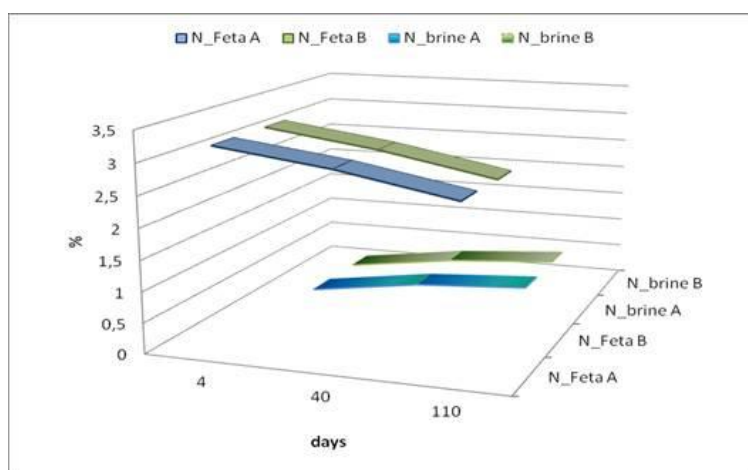


ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«Ολοκληρωμένη Διαχείριση Παραγωγής Γάλακτος και Γαλακτοκομικών Προϊόντων»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΛΜΗΣ ΣΤΗΝ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΩΡΙΜΑΣΗΣ ΛΕΥΚΟΥ
ΤΥΡΙΟΥ ΑΠΟ ΠΡΟΒΕΙΟ ΓΑΛΑ



ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ ΤΖΟΥΒΑΝΟΥ

Γεωπόνος

Επιβλέπουσα: Γ. Μοάτσου, Επίκουρος Καθηγήτρια ΤΕΤΔΑ-ΓΠΑ

Εξεταστική Επιτροπή: Ι. Πολίτης, Καθηγητής ΤΕΖΠΥ-ΓΠΑ

Α. Μοσχοπούλου, Λέκτορας ΤΕΤΔΑ-ΓΠΑ

Αθήνα, Ιούλιος 2013

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική μελέτη εκπονήθηκε στα πλαίσια του Διατμηματικού Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Ολοκληρωμένη Διαχείριση Παραγωγής Γάλακτος και Γαλακτοκομικών Προϊόντων», του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη της Επίκουρης Καθηγήτριας κ. Μοάτσου Γκόλφως. Θα ήθελα λοιπόν, πρωτίστως να ευχαριστήσω θερμά την καθηγήτριά μου, κ. Μοάτσου για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα αντικείμενο που με ενδιέφερε εξ αρχής αλλά και που μου δίδαξε πολλά στην πορεία. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την κ. Μοάτσου για την ανυπολόγιστη συμβολή και καθοδήγησή της κατά την διάρκεια διεξαγωγής των εργαστηριακών αναλύσεων αλλά και όλο τον χρόνο και την φροντίδα που αφιέρωσε στην συγγραφή της παρούσας μελέτης.

Επίσης, ιδιαίτερα και θερμότατα θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Ζωΐδου Ευαγγελία για την απεριόριστη βοήθεια, καθοδήγηση και συμπαράστασή της καθ'όλη την διάρκεια της εκτέλεσης του πειράματος και των εργαστηριακών αναλύσεων και για την άψογη συνεργασία μας καθώς η παρουσία και η εμπειρία της υπήρξαν πάντα καταλυτικές όπου οι συνθήκες το απαιτούσαν.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, κ. Πολίτη και κ. Μοσχοπούλου, για τις εύστοχες παρατηρήσεις τους και τις διορθώσεις τους κατά την συγγραφή της μελέτης και οφείλω επιπλέον ευχαριστίες στην κ. Μοσχοπούλου για την βοήθεια που μου προσέφερε κατά την διάρκεια των αναλύσεων και για την συνεργασία μας στον χώρο των εργαστηρίων.

Ακόμη θα ήθελα να εκφράσω θερμές ευχαριστίες σε όλους τους καθηγητές του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών, οι οποίοι μου προσέφεραν τα πολύτιμα εφόδια της γνώσης και της εμπειρίας τους καθ'όλη την διάρκεια της φοίτησής μου αλλά και ειδικότερα κατά την διάρκεια της μεταπτυχιακής μου μελέτης.

Επιπλέον, ευχαριστίες οφείλω σε όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας για την συνολική βοήθεια και το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας καθώς και στις συμφοιτήτριές μου Αναστασία Τσουμπρή και Κάζου Μαρία για την βοήθεια και συμπαράστασή τους κατά την διάρκεια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να μην εκφράσω θερμές ευχαριστίες σε όλα τα μέλη του οικογενειακού μου περιβάλλοντος για την συνεχή ηθική και υλική στήριξη που μου προσέφεραν καθ'όλη την διάρκεια των σπουδών μου και για την πίστη τους σε εμένα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	3
A': ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ	
1. Η ΩΡΙΜΑΣΗ ΤΩΝ ΤΥΡΙΩΝ	
1.1. Εισαγωγή	4
1.2. Παράγοντες που επηρεάζουν την ωρίμαση των τυριών	4
1.3. Βιοχημικές διεργασίες που συμβαίνουν κατά την ωρίμαση των τυριών	6
1.3.1. Μεταβολισμός της υπολειμματικής λακτόζης, του γαλακτικού και του κιτρικού οξέος, κατά την ωρίμαση των τυριών	7
1.3.2. Η πρωτεόλυση κατά την ωρίμαση των τυριών	11
1.3.2.1. Η υπολειμματική χυμοσίνη	12
1.3.2.2. Ενδογενείς πρωτεΐνες του γάλακτος	13
1.3.2.3. Πρωτεΐνες των οξυγαλακτικών καλλιέργειών και των NSLAB	14
1.3.2.4. Πρωτεολυτικοί παράγοντες προερχόμενοι από δευτερεύουσες εναρκτήριες καλλιέργειες ή/και δευτερεύουσα ενδογενή μικροχλωρίδα του γάλακτος	15
1.3.3. Η λιπόλυση κατά την ωρίμαση των τυριών	15
1.4. Η ωρίμαση της Φέτας	17
2. Η ΑΛΜΗ ΣΤΗΝ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΥΡΙΩΝ	
2.1. Εισαγωγή	21
2.2. Τρόποι αλατίσματος των τυριών	22
2.2.1. Παράγοντες που επηρεάζουν την πρόσληψη αλατιού από τα τυριά	23
2.3. Ελαττώματα που σχετίζονται με την άλμη διατήρησης των τυριών άλμης	24
2.4. Ο ρόλος τους αλατιού στην ωρίμαση των τυριών	26
2.5. Η σύσταση της άλμης των τυριών άλμης	27
B': ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
3.1. Πειραματικές τυροκομήσεις και δειγματοληψία	30
3.2. Αναλύσεις	31
3.2.1. Χημική σύσταση των τυριών	31
3.2.2. Ανάλυση του ανόργανου κλάσματος των τυριών	33
3.2.3. Μελέτη της πρωτεόλυσης των τυριών	33
3.2.3.1. Παραλαβή του υδατοδιαλυτού εκχυλίσματος των τυριών (YE)	33
3.2.3.2. HPLC ανεστραμμένης φάσης (RP-HPLC)	33
3.2.3.3. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης ελεύθερων αμινομάδων - Μέθοδος TNBS (trinitrobenzenesulphonic acid)	34
3.2.4. Ρεολογικές ιδιότητες των τυριών	35
3.2.5. Αντιοξειδωτικό δυναμικό των τυριών	36
3.2.5.1. Δεσμεντική ικανότητα ριζών DPPH' (DPPH' radical scavenging activity, DPPH'-RSA)	37
3.2.5.2. Δεσμεντική ικανότητα H ₂ O ₂ (H ₂ O ₂ scavenging activity, H ₂ O ₂ -SA)	38
3.2.5.3. Δεσμεντική ικανότητα υπεροξειδίων (superoxide scavenging activity, SO-SA)	39
3.2.5.4. Ικανότητα χήλωσης Fe ²⁺ (Fe ²⁺ chelating activity, Fe ²⁺ -CA)	40
3.2.6. Αναλύσεις της άλμης	41
3.2.7. Οργανοληπτικός έλεγχος των τυριών	42
3.3. Επεξεργασία αποτελεσμάτων	42
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	
4.1. Σύσταση των τυριών	44
4.2. Ανόργανο κλάσμα των τυριών	49
4.3. Εξέλιξη της πρωτεόλυσης των τυριών	53
4.4. Ρεολογικά χαρακτηριστικά των τυριών	58
4.5. Αντιοξειδωτικό δυναμικό των τυριών	61
4.6. Εξέλιξη της σύστασης της άλμης	66
4.7. Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τυριών	71
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	73
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	76
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	83
ABSTRACT	84

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το χαρακτηριστικό των τυριών άλμης είναι ότι ωριμάζουν και συντηρούνται σε διαλύματα χλωριούχου νατρίου. Τα τυριά αυτά είναι μια δημοφιλής κατηγορία παγκοσμίως και τα περισσότερα από τα τεχνολογικά και βιοχημικά τους χαρακτηριστικά έχουν μελετηθεί. Αντίθετα, πολύ λίγα είναι γνωστά για την άλμη διατήρησης και την επίδρασή της στο τυρί, παρ' ότι είναι γνωστό ότι πραγματοποιείται ανταλλαγή συστατικών μεταξύ τους. Είναι επίσης γνωστό ότι πολλά από τα ελαττώματα των τυριών αυτών οφείλονται στην «κακή επικοινωνία» τους με την άλμη τους και ένας από τους τρόπους πρόληψης εμφάνισης τέτοιων ελαττωμάτων είναι η ενίσχυση της άλμης διατήρησης με ασβέστιο.

Η παρούσα μελέτη είχε ως σκοπό να διερευνήσει πώς επιδρά η ενίσχυση με ασβέστιο της άλμης διατήρησης στα χαρακτηριστικά των τυριών και στην εξέλιξη των ανταλλαγών μεταξύ τυριού και άλμης κατά τη διάρκεια της ωρίμασης λευκών τυριών άλμης. Το χαρακτηριστικό των πειραματικών αυτών τυριών ήταν ότι παρασκευάστηκαν από πρόβειο γάλα του οποίου η σύσταση είχε τυποποιηθεί έτσι ώστε η αναλογία πρωτεΐνη/λίπος να είναι περίπου 1,30. Στο πλαίσιο αυτό μελετήθηκαν, η χημική σύσταση, τα αζωτούχα συστατικά, το κλάσμα των ανόργανων συστατικών, τα ρεολογικά χαρακτηριστικά και το αντιοξειδωτικό δυναμικό των τυριών παράλληλα με τα αζωτούχα συστατικά και τα κύρια άλατα της άλμης διατήρησής τους.

Α΄: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

1. Η ΩΡΙΜΑΣΗ ΤΩΝ ΤΥΡΙΩΝ

1.1. Εισαγωγή

Με τον όρο ωρίμαση εννοείται το χρονικό διάστημα διατήρησης των τυριών κάτω από ορισμένες συνθήκες, κατά την διάρκεια του οποίου συμβαίνουν ποσοτικές και ποιοτικές μεταβολές που τελικά προσδίδουν στο τυρί τα ιδιαίτερα οργανοληπτικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του. Ειδικότερα, οι μεταβολές που παρατηρούνται κατά την ωρίμαση, αλλάζουν τη σύσταση και τη δομή του τυριού και αφορούν κυρίως μεταβολές της λακτόζης, των πρωτεϊνών, του λίπους και του κιτρικού οξέος. Οι μεταβολές αφορούν και στο μικροβιολογικό φορτίο του τυριού, καθώς κατά την ωρίμαση θανατώνονται παθογόνοι και άλλοι ανεπιθύμητοι μικροοργανισμοί, οι οποίοι ενδεχομένως υπήρχαν στην μάζα του τυριού, ειδικά εάν το τυρί δεν έχει παρασκευασθεί από παστεριωμένο γάλα, ως αποτέλεσμα των βιοχημικών αλλαγών που συμβαίνουν ως προς την υγρασία, την αλατοπεριεκτικότητα, την αφθονία των υποστρωμάτων και του pH. Η περίοδος ωρίμασης κάθε είδους τυριού αποτελεί χαρακτηριστικό της τεχνολογίας παρασκευής του και μπορεί να κυμαίνεται από λίγες ώρες, ημέρες, μήνες, έως και χρόνια σε κάποιες περιπτώσεις.

1.2. Παράγοντες που επηρεάζουν την ωρίμαση των τυριών

Η ωρίμαση των τυριών αποτελεί ένα σύνθετο φαινόμενο διότι λαμβάνει χώρα εντός ενός πολύπλοκου υποστρώματος, του τυροπήγματος, το οποίο αποτελείται κατά κύριο λόγο από ένα πλέγμα καζεϊνών και λίπους, με την συμμετοχή μικρού ποσοστού πρωτεϊνών του ορού, λακτόζης (έως ~1%), γαλακτικού (έως ~1%) και κιτρικού οξέως (έως ~0,2%), NaCl (~0,7 έως 6%) και διάφορες ποσότητες νερού (από <32% έως και ~60% υγρασία) (Fox *et al.*, 2000).

Το τυρί δημιουργείται ως αποτέλεσμα συμπύκνωσης του λίπους και των καζεϊνών του γάλακτος με ταυτόχρονη απομάκρυνση των πρωτεϊνών του ορού, της λακτόζης και των διαλυτών αλάτων μέσω του τυρογάλακτος (Καμινारीδης & Μοάτσου 2009). Η παρασκευή των περισσότερων τυριών βασίζεται στην ενζυμική πήξη των καζεϊνών του γάλακτος ή εναλλακτικά η πήξη αυτή προκαλείται με οξίνιση ή με συνδυασμό των δύο αυτών παραγόντων. Η ενζυμική πήξη που αφορά στις περισσότερες κατηγορίες τυριών γίνεται με την βοήθεια της πυτιάς, η οποία είναι το εκχύλισμα του ηνύστρου, μη απογαλακτισμένων μηρυκαστικών ζώων, στο οποίο απαντώνται σε μεγάλες ποσότητες τα ένζυμα πεψίνη και

χυμοσίνη σε αναλογία ~10:90 έως 20:80. Επιγραμματικά αναφέρεται ότι, η πήξη του γάλακτος με πυτιά είναι μία διαδικασία η οποία διακρίνεται σε δύο στάδια, εκ των οποίων το πρώτο αφορά την ενζυμική υδρόλυση της, σταθεροποιητικής για τα μικύλλια, κ-καζεΐνης. Το δεύτερο είναι η συσσωμάτωση των μικελλίων, παρουσία ιόντων ασβεστίου, σε θερμοκρασία μεγαλύτερη των 20°C. Μεταξύ των δύο σταδίων, παρατηρείται μία χρονική αλληλεπικάλυψη, η έκταση της οποίας εξαρτάται από την θερμοκρασία, το pH και το πρωτεϊνικό περιεχόμενο του τυροπήγατος (Horne & Banks 2004, Fox *et al.* 1996, Fox & McSweeney 1997).

Οι παράγοντες που εμπλέκονται στην ωρίμαση των τυριών είναι:

- Η ποιότητα της πυτιάς ή των υποκατάστατών της (φυτικής προέλευσης, ανασυνδυασμένη χυμοσίνη κ.α.).
- τα ενδογενή ένζυμα του γάλακτος, τα οποία είναι ιδιαίτερα σημαντικά ειδικά στα τυριά από απαστερίωτο γάλα με εξαίρεση την πλασμίνη, την υπεροξειδάση και των όξινη φωσφατάση, τα οποία είναι ανθεκτικά στις συνθήκες παστερίωσης.
- η (εναρκτήρια) καλλιέργεια εκκίνησης που χρησιμοποιείται και ειδικά τα ένζυμα που περιέχει η καλλιέργεια αυτή.
- τα ένζυμα των δευτερευουσών καλλιεργειών (*secondary starters*), μυκήτων ή ζυμών που χρησιμοποιούνται σε ορισμένες κατηγορίες τυριών.
- το φορτίο ανεπιθύμητων μικροοργανισμών οι οποίοι μετά την θανάτωσή τους κατά την ωρίμαση απελευθερώνουν από το κύτταρό τους ένζυμα που παραμένουν ενεργά (Fox *et al.* 2000).

Το ποσοστό συμμετοχής καθενός από τους παραπάνω παράγοντες, στην διαδικασία της ωρίμασης, είναι επί πάρα πολλά έτη αντικείμενο ενδιαφέροντος και συστηματικής έρευνας. Επιπλέον αυτών των παραγόντων, άλλοι σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την πορεία της ωρίμασης είναι η δομή του τυροπήγατος, ως αποτέλεσμα της πρωτεόλυσης και της επίδρασης της οξίνισης (pH), η κατάσταση των επιμέρους συστατικών του τυροπήγατος (κατάσταση λιποσφαιρίων, ποσοστό δεσμευμένων στο μικύλλιο και διαλυτών καζεϊνών κ.α.) καθώς και η περιεκτικότητα σε ένζυμα. Πολύ σημαντικοί παράγοντες είναι οι περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η υγρασία και η θερμοκρασία του θαλάμου ωρίμασης οι οποίοι επηρεάζουν όχι μόνο την ανάπτυξη της μικροχλωρίδας εξωτερικά και εσωτερικά του τυριού αλλά και το σύνολο των διενεργούμενων βιοχημικών διεργασιών εντός της τυρομάζας (Fox *et al.*, 2000).

Ειδικότερα, σχετικά με την δομή του τυροπήγατος, είναι γνωστό ότι με την πρόοδο της πρωτεόλυσης και την απελευθέρωση πεπτιδίων, αυξάνεται η ικανότητα δέσμευσης νερού από το τυροπήγμα διότι μέρος από τα αρχικά υδρόφοβα μόρια των καζεϊνών διασπώνται (Καμινναρίδης & Μοιάτσου 2009). Επίσης ο ρυθμός και η έκταση της πτώσης του pH που

επέρχεται με την πάροδο της ωρίμασης λόγω της παραγωγής οξέων από την μικροβιακή χλωρίδα, προκαλεί αλλαγές στην δομή του κολλοειδούς φωσφορικού ασβεστίου οι οποίες επηρεάζουν την διαλυτότητα των μορίων καζεΐνης. Επιπλέον, η αφαλάτωση των καζεϊνικών μικελλίων επηρεάζει την υφή του τυριού αλλά και την διαδικασία της πρωτεόλυσης λόγω της υψηλής ευαισθησίας των τροποποιημένων αυτών μικυλλίων στην πρωτεόλυση (Lawrence *et al.* 1987, Fox *et al.* 1990).

Αναφορικά με τις συνθήκες του περιβάλλοντος ωρίμασης και την τεράστια σημασία τους στην επιτυχία της παραγωγής του επιθυμητού προϊόντος, αξίζει να αναφερθεί ότι η θερμοκρασία και η υγρασία και ειδικότερα, η ενεργότητα νερού θεωρούνται πολύ σημαντικές παράμετροι. Η ενεργότητα νερού παίζει κρίσιμο ρόλο στην ωρίμαση του τυριού καθώς επηρεάζει την ποιότητα, σταθερότητα και ασφάλειά του. Τελευταίως, αλλά όχι λιγότερο σημαντικός παράγοντας για την ωρίμαση του τυριού είναι η αλατοπεριεκτικότητά του. Το αλάτι στην υγρή φάση του τυριού ή συντελεστής αλατιού, δηλαδή το ποσοστό του αλατιού που βρίσκεται διαλυμένο στην υγρασία του τυροπήγματος είναι ένας καθοριστικός παράγοντας για την διαμόρφωση των οργανοληπτικών του χαρακτηριστικών αλλά και για το είδος των μικροοργανισμών που θα κυριαρχήσουν.

1.3. Βιοχημικές διεργασίες που συμβαίνουν κατά την ωρίμαση των τυριών

Οι βιοχημικές διεργασίες οι οποίες συμβαίνουν κατά την ωρίμαση, μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες (Fox & McSweeney 2000). Η πρώτη κατηγορία αφορά σε βιοχημικές διεργασίες που εξελίσσονται παράλληλα και ξεκινούν από την τυροκόμηση και περιλαμβάνει:

- Το μεταβολισμό της λακτόζης που έχει παραμείνει στο τυρόπηγμα, του γαλακτικού και κιτρικού οξέος
- τη λιπόλυση, δηλαδή την υδρόλυση του λίπους με παραγωγή ελεύθερων λιπαρών οξέων
- την πρωτεόλυση, δηλαδή την υδρόλυση των καζεϊνικών μορίων με παραγωγή ελεύθερων αμινοξέων και πληθώρας άλλων πεπτιδίων.

Η δεύτερη κατηγορία των βιοχημικών διεργασιών της ωρίμασης αφορά τον περαιτέρω μεταβολισμό των προϊόντων της λιπόλυσης και της πρωτεόλυσης οι οποίες έχουν προηγηθεί (ελεύθερα αμινοξέα, λιπαρά οξέα, πεπτιδία) με αποτέλεσμα την δημιουργία των ενώσεων που προσδίδουν στο τυρί τα ιδιαίτερα αρώματα και την γεύση του.

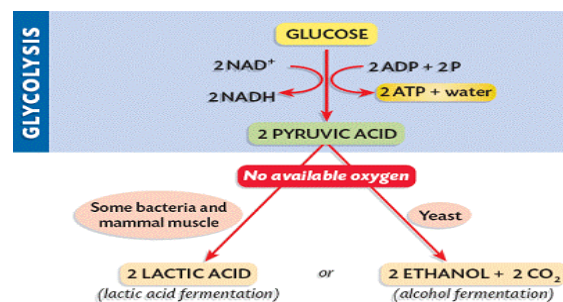
1.3.1. Μεταβολισμός της υπολειμματικής λακτόζης, του γαλακτικού και του κιτρικού οξέος, κατά την ωρίμαση των τυριών

Με τον όρο υπολειμματική λακτόζη, αναφερόμαστε στο ποσοστό ~0,8-1,5% λακτόζης το οποίο δεν έχει απομακρυνθεί με το τυρόγαλα, κατά την τυροκόμηση, και παραμένει στο τυρόπηγμα. Με την προσθήκη της καλλιέργειας εκκίνησης στο γάλα της τυροκόμησης, αρχίζει η μετατροπή της υπολειμματικής λακτόζης σε γαλακτικό οξύ (κυρίως L-ισομερές) από τα οξυγαλακτικά βακτήρια (Εικόνες 1.1 και 1.2). Υπο κανονικές συνθήκες, η υπολειμματική αυτή λακτόζη μεταβολίζεται γρήγορα από τους μικροοργανισμούς του τυριού, για τους οποίους αποτελεί πηγή ενέργειας. Η γρήγορη και πλήρης αποικοδόμηση της υπολειμματικής λακτόζης και των μονοσακχαριτών που προκύπτουν από αυτήν (γλυκόζη και γαλακτόζη) είναι γεγονός θεμελιώδους σημασίας για την παραγωγή ενός τυριού καλής ποιότητας (Fox *et al.*, 1990). Τα οξυγαλακτικά βακτήρια της εναρκτήριας καλλιέργειας, μεταβολίζουν είτε ομοιοζυμωτικά είτε ετεροζυμωτικά την λακτόζη και δίνουν ως τελικά προϊόντα, αποκλειστικά το γαλακτικό οξύ στην πρώτη περίπτωση ή γαλακτικό και οξικό οξύ, αιθανόλη και CO₂ στην δεύτερη περίπτωση. Κατά την διαδικασία αυτή, συσσωρεύονται στα τυριά, εκτός από τα τελικά προϊόντα και ενδιάμεσα προϊόντα, όπως το πυροσταφυλικό οξύ. Κύριο όμως προϊόν του μεταβολισμού της γλυκόζης θεωρείται σε κάθε περίπτωση το γαλακτικό οξύ, είτε στην D- μορφή του, είτε στην L- , είτε σε μίγμα αυτών.

Η ζύμωση της υπολειμματικής γλυκόζης από την εναρκτήρια μικροχλωρίδα εξαρτάται σημαντικά από τον συντελεστή αλατιού του τυροπήγματος και από την αναλογία των πληθυσμών εναρκτήριας / μη εναρκτήριας μικροχλωρίδας (non-starter lactic acid bacteria, NSLAB). Σε τυρόπηγμα με χαμηλό αλάτι στην υγρή φάση και χαμηλό πληθυσμό NSLAB βακτηρίων, η υπολειμματική λακτόζη ζυμώνεται κατά κύριο λόγο από την εναρκτήρια καλλιέργεια. Σε περιπτώσεις υψηλού αριθμού NSLAB βακτηρίων παράγονται σημαντικές ποσότητες γαλακτικού οξέος, κατά ένα μέρος από την ζύμωση της υπολειμματικής λακτόζης και κατά ένα μέρος από την ισομερίωση του L-γαλακτικού οξέος. Σε περιβάλλον υψηλού αλατιού στην υγρή φάση (π.χ. 6%) και με μικρό πληθυσμό NSLAB, η συγκέντρωση της λακτόζης μειώνεται πολύ αργά και δεν παράγονται μεγάλες ποσότητες γαλακτικού οξέος. Η ποιότητα του τυριού επηρεάζεται ιδιαίτερα από την ζύμωση της υπολειμματικής λακτόζης, όπως προκύπτει και από στοιχεία ερευνών των. Μετά το αλάτισμα του τυριού, το pH συνεχίζει να πέφτει πιθανότατα λόγω της συνεχιζόμενης δράσης της εναρκτήριας καλλιέργειας σε περιβάλλον με αλάτι στην υγρή φάση < 5%. Ωστόσο σε περιβάλλον τυροπήγματος με υψηλότερο αλάτι στην υγρή φάση, η δραστηριότητα της εναρκτήριας καλλιέργειας μειώνεται απότομα, όπως προκύπτει από τις υψηλές συγκεντρώσεις υπολειμματικής λακτόζης και από το υψηλό pH με αποτέλεσμα να αλλάζουν τα

χαρακτηριστικά των παραγόμενων τυριών (O'Connor *et al.* 1974). Συνοψίζοντας, η ζύμωση της λακτόζης από την εναρκτήρια καλλιέργεια οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι σημαντική για:

- την παραγωγή γαλακτικού οξέος και τη μείωση του pH η οποία επηρεάζει και την διαδικασία της πήξης.
- την ανάπτυξη της επιθυμητής μικροχλωρίδας.
- τον περαιτέρω μεταβολισμό των αρχικών μεταβολικών προϊόντων των οξυγαλακτικών βακτηρίων προς μόρια που θα προσδώσουν τα ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά κάθε είδους τυριού.



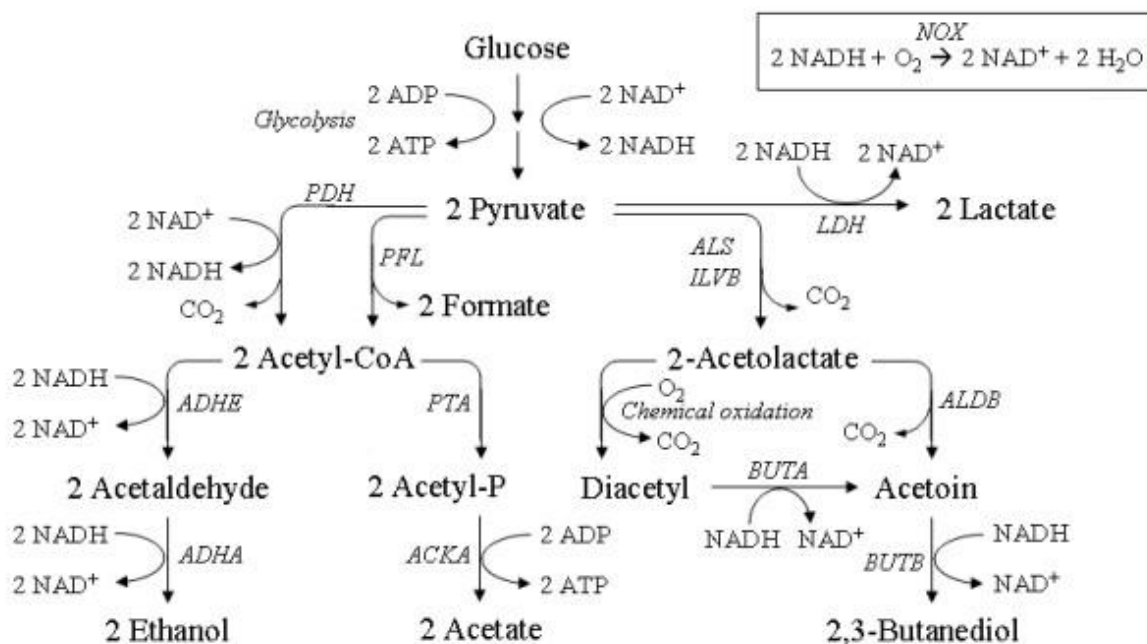
Εικόνα 1.1. Οδοί μεταβολισμού της παραγόμενης γλυκόζης (<http://www.scq.ubc.ca>).

Όσον αφορά το μεταβολισμό του γαλακτικού οξέος, αυτός μπορεί να ακολουθήσει διαφορετική πορεία, ανάλογα κυρίως με την μικροβιακή χλωρίδα που θα το χρησιμοποιήσει ως υπόστρωμα (Fox *et al.* 2000, Noomen 1983):

- Σε πολλά είδη τυριών όπως το Camembert, το Cheddar και τα Swiss παρουσιάζονται μεγάλες συγκεντρώσεις D-γαλακτικού οξέος, γεγονός το οποίο οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η ζύμωση της υπολειμματικής λακτόζης έγινε είτε από γαλακτοβακίλλους είτε μέσω ρακεμοποίησης του L-γαλακτικού οξέος, κάτι που αποδίδεται στην δράση βακτηρίων του γένους *Pediococcus*. Η ρακεμοποίηση του L-γαλακτικού οξέος δεν φαίνεται να έχει συνέπειες στη γεύση των τυριών. Όμως το D-γαλακτικό οξύ ενδέχεται να προκαλέσει διατροφικές διαταραχές σε άτομα πολύ νεαρής ηλικίας, ενώ άμεση τεχνολογική συνέπεια είναι οι κρύσταλλοι που σχηματίζονται σε ορισμένες περιπτώσεις και είναι αισθητοί κατά την μάσηση, μειώνοντας την εμπορική αξία των παραγόμενων τυριών, λόγω του σχηματισμού του D-L-γαλακτικού ασβεστίου, το οποίο είναι λιγότερο διαλυτό από το L-γαλακτικό ασβέστιο.
- Η οξείδωση της λακτόζης προς οξικό οξύ πραγματοποιείται από τους NSLAB πληθυσμούς και εξαρτάται από το διαθέσιμο O₂ που καθορίζεται από το μέγεθος του τυριού και από την διαπερατότητα της συσκευασίας. Το οξικό οξύ μπορεί επίσης να

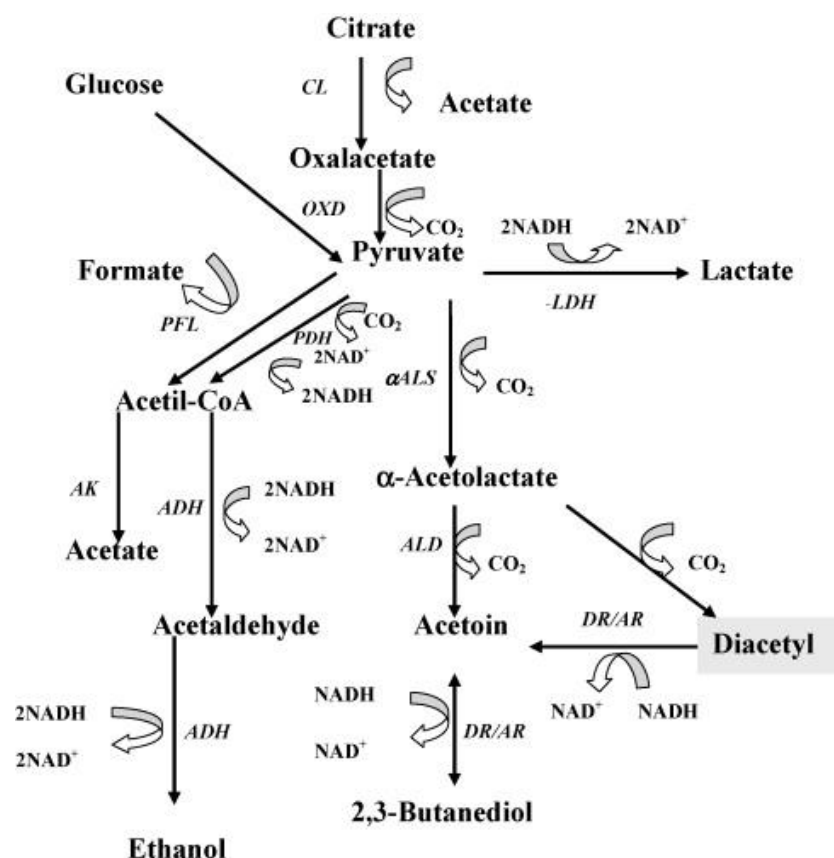
παραχθεί από τις εναρκτήριες καλλιέργειες από την λακτόζη, το κιτρικό οξύ ή από αμινοξέα και είναι συστατικό που βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο τυρί Cheddar και στο οποίο αποδίδεται μεγάλο μέρος της γεύσης και τους αρώματός του, παρόλο που γενικά οι υψηλές συγκεντρώσεις του ενδέχεται να προκαλέσουν και ανεπιθύμητα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.

- Άλλη οδός μεταβολισμού του γαλακτικού οξέος είναι αυτή που ακολουθείται από τα είδη του γένους *Propionibacterium* και έχει ως κύρια προϊόντα μεταβολισμού το προπιονικό και το οξικό οξύ που διαμορφώνουν την γεύση και το άρωμα πολλών τυριών. Επιπλέον είναι χαρακτηριστικό ότι λόγω της συσσώρευσης σε ορισμένα σημεία, των μεγάλων ποσοτήτων παραγόμενου CO₂, στα τυριά αυτά δημιουργούνται χαρακτηριστικές, μεγάλες οπές.
- Μία ανεπιθύμητη για τα παραγόμενα τυριά μεταβολική οδός είναι αυτή που ακολουθούν τα είδη του γένους *Clostridium*, τα οποία παράγουν ως τελικά προϊόντα βουτυρικό οξύ, με την χαρακτηριστική άσχημη οσμή και CO₂ και H₂, αέρια τα οποία προκαλούν ανεπιθύμητα φουσκώματα στα τυριά.
- Ο μεταβολισμός του γαλακτικού οξέος είναι πολύ εκτεταμένος στα είδη τυριών που ωριμάζουν με επιφανειακά αναπτυσσόμενους μύκητες (π.χ. Camembert, Brie). Δευτερεύοντες μικροοργανισμοί σύντομα αποικίζουν και επικρατούν στην επιφάνεια αυτών των τυριών – αρχικά ο *Geotrichum candidum* και ζύμες, ακολουθούμενοι από τον *Penicillium caseicolum* και στις παραδοσιακές παραγωγές από τον *Brevibacterium linens*. Οι οργανισμοί αυτοί μεταβολίζουν γρήγορα το γαλακτικό οξύ σε CO₂ και H₂O, προκαλώντας αύξηση του pH. Μετά την εξάντληση του γαλακτικού οξέος, οι μύκητες μεταβολίζουν τις πρωτεΐνες του τυριού παράγοντας NH₃ και αυξάνοντας περισσότερο το pH. Το αυξημένο pH ευνοεί την δράση της πλασμίνης, η οποία ευθύνεται για την εκτεταμένη πρωτεόλυση σε αυτά τα είδη τυριών. Ο συνδυασμός αυξημένου pH, απώλειας ασβεστίου (απαραίτητου συστατικού για την ακεραιότητα του πρωτεϊνικού δικτύου) και πρωτεόλυσης είναι υπεύθυνα για την ιδιαίτερα μαλακή υφή που συναντάται σε αυτά τα είδη τυριών.



Εικόνα 1.2. Ο μεταβολισμός του πυροσταφυλικού από τον *Lactococcus lactis*. *LDH*: lactate dehydrogenase; *PDH*: pyruvate dehydrogenase complex; *PFL*: pyruvate formate-lyase; *ADHE*: acetaldehyde dehydrogenase; *ADHA*: alcohol dehydrogenase; *PTA*: phosphotransacetylase; *ACKA*: acetate kinase, *ALS/ILVB*: catabolic and anabolic 2-acetolactate synthase; *ALDB*: acetolactate decarboxylase; *BUTA*: diacetyl reductase; *BUTB*: acetoin reductase; *NOX*: NADH oxidase. Από τους Oliveira *et al.* (2005).

Ο μεταβολισμός των κιτρικών (Εικόνα 1.4), παρά τη χαμηλή τους συγκέντρωση στο γάλα (~8 mM), είναι πολύ σημαντικός για την παραγωγή των τυριών. Τα κιτρικά οξέα καταναλώνονται από τους *Lc. lactis* subsp. *diacetylactis* και *Leuconostoc* spp. και τα προϊόντα του μεταβολισμού τους είναι το διακετυλίιο και το CO₂. Επίσης μεταβολίζονται από ορισμένους μεσόφιλους γαλακτοβακίλλους με παραγωγή διακετυλίου και μυρμηγκικού οξέος, η παρουσία του οποίου εξαρτάται από την διαθεσιμότητα σε λακτόζη. Η παραγωγή του CO₂ από τα κιτρικά ευθύνεται για τις χαρακτηριστικές οπές που συναντάμε σε ορισμένα ολλανδικά τυριά όπως το Gouda αλλά και για τα ανεπιθύμητα φουσκώματα που προκαλούν σε αυτά τα τυριά, καταστρέφοντας την συμπαγή εμφάνιση και δομή τους. Το διακετυλίιο αντίθετα, θεωρείται υπεύθυνο για την ιδιαίτερα ευχάριστη γεύση και το άρωμα που προσδίδει σε προϊόντα όπως το Cottage cheese, το Quarg, το Cheddar και πολλά ολλανδικά τυριά και ζυμωμένα προϊόντα γάλακτος (McSweeney & Fox 2004).



Εικόνα 1.4. Μεταβολισμός των κιντρικών από στελέχη του *Leuconostoc* spp. (Από τους Medina *et al.* 2011).

1.3.2. Η πρωτεόλυση κατά την ωρίμαση των τυριών

Η πρωτεόλυση αποτελεί ίσως την πιο σημαντική βιοχημική διεργασία που συντελείται κατά την ωρίμαση των τυριών λόγω των μεγάλων αλλαγών που επιφέρει στα φυσικοχημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους. Κατά την πρωτεόλυση ουσιαστικά, υδρολύονται οι καζεΐνες που αποτελούν τον σκελετό του τυροπήγματος και παράγονται μεγάλα, μεσαία και μικρά πεπτίδια, ελεύθερα αμινοξέα και αμμωνία (NH₃). Η περαιτέρω υδρόλυση των ελεύθερων αμινοξέων δίνει προϊόντα πτητικά που προσδίδουν χαρακτηριστικές γεύσεις και αρώματα στα τυριά. Γενικά, οι αλλαγές που προκαλούνται στην τυρομάζα εξαιτίας της πρωτεόλυσης αφορούν (Law 1987, Fox 1989):

- Στη διαμόρφωση οργανοληπτικών χαρακτηριστικών (γεύσης, οσμής).
- Στην πρόκληση δομικών αλλαγών λόγω της διάσπασης των μυκυλίων, οι οποίες επηρεάζουν την υφή των τυριών αλλά και την γεύση τους καθώς διευκολύνουν την απελευθέρωση γευστικών συστατικών (εμφάνιση, υφή, γεύση).

Πιο ειδικά, η διαμόρφωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, οφείλεται αφενός λόγω στη διάσπαση των πρωταρχικών προϊόντων υδρόλυσης των πρωτεϊνών και αφετέρου στη συσσώρευση αυτών των πρωταρχικών προϊόντων μεταβολισμού, όπως τα πεπτίδια και τα ελεύθερα αμινοξέα. Μάλιστα, κάποια από τα προϊόντα πρωτεόλυσης, ενδέχεται να προκαλέσουν και ελαττώματα στην γεύση των τυριών όπως η πρόκληση πικρής γεύσης (Fox *et al.*, 2000). Σχετικά με τις δομικές αλλαγές στα τυριά, αυτές συμβαίνουν διότι καταρρέει το πρωτεϊνικό πλέγμα του τυροπήγματος και παρατηρείται και αύξηση της ποσότητας του H₂O που δεσμεύεται στις νέοσχηματισθείσες αμινο- και καρβοξυλ-ομάδες από την διάσπαση των πεπτιδίων. Άλλες αλλαγές που επέρχονται κατά την πρωτεόλυση είναι αυτές της αύξησης του pH λόγω της παραγωγής NH₃ και όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η αύξηση των πτητικών και άλλων ενώσεων που απελευθερώνονται κατά την μύσηση.

Κατά τη διάρκεια της ωρίμασης των τυριών, μέσω της διαδικασίας της πρωτεόλυσης, παράγεται πλήθος πεπτιδίων ορισμένα πολλά από τα οποία είναι βιοενεργά και παρουσιάζουν πολλές και διαφορετικών τύπων φυσιολογικές δράσεις. Μερικά από αυτά έχουν παρόμοια μοριακή δομή με ενδογενή πεπτίδια του ανθρώπινου οργανισμού, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο ως ορμόνες, νευροδιαβιβαστές ή αντιβιοτικές ουσίες. Μπορούν είτε να επιβιώσουν της διαδικασίας της πέψης ή να έχουν ρόλο πρόδρομων για τα τελικά βιοενεργά μόρια ή μπορούν να αντιδράσουν με τους ίδιους υποδοχείς που προσδέονται ενδογενή πεπτίδια δρώντας ως συνεργιστικοί ή ανταγωνιστικοί παράγοντες. Η πιο πρόσφατη σχετική ανασκόπηση είναι των López-Exposito *et al.* (2012).

Στη συνέχεια παρουσιάζεται η συμβολή των διαφόρων πρωτεολυτικών παραγόντων που δραστηριοποιούνται στα τυριά.

1.3.2.1. Η υπολειμματική χυμοσίνη

Η υπολειμματική χυμοσίνη του τυριού αποτελεί μόνο το 3-6% της ποσότητας του αρχικού εμβολίου που έγινε στο γάλα της τυροκόμησης καθώς, όπως είναι γνωστό, η χυμοσίνη κατά κύριο λόγο απομακρύνεται με το τυρόγαλα κατά την δημιουργία του πήγματος. Ωστόσο η ποσότητα χυμοσίνης που θα παραμείνει μέσα στο τυρόπηγμα επηρεάζεται και από την θερμοκρασία αναθέρμανσης κατά την τυροκόμηση, τον τύπο της πυτιάς και σε μεγάλο βαθμό και από το pH του τυρογάλακτος, αυξανόμενου του οποίου μειώνεται το ποσοστό παραμονής της στο πήγμα. Επομένως, η ποσότητα υπολειμματικής χυμοσίνης στο τυρί, εξαρτάται από την τεχνολογία παρασκευής τους. Η υπολειμματική χυμοσίνη συμβάλλει στην ωρίμαση των τυριών, ως παράγοντας πρωτεόλυσης και επηρεάζει την δομή και την υφή τους δρώντας επί των καζεϊνικών κλασμάτων του τυροπήγματος ως εξής (Fox *et al.* 2000):

- *α₁-καζεΐνηη*: η χυμοσίηη υδρόλυεη σε πολλαπλά σημεία το μόριο της. Η παρουσία NaCl σε ποσοστό έως 5%, φαίνεται να διεγείρει την υδρόλυση της α₁-καζεΐνης.
- *α₂- καζεΐνη*: η χυμοσίηη δεν έχει εκτεταμένη επίδραση επί της α₂- καζεΐνης, παρουσία των άλλων καζεΐνών.
- *β- καζεΐνη*: η δράση της χυμοσίηης επί της β- καζεΐνης είναι σχετικά περιορισμένη και εντοπισμένη. Αναστέλλεται δε σε μεγάλο βαθμό παρουσία NaCl σε ποσοστό 5% ενώ αναστέλλεται εντελώς παρουσία NaCl 10%. Η παρεμπόδιση αυτή από το NaCl, είναι έντονη στο pH του γάλακτος ενώ σε pH <4,6 μειώνεται.
- *κ- καζεΐνη*: η δράση της χυμοσίηης επί της κ- καζεΐνης, ως γνωστόν, είναι έντονη και ξεκινάει με την προσθήκη της πυτιάς στο γάλα και ουσιαστικά είναι αυτή που προκαλεί την πήξη του γάλακτος λόγω της διάσπασης της κ-καζεΐνης στο δεσμό Phe105-Met106, παρουσία ιόντων Ca⁺².
- *παρα-κ-καζεΐνη*: φαίνεται να παρουσιάζει αντοχή έναντι της δράσης της χυμοσίηης, παρότι υπάρχουν στο μόριό της ευαίσθητες περιοχές.
- *γ- καζεΐνες*: Παρόλο που οι είναι προϊόντα διάσπασης της β- καζεΐνης και επομένως φέρουν τους ίδιους ευαίσθητους δεσμούς απέναντι στην χυμοσίηη, φαίνεται να συσσωρεύονται κατά την διάρκεια της ωρίμασης των τυριών, είναι επομένως πιθανό ότι οι δεσμοί που φέρουν είναι απρόσβλητοι από την χυμοσίηη, όπως είναι και όταν βρίσκονται στην β- καζεΐνη.

1.3.2.2. Ενδογενείς πρωτεΐνάσες του γάλακτος

Το γάλα περιέχει διάφορες ενδογενή πρωτεολυτικά ένζυμα, από τα οποία η πλασμίηη (EC 3.4.21.7.) είναι η κυριότερη (Moatsou 2011). Η πλασμίηη είναι μία πρωτεΐνάση τύπου σερίνης με βέλτιστες συνθήκες δράσης pH 7,5 / 37°C και μεγάλη εξειδίκευση υδρόλυσης στους πεπτιδικούς δεσμούς που περιέχουν λυσίνη και δευτερεύοντως αργινίνη, στο C-αμινοτελικό άκρο. Στην ουσία, στο γάλα, μιλάμε για *σύστημα πλασμίηης*, το οποίο αποτελείται από: την πλασμίηη, τους αναστολείς της πλασμίηης, το πλασμινογόνο, τους ενεργοποιητές του πλασμινογόνου και τους αναστολείς των ενεργοποιητών του πλασμινογόνου. Εξ αυτών, η πλασμίηη και το πλασμινογόνο είναι προσκολλημένα στα καζεΐνικά μικύλλια και ακολουθούν τις καζεΐνες κατά την πήξη του γάλακτος. Αντίθετα, τα υπόλοιπα συστατικά του συστήματος πλασμίηης είναι διαλυμένα στον ορό του γάλακτος και απομακρύνονται με το τυρόγαλα. Η κύρια δράση της πλασμίηης είναι η υδρόλυση της β-καζεΐνης με προϊόντα τις γ-καζεΐνες και τις πρωτεόζες και πεπτόνες (ορός). Δευτερεύοντως η πλασμίηη προσβάλλει το μόριο της α₂-και στην συνέχεια της α₁-καζεΐνης. Η πλασμίηη είναι γενικά πολύ θερμοανθεκτικό ένζυμο και επομένως επιζεί και κατά την διάρκεια της παστερίωσης του γάλακτος της τυροκόμησης. Θεωρείται ότι, εφόσον η πλασμίηη και το

πλασμινογόνο παραμένουν κατά κύριο λόγο στο τυρόπηγμα, συνεισφέρουν σε κάποιο ποσοστό στην ωρίμαση των περισσότερων τυριών και μάλιστα η άποψη αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι η πρωτεολυτική δράση της πλασμίνης είναι περισσότερο εμφανής σε τυριά των οποίων η τεχνολογία τυροκόμησης προβλέπει αναθέρμανση σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες (Sousa *et al.* 2001).

Εκτός της πλασμίνης, στο γάλα περιέχονται και ορισμένες ακόμα πρωτεΐνες, οι λυσισωμικές πρωτεΐνες των σωματικών κυττάρων όπως η καθεψίνη D, η καθεψίνη B, η καθεψίνη K και η ελαστάση. Από όλες αυτές η περισσότερο μελετημένη και μάλλον και πιο σημαντική είναι η πρώτη (Moatsou 2011). Τα ένζυμα αυτά βρίσκονται στα γάλα πιθανότατα απενεργοποιημένα λόγω του υψηλού οξειδοαναγωγικού δυναμικού του, εκτός από την καθεψίνη D. Αυτή η πρωτεΐνη βρίσκεται κυρίως με την μορφή ανενεργής προκαθεψίνης D και η δράση της είναι παρόμοια με εκείνη της χυμοσίνης, δηλαδή υδρολύει επίσης την κ-καζεΐνη προς παρα-κ-καζεΐνη ενώ υδρολύει με τον ίδιο τρόπο και τις β- και α₁-καζεΐνες. Αυτό όμως δεν σημαίνει ότι από μόνη της μπορεί να προκαλέσει πήξη του γάλακτος καθώς θα χρειαζόνταν δεκαπλάσια ποσότητα από αυτήν στην οποία ανευρίσκεται στο γάλα, ~0,4 μg/ml. Το σημαντικό για την ωρίμαση των τυριών σχετικά με αυτή είναι ότι ένα μέρος της επιζεί της παστερίωσης και πιθανόν να επηρεάζει την σταθερότητα των προϊόντων κατά την αποθήκευση. Τέλος, η καθεψίνη B φαίνεται να έχει δράση παρόμοια με της πλασμίνης καθότι υδρολύει πεπτιδικούς δεσμούς της β- και α₁-καζεΐνης σε θέσεις όμοιες ή παρόμοιες με εκείνη και επιπλέον θεωρείται ότι περισσότερο από το 20% της ενεργότητάς της διατηρείται μετά την παστερίωση του γάλακτος.

1.3.2.3. Πρωτεΐνες των οξυγαλακτικών καλλιέργειών και των NSLAB

Οι εναρκτήριοι καλλιέργειες περιλαμβάνουν στελέχη μεσόφιλων γενών/ειδών βακτηρίων όπως τα *Lactococcus* spp. και *Leuconostoc* spp. ή θερμόφιλων όπως οι *Lactobacillus* spp. και ο *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, τα οποία μπορούν να αναπτύσσονται ταχύτατα αυξάνοντας την συγκέντρωση γαλακτικού οξέος στο γάλα της τυροκόμησης. Πέραν των άλλων, η γρήγορη παραγωγή οξέος και η αναπόφευκτη πτώση του pH είναι παράγοντες βασικοί για τον έλεγχο της ανάπτυξης ανεπιθύμητων και παθογόνων βακτηρίων (Fox *et al.* 2000).

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι διατροφικά απαιτητικά και έχουν σύνθετες ανάγκες σε αμινοξέα. Η συγκέντρωση των ελεύθερων αμινοξέων στο γάλα είναι ανεπαρκής για να καλύψει τις ανάγκες ενός μεγάλου αριθμού οξυγαλακτικών βακτηρίων. Για το λόγο αυτό, οι γαλακτόκοκοι διαθέτουν ένα σύστημα πρωτεόλυσης το οποίο περιλαμβάνει την συντονισμένη δράση πρωτεϊνών και πεπτιδασών οι οποίες τελικά υδρολύουν τις πρωτεΐνες

του γάλακτος σε ελεύθερα αμινοξέα, απαραίτητα για την θρέψη τους (Sousa *et al.* 2001). Η άλλη μικροβιακή ομάδα που δραστηριοποιείται στο τυρί, η οποία προέρχεται όχι από εναρκτήρια καλλιέργεια αλλά προϋπήρχε από πριν στο γάλα, είναι τα NSLAB βακτήρια. Η δράση της είναι συμπληρωματική της δράσης των LAB βακτηρίων ως προς την πρόοδο της πρωτεόλυσης στα τυριά. Αρχικά υπάρχουν σε μικρούς σχετικά πληθυσμούς στην τυρομάζα, στην συνέχεια ωστόσο και με την αύξηση των διαθέσιμων θρεπτικών συστατικών λόγω της προϊούσας πρωτεόλυσης, ο αριθμός τους αυξάνεται ($\sim 10^7$ - 10^8 cfu/g) μέχρι να σταθεροποιηθεί περί τις τέσσερις εβδομάδες από την τυροκόμηση. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι στα NSLAB αποδίδεται και μία μικρή αλλά ίσως σημαντική συμβολή στην κατατομή των αρωματικών και γευστικών ενώσεων, λιπολυτική δράση (Fox *et al.* 2000).

1.3.2.4. Πρωτεολυτικοί παράγοντες προερχόμενοι από δευτερεύουσες εναρκτήριες καλλιέργειες ή/και δευτερεύουσα ενδογενή μικροχλωρίδα του γάλακτος

Με τον όρο δευτερεύουσα (εναρκτήρια/ή μη) μικροχλωρίδα του τυριού εννοούμε εκείνους τους μικροοργανισμούς οι οποίοι είτε προστίθενται εκουσίως στο τυρί ή εκείνους των οποίων η ανάπτυξη ενισχύεται προκειμένου τελικά να αποδοθούν επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά στο παραγόμενο προϊόν, όπως αρώματα και γεύσεις. Αναφέρονται μερικά γένη/είδη τέτοιων μικροοργανισμών στον Πίνακα 1.1.

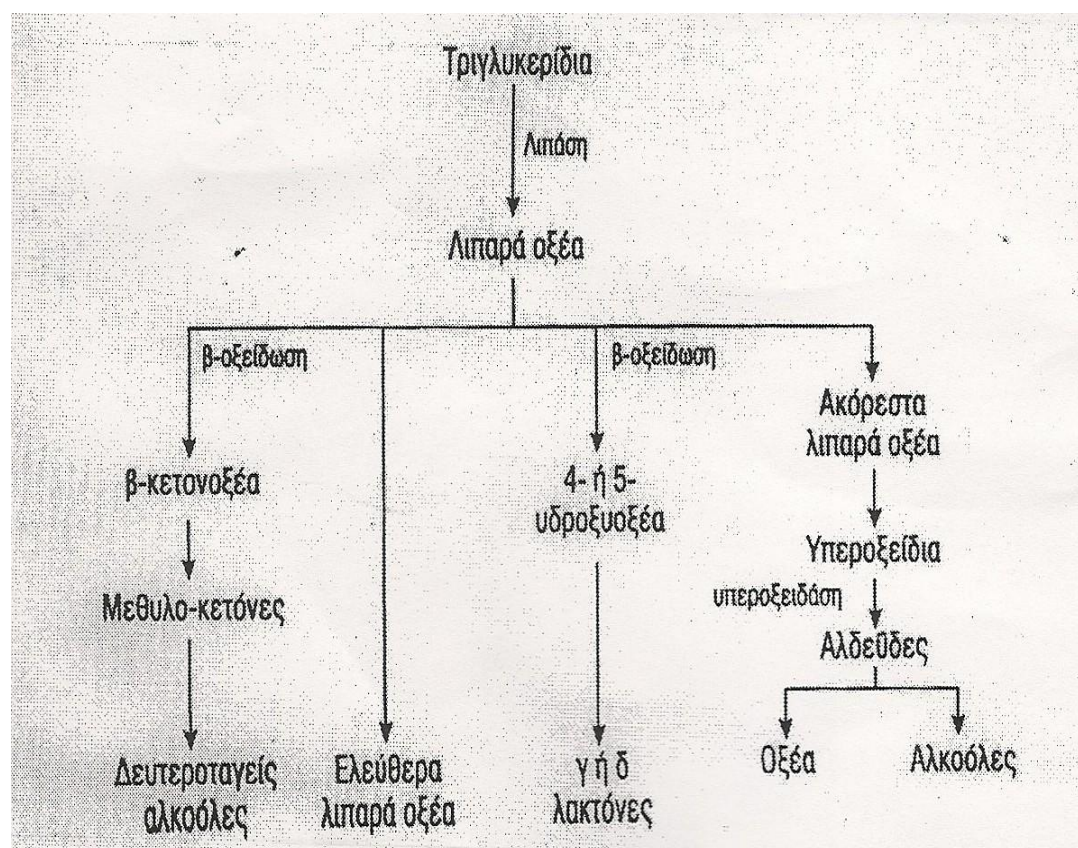
Πίνακας 1.1: Δευτερεύουσα μικροχλωρίδα των τυριών (Από τους McSweeney & Fox 2004).

Μικροοργανισμοί	Κατηγορίες Τυριών	Πρωτεολυτικοί παράγοντες
<i>Brevibacterium linens</i>	Τυριά με επίχρισμα στα οποία επίσης συνυπάρχουν ζύμες, κορυνόμορφα βακτήρια κ.α.	Ενδο- και εξωκυτταρικά πρωτεολυτικά ένζυμα
<i>Prorionobacterium freundenreichii</i>	Τυριά Ελβετικού τύπου	Πεπτιδάσες κυρίως και περιορισμένη δράση πρωτεϊνάσων
<i>Penicillium roqueforti</i> <i>Penicillium camemberti</i>	Roquefort και Camembert	Εξωκυτταρικές πρωτεϊνάσες και πεπτιδάσες.

1.3.3. Η λιπόλυση κατά την ωρίμαση των τυριών

Η ενζυμική λιπόλυση του γάλακτος είναι μία διεργασία με ουσιαστική συμβολή στην διαμόρφωση της γεύσης των γαλακτοκομικών προϊόντων. Όπως είναι γνωστό, το λίπος του γάλακτος αποτελείται κατά 98% από τριγλυκερίδια. Η υδρόλυση των τριγλυκεριδίων (λιπόλυση) αυτών οδηγεί στην παραγωγή ελεύθερων λιπαρών οξέων, μονο- και διγλυκεριδίων και γλυκερόλης. Το λίπος αποτελεί ένα συστατικό σημαντικό από άποψη

αρώματος και γεύσης για τα περισσότερα είδη τυριών, το ποσοστό του και η σημασία του παραλλάσσουν σημαντικά και συνεισφέρει στην γεύση άμεσα ή έμμεσα μέσω της λιπόλυσης (Guinee & Law 2002, Guinee & McSweeney 2006). Τα λιπαρά οξέα μικρής ($C_{4:0} - C_{10:0}$) και μεσαίας αλύσου ($C_{12:0} - C_{16:0}$) είναι εκείνα στα οποία αποδίδονται οι γευστικές ιδιότητες ενώ αντίθετα τα μακράς αλύσου ($>C_{18:0}$) δεν θεωρείται ότι συνεισφέρουν ιδιαίτερα προς την κατεύθυνση αυτή. Επιπρόσθετα, σε μερικά είδη τυριών, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα (free fatty acids ή FFAs) λειτουργούν ως πρόδρομες ουσίες για τον σχηματισμό άλλων αρωματικών ενώσεων για την παραγωγή των οποίων τα FFAs οξειδώνονται προς μεθυλ-κετόνες, οι οποίες δευτερεύοντως μπορεί να αναχθούν σε δευτεροταγείς αλκοόλες απελευθερώνοντας αρώματα στο τυρί (Collins *et al.* 2004). Οι οδοί καταβολισμού των ελεύθερων λιπαρών οξέων παρουσιάζονται στην Εικόνα 1.4.



Εικόνα 1.4. Οδοί καταβολισμού ελεύθερων λιπαρών οξέων στο τυρί (Ανυφαντάκης, 2004).

Οι παράγοντες που σχετίζονται με την λιπόλυση κατά την ωρίμαση είναι σύμφωνα με τους Guinee & McSweeney (2006) οι ακόλουθοι:

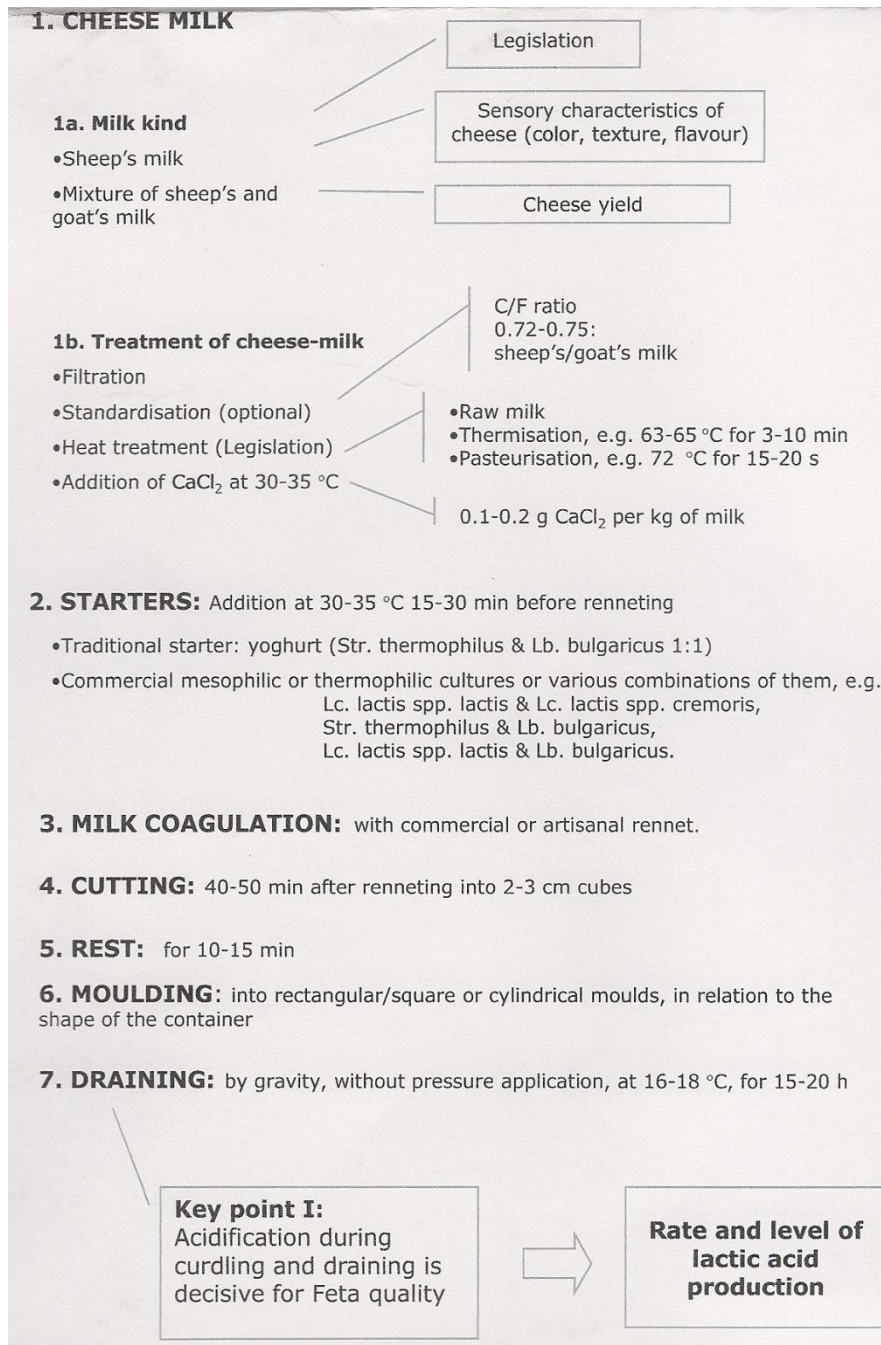
- Τα ενδογενή λιπολυτικά ένζυμα του γάλακτος. Παρόλο που είναι γνωστό ότι στο γάλα περιέχονται λιπολυτικά ένζυμα όπως η λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL) και διάφορες εστεράσες, αυτές, όπως και τα περισσότερα ένζυμα του γάλακτος, αδρανοποιούνται με

τις θερμικές επεξεργασίες. Η LPL αδρανοποιείται σε συνθήκες 73°C/ 30 s. Επομένως, με την παστερίωση απομένουν στο γάλα ελάχιστες ποσότητες του ενζύμου που δεν επηρεάζουν την λιπόλυση κατά την ωρίμαση. Ωστόσο, σύμφωνα με τον Driessen (1989), η LPL προκαλεί σημαντικής έκτασης λιπόλυση στα τυριά που δεν προέρχονται από παστεριωμένο γάλα και μάλιστα παρουσιάζει επιλεκτική δράση στο Sn3 άκρο των λιπαρών οξέων, μιας και το μεγαλύτερο ποσοστό βουτυρικού οξέος στο γάλα είναι εστεροποιημένο στην θέση αυτή. Αυτή ακριβώς η επιλεκτικότητα πιθανότατα εξηγεί την δυσανάλογα μεγάλη συσσώρευση ελεύθερου βουτυρικού οξέος στα τυριά (Fox *et al.* 2000).

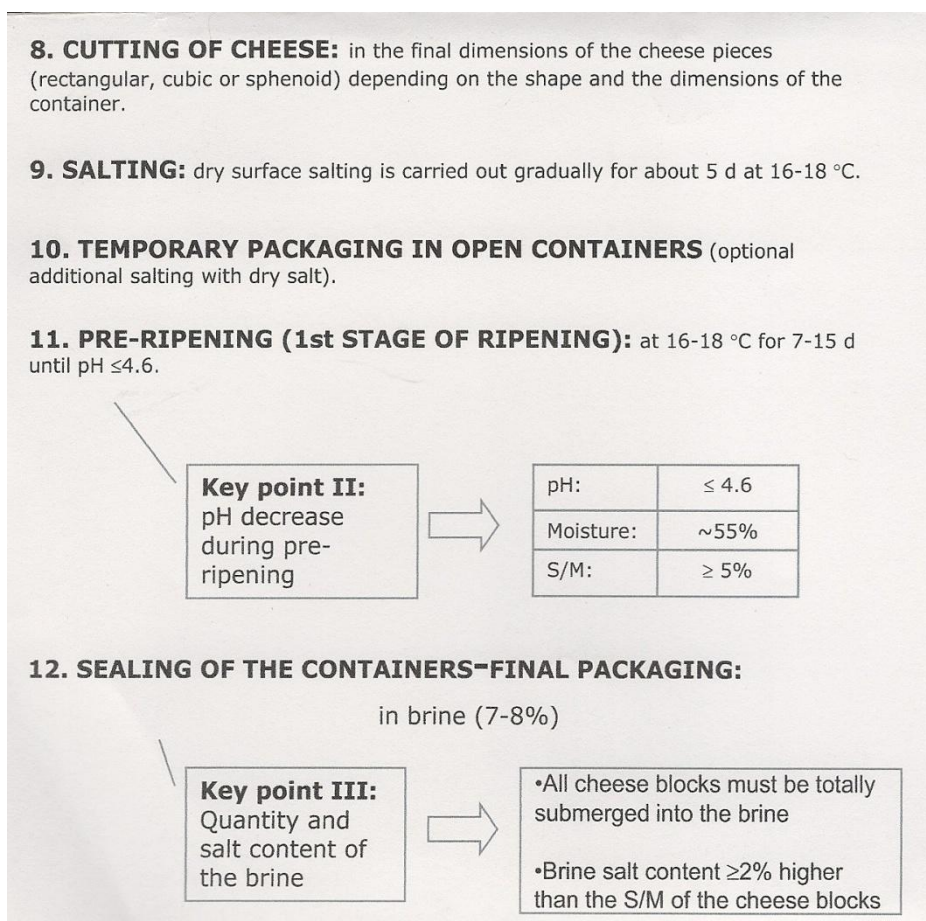
- *Η τυριά ή τα υποκατάστατά της.* Τα τυπικά εμπορικά εκχυλίσματα τυτιάς δεν παρουσιάζουν λιπολυτική δραστηριότητα. Αντιθέτως, η πάστα τυτιάς που χρησιμοποιείται στην παραγωγή ορισμένων τυριών Ιταλικού τύπου, περιέχει ένα λιπολυτικό ένζυμο, την προγαστρική εστεράση (PGE), η οποία σε ορισμένες χώρες προστίθεται στο γάλα τυροκόμησης σε μερικώς απομονωμένη μορφή. Παρόμοιες ιδιότητες έχουν αναφερθεί και για την παραδοσιακή ελληνική τυτιά (Moschoroulou, 2011).
- *Οι εναρκτήριες καλλιέργειες, τα NSLAB καλλιέργειες και οι δευτερεύουσες καλλιέργειες.* Σύμφωνα με τους Collins *et al.* (2003) η λιπολυτική δύναμη των LAB είναι σχετικά ασθενής όμως στους μεγάλους αριθμούς που μπορεί να αναπτυχθούν σε ένα ώριμο τυρί, η δράση των ενδοκυτταρικών τους λιπασών και εστερασών μπορεί να προκαλέσει απελευθέρωση ικανών ποσοτήτων FFA. Αντίστοιχα, οι αναπτυσσόμενοι μύκητες σε κάποια είδη τυριών, χρησιμοποιούν τις εξωκυτταρικές τους λιπάσες για να διασπάσουν το λίπος. Τέλος, σύμφωνα με τους Tzanetakakis *et al.* (1991) στελέχη τους γένους *Pediacoccus*, τα οποία ανήκουν NSLAB βακτήρια, παρουσιάζουν αξιόλογη λιπολυτική και εστερολυτική δράση.
- *Τα εξωγενή λιπολυτικά ένζυμα που ενδεχομένως προστίθενται κατά την τυροκόμηση.*

1.4. Η ωρίμαση της Φέτας

Το τυρί Φέτα που είναι το αντικείμενο της παρούσας μελέτης, ωριμάζει για τουλάχιστον 9 εβδομάδες και τα χαρακτηριστικά της ωρίμασής του, διαμορφώνονται από τις ιδιαιτερότητες της τεχνολογίας παραγωγής της (Εικόνα 1.5). Τα σημεία-κλειδιά που αναφέρονται στη σχηματική αυτή απεικόνιση καθορίζουν την ποιότητα του τελικού προϊόντος. Η μέση υγρασία για τυριά ηλικίας μεταξύ 60 και 120 ημερών είναι ~55%, η λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού ~51%, το ολικό άζωτο ~17,5%, η αναλογία αλατιού προς υγρασία ~5,2% και το μέσο pH~4,6 (Anifantakis & Moatsou 2006, Nega & Moatsou 2012).



Εικόνα 1.5: Σχηματική απεικόνιση των σταδίων παραγωγής της Φέτας (Από τους Moatsou & Govaris 2011).



Εικόνα 1.6 (συνέχεια). Σχηματική απεικόνιση των σταδίων παραγωγής της Φέτας (Από τους Moatsou & Govaris 2011).

Οι παράγοντες και η εξέλιξη της ωρίμασης της Φέτας διαμορφώνονται από:

- Το χαμηλό pH
- Τη σχετικά υψηλή υγρασία
- Την απουσία αναθέρμανσης του τυροπήγματος
- Το επιφανειακό αλάτισμα
- Τις δύο διακριτές φάσεις ωρίμασης σε διαφορετικές θερμοκρασίες
- Την ωρίμαση σε άλμη

Όλες οι σχετικές μελέτες δείχνουν ότι το μεγαλύτερο μέρος των βιοχημικών αλλαγών στη Φέτα πραγματοποιείται κατά το στάδιο της 1^{ης} φάσης ωρίμασης. Στο τέλος της πρώτης φάσης ωρίμασης 30-50% της α_{s1} -καζεΐνης έχει υδρολυθεί ενώ η υδρόλυση της β -καζεΐνης είναι περιορισμένη. Μετά από τρεις μήνες ωρίμανσης, η υπολειπόμενη α_{s1} -καζεΐνη είναι το 1/3 της αρχικής (Katsiari *et al.* 2000, Valsamaki *et al.* 2000, Michaelidou *et al.* 2003, Moatsou *et al.* 2002, 2004). Οι αλλαγές αυτές στη Φέτα και στα λευκά τυριά άλμης αποδίδονται στην υπολειπόμενη χυμοσίνη και στα βακτηριακά πρωτεολυτικά ένζυμα καθώς η φυσικοχημική σύσταση του τυριού δεν είναι ευνοϊκή για την δραστηριότητα της πλασμίνης. Άλλωστε, έχει

παρατηρηθεί ότι η δραστηριότητα της υπολειπόμενης χυμοσίνης στη Φέτα είναι αρκετά υψηλή σε σχέση με άλλες κατηγορίες τυριών (Nega & Moatsou, 2012), εξαιτίας του χαμηλού pH κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης και στράγγισης και της απουσία αναθέρμανσης. Αποτέλεσμα των παραπάνω είναι η έντονη υδρόλυση της α_{s1} -καζεΐνης σε αντίθεση με αυτή της β -καζεΐνης. Τέλος, τα περισσότερα μικρού και μεσαίου μεγέθους πεπτίδια προκύπτουν από τη δράση των βακτηριακών πρωτεασών και πεπτιδασών κατά την πρώτη φάση της ωρίμανσης και αποτελούν τα 2/3 των υδατοδιαλυτών αζωτούχων ουσιών του τυριού (Moatsou & Govaris, 2011).

Η λιπόλυση στη Φέτα αξιολογείται σύμφωνα με το επίπεδο των Ελεύθερων Λιπαρών Οξέων το οποίο μπορεί να κυμαίνεται από 1 έως 10 g ανά κιλό τυριού. Τα κύρια οργανικά οξέα καθ' όλη τη διάρκεια της ωρίμανσης είναι το γαλακτικό, το κιτρικό και το οξικό οξύ. Το οξικό οξύ είναι χαρακτηριστικό της Φέτας και η συγκέντρωσή του αυξάνεται σημαντικά κατά την ωρίμανση και στην ώριμη Φέτα κυμαίνεται από 0,4 ως 1,5 g ανά kg τυριού (Alichanidis *et al.* 1984, Manolaki *et al.* 2006). Πρέπει να σημειωθεί ότι υψηλές τιμές οξικού μέχρι 10 g ανά κιλό τυριού έχουν αναφερθεί από Φέτα με παραδοσιακή πυτιά (Georgala *et al.* 2005).

2. Η ΑΛΜΗ ΣΤΗΝ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΥΡΙΩΝ

2.1. Εισαγωγή

Η άλμη αποτελεί μέσο αλατίσματος για τις περισσότερες κατηγορίες τυριών και μέσο συντήρησης για τα τυριά άλμης. Η χρήση του αλατιού ως μέσο συντήρησης και ως ενισχυτικού της γεύσης των τροφίμων είναι πανάρχαια πρακτική. Στην λεκάνη της Μεσογείου ειδικότερα, η συντήρηση γαλακτοκομικών προϊόντων σε διαλύματα αλατιού έπαιξε σημαντικό ρόλο στην καθημερινή διατροφή, λαμβάνοντας υπόψη την δυσμενή επίδραση των υψηλών θερμοκρασιών της περιοχής στην ασφάλεια των τροφίμων. Με αυτόν τον τρόπο καθιερώθηκαν με το πέρασμα των αιώνων, στην περιοχή αυτή τα τυριά άλμης. Επομένως, ο όρος τυριά άλμης αναφέρεται σε τυριά τα οποία ωριμάζουν και συντηρούνται για ένα σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα μέχρι την κατανάλωσή τους, σε άλμη. Οι μεσογειακές χώρες αλλά και οι γύρω από αυτές χώρες, παράγουν τυριά άλμης με αρκετά κοινά χαρακτηριστικά αλλά και με διαφορές που αφορούν στην τεχνολογία παρασκευής, το μίγμα του γάλακτος της τυροκόμησης και τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά. Η σημαντικότερη κατηγορία τυριών άλμης είναι τα λευκά τυριά άλμης, το τυρόπηγμα των οποίων δεν υφίσταται θερμική επεξεργασία, με κύριο εκπρόσωπο τη Φέτα. Άλλα ελληνικά λευκά τυριά άλμης είναι ο Τελεμές και το Καλαθάκι Λήμνου. Σε κάθε περίπτωση, η σύστασή των τυριών επηρεάζει την αλατοπεριεκτικότητα κι επομένως και την ωρίμαση των τυριών(Πίνακας 2.3) .

Πίνακας 2.3. Αλατοπεριεκτικότητα και υγρασία διαφόρων κατηγοριών τυριών (από τον Bintsis 2006).

Είδος τυριού	Αλατοπεριεκτικότητα%	Υγρασία%
Cottage	0,25 - 1,0	70 - 80
Gouda	1,5 - 2,2	38 - 42
Cheddar	1,75 - 1,95	35 - 39
Domiaty	5,0 - 6,0	51 - 55
Feta	3,5 - 5,0	52 - 58
Teleme	3,0 - 4,7	50 - 55
Fresh Halloumi	2,7 - 3,0	47 - 49
Mature Halloumi	3,8 - 5,7	32 - 35
Parmegiano Regiano	2,0 - 2,5	32 - 34

2.2. Τρόποι αλατίσματος των τυριών

Οι τρόποι αλατίσματος που εφαρμόζονται στην τυροκομία είναι:

- η προσθήκη ξηρού αλατιού στο γάλα τυροκόμησης
- η απευθείας προσθήκη και ανάμειξη του αλατιού στο διαιρεμένο ή αλεσμένο τυρόπηγμα
- το επιφανειακό ξηρό αλάτισμα των κομματιών τυροπήγματος ή φρέσκου τυριού μετά την στράγγιση, που είναι και ο τρόπος αλατίσματος της Φέτας.
- το αλάτισμα σε άλμη όπου το τυρί βυθίζεται σε διάλυμα αλατιού (10-27% NaCl)

Με εξαίρεση το αιγυπτιακό τυρί Domiati, το οποίο παρασκευάζεται από αλατισμένο γάλα, όλα τα τυριά αλατίζονται μετά την προσθήκη της πυτιάς και μετά τον σχηματισμό του τυροπήγματος. Στα τυριά αυτά χρησιμοποιείται ένας ή συνδυαστικά περισσότεροι τρόποι αλατίσματος από αυτούς που αναφέρθηκαν παραπάνω (Bintsis 2006).

Οι αναφορές σχετικά με την καλύτερη μέθοδο αλατίσματος διαφοροποιούνται. Σύμφωνα με τους Bines & Holmes (1994), το αλάτισμα με άλμη προκαλεί γρηγορότερο ρυθμό απορρόφησης αλατιού από το τυρί, προσδίδει πιο ομοιόμορφο αλάτισμα στο τυρί και παράγει τυριά με μεγαλύτερη κατακράτηση υγρασίας, άρα και μεγαλύτερης απόδοσης. Αντιθέτως, ο ρόλος του ξηρού αλατίσματος είναι σημαντικός για την ανάπτυξη της δευτερεύουσας μικροχλωρίδας η οποία συνεισφέρει ιδιαίτερα στην ανάπτυξη των επιθυμητών και χαρακτηριστικών αρωμάτων και γεύσεων των λευκών τυριών άλμης. Αυτό επιβεβαιώνεται και από το γεγονός ότι η βιομηχανική Φέτα, λόγω του ότι παραμένει μικρότερο χρονικό διάστημα στο στάδιο του ξηρού αλατίσματος και μπαίνει νωρίτερα σε διάλυμα άλμης, έχει και πιο ήπια γεύση συγκριτικά με την παραδοσιακά παραγόμενη Φέτα και το ίδιο παρατηρείται και στα παρεμφερή λευκά τυριά τύπου-Φέτας. Επιπλέον, το γρήγορο αλάτισμα με άλμη διακόπτει τις βιοχημικές διεργασίες οι οποίες διενεργούνται κατά την ωρίμαση και το γαλακτικό οξύ που παράγεται από τις εναρκτηρίες καλλιέργειες συσσωρεύεται και έτσι το παραγόμενο τυρί χαρακτηρίζεται από έντονη οξύτητα (Bintsis, 2006).

Ο μηχανισμός του αλατίσματος με άλμη βασίζεται στην αρχή της ώσμωσης. Όπως περιγράφουν οι Guinne & Fox (1986), όταν ένα κομμάτι τυρί βυθίζεται σε διάλυμα χλωριούχου νατρίου, η διαφορά ωσμωτικής πίεσης ανάμεσα στην άλμη και το περιεχόμενο στο τυρί νερό, προκαλεί διάχυση του αλατιού της άλμης εντός του τυριού. Ως συνέπεια αυτού του γεγονότος, το νερό διαχέεται εκτός του τυριού (αφυδάτωση) προκειμένου να αποκατασταθεί η ισορροπία. Η ποσότητα νερού που εξέρχεται από το τυρί είναι περίπου διπλάσια από την ποσότητα αλατιού που εισέρχεται εντός του τυριού (από 1,5 -2,5 φορές περισσότερο), επειδή το μέγεθος του ζεύγους ιόντων Na^+Cl^- είναι περίπου διπλάσιο του μεγέθους του ζεύγους ιόντων H^+OH^- (Guinne & Fox 2004).

Η διείσδυση του αλατιού στο τυρί με ταυτόχρονη εκροή προς την άλμη υγρασίας μαζί με διαλυμένα στην υγρή φάση συστατικά, μπορεί να περιγραφεί ικανοποιητικά ως μία διαδικασία ταυτόχρονης, αλληλο-παρεμποδιζόμενης διάχυσης (Bintsis 2006). Τα μόρια του αλατιού, διαχυμένα εντός του τυριού, θα πρέπει να μεταφερθούν από την εξωτερική επιφάνεια του τυριού στο κέντρο του, διαμέσου της υγρής φάσης του και ξεπερνώντας τα φυσικά εμπόδια που προκύπτουν από τους σχηματισμούς των πρωτεϊνών και του λίπους και αποτελούν τον σκελετό του τυροπήγματος. Δηλαδή όσο πιο αυξημένη υγρασία έχει ένα τυρί, τόσο πιο εύκολα το αλάτι θα φτάσει από την εξωτερική επιφάνεια στο κέντρο του. Για αυτό τον λόγο η περίοδος αλατίσματος των λευκών τυρών άλμης, όπως η Φέτα, που έχουν υψηλή υγρασία, είναι σχετικά σύντομη.

2.2.1. Παράγοντες που επηρεάζουν την πρόσληψη αλατιού από τα τυριά

Η πρόσληψη αλατιού από το τυρί επηρεάζεται από ορισμένους φυσικοχημικούς παράγοντες που αφορούν την άλμη και το ίδιο το τυρί:

- *Η συγκέντρωση της άλμης σε αλάτι και η διάρκεια της περιόδου αλατίσματος.*
Φαίνεται ότι σε ποσοστά συγκέντρωσης της άλμης μεταξύ 5-25%, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της άλμης τόσο αυξάνεται και η απορρόφηση αλατιού από το τυρί (Bintsis 2006). Οι Melilli *et al.* (2003) έδειξαν ότι χρησιμοποιώντας άλμη με 18 g NaCl/100 g αντί για άλμη κορεσμένη σε αλάτι (26 g NaCl/100 g) τις πρώτες ημέρες της περιόδου αλατίσματος το ποσοστό πρόσληψης αλατιού από τα τυριά ήταν μεγαλύτερο στην πρώτη περίπτωση. Η εξήγηση του φαινομένου αυτού σχετίζεται με το πορώδες του αλατιζόμενου τυριού. Η άλμη με υψηλότερο περιεχόμενο προκαλεί ταχύτερη αφυδάτωση κοντά στην επιφάνεια του τυριού με αποτέλεσμα το πορώδες να μειώνεται λόγω της συρρίκνωσης της αρχικής δομής του τυριού που τελικά αποτρέπει την επαρκή διείσδυση της άλμης στο εσωτερικό του τυριού (Bintsis 2006).
- *Η σύνθεση του τυροπήγματος και της άλμης.*
Η υγρασία του τυροπήγματος μεταβάλλεται ανάλογα με το ρυθμό απορρόφησης αλατιού από αυτό. Το περιεχόμενο σε ασβέστιο και το pH της άλμης είναι επιπλέον παράγοντες που επηρεάζουν την απορρόφηση αλατιού από το τυρί. Η υψηλότερη πρόσληψη αλατιού που παρατηρείται σε συνθήκες χαμηλού pH, όπου η συγκέντρωση γαλακτικού οξέος είναι υψηλότερη, συμβαδίζει με μικρότερη απώλεια υγρασίας κατά την διάρκεια της ωρίμασης σε άλμη. Επιπρόσθετα, οι Geurts *et al.* (1972) βρήκαν ότι μία άλμη αλατίσματος με pH παρόμοιο με αυτό του τυριού και με μία συγκέντρωση σε ασβέστιο περί το 0,5-0,6 g/100 g ήταν απαραίτητη προκειμένου να αποφευχθούν ελαττώματα όπως η δημιουργία επιφανειακής, μαλακής κρούστας και η υπερβολική πρόσληψη αλατιού σε τυριά Gouda. Μία από τις πρακτικές που εφαρμόζονται για το τυρί Φέτα και για άλλα

παρόμοια τυριά, είναι η ρύθμιση του pH της άλμης σε 4,6-5,0 και η ρύθμιση αυτή θεωρείται ότι σχετίζεται με την διατηρησιμότητα της Φέτας.

- *Η θερμοκρασία της άλμης*

Η θερμοκρασία της άλμης κυμαίνεται κατά κανόνα, από 4-20°C. Σε γενικές γραμμές, η αυξομείωση της θερμοκρασίας της άλμης επηρεάζει τον ρυθμό διάχυσης της στο εσωτερικό του τυριού και την ποσότητα του απορροφημένου αλατιού. Επιπλέον, το ιξώδες της υγρής φάσης του τυριού εξαρτάται και αυτό από την θερμοκρασία, που σημαίνει ότι οι άλμες χαμηλότερης θερμοκρασίας ευνοούν την αύξηση του ιξώδους άρα και την μικρότερη διείσδυση του αλατιού στην τυρομάζα. Η χαμηλότερη θερμοκρασία μειώνει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών ωστόσο είναι πιθανόν η προκαλούμενη μείωση στον ρυθμό διείσδυσης στην της άλμης στην τυρομάζα να ευνοεί τον πολλαπλασιασμό τους. Είναι επομένως πιθανό ότι ο συνδυασμός χαμηλότερου ποσοστού αλατιού στην άλμη και χαμηλότερης θερμοκρασίας θα μπορούσαν να επιτύχουν την επιθυμητή συγκέντρωση αλατιού στο κέντρο της τυρομάζας με το επιπλέον πλεονέκτημα της καθυστέρησης της ανάπτυξης των ανεπιθύμητων αεριογόνων βακτηρίων στα τυριά. Όμως υπάρχει πάντοτε η πιθανότητα ανάπτυξης / επιβίωσης δυνητικά παθογόνων βακτηρίων σε μικρής συγκέντρωσης άλμες και η οποιαδήποτε αλλαγή στις τεχνολογικές παραμέτρους παραγωγής των τυριών πρέπει να εξετάζεται πολύ προσεκτικά από όλες τις απόψεις (Bintsis 2006).

- *Το μέγεθος και σχήμα του τυριού*

Το σχήμα του τυριού επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τον ρυθμό με τον οποίο αυτό θα αλατιστεί. Τα μικρότερα τυριά και τα επίπεδα σχήματα ευνοούν την γρήγορη διείσδυση του αλατιού στην μάζα τους ενώ αντίθετα τα κυλινδρικού/στρογγυλού σχήματος τυριά και τα μεγάλα μεγέθη, έχουν την αντίθετη επίδραση (Guinee & Fox 1986).

- *Ο λόγος του όγκου της άλμης προς το βάρος του τυριού.*

Η σχέση αυτή επηρεάζει επίσης τον ρυθμό διείσδυσης της άλμης στην τυρομάζα. Θεωρείται ότι από ένα σημείο και πέρα, ο ρυθμός πρόσληψης αλατιού μειώνεται σημαντικά όταν σε συγκεκριμένη ποσότητας άλμης ωριμάζει μεγάλη αναλογικά ποσότητα τυριού (Bintsis 2006).

2.3. Ελαττώματα που σχετίζονται με την άλμη διατήρησης των τυριών άλμης

Η άλμη διατήρησης σχετίζεται συχνά με ορισμένα ελαττώματα που παρουσιάζει η Φέτα και τα λευκά τυριά άλμης. Το θέμα των ελαττωμάτων στα τυριά αυτά παρουσιάζεται στην ανασκόπηση του Alichanidis (2007) σύμφωνα με την οποία, τα κύρια προβλήματα που παρουσιάζονται στα τυριά άλμης, τύπου Φέτας είναι τα ακόλουθα:

- *Το πρώιμο φούσκωμα λόγω αερίων.*

Το ελάττωμα αυτό παρουσιάζεται στα τυριά που ωριμάζουν σε άλμη, κατά την διάρκεια της τυροκόμησης ή κατά την διάρκεια της ωρίμασης και συνίσταται στην δημιουργία μικρών ή μεγαλύτερων οπών λόγω της ανεπιθύμητης δραστηριότητας μικροοργανισμών. Μπορεί να παρατηρηθεί περίπου ένα εικοσιτετράωρο μετά την πήξη του τυριού και χαρακτηρίζεται από την δημιουργία πολλών μικρών οπών που προσδίδει μορφή σπόγγου στο τυρί. Το φαινόμενο προκαλείται από την δραστηριότητα κυρίως κολιβακτηριδίων τα οποία προέρχονται από κακής ποιότητας γάλα τυροκόμησης και αναπτύσσονται ευκολότερα όταν στην τυροκόμηση δεν χρησιμοποιείται εναρκτήρια καλλιέργεια ή χρησιμοποιείται κακής ποιότητας καλλιέργεια, όταν υπάρχουν υπολείμματα αντιβιοτικών ουσιών στο γάλα τυροκόμησης που δεν επιτρέπουν στην εναρκτήρια καλλιέργεια να αναπτυχθεί και όταν γίνεται ανεπαρκής στράγγιση του τυροπήγματος με αποτέλεσμα να μην απομακρύνεται η λακτόζη με το τυρόγαλα και να ζυμώνεται από ανεπιθύμητους μικροοργανισμούς. Το ελάττωμα αυτό μπορεί να εμφανισθεί αργότερα κατά την ωρίμασης και οφείλεται στο γένος *Clostridium*. Άλλα στελέχη που μπορεί να προκαλέσουν πρώιμο φούσκωμα στα τυριά άλμης είναι τα *Escherichia*, *Enterobacter*, *Aerobacter* και *Propionibacterium*.

- *Το φούσκωμα στα δοχεία συσκευασίας των τυριών.*

Το ελάττωμα αυτό αφορά αποκλειστικά και μόνο στη συσκευασία των τυριών (πλαστικά ή λευκοσιδηρά δοχεία) και δεν επηρεάζει την ποιότητα των τυριών. Προκαλείται από αεριογόνους μικροοργανισμούς στην περίπτωση που οι συσκευασίες των τυριών σφραγίζονται πρόωρα ή/και στην αύξηση της θερμοκρασίας κατά την μεταφορά ή αποθήκευση. Το αίτιο του φουσκώματος είναι η παραγωγή αερίων από ετεροζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια, ζύμες ή από τον *Bacillus* spp.

- *Η ιξώδης άλμη.*

Το ελάττωμα της ιξώδους άλμης είναι ελάττωμα το οποίο επηρεάζει την εμφάνιση του τυριού αλλά όχι τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά. Το αίτιο της εμφάνισης της ιξώδους άλμης αποτελεί η παραγωγή εξω-πολυσακχαριτών από βακτηριακά στελέχη όπως των *Lb. planatum*, *Lb. pseudoplantarum*, *Alcaligenes* spp., *Str. thermophilus* και *Lb. bulgaricus* αλλά και από ορισμένα στελέχη των εναρκτήριων καλλιιεργειών.

- *Το λάσπισμα του τυριού.*

Το ελάττωμα αυτό μπορεί να εμφανιστεί σε τυρί με κανονικό pH ~4,6 και υγρασία 56% (σπάνιο φαινόμενο) ή σε τυρί με οξύτητα μεγαλύτερη από την επιθυμητή και υψηλή περιεκτικότητα σε υγρασία (συχνότερο φαινόμενο). Στην πρώτη περίπτωση, το ελάττωμα εμφανίζεται όταν η συγκέντρωση αλατιού στην άλμη συντήρησης είναι μικρότερη ή ίση με τη συγκέντρωση αλατιού στην υγρή φάση του τυριού.

- *Η ανάπτυξη μυκήτων.*

Αποτέλεσμα της ανάπτυξης μυκήτων είναι η μείωση της εμπορικής αξίας των παραγόμενων τυριών καθώς οι μύκητες προκαλούν αποχρωματισμούς στην επιφάνειά τους και ανάπτυξη χρωματικών κηλίδων που μπορεί να είναι υποκίτρινες, πράσινες ή κυανόχρωμες ενώ ταυτόχρονα επηρεάζουν την γεύση και οσμή των τυριών. Συνήθως το πρόβλημα ξεκινάει κατά την διαίρεση του τυροπήγματος, με επιμόλυνση της τυρομάζας με κάποιον από τους μικροοργανισμούς των γενών *Penicillium*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium* και *Geotrichum*. Το ελάττωμα αυτό εμφανίζεται όταν τα τυριά άλμης δεν είναι εντελώς βυθισμένα σε αυτήν, κάτι σχεδόν αδύνατο για τις σημερινές συνθήκες παραγωγής.

Εκτός από τα ελαττώματα που παρουσιάζονται στα τυριά άλμης όμως, έχουν παρατηρηθεί και ορισμένες αλλοιώσεις της άλμης αλατίσματος, τις οποίες ο Ανυφαντάκης (2004) συνοψίζει:

- *Οσμή τάγγισης.* Προκαλείται από την οξειδωση του λίπους.
- *Οσμή τυριού.* Προκαλείται από την πρωτεόλυση των καζεϊνών που έχουν διαχυθεί στην άλμη. Εάν οι καζεΐνες απομακρυνθούν, το πρόβλημα είναι αναστρέψιμο. Η απομάκρυνση υλοποιείται είτε με διήθηση είτε με κατακρήμνιση.
- *Οσμή σήψης.* Προκαλείται από την αλλοίωση των πρωτεϊνών που έχουν διαχυθεί στην άλμη με αποτέλεσμα την παραγωγή H_2S . Το πρόβλημα αντιμετωπίζεται με αλλαγή της άλμης και με τον έλεγχο του pH και της θερμοκρασίας.
- *Οσμή φρούτου.* Προκαλείται από τον καταβολισμό του λίπους που έχει διαχυθεί στην άλμη από τους μικροοργανισμούς.

2.4. Ο ρόλος τους αλατιού στην ωρίμαση των τυριών

Το ποσοστό του αλατιού στο τυρί επηρεάζει πολλά φυσικοχημικά, βιοχημικά και μικροβιολογικά χαρακτηριστικά του κατά την ωρίμαση. Οι αλλαγές αυτές που προκαλούνται από την περιεκτικότητα σε αλάτι είναι που εξασφαλίζουν την διατηρησιμότητα των τυριών και το περιβάλλον ανάπτυξης των ιδιαίτερων για κάθε τύπο τυριού, οργανοληπτικών και φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του (Bintsis, 2006, Εικόνα 2.8). Κατά την ωρίμαση των τυριών, το αλάτι δρα ως εξής (Guinee & Fox 1986):

- επηρεάζει την ανάπτυξη και επιβίωση των μικροοργανισμών
- επηρεάζει την δραστηριότητα των ενζύμων (ενδογενών του γάλακτος, ενζύμων της πυτιάς, ενζύμων εναρκτήριων και NSLAB καλλιεργείων)

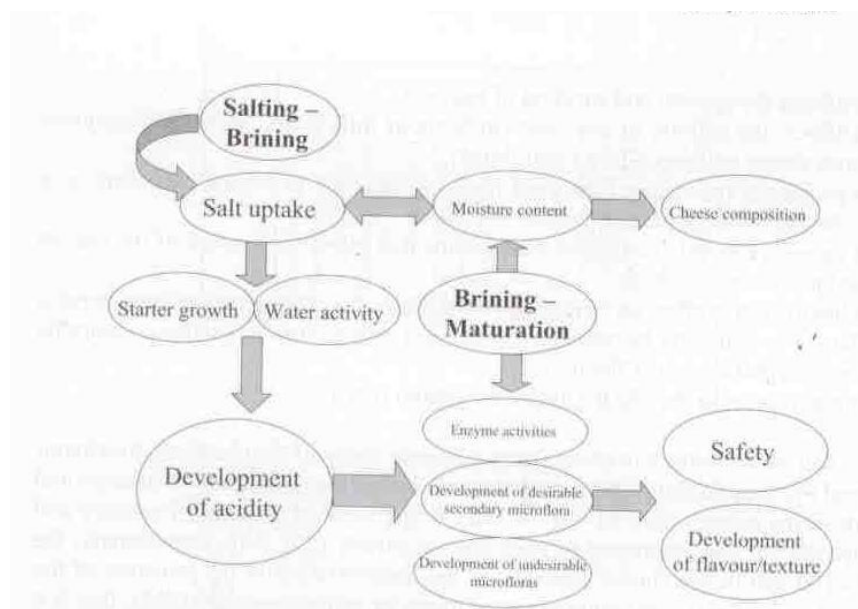
- προκαλεί την συναίρεση του τυροπήγματος με αποτέλεσμα την αποβολή ορού και επομένως, την μείωση του επιπέδου υγρασίας του τυριού
- προκαλεί αλλαγές στις πρωτεΐνες που με την σειρά τους επηρεάζουν την υφή του τυριού και την διαλυτότητα των πρωτεϊνών.
- έχει θετική επίπτωση στη γεύση και το άρωμα, είτε άμεσα είτε έμμεσα καλύπτοντας δυσάρεστες γεύσεις και αρώματα αποτρέποντας παράλληλα την ανάπτυξη αυτών των ανεπιθύμητων μικροοργανισμών που προκαλούν αυτού του είδους τις γεύσεις και τα αρώματα.
- συνεισφέρει στην καθημερινή πρόσληψη νατρίου από τον ανθρώπινο οργανισμό.

Επιπλέον των προηγούμενων, το NaCl της άλμης επιδρά και στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών του τυροπήγματος. Οι σχετικές πληροφορίες έχουν συνοψισθεί από τον Bintsis (2006). Η έκταση της επίδρασης του NaCl επί των πρωτεϊνών είναι ανάλογη με την ποσότητα στην οποία αυτό προστίθεται και αντιστρόφως ανάλογη με την αύξηση της ενεργότητας του νερού. Ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης του με το παρακαζεϊνικό σύμπλεγμα, η δεσμευμένη ποσότητα υγρασίας μειώνεται. Αυτό ο γεγονός με την σειρά του προκαλεί αύξηση στην συνεκτικότητα του τυροπήγματος αλλά μειώνει την ελαστικότητα και την πλαστικότητα του. Η επίδραση του NaCl ή του συνδυασμού NaCl και γαλακτικού οξέος σε μοντέλο προσομοίωσης ενός μαλακού τυριού καθώς και σε σύμπλεγμα παρα-καζεϊνης και φωσφορικών αλάτων, ήταν η απελευθέρωση σημαντικών ποσοτήτων φωσφορικού ασβεστίου και μικρών ποσοτήτων παρακαζεϊνικού ασβεστίου, αντίστοιχα. Τέλος, σύμφωνα με τους Geurts et al. (1974) το ποσοστό του NaCl που αλληλεπιδρά με τα παρα-καζεϊνικά μόρια εξαρτάται από την ποσότητά του, το pH και τα ιόντα Ca^{2+} .

2.5. Η σύσταση της άλμης των τυριών άλμης

Με την προσθήκη φρέσκιας άλμης στα τυριά άλμης, η άλμη προοδευτικά εμπλουτίζεται με διάφορες διαλυμένες ουσίες, προερχόμενες κυρίως από το τυρί αλλά πιθανά και από το χρησιμοποιούμενο νερό, εάν αυτό δεν είναι επαρκώς καθαρισμένο. Παράλληλα, πραγματοποιείται και μία αργή αραίωση της άλμης λόγω της κατακράτησης αλατιού από την τυρομάζα. Κατά τα πρώτα στάδια της ωρίμασης, παρατηρείται μία ανταλλαγή υδατοδιαλυτών συστατικών ανάμεσα στην τυρομάζα και στην αντίστοιχη άλμη, ενώ αργότερα αποκαθίσταται μία σχετική ισορροπία στην ανταλλαγή αυτή. Επιπλέον, στα πρώτα στάδια ωρίμασης, η άλμη μπορεί να προκαλέσει τον σχηματισμό επιδερμίδας στα τυριά εξαιτίας της παρουσίας του αλατιού. Προς αποφυγή αυτού του ανεπιθύμητου φαινομένου, συχνά κατά την προσθήκη της φρέσκιας άλμης στα τυριά, προστίθεται προηγουμένως στην

άλμη και άνυδρο γλωριούχο ασβέστιο (CaCl_2) σε αναλογία 0,5 kg/100 L άλμης. Ωστόσο τα λευκά τυριά άλμης, τα οποία ωριμάζοντας σε άλμες μπορεί να προσλάβουν υγρασία από αυτές κατά την διάρκεια της περιόδου ωρίμασης (Alichanidis 2007, Pappas *et al.* 1996). Σε γενικές γραμμές, η άλμη των τυριών άλμης περιέχει αλάτι (NaCl), πρωτεΐνες του γάλακτος, λίπος του γάλακτος, λακτόζη, γαλακτικό οξύ και νερό. (Bintsis *et al.* 2000).



Εικόνα 2.1: Κύριες επιδράσεις του αλατίσματος και της διατήρησης σε άλμη στα τυριά άλμης (από τον Bintsis 2006).

Ο ρόλος της άλμης διατήρησης στα τυριά άλμης δεν αφορά μόνο στην συντήρηση του τροφίμου για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα αλλά επιτελεί πολλαπλό ρόλο (Εικόνα 2.1). Καταρχήν, λόγω του αλατιού και ανάλογα με τη συγκέντρωσή του (συνήθως 7-8% στην άλμη Φέτας) ενισχύει την απομάκρυνση της υγρασίας έτσι ώστε το τυρί να σταθεροποιήσει την περιεκτικότητά του σε υγρασία στα επιθυμητά επίπεδα (56% μέγιστη για τη Φέτα). Επιπλέον, η άλμη συντήρησης επιτρέπει τον έλεγχο της ανάπτυξης της μικροχλωρίδας, ποσοτικά και ποιοτικά ανάλογα με το σημείο της ωρίμασης κατά το οποίο ένα τυρί άλμης «μπαίνει» στην άλμη συντήρησης. Για παράδειγμα στην περίπτωση της Φέτας, μετά τον σχηματισμό του τυροπήγματος και την στράγγισή του (δηλαδή το ελάχιστο 24 ώρες από την προσθήκη της καλλιέργειας και της πυτιάς), γίνεται το επιφανειακό αλάτισμα επιτρέποντας στα ένζυμα της πυτιάς αλλά και στους μικροοργανισμούς της εναρκτήριας καλλιέργειας να αναπτυχθούν και να δράσουν, πριν η προσθήκη αλατιού ανακόψει την ανάπτυξή τους. Η τοποθέτηση του τυριού στην άλμη γίνεται σε δεύτερο στάδιο αφού έχει επιτευχθεί η οξίνιση και η αποβολή υγρασίας. Τέλος, η άλμη συντήρησης εξαιτίας του NaCl που περιέχει

αναστέλλει αντίστοιχα και την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών και παίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της ωρίμασης επιδρώντας στους διάφορους βιοχημικούς παράγοντες που σχετίζονται με αυτή (Μπίντσης & Παπαδήμας 2009).

Β΄: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Πειραματικές τυροκομήσεις και δειγματοληψία

Πραγματοποιήθηκαν τρεις τυροκομήσεις, σε τρεις διαδοχικές ημέρες χρησιμοποιώντας 50 kg νωπό, πρόβειο γάλα (pH 6,60) από τις εγκαταστάσεις του Γ.Π.Α., η σύσταση του οποίου προσδιοριζόταν σε αυτόματο αναλυτή υπερύθρου (Milkoscan 133, Foss Electric Denmark). Με βάση τα αποτελέσματα της ανάλυσης γινόταν αποκορύφωση ποσότητας γάλακτος, τόσης ώστε η αναλογία πρωτεΐνης/λίπος να ισούται με 1,3 (Πίνακας 3.1). Το γάλα παστεριωνόταν στον τυρολέβητα (68 °C για 10 min) και κατόπιν ψυχόταν άμεσα στους 35 °C.

Πίνακας 3.1: Σύσταση του γάλακτος των τυροκομήσεων (μέσος όρος ± τυπική απόκλιση).

Πρόβειο γάλα	pH	Λίπος %	Πρωτεΐνη %	Λακτόζη %	ΣΥΑΛ %	Πρωτεΐνη / Λίπος
Νωπό	6,65±0,04	4,65±0,06	4,91±0,08	5,25±0,05	10,98±0,11	1,06±0,03
Τυποποιημένο	6,47±0,03	3,85±0,04	4,91±0,09	5,41±0,06	11,19±0,19	1,28±0,01

Μετά την ψύξη του παστεριωμένου γάλακτος 36°C γινόταν η προσθήκη χλωριούχου ασβεστίου σε αναλογία 10 g ανά 50 kg γάλακτος, ακολουθούσε η προσθήκη της καλλιέργειας (CHOOZIT MT1 LYO, Danisco) και μετά από 10 min γινόταν η προσθήκη βιοτεχνολογικής πυτιάς (CHY-MAX Powder Extra NB, Chr. Hansen), σε αναλογίες σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Ο μέσος χρόνος (προ)πήξης με αναλογία πυτιάς 1,1 g σε 50 kg ήταν 6 min. Μετά από 35 min μετά την προσθήκη πυτιάς ακολουθούσε η διαίρεση του τυροπήγματος. Το διαιρεμένο τυρόπηγμα παρέμενε σε ηρεμία για 10 min πριν την εισαγωγή του και την τοποθέτησή του στα καλούπια που ολοκληρωνόταν 45 min μετά την προσθήκη της πυτιάς. Μια ώρα αργότερα η θερμοκρασία του τυροπήγματος στα καλούπια ήταν 32° C και το pH 6,5.

Την επόμενη ημέρα, περίπου 24 ώρες μετά την πήξη, το pH των τυριών ήταν 4,85±0,03 και η θερμοκρασία τους ήταν 22°C. Το φρέσκο τυρί κόβονταν σε κομμάτια διαστάσεων περίπου 5 x 7 x 10 cm, τα οποία ζυγίζονταν και συσκευάζονταν μεμονωμένα σε πλαστικούς εμπορικούς περιέκτες των 400 g. Η απόδοση σε λευκό τυρί σε αυτή τη φάση ήταν 13,5%, εκφρασμένη ως ποσοστό της αρχικής ποσότητας γάλακτος. Το αλάτισμα του τυριού γινόταν με επιφανειακή επίστρωση χονδρόκοκκου αλατιού σε ποσοστό ίσο με το 2,3% του βάρους κάθε κομματιού, διασπαρμένο ομοιόμορφα στην επάνω και κάτω επιφάνεια των κομματιών των τυριών. Από

όλες τις πειραματικές τυροκομήσεις προέκυψαν συνολικά 15 συσκευασίες τυριών Α και 15 τυριών Β.

Την τέταρτη ημέρα μετά την τυροκόμηση γινόταν προσθήκη άλμης στις συσκευασίες. Στο σημείο αυτό το pH των τυριών ήταν $4,66 \pm 0,04$ και του τυρογάλακτος που είχε συγκεντρωθεί στις συσκευασίες ήταν $4,78 \pm 0,05$. Τα τυριά κάθε πειράματος χωρίζονταν σε δύο ομάδες. Στη μία ομάδα γινόταν προσθήκη άλμης με 7,5% NaCl (τυριά Α) και στην άλλη προσθήκη άλμης με 7,5 % NaCl και 0,2% CaCl_2 (τυριά Β). Σε όλες τις περιπτώσεις είχε προηγηθεί παστερίωση της άλμης στους 80°C για 5-6 min. Επειδή η παστερίωση γινόταν σε ανοικτό δοχείο η συγκέντρωση της άλμης σε αλάτι μετά το τέλος της παστερίωσης ήταν 7,9%, εξαιτίας της συμπύκνωσης. Το pH των αλμών Α και Β μετά την παστερίωση ήταν 7,50 και 5,50 αντίστοιχα.

Τα τυριά παρέμεναν στον θάλαμο της πρώτης ωρίμασης των $16-17^\circ \text{C}$ μέχρι την 10^η ημέρα, προκειμένου να ολοκληρωθεί η οξίνιση έως pH 4,60. Στη συνέχεια μεταφέρονταν στο ψυγείο για τη δεύτερη φάση της ωρίμασης, μετά από συμπλήρωση με άλμη, ώστε τα τυριά να είναι πλήρως καλυμμένα. Η αναλογία τυριού/άλμη ήταν ~3:1. Κατά τη διάρκεια της ωρίμασης των τυριών, γινόταν τακτικός εξαερισμός των συσκευασιών.

Λαμβάνονταν δείγματα τυριού και άλμης και από τις δύο σειρές τυριών (Α και Β) κατά τη διάρκεια της ωρίμασης. Τα δείγματα ήταν μία μεμονωμένη συσκευασία τυριού κάθε φορά. Συγκεκριμένα, σε κάθε σημείο δειγματοληψίας μετά από τις μετρήσεις βαρών, το κομμάτι του τυριού στεγνωνόταν με διηθητικό χαρτί και υποδιαιρούνταν σε μικρότερα δείγματα, ενώ η άλμη διηθούνταν για την απομάκρυνση μικρών κομματιών τυριών και συλλεγόταν σε φιαλίδια δειγματοληψίας. Τα δείγματα τυριών και άλμης συντηρούνταν στους -25°C για τις περαιτέρω αναλύσεις με εξαίρεση τους προσδιορισμούς υγρασίας και λιποπεριεκτικότητας που γίνονταν άμεσα. Δειγματοληψία έγινε την 4^η, αμέσως πριν την συμπλήρωση άλμης στις συσκευασίες, την 10^η, πριν τη μεταφορά των τυριών στο ψυγείο, την 40^η και την 110^η ημέρα. Η σήμανση των δειγμάτων ήταν κωδικοποιημένη ως $\alpha A/B_X$, α: ο αύξων αριθμός του πειράματος, A/B: η σύσταση της άλμης και X: η ηλικία των τυριών.

3.2. Αναλύσεις

3.2.1. Χημική σύσταση των τυριών

Η υγρασία προσδιορίστηκε εις τριπλούν για κάθε δείγμα με τη μέθοδο της αποξήρασης σε κλίβανο. Αρχικά, γινόταν ξήραση για 20-24 ώρες σε κλίβανο $105 \pm 1^\circ \text{C}$ πορσελάνινων καψών που περιείχαν περίπου 20 g αλάτι και μικρή γυάλινη ράβδο. Οι κάψες αποκτούσαν

θερμοκρασία δωματίου σε ξηραντήριο και ακολουθούσε προσδιορισμός του βάρους τους και του μικτού βάρους μετά την τοποθέτηση περίπου ~3g ομογενοποιημένου τυριού σε ζυγό ακριβείας με ακρίβεια 0,1 mg. Το τυρί αναμιγνυόταν προσεκτικά με το αλάτι με τη βοήθεια της μικρής ράβδου και η κάψες με το περιεχόμενό τους τοποθετούνταν στον κλίβανο $105\pm 1^\circ\text{C}$ έως σταθερού βάρους. Μετά την ξήρανση και την ψύξη των καψών με τον τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω γινόταν νέα ζύγιση ακριβείας. Η υγρασία υπολογιζόταν με βάση τη διαφορά των βαρών πριν και μετά την ξήρανση.

Ο προσδιορισμός της τέφρας που είναι η ποσοτική έκφραση των ανόργανων συστατικών των τυριών γινόταν εις τριπλούν σε δείγματα τυριού βάρους περίπου 3 g με ακρίβεια 0,1 mg, των οποίων η υγρασία είχε απομακρυνθεί μετά από παραμονή στους $105\pm 1^\circ\text{C}$ για ~20 ώρες. Το αποξηραμένο μέσα σε πορσελάνινη κάψα τυρί καιγόταν σε λύχνο Bunsen. Όταν ολοκληρωνόταν η καύση της οργανικής ουσίας (λίπος, πρωτεΐνη), δηλαδή μετά το σβήσιμο της, η αποτέφρωση γινόταν στους $500-550^\circ\text{C}$ για 5,5 ώρες. Το περιεχόμενο των καψών με την λευκή τέφρα, αφού κρύωνε σε ξηραντήριο προσδιοριζόταν με ζύγιση ακριβείας. Οι υπολογισμοί βασίζονταν στη διαφορά των βαρών πριν από την ξήρανση και μετά την αποτέφρωση.

Ο προσδιορισμός της λιποπεριεκτικότητας έγινε τουλάχιστον εις τριπλούν με την ογκομετρική μέθοδο Van Gulik σύμφωνα με το πρότυπο ISO 3433/IDF222 (2008) σε περίπου 3 g δείγματος τυριού, ζυγισμένου με ακρίβεια 0,1 mg, χρησιμοποιώνταςθειικό οξύ ειδικού βάρους 1,53 και ισοαμυλική αλκοόλη για τον σαφή διαχωρισμό του λίπους από τα υπόλοιπα συστατικά του τυριού.

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας των τυριών σε NaCl γινόταν με την ποτενσιομετρική τιτλοδότηση των χλωριόντων, σύμφωνα με το σχετικό IDF/ISO πρότυπο (ISO 5943/IDF 88 2006). Αναλύονταν δείγματα των 3 g τυριού κάθε φορά, που ήταν ζυγισμένα με ακρίβεια mg. Το τυρί διασπείρονταν σε 30 ml θερμού υπερκάθαρου νερού και μετά από οξίνιση της διασποράς με 2,5 ml νιτρικού οξέος 4 M, γινόταν τιτλοδότηση των ιόντων χλωρίου με το διάλυμα 0,1 M νιτρικού αργύρου. Ως τέλος της τιτλοδότησης θεωρούνταν το σημείο που αντιστοιχούσε στη μέγιστη διαφορά δυναμικού που παρατηρείται ανάμεσα σε δυο διαδοχικές και ισόποσες προσθήκες γνωστής ποσότητας (~0,05 ml) διαλύματος νιτρικού αργύρου (AgNO_3) 0,1N. Ταυτόχρονα γινόταν και λευκός προσδιορισμός. Οι υπολογισμοί έγιναν όπως περιγράφεται στο παραπάνω πρότυπο και κάθε δείγμα αναλύθηκε εις διπλούν.

Ο προσδιορισμός του ολικού αζώτου / πρωτεΐνης των τυριών πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Kjeldahl, σύμφωνα με το πρότυπο ISO 17837/IDF 25 (2008). Η ποσότητα του δείγματος που αναλύονταν κάθε φορά ήταν ~0,7 g και κάθε δείγμα αναλύθηκε εις τριπλούν.

3.2.2. Ανάλυση του ανόργανου κλάσματος των τυριών

Τα ανόργανα συστατικά που προσδιορίστηκαν στο τυρί και στις άλμες είναι τα ασβέστιο (Ca), μαγνήσιο (Mg), κάλιο (K) και νάτριο (Na). Ο προσδιορισμός τους έγινε με φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης με φλόγα, μίγματος C₂H₂ / αέρα με όργανο Shimadzu/AA-6800, εφοδιασμένου με αυτόματο δειγματολήπτη Shimadzu/ASC-6100, σύμφωνα με το πρότυπο ISO 8070/IDF 119 (2007). Η απορρόφηση των Ca, Mg, K, Na πραγματοποιήθηκε σε μήκη κύματος 422,7 nm, 285,2 nm, 766,5 nm, 589 nm αντίστοιχα.

Η προετοιμασία των δειγμάτων έγινε με το πρότυπο ISO 8070/IDF 119 (2007). Πρώτο στάδιο ήταν η παρασκευή ενός μητρικού διαλύματος τέφρας, το οποίο περιείχε 40 mg από την τέφρα του διαλυμένα 1 ml νιτρικού οξέος 25% 100 ml με υπερκάθαρο νερό. Η επόμενη (1^η αραιώση) του μητρικού διαλύματος ήταν 5 ml από το μητρικό διάλυμα, 10 ml οξειδίου του λανθανίου για την αποφυγή αλληλεπιδράσεων με άλλα ιόντα (2,7% LaCl₃, σε υπερκάθαρο νερό) και υπερκάθαρο νερό μέχρι τη συμπλήρωση του όγκου των 100 ml. Ακολουθούσαν και άλλες διαδοχικές αραιώσεις κατά περίπτωση και ιδιαίτερα για το νάτριο, του οποίου η συγκέντρωση ήταν υψηλή εξαιτίας του αλατίσματος. Οι αναλύσεις έγιναν εις διπλούν για κάθε δείγμα και ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των στοιχείων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια των καμπυλών αναφοράς που υπολογίστηκαν με πρότυπα διαλύματα για κάθε στοιχείο.

3.2.3. Μελέτη της πρωτεόλυσης των τυριών

3.2.3.1. Παραλαβή του υδατοδιαλυτού εκχυλίσματος των τυριών (ΥΕ)

- Ζυγίζοταν με ακρίβεια σε σωλήνες φυγοκέντρωσης, 1,5 g ομογενοποιημένου τυριού, εις διπλούν και προστίθονταν 5 ml υπερκάθαρου νερού .
- Ακολουθούσε ομογενοποίηση αυτής της διασποράς με ομογενοποιό Ultra Turrax (IKA), για 2 min, στις 9500/min στροφές.
- Ακολουθούσε παραμονή σε υδατόλουτρο υπό ανάδευση στους 40°C για 1 ώρα.
- Η ομογενοποίηση επαναλαμβανόταν όπως προηγουμένως.
- Ακολουθούσε φυγοκέντρωση για 10 min σε 10000 g και στους 4°C.
- Μετά την απομάκρυνση της στερεοποιημένης επιφανειακής στιβάδας του λίπους γινόταν διήθηση από ηθμό Whatman No 42.
- Το διήθημα συλλεγόταν και φυλασσόταν στους -25° C.

3.2.3.2. HPLC ανεστραμμένης φάσης (RP-HPLC)

Εφαρμόστηκε όπως περιγράφεται από τους Moatsou *et al.* (2004). Αναλύθηκε ποσότητα 100 μl από τα ΥΕ των τυριών που είχαν προετοιμασθεί όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.3.1. Οι αναλύσεις έγιναν εις διπλούν και οι συνθήκες ανάλυσης ήταν:

- Στήλη: RP C18 Nucleosil (5 μm, 30nm, 250 × 4.0 mm) και Nucleosil C18 guard column 4 mm × 10 mm)
- Διαλύτης A: 0.1% TFA σε υπερκάθαρο νερό, Διαλύτης B: 0.1% TFA σε μίγμα ακετονιτριλίου και υπερκάθαρου νερού 60:40
- Ταχύτητα ροής: 0,75 ml/min.
- Συνθήκες έκλουσης: 100 % Διαλύτης A για 10 min, 0-80% Διαλύτης B για 80 min, 100% Διαλύτης B για 10 min και εξισορρόπηση με 100% Διαλύτη A για 10 min.
- Το δείγμα ΥΕ (παρ. 3.2.3.2) αραιωνόταν με διαλύτη A σε αναλογία 1:1 και πριν από την ανάλυση γινόταν διήθησή του με φίλτρο σύριγγος με πορώδες 0,45 μm (PVDF, Whatman).
- Ανίχνευση του εκλούσματος: στα 220 nm

3.2.3.3. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης ελεύθερων αμινομάδων - Μέθοδος TNBS (trinitrobenzenesulphonic acid)

Η μέθοδος TNBS που εφαρμόστηκε είναι μια απλή, γρήγορη και ευαίσθητη φωτομετρική μέθοδος που βασίστηκε στην τεχνική της Polychroniadou (1988) και εφαρμόζεται για την παρακολούθηση της πρωτεόλυσης κατά την ωρίμαση των τυριών. Βασίζεται στην αντίδραση των ελεύθερων α-αμινομάδων που συσσωρεύονται από την υδρόλυση των πρωτεϊνών του τυριού στη διάρκεια της ωρίμασης των τυριών. Τα προϊόντα αυτής της αντίδρασης απορροφούν ισχυρά στα 420 nm.

- Δύο υποδείγματα 0,7 g από κάθε δείγμα τυριού ζυγίσθηκαν σε σωλήνες φυγοκέντρωσης.
- Ακολουθούσε προσθήκη 12 ml διαλύματος Borax (0,1M Na₂B₄O₇ σε 0,1M NaOH, pH 9,5) στους σωλήνες φυγοκέντρωσης και θέρμανση υπό ανάδευση στους 45°C για 15 min.
- Φυγοκέντρωση 3000 g για 20 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (~20-22°C).
- 3 ml από κάθε υπερκείμενο αραιώνονται στα 50 ml με νερό σε ογκομετρική φιάλη και γινόταν σχολαστική ανάμιξη.

- Η αντίδραση TNBS γινόταν ως εξής: 1 ml από αυτή την ανάμειξη + 1 ml διάλυμα Borax + 2 ml αντιδραστήριο TNBS συγκέντρωσης 1 mg/ml αναμιγνύονταν σχολαστικά και επωάζονταν στους 37°C για 60 min.
- Η αντίδραση τερματιζόταν με προσθήκη 4 ml διαλύματος 0,1M NaH₂PO₄ + 1,5M NaSO₃.
- Ακολουθούσε μέτρηση στα 420 nm (A420) με λευκό δείγμα στη θέση της κυβέτας αναφοράς. Το λευκό είχε προετοιμασθεί με την ίδια διαδικασία, αλλά αντί για δείγμα τυριού περιείχε νερό.
- Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως mM γλυκίνης και υπολογίστηκαν με βάση πρότυπη καμπύλη που βασιζόταν σε πρότυπα διαλύματα γλυκίνης με συγκεντρώσεις 0-0,5 mM γλυκίνης. Για τις μετρήσεις της πρότυπης εφαρμόστηκε η παραπάνω διαδικασία αντικαθιστώντας το δείγμα τυριού με τα πρότυπα διαλύματα γλυκίνης.

3.3.4. Ρεολογικές ιδιότητες των τυριών

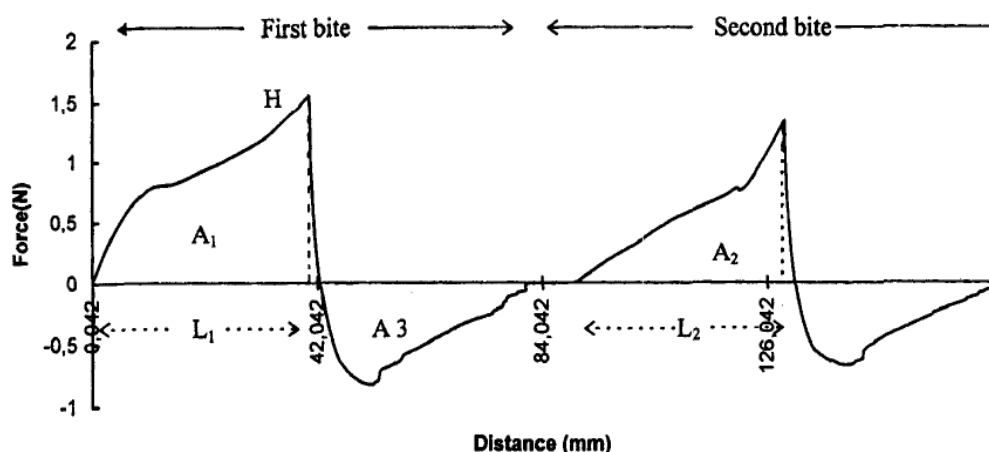
Τα δείγματα όλων των τυριών ηλικίας 40 και 110 ημερών, εξετάστηκαν ως προς τις ρεολογικές τους ιδιότητες. Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε είναι αυτή που αναφέρεται από τους Kaminarides & Stachtiaris (2000) και βασίζεται στη συμπίεση του δείγματος του τυριού με έμβολο σε δύο κύκλους (δαγκωματικές). Η δύναμη που ασκείται από το έμβολο στο δείγμα προκαλεί το τυπικό διάγραμμα συμπίεσης (Εικόνα 3.1). Οι συνθήκες ανάλυσης του δείγματος ήταν:

- Όργανο Shimadzu AGS-500 NG
- Θερμοκρασία δείγματος: ~20° C
- Διάμετρος εμβόλου: 6x6 mm
- Ταχύτητα κεφαλής: 25 mm/min
- Δείγμα: ολόκληρο κομμάτι τυριού (~400 g, αμέσως μετά την έξοδο του από την άλμη και το σκούπισμα με διηθητικό χαρτί).

Από την επεξεργασία των μετρήσεων που καταγράφονταν με το ειδικό λογισμικό προέκυπταν τα εξής ρεολογικά χαρακτηριστικά του τυριού, όπως αναφέρονται από τους Kaminarides & Stachtiaris (2000):

- Σκληρότητα /Hardness (N): είναι η απαιτούμενη δύναμη για να συμπιεστεί ένα τρόφιμο μεταξύ των γομφίων του στόματος και ορίζεται ως η μέγιστη κορυφή κατά την πρώτη συμπίεση του δείγματος
- Συνεκτικότητα/Cohesiveness (N mm): είναι η «ένταση» των δεσμών που συγκρατούν ένα τρόφιμο και ορίζεται ως ο λόγος του εμβαδού της δεύτερης συμπίεσης προς το εμβαδό της πρώτης συμπίεσης, A_2/A_1

- Συγκολλητικότητα/Adhesiveness (N mm): είναι η «ενέργεια» που απαιτείται για να αποκολληθεί ένα τρόφιμο από μια επιφάνεια και ορίζεται ως το εμβαδό της πρώτης αποσυμπίεσης, A_3
- Ελαστικότητα/Elasticity (mm): είναι το μέτρο της δυνατότητας που έχει ένα συμπιεσμένο τρόφιμο να επανέλθει στην αρχική του κατάσταση όταν πάψει να υφίσταται το φορτίο μεταξύ των δύο «δαγκωματιών» και ορίζεται ως ο λόγος L_1/L_2
- Κομμιάδες-Κολλητικότητα/Gumminess (N): η δύναμη που απαιτείται για να «αποσυντεθεί» ένα τρόφιμο ώστε να είναι δυνατή κατάποσή του και ορίζεται ως το γινόμενο της σκληρότητας επί τη συνεκτικότητα, $H \times (A_2/A_1)$
- Μασητικότητα/Chewiness (N): είναι η δύναμη που απαιτείται για να μασηθεί ένα τρόφιμο μέχρι να είναι έτοιμο για κατάποση και ορίζεται ως το γινόμενο της κολλητικότητας επί την ελαστικότητα, $H \times (A_2/A_1) \times (L_2/L_1)$



Εικόνα 3.1: Τυπική καμπύλη ρεολογικής ανάλυσης δείγματος τυριού. H: σκληρότητα, A1: εμβαδό πρώτης συμπίεσης, A2: εμβαδό δεύτερης συμπίεσης, A3: συγκολλητικότητα (Kaminarides & Stachtiaris, 2000)

3.2.5. Αντιοξειδωτικό δυναμικό των τυριών

Τα αντιοξειδωτικά παρεμποδίζουν την οξείδωση άλλων μορίων, η οποία μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ελευθέρων ριζών, οι οποίες με τη σειρά τους μπορούν να προκαλέσουν την έναρξη αλυσιδωτών αντιδράσεων. Εφαρμόστηκαν διαφορετικά πρωτόκολλα για τον προσδιορισμό αντιοξειδωτικής δράσης κατά τη διάρκεια της ωρίμασης στα υδατοδιαλυτά εκχυλίσματα των τυριών (ΥΕ, παρ. 3.2.3.1) τα οποία βασίστηκαν στις

εργασίες των Apostolidis *et al.* (2007), Gupta *et al.* (2009), Karadak *et al.* (2009), McCue & Setty (2005), Meira *et al.* (2012), Pritchard *et al.* (2010) και Unal & Akalin (2012).

3.2.5.1. Δεσμευτική ικανότητα ριζών DPPH[•] (DPPH[•] radical scavenging activity, DPPH[•]-RSA)

Το αντιδραστήριο DPPH[•] (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl ή 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, C₁₈H₁₂N₅O₆) αποτελείται από μόρια σταθερών ελεύθερων ριζών, τα διαλύματα των οποίων έχουν βαθύ ιώδες χρώμα με ένα μέγιστο απορρόφησης στα 517 nm (A517). Είναι το βασικό αντιδραστήριο μιας κοινής δοκιμής για αντιοξειδωτική δράση και χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της «δεσμευτικής ικανότητας ριζών» (radical scavenging activity) σε τρόφιμα ή άλλα υλικά με βιολογική σημασία. Εάν υπάρχει δέσμευση του από πιθανά αντιοξειδωτικά συστατικά των τροφίμων, η ένταση του χρώματος των διαλυμάτων του μειώνεται και παρατηρούνται αντίστοιχες μεταβολές της A517.

- Διάλυμα 1 mM DPPH[•] (D9132, Aldrich) σε μεθανόλη (40mg/100 ml)
- Διάλυμα πρότυπου αντιοξειδωτικού Trolox, 0,25 mg/ml σε μίγμα μεθανόλης/νερού 80:20
- Υδατοδιαλυτό εκχύλισμα των τυριών (YE, παρ. 3.2.3.1) διηθημένο με φίλτρο σύριγγος 0,45 μm (PVDF, Whatman)

Η δοκιμή έγινε με μικροπλακίδια. Σε κάθε θέση τοποθετούνταν 250 μl YE και αμέσως πριν από την έναρξη των φωτομετρικών προσδιορισμών γινόταν σε όλες τις θέσεις προσθήκη 40 μl διαλύματος 1 mM DPPH[•] με πολυκάναλη αυτόματη πιπέττα. Ο προσδιορισμός της απορρόφησης στα 517 nm γινόταν σε φωτόμετρο ELISA (TECAN Sunrise) κάθε 10 min, μέχρι τα 40 min. Ταυτόχρονα γινόταν μετρήσεις σε λευκά δείγματα που περιείχαν μόνο YE και στη θέση του διαλύματος DPPH[•] νερό. Για επιβεβαίωση της εκτέλεσης της δοκιμής ταυτόχρονα γινόταν μέτρηση και σε θέσεις, οι οποίες περιείχαν το διάλυμα DPPH[•] και στη θέση του YE το διάλυμα Trolox. Αντί για την αιθανόλη που είναι ένα συχνά αναφερόμενο μέσο διάλυσης του DPPH[•], χρησιμοποιήθηκε μεθανόλη, λαμβάνοντας υπόψη ότι η αιθανόλη θα αδιαλυτοποιούσε μέρος των πεπτιδίων που περιέχονται στο YE των τυριών. Για να αποφευχθούν τέτοιου είδους προβλήματα, η δοκιμή σχεδιάστηκε έτσι ώστε ο οργανικός διαλύτης (μεθανόλη) να είναι σε χαμηλή συγκέντρωση στο μίγμα των αντιδρώντων (16.7%), ενώ ταυτόχρονα η συγκέντρωση DPPH[•] ήταν 167 mM.

Για τον έλεγχο της επίδρασης της σχετικής συγκέντρωσης των αντιδρώντων στην κάθε θέση, παράλληλα αναλύθηκαν τα ίδια δείγματα με αναλογίες 200 μl YE + 40 μl διαλύματος 1 mM DPPH[•]. Οι δοκιμές αυτές δεν έδωσαν αποτελέσματα που να μπορούν να αξιολογηθούν.

Τα αποτελέσματα με βάση τον συνήθη τρόπο υπολογισμού που παρουσιάζεται στη βιβλιογραφία παρουσίαζαν ασυνέχειες και κρίθηκε ότι και η A517 του ΥΕ του τυριού αυτού καθαυτού επηρεάζει τις μετρήσεις.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι:

- το ΥΕ είναι 5 φορές περισσότερο από το διάλυμα DPPH' στο μίγμα των αντιδρώντων. Επομένως η συμπεριφορά του στα 517 nm μπορεί να καλύπτει τις μεταβολές του DPPH',
- η A517 του ΥΕ αυτή μπορεί να αλλάζει κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, ακολουθώντας την εξέλιξη της πρωτεόλυσης,

η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων βασίστηκε στην μεταβολή της A517 που καταγράφηκε για κάθε συγκεκριμένο δείγμα κατά το χρονικό διάστημα από 0 έως 40 min (t0- t40).

Δηλαδή: %DPPH'-RSA= [(A517_{t0}-A517_{t40})/A517_{t0}] \times 100.

3.2.5.2. Δεσμευτική ικανότητα H₂O₂ (H₂O₂ scavenging activity, H₂O₂-SA)

Η δοκιμή αυτή ανιχνεύει την πιθανή δέσμευση εξωγενώς προστιθέμενου H₂O₂ από αντιοξειδωτικά συστήματα του ΥΕ των τυριών, οποία προσδιορίζεται με βάση τη μεταβολή της απορρόφησης στα 230 nm. Το H₂O₂ παρουσία καταλυτών όπως ο Fe^{2+} μπορεί να αποτελέσει ισχυρό οξειδωτικό παράγοντα διαφόρων βιολογικών συστημάτων, καθώς μπορεί να παραχθούν οι πολύ δραστικές HOO'. Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής:

- 0,1 M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7,4 (14 g K₂HPO₄ +2,7 g KH₂PO₄ σε 1 L H₂O)
- Διάλυμα 43 mM H₂O₂ στο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7,4
- Μητρικό διάλυμα 50 mM H₂O₂ στο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7,4, για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης
- Υδατοδιαλυτό εκχύλισμα των τυριών (ΥΕ, παρ. 3.2.3.1) διηθημένο με φίλτρο σύριγγος 0,45 μm (PVDF, Whatman)

Για την εκτέλεση της δοκιμής αναμιγνύονταν 200 μl του ΥΕ των τυριών με 680 μl από το 0,1 M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7,4 σε erpendorf και αμέσως πριν την μέτρηση της απορρόφησης στα 230 nm (A230), γινόταν η προσθήκη 120 μl του διαλύματος 43 mM H₂O₂. Μετά από καλή ανάμιξη, το μίγμα των αντιδρώντων μεταφερόταν σε μικροκυβέττα χωρητικότητας ενός ml και γινόταν καταγραφή της A230 άμεσα (t0) και μετά από 40 min (t40). Η κυβέττα αναφοράς περιείχε ανάμιξη 200 μl από το αντίστοιχο ΥΕ + 800 μl ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7,4, για να «αφαιρεθεί» η συνεισφορά της A230 των ΥΕ των τυριών στους προσδιορισμούς. Προκαταρκτικές αναλύσεις έδειξαν ότι η A230 αυτών των αναμίξεων κυμαινόταν από 0,780 έως 1,180.

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του H_2O_2 που παρέμενε μετά την αντίδραση υπολογίστηκε σχετική πρότυπη καμπύλη με συγκεντρώσεις 0-40 mM H_2O_2 , που προέκυπταν από αντίστοιχες αραιώσεις του μητρικού 50 mM H_2O_2 στο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 7,4. Η εξίσωση που χρησιμοποιήθηκε στους υπολογισμούς ήταν: $A_{230}=0,0672 \times \text{mM } H_2O_2$, $R=0,999$.

Στον λευκό προσδιορισμό χρησιμοποιήθηκε στη θέση του ΥΕ νερό, επομένως η μέτρηση του λευκού αφορούσε ανάμιξη 200 μl H_2O + 680 μl ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7,4 + 120 μl του διαλύματος 43 mM H_2O_2 . Στην κυβέττα αναφοράς αυτού του λευκού προσδιορισμού ήταν 880 μl ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7,4 + 120 μl του διαλύματος 43 mM H_2O_2 . Η μέση A_{230} στον χρόνο t40 τριών επαναλήψεων του λευκού αυτού προσδιορισμού ήταν 0,355 και δεν επηρεαζόταν από τη διάρκεια αντίδρασης. Τελικά, με βάση την πρότυπη καμπύλη, η συγκέντρωση του λευκού αντιστοιχούσε σε 5,283 mM H_2O_2 .

Οι υπολογισμοί έγιναν με βάση τις μετρήσεις των 40 min (t40), ως εξής:

$$\begin{aligned} \%H_2O_2\text{-SA} &= [100\text{-mM } H_2O_2] / \text{mM } H_2O_2 \text{ λευκού}] \times 100 = \\ &= [100\text{-mM } H_2O_2] / 5,283] \times 100 \end{aligned}$$

3.2.5.3. Δεσμευτική ικανότητα υπεροξειδίων (superoxide scavenging activity, SO-SA)

Η δοκιμή αυτή βασίζεται στη δημιουργία υπεροξειδίων in vitro μέσω της αντίδρασης του phenazin methosulfate (PMS) και nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), η οποία παράγει ρίζες υπεροξειδίων $O_2^{\cdot-}$, παρουσία της χρωστικής nitroblue tetrazolium (NBT). Οι $O_2^{\cdot-}$ ανάγουν την NBT σε formazan. Η τελευταία είναι αδιάλυτη κι έχει χρώμα μπλε-ιώδες. Η αντίδραση αυτή παρεμποδίζεται όταν υπάρχουν αντιοξειδωτικά στο μίγμα των αντιδρώντων, τα οποία μπορούν να δεσμεύουν τις $O_2^{\cdot-}$. Ο προσδιορισμός γίνεται με μέτρηση της απορρόφησης του μίγματος αντιδρώντων στα 560 nm (A_{560}) και η παρουσία αντιοξειδωτικών στο δείγμα που εξετάζεται αναμένεται να μειώνει την απορρόφηση. Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής:

- Διάλυμα 234 μM NADH σε ρυθμιστικό διάλυμα 16 mM Tris-HCl, pH 8,0
- Διάλυμα 150 μM nitroblue tetrazolim (NBT) σε ρυθμιστικό διάλυμα 16 mM Tris-HCl, pH 8,0
- Διάλυμα 30 μM phenazin methosulfate (PMS) σε ρυθμιστικό διάλυμα 16 mM Tris-HCl, pH 8,0
- Υδατοδιαλυτό εκχύλισμα των τυριών (ΥΕ, παρ. 3.2.3.1) διηθημένο με φίλτρο σύριγγος 0,45 μm (PVDF, Whatman)

- Διάλυμα πρότυπου αντιοξειδωτικού Trolox, 0,25 mg/ml σε μίγμα μεθανόλης/νερού 80:20

Η δοκιμή έγινε σε μικροπλακίδια 96 θέσεων στα οποία τοποθετούνταν με τη σειρά 30 ή 50 μl YE των τυριών + 60 μl διαλύματος NADH + 60 μl διαλύματος PMS + 60 μl διαλύματος NBT. Τα τρία τελευταία αντιδραστήρια προσθέτονταν με πολυκάναλη πιπέττα και η μέτρηση A560 ξεκινούσε αμέσως μετά την προσθήκη του NBT. Με βάση δοκιμές που έγιναν πρώτα με κανονικές κυψελίδες φωτομέτρου οπτικής διαδρομής ενός cm αποφασίσθηκε να γίνει η καταγραφή των A560 του μικροπλακιδίου σε 0, 5 και 10 min σε φωτόμετρο ELISA (TECAN Sunrise) Για τον λευκό προσδιορισμό χρησιμοποιήθηκε στη θέση του YE νερό και η μέση A560 ήταν 0,697. Για επιβεβαίωση της εκτέλεσης της δοκιμής ταυτόχρονα γινόταν μέτρηση και σε θέσεις, οι οποίες περιείχαν στη θέση του YE το διάλυμα Trolox.

Οι υπολογισμοί έγιναν με βάση τον τύπο:

$$\%SO-SA = [(A560 \text{ λευκού} - A560 \text{ YE}) / A560 \text{ λευκού}] \times 100$$

Από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων προέκυψε ότι η αντίδραση αναπτύσσεται μέχρι τα 10 min και μέχρι τα 20 min οι A560 παραμένουν σταθερές. Οι σχετικοί υπολογισμοί βασίζονται στις τιμές των 10 min και σε ποσότητα δείγματος YE 50 μl, η οποία έδωσε καλύτερα αποτελέσματα από άποψη επαναληψιμότητας. Η %SO-SA του διαλύματος Trolox ήταν 30%.

3.2.5.4. Ικανότητα χήλωσης Fe^{2+} (Fe^{2+} chelating activity, Fe^{2+} -CA)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί τη φεροζίνη ως χηλωτικό του Fe^{2+} (δεν αντιδρά με Fe^{3+}) που προστίθεται εξωγενώς στο μίγμα της δοκιμής με αποτέλεσμα τη δημιουργία έγχρωμου συμπλόκου. Εάν στα δείγματα των YE των τυριών υπάρχει ικανότητα δέσμευσης Fe^{2+} η ένταση του παραγόμενου χρώματος στα 562 nm (A562) διαφοροποιείται. Η δοκιμή οργανώθηκε με βάση τους Meira *et al.* (2012) και Unal & Akalin (2012).

Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής:

- Διάλυμα 2 mM $FeSO_4$
- Διάλυμα 2,5 mM ferrozine
- Πρότυπο διάλυμα 50 mg/ml EDTA
- Υδατοδιαλυτό εκχύλισμα των τυριών (YE, παρ. 3.2.3.1) διηθημένο με φίλτρο σύριγγος 0,45 μm (PVDF, Whatman)

Η δοκιμή έγινε σε μικροπλακίδια 96 θέσεων στα οποία τοποθετούνταν με τη σειρά 50 μl YE των τυριών + 185 μl υπερκίθαρο νερό + 5 μl διαλύματος $FeSO_4$ + 20 μl διαλύματος ferrozine. Η τελευταία προσθήκη γινόταν με πολυκάναλη πιπέττα ακριβώς πριν από την

τοποθέτηση του πλακιδίου σε φωτόμετρο TECAN Sunrise. Μετά από καλή ανάμιξη επάνω στο όργανο ακολουθούσαν 3 μετρήσεις A562 ανά 10 min (t0, t10 και t20 αντίστοιχα). Ο λευκός προσδιορισμός είχε στη θέση του YE τυριών υπερκάθαρο νερό, ενώ για τον έλεγχο της δοκιμής το YE τυριών αντικαταστάθηκε από το πρότυπο διάλυμα EDTA.

Η μέση A562 του πρότυπου διαλύματος EDTA και του υπερκάθαρου νερού (λευκός προσδιορισμός) παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.2.

Πίνακας 3.2. A562 του πρότυπου διαλύματος 50 mg/ml EDTA και του υπερκάθαρου νερού (λευκός προσδιορισμός).

δείγμα	t0	t10	t20
EDTA	0,027±0,0008	0,027±0,0007	0,027±0,0009
λευκό	0,361±0,100	0,397±0,072	0,416±0,084

Οι υπολογισμοί έγιναν με βάση τον τύπο:

$$\text{Fe}^{2+}\text{-CA} = [(A562 \text{ λευκού} - A562 \text{ YE}) / A562 \text{ λευκού}] \times 100$$

3.2.6. Αναλύσεις της άλμης

Στην άλμη των τυριών των 40 και 110 ημερών προσδιορίστηκαν η περιεκτικότητα σε άζωτο και τα κύρια ανόργανα συστατικά με τις μεθόδους Kjeldahl και ατομικής απορρόφησης που χρησιμοποιήθηκαν για τις αναλύσεις των τυριών (παρ. 3.2.1 και 3.2.2 αντίστοιχα) αφού έγιναν τροποποιήσεις στην προετοιμασία των δειγμάτων.

Για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε άζωτο ζυγίζονταν με ακρίβεια mg περίπου 5 ml διηθημένης άλμης, η οποία αναδεύονταν συνεχώς κατά τη διάρκεια λήψης του δείγματος.

Επιπλέον εφαρμόστηκε η RP-HPLC μέθοδος που αναφέρεται στην παρ. 3.2.3.2 για την ανάλυση των πεπτιδίων της άλμης. Η προετοιμασία του δείγματος περιελάμβανε την αραιώση της άλμης με διάλυμα A σε αναλογία 1:3, φυγοκέντρηση και φιλτράρισμα του υπερκειμένου.

Για τον προσδιορισμό των κύριων αλάτων στην άλμη γινόταν μία προηγούμενη κατεργασία του δείγματος για την απομάκρυνση πρωτεϊνικής φύσης συστατικών. Καταρχήν 5 ml δείγματος διηθημένης άλμης και 5ml τριχλωροξικού οξέος (TCA) 25% αναμιγνύονταν σε σωλήνες φυγοκέντρησης και παρέμεναν σε ηρεμία για δύο ώρες με σκοπό την κατακρήμιση των πρωτεϊνών και πεπτιδίων. Μετά από φυγοκέντρηση στις 4000 g για 10 min στους 25 °C, 6 ml από το υπερκείμενο χρησιμοποιούνταν στην παρασκευή του μητρικού διαλύματος. Πιο συγκεκριμένα, 6 ml υπερκειμένου μεταφέρονταν σε ογκομετρικές φιάλες των 100 ml μαζί με

10 ml νιτρικού οξέος 25% και η συμπλήρωση του όγκου γινόταν με υπερκάρθαρo νερό. Ο προσδιορισμός του ασβεστίου, μαγνησίου, καλίου πραγματοποιούνταν από διάλυμα το οποίο περιείχε 1 ml μητρικού διαλύματος και 5 ml LaCl_3 αραιωμένα στα 50 ml με υπερκάρθαρo νερό (1^η αραιώση). Τέλος, για το νάτριο γινόταν και μία επιπλέον αραιώση ως εξής: 5 ml από την προαναφερθείσα 1^η αραιώση, 5 ml LaCl_3 και υπερκάρθαρo νερό σε ογκομετρικές φιάλες των 50 ml. Στους τελικούς υπολογισμούς λαμβανόταν υπόψη και η αραιώση που είχε προκληθεί στο δείγμα εξαιτίας της προσθήκης TCA.

3.2.7. Οργανοληπτικός έλεγχος των τυριών

Ο οργανοληπτικός έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε τυριά ηλικίας 40 και 110 ημερών. Οι δοκιμαστές καλούνταν να αξιολογήσουν συγκριτικά δύο τυριά (Α και Β) από κάθε πειραματική τυροκόμηση, τα οποία συμβολίζονταν με τυχαίους κωδικούς, και να απαντήσουν στο ερωτηματολόγιο της Εικόνας 3.2. Τα τυριά βαθμολογήθηκαν με κλίμακα 0-10 ως προς: εμφάνιση-χρώμα, υφή-δομή και γεύση-οσμή. Οι βαθμολογίες για τις τρεις αυτές μεταβλητές πολλαπλασιάζονταν με διαφορετικούς συντελεστές βαρύτητας, οι οποίοι ήταν 1, 4 και 5 αντίστοιχα.

3.3. Επεξεργασία αποτελεσμάτων

Η επίδραση των παραγόντων του πειράματος (είδος άλμης, ωρίμαση) στις μεταβλητές που προσδιορίστηκαν 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 $<0,05$ ($P<0,05$). Ο έλεγχος των διαφορών των μέσων όρων έγινε με τη δοκιμή Duncan σε επίπεδο σημαντικότητας 95%. Η στατιστική ανάλυση έγινε με το λογισμικό Statgraphics Centurion XVI.

ΦΥΛΛΟ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ **ΦΕΤΑΣ** (RANKING TEST)

ΟΝΟΜΑ:

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ:

Αξιολογείστε τα παρακάτω δείγματα **Φέτας** ως προς τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά, με κλίμακα 10 σημείων, στην οποία το 10 αντιστοιχεί στο χαρακτηρισμό «εξαιρετικό».

Σημειώστε τη βαθμολογία σας στο αντίστοιχο κελί.

Κωδικός	598	742
ΕΜΦΑΝΙΣΗ-ΧΡΩΜΑ (0-10 βαθμούς)		
ΥΦΗ-ΔΟΜΗ (0-10 βαθμούς)		
ΓΕΥΣΗ-ΟΣΜΗ (0-10 βαθμούς)		

Χαρακτηρίστε με √ την **υφή-δομή** του τυριού:

Κωδικός	598	742
Σκληρή		
Ημισκληρή		
Μαλακή		

Χαρακτηρίστε με √ την **γεύση-οσμή** του τυριού:

Κωδικός	598	742
Ευχάριστα όξινη		
Όξινη		
Πικάντικη		
Ταγγισμένη		
Πικρή		
Αλμυρή		

ΕΠΙΠΛΕΟΝ ΣΧΟΛΙΑ:

Εικόνα 3.2. Φύλλο οργανοληπτικού ελέγχου τυριού Φέτα

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. Σύσταση των τυριών

Ήδη από την 2^η ημέρα το pH των τυριών ήταν πολύ χαμηλό (παρ. 3.1), ως αποτέλεσμα της έντονης γαλακτικής ζύμωσης που οφείλεται στην μεγάλη συγκράτηση υγρασίας κι επομένως και λακτόζης στο τυρόπηγμα, στην απουσία αναθέρμανσης και πίεσης που ευνοούν τη δραστηριότητα των καλλιιεργειών εκκίνησης. Η εξέλιξη της χημικής σύστασης των τυριών Α και Β κατά τη διάρκεια της ωρίμασής τους παρουσιάζεται στον Πίνακα 4.1. Η επίδραση των παραγόντων του πειράματος (σύσταση άλμης και ημέρες ωρίμασης) μελετήθηκε εφαρμόζοντας την ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) δύο διαστάσεων με σκοπό τον προσδιορισμό των αντίστοιχων πιθανοτήτων (P-values) με βάση το λόγο F. Τιμές $P < 0.05$ υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική επίδραση του παράγοντα του πειράματος σε κάθε μία από τις μεταβλητές (π.χ. ξηρή ουσία, λίπος, πρωτεΐνη, τέφρα κτλ) που προσδιορίστηκαν. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.1.1.

Η ξηρή ουσία των τυριών ήταν χαμηλότερη από αυτή της Φέτας και το αντίστροφο ίσχυε για την υγρασία. Σύμφωνα με την υγρασία τους, τα τυριά χαρακτηρίζονται ως μαλακά (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, 2009). Το λίπος επί ξηρού των ώριμων τυριών (>40 ημέρες) κυμαινόταν από $\cong 51-54\%$ που αντιστοιχούσε σε $\cong 22-25\%$ λιποπεριεκτικότητα. Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα των αναλύσεων, το λίπος ήταν το κυρίαρχο στερεό συστατικό των τυριών, αν και στο τυποποιημένο γάλα της τυροκόμησης, η πρωτεΐνη ήταν περισσότερη από το λίπος κατά 30% (Πίνακας 3.1). Η καζεΐνη είναι 75-77% της ολικής πρωτεΐνης στο πρόβειο γάλα και εφόσον στο τυποποιημένο γάλα ο λόγος P/F ήταν 1,28 ο λόγος καζεΐνη/λίπος ήταν $>0,96$. Λαμβάνοντας υπόψη ότι στο τυρόπηγμα συγκρατείται το λίπος, η καζεΐνη και διάφορες ποσότητες πρωτεϊνών του ορού ανάλογα με την υγρασία, ο αντίστοιχος δείκτης P/F στα φρέσκα τουλάχιστον τυριά θα έπρεπε να ήταν $>0,96$. Επομένως, υπήρχαν απώλειες καζεΐνης στο τυρόγαλα, οι οποίες μπορούν να αποδοθούν α) στο σχετικά σύντομο χρόνο (προ)πήξης που παρατηρήθηκε εξαιτίας της μείωσης του pH του γάλακτος της τυροκόμησης που συνέβη κατά τη διάρκεια των χειρισμών της αποκορύφωσης-τυποποίησης και β) στη μη-τυπική αρχική σύσταση του πρόβειου γάλακτος που παραλήφθηκε (Πίνακας 3.1).

Ο παράγοντας «άλμη» δεν επέδρασε στατιστικά σημαντικά στις περισσότερες μεταβλητές του Πίνακα 4.1.1, με εξαίρεση την αλατοπεριεκτικότητα. Αντίθετα, η ωρίμαση είχε σημαντική επίδραση σε όλες τις παραμέτρους σύστασης εκτός από την υγρασία. Συγκεκριμένα, όπως έδειξε η δοκιμή Duncan για τον έλεγχο των διαφορών των μέσων όρων,

οι περισσότερες στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P < 0.05$) των μέσων όρων προέρχονται από τα δείγματα των 10 ημερών. Το σημείο αυτό αντιστοιχεί στο πρώτο στάδιο της ωρίμασης στον θάλαμο της υψηλής θερμοκρασίας 16-18 °C. Ένα από τα χαρακτηριστικά ωρίμασης των τυριών άλμης είναι ότι οι έντονες βιοχημικές αλλαγές παρατηρούνται κατά το στάδιο αυτό (Moatsou & Govaris 2011).

Πίνακας 4.1. Γενική σύσταση (μέσος όρος των τριών πειραμάτων \pm τυπική απόκλιση) των τυριών σε διαφορετικά στάδια της ωρίμασης.

Κωδικός ¹	DM ²	F ³	FDM ⁴	P ⁵	P/F ⁶	MNFS ⁷	Ash ⁸	NaCl ⁹	SiM ¹⁰
AB4	43,36a	21,55a,b,c	49,71a,b	20,63c	0,96b	72,21a,b	3,86a	2,54a	4,28a
	$\pm 0,205$	$\pm 0,868$	$\pm 1,882$	$\pm 0,183$	$\pm 0,035$	$\pm 0,693$	$\pm 0,330$	$\pm 0,476$	$\pm 0,772$
A10	41,79a	20,71a	49,55a,b	19,21b	0,93b	73,41b,c	4,42b	3,39b	5,51b
	$\pm 1,006$	$\pm 0,673$	$\pm 0,423$	$\pm 0,775$	$\pm 0,031$	$\pm 0,651$	$\pm 0,186$	$\pm 0,146$	$\pm 0,135$
B10	43,17a	20,78a,b	48,16a	19,12b	0,92 b	71,73a	4,58b	3,75b,c	6,19c
	$\pm 1,531$	$\pm 0,280$	$\pm 1,081$	$\pm 0,306$	$\pm 0,017$	$\pm 1,679$	$\pm 0,121$	$\pm 0,110$	$\pm 0,204$
A40	43,22a	22,71c,d	52,55c,d	19,11b	0,84b	73,46b,c	4,59b	4,07c,d	6,69c,d
	$\pm 0,380$	$\pm 0,228$	$\pm 0,530$	$\pm 0,282$	$\pm 0,016$	$\pm 0,443$	$\pm 0,126$	$\pm 0,032$	$\pm 0,037$
B40	43,00a	23,06d	53,62d	18,98b	0,82b	74,08c	4,69b	4,28d	6,98d
	$\pm 0,775$	$\pm 0,834$	$\pm 1,888$	$\pm 1,237$	$\pm 0,032$	$\pm 1,074$	$\pm 0,115$	$\pm 0,108$	$\pm 0,101$
A110	42,94a	21,93b,c,d	51,06b,c	16,93a	0,77a	73,08a,b,c	4,41b	4,16d	6,79d
	$\pm 0,631$	$\pm 0,530$	$\pm 0,646$	$\pm 0,284$	$\pm 0,029$	$\pm 0,421$	$\pm 0,105$	$\pm 0,079$	$\pm 0,093$
B110	42,60a	21,66a,b,c	50,85b,c	16,69a	0,77a	73,28a,b,c	4,61b	4,40d	7,11d
	$\pm 0,486$	$\pm 0,723$	$\pm 1,112$	$\pm 0,245$	$\pm 0,018$	$\pm 0,057$	$\pm 0,109$	$\pm 0,135$	$\pm 0,196$

¹ η σήμανση όπως περιγράφεται στην παρ. 3.1

² dry matter, ξηρή ουσία, %

³ fat, λίπος, %

⁴ fat on dry matter, λίπος επί ξηρού, %

⁵ total protein, ολική πρωτεΐνη, %

⁶ protein/fat, ολική πρωτεΐνη/λίπος

⁷ moisture on non-fat fat dry substances, υγρασία επί των μη-λιπαρών συστατικών, %

⁸ τέφρα, %

⁹ αλάτι, %

¹⁰ salt-in-moisture, αλάτι στην υγρή φάση, %

a-d: διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων κάθε στήλης (δοκιμή Duncan, $P < 0.05$).

Πίνακας 4.1.1. Πιθανότητες (P-values) που υπολογίσθηκαν από την ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) των μεταβλητών της γενικής σύστασης ως προς τους παράγοντες «άλμη» και «ημέρες ωρίμασης». Με έντονα γράμματα υποδηλώνονται στατιστικά σημαντικές επιδράσεις. Τα σύμβολα των μεταβλητών όπως στον Πίνακα 4.1.

Παράγοντες	DM	FDM	P	P/F	MNFS	Ash	SiM
άλμη	0,5202	0,7692	0,5650	0,4405	0,5358	0,0615	0,0101
ημέρες	0,5605	0,0002	0,0000	0,0000	0,1436	0,0000	0,0000

Η συζήτηση των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης βασίζεται στη διεθνή βιβλιογραφία σχετικά με τη Φέτα. Η μέση υγρασία για τυριά Φέτα ηλικίας μεταξύ 60 και 120 ημερών είναι ~55%, η λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού ~51%, η ολική πρωτεΐνη ~17,5%, η αναλογία αλατιού προς υγρασία ~5,2% και το μέσο pH~4,6 (Anifantakis & Moatsou 2006, Nega & Moatsou 2012). Στα τυριά που μελετήθηκαν, η υγρασία αλλά και πρωτεΐνη ήταν υψηλότερα στις 40 ημέρες, γεγονός που οφείλεται στην τυποποίηση της σύστασης του γάλακτος που τυροκομήθηκε.

Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 4.1 η ξηρή ουσία παρέμενε πρακτικά σταθερή κατά τη διάρκεια της ωρίμασης, αφού όπως απέδειξε η στατιστική ανάλυση μετά την 4^η ημέρα δεν παρουσιάσθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P>0.05$). Η έντονη οξίνιση των πρώτων 24ώρων προκαλεί μείωση του pH του τυροπήγματος, η οποία προκαλεί και μείωση του αρνητικού φορτίου των καζεϊνών πλησιάζοντας το ισοηλεκτρικό τους σημείο. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, ενισχύονται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους που ευνοούν την αποβολή υγρασίας (McSweeney 2004). Στο τέλος της πρώτης φάσης της ωρίμασης παρατηρήθηκε μία αναμενόμενη για τα τυριά άλμης απορρόφηση υγρασίας από την άλμη, η οποία ήταν εντονότερη στην περίπτωση της άλμης A που δεν είχε ενισχυθεί με ασβέστιο.

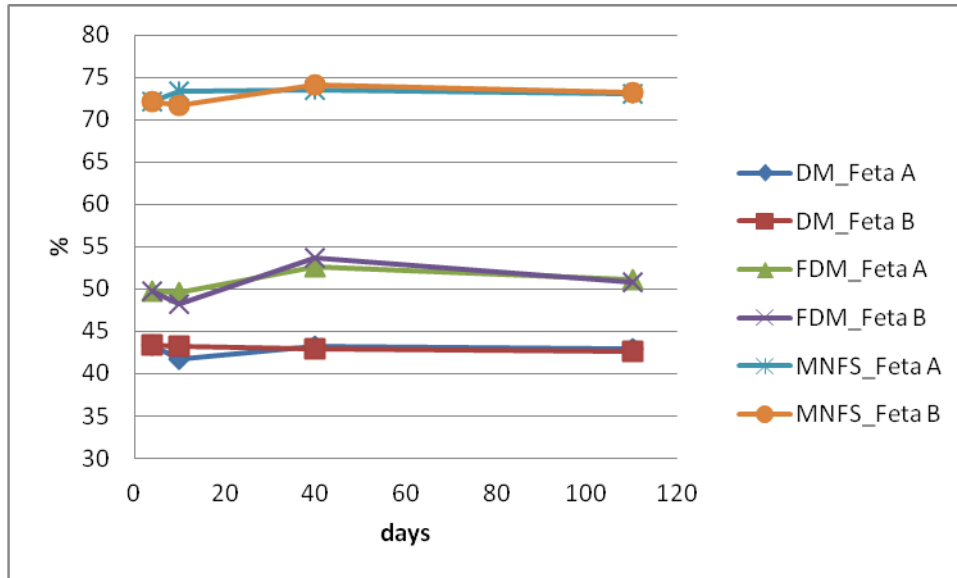
Η παράμετρος MNFS που εκφράζει με πιο αντικειμενικό τρόπο την εξέλιξη της υγρασίας, αφού η λιποπεριεκτικότητα δεν λαμβάνεται υπόψη, εξελίχθηκε αντι-παράλληλα με την ξηρή ουσία και παρέμεινε πρακτικά σταθερή κατά τη διάρκεια της ωρίμασης. Αντίθετα με τις προηγούμενες μεταβλητές, το FDM αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά από το σημείο της έναρξης της δεύτερης φάσης ωρίμασης στις 10 ημέρες κι έπειτα (Πίνακας 4.1, Εικόνα 4.1).

Η μέση αναλογία P/F σε δείγματα Φέτας της αγοράς προσδιορίστηκε ως 0,68 (Nega & Moatsou 2012), δηλαδή πολύ χαμηλότερο από το $\approx 0,8$ των ώριμων τυριών της παρούσας μελέτης. Μάλιστα από τις 40 ημέρες κι έπειτα παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της αναλογίας αυτής, η οποία υποδεικνύει ότι υπάρχει διάχυση αζωτούχων συστατικών στην άλμη διατήρησης με εντονότερο ρυθμό σε σχέση με το λίπος. Το φαινόμενο αυτό

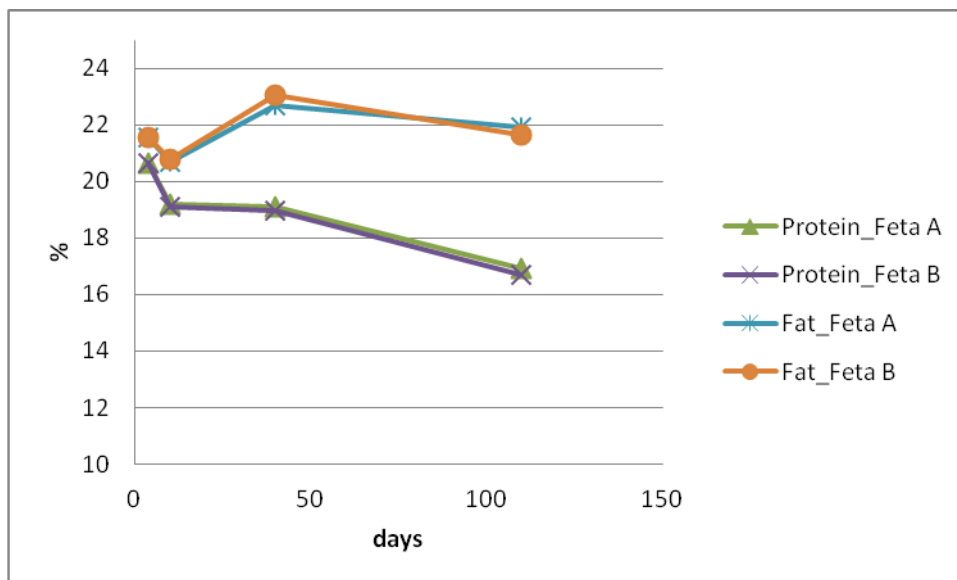
απεικονίζεται στη Εικόνα 4.2, στην οποία φαίνεται ότι ενίσχυση της άλμης Β με ασβέστιο δεν μπόρεσε να περιορίσει τις εκτεταμένες απώλειες σε αζωτούχα συστατικά κατά τη 2^η φάση ωρίμασης στο ψυγείο. Η μείωση των αζωτούχων συστατικών κατά τη διάρκεια της ωρίμασης λευκών τυριών άλμης και Φέτας έχει αναφερθεί και από άλλους ερευνητές (π.χ. Katsiari & Voutsinas 1994, Katsiari *et al.* 2002, Michaelidou *et al.* 2003, 2005).

Το αλάτι % του τυριού ήταν υψηλότερο (Πίνακας 4.1) από το 2,34 % που έχει αναφερθεί για τη Φέτα της αγοράς (Nega & Moatsou 2012). Επειδή η υγρασία των τυριών είναι το πραγματικό περιβάλλον για τις βιοχημικές διεργασίες που πραγματοποιούνται στα τυριά, ο πιο αντικειμενικός τρόπος έκφρασης αυτής της σημαντικής παραμέτρου είναι το αλάτι στην υγρή φάση (SiM) = $\%NaCl \times 100 / \%(υγρασία + NaCl)$. Το SiM ήταν υψηλό (>5%) και παρουσίασε στατιστικά σημαντική αύξηση στα σημεία δειγματοληψίας μέχρι τις 40 ημέρες. Η σχετικά υψηλή υγρασία των τυριών σε σχέση με τη Φέτα ενίσχυσε την απορρόφηση αλατιού από την άλμη συντήρησης (Guinee & Fox 2004). Η έντονη αύξηση της αλατοπεριεκτικότητας μεταξύ 4 και 10 ημερών αντιστοιχίζεται με την στατιστικά σημαντική αύξηση της τέφρας των τυριών (Ash) και απεικονίζεται και στην Εικόνα 4.3. Η τέφρα, η οποία είναι το σύνολο των ανόργανων συστατικών όπως αυτά προκύπτουν μετά την τεφροποίηση του τυριού, το αφθονότερο συστατικό της οποίας είναι το Na εξελισσόταν παράλληλα με το % NaCl κατά την ωρίμαση. Επομένως, η πρόσληψη αλατιού από το φρέσκο τυρί επηρέαζε καθοριστικά και την εξέλιξη των ποσοτικών μεταβολών της τέφρας.

Τελικά, η ενίσχυση της άλμης με ασβέστιο δεν επέδρασε στατιστικά σημαντικά στις παραμέτρους της σύστασης των τυριών και στην εξέλιξή τους και ουσιαστικά «αλγεβρικές» διαφορές εντοπίστηκαν στις 10 ημέρες, οι οποίες στη συνέχεια εξομαλύνθηκαν. Η εξέλιξη της σύστασης των τυριών κατά τη διάρκεια της ωρίμασης και συντήρησής τους ακολούθησε το πρότυπο της Φέτας, δηλαδή έντονες μεταβολές κατά την πρώτη φάση και οριακές αλλαγές μετά τη μεταφορά των τυριών στο ψυγείο.



Εικόνα 4.1. Μεταβολές της ξηρής ουσίας (DM), του λίπους επί ξηρού (FDM) και της υγρασίας επί των μη-λιπαρών συστατικών των τυριών Φέτα κατά τη διάρκεια της ωρίμασης και συντήρησής τους στις άλμες A και B (παρ. 3.1).



Εικόνα 4.2. Μεταβολές της πρωτεΐνης (P) και του λίπους (F) των τυριών Φέτα κατά τη διάρκεια της ωρίμασης και συντήρησής τους στις άλμες A και B (παρ. 3.1).

4.2. Ανόργανο κλάσμα των τυριών

Στον Πίνακα 4.2 παρουσιάζεται η περιεκτικότητα των τυριών στα κύρια ανόργανα στοιχεία στη διάρκεια της ωρίμασης και στην Εικόνα 4.3 παρουσιάζεται η εξέλιξη της περιεκτικότητας σε ασβέστιο εκφρασμένης επί ξηρού παράλληλα με την εξέλιξη της τέφρας και της αλατοπεριεκτικότητας. Με βάση την ANOVA (Πίνακας 4.3), οι δύο παράγοντες του πειράματος αυτού δεν είχαν στατιστικά σημαντική επίδραση στις τιμές του Πίνακα 4.2.

Τα ανόργανα ή μεταλλικά στοιχεία των τυριών προέρχονται από το γάλα της τυροκόμησης. Πηγή επιπλέον ασβεστίου μπορεί να αποτελεί η ενδεχόμενη προσθήκη χλωριούχου ασβεστίου στο γάλα της τυροκόμησης. Τα ανόργανα συστατικά περιέχονται στις διάφορες κατηγορίες τυριών σε ποσότητες που εξαρτώνται από την τεχνολογία παρασκευής τους η οποία επηρεάζει και την κατανομή τους μεταξύ του πήγματος και του τυρογάλακτος. Η περιεκτικότητα σε άλατα καθορίζεται από την ποσότητα φωσφορικού ασβεστίου που χάνεται από το τυρόπηγμα, η οποία με τη σειρά της επηρεάζεται από την οξύτητα που αναπτύσσεται πριν τη στράγγιση του τυρογάλακτος και τη δομή των τυριών. Η απώλεια αυτή ορίζει την έκταση στην οποία τα καζεϊνικά υπομικκύλια που υπήρχαν στο γάλα θα διαταραχθούν και έτσι καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό η δομή του τυριού. Το pH είναι ένας άλλος παράγοντας που συμβάλλει, στη διαμόρφωση της δομής του τυριού. Σε υψηλής οξύτητας τυριά, όπως η Φέτα και τα τυριά της παρούσας μελέτης, η διαμόρφωση των καζεϊνών αλλάζει σημαντικά καθώς αυτό πλησιάζει το ισοηλεκτρικό τους σημείο με συνέπεια εμφανείς αλλαγές στην υφή του τυριού (Tunick 1987, Lawrence *et al.* 1984, 1987).

Το Ca και το Mg στο γάλα βρίσκονται και στην καζεΐνη και στον ορό, επομένως το ίδιο ισχύει και για το τυρί. Οι μεταξύ τους αναλογίες στο γάλα είναι περίπου $Ca/Mg = 9-10$ (Καμιναρίδης & Μοάτσου, 2009). Το ασβέστιο αποτελεί το σημαντικότερο και αφθονότερο ανόργανο στοιχείο του γάλακτος και κατά συνέπεια και του τυριού καθώς συμβάλλει στη διαμόρφωση των καζεϊνικών μικκυλίων. Η κατανομή των αλάτων μεταξύ της παρακαζεϊνικής μήτρας και του ορού τυριών Φέτα και Γραβιέρα έχει μελετηθεί διεξοδικά από την Παντελή (2011). Με βάση τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας στις 60 ημέρες, το ασβέστιο στον ορό τυριού Φέτα ήταν το 55% του συνολικού ασβεστίου του τυριού, ενώ σε Γραβιέρα ίδιας ηλικίας ήταν μόλις το 22%. Μάλιστα καθώς η ωρίμαση προχώρησε στις 120 ημέρες, το ασβέστιο στον ορό της Φέτας αυξήθηκε στο 75%, ενώ της Γραβιέρας παρέμεινε σταθερό. Δηλαδή η αυξημένη οξύτητα του πρώτου τυριού δεν επηρέασε μόνο τη συνολική περιεκτικότητα σε ασβέστιο, αλλά και την κατανομή του στις διαφορετικές φάσεις του τυριού.

Πίνακας 4.2. Κύρια ανόργανα συστατικά εκφρασμένα σε mg / 100 g τυριού (μέσος όρος των τριών πειραμάτων \pm τυπική απόκλιση) των τυριών σε διαφορετικά στάδια της ωρίμασης.

Κωδικός ¹	Ca	Mg	K	Na	Ca/Mg	Ca/Protein
AB4	948 c $\pm 154,2$	37,5 c $\pm 4,31$	151,8 d $\pm 10,5$	1193 a $\pm 235,4$	25,3 a,b	0,05 c
A10	573 b $\pm 94,0$	24,4 b $\pm 5,00$	75,0 c $\pm 5,25$	1975 b $\pm 202,9$	23,5 a	0,03 b
B10	588 b $\pm 98,3$	24,5 b $\pm 3,58$	67,4 c $\pm 3,90$	1926 b $\pm 139,6$	24,1 a,b	0,031 b
A40	315 a $\pm 24,2$	12,8 a $\pm 0,41$	43,9 b $\pm 13,56$	2241 b $\pm 120,4$	24,6 a,b	0,017 a
B40	359 a $\pm 32,5$	12,4 a $\pm 1,12$	35,6 a,b $\pm 7,60$	2246 b $\pm 135,7$	28,9 c	0,019 a
A110	296 a $\pm 42,0$	12,8 a $\pm 0,27$	44,2 b $\pm 2,03$	$\Delta\Pi$	23,1 a	0,017 c
B110	309 a $\pm 27,2$	11,2 a $\pm 0,06$	24,8 a $\pm 3,53$	$\Delta\Pi$	27,6 b,c	0,018 a

¹ η σήμανση όπως περιγράφεται στην παρ. 3.1

$\Delta\Pi$: δεν προσδιορίστηκε

a-d: διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων κάθε στήλης (δοκιμή Duncan, $P < 0.05$).

Πίνακας 4.2.1. Πιθανότητες (P-values) που υπολογίστηκαν από την ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) των μεταβλητών του ανόργανου κλάσματος των τυριών ως προς τους παράγοντες «άλμη» και «ημέρες ωρίμασης». Με έντονα γράμματα υποδηλώνονται στατιστικά σημαντικές επιδράσεις. Τα σύμβολα των μεταβλητών όπως στον Πίνακα 4.2.

Παράγοντες	Ca	Mg	K	Ca/Mg
άλμη	0,5166	0,6117	0,0052	0,0055
ημέρες	0,0000	0,0000	0,0000	0,1151

Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P < 0.05$) προκαλούσε μόνο η ωρίμαση και όχι η σύσταση της άλμης. Επίσης ήταν σαφές ότι συνέβαινε έντονη έξοδος ασβεστίου, μαγνησίου και καλίου από το τυρί. Το μεγαλύτερο μέρος των αλλαγών συνέβαινε στην πρώτη φάση ωρίμασης παράλληλα με την έντονη πρόσληψη αλατιού που παρατηρήθηκε και η οποία εκφράζεται είτε ως αλατοπεριεκτικότητα (Πίνακας 4.1), είτε ως περιεκτικότητα σε νάτριο (Πίνακας 4.2). Οι μεταβολές αυτές απεικονίζονται συγκριτικά στην Εικόνα 4.3.

Στα ώριμα τυριά η περιεκτικότητα σε ασβέστιο ήταν γύρω στα 0,30-0,36 g/100 g τυριού, παρόμοια με αυτή δειγμάτων Φέτας του εμπορίου που είχε προσδιορισθεί ως $318,2 \pm 99,1$ mg/100g. Ήταν δηλαδή πολύ χαμηλότερο από αυτό που προσδιορίστηκε με την ίδια μεθοδολογία σε σκληρά τυριά με υψηλότερο pH όπως η Γραβιέρα Κρήτης και το Κασέρι, 0,96 και 0,85g/100g τυριού αντίστοιχα. Η ίδια τάση ίσχυε και για το Mg, αλλά η περιεκτικότητα των ώριμων τυριών ήταν χαμηλότερη από την τιμή $22,3 \pm 8,4$ mg/100g που αναφέρεται για ώριμη Φέτα του εμπορίου (Nega *et al.*, 2012).

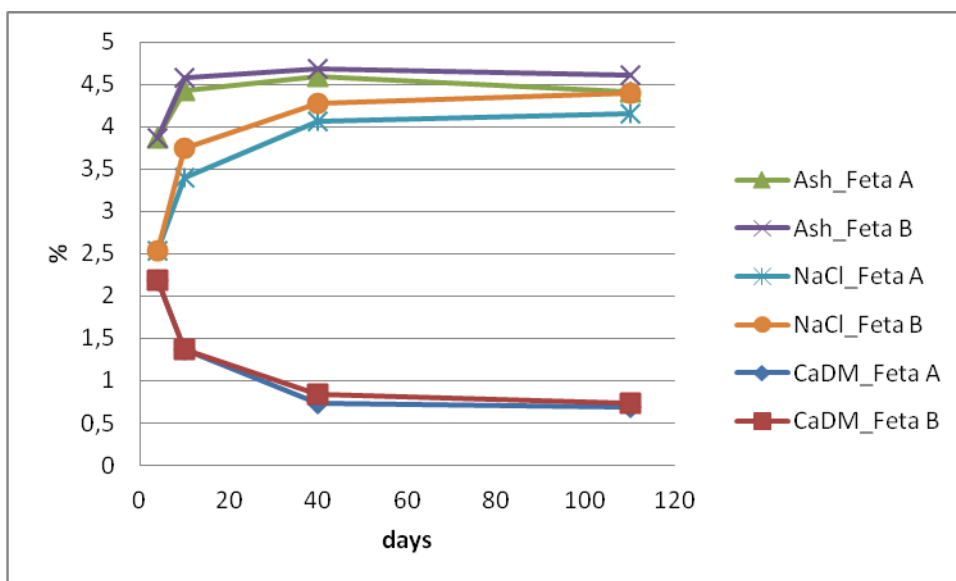
Στα τυριά της παρούσας μελέτης η αναλογία Ca/Mg ήταν υψηλή και ξεκινούσε από 25,3, την 4^η ημέρα. Μετά τις 40 ημέρες η αναλογία ήταν 24,6 και 28,9 για τα τυριά Α και Β αντίστοιχα και στις 110 ημέρες οι αντίστοιχες τιμές ήταν 23,1 και 27,6 (Πίνακας 4.2). Στην περίπτωση αυτής της αναλογίας, η ANOVA, σε αντίθεση με τις περιεκτικότητες, έδειξε στατιστικά σημαντική επίδραση της άλμης και όχι της ωρίμασης. Η επίδραση αυτή απεικονίστηκε και με τον έλεγχο των διαφορών των μέσων όρων (Πίνακας 4.2, Duncan, $P < 0.05$). Λαμβάνοντας υπόψη ότι και τα δύο αυτά ανόργανα συστατικά είναι κατανεμημένα και στην παρακαζεϊνική, αλλά και στην υδατική φάση του τυριού, η συμπεριφορά της αναλογίας Ca/Mg υποδεικνύει ότι η συμπλήρωση της άλμης Β με ασβέστιο περιόριζε την έξοδο ασβεστίου από το τυρί σε σχέση με την έξοδο άλλων συστατικών του ανόργανου κλάσματός του.

Τα τυριά όπως η Φέτα έχουν χαμηλότερη περιεκτικότητα σε ανόργανα συστατικά, εξαιτίας της οξύτητάς τους, σε σύγκριση με σκληρά τυριά που έχουν $pH < 5,5$. Το pH και η υγρασία είναι οι καθοριστικοί παράγοντες (Lawrence *et al.* 1987, Upreti *et al.* 2009). Επιπλέον, τα τυριά μπορούν να ταξινομηθούν και ανάλογα με τις αναλογίες Ca/P και Ca/πρωτεΐνη, γιατί θεωρείται ότι το Ca χάνεται με γρηγορότερο ρυθμό στο τυρόγαλα, όταν η οξύτητα κατά την τυροκόμηση αυξάνεται γρήγορα (Lucey & Fox 1993). Στα τυριά αυτής της μελέτης η αναλογία Ca/πρωτεΐνη ξεκινούσε από

0,04 (την 4^η ημέρα) και μειωνόταν σε 0,017 και 0,018 για τα ώριμα τυριά Α και Β αντίστοιχα, γεγονός που δείχνει ότι το ασβέστιο μεταφερόταν πιο γρήγορα προς την άλμη σε σχέση με τα πρωτεϊνικά συστατικά.

Το Ca % τυριού μειώθηκε κατά την 1^η φάση ωρίμασης κατά περίπου 40%. Με βάση όσα αναφέρθηκαν προηγουμένως η μείωση αυτή οφείλεται σε δύο παράγοντες, στην οξίνιση και την απώλεια υγρασίας. Στο ίδιο χρονικό διάστημα η συγκέντρωση Na και NaCl (Πίνακες 4.1 και 4.2) στο τυρί αυξήθηκε περίπου 65% για το Na και περίπου 40% για το NaCl. Οι μεταβολές αυτές απεικονίζονται στην Εικόνα 4.3 και μπορούν να αποδοθούν και σε φαινόμενα πιθανής ανταλλαγής Na^+ και Ca^{2+} . Έχει αποδειχθεί ότι το Na του NaCl μπορεί να αντικαταστήσει το καζεϊνικό-Ca (Creamer 1985, Guerts *et al.* 1972, Kindstedt *et al.* 1992) Το καζεϊνικό-Ca είναι το τμήμα του κολλοειδούς φωσφορικού ασβεστίου που είναι συνδεδεμένο με τον οργανικό φώσφορο (φωσφοσερίνες) των καζεϊνών (Καμιναρίδης & Μοάτσου, 2009). Έτσι, με την προσθήκη NaCl αυξάνει το Ca^{2+} και γενικά το κλάσμα του διαλυτού ασβεστίου και των διαλυτών καζεϊνών στον ορό του γάλακτος, ενώ ο P που βρίσκεται στα μικκύλια μειώνεται. Επομένως στους παράγοντες απώλειας ασβεστίου θα πρέπει να συνυπολογισθεί ότι καθώς το τυρί απορροφά NaCl χάνει ασβέστιο όχι μόνο εξαιτίας της αποβολής υγρασίας αλλά και από την «αντικατάσταση» κάποιου μέρους του ασβεστίου από το Na.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το πιο άφθονο ανόργανο συστατικό είναι το Na εξαιτίας της προσθήκης αλατιού. Κατά την 1^η φάση της ωρίμασης αυξάνει καθώς σταθεροποιείται η συγκέντρωση του τυριού σε NaCl. Η πορεία του ήταν γενικά παράλληλη με αυτή του %NaCl του τυριού. Το K βρίσκεται σε μικρή ποσότητα στα τυριά, αν και η συγκέντρωσή του στο γάλα είναι έως τριπλάσια του νατρίου. Επειδή βρίσκεται σχεδόν όλο στον ορό του γάλακτος (Καμιναρίδης & Μοάτσου, 2009) το μεγαλύτερο μέρος του φεύγει στο τυρόγαλα. Δηλαδή, υπολογίζοντας ότι η υγρασία των τυριών αυτών ήταν 55-58%, η υγρασία του γάλακτος της τυροκόμησης $\cong 82\%$ και ότι στο γάλα υπάρχουν $\sim 150 \text{ mg}/100\text{ml}$ K, οι τιμές που βρέθηκαν στα συγκεκριμένα τυριά είναι αναμενόμενες.



Εικόνα 4.3. Μεταβολές της τέφρας (Ash), του αλατιού (NaCl) και του ασβεστίου επί ξηρού (CaDM) των τυριών Φέτα κατά τη διάρκεια της ωρίμασης και συντήρησής τους στις άλμες A και B (παρ. 3.1).

4.3. Εξέλιξη της πρωτεόλυσης των τυριών

Για την αξιολόγηση της πρωτεόλυσης στα τυριά του πειράματος εφαρμόστηκαν δύο διαφορετικές προσεγγίσεις και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.3. Καταρχήν εφαρμόστηκε η μέθοδος TNBS (παρ. 3.2.3.3), η οποία προσδιορίζει ποσοτικά τις ελεύθερες αμινομάδες που αυξάνουν στο τυρί ως αποτέλεσμα της υδρόλυσης των καζεϊνών κατά τη διάρκεια της ωρίμασης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ισοδύναμα mM gly με βάση πρότυπη καμπύλη.

Οι χρωματογραφικές κατατομές του YE χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη του βάθους της πρωτεόλυσης. Με την αναλυτική τεχνική RP-HPLC «ταξινομούνται» τα διαφορετικού μεγέθους πεπτίδια και τα ελεύθερα αμινοξέα που περιέχονται στο υδατοδιαλυτό εκχύλισμα των τυριών (YE, παρ. 3.2.3.1) σε σχέση με την υδροφοβικότητα και το μέγεθός τους. Χαρακτηριστικές κατατομές στα διαφορετικά στάδια της ωρίμανσης παρουσιάζονται στην Εικόνα 4.5. Τα ελεύθερα αμινοξέα και μικρά-μεσαία κατά κανόνα υδρόφιλα πεπτίδια εκκλύονται στα πρώτα τμήματα των κατατομών

και στη δεύτερη περιοχή εκλύονται μεσαία-μεγάλα υδρόφοβα πεπτίδια καθώς και οι πρωτεΐνες του ορού. Οι μεγάλες κορυφές στην περιοχή 80-100 min αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες ορού, όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.9, η οποία παρουσιάζει την κατατομή όξινου ορού πρόβειου γάλακτος που αναλύθηκε ταυτόχρονα με τα ΥΕ των τυριών. Οι ποσοτικές διαφορές μεταξύ των κατατομών προσδιορίστηκαν με βάση την επιφάνεια διακριτών περιοχών τους και το λόγο των επιφανειών 10-55 και 55-100 min (Πίνακας 4.3). Ο λόγος μεταξύ των επιφανειών δύο αυτών περιοχών ονομάζεται λόγος υδρόφοβων (HB) προς υδρόφιλα πεπτίδια (HL).

Πίνακας 4.3. Δείκτες πρωτεόλυσης των τυριών (μέσος όρος των τριών πειραμάτων \pm τυπική απόκλιση) των τυριών σε διαφορετικά στάδια της ωρίμασης.

Κωδικός ¹	mM gly ²	RP-HPLC κατατομές (min) ³				
		0-10	10-40	40-70	70-100	55-100 / 10-55
AB4	0,17 a $\pm 0,039$	9,2 b $\pm 0,48$	8,3 a $\pm 0,56$	41,4 a $\pm 1,54$	41,1 b $\pm 2,57$	1,85 c $\pm 0,169$
A10	0,17 a $\pm 0,029$					
B10	0,16 a $\pm 0,041$					
A40	0,24 b $\pm 0,027$	7,3 a $\pm 1,10$	9,9 a,b $\pm 0,97$	55,5 b $\pm 1,83$	27,3 a $\pm 3,48$	1,41 b $\pm 0,175$
B40	0,16 a $\pm 0,03$	8,0 a,b $\pm 0,40$	12,1 b,c $\pm 0,58$	56,6 b $\pm 0,87$	23,3 a $\pm 1,86$	1,09 a $\pm 0,065$
A110	0,28 b $\pm 0,030$	7,8 a,b $\pm 0,496$	12,4 b,c $\pm 0,134$	54,9 b $\pm 5,213$	24,9 a $\pm 5,58$	0,99 a $\pm 0,098$
B110	0,16 a $\pm 0,032$	7,2 a $\pm 0,545$	13,2 c $\pm 1,459$	54,5 b $\pm 4,034$	25,1 a $\pm 2,75$	1,05 a $\pm 0,230$

¹ η σήμανση όπως περιγράφεται στην παρ. 3.1

² μέθοδος TNBS (παρ. 3.2.3.3)

³ σχετική επιφάνεια των επιμέρους περιοχών των χρωματογραφημάτων (παρ. 3.2.3.2), εκφρασμένη ως % της συνολικής επιφάνειας τους. Οι επιμέρους περιοχές χωρίζονται με βάση το χρόνο έκλυσης.

a-d: διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων κάθε στήλης (δοκιμή Duncan, $P < 0.05$).

Ο παράγοντας ωρίμαση δεν επέδρασε στη συγκέντρωση των ελεύθερων αμινομάδων, παρότι σε τυριά αυτού του τύπου η πρωτεόλυση, όταν προσδιορίζεται ως διαλυτό άζωτο προχωρά γρήγορα στην πρώτη φάση ωρίμασης. Συγκεκριμένα, στο τέλος της πρώτης φάσης ωρίμασης 30-50% της α_{s1} -καζεΐνης έχει υδρολυθεί ενώ η υδρόλυση της β -καζεΐνης είναι περιορισμένη. Μετά από τρεις μήνες ωρίμανσης, η υπολειπόμενη α_{s1} -καζεΐνη είναι το 1/3 της αρχικής. (Katsiari *et al.* 2000, Michaelidou *et al.* 2003, Moatsou *et al.* 2002, 2004). Προφανώς τα παραπάνω δεν επιβεβαιώθηκαν γιατί η μείωση της πρωτεΐνης που συνέβη κατά την ωρίμαση μείωσε και το σύνολο των ελεύθερων αμινομάδων στο τυρί. Αντίθετα με τον παράγοντα ωρίμαση, ο παράγοντας άλμη επέδρασε στατιστικά σημαντικά στην παράμετρο αυτή.

Πίνακας 4.3.1. Πιθανότητες (P-values) που υπολογίστηκαν από την ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) των μεταβλητών της πρωτεόλυσης ως προς τους παράγοντες «άλμη» και «ημέρες ωρίμασης». Με έντονα γράμματα υποδηλώνονται στατιστικά σημαντικές επιδράσεις. Τα σύμβολα των μεταβλητών όπως στον Πίνακα 4.3.

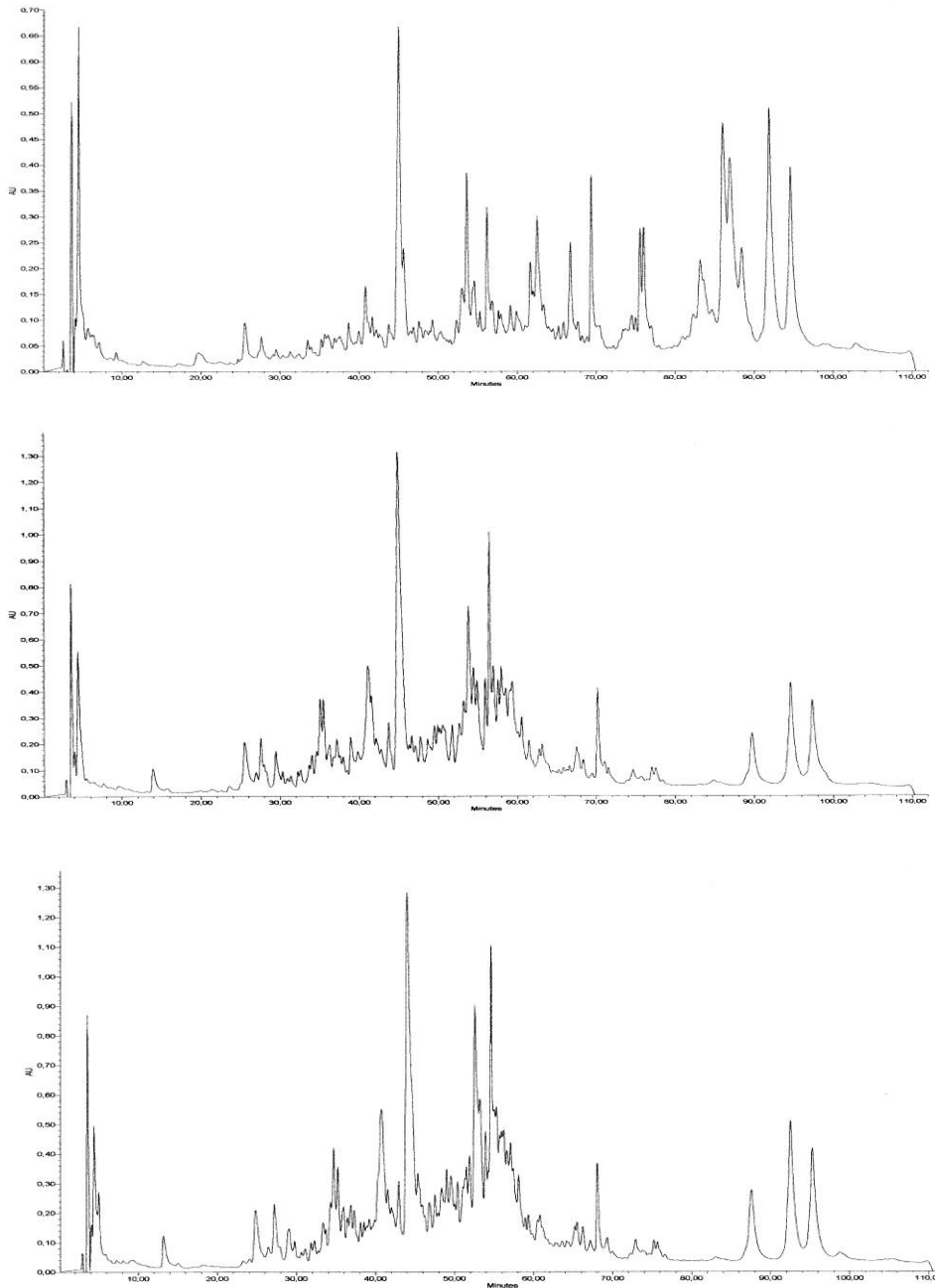
Παράγοντες	mM gly	0-10	10-40	40-70	70-100	55-100 / 10-55
άλμη	0,0014	0,7554	0,1633	0,7927	0,3033	0,2119
ημέρες	0,1330	0,0392	0,0092	0,0001	0,0001	0,0004

Από τις κατατομές της Εικόνας 4.5, φαίνεται σαφώς ότι συμβαίνει έντονη διάχυση πεπτιδίων της υδρόφοβης περιοχής κατά τη διάρκεια της ωρίμασης και ιδιαίτερα των πρωτεϊνών ορού. Τα ποσοτικά στοιχεία του Πίνακα 4.3. δείχνουν μείωση της περιοχής 70-100 από τις 4 στις 40 ημέρες με παράλληλη αύξηση των πεπτιδίων της περιοχής 40-70. Είναι επίσης σημαντικό ότι η εξέλιξη της αναλογίας υδρόφοβα προς υδρόφιλα πεπτίδια (HB/HL) συμβάδιζε με την παράμετρο mM gly (Εικόνα 4.6 και Πίνακας 4.3). Επιπλέον στις 40 ημέρες ο παράγοντας «άλμη» επέδρασε στατιστικά σημαντικά και στις δύο αυτές μεταβλητές.

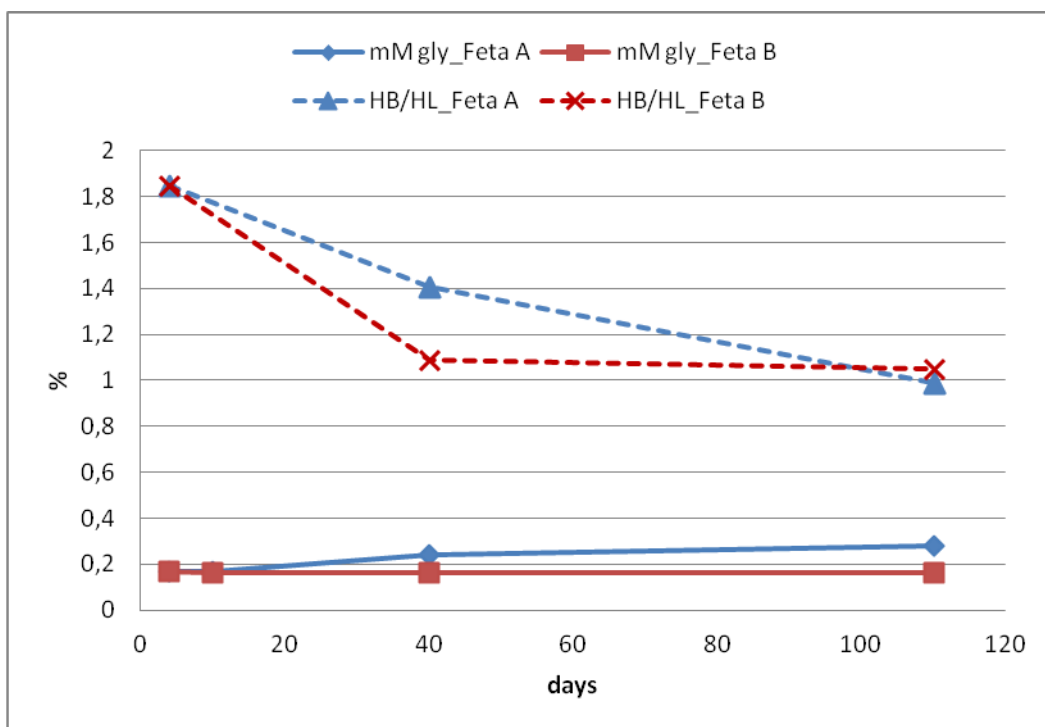
Γενικά, οι πρωτεολυτικές αλλαγές στη Φέτα και στα λευκά τυριά άλμης που αυξάνουν τη συγκέντρωση των πεπτιδίων στο ΥΕ των τυριών αποδίδονται στην υπολειπόμενη χυμοσίνη και στα βακτηριακά πρωτεολυτικά ένζυμα καθώς η φυσικοχημική σύσταση του τυριού δεν είναι ευνοϊκή

για την ενζυμική δραστηριότητα της πλασμίνης. Το χαρακτηριστικό των χρωματογραφικών κατατομών των πεπτιδίων των τυριών που μελετήθηκαν είναι η έντονη παρουσία της περιοχής 40-70, όπως έχει επίσης αναφερθεί από τους Nega & Moatsou (2012) και Maniou *et al.* (2013). Σύμφωνα με τις εργασίες αυτές το πρώτο τμήμα 0-10 περιλαμβάνει μερικά ελεύθερα αμινοξέα και άλλα μη-αζωτούχα συστατικά των ΥΕ των τυριών, ενώ στην περιοχή >85 min που αντιστοιχεί σε συγκέντρωση ακετονιτριλίου >48% εκλούνται οι πρωτεΐνες του ορού. Επιπλέον, η περιοχή 10-70 φαίνεται ότι εμπλουτίζεται με πεπτίδια που προέρχονται από τη δράση της χυμοσίνης. Στα τυριά της παρούσας μελέτης, τα οποία προέρχονται από τυρόπηγμα με υψηλή υγρασία χωρίς αναθέρμανση, η υπολειμματική χυμοσίνη αναμένεται να είναι υψηλή και ενεργή κατά τη διάρκεια της ωρίμασης, λόγω του χαμηλού pH των τυριών αυτών. Πράγματι, η μέση ενεργότητα υπολειμματικής χυμοσίνης για τα τυριά άλμης Φέτα, Καλαθάκι Λήμνου και Σφέλα έχει βρεθεί περίπου 6 φορές υψηλότερη από αυτή διαφόρων τύπων σκληρών τυριών (Nega & Moatsou 2012).

Τελικά, το χαρακτηριστικό ωρίμασης σε ότι αφορά το ΥΕ των τυριών είναι ότι η διάχυση των διαλυτών αζωτούχων συστατικών αφορά κυρίως στις πρωτεΐνες του ορού και μικρά-μεσαία πεπτίδια. Παρά τη μεγάλη σημασία που έχει η άλμη διατήρησης για το τυρί αυτό, έχουν γίνει ελάχιστες μελέτες για τη μεταφορά συστατικών προς την άλμη. (Bintsis *et al.* 2000, Michaelidou *et al.* 2005). Οι Michaelidou *et al.* (2005) απέδειξαν ότι η καζεΐνη και τα μεγάλα πεπτίδια παραμένουν στη Φέτα ενώ οι πρωτεΐνες του ορού και τα υδρόφιλα πεπτίδια μπορούν να μετακινηθούν προς την άλμη.



Εικόνα 4.5. RP-HPLC κατατομές των τυριών (παρ. 3.2.3) σε διαφορετικά στάδια ωρίμασης. Από επάνω προς τα κάτω: 4 ημέρες, υδατοδιαλυτό εκχύλισμα Φέτας Α στις 110 ημέρες, υδατοδιαλυτό εκχύλισμα Φέτας Β στις 110 ημέρες.



Εικόνα 4.6. Εξέλιξη της πρωτεόλυσης των τυριών Φέτα κατά τη διάρκεια της ωρίμασης και συντήρησής τους στις άλμες Α και Β (παρ. 3.1).

Η έκφραση HB/HL εκφράζει το λόγο υδρόφοβα/ υδρόφιλα πεπτίδια που αντιστοιχεί στο λόγο των επιφανειών των RP-HPLC κατατομών 55-100/10-55 min (παρ. 3.2.3.2, Πίνακας 4.3, Εικόνα 4.4).

Η έκφραση mM gly αντιστοιχεί στη συγκέντρωση των ελεύθερων αμινομάδων, όπως περιγράφεται για τη μέθοδο TNBS (παρ. 3.2.3.3)

4.4. Ρεολογικά χαρακτηριστικά των τυριών

Τα ρεολογικά χαρακτηριστικά των τυριών σχετίζονται τη μελέτη της παραμόρφωσης και της ροής των υλικών όταν αυτά υποβάλλονται σε πίεση. Στα χαρακτηριστικά αυτά περιλαμβάνονται ενδογενή χαρακτηριστικά όπως η σκληρότητα και η ελαστικότητα), τα οποία πρωτίστως σχετίζονται με τη σύσταση, τη δομή και τη δύναμη των έλξεων μεταξύ των δομικών στοιχείων των τυριών (Fox *et al.* 2000). Οι ρεολογικές ιδιότητες των τυριών επηρεάζονται από πολλές παραμέτρους όπως είναι το pH, η υγρασία, η περιεκτικότητα σε άλατα και η απώλεια ασβεστίου και φωσφορικών αλάτων κατά τη στράγγιση. Σε υψηλής οξύτητας τυριά, όπως η Φέτα, η διαμόρφωση των καζεϊνών αλλάζει σημαντικά καθώς αυτό πλησιάζει το ισοηλεκτρικό τους

σημείο με συνέπεια εμφανείς αλλαγές στη δομή του τυριού, προκαλώντας έντονη μείωση της ελαστικότητας. Τέλος, η δομή των τυριών επηρεάζεται και από άλλους παράγοντες όπως η αλατοπεριεκτικότητα και η λιποπεριεκτικότητα (Lawrence *et al.* 1984).

Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκε η τεχνική της μονοαξονικής συμπίεσης, μεθοδολογία που είναι γνωστή ως «ενόργανη ανάλυση της κατατομής της δομής» (instrumental texture profile analysis). Το όργανο και η μεθοδολογία της ανάλυσης αυτής περιγράφεται στην παρ. 3.3.4 και βασιζόταν στον έλεγχο της παραμόρφωσης του δείγματος κατά τη διάρκεια δύο κύκλων συμπίεσης (δαγκωματιών). Τα ρεολογικά χαρακτηριστικά των ώριμων τυριών αυτής της μελέτης παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.4 και όπως δείχνει ο Πίνακας 4.4.1 ο παράγοντας άλμη επηρεάζει στατιστικά σημαντικά τη συνεκτικότητα, ενώ η ωρίμαση αυξάνει στατιστικά σημαντικά τη σκληρότητα, τη συγκολλητικότητα και το κομμιώδες. Τα χαρακτηριστικά αυτά γίνονται αντιληπτά κατά την μάσηση κι επομένως συνδέονται κυρίως με μηχανικές ιδιότητες. Όμως στα φαινόμενα αυτά συμμετέχουν και άλλες διαδικασίες όπως ο χειρισμός της μασημένης μάζας στο στόμα, οι οποίες δεν μπορούν να αξιολογηθούν με όργανα. Συγκεκριμένα, τα ρεολογικά χαρακτηριστικά του Πίνακα μπορούν να αντιστοιχισθούν με αισθητηριακές ιδιότητες (Foegeding & Drake 2007). Η σκληρότητα και η ελαστικότητα μπορούν να αξιολογηθούν με το χέρι. Η σκληρότητα είναι η δύναμη που χρειάζεται για την πλήρη συμπίεση του δείγματος και η ελαστικότητα αντιστοιχεί στο βαθμός επαναφοράς του δείγματος μετά από συμπίεση μέχρι 30% μεταξύ αντίχειρα και δύο δακτύλων. Η σκληρότητα μπορεί επίσης να αξιολογηθεί κατά τη μάσηση ως η δύναμη που χρειάζεται για μια πλήρη δαγκωματιά κατά την 1^η μπουκιά. Η συνεκτικότητα και η συγκολλητικότητα είναι ιδιότητες που αξιολογούνται στο στόμα, κατά τη διάρκεια της μάσησης. Η συνεκτικότητα είναι ο βαθμός συγκόλλησης της «μασημένης» μάζας στο στόμα και η συγκολλητικότητα είναι ο βαθμός προσκόλλησης του μασημένου δείγματος στις επιφάνειες της στοματικής κοιλότητας και στα δόντια. Επιπλέον των παραπάνω, στη μελέτη αυτή προσδιορίστηκαν και τα μεγέθη κομμιώδες και μασητικότητα που προσδιορίζονται και αυτά στο στόμα. Όπως αναφέρεται από τους Kaminarides & Stachtiaris (2000) το κομμιώδες είναι η δύναμη που απαιτείται για να «αποσυντεθεί» ένα τρόφιμο ώστε να είναι δυνατή κατάποσή του και η μασητικότητα είναι η δύναμη που απαιτείται για να μασηθεί ένα τρόφιμο μέχρι να είναι έτοιμο για κατάποση.

Πίνακας 4.4. Ρεολογικά χαρακτηριστικά των τυριών (μέσος όρος των τριών πειραμάτων \pm τυπική απόκλιση) σε διαφορετικά στάδια της ωρίμασης.

Κωδικός ¹	Σκληρότητα Hardness (N)	Συνεκτικότητα Cohesiveness (N·mm)	Συγκολλητικότητα Adhesiveness (N·mm)	Ελαστικότητα Elasticity (mm)	Κοιμώδες Gumminess (N)	Μασσητικότητα Chewiness (N)
A40	8,7 a $\pm 1,68$	0,38 b $\pm 0,007$	-37,6 b $\pm 10,05$	1,15 a $\pm 0,197$	3,32 a $\pm 0,608$	3,76 a $\pm 0,171$
B40	8,6 a $\pm 2,13$	0,35 a,b $\pm 0,014$	-28,6 b $\pm 11,37$	1,01 a $\pm 0,017$	3,01 a $\pm 0,802$	3,05 a $\pm 0,847$
A110	15,7 b $\pm 0,01$	0,37 b $\pm 0,014$	-57,0 b $\pm 7,04$	1,00 a $\pm 0,007$	5,71 b $\pm 0,577$	5,71 b $\pm 0,619$
B110	12,6 a,b $\pm 3,33$	0,30 a $\pm 0,048$	-40,7 a $\pm 17,5$	1,03 a $\pm 0,034$	3,63 a $\pm 1,777$	3,77 a,b $\pm 1,944$

¹ η σήμανση όπως περιγράφεται στην παρ. 3.1

a-d: διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων κάθε στήλης (δοκιμή Duncan, $P < 0.05$).

Πίνακας 4.4.1. Πιθανότητες (P-values) που υπολογίσθηκαν από την ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) των ρεολογικών μεταβλητών ως προς τους παράγοντες «άλμη» και «ημέρες ωρίμασης». Με έντονα γράμματα υποδηλώνονται στατιστικά σημαντικές επιδράσεις. Τα σύμβολα των μεταβλητών όπως στον Πίνακα 4.4.

Παράγοντες	Σκληρότητα Hardness (N)	Συνεκτικότητα Cohesiveness (N·mm)	Συγκολλητικότητα Adhesiveness (N·mm)	Ελαστικότητα Elasticity (mm)	Κοιμώδες Gumminess (N)	Μασσητικότητα Chewiness (N)
άλμη	0,2753	0,0067	0,0941	0,3531	0,1671	0,0586
ημέρες	0,0025	0,0498	0,0372	0,2836	0,0294	0,0599

Με βάση τα παραπάνω, από τα αποτελέσματα του Πίνακα 4.4 προκύπτει ότι η ωρίμαση των τυριών από τις 40 στις 110 ημέρες σκληραίνει τα τυριά και μειώνει το βαθμό προσκόλλησης του μασημένου δείγματος στις επιφάνειες της στοματικής κοιλότητας και στα δόντια (συγκολλητικότητα). Επίσης στα (πολύ) ώριμα τυριά των 110 ημερών η συμπλήρωση της άλμης με ασβέστιο (τυριά Β) μείωσε τη σκληρότητα και αύξησε τη συγκολλητικότητα σε σχέση με τους μάρτυρες (Α). Ταυτόχρονα στα τυριά Β η αποσύνθεση και η κατάποση ήταν πιο «εύκολες» σε σχέση με τα τυριά Α, αφού το κομμιώδες και η μασητικότητα εμφάνισαν χαμηλότερες τιμές.

4.5. Αντιοξειδωτικό δυναμικό των τυριών

Στον Πίνακα 4.5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των τεσσάρων δοκιμών που εφαρμόστηκαν για την αξιολόγηση του αντιοξειδωτικού δυναμικού των τυριών Α και Β στη διάρκεια της ωρίμασης. Τα αποτελέσματα αυτά εκφράζουν ιδιότητες του υδατοδιαλυτού εκχυλίσματος των τυριών (ΥΕ).

Το αντιοξειδωτικό δυναμικό των τυριών αναμένεται να διαμορφώνεται καταρχήν από διαφορετικές κατηγορίες συστατικών του γάλακτος. Τα συστατικά αυτά είναι ένζυμα όπως η δισμουτάση των υπεροξειδίων ή η καταλάση, πρωτεΐνες όπως η λακτοφερίνη, οποία δεσμεύει ιόντα σιδήρου, λιποδιαλυτές βιταμίνες όπως η βιταμίνη Ε και τα καροτενοειδή και η υδατοδιαλυτή βιταμίνη C (Lindmark-Mansson & Akesson 2000). Όμως από όλα αυτά τα συστατικά μόνο οι λιποδιαλυτές βιταμίνες παίζουν ρόλο στα τυριά, αφού τα υπόλοιπα είναι συστατικά που απομακρύνονται με το τυρόγαλα. Ο δεύτερη πηγή αντιοξειδωτικών δράσεων στα τυριά είναι η διαδικασία της ωρίμασής τους και συγκεκριμένα η τυχόν συσσώρευση βιοενεργών πεπτιδίων μέσω της πρωτεόλυσης (Lopez-Exposito *et al.* 2012)

Όπως παρουσιάζεται από τους Gupta *et al.* (2009) αντιοξειδωτικά πεπτίδια από ζυμωμένα γάλατα περιέχουν ιστιδίνη, προλίνη αλλά και τυροσίνη, τρυπτοφάνη και μπορούν είτε να παρεμποδίσουν το σχηματισμό ελεύθερων ριζών, είτε να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες και ρίζες οξυγόνου. Οι Pritchard *et al.* (2010) βρήκαν ότι μεγαλύτερη συμβολή στο αντιοξειδωτικό δυναμικό έχουν πεπτίδια του τυριού με μέγεθος >10 kDa. Τα τμήματα των καζεϊνών που έχουν συσχετισθεί με αντιοξειδωτική δράση είναι τμήματα της παρα-κ-περιοχής της κ-καζεΐνης (Hernandez *et al.* 2005, Kudoh *et al.* 2001) ή της β-καζεΐνης (Gupta *et al.* 2010). Τέλος, οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των

τυριών μεταβάλλονται με το στάδιο ωρίμασης (Gupta *et al.* 2009). Με βάση τα παραπάνω η επιλογή του υδατοδιαλυτού εκχυλίσματος των τυριών (YE, παρ. 3.2.3.1) ως φορέα αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων είχε ως σκοπό την αξιολόγηση της επίδρασης της πρωτεόλυσης στη διαμόρφωση αυτών των ιδιοτήτων.

Στην παρούσα μελέτη, η ωρίμαση επηρέασε στατιστικά σημαντικά ($P < 0.05$) τις ιδιότητες δεσμευτική ικανότητα ριζών DPPH[•] (DPPH[•]-RSA), δεσμευτική ικανότητα H₂O₂ (H₂O₂-SA) και ικανότητα χήλωσης Fe²⁺ (Fe²⁺-CA) των YE των τυριών. Είναι επίσης ενδιαφέρον ότι δεσμευτική ικανότητα υπεροξειδίων (SO-SA) επηρεάστηκε από τον παράγοντα άλμη και ότι τα DPPH[•]-RSA και H₂O₂-SA μεταβάλλονταν αντιπαράλληλα κατά τη διάρκεια της ωρίμασης (Εικόνα 4.7). Κάθε ένας από αυτούς τους δείκτες εκφράζει διαφορετικού τύπου δραστικότητα, όπως περιγράφεται στο κεφ. «υλικά και μέθοδοι» (παρ. 3.2.5)

Σχετικά με το DPPH[•]-RSA, όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 3.2.5.1, εξαιτίας της μεγάλης συγκέντρωσης του YE στο μίγμα αντιδρώντων εφαρμόστηκε διαφορετικός τρόπος υπολογισμού, ο οποίος δε βασιζόταν σε προσδιορισμό του λευκού δείγματος με νερό αντί για δείγμα YE. Επομένως οι συγκρίσεις με σχετικά ευρήματα της βιβλιογραφίας είναι σχετικές. Οι Gupta *et al.* (2009) χρησιμοποιώντας τον κλασικό τρόπο υπολογισμού της % ανάσχεσης ως προς το νερό, αναφέρουν τιμές για το Cheddar που ξεκινούν από 15% και φθάνουν έως 65% τον 4^ο μήνα ωρίμασης, οι οποίες μειώνονται περίπου στο 40% τον 7^ο μήνα ωρίμασης. Οι Pritchard *et al.* (2010) βρήκαν ποσοστό ανάσχεσης έως 14% σε κλάσματα πεπτιδίων του YE των τυριών. Οι Meira *et al.* (2012) βρήκαν ότι μεταξύ τυριών τύπου Φέτα, Πεκορίνο και Ροκφόρ, μόνο τα τελευταία παρουσίασαν ανάσχεση σε σχέση με τον μάρτυρα (νερό) που ήταν ~22%. Τέλος οι Unal & Akalin (2012) αναφέρουν ανάσχεση 88-93% για γιαούρτια. Στα τυριά της παρούσας μελέτης τα ποσοστά ανάσχεσης που προσδιορίστηκαν ήταν γενικά υψηλότερα. Λαμβάνοντας υπόψη ότι όταν χρησιμοποιήθηκαν 250 μl νερό αντί για δείγμα YE, η t₄₀- t₀ του νερού ήταν 9,6 ± 5,4%, προκύπτει ότι τα τυριά στις 10 ημέρες είχαν υψηλότερη DPPH[•]-RSA σχετικά με άλλα τυριά που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία. Αντίθετα με ότι παρατηρήθηκε στο Cheddar από τους Gupta *et al.* (2009), η ωρίμαση μείωσε αυτή την ιδιότητα, προφανώς λόγω περαιτέρω υδρόλυσης ή το πιθανότερο διάχυσης των σχετικών πεπτιδίων στην άλμη.

Πίνακας 4.5. Αντιοξειδωτικό δυναμικό των τυριών (μέσος όρος των τριών πειραμάτων \pm τυπική απόκλιση) των τυριών σε διαφορετικά στάδια της ωρίμασης. Οι υπολογισμοί έχουν γίνει όπως περιγράφονται στην παρ. 3.2.5.

Κωδικός ¹	DPPH'-RSA ²	H ₂ O ₂ -SA ³	SO-SA ⁴	Fe ²⁺ -CA ⁵	
	t0-t40	t40	t10	t10	t20
AB4	17,9 a,b,c ±10,31	41,9 b ±7,51	27,6 a ±3,44	57,6 b ±5,06	57,8 b ±4,55
A10	31,1 c ±11,89	0,5 a ±1,92	28,1 a ±5,83	74,2 b ±4,45	76,1 b ±2,98
B10	29,8 b,c ±13,4	4,0 a ±1,97	26,8 a ±2,69	80,9 b ±2,61	81,5 b ±3,22
A40	21,0 a,b,c ±10,36	33,0 b ±1,85	28,3 a ±0,36	75,1 b ±12,93	76,1 b ±11,38
B40	16,0 a,b,c ±8,17	40,2 b ±10,82	23,7 a ±0,58	81,9 b ±2,97	82,6 b ±2,95
A110	12,6 a ±1,74	45,2 b ±14,77	37,6 b ±7,79	27,9 a ±15,97	30,6 a ±17,50
B110	14,1 a,b ±4,68	38,7 b ±3,14	28,1 a ±6,31	59,8 b ±22,82	60,9 b ±22,3

¹ η σήμανση όπως περιγράφεται στην παρ. 3.1

² Δεσμευτική ικανότητα ριζών DPPH' (DPPH' radical scavenging activity), παρ. 3.2.5.1

³ Δεσμευτική ικανότητα H₂O₂ (H₂O₂ scavenging activity), παρ. 3.2.5.2

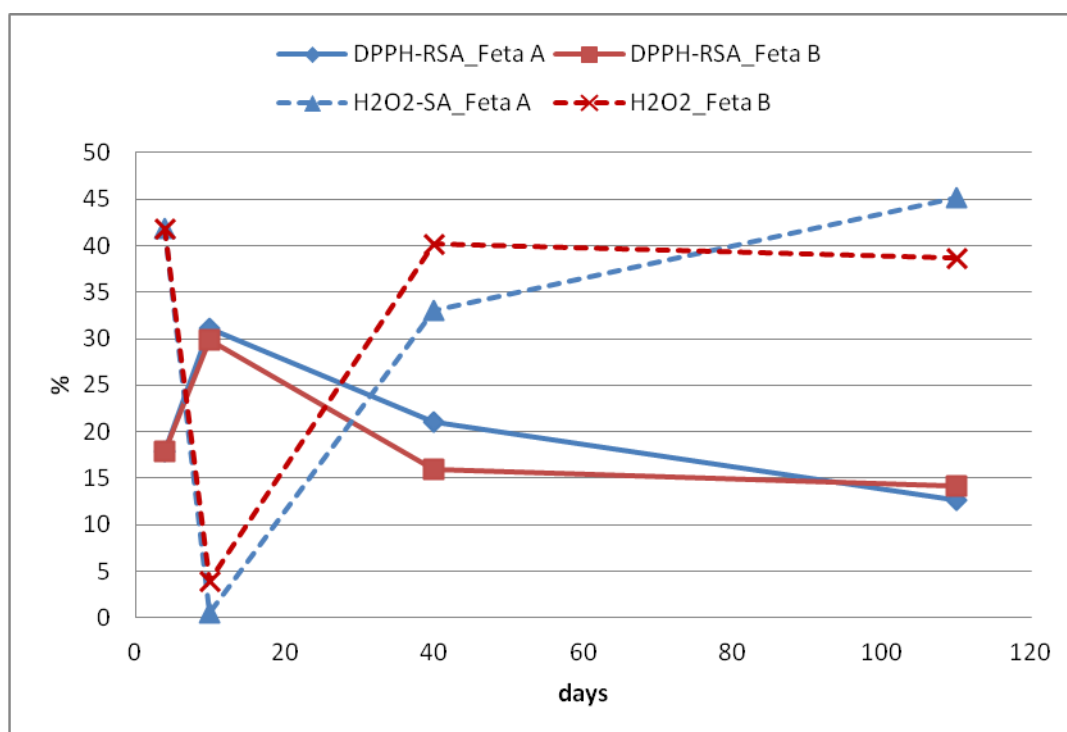
⁴ Δεσμευτική ικανότητα υπεροξειδίων (superoxide scavenging activity), παρ. 3.2.5.2

⁵ Ικανότητα χήλωσης Fe²⁺ (Fe²⁺ chelating activity), παρ. 3.2.5.4

a-d: διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων κάθε στήλης (δοκιμή Duncan, P<0.05).

Πίνακας 4.5.1. Πιθανότητες (P-values) που υπολογίσθηκαν από την ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) των δεικτών αντιοξειδωτικού δυναμικού ως προς τους παράγοντες «άλμη» και «ημέρες ωρίμασης». Με έντονα γράμματα υποδηλώνονται στατιστικά σημαντικές επιδράσεις. Τα σύμβολα των μεταβλητών όπως στον Πίνακα 4.5.

Παράγοντες	DPPH-RSA	H ₂ O ₂ -SA	SO-SA	Fe ²⁺ -CA t10	Fe ²⁺ -CA t20
άλμη	0,7117	0,7071	0,0356	0,0454	0,0605
ημέρες	0,0297	0,0000	0,1116	0,0017	0,0019



Εικόνα 4.7. Εξέλιξη δεικτών του αντιοξειδωτικού δυναμικού των τυριών Φέτα κατά τη διάρκεια της ωρίμασης και συντήρησής τους στις άλμες Α και Β (παρ. 3.1). Τα σύμβολα αντιστοιχούν στη δεσμευτική ικανότητα ριζών DPPH• και στη δεσμευτική ικανότητα H₂O₂ (παρ. 3.2.5.1 και 3.2.5.2, Πίνακας 4.5).

Ικανότητα δέσμευσης H_2O_2 δεν έχει μελετηθεί στη διεθνή βιβλιογραφία για εκχυλίσματα τυριών. Τιμές ανάσχεσης από 25-80% ανάλογα με της σύσταση του μίγματος των αντιδρώντων, έχουν αναφερθεί για το γιαούρτι (Unal & Akalin 2012). Στα τυριά της παρούσας μελέτης παρουσιάστηκε αξιοσημείωτη τέτοια δραστηριότητα και όπως προαναφέρθηκε, H_2O_2 -SA κινήθηκε αντίθετα από την προηγούμενη ιδιότητα στα τυριά της παρούσας (Εικόνα 4.7).

Η δοκιμή για τη δεσμευτική ικανότητα υπεροξειδίων (SO-SA) εφαρμόστηκε από τους Gupta *et al.* (2009) σε τυρί, οι οποίοι ανέφεραν αυξανόμενη ανάσχεση από 25-85% κατά τη διάρκεια ωρίμασης 4 μηνών τυριών Cheddar. Τα παρόντα αποτελέσματα έδειξαν για τα ώριμα τυριά (>40 ημέρες) μέση ανάσχεση ~30%, όση ήταν και η ανάσχεση του πρότυπου αντιοξειδωτικού Trolox. Το μέγεθος αυτό παρουσιάζόταν σταθερό στην ωρίμαση. Επομένως, φαίνεται ότι τα φαινόμενα ανταλλαγών με την άλμη και η περαιτέρω πρωτεόλυση δεν τα επηρέαζαν.

Οι τιμές της ικανότητας χήλωσης Fe^{2+} (Fe^{2+} -CA) που παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.5 ήταν υψηλότερες από το 5,4% που αναφέρεται από τους Meira *et al.* (2012) για τυριά τύπου Φέτα. Οι ίδιοι αναφέρουν τις υψηλότερες τιμές αυτού του δείκτη για τυριά τύπου Πεκορίνο (~50%). Τα τυριά που αναλύθηκαν έδειξαν υψηλές τιμές δέσμευσης σιδήρου, δεδομένου ότι το πρότυπο διάλυμα EDTA που χρησιμοποιήθηκε για τη δέσμευση σιδήρου ήταν 93,2% και 93,5% στα 10 και 20 min αντίστοιχα. Οι τιμές των τυριών είναι παρόμοιες με τις τιμές που αναφέρονται για το γιαούρτι (Unal & Akalin 2012). Οι υψηλότερες τιμές παρατηρήθηκαν στις 10 και στις 40 ημέρες.

Επομένως, η διαμόρφωση των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων των τυριών ήταν ένα δυναμικό φαινόμενο, το οποίο σε μερικές περιπτώσεις επηρεάστηκε από τη σύσταση της άλμης με τρόπο που δεν μπορεί να αξιολογηθεί κυρίως εξαιτίας των μεγάλων τυπικών αποκλίσεων ορισμένων μέσων. Στις 40 ημέρες όλες αυτές οι εκφράσεις αντιοξειδωτικού δυναμικού είχαν τιμές υψηλές σε σχέση με τη βιβλιογραφία, ενώ στις 110 ημέρες σε μερικές από αυτές παρατηρήθηκε μείωση, με πιο χαρακτηριστικά αυτή του Fe^{2+} -CA. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι η συνεχιζόμενη πρωτεόλυση κατά τη διάρκεια ωρίμασης/συντήρησης των τυριών συσσωρεύει αντιοξειδωτικά πεπτιδία, αλλά ταυτόχρονα υδρολύει και όσα έχουν ήδη συσσωρευτεί. Ειδικά στην περίπτωση τυριών που ωριμάζουν σε άλμη θα πρέπει να ληφθεί υπόψη και η έντονη διάχυση αζωτούχων συστατικών επομένως και πεπτιδίων στην άλμη συντήρησης. Το τελικό αποτέλεσμα μπορεί να οδηγεί και σε μείωση του αντιοξειδωτικού δυναμικού των τυριών.

4.6. Εξέλιξη της σύστασης της άλμης

Η σύσταση της άλμης σε αζωτούχα συστατικά καθώς και τα κύρια ανόργανα συστατικά τους στη διάρκεια της ωρίμασης παρουσιάζονται στους Πίνακες 4.6 και 4.7. Η άλμη των τυριών παρουσίασε αξιοσημείωτη περιεκτικότητα σε N, η οποία αυξανόταν στατιστικά σημαντικά από τις 40 στις 110 ημέρες κατά 44-53%. Στην Εικόνα 4.10 φαίνεται με σαφήνεια ότι η μείωση του % N των τυριών προκαλεί αύξηση του N της άλμης. Από τη συγκριτική παρουσίαση των κατατομών των πεπτιδίων τυριών και της αντίστοιχης άλμης, προκύπτει ότι τα δύο είδη κατατομών μοιάζουν με εξαίρεση την ομάδα κορυφών X που ενώ υπάρχουν στο τυρί δεν υπάρχουν στην άλμη. Επιπλέον, οι κυρίαρχες κορυφές της υδρόφοβης περιοχής 70-100 των αλμών είναι οι πρωτεΐνες του ορού (Εικόνα 4.9). Η χαρακτηριστική για τη Φέτα περιοχή 40-70 (παρ. 4.3) είναι κυρίαρχη επίσης και στις αντίστοιχες άλμες, εμπλουτιζόμενη κατά τη διάρκεια της ωρίμασης (Εικόνα 4.11). Επομένως παρατηρείται επιλεκτικότητα στη διάχυση αζωτούχων συστατικών στην άλμη, η οποία αφορά κυρίως σε πεπτίδια μικρά/μεσαία με χαμηλή έως μέτρια υδροφοβικότητα. Εξαίρεση αποτελούν οι πρωτεΐνες του ορού οι οποίες παρά το μεγάλο μέγεθός και την έντονη υδροφοβικότητά τους διαχέονται από τα πρώτα στάδια ωρίμασης.

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 4.7, η άλμη του τυριού ήταν πλούσια σε ανόργανα συστατικά και ενώ στις 40 ημέρες το ασβέστιο της άλμης B ήταν κατά 25% υψηλότερο από τη μη-ενισχυμένη άλμη, αν και δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά. Η αναλογία Ca/Mg στις άλμες 40 και 110 ημερών ήταν χαμηλότερη από των τυριών. Επιπλέον, η ενισχυμένη με χλωριούχο ασβέστιο άλμη B είχε υψηλότερη αναλογία Ca/Mg κατά 40% στις 40 ημέρες και κατά 20% στις 110 ημέρες. Παρόμοιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και στο Ca/Mg των τυριών. Οι διαφορές μεταξύ A και B ως προς το Ca δεν αντιστοιχίζονταν με διαφορές του %N των αλμών γεγονός που δείχνει ότι ο ρυθμός διάχυσης ανόργανων αλάτων και αζωτούχων ουσιών ήταν διαφορετικός. Ο εμπλουτισμός της άλμης με K ήταν αναμενόμενος αφού το K είναι ανόργανο συστατικό της υδατικής φάσης του τυριού.

Πίνακας 4.6. Αζωτούχα συστατικά στην άλμη των τυριών (μέσος όρος των τριών πειραμάτων \pm τυπική απόκλιση) των τυριών σε διαφορετικά στάδια της ωρίμασης.
Η άλμη πριν από την επαφή της με το τυρί περιείχε $0,002 \pm 0,0001\%$ N.

Άλμη ¹	%N ²	RP-HPLC κατατομές (min) ³				
		0-10	10-40	40-70	70-100	55-100 / 10-55
A40	0,27 a $\pm 0,057$	7,2 a $\pm 0,28$	12,9 a $\pm 0,171$	64,8 a $\pm 1,46$	15,1 b $\pm 1,36$	0,91 c $\pm 0,031$
B40	0,26 a $\pm 0,045$	7,2 a $\pm 0,36$	13,0 a $\pm 0,10$	65,7 a $\pm 0,41$	14,1 b $\pm 0,13$	0,86 c $\pm 0,016$
A110	0,39 b $\pm 0,018$	6,5 a $\pm 0,10$	15,8 a $\pm 1,08$	66,1 a $\pm 1,47$	11,6 a $\pm 0,43$	0,61 b $\pm 0,029$
B110	0,40 b $\pm 0,062$	5,80 a $\pm 0,05$	16,0 a $\pm 1,87$	67,2 a $\pm 3,16$	11,0 a $\pm 1,25$	0,55 a $\pm 0,061$

¹ η σήμανση όπως περιγράφεται στην παρ. 3.1

² σχετική επιφάνεια των επιμέρους περιοχών των χρωματογραφημάτων (παρ. 3.2.3.2), εκφρασμένη ως % της συνολικής επιφάνειας τους. Οι επιμέρους περιοχές χωρίζονται με βάση το χρόνο έκλουσης.
 a-d: διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων κάθε στήλης (δοκιμή Duncan, $P < 0.05$).

Πίνακας 4.6.1. Πιθανότητες (P-values) που υπολογίσθηκαν από την ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) των αζωτούχων συστατικών της άλμης ως προς τους παράγοντες «άλμη» και «ημέρες ωρίμασης». Με έντονα γράμματα υποδηλώνονται στατιστικά σημαντικές επιδράσεις. Τα σύμβολα των μεταβλητών όπως στον Πίνακα 4.6.

Παράγοντες	% N	RP-HPLC κατατομές (min)				
		0-10	10-40	40-70	70-100	55-100 / 10-55
άλμη	0,9810	0,5835	0,3283	0,4894	0,0713	0,0210
ημέρες	0,0011	0,7170	0,0922	0,5518	0,0001	0,0000

Πίνακας 4.7. Κύρια ανόργανα συστατικά εκφρασμένα σε mg / 100 g άλμης (μέσος όρος των τριών πειραμάτων \pm τυπική απόκλιση) των αλμών διατήρησης των τυριών σε διαφορετικά στάδια της ωρίμασης.

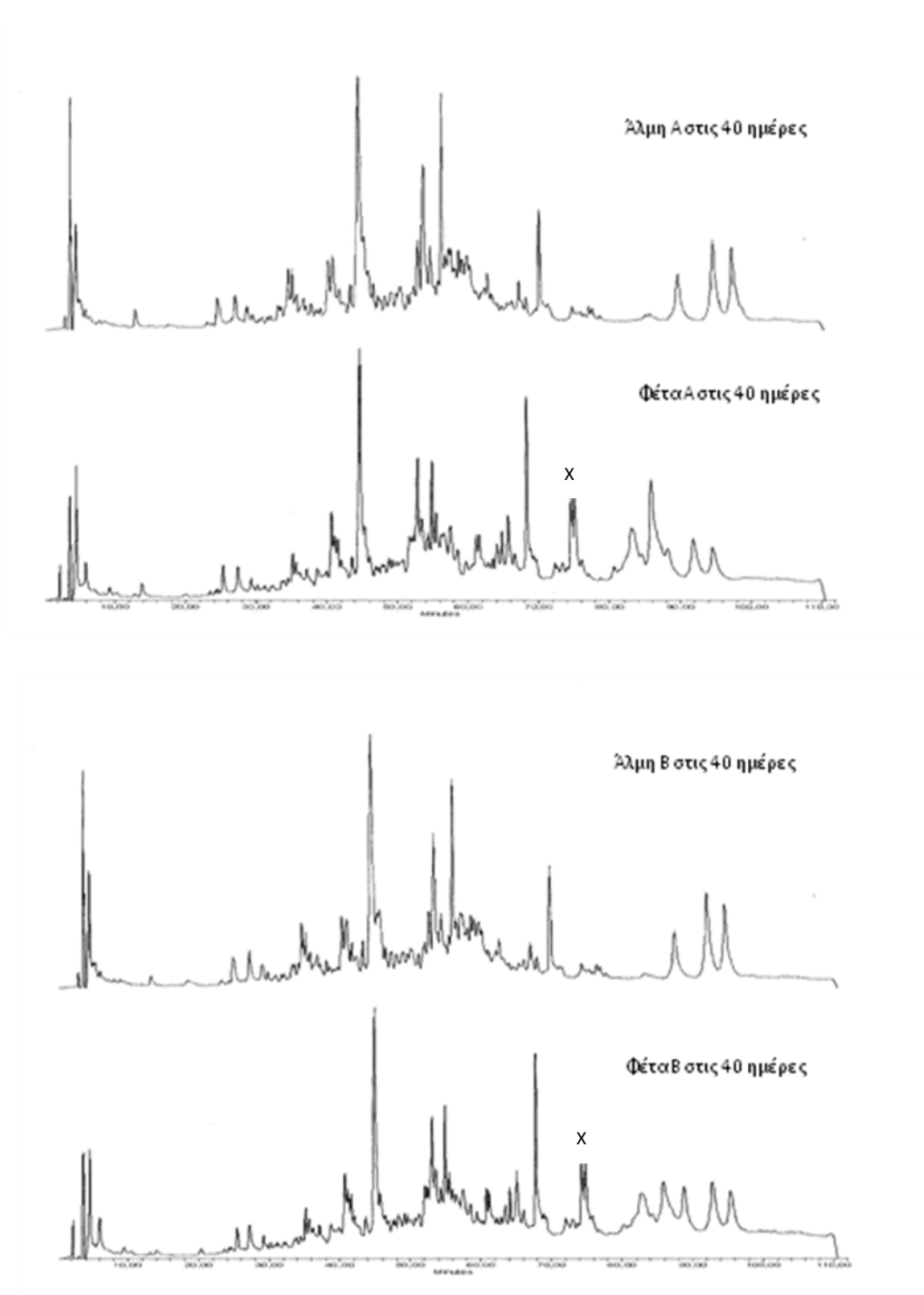
Άλμη ¹	Ca	Mg	K	Ca/ Mg
A40	312 a $\pm 48,4$	20,7 a $\pm 0,91$	69,5 b $\pm 9,55$	15,07
B40	417 a $\pm 51,6$	19,6 a $\pm 0,84$	73,9 b $\pm 5,94$	21,26
A110	481 a $\pm 136,2$	22,6 a $\pm 5,70$	79,6 b $\pm 11,38$	21,28
B110	424 a $\pm 198,5$	16,6 a $\pm 4,06$	41,7 a $\pm 9,01$	25,54

¹ η σήμανση όπως περιγράφεται στην παρ. 3.1

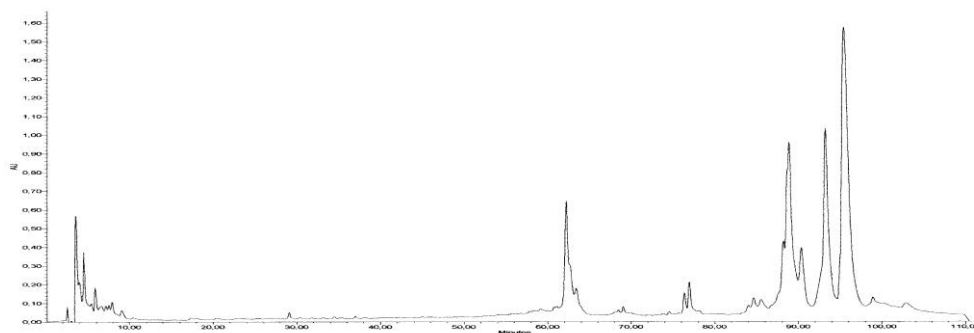
a-d: διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων κάθε στήλης (δοκιμή Duncan, $P < 0.05$).

Πίνακας 4.7.1. Πιθανότητες (P-values) που υπολογίσθηκαν από την ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) της περιεκτικότητας των αλμών σε ανόργανα συστατικά ως προς τους παράγοντες «άλμη» και «ημέρες ωρίμασης». Με έντονα γράμματα υποδηλώνονται στατιστικά σημαντικές επιδράσεις. Τα σύμβολα των μεταβλητών όπως στον Πίνακα 4.7.

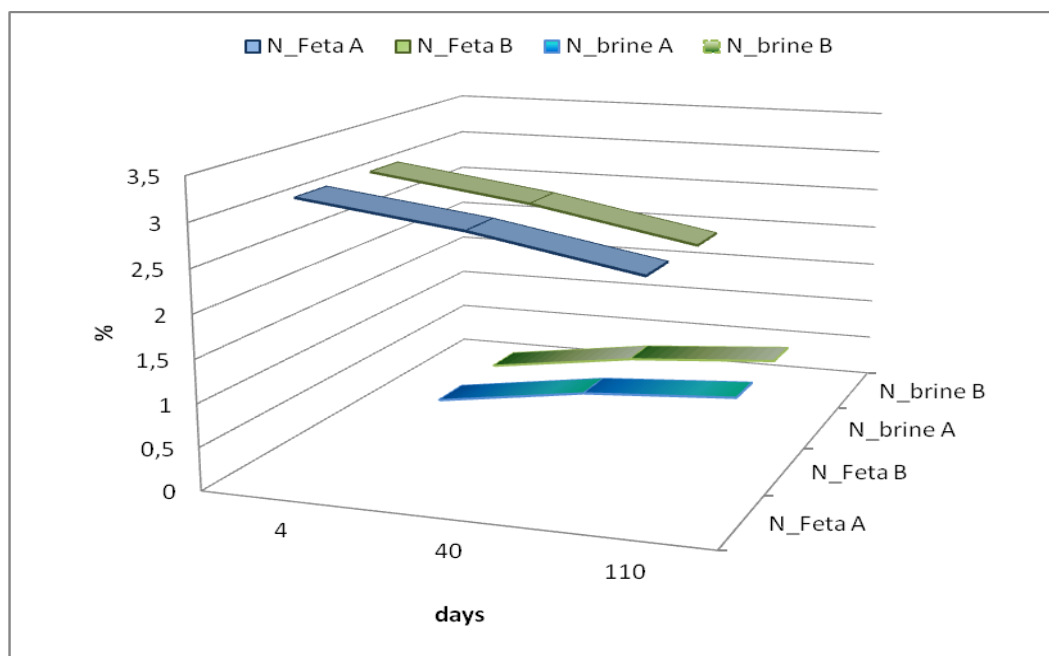
Παράγοντες	Ca	Mg	K
άλμη	0,7517	0,1241	0,0843
ημέρες	0,2637	0,7980	0,2319



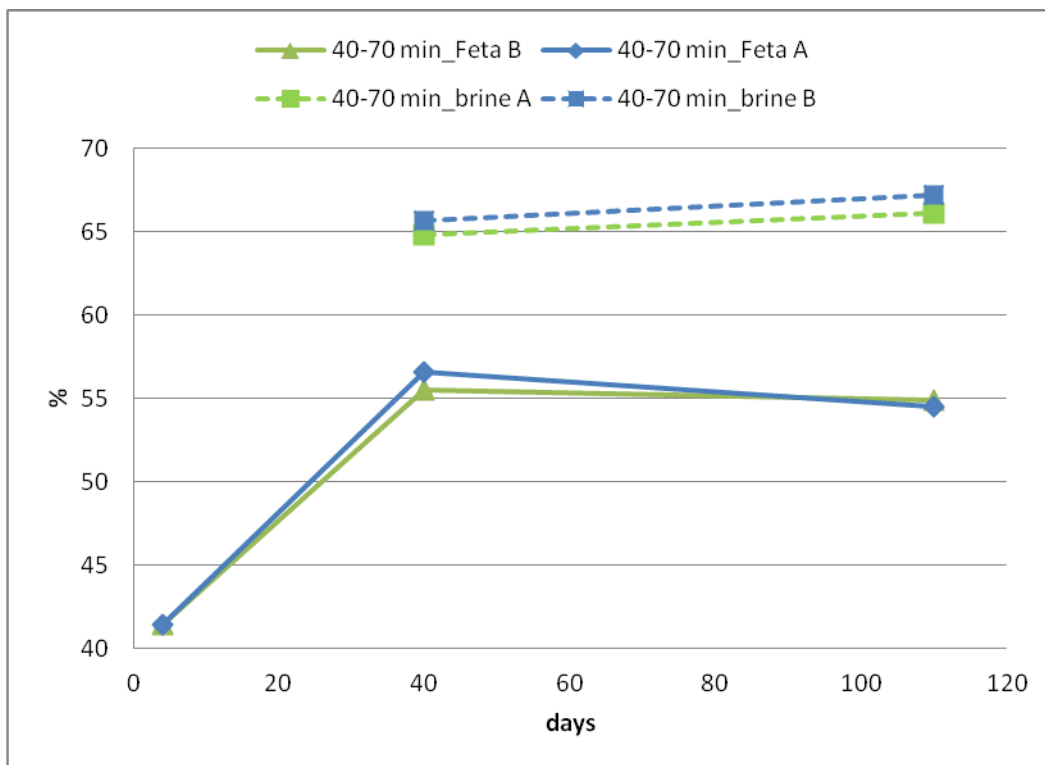
Εικόνα 4.8. Συγκριτική παρουσίαση των RP-HPLC κατατομών των τυριών και των αλμών τους (παρ. 3.2.3).



Εικόνα 4.9. RP-HPLC κατατομή όξινου ορού πρόβειου γάλακτος (20 mg λυοφιλωμένου ορού / ml).



Εικόνα 4.10. Περιεκτικότητα σε N (%) στη Φέτα και στις αντίστοιχες άλμες σε διάφορα στάδια ωρίμασης των τυριών.



Εικόνα 4.11. Ποσοτικά χαρακτηριστικά των RP-HPLC κατατομών τυριών και αντίστοιχων αλμών.

4.7. Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τυριών

Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των ώριμων τυριών παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.8 και η επίδραση των παραγόντων του πειράματος στον Πίνακα 4.8.1. Η ωρίμαση μείωνε τη γενική βαθμολογία των τυριών, κυρίως εξαιτίας της μείωσης της βαθμολογίας της υφής/δομής των τυριών, όμως η σύσταση της άλμης δεν επηρέασε σε καμία φάση αυτά τα χαρακτηριστικά. Πάντως η γενική βαθμολογία ήταν σε κάθε περίπτωση κοντά στο 80%.

Πρέπει να σημειωθεί ότι οι δοκιμαστές χαρακτήρισαν την γεύση των τυριών αλμυρή και ευχάριστα όξινη και τη δομή ως ημίσκληρη.

Πίνακας 4.8. Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τυριών (μέσος όρος των τριών πειραμάτων \pm τυπική απόκλιση) σε διαφορετικά στάδια της ωρίμασης (παρ. 3.2.7).

Κωδικός ¹	Εμφάνιση - Χρώμα	Υφή - Δομή	Γεύση	Συνολική βαθμολογία
A50	9,1 a $\pm 0,89$	35,3 a $\pm 2,25$	35,0 a $\pm 1,06$	79,4 a $\pm 2,67$
B50	9,2 a $\pm 0,89$	36,8 a $\pm 1,98$	34,3 a $\pm 3,17$	80,3 a $\pm 3,82$
A110	9,0 a $\pm 1,00$	33,7 a $\pm 3,00$	35,0 a $\pm 2,60$	77,7 a $\pm 6,49$
B110	9,1 a $\pm 1,01$	34,1 a $\pm 2,72$	36,0 a $\pm 4,27$	79,2 a $\pm 6,72$

¹ η σήμανση όπως περιγράφεται στην παρ. 3.1

a-d: διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων κάθε στήλης (δοκιμή Duncan, $P < 0.05$).

Πίνακας 4.8.1. Πιθανότητες (P-values) που υπολογίσθηκαν από την ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) των μεταβλητών της γενικής σύστασης ως προς τους παράγοντες «άλμη» και «ημέρες ωρίμασης». Με έντονα γράμματα υποδηλώνονται στατιστικά σημαντικές επιδράσεις. Τα σύμβολα των μεταβλητών όπως στον Πίνακα 4.8.

Παράγοντες	Εμφάνιση - Χρώμα	Υφή - Δομή	Γεύση	Συνολική βαθμολογία
άλμη	0,8834	0,3604	0,9643	0,6131
ημέρες	0,7681	0,1022	0,5582	0,5626

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την επεξεργασία και την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης που αφορούσε σε τυριά άλμης που έγιναν από πρόβειο γάλα με τυποποιημένη σύσταση (πρωτεΐνη/λίπος 1,28) προέκυψαν τα εξής συμπεράσματα:

- Γενικά, η εξέλιξη της σύστασης των τυριών κατά τη διάρκεια της ωρίμασης και συντήρησής τους ακολούθησε το πρότυπο της Φέτας, δηλαδή έντονες μεταβολές κατά την πρώτη φάση και οριακές αλλαγές μετά τη μεταφορά των τυριών στο ψυγείο. Στα ώριμα τυριά (>40 ημέρες) η ξηρή ουσία ήταν 42,6-43,2%, γεγονός που τα κατέτασσε στην κατηγορία των μαλακών τυριών. Στο ίδιο στάδιο ωρίμασης το λίπος επί ξηρού ήταν \approx 51-54% που αντιστοιχούσε σε \approx 22-25% λιποπεριεκτικότητα. Τέλος, η παράμετρος υγρασία επί των μη-λιπαρών συστατικών (MNFS) που εκφράζει με αντικειμενικό τρόπο την εξέλιξη της υγρασίας κυμαινόταν από 73,1-74,1%.
- Η ενίσχυση της άλμης με χλωριούχο ασβέστιο δεν επέδρασε στατιστικά σημαντικά στην πλειοψηφία των μεταβλητών που σχετίζονταν με τη σύσταση των τυριών και στην εξέλιξή τους και ουσιαστικά «αλγεβρικές» διαφορές εντοπίστηκαν στις 10 ημέρες, οι οποίες στη συνέχεια εξομαλύνθηκαν. Αντίθετα, η ωρίμαση είχε σημαντική επίδραση σε όλες τις παραμέτρους σύστασης εκτός από την υγρασία. Η παράμετρος MNFS εξελίχθηκε αντι-παράλληλα με την ξηρή ουσία και παρέμεινε πρακτικά σταθερή κατά τη διάρκεια της ωρίμασης.
- Από τις 40 ημέρες κι έπειτα παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της αναλογίας πρωτεΐνη/λίπος των τυριών, η οποία υποδεικνύει ότι η διάχυση αζωτούχων συστατικών στην άλμη διατήρησης συνέβαινε με εντονότερο ρυθμό σε σχέση με το λίπος και δεν περιορίστηκε από την ενίσχυση της άλμης με ασβέστιο. Επιπλέον, οι χρωματογραφικές κατατομές των πεπτιδίων του υδατοδιαλυτού εκχυλίσματος των τυριών έδειξαν ότι η διάχυση των διαλυτών αζωτούχων συστατικών από το τυρί προς την άλμη διατήρησης αφορά κυρίως στις πρωτεΐνες του ορού και μικρά-μεσαία πεπτίδια. Το συμπέρασμα αυτό επιβεβαιώθηκε και από τη μελέτη των χρωματογραφικών κατατομών των αντίστοιχων αλμών, από την οποία προέκυψε ότι η επιλεκτικότητα στη διάχυση αζωτούχων συστατικών

στην άλμη αφορά κυρίως σε πεπτίδια μικρά/μεσαία με χαμηλή έως μέτρια υδροφοβικότητα. Εξαιρέση αποτελούν οι πρωτεΐνες του ορού οι οποίες παρά το μεγάλο μέγεθός και την έντονη υδροφοβικότητά τους διαχέονται από τα πρώτα στάδια ωρίμασης.

- Στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς την περιεκτικότητα των τυριών σε κύρια ανόργανα συστατικά προκαλούσε μόνο η ωρίμαση και όχι η σύσταση της άλμης. Στα ώριμα τυριά 110 ημερών η περιεκτικότητα σε ασβέστιο ήταν 0,30-0,31 g/100 g τυριού, ενώ στην άλμη τους ήταν 0,42-0,48 g/100 g άλμης. Γενικά, η άλμη των τυριών ήταν πλούσια σε ανόργανα συστατικά. Κατά τη διάρκεια της ωρίμασης παρατηρήθηκε έντονη έξοδος ασβεστίου, μαγνησίου και καλίου από το τυρί, το μεγαλύτερο μέρος της οποίας συνέβαινε στην πρώτη φάση ωρίμασης παράλληλα με την έντονη πρόσληψη αλατιού που παρατηρήθηκε σε αυτό το χρονικό διάστημα. Μάλιστα η έντονη μείωση της αναλογίας Ca/πρωτεΐνη που παρατηρήθηκε στα τυριά στη διάρκεια της ωρίμασης σε συνδυασμό με την αύξηση αυτής της αναλογίας που παρατηρήθηκε στις αντίστοιχες άλμες έδειξαν ότι το ασβέστιο μεταφερόταν πιο γρήγορα προς την άλμη σε σχέση με τα αζωτούχα συστατικά.
- Η ωρίμαση των τυριών από τις 40 στις 110 ημέρες σκλήραινε τα τυριά και μείωνε το βαθμό προσκόλλησης του μασημένου δείγματος στις επιφάνειες της στοματικής κοιλότητας και στα δόντια (συγκολλητικότητα). Στα ώριμα τυριά των 110 ημερών η συμπλήρωση της άλμης με ασβέστιο μείωσε τη σκληρότητα και αύξησε τη συγκολλητικότητα σε σχέση με τους μάρτυρες. Επίσης, η αποσύνθεση και η κατάποση της μπουκιάς στο στόμα ήταν πιο «εύκολες» σε σχέση με ότι απαιτούνταν για τους μάρτυρες. Πάντως οι διαφορές αυτές δεν εντοπίστηκαν από τον οργανοληπτικό έλεγχο, κατά τον οποίο όλα τα τυριά χαρακτηρίστηκαν ως ημίσκληρα, αλμυρά με ευχάριστα όξινη γεύση. Δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των οργανοληπτικών βαθμολογιών των τυριών και η συνολική τους αποδοχή ήταν περίπου 80% στις 50 και 110 ημέρες ωρίμασης.
- Οι διάφοροι δείκτες αντιοξειδωτικού δυναμικού των τυριών είχαν στις περισσότερες περιπτώσεις τιμές υψηλότερες από αυτές που αναφέρονται για άλλα τυριά. Σε μερικές από αυτές παρατηρήθηκε μείωση από τις 40 στις 110 ημέρες ωρίμασης, η οποία προφανώς σχετίζεται με τη διάχυση αζωτούχων συστατικών που συνέβαινε από το τυρί προς την άλμη, στα οποία περιλαμβάνονται και πεπτίδια με σχετική δράση. Συνυπολογίζοντας και

την ενδεχόμενη περαιτέρω υδρόλυση των πεπτιδίων, η μελέτη αυτών των ιδιοτήτων κατά τη διάρκεια συντήρησης των τυριών άλμης παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον.

Τέλος, στην περίπτωση τυριών άλμης με υψηλή υγρασία, όπως αυτά της παρούσας μελέτης θα πρέπει να γίνονται επεμβάσεις που να περιορίζουν την έντονη πρόσληψη αλατιού εξασφαλίζοντας ταυτόχρονα και την ασφάλεια του προϊόντος. Εκτός από τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά το αλάτι επηρεάζει δραματικά τις ανταλλαγές μεταξύ τυριού και άλμης, όχι μόνο εξαιτίας της προκαλούμενης αποβολής υγρασίας αλλά και εξαιτίας της «αντικατάστασης» κάποιου μέρους του ασβεστίου της παρακαζεϊνικής μήτρας από το νάτριο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alichanidis E. (2007). Cheeses ripened in brine, In: McSweeney P.L.H. (Ed.), *Cheese Problems Solved*, CRC Press, Cambridge, UK, 330–342.
- Alichanidis E., Anifantakis E.M., Polychroniadou A., Nanou M. (1984). Suitability of some microbial coagulants for Feta cheese manufacture. *Journal of Dairy Research* 51, 141-147.
- Alichanidis E., Polychroniadou A., Tzanetakis N., Vafopoulou A. (1981). Teleme cheese from deep-frozen curd. *Journal of Dairy Science* 64, 732-739.
- Anifantakis E.M., Moatsou G. (2006). Feta and other Balkan cheeses. In: *Brined Cheeses*. A.Y. Tamime, edr, Blackwell Publishing, Eds, Oxford, UK, 43-76.
- Apostolidis E., Kwon Y.-I., Shetty K. (2007) inhibitory potential of herb, fruit and fungal-enriched cheese against key enzymes linked to type 2 diabetes and hypertension. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 8, 46-54.
- Bines V., Holmes D. (1994). Brine salting of cheese. *Dairy Industries International* 59, 33-38.
- Bintsis T. (2006). Quality of Brine. In: *Brined Cheeses*. Society of Dairy Technology. Edited by A.Y.Tamime, Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Bintsis T., Litopoulou-Tzanetaki E., Davies R., Robinson R.K. (2000). Microbiology of brines used to mature Feta cheese. *International Journal of Dairy Technology* 53, 106–112.
- Collins Y., McSweeney P.L.H., Wilkinson M. G. (2003). Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: A review of current knowledge. *International Dairy Journal* 13, 841-866.
- Collins Y., McSweeney P.L.H., Wilkinson, M. G. (2004). Lipolysis and catabolism of free fatty acids in cheese. In: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol.1, ed.P.F.Fox. Elsevier Applied Science, London, 373-389.
- Creamer L.K. (1985). Water absorption by renneted casein micelles. *Milchwissenschaft* 40, 589-594.
- Driessen, F.M. (1989). Heat-induced Changes in Milk, Bulletin 238. International Dairy Federation, Brussels.
- Foegeding E.A, Drake M.A. (2007). Invited Review: Sensory and mechanical properties of cheese texture. *Journal of Dairy Science* 90, 1611-1624.

- Fox P.F. & McSweeney, P.L.H. (1997) Rennets: their role in milk coagulation and cheeseripening. *The Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*, 2nd edition (ed.B.A.Law), 1-49. Chapman, Hall, London.
- Fox P.F., Cogan T.M., Lucey J.A. (1990). Glycolysis and related reactions during cheese manufacture and ripening. *Critical Reviews in Food Science and Technology* 29, 237.
- Fox P.F., Guinee T.P., Cogan T.M., McSweeney P.L.H. (2000). *Foundamentals of Cheese Science*. Aspen Publishers, pp. 305-306, 504-509.
- Fox P.F., O'Connor T.P., McSweeney P.L.H., Guinee T.P., O'Brien N.M. (1996). Cheese: Physical, chemical, biochemical and nutritional aspects. *Advances in Food and Nutritional Research* 39, 163-328.
- Georgala A., Moschopoulou E., Aktypis A., Masouras Th., Zoidou E., Kandarakis I. (2005). Evolution of lipolysis during the ripening of traditional Feta cheese. *Food Chemistry* 93, 73-80.
- Geurts T.J., Walstra P., Mulder H. (1974). Transport of salt and water during salting of cheese. I. Analysis of the process involved. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 28, 102-129.
- Greek Codex of Foodstuffs and Drinks (2009). General Chemical State Laboratory, Ministry of Economy and Finance, Hellenic Republic, Vol. 2.
- Gripon, J-C. (1997). Flavour and Texture in Soft Cheese. *Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*, 193-206.
- Guerts T.J., Walstra P., Mulder A. (1972). Brine composition and the defect of "soft rind" in cheese. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 26, 168-182.
- Guinee T.P. & Fox P.F. (1986). Transform of sodium chloride and water in Roman cheese slices during brining. *Food Chemistry* 19, 49-64.
- Guinee T.P., Fox P.F. (2004). Salt in cheese: physical, chemical and biological aspects. In: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 3rd edn (eds Fox, P.L.H. McSweeney, T.M. Cogan and T.P.Guinee), vol.1, 207-259. Elsevier Academic Press, London.
- Guinee T.P., McSweeney P.L.H. (2006). Significance of Milk Fat in Cheese. In: *Advanced Dairy Chemistry*, vol.2: Lipids, 3rd ed. Edited by P.F.Fox, P.L.H.McSweeney, Springer, New York, USA.

Guinee T.P., Law B.A. (2002). Role of milk fat in hard and semihard cheeses. In: *Fats in Food Technology* 10, 275-331.

Gupta A., Mann B., Kumar R., Sangwan R.B. (2009) Antioxidant activity of Cheddar cheeses at different stages of ripening. *International Journal of Dairy Technology* 62, 339-347.

Gupta A., Mann B., Kumar R., Sangwan R.B. (2010). Identification of antioxidant peptides in Cheddar cheese made with adjunct culture *Lactobacillus casei* ssp. *casei* 300. *Milchwissenschaft* 65, 369-339.

Hernandez L.B., Mirales B., Amigo L., Ramos M., Recio I. (2005). Identification of antioxidant and ACE-inhibitory peptides in fermented milk. *Journal of Science of Food and Agriculture* 85, 1041-1048.

Horne D.S., Banks J.M. (2004). Rennet-induced coagulation of milk. In: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 3rd edition (eds P.F.Fox, P.L.H. McSweeney, T.M.Cogan, T.P. Guinee), vol 1, 19-45. Elsevier Academic Press, Amsterdam.

<http://www.scq.ubc.ca/food-microbiology-the-basics-and-the-details-of-cheese-production/>

ISO 17837/ IDF 25, 2008, Processed cheese products- Determination of nitrogen content and crude protein calculation- Kjeldahl method.

ISO 3433/IDF 222 (2008) Cheese-determination of fat content-Van Gulik method.

ISO 5943/ IDF 88, (2006) Cheese and processed cheese products – Determination of chloride content -- Potentiometric titration method.

ISO 8070/IDF 119 (2007) Milk and milk products-Determination of calcium, sodium, potassium and magnesium contents-Atomic absorption spectrometric method.

Kaminarides S., Stachtiaris S. (2000). Production of processed cheese using kasseri cheese and processed cheese analogues incorporating whey protein concentrate and soybean oil. *International Journal of Dairy Technology* 53, 70-71.

Karadak A., Ozeelik B., Saner S. (2009). Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food analytical Methods* 2, 41-60.

Katsiari M.C., Alichanidis E., Voutsinas L.P., Roussis I.G. (2000). Proteolysis in reduced sodium Feta cheese made by partial substitution of NaCl by KCl. *International Dairy Journal* 10, 635-646.

Katsiari M.C., Voutsinas L.P. (1994). Manufacture of low-fat Feta cheese. *Food Chemistry* 49, 53–60.

- Katsiari M.C., Voutsinas L.P., Kondyli E., Alichanidis E. (2002). Flavour enhancement of low-fat Feta-type cheese using a commercial adjunct culture. *Food Chemistry* 79, 193–198.
- Kindstedt P.S., Kiely L.J., Gilmore J.A. (1992). Variation in composition and functional properties within brine salted Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science* 75, 913-921.
- Kudoh Y., Matsuda S., Igoshi K., Oki T. (2001). Antioxidative peptide from milk fermented with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* IFO13953. *Journal of the Japanese Society of Food Science* 48, 44-50.
- Law B.A. (1987). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, vol.1, p. 365. Ed. P.F.Fox, Elsevier Applied Science, London.
- Lawrence R., Heap H., Gilles J. (1984). A controlled approach to cheese technology. *Journal of Dairy Science*, pp.1633-1635, 1638, 1639.
- Lawrence R.C., Creamer L.K. and Gilles J. (1987). Texture development during cheese ripening. *Journal of Dairy Science* 70, 1748-1760.
- Lindmark-Manson H., Akesson B. (2000). Antioxidative factors in milk. *British Journal of Nutrition* 84 (Suppl. 1) S103-S110.
- López-Exposito I., Chicón R., Belloque J., López-Fandiño R., Berin M.C. (2012). In vivo methods for testing allergenicity show that high hydrostatic pressure hydrolysates of β -lactoglobulin are immunologically inert. *Journal of Dairy Science* 95, 541-548.
- Lucey J.A. (2003). Rennet coagulation of milk. *Encyclopedia of Dairy Sciences* (eds H.Roginski, J.W.Fuquay, P.F.Fox), 286-293, Academic Press, Amsterdam.
- Lucey J.A., Fox P.F. (1993). Importance of calcium and phosphate in cheese manufacture. *Journal of Dairy Science* 76, 1714-1724.
- Maniou D., Tsala A., Moschopoulou E., Giannoglou M., Taoukis P., Moatsou G. (2013). Effect of high-pressure-treated starter on ripening of Feta Cheese. *Dairy Science and Technology* 93, 11-20.
- Manolaki P., Katsiari M.C., Alichanidis E. (2006). Effect of a commercial adjunct culture on organic acid contents of low-fat Feta-type cheese. *Food Chemistry* 98, 658-663.

McCue P.P., Shetty K. (2005) Phenolic antioxidant mobilization during yogurt production from soy milk using kefir cultures. *Process Biochemistry*, 40 1791-1797.

McSweeney P.L.H. (2004). Overview of cheese ripening: Introduction and overview. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Vol 1: General Aspects 3rd ed. (Eds Fox P.F., McSweeney P.L.H., Cogan T.M. & Guinee T.P.), Elsevier Academic Press, Amsterdam, pp. 348-360.

McSweeney P.L.H., Fox P.F. (2004). Metabolism of residual lactase and of lactate and citrate. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 3rd edition (eds P.F.Fox, P.L.H. McSweeney, T.M.Cogan, T.P. Guinee), Vol 1, 19-45. Elsevier Academic Press, Amsterdam.

Medina R.B., Oliszewski R., Ageijon Mukdsi M.C., Van Nieuwenhove C.P., Gonzalez S.N. (2011). Sheep and goat's dairy products from South America: microbiota and its metabolic activity. *Small Ruminant Research* 101, 84-91.

Meira S.M.M., Daroit D.J., Helfer V.E., Corrêa A.P.F., Segalin J., Carro S., Brandelli A. (2012). Bioactive peptides in water soluble extracts of ovine cheeses from Southern Brasil and Uruguay. *Food Research International* 48, 322-329.

Melilli C., Barbano D.M., Licitra G., Tumino G., Farina G., Caprino S. (2003). Influence of presalting and brine concentration on salt uptake by Ragusano cheese. *Journal of Dairy Science* 86, 1083-1100.

Michaelidou A., Alichanidis E., Polychroniadou A., Zerfiridis G. (2005). Migration of water-soluble nitrogenous compounds of Feta cheese from the cheese blocks into the brine. *International Dairy Journal* 15, 663-668.

Michaelidou A., Katsiari M.C., Kondyli E., Voutsinas L.P., Alichanidis E. (2003). Effect of a commercial adjunct culture on proteolysis in low-fat Feta-type cheese. *International Dairy Journal* 13, 179-189.

Moatsou G (2011). Indigenous enzymatic activities in ovine and caprine milks. *International Journal of Dairy Technology* 63, 16-31.

Moatsou G., Govaris A. (2011). White Brined Cheeses: A diachronic exploitation of small ruminants' milk in Greece. *Small Ruminant Research* 101, 113-121.

- Moatsou G., Masouras Th., Kandarakis I., Anifantakis, E. (2002). Evolution of proteolysis during the ripening of traditional Feta cheese. *Le Lait* 82, 601-611.
- Moatsou G., Moschopoulou E., Georgala A., Zoidou E., Kandarakis I., Kaminarides S., Anifantakis E. (2004). Effect of artisanal liquid rennet from kids and lambs abomasa on the characteristics of Feta cheese. *Food Chemistry* 88, 517-525.
- Moatsou G., Moschopoulou E., Georgala Aik., Zoidou E., Kandarakis I., Kaminarides S., Anifantakis E. (2004). Effect of artisanal liquid rennet from kids and lambs abomasa on the characteristics of Feta cheese. *Food Chemistry* 88, 517-525.
- Moschopoulou E. (2011). Characteristics of rennet and other enzymes from small ruminants used in cheese production. *Small Ruminant Research* 101, 188-195.
- Nega A., Kehagias C., Moatsou G. (2012). Traditional cheeses: Effect of cheesemaking technology on the physicochemical composition and mineral contents. *IDF International Symposium on Sheep, Goat and other non-Cow milk. Special Issue*, pp. 129-131.
- Nega A., Moatsou G. (2012). Proteolysis and related enzymatic activities in ten Greek cheese varieties. *Dairy Science, Technology* 92, 57-73.
- Noomen A. (1983). The role of the surface flora in the softening of cheeses with a low initial Ph. Netherlands. *Milk Dairy Journal* 37, 229.
- O'Connor C.B. (1974). The quality and composition of Cheddar cheese: effect of various rates of salt addition. *Irish Agricultural Creamery Review* 27, 11.
- Oliveira A.P., Nielsen J., Förster J. (2005). Modeling *Lactococcus lactis* using a genome-scale flux model. *BMC Microbiology* 5, 39.
- Pappas C.P., Kondyli E., Voutsinas L.P, Mallatou H. (1996). Effects of salting method and storage time on composition and quality of feta cheese. *Journal of the Society of Dairy Technology* 49, 113-118.
- Polychroniadou A. (1988). A simple procedure using trinitrobenzensulfonic acid for monitoring proteolysis in cheese. *Journal of Dairy Research* 55, 585-596.
- Pritchard, S.R., Phillips M., Kailasapathy K. (2010). Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. *Food Research international* 43, 1545-1548.

Sousa M.J., Ardo X., McSweeney P.L.H. (2001). Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal* 11, 327-345.

Tunick M. H. (1987). Calcium in dairy products. *Journal of Dairy Science* 70, 2429-2438.

Tzanetakis N., Litopoulou-Tzanetaki E., Vafopoulou-Mastrojiannaki A. (1991) Effect of *Pediococcus pentosaceus* on microbiology and chemistry of Telemes cheese. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* 24, 173-176.

Unal G., Akalin A. S. (2012). Antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of yoghurt fortified with sodium calcium caseinate or whey protein concentrate. *Dairy Science and Technology* 92, 627-639.

Upreti P., Bühlmann P., Metzger L.E. (2009). Influence of calcium of phosphorous lactose and salt-to-moisture ratio on Cheddar cheese quality: pH buffering properties of cheese. *Journal of Dairy Science* 8, 938-950.

Valsamaki K., Michaelidou A., Polychroniadou A. (2000). Biogenic amine production in Feta cheese. *Food Chemistry* 71 (2), 259-266.

Ανυφαντάκης Ε. (2004). Τυροκομία – Χημεία - Φυσικοχημεία - Μικροβιολογία. Εκδόσεις Σταμούλης, Αθήνα.

Καμιναρίδης Σ., Μοάτσου Γ. (2009). Γαλακτοκομία, Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα.

Μπίντσης Θ., Παπαδήμας Φ. (2009). Τυρί. Εκδόσεις Ψύχαλου, Αθήνα.

Παντελή Μ. (2011). Μελέτη της παρακαζεϊνικής μήτρας διαφορετικών κατηγοριών τυριών κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης τους. Μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών «Ολοκληρωμένη Διαχείριση Παραγωγής Γάλακτος και Γαλακτοκομικών Προϊόντων», Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

«Επίδραση της άλμης στην εξέλιξη της ωρίμασης λευκού τυριού από πρόβειο γάλα».

Η παρούσα μελέτη είχε ως σκοπό να διερευνήσει πώς επιδρά η ενίσχυση με ασβέστιο της άλμης διατήρησης στα χαρακτηριστικά των τυριών και στην εξέλιξη των ανταλλαγών μεταξύ τυριού και άλμης κατά τη διάρκεια της ωρίμασης λευκών τυριών άλμης από πρόβειο γάλα στο οποίο η αναλογία πρωτεΐνη/λίπος ήταν περίπου 1,30. Στο πλαίσιο αυτό μελετήθηκαν, η χημική σύσταση, τα αζωτούχα συστατικά, το κλάσμα των ανόργανων συστατικών, τα ρεολογικά χαρακτηριστικά και το αντιοξειδωτικό δυναμικό των τυριών παράλληλα με τα αζωτούχα συστατικά και τα κύρια άλατα της άλμης διατήρησής τους.

Γενικά, η εξέλιξη της σύστασης των τυριών κατά τη διάρκεια της ωρίμασης και συντήρησής τους ακολούθησε το πρότυπο της Φέτας, δηλαδή έντονες μεταβολές κατά την πρώτη φάση και οριακές αλλαγές μετά τη μεταφορά των τυριών στο ψυγείο. Στα ώριμα τυριά (>40 ημέρες) η ξηρή ουσία ήταν 42,6-43,2%, γεγονός που τα κατέτασσε στην κατηγορία των μαλακών τυριών. Στο ίδιο στάδιο ωρίμασης το λίπος επί ξηρού ήταν \cong 51-54% και η υγρασία επί των μη-λιπαρών συστατικών (MNFS) κυμαινόταν από 73,1-74,1%. Η ενίσχυση της άλμης με χλωριούχο ασβέστιο δεν επέδρασε στατιστικά σημαντικά στην πλειοψηφία των μεταβλητών που σχετίζονταν με τη σύσταση των τυριών, ενώ η ωρίμαση είχε σημαντική επίδραση σε όλες τις παραμέτρους σύστασης εκτός από την υγρασία. Από τις 40 ημέρες κι έπειτα η διάχυση αζωτούχων συστατικών στην άλμη διατήρησης συνέβαινε με εντονότερο ρυθμό σε σχέση με το λίπος και δεν περιορίστηκε από την ενίσχυση της άλμης με ασβέστιο. Επιπλέον, οι χρωματογραφικές κατατομές των πεπτιδίων του υδατοδιαλυτού εκχυλίσματος των τυριών και των αντίστοιχων αλμών έδειξαν επιλεκτικότητα ως προς τη διάχυση αυτών των συστατικών, η οποία αφορούσε κυρίως σε πεπτίδια μικρά/μεσαία με χαμηλή έως μέτρια υδροφοβικότητα. Εξαίρεση ήταν οι πρωτεΐνες του ορού οι οποίες παρά το μεγάλο μέγεθός και την έντονη υδροφοβικότητά τους διαχέονταν στην άλμη από τα πρώτα στάδια ωρίμασης. Στα ώριμα τυριά 110 ημερών η περιεκτικότητα σε ασβέστιο ήταν 0,30-0,31 g/100 g τυριού, ενώ στην άλμη τους ήταν 0,42-0,48 g/100 g άλμης. Γενικά, η άλμη των τυριών ήταν πλούσια σε ανόργανα συστατικά. Κατά τη διάρκεια της ωρίμασης παρατηρήθηκε έντονη έξοδος ασβεστίου, μαγνησίου και καλίου από το τυρί, κυρίως κατά την πρώτη φάση ωρίμασης παράλληλα με την έντονη πρόσληψη αλατιού που παρατηρήθηκε σε αυτό το χρονικό διάστημα. Στατιστικά σημαντικές διαφορές στην περιεκτικότητα των τυριών σε κύρια ανόργανα συστατικά προκαλούσε μόνο η ωρίμαση και όχι η σύσταση της άλμης. Η ωρίμαση των τυριών από τις 40 στις 110 ημέρες σκλήραινε τα τυριά και μείωνε την συγκολλητικότητα. Στα ώριμα τυριά των 110 ημερών η συμπλήρωση της άλμης με ασβέστιο μείωσε τη σκληρότητα και αύξησε τη συγκολλητικότητα σε σχέση με τους μάρτυρες. Οι διάφοροι δείκτες αντιοξειδωτικού δυναμικού των τυριών είχαν στις περισσότερες περιπτώσεις τιμές υψηλότερες από αυτές που αναφέρονται για άλλα τυριά. Σε μερικές από αυτές παρατηρήθηκε μείωση από τις 40 στις 110 ημέρες ωρίμασης, η οποία προφανώς σχετίζεται με τη διάχυση αζωτούχων συστατικών που συνέβαινε από το τυρί προς την άλμη, στα οποία περιλαμβάνονται προφανώς και πεπτίδια με σχετική δράση.

Τέλος, στην περίπτωση τυριών άλμης με υψηλή υγρασία, όπως αυτά της παρούσας μελέτης θα πρέπει περιορίζεται η έντονη πρόσληψη αλατιού, η οποία μπορεί να επηρεάζει δραματικά τις ανταλλαγές μεταξύ τυριού και άλμης, όχι μόνο εξαιτίας της προκαλούμενης αποβολής υγρασίας αλλά και εξαιτίας της «αντικατάστασης» κάποιου μέρους του ασβεστίου της παρακαζείνικης μήτρας από το νάτριο.

ABSTRACT

«Effect of brine on the ripening of white brined cheese from ovine milk»

The aim of the present study was to investigate the effect of the supplementation of the keeping brine with Ca on cheese characteristics and on the evolution of the cheese/brine exchange phenomena during the ripening of white brined cheese made from ovine milk with protein/fat ratio ~1.3. Chemical composition, nitrogenous fractions, inorganic fraction, textural characteristics and antioxidant capacity of cheeses were monitored throughout ripening along with the nitrogenous and inorganic fractions of their keeping brines.

The evolution of cheese composition was similar to that reported for Feta cheese, i.e. intense changes during the first part of ripening. The dry matter of mature cheeses (>40 d) was from 42.6 to 43.2% corresponding to rather soft type varieties. At the same stage of ripening, fat on dry matter ranged from 51 to 54% and MNFS from 73.1 to 74.1%. Brine supplementation with Ca did not affect significantly the majority of cheese composition parameters, whereas the ripening period affected all of them except moisture. The diffusion of nitrogenous fractions from cheese into the brine was more intense than that of fat and was not affected by Ca supplementation of the brine. Moreover the RP-HPLC profiles of both cheese WSN and brine showed that the diffusion of these compounds was selective involving small and medium size peptides with low to medium hydrophobicity. But major whey proteins were also diffused into the brine from the early stages of ripening despite to their size and high hydrophobicity. Cheese brine contained apart from nitrogenous also considerable amounts of inorganic components. At 110 d of ripening Ca content of cheese and brine were 0.30-0.31 g/100g and 0.42-0.48 g/100g respectively. During the first part of ripening, intense migration of inorganic compounds from cheese occurred opposite to the intense increase of salt in the cheese mass. Statistically significant changes in the inorganic fractions were due to ripening, whereas the Ca supplementation of the brine had no significant effect. Cheese hardness increased and adhesiveness decreased from 40 to 110 d of ripening. The Ca supplementation of the brine decreased the hardness and increased the adhesiveness of the 110 d old cheeses. The values of the indices used the antioxidant capacity of the cheeses were high compared to those reported for other cheese varieties. Some of the decreased from 40 to 110 d of ripening, implying an effect of the diffusion of the nitrogenous fractions into the brine.

In addition, it was concluded that salting of high-moisture cheeses must be controlled carefully, since high salt content has a dramatic impact on cheese/brine exchange phenomena. These phenomena are strongly affected by the replacement of the Ca of the paracasein matrix with sodium.