

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ
ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΓΕΙΩΝ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ «ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΗ
ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΚΑΙ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΩΝ
ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΚΤΩΝ ΑΥΘΕΝΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΥΡΙΩΝ ΠΟΠ

ΜΑΡΙΑΝΝΑ Κ. ΠΑΡΠΟΥΝΑ

Επιβλεπων καθηγητης:

Μασούρας Θ. Επίκουρος Καθηγητής

Αθήνα 2015

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΚΤΩΝ ΑΥΘΕΝΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΥΡΙΩΝ ΠΟΠ

ΜΑΡΙΑΝΝΑ Κ. ΠΑΡΠΟΥΝΑ

**Επιβλέπων καθηγητής: Μασούρας Θ.
Επίκουρος Καθηγητής**

**Τριμελής Επιτροπή:
Μασούρας Θ. Επίκουρος Καθηγητής
Καμιναρίδης Σ. Καθηγητής
Χατζηγεωργίου Ι. Επίκουρος Καθηγητή**

Περίληψη

Η εξάπλωση των προϊόντων Π.Ο.Π τόσο σε ευρωπαϊκή, όσο και σε εγχώρια κλίμακα συγκλίνει με την αυξανόμενη στους καταναλωτές τάση προτίμησης για προϊόντα αυθεντικά, με αναφορές στην παράδοση της περιοχής προέλευσης, τα οποία επιπλέον διακρίνονται για τη σταθερότητα των ποιοτικών χαρακτηριστικών τους, για τη διασφάλιση της υγιεινής τους κατάστασης και για την ιχνηλασιμότητάς τους.

Συνεπακόλουθα, η πιστοποίηση της γνησιότητάς τους αποτελεί εξαιρετικής σημασίας ζήτημα, τόσο για τους παραγωγούς, όσο και για τους καταναλωτές. Σήμερα εφαρμόζονται διάφορα συστήματα πιστοποίησης για τις ανάγκες της αναγνωρισιμότητας των προϊόντων αυτών από τους ελεγκτικούς φορείς. Ωστόσο, μια αξιόπιστη μέθοδος για επιβεβαίωση της αυθεντικότητας θα αποτελούσε ένα απαραίτητο εργαλείο προς αυτήν την κατεύθυνση. Επομένως, κρίνεται αναγκαία η ανάπτυξη αναλυτικών τεχνικών που θα παρέχουν στον παραγωγό και τις αρχές τη δυνατότητα ελέγχου της ορθής ή μη επισήμανσης των προϊόντων Π.Ο.Π..

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε το προφίλ των πτητικών ενώσεων σε σχέση με το είδος του γάλακτος, το γεωγραφικό διαμέρισμα προέλευσης και το στάδιο ωρίμανσης, ως ένας πιθανός δείκτης αυθεντικότητας της Γραβιέρας.

Λέξεις-κλειδιά: γραβιέρα, πτητικές ενώσεις, αυθεντικότητα, SPME

Abstract

The spreading of PDO products both at EU and national scale is in accordance with the growing among consumers trend of preferring authentic products, having references to the tradition of their region's origins, additionally characterized by the stability of their qualitative features, the assurance of their sanitation standards and their traceability.

Subsequently, the certification of their authenticity is an extremely important issue for both consumers and producers. Today, several certification systems are applied from the supervising authorities for the needs of the recognition of those products. However, a reliable method for the verification of authenticity would be vital to this direction. Therefore, the development of analytical techniques, that will provide the producer and the supervising authorities with the ability to control the correct or not labeling of a product, deems significant.

In the present research the volatile fraction profile was studied as a possible authenticity marker in relation to milk type, administrative region of origin and ripening stage of the Graviera cheese.

Keywords: graviera, volatile compounds, authenticity, SPME

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους που, με τον δικό του τρόπο ο καθένας, συνέβαλε στην εκπόνηση και ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κύριο Θεοφύλακτο Μασούρα, Επίκουρο Καθηγητή του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας που με δέχθηκε στο εργαστήριό του για να εκπονήσω υπό την καθοδήγησή του την μελέτη αυτή και με βοήθησε σε όλα τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας και της συγγραφής. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής μου, τους κύριους Στυλιανό Καμιναρίδη, Καθηγητή του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας και του κύριου Ιωάννη Χατζηγεωργίου, Επίκουρο Καθηγητή του Εργαστηρίου Διατροφής Ζώων για τις συμβουλές τις επισημάνσεις τους. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά την κυρία Σωτηράκογλου Κυριακή, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Εργαστηρίου Βελτίωσης Φυτών και Γεωργικού Πειραματισμού που με βοήθησε ουσιαστικά και επισταμένα στην στατιστική επεξεργασία και αξιολόγηση των πειραματικών δεδομένων μου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη συμφοιτήτριά μου Επιτροπάκη Σταυρούλα, την προπτυχιακή φοιτήτρια Γκαλημάνα Ζωή και τον Σακκά Λάμπρο για τη βοήθεια και συνεργασία τους τους στο εργαστήριο.

Ευχαριστώ θερμά τους φίλους μου Κωνσταντοπούλου Μαρία, Ραπτόπουλο Δημήτρη και Παπαδοπούλου Όλγα για τις πολύτιμες συμβουλές και παρατηρήσεις τους κατά τη διάρκεια της συγγραφής της παρούσας μελέτης.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες στους γονείς μου Αθηνά και Κώστα για την αγάπη και την υποστήριξή τους σε κάθε μου βήμα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου Νίκο Κ., Κατερίνα Γ., Θέμις Κ., Ελένη Π., Γιώργο Α., Γιάννη Κ. και Μάρκο για τη βοήθειά τους με κάθε τρόπο, την υπομονή, την κατανόηση και την αγάπη τους.

Περιεχόμενα

A. Θεωρητικό μέρος	1
1.2. Η ισχύουσα νομοθεσία.....	1
1.3. Η σημασία των προϊόντων Π.Ο.Π και Π.Γ.Ε.....	4
1.4. Ελληνικά Τυριά Π.Ο.Π.....	4
1.4.1. Η παραγωγή Π.Ο.Π. τυριών στην Ελλάδα.....	7
2. Η Γραβιέρα.....	9
2.1. Ιστορικά στοιχεία	9
2.2. Τεχνολογία παρασκευής	9
2.3. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά.....	11
3. Η ωρίμανση των τυριών και η διαμόρφωση του αρώματος και της γεύσης τους.....	15
3.1. Μεταβολισμός της λακτόζης.....	16
3.1.1. Ο μεταβολισμός του γαλακτικού οξέος	17
3.2. Ο καταβολισμός του κιτρικού οξέος.....	19
3.3. Λιπόλυση και καταβολισμός των λιπαρών οξέων και η συμβολή τους στη διαμόρφωση της γεύσης και του αρώματος των τυριών.....	21
3.3.1. Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα.....	23
3.3.2. Τα προϊόντα του καταβολισμού των ελεύθερων λιπαρών οξέων	24
3.3.3. Πρωτεόλυση.....	27
3.3.3.1. Τα πρωτεολυτικά ένζυμα	28
3.3.3.2. Η πρωτεόλυση στις διάφορες ποικιλίες τυριών	34
3.3.4. Ο καταβολισμός των αμινοξέων	35
3.3.4.1. Η τρανσαμίνωση	37
3.3.4.2. Η παραγωγή πτητικών θειούχων ενώσεων	38
3.3.4.3. Ο καταβολισμός των αρωματικών αμινοξέων	39
3.3.4.4. Η απαμίνωση.....	42
3.3.4.5. Η αποκαρβοξυλίωση.....	43
3.3.4.6. Ο καταβολισμός των αμινοξέων με διακλάδωση.....	43
3.3.4.7. Ο καταβολισμός των λοιπών αμινοξέων.....	44
3.4. Η γεύση και το άρωμα των τυριών	44
4. Αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού των πτητικών αρωματικών ουσιών στο τυρί	47
4.1. Μέθοδοι εξαγωγής των πτητικών αρωματικών ουσιών.....	47

4.1.1. Εκχύλιση με ατμό (steam distillation).....	48
4.1.2. Εκχύλιση σε συνθήκες υψηλού κενού (high-vacuum distillation).....	49
4.1.3. Απευθείας εκχύλιση (direct extraction) από έναν διαλύτη (π.χ. διαιθυλαιθέρας). 49	
4.1.5. Εκχύλιση με υπερκριτικά υγρά (supercritical fluid extraction, SFE)	50
4.1.6. Χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αποκλεισμού μεγέθους (high-performance size-exclusion chromatography)	50
Είναι μια μέθοδος εξαγωγής αρωματικών ουσιών από οργανικά διαλύματα τροφίμων με μεγάλη περιεκτικότητα σε λίπος. Το βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ο περιορισμένος αριθμός των απαιτούμενων εγχύσεων δείγματος και ο μικρός τελικός όγκος των κλασμάτων, που με όρους τελικής ωφέλιμης συγκέντρωσης, φάνηκε σημαντικά ταχύτερη και προκάλεσε τη δημιουργία λιγότερων προκαλούμενων από τη θερμότητα παραπροϊόντων και παρατηρήθηκαν λιγότερες απώλειες στις περισσότερες πτητικές ουσίες συγκριτικά με άλλες μεθόδους εκχύλισης (Lubke <i>et al.</i> , 1996).....	
4.1.7. Τεχνικές υπερκείμενης φάσης (headspace techniques).....	50
4.1.7.1. Τεχνικές δυναμικής υπερκείμενης φάσης (dynamic headspace ή purge-and-trap)	50
4.1.7.2. Τεχνικές στατικής υπερκείμενης φάσης (static headspace)	51
4.5.7.3. Μικροεκχύλιση στερεής φάσης (solid phase microextraction, SPME)	56
4.2. Ανάλυση και ταυτοποίηση των πτητικών αρωματικών ουσιών	63
4.2.1. Αέρια χρωματογραφία-Φασματοσκοπία μαζών (Gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS).....	63
4.2.2. Αέρια χρωματογραφία-Ολφакτομετρία (Gas chromatography-Olfactometry, GCO ή GC-sniffing)	65
4.2.3. Ηλεκτρονική μύτη (Electronic nose, e-sensing)	66
B. Πειραματικό μέρος.....	68
5. Υλικά και μέθοδοι.....	68
5.1. Δείγματα.....	68
5.2. Προσδιορισμός των πτητικών αρωματικών ουσιών	69
5.3. Στατιστική ανάλυση.....	70
Γ. Αποτελέσματα και συζήτηση.....	75
6. Το προφίλ των πτητικών ουσιών	75
7. Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων.....	84
Δ. Συμπεράσματα.....	95
Βιβλιογραφία.....	97
Παραρτήματα	116

A. Θεωρητικό μέρος

1. Τα προϊόντα με χαρακτηρισμό Προστατευόμενης Ονομασία Προέλευσης (Π.Ο.Π), Προστατευόμενη Γεωγραφική Ένδειξη (Π.Γ.Ε) και Ιδιότυπο Παραδοσιακό Προϊόν (Ι.Π.Π)

1.1. Σύντομη Ιστορική αναδρομή με έμφαση στα γαλακτοκομικά προϊόντα

Ο θεσμός της ονομασίας προέλευσης ιστορικά φαίνεται να έχει τις ρίζες του από την αρχαία Ελλάδα. Η πρώτη αναφορά φαίνεται να έγινε από τον Αισχυλίδη, τον 4ο αιώνα π.Χ, ο οποίος αναφέρει ότι το τυρί από την Κύθνο ή «Κύθνιος τύρος» διαφοροποιούνταν από τη γενικότερη επικρατούσα κοινή ονομασία «νησιωτικός τύρος». Αργότερα, σε μια επιστολή του 10ου αιώνα μ.Χ, ο Πατριάρχης Κωνσταντινουπόλεως Νικόλαος Μυστικός ευχαριστεί τον Λέοντα, κριτή Παφλαγονίας, για τα «προβάτια δώρα», δηλαδή τυρί και βούτυρο, της οποίας περιοχής ήταν ονομαστά (Μπίντσης και Παπαδήμας, 2009).

Στην Ιταλία, ο θεσμός καθιερώθηκε για πρώτη φορά το 1955, με την ονομασία «Denominazione di Origine Controllata-D.O.C». Στην Γαλλία, χρησιμοποιείται από το 1979 η ονομασία «Appellation d' Origine Contrôlée-A.O.C» για το χαρακτηρισμό τυριών και κρασιών με ονομασία προέλευσης, αν και υπάρχουν κείμενα για την ονομασία προέλευσης του τυριού Roquefort ήδη από τον 15ο αιώνα μ.Χ. Στην Ισπανία επίσης από το 1979, χρησιμοποιείται η ονομασία «Denominación d' Origine Protegida-D.O.P» για το χαρακτηρισμό προϊόντων με ονομασία προέλευσης. Για τα προϊόντα γάλακτος των προαναφερθεισών χωρών θα έπρεπε να τηρούνται οι ακόλουθες προϋποθέσεις, προκειμένου να φέρουν να φέρουν την ονομασία:

α. να παράγονται από γάλα προερχόμενο από συγκεκριμένη περιοχή, στην οποία θα γινόταν η τυροκόμηση αλλά και μεγάλο μέρος της ωρίμανσης

β. η τυροκόμηση να ακολουθεί συγκεκριμένη τεχνολογία, η οποία έχει διασωθεί με την παράδοση

γ. τα χαρακτηριστικά του τυριού να είναι καθορισμένα

δ. οι τυροκόμοι να ελέγχονται από ελεγκτικούς μηχανισμούς ώστε να διασφαλίζεται η αυθεντικότητα και η ποιότητα των τυριών αυτών (Μπίντσης και Παπαδήμας, 2009).

1.2. Η ισχύουσα νομοθεσία

Το 1992 με τον κανονισμό 2081/92 η Ευρωπαϊκή Ένωση θέσπισε για πρώτη φορά το καθεστώς, για την προστασία των γεωγραφικών ενδείξεων και των ονομασιών προέλευσης των γεωργικών προϊόντων και των τροφίμων και με τον κανονισμό

2082/92 το καθεστώς, για τις βεβαιώσεις ιδιοτυπίας των γεωργικών προϊόντων και τροφίμων. Το 2006 με στόχο τη βελτίωση του συστήματος, οι παραπάνω κανονισμοί αντικαταστάθηκαν από τους 510/06 και 509/06 αντίστοιχα, χωρίς ωστόσο να μεταβληθεί το πεδίο εφαρμογής τους και η σκοπιμότητά τους. Με τον Κανονισμό (ΕΕ) 1151/2012 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 21ης Νοεμβρίου 2012 «για τα συστήματα ποιότητας των γεωργικών προϊόντων και τροφίμων» έχουν συγχωνευτεί σε ένα ενιαίο νομοθετικό πλαίσιο οι ανωτέρω κανονισμοί (Κανονισμός (ΕΚ) 509/2006 και 510/2006). Παράλληλα στον εν λόγω κανονισμό έχουν προστεθεί και άλλα σχήματα ποιότητας όπως οι προαιρετικές ενδείξεις «Προϊόν ορεινής παραγωγής» και «Προϊόν νησιωτικής γεωργίας».

Σύμφωνα με τους παραπάνω κανονισμούς και στο πλαίσιο του επαναπροσανατολισμού της Κοινής Αγροτικής Πολιτικής (Κ.Α.Π), οι αγρότες έχουν τη δυνατότητα να στραφούν σε μορφές ολοκληρωμένης ανάπτυξης της υπαίθρου, μέσω της διαφοροποίησης της γεωργικής παραγωγής. Επιπλέον παρέχεται η δυνατότητα αφενός στους παραγωγούς (ιδίως των μειονεκτικών και απομακρυσμένων περιοχών) να προωθήσουν ευκολότερα προϊόντα τους που παρουσιάζουν εξειδικευμένα χαρακτηριστικά, πετυχαίνοντας καλύτερες τιμές στην αγορά και βελτιώνοντας έτσι το εισόδημά τους και αφ' ετέρου στους καταναλωτές να αγοράζουν προϊόντα ποιοτικά, με εγγυήσεις για τη παραγωγή, επεξεργασία και τη γεωγραφική καταγωγή τους.

Σύμφωνα με τα Άρθρα 5 και 18 του Κανονισμού (ΕΕ) 1151/2012, εδραιώθηκαν οι ακόλουθοι ορισμοί:

Ως «ονομασία προέλευσης» νοείται η νομοθεσία που ταυτοποιεί ένα προϊόν:

α. το οποίο κατάγεται από συγκεκριμένο τόπο, περιοχή, ή, σε εξαιρετικές περιπτώσεις, χώρα·

β. του οποίου η ποιότητα ή τα χαρακτηριστικά οφείλονται κυρίως ή αποκλειστικά στο ιδιαίτερο γεωγραφικό περιβάλλον που συμπεριλαμβάνει τους εγγενείς φυσικούς και ανθρώπινους παράγοντες· και

γ. του οποίου όλα τα στάδια της παραγωγής εκτελούνται εντός της οριοθετημένης γεωγραφικής περιοχής.

Ως «γεωγραφική ένδειξη» νοείται η ονομασία που ταυτοποιεί ένα προϊόν:

α. το οποίο κατάγεται από συγκεκριμένο τόπο, περιοχή ή χώρα·

β. του οποίου ένα συγκεκριμένο ποιοτικό χαρακτηριστικό, η φήμη ή άλλο χαρακτηριστικό μπορεί να αποδοθεί κυρίως στη γεωγραφική του προέλευση· και

γ. του οποίου ένα τουλάχιστον από τα στάδια της παραγωγής εκτελείται εντός της οριοθετημένης γεωγραφικής περιοχής.

Ως «εγγυημένο» παραδοσιακό ιδιότυπο προϊόν νοείται ένα ιδιότυπο προϊόν ή τρόφιμο το οποίο:

α. παρασκευάζεται με τρόπο παραγωγής, μεταποίησης ή σύνθεσης που αντιστοιχεί στην παραδοσιακή πρακτική για το εν λόγω προϊόν ή τρόφιμο· ή

β. παράγεται από πρώτες ύλες ή συστατικά που είναι τα χρησιμοποιούμενα παραδοσιακά.

Για να μπορεί να καταχωρηθεί μια ονομασία ως ονομασία εγγυημένου παραδοσιακού ιδιότυπου προϊόντος, πρέπει:

- α. να χρησιμοποιείται κατά παράδοση για την περιγραφή του ιδιότυπου προϊόντος· ή
- β. να προσδιορίζει τον παραδοσιακό χαρακτήρα ή τον ιδιότυπο χαρακτήρα του προϊόντος.

Προκειμένου να καταχωρηθεί ένα προϊόν στις ανωτέρω ονομασίες, θα πρέπει να τεκμηριωθούν επαρκώς τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του προϊόντος αυτού. Συνήθως, συγκροτείται μια ομάδα παραγωγών του προϊόντος, η οποία θα καθορίσει το προϊόν αυτό σύμφωνα με συγκεκριμένες προδιαγραφές. Η ομάδα αποστέλλει στην αρμόδια εθνική υπηρεσία μια αίτηση καθώς και τις προδιαγραφές του προϊόντος και αυτή εξετάζει την αίτηση σε εθνικό επίπεδο και εφόσον εγκριθεί, την αποστέλλει εν συνεχεία στην Ευρωπαϊκή επιτροπή. Εάν το προϊόν πληροί τις απαραίτητες προϋποθέσεις, γίνεται μια αρχική δημοσίευση στην Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Κοινότητας, η οποία πληροφορεί όλους τους εντός Ένωσης ενδιαφερόμενους και εφόσον δεν υπάρξουν αντιρρήσεις ή ενστάσεις, η Ευρωπαϊκή Επιτροπή δημοσιεύει το όνομα του προστατευμένου προϊόντος στην Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Κοινότητας, γεγονός που αποτελεί και την τελική έγκριση αυτού.

Από την 1.6.2006 στην Ελλάδα ο Ελληνικός οργανισμός «ΔΗΜΗΤΡΑ» (πρώην Οργανισμός Πιστοποίησης και Επίβλεψης Γεωργικών Προϊόντων (Ο.Π.Ε.Γ.Ε.Π), με διακριτικό τίτλο AGROCERT) είναι αρμόδιος για την έγκριση των υποβαλλόμενων από τις ενδιαφερόμενες επιχειρήσεις αιτημάτων ένταξης στο σύστημα ελέγχου, την πραγματοποίηση ελέγχων σε συνεργασία με τις αρμόδιες Διευθύνσεις αγροτικής Οικονομίας και κτηνιατρικής των Περιφερειακών Ενοτήτων, τη διασφάλιση της τήρησης των προδιαγραφών, την πιστοποίηση των εν λόγω προϊόντων και την τήρηση Μητρώου Εγκεκριμένων Επιχειρήσεων και Μητρώου δικαιούχων χρήσης των ενδείξεων αυτών.



Εικόνα 1: Οι κοινοτικές ενδείξεις για τα Π.Ο.Π, Π.Γ.Ε και Ε.Π.Ι.Π προϊόντα αντίστοιχα

1.3. Η σημασία των προϊόντων Π.Ο.Π και Π.Γ.Ε

Η εξάπλωση των προϊόντων Π.Ο.Π και Π.Γ.Ε συγκλίνει με την αυξανόμενη τάση στις καταναλωτικές προτιμήσεις για προϊόντα αυθεντικά, με αναφορές στην παράδοση της κάθε περιοχής που διαφοροποιούνται σαφώς από τα παραγόμενα σε μαζική κλίμακα προϊόντα. Παράλληλα, τα σαφώς καθορισμένα ποιοτικά χαρακτηριστικά τους τα καθιστούν ελκυστικότερα σε ένα καταναλωτικό κοινό που πλέον επιλέγει να καλύπτει τις διατροφικές του ανάγκες με προϊόντα που χαρακτηρίζονται από σταθερότητα, διασφαλισμένη υγιεινή και ποιότητα με όλες τις σύγχρονες προδιαγραφές των διεθνών συστημάτων πιστοποίησης (συστήματα HACCP- ISO) και ιχνηλασιμότητα. Επιπροσθέτως, τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των προϊόντων αυτών αυξάνουν την προστιθέμενη αξία τους, ενισχύοντας το εισόδημα των παραγωγών.

Η αυξανόμενη ζήτηση των Π.Ο.Π προϊόντων δίνει ώθηση στην ενίσχυση της αγροτικής οικονομίας των τοπικών κοινωνιών που δύνανται να ενασχοληθούν με την παραγωγή και προώθηση τους, συμβάλλοντας ταυτόχρονα στην ανάδειξη και την τουριστική ανάπτυξη των περιοχών αυτών και δυναμικά στην δημιουργία νέων θέσεων εργασίας σχετιζόμενων με την παραγωγή, τυποποίηση και διάθεσή τους. Τέλος, τα χαρακτηρισμένα ως Π.Ο.Π προϊόντα αποκτούν μια αναγνωρισιμότητα που μπορεί να επεκταθεί και εκτός συνόρων, ευνοώντας έτσι τις μαζικότερες εξαγωγές τους.

1.4. Ελληνικά Τυριά Π.Ο.Π

Στην Ελλάδα ο κατάλογος με τα χαρακτηρισθέντα ως Π.Ο.Π-Π.Γ.Ε προϊόντα περιλαμβάνει μια ευρεία ποικιλία αυτών, στα ποία συγκαταλέγονται οίνοι, ελαιόλαδα-ελιές, φρούτα-λαχανικά-ξηροί καρποί-όσπρια, προϊόντα αρτοποιίας-ζαχαροπλαστικής (Κρητικό Παξιμάδι), ψάρια νωπά, μαλάκια και μαλακόστρακα (Αυγοτάραχο Μεσολογγίου), άλλα προϊόντα ζωικής προέλευσης (όπως το Μέλι Ελάτης Μαινάλου Βανίλια), γόμες-ρητίνες (όπως η Μαστίχα Χίου), αιθέρια έλαια (Μαστιχέλαιο Χίου), άλλα προϊόντα (Κρόκος Κοζάνης) και τυριά.

Ο κατάλογος των ελληνικών τυριών που έχουν χαρακτηριστεί ως Π.Ο.Π, περιλαμβάνει 20 τυριά, τα οποία παρατίθενται στον Πίνακα 1:

Πίνακας 1: Τα ελληνικά Π.Ο.Π τυριά

Όνομασία	Τύπος τυριού	Τρόπος ωρίμανσης
Γραβιέρα Αγράφων	Σκληρό	Ωριμασμένο
Γραβιέρα Κρήτης	Σκληρό	Ωριμασμένο

Γραβιέρα Νάξου	Σκληρό	Ωριμασμένο
Κεφαλογραβιέρα	Σκληρό	Ωριμασμένο
Λαδοτούρι Μυτιλήνης	Σκληρό	Ωριμασμένο
Φορμαέλλα Αράχωβας Παρνασσού	Σκληρό	Ωριμασμένο
Μπάτζος	Σκληρό	Λευκό τυρί άλμης
Σαν Μιχάλη	Ημίσκληρο	Ωριμασμένο
Κασέρι	Ημίσκληρο	Αναπλαθόμενης μάζας;
Σφέλα	Ημίσκληρο	Λευκό τυρί άλμης
Ανεβατό	Μαλακό	Ωριμασμένο
Γαλοτούρι	Μαλακό	Ωριμασμένο
Κατίκι Δομοκού	Μαλακό	Φρέσκο
Κοπανιστή	Μαλακό	Φρέσκο
Πηχτόγαλο Χανίων	Μαλακό	Φρέσκο
Ξύγαλο (ή Ξίγαλο) Σητείας	Μαλακό	Φρέσκο
Καλαθάκι Λήμνου	Μαλακό	Λευκό τυρί άλμης
Φέτα	Μαλακό	Λευκό τυρί άλμης
Μανούρι	Μαλακό	Τυρογάλακτος
Ξινομυζήθρα Κρήτης	Μαλακό	Τυρογάλακτος

Σημειώνεται πως ο Ελληνικός Κώδικας Τροφίμων ,Ποτών και Αντικειμένων Κοινής Χρήσης (Κ.Τ.), άρθρο 83 ,κατατάσσει τα τυριά με βάση την πρώτη ύλη από την οποία παρασκευάζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες , από γάλα και από τυρόγαλα. Τα τυριά από γάλα διακρίνονται περαιτέρω ,με κριτήριο την ωρίμανση ,σε αυτά που ωριμάζουν και σε αυτά που δεν ωριμάζουν και έχουν αλοιφώδη υφή. Όσα ωριμάζουν κατατάσσονται σε τέσσερις κατηγορίες, πολύ σκληρά, σκληρά, ημίσκληρα και μαλακά, τα οποία επιτρέπεται να διατίθενται στην κατανάλωση σε τέσσερις ποιότητες – εξαιρετική, πρώτη, δεύτερη και μερικώς αποβουτυρωμένη – ανάλογα με την υγρασία και λιποπεριεκτικότητά τους. Τα τυριά που δεν ωριμάζουν έχουν αλοιφώδη υφή και επιτρέπεται να διατίθενται στην κατανάλωση στις παραπάνω ποιότητες . Τα τυριά τυρογάλακτος με ή χωρίς ωρίμανση, διακρίνονται επίσης σε τέσσερις ποιότητες. Για κάθε κατηγορία και ποιότητα τυριού καθορίζεται από τον Κ.Τ. μία μέγιστη υγρασία % και ένα ελάχιστο επί τοις % ξηράς ουσίας για να κυκλοφορήσουν στην αγορά.

Σύμφωνα με τους Οργανισμούς Τροφίμων και Γεωργίας (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) και Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO) ,σε κοινή τους έκδοση το 2002, ταξινομούν τα τυριά με κριτήρια την επί % υγρασία στο άνευ λίπους τυρί (MFFB), την επί % λιποπεριεκτικότητα στην ξηρά ουσία του τυριού (FDM) και τον τρόπο ωρίμανσής τους (Πίνακας 2).

Πίνακας 2: Κριτήρια κατάταξης των τυριών κατά FAO και WHO

Κριτήρια κατάταξης				Τρόπος ωρίμανσης
Συνεκτικότητα		Λιποπεριεκτικότητα		
MFFB %	Χαρακτηρισμός	FDB %	Χαρακτηρισμός	Χαρακτηρισμός
<51	Πολύ σκληρό	>60	Υψηλής λιποπεριεκτικότητας	Ωριμασμένο
49- 56	Σκληρό	45-60	Πλήρες	Ωριμασμένο με μύκητες
54-69	Ημίσκληρο	25-45	Μέσης λιποπεριεκτικότητας	Χωρίς ωρίμανση/φρέσκο
>67	Μαλακό	10-25	Χαμηλής λιποπεριεκτικότητας	Σε άλμη
		<10	Άπαχο	

Τα Π.Ο.Π τυριά πρέπει να πληρούν τις ακόλουθες προδιαγραφές:

α. Τα τυριά αυτά πρέπει να παρασκευάζονται από γάλα το οποίο προέρχεται από φυλές αιγών, προβάτων ή/και αγελάδων οι οποίες εκτρέφονται σε οριοθετημένη γεωγραφική περιοχή, έχουν προσαρμοστεί πλήρως στο περιβάλλον και η διατροφή τους βασίζεται στη χλωρίδα της περιοχής. Οι φυλές αυτές θα πρέπει να είναι πλήρως προσαρμοσμένες στις τοπικές συνθήκες και να αξιοποιούν άριστα τους φτωχούς ελληνικούς βοσκότοπους, με την εκπληκτική όμως ποικιλία της ενδημικής βλάστησης. Ειδικά οι ντόπιες φυλές ζώων χαρακτηρίζονται μεν για την χαμηλή γαλακτοπαραγωγή τους, αλλά στον αντίποδα και για το ιδιαίτερα πλούσια χημικής σύστασης και οργανοληπτικών ιδιοτήτων γάλα τους

β. Θα πρέπει να υπάρχουν στοιχεία που να εγγυώνται τη σύνδεση του τυριού με ένα ειδικό κοινωνικό περιβάλλον και τη γεωγραφική περιοχή προέλευσης

β. Τα τυριά αυτά πρέπει να παρασκευάζονται με παραδοσιακή τεχνολογία. η παρασκευή και ωρίμανση των τυριών θα πρέπει να πραγματοποιούνται σε εγκαταστάσεις που βρίσκονται εντός της οριοθετημένης γεωγραφικής περιοχής

γ. Κατά την παρασκευή των τυριών απαγορεύεται η συμπύκνωση, η προσθήκη σκόνης ή συμπληρώματος γάλακτος, πρωτεϊνών γάλακτος, καζεϊνικών αλάτων, χρωστικών, συντηρητικών και αντιβιοτικών ουσιών

δ. Οι ονομασίες στις οποίες έχει δοθεί προστασία υπάγονται σε συστήματα ελέγχου, ώστε να κατοχυρώνονται τόσο οι παραγωγοί από απομιμήσεις, όσο και οι καταναλωτές από παραπλανητικές ενδείξεις στα τρόφιμα. Οι έλεγχοι αφορούν στην ορθή τήρηση των προδιαγραφών και την ορθή χρήση της επισήμανσης. Απαγορεύεται η παραγωγή, εισαγωγή, εξαγωγή, διακίνηση και εμπορία τυριού με κάποια από τις Προστατευόμενες Ονομασίες Προέλευσης, εφόσον δεν πληρούνται όλες οι προδιαγραφές παραγωγής τους.

Τα επιμέρους χαρακτηριστικά των 3 Γραβιερών (Νάξου, Κρήτης και Αγράφων) που φέρουν τον Χαρακτηρισμό ΠΟΠ σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών παρατίθενται αναλυτικά στο Παράρτημα 1.

1.4.1. Η παραγωγή Π.Ο.Π. τυριών στην Ελλάδα

Τα έτη 2012 και 2013 στην Ελλάδα παρήχθησαν συνολικά 1249928,94 (637752,034 αγελαδινό, 497168,327 πρόβειο και 115008,579 κατσικίσιο) και 1893176,339 (606614,45 αγελαδινό, 519910,296 πρόβειο και 123337,103 κατσικίσιο) τόνοι γάλακτος αντίστοιχα (ΕΛΟΓΑΚ). Οι συνολικές ποσότητες παραγόμενων τυριών ήταν αντίστοιχα 259959,046 και 287467,865 τόνοι (ΕΛΣΤΑΤ). Από αυτά, οι ποσότητες των παραγομένων Π.Ο.Π τυριών παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

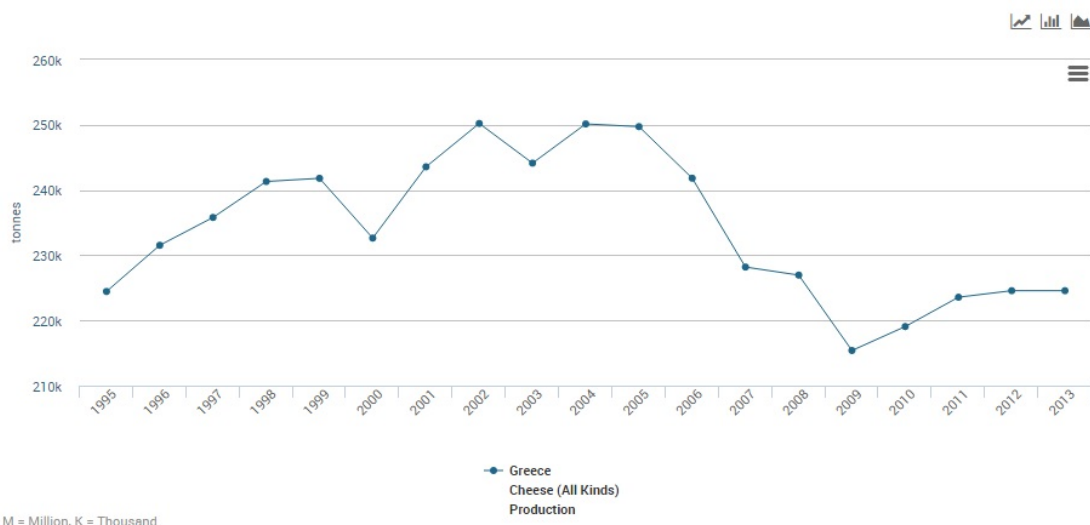
Πίνακας 3: Συνολικές ποσότητες παραγωγής των διάφορων ελληνικών Π.Ο.Π τυριών για τα έτη 2012 και 2013 (ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ).

Είδος τυριού	2012	2013
Φέτα	86566,817	94764,944
Κασέρι	2772,865	2526,92
Κεφαλογραβιέρα	2510,643	2303,584
Γραβιέρα Κρήτης	1731,629	1759,203
Μανούρι	839,543	925,038
Γραβιέρα Νάξου	967,898	1030,659
Κατίκι Δομοκού	389,46	454,839
Καλαθάκι Λήμνου	505,638	401,03
Γαλοτύρι	175,148	220,115
Λαδοτύρι Μυτιλήνης	496,405	412,929
Σφέλα	86,291	75,117
Μπάτζος	25,582	26,332

Σαν Μιγάλη	0	20,812
Πηχτόγαλο Χανίων	20,773	18,41
Κοπανιστή	1,987	4,751
Ξινομυζήθρα Κρήτης	36,209	42,923
Ανεβατό	10,704	14,467
Φορμαέλλα Αράχοβας	21,682	26,436
Γραβιέρα Αγράφων	0	0
Ξύγαλο Σητείας	0	0
ΣΥΝΟΛΟ	97159,274	105028,509

Από τη συνολικά παραγόμενη ποσότητα τυριών, το 37,37% για το έτος 2012 και το 36,53 % για το έτος 2013, δηλαδή περίπου το 1/3 της παραγωγής ήταν τυριά Π.Ο.Π., γεγονός που αναδεικνύει τη σημασία τους τόσο σε παραγωγικό όσο και σε οικονομικό επίπεδο. Αξίζει να σημειωθεί πως στα περισσότερα Π.Ο.Π. τυριά σημειώθηκε αύξηση στη συνολικώς παραγόμενη ποσότητα.

Οι συνολική ποσότητα παραγόμενης Γραβιέρας Π.Ο.Π. (Αγράφων, Κρήτης και Νάξου) ήταν 2699,527 για το έτος 2012 και 2789,862 για το έτος 2013, αποτελώντας το 2,77% και 2,65% της συνολικά παραγόμενης ποσότητας Π.Ο.Π τυριών, φέρνοντάς την στην τρίτη θέση πίσω από τα ευρέως καταναλισκόμενα τυριά Φέτα και Κασέρι, υπερτονίζοντας έτσι τη σημασία της για την ελληνική οικονομία και αναδεικνύοντας την προτίμηση και αναγνώριση του προϊόντος αυτού από το καταναλωτικό κοινό. Αξίζει να σημειωθεί πως κατά τα δύο αυτά έτη δεν παρήχθη καθόλου Γραβιέρα Αγράφων Π.Ο.Π. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στη γενικότερη πτώση της παραγόμενης ποσότητας τυριών από το έτος 2005 (Γράφημα 1), οπότε και άρχισαν να διαφαίνονται τα πρώτα σημάδια της επικείμενης οικονομικής κρίσης στην Ελλάδα, με τις προφανείς συνέπειες στην ελάττωση και του πρωτογενούς τομέα παραγωγής.



Γράφημα 1: Η συνολική ποσότητα παραγόμενων τυριών στην Ελλάδα για τα έτη 1995-2013 (FAOSTAT)

2. Η Γραβιέρα

2.1. Ιστορικά στοιχεία

Το τυρί γραβιέρα παρασκευάστηκε για πρώτη φορά στη Λάππα Μανωλάδος το 1914 από τον Ν. Ζυγούρη, επιστήμονα που συνέβαλε σημαντικά στην ανάπτυξη της ελληνικής γαλακτοβιομηχανίας. Η τυποποίησή της ολοκληρώθηκε στη Γαλακτοκομική σχολή Ιωαννίνων. Τελικά, παρήχθη ένας νέος, βελτιωμένος τύπος σκληρού τυριού, η τεχνολογία παρασκευής του οποίου διαδόθηκε μέσω των αποφοίτων της σχολής σε όλη την επικράτεια. Η τεχνολογία παρασκευής, όπως αναπτύχθηκε από το Ζυγούρη το 1952 ήταν μια εξέλιξη του τυριού από τα Άγραφα (Δημητριάδης, 1900), του πρώτου δηλαδή βελτιωμένου τύπου Κεφαλοτυριού (Ζυγούρης, 1926).

Το όνομα Γραβιέρα χρησιμοποιήθηκε αρχικά σαν συνώνυμο του τυριού Αγράφων εξαιτίας του ότι η τεχνολογία παρασκευής, η εμφάνιση και οι ιδιότητές του είχαν ομοιότητες με το ελβετικό τυρί Gruyère, το οποίο στην Ιταλία ήταν γνωστό ως Gruyera ή Ctiniera (Ζυγούρης, 1926). Σήμερα, το όνομα χρησιμοποιείται για σκληρά τυριά που παρασκευάζονται σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας με τεχνολογία παρόμοια με αυτή που περιέγραψε ο Ζυγούρης (Ζυγούρης, 1952). Οι διαφορές τους με το πρωτότυπο οφείλονται σε τροποποιήσεις που έγιναν στην αρχική τεχνολογία λόγω εμπορικών, κλιματικών και μεταφορικών συνθηκών της περιοχής παρασκευής. Το είδος του γάλακτος αποτελεί επίσης μια πολύ σημαντική παράμετρο (Ανυφαντάκης, 1998).

Αρχικά, η γραβιέρα παρασκευαζόταν αποκλειστικά από πρόβειο γάλα. Εκείνη την εποχή, το αγελαδινό γάλα δε χρησιμοποιούνταν καθόλου. Σήμερα, αν και το πρόβειο γάλα είναι το κυρίως χρησιμοποιούμενο, χρησιμοποιείται επίσης και αγελαδινό ή μίγματα του πρόβειου με γίδινο (Ανυφαντάκης, 1998).

2.2. Τεχνολογία παρασκευής

Αν και η μέθοδος παρασκευής της γραβιέρας διαφέρει από τυροκομική μονάδα σε τυροκομική μονάδα, σε γενικές γραμμές είναι αυτή που θα περιγραφεί ακολούθως.

Αρχικά, στα μικρά τυροκομεία παρασκευαζόταν από νωπό γάλα, ενώ σήμερα η μεγαλύτερη ποσότητα παράγεται σε σύγχρονα τυροκομεία κυρίως από παστεριωμένο γάλα.

Όταν χρησιμοποιείται παστεριωμένο γάλα, τότε μετά την παστερίωση προστίθενται οξυγαλακτικές καλλιέργειες (συνήθως *Lactococcus lactis* και *Lactococcus cremoris* σε αναλογία 1% καθώς και *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus helveticus* σε αναλογία 0,1%). Τα μικρά παραδοσιακά τυροκομεία που δεν έχουν τη δυνατότητα να διατηρούν τέτοιες καλλιέργειες, προσθέτουν συνήθως στο παστεριωμένο γάλα

γιαούρτης προηγούμενης ημέρας σε αναλογία 0,1-0,3%. Προπιονικά βακτήρια χρησιμοποιούνται κυρίως από τα μεγάλα τυροκομεία.

Μετά την παστερίωση το γάλα θερμαίνεται στους 34-36 °C, όπου και προστίθενται οι οξυγαλακτικές καλλιέργειες και χλωριούχο ασβέστιο (μέχρι 10gr/100kg γάλακτος), καθώς και ποσότητα πυτιάς ικανή να επιφέρει την πήξη σε 30-35 λεπτά.

Όταν το πήγμα αποκτήσει την επιθυμητή συνεκτικότητα, διαιρείται σε τεμάχια 0,5 cm μέσα σε 5 λεπτά περίπου και αφήνεται να ηρεμήσει για μερικά λεπτά. Ακολουθεί ανάδευση για 5-10 λεπτά και αναθέρμανση έως τους 48-50 °C υπό συνεχή ανάδευση. Ο ρυθμός αύξησης της θερμοκρασίας είναι αργός στην αρχή (2°C/5min) και επιταχύνεται (2 °C/3 min) προς το τέλος της αναθέρμανσης.

Η ανάδευση συνεχίζεται για 10-15 λεπτά έως ότου το πήγμα να παρουσιάσει την επιθυμητή σκληρότητα. Κατόπιν, αφήνεται 5 λεπτά να κατακαθίσει και μεταφέρεται σε καλούπια.

Στα μικρά τυροκομεία που ακόμα εφαρμόζονται οι παραδοσιακές πρακτικές τυροκόμησης, κάθε καλούπι ντύνεται με τυρόπανο, γεμίζεται με τυρόπηγμα και πιέζεται πρώτα με το χέρι και ύστερα στο πιεστήριο. Στην αρχή η πίεση είναι 2 φορές το βάρος του τυριού και σταδιακά αυξάνει στο 12πλάσιο (30 λεπτά-6πλάσιο, 60 λεπτά-8πλάσιο, 2 ώρες-10πλάσιο, 3 ώρες-12πλάσιο, με αλλαγές τυρόπανου στα μεσοδιαστήματα).

Την επόμενη ημέρα τα τυριά βγαίνουν από το πιεστήριο και τοποθετούνται σε ξύλινα ράφια στις αίθουσες αλατίσματος και αλατίζονται επιφανειακά με χονδρό αλάτι. Μία ημέρα μετά, το εναπομείναν διαλυμένο αλάτι τρίβεται στην επιφάνεια και τις πλευρές των τυριών, τα οποία ακολούθως αναστρέφονται και αλατίζονται εκ νέου με χονδρό αλάτι. Τα τυριά αλατίζονται κάθε μέρα τις 10 πρώτες μέρες, μέρα παρά μέρα τις επόμενες 10 και στο τέλος κάθε τρίτη μέρα. Ο συνολικός αριθμός αλατισμάτων είναι ανάλογος με το μέγεθος του τυριού (40-50 φορές κατά μέσο όρο). Όταν ολοκληρωθεί το αλάτισμα, τα τυριά τρίβονται και αναστρέφονται κάθε μέρα και διατηρούνται για ωρίμανση 3-4 μήνες. Μία φορά την εβδομάδα τα τυριά τρίβονται χρησιμοποιώντας ένα τυρόπανο εμβαπτισμένο σε πυκνή άλμη.

Στις μεγάλες βιομηχανίες, χρησιμοποιούνται μηχανικοί τυρολέβητες και μαχαίρια, η στράγγιση και η πλήρωση των καλουπιών γίνεται ημιαυτόματα και η πίεση γίνεται σε σύγχρονα πιεστήρια. Μετά την πίεση, το τυρί τοποθετείται σε ράφια σε χώρους θερμοκρασίας 12-14 °C για 2 ημέρες και στη συνέχεια εμβαπτίζεται σε άλμη 18-20 Be όπου παραμένει για 2 μέρες. Κατόπιν μεταφέρεται στους χώρους ωρίμανσης, θερμοκρασίας 18 °C, όπου μένουν για ένα περίπου μήνα και ακολούθως μεταφέρονται πάλι στους 12-14 °C και σε σχετική υγρασία 85-90%, όπου και παραμένουν μέχρι την ολοκλήρωση της ωρίμανσης. Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης γίνονται 20-30 ξηρά αλατίσματα με χονδρόκοκκο αλάτι (Ανυφαντάκης, 1998).

2.3. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά

Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης η επί τους εκατό σύσταση της γραβιέρας σε υγρασία, ολικά λιπαρά, αλάτι και CaO και οι φυσικοχημικές αλλαγές που επέρχονται, διαμορφώνονται όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 4. Τα δεδομένα αφορούν γραβιέρα παρασκευασμένη από παστεριωμένο πρόβειο γάλα (Βεϊνόγλου *et al.*, 1968) και παστεριωμένο αγελαδινό γάλα (Ζερφυρίδης *et al.*, 1984).

Πίνακας 4: Σύσταση και φυσικοχημικές αλλαγές στη γραβιέρα κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, όπου * (Βεϊνόγλου *et al.*, 1968) και ** (Ζερφυρίδης *et al.*, 1984).

Χρόνος Ωρίμανσης (ημέρες)	Υγρασία	Ολικά Λιπαρά	Αλάτι	pH	CaO
1	39,84 **	32 **	-	-	1,24 **
4	38,61 *	34,52 *	0,17 *	5,51 *	-
12	39,78 **	32,25 **	0,44 **	-	1,18 **
15	37,33 *	35,35 *	0,39 *	5,58 *	-
23	39,04 **	33 **	0,71 **	-	1,22 **
45	36,1 *	35,53 *	1,06 *	5,68 *	-
50	36,98 **	33,4 **	0,9 **	-	1,22 **
90	35,08 *	35,42 *	1,31 *	5,76 *	-
92	35,3 **	33,8 **	1,45 **	-	1,37 **
151	32,31 **	36 **	1,49 **	-	1,4 **
180	33,96 *	36,51 *	1,49 *	5,94 *	-

Επίσης, από μελέτη των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών της γραβιέρας Κρήτης από αιγοπρόβειο γάλα από διάφορους παραγωγούς (Ανυφαντάκης και Κανδαράκης, 1997) προέκυψαν τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά γραβιέρας Κρήτης (Ανυφαντάκης και Κανδαράκης, 1997).

Φυσικοχημικά	Μέγιστη τιμή	Ελάχιστη τιμή	Μέσος όρος
--------------	--------------	---------------	------------

χαρακτηριστικά			
pH	5,53	5,49	5,72
Υγρασία	34,7	31,74	37,61
Ξηρή ουσία	65,3	62,4	68,26
Λίπος	34,1	30,74	38
Λίπος επί ξηρού	52,22	48,35	56,28
Πρωτεΐνες	28,47	25,91	30,81
Πρωτεΐνες ορού	5,67	5,14	6,64
Αλάτι	1,69	1,3	2,03
Συντελεστής άλατος	4,67	3,51	5,82
Τέφρα	4,61	4,39	5,05

Το κλάσμα των αζωτούχων συστατικών (υδατοδιαλυτό άζωτο, μη πρωτεϊνικό άζωτο και αμινοξικό άζωτο) μελετήθηκε σε γραβιέρα από αγελαδινό γάλα (Ζερφυρίδης et al., 1984) και η επί τους εκατό αναλογία τους σε σχέση με το ολικό άζωτο διαμορφώθηκε όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 6.

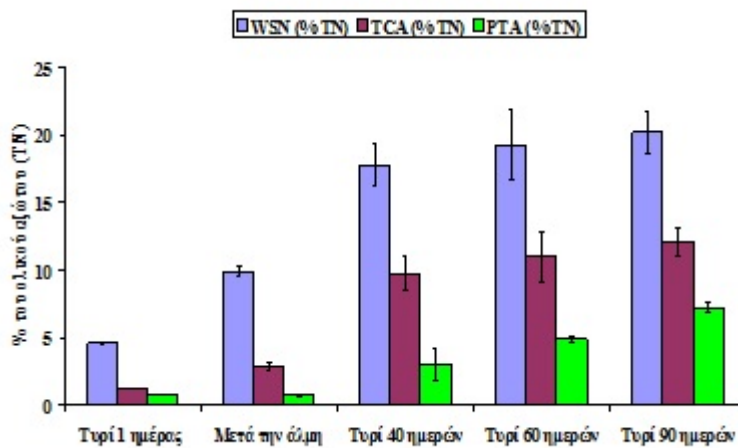
Πίνακας 6: Η % αναλογία των κλασμάτων του αζώτου σε σχέση με το ολικό άζωτο της γραβιέρας από αγελαδινό γάλα (Ζερφυρίδης et al., 1984).

Χρόνος ωρίμανσης	Υδατοδιαλυτό N	Μη πρωτεϊνικό N	Αμινοξικό N
4 ημέρες	13,9%	4,39%	8,25%
6 μήνες	30,7%	10,88%	16,3%

Στην ίδια μελέτη διερευνήθηκε και το προφίλ των ελεύθερων λιπαρών οξέων και παρατηρήθηκε πως ο σχηματισμός των λιπαρών οξέων χαμηλού μοριακού βάρους παρουσιάζει αύξηση κατά την κατεργασία του τυριού, ενώ τα μεγάλου μοριακού βάρους πλην των C18:1,2 και 3 παρουσιάζουν σημαντική αύξηση στους 3 μήνες και εν συνεχεία μειώνονται. Χαρακτηριστικό της γραβιέρας, σύμφωνα με τη μελέτη, αποτελεί η σχετικά υψηλή περιεκτικότητα σε βουτυρικό οξύ (Ζερφυρίδης et al., 1984).

Σε έρευνα για τις μεταβολές στα χημικά, μικροβιολογικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της γραβιέρας κατά τη διάρκεια της παρασκευής και της ωρίμανσης (Pappa et al., 2008), παρατηρήθηκαν τα εξής: η μέση περιεκτικότητα σε υγρασία

μειώθηκε από 43,8% στο φρέσκο τυρί σε 37,7% κατά την έξοδο από το θάλαμο 18-19°C, ενώ η περιεκτικότητα σε λίπος και πρωτεΐνη αυξήθηκαν 2,5-3,5% στο ίδιο διάστημα. Οι μετέπειτα μεταβολές ήταν μικρές. Η μέση περιεκτικότητα σε αλάτι στο φρέσκο τυρί (0,5%) αυξανόταν σταδιακά μετά το υγρό και τα ξηρά αλατίσματα, φθάνοντας 2,4% στο τυρί 90 ημερών. Όλα τα αζωτούχα κλάσματα αυξήθηκαν λόγω της σταδιακής πρωτεόλυσης στο τυρί (Γράφημα 2). Η λακτόζη και η γλυκόζη υπήρχαν στα φρέσκα δείγματα (0,2-0,5 g/100 g τυριού) αλλά μετατράπηκαν πλήρως σε οργανικά οξέα, με συνέπεια την μείωση του pH από 6,7 σε 6,2 εντός 24 ωρών. Μετά την άλμη το pH των τυριών ήταν 5,6-5,8. Το γαλακτικό οξύ αυξήθηκε μετά την πίεση μέχρι τα μέσα της ωρίμανσης και στη συνέχεια μειώθηκε, το οξικό αυξήθηκε κυρίως μετά την άλμη ενώ το κιτρικό οξύ παρέμεινε γενικά σταθερό (Πίνακας 7).



Γράφημα 2: Μεταβολές των κλασμάτων του αζώτου στη γραβιέρα κατά τη διάρκεια της παραγωγής (Pappa *et al.*, 2008).

Πίνακας 7: Ποσοτικές μεταβολές (mg/100 g τυριού) των κύριων οργανικών οξέων στη Γραβιέρα κατά τη διαδικασία παραγωγής (Pappa *et al.*, 2008).

Ηλικία τυριού	Κιτρικό	Γαλακτικό	Οξικό	Προπιονικό	Βουτυρικό
Παρτίδα 1					
1ης ημέρας	646.9	663.6	21.9	14.5	1.1
Μετά την άλμη	576.9	994.5	55.6	9.6	3.2
20 ημερών	415.4	944.8	113.9	4.9	6.2
40 ημερών	551.6	615.6	165.5	132.5	21.8

60 ημερών	550.3	496.4	173.6	114.3	35.1
90 ημερών	556.1	418.2	176.6	134.7	42.5
Παρτίδα 2					
1ης ημέρας	558.4	726.4	16.6	2.9	1.5
Μετά την άλμη	792.0	1012.7	14.6	ίχνη	1.9
20 ημερών	571.1	966.5	108.0	4.3	4.5
40 ημερών	524.5	1004.1	140.8	6.1	17.8
60 ημερών	614.0	771.7	133.1	2.8	27.7
90 ημερών	611.2	887.5	148.2	4.7	15.5

3. Η ωρίμανση των τυριών και η διαμόρφωση του αρώματος και της γεύσης τους

Η ωρίμανση περιλαμβάνει όλες τις μεταβολές, ποιοτικές και ποσοτικές, που συμβαίνουν στο τυρί, μερικές εκ των οποίων ξεκινούν πριν το πέρας της δημιουργίας του τυροπήγατος. Η δομή και η σύσταση του τυριού μεταβάλλεται κατά την ωρίμανση και ως εκ τούτου και οι οργανοληπτικές του ιδιότητες. Στις μεταβολές αυτές εμπλέκονται βιοχημικές, μικροβιολογικές, καθώς και αμιγώς φυσικοχημικές και μηχανικές παράμετροι. Οι κύριες βιοχημικές διεργασίες που συμβαίνουν κατά την ωρίμανση των τυριών είναι οι εξής:

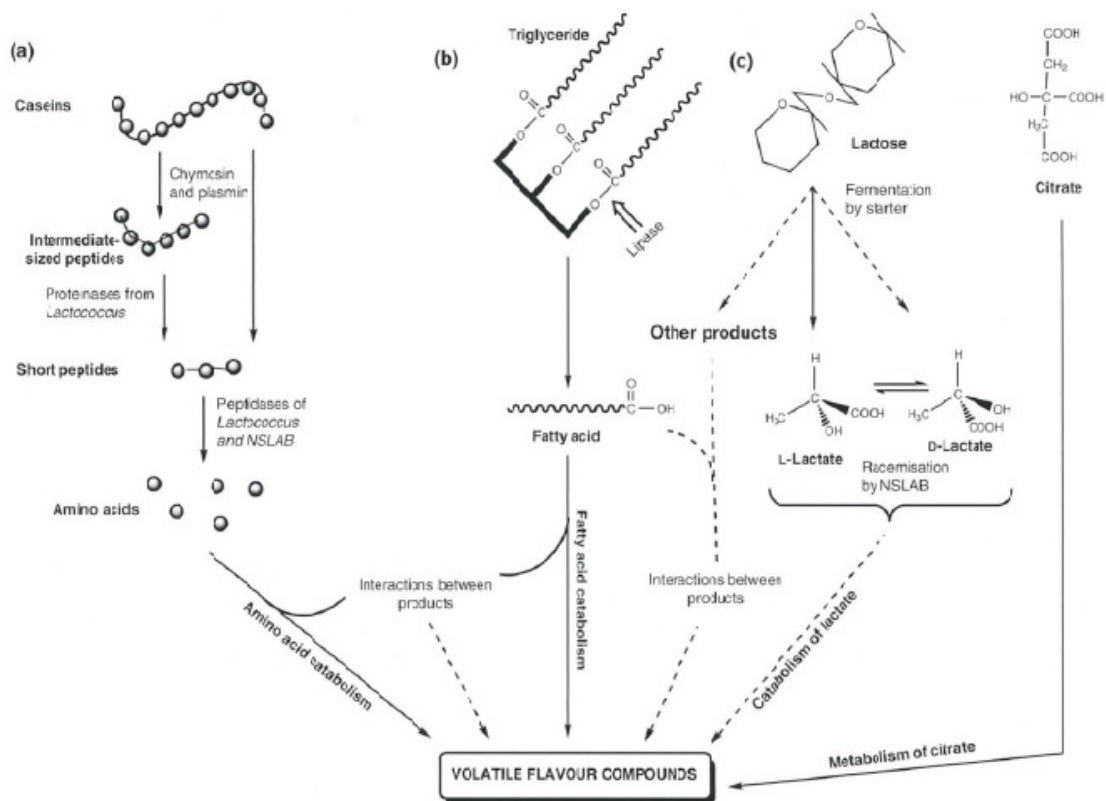
α. Ο μεταβολισμός της λακτόζης και του γαλακτικού οξέος

β. Ο καταβολισμός του κιτρικού οξέος

γ. Η λιπόλυση και ο καταβολισμός των λιπαρών οξέων

δ. Η πρωτεόλυση και ο καταβολισμός των αμινοξέων

Τα προϊόντα των διεργασιών αυτών (Εικόνα 2) διαμορφώνουν το άρωμα και τη γεύση των τυριών.



Εικόνα 2: Ανασκόπηση των βιοχημικών διεργασιών κατά την ωρίμανση των τυριών

3.1. Μεταβολισμός της λακτόζης

Το τυρόπηγμα περιέχει μια μικρή ποσότητα υπολειμματικής λακτόζης (περίπου 0,7-1,5%), η οποία μεταβολίζεται ταχέως στα πρώιμα στάδια της ωρίμανσης σε γαλακτικό οξύ, το οποίο ακολούθως καταβολίζεται προς άλλες ουσίες μέσω διαφόρων μεταβολικών μονοπατιών. Το ποσοστό της υπολειμματικής λακτόζης διαφοροποιείται ανάλογα με την τεχνολογία παρασκευής και μεταβολίζεται σε ύστερα στάδια της ωρίμανσης από την εναρκτήρια οξυγαλακτική καλλιέργεια και αν υπάρχει, τη δευτερεύουσα καλλιέργεια, συμβάλλοντας ταυτόχρονα στην ανάπτυξη ανεπιθύμητης μικροχλωρίδας. Ιδιαίτερη σημασία στην εξέλιξη της διεργασίας αυτής έχει η περιεκτικότητα σε NaCl στην υγρή φάση των τυριών, καθώς πειράματα στο Cheddar έδειξαν πως σε συγκεντρώσεις γύρω στο 4% η πτώση του pH και ο καταβολισμός της υπολειμματικής λακτόζης ολοκληρώνονταν ταχύτερα απ' ότι σε συγκεντρώσεις 6% (Turner and Thomas, 1980).

Τα χρησιμοποιούμενα ως καλλιέργειες εκκίνησης οξυγαλακτικά βακτήρια διακρίνονται σε ομοζυμωτικά, τα οποία μεταβολίζουν την λακτόζη κατά 90-95% προς γαλακτικό οξύ και προς ένα μικρό ποσοστό άλλων προϊόντων, όπως CO₂, βουτυρικό οξύ, φορμικό οξύ, οξικό οξύ (υπό αναερόβιες συνθήκες) και ακεταλδεΐδη και σε ετεροζυμωτικά που παράγουν εκτός από γαλακτικό οξύ και οξικό οξύ, αιθανόλη και CO₂ (Fox *et al.*, 2000).

Στα ομοζυμωτικά οξυγαλακτικά βακτήρια *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* και *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* bv. *diacetylactis*, η λακτόζη φωσφορυλιώνεται κατά την είσοδό της στο κύτταρο από ένα σύστημα φωσφοτρανσφεράσης στην κυτταρική μεμβράνη. Ακολουθεί η υδρόλυσή της από τη β-γαλακτοζιδάση προς γλυκόζη και γαλακτόζη και μετά από μια σειρά βιοχημικών αντιδράσεων τελικά από 1 mol λακτόζης προκύπτουν 4 mol L+ γαλακτικού οξέος (McSweeney and Sousa, 2000). Τα οξυγαλακτικά βακτήρια *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* και *Lactobacillus delbruckii* ssp. *bulgaricus* δεν διαθέτουν σύστημα φωσφορυλίωσης της εισερχόμενης λακτόζης, οπότε μετά την υδρόλυσή της από τη β-γαλακτοζιδάση, η γλυκόζη μεταβολίζεται προς 2 μόρια L+ ή D- ή μίγμα L, D γαλακτικού οξέος (γλυκόλυση- μεταβολικό μονοπάτι Embden Meyerhof). Η γαλακτόζη, που δε μεταβολίζεται, παραμένει στο πήγμα και μπορεί να υπάρχει σε σημαντικά ποσά σε τυριά που παρασκευάζονται με καλλιέργειες τους μικροοργανισμούς αυτούς (McSweeney and Sousa, 2000).

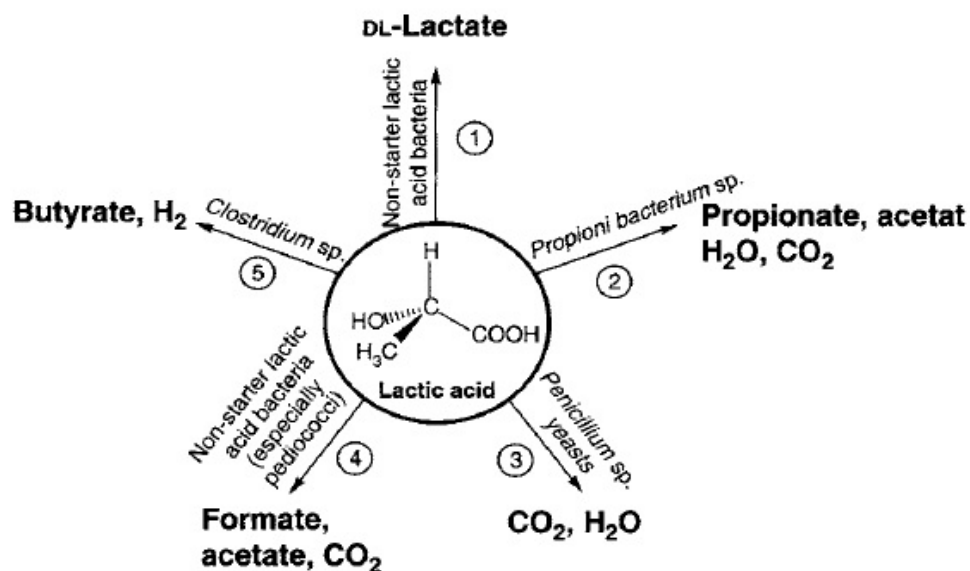
Τα ετεροζυμωτικά βακτήρια συμπεριλαμβανομένων και μερικών ειδών των γενών *Lactobacillus* sp. και *Leuconostoc* sp. διασπούν την λακτόζη μέσω του μεταβολικού μονοπατιού της φωσφοκετολάσης σε L+ ή D- ή μίγμα L, D γαλακτικού οξέος, αιθανόλη ή οξικό οξύ και διοξειδίο του άνθρακα (Vedamuthu, 1994, Cogan and Hill, 2004).

Εκτός από τα τελικά προϊόντα των ζυμώσεων της λακτόζης συσσωρεύονται και μικρές ποσότητες ενδιάμεσων προϊόντων της οξυγαλακτικής ζύμωσης, όπως το πυροσταφυλικό οξύ (McSweeney and Sousa, 2000).

Η παραγωγή του γαλακτικού οξέος επιτελεί σημαντικές λειτουργίες που συμβάλλουν στην εξέλιξη της ωρίμανσης και τη διαμόρφωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του τυριού, επιταχύνει τη συναίρεση του τυροπήγαμτος με αποτέλεσμα την αποβολή μεγαλύτερης ποσότητας τυρογάλακτος, επιταχύνει τη δράση της πυτιάς κατά την πήξη του γάλακτος, προκαλεί πτώση του pH και του οξειδοαναγωγικού δυναμικού και κατά αυτόν τον τρόπο επηρεάζει άμεσα το είδος των μικροοργανισμών που αναπτύσσονται και την ενεργότητα των ενζύμων και έχει επίδραση και στη γεύση (Ανυφαντάκης, 2004).

3.1.1. Ο μεταβολισμός του γαλακτικού οξέος

Το γαλακτικό οξύ αποτελεί υπόστρωμα για μια σειρά μεταβολικών μονοπατιών κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.



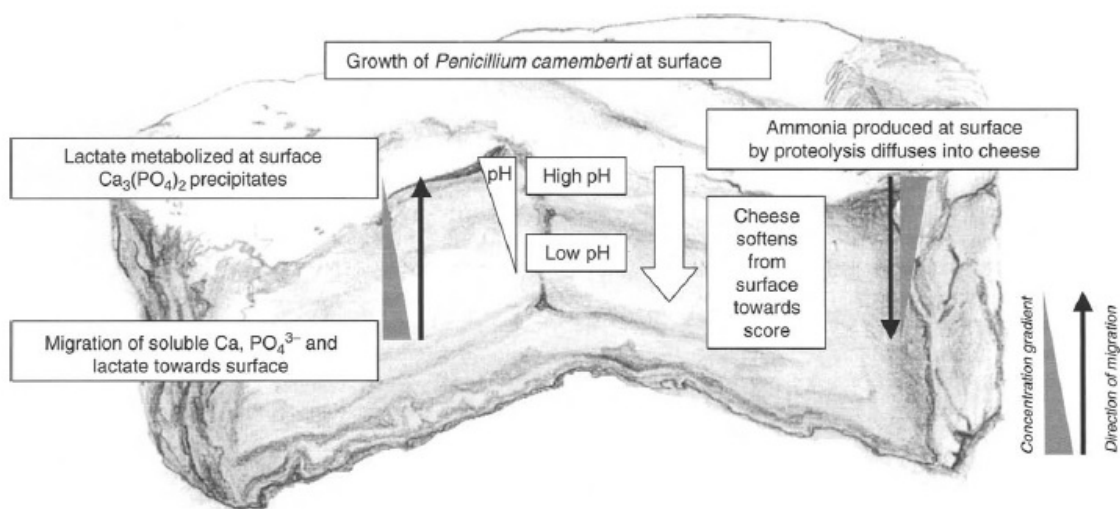
Εικόνα 3: Τα μεταβολικά μονοπάτια της λακτόζης κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης (McSweeney and Sousa, 2000).

Όπως ήδη έχει αναφερθεί, οι εναρκτήριες οξυγαλακτικές καλλιέργειες, ανάλογα με το είδος και το στέλεχος, μπορούν να μεταβολίσουν το γαλακτικό οξύ κατά κύριο λόγο προς οξικό οξύ, αιθανόλη, φορμικό οξύ και CO₂ (Fox *et al.*, 2000).

Όσον αφορά την ανεπιθύμητη μικροχλωρίδα, οι *Pediococci* σε υψηλές συγκεντρώσεις O₂ παράγουν από 1 mol γαλακτικού οξέος, 1 mol οξικού οξέος και ένα mol CO₂ καταναλώνοντας ταυτόχρονα 1 mol O₂ (Thomas, 1987). Γενικά, η οξείδωση του γαλακτικού οξέος προς οξικό οξύ εξαρτάται από τον πληθυσμό της ανεπιθύμητης μικροχλωρίδας και τη διαθεσιμότητα σε O₂, τα οποία με τη σειρά τους επηρεάζονται από το μέγεθος του τυριού και από την περατότητα του υλικού συσκευασίας (Aston and

Dulley, 1982). Το οξικό οξύ, που συνήθως υπάρχει σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε σχεδόν όλα τα είδη των τυριών, θεωρείται πως συμβάλλει στη διαμόρφωση της γεύσης, παρόλο που σε πολύ αυξημένες συγκεντρώσεις μπορεί να προκαλέσει ανεπιθύμητες γεύσεις (Girpon, 2004).

Ο μεταβολισμός του γαλακτικού οξέος είναι εκτεταμένος σε τυριά που ωριμάζουν με ανάπτυξη μικροοργανισμών στην επιφάνειά τους, όπως το Camembert και το Brie. Η εναρκτήρια μεσόφιλη καλλιέργεια παράγει γαλακτικό οξύ στο πήγμα, το οποίο πολύ γρήγορα μεταβολίζεται από την δευτερεύουσα καλλιέργεια. Η δευτερεύουσα καλλιέργεια σε αυτά τα τυριά αποτελείται από ζύμες και μύκητες, όπως οι ζύμες *Geotrichum candidum*, *Debaryomyces hansenii* και *Saccaromyces cerevisiae*, ο μύκητας *Penicillium camemberti* σε πολύ πυκνή ανάπτυξη και ίσως και κάποια Gram+ βακτήρια, όπως στελέχη του *Brevibacterium linens* (Spinnler and Girpon, 2004). Οι μικροοργανισμοί αυτοί μεταβολίζουν γρήγορα το γαλακτικό οξύ σε CO₂ και H₂O με αποτέλεσμα το pH στην επιφάνεια του τυριού να αυξάνει. Όταν το γαλακτικό οξύ εξαντληθεί, στελέχη του *Penicillium camemberti* μεταβολίζουν τα αμινοξέα που απελευθερώνονται από τις καζεΐνες και παράγεται NH₃ που διαχέεται εσωτερικά. Η αύξηση του pH στην επιφάνεια των τυριών αυτών έχει μεγάλη σημασία για την ανάπτυξη των κορινόμορφων βακτηρίων (τα στελέχη του *Brevibacterium linens* δεν αναπτύσσονται σε pH χαμηλότερο του 5.8), για την ενεργότητα της πλασμίνης (που είναι άριστη σε αλκαλικό pH) και έχει επίσης μεγάλη επίδραση στην υφή του τυριού διότι το Ca₂⁺ κατακρημνίζεται στην επιφάνεια του τυριού ως Ca₃(PO₄)₂ προκαλώντας την μείωση του κλάσματος του Ca₂⁺ στο εσωτερικό του τυριού και καθιστώντας το έτσι μαλακότερο (Fox *et al.*, 1995) (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση των αλλαγών που συμβαίνουν σε τυριά με επιφανειακή ανάπτυξη μύκητα κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης (Fox *et al.*, 1995).

Σε συγκεκριμένα σκληρά τυριά και σε προχωρημένο στάδιο της ωρίμανσης, είναι δυνατό να παράγονται αέρια και ανεπιθύμητες χημικές ενώσεις από την ζύμωση του γαλακτικού οξέος από βακτήρια του γένους *Clostridium* sp. (κυρίως το *Clostridium tyrobutyricum*) προς βουτυρικό οξύ και H₂ (Kleter *et al.*, 1984). Όταν το βουτυρικό οξύ βρίσκεται σε μεγάλη συγκέντρωση στο τυρί, έχει δυσμενή επίδραση στην γεύση του. Η παραγωγή αερίων συμβαίνει κυρίως σε ποικιλίες τυριών που αλατίζονται σε άλυμη και οφείλεται στο μεγάλο χρονικό διάστημα που απαιτείται για να φτάσει το αλάτι σε ένα επίπεδο ικανό να αναστείλει την ανάπτυξη των ανεπιθύμητων μικροοργανισμών (Fox *et al.*, 1995).

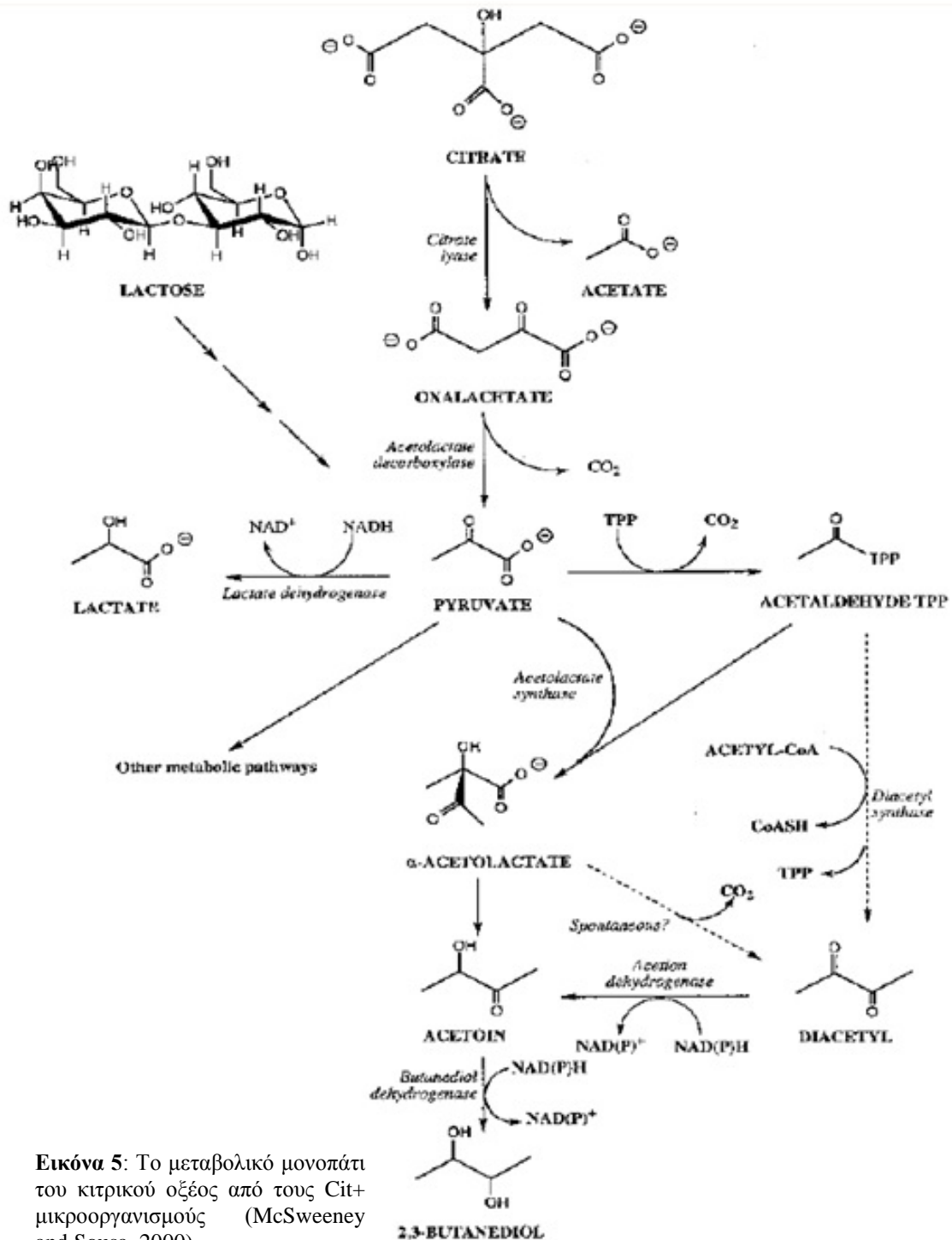
Στα ελβετικού τύπου τυριά, το *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* μεταβολίζει τη λακτόζη προς προπιονικό οξύ, οξικό οξύ, CO₂ και H₂O (Piveteau, 1999). Το CO₂ μετακινείται μέσω της μάζας του τυριού σε αδύναμα σημεία όπου και συσσωρεύεται σχηματίζοντας τις χαρακτηριστικές για τα ελβετικά τυριά οπές. Καθώς τα *Propionibacteria* είναι πολύ ευαίσθητα στο NaCl, τα τυριά ελβετικού τύπου περιέχουν μικρό ποσοστό αλατιού Richoux *et al.*, 1998). Σε ελβετικό τυρί 80 kg παρατηρήθηκε πως δημιουργήθηκαν συνολικά 120 λίτρα προπιονικού οξέος, εκ των οποίων περίπου 60 λίτρα παρέμειναν διαλυμένα στη μάζα του τυριού, 40 λίτρα χάθηκαν και μόνο 20 λίτρα παρέμειναν εντός των οπών (Steffen *et al.*, 2004).

3.2. Ο καταβολισμός του κιτρικού οξέος

Αν και η συγκέντρωση του κιτρικού οξέος στο τυρόπηγμα είναι χαμηλή, καθώς το μεγαλύτερο μέρος του χάνεται στον ορό, παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση της γεύσης του τυριού καθώς μεταβολίζεται σε έναν αριθμό αρωματικών συστατικών από μικροοργανισμούς που έχουν την ικανότητα να το μεταβολίζουν. Το κιτρικό οξύ μεταβολίζεται από συγκεκριμένα είδη μεσόφιλων εναρκτήριων μικροοργανισμών, τους θετικούς στο κιτρικό οξύ (Cit⁺) λακτόκοκκους *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* bv. *diacetylactis*, τον *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* και τον *Leuconostoc lactis*. Επίσης, μπορεί να μεταβολιστεί από συγκεκριμένους μεσόφιλους λακτοβακίλλους της δευτερεύουσας καλλιέργειας (Fox *et al.*, 2000).

Οι Cit⁺ μικροοργανισμοί δεν χρησιμοποιούν το κιτρικό οξύ ως πηγή ενέργειας, αλλά το μεταβολίζουν ταχέως με κάποιο μεταβολισμό σάκχαρο, όπως η λακτόζη (McSweeney and Sousa, 2000).

Το μεταβολικό μονοπάτι του κιτρικού οξέος από τους Cit⁺ μικροοργανισμούς είναι αυτό που παρουσιάζεται στην Εικόνα 5.



Εικόνα 5: Το μεταβολικό μονοπάτι του κιτρικού οξέος από τους Cit+ μικροοργανισμούς (McSweeney and Sousa, 2000).

Οι χαρακτηριστικές οπές στα ολλανδικού τύπου τυριά οφείλονται στην παραγωγή CO_2 κατά το μεταβολισμό των κιτρικών αλάτων. Οι ουσίες που παράγονται κατά το μεταβολισμό του κιτρικού οξέος και συμβάλλουν στη διαμόρφωση του αρώματος στο

τυρί είναι το οξικό οξύ, το διακετύλιο, η ακετοΐνη και η 2,3-βουτανεδιόλη. Εξαιτίας του σχηματισμού διακετυλίου, ο μεταβολισμός του κιτρικού οξέος είναι πολύ σημαντικός για το σχηματισμό της γεύσης και του αρώματος στο τυρί Cottage (Antinone *et al.*, 1994), ενώ συμβάλλει και στη δημιουργία αρώματος στα ολλανδικού τύπου τυριά και στο Cheddar (Milo and Reineccius, 1997). Το διακετύλιο παράγεται σε πολύ μικρή ποσότητα (1-10 $\mu\text{g/mL}$ γάλακτος), ενώ η ακετοΐνη παράγεται συνήθως σε 10 έως 50 φορές μεγαλύτερες της συγκέντρωσης του διακετυλίου ποσότητες. Σύμφωνα με το μεταβολικό μονοπάτι που παρουσιάζεται στην Εικόνα 4, από 1 mol κιτρικού οξέος θα έπρεπε να παράγεται 1 mol οξικού οξέος, στην πράξη όμως παράγονται 1,2 mol. Η περίσσεια αυτή κατά πάσα πιθανότητα προκύπτει από την παραγωγή μικρών ποσοτήτων οξικού οξέος κατά το μεταβολισμό των σακχάρων (McSweeney and Sousa, 2000).

3.3. Λιπόλυση και καταβολισμός των λιπαρών οξέων και η συμβολή τους στη διαμόρφωση της γεύσης και του αρώματος των τυριών

Τα λιπίδια των τροφίμων υφίστανται οξειδωτική και υδρολυτική αποικοδόμηση. Η οξείδωση των λιπιδίων στο τυρί δε συμβαίνει όμως σε εκτεταμένο βαθμό, πιθανόν εξαιτίας του χαμηλού του οξειδοαναγωγικού δυναμικού (-250 mV) (Fox *et al.*, 2000, McSweeney and Sousa, 2000). Η ενζυμική υδρόλυση (λιπόλυση) των τριγλυκεριδίων προς ελεύθερα λιπαρά οξέα, μόνο- ή διγλυκερίδια και γλυκερίνη είναι σημαντική για τη διαμόρφωση του αρώματος και της γεύσης των τυριών κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης. Τα λιπαρά οξέα αποτελούν πρόδρομες ουσίες διάφορων πτητικών αρωματικών ουσιών που συμβάλλουν στη διαμόρφωση της γεύσης και του αρώματος των τυριών (McSweeney and Sousa, 2000). Τυριά μειωμένων λιπαρών δεν αναπτύσσουν τις χαρακτηριστικές γεύσεις και αρώματα των αντίστοιχων πλήρων σε λιπαρά τυριών (Dimos *et al.*, 1996, Wijesundera *et al.*, 1998).

Γενικά, τα λιπολυτικά ένζυμα είναι ειδικά για λιπαρά οξέα εστεροποιημένα στις θέσεις sn-1 και sn-3 των τριγλυκεριδίων. Αρχικά, τα τριγλυκερίδια υδρολύονται προς 1,2- και 2,3-διγλυκερίδια και αυτά στην συνέχεια προς 2-μονογλυκερίδια (Deeth and Touch, 2000). Στις θέσεις sn-1 και sn-3 των τριγλυκεριδίων εντοπίζονται κυρίως το βουτυρικό οξύ και άλλα λιπαρά οξέα μακράς και μέσης αλύσου (Christie, 1983, Deeth and Touch, 2000).

Οι λιπάσες προέρχονται από διάφορες πηγές:

α. Το γάλα: Το γάλα περιέχει μια πολύ δραστική ενδογενή λιποπρωτεϊνική λιπάση (lipoprotein lipase, LPL), η οποία διέρχεται από την κυκλοφορία του αίματος μέσω της κυτταρικής μεμβράνης των μαστικών κυττάρων και βρίσκεται επί των καζεϊνικών μικκυλίων (Olivecrona *et al.*, 2003, Fox *et al.*, 2004). Δρα προτιμότερο επί των τριγλυκεριδίων με λιπαρά οξέα μέσης αλύσου απ'ότι επ' αυτών με λιπαρά οξέα μακράς αλύσου (Deckelbaum *et al.*, 1990). Η δράση της δεν είναι ιδιαίτερα εξειδικευμένη για τον τύπο του λιπαρού οξέος, αλλά είναι ειδική για τις θέσεις sn-1 και sn-3 του τριγλυκεριδίου (Olivecrona *et al.*, 1992). Η δράση της είναι σημαντική στα τυριά που

παρσκευάζονται από νωπό γάλα. Αν και η HTST παστερίωση (72 °C/15n sec) απενεργοποιεί σε μεγάλο βαθμό την LPL (Deeth and Fitz-Gerald, 1983), μπορεί να συμβάλλει στη λιπόλυση και σε τυριά από παστεριωμένο γάλα, καθώς απαιτείται θέρμανσή της στους 78 °C για 10 sec προκειμένου να απενεργοποιηθεί πλήρως (Driessen, 1989).

β. Η παραδοσιακή τυτιά: αν και γενικά τα σκευάσματα τυτιάς σε σκόνη του εμπορίου είναι απαλλαγμένα από λιπολυτικά ένζυμα, η παραδοσιακή τυτιά σε μορφή πάστας, που χρησιμοποιείται και για την παραγωγή ορισμένων ειδών σκληρών ιταλικών τυριών όπως το Pecorino και το Provolone, περιέχει μια λιπάση, την προγαστρική εστεράση (pregastric esterase, PGE) (Hamosh, 1990, Fox, 2003). Η PGE είναι ειδική για λιπαρά οξέα μικρής αλύσου εστεροποιημένα στη θέση sn-3 των τριγλυκεριδίων (Fox and Stepaniak, 1993, Fox, 2003). Διαφορές έχουν παρατηρηθεί στη δράση PGE προερχόμενων από διαφορετικό είδος μηρυκαστικού (αμνού, εριφίου, μόσχου) και ως αποτέλεσμα τα γευστικά χαρακτηριστικά στα αντίστοιχα παραγόμενα τυριά είναι ελαφρώς διαφορετικά (Fox and Stepaniak, 1993, Fox, 2003).

γ. Οι λιπάσες των μικροοργανισμών: Τα οξυγαλακτικά βακτήρια των εναρκτήριων καλλιιεργειών διαθέτουν διάφορες ενδοκυττάρειες κατα κύριο λόγο εστεράσες και λιπάσες, ικανές να υδρολύουν ένα μεγάλο εύρος προϊόντων των μονο-, δι- και τριγλυκεριδίων, καθώς και των ελεύθερων λιπαρών οξέων (Fox and Wallace JM, 1997, Liu *et al.*, 2001). Τα βακτήρια αυτά και ειδικά των γενών *Lactococcus* και *Lactobacillus* έχουν ασθενή λιπολυτική δράση. Παρόλα αυτά, επειδή είναι παρόντα σε μεγάλους πληθυσμούς κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, είναι υπεύθυνα για την απελευθέρωση σημαντικών ποσοτήτων ελεύθερων λιπαρών οξέων σε πολλές ποικιλίες τυριών που δε διαθέτουν μια ισχυρά λιπολυτική δευτερεύουσα καλλιιεργεία (Chich *et al.*, 1997, Fox *et al.*, 2004). Οι λιπάσες και οι εστράσες των εναρκτήριων οξυγαλακτικών καλλιιεργειών φαίνεται πως είναι οι κύριοι λιπολυτικοί παράγοντες σε τυριά ολλανδικού τύπου που παράγονται από παστεριωμένο γάλα (Fox and McSweeney, 2000).

Τα λιπολυτικά ένζυμα των προπιονικών βακτηρίων έχουν 10 με 100 φορές ισχυρότερη λιπολυτική δράση εν σχέσει με αυτά των εναρκτήριων οξυγαλακτικών καλλιιεργειών και συμβάλλουν στη λιπόλυση στα ελβετικού τύπου τυριά (Knaut and Mazurek, 1974, Dupuis, 1994).

Τα τυριά με επιφανειακή βακτηριακή ανάπτυξη, όπως το Limburger, υφίστανται εκτεταμένη λιπόλυση κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης. Το *Brevibacterium linens*, που αποτελεί μέρος της επιφανειακής τους μικροχλωρίδας, διαθέτει λιπολυτική και εστερολυτική δραστηριότητα (Sorhaug and Ordal, 1974).

Στα τυριά με ανάπτυξη μύκητα είτε στο εσωτερικό (Roquefort) είτε στην επιφάνειά τους (Camembert, Brie), οι μύκητες του γένους *Penicillium* spp. αποτελούν σημαντικούς παράγοντες λιπόλυσης με τις λιπάσες που διαθέτουν (McSweeney and Sousa 2000, Fox *et al.*, 1995). Λιπολυτική δράση έχει παρατηρηθεί και σε στελέχη του

μύκητα *Geotrichum candidum*, που αποτελεί μέρος της επιφανειακής μικροχλωρίδας τυριών με επιφανειακή ανάπτυξη μύκητα (Welch Baillargeon *et al.*, 1989).

Λιπολυτική δραστηριότητα έχει παρατηρηθεί και σε οξυγαλακτικά βακτήρια που δεν αποτελούν μέρος της εναρκτήριας καλλιέργειας (*Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus plantarum* και *Lactobacillus paracasei*) και σε τρία είδη ζυμών (*Debaromyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica* και *Cryptococcus laurentii*) που αναπτύσσονται ως ανεπιθύμητη μικροχλωρίδα (Freitas *et al.*, 1999). Οι *Micrococci* και οι *Pediococci*, που μπορούν να υπάρξουν στην ανεπιθύμητη μικροχλωρίδα, έχουν επίσης ασθενή λιπολυτική δράση (Bhowmik and Marth, 1990). Τα ψυχρότροφα βακτήρια, όπως αυτά του γένους *Pseudonomas* spp., παράγουν μια θερμοάντοχη λιπάση που απορροφάται μέσα στα λιποσφαίρια του γάλακτος και δεν καταστρέφεται κατά την παστερίωση. Οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορεί να συμβάλλουν στη λιπόλυση τυριών που παρασκευάζονται από γάλα με μεγάλους πληθυσμούς ψυχρότροφων βακτηρίων πριν την παστερίωση και έτσι να προκαλέσουν αλλοιώσεις στη γεύση (Cousins *et al.*, 1977).

δ. Εξωγενείς λιπάσες: Συχνά, προκειμένου να ενισχυθεί η γεύση και το άρωμα του τυριού, κατά την τυροκόμηση χρησιμοποιούνται διάφορα ενζυμικά σκευάσματα διαφόρων προελεύσεων, που περιέχουν πρωτεϊνάσες, πεπτιδάσες, λιπάσες ή μίγματα αυτών. Οι ζωϊκές λιπάσες λαμβάνονται μέσω εκχύλισης ζωϊκών ιστών. Από το πάγκρεας των βοοειδών και των χοίρων απομονώνονται οι παγκρεατικές λιπάσες. Από τους προγαστρικούς ιστούς μικρών αμνοεριφίων και μόσχων προέρχονται οι προγαστρικές λιπάσες. Οι μικροβιακές λιπάσες λαμβάνονται από βακτήρια, ζύμες και μύκητες μέσω ζυμώσεων. Οι λιπάσες που χρησιμοποιούνται είναι η Piccantase του *Mucor miehei*, Lipase S του *Rhizopus arrhizus*, Palatase A του *Aspergillus niger*, Palatase M του *Mucor miehei* και Lipase AP του *Aspergillus niger*. Υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμες λιπάσες και από άλλους μύκητες όπως οι *Candida lipolytica*, *Candida rugosa*, *Penicillium camemberti*, *Penicillium roqueforti*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus niveus* και *Pseudonomas* spp. (Collins *et al.*, 2003).

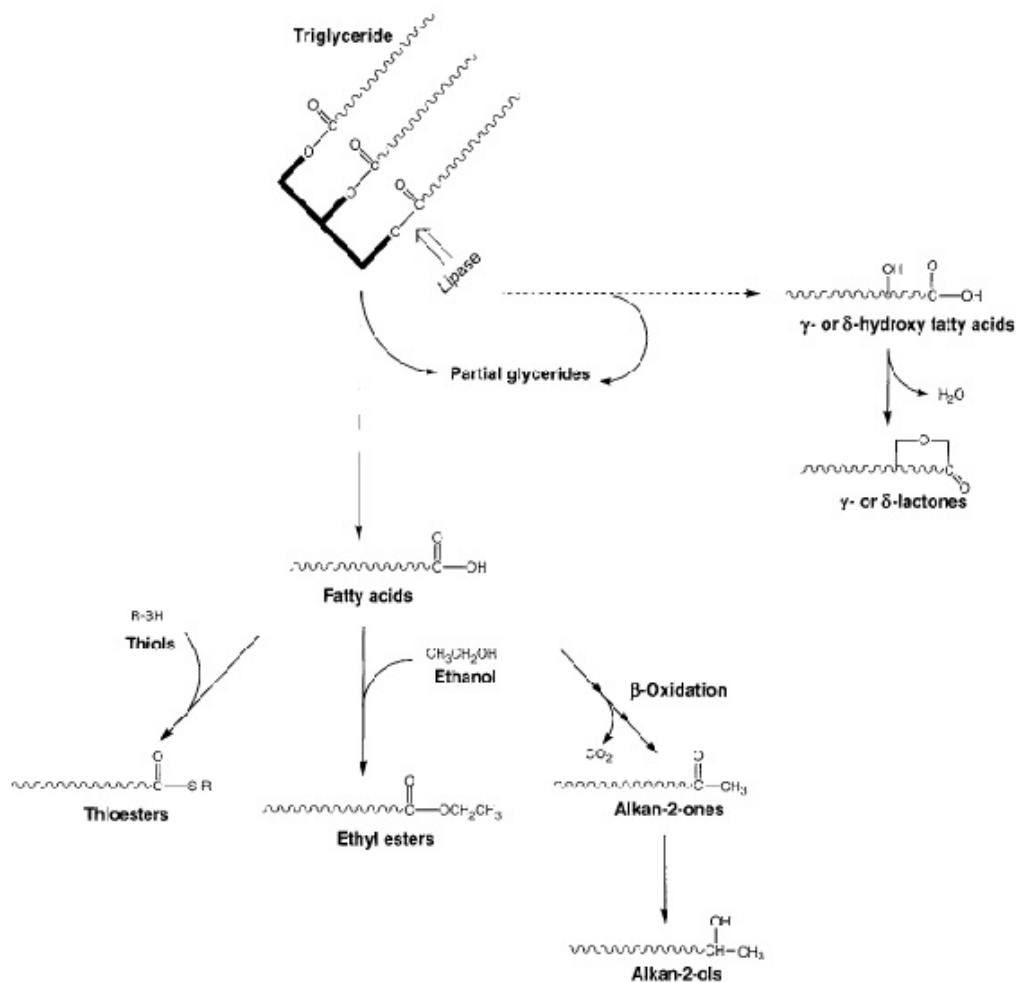
3.3.1. Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα

Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα μακράς αλύσου (>12 άτομα C) θεωρείται πως δε συμβάλλουν ιδιαίτερα στη διαμόρφωση της γεύσης του τυριού, καθώς έχουν πολύ υψηλά όρια αντίληψης, ενώ τα βραχείας και μέσης αλύσου (C_{4:0}- C_{12:0}) έχουν αρκετά χαμηλότερα όρια αντίληψης και επομένως το καθένα δίνει μια χαρακτηριστική γευστική ιδιότητα (Molimard and Spinnler, 1996). Το βουτανοϊκό οξύ προσδίδει "ταγγή" και "τυρώδη" γεύση· το εξανοϊκό οξύ προσδίδει "πικάντικη" γεύση και γεύση "μπλε τυριού"· το οκτανοϊκό οξύ προσδίδει άρωμα "κηρού", "σαπουνιού", "αίγας", "ταγγό", "μούχλας" και "φρουτώδες". Ανάλογα με τις συγκεντρώσεις τους στο τυρί και τα όρια αντίληψής τους, τα πτητικά λιπαρά οξέα μπορούν να συμβάλλουν είτε θετικά, στη διαμόρφωση του αρώματος, είτε αρνητικά, στην εμφάνιση γευστικών ελαττωμάτων τάγγισης. Η

γευστική επίδραση των ελεύθερων λιπαρών οξέων επηρεάζεται από το pH, καθώς σε τυριά με υψηλό pH, όπως το Blue Cheese, μπορεί να επηρεαστεί λόγω της εξουδετεροποίησής τους στο τυρί (Molimard and Spinnler, 1996).

3.3.2. Τα προϊόντα του καταβολισμού των ελεύθερων λιπαρών οξέων

Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα αποτελούν πρόδρομες ουσίες ενός μεγάλου εύρους σημαντικών συστατικών που αποτελούν σημαντικούς παράγοντες διαμόρφωσης της τελικής γεύσης και αρώματός τους. Τα κύρια μονοπάτια καταβολισμού των ελεύθερων λιπαρών οξέων συνοψίζονται στην Εικόνα 6.



Εικόνα 6: Κύρια μονοπάτια καταβολισμού των ελεύθερων λιπαρών οξέων (McSweeney and Sousa, 2000).

Μεθυλκετόνες (αλκαν-2-όνες): Αποτελούν τους σημαντικότερους παράγοντες διαμόρφωσης της γεύσης και του αρώματος στα μπλε τυριά (με κυριότερες τη 2-επτανόνη και τη 2-εννεανόνη) και βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις. Στο Blue cheese σχηματίζονται από τη δράση του μύκητα *Penicillium roqueforti* (Urbach, 1997).

Οι μύκητες *Penicillium camemberti* και *Geotrichum candidum* μπορούν να παράξουν μεθυλκετόνες (Cerning *et al.*, 1987, Molimard and Spinnler, 1996). Τα σπόρια καθώς και τα βλαστικά μυκήλια του *Penicillium* spp. μπορούν επίσης να παράξουν μεθυλκετόνες (Lamberet *et al.*, 1982, Molimard and Spinnler, 1996). Ο μεταβολισμός των λιπαρών οξέων από το γένος *Penicillium* spp. περιλαμβάνει 4 στάδια που αντιστοιχούν στα αρχικά στάδια της β-οξειδωσης. Αρχικά, τα λιπαρά οξέα απελευθερώνονται από λιπάσες. Ακολουθεί η οξειδωσή τους προς β-κετοοξέα και αποκαρβοξυλίωση προς αλκαν-2-όνες με ένα λιγότερο άτομο άνθρακα από το μητρικό λιπαρό οξύ. Οι αλκαν-2-όνες μπορούν ακολούθως να αναχθούν στην αντίστοιχη δευτεροταγή αλκοόλη (αλκαν-2-όλη) (McSweeney and Sousa, 2000). Μεθυλκετόνες μπορούν επίσης να παραχθούν από κετοοξέα που φυσιολογικά υπάρχουν σε μικρές συγκεντρώσεις στο γάλα ή από οξειδωση μονοακόρεστων λιπαρών οξέων (Kinsella and Hwang, 1976). Ο ρυθμός παραγωγής μεθυλκετονών επηρεάζεται από τη θερμοκρασία, το pH, τη φυσιολογική κατάσταση του μύκητα και τη συγκέντρωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων. Τα σπόρια του *Penicillium roqueforti* οξειδώνουν λιπαρά οξέα με 4-12 άτομα άνθρακα προς μεθυλκετόνες, με το οκτανοϊκό οξύ να οξειδώνεται γρηγορότερα, ενώ έχει αναφερθεί επίσης η οξειδωση προς μεθυλκετόνες και λιπαρά οξέα με 16-18 άτομα άνθρακα (Chalier and Crouzet, 1993).

Σε γενικές γραμμές, το όριο ανίχνευσης της γεύσης των μεθυλκετονών είναι αρκετά χαμηλό (Molimard and Spinnler, 1996). Η 2-οκτανόνη, η 2-εννεανόνη, η 2-δεκανόνη, η 2-εντεκανόνη και η 2-τριδεκανόνη έχουν άρωμα "φρουτώδες", "ανθέων" και "μούχλας", ενώ η 2-επτανόνη έχει άρωμα "μπλε τυριού" (Rothe *et al.*, 1982). Το άρωμα "μανιταριού" και "μούχλας" των μεθυλκετονών συμβάλλει σημαντικά στη διαμόρφωση της γεύσης του Camembert (Molimard and Spinnler, 1996).

Δευτεροταγείς αλκοόλες: Σχηματίζονται από ενζυμική αναγωγή των μεθυλκετονών (Engels *et al.*, 1997). Μύκητες του γένους *Penicillium* spp. παράγουν δευτεροταγείς αλκοόλες (π.χ. 2-πεντανόλη, 2-επτανόλη και 2-εννεανόλη) από αναγωγή των μεθυλκετονών στο Blue cheese (Martelli, 1989). Η 2-επτανόλη και η 2-νονανόλη είναι οι κύριες αλκοόλες στο παραδοσιακό Gamonedo Blue Cheese (Gonzalez de Llano *et al.*, 1990). Επίσης, στο Cheddar έχει παρατηρηθεί η παραγωγή 2-προπανόλης από ακετόνη και 2-βουτανόλης από βουτανόνη (Urbach, 1993). Έρευνα έδειξε αύξηση στις συγκεντρώσεις δευτεροταγών αλκοολών στην υδατική φάση του Emmental κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης (Thierry *et al.*, 1999).

Οι δευτεροταγείς αλκοόλες συμβάλλουν στη διαμόρφωση της γεύσης των τυριών (Aroga *et al.*, 1995). Η 2-προπανόλη, η 2-βουτανόλη, η 2-οκτανόλη και η 2-νονανόλη υπάρχουν στα περισσότερα μαλακά τυριά και είναι προσδίδουν γεύση στο Blue cheese (Engels *et al.*, 1997). Έχει διαπιστωθεί ότι η 2-επτανόλη και η 2-νονανόλη αποτελούν αντίστοιχα το 10-20% και το 5-10% όλων των αρωματικών συστατικών του Camembert (Moinas *et al.*, 1975).

Εστέρες: Μία μεγάλη ποικιλία εστέρων, που σχηματίζονται κατά την αντίδραση ενός ελεύθερου λιπαρού οξέος κατά προτίμηση βραχείας ή μέσης αλύσου με μια αλκοόλη (εστεροποίηση), παράγονται κατά την ωρίμανση και συμβάλλουν στη διαμόρφωση της γεύσης και του αρώματος των τυριών. Στην σύνθεση των εστέρων συμμετέχουν κυρίως βραχείας ή μέσης αλύσου λιπαρά οξέα και αλκοόλες που μπορεί να είναι αλειφατικές (αιθανόλη), αρωματικές (φαινυλαιθανόλη) ή θειόλες (μεθανοθειόλη) (McSweeney and Sousa, 2000, Collins *et al.*, 2003). Ο σχηματισμός εστέρων καταλύεται από τη δράση εστερασών προερχόμενων από τα οξυγαλακτικά βακτήρια, αλλά και από ζύμες, μύκητες και βακτήρια της ανεπιθύμητης μικροχλωρίδας. Έχει αποδειχτεί ότι οι εστεράσες των οξυγαλακτικών βακτηρίων έχουν τη δυνατότητα να συνθέτουν εστέρες με το μηχανισμό της μετεστεροποίησης (ή αλκοόλυσης) από αλκοόλες και ακυλγλυκερόλες ή από αλκοόλες και ακυλ-CoA προερχόμενα από το μεταβολισμό των λιπαρών οξέων, των αμινοξέων και των υδατανθράκων (Liu S-Q *et al.*, 2005). Οι εστεράσες αυτές στην πραγματικότητα είναι ακυλ-τρανσφεράσες που χρησιμοποιούν τόσο το νερό (υδρόλυση), όσο και τις αλκοόλες (αλκοόλυση) σαν δέκτες ακυλίων. Η εστεροποίηση καταλύεται κατά προτίμηση σε χαμηλής ενεργότητας νερού συστήματα, ενώ η μετεστεροποίηση σε συστήματα υψηλής ενεργότητας νερού, όπως είναι το υδατικό περιβάλλον του τυριού (Holland *et al.*, 2005). Αν και έχουν βρεθεί μεθυλ-, αιθυλ-, προπυλ- και βουτυλεστέρες σε διάφορες ποικιλίες τυριών (Meinhart and Schreier, 1986), οι αιθυλεστέρες επικρατούν, δεδομένου ότι η αιθανόλη είναι η επικρατέστερη αλκοόλη στα τυριά, καθώς παράγεται σε μεγάλες ποσότητες κατά τη ζύμωση της λακτόζης και τον καταβολισμό των αμινοξέων (Agora *et al.*, 1995). Θειοεστέρες σχηματίζονται κατά την αντίδραση ελεύθερων λιπαρών οξέων με σουλφυδρυλικές ενώσεις (Molimard and Spinnler, 1996). Η εστεροποίηση των βραχείας αλύσου λιπαρών οξέων με μεθανοθειόλη, που παράγεται κατά την αποικοδόμηση της μεθειονίνης από την επιφανειακή χλωρίδα των τυριών με επιφανειακή ανάπτυξη βακτηρίων (*Brevibacterium linens* και μικρόκοκκοι) οδηγεί στον σχηματισμό θειοεστέρων (Lamberet *et al.*, 1997).

Υψηλές συγκεντρώσεις βουτανοϊκού αιθυλεστέρα βρέθηκαν σε τυριά με "φρουτώδες" άρωμα, όπως το Gruyère, το Proostij και η Παρμεζάνα (Engels *et al.*, 1997). Οι περισσότεροι εστέρες που απομονώθηκαν από το Cheddar είχαν "βουτυρώδες"/"φρουτώδες" άρωμα, ενώ οι θειοεστέρες προσέδιδαν ένα χαρακτηριστικό "τυρώδες" άρωμα (Lamberet *et al.*, 1997).

Αλδεΰδες: Αν και οι αλδεΰδες παράγονται κατά κύριο λόγο από τον καταβολισμό των αμινοξέων, κάποιες αλδεΰδες ευθείας αλύσου, όπως η βουτανάλη, η επτανάλη και η εννεανάλη σχηματίζονται με β-οξειδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων.

Το Gruyère και η Παρμεζάνα έχουν υψηλά επίπεδα ελεύθερων λιπαρών οξέων και μεγάλες συγκεντρώσεις αλδεϋδών ευθείας αλύσου, που τους προσδίδουν αρώματα "πράσινου χορταριού" (Moio *et al.*, 1993).

Λακτόνες: Είναι κυκλικές ενώσεις που σχηματίζονται κατά την ενδομοριακή εστεροποίηση των υδροξυ-λιπαρών οξέων μέσω απώλειας νερού, προκειμένου να σχηματιστεί μια κυκλική δομή (Christie, 1983, Molimard and Spinnler, 1996), υπό θέρμανση (Eriksen, 1976). Οι α- και β- λακτόνες είναι πολύ δραστικές και ασταθείς ενώσεις (Fox and Wallace, 1997), ενώ οι γ- και δ- λακτόνες (με 5μελείς και 6μελείς δακτυλίους αντίστοιχα) είναι σταθερές και έχουν βρεθεί σε διάφορες ποικιλίες τυριών (Eriksen, 1976). Έχει αναφερθεί ότι ο μαστικός αδένας των μηρυκαστικών έχει ένα σύστημα δ-οξειδωσης των λιπαρών οξέων, από το οποίο και παράγονται τα υδροξυοξέα (Fox *et al.*, 2000). Υδροξυοξέα μπορούν επίσης να σχηματιστούν από αναγωγή των κετοοξέων (Wong *et al.*, 1975). Η παρουσία λακτονών μεγάλου μοριακού βάρους σε ταγγισμένο Cheddar έχει οδηγήσει στο συμπέρασμα πως και άλλα μεταβολικά μονοπάτια, πέραν της απελευθέρωσης υδροξυοξέων από τριγλυκερίδια μπορεί να συμβάλλουν στο σχηματισμό λακτονών (Wong *et al.*, 1975). Δωδεκαλακτόνη σχηματίζεται από σπόρια και βλαστητικά μυκήλια του *Penicillium roqueforti* από ακόρεστα λιπαρά οξέα μακράς αλύσου (C_{18:1} και C_{18:2}) (Chalier and Crouzet, 1992). Υδροξυ-λιπαρά οξέα μπορούν επίσης να προκύψουν από τη δράση ενζύμων, όπως οι λιποξυγενάσες της μικροχλωρίδας των μηρυκαστικών (Dufosse *et al.*, 1994). Η παραγωγή των πρόδρομων ενώσεων των λακτονών επηρεάζεται από παράγοντες όπως η διατροφή, η εποχή, το στάδιο της γαλακτικής περιόδου και η φυλή του ζώου (Fox *et al.*, 2000). Η γ-δωδεκαλακτόνη και η γ-δωδεκ-Z-6-ενολακτόνη, που έχουν γλυκιά γεύση, βρίσκονται σε μεγαλύτερα επίπεδα σε γάλα αγελάδων που διατρέφθηκαν με συμπυκνωμένες ζωοτροφές σε σύγκριση με αυτών που διατρέφθηκαν με βοσκή. Γ- και δ- δεκαλακτόνη, καθώς και γ- και δ- δωδεκαλακτόνη βρέθηκαν στο Camembert (Gallois and Langlois, 1990).

Οι λακτόνες έχουν πολύ δυνατή γεύση (Eriksen, 1976). Παρόλο που το άρωμά τους δεν μοιάζει γενικά με αυτό των τυριών, συμβάλλουν στη συνολική γεύση του και στο βουτυρώδη χαρακτήρα των τυριών (Dirinck and De Winne, 1999). Οι δ-λακτόνες έχουν χαμηλά γευστικά όρια ανίχνευσης σε σύγκριση με άλλα πτητικά αρωματικά συστατικά των τυριών (O'Keefe *et al.*, 1969) και χαρακτηρίζονται από πολύ σαφή "φρουτώδη" αρώματα ("ροδάκινου", "βερίκοκου", "καρύδας") και έχουν γενικότερα υψηλότερα όρια ανίχνευσης από τις γ-λακτόνες (Dufosse *et al.*, 1994).

3.3.3. Πρωτεόλυση

Η πρωτεόλυση είναι η πιο περίπλοκη και, στις περισσότερες ποικιλίες τυριών, η πιο σημαντική βιοχημική διεργασία κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης. Η πρωτεόλυση συμβάλλει στη διαμόρφωση της υφής του τυριού μέσω της υδρόλυσης του πρωτεϊνικού πλέγματος, της μείωσης της ενεργότητας του νερού (a_w) μέσω αλλαγών στην ικανότητα δέσμευσης νερού του τυριού από τα καρβοξυλικά οξέα και τις αμινομάδες που απελευθερώνονται κατά την υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών (οι ομάδες αυτές ιονίζονται στο pH του τυριού και έτσι καθίστανται ικανές να συγκρατούν νερό) και, τέλος, εμμέσως μέσω της αύξησης του pH εξ' αιτίας της απελευθέρωσης NH₃ από τα αμινοξέα που προκύπτουν από την πρωτεόλυση. Επίσης, συμβάλλει στη διαμόρφωση

της γεύσης και του αρώματος των τυριών (συμπεριλαμβανόμενων των ανεπιθύμητων) άμεσα μέσω της παραγωγής μικρών πεπτιδίων και αμινοξέων, μερικά εκ των οποίων έχουν γεύση, έμμεσα μέσω της απελευθέρωσης αμινοξέων που δρουν ως υποστρώματα για ένα μεγάλο εύρος καταβολικών αντιδράσεων από τις οποίες προκύπτουν διάφορα πτητικά αρωματικά και γευστικά συστατικά και τέλος μέσω διευκόλυνσης της απελευθέρωσης γευστικών συστατικών από τη μάζα του τυριού κατά τη μάσηση (Upadhyay *et al.*, 2004).

3.3.3.1. Τα πρωτεολυτικά ένζυμα

Η πρωτεόλυση καταλύεται από πρωτεϊνάσες και πεπτιδάσες, προερχόμενες από διάφορες πηγές:

α. Το πηκτικό μέσο: Τα πηκτικά μέσα (πυτιά) που χρησιμοποιούνται στην τυροκόμηση είναι είτε παρασκευάσματα πρωτεϊνών ποικίλου προελεύσεως (πρωτεϊνάσες ζωικής προελεύσεως διαφόρων ειδών, πρωτεϊνάσες των *Rhizomucor pusillus*, *Rhizomucor miehei* και *Cryphonectria parasitica*) με εξειδικευμένη δράση, είτε το εκχύλισμα του 4ου στομάχου των νεαρών μηρυκαστικών (παραδοσιακή πυτιά) που περιέχει κατά κύριο λόγο τα ένζυμα χυμοσίνη και πεψίνη σε αναλογία 80:20, η οποία μειώνεται με την αύξηση της ηλικίας του ζώου. Το μεγαλύτερο μέρος της πυτιάς απομακρύνεται με το τυρόγαλα, αλλά ένα μέρος (0-30%) παραμένει στο τυρόπηγμα και συμβάλλει σημαντικά στα αρχικά στάδια της πρωτεόλυσης. Το ποσοστό αυτό εξαρτάται από παράγοντες όπως ο τύπος του πηκτικού ενζύμου, η θερμοκρασία κατά την πήξη, το pH κατά τη στράγγιση του τυροπήγματος και το ποσοστό κατακρατημένης υγρασίας στο τυρόπηγμα (Upadhyay *et al.*, 2004). Στο Cheddar, το 6% της χυμοσίνης της πυτιάς παραμένει στο τυρόπηγμα, αλλά το ποσοστό αυτό αυξάνεται με τη μείωση του pH κατά τη στράγγιση του τυρογάλακτος (Holmes *et al.*, 1977, Creamer *et al.*, 1985). Η πεψίνη, και ειδικά του χοίρου, είναι περισσότερο ευαίσθητη στις μεταβολές του pH και άρα αυτό αποτελεί τον καθοριστικό παράγοντα για το ποσοστό παραμονής της στο τυρόπηγμα (Upadhyay *et al.*, 2004).. Σε τυριά, όπως το Emmental, που εφαρμόζεται υψηλή θερμοκρασία κατά την πήξη, η χυμοσίνη μετουσιώνεται σε μεγάλο βαθμό και επομένως έχει μικρή συμμετοχή στην ωρίμανση (Boudjellab *et al.*, 1994).

Η χυμοσίνη, το σημαντικότερο εκ των πηκτικών ενζύμων της τυροκόμησης, είναι μια ασπαρτυλο-πρωτεϊνάση που εκκρίνεται από το γαστρικό σύστημα των νεαρών μηρυκαστικών. Πρωταρχικός της ρόλος, όσον αφορά την τυροκόμηση είναι η υδρόλυση του πεπτιδικού δεσμού Phe₁₀₅-Met₁₀₆ της σταθεροποιητικής των καζεϊνικών μικκυλίων κ-καζεΐνης, με αποτέλεσμα την αποδιοργάνωσή τους και την συσσωμάτωσή τους σε μορφή πήγματος σε θερμοκρασίες >20 °C παρουσία ιόντων ασβεστίου, δημιουργώντας έτσι το τρισδιάστατο πρωτεϊνικό πλέγμα που περικλείει όλα τα συστατικά του γάλακτος (τυρόπηγμα) (Upadhyay *et al.*, 2004).

Οι α_{s1} , α_{s2} και β καζεΐνες (CN) δεν υδρολύονται από τη χυμοσίνη κατά την πήξη του γάλακτος, παρά μόνο κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης. Σε πειραματικές συνθήκες, έχει παρατηρηθεί ότι η χυμοσίνη υδρολύει την β -CN σε 7 σημεία (Hill *et al.*, 1974, Carles and Ribadeau-Dumas, 1984), με τη δράση της να περιορίζεται σημαντικά σε διάλυμα NaCl 10% (Mulvihill and Fox, 1978). Η χυμοσίνη υδρολύει την α_{s1} -CN κυρίως στο δεσμό Phe₂₃-Phe₂₄ (Hill *et al.*, 1974, McSweeney *et al.*, 1993a, Boudjellab *et al.*, 1994) και η διάσπαση του δεσμού αυτού θεωρείται πως είναι υπεύθυνη για το αρχικό μαλάκωμα της υφής του τυριού (de Jong, 1976). Έρευνες έχουν δείξει πως σε πειραματικές συνθήκες η χυμοσίνη υδρολύει και άλλους δεσμούς της α_{s1} -CN (Pelissier *et al.*, 1974, Mulvihill and Fox, 1979, Pahkala, 1989, McSweeney *et al.*, 1994a). Η α_{s2} -CN φαίνεται πως είναι σχετικά ανθεκτική στην υδρόλυση από την χυμοσίνη, με τα σημεία υδρόλυσής της να περιορίζονται στις υδρόφοβες περιοχές του μορίου (de Jong, 1976). Όσον αφορά την παρα-κ-CN, αν και διαθέτει αρκετά πιθανά σημεία υδρόλυσης από τη χυμοσίνη, φαίνεται πως δεν υδρολύεται από αυτήν ούτε σε διαλύματα ούτε κατά την ωρίμανση (Green and Foster, 1974).

β. Οι ενδογενείς πρωτεΐνάσες του γάλακτος: Η σημαντικότερη ενδογενής πρωτεΐνάση αναφορικά με την ωρίμανση του τυριού είναι η πλασμίνη, μία πρωτεΐνάση τύπου σερίνης. Η πλασμίνη εκκρίνεται στο αίμα με τη μορφή του προενζύμου της, του πλασμινογόνου (plasminogen), το οποίο ενεργοποιείται από ένα πολύπλοκο ενζυμικό σύστημα που περιλαμβάνει ενεργοποιητές του πλασμινογόνου (plasmin activators, PA), παρεμποδιστές της πλασμίνης (plasmin inhibitors) και παρεμποδιστές των PA. Το σύστημα αυτό υπάρχει και στο γάλα, όπου η πλασμίνη, το πλασμινογόνο και οι PA βρίσκονται στα καζεϊνικά μικκύλια ενώ τα υπόλοιπα στον ορό του γάλακτος (Upadhyay *et al.*, 2004).

Η πλασμίνη έχει ειδικότητα παρόμοια με αυτή της τρυψίνης δείχνοντας προτίμηση σε δεσμούς του τύπου Lys-X, σε μικρότερη έκταση σε δεσμούς του τύπου Arg-X και η σειρά δραστηριότητάς της στις καζεΐνες είναι $\beta \approx \alpha_{s2} > \alpha_{s1}$ ενώ η κ-CN φαίνεται πως είναι ανθεκτική στην υδρόλυση από την πλασμίνη (Bastian and Brown, 1996). Η β -καζεΐνη, ανάλογα με τη γενετική παραλλαγή έχει 15-17 δεσμούς ευαίσθητους στην πλασμίνη, αλλά μόνο τρεις υδρολύονται σε σημαντικό βαθμό στο γάλα, οι Lys₂₈-Lys₂₉, Lys₁₀₅-His₁₀₆ και Lys₁₀₇-Glu₁₀₈, η υδρόλυση των οποίων καταλήγει στην απελευθέρωση των γ_1 -CN (β -CN f29-209), γ_2 -CN (β -CN f106-209), γ_3 -CN (β -CN f108-209), πρωτεόζη-πεπτόνη 8 (PP8) γρήγορη (β -CN f1-28) και αργή (β -CN f29-105 και f29-107) και πρωτεόζη-πεπτόνη 5 (PP5) (β -CN f1-105 και 1-107) (Upadhyay *et al.*, 2004). Σε πειραματικές συνθήκες έχει διαπιστωθεί πως η πλασμίνη υδρολύει τη β -CN σε διάφορα σημεία (Fox *et al.*, 1994). Η α_{s2} -CN επίσης σε πειραματικές συνθήκες υδρολύεται σε διάφορα σημεία (le Bars and Gripon, 1989, Visser *et al.*, 1989), αν και δεν έχει διαπιστωθεί κατά πόσο αυτή η διεργασία γίνεται και κατά την ωρίμανση, που είναι πολύ πιθανό, καθώς η συγκέντρωση της α_{s2} -CN, που δεν αποτελεί καλό υπόστρωμα για τη χυμοσίνη, μειώνεται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης (McSweeney *et al.* 1997) αν και η λιγότερο ευαίσθητη στη δράση της πλασμίνης, έχει βρεθεί πως σε πειραματικές

συνθήκες και η α_{s1} -CN υδρολύεται σε διάφορα σημεία από την πλασμίνη (le Bars and Gripon, 1993, McSweeney *et al.*, 1993a). Η αντίσταση της κ-CN στη δράση της πλασμίνης οφείλεται στο υδατανθρακικό της κλάσμα που βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο του μορίου της (Doi *et al.*, 1979).

Η συνεισφορά της πλασμίνης στην πρωτεόλυση ποικίλλει από τυρί σε τυρί και η δραστικότητα της επηρεάζεται από παράγοντες όπως η θερμοκρασία κατά την πήξη και το pH κατά την ωρίμανση. Η πλασμίνη είναι ο βασικός πρωτεολυτικός παράγοντας στα ελβετικού τύπου τυριά όπως το Emmental, επειδή η υψηλή θερμοκρασία κατά την πήξη των τυριών αυτών (περίπου 55 °C) μετουσιώνει τη χυμοσίνη, αλλά όχι την πλασμίνη, που είναι θερμοάντοχο ένζυμο (Upadhyay *et al.*, 2004). Επίσης, στις υψηλές θερμοκρασίες ενεργοποιείται το πλασμινογόνο, πιθανόν εξ' αιτίας της αδρανοποίησης των αναστολέων του PA και της πλασμίνης (Farkye and Fox, 1990). Σημαντικό ρόλο παίζει και στην ωρίμανση των τυριών με επιφανειακή ανάπτυξη μύκητα, καθώς η αύξηση του pH στο εσωτερικό του τυριού διευκολύνει τη δράση της πλασμίνης (Gripon, 2004). Τέλος, σημαντική είναι και στην ωρίμανση των τυριών με επιφανειακή επικάλυψη βακτηρίων, καθώς η αύξηση του pH με την πάροδο της ωρίμανσης στην επιφάνειά του διευκολύνει τη δράση της πλασμίνης επί των καζεϊνών (O'Farrell *et al.*, 2002).

Πρωτεολυτική δράση έχουν και άλλες ενδογενείς πρωτεϊνάσες του γάλακτος. Η καθεψίνη D (cathepsin D), μία ασπαρτική πρωτεϊνάση των λυσοσωμάτων των θηλαστικών, υδρολύει σε πειραματικές συνθήκες σε διάφορα σημεία την α_{s1} -CN (McSweeney *et al.*, 1993a, Larsen *et al.*, 1996), τη β -CN σε σημεία παρόμοια με τη χυμοσίνη (McSweeney *et al.*, 1995), την α_{s2} -CN και την κ-CN (Larsen *et al.*, 1996). Παρόλο που η ειδικότητα της καθεψίνης D είναι παρόμοια με αυτή της χυμοσίνης, συμβάλλει μηδαμικά στην πήξη του γάλακτος (McSweeney *et al.*, 1995). Ενδέχεται όμως να συνεισφέρει στην αποικοδόμηση της α_{s1} -CN στα τυριά με υψηλή θερμοκρασία πήξης, όπως στα ελβετικού τύπου και την Παρμεζάνα, όπου η χυμοσίνη αδρανοποιείται (Upadhyay *et al.*, 2004). Τέλος, σε πειραματικές συνθήκες έχει παρατηρηθεί ενζυμική δραστηριότητα της καθεψίνης B (Magboul *et al.*, 2001) και της καθεψίνης G (Considine *et al.*, 2002) και της ελαστάσης (Considine *et al.*, 1999, 2000) επί της α_{s1} -CN και της β -CN.

γ. Τα πρωτεολυτικά ένζυμα των οξυγαλακτικών βακτηρίων των εναρκτήριων καλλιιεργειών: Τα σύνθετα πρωτεολυτικά συστήματα των οξυγαλακτικών βακτηρίων αποδομούν κυρίως τις καζεΐνες σε μικρά πεπτίδια και αμινοξέα ικανοποιώντας έτσι τις αυξημένες διατροφικές απαιτήσεις και συμβάλλοντας ταυτόχρονα στη διαμόρφωση της γεύσης και του αρώματος των τυριών (Law and Mulholland, 1995). Το αρχικό στάδιο της αποδόμησης των πρωτεϊνών εκτελείται από τη σχετιζόμενη με τον κυτταρικό φάκελο πρωτεϊνάση (cell envelope-associated proteinase, CEP) ή λακτοσεπίνη (lactocerin) και τα παραγόμενα μικρά πεπτίδια λαμβάνονται από το κύτταρο μέσω συστημάτων μεταφοράς πεπτιδίων (Juillard *et al.*, 1995). Η περαιτέρω αποδόμησή τους προς αμινοξέα καταλύεται από μια σειρά ενδοκυτταρικών πεπτιδασών (Kunji *et al.*,

1996, Law and Haandrikman, 1997, Christensen *et al.*, 1999). Οι εναρκτήριες καλλιέργειες σταματούν να αναπτύσσονται στο τυρόπηγμα σύντομα μετά το πέρας της παραγωγής του, εξ'αιτίας της μείωσης του pH, της αύξησης της συγκέντρωσης του NaCl, της χαμηλής θερμοκρασίας και της έλλειψης ζυμώσιμου υδατανθρακικού υποστρώματος. Παρόλα αυτά, έχουν εξέχουσα σημασία για την πρωτεόλυση κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης και συγκεκριμένα όταν απελευθερώνονται τα ενδοκυτταρικά ένζυμα μετά την επακόλουθη λύση των κυττάρων τους (Upadhyay *et al.*, 2004).

Τα ολιγοπεπτίδια που προκύπτουν από τη δράση των προαναφερθέντων ενζύμων, αφού ενσωματωθούν μέσα στο κύτταρο, υδρολύονται προς αμινοξέα υπό τη δράση πεπτιδασών. Ενώ ο ρόλος ορισμένων πεπτιδασών (πχ. ενδοπεπτιδάσες) είναι η αποδόμηση των ολιγοπεπτιδίων προς μικρότερα πεπτίδια, οι εξωπεπτιδάσες είναι υπεύθυνες για την απελευθέρωση ενός ή δύο αμινοξέων τη φορά από μικρά πεπτίδια (Upadhyay *et al.*, 2004).

Διάφορες ενδοπεπτιδάσες έχουν αναφερθεί στα γένη *Lactococcus* spp. και *Lactobacillus* spp. Η PepO είναι μια μονομερική μεταλλοπεπτιδάση που υδρολύει αποτελεσματικά ένα μεγάλο εύρος καζεϊνικών φραγμάτων, πλην δι- και τρι- και τετραπεπτιδίων (Monnet *et al.*, 1994). Η PepF είναι μια μονομερική μεταλλοπεπτιδάση και έχει την ικανότητα υδρόλυσης πεπτιδίων που περιέχουν 7-17 αμινοξέα (Monnet *et al.*, 1994). Επίσης, έχει εντοπιστεί το γονίδιο *pepE* που κωδικεύει μια εξαρτώμενη της θειόλης ενδοπεπτιδάση (Fenster *et al.*, 1997).

Οι τριπεπτιδάσες (PepT) των οξυγαλακτικών καλλιιεργειών είναι γενικά δι- ή τριμερείς μεταλλοπεπτιδάσες με ευρεία ειδικότητα, ικανές να υδρολύουν τριπεπτίδια με όξινα, βασικά ή ουδέτερα αμινο-τελικά αμινοξικά κατάλοιπα (Kunji *et al.*, 1996, Law and Haandrikman, 1997).

Μία ευρείας ειδικότητας γενική διπεπτιδάση (PepV) που υδρολύει μόνο διπεπτίδια (όλα τα διπεπτίδια, εξαιρουμένων αυτών με προλινικό κατάλοιπο) έχει βρεθεί στα οξυγαλακτικά βακτήρια (Kunji *et al.*, 1996, Law and Haandrikman, 1997).

Οι καρβοξυπεπτιδάσες είναι εξωπεπτιδάσες που καταλύουν την υδρόλυση πεπτιδίων από το καρβοξυτελικό άκρο των ολιγοπεπτιδίων (Kunji *et al.*, 1996, Law and Haandrikman, 1997).

Η αμινοπεπτιδάση PepN στα περισσότερα στελέχη των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι μια μονομερής μεταλλοπεπτιδάση με ευρεία ειδικότητα: εκτός p-νιτροανιλιδικά (p-NA) παράγωγα αμινοξέων έχει την ικανότητα να υδρολύει ένα μεγάλο εύρος πεπτιδίων με διαφορές τόσο στο μέγεθος όσο και στην αμινοξική σύσταση (Niven *et al.*, 1995, Sasaki *et al.*, 1996). Κατά προτίμηση υδρολύουν υποστρώματα με υδρόφοβο ή βασικό κατάλοιπο. Η υδρόλυση πεπτιδίων με υδρόφοβο αμινοτελικό άκρο θεωρείται πως συμβάλλει στη μείωση της πικρής γεύσης, προερχόμενης από τρυπτικά παράγωγα αποδόμησης της β-καζεΐνης, στα τυριά (Tan *et al.*, 1993). Γενικά, η PepN δεν υδρολύει υποστρώματα με γλουταμινικό οξύ, ασπαρτικό οξύ ή προλίνη στο αμινοτελικό άκρο ή διπεπτίδια με προλίνη (Miyakawa *et al.*, 1992, Tan *et al.*, 1993).

Η PepC είναι μια μεταλλο-ανεξάρτητη γενική αμινοπεπτιδάση (Kunji *et al.*, 1996) και όσες έχουν απομονωθεί είναι πολυμερικές εξαρτώμενες της θειόλης αμινοπεπτιδάσες (Wohlrab and Bockelmann, 1993). Οι PepC έχουν ευρεία ειδικότητα, με ιδιαίτερα αυξημένη δραστηριότητα σε συνθετικά υποστρώματα με υδρόφοβα αμινοξέα αλλά περιορισμένη σε αμινοξέα με θετικά φορτισμένα αμινοξικά κατάλοιπα (Wohlrab and Bockelmann, 1993, Mistou and Gripon, 1998). Έχει επίσης εντοπιστεί το γονίδιο *pepG*, το οποίο κωδικεύει μια εξαρτώμενη από την κυστεΐνη αμινοπεπτιδάση με δράση αρκετά παρόμοια με αυτή της PepC (Klein *et al.*, 1997).

Η γλουταμυλική/ασπαρτυλική αμινοπεπτιδάση PepA του είναι μια πολυμερική μεταλλοπεπτιδάση με πολύ περιορισμένη ειδικότητα που απελευθερώνει μόνο γλουταμινικό και ασπαρτικό οξύ από αμινοτελικά άκρα δι- τρι- και ολιγοπεπτιδίων με μέχρι 10 αμινοξικά κατάλοιπα (Bacon *et al.*, 1994). Το γλουταμινικό οξύ είναι γνωστό βελτιωτικό γεύσης και συνεπακόλουθα ο ρόλος της PepA στη διαμόρφωση των γευστικών χαρακτηριστικών του τυριού κρίνεται σημαντικός. Μελέτες στο ώριμο Cheddar έχουν καταδείξει τη σημαντικότητα του γλουταμινικού οξέος για τη διαμόρφωση της γεύσης του (Engels Visser, 1994, Fox *et al.*, 1994).

Έχει αναφερθεί η παρουσία λευκυλ-αμινοπεπτιδασών (PepL) στα οξυγαλακτικά βακτήρια, οι οποίες υδρολύουν κατά προτίμηση διπεπτιδάσες και μερικές τριπεπτιδάσες με λευκίνη στο αμινοτελικό άκρο (Sanz and Toldra, 1997, Magboul and McSweeney, 1999).

Οι καζεΐνες είναι πλούσιες σε προλίνη και εξ'αιτίας αυτού, χρειάζονται εξειδικευμένες πεπτιδάσες που να έχουν την ικανότητα υδρόλυσης πεπτιδικών δεσμών με προλίνη, προκείμενου να καθιστούν προσβάσιμες στη δράση άλλων πεπτιδασών. Η X-προλυλ-διπεπτιδυλ-αμινοπεπτιδάση (PepX) απελευθερώνει X-Pro και μερικές φορές X-Ala διπεπτιδάσες από το αμινοτελικό άκρο των ολιγοπεπτιδίων. Όλες οι PepX των οξυγαλακτικών βακτηρίων έχουν καταλυτικό μηχανισμό σερίνης (Cunningham and O'Connor, 1997). Έχει εντοπιστεί ενδοπεπτιδάση με δράση αρκετά παρόμοια με αυτή της PepX με ικανότητα υδρόλυσης της α_1 -CN (Stepaniak *et al.*, 1998).

Η αμινοπεπτιδάση της προλίνης PepI καταλύει την απελευθέρωση αμινοξικών καταλοίπων προλίνης από το αμινοτελικό άκρο δι-, τρι- και ολιγοπεπτιδίων (Baankreis and Exterkate, 1991).

Η προλινάση PepR είναι μια ειδική διπεπτιδάση που υδρολύει διπεπτιδά με την αλληλουχία Pro-X (Shao *et al.*, 1997).

Η προλινάση PepQ είναι μια διπεπτιδάση με ειδικότητα στο δεσμό X-Pro (εκτός από τις περιπτώσεις δεσμών Gly-Pro και Pro-Pro) και είναι μια μονομερική μεταλλοπεπτιδάση (Morel *et al.*, 1999).

Η αμινοπεπτιδάση PepP είναι μια ειδική αμινοπεπτιδάση που καταλύει την απομάκρυνση από το αμινοτελικό άκρο ολιγοπεπτιδίων με τις αλληλουχίες X-Pro-Pro-(X)_n ή X-Pro-(X)_n σε ολιγοπεπτιδά με έως και 11 αμινοξικά υπολείμματα (Kunji *et al.*, 1996). Το ένζυμο αυτό έχει επίσης την ικανότητα υδρόλυσης πεπτιδίων με αλανίνη στην προτελευταία θέση, αλλά με πιο αργό ρυθμό (McDonnell *et al.*, 1997).

δ. Τα πρωτεολυτικά ένζυμα της δευτερεύουσας καλλιέργειας: Στα τυριά με επιφανειακή ανάπτυξη βακτηρίων, με ανάπτυξη μύκητα, καθώς και στα ελβετικά τυριά οι μικροοργανισμοί της δευτερεύουσας καλλιέργειας είναι αυτοί που παίζουν τον πρωταρχικό ρόλο στη διαμόρφωση της χαρακτηριστικής δομής και γεύσης τους. Η μικροβιακή χλωρίδα των τυριών με επιφανειακή ανάπτυξη μύκητα, αλλά και αυτών με ανάπτυξη μύκητα στη μάζα του τυριού, (Camembert, Roquefort), περιλαμβάνει ζύμες (π.χ. *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces* spp. και *Debaryomyces hansenii*), μύκητες (*Geotrichum candidum*, *Penicillium* spp.), λακτόκοκκους, λακτοβάκιλλους, μικρόκοκκους, σταφυλόκοκκους, κορυνεβακτήρια και κολοβακτηρίδια (Upadhyay *et al.*, 2004).

Τα πρωτεολυτικά συστήματα των *Penicillium camemberti* και *Penicillium roqueforti* είναι παρόμοια και τα δύο συνθέτουν μια ασπαρτυλ-πρωτεΐνάση, μία μεταλλοπρωτεΐνάση, μια όξινη καρβοξυπεπτιδάση και μια αλκαλική αμινοπεπτιδάση (Upadhyay *et al.*, 2004).

Η ασπαρτυλ-πρωτεΐνάση του *Penicillium camemberti* υδρολύει γρηγορότερα την α_{s1} -CN από την β -CN και την κ -CN (Fox and McSweeney, 1995). Οι όξινες πρωτεΐνάσες των *Penicillium camemberti* και *Penicillium roqueforti* έχουν παρόμοια δράση επί της β -CN και υδρολύουν τους δεσμούς Lys₉₇-Val₉₈, Lys₉₉-Glu₁₀₀ και Lys₂₉-Ile₃₀ ταχύτερα από ότι τους υπόλοιπους της β -CN (Le Bars and Gripon, 1981, Trieu-Cuot *et al.*, 1982). Και οι δύο έχουν μεταλλοπρωτεΐνάσες με παρόμοιες ιδιότητες. Έχει απομονωθεί μία ασπαρτική πρωτεΐνάση από το *Penicillium camemberti* (Chrzanowska *et al.*, 1995). Το *Penicillium roqueforti* διαθέτει μια καρβοξυπεπτιδάση που απελευθερώνει όξινα, βασικά και υδρόφοβα αμινοξέα (Fox and McSweeney, 1995).

Το *Geotrichum candidum* συνθέτει εξωκυτταρικές και ενδοκυτταρικές πρωτεΐνάσες, που συμβάλλουν όμως εμφανώς λιγότερο στην ωρίμανση από ότι οι αντίστοιχες του *Penicillium* spp. (Fox and McSweeney, 1995).

Η μικροχλωρίδα των τυριών με επιφανειακή ανάπτυξη βακτηρίων, όπως τα Tilsit και Limburger, Münster και Tellagio, στα αρχικά στάδια της ωρίμανσης κυριαρχείται από ζύμες και μύκητες, ανθεκτικά στα οξέα και το αλάτι, αλλά στο τέλος της ωρίμανσης κυριαρχούν βακτήρια των γενών *Brevibacterium*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Staphylococcus* και *Corynebacterium* (Eliskases-Lechner and Ginzinger, 1995, Valdes-Stauber *et al.*, 1997). Η ανάπτυξη του *Brevibacterium linens* στην επιφάνεια των τυριών αυτών θεωρείται πως παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της χαρακτηριστικής γεύσης, αρώματος και χρώματός τους. Στα εξωκυτταρικά του ένζυμα συμπεριλαμβάνονται πρωτεΐνάσες, αμινοπεπτιδάσες και εστεράσες, οι βιοχημικές ιδιότητες των οποίων ποικίλλουν, εξαιτίας των μεγάλων διαφορών μεταξύ των στελεχών εντός του είδους (Ratray and Fox, 1999). Έχουν απομονωθεί πρωτεΐνάσες και πεπτιδάσες και σε είδη των γενών *Arthrobacter* και *Micrococcus* με ελάχιστη έως σημαντική συμβολή στην πρωτεόλυση (Upadhyay *et al.*, 2004).

Τα βακτήρια του γένους *Propionibacterium* έχουν πολύ περιορισμένη πρωτεολυτική, αλλά σημαντική πεπτιδολυτική δράση, ειδικά σε πεπτιδικούς δεσμούς με προλινικά κατάλοιπα, συμβάλλοντας έτσι στη διαμόρφωση της γεύσης και του αρώματος των τυριών ελβετικού τύπου (Upadhyay *et al.*, 2004). Τα χαρακτηριστικά της δράσης των πρωτεολυτικών ενζύμων τους έχουν μελετηθεί εκτεταμένα (Gagnaire *et al.*, 1999).

3.3.3.2. Η πρωτεόλυση στις διάφορες ποικιλίες τυριών

Το πρότυπο της πρωτεόλυσης στην πλειονότητα των τυριών συνοψίζεται ως εξής: οι καζεΐνες υδρολύονται αρχικά από το εναπομείναν στο τυρόπηγμα πηκτικό μέσο, την πλασμίνη και πιθανόν και άλλα ενδογενή πρωτεολυτικά ένζυμα. προς ένα μεγάλο εύρος μεγάλων και μετρίου μεγέθους πεπτιδίων, τα οποία εν συνεχεία υδρολύονται από τις πρωτεϊνάσες και πεπτιδάσες των οξυγαλακτικών βακτηρίων, της δευτερεύουσας μικροχλωρίδας και της ανεπιθύμητης μικροχλωρίδας προς μικρότερα πεπτίδια και αμινοξέα. Όμως, το πρότυπο και η έκταση της πρωτεόλυσης ποικίλλουν σημαντικά μεταξύ των διάφορων ποικιλιών τυριών λόγω διαφορών στην τεχνολογία παρασκευής τους (με βασικό παράγοντα τη θερμοκρασία κατά την τυροκόμηση), οι οποίες προκαλούν διαφοροποιήσεις στην περιεκτικότητα σε υγρασία, στην ενεργότητα του υπολειμματικού πηκτικού μέσου, στην ενεργοποίηση του πλασμινογόνου και πιθανόν στην ανάπτυξη έντονα πρωτεολυτικής δευτερεύουσας μικροχλωρίδας και στο χρόνο ωρίμανσης (Upadhyay *et al.*, 2004).

Η έκταση της πρωτεόλυσης, αντανακλώμενη στην μέτρηση του διαλυτού αζώτου, μπορεί να είναι από πολύ περιορισμένη (Mozzarella) έως πολύ εκτεταμένη (Blue cheese). Το πρότυπο της πρωτεόλυσης, δηλαδή η σχετική συγκέντρωση των διάφορων πεπτιδίων και αμινοξέων ποικίλλει και είναι μοναδικό στην κάθε ποικιλία τυριού. Οι διαφορές στην περιεκτικότητά τους σε διαλυτό άζωτο οφείλονται σε διαφορές στην περιεκτικότητα σε υγρασία, στη θερμοκρασία τυροκόμησης, στο pH κατά τη στράγγιση του τυροπήγματος και στη διάρκεια της ωρίμανσης και αποδίδονται πρωτίστως στη δράση της χυμοσίνης και σε μικρότερο βαθμό σε αυτή της πλασμίνης (Fox and McSweeney, 1996, 1997). Στη Mozzarella, η σύντομη περίοδος ωρίμανσης (περίπου 3 εβδομάδες) και η εκτενής μετουσίωση της χυμοσίνης υπό την επίδραση της υψηλής θερμοκρασίας (70 °C) κατά την ανάπλαση της τυρόμαζας δικαιολογούν το χαμηλό επίπεδο διαλυτού αζώτου. Αντίθετα, η εκτεταμένη πρωτεόλυση στο Blue cheese και ορισμένα τυριά με επιφανειακή ανάπτυξη βακτηρίων, προκαλείται από τη δράση της χυμοσίνης, της πλασμίνης και των πρωτεϊνολυτικών της δευτερεύουσας μικροχλωρίδας (Fox and McSweeney, 1996).

Το πρότυπο της πρωταρχικής πρωτεόλυσης είναι παρόμοιο στα περισσότερα είδη τυριών· η χυμοσίνη υδρολύει το δεσμό Phe₂₃-Phe₂₄ της α_{s1}-CN και προκύπτουν τα πεπτίδια α_{s1}-CN (f24-199) και α_{s1}-CN (f1-23) (Carles and Ribadeau-Dumas, 1985). Αυτό δε συμβαίνει στα τυριά με υψηλή θερμοκρασία τυροκόμησης (>50 °C), όπως τα ελβετικού τύπου, στα οποία η πλασμίνη είναι ο κύριος πρωτεολυτικός παράγοντας. Στα

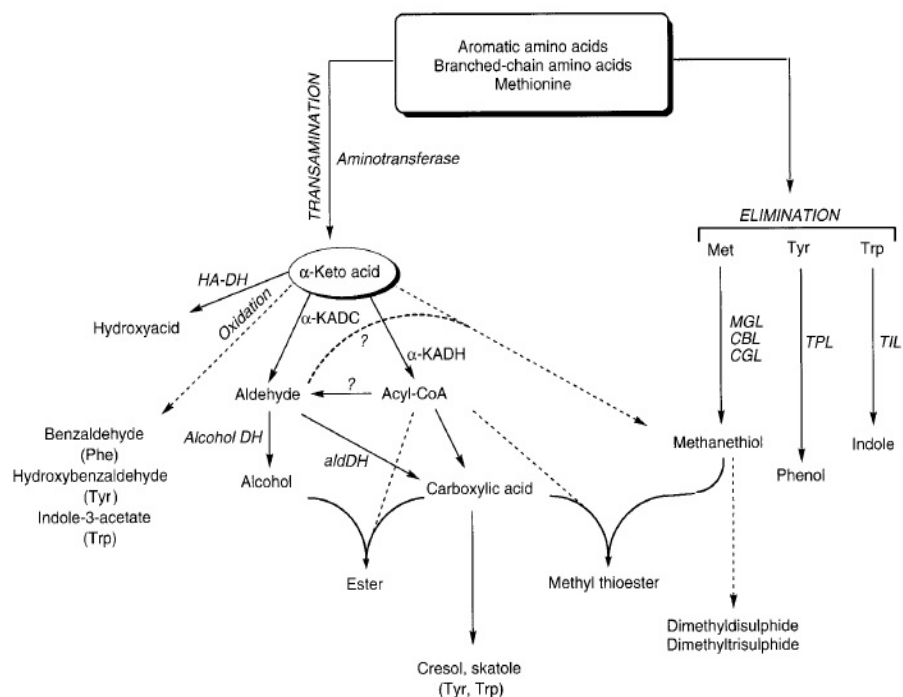
τυριά με εσωτερική ανάπτυξη μύκητα, όπως το Roquefort, τα ένζυμα του *Penicillium roqueforti* υδρολύουν το α_{s1} -CN (f24-199) και άλλα πεπτίδια, μεταβάλλοντας το προφίλ των πεπτιδίων και στο τέλος της ωρίμανσης η συνολική ποσότητα των α_{s1} -CN και β -CN έχει υδρολυθεί (Fox and McSweeney, 1995). Στα ελβετικού τύπου τυριά η β -CN υδρολύεται ταχύτερα από την α_{s1} -CN, σε αντίθεση με άλλα είδη τυριών, με συνεπακόλουθη αύξηση των διαφόρων κλασμάτων της γ -CN υπερτονίζοντας έτσι τη συμβολή της πλασμίνης και της αποδιάταξης της χυμοσίνης σε τυριά με υψηλή θερμοκρασία κατά την τυροκόμηση. Στη δράση της πλασμίνης και των πρωτεϊνολύσων των *Lactobacilli* οφείλεται η εκτεταμένη πρωτεόλυση στο Parmigiano-Reggiano, το οποίο ωριμάζει σε αυξημένη θερμοκρασία (περίπου 18-20 °C) και για παρατεταμένο χρονικό διάστημα (Battistotti and Corradini, 1993).

Τα κύρια αδιάλυτα στο νερό πεπτίδια του Cheddar προέρχονται από τη δράση της χυμοσίνης στην α_{s1} -CN και της πλασμίνης στη β -CN. Το πεπτίδιο α_{s1} -CN (f24-199) υδρολύεται σε διάφορα σημεία από τη χυμοσίνη και την πλασμίνη (McSweeney et al., 1994b). Το πεπτίδιο α_{s1} -CN (f1-23) υδρολύεται σε διάφορα σημεία από τη λακτοσεπίνη (Fox and McSweeney, 1996). Αν και ο δεσμός Leu₁₉₂-Tyr₁₉₃ της β -CN είναι ευαίσθητος στη δράση της χυμοσίνης, υδρολύεται σε αργό ρυθμό στα τυριά (Fox and McSweeney, 1997) και η υδρόλυσή του είναι ανεπιθύμητη, καθώς το πεπτίδιο β -CN (f193-209) που προκύπτει είναι πολύ υδρόφοβο και έχει πικρή γεύση (Visser et al., 1983). Η πλασμίνη υδρολύει τη β -CN προς όλα τα κλάσματα της γ -CN και προς PP5. Τέλος, στο τυρί αυτό δεν έχουν βρεθεί μεγάλα πεπτίδια προερχόμενα από την α_{s2} -CN (Mooney et al., 1998), παρά μόνο τέσσερα μικρά υδατοδιαλυτά πεπτίδια (Singh et al., 1997). Τα υδατοδιαλυτά πεπτίδια είναι χαρακτηριστικά σε ορισμένες ποικιλίες τυριών και σχετίζονται με την ειδικότητα των πρωτεϊνολύσων των μικροοργανισμών που εμπλέκονται στην ωρίμανσή τους (Fox and McSweeney, 1996). Στο Cheddar, τα περισσότερα υδατοδιαλυτά πεπτίδια προέρχονται κυρίως από το αμινοτελικό άκρο της β -CN και σε μικρότερο βαθμό από το αμινοτελικό άκρο της α_{s1} -CN και πιθανόν προκύπτουν από τη δράση της λακτοσεπίνης και άλλων μικροβιακών ενζύμων επί πεπτιδίων που με τη σειρά τους προήλθαν από τη δράση της χυμοσίνης και της πλασμίνης (Fox and McSweeney, 1996).

3.3.4. Ο καταβολισμός των αμινοξέων

Ο καταβολισμός των αμινοξέων έχει σημαντική συμβολή στη διαμόρφωση της γεύσης των τυριών κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης με την παραγωγή ενός μεγάλου αριθμού μεταβολιτών όπως οι αμίνες, οι αλδεύδες, οι φαινόλες, η ινδόλη και οι αλκοόλες.

Φαίνεται πως υπάρχουν δύο κύρια μεταβολικά μονοπάτια μέσω των οποίων γίνεται ο καταβολισμός των αμινοξέων (Yvon and Rijnen, 2001) και παρουσιάζονται συνοπτικά στη Εικόνα 7.



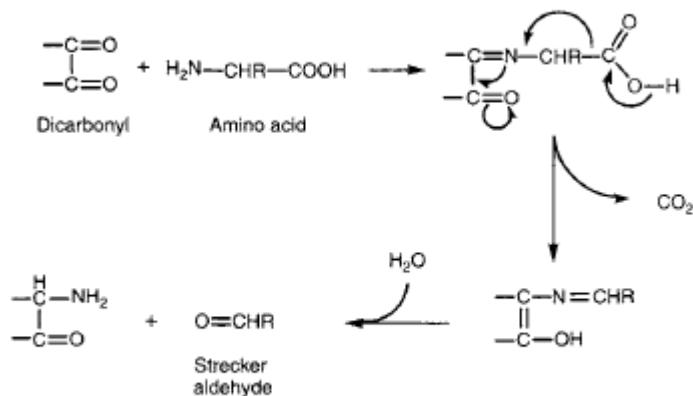
Εικόνα 7: Τα κύρια μονοπάτια καταβολισμού των αμινοξέων από τους μικροοργανισμούς και οι χημικές αντιδράσεις που συμβαίνουν κατά την ωρίμανση των τυριών [162], όπου AT: aminotransferase, HA-DH: hydroxyacid dehydrogenase, α -KADH: α -keto acid dehydrogenase, α -KADC: α -keto acid decarboxylase, aldDH: aldehyde dehydrogenase, alcohol DH: alcohol dehydrogenase, MGL: methionine- γ -lyase, CGL: cystathionine- γ -lyase, CBL: cystathionine-13-lyase, TPL: tyrosinephenol lyase, TIL: tryptophan-indole lyase (Yvon and Rijnen, 2001).

Φαίνεται πως υπάρχουν δύο βασικά μεταβολικά μονοπάτια για τον καταβολισμό των αμινοξέων. Η πρώτη σειρά αντιδράσεων ξεκινά με τη δράση μιας αμινοτρανσφεράσης που μεταφέρει την αμινομάδα από ένα αμινοξύ A σε ένα α -κετοξύ B (συνήθως το α -κετογλουταρικό οξύ) και έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενός α -κετοοξέος προερχόμενου από το αμινοξύ A και ενός νέου αμινοξέος προερχόμενου από το α -κετοξύ B. Τα α -κετοοξέα που προέρχονται από την τρανσαμίνωση αρωματικών αμινοξέων, των αμινοξέων με διακλάδωση και της μεθειονίνης μπορούν να καταβolicτούν περαιτέρω προς άλλες ενώσεις από ενζυμικά καταλυόμενες ή χημικές αντιδράσεις. Η δεύτερη σειρά αντιδράσεων ξεκινά με τη δράση λυσών των αμινοξέων που απομακρύνουν τις πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων. Τα δύο αυτά μεταβολικά μονοπάτια είναι ιδιαίτερα σημαντικά για τον καταβολισμό των αρωματικών αμινοξέων και της μεθειονίνης. Τα υπόλοιπα μονοπάτια καταβολισμού των αμινοξέων περιλαμβάνουν την παραγωγή αμιμών μέσω της δράσης αποκαρβοξυλασών και την παραγωγή NH_3 μέσω της δράσης απαμινασών. Υπάρχουν επίσης συγκεκριμένα μεταβολικά μονοπάτια για τον καταβολισμό των αμινοξέων μεθειονίνη, ασπαρτικό οξύ, γλουταμινικό οξύ και αργινίνη (Yvon and Rijnen, 2001).

3.3.4.1. Η τρανσαμίνωση

Οι αμινοτρανσφεράσες καταλύουν τη μεταφορά της αμινομάδας από ένα αμινοξύ προς ένα α -κετοξύ (Hemme *et al.*, 1982). Τα ένζυμα αυτά, που έχουν εντοπιστεί σε ποικίλους μικροοργανισμούς που εμπλέκονται στην ωρίμανση των τυριών, έχουν ειδικότητα για μεγάλο εύρος υποστρωμάτων και μπορούν να καταλύσουν αντιστρεπτές αντιδράσεις απαμίνωσης (Weimer *et al.*, 1999).

Τα αμινοξέα αντιδρούν χημικά με καρβονυλικές ενώσεις και σχηματίζονται αζομεθίνες. Αν η καρβονυλική ένωση έχει μια ομάδα που λειτουργεί σα δέκτης ηλεκτρονίων κοντά στο καρβονύλιο (π.χ. ένα δικαρβονύλιο), τότε συμβαίνει τρανσαμίνωση και αποκαρβοξυλίωση, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 8. Η αντίδραση αυτή καλείται αποδόμηση Strecker και μέσω αυτής σχηματίζονται αλδεύδες (Belitz and Grosch, 1987). Από την τρανσαμίνωση μέσω της αντίδρασης Strecker σχηματίζονται οι ίδιες αλδεύδες με αυτές που σχηματίζονται κατά την ενζυμικά καταλυόμενη τρανσαμίνωση με τη δράση του ενζύμου αποκαρβοξυλάσης των α -κετοξέων (α -KADC). Η αντίδραση Strecker παίζει σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση της γεύσης διάφορων τροφίμων, αφού δικαρβονύλια παράγονται κατά τις αντιδράσεις Maillard, που συμβαίνουν κατά τη θερμική επεξεργασία των τροφίμων και έχει παρατηρηθεί και στο τυρί (Dunn and Lindsay, 1985).



Εικόνα 8: Η αντίδραση Strecker (Belitz and Grosch, 1987)

Τα κετοοξέα που παράγονται ως αποτέλεσμα της τρανσαμίνωσης της μεθειονίνης, των αμινοξέων με διακλάδωση και των αρωματικών αμινοξέων λειτουργούν ως πρόδρομες ενώσεις ποικίλων αρωματικών ενώσεων που συντίθενται μέσω ενζυμικών ή χημικών αντιδράσεων (Yvon and Rijnen, 2001). Τέσσερις είναι οι κύριες οδοί αποικοδόμησης των α -κετοξέων από τους σχετιζόμενους με το τυρί μικροοργανισμούς:

α. Τα α-κετοοξέα μπορούν να αναχθούν στα αντίστοιχα υδροξυοξέα μέσω της δράσης των 2-υδροξυοξυ-αφυδρογονασών που έχουν εντοπιστεί στα οξυγαλακτικά βακτήρια των εναρκτήριων καλλιεργείων. Αν και τα υδροξυοξέα δεν συμβάλλουν σημαντικά στη διαμόρφωση της γεύσης, η παραγωγή τους μειώνει τα επίπεδα των διαθέσιμων για άλλες αντιδράσεις α-κετοοξέων (Yvon and Rijnen, 2001).

β. Τα προερχόμενα από αμινοξέα με διακλάδωση, αρωματικά αμινοξέα και μεθειονίνη α-κετοοξέα μπορούν να αποκαρβοξυλιωθούν προς τις αντίστοιχες αλδεύδες, αν και το μεταβολικό μονοπάτι αυτό είναι ελάχιστος σημασίας για τα οξυγαλακτικά βακτήρια των εναρκτήριων καλλιεργείων. Οι αλδεύδες που παράγονται από αυτό το μεταβολικό μονοπάτι είναι δυνατό να οξειδωθούν προς το αντίστοιχο καρβοξυλικό οξύ μέσω της αφυδρογονάσης των αλδευδών ή να αναχθούν σε αλκοόλες από αφυδρογονάσες των αλκοολών (Yvon and Rijnen, 2001).

γ. Τα προερχόμενα από τρανσαμίνωση α-κετοοξέα μπορούν να αποκαρβοξυλιωθούν οξειδωτικά προς καρβοξυλικά οξέα, μέσω της δράσης αφυδρογονασών των α-κετοοξέων συνθέτοντας ακετυλο-CoA, τα οποία υδρολύονται απελευθερώνοντας καρβοξυλικά οξέα. Το μονοπάτι αυτό δε φαίνεται να είναι κοινό στους μικροοργανισμούς του τυριού (Yvon and Rijnen, 2001).

δ. Τα α-κετοοξέα είναι δυνατό να αποδομηθούν και χημικά. Το φαινυλ-πυρουβικό οξύ και το υδροξυφαινυλ-πυρουβικό οξύ, που παράγονται αντιστοίχως από την φαινυλαλανίνη και την τυροσίνη, είναι δυνατό να μετατραπούν σε βενζαλδεύδη και υδροξυβενζαλδεύδη. Παρομοίως, το ινδολο-3-πυρουβικό οξύ, που παράγεται από την τρυπτοφάνη, είναι αρκετά ασταθές και αποδομείται προς ινδολο-οξικό οξύ, ινδολο-3-αλδεύδη και σκατόλη (Yvon and Rijnen, 2001). Έχει επίσης αναφερθεί η μη ενζυμική αποδόμηση του α-ετο-γ-μεθυλιο-βουτυρικού οξέος, που παράγεται από τη μεθειονίνη, προς μεθανθειόλη (Gao *et al.*, 1998).

3.3.4.2. Η παραγωγή πτητικών θειούχων ενώσεων

Οι πτητικές θειούχες ενώσεις ανευρίσκονται στα περισσότερα τυριά και είναι σημαντικοί παράγοντες διαμόρφωσης της γεύσης τους (Fox and McSweeney, 1996). Καθώς η μεθειονίνη βρίσκεται σε μεγαλύτερη αναλογία από την κυστεΐνη, οι θειούχες ενώσεις στο τυρί προέρχονται κατά κύριο λόγο από αυτήν.

Το διμεθυλδισουλφίδιο δε συμβάλλει στη διαμόρφωση της γεύσης, ενώ το διμεθυλσουλφίδιο αποτελεί γευστικό συστατικό (Weimer *et al.*, 1999). Η εμφάνιση των ενώσεων αυτών σχετίζεται με την περιεκτικότητα σε μεθανθειόλη και το χαμηλό οξειδοαναγωγικό δυναμικό των τυριών. Οι δύο αυτές ενώσεις παράγονται από την μεθανθειόλη, αλλά δεν έχει καταστεί σαφής ο μηχανισμός παραγωγής του διμεθυλτρисуλφιδίου στο τυρί (McSweeney and Sousa, 2000). Η μεθειονάλη, που θεωρείται πως συμβάλλει στη διαμόρφωση του αρώματος του Cheddar, είναι δυνατό να αποδομηθεί προς μεθανθειόλη είτε αυθόρμητα είτε μέσω αποκαρβοξυλίωσης (Weimer *et al.*, 1999). Η μεθανθειόλη είναι ένα αρωματικό συστατικό με "σαπρό ομοιάζον σε

περιττώματα" άρωμα σε υψηλές συγκεντρώσεις. Εντούτοις, σε χαμηλές συγκεντρώσεις συμβάλλει στο χαρακτηριστικό άρωμα των τυριών (Weimer *et al.*, 1999). Επίσης, αποτελεί πρόδρομη ένωση για τη σύνθεση άλλων πτητικών θειούχων ενώσεων που συμβάλλουν στη δημιουργία αρώματος "σκόρδου" στα τυριά με επιφανειακή ανάπτυξη βακτηρίων. Στα τυριά, η σύνθεση της μεθανθειόλης από τη μεθειονίνη μπορεί να επιτευχθεί από τη δράση ενζύμων της εναρκτήριας καλλιέργειας, της δευτερεύουσας καλλιέργειας και της ανεπιθύμητης μικροχλωρίδας μέσω διάφορων μεταβολικών μονοπατιών (Weimer *et al.*, 1999).

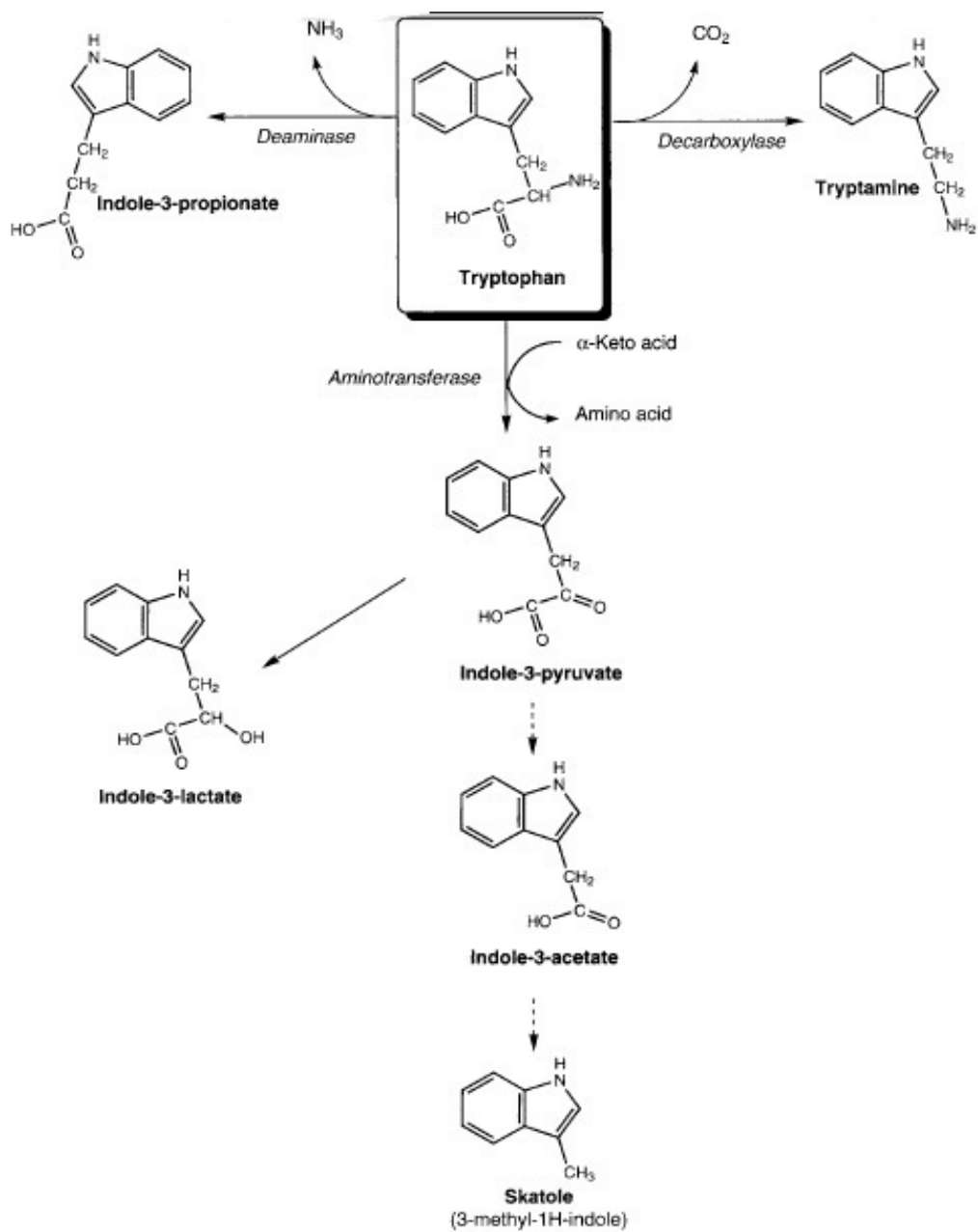
Οι S-θειοεστέρες αποτελούν σημαντικούς παράγοντες διαμόρφωσης της γεύσης των τυριών με επιφανειακή ανάπτυξη βακτηρίων, παράγονται από ποικίλα μεταβολικά μονοπάτια και η γεύση τους εξαρτάται από το μέγεθος και τη διαμόρφωση της ανθρακικής τους αλυσίδας (Weimer *et al.*, 1999). Επίσης, έχει παρατηρηθεί η σύνθεση S-μεθυλθειο-οξικού οξέος από τα *Geotrichum candidum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaryornyces hansenii*, *Kluuyverornyces lactis* και *Yarrowia lipolytica* (Arfi *et al.*, 2002).

Όσον αφορά τις λυάσες που εμπλέκονται στον καταβολισμό της μεθειονίνης, η γ-λυάση της μεθειονίνης (MγL) ή μεθειονινάση καταλύει τη μετατροπή της μεθειονίνης σε α-κετοβουτυρικό οξύ, μεθανθειόλη και NH₃ και παίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό της μεθειονίνης από τα βακτήρια (Soda *et al.*, 1983, Tanaka *et al.*, 1985), η β-λυάση της κυσταθειονίνης (CβL) καταλύει τη μετατροπή της κυσταθειονίνης προς ομοκυστεΐνη, πυρουβικό οξύ και NH₃ και η γ-λυάση της κυσταθειονίνης (CγL) καταλύει τη μετατροπή της κυσταθειονίνης προς κυστεΐνη, α-κετοβουτυρικό οξύ και NH₃ (Weimer *et al.*, 1999).

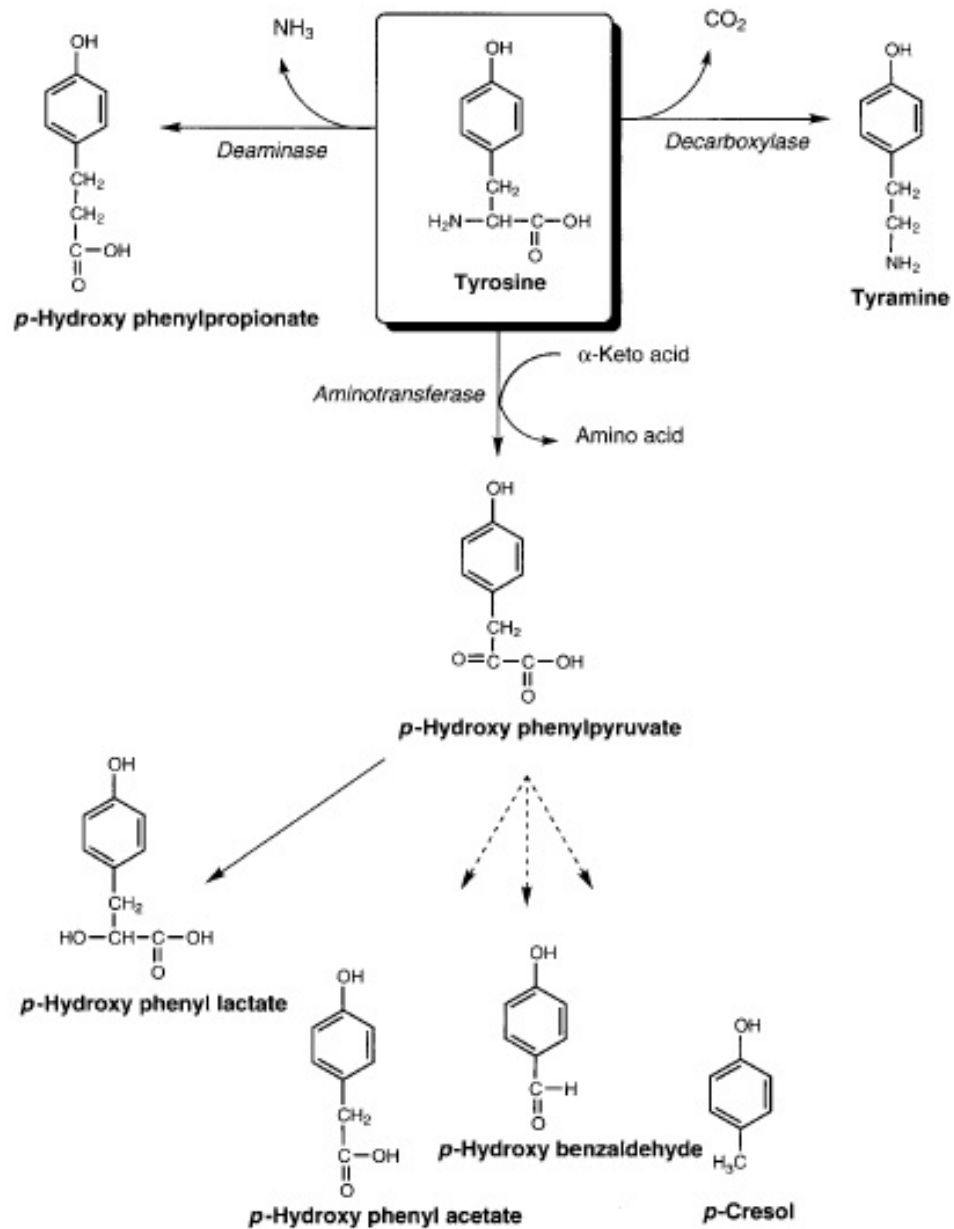
3.3.4.3. Ο καταβολισμός των αρωματικών αμινοξέων

α. Τρυπτοφάνη: Τα κύρια μεταβολικά μονοπάτια καταβολισμού της τρυπτοφάνης από τους σχετιζόμενους με το τυρί μικροοργανισμούς (Yvon and Rijnen, 2001) παρουσιάζονται στην Εικόνα 9.

β. Τυροσίνη: Η τυροσίνη αποτελεί πρόδρομο μόριο διάφορων ενώσεων που ανευρίσκονται στο τυρί· η τυραμίνη σχηματίζεται με αποκαρβοξυλίωση, η p-κρεζόλη και η φαινόλη από μια άτυπη αντίδραση Strecker και το p-υδροξυφαινυλ-πυρουβικό οξύ που σχηματίζεται με τη δράση μιας αμινοτρανσφεράσης (McSweeney and Sousa, 2000). Σημειώνεται πως η τυραμίνη είναι βιογενής αμίνη και προκαλεί τη μονοαμινική τοξίνωση, που συνδέεται με την κατανάλωση τυριού. Τα κύρια μεταβολικά μονοπάτια καταβολισμού της τυροσίνης από τους σχετιζόμενους με το τυρί μικροοργανισμούς (Yvon and Rijnen, 2001) παρουσιάζονται στην Εικόνα 10.

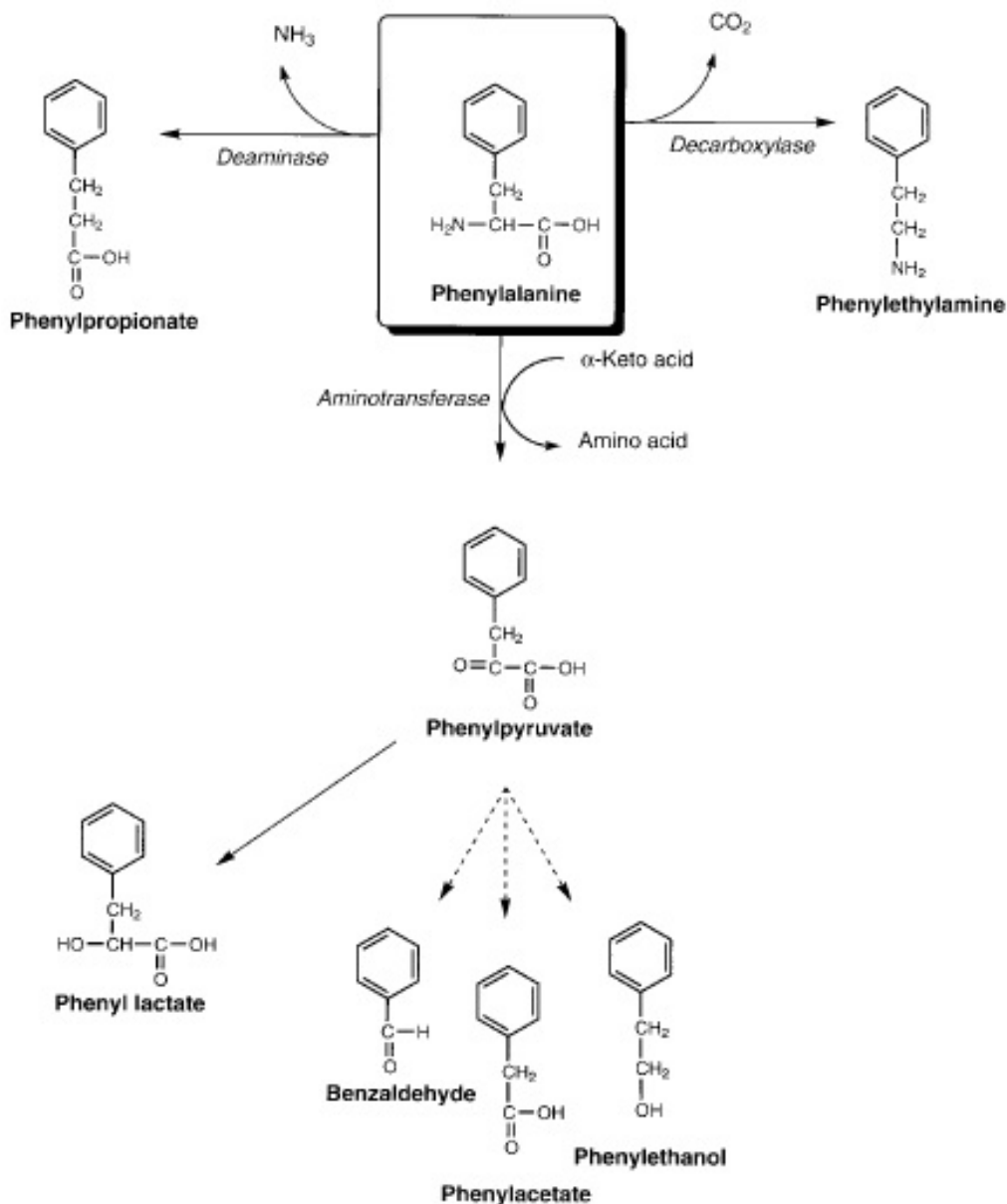


Εικόνα 9: Τα κύρια μεταβολικά μονοπάτια καταβολισμού της τρυπτοφάνης (Yvon and Rijnen, 2001).



Εικόνα 10: Τα κύρια μεταβολικά μονοπάτια καταβολισμού της τυροσίνης (Yvon and Rijnen, 2001).

γ. Φαινυλαλανίνη: Οι προερχόμενες από τη φαινυλαλανίνη ενώσεις που συμβάλλουν στη διαμόρφωση της γεύσης των τυριών είναι η φαινυλμεθανόλη, η φαινυλαιθανόλη, το φαινυλπροπάνιο, το υδροξυ-οξικό οξύ, η φαινυλακεταλδεΐδη, το φαινυλπυρουβικό οξύ και το φαινυθυλ-οξικό οξύ (Adda *et al.*, 1982, Dunn and Lindsay, 1985). Τα κύρια μεταβολικά μονοπάτια καταβολισμού της φαινυλαλανίνης από τους σχετιζόμενους με το τυρί μικροοργανισμούς (Yvon and Rijnen, 2001) παρουσιάζονται στην Εικόνα 11.

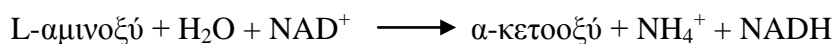


Εικόνα 11: Τα κύρια μεταβολικά μονοπάτια καταβολισμού της φαινυλαλανίνης (Yvon and Rijnen, 2001).

4.3.4.4. Η απαμίνωση

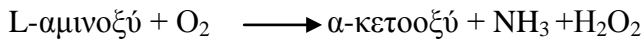
Υπάρχουν δύο τύποι απαμίνωσης που συμπεριλαμβάνουν οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις και διαφέρουν στη φύση του δέκτη υδρογόνου (Hemme *et al.*, 1982).

α. Με αφυδρογονάσες που χρησιμοποιούν το NAD^+ ως συνένζυμο. Η γενική αντίδραση που καταλύεται από τα ένζυμα αυτά είναι η ακόλουθη:

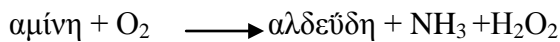


Από τις αντιδράσεις αυτές μπορούν να σχηματιστούν ενώσεις όπως το πυρουβικό οξύ και το α-κετογλουταρικό οξύ από την αλανίνη και το γλουταμινικό οξύ αντίστοιχα (Hemme *et al.*, 1982).

β. Με οξειδάσες που χρησιμοποιούν το οξυγόνο σαν δέκτη υδρογόνου. Οι οξειδάσες των L-αμινοξέων παράγουν α-κετοοξέα σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση:



Οι οξειδάσες των L-αμινοξέων μπορούν επίσης να σχηματίσουν αλδεύδες σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση:



Η αμμωνία, που είναι παράγωγο των αντιδράσεων απαμίνωσης, αποτελεί σημαντικό συστατικό της γεύσης τυριών όπως το Camembert, το Gruyère και το Comte και οι μικροοργανισμοί *Penicillium camemberti*, *Geotrichum candidum* και *Brevibacterium linens* παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην παραγωγή της (McSweeney and Sousa, 2000).

3.3.4.5. Η αποκαρβοξυλίωση

Η αποκαρβοξυλίωση είναι η μετατροπή ενός αμινοξέος στην αντίστοιχη αμίνη με την απομάκρυνση ενός CO₂. Οι αμίνες γενικά έχουν έντονα και συχνά δυσάρεστα αρώματα, όπως έχει φανεί από διάφορα τυριά με επιφανειακή ανάπτυξη βακτηριών (Fox and McSweeney, 1996). Επιπλέον, πολλές αμίνες, όπως η τυραμίνη, η ισταμίνη, η τρυπταμίνη, η πουτρεσίνη, η κανταβερίνη και η φαινυλαιθυλαμίνη, προκαλούν δυσμενείς φυσιολογικές επιδράσεις. Η σχετική συγκέντρωση των αμινών εξαρτάται από τον τύπο του τυριού και τη μικροχλωρίδα του (Fox and McSweeney, 1996) και δεν εξισώνεται με αυτή του αμινοξέος από το οποίο προήλθε, κάτι το οποίο μπορεί να οφείλεται σε διαφορές στο ρυθμό μετατροπής τους (Adda *et al.*, 1982).

3.3.4.6. Ο καταβολισμός των αμινοξέων με διακλάδωση

Ο καταβολισμός των αμινοξέων με διακλαδισμένη αλυσίδα πραγματοποιείται κυρίως από στελέχη του *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* με την δράση της αμινοτρανσφεράσης που μετατρέπει την λευκίνη, την ισολευκίνη και την βαλίνη σε α-κετοϊσοκαπροϊκό οξύ, α-κετο-β-μεθυλβαλερικό οξύ και σε α-κετοϊσοβαλερικό οξύ αντίστοιχα. Ο καταβολισμός αυτού του είδους αμινοξέων σχετίζεται κυρίως με την παραγωγή

συστατικών που έχουν αρνητική επίδραση στο άρωμα ή στην διαμόρφωση της γεύσης των γαλακτοκομικών προϊόντων. Οι αλδεΐδες και οι αλκοόλες που προκύπτουν από τον καταβολισμό των παραπάνω αμινοξέων έχουν την ιδιότητα να προκαλούν ελαττώματα στο τυρί (Yvon and Rijnen, 2001).

3.3.4.7. Ο καταβολισμός των λοιπών αμινοξέων

Η αργινίνη μπορεί να αποτελέσει ενδιάμεσο για τον καταβολισμό του ασπαρτικού οξέος και για την παραγωγή NH_3 από το ασπαρτικό οξύ υπό συνθήκες ανάπτυξης ορισμένων μικροοργανισμών με περιορισμένο άζωτο (Goux *et al.*, 1995). Είναι γνωστά αρκετά μονοπάτια μεταβολισμού της L-αργινίνης, ορισμένα εκ των οποίων είναι λειτουργικά σε μερικά είδη μικροοργανισμών (Kaneoke *et al.*, 1993). Επίσης, έχει παρατηρηθεί δραστηριότητα αμινοτρανσφεράσης και αφυρδογονάσης επί του γλουταμινικού οξέος με προϊόν καταβολισμού το α -κετογλουταρικό οξύ και δραστηριότητα αποκαρβοξυλάσης με προϊόν το γ -αμινοβουτυρικό οξύ (Fox and McSweeney, 1995). Η θρεονίνη μετατρέπεται σε ακεταλδεΐδη και γλυκίνη (McSweeney and Sousa, 2000). Συγκεκριμένα μεταβολικά μονοπάτια για τον καταβολισμό της γλυκίνης, της αλανίνης και της σερίνης από σχετιζόμενους με το τυρί μικροοργανισμούς δεν έχουν μελετηθεί.

3.4. Η γεύση και το άρωμα των τυριών

Η γεύση ορίζεται ως η ολοκληρωμένη αντίληψη των ερεθισμάτων της όσφρησης, της γεύσης και της χημαίσθησης (chemesthesis, trigeminal). Η αντίληψη της γεύσης ξεκινά πριν την κατανάλωση του τυριού, όταν ο καταναλωτής οσμιστεί το τυρί, αλλά τελικά γίνεται αντιληπτή κατά την κατανάλωση, όταν οι ουσίες που διεγείρουν το οσφρητικό σύστημα στη μύτη, το γευστικό σύστημα στο στόμα και το σύστημα της χημαίσθησης στο στόμα και τη μύτη, απελευθερώνονται από το τυρί και φτάνουν στους υποδοχείς. Έχει περιγραφεί ένας μεγάλος αριθμός γευστικών χαρακτηριστικών στο τυρί (πχ. "όξινη γεύση", "γεύση μανιταριού", "γεύση μούχλιασμένου" κ.ά.), τα οποία χρησιμοποιούνται στις περιγραφικές οργανοληπτικές αξιολογήσεις (Delahunty and Drake, 2004).

Η οσμή ή άρωμα είναι η πρώτη πτυχή της γεύσης που συναντά ο καταναλωτής. Τα οσφρητικά ερεθίσματα είναι οι πτητικές ουσίες που μεταφέρονται ορθορινικά από την πηγή στους οσφρητικούς υποδοχείς, όπου τα δημιουργούμενα ερεθίσματα εκφράζονται ως χαρακτηριστικές οσμές. Επίσης, είναι δυνατό να μεταφερθούν μέσω αέρος στη στοματική κοιλότητα κατά την κατανάλωση, απ' όπου μεταφέρονται στη μύτη οπισθορινικά. Τα πτητικά αρωματικά συστατικά των τυριών περιλαμβάνουν λιπαρά οξέα, μεθυλ-, αιθυλ- και ανώτερους εστέρες, μεθυλ-κετόνες, αλειφατικούς και αρωματικούς υδρογονάνθρακες, αλκοόλες βραχείας και μακράς αλυσίδας, αρωματικές αλκοόλες, αλδεΐδες, αμίνες, αμίδια, φαινόλες και θειούχες ενώσεις (Maarse and Visscher, 1996).

Τα γευστικά ερεθίσματα είναι μια άλλη πτυχή της γεύσης. Γίνεται αντιληπτή στη στοματική κοιλότητα, αρχικά από τη γλώσσα και μετέπειτα από τη μαλακή υπερώα. Τα πρωταρχικά ερεθίσματα της γεύσης προέρχεται από μη πτητικές ουσίες που έρχονται σε επαφή με τους υποδοχείς. Η επαφή αυτή δημιουργεί ερεθίσματα που χωρίζονται σε τέσσερις διακριτές γευστικές ποιότητες, το ξινό, το πικρό, το γλυκό και το αλμυρό. Οι ουσίες αυτές είναι το γαλακτικό οξύ (ξινό), το χλωριούχο νάτριο (αλμυρό), τα μεταλλικά άλατα του καλίου, του ασβεστίου και του μαγνησίου (αλμυρό) και τα διάφορα πεπτίδια και ελεύθερα αμινοξέα (γλυκό, πικρό) (Warmke *et al.*, 1996, Engel *et al.*, 2000).

Ο όρος χημαίσθηση χρησιμοποιείται για την περιγραφή του αισθητήριου συστήματος που είναι υπεύθυνο για την ανίχνευση χημικών ερεθισμάτων. Η ανίχνευση είναι γενικότερη από αυτή που γίνεται μεμονωμένα με τις αισθήσεις της όσφρησης και της γεύσης και συμβαίνει πρωταρχικά με τα μάτια, τη μύτη και το στόμα. Η αντίληψη σχετίζεται στενά με τα σωματο-αισθητηριακά χαρακτηριστικά του πόνου και της μεταβολής θερμοκρασίας και προκαλεί μια σημαντική συμπεριφορική απάντηση. Στα τυριά, η αντίληψη αυτή παρατηρείται πχ. σε τυριά με έντονη οξύτητα, με αίσθηση "ανθράκωσης" (το αίσθημα κατά την πόση σόδας) στη γλώσσα και με δριμύτητα στη γεύση, όπως στα μακρόχρονα ωριμασμένα τυριά (Delahunty and Drake, 2004).

Οι συχνότερα απαντώμενες αρωματικές ουσίες που συμβάλλουν στη διαμόρφωση της γεύσης και του αρώματος των περισσότερων τυριών, καθώς και η προέλευσή τους (πρωτεΐνες, λίπος, σάκχαρα, κιτρικό οξύ) παρατίθενται στον Πίνακα 8 (Curioni and Bosset, 2002).

Πίνακας 8: Οι κυριότερες πτητικές αρωματικές ουσίες των τυριών και η προέλευσή τους (Curioni and Bosset, 2002).

Προέλευση	
Οργανικά οξέα	
Οξικό οξύ	Σάκχαρα, Κιτρικό οξύ
Προπιονικό οξύ	Σάκχαρα, Πρωτεΐνες
Βουτανοϊκό οξύ	Σάκχαρα
Εξανοϊκό οξύ	Λίπος
Οκτανοϊκό οξύ	Λίπος
Δεκανοϊκό οξύ	Λίπος
Δωδεκανοϊκό οξύ	Λίπος
2-μεθυλ προπανοϊκό οξύ	Λίπος
3-μεθυλ βουτανοϊκό οξύ	Λίπος
2-αιθυλ εξανοϊκό οξύ	Λίπος
4-μεθυλ οκτανοϊκό οξύ	Λίπος
9-δεκενοϊκό οξύ	Λίπος
Αλκοόλες	

Αιθανόλη	Λίπος, Πρωτεΐνες
2-προπανόλη	Λίπος, Πρωτεΐνες
1-προπανόλη	Λίπος, Πρωτεΐνες
2-βουτανόλη	Λίπος, Πρωτεΐνες
1-βουτανόλη	Λίπος, Πρωτεΐνες
2-πεντανόλη	Λίπος, Πρωτεΐνες
1-εξανόλη	Λίπος, Πρωτεΐνες
2-επτανόλη	Λίπος, Πρωτεΐνες
1-οκτανόλη	Λίπος, Πρωτεΐνες
2-νονανόλη	Λίπος, Πρωτεΐνες
1-δεκανόλη	Λίπος, Πρωτεΐνες
3-μεθυλ βουτανόλη	Λίπος, Πρωτεΐνες
2-μεθυλ βουτανόλη	Λίπος, Πρωτεΐνες
2-αιθυλ εξανόλη	Λίπος, Πρωτεΐνες
3-μεθυλ-2-βουτενόλη	Λίπος, Πρωτεΐνες
1-οκτεν-3-όλη	Πρωτεΐνες
2,3 βουτανεδιόλη	Κιτρικό οξύ
Βενζεναιθανόλη	Πρωτεΐνες
Φουρανμεθανόλη	Πρωτεΐνες
Φαινυλαιθανόλη	Πρωτεΐνες
2-Φαινυλαιθανόλη	Πρωτεΐνες
Κετόνες	
3-υδροξυ 2-βουτανόνη (ακετοΐνη)	Κιτρικό οξύ, Λακτόζη
3-υδροξυ-2-πεντανόνη	Κιτρικό οξύ, Λακτόζη
2,3 βουτανεδιόνη (διακετύλιο)	Κιτρικό οξύ, Πρωτεΐνες, Λακτόζη
2-προπανόνη	Λίπος
2-πεντανόνη	Λίπος
2-εξανόνη	Λίπος
2-επτανόνη	Λίπος
2-νονανόνη	Λίπος
2-εντεκανόνη	Λίπος
2-τριδεκανόνη	Λίπος
1-οκτεν-3-όνη	Πτωρεΐνες
Αλδεΐδες	
Ακεταλδεΐδη	Κιτρικό οξύ
Βενζαλδεΐδη	Πρωτεΐνες
Εξανάλη	Πρωτεΐνες, Λίπος
Επτανάλη	Πρωτεΐνες, Λίπος
Νονανάλη	Πρωτεΐνες, Λίπος
Δεκανάλη	Πρωτεΐνες, Λίπος
2-μεθυλπροπανάλη	Πρωτεΐνες
2-μεθυλβουτανάλη	Πρωτεΐνες
3-μεθυλ βουτανάλη	Πρωτεΐνες
2-νονενάλη	Πρωτεΐνες
Εστέρες	
Αιθανοϊκός αιθυλεστέρας	Λίπος, Πρωτεΐνες, Σάκχαρα

Βουτανοϊκός αιθυλεστέρας	Λίπος, Πρωτεΐνες, Σάκχαρα
Εξανοϊκός μεθυλεστέρας	Λίπος, Πρωτεΐνες, Σάκχαρα
Εξανοϊκός αιθυλεστέρας	Λίπος, Πρωτεΐνες, Σάκχαρα
Οκτανοϊκός αιθυλεστέρας	Λίπος, Πρωτεΐνες, Σάκχαρα
Δεκανοϊκός αιθυλεστέρας	Λίπος, Πρωτεΐνες, Σάκχαρα
2-μεθυλ βουτανοϊκός αιθυλεστέρας	Λίπος, Πρωτεΐνες, Σάκχαρα
2-αιθυλ βουτανοϊκός αιθυλεστέρας	Λίπος, Πρωτεΐνες, Σάκχαρα
οξικός 3-μεθυλβουτυλεστέρας	Λίπος, Πρωτεΐνες, Σάκχαρα
Λακτόνες	
δ-οκταλακτόνη	Λίπος, Πρωτεΐνες
γ-δεκαλακτόνη	Λίπος, Πρωτεΐνες
δ-δεκαλακτόνη	Λίπος, Πρωτεΐνες
γ-δωδεκαλακτόνη	Λίπος, Πρωτεΐνες
δ-δωδεκαλακτόνη	Λίπος, Πρωτεΐνες
6-δωδεκεν-γ-λακτόνη	Λίπος, Πρωτεΐνες
Αρωματικοί υδρογονάνθρακες	
Βενζόλιο	Πρωτεΐνες
Θειούχες ενώσεις	
Μεθειονάλη	Πρωτεΐνες
Μεθανεθειόλη	Πρωτεΐνες
Διμεθυλσουλφίδιο	Πρωτεΐνες

4. Αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού των πτητικών αρωματικών ουσιών στο τυρί

4.1. Μέθοδοι εξαγωγής των πτητικών αρωματικών ουσιών

Οι αρωματικές ουσίες που παράγονται κατά την ωρίμανση των τυριών είναι κατά κύριο λόγο υδρόφοβες ή λιπόφιλες και ως εκ τούτου τείνουν να συγκεντρώνονται στο λίπος του τυριού σύμφωνα με το συντελεστή κατανομής στην υδάτινη προς τη λιπαρή φάση. Έτσι, ένα σημαντικό βήμα για την ανάλυσή τους είναι η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου εξαγωγής τους από τη λιπαρή φάση των τυριών. Παρόλα αυτά, δεν υπάρχει καμία μέθοδος που να αποτυπώνει την πραγματική εικόνα του αρωματικού προφίλ των τυριών και η απομόνωση και ανάλυση του αρώματος παραμένει ακόμα υπό διερεύνηση (Reineccius, 2002). Επιπλέον, όχι μόνο είναι δυνατό κατά την εκχύλιση των αρωματικών ουσιών να σχηματιστούν παραπροϊόντα, αλλά το προσδιορισθέν αρωματικό προφίλ στις περισσότερες περιπτώσεις είναι δύσκολο να συσχετιστεί με το γευστικό προφίλ που καθορίζεται από επιτροπές γευσιγνωστών κατά την οργανοληπτική αξιολόγηση. Άλλωστε, είναι δύσκολο να αποτυπωθεί μια γευστική αντίληψη αφού δεν είναι γνωστό το πώς αλληλεπιδρούν οι διάφορες ουσίες για να παραχθεί η συνολική γευστική εντύπωση (Noble *et al.*, 1996). Επομένως, είναι περισσότερο αποτελεσματικό να επικεντρωθεί η έρευνα στην ταυτοποίηση των ουσιών που πράγματι σχετίζονται με τη διαμόρφωση της γεύσης. Επειδή δεν έχει καθιερωθεί

παγκοσμίως μια συγκεκριμένη μέθοδος εξαγωγής, είναι απαραίτητο να επιλεγεί μια μέθοδος που να αποδίδει ένα όσο το δυνατόν περισσότερο αντιπροσωπευτικό προφίλ των οργανοληπτικών ιδιοτήτων του τυριού (Etievant and Langlois, 1998).

Τα πτητικά αρωματικά συστατικά, που στην πλειονότητά τους είναι υδρόφοβα, κατανέμονται με έναν αρκετά ετερογενή τρόπο στη μάζα του τυριού και βρίσκονται σε αρκετά χαμηλές συγκεντρώσεις, ακόμα και σε ίχνη (<10 μg/kg). Η ανάλυσή τους στο τυρί απαιτεί ομογενοποίηση του δείγματος πριν την εξαγωγή, όταν απαιτείται η χρήση τεχνικών απομόνωσης προσαρμοσμένες για λιπόφιλες ουσίες σε ίχνη. Μία κοινά εφαρμοζόμενη πρακτική στο τυρί είναι η κατάψυξη του δείγματος σε υγρό άζωτο και ακολουθείται από τρίψιμο του τυριού σε λεπτά τεμαχίδια. Άμα είναι απαραίτητο, γίνεται και προσαρμογή του pH, προκειμένου να διατηρηθεί η υψηλή συγκέντρωση των πτητικών λιπαρών οξέων που βρίσκονται στην υδατική φάση υπό μορφή αλάτων (Irnhof and Bosset, 1991).

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την εξαγωγή των πτητικών αρωματικών ουσιών από το τυρί είναι οι ακόλουθες:

4.1.1. Εκχύλιση με ατμό (steam distillation)

Στις βασιζόμενες σε αυτή τη μέθοδο τεχνικές, το υδατικό απόσταγμα συγκεντρώνεται με εκχύλιση υγρής/υγρής φάσης ή κρυσυγκέντρωση. Αν και ευρέως χρησιμοποιούμενη, η τεχνική αυτή έχει αρκετά μειονεκτήματα. Οι πολύ πτητικές ουσίες ανακτώνται ανεπαρκώς, οι θερμοευαίσθητες ουσίες μπορεί να χαθούν και είναι πιθανή η εμφάνιση παραπροϊόντων, εκτός και αν η εκχύλιση γίνει υπό μειωμένη πίεση. Σε κάθε περίπτωση, σε ατμοσφαιρική πίεση ή υπό κενό, η ποιότητα του εκχυλίσματος των αρωματικών ουσιών εξαρτάται από την πτητικότητα και τη διαλυτότητά τους στο χρησιμοποιούμενο διαλύτη. Άμα η απόσταξη γίνει χωρίς ταυτόχρονη εξαγωγή διαλύτη, είναι απαραίτητο να προστεθεί μια μεγάλη ποσότητα νερού στο τριμμένο τυρί προκειμένου να εξασφαλιστεί ένας ομοιογενής πολτός (περίπου 1 l νερού ανά 100 g τυριού). Το απόσταγμα που λαμβάνεται είναι στην πραγματικότητα ένα αραιωμένο υδατικό διάλυμα πτητικών ουσιών (Dumont and Adda, 1972). Ακολούθως απαιτείται εκχύλιση με έναν κατάλληλο διαλύτη και μετά συμπύκνωση.

Στην τεχνική εκχύλισης με ταυτόχρονη απόσταξη με ατμό (simultaneous steam distillation, SDE) χρησιμοποιούνται μόνο διαλύτες με πολύ χαμηλό σημείο ζέσεως (όπως το πεντάνιο) για τη συμπύκνωση των πτητικών ουσιών. Σε μια συνεχή διαδικασία, οι συμπυκνούμενοι ατμοί του νερού εκχυλίζονται από τους συμπυκνούμενους ατμούς του διαλύτη αποδίδοντας υψηλό ρυθμό εκχύλισης. Τόσο το νερό όσο και ο διαλύτης επανακυκλοφορούν στο σύστημα. Έχει προταθεί ένα σύστημα λειτουργίας υπό χαμηλή πίεση και θερμοκρασία (20-40 °C) προκειμένου να αποφευχθεί η δημιουργία παραπροϊόντων (Maignial *et al.*, 1992).

4.1.2. Εκχύλιση σε συνθήκες υψηλού κενού (high-vacuum distillation)

Στις τεχνικές που βασίζονται στη μέθοδο αυτή, παράγονται μικροί όγκοι συμπυκνωμένων υδατικών εκχυλισμάτων (το περιεχόμενο της υγρασίας του τυριού μόνο), τα οποία μπορούν να εκχυλιστούν με οργανικούς διαλύτες όπως το χλωρίδιο του μεθυλενίου και ο διαιθυλαιθέρας. Ένα τυπικό πείραμα περιλαμβάνει δύο βήματα: το παγωμένο τριμμένο τυρί μεταφέρεται σε μία κωνική φιάλη που συνδέεται με ένα μηχανισμό στατικού κενού (10 Pa) και κατόπιν, με τη χρήση θερμοκρασίας χαμηλότερης από αυτής του περιβάλλοντος και περιστροφής της φιάλης προκειμένου να διαρραγεί η διαρκώς αφυδατούμενη επιφάνεια του δείγματος, οι πτητικές ουσίες συμπυκνώνονται, με το περισσότερο νερό του τυριού στις παγίδες να παραμένει στη θερμοκρασία του υγρού αζώτου (Dumont and Adda, 1972). Στο δεύτερο στάδιο, η φιάλη που περιέχει το αφυδατωμένο τυρί συνδέεται σε μια συσκευή μοριακής εκχύλισης που λειτουργεί υπό υψηλό κενό (10^{-2} Pa). Σε αυτό το στάδιο, που καλείται και μοριακή εκχύλιση ψυχρού δακτύλου (cold-finger molecular distillation), το εναπομείναν νερό και πτητικές ουσίες μεταφέρονται απ' ευθείας στην επιφάνεια ενός ψυχρού συμπυκνωτή που διατηρείται στη θερμοκρασία του υγρού αζώτου και βρίσκεται σε πολύ κοντινή απόσταση από την επιφάνεια του δείγματος. Η συμπυκνωμένη επίστρωση πάγου στην επιφάνεια του συμπυκνωτή περιέχει λιγότερες πτητικές και περισσότερες λιπόφιλες ουσίες. Αυτό το κλάσμα συνενώνεται με το υδατικό εκχύλισμα του πρώτου σταδίου. Λειτουργώντας σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος ή χαμηλότερες αποτρέπεται η θερμική αποδόμηση, αλλά απαιτείται σχετικά μεγάλη ποσότητα δείγματος (50-250 g) και επιπλέον είναι πολύ χρονοβόρος διαδικασία. Χημική κλασματοποίηση του υδατικού εκχυλίσματος μέσω ελέγχου του pH έχει ως αποτέλεσμα το διαχωρισμό των οργανικών ενώσεων σε όξινες, βασικές και ουδέτερες και έτσι καθίσταται δυνατή η ανάλυση του κάθε κλάσματος ξεχωριστά (Reineccius, 2002).

4.1.3. Απευθείας εκχύλιση (direct extraction) από έναν διαλύτη (π.χ. διαιθυλαιθέρας)

Στις τεχνικές αυτές, το εκχύλισμα λαμβάνεται με κλασματοποίηση υγρής/υγρής φάσης ή υγρής/στερεής φάσης. Απαιτούνται όμως περαιτέρω ενέργειες προκειμένου να διαχωριστούν οι αρωματικές ουσίες από τα λιπίδια, τα οποία επίσης εκχυλίζονται πολύ αποτελεσματικά από το διαλύτη. Αν και με την απλή εφαρμογή της μεθόδου αυτής εκχυλίζονται κατά προτίμηση οι πτητικές ουσίες, είναι απαραίτητο να ακολουθήσουν και επιπλέον ενέργειες προκειμένου να επιτευχθεί μεγαλύτερη ειδικότητα (Reineccius, 2002). Για παράδειγμα, έχει εφαρμοστεί ο διαχωρισμός των πτητικών από τις μη πτητικές ουσίες με εκχύλιση υπό κενό (Kubicikova and Grosch, 1997, Rychlik *et al.*, 1997, Reineccius, 2002). Σε αυτή την περίπτωση, το διακύβευμα είναι πως μόνο οι πολύ πτητικές ουσίες επιλέγονται από μία πολύ λιπαρή φάση (Reineccius, 2002). Έτσι, οι βασιζόμενες στην απευθείας εκχύλιση τεχνικές χρειάζονται ένα επιπλέον στάδιο εκχύλισης υπό κενό και ως εκ τούτου δε προσφέρουν κάποιο σημαντικό πλεονέκτημα έναντι των λοιπών μεθόδων εκχύλισης υπό κενό.

4.1.4. Τεχνικές διαπίδυσης (dialysis techniques)

Βασίζονται στις διαφορές του μεγέθους των μορίων και ο διαχωρισμός γίνεται ανάλογα με την ικανότητα των μορίων να διαχέονται μέσω μιας μεμβράνης σε θερμοκρασία δωματίου, με αποτέλεσμα τη βαθμιαία συμπίκνωσή τους. Γενικά, η μέθοδος αυτή είναι χρονοβόρα (72 ώρες περίπου διαρκεί η διαπίδυση) και η αποδοτικότητά της μειώνεται δραστικά όσο αυξάνει ο αριθμός ατόμων άνθρακα στο μόριο της αρωματικής ένωσης (για $n > 10$) και διαμορφώνεται από την υδροφοβικότητα του μορίου (Molimard and Spinnler, 1993).

4.1.5. Εκχύλιση με υπερκριτικά υγρά (supercritical fluid extraction, SFE)

Στις τεχνικές αυτές χρησιμοποιείται το διοξείδιο του άνθρακα ως διαλύτης με το οποίο αποφεύγονται τα προβλήματα της συμπίκνωσης του εκχυλίσματος. Εξαιτίας της ταυτόχρονης εκχύλισης των μονο-, δι- και τριγλυκεριδίων και των πτητικών ουσιών, η εφαρμογή των τεχνικών αυτών περιορίζεται σε δείγματα με χαμηλή λιποπεριεκτικότητα. Στην περίπτωση που το δείγμα είναι τυρί, ο μόνος τρόπος που μπορεί να εφαρμοστεί η μέθοδος αυτή είναι με συνδυασμό με υγρή χρωματογραφία με υπερκριτικά υγρά (supercritical fluid chromatography, SFE-SFC) (Gmór *et al.*, 1987).

4.1.6. Χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αποκλεισμού μεγέθους (high-performance size-exclusion chromatography)

Είναι μια μέθοδος εξαγωγής αρωματικών ουσιών από οργανικά διαλύματα τροφίμων με μεγάλη περιεκτικότητα σε λίπος. Το βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ο περιορισμένος αριθμός των απαιτούμενων εγχύσεων δείγματος και ο μικρός τελικός όγκος των κλασμάτων, που με όρους τελικής ωφέλιμης συγκέντρωσης, φάνηκε σημαντικά ταχύτερη και προκάλεσε τη δημιουργία λιγότερων προκαλούμενων από τη θερμότητα παραπροϊόντων και παρατηρήθηκαν λιγότερες απώλειες στις περισσότερες πτητικές ουσίες συγκριτικά με άλλες μεθόδους εκχύλισης (Lubke *et al.*, 1996).

4.1.7. Τεχνικές υπερκείμενης φάσης (headspace techniques)

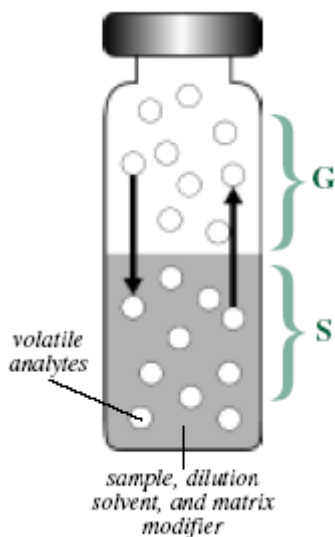
4.1.7.1. Τεχνικές δυναμικής υπερκείμενης φάσης (dynamic headspace ή purge-and-trap)

Στην τεχνική αυτή γίνεται εξαγωγή των πτητικών ουσιών από δείγματα τυριού (μερικές φορές είναι διεσπαρμένα μέσα σε νερό) με ένα αδρανές αέριο. Οι πτητικές ουσίες συμπυκνώνονται σε μια ψυχρή παγίδα (συνήθως τριχοειδείς σωλήνες που ψύχονται με υγρό άζωτο ή στερεό CO_2) ή προσροφώνται σε ένα αδρανές προσροφητικό μέσο, το οποίο μπορεί να είναι υγρό ή στερεό (συνήθως το πολυμερές Tenax TA) ή σε ένα διαλύτη. Ακολούθως, οι πτητικές ουσίες εκροφώνται με θέρμανση ή εκλύονται με τη χρήση του κατάλληλου διαλύτη (Mariaca and Bosset, 1997, Reineccius, 2002, van Ruth, 2001). Αν και με τη μέθοδο αυτή περιορίζεται σημαντικά η παραγωγή

παραπροϊόντων (van Ruth, 2001), ωστόσο το αρωματικό προφίλ μπορεί να αλλοιωθεί εξαιτίας της παγίδευσης των αρωματικών ουσιών στο προσροφητικό μέσο, ειδικά όταν το τελευταίο είναι κάποιο πολυμερές (Reineccius, 2002). Αν και η μέθοδος αυτή έχει μικρή ευαισθησία, συγκρινόμενη με άλλες μεθόδους εκχύλισης πτητικών ουσιών, τα βασικά της πλεονεκτήματα είναι η μικρή απαιτούμενη ποσότητα δείγματος (περίπου 20 g) και η ταχύτητά της (le Quere and Molimard , 2002).

4.1.7.2. Τεχνικές στατικής υπερκείμενης φάσης (static headspace)

Τα τυριά αποτελούνται από ένα μεγάλο εύρος ουσιών με μεγάλες διαφορές στο μοριακό βάρος, την πολικότητα και την πτητικότητα. Οι πτητικές ουσίες από περίπλοκα δείγματα όπως αυτά εξάγονται και απομονώνονται στην υπερκείμενη φάση του δειγματοληπτικού φιαλιδίου ως ατμός, όπως φαίνεται στην Εικόνα 11. Το δείγμα προετοιμάζεται σε ένα φιαλίδιο που περιέχει το δείγμα και ένα διαλύτη (π.χ. νερό) ή έναν τροποποιητή υποστρώματος (matrix modifier). Το δείγμα θερμαίνεται υπό ανάδευση και οι πτητικές ουσίες διαχέονται στην αέρια φάση μέχρι να επιτευχθεί ισορροπία, όπως φαίνεται στην Εικόνα 12. Οι ουσίες προσροφώνται από την υπερκείμενη φάση με δειγματοληπτική βελόνα και μεταφέρονται στο όργανο όπου θα γίνει ο διαχωρισμός και η ανάλυση των πτητικών ουσιών (αέριος χρωματογράφος-gas chromatograph, GC, βλέπε παρακάτω) (Kolb and Ettre , 2006).



Εικόνα 12: Οι φάσεις εντός του φιαλιδίου δειγματοληψίας των τεχνικών στατικής υπερκείμενης φάσης, όπου G η αέρια φάση (headspace), που βρίσκεται στο χώρο πάνω από το συμπυκνωμένο δείγμα και S η φάση του δείγματος, η οποία συνήθως είναι υγρό ή στερεό σε διαλύτη ή τροποποιητή υποστρώματος

Στη μέθοδο αυτή, οι μεταβλητές K (συντελεστής κατανομής, partition coefficient) και β (αναλογία φάσης, phase ratio) είναι εξέχουσας σημασίας και παριστάνονται από τις παρακάτω εξισώσεις:

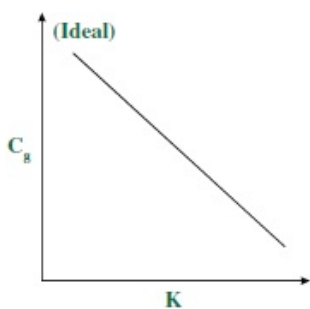
$$K = \frac{c_s}{c_g}$$

,όπου C_s η συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας στη φάση του δείγματος και C_g η συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας στην αέρια φάση

$$\beta = \frac{V_g}{V_s}$$

,όπου V_s ο όγκος της φάσης του δείγματος και V_g ο όγκος της αέριας φάσης (Kolb and Ettre, 2006).

Τα δείγματα πρέπει να προετοιμάζονται κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να μεγιστοποιείται η συγκέντρωση των πτητικών ουσιών στην υπερκείμενη φάση και να ελαχιστοποιείται η επιμόλυνση από το υπόστρωμα. Για να διευκολυνθεί ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της αναλυόμενης ουσίας στην υπερκείμενη φάση, πρέπει να υπολογιστεί ο συντελεστής κατανομής K , που ορίζεται ως η ισορροπία κατανομής της αναλυόμενης ουσίας ανάμεσα στη φάση του δείγματος και την αέρια φάση. Ουσίες με χαμηλό συντελεστή K τείνουν να διαχωρίζονται πιο εύκολα στην αέρια φάση και έχουν σχετικά υψηλές αποκρίσεις και χαμηλότερα όρια ανίχνευσης (Kolb and Ettre, 2006), όπως φαίνεται στην Εικόνα 12.

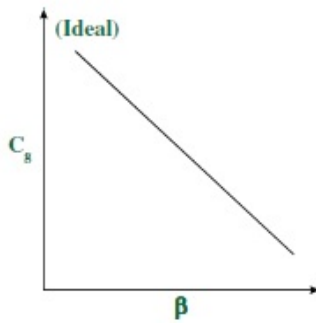


Εικόνα 13

Ο συντελεστής K μπορεί να μειωθεί με αλλαγή της θερμοκρασίας στην οποία γίνεται η εξισορρόπηση ή με αλλαγή της σύνθεσης του υποστρώματος. Επίσης, μπορεί να μειωθεί με την εισαγωγή κάποιου ανόργανου άλατος στο υδατικό υπόστρωμα του δείγματος: υψηλές συγκεντρώσεις άλατος σε υδατικά δείγματα μειώνουν τη διαλυτότητα των πολικών οργανικών πτητικών ουσιών στο δείγμα και προάγουν τη μεταφορά τους στην αέρια φάση, με συνεπακόλουθη μείωση του συντελεστή K . Η έκταση της επίδρασης της εξαλάτωσης στο συντελεστή K δεν είναι ίδια για όλες τις ουσίες. Γενικά, οι πολικές πτητικές ουσίες σε πολικά υποστρώματα υδατικών δειγμάτων παρουσιάζουν τις μεγαλύτερες μεταβολές και έχουν τις υψηλότερες

αποκρίσεις. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα άλατα είναι τα NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl , Na_2SO_4 , K_2CO_3 (Kolb and Ettre, 2006).

Η αναλογία φάσης β ορίζεται ως ο σχετικός όγκος της υπερκείμενης φάσης συγκρινόμενος με τον όγκο του δείγματος στο φιαλίδιο δειγματοληψίας. Χαμηλότερες τιμές του β (π.χ. μεγαλύτερο δείγμα) αποδίδουν υψηλότερες αποκρίσεις για τις πτητικές ουσίες (Kolb and Ettre, 2006), όπως φαίνεται στην Εικόνα 14.



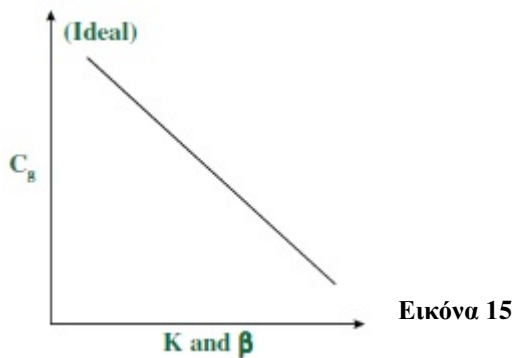
Εικόνα 14

Όμως, η μείωση του β δεν αποδίδει πάντα την αύξηση στην απόκριση που απαιτείται προκειμένου για να βελτιωθεί η ευαισθησία. Όταν το β μειώνεται με αύξηση του μεγέθους του δείγματος, οι ουσίες με υψηλούς συντελεστές K διαχωρίζονται λιγότερο στην υπερκείμενη φάση εν συγκρίσει με αυτές με χαμηλούς συντελεστές K και αποδίδουν αντίστοιχα μικρότερες αλλαγές στη C_g . Δείγματα που περιέχουν ουσίες με υψηλούς συντελεστές K χρειάζονται βελτιστοποίηση για να παράσχουν τη χαμηλότερη τιμή συντελεστή K προτού γίνουν αλλαγές στην τιμή του β (Kolb and Ettre, 2006).

Οι τιμές K και β αλληλεπιδρούν προκειμένου να καθοριστεί η τελική συγκέντρωση των πτητικών συστατικών στην υπερκείμενη φάση. Η συγκέντρωση των πτητικών ουσιών στην αέρια φάση μπορεί να εκφραστεί ως

$$C_g = \frac{C_o}{K+\beta}$$

,όπου C_g είναι η συγκέντρωση των πτητικών αναλυόμενων ουσιών στην αέρια φάση και C_o η αρχική συγκέντρωση των πτητικών αναλυόμενων ουσιών στο δείγμα. Προσπάθεια επίτευξης των χαμηλότερων δυνατών τιμών K και β θα έχει αποτέλεσμα υψηλότερες συγκεντρώσεις των αναλυόμενων ουσιών στην αέρια φάση και ως εκ τούτου μεγαλύτερη ευαισθησία, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 15 (Kolb and Ettre, 2006).



Εικόνα 15

Η μεταφορά του δείγματος στο GC μπορεί να γίνει με τρεις τεχνικές:

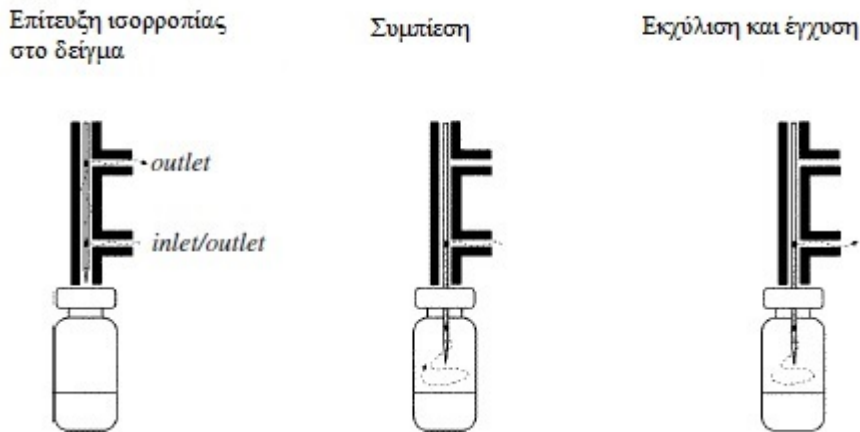
ι. Με έγχυση με αεροστεγή σύριγγα (gas-tight syringe injection) (Εικόνα 16), η οποία μπορεί να εφαρμοστεί με χρήση αυτόματου δειγματολήπτη ή χειροκίνητα. Η θερμοκρασία του δείγματος ρυθμίζεται (στην περίπτωση του αυτόματου δειγματολήπτη σε ένα κλίβανο επώασης) σε μία ορισμένη θερμοκρασία για ένα ορισμένο χρόνο, έτσι ώστε να επιτευχθεί ισορροπία ανάμεσα στην αέρια φάση και τη φάση του δείγματος. Μόλις γίνει αυτό, ένα κλάσμα του δείγματος (aliquot) λαμβάνεται από την υπερκείμενη φάση από την αεροστεγή σύριγγα και εγχέεται στη θύρα έγχυσης (injection port) του GC (Kolb and Ettre, 2006).



Εικόνα 16: Σύστημα αεροστεγούς σύριγγας

Επειδή το δείγμα θερμαίνεται, κανονικά πρέπει να θερμαίνεται και η σύριγγα προκειμένου να διασφαλιστεί ότι το δείγμα δε θα επανασυμπυκνωθεί στη σύριγγα. Έτσι, αρκετές εταιρείες έχουν κατασκευάσει θερμαινόμενους αυτόματους δειγματολήπτες. Επίσης η μέθοδος ενδέχεται να έχει ζητήματα επαναληψιμότητας, εξαιτίας πιθανής απώλειας δείγματος. Καθώς το δείγμα μεταφέρεται από το φιαλίδιο δειγματοληψίας στη θύρα έγχυσης, ενδέχεται ένα μέρος του να χαθεί εξαιτίας της διαφοράς πίεσης ατμόσφαιρας-φιαλιδίου. Πέραν αυτών των προβληματισμών, το βασικό πλεονεκτήματα της τεχνικής αυτής είναι ότι είναι απλή στην εφαρμογή (Kolb and Ettre, 2006).

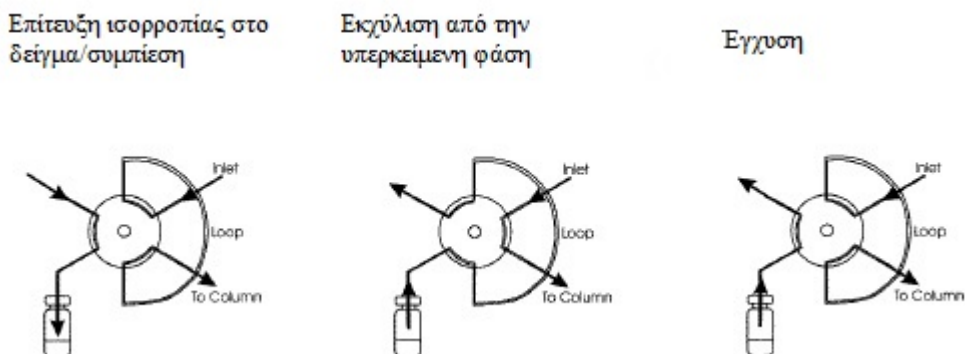
υ. Με σύστημα εξισορροπημένης πίεσης (balanced-pressure system) (Εικόνα 17), το οποίο χαρακτηρίζεται από τη μεγάλη επαναληψιμότητά του. Γίνεται απρόσκοπτη έγχυση απευθείας από το φιαλίδιο στη ροή του φέροντος αερίου με μόνα κινούμενα τμήματα τη βαλβίδα και τη βελόνα. Η ρύθμιση της θερμοκρασίας του δείγματος γίνεται με κλίβανο επώασης έτσι ώστε να επιτευχθεί ισορροπία στο δείγμα. Ταυτόχρονα, η βελόνα εισέρχεται στο φιαλίδιο και αυτό συμπιέζεται με το φέρον αέριο. Αφού επιτευχθεί ισορροπία, η βαλβίδα ανοίγει για ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα έτσι ώστε να ανακατευθυνθεί το δείγμα μέσω της βελόνας στη γραμμή μεταφοράς και μετά στη χρωματογραφική στήλη (Kolb and Ettre, 2006).



Εικόνα 17: Σύστημα εξισορροπημένης πίεσης

Το βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι η μεγάλη επαναληψιμότητα, καθώς δεν υπάρχουν πολλά κινητά μέρη κι έτσι μειώνεται η πιθανότητα προσρόφησης ανεπιθύμητων ουσιών και η απώλεια ουσιών από διαρροές.

ιι. Με σύστημα πίεσης-βρόχου (Εικόνα 18), το οποίο χρησιμοποιεί συγκεκριμένη ποσότητα δείγματος. Συνήθως χρησιμοποιείται μια εξάθυρη βαλβίδα που στην αρχή ρυθμίζει τη θερμοκρασία και συμπιέζει το δείγμα. Μετά τη συμπύεση, η βαλβίδα γυρνά και ο βρόχος γεμίζει με το δείγμα. Αφού ο βρόχος γεμίσει, η βαλβίδα γυρίζει ξανά για να ανακατευθύνει τη ροή του φέροντος αερίου και να εγχύσει το δείγμα στη γραμμή μεταφοράς και κατόπιν στη χρωματογραφική στήλη (Kolb and Ettre, 2006).



Εικόνα 18: Σύστημα πίεσης-βρόχου

Το πλεονέκτημα του συστήματος αυτού είναι ότι η θερμοκρασία του βρόχου μπορεί να ρυθμιστεί σε υψηλές θερμοκρασίες, που βοηθά στη μείωση της προσρόφησης ουσιών μεγάλου μοριακού βάρους και ευαίσθητων ουσιών. Το μειονέκτημά του είναι ότι μπορεί να συγκρατεί ουσίες από προηγούμενες αναλύσεις.

4.5.7.3. Μικροεκχύλιση στερεής φάσης (solid phase microextraction, SPME)

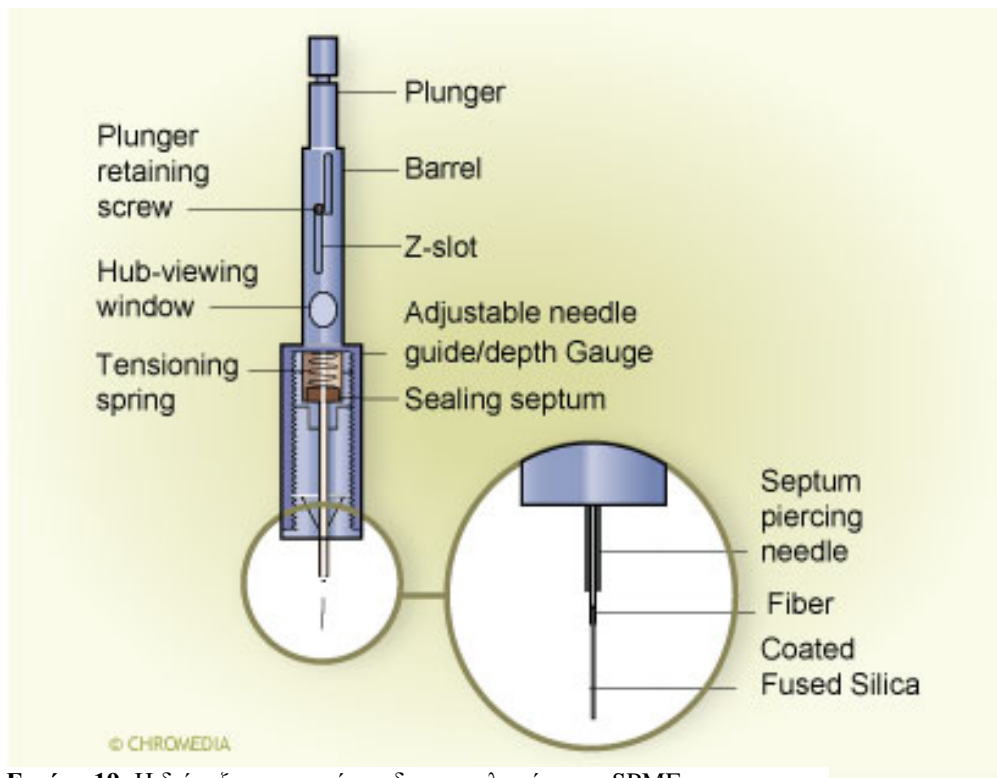
Είναι μια σχετικά πρόσφατη τεχνική που συνδυάζει την εξαγωγή των αναλυόμενων ουσιών από ένα μίγμα, την προσυμπύκνωση των αναλυόμενων ουσιών *in situ* και τη σχετικά απλή εκρόφηση στο αναλυτικό όργανο (Pawliszyn, 2009). Η τεχνική αυτή είναι ιδανική για υγρά ή υγροποιημένα τρόφιμα, καθώς η ισορροπία μεταξύ της ίνας και της υπερκείμενης φάσης (ή της υγρής φάσης, ανάλογα με την εφαρμοζόμενη μέθοδο) επιτυγχάνεται γρήγορα. Ένα βασικό πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής είναι η εύκολη και ταχεία εκχύλιση των αναλυόμενων ουσιών από το υπόστρωμα του δείγματος με οργανολογία απλή στη χρήση και με παράκαμψη του σταδίου της προσυμπύκνωσης των αναλυόμενων ουσιών που απαιτούνταν από προγενέστερες τεχνικές και η απευθείας έγχυση των αναλυόμενων ουσιών στην αναλυτική συσκευή (συνήθως GC-MS) (Risticovic *et al.*, 2010). Επίσης, έχει διαπιστωθεί πως η εξαγωγή των αναλυόμενων ουσιών γίνεται με μεγαλύτερη επαναληψιμότητα εν συγκρίσει με τις άλλες τεχνικές εκχύλισης (Wilkes *et al.*, 2000, Plutowska and Wardencki, 2007, Günther *et al.*, 2011).

Αρχή της μεθόδου:

Η μέθοδος βασίζεται στο διαχωρισμό των διαφορετικών φάσεων και την εκχύλιση των αναλυόμενων ουσιών σε μία προσροφητική ουσία πάνω σε ίνα. Αυτό γίνεται με την επίτευξη ισορροπίας μεταξύ των συγκεντρώσεων των αναλυόμενων ουσιών στο δείγμα, την υπερκείμενη φάση του και την επίστρωση της ίνας (Pawliszyn, 2009, Tan *et al.*, 2009).

Η διάταξη του οργάνου δειγματοληψίας της μεθόδου είναι η εξής (Εικόνα 19,20,21): μια ίνα από τετηγμένο διοξείδιο του πυριτίου (fused silica) με επίστρωση πολυμερούς είναι συνδεδεμένη με ένα έμβολο (plunger) από ανοξείδωτο ατσάλι και εγκατεστημένη σε διάταξη συγκράτησης του εμβόλου που προσομοιάζει σε σύριγγα (holder). Το έμβολο μετακινεί την ίνα εντός και εκτός μιας κοίλης βελόνας. Κατά τη δειγματοληψία, η ίνα εισάγεται μέσα στη βελόνα, η βελόνα διατρύπα το διάφραγμα (septum) που σφραγίζει αεροστεγώς τα φιαλίδια δειγματοληψίας (Εικόνα 22) και συμπιέζεται το έμβολο, προκειμένου να εκτεθεί η ίνα μέσα στο δείγμα ή στην υπερκείμενη φάση του, ανάλογα με την εφαρμοζόμενη μέθοδο της SPME (αναλύονται παρακάτω) (Εικόνα 23). Ξεκινά η προσρόφηση των οργανικών αναλυόμενων ουσιών στην επίστρωση της ίνας. Μόλις επιτευχθεί ισορροπία των αναλυόμενων ουσιών μεταξύ της επίστρωσης και της εκάστοτε φάσης του δείγματος, συνήθως σε διάστημα 20-30 λεπτών, η ίνα επανεισέρχεται μέσα στη σύριγγα και το όργανο δειγματοληψίας αποσύρεται από το φιαλίδιο δειγματοληψίας. Τέλος, η ίνα εισάγεται στον εγχυτήρα (injector) του αέριου

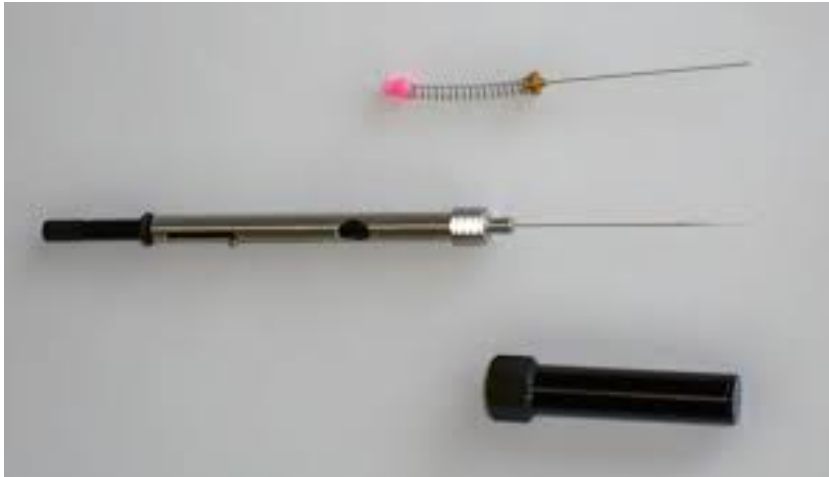
χρωματογράφου, όπου οι προσροφημένες ουσίες εκροφώνται θερμικά και μεταφέρονται στη στήλη του αέριου χρωματογράφου. Σημειώνεται ότι η μέθοδος SPME μπορεί να εφαρμοστεί με χειροκίνητα όργανα ή με χρήση αυτόματου δειγματολήπτη.



Εικόνα 19: Η διάταξη του οργάνου δειγματοληψίας της SPME



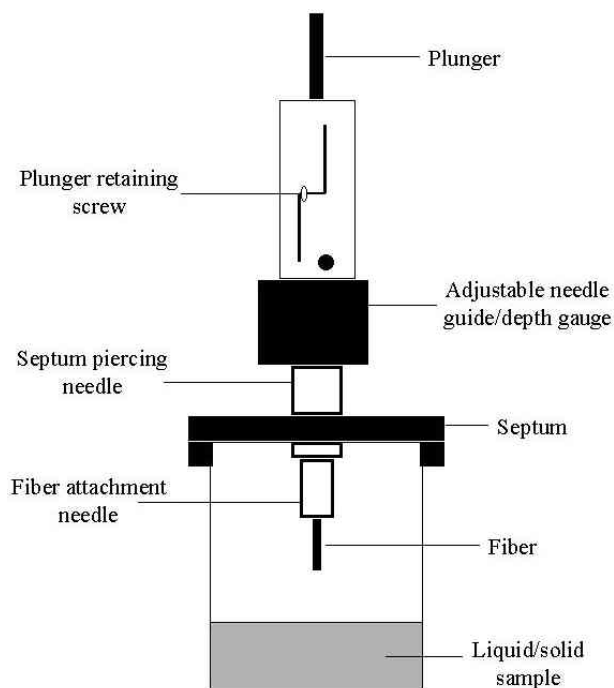
Εικόνα 20: Το όργανο δειγματοληψίας της SPME.



Εικόνα 21: Τα επιμέρους εξαρτήματα του οργάνου δειγματοληψίας της SPME.



Εικόνα 22: Διάφορα φιαλίδια δειγματοληψίας και τα αντίστοιχα διαφράγματα (septa).



Εικόνα 23: Το όργανο δειγματοληψίας της SPME κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας από το φιαλίδιο δειγματοληψίας.

Η ποσότητα της προσροφώμενης ουσίας από την επίστρωση της ίνας στην ισορροπία συσχετίζεται άμεσα με τη συγκέντρωσή της στο δείγμα και περιγράφεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$n = \frac{K_{fs}V_f C_o V_s}{K_{fs}V_f + V_s}$$

,όπου n η μάζα της προσροφώμενης από την επίστρωση αναλυόμενης ουσίας, C_o η αρχική συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας στο δείγμα, K_{fs} ο συντελεστής διαχωρισμού της αναλυόμενης ουσίας ανάμεσα στην επίστρωση και το υπόστρωμα του δείγματος, V_f ο όγκος της επίστρωσης και V_s ο όγκος του δείγματος (Pawliszyn, 2009, Balasubramanian and Panigrahi, 2011). Η εξίσωση καταδεικνύει πως η συσχέτιση μεταξύ αρχικής συγκέντρωσης της αναλυόμενης ουσίας στο δείγμα και ποσότητας αυτής που προσροφήθηκε στην επίστρωση είναι γραμμική. Καθώς οι επιλεγόμενες

επιστρώσεις της ίνας έχουν ισχυρή συγγένεια με τις αναλυόμενες ουσίες, ο K_{fs} των τελευταίων είναι συνήθως μεγάλος. Ως εκ τούτου, η μέθοδος SPME έχει πολύ ισχυρή ικανότητα συμπίκνωσης των αναλυόμενων ουσιών και κατά συνέπεια και μεγάλη ευαισθησία. Οι τιμές των K_{fs} συνήθως δεν είναι επαρκώς μεγάλες έτσι ώστε να εξαχθούν πλήρως οι αναλυόμενες ουσίες από το υπόστρωμα. Η εξίσωση επίσης δείχνει ότι αν ο V_s είναι πολύ μεγάλος, η ποσότητα της προσροφώμενης ουσίας από την επίστρωση της ίνας δε συσχετίζεται με αυτόν. Η ίνα της SPME έχει μικρότερο όγκο (περίπου 0,5 μ l) από τη φάση που δειγματίζεται (της τάξης των ml), προκειμένου να επιτευχθεί η ισορροπία ανάμεσα στις δύο φάσεις γρηγορότερα (Prieto *et al.*, 2010).

Η ποσότητα των αναλυόμενων ουσιών που θα προσροφηθούν από την ίνα εξαρτάται από το πάχος της επίστρωσης του πολυμερούς και τη σταθερά κατανομής των αναλυόμενων ουσιών. Σημειώνεται πως αν και με παχύτερες επιστρώσεις εξάγονται μεγαλύτερες ποσότητες της αναλυόμενης ουσίας και αποτελεσματικότερα οι ουσίες με υψηλά σημεία ζέσεως, ο ρυθμός εκρόφησης γίνεται χαμηλότερος με αποτέλεσμα να συγκρατείται μέρος της αναλυόμενης ουσίας (Pawliszyn, 2009).

Η χρονική διάρκεια της εκχύλισης εξαρτάται από το χρόνο που απαιτείται για την ολοκληρωμένη εξαγωγή των αναλυόμενων ουσιών με τις μεγαλύτερες σταθερές κατανομής. Γενικά, η σταθερά κατανομής αυξάνει με την αύξηση του μοριακού βάρους και του σημείου ζέσεως της αναλυόμενης ουσίας. Η εκλεκτικότητα μπορεί να μεταβληθεί αλλάζοντας τον τύπο του πολυμερούς της επίστρωσης ή το πάχος της, προκειμένου να ταιριάζει με τα χαρακτηριστικά των αναλυόμενων ουσιών (Pawliszyn, 2009).

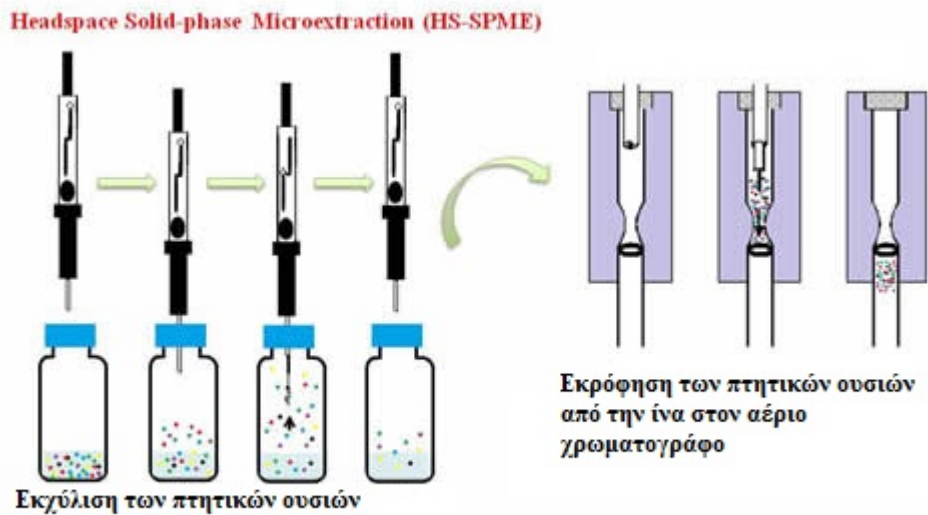
Η συνεχής ανάδευση του δείγματος ενισχύει την εκχύλιση των αναλυόμενων ουσιών και μειώνει το χρόνο εκχύλισης, ειδικά για τις ουσίες με μεγάλο μοριακό βάρος με μεγάλους συντελεστές διάχυσης. Η προσθήκη αλάτων αυξάνει κατά πολύ την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης για πολλές αναλυόμενες ουσίες, ειδικά τις πολικές και πτητικές. Δεν είναι απαραίτητη η προσθήκη άλατος για εκχύλιση ουσιών με μεγάλους συντελεστές κατανομής. Η αλλαγή του pH του υποστρώματος μπορεί να περιορίσει τη διαλυτότητα ορισμένων αναλυόμενων ουσιών, αλλά όξινες και βασικές ουσίες εκχυλίζονται καλύτερα σε αντίστοιχα όξινο και βασικό pH (Pawliszyn, 2009).

Μέθοδοι της SPME:

Οι αναλύσεις με την τεχνική SPME μπορούν να διεξαχθούν με τρεις διαφορετικές μεθόδους:

α. Μικροεκχύλιση στερεής φάσης υπερκείμενης φάσης (Headspace SPME, HS-SPME) (Εικόνα 24): Είναι η πλέον εφαρμοζόμενη μέθοδος. Η ίνα τοποθετείται ακριβώς πάνω από το υπόστρωμα του δείγματος, στην υπερκείμενη φάση (Pawliszyn, 2009). Με τη

μέθοδο αυτή μετριάζεται η διαστολή της ίνας και οι επιδράσεις του υποστρώματος του δείγματος σε αυτήν, τα οποία μπορούν να οδηγήσουν σε μη επαναλήψιμα αποτελέσματα ή/και καταστροφή της ίνας (Risticovic *et al.*, 2010).



Εικόνα 24: Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου HS-SPME.

β. Μικροεκχύλιση στερεής φάσης με απευθείας βύθιση (Direct-immersion SPME, DI-SPME): Η ίνα βυθίζεται απευθείας στο διάλυμα. Σε περίπλοκα δείγματα, όπως το γάλα και τα προϊόντα του, επηρεάζεται δυσμενώς η απόδοση της μεθόδου (Abilleira *et al.*, 2010, Lubbers and Butler, 2010). Η ρύπανση της ίνας μειώνει την επαναληψιμότητα εξαιτίας της πρόσδεσης σε αυτήν ουσιών μεγάλου μοριακού βάρους από το υπόστρωμα του δείγματος και συνεπακόλουθα της παρεμπόδισης των μικρού μοριακού βάρους αναλυόμενων ουσιών να προσεγγίσουν την επιφάνειά της. Η ρύπανση της ίνας μπορεί να περιοριστεί με την απομάκρυνση των ουσιών του υποστρώματος (π.χ. με σαπωνοποίηση των λιπών) (Wilkes *et al.*, 2000, Wang *et al.*, 2006), με εκχύλιση του δείγματος (Farajzadeh, 2010), με προσαρμογή του pH (Innocente *et al.*, 2011) ή με αύξηση της περιεκτικότητας άλατος στο διάλυμα (Balasubramanian and Panigrahi, 2011).

γ. Μία παραλλαγή της μεθόδου DI-SPME είναι με βύθιση της ίνας στο διάλυμα αλλά με μία μεμβράνη γύρω από την ίνα προκειμένου να αποτραπεί η ρύπανσή της από μεγάλου μοριακού βάρους ουσίες (Pawliszyn, 2009). Η μεμβράνη μεταβάλλει το ρυθμό επίτευξης ισορροπίας (δηλαδή τον K_{fs}) της κάθε ουσίας που εκχυλίζεται και παράλληλα είναι πιθανό να ρυπανθεί η μεμβράνη, με συνεπακόλουθη μείωση της επαναληψιμότητας (Heaven and Nash, 2012).

Τύποι ινών SPME

Υπάρχουν έξι βασικοί τύποι υλικών κατασκευής ινών για τη μέθοδο SPME (Pawliszyn, 2009). Τα διάφορα υλικά καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα πολικότητων για την εξαγωγή πτητικών και ημιπτητικών ουσιών. Τα υλικά αυτά συνδυάζονται για την κατασκευή ινών με δυνατότητα δειγματοληψίας ουσιών με μεγάλο εύρος ιδιοτήτων (Stashenko & Martínez, 2007). Τα υλικά αυτά είναι τα ακόλουθα (Heaven and Nash, 2012):

α. Polydimethylsiloxane (PDMS): Είναι ένα πολυμερές του σιλοξανίου. Είναι μη πολικό και άρα δουλεύει καλύτερα για εξαγωγή πολικών ουσιών. Χρησιμοποιείται στην HS-SPME και όταν το δείγμα είναι νερό και στην DI-SPME, καθώς στα οργανικά διαλύματα διαστέλλεται και καταστρέφεται. Χρησιμοποιείται για ανάλυση αλκοολών, εστέρων, αλδευδών και τερπενίων και συχνά χρησιμοποιείται ως επίχρισμα-βάση για άλλα υλικά επιχρίσματος ινών.

β. Polyacrylate (PA): Αποτελείται από ένα οργανικό πολυμερές μερικώς διασυνδεδεμένων (cross-linked) μονομερών ακρυλικού οξέος. Προτείνεται για δειγματοληψία τόσο πολικών όσο και μη πολικών ουσιών, καθώς είναι ισχυρότερες και περισσότερο ανθεκτικές στους οργανικούς διαλύτες από το PDMS. Διαστέλλονται ελαφρώς στο νερό και ο συνδυασμός νερού με οργανικό διαλύτη (π.χ. μεθανόλη) μπορεί να οδηγήσει σε εκτεταμένη διαστολή και καταστροφή της ίνας. Αυτός είναι και ο λόγος που δε χρησιμοποιούνται ιδιαίτερα για δειγματοληψία γάλακτος και των προϊόντων του.

γ. Divinylbenzene (DVB) και carboxen (CAR): Αν και κατασκευασμένα από διαφορετικές χημικές ενώσεις, αποτελούνται και οι δύο από μικρά σωματίδια με μια σειρά από μακροπόρους (διάμετρος $>500\text{\AA}$), μεσοπόρους (διάμετρος $20\text{-}500\text{\AA}$) και μικροπόρους (διάμετρος $<20\text{\AA}$) κατανεμημένους σε όλη την έκταση του κάθε σωματιδίου. Και τα δύο υλικά προσροφούν με σύλληψη ουσιών εντός των πόρων. Στις περισσότερες εμπορικές ίνες τα σωματίδια των DVB και CAR συνδέονται με την ίνα μέσω επιχρίσματος-βάσης από PDMS, που λειτουργεί σα συγκολλητικό, καθώς διαθέτει αρκετούς πόρους ώστε να επιτρέπει στα σωματίδια να έρχονται σε επαφή με το δείγμα. Έτσι, τα υλικά αυτά συνδυάστηκαν με μεγάλη αποτελεσματικότητα για την κατασκευή ινών τριπλής φάσης DVB-CAR-PDMS. Η ίνα DVB-CAR-PDMS έχει ενδιάμεση των ινών PDMS και PA πολικότητα.

Τα σωματίδια του DVB συντίθενται από πολυμερισμένες αλκυλ-αλυσίδες με φαινυλομάδες. Έχουν σταθερά υψηλό μεσοπορώδες μετά τον πολυμερισμό. Το πορώδες αυτό έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση ημιπτητικών και πτητικών ουσιών σε βάρος αερίων και ουσιών με μεγαλύτερο μοριακό βάρος. Τα σωματίδια του CAR είναι μοριακοί ηθμοί με βάση τον άνθρακα. Οι ηθμοί μπορεί να είναι κατασκευασμένοι με συγκεκριμένο μέγεθος πόρων ώστε να γίνεται επιλογή ουσιών εντός συγκεκριμένου εύρους μοριακών βαρών. Σε σύγκριση με το DVB οι πόροι των μοριακών ηθμών είναι

συνήθως σήραγγες διαμέσου του σωματιδίου και θεωρείται πως αυτή η δομή καθιστά ευκολότερη την εξαγωγή επιλεγμένων ουσιών.

δ. Carbowax (CBW): Οι CBW ίνες συντίθενται από πολυαιθυλενογλυκόλη αναμεμιγμένη με DVB ή με μία προτυποποιημένη ρητίνη. Αποτελούν εναλλακτική των PA ινών και προτιμούνται για την ανάλυση αλκοολών χαμηλής θερμοκρασίας. Δεν έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση πτητικών ουσιών στο γάλα και τα προϊόντα του.

Οι βασικοί τύποι ινών του εμπορίου (Sigma-Aldrich) παρατίθενται στον Πίνακα 9.

Πίνακας 9: Τύποι ινών του εμπορίου (Sigma-Aldrich).

Τύπος αναλυόμενης ουσίας	Προτεινόμενη ίνα
Αέρια και ουσίες μικρού μοριακού βάρους (MW 30-225)	75 μm/85 μm Carboxen/polydimethylsiloxane
Πτητικές ουσίες (MW 60-275)	100 μm polydimethylsiloxane
Πτητικές ουσίες, αμίνες και νιτρο-αρωματικές ουσίες (MW 50-300)	65 μm polydimethylsiloxane/divinylbenzene
Πολικά ημι-πτητικά (MW 80-300)	85 μm polyacrylate
Μη πολικές ουσίες μεγάλου μοριακού βάρους (MW 125-600)	7 μm polydimethylsiloxane
Μη πολικές ημι-πτητικές ουσίες (MW 80-500)	30 μm polydimethylsiloxane
Αλκοόλες και πολικές ουσίες (MW 40-275)	60 μm Carbowax (PEG)
Ουσίες που συμβάλλουν στη γεύση: πτητικές και ημι-πτητικές ουσίες, C3-C20 (MW 40-275)	50/30 μm divinylbenzene/Carboxen on polydimethylsiloxane on a StableFlex fiber
Ανάλυση ουσιών σε ίχνη (MW 40-275)	50/30 μm divinylbenzene/Carboxen on polydimethylsiloxane on a 2 cm StableFlex fiber

4.2. Ανάλυση και ταυτοποίηση των πτητικών αρωματικών ουσιών

Αφού επιλεγεί η μέθοδος εκχύλισης, κατόπιν επιλέγεται η μέθοδος με την οποία θα γίνει ο διαχωρισμός και η ταυτοποίηση των πτητικών αρωματικών ουσιών, προκειμένου να προσδιοριστεί ποσοτικά και ποιοτικά το αρωματικό προφίλ των τυριών.

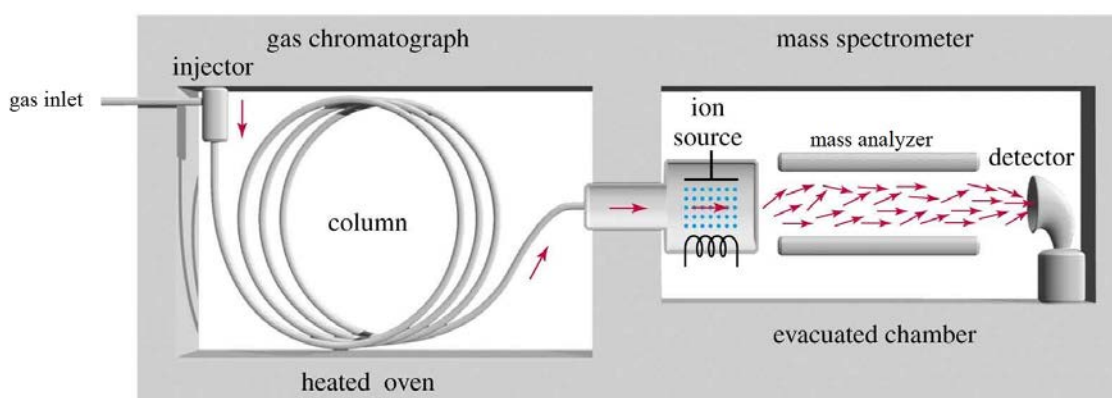
4.2.1. Αέρια χρωματογραφία-Φασματοσκοπία μαζών (Gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)

Η μέθοδος GC-MS είναι μια συζευγμένη τεχνική (hyphenated technique) που συνδυάζει τα χαρακτηριστικά της Αέριας χρωματογραφίας και της Φασματοσκοπίας μαζών. Τα πλεονεκτήματα της αέριας χρωματογραφίας είναι η μεγάλη ευαισθησία, η ταχύτητα, η απλότητα στην εφαρμογή και η μεγάλη διακριτική ικανότητα, που είναι απαραίτητη σε πολύπλοκα δείγματα, όπως τα τυριά. Η φασματοσκοπία μαζών είναι η

τεχνική που παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ποικιλία εφαρμογών, παρουσιάζοντας πληροφορίες σχετικά με τη σύσταση του εξεταζόμενου δείγματος, τη δομή των μορίων και την ποιοτική και ποσοτική σύσταση σύνθετων μιγμάτων (McMaster, 2008).

Στην αέρια χρωματογραφία, ο διαχωρισμός των πτητικών συστατικών βασίζεται στην κατανομή τους μεταξύ ενός μη πτητικού υγρού (στατική φάση) επιστρωμένου σε στερεό φορέα ή στα τοιχώματα ανοικτών τριχοειδών στηλών και ενός φέροντος αερίου (κινητή φάση).

Η διάταξη του GC-MS παρουσιάζεται στην Εικόνα 25.



Εικόνα 25: Διάγραμμα ενός τυπικού GC-MS

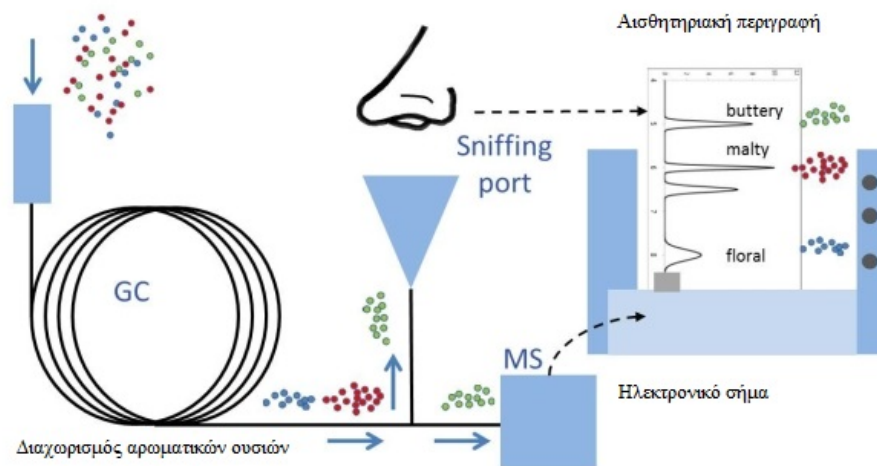
Αρχικά, το δείγμα μεταφέρεται στον αέριο χρωματογράφο μέσω της θύρας εισόδου (ή έγχυσης) (injector) και οι αναλυόμενες ουσίες εκροφώνται θερμικά από την ίνα της SPME και μεταφέρονται στη στήλη υπό την επίδραση του φέροντος αερίου. Οι αναλυόμενες ουσίες κινούνται μέσα στη στήλη (column) με διαφορετικές ταχύτητες, που εξαρτώνται από την τάση ατμών τους και τις αλληλεπιδράσεις τους με τη στατική φάση. Ο κλίβανος της στήλης (heated oven) είναι συνήθως ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας· η θερμοκρασία αυξάνει σταδιακά σε διαδοχικά βήματα κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού των πτητικών ουσιών και έτσι καθίσταται δυνατός ο διαχωρισμός μιγμάτων ουσιών με μεγάλο εύρος θερμοκρασιών ζέσεως, αυξάνοντας τη διακριτική ικανότητα της στήλης (McMaster, 2008).

Οι διαχωριζόμενες ουσίες κατόπιν εισέρχονται στην πηγή ιοντισμού (ion source) του φασματογράφου μάζας, όπου και θραυσματοποιούνται παράγοντας ιόντα (ion fragments). Η θραυσματοποίηση γίνεται συνήθως με δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας (ιοντισμός με πρόσκρουση ηλεκτρονίων - Electron impact, EI). Σε αυτή την περίπτωση, η θραυσματοποίηση γίνεται με βομβαρδισμό των ουσιών με μια δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας (συνήθως 70 eV), που οδηγεί στην απομάκρυνση ενός ηλεκτρονίου από το μόριο και τη διάσπαση συγκεκριμένων δεσμών. Τα παραγόμενα ιόντα μεταφέρονται στον αναλυτή μαζών (mass analyzer), ο οποίος συνήθως είναι

τετραπολικός ανιχνευτής (quadrupole analyzer). Ο ανιχνευτής μετράει το ηλεκτρικό ρεύμα που παρέχουν τα ιόντα με διαφορετικό λόγο m/z . Το διάγραμμα που δείχνει την ένταση του μετρούμενου ρεύματος (σε σχετικές μονάδες), ως συνάρτηση του λόγου m/z ονομάζεται φάσμα μαζών. Επειδή τα ιόντα που παράγονται φέρουν κατά κανόνα φορτίο ίσο με τη μονάδα, ο λόγος m/z αντιστοιχεί αριθμητικά με το μοριακό βάρος του ιόντος. Η ένταση των ιόντων που φθάνουν στον ανιχνευτή καταγράφεται και παρουσιάζεται με τη μορφή του συνόλου εντάσεων των ιόντων (TIC, Total Ion Current) ως γράφημα, όπου στον άξονα X παρουσιάζεται ο χρόνος ή οι αριθμοί σάρωσης και στον άξονα Y η ένταση του συνόλου των ιόντων που φθάνουν στον ανιχνευτή. Σε κάθε αριθμό σάρωσης το όργανο έχει σαρώσει ένα πλήρες εύρος περιοχής λόγων m/z . Τα φασματοφωτόμετρα μαζών μπορούν να σαρώνουν ένα εύρος m/z από 10 φορές/s έως 1 φορά/s, επομένως κάθε αριθμός σάρωσης αντιστοιχεί με ένα φάσμα μάζας σε συγκεκριμένη χρονική στιγμή. Με αυτό τον τρόπο λαμβάνονται τα φάσματα μάζας ολικής σάρωσης (full scan) (McMaster, 2008).

4.2.2. Αέρια χρωματογραφία-Ολφακτομετρία (Gas chromatography-Olfactometry, GCO ή GC-sniffing)

Ο πρωταρχικός σκοπός της τεχνικής αυτής είναι η διάκριση των πτητικών αρωματικών ενώσεων από την πλειάδα των πτητικών ουσιών που υπάρχουν σε ένα δείγμα. Το αρωματογράφημα (aromagram) προκύπτει από την όσφρηση των εκροών του GC στην θύρα όσφρησης από τον αναλυτή και συγκρίνεται με τις περιγραφές που μπορεί να δώσει ένα πάνελ αισθητηριακής αξιολόγησης (Reineccius, 2002). Η επιλεκτικότητα της μεθόδου βασίζεται μόνο στις αρωματικές ιδιότητες των επιμέρους ουσιών που διαχωρίζονται από το GC, καθώς οι περισσότερες πτητικές ουσίες έχουν μικρή αν όχι καθόλου επίδραση στη διαμόρφωση του αρώματος ενός τροφίμου (Reineccius, 2002). Η τελική ταυτοποίηση των αρωματικών ουσιών γίνεται με τη χρήση GC-MS (Reineccius, 2002) (Εικόνα 26).



Εικόνα 26: Σχηματική απεικόνιση της διάταξης του GCO.

Τρεις μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για την GCO: μέθοδοι αραίωσης που βασίζονται στον προσδιορισμό των ορίων ανίχνευσης (detection threshold), μέθοδοι συχνότητας ανίχνευσης (detection frequency) και μέθοδοι μέτρησης της έντασης (intensity). Οι μέθοδοι διάλυσης CHARM (Combined Hedonic Aroma Measurement) και AEDA (Aroma Extract Dilution Analysis) βασίζονται στον προσδιορισμό των ορίων ανίχνευσης και χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των αρωματικών ουσιών που είναι πιθανότερο να συμβάλλουν στο άρωμα ενός τροφίμου (Reineccius, 2002). Η μέθοδος OSME (Odour-Specific Magnitude Estimation) είναι μια cross modal τεχνική, δηλαδή βασίζεται στην αντίληψη που προκύπτει από την αλληλεπίδραση των επιμέρους ουσιών, και σκοπός της είναι η μέτρηση της αντιλαμβανόμενης έντασης της οσμής των εκλούμενων πτητικών ουσιών. Στη μέθοδο αυτή αξιολογείται μόνο μια συγκέντρωση του εκχυλίσματος και τα αποτελέσματα υπόκεινται σε στατιστική ανάλυση (Callement *et al.*, 2001). Στη μέθοδο συχνότητας ανίχνευσης SNIF (Surface Nasal Impact Frequency), στην οποία επίσης αξιολογείται μόνο μια συγκέντρωση του εκχυλίσματος, ένας εκτιμητής επισημαίνει τον εντοπισμό ενός αρώματος σε μία εφαρμογή της GC. Οι οσμές που επισημάνθηκαν από τους περισσότερους εκτιμητές θεωρούνται οι σημαντικότερες. Η μέθοδος έχει ένα σημαντικό πλεονέκτημα, καθώς δεν αξιολογούνται οι πραγματικές εντάσεις των αρωμάτων και ειδικά όταν οι αρωματικές ουσίες είναι παρούσες πάνω από το όριο ανίχνευσής τους για όλους τους εκτιμητές (Reineccius, 2002).

4.2.3. Ηλεκτρονική μύτη (Electronic nose, e-sensing)

Η ηλεκτρονική μύτη αναπτύχθηκε προκειμένου να μιμηθεί την ανθρώπινη όσφρηση ως μη διαχωριστικό μηχανισμό: η οσμή γίνεται αντιληπτή σαν ένα καθολικό αποτύπωμα. Η οργανολογία του μηχανήματος αποτελείται από ένα δειγματολήπτη head space, μια διάταξη αισθητήρων και μονάδες αναγνώρισης προτύπων, προκειμένου να παραχθούν πρότυπα σήματος που θα χρησιμοποιηθούν για το χαρακτηρισμό των οσμών.

Η ηλεκτρονική μύτη περιλαμβάνει τρία κύρια μέρη: ένα σύστημα μεταφοράς δείγματος, ένα σύστημα ανίχνευσης και ένα υπολογιστικό σύστημα. Στο σύστημα μεταφοράς δημιουργείται η υπερκείμενη φάση, στην οποία βρίσκονται οι πτητικές ουσίες και κατόπιν αυτές μεταφέρονται στο σύστημα ανίχνευσης. Το σύστημα ανίχνευσης αποτελείται από μια συστοιχία αισθητήρων που όταν έρχονται σε επαφή με τις πτητικές ουσίες τις προσροφούν και προκαλούνται στην επιφάνειά τους φυσικές αλλαγές (μεταβολές στο ηλεκτρικό σήμα). Μια συγκεκριμένη απόκριση καταγράφεται από την ηλεκτρονική διεπαφή που μετατρέπει το ηλεκτρικό σήμα σε ψηφιακή τιμή. Τα δεδομένα κατόπιν υπόκεινται σε στατιστική επεξεργασία (Röck *et al.*, 2008).

Οι συχνότερα χρησιμοποιούμενοι αισθητήρες είναι οι εξής (Röck *et al.*, 2008):

α. Συσκευές ημιαγωγών μετάλλου-οξειδίου (metal-oxide-semiconductor, MOSFET): χρησιμοποιείται κρυσταλλολυχνία για την ενίσχυση ή τη μεταβολή των ηλεκτρικών σημάτων. Βασίζεται στην αρχή ότι τα μόρια που εισέρχονται στην περιοχή του

αισθητήρα θα φορτιστούν είτε θετικά είτε αρνητικά, το οποίο θα έχει άμεση επίδραση στο ηλεκτρικό πεδίο μέσα στο MOSFET. Έτσι, η εισαγωγή κάθε επιπλέον φορτισμένου σωματιδίου θα επηρεάσει απευθείας την κρυσταλλολυχνία με ένα μοναδικό τρόπο, προκαλώντας μεταβολή στο σήμα του MOSFET που μπορεί να μεταφραστεί με υπολογιστικά συστήματα αναγνώρισης προτύπων.

β. Αγωγή πολυμερή (conducting polymers): είναι οργανικά πολυμερή που άγουν τον ηλεκτρισμό.

γ. Σύνθετα πολυμερή (polymer composites): παρόμοια στη χρήση με τα αγωγή πολυμερή, αλλά σχηματίζονται από μη αγωγή πολυμερή με την προσθήκη αγώγιμων υλικών όπως το μέλαν του άνθρακος (αιθάλη).

δ. Μικροϊσιζύγιο κρυστάλλων χαλαζία (quartz crystal microbalance): τρόπος μέτρησης μάζας ανά μονάδα περιοχής (unit area) μέσω της μέτρησης των αλλαγών στη συχνότητα ενός συντονιστή (resonator) από κρύσταλλο χαλαζία.

ε. Επιφανειακό ακουστικό κύμα (surface acoustic wave, SAW): είναι μια κατηγορία μικροηλεκτρομηχανικών συστημάτων (microelectromechanical systems, MEMS) που βασίζονται στη ρύθμιση των επιφανειακών ακουστικών κυμάτων προκειμένου να αντιλαμβάνονται μία φυσική μεταβολή

στ. Οσφρητικοί υποδοχείς: υπάρχουν οι λεγόμενες βιο-ηλεκτρονικές μύτες που χρησιμοποιούν οσφρητικούς υποδοχείς (πρωτεΐνες που έχουν κλωνοποιηθεί από τον ανθρώπινο οργανισμό) που συνδέονται με συγκεκριμένα αρωματικά μόρια.

Υπάρχουν διατάξεις που συνδυάζουν περισσότερους του ενός τύπους αισθητήρων, προκειμένου να ενισχυθεί τόσο η ευαισθησία όσο και η αποδοτικότητα της μεθόδου. Για την αναγνώριση των πτητικών αρωματικών ουσιών χρησιμοποιείται η MS (Röck *et al.*, 2008).

Το υπολογιστικό σύστημα συνδυάζει τις αποκρίσεις όλων των υποδοχέων και αντιπροσωπεύει την είσοδο για την επεξεργασία των δεδομένων. Σε αυτό το σύστημα διαμορφώνεται το καθολικό αποτύπωμα των οσμών και παρέχονται αποτελέσματα που μπορούν να επεξηγηθούν και να υποστούν επεξεργασία. Διάφορα συστήματα επεξήγησης δεδομένων, όπως το τεχνητό νευρωνικό δίκτυο (artificial neural network, ANN) και οι μονάδες αναγνώρισης προτύπων (pattern recognition modules) χρησιμοποιούνται για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων (Röck *et al.*, 2008).

B. Πειραματικό μέρος

5. Υλικά και μέθοδοι

5.1. Δείγματα

Λήφθηκαν 83 δείγματα Γραβιέρας του εμπορίου. Τα χαρακτηριστικά των δειγμάτων παρατίθενται στον Πίνακα 10. Περιορισμένος αριθμός δειγμάτων είχαν το χαρακτηρισμό "Βιολογικό", οπότε δε συμπεριλήφθηκαν στην στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων ως μη στατιστικώς σημαντικά.

Πίνακας 10: Δείγματα Γραβιέρας, όπου π: πρόβειο γάλα, κ: κατσικίσιο γάλα, α: αγελαδινό γάλα, a: διάρκεια ωρίμανσης <3 μήνες b: διάρκεια ωρίμανσης 3-9 μήνες c: διάρκεια ωρίμανσης 9-12 μήνες d: διάρκεια ωρίμανσης >12 μήνες.

Γεωγραφικό διαμέρισμα	n	Νομός	n	Είδος γάλακτος	Σήμανση	Διάρκεια ωρίμανσης
Κρήτη	22	Ηρακλείου	7	π(4), π+κ(3)	ΠΟΠ(1):π(1)	b(4), c(2), d(1)
		Χανίων	6	π(5), π+κ(1)	ΠΟΠ(2):π(1), π+κ(1)	b(1), c(5)
		Ρεθύμνης	9	π(5), π+κ(4)	ΠΟΠ(8): π(4), π+κ(4)	b(3), c(3), d(3)
Στερεά Ελλάδα	10	Αιτωλοακαρνανίας	5	π(4), π+κ(1)		c(4)
		Αττικής	3	π(1), π+κ(2)		b(1), c(1), d(1)
		Ευρυτανίας	1	π(1)		b(1)
		Εύβοιας	1	π+κ(1)		a(1)
Ήπειρος	8	Αρταίων	5	π(2), π+κ(3)		c(2), d(3)
		Ιωαννίνων	3	π(3)		c(3)
Θεσσαλία	3	Λαρίσης	2	π(1), π+κ(1)		b(2)
		Τρικάλων	1	α(1)		c(1)
Μακεδονία	12	Γρεβενών	11	π(4), κ(4), α(3)		b(3), c(3), d(6)
		Χαλκιδικής	1	π(1)		d(1)
Πελοπόννησος	7	Αρκαδίας	6	π(3), κ(1), π+κ(2)		b(2), c(1), d(3)
		Αργολίδας	1	π(1)		c(1)
Νότιο Αιγαίο	17	Κυκλάδων	16	π(1), π+κ+α(1), α(14)	ΠΟΠ(1):α(1)	a(4), b(3), c(9)
		Δωδεκανήσου	1	π+κ(1)		d(1)
Βόρειο Αιγαίο	4	Λέσβου	4	π(2), π+κ(2), α(1)		b(2), c(2)

5.2. Προσδιορισμός των πτητικών αρωματικών ουσιών

Η εκχύλιση των πτητικών αρωματικών ουσιών έγινε με τη μέθοδο HS-SPME (Head-space Solid Phase Microextraction). Ο διαχωρισμός και ο προσδιορισμός των πτητικών αρωματικών ουσιών έγινε με τη χρησιμοποίηση αερίου χρωματογράφου συνδεδεμένου με φασματογράφο μαζών (GC/MS- QP5050, Shimadzu, Columbia, USA).

Προετοιμασία του δείγματος

Ποσότητα 7,5 gr από κάθε δείγμα τυριού, που προηγουμένως είχε τριφτεί, αναμιγνύεται με 5 gr NaCl και 8 gr απεσταγμένου νερού. Στη συνέχεια προστίθενται 100 μl πρότυπου διαλύματος κυκλοεξανόνης συγκέντρωσης 1000 ppm που χρησιμοποιείται ως εσωτερικό πρότυπο. Γίνεται ανάμιξη και ομογενοποίηση αυτών εντός πορσελάνινης κάψας με πορσελάνινο γουδοχέρι. Κατόπιν, 5 gr του μίγματος μεταφέρονται εντός ειδικών για τη μέθοδο HS-SPME γυάλινων φιαλιδίων, τα οποία σφραγίζονται με ειδικό αεροστεγές ελαστικό πώμα. Το φιαλίδιο τοποθετείται στη διάταξη στην οποία θα γίνει η θερμοστάτηση. Ακολούθως, η βελόνα της χειροκίνητης διάταξης δειγματοληψίας δειγματοληψίας της SPME διατρύπα το ελαστικό διάφραγμα (septum) του πώματος του φιαλιδίου δειγματοληψίας και εισέρχεται στην υπερκείμενη φάση του δείγματος. Το δείγμα θερμαίνεται στους 80 °C για 10 λεπτά υπό ανάδευση.

Διαδικασία εκχύλισης των πτητικών ουσιών

Η ίνα που χρησιμοποιήθηκε ήταν η 50/30 m DVB/Carboxen/PDMS (Supelco). Η ίνα της SPME εξάγεται από τη βελόνα της χειροκίνητης διάταξης δειγματοληψίας της SPME και εκτίθεται στην υπερκείμενη φάση του δείγματος. Το δείγμα θερμοστατείται για 30 min στους 80 °C υπό ανάδευση. Μετά το πέρας της θερμοστάτησης, η ίνα επανεισάγεται στη βελόνα, η οποία διατρύπα το ελαστικό διάφραγμα της θύρας έγχυσης (injection port) του GC-MS και εξάγεται η ίνα.

Συνθήκες του GC-MS

Ο διαχωρισμός των αρωματικών έγινε με την βοήθεια της στήλης HP INNONAX (Agilent Technologies) μήκους 60 m, εσωτερικής διαμέτρου 0,25 mm και πάχους επίστρωσης (film thickness) 0,25 μm (film thickness).

Η θερμοκρασία της θύρας έγχυσης (injection port) ήταν 250 °C και η θερμοκρασία διεπαφής (interface) 250 °C. Ο χρόνος παραμονής της ίνας στη θύρα έγχυσης ήταν 5 min. Η λειτουργία της έγχυσης του φέροντος αερίου ρυθμίστηκε σε splitless. Το φέρον αέριο ήταν ήλιο, με πίεση στην είσοδο της στήλης (column inlet pressure) 88,7 kPa, ροή στη στήλη (column flow) με ρυθμό 0,8 ml/min, γραμμική ταχύτητα (linear velocity) 22,8 cm/sec, συνολική ροή (total flow) 12,2 ml/min. Η αναλογία διαχωρισμού (split ratio) ήταν 11.

Το πρόγραμμα των θερμοκρασιών που εφαρμόστηκε ήταν: 40 °C για διάστημα 3 min, αύξηση της θερμοκρασίας με ρυθμό ανύψωσης 7 °C/min έως τους 150 °C και

παραμονή για διάστημα 20 min και αύξηση της θερμοκρασίας με ρυθμό 10 °C/min στους 220 °C και παραμονή για διάστημα 35 min.

Η λειτουργία του φασματογράφου μάζας ρυθμίστηκε στην κλίμακα m/z 40 έως 450 (mass range) ενώ η θερμοκρασία διεπαφής του (interface temp) ήταν 250 °C.

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό πρόγραμμα CLASS 5000. Η ταυτοποίηση των ουσιών έγινε με την βοήθεια των βιβλιοθηκών των χημικών ουσιών NIST05, NIST05s, NIST08, NIST08s, NIST21, NIST107, PMW_TOX2, SZTERP και WILEY7.

Ημιποσοτικός προσδιορισμός των πτητικών αρωματικών ουσιών

Ο ημιποσοτικός προσδιορισμός των πτητικών αρωματικών ουσιών έγινε βάσει του εσωτερικού προτύπου. Χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση:

$$\frac{\text{εμβαδό κορυφής προτύπου}}{\text{συγκέντρωση προτύπου}} = \frac{\text{εμβαδό κορυφής ουσίας}}{\text{συγκέντρωση ουσίας}}$$

Τα εμβαδά των κορυφών υπολογίστηκαν από το χρωματογράφημα ολικής σάρωσης (full scan).

5.3. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη μέθοδο της γραμμικής διαχωριστικής (ή διακριτικής) ανάλυσης (Linear Discriminant Analysis) με τη χρήση των προγραμμάτων StatGraphics Centurion. XV.II v15.2.11.0 και SAS JMP 8.

Θεωρία

Η διαχωριστική ανάλυση είναι μία στατιστική τεχνική που έχει δύο βασικούς στόχους:

- i. τη διάκριση ενός πληθυσμού σε ευδιάκριτα σύνολα (ομάδες – υποπληθυσμούς) και
- ii. την ταξινόμηση παρατηρήσεων στους προηγούμενους γνωστούς πληθυσμούς, με γνωστές κατανομές για κάθε πληθυσμό, με τη βοήθεια ενός κανόνα (διαχωριστική συνάρτηση).

Ας υποθέσουμε ότι έχουμε K πληθυσμούς (ομάδες) $\pi_1, \pi_2, \dots, \pi_k$ με $k \geq 2$ και ότι για κάθε πληθυσμό γνωρίζουμε την κατανομή του. Έστω για τον πληθυσμό π_k η κατανομή του είναι $f_k(x)$, όπου x είναι το διάνυσμα στήλη p τυχαίων μεταβλητών. Σκοπός της διαχωριστικής ανάλυσης είναι να διαχωρίσει, δηλαδή να καταναείμει κάθε παρατήρηση στους k γνωστούς πληθυσμούς-ομάδες. Δηλαδή αναζητείται ένας κανόνας, διαχωριστική συνάρτηση, που στόχο έχει να κατατάξει όσο το δυνατόν πιο σωστά περισσότερες παρατηρήσεις. Στο τέλος της διαχωριστικής ανάλυσης, το επιθυμητό αποτέλεσμα είναι κάθε ομάδα να έχει κανονική κατανομή των διαχωριστικών βαθμών

(discriminant scores). Ο βαθμός της κάλυψης των κατανομών των διαχωριστικών αποτελεσμάτων μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέτρο αναφοράς για το αν η τεχνική είναι επιτυχημένη (Johnson and Wichern, 1998, Fernandez, 2002).

Βασικοί όροι και έννοιες

α. Συντελεστές της διαχωριστικής ανάλυσης (Discriminant function Coefficients)

Στη διαχωριστική ανάλυση υπολογίζονται τα μαθηματικά βάρη (weights) για κάθε βαθμό σε κάθε διαχωριστική μεταβλητή. Το βάρος κάθε μεταβλητής δείχνει τη διαφορά, μεταξύ των ομάδων, των βαθμών για τη συγκεκριμένη μεταβλητή που υπολογίστηκε το βάρος. Έτσι, οι διαχωριστικές μεταβλητές βάσει των οποίων διαφέρουν περισσότερο οι ομάδες ονομάζονται διαχωριστικοί συντελεστές. Οι τυποποιημένοι συντελεστές χρησιμοποιούνται για να καθοριστούν οι σχέσεις των διαχωριστικών μεταβλητών στις συναρτήσεις. Οι τυποποιημένοι συντελεστές μετατρέπονται σε z βαθμούς (δηλ. $m=0$ και $sd=1$) για να εξαλειφθούν οι διαφορές λόγω τυποποίησης μεταξύ των διαχωριστικών μεταβλητών. Το αποτέλεσμα είναι να μπορεί ο ερευνητής να καθορίσει τον βαθμό στον οποίο κάθε διαχωριστική μεταβλητή σχετίζεται με τις διαφορές μεταξύ των ομάδων εξετάζοντας την απόλυτη τιμή των τυποποιημένων συντελεστών καθώς και άμα είναι σχετικά σημαντική κάθε μεταβλητή στον διαχωρισμό των ομάδων (Johnson and Wichern, 1998, Fernandez, 2002).

β. Συνάρτηση και βαθμοί της διαχωριστικής ανάλυσης (Discriminant Function and Discriminant Scores)

Η διαχωριστική ανάλυση περιλαμβάνει τον καθορισμό μιας γραμμικής εξίσωσης η οποία θα χρησιμοποιείται για να προβλεφθεί σε ποιά ομάδα θα ανήκει κάθε παρατήρηση. Η μορφή αυτή της εξίσωσης ή συνάρτησης είναι:

$$D = a + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_px_p,$$

όπου D ο διαχωριστικός βαθμός (discriminant score), a σταθερά, b οι συντελεστές διαχωριστικής συνάρτησης, x ο βαθμός κάθε μεταβλητής και p ο αριθμός των διαχωριστικών μεταβλητών.

Οι συντελεστές b μεγιστοποιούν την απόσταση μεταξύ των μέσων από την εξαρτημένη μεταβλητή. Ένας διαχωριστικός βαθμός για κάθε συνάρτηση υπολογίζεται πολλαπλασιάζοντας κάθε μεταβλητή με το αντίστοιχο βάρος. Έπειτα, οι διαχωριστικοί βαθμοί χρησιμοποιούνται για να υπολογιστεί ο μέσος διαχωριστικός βαθμός των περιπτώσεων που ανήκουν στην ομάδα (δηλ. ο κεντροειδής της ομάδας) για κάθε διαχωριστική συνάρτηση. Ο σκοπός της διαχωριστικής συνάρτησης είναι να μεγιστοποιήσει την απόσταση μεταξύ των κατηγοριών, δηλαδή η διαχωριστική συνάρτηση πρέπει να έχει μεγάλη διαχωριστική δύναμη μεταξύ των ομάδων. Αφού χρησιμοποιηθεί ένα σύνολο δεδομένων για να διεξαχθεί η διαχωριστική συνάρτηση και να ταξινομηθούν αυτά τα δεδομένα, έπειτα οποιαδήποτε παρατήρηση θα μπορεί να ταξινομηθεί στις ήδη υπάρχουσες ομάδες. Ο αριθμός των διαχωριστικών συναρτήσεων

ισούται με τον αριθμό των ομάδων μειωμένος κατά ένα. Δηλαδή υπάρχει μόνο μια διαχωριστική συνάρτηση για την ανάλυση δύο ομάδων (Johnson and Wichern, 1998, Fernandez, 2002).

γ. Κεντροειδείς ομάδων (Group Centroids)

Στην διαχωριστική ανάλυση, ο κεντροειδής κάθε ομάδας αναπαριστάνει το μέσο διαχωριστικό βαθμό των μελών της ομάδας για την δεδομένη συνάρτηση. Για τους σκοπούς της πρόβλεψης και της ταξινόμησης, ο διαχωριστικός βαθμός σε κάθε περίπτωση συγκρίνεται με τον κεντροειδή κάθε ομάδας και υπολογίζεται η πιθανότητα να είναι μέλος στην συγκεκριμένη ομάδα η συγκεκριμένη περίπτωση. Όσο πιο κοντά είναι ο βαθμός στον κεντροειδή της ομάδας, τόσο μεγαλύτερη είναι η πιθανότητα η περίπτωση να ανήκει στη συγκεκριμένη ομάδα. Οι κεντροειδείς των ομάδων αποκαλύπτουν το μέγεθος και τον τρόπο με τον οποίο διαφοροποιούνται οι ομάδες σε κάθε συνάρτηση. Η απόλυτη τιμή δείχνει τον βαθμό ως προς τον οποίο μια ομάδα διαφοροποιείται στην συνάρτηση, ενώ το πρόσημο δείχνει τη κατεύθυνση της διαφοροποίησης (Johnson and Wichern, 1998, Fernandez, 2002).

Πρέπει να σημειωθεί πως κάθε μεταβλητή πρόβλεψης ακολουθεί κανονική κατανομή. Εφ' όσον τα μεγέθη των δειγμάτων είναι μεγάλα, τα μεγέθη των ομάδων είναι περίπου ίσα και οι ακραίες τιμές (outliers) ελάχιστες, η διαχωριστική ανάλυση μπορεί να παραλείψει κάποιες παραβιάσεις αυτής της υπόθεσης, ειδικά αν το πρόβλημα είναι η λοξότητα και όχι οι ακραίες τιμές. Καθώς η διαχωριστική ανάλυση είναι ευαίσθητη στο θέμα των ακραίων τιμών θα πρέπει να εξεταστεί η παρουσία τους πριν διεξαχθεί όλη η ανάλυση. Εάν υπάρχουν ακραίες τιμές, τότε αυτές θα πρέπει να μετασχηματιστούν ή να αφαιρεθούν (Johnson and Wichern, 1998, Fernandez, 2002).

Ερμηνεία των διαχωριστικών συναρτήσεων

Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων μιας διαχωριστικής ανάλυσης εξαρτάται, σε μεγάλο βαθμό, από την ερμηνεία των διαχωριστικών συναρτήσεων. Η συνάρτηση ορίζεται από τους συντελεστές οι οποίοι χρησιμοποιούνται για να 'ζυγίσουν' τον βαθμό κάθε περίπτωσης στις διαχωριστικές μεταβλητές. Πρώτα απ' όλα, ένας ερευνητής πρέπει να αναγνωρίσει τις διαχωριστικές μεταβλητές οι οποίες έχουν το υψηλότερο και το χαμηλότερο βάρος στην συνάρτηση. Το μέγεθος των συντελεστών δείχνει πόσο πολύ μία διαχωριστική μεταβλητή συνεισφέρει στον διαχωρισμό των ομάδων, ενώ το πρόσημο δείχνει την κατεύθυνση της σχέσης. Επίσης, ο ερευνητής θα πρέπει να εξετάσει τον πίνακα δομής των συντελεστών, ο οποίος δείχνει τη σχέση των διαχωριστικών μεταβλητών με την συνάρτηση. Η απόλυτη τιμή δείχνει τη δύναμη της σχέσης μεταξύ κάθε μεταβλητής και συνάρτησης, ενώ το πρόσημο, όπως και πριν, δείχνει την κατεύθυνση της σχέσης. Η διαδικασία είναι αρκετά αποτελεσματική, καθώς η πληροφορία που προέρχεται όταν εξετάζονται πολλές μεταβλητές ταυτόχρονα είναι πολύ πιο χρήσιμη σε σύγκριση με την πληροφορία που παίρνει μελετώντας κάθε μεταβλητή χωριστά. Τέλος, θα πρέπει να εξεταστούν οι κεντροειδείς κάθε ομάδας για κάθε συνάρτηση και να βρεθούν οι ομάδες με το υψηλότερο και το χαμηλότερο βαθμό.

Οι κεντροειδείς δίνουν πληροφορίες για τις ιδιότητες κάθε ομάδας (Johnson and Wichern, 1998, Fernandez, 2002).

Εκτίμηση της σημαντικότητας των συναρτήσεων

Το Wilk's lambda είναι το κλάσμα της μεταβλητότητας ανάμεσα στις ομάδες (within-groups variability) προς την συνολική μεταβλητότητα (total variability) των διαχωριστικών μεταβλητών και είναι ένα αντίστροφο μέτρο σημαντικότητας των συναρτήσεων. Όσο μικρότερο είναι το Wilk's lambda για μια μεταβλητή, τόσο περισσότερο συμβάλλει η μεταβλητή στην διαχωριστική συνάρτηση. Οι τιμές κοντά στο 1 δείχνουν ότι σχεδόν όλη η μεταβλητότητα των μεταβλητών σχετίζεται με τις διαφορές μέσα στην ομάδα (διαφορές μεταξύ των περιπτώσεων σε κάθε ομάδα), ενώ οι τιμές κοντά στο 0 δείχνουν ότι η μεταβλητότητα οφείλεται στις διαφορές ανάμεσα στις ομάδες. Το chi-square test που βασίζεται στο lambda δείχνει εάν η μεταβλητότητα η οποία σχετίζεται με τις διαφορές των ομάδων είναι στατιστικά σημαντική.

Οι ιδιοτιμές (eigenvalue) είναι το κλάσμα της μεταβλητότητας μεταξύ των ομάδων (between groups variability) προς την μεταβλητότητα ανάμεσα στις ομάδες (within-groups variability). Η ιδιοτιμή αποτελεί, μέσω των διαχωριστικών βαθμών στις ομάδες, έναν δείκτη αποτελεσματικότητας της διαχωριστικής συνάρτησης καθώς και δείκτη επιλογής του αριθμού των διαχωριστικών συναρτήσεων. Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή της ιδιοτιμής, τόσο πιο «τέλεια» είναι η διαχωριστική συνάρτηση. Υπάρχει μία ιδιοτιμή για κάθε διαχωριστική συνάρτηση. Για την διαχωριστική ανάλυση δύο ομάδων, υπάρχει μια διαχωριστική συνάρτηση και επομένως μία ιδιοτιμή. Εάν υπάρχουν περισσότερες από μία διαχωριστικές συναρτήσεις, η πρώτη θα είναι η μεγαλύτερη και η σημαντικότερη, η δεύτερη η αμέσως σημαντικότερη ως προς την επεξηγηματική δύναμη κοκ.

Το σχετικό ποσοστό (relative percentage) ισούται με το κλάσμα της ιδιοτιμής μιας συνάρτησης προς το άθροισμα των ιδιοτιμών όλων των διαχωριστικών συναρτήσεων στο μοντέλο. Το σχετικό ποσοστό δείχνει την αναλογία της συνολικής διασποράς μεταξύ των ομάδων που συνδέεται με μια δεδομένη διαχωριστική συνάρτηση. Δηλαδή, το σχετικό ποσοστό δείχνει την σημαντικότητα κάθε συνάρτησης λαμβάνοντας υπ' όψιν τις διαφορές μεταξύ των ομάδων.

Το απόλυτο ποσοστό (absolute percentage) υπολογίζεται διαιρώντας κάθε ιδιοτιμή προς τον αριθμό των διαχωριστικών μεταβλητών που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση. Το απόλυτο ποσοστό δείχνει το μέγεθος της μεταβλητότητας μεταξύ των ομάδων όπως εξηγείται από κάθε συνάρτηση που συνδέεται με το μέγεθος της μεταβλητότητας μεταξύ των ομάδων. Το απόλυτο ποσοστό είναι χρήσιμο για να μετρήσουμε πόσο αποτελεσματικές είναι οι διαχωριστικές μεταβλητές για τον διαχωρισμό των ομάδων.

Πολλές φορές η μεταβλητότητα μιας συνάρτησης δεν σχετίζεται με τις διαφορές των ομάδων. Αυτή η μεταβλητότητα μπορεί να σχετίζεται με διαφορές εντός των ομάδων, ή με άλλα λάθη που συμβαίνουν κατά την συλλογή δεδομένων ή κατά την εισαγωγή δεδομένων. Ο δείκτης κανονικής συσχέτισης (canonical correlation) δείχνει την

συσχέτιση μεταξύ των βαθμών των διαχωριστικών συναρτήσεων και των ομάδων. Παίρνει τιμές από 0 μέχρι και 1 και όσο πιο μεγάλος είναι ο δείκτης τόσο μεγαλύτερος είναι ο βαθμός συσχέτισης μεταξύ των διαχωριστικών συναρτήσεων και των ομάδων.

Ο πίνακας δομής (structure matrix) δίνει τους δείκτες συσχέτισης κάθε ανεξάρτητης μεταβλητής με τις διαχωριστικές συναρτήσεις. Οι δείκτες συσχέτισης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να αξιολογηθεί πόσο σημαντική είναι κάθε μεταβλητή για την κατασκευή της διαχωριστικής συνάρτησης.

Ο πίνακας ταξινόμησης (classification table) είναι χρήσιμος για τον υπολογισμό του ποσοστού των σωστά ταξινομημένων παρατηρήσεων. Στον πίνακα αυτόν, οι παρατηρούμενες κατηγορίες (ομάδες) καταγράφονται στις σειρές, ενώ στις στήλες οι προβλεπόμενες. Το ποσοστό στη διαγώνιο είναι το ποσοστό των σωστά ταξινομημένων παρατηρήσεων, το οποίο ονομάζεται hit ratio (Johnson and Wichern, 1998, Fernandez, 2002).

Γ. Αποτελέσματα και συζήτηση

6. Το προφίλ των πτητικών ουσιών

Από την ανάλυση των δειγμάτων ταυτοποιήθηκαν 112 πτητικές ουσίες, οι οποίες ταξινομήθηκαν ανάλογα με την κατηγορία της χημικής ένωσης στην οποία ανήκουν (ελεύθερα λιπαρά οξέα, εστέρες, αλκοόλες, αλδεΐδες, κετόνες, λοιπές ουσίες). Τα δεδομένα παρατίθενται σε ξεχωριστούς για την κάθε περιοχή προέλευσης των δειγμάτων πίνακες, και εντός των πινάκων γίνεται διαχωρισμός με βάση τη διάρκεια ωρίμανσης και το είδος γάλακτος.

Πρέπει να επισημανθεί ιδιαίτερα πως η διασπορά των τιμών για τις επιμέρους πτητικές ενώσεις ήταν πολύ μεγάλη, ακόμα και για ομοειδή ως προς κάποιο χαρακτηριστικό υποσύνολο δειγμάτων, π.χ. για δείγματα προερχόμενα από το ίδιο γεωγραφικό διαμέρισμα, από το ίδιο είδος γάλακτος και με παραπλήσια διάρκεια ωρίμανσης. Αυτή η μεγάλη διασπορά στις τιμές, που πατατηρείται συχνά στην ανάλυση διαφορετικών δειγμάτων τυριών της ίδιας ποικιλίας (Bellesia *et al.*, 2003), ήταν ιδιαίτερα εμφανής στην κατηγορία των ελεύθερων λιπαρών οξέων. Η παρατήρηση αυτή θα μπορούσε να αποδοθεί μερικώς στο γεγονός ότι δεν ήταν δυνατό να συλλεχθούν στοιχεία για τα χαρακτηριστικά του γάλακτος της τυροκόμησης (φυσικοχημικά και μικροβιακά χαρακτηριστικά του γάλακτος) και τις παραμέτρους της τυροκόμησης (είδος και ποσότητα τυτιάς, είδος και ποσότητα καλλιέργειας, διαφοροποιήσεις στα επιμέρους στάδια της παραγωγής, π.χ. τη θερμοκρασία πήξης, στη θερμοκρασία και υγρασία του θαλάμου ωρίμανσης, στην περιεκτικότητα της άλμης κ.τ.λ.) (Singh *et al.*, 2003).

Οι τιμές των επιμέρους ουσιών δίδονται σε mg/kg.

Ελεύθερα λιπαρά οξέα

Ταυτοποιήθηκαν 18 ελεύθερα λιπαρά οξέα, τα οποία παρατίθενται στους Πίνακες 12-13 (Παράρτημα 2).

Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα σχηματίζονται κατά την λιπόλυση, την πρωτεόλυση και τη ζύμωση της λακτόζης κατά την διάρκεια της ωρίμανσης. Τα περισσότερα λιπαρά οξέα με 4 έως 20 άτομα C προέρχονται από τη λιπόλυση των τριγλυκεριδίων. Ένα μικρότερο ποσοστό των ελεύθερων λιπαρών οξέων, κατά κανόνα με 2 έως 6 άτομα C προέρχονται από την αποικοδόμηση της λακτόζης και τον αμινοξέων. Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου είναι δυνατό να παραχθούν μέσω οξειδωσης από τις κετόνες, τις αλδεΐδες και τους εστέρες (Curioni and Bosset, 2002). Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα με 4 έως 12 άτομα C, εξαιτίας των χαμηλών ορίων αντίληψής τους, παίζουν πρωταρχικό ρόλο στη διαμόρφωση του αρωματικού προφίλ μιας μεγάλης ποικιλίας τυριών (Curioni and Bosset, 2002).

Πιο συγκεκριμένα, το οξικό οξύ παράγεται από τη ζύμωση της λακτόζης από τα ετεροζυμωτικά οξυγαλακτικά βακτήρια (Di Cagno *et al.*, 2003), από την οξειδωτική απαμίνωση ή αποκαρβοξυλίωση των αμινοξέων αλανίνη, σερίνη, γλυκίνη και γαλακτικό οξύ από τα οξυγαλακτικά βακτήρια και από το μεταβολισμό του κιτρικού οξέος (McSweeney and Sousa, 2002). Το οξικό οξύ έχει τυπικό οξώδες (vinegary) άρωμα (Frank *et al.*, 2004) και θεωρείται βασικό αρωματικό συστατικό του Gruyère (Mallia *et al.*, 2005).

Το προπανικό (προπιονικό) οξύ προκύπτει από τη ζύμωση της λακτόζης από βακτήρια του γένους *Propionibacterium* sp. και θεωρείται πως προσδίδει χαρακτηριστικό γλυκό και ομοιάζον με καρύδι άρωμα (Lawlor *et al.*, 2002).

Το βουτανικό (βουτυρικό) οξύ παράγεται κυρίως κατά τη λιπόλυση, αλλά είναι δυνατό να παραχθεί από τη ζύμωση του γαλακτικού οξέος από βακτήρια του γένους *Clostridium* sp.. Έχει ταγγό άρωμα (Frank *et al.*, 2004) και έχει βρεθεί πως συμβάλλει σημαντικά στη διαμόρφωση του αρώματος διάφορων σκληρών τυριών (Bellesia *et al.*, 2003, Wolf *et al.*, 2010, Endrizzi *et al.*, 2012) και του Gruyère (Mallia *et al.*, 2005).

Το εξανικό (καπροϊκό) οξύ που παράγεται κυρίως κατά τη λιπόλυση έχει άρωμα παρόμοιο με την οσμή της αίγας και επίσης θεωρείται πως συμβάλλει στη διαμόρφωση του αρώματος διάφορων σκληρών τυριών (Bellesia *et al.*, 2003, Wolf *et al.*, 2010, Endrizzi *et al.*, 2012) και του Gruyère (Mallia *et al.*, 2005).

Το οκτανικό (καπρυλικό) οξύ, με ταγγό και δριμύ άρωμα και το δεκανικό (καπρικό) οξύ, με όξινο άρωμα χαρακτηριστικό των παλαιωμένων τυριών (Poveda *et al.*, 2008) έχουν επίσης συμβολή στη διαμόρφωση του αρώματος διάφορων σκληρών τυριών (Bellesia *et al.*, 2003, Wolf *et al.*, 2010, Endrizzi *et al.*, 2012).

Όσον αφορά τα ελεύθερα λιπαρά οξέα με περιττό αριθμό ατόμων άνθρακα, φαίνεται πως έχουν υψηλά όρια αντίληψης, με το άρωμα του πεντανικού να περιγράφεται ως ομοιάζον με του καρυδιού και του τυριού, του επτανικού ως σαπωνώδες, όξινο και ομοιάζον με αυτό του λίπους, του εννεανικού ως ομοιάζον με αυτό του λίπους και σαπωνώδες και του εντεκανικού ως κηρώδες και σαπωνώδες (Attaie and Richter, 1996).

Το 9-δεκενικό οξύ ενδέχεται να προέρχεται από τα ακόρεστα λιπαρά οξέα ελαϊκό (9-δεκαοκτενικό οξύ) και λινολεϊκό (9,12- δεκαοκταδιενικό οξύ) με θραύση του διπλού δεσμού τους στη θέση C₁₀-C₁₁. Το άρωμά του, με υψηλό όριο αντίληψης, περιγράφηκε ως γλυκό και ομοιάζον με αυτό του λίπους (Attaie and Richter, 1996).

Τα διακλαδισμένης αλύσου ελεύθερα λιπαρά οξέα 2-μεθυλπροπανικό (ισοβουτυρικό) οξύ και 3-μεθυλβουτανικό (ισοβαλερικό) οξύ σχηματίζονται κατά τον καταβολισμό των αμινοξέων βαλίνη και λευκίνη αντιστοίχως (Molimard and Spinnler, 1996) και θεωρείται πως έχουν μεγάλη επίδραση στο άρωμα των τυριών από πρόβειο και γίδινο γάλα (Curioni and Bosset, 2002). Το 3-μεθυλβουτανικό οξύ συμβάλλει στη δημιουργία ταγγού, σαπρού και ομοιάζοντος με τυρί και με ιδρώτα αρώματος των τυριών

παλαιώσης από πρόβειο γάλα (Marilley and Casey, 2004) και στο Gruyère (Curioni and Bosset, 2002). Το 2-αιθυλεξανικό οξύ είναι προϊόν πρωτεολυτικής δραστηριότητας και έχει ευχάριστο φρουτώδες άρωμα (Ha and Lindsay, 1991). Το 4-μεθυλοκτανικό οξύ, πρωτεϊνικής επίσης προελεύσεως, ανευρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο λίπος του πρόβειου και το γίδινου γάλακτος και σε μικρές στο αγελαδινό και συμβάλλει σημαντικά στη διαμόρφωση του αρώματος των αντίστοιχων τυριών, προσδίδοντας ένα ομοιάζον του πρόβειου κρέατος άρωμα (Ha and Lindsay, 1991, Karl *et al.*, 1994).

Στην πλειονότητα των παρατηρήσεων, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα με άρτιο αριθμό ατόμων άνθρακα ανευρέθηκαν σε μεγάλες συγκεντρώσεις. Η παρατήρηση αυτή συνδέεται άμεσα με τον τύπο της ίνας που χρησιμοποιήθηκε για τη δειγματοληψία, η οποία ήταν υψηλής πολικότητας και κατά συνέπεια έχει συγγένεια και εκλεκτικότητα προς υψηλά πολικές ενώσεις, όπως τα οργανικά οξέα. Ειδικά το εξανικό, το οκτανικό και το δεκανικό οξύ είχαν κατά κανόνα μεγαλύτερες τιμές σε δείγματα προερχόμενα από πρόβειο ή κατσικίσιο γάλα ή μίγμα αυτών, καθώς οι ουσίες αυτές είναι αυξημένες στα αντίστοιχα τυριά και συμβάλλουν στο χαρακτηριστικό άρωμά τους. Επίσης, στις τιμές των ελεύθερων λιπαρών οξέων παρατηρήθηκαν οι μεγαλύτερες αποκλίσεις και συχνά δείγματα ωριμότερα φάνηκε να παρουσιάζουν μικρότερες τιμές εν σχέσει με άλλα λιγότερο ώριμα.

Για τα δείγματα από πρόβειο γάλα, ωρίμανσης 3-9 μηνών, γενικά παρατηρήθηκε μια σχετική ομοιογένεια ως προς τις ποσότητες των ελεύθερων λιπαρών οξέων στα δείγματα από Κρήτη και Κ. Ελλάδα και σε αυτά από Β. Αιγαίο και Θεσσαλία, με τα τελευταία να παρουσιάζουν τις χαμηλότερες τιμές. Αυξημένες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκαν στα δείγματα από Μακεδονία και Πελοπόννησο, με τα τελευταία να παρουσιάζουν τις υψηλότερες τιμές. Όσον αφορά τα δείγματα από πρόβειο γάλα, ωρίμανσης 9-12 μηνών, γενικά παρατηρήθηκε μια σχετική ομοιογένεια στα δείγματα από Κ. Ελλάδα, Ήπειρο και Ν. Αιγαίο και σε αυτά από Κρήτη και Μακεδονία. Οι μικρότερες τιμές παρατηρήθηκαν στα δείγματα από το Β. Αιγαίο και οι μεγαλύτερες στα δείγματα από Πελοπόννησο. Γενικά, εντός της ίδιας περιοχής τα λιγότερο ώριμα δείγματα φάνηκε να παρουσιάζουν μεγαλύτερες τιμές των ελεύθερων λιπαρών οξέων εν συγκρίσει με αυτά των πιο ώριμων.

Τα πλέον ανώριμα (<3 μήνες) δείγματα από μίγμα πρόβειου και κατσικίσου γάλακτος από την Κ. Ελλάδα φάνηκε να έχουν πολύ μεγάλες τιμές ελεύθερων λιπαρών οξέων εν συγκρίσει με τα πιο ώριμα των άλλων περιοχών. Για τα δείγματα ωρίμανσης 3-9 μηνών, τα δείγματα από το Β. Αιγαίο παρουσίασαν τις χαμηλότερες τιμές, ακολούθησαν αυτά από την Κρήτη και τις υψηλότερες τιμές παρουσίασαν τα δείγματα από τη Θεσσαλία. Όσον αφορά τα πολύ ώριμα δείγματα (>12 μήνες), οι τιμές που λάμβαναν εν συγκρίσει με τα δείγματα ωρίμανσης 3-9 μηνών ήταν ελαφρώς υψηλότερες, με τα δείγματα από το Ν. Αιγαίο να εμφανίζουν τις χαμηλότερες τιμές, να ακολουθούν τα σχετικά ομοιογενή από Κρήτη και Κεντρική Ελλάδα, και τις υψηλότερες τιμές να λαμβάνουν αυτά από Ήπειρο και Πελοπόννησο, τα οποία εμφάνισαν μια σχετική ομοιογένεια.

Όσον αφορά τα δείγματα από αγελαδινό γάλα, στα δείγματα του Ν. Αιγαίου φάνηκε να αυξάνονται οι τιμές των ελεύθερων λιπαρών οξέων με την αύξηση της διάρκειας ωρίμανσης. Στα δείγματα από τη Μακεδονία, τα δείγματα ωρίμανσης 9-12 μηνών είχαν αισθητά χαμηλότερες τιμές εν σχέσει με τα δείγματα ωρίμανσης 3-9 μηνών, ενώ τα πολύ ώριμα δείγματα (>12 μήνες) παρουσίαζαν σημαντικά υψηλότερες τιμές εν συγκρίσει με τα άλλα.

Εστέρες

Ταυτοποιήθηκαν 32 εστέρες, οι οποίοι παρατίθενται στους Πίνακες 14-17 (Παράρτημα 2).

Η βιοσύνθεση των εστέρων επιτυγχάνεται είτε με εστεροποίηση των πρωτοταγών αλκοολών με ελεύθερα λιπαρά οξέα είτε με τη διαδικασία της αλκοόλυσης και μπορεί να γίνει είτε μέσω μεταβολικών μονοπατιών των μικροοργανισμών είτε μέσω χημικών αντιδράσεων και η συγκέντρωση των αλκοολών αποτελεί συνήθως τον περιοριστικό παράγοντα (limiting factor) για την παραγωγή τους (Carbonell *et al.*, 2002). Επίσης, είναι δυνατό να συντεθούν και μέσω μετεστεροποίησης των μερικών γλυκεριδίων (Holland, 2004).

Οι εστέρες συμβάλλουν σημαντικά στη διαμόρφωση του αρώματος τυριών από πρόβειο γάλα (Di Cagno, 2003), στα οποία οι εστέρες βρίσκονται συνήθως σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις απ' ότι στα υπόλοιπα (Carbonell *et al.*, 2002).

Οι εστέρες θεωρείται πως προσδίδουν στα τυριά γλυκά, φρουτώδη και άνθηνα αρώματα και πως περιορίζουν τη δριμύτητα του ταγγού αρώματος των ελεύθερων λιπαρών οξέων και την πικράδα των αμινών, εφόσον υπάρχουν (Pinho *et al.*, 2003). Οι αιθυλεστέρες ειδικά συμβάλλουν σημαντικά στη διαμόρφωση φρουτώδους αρώματος στα τυριά, με κάποιους από αυτούς να έχουν πολύ χαμηλά όρια αντίληψης (Curioni and Bosset, 2002).

Ο εξανικός αιθυλεστέρας, με χαρακτηριστική οσμή άγουρου μήλου, βρέθηκε σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε τρία πρόβεια Π.Ο.Π τυριά (Di Cagno *et al.*, 2003), όπως επίσης και σε αρκετά άλλα τυριά, όπως το Grana Padano (Moio and Addeo, 1998) και το Parmigiano- Reggiano (Bellesia *et al.*, 2003). Ο βουτανικός αιθυλεστέρας επίσης έχει βρεθεί σε μεγάλες ποσότητες σε τυριά όπως το Gruyère, το Parmigiano (Engels *et al.*, 1997), το Pecorino και το Grana Padano (Curioni and Bosset, 2002). Ο οκτανικός αιθυλεστέρας φαίνεται πως συμβάλλει στη διαμόρφωση του αρώματος του Flor de Guia (Gonzalez-Mendoza and Diaz-Rodriguez, 1993).

Γενικά, στην πλειονότητα των δειγμάτων, ανεξαρτήτου προελεύσεως, διάρκειας ωρίμανσης και είδους γάλακος, κυριαρχούν οι αιθυλεστέρες. Επίσης, όπως ήταν αναμενόμενο, στα τυριά από αγελαδινό γάλα γενικά παρατηρήθηκαν οι μικρότερες τιμές στους εστέρες και το μικρότερο εύρος εστέρων. Τα δείγματα από την

Πελοπόννησο γενικά φάνηκε πως εμφάνιζαν τις μεγαλύτερες τιμές στοτυ εστέρες, ανεξαρτήτου περιχής. Γενικά, τα δείγματα από τη Μακεδονία είχαν το μικρότερο εύρος εστέρων, πλην των πολύ ώριμων (>12 μήνες) πρόβειων και κατσικίσιων.

Αλκοόλες

Ταυτοποιήθηκαν 32 αλκοόλες, οι οποίες παρατίθενται στους Πίνακες 18-21 (Παράρτημα 2).

Οι πρωτοταγείς αλκοόλες προέρχονται από την αναγωγή των αντίστοιχων αλδευδών που παράγονται κατά το μεταβολισμό των λιπαρών οξέων και των αμινοξέων (Barbieri *et al.*, 1994, McSweeney and Sousa, 2000), εκτός από την αιθανόλη, η οποία παράγεται κατά τον καταβολισμό της λακτόζης, από την αναγωγή της ακεταλδεύδης (Marilley and Casey, 2004) και από τον καταβολισμό της αλανίνης μέσω της αντίδρασης Strecker (Castillo *et al.*, 2007). Οι αλειφατικές πρωτοταγείς αλκοόλες συνεισφέρουν σε φρουτώδη και ομοιάζοντα με του καρυδιού αρώματα στη γεύση των τυριών (Gallois and Langlois, 1990).

Η πλειονότητα των δευτεροταγών αλκοολών σχηματίζεται με ενζυμική αναγωγή των αντίστοιχων μεθυλκετονών, οι οποίες προέρχονται από τον καταβολισμό των ελεύθερων λιπαρών οξέων (Collins *et al.*, 2003). Η 2-βουτανόλη είναι δυνατό να σχηματιστεί κατά την αναγωγή της 2,3-βουτανεδιόνης (διακετύλιο) προς 2,3-βουτανεδιόλη από βακτηριακά ένζυμα, η οποία με τη σειρά της ανάγεται προς 2-βουτανόλη μέσω της δράσης των οξυγαλακτικών βακτηρίων (Urbach, 1993). Έχει βρεθεί πως η 2-πεντανόλη και η 2-επτανόλη κυριαρχούν στο προφίλ των αλκοολών του Grana Padano και του Parmigiano Reggiano (Moio and Addeo, 1998).

Όσον αφορά τις αλκοόλες με διακλάδωση, συνήθως προέρχονται από τον καταβολισμό των αμινοξέων. Είναι γνωστό πως η 3-μεθυλ-1-βουτανόλη προκύπτει από την αναγωγή της αντίστοιχης 3-μεθυλβουτανάλης, η οποία σχηματίζεται κατά την αποικοδόμηση της λευκίνης μέσω της αντίδρασης Strecker (McSweeney and Sousa, 2000, Marilley and Casey, 2004) και προσδίδει ένα χαρακτηριστικό άρωμα φρέσκου τυριού (Moio *et al.*, 1993). Η αυξημένη συγκέντρωσή της συνδέεται με ελαττώματα στη γεύση τυριών όπως το Gouda και το Cheddar (Molimard and Spinnler, 1996).

Οι αλκοόλες αποτελούν την κύρια κατηγορία ουσιών σε αρκετά τυριά από πρόβειο γάλα, με την αιθανόλη να υπερτερεί ποσοτικά έναντι των υπολοίπων (Carbonell *et al.*, 2002, Kondyli *et al.*, 2002, Bintsis and Robinson, 2004).

Γενικά, το μικρότερο εύρος αλκοολών παρατηρήθηκε στα δείγματα από τη Μακεδονία και τη Θεσσαλία. Μικρές αποκλίσεις παρατηρήθηκαν στις τιμές των επιμέρους αλκοολών, ανεξαρτήτου προελεύσεως, είδους γάλακτος και σταδίου ωρίμανσης.

Αλδεΐδες

Ταυτοποιήθηκαν 7 αλδεΐδες, οι οποίες παρατίθενται στους παρακάτω Πίνακες 22-25 (Παράρτημα 2).

Οι γραμμικές αλδεΐδες παράγονται κατά την αυτοοξειδωση (β-οξειδωση) των ακόρεστων λιπαρών οξέων, αν και στα τυριά η οξειδωση των λιπών είναι περιορισμένη λόγω του χαμηλού οξειδοαναγωγικού τους δυναμικού και της χαμηλής τους συγκέντρωσης σε ακόρεστα λιπαρά οξέα (Molimard and Spinnler, 1996). Οι αλδεΐδες και κατά κύριο λόγο οι διακλαδισμένες, είναι επίσης δυνατό να σχηματιστούν κατά την αποδόμηση των αμινοξέων από τους μικροοργανισμούς, είτε μέσω της τρανσαμίνωσης που ακολουθείται από αποκαρβοξυλίωση είτε μέσω της αντίδρασης Strecker (Curioni and Bosset, 2002). Οι αλδεΐδες είναι γενικά μεταβατικές ουσίες που εύκολα ανάγονται στις αντίστοιχες αλκοόλες στο χαμηλό οξειδοαναγωγικό δυναμικό του τυριού (McSweeney and Sousa, 2000). Παρά τις συνήθως χαμηλές συγκεντρώσεις τους στα τυριά, ορισμένες έχουν χαμηλά όρια αντίληψης και θεωρείται πως παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση του αρώματος των τυριών (Bintsis and Robinson, 2004).

Η 3-μεθυλ-1-βουτανάλη προέρχεται από την λευκίνη μέσω της αντίδρασης Strecker (McSweeney and Sousa, 2000). Μεγάλη συγκέντρωση της ουσίας αυτής μπορεί να αποδοθεί στην ύπαρξη στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων με μεγάλη ενεργότητα της αμινοτρανσφεράσης (Amarita, 2006). Θεωρείται πως προσδίδει τραχύ ομοιάζον με της βύνης άρωμα (Dunn and Lindsay, 1985), βρίσκεται όμως και σε καλής ποιότητας Parmigiano (Engels *et al.*, 1997) και Gruyère (Curioni and Bosset, 2002).

Η εννεανάλη είναι σημαντική για τη διαμόρφωση του αρώματος τυριών όπως το Grana Padano (Moio and Addeo, 1998).

Η βενζαλδεΐδη, που έχει άρωμα πικραμύγδαλου, σχηματίζεται μέσω οξειδωτικών αντιδράσεων της φαινυλακεταλδεΐδης και του βενζενπροπενικού οξέος (Molimard and Spinnler, 1996).

Οι αποκλίσεις των τιμών των αλδεϊδών ήταν γενικά μικρές, ανεξαρτήτου προελεύσεως, διάρκειας ωρίμανσης και είδους γάλακτος.

Κετόνες

Ταυτοποιήθηκαν 8 κετόνες, οι οποίες παρατίθενται στους Πίνακες 26-29 (Παράρτημα 2).

Ο σχηματισμός των μεθυλκετονών είναι αποτέλεσμα της ενζυμικής β-οξειδωσης των ελεύθερων λιπαρών οξέων προς β-κετοοξέα και της αποκαρβοξυλίωσής τους προς 2-αλκανόνες με ένα λιγότερο άτομο C. Οι κετόνες αυτές έχουν χαμηλά όρια αντίληψης και γενικά θεωρείται πως συμβάλλουν στη διαμόρφωση του αρώματος διάφορων τυριών, ειδικά αυτών με ανάπτυξη μύκητα (McSweeney and Sousa, 2000).

Η 2-βουτανόνη, που έχει άρωμα καραμέλας βουτύρου, θεωρείται πως είναι η κύρια αρωματική ουσία στο Cheddar (Agora *et al.*, 1995) και επίσης συμβάλλει σημαντικά στο άρωμα διάφορων ισπανικών και ιταλικών τυριών από πρόβειο γάλα (Izco and Torre, 2000, Larrayoz *et al.*, 2001, Coda *et al.*, 2006). Η 2-βουτανόνη μπορεί επίσης να σχηματιστεί από αναγωγή του διακετυλίου προς ακετοΐνη, η οποία στη συνέχεια ανάγεται προς 2,3-βουτανεδιόλη και αυτή προς 2-βουτανόνη (Urbach, 1993). Η 2-πεντανόνη αποτελεί βασικό αρωματικό συστατικό του Parmigiano (Barbieri *et al.*, 1994), καθώς επίσης και σε ισπανικά και ιταλικά τυριά από πρόβειο γάλα (Izco and Torre, 2000, Larrayoz *et al.*, 2001, Coda *et al.*, 2006). Η 2-επτανόνη, με ομοιάζον με το χορτάρι άρωμα, αποτελεί σημαντικό αρωματικό συστατικό στο Emmental (Curioni and Bosset, 2002), το Parmigiano (Barbieri *et al.*, 1994) και διάφορα ισπανικά και ιταλικά τυριά από πρόβειο γάλα (Izco and Torre, 2000, Larrayoz *et al.*, 2001, Coda *et al.*, 2006) και επίσης συνεισφέρει ιδιαίτερα στο άρωμα των τυριών με ανάπτυξη μύκητα (Molimard and Spinnler, 1996). Η 2-εντεκανόνη, με φρουτώδες και ομοιάζον αυτό των ανθέων άρωμα, έχει ανευρεθεί σε διάφορα ισπανικά τυριά από πρόβειο γάλα (Larrayoz *et al.*, 2001). Η 2-οκτανόνη και η 2-εννεανόνη συνεισφέρουν στη δημιουργία φρουτωδών και ομοιαζόντων με άνθη αρωμάτων σε διάφορα τυριά (Molimard and Spinnler, 1996).

Η 3-υδροξυ-2-βουτανόνη (ακετοΐνη) σχηματίζεται από την αναγωγή της 2,3-βουτανεδιόλης (διακετύλιο) ή είναι δυνατό να συντεθεί από το πυρουβικό οξύ, το γαλακτικό οξύ ή το κιτρικό οξύ από τα οξυγαλακτικά βακτήρια και ειδικά το *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (Crow, 1990), έχει χαρακτηριστικό άρωμα ομοιάζον με του βουτύρου και χαμηλό όριο αντίληψης (Curioni and Bosset, 2002).

Οι τιμές των κετονών γενικά παρουσίαζαν μικρές αποκλίσεις ανεξαρτήτως προελεύσεως, διάρκειας ωρίμανσης και είδους γάλακτος. Η 3-υδροξυ-2-βουτανόνη, όπως ήταν αναμενόμενο, είχε αρκετά μεγαλύτερες τιμές στο σύνολο των δειγμάτων.

Λοιπές ουσίες

Ταυτοποιήθηκαν επιπλέον 2 λακτόνες, 3 υδρογονάνθρακες, 2 πυραζίνες, 5 αμίνες και 3 τερπένια και παρατίθενται στους Πίνακες 29-33 (Παράρτημα 2).

Σε παλαιότερη μελέτη υποστηρίχθηκε ότι τα πρόδρομα μόρια για τη σύνθεση των λακτονών προέρχονται από το σχηματισμό υδροξυ-οξέων στο μαστικό αδένια μέσω οξειδωσης στο νεοεξαχθέν γάλα (Eriksen, 1976). Η επικρατούσα πλέον άποψη είναι ότι οι λακτόνες προέρχονται από την αφυδάτωση και την κυκλοποίηση των υδροξυ-λιπαρών οξέων, τα οποία σχηματίζονται από τη δράση λιποξυγενασών ή υδρατασών στα ακόρεστα λιπαρά οξέα (Behnke, 1980, Molimard and Spinnler, 1996) και επομένως η συγκέντρωσή τους συσχετίζεται με την έκταση της λιπόλυσης (Collins *et al.*, 2003). Οι λακτόνες χαρακτηρίζονται από φρουτώδη, γλυκά, κρεμώδη και ομοιάζοντα με αυτά

των προϊόντων ζύμωσης αρώματα (Dufosse *et al.*, 1994) και συνήθως ανευρίσκονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε τυριά από πρόβειο γάλα (Di Cagno *et al.*, 2003).

Οι υδρογονάνθρακες που ευρίσκονται στα τυριά είναι συνήθως δευτερογενή προϊόντα της αυτοοξειδωσης των λιπιδίων (Barbieri *et al.*, 1994, Carbonell *et al.*, 2002), αλλά είναι δυνατό να προέρχονται και από τη διατροφή των ζώων (Carbonell *et al.*, 2002, Ziino *et al.*, 2005). Δεν συνεισφέρουν ιδιαίτερα στη διαμόρφωση του αρώματος, αν και ορισμένοι μπορούν να αποτελέσουν πρόδρομες ενώσεις για το σχηματισμό άλλων αρωματικών ουσιών (Agora *et al.*, 1995).

Οι πυραζίνες πιθανόν προέρχονται από τον καταβολισμό των αμινοξέων και αποτελούν πρωταρχικής σημασίας ουσίες στη διαμόρφωση του αρώματος των τυριών Gruyère (Rychlik and Bosset, 2001) και British farmhouse Cheddar (Suriyaphan *et al.*, 2001).

Τα τυριά είναι από τα πλέον σχετιζόμενα με την παρουσία βιογενών αμινών τρόφιμα (EFSA, 2011). Οι βιογενείς αμίνες, ουσίες γνωστές για τις δυσμενείς επιδράσεις τους στην υγεία του ανθρώπου (Ladero *et al.*, 2010) παράγονται κυρίως από την αποκαρβοξυλίωση των ελεύθερων αμινοξέων μέσω ενζυμικών διεργασιών της ανεπιθύμητης μικροχλωρίδας των τυριών και το είδος και η συγκέντρωσή τους εξαρτώνται από το είδος του γάλακτος, τη θερμική επεξεργασία, τη συγκέντρωση αλατιού, την ενεργότητα του νερού και τις συνθήκες και τη διάρκεια ωρίμανσης και συντήρησης (Loizzo *et al.*, 2013). Έτσι, καθίσταται σαφές ότι η παρουσία τους στα τυριά αποτελεί δείκτη ανεπαρκών συνθηκών και πρακτικών παραγωγής (Bunkova *et al.*, 2010). Γενικά, οι συγκεντρώσεις τους είναι αυξημένες στα μακράς ωρίμανσης τυριά, όπου η πρωτεόλυση και ο καταβολισμός των ελεύθερων αμινοξέων είναι εκτεταμένα (Bunkova *et al.*, 2010). Διάφορα περιστατικά τοξίκωσης από ισταμίνη έχουν συνδεθεί με την κατανάλωση τυριών μακράς ωρίμανσης (Gloria, 2005, Bunkova *et al.*, 2010, EFSA, 2011).

Τα τερπένια είναι δευτερογενείς φυτικοί μεταβολίτες, δηλαδή ουσίες που δε συμμετέχουν στις βασικές διεργασίες του μεταβολισμού και βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις σε ορισμένα φυτικά είδη, παρέχοντας προστασία από παθογόνους μικροοργανισμούς και συχνά λειτουργώντας ως προστατευτικές ενάντια στη βόσκηση ουσίες, λόγω πιθανών αντιδραστικών τους ιδιοτήτων (Acamovic and Brooker, 2005). Ορισμένα δε από αυτά διαθέτουν χαρακτηριστικό άρωμα. Επομένως, η ύπαρξή τους στο τυρί σχετίζεται με το είδος του σιτηρεσίου και κυρίως της βοσκήσιμης ύλης που κατανάλωσαν τα ζώα (Bosset *et al.*, 1994). Τα φυτικά είδη που αποτελούν τη βοσκήσιμη ύλη των ορεινών περιοχών φαίνεται πως διαθέτουν μεγαλύτερη ποικιλία τερπενίων και σε μεγαλύτερες ποσότητες έναντι αυτών των πεδινών περιοχών (Mariaca *et al.*, 1997).

Η κίτρονελλόλη, που θεωρείται ότι προέρχεται από τον καταβολισμό των καροτενοειδών (Belitz and Grosch, 1986), έχει ανευρεθεί σε τυρί παρασκευασμένο από γάλα ζώων που κατανάλωσαν φυτικά είδη, μεταξύ των οποίων τα *Anthemis arvensis*, *Calendula arvensis*, *Cerinth major*, *Sinapis arvensis* και *Malva silvestris*, στα οποία

επίσης ταυτοποιήθηκε το τερπένιο αυτό και τα οποία βρίσκονται επίσης σε αφθονία στην βλάστηση της Ελλάδας (Carpino *et al.*, 2004). Το καρυοφυλλένιο έχει ανευρεθεί σε γάλα που προερχόνταν από βόσκοντα ζώα (Abilleira *et al.*, 2010).

Τερπένια ανευρέθηκαν σε δείγματα που προέρχονταν από νησιωτικές περιοχές (Ν. Αιγαίο, Β. Αιγαίο, Κρήτη). Η παρουσία των τερπενίων αυτών υποδεικνύει ότι μάλλον τα δείγματα αυτά προέρχονταν από βόσκοντα ζώα και πιθανόν τα φυτικά είδη που κατανάλωσαν να ήταν παραπλήσια και χαρακτηριστικά για τις προαναφερθείσες περιοχές. Είναι πιθανό να υπήρχαν και άλλα τερπενια στα δείγματα, αλλά θα έπρεπε να είχε χρησιμοποιηθεί μη πολική ίνα δειγματοληψίας.

7. Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

Επιλέχθηκε η εφαρμογή της διαχωριστικής ανάλυσης για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων, καθώς είναι η πλέον κατάλληλη μέθοδος για την επεξεργασία μεγάλου αριθμού δειγμάτων με μεγάλο αριθμό εξαρτημένων μεταβλητών (πτητικές ενώσεις). Ο διαχωρισμός έγινε με βάση το είδος γάλακτος, το γεωγραφικό διαμέρισμα προέλευσης και τη διάρκεια της ωρίμανσης. Για τα δείγματα που προέρχονταν από το γεωγραφικό διαμέρισμα της Κρήτης εφαρμόστηκε διαχωριστική ανάλυση με βάση τη σήμανση (Π.Ο.Π).

Προκειμένου να μπορέσει να εφαρμοστεί διαχωριστική ανάλυση επιλέχθηκαν 62 ουσίες ως ανεξάρτητες μεταβλητές πρόβλεψης (predictor variables), οι οποίες δεν περιείχαν ακραίες τιμές (outliers), στις οποίες η ανάλυση αυτή είναι ευαίσθητη. Στη συγκεκριμένη περίπτωση ως ανεξάρτητες μεταβλητές πρόβλεψης με ακραίες τιμές θεωρήθηκαν οι ουσίες που σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων έπαιρναν την τιμή μηδέν. Συμπεριλήφθηκαν μερικές μόνο ανεξάρτητες μεταβλητές πρόβλεψης με ακραίες τιμές όπως ορίστηκαν προηγουμένως, επειδή οι ουσίες που αντιπροσώπευαν θεωρούνται σημαντικές στη διαμόρφωση της γεύσης και του αρώματος των τυριών και οι οποίες δεν επηρέασαν την εφαρμογή της διακριτικής μεθόδου. Τελικά, οι ανεξάρτητες μεταβλητές πρόβλεψης που επιλέχθηκαν ήταν το οξικό οξύ, το προπανικό οξύ, το βουτανικό οξύ, το πεντανικό οξύ, το εξανικό οξύ, το επτανικό οξύ, το οκτανικό οξύ, το εννεανικό οξύ, το δεκανικό οξύ, το εντεκανικό οξύ, το δωδεκανικό οξύ, το δεκατετρανικό οξύ, το 2-μεθυλπροπανικό οξύ, το 3-μεθυλβουτανικό οξύ, το 9-δεκενικό οξύ, ο βουτανικός αιθυλεστέρας, ο εξανικός αιθυλεστέρας, ο επτανικός αιθυλεστέρας, ο οκτανικός αιθυλεστέρας, ο εννεανικός αιθυλεστέρας, ο δεκανικός αιθυλεστέρας, ο δωδεκανικός αιθυλεστέρας, ο δεκαεξανικός αιθυλεστέρας, ο 9-δεκενικός αιθυλεστέρας, το 4-μεθυλοκτανικό οξύ, η 3-μεθυλ-2-βουτανόλη, η αιθανόλη η 3-βουτυν-1-όλη, η 2-εννεανόλη, η 2-επτανόλη, η 2-δεκανόλη, η 2-βουτεν-1-όλη, η 2-βουτανόλη, η 2,3-βουτανεδιόλη, η 1-εντεκανόλη, η 1-δεκατετρανόλη, η 2-αιθυλ-4-μεθυλ-1-πεντανόλη, η 1-πεντανόλη, η 3,7-διμεθυλ-1-οκτανόλη, η 2-βουτυλ-1-οκτανόλη, η 1-οκτανόλη, η 2-αιθυλ 1-εξανόλη, η 1-εξανόλη, η 1-δεκαεξανόλη, η 1-δωδεκανόλη, η 1-δεκανόλη, η 3-μεθυλ-1-βουτανόλη και η 1-βουτανόλη, η εννεανάλη, η 3-μεθυλβουτανάλη, η 3-υδροξυβουτανάλη, η βενζαλδεΰδη, η γ-δωδεκαλακτόνη, η δ-δωδεκαλακτόνη, η 3-υδροξυ 2-βουτανόνη, η 2-εντεκανόνη, η 2-δεκατετρανόνη, η 2-δεκατρινόνη, η 2-οκτανόνη, η 2-εννεανόνη, η 2-βουτανόνη, η 2-επτανόνη.

α. Διάκριση με βάση τη διάρκεια ωρίμανσης

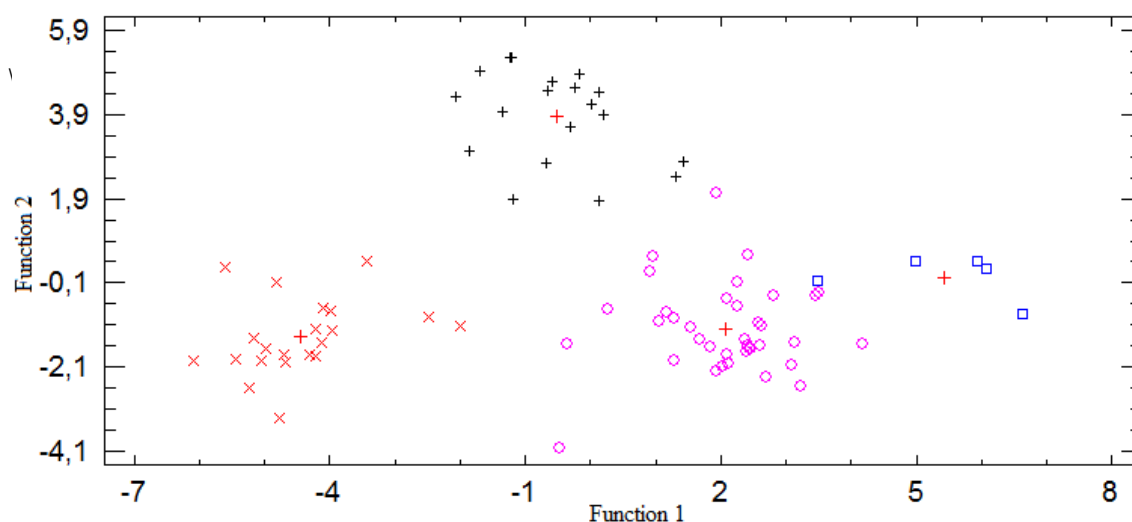
Εφαρμόστηκε διαχωριστική ανάλυση με μεταβλητή ταξινόμησης (classification variable) τη διάρκεια ωρίμανσης, ανεξάρτητα από το γεωγραφικό διαμέρισμα προέλευσης και το είδος του γάλακτος.

Προέκυψαν τρεις διαχωριστικές συναρτήσεις και με βάση τις πρώτες δύο προέκυψε το Διάγραμμα των διαχωριστικών συναρτήσεων (Plot of Discriminant Functions), τα χαρακτηριστικά των οποίων παρουσιάζονται στον Πίνακα 34

Πίνακας 34: Τα χαρακτηριστικά των διακριτικών συναρτήσεων με βάση τη διάρκεια ωρίμανσης

Διακριτική Συνάρτηση (Discriminant Function)	Ιδιοτιμή (Eigenvalue)	Σχετικό Ποσοστό (Relative Percentage)	Δείκτης Κανονικής Συσχέτισης (Canonical Correlation)	Wilk's Lambda	Chi-Squared	P-Value
1	9,293	53,77	0,950	0,0039	265,080	0,0001
2	4,792	27,73	0,909	0,0411	153,169	0,0295
3	3,197	18,50	0,872	0,2382	68,851	0,2028

Όπως φαίνεται στον Πίνακα, σχεδόν όλη η διασπορά οφείλεται στις δύο πρώτες διαχωριστικές συναρτήσεις με τα μεγαλύτερα σχετικά ποσοστά. Συγκεκριμένα, η διακριτική συνάρτηση 1 ερμήνευσε κατά 53,77% το διαχωρισμό και η διακριτική συνάρτηση 2 κατά 27,73% (Διάγραμμα 1). Στο συμπέρασμα αυτό συνηγορούν οι μεγάλες τιμές των ιδιοτιμών, οι μικρές τιμές του Wilk's Lambda, οι μεγάλες τιμές του Chi-Squared και οι μεγάλες τιμές των δεικτών κανονικής συσχέτισης. Οι διαχωριστικές συναρτήσεις 1 και 2 είναι στατιστικά σημαντικές σε ποσοστό >95%.



Διάγραμμα 1: Γράφημα των 2 πρώτων διαχωριστικών συναρτήσεων με βάση τη διάρκεια ωρίμανσης

- διάρκεια ωρίμανσης
- a: < 3 μήνες
 - × b: 3-9 μήνες
 - ◇ c: 9-12 μήνες
 - + d: > 12 μήνες
 - + κεντροειδείς

Στον Πίνακα 35 παρατίθενται οι συντελεστές διαχωριστικής συνάρτησης (Discriminant Function Coefficients) βάσει των οποίων αξιολογείται ο βαθμός στον οποίο κάθε διαχωριστική μεταβλητή σχετίζεται με τις διαφορές μεταξύ των ομάδων εξετάζοντας την απόλυτη τιμή των τυποποιημένων (standarized) συντελεστών καθώς και άμα είναι σχετικά σημαντική κάθε μεταβλητή στον διαχωρισμό των ομάδων. Οι διαχωριστικές μεταβλητές με μεγάλη απόλυτη τιμή είναι οι σημαντικότερες στο διαχωρισμό αυτό.

Πίνακας 35: Οι συντελεστές των δύο πρώτων διαχωριστικών συναρτήσεων με βάση τη διάρκεια ωρίμανσης

	1	2
δεκαεξανικός αιθυλεστέρας	-0,736	-0,514
εντεκανικό οξύ	-1,472	-0,666
2-μεθυλπροπανικό οξύ	-0,890	0,461
προπνικό οξύ	-1,822	0,641
πεντανικό οξύ	2,717	-3,772
οκτανικός αιθυλεστέρας	-3,823	1,352
οκτανικό οξύ	5,918	-0,859
εννεανικός αιθυλεστέρας	-0,613	-2,181
εννεανικό οξύ	5,266	2,736
εννεανάλη	-0,602	-1,782
εξανικός αιθυλεστέρας	8,556	-1,599
εξανικό οξύ	-8,357	-1,576
δεκατετρανικό οξύ	-5,612	1,512
επτανικός αιθυλεστέρας	7,800	-2,243
επτανικό οξύ	0,889	0,876
γ-δωδεκαλακτόνη	0,625	-0,587
αιθανόλη	0,293	1,169
δωδεκανικός αιθυλεστέρας	-0,894	-0,895
δωδεκανικό οξύ	-4,038	-3,494
δ-δωδεκαλακτόνη	-3,211	1,200
δεκανικός αιθυλεστέρας	-11,275	3,373
δεκανικό οξύ	-4,387	4,725
βουτανικός αιθυλεστέρας	0,099	-0,580
3-μεθυλβουτανικό οξύ	4,929	-0,337
βουτανικό οξύ	0,614	4,098
3-μεθυλβουτανάλη	-0,880	2,790
3-υδροξυβουτανάλη	-1,082	-0,308
βενζαλδεΐδη	-1,128	0,680
οξικό οξύ	0,339	-0,402
9-δεκενικός αιθυλεστέρας	-7,354	-2,135

9-δεκενικό οξύ	3,904	-2,202
4-μεθυλοκτανικό οξύ	4,472	-4,987
3-μεθυλ 2 βουτανόλη	0,528	0,589
3-υδροξυ 2-βουτανόνη	-0,879	0,831
3-βουτυν-1-όλη	1,898	-0,326
2-εντεκανόνη	-4,295	5,214
2-δεκατρινόνη	11,456	-1,515
2-δεκατετρανόνη	-1,697	0,427
2-οκτανόνη	-1,936	0,404
2-εννεανόνη	1,152	0,842
2-εννεανόλη	-0,552	-1,175
2-επτανόνη	1,269	-2,278
2-επτανόλη	-0,677	0,217
2-δεκανόλη	-2,620	-0,821
2-βουτεν-1-όλη	2,756	0,469
2-βουτανόνη	-2,893	-1,018
2-βουτανόλη	-0,023	3,107
2,3 βουτανεδιόλη	-3,285	-0,144
1-εντεκανόλη	-0,707	-0,313
1-δεκατετρανόλη	1,643	-0,901
2-αιθυλ 4-μεθυλ πεντανόλη	-2,298	0,172
1-πεντανόλη	1,643	-0,344
3,7-διμεθυλ 1-οκτανόλη	0,187	-0,849
2-βουτυλ 1-οκτανόλη	5,698	0,477
1-οκτανόλη	1,227	0,061
2-αιθυλ 1-εξανόλη	0,147	-0,066
1-εξανόλη	-0,565	1,001
1-δεκαεξανόλη	0,961	-0,188
1-δωδεκανόλη	-2,234	-0,882
1-δεκανόλη	0,405	-0,689
3-μεθυλ 1-βουτανόλη	-1,056	0,802
1-βουτανόλη	0,858	-1,805

Παρατηρείται ότι έγινε ένας σχετικά σαφής διαχωρισμός των δειγμάτων με βάση τη διάρκεια ωρίμανσης, ανεξάρτητα από το είδος γάλακτος και το γεωγραφικό διαμέρισμα προέλευσης με αρκετές παρατηρήσεις να είναι αρκετά απομακρυσμένες από τους κεντροειδείς των ομάδων. Οι ουσίες που συνέβαλαν περισσότερο στο διαχωρισμό βάσει των δύο πρώτων διαχωριστικών συναρτήσεων είναι τα οξέα βουτανικό, εξανικό οκτανικό, εννεανικό, δεκανικό, δωδεκανικό, δεκατετρανικό, 3-μεθυλβουτανικό και 4-μεθυλοκτανικό, οι εστέρες εξανικός αιθυλεστέρας, επτανικός αιθυλεστέρας, δεκανικός αιθυλεστέρας και 9-δεκενικός αιθυλεστέρας, οι κετόνες 2-εντεκανόνη και 2-δεκατρινόνη και η αλκοόλη 2-βουτυλ-1-οκτανόλη. Από τις ουσίες αυτές, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ειδικά τα ελεύθερα λιπαρά οξέα και οι εστέρες είναι σημαντικές στη διαμόρφωση της γεύσης και του αρώματος των τυριών.

β. Διάκριση με βάση το είδος γάλακτος

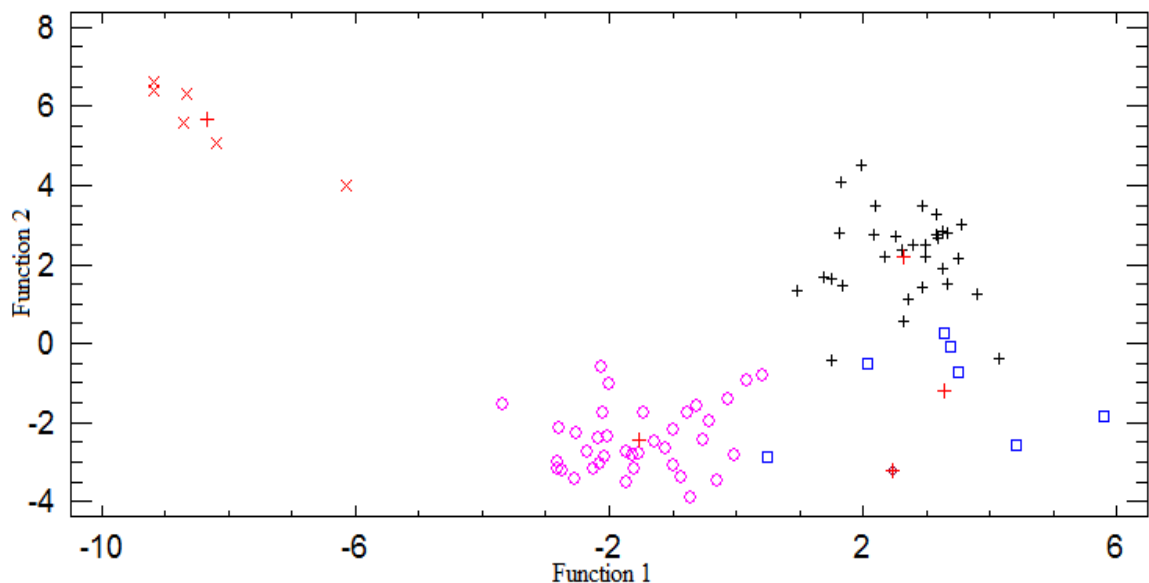
Εφαρμόστηκε διαχωριστική ανάλυση με μεταβλητή ταξινόμησης (classification variable) το είδος του γάλακτος, ανεξάρτητα από τη διάρκεια ωρίμανσης και το γεωγραφικό διαμέρισμα προέλευσης.

Προέκυψαν τέσσερις διαχωριστικές συναρτήσεις και με βάση τις πρώτες δύο προέκυψε το Διάγραμμα των διαχωριστικών συναρτήσεων (Plot of Discriminant Functions), τα χαρακτηριστικά των οποίων παρουσιάζονται στον Πίνακα 36.

Πίνακας 36: Τα χαρακτηριστικά των διακριτικών συναρτήσεων με βάση το είδος γάλακτος

Διακριτική Συνάρτηση (Discriminant Function)	Ιδιοτιμή (Eigenvalue)	Σχετικό Ποσοστό (Relative Percentage)	Δείκτης Κανονικής Συσχέτισης (Canonical Correlation)	Wilk's Lambda	Chi-Squared	P-Value
1	10,404	45,92	0,955	0,0011	322,601	0,0010
2	7,573	33,43	0,939	0,0128	206,986	0,1079
3	3,768	16,63	0,888	0,1098	104,924	0,8350
4	0,909	4,01	0,690	0,5237	30,724	0,9991

Όπως φαίνεται στον Πίνακα, σχεδόν όλη η διασπορά οφείλεται στις δύο πρώτες διαχωριστικές συναρτήσεις με τα μεγαλύτερα σχετικά ποσοστά. Συγκεκριμένα, η διακριτική συνάρτηση 1 ερμήνευσε κατά 45,92% το διαχωρισμό και η διακριτική συνάρτηση 2 κατά 33,43% (Διάγραμμα 2). Στο συμπέρασμα αυτό συνηγορούν οι μεγάλες τιμές των ιδιοτιμών, οι μικρές τιμές του Wilk's Lambda, οι μεγάλες τιμές του Chi-Squared και οι μεγάλες τιμές των δεικτών κανονικής συσχέτισης. Μόνο η διαχωριστική συνάρτηση 1 είναι στατιστικά σημαντική σε ποσοστό >95%.



Διάγραμμα 2: Γράφημα των 2 πρώτων διαχωριστικών συναρτήσεων με βάση το είδος γάλακτος

- είδος γάλακτος
- αγελαδινό
- × κατσικίσιο
- ◇ πρόβειο
- + πρόβειο και κατσικίσιο μίγμα
- ◇ πρόβειο, κατσικίσιο και αγελαδινό μίγμα
- + κεντροειδείς

Στον Πίνακα 37 παρατίθενται οι συντελεστές διαχωριστικής συνάρτησης (Discriminant Function Coefficients) βάσει των οποίων αξιολογείται ο βαθμός στον οποίο κάθε διαχωριστική μεταβλητή σχετίζεται με τις διαφορές μεταξύ των ομάδων εξετάζοντας την απόλυτη τιμή των τυποποιημένων (standarized) συντελεστών καθώς και άμα είναι σχετικά σημαντική κάθε μεταβλητή στον διαχωρισμό των ομάδων. Οι διαχωριστικές μεταβλητές με μεγάλη απόλυτη τιμή είναι οι σημαντικότερες στο διαχωρισμό αυτό.

Πίνακας 37: Οι συντελεστές των δύο πρώτων διαχωριστικών συναρτήσεων με βάση το είδος γάλακτος

	1	2
δεκαεξανικός αιθυλεστέρας	0,204	0,028
εντεκανικό οξύ	-2,005	-1,484
2-μεθυλπροπανικό οξύ	1,001	0,982
προπνικό οξύ	1,438	-0,232
πεντανικό οξύ	-0,507	0,692
οκτανικός αιθυλεστέρας	-1,049	5,518
οκτανικό οξύ	6,387	3,952
εννεανικός αιθυλεστέρας	-1,037	-1,418
εννεανικό οξύ	0,210	0,262
εννεανάλη	-0,569	1,259
εξανικός αιθυλεστέρας	-1,421	-0,097
εξανικό οξύ	-2,505	-2,738
δεκατετρανικό οξύ	-0,050	0,171
επτανικός αιθυλεστέρας	-3,708	-0,651
επτανικό οξύ	0,639	-0,410
γ-δωδεκαλακτόνη	-2,608	0,255
αιθανόλη	-0,320	1,263
δωδεκανικός αιθυλεστέρας	-0,478	-1,326
δωδεκανικό οξύ	2,949	-2,374
δ-δωδεκαλακτόνη	1,593	-0,829
δεκανικός αιθυλεστέρας	5,379	-2,035
δεκανικό οξύ	-7,732	1,333
βουτανικός αιθυλεστέρας	0,066	-0,912
3-μεθυλβουτανικό οξύ	-2,782	-0,392
βουτανικό οξύ	1,639	0,354
3-μεθυλβουτανάλη	-0,312	2,227
3-υδροξυβουτανάλη	1,522	0,677
βενζαλδεΐδη	-0,620	0,902

οξικό οξύ	1,247	0,361
9-δεκενικός αιθυλεστέρας	1,044	-1,548
9-δεκενικό οξύ	-0,124	0,859
4-μεθυλοκτανικό οξύ	-2,548	-5,431
3-μεθυλ 2 βουτανόλη	1,003	0,449
3-υδροξυ 2-βουτανόνη	-0,878	0,401
3-βουτυν-1-όλη	0,513	-0,603
2-εντεκανόνη	1,625	2,784
2-δεκατρινόνη	-2,283	-0,462
2-δεκατετρανόνη	1,446	1,573
2-οκτανόνη	1,581	0,360
2-εννεανόνη	-0,878	-2,038
2-εννεανόλη	0,517	-0,154
2-επτανόνη	0,648	0,229
2-επτανόλη	1,007	0,049
2-δεκανόλη	1,073	-0,853
2-βουτεν-1-όλη	0,441	0,705
2-βουτανόνη	0,138	-2,227
2-βουτανόλη	1,432	2,264
2,3 βουτανεδιόλη	0,469	-0,456
1-εντεκανόλη	-0,425	0,525
1-δεκατετρανόλη	0,491	1,006
2-αιθυλ 4-μεθυλ πεντανόλη	0,659	0,042
1-πεντανόλη	-0,524	-0,132
3,7-διμεθυλ 1-οκτανόλη	-0,220	-1,397
2-βουτυλ 1-οκτανόλη	-3,084	-1,512
1-οκτανόλη	2,959	-0,045
2-αιθυλ 1-εξανόλη	0,742	-0,020
1-εξανόλη	1,080	1,699
1-δεκαεξανόλη	-0,910	0,129
1-δωδεκανόλη	0,540	1,072
1-δεκανόλη	-1,204	-0,404
3-μεθυλ 1-βουτανόλη	0,059	0,286
1-βουτανόλη	-1,861	-1,202

Στον πίνακα ταξινόμησης (classification table) φάνηκε πως με τη χρήση αυτών των διακριτικών συναρτήσεων για την κατάταξη των δειγμάτων, το 100% ταξινομήθηκαν σωστά, δηλαδή π.χ. ένα δείγμα που με την εφαρμογή της μεθόδου αξιολογήθηκε και ταξινομήθηκε ως πρόβειο ήταν αληθώς πρόβειο.

Παρατηρείται ότι έγινε ένας σχετικά σαφής διαχωρισμός των δειγμάτων με βάση το είδος γάλακτος, ανεξάρτητα από τη διάρκεια ωρίμανσης και το γεωγραφικό διαμέρισμα προέλευσης, με αρκετές παρατηρήσεις να είναι αρκετά απομακρυσμένες από τους κεντροειδείς των ομάδων και με μια μικρή αλληλεπικάλυψη των δειγμάτων από μίγμα πρόβειου και κατσικίσιου γάλακτος με τα αγελαδινά. Οι ουσίες που συνέβαλαν περισσότερο στο διαχωρισμό βάσει των δύο πρώτων διαχωριστικών συναρτήσεων είναι τα οξέα οκτανικό, δεκανικό και 4-μεθυλοκτανικό, οι εστέρες επτανικός αιθυλεστέρας, οκτανικός αιθυλεστέρας, δεκανικός αιθυλεστέρας και η αλκοόλη 3-βουτυλ-1-οκτανόλη. Από τις ουσίες αυτές, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ειδικά τα ελεύθερα λιπαρά οξέα και οι εστέρες είναι σημαντικές στη διαμόρφωση της γεύσης και του αρώματος των τυριών.

γ. Διάκριση με βάση το γεωγραφικό διαμέρισμα προέλευσης

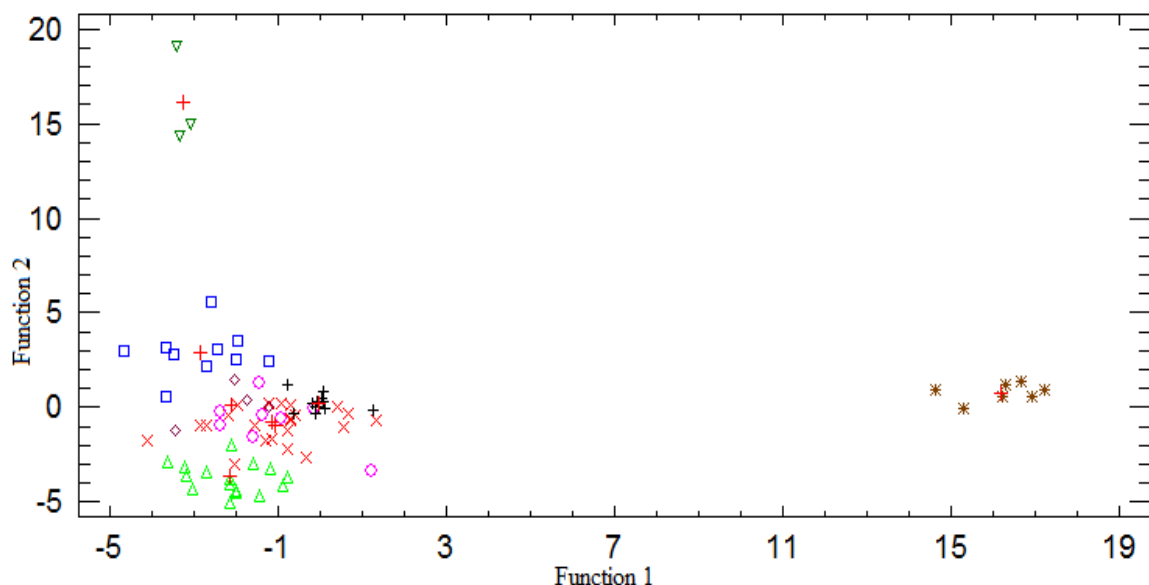
Εφαρμόστηκε διαχωριστική ανάλυση με μεταβλητή ταξινόμησης (classification variable) το γεωγραφικό διαμέρισμα προέλευσης, ανεξάρτητα από τη διάρκεια ωρίμανσης και το είδος του γάλακτος.

Προέκυψαν επτά διαχωριστικές συναρτήσεις και με βάση τις πρώτες δύο προέκυψε το Διάγραμμα των διαχωριστικών συναρτήσεων (Plot of Discriminant Functions), τα χαρακτηριστικά των οποίων παρουσιάζονται στον Πίνακα 38.

Πίνακας 38: Τα χαρακτηριστικά των διακριτικών συναρτήσεων με βάση το είδος γάλακτος

Διακριτική Συνάρτηση (Discriminant Function)	Ιδιοτιμή (Eigenvalue)	Σχετικό Ποσοστό (Relative Percentage)	Δείκτης Κανονικής Συσχέτισης (Canonical Correlation)	Wilk's Lambda	Chi-Squared	P-Value
1	27,913	40,98	0,982	$4,200 \times 10^{-7}$	675,412	0,00001
2	14,947	21,94	0,968	0,00001	520,654	0,00001
3	8,734	12,82	0,947	0,0001	393,265	0,0002
4	6,179	9,07	0,927	0,001	288,582	0,0110
5	5,241	7,69	0,916	0,013	197,906	0,1034
6	3,439	5,05	0,880	0,084	113,671	0,4911
7	1,666	2,45	0,790	0,375	45,111	0,8509

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 38, σχεδόν όλη η διασπορά οφείλεται στις δύο πρώτες διαχωριστικές συναρτήσεις με τα μεγαλύτερα σχετικά ποσοστά. Συγκεκριμένα, η διακριτική συνάρτηση 1 ερμήνευσε κατά 40,98% το διαχωρισμό και η διακριτική συνάρτηση 2 κατά 21,94% (Διάγραμμα 3). Στο συμπέρασμα αυτό συνηγορούν οι μεγάλες τιμές των ιδιοτιμών, οι μικρές τιμές του Wilk's Lambda, οι μεγάλες τιμές του Chi-Squared και οι μεγάλες τιμές των δεικτών κανονικής συσχέτισης. Οι διαχωριστικές συναρτήσεις 1, 2, 3 και 4 είναι στατιστικά σημαντικές σε ποσοστό >95%.



Διάγραμμα 3: Γράφημα των 2 πρώτων διαχωριστικών συναρτήσεων με βάση το γεωγραφικό διαμέρισμα

γεωγραφικό διαμέρισμα

- ▣ Κεντρική Ελλάδα
- × Κρήτη
- ◊ Ηπειρος
- + Μακεδονία
- ◇ Βόρεια Αιγαίο
- * Πελοπόννησος
- △ Νότιο Αιγαίο
- ▽ Θεσσαλία
- + Κεντροειδείς

Στον Πίνακα 39 παρατίθενται οι συντελεστές διαχωριστικής συνάρτησης (Discriminant Function Coefficients) βάσει των οποίων αξιολογείται ο βαθμός στον οποίο κάθε διαχωριστική μεταβλητή σχετίζεται με τις διαφορές μεταξύ των ομάδων εξετάζοντας την απόλυτη τιμή των τυποποιημένων (standarized) συντελεστών καθώς και άμα είναι σχετικά σημαντική κάθε μεταβλητή στον διαχωρισμό των ομάδων. Οι διαχωριστικές μεταβλητές με μεγάλη απόλυτη τιμή είναι οι σημαντικότερες στο διαχωρισμό αυτό.

Πίνακας 39: Οι συντελεστές των δύο πρώτων διαχωριστικών συναρτήσεων με βάση το γεωγραφικό διαμέρισμα

	1	2
δεκαεξανικός αιθυλεστέρας	0,116	0,638
εντεκανικό οξύ	-0,784	0,967
2-μεθυλπροπανικό οξύ	-0,200	0,030
προπνικό οξύ	1,990	0,877
πεντανικό οξύ	-1,917	1,321
οκτανικός αιθυλεστέρας	-0,363	-1,949
οκτανικό οξύ	2,414	-4,449
εννεανικός αιθυλεστέρας	-0,591	0,851
εννεανικό οξύ	-1,042	-2,399
εννεανάλη	-1,520	-1,368
εξανικός αιθυλεστέρας	8,890	-0,275
εξανικό οξύ	2,108	4,117
δεκατετρανικό οξύ	-0,334	2,857
επτανικός αιθυλεστέρας	-4,281	-2,405
επτανικό οξύ	-2,057	-2,429
γ-δωδεκαλακτόνη	1,055	0,622
αιθανόλη	0,197	-1,805

δωδεκανικός αιθυλεστέρας	-0,771	1,507
δωδεκανικό οξύ	2,125	1,028
δ-δωδεκαλακτόνη	1,306	0,082
δεκανικός αιθυλεστέρας	-8,005	1,955
δεκανικό οξύ	1,764	2,256
βουτανικός αιθυλεστέρας	1,375	0,715
3-μεθυλβουτανικό οξύ	-0,059	-3,300
βουτανικό οξύ	1,263	-1,724
3-μεθυλβουτανάλη	-1,234	-1,010
3-υδροξυβουτανάλη	0,315	0,429
βενζαλδεΐδη	2,581	-0,069
οξικό οξύ	-0,234	-0,544
9-δεκενικός αιθυλεστέρας	3,285	6,735
9-δεκενικό οξύ	-4,289	0,699
4-μεθυλοκτανικό οξύ	-1,053	2,748
3-μεθυλ 2 βουτανόλη	2,124	-1,028
3-υδροξυ 2-βουτανόνη	0,020	-0,004
3-βουτυν-1-όλη	0,761	1,036
2-εντεκανόνη	2,323	-0,914
2-δεκατρινόνη	-0,085	-3,467
2-δεκατετρανόνη	0,168	-2,277
2-οκτανόνη	0,75	0,978
2-εννεανόνη	0,618	-0,114
2-εννεανόλη	-0,467	2,796
2-επτανόνη	-0,805	0,350
2-επτανόλη	0,056	-0,657
2-δεκανόλη	-0,224	0,387
2-βουτεν-1-όλη	-0,101	-3,571
2-βουτανόνη	-1,987	1,577
2-βουτανόλη	1,066	-2,382
2,3 βουτανεδιόλη	-2,534	2,077
1-εντεκανόλη	0,104	1,058
1-δεκατετρανόλη	1,137	-2,011
2-αιθυλ 4-μεθυλ πεντανόλη	0,207	1,123
1-πεντανόλη	0,251	0,374
3,7-διμεθυλ 1-οκτανόλη	0,788	0,516
2-βουτυλ 1-οκτανόλη	-3,726	-2,175
1-οκτανόλη	0,166	-0,559
2-αιθυλ 1-εξανόλη	0,118	3,132
1-εξανόλη	-0,823	-0,469
1-δεκαεξανόλη	0,249	-1,486
1-δωδεκανόλη	-1,122	3,008
1-δεκανόλη	-0,003	-0,050
3-μεθυλ 1-βουτανόλη	-0,488	-1,168
1-βουτανόλη	-1,434	0,119

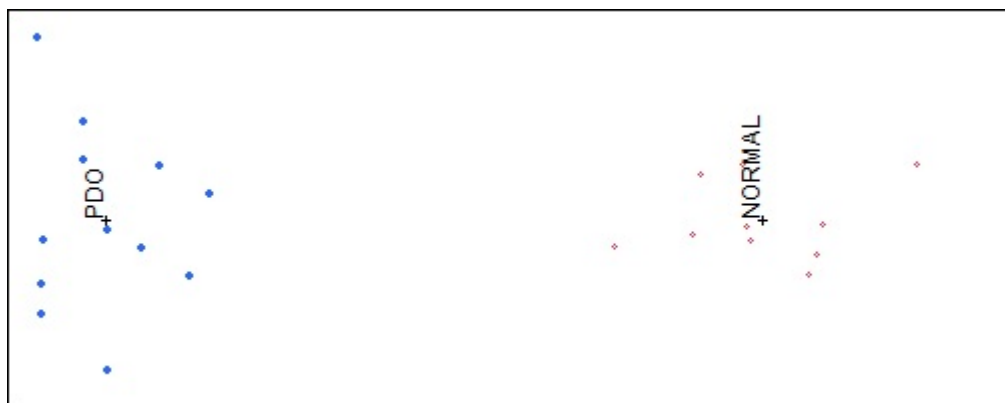
Στον πίνακα ταξινόμησης (classification table) φάνηκε πως με τη χρήση αυτών των διακριτικών συναρτήσεων για την κατάταξη των δειγμάτων, το 100% ταξινομήθηκαν σωστά, δηλαδή π.χ. ένα δείγμα που με την εφαρμογή της μεθόδου αξιολογήθηκε και

ταξινομήθηκε ως προερχόμενο από την Μακεδονία ήταν αληθώς προερχόμενο από τη Μακεδονία.

Παρατηρείται σαφής διαχωρισμός των δειγμάτων από τη Θεσσαλία, την Πελοπόννησο, την Κ. Ελλάδα και το Ν. Αιγαίο, αλλά υπάρχει εκτεταμένη αλληλεπικάλυψη μεταξύ των δειγμάτων από Κρήτη, Μακεδονία και Β. Αιγαίο. Οι ουσίες που συνέβαλαν περισσότερο στο διαχωρισμό βάσει των δύο πρώτων διαχωριστικών συναρτήσεων είναι τα οξέα εξανικό, οκτανικό, 3-μεθυλβουτανικό και 9-δεκενικό, οι εστέρες εξανικός αιθυλεστέρας, επτανικός αιθυλεστέρας, δεκανικός αιθυλεστέρας και 9-δεκενικός αιθυλεστέρας και οι αλκοόλες 2-βουτυλ-1-οκτανόλη, 2-αιθυλ-1-εξανόλη και 1-δωδεκανόλη.

δ. Διάκριση μεταξύ των Π.Ο.Π και συμβατικών δειγμάτων από το γεωγραφικό διαμέρισμα της Κρήτης

Εφαρμόστηκε διαχωριστική ανάλυση με μεταβλητή ταξινόμησης (classification variable) με βάση το αν τα δείγματα που προέρχονται από το γεωγραφικό διαμέρισμα της Κρήτης έφεραν το χαρακτηρισμό Π.Ο.Π ή όχι. Η ταξινόμηση των δειγμάτων ήταν 100% σωστή. Από τις δύο πρώτες διακριτικές συναρτήσεις προέκυψε το Διάγραμμα 4



Διάγραμμα 4: Γράφημα των 2 πρώτων διαχωριστικών συναρτήσεων με βάση το χαρακτηρισμό ή όχι των δειγμάτων από την Κρήτη ως Π.Ο.Π.

Το συγκεκριμένο πρόγραμμα δεν δίνει δεδομένα για τους συντελεστές των διακριτικών συναρτήσεων και άρα για τις ουσίες που συμβάλλουν στο διαχωρισμό, αλλά φαίνεται πως τα δείγματα που φέρουν τη σήμανση Π.Ο.Π διαχωρίζονται σαφώς από τα συμβατικά.

Δ. Συμπεράσματα

Παρόλη την ετερογένεια που εμφάνιζαν μεταξύ τους τα δείγματα, η στατιστική ανάλυση έδειξε πως ήταν δυνατό να γίνει διαχωρισμός αυτών με βάση τη διάρκεια ωρίμανσης, το είδος γάλακτος και μερικώς και με βάση το γεωγραφικό διαμέρισμα προέλευσης, ανεξάρτητα από το πώς αλληλοεπηρεάζονται οι επιμέρους μεταβλητές.

Οι ουσίες που φάνηκε να συντελούν περισσότερο στο να γίνει ο διαχωρισμός ήταν τα ελεύθερα λιπαρά οξέα μεσαίου μοριακού βάρους (C_6-C_{12}) με άρτιο αριθμό ατόμων C και οι αιθυλεστέρες, ουσίες που έχουν αυξημένη συγκέντρωση στα πρόβεια και κατσικίσια τυριά, λόγω της αυξημένης εν σχέσει με το αγελαδινό λιποπεριεκτικότητας των αντίστοιχων γαλάτων και που συμβάλλουν ιδιαίτερα στη γεύση και το άρωμά τους. Το γεγονός ότι παρατηρήθηκαν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ελευθέρων λιπαρών οξέων σε αγελαδινά τυριά από τα αντίστοιχα πρόβεια και κατσικίσια ή μίγματα αυτών, ακόμα και παραπλήσιας διάρκειας ωρίμανσης, υποδεικνύει τη σημασία που κατέχει η τεχνολογία παρασκευής των τυριών στην εξέλιξη των βιοχημικών διεργασιών που εμπλέκονται με την ωρίμανση.

Πράγματι, τα δείγματα λήφθηκαν από την αγορά και όπως γίνεται κατανοητό δεν ήταν δυνατό να έχουν απόλυτη ομοιογένεια ως προς τη διάρκεια ωρίμανσης, γεγονός που θα διευκόλυνε την ερμηνεία των αποτελεσμάτων και τη σύγκριση επιμέρους ομοιογενών ως προς το είδος γάλακτος και την περιοχή προέλευσης. Ως εκ τούτου δεν ήταν δυνατό να υπάρξει πρόσβαση σε δεδομένα όπως οι επιμέρους τεχνολογικές παράμετροι της τυροκόμησης, το είδος και η ποσότητα της πυτιάς, το είδος και η ποσότητα της καλλιέργειας, η ποσότητα του αλατιού κ.τ.λ..

Επίσης, δεν υπήρχαν δεδομένα για τη φυλή των ζώων από τα οποία προερχόταν το γάλα της τυροκόμησης, για το σύστημα εκτροφής (εκτατικό-εντατικό) που εφαρμόστηκε στα ζώα αυτά, καθώς και για το είδος του σιτηρεσίου που λάμβαναν, παράμετροι μεγάλης σημασίας τόσο για την απόδοση του προς τυροκόμηση γάλακτος σε τελικό προϊόν όσο και για τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος αυτού. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί πως για την περίπτωση της γραβιέρας, και συγκεκριμένα της Π.Ο.Π γραβιέρας Νάξου και Κρήτης, η νομοθεσία οριοθετεί τόσο τις φυλές των ζώων (αυτόχθονες ή προσαρμοσμένες στην περιοχή) και τις περιοχές από τις οποίες πρέπει να προέρχεται το προς τυροκόμηση γάλα και ορίζει πως η διατροφή των ζώων πρέπει να βασίζεται στη χλωρίδα της περιοχής αυτής. Εντούτοις, δεν γίνεται καμία αναφορά για την επιτρεπόμενη ποσότητα, διάρκεια χορήγησης και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του συμπληρωματικού σιτηρεσίου που πιθανό να χορηγείται σε ζώα που εκτρέφονται κατά το ημιεντατικό-ημιεκτατικό σύστημα, όπως γίνεται στην περίπτωση του τυριού Κοπανιστή, που ορίζεται ότι οι παραγωγοί γάλακτος που θα χρησιμοποιηθεί για την τυροκόμηση οφείλουν να διατηρούν αρχείο για τις εισαγόμενες από μέρη εκτός της περιοχής προέλευσης (Κυκλάδες) ζωοτροφές, το οποίο θα περιλαμβάνει στοιχεία για τους προμηθευτές, τις εισερχόμενες ποσότητες στην κτηνοτροφική εκμετάλλευση, την ημερήσια κατανάλωσή τους ανά ζώο και την προέλευσή τους.

Το γεγονός ότι δεν ανευρέθηκαν τερπένια σε δείγματα από Π.Ο.Π. γραβιέρες της Κρήτης, τα οποία αποτελούν ύψιστης σημασίας βιοδείκτη για την γεωγραφική πρέλευση ενός προϊόντος, καθώς αντανάκλουν το προφίλ της καταναλωθείσας βοσκήσιμης ύλης, χαρακτηριστικής για κάθε περιοχή, μπορεί να αποδοθεί αφενός στο γεγονός ότι η ίνα δειγματοληψίας που χρησιμοποιήθηκε δεν είναι και η πλέον κατάλληλη για την απομόνωση των ουσιών αυτών και αφ' ετέρου στο ότι η διατροφή των ζώων από τα αντίστοιχα τυριά μπορεί να μη βασίστηκε στη χλωρίδα της περιοχής σε ποσοστό που να δικαιολογούσε την παρουσία τους. Από την άλλη, φαίνεται ότι τα δείγματα που έφεραν το χαρακτηρισμό Π.Ο.Π διαχωρίστηκαν σαφώς από τα συμβατικά, γεγονός που υποδεικνύει ότι οι παράμετροι που ορίζονται από τη νομοθεσία για την γραβιέρα της Κρήτης ως Π.Ο.Π είναι όντως πιθανό να συμβάλλουν στη διαφοροποίηση του προϊόντος.

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη αποτέλεσε μια προσπάθεια συσχέτισης του προφίλ των πτητικών αρωματικών ουσιών με την εντοπιότητα της γραβιέρας (γι' αυτό άλλωστε επιλέχθηκαν δείγματα και από περιοχές που τα προϊόντα δεν ορίζονται ως Π.Ο.Π.). Φάνηκε πως τα μεσαίας αλύσου ελεύθερα λιπαρά οξέα και οι αιθυλεστέρες είναι δυνατό να αποτελέσουν δείκτες αυθεντικότητας τόσο σε σχέση με την προέλευση της γραβιέρας όσο και με το είδος γάλακτος. Εντούτοις, θα πρέπει να διεξαχθούν περαιτέρω μελέτες όπου θα διερευνώνται επιπλέον παραμέτροι όπως το προφίλ των λιπαρών οξέων, η ύπαρξη και το προφίλ βιοδεικτών (ισότοπα, καρροτενοειδή, φαινολικές ενώσεις, τερπένια) (Mitelut *et al.*, 2010) και η ύπαρξη και το προφίλ σπάνιων γαιών (Drivelos and Georgiou, 2012).

Βιβλιογραφία

- Abilleira E, de Renobales M, Nájera AI, Virto M, de Gordo JCR, Pérez-Elortondo FJ, 2010. An accurate quantitative method for the analysis of terpenes in milk fat by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry* 120(4): 1162-1169.
- Abilleira E, Virto M, Nájera AI, Salmerón J, Albisu M, Pérez-Elortondo FJ, Ruiz de Gordo JC, de Renobales M, Barron LJ, 2010. Effects of seasonal changes in feeding management under part-time grazing on the evolution of the composition and coagulation properties of raw milk from ewes. *Journal of Dairy Science* 93: 3902-3909.
- Acamovic T and Brooker JD, 2005. Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. *Proceedings of the Nutrition Society* 63: 403-412.
- Adda J, Gripon JC, Vassal L, 1982. The chemistry of flavour and texture generation in cheese. *Food Chemistry* 9: 115-129.
- Amarita F, De La Plaza M, Fernandez de Palencia P, Requena T, Pelaez C, 2006. Cooperation between wild lactococcal strains for cheese aroma formation. *Food Chemistry* 94(2): 240-246.
- Antinone MJ, Lawless HT, Ledford RA, Johnston M, 1994. Diacetyl as a flavor component in full-fat Cottage cheese. *Journal of Food Science* 59: 38-42.
- Arfi K, Spinnler H-E, Tache R, Bonnarme P, 2002. Production of volatile compounds by cheese-ripening yeasts: requirement for a methanethiol donor for S-methyl thioacetate synthesis by *Kluyveromyces lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58: 503-510.
- Arora G, Cormier E, Lee B, 1995. Analysis of odouractive volatiles in Cheddar cheese headspace by multidimensional GC/MS/sniffing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 748-752.
- Aston JW and Dulley JR, 1982. Cheddar cheese flavour. *Australian Journal of Dairy Technology* 37: 59-64.
- Attaie R and Richter RL, 1996. Formation of Volatile Free Fatty Acids During Ripening of Cheddar-like Hard Goat Cheese. *Journal of Dairy Science* 79: 717-724.
- Baankreis R and Exterkate EA, 1991. Characterization of a peptidase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* HP that hydrolyses di- and tripeptides containing proline or hydrophobic residues as the aminoterminal amino acid. *Systematic and Applied Microbiology* 14: 317-323.
- Bacon CL, Jennings PV, Ni Fhaolain I, O'Cuinn G, 1994. Purification and characterization of an aminopeptidase A from cytoplasm of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM2. *International Dairy Journal* 4: 503-519

Balasubramanian S and Panigrahi S, 2011. Solid-phase microextraction (SPME) techniques for quality characterization of food products: a review. *Food and Bioprocess Technology* 4(1): 1-26.

Banks JM, Muir DD, Williams AG, 1998. Manipulation of the NSLAB population in Cheddar cheese: effect on sensory character. *Australian Journal of Dairy Technology* 53: 126.

Barbieri G, Bolzoni L, Careri M, Mangia A, Parolari G, Spagnoli S, 1994. Study of the volatile fraction of parmesan cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42: 1170–1176.

Bastian ED and Brown RJ, 1996. Plasmin in milk and dairy products. *International Dairy Journal*. 6: 435-457.

Battistotti B and Corradini C, 2004. Italian cheese, in, *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 2, 2nd edn, Fox, P.E, ed., Chapman & Hall, London. pp. 221-243.

Behnke U, 1980. Biogenesis of cheese aroma. *Nahrung* 24: 71–83.

Belitz HD and Grosch W, 1986. *Food chemistry*. Pages 257–303 in *Aroma Substances*. Translation from German. D. Hadziyev, ed. Springer-Verlag, New York, NY.

Belitz H-D and Grosch W, 1987. *Food Chemistry* Springer- Verlag, Heidelberg.

Bellesia F, Pinetti A, Pagnoni UM, Rinaldi R, Zucchi C, Caglioti L, Palyi G, 2003. Volatile components of Grana Parmigiano- Reggiano type hard cheese. *Food Chemistry* 83: 55-61.

Bhownik T and Marth EH, 1990. Esterases of *Micrococcus* and *Pediococcus* species in cheese ripening: a review. *Journal of Dairy Science* 73: 879–886.

Bintsis T and Robinson RK, 2004. A study of the effects of adjunct cultures on the aroma compounds of Feta-type cheese. *Food Chemistry* 88: 435-441.

Blanc B, Laloi P, Atlan D, Gilbert C, Portalier R, 1993. Two cell-wall associated aminopeptidases from *Lactobacillus helveticus* and the purification and characterization of APII from strain ITGL1. *Journal of General Microbiology* 139:1441-1448.

Bosset JO., Butikofer U, Gauch R, Sieber R, 1994. [Occurrence of terpenes and aliphatic hydrocarbons in Swiss Gruyere and Etivaz alpine cheeses using dynamic headspace GCMS analysis of their volatile flavour compounds]. *Schweizerische Milchwirtschaftliche Forschung* 23: 37–41 (In French).

Boudjellab N, Rolet-Repecaud O, Collin J-C, 1994. Detection of residual chymosin in cheese by an enzymelinked immunosorbent assay. *Journal of Dairy Research*. 61: 101-109.

Bunkova, L, Bunka F, Mantlova G, Cablova A, Sedlacek I, Svec P, 2010. The effect of ripening and storage conditions on the distribution of tyramine, putrescine and cadaverine in Edam-cheese. *Food Microbiology* 27: 880-888.

Callement G, Bouchet M, Langlois D, Etievant P, Salles C, 2001. Odor intensity measurements in gas chromatography-olfactometry using cross modality matching: evaluation of training effects, in, *Gas Chromatography- Olfactometry. The State of the Art*, J.V. Leland P, Schieberle A, Buettner TE, Acree eds, American Chemical Society, Washington, DC. pp. 172-186.

Carbonell M, Nunez M, Fernandez-Garcia E, 2002. Evolution of the volatile components of ewe raw milk La Serena cheese during ripening. Correlation with flavour characteristics. *Lait* 82:683- 698.

Carles C and Ribadeau-Dumas B, 1984. Kinetics of action of chymosin (rennin) on some peptide bonds of bovine β -casein. *Biochemistry* 23: 6839-6843.

Carles C and Ribadeau-Dumas B, 1985. Kinetics of the action of chymosin (rennin) on a peptide bond of bovine C α -sl-casein: comparison of the behaviour of this substrate with that of β -caseins and κ -caseins. *FEBS Lett.* 185, 282-286.

Carpino S, Mallia S, La Terra S, Melilli C, Licitra G, Acree TE, Barbano DM, Van Soest PJ, 2004. Composition and Aroma Compounds of Ragusano Cheese: Native Pasture and Total Mixed Rations. *Journal of Dairy Science* 87: 816–830.

Castillo I, Calvo M, Alonso L, Juárez M, Fontecha J, 2007. Changes in lipolysis and volatile fraction of a goat cheese manufactured employing a hygienized rennet paste and a defined strain starter. *Food Chemistry* 100: 590–598.

Cerning J, Gripon J, Lamberet G, Lenoir J, 1987. Les activites biochimiques des *Penicillium* utilises en fromagerie. *Lait* 67: 3-39.

Chalier P and Crouzet J, 1992. Production of lactones by *Penicillium roqueforti*. *Biotechnology Letters* 14: 275-280.

Chalier P and Crouzet J, 1993. Production of volatile components by *Penicillium roqueforti* cultivated in the presence of soya bean oil. *Flavour and Fragrance Journal* 8: 43-49.

Chich JE, Marchesseau K, Gripon JC, 1997. Intracellular esterase from *Lactococcus lactis subsp, lactis* NCDO 763: purification and characterization. *Internationaional Dairy Journal* 7: 169-174.

Christensen JE, Dudley EG, Pederson JA, Steele JL, 1999. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 76: 217-246.

Christie WW, 1983. *The composition and structure of milk lipids*, in, *Developments in Dairy Chemistry-2: Lipids*, Fox, P.E, ed., Applied Science Publishers, London. pp. 1-35.

Chrzanowska J, Kolaczowska M, Dryjanski M, Stachowiak D, Polanowski A, 1995. Aspartic proteinase from *Penicillium camemberti*: purification, properties and substrate specificity. *Enzyme Microbiology and Technology* 17: 719-724.

Coda R, Brechany E, De Angelis M, De Candia S, Di Cagno R, Gobbetti M, 2006. Comparison of the compositional, microbiological, biochemical, and volatile profile characteristics of nine Italian ewes' milk cheeses. *Journal of Dairy Science* 89: 4126-4143.

Cogan TM, Hill C, 2004. *Cheese starter cultures*, in: Fox PF (Ed.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Chapman & Hall, London, 2nd ed. pp 193–255.

Collins YE, McSweeney PLH, Wilkinson MG, 2003. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal* 13: 841-866.

Considine T, Geary S, Kelly AL, McSweeney PLH, 2002. Proteolytic specificity of cathepsin G on bovine α s1- and β -caseins. *Food Chemistry* 76: 59-67.

Considine T, Healy A, Kelly AL, McSweeney PLH, 1999. Proteolytic specificity of elastase on bovine β -casein. *Food Chemistry* 66: 463-470.

Considine T, Healy A, Kelly AL, McSweeney PLH, 2000. Proteolytic specificity of elastase on bovine α s1-casein. *Food Chemistry* 69: 19-26.

Cousins CM, Sharpe ME, Law BA, 1977. the bacteriological quality of milk for Cheddar cheesemaking. *Dairy Industries International* 42: 12-17.

Creamer LK, Lawrence RC, Gilles J, 1985. Effect of acidification of cheese milk on the resultant Cheddar cheese. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* 20: 185-203.

Crow VL, 1990. Properties of the 2,3-butanediol dehydrogenase from *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* in relation to citrate fermentation. *Applied Environmental Microbiology* 56: 1656.

Cunningham DE and O'Connor B, 1997. Proline specific peptidases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1343: 160-186.

Curioni PMG and Bosset JO, 2002. Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. *International Dairy Journal* 12: 959-984.

de Jong L, 1976. Protein breakdown in soft cheese and its relation to consistency. 1. Proteolysis and consistency of 'Noordhollandse Meshanger' cheese. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 30: 242-253.

Deckelbaum RJ, Hamilton JA, Moser A, Bengtsson- Olivecrona G, Butbul E, Carpentier YA, Gutman A, Olivecrona T, 1990. Medium-chain versus long chain

triacylglycerol emulsion hydrolysis by lipoprotein lipase and hepatic lipase: implications for the mechanisms of lipase action. *Biochemistry* 29: 1136-1142.

Deeth HC and Fitz-Gerald CH, 1983. *Lipolytic enzymes and hydrolytic rancidity in milk and milk products*, in, *Developments in Dairy Chemistry-2: Lipids*, 2nd edn, Fox, P.E ed., Applied Science Publishers, London. pp. 195-240.

Deeth HC and Touch V, 2000. Methods for detecting lipase activity in milk and milk products. *Australian Journal of Dairy Technology* 55: 153-168.

Delahunty CM and Drake MA, 2004. *Sensory character of cheese and its evaluation*, in: Fox PF (Ed.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Chapman & Hall, London, 2nd ed. pp 455-487.

Di Cagno R, Banks E, Sheehan L, Fox P, Brechany E, Corsetti A, 2003. Comparison of the microbiological, compositional, biochemical, volatile profile and sensory characteristics of three Italian PDO ewes' milk cheeses. *International Dairy Journal* 13: 961-972.

Dimos A, Urbach GE, Miller AJ, 1996. Changes in flavour and volatiles of full-fat and reduced-fat Cheddar cheeses during maturation. *International Dairy Journal* 6: 981-995.

Dirinck P and De Winne A, 1999. Flavor characterisation of cheeses by gas chromatographic-mass spectrometric profiling. *Journal of Chromatography A* 847: 203-208.

Doi H, Kawaguchi N, Ibuki E, Kanamori M, 1979. Susceptibility of κ -casein components to various proteases. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 25: 33-41.

Driessen EM, 1989. *Inactivation of lipases and proteinases (indigenous and bacterial)*, in, *Heat-induced Changes in Milk*, Bulletin 238, International Dairy Federation, Brussels. pp. 71-93.

Drivelos S and Georgiou C, 2012. Multi-element and multi-isotope-ratio analysis to determine the geographical origin of foods in the European Union. *Trends in Analytical Chemistry* 40: 38-51.

Dufosse L, Latrasse A, Spinnler HE, 1994. Importance des lactones dans les arômes alimentaires: structures distribution, propriétés sensorielles et biosynthèse. *Sciences des Aliments* 14: 17-50.

Dumont JP and Adda J, 1972. Isolement des constituants de l'arôme des fromages: comparaison des méthodes. *Lait* 52: 311-323.

Dunn HC and Lindsay RC, 1985. Evaluation of the role of microbial Strecker-derived aroma compounds in unclean type flavors in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science* 68: 2859-2874.

Dupuis C, 1994. Activites Proteolytiques et Lipolytiques des Bacteries Propioniques Laitieres. Thesis, ENSA, Rennes.

EFSA, 2011. European Food Safety Authority e Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal* 9: 2393.

Eliskases-Lechner E and Ginzinger W, 1995. The bacterial flora of surface-ripened cheeses with special regard to coryneforms. *Lait* 75: 571-584.

Endrizzi I, Fabris A, Biasioli F, Aprea E, Franciosi E, Poznanski E, Cavazza A, Gasperi F, 2012. The effect of milk collection and storage conditions on the final quality of Trentingrana cheese: Sensory and instrumental evaluation. *International Dairy Journal* 23: 105-114.

Engel E, Nicklaus S, Septier C, Salles C, Le Quere JL, 2000. Taste active compounds in a goat cheese watersoluble extract. 2. Determination of the relative impact of water-soluble extract components on its taste using omission tests. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 4260-4267.

Engels WJM Visser S, 1994. Isolation and comparative characterization of compounds that contribute to the flavour of different cheese types. *Neterlands. Milk and Dairy Journl* 48: 127-140.

Engels WJM., Dekker R, de Jong C, Neeter R, Visser S, 1997. A comparative study of volatile compounds in the water-soluble fraction of various types of ripened cheese. *International Dairy Journal* 7: 255-263.

Eriksen S, 1976. Flavours of milk arid milk products. I. The role of lactones. *Milchwissenschaft* 31: 549-550.

Etievant PX and Langlois D, 1998. EAmelioration de la representativite olfactive des extraits aromatiques dans la recherche des composees clefs de l'arome des aliments. *Proc. 17 emes Journees Internationales Huiles Essentielles et Extraits*, Digne les Bains, France. pp. 268-278.

Farajzadeh MA, Djozan D, Nouri N, Bamorowat, M, Shalamzari MS, 2010. Coupling stir bar sorptive extraction-dispersive liquid-liquid microextraction for preconcentration of triazole pesticides from aqueous samples followed by GC-FID and GC-MS determinations. *Journal of Separation Science* 33(12): 1816-1828.

Farkye NY and Fox PE, 1990. Observations on plasmin activity in cheese. *Journal of Dairy Research* 57: 412-418.

Fenster KM, Parkin KL, Steele J, 1997. Characterization of a thiol-dependent endopeptidase from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *Journal of Bacteriology* 179: 2529-2533.

Fernandez GCJ, 2002. *Discriminant Analysis: A powerful Classification Techique in Data Mining*, SUGI 27, Statistics and Data analysis, paper 247.

Fox PE and McSweeney PLH, 1996. Proteolysis in cheese during ripening. *Food Reviews. International* 12: 457-509.

Fox PE and Stepaniak L, 1993. Enzymes in cheese technology. *International Dairy Journal* 3: 509-530.

Fox PE, 2003. *Exogenous enzymes in dairy technology*, in, *Handbook of Food Enzymology*, Whitaker, J.R., Voragen, A.G.J. and Wong, D.W.S., eds., Marcel Dekker, New York. pp. 279-301.

Fox PE, Law J, McSweeney PLH, Wallace J, 2004. *Biochemistry of cheese ripening*, in, *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol. 1*, 2nd edn, Fox, P.E, ed., Chapman & Hall, London. pp. 389-438.

Fox PE, Singh TK, McSweeney, PLH, 1994. Proteolysis in cheese during ripening, in, *Biochemistry of Milk Products*, Andrews, A.T. and Varley, J., eds., Royal Society of Chemistry, Cambridge. pp. 1-31.

Fox PF and Wallace JM, 1997. Formation of flavour compounds in cheese. *Advances in Applied Microbiology* 45: 17-85.

Fox PF, Guinee TP, Cogan TM, McSweeney PLH, 2000. *Fundamentals of cheese science*. Aspen Publishers, Gaithersburg, MD.

Fox RE and McSweeney PLH, 1997. Rennets: their role in milk coagulation and cheese ripening, in, *Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*, 2nd edn, Law, B.A., ed., Chapman & Hall, London. pp. 1-49.

Fox RE, Singh TK, and McSweeney PLH, 1995. *Biogenesis of flavour compounds in cheese*, in, *Chemistry of Structure/Function Relationships in Cheese*, Malin EL and Tunick MH, eds, Plenum Publishing Corporation, New York. pp. 59-98.

Frank DC, Owen CM, Patterson J, 2004. Solid phase microextraction (SPME) combined with gas-chromatography and olfactometry- mass spectrometry for characterization of cheese aroma compounds. *Lebenson. Wissenschaft und Technologie* 37: 139-154.

Freitas AC, Pintado AE, Pintado ME, Malcata EX, 1999. Role of dominant microflora of Picante cheese on proteolysis and lipolysis. *International Dairy Journal* 9: 593-603.

Gagnaire V, Molle D, Sorhaug T, Leonil J, 1999. Peptidases of dairy propionic acid bacteria. *Lait* 79: 43-57.

Gallois A and Langlois D, 1990. New results in the volatile odorous compounds of French cheese. *Lait* 70: 89-106.

Gao S, Mooberry ES, Steele JL, 1998. Use of ¹³C nuclear magnetic resonance and gas chromatography to examine methionine catabolism by lactococci. *Applied Environmental Microbiology* 64: 4670-4675.

Gloria MBA, 2005. Bioactive amines. In Hui & LL Nollet (Eds.), *Handbook of food science, technology and engineering*. In & Marcel Dekker (Eds.) (Vol. 4, pp. 1-38).

Gmór W, Bosset JO, Plattner E, 1987. Beitrag zur direkten Kopplung Fluidextraktion-Kapillarfluidchromatographie, III. Experimentelle Optimierung des Druck- und Temperaturprogramms in der Fluidchromatographie im Hinblick auf die Analyse von Milchprodukten. *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene* 78: 21-35.

Gonzalez de Llano D, Ramos M, Polo C, 1990. Evolution of the volatile components of artisanal Blue cheese during ripening. *Journal of Dairy Science* 73: 1676-1683.

Gonzalez-Mendoza LA and Diaz-Rodriguez F, 1993. Sensory analysis using sniffing, for determination of the aroma of Flor de Guia cheese. *Alimentacion Equipos y Tecnologia*, 12(6): 45-49.

Goux WJ, Strong AAD, Schneider BL, Lee WND, Reitzer LJ, 1995. Utilization of aspartate as a nitrogen source in *Escherichia coll*. *Journal of Biological Chemistry* 270: 638-646.

Green ML and Foster RDM, 1974. Comparison of the rates of proteolysis during ripening of Cheddar cheeses made with calf rennet and swine pepsin as coagulants. *Journal of Dairy Research* 41: 269-282.

Gripón JC, 2004. *Mould-ripened cheeses in Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology Vol.2, Major Cheese Groups*, 2nd edition, PF Fox, ed, Chapman and Hall, London. pp. 111-136.

Günther CS, Matich AJ, Marsh KB, Nicolau L, 2011. Development of a quantitative method for headspace analysis of methylsulfanyl-volatiles from kiwifruit tissue. *Food Research International* 44(5): 1331-1338.

Ha JK and Lindsay RC, 1991. Volatile branched-chain fatty acids and phenolic compounds in aged Italian cheese flavors. *Journal of Food Science* 56: 1241-1247.

Hamosh M, 1990. *Lingual and Gastric Lipases: Their Role in Fat Digestion*, CRC Press, Boca Raton, FL.

Heaven MW and Nash D, 2012. Recent analyses using solid phase microextraction in industries related to food made into or from liquids. *Food Control* 27: 214-227.

Hemme D, Bouillane C, Metro E, Desmazeaud MJ, 1982. Microbial catabolism of amino acids during cheese ripening. *Sciences des Aliments* 2: 113-123.

Hill RD, Lahav E, Givol D, 1974. A rennin-sensitive bond in %1 β -casein. *Journal of Dairy Research* 41: 147-153.

Holland R, 2004. Esterases of lactic acid bacteria and cheese flavour. IDF symposium on cheese: ripening, characterization & technology, Prague, Czech Republic, March 21–25, p. 24.

Holland R, Liu S-Q, Crow VL, Delabre M-L, Lubbers M, Bennett M, Norris G, 2005. Esterases of lactic acid bacteria and cheese flavour: Milk fat hydrolysis, alcoholysis and esterification. *International Dairy Journal* 6-9: 711- 718.

Holmes DG, Duersch JN, Ernstrom CA, 1977. Distribution of milk clotting enzymes between curd and whey and their survival during Cheddar cheesemaking. *Journal of Dairy Science* 60: 862-869.

Innocente N, Marchesini G, Biasutti M, 2011. Feasibility of the SPME method for the determination of the aroma retention capacity of proteose-peptone milk protein fraction at different pH values. *Food Chemistry*, 124(3): 1249-1257.

Irnhof R and Bosset JO, 1991. Comparison of two systems for sample preparation and injection by dynamic headspace GC analysis. *Journal of High Resolution Chromatography* 14: 621-625.

Izco J and Torre P, 2000. Characterisation of volatile flavour compounds in Roncal cheese extracted by the purge and trap method and analysed by GC-MS. *Food Chemistry* 70: 409-417.

Johnson AR and Wichern WD, 1998. *Applied Multivariate Statistical Analysis*. Fifth edition, Prentice Hall, New Jersey.

Juillard V, Le Bars D, Kunji ERS, Konings WN, Gripon J-C, Richard J, 1995. Oligopeptides are the main source of nitrogen for *Lactococcus lactis* during growth in milk. *Applied Environmental Microbiology* 61: 3024-3030.

Kaneoke M, Shiota K, Kusunose M, Shimizu E, Yorifuji T, 1993. Function of the arginine oxygenase pathway in utilization of L-arginine-related compounds in *Arthrobacter globiformis* and *Brevibacterium helvolum*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 57: 814-820.

Karl V, Gutser J, Dietrich A, Maas B, Mosandl A, 1994. Stereoisomeric flavour compounds. LXVIII. 2-, 3-, and 4-alkylbranched acids, Part 2: Chiro-specific analysis and sensory evaluation. *Chirality* 6: 427-434.

Kinsella JE and Hwang DH, 1976. Biosynthesis of flavors by *Penicillium roqueforti*. *Biotechnology and Bioengineering* 18: 927-938.

Klein JR, Schick J, Henrich B, Plapp R, 1997. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* DSM7290 *pepG* encodes a novel cysteine aminopeptidase. *Microbiology* 143: 527-537.

Kleter G, Lammers WL, Vos EA, 1984. The influence of pH and concentration of lactic acid and NaCl on the growth of *Clostridium tyrobutyricum* in whey and cheese. 2. Experiments in Cheese. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 38: 31-41.

Knaut T and Mazurek T, 1974. Caracteres lipolytiques des bacteries propioniques. *Proceedings of XIX International Dairy Congregation (Sydney)* B6,425-426.

Kolb B and Ettre L, 2006. Static Headspace-Gas Chromatography: Theory and Practice, 2nd Edition. Wiley.

Kondyli E, Katsiari MC, Masouras T, Voutsinas LP, 2002. Free fatty acids and volatile compounds of low fat Feta-type cheese made with a commercial adjunct culture. *Food Chemistry* 79:199- 205.

Kubickova J and Grosch W, 1997. Evaluation of potent odorants of Camembert cheese by dilution and concentration techniques. *International Dairy Journal* 7: 65-70.

Kunji ERS, Mierau I, Hagting A, Poolman B, Konings, WN, 1996. The proteolytic system of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70: 187-221.

Ladero V, Calles-Enriquez M, Fernandez M, Álvarez MA, 2010a. Toxicological effects of dietary biogenic amines. *Current Nutrition and Food Science* 6: 145-156.

Lamberet G, Auberger B, Bergere JL, 1997. Aptitude of cheese bacteria for volatile S-methyl thioester synthesis II. Comparison of coryneform bacteria, *Micrococcaceae* and some lactic acid bacteria starters. *Applied Microbiology and Biotechnology* 48: 393-397.

Lamberet G, Auberger B, Canteri C, Lenoir J, 1982. Eaptitude de *Penicillium caseicolum* a la degradation oxydative des acides gras. *Revue Lait Francaise* 406: 13-19.

Larrayoz P, Addis M, Gauch R, Bosset J, 2001. Comparison of dynamic headspace and simultaneous distillation extraction techniques used for the analysis of the volatile components in three European PDO ewes' milk cheeses. *International Dairy Journal* 11: 911-926.

Larsen LB, Benfeldt C, Rasmussen LK, Petersen TE, 1996. Bovine milk procathepsin D and cathepsin D: coagulation and milk protein degradation. *Journal of Dairy Research* 63: 119-130.

Law BA and Mulholland E, 1995. Enzymology of lactococci in relation to flavour development from milk proteins. *International Dairy Journal* 5: 833-854.

Law J and Haandrikman A, 1997. Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* 7: 1-11.

Lawlor JB, Delahunty CM, Wilkinson MG, Sheehan JJ, 2002. Relationships between the gross, non-volatile and volatile compositions and the sensory attributes of eight hard-type cheeses. *International Dairy Journal* 12: 493-509.

le Bars D and Gripon JC, 1981. Role of *Penicillium roqueforti* proteinases during Blue cheese ripening. *Journal of Dairy Research* 48: 479-487.

le Bars D and Gripon JC, 1989. Specificity of plasmin by bovine plasmin. *Lait* 73: 337-344.

le Bars D and Gripon JC, 1993. Hydrolysis of α sl-casein by bovine plasmin. *Lait* 73: 337-344.

le Quere JL and Molimard P, 2002. Cheese: cheese flavour, in, *Encyclopedia of Dairy Sciences*, H. Roginski, J.W. Fuquay and P.E Fox, eds, Academic Press, San Diego, CA. pp. 330-340.

le Quere JL, 2000. Gas chromatography/infrared spectroscopy, in, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, R.A. Meyers, ed., John Wiley & Sons, Chichester. pp. 10777-10798.

Liu S-Q, Holland R, Crow VL, 2001. Purification and properties of intracellular esterases from *Streptococcus thermophilus*. *International Dairy Journal* 11, 27-35.

Liu S-Q, Holland R, Crow VL, 2005. Esters and their biosynthesis in fermented dairy products: a review. *International Dairy Journal* 11: 923-945.

Loizzo M, Menichini F, Picci N, Puoci F, Spizzirri U, Restuccia D, 2013. Technological aspects and analytical determination of biogenic amines in cheese. *Trends in Food Science and Technology* 30: 38-55.

Lubbers S and Butler E, 2010. Effects of texture and temperature on the kinetic of aroma release from model dairy custards. *Food Chemistry* 123(2): 345-350.

Lubke M, Le Quere JL, Barron D, 1996. Prefractionation of aroma extracts from fat-containing food by high performance size-exclusion chromatography. *Journal of Chromatography A* 729,371-379.

Maarse H and Visscher CA, 1996. *Volatile Compounds in Foods: Qualitative and Quantitative Data*, 7th edn, TNO Biotechnology and Chemistry Institute, Zeist, The Netherlands.

Magboul AAA and McSweeney PLH, 1999. Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus curvatus* DPC2024. *International Dairy Journal* 9: 107-116.

Magboul AAA, Larsen LB, McSweeney PLH, Kelly AL, 2001. Cysteine protease activity in bovine milk. *International Dairy Journal* 11: 865-872.

Maignial L, Pibarot P, Bonetti G, Chaintreau A, Marion JP, 1992. Simultaneous distillation--extraction under static vacuum: isolation of volatile compounds at room temperature. *Journal of Chromatography* 606: 87-94.

Mallia SE, Fernandez-Garcia, Bosset JO, 2005. Comparison of purge and trap and solid phase microextraction techniques for studying the volatile aroma compounds of three European PDO hard cheeses. *International Dairy Journal* 15: 741-758.

Mariaca R and Bosset JO, 1997. Instrumental analysis of volatile (flavour) compounds in milk and dairy products. *Lait* 77: 13-40.

Mariaca RG, Berger TFH, Gauch R, Imhof MI, Jeangros B, Bosset JO, 1997. Occurrence of volatile mono- and sesquiterpenoids in highland and lowland plant species as possible precursors for flavor compounds in milk and dairy products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 4423-4434.

Marilley L and Casey MG, 2004. Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *International Journal of Food Microbiology* 90: 139-159.

Martelli A, 1989. Volatiles in the flavour of Gorgonzola cheese. *Rivista della Societa Italiana di Scienze dell' Alimentazione* 18: 251-262.

McDonnell M, Fitzgerald R, Ni Fhaolain I, Jennings PV, O'Cuinn G, 1997. Purification and characterization of aminopeptidase P from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Journal of Dairy Research* 64: 399-407.

McMaster M, 2008. *GC/MS: A Practical User's Guide*, 2nd Edition. Wiley.

McSweeney PLH and Sousa MJ, 2000. Biochemical pathways for the production of flavor compounds in cheese during ripening. *Le Lait* 80: 293-324.

McSweeney PLH, Fox PE, Olson NE, 1995. Proteolysis of bovine caseins by cathepsin D: preliminary observations and comparison with chymosin. *International Dairy Journal* 5: 321-336.

McSweeney PLH, Nursten HE, Urbach G, 1997. Flavours and off-flavours in milk and dairy products, in, *Advanced Dairy Chemistry-3. Lactose, Water, Salts and Vitamins*, 2nd edn, Fox, P.E, ed., Chapman & Hall, London. pp. 403-468.

McSweeney PLH, Olson NE, Fox PE, Healy A, Hojrup P, 1993a. Proteolytic specificity of plasmin on bovine α 1-casein. *Food Biotechnology* 7: 143-158.

McSweeney PLH, Olson NE, Fox PE, Healy A, 1994a. Proteolysis of bovine α 2-casein by chymosin. *Zeitschrift fur Lebensmittel Untersuchung und Forschung* 119: 429-432.

McSweeney PLH, Olson NE, Fox PE, Healy A, Hojrup P, 1993b. Proteolytic specificity of chymosin on bovine α 1-casein. *Journal of Dairy Research* 60: 401-412.

McSweeney PLH, Pochet S, Fox PE, Healy A, 1994b. Partial identification of peptides from the water-insoluble fraction of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Research* 61: 587-590.

Meinhart E and Schreier P, 1986. Study of flavour compounds from Parmigiano Reggiano cheese. *Milchwissenschaft* 41: 689-691.

Milo C and Reineccius GA, 1997. Identification and quantification of potent odorants in regular fat and low-fat mild Cheddar cheese. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 45: 3590-3594.

Mistou M-Y and Gripon J-C, 1998. Catalytic properties of the cysteine aminopeptidase PepC, a bacterial bleomycin hydrolase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1383: 63-70.

Mitelut A, Popa M, Culetu A, Abram V, 2010. Establishing produce origin through biochemical markers identification. *Scientific Bulletin Biotechnology, U.S.A.M.V. Bucharest, Serie F, Vol. XIV, 2010, p.44 - 49*

Miyakawa H, Kobayashi S, Shimamura S, Tomita M, 1992. Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus helveticus* LHE-511. *Journal of Dairy Science* 75: 27-35.

Moinas M, Groux M, Horman I, 1975. La saveur des fromages. 3. Mise en évidence de quelques constituants mineurs de l'arôme du Camembert. *Lait* 55: 414-417.

Moio L, Dekimpe J, Etievant PX, Addeo E, 1993. Volatile flavour compounds of water buffalo Mozzarella cheese. *Italian Journal of Food Science* 5: 57-68.

Moio L. and Addeo F, 1998. Grana Padano cheese aroma. *Journal of Dairy Research* 65: 317-333.

Molimard P and Spinnler HE, 1993. Dialysis of flavour compounds: yields of extraction on model solution. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung* 197:419-423.

Molimard P and Spinnler HE, 1996. Compounds involved in the flavor of surface mould-ripened cheeses: origins and properties. *Journal of Dairy Science* 79: 169-184.

Monnet V, Nardi M, Chopin A, Chopin M-C, Gripon J-C, 1994. Biochemical and genetic characterization of PepE an oligopeptidase from *Lactococcus lactis*. *Journal of Biological Chemistry* 269: 32070-32076.

Mooney, J.S., Fox, P.E, Healy, A. and Leaver, J. (1998). Identification of the principal water-insoluble peptides in Cheddar cheese. *Int. Dairy J.* 8,813-818.

Morel E, Frot-Coutaz J, Aubel D, Portalier R, Arian D, 1999. Characterization of a prolidase from *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* CNRZ 397 with an unusual regulation of biosynthesis. *Microbiology* 145: 437-446.

Mulvihill DM and Fox RE, 1978. Proteolysis of bovine β -casein by chymosin: influence of pH, urea and sodium chloride. *Irish Journal of Food Science and Technology* 2: 135-139.

Mulvihill DM and Fox RE, 1979. Proteolytic specificity of chymosin on bovine α 1-casein. *Journal of Dairy Research* 46: 641-651.

Niven GW, Holder SA, Stroman PA, 1995. A study of the substrate specificity of aminopeptidase N from *Lactococcus lactis* subsp, *cremoris* Wg2. *Applied Microbiology and Biotechnology* 44:100-105.

Noble AC, 1996. Taste-aroma interactions. *Trends in Food Science and Technology* 7: 439-444.

O'Farrell IP, Sheehan JJ, Wilkinson MG, Harrington D, Kelly AL, 2002. Influence of addition of plasmin or mastitic milk to cheesemilk on quality of smearripened cheese. *Lait* 82: 305-316.

O'Keefe PW, Libbey LM, Lindsay RC, 1969. Lactones in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science* 52: 888.

Olivecrona T, Vilaro S, Bengtsson-Olivecrona G, 1992. *Indigenous enzymes in milk. II. Lipases in milk*, in, *Advanced Dairy Chemistry. 1. Proteins*, Fox, RE, ed., Elsevier Applied Science, London, UK. pp. 292-310.

Olivecrona T, Vilaro S, Olivecrona G, 2003. *Lipases in milk*, in, *Advanced Dairy Chemistry. 1. Proteins*, 3rd edn, Fox, P.E and McSweeney, P.L.H., eds, Kluwer/Plenum Press, New York. pp. 473-488.

Pahkala, E, Pihlanto-Leppälä, A, Laukkanen, M, Antila V, 1989. Decomposition of milk proteins during the ripening of cheese. 1. Enzymatic hydrolysis of α -casein. *Meijeritieteenl. Aikakausk.* 47: 39-47.

Pappa EC, Lianou A, Mallatou H, Georgalaki MD, Tsakalidou E, Samelis J, 2008. Chemical, microbial and sensory changes during manufacture and ripening of Graviera cheese. *Greek Journal of Dairy Science and Technology*, Special edition 2009.

Pawliszyn J, 2009. Handbook of solid phase microextraction. Beijing: Chemical Industry Press of China.

Pelissier J-P, Mercier J-C, Ribadeau-Dumas B, 1974. Etude de la proteolyse des caseines α 1- et β -bovines par la presure. *Annales De Biologie Animale, Biochimie, Biophysique* 14: 343-362.

Phelan JA, 1985. *Milk Coagulants- An Evaluation of Alternatives to Standard Calf Rennet. PhD Thesis*, National University of Ireland, Cork.

Pinho O, Peres C, Ferreira, IMPLVO, 2003. Solid-phase microextraction of volatile compounds in "Terrincho" ewe cheese. Comparison of different fibers. *Journal of Chromatography A* 1011: 1-9.

Piveteau P, 1999. Metabolism of lactate and sugars by dairy propionibacteria: a review. *Lait* 79: 74-77.

Plutowska B and Wardencki W, 2007. Aromagrams e aromatic profiles in the appreciation of food quality. *Food Chemistry* 101(2): 845-872.

Poveda JM, Sánchez-Palomo E, Pérez-Coello MS, Cabezas L, 2008. Volatile composition, olfactometry profile and sensory evaluation of semi-hard Spanish goat cheeses. *Dairy Science and Technology* 88: 355–367.

Prieto A, Basauri O, Rodil R, Usobiaga A, Fernández L A, Etxebarria N, 2010. Stir-bar sorptive extraction: a view on method optimisation, novel applications, limitations and potential solutions. *Journal of Chromatography A*, 1217(16): 2642-2666.

Ratray EP and Fox RE, 1999. Aspects of enzymology and biochemical properties of *Brevibacterium linens* relevant to cheese ripening: a review. *Journal of Dairy Science* 82: 891-909.

Reineccius G, 2002. Instrumental methods of analysis, in, *Food Flavour Technology*, AJ Taylor, ed., Sheffield Academic Press, Sheffield. pp. 210-251.

Richoux R, Faivre E, Kerjean JR, 1998. Effect of salt content of lactate fermentation by *Propionibacterium freudenreichii* in small-scale Swiss-type cheeses. *Lait* 78: 319-331.

Risticovic S, Lord H, Gorecki T, Arthur CL, Pawliszyn J, 2010. Protocol for solid-phase microextraction method development. *Nature Protocols* 5(1): 122-139.

Röck F, Barsan N, Weimar U, 2008. Electronic Nose: Current Status and Future Trends. *Chemical Reviews* 108 (2): 705–25.

Rothe M, Engst W, Erhardt V, 1982. Studies on characterization of Blue cheese flavour. *Nahrung* 26: 591-602.

Rychlik M and Bosset JO, 2001. Flavour and off-flavour compounds of Swiss Gruyere cheese. Identification of key odorants by quantitative instrumental and sensory studies. *International Dairy Journal* 11: 903–910.

Rychlik M, Warmke R, Grosch W, 1997. Ripening of Emmental cheese wrapped in foil with and without addition of *Lactobacillus casei* subsp, *casei*. 3. Analysis of character impact flavour compounds. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* 30: 471-478.

Sanz Y and Toldra E, 1997. Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus sake*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 1552-1558.

Sasaki M, Bosman BW, Tan RST, 1996. A new broad substrate specificity aminopeptidase from the dairy organism *Lactobacillus helveticus* SBT2171. *Microbiology* 142,799-808.

Shao W, Yuksel, GU, Dudley EG, Parkin KL, Steele J, 1997. Biochemical and molecular characterization of PepR, a dipeptidase, from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 3438-3443.

Sigma-Aldrich,
<http://www.sigmaaldrich.com/analyticalchromatography/sample-preparation/spme/selecting-spme-fiber.html>

Singh T, Drake M, Cadwallader K, 2003. Flavor of cheddar cheese: A chemical and sensory perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2 :139–162.

Singh TK, Fox RE, Healy A, 1997. Isolation and identification of further peptides in the diafiltration retentate of the water-soluble fraction of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Research* 64: 433-443.

Soda K, Tanaka H, Esaki N, 1983. Multifunctional biocatalysis: methionine γ -lyase. *Trends of Biochemical Science* 8: 214-217.

Sorhaug T and Ordal ZJ, 1974. Cell-bound lipase and esterase of *Brevibacterium linens*. *Applied Microbiology* 27: 607-608.

Spinnler HE and Gripon JC, 2004. Mould-ripened cheeses, in, *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology Vol.2, Surface mould-ripened cheeses*, 2nd edition, PF Fox, ed, Chapman and Hall, London. pp. 157-174.

Stashenko EE and Martínez JR, 2007. Sampling volatile compounds from natural products with headspace/solid-phase micro-extraction. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 70(2): 235-242.

Steffen C, Eberhard E, Bosset JO, Ruegg M, 2004. *Swiss-type varieties*, in, *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol. 2, Major Cheese Groups*, 2nd edn, PE Fox, ed., Chapman and Hall, London. pp 83-110.

Stepaniak L, Gobbetti M, Sorhaug T, 1998. Isolation and characterization of high molecular mass endopeptidase complex from *Lactococcus lactis*. *Milchwissenschaft* 53, 255-259.

Suriyaphan O, Drake M, Chen, XQ, Cadwallader KR, 2001. Characteristic aroma components of British farmhouse Cheddar cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 1382–1387.

Tan F, Zhao H, Li X, Quan X, Chen J, Xiang X, 2009. Preparation and evaluation of molecularly imprinted solid-phase microextraction fibers for selective extraction of bisphenol A in complex samples. *Journal of Chromatography A*, 1216(30): 5647-5654.

Tan PST, Poolman B, Konings WN, 1993. Proteolytic enzymes of *Lactococcus lactis*. *Journal of Dairy Research* 60: 269-286.

Tanaka H, Esaki N, Soda K, 1985. A versatile bacterial enzyme: k-methionine γ -lyase. *Enzyme Microbiology and Technology* 7: 530-537.

Thierry A, Maillard MB, Le Quere JL, 1999. Dynamic headspace analysis of Emmental aqueous phase as a method to quantify changes in volatile flavour compounds during ripening. *International Dairy Journal* 9: 453-463.

Thomas TD, 1987. Acetate production from lactate and citrate by non-starter bacteria in Cheddar cheese. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* 22: 25-38.

Trieu-Cuot P, Archieri-Haze M, Gripon JC, 1982. Effect of aspartyl proteinases of *Penicillium caseicolum* and *Penicillium roqueforti* on caseins. *Journal of Dairy Research* 49: 487-500.

Turner KW and Thomas TD, 1980. Lactose fermentation in Cheddar cheese and the effect of salt. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* 15: 265-276.

Upadhyay VK, McSweeney PLH, Magboul AAA, Fox PF, 2004. *Proteolysis in Cheese during Ripening* in, *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol. 2*, 2nd edn, Fox, P.E, ed., Chapman & Hall, London. pp. 391-433.

Urbach G, 1993. Relations between cheese flavour and chemical composition. *International Dairy Journal* 3: 389-422.

Urbach G, 1997. The flavour of milk and dairy products. II. Cheese: contribution of volatile compounds. *International Journal of Dairy Technology* 50: 79-89.

Valdes-Stauber N, Schere S, Saller H, 1997. Identification of yeasts and coryneform bacteria from the surface microflora of brick cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 34: 115-129.

van Ruth SM, 2001. Aroma measurement: recent developments in isolation and characterisation, in, *Physics and Chemistry Basis of Biotechnology*, M De Cuyper and JWM Bulte, eds, Kluwer Academic Publishers, Amsterdam. pp. 305-328.

Vedamuthu ER, 1994. The dairy *Leuconostoc*: use in dairy products. *Journal of Dairy Science* 77: 2725-2737.

Visser S, Hup G, Exterkate EA, Stadhouders J, 1983. Bitter flavour in cheese. 2. Model studies on the formation and degradation of bitter peptides by proteolytic enzymes from calf rennet, starter cells and starter cell fractions. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 37: 169-180.

Visser S, Slangen CJ, Ahing AC, Vreeman HJ, 1989. Specificity of bovine plasmin on its action on bovine α s₂-casein. *Milchwissenschaft* 44: 335-339.

Wang J.-X, Jiang D-Q, Gu Z-Y, Yan X-P, 2006. Multiwalled carbon nanotubes coated fibers for solid-phase microextraction of polybrominated diphenyl ethers in water and milk samples before gas chromatography with electroncapture detection. *Journal of Chromatography A*, 1137(1): 8-14.

Warmke R, Belitz HD, Grosch W, 1996. Evaluation of taste compounds of Swiss cheese (Emmentaler). *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung* 203: 230-235.

Weimer B, Seefeldt K, Dias B, 1999. Sulfur metabolism in bacteria associated with cheese. *Antonie van Leeuwenhoek* 76: 247-261.

Welch Baillargeon M, Bistline RG Jr., Sonnet PE, 1989. Evaluation of strains of *Geotrichum candidum* for lipase production and fatty acid specificity. *Applied Microbiology and Biotechnology* 30: 92-96.

Wijesundera C, Drury L, Muthuku-Marappan K, Gunasekaran S, Everett DW, 1998. Flavour development and the distribution of fat globule size and shape in Cheddar-type cheese made from skim milk homogenized with AMF or its fractions. *Australian Journal of Dairy Technology* 53: 107.

Wilkes J G, Conte ED, Kim Y, Holcomb M, Sutherland JB, Miller DW, 2000. Sample preparation for the analysis of flavors and off-flavors in foods. *Journal of Chromatography A* 880(1-2): 3-33.

Wohlrab Y and Bockelmann W, 1993. Purification and characterization of a second aminopeptidase (PepC-like) from *Lactobacillus delbrueckii* subsp, *bulgaricus* B14. *International Dairy Journal* 3: 685-701.

Wolf IV, Perotti MC, Bernal SM, Zalazar CA, 2010. Study of the chemical composition, proteolysis, lipolysis and volatile compounds profile of commercial Reggianito Argentino cheese: Characterization of Reggianito Argentino cheese. *Food Research International* 43: 1204-1211.

Wong NP, Ellis R, La Croix DE, 1975. Quantitative determination of lactones in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science* 58: 1437-1441.

Yvon M and Rijnen L, 2001. Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *Int. Dairy J.* 11: 185-201.

Ziino M, Conduro C, Romeo V, Giuffrida D, Verzera A, 2005. Characterization of “Provola dei Nebrodi”, a typical Sicilian cheese, by volatiles analysis using SPME-GC/MS. *International Dairy Journal* 15: 585–593.

Ανυφαντάκης Ε, 2004. Τυροκομία, Χημεία-Φυσικοχημεία-Μικροβιολογία. Β' έκδοση, Εκδόσεις Σταμούλη.

Ανυφαντάκης Ε, Κανδαράκης Ι, 1997. Συνθήκες παραγωγής και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της γραβιέρας Κρήτης. *Greek Journal of Dairy Science and Technology* 1: 19-46.

Ανυφαντάκης Ε., 1998. *Ελληνικά Τυριά, μια παράδοση αιώνων*. Εθνική Επιτροπή Γάλακτος Ελλάδος.

Βαρανάκη Γ και Δημητρίου Π, 2006. *Ελληνικά τυριά Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης*. Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, διεύθυνση Βιολογικής Γεωργίας, τμήμα ΠΟΠ-ΠΓΕ-ΕΠΠΕ.

Βεϊνόγλου Β, England S, Καλαντζόπουλος ΓΚ, 1968. *Δελτίο Αγορανομικής Τράπεζας* 159.

Δημητριάδης Ρ, 1900. *Ελληνική Κτηνοτροφία*, σελ. 273. Εκδόσεις Κοσδώνη

Ζερφυρίδης ΓΚ, Βαφοπούλου Α, Λιτοπούλου Ε, 1984. *Journal of Dairy Science* 67: 1937.

Ζυγούρης Ν, 1926. *Τυρί Αγράφων ή Γραβιέρα*. Ελληνική Γεωργική Εταιρία.

Ζυγούρης Ν, 1952. *Η Βιομηχανία Γάλακτος*, σελ 462. Υπουργείο Γεωργίας.

Μπίντσης Θ, Παπαδήμας Φ, Εκδόσεις Ψύχαλου, 2009. *Τυρί. Τεχνολογία γάλακτος-τυροκομία-παρουσίαση τυριών*. Εκδόσεις Ψύχαλου.

Παραρτήματα

Παράρτημα 1

Οι Γραβιέρες με Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης και τα χαρακτηριστικά τους:

Γραβιέρα Αγράφων

Σύμφωνα με την απόφαση 313045/14-1-1994 του Υφυπουργού Γεωργίας (Φ.Ε.Κ 16/Β/14-1-94, 101/Β/16-2-94), η ονομασία «Γραβιέρα Αγράφων» αναγνωρίζεται ως προστατευόμενη ονομασία προέλευσης για το τυρί που παράγεται στην περιοχή των Αγράφων και συγκεκριμένα στις κοινότητες Αργιθέας, Ιθώμης, Γόμφων, Νεβρόπολης, Ιτάμου, Μενελαΐδος και Ταμασίου και το γάλα το οποίο χρησιμοποιείται για την παρασκευή του τυριού αυτού πρέπει να προέρχεται αποκλειστικά από τις περιοχές αυτές.

Προϋποθέσεις του προς τυροκόμηση γάλακτος:

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

β. Πρέπει να προέρχεται από αμέλξεις που γίνονται 10 ημέρες τουλάχιστον μετά τον τοκετό.

γ. Πρέπει να είναι πρόβειο ή μίγμα αυτού με γίδινο. Το ποσοστό του γιδίνου γάλακτος δεν πρέπει να υπερβαίνει το 30% κατά βάρος.

δ. Πρέπει να είναι καλής ποιότητας και πλήρες.

Επίσης, απαγορεύεται η συμπίκνωση, η προσθήκη σκόνης ή συμπληρώματος γάλακτος, πρωτεϊνών γάλακτος, καζεϊνικών αλάτων, χρωστικών, συντηρητικών και αντιβιοτικών ουσιών.

Στο προς τυροκόμηση γάλα για την παρασκευή του τυριού προστίθεται παραδοσιακή πυτιά ή άλλα ένζυμα με ανάλογη δράση. Επιτρέπεται η προσθήκη αβλαβών οξυγαλακτικών και προπιονικών βακτηρίων, καθώς και χλωριούχο ασβέστιο μέχρι 20 gr/100kgr γάλακτος.

Τεχνολογία παρασκευής του τυριού:

α. Το γάλα υποβάλλεται σε θερμισμό ή παστερίωση

β. Η πήξη του γάλακτος γίνεται στους 34-36 °C. Το δημιουργούμενο τυρόπηγμα διαιρείται μετά από 25-35 λεπτά. Αναθερμαίνεται υπό συνεχή ανάδευση στους 48-52

°C, τοποθετείται σε καλούπια και υποβάλλεται σε πίεση. Μετά από μια ημέρα το τυρί εξάγεται από τα καλούπια και παραμένει σε ξύλινα ράφια μέχρι 2 ημέρες. Ακολούθως τοποθετείται σε άλμη 19-20 Be για 2-4 ημέρες.

γ. Η ωρίμανση του τυριού γίνεται αρχικά σε θαλάμους με θερμοκρασία 12-15 °C και σχετική υγρασία 85%. Στο στάδιο αυτό διενεργούνται αρχικά επιφανειακά ξηρά αλατίσματα επί τρεις εβδομάδες, ούτως ώστε το ώριμο τυρί να έχει περιεκτικότητα σε αλάτι μέχρι 2% κατά βάρος. Όταν ολοκληρωθεί το αλάτισμα το τυρί μεταφέρεται σε θαλάμους με θερμοκρασία 12-15 °C και σχετική υγρασία 90-95% για να ολοκληρωθεί η ωρίμανση. Ο συνολικός χρόνος ωρίμανσης διαρκεί 3 μήνες. Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, αναπτύσσεται επιφανειακά μικροχλωρίδα που συμβάλλει στην ωρίμανση και τη διαμόρφωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του τυριού.

Χαρακτηριστικά του τυριού:

Χημική σύσταση:

- Μέγιστη υγρασία: 38% κατά βάρος
- Ελάχιστη λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού: 40% κατά βάρος

Τύπος τυριού:

- Συνεκτικότητα: σκληρό τυρί με συμπαγή μάζα και διάσπαρτες οπές λόγω προπιονικής ζύμωσης
- Σχήμα: κυλινδρικό
- Διαστάσεις: διάφορες
- Βάρος: κεφάλια 2-3 κιλών και 8-10 κιλών

Επιδερμίδα:

- Συνεκτικότητα: σκληρή
- Εμφάνιση: ξηρή που καλύπτεται με κατάλληλες για τρόφιμα ύλες
- Χρώμα: λευκοκίτρινο

Μάζα τυριού:

- Υφή: σκληρή και ελαστική
- Χρώμα: λευκοκίτρινο

Άλλα χαρακτηριστικά: ευχάριστη υπόγλυκη γεύση και πλούσιο άρωμα

Απαγορεύεται η χρήση χρωστικών, συντηρητικών και αντιβιοτικών ουσιών στο τυρί.

Δεσμός του τυριού με την περιοχή:

Οι νομάδες κτηνοτρόφοι και κύρια οι αιγοπροβατοτρόφοι αποτέλεσαν την αρχαιότερη παραγωγική τάξη των Αγράφων. Στην περίοδο της τουρκοκρατίας και στο διάστημα της επανάστασης των Αγραφιωτών ενάντια στους Τούρκους (1821-1877), το γάλα και το τυρί ήταν η μοναδική τροφή τους. Από την απελευθέρωση της Θεσσαλίας και μετά (1881) η αιγοπροβατοτροφία ανθεί. Τότε (1888) είναι που παράγεται από τον Ρεϋνόλδο Δημητριάδη το πρώτο βελτιωμένο ελληνικό σκληρό τυρί που ονομάστηκε τυρός

Αγράφων και που αργότερα επεκτάθηκε σε όλο το νομό Καρδίτσας με την ονομασία Γραβιέρα Αγράφων (Βαρανάκη και Δημητρίου, 2006).

Γραβιέρα Νάξου

Σύμφωνα με την απόφαση 313046/14-1-1994 του Υφυπουργού Γεωργίας (Φ.Ε.Κ 16/Β/14-1-94, 101/Β/16-2-94), η ονομασία «Γραβιέρα Νάξου» αναγνωρίζεται ως προστατευόμενη ονομασία προέλευσης για το τυρί που παράγεται παραδοσιακά στη νήσο Νάξο του Νομού Κυκλάδων από γάλα αγελαδινό ή μίγμα αυτού με πρόβειο και γίδινο, στα οποία όμως η αναλογία των τελευταίων δε ξεπερνά το 20% κατά βάρος και το γάλα το οποίο χρησιμοποιείται για την παρασκευή του τυριού αυτού πρέπει να προέρχεται αποκλειστικά από την περιοχή αυτή.

Προϋποθέσεις του προς τυροκόμηση γάλακτος:

α. Πρέπει να προέρχεται από φυλές αγελάδων και αιγοπροβάτων που εκτρέφονται στη νήσο Νάξο, έχουν προσαρμοσθεί στο περιβάλλον της περιοχής και η διατροφή τους πρέπει να βασίζεται στη χλωρίδα της περιοχής αυτής.

β. Πρέπει να προέρχεται από αμέλξεις που γίνονται 10 ημέρες τουλάχιστον μετά τον τοκετό

γ. Η πήξη του γάλακτος πρέπει να γίνεται εντός 48 ωρών από την άμελξη και μέχρι να πήξει να διατηρείται σε ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας, σύμφωνα με τις κείμενες διατάξεις.

δ. Πρέπει να είναι καλής ποιότητας, πλήρες νωπό ή παστεριωμένο.

Επίσης, απαγορεύεται η συμπύκνωση, η προσθήκη σκόνης ή συμπληρώματος γάλακτος, πρωτεϊνών γάλακτος, καζεϊνικών αλάτων, χρωστικών, συντηρητικών και αντιβιοτικών ουσιών.

Στο προς τυροκόμηση γάλα για την παρασκευή του τυριού προστίθεται παραδοσιακή πυτιά ή άλλα ένζυμα με ανάλογη δράση. Σε περίπτωση παστερίωσης του γάλακτος επιτρέπεται η προσθήκη χλωριούχου ασβεστίου 20 gr/100kgf γάλακτος και καλλιεργειών αβλαβών οξυγαλακτικών βακτηρίων.

Τεχνολογία παρασκευής του τυριού

α. Το γάλα υποβάλλεται σε θερμισμό ή παστερίωση.

β. Η πήξη του γάλακτος γίνεται στους 36-37 °C και διαρκεί 30-40 λεπτά. Ακολουθεί διαίρεση του τυροπήγματος σε μέγεθος κόκκων ρυζιού και η αναθέρμανσή του στους 50°C για 30 λεπτά περίπου. Σε σταθερή θερμοκρασία 50 °C το τυρόπηγμα «ψήνεται» για 60 λεπτά υπό συνεχή ανάδευση. Το τυρόπηγμα στη συνέχεια εξάγεται σε καλούπια με τουλουπάνι και οδηγείται στα πιεστήρια όπου παραμένει 3-4 ώρες και υφίσταται 2-4 «αλλαγές» του τυρόπανου. Μετά την πίεση οι τυροκεφαλές μπαίνουν σε άλμη 20 Be και θερμοκρασία 14-15 °C για 12-15 ημέρες ανάλογα με το μέγεθος του τυριού.

Εξάγονται από την άλμη, στεγνώνουν και οδηγούνται στα ωριμαντήρια για 70-80 ημέρες με θερμοκρασία θαλάμου 15 °C περίπου.

Χαρακτηριστικά του τυριού:

Χημική σύσταση:

- Μέγιστη υγρασία: 38% κατά βάρος
- Ελάχιστη λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού: 40% κατά βάρος

Τύπος τυριού:

- Συνεκτικότητα: σκληρό τυρί με συμπαγή και ελαστική μάζα και διάσπαρτες οπές λόγω προπιονικής ζύμωσης και ενίοτε ρωγμές
- Σχήμα: κυλινδρικό
- Διαστάσεις: διάφορες
- Βάρη: κεφάλια 1-2, 3-4 και 8-9 κιλών

Επιδερμίδα:

- Συνεκτικότητα: λεπτή, σκληρή
- Εμφάνιση: ξηρή, συνήθως καλύπτεται από μικροβιακή ανάπτυξη που συμβάλλει στην ωρίμανση

Μάζα τυριού:

- Υφή: σκληρή και ελαστική
- Χρώμα: υποκίτρινο

Άλλα χαρακτηριστικά: ευχάριστη γεύση και ελαφρύ άρωμα προπιονικής ζύμωσης

Απαγορεύεται η χρήση χρωστικών, συντηρητικών και αντιβιοτικών ουσιών στο τυρί.

Δεσμός του τυριού με την περιοχή:

Η γραβιέρα Νάξου είναι ένα ευρύτατα γνωστό παραδοσιακό τυρί που δημιουργήθηκε και εξελίχθηκε στη Νάξο, όπου παρασκευάζεται συνεχώς επί πολλά χρόνια. Είναι προϊόν ευρείας λαϊκής κατανάλωσης και εμφανίζει μεγάλη κατά κεφαλή κατανάλωση. Αναφορές σε «αξιότιμο τυρί» εμφανίζονται σε διατιμήσεις της τουρκοκρατίας (Βαρανάκη και Δημητρίου, 2006).

Γραβιέρα Κρήτης

Σύμφωνα με την απόφαση 313047/14-1-1994 του Υφυπουργού Γεωργίας (Φ.Ε.Κ 16/Β/14-1-94, 101/Β/16-2-94), η ονομασία «Γραβιέρα Κρήτης» αναγνωρίζεται ως προστατευόμενη ονομασία προέλευσης για το τυρί που παράγεται παραδοσιακά στην Κρήτη και το γάλα το οποίο χρησιμοποιείται για την παρασκευή του τυριού αυτού πρέπει να προέρχεται αποκλειστικά από την περιοχή αυτή.

Προϋποθέσεις του προς τυροκόμηση γάλακτος:

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

β. Πρέπει να είναι πρόβειο ή μίγμα αυτού με γίδινο. Το ποσοστό του γιδίνου γάλακτος δεν πρέπει να υπερβαίνει το 20% κατά βάρος.

γ. Πρέπει να προέρχεται από αμέλξεις που γίνονται 10 ημέρες τουλάχιστον μετά τον τοκετό.

δ. Πρέπει να είναι καλής ποιότητας και πλήρες, θερμισμένο ή παστεριωμένο.

Επίσης, απαγορεύεται η συμπύκνωση, η προσθήκη σκόνης ή συμπληρώματος γάλακτος, πρωτεϊνών γάλακτος, καζεϊνικών αλάτων, χρωστικών, συντηρητικών και αντιβιοτικών ουσιών.

Στο προς τυροκόμηση γάλα για την παρασκευή του τυριού προστίθεται παραδοσιακή πυτιά ή άλλα ένζυμα με ανάλογη δράση. Επιτρέπεται η προσθήκη αβλαβών οξυγαλακτικών βακτηρίων, καθώς και χλωριούχο ασβέστιο μέχρι 20 gr/100kg γάλακτος.

Τεχνολογία παρασκευής του τυριού

α. Η πήξη του γάλακτος γίνεται στους 34-36 °C. Το δημιουργούμενο τυρόπηγμα διαιρείται μετά από 30 λεπτά περίπου. Αναθερμαίνεται υπό συνεχή ανάδευση στους 50-52 °C, τοποθετείται σε καλούπια και υποβάλλεται σε πίεση. Ακολούθως το τυρί μεταφέρεται σε χώρο θερμοκρασίας 14-16 °C και σχετική υγρασία 85% περίπου. Μετά από μια μέρα τοποθετείται σε άλμη 18-20 Be για 2-5 ημέρες, ανάλογα με το μέγεθος του τυριού.

β. Η ωρίμανση του τυριού γίνεται σε θαλάμους με θερμοκρασία 14-18 °C και σχετική υγρασία 85-90%. Στο στάδιο αυτό διενεργούνται μέχρι 10 επιφανειακά ξηρά αλατίσματα και το τυρί αναστρέφεται ανά καιρούς. Ο συνολικός χρόνος ωρίμανσης διαρκεί 3 μήνες. Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, αναπτύσσεται επιφανειακά μικροχλωρίδα που συμβάλλει στην ωρίμανση και τη διαμόρφωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του τυριού.

Χαρακτηριστικά του τυριού:

Χημική σύσταση:

- Μέγιστη υγρασία: 38% κατά βάρος
- Ελάχιστη λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού: 40% κατά βάρος
- Μέγιστη περιεκτικότητα σε αλάτι: 2%

Τύπος τυριού:

- Συνεκτικότητα: σκληρό τυρί με συμπαγή και ελαστική μάζα και συνήθως διάσπαρτες οπές λόγω προπιονικής ζύμωσης
- Σχήμα: κυλινδρικό

- Διαστάσεις: διάφορες
- Βάρη: διάφορα

Επιδερμίδα:

- Συνεκτικότητα: σκληρή
- Εμφάνιση: ξηρή, φαιόχρους με μικροβιακή ανάπτυξη Μάζα τυριού:
- Υφή: σκληρή και ελαστική
- Χρώμα: λευκοκίτρινο

Άλλα χαρακτηριστικά: ευχάριστη υπόγλυκη γεύση και πλούσιο ελαφρύ άρωμα. Απαγορεύεται η χρήση χρωστικών, συντηρητικών και αντιβιοτικών ουσιών στο τυρί.

Δεσμός του τυριού με την περιοχή:

Σε αναφορές για τη βυζαντινή περίοδο, περιγράφεται πως «...εκ των κατά τόπους κατασκευαζομένων τυρών, εξ'ου εμφανίζεται και η ακμή της τυροκομίας, αναφέρεται ο Κρητικός τυρός...». Το 1815 αναφέρεται η παρασκευή τυριού καλής φήμης στην Κρήτη, λόγω της οποίας εμπορεύεται σε περιοχές εκτός Κρήτης: «...η Πελοπόννησος κάμνει αρκετόν τυρόν, καθώς και η Κρήτη και τα πωλούν εις κομμάτια στρογγυλά, επίπεδα εις το Αρχιπέλαγος και Κωνσταντινούπολιν, πλην και αυτά είναι άπαχα και με πολύ άλας έξω, μόνον από μερικά Κρητικά, επί τόπου καμωμένα καλά» (Βαρανάκη και Δημητρίου, 2006).

Παράρτημα 2

Οι συγκεντρώσεις (σε mg/kg) των επιμέρους ουσιών. Στις μη μεμονωμένες παρατηρήσεις παρατίθεται η μέση τιμή και το τυπικό σφάλμα.

Πίνακας 10: Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα στα δείγματα από την Κ. Ελλάδα, την Ηπειρο και τη Θεσσαλία (στις μη μεμονωμένες παρατηρήσεις παρατίθεται η μέση τιμή και το τυπικό σφάλμα).

Γεωγρ. Διαμέρισμα	Κ. Ελλάδα					Ήπειρος		Θεσσαλία		
	Διάρκεια ωρίμανσης	a(<3m)	b(3m-9m)	c(m9-12m)	d(>12m)	c(m9-12m)	d(>12m)	b(3m-9m)	c(m9-12m)	a
Είδος γάλακτος	π+κ	κ	π	π	π+κ	π	π+κ	π	π+κ	a
Ουσία										
οξικό οξύ	32,8 85	10,83 0	12,9 06	15,613± 2,388	21,216± 1,831	16,590±3, 559	22,059± 3,707	4,752	18,2 93	0,0 44
προπανικό οξύ	-	0,089	0,86 5	0,632±0, 509	18,207± 17,287	7,457±4,7 35	0,046±0, 046	3,337	0,15 5	0,1 09
βουτανικό οξύ	42,9 84	43,83 1	73,6 71	52,279± 28,693	20,590± 11,340	34,088±1 0,022	46,501± 8,970	11,89 2	22,3 82	8,0 77
πεντανικό οξύ	0,64 4	0,223	1,19 7	0,633±0, 352	0,202±0, 061	0,557±0,2 32	0,364±0, 058	0,339	0,20 5	-
εξανικό οξύ	136, 279	105,4 84	162, 636	125,079 ±73,458	71,717± 31,380	118,255± 34,756	113,964 ±13,909	50,98 8	84,2 08	3,5 76
εξανθιοϊκό οξύ	-	-	-	-	-	-	-	0,133	-	-
επτανικό οξύ	4,90 1	0,450	2,62 0	1,908±0, 557	1,406±0 ,889	3,322±1,4 92	2,610±1, 199	1,392	2,47 3	-
οκτανικό οξύ	223, 265	88,33 7	87,0 58	96,917± 25,543	92,950± 38,563	141,565± 52,168	171,183 ±6,132	47,53 8	106, 496	2,4 08
εννεανικό οξύ	6,44 0	0,864	0,81 2	1,177±0, 252	1,070±0 ,534	3,060±1,7 02	3,049±0, 251	1,390	1,44 3	-
δεκανικό οξύ	283, 428	96,68 2	35,6 85	66,273± 19,062	58,121± 26,905	121,077± 63,303	153,274 ±13,442	29,35 1	68,1 84	1,8 79
9-δεκενικό οξύ	7,41 5	0,862	0,48 4	1,868±0, 986	1,107±0 ,642	3,334±2,3 00	2,990±0, 454	0,477	0,76 7	-
εντεκανικό οξύ	-	1,108	-	0,356±0, 233	0,193±0 ,193	0,030±0,0 30	0,143±0, 143	0,254	-	-
δωδεκανικό οξύ	30,7 82	3,304	0,52 9	3,211±1, 132	2,495±1 ,456	9,515±6,9 54	8,390±1, 832	2,238	2,09 1	-
δεκατετρανικό οξύ	4,54 3	0,644	0,17 7	0,459±0, 125	1,193±0 ,718	1,310±0,6 77	0,868±0, 214	2,054	-	-
2-μεθυλ προπανικό οξύ	0,00 0	0,560	0,45 0	0,372±0, 260	0,049±0 ,049	0,358±0,1 66	0,315±0, 315	0,291	1,24 6	-
3-μεθυλ βουτανικό οξύ	2,78 3	2,803	1,76 2	1,567±0, 736	2,309±2 ,160	3,289±1,0 07	3,984±2, 417	0,940	-	0,2 45
2-αιθυλ εξανικό οξύ	-	-	-	0,010±0, 010	-	0,074±0,0 74	-	-	0,15 2	-
4-μεθυλ οκτανικό οξύ	0,40 9	0,064	0,08 4	0,136±0, 024	0,277±0 ,163	0,221±0,0 58	0,231±0, 031	0,250	0,19 8	-

Πίνακας 11: Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα στα δείγματα από την Κρήτη και το Ν. Αιγαίο (στις μη μεμονωμένες παρατηρήσεις παρατίθεται η μέση τιμή και το τυπικό σφάλμα).

Γεωγρ. Διαμέρισμα	Κρήτη					Ν.Αιγαίο						
	b(3m-9m)		c(m9-12m)		d(>12m)	a(<3m)		b(3m-9m)	c(m9-12m)		d(>12m)	
Είδος γάλακτος	π	π+κ	π	π+κ	π+κ	α	π+κ+α	α	α	π	π+κ	
Ουσία												
οξικό οξύ	24,515 ±4,603	31,92 3±18,193	25,57 3±5,537	23,81 8±7,064	26,90 8±6,314	11,422 ±3,742	6, 865	21,697 ±6,942	22,122 ±4,391	10, 512	14, 921	
προπανικό οξύ	1,212± 1,123	0,083 ±0,083	2,233 ±1,368	0,026 ±0,026	0,328 ±0,328	4,211± 0,635	0, 031	7,046± 2,642	1,587± 0,578	-	0,3 08	
βουτανικό οξύ	41,049 ±16,212	25,14 2±7,411	28,90 4±3,720	23,33 8±0,114	23,22 1±3,893	114,59 8±22,609	8, 993	182,01 3±80,312	84,051 ±18,332	27, 182	19, 214	
πεντανικό οξύ	0,272± 0,047	0,198 ±0,041	0,308 ±0,083	0,240 ±0,038	0,150 ±0,069	2,267± 0,633	0, 062	2,515± 1,524	0,611± 0,142	0,1 39	-	
εξαντικό οξύ	100,83 8±17,598	50,75 5±27,032	64,96 2±5,441	69,74 8±6,065	60,67 3±13,802	55,724 ±20,476	24, 395	83,940 ±24,406	107,01 2±15,618	69, 725	39, 765	
εξανθιοϊκό οξύ	-	-	-	-	-	0,064± 0,064	-	0,051± 0,051	0,099± 0,069	-	-	
επτανικό οξύ	2,023± 0,491	0,668 ±0,333	1,088 ±0,257	1,065 ±0,187	1,105 ±0,384	0,462± 0,176	0, 182	0,792± 0,227	0,922± 0,112	0,6 62	0,1 56	
οκτανικό οξύ	139,89 4±27,495	75,37 9±39,920	84,62 3±11,601	93,00 3±19,815	95,47 6±23,177	57,157 ±16,560	14, 159	79,924 ±22,399	89,053 ±17,398	10, 3,982	18, 579	
εννεανικό οξύ	2,016± 0,570	0,893 ±0,548	1,236 ±0,276	0,944 ±0,393	1,647 ±0,561	0,511± 0,179	0, 243	0,695± 0,250	0,688± 0,151	0,7 41	0,3 83	
δεκανικό οξύ	125,30 2±33,214	47,14 0±21,741	69,79 6±15,746	62,05 8±19,988	72,80 9±17,320	29,491 ±7,408	5, 395	42,608 ±13,133	46,101 ±12,335	88, 940	17, 077	
9-δεκενικό οξύ	2,116± 0,607	0,816 ±0,519	1,152 ±0,276	1,121 ±0,502	1,452 ±0,420	0,860± 0,188	0, 150	1,418± 0,441	2,162± 0,588	0,8 31	0,1 80	
εντεκανικό οξύ	0,908± 0,813	0,051 ±0,051	0,841 ±0,676	0,604 ±0,604	0,856 ±0,391	0,143± 0,088	-	0,334± 0,334	0,547± 0,244	0,4 28	0,2 68	
δωδεκανικό οξύ	6,456± 2,135	1,820 ±0,606	3,735 ±1,236	2,738 ±1,645	3,615 ±1,105	2,355± 0,659	0, 250	7,550± 5,139	4,871± 1,431	3,2 26	0,8 49	
δεκατετρανικό οξύ	0,840± 0,290	0,518 ±0,103	0,688 ±0,283	0,562 ±0,390	0,903 ±0,305	0,854± 0,242	0, 109	10,959 ±9,835	1,639± 0,467	0,6 16	0,1 86	
2-μεθυλπροπανικό οξύ	0,134± 0,071	2,021 ±2,021	1,052 ±0,374	0,119 ±0,119	0,956 ±0,956	0,112± 0,037	0, 070	0,392± 0,121	0,820± 0,266	-	2,3 61	
3-μεθυλβουτανικό οξύ	0,945± 0,282	2,752 ±1,481	3,139 ±0,855	0,637 ±0,175	1,688 ±1,229	0,713± 0,448	0, 256	1,406± 0,715	3,637± 1,336	1,1 33	4,0 17	

2-αιθυλ εξανικό οξύ	-	-	0,004 ±0,00 4	-	-	-	-	-	0,004± 0,004	-	-
4-μεθυλ οκτανικό οξύ	0,244± 0,046	0,223 ±0,05 8	0,182 ±0,02 9	0,146 ±0,04 3	0,238 ±0,06 4	0,101± 0,051	0, 04 9	0,034± 0,017	0,081± 0,022	0,1 17	0,0 70

Πίνακας 12: Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα στα δείγματα από τη Μακεδονία (στις μη μεμονωμένες παρατηρήσεις παρατίθεται η μέση τιμή και το τυπικό σφάλμα).

Γεωγρ. Διαμέρισμα	Μακεδονία								
	b(3m- 9m)			c(m9- 12m)			d(>12 m)		
Διάρκεια ωρίμανσης Είδος γάλακτος Ουσία	α	κ	π	α	κ	π	α	κ	π
οξικό οξύ	11,326	41,0 01	21,6 14	3,224	85,6 38	17,8 59	50,31 7	56,431±3,1 63	40,462±26, 965
προπανικό οξύ	0,146	0,41 8	0,55 9	-	-	0,10 2	0,676	0,965±0,06 3	2,177±1,11 3
βουτανικό οξύ	73,954	52,9 33	45,2 25	15,443	152, 652	26,0 56	226,6 08	106,578±3, 700	119,008±70 ,010
πεντανικό οξύ	1,701	1,58 3	0,56 1	0,272	2,84 7	0,27 3	3,577	1,277±0,32 2	1,600±0,97 8
εξανικό οξύ	161,03 0	204, 198	136, 466	29,177	396, 483	68,0 31	334,4 54	372,321±76 ,549	252,856±20 8,149
επτανικό οξύ	2,579	2,43 2	1,62 2	0,844	6,69 8	0,83 4	3,506	6,599±4,16 1	2,838±2,43 3
οκτανικό οξύ	60,954	382, 872	186, 721	26,709	623, 856	71,9 22	96,71 3	487,852±12 2,358	226,654±18 9,869
εννεανικό οξύ	1,237	2,13 8	2,29 6	-	5,51 4	0,84 9	1,507	6,074±2,53 4	1,522±1,36 9
δεκανικό οξύ	30,556	290, 192	171, 088	18,464	518, 739	50,0 28	52,23 0	424,259±14 1,939	146,449±12 3,893
9-δεκενικό οξύ	1,664	3,31 8	2,70 2	-	4,27 5	0,72 6	2,090	6,466±2,03 1	4,854±4,54 5
εντεκανικό οξύ	-	-	-	-	-	-	-	3,680±3,68 0	-
δωδεκανικό οξύ	1,719	15,2 47	8,50 4	-	21,3 87	1,82 3	3,446	18,952±8,0 73	13,985±13, 177
δεκατετρανικ ό οξύ	-	4,21 1	3,44 7	-	8,39 8	0,72 0	-	4,079±1,58 9	2,920±2,65 3
2-μεθυλ προπανικό οξύ	0,785	2,01 9	0,46 6	-	-	0,20 9	0,402	0,753±0,75 3	2,693±2,28 8
3-μεθυλ βουτανικό οξύ	3,795	8,73 4	2,60 2	-	2,12 6	0,86 5	1,658	1,574±0,26 7	3,141±2,50 5
4-μεθυλ οκτανικό οξύ	-	-	-	-	2,62 7	-	-	1,678±1,67 8	-

Πίνακας 13: Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα στα δείγματα από το Β. Αιγαίο και την Πελοπόννησο (στις μη μεμονωμένες παρατηρήσεις παρατίθεται η μέση τιμή και το τυπικό σφάλμα).

Γεωγρ. Διαμέρισμα	Β.Αιγαίο				Πελοπόννησος			
	b(3m-9m)		c(m9-12m)		b(3m-9m)	c(m9-12m)	d(>12m)	
Διάρκεια ωρίμανσης Είδος γάλακτος	π	π+κ	α	π	π	π	κ	π+κ
Ουσία								
οξικό οξύ	11,334	24,003	3,681	12,086	44,211±28,365	31,591±4,215	59,439	35,282±11,620
προπανικό οξύ	0,212	-	-	0,026	8,949±0,338	14,657±14,605	-	3,510±3,510
βουτανικό οξύ	20,368	14,992	15,806	9,126	98,395±8,505	137,761±88,093	53,900	60,163±15,190
πεντανικό οξύ	0,139	0,156	0,179	0,033	1,007±0,195	1,596±1,176	0,228	0,353±0,076
εξανικό οξύ	77,564	33,246	33,599	18,730	226,776±19,838	265,993±134,634	106,288	131,238±24,980
επτανικό οξύ	1,167	0,407	0,535	0,120	4,271±0,651	2,955±1,954	1,327	1,067±0,263
οκτανικό οξύ	93,719	31,983	30,211	11,788	236,062±13,406	221,018±154,117	189,754	130,025±23,060
εννεανικό οξύ	0,909	0,592	0,435	0,075	4,016±1,347	2,515±1,950	1,925	1,613±0,722
δεκανικό οξύ	52,879	16,525	16,685	4,612	211,209±24,707	187,352±149,231	197,757	82,117±18,650
9-δεκενικό οξύ	0,612	0,129	0,895	0,069	3,979±0,462	3,041±2,640	2,915	1,028±0,372
εντεκανικό οξύ	0,110	0,697	-	0,125	-	-	-	1,124±0,271
δωδεκανικό οξύ	2,417	0,665	1,732	0,112	9,943±1,780	6,528±5,844	14,021	4,234±2,334
δεκατετρανικό οξύ	0,201	0,354	0,449	-	0,716±0,007	0,738±0,557	2,954	1,083±0,366
2-μεθυλ προπανικό οξύ	0,337	-	-	0,384	0,737±0,595	0,273±0,088	0,741	0,311±0,311
3-μεθυλ βουτανικό οξύ	0,585	0,230	-	1,442	2,725±2,317	2,049±1,209	3,665	5,647±2,268
2-αιθυλ εξανικό οξύ	0,042	-	-	-	-	-	-	-
4-μεθυλ οκτανικό οξύ	0,077	0,226	0,069	0,061	0,394±0,117	0,248±0,059	0,325	0,224±0,061

Πίνακας 14: Οι εστέρες στα δείγματα από την Κ. Ελλάδα, την Ήπειρο και τη Θεσσαλία (στις μη μεμονωμένες παρατηρήσεις παρατίθεται η μέση τιμή και το τυπικό σφάλμα).

Γεωγρ. Διαμέρισμα	Κ. Ελλάδα				Ήπειρος		Θεσσαλία		c(m9-12m) α	
	a(<3m) π+κ	b(3m-9m) κ	π	c(m9-12m) π	d(>12m) π+κ	c(m9-12m) π	d(>12m) π+κ	b(3m-9m) π		π+κ
Ουσία										
εικοσανικός μεθυλεστέρας	-	-	-	-	-	0,154± 0,154	-	-	-	1,079
εννεανικός μεθυλεστέρας	0,180	-	-	-	-					
βουτανικός αιθυλεστέρας	0,206	-	-	-	-	0,116± 0,116	0,307± 0,217	-	-	-
εξανικός αιθυλεστέρας	0,475	-	-	0,136± 0,060	0,042± 0,042	0,256± 0,183	0,311± 0,119	-	0,151	-
επτανικός αιθυλεστέρας	0,079	-	0,072	0,005± 0,005	-	0,123± 0,110	-	-	-	-
οκτανικός αιθυλεστέρας	0,197	-	0,118	0,159± 0,083	0,061± 0,061	0,567± 0,370	0,579± 0,140	-	0,306	-
εννεανικός αιθυλεστέρας	0,181	-	-	0,039± 0,029	0,025± 0,025	0,105± 0,095	0,066± 0,033	0,172	0,089	-
δεκανικός αιθυλεστέρας	3,375	-	0,270	0,442± 0,424	0,127± 0,127	2,400± 2,299	1,671± 0,485	0,396	1,754	-
9-δεκενικός αιθυλεστέρας	0,200	0,139	0,033	0,130± 0,040	0,080± 0,080	0,259± 0,121	0,193± 0,061	-	0,137	-
εντεκανικός αιθυλεστέρας	-	-	-	-	-	-	0,026± 0,026	-	-	-
δωδεκανικός αιθυλεστέρας	0,830	-	-	0,155± 0,115	-	0,057± 0,057	0,036± 0,036	0,079	0,387	-
δεκατετρανικός αιθυλεστέρας	-	-	-	-	-	0,896± 0,896	0,672± 0,552	-	-	-
δεκαεξανικός αιθυλεστέρας	0,282	-	-	0,052± 0,034	-	0,464± 0,392	0,257± 0,210	-	0,067	-
εξανικός 2-μεθυλπροπυλεστέρας	-	-	-	0,029± 0,018	-	-	-	-	-	-
βουτανικός προπυλεστέρας	-	-	-	-	0,058± 0,058	0,038± 0,019	-	-	-	0,058± 0,058

δεκανικός οκτυλεστέρας	-	-	-	-	0,041± 0,041	-	-	-	-	0,041± 0,041
εξανικός 2- μεθυλβουτυλ εστέρας	-	-	-	-	0,059± 0,059	0,033± 0,033	-	0,039	-	0,059± 0,059

Πίνακας 15: Οι εστέρες στα δείγματα από την Κρήτη και το Ν. Αιγαίο (στις μη μεμονωμένες παρατηρήσεις παρατίθεται η μέση τιμή και το τυπικό σφάλμα).

Γεωγρ. Διαμέρισμα	Κρήτη					Ν.Αιγαίο					
	b(3m-9m)		c(m9-12m)		d(>12m)	a(<3m)		b(3m-9m)	c(m9-12m)		d(>12m)
Είδος γάλακτος	s	s+g	s	s+g	s+g	c	s+g+c	c	c	s	s+g
Ουσία											
εννεανικός μεθυλεστέρας	0,009 ±0,00	-	-	-	0,063 ±0,06	-	-	-	0,009 ±0,00	-	-
4- υδροξυβου τανικός μεθυλεστέ ρας	-	-	-	-	-	0,129 ±0,04	-	-	0,183 ±0,03	-	-
βουτανικός αιθυλεστέρας	0,034 ±0,03	-	0,128 ±0,09	-	-	-	-	0,153 ±0,15	-	-	-
εξανικός αιθυλεστέρας	0,203 ±0,07	0,032 ±0,03	0,283 ±0,11	-	-	0,025 ±0,02	-	0,111 ±0,11	0,012 ±0,01	0,06 5	0,12 5
επτανικός αιθυλεστέρας	-	-	0,071 ±0,04	-	-	-	-	-	-	0,08 3	-
οκτανικός αιθυλεστέρας	0,275 ±0,14	0,133 ±0,08	0,540 ±0,27	0,016 ±0,01	0,061 ±0,06	-	-	0,146 ±0,12	-	0,07 7	0,11 5
εννεανικός αιθυλεστέρας	0,071 ±0,02	0,021 ±0,02	0,050 ±0,03	0,053 ±0,00	-	-	-	0,106 ±0,05	-	0,17 6	0,10 3
δεκανικός αιθυλεστέρας	0,581 ±0,31	-	1,760 ±0,77	0,072 ±0,07	-	-	0,028	0,497 ±0,40	-	0,33 1	0,55 4
9- δεκενικός αιθυλεστέρας	0,164 ±0,02	0,141 ±0,00	0,167 ±0,05	0,099 ±0,00	0,133 ±0,01	8,832 ±8,83	0,041	0,237 ±0,00	0,008 ±0,00	0,17 0	0,21 7
δωδεκανικός αιθυλεστέρας	-	0,095 ±0,09	0,353 ±0,17	-	-	-	-	0,224 ±0,22	-	-	0,16 5
δεκατετρα νικός αιθυλεστέρας	0,044 ±0,04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ας											
δεκαεξανι	0,096	0,067	0,101	0,018	-	-	-	6,814	-	-	0,05
κός	±0,06	±0,00	±0,05	±0,01				±6,81			9
αιθυλεστέ	7	4	1	8				4			
ας											
βουτανικός	0,033	-	-	-	-	-	-	0,564	-	-	-
προπυλεστ	±0,03							±0,16			
έρας	3							7			
δωδεκανικ								-	0,043	-	-
ός								-	±0,04		
προπυλεστ									3		
έρας											
εξανικός	0,079	-	-	0,059	0,016	-	-	-	-	-	-
βουτυλεστ	±0,07			±0,05	±0,01						
έρας	9			9	6						
δεκανικός	-	-	-	-	-	-	-	-	0,139	-	-
επτυλεστέ									±0,05		
ρας									0		
βουτανικός	-	-	-	-	0,045	-	-	-	0,254	-	-
οκτυλεστέ					±0,04				±0,16		
ρας					5				6		
2-	-	-	-	-	-	0,039	-	0,147	0,091	-	-
μεθυλπροπ						±0,03		±0,14	±0,03		
ανικός 2-						0		7	6		
μεθυλπροπ											
υλεστέρας											
εξανικός 2-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,048	-	-
μεθυλπροπ									±0,03		
υλεστέρας									7		
δεκανικός	-	-	-	-	-	0,120	-	-	0,056	-	-
2-						±0,03			±0,02		
μεθυλπροπ						0			9		
υλεστέρας											
εξανικός 2-	0,010	-	0,073	-	0,012	-	-	0,028	-	-	0,03
μεθυλβουτ	±0,01		±0,04		±0,01			±0,02			5
υλεστέρας	0		8		2			8			

Πίνακας 16: Οι εστέρες στα δείγματα από τη Μακεδονία (στις μη μεμονωμένες παρατηρήσεις παρατίθεται η μέση τιμή και το τυπικό σφάλμα).

Γεωγρ. Διαμέρισμα	Μακεδονία								
	b(3m-9m)			c(m9-12m)			d(>12m)		
Διάρκεια ωρίμανσης Είδος γάλακτος	α	κ	π	α	κ	π	α	κ	π
Ουσία									
δεκατετρανικός μεθυλεστέρας	0,614	-	-	-	-	-	-	-	-
δεκαοκτανικός μεθυλεστέρας	-	0,1 17	0,0 95	-	0,3 67	0,0 20	-	0,024±0,02 4	0,037±0,03 7
εικοσανικός μεθυλεστέρας	2,442	-	-	-	-	-	-	-	-
4- υδροξυβουτανικ ός μεθυλεστέρας	-	-	0,5 84	-	-	0,0 89	-	-	-
βουτανικός αιθυλεστέρας	-	-	-	-	-	-	-	0,303±0,30 3	-
εξανικός αιθυλεστέρας	-	-	-	-	-	0,0 78	-	4,752±3,36 2	1,008±0,93 4
επτανικός αιθυλεστέρας	-	-	-	-	-	-	-	2,119±0,58 6	0,876±0,87 6
οκτανικός αιθυλεστέρας	-	-	-	-	-	-	-	18,099±17, 610	4,182±4,18 2
εννεανικός αιθυλεστέρας	-	-	-	-	-	0,1 19	-	1,263±1,26 3	0,054±0,05 4
δεκανικός αιθυλεστέρας	-	-	-	-	-	0,6 76	-	34,725±22, 680	11,997±11, 812
9-δεκενικός αιθυλεστέρας	-	1,0 84	1,0 34	-	-	0,1 11	-	0,918±0,91 8	0,945±0,94 5
δεκαεξανικός αιθυλεστέρας	0,285	-	-	0,149	0,0 35	-	0,116	0,096±0,08 5	0,036±0,03 0
2- μεθυλπροπανικ ός αιθυλεστέρας	-	-	-	-	-	-	-	0,419±0,41 9	0,251±0,25 1
δεκανικός προπυλεστέρας	-	-	-	-	-	-	-	-	0,826±0,82 6
δωδεκανικός προπυλεστέρας	-	-	-	-	-	-	-	0,333±0,33 3	0,086±0,08 6
οκτανικός βουτυλεστέρας	-	-	-	-	-	-	-	0,122±0,12 2	-
οκτανικός 2- βουτυλεστέρας	-	2,7 20	0,5 56	-	5,2 73	0,2 34	-	7,140±7,14 0	2,583±2,58 3
δεκατετρανικός 1- μεθυλαιθυλεστέ ρας	-	-	0,8 66	-	-	0,0 44	-	-	-
δωδεκανικός 1- μεθυλπροπυλεσ τέρας	-	-	-	-	-	-	-	1,880±1,88 0	0,419±0,41 9
εξανικός 2- μεθυλπροπυλεσ τέρας	-	-	-	-	-	-	-	0,907±0,90 7	-
δεκανικός 2- μεθυλπροπυλεσ τέρας	-	-	-	-	-	-	-	15,195±15, 195	0,461±0,46 1

Πίνακας 17: Οι εστέρες στα δείγματα από το Β. Αιγαίο και την Πελοπόννησο (στις μη μεμονωμένες παρατηρήσεις παρατίθεται η μέση τιμή και το τυπικό σφάλμα).

Γεωγρ. Διαμέρισμα	Β.Αιγαίο				Πελοπόννησος					
	b(3m-9m)		c(m9-12m)		b(3m-9m)		c(m9-12m)		d(>12m)	
Διάρκεια ωρίμανσης Είδος γάλακτος	π	π+κ	α	π	π	π	κ	π+κ		
Ουσία										
εννεανικός μεθυλεστέρας	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,435±0,4 35
βουτανικός αιθυλεστέρας	0,178	-	-	-	0,627±0,62 7	-	-	-	-	-
εξανικός αιθυλεστέρας	0,094	0,11 0	-	0,04 2	1,655±0,48 3	1,345±0,9 53	-	-	-	0,567±0,5 67
επτανικός αιθυλεστέρας	0,151	-	-	-	-	0,077±0,0 77	-	-	-	-
οκτανικός αιθυλεστέρας	0,096	0,02 6	-	0,02 7	2,663±1,31 3	0,755±0,6 11	0,138	-	-	1,215±1,1 20
εννεανικός αιθυλεστέρας	1,030	0,09 5	-	-	0,299±0,07 3	0,507±0,0 82	0,027	-	-	0,100±0,1 00
δεκανικός αιθυλεστέρας	3,163	-	-	0,18 0	4,069±2,61 3	2,841±0,3 90	-	-	-	0,109±0,1 09
9-δεκενικός αιθυλεστέρας	0,144	-	0,091	0,04 5	0,554±0,23 5	0,303±0,1 79	0,402	-	-	0,391±0,1 51
δωδεκανικός αιθυλεστέρας	-	-	-	-	1,723±1,58 9	-	-	-	-	0,399±0,3 99
δεκατετρανικός αιθυλεστέρας	0,678	-	-	-	0,769±0,47 2	0,219±0,0 52	-	-	-	0,066±0,0 66
δεκαεξανικός αιθυλεστέρας	0,242	-	0,063	-	0,980±0,59 2	0,105±0,1 05	0,138	-	-	0,411±0,4 11
βουτανικός προπυλεστέρας	-	-	-	-	0,026±0,02 6	-	-	-	-	-
εξανικός βουτυλεστέρας	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,213±0,0 86
δεκανικός επτυλεστέρας	-	-	-	-	-	-	0,179	-	-	-
δεκανικός οκτυλεστέρας	-	-	-	-	-	-	0,144	-	-	0,657±0,3 31

Πίνακας 18: Οι αλκοόλες στα δείγματα από την Κ. Ελλάδα, την Πελοπόννησο και τη Θεσσαλία (στις μη μεμονωμένες παρατηρήσεις παρατίθεται η μέση τιμή και το τυπικό σφάλμα).

Γεωγρ. Διαμέρισμα	Κ. Ελλάδα				Ήπειρος		Θεσσαλία			
	a(<3m)	b(3m-9m)		c(m9-12m)	d(>12m)	c(m9-12m)	d(>12m)	b(3m-9m)	c(m9-12m)	
Είδος γάλακτος	π+κ	κ	π	π	π+κ	π	π+κ	π	π+κ	α
Ουσία										
αιθανόλη	4,130	1,248	1,456	2,737±1,157	2,641±1,263	4,331±2,282	4,604±3,259	1,216	3,298	0,207
1-βουτανόλη	-	-	0,226	0,045±0,032	0,032±0,032	0,178±0,178	0,089±0,063	-	-	-
1-πεντανόλη	-	-	-	0,042±0,018	-	-	-	-	-	-
1-εξανόλη	1,241	-	-	0,043±0,030	0,062±0,062	0,072±0,049	0,182±0,049	-	-	-
1-οκτανόλη	0,150	0,045	-	0,051±0,041	-	0,009±0,009	-	-	-	-
1-δεκανόλη	0,170	-	-	0,152±0,093	0,129±0,129	0,290±0,221	0,093±0,080	-	-	-
1-εντεκανόλη	0,139	-	0,101	0,093±0,020	0,220±0,160	0,081±0,042	0,134±0,019	-	-	-
1-δωδεκανόλη	-	2,203	0,081	0,449±0,283	0,398±0,398	0,080±0,050	0,079±0,045	-	1,285	-
1-δεκατετρανόλη	-	0,508	0,063	0,028±0,013	-	0,016±0,016	0,035±0,018	-	0,128	-
1-δεκαεξανόλη	-	0,237	-	0,127±0,105	-	0,049±0,032	0,025±0,025	-	0,112	-
2-βουτεν-1-όλη	-	-	-	0,176±0,063	0,415±0,295	0,076±0,076	0,186±0,186	-	-	-
3-βουτυν-1-όλη	0,630	-	-	0,483±0,205	0,170±0,170	-	-	-	-	-
2-βουτανόλη	-	-	0,314	0,757±0,757	9,821±9,821	0,108±0,066	-	0,051	1,561	-
2-επτανόλη	-	-	-	0,019±0,013	-	-	-	-	0,030	-
2-εννεανόλη	0,035	0,158	0,414	0,082±0,061	0,189±0,099	0,085±0,029	0,104±0,054	0,150	1,057	0,049
2-δεκανόλη	0,059	0,105	-	0,105±0,028	0,092±0,092	0,216±0,119	0,156±0,087	-	-	-
3-μεθυλ-1-βουτανόλη	0,168	0,126	-	0,030±0,022	0,045±0,045	0,040±0,028	0,175±0,022	-	0,173	-
4-μεθυλ-1-πεντανόλη	-	-	-	-	-	-	0,018±0,018	-	-	-
2-αιθυλ-4-μεθυλ-1-πεντανόλη	0,071	-	-	0,095±0,042	-	-	0,088±0,052	-	-	-
2-αιθυλ-1-εξανόλη	0,125	-	-	0,171±0,140	1,042±1,042	0,162±0,107	0,296±0,247	3,395	-	2,238
2-βουτυλ-1-οκτανόλη	0,110	0,251	0,026	0,167±0,090	0,287±0,104	0,198±0,084	0,121±0,048	-	0,128	-
3,7-διμεθυλ-1-οκτανόλη	0,200	0,098	0,171	0,477±0,091	0,172±0,172	0,227±0,096	0,561±0,103	-	0,318	-
3-μεθυλ-2-βουτανόλη	2,056	-	-	0,835±0,835	-	0,343±0,343	2,283±1,270	-	-	-
2-	-	-	-	0,013±	-	0,083±	-	-	-	-

βουτοξυαιθανόλη				0,013		0,083					
2,3- βουτανεδιόλη	3,71 0	-	-	2,242± 1,592	1,674± 1,674	1,646± 1,018	4,102± 2,468	-	-	0,3 51	
2-φαινυλαιθανόλη	-	-	-	0,028± 0,028	-	-	-	-	0,6 61	-	

Πίνακας 19: Οι αλκοόλες στα δείγματα από την Κρήτη και το Ν. Αιγαίο (στις μη μεμονωμένες παρατηρήσεις παρατίθεται η μέση τιμή και το τυπικό σφάλμα).

Γεωγρ. Διαμέρισμα	Κρήτη					Ν.Αιγ αίο					
	b(3m-9m)		c(m9-12m)		d(>12m)	a(<3m)		b(3m-9m)	c(m9-12m)		d(>12m)
Είδος γάλακτος	π	π+κ	π	π+κ	π+κ	α	π+κ+α	α	α	π	π+κ
Ουσία											
αιθανόλη	1,930 ±0,80 2	3,458 ±2,90 8	5,288 ±2,25 4	0,629 ±0,05 5	0,866 ±0,33 9	-	0,2 50	3,632 ±1,42 6	0,009 ±0,00 9	0, 55 3	0,94 8
1-βουτανόλη	0,137 ±0,05 3	-	0,148 ±0,08 5	-	0,084 ±0,05 1	0,063 ±0,03 7	0,0 48	3,137 ±2,02 5	0,113 ±0,02 6	0, 03 3	0,03 9
1-πεντανόλη	0,014 ±0,01 4	-	0,022 ±0,01 5	0,023 ±0,02 3	-	0,212 ±0,10 0	-	-	0,097 ±0,07 0	-	-
1-εξανόλη	0,137 ±0,05 2	0,064 ±0,06 4	0,048 ±0,02 4	0,240 ±0,18 4	0,162 ±0,12 9	0,153 ±0,05 5	-	-	0,125 ±0,05 1	0, 16 5	-
1-οκτανόλη	0,066 ±0,05 2	0,177 ±0,17 7	0,045 ±0,03 9	0,137 ±0,06 9	0,187 ±0,07 9	-	0,1 73	0,081 ±0,04 9	0,041 ±0,02 9	-	0,05 2
1-δεκανόλη	0,226 ±0,10 7	0,318 ±0,31 8	0,086 ±0,04 3	0,190 ±0,19 0	0,674 ±0,18 0	0,035 ±0,01 9	0,4 89	-	0,033 ±0,01 8	0, 12 9	0,20 8
1-εντεκανόλη	0,135 ±0,04 6	0,221 ±0,05 1	0,095 ±0,03 7	0,120 ±0,04 2	0,190 ±0,04 9	0,109 ±0,01 8	0,0 24	0,190 ±0,14 7	0,100 ±0,04 4	-	-
1-δωδεκανόλη	0,108 ±0,06 0	0,117 ±0,00 3	0,246 ±0,07 2	0,100 ±0,10 0	0,074 ±0,01 8	-	0,0 23	0,736 ±0,64 4	0,084 ±0,05 6	0, 09 2	0,05 0
1-δεκατετρανόλη	0,039 ±0,03 1	0,063 ±0,06 3	0,291 ±0,14 7	0,040 ±0,04 0	-	-	-	0,215 ±0,10 9	0,047 ±0,03 3	-	-
1-δεκαεξανόλη	0,026 ±0,01 8	-	0,069 ±0,03 0	0,052 ±0,05 2	-	0,260 ±0,08 0	-	0,236 ±0,11 5	0,639 ±0,30 9	-	-
2-βουτεν-1-όλη	0,159 ±0,06 8	0,261 ±0,10 2	0,038 ±0,02 7	0,243 ±0,24 3	0,406 ±0,25 2	13,39 4±3,9 30	-	-	1,028 ±0,55 2	0, 75 8	0,08 0
3-βουτυν-1-όλη	0,073 ±0,04 6	-	0,389 ±0,27 0	0,112 ±0,11 2	0,037 ±0,03 7	-	-	-	-	0, 29 1	-

2-εξεν-1-όλη	-	-	-	-	0,073 ±0,07 3	-	-	0,081 ±0,04 2	-	-	-
2-προπανάλη	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-βουτανόλη	1,547 ±1,36 9	0,472 ±0,47 2	0,692 ±0,33 6	-	-	-	0,2 61	12,44 3±5,6 74	0,042 ±0,02 8	0, 14 8	7,46 9
2-πεντανόλη	-	-	-	-	-	0,020 ±0,02 0	-	-	0,016 ±0,00 8	-	-
2-επτανόλη	0,017 ±0,01 7	0,246 ±0,24 6	0,052 ±0,02 9	-	0,011 ±0,01 1	-	0,1 23	-	-	-	0,07 8
2-εννεανόλη	0,094 ±0,05 7	0,027 ±0,02 7	0,098 ±0,03 6	0,070 ±0,01 0	0,163 ±0,14 4	0,050 ±0,05 0	0,0 61	0,232 ±0,23 2	-	0, 18 1	0,11 4
2-δεκανόλη	0,305 ±0,11 3	0,551 ±0,16 4	0,093 ±0,03 5	0,087 ±0,01 9	0,307 ±0,09 7	0,069 ±0,03 7	-	0,184 ±0,11 2	0,080 ±0,04 6	0, 38 2	-
2-δωδεκανόλη	0,037 ±0,03 7	-	-	-	-	0,154 ±0,04 4	-	-	0,258 ±0,07 7	-	-
3-μεθυλ- 1-βουτανόλη	0,075 ±0,02 6	0,219 ±0,04 2	0,699 ±0,26 7	-	-	0,980 ±0,17 8	0,2 03	0,193 ±0,13 6	1,525 ±0,91 5	0, 05 9	0,27 1
4-μεθυλ- 1-πεντανόλη	0,043 ±0,02 7	0,038 ±0,03 8	-	-	-	0,594 ±0,59 4	-	-	0,345 ±0,16 7	-	-
2-αιθυλ 4-μεθυλ- 1-πεντανόλη	0,062 ±0,02 2	0,140 ±0,00 1	0,050 ±0,03 3	-	0,230 ±0,07 0	-	0,1 91	0,191 ±0,11 1	-	0, 12 6	0,05 0
2-αιθυλ- 1-εξανόλη	0,064 ±0,03 7	0,536 ±0,53 6	0,266 ±0,17 1	0,371 ±0,37 1	0,713 ±0,40 7	-	0,1 55	-	0,387 ±0,22 7	0, 74 2	0,31 9
2-βουτυλ- 1-οκτανόλη	0,124 ±0,03 7	0,199 ±0,01 9	0,144 ±0,02 7	0,085 ±0,02 6	0,089 ±0,03 3	0,021 ±0,02 1	0,0 58	0,336 ±0,01 5	0,074 ±0,03 7	0, 16 0	0,08 8
3,7-διμεθυλ 1-οκτανόλη	0,358 ±0,10 8	0,286 ±0,17 2	0,472 ±0,12 9	0,140 ±0,03 4	0,255 ±0,06 3	0,227 ±0,09 4	0,1 26	0,642 ±0,19 1	0,242 ±0,05 1	0, 10 6	0,06 3
3-μεθυλ- 2-βουτανόλη	1,503 ±0,82 5	0,280 ±0,28 0	0,430 ±0,39 1	0,113 ±0,11 3	0,600 ±0,31 5	-	-	-	0,148 ±0,14 8	2, 08 7	-
5-μεθυλ, 1-εξανόλη	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-βουτοξυαιθανόλη	-	-	0,038 ±0,02 8	-	0,016 ±0,01 6	0,529 ±0,15 6	-	-	2,340 ±1,04 3	0, 15 1	0,25 2
2,3-βουτανεδιόλη	1,582 ±0,77 1	1,435 ±1,43 5	0,442 ±0,43 4	1,089 ±0,98 7	1,914 ±0,72 6	0,028 ±0,02 8	-	-	0,096 ±0,03 9	3, 65 8	-
2-φουρανμεθανόλη	-	0,316 ±0,31 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
φαινυλμεθανόλη	0,668 ±0,66 8	-	-	-	-	-	-	-	0,027 ±0,02 7	-	-
2-φαινυλαιθανόλη	-	0,073 ±0,07 3	0,104 ±0,10 4	-	-	-	-	0,093 ±0,09 3	-	-	-

Πίνακας 20: Οι αλκοόλες στα δείγματα από τη Μακεδονία (στις μη μεμονωμένες παρατηρήσεις παρατίθεται η μέση τιμή και το τυπικό σφάλμα).

Γεωγρ. Διαμέρισμα	Μακεδονία								
	b(3m-9m)			c(m9-12m)			d(>12m)		
Διάρκεια ωρίμανσης Είδος γάλακτος	α	κ	π	α	κ	π	α	κ	π
Ουσία									
αιθανόλη	1,762	5,800	4,173	0,928	-	0,290	1,152	12,691±1,615	3,049±1,549
1-δωδεκανόλη	-	-	3,019	-	-	0,283	-	0,228±0,228	3,7±0,237
1-δεκατετρανόλη	-	-	2,728	-	-	0,373	-	-	-
3-βουτυν-1-όλη	-	-	-	0,232	1,643	0,227	-	0,301±0,301	0,476±0,476
2-προπανόλη	-	-	0,215	-	-	0,294	-	-	0,627±0,627
2-βουτανόλη	0,077	-	0,561	-	2,228	0,419	7,972	66,592±14,416	3,817±3,673
2-εννεανόλη	0,043	-	-	-	-	-	-	0,473±0,473	0,021±0,021
2-βουτυλ- 1-οκτανόλη	-	1,166	1,691	-	-	0,139	-	0,114±0,114	-
3,7-διμεθυλ 1-οκτανόλη	-	-	-	-	-	-	-	2,122±2,122	-
5-μεθυλ 2-εξανόλη	-	-	-	-	-	-	-	2,294±2,294	-

Πίνακας 21: Οι αλκοόλες στα δείγματα από το Β. Αιγαίο και την Πελοπόννησο (στις μη μεμονωμένες παρατηρήσεις παρατίθεται η μέση τιμή και το τυπικό σφάλμα).

Γεωγρ. Διαμέρισμα	Β.Αιγ αίο		Πελοπόννησος		b(3m-9m)	c(m9-12m)	d(>12m)	
	π	π+κ	α	π			π	κ
Ουσία								
αιθανόλη	8,745	9,329	-	2,997	16,400±3,796	2,030±0,583	0,441	10,861±10,861
1-βουτανόλη	0,057	-	-	-	0,227±0,227	0,633±0,497	0,414	-
1-πεντανόλη	-	0,159	-	-	-	-	-	0,143±0,062
1-εξανόλη	0,061	0,135	-	-	0,320±0,186	0,036±0,036	0,666	0,164±0,058
1-οκτανόλη	-	0,060	0,247	-	0,049±0,007	-	-	0,056±0,056
1-δεκανόλη	-	0,759	0,647	-	-	-	0,261	0,323±0,039
1-εντεκανόλη	0,073	0,213	0,083	0,040	0,072±0,072	0,138±0,138	0,269	0,231±0,041
1-δωδεκανόλη	0,452	-	0,090	0,053	0,567±0,495	0,392±0,035	0,040	0,060±0,060

1-δεκατετρανόλη	0,093	-	-	0,024	0,213±0,0 96	0,098±0, 098	-	-
1-δεκαεξάνολη	-	-	-	0,060	0,340±0,0 95	0,226±0, 226	-	-
2-βουτεν-1-όλη	-	0,284	0,047	-	0,080±0,0 80	-	0,268	0,388±0,1 70
3-βουτυν-1-όλη	-	-	-	-	0,210±0,2 10	-	-	0,537±0,5 37
2-βουτανόλη	-	1,137	-	-	9,539±8,2 61	0,614±0, 614	19,22 4	20,707±13 ,290
2-πεντανόλη	0,053	-	-	-	-	-	-	-
2-επτανόλη	0,024	-	-	0,026	-	0,203±0, 065	-	-
2-εννεανόλη	0,175	-	0,167	0,210	-	0,232±0, 109	0,211	0,121±0,0 34
2-δεκανόλη	0,366	0,484	-	0,043	0,197±0,0 81	0,124±0, 046	0,392	0,675±0,5 47
2-δωδεκανόλη	-	-	0,325	-	-	-	-	-
3-μεθυλ- 1-βουτανόλη	0,038	-	-	-	0,633±0,5 66	0,275±0, 275	0,798	0,319±0,0 68
4-μεθυλ- 1-πεντανόλη	-	-	-	-	0,121±0,0 43	-	-	0,039±0,0 39
2-αιθυλ 4-μεθυλ-1-πεντανόλη	0,395	0,171	-	-	0,167±0,1 67	-	0,198	0,144±0,0 48
2-αιθυλ- 1-εξάνολη	-	0,178	0,069	-	-	-	1,398	1,062±0,3 70
2-βουτυλ- 1-οκτανόλη	0,059	-	0,097	0,066	0,147±0,0 64	0,248±0, 248	0,629	0,311±0,0 08
3,7-διμεθυλ 1-οκτανόλη	0,130	0,195	0,092	0,020	0,883±0,4 10	1,191±0, 615	1,852	0,355±0,0 60
3-μεθυλ- 2-βουτανόλη	-	1,254	0,061	-	-	-	6,096	1,871±1,8 71
2,3- βουτανεδιόλη	-	2,334	-	-	-	-	-	1,542±1,2 59
φαινυλμεθανόλη	-	-	-	-	0,156±0,1 56	-	-	-
2-φαινυλαιθανόλη	-	-	-	-	-	0,034±0, 034	-	-

Πίνακας 22: Οι αλδεύδες στα δείγματα από την Κ. Ελλάδα, την Ήπειρο και τη Θεσσαλία (στις μη μεμονωμένες παρατηρήσεις παρατίθεται η μέση τιμή και το τυπικό σφάλμα).

Γεωγρ. Διαμέρισμα	Κ. Ελλάδα					Ήπειρος		Θεσσαλία		
	a(<3m)	b(3m-9m)	c(m9-12m)	d(>12m)		c(m9-12m)	d(>12m)	b(3m-9m)	c(m9-12m)	
Είδος γάλακτος	π+κ	κ	π	π	π+κ	π	π+κ	π	π+κ	α
Ουσία										
εννεανάλη	0,056	0,1373	0,155	0,162±0,034	0,195±0,085	0,135±0,039	0,156±0,028	0,725	0,085	0,176
βενζαλδεΐδη	0,825	0,3665	-	0,518±0,160	0,869±0,869	0,239±0,168	0,707±0,141	-	0,421	-
3-υδροξυβουτανάλη	0,208	-	-	-	-	0,154±0,098	0,188±0,188	-	-	-
3-μεθυλ, 1-βουτανάλη	0,853	0,1093	0,038	0,340±0,201	0,357±0,234	1,208±0,998	0,246±0,086	0,335	1,080	-

Πίνακας 23: Οι αλδεύδες στα δείγματα από την Κρήτη και το Ν. Αιγαίο (στις μη μεμονωμένες παρατηρήσεις παρατίθεται η μέση τιμή και το τυπικό σφάλμα).

Γεωγρ. Διαμέρισμα	Κρήτη					Ν.Αιγαίο					
	b(3m-9m)		c(m9-12m)		d(>12m)	a(<3m)		b(3m-9m)	c(m9-12m)		d(>12m)
Είδος γάλακτος	s	s+g	s	s+g	s+g	c	s+g+c	c	c	s	s+g
Ουσία											
εννεανάλη	0,322±0,146	0,272±0,113	0,196±0,036	0,342±0,199	0,057±0,038	0,159±0,109	0,250	0,166±0,037	0,431±0,156	0,229	0,141
βενζαλδεΐδη	0,766±0,295	0,827±0,541	0,370±0,170	0,808±0,570	1,324±0,159	0,027±0,027	0,107	0,079±0,079	0,151±0,110	1,018	0,484
3-υδροξυβουτανάλη	0,291±0,203	-	0,075±0,061	0,149±0,149	-	-	-	-	0,113±0,096	-	0,270
2-αιθυλβουτανάλη	-	-	-	-	-	0,106±0,043	-	-	0,159±0,046	-	-
3-μεθυλ, 1-βουτανάλη	0,135±0,037	0,131±0,131	0,152±0,050	0,217±0,140	0,575±0,324	-	-	0,076±0,038	-	1,638	0,194
2-βουτενάλη	-	-	-	-	-	0,840±0,633	-	-	0,055±0,055	-	-

Πίνακας 24: Οι αλδεΐδες στα δείγματα από τη Μακεδονία (στις μη μεμονωμένες παρατηρήσεις παρατίθεται η μέση τιμή και το τυπικό σφάλμα).

Γεωγρ. Διαμέρισμα	Μακεδονία								
	b(3m-9m)			c(m9-12m)			d(>12m)		
Διάρκεια ωρίμανσης Είδος γάλακτος	α	κ	π	α	κ	π	α	κ	π
Ουσία									
εννεανάλη	0,113	0,50 9	0,26 6	-	0,89 7	0,08 1	-	0,084±0, 084	0,024±0, 024
βενζαλδεΐδη	-	-	-	-	10,6 06	-	-	-	-
3-υδροξυβουτανάλη	-	0,32 0	-	-	0,65 5	-	-	-	0,017±0, 017
3-μεθυλ, 1-βουτανάλη	0,670	0,76 3	0,72 2	0,285	1,74 4	0,08 5	0,167	2,614±0, 925	5,445±5, 124
1-βουτενάλη	-	35,0 08	-	-	31,1 60	-	-	-	-
2-βουτενάλη	-	-	-	-	-	-	-	0,679±0, 679	-

Πίνακας 25: Οι αλδεΐδες στα δείγματα από το Β. Αιγαίο και την Πελοπόννησο (στις μη μεμονωμένες παρατηρήσεις παρατίθεται η μέση τιμή και το τυπικό σφάλμα).

Γεωγρ. Διαμέρισμα	Β.Αιγαίο				Πελοπόννησος				
	b(3m-9m)		c(m9-12m)		b(3m-9m)		c(m9-12m)		d(>12m)
Διάρκεια ωρίμανσης Είδος γάλακτος	π	π+κ	α	π	π	π	π	κ	π+κ
Ουσία									
εννεανάλη	0,183	0,17 0	0,177	0,06 3	0,136±0,06 9	0,184±0, 001	0,141	0,178±0, 063	
βενζαλδεΐδη	-	1,23 0	1,032	-	0,247±0,24 7	0,759±0, 258	0,717	0,815±0, 147	
3-υδροξυβουτανάλη	-	1,32 4	-	0,20 5	-	0,348±0, 348	-	0,206±0, 206	
3-μεθυλ, 1-βουτανάλη	0,143	0,23 3	0,241	0,01 3	0,327±0,32 7	0,296±0, 206	0,508	1,550±1, 271	

Πίνακας 26: Οι κετόνες στα δείγματα από την Κ. Ελλάδα, την Ήπειρο και τη Θεσσαλία (στις μη μεμονωμένες παρατηρήσεις παρατίθεται η μέση τιμή και το τυπικό σφάλμα).

Γεωγρ. Διαμέρισμα	Κ. Ελλάδα				Ήπειρος			Θεσσαλία		
	a(<3m)	b(3m-9m)		c(m9-12m)	d(>12m)	c(m9-12m)	d(>12m)	b(3m-9m)	c(m9-12m)	
Είδος γάλακτος	π+κ	κ	π	π	π+κ	π	π+κ	π	π+κ	α
Ουσία										
2-βουτανόνη	-	-	-	0,308±0,189	0,165±0,165	-	-	-	0,893	-
2-επτανόνη	0,504	0,109	-	0,139±0,065	0,189±0,189	0,401±0,260	-	0,415	0,185	0,222
2-οκτανόνη	0,182	0,088	0,154	0,145±0,071	0,165±0,027	0,266±0,118	0,092±0,074	1,234	0,058	0,186
2-εννεανόνη	-	-	-	-	-	-	0,060±0,060	-	-	-
2-εντεκανόνη	0,130	0,080	0,115	0,074±0,041	0,041±0,041	0,083±0,055	0,026±0,014	0,287	0,248	-
2-δεκατρινόνη	0,121	0,089	-	0,026±0,026	-	0,061±0,061	0,061±0,031	-	0,097	-
2-δεκατετρανόνη	0,146	0,176	-	0,080±0,027	0,166±0,095	0,078±0,043	0,110±0,030	-	0,055	-
3-υδροξυ-2-βουτανόνη	2,440	2,985	0,219	1,026±0,441	1,991±0,754	1,498±0,573	0,649±0,438	0,075	0,969	-

Πίνακας 27: Οι κετόνες στα δείγματα από την Κρήτη και το Ν. Αιγαίο (στις μη μεμονωμένες παρατηρήσεις παρατίθεται η μέση τιμή και το τυπικό σφάλμα).

Γεωγρ. Διαμέρισμα	Κρήτη					Ν.Αιγαίο					
	b(3m-9m)		c(m9-12m)		d(>12m)	a(<3m)	b(3m-9m)	c(m9-12m)	d(>12m)		
Είδος γάλακτος	π	π+κ	π	π+κ	π+κ	α	π+κ+α	α	α	π	π+κ
Ουσία											
2-βουτανόνη	1,117±1,117	0,521±0,521	1,002±0,489	-	0,191±0,191	0,077±0,044	-	0,398±0,398	0,108±0,064	-	1,388
2-επτανόνη	0,532±0,399	0,472±0,382	0,271±0,090	0,725±0,621	0,454±0,202	0,023±0,023	0,0	0,038±0,038	0,127±0,056	1,604	0,154
2-οκτανόνη	1,122±0,810	0,409±0,294	0,249±0,060	1,230±1,185	0,555±0,292	-	0,422	0,098±0,052	0,020±0,021	1,152	0,182
2-εννεανόνη	-	-	0,011±0,011	0,160±0,160	-	0,103±0,07	-	-	0,094±0,01	-	-

			1	0		0			8		
2-εντεκανόνη	0,102 ±0,06 7	0,157 ±0,05 0	0,072 ±0,02 0	0,110 ±0,11 0	0,170 ±0,07 4	0,105 ±0,03 6	0,0 89	0,267 ±0,16 8	0,135 ±0,02 4	0, 11 9	0,09 8
2-δεκατρινόνη	-	-	0,061 ±0,02 0	0,079 ±0,07 9	0,057 ±0,03 4	0,145 ±0,04 0	0,0 58	0,237 ±0,20 3	0,229 ±0,05 3	-	0,14 1
2-δεκατετρανόνη	0,095 ±0,01 8	0,039 ±0,03 9	0,077 ±0,02 1	0,108 ±0,05 3	0,189 ±0,07 8	0,082 ±0,04 4	0,0 46	0,486 ±0,25 6	0,745 ±0,40 0	0, 10 0	0,15 3
3-υδροξυ-2-βουτανόνη	2,400 ±2,06 3	1,925 ±1,92 5	4,195 ±2,79 4	5,833 ±2,64 5	7,770 ±4,97 7	0,064 ±0,03 3	0,0 65	0,149 ±0,10 8	0,332 ±0,08 6	0, 33 9	0,36 8

Πίνακας 28: Οι κετόνες στα δείγματα από τη Μακεδονία (στις μη μεμονωμένες παρατηρήσεις παρατίθεται η μέση τιμή και το τυπικό σφάλμα).

Γεωγρ. Διαμέρισμα	Μακεδονία								
	b(3m-9m)			c(m9-12m)			d(>12m)		
Διάρκεια ωρίμανσης Είδος γάλακτος	α	κ	π	α	κ	π	α	κ	π
Ουσία									
2-βουτανόνη	-	-	-	-	1,9 76	-	-	1,314±1,31 4	8,307±8, 025
2-επτανόνη	1,488	-	0,6 38	2,545	0,9 65	-	-	0,101±0,10 1	0,080±0, 080
2-οκτανόνη	0,510	-	0,4 86	0,347	-	0,1 20	-	-	0,513±0, 233
2-εντεκανόνη	0,098	-	-	0,243	-	-	-	0,067±0,06 7	0,610±0, 610
2-δεκατρινόνη	-	-	-	-	-	-	-	-	0,320±0, 320
3-υδροξυ-2-βουτανόνη	1,514	6,9 82	-	0,626	3,5 75	-	7,177	10,524±10, 524	0,213±0, 213

Πίνακας 29: Οι κετόνες στα δείγματα από το Β. Αιγαίο και την Πελοπόννησο (στις μη μεμονωμένες παρατηρήσεις παρατίθεται η μέση τιμή και το τυπικό σφάλμα).

Γεωγρ. Διαμέρισμα	Β.Αιγαίο				Πελοπόννησος				
	b(3m-9m)		c(m9-12m)		b(3m-9m)		c(m9-12m)		d(>12m)
Διάρκεια ωρίμανσης Είδος γάλακτος	π	π+κ	α	π	π	π	π	κ	π+κ
Ουσία									
2-βουτανόνη	-	0,915	-	0,138	2,317±1,460	0,403±0,403	-	-	3,088±0,198
2-επτανόνη	0,047	-	0,105	0,115	-	0,060±0,060	-	-	0,269±0,136
2-οκτανόνη	0,514	0,209	0,230	0,076	0,078±0,030	0,257±0,046	0,069	-	0,343±0,274
2-εννεανόνη	-	-	-	-	-	-	-	-	0,073±0,073
2-εντεκανόνη	0,305	-	0,055	0,072	0,025±0,025	0,190±0,007	0,036	-	0,141±0,032
2-δεκατρινόνη	0,177	-	-	0,039	-	0,105±0,105	-	-	0,099±0,099
2-δεκατετρανόνη	0,085	0,106	0,159	-	0,104±0,009	0,141±0,100	0,264	-	0,189±0,075
3-υδροξυ- 2-βουτανόνη	0,765	2,801	4,113	0,145	0,537±0,537	0,683±0,523	0,081	-	1,043±0,867

Πίνακας 30: Οι λοιπές ουσίες (λακτόνες, αλκάνια, αμίνες, τερπένια) στα δείγματα από την Κ. Ελλάδα και την Ήπειρο (στις μη μεμονωμένες παρατηρήσεις παρατίθεται η μέση τιμή και το τυπικό σφάλμα).

Γεωγρ. Διαμέρισμα	Κ. Ελλάδα				Ήπειρος		Θεσσαλία			
	a(<3m)	b(3m-9m)	c(m9-12m)	d(>12m)	c(m9-12m)	d(>12m)	b(3m-9m)	c(m9-12m)		
Είδος γάλακτος	π+κ	κ	π	π	π+κ	π	π+κ	π	π+κ	α
Ουσία										
γ-δωδεκαλακτόνη	3,191	-	0,093	0,211±0,033	0,288±0,146	0,128±0,064	0,414±0,091	0,496	0,280	-
δ-δωδεκαλακτόνη	0,920	0,649	0,141	0,533±0,155	0,401±0,003	1,154±0,879	0,463±0,090	1,118	0,102	-
δεκατετράνιο	-	-	-	-	-	-	-	0,490	-	-
δεκαεξάνιο	-	-	-	-	-	-	-	1,463	-	-
δεκαεπτάνιο	-	-	-	-	-	-	-	1,262	-	-
μεθαναμίνη	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,106
2-πενταναμίνη	-	-	-	-	-	0,151±0,151	-	-	-	-
βήτα-κιτρονελλόλη	-	-	-	-	0,318±0,318	-	-	-	-	-

Πίνακας 31: Οι λοιπές ουσίες (λακτόνες, αλκάνια, αμίνες, τερπένια) στα δείγματα από την Κρήτη και το Ν. Αιγαίο (στις μη μεμονωμένες παρατηρήσεις παρατίθεται η μέση τιμή και το τυπικό σφάλμα).

Γεωγρ. Διαμέρισμα	Κρήτη					Ν.Αιγαίο					
	b(3m-9m)		c(m9-12m)		d(>12m)	a(<3m)	b(3m-9m)	c(m9-12m)	d(>12m)		
Είδος γάλακτος	π	π+κ	π	π+κ	π+κ	α	π+κ+α	α	α	π	π+κ
Ουσία											
γ-δωδεκαλακτόνη	0,983±0,213	3,236±2,874	0,597±0,154	1,300±0,025	1,090±0,354	0,606±0,200	-	0,125±0,076	0,672±0,092	0,085	0,265
δ-δωδεκαλακτόνη	0,416±0,101	0,731±0,078	0,901±0,383	0,443±0,115	1,182±0,311	-	0,233	0,730±0,072	-	0,236	0,318
2-πενταναμίνη	-	-	0,075±0,075	-	-	-	-	-	-	-	-
2-οκταναμίνη	-	-	-	-	-	-	-	-	0,067±0,048	-	-
5-μεθυλ-2-εξαναμίνη	-	-	0,125±0,12	-	-	-	-	-	-	-	-

βήτα- κιτρονελλό λη φαρνεσόλη	0,110	0,096	5	-	-	-	-	-	-	0,	0,25
	±0,05	±0,09	0,194	-	-	-	-	-	-	11	2
	3	6	±0,19	-	-	-	-	-	-	1	
trans- καρροφυλλ ένιο	-	0,186	-	-	-	-	-	-	-	-	0,14
	-	±0,18	-	-	-	-	-	-	-	-	4
	-	6	-	-	-	-	-	-	-	0,	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	36	
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	

Πίνακας 32: Οι λοιπές ουσίες (λακτόνες, αλκάνια, αμίνες, τερπένια) στα δείγματα από την Κρήτη και το Ν. Αιγαίο (στις μη μεμονωμένες παρατηρήσεις παρατίθεται η μέση τιμή και το τυπικό σφάλμα).

Γεωγρ. Διαμέρισμα	Μακεδονία								
	b(3m-9m)			c(m9-12m)			d(>12m)		
Διάρκεια ωρίμανσης Είδος γάλακτος	α	κ	π	α	κ	π	α	κ	π
Ουσία									
γ- δωδεκαλακτόνη	-	-	-	-	-	-	0,243	-	-
δ- δωδεκαλακτόνη	10,599	5,69	29,0	1,296	10,8	1,02	0,735	4,274±1,	1,076±0,
τριμεθυλ- πυραζίνη	-	-	39	-	40	6	-	156	580
τετραμεθυλ- πυραζίνη	-	-	-	-	-	-	-	-	0,307±0,
2-οκταναμίνη	-	-	-	-	1,02	-	-	0,101±0,	5,300±5,
	-	-	-	-	3	-	-	101	300
5-μεθυλ- 2- εξαναμίνη	-	-	0,60	-	8,24	0,09	0,336	0,727±0,	0,517±0,
	-	-	2	-	5	1	-	350	417
2- φορμυλισταμίνη	-	-	-	0,445	-	-	-	0,211±0,	0,056±0,
	-	-	-	-	-	-	-	211	056

Πίνακας 33: Οι λοιπές ουσίες (λακτόνες, αλκάνια, αμίνες, τερπένια) στα δείγματα από το Β. Αιγαίο και την Πελοπόννησο (στις μη μεμονωμένες παρατηρήσεις παρατίθεται η μέση τιμή και το τυπικό σφάλμα).

Γεωγρ. Διαμέρισμα	Β.Αιγαίο				Πελοπόννησος				
	b(3m-9m)		c(m9-12m)		b(3m-9m)		c(m9-12m)		d(>12m)
Διάρκεια ωρίμανσης Είδος γάλακτος	π	π+κ	α	π	π	π	π	κ	π+κ
Ουσία									
γ- δωδεκαλακτόνη	0,795	0,52	-	0,08	0,495±0,04	0,200±0,2	5,981	1,247±0,8	
		9		6	7	00		78	
δ- δωδεκαλακτόνη	0,354	0,46	0,596	0,16	0,596±0,14	0,632±0,2	1,005	1,528±1,0	
		3		9	0	78		96	
βήτα- κίτρονελλόλη	-	0,12	0,034	-	-	-	-	-	-
		4							

