϊόντος (Rysstad and Kolstad, 2006). Σύμφωνα με τις σύγχρονες τάσεις, η συσκευασία των προϊόντων υψηλής παστερίωσης γίνεται σε ασηπτικές συνθήκες και σε συσκευασίες που συνήθως πλένονται και αποστειρώνονται μέσα στη γραμμή παραγωγής πριν το γέμισμα του προϊόντος και κλείνονται αεροστεγώς. Μέσα στη φιάλη εμφυσάται αδρανές αέριο, συνήθως άζωτο, και στη συνέχεια κλείνεται με αλουμινόφυλλο που σφραγίζεται σε υψηλές θερμοκρασίες περίπου 250°C.

ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗ: Θερμική επεξεργασία του γάλακτος σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες από την οποία παράγονται προϊόντα σταθερά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για μεγάλο χρονικό διάστημα περίπου 3-12 μήνες (Dairy Processing Handbook, 1995). Με την αποστείρωση καταστρέφεται το σύνολο των παθογόνων και μη μικροοργανισμών καθώς επίσης και το σύνολο των σπορίων τους και στόχος της είναι η καταστροφή του *Clostridium botulinum* και των σπορίων του, τα οποία

είναι τα πιο θερμοανθεκτικά (Lewis, 2003, Walstra *et al.*, 2006). Η αποστείρωση επιφέρει αλλοιώσεις στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων και μείωση της θρεπτικής τους αξίας.

Η αποστείρωση γίνεται με δύο τρόπους (Fox and McSweeney, 1998, Καμιναρίδης και Μοάτσου, 2009) :

- ✓ **UHT (Ultra High Temperature):** άκρως υψηλή θερμοκρασία στους 135-150°C για 1-4 s ή >140°C για 5 s και πάντως σε θερμοκρασίες άνω των 135°C για χρόνο μεγαλύτερο του 1 s. Τα περισσότερα ένζυμα αδρανοποιούνται ενώ ένα μέρος της πλασμίνης και των βακτηριακών πρωτεασών και λιπασών παραμένει ενεργό. Η επεξεργασία αυτή γίνεται σε συνεχή λειτουργία και τα αποτελέσματα είναι πιο ήπια από αυτά της κλασικής αποστείρωσης. Το γάλα έχει ελαφριά γεύση «βρασμένου» και μικρότερη απώλεια θρεπτικών συστατικών. Σε αυτή την περίπτωση έχουμε άμεση ανάμειξη του γάλακτος με τον ατμό που ακολουθείται από στιγμιαία ψύξη σε δοχείο κενού, όπου εξατμίζεται το νερό. Στη συνέχεια ακολουθεί ομογενοποίηση του γάλακτος υπό άσηπτες συνθήκες και συσκευασία. Η πλήρωση των συσκευασιών γίνεται υπό άσηπτικές συνθήκες σε αποστειρωμένα δοχεία και ακολουθεί ερμητικό σφράγισμα. Οι άσηπτες συνθήκες στη γραμμή παραγωγής επιτυγχάνονται με εισαγωγή υπέρθερμου ατμού ή με υπεροξείδιο του υδρογόνου.
- ✓ **Κλασική αποστείρωση:** έντονη θερμική επεξεργασία του γάλακτος, συνήθως ασυνεχούς τύπου, στους 115-125°C για 20-30 min. Σε αυτή την επεξεργασία αδρανοποιούνται όλα τα ενδογενή ένζυμα και το προϊόν υφίσταται έντονες αλλαγές στα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά, κασάνωση και χαρακτηριστική γεύση «καμένου» γάλακτος εξαιτίας των αντιδράσεων της λακτόζης. Η αντίδραση Maillard οφείλεται στην αλληλεπίδραση της λακτόζης με τη λυσίνη που καταλήγει στο σχηματισμό των μελανοιδινών, οι οποίες ευθύνονται για τον καφέ χρωματισμό και κάποια ενδιάμεσα από τα προϊόντα της αντίδρασης ευθύνονται για τις αλλαγές στη γεύση και το άρωμα. Άλλες μεταβολές που υφίσταται η λακτόζη είναι η αποικοδόμησή της σε οξέα και η σε μεγάλη έκταση ισομερείωση της σε λακτουλόζη, επιλακτόζη και ταγατόζη.

Τέλος, μία σύγχρονη τάση στην παραγωγή του γάλακτος που πρόκειται να καταναλωθεί ως πόσιμο είναι το γάλα ESL (Extended Shelf Life Milk) που ορίζεται ως «ένα προϊόν με χρόνο ζωής μεγαλύτερο του παστεριωμένου γάλακτος» (Henyon, 1999) ή ως «προϊόν που έχει επεξεργαστεί μ' έναν τρόπο που μειώνει το μικροβιακό πληθυσμό περισσότερο απ' την κανονική παστερίωση, συσκευασμένο κάτω από εξαιρετικά αυστηρές συνθήκες υγιεινής και το οποίο έχει μια προσδιορισμένη επιμήκυνση στη διάρκεια ζωής κάτω από συνθήκες ψύξης» (Rysstad and Kolstad, 2006). Κατά την παραγωγή αυτού του τύπου γάλακτος, μπορεί να εφαρμόζονται και άλλες τεχνολογίες σε συνδυασμό με τη θέρμανση, όπως η βακτηριοκάθαρση (bactofugation) και η μικροδιήθηση (microfiltration) που μπορούν να

απομακρύνουν από το γάλα και τα σπόρια. Στην κατηγορία αυτή μπορεί να ανήκουν και γάλατα με τη σήμανση «υψηλής παστερίωσης».

Πίνακας 1.1. Τύποι γάλακτος που προορίζεται να καταναλωθεί ως πόσιμο (από Moatsou, 2012).

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ / ΧΡΟΝΟΣ	ΣΤΟΧΟΣ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ	ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ	ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ
ΠΑΣΤΕΡΙΩΣΗ	72-75°C για 15-20 s ή ισοδύναμος συνδυασμός θερμοκρασίας – χρόνου	Θανάτωση παθογόνων μικροοργανισμών <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Coxiella burnetti</i> , <i>E. coli</i> O157:H7, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>Listeria monocytogenes</i> και αδρανοποίηση αλλοιογόνων μικροοργανισμών και ενζύμων.	Αρνητική αντίδραση στη δοκιμασία αλκαλικής φωσφατάσης και θετική στη δοκιμασία υπεροξειδάσης. Ελάχιστη επίδραση στα χαρακτηριστικά του γάλακτος.	5 ημέρες στους ≤6°C	Πλαστικά μπουκάλια από πολυαιθυλένιο ή πολυπροπυλένιο, χάρτινες συσκευασίες επιχρισμένες με πολυαιθυλένιο και που μπορεί να περιέχουν και φύλλο αλουμινίου, γυάλινα μπουκάλια.
ΥΨΗΛΗ ΠΑΣΤΕΡΙΩΣΗ	125-138°C για 2-4 s ή ισοδύναμος συνδυασμός θερμοκρασίας – χρόνου.	Καταστροφή όλων των αλλοιογόνων μικροοργανισμών αλλά όχι των σπορίων τους, αδρανοποίηση των περισσότερων ενζύμων.	Οι δοκιμασίες της φωσφατάσης και της υπεροξειδάσης πρέπει να έχουν αρνητική αντίδραση.	από 10 έως 30 ημέρες ή και περισσότερο στους ≤6°C .	Συσκευασία σε ασηπτικές συνθήκες με εισαγωγή στη συσκευασία αδρανούς αερίου (άζωτο). Κλείσιμο με αλουμινόφυλλο που συγκολλείται σε υψηλές θερμοκρασίες (250°C).
ESL	140 °C για 2 s ή 130-145 °C για <1 s	Καταστροφή όλων των αλλοιογόνων μικροοργανισμών, αδρανοποίηση των περισσότερων ενζύμων. Απομάκρυνση των σπορίων όταν εφαρμόζεται βακτηριοκάθαρση (bactofugation) ή μικροδιήθηση (microfiltration).	Οι δοκιμασίες της φωσφατάσης και της υπεροξειδάσης πρέπει να έχουν αρνητική αντίδραση	15-45 ημέρες στους <7 °C ή ≥45 ημέρες στους 10°C	Συσκευασία σε ασηπτικές συνθήκες με εισαγωγή στη συσκευασία αδρανούς αερίου (άζωτο). Κλείσιμο με αλουμινόφυλλο που συγκολλείται σε υψηλές θερμοκρασίες (250°C).
ΥΠΗ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗ	135-150°C για 1-4s ή >140°C για 5s.	Καταστροφή όλων των αλλοιογόνων μικροοργανισμών και των σπορίων τους. Τα περισσότερα ένζυμα αδρανοποιούνται, ενώ ένα μέρος της πλασμίνης και των βακτηριακών πρωτεασών και λιπασών παραμένει ενεργό.	Ελαφριά γεύση «βρασμένου» και μικρότερη απώλεια θρεπτικών συστατικών.	Διατήρηση στους ≤32,2°C για 3-12 μήνες.	Συσκευασία υπό ασηπτικές συνθήκες σε αποστειρωμένα δοχεία και ακολουθεί ερμητικό σφράγισμα.
ΚΛΑΣΙΚΗ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗ	115-125°C για 20-30min	Καταστροφή όλων των αλλοιογόνων μικροοργανισμών και των σπορίων τους. Αδρανοποίηση όλων των ενδογενών ενζύμων.	Έντονες αλλαγές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά	Διατήρηση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 8-12 μήνες.	Θερμική επεξεργασία και αποστείρωση σε ερμητικά κλειστούς περιέκτες.

Πίνακας 1.2. Μέθοδοι θέρμανσης που εφαρμόζονται κατά την επεξεργασία του γάλακτος που πρόκειται να καταναλωθεί ως πόσιμο (από Moatsou, 2012)

Μέθοδος	Εξοπλισμός	Ψύξη	Επεξεργασίες
Έμμεση	Πλακοειδείς ή σωληνοειδείς εναλλάκτες θερμότητας και εξωτερικός σωλήνας κατακράτησης.	Στο τμήμα ανάκτησης του εναλλάκτη θερμότητας.	Παστερίωση, ορισμένοι τύπου υψηλής παστερίωσης, προθέρμανση του γάλακτος πριν από τη UHT επεξεργασία.
Άμεση, με έγχυση ατμού στο γάλα, (Direct Injection)	Άμεση συμπύκνωση του ατμού που εγχέεται στο κινούμενο γάλα που βρίσκεται υπό πίεση.	Στο δοχείο κενού με αποτέλεσμα την ταχύτατη ψύξη και την απομάκρυνση του εγχυμένου ατμού.	Υψηλή παστερίωση, UHT επεξεργασία.
Άμεση, με έγχυση γάλακτος στον ατμό, (Direct Infusion)	Άμεση συμπύκνωση του ατμού στο γάλα που εγχέεται σε δοχείο πιεσμένου ατμού.	Όπως και στην προηγούμενη περίπτωση.	Υψηλή παστερίωση, UHT επεξεργασία.

1.4. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΑΝΣΗΣ ΣΤΑ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

Η θερμική επεξεργασία που υφίσταται το γάλα πέραν της επίδρασής της στο μικροβιακό φορτίο του γάλακτος προκαλεί και αλλαγές στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του. Όσο υψηλότερη είναι η θερμοκρασία και η διάρκεια έκθεσης στη θερμότητα, τόσο μεγαλύτερες είναι και οι αλλαγές. Ισοδύναμοι συνδυασμοί χρόνων – θερμοκρασίας μπορεί να έχουν το ίδιο αποτέλεσμα. Μερικές αλλαγές στα συστατικά και στη σύνθεση του γάλακτος είναι αντιστρεπτές και άλλες όχι (Walstra *et al.*, 2006). Οι αλλαγές που συμβαίνουν στο γάλα μπορεί να είναι είτε χημικές, είτε φυσικές, είτε βιοχημικές. Ακόμη, με τη θερμική επεξεργασία υπάρχει δυνατότητα ανάλογα με την ένταση της να παραχθούν και άλλα συστατικά που δεν υπάρχουν στο νωπό ή στο γάλα που έχει υποστεί ήπια θερμική επεξεργασία και αυτά τα συστατικά μπορεί να αποτελέσουν δείκτες για την έντασή της. Οι μεταβολές αυτές συνοψίζονται ως εξής:

➤ Η απώλεια ή η μείωση του οξυγόνου και άλλων αερίων (π.χ. CO₂) που μπορούν να απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια των θερμικών επεξεργασιών σε ανοικτό σύστημα παίζουν σημαντικό ρόλο στο ρυθμό των αντιδράσεων οξειδωσης καθώς και στο ρυθμό ανάπτυξης μερικών βακτηρίων. Η απώλεια των αερίων μπορεί να είναι αντιστρεπτή, αλλά η επαναπροσρόφησή τους από τον αέρα μπορεί να πάρει πολύ χρόνο.

- Η λακτόζη κατά τη θέρμανση συμμετέχει σε αντιδράσεις Maillard κατά τις οποίες αλδεϋδική ομάδα των σακχάρων αντιδρά με τις αμινοομάδες των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα την παραγωγή σκουρόχρωμων ενώσεων όπως οι μελανοϊδίνες που έχουν ως συνέπεια αλλαγή στο χρώμα, στη γεύση, στη θρεπτική αξία και στο pH του γάλακτος. Ανάλογα με την ένταση της θερμικής επεξεργασίας, η λακτόζη αντιδρά με τη λυσίνη (ένα από τα απαραίτητα αμινοξέα) κατά την αντίδραση Maillard, η οποία καθίσταται ανθεκτική στην υδρόλυση από την τρυψίνη, με αποτέλεσμα τη μείωση της πεπτικότητας και της βιολογικής αξίας των πρωτεϊνών (Fox and McSweeney, 1998).
- Κατά τη θερμική επεξεργασία έχει παρατηρηθεί μικρού βαθμού ισομερείωση της λακτόζης σε λακτουλόζη (δισακχαρίτης γαλακτόζης και φρουκτόζης), η ποσότητα της οποίας αυξάνει με την αύξηση της έντασης της θερμικής επεξεργασίας (>100°C) ενώ στο νωπό και στο παστεριωμένο γάλα δεν ανιχνεύεται. Η λακτουλόζη μπορεί να αποτελέσει και δείκτη θερμικής επεξεργασίας του γάλακτος υψηλής παστερίωσης γιατί το παστεριωμένο γάλα, το UHT και το αποστειρωμένο περιέχουν διαφορετικά επίπεδα λακτουλόζης (Σακκάς, 2011). Το περιεχόμενο της λακτουλόζης αυξάνει με την αύξηση της έντασης της θερμικής επεξεργασίας. Περαιτέρω διάσπαση της φρουκτόζης σε μυρμηγκικό οξύ οδηγεί στην αύξηση της οξύτητας του θερμικά επεξεργασμένου γάλακτος.
- Ακόμη παράγονται και άλλες ουσίες όπως επιλακτόζη που παράγεται σε ίχνη, και σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες μίγμα συστατικών υδροξυ-μεθυλφουρφουράλη, φουρφουριλαλκοόλη, ακεταλδεϋδη κ.α.
- Σε υψηλές θερμοκρασίες έχουμε αποφωσφορλίωση της καζεΐνης, υδρόλυση των φωσφορικών εστέρων, διάσπαση των φωσφολιπιδίων και αύξηση του ανόργανου φωσφόρου.
- Οι παραπάνω αλλαγές οδηγούν στη μείωση του pH και στην αύξηση της οξύτητας του γάλακτος και εξαρτώνται από τις συνθήκες που επικρατούν με αποτέλεσμα την δημιουργία ευνοϊκού ή μη περιβάλλοντος για τους μικροοργανισμούς και τα ένζυμα του γάλακτος.
- Πολλές από τις πρωτεΐνες του ορού μετουσιώνονται και καθίστανται αδιάλυτες. Η μετουσίωση της αλβουμίνης του ορού και των ανοσογλοβουλινών αρχίζει σε χαμηλές θερμοκρασίες (65°C) και σημαντική μετουσίωση σημειώνεται σε θερμοκρασίες παστερίωσης (72°C/15s). Η α-λακταλβουμίνη και η β-γαλακτογλοβουλίνη είναι πιο ανθεκτικές και η μετουσίωσή τους γίνεται σε θερμοκρασίες πάνω από τους 70-75°C (Considine *et al.*, 2007).
- Οι μετουσιωμένες πρωτεΐνες ορού (κυρίως η β-γαλακτογλοβουλίνη) σε θερμοκρασίες πάνω από 70-90°C μπορούν να αντιδράσουν μεταξύ τους ή να συνδεθούν ομοιοπολικά με την κ-καζεΐνη με S-S δεσμούς (Patel *et al.*, 2005) και με πρωτεΐνες της μεμβράνης των λιποσφαιρίων και να δημιουργήσουν σύμπλοκα (Fox and Mc Sweeney, 1998). Η σύνδεση αυτή εμποδίζει την υδρόλυση της κ-καζεΐνης από την πυτιά με αποτέλεσμα μετά από θερμικές επεξεργασίες εντονότερες από

την παστερίωση να υπάρχει καθυστέρηση στην πήξη και δημιουργία ασθενούς τυροπήγματος που συναιρείται δύσκολα (Καμιναρίδης και Μοάτσου, 2009).

➤ Με τη θερμική επεξεργασία δημιουργούνται ελεύθερες σουλφυδρυλικές ομάδες που προκαλούν μείωση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού κατά 0,05 V περίπου άρα και μείωση του O₂ που περιέχεται με αποτέλεσμα τη μείωση της τάσης αυτοοξειδωσης του λίπους.

➤ Οι ελεύθερες σουλφυδρυλικές ομάδες και οι μικροποσότητες H₂S που παράγονται κατά τη θερμική επεξεργασία είναι υπεύθυνες για την οσμή – γεύση «βρασμένου» που αποκτά το γάλα.

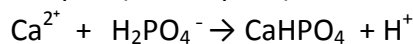
➤ Πολλές αλλαγές συμβαίνουν και στην καζεΐνη σε συνθήκες έντονης θέρμανσης. Τα καζεϊνικά μικκύλια συσσωματώνονται και η συσσωμάτωση τους αυξάνει το ιξώδες και μπορεί να οδηγήσει στη πήξη του γάλακτος. Αυτό συμβαίνει κυρίως σε γάλα που έχει αποστειρωθεί σε θερμοκρασία μεγαλύτερη από 110 °C και όταν το pH είναι μικρότερο από 6.2.

➤ Όταν το γάλα θερμαίνεται σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες της παστερίωσης, η αποκορυφωτική του ικανότητα μειώνεται εξαιτίας της μη αντιστρεπτής μετουσίωσης των κρυογλοβουλινών.

➤ Αλλαγές μπορεί ακόμη να συμβούν στη μεμβράνη των λιποσφαιρίων. Αν ο εξοπλισμός δεν είναι ανοξειδωτός και περιέχει χαλκό, ο οποίος δρα καταλυτικά και μπορεί να οδηγήσει σε οξειδωτική τάγγιση του λίπους, το γάλα αποκτά μια ιδιαίτερη ταγγή γεύση. Στο αποβουτυρωμένο γάλα, η αυτοοξειδωση των φωσφολιπιδίων μπορεί να δώσει και γεύση «χαρτονιού».

➤ Με τη θέρμανση κάποια από τα λιπαρά οξέα του γάλακτος με διάφορες χημικές αντιδράσεις σχηματίζουν λακτόνες και μεθυλοκετόνες. Οι λακτόνες είναι υπεύθυνες για τη χαρακτηριστική γεύση του λίπους του φρέσκου γάλακτος αλλά όταν η ποσότητά τους αυξηθεί με τη θερμική επεξεργασία και τη μακροχρόνια αποθήκευση δίνουν στο γάλα μια «άτυπη» γεύση.

➤ Από τα ανόργανα συστατικά του γάλακτος, επηρεάζεται η διαλυτότητα του διαλυτού ασβεστίου, η οποία με τη σειρά της επηρεάζει και την περιεκτικότητα σε κολλοειδές φωσφορικό ασβέστιο. Κατά τη διάρκεια της θέρμανσης το ιοντικό ασβέστιο μειώνεται σύμφωνα με την αντίδραση:



Οι αλλαγές αυτές στους 60°C είναι περιορισμένες και η αύξηση της θερμοκρασίας πάνω από τους 80°C έχει μικρή επίδραση. Η μεταβολή αυτή είναι αντιστρεπτή με πολύ αργό ρυθμό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

➤ Η απώλεια των βιταμινών εξαρτάται επίσης από την ένταση της θερμικής επεξεργασίας και τη συγκεκριμένη βιταμίνη.

Λιποδιαλυτές βιταμίνες. Η βιταμίνη A είναι σταθερή σε θερμοκρασίες μέχρι 100 °C και δεν καταστρέφεται με την UHT επεξεργασία. Παρουσιάζονται όμως απώλειες κατά τη μετέπειτα αποθήκευση του γάλακτος σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (Fox and McSweeney, 1998). Η βιταμίνη D, που ο πρωταρχικός της

ρόλος είναι η πρόσληψη του ασβεστίου από τα οστά, δεν καταστρέφεται με τις θερμικές επεξεργασίες αλλά με την έκθεση στο οξυγόνο και στο φως, ιδιαίτερα όταν τα προϊόντα συσκευάζονται σε διαφανείς συσκευασίες. Η βιταμίνη Ε είναι σταθερή στην HTST παστερίωση (Fox and McSweeney, 1998) και σε θερμοκρασίες μέχρι 100 °C. Απώλεια της βιταμίνης υπάρχει με την έκθεση των προϊόντων στο φως, παρουσία οξυγόνου και με την παρουσία Cu και Fe στον εξοπλισμό ή τη συσκευασία που επιταχύνουν την οξείδωσή της. Η βιταμίνη Κ είναι σταθερή στις θερμοκρασίες επεξεργασίας του γάλακτος.

Βιταμίνες της ομάδας Β. Η βιταμίνη Β1 είναι σταθερή σε θερμοκρασίες μέχρι 100°C και δεν καταστρέφεται με την UHT επεξεργασία. Οι απώλειες της κυμαίνονται στο 5-10% κατά την παστερίωση (Walstra *et al.* 2006) αλλά η κλασική αποστείρωση προκαλεί μείωση της κατά 20-25% (Καμιναρίδης και Μοάτσου, 2009). Η βιταμίνη Β2 είναι σταθερή στις θερμικές επεξεργασίες, αλλά είναι το πιο φωτοευαίσθητο συστατικό του γάλακτος με αποτέλεσμα να αποικοδομείται και να προκαλεί την οξείδωση και άλλων συστατικών του γάλακτος όπως βιταμίνη C, φυλλικό οξύ, μεθειονίνη κ.λπ. Οι αλλαγές αυτές οδηγούν σε απώλεια της θρεπτικής αξίας του γάλακτος και στη δημιουργία ανεπιθύμητων οσμών. Η συσκευασία των προϊόντων παίζει σημαντικό ρόλο για την αποφυγή αυτών των αλλαγών. Η βιταμίνη Β3 είναι σταθερή στις θερμικές επεξεργασίες και στην κλασική αποστείρωση. Οι απώλειες της βιταμίνης Β5 κυμαίνονται στο 3-5% κατά τη θέρμανση του γάλακτος, ενώ της Β6 στο 0-5% (Walstra *et al.* 2006). Η βιοτίνη (Β6) είναι σταθερή στις θερμικές επεξεργασίες και στην έκθεση στο φως. Το φυλλικό (φολικό) οξύ είναι σταθερό στη παστερίωση και ευαίσθητο στη UHT επεξεργασία ενώ στην κλασική αποστείρωση καταστρέφεται κατά 50%. Οι απώλειες της βιταμίνης Β12 κυμαίνονται στο 3-10% κατά τη θέρμανση του γάλακτος και υπάρχουν και απώλειες κατά την αποθήκευση, ενώ δεν επηρεάζεται από το φως (Walstra *et al.* 2006).

Η βιταμίνη C είναι η πιο ευαίσθητη βιταμίνη στη θέρμανση, ειδικά παρουσία οξυγόνου και ορισμένων μετάλλων. Οι απώλειες της βιταμίνης C κυμαίνονται στο 5-20% κατά την παστερίωση του γάλακτος (Walstra *et al.* 2006). Όμως κατά τη συντήρησή του, οι απώλειες κυμαίνονται σε ποσοστό 25-45% της αρχικής ποσότητας (Andersson and Öste, 1994).

➤ Τα ένζυμα αδρανοποιούνται με τις διάφορες θερμικές επεξεργασίες. Ο ρυθμός αδρανοποίησης των ενζύμων και των συστημάτων τους (ενεργοποιητές και αναστολείς) εξαρτώνται από τις συνθήκες που επικρατούν όπως η θερμοκρασία, το pH και η παρουσία ή η απουσία υποστρώματος. Η υπολειμματική ενεργότητα ορισμένων ενζύμων μπορεί να είναι δείκτης για την ένταση της θερμικής επεξεργασίας που έχει υποστεί το γάλα (αλκαλική φωσφατάση, υπεροξειδάση). Τα ένζυμα είναι ακόμη υπεύθυνα για την παραγωγή ουσιών που δίνουν χαρακτηριστική γεύση στο γάλα και στα προϊόντα του (λιποπρωτεϊνική λιπάση) και κάποια από αυτά έχουν και αντιμικροβιακή δράση (λυσοζύμη, λακτοϋπεροξειδάση). Στον Πίνακα 1.3 παρουσιάζεται

ενδεικτικά η αντοχή μερικών κύριων ενδογενών ενζύμων του γάλακτος στη θερμική επεξεργασία.

Πίνακας 1.3. Συμπεριφορά μερικών ενδογενών ενζύμων του γάλακτος κατά την εφαρμογή θερμικών επεξεργασιών του γάλακτος που πρόκειται να καταναλωθεί ως πόσιμο (από Μοατσου, 2012).

ΕΝΖΥΜΑ	ΥΠΟΛΕΙΜΑΤΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ		
	(ΧΑΜΗΛΗ) ΠΑΣΤΕΡΙΩΣΗ	ΥΨΗΛΗ ΠΑΣΤΕΡΙΩΣΗ	UHT
Πλασμίνη (πρωτεϊνάση σερίνης)	Υψηλή	Υψηλή	+/-
Λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL)	~ 0	0	0
Αλκαλική φωσφατάση (ALP)	~ 0	0	0
Όξινη φωσφατάση (ACP)	σημαντική	μέτρια	0
Λακτοϋπεροξειδάση (LPO)	60% της αρχικής	0	0
Ξανθίνη οξειδάση (οξειδοορεδοουκτάση, XOR)	ενισχυμένη	ίχνη	0
γ-γλουταμυλ-τρανσφεράση (γ-GGT)	>50% της αρχικής	0	0
Καταλάση	~ 8% της αρχικής	0	0
Λυσοζύμη	επιζεί	+/-	0
Ριβονουκλεάση (RNase)	σημαντική		0
Δισμουτάση των υπεροξειδίων (SOD)	επιζεί	επιζεί	
Καθειψίνη D (ασπαρτική πρωτεϊνάση)	Επιζεί μερικώς	0	
Καθειψίνη Β (κυστεϊνική πρωτεϊνάση)	>20% της αρχικής		

Η λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL, EC 3.1.1.34) είναι ένα ένζυμο μεγάλης σημασίας για την τεχνολογία των γαλακτοκομικών προϊόντων. Η λιποπρωτεϊνική λιπάση προέρχεται από το μαστό και είναι μία γλυκοπρωτεΐνη ηλεκτροστατικά και υδροφοβικά συνδεδεμένη με τα καζεϊνικά μικκύλια. Έχει άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης 33°C και βέλτιστο pH 8.5. Είναι υπεύθυνη για τη λιπόλυση στο νωπό γάλα καταλύοντας την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων κυρίως στη θέση 1 και 3 (Καμιναρίδης και Μοάτσου, 2009).



Προϋπόθεση για τη δράση της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης είναι η καταστροφή της μεμβράνης των λιποσφαιρίων που αφήνει τα τριγλυκερίδια εκτεθειμένα. Όσο η μεμβράνη των λιποσφαιρίων (MFGM) παραμένει άθικτη, η πρόσβαση του ενζύμου στο λίπος του γάλακτος παρεμποδίζεται. Η έντονη ανάδευση, ο αφρισμός, οι αυξομειώσεις της θερμοκρασίας και η ομογενοποίηση καταστρέφουν τη μεμβράνη των λιποσφαιρίων και ενισχύουν τη λιπόλυση. Η ενζυμική υδρόλυση του λίπους έχει ως αποτέλεσμα την ταγή γεύση που προκαλείται από μεγάλες συγκεντρώσεις πτητικών ελεύθερων λιπαρών οξέων όπως το βουτυρικό και το καπροϊκό οξύ. Υδρόλυση του 1-2% των τριγλυκεριδίων του γάλακτος σε ελεύθερα λιπαρά οξέα που μπορεί να επιτευχθεί σε μικρό χρονικό διάστημα, οδηγεί σε τάγγιση και απaráδεκτη γεύση (Moatsou, 2010). Η ελεγχόμενη λιπόλυση είναι διαδικασία επιθυμητή στην ωρίμανση των τυριών που παράγονται από νωπό ή θερμισμένο γάλα. Η λιποπρωτεϊνική λιπάση αδρανοποιείται με την παστερίωση (στους 63°C για 30 λεπτά ή στους 72°C για 15 δευτερόλεπτα).

Η αλκαλική φωσφατάση (ALP, EC 3.1.3.1) είναι υδρολάση που προέρχεται από τα γαλακτικά κύτταρα και μια μικρότερη ποσότητα προέρχεται από τα μυοεπιθηλιακά κύτταρα του μαστού και βρίσκεται στο αποβουτυρωμένο γάλα (Bingham *et al.* 1992). Βρίσκεται στη μεμβράνη των λιποσφαιρίων και έχει άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης 37°C και βέλτιστο pH ~9. Η βέλτιστη τιμή του pH εξαρτάται από το υπόστρωμα, π.χ. βέλτιστο pH 10.5 για p-nitrophenylphosphate και pH 6.8 για καζεϊνικά. Σε αυτό το pH θα μπορούσε να προκληθεί αποφωσφορυλίωση των καζεϊνών αλλά οι συνθήκες αυτές δύσκολα υπάρχουν στο γάλα. Μια πιθανή εξήγηση για την αναστολή της ALP είναι η παρουσία του ανόργανου φωσφόρου. Η παρουσία της στο γάλα έχει μεγάλη τεχνολογική σημασία, γιατί οι συνθήκες αδρανοποίησης της είναι λίγο ψηλότερες από αυτές που απαιτούνται για την αδρανοποίηση του πιο ανθεκτικού παθογόνου μικροοργανισμού του γάλακτος, *Mycobacterium tuberculosis*. Η ALP καταστρέφεται με την παστερίωση για αυτό και η αδρανοποίηση της χρησιμοποιείται ως δείκτης για την αποτελεσματικότητα της. Πολλές αναλυτικές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για τον προσδιορισμό της δραστηριότητάς της (Fox and Kelly, 2006a, b). Επανενεργοποίηση της αλκαλικής φωσφατάσης μπορεί να συμβεί σε UHT γάλα (Shakeel-ur-Rehman *et al.*, 2003), σε γάλα θερμασμένο σε θερμοκρασία μεγαλύτερη των 84°C και σε κρέμα που έχει θερμανθεί σε θερμοκρασία μεγαλύτερη των 74°C. Η δραστηριότητα της ALP είναι υψηλότερη στο μαστιτικό γάλα από ότι στο κανονικό γάλα.

Η λακτοϋπεροξειδάση (LPO, EC 1.11.1.7) είναι το κύριο ένζυμο του αγελαδινού γάλακτος, υπεύθυνο για τις αντιμικροβιακές ιδιότητές του παρουσία μικρών συγκεντρώσεων υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) και θειοκυανιούχων ιόντων (SCN⁻). Η δράση του ενισχύεται και από τη δράση του ενζύμου ξανθίνη-οξειδάση. Η LPO προέρχεται από το μαστό του ζώου και βρίσκεται στον ορό όπου αποτελεί το ~0,5% των πρωτεϊνών του ορού. Έχει άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης

20°C και βέλτιστο pH 6.7. Επιζεί της παστερίωσης και αδρανοποιείται σε θερμοκρασία μεγαλύτερη των 78°C για 15s. Για το λόγο αυτό η LPO χρησιμοποιείται ως δείκτης για θερμικές επεξεργασίες του γάλακτος εντονότερες της παστερίωσης (π.χ. υψηλή παστερίωση) και η ανίχνευση της πραγματοποιείται με διάφορες μεθόδους (Fox and Kelly, 2006b, Καμιναρίδης και Μοάτσου, 2009, Moatsou, 2010).

Το σημαντικότερο πρωτεολυτικό ένζυμο του γάλακτος είναι η **πλασμίνη**, η οποία είναι και ένα από τα αντικείμενα της παρούσας μελέτης. Τα ενζυμικά χαρακτηριστικά της και η τεχνολογική της σημασία παρουσιάζεται στο Κεφ. 2. Στην κατηγορία των ενδογενών πρωτεολυτικών ενζύμων του γάλακτος ανήκουν και οι καθεψίνες των λυσισωμάτων. Η σημαντικότερη από αυτές, η **καθεψίνη D**, μελετήθηκε επίσης στην παρούσα μελέτη και παρουσιάζεται στο Κεφ. 3.

2. ΠΛΑΣΜΙΝΗ

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, στο γάλα περιέχονται πολλά ενδογενή ένζυμα με ποικίλες ενεργότητες (Πίνακας 1.3). Μεταξύ αυτών η πλασμίνη, είναι ένα ένζυμο με πολύ μεγάλη τεχνολογική σημασία, καθώς συμβάλλει στη πρωτεόλυση των πρωτεϊνών του γάλακτος και των προϊόντων του. Το πλέον προτιμώμενο υπόστρωμα για την πλασμίνη στο γάλα είναι η β-καζεΐνη. Η διάσπαση τριών ευαίσθητων δεσμών οδηγεί στο σχηματισμό των γ1-, γ2-, γ3-καζεϊνών που παραμένουν στο καζεϊνικό κλάσμα και των πρωτεοζών-πεπτονών που μετακινούνται στον ορό. Ο έλεγχος της ενεργότητας της πλασμίνης έχει ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της γαλακτοπαραγωγής, την καλύτερη ποιότητα των προϊόντων και τη μείωση του κόστους επεξεργασίας τους. Εξαιτίας της μεγάλης σημασίας της για το γάλα και τα προϊόντα του, η πλασμίνη του αγελαδινού γάλακτος και οι παράγοντες που σχετίζονται με την ενεργότητά της έχουν μελετηθεί εκτεταμένα. Στο κεφάλαιο αυτό γίνεται μια συνοπτική παρουσίαση αυτού του θέματος σε σχέση κυρίως με τις θερμικές επεξεργασίες που βασίζεται κυρίως στις συνθετικές εργασίες των Bastian and Brown (1996), Datta and Deeth (2001), Kelly *et al.* (2006) και Ismail and Nielsen (2010).

2.1. ΣΥΣΤΗΜΑ ΠΛΑΣΜΙΝΗΣ

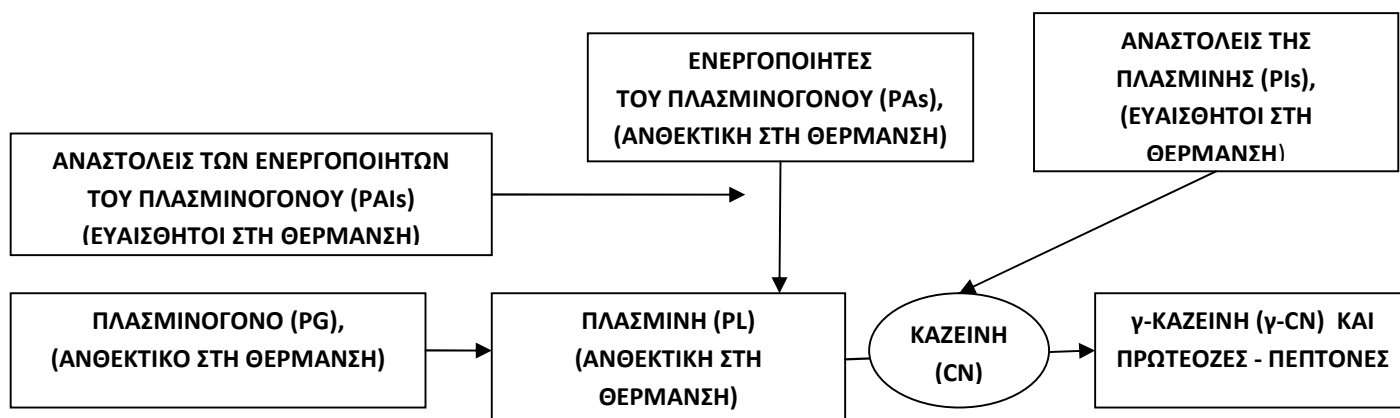
Η πλασμίνη (PL) είναι μια πρωτεάση τύπου σερίνης, η οποία βρίσκεται στο γάλα μαζί με την ανενεργό της μορφή, το πλασμινογόνο (PG) (Politis *et al.*, 1989, Politis, 1996). Η πλασμίνη και το πλασμινογόνο εισέρχονται στο γάλα, κυρίως από το αίμα, μέσω του τοιχώματος των γαλακτικών κυττάρων και συνδέονται με το κλάσμα της καζεΐνης του γάλακτος. Παρουσιάζει βέλτιστη ενεργότητα σε pH 7.5-8.0 και σε θερμοκρασία 37°C αλλά είναι σταθερή και ενεργή σε σχετικά ευρεία περιοχή pH, όπως φαίνεται από τη δραστηριότητά της σε διάφορα τυριά (Bastian and Brown, 1996). Είναι χαρακτηριστική η σταθερότητά της στη θέρμανση, καθώς για την αδρανοποίησή της στο γάλα απαιτούνται πολύ έντονες συνθήκες θέρμανσης, π.χ. 73°C για 40 min (Walstra *et al.* 2006).

Η ενεργότητα της πλασμίνης στο γάλα ελέγχεται από ένα σύστημα ενεργοποιητών ενζύμων και αναστολέων όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.1. Η μετατροπή του PG σε PL κι επομένως και η υδρόλυση της καζεΐνης μπορεί να επιβραδυνθεί από τη δράση των αναστολέων των ενεργοποιητών του πλασμινογόνου (PAIs). Οι αναστολείς της πλασμίνης (PIs) και οι PAIs βρίσκονται κυρίως στον ορό του γάλακτος και η ενεργότητά τους επηρεάζεται από τις διακυμάνσεις του pH και τη θερμική επεξεργασία. Οι PAIs και οι PIs είναι γενικά πιο θερμικά ασταθείς από τα άλλα ένζυμα αυτού του συστήματος. Οι ενεργοποιητές του πλασμινογόνου (PAs), θεωρούνται ακόμη πιο σταθεροί στη θέρμανση σε σχέση τα PL και PG και επιβιώνουν της παστερίωσης, σε αντίθεση με τους αναστολείς

τους (PAIs). Ως εκ τούτου, οι PAs μπορεί να έχουν σημαντική επίδραση στην ενεργότητα της PL στο γάλα, η οποία με τη σειρά της μπορεί να προκαλέσει είτε ευεργετική είτε επιζήμια πρωτεόλυση στα γαλακτοκομικά προϊόντα.

Η πλασμίνη δεν υδρολύει τις πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος. Στην πραγματικότητα, οι πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος δρουν ανασταλτικά στην ενεργότητα της πλασμίνης. Η β-γαλακτογλοβουλίνη Α, η α-λακταλβουμίνη και η αλβουμίνη του ορού (BSA) σε συγκεντρώσεις των 0,2 - 1 mg/ ml ανέστειλαν τη δραστηριότητα της πλασμίνης και του πλασμινογόνου κατά 18 και 54%, 1,9 και 20%, 25 και 63% αντίστοιχα, ενώ οι β-γαλακτογλοβουλίνη Β δεν είχε καμία ανασταλτική δράση (Politis *et al.*, 1993).

Τα επίπεδα της PL και του PG μπορεί να διαφέρουν σημαντικά ανάλογα με το στάδιο της γαλακτικής περιόδου (αυξανόμενα προς το τέλος της), τον αριθμό της γαλακτικής περιόδου (υψηλότερα σε γηραιότερες αγελάδες), και την κατάσταση υγείας του μαστού (Politis *et al.*, 1989, Bastian *et al.*, 1991c). Η αυξημένη ενεργότητα της πλασμίνης στο μαστιτικό γάλα και στο τέλος της γαλακτικής περιόδου έχει αποδοθεί στο αυξημένο επίπεδο των ενεργοποιητών του πλασμινογόνου (Politis *et al.*, 1989).



Εικόνα 2.1. ΣΥΣΤΗΜΑ ΠΛΑΣΜΙΝΗΣ-ΠΛΑΣΜΙΝΟΓΟΝΟΥ (από τον Richardson, 1983a)

Η μετατροπή του PG σε PL γίνεται με τη μεσολάβηση δύο ειδών ενεργοποιητών (PA) ιστικού τύπου (t-PA) και τύπου ουροκινάσης (u-PA) (Bastian and Brown, 1996). Οι t-PA και u-PA είναι όπως και η πλασμίνη, πρωτεάσες της σερίνης και βρίσκονται στους ιστούς των μαστών των βοοειδών και στο γάλα. Ο t-PA εμφανίζεται στα καζεϊνικά μικκύλια ως ένα σύμπλοκο με τον αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (PAI-1), ενώ ο (u-PA) βρίσκεται στα σωματικά κύτταρα, (Politis *et al.*, 1991; Lu and Nielsen, 1993b, Heegaard *et al.*, 1994a, White *et*

al., 1995). Οι t-PA και u-PA ενεργοποιούν τη μετατροπή του PG σε PL διασπώντας το δεσμό Arg557-Ile558 στο PG όταν το γάλα βρίσκεται στο μαστό πριν από την άμελη αλλά και κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης του γάλακτος. Η πλασμίνη αυτοκαταλύει και διασπά το δεσμό Lys77-Arg78 και παράγεται Arg-PG. Η διάσπαση του PG από την PL στο δεσμό Lys-Arg προκαλεί την απελευθέρωση του προενεργού πεπτιδίου και αλλάζει τη διαμόρφωση του πλασμινογόνου με αποτέλεσμα την εύκολη ενεργοποίησή του. (Driessen and Van Der Waals, 1978, Schaar, 1985, Alichanidis *et al.*, 1986).

Οι ενεργοποιητές του πλασμινογόνου σχετίζονται με τα σωματικά κύτταρα (SCC) και μάλιστα έχει αναφερθεί σύνδεση των t-PA με τα καζεϊνικά μικκύλια και των u-PA με τα σωματικά κύτταρα (Heegaard *et al.*, 1994b, White *et al.*, 1995). Η δραστηριότητα του t-PA ενισχύεται σημαντικά από το ινώδες (Karlán *et al.*, 1987) και οι δραστηριότητες και των δύο ενεργοποιητών, t-PA και u-PA, αυξάνουν παρουσία των πρωτεϊνών του γάλακτος και ειδικά της α_{s1} -καζεΐνης. (Markus *et al.*, 1993, Politis *et al.*, 1995a). Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η αμιλορίδη αναστέλλει τη δραστηριότητα του u-PA, αλλά δεν έχει καμία επίδραση στην δραστηριότητα του t-PA (Heegaard *et al.*, 1994b). Ο u-PA προκαλεί εντονότερη ενεργοποίηση και έχει μεγαλύτερη σταθερότητα στη θέρμανση σε σχέση με τον t-PA (Ismail *et al.*, 2006, Prado *et al.*, 2007).

Οι δεσμοί της λυσίνης και σε μικρότερο βαθμό, οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις συμμετέχουν στη δέσμευση των PL και PG, στα καζεϊνικά μικκύλια (Baer *et al.*, 1994). Παρόμοιος φαίνεται ότι είναι και ο μηχανισμός πρόσδεσης του u-PA στα καζεϊνικά μικκύλια (Politis *et al.*, 1995a). Η θερμοκρασία αποθήκευσης του γάλακτος, το pH, η ιοντική ισχύς, η υδρόλυση της καζεΐνης από την PL και η δράση των μικροβιακών πρωτεασών σχετίζονται με την αποδέσμευση της PL από τα καζεϊνικά μικκύλια. Ιδιαίτερα, το pH επηρεάζει σαφώς την αποσύνδεση της PL από τα καζεϊνικά μικκύλια του φρέσκου γάλακτος, σε pH 4.6 – 4.7 (Richardson and Elston, 1984, Grufferty and Fox, 1988b). Αυτή η επίδραση του pH εξηγεί, τουλάχιστον εν μέρει, τα υψηλότερα επίπεδα της PL στον όξινο ορό του γάλακτος (44 $\mu\text{g/g}$ πρωτεΐνης) σε σχέση με το μη όξινο (4 $\mu\text{g/g}$ πρωτεΐνης). Η μεταφορά της ενεργότητας της PL από την καζεΐνη στο κλάσμα ορού του γάλακτος, με διάφορους μηχανισμούς, μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την ποιότητα των προϊόντων που περιέχουν πρωτεΐνη ορού γάλακτος ως λειτουργικό συστατικό.

Η ενεργότητα της PL ή των PAs μπορεί να ανασταλεί από τους αναστολείς της πλασμίνης (PIs) ή από τους αναστολείς των ενεργοποιητών του πλασμινογόνου (PAIS), αντίστοιχα (Precetti *et al.*, 1997). Σε αντίθεση με τα PL, PG, και PAs τα οποία είναι συνδεδεμένα με τα καζεϊνικά μικκύλια, οι αναστολείς βρίσκονται στο κλάσμα του ορού του γάλακτος (Reimerdes *et al.*, 1976). Δύο αναστολείς των ενεργοποιητών του πλασμινογόνου έχουν απομονωθεί από το αγελαδινό γάλα (Precetti *et al.*, 1997). Ο αναστολέας_1 και η α_2 αντιπλασμίνη είναι πρωτεΐνες ευαίσθητες στη θερμική επεξεργασία.

Στο φρέσκο γάλα, το PG είναι η κυρίαρχη μορφή, όπου η συγκέντρωσή του είναι 2-20 φορές (Bastian and Brown, 1996; Richardson and Pearce, 1981) ή 2-30 φορές μεγαλύτερη από αυτή της PL (0,8 - 2,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PG και 0,1 - 0,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PL, Ozen *et al.*, 2003). Ως εκ τούτου, οποιαδήποτε πιθανή ενεργοποίηση του PG θα μπορούσε να συμβάλλει σημαντικά στην ενεργότητα της PL στο γάλα και τα προϊόντα του.

2.2. ΣΥΣΤΗΜΑ ΠΛΑΣΜΙΝΗΣ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΕΣ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

Πολλοί παράγοντες που συνδέονται με την τεχνολογία παραγωγής των προϊόντων όπως η θερμική επεξεργασία, το pH, οι συνθήκες τυροκόμησης, οι συνθήκες αποθήκευσης και οι βακτηριακές πρωτεάσες, επηρεάζουν τα επίπεδα της πλασμίνης και του πλασμινογόνου. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών του συστήματος της PL μπορεί να είναι περίπλοκες εξαιτίας επιδράσεων και από τα συστατικά του γάλακτος, όπως ο ορός του γάλακτος και οι καζεΐνες. Επιπλέον, κάθε ένα από τα στοιχεία του συστήματος της PL μπορεί να επηρεαστεί από διάφορες συνθήκες και με τη σειρά του, μπορεί να επηρεάσει την κινητική των ενζυμικών αντιδράσεων.

Η μείωση της συχνότητας συλλογής του γάλακτος από τη βιομηχανία έχει ως αποτέλεσμα την παράταση της παραμονής του νωπού γάλακτος σε ψύξη, η οποία ενισχύει την ανάπτυξη των ψυχρότροφων βακτηρίων, τα οποία τελικά γίνονται κυρίαρχη μικροχλωρίδα. Οι ανθεκτικές στη θερμότητα πρωτεάσες που παράγονται από τα ψυχρότροφα βακτήρια, όταν αυτά ξεπεράσουν τις 10^5 cfu/ml μπορούν να αποσταθεροποιήσουν τα μικκύλια της καζεΐνης (Cromie, 1992), με αποτέλεσμα την εμφάνιση πηγμάτων στο UHT γάλα καθώς και την εμφάνιση πικρής γεύσης στα παραγόμενα τυριά και την αύξηση των επικαθίσεων στους εναλλάκτες θερμότητας. (Champagne *et al.*, 1994). Στο νωπό γάλα που διατηρείται σε ψύξη, Gram-αρνητικά ψυχρότροφα βακτήρια, κυρίως *Pseudomonas* sp. είναι υπεύθυνα για την αλλοίωση. Από την άλλη πλευρά το παστεριωμένο γάλα αλλοιώνεται από Gram-αρνητικά ψυχρότροφα βακτήρια που επιμολύνουν το γάλα μετά την παστερίωση ή με Gram-θετικά ψυχρότροφα που επιβιώνουν της παστερίωσης (Sorhaug and Stepaniak, 1997).

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι οι βακτηριακές πρωτεάσες επηρεάζουν το σύστημα της PL, το οποίο με τη σειρά του επηρεάζει την ποιότητα των γαλακτοκομικών προϊόντων. Η ενεργότητα της πλασμίνης έχει αναφερθεί ότι μειώνεται με την ανάπτυξη μικροβίων και τη διάρκεια αποθήκευσης. Μειωμένη δραστηριότητα της PL παρατηρήθηκε σε νωπό γάλα μετά από 4 ημέρες αποθήκευσης στους 4°C , με ψυχρότροφα βακτήρια 10^6 έως 10^7 cfu/ml. Η μείωση της PL αποδίδεται στη δραστηριότητα της πρωτεάσης των ψυχρότροφων βακτηρίων και στην αυτόλυση της PL (Guinot-Thomas *et al.*, 1995).

Μειωμένη ενεργότητα της PL στο κλάσμα της καζεΐνης και αυξημένη ενεργότητα στον ορό παρατηρήθηκαν με την ανάπτυξη των ψυχρότροφων

μικροοργανισμών και την παρουσία των πρωτεασών που παρήγαγαν. Μελέτες σε ανασυσταμένη σκόνη άπαχου γάλακτος (NFDM), (Fajardo-Lira and Nielsen, 1998) και σε φρέσκο γάλα (Fajardo-Lira *et al.*, 2000) που αποθηκεύονται σε συνθήκες ψύξης έδειξαν ότι οι πρωτεάσες που παράγονται από τον *P. fluorescens* M3/6 επηρεάζουν την PL αποδιοργανώνοντας τα καζεϊνικά μικκύλια, με αποτέλεσμα να απελευθερώνονται ένζυμα από το σύστημα της PL στο κλάσμα ορού του γάλακτος. Επιπλέον, ορισμένες βακτηριακές πρωτεάσες μπορούν να ενισχύσουν την ενεργότητα των PA, ή στην πραγματικότητα λειτουργούν ως PA και αυξάνουν τη ενεργότητα της πλασμίνης (Frohbieter *et al.*, 2005, Larson *et al.*, 2006).

Οι Crudden *et al.* (2005) αναφέρουν σημαντική αυτόλυση της PL κατά την αποθήκευση του γάλακτος στους 5°C σε σύγκριση με την αποθήκευση στους 20°C και στους 37°C. Ακόμη αναφέρουν σημαντική αποσύνδεση της β-καζεΐνης, η οποία είναι το προτιμώμενο υπόστρωμα της πλασμίνης, στο κλάσμα του ορού κατά την αποθήκευση στους 5°C. Επιπλέον, η αποσύνδεση του ασβεστίου από τα καζεϊνικά μικκύλια και η διαλυτοποίηση του στον ορό, που παρατηρείται κατά την ψύξη του γάλακτος ενδέχεται να επηρεάσει τη δραστηριότητα της PL και την ενεργοποίηση του PG κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης σε ψύξη. Οι Schroeder *et al.* (2008) διερεύνησαν την επίδραση των ιόντων ασβεστίου στο σύστημα της PL κατά τη διάρκεια της συντήρησης του γάλακτος σε ψύξη. Έδειξαν ότι η αποθήκευση στους 2,2°C έχει ως αποτέλεσμα χαμηλότερη ενεργοποίηση του PG και υψηλότερη συγκέντρωση ασβεστίου του ορού σε σύγκριση με την αποθήκευση στους 4,4°C, η οποία προκαλεί επίσης μείωση της ενεργοποίησης του PG.

Η ενεργότητα της πλασμίνης και των ενζύμων που απαρτίζουν όλο το σχετικό σύστημα μπορεί να επηρεάσει δυσμενώς την ποιότητα του νωπού γάλακτος εξαιτίας της πρωτεόλυσης, αλλά σχετίζεται και με τη σταθερότητα πολλών γαλακτοκομικών προϊόντων. Η πρωτεόλυση στο γάλα είναι ένα σημαντικό κριτήριο ποιότητας που μπορεί να έχει είτε θετικές, είτε αρνητικές επιπτώσεις, ανάλογα τους σκοπούς της μεταποίησης. Σε ορισμένα προϊόντα, όπως το τυρί, η διάσπαση των πρωτεϊνών μπορεί να βοηθήσει στην ανάπτυξη επιθυμητής γεύσης και υφής κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, ενώ, σε άλλα προϊόντα, όπως το θερμικά επεξεργασμένο γάλα προκαλεί ανεπιθύμητα ιζήματα ή πήξη. Η σημασία της για το θερμικά επεξεργασμένο γάλα θα παρουσιασθεί στα δύο επόμενα τμήματα αυτού του κεφαλαίου.

2.2.1. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΣΤΙΣ ΕΝΖΥΜΙΚΕΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΠΛΑΣΜΙΝΗΣ

Η πλασμίνη είναι εξαιρετικά ανθεκτική στη θέρμανση με τιμή $D_{142^{\circ}\text{C}}$ στο γάλα 10-18 s (Driessen and van der Waals, 1978, Alichanidis *et al.* 1986). Ειδικότερα, οι Alichanidis *et al.* (1986) διαπίστωσαν ότι πλασμίνη στο άπαχο γάλα μένει σε

μεγάλο βαθμό ανεπηρέαστη από τις συνθήκες παστερίωσης και ότι το 30 - 40% της ενεργότητάς της παρέμεινε μετά από εργαστηριακές θερμικές επεξεργασίες σε θερμοκρασίες UHT. Τα επίπεδα της πλασμίνης στην πραγματικότητα αυξάνουν κατά την παστερίωση, μια παρατήρηση που αποδίδεται στην αυξημένη ενεργοποίηση του PG λόγω της αδρανοποίησης των PAI (Richardson, 1983a, Prado *et al.*, 2006). Οι Rollema and Poll (1986) αναφέρουν ότι το 6, 4 και 1, 3% της αναλογίας PL/PG απομένει μετά την έμμεση θέρμανση για 5 s στους 110, 120, 140 και 147°C αντίστοιχα, αλλά μετά από θέρμανση στους 147°C για 10 s η υπολειμματική ενεργότητα είναι μηδενική.

Οι Aroonkamonsri *et al.* (1996) αναφέρουν ότι το PG είναι πιο ανθεκτικό στη θέρμανση από ότι η PL. Οι Manji *et al.* (1986) ανέφεραν ότι το 19% της ενεργότητας της PL και το 37% του PG παρέμειναν στο γάλα, μετά από άμεση επεξεργασία (infusion) στους 142°C για 5 s, ενώ δεν υπήρχε υπολειμματική PL ενεργότητα και μόνο το 19% του PG παρέμεινε μετά από έμμεση επεξεργασία του γάλακτος 145°C για 3 s.

Τα PL και PG ως πρωτεΐνες, είναι επιρρεπή στη μετουσίωση και στις δομικές τροποποιήσεις που προκαλεί η θέρμανση. Το εύρος θερμοκρασιών για την μετουσίωση του PG είναι μεταξύ 50,1°C και 61,6°C (Burbrink and Hayes, 2006). Σε αυτές τις θερμοκρασίες το PG χάνει την τριτοταγή δομή του, αλλά δεν αδρανοποιείται. Αντίθετα, γίνεται πιο προσιτό στη δράση των PAs εξαιτίας του ξετυλίγματος των αλυσίδων του. Ο Richardson (1983), απέδωσε τη μετατροπή του PG σε PL κατά τη συντήρηση του παστεριωμένου γάλακτος, στην απενεργοποίηση των αναστολέων του συστήματος, αλλά φαίνεται ότι θα μπορούσε να είναι και αποτέλεσμα της ευκολότερης ενεργοποίησης της μετουσιωμένης μορφής του πλασμινογόνου. Οι Burbrink and Hayes (2006) έδειξαν ότι η ενεργοποίηση του PG εκφρασμένη ως k_{cat}/K_m (k_{cat} : ρυθμός αντίδρασης, K_m : σταθερά Michaelis-Menten) ενισχύεται με τη θέρμανση, και αυξάνεται όταν το PG θερμαίνεται σε θερμοκρασίες >60°C, δηλαδή μετά την έναρξη της μετουσίωσης.

Οι ενεργοποιητές του πλασμινογόνου (PAs), είναι ακόμα πιο ανθεκτικοί στη θέρμανση από ότι η πλασμίνη και το πλασμινογόνο. Δεν επηρεάζονται από την παστερίωση και επιζούν της επεξεργασίας UHT, με $D_{140^\circ C}$ 32 s (Deharveng and Nielsen, 1991, Lu and Nielsen, 1993a). Κατά συνέπεια, η θερμική επεξεργασία του γάλακτος αλλοιώνει τη φυσική ισορροπία μεταξύ των ενεργοποιητών και των αναστολέων υπέρ των ενεργοποιητών. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη πρωτεόλυση σε γάλα που έχει υποστεί θερμική επεξεργασία.

Και οι δύο τύποι PA, t-PA και u-PA είναι θερμικά σταθεροί κάτω από τις συνθήκες κλασικής παστερίωσης. Ειδικά ο u-PA έχει τιμή $D_{70^\circ C}$ 109 min. Η σημαντική αύξηση της ενεργοποίησης του πλασμινογόνου που παρατηρήθηκε σε UHT γάλα με υψηλή περιεκτικότητα σωματικών κυττάρων (SCC) σε σχέση με γάλα με χαμηλής περιεκτικότητας SCC αποδόθηκε στη θερμική σταθερότητα των PA (Kelly and Foley, 1997). Πιθανόν οφείλεται στο u-PA που σχετίζεται με τα

σωματικά κύτταρα (White *et al.*, 1995). Ωστόσο, έχει αναφερθεί ότι η θέρμανση του γάλακτος στους 85°C επηρέασε σημαντικά τις ενεργότητες των t-PA και u-PA. Σχεδόν η μισή ενεργότητα του t-PA χάθηκε μετά από θέρμανση του γάλακτος στους 85°C ανεξάρτητα από το χρόνο θέρμανσης (15 s ή 30 s), ενώ η επίδραση του χρόνου ή η αλληλεπίδραση μεταξύ του χρόνου και της θερμοκρασίας δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Όμως σημαντική μείωση στη δραστηριότητα του u-PA (30%) σημειώθηκε μόνο σε δείγματα που θερμαίνονται στους 85°C για 30 s (Lu and Nielsen, 1993b).

Η μελέτη των Saint Denis *et al.* (2001) για το γάλα έδειξε ότι η δραστηριότητα της PL δεν αυξήθηκε μετά από ήπια θερμική επεξεργασία (60-70 °C), γεγονός που υποδηλώνει ότι οι αναστολές θα μπορούσαν να παραμείνουν ενεργοί. Σύμφωνα με τους Prado *et al.* (2006), οι δύο τύποι αναστολέων (PA και PAI) παρουσιάζουν διαφορετική θερμική σταθερότητα, αφού στους 75°C για 15 s επιζεί >80% του PAI και περίπου το 35% του PI. Η αναστολή των PAI στο γάλα ενισχύει την ενεργοποίηση του PG από τους PAs.

Όμως, εκτός από τα ένζυμα που απαρτίζουν το σύστημα πλασμίνης σημαντικό ρόλο παίζουν και οι πρωτεΐνες του γάλακτος. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η θερμική επεξεργασία του γάλακτος κατά την παστερίωση αυξάνει τα επίπεδα της ενεργοποίησης της PL και του PG, ενώ εντονότερη θερμική επεξεργασία έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τα επίπεδα της PL. Αυτή η αρχική αύξηση της δραστηριότητας της PL αποδίδεται στην αδρανοποίηση των PI και των PAI, αλλά θα μπορούσε επίσης να σχετίζεται με τη θερμική σταθερότητα του t-PA και u-PA ή την αυξημένη ενεργοποίηση του μετουσιωμένου PG. Η μείωση της ενεργότητας της PL σε υψηλότερες θερμικές επεξεργασίες οφείλεται σε αλληλεπιδράσεις των PL, PG ή PA με τις μετουσιωμένες πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος.

Μετά από θερμική επεξεργασία UHT, η ενεργότητα της PL επηρεάζεται σημαντικά από τη μετουσιωμένη β-γαλακτογλοβουλίνη (β-LG), η οποία περιέχει ελεύθερες ομάδες -SH, οι οποίες προκαλούν μη αναστρέψιμη μετουσίωση της PL εξαιτίας S-S / S-H αλληλεπιδράσεων (Enright and Kelly, 1999). Το ξεδίπλωμα του PG, επίσης, μπορεί να προωθήσει την αλληλεπίδραση με την β-LG, πολύ περισσότερο σε αυξημένες θερμοκρασίες, με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της ενεργοποίησης του. Όμως, το σύστημα της PL δεν αδρανοποιείται εντελώς ακόμα και σε υψηλές θερμοκρασίες. Αν και έντονες θερμικές επεξεργασίες μπορούν να αδρανοποιήσουν μεγάλο μέρος της PL παρουσία της β-LG (Enright *et al.*, 1999), κάθε υπολειμματική ποσότητα PG και PA στο σύστημα, σε συνδυασμό και με την αδρανοποίηση των αναστολέων του συστήματος, θα οδηγήσει σε ενεργό PL κατά την αποθήκευση του γάλακτος. Σύμφωνα με τους Lu *et al.* (2009) σε γάλα θερμασμένο στους 75°C παρατηρήθηκε αύξηση της ενεργότητας της PL και μείωση της ενεργότητας του PG, ενώ σε θερμοκρασίες 85°C ή 90°C παρατηρήθηκε μεγαλύτερη μείωση της ενεργότητας του PG χωρίς επιπλέον αύξηση της ενεργότητας της PL. Αποδείχθηκε ότι η μείωση αυτή οφειλόταν στη β-LG, καθώς και την ίδια

επίπτωση είχε και η παρουσία κυστεΐνης. Η θέρμανση του PG παρουσία της β-Ig προκαλεί πολυμερισμό του PG σε διμερή, τριμερή και πολυμερή μέσω S-S αλληλεπιδράσεων, τα οποία παρεμποδίζουν την ενεργοποίηση του PG σε PL.

Σε θερμικά επεξεργασμένα δείγματα στα οποία προστέθηκε u-PA, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της PL ενεργότητας μετά από θέρμανση στους 72, 77 και 82°C για 15 s, σε σχέση με τον μάρτυρα στον οποίο δεν είχε προστεθεί ενεργοποιητής. Εκτός από την μερική απενεργοποίηση των αναστολέων, η παρατήρηση αυτή μπορεί να είναι αποτέλεσμα ομοιοπολικής σύνδεσης μεταξύ του PG και της β-LG, η οποία είναι πιθανόν υπεύθυνη για τη μείωση της ενεργοποίησης του PG στον μάρτυρα (Prado *et al.* 2006).

2.3. ΠΛΑΣΜΙΝΗ ΚΑΙ ΘΕΡΜΙΚΑ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΜΕΝΟ ΓΑΛΑ

Το γάλα UHT και η άπαχη σκόνη γάλακτος συνήθως αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου. Η πλασμίνη μπορεί να υποστεί αυτόλυση κατά τη διάρκεια παρατεταμένης αποθήκευσης χάνοντας έτσι μέρος της ενεργότητας της. Ωστόσο, οι πιθανότητες για ενεργοποίηση του PG είναι μεγάλες σε θερμοκρασίες 22-25°C, λαμβάνοντας υπόψη ότι η άριστη θερμοκρασία είναι 37°C και ότι οι PAIs αναστέλλονται από τη θερμική κατεργασία που εφαρμόζεται στο γάλα UHT και στη σκόνη γάλακτος. Ως εκ τούτου, η υδρόλυση της καζεΐνης μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την πήξη του γάλακτος UHT ή την υποβάθμιση της ποιότητας της πρωτεΐνης της άπαχης σκόνης γάλακτος, η οποία χρησιμοποιείται σε πολλά προϊόντα διατροφής. Τα στοιχεία σχετικά με το ρόλο της PL στην εμφάνιση πηγμάτων στο γάλα UHT είναι αντικρουόμενα. Τα αποτελέσματα και τα συμπεράσματα που προκύπτουν εξαρτώνται από παράγοντες όπως οι συνθήκες επεξεργασίας, οι συνθήκες αποθήκευσης, τα επίπεδα της PL, η σύσταση του γάλακτος, και τα άλλα συστατικά που χρησιμοποιούνται στα προϊόντα διατροφής, όταν πρόκειται για σκόνη γάλακτος.

Η ενεργότητα της πλασμίνης σε γάλα UHT επίσης συνδέεται με το σχηματισμό ανεπιθύμητων πικρών – στυφών γεύσεων. (Harwalkar *et al.*, 1989). Η επικρατούσα άποψη είναι ότι τα ελαττώματα του UHT γάλακτος εμφανίζονται όταν απελευθερωθεί το σύμπλοκο κ-καζεΐνης /β-γαλακτογλοβουλίνης από τα καζεϊνικά μικκύλια με τη δράση της πλασμίνης ή/και των θερμοάντοχων βακτηριακών πρωτεασών. Τα απελευθερωμένα αυτά σύμπλοκα μπορούν να διασυνδεθούν δημιουργώντας πήγματα ή ζελατινοποιώντας το γάλα κατά την αποθήκευση (Datta and Deeth 2001, Donatto and Guymarc'h, 2009).

Ωστόσο, είναι σαφές ότι όταν PG ή μικρό ποσοστό PL προστίθεται στο γάλα UHT, το γάλα παρουσιάζει πήγματα πιο γρήγορα από το γάλα στο οποίο δεν έχουν προστεθεί αυτά τα ένζυμα (Bastian and Brown, 1996). Η θέρμανση του γάλακτος προκαλεί σύνδεση των μετουσιωμένων πρωτεϊνών του ορού με την κ-καζεΐνη που βρίσκεται στην επιφάνεια των καζεϊνικών μικκυλίων. Η αύξηση του χρόνου

θέρμανσης και η θερμοκρασία έχει ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της σύνδεσης των πρωτεϊνών του ορού γάλακτος με τα καζεϊνικά μικκύλια. Έτσι, κατά την παραγωγή γάλακτος UHT, το νωπό γάλα προθερμαίνεται στους 80-95°C για 30-60 s πριν από την UHT επεξεργασία (135-150°C για λίγα s) με σκοπό τον έλεγχο των συμπλόκων μεταξύ πρωτεϊνών ορού γάλακτος και καζεΐνης. Ο χειρισμός αυτός καθυστερεί την πήξη αλλά δεν αδρανοποιεί πλήρως την πλασμίνη. Όπως προαναφέρθηκε, η PL (Metwalli *et al.*, 1998) και οι PAs (Lu and Nielsen, 1993b) είναι πολύ ανθεκτικοί στη θέρμανση και επιβιώνουν ακόμη και σε UHT διαδικασίες (Alichanidis *et al.*, 1986) και πιστεύεται ότι παίζουν ρόλο στην σταθερότητα του UHT γάλακτος, ακόμα και αν βρίσκονται σε πολύ χαμηλά επίπεδα (Kohlmann *et al.*, 1991).

Επομένως, για να αποφευχθεί η πρωτεόλυση και η περαιτέρω πήξη πρέπει ο στόχος της θερμικής επεξεργασίας να είναι η μετουσίωση του πλασμινογόνου. Οι Bastian *et al.* (1991) ανέφεραν ότι η δράση της πλασμίνης στην καζεΐνη αναστέλλεται πιο έντονα από την παρουσία της β-LG όταν προθερμαίνεται στους 60°C για 15 min, με αποτέλεσμα τη μείωση της τάσης προς δημιουργία πηγμάτων. Η διάρκεια ζωής και η σταθερότητα του γάλακτος UHT θα μπορούσε να ελεγχθεί με την προσθήκη του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου_1 ασηπτικά μετά την θερμική επεξεργασία (αφού πρόκειται για θερμικά ευαίσθητο παράγοντα) σε συγκέντρωση 125 mg/ ml (Lu and Nielsen, 1993a,b).

Αν και η δραστηριότητα της PL είναι σημαντική στα διάφορα προϊόντα πρωτεΐνης γάλακτος, λίγα είναι γνωστά σχετικά με την ενεργότητα πλασμίνης και την ποιότητα αυτών των προϊόντων.

3. ΚΑΘΕΨΙΝΗ-D

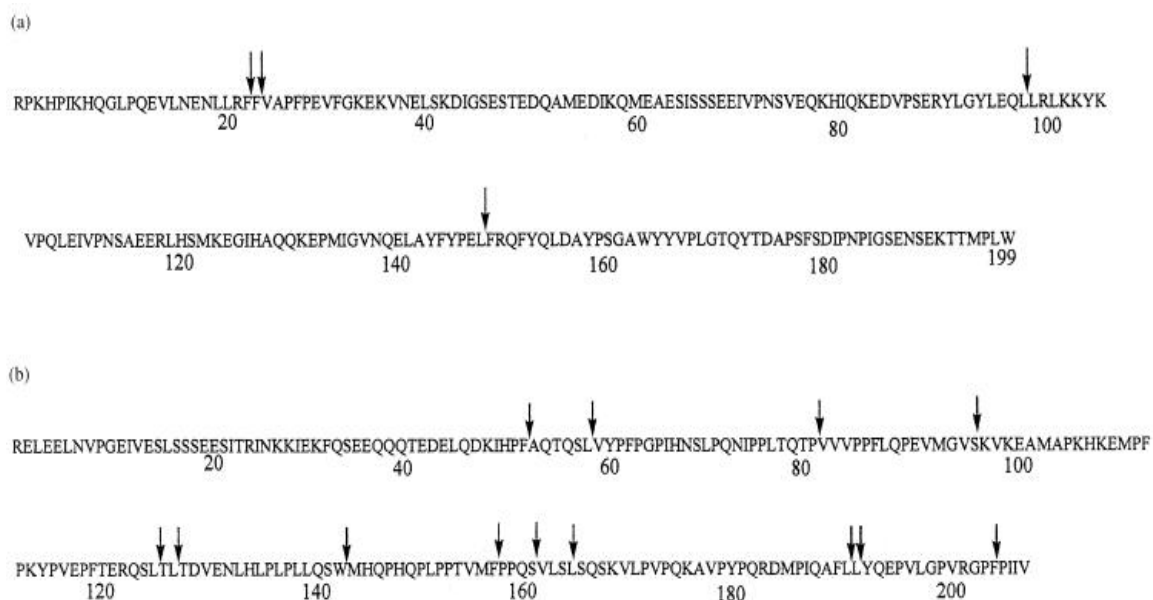
Η καθεψίνη D (EC 3.4.23.5) είναι ασπαρτική πρωτεΐνάση που ανήκει στην ομάδα των λυσισωμικών πρωτεασών. Η ομάδα αυτή περιλαμβάνει και άλλα ένζυμα όπως η πρωτεΐνάση καθεψίνη B (EC 3.4.22.1) τύπου κυστεΐνης (θειόλης), και ίσως η καθεψίνη K (EC 3.4.22.38) και η πρωτεΐνάση καθεψίνη G (EC 3.4.21.20) τύπου σερίνης καθώς και η ελαστάση (EC 3.4.21.37) (Moatsou, 2010). Αυτά τα ένζυμα βρίσκονται σε πολλούς ιστούς και στο αγελαδινό γάλα, αλλά είναι ανενεργά λόγω του υψηλού οξειδοαναγωγικού δυναμικού του γάλακτος (Fox and Kelly 2006a). Η παρουσία της καθεψίνης D στο αγελαδινό γάλα εντοπίστηκε για πρώτη φορά από τους Kamimogawa and Yamauchi (1972) και οι Larsen *et al.* (1993) επιβεβαίωσαν ότι αυτή η ασπαρτική πρωτεάση ήταν στην πραγματικότητα η προκαθεψίνη D.

Η καθεψίνη D είναι η πιο μελετημένη λυσισωμική πρωτεΐνάση στο γάλα (Hurley *et al.*, 2000). Ο κύριος τύπος στο αγελαδινό γάλα είναι η ανενεργή προκαθεψίνη D που προέρχεται από επιθηλιακά κύτταρα του μαστού και από τα γαλακτικά κύτταρα. Μέσα στο κύτταρο η προκαθεψίνη D έχει μικρή διάρκεια ζωής, καθώς μετατρέπεται ταχύτατα στην καταλυτικά ενεργή μορφή την ενεργή ψευδοκαθεψίνη D, και τελικά στην ώριμη καθεψίνη με τη βοήθεια και άλλων πρωτεασών. Η μετατροπή της προκαθεψίνης D οδηγεί στο σχηματισμό ενός καταλυτικά ενεργού ενδιάμεσου προϊόντος που ονομάζεται ψευδοκαθεψίνη D. Αυτή σχηματίζεται μέσω αυτοκαταλυτικής υδρόλυσης της προκαθεψίνης D μεταξύ Leu26 και Ile27 του προπεπτιδίου, με μείωση στο μοριακό βάρος 1-2 kDa, που εξαρτάται από το pH. Η πρωτεΐνη που σχηματίζεται περιέχει 18 αμινοξέα περισσότερα από την ώριμη καθεψίνη D. Η προκαθεψίνη D είναι πρωτεολυτικά ανενεργή και δε μπορεί να αυτοενεργοποιηθεί σε ώριμη καθεψίνη D χωρίς την ανάμιξη άλλων ενζύμων. Η ενεργοποίηση της οφείλεται σε κυστεΐνικές πρωτεάσες (Larsen *et al.*, 1993, Μπακοπάνος, 2007).

Στο αγελαδινό γάλα έχουν εντοπιστεί πέντε μοριακές δομές της καθεψίνης D με μοριακά βάρη 46, 45, 43, 39 και 31 kDa. Αυτές των 46 και 45 kDa αντιστοιχούν στην προκαθεψίνη D, η μορφή των 43 kDa αντιστοιχεί στην ψευδοκαθεψίνη D, ενώ μορφές των 39 και 31 kDa αντιστοιχούν ως ώριμη καθεψίνη D. Η συγκέντρωσή της στο αγελαδινό γάλα όπως προσδιορίστηκε με ELISA, στο άπαχο γάλα και στον όξινο ορό είναι 0,4μg/mL, ~0,4μg/mL, και 0,3 μg/mL αντίστοιχα (Larsen *et al.*, 1996).

Ο κύριος ρόλος της καθεψίνης D είναι η ενδοκυτταρική πέψη των πρωτεϊνών στο όξινο περιβάλλον των λυσισωμάτων. Έχει άριστο pH~4 και η πρωτεολυτική δραστηριότητα της στο γάλα είναι παρόμοια με εκείνη της χυμοσίνης, δηλαδή υδρολύει την κ-καζεΐνη σε παρα-κ-καζεΐνη και υποβαθμίζει τόσο την α_1 - όσο και τη β-καζεΐνη (Fox and Kelly, 2006a, Moatsou, 2010). Η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών του γάλακτος τόσο από την καθεψίνη D από σπλήνα αγελάδας όσο και από την προκαθεψίνη D που απομονώθηκε από γάλα και

αυτοενεργοποιήθηκε στην πρωτεολυτικά ενεργή ψευδοκαθεψίνη D εξελίχθηκε με παρόμοιο τρόπο. Όμως, η υδρόλυση ήταν πιο αργή με την ψευδοκαθεψίνη D σε σχέση με την ώριμη καθεψίνη D (Larsen *et al.* 1996). Η υδρόλυση της β-καζεΐνης από την καθεψίνη D είναι επίσης όμοια με τη δράση της χυμοσίνης (McSweeney *et al.*, 1995; Larsen *et al.*, 1996, Εικ. 3.1).



Εικόνα 3.1. Υδρόλυση των (a) α_{51} - και (b) β -καζεΐνών από την καθεψίνη D (McSweeney *et al.*, 1995; Larsen *et al.*, 1996).

Τα προϊόντα της υδρόλυσης της α_{52} -καζεΐνης από την καθεψίνη D διαφέρουν από αυτά της υδρόλυσης από τη χυμοσίνη (McSweeney *et al.*, 1995). Ο πρώτος δεσμός του μονομερούς της α_{52} -καζεΐνης που κόβεται από την καθεψίνη D είναι ο δεσμός Leu₉₉-Tyr₁₀₀ και ακολουθεί περαιτέρω αποικοδόμηση του καρβοξυτελικού τμήματος (Larsen *et al.*, 1996). Η κ-καζεΐνη υδρολύεται από την καθεψίνη D και παράγεται παρα-κ-καζεΐνη (Kaminogawa *et al.*, 1980, McSweeney *et al.*, 1995, Larsen *et al.*, 1996) και επιπλέον η παρα-κ-καζεΐνη υδρολύεται από την καθεψίνη D στις περιοχές, Leu₃₂-Ser₃₃ και Leu₇₉-Ser₈₀. Επίσης, η α-γαλακταλβουμίνη υδρολύεται στους δεσμούς Leu₅₂-Phe₅₃ και Trp₁₀₄-Leu₁₀₅, ενώ η φυσική β-γαλακτογλοβουλίνη δεν υδρολύεται (Larsen *et al.*, 1996).

Ο χρόνος πήξης άπαχου γάλακτος (rennet clotting time, RCT) με προσθήκη καθεψίνης D σε pH 6.4 και σε θερμοκρασία 30°C ήταν μακρύς εξαιτίας της αργής υδρόλυσης της κ-καζεΐνης (McSweeney *et al.*, 1995). Πήξη του γάλακτος παρατηρήθηκε με προσθήκη συγκεκριμένης ποσότητας καθεψίνης D > 3.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, (10πλάσια της ενδογενούς ποσότητας του γάλακτος) σε αγελαδινό γάλα με pH 5.0.

Ο χρόνος πήξης του γάλακτος που προκαλούσε η καθεψίνη D μειωνόταν καθώς το pH μειωνόταν (6.5-5.0) (Larsen *et al.*, 1996).

Επειδή η καθεψίνη D έχει παρόμοια δράση έναντι των καζεϊνών με αυτή της χυμοσίνης, θα αναμενόταν να παίζει σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση των τυριών. Όμως η ενεργότητα της καθεψίνης D επισκιάζεται από αυτή της χυμοσίνης που προστίθεται στο γάλα σε πολύ μεγαλύτερη συγκέντρωση από αυτή της ενδογενούς καθεψίνης D, και η οποία κατακρατείται στο πήγμα σε ποσοστό ~15% (McSweeney *et al.*, 1995). Επιπλέον, η καθεψίνη D είναι κυρίως πρωτεΐνη του ορού και απομακρύνεται κατά τη συναίρεση του πήγματος (Larsen *et al.*, 1996).

Στα τυριά ελβετικού τύπου η χυμοσίνη απενεργοποιείται σε μεγάλο βαθμό κατά την αναθέρμανση στους 53-55°C για μία ώρα (Matheson, 1981; Garnot and Molle, 1987), άρα ελάχιστη ή καθόλου αποικοδόμηση της α_{S1} -καζεΐνης αναμένεται, αντίθετα με ότι παρατηρείται. Μια ενεργή όξινη πρωτεάση που απομονώθηκε από τα τυριά ελβετικού τύπου (Emmental και Gruyère), θεωρήθηκε ως καθεψίνη D (Igoshi and Arima 1993). Επίσης η παραγωγή α_{S1} -I-καζεΐνης στα ελβετικά τυριά αποδόθηκε στη δράση της καθεψίνης D από τους Beunier *et al.*, 1997 και Cooney *et al.*, 2000). Ακόμη ο ρυθμός υδρόλυσης της α_{S1} -καζεΐνης ήταν ανάλογος του αριθμού των σωματικών κυττάρων, γεγονός που είναι σύμφωνο με την διαπίστωση ότι η καθεψίνη D είναι το υπεύθυνο ένζυμο για την αποικοδόμηση της α_{S1} -καζεΐνης (Cooney *et al.* 1999).

Η ενεργότητα του ενζύμου στο γάλα φαίνεται να συσχετίζεται με τον αριθμό των σωματικών κυττάρων (O'Driscoll *et al.*, 1999). Αύξηση του αριθμού των σωματικών κυττάρων οδηγεί σε αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου. Ακόμη αυξημένη ενεργότητα της καθεψίνης D παρατηρείται στα μέσα της γαλακτικής περιόδου. Ωστόσο, η καθεψίνη D δεν είναι δυνατόν να προκαλέσει την πήξη του αγελαδινού γάλακτος σε κανονικές συνθήκες, αλλά αναμένεται να επηρεάζει τη σταθερότητα των γαλακτοκομικών προϊόντων κατά την αποθήκευση τους και τα τυριά κατά την ωρίμανσή τους.

Υποστρώματα που χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση της δραστηριότητας της καθεψίνης D στο γάλα είναι η αιμογλοβίνη και ένα συνθετικό επταπεπτίδιο (Pro-Thr-Glu-Phe-[NO₂-Phe]-Arg-Leu (O'Driscoll *et al.*, 1999). Η καθεψίνη D επιδεικνύει μέγιστη δραστηριότητα έναντι της αιμογλοβίνης σε εύρος pH 3.0-3.5. Το βέλτιστο pH για την καθεψίνη D του γάλακτος έναντι της αιμογλοβίνης βρέθηκε πως ήταν 4.0 και η βέλτιστη θερμοκρασία 37°C (Kaminogawa and Yamauchi, 1972). Για την ανίχνευση της ενεργότητάς της έχει χρησιμοποιηθεί και η HPLC ανεστραμμένης φάσης (Chen *et al.*, 2003, Moatsou *et al.*, 2008a, b).

Η καθεψίνη D μπορεί να επιβιώσει κατά 45% σε θέρμανση στους 55°C για 30 min. Με την κλασική παστερίωση (72°C για 15 s) αδρανοποιείται το μεγαλύτερο μέρος της καθεψίνης D, αλλά απομένει περισσότερο από το 20% της καθεψίνης D και της καθεψίνης B (Larsen *et al.*, 2000, Hayes *et al.*, 2001, Moatsou, 2010).

Ολοκληρωτική απενεργοποίηση της καθεψίνης D στο γάλα προκαλείται με θέρμανση στους 70°C για 10 min (Kaminogawa and Yamauchi, 1972).

Αποικοδόμηση της α_{s1} -καζεΐνης, της α_{s1} -I-καζεΐνης και της κ-καζεΐνης παρατηρήθηκε κατά την ωρίμανση τυριού τύπου φέτα που παρασκευάστηκε χωρίς την προσθήκη πυτιάς. Στο πήγμα δεν περιλαμβάνονταν ένζυμα από οξυγαλακτικά βακτήρια (Wium and Qvist, 1998). Ως μέσο οξίνισης χρησιμοποιήθηκε δ-λακτόνη του γλυκονικού οξέος που προκάλεσε πτώση του pH άρα και πήξη του γάλακτος. Επομένως, η πρωτεόλυση που παρατηρήθηκε αποδόθηκε στην ενδογενή καθεψίνη D του γάλακτος, αφού η δράση της πλασμίνης αποκλείσθηκε εξαιτίας του χαμηλού pH.

Άρα η ποσότητα της ενδογενούς καθεψίνης D που περιέχει το γάλα δεν προκαλεί την πήξη του γάλακτος, παρά μόνο μπορεί να συμμετέχει στην αποικοδόμηση της κ-καζεΐνης κυρίως κατά τη διάρκεια μακρόχρονης αποθήκευσης κάποιων γαλακτοκομικών προϊόντων. Επομένως, σε γάλατα με υψηλό αριθμό σωματικών κυττάρων, όπου η ενεργότητα της καθεψίνης D και των κυστεϊνικών πρωτεασών είναι αυξημένη χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή (Somers *et al.*, 2003).

4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η παρούσα εργασία αποτελεί συνέχεια προηγούμενης ερευνητικής προσπάθειας, η οποία είχε ως αντικείμενο τους δείκτες θερμικής επεξεργασίας του γάλακτος. Η διερεύνηση των ενζυμικών δράσεων που είναι το αντικείμενό της έγινε σε πειραματικά δείγματα και σε δείγματα της αγοράς, τα οποία παρουσιάστηκαν σε μία προηγούμενη μεταπτυχιακή (κυρίως) και μία πτυχιακή μελέτη (Σακκάς 2011 και Μουτάφη 2010, αντίστοιχα).

4.1. ΘΕΡΜΙΚΕΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΕΣ ΚΑΙ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

4.1.1 Δείγματα νωπού γάλακτος που δέχθηκαν έμμεση θερμική επεξεργασία.

Τα πειράματα έγιναν σε πιλότο Armfield FT74 HTST/UHT Processing Unit και η θέρμανση γινόταν άμεσα με σωληνοειδείς εναλλάκτες. Η συχνότητα της αντλίας ήταν ρυθμισμένη στα 50 Hz, η πίεση στα ≥ 4 Pa και η θερμοκρασία εξόδου στους 8,3 °C. Η ροή ρυθμιζόταν αναλόγως ώστε το γάλα να παραμένει στον επιθυμητό χρόνο στον σωλήνα κατακράτησης (holding tube), σύμφωνα με υπολογισμούς που στηρίχθηκαν σε δεδομένα του κατασκευαστή (για παραμονή 3 s απαιτούνταν ροή 28 mL/15 s, για 4 s ροή 21 mL/15 s και για 5 s ροή 17 mL/15 s). Η μέτρηση της ροής γινόταν με ογκομετρικό κύλινδρο των 50 mL και χρονόμετρο. Οι συνθήκες θερμικής επεξεργασίας ήταν 80, 90, 100, 110, 120, 130 και 140°C για 3-4 s.

4.1.2. Εμπορικά δείγματα θερμικά επεξεργασμένου γάλακτος.

Τα δείγματα γάλακτος προέρχονταν κυρίως από την αγορά της Αθήνας. Ορισμένα UHT γάλατα προέρχονταν από αγορά του εξωτερικού και οι συνθήκες επεξεργασίας τους ήταν γνωστές. Παράλληλα ελήφθησαν δείγματα θερμισμένου γάλακτος, προκειμένου να χρησιμεύσουν ως μάρτυρες (Πίνακας 4.1).

ΠΙΝΑΚΑΣ 4.1. Εμπορικά δείγματα θερμικά επεξεργασμένου γάλακτος.

FF=πλήρες γάλα, LF=ημιάπαχο γάλα, LP=χαμηλή (κλασική) παστερίωση, HP=υψηλή παστερίωση, LL=μειωμένη λακτόζη, MF=μικροδιήθηση.

ΚΩΔΙΚΟΣ	ΤΥΠΟΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ		ΚΩΔΙΚΟΣ	ΤΥΠΟΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ	
THERM-1	FF	ΘΕΡΜΙΣΜΕΝΟ	150-1	FF	HP
THERM-2	FF	ΘΕΡΜΙΣΜΕΝΟ	150-2	FF	HP
THERM-3	FF	ΘΕΡΜΙΣΜΕΝΟ	150-3	FF	HP
THERM-4	FF	ΘΕΡΜΙΣΜΕΝΟ	160-1	FF	HP
PAST-1	LF	LP	160-2	FF	HP
PAST-2	LF	LP	170-1	FF	HP

ΚΩΔΙΚΟΣ	ΤΥΠΟΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ		ΚΩΔΙΚΟΣ	ΤΥΠΟΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ	
PAST-3	FF	LP	170-2	FF	HP
PAST-4	FF	LP	210-1	FF	HP
20_1	FF	HP	210-2	FF	HP
20_2	FF	HP	180-1	FF/LL	HP
20_3	FF	HP	180-2	FF/LL	HP
30_1	FF	HP	190-1	FF/LL	HP
30_2	FF	HP	190-2	FF/LL	HP
30_3	FF	HP	200-1	LF	HP
40_1	FF	HP	200-2	LF	HP
40_2	FF	HP	220-1	LF	HP
40_3	FF	HP	220-2	LF	HP
50_1	FF	HP	260-1	LF	HP
50_2	FF	HP	260-2	LF	HP
70_1	FF	HP	270-1	LF	HP
70_2	FF	HP	270-2	LF	HP
80_1	FF	HP	290-1	LF	HP
80_2	FF	HP	290-2	LF	HP
80_3	FF	HP	300-1	LF	HP
90_1	FF	HP	300-2	LF	HP
90_2	FF	HP	310-1	LF	HP
90_3	FF	HP	310-2	LF	HP
100_1	FF	HP	60_1	FF	MF+LP
100_2	FF	HP	60_2	FF	MF+LP
100_3	FF	HP	280-1	LF	MF+LP
110_1	FF	HP	280-2	LF	MF+LP
110_2	FF	HP	10_1	FF	UHT
110_3	FF	HP	10_2	FF	UHT
120_1	FF	HP	10_3	FF	UHT
120_2	FF	HP	240-1	FF	UHT ¹
120_3	FF	HP	240-2	FF	UHT ¹
130_1	FF	HP	250-1	FF	UHT ²
130_2	FF	HP	250-2	FF	UHT ²
130_3	FF	HP	230-1	LF	UHT
140_1	FF	HP	230-2	LF	UHT
140_2	FF	HP	320-1	LF	UHT ³
140_3	FF	HP	330-1	LF	UHT ⁴
140_4	FF	HP	340-1	LF	UHT ²
			350-1	LF	UHT ⁵

¹ 128°C/3s, ² 130°C/3s, ³ 140°C/3s,

⁴ 140°C/3s (+preheating 96°C/3min), ⁵ 130°C/3s (+preheating 96°C/3min)

4.1.3 Δείγματα ανασυσταμένης σκόνης γάλακτος που δέχθηκαν έμμεση θερμική επεξεργασία.

Χρησιμοποιήθηκαν τρεις τύποι σκόνης άπαχου γάλακτος (SMP): χαμηλής θέρμανσης (LH), μεσαίας θέρμανσης (MH) και υψηλής θέρμανσης (HH). Δείγματα ανασυσταμένης σκόνης γάλακτος και από τις τρεις κατηγορίες δέχθηκαν θερμική επεξεργασία 80°C/3 s και 130°C/3 s σε πιλοτική κλίμακα με τον τρόπο που περιγράφεται στην παρ. 4.1.1.

4.1.4. Δείγματα συμπυκνωμένου γάλακτος που δέχθηκαν έμμεση θερμική επεξεργασία.

Το συμπυκνωμένο γάλα που χρησιμοποιήθηκε είναι γάλα που προορίζεται για βιομηχανική χρήση και δέχθηκε θερμική επεξεργασία 80°C/3 s και 130°C/3 s σε πιλοτική κλίμακα με τον τρόπο που περιγράφεται στην παρ. 4.1.1.

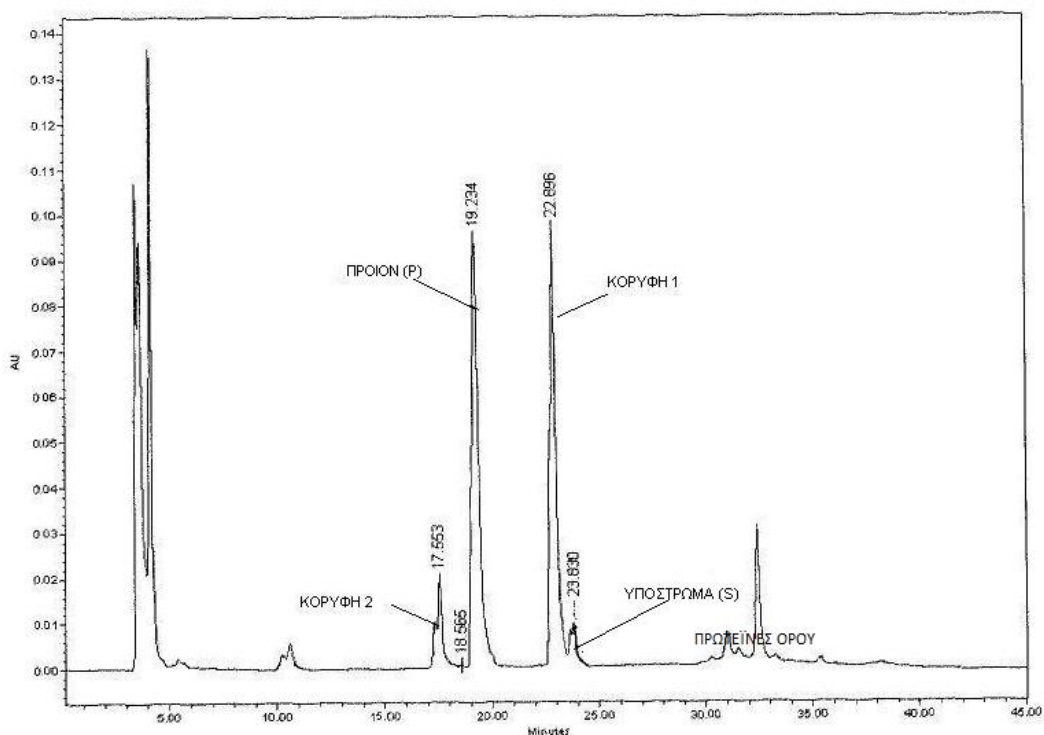
4.2. ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΚΑΘΕΨΙΝΗΣ D

Εφαρμόστηκε η μέθοδος των O'Driscoll *et al.* (1999) με τροποποιήσεις που αναφέρονται από τους Moatsou *et al.* (2008a,b). Η ανάλυση έγινε στους όξινους ορούς, που προετοιμάστηκαν για την εκτίμηση της μετουσίωσης των πρωτεϊνών του ορού όπως περιγράφεται παρακάτω.

Σε 5 mL δείγματος γάλακτος, αραιωμένου με 5 mL υπερκάθαρο νερό, προστέθηκαν 200 μL διαλύματος CH₃COOH 33% w/v και μετά από 10 min ηρεμίας προστέθηκαν 130 μL διαλύματος CH₃COONa 3,33 M, ώστε το pH να είναι 4.6. Μετά από φυγοκέντρηση των δειγμάτων σε 10000 rpm για 10 min στους 4°C, ο υπερκείμενος ορός διηθήθηκε από φίλτρο σύριγγας 0,45 μm (PVDF SLHVX13NL Dura pore Millipore). Ο προσδιορισμός της ενεργότητας της καθεψίνης D στο ορό των δειγμάτων έγινε εις διπλούν όπως περιγράφεται παρακάτω.

- Για τη μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα το συνθετικό πεπτίδιο Pro-Thr-Glu-Phe-[p-nitro-Phe]-Arg-Leu (Bachem Feinchemicalien AG, Bubendorf, Switzerland) σε υδατικό διάλυμα με συγκέντρωση 1mg/mL.
- 30 μl από το διάλυμα του υποστρώματος διαλύονται σε 200 μl ρυθμιστικό διάλυμα φορμικού νατρίου pH 3.2, που περιέχει 0,05% NaN₃ και προστίθενται 70 μl όξινου ορού ώστε να ξεκινήσει η ενζυμική δράση.
- Μετά από επώαση στους 37°C για 24 h, η αντίδραση τερματίζεται με θέρμανση στους 70°C για 10 min.

- Ύστερα από φυγοκέντρηση στα $10000 \times g$ για 10 min τα υπερκείμενα αναλύονται με RP-HPLC.
- Για την ανάλυση χρησιμοποιείται στήλη διαχωρισμού Nucleosil C8 4.6mm \times 250mm (μέγεθος σωματιδίου 5μm, μέγεθος πόρου 300 Å) και προστήλη Nucleosil C 84.6mm \times 10mm (Macherey-Nagel GmbH & Co, D-5252313, Düren, Germany).
- Το διάλυμα A είναι 0.1% TFA, το διάλυμα B 0.1% TFA σε ακετονιτρίλιο.
- Η ροή είναι 1 ml/min και οι συνθήκες: 15% B για 5 min, 15-45% B για 20 min, 45-95% B για 3 min, 95% B για 2 min, 95-15% B για 3 min και εξισορρόπηση με 15% B για 12 min.
- Ο όγκος των υπερκείμενων κατά την ένεση είναι 250 μl και το έκλουσμα καταγράφεται στα 300 nm.
- Σε κάθε σειρά αναλύσεων περιλαμβάνονταν δύο κατηγορίες δειγμάτων μαρτύρων: μόνο με υπόστρωμα και μόνο με ορό γάλακτος.



ΕΙΚΟΝΑ 4.1. Επίδραση του ορού νωπού γάλακτος στο υπόστρωμα (S) Pro-Thr-Glu-Phe-[p-nitro-Phe]-Arg-Leu, όπως απεικονίζεται στις χρωματογραφικές κατατομές RP-HPLC (A300).

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της ενεργότητας αυτής βασίστηκε στην χρωματογραφική επιφάνεια των κορυφών που αντιστοιχούσαν στο υπόστρωμα και

στο προϊόν της ενζυμικής αυτής αντίδρασης όπως παρουσιάζονται στην Εικόνα 4.1 Για την σωστή εκτίμηση των αποτελεσμάτων, εφαρμόστηκε επεξεργασία για την κανονικοποίησή τους, η οποία περιγράφεται στη συνέχεια. Από κάθε κορυφή που αντιστοιχούσε στα προϊόντα της αντίδρασης αφαιρούνταν η αντίστοιχη πολύ μικρή επιφάνεια που υπήρχε στις κατατομές των υποστρωμάτων που αναλύονταν ως δείγματα μάρτυρες κάθε φορά. Στον Πίνακα 4.2 παρουσιάζονται οι μέσοι όροι και οι διακυμάνσεις της επιφάνειας των σχετικών κορυφών στα δείγματα μάρτυρες με υπόστρωμα. Έτσι, όταν η διαφορά της επιφάνειας μίας από αυτές τις κορυφές ενός υπό μελέτη χρωματογραφήματος με την αντίστοιχή του μάρτυρα ήταν εντός των ορίων που αναφέρονται στον Πίνακα 4.2, αυτή θεωρούνταν ως μηδενική /μη-μετρήσιμη.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4.2. Μέση επιφάνεια (CAU $\times 10^6$) \pm τυπική απόκλιση των κορυφών που επισημαίνονται στην Εικόνα 4.1, όπως προσδιορίστηκαν στα δείγματα μάρτυρες με υπόστρωμα.

Κορυφή	CAU $\times 10^6$
Υπόστρωμα, S	5,58 \pm 0,55
Προϊόν, P	0,081 \pm 0,033
1	0,064 \pm 0,040
2	0,042 \pm 0,025

4.3. ΕΝΖΥΜΙΚΕΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΠΛΑΣΜΙΝΗΣ

Ο προσδιορισμός της ενεργότητας της πλασμίνης (PL), του πλασμινογόνου (PG) και των ενεργοποιητών του πλασμινογόνου (PA) πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο που περιγράφεται από τους Politis *et al.* (1989), Politis and Ng Kwai Hang (1989) και White *et al.* (1995) με μικρές τροποποιήσεις στους όγκους και τις συγκεντρώσεις των αντιδρώντων.

Ο προσδιορισμός των επιμέρους ενζυμικών ενεργοτήτων έγινε σε εκχυλίσματα των δειγμάτων γάλακτος, τα οποία προετοιμάστηκαν ως εξής: 1050 μl γάλακτος αναμίχθηκαν με 350 μl 0,4 M (κιτρικό τρινάτριο) και μετά από φυγοκέντρηση 27000 \times g για 20 min, το υπερκείμενο καταψύχθηκε στους - 20°C έως την πραγματοποίηση των προσδιορισμών. Ο προσδιορισμός των ενζυμικών ενεργοτήτων βασίστηκε στη υδρόλυση του χρωμογόνου υποστρώματος D-Val-Leu-Lys-*p*-nitroanilide (V7127 Sigma Aldrich Co.), η οποία είχε ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση *p*-νιτροανιλίνης και τη μεταβολή της απορρόφησης του μίγματος των αντιδρώντων στα 405nm (A405).

Για κάθε ένα από τα τρία ένζυμα, ακολουθήθηκε διαφορετικός σχεδιασμός των δοκιμών:

- (1) Η ενεργότητα της PL προσδιορίσθηκε στα εκχυλίσματα των γαλάτων, χωρίς άλλη προσθήκη: 12 μl εκχυλίσματος αναμείχθηκαν με 168 μl 50 mM Tris buffer (pH 7.4) που περιείχε 100 mM NaCl και 0.6 mM του χρωμογόνου υποστρώματος D-Val-Leu-Lys-*p*-nitroanilide (V7127 Sigma Aldrich Co.) και προστέθηκαν 20 μl H₂O και στη συνέχεια καταγραφόταν η A405 κατά τη διάρκεια της επώασης στους 37°C. Ως μία μονάδα (U) PL ορίστηκε η ποσότητα του ενζύμου που προκαλεί αλλαγή της A405 κατά 0,1 σε 60 min.
- (2) Η ενεργότητα του PG προσδιορίσθηκε στα εκχυλίσματα των γαλάτων αφού προστέθηκε εξωγενώς ενεργοποιητής (ουροκινάση) για την μετατροπή του PG σε ενεργή PL: 12 μl εκχυλίσματος αναμείχθηκαν με 168 μl 50 mM Tris buffer (pH 7.4) που περιείχε 100 mM NaCl και 0.6 mM του χρωμογόνου υποστρώματος και προστέθηκαν 20 μl ουροκινάση 150 Plough Units (U0633, Sigma Aldrich Co) με 20 μl H₂O. Το μίγμα επώαστηκε στους 37°C και καταγραφόταν η A405. Το αποτέλεσμα αυτής της δοκιμής ήταν η μέτρηση ενεργότητας που οφείλεται στο πλασμινογόνο και την πλασμίνη (PG+PL). Η PG ενεργότητα προσδιορίσθηκε ως η διαφορά μεταξύ (2) και (1).
- (3) Η ενεργότητα των PA προσδιορίσθηκε στα εκχυλίσματα των γαλάτων αφού προστέθηκε PG. Ο προσδιορισμός βασίστηκε στη μετατροπή του εξωγενώς προστιθέμενου PG σε PL από τους ενδογενείς ενεργοποιητές: 12 μl εκχυλίσματος αναμείχθηκαν με 168 μl 50 mM Tris buffer (pH 7.4) που περιείχε 100 mM NaCl και 0.6 mM του χρωμογόνου υποστρώματος και προστέθηκαν 20 μl πλασμινογόνο (P9156, Sigma Aldrich Co.) και καταγραφόταν η A405.

Σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας μίγμα όλων των αντιδρώντων χωρίς εκχύλισμα γάλακτος. Για τους υπολογισμούς ελήφθη υπόψη το γραμμικό τμήμα της καμπύλης απορρόφηση/χρόνος. Οι ενεργότητες εκφράστηκαν ως U/ml γάλακτος. Όλες οι αναλύσεις έγιναν εις διπλούν σε μικροπλάκες 96 θέσεων (βοθρίων).

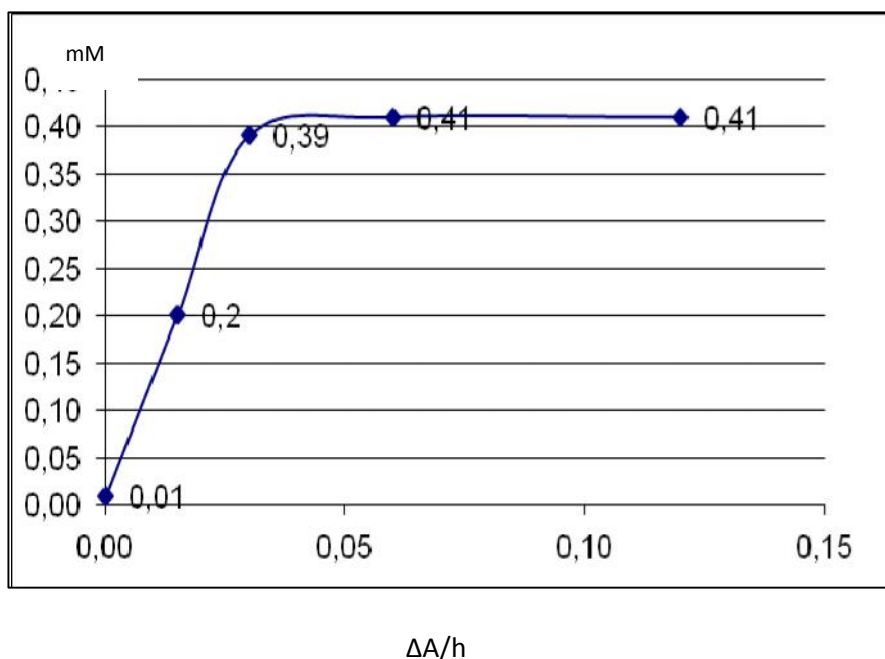
Οι συγκεντρώσεις του μίγματος των αντιδρώντων διαμορφώθηκαν μετά από δοκιμές με διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος (mM) και ποσότητες εκχυλίσματος γάλακτος (μl), τα αποτελέσματα των οποίων φαίνονται στις Εικόνες 4.2 και 4.3 αντίστοιχα.

4.4. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

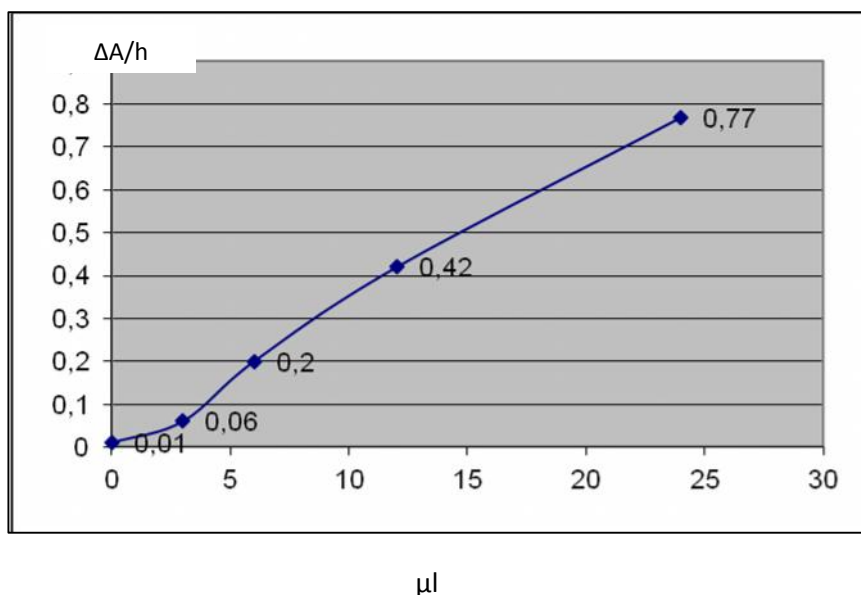
Η επίδραση των επεξεργασιών που εφαρμόσθηκαν στις μεταβλητές που προσδιορίσθηκαν ελέγχθηκε με τη μέθοδο ανάλυσης παραλλακτικότητας (Analysis Of Variance, ANOVA). Η επίδραση των επεξεργασιών θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική όταν η τιμή P του F-test ήταν <0,05 (P<0,05). Οι διαφορές μεταξύ των μέσων ελέγχθηκαν με τη μέθοδο της ελάχιστης σημαντικής διαφοράς (Least Significance Difference, LSD, P<0,05). Η σχέση μεταξύ των μεταβλητών

διερευνήθηκε με τη μέθοδο της γραμμικής παλινδρόμησης και αποτυπώθηκε με τους σχετικούς συντελεστές συσχέτισης (R). Τέλος, εφαρμόστηκε η ανάλυση των κυρίων συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA) με σκοπό τη μείωση του αριθμού των μεταβλητών. Οι νέες μεταβλητές χρησιμοποιήθηκαν για την καταγραφή και ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Η στατιστική ανάλυση έγινε με το λογισμικό Statgraphics Centurion XVI.



Εικόνα 4.2. Μεταβολή της A405 ($\Delta A/h$) σε σχέση με τη συγκέντρωση υποστρώματος (mM).



Εικόνα 4.3. Μεταβολή της A405 ($\Delta A/h$) σε σχέση με την ποσότητα εκχυλίσματος γάλακτος (μl).

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

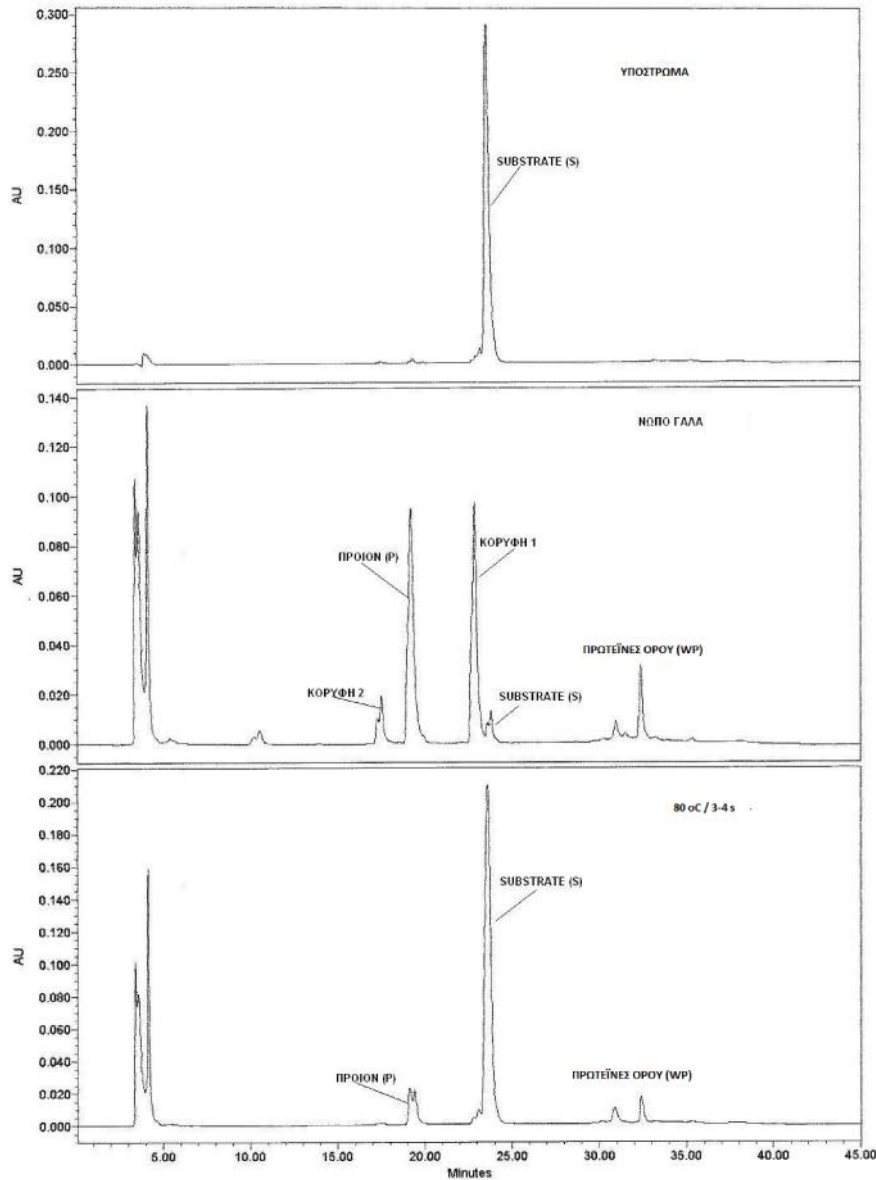
5.1. ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΝΩΠΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΠΟΥ ΔΕΧΘΗΚΑΝ ΕΜΜΕΣΗ ΘΕΡΜΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ.

Οι ενεργότητες των ενζύμων που μελετήθηκαν στο πλαίσιο των πειραμάτων της θερμικής επεξεργασίας του γάλακτος παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.1 σε συνδυασμό με τη συγκέντρωση υπολειμματικής β-γαλακτογλοβουλίνης που είχε προσδιορισθεί προηγουμένως. Τα αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας παρουσιάζονται στους Πίνακες 5.2 και 5.3. Η ταυτοποίηση των κορυφών των Εικόνων 4.1 και 5.1 έγινε με βάση πειράματα με τη χρήση ειδικών αναστολέων διαφόρων ενδοκυτταρικών πρωτεασών (Μπακοπάνος 2007, Moatsou *et al.* 2008a,b). Η κορυφή P είναι το προϊόν δράσης της καθεψίνης D στο συνθετικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε και η κορυφή 2 προϊόν δράσης της καθεψίνης B. Τέλος, η κορυφή 1 προκύπτει από τη δράση άλλων εκτός των κυστεϊνικών πρωτεασών και η οποία έχει χαρακτηριστεί ως unidendified milk protease (UMP) από τους Larsen *et al.* (2006)

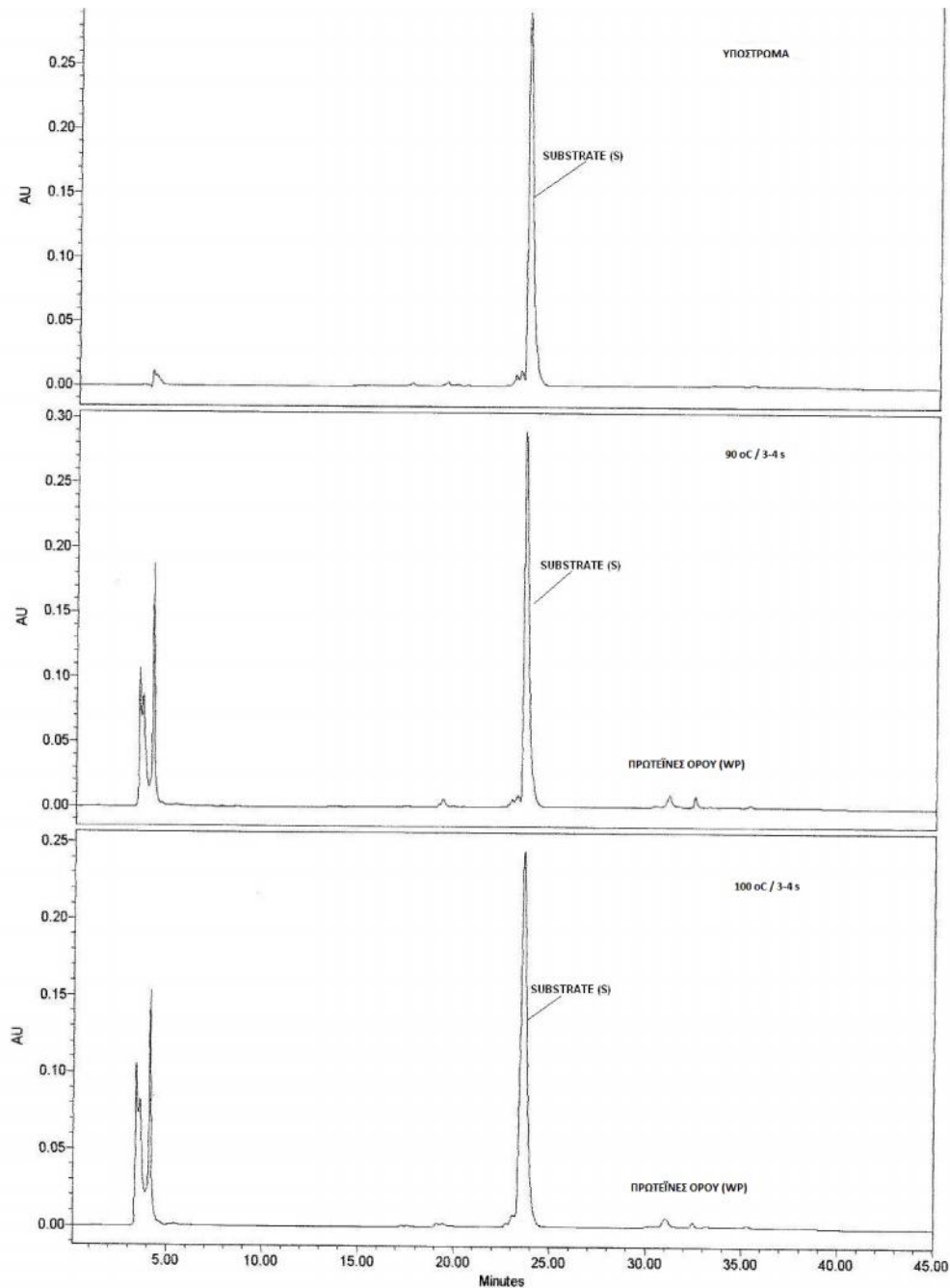
Από την Εικόνα 5.1 και τον Πίνακα 5.1 είναι εμφανές ότι θερμοκρασίες >90 °C στο έμμεσο σύστημα θέρμανσης που εφαρμόστηκε αδρανοποιούν την καθεψίνη D στο φυσικό pH του γάλακτος. Έτσι, στο γάλα που δέχθηκε την επίδραση των 80 °C για 3-4 s, το 90% του υποστρώματος παρέμεινε άθικτο και η παραγωγή του προϊόντος υδρόλυσης από την καθεψίνη D είναι το ¼ αυτής που παρατηρήθηκε στο νωπό γάλα σε συμφωνία με τις περισσότερες αναφορές σχετικά με το παστεριωμένο γάλα (Πίνακας 5.1, Εικόνα 5.1). Αντίθετα οι κορυφές 1 και 2 που αντιστοιχούν στην καθεψίνη B και στην UMP δεν υπάρχουν, υποδεικνύοντας ότι οι συνθήκες αυτές αδρανοποιούν τις συγκεκριμένες ενζυμικές ενεργότητες. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, με την κλασική παστερίωση (72°C για 15 s) αδρανοποιείται το μεγαλύτερο μέρος της καθεψίνης D, αλλά απομένει περισσότερο από το 20% της καθεψίνης D και της καθεψίνης B (Larsen *et al.*, 2000, Hayes *et al.*, 2001, Magboul *et al.*, 2001, Moatsou, 2010). Ολοκληρωτική απενεργοποίηση της καθεψίνης D στο γάλα προκαλείται με θέρμανση στους 70°C για 10 min (Kaminogawa and Yamauchi, 1972). Όμως έχει βρεθεί ότι με βάση το παραγόμενο προϊόν (κορυφή P) η παστερίωση του γάλακτος στους 68°C για 10 min δεν επηρέασε την ενεργότητα του ενζύμου (Moatsou *et al.* 2008a).

Σύμφωνα με τον Πίνακα 5.3, η υπολειμματική ενεργότητα της καθεψίνης D, υπολογισμένη με βάση την κορυφή P συσχετίζεται στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$) με την υπολειμματική β-LG. Η συσχέτιση αυτή είναι θετική και υψηλή, όπως έχει αναφερθεί σχετικά με την επίδραση της υπερυψηλής πίεσης στις δύο αυτές μεταβλητές από τους Moatsou *et al.* (2008a). Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 5.1. προκύπτει ότι όταν η υπολειμματική μη-μετουσιωμένη β-LG είναι <2600 mg/L που

είναι το όριο για το παστεριωμένο γάλα το ένζυμο αυτό δεν είναι ενεργό. Επομένως, γάλατα υψηλής παστερίωσης και ασφαλώς και τα UHT δεν αντιμετωπίζουν τον κίνδυνο υδρόλυσης των καζεϊνών από το ένζυμο αυτό κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους.



ΕΙΚΟΝΑ 5.1. Προσδιορισμός της υπολειμματικής καθεψίνης D (παρ. 4.2) σε δείγματα γάλακτος που δέχθηκαν έμμεση θερμική επεξεργασία.



ΕΙΚΟΝΑ 5.1 (συνέχεια). Προσδιορισμός της υπολειμματικής καθεψίνης D (παρ. 4.2) σε δείγματα γάλακτος που δέχθηκαν έμμεση θερμική επεξεργασία.

Στα νωπά γάλατα που χρησιμοποιήθηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα η αναλογία πλασμινογόνου προς πλασμίνη (PG/PL) ήταν $4,43 \pm 0,69$. Ήταν δηλαδή εντός των ευρέων ορίων 2-30 που αναφέρονται στη βιβλιογραφία για την αναλογία αυτή (Bastian and Brown, 1996, Richardson and Pearce, 1981, Ozen *et al.*, 2003).

Σύμφωνα με την ανάλυση παραλλακτικότητας, οι επιμέρους ενζυμικές ενεργότητες του συστήματος πλασμίνης (PL, PG και UPA) δεν επηρεάστηκαν στατιστικά σημαντικά ($P > 0,05$) από τις θερμικές επεξεργασίες που εφαρμόστηκαν (Πίνακες 5.1 και 5.2), καθώς οι τυπικές αποκλίσεις των μέσων ήταν σε ορισμένες περιπτώσεις πολύ μεγάλες. Όμως η σύγκριση των μέσων με τη μέθοδο της ελάχιστης σημαντικής διαφοράς (LSD, $P < 0,05$, Εικόνα 5.2) έδειξε διαφορές μεταξύ ορισμένων μέσων του PG, οι οποίες επηρέασαν και το άθροισμα PG+PL, το οποίο εκφράζει όχι μόνο την υπαρκτή αλλά και την εν δυνάμει ενεργότητα του συστήματος. Το άθροισμα αυτό έχει μεγάλη τεχνολογική σημασία, αφού ο ενεργοποιητής UPA που ενεργοποιεί το PG αποδείχθηκε επίσης εξαιρετικά ανθεκτικός στις θερμικές επεξεργασίες που εφαρμόστηκαν (Πίνακας 5.1, Εικόνα 5.4).

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 5.3, η συνολική αυτή ενεργότητα αυξάνει σε σχέση με αυτή του νωπού γάλακτος για τις επεξεργασίες μέχρι τους 110°C και μειώνεται στατιστικά σημαντικά στους 130°C και 140°C . Παρόμοια τάση ακολουθεί και ο λόγος PG/PL μέχρι τους 110°C , ο οποίος στους $80-110^{\circ}\text{C}$ είναι κατά 20-40% περίπου μεγαλύτερος από αυτόν του νωπού γάλακτος. Προφανώς, η PL μετουσιώνεται με ταχύτερο ρυθμό από το PG μέχρι τους 110°C κάτω από τις συνθήκες που εφαρμόστηκαν. Γενικά, πάντως σε αυτό το εύρος επεξεργασιών, το πλασμινογόνο επηρεάζεται σαφώς λιγότερο από το ενεργό ένζυμο. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης χρειάζονται συνθήκες $\geq 130^{\circ}\text{C}/3-4$ s για να προκληθεί σημαντική αδρανοποίηση του πλασμινογόνου, αλλά και για να παρατηρηθεί μείωση (όχι πάντως στατιστικά σημαντική) της ενεργότητας UPA, η οποία είναι η κρίσιμη παράμετρος για τη δράση αυτού του συστήματος στο θερμικά επεξεργασμένο γάλα. Άλλωστε, όπως φαίνεται στον Πίνακα 5.3 οι τιμές της PL συσχετίζονται σημαντικά και θετικά μόνο με τις τιμές UPA και με καμία άλλη από τις μεταβλητές που προσδιορίστηκαν.

Η θερμοανθεκτικότητα του συστήματος πλασμίνης είναι γνωστή (Κεφ. 2.2 και 2.3), καθώς αναφέρονται τιμές $D_{142^{\circ}\text{C}}$ στο γάλα 10-18 s για την πλασμίνη (Driessen and van der Waals, 1978, Alichanidis *et al.* 1986) και $D_{140^{\circ}\text{C}}$ 32 s για τους PAs (Deharveng and Nielsen, 1991, Lu and Nielsen, 1993a). Έχει επίσης αναφερθεί ότι το PG είναι περισσότερο θερμοανθεκτικό από την PL (Aroonkamonsri *et al.* 1996) και ότι επιζεί σε διπλάσιο ποσοστό (37%) σε σχέση με την PL μετά από άμεση θερμική επεξεργασία του γάλακτος 142°C για 5 s, ενώ παραμένει 1/5 της υπολειμματικής ενεργότητας μετά από έμμεση επεξεργασία 145°C για 3 s (Manji *et al.*, 1986). Στην παρούσα εργασία δεν παρατηρήθηκαν τόσο έντονες μεταβολές, προφανώς επειδή οι τελικές συνθήκες που εφαρμόστηκαν ήταν λιγότερο έντονες από αυτές που προαναφέρθηκαν.

Ένα ενδιαφέρον εύρημα του τμήματος αυτού της παρούσας εργασίας είναι η απουσία μαθηματικής συσχέτισης μεταξύ των υπολειμματικών ενζυμικών δράσεων του συστήματος πλασμίνης και της υπολειμματικής β -LG (Πίνακας 5.3). Έχει αποδειχθεί ότι η ενεργότητα της PL επηρεάζεται σημαντικά από τη UHT-

μετουσιωμένη β-γαλακτογλοβουλίνη, η οποία περιέχει ελεύθερες ομάδες –SH, οι οποίες προκαλούν μη αναστρέψιμη μετουσίωση της PL εξαιτίας των S-S / S-H αλληλεπιδράσεων. Έχει προταθεί η άποψη ότι το ξεδίπλωμα του PG, επίσης, μπορεί να προωθήσει την αλληλεπίδραση με τη β-LG, πολύ περισσότερο σε αυξημένες θερμοκρασίες, με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της ενεργοποίησης του (Enright and Kelly, 1999, Enright *et al.*, 1999. Σύμφωνα με τους Lu *et al.* (2009) σε γάλα θερμασμένο στους 85°C ή 90°C η ενεργότητα του PG μειώνεται χωρίς επακόλουθη αύξηση της ενεργότητας της PL εξαιτίας της β-LG καθώς και την ίδια επίπτωση είχε και η παρουσία κυστεΐνης. Η θέρμανση του PG παρουσία της β-LG προωθεί τη δημιουργία δι-, τρι- και πολυμερών του PG μέσω S-S αλληλεπιδράσεων, τα οποία παρεμποδίζουν την ενεργοποίηση του PG σε PL. Οι Prado *et al.* (2006) προτείνουν ότι ομοιοπολική σύνδεση μεταξύ του PG και της β-LG, είναι πιθανόν υπεύθυνη για τη μείωση της ενεργοποίησης του PG που παρατηρήθηκε σε γάλα επεξεργασμένο στους 82°C για 15 s.

Επομένως, τα ένζυμα που απαρτίζουν το σύστημα πλασμίνης, εμφανίστηκαν εξαιρετικά θερμοανθεκτικά κάτω από τις συνθήκες που εφαρμόστηκαν και δεν επηρεάστηκαν από τη μετουσίωση της β-LG, γεγονός που δείχνει ότι αποτελούν πολύ σημαντικό παράγοντα για τη σταθερότητα των θερμικά επεξεργασμένων γαλάτων σε «υπό»-UHT συνθήκες. Όμως πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι εκτός από την ένταση της θερμικής επεξεργασίας, τα φαινόμενα που σχετίζονται με το σύστημα αυτό θα πρέπει να μελετηθούν και σε ότι αφορά, το σύστημα μετάδοσης θερμότητας, την αρχική σχέση PL/PG/PA στο γάλα πριν από την επεξεργασία και τη διάρκεια/θερμοκρασία συντήρησης των επεξεργασμένων γαλάτων.

ΠΙΝΑΚΑΣ 5.1. Ενεργότητες καθεψίνης D και των ενζύμων του συστήματος πλασμίνης σε δείγματα γάλακτος που δέχθηκαν έμμεση θερμική επεξεργασία. Η υπολειμματική β-γαλακτογλοβουλίνη (β-LG) παρουσιάστηκε από τον Σακκά (2011).

S: υπόστρωμα, P: προϊόν, 1, 2: κορυφές Εικόνας 4.1. Για τον υπολογισμό της επιφάνειας των κορυφών των χρωματογραφήματων της καθεψίνης D έγινε κανονικοποίηση με αφαίρεση των αντίστοιχων επιφανειών του χρωματογραφήματος του υποστρώματος (Εικόνες 4.1 και 5.1, παρ. 4.2).

PL: πλασμίνη, PG: πλασμινογόνο, UPA: ενεργοποιητής του πλασμινογόνου (παρ. 4.3).

M.O.: μέση τιμή, T.A.: τυπική απόκλιση

ΘΕΡΜΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ	Υπολειμματική β-LG (mg/L)		Καθεψίνη-D: επιφάνεια κορυφών (κανονικοποιημένες τιμές) Χ10 ⁶								Σύστημα πλασμίνης								
			Υπολειμματικό S %		P		1		2		PL		PG		UPA		PG/PL		PL+PG
	M.O.	T.A.	M.O.	T.A.	M.O.	T.A.	M.O.	T.A.	M.O.	T.A.	M.O.	T.A.	M.O.	T.A.	M.O.	T.A.	M.O.	T.A.	
Νωπό	4076 f	103	6 a	1,8	1,89 c	0,26	2,18 b	0,28	0,40 b	0,10	10,0	1,8	43,4 a, b	2,0	0,241	0,015	4,43	0,69	53,43 a,b,c
80°C/3-4s	2716 e	181	89,5 b	0,7	0,51 b	0,09	0 a		0 a		9,6	1,6	52,7 a, b	3,3	0,253	0,031	5,57	0,61	62,25 a,b,c
90°C/3-4s	1132 d	167	100 c		0 a		0 a		0 a		10,3	2,8	57,9 b	6,9	0,236	0,031	5,95	2,27	68,10 c
100°C/3-4s	404 c	35	100		0		0		0		10,9	4,1	52,1 a, b	8,8	0,235	0,031	5,13	1,57	63,03 a,b,c
110°C/3-4s	200 b	25	100		0		0		0		10,5	4,6	56,2 b	10,7	0,239	0,030	6,00	2,52	66,70 b,c
120°C/3-4s	129 a, b	78	100		0		0		0		11,1	3,0	47,0 a, b	22,9	0,235	0,051	4,72	3,37	58,05 a,b,c
130°C/3-4s	57 a, b	41	100		0		0		0		7,2	0,2	36,6 a	5,9	0,204	0,030	5,11	0,68	43,75 a
140°C/3-4s	3 a	3	100		0		0		0		7,3	0,6	39,6 a	6,8	0,216	0,016	5,52	1,42	46,85 a,b

Οι Μ.Ο. με διαφορετικά γράμματα διέφεραν στατιστικά σημαντικά (LSD, P<0,05)

ΠΙΝΑΚΑΣ 5.2. Ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) των μεταβλητών του Πίνακα 5.1. Όταν η τιμή P του F-test είναι $<0,05$, υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μεταβλητών-δεικτών των διαφορετικών θερμικών επεξεργασιών. Οι συμβολισμοί των μεταβλητών όπως αναφέρονται στον Πίνακα 5.1.

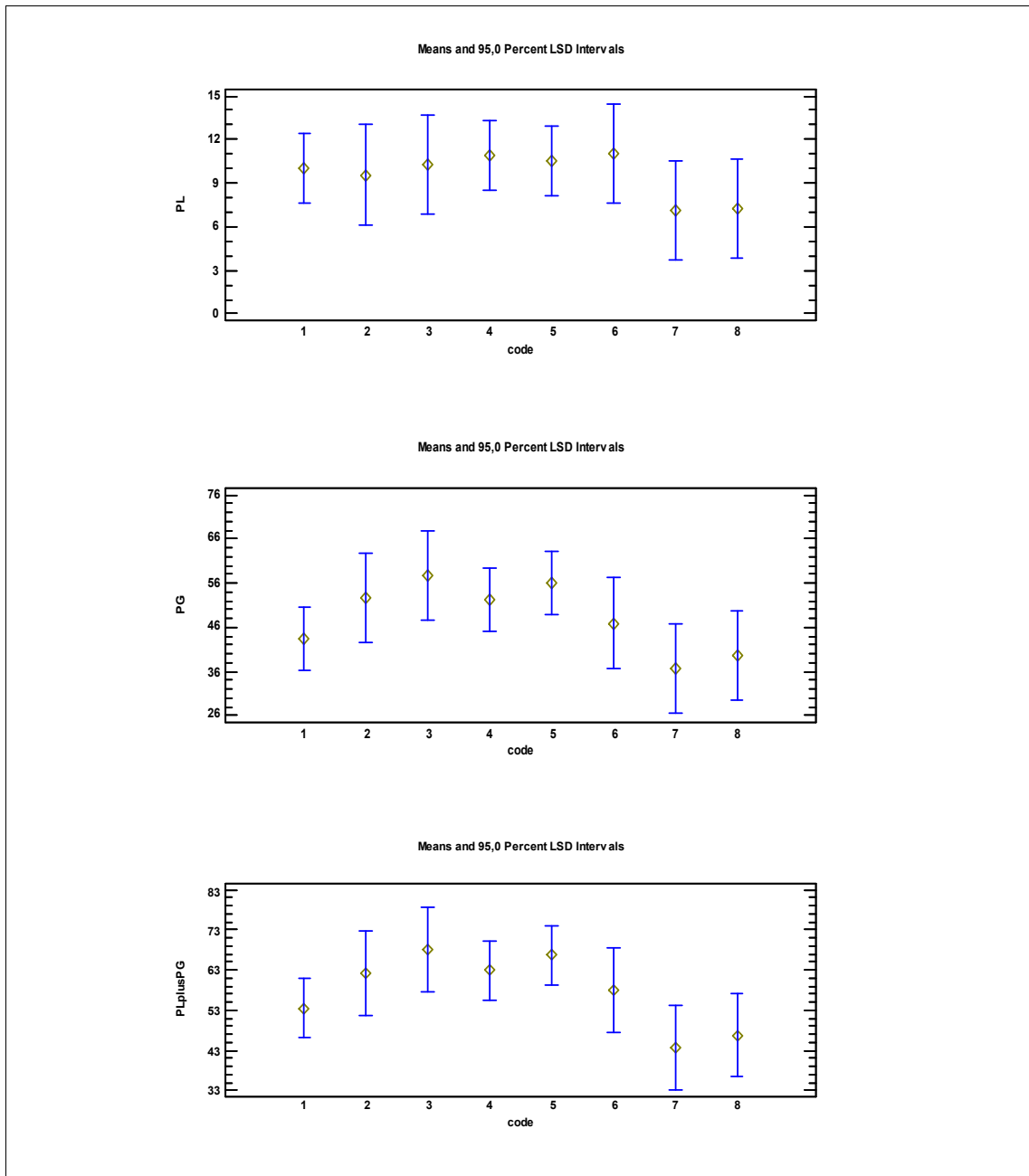
Μεταβλητή	Τιμή P
β-LG	0,0000
Υπολειμματικό S	0,0000
Προϊόν (P)	0,0000
Κορυφή 1	0,0000
Κορυφή 2	0,0000
PL	0,8007
PG	0,1953
UPA	0,7332
PL+PG	0,1165
PG/PL	0,9459

ΠΙΝΑΚΑΣ 5.3. Συντελεστές γραμμικής συσχέτισης (R) μεταξύ των μεταβλητών-δεικτών που προσδιορίστηκαν.

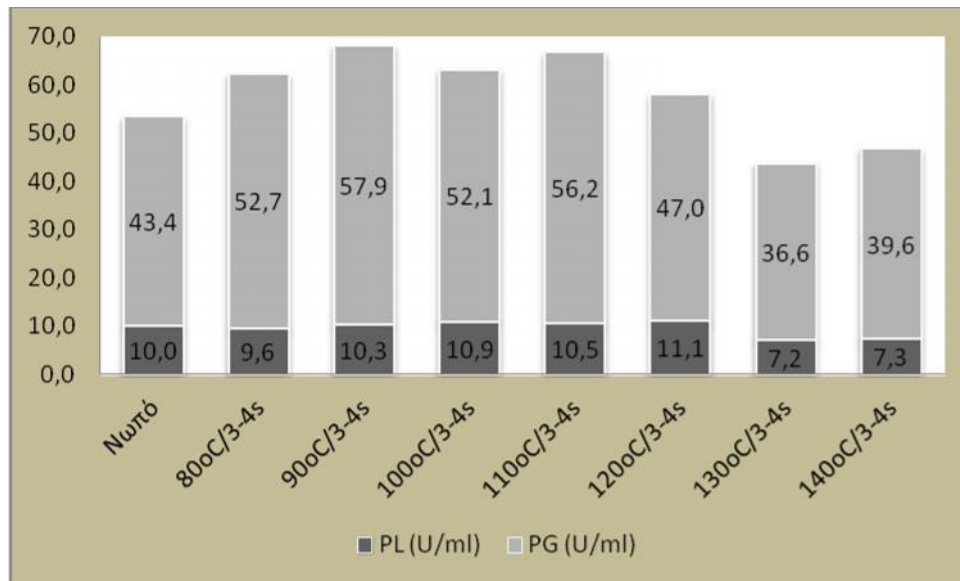
Οι συμβολισμοί των μεταβλητών όπως αναφέρονται στον Πίνακα 5.1.

* στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($P<0,05$)

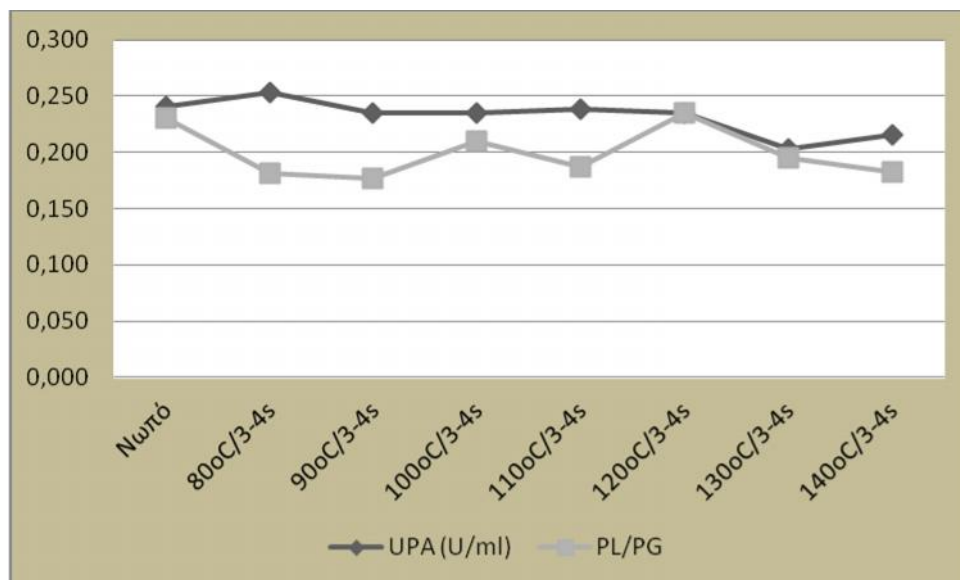
	Προϊόν (P)	PL	PG	UPA	PG/PL
β-LG	0,9220 *	0,0591	-0,0870	0,2689	-0,1801
Προϊόν (P)		0,0265	-0,2258	0,1991	-0,2293
PL	0,0265		0,1693	0,5050 *	-0,6637 *
PG	-0,2258	0,1693		0,2204	0,6028 *
UPA	0,1991	0,5050 *	0,2204		0,2036



ΕΙΚΟΝΑ 5.2. Απεικόνιση της σύγκρισης των τιμών PL και PG με τη μέθοδο της ελάχιστης σημαντικής διαφοράς (LSD, $P < 0,05$). Ο κωδικός 1 αντιστοιχεί στο νωπό γάλα και οι κωδικοί 2-8 στις θερμικές επεξεργασίες 80-140 °C.



ΕΙΚΟΝΑ 5.3. Ενεργότητες (U/ml γάλακτος) πλασμίνης (PL) και πλασμινογόνου (PG) σε δείγματα γάλακτος που δέχθηκαν έμμεση θερμική επεξεργασία. Ο προσδιορισμός έγινε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 4.3.



ΕΙΚΟΝΑ 5.4. Συγκριτική παρουσίαση της ενεργότητας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (UPA, U/ml γάλακτος) σε σχέση με την αναλογία πλασμίνη/πλασμινογόνο (PL/PG) σε δείγματα γάλακτος που δέχθηκαν έμμεση θερμική επεξεργασία. Ο προσδιορισμός έγινε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 4.3.

Η ανάλυση των κύριων συστασιών (PCA) εφαρμόστηκε μόνο στις μεταβλητές των θερμικά επεξεργασμένων γαλάτων (δηλαδή το νωπό εξαιρέθηκε) με σκοπό τη διερεύνηση της δυνατότητας ομαδοποίησης των δειγμάτων με βάση τη θερμική επεξεργασία που δέχθηκαν. Προέκυψαν 3 κύριες συστασιές (principal components, PCs) με ιδιοτιμές >1, στις οποίες αντιστοιχεί συνολικά το 90,5% της

διασποράς (Πίνακας 5.4). Οι συνιστώσες αυτές είναι γραμμικοί συνδυασμοί των 6 πρωτότυπων μεταβλητών-δεικτών που προσδιορίστηκαν με συντελεστές αυτούς που παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.5.

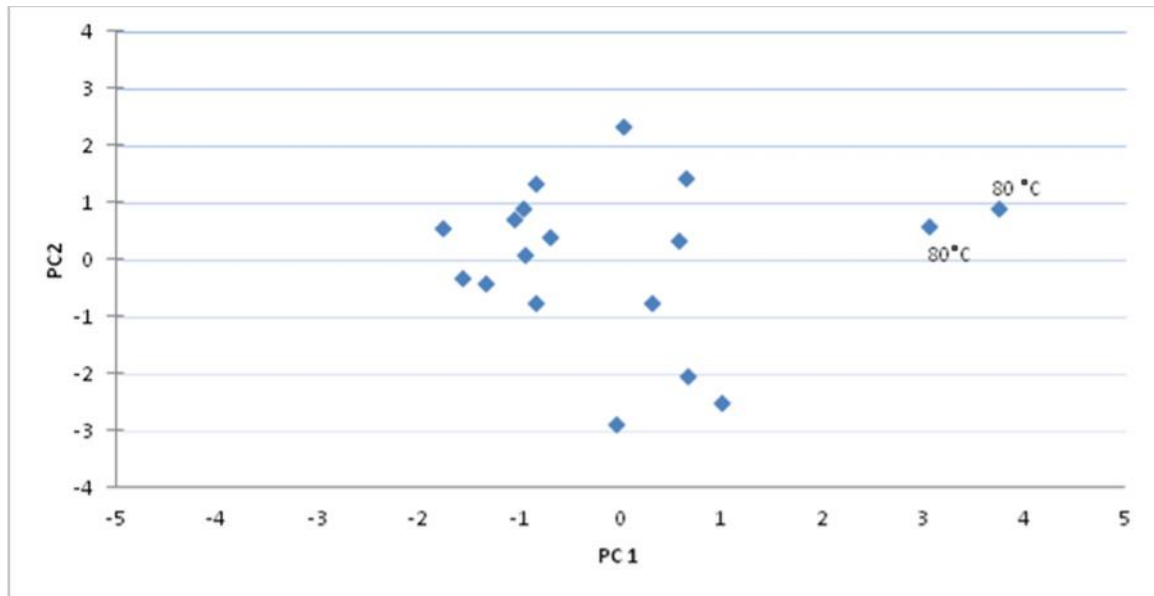
ΠΙΝΑΚΑΣ 5.4. Ανάλυση κύριων συνιστωσών του πειράματος της έμμεσης θερμικής επεξεργασίας.

Κύρια Συνιστώσα (PC)	Ιδιοτιμή (Eigenvalue)	% της διασποράς	Αθροιστική διασπορά, %
1	2,22514	37,086	37,086
2	1,91143	31,857	68,943
3	1,29168	21,528	90,471
4	0,484374	8,073	98,544
5	0,077916	1,299	99,842
6	0,00946407	0,158	100,000

ΠΙΝΑΚΑΣ 5.5. Συντελεστές των μεταβλητών που διαμορφώνουν τις κύριες συνιστώσες του πειράματος της έμμεσης θερμικής επεξεργασίας.

	PC1	PC2	PC3
β-LG	0,593464	0,152506	-0,287455
Προϊόν καθεψίνης D	0,558856	0,1456	-0,418051
PL	0,234692	-0,575264	0,35611
PG	0,277035	0,307309	0,674724
UPA	0,451138	-0,25341	0,302957
PG/PL	-0,0112493	0,682612	0,262211

Τα δείγματα του γάλακτος που δέχθηκαν έμμεση θερμική επεξεργασία ομαδοποιούνται με βάση τις δυο πρώτες κύριες συνιστώσες (PC1 και PC2) όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 5.5. Μόνο τα δείγματα των 80°C αποτελούν διακριτή ομάδα, καθώς τα υπόλοιπα είναι δύσκολο να διακριθούν μεταξύ τους. Προφανώς αυτό οφείλεται, ότι καθώς έχουμε απομακρυνθεί από τις συνθήκες παστερίωσης, η μεν ενεργότητα της καθεψίνης D μηδενίζεται, η δε της πλασμίνης δεν μεταβάλλεται δραματικά με αποτέλεσμα οι κύριες συνιστώσες να μην ομαδοποιούν αποτελεσματικά τα δείγματα.



ΕΙΚΟΝΑ 5.5. Ομαδοποίηση των δειγμάτων του πειράματος της έμμεσης θερμικής επεξεργασίας με βάση τις δύο πρώτες κύριες συνιστώσες (PC1, PC2) του Πίνακα 5.5.

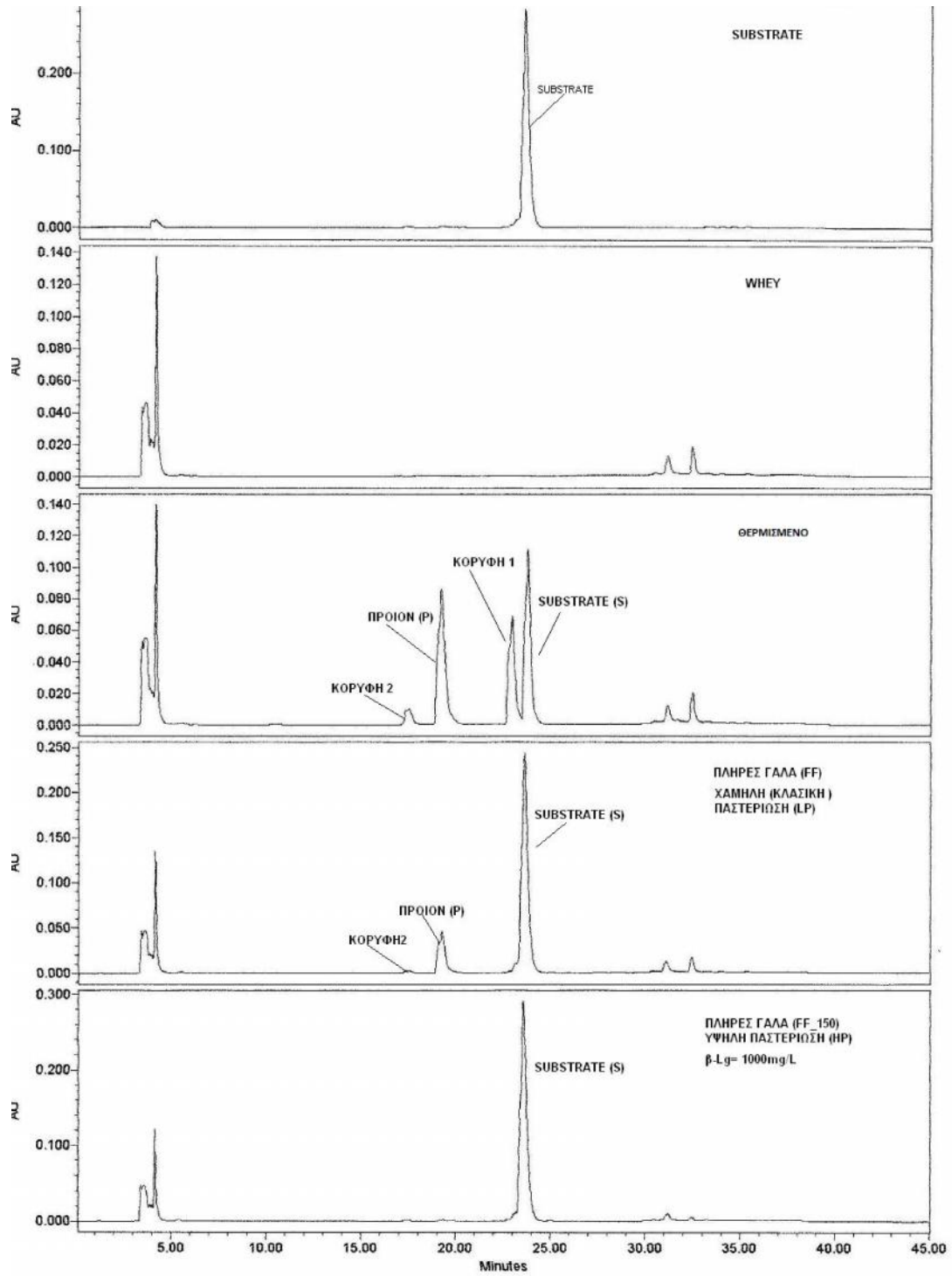
5.2. ΕΜΠΟΡΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΘΕΡΜΙΚΑ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΜΕΝΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ.

Στον Πίνακα 5.6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των προσδιορισμών των ενεργοτήτων των ενζύμων στα εμπορικά δείγματα θερμικά επεξεργασμένου γάλακτος ταξινομημένα ανά κατηγορίες ανάλογα με τη σήμανσή τους και στον Πίνακα 5.7 τα αποτελέσματα της ανάλυσης παραλλακτικότητας (ANOVA) που εφαρμόστηκε όπως αναφέρθηκε στο κεφ. 5.1. Η προκαταρκτική επεξεργασία έδειξε ότι δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των προϊόντων με πλήρη σύσταση και αυτών με μειωμένα λιπαρά του ίδιου τύπου, γι' αυτό και οι δύο αυτές υποκατηγορίες ανήκουν στην ίδια ομάδα. Τελικά τα δείγματα των εμπορικών προϊόντων ομαδοποιήθηκαν ως εξής:

Πίνακας 5.6^α. Κωδικοποίηση εμπορικών δειγμάτων.

Κωδικός	Τύπος γάλακτος	Σύμβολο
9	Θέρμισμα ¹	THERM
10	Παστερίωση	LP (FF/LF)
11	Υψηλή παστερίωση	HP (FF/LF)
12	Υψηλή παστερίωση-μειωμένη λακτόζη	HP-LL
13	Μικροδιήθηση + Παστερίωση	MF+LP (FF/LF)
14	UHT	UHT (FF/LF)

¹ Δεν είναι δείγμα της αγοράς, αλλά είναι γάλα μεγάλης ανάμιξης που έχει υποστεί θέρμισμα πριν από την τελική θερμική επεξεργασία.



ΕΙΚΟΝΑ 5.6. Παραδείγματα προσδιορισμού της υπολειμματικής καθεψίνης D (παρ. 4.2) σε εμπορικά δείγματα θερμικά επεξεργασμένου γάλακτος.

ΠΙΝΑΚΑΣ 5.6. Ενεργότητες καθεψίνης D και των ενζύμων του συστήματος πλασμίνης σε εμπορικά δείγματα θερμικά επεξεργασμένου γάλακτος
 Η υπολειμματική β-γαλακτογλοβουλίνη (β-LG) παρουσιάστηκε από τον Σακκά (2011) και την Μουτάφη (2010).

ΤHERM¹= θερμισμένο γάλα, FF= πλήρες γάλα, LF=ημιάπαχο γάλα, LP= χαμηλή (κλασική) παστερίωση, HP=υψηλή παστερίωση, LL= μειωμένη λακτόζη, MF= μικροδιήθηση

S: υπόστρωμα, P: προϊόν, 1, 2: κορυφές Εικόνας 4.1. Για τον υπολογισμό της επιφάνειας των κορυφών των χρωματογραφημάτων της καθεψίνης D έγινε κανονικοποίηση με αφαίρεση των αντίστοιχων επιφανειών του χρωματογραφήματος του υποστρώματος (Εικόνες 4.1 και 5.1, παρ. 4.2).

PL: πλασμίνη, PG: πλασμινογόνο, UPA: ενεργοποιητής του πλασμινογόνου (παρ. 4.3).

M.O.: μέση τιμή, T.A.: τυπική απόκλιση

ΤΥΠΟΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ		Υπολ. β-LG, mg/L		Καθεψίνη-D: επιφάνεια κορυφών (κανονικοποιημένες τιμές) x10 ⁶								Σύστημα πλασμίνης								
				Υπολ. S, %		P		1		2		PL		PG		UPA		PG/PL		PL+PG
		M.O.	T.A.	M.O.	T.A.	M.O.	T.A.	M.O.	T.A.	M.O.	T.A.	M.O.	T.A.	M.O.	T.A.	M.O.	T.A.	M.O.	T.A.	
ΤHERM ¹	FF	3539 c	175	42 a	6,9	1,92 a	0,23	1,05 b	0,41	0,23 b	0,08	10,0 b	1,8	43,4 a	2,0	0,239 a	0,013	4,43 a	0,69	53,4 a
LP	FF/LF	3271 c	156	83 b	3,7	1,04 b	0,14	0 a	0	0 a	0	9,4 b	3,3	52,6 a,b	6,4	0,237 a	0,025	5,8 a	1,40	62,0 a,b
HP	FF/LF	1473 b	941	99 c	3	0,04 c	0,16	0 a		0 a		8,9 b	2,7	54,3 b	7,2	0,246 a	0,017	6,58 a	2,21	63,2 b
HP-LL	FF	248 a	126	100 c	0	0 c		0 a		0 a		5,7 a	1,5	52,1 a,b	6,2	0,248 a	0,024	9,68 b	2,48	57,8 a,b
MF+LP	FF/LF	3298 c	213	80 b	6,1	1,12 b	0,07	0,02 a	0,03	0,03 b	0,03	10,3 b	2,1	53,3 b	8,8	0,243 a	0,021	5,44 a	1,88	63,6 b
UHT	FF/LF	296 a	354	100 c	0	0 c		0 a		0 a		6,5 a	1,6	56,1 b	5,6	0,269 b	0,025	9,36 b	3,15	62,5 b

Οι Μ.Ο. με διαφορετικά γράμματα διέφεραν στατιστικά σημαντικά (δοκιμή LSD, P<0,05)

¹ δεν είναι δείγμα της αγοράς, αλλά είναι γάλα μεγάλης ανάμιξης που έχει υποστεί θέρμιση πριν από την τελική θερμική επεξεργασία.

Στην Εικόνα 5.6 παρουσιάζονται χαρακτηριστικές χρωματογραφικές κατατομές προσδιορισμού υπολειμματικής ενεργότητας της καθεψίνης D. Όπως προκύπτει από τον Πίνακα 5.6, η ενεργότητα αυτή παρατηρήθηκε στο παστεριωμένο γάλα (LP) και σε αυτό που είχε επεξεργασθεί με μικροδιήθηση πριν από την παστερίωση (MF+LP) και μάλιστα σε αξιοσημείωτα επίπεδα, 54% και 57% αυτής που παρατηρήθηκε στο θερμισμένο. Οι άλλες κορυφές που αντιστοιχούν στις ενεργότητες καθεψίνης B και UMP δεν εμφανίζονται προφανώς επειδή τα ένζυμα αυτά αδρανοποιήθηκαν κατά την παστερίωση. Στα δείγματα HP και UHT το ένζυμο έχει αδρανοποιηθεί.

Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με βιβλιογραφικά δεδομένα που αναφέρθηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο, καθώς και με τα αποτελέσματα των πιλοτικών θερμικών επεξεργασιών του νωπού γάλακτος (κεφ. 5.1). Επομένως, στο παστεριωμένο γάλα το ένζυμο αυτό μπορεί να αποτελεί πιθανό παράγοντα αλλοίωσης αν και το pH και η συντήρηση σε ψύξη δεν ευνοούν τη δράση του. Παρόλα αυτά, η μελέτη της συμπεριφοράς του κατά τη διάρκεια συντήρησης του γάλακτος θα ήταν ενδιαφέρουσα.

Η στατιστική ανάλυση (Πίνακας 5.7) έδειξε ότι αντίθετα με τα πειραματικά δείγματα του προηγούμενου κεφαλαίου, το σύστημα πλασμίνης επηρεάστηκε στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$) από τη θερμική επεξεργασία, ειδικά η PL και το UPA. Και στις δύο περιπτώσεις, η επίδραση φαίνεται ουσιαστικά στα UHT δείγματα. Παρότι, η ANOVA δεν έδειξε στατιστικά σημαντική επίδραση στο PG, η σύγκριση των μέσων (LSD, $P < 0,05$) εντόπισε διαφορές. Η PL ενεργότητα έχει τις χαμηλότερες τιμές στα γάλατα UHT και HP-LL τα οποία έχουν και χαμηλή περιεκτικότητα σε φυσική β-LG. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον στατιστικά σημαντικά υψηλότερο λόγο PG/PL, ο οποίος είναι κατά $>60\%$ υψηλότερος από αυτόν των παστεριωμένων.

Η κατατομή των ενεργοτήτων του συστήματος πλασμίνης στα διάφορα είδη γάλακτος της αγοράς (Εικόνες 5.7 και 5.8) απεικονίζει επίσης αυτό το εύρημα. Είναι μάλιστα σαφές ότι ενώ η συνολική PG+PL ενεργότητα δεν διαφέρει μεταξύ των γαλάτων της αγοράς, έχει αλλάξει η σχέση μεταξύ των ενζύμων που απαρτίζουν το σύστημα. Αυτό είναι σημαντικό για τη σταθερότητα των προϊόντων, αφού η ενεργότητα του UPA δεν έχει μειωθεί στα εντονότερα επεξεργασμένα δείγματα κι επομένως υπάρχει η εν δυνάμει δυνατότητα μετατροπής του πλασμινογόνου σε ενεργό ένζυμο.

Όπως αναφέρθηκε στο εισαγωγικό μέρος και στο προηγούμενο κεφάλαιο τα ένζυμα του συστήματος πλασμίνης είναι εξαιρετικά θερμοανθεκτικά. Οι Rolletta and Poll (1986) αναφέρουν ότι μόνο μετά από θέρμανση στους $147\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 10 s οι υπολειμματικές ενεργότητες πλασμίνης και πλασμινογόνου είναι μηδενικές. Οι συνθήκες αυτές σε ότι αφορά στη διάρκεια της UHT επεξεργασίας δεν εφαρμόζονται από τη γαλακτοβιομηχανία. Είναι όμως γεγονός ότι οι συνθήκες θερμοκρασία/χρόνος αλλά και ο τρόπος μετάδοσης της θερμότητας διαφέρουν μεταξύ των γαλακτοβιομηχανιών. Οι συνθήκες επεξεργασίας ήταν γνωστές για

ορισμένα από τα δείγματα του Πίνακα 4.1. Τα δείγματα αυτά και οι ενεργότητες που προσδιορίστηκαν σε αυτά παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.8. Δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα, καθώς η διασπορά τιμών δεν φαίνεται να συνδέεται με την ένταση της θερμικής επεξεργασίας ή την προθέρμανση (preheating).

ΠΙΝΑΚΑΣ 5.7. Ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) των μεταβλητών του Πίνακα 5.6 Όταν η τιμή P του F-test είναι $<0,05$, υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των θερμικών επεξεργασιών.

Οι συμβολισμοί των μεταβλητών όπως αναφέρονται στον Πίνακα 5.6

Μεταβλητή	Τιμή P
β-LG	0,0000
Υπολειμματικό S	0,0000
Προϊόν (P)	0,0000
Κορυφή 1	0,0000
Κορυφή 2	0,0000
PL	0,0011
PG	0,0558
UPA	0,0139
PL+PG	0,1391
PG/PL	0,0002

ΠΙΝΑΚΑΣ 5.8. Ενεργότητες του συστήματος πλασμίνης σε ορισμένα UHT γάλατα. Τα σύμβολα είναι τα ίδια με αυτά του Πίνακα 5.6.

Κωδικός	Συνθήκες επεξεργασίας	PL	PG	UPA	PG/PL
240-1	128°C/3s	8	50,8	0,32	6,35
240-2	128°C/3s	4	51,2	0,308	12,8
250-1	130°C/3s	2,8	50,4	0,245	18
250-2	130°C/3s	6,5	51,6	0,248	7,94
320-1	140°C/3s	7	66,4	0,253	9,49
330-1	140°C/3s (+preheating 96°C/3min)	8,2	65,9	0,258	8,04
340-1	130°C/3s	6,4	52,8	0,276	8,25
350-1	130°C/3s (+preheating 96°C/3min)	6,9	52,8	0,274	7,65

Στην Εικόνα 5.7 και τον Πίνακα 5.6 είναι σαφές ότι η θερμική επεξεργασία, πέρα από το θέρμισμα αυξάνει την εν δυνάμει συνολική ενεργότητα (PL+PG) του συστήματος. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με τα σχετικά ερευνητικά ευρήματα. Τα επίπεδα της πλασμίνης, έχει αναφερθεί, ότι αυξάνουν κατά την παστερίωση, μια παρατήρηση που αποδίδεται στην αυξημένη ενεργοποίηση του PG λόγω της αδρανοποίησης των PAI (Richardson, 1983a, Prado *et al.*, 2006).

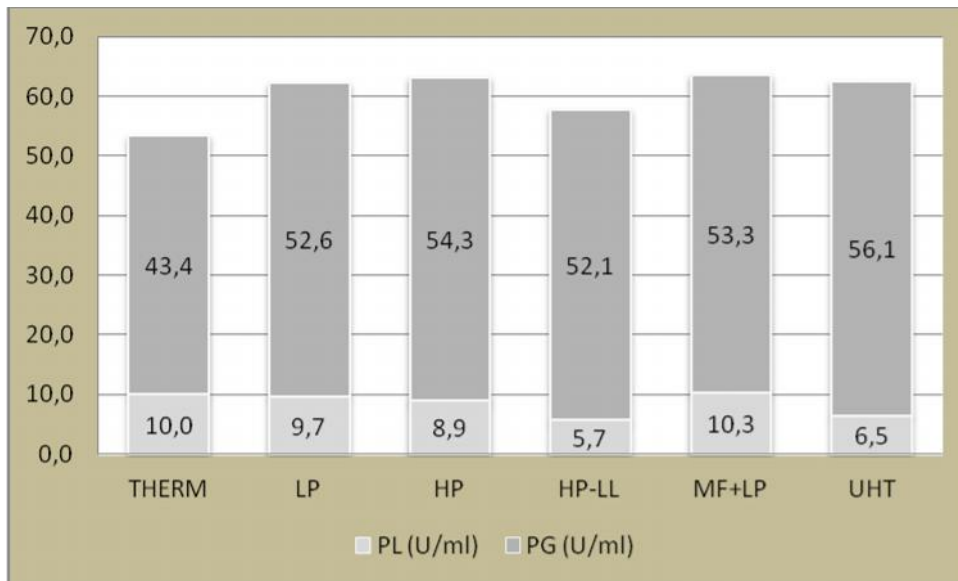
Όμως, σύμφωνα με τους Prado *et al.* (2006), στις συνθήκες παστερίωσης οι αναστολές δεν αδρανοποιούνται και μάλιστα οι δύο τύποι αναστολέων (PA και PAI) παρουσιάζουν διαφορετική θερμική σταθερότητα, αφού στους 75°C για 15 s επιζεί >80% του PAI και περίπου το 35% του PI. Σε θερμοκρασίες μεταξύ 50,1°C και 61,6°C το PG χάνει την τριτοταγή δομή του, αλλά δεν αδρανοποιείται. Αντίθετα, γίνεται πιο προσιτό στη δράση των PAs εξαιτίας του ξετυλίγματος των αλυσίδων του με αποτέλεσμα την ταχύτερη ενεργοποίησή του (Burbrink and Hayes, 2006). Επομένως η μετατροπή του PG σε PL κατά τη συντήρηση του παστεριωμένου γάλακτος, μπορεί να οφείλεται εκτός από την απενεργοποίηση των αναστολέων του συστήματος και στην ευκολότερη ενεργοποίηση της μετουσιωμένης μορφής του πλασμινογόνου.

ΠΙΝΑΚΑΣ 5.9. Συντελεστές γραμμικής συσχέτισης (R) μεταξύ των μεταβλητών/ δεικτών που προσδιορίστηκαν στα δείγματα του Πίνακα 4.1. Οι συμβολισμοί των μεταβλητών όπως αναφέρονται στον Πίνακα 5.6.

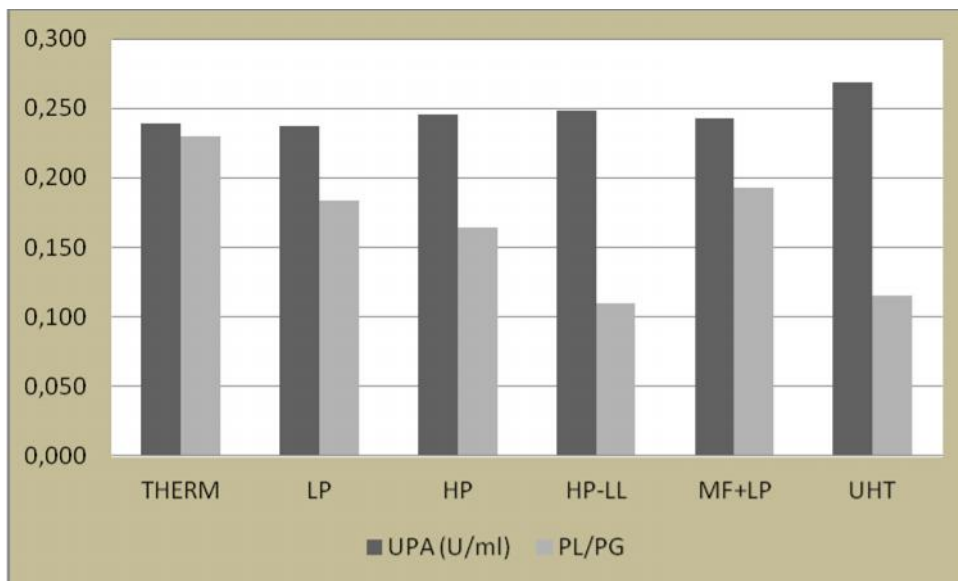
* στατιστικά σημαντική συσχέτιση (P<0,05)

	Προϊόν (P)	PL	PG	UPA	PG/PL
β-LG	0,7352 *	0,4938*	-0,2793*	-0,2022	-0,5791*
Προϊόν (P)		0,2768	-0,3016	-0,1864	-0,3512*
PL	0,2768*		-0,1305	-0,0297	-0,8758*
PG	-0,3016*	-0,1305		0,0261	0,3434*
UPA	0,1864	-0,0297	0,0261		0,0491

Οι συντελεστές γραμμικής συσχέτισης του Πίνακα 5.9 επιβεβαιώνουν τη θετική στατιστικά σημαντική συσχέτιση της υπολειμματικής καθειψίνης D με τη μη μετουσιωμένη β- LG, που παρατηρήθηκε και στα πειραματικά δείγματα. Όμως σε αυτή την περίπτωση παρατηρείται και στατιστικά σημαντική συσχέτιση αυτής της πρωτεΐνης του ορού με την πλασμίνη κυρίως αλλά και το πλασμινογόνο δευτερευόντως, η οποία αν και αναμενόμενη δεν παρατηρήθηκε στα πειραματικά δείγματα του κεφ. 5.1. Μετά από θερμική επεξεργασία UHT, η ενεργότητα της PL επηρεάζεται σημαντικά από τη μετουσιωμένη β-γαλακτογλοβουλίνη (β-LG), η οποία περιέχει ελεύθερες ομάδες –SH, οι οποίες προκαλούν μη αναστρέψιμη μετουσίωση της PL εξαιτίας S-S / S-H αλληλεπιδράσεων (Enright and Kelly, 1999). Το ξεδίπλωμα του PG, επίσης, μπορεί να προωθήσει την αλληλεπίδραση με την β-LG, πολύ περισσότερο σε αυξημένες θερμοκρασίες, με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της ενεργοποίησής του, καθώς η θέρμανση του παρουσία της β-LG προκαλεί πολυμερισμό του PG σε διμερή, τριμερή και πολυμερή μέσω S-S αλληλεπιδράσεων, τα οποία παρεμποδίζουν την ενεργοποίηση του PG σε PL (Lu *et al.*, 2009).



ΕΙΚΟΝΑ 5.7. Ενεργότητες (U/ml γάλακτος) πλασμίνης (PL) και πλασμινογόνου (PG) σε διάφορες κατηγορίες θερμικά επεξεργασμένου γάλακτος του εμπορίου. Ο προσδιορισμός έγινε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 4.3. Τα σύμβολα αναφέρονται στους Πίνακες 5.6 και 5.6^α.



ΕΙΚΟΝΑ 5.8. Συγκριτική παρουσίαση της ενεργότητας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (UPA, U/ml γάλακτος) σε σχέση με την αναλογία πλασμίνη/πλασμινογόνο (PL/PG) σε διάφορες κατηγορίες θερμικά επεξεργασμένου γάλακτος του εμπορίου. Ο προσδιορισμός έγινε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 4.3. Τα σύμβολα αναφέρονται στους Πίνακες 5.6 και 5.6^α.

Εφαρμόσθηκε η ανάλυση κυρίων συνιστωσών (PCA), όπως αναφέρθηκε στο κεφ. 51. Προέκυψαν 2 κύριες συνιστώσες (principal components, PCs) με ιδιοτιμές >1, στις οποίες αντιστοιχεί συνολικά στα 2/3 της διασποράς (Πίνακας 5.10). Οι συνιστώσες αυτές είναι γραμμικοί συνδυασμοί των 6 πρωτότυπων μεταβλητών-δεικτών που προσδιορίστηκαν με συντελεστές αυτούς που παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.11.

ΠΙΝΑΚΑΣ 5.10. Ανάλυση κύριων συνιστωσών των αναλύσεων των εμπορικών δειγμάτων.

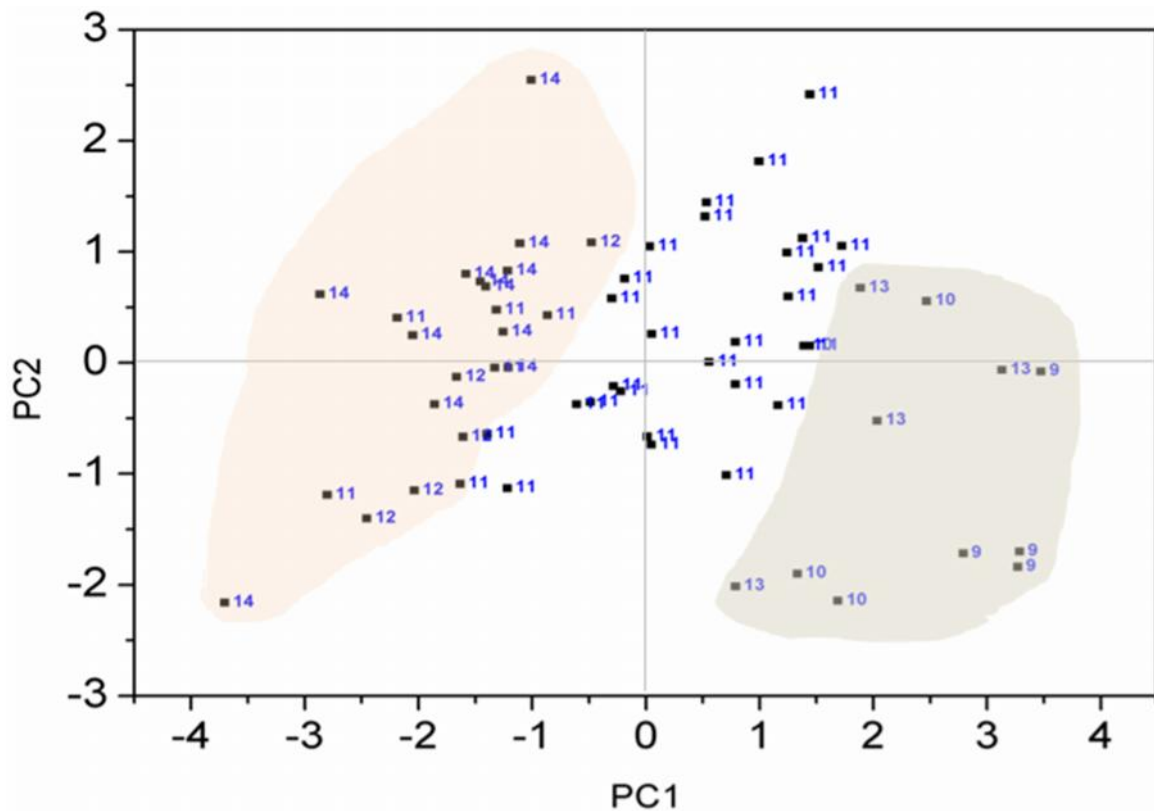
Κύρια Συνιστώσα (PC)	Ιδιοτιμή (Eigenvalue)	% της διασποράς	Αθροιστική διασπορά, %
1	2,85366	47,561	47,561
2	1,14381	19,064	66,624
3	0,936644	15,611	82,235
4	0,750025	12,500	94,736
5	0,221454	3,691	98,427
6	0,0944093	1,573	100,000

ΠΙΝΑΚΑΣ 5.11. Συντελεστές των μεταβλητών που διαμορφώνουν τις κύριες συνιστώσες των αναλύσεων των εμπορικών δειγμάτων.

	PC1	PC2
β-LG	0,506346	-0,216503
Προϊόν καθεψίνης D	0,423491	-0,418388
PL	0,461897	0,454866
PG	-0,274036	0,119405
UPA	-0,12262	0,648138
PG/PL	-0,510675	-0,36991

Στην Εικόνα 5.9 απεικονίζεται με σαφήνεια ο διαχωρισμός των γαλάτων που έχουν δεχθεί «χαμηλής» έντασης θερμική επεξεργασία (κωδικοί 9, 10, 13) από τα αυτά που έχουν υποστεί UHT ή παρόμοια επεξεργασία (κωδικοί 14, 12). Οι ομάδες αυτές κατανέμονται σαφώς στις θετικές και αρνητικές τιμές του PC1 αντίστοιχα. Είναι επίσης εμφανές ότι τα γάλατα υψηλής παστερίωσης είναι μία ανομοιογενής ομάδα, η οποία συχνά δεν διαχωρίζεται από αυτή των UHT γαλάτων.

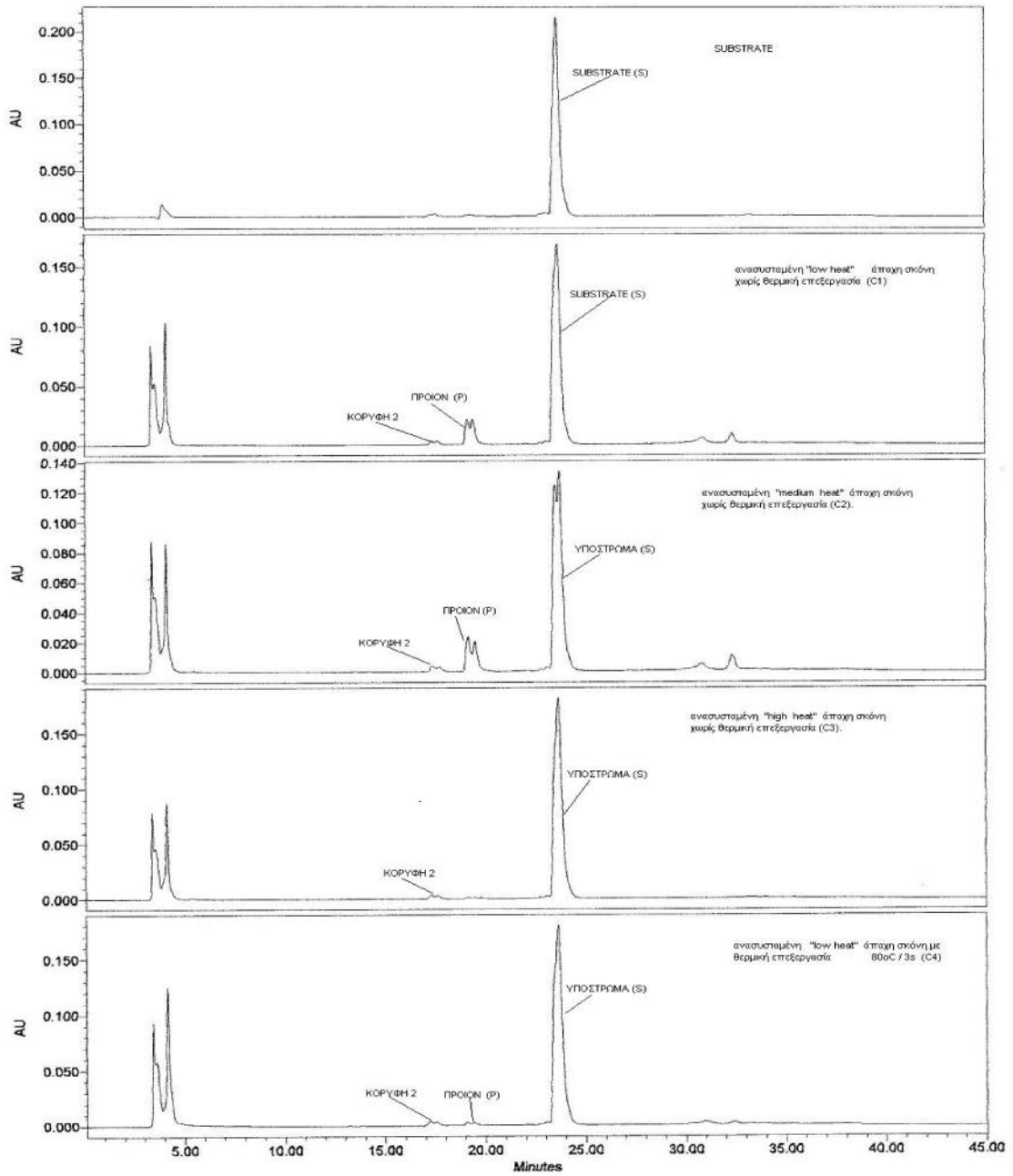
Τελικά, από το τμήμα αυτό της μελέτης προέκυψε ότι το γάλα υψηλής παστερίωσης και επομένως και το UHT δεν απειλείται από τις λυσιωμικές πρωτεΐνάσες, καθώς αυτές έχουν απενεργοποιηθεί. Όμως, χρειάζεται να λαμβάνεται πάντα υπόψη ότι τα ένζυμα του συστήματος πλασμίνης είναι ενεργά κι επομένως έχει ενδιαφέρον η περαιτέρω μελέτη των σχετικών ενεργοτήτων τους κατά τη διάρκεια συντήρησης αυτού του τύπου γάλακτος σε συνδυασμό με τις θερμοκρασιακές συνθήκες.



ΕΙΚΟΝΑ 5.9. Ομαδοποίηση των εμπορικών δειγμάτων θερμικά επεξεργασμένου γάλακτος με βάση τις δύο κύριες συνιστώσες (PC1, PC2) των Πινάκων 5.9 και 5.10. Τα σύμβολα αναφέρονται στον Πίνακα 5.6^α.

5.3 ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΝΑΣΥΣΤΑΜΕΝΗΣ ΣΚΟΝΗΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΠΟΥ ΔΕΧΘΗΚΑΝ ΠΟΥ ΔΕΧΘΗΚΑΝ ΕΜΜΕΣΗ ΘΕΡΜΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ.

Στον Πίνακα 5.12 και στην Εικόνα 5.6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του προσδιορισμού των ενζυμικών ενεργοτήτων και χαρακτηριστικές χρωματογραφικές κατατομές για την καθεψίνη των δειγμάτων ανασυσταμένης σκόνης γάλακτος.



ΕΙΚΟΝΑ 5.10. Παραδείγματα προσδιορισμού της υπολειμματικής καθεψίνης D (παρ. 4.2) σε δείγματα ανασυσταμένης σκόνης γάλακτος που δέχθηκαν έμμεση θερμική επεξεργασία.

Οι σκόνες άπαχου γάλακτος (SMP) που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τριών κατηγοριών ως προς την ένταση της θερμικής επεξεργασίας που είχε δεχθεί το γάλα πριν από τη συμπύκνωση και την ξήρανση. Οι συνθήκες παρασκευής τους δεν ήταν γνωστές, όμως σύμφωνα με το Dairy Processing Handbook (1995) οι σκόνες γάλακτος ταξινομούνται ως εξής, ανάλογα με την επεξεργασία πριν από την συμπύκνωση:

- Σκόνη χαμηλής θέρμανσης (LH): 70 °C/15 s
- Σκόνη μεσαίας θέρμανσης (MH): 85 °C/20 s ή 90 °C/30 s ή 95 °C/30 s
- Σκόνη υψηλής θέρμανσης (HH): 135 °C/30 s

Επομένως, στα προϊόντα αυτά υπάρχει μια «θερμική προϊστορία», η οποία αναμένεται να επηρεάζει τα αποτελέσματα.

Από την Εικόνα 5.10 είναι εμφανές ότι οι κατατομές στα δείγματα ανασυσταμένης σκόνης (Εικόνα 5.10) διαφοροποιούνται σαφώς από τα γάλατα (Εικόνες 5.1 και 5.6). Σε κανέναν από τους τρεις τύπους ανασυσταμένης σκόνης δεν προέκυψαν κορυφές που σχετίζονται με τη καθεψίνη Β και τη UMP (κεφ. 5.1 και 5.2). Επομένως, η διαδικασία παραγωγής των σκονών αδρανοποιεί αυτές τις ενζυμικές δράσεις. Η υπολειμματική ενεργότητα καθεψίνης D που παρατηρήθηκε στη LH σκόνη πρέπει να λαμβάνεται υπόψη όταν τα προϊόντα αυτά πρόκειται να ενσωματωθούν σε όξινα τρόφιμα.

Τα δείγματα του κεφαλαίου αυτού διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($P < 0,05$) ως προς όλες σχεδόν τις μεταβλητές-δείκτες που προσδιορίστηκαν. Στη σκόνη υψηλής θέρμανσης (HH) δεν παρατηρήθηκε ενεργότητα καθεψίνης D. Το αποτέλεσμα αυτό θεωρείται αναμενόμενο, λαμβάνοντας υπόψη την επεξεργασία αυτού του τύπου των προϊόντων, τα σχετικά με τη θερμική σταθερότητα των ενζύμων που αναφέρθηκαν προηγουμένως, αλλά και τη φυσική μη-μετουσιωμένη β-γαλακτογλοβουλίνη, που περιείχαν τα συγκεκριμένα δείγματα (Πίνακας 5.12).

Οι τρεις τύποι ανασυσταμένης σκόνης (LH, MH και HH) δεν διαφοροποιούνται πριν από τη θερμική επεξεργασία και ουσιαστικές στατιστικά σημαντικές διαφορές σχετικά με το σύστημα πλασμίνης παρατηρούνται μόνο για τα θερμικά επεξεργασμένα δείγματα HH. Το PG είναι πιο ανθεκτικό από την PL σε συμφωνία με τα ερευνητικά ευρήματα που αναφέρθηκαν στα προηγούμενα κεφάλαια. Ως αποτέλεσμα, ο λόγος PG/PL αυξάνει εντυπωσιακά στα HH δείγματα μετά τη θερμική επεξεργασία. Η ενεργότητα UPA ήταν σε παρόμοια επίπεδα με αυτά των πειραματικών και εμπορικών γαλάτων (κεφ. 5.1 και 5.2). Η στατιστικά σημαντική αύξησή του στις θερμασμένες HH σκόνες (Εικόνα 5.12) υποδεικνύει ότι μπορεί στα προϊόντα αυτά να παρατηρηθεί αυξημένη ενεργοποίηση του PG κι επομένως αύξηση της ενεργής πλασμίνης.

ΠΙΝΑΚΑΣ 5.12. Ενεργότητες καθεψίνης D και των ενζύμων του συστήματος πλασμίνης σε δείγματα ανασυσταμένης σκόνης γάλακτος που δέχθηκαν έμμεση θερμική επεξεργασία. Η υπολειμματική β-γαλακτογλοβουλίνη (β-LG) παρουσιάστηκε από τον Σακκά (2011).

SMP= skim milk powder, άπαχη σκόνη γάλακτος, LH= low heat, σκόνη χαμηλής θέρμανσης, MH= medium heat, σκόνη μεσαίας θέρμανσης και HH= high heat, σκόνη υψηλής θέρμανσης.

S: υπόστρωμα, P: προϊόν, 1, 2: κορυφές Εικόνας 4.1. Για τον υπολογισμό της επιφάνειας των κορυφών των χρωματογραφήματων της καθεψίνης D έγινε κανονικοποίηση με αφαίρεση των αντίστοιχων επιφανειών του χρωματογραφήματος του υποστρώματος (Εικόνες 4.1 και 5.1, παρ. 4.2).

PL: πλασμίνη, PG: πλασμινογόνο, UPA: ενεργοποιητής του πλασμινογόνου (παρ. 4.3).

M.O.: μέση τιμή, T.A.: τυπική απόκλιση

SMPs / ΘΕΡΜΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ		Υπολ. β-LG, mg/L		Καθεψίνη-D: επιφάνεια κορυφών (κανονικοποιημένες τιμές) $\times 10^6$								Σύστημα πλασμίνης								
				Υπολ. S, %		P		1		2		PL		PG		UPA		PG/PL		PL+PG
		M.O.	T.A.	M.O.	T.A.	M.O.	T.A.	M.O.	T.A.	M.O.	T.A.	M.O.	T.A.	M.O.	T.A.	M.O.	T.A.	M.O.	T.A.	
LH		2292 b,c	422	92,3 a,b	7,8	0,48 b	0,17	0		0		9,8 c,d	1,4	40,4 a	2,3	0,253 a	0,032	4,22 a	0,84	50,2 a
MH		2622 c	200	90,8 a	7,2	0,46 b	0,19	0		0		11,6, c,d	1,7	41,3 a	4,5	0,237 a	0,026	3,62 a	0,62	52,9 a
HH		3 a	3	100 c	0	0 a		0		0		10,4 c,d	1,6	40,9 a	3,5	0,252 a	0,018	4,01 a	0,70	51,2 a
LH	80 °C/3 s	1850 b	505	96 a,b,c	5,7	0,01 a	0,02	0		0		9,9 c,d	2,2	66,7 b	8,3	0,257 a	0,011	6,84 a,b	0,68	76,5 b
	130°C/3 s	191 a	232	100 c	0	0 a		0		0		10,7 d	0,4	63,8 b	0,8	0,262 a	0,025	5,99 a,b	0,12	74,5 b
MH	80 °C/3 s	2050 b	21	100 c	0	0 a		0		0		8,2 b,c	1,0	64,2 b	0,2	0,260 a	0,009	7,88 a,b	0,98	72,4 b
	130°C/3 s	210 a	236	100 c	0	0 a		0		0		6,4 a,b	0,6	66,5 b	4,9	0,245 a	0,038	10,40 b	0,15	72,9 b
HH	80 °C/3 s	26 a	30	100 c	0	0 a		0		0		4,0 a	1,5	66,1 b	10,3	0,370 a	0,007	17,48 c	3,96	70,1 b
	130°C/3 s	7 a	10	100 c	0	0 a		0		0		4,0 a	1,9	61,6 b	2,3	0,407 a	0,002	17,81 c	9,18	65,6 b

Οι Μ.Ο. με διαφορετικά γράμματα διέφεραν στατιστικά σημαντικά (δοκιμή LSD, P<0,05)

ΠΙΝΑΚΑΣ 5.13. Ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) των μεταβλητών του Πίνακα 5.12. Όταν η τιμή P του F-test είναι $<0,05$, υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των θερμικών επεξεργασιών.

Οι συμβολισμοί των μεταβλητών όπως αναφέρονται στον Πίνακα 5.6

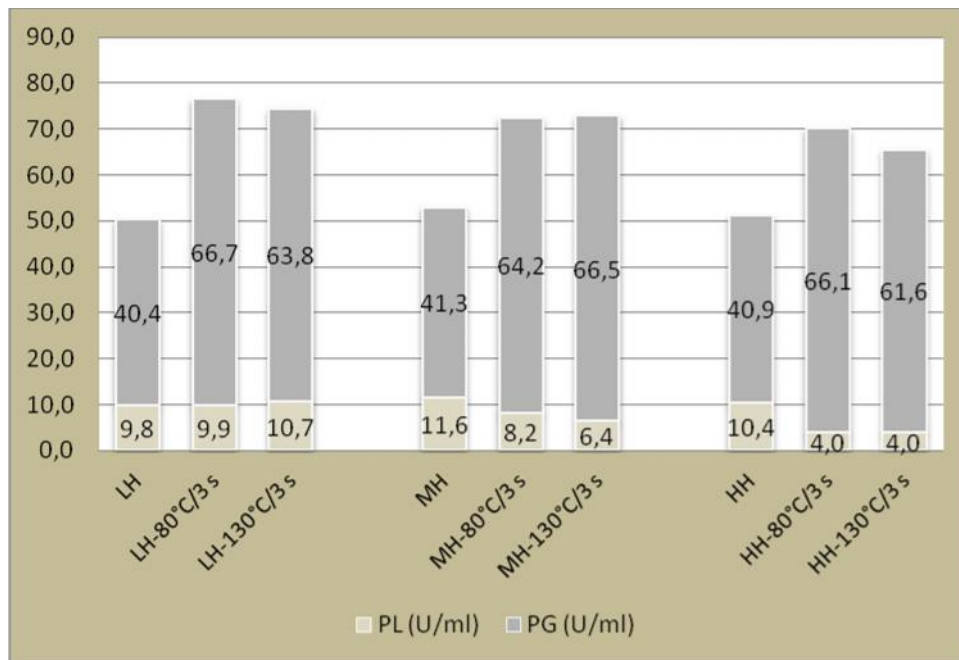
Μεταβλητή	Τιμή P
β-LG	0,0000
Υπολειμματικό S	0,1338
Προϊόν (P)	0,0000
PL	0,0002
PG	0,0000
UPA	0,0000
PL+PG	0,0000
PG/PL	0,0001

Σε κάθε περίπτωση, η θερμική επεξεργασία αλλάζει τη συνολική ενεργότητα του συστήματος (Εικόνα 5.11), όπως παρατηρήθηκε και προηγουμένως εξαιτίας της θερμικής συμπεριφοράς αυτών των ενζύμων, η οποία συζητήθηκε στα κεφ. 5.1 και 5.2. Είναι αξιοσημείωτο, ότι ο λόγος PG/PL είναι εξαιρετικά υψηλός στις θερμασμένες ΗΗ σκόνες, κατά πολύ υψηλότερος από αυτόν που παρατηρήθηκε στα UHT γάλατα του κεφ. 5.2. Προφανώς, η στατιστικά σημαντική μείωση του ενεργού ενζύμου είναι κατά κύριο λόγο υπεύθυνη για την αύξηση αυτή. Όμως, το εύρημα αυτό σε συνδυασμό με τον εντοπισμό εντυπωσιακά υψηλής ενεργότητας UPA δημιουργεί ερωτηματικά για τη συμπεριφορά των προϊόντων αυτών κατά την ενσωμάτωσή τους σε άλλα τρόφιμα, τα οποία θα πρέπει να διερευνηθούν.

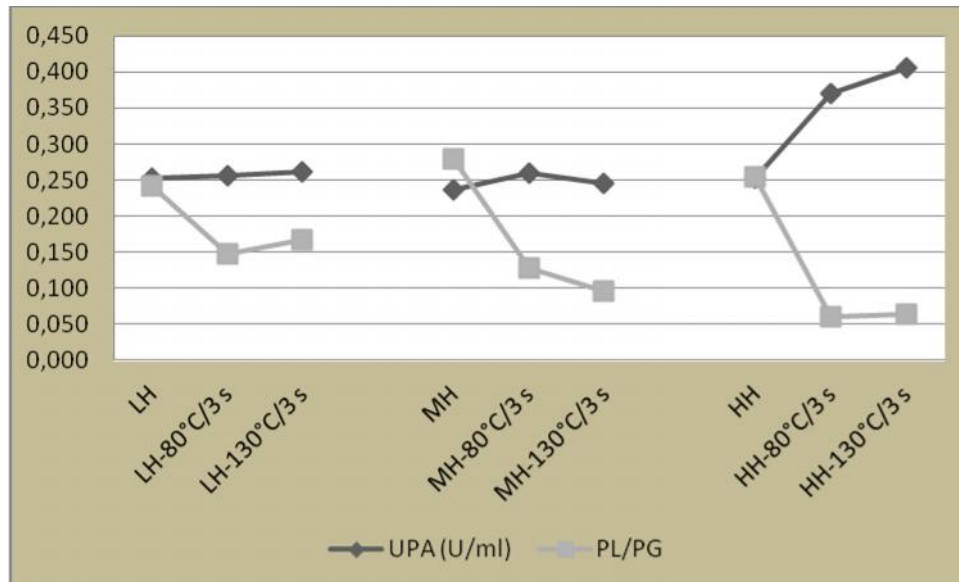
ΠΙΝΑΚΑΣ 5.14. Συντελεστές γραμμικής συσχέτισης (R) μεταξύ των μεταβλητών/ δεικτών που προσδιορίστηκαν στα δείγματα του Πίνακα 5.12. Οι συμβολισμοί των μεταβλητών όπως αναφέρονται στον Πίνακα 5.12.

* στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($P<0,05$)

	Προϊόν (P)	PL	PG	UPA	PG/PL
β-LG	0,7495*	0,4950*	-0,3482	-0,4415*	0,4833*
Προϊόν (P)		0,4628*	-0,6284*	-0,3043	-0,4480*
PL	0,4628*		0,5133*	0,7638*	-0,9015*
PG	-0,6284*	-0,5133*		0,4184*	0,6013*
UPA	-0,3043	-0,7638*	0,4184*		0,7941*



ΕΙΚΟΝΑ 5.11. Ενεργότητες (U/ml γάλακτος) πλασμίνης (PL) και πλασμινογόνου (PG) σε δείγματα ανασυσταμένης σκόνης γάλακτος που δέχθηκαν έμμεση θερμική επεξεργασία. Ο προσδιορισμός έγινε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 4.3. SMP= skim milk powder, σκόνη άπαχου γάλακτος, LH= low heat, σκόνη χαμηλής θέρμανσης, MH= medium heat, σκόνη μεσαίας θέρμανσης και HH= high heat, σκόνη υψηλής θέρμανσης



ΕΙΚΟΝΑ 5.12. Συγκριτική παρουσίαση της ενεργότητας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (UPA, U/ml γάλακτος) σε δείγματα ανασυσταμένης σκόνης γάλακτος που δέχθηκαν έμμεση θερμική επεξεργασία. Ο προσδιορισμός έγινε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 4.3. SMP= skim milk powder, σκόνη άπαχου γάλακτος, LH= low heat, σκόνη χαμηλής θέρμανσης, MH= medium heat, σκόνη μεσαίας θέρμανσης και HH= high heat, σκόνη υψηλής θέρμανσης

Ο Πίνακας 5.14 των γραμμικών συσχετίσεων δείχνει ότι η υπολειμματική καθεψίνη D, η PL και ο UPA συσχετίζονται σημαντικά και θετικά με την υπολειμματική β-LG. Η συσχέτιση αυτή οφείλεται προφανώς στις S-S/SH αλληλεπιδράσεις που συζητήθηκαν στα κεφ. 2, 5.1 και 5.2.

Σύμφωνα με τα ευρήματα των κεφ. 5.1 και 5.2, η έμμεση επεξεργασία 80°C/3 s κάτω από τις συνθήκες της παρούσας μελέτης μπορεί να θεωρηθεί αντίστοιχη της «καλής ποιότητας» υψηλής παστερίωσης. Οι συνθήκες 130°C/3 s μπορεί να θεωρηθούν αντίστοιχες της UHT επεξεργασίας, αν και το τεχνολογικά σημαντικό στάδιο της προθέρμανσης δεν έχει εφαρμοσθεί. Ενεργότητες πρωτεάσης στις σκόνες γάλακτος έχουν αναφερθεί καθώς και η επίδρασή τους κατά τη διάρκεια συντήρησης, οι οποίες όμως βασίζονται κυρίως στην εκτίμηση της πρωτεόλυσης (π.χ. Chen *et al.*, 2003, Celestino *et al.* 2003).

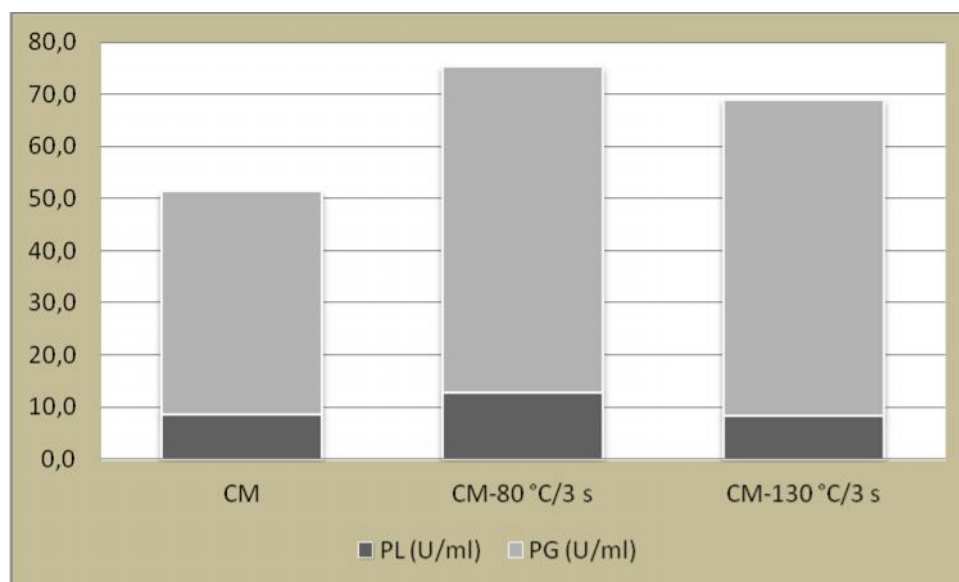
5.4. ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΣΥΜΠΥΚΝΩΜΕΝΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΠΟΥ ΔΕΧΘΗΚΑΝ ΕΜΜΕΣΗ ΘΕΡΜΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ.

Το τελευταίο τμήμα αυτής της ερευνητικής προσπάθειας αφορούσε σε δείγματα συμπυκνωμένου γάλακτος, το οποίο προορίζεται για βιομηχανική χρήση, τα οποία αναλύθηκαν αφού ανασυστάθηκαν πριν και μετά από επεξεργασίες 80°C/3 s και 130°C/3 s σε πιλοτική κλίμακα (έμμεση μέθοδος).

Τα αποτελέσματα αυτά δεν ήταν συμβατά με τις συνήθεις συνθήκες προθέρμανσης που εφαρμόζονται για το συμπυκνωμένο γάλα. Μάλιστα το συμπυκνωμένο γάλα, όσον αφορά τις πρωτεΐνες ορού, είχε χαρακτηριστικά παρόμοια με γάλα κλασικής (χαμηλής) παστερίωσης (LP), όπως φαίνεται στον Πίνακα 5.15 (Σακκάς, 2011). Όπως αναφέρεται στο Dairy Processing Handbook (1995), η συμπύκνωση γίνεται σε θερμοκρασίες 65-70°C υπό κενό, αλλά οι συνήθεις συνθήκες προθέρμανσης είναι έντονες, 100-110°C/1-3 min. Πρέπει όμως να αναφερθεί ότι το στάδιο της προθέρμανσης έχει κυρίως σκοπό να «σταθεροποιήσει» τις πρωτεΐνες του γάλακτος πριν από την αποστείρωση που θα γίνει κατά την εγκυτίωση του συμπυκνωμένου γάλακτος. Αν και δεν υπάρχουν πληροφορίες σχετικά με την τεχνολογία παρασκευής αυτού του τύπου γάλακτος, εάν όλες οι επεξεργασίες γίνονται σε θερμοκρασίες <80 °C και υπό κενό, εξηγείται η πολύ περιορισμένη μετουσίωση της β-LG. Μάλιστα με βάση τις τιμές της πρωτεΐνης και των υπολειμματικών ενζυμικών ενεργιοτήτων (Πίνακας 5.15), το γάλα αυτό πριν από τη θερμική επεξεργασία μοιάζει με ένα «καλής ποιότητας» γάλα υψηλής παστερίωσης ή με το πειραματικό γάλα 80°C/3 s.

Και σε αυτή την περίπτωση η σχετικά μέτρια επεξεργασία 80°C/3 s, ενισχύει το σύστημα πλασμίνης (Πίνακας 5.15, Εικόνα 5.13), ενώ η εντονότερη την μειώνει

ξανά στα επίπεδα του μη-επεξεργασμένου γάλακτος. Το προϊόν αυτό παρουσιάζει ενδιαφέρον, καθώς συντηρείται και μεταφέρεται για σχετικά παρατεταμένα χρονικά διαστήματα, καθώς η κύρια χρήση τους είναι στην παραγωγή προϊόντων τύπου γιαουρτιού. Επομένως, η διερεύνηση της σταθερότητάς του παρουσιάζει επιστημονικό και τεχνολογικό ενδιαφέρον.



ΕΙΚΟΝΑ 5.13. Ενεργότητες (U/ml γάλακτος) πλασμίνης (PL) και πλασμινογόνου (PG) σε δείγματα συμπυκνωμένου γάλακτος που δέχθηκαν έμμεση θερμική επεξεργασία. Ο προσδιορισμός έγινε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 4.3.

ΠΙΝΑΚΑΣ 5.15. Ενεργότητες καθεψίνης D και των ενζύμων του συστήματος πλασμίνης σε δείγματα συμπυκνωμένου γάλακτος που δέχθηκαν έμμεση θερμική επεξεργασία. Η υπολειμματική β-γαλακτογλοβουλίνη (β-LG) παρουσιάστηκε από τον Σακκά (2011).

CM= condensed milk, συμπυκνωμένο γάλα.

S: υπόστρωμα, P: προϊόν, 1, 2: κορυφές Εικόνας 4.1. Για τον υπολογισμό της επιφάνειας των κορυφών των χρωματογραφημάτων της καθεψίνης D έγινε κανονικοποίηση με αφαίρεση των αντίστοιχων επιφανειών του χρωματογραφήματος του υποστρώματος (Εικόνες 4.1 και 5.1, παρ. 4.2).

PL: πλασμίνη, PG: πλασμινογόνο, UPA: ενεργοποιητής του πλασμινογόνου (παρ. 4.3).

M.O.: μέση τιμή, T.A.: τυπική απόκλιση

CM / ΘΕΡΜΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ	Υπολ. β-LG, mg/L		Καθεψίνη-D: επιφάνεια κορυφών ¹				Σύστημα πλασμίνης								
			Υπολ. S, %		P		PL		PG		UPA		PG/PL		PL+PG
	M.O.	T.A.	M.O.	T.A.	M.O.	T.A.	M.O.	T.A.	M.O.	T.A.	M.O.	T.A.	M.O.	T.A.	
	3421 c	225	84,8 a	6,4	0,47 b	0,10	8,6 a	0,7	42,7 a	3,2	0,230 a	0,014	4,98 a	0,65	51,3 a
80 °C/3 s	2689 b	407	100,0 b	0,0	0 a		12,8 b	0,6	62,4 b	4,2	0,239 a	0,010	4,89 a	0,55	75,2 b
130 °C/3 s	287 a	274	100,0 b	0,0	0 a		8,4 a	0,9	60,6 b	0,4	0,232 a	0,019	7,30 b	0,85	68,9 b

¹ (κανονικοποιημένες τιμές) Χ10⁶

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση της έμμεσης εφαρμογής διαφόρων θερμοκρασιών με διάρκεια 3s στην ενεργότητα ενδογενών πρωτεολυτικών ενζύμων του γάλακτος. Η θερμική επεξεργασία εφαρμόστηκε σε νωπό γάλα, σε ανασυσταμένες σκόνες γάλακτος χαμηλής, μεσαίας και υψηλής θέρμανσης και σε ανασυσταμένο συμπυκνωμένο γάλα βιομηχανικής χρήσης. Ακολουθώντας την ίδια μεθοδολογία, αναλύθηκε και μεγάλος αριθμός θερμικά επεξεργασμένων γαλάτων διαφόρων τύπων, τα οποία κυκλοφορούν στην ελληνική αγορά και θερμισμένα δείγματα για λόγους σύγκρισης.

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων των σχετικών με την καθεψίνη D, έδειξε ότι:

- Θερμοκρασίες >90 °C για 3 s στο έμμεσο σύστημα θέρμανσης που χρησιμοποιήθηκε αδρανοποιούν την καθεψίνη D στο φυσικό pH του γάλακτος, είτε πρόκειται για γάλα, είτε για τα ανασυσταμένα προϊόντα.
- Η ενεργότητα αυτή παρατηρήθηκε στο παστεριωμένο γάλα και μάλιστα σε αξιοσημείωτα επίπεδα, 54% αυτής που παρατηρήθηκε στο θερμισμένο. Όμως ενεργότητες που αντιστοιχούν στις καθεψίνη B και UMP δεν εμφανίζονται προφανώς επειδή τα ένζυμα αυτά δεν επιζούν της παστερίωσης. Στα δείγματα HP και UHT του εμπορίου η καθεψίνη D έχει αδρανοποιηθεί.
- Η υπολειμματική ενεργότητα καθεψίνης D που παρατηρήθηκε στην χαμηλής θέρμανσης (LH) σκόνη πρέπει να λαμβάνεται υπόψη όταν τα προϊόντα αυτά πρόκειται να ενσωματωθούν σε όξινα τρόφιμα. Σε κανέναν από τους τρεις τύπους ανασυσταμένης σκόνης δεν προέκυψαν κορυφές που σχετίζονται με τη καθεψίνη B και τη UMP. Επομένως, η διαδικασία παραγωγής των σκονών αδρανοποιεί αυτές τις ενζυμικές δράσεις.
- Σε όλες τις περιπτώσεις, η ενεργότητα αυτή συσχετιζόταν θετικά και στατιστικά σημαντικά με την περιεκτικότητα των δειγμάτων σε φυσική, μη-μετουσιωμένη β-LG.
- Παρατηρήθηκε ότι όταν η φυσική μη-μετουσιωμένη β-LG είναι <2600 mg/L το ένζυμο αυτό δεν είναι ενεργό.

Τα αποτελέσματα σχετικά με την πλασμίνη επιβεβαίωσαν τη θερμοανθεκτικότητα των ενζύμων που απαρτίζουν το σύστημα αυτό (PL, PG, UPA):

- Παρότι, το σύστημα παραμένει ενεργό ακόμη και μετά από τις έντονες συνθήκες επεξεργασίας, παρατηρείται αλλαγή στην αναλογία μεταξύ των επιμέρους ενεργοτήτων.
- Η ενεργότητα της PL είχε τις χαμηλότερες τιμές στα γάλατα UHT και σε ορισμένα υψηλής παστερίωσης (HP), τα οποία είχαν και χαμηλή περιεκτικότητα σε φυσική β-LG. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον στατιστικά

σημαντικά υψηλότερο λόγο PG/PL, ο οποίος ήταν κατά >60% υψηλότερος από αυτόν των παστεριωμένων.

- Στις περισσότερες περιπτώσεις, η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι το σύστημα πλασμίνης επηρεάσθηκε στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$) από τη θερμική επεξεργασία, ειδικά η PL και το UPA.
- Ο λόγος PG/PL είναι εξαιρετικά υψηλός στις θερμασμένες υψηλής θέρμανσης (HH) σκόνες, κατά πολύ υψηλότερος από αυτόν που παρατηρήθηκε στα UHT γάλατα. Το εύρημα αυτό σε συνδυασμό με τον εντοπισμό εντυπωσιακά υψηλής ενεργότητας UPA πιθανόν να επηρεάζει τη συμπεριφορά του τύπου αυτής της σκόνης κατά την ενσωμάτωσή της σε άλλα τρόφιμα.
- Τέλος, εκτός από την ένταση της θερμικής επεξεργασίας, τα φαινόμενα που σχετίζονται με το σύστημα αυτό θα πρέπει να μελετηθούν και σε ότι αφορά, το σύστημα μετάδοσης θερμότητας, την αρχική σχέση PL/PG/PA στο γάλα πριν από την επεξεργασία και τη διάρκεια/θερμοκρασία συντήρησης των επεξεργασμένων γαλάτων.

Η ανάλυση των κυρίων συνιστωσών (PCA), έδειξε ότι μπορεί να γίνει ομαδοποίηση των δειγμάτων με βάση τις νέες μεταβλητές που προκύπτουν (κύριες συνιστώσες, PCs). Στη διαμόρφωση των τιμών των κύριων αυτών συνιστωσών, η υπολειμματική β-LG και η καθεψίνη D έχουν σημαντικότερη συμμετοχή σε σχέση με τα ένζυμα του συστήματος πλασμίνης, τα οποία επηρεάζονται λιγότερο από τη θερμική επεξεργασία. Σε ότι αφορά στα πειραματικά γάλατα, μόνο τα δείγματα των 80°C αποτελούσαν διακριτή ομάδα, καθώς τα υπόλοιπα είναι δύσκολο να διακριθούν μεταξύ τους με βάση την PCA. Όμως, με την ίδια ανάλυση διαχωρίστηκαν με σαφήνεια γάλατα που είχαν δεχθεί «χαμηλής» έντασης θερμική επεξεργασία από τα αυτά που έχουν υποστεί UHT ή παρόμοια επεξεργασία. Ήταν επίσης εμφανές ότι τα γάλατα υψηλής παστερίωσης της αγοράς είναι μία ανομοιογενής ομάδα, η οποία συχνά δεν διαχωρίζεται από αυτή των UHT.

Τελικά, προέκυψε ότι τα συγκεκριμένα ένζυμα αν και δεν μπορούν να χρησιμεύσουν ως δείκτες θερμικής επεξεργασίας του γάλακτος, θα πρέπει να μελετώνται με σκοπό την εκτίμηση της σταθερότητας των προϊόντων. Στο πλαίσιο αυτό χρειάζεται μια περισσότερο εκτεταμένη μελέτη των κονιοποιημένων προϊόντων γάλακτος, γιατί αποδείχθηκε ότι παρά την επεξεργασία που έχει μεσολαβήσει για την παραγωγή τους παρουσιάζουν αξιοσημείωτη βιολογική ενεργότητα σε ότι αφορά στα πρωτεολυτικά ένζυμα που μελετήθηκαν. Θα πρέπει επίσης να μελετηθεί, η συμπεριφορά των ενζύμων κατά τη διάρκεια συντήρησης των προϊόντων (π.χ. επανενεργοποίηση ή περαιτέρω αδρανοποίηση).

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alichanidis, E., Wrathall, J. H. M., and Andrews, A. T. (1986). Heat stability of plasmin (milk proteinase) and plasminogen. *Journal of Dairy Research*, 53, 259–269.
- Andersson, I., and Öste, R. (1994). Nutritional Quality of Pasteurized Milk. Vitamin B₁₂, Folate and Ascorbic Acid Content during Storage. *International Dairy Journal*, 161-172.
- Aroonkamonsri, J. H., Aroonkamonsri, W. and Kakuda, Y. (1996) The role of plasmin and bacterial proteinases on age gelation of UHT milk. *Scanning*, 18(3): 203–204.
- Baer, A., Ryba, I., and Collin, J. C. (1994). Binding of bovine Plasminogen to immobilized casein and its activation thereon. *International Dairy Journal*, 4, 597–616.
- Bastian, E. D., and Brown, R. J. (1996). Plasmin in milk and dairy products: An update *International Dairy Journal*, 6, 435–457.
- Bastian, E., D., Brown, R. J., and Ernstorn, C. A. (1991). Plasmin activity and milk coagulation. *Journal of Dairy Science*, 74, 3677–3685.
- Beuviel, E., Berthaud, K., Cegarra, S., Dasen, A., Pochet, S., Buchin, S., and Duboz, G. (1997). Ripening and quality of Swiss-type cheese made from raw, pasteurized or microfiltered milk. *International Dairy Journal*, 7, 311-323.
- Burbrink, C. N., and Hayes, K. D. (2006). Effect of thermal treatment on the activation of bovine plasminogen. *International Dairy Journal*, 16, 580–585.
- Celestino, E. L., Iyer, M., and Roginski, H. (1997). Reconstituted UHT-treated milk: Effects of raw milk, powder quality and storage conditions of UHT milk on its physicochemical attributes and flavor. *International Dairy Journal*, 7, 129-140.
- Champagne, C. P., Laing, R. R., Roy, D., Mafu, A. A., and Griffiths, M. W. (1994). Psychrotrophs in dairy products: Their effects and their control. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 34, 1–30.
- Chen, L., Daniel, R. M. and Coolbear, T. (2003). Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *International Dairy Journal*, 13, 255-275.
- Considine, T., Patel, H., A., Anema, S. G., Singh, H. and Creamer, L. K. (2007). Interactions of milk proteins during heat and high hydrostatic pressure treatments-A Review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8, 1-23
- Cooney, S., Tiernan, D., Joyce, P. and Kelly, A. L. (2000). Effect of somatic cell count and polymorphonuclear leucocyte content of milk on the composition and proteolysis during ripening of Swiss-type cheese. *Journal of Dairy Research*, 67, 301-307.
- Cromie, S. (1992). Psychrotrophs and their enzyme residues in cheese milk. *Australian Journal of Dairy Technology*, 48, 96–100.
- Crudden, A., Afoufa-Bastien, D., Fox, P. F., Brisson, G., and Kelly, A. L. (2005). Effect of hydrolysis of casein by plasmin on the heat stability of milk. *International Dairy Journal*, 15, 1017–1025.

- Crudden, A., Fox, P. F., and Kelly, A. L. (2005). Factors affecting the hydrolytic action of plasmin in milk. *International Dairy Journal*, 15, 305–313.
- Dairy Processing Handbook, 2nd edn. Tetra Pak Processing Systems AB (1995). Teknotext AB. Lund, Sweden.
- Datta, N., and Deeth, H. C. (2001). Age gelation of UHT milk— A review. *Institution of Chemical Engineers Trans IChemE, Vol 79, Part C*, 197-210.
- Deharveng, G., and Nielsen, S. S. (1991). Partial purification and characterization of native plasminogen activators from bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 74, 2060–2072.
- Donatto, L. and Guyomarc’h, F. (2009). Formation and complexes of the whey protein κ -casein complexes in heated skim milk – A review. *Dairy Science and Technology*, 89, 3-29.
- Driessen, F. M., and Van Der Waals, C. B. (1978). Inactivation of native milk proteinase by heat treatment. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 32, 245–254.
- Enright, E., Bland, A. P., Needs, E., C., and Kelly, A. L. (1999). Proteolysis and physicochemical changes in milk on storage as affected by UHT treatment, plasmin activity and KIO₃ addition. *International Dairy Journal*, 9, 581–591.
- Enright, E., and Kelly A. L. (1999). The influence of heat treatment of milk on susceptibility of casein to proteolytic attack by plasmin. *Milchwissenschaft*, 54, 491–493.
- European Union 2004. Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for the hygiene of foodstuffs. *Official Journal of the European Union L139, 30.4.2004*, 55-205.
- European Union 2006. Commission Regulation (EC) No 1662/2006 of 6 November 2006 amending Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council laying down specific hygiene rules for food of animal origin. *Official Journal of the European Union L320, 18.11.2006*, 1-10.
- Ελληνικός Κώδικας Τροφίμων και Ποτών. (2009). Γενικό Χημείο του Κράτους.
- Fajardo-Lira, C. E., and Nielsen, S. S. (1998). Effect of psychrotrophic micro-organisms on the plasmin system in milk. *Journal of Dairy Science*, 81:901–908.
- Fajardo-Lira, C., Oria, M., Hayes, K. D., and Nielsen, S. S. (2000). Effect of psychrotrophic bacteria and of an isolated protease from *Pseudomonas fluorescens* M3/6 on the plasmin system of fresh milk. *Journal of Dairy Science*, 83, 2190–2199.
- Fox, P. F., and McSweeney, P. L. H. (1998). *Dairy Chemistry and Biochemistry*, 1st edn. London, UK: Blackie Academic and Professional, pp. 265-291, 317-345, 347-377.
- Fox, P. F. and Kelly, A. L. (2006a). Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects-Part 1. *International Dairy Journal*, 16, 500-516.
- Fox, P. F. and Kelly, A. L. (2006b). Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects-Part I. *International Dairy Journal*, 16, 517-532.
- Frohbieter, K. A., Ismail, B., Nielsen, S. S. and Hayes, K. D. (2005). Effects of *Pseudomonas fluorescens* M3/6 bacterial protease on plasmin system and plasmin activation. *Journal of Dairy Science*, 88, 3392-3401.
- Garnot, P., and Molle, D. (1987). Heat stability of milk-clotting enzymes in conditions encountered in Swiss cheese making. *Journal of Food Science*, 52, 75-77.

- Grufferty, M. B., and Fox, P. F. (1988b). Factors affecting the release of plasmin activity from casein micelles. *N.Z. Journal of Dairy Science and Technology*, 23, 153–163.
- Guinot-Thomas P., Al Ammoury, M., Le Roux Y., and Laurent F. (1995). Study of proteolysis during storage of raw milk at 4°C: Effect of plasmin and microbial proteinases. *International Dairy Journal*, 5, 685–697.
- Harwalkar V. R., Boutin-Muma B., Cholette H., McKellar R. C. and Emmons D. B. (1989). Isolation and partial purification of astringent compounds from ultra-high temperature sterilised milk. *Journal of Dairy Research*, 56, 367-373.
- Hayes, M. G., Hurley, M. J., Larsen, L. B., Heegaard, C. W., Magboul, A. A. A, Oliveira, J. C., McSweeney, P. L. H. and Kelly, A. L (2001). Thermal inactivation kinetics of bovine cathepsin D. *Journal of Dairy Research*, 68, 267-276.
- Heegaard, C. W., J. H. White, B. Zavizion, J. D. Turner, and Politis I. (1994a). Production of various forms of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor by cultured mammary epithelial cells. *Journal of Dairy Science*, 77, 2949–2958.
- Heegaard, C. W., Christensen, T., Rasmussen, M. D., Benfeldt, C., Jensen, N. J., Sejrsen, K., Petersen, T. E., and Andreasen, P. A. (1994b). Plasminogen activators in bovine milk during mastitis, an inflammatory disease. *Fibrinolysis* 8:22–30.
- Henyon, D. K. (1999). Extended shelf-life milks in North America: a perspective. *International Journal of Dairy Technology*, 95-101.
- Hougaard, A. B., Hammershoj, M., Vestergaard, J. S., Poulsen, O., and Ipsen, R. H. (2009). Instant infusion pasteurisation of bovine milk. I. Effects on bacterial inactivation and physical-chemical properties. *International Journal of Dairy Technology*, 484-492.
- Hurley, M. J., Larsen, L. B., Kelly, A. L., and McSweeney, P. L. H. (2000). Cathepsin D activity in quarg cheese. *International Dairy Journal*, 10, 453-458.
- Igoshi, K., and Arima, S. (1993). Acid and semi-alkaline proteinase in Swiss-type cheese. *Milchwissenschaft*, 48, 623-625.
- Ismail, B., and Nielsen, S. S. (2010). Invited review: Plasmin protease in milk: Current knowledge and relevance to dairy industry. *Journal of Dairy Science*, 93, 4999–5009.
- Ismail, B., Choi, L. H., Were, L., and Nielsen, S. S. (2006). Activity and nature of plasminogen activators associated with the casein micelle. *Journal of Dairy Science*, 89, 3285–3
- Kaminogawa, S., and Yamauchi, K. (1972). Acid protease of bovine milk. *Agricultural and Biological Research*, 36, 2351-2356.
- Kaminogawa, S., Yamauchi, K., Miyazawa, S., and Koga, Y. (1980). Degradation of casein components by acid protease of bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 63, 701-704.
- Karlan, G., Clark, A. S., and Littlefield, B. A. (1987). A highly sensitive chromogenic microtiter plate assay for plasminogen activators which quantitatively discriminates between the urokinase and tissue-type activators. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 142,147–154.

- Kelly, A. L., and Foley, J. (1997). Proteolysis and storage stability of UHT milk as influenced by milk plasmin activity, plasmin / β -lactoglobulin complexation, Plasminogen activation and somatic cell count. *International Dairy Journal*, 7,411–420.
- Kelly, A. L., O’Flaherty, F. and Fox, P. F. (2006). Indigenous proteolytic enzymes in milk: A brief overview of the present stage of knowledge. *International Dairy Journal*, 16, 563-572
- Kohlmann, K. L., Nielsen, S. S., and Ladisch, M. R (1991a). Purification and characterization of an extracellular protease produced by *Pseudomonas fluorescens* M3/6. *Journal of Dairy Science*, 74, 4125–4136.
- Kohlmann, K. L., Nielsen, S. S., and Ladisch, M. R (1991b). Effects of a low concentration of added plasmin on ultra-high temperature processed milk. *Journal of Dairy Science*, 74, 1151–1156.
- Καμιναρίδης, Σ. και Μοάτσου, Γ. (2009). Γαλακτοκομία. Εκδόσεις Έμβροο. Αθήνα.
- Larson, N. K., Ismail, B., Nielsen, S. S., and Hayes, K. D. (2006). Activity of *Bacillus polymyxa* protease on components of the plasmin in milk. *International Dairy Journal*, 16, 586-592.
- Larsen, L. B., Wium, H., Benfeldt, C., Heegaard, C. W., ArdoK , Y., Qvist, K. B., and Petersen, T. E. (2000). Bovine milk procathepsin D: Presence and activity in heated milk and extracts of rennet free UF-feta. *International Dairy Journal*, 10, 67-74.
- Larsen, L., B., Benfeldt, C., Rasmussen, L. K. and Petersen, T. E. (1996). Bovine milk procathepsin D and cathepsin D: Coagulation and milk protein degradation. *Journal of Dairy Research*, 63, 119-130.
- Larsen, L., B., Boisen, A., and Petersen, T. E. (1993). Procathepsin D cannot autoactivate to cathepsin D at acid pH. *FEBS Letters*, 319, 54-58.
- Lewis, M. J. (2003). Improvements in the pasteurization and sterilization of milk. In *Dairy Processing: Improving quality*. Smit G, ed. Campridge, England: Woodhead Publishing Limited, pp. 81-100.
- Lu, D. D., and Nielsen, S. S. (1993a). Heat inactivation of native Plasminogen activators in bovine milk. *Journal of Food Science*, 58,1010–1012., 1016.
- Lu, D. D., and Nielsen, S. S. (1993b). Assays for native Plasminogen activators in bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 76, 3362–3368.
- Lu, R., Stevenson, C. D., Guck, S. E., Pillsbury, L. A., Ismail, B., and Hayes, K. D. (2009). Effect of various heat treatments on plasminogen activation in bovine milk during refrigerated storage. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 681–687
- Manji, B., Kakuda, Y. and Arnott, D. R. (1986). Effect of storage temperature on age gelation of ultra-high temperature milk processed by direct and indirect heating systems. *Journal of Dairy Science*, 69, 2994–3001.
- Markus, G., Hitt, S., Harvey, S. R., and Tritsch, G. L. (1993). Casein, a powerful enhancer of the rate of plasminogen activation. *Fibrinolysis*, 7, 229–236.
- Matheson, A. R. (1981). The immunochemical determination of chymosin activity in cheese. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 15, 33-41.

- McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., and Olson, N. F. (1995). Proteolysis of bovine caseins by cathepsin D: Preliminary observations and comparison with chymosin. *International Dairy Journal*, 5, 321-336.
- Metwalli, A. A. M., de Jongh, H. H. J., and van Boekel, M. A. J. S. (1998). Heat inactivation of bovine plasmin. *International Dairy Journal*, 8, 47–56.
- Moatsou, G (2010). Indigenous enzymatic activities in ovine and caprine milks. *International Journal of Dairy Technology*, 16-31.
- Moatsou G., Bakopanos C, Katharios D, Katsaros G, Kandarakis I., Taoukis P., and Politis I. (2008). Effect of high-pressure treatment at various temperatures on indigenous proteolytic enzymes and whey protein denaturation in bovine milk. *Journal of Dairy Research*, 75, 262-269.
- Moatsou G., Katsaros G, Bakopanos C, Kandarakis I., Taoukis P., and Politis I. (2008). Effect of high-pressure treatment at various temperatures on activity of indigenous proteolytic enzymes and denaturation of whey proteins in ovine milk. *International Dairy Journal*, 18, 1119-1125.
- Moatsou, G., (2012). Sanitary procedures, heat treatments, packaging, In: *Milk and Dairy Products in Human Nutrition*. Y. W. Park and G. F. W. Haenlein (Editors), Wiley-Blackwell (Eds.). Υπό έκδοση.
- Μουτάφη, Α. (2010) Πτυχιακή μελέτη. Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γ.Π.Α.
- Μπακοπάνος, Κ. (2007). Επίδραση της τεχνολογίας Υπερυψηλής Πίεσης σε βιοχημικά και Τεχνολογικά χαρακτηριστικά του Γάλακτος. Π.Μ.Σ. «Επιστήμη and Τεχνολογία Τροφίμων and Διατροφή του Ανθρώπου», Τμήμα ΕΤΤ, Γ.Π.Α.
- O'Driscoll, B. M., Rattray, F. P., McSweeney, P. L. H., and Kelly, A. L. (1999). Protease activities in raw milk determined using a synthetic heptapeptide substrate. *Journal of Food Science*, 64, 606-611.
- Ozen, B. F., Hayes, K. D., and Mauer, L. J. (2003). Measurement of plasminogen concentration and differentiation of plasmin and Plasminogen using Fourier-transform infrared spectroscopy. *International Dairy Journal*, 13, 441–446.
- Patel, H., A., Singh, H., Havea, P., Considine, T., and Creamer, L. K. (2005). Pressure induced unfolding and aggregation of the proteins in whey protein concentrate solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 9590–9601.
- Politis, I., Zavizion, B., Barbano, D. M., and Gorewit, R. C. (1993). Enzymatic assay for the combined determination of plasmin plus plasminogen in milk: Revisited. *Journal of Dairy Science*, 76, 1260–1267.
- Politis, I. (1996). Plasminogen activator system: Implication for mammary cell growth and involution. *Journal of Dairy Science*, 79, 1097–1107.
- Politis, I., and Ng Kwai Hang, K. F. (1989). Environmental Factors Affecting Plasmin Activity in Milk. *Journal of Dairy Science*, 72, 1713–1718.
- Politis, I., White, J. H., Zavizion, B., Goldberg, J. J., Guo, M. R., and Kindstedt, P. (1995). Effect of individual caseins on plasminogen activation by bovine urokinase-type and tissue-type Plasminogen activators. *Journal of Dairy Science*, 78, 484–490.

- Politis, I., Zhao, S., McBride, B. W., Burton, J. H., and Turner, J. D. (1991). Plasminogen activator production by bovine milk macrophages and blood monocytes. *American Journal of Veterinary Research*, 52, 1208–1213.
- Prado, B. M., Ismail, B., Ramos, O., and Hayes, K. D. (2007). Thermal stability of plasminogen activators and plasminogen activation in heated milk. *International Dairy Journal*, 17, 1028–1033.
- Prado, B. M., Ramos, O., Ismail, B., and Hayes, K. D. (2007). Effect of thermal treatment on plasminogen activators in milk and in buffer system. *International Dairy Journal*, 17, 1028–1033.
- Prado, B. M., Sombers, S. E., Ismail, B., and Hayes, K. D. (2006). Effect of heat treatment on the activity of inhibitors of plasmin and Plasminogen activator in milk. *International Dairy Journal*, 16, 593–599.
- Precetti, A. S., Oria, M. P., and Nielsen, S. S. (1997). Presence in bovine milk of two protease inhibitors of the plasmin system. *Journal of Dairy Science*, 80, 1490–1496.
- Reimerdes, E., Klostermeyer, H., and Sayk, E. (1976). Milk proteinases. *Milchwissenschaft*, 31, 329–334.
- Richardson, B. C. (1983). The proteinases of bovine milk and the effect of pasteurization on their activity. *N.Z. Journal of Dairy Science and Technology*, 18, 223–245.
- Richardson, B. C., and Pearce, K. N. (1981). The determination of PL in dairy products. *N.Z. Journal of Dairy Science and Technology*, 16, 209–220.
- Richardson, B. C., and Elston, P. D. (1984). Plasmin activity in commercial caseins and caseinates. *N.Z. Journal of Dairy Science and Technology*, 19:63–67.
- Rollema, H. S., and Poll, J. K. (1986). The alkaline milk proteinase system: Kinetics and mechanism of heat-inactivation. *Milchwissenschaft*, 41, 536–540.
- Rysstad, G., and Kolstad, J. (2006). Extended shelf life milk-advances in technology. *International Journal of Dairy Technology*, 85-96.
- Saint Denis, T., Humbert, G., and Gaillard, J. -L. (2001). Heat inactivation of native plasmin, plasminogen and plasminogen activators in bovine milk: A revisited study. *Lait*, 81, 715–729.
- Schaar, J. (1985). Plasmin activity and proteose-peptone content of individual milks. *Journal of Dairy Research*, 52,369–378.
- Schroeder, D. L., Nielsen, S. S., and Hayes, K. D. (2008). The effect of raw milk storage temperature on plasmin activity and plasminogen activation in pasteurized milk. *International Dairy Journal*, 18, 114–119.
- Shakeel-Ur-Rehman, Farkye, N. Y., and Fox, P. F. (2003). Indigenous phosphatases of milk. In P. F. Fox, and P. L. H. McSweeney (Eds), *Advanced Dairy Chemistry: Proteins*, Vol. 1 (3rd edition, Part A, pp. 524-543). New York, USA: Kluwer Academic/Plenum.
- Somers, J. M., O'Brien, B., Meaney, W. J. and Kelly, A. L. (2003). Heterogeneity of proteolytic enzyme activities in milk samples of different somatic cell count. *Journal of Dairy Research*, 70, 45-50.
- Sørhaug, T., and Stepaniak, L. 1997. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. *Trends in Food Science and Technology*, 35-42.

- Σακκάς, Λ. (2011). Αξιολόγηση της θερμικής επεξεργασίας του αγελαδινού γάλακτος. Διατμηματικό Μ.Π.Σ. «Επιστήμη Τροφίμων και Διατροφή», Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων και Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, ΤΕΙ Αθήνας.
- Ulberth, F. (2003). Testing the authenticity of milk and milk products. In *Dairy Processing: Improving quality*. Smit, G., ed. Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited, pp. 208-223.
- Walstra, P, Wouters, J. T. M., and Geurts, T. J. (2006). *Dairy Science and Technology*. 2nd edn. Boca Raton, USA: CRC Press, Taylor and Francis Group, pp. 225-272, 421-445.
- White, J. H., Zavizion, B., O'Hare, K., Gilmore, J., Guo, M. R., Kindstedt, P., and Politis, I. (1995). Distribution of plasminogen activators in different fractions of bovine milk. *Journal of Dairy Research*, 62, 115–122.
- Wilbey, R. A. (1996). Estimating the degree of heat treatment given to milk. *Journal of the Society of Dairy Technology*, 109-112.
- Wium, H., Kristiansen, K., R., and Qvist, K. B. (1998). Proteolysis and its role in relation to texture of Feta cheese made from ultra filtered milk with deferent amounts of rennet. *Journal of Dairy Research*, 65, 665-674.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Αποτελέσματα ανάλυσης δειγμάτων νωπού γάλακτος που επεξεργάστηκαν σε πιλοτική κλίμακα (έμμεση μέθοδος)

Κωδικός δείγματος	Θερμική επεξεργασία	Υπολειμματική β-LG (mg/L)	Καθεψίνη-D: κορυφές (κανονικοποιημένες τιμές) Χ10 ⁶				plasmin			
			Υπολειμματικό υπόστρωμα, %	P	1	2	PL	PG	UPA	PG/PL
Νωπό_1	Νωπό	4032	5	2,17	1,89	0,3 4	8,1	41,5	0,240	5,12
Νωπό_2	Νωπό	4229	7	1,75	2,52	0,3 2	9,6	46,0	0,232	4,79
Νωπό_3	Νωπό	4006	4	2,04	2,01	0,5 5	12,4	44,0	0,256	3,55
Νωπό_4	Νωπό	4035	8	1,59	2,29	0,4	9,9	42,2	0,227	4,26
80°C_1	80°C/3-4s	2588	89	0,57	0	0	8,4	50,4	0,275	6,00
80°C_2	80°C/3-4s	2844	90	0,44	0	0	10,7	55,0	0,231	5,14
90°C_1	90°C/3-4s	1014	100	0	0	0	12,2	53,0	0,228	4,34
90°C_2	90°C/3-4s	1250	100	0	0	0	8,3	62,7	0,243	7,55
100°C_1	100°C/3-4s	394	100	0	0	0	7,4	47,8	0,207	6,46
100°C_2	100°C/3-4s	427	100	0	0	0	16,8	58,3	0,246	3,47

100°C_3	100°C/3 -4s		359									
				100	0	0	0	10,2	41,9	0,212	4,11	
100°C_4	100°C/3 -4s		436									
				100	0	0	0	9,3	60,4	0,273	6,49	
110°C_1	110°C/3 -4s		181									
				100	0	0	0	17,4	58,2	0,275	3,34	
110°C_2	110°C/3 -4s		183									
				100	0	0	0	8,8	46,8	0,212	5,32	
110°C_3	110°C/3 -4s		236									
				100	0	0	0	8,3	49,3	0,224	5,94	
110°C_4	110°C/3 -4s		199									
				100	0	0	0	7,5	70,5	0,243	9,40	
120°C_1	120°C/3 -4s		74									
				100	0	0	0	8,9	63,2	0,199	7,10	
120°C_2	120°C/3 -4s		184									
				100	0	0	0	13,2	30,8	0,271	2,33	
130°C_1	130°C/3 -4s		28									
				100	0	0	0	7,0	32,4	0,225	4,63	
130°C_2	130°C/3 -4s		86									
				100	0	0	0	7,3	40,8	0,182	5,59	
140°C_1	140°C/3 -4s		5									
				100	0	0	0	6,8	44,4	0,227	6,53	
140°C_2	140°C/3 -4s		1									
				100	0	0	0	7,7	34,8	0,205	4,52	

Αποτελέσματα ανάλυσης δειγμάτων γάλακτος της αγοράς.

MF=μικροδομημένο γάλα.

FF=πλήρες γάλα, LF=ημιάπαχο γάλα, LP=χαμηλή (κλασική) παστερίωση, HP=υψηλή παστερίωση, LL=γάλα με μειωμένη λακτόζη

Κωδικός δείγματος	Τύπος γάλακτος		Υπολειμματική β-LG (mg/L)	Καθεψίνη-D: κορυφές (κανονικοποιημένες τιμές) Χ10 ⁶				plasmin			
				Υπολειμματικό υπόστρωμα, %	P	1	2	PL	PG	UPA	PG/PL
THERM-1	FF	ΘΕΡΜΙ-ΣΜΕΝΟ	3649	40	1,84	1,23	0,19	8,1	41,5	0,24	5,12
THERM-2	FF	ΘΕΡΜΙ-ΣΜΕΝΟ	3693	36	2,21	1,53	0,26	9,6	46	0,232	4,79
THERM-3	FF	ΘΕΡΜΙ-ΣΜΕΝΟ	3508	52	1,66	0,64	0,15	12,4	44	0,256	3,55
THERM-4	FF	ΘΕΡΜΙ-ΣΜΕΝΟ	3304	40	1,98	0,78	0,33	9,9	42,2	0,227	4,26
PAST-1	LF	LP	3467	87	1,1	0	0	8	51,5	0,207	6,44
PAST-2	LF	LP	3238	79	0,9	0	0	7,6	50,8	0,213	6,68
PAST-3	FF	LP	3290	85	1,2	0	0,09	9,9	60,4	0,268	6,1
PAST-4	FF	LP	3089	81	0,96	0	0	12	47,8	0,26	3,98
20_1	FF	HP	2514	100	0	0	0	8,8	59,3	0,248	6,74
20_2	FF	HP	2583	100	0	0	0	11,7	48,8	0,246	4,17
20_3	FF	HP	2280	100	0	0	0				
30_1	FF	HP	2774	100	0	0	0	8,7	49,4	0,287	5,68
30_2	FF	HP	2657	100	0	0	0	11,4	53,8	0,280	4,72
30_3	FF	HP	2520	100	0	0	0				

40_1	FF	HP	492	100	0	0	0	6,9	60,7	0,226	8,80
40_2	FF	HP	538	100	0	0	0	5,4	48,9	0,227	9,06
40_3	FF	HP	624	100	0	0	0				
50_1	FF	HP	1645	100	0	0	0	12,0	48,8	0,243	4,07
50_2	FF	HP	1680	100	0	0	0	6,9	48,7	0,245	7,06
70_1	FF	HP	1963	100	0	0	0	6,9	63,2		9,16
70_2	FF	HP	1803	100	0	0	0				
80_1	FF	HP	1258	100	0	0	0				
80_2	FF	HP	1609	100	0	0	0				
80_3	FF	HP	1594	100	0	0	0				
90_1	FF	HP	267	100	0	0	0				
90_2	FF	HP	205	100	0	0	0				
90_3	FF	HP	153	100	0	0	0				
100_1	FF	HP	2510	100	0	0	0				
100_2	FF	HP	2354	100	0	0	0	10,4	55,5	0,231	5,34
100_3	FF	HP	2379	100	0	0	0				
110_1	FF	HP	256	100	0	0	0	11,8	60,4	0,236	5,12
110_2	FF	HP	253	100	0	0	0	4,6	60,7	0,240	13,20
110_3	FF	HP	219	100	0	0	0				
120_1	FF	HP	417	100	0	0	0	11,5	49,5	0,255	4,30
120_2	FF	HP	304	100	0	0	0	15,7	49,5	0,257	3,15
120_3	FF	HP	258	100	0	0	0				
130_1	FF	HP	1759	100	0	0	0	8,0	53,2	0,218	6,65
130_2	FF	HP	1672	100	0	0	0	8,0	53,0	0,220	6,63
130_3	FF	HP	1693	100	0	0	0				
140_1	FF	HP	3434	87	0,8	0	0	5,8	46,0	0,261	7,93

140_2	FF	HP	3168	95	0,57	0	0	7,7	46,2	0,255	6,00
140_3	FF	HP	1254	100	0	0	0				
140_4	FF	HP	1153	100	0	0	0				
150-1	FF	HP	1071	100	0	0	0	8,0	53,0	0,232	6,63
150-2	FF	HP	1144	100	0	0	0				
150-3	FF	HP	1184	100	0	0	0	7,8	68,0	0,240	8,72
160-1	FF	HP	69	100	0	0	0	6,6	64,9	0,263	9,83
160-2	FF	HP	35	100	0	0	0	6,0	42,0	0,268	7,00
170-1	FF	HP	832	100	0	0	0				
170-2	FF	HP	1046	100	0	0	0	7,5	53,3	0,232	7,11
210-1	FF	HP	2821	100	0	0	0	11,2	49,3	0,260	4,40
210-2	FF	HP	2617	100	0	0	0	8,9	65,2	0,258	7,33
180-1	FF/LL	HP	116	100	0	0	0	4,9	59,2	0,226	12,08
180-2	FF/LL	HP	118	100	0	0	0	6,3	57,6	0,230	9,14
190-1	FF/LL	HP	374	100	0	0	0	8,0	48,3	0,272	6,04
190-2	FF/LL	HP	275	100	0	0	0	4,9	47,2	0,266	9,63
200-1	LF	HP	358	100	0	0	0	4,2	48,4	0,244	11,52
200-2	LF	HP	376	100	0	0	0	10,4	63,2	0,247	6,08
220-1	LF	HP	1862	100	0	0	0	13,4	48,3	0,236	3,60
220-2	LF	HP	2018	100	0	0	0	9,6	53,5	0,230	5,57
260-1	LF	HP	2621					7,9	52,8	0,242	6,68
260-2	LF	HP	2831	81	0,77	0	0	11,6	63,7	0,255	5,49
270-1	LF	HP	1908	100	0	0	0	13,2	69,8		5,29
270-2	LF	HP	1808	100	0	0	0	8,9	62,0		6,97
290-1	LF	HP	1882	100	0	0	0	10,8	43,5	0,226	4,03
290-2	LF	HP	2191	100	0	0	0	9,0	48,0	0,230	5,33

300-1	LF	HP	1233	100	0	0	0	6,9	60,3	0,268	8,74
300-2	LF	HP	1290	100	0	0	0	7,6	47,5	0,270	6,25
310-1	LF	HP	471	100	0	0	0	4,7	48,3	0,238	10,28
310-2	LF	HP	461	100	0	0	0	7,3	50,8	0,230	6,96
60_1	FF	MF+LP	3166	88	1,09	0,067	0	12	59,8	0,265	4,98
60_2	FF	MF+LP	3086	74	1,13	0	0	7,5	60	0,215	8
280-1	LF	MF+LP	3553	81	1,05	0	0,05	11,9	41,4	0,246	3,48
280-2	LF	MF+LP	3388	77	1,21	0	0,05	9,8	51,8	0,248	5,29
10_1	FF	UHT	970	100	0	0	0	7,5	58,2	0,28	7,76
10_2	FF	UHT	890	100	0	0	0	7	60	0,272	8,57
10_3	FF	UHT	858	100	0	0	0				
240-1	FF	UHT	115	100	0	0	0	8	50,8	0,32	6,35
240-2	FF	UHT	150	100	0	0	0	4	51,2	0,308	12,8
250-1	FF	UHT	65	100	0	0	0	2,8	50,4	0,245	18
250-2	FF	UHT	101	100	0	0	0	6,5	51,6	0,248	7,94
230-1	LF	UHT	54	100	0	0	0	5,8	56,2	0,246	9,69
230-2	LF	UHT	47	100	0	0	0	7,3	56,4	0,25	7,73
320-1	LF	UHT	86	100	0	0	0	7	66,4	0,253	9,49
330-1	LF	UHT	61	100	0	0	0	8,2	65,9	0,258	8,04
340-1	LF	UHT	196	100	0	0	0	6,4	52,8	0,276	8,25
350-1	LF	UHT	259	100	0	0	0	6,9	52,8	0,274	7,65

Αποτελέσματα ανάλυσης δειγμάτων τριών τύπων ανασυσταμένης σκόνης άπαχου γάλακτος που δέχθηκαν θερμική επεξεργασία σε πιλοτική μονάδα (έμμεση μέθοδος).

SMP= skim milk powder, σκόνη άπαχου γάλακτος, LH=low heat, σκόνη χαμηλής θέρμανσης, MH=medium heat, σκόνη μεσαίας θέρμανσης και HH=high heat, σκόνη υψηλής θέρμανσης.

Κωδικός δείγματος	Τύπος SMP	Θερμική επεξεργασία	Υπολειμματική β-LG (mg/L)	Καθεψίνη-D: κορυφές (κανονικοποιημένες τιμές) $\times 10^6$				plasmin			
				Υπολειμματικό υπόστρωμα, %	P	1	2	PL	PG	UPA	PG/PL
LH_1	LH	-	2200	91	0,59	0	0	11,30	38,30	0,255	3,39
LH_2	LH	-	2496	82	0,47	0	0	10,60	38,50	0,243	3,63
LH_3	LH	-	1748	100	0,23	0	0	8,80	42,30	0,218	4,81
LH_4	LH	-	2725	96	0,61	0	0	8,40	42,60	0,294	5,07
MH_1	MH	-	2414	88	0,66	0	0,09	12,00	44,00	0,236	3,67
MH_2	MH	-	2895	82	0,46	0	0	13,60	44,40	0,200	3,26
MH_3	MH	-	2591	98	0,21	0	0	9,40	42,00	0,255	4,47
MH_4	MH	-	2587	95	0,52	0	0	11,30	34,80	0,257	3,08
HH_1	HH	-	6	100	0	0	0	8,00	39,20	0,255	4,90

HH_2	HH	-	0	100	0	0	0	11,30	36,80	0,247	3,26
HH_3	HH	-	4	100	0	0	0	11,50	43,00	0,232	3,74
HH_4	HH	-	1	100	0	0	0	10,70	44,40	0,275	4,15
LH-80_1	LH	80 °C/3 s	1493	100	0	0	0	8,30	60,80	0,249	7,33
LH-80_2	LH	80 °C/3 s	2207	92	0	0	0	11,40	72,50	0,265	6,36
LH-130_1	LH	130°C/3 s	27	100	0	0	0	10,40	63,20	0,280	6,08
LH-130_2	LH	130°C/3 s	355	100	0	0	0	10,90	64,40	0,244	5,91
MH-80_1	MH	80 °C/3 s	2035	100	0	0	0	7,50	64,30	0,266	8,57
MH-80_2	MH	80 °C/3 s	2065	100	0	0	0	8,90	64,00	0,253	7,19
MH-130_1	MH	130°C/3 s	43	100	0	0	0	6,00	63,00	0,218	10,50
MH-130_2	MH	130°C/3 s	377	100	0	0	0	6,80	70,00	0,272	10,29
HH-80_1	HH	80 °C/3 s	47	100	0	0	0	5,00	73,40	0,375	14,68
HH-80_2	HH	80 °C/3 s	5	100	0	0	0	2,90	58,80	0,365	20,28
HH-130_1	HH	130°C/3 s	0	100	0	0	0	2,60	63,20	0,405	24,31
HH-130_2	HH	130°C/3 s	14	100	0	0	0	5,30	60,00	0,408	11,32

Αποτελέσματα ανάλυσης δειγμάτων συμπυκνωμένου γάλακτος βιομηχανικής χρήσης που δέχθηκε θερμική επεξεργασία σε πιλοτική μονάδα (έμμεση μέθοδος).

CM= condensed milk,
συμπυκνωμένο γάλα.

				Καθεψίνη-D: κορυφές (κανονικοποιημένες τιμές) X10 ⁶				plasmin			
Κωδικός δείγματος	Θερμική επεξεργασία	Υπολειμματική β-LG (mg/L)	Υπολειμματικό υπόστρωμα, %	P	1	2	PL	PG	UPA	PG/PL	
CM_1	-	3154	80	0,54	0	0	8,20	44,30	0,225	5,40	
CM_2	-	3320	81	0,53	0	0	8,40	39,80	0,213	4,74	
CM_3	-	3572	94	0,33	0	0	9,60	40,20	0,247	4,19	
CM_4	-	3638	84	0,46	0	0	8,30	46,50	0,235	5,60	
CM-80_1	80 °C/3 s	2401	100	0	0	0	13,20	59,40	0,232	4,50	
CM-80_2	80 °C/3 s	2976	100	0	0	0	12,40	65,40	0,246	5,27	

CM-130_1	130 °C/3 s		93	100	0	0	0	9,00	60,30	0,245	6,70
CM-130_2	130 °C/3 s		481	100	0	0	0	7,70	60,80	0,218	7,90