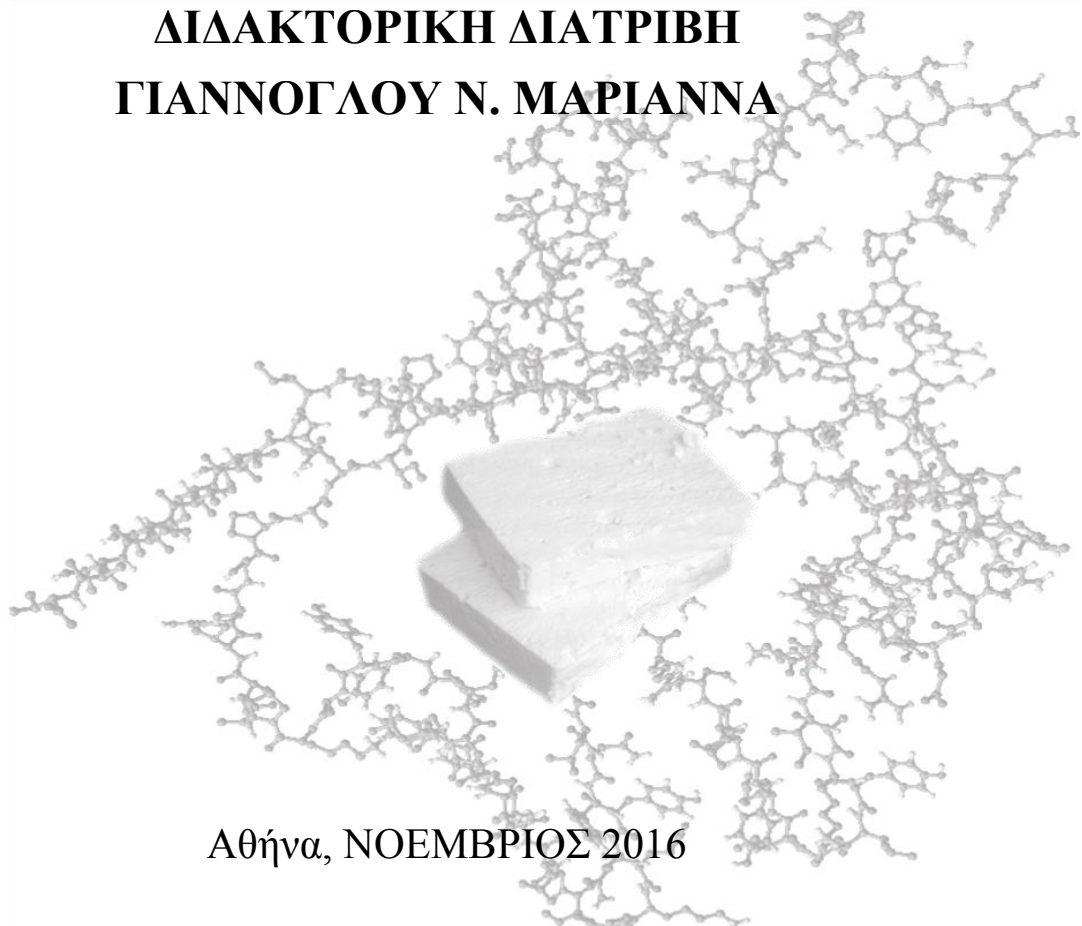




Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Χημικών Μηχανικών
Τομέας Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών (IV)
Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων

Έλεγχος της Δομής και της Δράσης Ενζύμων με Υπερυψηλή Πίεση: Εφαρμογή στην Παραγωγή και Ωρίμανση Γαλακτοκομικών Προϊόντων

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΓΙΑΝΝΟΓΛΟΥ Ν. ΜΑΡΙΑΝΝΑ**



Αθήνα, ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2016

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ανώτατη Σχολή Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Πολυτεχνείου δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα (Ν.5343/1932, Άρθρο 202).

Στο σύζυγό μου Γιώργο και στην κορούλα μας Ιωάννα...

Πρόλογος

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Π. κατά το διάστημα 2009-2016. Το διάστημα αυτό αποτέλεσε ένα ιδιαίτερα σημαντικό κομμάτι της ζωής μου, προσφέροντας μου τη δυνατότητα να εμπλουτίσω τις γνώσεις μου, αλλά και την ευκαιρία να γνωρίσω και να συνεργαστώ με διαφορετικούς ανθρώπους σε ένα ιδιαίτερα φιλικό περιβάλλον. Στο σημείο αυτό νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά όλους όσους με βοήθησαν, ο καθένας με το δικό του ξεχωριστό τρόπο, κατά τη διάρκεια της εργασίας αυτής.

Ευχαριστώ θερμά:

Τον Καθηγητή ΕΜΠ **κ. Πέτρο Ταούκη**, για την τιμή να με εντάξει στην ομάδα του, την ανάθεση της παρούσας εργασίας, την πολύτιμη και ουσιαστική καθοδήγησή του σε όλη τη διάρκεια αυτής, τη μετάδοση όλων των πολύτιμων γνώσεων του που συνέβαλαν στην ανάπτυξη της επιστημονικής μου σκέψης και θα με βοηθήσουν στην επαγγελματική μου καριέρα, για την κατανόηση και την υποστήριξή του σε κάποιες ιδιαίτερα δύσκολες περιόδους, καθώς και για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με καινοτόμες τεχνολογίες επεξεργασίας τροφίμων όπως είναι η Υπερυψηλή Πίεση.

Την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια **κ. Γκόλφω Μοάτσου** του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΓΠΑ) για τη συμμετοχή της στη συμβουλευτική επιτροπή μου, τη μετάδοση των πολύτιμων γνώσεών της και την καθοδήγηση για την ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής. Επιπλέον για τη συμβολή της για τη παρασκευή των τυριών του τελευταίου σταδίου της παρούσας διατριβής στο Εργαστήριο Γαλακτοκομίας του ΓΠΑ.

Την Καθηγήτρια ΕΜΠ **κ. Κωνσταντίνα Τζια**, για την αποδοχή και συμμετοχή της στη συμβουλευτική επιτροπή μου, τις συμβουλές της, τη μετάδοση των πολύτιμων γνώσεών της και την καθοδήγηση κατά την παραμονή μου στο εργαστήριο το διάστημα εκπόνησης της διατριβής μου.

Τον Επίκουρο Καθηγητή **κ. Πέτρο Καταπόδη** του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τη συμμετοχή του στη συμβουλευτική επιτροπή μου και την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή του στα πειράματα απομόνωσης και καθαρισμού του ενζύμου.

Την Καθηγήτρια ΕΜΠ **κ. Βασιλική Ωραιοπούλου**, τον Καθηγητή ΓΠΑ **κ. Νικόλαο Στοφόρο** καθώς και την Επίκουρο καθηγήτρια του ΤΕΙ Αθηνών **κ. Γιαννακούρου Μαρία**, για τη συμμετοχή τους στην εξεταστική επιτροπή, το χρόνο που διέθεσαν και τις παρατηρήσεις τους.

Τη Χημικό Μηχανικό και φίλη μου **Ελένη Πλατάκου** για τη βοήθεια κατά τη διάρκεια των τυροκομήσεων και των φυσικοχημικών αναλύσεων των τυριών.

Τη Χημικό Μηχανικό και φίλη μου **Ζωή Καρρά** η οποία βοήθησε πολύ στην ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής μέσω της εκπόνησης της διπλωματικής της εργασίας.

Τον Ερευνητή Α΄ **κ. Γεώργιο Νούνεση** του «ΕΚΕΦΕ» Δημόκριτος για τη φιλοξενία του στο Εργαστήριο Βιομοριακής Φυσικής και την καθοδήγησή του πάνω σε θέματα που σχετίζονται με δομικές μεταβολές πρωτεϊνικών συστημάτων.

Τον διδάκτορα **Φιλήμωνα Σταύρου** του επιστημονικού προσωπικού του Εργαστηρίου Βιομοριακής Φυσικής (ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος) για την πολύτιμη βοήθεια του κατά τη συλλογή και επεξεργασία δεδομένων που προέκυψαν κατά την χρήση της Φασματοπολωσιμετρίας Κυκλικού Διχρωισμού.

Τους γαλακτοκόμους του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας του ΓΠΑ **κ. Πάσχο Θεόδωρο και κ. Γραμματικά Ηλία**, για τη βοήθεια που μου προσέφεραν κατά τη διάρκεια των τυροκομήσεων.

Τους συναδέλφους μου και διδάκτορες **Αλεξανδράκη Ζαχαρία, Θεοφανία Τσιρώνη, Βιργινία Γιάννου, Ευφημία Δερμεσονλούογλου, Αθηνά Τζιμάνη, Δημήτρη Τσιμογιάννη, Ελένη Γώγου, Μαρία Τσεβδού** και τους υποψήφιους διδάκτορες **Βάνα Ανδρέου και Γιώργο Δημόπουλο** καθώς και όλα τα παιδιά του εργαστηρίου για το ζεστό κλίμα που δημιούργησαν όλα αυτά τα χρόνια, τη φιλία τους, την καθημερινή τους βοήθεια και συμπαράσταση και την άψογη συνεργασία μας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ **στους γονείς μου** για την ανιδιοτελή βοήθεια, αγάπη και συνεχή συμπαράστασή τους.

Τέλος το πιο μεγάλο ευχαριστώ ανήκει στην οικογένειά μου, στον διδάκτορα και σύζυγό μου **Γιώργο Κατσαρό** για τις συμβουλές του και την πολύτιμη βοήθειά του κατά το σχεδιασμό και την εκπόνηση των πειραμάτων καθώς και για την καθοδήγησή του για την περάτωση της διατριβής αυτής καθώς και στην κορούλα μας **Ιωάννα Κατσαρού** για τη συμπαράσταση και την τεράστια υπομονή της κατά τη συγγραφή της παρούσας διατριβής.

Μαριάννα Γιαννόγλου

Αθήνα, 2016

Σκοπός της Διδακτορικής Διατριβής

Σκοπός της διδακτορικής διατριβής είναι η μελέτη της μοναδικής δυνατότητας που παρέχει η Υπερυψηλή υδροστατική πίεση (ΥΠ) να μεταβάλει τη δομή και να προκαλεί μεταβολή της δραστηριότητας ενζύμων· μείωση και σε μερικές περιπτώσεις αύξηση σε επιλεγμένες συνθήκες. Η δράση αυτή παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για συστήματα στα οποία η ενζυμική δράση αποτελεί επιθυμητό φαινόμενο και συντελεί στη διαμόρφωση των τελικών χαρακτηριστικών και την ποιότητα του προϊόντος. Ιδιαίτερη περίπτωση τέτοιας ενζυμικής δράσης αποτελεί μία σειρά από ένζυμα που συμμετέχουν στη διαδικασία της παραγωγής και κυρίως της ωρίμανσης του τυριού και τα οποία είτε υπάρχουν στις πρώτες ύλες είτε προστίθενται άμεσα ή έμμεσα για να καταλύσουν συγκεκριμένες δράσεις, οι οποίες στις ενδεικνυόμενες συνθήκες θα οδηγήσουν σε επιθυμητό/αριστοποιημένο προϊόν. Για την παρασκευή του προϊόντος αυτού απαιτείται πολύ αυστηρός έλεγχος των συνθηκών και σε πολλές περιπτώσεις για μεγάλη χρονική διάρκεια. Η προσπάθεια για επιτάχυνση αυτής της διαδικασίας, η οποία συνεπάγεται μεγάλη μείωση του κόστους, αποτελεί σημαντικό κομμάτι της έρευνας για το τυρί και την ωρίμανσή του· τις περισσότερες φορές χωρίς να υπάρχουν ικανοποιητικά αποτελέσματα. Ένας μικρός αριθμός των ερευνητικών προσπαθειών αναφέρεται και στην εφαρμογή της ΥΠ για τον έλεγχο των ενζυμικών φαινομένων προς την κατεύθυνση της ταχύτερης και ενδεχομένως βελτιωμένης διαδικασίας ωρίμανσης του τυριού. Η παρούσα διατριβή επικεντρώθηκε στη μελέτη των συγκεκριμένων ενζύμων, της ποσοτικής ανάδειξης της μεταβολής της δραστηριότητάς τους, την ερμηνεία αυτού του φαινομένου μέσω μελέτης των δομικών μεταβολών τους και τέλος τη μελέτη της εφαρμογής στην παρασκευή λευκού τυριού άλμης για την ανάδειξη των ελεγχόμενων πλεονεκτημάτων μέσω σύγκρισης με αντίστοιχο συμβατικά παραγόμενο προϊόν.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διατριβή έχει ως αντικείμενο τη διερεύνηση της επίδρασης της συνδυασμένης εφαρμογής Υπερυψηλής Πίεσης (ΥΠ) και ήπιων θερμοκρασιών, στη δομή και τη δράση ενδοκυτταρικών ενζύμων οξυγαλακτικών καλλιέργειών εκκίνησης που χρησιμοποιούνται σε τυριά άλμης. Επιπρόσθετα, αφορά στη μελέτη των πιθανών αποτελεσμάτων του ελέγχου της δράσης των ενζύμων αυτών στο στάδιο της ωρίμανσης του τυριού, με απώτερο σκοπό την παραγωγή τυριού με βελτιωμένα οργανοληπτικά, φυσικοχημικά και δομικά χαρακτηριστικά και μειωμένο χρόνο ωρίμανσης.

Με στόχο την ταχύτερη ωρίμανση και τη βελτίωση των χαρακτηριστικών του τελικού προϊόντος, αρχικά κρίθηκε απαραίτητος ο καθορισμός των βέλτιστων συνθηκών επεξεργασίας των οξυγαλακτικών καλλιέργειών με ΥΠ. Ειδικότερα, διερευνήθηκε η επίδραση τριών παραμέτρων, της ΥΠ, της θερμοκρασίας και του χρόνου επεξεργασίας στη δραστηριότητα της γενικής αμινοπεπτιδάσης *PerN* και της αμινοπεπτιδάσης ειδικής δράσης *PerX*, στελεχών των οξυγαλακτικών καλλιέργειών *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* και *Lactococcus lactis*: τα στελέχη που μελετήθηκαν έχουν χρησιμοποιηθεί και ως καλλιέργειες εκκίνησης κατά την παρασκευή τυριού Φέτα. Η επεξεργασία των οξυγαλακτικών καλλιέργειών με διαφορετικούς συνδυασμούς ΥΠ (100-450 MPa) και ήπιων θερμοκρασιών (20-40°C) είχε ως αποτέλεσμα τη διαφορετική συμπεριφορά των ενδοκυτταρικών ενζύμων, προκαλώντας την ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση των αμινοπεπτιδασών, ανάλογα με τις συνθήκες επεξεργασίας που εφαρμόστηκαν. Η μεταβολή της δραστηριότητας των αμινοπεπτιδασών τόσο για τις συνθήκες ενεργοποίησης όσο και για τις συνθήκες απενεργοποίησης ακολούθησε κινητική πρώτη τάξης. Με την στατιστική προσαρμογή των πειραματικών αποτελεσμάτων στις αντίστοιχες μαθηματικές εξισώσεις, υπολογίστηκαν τόσο στο εύρος συνθηκών ενεργοποίησης όσο και στο εύρος των συνθηκών απενεργοποίησης, οι σταθερές των ρυθμών ενεργοποίησης/απενεργοποίησης των ενζύμων, αντίστοιχα. Αναπτύχθηκαν στη συνέχεια δευτερογενή μαθηματικά μοντέλα πρόβλεψης της δραστηριότητας των αμινοπεπτιδασών, στο υπό μελέτη εύρος των συνθηκών επεξεργασίας. Μέσω των συγκεκριμένων εξισώσεων προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες επεξεργασίας με κριτήριο τη μέγιστη ενεργοποίηση των αμινοπεπτιδασών *PerN* και *PerX*, οι οποίες αντιστοιχούν σε ΥΠ 200 MPa, θερμοκρασία 20°C και χρόνο επεξεργασίας 20 min.

Η διαφορετική συμπεριφορά (ενεργοποίηση/απενεργοποίηση) των συγκεκριμένων αμινοπεπτιδασών μετά από την επεξεργασία τους με ΥΠ και θερμοκρασία, θα μπορούσε να αποδοθεί στην πρόκληση δομικών μεταβολών στα ένζυμα. Για την εξήγηση της επίδρασης της ΥΠ στη δραστηριότητα των ενζύμων αυτών, έγινε καθαρισμός της αμινοπεπτιδάσης *PerX* του στελέχους *S. thermophilus* και διερευνήθηκαν πιθανές μεταβολές της δευτεροταγούς και τριτοταγούς δομής της, μετά από επεξεργασία με διάφορους συνδυασμούς ΥΠ και θερμοκρασίας. Η απομόνωση και ο καθαρισμός της αμινοπεπτιδάσης επιτεύχθηκε με εφαρμογή χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής, μοριακής διήθησης και υδροξυαπατίτη. Μετά από SDS- και Native-Page ηλεκτροφόρηση, προέκυψε ότι η αμινοπεπτιδάση *PerX* αποτελεί διμερή πρωτεΐνη σχετικής μοριακής μάζας 86 kDa. Πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη της συνδυασμένης επίδρασης ΥΠ και θερμοκρασίας στη δραστηριότητα της καθαρής *PerX* με σκοπό την επιβεβαίωση της διαφορετικής συμπεριφοράς στην επεξεργασία με ΥΠ της καθαρής μορφής της αμινοπεπτιδάσης *PerX* (ενεργοποίηση/απενεργοποίηση), τη σύγκριση με τα αποτελέσματα που προέκυψαν για τη μη καθαρή μορφή του ενζύμου και τον καθορισμό των συνθηκών επεξεργασίας του ενζύμου για την επακόλουθη μελέτη των μεταβολών της δομής του. Η καθαρή αμινοπεπτιδάση εμφάνισε παρόμοια συμπεριφορά με τη μη καθαρή της μορφή στην επεξεργασία με ΥΠ και ήπιες θερμοκρασίες (ενεργοποίηση/απενεργοποίηση), ωστόσο η πρώτη εμφανίστηκε περισσότερο ανθεκτική στις

συνθήκες επεξεργασίας. Μέσω κατάλληλων μαθηματικών εξισώσεων υπολογίστηκαν τόσο στο εύρος συνθηκών ενεργοποίησης όσο και στο εύρος των συνθηκών απενεργοποίησης, οι σταθερές των ρυθμών ενεργοποίησης/απενεργοποίησης του ενζύμου, αντίστοιχα. Μέγιστη ενεργοποίηση της καθαρής PepX, εμφανίστηκε σε συνθήκες 200 MPa, 20°C και 20 min, όπως ακριβώς και στην περίπτωση της μη καθαρής της μορφής. Η μελέτη των δομικών μεταβολών της PepX μετά από επεξεργασία με ΥΠ (100-450 MPa), θερμοκρασία 20°C και χρόνο επεξεργασίας 20 min, πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού. Τα φάσματα κυκλικού διχρωισμού σχετικά με τη φυσιολογική διαμόρφωση της αμινοπεπτιδάσης PepX αποκάλυψαν δύο αρνητικές ελλειπτικότητες σε μήκη κύματος 208 και 220 nm με τη δεύτερη να εμφανίζεται εντονότερη, ενώ η ανάλυση των φασμάτων της ανεπεξεργαστής PepX στο άπω υπεριώδες, αποκάλυψε ότι το 34.8% της δευτεροταγούς δομής της PepX αποτελείται από δομή α-έλικας, ενώ το 14.4% από β-πτυχωτά φύλλα και β-στροφές. Οι μεταβολές της δευτεροταγούς δομής του ενζύμου μετά από επεξεργασία με ΥΠ και ήπια θερμική επεξεργασία, εξετάστηκαν στην άπω υπεριώδη περιοχή (190-260 nm) ενώ οι μεταβολές της τριτοταγούς δομής στην εγγύς υπεριώδη περιοχή (260-360 nm). Το επεξεργασμένο με ΥΠ ένζυμο σε συνθήκες 200 MPa, 20°C και 20 min, φάνηκε να διατηρεί τη δευτεροταγή του δομή ενώ αντίθετα σημαντική απώλεια παρουσιάστηκε αναφορικά με την τριτοταγή του δομή. Αντίθετα, σε συνθήκες επεξεργασίας 450 MPa, 20°C και 20 min, παρατηρήθηκαν σημαντικές μη αντιστρεπτές μεταβολές της δευτεροταγούς και τριτοταγούς δομής της αμινοπεπτιδάσης PepX.

Έχοντας ως τελικό στόχο την παρασκευή και μελέτη λευκού τυριού άλμης τύπου Φέτας με προσθήκη καλλιέργειας εκκίνησης με ενεργοποιημένες με ΥΠ αμινοπεπτιδάσες, σε επόμενο βήμα πραγματοποιήθηκε διερεύνηση και κινητική μελέτη της επίδρασης της ΥΠ (0.1-450 MPa) και ήπιων θερμοκρασιών (20-40°C) στο φορτίο και την ικανότητα οξίνισης των προαναφερόμενων στελεχών. Η μεταβολή του φορτίου των κυττάρων εξαρτήθηκε από τις συνθήκες επεξεργασίας. Εντονότερες συνθήκες επεξεργασίας είχαν ως αποτέλεσμα τον όλο και μικρότερο αριθμό ζωντανών κυττάρων. Μέσω της εξίσωσης Baranyi, υπολογίστηκαν οι σταθερές του ρυθμού μεταβολής του φορτίου (απενεργοποίησης) των επεξεργασμένων με ΥΠ και θερμοκρασία κυττάρων. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι σε συνθήκες επεξεργασίας 200 MPa, 20°C και 20 min, για τα στελέχη *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* και *L. lactis* παρατηρήθηκε απενεργοποίηση κατά 2.2, 11.1 και 12.7%, αντίστοιχα. Η επεξεργασία με ΥΠ και ήπιες θερμοκρασίες οδήγησε σε μείωση της παραγόμενης από τους μικροοργανισμούς ποσότητας οξέος. Για όλες τις καλλιέργειες και σε όλες τις συνθήκες επεξεργασίας υπολογίστηκαν, με χρήση γραμμικής παλινδρόμησης, οι σταθερές του ρυθμού οξίνισης. Σε συνθήκες επεξεργασίας 200 MPa, 20°C και 20 min, για τα στελέχη *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* και *L. lactis* παρατηρήθηκε μείωση της ικανότητας οξίνισης κατά 30.3, 44.8 και 45.4%, αντίστοιχα.

Η έρευνα ολοκληρώθηκε με την εφαρμογή της ΥΠ ως στάδιο της παρασκευής λευκού τυριού άλμης τύπου Φέτας μικρής κλίμακας, για την επιβεβαίωση των δυνητικών πλεονεκτημάτων όσον αφορά τη χρονική διάρκεια του σταδίου ωρίμανσης καθώς και τη βελτίωση των φυσικοχημικών, οργανοληπτικών και δομικών χαρακτηριστικών του προϊόντος. Πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης της χρήσης μείγματος επεξεργασμένων με ΥΠ (200 MPa-20°C-20 min) των στελεχών *Lactococcus lactis* ACA-DC 0049: *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0022: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105, 2:1:1, ως καλλιέργειας εκκίνησης κατά την τυροκόμηση λευκού τυριού άλμης τύπου Φέτας, μελέτη της επίδρασης του μείγματος των επεξεργασμένων με ΥΠ στελεχών ως συμπληρωματικής καλλιέργειας, καθώς και μελέτη της επίδρασης της επεξεργασίας με ΥΠ (200 MPa-20°C-20 min) του ίδιου του τυριού. Δείγματα αναφοράς (Control) μελετήθηκαν παράλληλα.

Η προσθήκη κατά την τυροκόμηση επεξεργασμένων με ΥΠ καλλιιεργειών εκκίνησης, οδήγησε σε αύξηση της πρωτεόλυσης κατά το δεύτερο στάδιο της ωρίμανσης του τυριού όπως φάνηκε από τα αυξημένα επίπεδα του υδατοδιαλυτού αζώτου σε 12% τριχλωροξικό οξύ και 5% φωσφοροβολφραμικό οξύ καθώς και από την ανάλυση των πεπτιδίων των εκχυλισμάτων των τυριών. Η βαθμολογία της οργανοληπτικής αξιολόγησης των συγκεκριμένων τυριών εμφανίστηκε υψηλότερη συγκριτικά με το τυρί το οποίο δεν είχε υποστεί κανενός είδους επεξεργασία (τυρί αναφοράς). Η υπεροχή των συγκεκριμένων τυριών ήταν εμφανής από την αρχή του δεύτερου σταδίου ωρίμανσης, ενώ δεν ανιχνεύτηκε και η ύπαρξη πικρής γεύσης, χαρακτηριστικό που μπορεί να παρατηρηθεί σε τυριά με περιορισμένη ωρίμανση. Αν και στο επεξεργασμένο με ΥΠ τυρί προσδιορίστηκαν οι υψηλότερες δραστηριότητες των αμινοπεπτιδασών PerX και APer και η εξέλιξη της πρωτεόλυσής του βάσει των αζωτούχων ενώσεων και της ανάλυσης των πεπτιδίων φάνηκε αντίστοιχη των τυριών που παρασκευάστηκαν με μέρος επεξεργασμένης με ΥΠ καλλιέργειας, αυτό δε συμβάδισε με τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής αξιολόγησης των συγκεκριμένων δειγμάτων.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν η προσθήκη επεξεργασμένης με ΥΠ καλλιέργειας εκκίνησης μπορεί να αυξήσει την πρωτεόλυση και κατ'επέκταση να επιφέρει επιτάχυνση του δευτέρου σταδίου ωρίμανσης καθώς και τροποποίηση-βελτίωση των δομικών, αρωματικών και γευστικών χαρακτηριστικών λευκού τυριού άλμης τύπου Φέτας.

STRUCTURAL MODIFICATION AND ACTIVITY CONTROL OF ENZYMES USING HIGH PRESSURE: APPLICATION IN THE PRODUCTION AND RIPENING OF DAIRY PRODUCTS

PhD thesis

By

Marianna N. Giannoglou

ABSTRACT

The objective of the dissertation was to investigate the effect of High Pressure (HP) processing at mild temperatures, on the structure and activity of intracellular enzymes from lactic acid bacteria used as starter cultures of cheeses in brine. The production of a cheese with improved organoleptic, physicochemical and structural characteristics with reduced ripening time based on controlling the activity of these intracellular enzymes, was studied.

The effect of HP (100–450 MPa) combined with temperature (20–40°C) on the activity of the general aminopeptidase PepN and the proline-specific aminopeptidase PepX of the strains *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105, *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0022 and *Lactococcus lactis* ACA-DC 0049, used as starter culture for the production of the Greek cheese in brine (Feta), was studied. The results showed activation or inactivation of aminopeptidases by HP, depending on the process conditions, and suggest interspecific variation in their pressure sensitivity. Two multi-parameter equations were developed for predicting the activation and inactivation of all aminopeptidases in the studied domain. The optimum process conditions for acceleration of the significant long-duration cheese ripening step, were selected based on maximum enzyme activation and HP process cost control. Overall, processing at 200 MPa and 20°C were selected as the optimum conditions at which maximum activation of all aminopeptidases from all studied strains could be achieved. A 20-min treatment at these conditions leads to an average threefold increase in activity which could lead to better and faster maturation of white cheese.

The knowledge on the HP-induced conformational alterations in the protein structure of peptidases is of high importance, since it can contribute to elucidation of how structural changes are correlated to remaining enzyme activity. PepX isolated from *S. thermophilus* ACA DC 0022 was purified and found to comprise of two subunits of equal molecular mass estimated as 86 kDa by SDS-PAGE and native-PAGE electrophoresis. The effect of HP (100 to 450 MPa), at temperatures from 20 to 40°C on purified PepX activity and structure was studied. Activation of the enzyme was observed after processing at pressures 100-200 MPa and temperatures 20-30°C. More intense processing conditions led to enzyme inactivation. PepX HP-induced conformational changes were investigated, through application of Circular Dichroism spectroscopy (CD). Pressures up to 200 MPa may result in a structurally molten globule-like state, where the PepX maintains a secondary structure of untreated protein molecules, while the tertiary structure is substantially affected, leading to increase of enzyme activity. Both secondary and tertiary structures were severely affected at higher pressures (450 MPa) resulting in enzyme activity reduction.

The effect of pressures 0.1-450 MPa combined with temperatures 20-40°C on the cell lysis and the ability to produce acid by the used lactic acid bacteria, was also investigated. The viability of the

cells depended on the process conditions. More intense process conditions resulted in lower number of viable cells. At the optimum processing conditions (based on enzyme activity), 200 MPa 20°C and 20 min, inactivation of the strains *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* and *L. lactis* of about 2.2, 11.1 and 12.7% was observed, respectively. The HP treatment impaired acid production rate depending on the process parameters. More intense process conditions resulted in reduction of lactic acid production correlated to lower pH value decrease. A 30.3, 44.8 and 45.4% reduction of acidification ability was measured after processing at the same optimal conditions *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* and *L. lactis* strains, respectively.

The research was completed with the application of HP as a stage of a lab-scale production of a white cheese in brine, to validate and confirm the potential benefits of aminopeptidases activity increase in terms of reduction of ripening time and improvement of the physicochemical, organoleptic and structural characteristics of the final product. HP (200MPa-20°C-20 min) was applied directly on white brined cheese or on the starter culture used for cheese in brine manufacture (ratio: *S. thermophilus*:*L. lactis*:*L. bulgaricus* 2:1:1). Microbial, textural, physicochemical and organoleptic characteristics as well as proteolysis progress were assessed during the 2nd stage of ripening in cold stores. The obtained results were compared to corresponding results from untreated (control) cheese.

Cheeses made with HP-treated starters had increased secondary proteolysis. Organoleptic scoring of these cheeses was higher during the whole storage period compared to control and HP-treated cheese. Their superiority was evident even at the early stages of ripening in cold stores, since no bitterness was detected. Although HP treated cheeses showed the highest increase in aminopeptidases activities and proteolysis progress found to be similar as cheeses produced with partial HP treated starter culture, this was not correlated to their organoleptic evaluation. According to the obtained results, HP-treated starter culture may accelerate proteolysis and potentially the ripening of cheese-in-brine.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σκοπός της Διδακτορικής Διατριβής.....	i
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	iii
ABSTRACT.....	vii
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	1
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	5
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	13
ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΥΡΙΟΥ – ΤΟ ΣΤΑΔΙΟ ΤΗΣ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ.....	13
2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	13
2.2. ΒΑΣΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΕΜΠΛΕΚΟΜΕΝΑ ΣΤΗΝ ΤΥΡΟΚΟΜΗΣΗ.....	15
2.2.1. Το Γάλα Τυροκόμησης.....	15
2.2.2. Η Πυτιά Τυροκόμησης ως παράγοντας πήξης του γάλακτος.....	23
2.2.3. Οξυγαλακτικές Καλλιέργειες Εκκίνησης.....	25
2.2.4. Το Αλάτι στην Παρασκευή Τυριού.....	28
2.2.5. Δευτερεύουσες Πρώτες Ύλες Παρασκευής Τυριού.....	29
2.2.6. Απόδοση του Γάλακτος σε Τυρί.....	31
2.2.7. Αλλοιώσεις - Κίνδυνοι στα Τυριά.....	31
2.3. ΤΟ ΣΤΑΔΙΟ ΤΗΣ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ ΤΟΥ ΤΥΡΙΟΥ.....	33
2.3.1. Εισαγωγή.....	33
2.3.2. Μικροβιολογικές Μεταβολές κατά την Ωρίμανση του Τυριού.....	33
2.3.3. Βιοχημικές Μεταβολές κατά την Ωρίμανση του Τυριού.....	34
2.3.3.1. Το στάδιο της πρωτεόλυσης.....	35
2.3.3.1.1. Δράση ενδογενών πρωτεϊνολυσών του γάλακτος στο στάδιο της πρωτεόλυσης.....	38
2.3.3.1.2. Δράση εναπομένουσας χυμοσίνης στο στάδιο της πρωτεόλυσης.....	39
2.3.3.1.3. Δράση πρωτεϊνολυσών και πεπτιδολυσών οξυγαλακτικών καλλιιεργειών στο στάδιο της πρωτεόλυσης.....	41
2.3.3.1.3.1. Ενζυμα Βακτηρίων Εκκίνησης (Starters).....	41
2.3.3.1.3.2. Οξυγαλακτικά βακτήρια εκτός των καλλιιεργειών εκκινητών (NSLAB).....	65
2.3.3.1.3.3. Δευτερεύουσες καλλιιεργειες γάλακτος.....	66
2.3.3.1.4. Παραγωγή και Διάσπαση ‘‘Πικρών’’ Πεπτιδίων κατά την Ωρίμανση του Τυριού.....	67
2.3.3.1.5. Εκτίμηση της Πρωτεόλυσης Στο Τυρί.....	69
2.3.3.2. Το στάδιο της λιπόλυσης.....	71
2.3.3.3. Μεταβολισμός της εναπομένουσας λακτόζης και του γαλακτικού οξέος κατά την ωρίμανση του τυριού.....	73
2.3.3.4. Μεταβολισμός κιτρικού οξέος.....	75
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	76
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	93
ΕΠΙΤΑΧΥΝΣΗ ΤΟΥ ΣΤΑΔΙΟΥ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ –ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ ΣΕ ΕΝΖΥΜΑ ΤΥΡΙΟΥ ΚΑΙ ΣΤΟ ΣΤΑΔΙΟ ΤΗΣ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ.....	93
3.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	93
3.2. ΑΥΞΗΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ.....	93
3.3. ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΕΞΩΓΕΝΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ Η ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ (ΕΞΑΣΘΕΝΗΜΕΝΩΝ) ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΕΚΚΙΝΗΣΗΣ.....	94

3.3.1. Προσθήκη εξωγενών ενζύμων.....	94
3.3.2. Προσθήκη τροποποιημένων (εξασθενημένων) καλλιεργείων εκκίνησης.....	95
3.4. ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ .ΕΚΚΙΝΗΣΗΣ.....	102
3.5. ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΕΚΤΟΣ ΤΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΕΚΚΙΝΗΣΗΣ ΩΣ ΠΡΟΣΘΕΤΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ.....	102
3.6. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠ ΣΕ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΚΑΙ ΕΝΖΥΜΑ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΤΟΥ ΤΥΡΙΟΥ.....	103
3.6.1. Εισαγωγή.....	103
3.6.2. Επίδραση της ΥΠ στις πρωτεΐνες και σε ενδογενή ένζυμα του γάλακτος τυροκόμησης- Παρασκευή τυριού με επεξεργασμένο με ΥΠ γάλα.....	104
3.6.2.1. Επίδραση της ΥΠ στην Αλκαλική Φωσφατάση του Γάλακτος Τυροκόμησης.....	104
3.6.2.2. Επίδραση της ΥΠ στη Λιπάση του Γάλακτος Τυροκόμησης.....	104
3.6.2.3. Επίδραση της ΥΠ στις Ενδογενείς Καζεΐνες του Γάλακτος Τυροκόμησης.....	105
3.6.2.4. Επίδραση της ΥΠ στις Πρωτεΐνες Ορού του Γάλακτος Τυροκόμησης.....	105
3.6.2.5. Επίδραση της ΥΠ στις Ενδογενείς Πρωτεάσες του Γάλακτος Τυροκόμησης.....	106
3.6.2.6. Παρασκευή Τυριού με Χρήση Επεξεργασμένου με ΥΠ Γάλακτος.....	107
3.6.3. Επίδραση της ΥΠ σε πρωτεάσες τυροκόμησης εξωγενούς προέλευσης.....	108
3.6.3.1. Επίδραση της ΥΠ στην Προστιθέμενη κατά την Τυροκόμηση Πυτιά.....	108
3.6.3.2. Επίδραση της ΥΠ στην Καλλιέργεια Εκκίνησης.....	108
3.6.4. Επίδραση της ΥΠ στο στάδιο της ωρίμανσης.....	110
3.6.5. Επίδραση της ΥΠ στα φυσικοχημικά, ρεολογικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τυριών.....	115
3.6.6. Εφαρμογές της ΥΠ στη βιομηχανία παρασκευής τυριού διεθνώς.....	118
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	120
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	131
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	131
4.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	131
4.2. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΥΠ ΚΑΙ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΣΕ ΑΜΙΝΟΠΕΠΤΙΔΑΣΕΣ ΤΩΝ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ACA-DC 0105, <i>Streptococcus thermophilus</i> ACA DC 0022 και <i>Lactococcus lactis</i> ACA-DC 0049.....	133
4.2.1. Εισαγωγή – Σκοπός.....	133
4.2.2. Αναμενόμενα Αποτελέσματα Έρευνας.....	134
4.2.3. Σχεδιασμός Πειράματος.....	134
4.2.4. Πρώτες Ύλες, Χημικά Αντιδραστήρια και Υλικά Συσκευασίας.....	134
4.2.4.1. Ανάπτυξη οξύγαλακτικών καλλιεργείων των στελεχών <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ACA-DC 0105, <i>S. thermophilus</i> ACA-DC 0022 και <i>L. lactis</i> ACA-DC 0049.....	134
4.2.4.2. Προετοιμασία δείγματος προς επεξεργασία με ΥΠ.....	135
4.2.5. Πειραματική Διαδικασία.....	135
4.2.5.1. Επεξεργασία με ΥΠ.....	135
4.2.5.1.1. Περιγραφή μονάδας ΥΠ.....	135
4.2.5.1.2. Διαδικασία συμπίεσης των προς επεξεργασία δειγμάτων.....	138
4.2.5.2. Εκχύλιση με εφαρμογή υπερήχων.....	139
4.2.6. Αναλυτικές Μέθοδοι.....	139

4.2.6.1. Μέθοδος μέτρησης της δραστηριότητας των αμινοπεπτιδασών των οξυγαλακτικών καλλιεργείων.....	139
4.2.7. Ανάλυση Δεδομένων.....	140
4.2.7.1. Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων.....	142
4.3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΥΠ ΚΑΙ ΗΠΙΩΝ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΩΝ ΣΤΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΤΗ ΔΟΜΗ ΚΑΘΑΡΗΣ X-prolyl-dipeptidyl AMINOPEPTIDΑΣΗΣ (PepX) ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΗΣ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ <i>Streptococcus thermophilus</i> ACA-DC 0022.....	143
4.3.1. Εισαγωγή – Σκοπός.....	143
4.3.2. Αναμενόμενα Αποτελέσματα Έρευνας.....	144
4.3.3. Σχεδιασμός Πειράματος.....	144
4.3.4. Πρώτες Ύλες, Χημικά Αντιδραστήρια και Υλικά Συσκευασίας.....	145
4.3.4.1. Παραγωγή PepX.....	145
4.3.4.2. Απομόνωση και καθαρισμός της αμινοπεπτιδάσης PepX από το μικροοργανισμό <i>S. thermophilus</i> ACA-DC 0022.....	146
4.3.5. Πειραματική Διαδικασία.....	148
4.3.5.1. Θερμική επεξεργασία της αμινοπεπτιδάσης PepX.....	148
4.3.5.2. Επεξεργασία της αμινοπεπτιδάσης PepX με ΥΠ.....	148
4.3.6. Αναλυτικές Μέθοδοι.....	148
4.3.6.1. Μέθοδος μέτρησης της δραστηριότητας της αμινοπεπτιδάσης PepX.....	148
4.3.6.2. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE πεπτιδάσης PepX υπό αποδιατακτικές συνθήκες και ηλεκτροφόρηση NATIVE-PAGE.....	148
4.3.6.3. Μελέτη της δομής της αμινοπεπτιδάσης PepX με τη χρήση της φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού (CD).....	150
4.3.7. Ανάλυση Δεδομένων.....	151
4.3.7.1. Επίδραση της θερμοκρασίας στο ρυθμό απενεργοποίησης και επίδραση της ΥΠ στο ρυθμό ενεργοποίησης/απενεργοποίησης της καθαρής PepX.....	151
4.4. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΠΙΕΣΗΣ ΚΑΙ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΣΤΟ ΦΟΡΤΙΟ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΟΞΙΝΙΣΗΣ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ACA-DC 0105, <i>S. thermophilus</i> ACA-DC 0022 και <i>L. lactis</i> ACA-DC 0049.....	152
4.4.1. Εισαγωγή – Σκοπός.....	152
4.4.2. Αναμενόμενα Αποτελέσματα Έρευνας.....	152
4.4.3. Σχεδιασμός Πειράματος.....	153
4.4.4. Πρώτες Ύλες, Χημικά Αντιδραστήρια και Υλικά Συσκευασίας.....	154
4.4.4.1. Ανάπτυξη των οξυγαλακτικών στελεχών <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ACA-DC 0105, <i>Streptococcus thermophilus</i> ACA-DC 0022 και <i>Lactococcus lactis</i> ACA-DC 0049.....	154
4.4.4.2. Προετοιμασία δείγματος προς επεξεργασία με ΥΠ.....	154
4.4.5. Πειραματική Διαδικασία.....	154
4.4.6. Αναλυτικές Μέθοδοι.....	154
4.4.6.1. Μέθοδος καταμέτρησης του φορτίου των οξυγαλακτικών καλλιεργείων.....	154
4.4.6.2. Μέθοδος προσδιορισμού της ικανότητας οξίνισης των μικροοργανισμών.....	155
4.4.7. Ανάλυση Δεδομένων.....	155

4.4.7.1. Μελέτη της μεταβολής του φορτίου των επεξεργασμένων με ΥΠ των στελεχών <i>L. bulgaricus</i> ACA-DC 0105, <i>S. thermophilus</i> ACA-DC 0022 και <i>L. lactis</i> ACA DC 0049.....	155
4.4.7.2. Μελέτη της ικανότητας οξίνισης των επεξεργασμένων με ΥΠ οξυγαλακτικών στελεχών <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ACA-DC 0105, <i>Streptococcus thermophilus</i> ACA-DC 0022 και <i>Lactococcus lactis</i> ACA-DC 0049.....	156
4.5. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΛΕΥΚΟΥ ΤΥΡΙΟΥ ΑΛΜΗΣ ΤΥΠΟΥ ΦΕΤΑΣ ΜΕ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΥΠ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ – ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΥΠ ΣΤΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΚΑΙ ΣΕ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ.....	157
4.5.1. Εισαγωγή – Σκοπός.....	157
4.5.2. Αναμενόμενα Αποτελέσματα Έρευνας.....	157
4.5.3. Σχεδιασμός Πειράματος.....	157
4.5.4. Πρώτες Ύλες, Χημικά Αντιδραστήρια και Υλικά Συσκευασίας.....	158
4.5.4.1. Προετοιμασία καλλιέργειας εκκίνησης.....	158
4.5.4.2. Παρασκευή τυριού.....	159
4.5.5. Πειραματική Διαδικασία.....	159
4.5.5.1. Επεξεργασία της καλλιέργειας εκκίνησης με ΥΠ.....	159
4.5.5.2. Επεξεργασία του τυριού με ΥΠ.....	160
4.5.5.3. Διαδικασία παρασκευής λευκών τυριών άλμης τύπου Φέτας.....	160
4.5.6. Αναλυτικές Μέθοδοι.....	163
4.5.6.1. Μικροβιολογικός έλεγχος τυριών.....	163
4.5.6.2. Ανάλυση Φυσικοχημικών χαρακτηριστικών.....	163
4.5.6.2.1. Μέτρηση του pH.....	163
4.5.6.2.2. Προσδιορισμός χρώματος τυριού.....	163
4.5.6.2.3. Μέτρηση υγρασίας τυριού.....	164
4.5.6.2.4. Μέτρηση ενεργότητας νερού (a_w).....	164
4.5.6.2.5. Έλεγχος ολικών λιπαρών τυριού.....	165
4.5.6.2.6. Μέτρηση τέφρας (ανόργανα συστατικά).....	165
4.5.6.2.7. Μέτρηση Αλατοπεριεκτικότητας.....	166
4.5.6.3. Μελέτη δομικών χαρακτηριστικών του τυριού - Ανάλυση Υφής.....	166
4.5.7. Οργανοληπτικός Έλεγχος Τυριού.....	168
4.5.8. Μελέτη της Εξέλιξης της Πρωτεόλυσης.....	169
4.5.8.1. Προσδιορισμός ολικών πρωτεϊνών και αζωτούχων ενώσεων.....	169
4.5.8.1.1. Προσδιορισμός ολικού αζώτου (TN) και ολικής πρωτεΐνης (TP).....	169
4.5.8.1.2. Προσδιορισμός υδατοδιαλυτού αζώτου (SN), αζώτου διαλυτού σε 12% TCA (TCA-SN) και αζώτου διαλυτού σε 5% PTA (PTA-SN).....	169
4.5.8.1.2.1. Παρασκευή υδατοδιαλυτών εκχυλισμάτων τυριού (WSE).....	170
4.5.8.1.2.2. Προσδιορισμός υδατοδιαλυτού αζώτου (SN).....	170
4.5.8.1.2.3. Προσδιορισμός αζώτου διαλυτού σε 12% TCA (TCA-SN).....	170
4.5.8.1.2.4. Προσδιορισμός αζώτου διαλυτού σε 5% PTA (PTA-SN).....	170
4.5.8.2. Ανάλυση πεπτιδίων.....	170
4.5.8.3. Προσδιορισμός της δραστηριότητας των αμινοπεπτιδασών APep και PepX.....	171
4.5.9. Ανάλυση Δεδομένων.....	171
4.5.9.1. Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων.....	171
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	172

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	177
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	177
5.1. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΥΠΙ ΚΑΙ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΣΕ ΑΜΙΝΟΠΕΠΤΙΔΑΣΕΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΩΝ <i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactococcus lactis</i>	177
5.1.1. Επεξεργασία με ΥΠΙ σε Συνδυασμό με Ήπιες Θερμοκρασίες των Αμινοπεπτιδασών PepN και PepX του <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ACA-DC 0105.....	178
5.1.2. Επεξεργασία με ΥΠΙ σε Συνδυασμό με Ήπιες Θερμοκρασίες των Αμινοπεπτιδασών PepN και PepX του <i>Streptococcus thermophilus</i> ACA-DC 0022.....	183
5.1.3. Επεξεργασία με ΥΠΙ σε Συνδυασμό με Ήπιες Θερμοκρασίες των Αμινοπεπτιδασών PepN και PepX του <i>Lactococcus lactis</i> ACA-DC 0049.....	188
5.1.4. Επεξεργασία με ΥΠΙ των Αμινοπεπτιδασών PepN και PepX Μεικτής Οξυγαλακτικής Καλλιέργειας <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ACA-DC 0105, <i>Streptococcus thermophilus</i> ACA-DC 0022 και <i>Lactococcus lactis</i> ACA-DC 0049.....	194
5.2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΥΠΙ ΚΑΙ ΗΠΙΩΝ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΩΝ ΣΤΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΤΗ ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΚΑΘΑΡΗΣ X-prolyl-dipeptidyl ΑΜΙΝΟΠΕΠΤΙΔΑΣΗΣ (PepX) ΑΠΟ ΤΗΝ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΕΚΚΙΝΗΣΗΣ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ <i>Streptococcus thermophilus</i> ACA-DC 0022.....	195
5.2.1. Απομόνωση και Καθαρισμός της X-prolyl-dipeptidyl Αμινοπεπτιδάσης (PepX) από το στέλεχος <i>Streptococcus thermophilus</i> ACA-DC 0022.....	196
5.2.2. Κινητική Μελέτη της Επίδρασης της Θερμοκρασίας στην Καθαρή Αμινοπεπτιδάση PepX από το Στέλεχος <i>Streptococcus thermophilus</i> ACA-DC 0022.....	198
5.2.3. Κινητική Μελέτη της Επίδρασης της ΥΠΙ σε Συνδυασμό με Ήπιες Θερμοκρασίες στην Καθαρή Αμινοπεπτιδάση PepX του <i>Streptococcus thermophilus</i> ACA-DC 0022.....	200
5.2.4. Ανάλυση Δομής της καθαρής Αμινοπεπτιδάσης PepX του στελέχους <i>Streptococcus thermophilus</i> ACA-DC 0022.....	203
5.3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΥΠΙ ΚΑΙ ΗΠΙΩΝ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΩΝ ΣΤΗ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΟΞΙΝΙΣΗΣ ΤΩΝ <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ACA-DC 0105, <i>Streptococcus thermophilus</i> ACA-DC 0022 και <i>Lactococcus lactis</i> ACA-DC 0049.....	207
5.3.1. Μελέτη της Μεταβολής του Φορτίου των Επεξεργασμένων με ΥΠΙ Στελεχών <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ACA-DC 0105, <i>Streptococcus thermophilus</i> ACA-DC 0022 και <i>Lactococcus lactis</i> ACA-DC 0049.....	208
5.3.2. Μελέτη της Ικανότητας Οξίνισης των Επεξεργασμένων με ΥΠΙ Στελεχών <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ACA-DC 0105, <i>Streptococcus thermophilus</i> ACA-DC 0022 και <i>Lactococcus lactis</i> ACA-DC 0049.....	215
5.3.3. Συνδυασμός της Μεταβολής του Φορτίου με την Ικανότητα Οξίνισης των Επεξεργασμένων με ΥΠΙ στελεχών <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ACA-DC 0105, <i>Streptococcus thermophilus</i> ACA-DC 0022 και <i>Lactococcus lactis</i> ACA-DC 0049.....	220
5.3.4. Μελέτη της Μεταβολής του Φορτίου και της Ικανότητας Οξίνισης, Επεξεργασμένης με ΥΠΙ Μεικτής Καλλιέργειας των Στελεχών <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ACA-DC 0105, <i>Streptococcus thermophilus</i> ACA-DC 0022 και <i>Lactococcus lactis</i> ACA-DC 0049.....	222
5.4. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΥΠΙ ΣΤΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΛΕΥΚΟΥ ΤΥΡΙΟΥ ΑΛΜΗΣ ΤΥΠΟΥ ΦΕΤΑΣ.....	224

5.4.1. Μικροβιολογικός Έλεγχος Δειγμάτων Λευκού Τυριού Άλμης Τύπου Φέτας.....	225
5.4.2. Μελέτη Φυσικοχημικών Χαρακτηριστικών Δειγμάτων Λευκού Τυριού Άλμης Τύπου Φέτας.....	226
5.4.3. Ανάλυση Υφής Δειγμάτων Λευκού Τυριού Άλμης Τύπου Φέτας.....	231
5.4.4. Προσδιορισμός Χρώματος Δειγμάτων Λευκού Τυριού Άλμης Τύπου Φέτας.....	233
5.4.5. Οργανοληπτική Αξιολόγηση Δειγμάτων Λευκού Τυριού Άλμης Τύπου Φέτας.....	234
5.4.5.1. Αξιολόγηση χαρακτηριστικών που σχετίζονται με την εμφάνιση-χρώμα των δειγμάτων λευκού τυριού άλμης τύπου Φέτας.....	234
5.4.5.1.1. Αξιολόγηση των δειγμάτων ως προς το χαρακτηριστικό Λευκό-Ομοιογενές.....	234
5.4.5.1.2. Αξιολόγηση των δειγμάτων ως προς το χαρακτηριστικό Μικρές Χαρακτηριστικές Σχισμές.....	235
5.4.5.1.3. Αξιολόγηση των δειγμάτων ως προς την αρέσκεια του χαρακτηριστικού εμφάνιση-χρώμα.....	236
5.4.5.2. Αξιολόγηση χαρακτηριστικών που σχετίζονται με την υφή-δομή των δειγμάτων λευκού τυριού άλμης τύπου Φέτας.....	237
5.4.5.2.1. Αξιολόγηση των δειγμάτων ως προς το χαρακτηριστικό Σκληρότητα.....	237
5.4.5.2.2. Αξιολόγηση των δειγμάτων ως προς το χαρακτηριστικό Ευθρυπτότητα.....	238
5.4.5.2.3. Αξιολόγηση των δειγμάτων ως προς την αρέσκεια του χαρακτηριστικού υφή-δομή.....	239
5.4.5.3. Αξιολόγηση χαρακτηριστικών που σχετίζονται με την οσμή-γεύση των δειγμάτων λευκού τυριού άλμης τύπου Φέτας.....	240
5.4.5.2.1. Αξιολόγηση των δειγμάτων ως προς το χαρακτηριστικό αντίληψη πικρής γεύσης.....	240
5.4.5.2.2. Αξιολόγηση των δειγμάτων ως προς το χαρακτηριστικό αντίληψη ωρίμανσης.....	241
5.4.5.4. Αξιολόγηση των δειγμάτων λευκού τυριού άλμης τύπου Φέτας ως προς τη γενική εντύπωση.....	242
5.4.6. Μελέτη Παραγόντων Ωρίμανσης των Δειγμάτων Λευκού Τυριού Άλμης Τύπου Φέτας – Εξέλιξη της Πρωτεόλυσης.....	243
5.4.6.1. Προσδιορισμός αζωτούχων ενώσεων.....	243
5.4.6.2. Ανάλυση πεπτιδίων.....	245
5.4.6.3. Προσδιορισμός της δραστικότητας των αμινοπεπτιδασών APep και PepX.....	249
5.4.7. Στατιστική Επεξεργασία Μετρήσεων – Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών (PCA).....	250
5.4.8. Συνολική εκτίμηση και σύγκριση της εξέλιξης της πρωτεόλυσης των τυριών.....	254
5.4.9. Τεχνικοοικονομική Προσέγγιση της Εφαρμογής ΥΠ στην Παρασκευή Λευκού Τυριού Άλμης Τύπου Φέτας.....	258
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	259
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6.....	263
ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ.....	263
ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ.....	269

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ωρίμανση των τυριών, κατά τη διάρκεια της οποίας το τυρί αποκτά τα ιδιαίτερα οργανοληπτικά, φυσικοχημικά και δομικά του χαρακτηριστικά, συμβάλλει καθοριστικά στη διαμόρφωση της τελικής του ποιότητας. Η χρονική διάρκεια η οποία απαιτείται για την ολοκλήρωση του σταδίου της ωρίμανσης και τη διαμόρφωση του τελικού προϊόντος καθώς και η εξασφάλιση των απαραίτητων συνθηκών ωρίμανσης, αποτελούν δύο από τους σημαντικότερους συντελεστές κόστους για τις μονάδες παρασκευής τυριού, οι οποίες και καλούνται να καλύψουν το κόστος αυτό. Από την πλευρά των καταναλωτών η αναζήτηση νέων ποιοτικότερων και υψηλότερης διατροφικής αξίας προϊόντων είναι συνεχής. Ο τομέας της επιστήμης της τυροκομίας καλείται και προσπαθεί εδώ και δεκαετίες να καλύψει τόσο τις ανάγκες της βιομηχανίας όσο και των καταναλωτών, με συνεχή αναζήτηση νέων τεχνικών και μεθόδων επεξεργασίας για τη βελτιστοποίηση της παραγωγικής της διαδικασίας, την αύξηση της απόδοσης σε τελικό προϊόν, τη βελτίωση των φυσικοχημικών και οργανοληπτικών τους χαρακτηριστικών, την αύξηση του χρόνου ζωής τους και τη μείωση του χρονοβόρου και κοστοβόρου σταδίου της ωρίμανσης.

Μία από τις ιδιαίτερα υποσχόμενες τεχνολογίες με μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον διεθνώς, αποτελεί η μη θερμική τεχνολογία της Υπερυψηλής Υδροστατικής Πίεσης (ΥΠ), η οποία βρίσκει όλο και περισσότερες εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων (Kadam et al., 2012). Πρόκειται για φυσική διεργασία σε συνθήκες που κυμαίνονται από 100-1000 MPa (1000-10000 atm) με δυνατότητα συνδυασμού με ήπιες θερμοκρασίες (20-60°C). Αρχή της μεθόδου αποτελεί η ομοιόμορφη και στιγμιαία μεταφορά της πίεσης μέσω κατάλληλου υγρού μεταφοράς της, σε όλα τα σημεία του τροφίμου (αρχή Pascal). Βασικό πλεονέκτημα αποτελεί η πολύ μικρή επίδραση στις επιθυμητές ποιοτικές παραμέτρους που αναπόφευκτα υποβαθμίζονται με τη συμβατική θερμική επεξεργασία. Λόγω της μη ανάπτυξης υψηλών θερμοκρασιών τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (γεύση, άρωμα, χρώμα, υφή) και τα θρεπτικά συστατικά (βιταμίνες, αντιοξειδωτικά) υφίστανται περιορισμένη υποβάθμιση (Knorr, 1993; Van den Broeck et al., 1999). Μετά τις πρωτοποριακές προσπάθειες του Hite et al. (1914), η έρευνα σχετικά με την ΥΠ στα τρόφιμα ήταν σποραδική μέχρι το τέλος της δεκαετίας του 1980, περίοδος η οποία σηματοδότησε μια αναζωπύρωση του ερευνητικού ενδιαφέροντος στην εφαρμογή της ΥΠ ως εναλλακτική τεχνολογία της θερμικής επεξεργασίας των τροφίμων (Patterson, 2005). Το αρχικό ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας ως προς την εφαρμογή και τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης τεχνολογίας αφορούσε στη μελέτη των συνθηκών επεξεργασίας με ΥΠ για την απενεργοποίηση μικροοργανισμών, όπως βλαστικά κύτταρα βακτηρίων, ζύμες και μύκητες (Hoover et al., 1989; Patterson et al., 1997; Smelt, 1998) με σκοπό την αύξηση της διατηρησιμότητας των τροφίμων, καθώς και για την απενεργοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών (Styles et al., 1991; Mackey et al., 1994; Patterson & Kilpatrick, 1998; Berlin et al., 1999; Calik et al., 2002; Dogan & Erkmen, 2004; Smiddy et al., 2005; Smiddy et al., 2004, 2005; Bayindirli et al., 2006; Donaghy et al., 2007; Jofré et al., 2008) με σκοπό την εύρεση εκείνων των συνθηκών επεξεργασίας με ΥΠ που θα εξασφάλιζαν ταυτόχρονα την ποιότητα και ασφάλεια του τροφίμου. Η χρήση ΥΠ σε χαμηλές θερμοκρασίες δεν αποδείχτηκε αποτελεσματική όσον αφορά την απενεργοποίηση спорίων (Akhtar et al. 2009; Shearer et al. 2000). Ο συνδυασμός όμως πιέσεων άνω των 700 MPa σε συνδυασμό με θερμοκρασίες 70 έως 90°C, θα μπορούσε να οδηγήσει σε απενεργοποίησή τους (Farkas & Hoover, 2000; Torres et al., 2005; 2009). Από τα παραπάνω και σύμφωνα με τους Ly-

Nguyen et al. (2003), η ΥΠ θα μπορούσε να θεωρηθεί ως μια τεχνολογία με την οποία επιτυγχάνεται ψυχρή παστερίωση των τροφίμων, ενώ ταυτόχρονα, τα προϊόντα που έχουν υποστεί επεξεργασία με ΥΠ χαρακτηρίζονται ως φρέσκα και υψηλής ποιότητας προϊόντα.

Την έρευνα της απενεργοποίησης μικροοργανισμών των τροφίμων με ΥΠ ακολούθησε η έρευνα της επίδρασης της τεχνολογίας ΥΠ σε ενζυμικά συστήματα των τροφίμων. Το συμπέρασμα ήταν ότι η ΥΠ επηρεάζει σημαντικά τα ένζυμα και τις ενζυμικές δράσεις, γεγονός που παρέχει τη δυνατότητα ανάπτυξης νέων μεθόδων συντήρησης και πιθανής μεταβολής της υφής ή/και της γεύσης των τροφίμων. Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές αναφορές σχετικές με την απενεργοποίηση με χρήση ΥΠ ενζύμων τα οποία επηρεάζουν αρνητικά την ποιότητα των τροφίμων (Irwe & Olsson, 1994; Seyderhelm et al., 1996; Butz et al., 1996; Weemaes et al., 1997; Ludikhuyze et al., 1996, 1998, 2000; Indrawati et al., 2000; Nienaber & Shellhammer, 2001; Moatsou et al., 2008a, b; Eylen et al., 2008; Boulekou et al., 2009, Katsaros et al., 2009a). Κατά τη μελέτη της επίδρασης της ΥΠ στα ένζυμα των τροφίμων, παρατηρήθηκε ότι η ΥΠ προσφέρει τη μοναδική δυνατότητα, συγκριτικά με άλλες τεχνολογίες όπως η θερμική επεξεργασία και τα παλλόμενα ηλεκτρικά πεδία (ΠΕΦ), της ενεργοποίησης ενζύμων. Το φαινόμενο αυτό έχει αναφερθεί στη διεθνή βιβλιογραφία (Kunugi, 1992; Van den Broeck, 2000; Jolibert et al., 1994; Butz et al., 1994; Hernandez & Cano, 1998; Mozhaev et al., 1996; Prat-Gay, 1991; Katsaros et al., 2009b) και αποδίδεται στις μεταβολές της δευτεροταγούς και τριτοταγούς δομής των ενζύμων που συντελούνται σε συγκεκριμένες πιέσεις (Heremans, 1982; Cheftel, 1992). Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου στηρίζεται στην αρχή 'Le Chatelier' σύμφωνα με την οποία κάθε φαινόμενο που βρίσκεται σε ισορροπία και συνοδεύεται από μείωση του όγκου (χημική αντίδραση, αλλαγή φάσης, μεταβολή στη διαμόρφωση του μορίου) ευνοείται από την πίεση, ενώ φαινόμενα που οδηγούν σε αύξηση του όγκου παρεμποδίζονται από την αύξηση της πίεσης. Η ΥΠ έχει μικρή επίδραση στην πρωτοταγή δομή των πρωτεϊνών η οποία σχηματίζεται από την αλληλουχία των αμινοξέων τα οποία συνδέονται με πεπτιδικούς δεσμούς. Ωστόσο, προκαλεί αντιδράσεις ανταλλαγής ημι-ομοιοπολικών δεσμών -δισουλφιδικοί δεσμοί- με ελεύθερες σουλφιδρικές ομάδες (Visschers & de Jong, 2005). Η ΥΠ επηρεάζει τους δεσμούς υδρογόνου σταθεροποιώντας τη δευτεροταγή δομή, όπως είναι οι α-έλικες (Mozhaev et al., 1996; Boonyaratanakornkit et al., 2002), αλλά πολύ υψηλές πιέσεις μπορεί να οδηγήσουν σε διάσπαση των δεσμών υδρογόνου των πρωτεϊνών που οδηγεί σε μη αντιστρεπτή καταστροφή της δευτεροταγούς δομής (Hayakawa et al., 1996). Η ΥΠ ευνοεί επίσης τη διάσπαση των ηλεκτροστατικών και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Συνεπώς, η επίδραση της ΥΠ προς μετουσίωση των πρωτεϊνών επηρεάζει κυρίως την τριτοταγή και τεταρτοταγή δομή τους (Mozhaev et al., 1996). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι διαφορετικά ένζυμα, αλλά και ίδια ένζυμα από διαφορετικές πηγές, εμφανίζουν διαφορετικές κινητικές απενεργοποίησης ή ενεργοποίησης με ΥΠ. Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν ελάχιστες δημοσιεύσεις σχετικές με συσχέτιση μεταβολής της δραστηριότητας επεξεργασμένων με ΥΠ πρωτεϊνών με τις μεταβολές της δομής τους, όπως για β-λακτογλοβουλίνη (Tedford et al., 1999), μικροβιακή τρανσγλουταμινάση (Menendez et al., 2006), πηκτινομεθυλεστεράση (Alexandrakis et al., 2014a) και ακτινιδίνη (Alexandrakis et al., 2016).

Λόγω του υψηλού κόστους επένδυσης (εξοπλισμός ΥΠ), η διεργασία της ΥΠ είναι αρκετά πιο ακριβή από τη συμβατική θερμική επεξεργασία. Για το λόγο αυτό, η εφαρμογή της τεχνολογίας αυτής περιοριζόταν κυρίως σε προϊόντα που δεν επιδέχονταν θερμική επεξεργασία ή προϊόντα υψηλής εμπορικής αξίας, όπως φυσικοί χυμοί φρούτων και προϊόντα ντελικατέσεν. Σύμφωνα με τους Donsi et al. (1996), η διατήρηση ή/και η βελτίωση της γεύσης, του αρώματος, της διατροφικής αξίας και της συνολικής ποιότητας των προϊόντων αυτών, είναι επιθυμητή από τους καταναλωτές και δικαιολογεί την αυξημένη τους τιμή. Τα τελευταία όμως χρόνια, η βελτίωση και η τυποποίηση της παραγωγής μονάδων ΥΠ και η εισαγωγή νέων βιομηχανικών παραγωγής τέτοιων μονάδων με άμεση συνέπεια την

αύξηση του ανταγωνισμού μεταξύ των εταιριών, έχουν συμβάλει στη σημαντική μείωση του πάγιου κόστους αγοράς μια τέτοιας μονάδας. Βιομηχανίες τροφίμων έχουν ξεκινήσει να εξοπλίζονται με μονάδες ΥΠ λόγω των σημαντικών πλεονεκτημάτων που υπόσχεται η εφαρμογή της συγκεκριμένης τεχνολογίας στην αύξηση του χρόνου ζωής των τροφίμων και τη βελτίωση της ποιότητάς τους. Το αποτέλεσμα είναι η ερευνητική δραστηριότητα να επεκτείνεται και σε άλλα τρόφιμα υψηλής εμπορικής αξίας. Τα τρόφιμα τα οποία έχουν επεξεργαστεί με ΥΠ και μελετηθεί μέχρι σήμερα είναι αυγά (Hayashi et al., 1989; Iametti et al., 1999), κρέας και προϊόντα κρέατος (Ananth et al., 1998; Ashie & Lanier, 1999; Crawford et al., 1996; Jimenez-Colmenero et al., 1998; Lopez-Caballero et al., 2000; Ludikhuyze et al., 2000; Hygreeva & Pandey, 2016), γαλακτοκομικά προϊόντα (Buchheim & Abou El-Nour, 1992; Drake et al., 1997; Garcia-Risco et al., 1998; Hayashi et al., 1987; Pandey et al., 2000; Katsaros et al., 2009b; Maniou et al., 2013; Costabel et al., 2016), ψάρια και θαλασσινά (Amanatidou et al., 2000; He et al., 2002; Tsironi et al., 2015; Serment -Moreno et al., 2015), χυμοί φρούτων και λαχανικών (Tonello et al., 1997; Zabetakis et al., 2000 ; Bull et al., 2004 ; Polydera et al., 2005 ; Sampedro et al., 2008; Alexandrakis et al., 2014b), χαμηλής οξύτητας σάλτσες για ζυμαρικά και άλλα (Barbosa-Canovas & Juliano, 2008).

Στον τομέα της τυροκομίας γίνεται προσπάθεια εφαρμογής της ΥΠ είτε άμεσα στο ίδιο το προϊόν, είτε ως στάδιο παρασκευής του, στοχεύοντας σε διάφορους τομείς όπως την αύξηση της διατηρησιμότητάς του, την αύξηση της απόδοσης του τελικού τυριού, τη βελτίωση των οργανοληπτικών, φυσικοχημικών και δομικών του χαρακτηριστικών και κυρίως τη μείωση του χρόνου ωρίμανσης του τυριού.

Αναφορικά με τη συντήρηση και την αύξηση της διατηρησιμότητας των γαλακτοκομικών προϊόντων, μέρος της έρευνας εστιάζεται στην επίδραση της εφαρμογής ΥΠ στην πρώτη ύλη, που είναι το προς χρήση γάλα, είτε στο γάλα που πρόκειται να αποθηκευτεί προς μετέπειτα χρήση, σχετικά με την ανάπτυξη αλλοιογόνων και παθογόνων μικροοργανισμών (Rademacher & Kessler, 1997; Gervilla et al., 1997, 1999; Garcia-Graells et al., 2000; Vachon et al., 2002; Arques et al., 2005 α, β; Rodriguez et al., 2005) και την απώλεια βιταμινών και απενεργοποίηση ανεπιθύμητων ενζύμων (Garcia-Risco et al., 2003; Borda et al., 2004; Hayes et al., 2005). Λίγες αναφορές συναντώνται στη διεθνή βιβλιογραφία οι οποίες αναφέρουν αύξηση της διάρκειας ζωής τυριών επεξεργασμένων με ΥΠ, οι οποίες περιορίζονται σε φρέσκα τυριά (fresh cheese) (Daryaei, 2008; Evert-Arriagada et al., 2014). Σημαντική έρευνα έχει πραγματοποιηθεί στον τομέα της τυροκομίας, στη διερεύνηση της επίδρασης της ΥΠ σε παθογόνους μικροοργανισμούς που συναντώνται σε τυριά (O'Reilly et al., 2000a; Rodriguez et al., 2005; Shao et al., 2007; Lopez-Pedemonte et al., 2007).

Βάσει της διεθνούς βιβλιογραφίας, η επεξεργασία με ΥΠ δίνει επιπλέον τη δυνατότητα αύξησης της απόδοσης στην παρασκευή τυριού (O'Reilly et al., 2001; Coker et al., 2005).

Η μοναδική ικανότητα της τεχνολογίας της ΥΠ να προκαλεί ενεργοποίηση ενζύμων, θεωρείται πολύ σημαντική στον τομέα της τυροκομίας. Κατά το στάδιο της παρασκευής των τυριών και κυρίως κατά το στάδιο της ωρίμανσής τους, ένζυμα περιεχόμενα στη μάζα του τυριού, πηγή προέλευσης των οποίων αποτελεί το γάλα τυροκόμησης, η προστιθέμενη πυτιά και οι προστιθέμενες καλλιέργειες εκκίνησης, προκαλούν την υδρόλυση πρωτεϊνών προς παραγωγή ελεύθερων αμινοξέων τα οποία οδηγούν περαιτέρω σε αρωματικές ενώσεις που προσδίδουν στο τυρί τα ιδιαίτερα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά. Η ενεργοποίηση των ενζύμων αυτών μέσω εφαρμογής ΥΠ είτε στο ίδιο το τυρί, είτε στην πηγή προέλευσης τους θα μπορούσε να οδηγήσει στην παρασκευή τυριού βελτιωμένων χαρακτηριστικών σε μειωμένο χρόνο ωρίμανσης. Στην υπόθεση αυτή στηρίχθηκαν ερευνητές, τα αποτελέσματα της δραστηριότητας των οποίων έδειξαν ότι η εφαρμογή της ΥΠ μπορεί να επιφέρει αύξηση της πρωτεολυτικής δραστηριότητας, μείωση του χρόνου ωρίμανσης και βελτίωση των ποιοτικών χαρακτηριστικών του τελικού τυριού (Yokoyama et al., 1992; O'Reilly et al., 2000;

Capellas et al., 2001; San Martin-Gonzalez et al. 2006; Juan et al. 2007; Garde et al., 2007; Voigt et al., 2010; Moschopoulou et al., 2010; Maniou et al., 2013; Costabel et al., 2016).

Στη συγκεκριμένη θεώρηση βασίστηκε ο σχεδιασμός και η εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής, αντικείμενο της οποίας αποτελεί συνδυασμό βασικής και εφαρμοσμένης έρευνας. Η έρευνα αφορά:

Στην εφαρμογή της τεχνολογίας ΥΠ για τον έλεγχο της δράσης ενδοκυτταρικών ενζύμων οξυγαλακτικών καλλιεργείων εκκίνησης που χρησιμοποιούνται στην τυροκόμηση Φέτας, με στόχο την εύρεση των συνθηκών ΥΠ που προκαλούν ενεργοποίηση ενζύμων που μπορούν να επιφέρουν αύξηση της πρωτεόλυσης, επιτάχυνση του σταδίου ωρίμανσης και βελτίωση των χαρακτηριστικών του τυριού.

Στη μελέτη της δομής επεξεργασμένων με ΥΠ και μη ενδοκυτταρικών ενζύμων οξυγαλακτικών στελεχών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως καλλιέργειες εκκίνησης κατά την παραγωγή Φέτας, προς διερεύνηση της αιτιακής βάσης της επίδρασης της ΥΠ στη δραστηριότητα των ενζύμων αυτών.

Στη μελέτη της επίδρασης της ΥΠ στο φορτίο και στην ικανότητα οξίνισης των οξυγαλακτικών αυτών στελεχών, με στόχο τη διερεύνηση της δυνατότητάς τους να λειτουργήσουν ως καλλιέργειες εκκίνησης μετά την επεξεργασία.

Στην εφαρμογή των αποτελεσμάτων στην παρασκευή τυριού άλμης τύπου Φέτας και τη μελέτη της εξέλιξης των φαινομένων, στοχεύοντας στην παραλαβή τυριού βελτιωμένων οργανοληπτικών, φυσικοχημικών και δομικών χαρακτηριστικών σε μικρότερο χρόνο ωρίμανσης.

Τα αποτελέσματα που θα προκύψουν από την πραγματοποίηση της συγκεκριμένης έρευνας θα αποτελέσουν σημαντική πηγή νέας γνώσης για την επιστημονική κοινότητα. Καταρχήν, θα τεκμηριωθεί η αιτία της μεταβολής της δραστηριότητας των σημαντικών αυτών ενζυμικών συστημάτων όταν αυτά υποβάλλονται σε διαφορετικούς συνδυασμούς πίεσης και θερμοκρασίας, μέσω της μελέτης της δευτεροταγούς και τριτοταγούς δομής τους καθώς και της θερμοδυναμικής τους σταθερότητας. Επιπλέον, η μελέτη της δραστηριότητας επεξεργασμένων με ΥΠ αμινοπεπτιδασών μπορεί να συντελέσει μέσω ενεργοποίησής τους στη μείωση του χρόνου ωρίμανσης του παραγόμενου τυριού, ενώ η επακόλουθη μελέτη της ωρίμανσής του θα συντελέσει στην τεκμηρίωση του τρόπου βελτιστοποίησης των χαρακτηριστικών του τελικού προϊόντος. Τέλος, με την παραγωγή ενός νέου τυριού άλμης με εφαρμογή της μη θερμικής επεξεργασίας της ΥΠ καθώς και όλων των αποτελεσμάτων της παρούσας έρευνας, επιδιώκεται η παραλαβή ενός προϊόντος με βελτιστοποιημένα φυσικοχημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Η συγκεκριμένη μελέτη αναμένεται να συμβάλει στην έρευνα των αιτίων που προκαλούν την ενεργοποίηση καθώς και την απενεργοποίηση σημαντικών ενζυμικών συστημάτων από μικροοργανισμούς που εμπλέκονται στην τεχνολογία παραγωγής τυριών καθώς και των αποτελεσμάτων της δράσης τους στη διαμόρφωση των χαρακτηριστικών του τελικού προϊόντος. Το προτεινόμενο έργο είναι στην αιχμή της διεθνούς έρευνας σχετικά με την αξιοποίηση των δυνατοτήτων που προσφέρει η νέα διεργασία ΥΠ ελεγχόμενης απενεργοποίησης ή ενεργοποίησης βιολογικών συστημάτων όπως τα υπό μελέτη ένζυμα.

Με την ολοκλήρωση και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων αναμένεται να βοηθηθεί σημαντικά η τεχνολογία παραγωγής γαλακτοκομικών προϊόντων και κυρίως τυριών. Απώτερος στόχος είναι η μείωση του αναγκαίου χρόνου ωρίμανσης των τυριών και κατά συνέπεια η μείωση του κόστους παραγωγής τους. Το μειωμένο κόστος παραγωγής των τυριών και η βελτίωση των οργανοληπτικών τους χαρακτηριστικών μπορεί να βοηθήσει σημαντικά την εμπορικότητα τέτοιων ελληνικών προϊόντων και την ελληνική βιομηχανία τυριού προσφέροντας στον καταναλωτή προϊόντα ποιοτικά σε τιμές προσιτές.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Akhtara, S., Paredes-Sabjaa, D., Torres, A. & Sarker, M. (2009). Strategy to inactivate *Clostridium perfringens* spores in meat products. *Food Microbiology*, 26 (3), 272–277.
- Alexandrakis, Z., Katsaros, G., Stavros, P., Katapodis, P., Nounesis, G. & Taoukis, P. (2014a). Comparative structural changes and inactivation kinetics of pectin methylesterases from different orange cultivars processed by high pressure. *Food and Bioprocess Technology*, 7 (3), 853–867.
- Alexandrakis, Z., Kyriakopoulou, K., Katsaros, G., Krokida, M. & Taoukis, P. (2014b). Selection of process conditions for high pressure pasteurization of sea buckthorn juice retaining high antioxidant activity. *Food and Bioprocess Technology*, 7 (11), 3226–3234.
- Alexandrakis, Z., Katsaros, G., Stavros, Ph., Nounesis, G. & Taoukis, P. (2016). Inactivation kinetics and structural changes of high pressure treated actinidin. *International Journal of Agricultural Science and Technology, IJAST 7297*, Volume 2016, Open access DOI: Pending.
- Amanatidou, A., Schluter, O., Lemkau, K., Gorris, L.G.M., Smid, E.J. & Knorr D. (2000). Effect of combined application of high pressure treatment and modified atmospheres on the shelf life of fresh Atlantic salmon. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 1, 87-98.
- Ananth, V., Dickson, J.S., Olson, D.G. & Murano, E.A. (1998). Shelf life extension, safety, and quality of fresh pork loin treated with high hydrostatic pressure. *Journal of Food Protection*, 61(12), 1649-1656.
- Arqués, J.L., Rodríguez, E., Gaya, P., Medina, M., Guamis, B. & Nuñez, M. (2005a). Inactivation of *Staphylococcus aureus* in raw milk cheese by combinations of high pressure treatments and bacteriocin-producing lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 254–60.
- Arqués, J.L., Rodríguez, E., Gaya, P., Medina, M. & Nuñez, M. (2005b). Effect of combinations of high pressure treatments and bacteriocin-producing lactic acid bacteria on the survival of *Listeria monocytogenes* on raw milk cheese. *International Dairy Journal*, 15, 893–900.
- Ashie, I.N.A. & Lanier, T.C. (1999). High pressure effects on gelation of surimi and turkey breast muscle enhanced by microbial transglutaminase. *Journal of Food Science*, 64 (4), 704-708.
- Barbosa-Cánovas, G.V. & Juliano P. (2008). Food sterilization by combining high pressure and thermal energy. In: Gutiérrez-López, G., Barbosa-Cánovas, G.V., Welti-Chanes, J. & Parada-Arias E. (eds), *Food Engineering: Integrated Approaches*. New York: Springer, 9-46.
- Bayindirli, A., Alpas, H., Bozoglu, F. & Hizal, M. (2006). Efficiency of high pressure treatment on inactivation of pathogenic microorganisms and enzymes in apple, orange, apricot and sour cherry. *Food Control*, 17, 52-58.
- Berlin, D.L., Herson, D.S., Hicks, D.T. & Hoover, D.G. (1999). Response of pathogenic *Vibrio* species to high hydrostatic pressure. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 2776–80.
- Boonyaratanakornkit, B.B., Park, C.B. & Clark, D.S. (2002). Pressure effects on intra- and intermolecular interactions within proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1595, 235-249.
- Borda, D., Van Loey, A., Smout, C. & Hendrickx, M. (2004). Mathematical models for combined high pressure and thermal plasmin inactivation kinetics in two model systems. *Journal of Dairy Science*, 87(12), 4042-4049.
- Boulekou, S., Katsaros, G., & Taoukis, P. (2010). Inactivation kinetics of peach pulp pectin methylesterase as a function of high hydrostatic pressure and temperature process conditions. *Food and Bioprocess Technology*, 3(5), 699–706.

- Buchheim, W. & Abou El-Nour, A.M. (1992). Induction of milk fat crystallization in the emulsified state by high hydrostatic pressure. *Fat Science & Technology*, 10, 369-373.
- Bull, M. K., Zerdin, K. & Howe, E. (2004). The effect of high pressure processing on the microbial, physical and chemical properties of Valencia and Navel orange juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5: 135–149.
- Butz, P., Koller, D. & Tausher, B. (1994). Ultra high pressure processing of onions: Chemical and sensory changes, *Lebensmittel Wissenschafts Technologie*, 27, 463-467.
- Butz, P., Fister, H., Losch, S. & Tauscher, B. (1996). Response of immobilized *Bacillus subtilis* α -amylase to high pressure inactivation. *Food Biotechnology*, 10(2), 93-103.
- Butz, P., Fernández-García, A., Lindauer, R., Dieterich, S., Bognár, A. & Tauscher B. (2003). Influence of ultra high pressure processing on fruit and vegetable products. *Journal of Food Engineering*, 56, 233-236.
- Calik, H., Morrissey, M. T., Reno, P. W., & An. H. (2002). Effect of high-pressure processing on *Vibrio parahaemolyticus* strains in pure culture and Pacific oysters. *Journal of Food Science*, 67, 1506–1510.
- Capellas, M., Mor-Mur, M., Sendra, E. & Guamis, B. (2001). Effect of high-pressure processing on physico-chemical characteristics of fresh goats' milk cheese (Mató). *International Dairy Journal*, 11, 165–73.
- Cheftel, J.C., (1995). Review: high pressure, microbial inactivation and food preservation, *Food Science & Technology International*, 1(2/3), 75-90.
- Cheftel, J., (1992). Effects of high hydrostatic pressure on food constituents: an overview. In *High Pressure and Biotechnology*; Balny, C., Hayashi, R., Heremans, K., Masson, P., Eds.; Colloques INSERM/John Libbey Eurotext Ltd: Montrouge, France, 195-209.
- Coker C., Crawford R., Johnston K., Singh H., Creamer L. (2005). Towards the classification of cheese variety and maturity on the basis of statistical analysis of proteolysis data – A review. *International Dairy Journal*, 15, 631–643.
- Costabel, L., Bergamini, C., Vaudagna, S., Cuatrin, A., Audero, G. & Hynes, E. (2016). Effect of high-pressure treatment on hard cheese proteolysis. *Journal of Dairy Science*, 99 (6), 4220-4232.
- Crawford, Y.J., Murano, E.A., Olson, D.G. & Shenoy, K. (1996). Use of high hydrostatic pressure and irradiation to eliminate *Clostridium sporogenes* spores in chicken breast. *Journal of Food Protection*, 59(7), 711-715.
- Dogan, C. & Erkmen, O. (2004). High pressure inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* inactivation in broth, milk, and peach and orange juices. *Journal of Food Engineering*, 62 (1), 47-52.
- Donaghy, J.A., Linton, M., Patterson, M.F. & Rowe, M.T. (2007). Effect of high pressure on *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* in milk. *Letters in Applied Microbiology*, 45, 154–159.
- Donsi, G., Ferrari, G. & Di Matteo, M. (1996). High pressure stabilization of orange juice: evaluation of the effects of process conditions. *Italian Journal of Food Sciences*, 8 (2), 99-106.
- Drake, M.A., Harrison, S.L., Asplund, M., Barbosa-Canovas, G. & Swanson B.G. (1997). High pressure treatment of milk and effects on microbiological and sensory quality of Cheddar cheese. *Journal of Food Science*, 62 (4), 843-845,860.
- Evert-Arriagada, K., Hernández-Herrero, M. M., Guamis, B. & Trujillo, A. J. (2014). Commercial application of high-pressure processing for increasing starter-free fresh cheese shelflife. *LWT-Food Science and Technology*, 55, 498–505.

- Eylen, D.V., Bellostas, N., Strobel, B.W., Oey, I., Hendrickx, M., Van Loey, A., Sørensen, H. & Sørensen, J.C. (2008). Influence of pressure/temperature treatments on glucosinolate conversion in broccoli (*Brassica oleraceae L. cv Italica*) heads. *Food Chemistry*, 112 (3), 646-653.
- Farkas, D.F. & Hoover, D.G. (2000). High-pressure processing. *Journal of Food Science*, 65 (suppl.), 47–64.
- García-Graells, C., Valckx, C. & Michiels, C.W. (2000). Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in milk by combined treatment with high hydrostatic pressure and the lactoperoxidase system. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4173–4179.
- García-Risco, M.R., Cortis, E., Carrascosa, A.V. & Lopez-Fandipo, R. (1998). Microbiological and chemical changes in high-pressure treated milk during refrigerated storage. *Journal of Food Protection*, 61(6), 735-737.
- García-Risco, M.R., Recio, I., Molina, E. & Lopez-Fandino, R. (2003). Plasmin Activity in Pressurized Milk. *Journal of Dairy Science*, 86, 728-734.
- Garde, S, Arqués, J.L., Gaya, P., Medina, M. & Nuñez, M. (2007). Effect of high-pressure treatments on proteolysis and texture of ewes' raw milk La Serena cheese. *International Dairy Journal*, 17, 1424–1433.
- Gervilla, R., Capellas, M., Ferragut, V. & Guamis, B. (1997). Effect of hydrostatic pressure on *Listeria innocua* 910 CECT inoculated into ewe's milk. *Journal of Food Protection*, 60, 33-37.
- Gervilla, R., Sendra, E., Ferragut, V. & Guamis, B. (1999). Sensitivity of *Staphylococcus aureus* and *Lactobacillus helveticus* in ovine milk subjected to high hydrostatic pressure. *Journal of Dairy Science*, 82, 1099-1107.
- Hayakawa, I., Linko, Y.Y, Linko, P. (1996). Mechanism of high pressure denaturation of proteins. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 29, 756 -762.
- Hayashi, R., Kawamura, Y. & Kunugi, S. (1987). Introduction of high pressure to food processing: Preferential proteolysis of β -lactoglobulin in milk whey. *Journal of Food Science*, 52(4), 1107-1108.
- Hayashi, R., Kawamura, Y., Nakasa, T. & Okinaka, O. (1989). Application of high pressure to food processing: pressurization of egg white and yolk and properties of gels formed. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53(11), 2935-2940.
- Hayes, M.G., Fox, P.F. & Kelly, A.L. (2005). Potential applications of high pressure homogenisation in processing of liquid milk. *Journal of Dairy Research*, 72(1), 25-33.
- He, H., Adams, R.M., Farkas, D.F. & Morrissey, M.T. (2002). Use of high-pressure processing for oyster shucking and shelf-life extension. *Journal of Food Science*, 67(2), 640-645.
- Heremans, K. (1982). High pressure effects on proteins and other biomolecules. *Annual Review on Biophysics and Bioengineering*. 11, 1–21.
- Hernandez, A. & Cano, M.P. (1998). High pressure and temperature effects on enzyme inactivation in tomato puree. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 266-270.
- Hite, B.H., Giddings, N.J. & Weakley, C.E. (1914). The effect of pressure on certain microorganisms encountered in the preservation of fruits and vegetables. *Bull. W.V. Univ. Agric. Exp. Station*, 146, 1–67.
- Hoover, D.G., Metrick, C., Papineau, A.M., Farkas, D.F. & Knorr, D. (1989). Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms. *Food Technology*, 43, 99–107.

- Daryaei, H., Coventry, M.J., Versteeg, C. & Sherkat, F. (2008). Effect of high pressure treatment on starter bacteria and spoilage yeasts in fresh lactic curd cheese of bovine milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 201-205.
- Hygreeva, D. & Pandey, M. (2016). Novel Approaches in improving the quality and safety Aspects of Processed Meat Products through High Pressure Processing Technology- A Review. *Trends in Food Science & Technology*, 54, doi:1016/j.tifs.2016.06.002
- Iametti, S., Donnizzelli, E., Pittia, P., Rovere, P., Squarcina, N., & Bono mi, F. (1999). Characterization of high-pressure-treated eggalbumen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3611– 3616.
- Indrawati, I., Van Loey, A.M., Ludikhuyze, L.R. & Hendrickx, M.E. (2000). Kinetics of pressure inactivation at subzero and elevated temperatures of lipoxygenase in crude green beans (*Phaseolus vulgaris*) extract. *Biotechnology Progress*, 16 (1), 109-115.
- Irwe, S. & Olsson, I. (1994). Reduction of pectinesterase activity in orange juice by high pressure treatment. In: R.P. Singh, F.A.R. Oliveira (Eds.). Minimal processing of foods and process optimisation-an interface, CRC Press, Boca Raton, Fla, 35-42.
- Jimenez-Colmenero, F., Fernandez, P., Carballo, J., Fernandez-Martin, F. (1998). High-pressure-cooked low-fat pork and chicken batters as affected by salt levels and cooking temperature. *Journal of Food Science*, 63 (4), 656-659.
- Jofre, A., Garriga, M. & Aymerich, T. (2008). Inhibition of *Salmonella sp.* *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in cooked ham by combining antimicrobials, high hydrostatic pressure and refrigeration. *Meat Science*, 78: 53–59.
- Jolibert, F., Tonello, C., Sagegh, P. & Raymond, J. (1994). Les Effets des Hautes Pressions sur la Polyphenol Oxydase des Fruits. *Bios Boissons*, 251, 27-35.
- Juan, B., Ferragut, V., Buffa, M., Guamis, B. & Trujillo, A. (2007). Effects of high pressure on proteolytic enzymes in cheese: relationship with the proteolysis of ewe milk cheese. *Journal of Dairy Science*, 90, 2113–2125.
- Kadam, P.S., Jadhav, B.A., Salve, R.V. & Machewad, G.M. (2012). Review on the high pressure technology (HPT) for food preservation. *Journal of Food Processing and Technology*, 3(1), <http://dx.doi.org/10.4172/2157-7110.1000135>.
- Katsaros, G.I., Katapodis, P. & Taoukis P.S. (2009a). High hydrostatic pressure inactivation kinetics of the plant proteases ficin and papain. *Journal of Food Engineering*, 91(1), 42-48.
- Katsaros, G., Giannoglou, M. & Taoukis P. (2009b). Kinetic study of the effect of high hydrostatic pressure on the activity of *L. bulgaricus* aminopeptidases. *Journal of Food Science*, 74 (5), 219-225.
- Knorr, D. (1993). Effects of high-hydrostatic-pressure processes on food safety and quality. *Food Technology*, 47, 156-161.
- Kunugi, S. (1992), Enzyme reactions under high pressure and their applications. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 672, 293–304.
- Lopez-Caballero, M.E., Perez-Mateos, M., Bordervas, J.A. & Montero P. (2000). Extension of the shelf life of prawns (*penaeus japonicus*) by vacuum packaging and high-pressure treatment. *Journal of Food Protection*, 63 (10), 1381-1388.
- López-Pedemonte, T., Roig-Sagués, A., De Lamo, S., Hernández-Herrero, M. & Guamis, B. (2007). Reduction of counts of *Listeria monocytogenes* in cheese by means of high hydrostatic pressure. *Food Microbiology*, 24, 59–66.

- Ludikhuyze, L., De Cordt, S., Weemaes, C., Hendrickx, M. & Tobback, P. (1996). Kinetics for heat and pressure-temperature inactivation of *Bacillus subtilis* α -amylase. *Food Biotechnology*, 10 (2), 105-129.
- Ludikhuyze, L., Indrawati, I., Van den Broek, I., Weemaes, C. & Hendrickx, M. (1998). Effect of combined pressure and temperature on soybean lipoxygenase. II Modeling inactivation kinetics under static and dynamic conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4081-4086.
- Ludikhuyze, L., Claeys, W. & Hendrickx, M., (2000). Combined pressure-temperature inactivation of alkaline phosphatase in bovine milk: a kinetic study. *Food Engineering and Physical Properties*, 65 (1), 155-159.
- Ly Nguyen, B., Van Loey, A.M., Smout, C., Eren Özcan, S., Fachin, D., Verlent, I., Vu, S., Duvetter, T. & Hendrickx, M.E. (2003). Mild-heat and high-pressure inactivation of carrot pectin methylesterase: A kinetic study. *Journal of Food Science*, 68 (4), 1377–1383.
- Mackey, B. M., K. Forestiere, N. S. Isaacs, R. Stenning & Brooker, B. (1994). The effect of high hydrostatic pressure on *Salmonella thompson* and *Listeria monocytogenes* examined by electron microscopy. *Letters of Applied Microbiology*, 19, 429-432.
- Maniou, D., Tsala, A., Moschopoulou, E., Giannoglou, M., & Taoukis, P. (2013). Effect of high-pressure-treated starter on ripening of Feta cheese. *Dairy Science. & Technology*, 93, 11–20.
- Menéndez, O.H., Schwarzenbolz, U. R. & Henle, T. (2006). Structural changes of microbial transglutaminase during thermal and high-pressure treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(5), 1716–1721.
- Mills, G., Earnshaw, R., and Patterson, M.F. (1998). Effects of high hydrostatic pressure on *Clostridium sporogenes* spores. *Letters of Applied Microbiology*, 26, 227-230.
- Moatsou G., Bakopanos C, Katharios D, Katsaros G, Kandarakis I, Taoukis P. & Politis I. (2008a). Effect of high-pressure treatment at various temperatures on indigenous proteolytic enzymes and whey protein denaturation in bovine milk. *Journal of Dairy Research*, 75, 262-269.
- Moatsou G., Katsaros G, Bakopanos C, Kandarakis I, Taoukis P. & Politis I. (2008b). Effect of high-pressure treatment at various temperatures on activity of indigenous proteolytic enzymes and denaturation of whey proteins in ovine milk. *International Dairy Journal*, 18, 1119-1125.
- Moschopoulou, E., Anisa, T., Katsaros, G., Taoukis, P. & Moatsou, G. (2010). Application of high-pressure treatment on ovine brined cheese: effect on composition and microflora throughout ripening. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 543–50.
- Mozhaev, V.V., Lange, R., Kudryashova, E.V. & Balny, C. (1996). Application of high hydrostatic pressure for increasing activity and stability of enzymes. *Biotechnology and Bioengineering*, 52, 320-331.
- Nienaber, U. & Shellhammer, T.H. (2001). High-pressure processing of orange juice: kinetics of pectinmethylesterase inactivation. *Journal of Food Science*, 66 (2), 328-331.
- O'Reilly, C.E., Kelly, A.L., Murphy, P.M. & Beresford, T.P. (2001). High pressure treatment: applications in cheese manufacture and ripening. *Trends in Food Science and Technology*, 12, 51–9.
- O'Reilly, C.E., O'Connor, P.M., Kelly, A.L., Beresford, T.P. & Murphy, P.M. (2000a). Use of hydrostatic pressure for inactivation of microbial contaminants in cheese. *Applied Environmental Microbiology*, 66, 4890–96.
- O'Reilly, C.E., O'Connor, P.M., Murphy, P.M., Kelly, A.L. & Beresford, T.P. (2000b). The effect of exposure to pressure of 50 MPa on Cheddar cheese ripening. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 1, 109–17.

- Pandey, P.K., Ramaswamy, H.S. & St-Gelais, D., (2000). Water-holding capacity and gel strength of rennet curd as affected by high-pressure treatment of milk. *Food Research International*, 33, 655-663.
- Patterson, M. F. & Kilpatrick, D. J. (1998). The combined effect of high hydrostatic pressure and mild heat on the inactivation of pathogens in milk and poultry. *Journal of Food Protection*, 61 (4), 432 – 436.
- Patterson, M.F., Margey, D.M., Mills, G., Simpson, R. & Gilmour, A. (1997). The effect of high hydrostatic pressure treatment on microorganisms in foods, In: Heremans, K. (Ed.). High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology, Proceedings of the XXXIVth meeting of the European High Pressure Research Group, Leuven University Press, Leuven, Belgium, 269-272.
- Patterson, M.F. (2005). A review: microbiology of pressure-treated foods. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 1400–1409.
- Polydera, A., Stoforos, G. & Taoukis, P. (2005). Quality degradation kinetics of pasteurised and high pressure processed fresh Navel orange juice: Nutritional parameters and shelf life. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6, 1 – 9.
- Prat-Gay, G., Paladini, A., Stein, M. & Wolosiuk, R. (1991). The effect of high hydrostatic pressure on the modulation of regulatory enzymes from spinach chloroplasts. *The journal of Biological Chemistry*, 266 (31), 20913-20921.
- Rademacher, B. & Kessler, H.G. (1997). High pressure inactivation of microorganisms and enzymes in milk and milk products. In: Heremans K, editor. High pressure bioscience and biotechnology. Leuven: Leuven University Press, 291–293.
- Rodríguez, E., Arqués, J.L., Nuñez, M., Gaya, P. & Medina, M. (2005). Combined effect of high pressure treatments and bacteriocin-producing lactic acid bacteria on the inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in raw milk cheese. *Applied Environmental Microbiology*, 71, 3399–3404.
- Sampedro, F., Rodrigo, D. & Hendrickx, M. (2008). Inactivation kinetics of pectin methyl esterase under combined thermal–high pressure treatment in an orange juice–milk beverage. *Journal of Food Engineering*, 86, 133–139.
- San Martin-Gonzalez, M. F., Welti-Chanes, J. & Barbosa-Canovas, G. V. (2006). Cheese manufacture assisted by high pressure. *Food Reviews International*, 22 (3), 275–289.
- Serment-Moreno, V., Fuentes, C., Barbosa-Cánovas, G., Torres, A. & Welti-Chanes, J. (2015). Evaluation of high pressure processing kinetic models for microbial inactivation using standard statistical tools and information theory criteria and the development of generic time-pressure functions for process design. *Food and Bioprocess Technology*, 8 (6), 1244–1257.
- Seyderhelm, I., Boguslawski, S., Michaelis, G. & Knorr D. (1996). Pressure induced inactivation of selected food enzymes. *Journal of Food Science*, 61 (2), 308-310.
- Shao, Y., Ramaswamy, H.S. & Zhu, S. (2007). High-pressure destruction kinetics of spoilage and pathogenic bacteria in raw milk cheese. *Journal of Food Process Engineering*, 30, 357–74.
- Shearer, A.E., Dunne, C.P., Sikes, A. & Hoover, D.G. (2000). Bacterial spore inhibition and inactivation in foods by pressure, chemical preservatives, and mild heat. *Journal of Food Protection*. 63, 1503–1510.
- Smelt, J.P.P.M. (1998). Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends in Food Science and Technology*, 9, 152–158.
- Smiddy, M., Sleator, R.D., Patterson, M.F., Hill, C. & Kelly, A.L. (2004). Role for compatible solutes glycine betaine and L-carnitine in listerial barotolerance. *Applied Environmental Microbiology*, 70, 7555–7557.

- Smiddy, M., O’Gorman, L., Sleator, R.D., Kerry, J.P., Patterson, M.F., Kelly, A.L. & Hill, C. (2005). Greater high-pressure resistance of bacteria in oysters than in buffer. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6, 83–90.
- Styles, M.F., Hoover, D.G. & Farkas, D.F. (1991). Response of *Listeria monocytogenes* and *Vibrio parahaemolyticus* to high hydrostatic pressure. *Journal of Food Science*, 56 (5), 1404-1407.
- Tedford, L.A., Smith, D. & Schaschke, C.J. (1999). High pressure processing effects on the molecular structure of ovalbumin, lysozyme and β -lactoglobulin. *Food Research International*, 32(2), 101–106.
- Tonello, C., Kesenne, S., Muterel, C. & Jolibert, F. (1997). Effect of high hydrostatic pressure treatments on shelf-life of different fruit products. In: K. Heremans (Ed.). *High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology*, Leuven University press, Leuven, Belgium, 439-442.
- Torres, J.A., Sanz, P.D., Otero, L., Pérez Lamela, C. & Saldaña, M. D. A. (2009). Engineering principles to improve food quality and safety by high pressure processing. In E. Ortega-Rivas (Ed.), *Processing effects on safety and quality of foods* (pp. 379–414). Boca Raton, FL: CRC Taylor & Francis, Inc.
- Torres, J.A. & Velazquez, G. (2005). Commercial opportunities and research challenges in the high pressure processing of foods. *Journal of Food Engineering*, 67 (1–2), 95–112.
- Tsironi, T., Maltezou, I., Tsevdou, M., Katsaros, G. & Taoukis, P. (2015). High-pressure cold pasteurization of gilthead seabream fillets: Selection of process conditions and validation of shelf life extension. *Food and Bioprocess Technology*, 8 (3), 681–690.
- Vachon, J.F., Kheadr, E.E., Giasson, J., Paquin, P. & Fliss, I. (2002). Inactivation of foodborne pathogens in milk using dynamic high pressure. *Journal of Food Protection*, 65, 345–352.
- Van den Broeck, I., Ludikhuyze, L.R., Weemaes, C.A., Van Loey, A.M. & Hendrickx, M.E. (2000). Effect of temperature and/or pressure on tomato pectinesterase activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (2), 551-558.
- Van den Broeck, I., Ludikhuyze, L.R., Van Loey, A.M., Weemaes, C.A. & Hendrickx, M.E. (1999). Thermal and combined pressure-temperature inactivation of orange pectinesterase: Influence of pH and additives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2950-2958. Ms. 20001526.
- Visschers, R.W. & de Jong, H. (2005). Bisulphide bond formation in food protein aggregation and gelation. *Biotechnology Advances*, 23(1), 75-80.
- Voigt, D.D., Chevalier, F., Qian, M.C. & Kelly, A.L. (2010). Effect of high-pressure treatment on microbiology, proteolysis, lipolysis and levels of flavour compounds in mature blue-veined cheese. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 68–77.
- Weemaes, C., Rubens, P., De Cordt, S., Ludikhuyze, L., Van den Broeck, I. & Hendrickx, M. (1997). Temperature sensitivity and pressure resistance of mushroom polyphenoloxidase. *Journal of Food Science*, 62 (2), 261–266.
- Wuytack, E.Y., Boven, S. & Michiels, C.W. (1998). Comparative study of pressure-induced germination of *Bacillus subtilis* spores at low and high pressures. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (9), 3220-3224.
- Yokoyama, H., Sawamura, N. & Motobayashi, N. (1992). Method for accelerating cheese ripening. *European Patent EP 4 698 570*.
- Zabetakis, I., Leclerc, D. & Kajda, P. (2000). The effect of high hydrostatic pressure on the strawberry anthocyanins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48, 2749-2754.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΥΡΙΟΥ – ΤΟ ΣΤΑΔΙΟ ΤΗΣ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ

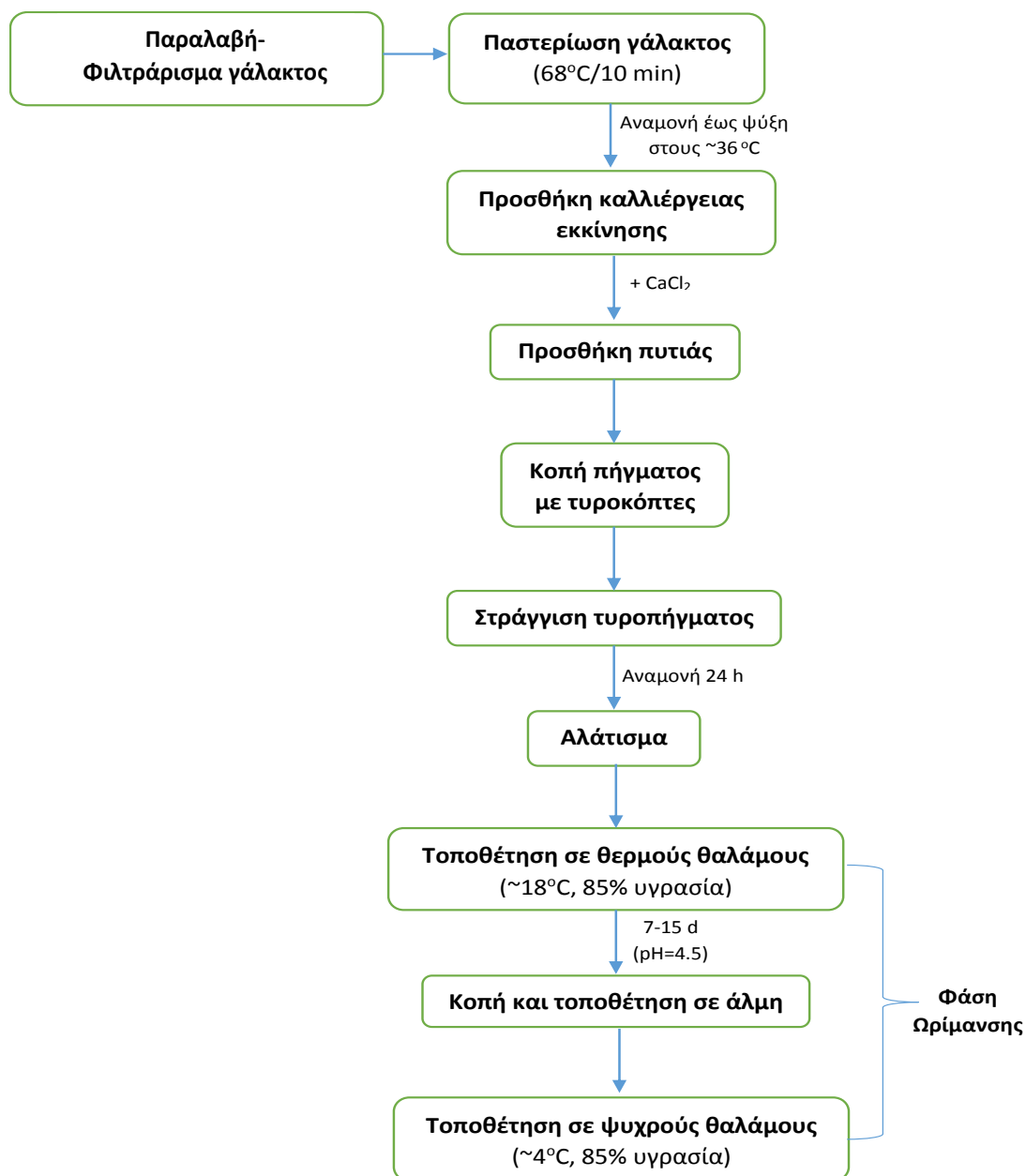
2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το γάλα αποτελεί μία από τις σημαντικότερες τροφές για τον άνθρωπο. Όμως, εξαιτίας της σχετικά γρήγορης αλλοίωσής του καθίσταται σε σύντομο χρόνο ακατάλληλο για κατανάλωση. Έτσι από την αρχαιότητα, προέκυψε η ανάγκη για μετατροπή του σε προϊόντα τα οποία μπορούν να διατηρηθούν για μεγάλο διάστημα χωρίς να προκληθεί μεταβολή στη βιολογική τους αξία. Ένα από τα προϊόντα γάλακτος είναι το τυρί που αποτελεί σημαντικό μέρος της διατροφής του ανθρώπου. Σήμερα απαριθμούνται περισσότερες από 2000 ποικιλίες τυριού παγκοσμίως (Freitas et al., 2013).

Για την Ελλάδα, το σημαντικότερο τυρί είναι η παραδοσιακή Φέτα, γνωστή σε όλον τον κόσμο ως “Greek feta”. Πρόκειται για λευκό, μαλακό τυρί άλμης, κατοχυρωμένο ως προϊόν προστατευόμενης ονομασίας προέλευσης, που φτιάχνεται σε συγκεκριμένες περιοχές της Ελλάδας (Στερεά Ελλάδα, Θεσσαλία, Ήπειρος, Μακεδονία, Θράκη, Πελοπόννησος, Λέσβος) από πρόβειο και αιγοπρόβειο γάλα, με την αναλογία του αίγιου να μην ξεπερνάει το 30% (Κ.Τ.Π., άρθρο 83). Η Φέτα είναι εύθρυπτη, με αλμυρή, υπόξινη γεύση και διαθέτει σφιχτή υφή. Είναι συνήθως απαλλαγμένη από οπές αερίων, παρουσιάζοντας μόνο μικρές ακανόνιστες λειτουργικές οπές. Παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν την υφή του τυριού είναι, η αναλογία του σε αιγοπρόβειο γάλα, η θερμοκρασία αποθήκευσης, η καλλιέργεια εκκίνησης και η συγκέντρωση σε αλάτι (Tsigkros et al., 2003).

Παρακάτω, παρατίθενται τα βασικά σημεία που αφορούν την τυροκόμηση τυριών με έμφαση σε τυριά άλμης (όπως η Φέτα), παρουσιάζοντας και στοιχεία για την αναγκαία ωρίμανσή τους που συμβάλλει στην διαμόρφωση των χαρακτηριστικών ιδιοτήτων τους.

Ένα τυπικό διάγραμμα ροής για την παρασκευή τυριού άλμης όπως η Φέτα δίνεται στο Σχήμα 2.1.



Σχήμα 2.1. Διάγραμμα ροής παρασκευής τυριού άλμης

Παρακάτω παρατίθενται και αναλύονται τα βασικότερα συστατικά τα οποία εμπλέκονται στην τυροκόμηση.

2.2. ΒΑΣΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΕΜΠΛΕΚΟΜΕΝΑ ΣΤΗΝ ΤΥΡΟΚΟΜΗΣΗ

2.2.1. Το Γάλα Τυροκόμησης

Αν και υπάρχουν διάφορα είδη γάλακτος και η διάκριση έγκειται στο γαλακτοπαραγωγικό ζώο, ο γενικός όρος ‘Γάλα’ αναφέρεται κυρίως στο αγελαδινό, που παράγεται από υγιή ζώα (Golden, 2008). Στο εμπόριο, οποιοδήποτε γάλα εκτός του αγελαδινού πρέπει να συνοδεύεται από το είδος του ζώου από το οποίο παράγεται. Γενικότερα και σύμφωνα με τη Διεθνή Οργάνωση Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) και τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας:

‘Γάλα’ είναι η έκκριση των μαστικών αδένων γαλακτοφόρων ζώων, που προέρχεται από μία ή περισσότερες αρμέξεις, χωρίς επιπλέον προσθήκη ή εξαγωγή συστατικών από αυτό, που προορίζεται για κατανάλωση ως υγρό ή για περαιτέρω επεξεργασία (WHO, 2011).

Ανάλογα με το είδος του τυριού που πρόκειται να παρασκευαστεί, χρησιμοποιείται και γάλα διαφορετικής προέλευσης ή μείγματα διαφορετικών ειδών γάλακτος. Το γάλα αποτελεί σύνθετη βιολογική έκκριση στην οποία απαντούν όλες οι μορφές διαμερισμού (αδρομερής, κολλοειδής, μοριακός). Ανάλογα με το είδος των διαφόρων ζώων, μεταξύ των συστατικών εμφανίζονται μόνο ποσοτικές διαφορές.

Το γάλα αποτελείται από κύρια και δευτερεύοντα συστατικά όπως συνοψίζονται στον Πίνακα 2.1. Όσον αφορά στην τυροκομία, τα κύρια συστατικά έχουν τον σημαντικότερο ρόλο, ωστόσο και μερικά δευτερεύοντα συστατικά παρά τη μικρή τους ποσότητα, εμφανίζουν υψηλή βιολογική αξία και τεχνολογικό ενδιαφέρον.

Πίνακας 2.1. Κύρια και δευτερεύοντα συστατικά γάλακτος

Κύρια Συστατικά Γάλακτος*		Δευτερεύοντα Συστατικά Γάλακτος		
Νερό (80.71 – 88.00%)		Αέρια (~6% του όγκου του γάλακτος μετά την άμελξη)	O ₂ (~0.5%)	
Λίπος (3.90 – 7.90%)			N ₂ (~1.3%)	
Πρωτεΐνες (3.52 – 5.23%)	Καζεΐνες	Λιπίδια (εκτός τριγλυκεριδίων) (~1.5-2% συνολικού λίπους)	CO ₂ (~4.5%)	
	Πρωτεΐνες Ορού		Φωσφολιπίδια	
Υδατάνθρακες (4.27 – 4.93%)	Λακτόζη		Βιταμίνες D, E, K, A,	
	Άλατα (0.7 – 0.9%)		Φωσφορικά	Στερόλες
Θειικά			Καροτινοειδή	
Χλωριούχα			Κερεβροσίτες	
Κιτρικά			Καταλάση	Υπεροξειδάση
Ανθρακικά			Ξανθίνη οξειδάση	Φωσφατάσες
	Ένζυμα		Αμυλάσες	Λιπάσες
			Εστεράσες	Πρωτεάσες
		Αλδολάσες	Καρβονική ανυδράση	
		Θειαμίνη	Βιοτίνη	
	Βιταμίνες Υδατοδιαλυτές (~2 mg/mL)	Ριβοφλαβίνη	Φυλλικό οξύ	
		Νιασίνη	Πυριδοξίνη	
		Παντοθενικό οξύ	Βιταμίνες B ₁₂ , C	
		Αζωτούχες ενώσεις (Μη πρωτεϊνικές) (~5% συνολικού αζώτου)	Αμμωνία	Αμινοξέα
	Ίχνη μετάλλων (3.5-15 mg/mL)	Ουρία	Ουρικό οξύ	
		Χαλκός	Αδενίνη	Γουανιδίνη
		Ψευδάργυρος	Χαλκός	Σίδηρος
	Ορμόνες (<1 mg/mL)	Ψευδάργυρος	Μαγνήσιο	
Αντιβακτηριακές ουσίες	Ιώδιο	Κοβάλτιο		
Μικροοργανισμοί	Ορμόνες (<1 mg/mL)			
	Αντιβακτηριακές ουσίες			
	Μικροοργανισμοί			
Σωματικά κύτταρα	Βακτήρια			
	Ζύμες			
	Μύκητες			
	Επιθηλιακά	Λευκοκύτταρα		

*Η διακύμανση αφορά τα διαφορετικά είδη γάλακτος (πρόβειο, γίδινο, αγελαδινό) (Πηγή: Ανυφαντάκης, 2004; Κεχαγιάς Χ., 1997)

Η σύσταση του γάλακτος που παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.1, αποτελείται από τις κατώτερες και ανώτερες μέσες τιμές των κύριων συστατικών, καθώς η ποιότητα και η ποσότητα του γάλακτος επηρεάζεται σημαντικά από διάφορους παράγοντες όπως η υγιεινή κατάσταση του ζώου, η διατροφή, οι περιβαλλοντικές συνθήκες κ.α. Επομένως είναι αδύνατο να παρατεθούν ακριβείς τιμές που περιλαμβάνουν όλες τις προαναφερόμενες περιπτώσεις.

Η σύσταση του γάλακτος προσδιορίζει τα φυσικοχημικά του χαρακτηριστικά, τη θρεπτική του αξία, την καταλληλότητά του ως ακατέργαστου υλικού για παραγωγή άλλων προϊόντων και πολλές από τις

ιδιότητές τους. Ως εκ τούτου, τα συστατικά που βρίσκονται σε μεγαλύτερες ποσότητες στο γάλα και τα οποία αναλύονται εκτενέστερα παρακάτω, να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην τυροκομία.

Νερό

Το νερό είναι το συστατικό που συναντάται σε συντριπτικά μεγαλύτερο ποσοστό σε σχέση με τα υπόλοιπα και αποτελεί μέσο διασποράς όλων των υπολοίπων. Ένα μικρό μέρος του βρίσκεται ‘δεσμευμένο’ στη λακτόζη και τις πρωτεΐνες του γάλακτος.

Η τυροκόμηση του γάλακτος αποσκοπεί στην απομάκρυνση μέρους του νερού που περιέχεται σε αυτό, ώστε να διατηρηθούν τα υπόλοιπα συστατικά του για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Η ποσότητα νερού που απομακρύνεται εξαρτάται από το είδος του τυριού που επιδιώκεται να παραχθεί (πολύ σκληρό, σκληρό, ημίσκληρο, μαλακό, αλοιφώδες).

Λίπος

Στη λιπαρή φάση του γάλακτος περιλαμβάνονται κυρίως τρεις κατηγορίες ενώσεων: τα ουδέτερα λίπη (τριγλυκερίδια, διγλυκερίδια, μονογλυκερίδια), τα πολικά λιπίδια (φωσφολιπίδια, γλυκολιπίδια), τα ασαπωνοποίητα συστατικά (στερόλες, λιποδιαλυτές βιταμίνες, καροτενοειδή) με αναλογία 98%, 1% και 1%, αντίστοιχα (Ανυφαντάκης, 2004).

Η βασική δομή των τριγλυκεριδίων προκύπτει από την εστεροποίηση τριών λιπαρών οξέων πάνω σε ένα μόριο γλυκερόλης. Το λίπος του γάλακτος είναι το πιο περίπλοκο όλων των φυσικών λιπαρών, λαμβάνοντας υπόψη ότι περισσότεροι από 400 συνδυασμοί διαφορετικών λιπαρών οξέων σχηματίζουν τα τριγλυκερίδια. Τα λιπαρά οξέα είναι οργανικά οξέα που αποτελούνται από τις αλυσίδες των υδατανθράκων με μια καρβοξυλική ομάδα (-COOH) στο τέλος της αλυσίδας. Αυτά μπορεί να είναι είτε κορεσμένα είτε ακόρεστα (Harding, 1999). Τα περιεχόμενα λιπαρά οξέα των λιπιδίων του γάλακτος αποτελούνται από 4-20 άτομα άνθρακα με παρουσία 0-4 διπλών δεσμών. Άλλα λιπίδια που υπάρχουν είναι η χοληστερόλη (<0.5%), διγλυκερίδια (~2%), ελεύθερα λιπαρά οξέα (0.1%), φωσφολιπίδια (~1%) και κερεβροζίδια. Επιπλέον, περιέχονται ίχνη από υδατάνθρακες, λιποδιαλυτές βιταμίνες, αρωματικές ενώσεις και διάφορα συστατικά που εισέρχονται στο γάλα μέσω της λαμβανόμενης τροφής των ζώων (Walstra & Jenness, 1984).

Η περιεκτικότητα του γάλακτος σε λιπαρά και η σύστασή τους εξαρτάται από το είδος του ζώου, τη γαλακτοπαραγωγική περίοδο, την ύπαρξη μαστίτιδας και γενικότερα την υγιεινή του ζώου, από την τροφή και πολλούς άλλους παράγοντες. Κατά μέσο όρο, περίπου το 70% του λιπαρού κλάσματος συντίθεται από κορεσμένα λιπαρά οξέα, ενώ το 30% από ακόρεστα (Pereira, 2014).

Πρωτεΐνες

Το γάλα περιέχει μια μεγάλη ποικιλία από αζωτούχες ενώσεις, όπου το 95% εξ'αυτών είναι πρωτεϊνικής φύσεως, ενώ το 5% μη πρωτεϊνικής (Ανυφαντάκης, 2004). Στην τυροκομία σημαντικό ρόλο έχουν οι πρώτες. Οι πρωτεΐνες μπορούν να χωριστούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τις διαλυτές και τις αδιάλυτες πρωτεΐνες. Οι διαλυτές, που αναφέρονται και ως πρωτεΐνες ορού, καταλαμβάνουν περίπου το 20% του συνολικού κλάσματος πρωτεϊνών, ενώ οι αδιάλυτες, δηλαδή οι καζεΐνες, το 80% (Pereira, 2014). Στον Πίνακα 2.2. δίνονται αναλυτικά οι αζωτούχες ουσίες καθώς και η ποσότητά τους σε γάλα αγελάδος.

Πίνακας 2.2. Αζωτούχες ουσίες αγελαδινού γάλακτος

Αζωτούχες ουσίες	Ποσότητα (g/L)	%συνόλου αζωτούχων ουσιών	Σχετικές τιμές
I. Πρωτεΐνες	30.5	95	
1. Ισοηλεκτρική καζεΐνη	25	78	100
α_{s1} -καζεΐνη	7.5		30
α_{s2} -καζεΐνη	2.5		10
β -καζεΐνη	7.5		30
κ -καζεΐνη	3.8		15
γ -καζεΐνη κ.α.	3.7		15
2. Πρωτεΐνες Ορού	5.4	17	100
β -λακτογλοβουλίνη	2.70		51
α -λακταλβουμίνη	1.20		22
Οροαλβουμίνη	0.25		5
Ανοσογλοβουλίνες	0.65		12
Πρωτεόζες-Πεπτόνες	0.60		10
II. Αζωτούχες ουσίες μη πρωτεϊνικής φύσεως	1.60	5	

(Πηγή: Ανυφαντάκης, 2004)

Τα αμινοξέα των καζεϊνών διαφέρουν από εκείνα των πρωτεϊνών ορού. Η διαφορά έγκειται κυρίως στο γεγονός ότι ο ορός είναι πλούσιος σε αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας (branched chain amino acids), όπως για παράδειγμα λευκίνη, ισολευκίνη και βαλίνη, σε αντίθεση με τις καζεΐνες που περιέχουν φώσφορο στο μόριο τους και το μεγαλύτερο ποσοστό τους είναι ιστιδίνη, μεθειονίνη και φαινυλαλανίνη. Ακόμη, οι καζεΐνες είναι πιο υδρόφοβες από αυτές του ορού.

Οι **καζεΐνες** είναι χαρακτηριστικές πρωτεΐνες του γάλακτος και αντιστοιχούν στο κλάσμα των φωσφοπρωτεϊνών που καθιζάνει ύστερα από οξίνιση σε pH 4.6 και σε θερμοκρασία 20°C. Με βάση τη διάταξη των αμινοξέων στο μόριό τους διακρίνονται σε α_{s1} -, α_{s2} -, β και κ -καζεΐνες. Όλες οι καζεΐνες (α_{s1} -, α_{s2} -, κ -, β -καζεΐνες) περιέχουν φώσφορο συνδεδεμένο με το αμινοξύ σερίνη, σε διαφορετική ωστόσο περιεκτικότητα η καθεμιά. Η διαφορά μεταξύ τους έγκειται στη διαφορετική συμπεριφορά που εμφανίζουν παρουσία ιόντων ασβεστίου.

Η α_{s1} -καζεΐνη αποτελεί περίπου το 1% των συστατικών του γάλακτος. Στο αγελαδινό γάλα έχουν ανιχνευτεί τουλάχιστον 5 γενετικές παραλλαγές της, οι A, B, C, D, E. Η παραλλαγή B κυριαρχεί και αποτελείται από 199 αμινοξέα. Οι παραλλαγές B, A, C έχουν οκτώ φωσφορικές ομάδες ενώ η D έχει εννέα (Mercier et al., 1971; Eigel et al., 1984). Οι α_{s1} -καζεΐνες καθιζάνουν παρουσία ιόντων ασβεστίου (Ca^{++}).

Η α_{s2} -καζεΐνη αποτελεί το 0.3-0.4% των συστατικών του γάλακτος. Βρίσκεται στο γάλα με διάφορους «τύπους» που έχουν την ίδια σειρά και τον ίδιο αριθμό αμινοξέων (207) διαφέρουν όμως ως προς τον αριθμό των φωσφορικών ομάδων, ο αριθμός των οποίων κυμαίνεται από 10 έως 13. Συναντάται στο αγελαδινό γάλα κυρίως σε 4 γενετικές παραλλαγές, που χαρακτηρίζονται ως A, B, C και D. Η παραλλαγή D έχει 9 αμινοξέα λιγότερα (Brignon et al., 1977). Η A και D παρατηρούνται στις ευρωπαϊκές φυλές του Bos taurus ενώ η C, βρίσκεται μόνο στο γάλα του Yak (είδος βοοειδούς του Θιβέτ-Bos grunniens).

Η β -καζεΐνη αποτελεί περίπου το 1% των συστατικών του γάλακτος και είναι η πιο υδρόφοβη καζεΐνη. Στο αγελαδινό γάλα απαντά σε διάφορες γενετικές παραλλαγές (A^1 , A^2 , A^3 , C, D, E). Οι καζεΐνες γ_1 , γ_2 και γ_3 που συναντώνται στο νωπό γάλα, είναι πεπτίδια ενζυμικής διάσπασης της β -

καζεΐνης (Ribadeau-Dumas et al., 1972, Grosclaude et al., 1973) όπως είχε αρχικά διαπιστωθεί από τους Groves et al. (1972, 1973) και Gordon et al. (1972). Έτσι η γ_1 -καζεΐνη αποτελεί τμήμα της β -καζεΐνης από τη θέση 29 έως τη θέση 209, η γ_2 -από τη θέση 106 έως τη 209 και η γ_3 από τη θέση 108 έως τη 209. Η διάσπαση της β -καζεΐνης γίνεται με την επίδραση μίας από τις πρωτεάσες του γάλακτος, της πλασμίνης (Eigel, 1977). Οι β -καζεΐνες εμφανίζουν επίσης ευαισθησία στην παρουσία ιόντων ασβεστίου (Ca^{++}).

Η κ -καζεΐνη αποτελεί το 0.3-0.4% περίπου των συστατικών του γάλακτος, και απαντά σε μορφή ολιγομερών κ -καζεϊνών που συνδέονται με δισουλφιδικούς δεσμούς. Με ηλεκτροφόρηση διαπιστώνονται 2 γενετικές παραλλαγές, η A και η B, με 159 αμινοξέα η κάθε μία και μοριακό βάρος ~19 kDa (Mercier et al., 1973). Είναι γλυκοπρωτεΐνη και το μόριό της περιέχει σχεδόν πάντοτε υδατάνθρακες. Η διάσπασή της με χυμοσίνη πραγματοποιείται στη θέση 105-106 και παράγεται έτσι η παρα- κ -καζεΐνη (1-105) και ένα γλυκομακροπεπτίδιο (106-169). Σε αντίθεση με τις προηγούμενες, οι κ -καζεΐνες είναι διαλυτές παρουσία ιόντων ασβεστίου σε όλες τις θερμοκρασίες και δεν καθιζάνουν. Ακόμη, οι κ -καζεΐνες σταθεροποιούν τις άλλες δύο κατηγορίες καζεϊνών έναντι των ιόντων ασβεστίου που υπάρχει στο γάλα (Κεχαγιάς, 1997).

Οι προαναφερόμενες πρωτεΐνες συναντώνται στο γάλα υπό μορφή οργανωμένων δομών που περιλαμβάνουν τις α_{s1} -, α_{s2} -, β - και κ -καζεΐνες, τα οποία καλούνται μικκύλια και βρίσκονται σε κolloειδή διασπορά στην υδατική φάση. Τα μικκύλια αποτελούνται κατά 93% από καζεΐνες ενώ το υπόλοιπο συμπληρώνεται από ανόργανη ύλη. Κύρια συστατικά της ανόργανης ύλης αποτελούν ο φωσφόρος και το ασβέστιο τα οποία απαντούν κυρίως με τη μορφή κolloειδούς φωσφορικού ασβεστίου (CCP) και συμβάλλουν στο σχηματισμό και τη διατήρηση του σχήματος των μικκυλίων. Σημαντικό ρόλο έχουν και τα κιτρικά άλατα, τα οποία ρυθμίζουν την ισορροπία της κατάστασης διασποράς των μικκυλίων. Μέσα στο γάλα τα μικκύλια είναι ισχυρώς ενυδατωμένα (2 g $\text{H}_2\text{O}/\text{g}$ πρωτεΐνης). Η ελεγχόμενη υδρόλυση των καζεϊνών είναι το μέσο παρασκευής τυριών και άλλων γαλακτοκομικών προϊόντων.

Οι **πρωτεΐνες ορού** όπως προαναφέρθηκε αποτελούν περίπου το 20% των συνολικών πρωτεϊνών στο αγελαδινό (Walstra, 1999), στο βουβαλίσιο και στο αιγοπρόβειο (Anifantakis, 1986) γάλα. Οι πρωτεΐνες αυτές, στην κανονική τους μορφή είναι διαλυτές σε pH 4.6 ή κατά τον κορεσμό σε NaCl και παραμένουν διαλυτές σε αντίθεση με τις καζεΐνες που σε αυτό το pH καθιζάνουν. Κατά την παρασκευή τυριού, οι πρωτεΐνες αυτές κατανέμονται στον ορό (τυρόγαλα). Οι περισσότερες από αυτές είναι σφαιρικές και υπόκεινται σε μετουσίωση κατά τη θέρμανση. Το κλάσμα των υδατοδιαλυτών αυτών πρωτεϊνών αποτελείται από τις γαλακταλβουμίνες (οροαλβουμίνη, α-λακταλβουμίνη), γαλακτογλοβουλίνες (β -λακτογλοβουλίνη) και ανοσογλοβουλίνες. Οι τελευταίες περιλαμβάνουν μια ετερογενή οικογένεια πρωτεϊνών, που έχουν σαν κοινό χαρακτηριστικό τον εφοδιασμό των νεαρών ζώων με αντισώματα για την προστασία κατά των παθογόνων μικροοργανισμών (Κεχαγιάς, 1997).

Ως προς τις δομικές διαφορές, η β -γαλακτογλοβουλίνη περιέχει δύο δισουλφιδικούς (-S-S-) δεσμούς και μια ελεύθερη ομάδα S-H. Η ελεύθερη αυτή ομάδα είναι δυνατόν να αντιδράσει κάτω από ειδικές συνθήκες και να σχηματίσει νέους δισουλφιδικούς δεσμούς. Αντιθέτως, η α -γαλακταλβουμίνη περιέχει τέσσερις δισουλφιδικούς δεσμούς σε κάθε μόριο, είναι σφαιρικής δομής, με τη λυσίνη της εκτεθειμένη στην επιφάνεια. Η τελευταία θεωρείται πιο θερμοάντοχη πρωτεΐνη (Κεχαγιάς, 1997).

Από τυροκομικής άποψης, μόνο οι δύο πρώτες κατηγορίες υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών, οι γαλακταλβουμίνες και οι γαλακτογλοβουλίνες, παρουσιάζουν ενδιαφέρον κι αυτό επειδή είναι δυνατή η κατακρήμνισή τους με οξίνιση και θέρμανση, αποτελώντας βάση για την παραγωγή διαφόρων προϊόντων, όπως των τυριών τυρογάλακτος (ανθότυρο, μανούρι, μυζήθρα κ.α.) (Ανυφαντάκης, 2004).

Μία ενδεικτική σύσταση των ολικών, των υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών και των καζεϊνών διαφόρων ειδών γάλακτος, παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.3.

Πίνακας 2.3. Εκατοστιαία σύσταση πρωτεϊνών γάλακτος διαφόρων ειδών

ΕΙΔΟΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ	ΟΛΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ (%)	ΚΑΖΕΪΝΕΣ (%)	ΥΔΑΤΟΔΙΑΛΥΤΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ (%)
ΑΓΕΛΛΙΝΟ	3.4	2.7	0.7
ΠΡΟΒΕΙΟ	6.0	4.8	1.2
ΚΑΤΣΙΚΙΣΙΟ	3.6	2.8	0.8
ΒΟΥΒΑΛΙΝΟ	4.4	3.5	0.9
ΟΝΟΥ	2.0	0.7	1.3

(Πηγή: Ζερφυρίδης, 2001)

Υδατάνθρακες

Ο κυρίαρχος ελεύθερος υδατάνθρακας του γάλακτος, στα περισσότερα είδη, είναι η λακτόζη. Στο γάλα, η λακτόζη βρίσκεται σε ποσοστό 4.4% έως 5.2% και αντιπροσωπεύει το 50-52% των στερεών του άπαχου γάλακτος.

Η λακτόζη είναι δισακχαρίτης που αποτελείται από ένα μόριο D-γλυκόζης και ένα μόριο D-γαλακτόζης συνδεδεμένα με β-1.4-γλυκοζιτικό δεσμό. Απαντάται σε δύο μορφές α και β, που διακρίνονται μεταξύ τους από τη θέση του υδροξυλίου στο μόριο της γλυκόζης. Οι μορφές αυτές σε υδατικό περιβάλλον βρίσκονται σε ισορροπία (Walstra & Jenness, 1984). Η παρουσία της στο γάλα αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την παρασκευή προϊόντων ζύμωσης και τυριών. Στο γάλα η λακτόζη μπορεί να υποστεί δύο ζυμώσεις, τη γαλακτική και την αλκοολική, ενώ στα τυριά τρεις, την οξυγαλακτική, την προπιονική και τη βουτυρική (Harding, 1999).

Άλατα και ιγνοστοιχεία

Η φυσική κατάσταση και σταθερότητα των πρωτεϊνών του γάλακτος εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από τη σύσταση των αλάτων του. Μερικά από τα μεταλλικά συστατικά του γάλακτος, κατά κύριο λόγο όμως ο χαλκός και ο σίδηρος, καταλύουν την οξείδωση των λιπιδίων του, με αποτέλεσμα την εμφάνιση ανεπιθύμητων γεύσεων και οσμών.

Στον Πίνακα 2.4 παρατίθεται η περιεκτικότητα σε άλατα σε διάφορα είδη γάλακτος.

Πίνακας 2.4. Περιεκτικότητα σε άλατα (g/1000g) σε διάφορα είδη γάλακτος

	ΚΑΤΣΙΚΙΣΙΟ	ΠΡΟΒΕΙΟ	ΑΓΕΛΛΙΝΟ
ΚΑΛΙΟ	1.6	1.5	1.60
ΝΑΤΡΙΟ	0.4	0.4	0.50
ΑΣΒΕΣΤΙΟ	1.3	2.3	1.30
ΜΑΓΝΗΣΙΟ		-	0.14
ΦΩΣΦΟΡΟΣ	1.0	1.6	1.00
ΧΛΩΡΙΟ	1.5	0.7	1.10
ΘΕΙΟ	0.2	-	0.35
ΚΙΤΡΙΚΑ	1.5	-	1.80

(Πηγή: Κεχαγιάς, 1997)

Στην τυροκομία, ο χρόνος πήξης του γάλακτος με την πυτιά, κατά την παρασκευή τυριού, επηρεάζεται σημαντικά από τη σύσταση των αλάτων του και ιδιαίτερη σημασία έχουν τα ιόντα

ασβεστίου. Η σύσταση του ασβεστίου επηρεάζει σημαντικά την υφή των τυριών αλλά και της γιαούρτης όπως και άλλων γαλακτοκομικών προϊόντων.

Συμπερασματικά, από τυροκομικής απόψης ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν το ασβέστιο, χωρίς τα ιόντα του οποίου δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί ενζυμική πήξη του γάλακτος, η σχέση ασβεστίου, καλίου, μαγνησίου και κιτρικών για τη σταθερότητα του γάλακτος στη θέρμανση, ο σίδηρος και ο χαλκός που συνεισφέρουν στην επιτάχυνση της οξειδωσης των λιπιδίων και τέλος το χλώριο, καθώς αποτελεί δείκτη της υγιεινής κατάστασης του μαστού και επηρεάζει τη γεύση του γάλακτος (Μάντης, 2000). Πρέπει να τονιστεί ότι με την επεξεργασία του γάλακτος, όπως θέρμανση και οξίνιση, η κατάσταση των αλάτων στο γάλα μεταβάλλεται, ανεξάρτητα του γεγονότος ότι η τέφρα παραμένει σχετικά σταθερή (Κεχαγιάς, 1997).

Από τα δευτερεύοντα συστατικά του γάλακτος, ιδιαίτερο ενδιαφέρον από διατροφικής πλευράς παρουσιάζουν οι βιταμίνες, οι στερόλες και τα φωσφολιπίδια, ενώ από τυροκομικής οι χρωστικές, οι αντιβακτηριακές ουσίες, τα σωματικά κύτταρα και τα ένζυμα.

Τα **λιπίδια (εκτός των τριγλυκεριδίων)** αποτελούν το 1.5-2% περίπου του συνολικού λίπους. Στην κατηγορία αυτή συμπεριλαμβάνονται λιποδιαλυτές βιταμίνες και καροτινοειδή, διγλυκερίδια, μονογλυκερίδια, ελεύθερα λιπαρά οξέα και φωσφολιπίδια, όπως λεκιθίνη, κεφαλίνη και σφυγγομυελίνη.

Σχετικά με τις **αντιβακτηριακές ουσίες**, το γάλα εμφανίζει ασθενή βακτηριοστατική ενέργεια για πέντε ώρες περίπου μετά το άρμεγμα. Πολλοί ερευνητές αποδίδουν την ιδιότητα αυτή σε αντισώματα που περιέχει, άλλοι στην παρουσία λευκοκυττάρων, ενώ υπάρχουν αρκετοί που αμφισβητούν την ύπαρξή της. Η αντοχή του γάλακτος στην οξίνιση τις πρώτες ώρες μετά το άρμεγμά του αποδίδεται στις ουσίες αυτές.

Το γάλα περιέχει ένα μικρό αριθμό **επιθηλιακών κυττάρων** που προέρχονται από το μαστό του ζώου από το οποίο προέρχεται. Μεταξύ αυτών είναι και τα λευκοκύτταρα, που είναι κύτταρα μεγάλης σχετικά διαμέτρου χωρίς χρωστική. Όταν το γάλα παράγεται από υγιή μαστό, ο αριθμός τους είναι συνήθως 50.000-100.000 / mL. Η παρουσία τους στο γάλα σε αριθμούς > 400.000 / mL, αποτελεί ένδειξη ανώμαλης λειτουργίας του μαστού, συνήθως προσβολή από μαστίτιδα (Ανυφαντάκης, 2004). Το θέμα των μαστίτιδων είναι ιδιαίτερα σημαντικό για την τυροκομία.

Τα **ένζυμα του γάλακτος** υπάρχουν φυσιολογικά στο γάλα ως προϊόντα εκκριτικής δραστηριότητας των ζώων. Αν και βρίσκονται σε μικρές ποσότητες, καταλύουν πολλές αντιδράσεις και αποτελούν σημαντικά 'εργαλεία' στη γαλακτοκομία. Εκτός από τα φυσικά ένζυμα υπάρχουν και τα ένζυμα μικροβιακής προέλευσης, που παράγονται πριν ή μετά το άρμεγμα.

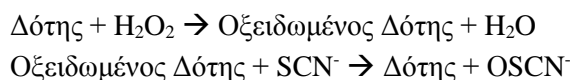
Οι **φωσφατάσες**, είναι ένζυμα που καταλύουν την υδρόλυση φωσφορικών εστέρων, καταστρέφονται σε θερμοκρασία παστερίωσης του γάλακτος (72°C, 15 s) και χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της καλής παστερίωσης. Σημαντικότερη στην κατηγορία αυτή θεωρείται η **αλκαλική φωσφατάση (ALP; EC.3.1.3.1.)** η οποία είναι φωσφοεστεράση με βέλτιστη δραστηριότητα σε εύρος pH 9.0-10.5 και θερμοκρασία 37°C. Είναι διμερής πρωτεΐνη με μοριακή μάζα για την καθεμία από τις δύο υπομονάδες 85 kDa και κάθε μόριο περιέχει τέσσερα άτομα ψευδαργύρου, απαραίτητα για τη δραστηριότητά της. Όσον αφορά τα προϊόντα γάλακτος η σημαντικότητα της ALP σχετίζεται με την απενεργοποίησή της μετά από θερμική επεξεργασία και τη σχετικά ευκολία να εκτιμηθεί ο βαθμός επεξεργασίας. Υγρά προϊόντα γάλακτος με δραστηριότητα ALP κάτω από το όριο που ορίζει η νομοθεσία θεωρείται επαρκώς παστεριωμένο για ασφαλή κατανάλωση (-Ur-Rehman & Farkye, 2003b; Shakeel-Ur-Rehman et al., 2003).

Οι **υπεροξειδάσες**, μεταφέρουν το οξυγόνο κυρίως από το υπεροξείδιο του υδρογόνου και άλλα υπεροξείδια σε δέκτες οξυγόνου. Αδρανοποιούνται όταν το γάλα θερμανθεί στους 80°C για μερικά

δευτερόλεπτα και για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται για να διαπιστωθεί αν το γάλα έχει υποστεί θερμική επεξεργασία μεγαλύτερη της παστερίωσης (υπερπαστερίωση) (Κεχαγιάς, 1997). Το σημαντικότερο ένζυμο στην κατηγορία αυτή θεωρείται η **λακτοπεροξειδάση (LPO; EC. 1.11.1.7)** η οποία καταλύει την οξειδωση μιας ένωσης δότη σύμφωνα με την αντίδραση:



Η LPO συντίθεται στους αδένες των θηλαστικών και αποτελεί γλυκοπρωτεΐνη (~10.0 g / 100 g υδατάνθρακα) με μοριακό βάρος ~78 kDa. Στο γάλα η LPO υπάρχει αρχικά σε διαλυτή μορφή. Οι βέλτιστες συνθήκες pH είναι ~8.0 (Bjork, 1992; Pruit, 2003; Shakeel-Ur-Rehman & Farkye, 2003c). Στο γάλα η LPO εμφανίζει αντιβακτηριακή δράση παρουσία H_2O_2 και θειοκυανικού ιόντος (thiocyanate - SCN^-), μέσω κατάλυσης της οξειδωσης του θειοκυανικού ιόντος (thiocyanate) σε hypothiocyanite (OSCN^-):



Το OSCN^- και το συζυγές οξύ του (HOSCN), με το οποίο είναι σε ισορροπία, είναι υπεύθυνα για την αντιβακτηριακή δράση του συστήματος (Pruitt, 2003).

Οι **λιπάσες** είναι ένζυμα που καταλύουν την υδρόλυση του λίπους και δίδουν ελεύθερα λιπαρά οξέα, τα οποία θεωρούνται ότι δίδουν τα τυπικά γευστικά χαρακτηριστικά σε πολλά γαλακτοκομικά προϊόντα. Η βασική αντίδραση που καταλύουν οι λιπάσες είναι:



Δρουν επί του λίπους του γάλακτος, το υδρολύουν, απελευθερώνουν λιπαρά οξέα και δημιουργούν ανεπιθύμητες οσμές και γεύσεις. Στο γάλα υπάρχουν πάντοτε φυσικές λιπάσες αλλά και μικροβιακές. Οι λιπάσες του γάλακτος για να δράσουν χρειάζονται συνήθως ενεργοποίηση η οποία γίνεται κατά τους διάφορους χειρισμούς που υφίσταται το γάλα κατά την επεξεργασία του. Η ομογενοποίηση, η έντονη ανάδευση, η ψύξη στους 5°C, θέρμανση στους 30°C και ξανά ψύξη στους 5°C είναι χειρισμοί που ενεργοποιούν τις λιπάσες. Στην πραγματικότητα δεν τις ενεργοποιούν, αλλά διευκολύνουν την επίδρασή τους επί του λίπους του γάλακτος εντός των λιποσφαιρίων. Η παστερίωση αδρανοποιεί τις φυσικές λιπάσες, ενώ αντίθετα οι περισσότερες μικροβιακές αντέχουν, δε χρειάζονται ενεργοποίηση για να δράσουν και μεταφέρονται κατά την τυροκόμηση στο τυρί, όπου συνεχίζεται η δράση τους κατά την ωρίμασή του. Η λιπάση του γάλακτος είναι **λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL; EC 3.1.1.34)**, η οποία συντίθεται στα κύτταρα των εκκριτικών αδένων των θηλαστικών και στη συνέχεια μεταφέρεται στο γάλα στους αδένες των θηλαστικών. Η LPL είναι γλυκοπρωτεΐνη (~8.3 g / 100 g υδατάνθρακα), η οποία αποτελείται από 450 ομάδες αμινοξέων, με μοριακό βάρος ~100 kDa. Οι βέλτιστες συνθήκες δραστηριότητας εμφανίζονται σε pH 9.2 και θερμοκρασία 37°C (Olivecrona et al., 2003; Shakeel-Ur-Rehman & Farkye, 2003a). Στο αγελαδινό γάλα, το μεγαλύτερο μέρος της LPL είναι συνδεδεμένο στα μικκύλια καζεΐνης, ένα ποσοστό υπάρχει στον ορό και ένα πολύ μικρό ποσοστό είναι συνδεδεμένο με τα MFGM.

Οι **πρωτεάσες** συμβάλλουν στην υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών. Η πιο σημαντική πρωτεάση του γάλακτος είναι η πλασμίνη. Στην ίδια κατηγορία ανήκουν και τα ένζυμα καθεψίνη D (cathepsin D) και κυστεϊνικές πρωτεάσες, η προέλευση των οποίων είναι τα σωματικά κύτταρα του γάλακτος (Hayes et al., 2001; Somers et al., 2003).

Η **πλασμίνη (EC 3.4.21.7)** είναι η επικρατέστερη ενδογενής πρωτεϊνάση του γάλακτος η οποία υπάρχει σ' αυτό κατά κύριο λόγο στην ανενεργή μορφή του πλασμινογόνου. Το τελευταίο μετατρέπεται σε πλασμίνη από ουσίες-ενεργοποιητές του πλασμινογόνου που αφθονούν στα

σωματικά κύτταρα. Για το λόγο αυτό, στο γάλα που λαμβάνεται από ζώα με υποκλινική μαστίτιδα εκδηλώνεται μεγαλύτερη πρωτεολυτική δράση, με συνέπειες τόσο στην απόδοση όσο και στην ποιότητα των τυριών. Η πλασμίνη υδρολύει όλα τα καζεϊνικά κλάσματα, κυρίως όμως τις β- και α₂-καζεΐνες. Ασκεί εξειδικευμένη δράση σε πεπτιδικούς δεσμούς που συμμετέχει κατά κύριο λόγο η λυσίνη και σε μικρότερο βαθμό η αργινίνη. Επιδεικνύει μέγιστη δράση σε pH 7.5 και θερμοκρασία 3°C. Προϊόντα υδρόλυσης της β-καζεΐνης του αγελαδινού από την πλασμίνη αποτελούν οι γ₁-, γ₂- και γ₃- καζεΐνες, καθώς και τα κλάσματα των πρωτεοζών-πεπτονών 5, 8 βραδύ και 8 ταχύ.

Το σύστημα της πλασμίνης-πλασμινογόνο συναντάται πάντοτε στο γάλα. Αποτελείται από το ενεργό ένζυμο (πλασμίνη), το ανενεργό προ ένζυμο (πλασμινογόνο), τους ενεργοποιητές και τους παρεμποδιστές του ενζύμου και του προενζύμου (Politis et al., 1989; Politis et al., 1992). Η πλασμίνη, το πλασμινογόνο και οι ενεργοποιητές του πλασμινογόνου βρίσκονται στα μικκύλια της καζεΐνης από τα οποία αποδεσμεύονται σε pH μικρότερο του 4.6 και μεταφέρονται στον ορό, ενώ οι παρεμποδιστές βρίσκονται πάντα στον ορό του γάλακτος. Η παστερίωση αυξάνει την ενεργότητα της πλασμίνης πιθανόν, γιατί καταστρέφει τους παρεμποδιστές των ενεργοποιητών του πλασμινογόνου.

Κατά την τυροκόμηση η πλασμίνη μεταφέρεται στο τυρί και συμβάλλει στην ωρίμανσή του. Η δράση της πλασμίνης κατά την παραγωγή του τυροπήγματος επηρεάζει αρνητικά την όλη διαδικασία (αυξημένος χρόνος πήξης, αυξημένη υγρασία του τυροπήγματος), ενώ αντίθετα μετά την παρασκευή του τυριού συνεισφέρει στην πρωτογενή πρωτεόλυση (μετατροπή καζεϊνών σε πολυπεπτίδια). Η δράση της μπορεί να εκτιμηθεί από την παραγωγή γ-καζεϊνών κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης.

Η **καθεψίνη D (E.C. 3.4.23.5)** είναι όξινη πρωτεάση με άριστο pH δράσης 4.0. Είναι ένζυμο που καταστρέφεται πλήρως με τη θέρμανση του γάλακτος στους 70°C/10 min. Αν και τα δεδομένα για το ένζυμο αυτό είναι περιορισμένα, φαίνεται ότι δείχνει εξειδίκευση ανάλογη με τη χυμοσίνη και ότι η πηκτική της δύναμη είναι πολύ μικρή.

Στο γάλα υπάρχουν επιπλέον ενδογενή ένζυμα που αποτελούν δείκτη της υγιεινής κατάστασης του μαστού του ζώου καθώς ενώ μερικά ένζυμα παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον κατά την επεξεργασία γαλακτοκομικών προϊόντων. Μερικά από αυτά είναι η **L-γαλακτική-αφυδρογονάση (LDH; EC.1.1.1.27)**, η **καταλάση (EC. 1.11.1.6)**, η **οξειδάση της ξανθίνης (EC.1.1.3.22)**, η **υπεροξειδική δισμουτάση (EC. 1.15.1.1)** και η **γ-γλουταμυλική τρανσφεράση (EC. 2.3.2.2.)**

Επιπλέον στο γάλα περιέχονται **βιταμίνες, ορμόνες** οι οποίες είναι οι φυσιολογικές ορμόνες του γαλακτοπαραγωγού ζώου, **αλδεΐδες, κετόνες και αλειφατικά οξέα, μη πρωτεϊνικής φύσεως αζωτούχες ουσίες, θειούχες ενώσεις και αέρια.**

2.2.2. Η Πυτιά Τυροκόμησης ως Παράγοντας Πήξης του Γάλακτος

Η χαρακτηριστική φάση στην τεχνολογία παραγωγής όλων των τυριών είναι ο σχηματισμός του πήγματος της καζεΐνης και η παγίδευση του λίπους μέσα στο πήγμα. Η πήξη του γάλακτος μπορεί να προκληθεί με την επίδραση αλκοόλης, οξέος, αλάτων και ενζύμων. Ωστόσο στην κλασική τυροκομία, χρησιμοποιούνται για την πήξη του γάλακτος κατά κύριο λόγο, τόσο επιλεγμένα ένζυμα, δηλαδή παρασκευάσματα από όξινες πρωτεΐνάσες, όσο και η οξίνιση στο ισοηλεκτρικό σημείο των καζεϊνών (pH 4.6) ή οξίνιση σε pH 5.2 σε συνδυασμό με θέρμανση.

Το πιο κοινό ένζυμο που χρησιμοποιείται στη σύγχρονη τυροκομία είναι ζωικής προέλευσης και ονομάζεται χυμοσίνη στην καθαρή του μορφή και παραλαμβάνεται ως εκχύλισμα από το τέταρτο στομάχι των μικρών μη απογαλακτισμένων μηρυκαστικών, το ήνυστρο. Το συγκεκριμένο εκχύλισμα περιέχει επίσης σε μικρές ποσότητες πεψίνη, τρυψίνη και πεπτιδάσες και από αυτό παρασκευάζεται κρυσταλλική χυμοσίνη με πολλαπλάσια ενζυμική δραστηριότητα.

Ο πρώτος που παρασκεύασε τυποποιημένη και σταθερή τυτιά ήταν ο Christian Ditlev Ammentorp Hansen στη Δανία το 1874 και στη συνέχεια διαδόθηκε ραγδαία και στις υπόλοιπες ευρωπαϊκές χώρες. Για την παραγωγή τυτιάς χρησιμοποιούνται ήνυστρα μοσχαριών που θηλάζουν και κυρίως δεκαπέντε-είκοσι ημερών, διότι σε ηλικία μεγαλύτερη των δεκαπέντε ημερών και κυρίως μετά τον απογαλακτισμό του νεογνού αρχίζει να εμφανίζεται η πεψίνη και μειώνεται σταδιακά η χυμοσίνη έως ότου εξαφανισθεί. Η πεψίνη μπορεί να προκαλέσει προβλήματα στο τυρί καθώς επηρεάζει την εξέλιξη της πρωτεόλυσης (Ανυφαντάκης, 2004).

Η χυμοσίνη είναι ενδοπεπτιδάση με ισοηλεκτρικό σημείο 4.6-4.7 και είναι διαλυτή σε υδατικό περιβάλλον. Στο ήνυστρο των νεαρών μηρυκαστικών συντίθεται μία πρόδρομη ένωση που ονομάζεται προχυμοσίνη. Σε όξινο περιβάλλον διαχωρίζεται ένα πεπτίδιο μοριακού βάρους 5300 g/mol, απελευθερώνοντας τη χυμοσίνη. Αυτή η διάσπαση είναι ως ένα βαθμό αυτοκαταλυόμενη. Όσο το νεογνό μεγαλώνει το ήνυστρο παράγει, όπως προαναφέρθηκε, όλο και περισσότερη πεψίνη, σε αντίθεση με τη χυμοσίνη που η παραγωγή της μειώνεται έως ότου σταματήσει. Οι τυτιές του εμπορίου, περιέχουν πάντοτε εκτός από χυμοσίνη και ορισμένη ποσότητα πεψίνης. Ακόμη, η χυμοσίνη υδρολύει τα μόρια των πρωτεϊνών του γάλακτος σε πεπτίδια διαφορετικού μεγέθους τα οποία προσδίδουν τα διάφορα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά στο εκάστοτε τυρί (ιδιαίτερη γεύση και άρωμα). Η ενεργότητα της χυμοσίνης μειώνεται με την αύξηση του pH, όμως στο τυρί το βέλτιστο pH δράσης της χυμοσίνης είναι μεγαλύτερο από ότι θα ήταν όταν το ένζυμο βρισκόταν σε υδατικό περιβάλλον. Επίσης, σημαντικό ρόλο στην ενεργότητα του ενζύμου παίζει η θερμοκρασία, αφού σε θερμοκρασία πάνω από τους 40°C η δραστηριότητα της χυμοσίνης στο γάλα μειώνεται και πάνω από τους 55°C αδρανοποιείται. Επιπλέον, τα άλατα σταθεροποιούν τη χυμοσίνη, γι' αυτό και οι τυτιές του εμπορίου περιλαμβάνουν μεγάλη αναλογία αλάτων. Κατά τη δημιουργία του πήγματος του τυριού απομακρύνεται νερό και το λίπος και η καζεΐνη συμπυκνώνονται από 6 ως 12 φορές, ανάλογα με το είδος του. Η δημιουργία του πήγματος ξεκινά με τη διάσπαση της κ-καζεΐνης από τα πρωτεολυτικά ένζυμα της τυτιάς, κυρίως τη χυμοσίνη ή την πεψίνη ή άλλες μικροβιακής φύσεως πρωτεϊνάσες. Εκτός από την κ-καζεΐνη που παίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία του πήγματος, η καθεμία από τις υπόλοιπες καζεΐνες διασπώνται σε διαφορετικούς χρόνους, σύμφωνα με τη σειρά α_{s1} - β - α_{s2} . Το αλάτι παρεμποδίζει την πρωτεολυτική δράση του ενζύμου, ιδίως στη β-καζεΐνη (Walstra & Jenness, 1984). Βιομηχανική παραγωγή της τυτιάς πραγματοποιείται και με την παραγωγή της χυμοσίνης από γενετικά τροποποιημένους μικροοργανισμούς. Το γονίδιο που φυσιολογικά παράγει τη χυμοσίνη (ή προχυμοσίνη) στα βοοειδή έχει κλωνοποιηθεί σε επιλεγμένους μικροοργανισμούς, όπως παραδείγματος χάρη *Kluyveromyces lactis*, *Escherichia coli* και *Aspergillus niger* (Fox & Stepaniak, 1993).

Η πεψίνη που χρησιμοποιείται στην τυροκόμηση προέρχεται κυρίως από μοσχάρι και χρησιμοποιείται σε μικρή ποσότητα σε μίγμα με χυμοσίνη σε εμπορικά διαθέσιμες τυτιές. Υπάρχει στα επιθηλιακά κύτταρα τόσο των μη απογαλακτισμένων μοσχαριών όσο και των ενήλικων βοοειδών σε μορφή προενζύμου, του πεψινογόνου, από το οποίο και λαμβάνεται με οξίνιση, όπως και στην περίπτωση της χυμοσίνης.

Η πρωτεολυτική δράση των δύο ενζύμων επί των καζεϊνικών κλασμάτων κατά την ωρίμανση των τυριών μπορεί να διαφέρει ως προς τα τελικά προϊόντα, καθώς με τη δράση της πεψίνης παράγεται μεγαλύτερος αριθμός πεπτιδίων χαμηλότερου μοριακού βάρους (Ανυφαντάκης, 2004). Τα παρασκευάσματα χυμοσίνης-πεψίνης σε αναλογία 50%-50% φαίνεται να είναι αρκετά αποδεκτά, παρά τα ορισμένα μειονεκτήματα που έχουν παρατηρηθεί, όπως ο σχηματισμός μαλακού τυροπήγματος που στη συνέχεια σκληραίνει, η μεγαλύτερη απώλεια λίπους στο τυρόγαλα ιδίως την άνοιξη με αποτέλεσμα τη μικρότερη απόδοση και τη μειωμένη ένταση στη γεύση κατά την ωρίμανση των τυριών (Ζερφυρίδης, 2001).

Η ικανότητα της πυτιάς να προκαλεί πήξη του γάλακτος εκφράζεται ως πηκτική δύναμη με τον διεθνή όρο milk clotting activity (MCA). Ο παλαιότερος ορισμός του MCA δόθηκε από τον Soxhlet (1877) βάσει του οποίου, MCA ορίζεται ο όγκος του νωπού γάλακτος που μπορεί να πήξει με μία μονάδα όγκου πυτιάς σε 40 min στους 35°C. Σήμερα, η συνολική MCA πυτιάς από μικρά μηρυκαστικά μετράται βάσει της Δοκιμής της Σχετικής Δραστηκότητας Πήξης του γάλακτος (μέθοδος REMCAT) του IDF (IDF, 2006) σε τυποποιημένο γάλα και εκφράζεται σε IMCU (International Milk Clotting Units – μονάδες πήξης γάλακτος) ανά g ή mL πάστας πυτιάς ή υγρής πυτιάς, αντίστοιχα (Μοσχοπούλου, 2011).

2.2.3. Οξυγαλακτικές Καλλιέργειες Εκκίνησης

Από τα βακτήρια, τα οξυγαλακτικά είναι αυτά που συνήθως χρησιμοποιούνται στην τυροκομία. Αναφέρονται συχνά και με τον όρο εκκίνητες ή καλλιέργειες εκκίνησης-starters καθώς με αυτά ξεκινά η ζύμωση της λακτόζης προς γαλακτικό οξύ που είναι απαραίτητη κατά την παραγωγική διαδικασία των τυριών. Συνηθέστερα, είναι ομοζυμωτικά, δηλαδή κατά τη ζύμωση της λακτόζης παράγουν σχεδόν αποκλειστικά γαλακτικό οξύ και δεν παράγουν αέρια σε αντίθεση με τα ετεροζυμωτικά. Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος διεθνώς χαρακτηρίζονται με τα αρχικά LAB (Lactic Acid Bacteria). Αποτελούν ετερογενή ομάδα μικροοργανισμών από άποψη μορφολογίας και φυσιολογίας και έχουν διπλό ρόλο στην παραγωγή του τυριού· την παραγωγή γαλακτικού οξέος κατά την παρασκευή του τυριού μέσω μεταβολισμού της υπάρχουσας λακτόζης και τη συμβολή στην ανάπτυξη αρώματος κατά την ωρίμανση μέσω της δράσης ενζύμων που διαθέτουν στην κυτταρική τους μεμβράνη και στο ενδοκυτταρικό τους περιβάλλον (Fox & Wallace, 1997). Τα πλέον χρησιμοποιούμενα βακτήρια εκκίνησης ανήκουν στα γένη *Lactococcus* (L), *Streptococcus* (S), *Lactobacillus* (Lb), *Leuconostoc* (Ln) και *Enterococcus* (E) (Beresford et al., 2001).

Βασικά κριτήρια επιλογής των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι :

Η έλλειψη παθογένειας ή τοξικότητας για τον άνθρωπο.

Η ικανότητα ταχείας παραγωγής γαλακτικού οξέος.

Η ικανότητα επικράτησης έναντι ανταγωνιστικής μικροχλωρίδας.

Η ευκολία πολλαπλασιασμού τους.

Η σταθερότητα των επιθυμητών ιδιοτήτων τους κατά τη διάρκεια του πολλαπλασιασμού και της συντήρησής τους.

Οι κυριότεροι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται στην τυροκομία καταγράφονται παρακάτω:

Γένος *Lactococcus*: Είναι μεσόφιλοι ομοζυμωτικοί μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή οξύτητας. Όταν αναπτύσσονται στο γάλα ζυμώνουν τη λακτόζη προς παραγωγή γαλακτικού οξέος ~95%. Στο γένος αυτό ανήκουν 5 είδη από τα οποία το *Lactococcus lactis* χρησιμοποιείται ευρύτατα από τις γαλακτοβιομηχανίες. Υπάρχουν δύο υποείδη του τα *L. lactis subsp. lactis* και *L. lactis subsp. cremoris*, από τα οποία το πρώτο είναι πιο ανθεκτικό σε σχετικά υψηλές θερμοκρασίες και στο αλάτι γι' αυτό και χρησιμοποιείται περισσότερο. Μία παραλλαγή του, *L. lactis biovar diacetylactis* ζυμώνει το κιτρικό οξύ προς διακετύλιο, διοξειδίο του άνθρακα και άλλα προϊόντα ιδιαίτερα σημαντικά για τη γεύση των φρέσκων τυριών. Μεταξύ των στελεχών του *L. lactis* υπάρχουν μερικά που παράγουν εξω-πολυσακχαρίτες και χρησιμοποιούνται στην παραγωγή γαλακτοκομικών, όταν επιδιώκεται αύξηση του ιξώδους. Οι (γα)λακτόκοκκοι είναι μικροοργανισμοί οι οποίοι μπορούν να χρησιμοποιήσουν τις πρωτεΐνες του γάλακτος για την ανάπτυξή τους.

Γένος *Streptococcus*: Από το γένος *Streptococcus* ενδιαφέρον για τις γαλακτοβιομηχανίες παρουσιάζει μόνο ο *S. salivarius subsp. thermophilus*. Είναι μικροοργανισμός με πρωτεολυτική ικανότητα και ανθεκτικός στη θέρμανση (Ανυφαντάκης, 2004). Ο στρεπτόκοκκος αυτός επώαζεται σε θερμοκρασία 45°C. Έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται και να παράγει οξύ και στους 50°C με ταυτόχρονη παραγωγή αρώματος. Επιβιώνει κατά την παστερίωση και σε ευνοϊκές συνθήκες αναπτύσσεται και δρα πολύ καλά, αλλά γενικά είναι μάλλον ευαίσθητος μικροοργανισμός. Δεν αναπτύσσεται καλά ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις άλατος (2%) και αντιβιοτικών (0.01 U/mL). Οι ιδιότητές του αυτές τον καθιστούν απαραίτητο για τα τυριά που αναθερμαίνονται σε υψηλές θερμοκρασίες αλλά πρέπει να χρησιμοποιείται παράλληλα με άλλες καλλιέργειες. Χρησιμοποιείται πολύ για τα τυριά ελβετικού τύπου, Cheddar και άλλα σκληρά τυριά. Μαζί με τον *L. bulgaricus* αποτελούν τα βακτήρια της γιαούρτης, η οποία παραδοσιακά χρησιμοποιείται ως καλλιέργεια σε διάφορα τυριά μεταξύ των οποίων και η Φέτα (Ζερφυρίδης, 2001).

Γένος *Lactobacillus*: Στο γένος *Lactobacillus* κατατάσσονται διάφορα οξυγαλακτικά βακτήρια τα οποία παρουσιάζουν μεταξύ τους γενετικές διαφορές, καθώς και διαφορές στη φυσιολογία τους. Είναι οι πλέον οξυάντοχοι από τα οξυγαλακτικά βακτήρια και μπορούν να μειώσουν το pH του γάλακτος κάτω από 4.0 (Ανυφαντάκης, 2004). Οι (γα)λακτοβάκιλοι συναντώνται σε όλα τα τυριά. Ο πληθυσμός τους είναι ιδιαίτερα αυξημένος στα προχωρημένα στάδια ωρίμανσης όταν οι στρεπτόκοκκοι δείχνουν στασιμότητα ή μείωση. Οι συνθήκες αυξημένης οξύτητας που δημιουργούνται στα τυριά ανακόπτουν την αύξηση των στρεπτόκοκκων ενώ ευνοούν την ανάπτυξη των (γα)λακτοβακίλλων. Η ανάπτυξή τους ενισχύεται όταν δημιουργηθεί όξινο περιβάλλον. Γι' αυτό στις καλλιέργειες των τυριών χρησιμοποιούνται οπωσδήποτε (γα)λακτόκοκκοι και στρεπτόκοκκοι (συνήθως ο *S. salivarius subsp. thermophilus*), οι οποίοι ανεβάζουν την οξύτητα σε 0.6-0.8% γαλακτικό οξύ. Στο σημείο αυτό περιορίζεται η δική τους δράση και συνεχίζουν οι (γα)λακτοβάκιλοι μέχρι 1.2% γαλακτικό οξύ ή και περισσότερο, ως δεύτερη καλλιέργεια και ποτέ μόνη της (Ζερφυρίδης, 2001). Ανάλογα με τα τελικά προϊόντα της ζύμωσης που προκαλούν οι λακτοβάκιλοι διακρίνονται σε τρεις ομάδες:

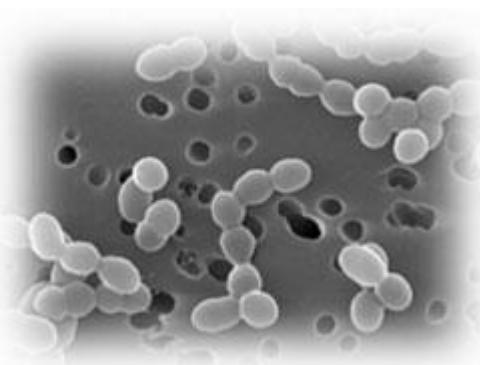
- Τους ομοζυμωτικούς. Στην ομάδα αυτή ανήκουν οι *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lb. delbrueckii subsp. lactis*, *Lb. helveticus* και *Lb. acidophilus* οι οποίοι ζυμώνουν αποκλειστικά εξόξες προς γαλακτικό οξύ σύμφωνα με τον κύκλο Embden-Meyerhof, ενώ δε ζυμώνουν πεντόζες. Είναι μικροοργανισμοί θερμοάντοχοι και αναπτύσσονται σε υψηλότερες θερμοκρασίες (>45°C) από ότι οι άλλοι γαλακτοβάκιλοι.

- Τους προαιρετικά ετεροζυμωτικούς. Οι μικροοργανισμοί της ομάδας αυτής ζυμώνουν εξόξες είτε προς γαλακτικό οξύ, είτε προς γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ, αιθανόλη και μυρμηκικό (φορμικό) οξύ, όταν υπάρχει ανεπάρκεια γλυκόζης. Ζυμώνουν επίσης πεντόζες προς γαλακτικό οξύ και οξικό οξύ. Στην ομάδα αυτή ανήκει ο *Lb. casei* ο οποίος δε χρησιμοποιείται συχνά ως οξυγαλακτική καλλιέργεια, αναπτύσσεται όμως κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των τυριών και συμβάλλει στη διαμόρφωση των οργανοληπτικών τους χαρακτηριστικών.

- Τους υποχρεωτικά ετεροζυμωτικούς. Ζυμώνουν τις εξόξες και πεντόζες σε γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ ή αιθανόλη και σε διοξείδιο του άνθρακα. Οι μικροοργανισμοί αυτοί προκαλούν ανεπιθύμητη οσμή και γεύση και το σχηματισμό αερίων κατά την ωρίμανση των τυριών (Ανυφαντάκης, 2004).

Από τους (γα)λακτοβάκιλλους σπουδαιότεροι είναι ο *L. helveticus* που χρησιμοποιείται στα τυριά ελβετικού τύπου που αναθερμαίνονται στους 50-53°C, ο *L. bulgaricus* που δίνει μεγαλύτερη οξύτητα χρησιμοποιείται σε πολλά σκληρά τυριά και τα λευκά τυριά άλμης όπως η Φέτα και ο *L. casei* που χρησιμοποιείται πιο σπάνια διότι δίνει πολύ μεγάλη οξύτητα (Ζερφυρίδης, 2001).

Γένος *Leuconostoc* ή *Betacocci*:



Εικόνα 2.1. *Leuconostoc mesenteroides*

Πρόκειται για μια κατηγορία κόκκων με κυριότερους αντιπροσώπους τους *L. citrovorum* και *L. paracitrovorum* που ζυμώνουν τα κίτρινα προς διακετύλιο. Δηλαδή παράγουν άρωμα στο τυρί αλλά αναπτύσσονται αργά και γι' αυτό πρέπει να χρησιμοποιηθούν παράλληλα με άλλη οξυγαλακτική καλλιέργεια. Οι μικροοργανισμοί αυτοί αντέχουν στην οξύτητα και επιβιώνουν στο τυρί καλύτερα από άλλους στρεπτόκοκκους γι' αυτό επιφέρουν το αποτέλεσμά τους με μειωμένο ρυθμό. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται γνωστά στελέχη, διότι στην κατηγορία αυτή υπάρχουν και είδη ισχυρά ετεροζυμωτικά που αναπτύσσονται σε μικρό χρόνο σε

βαθμό που να δημιουργούν ελαττώματα στα πρώτα στάδια παρασκευής των τυριών.

Αποστολή των οξυγαλακτικών βακτηρίων κατά την τυροκόμηση είναι η οξίνιση του πήγματος στον επιθυμητό κατά περίπτωση βαθμό και ρυθμό, εξαιτίας της ζύμωσης της λακτόζης προς γαλακτικό οξύ, η ποσότητα του οποίου εξαρτάται από το στέλεχος ή τα στελέχη των μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται και τους παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξή τους.

Η ζύμωση της λακτόζης προς γαλακτικό οξύ από τις καλλιέργειες εκκίνησης προκαλεί μείωση του pH, παρεμποδίζει την ανάπτυξη των μη επιθυμητών βακτηρίων, ενώ παράλληλα επηρεάζει τη γεύση και το άρωμα των φρέσκων τυριών.

Στην περίπτωση των τυριών η παραγωγή γαλακτικού οξέος επιτελεί τις εξής λειτουργίες:

- Επιταχύνει τη συναίρεση του τυροπήγματος, με αποτέλεσμα την αποβολή μεγαλύτερης ποσότητας τυρογάλακτος από τη μάζα του - ταχύτερη στράγγιση.
- Αυξάνει τη συνεκτικότητα του τυροπήγματος, η οποία επηρεάζει την απόδοση σε τυρί.
- Επιταχύνει τη δράση της πτυιάς κατά την πήξη του γάλακτος.
- Επηρεάζει τη δραστηριότητα και το βαθμό κατακράτησής της στο τυρί.
- Παρεμποδίζει την ανάπτυξη πολλών βακτηρίων, ιδιαίτερα των παθογόνων και των μικροοργανισμών που προκαλούν αλλοιώσεις.
- Επηρεάζει την κατάσταση του κολλοειδούς φωσφορικού ασβεστίου και τις ρεολογικές ιδιότητες των τυριών.
- Επηρεάζει τη γεύση των τυριών.

Η αναλογία στην οποία προστίθενται στο γάλα της τυροκόμησης οι καλλιέργειες εκκίνησης, η θερμοκρασία, η παρουσία αντιβιοτικών και άλλων ανασταλτικών ουσιών καθώς και η προσβολή τους από βακτηριοφάγους, αποτελούν τους πιο σημαντικούς παράγοντες που επηρεάζουν το ρυθμό οξίνισης κατά περίπτωση (Ανυφαντάκης, 2004).

Συμπληρωματικά με τις οξυγαλακτικές καλλιέργειες στα τυριά Ελβετικού τύπου χρησιμοποιούνται και καλλιέργειες βακτηρίων του προπιονικού οξέος: με σκοπό κυρίως τη δημιουργία χαρακτηριστικών οπών στην τυρομάζα και δευτερευόντως την ανάπτυξη 'γλυκίζουσας' γεύσης. Η ιδιαίτερη γεύση μπορεί να αποδοθεί κατά κύριο λόγο στην αυξημένη συγκέντρωση προλίνης και προπιονικού οξέος και οι οπές στη δημιουργία διοξειδίου του άνθρακα από τη ζύμωση του γαλακτικού οξέος. Το κύριο βακτήριο της καλλιέργειας είναι το *Propionibacterium shermanii*, το οποίο παράγει πολύ προπιονικό οξύ στο τυρί. Χρησιμοποιείται σε πολύ μικρές ποσότητες στο γάλα και αναπτύσσεται στο τυρί μετά από δύο περίπου εβδομάδες.

Στον Πίνακα 2.5. παρατίθενται μερικά από τα χαρακτηριστικά των σπουδαιότερων μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται ως οξυγαλακτικές καλλιέργειες εκκίνησης στη βιομηχανία παραγωγής τυριού.

Πίνακας 2.5. Χαρακτηριστικά οξυγαλακτικών βακτηρίων που χρησιμοποιούνται ως καλλιέργειες εκκίνησης

Μικροοργανισμός	Ιδανική Τ (°C)	pH (Μετά την επώαση)	Παραγωγή αρώματος / οξέος	Παραγωγή γαλακτικού οξέος στο γάλα
<i>Str. thermophilus</i>	35-40	4.6	- / -	<i>Str. salivarious</i> subsp. <i>thermophilus</i> : 0.6%
<i>Lb. bulgaricus</i>	40-45	3.8	- / +	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> : 1.8%
<i>Lc. cremoris</i>	20-25	4.8	- / -	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> : 0.8% <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> : 0.2%
<i>Lc. lactis</i>	40	4.5	- / +	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>I lactis</i> : 1.8% <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> : 0.8%
<i>Lb. helveticus</i>	40-45	4.4	- / +	<i>Lb. helveticus</i> : 2.0%
<i>Str. diacetylactis</i>	25-30	4.6	+ / -	-
<i>Leuconostoc citrovorum</i>	20-25	5.2	+ / -	-

(Πηγή: Συνδυασμός δεδομένων Fox, 1996; Ζερφυρίδης, 2001)

2.2.4. Το Αλάτι στην Παρασκευή Τυριού

Το αλάτι που χρησιμοποιείται στην τυροκομία πρέπει να είναι απαλλαγμένο από πιθανώς επικίνδυνα ξένα σώματα. Σε διάλυμα μέχρι 10% πρέπει να είναι άχρωμο και να έχει υγρασία κάτω από 4.0% (ξηρό αλάτι < 0.2%). Σύμφωνα με τον Κ.Τ.Π. δεν πρέπει να περιέχει αρσενικό και μόλυβδο σε ποσότητες μεγαλύτερες από 3 και 10 ppm αντίστοιχα, όπως άλλωστε και οι υπόλοιπες συντηρητικές ουσίες των τροφίμων. Ως προς τα υπολείμματα άλλων στοιχείων ισχύουν οι προδιαγραφές του FAO σύμφωνα με τις οποίες ο σίδηρος δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 10 ppm διότι προκαλεί κόκκινα στίγματα στο τυρί και ο χαλκός τα 2 ppm, καθώς επιδρά στη μικροχλωρίδα, τις ενζυμικές δράσεις και τα οξειδωτικά φαινόμενα στο τυρί (Ζερφυρίδης, 2001).

Σημαντικό ρόλο στην τυροκομία παίζει και η κοκκομετρία του αλατιού. Για παράδειγμα σε περίπτωση ξηρού αλατίσματος με πολύ λεπτόκοκκο αλάτι, δημιουργείται σκληρή εξωτερική επιφάνεια που εμποδίζει την ομοιόμορφη απορρόφηση από το εσωτερικό του τυριού. Ανεπιθύμητα αποτελέσματα έχουμε και σε περίπτωση που το αλάτι είναι χονδρόκοκκο από το κατάλληλο μέγεθος, διότι καθυστερεί η απορρόφησή του από το εσωτερικό του τυριού.

Ανάλογα με το είδος του τυριού μεταβάλλεται τόσο η ποσότητα του αλατιού, όσο και ο τρόπος αλατίσματος. Οι βασικότεροι τρόποι αλατίσματος, λοιπόν, είναι η άμεση ανάμιξη του αλατιού με το τυρόπηγμα, το ξηρό αλάτισμα ή αλλιώς επιφανειακό, και τέλος το αλάτισμα σε άλμη. Στην πρώτη μέθοδο, το αλάτι προστίθεται κατευθείαν στο τυρόπηγμα προτού αυτό τοποθετηθεί στα καλούπια. Χαρακτηριστικό παράδειγμα το τυρί Cheddar. Υπάρχουν ακόμη περιπτώσεις, όπως το τυρί Domiatī που παράγεται στην Αίγυπτο, όπου το αλάτι προστίθεται ακόμη και στο γάλα. Στη δεύτερη μέθοδο, χονδρόκοκκο αλάτι εισάγεται αρχικά στην πάνω επιφάνεια του τυριού και στη συνέχεια διασκορπίζεται το λιωμένο αλάτι και στις πλάγιες επιφάνειες. Συνήθως το ξηρό αλάτισμα προηγείται ή έπεται της μεθόδου αλατίσματος σε άλμη. Η τελευταία από τις μεθόδους θεωρείται από πολλούς πως αποτελεί τον καταλληλότερο τρόπο αλατίσματος των τυριών, αν και αυτό εξαρτάται κυρίως από

το είδος του τυριού. Πρέπει, ωστόσο, να σημειωθεί ότι η πυκνότητα της άλμης ανάλογα και με το είδος του τυριού κυμαίνεται από 18-22% (Ζερφυρίδης, 2001).

Ως φυσικό συντηρητικό του τυριού, εκτός από την οξύτητα που είναι αδιαμφισβήτητα ο βασικότερος παράγοντας, θα μπορούσε να θεωρηθεί και το αλάτι. Η προσθήκη του στο τυρί, επηρεάζει με πολλούς τρόπους την ωρίμανσή του, επιδρώντας στη μικροχλωρίδα του τυριού και σε πολλές ενζυμικές δράσεις. Όσον αφορά στη μικροχλωρίδα, το αλάτι αναστέλλει τη δράση ανεπιθύμητων ενώ επιβραδύνει την ανάπτυξη επιθυμητών μικροοργανισμών και ευνοεί άλλους για την ανάπτυξή τους. Με τον τρόπο αυτό εξισορροπεί τη δράση των μικροοργανισμών. Ακόμη συντελεί στις φυσικοχημικές του μεταβολές, όπως η διατήρηση του pH στα επιθυμητά επίπεδα για την πραγματοποίηση των κατάλληλων ζυμώσεων, ευνοεί την υδρόλυση της α_s -καζεΐνης ενώ δεν επηρεάζει την υδρόλυση της β -καζεΐνης, της οποίας τα προϊόντα μπορεί να προσδώσουν πικρή γεύση στο τυρί. Ακόμη βοηθά στη λύση και την απελευθέρωση του περιεχομένου των νεκρών βακτηριακών κυττάρων και ενεργοποιεί τα πρωτεολυτικά τους ένζυμα, ενισχύοντας την πρωτεόλυση η οποία είναι ένα από τα βασικότερα στάδια της ωρίμανσης. Τέλος, το αλάτι ρυθμίζει την υγρασία του τυριού, δημιουργώντας υψηλή οσμωτική πίεση η οποία μπορεί να αφαιρέσει νερό από το εσωτερικό του τυριού, γεγονός που επιδρά εκτός από τα χαρακτηριστικά του τυριού και στην ανάπτυξη ανεπιθύμητων μικροβιακών δράσεων. Όλες οι προαναφερθείσες επιδράσεις του αλατιού, συνυπάρχουν με τη διαμόρφωση ευχάριστων οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του τυριού με την προϋπόθεση φυσικά ότι οι ποσότητες που εισάγονται είναι οι απαιτούμενες.

Καθώς η κατανάλωση τυριού αυξάνεται παγκοσμίως, η μείωση του αλατιού ως φορέας νατρίου, θα πρέπει να ληφθεί σοβαρά υπόψη. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η λήψη καλίου μέσω της διατροφής μπορεί να βοηθήσει προστατευτικά σε άτομα στα οποία το νάτριο προκαλεί υπέρταση, να μειώσει την απέκκριση ασβεστίου με τα ούρα και πιθανότατα να προστατεύει την σκελετική μάζα (Karagözü et al., 2008). Έρευνες έχουν γίνει για την αντικατάσταση του NaCl από KCl τόσο στην Κεφαλογραβιέρα, όσο και στη Φέτα (Katsiari et al., 1997; 2000; 2001). Αποδείχθηκε ότι τα δείγματα Φέτας στα οποία προστέθηκε μίγμα χλωριούχου νατρίου και χλωριούχου καλίου (~25%) δε διέφεραν σημαντικά από τα δείγματα αναφοράς στη σύνθεση, όπως η υγρασία, το pH, η ολική πρωτεΐνη και η αλατότητα. Ωστόσο από την οργανοληπτική πλευρά μεγαλύτερης αποδοχής έχαιραν οι Φέτες με μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε χλωριούχο νάτριο.

2.2.5. Δευτερεύουσες Πρώτες Ύλες Παρασκευής Τυριού

Για την παρασκευή του τυριού, μπορούν να χρησιμοποιηθούν, ανάλογα με την περίπτωση, ουσίες είτε για ενίσχυση της γεύσης, είτε για βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών είτε για βελτίωση του ίδιου του τρόπου παρασκευής στις περιπτώσεις που οι Εθνικές Νομοθεσίες για τα τυριά το επιτρέπουν. Κάποιες από αυτές τις ουσίες παρουσιάζονται παρακάτω:

Χλωριούχο ασβέστιο (CaCl₂)

Είναι γνωστό ότι σε περίπτωση απώλειας ιόντων ασβεστίου από το γάλα, ο σχηματισμός πήγματος δεν ευνοείται. Το ασβέστιο του γάλακτος, υπάρχει σε φυσιολογικές συνθήκες σε ποσοστό περίπου 0.125%. Από αυτό περίπου το 65% βρίσκεται σε κolloειδή μορφή ενώ το υπόλοιπο είναι διαλυτό και έχει ιδιαίτερη σημασία για την τυροκομία. Η μείωση του διαλυτού ασβεστίου του γάλακτος, μπορεί να προκληθεί με τη θέρμανσή του (θέρμανση > 80°C). Αν το γάλα θερμανθεί σε θερμοκρασία μεγαλύτερη των 80°C, μια ποσότητα διαλυτού ασβεστίου μετατρέπεται σε αδιάλυτη μορφή σε ποσοστό περίπου 5% του διαλυτού ασβεστίου. Η απώλεια του διαλυτού ασβεστίου μπορεί να είναι μικρή, όμως έχει επίδραση στο δημιουργούμενο από παστεριωμένο γάλα πήγμα, το οποίο είναι πιο

μαλακό σε σχέση με αυτό που προκύπτει από μη παστεριωμένο (Ζερφυρίδης, 2001). Το ασβέστιο έχει δομικό ρόλο στο σχηματισμό του πήγματος, άρα απώλειά του έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ελαττωματικού πήγματος. Μπορεί να προστεθεί στο γάλα της τυροκόμησης ως άνυδρο CaCl_2 σε ποσοστό 0.01-0.03% (Κεχαγιάς, 1997), καθώς μεγαλύτερες ποσότητες μπορεί να οδηγήσουν σε σκληρό πήγμα και αργότερα σε πικρή γεύση.

Υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2)

Σε ορισμένες χώρες, μεταξύ των οποίων και στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, επιτρέπεται και με βάση τη νομοθεσία, πριν από την πήξη του γάλακτος, επεξεργασία του με υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) με σκοπό την καταστροφή των μικροοργανισμών του προς τυροκόμηση γάλακτος. Φυσικά, τα παραπάνω ισχύουν στην περίπτωση που η βιομηχανία ή ο παραγωγός δεν επεξεργαστούν το γάλα με θερμικές μεθόδους. Πρέπει να τονιστεί, ωστόσο, ότι στην Ελλάδα δεν χρησιμοποιείται καθώς απαγορεύεται από τη νομοθεσία.

Χρωστικές

Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο, οι περιεκτικότητες των συστατικών του γάλακτος, κυμαίνονται κατά τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου. Την άνοιξη και το καλοκαίρι που στην τροφή των αγελάδων χρησιμοποιούνται πιο πολλές πράσινες τροφές, το γάλα περιέχει β-καροτένιο, του οποίου το χρώμα είναι έως πορτοκαλί και επειδή είναι λιποδιαλυτό κατά την τυροκόμηση του γάλακτος εισέρχεται στο τυρί προσδίδοντας σε αυτό υποκίτρινη χροιά. Το πρόβλημα αυτό είναι εντονότερο στο αγελαδινό γάλα αφού το χρώμα του πρόβειου γάλακτος είναι λευκό καθώς περιέχει περισσότερη βιταμίνη Α, ενώ η προβιταμίνη Α (β-καροτένιο) βρίσκεται σε ίχνη ανεξάρτητα αν τα ζώα λαμβάνουν χλωρά νομή ή όχι (Jandal, 1996). Έτσι, λόγω μεταβολών στην περιεκτικότητα σε καροτενοειδή, κυρίως στο αγελαδινό γάλα, η οποία προκαλεί ανομοιομορφίες στο χρώμα των τυριών, επιτρέπεται σε ορισμένες χώρες η χρήση διάφορων χρωστικών όπως το safran ή κρόκος, κουρκουμάς, καροτένιο, αννάτο και χλωροφύλλη. Από τις χρωστικές αυτές, άλλες χρησιμοποιούνται για να 'λευκάνουν' το γάλα, όπως είναι η χλωροφύλλη, ενώ άλλες για να προσδώσουν χρώμα όπως είναι το αννάτο.

Νιτρικά άλατα

Πριν από την πήξη του γάλακτος, μπορεί να χρησιμοποιηθούν και διάφορες ουσίες για την ενίσχυση της γεύσης, τη βελτίωση του χρώματος, την ανάπτυξη ενός ιδιαίτερου χαρακτηριστικού καθώς και για την εξασφάλιση της ποιότητας των τυριών από διάφορα ελαττώματα. Μια από αυτές τις ουσίες είναι το νιτρικό κάλιο ή νάτριο (NaNO_3 ή KNO_3) που παρεμποδίζει το σχηματισμό αερίων σε τυριά με χαμηλή οξύτητα, όπως το Edam και το Gouda, από βλάστηση σπορίων του γένους *Clostridium*, ενώ δεν επηρεάζουν τη δράση των οξυγαλακτικών, των προπιονικών και των βουτυρικών βακτηρίων. Στην Ελλάδα, ωστόσο, δεν επιτρέπεται η χρήση τους.

2.2.6. Απόδοση του Γάλακτος σε Τυρί

Στην ουσία, όταν αναφερόμαστε στην απόδοση, εννοούμε πόσα κιλά τυριού παράγονται από συγκεκριμένη ποσότητα γάλακτος. Η απόδοση του γάλακτος σε τυρί εξαρτάται κατά κύριο λόγο από την περιεκτικότητά του σε καζεΐνη και λίπος, το είδος του τυριού που παράγεται και τη σωστή εφαρμογή της τεχνολογίας παραγωγής και συντήρησης του τυριού. Έτσι, κάθε είδος γάλακτος (πρόβειο, αγελαδινό, γίδινο, βουβαλίσιο) θα έχει και διαφορετική απόδοση σε τυρί, λαμβάνοντας υπόψη τις διακυμάνσεις μεταξύ των παραπάνω συστατικών του σε κάθε είδος. Λαμβάνοντας σαν βάση σύγκρισης το αγελαδινό γάλα, γενικοί συντελεστές αναγωγής των άλλων ειδών γάλακτος σε γάλα αγελαδινό, από τυροκομική άποψη είναι αυτοί που απεικονίζονται στο Πίνακα 2.6.

Πίνακας 2.6. Συντελεστής αναγωγής διαφόρων ειδών γάλακτος σε αγελαδινό, ανάλογα με την απόδοσή τους σε τυρί

ΓΑΛΑ (ΙΔΙΑ ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΓΑΛΑΚΤΟΣ)	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΑΝΑΓΩΓΗΣ
ΑΓΕΛΑΔΙΝΟ	1.00
ΓΙΔΙΝΟ	1.25
ΒΟΥΒΑΛΙΣΙΟ	1.45
ΠΡΟΒΕΙΟ	1.85

(Πηγή: Ζερφυρίδης, 2001)

2.2.7. Αλλοιώσεις - Κίνδυνοι στα Τυριά

Κατά την παραγωγή, τόσο στο στάδιο της ωρίμανσης όσο και στα υπόλοιπα στάδια, οι συνθήκες καθαριότητας, η ποιότητα των πρώτων υλών και οι μέθοδοι επεξεργασίας που χρησιμοποιούνται, οι συνθήκες του περιβάλλοντα χώρου και πληθώρα άλλων παραμέτρων έχουν σημαντικό ρόλο στην ποιότητα του τελικού προϊόντος. Οι πιο συνηθισμένες αλλοιώσεις που προκαλούνται στα τυριά, είναι η διόγκωση ή κοινώς φούσκωμα, τα ρήγματα, η ευρωτίαση ή αλλιώς μούχλιασμα, η αλλοιωμένη οσμή και γεύση, καθώς και οι αλλοιωμένες χρώσεις. Όσον αφορά τη διόγκωση, αυτή μπορεί να οφείλεται στη δράση διάφορων μικροοργανισμών που παράγουν ανεπιθύμητα αέρια, όπως για παράδειγμα το διοξείδιο του άνθρακα, τα οποία διογκώνουν το τυρί. Τα ρήγματα, είναι αποτέλεσμα κακών χειρισμών κατά την παρασκευή και διατήρηση του τυριού και αποτελούν εστίες μόλυνσης από μικροοργανισμούς, συνεπώς περαιτέρω επιμόλυνση του προϊόντος. Η ευρωτίαση, οφείλεται σε μύκητες που αναπτύσσονται στην επιφάνεια ή στο εσωτερικό των τυριών όταν αυτά δε διατηρούνται κάτω από τις κατάλληλες συνθήκες. Αποτέλεσμα της δράσης των ευρωτομυκήτων, είναι η δημιουργία έγχρωμων κηλίδων ή η κάλυψη ολόκληρης της επιφάνειας του τυριού από ‘μούχλα’. Ακόμη, η ταγγή γεύση που είναι δυνατόν να εμφανίσει το τυρί, μπορεί να οφείλεται στην παρουσία βουτυρικού οξέος που προέρχεται από την υδρόλυση του λίπους από λιπολυτικά ένζυμα των μυκήτων. Τέλος, οι μη κανονικές χρώσεις, συνήθως είναι απόρροια δράσης ορισμένων μικροοργανισμών που επιμολύνουν το τυρί, σε κάποιο από τα στάδια παραγωγής του (Βουδούρη & Κοντομηνά, 2009; Harper & Hall, 1976).

Ένα ακόμη πρόβλημα, που εμφανίζεται σπάνια στα τυριά, είναι η ύπαρξη μυκοτοξινών και συγκεκριμένα αφλατοξίνης, που είναι προϊόντα ανάπτυξης τοξικών μυκήτων ακόμη και στο γάλα τυροκόμησης. Αυτές μπορεί να παραχθούν κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης των ζωοτροφών καθώς και στους αγρούς κατά τη διάρκεια καλλιέργειας των φυτών (Moss, 1989). Οι κύριοι παράγοντες που επιδρούν στην ανάπτυξη των μυκήτων στις ζωοτροφές είναι οι επικρατούσες συνθήκες, όπως η υγρασία, η θερμοκρασία, το pH, το φως, το διαθέσιμο οξυγόνο και βιολογικοί παράγοντες όπως η ευαισθησία του φυτού σε στέλεχος του αφλατοξινογόνου μύκητα. Ωστόσο, τον

σημαντικότερο παράγοντα αποτελεί η υγρασία, υψηλές τιμές της οποίας ευνοούν την ανάπτυξη των μυκήτων (Diekman & Green, 1992). Η παρουσία τους στα τυριά, μπορεί να οφείλεται σε τρεις πιθανές αιτίες:

1. Στην αφλατοξίνη M_1 (AFM_1) που μπορεί να βρίσκεται στο γάλα των ζώων που έχουν τραφεί με ζωοτροφές μολυσμένες με την αφλατοξίνη B_1 (η αφλατοξίνη M_1 αποτελεί υδροξυπαράγωγο της B_1).
2. Στην παραγωγή των αφλατοξινών B_1 , B_2 , G_1 , G_2 από του μύκητες *Aspergillus flavus* και *Aspergillus paracitius* που αναπτύχθηκαν στο τυρί.
3. Στη μεταφορά αφλατοξίνης M_1 στο τυρί από σκόνη γάλακτος που την περιέχει ήδη και χρησιμοποιείται, όταν το επιτρέπει η Νομοθεσία, για εμπλουτισμό του προς τυροκόμηση γάλακτος (Zerfiridis, 1985; van Egmond, 1991; Blanco et al., 1998; Kamkar et al., 2008).

Αν και για το γάλα έχουν θεσπιστεί συγκεκριμένα όρια για τις αφλατοξίνες από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Commission Regulation EC, 2006) και τις επιτροπές του Κώδικα τροφίμων (Codex Alimentarius Commission, 2001), για το τυρί τέτοια όρια δεν έχουν θεσπιστεί, καθώς ο καλύτερος τρόπος για το έλεγχο αφλατοξινών στο γάλα και στα προϊόντα του είναι ο περιορισμός της AFB_1 στις ζωοτροφές (Georgala et al., 2009).

Τα κριτήρια ασφάλειας και υγιεινής των τυριών από μικροβιολογικής σκοπιάς συνοψίζονται στον πίνακα 2.7.

Πίνακας 2.7. Μικροβιολογικά κριτήρια ασφάλειας στα τυριά

Μικροοργανισμός	Πλάνο δειγματοληψίας ¹		Όρια ²	
	Κριτήρια ασφαλείας			
	n	c	m	M
<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 cfu/g ³	
<i>Salmonella</i>	5	0	Απουσία σε 25 g ⁴	
Σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες	5	0	Απουσία σε 25 g ⁵	
Κριτήρια υγιεινής κατά την διάρκεια της διαδικασίας για τυριά από νωπό γάλα				
	n	c	m	M
Σταφυλόκοκκοι θετικοί στην πηκτάση	5	2	10 ⁴ cfu/g	10 ⁵ cfu/g

¹n= αριθμός μονάδων / δείγμα, c=αριθμός μονάδων με τιμές > m ή μεταξύ m και M (Πηγή: Σαμούρης, 2008)

²m= M για τυριά και άλλα προϊόντα, σε ότι αφορά τα κριτήρια ασφαλείας

³Το κριτήριο εφαρμόζεται αν ο παρασκευαστής μπορεί να αποδείξει ικανοποιώντας την αρμόδια αρχή ότι το προϊόν δε θα υπερβεί το όριο των 100 cfu/g σε όλη τη διάρκεια της διατήρησης.

⁴Το κριτήριο αυτό εφαρμόζεται πριν το προϊόν αποδεσμευτεί από τον άμεσο έλεγχο του υπεύθυνου της επιχείρησης τροφίμου που το παρήγαγε.

⁵Το κριτήριο αυτό εφαρμόζεται εάν βρεθούν τιμές σταφυλόκοκκων πηκτάση θετικών >10⁵ cfu/g.

* Το κριτήριο της *E. coli* δεν αναφέρεται στα τυριά από νωπό γάλα, ενώ στα τυριά από παστεριωμένο γάλα είναι για n=5 c=2, m=10² cfu/g και M=10³cfu/g.

2.3. ΤΟ ΣΤΑΔΙΟ ΤΗΣ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ ΤΟΥ ΤΥΡΙΟΥ

2.3.1. Εισαγωγή

“Ωρίμανση καλείται το σύνολο των μεταβολών, ποιοτικών και ποσοτικών, των χημικών, βιοχημικών, φυσικοχημικών και μηχανικών ιδιοτήτων των τυριών, που συμβάλλουν στη διαμόρφωση της δομής και των οργανοληπτικών τους χαρακτηριστικών.”

Τα τυριά αποτελούν το πιο πολύπλοκο τρόφιμο και ένα από τα πιο πολύπλοκα βιοσυστήματα που υπάρχουν στη φύση και επηρεάζεται από ποικιλία ενδογενών και εξωγενών παραγόντων.

Σε ορισμένα τυριά, το στάδιο της ωρίμανσης ολοκληρώνεται σε λίγες ημέρες ή εβδομάδες και σε άλλα σε μήνες μετά την παρασκευή τους. Υπάρχουν όμως και τυριά, που καταναλώνονται αμέσως μετά την παρασκευή τους, χωρίς ωρίμανση (Ανυφαντάκης, 2004). Σύμφωνα με το άρθρο 83/2014 του Κώδικα Τροφίμων και Ποτών, η ωρίμανση των τυριών πρέπει να γίνεται σε χώρους όπου η θερμοκρασία δε θα είναι κατώτερη των +10°C και θα υπάρχει κατάλληλη για κάθε τύπο τυριού υγραμετρική κατάσταση. Ο χρόνος ωρίμανσης εξαρτάται από την κατηγορία του τυριού: α) τα πολύ σκληρά, τα σκληρά και τα ημίσκληρα τυριά για να συμπληρώσουν την ωρίμανσή τους πρέπει να παραμείνουν τουλάχιστον τρεις (3) μήνες στις παραπάνω συνθήκες και β) τα μαλακά τυριά για να συμπληρώσουν την ωρίμανσή τους πρέπει να παραμείνουν τουλάχιστον δύο (2) μήνες. Εξαιρούνται τα «Λευκά τυριά άλμης», τα οποία είναι παρασκευασμένα από παστεριωμένο γάλα και επιτρέπεται να διατίθενται δεκαπέντε ημέρες (15) μετά την παρασκευή τους (η εξαίρεση αυτή δεν αφορά στα Ελληνικά Παραδοσιακά Τυριά).

Μετά την παρασκευή τους, τα τυριά είναι συνεκτικά και άγευστα. Περιλαμβάνουν όλα τα συστατικά του γάλακτος σε διαφορετική όμως αναλογία, καθώς μέρος τους μεταφέρεται στο τυρόγαλα. Η ωρίμανση περιλαμβάνει μια περίπλοκη σειρά από σύνθετες βιοχημικές αλλαγές που οδηγούν στη διαμόρφωση της τελικής χαρακτηριστικής γεύσης και υφής του τυριού. Το στάδιο της ωρίμανσης και κατ' επέκταση η ποιότητα του τελικού προϊόντος επηρεάζεται από μία σειρά παραγόντων όπως η ποιότητα του γάλακτος της τυροκόμησης, η πυτιά, οι οξυγαλακτικές καλλιέργειες και οι διάφοροι χειρισμοί που γίνονται κατά την παρασκευή τους.

Οι διεργασίες που θα πραγματοποιηθούν κατά την ωρίμανση του τυριού και η έκτασή τους, προσδιορίζονται σε μεγάλο βαθμό και από τις συνθήκες ωρίμανσης, ο έλεγχος των οποίων θα καθορίσει σε σημαντικό βαθμό τα χαρακτηριστικά και την ποιότητα του τελικού προϊόντος.

2.3.2. Μικροβιολογικές Μεταβολές κατά την Ωρίμανση του Τυριού

Οι πιο χαρακτηριστικές μικροβιολογικές μεταβολές που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια του σταδίου ωρίμανσης του τυριού είναι, ο θάνατος και η λύση των βακτηριακών κυττάρων (starter cells), η ανάπτυξη βακτηρίων εκτός των καλλιιεργειών εκκίνησης (non-starter) που είναι κυρίως ετεροζυμωτικοί λακτοβάκιλλοι και σε πολλές ποικιλίες τυριών, η ανάπτυξη δευτερεύουσας μικροχλωρίδας, όπως για παράδειγμα το *Propionibacterium freudenreichii* στο Ελβετικό τυρί και μύκητες στα τυριά των οποίων η ωρίμανση απαιτεί την ανάπτυξή τους.

Όπως ήδη αναφέρθηκε εκτενώς (Παρ. 2.2.3), στην κατηγορία των βακτηρίων εκκινητών, ανήκουν οξυγαλακτικά βακτήρια τα οποία είτε προστίθεται κατά το στάδιο παρασκευής του τυριού, είτε μπορεί να αποτελούν ενδογενή χλωρίδα του γάλακτος τυροκόμησης τυριών που παρασκευάζονται από μη παστεριωμένο γάλα. Αναφέρονται με τον όρο βακτήρια εκκινητές διότι με αυτά ξεκινά ουσιαστικά η διαδικασία της τυροκόμησης.

Τα βακτήρια εκκινητές, αρχικά, πολλαπλασιάζονται και ξεκινούν από 10^6 - 10^7 βακτηριακές αποικίες (colony forming units-CFU) ανά mL γάλακτος και φθάνουν έως 10^9 CFU/g φρέσκου τυροπήγματος. Καθ' όλη τη διάρκεια της ωρίμανσης, ο πληθυσμός των μικροοργανισμών υφίσταται μείωση ο ρυθμός της οποίας ποικίλει ανάλογα με το είδος τυριού και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η ποσότητα της εναπομένουσας λακτόζης (λειτουργεί ως πηγή ενέργειας για τους μικροοργανισμούς), η παρεμπόδιση από το αλάτι και η αυτόλυσή τους. Η δραστηριότητα της καλλιέργειας εκκίνησης αναστέλλεται όταν ο λόγος άλατος/υγρασία (Salt/Moisture) είναι υψηλότερος από περίπου 5% (Farkey, 2003).

Εκτός από την ύπαρξη των μικροοργανισμών που εισάγονται ως εκκινητές, πιθανώς σε όλες τις ποικιλίες τυριών, υπάρχουν και τα βακτήρια που δεν εισάγονται ως εκκινητές αλλά υπάρχουν ήδη στο γάλα ή στην πυτιά που προστίθεται (NSLAB) και αναπτύσσονται κατά την ωρίμανση.

2.3.3. Βιοχημικές Μεταβολές κατά την Ωρίμανση του Τυριού

Τα βιοχημικά μονοπάτια κατά την ωρίμανση των τυριών περιλαμβάνουν, μέσω ενζυμικής κατάλυσης, το μεταβολισμό της εναπομένουσας λακτόζης (το μεγαλύτερο της μέρος απομακρύνεται με το τυρόγαλα κατά την τυροκόμηση), το μεταβολισμό του γαλακτικού και κητρικού οξέος, τη λιπόλυση και το μεταβολισμό των ελεύθερων λιπαρών οξέων και το φαινόμενο της πρωτεόλυσης και του μεταβολισμού των αμινοξέων (Upadhyay & McSweeney, 2003). Το αποτέλεσμα είναι αλλαγές στη δομή, στο χρώμα, στη γεύση και στο άρωμα του τυριού.

Η πηγή προέλευσης των ενζύμων που συμμετέχουν στις βιοχημικές μεταβολές που παρατηρούνται στο στάδιο της ωρίμανσης είναι, το γάλα και η μικροχλωρίδα του, η προστιθέμενη κατά την τυροκόμηση πυτιά, η προστιθέμενη κατά την τυροκόμηση καλλιέργεια εκκίνησης, καθώς και σκευάσματα ενζύμων που πιθανόν προστίθενται κατά την τυροκόμηση.

Το γάλα αν και περιέχει μεγάλη ποικιλία φυσικών ενζύμων, το μεγαλύτερο ποσοστό τους απενεργοποιείται κατά την παστερίωση, με εξαίρεση την πλασμίνη, την όξινη φωσφατάση και την υπεροξειδάση, που επιβιώνουν λόγω της ανθεκτικότητάς τους στη θερμική επεξεργασία.

Τα ένζυμα της πυτιάς δεν προκαλούν μόνο την πήξη του γάλακτος κατά την τυροκόμηση. Μέρος τους, που εξαρτάται από το είδος του τυριού που παρασκευάζεται, μεταφέρεται κατά την τυροκόμηση στο τυρί και συμβάλλει στην ωρίμανσή του. Όσο χαμηλότερο είναι το pH του τυριού, τόσο μεγαλύτερη αναλογία ενζύμου μεταφέρεται στο τυρί. Τα ένζυμα αυτά καθώς και η πλασμίνη του γάλακτος, αποτελούν ισχυρά παράγοντα πρωτεόλυσης κατά την ωρίμανση των περισσότερων ειδών τυριού (Casey et al., 1987; Ollikainen & Nyberg, 1988; Ollikainen & Kivela, 1989; Farkye & Fox, 1991, 1992; Farkye & Landkammer, 1992; Song et al., 1993; Scherze et al., 1994; Mulvihill & McCarthy 1994; Bastian & David, 1997; Benfeldt et al., 1997).

Οι βακτηριακές καλλιέργειες εκκίνησης αναπτύσσονται ταχύτατα και αποκτούν ένα μέγιστο αριθμό προς το τέλος της τυροκόμησης ή λίγο μετά από αυτήν, ο οποίος και διατηρείται για κάποιο διάστημα και στη συνέχεια αρχίζει η μείωσή τους. Οι μικροοργανισμοί αυτοί συμβάλλουν στην ωρίμανση των τυριών μέσω ενζύμων που διαθέτουν στην κυτταρική τους μεμβράνη (εξωκυτταρικά ένζυμα) αλλά κυρίως μέσω των ενδοκυτταρικών ενζύμων, τα οποία απελευθερώνονται και δρουν μετά την αυτόλυση των κυττάρων. Μεταξύ των διαφορετικών οξυγαλακτικών βακτηρίων, πολλές φορές, και μεταξύ στελεχών του ίδιου είδους, υπάρχουν σημαντικές διαφορές στην πρωτεασική και πεπτιδασική τους δράση. Για το λόγο αυτό, απαιτείται πάντοτε προσεκτική επιλογή των ειδών και των στελεχών που χρησιμοποιούνται, για την επίτευξη του επιδιωκόμενου αποτελέσματος, που είναι η διάσπαση των μεγάλων πεπτιδίων που παράγονται από τη δράση της πυτιάς σε μικρά άπικρα πεπτίδια και αμινοξέα. Τα βακτήρια και οι ζύμες, που αναπτύσσονται στην επιφάνεια των τυριών, παράγουν

επίσης πρωτεάσες και πεπτιδάσες που συμβάλλουν, σε μικρό ή μεγάλο βαθμό, στην ωρίμανση. Σχετικά με τη λιπασική δράση των μικροβίων κατά την ωρίμανση των τυριών, αυτή των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι περιορισμένη. Οι (γα)λακτόκοκκοι είναι πιο ενεργοί από την άποψη αυτή από τους (γα)λακτοβάκιλλους και οι λιπάσες τους επιδεικνύουν επιλεκτική δράση επί δεσμών λιπαρών οξέων με μικρή αλυσίδα ατόμων άνθρακα. Οι μύκητες είναι οι πιο λιπολυτικοί από τους μικροοργανισμούς που απαντούν στα τυριά. Αυτά που ωριμάζουν με μύκητες του γένους *Penicillium* περιέχουν πάντοτε μεγάλη αναλογία ελεύθερων λιπαρών οξέων εξαιτίας του ισχυρού λιπολυτικού συστήματος των μικροοργανισμών αυτών. Όσον αφορά στις ζύμες, επιδεικνύουν λιπασική δράση, που όμως κυμαίνεται εντός ευρέων ορίων (Ανυφαντάκης, 2004).

Εν κατακλείδι, κατά την παρασκευή και κυρίως κατά τη διάρκεια του σταδίου ωρίμανσης, στη μάζα του τυριού απελευθερώνονται πρωτεάσες οι οποίες υδρολύουν τις πρωτεΐνες και απελευθερώνουν πεπτίδια, ενδο- και εξωπεπτιδάσες οι οποίες διασπούν περαιτέρω τα πεπτίδια και προς ελεύθερα αμινοξέα, λιπάσες που υδρολύουν το λίπος και παράγουν ελεύθερα λιπαρά οξέα, ενεργά συστήματα αμινοξέων που τροποποιούν ή διασπούν αμινοξέα που ελευθερώνονται από τις εξωπεπτιδάσες και ενεργά συστήματα που δρουν επί των λιπαρών οξέων ή των προϊόντων τους και οδηγούν στο σχηματισμό β-κετονικών οξέων, μεθυλοκετονών και αλκοολών.

2.3.3.1. Το στάδιο της πρωτεόλυσης

Η πρωτεόλυση είναι η βασικότερη και πολυπλοκότερη βιοχημική διαδικασία που παρατηρείται κατά το στάδιο της ωρίμανσης των τυριών (Trujillo, 2002; Grappin & Beuvier, 1997; Fox, 1989). Αφορά την υδρόλυση των καζεϊνών που αποτελούν τον σκελετό του τυροπήγματος με αποτέλεσμα την παραγωγή μεγάλου, μεσαίου και μικρού μεγέθους πεπτιδίων, ελεύθερων αμινοξέων και αμμωνίας (NH_3). Ο περαιτέρω καταβολισμός των ελεύθερων αμινοξέων (Free Amino Acids-FAA) δίνει προϊόντα πτητικά όπως αμίνες, θειόλες και θειοεστέρες, τα οποία προσδίδουν στο τυρί χαρακτηριστική γεύση και υφή.

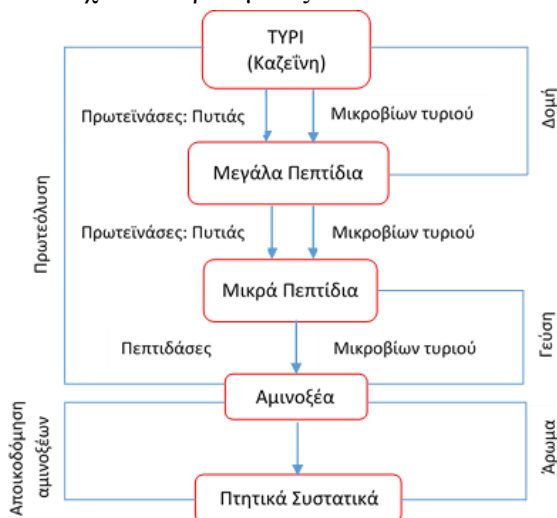
Σύμφωνα με τους Upadhyay et al. (2004), η πρωτεόλυση συμβάλλει στη διαμόρφωση της γεύσης και του αρώματος των τυριών άμεσα, μέσω της παραγωγής μικρών πεπτιδίων και αμινοξέων μερικά εκ των οποίων έχουν γεύση, έμμεσα μέσω της απελευθέρωσης αμινοξέων που δρουν ως υποστρώματα για ένα μεγάλο εύρος καταβολικών 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 μύσηση.

Σύμφωνα με τους Law (1987), Fox (1989) και Trujillo (2002), οι μεταβολές που προκαλούνται στην τυρόμαζα κατά το στάδιο της πρωτεόλυσης έχουν ως αποτέλεσμα τη διαμόρφωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του τυριού (γεύση, οσμή) καθώς και δομικές μεταβολές λόγω διάσπασης των καζεϊνικών μικκυλίων, οι οποίες επηρεάζουν τόσο την υφή του τυριού όσο και τη γεύση καθώς διευκολύνεται η απελευθέρωση γευστικών συστατικών.

Το ενδιαφέρον, για τις πρωτεολυτικές διεργασίες που πραγματοποιούνται στο τυρί, περιορίζεται στις καζεΐνες του και κυρίως στις α_{s1-} , α_{s2-} , $\beta-$ και $\kappa-$ καζεΐνες. Οι καζεΐνες είναι οι πρωτεΐνες του γάλακτος που δημιουργούν κατά την τυροκόμηση το πήγμα (Παρ. 2.2.1). Σ' αυτό ενσωματώνονται και μικρές ποσότητες πρωτεϊνών του ορού, κυρίως α -λακταλβουμίνη και β -λακτογλοβουλίνη, οι οποίες όμως δε μεταβάλλονται σε σημαντικό βαθμό κατά την ωρίμανση. Έχει αποδειχθεί ότι στη Φέτα τα περισσότερα πεπτίδια που απελευθερώνονται προέρχονται κυρίως από διάφορα τμήματα της α_{s1-} καζεΐνης, δύο προέρχονται από το καρβοξυτελικό άκρο της β -καζεΐνης και ένα από την κ -καζεΐνη (Sousa et al., 2001).

Τα ένζυμα με καθοριστικό ρόλο στη διαδικασία της πρωτεόλυσης ονομάζονται πρωτεϊνάσες. Οι πρωτεϊνάσες και πεπτιδάσες που καταλύουν την πρωτεόλυση στο τυρί προέρχονται κατά κύριο λόγο από έξι πηγές: την πυτιά (εναπομένουσα χυμοσίνη), το γάλα (η πλασμίνη, ίσως και η καθεψίνη D και άλλα σωματικά κύτταρα), τα οξυγαλακτικά βακτήρια εκκίνησης (καλλιέργεια εκκινητής LAB), τα οξυγαλακτικά βακτήρια εκτός των καλλιιεργειών εκκίνησης (NSLAB), δευτερεύουσες καλλιέργειες εκκίνησης (π.χ. τα στελέχη *Propionibacterium Freudenreichii* στα ελβετικού τύπου τυριά, *Penicillium roqueforti* στα μπλε τυριά και άλλα) (Upadhyay et al., 2004) και εξωγενείς πεπτιδάσες και πρωτεϊνάσες που πιθανώς προστίθενται για επιτάχυνση της ωρίμανσης.

Από τη στιγμή της δημιουργίας του καζεϊνικού πήγματος αρχίζει η προοδευτική διάσπαση των καζεϊνών. Αρχικά, τα μόρια των καζεϊνών υδρολύονται σε μεγάλα πεπτίδια, τα οποία στη συνέχεια διασπώνται σε μικρά πεπτίδια και αμινοξέα (Σχήμα 2.2). Οι διεργασίες εξελίσσονται ταυτόχρονα κατά την ωρίμανση του τυριού, με διαφορετική ταχύτητα κατά περίπτωση. Η αρχική αποδόμηση των καζεϊνών σε μεγάλα πεπτίδια καταλύεται από την εναπομένουσα χυμοσίνη και την κύρια ενδογενή πρωτεϊνάση του γάλακτος, την πλασμίνη και σε μικρότερο βαθμό από πρωτεϊνάσες που ελευθερώνονται από τα μικροβιακά κύτταρα που αυτολύονται. Στο πρώτο στάδιο επέρχεται και η μείωση της ενεργότητας νερού εξαιτίας των δεσμών που δημιουργούνται μεταξύ του νερού με τις καρβοξυ- και αμινο-ομάδες των πεπτιδίων, αλλάζοντας έτσι τη δομή του τυροπήγματος (Nega & Moatsou, 2012). Με τη δράση της πυτιάς, διασπώνται ο Phe₁₀₅-Met₁₀₆ δεσμός της κ-καζεΐνης, επάγοντας έτσι την συσσωμάτωση και οι Phe₂₃-Phe₂₄ και Phe₂₄-Val₂₅ δεσμοί της α_{s1}-καζεΐνης. Η δράση της πυτιάς συνεχίζει καθ' όλη τη διάρκεια της ωρίμανσης απελευθερώνοντας μεγάλο μοριακού βάρους πεπτίδια, αλλά όχι ελεύθερα αμινοξέα.



(Πηγή: Τροποποίηση από Ανυφαντάκης, 2004)

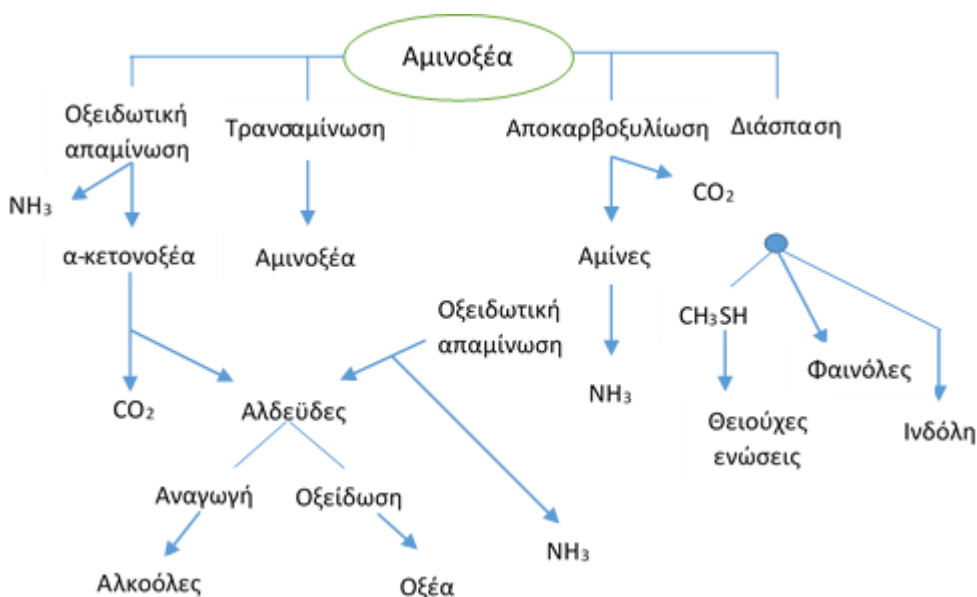
Σχήμα 2.2. Συμβολή της πυτιάς και των μικροβιακών ενζύμων στη δομή, τη γεύση και το άρωμα των τυριών

Αντίθετα, η διάσπαση των μεγάλων πολυπεπτιδίων σε μικρά πεπτίδια και αμινοξέα γίνεται σχεδόν αποκλειστικά από μικροβιακά ένζυμα (Σχήμα 2.2). Ένα μέρος των ενζύμων που υπάρχει στη βακτηριακή καλλιέργεια εκκίνησης διασπά τα προκύπτοντα πεπτίδια. Η πρωτεϊνάση lactocerpine Prtp, η οποία είναι ενθυλακωμένη στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (Cell Envelope-associated Proteinase-CEP) των οξυγαλακτικών βακτηρίων (περιέχονται στο γάλα ή προστίθενται επιπλέον αν το γάλα τυροκόμησης είναι παστεριωμένο) είναι ιδιαίτερα σημαντική στη διάσπαση των μεσαίου μεγέθους πεπτιδίων που παράγονται από τη χυμοσίνη και την πλασμίνη, προς παραγωγή μικρότερου μεγέθους πεπτιδίων και αμινοξέων, μερικά εκ των οποίων μπορεί να προσδώσουν πικρή γεύση. Τα

τελευταία, αποτελούν ιδανικό υπόστρωμα για εσωκυτταρικές εξω-πεπτιδάσες που προέρχονται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια και απελευθερώνονται στο τυρόπηγμα, όταν επέλθει λύση των κυττάρων και κατ' επέκταση κυτταρικός θάνατος. Έτσι παράγονται ελεύθερα αμινοξέα, τα οποία λειτουργούν και ως πρόδρομα συστατικά για ένα μεγάλο πλέγμα καταβολικών αντιδράσεων, οι οποίες παράγουν πτητικά συστατικά που συνεισφέρουν κι αυτά στη γεύση και οσμή πολλών ποικιλιών τυριού. Στην περίπτωση που η πρωτεόλυση σταματήσει στην παραγωγή μικρών πεπτιδίων, χωρίς την απελευθέρωση ελεύθερων αμινοξέων έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία πικρής γεύσης στο τυρί, ενώ με την έντονη πρωτεόλυση είναι δυνατόν να δημιουργηθούν σημαντικές ανεπιθύμητες μεταβολές στη δομή του τελικού προϊόντος.

Είναι προφανές ότι οι αλλαγές που εκδηλώνονται στην αρχή της ωρίμανσης επηρεάζουν, κατά κύριο λόγο, τη δομή των τυριών, ενώ οι αρωματικές ουσίες παράγονται προς το τέλος της.

Τα διάφορα αμινοξέα, που παράγονται κατά την πρωτεόλυση, είναι δυνατόν, υπό την επίδραση ενζύμων, να μετατραπούν προς ουσίες με σημαντική συμβολή στο άρωμα των τυριών. Τα ένζυμα που κατά κύριο λόγο εμπλέκονται στη διεργασία αυτή είναι αποκαρβοξυλάσες, τρανσαμινάσες και απαμινάσες. Οι αποκαρβοξυλάσες, σε pH ~5.5, απελευθερώνουν CO₂ από την καρβοξυλική ομάδα των αμινοξέων και παράγουν αμίνες, οι τρανσαμινάσες μετατρέπουν ένα αμινοξύ σε ισοδύναμο κετο-οξύ μεταφέροντας την ομάδα των αμινοξέων σε ένα άλλο κετο-οξύ, ενώ οι απαμινάσες μετατρέπουν αμινοξέα ή τις αμίνες τους σε αμμωνία και σε αντίστοιχο κετο-οξύ ή αλδεΐδες ή προϊόντα διάσπασής τους (Σχήμα 2.3).



(Πηγή: Τροποποίηση από Ανυφαντάκης, 2004)

Σχήμα 2.3. Καταβολισμός των ελεύθερων αμινοξέων κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης

Από τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι η πυτιά και τα οξυγαλακτικά βακτήρια, συμβάλλουν εκτός από την πήξη του γάλακτος και την παραγωγή γαλακτικού οξέος αντίστοιχα, και στην ωρίμανση των τυριών. Για το λόγο αυτό, οι οξυγαλακτικές καλλιέργειες ελέγχονται εκτός από την ικανότητά τους να παράγουν γαλακτικό οξύ και για τη συμβολή τους στην ανάπτυξη του αρώματος και της γεύσης των τυριών. Η πρωτεόλυση έχει βιομηχανική σημασία λόγω της συμβολής της στις οργανοληπτικές ιδιότητες των γαλακτοκομικών προϊόντων (Meyer & Spahni, 1998; Sridhar et al., 2005).

2.3.3.1.1. Δράση ενδογενών πρωτεϊνών του γάλακτος στο στάδιο της πρωτεόλυσης

Η σημαντικότερη αναφορικά με την ωρίμανση του τυριού και περισσότερο μελετημένη ενδογενής πρωτεΐνωση του γάλακτος θεωρείται η πλασμίνη (Moatsou, 2011).

Η πλασμίνη εμφανίζει μεγάλη επιλεκτικότητα σε πεπτιδικούς δεσμούς και υδρολύει τις α_{s1} -καζεΐνη, α_{s2} -καζεΐνη και τη β -καζεΐνη συμπεριλαμβανομένων και των υπολειμμάτων λυσίνης. 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 και ακολουθούν τις καζεΐνες κατά την πήξη του γάλακτος. Τα υπόλοιπα συστατικά του συστήματος πλασμίνης είναι διαλυμένα στον ορό του γάλακτος και απομακρύνονται με το τυρόγαλα (Upadhyay et al., 2004).

Η ενεργότητα της πλασμίνης εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως η γαλακτική περίοδος, η φυλή και η ηλικία του ζώου καθώς και η ύπαρξη μαστίτιδας.

Το σύστημα πλασμίνης-πλασμινογόνου είναι σταθερό σε θερμοκρασίες παστερίωσης και έχει ανιχνευτεί απομένουσα δραστηριότητα της πλασμίνης ακόμη και σε γάλατα που έχουν υποστεί θερμική επεξεργασία στους 110°C και πάνω (Driessen, 1989). Μεγάλη αναλογικά ποσότητα του ενζύμου αυτού παραμένει στο τυρί και συμβάλλει ως ένα βαθμό στην ωρίμανση πολλών ποικιλιών (στην πρωτεόλυση). Στο τυρί η πλασμίνη υδρολύει κυρίως την β -καζεΐνη για να παράγει γ -καζεΐνες καθώς και πρωτεόζες και πεπτόνες (ορός). Δευτερευόντως η πλασμίνη προσβάλλει το μόριο της α_{s2} -καζεΐνης και στη συνέχεια της α_{s1} -καζεΐνης, ενώ η κ -καζεΐνη φαίνεται πως είναι ανθεκτική στην υδρόλυση από την πλασμίνη (Bastian & Brown, 1996). Η β -καζεΐνη ανάλογα με τη γενετική παραλλαγή έχει 15 με 17 δεσμούς ευαίσθητους στην πλασμίνη, αλλά μόνο τρεις υδρολύονται σε σημαντικό βαθμό στο γάλα, οι Lys28-Lys29, Lys105-His106 και Lys107-Glu108. Η υδρόλυσή τους καταλήγει σε απελευθέρωση των $\gamma 1$ -CN (β -CN f29-209), $\gamma 2$ -CN (β -CN f106-209), $\gamma 3$ -CN (β -CN f108-209) καζεϊνών, 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 ότι η πλασμίνη υδρολύει τη β -CN σε διάφορα σημεία (Fox et al., 1994). Επίσης η α_{s2} -CN σε πειραματικές συνθήκες υδρολύεται σε διάφορα σημεία (Le Bars & Gripon, 1989; Visser et al., 1989), αν και δεν έχει διαπιστωθεί κατά πόσο η διεργασία αυτή γίνεται και κατά την ωρίμανση των τυριών. Είναι πιθανό να συμβαίνει, καθώς η συγκέντρωση της α_{s2} -CN, η οποία δεν αποτελεί καλό υπόστρωμα για τη χυμοσίνη μειώνεται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης (McSweeney & Fox, 1997). Με μικρότερη ευαισθησία στη δράση της πλασμίνης έχει βρεθεί σε πειραματικές συνθήκες ότι και η α_{s1} -CN υδρολύεται σε διάφορα σημεία από την πλασμίνη (McSweeney et al., 1993). Η αντίσταση της κ -CN στη δράση της πλασμίνης οφείλεται στο υδατανθρακικό κλάσμα που βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο του μορίου της (Doi et al., 1979).

Στο γάλα περιέχονται επίσης και οι λυσοσωμικές πρωτεΐνες με πηγή προέλευσης τα σωματικά κύτταρα όπως η καθεψίνη D, η καθεψίνη B, η καθεψίνη K και η ελαστάση.

Η καθεψίνη D συναντάται κυρίως με μορφή ανενεργής προκαθεψίνης D. Η δράση της είναι παρόμοια με της χυμοσίνης και αφορά την υδρόλυση της κ -καζεΐνης προς πάρα- κ -καζεΐνη και την υδρόλυση της β - και α_{s1} -καζεΐνης. Ειδικότερα, παράγει το γλυκομακροπεπτίδιο, κ -CN (f106-169), το οποίο παράγεται επίσης από τη χυμοσίνη και το οποίο διασπά την κ -καζεΐνη σε δύο ακόμη θέσεις: Leu₃₂-Ser₃ και Leu₇₉-Ser₈₀ (Larsen et al., 1996). Στο γάλα βρίσκεται σε ποσότητα ~0.4 $\mu\text{g/mL}$. Ένα μέρος της επιζεί της παστερίωσης, ποσότητα όμως η οποία δεν αρκεί για την πήξη του γάλακτος

(Sousa et al., 2001). Όσον αφορά το στάδιο της ωρίμανσης του τυριού θεωρείται ότι επηρεάζει τη σταθερότητα του προϊόντος κατά την αποθήκευση.

Η καθεψίνη Β, εμφανίζει δράση παρόμοια της πλασμίνης και αφορά την υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών της β- και α_{s1} -καζεΐνης σε θέσεις όμοιες ή παρόμοιες με εκείνες που υδρολύονται από την πλασμίνη. Θεωρείται ότι περισσότερο από το 20% της δραστηριότητάς της διατηρείται μετά την παστερίωση του γάλακτος.

Οι υπόλοιπες πρωτεΐνες θεωρείται ότι βρίσκονται στο γάλα απενεργοποιημένες λόγω του υψηλού οξειδοαναγωγικού δυναμικού που επικρατεί στο τυρί.

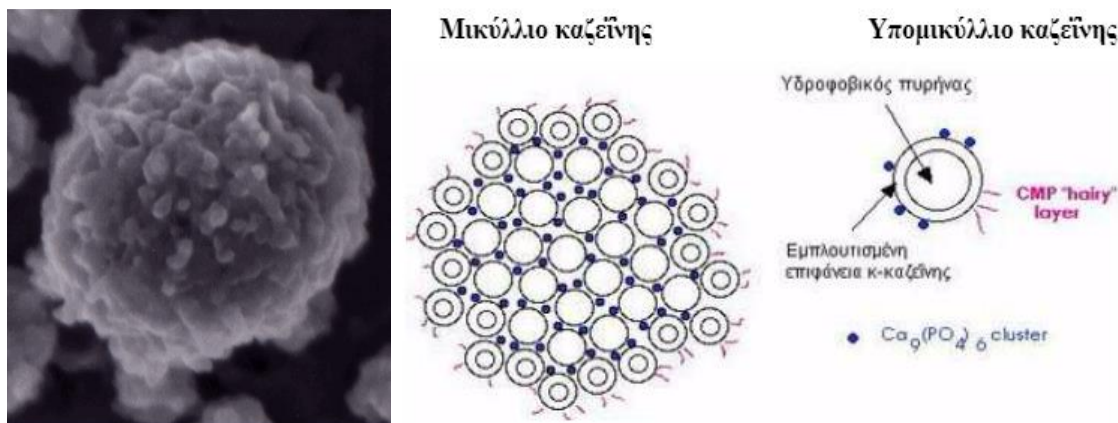
2.3.3.1.2. Δράση εναπομένουσας χυμοσίνης στο στάδιο της πρωτεόλυσης

Κατά το στάδιο της τυροκόμησης η πυτιά που προστίθεται μπορεί να είναι όπως προαναφέρθηκε, είτε παρασκεύασμα πρωτεϊνών διαφόρων προελεύσεων (πρωτεΐνες ζωικής προέλευσης διαφόρων ειδών, πρωτεΐνες των *Rhizomucor pusillus*, *Rhizomucor miehei*, *Cryphonectria parasitica*) με εξειδικευμένη δράση, είτε η κλασική πυτιά που είναι το εκχύλισμα του 4^{ου} στομάχου των νεαρών μηρυκαστικών (παραδοσιακή πυτιά) που περιέχει κατά κύριο λόγο τα ένζυμα χυμοσίνη και πεψίνη σε αναλογία 80:20. Η πεψίνη, είναι περισσότερο ευαίσθητη στις μεταβολές του pH και αυτό αποτελεί τον καθοριστικό παράγοντα για το ποσοστό παραμονής της στο τυρόπηγμα (Uradhyay et al., 2004).

Η εναπομένουσα χυμοσίνη του τυριού αντιστοιχεί στο 3-6% του αρχικού εμβολίου του γάλακτος τυροκόμησης. Ωστόσο, ένα ποσοστό μεγαλύτερο του 30% της δραστηριότητας της πυτιάς παραμένει στο τυρόπηγμα, ενώ το υπόλοιπο απομακρύνεται με το τυρόγαλα, και διαφοροποιείται ανάλογα με το είδος των ενζύμων, τη θερμοκρασία επεξεργασίας και το pH κατά τη στράγγιση του ορού (Uradhyay et al., 2004). Η εναπομένουσα χυμοσίνη συμβάλλει στην ωρίμανση των τυριών, ως παράγοντας πρωτεόλυσης και επηρεάζει τη δομή και την υφή τους δρώντας επί των καζεϊνικών κλασμάτων του τυροπήγατος. Η δράση της χυμοσίνης υπάρχει καθ' όλη τη διάρκεια της ωρίμανσης απελευθερώνοντας μεγάλο μοριακού βάρους πεπτίδια, αλλά όχι ελεύθερα αμινοξέα.

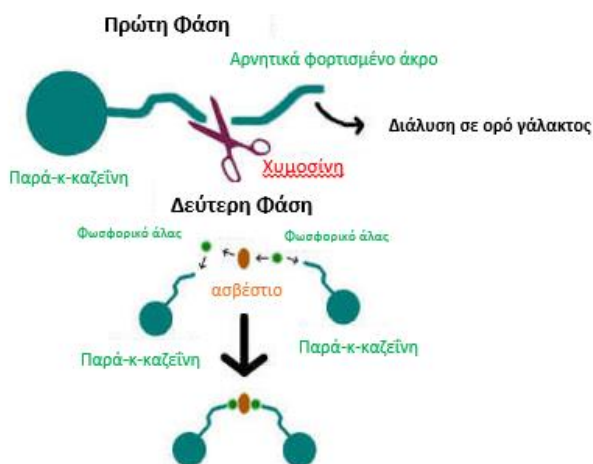
Η χυμοσίνη αποτελεί όξινη πρωτεΐνη (ασπαρτυλο-πρωτεΐνη), η οποία υδρολύει τις καζεΐνες σε συγκεκριμένα σημεία της πρωτοταγής τους δομής.

Για την κατανόηση της διαδικασίας της συμβολής της χυμοσίνης προς σχηματισμό του τυροπήγατος κρίνεται απαραίτητη η περιγραφή της μονάδας του καζεϊνικού μικκυλίου το οποίο μπορεί να θεωρηθεί ως σφαιροειδής δομή αποτελούμενη από τους τέσσερεις τύπους καζεϊνών (α_{s1} -, α_{s2} -, β-, κ) και περιέχει και φωσφορικό ασβέστιο σε κolloειδή μορφή (Μάντης, 2000). Οι υδρόφιλες κ-καζεΐνες και οι υδρόφοβες α_{s1} -καζεΐνες φαίνεται να είναι τοποθετημένες στην επιφάνεια του μικκυλίου με αποτέλεσμα την αποφυγή της συγκόλλησης των ομοιοπολικών μορίων. Στο κέντρο είναι τοποθετημένες οι υδρόφοβες α_{s2} - και β-καζεΐνες (Εικόνα 2.2). Η σταθερότητα αυτών των μικκυλίων βασίζεται κυρίως στην διπολικότητα του μορίου της κ-καζεΐνης η οποία αποτελείται από ένα υδρόφοβο μόριο, την πάρα-κ-καζεΐνη η οποία συνδέεται με το υδροφοβικό εσωτερικό του μορίου του μικκυλίου και από ένα υδρόφιλο μόριο, το μακροπεπτίδιο ή γλυκομακροπεπτίδιο (CMP ή GMP) το οποίο αντιδρά με το περιβάλλον διάλυμα ώστε να σταθεροποιεί το μικκύλιο σε αυτό.



Εικόνα 2.2. Μικκύλιο καζεΐνης μέσω ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και σχηματική απεικόνιση του ίδιου και του υπομικκυλίου του.

Μετά τη διάσπαση, το διαλυτό γλυκομακροπεπτίδιο διαχέεται στην υδατική φάση του τυρογάλακτος, ενώ η υδρόφοβη παρα-κ-καζεΐνη παραμένει στο καζεϊνικό μικκύλιο. Όταν η κ-καζεΐνη διασπάται, το καζεϊνικό μικκύλιο αποσταθεροποιείται από την απώλεια ενός αρνητικά φορτισμένου τμήματος. Επειδή μειώνονται τα επιφανειακά φορτία και οι στερεοχημικές αλληλεπιδράσεις των μικκυλίων, μπορούν να δημιουργηθούν μεταξύ τους υδροφοβικοί δεσμοί, που οδηγούν σε συσσωμάτωσή τους (Beattie, 2004) (Εικόνα 2.3).



Εικόνα 2.3. Επίδραση της χυμοσίνης στα μικκύλια καζεΐνης

Σε διάλυμα, η χυμοσίνη διασπά τη β-καζεΐνη σε επτά μέρη (Visser & Slangen, 1997), πολλά από τα οποία συναντώνται κοντά στο υδροφοβικό C-άκρο της β-καζεΐνης και η διάσπαση αυτή μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή υδρόφοβων πεπτιδίων, τα οποία έχουν πικρή γεύση. Η δράση της χυμοσίνης επί της β-καζεΐνης στο τυρί αρχίζει να αναστέλλεται από την παρουσία NaCl σε ποσοστό έως 5%, ενώ φαίνεται ότι αναστέλλεται εντελώς παρουσία NaCl 10%. Η παρεμπόδιση είναι έντονη στο pH του γάλακτος ενώ σε pH<4.6 μειώνεται (Fox et al., 2000).

Οι γ-καζεΐνες αποτελούν προϊόντα διάσπασης της β-καζεΐνης κι επομένως φέρουν στο μόριό τους τους ίδιους ευαίσθητους δεσμούς στη δράση της χυμοσίνης. Ωστόσο φαίνεται να συσσωρεύονται κατά την ωρίμανση και θεωρείται πιθανό οι δεσμοί που φέρουν να είναι απρόσβλητοι από τη χυμοσίνη, όπως συμβαίνει και όταν βρίσκονται στη β-καζεΐνη.

Η πρωτογενής θέση της δράσης της χυμοσίνης στην α_{s1} -καζεΐνη είναι η Phe₂₃-Phe₂₄ (McSweeney et al., 1993; Boudjellab et al., 1994), με αποτέλεσμα την παραγωγή μικρότερων πεπτιδίων (α_{s1} -CN f1-23) τα οποία υδρολύονται ταχύτατα από τις πρωτεΐνάσες των βακτηριακών εκκινήτων. Η διάσπαση του δεσμού αυτού θεωρείται πως είναι υπεύθυνη για το αρχικό μαλάκωμα της υφής του τυριού (de Jong, 1976). Η χυμοσίνη διασπά την α_{s1} -καζεΐνη και σε άλλα σημεία (McSweeney et al., 1993), συγκεκριμένα Leu₁₀₁-Lys₁₀₂, που στη συνέχεια υδρολύονται κατά την ωρίμανση σε πολλά τυριά. Η παρουσία NaCl σε ποσοστό έως 5%, φαίνεται να διεγείρει την υδρόλυση της α_{s1} -καζεΐνης (Fox et al., 2000).

Η α_{s2} -καζεΐνη είναι πιο ανθεκτική στην υδρόλυση από την α_{s1} -καζεΐνη. Οι θέσεις διάσπασης της α_{s2} -καζεΐνης από τη χυμοσίνη περιορίζονται στις υδροφοβικές περιοχές του μορίου (McSweeney et al., 1994).

Η δράση της χυμοσίνης επί της κ-καζεΐνης θεωρείται έντονη. Ξεκινάει με την προσθήκη της πυτιάς στο γάλα και είναι αυτή που προκαλεί την πήξη του γάλακτος λόγω υδρόλυσης του δεσμού Phe₁₀₅ και Me₁₀₆ της κ-καζεΐνης παρουσία ιόντων Ca⁺², διαιρώντας έτσι την αλυσίδα σε δύο διακριτά τμήματα, ένα υδρόφοβο και ένα υδρόφιλο. Τα προϊόντα της ενζυμικής δράσης είναι το υδατοδιαλυτό στοιχείο, γλυκομακροπεπτίδιο και το υδρόφοβο τμήμα παρα-κ-καζεΐνη (Beattie, 2004). Η παρα-κ-καζεΐνη παρότι έχει πολλές θέσεις διάσπασης στις οποίες θα μπορούσε να δράσει η χυμοσίνη, δεν εμφανίζεται να υδρολύεται ούτε σε διάλυμα ούτε στο τυρί (Green & Foster, 1974).

2.3.3.1.3. Δράση πρωτεϊνών και πεπτιδίων οξυγαλακτικών καλλιεργιών στο στάδιο της πρωτεόλυσης

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι διατροφικά απαιτητικά και έχουν σύνθετες ανάγκες σε αμινοξέα. Η συγκέντρωση των ελεύθερων αμινοξέων στο γάλα τυροκόμησης είναι ανεπαρκής για να καλύψει τις ανάγκες ενός μεγάλου αριθμού οξυγαλακτικών βακτηρίων. Οι γαλακτόκοκοι διαθέτουν ένα σύστημα πρωτεόλυσης το οποίο περιλαμβάνει τη συντονισμένη δράση πρωτεϊνών και πεπτιδίων προς υδρόλυση των πρωτεϊνών του γάλακτος σε ελεύθερα αμινοξέα απαραίτητα για τη θρέψη τους (Fox et al., 1993; Sousa et al., 2001).

Όλα τα τυριά περιέχουν έναν αριθμό μικροοργανισμών διαφόρων ειδών, οι οποίοι συνεισφέρουν στο στάδιο της πρωτεόλυσης. Οι μικροοργανισμοί μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως εξής:

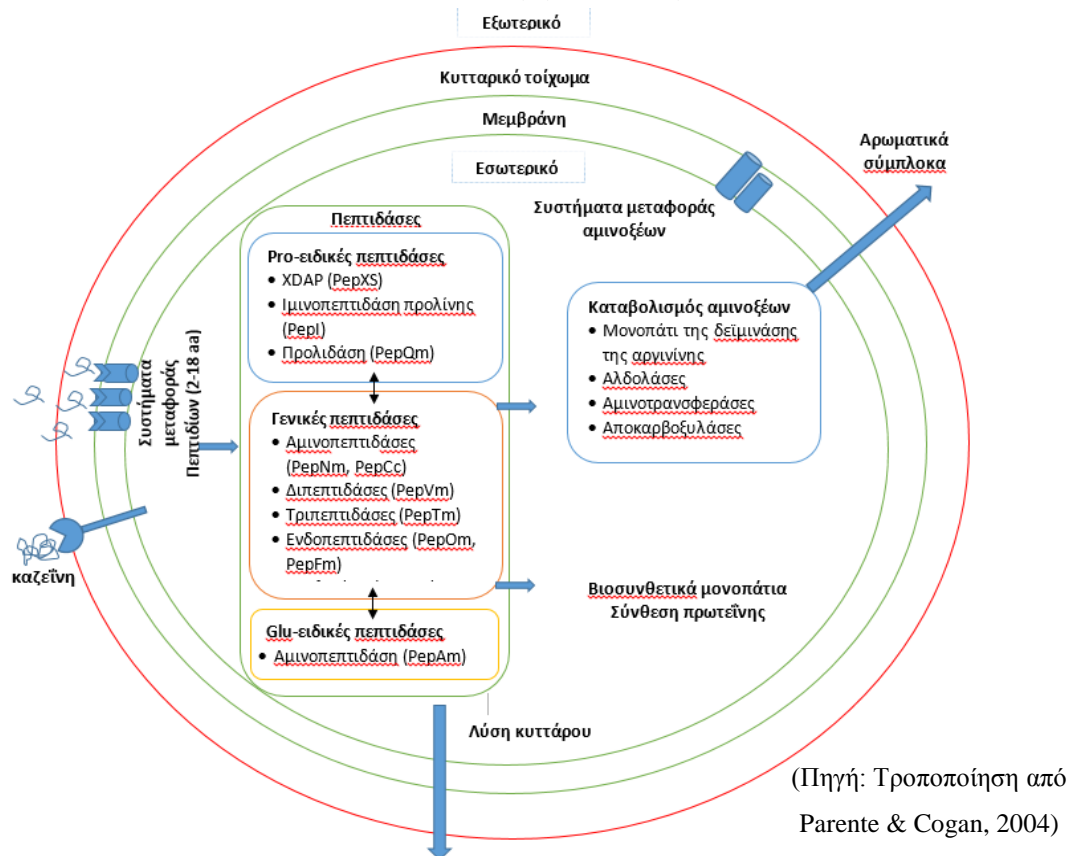
- Βακτήρια Εκκίνησης (*Lactococcus* ή *Lactococcus/Leuconostoc* ή *Lactobacillus* ή *Lactobacillus/Streptococcus*)
- Οξυγαλακτικά βακτήρια μη εκκινήτες (Non-starter lactic acid bacteria) (NSLAB; κυρίως μεσόφιλα βακτήρια γένους *Lactobacillus* και *Pediococcus*; επίσης *Micrococcus*)
- Δευτερεύουσες καλλιέργειες (*Penicillium*, *Brevibacterium*, ζύμες, *Lactobacillus*).

2.3.3.1.3.1. Ενζύμα Βακτηρίων Εκκίνησης (Starters)

Τα πιο κοινά βακτήρια εκκίνησης (SLAB) που χρησιμοποιούνται στην τυροκόμηση είναι μεσόφιλα βακτήρια του γένους *Lactococcus* και *Leuconostoc*, θερμόφιλα βακτήρια του γένους *Lactobacillus* και στελέχη του *S. thermophilus*.

Οι καλλιέργειες εκκίνησης (SLAB) περιλαμβάνουν πρωτεΐνάσες ενθυλακωμένες στην κυτταρική τους μεμβράνη (CEP) και στην ενδοκυτταρική περιοχή τους μία συστοιχία από ενδοπεπτιδάσες και εξωπεπτιδάσες. Οι CEP υδρολύουν τα πεπτιδία, τα οποία έχουν προκύψει από τη δράση της χυμοσίνης και των ενδογενών πρωτεϊνών του γάλακτος, προς παραγωγή ολιγοπεπτιδίων. Τα παραγόμενα ολιγοπεπτιδία, μεταφέρονται σε πρώτο στάδιο, μέσω συστημάτων μεταφοράς που διαθέτουν τα κύτταρα, στην ενδοκυτταρική περιοχή, όπου οι ενδοπεπτιδάσες προκαλούν την

υδρόλυσή τους προς μικρού μοριακού βάρους πεπτιδία. Οι εξωπεπτιδάσες οι οποίες κατηγοριοποιούνται περαιτέρω σε γενικές αμινοπεπτιδάσες (αμινοπεπτιδάσες ευρείας δράσης), αμινοπεπτιδάσες ειδικής δράσης (proline-specific peptidases), διπεπτιδάσες και τριπεπτιδάσες αναλαμβάνουν την υδρόλυση των μικρών πεπτιδίων προς παραγωγή ελεύθερων αμινοξέων (Kunji et al., 1996; Mierau et al., 1996; Christensen et al., 1999) (Εικόνα 3.4).



Εικόνα 3.4. Καταβολισμός αζωτούχων ενώσεων κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης τυριού και ενζυμικό σύστημα οξυγαλακτικών βακτηρίων

Οι εναρκτήριες καλλιέργειες σταματούν να αναπτύσσονται στο τυρόπηγμα σύντομα μετά το πέρας της παραγωγής του, λόγω της μείωσης του pH, της αύξησης της συγκέντρωσης του NaCl, της χαμηλής θερμοκρασίας και της έλλειψης ζυμώσιμου υδατανθρακικού υποστρώματος. Έτσι σε δεύτερο στάδιο πραγματοποιείται λύση των κυττάρων τους και απελευθέρωση των ενδοκυτταρικών τους ενζύμων (Uradyay et al., 2004). Οι πεπτιδάσες οι οποίες απελευθερώνονται υδρολύουν τα ολιγοπεπτιδία και μικρού μοριακού βάρους πεπτιδία σε ελεύθερα αμινοξέα τα οποία συμμετέχουν σε περαιτέρω χημικές αντιδράσεις συνεισφέροντας στην ανάπτυξη του αρώματος και της γεύσης του τυριού.

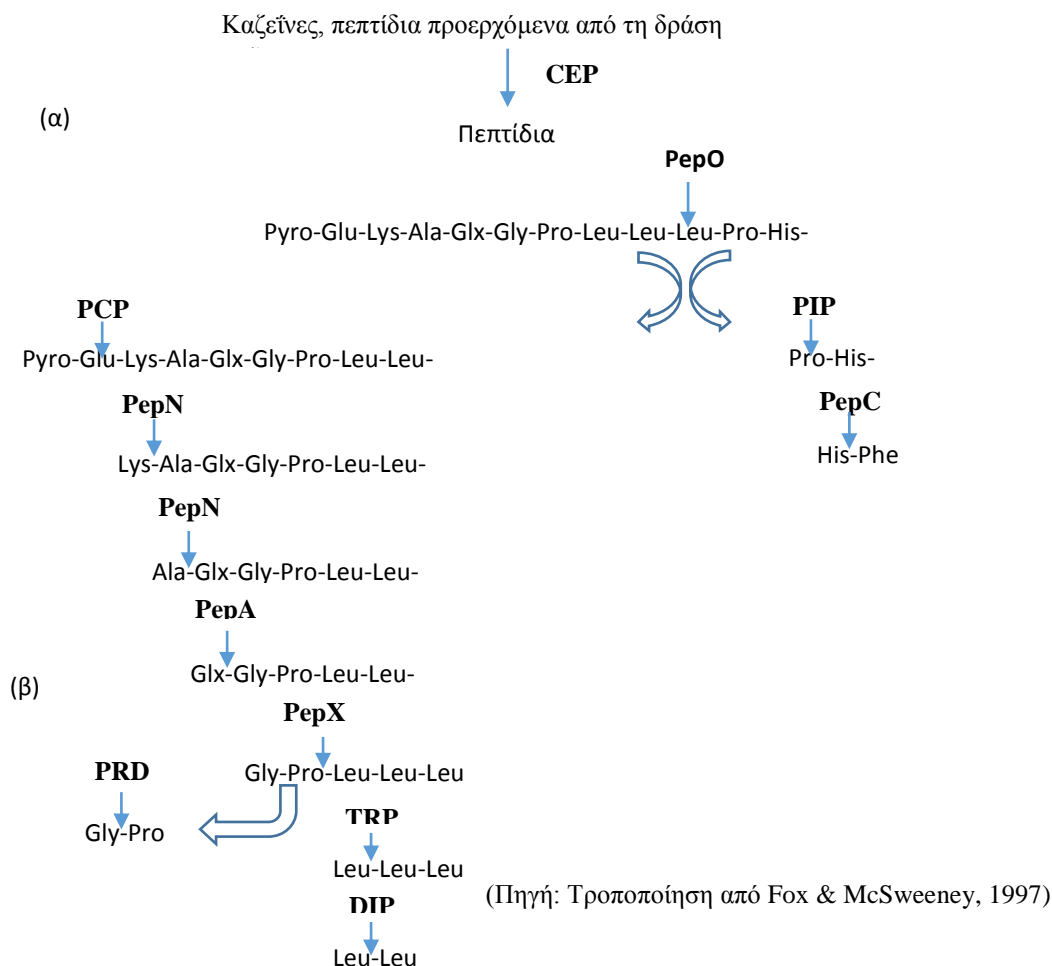
Αρκετοί τύποι γονιδίων πρωτεϊνών οξυγαλακτικών βακτηρίων έχουν κλωνοποιηθεί συμπεριλαμβανομένων των *L. lactis*, *Lb. helveticus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* και *S. thermophilus* (Savijoki et al., 2006).

Σύμφωνα με τους Bianci-Salvadori et al. (1995), οι εξωπεπτιδάσες των στελεχών του *S. thermophilus* θεωρούνται πιο δραστικές στα πεπτιδία συγκριτικά με τις εξωπεπτιδάσες των βακτηρίων *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Από την άλλη πλευρά, η δραστικότητα των ενδοπεπτιδίων του *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την υδρόλυση των καζεϊνικών φραγμάτων, είναι μεγαλύτερη (Bertrand-Harb et al., 2003). Οι πεπτιδάσες και αμινοπεπτιδάσες του *S.*

thermophilus εμφανίζουν υψηλότερη δραστηριότητα συγκριτικά με τη δραστηριότητα των πρωτεϊνών του (Shankar, 1977).

Σύμφωνα με τους Fox & McSweeney, (1997), το πρωτεολυτικό σύστημα του *Lactococcus lactis* αποτελείται από μία ενθυλακωμένη στην κυτταρική μεμβράνη πεπτιδάση CEP, τη λακτοσεπίνη (lactocerin, Prt) και συστήματα μεταφοράς αμινοξέων. Οι ενδοκυτταρικές πεπτιδάσες περιλαμβάνουν ολιγοενδοπεπτιδάσες (PepO και PepF), τουλάχιστον τρεις γενικές αμινοπεπτιδάσες (PepN, PepC και PepG), γλουταμυλ-αμινοπεπτιδάση (PepA), πεπτιδάση πυρολιδόνης καρβοξυλίου (pyrrolidone carboxyl peptidase) (PCP), λευκυλ-αμινοπεπτιδάση (PepL), X-προλυλ-διπεπτιδύλ-αμινοπεπτιδάση (PepX), προλυλ-ιμινοπεπτιδάση (PepI), αμινοπεπτιδάση P (PepP), προλινάση (PepR), προλινάση (PepQ), γενικές διπεπτιδάσες (PepV, PepD και PepDA) και τη γενική τριπεπτιδάση (PepT). Στο Σχήμα 2.4. δίνεται αναλυτικά η πορεία πρωτεόλυσης για το σύστημα της οξυγαλακτικής καλλιέργειας του μικροοργανισμού *Lactococcus lactis*.

Η ειδικότητα της πρωτεΐνωσης κυτταρικού τοιχώματος (CEP) από διάφορα είδη επί των καζεϊνών έχει τεκμηριωθεί, όπως και οι ιδιαιτερότητες των κυριότερων ενδο- και εξωπεπτιδασών (Fox et al., 1994; 1996). Το πρωτεολυτικό σύστημα του θερμόφιλου *Lactobacillus* spp. έχει χαρακτηριστεί αρκετά καλά και είναι γενικώς όμοιο με εκείνο του *Lactococcus*.



Σχήμα 2.4. α) Παραγωγή πεπτιδίων από τη δράση των πρωτεϊνών CEP στις καζεΐνες και σε μεγάλο μεγέθους καζεϊνικά πεπτίδια β) Διάσπαση ενός υποθετικού πεπτιδίου του μικροοργανισμού *Lactococcus lactis* από τη συνδυαστική δράση των ενδο- και εξωπεπτιδασών PepO (oligoendopeptidase), PIP (prolyl iminopeptidase), PCP (pyrrolidonyl carboxyl peptidase), PepN (general aminopeptidase), PepA (glutamyl aminopeptidase), PepC (thiol aminopeptidase), PepX (X-prolyl dipeptidylaminopeptidase), PRD (prolidase), TRP (tripeptidase), DIP (dipeptidase)

Μελέτες σε τυριά ελεγχόμενης μικροχλωρίδας έχουν δείξει ότι το πρωτεολυτικό σύστημα των βακτηρίων εκκινητών και βακτηρίων εκτός των εκκινητών συμβάλλει ελάχιστα στην πρώτη φάση της πρωτεόλυσης στο τυρί, αλλά είναι κυρίως υπεύθυνο για το σχηματισμό μικρών πεπτιδίων και ελεύθερων αμινοξέων (O'Keeffe et al., 1976; Visser, 1977). Σύμφωνα με τους Lane & Fox (1996) και Lynch et al., (1996), οι οποίοι μελέτησαν τη σημασία του ρόλου των βακτηρίων εκκινητών και βακτηρίων εκτός των εκκινητών, τα δεύτερα φαίνεται να έχουν τον ίδιο αλλά μικρότερο ρόλο στην πρωτεόλυση συγκριτικά με τα βακτήρια εκκίνησης. Τα βακτήρια εκτός των εκκινητών φαίνεται να συνεισφέρουν στο σχηματισμό ελεύθερων αμινοξέων.

Η βασική πρωτεϊνάση κυτταρικού τοιχώματος (Cell Envelope Proteinase-CEP) των περισσότερων οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι η λακτοσεπίνη (lactocerin). Το ένζυμο αυτό ανήκει στην οικογένεια της σουμπτιλισίνης και είναι μία πρωτεάση σερίνης. Οι CEPs είναι ενθυλακωμένες στο κυτταρικό τοίχωμα μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει την τυπική sortase A (SrtA) (Dandoy et al., 2011). Βασικός ρόλος των CEP κατά την ωρίμανση, είναι η υδρόλυση των μεσαίου μοριακού βάρους πεπτιδίων τα οποία παράγονται από τη δράση της πλασμίνης ή/και της χυμοσίνης προς παραγωγή ολιγοπεπτιδίων (Upadyay et al., 2004). Στα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν κλωνοποιηθεί και χαρακτηριστεί πέντε διαφορετικοί τύποι ενζύμων CEP, η PrtP από *Lc. lactis* και από *Lb. paracasei*, η PrtH από *Lb. helveticus*, η PrtR από *Lb. rhamnosus*, η PrtS από *S. thermophilus* και η PrtB από *Lb. bulgaricus* (Frees et al., 2007).

Για τη μεταφορά των προϊόντων αποικοδόμησης (αμινοξέα, πεπτίδια) των καζεϊνών προς το κυτταρόπλασμα, τα οξυγαλακτικά βακτήρια διαθέτουν συστήματα μεταφοράς τα οποία διακρίνονται στο σύστημα μεταφοράς αμινοξέων, στα συστήματα μεταφοράς διπεπτιδίων (DtpT) και τριπεπτιδίων (DtpP) και στο σύστημα μεταφοράς ολιγοπεπτιδίων (Opp), το οποίο μεταφέρει πεπτίδια τα οποία αποτελούνται από 4-18 αμινοξέα. Σύμφωνα με τους Sanz et al. (2003), το σύστημα DtpP πραγματοποιεί τη μεταφορά δι-, τρι- και τετραπεπτιδίων τα οποία περιέχουν σχετικά υδρόφοβα διακλαδισμένα αμινοξέα, ενώ εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια με τα τρι-πεπτίδια σε αντίθεση με το σύστημα μεταφοράς DtpT το οποίο εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια προς υδρόφιλα δι- και τριπεπτίδια. Σύμφωνα με τους Christensen et al. (1999), το σύστημα μεταφοράς Opp είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε υποστρώματα τα οποία περιέχουν καζεΐνη, αφού μετά από ανάλυση των καζεϊνικών κλασμάτων του γάλακτος κατά την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων, υπολογίστηκε ότι το 98% του αζώτου που χρησιμοποιούν για την ανάπτυξή τους προέρχεται από τα ολιγοπεπτίδια που μεταφέρονται μέσω του συστήματος Opp.

Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία έχουν αναγνωριστεί και χαρακτηριστεί βιοχημικά ή /και γενετικά πάνω από 20 διαφορετικές ενδοκυτταρικές πεπτιδάσες των στελεχών *Lactococcus* και *Lactobacillus* (Πίνακας 2.8).

Πίνακας 2.8. Πεπτιδάσες στελεχών του γένους *Lactococcus* και *Lactobacillus*

Πεπτιδάση	Όνομασία	Υδρόλυση υποστρώματος
Αμινοπεπτιδάση A	PepA	Glu/Asp ↓ (X) _n
Αμινοπεπτιδάση C	PepC	X ↓ (X) _n
Αμινοπεπτιδάση L	PepL	Leu ↓ X Leu ↓ X - X
Αμινοπεπτιδάση N	PepN	X ↓ (X) _n
Αμινοπεπτιδάση P	PepP	X ↓ Pro - (X) _n
Αμινοπεπτιδάση X	PepX	X - Pro ↓ (X) _n
Pyrrolidone carboxyl peptidase	Pep	Glu ↓ (X) _n
Δι-πεπτιδάση V	PepV	X ↓ X
Δι-πεπτιδάση D	PepD	X ↓ X
Τρι-πεπτιδάση T	PepT	X ↓ X - X
Προ-ιμινοπεπτιδάση	PepI	Pro ↓ X - (X) _n
Προλιδάση	PepQ	X ↓ Pro
Προλινάση	PepR	Pro ↓ X
Ενδοπεπτιδάση F	PepF	(X) _n - X - X ↓ X - (X) _n
Ενδοπεπτιδάση O	PepO	(X) _n - X ↓ X - (X) _n
Ενδοπεπτιδάση E	PepE	(X) _n - X ↓ X - (X) _n
Ενδοπεπτιδάση G	PepG	(X) _n - X ↓ X - (X) _n

*Η θέση στο δεσμό που υδρολύεται καταδεικνύεται από το βέλος

(Πηγή: Hutkins, 2001)

Οι ενδοκυτταρικές πεπτιδάσες των οξυγαλακτικών βακτηρίων χωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες, τις ενδοπεπτιδάσες και τις εξωπεπτιδάσες.

Οι ενδοπεπτιδάσες των οξυγαλακτικών βακτηρίων προκαλούν υδρόλυση των πεπτιδίων στο εσωτερικό τους (ενδόλυση). Οι κυριότερες ενδοπεπτιδάσες γαλακτικών βακτηρίων που έχουν χαρακτηριστεί είναι οι PepO, PepF, PepG και PepE με δράση πάνω στα υποστρώματα NH₂-X_n-X_n-COOH. Αρκετές ενδοπεπτιδάσες έχουν περιγραφεί, συμπεριλαμβανομένων των PepF και PepO σε *L. lactis* (Monnet et al., 1994) καθώς και των PepE, PepG και PepO σε *Lb. helveticus* (Christensen et al., 1999).

Μετά από ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας, στον Πίνακα 2.9. δίνεται το μεγαλύτερο μέρος της έρευνας σχετικά με τη μελέτη και τον χαρακτηρισμό ενδοπεπτιδασών γαλακτικών βακτηρίων.

Οι περισσότερες από τις ενδοπεπτιδάσες είναι μεταλλοπεπτιδάσες, οι οποίες περιέχουν αλληλουχίες στις οποίες μπορεί να προσδεθεί υδράργυρος και υδρολύουν oligopeptidα ποικίλου μήκους αλυσίδας προς μικρότερα πεπτιδία. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι μερικές ενδοπεπτιδάσες, όπως για παράδειγμα η PepF, έχουν βέλτιστο pH στο αλκαλικό εύρος 7.5-9.0 με αποτέλεσμα η δραστηριότητά τους στα τυπικά επίπεδα pH που επικρατούν κατά την ωρίμανση <pH 6.0 να είναι πολύ μικρή. Επιπλέον, είναι δυνατή στο γάλα η ανάπτυξη μεταλλαγμένων στελεχών χωρίς αυτές. Επομένως η συμβολή των πεπτιδασών αυτών στην ωρίμανση του τυριού είναι πολύ μικρή (Mireau et al., 1993; Monnetetal.,1994).

Πίνακας 2.9. Βιβλιογραφική ανασκόπηση σχετική με τη μελέτη και χαρακτηρισμό ενδοπεπτιδασών γαλακτικών βακτηρίων

Λακτοβάκιλλος	Ενδοπεπτιδάση	Υπόστρωμα	M.B.	pH	T (°C)	Υπομονάδες	Τάξη	Δημοσίευση
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> H61	Unclassified	Πεπτιδάση	98	7-7.5	40	1	M	Yan et al., 1987a
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> H61	Unclassified	α_{s1} -CN (1-23)	80	6	37	2	M	Yan et al., 1987b
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> Wg2	Unclassified	Met-enkephalin	70	6-6.5	30-38	1	M	Tan et al., 1991
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> HP	Unclassified	α_{s1} -CN (1-23)	180	8-9	42	>2	M	Baankreis, 1992
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> C13	Unclassified	α_{s1} -CN (1-23)	70	6-7	35	1	N	Baankreis, 1992
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> SK11	Unclassified	bradykinin	70	6	-	1	M	Pritchard et al., 1994
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MG 1363	Unclassified	α_{s1} -CN (1-23)	70	7.5	40	1	M	Stepniak & Fox, 1995
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> B14	Unclassified	Met-enkephalin	70	7.7	47	1	M	Bockelmann et al., 1997
<i>P. freudenreichii</i> ATCC 9614	Unclassified	bradykinin	44	6.5-8.0	45-50	1	M	Tobiassen et al., 1996
<i>Lb. paracasei</i> Lc01	Unclassified	bradykinin	140	8	40	>4	M	Tobiassen et al., 1997
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> NCDO 853	Unclassified	Ala-Pro-pNa	84	7.0	40		S	Fernandez-Espla & Fox, 1997
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MG1363	unclassified	Met-enkephalin	350	7	35	6-7	M	Stepaniak et al., 1998a
<i>P. freudenreichii</i> ATCC 9614	unclassified	bradykinin	120	6.7-7.5	40-50	1	M	Stepaniak et al., 1998b
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> P8-2-47	PepO	-	70	-	-	1	M	Mireau et al., 1993
<i>Lc. lactis</i>	PepO		71					Tynkkynen et al., 1993
<i>Lc. lactis</i>	PepO		70			1	M	Pritchard et al., 1994
<i>Lc. lactis</i>	PepO		71				M	Lian et al., 1996
<i>Lb. helveticus</i>	PepO		71				M	Chen & Steele, 1998
<i>S. thermophilus</i> A	PepO	Met-enkephalin	70	6.5	41	4	M	Chavagnat et al., 2000
<i>Lb. rhamnosus</i> HN001 (DR20)	PepO		70.9					Christensson et al., 2002

Λακτοβάκιλλος	Ενδοπεπτιδάση	Υπόστρωμα	M.B.	pH	T (°C)	Υπομονάδες	Τάξη	Δημοσίευση
<i>Lb. helveticus</i> CNRZ32	PepO2		71.4					Chen et al., 2003
<i>Lb. helveticus</i> CNRZ32	PepO3							Sridhar et al., 2005
<i>Lb. helveticus</i> WSU19	PepO, PepO2, PepO3							Soeryapranata et al., 2007
<i>Lc. lactis ssp. lactis</i> NCDO 763	PepFI	bradykinin	70	8	40	1	M	Monnet et al., 1994
<i>Lc. lactis</i>	PepFI		70					Nardi et al., 1997
<i>Lc. lactis</i>	PepF2		70					Nardi et al., 1997
<i>Lb. delbrueckii</i>	PepG		50				C	Klein et al., 1997
<i>Lb. helveticus</i> CNRZ32	PepE	Met-enkephalin	52	4.5	32-37	-	C	Fenster et al., 1997
<i>Lb. helveticus</i> CNRZ32	PepE2						C	Sridhar et al., 2005
<i>Lb. helveticus</i> WSU19	PepE						C	Soeryapranata et al., 2007

M: Μεταλλοπεπτιδάση, C: Κυστεϊνική πεπτιδάση, S: Σερινική πεπτιδάση

Παρακάτω αναλύονται οι σημαντικότερες των ενδοπεπτιδασών.

Ολιγοπεπτιδάση O - PepO

DATABANKS

MEROPS name: oligopeptidase O1

MEROPS classification: clan MA, subclan MA (E), family M13, peptidase M13.004

Species distribution: order Lactobacillales

Reference sequence from: *Lactococcus lactis* (UniProt: Q02VB0)

Η γενική ονομασία που χρησιμοποιείται για το συγκεκριμένο ένζυμο είναι ολιγοενδοπεπτιδάση (PepO) (Mierau et al., 1993), ακολουθώντας την πρόταση των Tan et al., (1993).

Η PepO είναι μονομερής ενδοπεπτιδάση μοριακής μάζας ~70 kDa και με ισοηλεκτρικό σημείο pI 4.3 (Tan et al., 1991, Stepaniak & Fox, 1995) και ανήκει στην κατηγορία των μεταλλοπεπτιδασών. Είναι αποτελεσματική στην υδρόλυση μεγάλων πεπτιδίων με μέγεθος από πέντε έως τουλάχιστον 30 υπολείμματα αμινοξέων, όπως του πενταπεπτιδίου Μετ-ενκεφαλίνη, της βαδουκίνης, της ουσίας P και του γλυκαγόνου. Δεν προκαλεί υδρόλυση των δι-, τρι και τετρα-πεπτιδίων (Monnet, 1994) καθώς και των α-, β- και κ-καζεϊνών (Baankreis et al., 1995; Stepaniak & Fox, 1995). Σύμφωνα με τους Baankreis et al., (1995), οι βέλτιστες συνθήκες για τη δράση του ενζύμου σε υπόστρωμα α_{S1}-CN(f1-23) είναι pH 5.5 και θερμοκρασία 50°C. Αντίθετα, οι Tan et al. (1991) και Stepaniak & Fox (1995), αναφέρουν ότι οι βέλτιστες θερμοκρασιακές συνθήκες κυμαίνονται στο εύρος 30-38°C για δράση του ενζύμου σε υπόστρωμα Μετ-ενκεφαλίνη και α_{S1}-CN (f1-23), αντίστοιχα.

Είναι η πρώτη ενδοπεπτιδάση όπου εντοπίστηκε η αλληλουχία του γονιδίου (Mireau et al., 1993). Τρία γονίδια της PepO έχουν κωδικοποιηθεί, τα *pepO*, *pepO2* και *pepO3*. Στα στελέχη *L. helveticus* τα γονίδια αυτά είναι όμοια· ωστόσο, διαφορετικότητα μπορεί να παρατηρηθεί λόγω της απώλειας της λειτουργικότητας του γονιδίου ή λόγω πολυμορφισμών της αλληλουχίας, τα οποία πιθανώς επιδρούν στην εξειδίκευση και τη σχετική δραστηριότητα των διαφορετικών πεπτιδασών (Broadbent et al., 2011). Ο βασικός ρόλος της PepO, συνδέεται με την υδρόλυση των καζεϊνών η οποία είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη των γαλακτόκοκκων στο γάλα. Τα ολιγοπεπτιδία αποτελούν την κύρια πηγή αζώτου για τους γαλακτόκοκκους στο γάλα (Juillard et al., 1995) και εφ' όσον γενετικές και βιοχημικές μελέτες έχουν δείξει ότι η PepO, όπως και άλλες πεπτιδάσες, βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα (Mireau et al., 1993; Pritchard et al., 1994; Tan et al., 1992a), το σύστημα μεταφοράς ολιγοπεπτιδίων (Opp) είναι μέγιστης σημασίας για την ανάπτυξη. Εκτός από την ανάπτυξη των λακτόκοκκων στο γάλα, η PepO φαίνεται να παίζει ρόλο στην ωρίμανση του τυριού. Σύμφωνα με τους Baankreis et al. (1995), σε μη ώριμο τυρί Gouda, η διάσπαση των καζεϊνών σε πεπτιδία φαίνεται να σχετίζεται με τη δραστηριότητα της PepO στο τυρί.

Ολιγοπεπτιδάση F - PepF

DATABANKS

MEROPS name: oligopeptidase F

MEROPS classification: clan MA, subclan MA (E), family M3, subfamily M3B, peptidase M03.007

Tertiary structure: Available

Species distribution: superkingdoms Archaea, Bacteria

Reference sequence from: *Lactococcus lactis* (UniProt: Q9CEV7)

Η παρουσία της ολιγοπεπτιδάσης F (PepF) πιθανότατα αναφέρθηκε για πρώτη φορά σε *Lactococcus lactis* με την ονομασία LEP I και στη συνέχεια ως alkaline endopeptidase. Οι Monnet et al. (1994),

κλωνοποίησαν γονίδιο της ολιγοπεπτιδάσης PepF και κατέγραψαν την αλληλουχία του. Τρία γονίδια της PepF έχουν κωδικοποιηθεί, τα *pepF*, *pepF1* και *pepF2*. Στον *L. lactis*, η *pepF1* συναντάται πάνω σε χρωμόσωμα, ενώ η *pepF2* πάνω σε πλασμίδιο. Η θέση της *pepF2* εξηγεί και την παρουσία της ή απουσία της μεταξύ των διαφορετικών στελεχών λακτόκοκκων (Liu et al., 2010).

Η PepF αποτελεί μονομερή μεταλλοπεπτιδάση μοριακής μάζας 90 kDa (Monnet et al., 1994) προσδιορισμένη μέσω μοριακής διήθησης ή με μοριακή μάζα 70 kDa βάσει του μεγέθους του αντίστοιχου γονιδίου. Θεωρείται υπεύθυνη για την υδρόλυση πεπτιδίων με 5-23 αμινοξέα με ευρεία ειδικότητα, σε αντίθεση με την PepO. Η PepF από *Lactobacillus helveticus* υδρολύει ένα πεπτίδιο πικρής γεύσης σε διάφορα σημεία (Sridhar et al., 2005). Δεν προκαλεί υδρόλυση μικρότερων ή μεγαλύτερων πεπτιδίων (Baankreis et al., 1995). Η PepF δεν μπορεί να υδρολύσει τη Μετενκεφαλίνη, σε αντίθεση με την PepO, για την οποία αποτελεί πολύ καλό υπόστρωμα. Οι βέλτιστες συνθήκες για τη δραστηριότητα της PepF είναι pH 7-9 και θερμοκρασία ~40°C. Η PepF απενεργοποιείται σε θερμοκρασία πάνω από 55°C (Asdornithee et al., 1995; Chao et al., 2006).

Η ολιγοπεπτιδάση F βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα του *L. lactis*, ο οποίος χρησιμοποιείται ευρέως στην τεχνολογία παρασκευής τυριού. Ωστόσο, δε φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην υδρόλυση των πεπτιδίων καζεΐνης κατά την διάρκεια της ωρίμανσης τυριού (Baankreis et al. 1995), αν και μπορεί να υδρολύσει τουλάχιστον ένα πεπτίδιο β-καζεΐνης (Sridhar et al., 2005). Δεδομένου ότι η PepF είναι ευρέως διαδεδομένη μεταξύ των βακτηρίων, πιθανότατα εμπλέκεται σε μια λειτουργία απαραίτητη σε όλα τα βακτήρια. Μέσω στατιστικής ανάλυσης ετερογενών δεδομένων, οι Lopez-Kleine et al. (2008), ανέφεραν ένα ρόλο της PepF από *L. lactis*, στην αποικοδόμηση πεπτιδίων (signal peptides).

Ολιγοπεπτιδάση E - PepE

DATABANKS

MEROPS name: oligopeptidase E

MEROPS classification: clan CA, family C1, subfamily C1B, peptidase C01.088

Species distribution: known only from *Lactobacillus helveticus*

Reference sequence from: *Lactobacillus helveticus*

(UniProt: P94870)

Η ολιγοπεπτιδάση E ή χάρη ευκολίας PepE, αποτελεί ενδοπεπτιδάση εξαρτώμενη της θειόλης και απουσιάζει από λακτόκοκκους και στρεπτόκοκκους. Έχει βέλτιστη θερμοκρασία στο εύρος 32-37°C και βέλτιστο pH 4.5, ενώ εμφανίζεται να χάνει τη δραστηριότητά της σε τιμές pH κάτω από 3.5 και πάνω από 7.5. Το γονίδιο *pepE* αποτελείται από μία αλληλουχία 1314 νουκλεοτιδίων, η οποία κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη μοριακής μάζας 52.1 kDa (Fenster et al., 1997).

Έχει απομονωθεί από *Lb. helveticus* CNRZ32 και αναγνωρίστηκε μετά από υδρόλυση των N-τερματικών και C-τερματικών ομάδων του υποστρώματος N-benzoyl-Phe-Val-Arg-pNa (Fenster et al., 1997). Η αλληλουχία των αμινοξέων της φαίνεται να εμφανίζει ομοιότητα με της PepC από *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* DSM7290 (Klein et al., 1994a), *Lb. helveticus* CNRZ32 (Fernandez et al., 1994; Vesanto et al., 1994), *S. thermophilus* CNRZ302 (Chapot-Chartier et al., 1994) και *Lc. lactis* subsp. *cremoris* AM2 (Chapot-Chartier et al., 1993) σε ποσοστό 41.7, 40.8, 39.1 και 37.4%, αντίστοιχα καθώς και με την PepG από *L. delbrueckii* DSM7290, με ποσοστό ομοιότητας 72.3% (Klein, et al., 1997). Οι γενικές ιδιότητες του ενζύμου δείχνουν διαφορετικότητα συγκριτικά με τις υπόλοιπες μεταλλο-ενδοπεπτιδάσες που έχουν χαρακτηριστεί από τα γαλακτικά βακτήρια. Σε γαλακτοβάκιλους δύο γονίδια έχουν περιγραφεί για την PepE, τα *pepE* και *pepE2*. Η PepE από *Lb.*

helveticus φαίνεται ότι έχει σημαντικό ρόλο στην λειτουργία αποπύκνωσης του τυριού (Broadbent et al., 2011).

PepG

Η PepG όπως και η PepC, αποτελεί ενδοπεπτιδάση εξαρτώμενη της θειόλης. Έχει απομονωθεί από *Lb. delbrueckii* (Klein et al., 1997). Η μοριακή της μάζα αντιστοιχεί στα ~50 kDa. Εμφανίζει βέλτιστες συνθήκες δράσης σε θερμοκρασία 50-55°C και pH 6-8. Απουσιάζει από λακτόκοκους και στρεπτόκοκους.

Οι **εξωπεπτιδάσες των οξυγαλακτικών βακτηρίων** βρίσκονται στο ενδοκυτταρικό περιβάλλον των οξυγαλακτικών βακτηρίων, διασπούν ένα ή δύο αμινοξέα από την άκρη του πεπτιδίου και για τη δράση τους απαιτείται η ύπαρξη ενός ελεύθερου αμινοτελικού άκρου. Μετά από ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας, στον Πίνακα 2.10. παρουσιάζεται το μεγαλύτερο μέρος των ευρημάτων της έρευνας σχετικά με τη μελέτη και τον χαρακτηρισμό των εξωπεπτιδασών των γαλακτικών βακτηρίων.

Πίνακας 2.10. Βιβλιογραφική ανασκόπηση σχετική με τη μελέτη και χαρακτηρισμό εξωπεπτιδασών γαλακτικών βακτηρίων

	Υπόστρωμα	M.B.	pH	T (°C)	Υπομονάδες	Τάξη	Δημοσίευση
Aminopeptidase A - PepA							
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> HP	Glu-pNA	130	-	50-55	3	*M	Exterrkate & de Veer 1987
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 712	Glu-pNA	245	8	65	6	M	Niven, 1991
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> HP	Glu-pNA	520	8	50	~10	M	Baankreis, 1992
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> AM2	Asp-pNA	240	-	-	6	M	Bacon et al., 1994
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MG1363	Glu-pNA	-	-	-	-	M	I' Anson et al., 1995
<i>Str. thermophilus</i> CNRZ 302	Asp-pNA	360	8.5	62	8	M	Rul et al., 1995
<i>Str. pneumonia</i> R6	-	-	-	-	-	-	Kim et al., 2010
Aminopeptidase P - PepP							
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 763	Βραδυκινίνη	43	8.0	37	1	M	Mars & Monnet 1995
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> AM2	Leu-Pro-Pro	41	8.5	-	1	M	McDonnell et al., 1997
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	-	43	-	-	1	M	Matos et al., 1998
Leucyl aminopeptidase (PepL)							
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> DSM7290	Leu-βNA	35	-	-	-	-	Klein et al., 1995
<i>Lb. sake</i> IATA115	Leu-pNA	35-36	7.5	37	1	*C	Sanz & Toldra, 1997
<i>Lb. curvatus</i> DPC2024	Leu-pNA	64	7	40	2	C	Magboul & McSweeney, 1999b
Aminopeptidase C (PepC)							
<i>Lb. delbrueckii</i>		54			4	C	Wohlrab & Bockelmann, 1993
<i>Lb. delbrueckii</i>		51				C	Klein et al., 1994a
<i>Lb. helveticus</i>		49				C	Fernandez et al., 1994
<i>Lb. helveticus</i>		51				C	Vesanto et al., 1994
<i>Lb. helveticus</i>		50			4	C	Fernandez de Palencia, 2000

	Υπόστρωμα	M.B.	pH	T (°C)	Υπομονάδες	Τάξη	Δημοσίευση
	<i>Lc. lactis</i>	50			6	C	Neviani et al., 1989
	<i>Lc. lactis</i>	50				C	Chapot-Chartier et al., 1993
	<i>Lc. lactis</i>	50			6		Mistou et al., 1994
	<i>Str. thermophilus</i>	50			6	C	Chapot-Chartier et al., 1994
Aminopeptidase N (PepN)							
	<i>Lb. casei</i>	95			1	M	Fernandez de Palencia et al., 1997
	<i>Lb. casei</i>	87			1	M	Arora & Lee, 1992
	<i>Lb. rhamnosus</i>	89			1	M	Arora & Lee, 1994
	<i>Lb. delbrueckii</i>	98			1	M	Tsakalidou et al., 1993
	<i>Lb. delbrueckii</i>	95			-	M	Bockelmann et al., 1992
	<i>Lb. delbrueckii</i>	95			1	M	Klein et al., 1993
	<i>Lb. helveticus</i>	97			1	M	Khalid & Marth, 1990a
	<i>Lb. helveticus</i>	96			-	M	Christensen et al., 1995
	<i>Lb. helveticus</i>	97			1	M	Blanc et al., 1993
	<i>Lb. helveticus</i>	92			1	M	Miyakawa et al., 1992
	<i>Lb. helveticus</i>	95			1	M	Sasaki et al., 1996
	<i>Lb. helveticus</i>	96			-	M	Varmanen et al., 1994
	<i>Lb. lactis</i>	78			1	M	Eggimann & Bachmann, 1980
	<i>Lb. sanfrancisco</i>	75			1	M	Gobbetti et al., 1996
	<i>Lc. lactis</i>	95			-	M	Exterkate et al., 1992
	<i>Lc. lactis</i>	95			1	-	Van Alen-Boerrigter et al., 1991
	<i>Lc. lactis</i>	95			-	M	Stroman, 1992
	<i>Lc. lactis</i>	95			1	M	Tan & Konings, 1990

	Υπόστρωμα	M.B.	pH	T (°C)	Υπομονάδες	Τάξη	Δημοσίευση
<i>Lc. lactis</i>		95			-	M	Tan et al., 1992b
<i>Lc. lactis</i>		85			-	M	Desmazeaud & Zevaco, 1979
<i>S. thermophilus</i>		92			1	M	Tsakalidou & Kalantzopoulos, 1992
<i>S. thermophilus</i>		97			1	M	Rul et al., 1994
<i>S. thermophilus</i>		98			1	M	Midwinter & Pritchard, 1994
<i>S. thermophilus</i>		89			1	M	Tsakalidou et al., 1993
<i>L. helveticus</i> CNRZ32							Christensen, 1999
X-Prolyl dipeptidyl aminopeptidase – PepX							
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> H1	X-Pro-pNA	150			2	*S	Lloyd & Pritchard, 1991
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> P8-2-47	X-Pro-pNA	180			2	S	Kiefer-Partsch et al., 1989
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NCDO 763	Arg-Pro-pNA	190			2	S	Zevaco et al., 1990
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> AM2	Gly-Pro-AMC	117			2	S	Booth et al., 1990b
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> nTR	-	88			2	S	Yan et al., 1991
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> Wg2	-	-			-	S	Tan et al., 1992a
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Ala-Pro-pNA	175			-	S	Chich et al., 1995
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	Gly-Pro-AMC	165			2	S	Meyer & Jordi, 1987
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> CNRZ 397	X-Pro-pNA	82			2	S	Atlan et al., 1990
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> B14	Ala-Pro-pNA	170-200			2	S	Bockelmann et al., 1991
<i>Lb. acidophilus</i> 357	Ala-Pro-pNA	170-200			2	S	Bockelmann et al., 1991
<i>Lb. helveticus</i> CNRZ 32	X-Pro-pNA	72			1	S	Khalid & Marth, 1990b
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> LBU 147	Gly-Pro-pNA	270			3	S	Miyakawa et al., 1991
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i> LLG	Gly-Pro-pNA	79			1	S	Habibi-Najafi & Lee, 1994
<i>Lb. helveticus</i> 53/7	Gly-Pro-pNA	165			2	S	Vesanto et al., 1995

	Υπόστρωμα	M.B.	pH	T (°C)	Υπομονάδες	Τάξη	Δημοσίευση
<i>Lb. helveticus</i> ITG LH1	Gly-Pro-pNA	140			1	S	Degraeve & Martial-Gros, 2003
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> DSM7290	Ala-Pro-pNA	95			1	S	Meyer-Barton et al., 1993
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i> IFPL731	Arg-Pro-pNA	67			1	S	Fernandez-Espla et al., 1997a
<i>Lb. helveticus</i> LHE-511	Gly-Pro-pNA	93-87			1	S	Miyakawa et al., 1994
<i>Lb. curvatus</i> DPC2024	Ala-Pro-pNA	200			2	S	Magboul & McSweeney, 2000
<i>Sc. thermophilus</i>	Gly-Pro-pNA	165			2	S	Meyer & Jordi, 1987
<i>Sc. thermophilus</i> ACA-DC 4	X-Pro-pNA	160			2	S	Tsakalidou et al., 1998
<i>Sc. Macedonicus</i> ACA-DC 191	Gly-Pro-pNA	167			2	S	Georgalaki et al., 2002
<i>Lactococcus lactis</i>							Rigolet et al., 2002
Prolinase - PepR							
<i>Lb. helveticus</i> CNRZ323	Pro-Leu	35			-	T/S	Dudley & Steele, 1994
<i>Lb. helveticus</i> 53/7	Pro-Leu	35			-	T/S	Varmanen et al., 1996a
<i>Lb. helveticus</i> CNRZ323	Pro-Leu	125			4	S	Shao et al., 1997
<i>Lb. rhamnosus</i> 1/6	Pro-Leu	34			-	S	Varmanen et al., 1998
Prolidase - PepQ							
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> H61	Leu-Pro	43			1	M	Kaminogawa et al., 1984
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> AM2	Leu-Pro	42			1	M	Booth et al., 1990c
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> DSM7290	-	-			-	-	Stuckey et al., 1995
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i> IFPL 731	Leu-Pro	41			1	M	Fernandez-Espla et al., 1997b
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> CNRZ 397	-	-			-	-	Morel et al., 1999
Dipeptidase PepV							
<i>Lc. lactis</i> CNRZ267	Leu-Leu	51			1	M	Desmazeaud & Zevaco, 1977
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> H61	Leu-Gly	100			-	M	Hwand et al., 1981

	Υπόστρωμα	M.B.	pH	T (°C)	Υπομονάδες	Τάξη	Δημοσίευση
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> Wg2	Dipeptides	49			1	M	Van Boven et al., 1988
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> B14	Leu-Leu	51			1	M	Wohlrab & Bockelmann, 1992
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> DSM7290	B-Ala-Ala	52			-	M	Vongeichten et al., 1994
<i>Lb. sake</i> L110	Leu-Gly	50			1	M	Montel et al., 1995
<i>Lb. helveticus</i> SBT2171	Leu-leu	50			1	M	Tan et al., 1995
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i> IFPL 731	Leu-Leu	46			1	M	Fernandez-Espla & Martin-Hernandez, 1997
<i>Lb. curvatus</i> DPC2024	Leu-Leu	52			1	M	Magboul & McSweeney, 1999c
Dipeptidase PepD							
<i>Lb. helveticus</i> CNRZ32	Leu-Leu	54			-	-	Dudley et al., 1996
<i>Lb. helveticus</i> 53/7	Gly-Try	420			8	*T	Vesanto et al., 1996
Tripeptidases							
<i>Lc. lactis</i> subsp. CNRZ267	Tripeptides	75			-	M	Desmazeaud & Zevaco, 1979
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> Wg2(PepT)	Leu-Leu-Leu	103-105			2	M	Bosman et al., 1990
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> AM2 (PepT)	Tripeptides	105			2	M	Bacon et al., 1993
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> IMN-C 12	Leu-Leu-Leu	72			3	T/M	Sahlstorm et al., 1993
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> B14	Leu-Gly-Gly	85			3	M	Bockelmann et al., 1995
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> B14	Leu-Gly-Gly	77			2	M	Bockelmann et al., 1997
<i>Lb. sake</i> IATA115	Ala-Ala	55			1	M	Sanz et al., 1998
<i>Lb. helveticus</i>	Met-Cly-Gly	150			3	M	Savijoki & Palva, 2000
PCP							
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> HP	Pyr-pNA	-			-	-	Exterkate, 1977
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> HP	Pyr-pNA	80			2	S	Baankreis, 1992

	Υπόστρωμα	M.B.	pH	T (°C)	Υπομονάδες	Τάξη	Δημοσίευση
Pro-iminopeptidase - PepI							
	<i>Lb. delbrueckii</i>	33			-	S	Atlan et al., 1994
	<i>Lb. delbrueckii</i>	34			3	S	Gilbert et al., 1994
	<i>Lb. delbrueckii</i>	33			-	S	Klein et al., 1994b
	<i>Lb. helveticus</i>	34			2	S	Varmanen et al., 1996b

*M: Μεταλλο-πεπτιδάση (Metallo-peptidase), C: Κυστεϊνική πεπτιδάση (Cystein-peptidase), S: Σερινική πεπτιδάση (Serine-peptidase), T: Πεπτιδάση θρεονίνης (Threonin-peptidase)

Όπως προαναφέρθηκε, οι εξωπεπτιδάσες ταξινομούνται ανάλογα με την ειδίκευσή τους σε αμινοπεπτιδάσες, διπεπτιδάσες και τριπεπτιδάσες.

Οι **αμινοπεπτιδάσες** υδρολύουν το αμινοτελικό άκρο του ολιγοπεπτιδίου NH₂-X-X_n-COOH προς απελευθέρωση αμινοξέων. Όπως προαναφέρθηκε οι αμινοπεπτιδάσες χωρίζονται σε δύο περαιτέρω κατηγορίες. Στις γενικές αμινοπεπτιδάσες (general aminopeptidases) οι οποίες έχουν ευρεία δράση και στις ειδικές αμινοπεπτιδάσες (specified aminopeptidases) των οποίων η δράση είναι πιο εξειδικευμένη (Mireau et al., 1997). Οι γενικές αμινοπεπτιδάσες υδρολύουν πεπτίδια 2 έως 12 αμινοξέων και γενικά έχουν μικρή δράση σε πεπτίδια προλίνης. Η β-καζεΐνη είναι πλούσια σε προλίνη, για το λόγο αυτό τα ολιγοπεπτιδία που παράγονται (PrP-generated oligopeptides) περιέχουν προλίνη. Οι ειδικές προλυλ-πεπτιδάσες θεωρούνται πολύ σημαντικές καθώς άλλες πεπτιδάσες δε μπορούν να υδρολύσουν ικανοποιητικά τα προλυλ-πεπτιδία εξαιτίας της δομής της προλίνης (Upadyay et al., 2004; Mc Sweeney, 2007). Οι ειδικές αμινοπεπτιδάσες, σε αντίθεση με τις γενικές αμινοπεπτιδάσες μπορούν και υδρολύουν τα πεπτίδια που περιέχουν προλίνη.

Οι γενικές και ειδικές πεπτιδάσες είναι πολύ σημαντικές, αφού αρκετά ολιγοπεπτιδία είναι υπεύθυνα για την πικρή γεύση στο τυρί σε περίπτωση που αυτά δε διασπαστούν. Οι σημαντικότερες εξ' αυτών αναλύονται παρακάτω.

Αμινοπεπτιδάσες γενικής δράσης

PepN (Lysyl Aminopeptidase)

DATABANKS

MEROPS name: lysyl aminopeptidase (bacteria)

MEROPS classification: clan MA, subclan MA(E), family M1, peptidase M01.002

Species distribution: phylum Firmicutes

Reference sequence from: *Lactococcus lactis* (UniProt: A2RI32)

Η PepN αποτελεί λύσυλ-αμινοπεπτιδάση γενικής δράσης και ανήκει στις μεταλλο-πεπτιδάσες. Η πιο κοινή ονομασία για το ένζυμο είναι peptidase N (PepN) και ανήκει στην οικογένεια M1 η οποία συμπεριλαμβάνει ένζυμα βακτηρίων, μυκήτων και θηλαστικών. Η ονομασία αυτή χρησιμοποιείται για την περιγραφή αμινοπεπτιδασών οι οποίες υδρολύουν τα αμινοακυλικά β-ναφθυλαμίδια (aminoacyl β-naphthylamides) (το N προέκυψε από το ναφθυλαμίδιο). Η PepN συναντάται στα περισσότερα στελέχη των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Έχει απομονωθεί και χαρακτηριστεί από στελέχη *Lb. casei*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. helveticus*, *Lc. lactis* και *S. thermophilus* (Πίνακας 2.10).

Έχει την ικανότητα να υδρολύει ένα μεγάλο εύρος πεπτιδίων με διαφορές τόσο στο μέγεθος όσο και στη σύσταση των αμινοξέων (Niven et al., 1995, Sasaki et al., 1996) κυρίως υποστρώματα με βασικό ή υδρόφοβο υπόλειμμα. Πιο συγκεκριμένα η δραστηριότητα της PepN σε υποστρώματα AA-ρNA υποδεικνύει τη μέγιστη εξειδίκευση της αμινοπεπτιδάσης για τα βασικά αμινοξέα Lys και Arg, ενώ ακολουθούν τα αμινοξέα με τα υδρόφοβα υπολείμματα Leu και Ala. Σημαντική δραστηριότητα έχει παρατηρηθεί επίσης ως προς τα υποστρώματα Met και Phe- ρNA. Η PepN δεν υδρολύει υποστρώματα που περιέχουν γλουταμινικό οξύ (Glu- ρNA), ασπαρτικό οξύ (Asp-ρNA) ή προλίνη (Gly-ρNA) στο αμινοτελικό άκρο ή διπεπτιδία με προλίνη (Miyakawa et al., 1992; Tan et al., 1993). Σύμφωνα με τους Klein et al., (1993), οι οποίοι μελέτησαν την υδρόλυση χρωμοφόρων_NHPhNO₂ αναλόγων διπεπτιδίων από καθαρή PepN από *L. delbrueckii* subsp. *lactis* παρατηρήθηκε προτίμηση της PepN στα υποστρώματα με σειρά Lys↓ > Leu↓ > Ala↓ > Phe↓ > Pro↓ > Tyr↓ > Gly↓.

Η PepN από λακτόκοκκο εμφανίζει βέλτιστη θερμοκρασία δράσης στους 40°C, ενώ η PepN από *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, εμφανίζεται πιο θερμοάντοχη με βέλτιστη θερμοκρασία δράσης τους 50°C και pH 6.5-7.0 και παράλληλα εμφανίζει και 8 φορές υψηλότερη αποτελεσματικότητα στα υποστρώματα Lys↓NHPhNO₂.

Οι περισσότερες από τις PepN αποτελούν μονομερείς πρωτεΐνες με μοριακή μάζα που κυμαίνεται στο εύρος 95-97 kDa. Έχουν αναγνωριστεί ως μέλη της οικογένειας M1 των πεπτιδασών με παρουσία μιας προστατευμένης αμινοτελικής περιοχής που αποτελείται από 393 αμινοξέα. Μεταξύ των οξυγαλακτικών βακτηρίων, οι αλληλουχίες των αμινοξέων των PepN είναι καλά προστατευμένες καθ' όλη την έκταση των 845 υπολειμμάτων. Οι PepN προερχόμενες από *L. lactis* subsp. *cremoris* WG2 (Stroman, 1992) MG1363 και (Tan et al., 1992b) διαφέρουν σε πέντε αμινοξέα, ενώ οι PepN από *L. helveticus* CNRZ32 (Christensen et al., 1999) και 57/3 (Varmanen et al., 1994) διαφέρουν σε έξι αμινοξέα.

Η PepN φαίνεται να έχει βασικό ρόλο στο μεταβολισμό αφού συμμετέχει στην παροχή αζώτου. Σύμφωνα με τους Mireau et al., (1996), η απενεργοποίηση μόνο της PepN από *L. lactis* οδήγησε σε σημαντική μείωση του ρυθμού ανάπτυξής του. Επίσης η PepN φαίνεται ότι έχει σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση του χαρακτηριστικού flavor του τυριού. Ο Baankreis, (1992) παρατήρησε έντονη πικρή γεύση σε τυρί το οποίο παρασκευάστηκε με στέλεχος *Lactococcus* το οποίο δεν περιείχε PepN, χαρακτηριστικό το οποίο δεν εμφανίστηκε σε παρασκευασμένο τυρί με στέλεχος το οποίο περιείχε PepN. Σύμφωνα με τους Tan et al., (1993), η υδρόλυση πεπτιδίων με υδρόφοβο αμινοτελικό άκρο θεωρείται ότι συμβάλλει στη μείωση της πικρής γεύσης, η οποία στο τυρί προέρχεται κατά κανόνα από την αποδόμηση της β-καζεΐνης.

PepC (Aminopeptidase C)

DATABANKS

MEROPS name: aminopeptidase C

MEROPS classification: clan CA, family C1, subfamily

C1B, peptidase C01.086

Species distribution: superkingdom Bacteria

Reference sequence from: *Lactococcus lactis* (UniProt: Q04723)

Η PepC έχει απομονωθεί και χαρακτηριστεί από στελέχη *Lb. delbrueckii*, *Lb. helveticus*, *Lc. lactis* και *S. thermophilus* (Πίνακας 2.10). Ανήκει στις γενικές αμινοπεπτιδάσες και αποτελεί ανεξάρτητη μεταλλοπεπτιδάση (Kunji et al., 1996). Οι PepCs από στελέχη *Lactococcus* και *Lactobacillus* έχουν χαρακτηριστεί ως πολυμερικές αμινοπεπτιδάσες εξαρτώμενες της θειόλης, η δράση των οποίων παρεμποδίζεται από p-chloromercuribenzoate και ιωδοακεταμίδιο (Neviani et al., 1989; Wohlrab & Bockelmann, 1993; Fernandez de Palencia et al., 1997). Το ένζυμο έχει κατηγοριοποιηθεί στις κυστεϊνικές πεπτιδάσες λόγω της παρόμοιας αλληλουχίας με την παπαΐνη γύρω από το καταλυτικό μέρος των υπολειμμάτων (Chapot-Chartier et al., 1993). Το γράμμα C του γονιδίου *pepC* αφορά το υπόλειμμα 'Cys' του καταλυτικού μέρους με αποτέλεσμα η ονομασία PepC να θεωρείται κατάλληλη για το ένζυμο (Tan et al., 1993).

Η PepC εμφανίζει ευρεία εξειδίκευση. Σημαντική δραστηριότητα έχει παρατηρηθεί στα υποστρώματα AA-βNAP τα οποία περιέχουν τα βασικά αμινοξέα Arg, His και Lys, τα όξινα αμινοξέα Glu και Asp και τα αρωματικά Phe. Επιπλέον εμφανίζει ιδιαίτερα υψηλή δραστηριότητα σε συνθετικά υποστρώματα τα οποία περιέχουν υδρόφοβα μη φορτισμένα αμινοξέα (Ala και Leu). Η δραστηριότητα εμφανίζεται χαμηλή σε πεπτιδά με θετικά φορτισμένα υπολείμματα αμινοξέων (Neviani et al., 1989;

Wohlrab & Bockelmann, 1993; Fernandez de Palencia et al., 1997; Mistou & Gripon, 1998). Η PepC από λακτόκοκκο μπορεί και υδρολύει πεπτιδία αποτελούμενα από 2-10 υπολείμματα αμινοξέων, ενώ εμφανίζει μέγιστη δραστηριότητα έναντι των πεπτιδίων με 4 υπολείμματα (Mistou & Gripon, 1998). Το γονίδιο *pepC* από λακτόκοκκο κωδικοποιεί ένα πολυπεπτιδίο αποτελούμενο από 436 υπολείμματα αμινοξέων. Το ένζυμο είναι κυταροπλασματικό και δεν περιέχει δισουλφιδικούς δεσμούς. Έχει μοριακή μάζα στα 49.83 kDa και ισοηλεκτρικό σημείο pI 4.6.

Η PepC φαίνεται ότι συμμετέχει στο μεταβολισμό του αζώτου από το μικροοργανισμό *L. lactis* κατά την ανάπτυξή του σε γάλα, απελευθερώνοντας αμινοξέα από πεπτιδία των κυττάρων (Mierau et al., 1996).

Αμινοπεπτιδάσες με ειδική δράση

PepA

DATABANKS

MEROPS name: glutamyl aminopeptidase (bacterium)

MEROPS classification: clan MH, family M42, peptidase M42.001

Tertiary structure: Available

Species distribution: superkingdoms Archaea, Bacteria

Reference sequence from: *Lactococcus lactis* (UniProt: Q48677)

Η δραστηριότητα της γλουταμυλ- αμινοπεπτιδάσης παρατηρήθηκε πρώτη φορά σε λακτόκοκκο κατά τη διάρκεια πειραμάτων σε διάφορα υποστρώματα για τον προσδιορισμό της γενικής πεπτιδολυτικής ικανότητας των γαλακτικών βακτηρίων εκκίνησης. Για παράδειγμα οι Sullivan et al. (1975), ανέφεραν υδρόλυση του συνθετικού υποστρώματος Glu↓NH₂Nap από *Streptococcus cremoris*. Ο Exterkate (1984), πιθανώς είναι ο πρώτος που οι μελέτες του σχετίζονται με τη γλουταμυλική πεπτιδάση ως διακριτό συστατικό του πεπτιδολυτικού συστήματος.

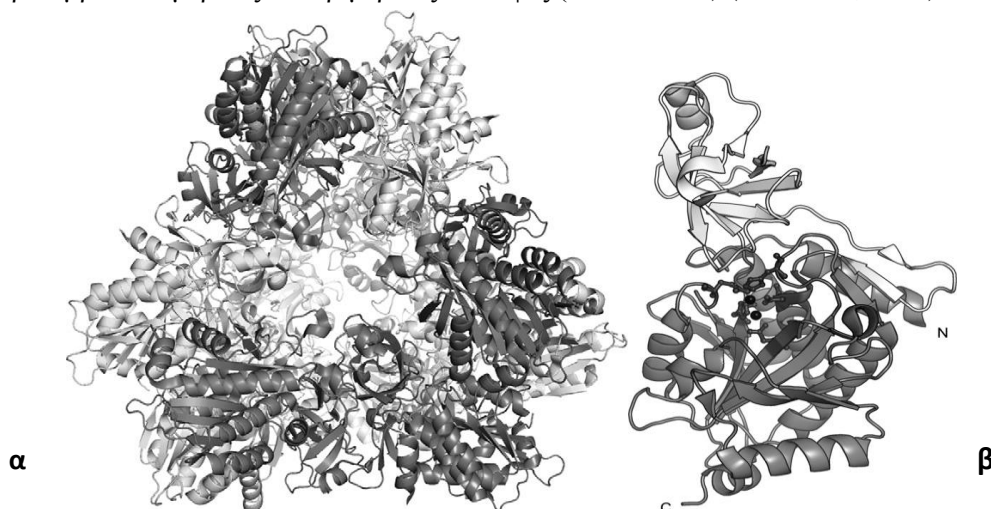
Όσον αφορά την ονοματολογία, από τους Tan et al. (1993), προτάθηκε η ονομασία γλουταμυλ-αμινοπεπτιδάση (glutamyl aminopeptidase (GAP)). Σύμφωνα όμως με το σύστημα, συνιστάται σε ένζυμα τα οποία έχουν γενετικά χαρακτηριστεί να δίνεται ένα αρχικό γράμμα το οποίο ακολουθεί τη συντομογραφία 'Pep'. Έτσι μετά την κλωνοποίηση του γονιδίου και την καταγραφή της αλληλουχίας των αμινοξέων από τους I'Anson et al. (1995), οι ονομασίες αμινοπεπτιδάση A και PepA θεωρήθηκαν καταλληλότερες όσον αφορά την ονοματολογία.

Η PepA είναι πολυμερής αμινοπεπτιδάση με ειδική δράση, η οποία ως γλουταμυλική πεπτιδάση απελευθερώνει υπολείμματα γλουταμινικού οξέος (Glu) αλλά και ασπαρτικού οξέος (Asp) από το αμινοτελικό άκρο των δι-, τρι- και ολιγοπεπτιδίων τα οποία περιέχουν μέχρι δέκα αμινοξέα (Exterkate & de Veer, 1987; Niven, 1991; Bacon et al., 1994; Liu et al., 2010).

Η αλληλουχία του γονιδίου της PepA από *Lactococcus lactis* υποδηλώνει μοριακή μάζα υπομονάδας στα 38.1 kDa ενώ τιμές 40-43 kDa προέκυψαν μετά από SDS-PAGE του καθαρού ενζύμου (Niven, 1991). Οι Niven (1991) και Bacon et al. (1994), εφάρμοσαν χρωματογραφία μοριακής διήθησης υπό συνθήκες μη μετουσίωσης και πρότειναν ότι πρόκειται για εξαμερή πεπτιδάση μοριακής μάζας περίπου 240 kDa. Επίσης στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί μοριακές μάζες PepA στα 130 kDa (Exterkate & de Veer, 1987) και 440-520 kDa (Baankreis, 1992) για το native ένζυμο.

Το ισοηλεκτρικό σημείο pI της PepA έχει προσδιοριστεί από τους Exterkate & de Veer (1987), ίσο με 4.35 και οι βέλτιστες συνθήκες για τη δράση της σε pH 8.0 και θερμοκρασία 50-65°C.

Πρόσφατα, ανασυνδυασμένη PepA από *Streptococcus pneumoniae* R6 (SpGAP), παράχθηκε με χρήση *Escherichia coli* και χαρακτηρίστηκε βιοχημικά (Kim et al., 2010). Από τη μελέτη της κρυσταλλικής δομής της SpGAP προέκυψε ένα δωδεκαμερικό ολιγομερές, με τετραεδρικό σχήμα κατασκευής το οποίο περιλαμβάνει διμερικές και τριμερικές διεπαφές (Εικόνα 2.5α) (Kim et al., 2010).



Εικόνα 2.5. α) Απεικόνιση δωδεκαμερούς γλουταμυλ- αμινοπεπτιδάσης από *Streptococcus pneumoniae* R6 (PDB ID: 3KL9). Οι δώδεκα υπομονάδες απεικονίζονται με διαφορετικές αποχρώσεις του γκρι και β) Απεικόνιση του μονομερούς της γλουταμυλικής αμινοπεπτιδάσης από *Streptococcus pneumoniae* R6 (PDB ID: 3KL9). Ο διμερισμός και οι καταλυτικές περιοχές εμφανίζονται με ανοιχτό και σκούρο γκρι, αντίστοιχα.

Η υπομονάδα της SpGAP, της οποίας η μοριακή μάζα υπολογίστηκε στα 38.02 kDa, χωρίζεται σε δύο σφαιρικά πεδία: ένα πεδίο διμερισμού κι ένα καταλυτικό πεδίο (Εικόνα 2.5β) κι έχει τις πρωτεάσες της οικογένειας M42 προστατευμένες σε όλη την πτυχή (PDB ID: 1VHE, 2CF4, 1XFO, 1YOR, 3CPX και 2WZN).

Μελέτη της SpGAP μέσω χρωματογραφίας μοριακής διήθησης και μέσω ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, επιβεβαίωσαν τη δωδεκαμερική κατάσταση του ενζύμου σε φυσιολογικές συνθήκες.

Η PepA γενικώς θεωρείται συστατικό του πολυενζυμικού πρωτεολυτικού συστήματος των οξυγαλακτικών βακτηρίων, ο βιολογικός ρόλος της οποίας είναι η παροχή αμινοξέων για την ανάπτυξή τους. Ωστόσο σύμφωνα με τους I'Anson et al. (1995), η ανάπτυξη του λακτόκοκκου στο γάλα δεν εξαρτάται από την ύπαρξη της PepA αφού οι ρυθμοί ανάπτυξης παραλλαγής λακτόκοκκου που δεν την περιείχε και του δείγματος αναφοράς δε διέφεραν. Ίδιες παρατηρήσεις προέκυψαν και από τους Mierau et al. (1996), οι οποίοι μελέτησαν αρκετές άλλες πεπτιδάσες και κατέληξαν ότι καμία από τις μελετώμενες πεπτιδάσες από μόνη της δεν έχει ουσιώδη επίδραση στην ανάπτυξη, η οποία επηρεάζεται μόνο όταν υπάρχουν πολλαπλές απώλειες πεπτιδασών.

Υπάρχει ωστόσο και τεχνολογικό ενδιαφέρον αφού το γλουταμινικό οξύ βελτιώνει το flavor, με αποτέλεσμα η δράση της PepA στο τυρί να θεωρείται πολύ σημαντική (McGugan et al., 1979; Aston & Creamer, 1986; Engels & Visser, 1994; Fox et al., 1994). Παρ' όλ' αυτά ο ακριβής ρόλος της PepA στην ανάπτυξη του αρώματος του τυριού δεν είναι ξεκάθαρος.

PepP

DATABANKS

MEROPS name: lactobacillus Xaa-Pro aminopeptidase

MEROPS classification: clan MG, family M24, subfamily M24B, peptidase M24.006

Species distribution: superkingdom Bacteria

Reference sequence from: *Lactobacillus delbrueckii*

(UniProt: P46545)

Η παρουσία μιας Xaa-Pro αμινοπεπτιδάσης έχει αναφερθεί σε λακτόκοκκους (Mou et al., 1975; Booth et al., 1990) και σε λακτοβακίλλους (Hickey et al., 1983).

Πιο πρόσφατα, η αμινοπεπτιδάση καθарίστηκε από *L. lactis* και χαρακτηρίστηκε (Mars & Monnet, 1995; Mc Donnell, 1997) ενώ οι Matos et al. (1998), κλωνοποίησαν και προσδιόρισαν την αλληλουχία των αμινοξέων του αντίστοιχου γονιδίου ονομαζόμενου *pepP*. Επίσης η ύπαρξη του έχει επιβεβαιωθεί και στα οξυγαλακτικά βακτήρια του μικροοργανισμού *S. thermophilus* (Rul & Monnet, 1997). Σύμφωνα με το NC-IUBMB nomenclature, το ένζυμο έχει προταθεί να αναφέρεται ως Xaa-Pro αμινοπεπτιδάση. Η κοινή ονομασία είναι αμινοπεπτιδάση P ή PepP.

Η PepP ανήκει στις αμινοπεπτιδάσες με ειδική δράση. Οι βέλτιστες συνθήκες για τη δράση της είναι pH 8.0 και θερμοκρασία 37°C. Είναι μεταλλοπεπτιδάση προλίνης η οποία μπορεί να διασπάσει οποιοδήποτε αμινοξύ συνδεδεμένο με προλίνη, από το αμινοτελικό άκρο ολιπεπτιδίων τα οποία περιέχουν μέχρι και 11 αμινοξέα με τις αλληλουχίες Xaa-Pro-Pro-(X)_n ή Xaa-Pro-(X)_n (Kunji et al., 1996). Σύμφωνα με τους Mars & Monnet (1995), ο υψηλότερος ρυθμός υδρόλυσης παρατηρήθηκε για τα πενταπεπτίδια Arg-Pro-Pro-Gly-Phe (bradykinin f1-5) και Leu-Pro-Pro-Ser-Arg. Σχετικά υψηλή δραστηριότητα παρατηρήθηκε με πεπτίδια από 3-9 αμινοξέα, αλλά δεν παρατηρήθηκε υδρόλυση των μελετώμενων διπεπτιδίων. Σύμφωνα με τους Mc Donnell et al. (1997), μπορεί να προκαλέσει και υδρόλυση των πεπτιδίων με αλανίνη (Ala) στην προτελευταία θέση αλλά με αργό ρυθμό. Η PepP έχει περιγραφεί ως μονομερές ένζυμο η μοριακή μάζα του οποίου έχει προσδιοριστεί στα 50 kDa (Mc Donnell et al., 1997), μέγεθος που αντιστοιχεί πολύ καλά με το μέγεθος του αντίστοιχου γονιδίου (1050 bp) (Matos et al., 1998).

Η PepP βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα του *L. lactis*, ο οποίος χρησιμοποιείται ευρέως στην τυροκομία. Παρ' όλ' αυτά ο ακριβής ρόλος της αμινοπεπτιδάσης στη θρέψη των βακτηρίων και κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του τυριού δεν έχει εξακριβωθεί.

PepX

DATABANKS

MEROPS name: Xaa-Pro dipeptidyl-peptidase

MEROPS classification: clan SC, family S15, peptidase S15.001

IUBMB: EC 3.4.14.11 (BRENDA)

Tertiary structure: Available

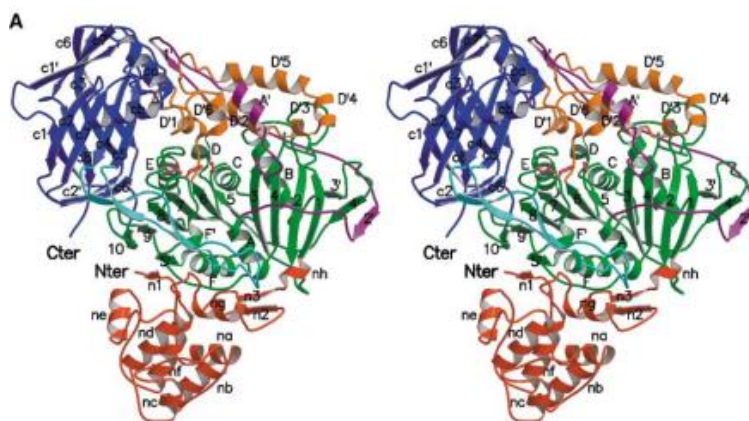
Species distribution: class Bacilli

Reference sequence from: *Lactococcus lactis* (UnitProt: Q02W78)

Η X-Pro dipeptidyl-peptidase η οποία κοινώς αναφέρεται ως PepX ή PepXP ανιχνεύτηκε πρώτη φορά από τους Casey & Meyer (1985), οι οποίοι μέτρησαν τη δραστικότητα της με χρήση υποστρώματος Gly-Pro-NHMeC, σε 21 στελέχη γαλακτόκοκκων και γαλακτοβακίλλων (Πίνακας 2.10). Στη συνέχεια το ένζυμο απομονώθηκε από αρκετά στελέχη βακτηρίων. Το γονίδιο της με ονομασία *pepX* προερχόμενο από *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Nardi et al. 1991) και από *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (Mayo et al. 1991), έχει κλωνοποιηθεί και έχει καταγραφεί η αλληλουχία των αμινοξέων του. Επίσης το γονίδιο *pepX* προερχόμενο από γαλακτοβακίλλους έχει κλωνοποιηθεί (Meyer-Barton et al. 1993, Vesanto et al. 1995, Yuksel & Steele, 1996). Από τη γνώση που υπάρχει μέχρι στιγμής, η PepX φαίνεται ότι εγκλείεται στα γαλακτικά βακτήρια.

Η αμινοπεπτιδάση PepX είναι σερινική πεπτιδάση με ειδική δράση αφού έχει την ικανότητα να υδρολύει πεπτιδικούς δεσμούς με προλίνη, προκειμένου να γίνουν προσβάσιμες στη δράση άλλων πεπτιδασών. Ειδικότερα προκαλεί την υδρόλυση των πεπτιδίων στο αμινοτελικό τους άκρο προς παραγωγή διπεπτιδίων Xaa-Pro (Lloyd & Pritchard, 1991). Η PepX προκαλεί την απελευθέρωση, με μικρότερη αποτελεσματικότητα, διπεπτιδίων της μορφής Xaa-Ala και Xaa-Gly (Khalid & Marth, 1990; Lloyd & Pritchard, 1991). Οι βέλτιστες συνθήκες pH κυμαίνονται στο εύρος 6.0 - 9.0 και η βέλτιστη θερμοκρασία για τη δράση της είναι περίπου 40°C (Vesanto et al., 1995).

Από τις διάφορες PepX που έχουν μελετηθεί προκύπτει ότι γενικά είναι διμερές ένζυμο (Lloyd & Pritchard, 1991) χωρίς δισουλφιδικές γέφυρες, με μοριακή μάζα μονομερούς που κυμαίνεται μεταξύ 72-90 kDa. Παρ' όλ' αυτά έχει περιγραφεί μία μονομερής PepX (Atlan et al., 1990) και μία τριμερής PepX (Miyakawa et al., 1991). Το ισοηλεκτρικό σημείο της αμινοπεπτιδάσης βρίσκεται στο εύρος 4.5-4.7 (Habibi-Nafaji & Lee, 1994). Η αλληλουχία γύρω από το δραστικό μέρος της σερίνης έχει αναγνωριστεί (Chich et al., 1992) και φαίνεται ότι διαφέρει από τις παρόμοιες αλληλουχίες που εμφανίζονται μεταξύ των άλλων σερινικών πεπτιδασών. Η κρυσταλλική μορφή της PepX από *Lactococcus lactis* έχει παρουσιαστεί και έχει αναλυθεί η τρισδιάστατη δομή της (Chich et al., 1995; Rigolet et al., 2002). Είναι ομοδιμερικό ένζυμο με δίπτυχη συμμετρία άξονα (two-fold symmetry axis) (Rigolet et al., 2002) (Εικόνα 2.6). Κάθε μονομερές αντιστοιχεί σε ένα ευρύ αλλά «αραιό» μόριο του οποίου το σχήμα μοιάζει με το χάρτη της Αφρικής. Αναδιπλώνεται σε τέσσερις διακριτές περιοχές. Η α/β πτυχή υδρολάσης (α/β hydrolase fold) (υπολείμματα 163-372 και 458-548) είναι η μεγαλύτερη και καταλυτική και περιέχει την καταλυτική τριάδα (Ser348, His468, Asp498). Η μικρότερη περιοχή (υπολείμματα 373-457) είναι υπεύθυνη για τη ειδική δέσμευση του υποστρώματος κι επίσης συμμετέχει στον διμερισμό (involved in the dimerization). Το αμινοτελικό άκρο (υπολείμματα 1-162) είναι κυρίως υπεύθυνο για το διμερισμό.



Εικόνα 2.6. Τρισδιάστατη δομή των δύο μονομερών της PepX. Ως Nter και Cter αναφέρονται το αμινοτελικό (N-terminal) και καρβοξυλικό άκρο (C-terminal), αντίστοιχα. Η περιοχή N-terminal εμφανίζεται με κόκκινο χρώμα, η καταλυτική περιοχή με πράσινο χρώμα, η ελικοειδής περιοχή με πορτοκαλί και η περιοχή C-terminal με μπλε χρώμα (Rigolet et al., 2002).

Έχει αποδειχθεί ότι η PepX μπορεί να υδρολύσει διαδοχικά, πεπτίδια που προκύπτουν από τη β-καζεΐνη, συμπεριλαμβανομένης της β-καζομορφίνης (β-casomorphin) (Lloyd & Pritchard, 1991) και πιστεύεται ότι το ένζυμο αυτό παίζει ρόλο στην αποσύνθεση των καζεϊνών.

Σύμφωνα με τους Atlan et al. (1990) και Yuksel & Steele (1996), η PepX εμπλέκεται στο μονοπάτι του καταβολισμού των καζεϊνών, παρέχοντας βασικά αμινοξέα στους γαλακτοβακίλλους. Σε αντίθεση οι Mayo et al. (1991), έδειξαν ότι ο ρόλος της PepX δεν είναι ουσιώδης όσον αφορά την ανάπτυξη των λακτόκοκκων στο γάλα, αλλά επιδρά στη σύνθεση των πεπτιδίων προϊόντων γάλακτος. Η ίδια παρατήρηση έγινε και από τους Mierau et al. (1996), οι οποίοι μελέτησαν την ανάπτυξη σε γάλα μεταλλαγμένων χωρίς αρκετές πεπτιδάσες *Lactococcus lactis*. Έτσι από τις έρευνες προκύπτει ότι ο ρόλος της PepX στα πρωτεολυτικά συστήματα των γαλακτοβακίλλων και γαλακτόκοκκων πιθανώς διαφέρει. Τέλος, η PepX έχει χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο της σύνθεσης των πεπτιδίων που περιέχουν προλίνη (Yoshpe-Besancon et al., 1994; Houbart et al., 1995).

Ιμινοπεπτιδάση προλίνης – PepI

DATABANKS

MEROPS name: prolinase (Lactobacillus-type)

MEROPS classification: clan SC, family S33, peptidase S33.004

Species distribution: known only from *Lactobacillus helveticus*

Reference sequence from: *Lactobacillus helveticus*

Η ιμινοπεπτιδάση προλίνης (PepI) ανήκει στην κατηγορία των Prolyl πεπτιδασών. Είναι πεπτιδάση ειδικής δράσης η οποία υδρολύει δι-, τρι- και ολιγοπεπτίδια τα οποία περιέχουν προλίνη (Baankreis & Exterkate, 1991).

Στην τυροκομία έχει βασικό ρόλο στο στάδιο της ωρίμανσης του τυριού. Φαίνεται ότι δρα ως παράγοντας αποπίκρασης του τυριού, διότι τα πεπτίδια που περιέχουν προλίνη προκαλούν πικρή γεύση στο τυρί. Η δραστηριότητά της έχει μελετηθεί σε αρκετούς μικροοργανισμούς που σχετίζονται με την παρασκευή τυριού όπως στους *Arthrobacter nicotiana* 9458 (Smacchi et al., 1999), *Corynebacterium variabilis* NCDO2101 (Gobbetti et al., 2001), *Propionibacterium shermanii*

(Leenhouts et al., 1998), *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* DSM 7290 (Klein et al., 1994) και *Lactobacillus helveticus* (Varmanen et al., 1996b).

Τριπεπτιδάσες

PepT

DATABANKS

MEROPS name: peptidase T

MEROPS classification: clan MH, family M20, subfamily M20B, peptidase M20.003

Tertiary structure: Available

Species distribution: superkingdoms Eukaryota, Bacteria

Reference sequence from: *Escherichia coli* (UniProt: P29745)

Η PepT των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι διμερής ή τριμερής μεταλλοπεπτιδάση ευρείας ειδικότητας. Προκαλεί την υδρόλυση τριπεπτιδίων με όξινα, βασικά ή ουδέτερα υπολείμματα αμινοξέων στο αμινοτελικό άκρο (Kunji et al., 1996; Law & Haandrikman, 1997), όπως Ala-Pro-Gly ή Pro-Pro-Phe. Η PepT από *L. lactis* είναι ομοδιμερές ένζυμο με το κάθε μονομερές να αποτελείται από 413 αμινοξέα μοριακής μάζας 47 kDa. Οι βέλτιστες συνθήκες για αντίδραση είναι θερμοκρασία 40°C και pH 8.0 (Bacon et al., 1993). Αρκετές PepT από διάφορα βακτήρια έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί, συμπεριλαμβανομένων και των βακτηρίων *L. lactis* (Desmazeaud & Zevaco, 1979; Bosman, 1990), *L. helveticus* (Savijoki & Palva, 2000), *Lb. delbrueckii* (Bockelmann et al., 1995) και *Lb. sakei* (Sanz et al., 1998). Η PepT των γαλακτόκοκκων δρα σε συνεργασία με ποικίλες πρωτεΐνες και πεπτιδάσες και διασπά τις καζεΐνες σε μικρά πεπτίδια και αμινοξέα (Pritchard & Coolbear, 1993; Kok, 1990; Kunji et al., 1996). Ειδικότερα, οι PepT και PepV συμμετέχουν στο τελικό στάδιο της πρωτεολυτικής δραστηριότητας των λακτόκοκκων. Τα συγκεκριμένα ένζυμα απελευθερώνουν αμινοξέα από το αμινοτελικό άκρο τριπεπτιδίων ή διπεπτιδίων, τα οποία προωθούνται μέσα στα κύτταρα μέσω του συστήματος μεταφοράς των μεμβρανών, DtpT και Dpp, για χρήση τους ως θρεπτικά συστατικά και ως υποστρώματα βιοσυστατικών.

Διπεπτιδάσες

Οι διπεπτιδάσες συμμετέχουν στο τελικό στάδιο της διάσπασης των πρωτεϊνών. Υποστρώματα των ενζύμων αυτών αποτελούν συνήθως προϊόντα διάσπασης άλλων πρωτεασών ή πεπτιδασών.

Peptidase V – PepV

DATABANKS

MEROPS name: peptidase V

MEROPS classification: clan MH, family M20, subfamily

M20A, peptidase M20.004

Tertiary structure: Available

Species distribution: superkingdom Bacteria

Reference sequence from: *Lactobacillus delbrueckii* (UniProt: P45494)

Η πεπτιδάση V (PepV) από *Lactobacillus delbrueckii* έχει περιγραφεί ως καρνοσινάση η οποία διασπά το ασυνήθιστο πεπτίδιο β-Ala-His (καρνοσίνη). Η PepV σχετίζεται όχι μόνο με πρωτεάσες αλλά και με την απακετυλάση της ακετυλορνιθίνης (acetylornithine deacetylase). Η PepV ανήκει

στην οικογένεια των αμινοακυλασών-1, στην οποία ανήκουν μεταλλοπρωτεάσες οι οποίες υδρολύουν δεσμούς αμιδίων με χρήση διαφόρων μετάλλων όπως Zn, Co, Mg ή Mn (Biagini & Puigserver, 2001).

PepQ (Xaa-Pro Dipeptidase)

DATABANKS

MEROPS name: Xaa-Pro dipeptidase (bacteria-type)

MEROPS classification: clan MG, family M24, subfamily M24B, peptidase M24.003

IUBMB: EC 3.4.13.9 (BRENDA)

Species distribution: superkingdoms Eukaryota, Bacteria

Reference sequence from: *Escherichia coli* (UniProt: P27862)

Αρκετά ονόματα έχουν χρησιμοποιηθεί για να περιγράψουν το συγκεκριμένο ένζυμο όπως προλιδάση (prolidase), ιμιδοδιπεπτιδάση (imidodipeptidase), διπεπτιδάση προλίνης (proline dipeptidase), πεπτιδάση D (peptidase D), γ-πεπτιδάση (γ-peptidase), PepQ και Xaa-Pro διπεπτιδάση (Xaa-Pro dipeptidase-XPD). Η PepQ είναι διπεπτιδάση η οποία υδρολύει την προλίνη στο C-τερματικό άκρο των πεπτιδίων. Ειδικότερα προκαλεί την υδρόλυση των διπεπτιδίων της μορφής Xaa-Pro.

Οι Fernandez-Esplá et al., (1997b) και Morel et al., (1999), απομόνωσαν και χαρακτήρισαν την PepQ από *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 731 και *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CNRZ 397, αντίστοιχα. Σύμφωνα με τους Fernandez-Esplá et al., (1997b), αποτελεί μονομερική μεταλλοπεπτιδάση με μοριακή μάζα στα 41 kDa. Η PepQ χρησιμοποιείται στη βιομηχανία παρασκευής τυριού για τη βελτίωση του flavor και της δομής του προϊόντος (Theriot et al., 2009).

PepR (Prolinase)

Η προλινάση, η οποία πολλές φορές αναφέρεται και ως prolylglycine dipeptidase ή iminodipeptidase είναι διπεπτιδάση ειδικής δράσης η οποία υδρολύει διπεπτιδία τα οποία περιέχουν προλίνη κι έχουν την αλληλουχία Pro-X (Shao et al., 1997). Η προλινάση αναγνώστηκε πρώτη φορά το 1951 από τους Neuman & Smith, οι οποίοι χρησιμοποίησαν ως υπόστρωμα Pro-Gly.

PepL (Glycyl – Leucine dipeptidase)

Οι λευκυλ-διπεπτιδάσες (leucyl-dipeptidases) στα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν την ικανότητα να υδρολύουν διπεπτιδάσες με λευκίνη στο αμινοτελικό άκρο (Sanz & Toldra, 1997; Magboul & McSweeney, 1999).

2.3.3.1.3.2. Οξυγαλακτικά βακτήρια εκτός των καλλιιεργειών εκκινητών (NSLAB)

Στα NSLAB βακτήρια περιλαμβάνονται οι μεσόφιλοι γαλακοβάκιλλοι και πεδιόκοκκοι, οι οποίοι αποτελούν φυσική μικροβιακή χλωρίδα του προς τυροκόμηση γάλακτος και σημαντικό μέρος της μικροβιακής χλωρίδας των περισσότερων τυριών κατά την ωρίμανση. Σε αρκετές ποικιλίες τυριού η συνεισφορά των NSLAB καλλιιεργειών στην ανάπτυξη των χαρακτηριστικών τους είναι θέμα υπό αμφισβήτηση. Δε συνιστούν μέρος της φυσιολογικής εναρκτηρίας χλωρίδας, δεν αναπτύσσονται καλά στο γάλα (Cogan et al., 1997) και δε διαθέτουν υψηλή ικανότητα οξίνισης του γάλακτος. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα βακτήρια *Lactobacillus casei/paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus curvatus*, *Pediococcus acidilactici* και *Pediococcus pentosaceus* (Beresford et al., 2001).

Αρχικά υπάρχουν σε μικρούς αριθμούς στην τυρόμαζα, κυρίως στα τυριά από γάλα τυροκόμησης που έχει υποστεί παστερίωση. Στη συνέχεια ωστόσο λόγω αύξησης των διαθέσιμων θρεπτικών

συστατικών κατά το στάδιο της πρωτογενούς πρωτεόλυσης, ο αριθμός τους αυξάνεται ($\sim 10^7$ - 10^8 cfu/g) και στη συνέχεια σταθεροποιείται περίπου στις τέσσερις εβδομάδες μετά την τυροκόμηση.

Είναι γνωστό ότι η δραστηριότητα των πρωτεϊνών των NSLAB βακτηρίων είναι μικρότερη συγκριτικά με τη δραστηριότητα των βακτηρίων εκκινητών (SLAB), με αποτέλεσμα η συνεισφορά τους στην υδρόλυση των καζεϊνών να εμφανίζεται σχετικά χαμηλή (Lynch et al., 1997). Σε αντίθεση, η δραστηριότητα των πεπτιδασών, τουλάχιστον στα κύρια στελέχη, συνεισφέρει στην υδρόλυση των πικρών πεπτιδίων προς παραγωγή ελεύθερων αμινοξέων (Gagnaire et al., 2001).

Σύμφωνα με τους Fox et al. (2000), στα NSLAB αποδίδεται μικρή αλλά σημαντική συμβολή στην κατατομή των αρωματικών και γευστικών ενώσεων, λιπολυτική δράση.

Τα NSLAB επιδεικνύουν αρκετές ιδιότητες, οι οποίες δεν έχουν μελετηθεί σε βάθος. Η επίδραση τους στα χαρακτηριστικά του τυριού ποικίλει ανάλογα με το στέλεχος από αρνητική σε σταθερή ή θετική.

2.3.3.1.3.3. Δευτερεύουσες καλλιέργειες γάλακτος

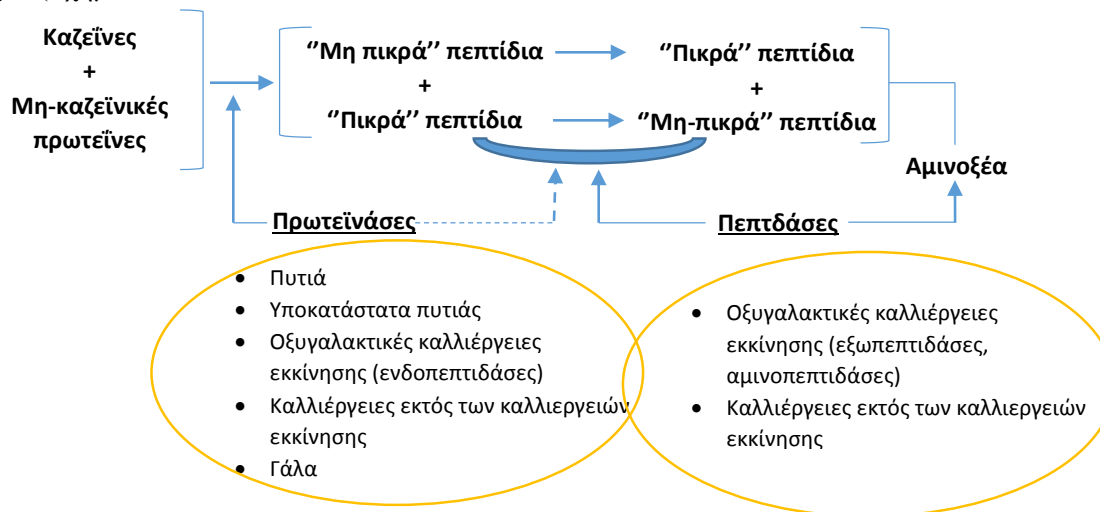
Οι δευτερεύουσες καλλιέργειες αποτελούν μικροοργανισμούς οι οποίοι προστίθενται στο γάλα τυροκόμησης ως ενισχυτές των ήδη υπάρχοντων μικροοργανισμών, με στόχο την ανάπτυξη των επιθυμητών οργανοληπτικών χαρακτηριστικών (άρωμα, γεύση) του τυριού. Σύμφωνα με τους Mc Sweeney & Fox (2004), δευτερεύουσες μικροχλωρίδες που χρησιμοποιούνται στα τυριά με επίχρισμα, Ελβετικού τύπου, Roquefort και Camembert δίνονται στον Πίνακα 2.11.

Πίνακας 2.11. Δευτερεύουσες χλωρίδες τυριών με επίχρισμα, Ελβετικού τύπου, Roquefort και Camembert

Μικροοργανισμός	Κατηγορία τυριού	Πρωτεολυτικός παράγοντας
<i>Brevibacterium linens</i>	Τυριά με επίχρισμα. Συνυπάρχουν ζύμες, κορυνόμορφα βακτήρια κ.α.	Ένδο- και εξωκυτταρικά πρωτεολυτικά ένζυμα
<i>Prorionobacterium freundenreichii</i>	Τυριά Ελβετικού τύπου	Πεπτιδάσες και πρωτεϊνάσες με περιορισμένη δράση
<i>Penicillium roqueforti</i> <i>Penicillium camemberti</i>	Roquefort, Camembert	Εξωκυτταρικές πρωτεϊνάσες και πεπτιδάσες

2.3.3.1.4. Παραγωγή και Διάσπαση "Πικρών" Πεπτιδίων κατά την Ωρίμανση του Τυριού

Η πικρή γεύση στο τυρί είναι αποτέλεσμα της παρουσίας υδρόφοβων πεπτιδίων, δηλαδή πεπτιδίων χαμηλού μοριακού βάρους, τα οποία δεν έχουν αποικοδομηθεί περαιτέρω σε 'μη-πικρά' πεπτίδια και αμινοξέα (Σχήμα 2.4).



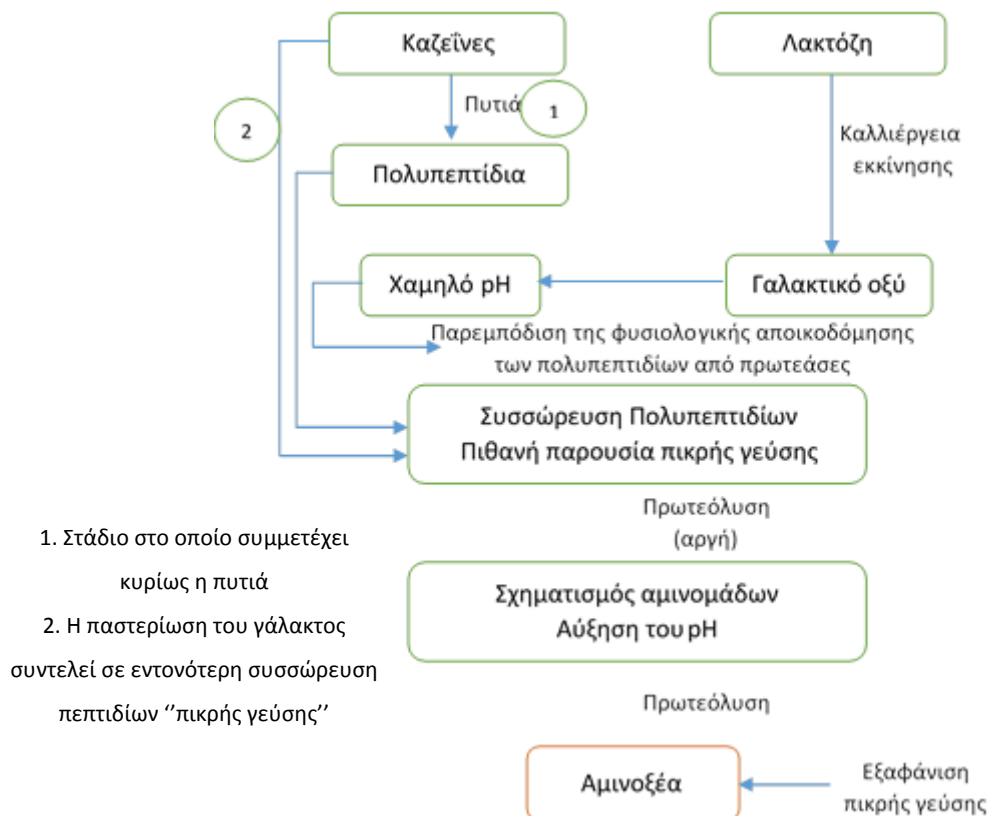
(Πηγή: Τροποποίηση από Rouseff, 1990)

Σχήμα 2.4. Πρωτεολυτικές αντιδράσεις που συμβάλλουν στο σχηματισμό των πικρών πεπτιδίων σε σκληρά τυριά κατά την ωρίμανσή τους.

Αρκετά από τα συγκεκριμένα πεπτίδια είναι ήδη αναγνωρισμένα και είναι γνωστό ότι παράγονται μέσω της υδρόλυσης της καζεΐνης. Τα 'πικρά' πεπτίδια αποτελούνται από 3-15 αμινοξέα και χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη λευκίνης, ισολευκίνης, προλίνης, βαλίνης, φαινυλαλανίνης, τυροσίνης και τρυπτοφάνης. Θεωρείται ότι τα ένζυμα που συμμετέχουν στο σχηματισμό των πεπτιδίων που προκαλούν την πικρή γεύση στο τυρί είναι εξωκυτταρικές πρωτεάσες οξυγαλακτικών καλλιεργείων που χρησιμοποιούνται ως καλλιέργειες εκκίνησης, πρωτεάσες μικροοργανισμών των *Lactobacilli* (εκτός των καλλιεργείων εκκίνησης), οι οποίοι αναπτύσσονται σε μεγάλους πληθυσμούς στα τυριά, ενδογενείς πρωτεάσες του γάλακτος όπως η πλασμίνη, και τέλος η χυμοσίνη και η πεψίνη της πυτιάς που παραμένουν στο τυρόπηγμα (Sousa et al., 2001). Το αποτέλεσμα είναι να παρατηρείται διάκριση μεταξύ 'πικρών' και 'μη-πικρών' πεπτιδίων.

Η υδροφοβικότητα των πρωτεϊνών παίζει καθοριστικό ρόλο στην παραγωγή πικρών πεπτιδίων. Ορισμένες αλληλουχίες στις καζεΐνες είναι ιδιαίτερα υδρόφοβες και όταν αποκόπτονται από τις πρωτεάσες μπορεί να επιφέρουν πικρή γεύση. Ανάμεσα στις πρωτεΐνες, αυτές που προσδίδουν πιο πικρή γεύση είναι οι καζεΐνες, και πιο συγκεκριμένα στο φαινόμενο αυτό συμβάλλει κυρίως η α_{s1} -καζεΐνη και λιγότερο η β -καζεΐνη. Αυτό, πιθανώς εξηγεί και το γεγονός ότι τα τυριά από πρόβειο και γίδινο γάλα, που περιέχουν σχετικά λιγότερη α_{s1} -καζεΐνη, είναι συνήθως λιγότερο πικρά από εκείνα που παρασκευάζονται από αγελαδινό (Pelissier & Manchon, 1976). Η δράση της χυμοσίνης (ένζυμο πυτιάς) φαίνεται σημαντική στην παραγωγή πικρών πεπτιδίων, αφού η αρχική της δράση στη β -καζεΐνη απελευθερώνει αρκετά υδρόφοβα πεπτίδια. Έτσι, παράγοντες που θα μπορούσαν να επηρεάσουν τη διατήρηση και τη δραστηριότητα της πυτιάς στο τυρόπηγμα, όπως η εφαρμογή ΥΠ, επηρεάζουν σημαντικά και την ανάπτυξη της πικρής γεύσης. Ο Noomen, (1983) ανέφερε ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των τριών πρωτεολυτικών συστημάτων δηλαδή τα ένζυμα πυτιάς (κυρίως η χυμοσίνη), τα ένζυμα της βακτηριακής καλλιέργειας και οι πρωτεΐνάσες του γάλακτος (κυρίως η πλασμίνη) επιδρούν συνεργιστικά για την παρουσία πικρών πεπτιδίων στο τυρί.

Σύμφωνα με τους Emmons et al. (1962), τα βακτηριακά στελέχη τα οποία παράγουν τυριά με πικρή γεύση είναι ανεπαρκή σε πρωτεολυτικά ένζυμα που αποικοδομούν τα πεπτίδια που αποδίδουν τη γεύση αυτή. Ωστόσο, οι μηχανισμοί σχηματισμού και αποικοδόμησης των πικρών πεπτιδίων κατά την ωρίμανση των τυριών, είναι αρκετά περίπλοκο φαινόμενο που επιδέχεται περαιτέρω ανάλυση, όπως αποδεικνύεται από τις αντικρουόμενες δημοσιεύσεις που υπάρχουν στη βιβλιογραφία. Για το μηχανισμό σχηματισμού και αποικοδόμησης των πικρών πεπτιδίων στο τυρί, ο Czulak (1959), πρότεινε το μηχανισμό του Σχήματος 2.5.



Εικόνα 2.5. Μηχανισμός σχηματισμού και αποικοδόμησης των "πικρών" πεπτιδίων στο τυρί, σύμφωνα με τον Czulak (1959) (Πηγή: Τροποποίηση από Furtado, 1984)

Σύμφωνα με αυτή, η ανάπτυξη της πικρής γεύσης στο τυρί, είναι αποτέλεσμα της συνδυαστικής δράσης της πυτιάς και των βακτηριακών πρωτεολυτικών ενζύμων. Τα πεπτίδια που απελευθερώνονται από τη δράση της πυτιάς, υδρολύονται περαιτέρω από «μη πικρά» στελέχη γαλακτικών στρεπτόκοκκων (*Lactic streptococci*), ενώ τα «πικρά» στελέχη δεν είναι ικανά να υδρολύσουν αυτά τα πεπτίδια, τα οποία έτσι συσσωρεύονται και δημιουργούν την πικρή γεύση. Ακόμη, προτείνει ότι η συσσώρευση αυτή, ίσως προκαλείται από την αύξηση της δραστηριότητας της πυτιάς στο χαμηλό pH που προκαλείται από την παραγωγή του γαλακτικού οξέος.

Έχει αναφερθεί προηγουμένως στην Παράγραφο 2.3.3.1.3, ότι ενδοκυτταρικές πεπτιδάσες οξυγαλακτικών καλλιεργείων που χρησιμοποιούνται στην τυροκόμηση μπορούν να μετατρέψουν τα πεπτίδια που προκαλούν την πικρή γεύση σε πεπτίδια που δεν προκαλούν πικρή γεύση και σε αμινοξέα, με αποτέλεσμα τη μείωση της πικρότητας και συνεπώς τη βελτίωση της γεύσης του τυριού (Bartels et al., 1987; Drake et al., 1997; El Abboudi et al., 1991; Fajarrini, 1999; Fox et al., 1998; El Soda et al., 2000). Οι Soeryapranata et al. (2007), μετά από κλωνοποίηση και χαρακτηρισμό των πεπτιδασών PepE, PepO, PepO2, PepO3 και PepN του μικροοργανισμού *Lactobacillus helveticus*, μελέτησαν τη δράση τους στο πεπτίδιο β-CN f193-209 που προκαλεί την εμφάνιση πικρής γεύσης σε

τυρί Cheddar. Η συνδυασμένη χρήση της αμινοπεπτιδάσης PepN και των υπόλοιπων ενδοπεπτιδασών οδήγησε σε διάσπαση του πεπτιδίου β-CN f193-209. Οι Lee et al. (1996), προσπάθησαν να διασπάσουν πεπτίδια που προκαλούσαν πικρή γεύση σε τυρί Cheddar με χρήση πεπτιδασών της οξυγαλακτικής καλλιέργειας του μικροοργανισμού *L. lactis*. Μετά από απομόνωση της πεπτιδάσης X-propyl-dipeptidyl (PepX) η οποία εμφάνισε τη μέγιστη δραστηριότητα και επώασή της με το κλάσμα των πεπτιδίων παρατηρήθηκε διάσπαση μερικών πεπτιδίων με χρήση της αναλυτικής μεθόδου HPLC. Μετά από 4 h υδρόλυση σε pH 7.0 στους 35°C παρατήρησαν ουσιαστική μείωση της έντασης της πικρότητας οργανοληπτικά. Οι Motoshima et al. (2003), απομόνωσαν αμινοπεπτιδάση της οξυγαλακτικής καλλιέργειας του μικροοργανισμού *S. thermophilus* με στόχο τη χρήση της για μείωση της πικρής γεύσης τυριών και παρατήρησαν ότι το απομονωμένο ένζυμο μείωσε την πικρότητα που προκαλούσε η τρυψίνη σε ανασυσταμένο γάλα.

Επιπλέον, εκτός των πεπτιδίων, πολλές είναι, ακόμη, οι ουσίες εκείνες που συμβάλλουν στην πικρή γεύση του τυριού, όπως διάφορα αμινοξέα (κυρίως εκείνα με μη πολικές ή υδροφοβικές πλευρικές αλυσίδες), αμίνες, αμίδια, υποκατεστημένα αμίδια, κετόνες μακρίας αλυσίδας, ορισμένα μονογλυκερίδια κ.α. (Bergere & Lenoir, 1997).

2.3.3.1.5. Εκτίμηση της Πρωτεόλυσης Στο Τυρί

Μετά την παρασκευή του τυριού, το σύνολο σχεδόν των καζεϊνών είναι αδιάλυτο στο νερό. Κατά τη διάρκεια όμως της ωρίμανσης, ένα μέρος τους, μικρό ή μεγάλο, ανάλογα με το είδος του τυριού, υδρολύεται σε απλούστερες ουσίες που είναι υδατοδιαλυτές. Από τις καζεΐνες προκύπτουν, κατά σειρά, μεγάλα πεπτίδια, μικρά πεπτίδια, αμινοξέα, αμμωνία, αμίνες. Οι μεταβολές αυτές εξελίσσονται ταυτόχρονα και σε καμία περίπτωση δεν τελειώνει η μία, για να ξεκινήσει η άλλη. Όσο προχωρά η ωρίμανση, τόσο η αναλογία των μικρομοριακών ουσιών αυξάνει. Σύμφωνα με έρευνα, σε ένα ώριμο τυρί είναι δυνατόν να υπάρχουν 2.000 έως 3.000 διαφορετικά πεπτίδια.

Η εξέλιξη της πρωτεόλυσης στα τυριά παρακολουθείται συνήθως με προσδιορισμό των διαλυτών αζωτούχων ουσιών τους και των κλασμάτων τους. Για τον προσδιορισμό αυτό, γίνεται εκχύλιση του διαλυτού αζωτούχου κλάσματός τους είτε με νερό (εκχυλίζονται υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες, μεσαία και μικρού μεγέθους πεπτίδια, αμινοξέα, αμίνες, ουρία και αμμωνία, εκτός από τις περισσότερες καζεΐνες και τα πρώτα μεγάλα πεπτίδια που προέρχονται από τη δράση της χυμοσίνης) είτε με κιτρικό νάτριο σε pH μικρότερο του ισοηλεκτρικού σημείου των καζεϊνών, συνήθως 4.4 (εκχυλίζονται υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες, αμινοξέα, αμίνες, ουρία και αμμωνία, αποκλείονται όμως οι καζεΐνες και τα πολύ μεγάλα πεπτίδια).

Η εκτίμηση του βαθμού πρωτεόλυσης στα τυριά, γίνεται με τη βοήθεια διαφόρων δεικτών, καθώς ένας μόνο δε μπορεί να αποδώσει το φαινόμενο. Συνήθως στην πράξη χρησιμοποιείται ο συντελεστής ωρίμανσης, που αποτελεί έκφραση των υδατοδιαλυτών αζωτούχων ουσιών του τυριού ως ποσοστό % του συνόλου των αζωτούχων ουσιών του. Καθώς η ωρίμανση εξελίσσεται, ο δείκτης αυτός αυξάνει και μάλιστα κατά διαφορετικό τρόπο στα διάφορα τυριά. Σε πολλά απ' αυτά έχουν καθοριστεί τα όρια που πρέπει να κυμαίνεται, για να επιτευχθούν τα καλύτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.

Πρέπει να τονιστεί ότι ο συντελεστής ωρίμανσης αποτελεί δείκτη της έκτασης και όχι του βάθους των συντελούμενων μεταβολών στις αζωτούχες ουσίες του τυριού. Δηλαδή σ' ένα τυρί μπορεί να προσδιορισθεί μεγάλος συντελεστής ωρίμανσης, χωρίς όμως να έχει προχωρήσει η διάσπαση των μεγάλων υδατοδιαλυτών κλασμάτων του προς άλλα απλούστερα, που είναι και τα σημαντικότερα όσον αφορά τη γεύση και το άρωμα του τυριού.

Εκτίμηση του βάθους της ωρίμανσης μπορεί να γίνει με προσδιορισμό των μικρών πεπτιδίων, των ελεύθερων αμινοξέων και των προϊόντων διάσπασής τους. Περαιτέρω κλασμάτωση του

υδατοδιαλυτού αζώτου επιτυγχάνεται με χρήση διαλύματος 12% τριχλωροξικού οξέος (TCA) ή φωσφοροβολφραμικού οξέος (PTA). Στην πρώτη περίπτωση, το διαλυτό αζωτούχο κλάσμα (TCA-SN) περιέχει μεσαίου και μικρού μεγέθους πεπτίδια, αμινοξέα και αζωτούχες ουσίες (αμίνες, ουρία, αμμωνία), ενώ στη δεύτερη (PTA-SN) πολύ μικρά πεπτίδια, αμινοξέα και μικρότερου μοριακού βάρους αζωτούχες ουσίες. Με συνεκτίμηση των δύο αυτών κλασμάτων δίνεται η εικόνα του τυριού για ουσίες που έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη δομή, αλλά και τη γεύση του τυριού (πικρά πεπτίδια).

Για τη μέτρηση των παραπάνω κλασμάτων, συνήθως εφαρμόζεται η μέθοδος του Kjeldahl αλλά συχνά γίνεται και φωτομετρικός προσδιορισμός της περιεχόμενης τυροσίνης - τρυπτοφάνης στο υδατοδιαλυτό κλάσμα σε pH 4.4 ή των ελεύθερων αμινομάδων.

Έτσι σε κάθε τυρί, κατά συνέπεια, υπάρχει μία σχέση μεταξύ των κλασμάτων του, η οποία δίνει τα επιθυμητά οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά (Πίνακας 2.11).

Πίνακας 2.11. Δείκτες ωρίμανσης διαφόρων τυριών

Είδος τυριού	Υδατοδιαλυτό άζωτο % του ολικού	Αμινικό άζωτο του υδατοδιαλυτού (%)	Αμμωνιακό άζωτο του υδατοδιαλυτού (%)
Gruyere	16-20	32-37	10-14
Camembert	30-40	9-12	21-27
Pecorino Romano	25-30	10-12	19-22
Roquefort	45-55	40-45	9-15
Gorgonzola	65-70	35-45	6-14
Provolone	17-30	7-15	4-6
Edam	15-27	9-11	1-3
Emmental	25-35	30-50	7-10
Cheddar	40-60	30-50	7-12
Φέτα	10-20	10-12	3-10
Brie	40-50	-	10-20
Tallegio	35-50	15-22	5-10
St. Paullin	16-20	13-18	3-6
Grana	20-40	-	20-26

(Πηγή: Ανυφαντάκης, 2004)

Η εξέλιξη των μεθόδων της ηλεκτροφόρησης και της χρωματογραφίας έχει συντελέσει στην ακριβέστερη απεικόνιση της υδρόλυσης των καζεϊνικών κλασμάτων και των μεγάλων πεπτιδίων των τυριών, αλλά και των αρωματικών αζωτούχων συστατικών τους και κατά συνέπεια στη διαμόρφωση μιας πιο ολοκληρωμένης εικόνας για την πορεία της πρωτεόλυσης (Ανυφαντάκης, 2004).

2.3.3.2. Το στάδιο της λιπόλυσης

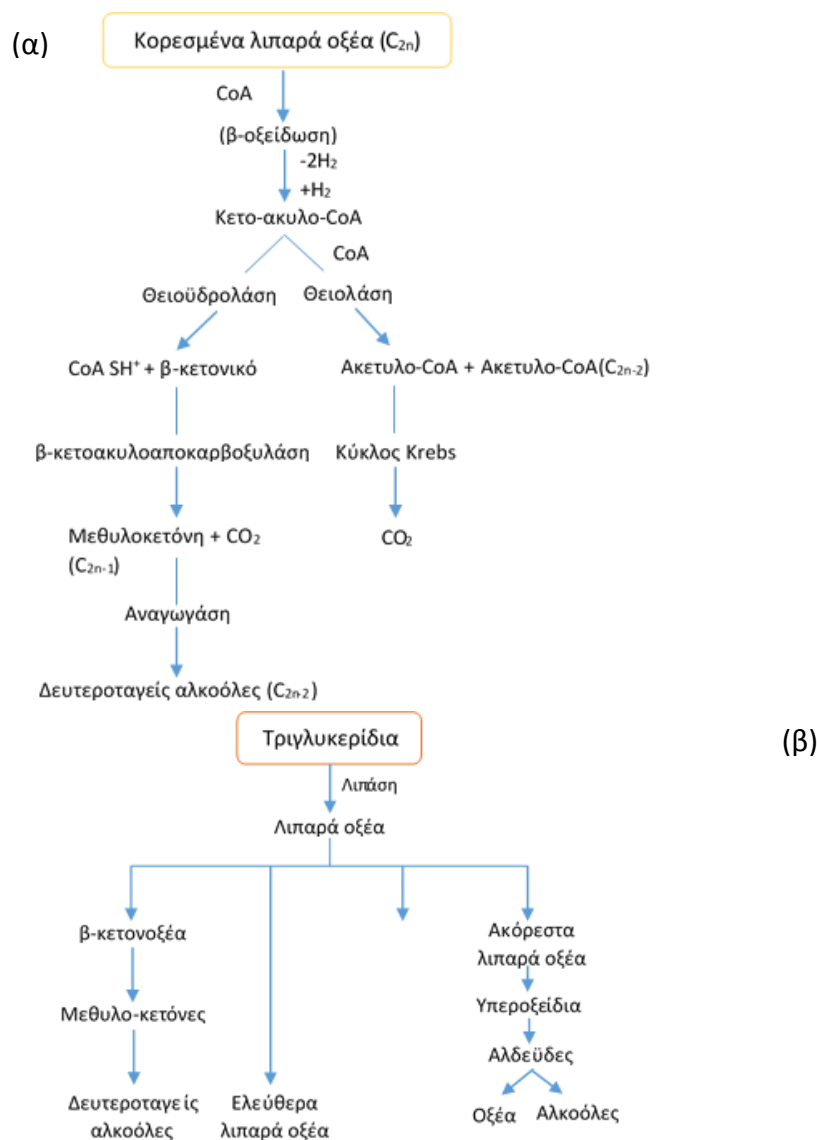
Τα λιπίδια του γάλακτος μπορούν να υποστούν υδρόλυση ή οξειδωση. Ωστόσο, στο τυρί, η οξειδωση του λίπους είναι σπάνια, λόγω του χαμηλού οξειδοαναγωγικού δυναμικού (-250 mV) (Fox & Wallace, 1997; McSweeney & Sousa, 2000).

Το λίπος του γάλακτος είναι σημαντικό συστατικό για τη βιογένεση των αρωματικών ενώσεων (Foda et al., 1974). Το ποσοστό του και η σημασία του παραλλάσσουν σημαντικά και συνεισφέρει στη γεύση άμεσα ή έμμεσα μέσω της λιπόλυσης (Guinee & Law, 2002; Guinee & McSweeney, 2006).

Όσον αφορά την άμεση συνεισφορά του λίπους, έχει παρατηρηθεί η μη σωστή ανάπτυξη αρώματος σε τυριά από άπαχο γάλα αφού το λίπος λειτουργεί ως μέσο διάλυσης και διατήρησης των αρωματικών ενώσεων (Adda et al., 1982).

Λιπόλυση καλείται η υδρόλυση των τριγλυκεριδίων από ένζυμα που καλούνται λιπάσες, με αποτέλεσμα την παραγωγή ελεύθερων λιπαρών οξέων (Free Fatty Acids-FFAs), μόνο- και δι-γλυκεριδίων και γλυκερόλης.

Σε μερικά είδη τυριών τα FFAs αποτελούν πρόδρομες ουσίες αρωματικών ενώσεων όπως n-μεθυλοκετόνες (alkan-2-ones), η παραγωγή των οποίων οφείλεται σε οξειδωση των FFAs, δευτεροταγείς αλκοόλες μέσω αναγωγής των μεθυλ-κετονών, υδροξυ-οξέα, λακτόνες μέσω ενδομοριακής εστεροποίησης των υδροξυοξέων και εστέρες και θειο-εστέρες, απελευθερώνοντας αρωματικά συστατικά στο τυρί (Molimard & Spinnler, 1996; Gallois & Langlois, 1990; Collins et al., 2004, Guinee & McSweeney, 2006) (Σχήμα 2.6 α,β). Οι εστέρες είναι εκείνα τα συστατικά που αποδίδουν τη 'φρουτώδη' γεύση στο τυρί (Upadhyay et al., 2004).



Σχήμα 2.6. α) Μετασχηματισμός λιπαρών οξέων σε διάφορα συστατικά, μέσω β-οξειδωσης και β) Οδοί καταβολισμού των ελεύθερων λιπαρών οξέων στο τυρί.

Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, που παράγονται κατά τη λιπόλυση, μικρής (-C4 έως -C12 και μεσαίας αλύσου (-C12 έως -C16), είναι αυτά που επηρεάζουν σε μεγαλύτερο βαθμό το άρωμα και τη γεύση των τυριών. Το καθένα απ' αυτά έχει το δικό του χαρακτηριστικό άρωμα με το οποίο συμβάλλει περισσότερο στο άρωμα παρά στη γεύση (McSweeney, 2004). Ιδιαίτερη σημασία έχει, αν τα οξέα είναι διαλυμένα στην ελαιώδη ή την υγρή φάση των τυριών, αλλά και η μορφή με την οποία εμφανίζονται. Η αδιάστατη μορφή τους συνδέεται περισσότερο με το άρωμα και μειώνεται με αύξηση του pH. Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα μακράς αλύσου >C18 θεωρείται ότι δε συνεισφέρουν ιδιαίτερα στη διαμόρφωση του αρώματος του τυριού.

Η έκταση της λιπόλυσης διαφέρει ανάλογα με το είδος του τυριού (Woo et al., 1984; Woo & Lindsay, 1984). Σε τυριά όπως η Φέτα, το Κεφαλοτύρι, το μπλε τυρί και τα σκληρά Ιταλικά τυριά η ελεγχόμενη λιπόλυση είναι επιθυμητή. Υπάρχουν όμως και τυριά στα οποία η λιπόλυση πρέπει να αποφεύγεται (π.χ. Cheddar, Emmental, Gouda) λόγω παραγωγής μη αποδεκτών αρωματικών συστατικών. Όπως γίνεται φανερό, η λιπόλυση, ακόμη και σε περιπτώσεις που δεν είναι μεγάλη,

επηρεάζει τη γεύση καθώς και το άρωμα, σε διαφορετικό βαθμό ανάλογα με το είδος του τυριού. Η μέτρηση της λιπόλυσης στα τυριά πραγματοποιείται με βάση τα ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA). Για τη μέτρησή τους αυτά απομονώνονται από την υδατική και τη λιπαρή τους φάση και στη συνέχεια προσδιορίζονται με διάφορες μεθόδους, απ' τις οποίες οι πιο συνηθισμένες είναι η μέτρηση της οξύτητας του λίπους (Acid Degree Value) και η αέρια χρωματογραφία. Στον Πίνακα 2.16 παρατίθεται η μέση περιεκτικότητα σε ελεύθερα λιπαρά οξέα σε διάφορους τύπους τυριών.

Πίνακας 2.16. Ελεύθερα λιπαρά οξέα σε διάφορα είδη τυριών

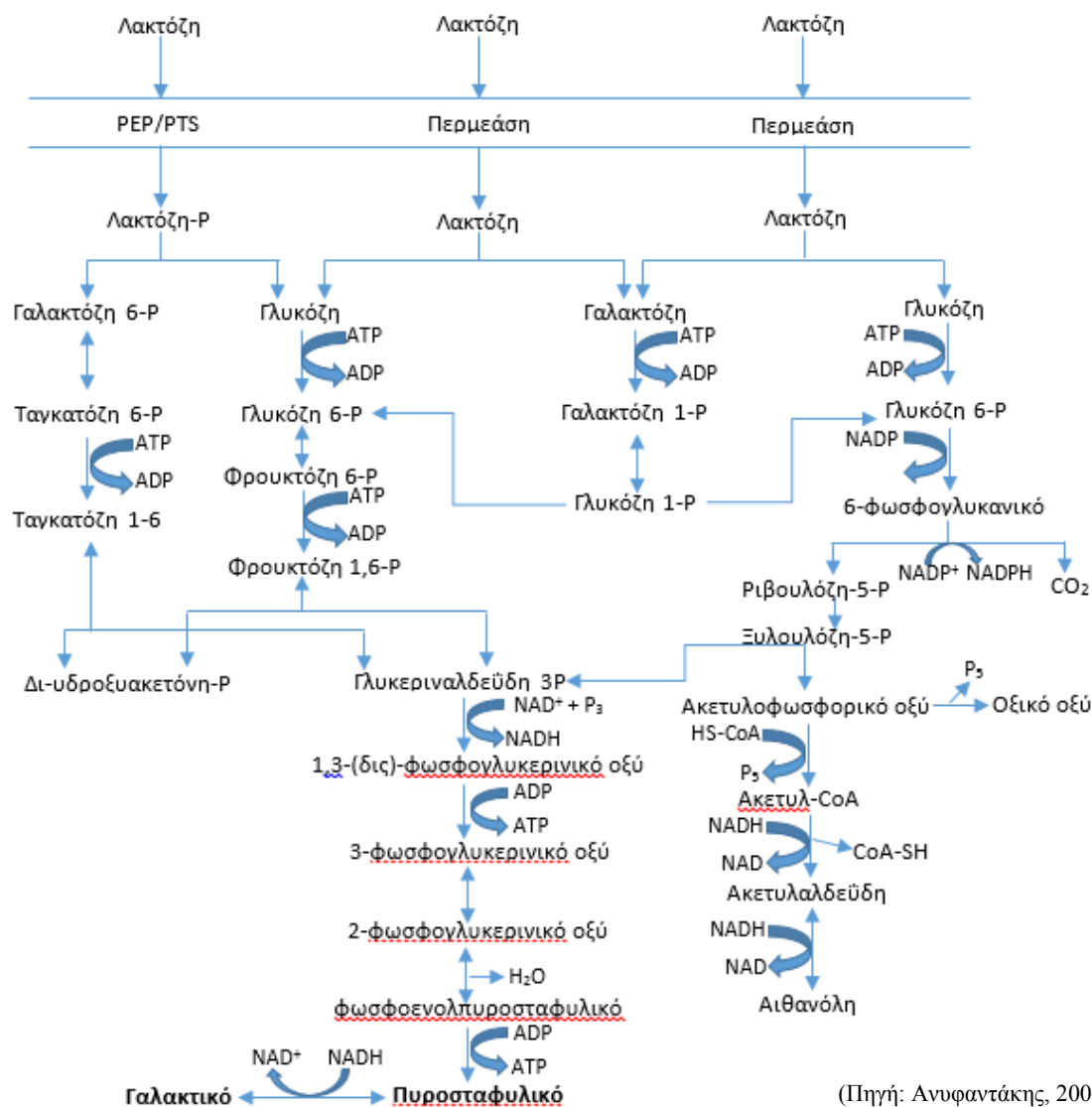
Είδος τυριού	Ελεύθερα λιπαρά οξέα (mg/kg)	Είδος τυριού	Ελεύθερα λιπαρά οξέα (mg/kg)
Edam	356	Gjetost	1.658
Mozzarella	363	Provolone	2.118
Colby	550	Brick	2.150
Camembert	681	Limburger	4.187
Port Salut	700	Parmesan	4.993
Monterey	736	Romano	6.743
		Φέτα	8.071 (60d of ripening) 14.140 (120d of ripening)
Cheddar	1.028	Roquefort	32.453
Gruyere	1.481	Blue	32.230

(Πηγή: Ανυφαντάκης, 2004; Voudouris et al., 1986)

2.3.3.3. Μεταβολισμός της εναπομένουσας λακτόζης και του γαλακτικού οξέος κατά την ωρίμανση του τυριού

Με τον όρο εναπομένουσα λακτόζη αναφέρεται το ποσοστό 0.7-1.5% της λακτόζης η οποία δεν απομακρύνθηκε με το τυρόγαλα αλλά παρέμεινε στη μάζα του τυριού. Η εναπομένουσα λακτόζη έχει σημαντικό ρόλο για τη δομή και την ποιότητά των τυριών. Η συμβολή της δεν έγκειται στο ότι ως συστατικό επηρεάζει τη θρεπτική αξία και τις ιδιότητες των τυριών, αλλά στο γεγονός ότι αποτελεί πηγή ενέργειας των μικροοργανισμών που αναπτύσσονται σ' αυτά, από τους οποίους και μεταβολίζεται προς διάφορα προϊόντα.

Οι οξυγαλακτικές καλλιέργειες, για να πολλαπλασιαστούν, προκαλούν τη ζύμωση της λακτόζης, με άντληση της απαραίτητης ενέργειας. Για το μεταβολισμό της λακτόζης και των παρόμοιων σακχάρων (εξόζης), τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν αναπτύξει τρεις οδούς οι οποίες είναι γνωστές ως ομοιογαλακτική οδός, ετερογαλακτική οδός και οδός των *Bifidobacteria*. Οι οξυγαλακτικές καλλιέργειες που χρησιμοποιούνται σε τυριά άλμης είναι ομοιοζυμωτικές και ακολουθούν την ομοιογαλακτική οδό, σύμφωνα με την οποία η γλυκόζη μέσω της 3-φωσφορικής γλυκεριναλδεΐδης μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό οξύ και στη συνέχεια σε γαλακτικό οξύ το οποίο αποτελεί το μοναδικό τελικό προϊόν (Monnet et al., 1996) (Σχήμα 2.7).



(Πηγή: Ανυφαντάκης, 2004)

Σχήμα 2.7. Ζύμωση λακτόζης από οξυγαλακτικά βακτήρια

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια *S. salivarius* subsp. *thermophilus* και *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* τα οποία χρησιμοποιούνται κατά την παρασκευή τυριών άλμης, προσλαμβάνουν τη λακτόζη και τη διασπούν σε γλυκόζη και γαλακτόζη. Ακολούθως μεταβολίζουν τη γλυκόζη προς γαλακτικό οξύ, ενώ δε μπορούν να μεταβολίσουν περαιτέρω τη γαλακτόζη την οποία και αποβάλλουν από το κύτταρο με ένα σύστημα αντιμεταφοράς προσλαμβάνοντας λακτόζη, με αποτέλεσμα η γαλακτόζη να συσσωρεύεται στο τυρόπηγμα (Hutkins & Prone, 1991).

Η εναπομένουσα λακτόζη, δηλαδή αυτή που δε μεταβολίζεται από την καλλιέργεια εκκίνησης, πιθανώς να μεταβολιστεί από οξυγαλακτικά βακτήρια που υπάρχουν ήδη στο γάλα, δηλαδή βακτήρια που δεν είναι εκκινητές (NSLAB) (McSweeney & Fox, 2004). Όμως, είναι ιδιαίτερα σημαντική η ολοκληρωτική ζύμωση της λακτόζης στο τυρί, ώστε να αποφευχθεί η ανεξέλεγκτη ανάπτυξη δευτερεύουσας βακτηριακής μικροχλωρίδας, η οποία δεν είναι επιθυμητή. Ο μεταβολισμός της κύριας ποσότητας της λακτόζης σε γαλακτικό οξύ, που πραγματοποιείται από τα πρώτα κιάλας στάδια της ωρίμανσης του τυριού, εξαρτάται κυρίως από τη θερμοκρασία και από την περιεκτικότητα σε αλάτι και υγρασία που με τη σειρά τους επηρεάζουν τη δραστικότητα της καλλιέργειας-εκκινητή.

Κατά την οξυγαλακτική ζύμωση της λακτόζης, παράλληλα με την παραγωγή του γαλακτικού οξέος, παράγονται και άλλες ουσίες οι οποίες συμβάλλουν στο άρωμα και τη γεύση των τυριών. Η σημασία των ουσιών αυτών εξαρτάται από το είδος του τυριού. Τα φρέσκα τυριά, για παράδειγμα, που δεν ωριμάζουν, οφείλουν τα γευστικά χαρακτηριστικά τους, σε μεγάλο βαθμό, στις ουσίες αυτές, που είναι συνήθως μη πτητικά (πυροσταφυλικό, οξαλικό), πτητικά οξέα (μυρμηκικό, οξικό, προπιονικό, βουτυρικό), καθώς και καρβονυλικά παράγωγα (ακεταλδεΐδη, ακετοΐνη, διακετύλιο) (Σχήμα 2.8).

Αντίθετα, στα σκληρά τυριά η συμβολή των συστατικών αυτών είναι περιορισμένη, καθώς κατά τη διάρκεια της ωρίμανσής τους δημιουργούνται και άλλες ουσίες με σημαντικότερο ρόλο για τα γευστικά χαρακτηριστικά τους.

Η οξυγαλακτική ζύμωση είναι μεγάλης σημασίας για τα τυριά. Το γαλακτικό οξύ, που παράγεται κατά τη διάρκεια της τυροκόμησης αλλά και στις αρχές της ωρίμανσης, οδηγεί σε μείωση του pH κι έτσι το τυρί προστατεύεται απ' την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών, ενώ παράλληλα το εμπλουτίζει και με νέα συστατικά που επηρεάζουν, ως είναι ή μετά από μετατροπή τους, τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του.

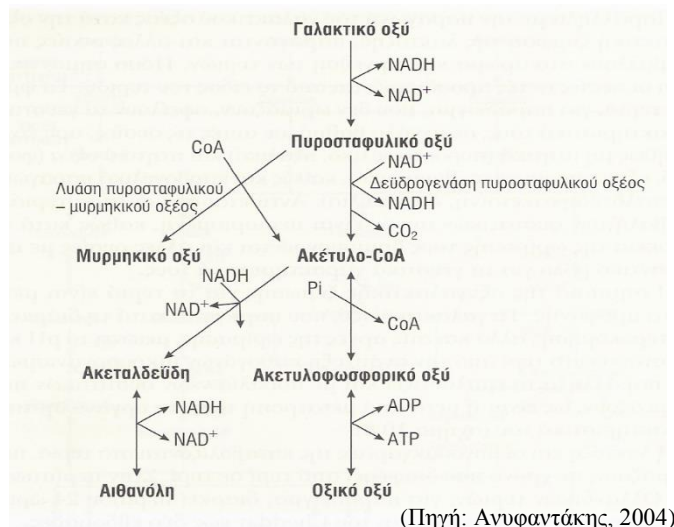
2.3.3.4. Μεταβολισμός κιτρικού οξέος

Στο γάλα, το κιτρικό οξύ περιέχεται κυρίως σε διαλυτή μορφή και γι' αυτό σημαντική ποσότητά του χάνεται με το τυρόγαλα κατά την τυροκόμηση. Ωστόσο τα επίπεδα κιτρικού οξέος στο τυρόπηγμα είναι περίπου τρεις φορές υψηλότερα από τα αντίστοιχα του ορού (Fryer et al., 1970) κι αυτό πιθανώς συμβαίνει λόγω της παρουσίας του κολλοειδούς κιτρικού οξέος. Το κιτρικό οξύ είναι μια πρόδρομη

ένωση για την περαιτέρω παραγωγή ενώσεων που προσδίδουν γεύση στο τυρί.

Πιο συγκεκριμένα το κιτρικό οξύ μεταβολίζεται από κιτρικά-θετικά (Cit^+) στελέχη γαλακτοβακίλλων (*Streptococcus diacetylactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*), τα οποία περιέχουν ένα πλασμίδιο για τη μεταφορά του κιτρικού οξέος. Συγκεκριμένοι μεσόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι δευτερεύουσας καλλιέργειας μπορούν να μεταβολίσουν το κιτρικό οξύ (Fox et al., 2000), όπως τα στελέχη *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* και *L. lactis*.

Ωστόσο δε μπορεί να μεταβολιστεί από άλλα οξυγαλακτικά (LAB) που



(Πηγή: Ανυφαντάκης, 2004)

Σχήμα 2.8. Μεταβολισμός γαλακτικού οξέος

χρησιμοποιούνται ως εκκινητές (όπως θερμοφιλοι λακτοβάκιλλοι, *S. thermophilus* και τα περισσότερα στελέχη λακτόκοκκων).

Σύμφωνα με τους Sousa et al. (2001), το κιτρικό οξύ δεν το χρησιμοποιούν οι Cit^+ μικροοργανισμοί ως πηγή ενέργειας, παρά το μεταβολίζουν ταχέως με κάποιο μεταβολισμό σάκχαρο όπως η λακτόζη.

Τα προϊόντα του μεταβολισμού του κιτρικού οξέος περιλαμβάνουν CO_2 και διακετύλιο. Η παραγωγή του CO_2 είναι υπεύθυνη για τις χαρακτηριστικές οπές ορισμένων τυριών όπως το Gouda καθώς και για ανεπιθύμητο φούσκωμα του τυριού που επιφέρει καταστροφή της δομής τους. Σε αντίθεση, το διακετύλιο θεωρείται υπεύθυνο για το ευχάριστο flavor τυριών όπως τα Cottage, Quarg, Cheddar και κάποια ολλανδικά τυριά (McSweeney & Fox, 2004).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adda, J., Gripon, J.C. & Vassal, L. (1982). The chemistry of flavor and texture generation in cheese. *Food Chemistry*, 9, 115-129.
- Anifantakis, E.M. (1986). Comparison of physico-chemical properties of ewe and cow's milk. *FIL-IDF Bulletin*, 202, 42-53.
- Arora, G. & Lee, B.H. (1992). Purification and characterization of aminopeptidase from *Lactobacillus casei subsp. casei* LLG. *Journal of Dairy Science*, 75, 700-710.
- Arora, G. & Lee, B.H. (1994). Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* S93. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 19, 179-182.
- Asdornnithee, S., Himeji, E., Akiyama, K., Sasaki, T. & Takata, R. (1995). Isolation and characterization of Pz-peptidase from *Bacillus licheniformis* N22. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 79, 200-204.
- Aston, J. & Creamer, L. (1986). Contribution of the components of the water-soluble fraction to the flavour of Cheddar cheese. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 21, 229-248.
- Atlan, D., Laloi, P. & Portalier, R. (1990). X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*: characterization of the enzyme and isolation of deficient mutants. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 2174-2179.
- Atlan, D., Gilbert, C., Blanc, B. & Portalier, R. (1994). Cloning, sequencing and characterization of the pepIP gene encoding a proline iminopeptidase gene from *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* CNRZ397. *Microbiology*, 140, 527-535.
- Baankreis, R. & Exterkate, F.A. (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.
- Baankreis, R. (1992). The role of Lactococcal peptidases in cheese ripening. PhD Thesis, University of Amsterdam. The Netherlands.
- Baankreis, R., van Schalkwijk, S., Alting, A.C. & Exterkate, F.A. (1995). The occurrence of two intracellular oligoendopeptidases in *Lactococcus lactis* and their significance for peptide conversion in cheese. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44, 386-92.
- Bacon, C.L., Wilkinson, M., Jennings, P.Y., Fhaolain, I.N. & O'Cuinn, G. (1993). Purification and characterization of an aminotripeptidase from cytoplasm of *Lactococcus lactis subsp. cremoris* AM2. *International Dairy Journal*, 3, 163-177.
- Bacon, C.L., Jennings, P.Y., Fhaolain, I.N. & O'Cuinn, G. (1994). Purification and characterization of an aminopeptidase A from cytoplasm of *Lactococcus lactis subsp. cremoris* AM2. *International Dairy Journal*, 3, 503-519.
- Bastian, E. & Brown, R.J. (1996). Plasmin in dairy products. *International Dairy Journal*, 6, 435-7.
- Bastian, E.D., Lo, C.G. & David, K.M.M. (1997). Plasminogen activation in cheese milk: influence on Swiss cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, 80, 245-251.
- Beattie, S.A. (2004). Dairy: Cheese. In: *Food Processing: Principles and Applications*. Edited by J. Scott Smith & Y. H. Hui, Blackwell Publishing, 277-286.

- Benfeldt, C., Sørensen, J., Ellegaard, K. E., & Petersen, T. E. (1997). Heattreatment of cheese milk: Effect on plasmin activity and proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 7, 723–731.
- Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N.L. & Cogan, T.M. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, 11, 259-274.
- Bertrand-Harb, C., Ivanova, I.V., Dalgalarondo, M. & Haertlé, T. (2003). Evolution of β -lactoglobulin and α -lactalbumin content during yoghurt fermentation. *International Dairy Journal*, 13, 39–45.
- Biagini, A. & Puigserver, A. (2001). Sequence analysis of the aminoacylase-1 family. A new proposed signature for metalloexopeptidases. Comparative biochemistry and physiology Part B. *Biochemistry & Molecular Biology*, 128, 469-481.
- Bjork, L. (1992). Lactoperoxidase. In: Advanced Dairy Chemistry: Proteins, 2nd edn (ed. P.F. Fox), vol. 1, pp. 332-338, Elsevier Applied Science, London.
- Biochemistry, 19, 179–192
- 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.
- Blanco, J.L., Domingues, L., Gomez-Lucia, E., Garayzabal, J.F.F., Goyache, J. & Suarez, G. (1998). Behavior of aflatoxin during the manufacture, ripening and storage of Manchego-type cheese. *Journal of Food Science*, 53, 1373- 1376.
- Bockelmann, W., Fobker, M. & Teuber, M. (1991). Purification and characterization of the X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase from *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus*. *International Dairy Journal*, 1, 51-66.
- Bockelmann, W., Schulz, Y. & Teuber, M. (1992). Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. *International Dairy Journal*, 2, 95-107.
- Bockelmann, W., Beuck, H.-P., Lick, S. & Heller, K.J. (1995). Purification and characterization of a new tripeptidase from *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* B14. *International Dairy Journal*, 5, 493-502.
- Bockelmann, W., Gollan, V. & Heller, K.J. (1997). Purification of a second tripeptidase from *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* B14. *Milchwissenschaft*, 52, 500-503.
- Booth, M., Fhaolain, I.N., Jennings, P.V. & O’Cuinn, G. (1990a). Purification and characterization of a post-proline dipeptidyl aminopeptidase from *Streptococcus cremoris* AM2. *Journal of Dairy Research*, 57, 89-99.
- Booth, M., Donnelly, W.J., Fhaolain, LN., Jennings, P.Y. & O’Cuinn, G. (1990b). Proline specific peptidases of *Streptococcus cremoris* AM2. *Journal of Dairy Research*, 57, 89-99.
- Booth, M., Jennings, P.Y., Fhaolain, LN. & O’Cuinn, G. (1990c). Prolidase activity of *Lactococcus lactis subsp. cremoris* AM2: partial purification and characterization. *Journal of Dairy Research*, 57, 245-54.
- Bosman, B.W., Tan, P.S.T. & Konings, W.N. (1990). Purification and characterization of a tripeptidase from *Lactococcus lactis subsp. cremoris* Wg2. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 1839-43.
- 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.

- Brignon, G., Ribadeau-Dumas, B., Mercier, C., Pellisier, P. & Das, B.C. (1977). Complete amino acid sequence of bovine α_{s2} -casein. *FEBS Letters*, 76, 274-279.
- Broadbent, J.R., Cai, H., Larsen, R.L., Hughes, J.E., Welker, D.L. & De Carvalho V.G. (2011). Genetic diversity in proteolytic enzymes and amino acid metabolism among *Lactobacillus helveticus* strains. *Journal of Dairy Science*, 94, 4313-4328.
- Casey, M., Gruskovnjak, J. & Furst, M. (1987). Die Bedeutung von Plasmin bei der Feifung von Greyerzkerkase. *Schweizerische Milchwirtschaftliche Forchung*, 16, 21-24.
- Casey, M.G. & Meyer, J. (1985). Presence of X-prolyl-dipeptidylpeptidase in lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 58, 3212-3215.
- Chao, S.H., Cheng, T.H., Chaw, C.Y., Lee, M.H., Hsu, Y.H. & Tsai, Y.C. (2006). Characterization of a novel PepF-like oligopeptidase secreted by *Bacillus amyloliquefaciens* 23-7A. *Applied Environmental Microbiology*, 72, 968-971.
- Chapot-Chartier, M.P., Nardi, M., Chopin, M.-C., Chopin, A. & Gripon, J.C. (1993). Cloning and sequencing of pepC, a cysteine aminopeptidase from *Lactococcus lactis subsp.cremoris* AM2. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 330-333.
- Chapot-Chartier, M., Deniel, C., Rousseau, M., Vassal, L. & Gripon, J. (1994) Autolysis of two strains of *Lactococcus lactis* during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 4, 251-69.
- Chich, J.F., Chapot-Chartier, M.P., Ribadeau-Dumas, B. & Gripon, J.C. (1992). Identification of the active site serine of the X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase from *Lactococcus lactis*. *FEBS Letters*, 314, 139-142.
- Chich, J.F., Rigolet, P., Nardi, M., Gripon, J.C., Ribadeau-Dumas, L. & Brunie, S. (1995). Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of PepX, an X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase from *Lactococcus lactis*. *Proteins*, 23, 278-281.
- Christensen, J.E., Johnson, M.E. & Steele, J.L. (1995). Production of Cheddar cheese using a *Lactococcus lactis subsp. cremoris* SK11 derivative with enhanced aminopeptidase activity. *International Dairy Journal*, 5, 367-79.
- Christensen, J. E., Dudley, E.G., Pedersen, J.A. & Steele, J. (1999). Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76, 217-246.
- Codex Alimentarius Commission. (2001). Comments submitted on the draft maximum level for aflatoxin M1 in milk. Codex committee on food additives and contaminants, 33rd session, Hague, The Netherlands.
- Cogan, T.M., Barbosa, M., Beuvier, E., Bianchi-Salvadore, B., Coconcelli, P.H., Fernandez, P.S., Gomez, I., Kalantzopoulos, G., Ledda, A., Medina, M., Rea, M.C. & Rodriguez, E. (1997). Characterisation of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *Journal of Dairy Research*, 64, 409-421.
- Collins, Y.F., Mc Sweeney, P.L.H. & Wilkinson, M.G. (2004). Lipolysis and catabolism of fatty acids in cheese in: P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, T.M. Cogan, T.P. Guinee (Eds.), *Cheese: Chemistry Physics and Microbiology, General Aspects* (3rd ed.), vol. 1, Elsevier Academic Press, London, 373-389.
- Commission Regulation (EC) (2006). No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of European Union*, L 364, pp 524.
- Dandoy, D., Fremaux, C., Henry de Frahan, M., Horvath, P., Boyaval, P. & Hols P., et al. (2011). The fast milk acidifying phenotype of *Streptococcus thermophilus* can be acquired by natural transformation of the genomic island encoding the cell-envelope proteinase PrtS. *Microbial Cell Factories*, 10, 1-21

- 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.
- Degraeve, P. & Martial-Gros, A. (2003). Purification and partial characterization of X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase of *Lactobacillus helveticus* ITG LH1. *International Dairy Journal*, 13, 497-507.
- Desmazeaud, M.J. & Zevaco, C. (1977). General properties and substrate specificity of an intracellular soluble dipeptidase from *Streptococcus diacetylactis*. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique*, 17, 723-736.
- Desmazeaud, M.J. & Zevaco, C. (1979). Isolation and general properties of two intracellular aminopeptidases of *Streptococcus diacetylactis*. *Milchwissenschaft*, 34, 606-610.
- Diekman, M.A., Green, M.L. (1992). Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. *Journal of Animal Science*, 70, 1615-1627.
- Doi, H., Kawaguchi, N., Ibuki, E. & Kanamori, M. (1979). Susceptibility of k-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, 71-93.
- Dudley, E.G., Husgen, A.C., He, W. & Steele, J.L. (1996). Sequencing, distribution, and inactivation of the dipeptidase A gene (pepDA) from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *Journal of Applied Bacteriology*, 178, 701-704.
- Eggimann, B. & Bachmann, B. (1980). Purification and partial characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 40, 876-882.
- Eigel, W.N. (1977). Formation of γ_1 -A, γ_2 -A² and γ_3 -A caseins by in vitro proteolysis of β -casein A² with bovine plasmin. *International Journal of Biochemistry*, 8, 187.
- Eigel, W.N., Butler, J.E., Ernstrom, C.A., Førell, H.M., Harwalker, V.R. Jenness, R. & Whitney, R. Mc.L. (1984). Nomenclature of proteins of cow's milk: Five revision. *Journal of Dairy Science*, 67, 1599.
- Engels, W.J.M. & Visser, S. (1994). Isolation and comparative characterization of compounds that contribute to the flavour of different cheese types. *Netherlands Milk Dairy Journal*, 48, 127-140.
- Exterkate, EA. (1977). Pyrrolidone carboxyl peptidase in *Streptococcus cremoris*: dependence on an interaction with membrane components. *Journal of Bacteriology*, 129, 1281-1288.
- Exterkate, F.A. & de Veer, O.J.C.M. (1987). Purification and some properties of a membrane-bound aminopeptidase A from *Streptococcus cremoris*. *Applied Environmental Microbiology*, 59, 3640-3647.
- Exterkate, F.A. (1984). Location of peptidases outside and inside the membrane of *Streptococcus cremoris*. *Applied and Environmental Microbiology*, 47, 177-183.
- Exterkate, F.A., de Jong, M., de Veer, O.J.C.M. & Baankreis, R. (1992). Location and characterisation of aminopeptidase N in *Lactococcus lactis subsp. cremoris* HP. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 37, 46-54.
- Farkey, N.Y. (2003). Cheeses/Chemistry and Microbiology of Maturation. *Elsevier Science Ltd*, 1062-1066.
- Farkye, N.Y. & Fox, P.F. (1991). Preliminary study on the contribution of plasmin to proteolysis in Cheddar cheese: cheese containing plasmin inhibitor, 6-amino-hexanoic acid. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 39, 786-788.

- Farkye, N.Y. & Fox, P.F. (1992). Contribution of plasmin to Cheddar cheese ripening: effect of added plasmin. *Journal of Dairy Research*, 59, 209-216.
- Farkye, N.Y. & Landkammer, C.F. (1992). Milk plasmin activity influence on Cheddar cheese quality during ripening. *Journal of Food Science*, 57, 622-624.
- Fenster, K.M., Parkin, K.L. & Steele, J. (1997). Characterization of a thiol-dependent endopeptidase from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *Journal of Bacteriology*, 179, 2529-2533.
- Fernandez de Palencia, P., Pelaez, C. & Martin-Hernandez, C.M. (1997). Purification of an aminopeptidase (PepC-like) from *Lactobacillus casei subsp. casei* IFPL 731 isolated from raw goat's milk cheese. *International Dairy Journal*, 7, 629-634.
- Fernandez de Palencia, P., Felipe, E., Requena, T. & Pelaez, C. (2000). The aminopeptidase C (PepC) from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32: a comparative study of PepC from lactic acid bacteria. *European Food Research and Technology*, 212, 89-94.
- Fernandez, L., Bhowmik, T. & Steele, J.L. (1994). Characterization of the *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 PepC gene. *Applied Environmental Microbiology*, 60, 333-336.
- Fernandez-Espla, M.D. & Martin-Hernandez, M.C. (1997). Purification and characterization of a dipeptidase from *Lactobacillus casei ssp. casei* IFPL 731 isolated from goat cheese made from raw milk. *Journal of Dairy Science*, 80, 1497-1504.
- Fernandez-Espla, M.D., Fox, P.E & Martin-Hernandez, M.C. (1997a). Purification and characterization of a novel serine aminopeptidase from *Lactobacillus casei subsp. casei* IFPL 731. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 45, 1624-1628.
- Fernandez-Espla, M.D., Martin-Hernandez, M.C. & Fox, P.E (1997b). Purification and characterization of a prolidase from *Lactobacillus casei subsp. casei* IFPL 731. *Applied Environmental Microbiology*, 63, 314-316.
- Foda, E.A., Hammond, E.G., Reinbold, G.W. & Hotchkiss, D.K. (1974). Role of fat in flavor of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 57, 1137-1142.
- Fox, P.E, Law, J., McSweeney, P.L.H. & Wallace, J. (1993). Biochemistry of cheese ripening. In: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 1, 2nd edn, Fox, P.E, ed., Chapman & Hall, London, 389-438.
- Fox, P.E, O'Connor, T.P., McSweeney, P.L.H., Guinee, T.P. & O'Brien, N.M. (1996). Cheese: Physical, chemical, biochemical and nutritional aspects. *Advances in Food and Nutrition Research*, 39, 163-328.
- Fox, P.E, Singh, T.K. & McSweeney, P.L.H. (1994). Proteolysis in cheese during ripening. In: *Biochemistry of Milk Products*, Andrews, A.T. and Varley, J., eds., Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1-31.
- Fox, P.F. & Stepaniak, L. (1993). Enzymes in Cheese Technology. *International Dairy Journal*, 3, 509-530.
- Fox, P.F. & McSweeney, P.L.H. (1997). Rennets: their role in milk coagulation and cheese ripening. In: *Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*, 2nd edn, pp 1-49. Law B A, ed. London: Chapman & Hall.
- Fox, P.F. & Wallace J.M. (1997). Formation of flavour compounds in cheese. *Advances in Applied Microbiology* 45, 17-85.
- Fox, P.F. (1989). Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *Journal of Dairy Science*, 72 1379-1400.

- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M. & McSweeney P.L.H. (2000). *Fundamentals of Cheese Science*. Gaithersburg, MD: Aspen, 2000.
- Frees, D., Savijoki, K., Varmanen, P. & Ingmer, H. (2007). Clp ATPases and ClpP proteolytic complexes regulate vital biological processes in low GC, Gram-positive bacteria. *Molecular Biology*, 63 (5), 1285–1295.
- Freitas, A.C., Rodrigues, D., Duarte, A.C. & Gomes, A.M. (2013). The principals of cheese making: an overview. In: *Handbook of cheese in health, Production, nutrition and medical sciences*. Edited by: Preedy, V., Watson, R.R. & Patel, V.B., Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, 2013.
- Fryer, T.F., Sharpe, M.E. & Reiter B. (1970). Utilization of milk citrate by lactic acid bacteria and ‘blowing’ of filmwrapped cheese. *Journal of Dairy Research*, 3, 17–28.
- Gagnaire, V., Thierry, A. & Leonil, J. (2001). Propionibacteria and facultatively heterofermentative lactobacilli weakly contribute to secondary proteolysis of Emmental cheese. *Lait*, 61, 339-353.
- Gallois, A. & Langlois, D. (1990). New results in the volatile odorous compounds of French cheese. *Lait*, 70, 89-106.
- Georgala, A., Karali, F., Moatsou, G. & Kaminarides, S. (2009). The presence of aflatoxin M₁ in cheeses. *Greek Journal and Dairy Science and Technology*, 1, 27-41.
- Georgalaki, M.D., Papdelli, M., Anastasiou, R., Kalantzopoulos, G. & Tsakalidou, E. (2002). Purification and characterization of the X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase (PepX) from *Streptococcus macedonicus* and cloning of the PepX gene. *Lait*, 6, 657-671.
- Gilbert, C., Atlan, D., Blanc, B. & Portalier, R. (1994). Proline iminopeptidase from *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* CNRZ397: purification and characterization. *Microbiology*, 140, 537-542.
- Gobbetti, M., Fox, R.E., Smacchi, E., Stepaniak, L. & Damiani, E. (1996). Purification and characterization of a lipase from *Lactobacillus plantarum* 2739. *Food Biochemistry*, 20, 227-246.
- Gobbetti, M., Smacchi, E., Semeraro, M., Fox, P.F., Lanciotti, R. & Cogan, T. (2001). Purification and characterization of an extracellular proline iminopeptidase from *Corynebacterium variabilis* NCDO 2101. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 449-456.
- Golden S. (2008). Colostrum management for dairy calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 24, 19-39.
- Gordon, W.G., Groves, M.L., Greenberg, R., Jones, S.B., Kalan, E.B., Peterson, R.F. & Townsend R.E. (1972). Probable identification of γ -, TS-R- and S-caseins as fragments for β -caseins. *Journal of Dairy Science*, 55 (2), 261-263.
- Grappin, R., & Beuviel, E. (1997). Review: Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. *International Dairy Journal*, 7, 751-761.
- Green, M.L. & Foster, P.M.D. (1974). Comparison of the rates of proteolysis during ripening of Cheddar cheese made with calf rennet and swine pepsin as coagulants. *Journal of Dairy Research*, 41, 269–282
- Grosclaude, F., Mahe, M.F. & Ribadeau-Dumas, B. (1973). Structure primaire de la caseine α_{s1} et de la caseine β bovine. *European Journal of Biochemistry*, 40, 323.
- Groves, M.L., Gordon, W.G. Kalan, E.B. & Jones, S.B. (1972). Composition of bovine γ -caseins A¹ and A³ and further evidence for a relationship in biosynthesis of γ - and β -caseins. *Journal of Dairy Science*, 55, 1041.

Groves, M.L., Gordon, W.G. Kalan, E.B. & Jones, S.B. (1973). TS-A², TS-B, R-and S-caseins. Their isolation, composition and relationship to the β- and γ-casein polymorphs A² and B. *Journal of Dairy Science*, 56, 558.

Guinee, T.P. & Law, B.A. (2002). Role of milk fat in hard and semihard cheeses. In: *Fats in Food Technology*, Kanes, K.R., ed., *Sheffield Academic Press*, Sheffield, 275-331.

Guinee, T.P. & McSweeney, P.L.H. (2006). Significance of milk fat in cheese. *Advanced Dairy Chemistry, Volume 2 - Lipids* (eds. P.F. Fox and McSweeney, P.L.H.), 3rd edition, pp. 377-440. Springer Science + Business Media, New York.

Habibi-Nafaji, M.B. & Lee, B.H. (1994). Purification and characterization of X-prolyl-dipeptidyl-aminopeptidase from *Lactobacillus casei subsp. casei* LLG. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 42, 280-286.

Harding, F. (1999). *Milk Quality*. First edition, Chapman and Hall Food Science Book Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Maryland.

Harper, W.J. & Hall, C.W. (1976). *Dairy technology and engineering*. The AVI Publishing Co Inc, Westport, Connecticut, 631.

Hayes, M.G., Hurley, M.J., Magboul, A.A.A., Larsen, L.B., Heegaard, C.W., Oliveira, J.C., McSweeney, P.L.H. & Kelly, A.L. (2001). Thermal inactivation kinetics of bovine cathepsin D. *Journal of Dairy Research*, 68, 267-276.

Hickey, M.W., Van Leeuwen, H., Hillier, A.J. & Jago, G.R. (1983). Amino acid accumulation in Cheddar cheese manufactured from normal and ultrafiltered milk. *Australian Journal of Dairy Technology*, 38, 110-113.

Houbart, V., Ribadeau-Dumas, B., Chich, J.-F. (1995). Synthesis of enterostatin-amide by the Xaa-prolyl dipeptidyl aminopeptidase from *Lactococcus lactis subsp. lactis* NCDO 763. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 21, 149-159.

Hutkins, R.W. & Ponne, C. (1991). Lactose uptake driven by galactose efflux in *Streptococcus thermophilus*: evidence for a galactose-lactose antiporter. *Applied Environmental Microbiology*, 57, 941-944.

Hutkins, R.W. (2001). Metabolism of starter cultures. pp. 207-242. In: E.H. Marth and J.L. Steele (eds.), *Applied Dairy Microbiology*, Mercel Dekker, Inc., New York.

Jandal, J.M. (1996). Comparative aspects of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 22, 177-185.

Juillard, V., Le Bars, D., Kunji, E.R.S., Konings, W.N., 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.

Kaminogawa, S., Azuma, N., Hwang, I.K., Suzuki, Y. & Yamauchi, K. (1984) Isolation and characterization of a prolidase from *Streptococcus cremoris* H61. *Agricultural and Biological Chemistry*, 48, 3035-3040.

Kamkar, A., Karim, G., Shojaee Aliabadi, F. & Khaksar, R. (2008). Fate of aflatoxin M1 in Iranian white cheese processing. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 2236-2238.

Karagözlu, C., Kinik, O. & Akbulut, N. (2008). Effects of fully and partial substitution of NaCl by KCl on physico-chemical and sensory properties of white pickled cheese. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 59, 181-191.

- Katsiari, M.C., Voutsinas, L.P., Alichanidis, E., & Roussis, I.G. (1997). Reduction of sodium content in Feta cheese by partial substitution of NaCl by KCl. *International Dairy Journal*, 7, 465–472.
- Katsiari, M.C., Voutsinas, L.P., Alichanidis, E. & Roussis, I.G. (2000). Lipolysis in reduced sodium Feta cheese made by partial substitution of NaCl by KCl. *International Dairy Journal*, 10, 369–373.
- Katsiari, M.C., Alichanidis, E., Voutsinas, L.P. & Roussis, I.G. (2001). Proteolysis in reduced sodium Kefalograviera cheese made by partial replacement of NaCl with KCl, *Food Chemistry*, 73, 31–43.
- Khalid, N.M. & Marth, E.H. (1990a). Partial purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus helveticus* CNRZ 32. *Systematic and Applied Microbiology*, 13, 311-319.
- Khalid, N.M. & Marth, E.H. (1990b). Purification and partial characterization of an X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase from *Lactobacillus helveticus* CNRZ 32. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 381-388.
- Kiefer-Partsch, B., Bockelmann, W., Geis, A., Teuber, M. (1989). Purification of an X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase from *Lactococcus lactis subsp. cremoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 31, 75-78.
- Kim, H.S., Park, D.W., Youn, Y.K., Jo, Y.M., Kim, J.Y., Song, J.Y., Sohn, J.W., Cheong, H.J., Kim, W.J., Kim, M.J. & Choi, W.S. (2010). Liver abscess and empyema due to *Lactococcus lactis cremoris*. *Journal of Korean Medical Science*, 25(11), 1669-1671.
- Klein, J.R., Klein, U., Schad, M. & Plapp, R. (1993). Cloning, DNA sequence analysis and partial characterization of pepN, a lysyl aminopeptidase from *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* DSM7290. *European Journal of Biochemistry*, 217, 105-114.
- Klein, J.R., Henrich, B. & Plapp, R. (1994a). Cloning and nucleotide sequence analysis of *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* DSM7290 cysteine aminopeptidase gene pepC. *FEMS Microbiology Letters*, 124, 291-300.
- Klein, J.R., Schmidt, U. & Plapp, R. (1994b). Cloning, heterologous expression, and sequencing of a novel proline iminopeptidase gene, pepI, from *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* DSM7290. *Microbiology*, 140, 1133-1139.
- Klein, J.R., Dick, A., Schick, J., Matern, H.T., Henrich, B. & Plapp, R. (1995). Molecular cloning and DNA sequence analysis of pepL, a leucyl-aminopeptidase gene from *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* DSM7290. *European Journal of Biochemistry*, 228, 570-578.
- Klein, J.R., Schick, J., Henrich, B. & Plapp, R. (1997). *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* DSM7290 pepG gene encodes a novel cysteine aminopeptidase. *Microbiology*, 143 (2), 527-537.
- Kok, J. (1990). Genetics of the proteolytic system of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 7, 15-42.
- Kunji, E.R., Mierau, I. Hagting, A. Poolman, B. & Konings, W.N. (1996). The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70, 187–221.
- l'Anson, K.J., Movahedi, S., Griffin, H.G., Gasson, M.J. & Mulholland, F. (1995). A non-essential glutamyl aminopeptidase is required for optimal growth of *Lactococcus lactis* MG1363 in milk. *Microbiology*, 141(Pt. 11), 2873-2881.
- Lane, C.N. & Fox, R.E. (1996). Contribution of starter and adjunct lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese during ripening. *International Dairy Journal*, 6, 715-728.

- Larsen, C.N., Price, J.S. & Wilkinson, K.D. (1996). Substrate binding and catalysis by ubiquitin C-terminal hydrolases: identification of two active site residues. *Biochemistry*, 35, 6735-6744.
- Law, B.A. (1987). Proteolysis in relation to normal and accelerated cheese ripening. In: P.F Fox (Ed.), *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*, Vol. 1., *Elsevier Applied Science*, London, 365–392.
- Law, J. & Haandrikman, A. (1997). Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 7, 1-11.
- Le Bars, D. & Gripon, J.C. (1989). Specificity of plasmin towards bovine Ots2-casein. *Journal of Dairy Research*, 56, 817-821.
- Leenhouts, K., Bolhuis, A., Boot, J., Deutz, I., Toonen, M., Venema, G., Kok, J. & Ledebøer, A. (1998). Cloning, expression and chromosomal stabilization of the *Propionibacterium shermanii* proline iminopeptidase gene (pip) for food-grade application in *Lactococcus lactis*. *Applied Environmental Microbiology*, 64, 4736-4742.
- Liu, M, Bayjanov, J.R., Renckens, B., Nauta, A. & Siezen, R.J. (2010). The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. *BMC Genomics*, 11, 36.
- Lloyd, R.J. & Pritchard, G.G. (1991). Characterization of X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Journal General Microbiology*, 137, 49-55.
- Lopez-Kleine, L., Monnet, V., Pechoux, C. & Trubuil, A. (2008). Role of bacterial peptidase F inferred by statistical analysis and further experimental validation. *HFSP Journal*, 2(1), 29-41.
- Lynch, C.M., McSweeney, P.L.H., Fox, R.E., Cogan, T.M. & Drinan, F.D. (1996). Manufacture of Cheddar cheese with and without adjunct lactobacilli under controlled microbiological conditions. *International Dairy Journal*, 6, 851-867.
- Lynch, C.M., McSweeney, P.L.H., Fox, RE, Cogan, T.M. & Drinan, F.D. (1997). Contribution of starter lactococci and non-starter lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese with a controlled microflora. *Lait*, 77, 441-459.
- Magboul, A.A.A. & McSweeney, P.L.H. (1999a). PepN-like aminopeptidase from *Lactobacillus curvatus* DPC2024: purification and characterization. *Lait*, 79, 515-526.
- Magboul, A.A.A. & McSweeney, P.L.H. (1999b). Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus curvatus* DPC2024. *International Dairy Journal*, 9, 107-116.
- Magboul, A.A.A. & McSweeney, P.L.H. (1999c). Purification and characterization of a dipeptidase from *Lactobacillus curvatus* DPC2024. *Food Chemistry*, 67, 233-240.
- Magboul, A.A.A. & McSweeney, P.L.H. (2000). Purification and characterization of an X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase from *Lactobacillus curvatus* DPC2024. *Lait*, 80, 385-396.
- Mars, I. & Monnet, V. (1995). An aminopeptidase P from *Lactococcus lactis* with original specificity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1243(2), 209-215.
- Matos, J., Nardi, M., Kumura, H. & Monnet, V. (1998). Genetic characterization of pepP, which encodes an aminopeptidase P whose deficiency does not affect *Lactococcus lactis* growth in milk, unlike deficiency of the X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase. *Applied Environmental Microbiology*, 64, 4591-4595.
- Mayo, B., Kok, J., Venema, K., Bockelmann, W., Teuber, M., Reinke, H. & Venema, G. (1991). Molecular cloning and sequence analysis of the X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase gene from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Applied Environmental Microbiology*, 57, 38-44.

- McDonnell, M., Fitzgerald, R., Fhaolain, I.N., Jennings, P.V. & O’Cuinn, G. (1997). Purification and characterization of aminopeptidase P from *Lactococcus lactis subsp. cremoris*. *Journal of Dairy Research*, 64(3), 399-407.
- McGugan, W.A., Emmons, D.B. & Larmond, E. (1979) Influence of volatile and non-volatile fractions on intensity of Cheddar cheese flavor. *Journal of Dairy Science*, 62, 398-402.
- McSweeney, P.L.H & Fox, P.F. (1997). Chemical methods for the characterization of proteolysis in cheese during ripening. *Lait*, 77, 41-76.
- McSweeney P.L.H & Sousa M.J. (2000). Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheese during ripening. *Le Lait*, 80, 293-324.
- McSweeney P.L.H. & Fox P.F. (2004). Metabolism of residual lactose and of lactate and citrate. In: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol 1: General Aspects, 3rd edn, pp 361-372. Fox P F, McSweeney P. L. H., Cogan T. M. and Guinee T. P., eds. London: Elsevier, 2004.
- McSweeney, P.L.H. (2007). *Cheese Problems Solved*. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd.
- McSweeney, P.L.H., Olson, N.F., Fox, P.F., Healy, A. & Højrup, P. (1993). Proteolytic specificity of chymosin on bovine α_{s1} casein. *Journal of Dairy Research*, 60, 401-412.
- McSweeney, P.L.H., Walsh, E.M., Fox, RE, Cogan, T.M., Drinan, ED. and Castelo-Gonzalez, M. (1994). A procedure for the manufacture of Cheddar cheese under controlled bacteriological conditions and the effect of adjunct lactobacilli on cheese quality. *Irish J. Agric. Food Res.* 33, 183-192.
- Mercier, J.C., Grosclaude, F. & Ribadeau-Dumas, B. (1971). Structure de la caséine α_{s1} -bovine. Séquence complète. *European Journal Biochemistry*, 23, 41-51.
- Mercier, J.C., Brignon, G. & Ribadeau-Dumas, B. (1973). Structure primaire de la caséine κ B bovine. *European Journal of Biochemistry*, 35, 222-235.
- Meyer, J. & Jordi, R. (1987). Purification and characterization of X-prolyl-dipeptidyl-aminopeptidase from *Lactobacillus lactis* and from *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Dairy Science*, 70, 738-745.
- Meyer, J. & Spahni, A. (1998). Influence of X-prolyldipeptidylaminopeptidase of *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* on proteolysis and taste of Swiss Gruyere cheese. *Milchwissenschaft*, 53, 449-453.
- Meyer-Barton, E.C., Klein, J.R., Imam, M. & Plapp, R. (1993). Cloning and sequence analysis of the X-prolyl-dipeptidyl-aminopeptidase gene (pepX) from *Lactobacillus delbrueckii spp. lactis* DSM7290. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 40, 82-89.
- Midwinter, R.G. & Pritchard, G.G. (1994). Aminopeptidase N from *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* NCDO 573: purification and properties. *Journal of Applied Bacteriology*, 77, 288-295.
- Mierau, I., Kunji, E.R., Leenhouts, K.J., Hellendoorn, M.A., Haandrikman, A.J., Poolman, B. Konings, W.N., Venema, G. & Kok, J. (1996). Multiple-peptidase mutants of *Lactococcus lactis* are severely impaired in their ability to grow in milk, *Journal of Bacteriology*, 178, 2794-2803.
- Mierau, I., Tan, P.S.T., Haandrikman, A.J., Kok, J., Leenhouts, K.J., Konings, W.N. & Venema, G. (1993). Cloning and sequencing of the gene for a lactococcal endopeptidase, an enzyme with sequence similarity to mammalian enkephalinase. *Journal of Bacteriology*, 175, 2087-2096.
- Mistou, M.Y. & Gripon, J.C. (1998). Catalytic properties of the cysteine aminopeptidase PepC, a bacterial bleomycin hydrolase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1383(1), 63-70.

- Mistou, M.Y., Rigolet, P., Chapot-Chartier, M.P., Nardi, M., Gripon, J.C. & Brunie, S. (1994). Crystallization and preliminary X-ray analysis of PepC, a thiol aminopeptidase from *Lactococcus lactis* homologous to bleomycin hydrolase. *Journal of Molecular Biology*, 237(1), 160-162.
- Miyakawa, H., Kobayashi, S., Shimamura, S., Tomita, M. (1991). Purification and characterization of an X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase from *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* LBU-147. *Journal of Dairy Science*, 74, 2375-2381.
- 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.
- Miyakawa, H., Hashimoto, I., Nakamura, T., Ishibashi, N., Shimamura, S. and Igoshi, K. (1994). Purification and characterization of an X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase from *Lactobacillus helveticus* LHE-511. *Milchwissenschaft*, 49, 670-673.
- Moatsou, G. (2011). Indigenous enzymatic activities in ovine and caprine milks. *International Journal of Dairy Technology*, 63, 16-31.
- Molimard, P. & Spinnler, H.E. (1996). Compounds involved in the flavor of surface mould-ripened cheeses: origins and properties. *Journal of Dairy Science*, 79, 169-184.
- Monnet, V., Condon, S., Cogan, T.M. & Gripon, J.C. (1996). Metabolism of starter cultures. In: *Dairy Starter Cultures* (Ed. T. M. Cogan, J.-P. Accolas) Wiley- VCH, Inc. New York, 47-99.
- Monnet, V., Nardi, M., Chopin, A., Chopin, M.C. & Gripon, J.C. (1994). Biochemical and genetic characterization of PepF, an oligopeptidase from *Lactococcus lactis*. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 32070-32076.
- Montel, M.C., Seronie, M.P., Talon, R. & Hebraud, M. (1995). Purification and characterization of a dipeptidase from *Lactobacillus sake*. *Applied Environmental Microbiology*, 61, 837-839.
- Morel, F., Frot-Coutaz, J., Aubel, D., Portalier, R. & Atlan, D. (1999). Characterization of a prolidase from *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* CNRZ 397 with an unusual regulation of biosynthesis. *Microbiology*, 145, 437-446.
- Moss, M.O. (1989). Mycotoxins of *Aspergillus* and other filamentous fungi. In: *Filamentous Fungi in Foods and Feeds*. Eds M.O. Moss, B. Jarvis & F.A. Skinner. *Journal of Applied Bacteriology*, Symposium Supplement No. 18, 69S-81S.
- Mou, L., Sullivan, J.J. & Jago, G.R. (1975). Peptidase activities in group N streptococci. *Journal of Dairy Research*. 42(1), 147-155.
- Mulvihill, D.M. & McCarthy, A. (1994). Proteolytic and rheological changes during ageing of cheese analogues made from rennet casein. *International Dairy Journal*, 4, 15-23.
- Nardi, M., Chopin, M.C., Chopin, A., Cals, M.M. & Gripon, J.C. (1991). Cloning and DNA sequence analysis of an X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase gene from *Lactococcus lactis subsp. lactis* NCDO 763. *Applied Environmental Microbiology*, 57, 45-50.
- Nardi, M., Renault, P. & Monnet, V. (1997). Duplication of the pepF gene and shuffling of DNA fragments on the lactose plasmid of *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*, 179, 4164-4171.
- Nega, A. & Moatsou, G. (2012). Proteolysis and related enzymatic activities in ten Greek cheese varieties. *Dairy Science & Technology*, 92 (1), 57-73.

- Neviani, E., Boquien, C.Y., Monnet, V., Thanh, L.P. & Gripon, J.C. (1989). Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactococcus lactis subsp. cremoris* AM2. *Applied Environmental Microbiology*, 55(9), 2308-2314.
- Niven, G.W. (1991). Purification and characterization of aminopeptidase A from *Lactococcus lactis subsp. lactis* NCDO 712. *Journal of General Microbiology*, 137, 1207-1212.
- Niven, G.W., Holder, S.A. & Stroman, P. (1995). A study of the substrate specificity of aminopeptidase N from *Lactococcus lactis subsp. cremoris* Wg2. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44, 100-105.
- Olivecrona, T., Vilaro, S. & Olivecrona, G. (2003). Lipases in milk. In: *Advanced Dairy Chemistry: Proteins*, 3rd edn (eds. P.F. Fox & P.L.H. Mc Sweeney), vol. 1, pp. 473-494, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Ollikainen, P. & Nyberg, K. (1988). A study of plasmin activity during ripening of Swisstype cheese. *Milchwissenschaft*, 43, 497-499.
- Ollikainen, P. & Kivela, T. (1989). The importance of plasmin in Swiss-type cheese ripening. *Milchwissenschaft*, 44, 204-206.
- Parente, E. & Cogan, T.M. (2004). Starter cultures: general aspects. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol 1: General Aspects, 3rd edn, Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M. & Guinee, T.P., eds. London: Elsevier, 123-148.
- Pereira P.C. (2014). Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition*, 30(6), 619-627.
- Politis, I., Lachance, E., Block, E. & Turner, J.D. (1989). Plasmin and plasminogen in bovine milk: a relationship with involution. *Journal of Dairy Science*, 72, 900-906.
- Politis, I., Gorewit, R.C. & Barbano, D.M. (1992). Distribution of plasminogen and plasmin in fractions of bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 75, 1402-1410.
- Pritchard, G.G. & Coolbear, T. (1993). The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12, 179-206.
- Pritchard, G.G., Freebairn, A.D. & Coolbear, T. (1994). Purification and characterization of an endopeptidase from *Lactococcus lactis subsp. lactis* SK11. *Microbiology*, 140, 923-930.
- Pruitt, K. (2003). Lactoperoxidase, In: *Advanced Dairy Chemistry: Proteins*, 3rd edn (eds. P.F. Fox & P.L.H. Mc Sweeney), vol. 1, pp. 563-570, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Ribadeau-Dumas, B., Brignon, G., Grosclaude, F. & Mercier, J.C. (1972). Structure primaire de la caséine β bovine. Séquence complete. *European Journal of Biochemistry*, 25, 505-514.
- Rigolet, P., Mechin, I., Delage, M.M. & Chich, J.F. (2002). The structural basis for catalysis and specificity of the X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase from *Lactococcus lactis*. *Structure*, 10(10), 1383-1394.
- Rul, E. & Monnet, V. (1997). Presence of additional peptidases in *Streptococcus thermophilus* CNRZ 302 compared to *Lactococcus lactis*. *Journal of Applied Microbiology*, 82, 695-704.
- Rul, E., Monnet, V. & Gripon, J.C. (1994). Purification and characterization of a general aminopeptidase (St-PepN) from *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* CNRZ 302. *Journal of Dairy Science*, 77, 2880-2889.

- Sahlstrom, S., Chrzanowska, J. & Sorhaug, T. (1993). Purification and characterization of a cell wall peptidase from *Lactococcus lactis subsp. cremoris* IMN-C12. *Applied Environmental Microbiology*, 59, 3076-3082.
- Sanz, Y. & Toldrá, E. (1997). Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus sake*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1552-1558.
- Sanz, Y., Mulholland, E. & Toldrá, E. (1998). Purification and characterization of a tripeptidase from *Lactobacillus sake*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 349-353.
- Sanz, Y., Toldrá, F., Renault, P., & Poolman, B. (2003). Specificity of the second binding protein of the peptide ABC-transporter (Dpp) of *Lactococcus lactis* IL1403. *FEMS Microbiology Letters*, 227, 33-38.
- Sasaki, M., Bosman, B.W. & Tan, R.S.T. (1996). A new broad substrate specificity aminopeptidase from the dairy organism *Lactobacillus helveticus* SBT2171. *Microbiology*, 42, 799-808.
- Savijoki, K. & Palva, A. (2000). Purification and molecular characterization of a tripeptidase (PepT) from *Lactobacillus helveticus*. *Applied Environmental Microbiology*, 66, 794-800.
- Savijoki, K., Ingmer, H. & Varmanen, P. (2006) Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 394-406.
- Scherze, I., Sienkiewicz, T. & Krenkel, K. (1994) Untersuchungen zum proteolytischen Abbau der Caseine. 2. Einfluß von Plasmin auf die Proteolyse im Gaudakase. *Milchwissenschaft*, 49, 564-569.
- Shankar, P. A. (1977). Interrelationships of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in yogurt culture. Thesis, University of Reading.
- Shakeel-ur-Rehman & Farkye, N.C. (2003a). Lipases and Esterases. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences* (eds. H. Roginski, J.W. Fuquay & P.F. Fox), pp. 926-929. Academic Press, Amsterdam.
- Shakeel-ur-Rehman & Farkye, N.C. (2003b). Phosphatases. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences* (eds. H. Roginski, J.W. Fuquay & P.F. Fox), pp. 934-938. Academic Press, Amsterdam.
- Shakeel-ur-Rehman & Farkye, N.C. (2003c). Lactoperoxidase. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences* (eds. H. Roginski, J.W. Fuquay & P.F. Fox), pp. 938-941. Academic Press, Amsterdam.
- Shakeel-ur-Rehman & Farkye, N.C. (2003). Indigenous phosphatases in milk. In: *Advanced Dairy Chemistry: Proteins, 3rd edn* (eds. P.F. Fox & P.L.H. Mc Sweeney), vol.1 pp. 523-543. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Shao, W., Yuksel, G.U., Dudley, E.G., Parkin, K.L. & Steele, J. (1997). Biochemical and molecular characterization of PepR, a dipeptidase, from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *Applied Environmental Microbiology*, 63, 3438-3443.
- Smacchi, E., Gobbetti, M., Lanciotti, R. & Fox, P.F. (1999). Purification and characterization of an extracellular proline iminopeptidase from *Arthrobacter nicotianae* 9458. *FEMS Microbiology Letters*, 178, 191-197.
- Somers, J.M., O'Brien, B., Meanev, W.J. & Kelly, A.L., (2003). Heterogeneity of proteolytic enzyme activities in milk samples of different somatic cell count. *Journal of Dairy Research*, 70(1), 45-50.
- Song, X.G., Nagaoka, S., Kanamaru, V. & Kuzuya, V. (1993). Plasmin and plasminogen activities and casein degradation during ripening of Swiss-type cheese. *Nippon Schokuhin Kogyo Gakkaishi*, 40, 287-295.

- Sousa, M.J., Ardö, Y. & McSweeney, P.L.H. (2001). Advances in study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 11, 327-345.
- Soxhlet, F. (1877). Die darstellunghaltbarer labflussigkeiten. *Milchzeitung*, 6, 495-513.
- Sridhar, V.R., Hughes, J.E., Welker, D.L., Broadbent, J.R. & Steele, J.L. (2005). Identification of endopeptidase genes from the genomic sequence of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 and the role of these genes in hydrolysis of model bitter peptides. *Applied Environmental Microbiology*, 71, 3025–3032.
- Stepaniak, L. & Fox, R.E. (1995). Characterization of the principal intracellular endopeptidase from *Lactococcus lactis subsp. lactis* MG1363. *International Dairy Journal*, 5, 699-713.
- Stroman, P. (1992). Sequence of a gene (lap) encoding a 95.3-kDa aminopeptidase from *Lactococcus lactis subsp. cremoris* Wg2. *Gene*, 113, 107-112.
- Stuckey, K., Klein, J.R., Schuller, A., Matern, H., Henrich, B. & Plapp, R. (1995). Cloning and DNA sequence analysis of pepQ, a prolidase gene from *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* DSM 7290 and partial characterization of its products. *Molecular Genomics and Genetics*, 247, 494-500.
- Sullivan, J.J., Jago, G.R. & Mou, L. (1975). Peptidase activities ingroup N streptococci. *Journal of Dairy Research*, 42(1), 147-155.
- Tan, P.S.T. & Konings, W.N. (1990). Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactococcus lactis subsp. cremoris* Wg2. *Applied Environmental Microbiology*, 56, 526-32.
- Tan, P.S.T., Pos, K.M. & Konings, W.N. (1991). Purification and characterization of an endopeptidase from *Lactococcus lactis subsp. cremoris* Wg2. *Applied Environmental Microbiology*, 57, 2593-9.
- Tan, P.S.T., Chapot-Chartier, M.P., Pos, K.M., Rousseau, M., Boquein, C.Y., Gripon, J.C. & Konings, W.N. (1992a). Localization of peptidases in Lactococci. *Applied Environmental Microbiology*, 58, 285-90.
- Tan, P.S.T., van Alen-Boerrigter, J.J., Poolman, B., Siezen, R.J., de Vos, W.M. & Konings, W.N. (1992b). Characterization of the *Lactococcus lactis* pepN gene encoding an aminopeptidase homologous to mammalian aminopeptidase N. *FEBS Letters*, 306, 9-16.
- Tan, P.S.T., Poolman, B. & Konings, W.N. (1993). Proteolytic enzymes of *Lactococcus lactis*. *Journal of Dairy Research*, 60, 269-286.
- Tan, P.S.T., Sasaki, M., Bosman, B.W. & Iwasaki, T. (1995). Purification and characterization of a dipeptidase from *Lactobacillus helveticus* SBT 2171. *Applied Environmental Microbiology*, 61, 3430-3435.
- Theriot, C.M., Tove, S.R. & Grunden, A.M. (2009). Biotechnological applications of recombinant microbial prolidases. *Advances in Applied Microbiology*, 68, 99–132.
- Trujillo, A.J., Buffa, M., Casals, I., Fernandez, P. & Guamis, B. (2002). Proteolysis in goat cheese made from raw, pasteurized or pressure-treated milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 3, 309-319.
- Tsakalidou, E. & Kalantzopoulos, G. (1992), Purification and partial characterization of an intracellular aminopeptidase from *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* strain ACA-DC 114. *Journal of Applied Bacteriology*, 72, 227–232.
- Tsakalidou, E., Zoidou, E. & Kalantzopoulos, G. (1992). Esterase activities of cell free extracts from strains of *Lactococcus lactis subsp. lactis* isolated from traditional Greek cheese. *Journal of Dairy Research*, 59, 111-13.

- Tsakalidou, E., Anastasiou, R., Papadimitriou, K., Moscholopoulou, E. & Kalantzopoulos, G. (1998). Purification of an intracellular X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase from *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 4. *Journal of Biotechnology*, 59, 203-211.
- Tsigkros, D., Folland, E., Moate, R. & Brennan, C.S. (2003). Feta cheese texture: the effect of caprine and ovine milk concentration. *International Journal of Dairy Technology*, 56 (4), 233-236.
- Upadhyay, V.K. & McSweeney, P.L.H. (2003). Dairy Processing-Improving Quality. University College Cork, Ireland, ch.19, *Woodhead Publishing Limited*, 419-447.
- Upadhyay, V.K, McSweeney, P.L.H., Magboul, A.A.A. & Fox, P. (2004). Proteolysis in cheese during ripening. In: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol 1: General Aspects, 3rd edn. Fox P F, McSweeney P L H, Cogan T M and Guinee T P, eds. London: Elsevier, 391-434.
- van Alen-Boerrigter, I.J., Baankreis, R. & de Vos, W.M. (1991). Characterization and overexpression of the *Lactococcus lactis* pepN gene and localization of its product, Aminopeptidase N. *Applied Environmental Microbiology*, 57, 2555-2561.
- van Boven, A., Tan, P.S.T. & Konings, W.N. (1988). Purification and characterization of a dipeptidase from *Streptococcus cremoris* Wg2. *Applied Environmental Microbiology*, 54, 43-9.
- van Egmond, H.P. (1991). Mycotoxins. *International Dairy Federation*, 9101, 131-135.
- Varmanen, P., Vesanto, E., Steele, J.L. & Palva, A. (1994). Characterization and expression of the pepN gene encoding a general aminopeptidase from *Lactobacillus helveticus*. *FEMS Microbiology Letters*, 124, 315-320.
- Varmanen, P., Steele, J. & Palva, A. (1996a). Characterization of a prolinase gene and its product and an adjacent ABC transporter gene from *Lactobacillus helveticus*. *Microbiology*, 142, 809-816.
- Varmanen, P., Rantanen, T. & Palva, A. (1996b). An operon from *Lactobacillus helveticus* composed of a proline iminopeptidase gene (pepI) and two genes coding for putative members of the ABC transporter family of proteins. *Microbiology*, 142, 3459-3468.
- Varmanen, P., Rantanen, T., Palva, A. & Tynkkynen, S. (1998). Cloning and characterization of a prolinase gene (pepR) from *Lactobacillus rhamnosus*. *Applied Environmental Microbiology*, 64, 1831-1836.
- Vesanto, E., Varmanen, P., Steele, J.L., Palva, A. (1994). Characterization and expression of the *Lactobacillus helveticus* pepC gene encoding a general aminopeptidase. *European Journal of Biochemistry*, 224, 991-997.
- Vesanto, E., Savijoki, K., Rantanen, T., Steele, J.L. & Palva, A. (1995). Molecular characterization, heterologous expression and purification of an X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase (pepX) gene from *Lactobacillus helveticus*. *Microbiology*, 141, 3067-3075.
- Vesanto, E., Peltoniemi, K., Purtsi, T., Steele, J.L. & Palva, A. (1996). Molecular characterization, over-expression and purification of a novel dipeptidase from *Lactobacillus helveticus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45, 638-645.
- Visser, S. & Slangen, K.J. (1977). On the specificity of chymosin (rennin) in its action on bovine β -casein. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 31, 16-30.
- Visser, S., Slangen, C.J., Ahing, A.C. & Vreeman, H.J. (1989). Specificity of bovine plasmin on its action on bovine Ots2-casein. *Milchwissenschaft*, 44, 335-339.

Voudouris, E., Drainas, K., Roussis, J. & Sari, Ch. (1986). Final report of research project on: Study of exellular proteolytic and lipolytic enzymes of psychrotrops bacteria and their effect on milk and dairy products. *Ministry of Research and Technology*, Greece.

Walstra, P. (1999). Dairy Technology: Principles of Milk Properties and Processes. *Marcel Dekker, Inc., New York*.

Walstra, P. & Jenness, R. (1984). Dairy Chemistry and Physics. John Wiley & Sons, New York.

WHO, (2011). Milk and Milk Products, Second Edition, *World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations*, Rome.

Wohlrab, Y. & Bockelmann, W. (1992). Purification and characterization of a dipeptidase from *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. *International Dairy Journal*, 2, 345-361.

Wohlrab, Y. & Bockelmann, W. (1993). Purification and characterization of a second aminopeptidase (pepC-like) from *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* B14. *International Dairy Journal*, 3(8), 685-701.

Woo, A.H., & Lindsay, R.C. (1984). Concentrations of major free fatty acids and flavour development in Italian cheese varieties. *Journal of Dairy Science*, 67, 960-968.

Woo, A.H., Kollodge, S. & Lindsay, R. C. (1984). Quantification of major free fatty acids in several cheese varieties. *Journal Dairy Science*, 67, 874-878.

Yan, T.R., Lin, M.Z., Lin, M.J. & Sun, B.J. (1991). Purification and characterization of an X-prolyl-dipeptidyl-aminopeptidase from *Streptococcus cremoris* nTR. *Journal of Chinese Biochemistry Society*, 20, 21-32.

Yoshpe-Besancon, I., Gripon, J.C. & Ribadeau-Dumas, B. (1994). Xaa-Pro-dipeptidyl-aminopeptidase from *Lactococcus lactis* catalyses kinetically controlled synthesis of peptide bonds involving proline. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 20, 131-140.

Yuksel, G.U. & Steele, J.L. (1996). DNA sequence analysis, expression, distribution and physiological role of the Xaa-prolyldipeptidyl aminopeptidase gene from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44, 766-773.

Zerfiridis, G.K. (1985). Potential aflatoxin hazards to human health from direct mold Teleme cheese. *Journal of Dairy Science*, 68, 2184-2188.

Zevaco, C., Monnet, V. & Gripon, J.C. (1990). Intracellular X-prolyl dipeptidyl peptidase from *Lactococcus lactis subsp. lactis*: purification and properties. *Journal of Applied Bacteriology*, 68, 357-366.

Ελληνική Βιβλιογραφία

Ανυφαντάκης, Ε.Μ. (2004). Τυροκομία. Τόμος Β. *Εκδόσεις Σταμούλης*, Αθήνα 2004.

Βουδούρη, Ε.Κ., Κοντομηνά, Μ.Γ. (2009). Εισαγωγή στην Χημεία των Τροφίμων. *Οργανισμός Εκδόσεων Διδακτικών Βιβλίων*, 2009.

Ζερφυρίδης, Γ. Κ. (2001). Τεχνολογία Προϊόντων Γάλακτος-Τυροκομία. *2η Έκδοση*, Θεσσαλονίκη, 2001.

Κεχαγιάς Χ. (1997), «Σύσταση και φυσικο-χημικές ιδιότητες του γάλακτος» στο «Τεχνολογία γάλακτος & Γαλακτοκομικών προϊόντων», κεφ. 2, σελ. 18-26, Τ.Ε.Ι., Αθήνα.

Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, Μαλακά τυριά και τυριά αλοифώδους υφής, Φέτα (Feta), Απόφαση 313025/11.1.94 του Υφυπουργού Γεωργίας (ΦΕΚ 8/Β/11.1.94, 101/Β/16.2.94), Άρθρο 2.

Μάντης Α.Ι. (2000). Υγιεινή και τεχνολογία του γάλακτος και των προϊόντων του. Τόμος Γ', *Εκδόσεις Αδελφών Κυριακίδη Α.Ε., Θεσσαλονίκη*, 2000.

ΟΔΗΓΙΑ 92/46/ΕΟΚ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ της 16ης Ιουνίου 1992 για τη θέσπιση των υγειονομικών κανόνων για την παραγωγή και την εμπορία νωπού γάλακτος, θερμικά επεξεργασμένου γάλακτος και προϊόντων με βάση το γάλα, 1992.

Σαμούρης, Γ. (2008). Παραδοσιακά τυριά ωρίμανσης από νωπό γάλα. *Περιοδικό ΕΘΙΑΓΕ*, τεύχος 33, 12-15.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΕΠΙΤΑΧΥΝΣΗ ΤΟΥ ΣΤΑΔΙΟΥ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ –

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ ΣΕ ΕΝΖΥΜΑ ΤΥΡΙΟΥ ΚΑΙ ΣΤΟ ΣΤΑΔΙΟ ΤΗΣ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ

3.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ωρίμανση του τυριού, θεωρείται από τα πιο πολύπλοκα και απαιτητικά στάδια της παρασκευής του, κατά τη διάρκεια του οποίου πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στη διατήρηση των κατάλληλων συνθηκών θερμοκρασίας και υγρασίας. Όσο αυξάνεται ο απαιτούμενος χρόνος ωρίμανσης, αυξάνεται επακόλουθα και το κόστος διατήρησης και συντήρησης με συνέπεια την οικονομική επιβάρυνση της βιομηχανίας παρασκευής τυριού. Αυτός είναι ένας από τους πολλούς λόγους που εδώ και πολλά χρόνια πραγματοποιούνται μελέτες για την εύρεση τρόπων επιτάχυνσης του σταδίου ωρίμανσης. Διάφορες προσεγγίσεις έχουν υιοθετηθεί και άλλες βρίσκονται ακόμη υπό μελέτη, συμπεριλαμβανομένων και των ακόλουθων :

1. Αύξηση της θερμοκρασίας ωρίμανσης.
2. Προσθήκη εξωγενών ενζύμων ή εξασθενημένων καλλιιεργειών εκκίνησης (attenuated starters).
3. Χρήση πρόσθετων καλλιιεργειών.
4. Γενετική τροποποίηση των βακτηριακής καλλιιεργείας εκκίνησης.
5. Επεξεργασία με Υπερυψηλή Υδροστατική Πίεση.

Οι συγκεκριμένες μέθοδοι επιτάχυνσης του σταδίου ωρίμανσης του τυριού αναλύονται στη συνέχεια.

3.2. ΑΥΞΗΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ

Η μέθοδος αυτή είναι από τις πιο απλές, από τεχνολογικής άποψης, τεχνικές επιτάχυνσης της ωρίμανσης και οι χαμηλότερες απαιτήσεις για ψύξη παρέχουν στον παραγωγό τη δυνατότητα της μείωσης του κόστους. Η θερμοκρασία ωρίμανσης επηρεάζει το ρυθμό της πρωτεόλυσης, της λιπόλυσης, τη μικροβιακή ανάπτυξη, την υφή και γενικότερα την ποιότητα του τυριού. Αρχή της μεθόδου αυτής αποτελεί η αύξηση της θερμοκρασίας μέσα σε συγκεκριμένα όρια, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την επιτάχυνση της ωρίμανσης. Μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί το γεγονός ότι η αυξημένη θερμοκρασία μπορεί να οδηγήσει σε μικροβιακή αλλοίωση του τυριού και ανεξέλεγκτη ανάπτυξη αλλοιογόνων και παθογόνων μικροοργανισμών που μπορεί να επιφέρουν ανεπιθύμητες αλλαγές στη γεύση και την υφή του και να καταστήσουν το προϊόν μη ασφαλές. Για την αποφυγή της μη ελεγχόμενης μικροβιακής ανάπτυξης, θα πρέπει το γάλα να είναι πολύ καλής ποιότητας και σωστά παστεριωμένο (Upadhyay & McSweeney, 2003).

Οι Folkertsma & Fox (1992), μελέτησαν τα στάδια της πρωτεόλυσης και λιπόλυσης τυριού Cheddar μετά από αύξηση της θερμοκρασίας ωρίμανσης και μετά από αργή ψύξη του τυριού και παρατήρησαν αύξηση ή μείωση της ταχύτητας ωρίμανσης λόγω αλλαγών στη θερμοκρασία. Σε θερμοκρασία ωρίμανσης 16°C το τυρί είχε εντονότερη γεύση ειδικά κατά τα πρώτα στάδια της ωρίμανσης, αλλά η

δομή επιδεινώθηκε μετά από μακρά περίοδο ωρίμανσης, ενώ συμπεράναν ότι 12°C ήταν η βέλτιστη θερμοκρασία για την επιτάχυνση της ωρίμανσης του τυριού Cheddar.

Οι Hannon et al. (2005), επίσης μετά από μελέτη των σταδίων πρωτεόλυσης και λιπόλυσης τυριού Cheddar, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ο χρόνος έκθεσης του τυριού σε υψηλές θερμοκρασίες επηρέασε τις ιδιότητές του, ενώ η ωρίμανση στους 20°C για μία εβδομάδα, 12°C για έξι εβδομάδες και 8°C για οκτώ μήνες, βοήθησε στη μείωση του χρόνου ωρίμανσης κατά δύο μήνες με διατήρηση της επιθυμητής γεύσης και του αρώματος του τυριού. Επιπρόσθετα, παρατήρησαν αύξηση των δεικτών πρωτεόλυσης και λιπόλυσης, με αύξηση της θερμοκρασίας ωρίμανσης.

Οι Sihufe et al. (2007), μελέτησαν την επίδραση της αυξανόμενης θερμοκρασίας στη λιπόλυση τυριού τύπου Reggianito Αργεντινής, μετά από αποθήκευση σε θερμοκρασίες 12°C και 18°C και σε 85% σχετική υγρασία. Η θερμοκρασία ωρίμανσης, οδήγησε σε αύξηση της λιπολιτικής διεργασίας κατά την ωρίμανση του τυριού, με την επίδραση της θερμοκρασίας να είναι εντονότερη κατά τη διάρκεια των δύο τελευταίων μηνών της ωρίμανσης.

Οι Ceruti et al. (2012), μελέτησαν την επίδραση της θερμοκρασίας και του χρόνου ωρίμανσης στην πρωτεόλυση τυριού Reggianito Αργεντινής, μετά από σύγκριση των αποτελεσμάτων τυριού αναφοράς αποθηκευμένου στους 12°C για έξι μήνες με τυρί αποθηκευμένο στους 20°C για 2 ή 4 εβδομάδες και κατόπιν στους 12°C για έξι μήνες, κατά την ωρίμανση. Τα αποτελέσματα έδειξαν αύξηση της πρωτεόλυσης μετά από αποθήκευση σε αυξημένες θερμοκρασίες, με υψηλότερο επίπεδο πρωτεόλυσης για το αποθηκευμένο τυρί στους 20°C για τέσσερις εβδομάδες.

Οι Al-Attar et al. (2015), μελέτησαν την επίδραση υψηλών θερμοκρασιών για επιτάχυνση της ωρίμανσης τυριού Kashkaval, μέσω προσδιορισμού χημικών και οργανοληπτικών δεικτών ώριμου τυριού αποθηκευμένου στους 16°C ή 20°C για μία εβδομάδα και ολοκλήρωση της ωρίμανσης με παραμονή για 60 ημέρες στους 10°C, ενώ τα δείγματα συγκρίθηκαν με δείγματα αναφοράς τα οποία ωρίμασαν σε συνθήκες 10°C για 60 ημέρες. Η οργανοληπτική αξιολόγηση έδειξε ότι με τη χρήση αυξημένης θερμοκρασίας στους 16°C για μία εβδομάδα και στη συνέχεια 60 ημέρες στους 10°C μείωσε την ωρίμανση κατά 15 ημέρες, με το τυρί να διατηρεί τη χαρακτηριστική γεύση με το τυρί αναφοράς. Αντίθετα, ωρίμανση στους 20°C για μία εβδομάδα και στη συνέχεια 60 ημέρες στους 10°C, επηρέασε αρνητικά τις οργανοληπτικές ιδιότητες του ώριμου τυριού με το τυρί να εμφανίζει ανεπιθύμητο άρωμα και γεύση και πιο μαλακή υφή.

3.3. ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΕΞΩΓΕΝΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ Η ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ (ΕΞΑΣΘΕΝΗΜΕΝΩΝ) ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΕΚΚΙΝΗΣΗΣ

3.3.1. Προσθήκη εξωγενών ενζύμων

Η πτυϊά (χυμοσίνη) και η πλασμίνη, είναι υπεύθυνες για την πραγματοποίηση της αρχικής πρωτεόλυσης, ενώ οι πρωτεάσες και οι πεπτιδάσες των LAB και NSLAB βακτηρίων μετατρέπουν τα μεγαλύτερα πεπτίδια, που παράγονται από τη δράση της πτυϊάς στις καζεΐνες, σε ενδιάμεσου και μικρότερου μεγέθους πεπτίδια, τα οποία αποτελούν πρόδρομες ενώσεις για την παραγωγή ουσιών που συμβάλλουν στη γεύση και στο άρωμα του τυριού. Έτσι, με την προσθήκη εξωγενών ενζύμων στο τυρί αυξάνεται ο αριθμός τους, κατ' επέκταση και η ενζυμική δραστηριότητα στο σύνολό της, η οποία τελικά βοηθά στην επιτάχυνση ορισμένων αντιδράσεων στο τυρί, σε αντίθεση με την τεχνική της αυξανόμενης θερμοκρασίας ωρίμανσης, κατά την οποία αυξάνεται ο ρυθμός όλων των αντιδράσεων, πολλές από τις οποίες παράγουν πιθανώς συστατικά που αλλοιώνουν τη γεύση. Με δεδομένο ότι τα κυριότερα βιοχημικά μονοπάτια της ωρίμανσης είναι η πρωτεόλυση, η λιπόλυση και

ο μεταβολισμός της λακτόζης, τα ένζυμα που λαμβάνονται κυρίως υπόψη είναι οι πρωτεάσες, οι πεπτιδάσες, οι λιπάσες και η β-γαλακτοζιδάση που συμμετέχουν σε αυτά. Τα ένζυμα που προστίθενται μπορεί να προέρχονται είτε από πηγές που δεν έχουν σχέση με το τυρί, είτε από μικροοργανισμούς που χρησιμοποιούνται στην παρασκευή τυριών (*Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Propionibacterium*, *Pseudomonas* κ.α.).

Αρκετά εμπορικά ενζυμικά σκευάσματα διατίθενται στο εμπόριο προς χρήση για επιτάχυνση της ωρίμανσης όπως τα Flavor-Age (C. Hansens), Nature-Age (Miles), Accelerase (Imperial) και Neutrase (Novo, Nordisk A/S). Ωστόσο, τα αποτελέσματα της εφαρμογής των ενζύμων αυτών δεν είναι επιτυχή λόγω της εμφάνισης ελαττωμάτων που μειώνουν την τελική ποιότητα του τυριού (πικρή γεύση, οξύτητα, μη αποδεκτή δομή και άρωμα κ.α.), της δυσκολίας κατανόησης του μηχανισμού ωρίμανσης και των συνθηκών ωρίμανσης που προτείνονται από τη βιομηχανία (4-6°C) για επιβράδυνση της ανάπτυξης αλλοιογόνων μικροοργανισμών (Byong & Lee, 2014). Επιπλέον, ενώ όταν τα ένζυμα προστίθενται στο γάλα τυροκόμησης πραγματοποιείται καλύτερη ομογενοποίηση, σε σχέση με την εισαγωγή τους στο τυρόπηγμα, η απόδοση είναι σχετικά χαμηλή, αφού το μεγαλύτερο μέρος τους απομακρύνεται. Τα πρωτεολυτικά ένζυμα που παραμένουν στο τυρί διασπούν τις καζεΐνες σε πεπτίδια τα οποία απομακρύνονται και αυτά με τον ορό. Τέλος, η γρήγορη διάρρηξη του καζεϊνικού πλέγματος μπορεί να οδηγήσει σε τυρόπηγμα με ελλιπή δομή, το οποίο απαιτεί δύσκολους χειρισμούς κατά την επεξεργασία του (Fox, 1999).

Για την αντιμετώπιση των δύο τελευταίων προβλημάτων, προτείνεται ο μικροεγκλεισμός τους, που ακόμη αποτρέπει και την έντονη πρωτεόλυση. Τα ακινητοποιημένα ένζυμα είναι διαχωρισμένα από τα υποστρώματα που βρίσκονται στο γάλα και στο τυρόπηγμα κατά την παραγωγή και απελευθερώνονται στη μάζα του τυριού μόνο μετά τη λύση της κάψουλας κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης. Κάποια ένζυμα που έχουν δοκιμαστεί σε μικροεγκλεισμό, είναι πρωτεάσες, πεπτιδάσες, χυμοσίνη και λιπάσες (Anjani et al., 2007; Kheadar et al., 2000; Magee & Oslen, 1981; Picon et al., 1997; Kailasapathy et al, 1998). Οι Azarnia et al. (2010 a, b), μετά από μικροεγκλεισμό με χρήση αλγινικών και χιτοζάνης αμινοπεπτιδάσης PepN από *Lactobacillus rhamnosus* και εφαρμογή σε τυρί Cheddar, υποστήριξαν μείωση της ωρίμανσης κατά 4 μήνες ενώ το τυρί είχε άριστα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.

3.3.2. Προσθήκη τροποποιημένων (εξασθενημένων) καλλιιεργειών εκκίνησης

Μετά από αρκετή μελέτη της ωρίμανσης των τυριών, είναι ξεκάθαρος ο εξέχων ρόλος που παίζουν τα ένζυμα των βακτηρίων εκκίνησης (starter bacteria), στην ανάπτυξη των χαρακτηριστικών γεύσης και αρώματος στο τυρί.

Αρχικές ερευνητικές προσπάθειες προς αύξηση του αριθμού των επιθυμητών βακτηρίων στο τυρί, περιλάμβαναν την αύξηση της ποσότητας της καλλιέργειας εκκίνησης στο γάλα τυροκόμησης, είτε χρησιμοποιώντας υψηλότερο επίπεδο μικροοργανισμών (Stadhouders, 1961) είτε με την προσθήκη συστατικών επιτάχυνσης της ανάπτυξής τους (Hofi et al, 1973a β; Nassib, 1974). Αυτή η προσέγγιση όμως οδήγησε σε τυρί με χαμηλότερο pH, υψηλότερη υγρασία και ανεπιθύμητη γεύση. Ως εκ τούτου, έγιναν προσπάθειες προσθήκης εξασθενημένων καλλιιεργειών, οι οποίες θα βοηθούσαν στην ωρίμανση του τυριού χωρίς να παράγουν περίσσεια γαλακτικού οξέος.

Στη κατηγορία των τροποποιημένων καλλιιεργειών εκκίνησης, ανήκουν μικροοργανισμοί οι οποίοι προστίθενται μαζί με τα βακτήρια εκκίνησης (starters) που χρησιμοποιούνται σε κάθε είδος τυριού. Στόχος είναι η αύξηση του πληθυσμού των αρχικών βακτηριακών κυττάρων με κύτταρα τα οποία δε θα παράγουν υψηλές ποσότητες οξέος (για την αποφυγή μεγάλης αύξησης της οξύτητας του τυροπήγματος) αλλά θα αποτελούν φορείς δραστικών ενζύμων απαραίτητα για την ωρίμανση του

τυριού, κυρίως για την πρωτεόλυση. Η τροποποίηση των καλλιιεργειών αυτών μπορεί να πραγματοποιηθεί α) με επεξεργασία της καλλιέργειας με λυσοζύμη β) με θέρμανση, γ) με φυσική ή τεχνική μετάλλαξη των κυττάρων, δ) με ψύξη ή παγόλυση ε) με ξήρανση με ψεκασμό ή κατάψυξη ε) με χρήση διαλυτών ζ) με χρήση υπερυψηλής υδροστατικής πίεσης. Ανάλογα με το τυρί που παρασκευάζεται, οι τροποποιημένες καλλιέργειες μπορεί να περιλαμβάνουν θερμοφίλους γαλακτοβάκιλλους και γαλακτόκοκους, *L. bulgaricus*, *L. helveticus*, *S. thermophilus* κ.α. (Fox, 1999). Η επεξεργασία θερμικού-ψυχρού σοκ της καλλιέργειας, έχει ως σκοπό τη μείωση της ικανότητάς παραγωγής οξέος, αλλά και την ενίσχυση του ρυθμού αυτόλυσης, για την απελευθέρωση των ενδοκυτταρικών ενζύμων που συμβάλλουν στην επιτάχυνση της ωρίμανσης (Uradhyay & McSweeney, 2003; Fox, 1999).

Στον Πίνακα 3.1. παρατίθενται συνολικά οι μικροοργανισμοί που έχουν κατά καιρούς τροποποιηθεί, η επεξεργασία που έχουν υποστεί και η επίδραση της προσθήκης τους κατά την ωρίμανση του τυριού.

Πίνακας 3.1. Τροποποιημένα βακτήρια που έχουν χρησιμοποιηθεί για την επιτάχυνση της ωρίμανσης διαφόρων τύπων τυριών.

Στέλεχος	Επεξεργασία τροποποίησης	Συνθήκες επεξεργασίας	Μεταβολή ενζυμικής δραστηριότητας	Επίδραση στο στάδιο της ωρίμανσης	Δημοσίευση
<i>Lb. helveticus</i>	Θερμικό σοκ	69°C / 17 s	10 - 30%	<u>Σουηδικό ημίσκληρο τυρί</u> Αύξηση της ποσότητας της τυροσίνης Αύξηση της πρωτεόλυσης	Petterson & Sjostrom, 1975
<i>Mixed strain lactococci</i>		56°C / 17 s	15%	<u>Τυρί Gouda</u> Αύξηση της πρωτεόλυσης Μείωση χρόνου ωρίμανσης κατά 25% Ελεγχόμενη αύξηση της έντασης αρώματος Μείωση πικρής γεύσης	Exterkate et al., 1987
<i>Lb. helveticus</i>		67°C / 15 s	*AP (74%), *EP (35%)	<u>Σουηδικό σκληρό τυρί</u> Αύξηση πρωτεόλυσης Αύξηση έντασης αρώματος Αύξηση ελεύθερων αμινοξέων	Ardo & Petterson, 1988
<i>Lb. bulgaricus</i>		63°C / 20 s	*N.D.	<u>Τυρί Φέτα</u> Αύξηση πρωτεόλυσης Αύξηση αρώματος Βελτίωση της δομής	Vafopoulou et al., 1989
<i>Lb. helveticus</i>		64°C / 18 s	10%	<u>Τυρί Saint-Paulin</u> Αύξηση πρωτεόλυσης Αύξηση έντασης αρώματος	Castaneda et al., 1990
<i>Lb. helveticus</i>		70°C / 18 s	N.D.	<u>Τυρί Ras</u> Αύξηση υδατοδιαλυτού αζώτου Αύξηση της έντασης αρώματος Μείωση της πικρής γεύσης Αύξηση στην %ολική πτητική οξύτητα	Ezzat & El-Shafei, 1991

Στέλεχος	Επεξεργασία τροποποίησης	Συνθήκες επεξεργασίας	Μεταβολή ενζυμικής δραστηριότητας	Επίδραση στο στάδιο της ωρίμανσης	Δημοσίευση
<i>Lb. casei</i>	Θερμικό σοκ	67°C / 22 s	*DAP (37%)	<u>Τυρί Cheddar</u> Αύξηση πρωτεόλυσης Μη ανιχνεύσιμη πικρή γεύση	El Abboudi et al., 1991
<i>Lb. plantarum, Lb. casei</i>		50°C / 15 s	-	<u>Τυρί από κατσικίσιο γάλα χαμηλών λιπαρών</u> Μείωση του ρυθμού παραγωγής οξέος Αύξηση αζωτούχων ενώσεων Αύξηση δραστηριότητας αμινοπεπτιδασών Υψηλότερη αποικοδόμηση αs1-CN συγκριτικά με β-CN	Asensio et al., 1996
<i>Lb. helveticus, Lb. casei</i>		60, 65 & 70°C / 15 s	30%, 62 to 93% AP 0%, 40 to 64% DAP	<u>Ρυθμιστικό διάλυμα</u> Μέτριο επίπεδο πρωτεόλυσης	El Soda et al., 1999
<i>Lb. helveticus</i>		69°C / 25 s	-	<u>Τυρί παρασκευασμένο με χρήση τροποποιημένων ενζύμων</u> Αύξηση δευτερογενούς πρωτεόλυσης Αύξηση της έντασης αρώματος	Lee et al., 2007
<i>Lb. helveticus</i>	Ψυχρό σοκ	-24°C / 24 h	-	<u>Τυρί Gouda</u> Σημαντική αύξηση υδατοδιαλυτού αζώτου Μείωση πικρής γεύσης	Bartels et al., 1987
<i>Lb. helveticus, Lb. casei</i>		-20°C / 20 h	-	<u>Τυρί Ras</u> Μείωση χρόνου ωρίμανσης κατά 50%	Aly, 1990; 1994
<i>Lb. helveticus</i>		-96°C / 1 wk	24-35% EP, 13% *DP	<u>Άπαχο γάλα</u> Μέτρια αύξηση της πρωτεόλυσης (1-2%)	Khalid et al., 1990b Khalid et al., 1991
<i>Lc. lactis subsp. lactis</i>		-20°C / 20 h	-	<u>Τυρί Cheddar</u> Αύξηση της πρωτεόλυσης τυριού Εμφάνιση όξινου flavor και με τα δύο βακτήρια	Guinee et al., 1991

Στέλεχος	Επεξεργασία τροποποίησης	Συνθήκες επεξεργασίας	Μεταβολή ενζυμικής δραστηριότητας	Επίδραση στο στάδιο της ωρίμανσης	Δημοσίευση
	Ψυχρό σοκ			Εμφάνιση κρυστάλλων γαλακτικού ασβεστίου λόγω της δράσης πεδίοκοκκων	
<i>Lb. casei</i> , <i>Pediococcus sp.</i>		-20°C / 20 h	-	<u>Τυρί Ras</u> Αύξηση πρωτεόλυσης και λιπόλυσης τυριού	El Soda et al., 1991
<i>Pediococcus halophilus</i>		-30°C / 36 h	-	<u>Τυρί Ras</u> Αύξηση πρωτεόλυσης Μείωση πικρής γεύσης	El Shafei et al., 1992
<i>Lb. helveticus</i>		-15°C / 96 h	-	<u>Τυρί Cheddar</u> Μείωση πικρής γεύσης	Kim et al., 1994
<i>Leuconostoc sp.</i>		-20°C / 24 h	-	-	El Shafei, 1994
<i>Lb. casei</i>		-24°C / 24 h	75–95%	-	To & Etzel, 1997
<i>Lb. helveticus</i>		-20°C / 2 wk	AP (15%)	-	Johnson & Etzel, 1995
<i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. casei</i>		-20°C / 24 h	-	<u>Τυρί Cheddar</u> Έντονη απελευθέρωση ενζύμων Υψηλά επίπεδα υδατοδιαλυτού αζώτου Υψηλά επίπεδα ελεύθερων αμινοξέων Αύξηση έντασης flavor Αποτροπή πικρής γεύσης	Madkor et al., 1998;1999
<i>Lb. casei</i> , <i>Lb. helveticus</i>		Επεξεργασία όπως περιγράφηκε από τους Frey et al., 1986	-	<u>Τυρί Kaşar χαμηλών λιπαρών</u> Δεν παρουσιάστηκαν μεταβολές στο σχηματισμό του τυριού Αύξηση πρωτεόλυσης-Επιτάχυνση ωρίμανσης Υψηλότερη πρωτεόλυση στα τυριά με <i>L. helveticus</i>	Gürsoy, 2009
<i>Lb. acidophilus</i>		-10, -20°C / 24 & 96 h	-	<u>Τυρί Gouda</u> Καμία μεταβολή στη δομή και το pH συγκριτικά	El-Tanboly et al., 2010

Στέλεχος	Επεξεργασία τροποποίησης	Συνθήκες επεξεργασίας	Μεταβολή ενζυμικής δραστηριότητας	Επίδραση στο στάδιο της ωρίμανσης	Δημοσίευση
	Ψυχρό σοκ			με δείγματα αναφοράς Αύξηση της πρωτεόλυσης Υψηλό οργανοληπτικό σκορ στα τυριά τα οποία περιείχαν επιπρόσθετη προβιοτική καλλιέργεια <i>Lactobacillus</i>	
<i>Lb. helveticus</i>	Ξήρανση με ψεκασμό	82 & 120°C	AP (85%)	<u>Τυρί Cheddar</u> Αύξηση πρωτεόλυσης Αύξηση έντασης flavor τυριού	Johnson & Etzel, 1995; Johnson et al., 1995
<i>Lb. helveticus, Lb. casei</i>	Θερμικό σοκ Ψυχρό σοκ Ξήρανση με ψεκασμό	Θερμικό σοκ 50, 65, και 4°C Ψυχρό σοκ -20°C/24 h Ξήρανση 38 & 82°C	-	<u>Τυρί Cheddar</u> Υψηλότεροι ρυθμοί παραγωγής αζωτούχων ενώσεων στα τυριά καλλιέργειας <i>L. helveticus</i> επεξεργασμένη με θερμικό και ψυχρό σοκ Υψηλότερος ρυθμός παραγωγής ελεύθερων λιπαρών οξέων στα τυριά καλλιέργειας <i>L. casei</i> επεξεργασμένης με ψυχρό σοκ Υψηλότερες βαθμολογίες στο άρωμα και το flavor των τυριών καλλιέργειας <i>L. helveticus</i> επεξεργασμένης με ψυχρό σοκ	Madkor et al., 2000
<i>Lb. helveticus</i>	ΥΠ	100-400 MPa 10 min / 30°C	-	Πλήρης παρεμπόδιση της παραγωγής γαλακτικού οξέος με επεξεργασία σε συνθήκες 400 MPa, 10 min, 30°C	Miyakawa et al., 1994
<i>Lc. lactis</i>		100-400 MPa 20 min / 20°C	-	Μείωση της ικανότητα παραγωγής γαλακτικού οξέος μετά από επεξεργασία σε συνθήκες 200 MPa, 20 min, 20°C	Casal & Gomez, 1999
<i>Lc. lactis MG1363</i>		0-800 MPa 5 min / 25°C	-	Σημαντική μείωση της ικανότητας παραγωγής γαλακτικού οξέος στο 0.006% για επεξεργασία σε	Malone et al., 2003

Στέλεχος	Επεξεργασία τροποποίησης	Συνθήκες επεξεργασίας	Μεταβολή ενζυμικής δραστηριότητας	Επίδραση στο στάδιο της ωρίμανσης	Δημοσίευση
				συνθήκες 300-800 MPa	
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> HP, <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 303	ΥΠ	200 MPa / 20 min / 20°C	-	<u>Τυρί Cheddar</u> Υψηλότερα επίπεδα κυτταρικής λύσης μετά από 26 d ωρίμανσης Μικρές διαφορές στα προφίλ πεπτιδίων Ελαφρώς υψηλότερος αριθμός αμινοξέων Επιτάχυνση της δευτερεύουσας πρωτεόλυσης	Upadhyay et al., 2007
DVI starter mixture (<i>Lc. lactis</i>, <i>Lb. bulgaricus</i>, <i>S. thermophilus</i>)		200 MPa / 15 min / 20°C	-	<u>Τυρί Φέτα</u> Η επεξεργασία δεν προκάλεσε λύση των κυττάρων Αύξηση της δευτερογενούς πρωτεόλυσης Αύξηση των υδατοδιαλυτών αζωτούχων ενώσεων Αύξηση της περιοχής των μικρών υδρόφιλων πεπτιδίων στο προφίλ πεπτιδίων	Maniou et al., 2013

*AP: Αμινοπεπτιδάση (Aminopeptidase), EP: Ενδοπεπτιδάση (Endopeptidase), DAP: Διπεπτιδυλ αμινοπεπτιδάση (Dipeptidyl aminopeptidase), DP: Διπεπτιδάση (Dipeptidase), ND: Μη ανιχνεύσιμη (Not Detected)

3.4. ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΕΚΚΙΝΗΣΗΣ

Μία ακόμη μέθοδος για την επίτευξη ταχύτερης ωρίμανσης των τυριών, προσφέρει και η γενετική μηχανική. Αυτή, δίνει τη δυνατότητα παραγωγής βακτηρίων εκκίνησης, που περιέχουν πεπτιδάσες κι άλλα ενδοκυτταρικά ένζυμα (για παράδειγμα PepX, PepN κ.α.) που είναι εξαιρετικά χρήσιμα στη δευτερογενή πρωτεόλυση που πραγματοποιείται κατά την ωρίμανση του τυριού. Για τη μέθοδο αυτή θα πρέπει να είναι γνωστά τα γενετικά χαρακτηριστικά των μικροοργανισμών, όπως ισχύει για παράδειγμα για τον *Lactococcus lactis ssp. lactis* IL 1403 (Bolotin et al., 2001), ώστε να καθίσταται δυνατή η στοχευμένη τροποποίησή τους. Στη γενετική τροποποίηση των βακτηρίων σημαντικό ρόλο παίζουν τα πλασμίδια που λειτουργούν ως φορείς γονιδίων. Συγκεκριμένα, οι πληροφορίες που χρειάζεται να εκφραστούν, κωδικοποιούνται σε ένα τμήμα πλασμιδίου και στη συνέχεια εισάγονται στον ξενιστή που δεν το διαθέτει. Όταν ο ξενιστής πολλαπλασιάζεται, το εισαγόμενο τμήμα του πλασμιδίου επίσης πολλαπλασιάζεται, εκφράζοντας έτσι τα κωδικοποιημένα χαρακτηριστικά (Upadhyay & McSweeney, 2003).

Στον τομέα της επιτάχυνσης της ωρίμανσης των τυριών, έχουν γίνει προσπάθειες για κλωνοποίηση και εισαγωγή γονιδίων για συγκεκριμένα ένζυμα σε βακτήρια, τα οποία χρησιμοποιούνται ως αρχική καλλιέργεια στην παρασκευή τυριών. Οι McGarry et al., (1995), παρήγαγαν τυρί Cheddar χρησιμοποιώντας ένα στέλεχος του *Lactococcus* που περιείχε κλωνοποιημένα γονίδια για την ουδέτερη πρωτεάση του *Bacillus subtilis* (Neutrase). Τα τυριά αυτά όμως με το πέρασμα των δύο εβδομάδων ωρίμανσης έγιναν πολύ μαλακά.

Οι Azarnia et al. (2010b), μελέτησαν την εξέλιξη της πρωτεόλυσης σε τυρί Cheddar παρασκευασμένο με προσθήκη ενζύμου μη καθαρής μορφής (crude enzyme) ή με ανασυνδυασμένη αμινοπεπτιδάση και τα δύο προερχόμενα από *Lactobacillus rhamnosus* S93, παρουσία εμπορικής πρωτεάσης Neutrase. Το υψηλότερο επίπεδο αζώτου διαλυτό σε φωσφοροβολφραμικό οξύ καθώς και ελεύθερων αμινοξέων παρατηρήθηκε στην περίπτωση του τυριού που περιείχε το φυσικό ένζυμο, ενώ ακολουθούσε το τυρί που παρασκευάστηκε με προσθήκη συνδυασμού φυσικού ενζύμου και ανασυνδυασμένης αμινοπεπτιδάσης. Στο τυρί που παρασκευάστηκε με προσθήκη μόνο ανασυνδυασμένης αμινοπεπτιδάσης δεν παρατηρήθηκε ύπαρξη προλίνης μετά από ωρίμανση μιας ημέρας.

3.5. ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΕΚΤΟΣ ΤΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΕΚΚΙΝΗΣΗΣ ΩΣ ΠΡΟΣΘΕΤΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Οι καλλιέργειες εκκίνησης (starters), είτε είναι πρωταρχικές είτε δευτερεύουσες, φυσικές ή εμπορικές, περιορίζονται σε συγκεκριμένα είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων (π.χ. *Lactococcus lactis subsp. lactis* και *Lactobacillus helveticus*) ή άλλων βακτηρίων (π.χ. βακτήρια προπιονικού οξέος) και μυκήτων (π.χ. *Penicillium roqueforti*). Σε όλα τα είδη τυριών που υφίστανται το στάδιο της ωρίμανσης, αναπτύσσονται αυτόχθονοι μικροοργανισμοί, οι οποίοι προκύπτουν κυρίως από περιβαλλοντικούς αλλά και τεχνολογικούς παράγοντες, και εξασφαλίζουν τη διαφορετικότητα μεταξύ των τυριών (Montel et al., 2014). Η μικροχλωρίδα αυτή αποτελείται κυρίως από οξυγαλακτικά βακτήρια εκτός των βακτηρίων εκκινητών (NSLAB), στα οποία συμπεριλαμβάνονται ως επί το πλείστον προαιρετικά μεσόφιλοι και ετεροζυμωτικοί γαλακτοβάκλιοι. Ακόμη, μέρος αυτού του πληθυσμού αποτελούν και οι λακτόκοκκοι, πεδιόκοκκοι (pediococci), εντερόκοκκοι (*Leuconostoc*

sp.), θερμόφιλα οξυγαλακτικά βακτήρια και μεσόφιλοι γαλακτοβάκλιοι (π.χ. *Lb. casei*, *Lb. parasei*, *Lb. curvatus*).

Τα NSLAB, τα οποία μπορεί να βρίσκονται σε συγκεντρώσεις κάτω των 100 cfu/g κατά την πρώτη ημέρα, αναπτύσσονται ταχύτατα στο τυρί και μπορούν να φτάσουν έως και 10⁸ cfu/g μέσα σε δύο μήνες, ανάλογα με τις συνθήκες διατήρησης. Πολλές ποικιλίες τυριών περιέχουν μια δευτερογενή μικροχλωρίδα, η οποία δεν παράγει οξύ κατά την παρασκευή του τυριού, αλλά είναι υπεύθυνη για την ανάπτυξη συγκεκριμένων χαρακτηριστικών στην εκάστοτε ποικιλία. Η κύρια πηγή αυτών των NSLAB είναι το νωπό γάλα (δεν έχει υποστεί θερμική ή άλλη επεξεργασία), αλλά μπορούν να εισέλθουν στο τυρί ως επιμολύνσεις από τον περιβάλλοντα χώρο (πατώματα, επιφάνειες μηχανημάτων κ.α.).

3.6. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΙ ΣΕ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΚΑΙ ENZYMA ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΤΟΥ ΤΥΡΙΟΥ

3.6.1. Εισαγωγή

Η ζήτηση των καταναλωτών για πιο φυσικά, χωρίς συντηρητικά, εύγευστα και πιο υγιεινά τρόφιμα, έχει οδηγήσει στην αναζήτηση νέων τεχνολογιών για την επεξεργασία τους. Με το πέρασμα του χρόνου, πολλές ερευνητικές μελέτες έχουν χαρακτηρίσει την υπερυψηλή υδροστατική πίεση (ΥΠ) ως διεργασία ικανή να αποδώσει τρόφιμα μικροβιολογικά ασφαλή και με βελτιωμένα χαρακτηριστικά, συγκριτικά με τη συμβατική θερμική επεξεργασία. Σε αντίθεση με τη θερμική παστερίωση, η ΥΠ μπορεί να διατηρήσει χαρακτηριστικά ποιότητας, όπως τη φρεσκάδα των τροφίμων, τη θρεπτική τους αξία και τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά, λόγω της επίδρασής της μόνο σε μη ομοιοπολικούς δεσμούς, με αποτέλεσμα αμινοξέα, βιταμίνες, αρωματικές ενώσεις και άλλες ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους να παραμένουν ανεπηρέαστες.

Εκτός από την ικανότητα της ΥΠ να προκαλεί την απενεργοποίηση αλλοιογόνων και παθογόνων μικροοργανισμών των τροφίμων, πολύ σημαντική θεωρείται και η επίδρασή της σε ένζυμα τροφίμων. Οι πρωτεΐνες είναι μακρομόρια με χαρακτηριστική τρισδιάστατη διαμόρφωση στο χώρο. Είναι ευμετάβλητες δομές, με αποτέλεσμα μεταβολές σε εξωτερικούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία και η πίεση, να προκαλούν διατάραξη της ισορροπίας των ενδομοριακών δεσμών και αλληλεπιδράσεων με αποτέλεσμα τη μεταβολή της τρισδιάστατης διαμόρφωσης «ξετύλιγμα» της πολυπεπτιδικής αλυσίδας (μετουσίωση) (Hendrickx et al., 1998). Τα ένζυμα αποτελούν ειδική κατηγορία πρωτεϊνών των οποίων η δραστηριότητα εξαρτάται από το ενεργό τους κέντρο σε συνδυασμό με την τρισδιάστατη δομή του μορίου. Ακόμα και μικρές αλλαγές στη δομή που επηρεάζουν το ενεργό κέντρο του ενζύμου μπορούν να οδηγήσουν σε μεταβολή της ενζυμικής δραστηριότητας (Tsou, 1986).

Η επεξεργασία με ΥΠ έχει ως αποτέλεσμα τη μεταβολή της δραστηριότητας των ενζύμων, η οποία αποδίδεται σε μεταβολές στη δομή τους, που αφορούν είτε το σχηματισμό είτε τη διάσπαση μη-ομοιοπολικών δεσμών και την αναδιάταξη των μορίων. Οι ομοιοπολικοί δεσμοί κατά την επεξεργασία με ΥΠ παραμένουν ανεπηρέαστοι και κατ' επέκταση η πρωτοταγής δομή των ενζύμων παραμένει αμετάβλητη (Cheftel, 1991; Hayashi et al., 1989). Σύμφωνα με τους Mozhaev et al. (1994), (1996), οι δεσμοί υδρογόνου οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τη διατήρηση της ελικοειδούς δομής των πεπτιδίων δεν επηρεάζονται από την ΥΠ. Αλλαγές στη δευτεροταγή δομή λαμβάνουν χώρα στις πολύ υψηλές πιέσεις (συνήθως πάνω από 600 MPa) και οδηγούν σε μη αντιστρεπτή μετουσίωση (Masson, 1992; Balny & Masson, 1993). Γενικά, η ΥΠ επηρεάζει την τριτοταγή και τεταρτοταγή δομή των ενζύμων μεταβάλλοντας τις ηλεκτροστατικές και υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις. Η τριτοταγής δομή επηρεάζεται σημαντικά κατά την επεξεργασία με ΥΠ (Heremans, 1993; Mozhaev et al., 1994)

εξαιτίας της επίδρασης στους υδροφοβικούς και ηλεκτροστατικούς δεσμούς σε πιέσεις από 150 MPa (Cheftel, 1991; Balny & Masson, 1993; Gross & Jaenicke, 1994; Barbosa et al., 1997). Η τεταρτοταγής δομή των πρωτεϊνών επηρεάζεται σημαντικά και αυτή από την πίεση, καθώς αυτή διασπάται σε μικρότερες υπομονάδες (Balny & Masson, 1993; Barbosa et al., 1997).

Η εφαρμογή της ΥΠ μπορεί να προκαλέσει και σταθεροποίηση, ακόμα και αύξηση της δραστηριότητας των ενζύμων (Jung et al., 2000; Farid, 2007; Mozhaev et al., 1996; Kunugi, 1992; Prat-Gay et al., 1991; Van den Broeck et al., 2000; Malone et al., 2003; Katsaros et al., 2009). Ένζυμα τα οποία υπόκεινται σε ΥΠ μπορεί να ενεργοποιηθούν αντί να απενεργοποιηθούν, ανάλογα με τις μεταβολές της δευτεροταγούς και τριτοταγούς δομής τους που συντελούνται σε συγκεκριμένες πιέσεις (Heremans, 1982; Cheftel, 1992). Έτσι, η ΥΠ μπορεί να επηρεάσει τη λειτουργικότητα των ενζύμων και επομένως και τη χρήση τους, με πιθανή μεταβολή των οργανοληπτικών και δομικών χαρακτηριστικών των τροφίμων η οποία θα μπορούσε να οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων ή βελτιωμένων προϊόντων.

3.6.2. Επίδραση της ΥΠ στις πρωτεΐνες και σε ενδογενή ένζυμα του γάλακτος τυροκόμησης – Παρασκευή τυριού με επεξεργασμένο με ΥΠ γάλα

3.6.2.1. Επίδραση της ΥΠ στην Αλκαλική Φωσφατάση του Γάλακτος Τυροκόμησης

Η δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφατάσης χρησιμοποιείται συχνά για τον προσδιορισμό της αποτελεσματικότητας της θερμικής επεξεργασίας, αφού το συγκεκριμένο ένζυμο απενεργοποιείται κατά την παστερίωση. Οι Rademacher et al. (1998), (1999), ασχολήθηκαν με τις κινητικές απενεργοποίησης της αλκαλικής φωσφατάσης στο γάλα και παρατήρησαν αντίσταση του ενζύμου σε πιέσεις μέχρι και 500 MPa, με κατώτατο όριο για την επίτευξη πλήρους απενεργοποίησης τα 800 MPa (με χρόνο επεξεργασίας 8 min). Δύο άλλα ένζυμα, η γ-γλουταμινοτρανσφεράση και φωσφοεξόζη ισομεράση εμφανίστηκαν περισσότερο ευάλωτες στην πίεση. Οι Needs et al. (2000), ασχολήθηκε επίσης με τη δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφατάσης και βρήκε ότι μόλις το 20% της δραστηριότητας της χάνεται μετά από επεξεργασία για 15 min στα 400 MPa. Σε άλλες αναφορές μελετήθηκε η δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφατάσης σε ρυθμιστικό διάλυμα ή σε γάλα, για πιέσεις γύρω στα 600 MPa και θερμοκρασία 45°C και από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι δεν παρουσίασε σημαντική μείωση. Όταν όμως η θερμοκρασία κατεργασίας αυξήθηκε στους 55°C, η εφαρμογή πίεσης 600MPa για 30 min οδήγησε σε μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου κατά 90% στο ρυθμιστικό διάλυμα. Το γάλα επειδή παρουσιάζει μια προστατευτική συμπεριφορά στο ένζυμο, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της δραστηριότητας της φωσφατάσης κατά μόλις 10% στις ίδιες συνθήκες (Seyderhelm et al., 1996).

3.6.2.2. Επίδραση της ΥΠ στη Λιπάση του Γάλακτος Τυροκόμησης

Η λιποπρωτεϊνική λιπάση του γάλακτος, η λιπάση, είναι ένα θερμικά ευαίσθητο ένζυμο που απενεργοποιείται με την παστερίωση. Ωστόσο, μπορεί να αυξήσει τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, υδrolύοντας τα τριγλυκερίδια του γάλακτος εάν το ακατέργαστο γάλα δε συντηρηθεί σωστά και προηγηθεί ζημιά στη δομή των λιποσφαιρίων (Needs et al, 1986). Οι λιπάσες είναι σχετικά ανθεκτικές κατά την επεξεργασία με ΥΠ. Όταν αίγιο γάλα συμπίεστηκε στα 500 MPa για 15 min είχε περισσότερη εναπομένουσα ενζυμική δραστηριότητα και μεγαλύτερη συγκέντρωση ελεύθερων λιπαρών οξέων από το παστεριωμένο δείγμα (Trujillo et al, 1999a, b). Ο Argyρίου (1998), καθάρισε λιποπρωτεϊνική λιπάση γάλακτος από ακατέργαστο γάλα με χρωματογραφία συγγένειας και μέτρηση

την εναπομένουσα δραστικότητα μετά από ΥΠ. Υπό ήπιες συνθήκες επεξεργασίας (200 MPa για 5 min), η εναπομένουσα ενζυμική δραστικότητα μειώθηκε κατά 45%. Ωστόσο, με επεξεργασία στα 800 MPa για 30 min το 20% της δραστικότητας παρέμενε ανεπηρέαστο. Η εναπομένουσα δραστικότητα της λιπάσης μετά από συμπίεση ακατέργαστου γάλακτος θα μπορούσε να παίζει σημαντικό ρόλο στη βελτίωση της γεύσης των τυριών.

3.6.2.3. Επίδραση της ΥΠ στις Ενδογενείς Καζεΐνες του Γάλακτος Τυροκόμησης

Η εφαρμογή της ΥΠ επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τις φυσικοχημικές και τεχνολογικές ιδιότητες του γάλακτος. Τα μικκύλια της καζεΐνης διασπώνται σε μικρότερα σωματίδια, γεγονός που συνοδεύεται από αύξηση των επιπέδων καζεΐνης και του φωσφορικού ασβεστίου στη φάση του ορού του γάλακτος με μείωση τόσο του μη καζεϊνικού αζώτου όσο και των κλασμάτων αζώτου του ορού γάλακτος (Law et al. 1998). Πίεση πάνω από 300 MPa οδηγεί σε μη αναστρέψιμη μετουσίωση σε αντίθεση με πιέσεις 100-300 MPa όπου η μετουσίωση θεωρείται αναστρέψιμη (Jaenicke, 1981). Η ΥΠ προκαλεί εκτεταμένη διάσπαση των καζεϊνικών μικκυλίων σε συνθήκες 250-310 MPa. Ωστόσο, η προσθήκη πρωτεΐνης ορού γάλακτος σε απομονωμένη καζεΐνη φάνηκε να προστατεύει τα μικκύλια από επαγόμενη διάσπαση λόγω της ΥΠ (Harte et al., 2007).

Η συμπίεση του γάλακτος προκαλεί σημαντικές μεταβολές της δομής των πρωτεϊνών του. Το μέγεθος και ο αριθμός των καζεϊνικών μικκυλίων αυξάνεται (τα καζεϊνικά μικκύλια διασπώνται εξαιτίας αποδυνάμωσης των υδρόφοβων και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των υπο-μικκυλίων και συσσωματώνονται περαιτέρω σχηματίζοντας σύμπλεγμα) καθώς τα σφαιρικά σωματίδια μεταβάλλονται προς σχηματισμό αλυσίδων ή συμπλεγμάτων υπο-μικκυλίων (Huppertz et al., 2006). Το φαινόμενο αυτό οδηγεί σε μείωση του χρόνου πήξης της τυτιάς. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρθηκαν και από τους Johnston et al. (1992) και Sivanandan et al. (2008).

3.6.2.4. Επίδραση της ΥΠ στις Πρωτεΐνες Ορού του Γάλακτος Τυροκόμησης

Η επεξεργασία με ΥΠ σε συνθήκες 400 MPa προκαλεί αύξηση της υδρόλυσης της πεψίνης της β-λακτοσφαιρίνης (β-LG), μείωση της αντιγονικότητας και της σύνδεσης της ανοσοσφαιρίνης E (IgE) της β-LG, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η πιθανότητα απόκτησης υποαλλεργικών υδρολυμάτων β-LG (Chicon et al., 2008). Επεξεργασία με ΥΠ στα 500 MPa και σε θερμοκρασία 25°C, προκαλεί μετουσίωση της λακτοσφαιρίνης. Η μετουσίωση των ανοσοσφαιρινών και των λακταλβουμινών επιφέρεται μόνο σε πολύ υψηλές πιέσεις, ιδιαίτερα σε θερμοκρασίες άνω των 50°C, με αποτέλεσμα η τεχνολογία της ΥΠ να προτείνεται για διατήρηση των ανοσοσφαιρινών του πρωτογάλακτος, οι οποίες σε διαφορετική περίπτωση καταστρέφονται κατά τη διάρκεια της θερμικής επεξεργασίας (Felipe et al., 1997).

Οι Liu et al. (2005b), μελέτησαν της επίδραση της ΥΠ στην υδροφοβικότητα των πρωτεϊνών ορού γάλακτος και διατύπωσαν ότι η επεξεργασία τους με ΥΠ προκαλεί αύξηση του αριθμού των θέσεων σύνδεσης. Η σημαντική αναδιαμόρφωση των πρωτεϊνών επιφέρει αύξηση της υδροφοβικότητας. Τα αποτελέσματα φαίνεται ότι μπορεί να οδηγήσουν σε βελτίωση των λειτουργικών ιδιοτήτων των τροφίμων. Παρόμοιες παρατηρήσεις έχουν διατυπωθεί όσον αφορά τη λειτουργικότητα των πρωτεϊνών ορού γάλακτος και ειδικότερα για τη βελτίωση της σκληρότητας, της επιφανειακής υδροφοβικότητας, της διαλυτότητας, της ζελατινοποίησης και των ιδιοτήτων γαλακτωματοποίησης (Lee et al., 2006a).

Σε μελέτη των Moatsou et al. (2008a), σχετικά με την επίδραση της ΥΠ (200-650 MPa) και της θερμοκρασίας (20-55°C) στις πρωτεΐνες του ορού αγελαδινού γάλακτος, η β-λακτογλοβουλίνη

μετουσιώθηκε σε πιέσεις μεγαλύτερες από 450 MPa σε όλες τις μελετώμενες θερμοκρασίες. Αντίστοιχα, η α -λακταλβουμίνη μετουσιώθηκε μόνο κατά την επεξεργασία στα 650 MPa σε όλες τις θερμοκρασίες. Στην περίπτωση του πρόβειου γάλακτος η α -λακταλβουμίνη παρουσίασε την ίδια συμπεριφορά κατά την απενεργοποίησή της, όπως στην περίπτωση του αγελαδινού γάλακτος. Στη συγκεκριμένη περίπτωση όμως η β -λακτογλοβουλίνη μετουσιώθηκε σε όλες τις μελετώμενες συνθήκες (200-650 MPa και 20-55°C) (Moatsou et al., 2008b).

3.6.2.5. Επίδραση της ΥΠ στις Ενδογενείς Πρωτεάσες του Γάλακτος Τυροκόμησης

Στην κατηγορία αυτή ανήκει το σύστημα πλασμίνης-πλασμινογόνο, το οποίο περιλαμβάνει τα ένζυμα πλασμίνη, το ανενεργό της προένζυμο πλασμινογόνο και τον ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (Politis et al., 1989, 1992). Στην ίδια κατηγορία ανήκουν τα ένζυμα καθεψίνη D (cathepsin D) και οι κυστεϊνικές πρωτεάσες, η προέλευση των οποίων είναι τα σωματικά κύτταρα του γάλακτος (Hayes et al., 2001; Somers et al., 2003). Μεγάλο μέρος των ενζύμων αυτών είναι θερμοάντοχα ή διατηρούν σημαντικό μέρος της ενεργότητας, παρά τη θερμική επεξεργασία που υφίσταται το γάλα πριν (παστερίωση) ή και κατά τη διάρκεια της τυροκόμησης και συμβάλλουν καθοριστικά στο στάδιο της ωρίμανσης του τυριού (O'Reilly et al., 2003; Fallico et al., 2004).

Η δραστηριότητα της πλασμίνης, που αποτελεί τη βασική πρωτεάση του γάλακτος, ελέγχεται από ένα πολύπλοκο σύστημα ενεργοποιητών και αναστολέων. Η πλασμίνη είναι η κύρια ενδογενής πρωτεάση, η οποία είναι υπεύθυνη για την υδρόλυση των α_{s2} - και β -καζεϊνών με τον ίδιο ρυθμό και της α_{s1} -καζεΐνης με μικρότερο ρυθμό (Nielsen, 2002).

Οι Scollard et al. (2000), μελέτησαν την επίδραση της πίεσης σε αυτό το σύστημα. Βρήκαν ότι απαιτούνται πιέσεις μεγαλύτερες από 400 MPa για να παρατηρηθεί κάποια μείωση στη δραστηριότητα της πλασμίνης, ενώ ακόμη και μετά από παρατεταμένη επεξεργασία στα 800 MPa εμφάνιζε 20% εναπομένουσα δραστηριότητα. Ωστόσο, η επεξεργασία σε περιοχή πιέσεων μεταξύ 300 και 400 MPa προκάλεσε αύξηση της πρωτεόλυσης. Το γεγονός αυτό αποδόθηκε στην επίδραση της πίεσης στη δομή των μικυλλίων της καζεΐνης (αύξηση στη διαθεσιμότητα του υποστρώματος και όχι τόσο άμεση επίδραση στο ένζυμο) (Hendrickx & Knorr, 2001).

Οι Malone et al. (2003), μελέτησαν την επίδραση συνθηκών ΥΠ έως και 800 MPa για 5 min σε πλασμίνη και κατέληξαν ότι δεν επηρεάζεται σε καμία συνθήκη.

Οι Borda et al. (2004), κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η υψηλή πίεση μειώνει δραματικά την ενεργότητα της πλασμίνης όταν συνδυαστεί με θερμική επεξεργασία (60°C).

Σύμφωνα με τους Huppertz et al. (2004), η εφαρμογή ΥΠ σε συνθήκες 800 MPa για 60 min στους 8°C, δεν προκάλεσε απενεργοποίηση της πλασμίνης σε τυρί Cheddar 14 ημερών, στους 20°C η δραστηριότητά της μειώθηκε κατά 15 % συγκριτικά με δείγματα αναφοράς και επεξεργασία στις ίδιες συνθήκες στους 30°C οδήγησε σε μείωση της δραστηριότητας της πλασμίνης ~50%.

Οι Hayes et al. (2005), διαπίστωσαν μια δραματική μείωση στην ενεργότητα της πλασμίνης σε γάλα που είχε υποστεί επεξεργασία υψηλών πιέσεων.

Όπως προκύπτει από τη μελέτη των Moatsou et al. (2008a), σχετικά με την επίδραση της ΥΠ στη δραστηριότητα της πλασμίνης, του πλασμινογόνου και της καθεψίνης-D, υπήρξε μεταφορά τόσο της πλασμίνης, όσο και του πλασμινογόνου από τα μικκύλια καζεΐνης στον ορό του γάλακτος, κατά την τυροκόμηση μετά την επεξεργασία αγελαδινού γάλακτος σε πιέσεις από 200-650 MPa στους 20°C. Επιπλέον, βρέθηκε ότι η δραστηριότητα της πλασμίνης και του πλασμινογόνου μειώθηκαν κατά 16-18% και κατά 38-62% η δραστηριότητα των ενεργοποιητών πλασμινογόνου, μετά από επεξεργασία σε πιέσεις 450 και 650 MPa, σε θερμοκρασία δωματίου. Η καθεψίνη-D φάνηκε ότι ήταν αρκετά

ανθεκτική στην πίεση σε θερμοκρασία δωματίου. Η δραστηκότητά της όμως μειώθηκε σημαντικά μετά από επεξεργασία στα 650 MPa και 40°C και σε πιέσεις 450 και 650 MPa στους 55°C.

Παρόμοια μελέτη πραγματοποιήθηκε και για πρόβειο γάλα. Στην περίπτωση αυτή, η πλασμίνη, το πλασμινογόνο και η καθεψίνη-D απενεργοποιήθηκαν μερικώς σε πιέσεις 450 και 650 MPa και θερμοκρασίες 20-55°C. Αντίθετα, επεξεργασία στα 200 MPa δεν επηρέασε τη δραστηκότητα κανενός από τα ανωτέρω ένζυμα σε καμία θερμοκρασία (Moatsou et al., 2008b).

3.6.2.6. Παρασκευή Τυριού με Χρήση Επεξεργασμένου με ΥΠ Γάλακτος

Η επεξεργασία του γάλακτος με ΥΠ σε θερμοκρασία δωματίου προκαλεί τη μεταβολή των πρωτεϊνών του, όπως τη μετουσίωση των πρωτεϊνών του ορού γάλακτος και τη διάσπαση των μικκυλίων καζεΐνης, διαταράσσοντας την ισορροπία του συστήματος. Έχει παρατηρηθεί ότι η μετουσίωση των πρωτεϊνών του ορού γάλακτος οφείλεται στην εφαρμοζόμενη πίεση και έχει ως αποτέλεσμα την αλληλεπίδραση μεταξύ της μετουσιωμένης πρωτεΐνης του ορού γάλακτος με την καζεΐνη, η οποία με τη σειρά της αυξάνει την κατακράτηση της πρώτης εντός της καζεϊνικής μήτρας του τυριού. Οι μεταβολές αυτές έχουν ως αποτέλεσμα την τροποποίηση των τεχνολογικών παραμέτρων του προς τυροκόμηση γάλακτος, τη βελτίωση των ιδιοτήτων πήξης της τυτιάς και την αύξηση της απόδοσης των τυριών (Trujillo et al., 1999a; San Martin-Gonzalez et al., 2004; Zamora et al., 2007). Σύμφωνα με τους Huppertz et al. (2002), η απόδοση σε τυρί μπορεί να αυξηθεί με την εφαρμογή πιέσεων >300 MPa για 15-60 min, εξαιτίας της μεταβολής της δομής των πρωτεϊνών του ορού (κυρίως της β-γαλακτογλοβουλίνης) και της ενσωμάτωσής τους στο πρωτεϊνικό δίκτυο του τυροπήγματος. Η κατάσταση αυτή επηρεάζει με δύο τρόπους την απόδοση, άμεσα με τη συγκράτηση στο πήγμα επιπλέον πρωτεΐνης και έμμεσα επιδρώντας στη συναίρεση και την αποβολή υγρασίας από το πήγμα κατά τη διάρκεια της τυροκόμησης (Lopez-Fandino et al., 1996; Drake et al., 1997; Needs et al., 2000; Trujillo et al., 1999a; Arias et al., 2000).

Μελέτη η οποία πραγματοποιήθηκε σε τυρί Casciotta επεξεργασμένο σε συνθήκες ΥΠ 100 MPa, έδειξε αύξηση στην απόδοση κατά 3% συγκριτικά με τυρί παρασκευασμένο από επεξεργασμένο θερμικά γάλα. Επιπλέον παρατηρήθηκε βελτιωμένη ικανότητα δέσμευσης νερού των πρωτεϊνών, υψηλότερη συγκράτηση του τυροπήγματος, σημαντική μεταβολή στο προφίλ των αρωματικών ενώσεων του τυριού και επιτάχυνση της διαδικασίας ωρίμανσης (Lanciotti et al., 2006; Stewart et al., 2006).

Η επεξεργασία του γάλακτος τυροκόμησης με ΥΠ προκαλεί μεταβολές στη σύνθεση του τυριού καθώς και στο στάδιο της ωρίμανσής του συγκριτικά με τυρί παρασκευασμένο από θερμικά επεξεργασμένο γάλα. Η χρήση επεξεργασμένου με ΥΠ γάλακτος τυροκόμησης έχει ως αποτέλεσμα, την αύξηση της υγρασίας, την αύξηση της αλατοπεριεκτικότητας και την αύξηση των ελεύθερων αμινοξέων. Το επίπεδο λιπόλυσης φαίνεται να μην εμφανίζει διαφορές από εκείνο των τυριών με χρήση μη παστεριωμένου γάλακτος, ενώ αντίθετα τυριά από παστεριωμένο γάλα εμφανίζουν χαμηλότερο επίπεδο λιπόλυσης. Η συμπεριφορά αυτή αποδίδεται στην ευαισθησία στη θέρμανση με ταυτόχρονη ανθεκτικότητα στην πίεση της ενδογενούς του γάλακτος λιπάσης. Τα τυριά από επεξεργασμένο με ΥΠ γάλα εμφανίζουν πιο ιξωδοελαστική δομή και μικρότερη αντίσταση στη ροή (Messens et al., 1999). Οι Drake et al. (1997), μελέτησαν την υφή και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του Cheddar που παράγεται από συμπιεσμένο γάλα. Κατά τη διάρκεια των μελετών τους εφάρμοσαν περιοδική επεξεργασία ΥΠ (586 MPa για 1 min, που επαναλαμβάνονταν τρεις φορές). Ο χρόνος πήξης ήταν μικρός, γεγονός που απέδειξε ότι η συγκεκριμένη επεξεργασία πιθανόν να μην έδινε αρκετό χρόνο για την ανάπτυξη εκτεταμένων δισουλφιδικών αναδιατάξεων. Επιπλέον παρατηρήθηκε μικρή αύξηση στην απόδοση και το ποσοστό υγρασίας. Οργανοληπτικά το

παραγόμενο προϊόν δεν παρουσίαζε διαφορές αλλά η υφή του ήταν σημαντικά υποβαθμισμένη εξαιτίας του αυξημένου ποσοστού υγρασίας. Οι Lee et al. (2006b), μελέτησαν τα χαρακτηριστικά τυριού χαμηλών λιπαρών παρασκευασμένου από πρωτεΐνες ορού γάλακτος επεξεργασμένες με ΥΠ. Το τυρί ήταν αποδεκτό ως προς τη σταθερότητα, ωστόσο, η υφή ήταν ανεπιθύμητη λόγω της αμμώδους ή κοκκώδους υφής. Αυτό πιθανόν να οφείλεται σε ξεδίπλωση της πρωτεΐνης ορού κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας με ΥΠ, η οποία συνέβαλε σε ανώμαλη πρωτεϊνική μήτρα, όπως αποκαλύφθηκε στις μελέτες μικροδομής.

3.6.3. Επίδραση της ΥΠ σε πρωτεάσες τυροκόμησης εξωγενούς προέλευσης

3.6.3.1. Επίδραση της ΥΠ στην Προστιθέμενη κατά την Τυροκόμηση Πυτιά

Η χυμοσίνη είναι η κύρια πρωτεάση της παραδοσιακής ζωικής πυτιάς, ρόλος της οποίας είναι η υδρόλυση του δεσμού Phe₁₀₅-Met₁₀₆ της κ-καζεΐνης του προς πήξη γάλακτος (McSweeney & Sousa, 2000). Η χυμοσίνη θεωρείται λιγότερο ανθεκτική στην πίεση συγκριτικά με την πλασμίνη. Θεωρείται σταθερή μετά από επεξεργασία σε συνθήκες ΥΠ 50-400 MPa σε χρόνους 10-100 min και θερμοκρασίες 2-30°C (Messens et al., 1999; Trujillo et al., 2000; O'Reilly et al., 2002a; Huppertz et al., 2004; Rynne et al., 2008). Ωστόσο, οι Saldo et al. (2002a), υποστήριξαν ότι μετά από επεξεργασία τυριού Garrotxa την 1^η ημέρα της ωρίμανσής του σε συνθήκες 400 MPa για 5 min στους 14°C, η υπολειμματική πηκτική δράση μειώθηκε κατά 50%.

Οι Trujillo et al. (1997) και Juan et al. (2004), μελετώντας την επίδραση της ΥΠ στις ιδιότητες πήξης της χυμοσίνης αίγειου γάλακτος, υποστήριξαν ότι επεξεργασία αυτών στα 400 MPa δεν επιμήκυνε σημαντικά τον χρόνο πήξης, ενώ η συνεκτικότητα του πήγματος βελτιώθηκε σημαντικά.

Οι Juan et al. (2007d), παρατηρήσαν επίσης παρόμοια συμπεριφορά, μετά από επεξεργασία ημίσκληρου τυριού από πρόβειο γάλα μετά το στάδιο της τυροκόμησής του. Η δραστηριότητα της χυμοσίνης μειώθηκε κατά 62% συγκριτικά με δείγματα αναφοράς τη 15^η ημέρα της ωρίμανσης.

Σύμφωνα με τους Malone et al. (2003), η δραστηριότητα της χυμοσίνης δεν επηρεάστηκε για συνθήκες επεξεργασίας μέχρι και 400 MPa ενώ εμφάνισε μείωση μετά από επεξεργασία σε συνθήκες 500-800 MPa. Η δραστηριότητα της χυμοσίνης μειώθηκε κατά 50% μετά από επεξεργασία στα 800 MPa.

Οι Leite junior et al. (2014), μελέτησαν το στάδιο πήξης του γάλακτος τυροκόμησης μετά από προσθήκη πυτιάς μοσχारीου επεξεργασμένης σε συνθήκες ΥΠ 190 MPa. Τα αποτελέσματα έδειξαν μείωση της μη ειδικής πρωτεολυτικής δράσης της πυτιάς, αύξηση του ρυθμού πήξης, αύξηση της συναίρεσης κατά 8.42% και πιο συνεκτικό πήγμα.

Οι Leite junior et al. (2016), μελέτησαν την επίδραση της ΥΠ σε ανασυνδυασμένη χυμοσίνη (212 MPa/5 min/10°C), πυτιά αγελάδος (222 MPa/5 min/23°C) και πεψίνη χοίρου (50 MPa/5 min/20°C). Τα αποτελέσματα έδειξαν αύξηση της δραστηριότητας των ενζύμων πήξης κατά 10% για τη χυμοσίνη και την πυτιά και 6% για την πεψίνη. Τα επεξεργασμένα με ΥΠ ένζυμα μείωσαν το χρόνο πήξης του γάλακτος και τα πήγματα που παρασκευάστηκαν ήταν πιο σταθερά. Οι συγγραφείς πρότειναν τη χρήση ΥΠ ως εναλλακτική λύση για τη βελτίωση της αποδοτικότητας των ενζύμων πήξης του γάλακτος τυροκόμησης, την επιτάχυνση της πήξης του γάλακτος και πιθανώς την αύξηση της απόδοσης του τυριού.

3.6.3.2. Επίδραση της ΥΠ στην Καλλιέργεια Εκκίνησης

Στο στάδιο της ωρίμανσης του τυριού, η παρουσία των πρωτεασών εξωγενούς προέλευσης των οξυγαλακτικών καλλιιεργειών εκκίνησης που προστίθενται κατά την τυροκόμηση, θεωρείται

καθοριστική. Τα ένζυμα που συνεισφέρουν οι γαλακτικές καλλιέργειες χωρίζονται σε 3 ομάδες: πρωτεάσες μεμβράνης, ενδοκυτταρικές πρωτεάσες και γλυκολυτικά ένζυμα (Malone et al., 2003).

Οι πρωτεϊνάσες μεμβράνης των οξυγαλακτικών καλλιεργειών συμμετέχουν στην πρωτογενή πρωτεόλυση μέσω υδρόλυσης των μεσαίου μεγέθους πεπτιδίων, τα οποία δημιουργούνται από τη δράση της χυμοσίνης και της πλασμίνης, προς παραγωγή ολιγοπεπτιδίων (Upadhyay et al., 2004). Ωστόσο πληροφορίες σχετικά με την επίδραση της ΥΠ στις πρωτεϊνάσες μεμβράνης όταν η πίεση εφαρμόζεται σε τυρί είναι πολύ περιορισμένες. Επιπρόσθετα δεν υπάρχουν αναφορές σχετικά με την επίδραση της ΥΠ στη δραστικότητα πρωτεολυτικών ενζύμων προστιθέμενων κατά την τυροκόμηση δευτερευουσών οξυγαλακτικών καλλιεργειών (π.χ. *Penicillium roqueforti* και *Penicillium camemberti*), οι οποίες έχουν σημαντικό ρόλο σε τυριά που ωριμάζουν με τη βοήθεια μυκήτων.

Η δευτερογενής πρωτεόλυση προκύπτει κυρίως από τη δράση των πεπτιδασών των οξυγαλακτικών βακτηρίων εκκίνησης, οι οποίες διασπούν τα πεπτιδία προς παραγωγή ελεύθερων αμινοξέων (FAA). Τα συγκεκριμένα ένζυμα βρίσκονται στο εσωκυτταρικό περιβάλλον των βακτηρίων με αποτέλεσμα η δράση των περισσότερων από αυτά τα ένζυμα να απαιτεί την αυτόλυση των κυττάρων προς απελευθέρωσή του στη μάζα του τυριού. Τα αποτελέσματα διαφόρων ερευνών δείχνουν ότι η επίδραση της πίεσης στη λύση των κυττάρων εξαρτάται από το στέλεχος του μικροοργανισμού, ενώ η πίεση επιφέρει μεταβολή της δραστικότητας των αμινοπεπτιδασών (Malone et al., 2002; Juan et al., 2007a).

Αναφορικά με την επίδραση της ΥΠ στην κυτταρική λύση των βακτηρίων εκκίνησης, οι Juan et al. (2008), ανέφεραν ότι η αυτόλυση των βακτηρίων εκκινητών (*L. lactis* subsp. *lactis* και *L. lactis* subsp. *cremoris*) ήταν υψηλότερη σε τυρί πρόβειου γάλακτος μετά από επεξεργασία του σε συνθήκες ΥΠ 300 MPa για 10 min στους 12°C την 1^η ημέρα της ωρίμανσής του συγκριτικά με επεξεργασία τη 15^η ημέρα ωρίμανσης και συγκριτικά με δείγματα αναφοράς, όπως προέκυψε από τη μέτρηση της δραστικότητας της λακτάσης αφυδρογονάσης με τιμές 0.39, 0.30 και 0.27 U/g, αντίστοιχα. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα είναι σε συμφωνία με εκείνα των Malone et al., (2002), οι οποίοι παρατήρησαν ότι τα κύτταρα του μικροοργανισμού *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 σε διάλυμα λύθηκαν γρηγορότερα μετά από επεξεργασία σε πίεση 300 MPa συγκριτικά με κύτταρα που επεξεργάστηκαν σε συνθήκες 100-200 και 600-800 MPa για 5 min. Αντίθετα, σύμφωνα με τους O'Reilly et al. (2002a), δεν παρουσιάστηκε κυτταρική λύση για τα στελέχη 303, 223, 227 και AM2 του μικροοργανισμού *L. lactis* σε τυρί Cheddar, μετά από επεξεργασία του σε συνθήκες ΥΠ 100-400 MPa στους 25°C για 20 min. Σε συμφωνία, οι Moschoroulou et al. (2010), δεν παρατήρησαν σημαντικές διαφορές στη δραστικότητα της λακτάσης αφυδρογονάσης τυριού άλμης επεξεργασμένου τη 15^η ημέρα της ωρίμανσής του σε συνθήκες ΥΠ 200 MPa για 15 min στους 20°C ή 500 MPa για 15 min στους 20°C, συγκριτικά με δείγματα αναφοράς κατά τη διάρκεια 90 ημερών ωρίμανσης.

Αναφορικά με την επίδραση της ΥΠ στη δραστικότητα αμινοπεπτιδασών των οξυγαλακτικών βακτηρίων εκκίνησης, οι Miyakawa et al. (1994), μελέτησαν την επίδραση της ΥΠ στη δραστικότητα των πεπτιδασών του *L. helveticus* και παρατήρησαν αυξημένες δραστικότητες μετά από επεξεργασία σε συνθήκες 400 MPa, 30°C και 10 min. οι Malone et al. (2003), μελέτησαν την επίδραση της επεξεργασίας υψηλών πιέσεων σε ενζυμικά συστήματα καθοριστικά για την ωρίμανση του τυριού. Η επεξεργασία υψηλών πιέσεων (400-800 MPa) είχε ως αποτέλεσμα τη δραματική μείωση ή την πλήρη απενεργοποίηση των πρωτεασών της μεμβράνης του *L. lactis*, της X-προλυλ-διπεπτιδυλικής αμινοπεπτιδάσης (PepX), της αμινοπεπτιδάσης N (PepN) και των γλυκολυτικών ενζύμων. Αντίθετα, η επεξεργασία υψηλών πιέσεων αύξησε την ενεργότητα της αμινοπεπτιδάσης C (PepC), ενώ δεν είχε επίδραση στην αμινοπεπτιδάση A (PepA).

Οι Katsaros et al. (2009), μετά από επεξεργασία διαλύματος της οξυγαλακτικής καλλιέργειας του μικροοργανισμού *L. bulgaricus*, σε συνθήκες ΥΠ 0.1-700 MPa, παρατήρησαν ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση των αμινοπεπτιδασών PepN, PepX, PepA, PepC και PepY ανάλογα με τις συνθήκες επεξεργασίας και την ευαισθησία του κάθε ενζύμου στις συνθήκες αυτές. Η μέγιστη δραστηριότητα των 5 αμινοπεπτιδασών παρατηρήθηκε μετά από επεξεργασία σε συνθήκες 200 MPa, 20 min, σε θερμοκρασία 20°C.

Οι Juan et al. (2007a), παρατήρησαν αύξηση της δραστηριότητας των αμινοπεπτιδασών μετά από επεξεργασία τυριού από πρόβειο γάλα σε συνθήκες ΥΠ 200-500 MPa για 10 min στους 12°C, κατά τη διάρκεια της ωρίμανσής του. Επιπρόσθετα παρατηρήθηκαν υψηλότερες τιμές δραστηριότητας για δείγματα τα οποία επεξεργάστηκαν την 1^η ημέρα της ωρίμανσής τους συγκριτικά με επεξεργασία τη 15^η ημέρα. Μετά από 60 ημέρες ωρίμανσης, τα επεξεργασμένα τυριά σε συνθήκες 300 MPa (1^η ημέρα ωρίμανσης) είχαν την υψηλότερη δραστηριότητα (8.03 nmol για την Leu-p-NA/g per h) ενώ τα επεξεργασμένα τυριά σε συνθήκες 500 MPa (15^η ημέρα), τη χαμηλότερη (2.19 nmol για την Leu-p-NA/g per h). Αντίθετα, οι Moschoroulou et al. (2010), δεν παρατήρησαν σημαντική επίδραση της ΥΠ στις αμινοπεπτιδάσες μετά από επεξεργασία τυριού άλμης από πρόβειο γάλα τη 15^η ημέρα της ωρίμανσής του σε συνθήκες ΥΠ 200 ή 500 MPa για 15 min στους 20°C.

3.6.4. Επίδραση της ΥΠ στο στάδιο της ωρίμανσης

Το στάδιο της ωρίμανσης του τυριού αποτελεί χρονοβόρα και υψηλού κόστους διαδικασία εξαιτίας της απαραίτητης αποθήκευσης των τυριών σε συγκεκριμένες συνθήκες για μεγάλο χρονικό διάστημα. Για το λόγο αυτό, η εύρεση ενός τρόπου μείωσης της διάρκειας του συγκεκριμένου σταδίου χωρίς να υπάρχει επίδραση στα ποιοτικά χαρακτηριστικά του τυριού, θα μπορούσε να μειώσει το κόστος της βιομηχανίας παρασκευής τυριού (El Soda & Awad, 2011). Τα στάδια της πρωτεόλυσης, λιπόλυσης και γλυκόλυσης σε συνδυασμό με δευτερογενείς δράσεις των ενώσεων που σχηματίζονται, αποτελούν τα βιοχημικά μονοπάτια του σταδίου της ωρίμανσης, τα οποία καταλύονται από ένζυμα προερχόμενα από το γάλα τυροκόμησης, την προστιθέμενη πυτιά, τα οξυγαλακτικά βακτήρια εκκίνησης (SLAB), τα οξυγαλακτικά βακτήρια εκτός των καλλιεργιών εκκίνησης (NSLAB), δευτερεύουσες καλλιέργειες που πιθανόν προστίθενται κατά την τυροκόμηση και από δευτερεύουσα μικροχλωρίδα. Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν δημοσιεύσεις που αναφέρουν την εφαρμογή της ΥΠ με στόχο την επιτάχυνση της ωρίμανσης διαφόρων τύπων τυριών. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν τη δυνατότητα της εφαρμογής της ΥΠ για επιτάχυνση της ωρίμανσης των τυριών μέσω μεταβολών που προκαλούνται στην ενζυμική δομή και στη διαμόρφωση της καζεϊνικής μήτρας, καθιστώντας την πιο επιρρεπή στη δράση των πρωτεασών, καθώς και μέσω πρόκλησης λύσης των βακτηριακών κυττάρων που απελευθερώνει στη μάζα του τυριού ένζυμα τα οποία προάγουν βιοχημικές δράσεις (Messens et al., 1998; O'Reilly et al., 2000, 2003; Saldo et al., 2000, 2002a; Garde et al., 2007; Voigt et al., 2010). Επιπρόσθετα, η επεξεργασία με ΥΠ οδηγεί σε αύξηση του pH (0.1-0.7 μονάδες) μέσω τροποποίησης της διάχυσης του νερού σε ορισμένα τυριά, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ευνοϊκότερων συνθηκών για τη δραστηριότητα των ενζύμων (Saldo et al., 2002b).

Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν ευρήματα σχετικά με την επίδραση της ΥΠ στην πρωτεόλυση, τη λιπόλυση και τη ζύμωση της λακτόζης κατά την ωρίμανση διαφόρων τύπων τυριών, που σχετίζονται με την επιτάχυνση της ωρίμανσής τους (Πίνακας 3.2).

Πίνακας 3.2. Βιβλιογραφικές αναφορές σχετικές με την επίδραση της ΥΠ στη διαδικασία ωρίμανσης διαφόρων ειδών τυριών

Είδος Τυριού	Στάδιο Εφαρμογής ΥΠ	Συνθήκες Επεξεργασίας	Ευρήματα	Αναφορά
ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΟΛΥΣΗΣ				
Cheddar	Μετά το αλάτισμα	50 MPa, 72 h ^a , 25°C	Μετά από 3 ημέρες παραλαβή τυριού με όμοια γεύση και περιεκτικότητα σε FAA ^β με τυρί του εμπορίου 6 μηνών ωρίμανσης (Cheddar: 26.5 mg/g, Parmensan: 76.7 mg/g).	Yokoyama et al., 1992
Cheddar	2, 7, 14, ή 21 d ^γ	50 MPa, 72 h, 25°C	Επιτάχυνση υδρόλυσης α _{s1} -καζεΐνης και συσσώρευση α _{s1} -I-καζεΐνης. Αύξηση των επιπέδων SN/TN ^δ (pH 4.6) και των FAA.	O'Reilly et al., 2000b
Cheddar	1 d	70–400 MPa, 3.5–81.5 h, 25°C	Μέγιστη συσσώρευση α _{s1} -I-καζεΐνης μετά από επεξεργασία στα 100 MPa. Αύξηση του επιπέδου SN/TN (pH 4.6) για πιέσεις <150 MPa. Μείωση των FAA κατά την αύξηση της πίεσης.	O'Reilly et al., 2003
Cheddar	1 ή 4 m ^ε	200–800 MPa, 5, 25°C	Επιβράδυνση ωρίμανσης σε πιέσεις ≥ 400 MPa.	Wick et al., 2004
Camembert	5 ή 10 d	0.1–500 MPa, 4 h, 5°C	Η εντονότερη πρωτεόλυση παρατηρήθηκε μετά από επεξεργασία σε συνθήκες 50 MPa τη 10 ^η ημέρα.	Kolakowski et al., 1998
Père Joseph και Paillardin	2 d	50 MPa, 8 h, 20°C	Επιτάχυνση πρωτεόλυσης εξαιτίας της αύξησης της ενζυμικής δραστηριότητας και αποδυνάμωση των υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων.	Messens et al., 2000, 2001
Blue-veined	42 d	400–600 MPa, 10 min, 20°C	Επιτάχυνση υδρόλυσης της β- και α _{s2} -καζεΐνης. Αυξημένα επίπεδα PTA-SN/TN ^ζ .	Voigt et al., 2010
Gouda	Μετά το αλάτισμα, 5 ή 10 d	50 ή 500 MPa, 20–100 min, 14°C	Καμία μεταβολή στα επίπεδα των pH 4.6, SN, PTA-SN/TN, της περιεκτικότητας σε FAA και των ηλεκτροφορημάτων SDS-PAGE.	Kolakowski et al., 1998; Messens et al., 1999

Είδος Τυριού	Στάδιο Εφαρμογής ΥΠ	Συνθήκες Επεξεργασίας	Ευρήματα	Αναφορά
Edam	Μετά το αλάτισμα, 4, 6, και 8 εβδομάδες	200 ή 400 MPa, 30 min, 25°C	Καμία μεταβολή στα διάφορα κλάσματα των αζωτούχων ενώσεων.	Iwańczak & Wiśniewska, 2005
Extracts of frozen Edam	1 d	50 ή 100 MPa, 0.5 h, 18°C		Wachowska, 2010
Μειωμένων λιπαρών, χαμηλής υγρασίας και μη ώριμη mozzarella	1, 5, 15, 20, και 25 d	400/5 MPa, 20/21 min, 2.5°C	Καμία επίδραση στην υδρόλυση των καζεϊνών και στο επίπεδο των SN/TN (pH 4.6) και των FAA.	Johnston & Darcy, 2000; O' Reilly et al., 2002b; Sheehan et al., 2005
Garrotxa	1 d	400 MPa, 5 min, 14°C και ακολούθως 50 MPa, 72 h, 14°C	Μείωση περιόδου ωρίμανσης από 28 σε 14 d.	Saldo et al., 2000
Τυρί από πρόβειο γάλα	1 ή 15 d	200–500 MPa, 10 min, 12°C	Αύξηση πεπτιδολυτικής δραστηριότητας και υψηλότερο ποσοστό FAA μετά από επεξεργασία σε συνθήκες 300 MPa και εφαρμογή την 1 ^η ημέρα. Επεξεργασία στα 500 MPa επιβράδυνε την πρωτογενή πρωτεόλυση.	Juan et al., 2007a; Juan et al., 2008
Hispánico	15 d	400 MPa, 5 min, 10°C	Επιτάχυνση υδρόλυσης καζεϊνών και αύξηση επιπέδων FAA	Avila et al., 2006
La Serena	2 ή 50 d	300 ή 400 MPa, 10 min, 10°C	Υψηλότερα επίπεδα πρωτεόλυσης μετά από επεξεργασία σε συνθήκες 400 MPa και εφαρμογή τη 2 ^η ημέρα συγκριτικά με τυριά τα οποία επεξεργάστηκαν σε διαφορετικές συνθήκες.	Garde et al., 2007
Reggianito	1 d	100 ή 400 MPa, 20°C, 5 ή 10 min	Καμία μεταβολή στη δομή του τυριού. Μείωση μικροβιακού φορτίου στα επεξεργασμένα τυριά σε συνθήκες 400 MPa συγκριτικά με τα τυριά των 100 MPa και των δειγμάτων αναφοράς. Αύξηση της δραστηριότητας της πλασμίνης στα τυριά επεξεργασμένα στα 400 MPa/10 min. Καμία επίδραση στη εναπομένουσα πηκτική δράση. Σε ΥΠ 400 MPa, παρατηρήθηκε	Costabel et al., 2016

Είδος Τυριού	Στάδιο Εφαρμογής ΥΠ	Συνθήκες Επεξεργασίας	Ευρήματα	Αναφορά
			αυξημένη υδρόλυση της α _{SI} - και β-καζεΐνης, σημαντικά υψηλότερη περιεκτικότητα των κλασμάτων αζωτούχων ενώσεων καθώς και των διαλυτών πεπτιδίων και των FAA. Τα πεπτίδια και η περιεκτικότητα σε ελεύθερα αμινοξέα τυριού ωρίμανσης 60 d ήταν παρόμοια με τυριού 90 d. Αύξηση του SN/TN (pH 4.6) με αύξηση του χρόνου επεξεργασίας.	
Τυρί Φέτα	Καλλιέργεια εκκίνησης	200 MPa, 15 min, 20°C	Αυξημένη πρωτεόλυση, αυξημένα επίπεδα TCA-SN/TN ¹ και PTA-SN/TN, αύξηση των μικρών υδρόφιλων πεπτιδίων. Οι δραστηκότητες της χυμοσίνης και των πεπτιδασών APep δε διέφεραν από τα τυριά αναφοράς.	Maniou et al., 2013
Τυρί από απαστερίωτο γάλα	14 d ή 21 d	400 MPa ή 600 MPa	Μικρότερη δραστηκότητα αμινοπεπτιδασών στα επεξεργασμένα τυριά συγκριτικά με τα δείγματα αναφοράς. Αύξηση της υδρόλυσης της α _S -καζεΐνης στο επεξεργασμένο τυρί στα 400 MPa αλλά όχι στα 600 MPa. Αυξημένη υδρόλυση β-, κ- και παρα-κ-καζεϊνών σε όλα τα επεξεργασμένα τυριά από τις 60 d ωρίμανσης. Αυξημένα επίπεδα υδρόφιλων και υδρόφοβων πεπτιδίων στα επεξεργασμένα τυριά συγκριτικά με τα δείγματα αναφοράς από τις 60 d ωρίμανσης. Μικρότερη συγκέντρωση ελεύθερων αμινοξέων (FAA) στο επεξεργασμένο τυρί στα 600 MPa από τις 60 d ωρίμανσης συγκριτικά με τα υπόλοιπα δείγματα. Μικρότερη συγκέντρωση ολικών βιογενών αμινών στα επεξεργασμένα τυριά από τις 60 d ωρίμανσης συγκριτικά με τα δείγματα αναφοράς.	Calzada et al., 2015

Είδος Τυριού	Στάδιο Εφαρμογής ΥΠ	Συνθήκες Επεξεργασίας	Ευρήματα	Αναφορά
ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΛΙΠΟΛΥΣΗΣ				
Garrotxa	1 d	400 MPa, 5 min, 14°C	Επιβράδυνση λιπόλυσης λόγω της απενεργοποίησης των οξυγαλακτικών βακτηρίων ή των λιπολυτικών ενζύμων.	Saldo et al., 2003
Τυρί από πρόβειο γάλα	1 ή 15 d	200–500 MPa, 10 min, 12°C	Στα επεξεργασμένα τυριά (15 ημέρες από την παρασκευή) σε συνθήκες 400-500 MPa, παρατηρήθηκε μικρή συγκέντρωση FFA μετά από 60 d ωρίμανσης συγκριτικά με άλλες συνθήκες επεξεργασίας. Τα υψηλότερα επίπεδα FFAs παρατηρήθηκαν μετά από επεξεργασία στα 300 MPa μετά από εφαρμογή την 1 ^η ημέρα συγκριτικά με άλλες επεξεργασίες.	Juan et al., 2007b
Hispánico	15 d	400 MPa, 5 min, 10°C	Καμία μεταβολή στη δραστικότητα της εστεράσης. Ασήμαντες διαφορές στα επίπεδα των FFA με τα δείγματα αναφοράς.	Avila et al., 2007
Cheddar από γάλα πλήρες σε λιπαρά	1 d	400 MPa, 10 min, 25°C	Μη σημαντική διαφορά της λιπόλυσης με τα δείγματα αναφοράς κατά τη διάρκεια 180 d ωρίμανσης.	Rynne et al., 2008
Blue-veined	42 d	400–600 MPa, 10 min, 20°C	Μείωση της λιπολυτικής δραστικότητας του μικροοργανισμού <i>P. roqueforti</i> .	Voigt et al., 2010
ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ ΤΗΣ ΛΑΚΤΟΖΗΣ				
Cheddar από γάλα πλήρες σε λιπαρά	1 d	400 MPa, 10 min, 25°C	Μείωση της συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος μετά από 180 d ωρίμανσης.	Rynne et al., 2008

^a h: ώρες (hours), ^β FAA: Ελεύθερα αμινοξέα (Free Amino Acids), ^γ d: ημέρες (days), ^δ SN/TN: Υδατοδιαλυτό άζωτο/Ολικό άζωτο (Soluble nitrogen/Total nitrogen), ^ε m: μήνες (months), PTA-SN/TN^ς: Άζωτο διαλυτό σε φωσφοροβόλφραμικό οξύ/Ολικό άζωτο (Phosphotungstic acid-Soluble nitrogen/Total nitrogen), TCA-SN/TN^η: Άζωτο διαλυτό σε τριχλωροοξικό οξύ/Ολικό άζωτο (Trichloroacetic acid-Soluble nitrogen/Total nitrogen)

3.6.5. Επίδραση της ΥΠ στα φυσικοχημικά, ρεολογικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τυριών

Ο κάθε τύπος τυριού έχει τα ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του και η επιβεβαίωση ότι οι τεχνολογίες που εφαρμόζονται για την επεξεργασία τους δεν επιδρούν αρνητικά στα χαρακτηριστικά τους είναι μεγάλης σημασίας. Στον Πίνακα 3.3, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα μελετών σχετικά με την επίδραση της ΥΠ σε ρεολογικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά διαφόρων ειδών τυριού.

Πίνακας 3.3. Βιβλιογραφικές αναφορές σχετικές με την επίδραση της ΥΠ στο χρώμα, στα ρεολογικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά διαφόρων τύπων τυριού

Παράμετρος προς εκτίμηση	Είδος τυριού	Στάδιο εφαρμογής ΥΠ	Συνθήκες επεξεργασίας	Επίδραση	Αναφορά
Χρώμα	Mató	1 d ^a	500 MPa, 5/10/15 min, 10°C	Μείωση παραμέτρων L^b και a' , αύξηση παραμέτρου $b^δ$, συγκριτικά με τα τυριά αναφοράς.	Capellas et al., 2001
	Garrotxa	1 d	400 MPa, 5 min /14°C	Μείωση φωτεινότητας (L) και αύξηση παραμέτρων χρώματος (a και b) συγκριτικά με τα τυριά αναφοράς.	Saldo et al., 2002c
	Queso fresco	1 d	400 MPa, 20 min /20°C	Υψηλότερη ένταση κίτρινου χρώματος μετά από 1 d επεξεργασίας αλλά όχι μετά από 8 d, συγκριτικά με τα τυριά αναφοράς.	Sandra et al., 2004
	Cheddar, Turkish white-brined	1 d	50–400 MPa, 5/10/15 min, 22–25°C	Καμία επίδραση στην παράμετρο L μετά από αύξηση της έντασης της πίεσης και του χρόνου επεξεργασίας. Μείωση της παραμέτρου a και αύξηση της παραμέτρου b συγκριτικά με τα τυριά αναφοράς.	Koca et al., 2011; Rynne et al., 2008
Ρεολογικές Ιδιότητες	Stirred and milled-curd Cheddar	1 d	345/483 MPa, 3/7 min	Επιτάχυνση του θρυμματισμού (μικροδομή και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τυριού 1 d όμοια με τυρί 27 d ωρίμανσης).	Serrano et al., 2004; Serrano et al., 2005
	Cheddar	1 και 4 m ^e	200–800 MPa, 5 min, 25°C	Καμία επίδραση της επεξεργασίας σε πιέσεις μέχρι 300 MPa μετά από εφαρμογή σε τυρί 1 m ωρίμανσης. Στα 800 MPa, το τυρί παρουσίασε όμοια ικανότητα θρυμματισμού με τα τυριά αναφοράς. Μετά από εφαρμογή ΥΠ σε τυρί 4 m ωρίμανσης μειώθηκε η ένταση θρυμματισμού.	Wick et al., 2004
	Cheddar	1 d	400 MPa, 10 min, 25°C	Αυξημένες τιμές θλίψης, μικρότερες τιμές G' G'' και αυξημένη ελαστικότητα μέχρι τις 21 d, αλλά μικρότερης έκτασης σε σχέση με δείγμα αναφοράς.	Rynne et al., 2008
	Χαμηλής υγρασίας	1 και 5 d	400 MPa, 20 min, 25°C	Μείωση χρόνου μαγειρέματος (μέχρι τις 15 d).	O' Reilly et al., 2002b

Παράμετρος προς εκτίμηση	Είδος τυριού	Στάδιο εφαρμογής ΥΠ	Συνθήκες επεξεργασίας	Επίδραση	Αναφορά
	mozzarella			Αυξημένες τιμές G' , G'' και ελαστικότητας και μείωση του χρόνου λιώσιματος στους 280°C.	
	Μειωμένων λιπαρών mozzarella	1 d	400 MPa, 5 min, 21°C	Μη σημαντική επίδραση στα ρεολογικά χαρακτηριστικά.	Sheehan et al., 2005
	Gouda	3 d	50, 225, or 400 MPa, 1 h ^ξ , 14°C	Μείωση της «ακαμψίας», μεγαλύτερη ιξωδοελαστικότητα	Messens et al., 2000
	Τυρί από πρόβειο γάλα	1 ή 15 d	200–500 MPa, 10 min, 12°C	Η εφαρμογή την 1 ^η ημέρα ενίσχυσε την σκληρότητα και οι υψηλότερες πιέσεις μείωσαν την ευθρυπτότητα και την «ακαμψία».	Juan et al., 2007c
	Garrotxa		50 MPa, 72 h, 25°C	Αύξηση της «ρευσιτότητας» και μείωση ελαστικότητας συγκριτικά με τα τυριά αναφοράς.	Saldo et al., 2001
	La Serena	2 ή 50 d	300/400 MPa, 10 min, 10°C	Μέγιστη «ευθρυπτότητα», σκληρότητα και ελαστικότητα σε τυρί επεξεργασμένο τη 2 ^η ημέρα.	Garde et al., 2007
Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά	Hispánico	15 d	400 MPa, 5 min, 10°C	Επεξεργασία μη ώριμου τυριού περιορίσε το σχηματισμό πτητικών ενώσεων. Οι διαφορές ήταν λιγότερο σημαντικές κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης.	Avila et al., 2006
	Τυρί από πρόβειο γάλα	1 ή 15 d	200/500 MPa, 10 min, 12°C		Juan et al., 2007d
	La Serena	2 ή 50 d	300/400 MPa, 10 min, 14°C	Εφαρμογή της επεξεργασίας σε προχωρημένα στάδια δεν προκάλεσε σημαντικές διαφορές συγκριτικά με τα τυριά αναφοράς.	Arqués et al., 2007
	Τυρί από απαστερίωτο γάλα κατσίκας	1, 3, ή 50 d	400/600 MPa, 7 min, 10°C		Degaldo et al., 2011

^a d: ημέρες (days), ^β L: παράμετρος φωτεινότητας ((+)άσπρο- (-)μαύρο) χρωματικής κλίμακας CIELab, ^γ α: παράμετρος χρωματικής κλίμακας CIELab ((+)κόκκινο- (-)πράσινο), ^δ α: παράμετρος χρωματικής κλίμακας CIELab ((+)κίτρινο- (-)μπλε), ^ε m: μήνες (months), ^ξ h: ώρες (hours)

3.6.6. Εφαρμογές της ΥΠ στη βιομηχανία παρασκευής τυριού διεθνώς

Η απόφαση για εφαρμογή της ΥΠ για την αύξηση της διατηρησιμότητας ή για την επιτάχυνση της ωρίμανσης των τυριών απαιτεί προσεκτικό σχεδιασμό βάσει τεχνικών και επιχειρηματικών σχεδίων (Farkas, 2011). Στην Ευρωπαϊκή αγορά υπάρχουν τυριά και προϊόντα τυριού επεξεργασμένα με ΥΠ. Σε αυτά περιλαμβάνονται αλοιφές τυριού για σάντουιτς, κρέμα τυριού, σνακ τυριού Cheddar και cheese jerky, τα οποία είναι απαλλαγμένα από παθογόνους μικροοργανισμούς κι έχουν αυξημένη διάρκεια ζωής (Hiperbaric, 2011). Μεγάλο πλεονέκτημα της επεξεργασίας του τροφίμου με ΥΠ είναι η μείωση ή η κατάργηση των πρόσθετων και των συντηρητικών. Η εταιρία Rodilla η οποία βρίσκεται στην Ισπανία μείωσε το κόστος παραγωγής και αύξησε τη διάρκεια ζωής αλοιφής τυριού για σάντουιτς από 4-6 ημέρες σε 21 ημέρες μετά από επεξεργασία του τροφίμου με ΥΠ σε συνθήκες 500 MPa για ορισμένο χρόνο χωρίς να επηρεάζονται η δομή και τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά (Tonello, 2011). Σύμφωνα με τον Purtoy (2009), το κόστος της επεξεργασίας με ΥΠ σχετίζεται με τον εξοπλισμό, την ένταση της πίεσης, το χρόνο επεξεργασίας και τα κόστη της εργασίας, της κατανάλωσης ενέργειας και της συντήρησης. Η αρχική επένδυση σε εξοπλισμό ΥΠ μπορεί να κυμαίνεται από US \$ 650.000 μέχρι και US \$ 2.600.000, ανάλογα με τον εξοπλισμό (55 - 425 L).

Το κόστος επεξεργασίας με ΥΠ ανά kg τροφίμου, εξαρτάται από την ένταση της πίεσης και το χρόνο επεξεργασίας. Επί του παρόντος, το κόστος επεξεργασίας με ΥΠ για σταθερό χρόνο είναι περίπου US \$ 0,096 / kg για πίεση στα 300 MPa , US \$ 0,112 / kg στα 400 MPa , US \$ 0,129 / kg στα 500 MPa και US \$ 0,145 / kg στα 600 MPa. Το κόστος της φθοράς των εξαρτημάτων είναι US \$ 0,015 / kg , US \$ 0,026 / kg , US \$ 0,034 / kg, και US \$ 0,05 / kg στις προαναφερόμενες συνθήκες πίεσης, αντίστοιχα.

Όσον αφορά στο χρόνο επεξεργασίας, 5 min σε σταθερή πίεση συνεπάγεται κόστος US \$ 0.159 / kg, ενώ 10 min \$ 0.21 / kg, 15 min US \$ 0.263 / kg και 20 min US \$ 0.316 / kg. Αρκετές ερευνητικές μελέτες έχουν δείξει ότι επεξεργασία σε πιέσεις 500 έως 600 MPa που εφαρμόζονται στο τυρί για 5 έως 20 min, είναι επαρκής για να επιτευχθεί μείωση πάνω από 5 logcfu / g των καλλιεργειών *S. aureus*, *L. monocytogenes* και *E. coli*, όταν η εφαρμογή γίνει αμέσως μετά την παρασκευή του τυριού ή σε πιο προχωρημένα στάδια της ωρίμανσης. Ηπιότερες συνθήκες επεξεργασίας με ΥΠ (345 MPa για 3 min) απαιτούνται για την επιτάχυνση της διαμόρφωσης της δομής (ικανότητα θρυμματισμού) τυριού Cheddar. Τυπικές συνθήκες λειτουργίας για επεξεργασία θαλασσινών, χυμών και έτοιμα για κατανάλωση προϊόντα είναι 300, 450 και 590 MPa για χρόνους επεξεργασίας 1, 1 και 3 min, αντίστοιχως (Purtoy, 2009). Συνολικά, ανάλογα με τις παραμέτρους λειτουργίας και την κλίμακα λειτουργίας, το κόστος της επεξεργασίας με ΥΠ είναι περίπου US \$ 0,05 έως 0.5 / kg τροφίμου (Rastogi et al., 2007). Αναμφίβολα, οι δαπάνες που προκύπτουν από την εφαρμογή της ΥΠ φαίνονται υψηλές συγκριτικά με εκείνες των παραδοσιακών τεχνολογιών επεξεργασίας. Ωστόσο, πιθανές ανακλήσεις προϊόντων μπορεί να επιφέρουν υψηλό κόστος στην εταιρεία καθώς και τη δημιουργία αρνητικής εντύπωσης στον καταναλωτή. Επιπλέον, η μείωση του χρόνου παρασκευής τυριού μέσω επιτάχυνσης της ωρίμανσής του, μπορεί να έχει σημαντικές επιπτώσεις στο κόστος παραγωγής. Οι περισσότεροι τύποι μαλακών τυριών, συμπεριλαμβανομένων των μη παστεριωμένων, όπως panela, requeson (ανθότυρο) και fresco, τα οποία έχουν πρόσφατα εμπλακεί σε κρούσματα ασθενειών, προτείνονται για επεξεργασία με ΥΠ, λόγω της υψηλής ενεργότητας νερού. Επίσης ποικιλίες τυριών με χαμηλές τιμές pH (pH ~4.75) θα μπορούσαν επίσης να επωφεληθούν από την παστερίωση με ΥΠ, όπως επιβεβαιώνεται από τους De Lamo-Castellvi et al. (2006; 2007).

Η εφαρμογή κάθε νέας τεχνολογίας επεξεργασίας τροφίμων αποτελεί πρόκληση για την επιστημονική κοινότητα. Η επεξεργασία του τυριού κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες ΥΠ, μπορεί να διασφαλίσει

την παραλαβή ενός ασφαλούς μικροβιολογικά προϊόντος και να οδηγήσει σε αύξηση του χρόνου ζωής του. Όσον αφορά στην ωρίμανση του τυριού, οι επιστήμονες έχουν επικεντρωθεί στην εφαρμογή της ΥΠ με στόχο την επιτάχυνσή της με επιδιωκόμενο αποτέλεσμα τη μείωση του υψηλού κόστους που επιφέρει το συγκεκριμένο στάδιο.

Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν τρεις δημοσιεύσεις σχετικά με την επίδραση της ΥΠ σε τυριά άλμης, όπως η Φέτα, η οποία παράγεται και καταναλώνεται ευρέως στη χώρα μας. Τα ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (γεύση, άρωμα) της συγκεκριμένης κατηγορίας τυριών, οφείλονται σε μεγάλο βαθμό στα πρωτεολυτικά ένζυμα που βοηθούν στην παραγωγή πτητικών αζωτούχων ενώσεων, κατά τη διάρκεια της ωρίμανσής τους.

Στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη της επίδρασης της ΥΠ στη δομή και τη δραστικότητα ενζύμων που βρίσκουν εφαρμογή στην τεχνολογία παραγωγής του ελληνικού τυριού άλμης Φέτας. Απώτερος στόχος ήταν η μείωση του αναγκαίου χρόνου ωρίμανσης των τυριών και κατά συνέπεια η μείωση του κόστους παραγωγής τους, εξαιτίας της δίμηνης τουλάχιστον ωρίμανσής τους. Η μείωση του κόστους παρασκευής, η βελτίωση των οργανοληπτικών τους χαρακτηριστικών και η μείωση του χρονοβόρου σταδίου της ωρίμανσης αναμένεται να βοηθήσει σημαντικά και να προσφέρει στους καταναλωτές ποιοτικά προϊόντα σε μειωμένες τιμές. Επιπρόσθετα, εφαρμογή της ΥΠ και σε καλλιέργειες που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή παραδοσιακών γαλακτοκομικών προϊόντων, αναμένεται να βοηθήσει σημαντικά στη βελτίωση της ποιότητας των τελικών προϊόντων, αλλά και στην απαιτούμενη τεχνογνωσία της εφαρμογής αυτής της τεχνολογίας. Η επένδυση που απαιτείται με τις σήμερα πλέον διαθέσιμες μονάδες ΥΠ και το χαμηλό λειτουργικό κόστος της ΥΠ στη πράξη, κάνουν την εφαρμογή της στη βιομηχανία (ή και τη βιοτεχνία) απολύτως ρεαλιστική πρόταση εφόσον έχει γίνει σωστή μελέτη και αποτίμηση των πλεονεκτημάτων στη ποιότητα και το κόστος των προϊόντων.

Η παρούσα διατριβή αναμένεται να συμβάλλει σε σημαντικό βαθμό στην επιστημονική γνώση πάνω σε θέματα που αφορούν στην επίδραση της ΥΠ στη δομή ενζύμων, με την πραγματοποίηση βασικής έρευνας των δομικών αλλαγών που επηρεάζουν τη δράση των ενζύμων που υποβάλλονται σε ΥΠ. Παρόμοιες μελέτες σχετικές με τη συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή υπάρχουν ελάχιστες στη διεθνή βιβλιογραφία, ενώ καμία από αυτές δεν έχει εμβαθύνει σε τέτοιο βαθμό όπως η συγκεκριμένη διατριβή.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Al-attar, S., Abou-ghorrah, S. & Haddal, A. (2015). The impact of elevated temperatures on accelerating the ripening process of kashcaval cheese manufactured in Syria. *International Food Research Journal*, 22(4), 1519-1524.
- Aly, M.E. (1990). Utilization of freeze-shocked Lactobacilli for enhancing flavour development of Ras cheese. *Egyptian Journal of Dairy Science*, 18, 143-156.
- Aly, M.E. (1994). Flavour enhancement of low-fat Kashkaval cheese using heat or freeze-shocked *Lactobacillus delbrueckii var. helveticus* culture. *Die Nahrung*, 38 (5), 504-510.
- Anjani K., Kailasapathy, K. & Phillips, M. (2007). Microcapsulation of enzymes for potential application in acceleration of cheese ripening. *International Dairy Journal*, 17, 79-86.
- Ardö, Y. & Pettersson, H.E. (1988). Accelerated cheese ripening with heat treated cells of *Lactobacillus helveticus* and a commercial proteolytic enzyme. *Journal of Dairy Research*, 55, 236-245.
- Argyriou, A. (1998). Effects of high pressure treatment on the bovine milk lipoprotein lipase. MSc. Thesis, Department of Food Science and Technology, University of Reading, Reading, U.K.
- Arias, M., Lopez-Fandino, R. & Olano, A. (2000). Influence of pH on the effects of high pressure on milk. *Milchwissenschaft*, 55(4), 191-94.
- Arqués, J.L., Garde, S., Fernández-García, E., Gaya, P. & Núñez M. (2007). Volatile compounds, odor, and aroma of La Serena cheese high-pressure treated at two different stages of ripening. *Journal of Dairy Science*, 90, 3627-3639.
- Asensio, C., Parra, L., Pelaez, C. & Gomez, R. (1996). Use of heat-shocked mesophilic lactic acid bacteria in low-fat goat's milk cheesemaking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 2919-2923.
- Ávila, M., Garde, S., Fernandez-Garcia, E., Medina, M. & Nunez, M. (2006). Effect of high pressure treatment and a bacteriocin-producing lactic culture on the odour and aroma of Hispanico cheese: Correlation of volatile compounds and sensory analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54, 382-389.
- Ávila, M., Calzada, J., Garde, S. & Nuñez, M. (2007). Effect of a bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* strain and high-pressure treatment on the esterase activity and free fatty acids in Hispánico cheese. *International Dairy Journal*, 17, 1415-1423.
- Azarnia, S., Lee, B.H., St-Gelais, D., Champagne, C.P. & Kilcawley, K.N. (2010a). Effect of free or encapsulated recombinant aminopeptidase of *Lactobacillus rhamnosus* S93 on acceleration of Cheddar cheese ripening. *Food Biotechnology*, 24, 135-149.
- Azarnia, S., Lee, B.H., Yaylayan, V. & Kilcawley, K.N. (2010b). Proteolysis development in enzyme-modified Cheddar cheese using natural and recombinant enzymes of *Lactobacillus rhamnosus* S93. *Food Chemistry*, 120, 174-178.
- Balny, C. & Masson, P. (1993). Effects of High-Pressure on Proteins. *Food Reviews International*, 9(4), 611-628.
- Barbosa-Canovas, G.V., Pothakamury, U.R., Palou, E. & Swanson, B.G. (1997). Nonthermal preservation of foods. *Marcel Dekker*, New York.

- Bartels, H.J., Johnson, M.E. & Olson, N.F. (1987). Accelerated ripening of Gouda cheese. 2. Effect of Freeze shocked *Lactobacillus helveticus* on proteolysis and flavour development. *Milchwissenschaft*, 42, 139-144.
- Bergere, J.L. & Lenoir, J. (1997). The Accidents in Cheese Factory and the Defects of Cheese. In: The Cheese, Eck, A. & J.C. Gillis (Eds.). 3rd Edn. Technical Document Publisher, Paris, France, 509-541.
- Bolotin A., Wincker P., Mauger S., Jaillon O., Malarme K., Weissenbach J., Ehrlich S. D. & Sorokin A. (2001). The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis ssp. lactis* IL1403. *Genome Research*, 11, 731–753.
- Borda, D., Indrawati, C., Smout, A. Van Loey & Hendrickx, M. (2004). High pressure thermal inactivation of a plasmin system. *Journal of Dairy Science*, 87, 2351–2358.
- Calzada, J., Olmo, A., Picon, A. Gaya, P. & Nuñez, M. (2015). Effect of high-pressure processing on the microbiology, proteolysis, biogenic amines and flavour of cheese made from unpasteurized milk. *Food and Bioprocess Technology*, 8(2), 319-332.
- Capellas, M., Mor-Mur, M., Sendra, E. & Guamis, B. (2001). Effect of high-pressure processing on physico-chemical characteristics of fresh goat's milk cheese (Mato). *International Dairy Journal*. 11(3), 165–73.
- Casal V. & Goamez R. (1999). Effect of high pressure on the viability and enzymatic activity of mesophilic lactic acid bacteria isolated from caprine cheese. *Journal of Dairy Science*, 82, 1092-1098.
- Castaneda, R., Vassal, L., Gripon, J. & Rousseau, M. (1990). Accelerated ripening of a Saint-Paulin cheese variant by addition of a heat-shocked *Lactobacillus* suspension. *Netherlands Milk Dairy Journal*, 44,49-62.
- Ceruti, R.J., Zorrilla, S.E. & Sihufe, G.A. (2012). The influence of elevated initial ripening temperature on the proteolysis in Reggianito cheese. *Food Research International*, 48, 34–40.
- Cheftel J.C. (1992). Effect of high hydrostatic pressure on food constituents: an overview. In: Balny, C., Hayashi, R., Heremans, K., & Masson, P., High pressure and biotechnology (Vol. 224) (pp. 195- 209). London, UK: Coloque INSERM/John Libbey Eurotext, 1992.
- Cheftel, J.C. (1991). Applications des hautes pressions en technologie alimentaire. *Industries Agro-Alimentaires*, 141-153.
- Chicon, R., Lopez-Fandino, R., Alonso, E. & Belloque, J. (2008). Proteolytic pattern, antigenicity, and serum immunoglobulin E binding of β -lactoglobulin hydrolysates obtained by pepsin and high pressure treatments. *Journal of Dairy Science*, 91, 928–938.
- Costabel, L., Bergamini, C., Vaudagna, S., Cuatrin, A., Audero, G. & Hynes, E. (2016). Effect of high-pressure treatment on hard cheese proteolysis. *Journal of Dairy Science*, 99 (6), 4220-4232.
- Czulak J. (1959). Bitter flavor in cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 14, 177-179.
- De Lamo-Castellví, S., Capellas, M., Roig-Sagués, A.X., López-Pedemonte, T., Hernández-Herrero, M.M. & Guamis, B. (2006). Fate of *Escherichia coli* strains inoculated in model cheese elaborated with or without starter and treated by high hydrostatic pressure. *Journal of Food Protection*, 69, 2856–2864.
- De Lamo-Castellví, S., Roig-Sagués, A.X., López-Pedemonte, T., Hernández-Herrero, M.M., Guamis, B. & Capellas, M. (2007). Response of two *Salmonella enterica* strains inoculated in model cheese treated with high hydrostatic pressure. *Journal of Dairy Science*, 90, 99–109.

- Delgado, F.J., González-Crespo, J., Cava, R. & Ramírez, R. (2011). Changes in the volatile profile of a raw goat milk cheese treated by hydrostatic high pressure at different stages of maturation. *International Dairy Journal*, **21**, 135–41.
- Drake, M.A., Boylston, T.D., Spence, K.D. & Swanson, B.G. (1997). Improvement of sensory quality of reduced fat Cheddar cheese with a *Lactobacillus* adjunct. *Food Research International*, **30**, 35–40.
- El-Abboudi, M., El-Soda, M., Pandian, S., Barreau, M., Trepaniei, G. & Simard, R. (1991). Peptidase activities in debittering and nondebittering strains of lactobacilli. *International Dairy Journal*, **1**, 55-64.
- El-Shafei, H., Hantira, A., Ezzat, N. & El-Soda, M. (1992). Characteristics of Ras cheese made with freeze-shocked *Pediococcus halophilus*. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, **25**, 38-441.
- El-Shafie, H. (1994). Manufacture of Ras cheese with cell free extract of freeze and heat shocked starters of *Bifidobacterium* spp. *Indian Journal of Dairy Science*, **47**(9), 774-779.
- El-Soda, M. & Awad, S. (2011). Accelerated cheese ripening. In: Fuquay J.W., Fox P.F., McSweeney P.H.L., editors. Encyclopedia of dairy sciences. Vol. 1. Oxford: Elsevier Science, 795–98.
- El-Soda, M., Chen, C., Reisterer, B. & Olson, N. (1991). Acceleration of low-fat cheese ripening using lyophilized extracts or freeze shocked cells of some cheese related microorganism. *Milchwissenschaft*, **46**, 358-360.
- El-Soda, M., Madkor, S.A. & Tong, P. S. (1999). Evaluation of commercial adjuncts for use in cheese ripening: 3. Properties of heat-shocked adjuncts in buffer and cheese slurry systems. *Milchwissenschaft*, **54**(5), 262-265.
- El-Soda, M., Madkor, S.A. & Tong, P. S. (2000). Evaluation of commercial adjuncts for use in cheese ripening: 4. Comparison between attenuated and not attenuated lactobacilli. *Milchwissenschaft*, **55**(5), 260-263.
- El-Tanboly, Mahmoud El-Hofi, Youssef, Y.B. El-Desoki, W. & Jalil, R.A. (2010). Influence of freeze-shocked mesophilic lactic starter bacteria and adjunct lactobacilli on the rate of ripening Gouda cheese and flavor development. *Journal of American Science*, **6**(11), 465-471.
- Emmons D.B., McGugan W.A., Elliott J.A. & Morse P.M. (1962). Effect of strain of starter culture and of manufacturing procedure on bitterness and protein breakdown in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, **45**, 332-342.
- Exterkate, F., de Veer, G. & Stahouders, J. (1987). Acceleration of the ripening process of Gouda cheese by using heat-treated mixed-strain starter strains. *Netherlands Milk Dairy Journal*, **41**, 307-320.
- Ezzat, N. & El-Shafei, H. (1991). Accelerated ripening of Ras cheese using freeze and heat-shocked *Lactobacillus helveticus*. *Egyptian Journal of Dairy Science*, **19**(2), 347-358.
- Fajarrini, F. (1999). The influence of aminopeptidases from adjunct *Lactobacillus helveticus* on bitterness in Cheddar cheese. M.S. thesis, Washington State University, USA.
- Fallico, V., McSweeney, P.L.H., Siebert, K.J., Horne, J., Carpino, S. & Licitra, G. (2004). Chemometric analysis of proteolysis during ripening of Ragusano cheese. *Journal of Dairy Science*, **87**, 3138–3152.
- Farid M., (2007). Inactivate enzymes using thermal-assisted high-pressure processing, *Food & Beverage Industry, Emerging Food R&D Report*, March 2007.
- Farkas, D.F. (2011). High pressure processing pathways to commercialization. In: Zhang HQ, Barbosa-Cánovas, G.V., Balasubramanian, V.M., Dunne, C.P., Farkas, D.F., Yuan, J.T.C., editors. *Nonthermal processing technologies for food*. Oxford: Wiley-Blackwell, 28–35.

- Felipe, X., Capellas, M. & Law, A.R. (1997). Comparison of the effects of high-pressure treatments and heat pasteurization on the whey proteins in goat's milk. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 45, 627–631.
- Folkertsma, B. & Fox P.F. (1992). Use of the Cd-ninhydrin reagent to assess proteolysis in cheese during ripening. *Journal of Dairy Research*, 59(2), 217–224.
- Fox P.F. (1999). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. ASPEN publication, Second Edition, Vol. 1 *General Aspects*, 1999.
- Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. & Lynch, C.M. (1998). Significance of non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 53, 83–89.
- Furtado, M., Chandan, R. & Wishnetsky, T. (1984). Characterization of cheese curd ripened with *Penicillium caseicolum* for producing a flavor concentrate. *Journal of Dairy Science*, 67, 2850-2855.
- Garde, S., Arqués, J.L., Gaya, P., Medina, M. & Nuñez, M. (2007). Effect of high-pressure treatments on proteolysis and texture of ewes' raw milk La Serena cheese. *International Dairy Journal*, 17, 1424–33.
- Gross, M. & Jaenicke R., (1994). Proteins under pressure: The influence of high hydrostatic pressure on structure, function and assembly of proteins and protein complexes. *European Journal of Biochemistry*, 221, 617-630.
- Guinee, T., Wilkinson, M., Mulholland, E. & Fox, P. (1991). The influence of ripening temperature, added commercial enzyme preparations and attenuated mutant (Lactose negative) *Lactococcus lactis* starter bacteria on the proteolysis and maturation of Cheddar cheese. *Journal of Food Science and Technology*, 15, 27-52.
- Gürsoy, A. (2009). Effect of using attenuated lactic starter cultures on lipolysis and proteolysis in low fat Kasar cheese. *Journal of Agricultural Sciences*, 15 (3), 285-292.
- Hannon, J.A., Wilkinson, M.G., Delahunty, C.M., Wallace, J.M., Morrissey, P.A & Beresford, T.P. (2005). Application of descriptive sensory analysis and key chemical indices to assess the impact of elevated ripening temperature on the acceleration of cheddar cheese ripening. *International Dairy Journal*, 15, 263-273.
- Harte, F.M., Gurram, S.R., Luedecke, L., Swanson, B.G. & Barbosa-Canovas, G.V. (2007). Effect of high hydrostatic pressure and whey proteins on the disruption of casein micelle isolates. *Journal of Dairy Research*, 74, 452–458.
- Hayashi, R., Kawamura, Y., Nakasa, T. & Okinaka, O., (1989). Application of high pressure to food processing: pressurization of egg white and yolk, and properties of gels formed. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53(11), 2935-2940.
- Hayes, M.G., Fox, P.F. & Kelly, A.L. (2005). Potential applications of high pressure homogenisation in processing of liquid milk. *Journal of Dairy Research*, 72(1), 25-33.
- Hayes, M.G., Hurley, M.J., Magboul, A.A.A., Larsen, L.B., Heegaard, C.W., Oliveira, J.C., McSweeney, P.L.H. & Kelly, A.L. (2001). Thermal inactivation kinetics of bovine cathepsin D. *Journal of Dairy Research*, 68, 267–276.
- Hendrickx, M., Ludikhuyze, L., Van den Broeck, I. & Weemaes, C. (1998). Effects of high pressure on enzymes related to food quality. *Trends in Food Science and Technology*, 9, 197-203.
- Hendrickx, M. & Knorr, D. (2001). Ultra-high pressure treatments of foods. *Plenum Publishers*, p. 87–106.

- Heremans, K. (1982). High pressure effects on proteins and other biomolecules. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, 11, 1-21.
- Heremans, K. (1993). The behaviour of proteins under pressure, in high pressure chemistry, biochemistry and material science (Winter, R. & Jonas, J., eds), *Kluwer Academic Publishers*, 443–469.
- Hiperbaric. (2011). High pressure processing: dairy products. Internet Available from: <http://www.hiperbaric.com/DINAMICAS/AP/desc/dairy-high-pressure-pasteurization.pdf>, Accessed Feb, 2012.
- Hofi, A., Mahran, G., Abdel-Salam, M. & Rifaat, I. (1973a). Acceleration of cephalotyre (Ras) cheese ripening by using trace elements. II-Optimum conditions. *Egyptian Journal of Dairy Science*, 1, 45-55.
- Hofi, A., Mahran, G., Ashour, M., Khorshid, A. & Farahat, S. (1973b). The use of casein and whey protein hydrolysates in Ras cheese making. *Egyptian Journal of Dairy Science*, 1, 79-83.
- Huppertz T., Kelly, A.L. & Fox, P.F. (2002). Effects of high pressure on constituents and properties of milk. *International Dairy Journal*, 12, 561-72.
- Huppertz, T., Kelly, A.L. & Fox, P.F. (2006). High pressure induced changes in ovine milk: effects on casein micelles and whey proteins. *Milchwissenschaft*, 61, 394–397.
- Huppertz, T., Fox, P.F. & Kelly, A.L. (2004). Susceptibility of plasmin and chymosin in Cheddar cheese to inactivation by high pressure. *Journal of Dairy Research*, 71, 496–99.
- Iwańczak, M. & Wiśniewska, K. (2005). Effect of high pressures on the process of Edam cheese proteolysis. *High Pressure Research*, 25, 43-50.
- Jaenicke, R. (1981). Enzymes under extreme conditions. *Annual Reviews of Biophysics and Bioengineering*, 10, 1-6.
- Johnson, J.A.C., Etzel, M.R., Chen, C.M., & Johnson, M.E. (1995). Accelerated ripening of reduced-fat Cheddar cheese using four attenuated *Lactobacillus helveticus* CNRZ-32 adjuncts. *Journal of Dairy Science*, 78, 769–776.
- Johnston, D.E., & Darcy, P.C. (2000). The effects of high pressure treatment on immature Mozzarella cheese. *Milchwissenschaft*, 55, 617–620.
- Johnston, D.E., Austin, B.A. & Murphy, R.J. (1992). Effects of high hydrostatic pressure on milk. *Milchwissenschaft*, 47, 760–763.
- Juan, B., Ferragut, V., Guamis, B., Buffa, M. & Trujillo, A.J. (2004). Proteolysis of a high pressure-treated ewe's milk cheese. *Milchwissenschaft*, 59, 616-619.
- Juan, B., Trujillo, A.J., Guamis, V., Buffa, M. & Ferragut, V. (2007d). Rheological, textural and sensory characteristics of high-pressure treated semi-hard ewes' milk cheese. *International Dairy Journal*, 17, 248-254.
- Juan, B., Barron, L.J.R., Ferragut, V. & Trujillo, A.J. (2007a). Effects of high pressure treatment on volatile profile during ripening of ewe. *Journal of Dairy Science*, 90, 124–35.
- Juan, B., Barron, L.J.R., Ferragut, V. & Trujillo, A.J. (2007b). Effects of high pressure on proteolytic enzymes in cheese: relationship with the proteolysis of ewe milk cheeses. *Journal of Dairy Science*, 90, 2113–25.
- Juan, B., Ferragut, V., Buffa, M., Guamis, B. & Trujillo, A.J. (2007c). Effects of high-pressure treatment on free fatty acids release during ripening of ewes' milk cheese. *Journal of Dairy Research*, 74, 438–45.

- Juan, B., Ferragut, V., Guamis, B. & Trujillo, A.J. (2008). The effect of high-pressure treatment at 300 MPa on ripening of ewes' milk cheese. *International Dairy Journal*, 18, 129–38.
- Jung, S., Lamballerie-Anton, M.D. & Ghoul, M. (2000). Modifications of ultrastructure and myofibrillar proteins of post-rigor beef treated by high pressure. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 33, 313-319.
- Kailasapathy, K., Lam, S.H. & Hourigan, J.A. (1998). Studies on encapsulating enzymes to accelerate cheese ripening. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 53, 125.
- Katsaros, G., Giannoglou, M. & Taoukis P. (2009b). Kinetic study of the effect of high hydrostatic pressure on the activity of *L. bulgaricus* aminopeptidases. *Journal of Food Science*, 74 (5), 219-225.
- Khalid, N., El-Soda, M. & Marth, E. (1991). Peptide hydrolases of *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. *Journal of Dairy Science*, 74, 29-4.
- Khalid, N.M., El-Soda, M. & Marth, E.H. (1990). Esterase of *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus*. *Journal of Dairy Science*, 73, 2711-2719.
- Kheadr, E.E., Vuillemand, J. & El-Deeb, S.A. (2000). Accelerated Cheddar cheese ripening with encapsulated proteinases. *International Journal of Food science and Technology*, 35(5), 483–495.
- Kim, M.S., Kim, S.C. & Olson, N.F. (1994b). Effect of commercial fungal proteases and freeze-shocked *Lactobacillus helveticus* CDR 101 on accelerating cheese fermentation. 2. Proteolysis. *Milchwissenschaft*, 49, 442.
- Koca, N., Balasubramanian V.M. & Harper, J.W. (2011). High-pressure effects on the microstructure, texture, and color of white-brined cheese. *Journal Food Science*, 76, 399-404.
- Kolakowski, P., Reys, A. & Babuchowski, A. (1998). Characteristics of pressurised ripened cheeses. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 7(3), 473-482.
- Kunugi S., (1992). Enzyme reactions under high pressure and their applications, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 672, 293–304.
- Lanciotti, R., Vannini, L., Patrignani, F., Lucci, L., Vallicelli, M., Ndagijimana, M. & Guerzoni, M.E. (2006). Effect of high pressure homogenization of milk on cheese yield and microbiology, lipolysis and proteolysis during ripening of Caciotta cheese. *Journal of Dairy Research*, 73, 216–226.
- Law, A.J.R., Leaver, J., Felipe, X., Ferragut, V., Pla, R. & Guamis, B. (1998). Comparison of the effects of high pressure and thermal treatments on the casein micelles in goat's milk. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 46, 2523–2530.
- Lee, B.H. & Robert, N. (1997). Overproduction of *Lactobacillus rhamnosus* aminopeptidase in *E. coli*. *US Patent/AAFC Invention No. 60/025*, 172.
- Lee, K.D., Lo, C.G. & Warthesen, J.J. (1996). Removal of bitterness from the bitter peptides extracted from Cheddar cheese with peptidase from *Lactococcus lactis ssp. cremoris* SK11. *Journal of Dairy Science*, 79, 1521-1528.
- Lee, W., Clark, S. & Swanson, B.G. (2006). Functional properties of high hydrostatic pressure-treated whey protein. *Journal of Food Processing & Preservation*, 30, 488–501.
- Lee, W., Clark, S. & Swanson, B.G. (2006). Low-fat process cheese food containing ultrahigh pressure-treated whey protein. *Journal of Food Processing & Preservation*, 30, 164–179.

- Leite Junior, B.R.C., Tribst, A.A.L. & Cristianini, M. (2014). Proteolytic and milk-clotting activities of calf rennet processed by high pressure homogenization and the influence on the rheological behavior of the milk coagulation process. *Innovative Food Science and Emerging Technology*, 21, 44–49.
- Leite Junior, B.R.C., Tribst, A.A.L., Bonafe, C.F.S. & Cristianini, M. (2016). Determination of influence of high pressure processing on calf rennet using response surface methodology: Effects on milk coagulation. *LWT – Food Science and Technology*, 65, 10-17.
- Lopez Fandino, R., Carrascosa, A.V. & Olano, A. (1996). The effects of high pressure on whey protein denaturation and cheese-making properties of raw milk. *Journal of Dairy Science*, 79(6), 929-1126.
- Madkor, S.A., El-Soda, M. & Tong, P.S. (1999). Evaluation of commercial adjuncts for use in cheese ripening: 2. Ripening aspects and flavor development in cheese curd slurries prepared with adjunct lactobacilli. *Milchwissenschaft*, 54(3), 133-137.
- Madkor, S.A., Tong, P.S. & El-Soda, M. (2000). Ripening of Cheddar cheese with added attenuated adjunct cultures of lactobacilli. *Journal of Dairy Science*, 83, 1684-1691.
- Magee, E.L. & Olsen, N.F. (1981). Microencapsulation of cheese ripening systems: Formation of microcapsules. *Journal of Dairy Science*, 64, 600–610.
- Malone, A.S., Wick, C., Shellhammer T.H. & Courtney, P.D. (2003). High Pressure Effects on Proteolytic and Glycolytic Enzymes involved in Cheese Manufacturing. *Journal of Dairy Science*, 86(4), 1139-46.
- Malone, A.S., Shellhammer, T.H. & Courtney, P.D. (2002). Effects of high pressure on the viability, morphology, lysis and cell wall activity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Applied Environmental Microbiology*, 68, 4357–63.
- Maniou, D., Tsala, A., Moschopoulou, E., Giannoglou, M., & Taoukis, P. (2013). Effect of high-pressure-treated starter on ripening of Feta cheese. *Dairy Science. & Technology*, 93, 11–20.
- Masson, P., (1992). Pressure denaturation of proteins, In: Balny, C., Hayashi, R., Heremans, K., Masson, P. (Eds.), *High Pressure and Biotechnology*, Colloque Inserm/John Libbey Eurotex Ltd, Montrouge, 89-98.
- Mcgarra, A., Law, J., Coffey, A., Daly, C., Fox, P.F. & Fitzgerald, G.F. (1995). Effect of genetically modifying the lactococcal proteolytic system on ripening and flavour development in Cheddar cheese. *Applied Environmental Microbiology*, 60, 4226–4233.
- McSweeney, P.H.L. & Sousa, M.J. (2000). Biochemical pathways for the production of flavor compounds in cheeses during ripening: a review. *Lait*, 80, 293–324.
- Messens, W., Arevalo, J., Dewettinck, K. & Huyghebaert, A. (1999). Proteolysis and viscoelastic properties of high pressure treated Gouda cheese. In: Ludwig H (ed) *Advances in high pressure bioscience and biotechnology*. Proc. Int. Conf. High pressure bioscience and biotechnology, Heidelberg, Springer-Verlag, Berlin, 445–448.
- Messens, W., Foubert, I., Dewettinck, K. & Huyghebaert, A. (2000). Proteolysis of a high-pressure-treated smear-ripened cheese. *Milchwissenschaft*. 55(6), 328-332.
- Messens, W., Dewettinck, K., Van Camp, J. & Huyghebaert, A. (1998). High pressure brining of Gouda cheese and its effect on the cheese serum. *Food Science Technology*, 31, 552–58.
- Messens, W., Foubert, I., Dewettinck, K. & Huyghebaert, A. (2001). Proteolysis of high-pressure-treated mould-ripened cheese. *Milchwissenschaft*, 56, 201–204.
- Miyakawa, H., Anjitsu, K., Ishibashi, N. & Shimamura, S. (1994). Effects of pressure on enzyme activities of *Lactobacillus helveticus* LHE-511, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 58, 606–607.

- Moatsou, G., Bakopanos, C., Katharios, D., Katsaros, G., Kandarakis, I., Taoukis, P. & Politis, I., (2008a). Effect of high-pressure treatment at various temperatures on indigenous proteolytic enzymes and whey protein denaturation in bovine milk. *Journal of Dairy Research*, 75, 262-269.
- Moatsou, G., Katsaros, G., Bakopanos, C., Kandarakis, I., Taoukis, P. & Politis, I., (2008b). Effect of high-pressure treatment at various temperatures on activity of indigenous proteolytic enzymes and denaturation of whey proteins in ovine milk, *International Dairy Journal*, 18, 1119-1125.
- Montel, M.C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D., Desmases, N. & Berthier, F. (2014). Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. *International Journal of Food Microbiology*, 177, 136-154.
- Moschopoulou, E., Anisa, T., Katsaros, G., Taoukis, P. & Moatsou, G. (2010). Application of high-pressure treatment on ovine brined cheese: effect on composition and microflora throughout ripening. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 543-50.
- Motoshima, H., Shiraishi, T., Tsukasaki, F. & Kaminogawa, S. (2003). Purification, characterization, and gene cloning of Lysyl Aminopeptidase from *Streptococcus thermophilus* YRC001. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 67, 772-782.
- Mozhaev, V.V., Heremans, K., Frank, J., Masson, P. & Balny, C., (1994). Exploiting the effects of high hydrostatic pressure in biotechnological applications. *Trends in Biotechnology*, 12, 493-501.
- Mozhaev, V.V., Lange, R., Kudryashova, E.V. & Balny, C. (1996). Application of high hydrostatic pressure for increasing activity and stability of enzymes. *Biotechnology and Bioengineering*, 52, 320-331.
- Nassib, T. (1974). Acceleration of Ras cheese ripening by autolyzed starter. *Assiut J. Agrie Sei.*, 5, 123-129.
- Needs, E.C., Anderson, M. & Morant, S.V. (1986). Interaction of factors which influence the extent of lipolysis during milking and storage of raw milk. *Journal of Dairy Research*, 53, 203-210.
- Needs, E.C., Stenning, R.A., Gill, A.L., Ferragut, V. & Rich, G.T. (2000). High-pressure treatment of milk: Effects on casein micelle structure and on enzymic coagulation. *Journal of Dairy Research*, 67, 31-42.
- Nielsen, S.S. (2002). Plasmin system and microbial proteases in milk: characteristics, roles, and relationship. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50, 6628-34.
- Noomen, A. (1983). Proteolysis in cheese: sources and consequences. *Netherlands Milk Dairy Journal*, 37, 96-97.
- O'Reilly, C.E., Kelly, A.L., Oliviera, J.C., Murphy, P.M., Auty, M.A.E. & Beresford, T.P. (2003). Effect of varying high-pressure treatment conditions on acceleration of ripening of Cheddar cheese. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 4, 277-284.
- O'Reilly, C.E., Murphy, P.M., Kelly, A.L., Guinee, T.P., Auty, M.A.E. & Beresford, T.P. (2002b). The effect of high pressure treatment on the functional and rheological properties of mozzarella cheese. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 3, 3-9.
- O'Reilly, C.E., O'Connor, P.M., Murphy, P.M., Kelly, A.L. & Beresford, T.P. (2000). The effect of exposure to pressure of 50 MPa on Cheddar cheese ripening. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 1, 109-17.

- O'Reilly, C.E., O'Connor, P.M., Murphy, P.M., Kelly, A.L. & Beresford, T.P. (2002a). Effects of high-pressure treatment on viability and autolysis of starter bacteria and proteolysis in Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 12, 915–922.
- Pelissier, J.P. & Manchon, P. (1976). Comparative study of the bitter taste of enzymic hydrolysates from cow, ewe and goat caseins. *Journal of Food Science*, 41, 231.
- Petterson, H. & Sjostrom, G. (1975). Accelerated cheese ripening: A method for increasing the number of lactic starter without detrimental effect to the cheesemaking process and its effect on cheese ripening. *Journal of Dairy Research*, 42, 313-326.
- Picon, A., Gaya, P., Medina, M. & Nunez, M. (1997). Proteinases encapsulated in stimulated release liposomes for cheese ripening. *Biotechnology Letters*, 19(4), 345–348.
- Politis, I., Gorewit, R.C. & Barbano, D.M. (1992). Distribution of plasminogen and plasmin in fractions of bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 75, 1402-1410.
- Politis, I., Lachance, E., Block, E. & Turner, J.D. (1989). Plasmin and plasminogen in bovine milk: a relationship with involution. *Journal of Dairy Science*, 72, 900-906.
- Prat-Gay, G., Paladini, A, Stein, M. & Wolosiuk, R. (1991). The effect of high hydrostatic pressure on the modulation of regulatory enzymes from spinach chloroplasts. *The journal of Biological Chemistry*, 266(31), 20913-20921.
- Purroy, F. (2009). Industrial applications & economics of pressurized foods. Internet (Burgos, SP: NC Hiperbaric. Available from: <http://www.confindustria.ud.it/InfoCMS/RepositPubbl/table17/120/Allegati/Industrial%20applications.pdf>. Accessed Aug, 2011.
- Rademacher, B., Pfeiffer, B., Brinker, C., Lechner, E. & Kessler, H.G. (1999). Kinetics of the deactivation of milk enzymes by ultrahigh pressure. *Chemie Ingenieur Technik*, 71, 392–396.
- Rademacher, B., Pfeiffer, B., Kessler, H. (1998). Inactivation of microorganisms and enzymes in pressure-treated raw milk. In: Isaacs, N.S., Editor, 1998. High pressure food science, bioscience and chemistry, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 145–151.
- Rastogi, N.K., Raghavarao, K.S.M.S., Balasubramaniam, V.M., Niranjana, K. & Knorr, D. (2007). Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Critical Reviews in Food Science*, 47, 69–112.
- Rouseft, R.L. (1990). Bitterness in Foods and Beverages. *Developments in Food Science* 25. Elsevier Sci Publ, Amsterdam, 1990.
- Rynne, N.M., Beresford, T.P., Guinee, T.P., Sheehan, E., Delahunty, C.M. & Kelly A.L. (2008). Effect of high-pressure treatment of 1 day-old full-fat Cheddar cheese on subsequent quality and ripening. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 429-40.
- Saldo, J., Fernández, A., Sendra, E., Butz, P., Tauscher, B. & Guamis, B. (2003). High pressure treatment decelerates the lipolysis in a caprine cheese. *Food Research International*, 36, 1061-1068.
- Saldo, J., McSweeney, P.H.L., Sendra, E., Kelly, A.L. & Guamis, B. (2002a). Proteolysis in caprine milk cheese treated by high pressure to accelerate cheese ripening. *International Dairy Journal*, 12, 35-44.
- Saldo, J., Sendra, E. & Guamis, B. (2000). High hydrostatic pressure for accelerating ripening of goats' milk cheese: proteolysis and texture. *Journal of Food Science*, 65, 636–40.
- Saldo, J., Sendra, E. & Guamis, B. (2001). Hard cheese structure after a high hydrostatic pressure treatment at 50 MPa for 72 h applied to cheese after brining. *Lait*, 81, 625-635.

- Saldo, J., Sendra, E. & Guamis, B. (2002b). Changes in water binding in high-pressure-treated cheese, measured by TGA (thermogravimetical analysis). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 3, 203–207.
- Saldo, J., Sendra, E. & Guamis, B. (2002c). Colour changes during ripening high-pressure-treated hard caprine cheese. *High Pressure Research*, 22, 659–663.
- San Martín-González, M.F., Welty-Chanes, J. & Barbosa-Cánovas, G.V. (2006). Cheese manufacture assisted by high pressure. *Food Reviews International*, 22, 275-289.
- Sandra, S., Standford, M.A. & Meunier Goddik, L. (2004). The use of high-pressure processing in the production of queso fresco cheese. *Journal of Food Science*, 69, 153–158.
- Scollard, P.G., Beresford, T.P., Needs, E.C., Murphy, P.M. & Kelly, A.L. (2000). Plasmin activity, β -lactoglobulin denaturation and proteolysis in high pressure treated milk. *International Dairy Journal*, 10(12), 809-884.
- Serrano, J., Velazquez, G., Lopetcharat, K., Ramírez, J.A. & Torres, J.A. (2004). Effect of moderate pressure treatments on microstructure, texture, and sensory properties of stirred-curd Cheddar shreds. *Journal of Dairy Science*, 87, 3172–3182.
- Serrano, J., Velazquez, G., Lopetcharat, K., Ramírez, J.A. & Torres, J.A. (2005). Moderately high hydrostatic pressure processing to reduce production costs of shredded cheese: microstructure, texture and sensory properties of shredded milled curd Cheddar. *Journal of Food Science*, 70, 286-293.
- Seyderhelm, I., Boguslawski, S., Michaelis, G. & Knorr, D. (1996). Pressure induced inactivation of selected food enzymes. *Journal of Food Science*, 61(2), 308-310.
- Sheehan, J.J., Huppertz, T., Hayes, M.G., Kelly, A.L., Beresford, T.P. & Guinee, T.P. (2005). High pressure treatment of reduced-fat mozzarella cheese: effects on functional and rheological properties. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6, 73-81.
- Sihufe, G.A., Zorrilla, S.E., Mercanti, D.J., Perotti, M.C., Zalazar, C.A. & Rubiolo, A.C. (2007). The influence of ripening temperature and sampling site on the lipolysis in Reggianito Argentino cheese. *Food Research International*, 40, 1220–1226.
- Sivanandan, L., Toledo, R.T. & Singh, R.K. (2008). Effect of continuous flow high-pressure throttling on rheological and ultrastructural properties of soymilk. *Journal of Food Science*, 73(6), 288-296.
- Soeryapranata, E., Powers, J.R. & Ünlü, G. (2007). Cloning and characterization of debittering peptidases, PepE, PepO, PepO2, PepO3, and PepN, of *Lactobacillus helveticus* WSU19. *International Dairy Journal*, 17, 1096–1106.
- Somers, J.M., O'Brien, B., Meanev, W.J. & Kelly, A.L., (2003). Heterogeneity of proteolytic enzyme activities in milk samples of different somatic cell count. *Journal of Dairy Research*, 70(1), 45-50.
- Sousa, M.J., Ardo, Y. & McSweeney P.L.H., (2001). Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 11, 327-345.
- Stadhouders, J., (1961). The hydrolysis of protein during the ripening of cheese. Some methods to accelerate the ripening. *Netherlands Milk Dairy Journal*, 15(2), 151-64.
- Stewart, D.I., Kelly, A.L., Guinee, T.P. & Beresford, T.P. (2006). High pressure processing: review of application to cheese manufacture and ripening. *Australian Journal of Dairy Technology*, 61, 170–178.
- To, B.C.S. & Etzel, M.R. (1997). Survival of *Brevibacterium linens* (ATCC 9174) after spraydrying, freeze drying, or freezing. *Journal of Food Science*, 62, 167–170.

- Tonello, C. (2011). Case studies on high pressure processing of foods. In: Zhang HQ, Barbosa-Cánovas GV, Balasubramanian VM, Dunne CP, Farkas DF, Yuan JTC, editors. *Nonthermal processing technologies for food*. Oxford: Wiley-Blackwell, 36–50.
- Trujillo, A.J., Guamis B. & Carretero C. (1997). Proteolysis of goat casein by calf rennet. *International Dairy Journal*, 7 (8-9), 579-588.
- Trujillo, A.J., Royo, C., Ferragut, V. & Guamis B., (1999b). Ripening profiles of goat cheese produced from milk treated with high pressure. *Journal of Food Science*, 64, 833-837.
- Trujillo, A.J., Royo, C., Ferragut, V. & Guamis, B. (1999a). Influence of pressurization on goat milk and cheese composition and yield. In: Ludwig H (eds) *Advances in high pressure bioscience and biotechnology*. Proc Int Conf high pressure Bioscience and Biotechnology, Heidelberg, Aug 30–Sept 3, 1998. Springer–Verlag, Berlin, 457–460.
- Trujillo, A.J., Guamis, B. & Carretero, C. (2000). A procedure for the manufacture of goat milk cheese with controlled-microflora by means of high hydrostatic pressure. *Food Chemistry*, 69, 73-79.
- Tsou, C.L. (1986). Location of the active sites of some enzymes in limited and flexible molecular regions. *Trends in Biochemistry Science*, 11, 427-429.
- Upadhyay, V.K. & McSweeney, P.L.H. (2003). Acceleration of cheese ripening. In: *Dairy Products: maximizing Quality*, Smit, G. (ed.), Woodhead Publishers, Cambridge, 419–447.
- Upadhyay, V.K., Huppert, T., Kelly, A.L. & McSweeney, P.L.H. (2007). Use of high pressure treatment to attenuate starter bacteria for use as adjuncts for Cheddar cheese manufacture. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8, 485-492.
- Upadhyay, V.K., McSweeney, P.H.L., Magboul, A.A. & Fox, P.F. (2004). Proteolysis in cheese during ripening. In: Fox PF, McSweeney PHL, Cogan TM, Guinee TR, editors. *Cheese: chemistry, physics & microbiology*. 3rd ed. Oxford: Elsevier Science, 391–434.
- Vafopoulou, A., Alichandis, E. & Zerfiridis, G. (1989). Accelerated ripening of Feta cheese with heatshocked cultures or microbial proteinase. *Journal of Dairy Research*, 56, 285-296.
- Van den Broeck, I., Ludikhuyze, L.R., Weemaes, C.A., Van Loye, A.M. & Hendrickx M.E., (2000). Effect of temperature and pressure on tomato pectinesterase activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (2), 551-558.
- Voigt, D.D., Chevalier, F., Qian, M.C. & Kelly, A.L. (2010). Effect of high-pressure treatment on microbiology, proteolysis, lipolysis and levels of flavour compounds in mature blue-veined cheese. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 68–77.
- Wachowska, M. (2010). The effect of freezing and pressure of 50 MPa and 100 MPa on the proteolytic activity of enzymes in Edam cheese. *Polish Journal of Natural Sciences*, 25, 427-437.
- Wick, C., Nienaber, U., Anggraeni, O., Shellhammer, T. H. & Courtney, P. D. (2004). Texture, proteolysis and viable lactic acid bacteria in commercial Cheddar cheeses treated with high pressure. *Journal of Dairy Research*, 71, 107-115.
- Yokoyama, H., Sawamura, N. & Motobayashi, N. (1992). Method for accelerating cheese ripening. *European Patent EP 4 698570*.
- Zamora, A., Ferragut, V., Jaramillo, P.D., Guamis, B. & Trujillo, A.J. (2007). Effects of ultra- high pressure homogenization on the cheese making properties of milk. *Journal of Dairy Science*, 90, 13-23.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι τρόφιμα υψηλής διατροφικής αξίας, ενώ τα επιθυμητά από τον καταναλωτή οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους, τους προσδίδουν υψηλή εμπορική αξία. Συνεχώς είναι η αναζήτηση νέων τεχνικών και μεθόδων επεξεργασίας για τη βελτιστοποίηση της παραγωγικής τους διαδικασίας, των φυσικοχημικών και οργανοληπτικών τους χαρακτηριστικών, καθώς και για την αύξηση του χρόνου ζωής τους.

Μία από τις νέες τεχνολογίες με μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον διεθνώς, είναι η Υπερυψηλή Υδροστατική Πίεση (ΥΠ). Η ΥΠ αποτελεί μη θερμική μέθοδο επεξεργασίας τροφίμων, η οποία προκαλεί απενεργοποίηση μικροοργανισμών και μεταβολή της δράσης των ενζύμων (ενεργοποίηση/απενεργοποίηση). Οι συνθήκες της διεργασίας μπορεί να κυμανθούν από 100-1000 MPa (1000-10000 atm), ενώ υπάρχει δυνατότητα συνδυασμού με ήπιες θερμοκρασίες (20-60°C). Το πλεονέκτημα της ΥΠ είναι η πολύ μικρή επίδραση στις επιθυμητές ποιοτικές παραμέτρους που αναπόφευκτα υποβαθμίζονται με τη συμβατική θερμική επεξεργασία.

Η επεξεργασία με ΥΠ έχει ως αποτέλεσμα τη μεταβολή της δραστηριότητας των ενζυμικών συστημάτων των τροφίμων. Η μοναδική όμως δυνατότητα που προσφέρει η ΥΠ σε σύγκριση με άλλες τεχνολογίες, όπως για παράδειγμα με τη συμβατική θερμική επεξεργασία ή και με άλλες νέες τεχνολογίες όπως είναι τα παλλόμενα ηλεκτρικά πεδία, είναι αυτή της ενεργοποίησης ενζύμων. Το φαινόμενο αυτό έχει παρατηρηθεί σε μελέτες διεθνώς και αποδίδεται στις μεταβολές της δευτεροταγούς και τριτοταγούς δομής τους που συντελούνται σε συγκεκριμένες πιέσεις (Heremans, 1982; Cheftel, 1992). Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου στηρίζεται στην αρχή 'Le Chatelier' σύμφωνα με την οποία κάθε φαινόμενο που βρίσκεται σε ισορροπία και συνοδεύεται από μείωση του όγκου (χημική αντίδραση, αλλαγή φάσης, μεταβολή στη διαμόρφωση του μορίου) ευνοείται από την πίεση, ενώ φαινόμενα που οδηγούν σε αύξηση του όγκου παρεμποδίζονται από την αύξηση της πίεσης.

Η τεχνολογία της ΥΠ μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην παραγωγική διαδικασία τυριών με στόχο την απενεργοποίηση μικροοργανισμών, είτε στο ίδιο το τυρί για την εξυγίανσή του, είτε στο γάλα που θα χρησιμοποιηθεί για την τυροκόμηση (Lopez-Pedemonte et al., 2007, Linton et al., 2008, O'Reilly et al., 2000). Εκτός όμως από την εφαρμογή της για την ψυχρή παστερίωση (απενεργοποίηση ενζύμων και μικροοργανισμών), μπορεί να βρει εφαρμογές και σε άλλα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας, όπως είναι η μείωση του αναγκαίου χρόνου ωρίμανσης μέσω της τροποποίησης των ενζυμικών συστημάτων που παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ωρίμανση των τυριών (O'Reilly et al., 2001; Saldo et al., 2002).

Αντικείμενο της παρούσας διατριβής ήταν η συστηματική μελέτη της εφαρμογής της ΥΠ για τον έλεγχο της δομής και της δράσης ενδοκυτταρικών ενζύμων οξυγαλακτικών καλλιεργειών εκκίνησης που χρησιμοποιούνται σε τυριά άλμης, καθώς και η μελέτη των πιθανών αποτελεσμάτων του ελέγχου της δράσης των ενζύμων αυτών στο στάδιο της ωρίμανσης του τυριού (π.χ. μείωση του χρόνου ωρίμανσης, βελτίωση οργανοληπτικών χαρακτηριστικών). Απώτερο στόχο αποτέλεσε ο καθορισμός

των βέλτιστων συνθηκών επεξεργασίας (χρόνος-πίεση-θερμοκρασία) των οξυγαλακτικών καλλιεργείων εκκίνησης που προστίθενται κατά την τυροκόμηση, έτσι ώστε να επιτευχθεί ωρίμανση σε μικρότερο χρόνο, με ταυτόχρονα πιο πλούσια οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.

Για την επίτευξη του στόχου, σε αρχικό στάδιο πραγματοποιήθηκε έρευνα σχετικά με την επίδραση της ΥΠ σε συνδυασμό με ήπιες θερμοκρασίες, στη δραστικότητα της γενικής αμινοπεπτιδάσης PepN και της αμινοπεπτιδάσης ειδικής δράσης PepX για κάθε ένα εκ των τριών οξυγαλακτικών στελεχών *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105, *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0022 και *Lactococcus lactis* ACA-DC 0049, τα οποία ανήκουν στη συλλογή μικροοργανισμών που διατηρείται στο Εργαστήριο Γαλακτοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και έχουν χρησιμοποιηθεί και ως καλλιέργειες εκκίνησης κατά την παρασκευή τυριού Φέτα (Kandarakis et al., 2001). Μετά από κινητική μελέτη των αποτελεσμάτων, αναπτύχθηκαν κατάλληλες μαθηματικές εξισώσεις, μέσω των οποίων προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες επεξεργασίας για μέγιστη ενεργοποίηση των αμινοπεπτιδασών.

Για να δοθεί απάντηση στην αιτιακή βάση της επίδρασης της ΥΠ στη δραστικότητα των ενζύμων αυτών (ενεργοποίηση/απενεργοποίηση), μετά από καθαρισμό της αμινοπεπτιδάσης PepX του μικροοργανισμού *S. thermophilus*, μελετήθηκε η δευτεροταγής και τριτοταγής δομή του ανεπεξέργαστου και επεξεργασμένου υπό διάφορους συνδυασμούς ΥΠ και θερμοκρασίας ενζύμου.

Έχοντας ως τελικό στόχο την παρασκευή και μελέτη τυριού τύπου Φέτας με προσθήκη καλλιέργειας εκκίνησης με ενεργοποιημένες με ΥΠ αμινοπεπτιδάσες, σε επόμενο βήμα πραγματοποιήθηκε διερεύνηση και κινητική μελέτη της επίδρασης της ΥΠ στο φορτίο και στην ικανότητα οξίνισης των προαναφερόμενων οξυγαλακτικών καλλιεργείων εκκίνησης. Αρχικός σκοπός ήταν ο υπολογισμός της ποσότητας καλλιέργειας που πρέπει να προστεθεί κατά την τυροκόμηση έτσι ώστε το φορτίο και η παραγωγή οξέος να μην αποτελέσουν παράγοντες μεταβολής. Επιπλέον στο στάδιο αυτό θεωρήθηκε σημαντική η μελέτη της επίδρασης της ΥΠ στο ρυθμό παραγωγής οξέος, έχοντας ως στόχο την προσθήκη κατά την τυροκόμηση (επιπρόσθετα της καλλιέργειας εκκίνησης), αδρανποιημένων καλλιεργείων, οι οποίες δε θα παράγουν γαλακτικό οξύ αλλά θα υπάρχουν στην τυρόμαζα ως φορείς σημαντικών ενζύμων.

Η έρευνα ολοκληρώθηκε με την εφαρμογή της ΥΠ ως στάδιο της τεχνολογίας παρασκευής λευκού τυριού άλμης τύπου Φέτας μικρής κλίμακας, για την επιβεβαίωση των ισχυριζόμενων πλεονεκτημάτων όσον αφορά τη χρονική διάρκεια της ωρίμανσης καθώς και τη βελτίωση των φυσικοχημικών, οργανοληπτικών και δομικών χαρακτηριστικών του προϊόντος. Τέλος, πραγματοποιήθηκε τεχνικοοικονομική προσέγγιση της εφαρμογής της ΥΠ στην παραγωγική διαδικασία του συγκεκριμένου τυριού.

Η ερευνητική μελέτη παρατίθεται σε τέσσερις θεματικές ενότητες για την ευκολότερη ανάγνωση και κατανόηση.

4.2. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΥΠ ΚΑΙ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΣΕ ΑΜΙΝΟΠΕΠΤΙΔΑΣΕΣ ΤΩΝ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105, *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0022 και *Lactococcus lactis* ACA-DC 0049.

4.2.1. Εισαγωγή - Σκοπός

Κατά την ωρίμανση των τυριών άλμης η πρωτεόλυση είναι πολύ σημαντική για τη δημιουργία των αρωματικών και γευστικών χαρακτηριστικών του τυριού και θεωρείται ότι οι αμινοπεπτιδάσες των οξύγαλακτικών βακτηρίων εκκίνησης *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* και *Lactococcus lactis* έχουν το βασικότερο ρόλο (Fallico et al. 2004).

Οι καλλιέργειες αυτές διαθέτουν ενδοκυτταρικές πεπτιδάσες οι οποίες υδρολύουν ολιγοπεπτίδια τα οποία παράγονται από τη δράση πρωτεϊνών, είτε ενδογενών του γάλακτος τυροκόμησης είτε της κυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων (CEP), προς παραγωγή ελεύθερων αμινοξέων (Kunji et al. 1996; Mierau et al. 1996; Christensen et al. 1999; Malone et al. 2003), τα οποία βελτιώνουν και αναπτύσσουν σημαντικά τα γευστικά και αρωματικά χαρακτηριστικά του προϊόντος.

Το στάδιο της ωρίμανσης των τυριών άλμης είναι αρκετά χρονοβόρο και κατά συνέπεια δαπανηρό για τους παραγωγούς, με αποτέλεσμα να αναζητούνται τρόποι επιτάχυνσής του οι οποίοι θα οδηγήσουν σε μείωση του κόστους που επιφέρει η χρονοβόρα αποθήκευση των τυριών (Saldo et al. 2001; O'Reilly et al. 2003).

Έχει παρατηρηθεί ότι η χρήση της ΥΠ μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της δραστηριότητας (ενεργοποίηση) των προαναφερόμενων πεπτιδασών, με αποτέλεσμα να θεωρείται ότι με χρήση της τεχνολογίας αυτής μπορεί να επέλθει επιτάχυνση του σταδίου ωρίμανσης των τυριών άλμης (Mierau et al. 1996; Christensen et al. 1999; Katsaros et al. 2009).

Μία από τις πιο κοινές μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την επιτάχυνση της πρωτεόλυσης είναι η χρήση υψηλών θερμοκρασιών ωρίμανσης (Aston et al. 1985; Law 1984; Fox & McSweeney, 1998; O'Reilly et al. 2003). Θεωρείται όμως ότι η μέθοδος αυτή επιδρά στη δομή και τη σταθερότητα του τελικού προϊόντος.

Σκοπός της έρευνας ήταν η διερεύνηση της επίδρασης της ΥΠ στη δραστηριότητα αμινοπεπτιδασών των οξύγαλακτικών στελεχών *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105, *S. thermophilus* ACA-DC 0022 και *L. lactis* ACA-DC 0049 που έχουν χρησιμοποιηθεί και ως καλλιέργειες εκκίνησης κατά την παρασκευή τυριού Φέτα, η εύρεση των συνθηκών ενεργοποίησης/ απενεργοποίησής τους και ο καθορισμός των βέλτιστων συνθηκών επεξεργασίας μέσω αξιολόγησης της μέγιστης δυνατής ενεργοποίησής τους, ταυτόχρονα με μειωμένο κόστος επεξεργασίας (όσο δυνατόν πιο ήπιες συνθήκες και μικρότερος χρόνος επεξεργασίας). Απώτερος στόχος ήταν η επιτάχυνση της ωρίμανσης λευκού τυριού άλμης τύπου Φέτα μετά από παρασκευή της με χρήση των συγκεκριμένων καλλιέργειες εκκίνησης επεξεργασμένων με ΥΠ στις βέλτιστες συνθήκες. Στη συγκεκριμένη φάση της ερευνητικής δραστηριότητας μελετήθηκε η μεταβολή της δραστηριότητας μίας γενικής αμινοπεπτιδάσης και μιας αμινοπεπτιδάσης ειδικής δράσης, τριών οξύγαλακτικών καλλιεργειών που προστίθενται κατά την τυροκόμηση τυριού Φέτας, μετά από εφαρμογή της μη θερμικής τεχνολογίας ΥΠ σε συνδυασμό με ήπιες θερμοκρασίες.

Τα αποτελέσματα είναι επιπρόσθετα και επιβεβαιωτικά στα αποτελέσματα που προέκυψαν από τους Katsaros et al. (2009), καθώς και της διδακτορικής διατριβής του Δρ. Κατσαρού Γ. (2009), οι οποίοι μελέτησαν την επίδραση της ΥΠ στη δραστηριότητα αμινοπεπτιδασών ιδίων με την παρούσα διατριβή οξύγαλακτικών στελεχών των *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* και *L. lactis* και παρατήρησαν τη

διαφορετική συμπεριφορά των ενζύμων ανάλογα με τις συνθήκες επεξεργασίας (ενεργοποίηση/απενεργοποίηση).

4.2.2. Αναμενόμενα Αποτελέσματα Έρευνας

Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης έρευνας, αναμένεται να οδηγήσουν στη γνώση των συνθηκών ΥΠ και θερμοκρασίας που μπορεί να επιφέρουν αύξηση της δραστηριότητας των αμινοπεπτιδασών. Η χρήση αμινοπεπτιδασών αυξημένης δραστηριότητας σε τυρί, δυνητικά θα οδηγήσει σε μείωση του χρόνου ωρίμανσής του καθώς και σε βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του αφού θεωρείται ότι μπορεί να περιοριστεί και η ύπαρξη πεπτιδίων που προκαλούν πικρή γεύση (O'Reilly et al., 2001; Saldo et al., 2002; El Soda et al., 2000).

4.2.3. Σχεδιασμός Πειράματος

Στόχος του πρώτου σταδίου ήταν η μελέτη ενζύμων που καταλύουν δράσεις οι οποίες συμβάλλουν στη διαδικασία ωρίμανσης του τυριού. Μελετήθηκε η επίδραση της ΥΠ στη δραστηριότητα της γενικής αμινοπεπτιδάσης PepN καθώς και της αμινοπεπτιδάσης ειδικής δράσης PepX (X-prolyl-dipeptidyl peptidase), για τον καθένα από τα οξυγαλακτικά στελέχη (SLAB), *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105, *S. thermophilus* ACA-DC 0022 και *L. lactis* ACA-DC 0049, οι οποίοι έχουν χρησιμοποιηθεί και ως οξυγαλακτική καλλιέργεια εκκίνησης σε τυρί Φέτα. Μετά από βιβλιογραφική ανασκόπηση και προκαταρκτικά πειράματα, πραγματοποιήθηκε έκθεση των αμινοπεπτιδασών σε ένα εύρος συνθηκών ΥΠ και θερμοκρασίας. Για το σκοπό αυτό για τις πεπτιδάσες των στελεχών των *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* και *L. lactis* μελετήθηκαν πιέσεις επεξεργασίας από 100-450 MPa σε συνδυασμό με θερμοκρασίες 20, 30 και 40°C και για χρόνους επεξεργασίας 0-30 min.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη των οξυγαλακτικών στελεχών των *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* και *L. lactis* σε κατάλληλες συνθήκες. Μετά από κατάλληλη προετοιμασία τους που περιγράφεται στην Παρ. 4.2.4., οι καλλιέργειες οδηγήθηκαν προς επεξεργασία με ΥΠ. Ακολούθησε λύση των κυττάρων με χρήση υπερήχων και μέτρηση της δραστηριότητας των αμινοπεπτιδασών.

Με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μέτρηση της δραστηριότητας των πεπτιδασών, κατασκευάστηκαν διαγράμματα τα οποία περιεγράφηκαν και συγκρίθηκαν αναλυτικά. Για την περιγραφή της εξάρτησης του ρυθμού μεταβολής της δραστηριότητας των πεπτιδασών από την ΥΠ και τη θερμοκρασία αναπτύχθηκαν κατάλληλα μαθηματικά μοντέλα τα οποία επιτρέπουν τον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών επεξεργασίας με ΥΠ με κύριο στόχο την αύξηση της δραστηριότητάς τους.

4.2.4. Πρώτες Ύλες, Χημικά Αντιδραστήρια και Υλικά Συσκευασίας

4.2.4.1. Ανάπτυξη οξυγαλακτικών καλλιεργειών των στελεχών *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105, *S. thermophilus* ACA-DC 0022 και *L. lactis* ACA-DC 0049

Οι μικροοργανισμοί που μελετήθηκαν ήταν οι *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105, *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0022 και *Lactococcus lactis* ACA-DC 0049 (όλα τα στελέχη απομονώθηκαν από τυρί Φέτα στο Εργαστήριο Γαλακτοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, Ελλάδας και ανήκουν στη συλλογή ACA-DC του ίδιου Εργαστηρίου). Η ανάπτυξη του στελέχους του *L. bulgaricus* πραγματοποιήθηκε σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα MRS-Broth (1.10661, Merck, Germany) υπό αναερόβιες συνθήκες και σε θερμοκρασία 45°C, ενώ η ανάπτυξη των στελεχών των *S. thermophilus* και *L. lactis* πραγματοποιήθηκε σε υπόστρωμα M-17

Broth (1.15029, Merck, Germany) υπό αερόβιες συνθήκες στους 37°C. Η ανάπτυξη των βακτηρίων συσχετίστηκε με την αύξηση της απορρόφησης, $A_{600\text{nm}}$, στα 600 nm. Τα βακτήρια λαμβάνονταν για περαιτέρω πειράματα στο τέλος της εκθετικής φάσης ανάπτυξής τους (περίπου 10^8 cfu/g, με αντίστοιχη απορρόφηση $A_{600\text{nm}}=4.2$).

4.2.4.2. Προετοιμασία δείγματος προς επεξεργασία με ΥΠ

Σε ποσότητα 1 L από την κάθε καλλιέργεια (σημείο παραλαβής το τέλος της εκθετικής φάσης ανάπτυξης του μικροοργανισμού) πραγματοποιούνταν φυγοκέντρωση ($1125 \times g$, 10 min) (HermLe Z 380, HermLe Labortechnik GmbH, Wehingen, Germany) και μετά από διπλή έκπλυση των κυττάρων με 20 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 7.0, γινόταν επαναδιάλυση των κυττάρων σε τελικό όγκο 1 L του προαναφερθέντος ρυθμιστικού διαλύματος. Για την επεξεργασία με ΥΠ, δείγματα όγκου 10 mL από την κάθε καλλιέργεια συσκευάζονταν σε αποστειρωμένη υπό UV ακτινοβολία συσκευασία από κατάλληλο πολυστρωματικό υλικό (πολυπροπυλένιο (PP) – πολυαιθυλένιο (PE)).

4.2.5. Πειραματική Διαδικασία

4.2.5.1. Επεξεργασία με ΥΠ

4.2.5.1.1. Περιγραφή μονάδας ΥΠ

Ένα τυπικό σύστημα διεργασίας ΥΠ περιλαμβάνει ένα θάλαμο ΥΠ, ένα σύστημα δημιουργίας της επιθυμητής πίεσης και ένα σύστημα ελέγχου της θερμοκρασίας της διεργασίας. Ο όγκος του θαλάμου ΥΠ, η μέγιστη πίεση διεργασίας, το εύρος της θερμοκρασίας της διεργασίας και ο χρόνος που απαιτείται για την ολοκλήρωση ενός κύκλου της διεργασίας, αποτελούν τα κύρια τεχνικά χαρακτηριστικά ενός συστήματος ΥΠ.

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων με ΥΠ χρησιμοποιήθηκε η μονάδα Food Pressure Unit FPU 1.01, της Resato International BV (Roden, Holland) η οποία αποτελεί συνιδιοκτησία του Ε.Μ.Π. και του οργανισμού ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ (Ελληνικός Γεωργικός Οργανισμός ‘‘ΔΗΜΗΤΡΑ’’) (Εικόνα 4.1). Η συγκεκριμένη μονάδα είναι εγκατεστημένη και λειτουργεί σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο του ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ. Ο συγκεκριμένος εξοπλισμός περιλαμβάνει:

A. Μία μονάδα ΥΠ, η οποία παρέχει τη δυνατότητα ανάπτυξης πιέσεων επεξεργασίας έως και 1000 MPa και η οποία συνδέεται με δύο τύπους θαλάμων ΥΠ (Εικόνα 4.1) που λειτουργούν ανεξάρτητα μεταξύ τους.



Εικόνα 4.1: Μονάδα ΥΠ

Β. Ένα θάλαμο ΥΠ όγκου 1.5 L (Εικόνα 4.2), ο οποίος χρησιμοποιείται για την παραγωγή μεγαλύτερων ποσοτήτων προϊόντων επεξεργασμένων με ΥΠ.



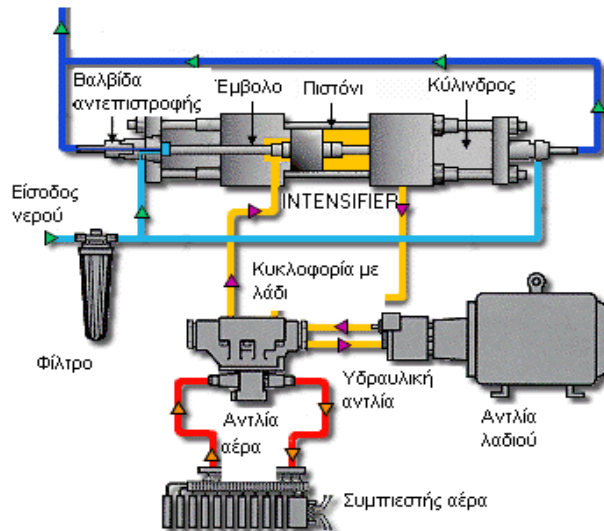
Εικόνα 4.2: Μονάδα επεξεργασίας τροφίμων χωρητικότητας 1.5 L

Γ. Μία συστοιχία 6 κυλινδρικών μικροθαλάμων ΥΠ (Εικόνα 4.3), χωρητικότητας 42 mL ο καθένας. Οι μικροθάλαμοι έχουν δυνατότητα ανεξάρτητου χειρισμού, για τη συλλογή κινητικών δεδομένων. Η συστοιχία αυτή χρησιμοποιήθηκε κατά τη μελέτη της επίδρασης της ΥΠ στη δραστικότητα των ενζύμων.



Εικόνα 4.3: Συστοιχία κυλινδρικών μικροθαλάμων ΥΠ χωρητικότητας 42 mL ο καθένας, που χρησιμοποιείται για κινητικές μελέτες

Για τη δημιουργία των υπερυψηλών πιέσεων χρησιμοποιείται η αρχή του λεγόμενου ενισχυτή πίεσης (pressure intensifier) (Εικόνα 4.4).



Εικόνα 4.4: Διάγραμμα λειτουργίας ενισχυτή πίεσης

Ένας αεροσυμπιεστής χρησιμοποιείται για την επίτευξη πιέσεων έως 0.5 MPa. Ο πεπιεσμένος αέρας χαμηλής πίεσης εισέρχεται σε μια αντλία αέρα από την οποία εξέρχεται το υγρό μεταφοράς της πίεσης (υγρό χαμηλής συμπιεστότητας) που στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι πολυγλυκόλη με πολύ μεγαλύτερη πίεση (100 MPa). Αυτό επιτυγχάνεται εξαιτίας της διαφοράς διατομών των σωληνώσεων εισόδου (μεγάλη διατομή) και εξόδου (μικρή διατομή) της αντλίας. Για πιέσεις μεγαλύτερες από 100 MPa, χρησιμοποιείται μια αντλία λαδιού, όπου με μια σχετικά χαμηλή πίεση λαδιού δημιουργείται η επιθυμητή υψηλή πίεση εξόδου. Αυτό επιτυγχάνεται με τη σύνδεση ενός μικρού εμβόλου με ένα έμβολο λαδιού μεγαλύτερης επιφάνειας. Η πίεση του υγρού μεταφοράς της πίεσης που δρα στην μικρή επιφάνεια αντισταθμίζει την πίεση του λαδιού που δρα στην μεγάλη επιφάνεια. Η πίεση του υγρού μεταφοράς της πίεσης είναι μεγαλύτερη από την πίεση του λαδιού λόγω της αναλογίας των επιφανειών των εμβόλων του λαδιού και του υγρού. Η ρύθμιση έτσι της πίεσης εξόδου του ενισχυτή πίεσης μπορεί να γίνει ρυθμίζοντας την πίεση εισόδου του λαδιού. Ο ενισχυτής πίεσης της συγκεκριμένης μονάδας είναι διπλής δράσης και λειτουργεί με τη βοήθεια μιας υδραυλικής αντλίας (τροφοδοτούμενης από ηλεκτρικό κινητήρα), η οποία διοχετεύει το απαιτούμενο λάδι στον ενισχυτή ισοσταθμίζοντας την πίεση.

Μια μικρότερη αντλία χρησιμοποιείται για την κυκλοφορία του λαδιού μέσω ενός συστήματος ψύξης (για τον έλεγχο της θερμοκρασίας του) και ενός φίλτρου λαδιού χαμηλής πίεσης. Ο ενισχυτής πίεσης διαθέτει βαλβίδες ελέγχου εισόδου και εξόδου λειτουργώντας έτσι ως παλινδρομική αντλία. Όταν το υδραυλικό έμβολο του ενισχυτή φτάσει στο τέλος, ενεργοποιεί έναν ηλεκτρονικό διακόπτη και η ροή του λαδιού αντιστρέφεται, καθώς πλέον το έμβολο κινείται προς την αντίθετη κατεύθυνση. Πολυγλυκόλη ή κάποιο άλλο υγρό χαμηλής συμπιεστότητας εισέρχεται στον ενισχυτή. Η πίεση του υγρού αυξάνεται σύμφωνα με την παραπάνω αρχή και μεταβιβάζεται προς τους θαλάμους ΥΠ μέσα από σωλήνες από ανοξείδωτο χάλυβα. Πνευματικές χειροκίνητες βαλβίδες ρυθμίζουν την εισαγωγή ή όχι του υγρού σε κάθε έναν από τους θαλάμους. Για λόγους ασφαλείας, το σύστημα περιλαμβάνει ειδικούς δακτυλίους, οι οποίοι διαρρηγνύονται σε περίπτωση προβλήματος για την εκτόνωση της υψηλής πίεσης.

Στα γενικά τεχνικά χαρακτηριστικά της μονάδας ΥΠ αναφέρονται η μέγιστη πίεση λειτουργίας, που είναι 1000 MPa και το εύρος της θερμοκρασίας διεργασίας που μπορεί να κυμαίνεται από -40°C έως $+100^{\circ}\text{C}$. Το μέσο μεταφοράς της πίεσης του συστήματος είναι πολυγλυκόλη (ISO viscosity class VG 15, Resato International BV, Roden, Holland).

Για την προστασία και την αποφυγή απευθείας επαφής του επεξεργαζόμενου τροφίμου με το μέσο μεταφοράς της ΥΠ, τα δείγματα συσκευάζονται κατάλληλα. Η χρήση προστατευτικής εξωτερικής συσκευασίας είναι απαραίτητη όχι μόνο για να αποφευχθεί η επαφή της γλυκόλης με το τρόφιμο, αλλά και για το φράξιμο της οπής εισόδου/ εξόδου του υγρού μεταφοράς της πίεσης στον πυθμένα των δοχείων πίεσης από τα διάφορα σωματίδια του τροφίμου.

Η πίεση του συστήματος καθώς και η πίεση στο εσωτερικό του μεγάλου θαλάμου, ελέγχονται και καταγράφονται μέσω δύο μετατροπέων σήματος (transducers), ενώ εμφανίζονται κατά την διάρκεια λειτουργίας του συστήματος σε οθόνη ενσωματωμένη στη μονάδα ΥΠ, καθώς και σε ηλεκτρονικό υπολογιστή συνδεδεμένο με την μονάδα μέσω κατάλληλου λογισμικού. Η καταγραφή της θερμοκρασίας στο εσωτερικό καθενός θαλάμου πίεσης του συστήματος γίνεται με τη χρήση θερμοστοιχείων (τύπου T) και παρακολουθείται μέσω του ίδιου λογισμικού από την οθόνη του υπολογιστή.

Η πίεση λειτουργίας της μονάδας ρυθμίζεται με τη βοήθεια των πλήκτρων του PLC με βήμα αύξησης ή μείωσης 25 MPa. Για την επίτευξη ταχύτερης ανόδου της πίεσης, υπάρχει δυνατότητα άμεσης συμπίεσης στα 250, 500 και 750 MPa. Ο χρόνος επίτευξης της επιθυμητής πίεσης εξαρτάται από το μέγεθος και την ταχύτητα μεταβολής της πίεσης. Ο ρυθμός αύξησης της πίεσης είναι περίπου 100 MPa / 7 s, ενώ ο χρόνος εκτόνωσης της πίεσης είναι μικρότερος από 3 s.

4.2.5.1.2. Διαδικασία συμπίεσης των προς επεξεργασία δειγμάτων

Για τη διεξαγωγή των ισοβαρών και ισοθερμοκρασιακών πειραμάτων ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία. Τα δείγματα των υπό μελέτη ενζυμικών διαλυμάτων συσκευάζονται σε σακουλάκια κατάλληλου όγκου και τοποθετούνται στους 6 μικροθαλάμους πίεσης, μέσα στους οποίους περιέχεται το υγρό μεταφοράς της πίεσης (πολυγλυκόλη). Οι θάλαμοι έχουν από πριν ισορροπήσει στην επιθυμητή θερμοκρασία με την κυκλοφορία νερού στο μανδύα που τους περιβάλλει. Το νερό θερμοστατείται και κυκλοφορεί από κατάλληλη μονάδα (Valka-K-10W5, Val Electronic).

Αρχικά, οι βαλβίδες εισαγωγής του υγρού πίεσης στα δοχεία μένουν ανοιχτές ώστε η επιθυμητή πίεση του συστήματος να μεταφερθεί σε κάθε ένα από αυτά. Εφόσον ρυθμιστεί και επιτευχθεί η επιθυμητή πίεση, κλείνονται οι βαλβίδες, οπότε οι θάλαμοι πίεσης απομονώνονται και η πίεση διατηρείται σταθερή σε κάθε έναν από αυτούς μέχρι να ανοιχτεί η αντίστοιχη βαλβίδα και να εκτονωθεί. Κατά την άνοδο της πίεσης μέχρι την τιμή που έχει ρυθμιστεί, παρατηρείται και αύξηση της θερμοκρασίας (αδιαβατική θέρμανση), η οποία εξαρτάται από την ταχύτητα της αύξησης της πίεσης, καθώς επίσης και την ίδια πίεση. Η θερμοκρασία ύστερα από μικρό σχετικά διάστημα ισορροπεί στην αρχική της τιμή σε όλους τους μικροθαλάμους. Η χρονική αυτή στιγμή μπορεί να θεωρηθεί ως ο χρόνος έναρξης των πειραμάτων ($t=0$), οπότε και εξασφαλίζονται οι ισοθερμοκρασιακές και ισοβαρείς συνθήκες του πειράματος. Τη χρονική στιγμή μηδέν ανοίγεται η βαλβίδα του πρώτου θαλάμου και το αντίστοιχο δείγμα θεωρείται ως δείγμα αναφοράς (χρόνος $t=0$). Οι τιμές στο δείγμα αναφοράς των υπό μελέτη παραμέτρων, όπως η δραστηριότητα του ενζύμου, συγκρίνονται με τις αντίστοιχες τιμές των επόμενων δειγμάτων μετά από διάφορους χρόνους επεξεργασίας. Οι υπόλοιπες βαλβίδες ανοίγονται ύστερα από καθορισμένα χρονικά διαστήματα που είχαν προσδιοριστεί κατά τον σχεδιασμό του πειράματος.

Η περαιτέρω επεξεργασία των δειγμάτων και η μέτρηση της δραστηριότητας των ενζύμων με αναλυτικές μεθόδους που περιγράφονται στην Παράγραφο 4.2.6, πραγματοποιούνταν ακριβώς μετά την επεξεργασία με ΥΠ, για την αποφυγή μεταβολής της δραστηριότητας των ενζύμων που πιθανόν να προκαλούνταν κατά την αποθήκευση υπό κατάψυξη. Τα πειράματα επίδρασης της ΥΠ στη δραστηριότητα των ενζύμων διεξήχθησαν εις τριπλούν σε διάφορες συνθήκες πίεσης (100–700 MPa)

και θερμοκρασίας (20-40°C) για κατάλληλες χρονικές διάρκειες, ανάλογα και με την ευαισθησία του ενζύμου στην πίεση και τη θερμοκρασία. Η αρχική αδιαβατική αύξηση της θερμοκρασίας κατά τη συμπίεση λαμβανόταν υπόψη με σκοπό την επίτευξη της επιθυμητής θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια της συμπίεσης. Η πίεση και η θερμοκρασία καταγράφονταν κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας.

4.2.5.2. Εκχύλιση με εφαρμογή υπερήχων

Στα επεξεργασμένα με ΥΠ δείγματα όγκου 10 mL πραγματοποιούνταν κάθε φορά φυγοκέντρηση (HermLe Z 380, HermLe Labortechnik GmbH, Wehingen, Germany), ξέπλυμα και αναδιάλυση σε ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Tris-HCl pH 7.0 σε τελικό όγκο 2 mL.



Εικόνα 4.5. Συσκευή υπερήχων

Vibra-Cell

Για το σπάσιμο των κυττάρων των μικροοργανισμών, με σκοπό την απελευθέρωση των ενδοκυτταρικών αμινοπεπτιδασών, έγινε χρήση υπερήχων. Χρησιμοποιήθηκε ειδικό στέλεχος υπερήχων ενσωματωμένο σε γεννήτρια υπερήχων Vibra-Cell (20 kHz, συχνότητα ρυθμισμένη σε 40% της μέγιστης συχνότητας του οργάνου, VC750, Sonics & Materials inc., Newtown, USA) (Εικόνα 4.5). Για την απελευθέρωση του 95% των αμινοπεπτιδασών, ήταν απαραίτητες έξι επαναλήψεις της χρήσης υπερήχων χρόνου 1 min η καθεμία, με διαλείμματα του 1 min ανάμεσα στις διασπάσεις των κυττάρων, με σκοπό τη μη αύξηση της θερμοκρασίας. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας τα δείγματα διατηρούνταν σε παγόλουτρο για όσο το δυνατόν χαμηλότερη θερμοκρασία δείγματος.

Μετά την απελευθέρωση των αμινοπεπτιδασών στο μέσο, ακολούθησε φυγοκέντρηση 3500 rpm×10 min.

4.2.6. Αναλυτικές Μέθοδοι

4.2.6.1. Μέθοδος μέτρησης της δραστηριότητας των αμινοπεπτιδασών των οξυγαλακτικών καλλιιεργειών

Η μέτρηση της δραστηριότητας των αμινοπεπτιδασών πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο που περιεγράφηκε από τους Mierau et al., (1996) και Vesanto et al., (1995), όπως τροποποιήθηκε από τους Malone et al., (2003).

Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας των αμινοπεπτιδασών, 40 μ L του εξαγόμενου διαλύματος από το σπάσιμο των κυττάρων προστέθηκαν σε 160 μ L ρυθμιστικού διαλύματος 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) το οποίο περιείχε 0.2 mM εξειδικευμένου για την κάθε αμινοπεπτιδάση υποστρώματος.



Εικόνα 4.6. Φασματοφωτόμετρο

SPECTRAmax 250

Η μεταβολή της απορρόφησης λόγω υδρόλυσης του υποστρώματος μετρήθηκε φασματοφωτομετρικά στους 30°C, στα 410 nm (SPECTRAmax 250 Microplate Spectrophotometer, Molecular devices, U.S.A.) (Εικόνα 4.6). Ο προσδιορισμός του ρυθμού απελευθέρωσης της NA συσχετίστηκε με τη μεταβολή του ρυθμού της απορρόφησης ϵ^{410nm} , η οποία μετρούνταν για συνολικό χρόνο 5 min.

Ως 1 Unit (μ ges NA / min·mL ενζυμικού

διαλύματος) της δραστηριότητας των ενζύμων ορίστηκε η συγκέντρωση ενζύμου που απαιτείται για τη μεταβολή της απορρόφησης κατά μια μονάδα σε χρόνο 1 min. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον τρεις φορές. Η δραστηριότητα της PepN μετρήθηκε με χρήση υποστρώματος Lys-*p*-NA και για την PepX χρησιμοποιήθηκε το υπόστρωμα, Gly-Pro-*p*-NA (Christensen et al., 1999; Malone et al., 2003). Τα υποστρώματα προμηθεύτηκαν από την εταιρία Bachem (Bachem Ltd., St Helens, UK).

4.2.7. Ανάλυση Δεδομένων

Οι τιμές δραστηριότητας ενζύμου που προέκυψαν (μέσος όρος μετρήσεων τριών δειγμάτων για κάθε συνθήκη επεξεργασίας για το καθένα από τα μελετώμενα στελέχη) απεικονίστηκαν διαγραμματικά συναρτήσει του χρόνου επεξεργασίας, για όλες τις συνθήκες ΥΠ και θερμοκρασίας που εφαρμόστηκαν.

Τόσο η ενεργοποίηση όσο και η απενεργοποίηση των αμινοπεπτιδασών ακολούθησαν κινητική 1ης τάξης της μορφής:

$$\frac{A}{A_0} = e^{k \cdot t} \quad (\text{Εξίσωση 4.1})$$

Όπου, A η δραστηριότητα της αμινοπεπτιδάσης μετά από χρόνο επεξεργασίας t (min), A₀ η αρχική δραστηριότητα του ενζύμου (t=0 min) και k η σταθερά του ρυθμού ενεργοποίησης (+) / απενεργοποίησης (-) του ενζύμου (min⁻¹).

Οι σταθερές των ρυθμών μεταβολής της δραστηριότητας των ενζύμων υπολογίστηκαν με γραμμικοποίηση της Εξίσωσης 4.1 και χρήση γραμμικής παλινδρόμησης.

Η εξάρτηση του ρυθμού ενεργοποίησης/απενεργοποίησης των αμινοπεπτιδασών (k) από τη θερμοκρασία εκφράστηκε μέσω της ενέργειας ενεργοποίησης (E_a) με χρήση της εξίσωσης Arrhenius (Εξίσωση 4.2).

$$k_T = k_{T_{ref}} \cdot \exp \left[\left(-\frac{E_a}{R} \right) \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \right] \quad (\text{Εξίσωση 4.2})$$

Όπου, k_T η σταθερά του ρυθμού μεταβολής της δραστηριότητας του ενζύμου σε θερμοκρασία επεξεργασίας T (K), k_{T_{ref}} η σταθερά του ρυθμού μεταβολής της δραστηριότητας του ενζύμου στη θερμοκρασία αναφοράς T_{ref} = 293.15 K (20°C), E_a η ενέργεια ενεργοποίησης (J/mol) και R η παγκόσμια σταθερά των αερίων (8.314 J·mol⁻¹·K⁻¹).

Για το εύρος των συνθηκών που παρατηρήθηκε ενεργοποίηση των ενζύμων, η εξάρτηση της σταθεράς του ρυθμού ενεργοποίησής τους (k) από τη θερμοκρασία εκφράστηκε μέσω της πολυωνυμικής Εξίσωσης 4.3.

$$k_p = a_1 \cdot (P - P_{ref})^2 + b_1 \cdot (P - P_{ref}) + k_{p_{ref}} \quad (\text{Εξίσωση 4.3})$$

Όπου, k_p η σταθερά του ρυθμού μεταβολής της δραστηριότητας του ενζύμου σε πίεση επεξεργασίας P (MPa), k_{p_{ref}} η σταθερά του ρυθμού μεταβολής της δραστηριότητας του ενζύμου στην πίεση αναφοράς P_{ref} = 200 MPa.

Για τη μαθηματική έκφραση της συνδυασμένης επίδρασης της ΥΠ και της θερμοκρασίας στην ενεργοποίηση των πεπτιδασών PepN και PepX καθώς και για τον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών επεξεργασίας των πεπτιδασών με ΥΠ με στόχο τη μέγιστη δραστηριότητά τους, η επίδραση της ΥΠ και της θερμοκρασίας στη σταθερά του ρυθμού ενεργοποίησης των πεπτιδασών εκφράστηκε μέσω της πολύ-παραμετρικής Εξίσωσης 4.4.

$$k = k_{P_{ref}} \cdot \left[a \cdot (P - P_{ref})^2 + b \cdot (P - P_{ref}) + 1 \right] \cdot \exp \left[\left(-\frac{E_a}{R} \right) \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \right] \quad (\text{Εξίσωση 4.4})$$

Όπου, k η σταθερά του ρυθμού μεταβολής της δραστηριότητας του ενζύμου σε πίεση επεξεργασίας P (MPa) και θερμοκρασία T (K), $k_{P_{ref}}$ η σταθερά του ρυθμού μεταβολής της δραστηριότητας του ενζύμου στην πίεση αναφοράς $P_{ref} = 200$ MPa και τη θερμοκρασία αναφοράς $T_{ref} = 293.15$ K (20°C), E_a η ενέργεια ενεργοποίησης (J/mol), R η παγκόσμια σταθερά αερίων ($8.314 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$). Το ίδιο μοντέλο χρησιμοποιήθηκε και από τους Katsaros et al. (2009), για την περιγραφή της κινητικής ενεργοποίησης αμινοπεπτιδασών της οξυγαλακτικής καλλιέργειας του μικροοργανισμού *L. bulgaricus*.

Οι παράμετροι της Εξίσωσης 4.4 προσδιορίστηκαν με ανάλυση μη γραμμικής παλινδρόμησης με χρήση του προγράμματος Systat 10.2.

Στην περίπτωση των συνθηκών επεξεργασίας στις οποίες υπήρξε απενεργοποίηση των ενζύμων, η επίδραση της πίεσης επεξεργασίας στην ενέργεια ενεργοποίησης εκφράστηκε μέσω εξίσωσης εκθετικής μορφής (Εξίσωση 4.5).

$$E_a = E_{a_{P_{ref}}} \cdot \exp \left[B_1 \cdot (P - P_{ref}) \right] \quad (\text{Εξίσωση 4.5})$$

Όπου, E_a η ενέργεια ενεργοποίησης σε πίεση P (MPa), $P_{ref} = 450$ MPa και $E_{a_{P_{ref}}}$ η τιμή της E_a στην πίεση αναφοράς P_{ref} .

Οι παράμετροι της Εξίσωσης 4.5 προσδιορίστηκαν μετά από γραμμικοποίησή της και χρήση γραμμικής παλινδρόμησης.

Για το εύρος των συνθηκών που παρατηρήθηκε απενεργοποίηση των ενζύμων, η εξάρτηση της σταθεράς του ρυθμού απενεργοποίησής τους (k) από τη θερμοκρασία εκφράστηκε μέσω του όγκου ενεργοποίησης (V_a) με χρήση της εξίσωσης 4.6.

$$k_p = k_{P_{ref}} \cdot \exp \left[\left(-\frac{V_a}{R \cdot T} \right) \cdot (P - P_{ref}) \right] \quad (\text{Εξίσωση 4.6})$$

Όπου, k_p η σταθερά του ρυθμού απενεργοποίησης των πεπτιδασών σε πίεση P (MPa), $k_{P_{ref}}$ η σταθερά του ρυθμού απενεργοποίησης των πεπτιδασών στην πίεση αναφοράς $P_{ref} = 450$ MPa, V_a ο όγκος ενεργοποίησης (mL/mol), R η παγκόσμια σταθερά αερίων ($8.314 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$) και T (K) η θερμοκρασία επεξεργασίας.

Η εξάρτηση του V_a από τη θερμοκρασία εκφράστηκε μέσω γραμμικής εξίσωσης (Εξίσωση 4.7).

$$V_a = V_{a_{T_{ref}}} - A_1 \cdot (T - T_{ref}) \quad (\text{Εξίσωση 4.7})$$

Όπου, V_a ο όγκος ενεργοποίησης σε θερμοκρασία T , $V_{a_{T_{ref}}}$ ο όγκος ενεργοποίησης στη θερμοκρασία αναφοράς $T_{ref} = 40^\circ\text{C}$ και A_1 σταθερά.

Με συνδυασμό των εξισώσεων 4.2, 4.5, 4.6 και 4.7 προέκυψε η συνολική εξίσωση 4.8 η οποία συνδυάζει την επίδραση της θερμοκρασίας στον όγκο ενεργοποίησης και την επίδραση της πίεσης στην ενέργεια ενεργοποίησης, για το εύρος συνθηκών στις οποίες το ένζυμο απενεργοποιείται.

$$k = k_{P_{ref}, T_{ref}} \cdot \exp \left\{ -\frac{E_{a_{P_{ref}}}}{R} \cdot \exp \left[-B(P - P_{ref}) \right] \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) - \frac{A \cdot (T - T_{ref}) + V_{a_{T_{ref}}} \cdot (P - P_{ref})}{R \cdot T} \right\} \quad (\text{Εξίσωση 4.8})$$

Όπου, $k_{P_{ref}, T_{ref}}$ η σταθερά του ρυθμού απενεργοποίησης στην πίεση αναφοράς P_{ref} και τη θερμοκρασία αναφοράς T_{ref} .

Οι παράμετροι της Εξίσωσης 4.8 προσδιορίστηκαν με ανάλυση μη γραμμικής παλινδρόμησης με χρήση του προγράμματος Systat 10.2.

Το ίδιο μοντέλο χρησιμοποιήθηκε και από τους Katsaros et al. (2009), για την περιγραφή της κινητικής απενεργοποίησης αμινοπεπτιδασών της οξυγαλακτικής καλλιέργειας του μικροοργανισμού *L. bulgaricus* και από τους Alexandrakis et al., (2014) για την περιγραφή της κινητικής απενεργοποίησης πηκτινομεθυλεστεράσης πορτοκαλιού, μετά από επεξεργασία με ΥΠ.

4.2.7.1. Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

Για κάθε πειραματική μέτρηση που αποτυπώνεται με ένα σημείο σε όλα τα διαγράμματα της παρούσας διατριβής, υπολογίστηκε από το σύνολο των επαναλήψεων (3 τουλάχιστον επαναλήψεις για κάθε σημείο) η τυπική απόκλιση (standard deviation) η οποία εμφανίζεται με χρήση γραμμών (άνω και κάτω γραμμή σε κάθε σημείο ως μέγιστη και ελάχιστη απόκλιση, αντίστοιχα) σε κάθε σημείο στα διαγράμματα. Η στατιστική επεξεργασία των καμπυλών ενεργοποίησης/απενεργοποίησης των ενζύμων, που προέκυψαν, για τον υπολογισμό των standard errors (s. error) πραγματοποιήθηκε μέσω γραμμικοποίησης των εξισώσεων και εφαρμογή γραμμικής παλινδρόμησης στο πρόγραμμα excel. Η εξάρτηση των ρυθμών ενεργοποίησης/απενεργοποίησης από παραμέτρους επεξεργασίας, περιγράφηκε μέσω κατάλληλων μαθηματικών εξισώσεων, στατιστικά επεξεργασμένων με εφαρμογή γραμμικής παλινδρόμησης στο πρόγραμμα excel. Για τον προσδιορισμό των παραμέτρων των μαθηματικών μοντέλων που αναπτύχθηκαν (Εξισώσεις 4.4, 4.8) έγινε εφαρμογή μη γραμμικής παλινδρόμησης μέσω χρήσης του προγράμματος SYSTAT 10.2 (SYSTAT 10.2 Statistics, 2002, SPCC Inc., Chicago, IL, USA).

4.3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΥΠ ΚΑΙ ΗΠΙΩΝ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΩΝ ΣΤΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΤΗ ΔΟΜΗ ΚΑΘΑΡΗΣ X-prolyl-dipeptidyl AMINOPEPTIDΑΣΗΣ (PepX) ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΗΣ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0022.

4.3.1. Εισαγωγή - Σκοπός

Όπως προαναφέρθηκε, τα οξυγαλακτικά βακτήρια εκκίνησης είναι φορείς ενζύμων τα οποία υδρολύουν πεπτίδια προς παραγωγή ελεύθερων αμινοξέων, με αποτέλεσμα τη διαμόρφωση των γευστικών και αρωματικών χαρακτηριστικών του τυριού. Η επεξεργασία με ΥΠ των οξυγαλακτικών στελεχών μελετήθηκε με στόχο την αύξηση της δραστηρότητάς τους, την επιτάχυνση των δράσεων και κατ' επέκταση τη μείωση του χρόνου ωρίμανσης του τυριού. Η διαφορετική συμπεριφορά των ενζύμων μετά από έκθεσή τους σε διαφορετικές συνθήκες ΥΠ παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον και αποδίδεται σε μεταβολές στη δομή τους που προκαλούνται μετά την επεξεργασία τους με ΥΠ.

Η μεταβολή της δραστηρότητας των ενζύμων λόγω ολικής ή μερικής μετουσίωσής τους οφείλεται είτε σε σχηματισμό είτε σε σπάσιμο μη-ομοιοπολικών δεσμών και σε αναδιάταξη των μορίων. Οι ομοιοπολικοί δεσμοί παραμένουν ανέπαφοι άρα και η πρωτοταγής δομή των ενζύμων παραμένει ανεπηρέαστη κατά την επεξεργασία με ΥΠ (Cheftel, 1991; Hayashi et al., 1989). Αντίθετα, η δευτεροταγής, η τριτοταγής και η τεταρτοταγής δομή των ενζύμων φαίνεται να επηρεάζονται από την επεξεργασία με ΥΠ. Η τριτοταγής δομή επηρεάζεται σημαντικά κατά την επεξεργασία με ΥΠ (Heremans, 1993; Mozhaev et al., 1996) εξαιτίας της επίδρασης στους υδροφοβικούς και ηλεκτροστατικούς δεσμούς σε πιέσεις από 150 MPa (Cheftel, 1991; Balny & Masson, 1993; Gross & Jaenicke, 1994; Barbosa et al., 1997). Η τεταρτοταγής δομή των πρωτεϊνών επηρεάζεται επίσης σημαντικά από την πίεση, καθώς διασπάται σε μικρότερες υπομονάδες (Balny & Masson, 1993; Barbosa et al., 1997). Αλλαγές στη δευτεροταγή δομή λαμβάνουν χώρα σε πιέσεις υψηλότερες των 400 MPa και οδηγούν σε μη αντιστρεπτή μετουσίωση (Masson, 1992; Balny & Masson, 1993). Ένζυμα τα οποία υπόκεινται σε ΥΠ μπορεί να ενεργοποιηθούν αντί να απενεργοποιηθούν, ανάλογα με τις μεταβολές της δευτεροταγούς και τριτοταγούς δομής τους που συντελούνται σε συγκεκριμένες πιέσεις (Heremans, 1982; Cheftel, 1992). Έτσι, η ΥΠ μπορεί να επηρεάσει τη λειτουργικότητα των ενζύμων και επομένως και τη χρήση τους.

Κατά καιρούς αρκετοί ερευνητές αναφέρουν την απομόνωση και το χαρακτηρισμό αμινοπεπτιδασών οξυγαλακτικών καλλιιεργειών (Bockelmann et al., 1997; Rul et al., 1994; Chavagnat et al., 2000; Magboul & Mc Sweeney, 2000; Anastasiou et al., 2002; Georgalaki et al., 2002; Motoshima et al., 2003).

Καμία όμως μελέτη δεν έχει πραγματοποιηθεί μέχρι τώρα σχετικά με την απομόνωση και το χαρακτηρισμό επεξεργασμένων με ΥΠ αμινοπεπτιδασών καθώς και μελέτη των μεταβολών που μπορεί να υποστεί η δομή τους εξαιτίας της επεξεργασίας αυτής.

Σκοπός της έρευνας ήταν η διερεύνηση των πιθανών μεταβολών της δομής επεξεργασμένων αμινοπεπτιδασών σε διάφορους συνδυασμούς ΥΠ-θερμοκρασίας και η αντιστοίχιση και συσχέτισή τους με τις μεταβολές της δραστηρότητάς τους. Απώτερος στόχος ήταν η εύρεση της αιτίας που η επεξεργασία με ΥΠ οδηγεί σε αύξηση ή μείωση της δραστηρότητας των αμινοπεπτιδασών μετά από υποβολή τους σε συνθήκες ΥΠ-θερμοκρασίας μέσω δομικών μεταβολών που συντελούνται προσφέροντας βασική γνώση για την επίδραση της ΥΠ σε δομή ενζύμων.

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε για την αμινοπεπτιδάση PepX του οξυγαλακτικού στελεχούς *S. thermophilus* ACA-DC 0022. Η X-prolyl dipeptidyl αμινοπεπτιδάση (PepX), όπως έχει αναλυθεί στο θεωρητικό μέρος της παρούσας διατριβής, αποτελεί ειδική πεπτιδάση προλίνης (proline-specific

peptidase) και θεωρείται πολύ σημαντική για την υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών (Kok & De Vos, 1994; Baankreis & Exterkate, 1991). Ειδικότερα προκαλεί την υδρόλυση των πεπτιδίων στο αμινοτελικό τους άκρο προς παραγωγή διπεπτιδίων με προλίνη της μορφής Xaa-Pro (Lloyd & Pritchard, 1991).

Αντικείμενο του συγκεκριμένου σταδίου της ερευνητικής δραστηριότητας αποτέλεσε η συστηματική μελέτη της επίδρασης της ΥΠ στη δραστικότητα και τη δομή της καθαρής αμινοπεπτιδάσης PepX προερχόμενης από το οξυγαλακτικό στέλεχος *S. thermophilus* ACA-DC 0022, καθώς και η συσχέτιση των πιθανών μεταβολών της δομής με τις μεταβολές της δραστικότητας του ενζύμου.

4.3.2. Αναμενόμενα Αποτελέσματα Έρευνας

Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης έρευνας αναμένεται να καλύψουν το μεγάλο κενό που υπάρχει ανάμεσα στη γνώση και την παρατήρηση, όσον αφορά τις αιτίες της διαφορετικής μεταβολής στη συμπεριφορά και τη δραστικότητα ενζύμων σε συνθήκες ΥΠ και θερμοκρασίας. Δεν υπάρχουν αντίστοιχες αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία παρόμοιας θεματολογίας με την προτεινόμενη μελέτη, παρά μόνον κάποιες μεμονωμένες εργασίες στην αλλαγή της δομής ορισμένων πρωτεϊνικών συστημάτων, οι οποίες όμως δεν επαρκούν για την κάλυψη των κενών που υπάρχουν στη γνώση. Η γνώση που θα προκύψει από το έργο αυτό θα χρησιμεύσει στη βαθύτερη κατανόηση των αιτιών των διαφοροποιημένων βιοχημικών χαρακτηριστικών και θα προσφέρει βάση για την εξήγηση των πιθανά διαφορετικών λειτουργικών ιδιοτήτων τους.

4.3.3. Σχεδιασμός Πειράματος

Για τη διερεύνηση της αιτίας που προκαλεί την ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση των αμινοπεπτιδασών μετά την επεξεργασία τους με ΥΠ, στόχο της έρευνας αποτέλεσε η μελέτη της δραστικότητας και των δομικών μεταβολών της καθαρής αμινοπεπτιδάσης X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase (PepX) της οξυγαλακτικής καλλιέργειας του μικροοργανισμού *S. thermophilus* ACA DC 0022, οι οποίες προκαλούνται μετά από επεξεργασία του με ΥΠ σε συνδυασμό με ήπιες θερμοκρασίες. Παράλληλα στόχο αποτέλεσε η συσχέτιση των δομικών αυτών μεταβολών με τη μεταβολή της δραστικότητας του ενζύμου.

Για το σκοπό αυτό σε αρχικό στάδιο πραγματοποιήθηκε καθαρισμός και απομόνωση της αμινοπεπτιδάσης PepX μετά από εφαρμογή χρωματογραφίας ανιοντοανταλλαγής (anion-exchange chromatography), μοριακής διήθησης (gel filtration chromatography) και χρωματογραφίας υδροξυαπατίτη (hydroxyapatite chromatography).

Στο καθαρό ένζυμο, για τη συσχέτιση της δραστικότητας του ενζύμου με τη δομή του, πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη της επίδρασης της ΥΠ (100-450 MPa) σε συνδυασμό με ήπιες θερμοκρασίες (20-40°C) και για χρόνους έκθεσης 0-30 min στη δραστικότητά του. Για την περιγραφή της εξάρτησης του ρυθμού μεταβολής της δραστικότητας του καθαρού ενζύμου από την ΥΠ και τη θερμοκρασία αναπτύχθηκαν κατάλληλα μαθηματικά μοντέλα (Katsaros et al., 2009). Επιπλέον, στο σημείο αυτό πραγματοποιήθηκε συσχέτιση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν σχετικά με την επίδραση της ΥΠ στην καθνή και μη καθνή (crude form) PepX. Παράλληλα μελετήθηκε κινητικά και η ευαισθησία του καθαρού ενζύμου στη θερμική επεξεργασία μετά από έκθεσή του σε θερμοκρασίες 30-60°C για χρόνους 0-60 min.

Για τη μελέτη της δευτεροταγούς και τριτοταγούς δομής του καθαρού ενζύμου (επεξεργασμένου και μη) εφαρμόστηκε η μέθοδος φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωϊσμού (Circular Dichroism - CD).

Βάσει των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την έρευνα που παρουσιάστηκε στην Παράγραφο 4.2. καθώς και από τα αποτελέσματα που προέκυψαν σχετικά με την επίδραση της ΥΠ στη δραστικότητα

της καθαρής PepX, επιλέχθηκαν ως συνθήκες επεξεργασίας του καθαρού ενζύμου με ΥΠ για την περαιτέρω μελέτη της δομής του, πιέσεις 100-450 MPa, σε θερμοκρασία 20°C και για χρόνο επεξεργασίας 20 min, ενώ πραγματοποιήθηκε και επεξεργασία του καθαρού ενζύμου σε σταθερή πίεση 200 MPa και θερμοκρασία 20°C αλλά με μεταβολή του χρόνου (0-30 min).

Μετά τη μελέτη της επίδρασης της ΥΠ στη δευτεροταγή και τριτοταγή δομή του ενζύμου έγινε προσπάθεια συσχέτισης των μεταβολών της δομής με τη μεταβολή της δραστηριότητάς του.

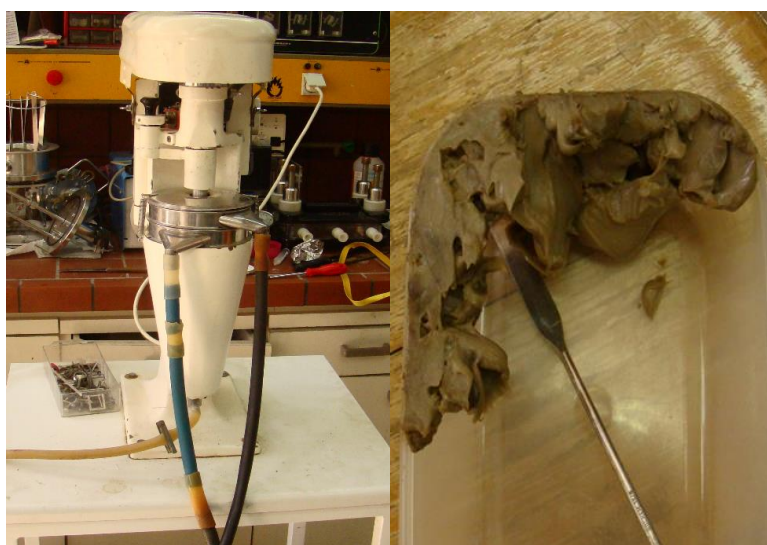
4.3.4. Πρώτες Ύλες, Χημικά Αντιδραστήρια και Υλικά Συσκευασίας

4.3.4.1. Παραγωγή PepX

Ο *S. thermophilus* ACA-DC 0022, αναπτύχθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα M-17 Broth (1.15029, Merck, Germany), σε θερμοκρασία 35°C και υπό αερόβιες συνθήκες, σε βιοαντιδραστήρα MBR AG Ltd. (Switzerland) όγκου 2 dm³ συνδεδεμένο με συσκευή ελέγχου IMCS – 2000 (Εικόνα 4.7). Η ανάπτυξη των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε μέχρι το τέλος της εκθετικής φάσης, η οποία αντιστοιχούσε σε φορτίο ~10⁸ cfu/g και με αντίστοιχη απορρόφηση A_{600nm} = 4.2.



Εικόνα 4.7. Βιοαντιδραστήρας MBR AG Ltd. (Switzerland) συνδεδεμένος με συσκευή ελέγχου IMCS – 2000



(α)

(β)

Εικόνα 4.8.α) Φυγοκέντριση συνεχούς ροής Z41, CEPA centrifuge, β) Συλλογή κυττάρων του στελέχους του *S. thermophilus*

Τα κύτταρα του μικροοργανισμού *S. thermophilus* συλλέχθηκαν μετά από εφαρμογή φυγοκέντρησης συνεχούς ροής (Z41, CEPA centrifuge), σε συνθήκες 12000 rpm/min, για 20 min (Εικόνες 4.8 α, β). Τα κύτταρα που συλλέχθηκαν, τοποθετήθηκαν σε 20 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$) pH 7.0 όγκου αντίστοιχου με εκείνο του θρεπτικού μέσου. Μετά από δεύτερη φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και επαναδιαλύθηκαν σε ίσου όγκου ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl, συγκέντρωσης 20 mM και pH 7.0.

Για τη λύση της κυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων και την παραλαβή του ενδοκυτταρικού ενζύμου, έγινε χρήση υπερήχων με χρήση στελέχους υπερήχων συνδεδεμένο σε γεννήτρια Vibra-Cell (20 kHz, amplitude set at 40%, VC750, Sonics & Materials Inc., Newtown, Mass., U.S.A.) και με χρόνο αναμονής 1 min για κάθε λεπτό επεξεργασίας για αποφυγή αύξησης της θερμοκρασίας. Κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας, τα δείγματα διατηρούνταν σε πάγο για την αποφυγή απενεργοποίησης του ενζύμου. Μετά την απελευθέρωση της αμινοπεπτιδάσης PepX στο μέσο, τα κύτταρα αφαιρέθηκαν μετά από φυγοκέντρηση σε συνθήκες 12000 rpm/min, για 20 min στους 4°C. Το διάλυμα ενζύμου αποθηκεύονταν σε θερμοκρασία -40°C προς απομόνωση και καθαρισμό.

4.3.4.2. Απομόνωση και καθαρισμός της αμινοπεπτιδάσης PepX από το μικροοργανισμό *S. thermophilus* ACA-DC 0022

Η απομόνωση και ο καθαρισμός της αμινοπεπτιδάσης PepX επιτεύχθηκε μετά από συνδυασμό εκχύλισης, εξαλάτωσης, διήθησης, υπερδιήθησης, φυγοκέντρησης και χρωματογραφικών διαχωρισμών.

Το διάλυμα ενζύμου της Παραγράφου 4.3.4.1. παραλήφθηκε και ακολούθησε καταβύθιση των πρωτεϊνών παρουσία θειικού αμμωνίου (70% κορεσμός), σε θερμοκρασία 4°C για 24 h υπό ήπια μαγνητική ανάδευση. Το ίζημα συλλέχθηκε και αναδιαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα με ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Tris-HCl, pH 7.0. Το ανωτέρω ενζυμικό παρασκεύασμα διηθήθηκε υπό κενό με φίλτρα διαμέτρου 0.45 μm (Millipore, USA) και συμπυκνώθηκε σε συσκευή υπερδιήθησης Amicon P-8400 με μεμβράνες συγκράτησης μορίων με μοριακό βάρος 10 kDa.

Το ενζυμικό συμπύκνωμα παραλήφθηκε για περαιτέρω καθαρισμό μέσω τεχνικών χρωματογραφίας. Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε με χρήση συστήματος Biologic LP (Biorad, USA) (Εικόνα 4.9) το οποίο αποτελείται από περισταλτική αντλία ρυθμιζόμενης ροής, μετρητική βαλβίδα δύο καναλιών, ανιχνευτή φωτοδιόδου 280 nm (μέτρηση απορρόφησης), μετρητή ηλεκτρικής αγωγιμότητας και συλλογέα κλασμάτων BioFrac Fraction Collector. Οι μετρήσεις απορρόφησης και αγωγιμότητας καταγράφονταν σε συνδεδεμένο υπολογιστή με το λογισμικό BioLogic LP Data View. Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός διεξαγόταν κάθε φορά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και τα κλάσματα τοποθετούνταν στους 4°C αμέσως μετά τη συλλογή τους.



Εικόνα 4.9. Σύστημα Biologic LP (Biorad, USA)

Αρχικά εφαρμόστηκε χρωματογραφία ανιοντοανταλλαγής. Η τεχνική της χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής βασίζεται στην έλξη ανάμεσα σε αντίθετα φορτισμένα σωματίδια με αποτέλεσμα το διαχωρισμό των μορίων βάσει του φορτίου τους. Ο διαχωρισμός

γίνεται σε στήλες γεμάτες με έναν ιοντοανταλλάκτη (π.χ. ρητίνες) και οι ενώσεις που συγκρατούνται στη στήλη εκλούνται με διάλυμα αυξανόμενης ποσότητας άλατος. Οι ενώσεις που συγκρατούνται ασθενώς εκλούνται πρώτα ενώ όσες συγκρατούνται ισχυρά εκλούνται πιο αργά. Για τη χρωματογραφία ανιοντοανταλλαγής, 20 mL διαλύματος ενζύμου εισήχθησαν σε στήλη πληρωμένη με ρητίνη ανιοντικής ανταλλαγής UNOsphereQ (2.5x10cm) (Biorad, USA), η οποία εκπλενόταν με ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Tris-HCl pH 7.0 (κινητή φάση) με ροή 2.0 mL/min, μέχρι την απομάκρυνση από τη στήλη των μη δεσμευμένων μορίων. Ακολούθησε έκλυση των δεσμευμένων στη στήλη μορίων με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος 20 mM Tris-HCl + 0.5 M NaCl και διαβάθμιση συγκέντρωσης NaCl από 0-0.5 M. Η ροή ρυθμίστηκε στα 2.0 mL/min και τα κλάσματα συλλέγονταν ανά 4 min. Σε κάθε κλάσμα μετρήθηκε η δραστηριότητα της αμινοπεπτιδάσης PepX (Παρ. 4.2.6.1., 4.3.6.1.). Τα κλάσματα, με δραστηριότητα PepX συλλέχθηκαν, συμπυκνώθηκαν και αποθηκεύτηκαν στους -40°C. Η ανωτέρω χρωματογραφία ανιοντοανταλλαγής πραγματοποιήθηκε δύο φορές για την επίτευξη μεγαλύτερου βαθμού καθαρότητας του εξεταζόμενου ενζύμου.

Ακολούθησε χρωματογραφία μοριακής διήθησης. Η τεχνική του καθαρισμού ενζύμων με μοριακή διήθηση βασίζεται στο διαχωρισμό των μορίων ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Στη συγκεκριμένη τεχνική γίνεται χρήση υλικών που διογκώνονται στο νερό και σχηματίζουν πηκτές με πόρους διαφόρων μεγεθών. Τα μόρια που λόγω μεγέθους δε μπορούν να εισχωρήσουν στους πόρους των σωματιδίων της πηκτής, κυκλοφορούν μόνο στην κινητή φάση της στήλης και εκλούνται πρώτα. Τα μικρότερα μόρια όμως μπορούν να εισχωρήσουν στους πόρους των σωματιδίων της πηκτής (κυκλοφορούν δηλαδή και στη στατική και στην κινητή φάση της στήλης). Συγκρατούνται λιγότερο ή περισσότερο με το μέγεθος και το σχήμα τους, με αποτέλεσμα να επιβραδύνεται η κίνησή τους προς τα κάτω και να εκλούνται σε χρόνο ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Η χρωματογραφία μοριακής διήθησης πραγματοποιήθηκε με προσαρμογή στο σύστημα FPLC, στήλης Sephacryl S-300 (GE Healthcare, USA) υψηλής ανάλυσης. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM (pH 7.0) χρησιμοποιήθηκε για την ισορρόπηση της στήλης. 4 mL ενζυμικού διαλύματος φορτώθηκαν στη στήλη μετά από διήθηση με χρήση φίλτρου σύριγγας 0.2 μm. Η ροή ρυθμίστηκε στο 1 mL/min και τα κλάσματα συλλέγονταν ανά 3 min. Τα κλάσματα με δραστηριότητα PepX συλλέχθηκαν, συμπυκνώθηκαν και αποθηκεύτηκαν στους -40°C.

Η αμινοπεπτιδάση PepX καθαρίστηκε περαιτέρω μέσω χρωματογραφίας υδροξυαπατίτη. Ο υδροξυαπατίτης είναι η κρυσταλλική μορφή του φωσφορικού ασβεστίου ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Όταν μία πρωτεΐνη προστίθεται σε υδροξυαπατίτη, οι θετικά φορτισμένες αμινομάδες στην επιφάνεια της πρωτεΐνης έλκονται από τα φωσφορικά ανιόντα ενώ απωθούνται από τα κατιόντα ασβεστίου. Επιπλέον, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φωσφορικών ομάδων και των κατιόντων ασβεστίου με τις καρβοξυλικές ομάδες της πρωτεΐνης εμφανίζονται αρκετά ισχυρότερες από μία απλή ηλεκτροστατική έλξη (Bonner, 2007) και η πρωτεΐνη εκλύεται με διάλυμα αυξανόμενης συγκέντρωσης φωσφορικών. Η χρωματογραφία υδροξυαπατίτη πραγματοποιήθηκε με προσαρμογή στο σύστημα FPLC στήλης διαστάσεων 2.5 x 10 cm (Biogel, HT). Η στήλη εκπλενόταν με 30 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH 7.0, 50 mM NaCl και 5 mM MgCl_2 (Διάλυμα A) (κινητή φάση) με ροή 2.0 mL/min. Ακολούθησε έκλυση των δεσμευμένων στη στήλη μορίων με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 0.5 M, 50 mM NaCl και διαβάθμιση της συγκέντρωσης από 0 έως 0.5 M. Η ροή ρυθμίστηκε στο 1.0 mL/min και τα κλάσματα συλλέγονταν ανά 2.5 min. Τα κλάσματα με δραστηριότητα PepX συλλέχθηκαν, συμπυκνώθηκαν και αποθηκεύτηκαν στους -40°C.

Στο τέλος της κάθε μεθόδου χρωματογραφίας, πραγματοποιούνταν μέτρηση της δραστηριότητας της PepX καθώς και μέτρηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης μέσω της μεθόδου Bradford (Bradford et al., 1976). Η καθαρότητα του ενζύμου ελέγχθηκε μέσω ηλεκτροφόρησης (Παρ. 4.3.6.2.).

4.3.5. Πειραματική Διαδικασία

4.3.5.1. Θερμική επεξεργασία της αμινοπεπτιδάσης PepX

Μελετήθηκε η επίδραση των θερμοκρασιών 30, 40, 50 και 60°C για 0-60 min, στη δραστηριότητα της καθαρής αμινοπεπτιδάσης PepX. Για το σκοπό αυτό, 15 μ L διαλύματος καθαρού ενζύμου σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7.0, συσκευάζονταν σε φακελάκια πολυπροπυλενίου 0.5 mL, τα οποία βυθίζονταν σε υδατόλουτρο (WB/OB 7-45, MEMMERT GmbH + Co. KG, Schwabach, Germany) που είχε ρυθμιστεί στην επιθυμητή θερμοκρασία (ακρίβεια $\pm 0.1^\circ\text{C}$). Τα δείγματα παρέμεναν για 30 s μέσα στο υδατόλουτρο, προκειμένου να επιτευχθεί ισορροπία της θερμοκρασίας των διαλυμάτων μέσα στα φακελάκια με τη θερμοκρασία του νερού του υδατόλουτρου ($t = 0$). Για τον έλεγχο της θερμοκρασίας των δειγμάτων κατά τη θερμική επεξεργασία τους υπήρχε ένα επιπλέον φακελάκι με ενζυμικό διάλυμα, το οποίο χρησιμοποιείται ως δείγμα αναφοράς και στο οποίο γινόταν συνεχής καταγραφή της θερμοκρασίας ανά 2 s, με χρήση θερμοστοιχείου τύπου T συνδεδεμένου σε κατάλληλο καταγραφικό (CR10X, Campbell Scientific, Leicestershire, UK). Σε κάθε χρονική στιγμή, κάθε δείγμα τοποθετούνταν σε παγόλουτρο για ταχεία ψύξη, ώστε να αποφευχθεί πρόσθετη απενεργοποίησή του. Μετά την ολοκλήρωση της θερμικής κατεργασίας του ενζύμου, ακολουθούσε η μέτρηση της εναπομένουσας δραστηριότητας των ενζύμων σε όλα τα δείγματα, όπως περιγράφεται στις αναλυτικές μεθόδους.

4.3.5.2. Επεξεργασία της αμινοπεπτιδάσης PepX με ΥΠ

Μελετήθηκε η επίδραση της ΥΠ 100, 200, 300 και 450 MPa σε συνδυασμό με ήπιες θερμοκρασίες 20, 30 και 40°C για 0-30 min, στη δραστηριότητα της καθαρής αμινοπεπτιδάσης PepX. Για κάθε συνθήκη επεξεργασίας, 1 mL διαλύματος καθαρού ενζύμου σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7.0, συσκευάστηκε υπό κενό σε φακελάκια πολυπροπυλενίου (PP film) όγκου 2.0 mL. Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκε η μονάδα Food Pressure Unit FPU 1.01 (Food Pressure Unit FPU 1.01, Resato International BV, Roden, Holland) (Παρ. 4.2.5.1.1).

4.3.6. Αναλυτικές Μέθοδοι

4.3.6.1. Μέθοδος μέτρησης της δραστηριότητας της αμινοπεπτιδάσης PepX

Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της PepX χρησιμοποιήθηκε το υπόστρωμα, Gly-Pro-p-NA (Christensen et al., 1999; Malone et al., 2003). Η μέτρηση της δραστηριότητας της αμινοπεπτιδάσης πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο που περιεγράφηκε από τους Mierau et al., (1996) και Vesanto et al., (1995), όπως τροποποιήθηκε από τους Malone et al., (2003) (βλ. Παρ.4.2.6.1.).

4.3.6.2. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου SDS-PAGE πεπτιδάσης PepX υπό αποδιατακτικές συνθήκες και ηλεκτροφόρηση NATIVE-PAGE

Για τον έλεγχο καθαρότητας του ενζύμου πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση με χρήση της μεθόδου SDS-PAGE. Ειδικότερα, χρησιμοποιήθηκε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 4–20% Mini-PROTEAN TGX™ precast (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) σε σύστημα Mini-PROTEAN Tetra (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) (Εικόνα 4.10).



Εικόνα 4.10. Πειραματική διάταξη ηλεκτροφόρησης πήγματος ακρυλαμιδίου

Η αρχή της μεθόδου αυτής στηρίζεται στο διαχωρισμό των πρωτεϊνών ανάλογα με το μοριακό τους μέγεθος. Στο συγκεκριμένο είδος ηλεκτροφόρησης ως αποδιατακτικό μέσο χρησιμοποιείται το ανιονικό απορρυπαντικό SDS, (μετά νατρίου άλας του θειικού δωδεκυλίου). Το SDS δεσμεύεται στις πρωτεΐνες με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και τις αποδιατάσσει. Έτσι, δημιουργούνται επιμήκη μόρια, αρνητικά φορτισμένα, με σαφή και καθορισμένη δομή. Επειδή το φορτίο ανά μονάδα μάζας είναι περίπου σταθερό και οι υδροδυναμικές ιδιότητες είναι συνάρτηση μόνο του μοριακού μεγέθους, η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων, κάτω από αυτές τις συνθήκες, εξαρτάται αποκλειστικά από το μοριακό μέγεθος.

Τα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα (~1-5 μg πρωτεΐνης) όγκου 15 μL αναμίχθηκαν με 7 μL ρυθμιστικού διαλύματος δείγματος (1 g SDS, 5 mL 0.25 M Tris pH 6.8, 2.5mL 50% (w/w) γλυκερόλη, 2.5 mL μερκαπτοαιθανόλη, 4 mL 0.1% (w/v) κυανούν βρωμοφαινόλης, pH 6.8) και ακολούθησε βρασμός για 5-7 min. Στη συνέχεια τα δείγματα καθώς και 5-7 μL πρότυπου διαλύματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (Unstained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas) (β -γαλακτοζιδάση-116 kDa, αλβουμίνη ορού βοδινού-66.2 kDa, αλβουμίνη ασπράδι-45.0 kDa, γαλακτική αφυδρογονάση-35.0 kDa, REase Bsp98I-25.0 kDa, β -λακτογλοβουλίνη-18.4 kDa, λυσοζύμη-14.4 kDa) τοποθετήθηκαν στις θέσεις-βοθρία της πηκτής και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση με 35 mA/πηκτή για περίπου 1 h. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης η πηκτή απομακρύνθηκε από τις γυάλινες πλάκες και εμβαπτίστηκε στο διάλυμα χρωματισμού (40% (v/v) μεθανόλη, 10% (v/v) οξικό οξύ, 0.4% (w/v) Coomassie G-250) όπου παρέμεινε για περίπου 20 min υπό ήπια ανάδευση. Ακολούθησε αποχρωματισμός και εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών με συνεχείς πλύσεις σε διάλυμα αποχρωματισμού (40% (v/v) μεθανόλη, 10% (v/v) οξικό οξύ).

Για τον προσδιορισμό του αριθμού των υπομονάδων του ενζύμου πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση υπό συνθήκες μη αποδιάταξης (NATIVE-PAGE). Στη συγκεκριμένη ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους της εταιρίας Sigma-Aldrich, αποτελούμενα από carbonic anhydrase, bovine (29 kDa), albumin, egg (45 kDa), albumin, bovine (66 kDa), phosphorylase b., rabbit (97 kDa), β -galactosidase, *E. coli* (116 kDa) και myosin (200 kDa).

4.3.6.3. Μελέτη της δομής της αμινοπεπτιδάσης PepX με τη χρήση της φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού (CD)

Οι μόνιμες δομικές μεταβολές της καθαρής αμινοπεπτιδάσης PepX μετά από επεξεργασία σε κατάλληλους συνδυασμούς των παραμέτρων της πίεσης, της θερμοκρασίας και του χρόνου, διερευνήθηκαν με φασματομετρία κυκλικού διχρωισμού. Τα φάσματα CD όλων των δειγμάτων ελήφθησαν ακριβώς μετά την επεξεργασία τους με χρήση του φασματοφωτοπολαρίμετρου J-715 (Jasco, Japan) εξοπλισμένο με σύστημα θερμοστάτη Peltier στους 25°C. Το φασματοφωτοπολαρίμετρο Jasco J-715 (Εικόνα 4.11) ανήκει στο Εργαστήριο Βιομοριακής Φυσικής, του Ινστιτούτου Ραδιοϊσοτόπων και Ραδιοδιαγνωστικών Προϊόντων, του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος. Ο συγκεκριμένος εξοπλισμός χρησιμοποιήθηκε τόσο για τη μελέτη της δευτεροταγούς και τριτοταγούς δομής του επεξεργασμένου ενζύμου με ΥΠ όσο και για τα πειράματα θερμικής αποδιάταξής της.



Εικόνα 4.11. Φασματοπολαρίμετρο Jasco J-715

Τα προς ανάλυση δείγματα αποτελούνταν από PepX σε 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών με τιμή pH 7.0 και με συγκέντρωση πεπτιδάσης στο διάλυμα να κυμαίνεται στο εύρος 0.05–0.45 mg/mL. Για την ανάλυση της πεπτιδάσης στο άπω (200 - 260 nm) και άνω (260-340 nm) υπεριώδες, χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα χαλαζία Quartz SUPRASIL (HELLMA, Germany) πάχους 0.1 και 1 cm, αντίστοιχα. Κάθε δείγμα σαρώθηκε από πέντε έως οκτώ φορές με βήμα αύξησης μήκους κύματος 0.2 nm σε ρυθμό 50 nm·min⁻¹, χρόνο απόκρισης 2 s και εύρος μήκους κύματος 2 nm.

Για τη μελέτη της δευτεροταγούς και τριτοταγούς δομής του ενζύμου, αρχικά από τα φάσματα που ελήφθησαν αφαιρέθηκε το φάσμα του ρυθμιστικού διαλύματος, ενώ στη συνέχεια κατασκευάστηκαν διαγράμματα με χρήση του προγράμματος ORIGIN 8.0 (OriginLab Corporation, USA). Για την ανάλυση της δευτεροταγούς δομής (άπω υπεριώδες) της πεπτιδάσης χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό CDNN (Institut für Biotechnologie, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg).

Όσον αφορά τα πειράματα θερμικής αποδιάταξης χρησιμοποιήθηκε ποσότητα 0.5 mL διαλύματος σε συγκέντρωση 0.3 mg/mL. Η θερμοκρασία μεταβαλλόταν από 25 έως 90°C με ρυθμό θέρμανσης 2°C/min.

4.3.7. Ανάλυση Δεδομένων

Οι τιμές δραστηριότητας του επεξεργασμένου καθαρού ενζύμου που προέκυψαν (μέσος όρος μετρήσεων τριών δειγμάτων για κάθε συνθήκη επεξεργασίας για το καθένα από τα μελετώμενα στελέχη) τόσο στην περίπτωση της θερμικής επεξεργασίας όσο και στην περίπτωση της επεξεργασίας με ΥΠ και θερμοκρασία, αντιπαρατάχθηκαν διαγραμματικά με το χρόνο επεξεργασίας. Η στατιστική επεξεργασία των καμπυλών ενεργοποίησης / απενεργοποίησης των ενζύμων, που προέκυψαν, πραγματοποιήθηκε μέσω μη γραμμικής παλινδρόμησης με εφαρμογή του προγράμματος SYSTAT 10.2 (SYSTAT 10.2 Statistics, 2002, SPCC Inc., Chicago, IL, USA). Η εξάρτηση των ρυθμών ενεργοποίησης/απενεργοποίησης από παραμέτρους επεξεργασίας, περιεγράφηκε μέσω κατάλληλων μαθηματικών εξισώσεων, στατιστικά επεξεργασμένων με εφαρμογή γραμμικής είτε παλινδρόμησης.

4.3.7.1. Επίδραση της θερμοκρασίας στο ρυθμό απενεργοποίησης και επίδραση της ΥΠ στο ρυθμό ενεργοποίησης/απενεργοποίησης της καθαρής PerX

Τόσο η ενεργοποίηση όσο και η απενεργοποίηση της καθαρής PerX ακολούθησαν κινητική 1ης τάξης της μορφής:

$$\frac{A}{A_0} = e^{k \cdot t} \quad (\text{Εξίσωση 4.1})$$

Όπου, A η δραστηριότητα της αμινοπεπτιδάσης μετά από χρόνο επεξεργασίας t (min), A₀ η αρχική δραστηριότητα του ενζύμου (t=0 min) και k η σταθερά του ρυθμού ενεργοποίησης (+) / απενεργοποίησης (-) του ενζύμου (min⁻¹).

Οι σταθερές των ρυθμών μεταβολής της δραστηριότητας των ενζύμων υπολογίστηκαν με γραμμικοποίηση της Εξίσωσης 4.1 και χρήση γραμμικής παλινδρόμησης.

Η εξάρτηση του ρυθμού ενεργοποίησης/απενεργοποίησης των αμινοπεπτιδασών (k) από τη θερμοκρασία εκφράστηκε μέσω της ενέργειας ενεργοποίησης (E_a) με χρήση της εξίσωσης Arrhenius (Εξίσωση 4.2).

$$k_T = k_{T_{ref}} \cdot \exp \left[\left(-\frac{E_a}{R} \right) \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \right] \quad (\text{Εξίσωση 4.2})$$

Όπου, k_T η σταθερά του ρυθμού μεταβολής της δραστηριότητας του ενζύμου σε θερμοκρασία επεξεργασίας T (K), k_{T_{ref}} η σταθερά του ρυθμού μεταβολής της δραστηριότητας του ενζύμου στη θερμοκρασία αναφοράς T_{ref} = 293.15 K (20°C), E_a η ενέργεια ενεργοποίησης (J/mol) και R η παγκόσμια σταθερά των αερίων (8.314 J·mol⁻¹·K⁻¹).

4.4. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΠΙΕΣΗΣ ΚΑΙ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΣΤΟ ΦΟΡΤΙΟ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΟΞΙΝΙΣΗΣ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105, *S. thermophilus* ACA-DC 0022 και *L. lactis* ACA-DC 0049

4.4.1. Εισαγωγή - Σκοπός

Τα γαλακτικά βακτήρια στην τυροκομία έχουν δύο ρόλους. Ο ένας έχει ήδη αναφερθεί και μελετηθεί και αφορά στα ένζυμα που εσωκλείουν τα οποία προκαλούν την υδρόλυση πεπτιδίων προς παραγωγή ελεύθερων αμινοξέων με αποτέλεσμα να συμβάλλουν στη δημιουργία των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του τυριού κατά το στάδιο της ωρίμανσης. Ο ουσιαστικός όμως λόγος για τον οποίο χρησιμοποιούνται στην τυροκομία είναι η ζύμωση της λακτόζης και η παραγωγή γαλακτικού οξέος με αποτέλεσμα από τη μία πλευρά την παρεμπόδιση της ανάπτυξης ανεπιθύμητων βακτηρίων και από την άλλη την ανάπτυξη των φυσικοχημικών, δομικών και οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του τυριού εξαιτίας της μείωσης του pH.

Έχει παρατηρηθεί ότι η επεξεργασία των οξυγαλακτικών καλλιέργειών με ΥΠ μπορεί να συντελέσει σε μερική μετουσίωση των κυττάρων, με άμεσο αποτέλεσμα τη μείωση της ικανότητάς τους να παράγουν γαλακτικό οξύ, ανάλογα με τις συνθήκες επεξεργασίας (Miyakawa et al., 1994; Casal & Gomez, 1999; Malone et al., 2003).

Εξαιρετικό ενδιαφέρον εμφανίζει η χρήση γαλακτικών βακτηρίων εκκίνησης τα οποία δε θα παράγουν γαλακτικό οξύ, αλλά θα προστίθενται κατά την τυροκόμηση ως φορέας σημαντικών ενζύμων, έχοντας ως στόχο την επιτάχυνση της ωρίμανσης και τη βελτίωση των χαρακτηριστικών του τυριού.

Σκοπός της έρευνας ήταν η μερική ή ολική αδρανοποίηση οξυγαλακτικών στελεχών και η μείωση της ικανότητάς τους για παραγωγή γαλακτικού οξέος. Απώτερος στόχος ήταν η πιθανή χρήση τους στην παρασκευή λευκού τυριού άλμης τύπου Φέτα ως κύτταρα αδρανή ως προς την παραγωγή οξέος αλλά ταυτόχρονα ως φορέων σημαντικών για την εξέλιξη της ωρίμανσης του τυριού ενζύμων. Οι συγκεκριμένες καλλιέργειες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν παράλληλα με συμβατικές καλλιέργειες για προσθήκη επιπλέον ποσότητας ενζύμων απαραίτητων για την ωρίμανση του τυριού, χωρίς την αρνητική επίδραση της έντονης οξίνισης.

Αντικείμενο του συγκεκριμένου σταδίου της έρευνας αποτέλεσε η διερεύνηση της επίδρασης διαφόρων συνδυασμών ΥΠ και ήπιων θερμοκρασιών στην ικανότητα οξίνισης των οξυγαλακτικών στελεχών *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105, *S. thermophilus* ACA-DC 0022 και *L. lactis* ACA-DC 0049 καθώς και στο φορτίο τους.

4.4.2. Αναμενόμενα Αποτελέσματα Έρευνας

Τα αποτελέσματα του συγκεκριμένου σταδίου αναμένεται να οδηγήσουν στη γνώση εκείνων των συνθηκών επεξεργασίας με ΥΠ που προκαλούν αδρανοποίηση ή τροποποιούν δραστικά το ενζυμικό τους σύστημα των συγκεκριμένων στελεχών. Ο σκοπός του σταδίου αυτού της μελέτης είναι να καθορισθούν οι συνθήκες εκείνες που αδρανοποιούν ένζυμα που σχετίζονται με την οξυπαραγωγική ικανότητα χωρίς όμως να επηρεάζουν την πεπτιδασική δραστηριότητα των μικροοργανισμών. Η διερεύνηση αυτή έχει ως στόχο τη χρήση αυτών των καλλιεργειών ως επιπρόσθετων (συμπληρωματικών) στο προς τυροκόμηση γάλα έτσι ώστε να μην παράγεται επιπλέον γαλακτικό οξύ, που θα μπορούσε να επιφέρει αρνητικά αποτελέσματα στα φυσικοχημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος, αλλά θα αποτελούν φορείς σημαντικών για το τυρί ενζύμων

(αμινοπεπτιδασών). Τα πρόσθετα ένζυμα αναμένεται να αποτελέσουν παράγοντες μείωσης του χρόνου ωρίμανσης του προϊόντος και βελτίωσης των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του.

4.4.3. Σχεδιασμός Πειράματος

Στόχος του τρίτου σταδίου ήταν η μελέτη της μεταβολής του φορτίου και της ικανότητας οξίνισης των οξυγαλακτικών καλλιέργειών των μικροοργανισμών εκκίνησης *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105, *S. thermophilus* ACA-DC 0022 και *L. lactis* ACA-DC 0049 μετά από επεξεργασία τους με ΥΠ στο εύρος πιέσεων 0.1-450 MPa σε συνδυασμό με θερμοκρασίες 20-40°C και σε χρόνους επεξεργασίας 0-40 min.

Η συγκεκριμένη έρευνα πραγματοποιήθηκε για δύο βασικούς λόγους. Ο πρώτος λόγος αφορά τη χρήση στην τυροκόμηση μικροοργανισμών εκκίνησης, (επιπρόσθετα στην καλλιέργεια εκκίνησης) αδρανοποιημένων ως προς την παραγωγή γαλακτικού οξέος, ως φορέων σημαντικών ενζύμων για τα χαρακτηριστικά του τυριού. Για το λόγο αυτό μελετήθηκε η επίδραση της ΥΠ ξεχωριστά σε κάθε έναν από τους τρεις μικροοργανισμούς. Ο δεύτερος λόγος αφορούσε τον υπολογισμό της ποσότητας της επεξεργασμένης στις βέλτιστες συνθήκες ΥΠ-θερμοκρασίας καλλιέργειας εκκίνησης, η οποία θα πρέπει να προστεθεί κατά την τυροκόμηση του τελευταίου σταδίου της έρευνας, έτσι ώστε η οξίνιση του τυροπήγματος να είναι αντίστοιχη με εκείνη που θα επέφερε η ανεπεξέργαστη καλλιέργεια. Για το δεύτερο λόγο η έρευνα πραγματοποιήθηκε και σε καλλιέργεια συναποτελούμενη από τους τρεις μικροοργανισμούς στην αναλογία της προστιθέμενης καλλιέργειας κατά την τυροκόμηση.

Για τη μελέτη της επίδρασης της ΥΠ στο φορτίο των οξυγαλακτικών βακτηρίων, αρχικά πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη των βακτηρίων αυτών σε γάλα υπό κατάλληλες συνθήκες. Μετά από την επεξεργασία τους σε διάφορες συνθήκες ΥΠ-θερμοκρασίας ακολουθούσε μικροβιολογική ανάλυση των επεξεργασμένων δειγμάτων και καταμέτρηση μετά από τον απαραίτητο για την ανάπτυξή τους χρόνο. Με χρήση των αποτελεσμάτων και κατάλληλων μαθηματικών εξισώσεων, υπολογίστηκαν οι ρυθμοί και τα κινητικά χαρακτηριστικά της απενεργοποίησης των επεξεργασμένων μικροοργανισμών.

Για τη μελέτη της επίδρασης της ΥΠ στην ικανότητα οξίνισης των μικροοργανισμών, τα βακτήρια επεξεργάστηκαν στο προαναφερόμενο εύρος συνθηκών (0.1-450 MPa, 20-40°C, 0-40 min). Ακολούθησε επώαση σε κατάλληλο περιβάλλον και κάτω από κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας και ανά τακτά χρονικά διαστήματα πραγματοποιούνταν μέτρηση της τιμής pH. Με χρήση των αποτελεσμάτων και κατάλληλων μαθηματικών εξισώσεων, υπολογίστηκαν οι ρυθμοί μεταβολής της παραγόμενης ποσότητας οξέος των επεξεργασμένων και ανεπεξέργαστων μικροοργανισμών.

Όλα τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν με χρήση κατάλληλων εξισώσεων και λογισμικών, ενώ πραγματοποιήθηκε και στατιστική επεξεργασία.

4.4.4. Πρώτες Ύλες, Χημικά Αντιδραστήρια και Υλικά Συσκευασίας

4.4.4.1. Ανάπτυξη των οξυγαλακτικών στελεχών *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105, *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0022 και *Lactococcus lactis* ACA-DC 0049

Οι μικροοργανισμοί που μελετήθηκαν ήταν οι *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105, *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0022 και *Lactococcus lactis* ACA-DC 0049 (όλα τα στελέχη απομονώθηκαν από τυρί Φέτα στο Εργαστήριο Γαλακτοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, Ελλάδα και ανήκουν στη συλλογή ACA-DC του ίδιου Εργαστηρίου). Η ανάπτυξη του μικροοργανισμού *L. bulgaricus* πραγματοποιήθηκε σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα MRS-Broth (1.10661, Merck, Germany) υπό αναερόβιες συνθήκες και σε θερμοκρασία 45°C, ενώ η ανάπτυξη των μικροοργανισμών *S. thermophilus* και *L. lactis* πραγματοποιήθηκε σε υπόστρωμα M-17 Broth (1.15029, Merck, Germany) υπό αερόβιες συνθήκες στους 37°C.

Η ανάπτυξη των βακτηρίων συσχετίστηκε με την αύξηση της απορρόφησης, $A_{600\text{nm}}$, στα 600 nm. Τα βακτήρια λαμβάνονταν για περαιτέρω πειράματα στο τέλος της εκθετικής φάσης ανάπτυξής τους (περίπου 10^8 CFU/g, με αντίστοιχη απορρόφηση $A_{600\text{nm}}=4.2$).

4.4.4.2. Προετοιμασία δείγματος προς επεξεργασία με ΥΠ

Στην περίπτωση της μελέτης των μεμονωμένων οξυγαλακτικών καλλιιεργειών, σε ποσότητα 10 mL από την κάθε καλλιέργεια και για την κάθε μελετώμενη συνθήκη επεξεργασίας πραγματοποιούνταν φυγοκέντρηση ($1125 \times g$, 10 min) και μετά από διπλή έκπλυση των κυττάρων με 20 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων (αναλογία διαλυμάτων $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$) τιμής pH 7.0, γινόταν επαναδιάλυση των κυττάρων σε τελικό όγκο 10 mL αποστειρωμένου, ανασυσταμένου γάλακτος από σκόνη (spray skimmed milk powder), 10% ολικών στερεών, 1,5% σε λιπαρά Στην περίπτωση της μελέτης της συνολικής καλλιέργειας, η διαδικασία αυτή πραγματοποιούνταν σε ποσότητα 10 mL καλλιέργειας αποτελούμενης από 50% *L. lactis* ACA-DC 0049 και 50% *L. bulgaricus* ACA-DC 0105 / *S. thermophilus* ACA-DC 0022 σε αναλογία 1:1.

Για την επεξεργασία με ΥΠ, τα δείγματα συσκευάζονταν σε αποστειρωμένη υπό UV ακτινοβολία συσκευασία από κατάλληλο πολυστρωματικό υλικό (πολυπροπυλένιο (PP) – πολυαιθυλένιο (PE)).

4.4.5. Πειραματική Διαδικασία

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων με ΥΠ χρησιμοποιήθηκε η συστοιχία των 6 κυλινδρικών μικροθαλάμων υπερυψηλής πίεσης, χωρητικότητας 42 mL ο καθένας, της μονάδα Food Pressure Unit FPU 1.01, της Resato International BV (Roden, Holland) (Εικόνες 4.1, 4.3)

Εφαρμόστηκαν πιέσεις 0.1, 100, 200, 300 και 450 MPa, σε συνδυασμό με ήπιες θερμοκρασίες 20, 30 και 40°C και σε χρόνους επεξεργασίας που κυμάνθηκαν από 0-40 min.

4.4.6. Αναλυτικές Μέθοδοι

4.4.6.1. Μέθοδος καταμέτρησης του φορτίου των οξυγαλακτικών καλλιιεργειών

Μετά από την επεξεργασία των δειγμάτων ακολουθούσε μικροβιολογική ανάλυση. Για τον προσδιορισμό του στελέχους *L. bulgaricus* ACA-DC 0105, χρησιμοποιήθηκε το επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα de Man-Rogosa and Sharpe's-Agar (MRS). Ακολουθήθηκε η τεχνική της ενσωμάτωσης με διπλό στρώμα για αναερόβιες συνθήκες. Πραγματοποιήθηκαν διπλές μετρήσεις για κάθε αραίωση.

Για τον προσδιορισμό των στελεχών *S. thermophilus* ACA-DC 0022 και *L. lactis* ACA-DC 0049 χρησιμοποιήθηκε το επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα M17-Agar (1.15029, Merck, Germany). Ακολουθήθηκε η τεχνική επιφανειακής ανάπτυξης σε διπλά τρυβλία (spread plate count). Όλα τα τρυβλία αποθηκεύονταν για 3 d στους 30°C.

4.4.6.2. Μέθοδος προσδιορισμού της ικανότητας οξίνισης των μικροοργανισμών

Η ικανότητα οξίνισης των επεξεργασμένων με ΥΠ και ανεπεξέργαστων μικροοργανισμών, ελέγχθηκε μέσω μέτρησης του pH κατά τη διάρκεια του χρόνου. Η μέτρηση του pH γινόταν σε αποστειρωμένο, ανασυσταμένο διάλυμα σκόνης γάλακτος 10% ολικών στερεών και 1.5% λίπους, το οποίο εμβολιαζόταν σε ποσότητα 4% v/v με τον επεξεργασμένο κάθε φορά μικροοργανισμό. Τα δείγματα καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος επωάζονταν στους 45°C για το μικροοργανισμό *L. bulgaricus* και υπό αναερόβιες συνθήκες και στους 37°C, για τους μικροοργανισμούς *S. thermophilus* και *L. lactis* υπό αερόβιες συνθήκες. Στην περίπτωση της συνολικής καλλιέργειας η επώαση γινόταν στους 37°C.

4.4.7. Ανάλυση Δεδομένων

4.4.7.1. Μελέτη της μεταβολής του φορτίου των επεξεργασμένων με ΥΠ των στελεχών *L. bulgaricus* ACA-DC 0105, *S. thermophilus* ACA-DC 0022 και *L. lactis* ACA DC 0049

Η μεταβολή του φορτίου (logcfu/g) των κυττάρων με το χρόνο επεξεργασίας μετά από εφαρμογή ΥΠ 100-450 MPa και για θερμοκρασίες επεξεργασίας 20-40°C, απεικονίστηκε διαγραμματικά για κάθε μία από τις καλλιέργειες των τριών μικροοργανισμών.

Η μεταβολή του μικροβιακού φορτίου μοντελοποιήθηκε με χρήση της εξίσωσης Baranyi (Baranyi et al., 1994) βάσει της οποίας υπολογίστηκαν οι σταθερές των ρυθμών μεταβολής του φορτίου για κάθε μία από τις καλλιέργειες των τριών μικροοργανισμών σε όλες τις συνθήκες επεξεργασίας.

Η εξάρτηση του ρυθμού μείωσης του φορτίου (απενεργοποίηση) των κυττάρων (k) από τη θερμοκρασία εκφράστηκε μέσω της ενέργειας ενεργοποίησης (E_a) με χρήση της εξίσωσης Arrhenius (Εξίσωση 4.2).

$$k_T = k_{T_{ref}} \cdot \exp \left[\left(-\frac{E_a}{R} \right) \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \right] \quad (\text{Εξίσωση 4.2})$$

Όπου, k_T η σταθερά του ρυθμού απενεργοποίησης του στελέχους σε θερμοκρασία επεξεργασίας T (K), $k_{T_{ref}}$ η σταθερά του ρυθμού απενεργοποίησης του στελέχους στη θερμοκρασία αναφοράς $T_{ref} = 293.15$ K (20°C), E_a η ενέργεια ενεργοποίησης (J/mol) και R η παγκόσμια σταθερά των αερίων (8.314 J·mol⁻¹·K⁻¹).

Η επίδραση της πίεσης επεξεργασίας στην ενέργεια ενεργοποίησης εκφράστηκε μέσω εξίσωσης εκθετικής μορφής (Εξίσωση 4.5).

$$E_a = E_{aP_{ref}} \cdot \exp [B_1 \cdot (P - P_{ref})] \quad (\text{Εξίσωση 4.5})$$

Όπου, E_a η ενέργεια ενεργοποίησης σε πίεση P (MPa), $P_{ref} = 450$ MPa και $E_{aP_{ref}}$ η τιμή της E_a στην πίεση αναφοράς P_{ref} .

Οι παράμετροι της Εξίσωσης 4.5 προσδιορίστηκαν μετά από γραμμικοποίησή της και ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης.

Η εξάρτηση της σταθεράς του ρυθμού απενεργοποίησης (k) των στελεχών από τη θερμοκρασία εκφράστηκε μέσω του όγκου ενεργοποίησης (V_a) με χρήση της εξίσωσης Eyring (Εξίσωση 4.6).

$$k_p = k_{p_{ref}} \cdot \exp\left[\left(-\frac{V_a}{R \cdot T}\right) \cdot (P - P_{ref})\right] \quad (\text{Εξίσωση 4.6})$$

Όπου, k_p η σταθερά του ρυθμού απενεργοποίησης των στελεχών σε πίεση P (MPa), $k_{p_{ref}}$ η σταθερά του ρυθμού απενεργοποίησης των στελεχών στην πίεση αναφοράς $P_{ref} = 450$ MPa, V_a ο όγκος ενεργοποίησης (mL/mol), R η παγκόσμια σταθερά αερίων ($8.314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$) και T (K) η θερμοκρασία επεξεργασίας.

Η εξάρτηση του V_a από τη θερμοκρασία εκφράστηκε μέσω γραμμικής εξίσωσης (Εξίσωση 4.7).

$$V_a = V_{aT_{ref}} - A_1 \cdot (T - T_{ref}) \quad (\text{Εξίσωση 4.7})$$

Όπου, V_a ο όγκος ενεργοποίησης σε θερμοκρασία T , $V_{aT_{ref}}$ ο όγκος ενεργοποίησης στη θερμοκρασία αναφοράς $T_{ref} = 40^\circ\text{C}$ και A_1 σταθερά.

4.4.7.2. Μελέτη της ικανότητας οξίνισης των επεξεργασμένων με ΥΠ οξυγαλακτικών στελεχών *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105, *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0022 και *Lactococcus lactis* ACA-DC 0049

Η μεταβολή της τιμής pH των εμβολιασμένων δειγμάτων γάλακτος με τα στελέχη των *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* και *L. lactis*, επεξεργασμένων σε συνθήκες ΥΠ 200- 450 MPa, σε θερμοκρασίες 20-40°C και για χρόνους επεξεργασίας 0-30 min, απεικονίσθηκαν σχηματικά συναρτήσει του χρόνου επώασης.

Η μεταβολή της τιμής pH με το χρόνο επώασης ακολούθησε κινητική μηδενικής τάξης. Για όλες τις καλλιέργειες και σε όλες τις συνθήκες επεξεργασίας υπολογίστηκαν οι σταθερές του ρυθμού μεταβολής της τιμής pH, με χρήση γραμμικής παλινδρόμησης.

4.5. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΛΕΥΚΟΥ ΤΥΡΙΟΥ ΑΛΜΗΣ ΤΥΠΟΥ ΦΕΤΑΣ ΜΕ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΥΠ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ – ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΥΠ ΣΤΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΚΑΙ ΣΕ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ

4.5.1. Εισαγωγή - Σκοπός

Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, η οποία διαφοροποιείται ανάλογα με το είδος του τυριού, το άγευστο τυρόπηγμα μετατρέπεται σε ένα εύγευστο τελικό προϊόν με ιδιαίτερες ρεολογικές και λειτουργικές ιδιότητες. Οι μεταβολές των ρεολογικών και φυσικών ιδιοτήτων του πήγματος είναι αποτέλεσμα της πρωτεόλυσης, η οποία επιπλέον συμβάλλει στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τυριού, είτε άμεσα (μικρά πεπτιδία, αμινοξέα), είτε έμμεσα δημιουργώντας υποστρώματα για ενζυμικές και χημικές μετατροπές που δίνουν πτητικά αρωματικά συστατικά. Για το λόγο αυτό, το στάδιο της ωρίμανσης θεωρείται από τα βασικότερα στάδια της τυροκόμησης και είναι καθοριστική για την τελική ποιότητα του τυριού. Συνήθως για την ωρίμανση των τυριών απαιτούνται μήνες παραμονής σε συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες, με αποτέλεσμα να απαιτούνται μεγάλα ποσά ενέργειας και κατάλληλα διαμορφωμένοι χώροι, γεγονός που οδηγεί σε μεγάλες οικονομικές επιβαρύνσεις.

Για το λόγο αυτό μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον παρουσιάζει η επίδραση της ΥΠ σε παράγοντες ωρίμανσης διαφόρων τύπων τυριών, με στόχο την επιτάχυνσή της (Yokoyama et al., 1992; O'Reilly et al. 2000; Capellas et al., 2001; Maniou et al. 2013).

Σκοπός της έρευνας ήταν η μείωση του μεγάλου και κοστοβόρου χρόνου ωρίμανσης καθώς και η παρασκευή λευκού τυριού άλμης με βελτιωμένα οργανοληπτικά και χαρακτηριστικά υφής. Για το λόγο αυτό, στην παρούσα διατριβή έχοντας ως τελικό στόχο την επιτάχυνση της ωρίμανσης και τη βελτίωση των οργανοληπτικών, φυσικοχημικών και δομικών χαρακτηριστικών λευκού τυριού άλμης τύπου Φέτας, στο τελικό στάδιο επιχειρήθηκε η εφαρμογή των αποτελεσμάτων της έρευνας μέσω παρασκευής του συγκεκριμένου τυριού σε μικρή κλίμακα, στην παραγωγική διαδικασία του οποίου εντάχθηκε η επεξεργασία με ΥΠ.

4.5.2. Αναμενόμενα Αποτελέσματα Έρευνας

Από τα αποτελέσματα του συγκεκριμένου τμήματος της μελέτης, στο οποίο συναθροίζεται η γνώση όλων των επιμέρους σταδίων, αναμένεται να προκύψουν και να επιβεβαιωθούν όλα τα οφέλη όπως θα έχουν προκύψει από τις τρεις πρώτες ενότητες, όπως η μείωση του χρόνου του σταδίου ωρίμανσης και η βελτίωση των οργανοληπτικών, φυσικοχημικών και δομικών χαρακτηριστικών του λευκού τυριού άλμης τύπου Φέτας.

4.5.3. Σχεδιασμός Πειράματος

Στόχος του τέταρτου και τελευταίου σταδίου της μελέτης ήταν η εφαρμογή της γνώσης που προέκυψε από την έρευνα που προηγήθηκε, στην παρασκευή σε μικρή κλίμακα λευκού τυριού άλμης τύπου Φέτας. Κατά την τυροκόμηση προστέθηκε ως στάδιο η εφαρμογή της ΥΠ. Η ΥΠ εφαρμόστηκε είτε στην καλλιέργεια εκκίνησης που προστέθηκε κατά την τυροκόμηση, είτε στο ίδιο το τυρί.

Αναλυτικότερα, παρασκευάστηκαν για μελέτη και σύγκριση, τέσσερα λευκά τυριά άλμης από πρόβειο γάλα τύπου Φέτας, τα οποία κωδικοποιήθηκαν ως Control, HPC, HPA και HPB. Η παρασκευή των τυριών πραγματοποιήθηκε δύο φορές.

Κατά την παρασκευή και των τεσσάρων τυριών η καλλιέργεια εκκίνησης που προστέθηκε αποτελούνταν από τις ήδη μελετημένες οξυγαλακτικές καλλιέργειες των μικροοργανισμών εκκίνησης

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105, *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0022 και *Lactococcus lactis* ACA-DC 0049.

Με την ονομασία **Control** αναφέρεται το τυρί αναφοράς το οποίο παρασκευάστηκε με τη μέθοδο παρασκευής του τυριού Φέτα (προσθήκη καλλιέργειας εκκίνησης 2% v/v).

Το 50% της παρασκευής τυριού Control επεξεργάστηκε με ΥΠ στις βέλτιστες συνθήκες που προέκυψαν από την έρευνα (200 MPa, 20°C, 20 min). Το τυρί αυτό αναφέρεται ως **HPC**.

Ως **HPA** αναφέρεται το τυρί κατά την τυροκόμηση του οποίου το 60% της καλλιέργειας εκκίνησης που προστέθηκε (2.5% v/v) ήταν επεξεργασμένο με ΥΠ (200 MPa, 20°C, 20 min).

Ως **HPB** αναφέρεται το τυρί κατά την τυροκόμηση του οποίου ολόκληρη η καλλιέργεια εκκίνησης που προστέθηκε (3% v/v) επεξεργάστηκε με ΥΠ (200 MPa, 20°C, 20 min).

Μετά το στάδιο της παρασκευής τα τυριά αποθηκεύτηκαν σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 18°C για την πρώτη φάση της ωρίμανσης. Μετά από κατάλληλο χρονικό διάστημα ακολούθησε τεμαχισμός, συσκευασία με προσθήκη άλμης και αποθήκευση των τυριών σε θάλαμο συντήρησης στους 4°C για τη δεύτερη φάση της ωρίμανσης.

Για συνολικό χρόνο 2^{ns} ωρίμανσης 90 d μελετήθηκαν δείγματα των τεσσάρων τυριών σε χρόνους 1, 7, 14, 21, 30, 45, 60 και 90 d μετά τη μεταφορά τους στους 4°C. Η μελέτη περιλάμβανε μικροβιολογική ανάλυση, προσδιορισμό των φυσικοχημικών, δομικών και οργανοληπτικών χαρακτηριστικών καθώς και πρωτεολυτικών δεικτών για τον έλεγχο της εξέλιξης της ωρίμανσης. Με χρήση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν για το κάθε τυρί κατασκευάστηκαν συγκριτικοί πίνακες και διαγράμματα ώστε να καταστεί η μελέτη και σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ των τεσσάρων τυριών ευκολότερη. Ακόμη πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση (ANOVA) των αποτελεσμάτων του οργανοληπτικού ελέγχου για να ελεγχθεί η σημαντικότητα της επίδρασης του χρόνου ωρίμανσης και της μεθόδου επεξεργασίας στα χαρακτηριστικά των δειγμάτων λευκού τυριού Φέτας. Επιπλέον, τα αποτελέσματα υποβλήθηκαν σε ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) μέσω του προγράμματος *Statistica* για να διερευνηθεί περαιτέρω η επίδραση των εναλλακτικών τεχνολογιών στα φυσικοχημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.

4.5.4. Πρώτες Ύλες, Χημικά Αντιδραστήρια και Υλικά Συσκευασίας

4.5.4.1. Προετοιμασία καλλιέργειας εκκίνησης

Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν ως καλλιέργεια εκκίνησης ήταν οι *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105, *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0022 και *Lactococcus lactis* ACA-DC 0049.

Η επώαση των καλλιεργειών πραγματοποιήθηκε σε αποστειρωμένη, ανασυσταμμένη σκόνη γάλακτος (spray skimmed milk powder), 10% ολικών στερεών με 1.5% λίπος. Τα στελέχη *S. thermophilus* και *L. lactis* αναπτύχθηκαν υπό αερόβιες συνθήκες στους 37°C. Ο *L. bulgaricus* αναπτύχθηκε υπό αναερόβιες συνθήκες στους 45°C. Η καλλιέργεια που χρησιμοποιούνταν κατά την τυροκόμηση αποτελούσε κάθε φορά την 3^η ανανέωση.

4.5.4.2. Παρασκευή τυριού

Για την παρασκευή του λευκού τυριού άλμης τύπου Φέτας χρησιμοποιήθηκε:

Πρόβειο παστεριωμένο γάλα

Η μέση σύσταση του γάλακτος που χρησιμοποιήθηκε ήταν: λίπος 5.36%, πρωτεΐνη 5.23%, ΣΥΑΛ 11.47% και στερεό υπόλειμμα 16.85%, pH 6.60.

Καλλιέργεια εκκίνησης (SLAB)

Η καλλιέργεια εκκίνησης που χρησιμοποιήθηκε περιείχε 50% *Lactococcus lactis* ACA-DC 0049 και 50% *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105 / *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0022 σε αναλογία 1:1. Η ποσότητα της καλλιέργειας που προστέθηκε διέφερε (2% - 3.5% v/v) ανάλογα με το προς παρασκευή τυρί.

Πυτιά

Στις τυροκομήσεις προστέθηκε πυτιά εμπορίου, 96% χυμοσίνη και 2% πεψίνη, προέλευσης Chr. Hansen, Naturen Extra 1125 NB.

Χλωριούχο ασβέστιο CaCl₂

Κατά την τυροκόμηση για τη δημιουργία πιο συνεκτικής δομής προστέθηκε CaCl₂ σε αναλογία 5 mL σε 50 kg γάλα.

4.5.5. Πειραματική Διαδικασία

4.5.5.1. Επεξεργασία της καλλιέργειας εκκίνησης με ΥΠ

Μετά το στάδιο της επώασης, κατάλληλες ποσότητες των τριών στελεχών των *L. lactis*, *L. bulgaricus* και *S. thermophilus* τοποθετήθηκαν ξεχωριστά σε αποστειρωμένα υπό UV ακτινοβολία σακουλάκια από πολυστρωματικό υλικό (Πολυαιθυλένιο (PE) – Πολυπροπυλένιο (PP)) και οδηγήθηκαν για επεξεργασία.

Η καλλιέργεια εκκίνησης που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του τυριού HPA επεξεργάστηκε με ΥΠ σε ποσοστό 60% του συνολικού της όγκου.

Η καλλιέργεια εκκίνησης που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του τυριού HPB επεξεργάστηκε εξ' ολοκλήρου με ΥΠ.

Οι συνθήκες επεξεργασίας που επιλέχθηκαν και εφαρμόστηκαν ήταν πίεση 200 MPa, θερμοκρασία 20°C και χρόνος επεξεργασίας 20 min, συνθήκες οι οποίες αντιστοιχούν στις βέλτιστες συνθήκες επεξεργασίας με ΥΠ για τους τρεις μικροοργανισμούς, υπολογισμένες βάσει της αύξησης της δραστηριότητας των αμινοπεπτιδασών τους, PepN και PepX και της αύξησης του κόστους επεξεργασίας. Οι τιμές των συνθηκών επεξεργασίας που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα, βασίστηκαν και σε αποτελέσματα των Katsaros et al., (2009) και Giannoglou et al., (2016). Οι συγγραφείς μελέτησαν τις συνθήκες επεξεργασίας, ΥΠ (100-700 MPa) και θερμοκρασίας (20-40°C) για ενεργοποίηση 5 πεπτιδασών (PepN, PepX, PepA, PepY, PepC) των μικροοργανισμών, του *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105, *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0022 και *Lactococcus lactis* ACA-DC 0049, στελέχη τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία της καλλιέργειας εκκίνησης. Βάσει των αποτελεσμάτων που προέκυψαν, οι συνθήκες επεξεργασίας που οδηγούν στη βέλτιστη ενεργοποίηση των περισσότερων αμινοπεπτιδασών που μελετήθηκαν, είναι πίεση 200 MPa σε θερμοκρασία 20°C. Επιπρόσθετα, υπέδειξαν ότι η εφαρμογή των συνθηκών

αυτών για 20 min, μπορεί να τριπλασιάσει τη δραστικότητα των ενζύμων αυτών και πιθανότατα να οδηγήσει σε καλύτερη και ταχύτερη ωρίμανση του λευκού τυριού άλμης τύπου Φέτα.

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων με ΥΠ χρησιμοποιήθηκε ο μεγάλος κυλινδρικό θάλαμος υπερυψηλής πίεσης, χωρητικότητας 1 L, της μονάδα Food Pressure Unit FPU 1.01, της Resato International BV (Roden, Holland) (Εικόνα 4.2), η οποία περιεγράφηκε στη Παράγραφο 4.2.5.1.1.

4.5.5.2. Επεξεργασία του τυριού με ΥΠ

Η επεξεργασία της Φέτας με ΥΠ πραγματοποιήθηκε στο τέλος της 1^{ης} φάσης ωρίμανσης του τυριού και ακριβώς πριν τη συσκευασία του και την αποθήκευσή του στους 4°C για ωρίμανση. Το τυρί κόπηκε σε κομμάτια διαστάσεων $5.0 \times (2.5-2.75) \times 7.5$ cm, τα οποία στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένες πολυστρωματικές συσκευασίες (Πολυαιθυλένιο (PE) – Πολυπροπυλένιο (PP)) και οδηγήθηκαν για επεξεργασία με ΥΠ. Η επεξεργασία τους πραγματοποιήθηκε όπως και στην περίπτωση των καλλιέργειών εκκίνησης στο μεγάλο θάλαμο της μονάδας ΥΠ (Εικόνα 4.2).

Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πίεση των δειγμάτων λευκού τυριού τύπου Φέτας (HPC), ήταν ΥΠ 200 MPa σε θερμοκρασία 20°C και για χρόνο επεξεργασίας 20 min.

4.5.5.3. Διαδικασία παρασκευής λευκών τυριών άλμης τύπου Φέτας

Παρακάτω παρουσιάζονται τα βήματα που ακολουθήθηκαν για τις τέσσερις τυροκομίες καθώς και οι μεταξύ τους διαφοροποιήσεις.

1. Παστερίωση γάλακτος

Η παστερίωση του γάλακτος πραγματοποιήθηκε στους 68°C για 10 min υπό ανάδευση.



Εικόνα 4.12. Παστερίωση του γάλακτος υπό συνεχή ανάδευση

2. Προσθήκη χλωριούχου ασβεστίου (CaCl₂)

Για την ενίσχυση του πήγματος και για πιο συνεκτική δομή, πραγματοποιήθηκε προσθήκη χλωριούχου ασβεστίου (CaCl₂) σε αναλογία 5 mL σε 50 kg γάλα. Η προσθήκη πραγματοποιήθηκε υπό συνεχή ανάδευση.

3. Προσθήκη καλλιέργειας εκκίνησης

Μόλις η θερμοκρασία του παστεριωμένου γάλακτος μειώθηκε στους 36°C προστέθηκε η καλλιέργεια εκκίνησης και ακολούθησε ανάδευση και παραμονή για 10 min.

Η καλλιέργεια εκκίνησης αποτελούνταν από 50% *Lactococcus lactis* ACA-DC 0049 και 50% *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* ACA-DC 0105 / *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0022 σε αναλογία 1:1.

Για την παρασκευή των τυριών **Control και HPC** η καλλιέργεια εκκίνησης προστέθηκε σε ποσοστό 2% v/v. Για την παρασκευή των τυριών **HPA και HPB** η καλλιέργεια εκκίνησης προστέθηκε σε ποσοστό 2.5 και 3.5% v/v, αντίστοιχα. Η ποσότητα της επεξεργασμένης με ΥΠ καλλιέργειας η οποία έπρεπε να προστεθεί στα δύο τυριά υπολογίστηκε αφού ελήφθη υπ' όψη το ποσοστό μείωσης του οξέος που προκαλείται λόγω επεξεργασίας της καλλιέργειας με ΥΠ (Παρ. 5.3.2), ώστε η παραγωγή οξέος από τις καλλιέργειες να είναι στα ίδια ποσοστά με εκείνης του τυριού Control.

4. Προσθήκη πυτιάς

Ακολούθησε προσθήκη πυτιάς σε αναλογία 3 g σε 100 kg γάλα. Η πυτιά προστέθηκε, αφού πρώτα είχε διαλυθεί σε μικρή ποσότητα νερού. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάδευση για λίγα λεπτά και παρέμεινε σε ηρεμία.

5. Έλεγχος πήξης

Μετά από 6-10 min από την προσθήκη της πυτιάς, πραγματοποιήθηκε έλεγχος για την πήξη με ειδική σπάτουλα. Στο σημείο αυτό αναμένεται ο σχηματισμός κόκκων πήγματος καζεΐνης στη σπάτουλα (Εικόνα 4.13).



Εικόνα 4.13. Έλεγχος πήξης γάλακτος με χρήση ειδικής σπάτουλας

6. Διαίρεση τυροπήγματος

Μετά από αναμονή 40 min ηρεμίας ακολούθησε διαίρεση του τυροπήγματος με ειδικούς τυροκόπτες. Το τυρόπηγμα αφέθηκε σε ηρεμία για 10 min προς αποβολή ορού. Για την υποβοήθηση της αποβολής ορού πραγματοποιήθηκε ήπια ανάδευση (Εικόνα 4.14 α, β).



Εικόνα 4.14 α) Διαίρεση τυροπήγματος με ειδικούς τυροκόπτες και **β)** Αποβολή ορού από το τυρόπηγμα

7. Τοποθέτηση του τυροπήγματος σε καλούπια

Ακολούθησε εξαγωγή του τυροπήγματος σε προζυγισμένα καλούπια για περαιτέρω αποβολή ορού, και αναστροφή των καλουπιών ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Όταν μεγάλη ποσότητα του ορού αποβλήθηκε, η σχηματισμένη τυρομάζα μεταφέρθηκε σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας (17-18°C).

8. Αλάτισμα τυριού

Μετά από 24 h, πραγματοποιήθηκε εξαγωγή του τυριού από τα καλούπια. Το τυρί κόπηκε σε μεγάλα κομμάτια και ζυγίστηκε για τον υπολογισμό της ποσότητας του αλατιού. Στη συνέχεια, έλαβε χώρα ξηρό αλάτισμα του τυριού με 2.5% χονδρόκοκκο αλάτι (Εικόνα 4.15).

9. Τοποθέτηση σε δοχεία προωρίμανσης και αποθήκευση

Το τυρί τοποθετήθηκε σε δοχεία (Εικόνα 4.15), τα οποία τοποθετήθηκαν σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 17-18°C μέχρι το pH του τυριού να φτάσει την τιμή 4.6 (6-10 μέρες).



Εικόνα 4.15. Αλάτισμα τυριού και τοποθέτησή του στα δοχεία προωρίμανσης

10. Τελική συσκευασία και μεταφορά στο ψυγείο (2^η φάση ωρίμανσης)

Τα τυριά κόπηκαν σε κομμάτια διαστάσεων 10.0 x (5.0-5.5) x 7.5 cm. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν από 2 κομμάτια τυριού σε περιέκτες των 400 g και προστέθηκε αποστειρωμένη άλμη (7% NaCl). Η ποσότητα άλμης ήταν τόση ώστε να μην επιτρέπεται η ύπαρξη αέρα μέσα στη συσκευασία.

Όλα τα τυριά τοποθετήθηκαν σε ψυγείο στους 4°C και σε προκαθορισμένους χρόνους λαμβάνονταν δείγματα προς ανάλυση.

4.5.6. Αναλυτικές Μέθοδοι

4.5.6.1. Μικροβιολογικός έλεγχος τυριών

Ο μικροβιολογικός έλεγχος των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους Moschopoulou et al. (2010).

Για τον έλεγχο της ολικής μικροβιακής χλωρίδας (total viable count) χρησιμοποιήθηκε το μη επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα Plate Count Agar (PCA, Merk, Darmstadt, Germany). Ακολουθήθηκε η τεχνική επιφανειακής ανάπτυξης σε τριπλά τρυβλία (spread plate count).

Για τον προσδιορισμό των αερόβιων θερμοφίλων κόκκων (thermophilic cocci) χρησιμοποιήθηκε το επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα M17-Agar (1.15029, Merck, Germany). Ακολουθήθηκε η τεχνική επιφανειακής ανάπτυξης σε διπλά τρυβλία (spread plate count).

Για τον προσδιορισμό των αναερόβιων θερμοφίλων γαλακτοβακίλλων (thermophilic lactobacilli) χρησιμοποιήθηκε το επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα de Man-Rogosa and Sharpe's-Agar (MRS) μετά από οξίνισή του με χρήση οξικού οξέος σε pH 5.4. Ακολουθήθηκε η τεχνική της ενσωμάτωσης με διπλό στρώμα για αναερόβιες συνθήκες. Πραγματοποιήθηκαν διπλές μετρήσεις για κάθε αραίωση.

Για τον προσδιορισμό των γαλακτικών βακτηρίων που δεν ανήκουν στις εναρκτήριες καλλιέργειες (Non Starter LABs) χρησιμοποιήθηκε το επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα Rogosa – Agar μετά από όξυνσή του με χρήση οξικού οξέος σε pH 5.5. Ακολουθήθηκε η τεχνική της ενσωμάτωσης με διπλό στρώμα, για την εξασφάλιση αναερόβιων συνθηκών.

Για την κάθε μελετώμενη αραίωση πραγματοποιήθηκαν διπλές μετρήσεις. Όλα τα τρυβλία επωάζονταν στους 30°C για 72 h.

4.5.6.2. Ανάλυση Φυσικοχημικών χαρακτηριστικών

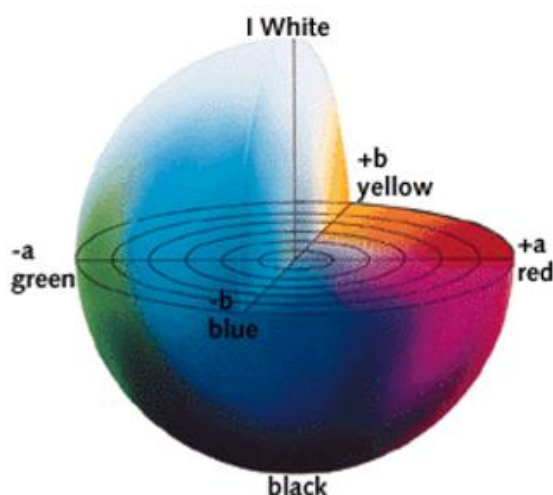
4.5.6.2.1. Μέτρηση του pH

Το pH όλων των τυριών μετρήθηκε σε προκαθορισμένους χρόνους με χρήση του pH-μέτρου AMEL (pH-meter 338, AMEL Instruments, Milan, Italy). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τυρί διαλυμένο σε απιονισμένο νερό σε αναλογία 1:1, στους 25°C.

4.5.6.2.2. Προσδιορισμός χρώματος τυριού

Το χρώμα των τυριών προσδιορίστηκε με τη βοήθεια του χρωματόμετρου Minolta CR-200 (Minolta Company, Chuo-Ku, Osaka, Japan). Οι μετρήσεις ήταν εκφρασμένες στην κλίμακα CIELAB (Commission International de l' Eclairage) (L, a, b), η οποία εκφράζει τη μαθηματική προσέγγιση της μη γραμμικής απόκρισης του ματιού (CIE, 1978). Το χρωματόμετρο φέρει στο άκρο του σπή 8 mm. Η βαθμονόμηση του οργάνου πραγματοποιούνταν με τη βοήθεια λευκής πλάκας (Calibration plate CR-200, L = 97.5, a = -0.31, b = -3.83). Οι μετρήσεις διεξήχθησαν σε αντιπροσωπευτικά σημεία των δειγμάτων λευκού τυριού Φέτας, αποφεύγοντας τις χαρακτηριστικές σχισμές.

Το μέγεθος L εκφράζει τη φωτεινότητα του χρώματος. Μια χαμηλή τιμή (0-50) υποδηλώνει ότι το χρώμα του δείγματος τείνει προς το μαύρο, ενώ μια υψηλή τιμή (51-100) προς το λευκό. Μια θετική τιμή της παραμέτρου a υποδεικνύει κόκκινο χρώμα (redness), ενώ μια αρνητική τιμή πράσινο χρώμα (greenness). Αντίστοιχα, μια θετική τιμή της παραμέτρου b υποδεικνύει κίτρινο χρώμα (yellowness), ενώ μια αρνητική τιμή μπλε χρώμα (blueness). Οι δύο τελευταίες παράμετροι είναι οι ορθογώνιες συντεταγμένες του χρώματος (χρωματικότητα) πάνω στο επίπεδο διατομής του χρώματος, κάθετο στον άξονα μαύρου-άσπρου (Εικόνα 4.16).



Εικόνα 4.16. Τρισδιάστατη απεικόνιση της κλίμακας CIELAB

Η ολική μεταβολή του χρώματος συναρτήσει του χρόνου προσδιορίστηκε από την Εξίσωση 4.9.

$$\Delta E = \sqrt{(L - L_0)^2 + (a - a_0)^2 + (b - b_0)^2} \quad (\text{Εξίσωση 4.9})$$

όπου L_0 , a_0 , b_0 , οι τιμές των L , a , b για $t=0$.

4.5.6.2.3. Μέτρηση υγρασίας τυριού

Για τον προσδιορισμό της περιεχόμενης υγρασίας στο τυρί ακολουθήθηκε η μέθοδος της ξήρανσης. Η μέθοδος στηρίζεται στην εύρεση της επί τοις % απώλειας του βάρους του τροφίμου με την ξήρανσή του, βάσει της παραδοχής ότι όλη η απώλεια του βάρους οφείλεται στην απομάκρυνση της υγρασίας του. Η έκφραση του αποτελέσματος στην προκειμένη περίπτωση γίνεται επί ξηρής μάζας του δείγματος.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε μπορεί να συνοψιστεί στα επόμενα βήματα:

1. Πολτοποίηση ποσότητας του τυριού.
2. Ζύγιση σε αναλυτικό ζυγό (ακρίβεια 0.0001 g) και τοποθέτηση 10 g πολτοποιημένου δείγματος σε προζυγισμένη ύαλο ωρολογίου (το δείγμα απλώνεται έτσι ώστε να είναι όσο το δυνατόν μεγαλύτερη η επιφάνεια, προκειμένου να διευκολυνθεί η εξάτμιση του νερού).
3. Ξήρανση του δείγματος σε κλίβανο (WTB BINDER 7200, Type E, Tuttlingen, Germany) στους 105-110°C μέχρι να σταθεροποιηθεί το βάρος του (περίπου 48 h).
4. Τοποθέτηση του δείγματος σε ξηραντήρα προς ισορρόπηση της θερμοκρασίας ($T=25^\circ\text{C}$).
5. Ζύγιση της ύαλου με το δείγμα σε αναλυτικό ζυγό.

Ο υπολογισμός της υγρασίας εκφράστηκε μέσω της Εξίσωσης 4.10.

$$\% \text{Υγρασία} = \frac{\text{Βάρος (Υάλου + Δείγματος)} - \text{Βάρος Μετά}}{\text{Βάρος Δείγματος}} \times 100 \quad (\text{Εξίσωση 4.10})$$

4.5.6.2.4. Μέτρηση ενεργότητας νερού (a_w)

Ως ενεργότητα νερού ορίζεται η παράμετρος που εκφράζει το μη δεσμευμένο από τα μόρια του τροφίμου νερό. Είναι κατ' επέκταση η ποσότητα νερού στο τρόφιμο που είναι διαθέσιμη για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των μικροοργανισμών. Η διαθεσιμότητα του νερού για την ανάπτυξη και δράση των μικροοργανισμών εξαρτάται επίσης και από το πόσο ισχυρά αυτό είναι δεσμευμένο. Το νερό που αποτελεί τμήμα των μη υδατικών συστατικών του τροφίμου και το γεινιάζον νερό δεν είναι διαθέσιμα για τις μικροβιακές δράσεις. Από αυτό το νερό, ελάχιστο είναι διαθέσιμο. Αντιθέτως, το ελεύθερο νερό είναι πλήρως διαθέσιμο. Αυτό σημαίνει ότι η ικανότητα ανάπτυξης των μικροοργανισμών και μέσω αυτής η σταθερότητα των τροφίμων, δεν εξαρτάται από το ολικό ποσό του περιεχόμενου νερού, αλλά από το ελεύθερο ή ελαφρώς δεσμευμένο νερό και γι' αυτό σχετίζεται συνήθως με την ενεργότητα του νερού στο τρόφιμο. Οπότε, καθίσταται αναγκαίος ο προσδιορισμός της, καθώς επηρεάζει τα φυσικοχημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων, όπως και την ευαισθησία στην αλλοίωσή τους.

Για τη μέτρηση της ενεργότητας του τυριού χρησιμοποιήθηκε η συσκευή AQUA LAB 4TEV της Decagon devices.

4.5.6.2.5. Έλεγχος ολικών λιπαρών τυριού

Το λίπος είναι ένα συστατικό του τυριού, στο οποίο δίνεται μεγάλη σημασία και πολλές φορές συνδέεται με τη ποιότητά του. Κατά τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών, η διαφοροποίηση του τυριού γίνεται και με βάση την περιεκτικότητά του σε λίπος.

Για τον προσδιορισμό των λιπαρών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Smedes (Smedes, 1999).

Η μέθοδος προσδιορισμού του λίπους περιλάμβανε τα παρακάτω βήματα :

1. Τοποθέτηση αντιπροσωπευτικής ποσότητας τυριού (1 g) σε κωνική φιάλη των 100 mL.
2. Προσθήκη στην κωνική φιάλη 20 mL ισοπροπανόλης (2PrOH) και 10 mL κυκλοεξανίου υπό ανάδευση.
3. Προσθήκη 10 mL κυκλοεξανίου υπό συνεχή ανάδευση (η προσθήκη του κυκλοεξανίου πραγματοποιείται για την παραλαβή των λιπαρών).
4. Προσθήκη 18 mL απιονισμένου νερού (dH_2O) και συνεχής ανάδευση (το νερό προκαλεί τη δημιουργία δύο φάσεων, ώστε να είναι δυνατός ο διαχωρισμός της λιπαρής από την υδατική φάση).
5. Φυγοκέντρηση για 10 min στα 10000 rpm.
6. Διαχωρισμός της επάνω φάσης και επαναδιάλυση της κάτω φάσης με 20 mL ισοπροπανόλης 10% v/v σε κυκλοεξάνιο.
7. Φυγοκέντρηση για 10 min στα 10000 rpm.
8. Λήψη εκ νέου της φάσης του κυκλοεξανίου (επάνω φάση).
9. Τοποθέτηση των κυκλοεξανικών κλασμάτων σε σφαιρική φιάλη και εξάτμιση σε περιστροφικό εξατμιστήρα (η φιάλη στην οποία τοποθετείται το μίγμα προς εξάτμιση είναι προζυγισμένη, για τον υπολογισμό των λιπαρών που αποτίθενται στη φιάλη).

Για τον υπολογισμό της % περιεκτικότητας των τυριών σε ολικά λιπαρά έγινε χρήση της εξίσωσης 4.11.

$$\% \text{ fat content} = \frac{W_f - W_{\text{after}}}{W_{\text{sample}}} * 100 \quad (\text{Εξίσωση 4.11})$$

Όπου, W_f το βάρος της κενής φιάλης, W_{after} το βάρος της φιάλης και του απομένοντος σε αυτή λιπαρού και W_{sample} το βάρος του δείγματος.

4.5.6.2.6. Μέτρηση τέφρας (ανόργανα συστατικά)

Τέφρα καλείται το υπόλειμμα του τυριού που παραμένει μετά την καύση στους 600°C και προσεγγίζει το ανόργανο περιεχόμενο. Για τον προσδιορισμό της τέφρας ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

1. Τοποθέτηση 3 g δείγματος σε προζυγισμένη με αναλυτικό ζυγό κάψα.
2. Τοποθέτηση της κάψας σε κλίβανο τέφρας (Gallenkamp Muffle Furnace, size1) στους 550-600°C για 6 h.
3. Τοποθέτηση σε ξηραντήρα προς ισορρόπηση της θερμοκρασίας (T=25°C).
5. Ζύγιση της κάψας με το δείγμα σε αναλυτικό ζυγό.

Η περιεκτικότητα σε ανόργανα συστατικά εκφράστηκε σε % ποσοστό ανά βάρος του δείγματος και υπολογίστηκε με χρήση της Εξίσωσης 4.12.

$$\text{Τέφρα} = \frac{(\text{Βάρος κάψας} + \text{δείγματος μετά την έψηση}) - (\text{Βάρος κενής κάψας})}{\text{Βάρος δείγματος}} * 100 \text{ (Εξίσωση 4.12)}$$

4.5.6.2.7. Μέτρηση Αλατοπεριεκτικότητας

Η μέτρηση του ποσοστού άλατος στα δείγματα τυριού, προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο Mohr (IDF, 1988), με τιτλοδότηση με διάλυμα νιτρικού αργύρου. Η μέθοδος περιλάμβανε τα εξής στάδια:

1. Ζύγιση 2 g δείγματος.
2. Ανάμιξη του δείγματος με 25 mL απιονισμένο νερό.
3. Εισαγωγή του διαλύματος σε αποστειρωμένη πλαστική σακούλα και ομογενοποίηση με χρήση ομογενοποιητή Bag Mixer, interscience.
4. Εισαγωγή 2 mL από το ομογενοποιημένο διάλυμα σε κωνική φιάλη.
5. Προσθήκη 2 mL (4-5 σταγόνες) δείκτη χρωμικού καλίου (K₂CrO₄).
6. Τιτλοδότηση με διάλυμα νιτρικού αργύρου (AgNO₃) 0.1 N.
7. Καταγραφή της καταναλωθείσας ποσότητας του τιτλοδότη.

Η ποσότητα του περιεχόμενου στο τυρί NaCl εκφρασμένου σε % ποσοστό επί του βάρους του δείγματος προσδιορίστηκε μέσω της Εξίσωσης 4.13.

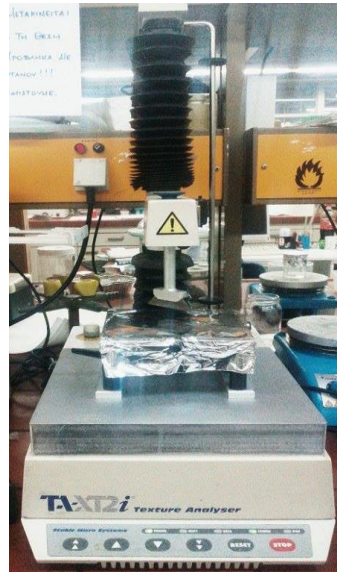
$$S = \frac{T * N * 0,05845 * 100}{V} * \frac{25}{W_{\text{δείγματος}}} \text{ (Εξίσωση 4.13)}$$

Όπου, S η αλατοπεριεκτικότητα του δείγματος, T η ποσότητα νιτρικού αργύρου που καταναλώθηκε σε mL, N η κανονικότητα του διαλύματος, V ο όγκος του δείγματος εκφρασμένος σε mL, 0.05845 συντελεστής μετατροπής σε NaCl που αντιδρά με 1 mL κανονικού νιτρικού αργύρου, 100 παράγοντας μετατροπής των αποτελεσμάτων σε % κατά βάρος ή όγκο, 25 η αραίωση του δείγματος σε mL και W_{δείγματος} το βάρος δείγματος.

4.5.6.3. Μελέτη δομικών χαρακτηριστικών του τυριού - Ανάλυση Υφής

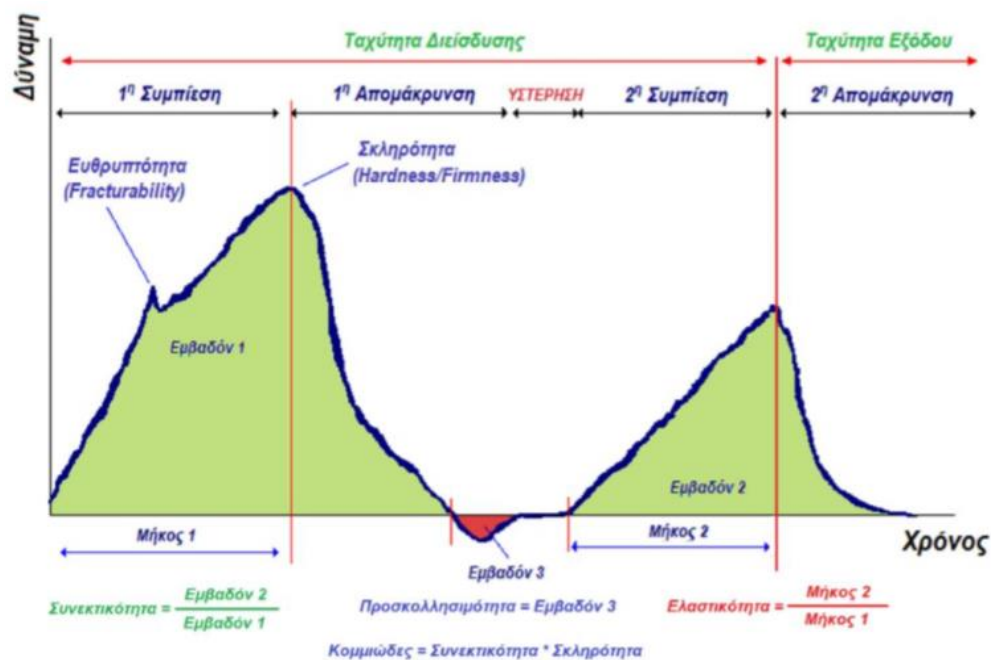
Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε ανάλυση υφής με χρήση του αναλυτή υφής TA-XT2i Plus Texture Analyzer (Stable Micro Systems Ltd., UK). Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε πρόγραμμα διπλής διείσδυσης με χρήση στελέχους λεπίδας. Η ταχύτητα στελέχους πριν και μετά τη διείσδυση ορίστηκε στα 2 mm/sec, η ταχύτητα κατά τη διείσδυση στο 1 mm/sec, το βάθος διείσδυσης ορίστηκε 10 cm και η δύναμη 5.0 g.

Η σκληρότητα, η προσκολλησιμότητα, η ελαστικότητα και η συνεκτικότητα, ήταν τα χαρακτηριστικά υφής των δειγμάτων λευκού τυριού τύπου Φέτας που προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια κατάλληλου προγράμματος (Texture Exponent 32, Stable Micro Systems Ltd., UK) (Εικόνα 4.17).



Εικόνα 4.17. Αναλυτής υφής TA-XT2i Plus Texture Analyzer (Stable Micro Systems Ltd., UK)

Στην Εικόνα 4.18, παρουσιάζεται μία τυπική καμπύλη διπλής διείσδυσης και ο υπολογισμός των προαναφερόμενων χαρακτηριστικών.

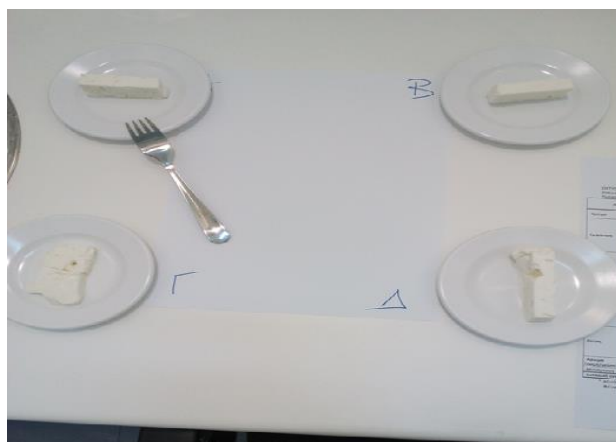


Εικόνα 4.18. Διάγραμμα διπλής διείσδυσης αναλυτή υφής

4.5.7. Οργανοληπτικός Έλεγχος Τυριού

Η οργανοληπτική αξιολόγηση των δειγμάτων είναι απαραίτητη για τη συνολική εκτίμηση της ποιότητάς τους. Η σημασία του οργανοληπτικού ελέγχου είναι μεγάλη και ουσιαστικά αφορά την αναγνώριση των επιθυμητών για τον καταναλωτή χαρακτηριστικών όπως και των ελαττωμάτων και την περιγραφική απόδοσή τους, την ενσωμάτωση αυτών στο προϊόν και τον έλεγχο του αποτελέσματος. Η επιτυχία του οργανοληπτικού ελέγχου ολοκληρώνεται με τη συσχέτιση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των τροφίμων με τα αντίστοιχα φυσικά, φυσικοχημικά, βιοχημικά και τεχνολογικά χαρακτηριστικά τους (συστατικά και ποσότητες αυτών, συνθήκες παραγωγής και συντήρησης).

Μια ομάδα εκπαιδευμένων δοκιμαστών, αποτελούμενη από 6 άτομα εξέτασε τα δείγματα για το σκοπό αυτό. Κάθε φορά ζητούνταν από τους δοκιμαστές να αξιολογήσουν και να βαθμολογήσουν ως προς την αρέσκεια, την εμφάνιση-χρώμα, την υφή-δομή και τη γεύση-οσμή των τεσσάρων τυριών και ως προς την ένταση και την αρέσκεια, την εμφάνιση (μικρές χαρακτηριστικές σχισμές, μεγάλες σχισμές-ρήγματα, ενιαία τομή με ελάχιστες σχισμές), το χρώμα (λευκό ομοιογενές, υποκίτρινο), την υφή-δομή (σκληρή, ημίσκληρη, μαλακή, εύθρυπτη, σπογγώδης, αλοιφώδης) και ως προς τη γεύση-οσμή (ευχάριστα όξινη, όξινη, πικάντικη, ταγγισμένη, πικρή, αλμυρή). Η εξέταση λάμβανε χώρα κάθε φορά που πραγματοποιούνταν και οι υπόλοιπες ενόργανες αναλύσεις. Παράλληλα στις 30 ημέρες 2ης φάσης ωρίμανσης των τεσσάρων τυριών, πραγματοποιήθηκε εκτενέστερος οργανοληπτικός έλεγχος στον οποίο συμμετείχαν 15 δοκιμαστές. Στο συγκεκριμένο οργανοληπτικό έλεγχο ζητήθηκε από τους δοκιμαστές να αξιολογήσουν και να βαθμολογήσουν τα τέσσερα τυριά ως προς την ένταση, το χρώμα (λευκό ομοιογενές, υποκίτρινο), την εμφάνιση (μικρές χαρακτηριστικές σχισμές, μεγάλες σχισμές-ρήγματα, ενιαία τομή με ελάχιστες σχισμές, τρύπες, λιπαρότητα, άλμη, ελαττώματα), την οσμή (κανονική, αλλοιωμένη, ανώμαλη), την υφή στο μαχαίρι (σκληρή, μαλακή, συνεκτική-σφικτή, κολλώδης, ενιαία μάζα, κομματάκια (από θρυμματισμό), λιπαρότητα), την υφή στο στόμα (σκληρή, μαλακή, συνεκτική, κολλώδης, κοκκώδης, αδιάλυτα στερεά στο στόμα, λιπαρότητα), τη γεύση (αλμυρή, ευχάριστη, πικρή, όξινη, πικάντικη, αντίληψη ωρίμανσης), το άρωμα (οσμή/γεύση) (ευχάριστο, αλλοιωμένο-ξένο), τη μετάγευση και τη συνολική εντύπωση. Επιπλέον ζητήθηκε να σημειώσουν σε κάθε χαρακτηριστικό το δείγμα προτίμησής τους. Τα τυριά βαθμολογούνταν από τους δοκιμαστές με κλίμακα 1-9 βαθμών. Επίσης κάθε φορά ζητούνταν από τους δοκιμαστές να αναφέρουν, οποιοδήποτε χαρακτηριστικό παρατηρήσουν. Τα δείγματα ήταν ισομεγέθη. Κάθε δείγμα τυριού κωδικοποιούνταν με ένα τυχαίο γράμμα (Εικόνα 4.19).



Εικόνα 4.19. Οργανοληπτικός έλεγχος δειγμάτων (Α : δείγμα ΗΡΑ, Β : δείγμα ΗΡΒ, Γ : δείγμα ΗΡC, Δ : δείγμα Control)

4.5.8. Μελέτη της Εξέλιξης της Πρωτεόλυσης

4.5.8.1. Προσδιορισμός ολικών πρωτεϊνών και αζωτούχων ενώσεων

Για την έλεγχο της ωρίμανσης των τυριών πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των αζωτούχων ενώσεων του. Οι πρωτεΐνες του γάλακτος που μεταφέρονται στο τυρί είναι βασικά οι καζεΐνες και μικρό μόνο μέρος των πρωτεϊνών τυρογάλακτος. Έτσι, κατά τον έλεγχο ωρίμανσης του τυριού, αυτό που προσδιορίζεται ως ολική πρωτεΐνη είναι ουσιαστικά οι καζεΐνες και τα προϊόντα στα οποία διασπώνται κατά τη διάρκεια της πρωτεόλυσης.

Στην περίπτωση που το τυρί εκχυλίζεται με νερό, λαμβάνεται το υδατοδιαλυτό άζωτο (Water Soluble Nitrogen - WSN ή SN) που είναι το πρωτεϊνικό και μη πρωτεϊνικό υδατοδιαλυτό άζωτο. Αυτό περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες τυρογάλακτος, τα χαμηλού μοριακού βάρους προϊόντα διάσπασης της καζεΐνης και ελεύθερα αμινοξέα. Από το υδατοδιαλυτό άζωτο κατακρημνίζονται οι πρωτεΐνες σε τελικό διάλυμα 12% τριχλωροξικού οξέος και κατά τον τρόπο αυτό πραγματοποιείται προσδιορισμός του πρωτεϊνικού κλάσματος του υδατοδιαλυτού αζώτου και το κλάσμα του μη πρωτεϊνικού αζώτου (NPN ή το διαλυτό σε TCA-SN). Οι αζωτούχες βάσεις που μένουν στο διάλυμα του τριχλωροξικού οξέος είναι μικρά πεπτίδια και αμινοξέα. Με την προσθήκη 5% φωσφοροβολφραμικού οξέος, λαμβάνονται ορισμένα μικρότερου μοριακού βάρους πεπτίδια και αμινοξέα, ώστε ο προσδιορισμός αζώτου του διηθήματος να δίνει ουσιαστικά το άζωτο των αμινοξέων.

4.5.8.1.1. Προσδιορισμός ολικού αζώτου (TN) και ολικής πρωτεΐνης (TP)

Η μέτρηση του ολικού αζώτου και της ολικής πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους Moatsou et al. (2001). Κατάλληλη ποσότητα τυριού (~1 g) οδηγήθηκε προς πέψη με προσθήκη πυκνού θειικού οξέος, υπεροξειδίου του υδρογόνου και καταλυτών (K_2SO_4 , TiO_2 , $CuSO_4 \cdot 5H_2O$) προς μετατροπή του οργανικού αζώτου σε αμμωνιακό άζωτο. Για τη μέτρηση του ολικού αζώτου εφαρμόστηκε η μέθοδος Kjeldahl (IDF, 2008) κατά την οποία η σχηματιζόμενη αμμωνία αποστάζεται με τη βοήθεια υδρατμών σε έντονα αλκαλικό περιβάλλον και δεσμεύεται από διάλυμα θειικού οξέος. Το υπόλοιπο τιτλοδοτήθηκε με διάλυμα υδροχλωρίου (0.02-0.1 M ανάλογα με την κατανάλωση).

Για τον υπολογισμό του ολικού αζώτου χρησιμοποιήθηκε η Εξίσωση 4.14.

$$TN\% = 1.4007 * N * \frac{V_s - V_b}{W} \quad (\text{Εξίσωση 4.14})$$

Όπου, V_s η κατανάλωση σε mL 0.1 N HCl για την τιτλοδότηση του δείγματος, V_b η κατανάλωση σε mL 0.1 N HCl για την τιτλοδότηση του τυφλού δείγματος, N η κανονικότητα του διαλύματος HCl που χρησιμοποιήθηκε για την τιτλοδότηση και W το βάρος του δείγματος.

Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη (TP) εκφράστηκε ως ποσοστό % και υπολογίστηκε μέσω της Εξίσωσης 4.15.

$$TP\% = TN\% * 6.38 \quad (\text{Εξίσωση 4.15})$$

4.5.8.1.2. Προσδιορισμός υδατοδιαλυτού αζώτου (SN), αζώτου διαλυτού σε 12% TCA (TCA-SN) και αζώτου διαλυτού σε 5% PTA (PTA-SN)

Ο προσδιορισμός των αζωτούχων κλασμάτων, υδατοδιαλυτό άζωτο (SN), διαλυτό άζωτο σε 12% τριχλωροξικό οξύ (TCA-SN) και διαλυτό άζωτο σε 5% φωσφοροβολφραμικό οξύ (PTA-SN) πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους Nega & Moatsou, (2012) και Zoidou et al., (2015).

4.5.8.1.2.1. Παρασκευή υδατοδιαλυτών εκχυλισμάτων τυριού (WSE)

Η παρασκευή των υδατοδιαλυτών εκχυλισμάτων τυριού έγινε σύμφωνα με τους Zoidou et al., (2015). Συγκεκριμένα:

10 g τυρί ομογενοποιήθηκαν για 5 min με 100 g απιονισμένο νερό. Το δείγμα εισήχθη για 60 min σε υδατόλουτρο στους 40°C και ακολούθησε νέα ομογενοποίηση στις ίδιες συνθήκες. Μετά από φυγοκέντρηση του δείγματος σε συνθήκες 3000×g για 30 min σε θερμοκρασία 6°C, το υπερκείμενο υγρό διηθήθηκε από φίλτρα Whatman No. 40 και No. 1.

4.5.8.1.2.2. Προσδιορισμός υδατοδιαλυτού αζώτου (SN)

Για τον προσδιορισμό του SN του τυριού, 10 g από το WSE αναλύθηκαν με χρήση της μεθόδου Kjeldahl (βλ. Παρ. 4.5.8.1.1.). Για τον προσδιορισμό του έγινε χρήση της Εξίσωσης 4.14 με εφαρμογή συντελεστή διόρθωσης για τα εκχυλίσματα.

4.5.8.1.2.3. Προσδιορισμός αζώτου διαλυτού σε 12% TCA (TCA-SN)

Η μέτρηση του ρυθμού πρωτεόλυσης μπορεί να γίνει με τη χρήση 12% TCA, οπότε καταπίπτουν όλες οι πρωτεΐνες και παραμένουν σε διάλυση τα πεπτίδια μικρού μοριακού βάρους (Ζερφυρίδης, 2001). Η πρωτογενής φάση της πήξης είναι ενζυμική και ολοκληρώνεται μέσα σε λίγα λεπτά.

Για τον προσδιορισμό του 12% TCA-SN του τυριού, 25 mL από το WSE αναμίχθηκαν με ίση ποσότητα τριχλωροξικού οξέος (TCA) 24% w/w και παρέμειναν 12-16 h σε θερμοκρασία 4°C. Ακολούθησε διήθηση με χρήση φίλτρων Whatman No 1. 15 g του υπερκείμενου υγρού χρησιμοποιήθηκαν για ανάλυση μέσω της μεθόδου Kjeldahl. Για τον προσδιορισμό του έγινε χρήση της εξίσωσης 4.14 με εφαρμογή συντελεστή διόρθωσης.

4.5.8.1.2.4. Προσδιορισμός αζώτου διαλυτού σε 5% PTA (PTA-SN)

Το PTA χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό του αζώτου των αμινοξέων και ορισμένων πολύ μικρών πεπτιδίων.

Για τον προσδιορισμό του 5% PTA-SN του τυριού, 33.6 mL (3.95 mol/L) θεικού οξέος (H₂SO₄) και 14.4 mL φωσφοροβολφραμικού οξέος (PTA) 33.3% (w/v) προστέθηκαν σε 60 mL WSE. Το διάλυμα αποθηκεύτηκε στους 4 °C 12-16 h και ακολούθησε διήθηση με χρήση φίλτρων Whatman no 1. 40 mL του υπερκείμενου υγρού χρησιμοποιήθηκαν για ανάλυση μέσω της μεθόδου Kjeldahl. Για τον προσδιορισμό του έγινε χρήση της εξίσωσης 4.14 με εφαρμογή συντελεστή διόρθωσης.

4.5.8.2. Ανάλυση πεπτιδίων

Η ανάλυση των πεπτιδίων πραγματοποιήθηκε με χρήση υγρής χρωματογραφίας αντιστρεπτής φάσης RP-HPLC όπως περιεγράφηκε από τους Nega & Moatsou (2012).

Ποσότητα 70 μL των υδατοδιαλυτών εκχυλισμάτων διηθήθηκε με χρήση φίλτρου σύριγγας 0.45 μm (Chromafil, Macherey-Nagel). Το χρωματογραφικό σύστημα που χρησιμοποιήθηκε ανήκει στη σειρά HP series 1100 (Waldbronn, Germany). Αποτελείται από αντλία βαθμωτής έκλυσης (gradient pump) τεσσάρων καναλιών, απαερωτή κενού, βρόγχο εισαγωγής δείγματος (injection loop) όγκου 20 μL και ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων. Η ανάκτηση και επεξεργασία των δεδομένων έγινε με χρήση του προγράμματος HP ChemStation. Για την ανάλυση των τυριών χρησιμοποιήθηκε η στήλη υγρής χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης υψηλής απόδοσης C18 στελεχωμένη με προστήλη, EC 250/4 Nucleosil 300–5 (Macherey-Nagel, Düren, Germany).

Χρησιμοποιήθηκαν δύο διαλύτες από τους οποίους ο Διαλύτης Α περιείχε $1 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ Τριφωσφοροξικό οξύ (TFA) σε νερό HPLC και ο Διαλύτης Β περιείχε $1 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ TFA σε διάλυμα 600 mL ακετονιτρίλιο και 399 mL νερό HPLC. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με ρυθμό ροής $0.75 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τα βήματα που ορίστηκαν για την ανάλυση περιλάμβαναν αρχικά τη χρήση 100% Διαλύτη Α για 10 min, στη συνέχεια βαθμιαία αύξηση του Διαλύτη Β από 0–80% για 80 min και τέλος πέρασμα από τη στήλη 100% Διαλύτη Β για 10 min. Κατά τη διάρκεια της ανάλυσης γινόταν μέτρηση της απορρόφησης του δείγματος στα 220 nm.

4.5.8.3. Προσδιορισμός της δραστηριότητας των αμινοπεπτιδασών APep και PepX

Η δραστηριότητα των αμινοπεπτιδασών APep και PepX μετρήθηκαν κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των τεσσάρων τυριών. Η μέτρηση των ενζύμων έγινε σε εκχυλίσματα τυριού σύμφωνα με τους Juan et al., 2007. Σε 20 g τυρί προστέθηκαν 30 mL ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων $0.1 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7.0. Ακολούθησε ομογενοποίηση με χρήση ομογενοποιητή Stomacher και φυγοκέντρηση στα $12.000\times g$ για 150 min στους 4°C . Τέλος το δείγμα διηθήθηκε με χρήση φίλτρων Whatman No 1. Η μέτρηση της δραστηριότητας των APep και PepX αμινοπεπτιδασών πραγματοποιήθηκε φασματοφωτομετρικά σύμφωνα με τους Desmazeaud & Juge, (1796) με χρήση υποστρωμάτων Leu-p-NA και Gly-Pro-p-NA αντίστοιχα. Οι δραστηριότητες των ενζύμων εκφράστηκαν ως nmoles p-NA ανά min ανά g τυριού.

4.5.9. Ανάλυση Δεδομένων

Όλες οι παράμετροι που προσδιορίστηκαν απεικονίστηκαν σχηματικά συναρτήσει του χρόνου ωρίμανσης για όλα τα τυριά και πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ των μεταβολών των παραμέτρων των διαφορετικών δειγμάτων.

4.5.9.1. Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

Προκειμένου να μελετηθεί η σημαντικότητα της επίδρασης των πειραματικών παραμέτρων στα επιμέρους ποιοτικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων, τα δεδομένα υποβλήθηκαν σε ανάλυση διακύμανσης δύο παραγόντων χωρίς αλληλεπίδραση (ANOVA). Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας ως στάθμη σημαντικότητας την τιμή $\alpha = 0.05$ ($p\text{-value} = 0.05$). Επιπλέον για να ελεγχθεί περαιτέρω η επίδραση τόσο του χρόνου ωρίμανσης όσο και των διαφορετικών τεχνολογιών επεξεργασίας στα φυσικοχημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, καθώς και στην ωρίμανση των δειγμάτων λευκού τυριού τύπου Φέτας, τα αποτελέσματα υποβλήθηκαν σε Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (ΑΚΣ) μέσω του προγράμματος Statistica. Ο μέγιστος αριθμός κύριων συνιστωσών που απαιτείται για την επαρκή εξήγηση της ολικής διακύμανσης καθορίστηκε βάσει του διαγράμματος ιδιοτιμών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alexandrakis, Z., Katsaros, G., Stavros, P., Katapodis, P., Nounesis, G. & Taoukis, P. (2014). Comparative structural changes and inactivation kinetics of pectin methylesterases from different orange cultivars processed by high pressure. *Food and Bioprocess Technology*, 7 (3), 853–867.
- Anastasiou, R., Papadelli, M., Georgalaki, M., Kalantzopoulos, G. & Tsakalidou, E. (2002). Cloning and sequencing of the gene encoding X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase (PepX) from *Streptococcus thermophilus* strain ACA-DC 4. *Journal of Applied Microbiology*, 93, 52–59.
- Aston, J.W., Giles, J.E., Durward, I.G. & Dulley, J.R. (1985). Effect of elevated ripening temperatures on proteolysis and flavour development in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Research*, 52(04), 565–572.
- Baankreis, R. & Exterkate, F.A. (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, 317–23.
- Balny, C. & Masson, P. (1993). Effects of high pressure on proteins. *Food Reviews International*, 9(4), 611–628.
- Baranyi, J. & Roberts, T.A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 277–294.
- Barbosa-Canovas, G.V., Pothakamury, U.R., Palou, E. & Swanson, B.G. (1997). Nonthermal preservation of foods, Marcel Dekker, Inc., New York, USA.
- Bockelmann, W., Gollan, V. & Heller, K.J. (1997). Purification of a second tripeptidase from *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* B14. *Milchwissenschaft*, 52, 500-503.
- Bonner, P.I.R. (2007). Protein purification. The Basics, London: Taylor and Francis, 2007.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Capellas, M., Mor-Mur, M., Sendra, E. & Guamis, B. (2001). Effect of high pressure processing on physico-chemical characteristics of fresh goat's milk cheese (Mató). *International Dairy Journal*, 11(3), 165–173.
- Casal, V. & Gomez, R. (1999). Effect of high pressure on the viability and enzymatic activity of mesophilic lactic acid bacteria isolated from caprine cheese. *Journal of Dairy Science*, 82, 1092–1098.
- Chavagnat, F., Meyer, J. & Casey, M. (2000). Purification, characterization, cloning and sequencing of the gene encoding oligopeptidase PepO from *Streptococcus thermophilus* A. *FEMS Microbiology Letters*, 191, 79–85.
- Cheftel, J.C. (1991). Applications des hautes pressions en technologie alimentaire. *Industries Alimentaires et Agricoles*, 108, 141–153.
- Cheftel, J.C. (1992). Effects of high hydrostatic pressure on food constituents: An overview. In C., R., K., & P. (Eds.), High pressure and biotechnology. Montrouge, France: John Libbey Eurotext, 195-209.
- Christensen, J.E., Dudley, E.G., Pedersen, J.A. & Steele, J. (1999). Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76(1), 217–246.
- Desmazeaud, M.J. & Juge, M. (1976). Caractérisation de l'activité protéolytique et fractionnement des dipeptidases et des aminopeptidase de *Streptococcus thermophilus*. *Le Lait*, 56, 24.

- El Soda, M., Madkor, S.A. & Tong, P.S. (2000). Adjunct cultures: recent development and potential significance to the cheese industry. *Journal of Dairy Science*, 83, 609–619.
- Fallico, V., McSweeney, P. L., Siebert, K. J., Horne, J., Caprino, S. & Licitra, G. (2004). Chemometric analysis of proteolysis during ripening of Ragusano cheese. *Journal of Dairy Science*, 87(10), 3138–3152.
- Fox, P.F. & McSweeney, P.L.H. (1998). *Dairy chemistry and biochemistry*. New York: Kluwer Academic/Plenum.
- Georgalaki M., Papadeli, M., Anastasiou, R., Kalantzopoulos, G. & Tsakalidou, E. (2002). Purification, biochemical characterization and cloning of the intracellular X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase from *Streptococcus macedonicus* strain ACA-DC 191. *Le Lai*, 82, 657-671.
- Giannoglou, M., Katsaros, G. & Taoukis, P. (2016). Selective activation/inactivation of aminopeptidases of starter cultures of brine cheeses by high pressure and temperature. *Food and Bioprocess Technology*. <http://dx.doi.org/10.1007/s11947-016-1781-3> (FABT-D-16-00165).
- Gross, M. & Jaenicke, R., (1994). Proteins under pressure: The influence of high hydrostatic pressure on structure, function and assembly of proteins and protein complexes. *European Journal of Biochemistry*, 221, 617-630.
- Hayashi R., Kawamura Y., Nakasa T. & Okinaka O. (1989). Application of high pressure to food processing: pressurization of egg white and yolk, and properties of gels formed. *Agricultural Biology and Chemistry*, 53(11), 2935-2940.
- Heremans, K. (1982). High pressure effects on proteins and other biomolecules. *Annual Review on Biophysics and Bioengineering*, 11, 1–21.
- Heremans, K. (1993). The behaviour of proteins under pressure. In *High Pressure Chemistry, Biochemistry and Materials Science*, eds. R. Winter and J. Jonas. The Netherlands: Kluwer Academic Publisher, 443–469.
- IDF (International Dairy Federation) (1988). Determination of salt content (Mohr method). International Dairy Federation IDF Standard 12B. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.
- IDF (International Dairy Federation) (2008). Processed Cheese Products- Determination of Nitrogen Content and Crude Protein Calculation-Kjeldahl Method. IDF Standard 25:2008. Brussels: IDF.
- Katsaros, G.I., Giannoglou, M.N. & Taoukis, P.S. (2009). Kinetic study of the combined effect of high hydrostatic pressure and temperature on the activity of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* aminopeptidases. *Journal of Food Science*, 74(5), 219–225.
- Kok, J. & De Vos, W. (1994). The proteolytic system of lactic acid bacteria. In Gasson, M., & De Vos, W. (Eds.), *Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria*. Glasgow: Blackie Academic, 169-210.
- Kunji, E.R., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B. & Konings, W.N. (1996). The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70, 187–221.
- Law, B.A. (1984). The accelerated ripening of cheese. In: F.L. Davies & B.A. Law (Eds.), *Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk*. London: Elsevier Applied Science Publishers, 209-228.
- Linton, M., Mackle, A.B., Upadhyay, V.K., Kelly, A.L. & Paterson, M.F. (2008). The fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture of Camembert-type cheese: A comparison between raw milk and milk treated with high hydrostatic pressure. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 423-428.

- Lloyd, R.J. & Pritchard, G.G. (1991). Characterization of X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase from *Lactococcus lactis subsp. lactis*. *Journal of Genetic Microbiology*, 137, 49–55.
- López-Pedemonte, T., Roig-Sagués, A., De Lamo, S., Hernández-Herrero, M. & Guamis, B. (2007). Reduction of counts of *Listeria monocytogenes* in cheese by means of high hydrostatic pressure. *Food Microbiology*, 24(1), 59-66.
- Magboul, A. & McSweeney, P. (2000). Purification and characterization of an X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase from *Lactobacillus curvatus* DPC2024. *Le Lait*, 80(4), 385-396.
- Malone, A.S., Wick, C., Shellhammer, T.H. & Courtney, P.D. (2003). High pressure effects on proteolytic and glycolytic enzymes involved in cheese manufacturing. *Journal of Dairy Science*, 86(4), 1139–1146.
- Maniou, D., Tsala, A., Moschopoulou, E., Giannoglou, M. & Taoukis, P. (2013). Effect of high-pressure-treated starter on ripening of Feta cheese. *Dairy Science and Technology*, 93, 11–20.
- Masson, P. (1992). Pressure denaturation of proteins. In: High Pressure and Biotechnology, eds. C. Balny, R., Hayashi, K. & Heremans, P. Masson. France: Colloque INSERM 224, John Libbey Eurotext Ltd., 89–99.
- Mierau, I., Kunji, E. R., Leenhouts, K. J., Hellendoorn, M. A., Haandrikman, A. J., Poolman, B. & Kok, J. (1996). Multiple-peptidase mutants of *Lactococcus lactis* are severely impaired in their ability to grow in milk. *Journal of Bacteriology*, 178, 2794–2803.
- Miyakawa, H., Anjitsu, K., Ishibashi, N. & Shimamura, S. (1994). Effects of pressure on enzyme activities of *Lactobacillus helveticus* LHE-511. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 58(3), 606–607.
- Moatsou, G., Kandarakis, I., Moschopoulou, E., Anifantakis, E. & Alichanidis, E. (2001). Effect of technological parameters on the characteristics of Kasseri cheese made from raw or pasteurized ewes' milk. *International Journal of Dairy Technology*, 54, 69–77.
- Moschopoulou, E., Anisa, T., Katsaros, G., Taoukis, P. & Moatsou, G. (2010). Application of high-pressure treatment on ovine brined cheese: Effect on composition and microflora throughout ripening. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(4), 543–550.
- Nega, A. & Moatsou, G. (2012). Proteolysis and related enzymatic activities in ten Greek cheese varieties. *Dairy Science and Technology*, 92(1), 57–73.
- Motoshima, H., Shiraishi, T., Tsukasaki, F. & Kaminogawa, S. (2003). Purification, characterization, and gene cloning of Lysyl Aminopeptidase from *Streptococcus thermophilus* YRC001, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 67, 772-782.
- Mozhaev, V., Heremans, K., Frank, J., Masson, P. & Balny, C. (1996). High pressure effects on protein structure and function. *Proteins*, 24, 81–91.
- O'Reilly, C.E., Kelly, A.L., Murphy, P.M. & Beresford, T.P. (2000). Effect of high pressure on proteolysis during ripening of Cheddar cheese. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 1(2), 109–117.
- O'Reilly, C.E., Kelly, A.L., Murphy, P.M. & Beresford, T.P. (2001). High pressure treatment: applications in cheese manufacture and ripening. *Trends in Food Science & Technology*, 12, 51–59.
- O'Reilly, C.E., Kelly, A.L., Oliveira, J.C., Murphy, P.M., Auty, M.A.E. & Beresford, T.P. (2003). Effect of varying high-pressure treatment conditions on acceleration of ripening of Cheddar cheese. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 4, 277–284.

- Rul, F., Monnet, V. & Gripon, J.C. (1994). Purification and characterization of a general aminopeptidase (St-PepN) from *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* CNRZ 302, *Journal of Dairy Science*, 77, 2880-2889.
- Saldo, J., Sendra, E. & Guamis, B. (2001). Hard cheese structure after a high hydrostatic pressure treatment at 50 MPa for 72 h applied to cheese after brining. *Le Lait*, 81, 625–635.
- Saldo, J., McSweeney, P.L.H., Sendra, E., Kelly, A.L. & Guamis, B. (2002). Proteolysis in caprine milk cheese treated by high-pressure to accelerate cheese ripening. *International Dairy Journal*, 12, 35-44.
- Smedes, F. (1999). Determination of total lipid using non-chlorinated solvents. *Analytist*, 124, 1711-1718.
- Vesanto, E., Savijoki, K., Rantanen, T., Steele, J. L. & Palva, A. (1995). An X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase (pepX) gene from *Lactobacillus helveticus*. *Microbiology*, 141, 3067–3075.
- Yokoyama, K., Chiba, H. & Yoshikawa, M. (1992). Peptide inhibitors for angiotensin-I converting enzyme from thermolysin digest of dried bonito. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 56(10), 1541–1545.
- Zoidou, E., Plakas, N., Giannopoulou, D., Kotoula, M. & Moatsou, G. (2015). Effect of supplementation of brine with calcium on the Feta cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 68(3), 420–426.

Ελληνική Βιβλιογραφία

- Κατσαρός Γ. (2009), Επίδραση της υπερυψηλής πίεσης σε πρωτεολυτικά ένζυμα τροφίμων. Διδακτορική διατριβή, Αθήνα, 2009.
- Ζερφυρίδης, Γ. Κ. (2001). Τεχνολογία Προϊόντων Γάλακτος-Τυροκομία. 2η Έκδοση, Θεσσαλονίκη, 2001.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΥΠ ΣΕ ΑΜΙΝΟΠΕΠΤΙΔΑΣΕΣ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΕΚΚΙΝΗΣΗΣ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΕ ΛΕΥΚΟ ΤΥΡΙ ΑΛΜΗΣ ΤΥΠΟΥ ΦΕΤΑΣ

5.1. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΥΠ ΚΑΙ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΣΕ ΑΜΙΝΟΠΕΠΤΙΔΑΣΕΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΩΝ *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*

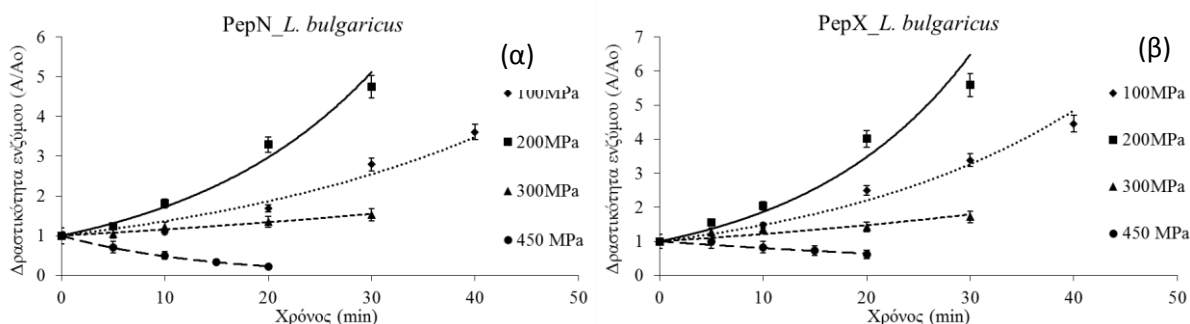
Μελετήθηκε η επίδραση της ΥΠ (100-450 MPa) σε συνδυασμό με ήπιες θερμοκρασίες (20-40°C) στη δραστηριότητα της αμινοπεπτιδάσης ειδικής δράσης PepX και της γενικής αμινοπεπτιδάσης PepN, των οξυγαλακτικών καλλιέργειών *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105, *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0022 και *Lactococcus lactis* ACA-DC 0049, οι οποίες χρησιμοποιούνται ως καλλιέργειες εκκίνησης κατά την παρασκευή τυριού Φέτας. Ειδικότερα οι συνδυασμοί ΥΠ και θερμοκρασίας που εφαρμόστηκαν παρατίθενται στον Πίνακα 5.1.

Πίνακας 5.1. Συνδυασμοί συνθηκών επεξεργασίας ΥΠ-θερμοκρασίας-χρόνου των στελεχών των *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* και *L. lactis*

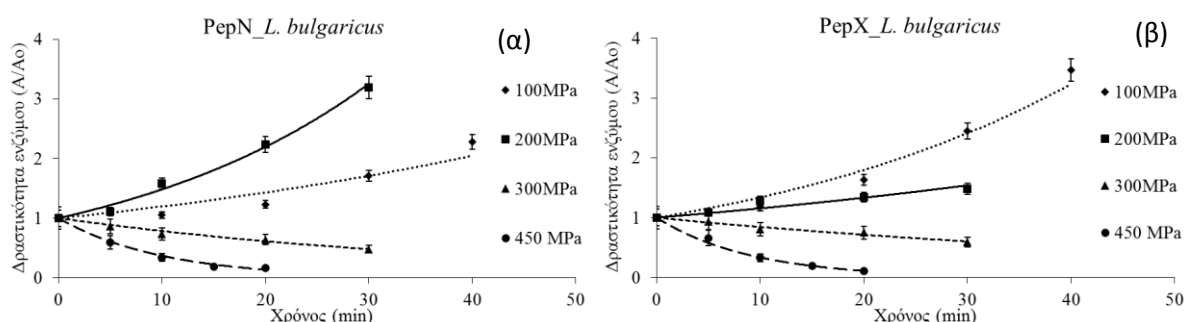
100 MPa	20°C	0, 10, 20, 30, 40 min
	30°C	0, 10, 20, 30, 40 min
	40°C	0, 10, 20, 30, 40 min
200 MPa	20°C	0, 5, 10, 20, 30 min
	30°C	0, 5, 10, 20, 30 min
	40°C	0, 5, 10, 20, 30 min
300 MPa	20°C	0, 5, 10, 20, 30 min
	30°C	0, 5, 10, 20, 30 min
	40°C	0, 5, 10, 20, 30 min
450 MPa	20°C	0, 2, 5, 10, 20 min
	30°C	0, 2, 5, 10, 20 min
	40°C	0, 2, 5, 10, 20 min

5.1.1. Επεξεργασία με ΥΠ σε Συνδυασμό με Ήπιες Θερμοκρασίες των Αμινοπεπτιδασών PepN και PepX του *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105

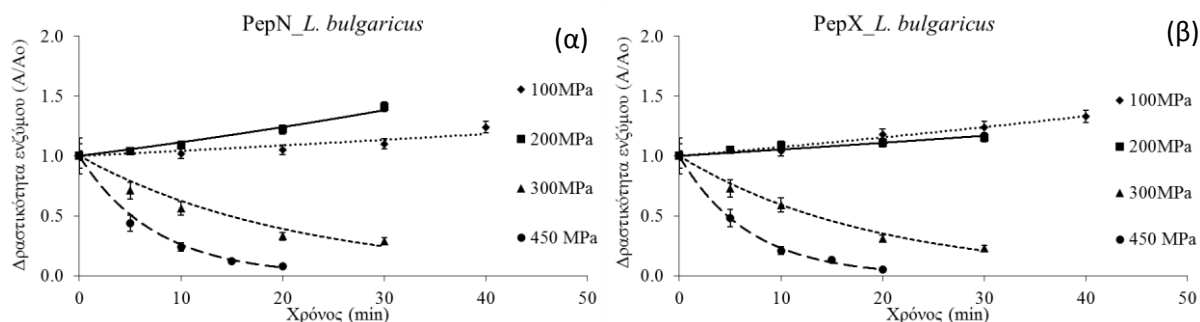
Στα Σχήματα 5.1-5.3 απεικονίζεται η μεταβολή της δραστηριότητας των αμινοπεπτιδασών PepN και PepX του στελέχους *L. bulgaricus*, με τη μεταβολή της ΥΠ και του χρόνου επεξεργασίας σε σταθερή θερμοκρασία 20, 30 και 40°C, αντίστοιχα.



Σχήμα 5.1. Μεταβολή της δραστηριότητας των αμινοπεπτιδασών α) PepN και β) PepX του μικροοργανισμού *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105 σε πιέσεις ♦ 100 ($R^2_{\text{PepN}}=0.945$, $R^2_{\text{PepX}}=0.984$), ■ 200 ($R^2_{\text{PepN}}=0.987$, $R^2_{\text{PepX}}=0.966$), ▲ 300 ($R^2_{\text{PepN}}=0.965$, $R^2_{\text{PepX}}=0.811$) και ● 450 MPa ($R^2_{\text{PepN}}=0.997$, $R^2_{\text{PepX}}=0.919$) σε σταθερή θερμοκρασία 20°C.



Σχήμα 5.2. Μεταβολή της δραστηριότητας των αμινοπεπτιδασών α) PepN και β) PepX του μικροοργανισμού *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105 σε πιέσεις ♦ 100 ($R^2_{\text{PepN}}=0.895$, $R^2_{\text{PepX}}=0.970$), ■ 200 ($R^2_{\text{PepN}}=0.986$, $R^2_{\text{PepX}}=0.896$), ▲ 300 ($R^2_{\text{PepN}}=0.976$, $R^2_{\text{PepX}}=0.971$) και ● 450 MPa ($R^2_{\text{PepN}}=0.974$, $R^2_{\text{PepX}}=0.994$) σε σταθερή θερμοκρασία 30°C.



Σχήμα 5.3. Μεταβολή της δραστηριότητας των αμινοπεπτιδασών α) PepN και β) PepX του μικροοργανισμού *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105 σε πιέσεις ♦ 100 ($R^2_{\text{PepN}}=0.834$, $R^2_{\text{PepX}}=0.973$), ■ 200 ($R^2_{\text{PepN}}=0.982$, $R^2_{\text{PepX}}=0.890$), ▲ 300 ($R^2_{\text{PepN}}=0.924$, $R^2_{\text{PepX}}=0.980$) και ● 450 MPa ($R^2_{\text{PepN}}=0.984$, $R^2_{\text{PepX}}=0.993$) σε σταθερή θερμοκρασία 40°C.

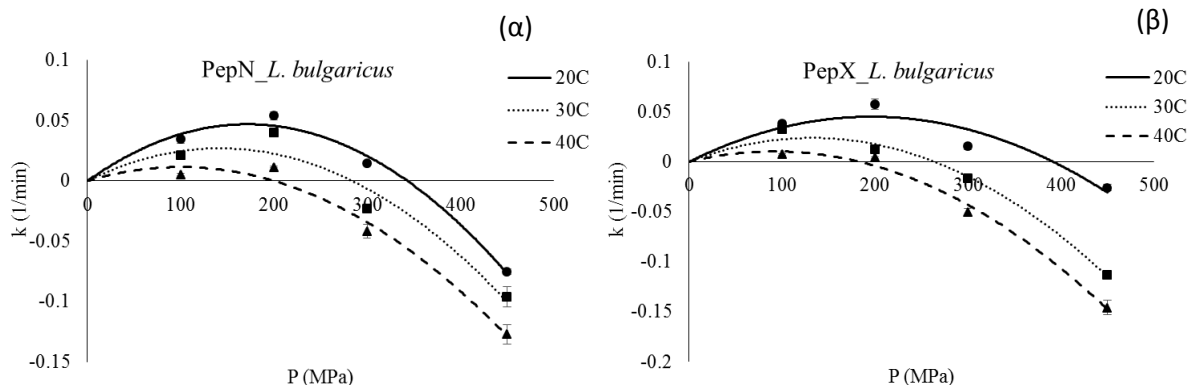
Τόσο η ενεργοποίηση όσο και η απενεργοποίηση των αμινοπεπτιδασών ακολούθησε κινητική αντίδραση 1ης τάξης. Οι τιμές των σταθερών των ρυθμών ενεργοποίησης / απενεργοποίησης, υπολογίστηκαν με γραμμικοποίηση της Εξίσωσης 4.1 και γραμμική παλινδρόμηση. Η εξάρτηση της σταθεράς των ρυθμών ενεργοποίησης/απενεργοποίησης των πεπτιδασών από την θερμοκρασία εκφράστηκε μέσω της ενέργειας ενεργοποίησης (Εξίσωση 4.2), με $T_{ref} = 293.15 \text{ K}$ (20°C) για το διάστημα ενεργοποίησης και $T_{ref} = 313.15 \text{ K}$ (40°C) για το διάστημα απενεργοποίησής τους. Η εξάρτηση της σταθεράς του ρυθμού απενεργοποίησης από την πίεση εκφράστηκε μέσω του όγκου ενεργοποίησης (Εξίσωση 4.6), με $P_{ref} = 450 \text{ MPa}$.

Στον Πίνακα 5.2 παρουσιάζονται τα κινητικά χαρακτηριστικά των αμινοπεπτιδασών PepN και PepX για όλες τις συνθήκες επεξεργασίας.

Πίνακας 5.2. Κινητικά χαρακτηριστικά των αμινοπεπτιδασών PepN και PepX του μικροοργανισμού *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105, για όλες τις συνθήκες επεξεργασίας (ενεργοποίηση (+) / απενεργοποίηση (-))

PepN	P (MPa)											
	100		200		300		450		Ενεργοποίηση		Απενεργοποίηση	
T (°C)	k (1/min)	s. error	k (1/min)	s. error	k (1/min)	s. error	k (1/min)	s. error	V _a (mL/mol)	s.error	V _a (mL/mol)	s.error
20	(+) 0.0350	0.0040	(+) 0.0540	0.0035	(+) 0.0143	0.0016	(-) 0.0753	0.0022	10.1	1.8	-	-
30	(+) 0.0214	0.0033	(+) 0.0399	0.0027	(-) 0.0232	0.0019	(-) 0.0960	0.0086	-5.6	-	-18.7	-
40	(+) 0.0051	0.0011	(+) 0.0115	0.0007	(-) 0.0419	0.0058	(-) 0.1270	0.0079	-34.4	-	-17.8	-
	P (MPa)											
	100		200		300		450					
	E _a (kJ/mol)	s. error	E _a (kJ/mol)	s. error	E _a (kJ/mol)	s. error	E _a (kJ/mol)	s. error				
	73.5 (+)	8.5	58.7 (+)	7.9	25.6 (-)	-	20.0 (-)	5.8				
PepX	P (MPa)											
	100		200		300		450		Ενεργοποίηση		Απενεργοποίηση	
T (°C)	k (1/min)	s. error	k (1/min)	s. error	k (1/min)	s. error	k (1/min)	s. error	V _a (mL/mol)	s.error	V _a (mL/mol)	s.error
20	(+) 0.0382	0.0027	(+) 0.0575	0.0050	(+) 0.0153	0.0033	(-) 0.0259	0.0034	6.7	1.5	-	-
30	(+) 0.0322	0.0025	(+) 0.0126	0.0023	(-) 0.0169	0.0017	(-) 0.1132	0.0042	3.9	-	-25.6	-
40	(+) 0.0075	0.0007	(+) 0.0042	0.0008	(-) 0.0501	0.0037	(-) 0.1460	0.0071	-35.2	-	-21.0	-
	P (MPa)											
	100		200		300		450					
	E _a (kJ/mol)	s. error	E _a (kJ/mol)	s. error	E _a (kJ/mol)	s. error	E _a (kJ/mol)	s. error				
	61.7 (+)	7.3	99.6 (+)	8.1	86.1 (-)	-	66.5 (-)	6.4				

Η συνδυαστική επίδραση της ΥΠ και της θερμοκρασίας στις σταθερές των ρυθμών ενεργοποίησης και απενεργοποίησης των αμινοπεπτιδασών PepN και PepX, παρατίθενται στα Σχήματα 5.4 α, β, αντίστοιχα. Ο οριζόντιος άξονας δείχνει το όριο πάνω από το οποίο παρατηρείται ενεργοποίηση των αμινοπεπτιδασών για την κάθε περίπτωση, ενώ κάτω από αυτό το όριο παρατηρείται απενεργοποίησή τους.



Σχήμα 5.4. Συνδυαστική επίδραση της ΥΠ και της θερμοκρασίας στις σταθερές των ρυθμών ενεργοποίησης και απενεργοποίησης των αμινοπεπτιδασών α) PepN και β) PepX του μικροοργανισμού *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105. Οι τιμές πάνω από τον οριζόντιο άξονα αναφέρονται σε ενεργοποίηση της αμινοπεπτιδάσης, ενώ κάτω από τον άξονα σε απενεργοποίησή της

Οι υψηλότερες τιμές των σταθερών των ρυθμών ενεργοποίησης των πεπτιδασών παρατηρήθηκαν για συνθήκες επεξεργασίας 200 MPa, 20°C. Από τα Σχήματα 5.4 α, β φαίνεται ότι σε συγκεκριμένες πιέσεις για κάθε θερμοκρασία ο ρυθμός μεταβολής της δραστηριότητας των πεπτιδασών μηδενίζεται. Μετά από πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε συνθήκες 350 MPa/20°C, 290 MPa/30°C, 220 MPa/40°C για την αμινοπεπτιδάση PepN και 400 MPa/20°C, 270 MPa/30°C, 190 MPa/40°C για την αμινοπεπτιδάση PepX του *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105, επαληθεύτηκε ο προαναφερόμενος ισχυρισμός.

Για τη μαθηματική έκφραση της συνδυασμένης επίδρασης της ΥΠ και της θερμοκρασίας στην ενεργοποίηση των πεπτιδασών PepN και PepX καθώς και για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών επεξεργασίας των πεπτιδασών της οξυγαλακτικής καλλιέργειας του στελέχους αυτού με ΥΠ και θερμοκρασία για τη μέγιστη ενεργοποίησή τους, προσδιορίστηκαν μετά από εφαρμογή μη γραμμικής παλινδρόμησης στα δεδομένα της παρούσας διατριβής, οι παράμετροι της Εξίσωσης 4.4 (Πίνακας 5.3).

Πίνακας 5.3. Παράμετροι της Εξίσωσης 4.4 που προβλέπει το ρυθμό ενεργοποίησης των αμινοπεπτιδασών PepN και PepX ($P_{ref} = 200$ MPa, $T_{ref} = 20^\circ\text{C}$) του *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105, βάσει των δεδομένων της παρούσας μελέτης

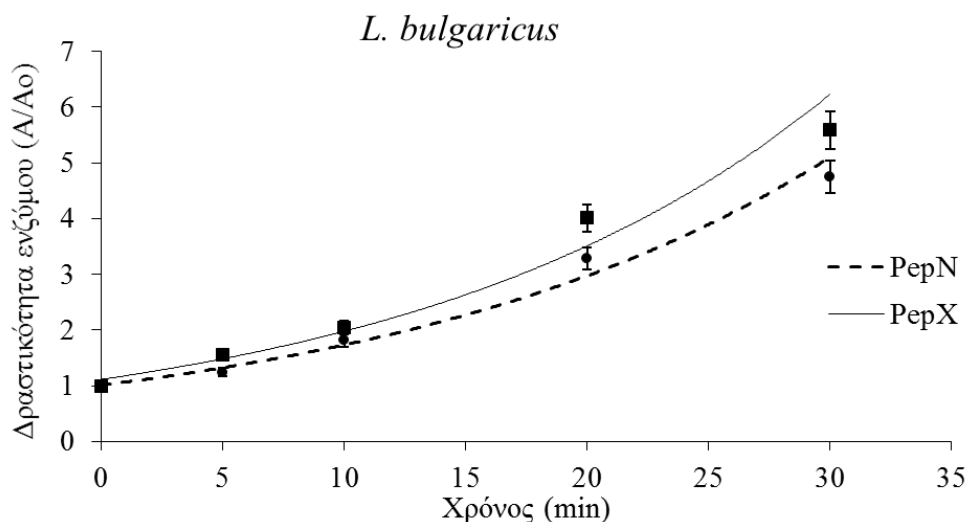
Παράμετρος	PepN	PepX
A (mL/mol·K)	-0.000053	-0.000061
B (MPa⁻¹)	-0.00148	-0.00262
k₀ (min⁻¹)	0.0515	0.0583
E_a (kJ/mol)	48.2	91.3
R²	0.926	0.912
Εύρος πιέσεων και θερμοκρασιών	100-300 MPa στους 20°C και 100-200 MPa στους 30 και 40°C	

Για τη μαθηματική έκφραση της συνδυασμένης επίδρασης της ΥΠ και της θερμοκρασίας στην απενεργοποίηση των πεπτιδασών PepN και PepX, οι παράμετροι της Εξίσωσης 4.8 προσδιορίστηκαν μετά από εφαρμογή μη γραμμικής παλινδρόμησης στα δεδομένα της παρούσας διατριβής και εκείνων των Katsaros et al., (2009) (Πίνακας 5.4).

Πίνακας 5.4. Παράμετροι της Εξίσωσης 4.8 που προβλέπει το ρυθμό απενεργοποίησης των αμινοπεπτιδασών PepN και PepX ($P_{ref} = 450$ MPa, $T_{ref} = 30^{\circ}\text{C}$) του *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105, βάσει των δεδομένων της παρούσας μελέτης (300-450 MPa) και αυτής των Katsaros et al. (2009) (300-700 MPa).

Παράμετρος	PepN	PepX
A (mL/mol.K)	-0.468	-0.125
B (MPa-1)	-0.0044	0.0012
k_0 (min⁻¹)	-0.089	-0.165
E_a (kJ/mol)	26.0	46.7
V_{a0} (mL/mol)	-18.1	-20.8
R^2	0.990	0.992
Εύρος πιέσεων και θερμοκρασιών	450-700 MPa στους 20°C και 300-700 MPa στους 30 και 40°C	

Βάσει των αποτελεσμάτων που ελήφθησαν για τη δραστηριότητα των αμινοπεπτιδασών PepN και PepX της καλλιέργειας του συγκεκριμένου στελέχους του *L. bulgaricus* μετά από την επεξεργασία τους ΥΠ και θερμοκρασία και με χρήση των εξισώσεων που αναπτύχθηκαν δίνεται η δυνατότητα επιλογής των βέλτιστων συνθηκών επεξεργασίας στις οποίες τα ένζυμα εμφανίζουν τη μέγιστη δραστηριότητά τους. Οι βέλτιστες συνθήκες επεξεργασίας για τις αμινοπεπτιδάσες PepN και PepX του στελέχους του *L. bulgaricus* προσδιορίστηκαν σε πίεση 200 MPa, θερμοκρασία 20°C και χρόνο επεξεργασίας 20 min (Σχήμα 5.5). Στις συγκεκριμένες συνθήκες παρατηρήθηκε αύξηση της δραστηριότητας κατά περίπου 4 φορές τόσο για την αμινοπεπτιδάση PepX, όσο και για την PepN. Περαιτέρω επεξεργασία στις συγκεκριμένες συνθήκες ($t > 20$ min) θα μπορούσε να δώσει ακόμα υψηλότερη δράση για τα συγκεκριμένα ένζυμα, αλλά ο χρόνος επεξεργασίας θα αυξανόταν σημαντικά, αυξάνοντας παράλληλα και το κόστος επεξεργασίας. Καθαρός χρόνος επεξεργασίας 20 min επιτρέπει το γέμισμα του δοχείου ΥΠ 2 φορές σε μια ώρα, φτάνοντας τις 16 συμπίεσεις σε 8 h λειτουργίας (ενδεικτικά για χρόνο επεξεργασίας 30 min ο αντίστοιχος αριθμός συμπίεσεων σε 8 h είναι μικρότερος από 12).



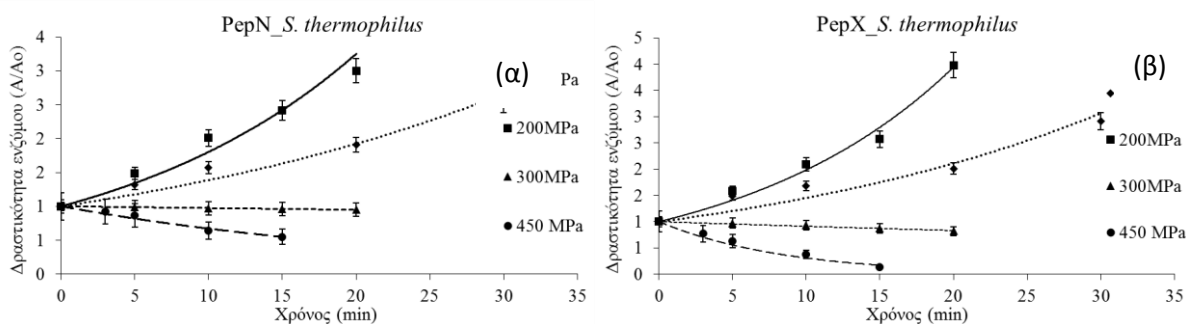
Σχήμα 5.5. Επίδραση της πίεσης επεξεργασίας 200 MPa και θερμοκρασίας 20°C στη δραστηκότητα των αμινοπεπτιδασών PepN - - - και PepX — του μικροοργανισμού *L. bulgaricus*.

Βάσει της μετρούμενης δραστηκότητας των δύο αμινοπεπτιδασών, μετά από επεξεργασία του στελέχους του *L. bulgaricus* στις συνθήκες 200 MPa, 20°C και 20 min οι αμινοπεπτιδάσες PepN και PepX ενεργοποιήθηκαν κατά 72.6 και 74.5%, αντίστοιχα.

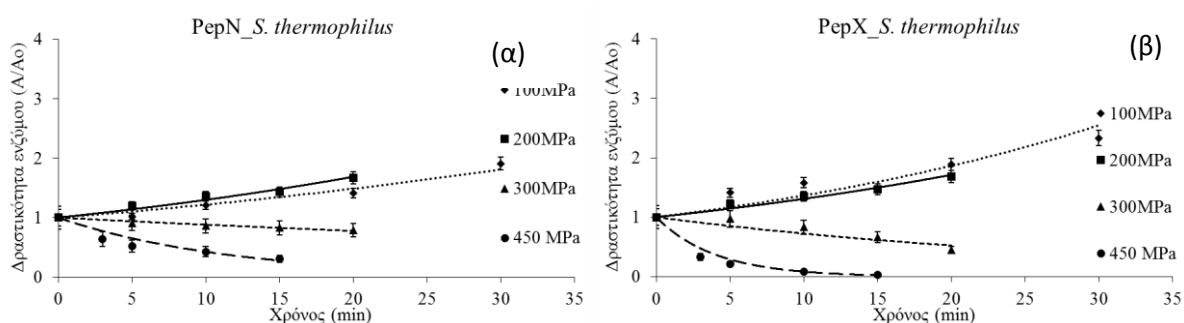
Στη διεθνή βιβλιογραφία και σε συμφωνία με τα αποτελέσματα του συγκεκριμένου τμήματος της διατριβής (επίδραση της ΥΠ σε πεπτιδάσες γαλακτοβακίλλων), οι Miyakawa et al. (1994), μελέτησαν την επίδραση της πίεσης στη δραστηκότητα πεπτιδασών γαλακτοβακίλλου και πιο συγκεκριμένα του στελέχους του *Lb. helveticus* και παρατήρησαν αύξηση της δραστηκότητάς τους μετά από επεξεργασία σε συνθήκες 400 MPa στους 30°C για 10 min. Σε αντίθεση, οι Casal & Gomez (1999), ανέφεραν μείωση της δραστηκότητας των αμινοπεπτιδασών στελέχους του *Lb. casei* μετά από επεξεργασία στα 400 MPa για 20 min.

5.1.2. Επεξεργασία με ΥΠ σε Συνδυασμό με Ήπιες Θερμοκρασίες των Αμινοπεπτιδασών PepN και PepX του *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0022

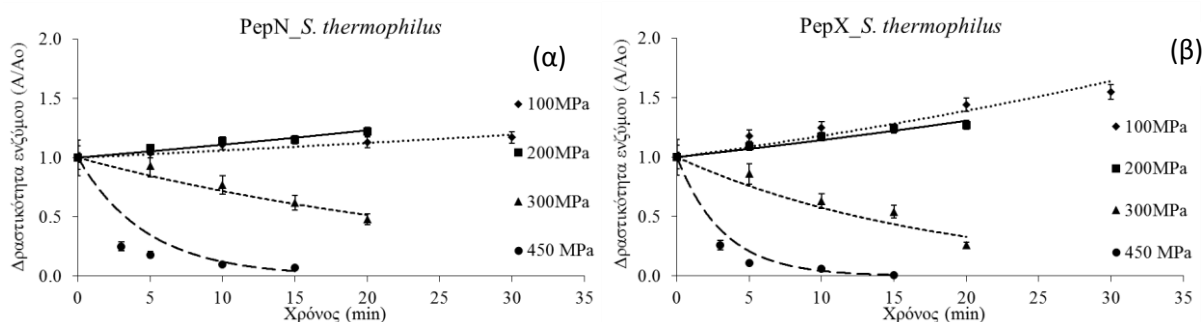
Στα Σχήματα 5.6-5.8 απεικονίζεται η μεταβολή της δραστηκότητας των αμινοπεπτιδασών PepN και PepX του μικροοργανισμού του *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0022, με τη μεταβολή της ΥΠ και του χρόνου επεξεργασίας σε σταθερή θερμοκρασία 20, 30 και 40°C, αντίστοιχα.



Σχήμα 5.6. Μεταβολή της δραστηκότητας των αμινοπεπτιδασών PepN και PepX του *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0022 σε πιέσεις ♦ 100 ($R^2_{\text{PepN}} = 0.936$, $R^2_{\text{PepX}} = 0.884$), ■ 200 ($R^2_{\text{PepN}} = 0.961$, $R^2_{\text{PepX}} = 0.979$), ▲ 300 ($R^2_{\text{PepN}} = 0.980$, $R^2_{\text{PepX}} = 0.968$) και ● 450 MPa ($R^2_{\text{PepN}} = 0.973$, $R^2_{\text{PepX}} = 0.955$) σε σταθερή θερμοκρασία 20°C.



Σχήμα 5.7. Μεταβολή της δραστηριότητας των αμινοπεπτιδασών PepN και PepX του *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0022 σε πιέσεις \blacklozenge 100 ($R^2_{\text{PepN}} = 0.958$, $R^2_{\text{PepX}} = 0.841$), \blacksquare 200 ($R^2_{\text{PepN}} = 0.959$, $R^2_{\text{PepX}} = 0.963$), \blacktriangle 300 ($R^2_{\text{PepN}} = 0.943$, $R^2_{\text{PepX}} = 0.854$) και \bullet 450 MPa ($R^2_{\text{PepN}} = 0.870$, $R^2_{\text{PepX}} = 0.961$) σε σταθερή θερμοκρασία 30°C.



Σχήμα 5.8. Μεταβολή της δραστηριότητας των αμινοπεπτιδασών PepN και PepX του *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0022 σε πιέσεις \blacklozenge 100 ($R^2_{\text{PepN}} = 0.842$, $R^2_{\text{PepX}} = 0.876$), \blacksquare 200 ($R^2_{\text{PepN}} = 0.924$, $R^2_{\text{PepX}} = 0.949$), \blacktriangle 300 ($R^2_{\text{PepN}} = 0.948$, $R^2_{\text{PepX}} = 0.884$) και \bullet 450 MPa ($R^2_{\text{PepN}} = 0.696$, $R^2_{\text{PepX}} = 0.942$) σε σταθερή θερμοκρασία 40°C.

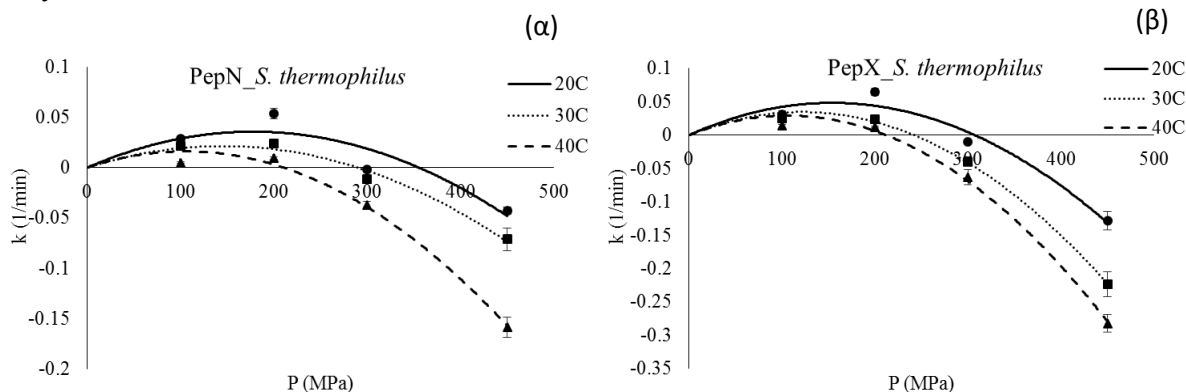
Όπως και στην περίπτωση των αμινοπεπτιδασών του στελέχους του *L. bulgaricus*, η ενεργοποίηση καθώς και η απενεργοποίηση των αμινοπεπτιδασών του μικροοργανισμού *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0022 ακολούθησε κινητική αντίδραση 1^{ης} τάξης. Οι τιμές των σταθερών των ρυθμών ενεργοποίησης/απενεργοποίησης, υπολογίστηκαν μετά από γραμμικοποίηση της Εξίσωσης 4.1 και γραμμική παλινδρόμηση. Η εξάρτηση της σταθεράς των ρυθμών ενεργοποίησης/απενεργοποίησης των πεπτιδασών από την θερμοκρασία εκφράστηκε μέσω της ενέργειας ενεργοποίησης (Εξίσωση 4.2), με $T_{\text{ref}} = 293.15$ K (20°C) για το διάστημα ενεργοποίησης και $T_{\text{ref}} = 313.15$ K (40°C) για το διάστημα απενεργοποίησής τους. Η εξάρτηση της σταθεράς του ρυθμού απενεργοποίησης από την πίεση εκφράστηκε μέσω του όγκου ενεργοποίησης (Εξίσωση 4.6), με $P_{\text{ref}} = 450$ MPa.

Στον Πίνακα 5.4. παρουσιάζονται τα κινητικά χαρακτηριστικά των αμινοπεπτιδασών PepN και PepX του στελέχους του *S. thermophilus* για όλες τις συνθήκες επεξεργασίας.

Πίνακας 5.4. Κινητικά χαρακτηριστικά των αμινοπεπτιδασών PepN και PepX του μικροοργανισμού *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0022, για όλες τις συνθήκες επεξεργασίας (ενεργοποίηση (+) / απενεργοποίηση (-))

PepN	P (MPa)								Ενεργοποίηση		Απενεργοποίηση		
	100		200		300		450		Va (mL/mol)	s.error	Va (mL/mol)	s.error	
T (°C)	k (1/min)	s. error	k (1/min)	s. error	k (1/min)	s. error	k (1/min)	s. error					
20	(+) 0.0287	0.0031	(+) 0.0536	0.0050	(-) 0.0017	0.0002	(-) 0.0426	0.0037	-13.5	-	-0.62	-	
30	(+) 0.0219	0.0021	(+) 0.0240	0.0024	(-) 0.0113	0.0017	(-) 0.0712	0.0113	-41.1	-	-1.12	-	
40	(+) 0.0050	0.0010	(+) 0.0092	0.0013	(-) 0.0375	0.0040	(-) 0.1589	0.0098	-31.3	-	-3.51	-	
PepX	P (MPa)								Ενεργοποίηση		Απενεργοποίηση		
	100		200		300		450		Va (mL/mol)	s.error	Va (mL/mol)	s.error	
T (°C)	k (1/min)	s. error	k (1/min)	s. error	k (1/min)	s. error	k (1/min)	s. error					
20	(+) 0.0316	0.0047	(+) 0.0650	0.0049	(-) 0.0101	0.0009	(-) 0.1284	0.0139	-159.3	-	-1.82	-	
30	(+) 0.0254	0.0043	(+) 0.0245	0.0022	(-) 0.0396	0.0076	(-) 0.2235	0.0185	-65.8	-	-4.00	-	
40	(+) 0.0138	0.0021	(+) 0.0121	0.0014	(-) 0.0632	0.0118	(-) 0.2824	0.0134	-32.6	-	-4.82	-	
Ea (kJ/mol)													
100		200		300		450							
	Ea (kJ/mol)	s. error	Ea (kJ/mol)	s. error	Ea (kJ/mol)	s. error	Ea (kJ/mol)	s. error					
	79.7 (+)	6.1	80.8 (+)	6.5	114.1 (-)	8.2	60.2 (-)	5.9					
	37.7 (+)	3.3	77.1 (+)	5.4	44.3 (-)	3.8	36.3 (-)	2.6					

Η συνδυαστική επίδραση της ΥΠ και της θερμοκρασίας στις σταθερές των ρυθμών ενεργοποίησης και απενεργοποίησης των αμινοπεπτιδασών PepN και PepX, παρατίθενται στα Σχήματα 5.9. α, β, αντίστοιχα. Ο οριζόντιος άξονας δείχνει το όριο πάνω από το οποίο παρατηρείται ενεργοποίηση των αμινοπεπτιδασών για την κάθε περίπτωση, ενώ κάτω από αυτό το όριο παρατηρείται απενεργοποίησή τους.



Σχήμα 5.9. Συνδυαστική επίδραση της ΥΠ και της θερμοκρασίας στις σταθερές των ρυθμών ενεργοποίησης και απενεργοποίησης των αμινοπεπτιδασών α) PepN και β) PepX του μικροοργανισμού *S. thermophilus* ACA-DC 0022. Οι τιμές πάνω από τον οριζόντιο άξονα αναφέρονται σε ενεργοποίηση της αμινοπεπτιδάσης, ενώ κάτω από τον άξονα σε απενεργοποίησή της

Όπως και στην περίπτωση του μικροοργανισμού *L. bulgaricus*, οι υψηλότερες τιμές των σταθερών των ρυθμών ενεργοποίησης των αμινοπεπτιδασών PepN και PepX του στελέχους του *S. thermophilus* που μελετήθηκε, παρατηρήθηκαν για συνθήκες επεξεργασίας 200 MPa, 20°C. Από τα Σχήματα 5.9 α, β φαίνεται ότι σε συγκεκριμένες πιέσεις για κάθε θερμοκρασία ο ρυθμός μεταβολής της δραστηριότητας των πεπτιδασών μηδενίζεται. Μετά από πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε συνθήκες 370 MPa/20°C, 290 MPa/30°C, 210 MPa/40°C για την αμινοπεπτιδάση PepN και 320 MPa/20°C, 250 MPa/30°C και 210 MPa/40°C για την αμινοπεπτιδάση PepX, επαληθεύτηκε ο προαναφερόμενος ισχυρισμός.

Για τη μαθηματική έκφραση της συνδυασμένης επίδρασης της ΥΠ και της θερμοκρασίας στην ενεργοποίηση των πεπτιδασών PepN και PepX καθώς και για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών επεξεργασίας των πεπτιδασών της οξυγαλακτικής καλλιέργειας του μικροοργανισμού *S. thermophilus* ACA-DC 0022 με ΥΠ και θερμοκρασία για μέγιστη ενεργοποίησή τους, προσδιορίστηκαν μετά από εφαρμογή μη γραμμικής παλινδρόμησης στα δεδομένα της παρούσας διατριβής και εκείνων των Giannoglou et al., (2016), οι παράμετροι της Εξίσωσης 4.4 (Πίνακας 5.5).

Πίνακας 5.5. Παράμετροι της Εξίσωσης 4.4 που προβλέπει το ρυθμό ενεργοποίησης των αμινοπεπτιδασών PepN και PepX ($P_{ref} = 200$ MPa, $T_{ref} = 20^\circ\text{C}$) του *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0022, βάσει των δεδομένων της παρούσας μελέτης και αυτής των Giannoglou et al. (2016)

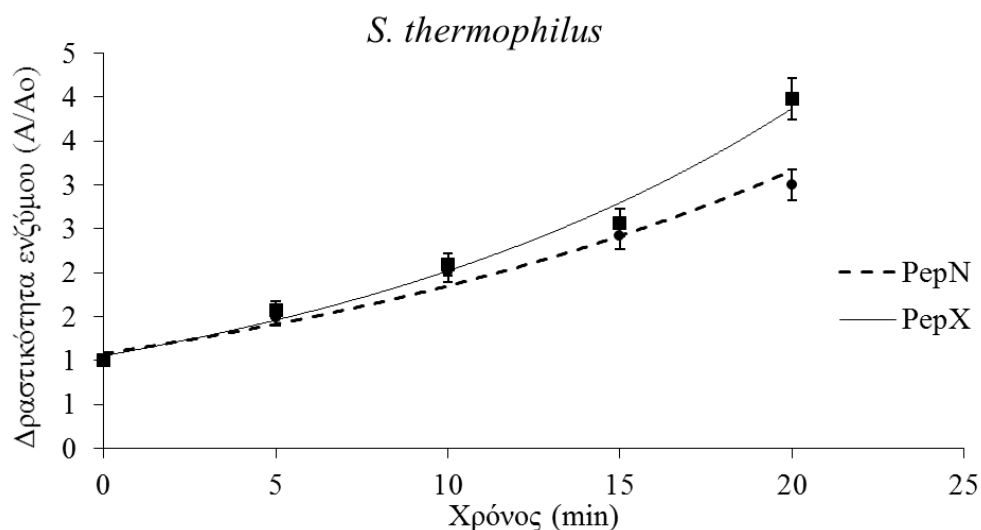
Παράμετρος	PepN	PepX
A (mL/mol·K)	-0.000066	-0.000037
B (MPa⁻¹)	-0.00136	-0.00185
k₀ (min⁻¹)	0.0535	0.0529
E_a (kJ/mol)	62.2	74.6
R²	0.966	0.972
Εύρος πιέσεων και θερμοκρασιών	100-200 MPa στους 20, 30 και 40°C	

Για τη μαθηματική έκφραση της συνδυασμένης επίδρασης της ΥΠ και της θερμοκρασίας στην απενεργοποίηση των πεπτιδασών PepN και PepX του μικροοργανισμού *S. thermophilus*, οι παράμετροι της Εξίσωσης 4.8 προσδιορίστηκαν μετά από εφαρμογή μη γραμμικής παλινδρόμησης στα δεδομένα της παρούσας διατριβής και εκείνων των Giannoglou et al., (2016) (Πίνακας 5.6).

Πίνακας 5.6. Υπολογιζόμενες παράμετροι της Εξίσωσης 4.8 που προβλέπει το ρυθμό απενεργοποίησης των αμινοπεπτιδασών PepN και PepX ($P_{ref} = 450 \text{ MPa}$, $T_{ref} = 30^\circ\text{C}$) του *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0022, βάσει των δεδομένων της παρούσας μελέτης και αυτής των Giannoglou et al. (2016)

Παράμετρος	PepN	PepX
A (mL/mol·K)	-0.806	-0.411
B (MPa⁻¹)	-0.0042	0.0133
k₀ (min⁻¹)	-0.222	-0.341
E_a (kJ/mol)	84.9	30.1
V_{ao} (mL/mol)	-18.3	-20.5
R²	0.988	0.986
Εύρος πιέσεων και θερμοκρασιών	300-450 MPa στους 20, 30 και 40°C	

Βάσει των αποτελεσμάτων που ελήφθησαν για τη δραστηριότητα των αμινοπεπτιδασών PepN και PepX του στελέχους *S. thermophilus* ACA-DC 0022 μετά από την επεξεργασία τους ΥΠ και θερμοκρασία και με χρήση των εξισώσεων που αναπτύχθηκαν δίνεται η δυνατότητα επιλογής των βέλτιστων συνθηκών επεξεργασίας στις οποίες τα ένζυμα εμφανίζουν τη μέγιστη δραστηριότητά τους. Οι βέλτιστες συνθήκες επεξεργασίας για τις αμινοπεπτιδάσες PepN και PepX, προσδιορίστηκαν σε πίεση 200 MPa, θερμοκρασία 20°C και χρόνο επεξεργασίας 20 min (Σχήμα 5.10). Αντίστοιχα με τα αποτελέσματα της δραστηριότητας του στελέχους του *L. bulgaricus*, στις συγκεκριμένες συνθήκες παρατηρήθηκε αύξηση της δραστηριότητας κατά περίπου 4 φορές τόσο για την αμινοπεπτιδάση PepX, όσο και για την PepN του στελέχους του *S. thermophilus*. Και σε αυτή την περίπτωση η επιλογή των βέλτιστων συνθηκών έγινε βάσει της αύξησης της δραστηριότητας και λαμβάνοντας ταυτόχρονα υπόψη το εκτιμώμενο κόστος επεξεργασίας.



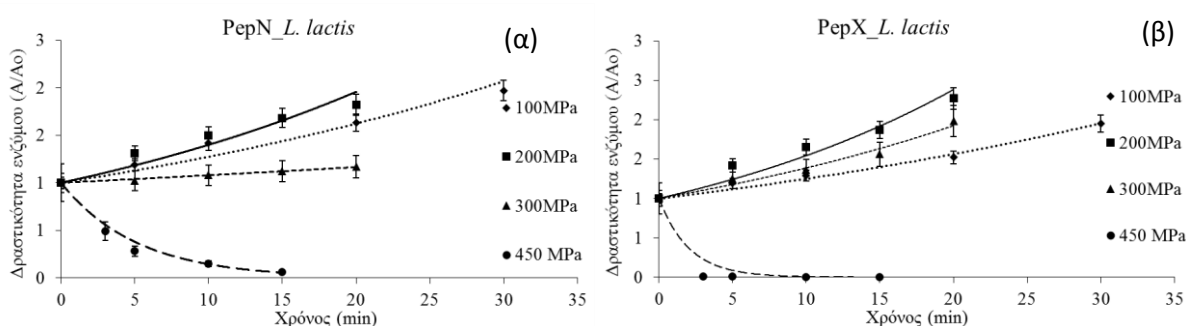
Σχήμα 5.10. Επίδραση της πίεσης επεξεργασίας 200 MPa και θερμοκρασίας 20°C στη δραστηριότητα των αμινοπεπτιδασών PepN - - - και PepX — του στελέχους *S. thermophilus* ACA-DC 0022.

Βάσει της μετρούμενης δραστηριότητας των δύο αμινοπεπτιδασών, μετά από επεξεργασία της οξυγαλακτικής καλλιέργειας του στελέχους *S. thermophilus* ACA-DC 0022, οι αμινοπεπτιδάσες PepN και PepX ενεργοποιήθηκαν κατά 73.8 και 78.3%, αντίστοιχα.

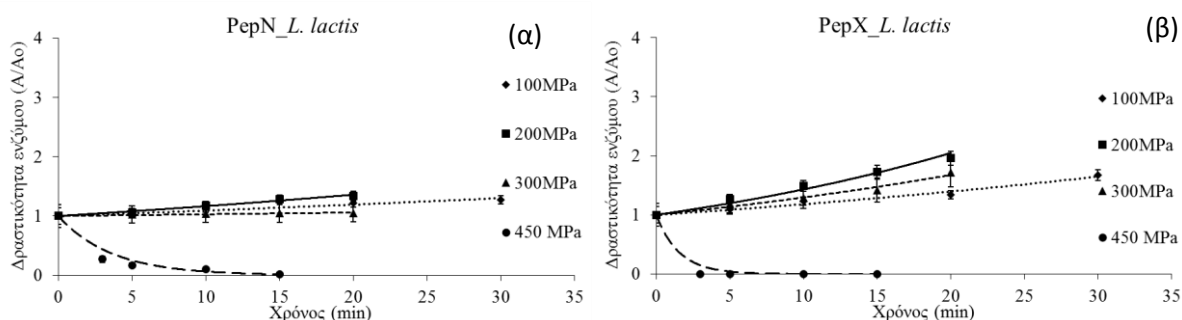
Στη διεθνή βιβλιογραφία δε συναντώνται αναφορές σχετικές με την επίδραση της ΥΠ σε αμινοπεπτιδάσες της οξυγαλακτικής καλλιέργειας του μικροοργανισμού *S. thermophilus*.

5.1.3. Επεξεργασία με ΥΠ σε Συνδυασμό με Ήπιες Θερμοκρασίες των Αμινοπεπτιδασών PepN και PepX του *Lactococcus lactis* ACA-DC 0049

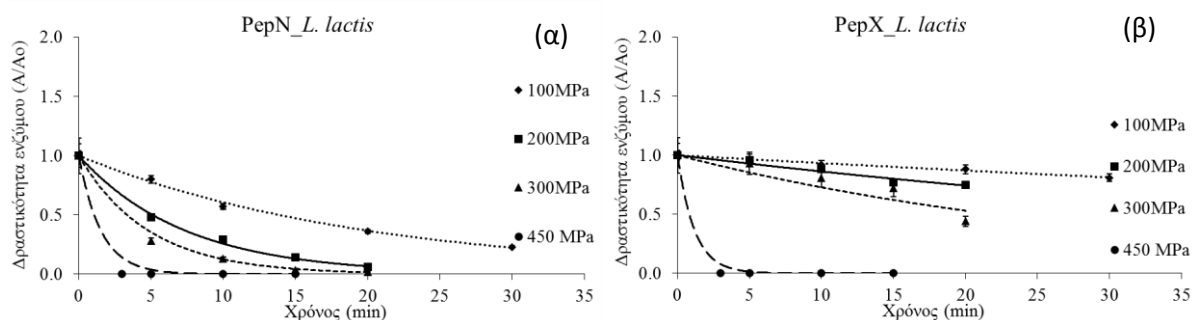
Στα Σχήματα 5.11-5.13 απεικονίζεται η μεταβολή της δραστηριότητας των αμινοπεπτιδασών PepN και PepX του μικροοργανισμού *Lactococcus lactis* ACA-DC 0049, με τη μεταβολή της ΥΠ και του χρόνου επεξεργασίας σε σταθερή θερμοκρασία 20, 30 και 40°C, αντίστοιχα.



Σχήμα 5.11. Μεταβολή της δραστηριότητας των αμινοπεπτιδασών PepN και PepX του μικροοργανισμού *Lactococcus lactis* ACA-DC 0049 σε πιέσεις ♦100 ($R^2_{\text{PepN}} = 0.939$, $R^2_{\text{PepX}} = 0.978$), ■ 200 ($R^2_{\text{PepN}} = 0.906$, $R^2_{\text{PepX}} = 0.934$), ▲ 300 ($R^2_{\text{PepN}} = 0.979$, $R^2_{\text{PepX}} = 0.973$) και ● 450 MPa ($R^2_{\text{PepN}} = 0.974$, $R^2_{\text{PepX}} = 0.665$) σε σταθερή θερμοκρασία 20°C.



Σχήμα 5.12. Μεταβολή της δραστηριότητας των αμινοπεπτιδασών PepN και PepX του μικροοργανισμού *Lactococcus lactis* ACA-DC 0049 σε πιέσεις ♦100 ($R^2_{\text{PepN}} = 0.943$, $R^2_{\text{PepX}} = 0.978$), ■ 200 ($R^2_{\text{PepN}} = 0.984$, $R^2_{\text{PepX}} = 0.974$), ▲ 300 ($R^2_{\text{PepN}} = 0.763$, $R^2_{\text{PepX}} = 0.976$) και ● 450 MPa ($R^2_{\text{PepN}} = 0.937$, $R^2_{\text{PepX}} = 0.678$) σε σταθερή θερμοκρασία 30°C.



Σχήμα 5.13. Μεταβολή της δραστηριότητας των αμινοπεπτιδασών PepN και PepX του μικροοργανισμού *Lactococcus lactis* ACA-DC 0049 σε πιέσεις \blacklozenge 100 ($R^2_{\text{PepN}} = 0.996$, $R^2_{\text{PepX}} = 0.988$), \blacksquare 200 ($R^2_{\text{PepN}} = 0.993$, $R^2_{\text{PepX}} = 0.953$), \blacktriangle 300 ($R^2_{\text{PepN}} = 0.989$, $R^2_{\text{PepX}} = 0.822$) και \bullet 450 MPa ($R^2_{\text{PepN}} = 0.677$, $R^2_{\text{PepX}} = 0.692$) σε σταθερή θερμοκρασία 40°C.

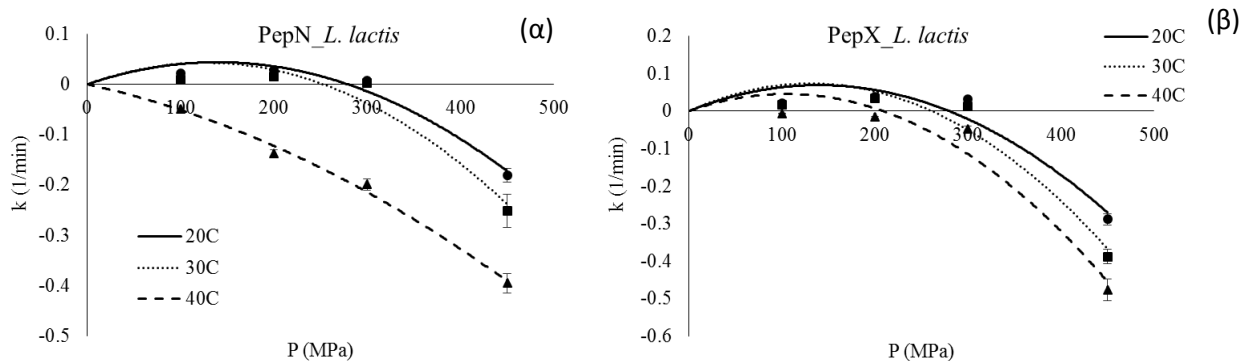
Όπως και στην περίπτωση των αμινοπεπτιδασών των προηγούμενων στελεχών του γαλακτοβακίλου και του στρεπτόκοκκου, η ενεργοποίηση καθώς και η απενεργοποίηση των αμινοπεπτιδασών του μικροοργανισμού *Lactococcus lactis* ACA-DC 0049 ακολούθησε κινητική αντίδραση 1^{ης} τάξης. Οι τιμές των σταθερών των ρυθμών ενεργοποίησης/απενεργοποίησης, υπολογίστηκαν μετά από γραμμικοποίηση της Εξίσωσης 4.1 και γραμμική παλινδρόμηση. Η εξάρτηση της σταθεράς των ρυθμών ενεργοποίησης/απενεργοποίησης των πεπτιδασών από την θερμοκρασία εκφράστηκε μέσω της ενέργειας ενεργοποίησης (Εξίσωση 4.2), με $T_{\text{ref}} = 293.15$ K (20°C) για το διάστημα ενεργοποίησης και $T_{\text{ref}} = 313.15$ K (40°C) για το διάστημα απενεργοποίησής τους. Η εξάρτηση της σταθεράς του ρυθμού απενεργοποίησης από την πίεση εκφράστηκε μέσω του όγκου ενεργοποίησης (Εξίσωση 4.6), με $P_{\text{ref}} = 450$ MPa.

Στον Πίνακα 5.7. παρουσιάζονται τα κινητικά χαρακτηριστικά των αμινοπεπτιδασών PepN και PepX του μικροοργανισμού *Lactococcus lactis* ACA-DC 0049 για όλες τις συνθήκες επεξεργασίας.

Πίνακας 5.7. Κινητικά χαρακτηριστικά των αμινοπεπτιδασών PepN και PepX του μικροοργανισμού *Lactococcus lactis* ACA-DC 0049, για όλες τις συνθήκες επεξεργασίας (ενεργοποίηση (+) / απενεργοποίηση (-))

PepN	P (MPa)								Ενεργοποίηση		Απενεργοποίηση	
	100		200		300		450		Va (mL/mol)	s. error	Va (mL/mol)	s. error
T (°C)	k (1/min)	s. error	k (1/min)	s. error	k (1/min)	s. error	k (1/min)	s. error				
20	(+) 0.0216	0.0024	(+) 0.0289	0.0041	(+) 0.0082	0.0006	(-) 0.1804	0.0135	-43.1	3.8	-	-
30	(+) 0.0082	0.0011	(+) 0.0155	0.0011	(+) 0.0023	0.0005	(-) 0.2518	0.0333	-17.0	1.5	-	-
40	(-) 0.0494	0.0018	(-) 0.1372	0.0065	(-) 0.1990	0.0115	(-) 0.3954	0.0194	-	-	-4.5	0.3
	P (MPa)											
	100		200		300		450					
	Ea (kJ/mol)	s. error	Ea (kJ/mol)	s. error	Ea (kJ/mol)	s. error	Ea (kJ/mol)	s. error				
	71.4 (+)	-	46.4 (+)	-	95.1 (+)	-	30.0 (-)	3.2				
PepX	P (MPa)								Ενεργοποίηση		Απενεργοποίηση	
	100		200		300		450		Va (mL/mol)	s. error	Va (mL/mol)	s. error
T (°C)	k (1/min)	s. error	k (1/min)	s. error	k (1/min)	s. error	k (1/min)	s. error				
20	(+) 0.0209	0.0015	(+) 0.0383	0.0046	(+) 0.0318	0.0030	(-) 0.2884	0.0153	-77.2	5.5	-	-
30	(+) 0.0163	0.0014	(+) 0.0331	0.0024	(+) 0.0125	0.0023	(-) 0.3883	0.0190	-61.1	5.1	-	-
40	(-) 0.0069	0.0004	(-) 0.0159	0.0019	(-) 0.0484	0.0090	(-) 0.4768	0.0282	-	-	-6.3	0.8
	P (MPa)											
	100		200		300		450					
	Ea (kJ/mol)	s. error	Ea (kJ/mol)	s. error	Ea (kJ/mol)	s. error	Ea (kJ/mol)	s. error				
	18.4 (+)	-	21.7 (+)	-	68.7 (+)	-	19.2 (-)	2.0				

Η συνδυαστική επίδραση της ΥΠ και της θερμοκρασίας στις σταθερές των ρυθμών ενεργοποίησης και απενεργοποίησης των αμινοπεπτιδασών PepN και PepX του στελέχους *L. lactis* ACA-DC 0049, παρατίθενται στα Σχήματα 5.14. α, β, αντίστοιχα. Ο οριζόντιος άξονας δείχνει το όριο πάνω από το οποίο παρατηρείται ενεργοποίηση των αμινοπεπτιδασών για την κάθε περίπτωση, ενώ κάτω από αυτό το όριο παρατηρείται απενεργοποίησή τους.



Σχήμα 5.14. Συνδυαστική επίδραση της ΥΠ και της θερμοκρασίας στις σταθερές των ρυθμών ενεργοποίησης και απενεργοποίησης των αμινοπεπτιδασών α) PepN και β) PepX του στελέχους *L. lactis* ACA-DC 0049. Οι τιμές πάνω από τον οριζόντιο άξονα αναφέρονται σε ενεργοποίηση της αμινοπεπτιδάσης, ενώ κάτω από τον άξονα σε απενεργοποίησή της.

Όπως και στην περίπτωση των αμινοπεπτιδασών των στελεχών *L. bulgaricus* και *S. thermophilus*, οι υψηλότερες τιμές των σταθερών των ρυθμών ενεργοποίησης των αμινοπεπτιδασών PepN και PepX του *L. lactis* ACA-DC 0049, παρατηρήθηκαν για συνθήκες επεξεργασίας 200 MPa, 20°C. Από τα Σχήματα 5.9 α, β φαίνεται ότι σε συγκεκριμένες πιέσεις για κάθε θερμοκρασία ο ρυθμός μεταβολής της δραστηριότητας των πεπτιδασών μηδενίζεται. Μετά από πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε συνθήκες 370 MPa/20°C, 290 MPa/30°C, 210 MPa/40°C για την αμινοπεπτιδάση PepN και 320 MPa/20°C, 250 MPa/30°C και 210 MPa/40°C για την αμινοπεπτιδάση PepX του μικροοργανισμού *L. lactis*, επαληθεύτηκε ο προαναφερόμενος ισχυρισμός.

Για τη μαθηματική έκφραση της συνδυασμένης επίδρασης της ΥΠ και της θερμοκρασίας στην ενεργοποίηση των πεπτιδασών PepN και PepX καθώς και για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών επεξεργασίας των πεπτιδασών της καλλιέργειας του στελέχους *L. lactis* ACA-DC 0049 με ΥΠ και θερμοκρασία για μέγιστη ενεργοποίησή τους, προσδιορίστηκαν μετά από εφαρμογή μη γραμμικής παλινδρόμησης στα δεδομένα της παρούσας διατριβής και εκείνων των Giannoglou et al., (2016), οι παράμετροι της Εξίσωσης 4.4 (Πίνακας 5.8).

Πίνακας 5.8. Υπολογιζόμενες παράμετροι της Εξίσωσης 4.4 που προβλέπει το ρυθμό ενεργοποίησης των αμινοπεπτιδασών PepN και PepX ($P_{ref} = 200$ MPa, $T_{ref} = 20^\circ\text{C}$) του μικροοργανισμού *L. lactis* ACA-DC 0049, βάσει των δεδομένων της παρούσας μελέτης και αυτής των Giannoglou et al. (2016)

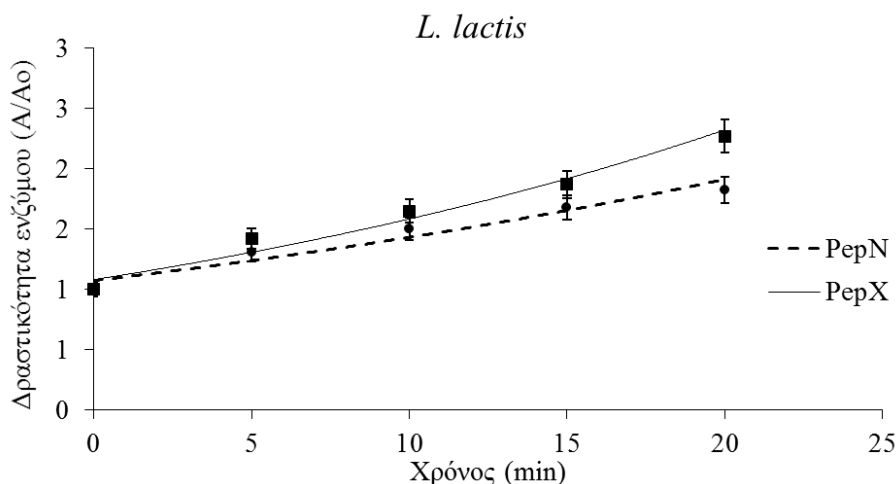
Παράμετρος	PepN	PepX
A (mL/mol·K)	-0.0001	-0.0001
B (MPa⁻¹)	-0.00031	-0.00022
k_o (min⁻¹)	0.035	0.043
E_a (kJ/mol)	62.9	18.4
R²	0.994	0.991
Εύρος πιέσεων και θερμοκρασιών	100-200 MPa στους 20, 30°C	

Για τη μαθηματική έκφραση της συνδυασμένης επίδρασης της ΥΠ και της θερμοκρασίας στην απενεργοποίηση των πεπτιδασών PepN και PepX του μικροοργανισμού *L. lactis* ACA-DC 0049, οι παράμετροι της Εξίσωσης 4.8 προσδιορίστηκαν μετά από εφαρμογή μη γραμμικής παλινδρόμησης στα δεδομένα της παρούσας διατριβής και εκείνων των Giannoglou et al., (2016) (Πίνακας 5.9).

Πίνακας 5.9. Υπολογιζόμενες παράμετροι της Εξίσωσης 4.8 που προβλέπει το ρυθμό απενεργοποίησης των αμινοπεπτιδασών PepN και PepX ($P_{ref} = 450$ MPa, $T_{ref} = 30^{\circ}\text{C}$) του μικροοργανισμού *L. lactis* ACA-DC 0049, βάσει των δεδομένων της παρούσας μελέτης και αυτής των Giannoglou et al. (2016)

Παράμετρος	PepN	PepX
A (mL/mol·K)	-0.482	-0.123
B (MPa ⁻¹)	-0.0040	0.0013
k ₀ (min ⁻¹)	-0.083	-0.161
E _a (kJ/mol)	25.8	46.7
V _{ao} (mL/mol)	-18.6	-20.9
R ²	0.990	0.993
Εύρος πιέσεων και θερμοκρασιών	100-200 MPa στους 40°C και 300-450 MPa στους 20, 30 και 40°C	

Βάσει των αποτελεσμάτων που ελήφθησαν για τη δραστηριότητα των αμινοπεπτιδασών PepN και PepX της οξυγαλακτικής καλλιέργειας του μικροοργανισμού *L. lactis* ACA-DC 0049 μετά από την επεξεργασία τους ΥΠ και θερμοκρασία και με χρήση των εξισώσεων που αναπτύχθηκαν δίνεται η δυνατότητα επιλογής των βέλτιστων συνθηκών επεξεργασίας στις οποίες τα ένζυμα εμφανίζουν τη μέγιστη δραστηριότητά τους. Οι βέλτιστες συνθήκες επεξεργασίας για τις αμινοπεπτιδάσες PepN και PepX της οξυγαλακτικής καλλιέργειας του μικροοργανισμού *L. lactis* ACA-DC 0049 προσδιορίστηκαν σε πίεση 200 MPa, θερμοκρασία 20°C και χρόνο επεξεργασίας 20 min (Σχήμα 5.15). Αντίστοιχα με τα αποτελέσματα της δραστηριότητας των στελεχών των *L. bulgaricus* και *S. thermophilus*, στις συγκεκριμένες συνθήκες παρατηρήθηκε αύξηση της δραστηριότητας κατά περίπου 2.5 φορές τόσο για την αμινοπεπτιδάση PepX, όσο και για την PepN του στελέχους του *L. lactis*. Και σε αυτή την περίπτωση η επιλογή των βέλτιστων συνθηκών έγινε βάσει της αύξησης της δραστηριότητας και λαμβάνοντας ταυτόχρονα υπόψη το εκτιμώμενο κόστος επεξεργασίας.



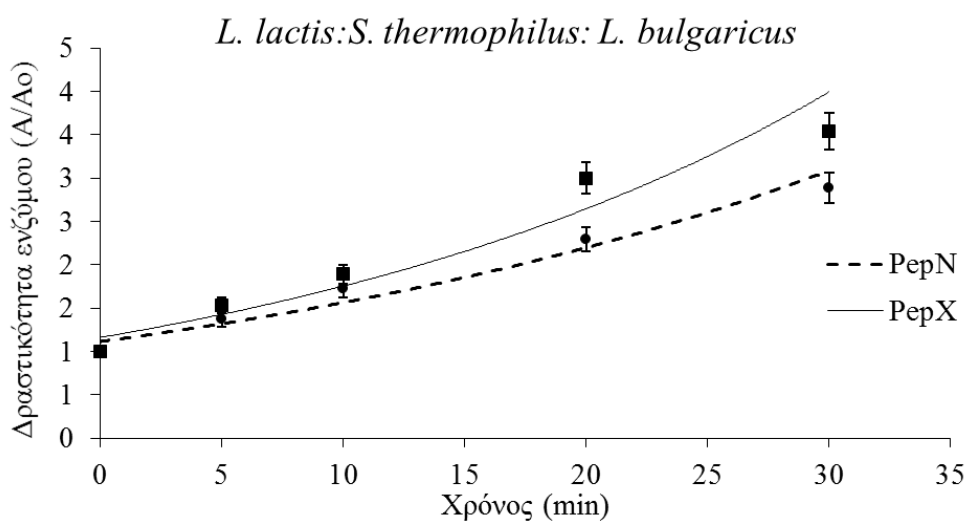
Σχήμα 5.15. Επίδραση της πίεσης επεξεργασίας 200 MPa και θερμοκρασίας 20°C στη δραστηριότητα των αμινοπεπτιδασών PepN - - - και PepX — του μικροοργανισμού *L. lactis* ACA-DC 0049.

Βάσει της μετρούμενης δραστηριότητας των δύο αμινοπεπτιδασών, μετά από επεξεργασία της οξυγαλακτικής καλλιέργειας του μικροοργανισμού *L. lactis* ACA-DC 0049, οι αμινοπεπτιδάσες PepN και PepX ενεργοποιήθηκαν κατά 40.8 και 55.6%, αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα της επίδρασης της ΥΠ στη δραστηριότητα αμινοπεπτιδασών του *L. lactis* ACA-DC 0049 είναι σε μερική συμφωνία με τα αποτελέσματα των Malone et al. (2003), οι οποίοι μελέτησαν την επίδραση της ΥΠ σε συνθήκες 100-800 MPa για 5 min στους 25°C, σε αμινοπεπτιδάσες του στελέχους *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, οι συγγραφείς παρατήρησαν σταθερή δραστηριότητα για την αμινοπεπτιδάση PepN μετά από επεξεργασία σε πιέσεις έως 200 MPa και απενεργοποίηση του ενζύμου σε εντονότερες συνθήκες. Ωστόσο ανέφεραν ενεργοποίηση της αμινοπεπτιδάσης PepC σε πιέσεις 100-700 MPa.

5.1.4. Επεξεργασία με ΥΠ των Αμινοπεπτιδασών PepN και PepX Μεικτής Οξυγαλακτικής Καλλιέργειας *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105, *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0022 και *Lactococcus lactis* ACA-DC 0049.

Έχοντας ως τελικό στόχο της ερευνητικής δραστηριότητας τη χρήση μείγματος επεξεργασμένων με ΥΠ στελεχών ως καλλιέργειας εκκίνησης για την παρασκευή λευκού τυριού άλμης τύπου Φέτας, πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης της ΥΠ στις PepN και PepX, στις βέλτιστες συνθήκες (200 MPa, 20°C) που προσδιορίστηκαν, σε μείγμα των μικροοργανισμών *L. lactis* ACA-DC 0049, *S. thermophilus* ACA-DC 0022 και *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105 σε αναλογία 2:1:1. Στο Σχήμα 5.16 δίνεται η επίδραση των συνθηκών 200 MPa, 20°C στις αμινοπεπτιδάσες PepN και PepX για τη μεικτή καλλιέργεια.



Σχήμα 5.16. Επίδραση της πίεσης επεξεργασίας 200 MPa και θερμοκρασίας 20°C στη δραστηριότητα των αμινοπεπτιδασών PepN και PepX μεικτής καλλιέργειας *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105, *S. thermophilus* ACA-DC 0022 και *L. lactis* ACA-DC 0049 σε αναλογία 2:1:1.

Οι σταθερές των ρυθμών ενεργοποίησης των αμινοπεπτιδασών PepN και PepX προσδιορίστηκαν ως 0.0527 ± 0.0016 και $0.0640 \pm 0.0052 \text{ min}^{-1}$, αντίστοιχα. Βάσει της μετρούμενης δραστηριότητας των δύο αμινοπεπτιδασών, μετά από επεξεργασία της μεικτής οξυγαλακτικής καλλιέργειας των τριών στελεχών, οι αμινοπεπτιδάσες PepN και PepX ενεργοποιήθηκαν κατά 61.3 και 70.1%, αντίστοιχα.

Οι μεταβολές που παρατηρούνται στη δραστηριότητα των αμινοπεπτιδασών οφείλονται πιθανώς σε μεταβολές στη δομή τους. Οι Mozhaen et al. (1996), ανέφεραν ότι η εφαρμογή της ΥΠ προκαλεί μεταβολές στη δομή των πρωτεϊνών. Πιέσεις από 100-200 MPa αρκούν για να προκληθεί διαχωρισμός ολιγομερών πρωτεϊνών και πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων, ενώ μετουσίωση μικρών μονομερών πρωτεϊνών επιτεύχθηκε κατά τη διάρκεια εφαρμογής πιέσεων από 400 έως 800 MPa.

5.2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΥΠ ΚΑΙ ΗΠΙΩΝ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΩΝ ΣΤΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΤΗ ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΚΑΘΑΡΗΣ X-prolyl-dipeptidyl ΑΜΙΝΟΠΕΠΤΙΔΑΣΗΣ (PepX) ΑΠΟ ΤΗΝ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΕΚΚΙΝΗΣΗΣ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0022.

Η αμινοπεπτιδάση PepX απομονώθηκε από το στέλεχος *S. thermophilus* ACA DC 0022 και καθαρίστηκε με εφαρμογή χρωματογραφίας ανιοντοανταλλαγής, μοριακής διήθησης και υδροξυαπατίτη. Για τη μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας και της ΥΠ στη δραστηριότητα της καθαρής PepX εφαρμόστηκαν οι συνθήκες επεξεργασίας που παρουσιάζονται στους Πίνακες 5.10, 5.11, αντίστοιχα.

Πίνακας 5.10. Συνδυασμοί συνθηκών επεξεργασίας θερμοκρασίας-χρόνου της καθαρής PepX απομονωμένη από το στέλεχος *S. thermophilus* ACA DC 0022

20°C	0, 5, 10, 20, 30, 60 min
30°C	
40°C	
50°C	
55°C	
60°C	

Πίνακας 5.11. Συνδυασμοί συνθηκών επεξεργασίας ΥΠ-θερμοκρασίας-χρόνου της καθαρής PepX απομονωμένη από το στέλεχος *S. thermophilus* ACA DC 0022

100 MPa	20°C	0, 5, 10, 20, 30 min
	30°C	0, 5, 10, 20, 30 min
	40°C	0, 5, 10, 20, 30 min
200 MPa	20°C	0, 5, 10, 20, 30 min
	30°C	0, 5, 10, 20, 30 min
	40°C	0, 5, 10, 20, 30 min
300 MPa	20°C	0, 5, 10, 15, 20, 30 min
	30°C	0, 5, 10, 15, 20, 30 min
	40°C	0, 5, 10, 15, 20 min
450 MPa	20°C	0, 5, 10, 20, 30 min
	30°C	0, 2, 5, 10, 20 min
	40°C	0, 2, 5, 10, 20 min

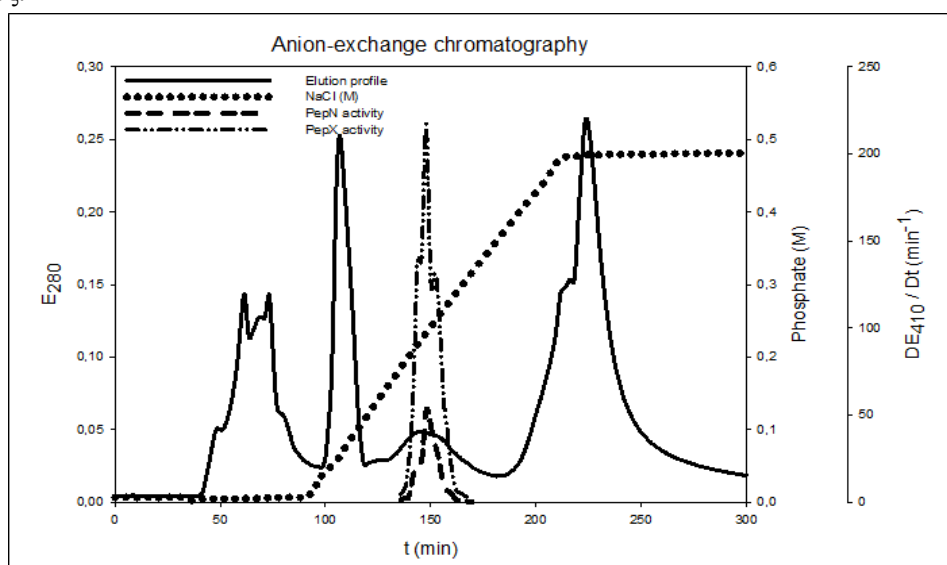
5.2.1. Απομόνωση και Καθαρισμός της X-prolyl-dipeptidyl Αμινοπεπτιδάσης (PepX) από το στέλεχος *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0022.

Μετά την καλλιέργεια μεγάλης ποσότητας του στελέχους *S. thermophilus* ACA-DC 0022, τη λύση των κυττάρων με χρήση υπερήχων και την παραλαβή του εσωκυτταρικού υγρού μέσω διαχωρισμού του με εφαρμογή φυγοκέντρησης ακολούθησε καθαρισμός του ενζύμου με εφαρμογή μεθόδων όπως η κατακρήμνιση των πρωτεϊνών με θειικό αμμώνιο, η υπερδιήθηση και η χρωματογραφία (Παρ. 4.3.4.2).

Η κατακρήμνιση των πρωτεϊνών με θειικό αμμώνιο ((NH₄)₂SO₄) στηρίζεται στο διαχωρισμό με προσθήκη άλατος σε υψηλές συγκεντρώσεις, ο οποίος εξαρτάται από την υδροφοβικότητα των πρωτεϊνών. Μετά την καταβύθιση σε 30% του κορεσμού (NH₄)₂SO₄ δεν παρατηρήθηκε σημαντική απώλεια ενεργότητας, απομακρύνθηκε όμως μεγάλη ποσότητα σωματιδίων υψηλού μοριακού βάρους. Η καταβύθιση σε 70% (NH₄)₂SO₄ ήταν επιτυχής δίνοντας ενεργότητα ενζύμου άνω του 80% του αρχικού ανεπεξέργαστου εκχυλίσματος. Το υπερκείμενο υγρό της φυγοκέντρησης δεν είχε ανιχνεύσιμη ενεργότητα. Μέρος της ενεργότητας του δείγματος χάθηκε κατά τη σειρά διηθήσεων που ακολούθησαν. Οι διηθήσεις ήταν απαραίτητες, καθώς επέτρεψαν την απομάκρυνση σωματιδίων μεγάλου μεγέθους που θα μπορούσαν να δημιουργήσουν προβλήματα στον εξοπλισμό των μετέπειτα σταδίων (υπερδιήθηση, χρωματογραφικός διαχωρισμός).

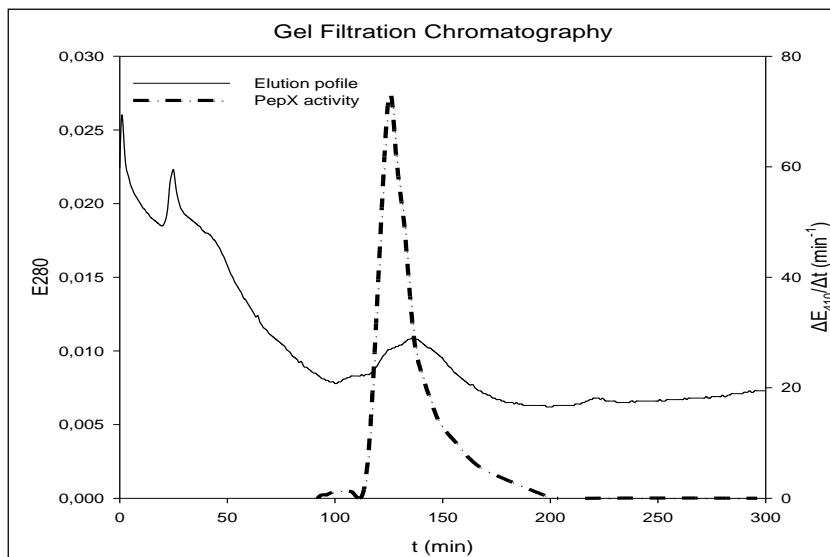
Ακολούθησε υπερδιήθηση του ενζυμικού διαλύματος για την απομάκρυνση των αλάτων και για τη συμπύκνωσή του. Και τα δύο βήματα απαιτούνται για τη σωστή λειτουργία των διαδικασιών χρωματογραφικού καθαρισμού.

Κατά τη διάρκεια της FPLC-χρωματογραφίας ανιοντοανταλλαγής, η αμινοπεπτιδάση PepX εμφανίστηκε να συνδέεται ισχυρά με το υλικό της στήλης UNOsphere Q σε pH 7.0, ενώ μεγάλο ποσοστό άλλων πρωτεϊνών δε συγκρατήθηκε από τη στήλη (έκλουση). Κατά την έκλουση με σταδιακή αυξανόμενη συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου (NaCl), η αμινοπεπτιδάση PepX παρουσιάστηκε ως μία κορυφή σε συγκέντρωση NaCl 0.18 M (Σχήμα 5.17). Στο συγκεκριμένο σημείο ανιχνεύτηκε και μικρή ποσότητα αμινοπεπτιδάσης PepN. Η συγκεκριμένη μέθοδος χρωματογραφίας επαναλήφθηκε τρεις φορές για την αύξηση της καθαρότητας του ενζυμικού διαλύματος.



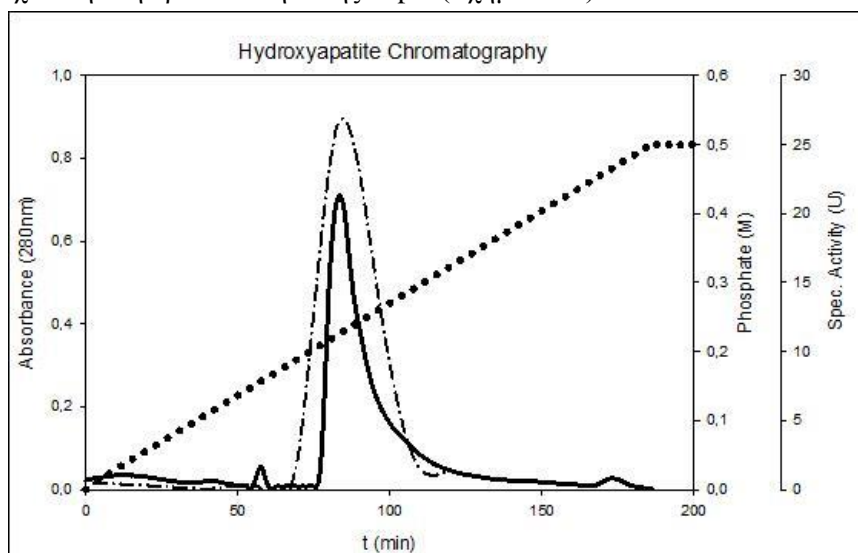
Σχήμα 5.17. Χρωματογραφία ανιοντοανταλλαγής σε στήλη UNOsphere Q για τον καθαρισμό της αμινοπεπτιδάσης PepX. Η έκλουση έγινε με ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Tris-HCl pH 7.0 και διαβάθμιση συγκέντρωσης NaCl

Για περαιτέρω καθαρισμό των ενζυμικών κλασμάτων πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία μοριακής διήθησης με χρήση στήλης Sephacryl S-300. Μετά από αντιπαράθεση της καμπύλης έκλυσης που προέκυψε, με την καμπύλη μέτρησης της δραστηκότητας της PepX αποκαλύφθηκε το σημείο έκλυσης του ενζύμου (Σχήμα 5.18).



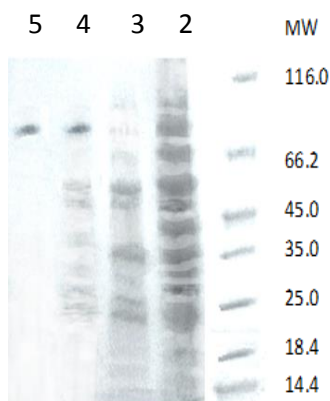
Σχήμα 5.18. Χρωματογραφία μοριακής διήθησης για τον περαιτέρω καθαρισμό της αμινοπεπτιδάσης PepX (Σχήμα 5.17) σε στήλη Sephacryl S-300. Η έκλυση έγινε με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM pH 7.0

Τελευταίο στάδιο καθαρισμού αποτέλεσε η εφαρμογή χρωματογραφίας υδροξυαπατίτη. Στο χρωματογράφημα παρατηρήθηκε μόνο μία έντονη κορυφή σε συγκέντρωση φωσφορικών 0.19 M, στην οποία ανιχνεύτηκε η δραστηκότητα της PepX (Σχήμα 5.19).



Σχήμα 5.19. Χρωματογραφία υδροξυαπατίτη για τον περαιτέρω καθαρισμό της αμινοπεπτιδάσης PepX (Σχήμα 5.18). Η έκλυση έγινε με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 30 Mm, 50 mM NaCl, 5 Mm MgCl₂ pH 7.0

Για τον έλεγχο καθαρότητας της κορυφής του Σχήματος 5.19, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE, το αποτέλεσμα της οποίας έδειξε την ύπαρξη μόνο της αμινοπεπτιδάσης PepX με μοριακό βάρος 86 kDa (Εικόνα 5.1).

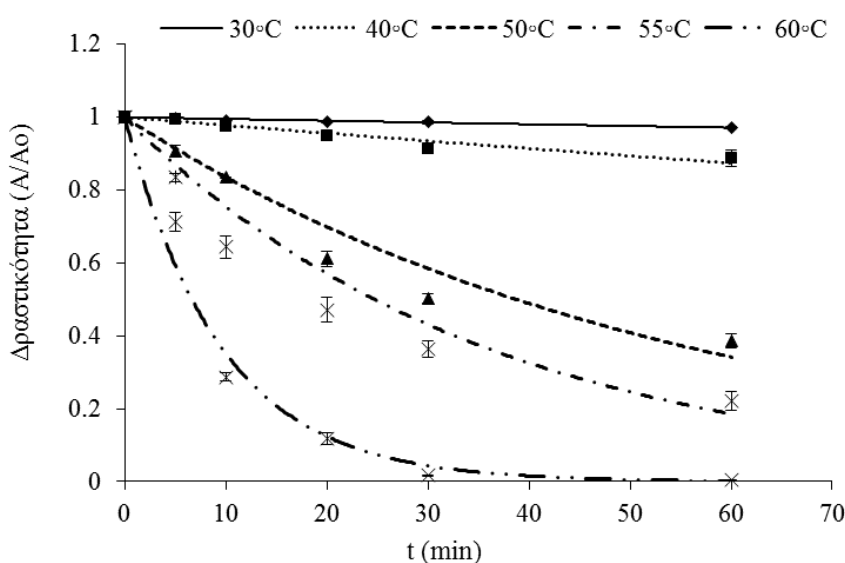


Εικόνα 5.1. SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση στα διάφορα στάδια καθαρισμού της αμινοπεπτιδάσης PepX ; Στήλη 1, πρότυπα MW; Στήλη 2, καθαρισμός PepX μετά από καταβύθιση με χρήση $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; Στήλη 3, καθαρισμός PepX μετά από χρωματογραφία ανιοντο-εναλλαγής; Στήλη 4, καθαρισμός PepX μετά από χρωματογραφία μοριακής διήθησης; Στήλη 5, MW της PepX μετά από χρωματογραφία υδροξυπατίτη.

Μετά από ηλεκτροφόρηση σε συνθήκες μη αποδιάταξης NATIVE-PAGE, το μοριακό βάρος του ενζύμου προσδιορίστηκε στα ~170 kDa. Συνεπώς, προκύπτει ότι η PepX προερχόμενη από το στέλεχος *S. thermophilus* ACA-DC 0022, χαρακτηρίζεται ως διμερής πρωτεΐνη.

5.2.2. Κινητική Μελέτη της Επίδρασης της Θερμοκρασίας στην Καθαρή Αμινοπεπτιδάση PepX από το Στέλεχος *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0022

Για τη μελέτη της ευαισθησίας της καθαρής αμινοπεπτιδάσης PepX στη θερμοκρασία, μελετήθηκε η επίδραση θερμοκρασιών 30-60°C στη δραστικότητα του καθαρού ενζύμου για χρόνους επεξεργασίας 0-60 min. Τα αποτελέσματα έδειξαν απενεργοποίηση του καθαρού ενζύμου, ανάλογα με τις κάθε φορά εφαρμοζόμενες συνθήκες. Εντονότερη θερμική επεξεργασία οδήγησε σε μεγαλύτερο βαθμό απενεργοποίησης του καθαρού ενζύμου. Η απενεργοποίηση της καθαρής PepX ακολούθησε κινητική πρώτης τάξης (Σχήμα 5.20).



Σχήμα 5.20. Επίδραση της θερμικής επεξεργασίας (30-60°C) για 0-60 min, στη δραστικότητα της καθαρής PepX του *S. thermophilus* ACA-DC 0022

Για όλες τις θερμοκρασίες στις οποίες επεξεργάστηκε το καθαρό ένζυμο, υπολογίστηκαν οι ρυθμοί απενεργοποίησής του μετά από γραμμικοποίηση της Εξίσωσης 4.1 και εφαρμογή γραμμικής παλινδρόμησης. Η εξάρτηση του ρυθμού απενεργοποίησης του καθαρού ενζύμου (k) από τη θερμοκρασία εκφράστηκε μέσω της ενέργειας ενεργοποίησης (E_a) η οποία υπολογίστηκε με χρήση της εξίσωσης Arrhenius (Εξίσωση 4.2). Στον Πίνακα 5.12 παρατίθενται οι ρυθμοί απενεργοποίησης του καθαρού ενζύμου σε κάθε θερμοκρασία επεξεργασίας καθώς και η E_a και η σταθερά του ρυθμού απενεργοποίησης στη θερμοκρασία αναφοράς (k_{ref}) ($T_{ref}=30^\circ\text{C}$).

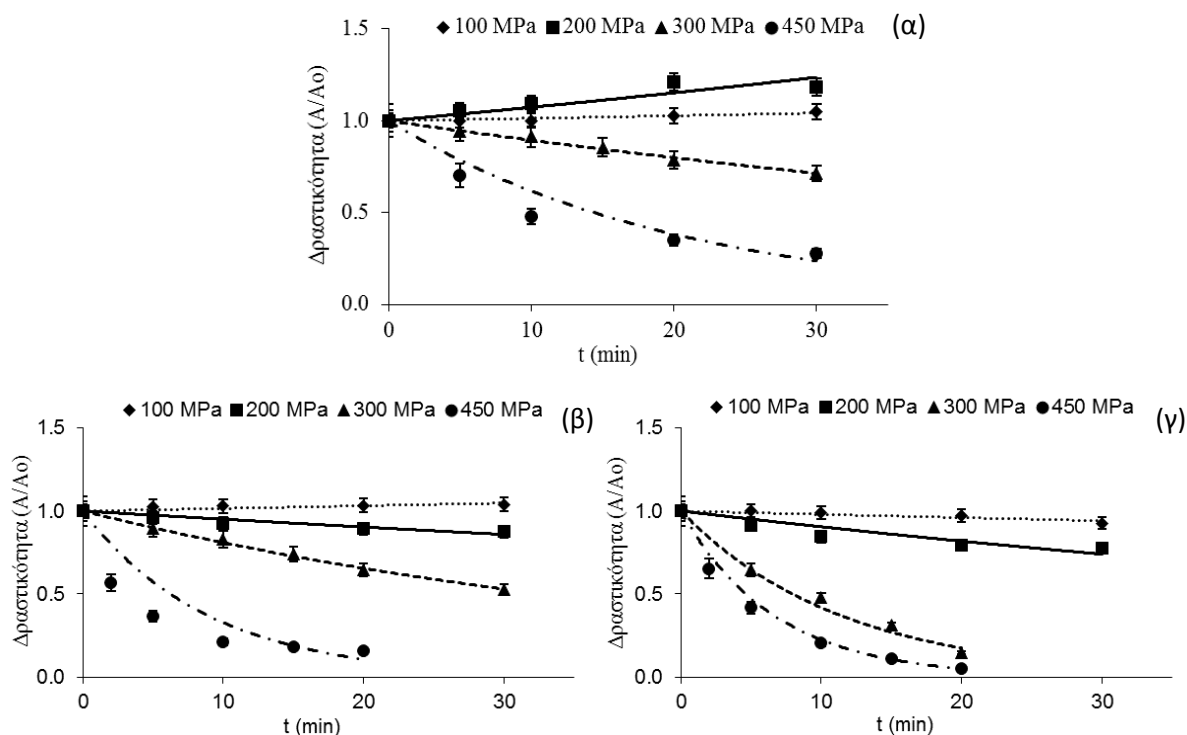
Πίνακας 5.12. Σταθερές των ρυθμών απενεργοποίησης και τα κινητικά χαρακτηριστικά της θερμικά επεξεργασμένης καθαρής PepX του *S. thermophilus* ACA-DC 0022.

T (°C)	k (min⁻¹)	Standard error
30	0.00044	0.00003
40	0.0021	0.0003
50	0.0164	0.0022
55	0.0247	0.0028
60	0.0998	0.0114
E_a (kJ/mol)	149.3	8.6
k_{ref} (min⁻¹)	0.00041	0.00003

Η θερμική επεξεργασία της καθαρής PepX σε θερμοκρασίες 30, 40, 50 και 60°C οδήγησε σε 3, 12, 52 και 88-πλάσια αύξηση της σταθεράς του ρυθμού απενεργοποίησής της, αντίστοιχα.

5.2.3. Κινητική Μελέτη της Επίδρασης της ΥΠ σε Συνδυασμό με Ήπιες Θερμοκρασίες στην Καθαρή Αμινοπεπτιδάση PerX του *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0022.

Στο συγκεκριμένο στάδιο, διερευνήθηκε η επίδραση της ΥΠ 100-450 MPa σε συνδυασμό με ήπιες θερμοκρασίες 20-40°C και για χρόνους επεξεργασίας 0-30 min, στη δραστηριότητα της καθαρής αμινοπεπτιδάσης PerX. Η μεταβολή της δραστηριότητας της καθαρής αμινοπεπτιδάσης κατά την επεξεργασία της στους διαφορετικούς συνδυασμούς συνθηκών ΥΠ-θερμοκρασίας (Πίνακας 5.11), δίνεται στα Σχήματα 5.21 α, β, γ.



Σχήμα 5.21. Επίδραση της ΥΠ 100 \blacklozenge , 200 \blacksquare , 300 \blacktriangle και 450 MPa \bullet στη δραστηριότητα της καθαρής PerX του *S. thermophilus* ACA-DC 0022 σε θερμοκρασία επεξεργασίας (α) 20°C, (β) 30°C και (γ) 40°C

Από τα αποτελέσματα προέκυψε διαφορετική συμπεριφορά του καθαρού ενζύμου ανάλογα με τις συνθήκες επεξεργασίας που εφαρμόστηκαν όπως ακριβώς παρατηρήθηκε και στην περίπτωση της επεξεργασίας με ΥΠ και θερμοκρασία της μη καθαρής μορφής της PerX (Παρ. 5.1.1.2).

Μετά από επεξεργασία του καθαρού ενζύμου σε συνθήκες πίεσης-θερμοκρασίας 100-200 MPa στους 20°C και 100 MPa στους 30°C, παρατηρήθηκε αύξηση της δραστηριότητας της καθαρής PerX. Αντίθετα επεξεργασία σε εντονότερες συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας οδήγησε σε μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου.

Για όλες τις συνθήκες ΥΠ-θερμοκρασίας στις οποίες επεξεργάστηκε το καθαρό ένζυμο, υπολογίστηκαν οι σταθερές των ρυθμών ενεργοποίησης (+)/απενεργοποίησης (-) του (k) μετά από γραμμικοποίησης της Εξίσωσης 4.1 και εφαρμογή γραμμικής παλινδρόμησης (Πίνακας 5.13).

Πίνακας 5.13. Σταθερές των ρυθμών ενεργοποίησης (+) και απενεργοποίησης (-) της επεξεργασμένης με ΥΠ και θερμοκρασία καθαρής PcpX (τιμή \pm standard error) του *S. thermophilus* ACA-DC 0022.

P (MPa) T (°C)	100	200	300	450
20	+0.0017 \pm 0.0003 (R ² =0.837)	+0.0060 \pm 0.0005 (R ² =0.924)	-0.0107 \pm 0.0017 (R ² =0.990)	-0.0416 \pm 0.0054 (R ² =0.935)
30	+0.0012 \pm 0.0006 (R ² =0.805)	-0.0043 \pm 0.0007 (R ² =0.927)	-0.0216 \pm 0.0008 (R ² =0.995)	-0.0865 \pm 0.0099 (R ² =0.868)
40	-0.0026 \pm 0.0005 (R ² =0.884)	-0.0081 \pm 0.00082 (R ² =0.877)	-0.0914 \pm 0.0090 (R ² =0.972)	-0.1427 \pm 0.0044 (R ² =0.996)

Για επεξεργασία του καθαρού ενζύμου σε συνθήκες 450 MPa, 40°C και για χρόνους επεξεργασίας >10 min, παρατηρήθηκε εναπομένουσα δραστικότητα του ενζύμου 0.340 nmol pNa / g / min.

Για την παρατήρηση και καλύτερη κατανόηση των ακριβών συνθηκών που πραγματοποιείται ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση του καθαρού ενζύμου καθώς και του ποσοστού μεταβολής της δραστικότητάς του, στον Πίνακα 5.14. παρατίθεται η %μεταβολή της δραστικότητας της καθαρής PcpX (ενεργοποίηση (+) ή απενεργοποίηση (-)) συγκριτικά με τη δραστικότητα της ανεπεξεργαστης καθαρής PcpX, σε όλες τις μελετώμενες συνθήκες επεξεργασίας.

Πίνακας 5.14. % αύξηση της ενεργότητας (+) ή %μείωση της ενεργότητας (-) της καθαρής PcpX συγκριτικά με τη δραστικότητα της ανεπεξεργαστου καθαρού ενζύμου, σε όλες τις μελετώμενες συνθήκες επεξεργασίας

P (MPa)			
100			
T (°C)	20	30	40
t (min)	% ενεργοποίηση (+) ή % απενεργοποίηση (-)		
0	+0.05	-13.07	-10.99
5	+0.04	-10.63	-11.03
10	+0.19	-10.56	-11.73
20	+2.70	-10.15	-13.27
30	+4.65	-9.67	-17.54
P (MPa)			
200			
T (°C)	20	30	40
t (min)	% ενεργοποίηση (+) ή % απενεργοποίηση (-)		
0	+8.95	+5.04	+0.67
5	+13.86	+1.08	-7.84
10	+16.79	-2.55	-14.91
20	+24.81	-5.98	-19.87
30	+23.10	-7.90	-21.93
P (MPa)			
300			
T (°C)	20	30	40
t (min)	% ενεργοποίηση (+) ή % απενεργοποίηση (-)		
0	+13.77	+7.92	-48.94
5	+8.65	+3.87	-66.99
10	+7.46	-2.82	-75.59
15	+1.93	-3.53	-84.18
20	-8.12	-9.12	-92.49
30	-10.84	-14.65	-
P (MPa)			
450			
T (°C)	20	30	40
t (min)	% ενεργοποίηση (+) ή % απενεργοποίηση (-)		
0	-34.56	-89.72	-94.20
2	-	-94.17	-95.59
5	-71.78	-96.26	-96.53
10	-86.45	-97.82	-97.97
15	-	-98.00	-98.02
20	-91.07	-98.01	-98.07
30	-97.85	-	-

Βάσει των αποτελεσμάτων, οι υψηλότερες δραστικότητες για την καθαρή αμινοπεπτιδάση PcpX παρατηρήθηκαν σε συνθήκες επεξεργασίας 200 MPa και 20°C. Ειδικότερα μετά από επεξεργασία σε συνθήκες 200 MPa, 20°C για 20 min η δραστικότητα της καθαρής PcpX εμφανίστηκε υψηλότερη κατά 24.81% σε σύγκριση με την ανεπεξεργαστη καθαρή PcpX. Τα αποτελέσματα του συγκεκριμένου σταδίου της έρευνας είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα που προέκυψαν για τη

μη καθαρή μορφή της αμινοπεπτιδάσης PepX (Παρ. 5.1.2) καθώς και με τα αποτελέσματα που αφορούν στη μεταβολή της δραστηριότητας με ΥΠ και θερμοκρασία των υπολοίπων αμινοπεπτιδασών της καλλιέργειας στελέχους *S. thermophilus* ACA-DC 0022 που μελετήθηκαν από τους Giannoglou et al., 2016.

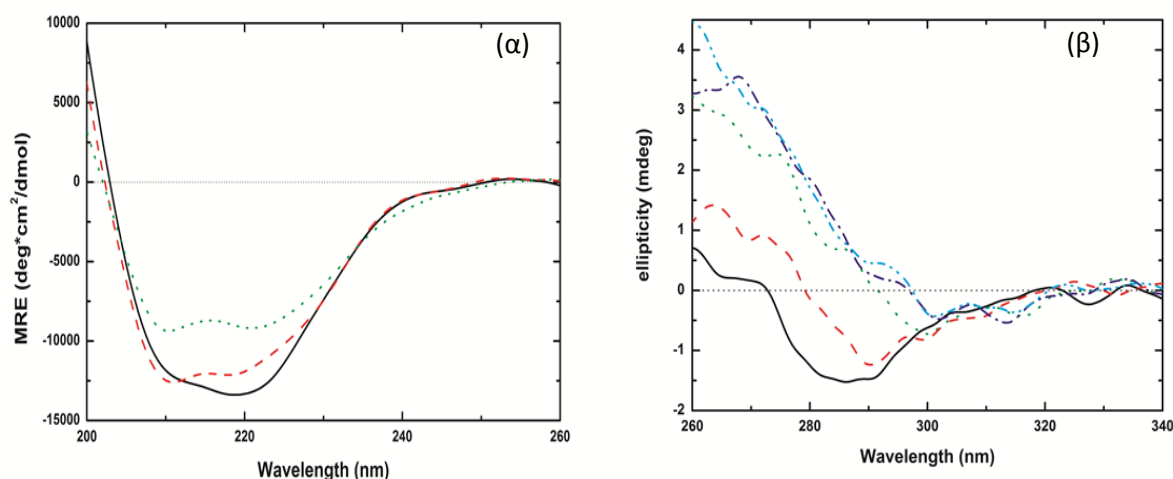
Ειδικότερα η δραστηριότητα της μη καθαρής μορφής της αμινοπεπτιδάσης PepX αυξήθηκε μετά από επεξεργασία σε ΥΠ 100 και 200 MPa στους 20°C. Αντίθετα μείωση της δραστηριότητας παρατηρήθηκε σε συνθήκες επεξεργασίας υψηλότερες των 300 MPa.

Η μη καθαρή μορφή αυτής της αμινοπεπτιδάσης PepX εμφάνισε μεγαλύτερη ευαισθησία στην επεξεργασία με ΥΠ σε σύγκριση με την καθαρή PepX η οποία εμφανίστηκε πιο ανθεκτική. Οι τιμές των σταθερών του ρυθμού ενεργοποίησης/απενεργοποίησης της μη καθαρής PepX ήταν υψηλότερες συγκριτικά με της καθαρής αμινοπεπτιδάσης (π.χ. σε συνθήκες 450 MPa, 30°C, οι σταθερές των ρυθμών απενεργοποίησης προσδιορίστηκαν ως 0.2758 min⁻¹ και 0.0865 min⁻¹ για τη μη καθαρή και την καθαρή μορφή του ενζύμου, αντίστοιχα).

5.2.4. Ανάλυση Δομής της καθαρής Αμινοπεπτιδάσης PepX του στελέχους *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0022.

Για τη διερεύνηση της διαφορετικής συμπεριφοράς των αμινοπεπτιδασών μετά από επεξεργασία τους με ΥΠ (ενεργοποίηση/απενεργοποίηση), στο συγκεκριμένο στάδιο της έρευνας μελετήθηκαν οι πιθανές δομικές μεταβολές του επεξεργασμένου με ΥΠ μορίου της καθαρής αμινοπεπτιδάσης PepX στελέχους *S. thermophilus* ACA-DC 0022. Από τη μελέτη της διεθνούς βιβλιογραφίας, αν και έχουν γίνει σημαντικά βήματα πάνω στη δομή και τον τρόπο λειτουργίας των αμινοπεπτιδασών, δεν υπάρχουν αναφορές σχετικά με τη μεταβολή της δομής τους μετά από αλλαγές διαφόρων παραγόντων όπως είναι η θερμοκρασία και η ΥΠ.

Οι δομικές μεταβολές της επεξεργασμένης με ΥΠ καθαρής αμινοπεπτιδάσης PepX μελετήθηκαν με χρήση φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού (CD). Η τεχνική αυτή όπως αναλύθηκε και στην Παράγραφο 4.3.6.3, επιτρέπει την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τη δευτεροταγή και την τριτοταγή δομή, χρησιμοποιώντας ως δείγματα πρωτεϊνικά διαλύματα υψηλής καθαρότητας. Για τη μελέτη της επίδρασης της ΥΠ στη δευτεροταγή δομή του ενζύμου, λήφθηκαν φάσματα κυκλικού διχρωισμού της ανεπεξεργαστής αμινοπεπτιδάσης και της επεξεργασμένης PepX στις συνθήκες που παρουσιάστηκε μέγιστη ενεργοποίηση του ενζύμου 200 MPa, 20°C, 20 min και σε συνθήκες απενεργοποίησης του ενζύμου 450 MPa, 20°C, 20 min, στο άπω υπεριώδες (190-260 nm) (Σχήμα 5.22 α). Για τη μελέτη της επίδρασης της ΥΠ στην τριτοταγή δομή του ενζύμου, λήφθηκαν φάσματα κυκλικού διχρωισμού της ανεπεξεργαστής αμινοπεπτιδάσης και της επεξεργασμένης PepX σε συνθήκες 100-450 MPa στους 20°C και για χρόνο επεξεργασίας 20 min, στο εγγύς υπεριώδες (260-320 nm) (Σχήμα 5.22 β).



Σχήμα 5.22. α) Φάσμα στο άπω υπεριώδες της ανεπεξέργαστης PerX (μαύρη γραμμή) και της επεξεργασμένης PerX σε ΥΠ 200 (κόκκινη γραμμή) και 450 MPa (πράσινη γραμμή) στους 20°C για 20 min και **β)** Φάσμα στο εγγύς υπεριώδες: Ελλειπτικότητα της ανεπεξέργαστης PerX (μαύρη γραμμή) και της επεξεργασμένης PerX σε πίεση 100 (κόκκινη γραμμή), 200 (μπλε γραμμή), 300 (πράσινη γραμμή) και 450 MPa (γαλάζια γραμμή) σε θερμοκρασία 20°C για χρόνο 20 min.

Τα φάσματα κυκλικού διχρωισμού σχετικά με τη φυσιολογική διαμόρφωση της αμινοπεπτιδάσης PerX αποκαλύπτουν δύο αρνητικές ελλειπτικότητες σε μήκη κύματος 208 και 220 nm με τη δεύτερη να εμφανίζεται εντονότερη (Σχήμα 5.22α). Παρόμοια δευτεροταγής δομή έχει παρατηρηθεί για την πρωτεΐνωση Ω, την παπαΐνη (Solis-Mendiola, 1992) και την ακτινιδίνη (Alexandrakis et al., 2016). Η ανάλυση των φασμάτων της ανεπεξέργαστης PerX στο άπω υπεριώδες με χρήση του λογισμικού CDNN (Bohm et al., 1992) αποκάλυψε ότι το 34.8% της δευτεροταγούς δομής της PerX αποτελείται από δομή α-έλικας, ενώ το 14.4% από β-πτυχωτά φύλλα και β-στροφές. Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας είναι παρόμοια με τα αποτελέσματα της κρυσταλλογραφημένης δομής της απομονωμένης από *Lc. lactis* PerX των Rigolet et al., (2002).

Οι Mozhaev et al. (1996), υποστήριξαν ότι η εφαρμογή της ΥΠ μπορεί να προκαλέσει μερικές (local changes) ή ολικές μεταβολές (global changes) της πρωτεϊνικής δομής και τελικώς να οδηγήσει σε μετουσίωση του πρωτεϊνικού μορίου. Πιέσεις στο εύρος 100-200 MPa μπορεί να προκαλέσουν τη διάσπαση ολιγομερών πρωτεϊνών και πολύ-πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων. Σύμφωνα με τον Heremans, (1982), μετουσίωση μικρών μονομερών πρωτεϊνών μπορεί να επιτευχθεί μετά από εφαρμογή πιέσεων στο εύρος 400 to 800 MPa. Γενικώς, οι δομικές μεταβολές που προκαλούνται στο ένζυμο εξαιτίας της πίεσης εξαρτώνται σε σημαντικό βαθμό από το «πακετάρισμα» των μορίων του (internal packing). Η πρωτεΐνη σε διάλυμα περιέχει κενά και εσωτερικές κοιλότητες, το οποίο είναι αποτέλεσμα του ατελούς πακεταρίσματος (imperfect packing) των αμινοξέων, καθώς και της διαλυτοποίησης των πεπτιδικών δεσμών και των αμινοξέων των πλευρικών αλυσίδων.

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την παρούσα έρευνα και μετά από μελέτη των φασμάτων που λήφθηκαν στην περιοχή του άπω υπεριώδους (Σχήμα 5.22α), παρατηρήθηκαν σημαντικές μη αντιστρεπτές μεταβολές της δομής της αμινοπεπτιδάσης PerX μετά από επεξεργασία σε συνθήκες 450 MPa, 20°C και 20 min. Μετά από ανάλυση του φάσματος με το πρόγραμμα CDNN, προέκυψε ότι η επεξεργασία του ενζύμου στις συγκεκριμένες συνθήκες οδήγησε σε μείωση της δομής α-έλικας σε ποσοστό 38% (Πίνακας 5.15). Επεξεργασία της αμινοπεπτιδάσης PerX σε συνθήκες 200 MPa, 20°C και 20 min, είχε ως αποτέλεσμα μικρή μεταβολή της δευτεροταγούς δομής του μορίου.

Πίνακας 5.15. Ανάλυση μεταβολών της δευτεροταγούς δομής της επεξεργασμένης με ΥΠ και ανεπεξέργαστης αμινοπεπτιδάσης PepX με χρήση του λογισμικού CDNN

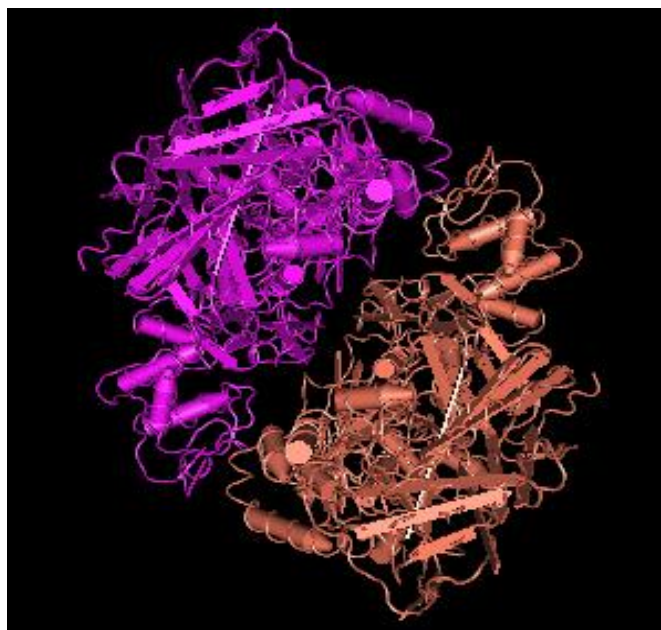
Συνθήκες Επεξεργασίας PepX	α-έλικα %	relative H* %	β-στροφές και β-πτυχές %	Random coil %	Εναπομένουσα Δραστικότητα %
native	34.8	100.0	14.4	29.0	100.0
200 MPa 20°C 20 min	36.3	104.3	16.2	31.1	124.8
450 MPa 20°C 20 min	21.6	62.1	17.3	32.6	4.8

* relative H,% υποδηλώνει το ρυθμό της περιεκτικότητας σε α-έλικα του επεξεργασμένου ενζύμου προς την περιεκτικότητα α-έλικας του ανεπεξέργαστου ενζύμου

Τα φάσματα κυκλικού διχρωισμού που λήφθηκαν στο εγγύς υπεριώδες σχετίζονται με την τριτοταγή δομή του ενζύμου (Woody, 1995). Η μελέτη του συγκεντρωτικού φάσματος της Εικόνας 5.22β οδήγησε στην παρατήρηση σημαντικών μεταβολών στη δομή του ενζύμου. Ειδικότερα, η εφαρμογή ΥΠ οδήγησε σε εκτεταμένες μη αντιστρεπτές μεταβολές της τριτοταγούς δομής της PepX. Οι μεταβολές αυτές είναι εμφανείς ακόμη και στην περίπτωση επεξεργασίας του ενζύμου στις συνθήκες 200 MPa, 20°C και 20 min. Είναι αξιοσημείωτο ότι οι μικρές ή μεγάλες μεταβολές που παρατηρήθηκαν στη δευτεροταγή και τριτοταγή δομή μετά από επεξεργασία της PepX σε συνθήκες 200 MPa, 20°C, 20 min και 450 MPa, 20°C, 20 min συνοδεύονται από ενεργοποίηση και απενεργοποίηση του ενζύμου, αντίστοιχα.

Για την περαιτέρω μελέτη των συνθηκών που οδηγούν σε ενεργοποίηση της PepX πραγματοποιήθηκε ανάλυση δειγμάτων PepX επεξεργασμένης υπό σταθερές συνθήκες πίεσης 200 MPa και θερμοκρασίας 20°C αλλά για διαφορετικούς χρόνους επεξεργασίας (0-30 min). Από τα φάσματα που λήφθηκαν στις περιοχές του άπω και εγγύς υπεριώδους, παρατηρήθηκαν ασήμαντες μεταβολές της δευτεροταγούς δομής της αμινοπεπτιδάσης και πολύ μικρές μεταβολές της τριτοταγούς δομής, αντίστοιχα.

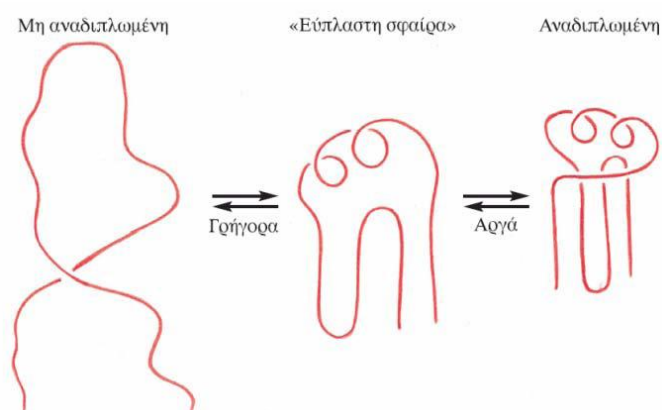
Βάσει της 3D δομής της αμινοπεπτιδάσης PepX (PDB code 1LNS) (Εικόνα 5.2), ο διμερής σχηματισμός της PepX αποτελούμενος από δύο πανομοιότυπες υπομονάδες εσωκλείει μεγάλο μέρος του καταλυτικού πεδίου, το οποίο στο μονομερές είναι εκτεθειμένο, με αποτέλεσμα το ενεργό μέρος να βρίσκεται βαθιά μέσα στο ένζυμο. Κάθε μονομερές αποτελείται από τέσσερις περιοχές από τις οποίες η μεγαλύτερη εκθέτει την αναδίπλωση της α/β υδρολάσης και περιλαμβάνει το ενεργό μέρος σερίνης (Rigolet et al., 2002).



Εικόνα 5.2. 3D δομή της αμινοπεπτιδάσης PerX (PDB code 1LNS)

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η αμινοπεπτιδάση PerX ενεργοποιείται σε πιέσεις μέχρι και 200 MPa και για θερμοκρασίες επεξεργασίας μέχρι και 40°C (η δραστηριότητα της PerX αυξήθηκε κατά 25% μετά από επεξεργασία 200 MPa, 20°C και 20 min). Το επεξεργασμένο με ΥΠ ένζυμο στα 200 MPa εμφανίστηκε να διατηρεί τη δευτεροταγή δομή ενώ αντίθετα να χάνει την τριτοταγή του δομή. Αυτό σημαίνει ότι το διμερές το οποίο συγκρατείται με δεσμούς υδρογόνου δε διασπάται υπό αυτές τις συνθήκες.

Γενικά, αυτή η μετουσιωμένη μορφή λόγω της πίεσης αποτελεί σημαντικό ενδιάμεσο στο μονοπάτι της αναδίπλωσης και περιγράφεται ως κατάσταση της εύπλαστης σφαίρας (molten globule states) (Mozhaev et al., 1996, Vidugiris & Royer, 1998, Foguel & Silva, 1994) (Εικόνα 5.3).



Εικόνα 5.3. Η κατάσταση της «εύπλαστης σφαίρας» (molten globule state) αποτελεί σημαντικό ενδιάμεσο στο μονοπάτι αναδίπλωσης καθώς μια πολυπεπτιδική αλυσίδα μεταπίπτει από μια αδίπλωτη στη διπλωμένη της δομή. Η «εύπλαστη σφαίρα» έχει μεγάλο μέρος από τη δευτεροταγή δομή της φυσικής κατάστασης, αλλά είναι λιγότερο συμπαγής από τη φυσική δομή και οι κατάλληλες αλληλεπιδράσεις πακεταρίσματος, στο εσωτερικό της πρωτεΐνης, δεν έχουν ακόμη δημιουργηθεί (Vidugiris & Royer, 1998)

Στη φυσιολογική του κατάσταση στο ενζύμο οι δύο ενεργές περιοχές βρίσκονται μακριά η μία από την άλλη και είναι ανεξάρτητα προσβάσιμες στο υπόστρωμα στον ίδιο χρόνο.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας προτείνεται ότι εφαρμογή πιέσεων μέχρι 200 MPa οδηγεί σε κατάσταση εύπλαστης σφαίρας (molten globule state) ιδανική για τη δραστηριότητά του. Πιθανώς οδηγεί σε μείωση της απόστασης μεταξύ των δύο ενεργών σερινών με αποτέλεσμα την αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου.

Από την άλλη πλευρά, αύξηση της πίεσης (450 MPa) οδήγησε σε μετουσιωμένη κατάσταση λόγω σημαντικών μεταβολών τόσο της δευτεροταγούς όσο και της τριτοταγούς δομής του ενζύμου. Αυτό αντικατοπτρίζεται και στη μεταβολή της δραστηριότητας του ενζύμου (απενεργοποίηση) αφού παραμένει μόνο το 4.8% της αρχικής δραστηριότητας μετά από επεξεργασία σε συνθήκες 450 MPa, 20°C για 20 min.

Η μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου θεωρείται ότι είναι αποτέλεσμα της μετουσίωσης βασικών δομικών στοιχείων καθώς και χωροταξικών μεταβολών του μορίου με επακόλουθη επίπτωση στη σύνδεση υποστρώματος-ενζύμου, οδηγώντας τελικά σε μείωση της δραστηριότητάς του.

5.3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΥΠ ΚΑΙ ΗΠΙΩΝ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΩΝ ΣΤΟ ΦΟΡΤΙΟ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΟΞΙΝΙΣΗΣ ΤΩΝ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105, *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0022 ΚΑΙ *Lactococcus lactis* ACA-DC 0049.

Αντικείμενο του συγκεκριμένου σταδίου της έρευνας αποτέλεσε η μελέτη της επίδρασης της ΥΠ και ήπιων θερμοκρασιών στη μεταβολή του φορτίου και στην ικανότητα οξίνισης των στελεχών *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105, *S. thermophilus* ACA-DC 0022 και *L. lactis* ACA-DC 0049. Οι διάφοροι συνδυασμοί συνθηκών επεξεργασίας ΥΠ-θερμοκρασίας και χρόνου που εφαρμόστηκαν παρατίθενται στον Πίνακα 5.16.

Πίνακας 5.16. Συνδυασμοί συνθηκών επεξεργασίας ΥΠ-θερμοκρασίας-χρόνου των στελεχών *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105, *S. thermophilus* ACA-DC 0022 και *L. lactis* ACA-DC 0049 για τη μελέτη της επίδρασης στο φορτίο και στην ικανότητα οξίνισης

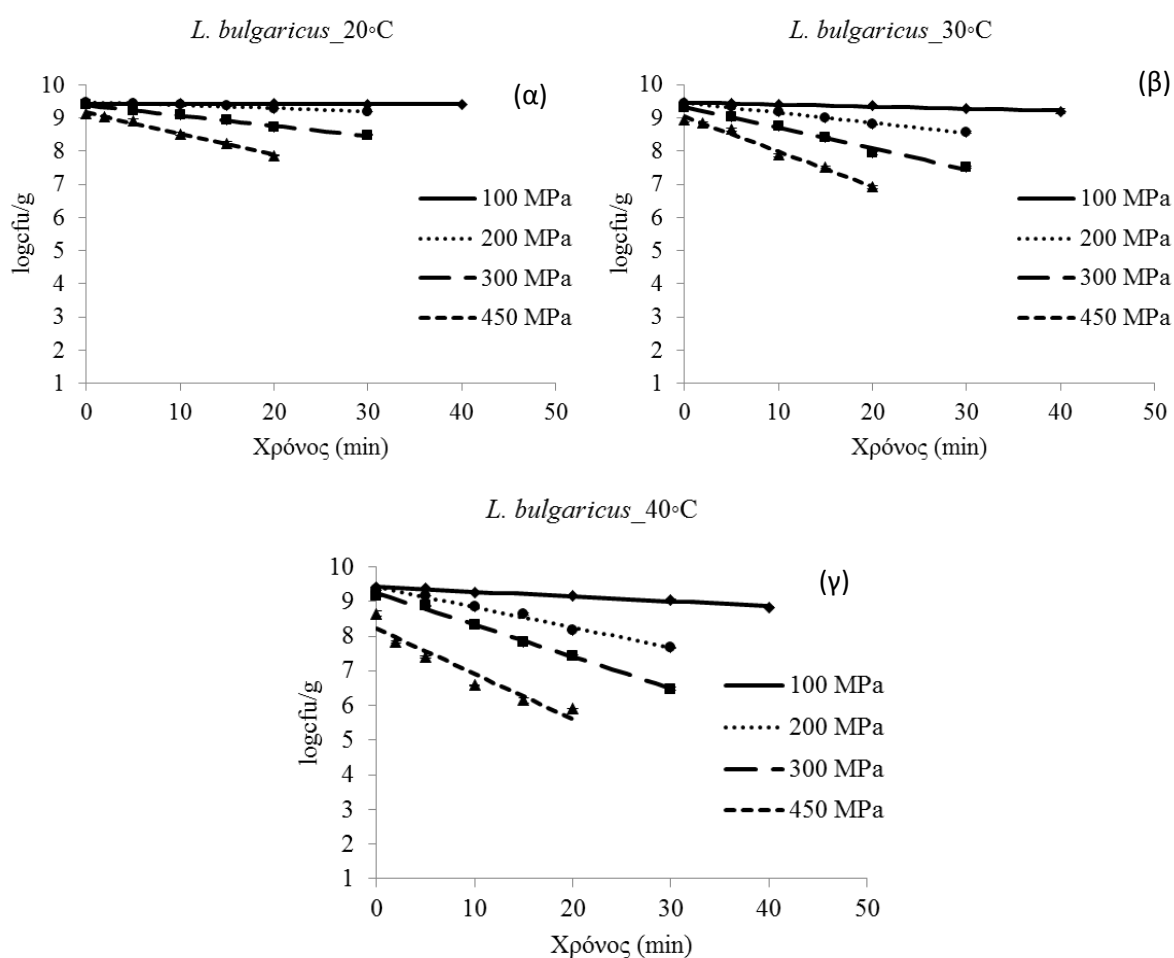
100 MPa	20°C	0, 5, 10, 20, 30, 40 min
	30°C	0, 5, 10, 20, 30, 40 min
	40°C	0, 5, 10, 20, 30, 40 min
200 MPa	20°C	0, 5, 10, 15, 20, 30 min
	30°C	0, 5, 10, 15, 20, 30 min
	40°C	0, 5, 10, 15, 20, 30 min
300 MPa	20°C	0, 5, 10, 15, 20, 30 min
	30°C	0, 5, 10, 15, 20, 30 min
	40°C	0, 5, 10, 15, 20, 30 min
450 MPa	20°C	0, 2, 5, 10, 15, 20 min
	30°C	0, 2, 5, 10, 15, 20 min
	40°C	0, 2, 5, 10, 15, 20 min

Η μεταβολή του φορτίου των επεξεργασμένων στελεχών προσδιορίστηκε μέσω ανάλυσης του μικροβιακού φορτίου. Η ικανότητα οξίνισης προσδιορίστηκε μέσω εμβολιασμού κατάλληλης ποσότητας αποστειρωμένου γάλακτος και προσδιορισμού του ρυθμού μείωσης του pH με το χρόνο επώασης.

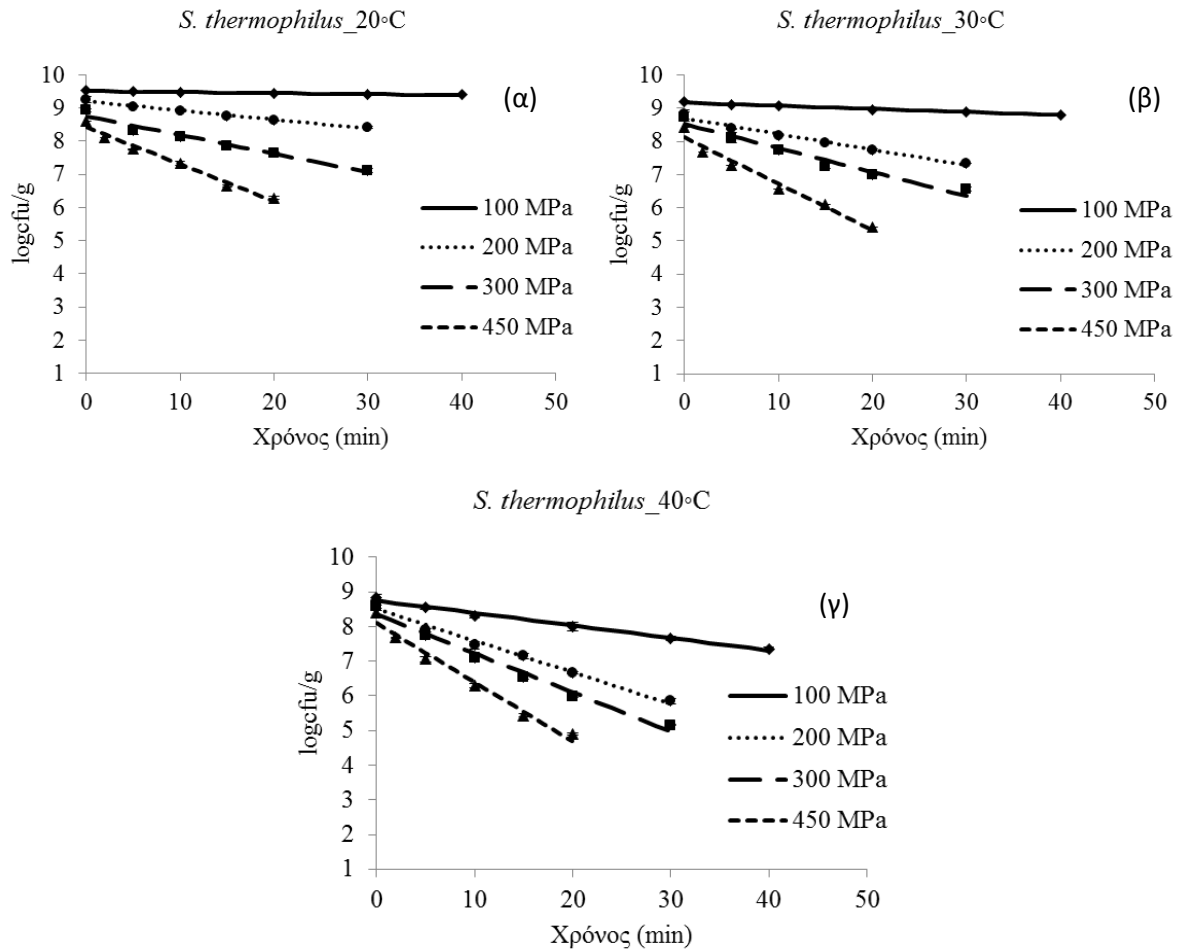
5.3.1. Μελέτη της Μεταβολής του Φορτίου των Επεξεργασμένων με ΥΠ Στελεχών *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105, *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0022 και *Lactococcus lactis* ACA-DC 0049.

Η μεταβολή του φορτίου των καλλιιεργειών των στελεχών των *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* και *L. lactis* μελετήθηκε μετά από επεξεργασία των στελεχών ξεχωριστά αλλά και συνολικά στο μείγμα τους που χρησιμοποιήθηκε κατά την παρασκευή του τυριού στο τελευταίο στάδιο. Οι συνθήκες που μελετήθηκαν ήταν πιέσεις 100, 200, 300 και 450 MPa σε συνδυασμό με ήπιες θερμοκρασίες 20, 30 και 40°C και για χρόνους επεξεργασίας 0-40 min.

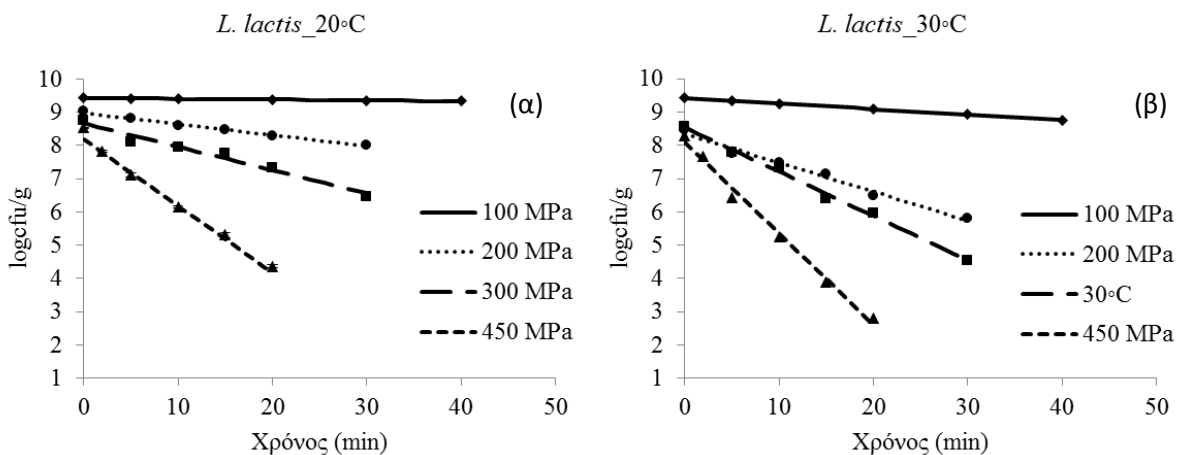
Στα Σχήματα 5.23-5.25 α, β, γ παρατίθεται η μεταβολή του φορτίου (logcfu/g) των κυττάρων με το χρόνο επεξεργασίας μετά από εφαρμογή πιέσεων 100, 200, 300 και 450 MPa, σε θερμοκρασίες επεξεργασίας 20, 30 και 40°C, αντίστοιχα, για κάθε στέλεχος.

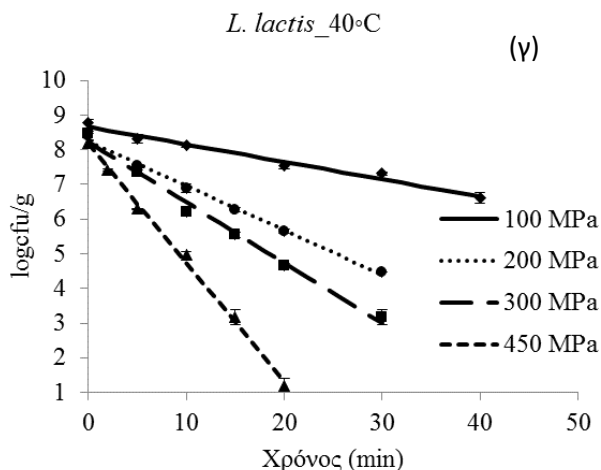


Σχήμα 5.23. Μεταβολή του φορτίου (logcfu/g) του στελέχους *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105 με το χρόνο επεξεργασίας μετά από εφαρμογή ΥΠ 100 —, 200 ·····, 300 — — και 450 MPa - - - - σε θερμοκρασίες επεξεργασίας α) 20 β) 30 και γ) 40°C



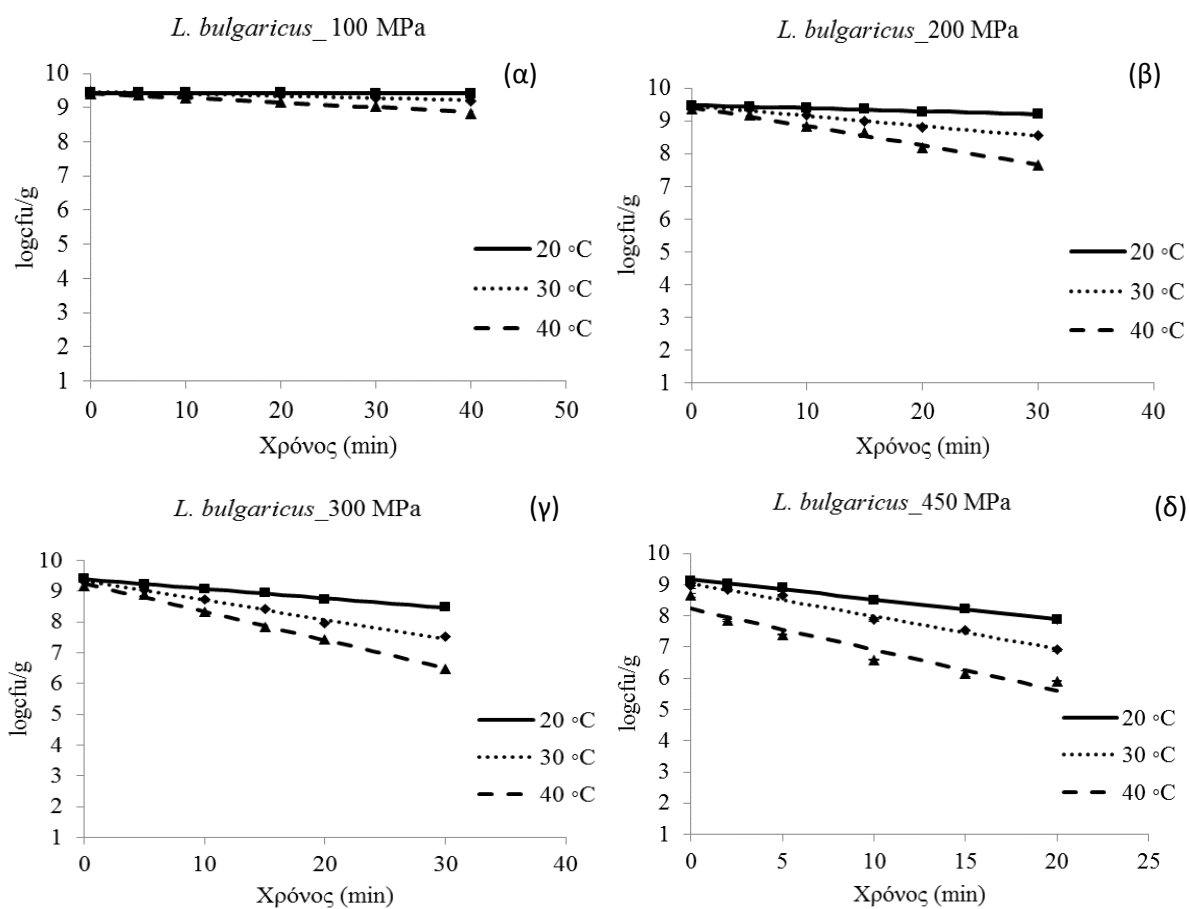
Σχήμα 5.24. Μεταβολή του φορτίου (logcfu/g) του στελέχους *S. thermophilus* ACA-DC 0022 με το χρόνο επεξεργασίας μετά από εφαρμογή ΥΠ 100 —, 200....., 300—■ και 450 MPa -·-·- σε θερμοκρασίες επεξεργασίας α) 20 β) 30 και γ) 40°C



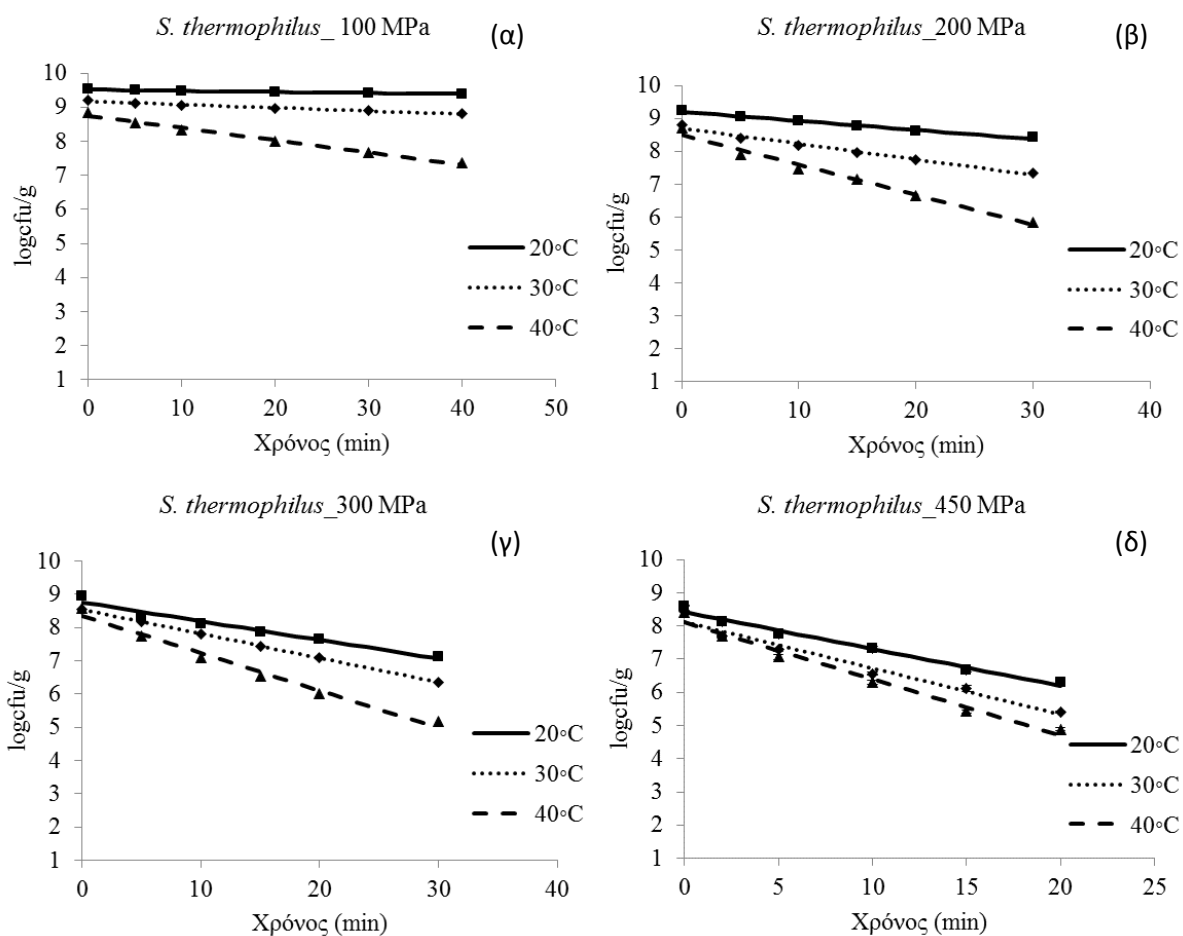


Σχήμα 5.25. Μεταβολή του φορτίου (logcfu/g) του *L. lactis* ACA-DC 0049 με το χρόνο επεξεργασίας μετά από εφαρμογή ΥΠ 100 —, 200....., 300— — και 450 MPa - - - - σε θερμοκρασίες επεξεργασίας α) 20 β) 30 και γ) 40°C

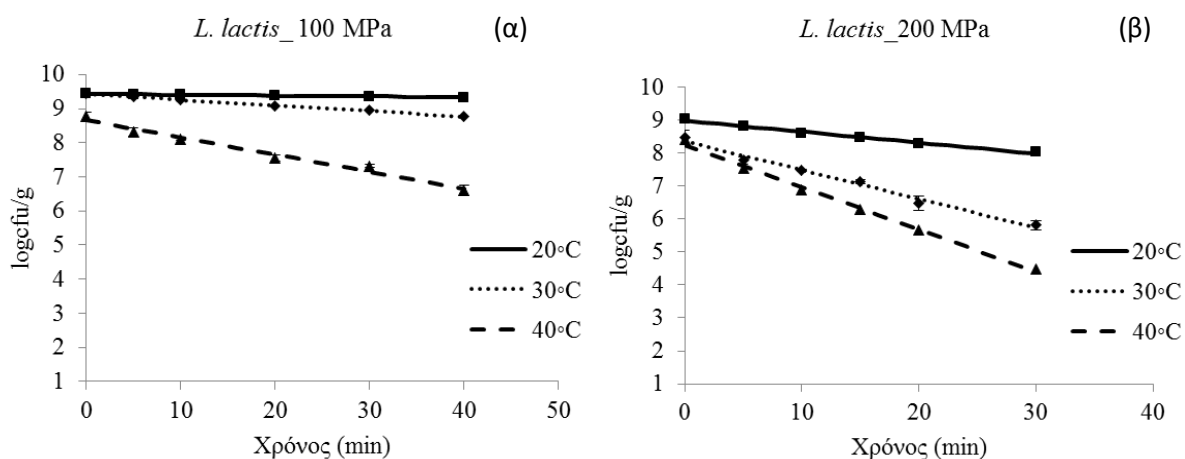
Στα σχήματα 5.26-5.28 α, β, γ, δ παρατίθεται η επίδραση της θερμοκρασίας 20, 30 και 40°C, σε χρόνους επεξεργασίας 0-30 min και μετά από εφαρμογή πιέσεων 100, 200, 300 και 450 MPa, αντίστοιχα, στο φορτίο του κάθε στελέχους.

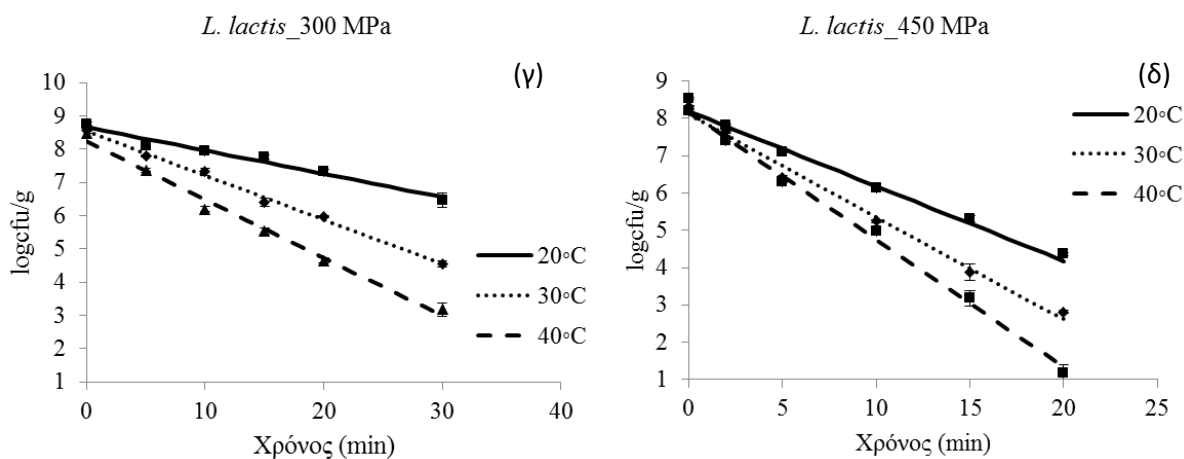


Σχήμα 5.26. Μεταβολή του φορτίου (logcfu/g) του στελέχους *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105 με το χρόνο επεξεργασίας μετά από εφαρμογή θερμοκρασιών 20, 30 και 40°C σε ΥΠ α) 100 MPa και β) 200 MPa γ) 300 MPa και δ) 450 MPa



Σχήμα 5.27. Μεταβολή του φορτίου (logcfu/g) του στελέχους *S. thermophilus* ACA-DC 0022 με το χρόνο επεξεργασίας μετά από εφαρμογή θερμοκρασιών 20, 30 και 40°C σε ΥΠ α) 100 MPa και β) 200 MPa γ) 300 MPa και δ) 450 MPa





Σχήμα 5.28. Μεταβολή του φορτίου (logcfu/g) του *L. lactis* ACA-DC 0049 με το χρόνο επεξεργασίας μετά από εφαρμογή θερμοκρασιών 20, 30 και 40°C σε ΥΠ α) 100 MPa και β) 200 MPa γ) 300 MPa και δ) 450 MPa

Η κατάσταση στην οποία βρίσκονταν τα κύτταρα καθώς και ο πληθυσμός τους εξαρτήθηκε από τις συνθήκες επεξεργασίας. Εντονότερες συνθήκες επεξεργασίας είχαν ως αποτέλεσμα τον όλο και μικρότερο αριθμό αδύναμων (πολύ μικρά σε μέγεθος κατά τη μέτρηση τους συγκριτικά με τον ανεπεξέργαστο μικροοργανισμό) ζωντανών κυττάρων. Η καλλιέργεια του στελέχους *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105 εμφάνισε μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην επεξεργασία με ΥΠ και θερμοκρασία. Σε αντίθεση, οι Shah et al. (2008), μετά από εφαρμογή πίεσης 480 MPa σε καλλιέργειες των *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* και *L. acidophilus* σε ανασυσταμένο γάλα παρατήρησαν υψηλή ευαισθησία στην πίεση για τον *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, συγκριτικά με τον *S. thermophilus* ο οποίος φάνηκε πιο ανθεκτικός. Οι Malone et al. (2002), μετά από επεξεργασία με ΥΠ σε συνθήκες 400-800 MPa, 25°C, 5 min των στελεχών *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 και SK11 σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) και ανεπτυγμένων έως το τέλος της εκθετικής τους φάσης, ανέφεραν πλήρη απενεργοποίησή τους. Επεξεργασία των συγκεκριμένων στελεχών σε συνθήκες 300 MPa, 25°C, 5 min, οδήγησαν σε μείωση του φορτίου κατά 7.3 και 2.5 logs, αντίστοιχα. Οι O'Reilly et al. (2002), μετά από μελέτη της επίδρασης της ΥΠ στο φορτίο των στελεχών *L. lactis* 303, 223, 227 και AM2 σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος pH 5.3, παρατήρησαν μείωση του φορτίου ≥ 6 log μετά από επεξεργασία σε συνθήκες 300-400 MPa, 25°C, 20 min. Ο πιο ανθεκτικός στην πίεση γαλακτόκοκκος φάνηκε να είναι ο *L. lactis* 227 με μείωση φορτίου κατά ~ 2 log μετά από επεξεργασία στα 400 MPa, ενώ ο πιο ευαίσθητος στην πίεση εμφανίστηκε ο *L. lactis* AM2 με μείωση φορτίου > 5 log μετά από επεξεργασία 400 MPa, 25°C, 20 min. Οι Daryaei et al. (2010), επεξεργάστηκαν με ΥΠ το στέλεχος *L. lactis* subsp. *lactis* C10 σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 5.5 ή 6.5, σε συνθήκες 300 και 600 MPa. Επεξεργασία στα 600 MPa οδήγησε σε μείωση του φορτίου κατά 11.1 και 10.7 logs σε pH 5.5 και 6.5, αντίστοιχα, ενώ μετά από επεξεργασία στα 300 MPa δεν παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του φορτίου ($p > 0.05$).

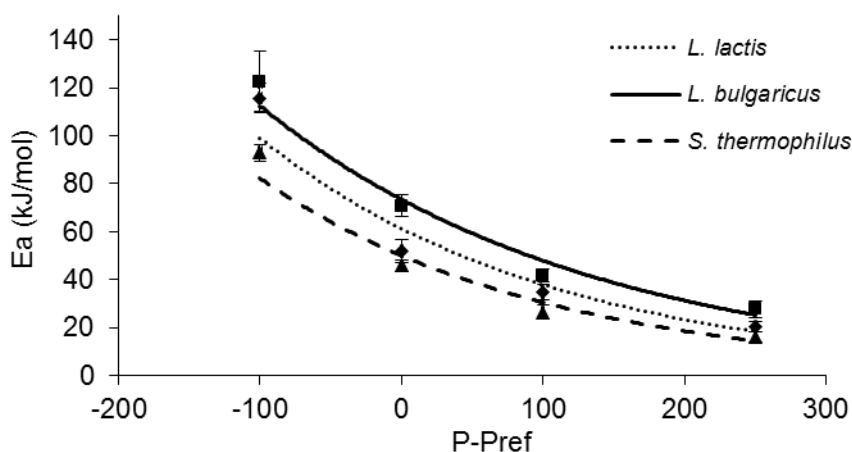
Η μεταβολή του μικροβιακού φορτίου μοντελοποιήθηκε με χρήση της εξίσωσης Baranyi (Baranyi et al., 1994) και για όλες τις συνθήκες επεξεργασίας που εφαρμόστηκαν, υπολογίστηκαν οι σταθερές των ρυθμών μεταβολής του φορτίου (απενεργοποίησης) για κάθε μία από τις καλλιέργειες των τριών στελεχών (Πίνακας 5.14). Η εξάρτηση των σταθερών του ρυθμού απενεργοποίησης των στελεχών από τη θερμοκρασία σε κάθε πίεση επεξεργασίας εκφράστηκε μέσω της ενέργειας ενεργοποίησης (E_a) η οποία υπολογίστηκε με χρήση της εξίσωσης Arrhenius (Εξίσωση 4.2) (Οι τιμές R^2 κυμάνθηκαν

στο εύρος 0.934 έως 0.999) (Πίνακας 5.14). Η εξάρτηση των σταθερών του ρυθμού απενεργοποίησης των στελεχών από την πίεση σε κάθε θερμοκρασία επεξεργασίας εκφράστηκε μέσω του όγκου ενεργοποίησης (V_a) ο οποίος υπολογίστηκε με χρήση της εξίσωσης Eyring (Εξίσωση 4.3) (Οι τιμές R^2 κυμάνθηκαν στο εύρος 0.827 έως 0.967) (Πίνακας 5.17).

Πίνακας 5.17. Σταθερές των ρυθμών απενεργοποίησης των επεξεργασμένων με ΥΠ και θερμοκρασία κυττάρων. Η επίδραση της θερμοκρασίας (E_a) και της πίεσης (V_a) στο ρυθμό απενεργοποίησης των κυττάρων παρατίθενται ($T_{ref}=20^\circ\text{C}$, $P_{ref}=200\text{ MPa}$) (μέση τιμή \pm standard error)

<i>S. thermophilus</i> ACA-DC 0022					
P (MPa)	100	200	300	450	V_a (mL/mol)
T ($^\circ\text{C}$)					
20	0.0031 \pm 0.0003	0.0273 \pm 0.0016	0.0564 \pm 0.0053	0.1116 \pm 0.0076	-23.4\pm3.0
30	0.0093 \pm 0.0007	0.0471 \pm 0.0032	0.0903 \pm 0.0076	0.1393 \pm 0.0088	-17.9\pm2.4
40	0.0360 \pm 0.0020	0.0912 \pm 0.0063	0.1127 \pm 0.0075	0.1703 \pm 0.0125	-10.1\pm1.2
E_a (kJ/mol)	93.1\pm3.5	45.9\pm2.3	26.6\pm3.0	16.1\pm2.0	
<i>L. lactis</i> ACA-DC 0049					
P (MPa)	100	200	300	450	V_a (mL/mol)
T ($^\circ\text{C}$)					
20	0.0024 \pm 0.0001	0.0332 \pm 0.0018	0.0703 \pm 0.0064	0.2003 \pm 0.0227	-28.7\pm3.4
30	0.0165 \pm 0.0003	0.0871 \pm 0.0053	0.1274 \pm 0.0053	0.2742 \pm 0.0132	-18.3\pm2.1
40	0.0503 \pm 0.0037	0.1284 \pm 0.0044	0.1746 \pm 0.0089	0.3411 \pm 0.0104	-12.7\pm1.0
E_a (kJ/mol)	115.7\pm 6.1	51.9\pm4.7	34.9\pm3.4	20.5\pm2.2	
<i>delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ACA-DC 0105					
P (MPa)	100	200	300	450	V_a (mL/mol)
T ($^\circ\text{C}$)					
20	0.0006 \pm 0.0000	0.0092 \pm 0.0006	0.0308 \pm 0.0013	0.0636 \pm 0.0026	-31.4\pm4.1
30	0.0061 \pm 0.0004	0.0308 \pm 0.0014	0.0626 \pm 0.0032	0.1047 \pm 0.0060	-18.9\pm2.3
40	0.0137 \pm 0.0009	0.0584 \pm 0.0030	0.0918 \pm 0.0026	0.1308 \pm 0.0190	-14.7\pm2.2
E_a (kJ/mol)	122.5\pm12.5	70.8\pm4.5	41.8\pm2.7	27.4\pm3.5	

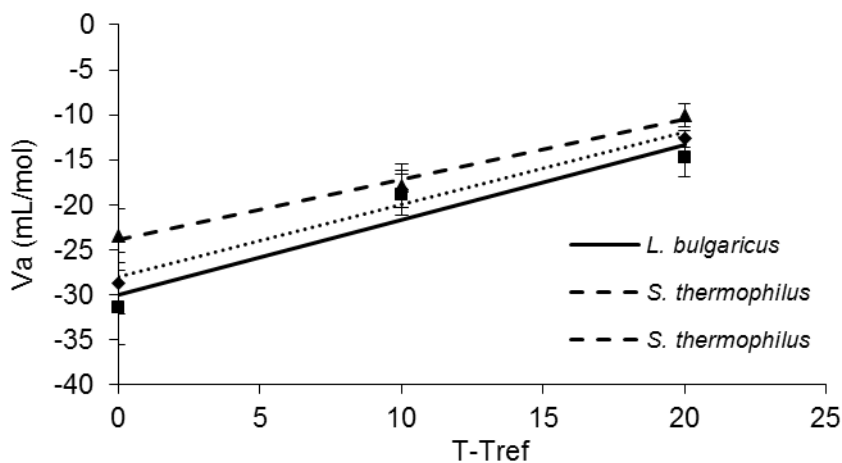
Αύξηση της πίεσης οδήγησε σε μείωση της E_a σε όλες τις περιπτώσεις, εκφράζοντας την όλο και μικρότερη επίδραση της θερμοκρασίας στο ρυθμό απενεργοποίησης των κυττάρων με αύξηση της πίεσης. Στο σχήμα 5.29 παρατίθεται η επίδραση της ΥΠ στην E_a για την απενεργοποίησης των τριών στελεχών.



Σχήμα 5.29. Επίδραση της ΥΠ στην E_a για την απενεργοποίηση των τριών στελεχών ($P_{ref} = 200$ MPa)

Η επίδραση της ΥΠ στην E_a εκφράστηκε μέσω της Εξίσωσης 4.5. Οι παράμετροι της συγκεκριμένης εξίσωσης προσδιορίστηκαν μετά από γραμμικοποίηση της εξίσωσης και χρήση γραμμικής παλινδρόμησης ως $E_{a0} = 50.1$ kJ/mol και $B_1 = 0.0050$ MPa⁻¹ ($R^2 = 0.968$) για τον μικροοργανισμό *S. thermophilus* ACA-DC 0022, $E_{a0} = 73.4$ kJ/mol και $B_1 = 0.0043$ MPa⁻¹ ($R^2 = 0.972$) για τον μικροοργανισμό *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105, $E_{a0} = 61.3$ kJ/mol και $B_1 = 0.0048$ MPa⁻¹ ($R^2 = 0.958$) για τον μικροοργανισμό *L. lactis* ACA-DC 0049.

Αύξηση της θερμοκρασίας οδήγησε σε αύξηση των απόλυτων τιμών V_a , εκφράζοντας την όλο και μεγαλύτερη επίδραση της πίεσης στο ρυθμό απενεργοποίησης των κυττάρων με αύξηση της θερμοκρασίας. Στο σχήμα 5.30 παρατίθεται η επίδραση της θερμοκρασίας στον V_a για την απενεργοποίηση των τριών στελεχών.

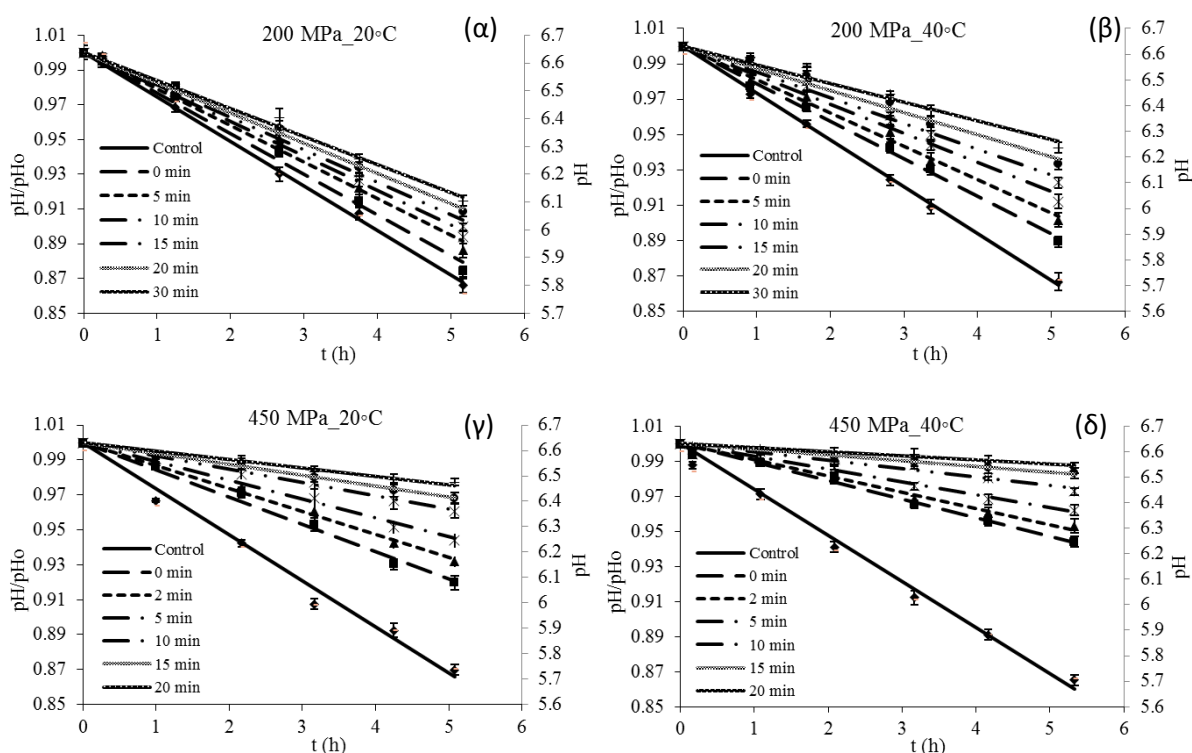


Σχήμα 5.30. Επίδραση της της θερμοκρασίας στον V_a για την απενεργοποίηση των τριών στελεχών ($T_{ref} = 20^\circ\text{C}$)

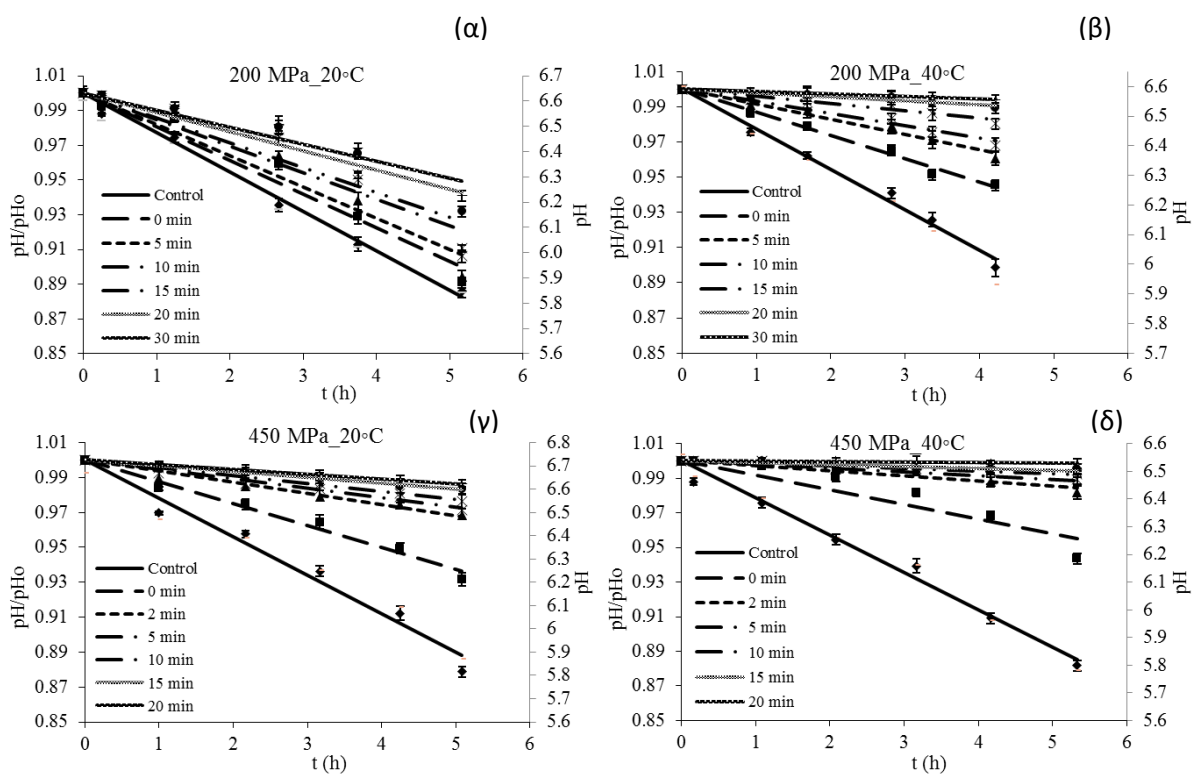
Η επίδραση της θερμοκρασίας στον V_a εκφράστηκε μέσω της Εξίσωσης 4.7. Οι παράμετροι της συγκεκριμένης εξίσωσης προσδιορίστηκαν με χρήση γραμμικής παλινδρόμησης ως $V_{a0} = -23.8$ mL/mol και $A_1 = 0.669$ mL·mol⁻¹·K⁻¹ ($R^2 = 0.991$) για τον μικροοργανισμό *S. thermophilus* ACA-DC 0022, $V_{a0} = -30.1$ mL/mol και $A_1 = 0.837$ mL·mol⁻¹·K⁻¹ ($R^2 = 0.962$) για τον μικροοργανισμό *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105, $V_{a0} = -27.9$ mL/mol και $A_1 = 0.804$ mL·mol⁻¹·K⁻¹ ($R^2 = 0.970$) για τον μικροοργανισμό *L. lactis* ACA-DC 0049.

5.3.2. Μελέτη της Ικανότητας Οξίνισης των Επεξεργασμένων με ΥΠ Στελεχών *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105, *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0022 και *Lactococcus lactis* ACA-DC 0049.

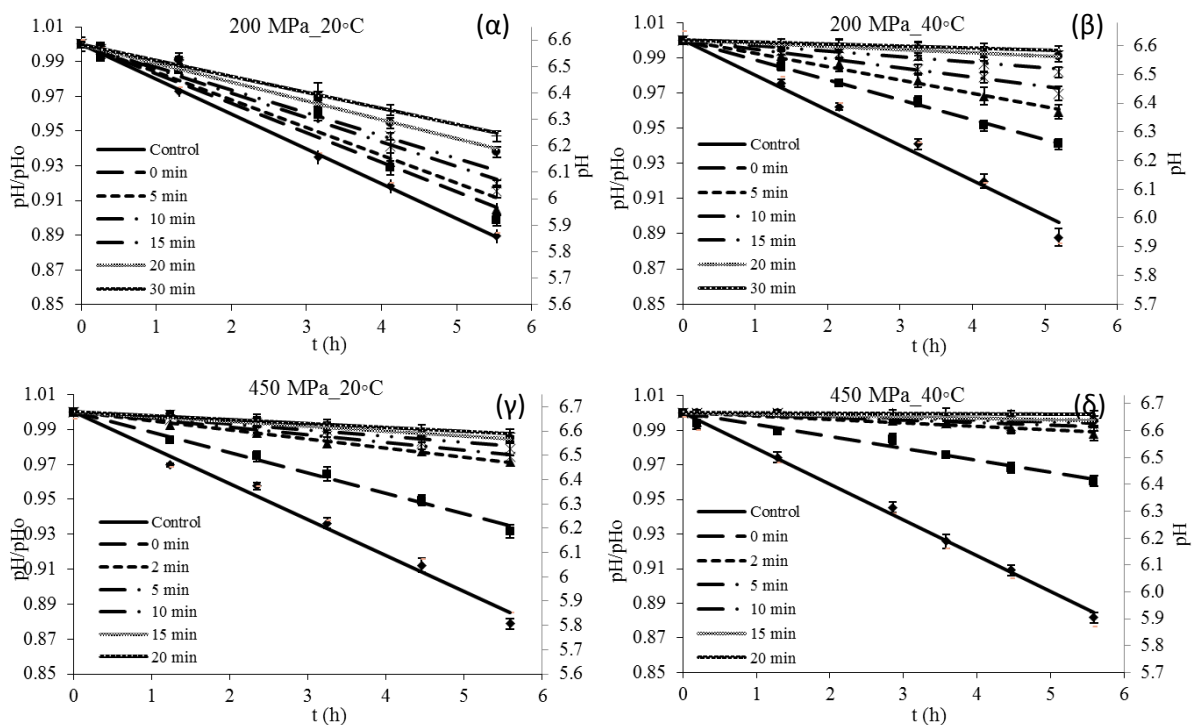
Η ικανότητα οξίνισης των τριών μεμονωμένων στελεχών καθώς του μείγματός τους, διερευνήθηκε μετά από επεξεργασία τους σε συνθήκες ΥΠ 100, 200, 300 και 450 MPa σε συνδυασμό με θερμοκρασίες 20, 30 και 40°C και για χρόνους επεξεργασίας 0-40 min. Η τιμή pH του αποστειρωμένου γάλακτος εμβολιασμένου με το επεξεργασμένο δείγμα μετρούνταν με την πάροδο του χρόνου. Στα σχήματα 5.31-5.33 α, β, γ, δ, παρατίθεται η μεταβολή της τιμής pH/pH₀ των εμβολιασμένων δειγμάτων με τα επεξεργασμένα στελέχη *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105, *S. thermophilus* ACA-DC 0022 και *L. lactis* ACA-DC 0049, αντίστοιχα, σε συνθήκες ΥΠ 200 και 450 MPa, σε θερμοκρασίες 20 και 40°C και για χρόνους επεξεργασίας 0-30 min.



Σχήμα 5.31. Μεταβολή της τιμής pH με το χρόνο επώασης του εμβολιασμένου γάλακτος με το στέλεχος *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105, επεξεργασμένο υπό συνθήκες α) 200 MPa, 20°C β) 200 MPa, 40°C γ) 450 MPa, 20°C δ) 450 MPa, 40°C για 0-30 min



Σχήμα 5.32. Μεταβολή της τιμής pH με το χρόνο επώασης του εμβολιασμένου γάλακτος με το στέλεχος *S. thermophilus* ACA-DC 0022, επεξεργασμένο υπό συνθήκες α) 200 MPa, 20°C β) 200 MPa, 40°C γ) 450 MPa, 20°C δ) 450 MPa, 40°C για 0-30 min



Σχήμα 5.33. Μεταβολή της τιμής pH με το χρόνο επώασης του εμβολιασμένου γάλακτος με το στέλεχος *L. lactis* ACA-DC 0049, επεξεργασμένο υπό συνθήκες α) 200 MPa, 20°C β) 200 MPa, 40°C γ) 450 MPa, 20°C δ) 450 MPa, 40°C για 0-30 min

Η μεταβολή της τιμής pH/pH₀ συναρτήσει του χρόνου επώασης των καλλιιεργειών ακολούθησε κινητική μηδενικής τάξης. Για όλες τις καλλιιεργειες και σε όλες τις συνθήκες επεξεργασίας υπολογίστηκαν οι σταθερές του ρυθμού μεταβολής της τιμής pH/pH₀, με χρήση γραμμικής παλινδρόμησης (Πίνακας 5.18).

Πίνακας 5.18. Σταθερές του ρυθμού μεταβολής της τιμής pH/pH₀ του εμβολιασμένου γάλακτος με τα στελέχη *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105, *S. thermophilus* ACA-DC 0022 και *L. lactis* ACA-DC 0049 (μέση τιμή±standard error)

<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ACA-DC 0105							
Χρόνος Επεξεργασίας (min)							
P (MPa) / T (°C)	Control	0	5	10	20	30	40
100/20	0.1696 ±0.0063	0.1660 ±0.0060	0.1654 ±0.0059	0.1630 ±0.0054	0.1618 ±0.0041	0.1592 ±0.0043	0.1578 ±0.0038
100/30	0.1691 ±0.0062	0.1649 ±0.0049	0.1613 ±0.0045	0.1524 ±0.0033	0.1490 ±0.0037	0.1472 ±0.0024	0.1447 ±0.0034
100/40	0.1732 ±0.0072	0.1613 ±0.0041	0.1495 ±0.0037	0.1398 ±0.0086	0.1271 ±0.0059	0.1163 ±0.0036	0.1044 ±0.0021
Χρόνος Επεξεργασίας (min)							
	Control	0	5	10	20	30	40
200/20	0.1725 ±0.0033	0.1608 ±0.0054	0.1477 ±0.0060	0.1363 ±0.0047	0.1283 ±0.0042	0.1185 ±0.0023	0.1096 ±0.0043
200/30	0.1735 ±0.0099	0.1483 ±0.0076	0.1331 ±0.0046	0.1209 ±0.0037	0.1091 ±0.0059	0.0931 ±0.0029	0.0838 ±0.0049
200/40	0.1724 ±0.0028	0.1399 ±0.0040	0.1262 ±0.0053	0.1153 ±0.0050	0.1030 ±0.0043	0.0890 ±0.0047	0.0770 ±0.0049
Χρόνος Επεξεργασίας (min)							
	Control	0	5	10	15	20	30
300/20	0.1724 ±0.0093	0.1403 ±0.0051	0.1239 ±0.0076	0.1093 ±0.0065	0.0952 ±0.0070	0.0813 ±0.0040	0.0708 ±0.0065
300/30	0.1695 ±0.0078	0.1219 ±0.0032	0.1058 ±0.0050	0.0895 ±0.0057	0.0771 ±0.0048	0.0627 ±0.0029	0.0476 ±0.0023
300/40	0.1680 ±0.0062	0.1132 ±0.0032	0.0947 ±0.0036	0.0788 ±0.0035	0.0550 ±0.0024	0.0345 ±0.0024	0.0248 ±0.0019
Χρόνος Επεξεργασίας (min)							
	Control	0	2	5	10	15	20
450/20	0.1689 ±0.0085	0.1072 ±0.0045	0.0904 ±0.0029	0.0751 ±0.0043	0.0508 ±0.0028	0.0412 ±0.0016	0.0294 ±0.0023
450/30	0.1728 ±0.0027	0.0813 ±0.0025	0.0664 ±0.0038	0.0527 ±0.0035	0.0440 ±0.0022	0.0336 ±0.0014	0.0281 ±0.0017
450/40	0.1693 ±0.0051	0.0678 ±0.0029	0.0575 ±0.0029	0.0457 ±0.0029	0.0312 ±0.0025	0.0193 ±0.0011	0.0150 ±0.0013
<i>S. thermophilus</i> ACA-DC 0022							
Χρόνος Επεξεργασίας (min)							
P (MPa)/T (°C)	Control	0	5	10	20	30	40
100/20	0.1469	0.1372	0.1303	0.1275	0.1248	0.1228	0.1178

Αποτελέσματα-Συζήτηση Αποτελεσμάτων

	±0.0037	±0.0026	±0.0024	±0.0033	±0.0037	±0.0027	±0.0027
100/30	0.1445	0.1311	0.1208	0.1153	0.1082	0.0984	0.0911
	±0.0080	±0.0067	±0.0105	±0.0113	±0.0101	±0.0087	±0.0092
100/40	0.1470	0.1242	0.1101	0.1017	0.0892	0.0772	0.0654
	±0.0114	±0.0050	±0.0064	±0.0069	±0.0078	±0.0101	±0.0088
Χρόνος Επεξεργασίας (min)							
	Control	0	5	10	20	30	40
200/20	0.1467	0.1350	0.1301	0.1125	0.1065	0.0807	0.0705
	±0.0061	±0.0121	±0.0148	±0.0168	±0.0172	±0.0117	±0.0091
200/30	0.1500	0.1095	0.1007	0.0864	0.0791	0.0646	0.0534
	±0.0078	±0.0100	±0.0049	±0.0047	±0.0109	±0.0060	±0.0069
200/40	0.1509	0.0869	0.0588	0.0494	0.0298	0.0150	0.0091
	±0.0085	±0.0051	±0.0050	±0.0051	±0.0038	±0.0026	±0.0013
Χρόνος Επεξεργασίας (min)							
	Control	0	5	10	15	20	30
300/20	0.1484	0.1145	0.0798	0.0656	0.0546	0.0396	0.0375
	±0.0068	±0.0108	±0.0062	±0.0041	±0.0033	±0.0036	±0.0040
300/30	0.1436	0.0820	0.0518	0.0447	0.0365	0.0253	0.0193
	±0.0060	±0.0055	±0.0042	±0.0047	±0.0040	±0.0018	±0.0010
300/40	0.1485	0.0657	0.0293	0.0181	0.0135	0.0104	0.0076
	±0.0064	±0.0037	±0.0019	±0.0023	±0.0014	±0.0011	±0.0011
Χρόνος Επεξεργασίας (min)							
	Control	0	2	5	10	15	20
450/20	0.1451	0.0841	0.0384	0.0342	0.0312	0.0225	0.0180
	±0.0970	±0.0066	±0.0030	±0.0028	±0.0014	±0.0011	±0.0008
450/30	0.1504	0.0782	0.0384	0.0279	0.0220	0.0153	0.0129
	±0.0091	±0.0038	±0.0043	±0.0041	±0.0027	±0.0018	±0.0020
450/40	0.1485	0.0642	0.0220	0.0151	0.0100	0.0069	0.0020
	±0.0073	±0.0098	±0.0029	±0.0019	±0.0014	±0.0014	±0.0008
<i>L. lactis</i> ACA-DC 0049							
Χρόνος Επεξεργασίας (min)							
P (MPa)/T (°C)	Control	0	5	10	20	30	40
100/20	0.1365	0.1298	0.1273	0.1258	0.1246	0.1240	0.1200
	±0.0049	±0.0040	±0.0053	±0.0064	±0.0081	±0.0080	±0.0100
100/30	0.1394	0.1205	0.1111	0.0995	0.0926	0.0820	0.0709
	±0.0084	±0.0078	±0.0101	±0.0095	±0.0090	±0.0073	±0.0054
100/40	0.1353	0.1146	0.1003	0.0879	0.0787	0.0671	0.0560
	±0.0032	±0.0038	±0.0053	±0.0054	±0.0044	±0.0055	±0.0030
Χρόνος Επεξεργασίας (min)							
	Control	0	5	10	20	30	40
200/20	0.1370	0.1165	0.1120	0.0990	0.0926	0.0753	0.0634
	±0.0016	±0.0106	±0.0103	±0.0087	±0.0083	±0.0032	±0.0021
200/30	0.1360	0.1015	0.0863	0.0733	0.0603	0.0481	0.0413
	±0.0061	±0.0040	±0.0018	±0.0019	±0.0053	±0.0011	±0.0031
200/40	0.1394	0.0756	0.0524	0.0383	0.0236	0.0110	0.0076
	±0.0083	±0.0018	±0.0025	±0.0033	±0.0021	±0.0012	±0.0007

		Χρόνος Επεξεργασίας (min)						
		Control	0	5	10	15	20	30
300/20	0.1398	0.0949	0.0617	0.0545	0.0433	0.0308	0.0288	
	±0.0042	±0.0032	±0.0021	±0.0049	±0.0040	±0.0016	±0.0033	
300/30	0.1362	0.0715	0.0506	0.0385	0.0289	0.0200	0.0138	
	±0.0030	±0.0027	±0.0041	±0.0051	±0.0030	±0.0010	±0.0022	
300/40	0.1387	0.0585	0.0268	0.0175	0.0138	0.0098	0.0047	
	±0.0026	±0.0018	±0.0019	±0.0007	±0.0010	±0.0003	±0.0111	
		Χρόνος Επεξεργασίας (min)						
		Control	0	2	5	10	15	20
450/20	0.1373	0.0796	0.0335	0.0296	0.0267	0.0197	0.0155	
	±0.0078	±0.0036	±0.0011	±0.0015	±0.0022	±0.0015	±0.0010	
450/30	0.1375	0.0626	0.0307	0.0218	0.0174	0.0134	0.0093	
	±0.0062	±0.0037	±0.0042	±0.0023	±0.0022	±0.0017	±0.0014	
450/40	0.1367	0.0430	0.0146	0.0106	0.0077	0.0056	0.0014	
	±0.0037	±0.0037	±0.0014	±0.0014	±0.0008	±0.0008	±0.0005	

Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι ο ρυθμός οξίνισης εξαρτάται από τις συνθήκες επεξεργασίας της καλλιέργειας των συγκεκριμένων στελεχών. Εντονότερες συνθήκες επεξεργασίας οδήγησαν σε μικρότερη μείωση της τιμής pH η οποία συσχετίστηκε με εντονότερη μείωση της ικανότητας οξίνισης.

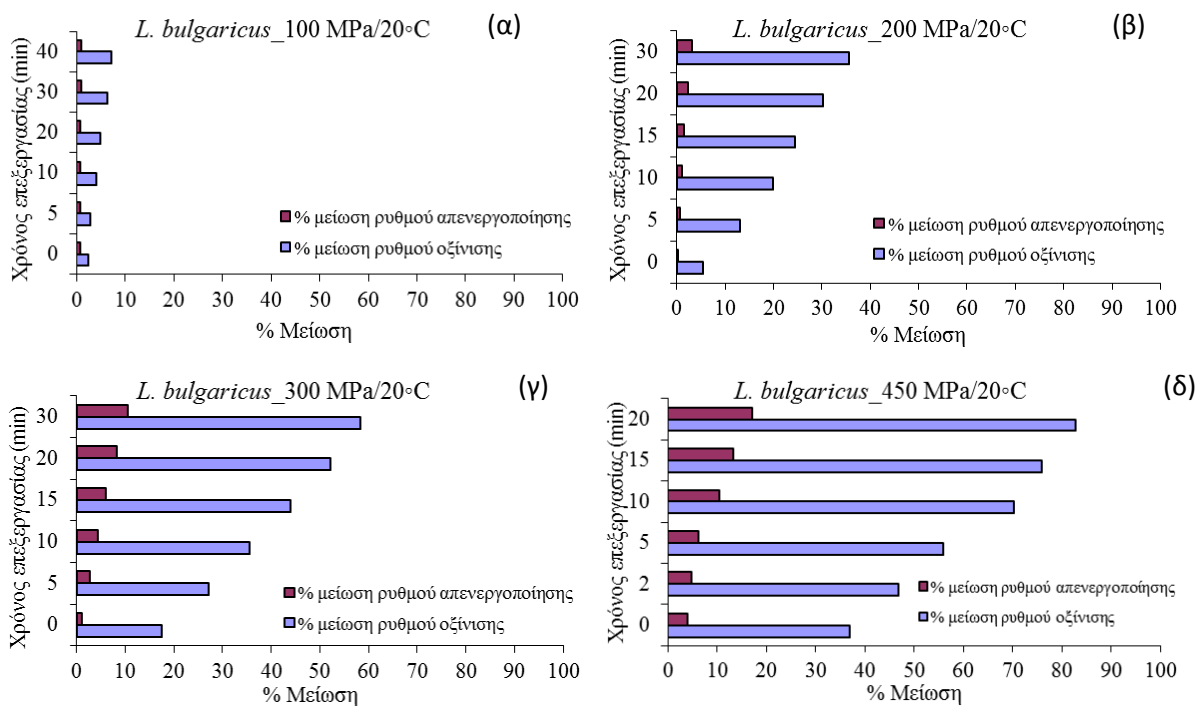
Βάσει της διεθνούς βιβλιογραφίας, οι Miyakawa et al. (1994), μελέτησαν την οξυπαραγωγική ικανότητα του στελέχους *Lb. helveticus* LHE-511 μετά από επεξεργασία του στα 400 MPa, όταν μετά από εφαρμογή υπερήχων το κυτταρικό εκχύλισμα (2% w/v σε 100 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7.0) επώαστηκε με 1.1% (w/v) γλυκόζης για 1 h στους 37°C. Παρατήρησαν πλήρη παρεμπόδιση της ικανότητας παραγωγής οξέος του επεξεργασμένου στελέχους *Lb. helveticus* LHE-511 συγκριτικά με ανεπεξεργαστο στέλεχος. Εφαρμόζοντας παρόμοια τεχνική, οι Malone et al. (2003), παρατήρησαν σημαντική μείωση της παραγωγής γαλακτικού οξέος του στελέχους *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363, ως αποτέλεσμα της επεξεργασίας σε πιέσεις 300-800 MPa, την οποία και απέδωσαν σε απώλεια δραστηριότητας ενός ή περισσότερων γλυκολυτικών ενζύμων. Οι Upadhyay et al. (2007), μελέτησαν την ικανότητα παραγωγής οξέος των στελεχών *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* HP και *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 303, μετά από επεξεργασία τους με ΥΠ σε συνθήκες 100, 200 ή 300 MPa για 1 s, 10 ή 20 min και μετά από εμβολιασμό τους σε ανασυσταμένο άπαχο γάλα και μέτρηση της μεταβολής του pH. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης έρευνας και σε συμφωνία με τα αποτελέσματα του συγκεκριμένου τμήματος της διατριβής, εντονότερες συνθήκες επεξεργασίας οδήγησαν σε εντονότερη μείωση της ικανότητας παραγωγής οξέος των δύο στελεχών. Μετά από επεξεργασία σε συνθήκες 200 MPa για 10 ή 20 min ή 300 MPa για 10 ή 20 min, παρατηρήθηκε πλήρης παρεμπόδιση της ικανότητας παραγωγής οξέος των δύο στελεχών. Οι Daryaei et al. (2010), μελέτησαν την επίδραση της ΥΠ στην ικανότητα του στελέχους *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* C10 να παράγει οξύ καθώς και στη δραστηριότητα των γλυκολυτικών ενζύμων P-β-gal και β-gal των στελεχών *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* C10, *Streptococcus thermophilus* και TS1 *Lactobacillus acidophilus* 2400. Η οξυπαραγωγική ικανότητα μελετήθηκε μετά από επεξεργασία στα 300 και 600 MPa στους 22°C για 5 min σε 100 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 6.5, επώαση με 5% (w/v) λακτόζη στους 30°C και προσδιορισμό της τιτλοδοτούμενης οξύτητας. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, επεξεργασία στα 600 MPa παρεμπόδισε την παραγωγή οξέος του στελέχους του *L. lactis*, η οποία αποδόθηκε στην 94% μείωση της

δραστηκότητας της P-β-gal, η οποία αποτελεί κύριο ένζυμο μεταβολισμού της λακτόζης. Η δραστηκότητα του γλυκολυτικού ενζύμου β-gal μειώθηκε κατά 97 και 27% στα στελέχη των *S. thermophiles* και *L. acidophilus*, αντίστοιχα.

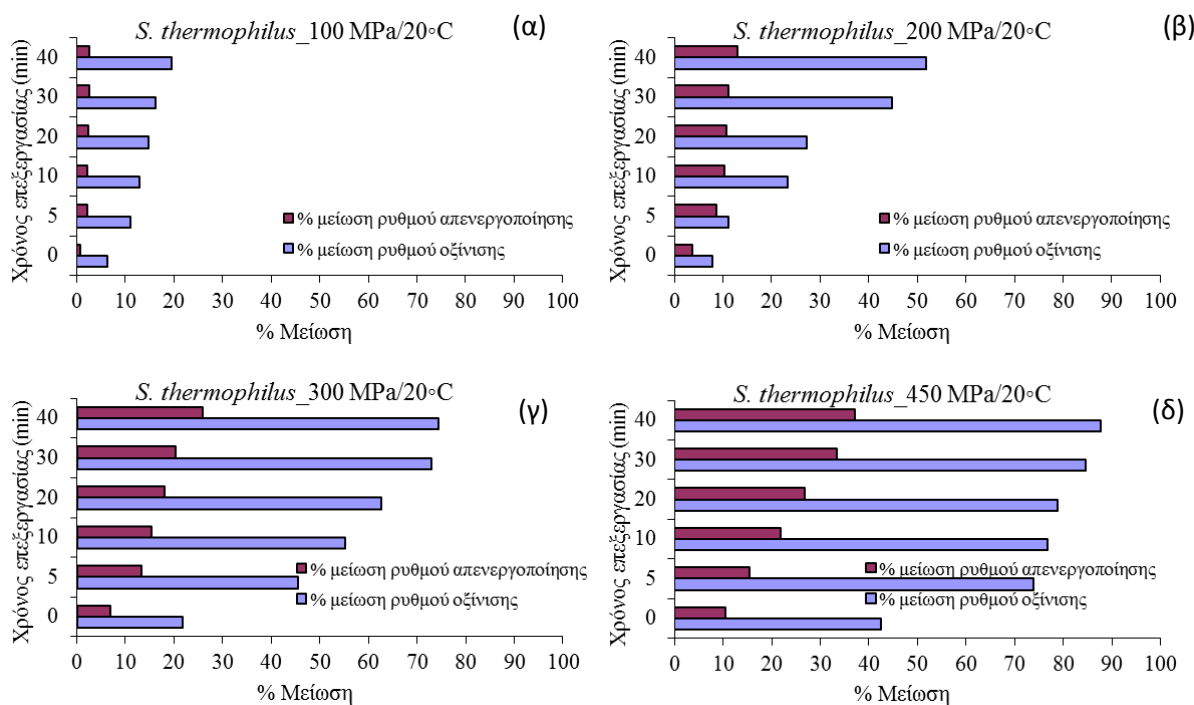
5.3.3. Συνδυασμός της Μεταβολής του Φορτίου με την Ικανότητα Οξίνισης των Επεξεργασμένων με ΥΠ στελεχών *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105, *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0022 και *Lactococcus lactis* ACA-DC 0049

Για την καλύτερη κατανόηση των αποτελεσμάτων του συγκεκριμένου σταδίου της έρευνας υπολογίστηκε η %μείωση του ρυθμού απενεργοποίησης και του ρυθμού της ικανότητας οξίνισης των καλλιιεργειών των τριών στελεχών που προκαλείται λόγω της επεξεργασίας τους με ΥΠ και θερμοκρασία, σε όλες τις μελετώμενες συνθήκες επεξεργασίας.

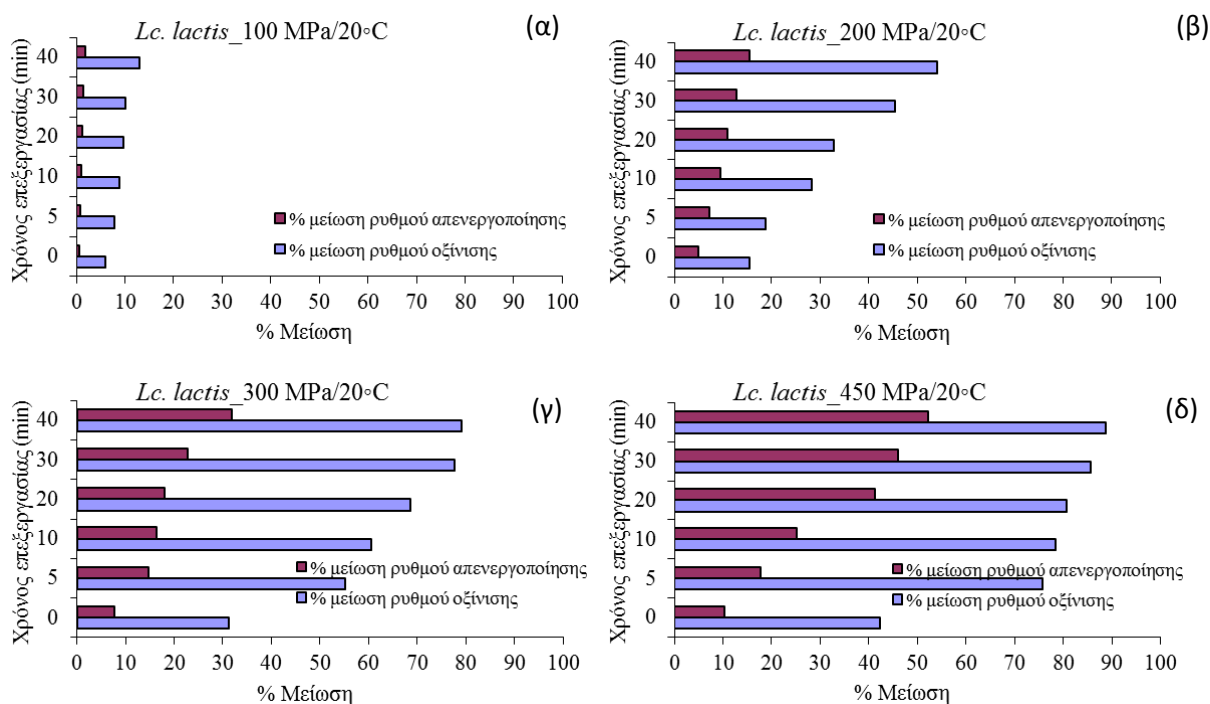
Στα Σχήματα 5.34-5.36 α, β, γ, δ παρουσιάζονται συνδυασμένα τα αποτελέσματα της απενεργοποίησης και της ικανότητα οξίνισης των τριών στελεχών, για συνθήκες επεξεργασίας 100-450 MPa σε θερμοκρασία 20°C.



Σχήμα 5.34. Συσχέτιση της %μείωσης του ρυθμού απενεργοποίησης και του ρυθμού οξίνισης του στελέχους *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105, σε θερμοκρασία επεξεργασίας 20°C και ΥΠ α) 100 MPa β) 200 MPa γ) 300 MPa και δ) 450 MPa



Σχήμα 5.35. Συσχέτιση της %μείωσης του ρυθμού απενεργοποίησης και του ρυθμού οξίνισης του στελέχους *S. thermophilus* ACA-DC 0022, σε θερμοκρασία επεξεργασίας 20°C και ΥΠ α) 100 MPa β) 200 MPa γ) 300 MPa και δ) 450 MPa



Σχήμα 5.36. Συσχέτιση της %μείωσης του ρυθμού απενεργοποίησης και του ρυθμού οξίνισης του στελέχους *L. lactis* ACA-DC 0049, σε θερμοκρασία επεξεργασίας 20°C και ΥΠ α) 100 MPa β) 200 MPa γ) 300 MPa και δ) 450 MPa

Η επεξεργασία των οξυγαλακτικών στελεχών με ΥΠ και θερμοκρασία είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του πληθυσμού τους καθώς και τη μείωση της ικανότητας οξίνισης. Εντονότερες συνθήκες επεξεργασίας οδήγησαν σε μεγαλύτερη μείωση του πληθυσμού των καλλιιεργειών καθώς και της

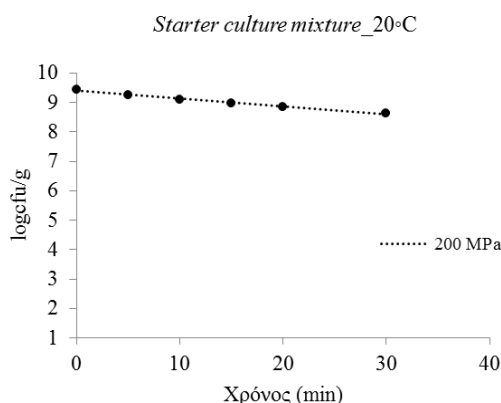
παραχθείσας ποσότητας οξέος (συσχετίσιμο με την ικανότητα οξίνισης). Ενδεικτικά αναφέρεται ότι σε συνθήκες επεξεργασίας 200 MPa, 20°C και 20 min, για το στέλεχος του *L. bulgaricus* παρατηρήθηκε μείωση φορτίου κατά 2.2% με ταυτόχρονη μείωση της ικανότητας οξίνισης του μικροοργανισμού κατά 30.3%, για το στέλεχος του *S. thermophilus* παρατηρήθηκε μείωση φορτίου κατά 11.1% με ταυτόχρονη μείωση της ικανότητας οξίνισης του μικροοργανισμού κατά 44.8% και για το στέλεχος του *L. lactis* παρατηρήθηκε μείωση φορτίου κατά 12.7% με ταυτόχρονη μείωση της ικανότητας οξίνισης του μικροοργανισμού κατά 45.4%.

Συνδυάζοντας τα συγκεκριμένα αποτελέσματα της απενεργοποίησης των μικροοργανισμών εκκίνησης και της μείωσης της ικανότητας οξίνισής τους με τα αποτελέσματα της μεταβολής της δραστηριότητας των ενδοκυτταρικών αμινοπεπτιδασών τους, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι οι προεπιλεγθείσες βέλτιστες συνθήκες 200 MPa στους 20°C για χρόνο μεγαλύτερο από 10 min (20 min), επαρκούν για μείωση της ικανότητας οξίνισης κατά τουλάχιστον 30% με μη σημαντική ταυτόχρονη λύση των κυττάρων (<13% της αρχικής χλωρίδας). Συνεπώς, οι επεξεργασμένες με ΥΠ καλλιέργειες στις συγκεκριμένες συνθήκες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν είτε ως πρόσθετες καλλιέργειες, είτε αυτούσιες σε σημαντικά μεγαλύτερη ποσότητα, αποδίδοντας μεγαλύτερη συγκέντρωση ενδοκυτταρικών ενζύμων και με επιπλέον αυξημένη δραστηριότητα, αποφεύγοντας το πρόβλημα της έντονης οξίνισης (όπως στην περίπτωση προσθήκης ισόποσης ανεπεξεργαστης καλλιέργειας εκκίνησης) κατά την παρασκευή του τυριού.

5.3.4. Μελέτη της Μεταβολής του Φορτίου και της Ικανότητας Οξίνισης, Επεξεργασμένης με ΥΠ Μεικτής Καλλιέργειας των Στελεχών *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105, *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0022 και *Lactococcus lactis* ACA-DC 0049

Έχοντας ως τελικό στόχο την παρασκευή και μελέτη των χαρακτηριστικών τυριού κατά την παραγωγική διαδικασία του οποίου θα γινόταν προσθήκη καλλιέργειας εκκίνησης η οποία θα ήταν μείγμα των μελετηθέντων στελεχών, στο σημείο αυτό κρίθηκε απαραίτητη η μελέτη της μεταβολής του φορτίου και της ικανότητας οξίνισης να πραγματοποιηθούν και σε μεικτή καλλιέργεια των συγκεκριμένων στελεχών στην προς χρήση αναλογία της.

Στο Σχήμα 5.37 παρατίθεται η μεταβολή του φορτίου (logcfu/g) των κυττάρων της καλλιέργειας αυτής με το χρόνο επεξεργασίας μετά από εφαρμογή ΥΠ 200 MPa, σε θερμοκρασία επεξεργασίας 20°C.

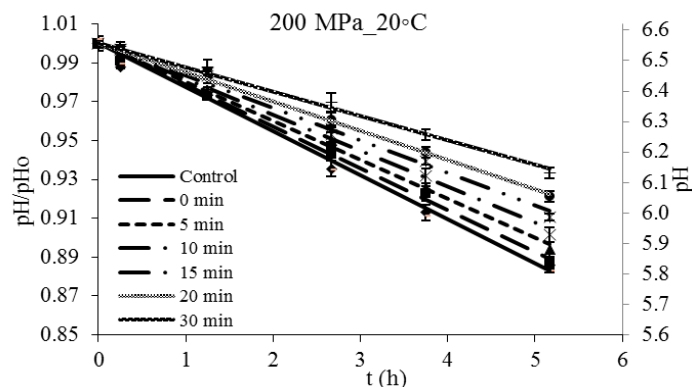


Σχήμα 5.37. Μεταβολή του φορτίου (logcfu/g) της μεικτής καλλιέργειας των στελεχών *L. lactis* ACA-DC 0049, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105 και *S. thermophilus* ACA-DC 0022 (2:1:1), με το χρόνο επεξεργασίας μετά από εφαρμογή ΥΠ 200 MPa, σε θερμοκρασία επεξεργασίας 20°C

Όπως και στην περίπτωση της μελέτης των μεμονωμένων στελεχών, παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση του φορτίου της συνολικής καλλιέργειας με το χρόνο επεξεργασίας. Η μεταβολή του φορτίου της

συνολικής καλλιέργειας με το χρόνο επεξεργασίας μοντελοποιήθηκε με χρήση της εξίσωσης Baranyi (Baranyi et al., 1994) μέσω της οποίας προσδιορίστηκε η σταθερά του ρυθμού απενεργοποίησης $k=0.0270\pm 0.0017 \text{ min}^{-1}$ με προσαρμογή $R^2=0.980$.

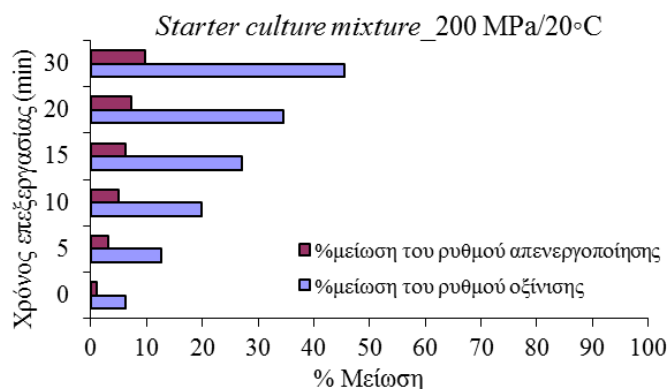
Στο Σχήμα 5.38 παρατίθεται η μεταβολή της οξίνισης (pH/pH_0) των κυττάρων της μεικτής καλλιέργειας με το χρόνο επεξεργασίας μετά από εφαρμογή ΥΠ 200 MPa, σε θερμοκρασία επεξεργασίας 20°C.



Σχήμα 5.38. Μεταβολή της τιμής pH με το χρόνο επώασης του εμβολιασμένου γάλακτος με τη μεικτή καλλιέργεια των στελεχών *L. lactis* ACA-DC 0049, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105 και *S. thermophilus* ACA-DC 0022 (2:1:1), επεξεργασμένη υπό συνθήκες 200 MPa, 20°C για 0-30 min

Όπως και στην περίπτωση της μελέτης της ικανότητας οξίνισης των μεμονωμένων καλλιεργειών, εντονότερες συνθήκες επεξεργασίας οδήγησαν σε μικρότερη μείωση της τιμής pH η οποία συσχετίστηκε με εντονότερη μείωση της ικανότητας οξίνισης. Η μεταβολή της τιμής pH/pH_0 με το χρόνο επώασης ακολούθησε κινητική πρώτης τάξης. Οι σταθερές του ρυθμού μεταβολής της τιμής pH υπολογίστηκαν με χρήση γραμμικής παλινδρόμησης για δείγματα Αναφοράς και επεξεργασμένα σε χρόνους 0, 5, 10, 15, 20 και 30 min ως 0.1467 ± 0.0057 , 0.1401 ± 0.0040 , 0.1342 ± 0.0029 , 0.1267 ± 0.0044 , 0.1144 ± 0.0041 , 0.1015 ± 0.0023 και 0.0860 ± 0.0029 , αντίστοιχα.

Ο συνδυασμός των αποτελεσμάτων της απενεργοποίησης και της ικανότητας οξίνισης της μεικτής καλλιέργειας των τριών στελεχών μετά από επεξεργασία σε συνθήκες 200 MPa, 20°C, παρουσιάζεται στο Σχήμα 5.39.



Σχήμα 5.39. Συσχέτιση της %μείωσης του ρυθμού απενεργοποίησης και του ρυθμού οξίνισης της καλλιέργειας των *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105, *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0022 και *Lactococcus lactis* ACA-DC 0049 (2:1:1), σε συνθήκες επεξεργασίας 200 MPa, 20°C

Ενδεικτικά αναφέρεται ότι σε συνθήκες επεξεργασίας 200 MPa, 20°C και 20 min, παρατηρήθηκε μείωση φορτίου κατά 7.3% με ταυτόχρονη μείωση της ικανότητας οξίνισης της καλλιέργειας κατά 34.6%, παρατήρηση η οποία θα πρέπει να ληφθεί υπόψη στο στάδιο παρασκευής του τυριού.

5.4. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΥΠ ΣΤΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΛΕΥΚΟΥ ΤΥΡΙΟΥ ΑΛΜΗΣ ΤΥΠΟΥ ΦΕΤΑΣ

Η επιτάχυνση του σταδίου ωρίμανσης του τυριού εμφανίζει μεγάλο ενδιαφέρον από την πλευρά της βιομηχανίας. Η ωρίμανση, δηλαδή η ανάπτυξη των επιθυμητών γευστικών και αρωματικών χαρακτηριστικών του τυριού οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στις πεπτιδάσες των καλλιέργειών εκκίνησης. Ο μόνος τρόπος αύξησης της δραστηριότητας των πεπτιδασών είναι με προεπεξεργασία της καλλιέργειας εκκίνησης με Υπερυψηλή πίεση. Με τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης όπως αναφέρθηκαν παραπάνω, προκύπτει το συμπέρασμα ότι η ΥΠ επιπλέον της ικανότητας να αυξάνει τη δραστηριότητα αμινοπεπτιδασών οξυγαλακτικών καλλιέργειών εκκίνησης, οδηγεί σε σημαντική μείωση της ικανότητας οξίνισης των καλλιέργειών, χωρίς όμως σημαντική κυτταρική απενεργοποίηση (διάρρηξη κυτταρικών μεμβρανών) που θα οδηγούσε σε διάχυση των ενδοκυτταρικών αμινοπεπτιδασών στο έξω σύστημα. Με βάση την παρατήρηση αυτή, είναι δυνατή η χρήση μεγαλύτερης ποσότητας καλλιέργειας εκκίνησης κατά την παρασκευή του τυριού, προσφέροντας μεγαλύτερη συγκέντρωση ενζύμων (αμινοπεπτιδασών), χωρίς ταυτόχρονα το σημαντικό πρόβλημα της έντονης οξίνισης (τα επεξεργασμένα με ΥΠ στελέχη έχουν μειωμένη ικανότητα οξίνισης) όπως στην περίπτωση προσθήκης μεγαλύτερης ποσότητας ανεπεξεργαστης καλλιέργειας.

Αντικείμενο της έρευνας του συγκεκριμένου σταδίου αποτέλεσε η μελέτη της επίδρασης της προσθήκης επεξεργασμένης με ΥΠ (200 MPa-20°C-20 min) καλλιέργειας εκκίνησης (*L. lactis* ACA-DC 0049 : *S. thermophilus* ACA-DC 0022 : *L. bugaricus* ACA-DC 0022 2:1:1) κατά την τυροκόμηση λευκού τυριού άλμης τύπου Φέτας, η μελέτη της επίδρασης της προσθήκης επεξεργασμένης με ΥΠ καλλιέργειας εκκίνησης κατά την τυροκόμηση ως συμπληρωματικής της ήδη υπάρχουσας καλλιέργειας εκκίνησης και η μελέτη της επίδρασης της επεξεργασίας με ΥΠ (200 MPa-20°C-20 min) του ίδιου του τυριού. Δείγματα αναφοράς (Control) μελετήθηκαν παράλληλα. Για την παρασκευή των τυριών δειγμάτων αναφοράς, προστέθηκε ανεπεξεργαστη καλλιέργεια εκκίνησης σε ποσοστό 2% v/v. Για την παρασκευή τυριού με αντικατάσταση μέρους της ανεπεξεργαστης καλλιέργειας με επεξεργασμένη με ΥΠ, αλλά και του τυριού που παρήχθη με ολόκληρη επεξεργασμένη με ΥΠ καλλιέργεια, έγινε προσθήκη σε ποσοστό 2.5 και 3% v/v, αντίστοιχα. Στην πρώτη περίπτωση (αντικατάσταση ανεπεξεργαστης καλλιέργειας με επεξεργασμένη με ΥΠ), χρησιμοποιήθηκε 40% ανεπεξεργαστη καλλιέργεια και 60% επεξεργασμένη με ΥΠ (σε σύνολο 2.5% v/v ως προς το γάλα), δηλαδή υπήρξε αύξηση της συγκέντρωσης των αμινοπεπτιδασών κατά 275%, λαμβάνοντας υπόψη και τον περίπου τριπλασιασμό της δραστηριότητας για την επεξεργασμένη με ΥΠ καλλιέργεια (Παρ. 5.1.4). Αντίστοιχα, στη δεύτερη περίπτωση της παρασκευής τυριού με ολόκληρη επεξεργασμένη καλλιέργεια, η αντίστοιχη αύξηση της συγκέντρωσης των αμινοπεπτιδασών ήταν 450%.

Στις επόμενες παραγράφους ακολουθεί η παρουσίαση των αποτελεσμάτων. Στο συγκεκριμένο σημείο θα πρέπει να τονιστεί ότι σε όλα τα δείγματα ως χρόνος μηδέν θεωρείται η ημέρα κατά την οποία τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε ψυχρό θάλαμο (4°C) για ωρίμανση, εκτός των τιμών που έχουν ληφθεί σχετικά με το pH των δειγμάτων όπου χρόνος μηδέν θεωρείται η ημέρα παρασκευής των δειγμάτων λευκού τυριού άλμης τύπου Φέτας. Τα αποτελέσματα αποτελούν μέσο όρο των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από δύο τυροκομήσεις-επαναλήψεις των πειραμάτων.

Χαρακτηρισμός Τυριών

Control : Τυρί Φέτα (χρησιμοποιήθηκε μη επεξεργασμένη με ΥΠ καλλιέργεια και το τυρί δεν υπέστη ΥΠ επεξεργασία).

HPC : Λευκό τυρί άλμης τύπου Φέτας το οποίο επεξεργάστηκε με ΥΠ πριν τη συσκευασία του και πριν την αποθήκευση στον ψυχρό θάλαμο (4°C) για ωρίμανση.

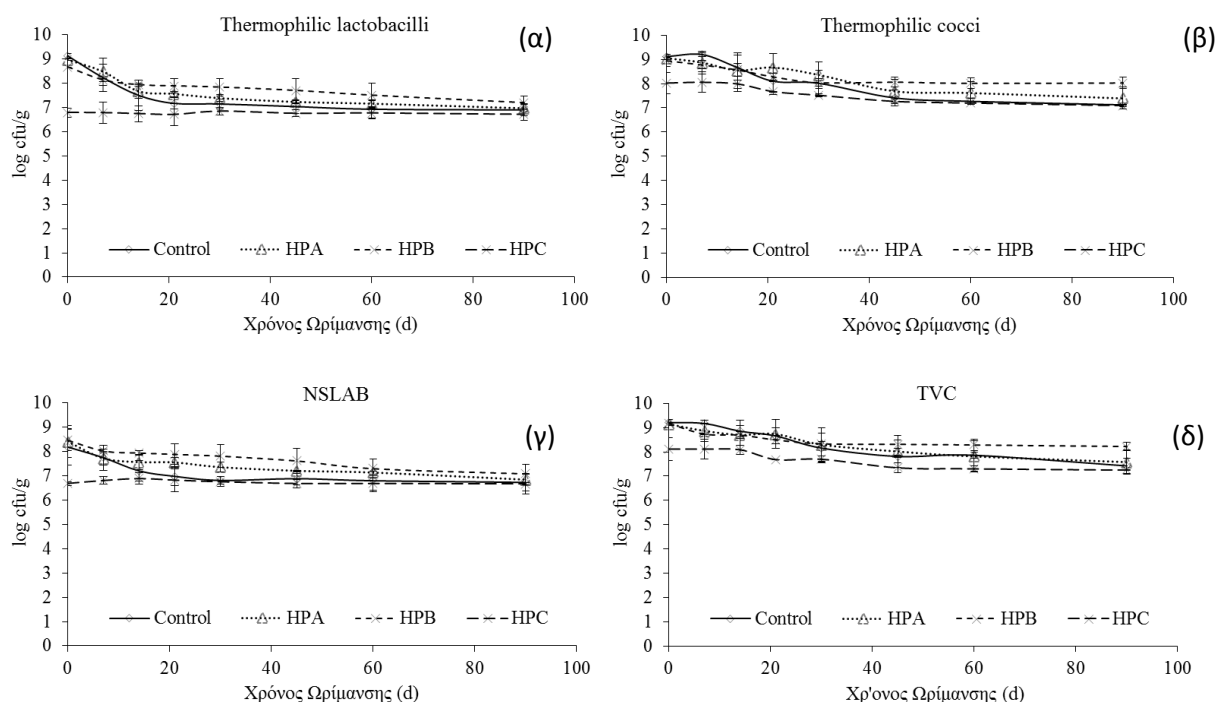
HPA : Λευκό τυρί άλμης τύπου Φέτας κατά την τυροκόμηση του οποίου το 60% της καλλιέργειας-εκκίνησης που προστέθηκε ήταν επεξεργασμένο με ΥΠ ενώ το υπόλοιπο δεν είχε υποστεί επεξεργασία.

HPB : Λευκό τυρί άλμης τύπου Φέτας κατά την τυροκόμηση του οποίου προστέθηκε καλλιέργεια-εκκίνησης επεξεργασμένη εξ' ολοκλήρου με ΥΠ.

5.4.1. Μικροβιολογικός Έλεγχος Δειγμάτων Λευκού Τυριού Άλμης Τύπου Φέτας

Κατά τη διάρκεια του 2^{ου} σταδίου ωρίμανσης των τυριών πραγματοποιήθηκε μικροβιολογικός τους έλεγχος κατά τον οποίο προσδιορίστηκαν η ολική μεσόφιλη μικροβιακή χλωρίδα (total viable count), ο πληθυσμός των θερμόφιλων γαλακτοβακίλλων (thermophilic lactobacilli), των θερμόφιλων κόκκων (thermophilic cocci) και των οξυγαλακτικών βακτηρίων που δεν αποτελούν εκκινητές (NSLAB).

Τα αποτελέσματα της μικροβιολογικής ανάλυσης των τεσσάρων τυριών παρατίθενται στα Σχήματα 5.40 α, β, γ και δ.



Σχήμα 5.40. Μεταβολή του μικροβιακού φορτίου (log cfu/g) των α) Θερμόφιλων γαλακτοβακίλλων β) Θερμόφιλων κόκκων, γ) Οξυγαλακτικών βακτηρίων μη εκκινητών και δ) Ολικών μεσόφιλων βακτηρίων των δειγμάτων τυριών Control —◇—, HPA —△—, HPB —×— και HPC —□— κατά τη διάρκεια του δευτέρου σταδίου ωρίμανσης (μέσος όρος δύο τυροκομήσεων±stdev)

Για τα τυριά Control, HPA και HPB το μικροβιακό φορτίο (συμπεριλαμβανομένων των καλλιεργειών εκκίνησης, των καλλιεργειών μη εκκινητών και της ολικής μικροβιακής χλωρίδας) σε χρόνο t=0 του 2^{ου} σταδίου ωρίμανσης εμφάνισε παρόμοιες τιμές. Σε συμφωνία οι Upadhyay et al. (2007) και οι

Maniou et al. (2013), ανέφεραν ότι το φορτίο της καλλιέργειας εκκίνησης και των NSLAB δεν επηρεάστηκε από τη χρήση επεξεργασμένης με ΥΠ καλλιέργειας εκκίνησης. Σε γενικές γραμμές όλα τα τυριά με εξαίρεση τα HPC, εμφάνισαν παρόμοια μεταβολή μικροβιακού φορτίου των μικροοργανισμών που μελετήθηκαν. Μικρή μείωση του μικροβιακού φορτίου παρατηρήθηκε για διάστημα 20 ημερών ψυχρής αποθήκευσης, ενώ για περαιτέρω αποθήκευση παρατηρήθηκε στατιστικά μη σημαντική μεταβολή του μικροβιακού φορτίου. Σχετικά με τα τυριά HPC, το μικροβιακό φορτίο (συμπεριλαμβανομένων των καλλιεργείων εκκίνησης, των καλλιεργείων μη εκκινητών και της ολικής μικροβιακής χλωρίδας) σε χρόνο $t=0$ του 2^{ου} σταδίου ωρίμανσης εμφανίστηκε μειωμένο συγκριτικά με τα υπόλοιπα δείγματα. Βάσει της διεθνούς βιβλιογραφίας, οι Moschoroulou et al. (2010), ανέφεραν ότι επεξεργασία τυριού Φέτα με ΥΠ στα 200 MPa δεν επηρέασε το αρχικό φορτίο των θερμοφίλων γαλακτοβακκίλων και λακτόκοκκων καθώς και των NSLAB. Οι Costabel et al. (2016), μετά από επεξεργασία τυριού Reggianito σε συνθήκες 100 και 400 MPa, παρατήρησαν σταθερό φορτίο καλλιέργειας εκκίνησης στα 100 MPa αλλά σημαντική μείωσή του μετά από επεξεργασία στα 400 MPa. Οι Cazalda et al. (2015), μετά από επεξεργασία με ΥΠ τυριού από απαστερίωτο γάλα τη 14^η και την 21^η ημέρα ωρίμανσής του σε συνθήκες 400 και 600 MPa, παρατήρησαν μείωση του φορτίου των γαλακτικών βακτηρίων κατά 2 και 6 logs, αντίστοιχα. Συνεπώς οι μειωμένες τιμές φορτίου στα τυριά HPC την 1^η ημέρα του 2^{ου} σταδίου ωρίμανσης θα μπορούσε να αποδοθεί σε επίδραση της ΥΠ στα μικροβιακά κύτταρα, ωστόσο πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι η επίδραση της ΥΠ στο τυρί HPC συνέβη στο περιβάλλον του τυριού παρουσία και του αλατιού, γεγονός που να οδήγησε σε επιταχυνόμενη λύση των βακτηριακών κυττάρων.

5.4.2. Μελέτη Φυσικοχημικών Χαρακτηριστικών Δειγμάτων Λευκού Τυριού Άλμης Τύπου Φέτας

Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των τεσσάρων τυριών προσδιορίστηκαν και μελετήθηκαν κατά τη διάρκεια του δευτέρου σταδίου ωρίμανσής τους. Στον Πίνακα 5.19 παρουσιάζονται οι τιμές των μελετημένων φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των τεσσάρων τυριών (μέσος όρος τιμών δύο τυροκομήσεων \pm stdev).

Πίνακας 5.19. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των τυριών Control, HPA, HPB και HPC κατά τη διάρκεια του δευτέρου σταδίου ωρίμανσής τους (μέσος όρος δύο τυροκομήσεων \pm stdev)

Δείγμα	Rt ^a (d)	Υγρασία (%)	Λιπαρά (%)	FDM ^b	Πρωτεΐνη (%)	Τέφρα (%)	Αλάτι (%)	S/M ^c	pH	a _w
Control	1	63.22±0.05	17.61±0.20	47.88±0.48	15.25±0.67	3.95±0.98	3.11±0.61	4.92±0.96	4.65±0.07	0.959±0.019
	7	62.55±0.70	18.50±0.76	49.40±1.11	14.90±0.54	3.96±0.79	3.38±0.69	5.40±1.04	4.72±0.05	0.957±0.003
	14	63.03±0.48	18.07±0.97	48.89±1.99	14.62±0.29	4.23±0.79	3.55±0.55	5.64±0.83	4.76±0.11	0.953±0.005
	21	61.81±0.43	19.26±0.21	50.43±0.01	14.47±0.20	4.08±0.46	2.43±0.73	5.56±1.14	4.74±0.10	0.943±0.018
	30	62.64±2.13	18.70±2.20	50.04±3.04	14.35±0.20	4.26±0.18	3.63±0.54	5.79±1.06	4.75±0.01	0.942±0.011
	45	59.56±2.56	21.71±2.23	53.67±2.12	14.07±0.26	4.36±0.34	3.49±0.67	5.86±0.87	4.64±0.03	0.946±0.013
	60	60.41±1.45	21.19±1.05	53.52±0.70	13.90±0.24	4.22±0.21	3.53±0.45	5.84±0.60	4.64±0.05	0.946±0.012
	90	59.83±2.67	21.85±2.45	54.39±2.48	13.79±0.26	4.34±0.26	3.67±0.21	6.13±0.07	4.65±0.03	0.942±0.009
HPA	1	63.13±0.14	18.07±0.09	49.02±0.06	15.21±0.24	3.80±0.13	3.43±0.12	5.43±0.18	4.50±0.01	0.950±0.003
	7	59.13±1.98	21.71±2.00	53.13±2.33	15.07±0.18	4.08±0.28	3.79±0.26	6.41±0.22	4.62±0.11	0.944±0.008
	14	60.03±0.57	21.15±0.56	52.91±0.66	14.89±0.16	3.97±0.17	3.54±0.01	5.90±0.03	4.62±0.13	0.944±0.008
	21	61.51±2.06	19.56±1.66	50.83±1.59	14.74±0.09	4.18±0.45	3.54±0.01	5.75±0.20	4.66±0.17	0.939±0.011
	30	59.26±0.56	21.79±0.90	52.87±1.47	14.70±0.01	4.19±0.40	3.54±0.43	5.97±0.67	4.62±0.13	0.941±0.012
	45	59.62±0.14	21.35±0.08	55.26±0.02	14.55±0.08	4.11±0.36	3.52±0.57	5.90±0.94	4.56±0.07	0.943±0.020
	60	58.99±0.14	22.66±0.11	55.50±0.47	14.19±0.25	4.14±0.49	3.60±0.61	6.10±1.05	4.62±0.15	0.942±0.020
	90	57.97±0.57	23.32±0.57	55.93±0.62	14.22±0.10	4.26±0.41	3.82±0.45	6.59±0.71	4.59±0.12	0.940±0.018
HPB	1	63.28±0.18	17.45±0.06	47.51±0.41	15.45±0.49	3.97±0.55	3.56±0.35	5.63±0.57	4.61±0.10	0.950±0.002

	7	61.57±0.75	19.17±0.61	49.88±0.61	15.29±0.31	4.04±0.56	3.63±0.45	5.90±0.81	4.69±0.06	0.947±0.007
	14	61.05±0.54	19.71±0.46	50.60±0.48	15.11±0.24	4.18±0.41	3.73±0.56	6.11±0.97	4.69±0.14	0.941±0.014
	21	61.12±0.39	19.79±0.33	50.89±0.35	14.96±0.12	4.20±0.30	3.58±0.66	5.86±1.12	4.61±0.07	0.942±0.014
	30	59.30±1.48	21.60±1.91	53.07±2.77	14.60±0.35	4.49±0.79	3.76±0.73	6.35±1.07	4.56±0.04	0.940±0.012
	45	60.74±0.95	20.30±0.42	51.70±0.18	14.52±0.28	4.42±0.80	3.56±0.64	5.86±1.15	4.57±0.05	0.938±0.014
	60	59.03±0.40	22.09±0.75	53.93±1.31	14.35±0.39	4.49±0.81	3.66±0.79	6.19±1.30	4.56±0.04	0.936±0.010
	90	58.26±1.46	22.90±1.63	54.88±1.99	14.16±0.53	4.58±0.81	3.82±0.79	6.55±1.19	4.55±0.05	0.935±0.009
HPC	1	61.80±0.43	19.13±0.60	50.10±1.02	15.26±0.44	3.99±0.53	2.99±0.36	4.83±0.54	4.65±0.07	0.965±0.015
	7	64.22±0.73	17.31±0.86	48.37±1.41	14.70±0.72	4.03±0.38	3.68±0.32	5.73±0.57	4.71±0.01	0.956±0.007
	14	63.70±0.85	17.57±0.99	48.39±1.59	14.45±0.77	4.40±0.69	4.14±0.45	6.49±0.79	4.72±0.01	0.951±0.001
	21	61.93±1.06	19.66±0.41	51.63±0.37	14.24±0.66	4.15±0.06	3.76±0.28	6.07±0.56	4.73±0.18	0.941±0.016
	30	62.42±0.31	19.34±0.46	51.46±1.64	13.93±0.70	4.18±0.11	3.87±0.04	6.19±0.09	4.74±0.13	0.942±0.017
	45	62.17±0.70	19.90±0.06	52.61±0.83	13.75±0.86	4.18±0.18	3.94±0.07	6.34±0.04	4.69±0.05	0.943±0.020
	60	62.38±0.21	19.68±0.33	52.32±1.16	13.75±0.67	4.21±0.09	3.98±0.02	6.38±0.06	4.60±0.02	0.943±0.021
	90	61.40±1.70	20.69±1.38	53.60±1.20	13.66±0.71	4.41±0.10	4.11±0.15	6.69±0.06	4.63±0.01	0.941±0.017

a: Χρόνος Ωρίμανσης (ημέρες του δευτέρου σταδίου ωρίμανσης). b: Λιπαρά επί ξηρής βάσης. c: Αλάτι επί της υγρασίας

Μη σημαντικές στατιστικά διαφορές παρατηρήθηκαν μεταξύ των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των τυριών HPA και HPB.

Σε όλα τα δείγματα, η υγρασία παρουσίασε ελαφρά σταδιακή μείωση. Μη σημαντικές στατιστικά διαφορές παρατηρήθηκαν όσον αφορά την υγρασία μεταξύ των τυριών HPA και HPB. Αντίθετα, τα τυριά HPC, διατήρησαν την αρχική τους υγρασία πιθανώς εξ' αιτίας της επεξεργασίας τους με ΥΠ η οποία μπορεί να επιφέρει αύξηση της ικανότητας συγκράτησης νερού (Saldo et al., 2001; Costabel et al., 2016). Οι Costabel et al. (2016), υποστήριξαν ότι η αύξηση του αριθμού των μικρών πεπτιδίων στο τυρί μπορεί να επιφέρει μείωση της απώλειας νερού από αυτό. Σύμφωνα με τον Smit (2003), η κατακράτηση νερού μπορεί να αιτιολογηθεί από τη λιγότερο στενή συσσωμάτωση των καζεϊνικών μικκυλίων και των λιποσφαιριών μετά τη συμπίεση, επιτρέποντας έτσι, τον εγκλωβισμό περισσότερης υγρασίας στο τυρί. Επιπρόσθετα τα τυριά HPC εμφάνισαν μειωμένη αρχική ($t=0$) υγρασία συγκριτικά με τα υπόλοιπα δείγματα, όμως στη συνέχεια η αποβολή της περιεχόμενης υγρασίας της είναι ασθενής. Αυτό συμβαίνει καθώς κατά την επεξεργασία του δείγματος, αποβάλλεται μέρος του περιεχόμενου νερού, ενώ όταν εισαχθεί στην άλμη αρχίζει να λαμβάνει και πάλι νερό από το μέσο συντήρησης. Στη διεθνή βιβλιογραφία, τα αποτελέσματα σχετικά με την επίδραση της ΥΠ στην υγρασία διαφόρων ειδών τυριών ποικίλουν. Οι Garde et al. (2007), προσδιόρισαν χαμηλότερη περιεκτικότητα νερού σε τυρί La Serena επεξεργασμένο στα 300-400 MPa μετά από 2 ή 50 d ωρίμανσης, συγκριτικά με δείγματα αναφοράς. Σε συμφωνία οι Moschoroulou et al. (2010), παρατήρησαν χαμηλότερες τιμές υγρασίας σε επεξεργασμένο τυρί Φέτα στα 200 και 500 MPa συγκριτικά με δείγματα αναφοράς, ενώ οι Capellas et al. (2001), δεν παρατήρησαν μεταβολή της υγρασίας σε τυρί από απαστερίωτο κατσικίσιο γάλα επεξεργασμένο στα 500 MPa. Σε αντίθεση, υψηλή ικανότητα συγκράτησης νερού συγκριτικά με δείγματα αναφοράς έχει αναφερθεί για άλλα είδη τυριού μετά από επεξεργασία τους με ΥΠ (Juan et al., 2007a; Juan et al., 2007b; Juan et al., 2004; Juan et al., 2008; Saldo et al., 2002). Ως εκ τούτου, τα χαρακτηριστικά της παρακαζεϊνικής μήτρας διαφόρων τύπων τυριού τα οποία διαμορφώνονται από την ανάπτυξη της οξύτητας και τις συνθήκες αλατίσματος, είναι ο κρίσιμος παράγοντας για την επίδραση της ΥΠ στην υγρασία του τυριού.

Το ποσοστό των ολικών λιπαρών σε όλα τα δείγματα λευκού τυριού παρουσίασε αύξηση με το χρόνο ωρίμανσης. Η αύξηση των λιπαρών σχετίζεται άμεσα με τη μείωση της υγρασίας, άρα συμπύκνωση των υπόλοιπων συστατικών συμπεριλαμβανομένων και των λιπαρών. Μη σημαντικές στατιστικά διαφορές παρατηρήθηκαν μεταξύ των τυριών HPA και HPB.

Σε γενικά πλαίσια παρατηρήθηκε μείωση του πρωτεϊνικού περιεχομένου των τεσσάρων τυριών, η οποία μπορεί κυρίως να αποδοθεί σε διάχυση των πρωτεϊνών στην άλμη (Zoidou et al., 2015; Maniou et al. 2013). Οι χαμηλότερες τιμές πρωτεϊνών παρατηρήθηκαν στα τυριά HPC, πιθανώς λόγω μεταφοράς τους μαζί με τη αποβολή υγρασίας που όπως προαναφέρθηκε παρατηρείται κατά την επεξεργασία.

Σε όλα τα δείγματα το ποσοστό τέφρας ανά βάρος δείγματος παρουσίασε μικρή αύξηση έως τις 21 ημέρες ενώ στη συνέχεια εμφάνισε σχετική σταθεροποίηση. Η αρχική αύξηση είναι αποτέλεσμα απομάκρυνσης ποσοστού της υγρασίας του τυριού και συμπύκνωσης των υπόλοιπων συστατικών του.

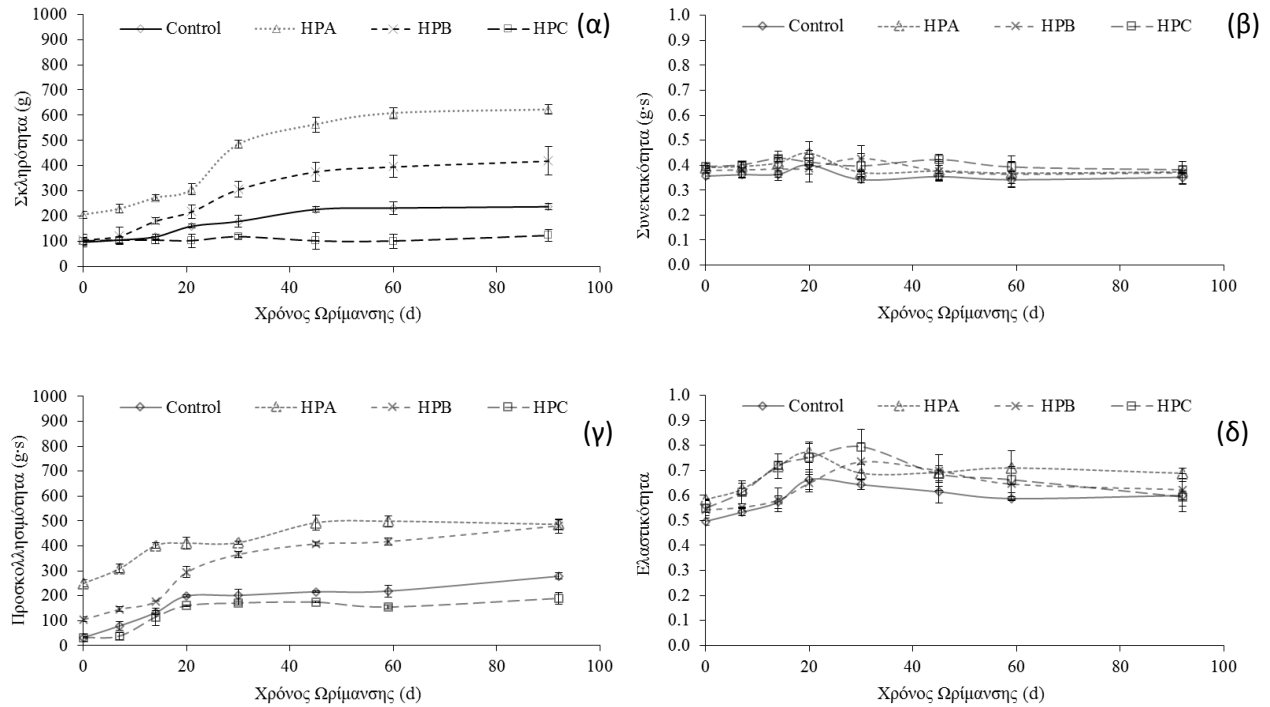
Τα τυριά HPC εμφάνισαν την υψηλότερη περιεκτικότητα σε αλάτι συγκριτικά με τα υπόλοιπα δείγματα με σημαντικές στατιστικά διαφορές ($p<0.05$). Βάσει των τιμών αλατοπεριεκτικότητας των τυριών HPC, παρατηρήθηκε σταδιακή αύξησή της με το χρόνο ωρίμανσης. Οι αυξημένες τιμές αλατότητας στα δείγματα HPC πιθανώς οφείλονται στη γρηγορότερη διάχυση αλάτος από την εξωτερική επιφάνεια προς το εσωτερικό του τυριού, όπως υποστήριξαν και οι Juan et al. (2008), ύστερα από επεξεργασία τυριού

από πρόβειο γάλα, στα 300 MPa για 10 min στις 1 και 15 d ωρίμανσης. Οι Moschoroulou et al. (2010), μετά από επεξεργασία τυριού Φέτα στα 200 και 500 MPa, παρατήρησαν αυξημένες τιμές άλατος, γεγονός που αποδόθηκε στη χαμηλότερη υγρασία που εμφάνισαν τα συγκεκριμένα τυριά. Γενικά στη διεθνή βιβλιογραφία συναντώνται αντιφατικά αποτελέσματα σχετικά με την επίδραση της ΥΠ στη διάχυση του άλατος σε διάφορα είδη τυριών τα οποία εμβαπτίζονται-αλατίζονται σε άλμη (Messens et al., 1999; Pavia et al., 2000; Saldo et al., 2001; Saldo et al., 2002). Ωστόσο, τα αποτελέσματα των συγκεκριμένων ερευνών δε μπορούν να συσχετιστούν άμεσα με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής διότι στην παρούσα έρευνα η άλμη είναι το μέσο συντήρησης και όχι τρόπος αλατίσματος.

Οι τιμές pH των τεσσάρων τυριών στο τέλος της ωρίμανσής τους βρίσκονται εντός των ορίων που παρατηρούνται σε Φέτα του εμπορίου (Nega et al., 2012). Αναφορικά με την ενεργότητα νερού των τεσσάρων τυριών, παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση η οποία αποδίδεται στην πτωτική τάση της υγρασίας των δειγμάτων καθώς και στην αύξηση της αλατοπεριεκτικότητάς τους.

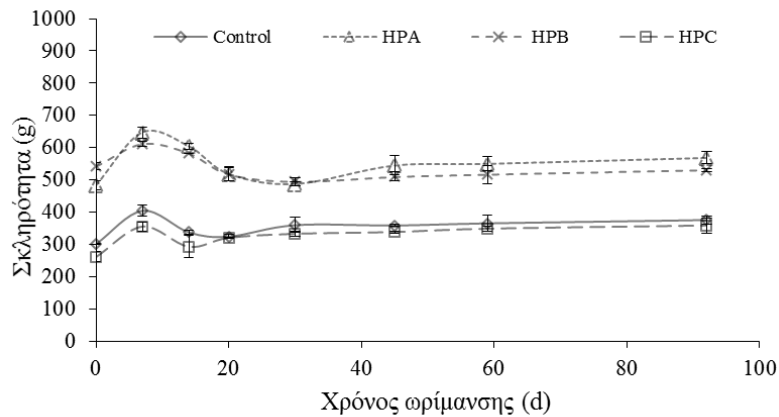
5.4.3. Ανάλυση Υφής Δειγμάτων Λευκού Τυριού Άλμης Τύπου Φέτας

Σε όλα τα δείγματα πραγματοποιήθηκε ανάλυση της υφής τους κατά τη διάρκεια του δευτέρου σταδίου ωρίμανσης. Οι παράμετροι που αναλύθηκαν ήταν η σκληρότητα, συνεκτικότητα, προσκολλησιμότητα και ελαστικότητα. Στα Σχήματα 5.41 α, β, γ και δ παρουσιάζεται για τα τέσσερα τυριά η μεταβολή των προαναφερόμενων παραμέτρων υφής, αντίστοιχα.



Σχήμα 5.41. Ανάλυση παραμέτρων υφής των δειγμάτων Control \diamond , HPA \triangle , HPB \times και HPC \square σχετικά με τη α) Σκληρότητα β) Συνεκτικότητα γ) Προσκολλησιμότητα και δ) Ελαστικότητα κατά τη διάρκεια του δευτέρου σταδίου ωρίμανσης (μέσος όρος δύο τυροκομήσεων \pm stdev)

Οι τιμές των παραμέτρων που παρουσιάζονται παραπάνω έχουν ληφθεί μετά από ανάλυση των δειγμάτων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Συμπληρωματικά, τα τέσσερα τυριά μελετήθηκαν και ως προς τη σκληρότητά τους σε θερμοκρασία 4°C με τα αποτελέσματα να παρατίθενται στο Σχήμα 5.42.



Σχήμα 5.42. Μεταβολή της σκληρότητας των δειγμάτων Control \diamond , HPA \triangle , HPB \times και HPC \square , μετά από ανάλυσή τους στους 4°C, κατά τη διάρκεια του δευτέρου σταδίου ωρίμανσης (μέσος όρος δύο τυροκομήσεων \pm stdev)

Υψηλότερες τιμές σκληρότητας συγκριτικά με τα δείγματα αναφοράς, παρατηρήθηκαν για τα τυριά HPA και HPB, με τα πρώτα να εμφανίζουν τις υψηλότερες τιμές, ενώ τα τυριά HPC ήταν εκείνα με τις μικρότερες τιμές σκληρότητας. Μετά από μέτρηση της σκληρότητας των τυριών σε θερμοκρασία 4°C, τα τυριά εμφάνισαν την ίδια σειρά ως προς την ένταση του συγκεκριμένου χαρακτηριστικού συγκριτικά με τις μετρήσεις σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στη συγκεκριμένη περίπτωση όμως, όπως φαίνεται από το Σχήμα 5.42 τα τυριά HPA και HPB όπως και τα Control και HPC φαίνεται ότι δεν εμφανίζουν μεγάλες διαφορές μεταξύ τους. Ωστόσο όπως προέκυψε μέσω στατιστικής ανάλυσης, η διαφορά στη σκληρότητα μεταξύ των τυριών HPA και HPB ήταν σημαντική ($p < 0.05$). Η σκληρότητα σχετίζεται άμεσα και με την υγρασία του τυριού, η οποία σύμφωνα με τον Πίνακα 5.2 είναι σχετικά χαμηλότερη στα δείγματα HPA, ενώ ακολουθούν τα HPB. Τα τυριά HPC εμφάνισαν τη μικρότερη σκληρότητα, καθώς η επεξεργασία τους με ΥΠ πιθανώς να οδήγησε σε αύξηση της ικανότητας συγκράτησης νερού (Saldo et al. 2001).

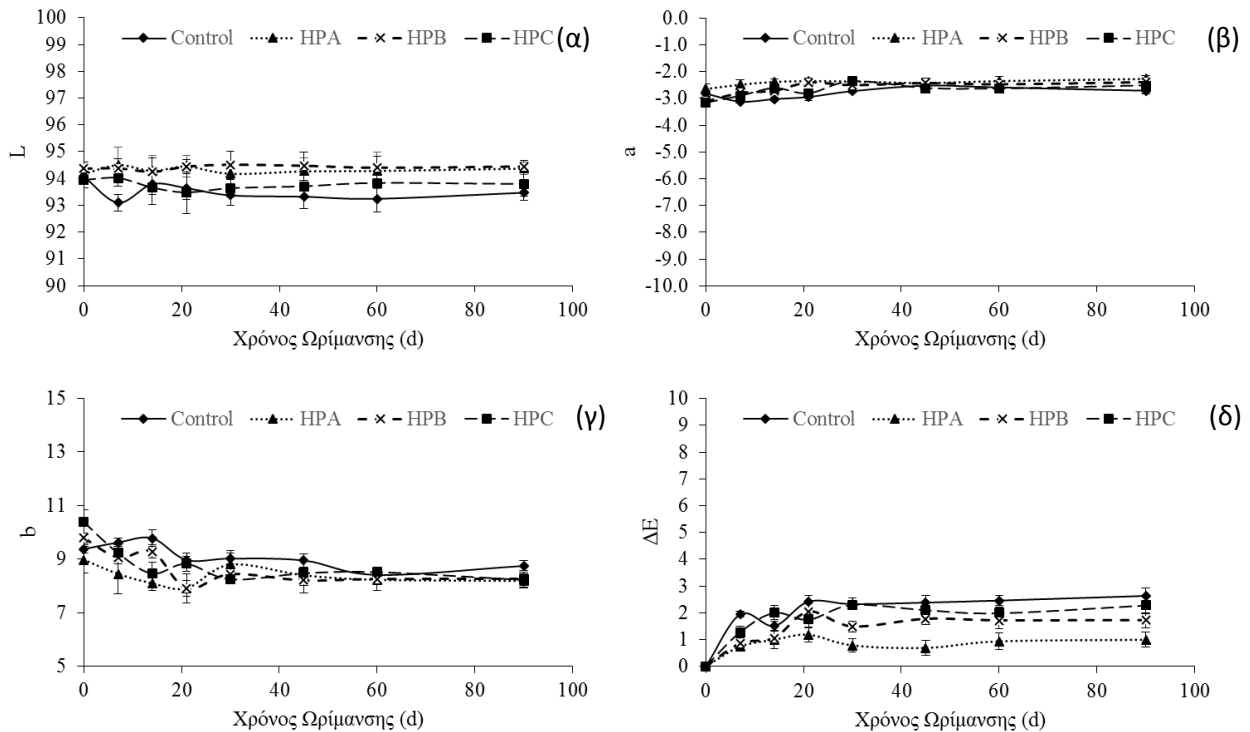
Μη σημαντικές στατιστικά διαφορές παρατηρήθηκαν μεταξύ των τιμών της συνεκτικότητας των τυριών HPA, HPB και HPC, με τα τελευταία να εμφανίζουν τι υψηλότερες τιμές. Τα δείγματα αναφοράς εμφάνισαν τη μικρότερη συνεκτικότητα.

Η προσκολλησιμότητα των τεσσάρων τυριών, όπως ακριβώς και στην περίπτωση της σκληρότητάς τους φαίνεται να αυξάνεται με το χρόνο ωρίμανσης σε όλα τα δείγματα. Η συγκεκριμένη παράμετρος φαίνεται να σχετίζεται άμεσα με την υγρασία των τυριών αφού όπως και στην περίπτωση της σκληρότητας, τις υψηλότερες τιμές εμφάνισαν τα τυριά HPA, ενώ έπονται κατά φθίνουσα σειρά τα δείγματα HPB, Control και HPC.

Η ελαστικότητα παρουσίασε αύξηση μέχρι τις 30 ημέρες ωρίμανσης στον ψυχρό θάλαμο και στη συνέχεια σταθεροποίηση για όλα τα δείγματα. Μη σημαντικές στατιστικά διαφορές παρατηρήθηκαν μεταξύ των τιμών της ελαστικότητας των τυριών HPA και HPC.

5.4.4. Προσδιορισμός Χρώματος Δειγμάτων Λευκού Τυριού Άλμης Τύπου Φέτας

Για όλα τα τυριά πραγματοποιήθηκε μέτρηση και ανάλυση του χρώματός τους κατά τη διάρκεια του δευτέρου σταδίου ωρίμανσής τους. Ειδικότερα μετρήθηκαν οι παράμετροι L, a και b της κλίμακας CIELab, ενώ προσδιορίστηκε και η συνολική μεταβολή χρώματος ΔΕ. Στα Σχήματα 5.43 α, β, γ και δ παρουσιάζεται για όλα τα δείγματα η μεταβολή των προαναφερόμενων παραμέτρων χρώματος, αντίστοιχα.



Σχήμα 5.43. Μεταβολή των παραμέτρων χρώματος α) L β) a και γ) b καθώς και δ) της συνολικής μεταβολής χρώματος ΔΕ, των δειγμάτων Control —○—, HPA —▲—, HPB —×— και HPC —■— με το χρόνο ωρίμανσης (μέσος όρος δύο τυροκομήσεων ±stdev)

Η φωτεινότητα του χρώματος εκφράζεται μέσω της παραμέτρου L, η οποία δε φάνηκε να μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης για το καθ' ένα από τα τέσσερα δείγματα. Τα τυριά HPB εμφάνισαν τις υψηλότερες τιμές της συγκεκριμένης παραμέτρου, κατ' επέκταση ήταν πιο άσπρα, όμως δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές στατιστικά διαφορές των συγκεκριμένων τυριών με τα τυριά HPA. Μη σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν επίσης μεταξύ των τυριών HPC και Control, με τα δεύτερα να εμφανίζουν τις χαμηλότερες τιμές της παραμέτρου L.

Όσον αφορά την παράμετρο a παρατηρήθηκε αρχική αύξηση και επακόλουθη σταθεροποίηση της παραμέτρου για όλα τα δείγματα έως το τέλος της ωρίμανσης. Η αύξηση αυτή υποδεικνύει μεταβολή του χρώματος του τυριού προς το κόκκινο. Η παράμετρος αυτή, συμβάλλει στη γενικότερη μεταβολή των χρώματος των δειγμάτων.

Η ένταση του κίτρινου χρώματος εκφράζεται μέσω της παραμέτρου b, η οποία φάνηκε να μειώνεται για όλα τα τυριά μέχρι τις 20 ημέρες ωρίμανσης στον ψυχρό θάλαμο ενώ στη συνέχεια σταθεροποιήθηκε. Μη σημαντικές στατιστικά διαφορές παρατηρήθηκαν μεταξύ των τυριών HPA και HPB με τα πρώτα να

εμφανίζουν ως επί το πλείστον τις χαμηλότερες τιμές της παραμέτρου *b*. Μη σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν επίσης και μεταξύ των τυριών HPC και Control, με τα δεύτερα να εμφανίζουν τις υψηλότερες τιμές της παραμέτρου *b*, δηλαδή να εμφανίζουν μεγαλύτερη ένταση κίτρινου χρώματος.

Τα τυριά τα οποία εμφάνισαν τη μεγαλύτερη μεταβολή χρώματος ΔΕ με το χρόνο ωρίμανσης ήταν τα Control, ενώ ακολουθούν τα τυριά HPC, μεταξύ όμως των οποίων δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Η μικρότερη μεταβολή χρώματος παρατηρήθηκε στα τυριά HPA, ενώ έπονται τα τυριά HPB.

5.4.5. Οργανοληπτική Αξιολόγηση Δειγμάτων Λευκού Τυριού Άλμης Τύπου Φέτας

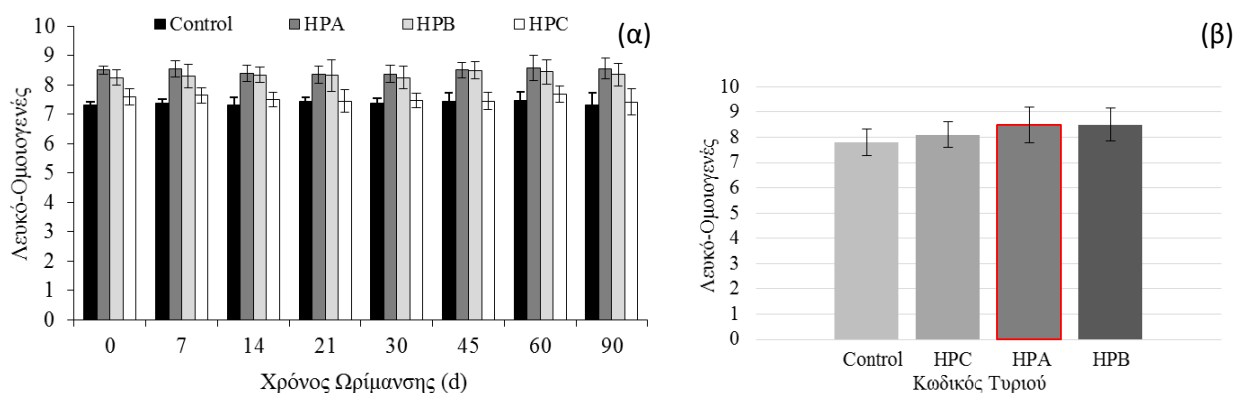
Τα τέσσερα τυριά αξιολογήθηκαν μέσω οργανοληπτικών δοκιμών που πραγματοποιούνταν κατά τη διάρκεια της ωρίμανσής τους στον ψυχρό θάλαμο από ομάδα 6 δοκιμαστών αλλά και μέσω οργανοληπτικής δοκιμής που πραγματοποιήθηκε σε χρόνο 30 ημέρες αποθήκευσης στον ψυχρό θάλαμο από μεγαλύτερη ομάδα 15 δοκιμαστών.

Η βαθμολογία η οποία αποδόθηκε, όσον αφορά την ένταση και την αρέσκεια των βασικότερων χαρακτηριστικών δίνεται αναλυτικά παρακάτω.

5.4.5.1. Αξιολόγηση χαρακτηριστικών που σχετίζονται με την εμφάνιση-χρώμα των δειγμάτων λευκού τυριού άλμης τύπου Φέτας

5.4.5.1.1. Αξιολόγηση των δειγμάτων ως προς το χαρακτηριστικό Λευκό-Ομοιογενές

Οι βαθμολογίες που έλαβαν τα τέσσερα τυριά σε διαφορετικούς χρόνους κατά τη διάρκεια ωρίμανσής τους στον ψυχρό θάλαμο (μέσος όρος τιμών 2 τυροκομήσεων-επαναλήψεων) καθώς και σε χρόνο 30 ημέρες αποθήκευσης (αξιολόγηση μίας τυροκομής), ως προς την ένταση του χαρακτηριστικού λευκό-ομοιογενές, παρατίθενται στα Σχήματα 5.44 α και β, αντίστοιχα.



Σχήμα 5.44. Βαθμολόγηση ως προς την ένταση του χαρακτηριστικού λευκό-ομοιογενές των τεσσάρων τυριών α) συναρτήσει του χρόνου ωρίμανσης (μέσος όρος τιμών 2 τυροκομήσεων±stden) και β) σε χρόνο 30 ημέρες ωρίμανσης (1 τυροκομήση±stden) στον ψυχρό θάλαμο

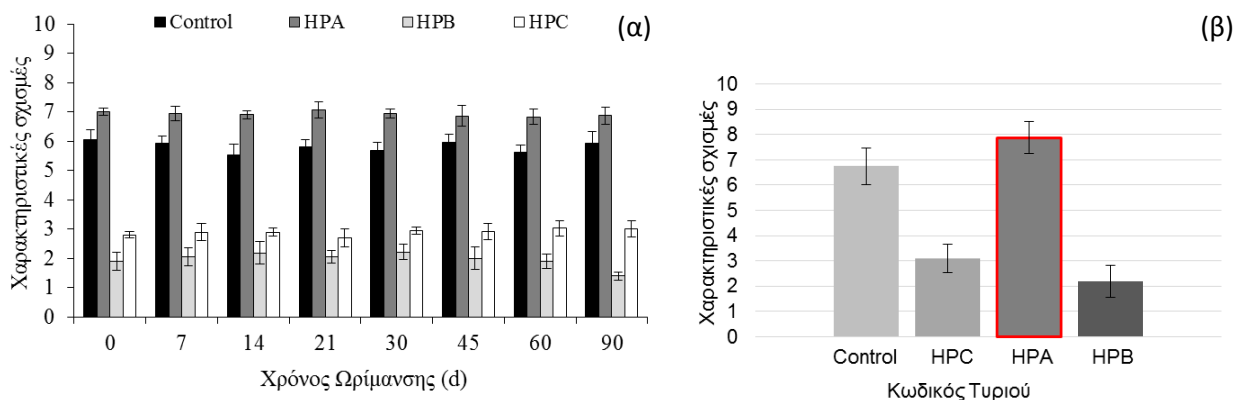
Μετά από υποβολή των αποτελεσμάτων του Σχήματος 5.44 α σε ανάλυση διακύμανσης (ANOVA), παρατηρήθηκαν μη σημαντικές στατιστικά μεταβολές μεταξύ των βαθμολογιών σχετικά με την ένταση του χαρακτηριστικού λευκό-ομοιογενές με το χρόνο ωρίμανσης για το καθένα από τα τέσσερα δείγματα.

Τα τυριά HPA θεωρήθηκαν εκείνα με τη μεγαλύτερη ένταση λευκού χρώματος εφ' όσον απέσπασαν την υψηλότερη βαθμολογία, με τα τυριά HPB να ακολουθούν με μικρή αλλά σημαντική ($p<0.05$) διαφορά. Χαμηλότερες βαθμολογίες και σημαντικές διαφορές ($p<0.05$) παρατηρήθηκαν για τα τυριά HPC και Control, με τα δεύτερα να θεωρούνται αυτά με τη μικρότερη ένταση λευκού χρώματος. Ωστόσο, λαμβάνοντας υπόψη τα σφάλματα, μπορεί να εξαχθεί με ασφάλεια μόνο το συμπέρασμα, ότι τα δείγματα HPA και HPB εμφάνισαν μεγαλύτερη ένταση λευκού - ομοιογενούς χρώματος συγκριτικά με τα δείγματα HPC και Control. Μη σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν ως προς τη μεταβολή της έντασης του συγκεκριμένου χαρακτηριστικού με το χρόνο ωρίμανσης για το καθένα από τα τέσσερα τυριά.

Την ίδια σειρά βαθμολόγησης της έντασης του χαρακτηριστικού λευκό-ομοιογενές έλαβαν τα τέσσερα τυριά και από την ομάδα των 15 δοκιμαστών μετά από 30 ημέρες ωρίμανσης στον ψυχρό θάλαμο. Στο Σχήμα 5.44 β δίνεται επιπλέον σε κόκκινο πλαίσιο το δείγμα το οποίο απέσπασε την αρέσκεια του μεγαλύτερου ποσοστού των δοκιμαστών.

5.4.5.1.2. Αξιολόγηση των δειγμάτων ως προς το χαρακτηριστικό μικρές χαρακτηριστικές σχισμές

Κατά την παρασκευή της Φέτας και συγκεκριμένα κατά τη μεταφορά του τυροπήγματος στα καλούπια, σχηματίζονται στο τυρόπηγμα μικρές σχισμές γεμάτες με ορό γάλακτος. Οι σχισμές αυτές είναι χαρακτηριστικές του συγκεκριμένου τύπου τυριού και για το λόγο αυτό ζητήθηκε από τους δοκιμαστές η βαθμολόγηση του συγκεκριμένου χαρακτηριστικού. Οι βαθμολογίες που έλαβαν τα τέσσερα τυριά σε διαφορετικούς χρόνους κατά τη διάρκεια ωρίμανσής τους στον ψυχρό θάλαμο (μέσος όρος τιμών 2 τυροκομήσεων) καθώς και σε χρόνο 30 ημέρες αποθήκευσης (μέσος όρος τιμών μίας τυροκόμησης), ως προς την ένταση του χαρακτηριστικού μικρές χαρακτηριστικές σχισμές, παρατίθενται στα Σχήματα 5.45 α και β, αντίστοιχα.



Σχήμα 5.45. Βαθμολόγηση ως προς την ένταση του χαρακτηριστικού μικρές χαρακτηριστικές σχισμές των τεσσάρων τυριών α) συναρτήσει του χρόνου ωρίμανσης (μέσος όρος τιμών 2 τυροκομήσεων±stdev) και β) σε χρόνο 30 ημέρες ωρίμανσης (μέσος όρος τιμών 1 τυροκόμησης±stdev) στον ψυχρό θάλαμο

Μετά από υποβολή των αποτελεσμάτων του Σχήματος 5.45 α σε ανάλυση διακύμανσης (ANOVA), παρατηρήθηκαν σημαντικές στατιστικά διαφορές μεταξύ των τεσσάρων τυριών ($p<0.05$).

Το δείγμα HPA βαθμολογήθηκε ως το τυρί με τις εντονότερες μικρές χαρακτηριστικές σχισμές, ενώ ακολουθεί η Φέτα Control. Τα τυριά HPC και HPB απέσπασαν τις χαμηλότερες βαθμολογίες, με τα τυριά HPB να εμφανίζουν την πιο ενιαία δομή με ελάχιστες τομές (Εικόνα 5.1). Οι διαφορές στη βαθμολογία των δύο δειγμάτων με τις περισσότερες τομές από εκείνα με την πιο ενιαία δομή είναι αρκετά εμφανείς.

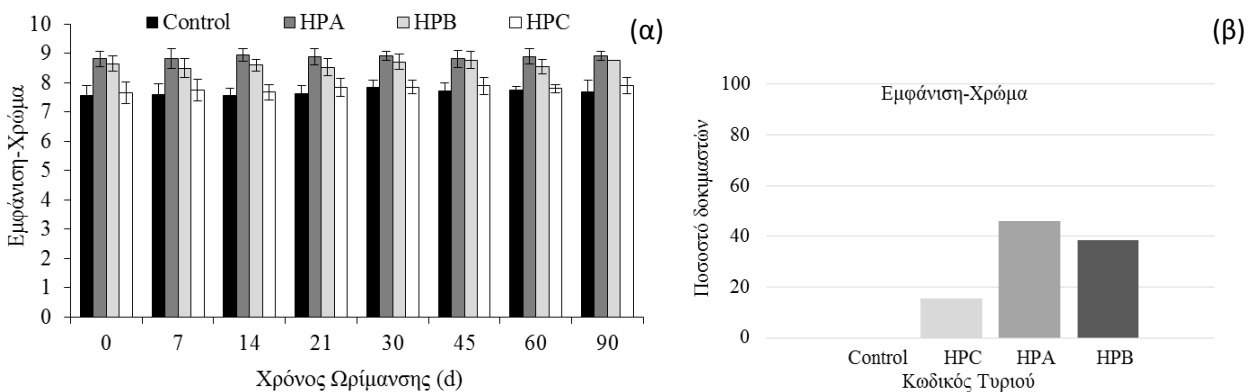
Ο πολύ μικρός αριθμός χαρακτηριστικών σχισμών των τυριών HPC θα μπορούσε να αποδοθεί στην υδροποίηση του εγκλωβισμένου αέρα που προκαλείται μέσω της άμεσης επεξεργασίας του τυριού με ΥΠ.

Μη σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν ως προς τη μεταβολή της έντασης του συγκεκριμένου χαρακτηριστικού με το χρόνο ωρίμανσης για το καθένα από τα τέσσερα τυριά.

Την ίδια σειρά βαθμολόγησης της έντασης του συγκεκριμένου χαρακτηριστικού έλαβαν τα τέσσερα τυριά και από την ομάδα των 15 δοκιμαστών μετά από 30 ημέρες ωρίμανσης στον ψυχρό θάλαμο. Στο Σχήμα 5.45 β φαίνεται σε κόκκινο πλαίσιο το δείγμα HPA το οποίο απέσπασε την αρέσκεια του μεγαλύτερου ποσοστού των δοκιμαστών.

5.4.5.1.3. Αξιολόγηση των δειγμάτων ως προς την αρέσκεια του χαρακτηριστικού εμφάνιση-χρώμα

Οι βαθμολογίες που έλαβαν από τους δοκιμαστές τα τέσσερα τυριά κατά τη διάρκεια ωρίμανσής τους στον ψυχρό θάλαμο ως προς την αρέσκεια του χαρακτηριστικού εμφάνιση-χρώμα καθώς και το ποσοστό των δοκιμαστών που επέλεξε το κάθε τυρί με κριτήριο την αρέσκεια του συγκεκριμένου χαρακτηριστικού σε χρόνο 30 ημέρες αποθήκευσης, παρατίθενται στα Σχήματα 5.46 α και β, αντίστοιχα.



Σχήμα 5.46. α) Βαθμολόγηση ως προς την αρέσκεια του χαρακτηριστικού εμφάνιση-χρώμα των τεσσάρων τυριών α) συναρτήσει του χρόνου ωρίμανσης (μέσος όρος τιμών 2 τυροκομήσεων±stdev) και **β)** Ποσοστό δοκιμαστών που επέλεξε το κάθε τυρί ως προς την αρέσκεια του χαρακτηριστικού εμφάνιση-χρώμα σε χρόνο 30 ημέρες ωρίμανσης στον ψυχρό θάλαμο

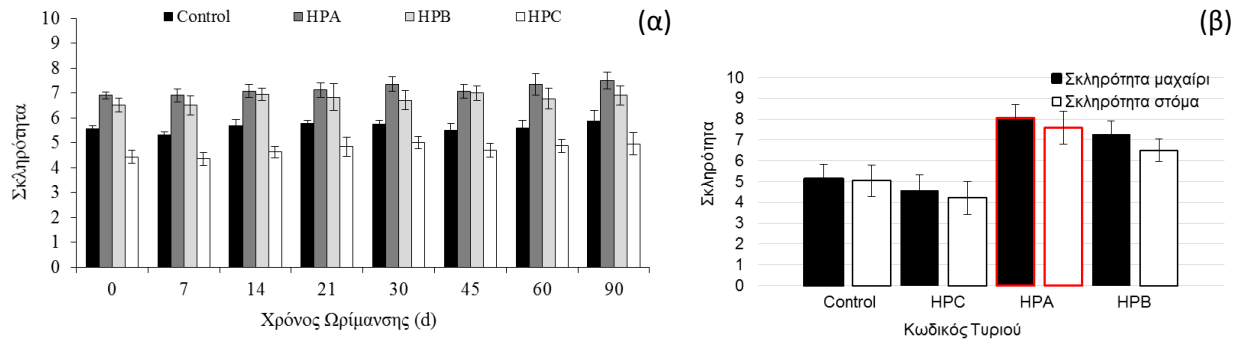
Παρόμοια αποτελέσματα με εκείνα της έντασης του συγκεκριμένου χαρακτηριστικού προέκυψαν και στην περίπτωση βαθμολόγησης της αρέσκειας. Μετά από υποβολή των αποτελεσμάτων του Σχήματος 5.46 α σε ανάλυση διακύμανσης (ANOVA), παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των τεσσάρων δειγμάτων ($p < 0.05$). Ωστόσο, μη σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν ως προς τη μεταβολή της έντασης του συγκεκριμένου χαρακτηριστικού με το χρόνο ωρίμανσης για το καθένα από τα τέσσερα τυριά.

Αναφορικά με το Σχήμα 5.46 β, για χρόνο δευτέρου σταδίου ωρίμανσης των τεσσάρων τυριών 30 ημέρες, ποσοστό 46.2% των δοκιμαστών επέλεξε με κριτήριο την αρέσκεια του χαρακτηριστικού εμφάνιση-χρώμα τα τυριά HPA, ποσοστό 38.5% των δοκιμαστών επέλεξε τα τυριά HPB, το 15% επέλεξε τα τυριά HPC και το 0% τα τυριά Control.

5.4.5.2. Αξιολόγηση χαρακτηριστικών που σχετίζονται με την υφή-δομή των δειγμάτων λευκού τυριού άλμης τύπου Φέτας

5.4.5.2.1. Αξιολόγηση των δειγμάτων ως προς το χαρακτηριστικό Σκληρότητα

Οι βαθμολογίες που έλαβαν τα τέσσερα τυριά σε διαφορετικούς χρόνους κατά τη διάρκεια ωρίμανσής τους στον ψυχρό θάλαμο (μέσος όρος τιμών 2 τυροκομήσεων) καθώς και σε χρόνο 30 ημέρες αποθήκευσης (μέσος όρος τιμών τυροκόμησης), ως προς την ένταση της σκληρότητάς τους, παρατίθενται στα Σχήματα 5.47 α και β, αντίστοιχα.



Σχήμα 5.47. Βαθμολόγηση ως προς την ένταση της σκληρότητας των τεσσάρων τυριών α) συναρτήσει του χρόνου ωρίμανσης (μέσος όρος τιμών 2 τυροκομήσεων±stdev) και β) σε χρόνο 30 ημέρες ωρίμανσης (μέσος όρος τιμών 1 τυροκόμησης±stdev) στον ψυχρό θάλαμο

Για όλα τα δείγματα παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια του δεύτερου σταδίου ωρίμανσής τους, μικρή αυξητική τάση των βαθμολογιών. Βάσει του Σχήματος 5.47 α, οι υψηλότερες βαθμολογίες ως προς την ένταση της σκληρότητας των τυριών, παρατηρήθηκαν για τα τυριά HPA, με τα HPB να ακολουθούν με μικρή αλλά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$). Τα δείγματα Control και HPC απέσπασαν μικρότερες βαθμολογίες οι οποίες εμφάνισαν μεταξύ τους σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$), με τα δεύτερα να εμφανίζουν τις χαμηλότερες τιμές, ομοίως με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τον αναλυτή υφής (Παρ. 5.4.3). Οι χαμηλοί βαθμοί της έντασης της σκληρότητας των δειγμάτων HPC πιθανόν να οφείλονται στην επίδραση της ΥΠ στη δομή των συγκεκριμένων τυριών (Saldo et al., 2001) καθώς και στις υψηλότερες τιμές υγρασίας που παρατηρήθηκαν, πιθανότατα εξ' αιτίας της ικανότητας συγκράτησης νερού που ανέπτυξαν μετά την επεξεργασία τους με ΥΠ. Μη σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν ως προς τη μεταβολή της έντασης του συγκεκριμένου χαρακτηριστικού με το χρόνο ωρίμανσης για το καθένα από τα τέσσερα τυριά.

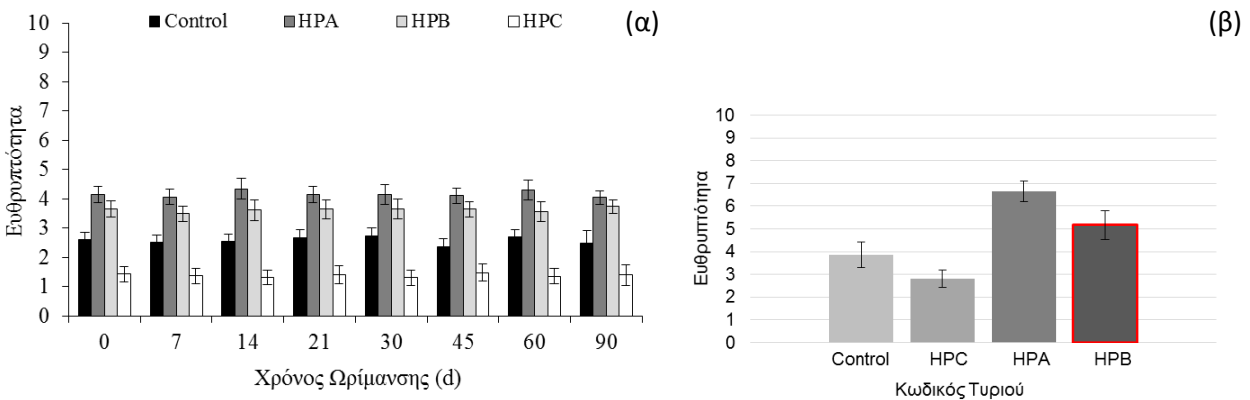
Την ίδια σειρά βαθμολόγησης της έντασης της σκληρότητας έλαβαν τα τέσσερα τυριά και από τους 15 δοκιμαστές μετά από 30 ημέρες ωρίμανσης στον ψυχρό θάλαμο. Στη συγκεκριμένη περίπτωση τα δείγματα βαθμολογήθηκαν ως προς την ένταση της σκληρότητας κατά την κοπή τους με μαχαίρι αλλά και κατά τη μάσηση. Μη σημαντικές στατιστικά διαφορές παρατηρήθηκαν μεταξύ των βαθμών που έλαβαν για την ένταση της σκληρότητας κατά την κοπή με μαχαίρι τα δείγματα HPC και Control από τον κάθε δοκιμαστή. Αντίθετα σημαντικές διαφορές υπήρξαν μεταξύ των βαθμών που έλαβαν για την ένταση της σκληρότητας κατά την κοπή με μαχαίρι αλλά και κατά τη μάσηση, τα υπόλοιπα τυριά ($p < 0.05$). Μετά από σύγκριση των βαθμολογιών που έλαβε το κάθε δείγμα ως προς την ένταση της σκληρότητας κατά την κοπή και κατά τη μάσηση, παρατηρήθηκαν μη σημαντικές στατιστικές μεταβολές στους βαθμούς των

τυριών HPA και Control. Σε αντίθεση στα τυριά HPB παρατηρήθηκαν σημαντικές στατιστικά μεταβολές μεταξύ των βαθμών που έλαβαν για την ένταση της σκληρότητας κατά την κοπή και τη μάσηση ($p < 0.05$). Τέλος αναφορικά με τα τυριά HPC παρατηρήθηκαν μη σημαντικές μεταβολές μεταξύ των βαθμών που έλαβαν για την ένταση της σκληρότητας κατά την κοπή και τη μάσηση.

Στο Σχήμα 5.47 β δίνεται επιπλέον σε κόκκινο πλαίσιο το δείγμα το οποίο απέσπασε την αρέσκεια για το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό του μεγαλύτερου ποσοστού των δοκιμαστών.

5.4.5.2.2. Αξιολόγηση των δειγμάτων ως προς το χαρακτηριστικό Ευθρυπτότητα

Οι βαθμολογίες που έλαβαν από τους δοκιμαστές τα τέσσερα τυριά σε διαφορετικούς χρόνους κατά τη διάρκεια ωρίμανσής τους στον ψυχρό θάλαμο (μέσος όρος τιμών 2 τυροκομήσεων) καθώς και σε χρόνο 30 ημέρες αποθήκευσης (μέσος όρος τιμών 1 τυροκόμησης), ως προς την ένταση της ευθρυπτότητάς τους, παρατίθενται στα Σχήματα 5.48 α και β, αντίστοιχα.



Σχήμα 5.48. Βαθμολόγηση ως προς την ένταση της ευθρυπτότητας των τεσσάρων τυριών α) συναρτήσει του χρόνου ωρίμανσης (μέσος όρος τιμών 2 τυροκομήσεων \pm stdev) και β) σε χρόνο 30 ημέρες ωρίμανσης (μέσος όρος τιμών 1 τυροκόμησης \pm stdev) στον ψυχρό θάλαμο

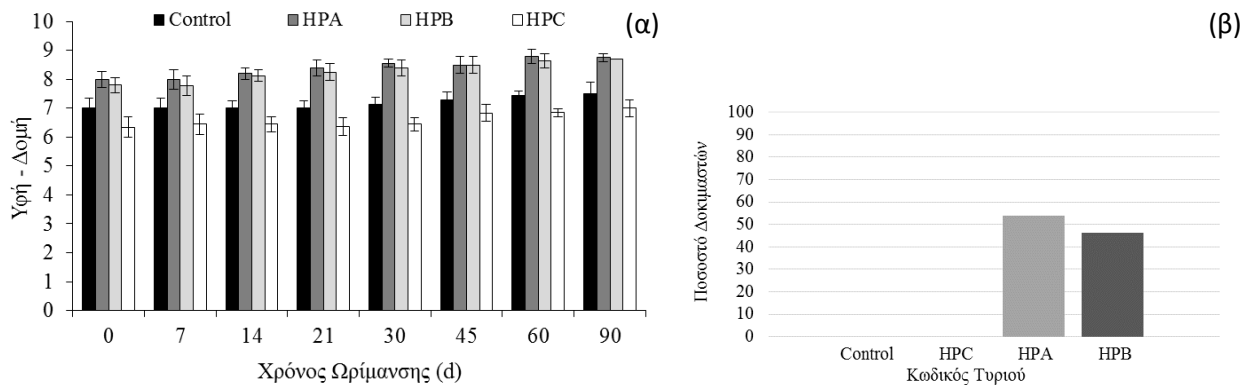
Αντίστοιχα της σειράς βαθμολόγησης που έλαβαν τα δείγματα ως προς την ένταση της σκληρότητάς τους, βαθμολογήθηκαν και ως προς την ένταση της ευθρυπτότητάς τους. Ειδικότερα, τα τυριά HPA τα οποία βαθμολογήθηκαν ως τα πιο σκληρά, βαθμολογήθηκαν και ως τα πιο εύθρυπτα, με τα τυριά HPB να ακολουθούν. Να τονιστεί, ότι οι βαθμοί που έλαβαν τα συγκεκριμένα τυριά (3.5-4) δεν οδηγούν σε ανεπιθύμητα αποτελέσματα στη δομή τους είτε κατά τον τεμαχισμό είτε κατά τη μάσηση. Τα δείγματα Control πήραν χαμηλότερες βαθμολογίες ενώ οι χαμηλότερες εμφανίστηκαν στα δείγματα HPC. Μετά από υποβολή των αποτελεσμάτων του Σχήματος 5.48 α σε ανάλυση διακύμανσης (ANOVA), παρατηρήθηκαν μη σημαντικές στατιστικά μεταβολές των βαθμολογιών σχετικά με την ένταση της ευθρυπτότητας με το χρόνο ωρίμανσης για το καθένα από τα τέσσερα δείγματα, αλλά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τεσσάρων δειγμάτων ($p < 0.05$).

Την ίδια σειρά βαθμολόγησης της έντασης της ευθρυπτότητας έλαβαν τα τέσσερα τυριά και από την ομάδα των 15 δοκιμαστών μετά από 30 ημέρες ωρίμανσης στον ψυχρό θάλαμο. Σημαντικές στατιστικά μεταβολές παρατηρήθηκαν μεταξύ των βαθμών που έλαβαν τα δείγματα HPA και HPB από τον κάθε δοκιμαστή ($p < 0.05$). Σημαντικές διαφορές υπήρξαν επίσης μεταξύ των βαθμών που έλαβαν τα υπόλοιπα τυριά από τον κάθε δοκιμαστή ($p < 0.05$).

Στο Σχήμα 5.48 β δίνεται επιπλέον σε κόκκινο πλαίσιο το δείγμα το οποίο απέσπασε την αρέσκεια για το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό του μεγαλύτερου ποσοστού των δοκιμαστών.

5.4.5.2.3. Αξιολόγηση των δειγμάτων ως προς την αρέσκεια του χαρακτηριστικού υφή-δομή

Οι βαθμολογίες που έλαβαν τα τέσσερα τυριά κατά τη διάρκεια ωρίμανσής τους στον ψυχρό θάλαμο ως προς την αρέσκεια του χαρακτηριστικού υφή-δομή καθώς και το ποσοστό των δοκιμαστών που επέλεξε το κάθε τυρί με κριτήριο την αρέσκεια του συγκεκριμένου χαρακτηριστικού σε χρόνο 30 ημέρες αποθήκευσης, παρατίθενται στα Σχήματα 5.49 α και β, αντίστοιχα.



Σχήμα 5.49. α) Βαθμολόγηση ως προς την αρέσκεια του χαρακτηριστικού υφή-δομή των τεσσάρων τυριών α) συναρτήσει του χρόνου ωρίμανσης (μέσος όρος τιμών 2 τυροκομήσεων±stden) και **β)** Ποσοστό δοκιμαστών που επέλεξε το κάθε τυρί ως προς την αρέσκεια του χαρακτηριστικού εμφάνιση-χρώμα σε χρόνο 30 ημέρες ωρίμανσης στον ψυχρό θάλαμο

Μικρή αυξητική τάση της βαθμολογίας ($p>0.05$) και σημαντικές διαφορές ($p<0.05$) ως προς την αρέσκεια της υφής-δομής παρουσιάστηκε συναρτήσει του χρόνου ωρίμανσης για όλα τα τυριά. Τα δείγματα HPA ήταν εκείνα που απέσπασαν τους υψηλότερους βαθμούς ως προς την αρέσκεια της υφής-δομής τους, καθ' όλη τη διάρκεια του δευτέρου σταδίου ωρίμανσης. Ακολουθούν με μη σημαντική διαφορά τα τυριά HPB, ενώ χαμηλότερους βαθμούς και σημαντική διαφορά ($p<0.05$) εμφάνισαν τα τυριά Control και HPC με τα δεύτερα να παρουσιάζουν τη χαμηλότερη βαθμολογία.

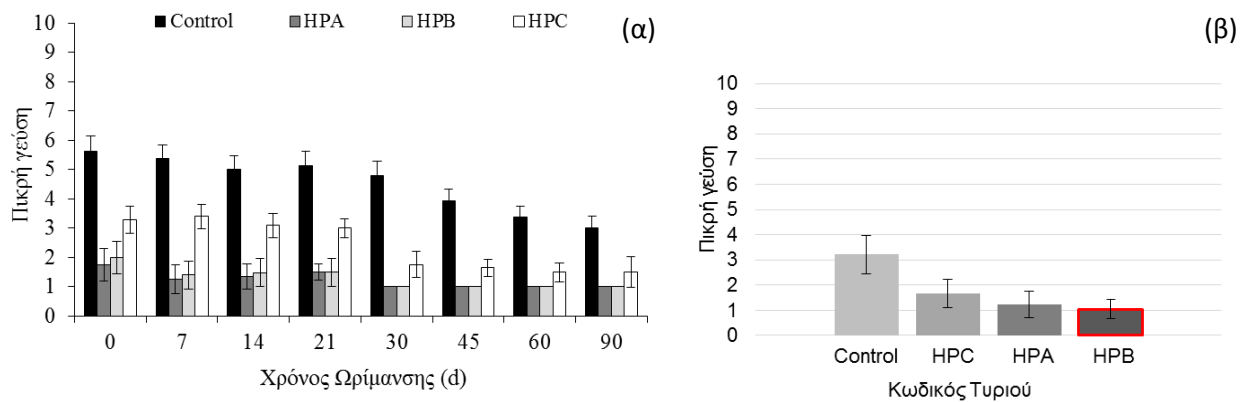
Αναφορικά με το Σχήμα 5.49 β, για χρόνο δευτέρου σταδίου ωρίμανσης των τεσσάρων τυριών 30 ημέρες, ποσοστό 53.8% των δοκιμαστών επέλεξε με κριτήριο την αρέσκεια ως προς την υφή-δομή τα τυριά HPA και ποσοστό 46.2% των δοκιμαστών επέλεξε τα τυριά HPB.

5.4.5.3. Αξιολόγηση χαρακτηριστικών που σχετίζονται με την οσμή-γεύση των δειγμάτων λευκού τυριού άλμης τύπου Φέτας

5.4.5.3.1. Αξιολόγηση των δειγμάτων ως προς το χαρακτηριστικό αντίληψη πικρής γεύσης

Όπως αναφέρθηκε στο θεωρητικό μέρος της παρούσας διατριβής (Παρ. 2.3.3.1.4), χαρακτηριστικό των τυριών που βρίσκονται σε πρώιμο στάδιο ωρίμανσης μπορεί να είναι η ύπαρξη πεπτιδίων τα οποία επιφέρουν πικρή γεύση στο τυρί και τα οποία διασπώνται σταδιακά από τις ενδοκυτταρικές πεπτιδάσες των μικροοργανισμών εκκίνησης και μη. Για το λόγο αυτό ζητήθηκε από την ομάδα να βαθμολογήσει τα τέσσερα τυριά ως προς την ένταση της πικρής γεύσης.

Οι βαθμολογίες που έλαβαν τα τέσσερα τυριά σε διαφορετικούς χρόνους κατά τη διάρκεια ωρίμανσής τους στον ψυχρό θάλαμο (μέσος όρος τιμών 2 τυροκομήσεων) καθώς και σε χρόνο 30 ημέρες αποθήκευσης (μέσος όρος τιμών 1 τυροκόμησης), ως προς την ένταση της πικρής γεύσης, παρατίθενται στα Σχήματα 5.50 α και β, αντίστοιχα.



Σχήμα 5.50. Βαθμολόγηση ως προς την ένταση της πικρής γεύσης των τεσσάρων τυριών **α)** συναρτήσει του χρόνου ωρίμανσης (μέσος όρος τιμών 2 τυροκομήσεων \pm stdev) και **β)** σε χρόνο 30 ημέρες ωρίμανσης (μέσος όρος τιμών 1 τυροκόμησης \pm stdev) στον ψυχρό θάλαμο

Μειωτική τάση της βαθμολογίας και σημαντικές στατιστικά διαφορές ($p < 0.05$) ως προς την ένταση της πικρής γεύσης παρουσιάστηκαν συναρτήσει του χρόνου ωρίμανσης για όλα τα τυριά. Τα τυριά HPA και HPB εμφάνισαν ταχύτερη μείωση της πικρής γεύσης συγκριτικά με τα τυριά HPC και Control, με τα δεύτερα να εμφανίζουν την εντονότερα πικρή γεύση. Αρκετά χαμηλές βαθμολογίες παρατηρήθηκαν για τα τυριά HPA και HPB ήδη από την αρχή του δευτέρου σταδίου ωρίμανσης, χωρίς να παρατηρούνται σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Ακολουθούν με σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) με τα πρώτα τα τυριά HPC, ενώ η υψηλότερη ένταση πικρής γεύσης παρατηρήθηκε για τα τυριά Control με σημαντική διαφορά από τα υπόλοιπα δείγματα ($p < 0.05$).

Παρόμοια σειρά βαθμολόγησης της έντασης της πικρής γεύσης έλαβαν τα τέσσερα τυριά και από την ομάδα των 15 δοκιμαστών μετά από 30 ημέρες ωρίμανσης στον ψυχρό θάλαμο, με τα τυριά HPA και HPB να αποσπών τους χαμηλότερους βαθμούς, τα τυριά HPC να έπονται και τα δείγματα Control να εμφανίζουν την υψηλότερη βαθμολογία. Μη σημαντικές στατιστικά μεταβολές παρατηρήθηκαν μεταξύ των βαθμών που έλαβαν τα δείγματα HPA και HPB από τον κάθε δοκιμαστή. Σημαντικές διαφορές υπήρξαν ωστόσο μεταξύ των βαθμών που έλαβαν τα υπόλοιπα τυριά από τον κάθε δοκιμαστή ($p < 0.05$).

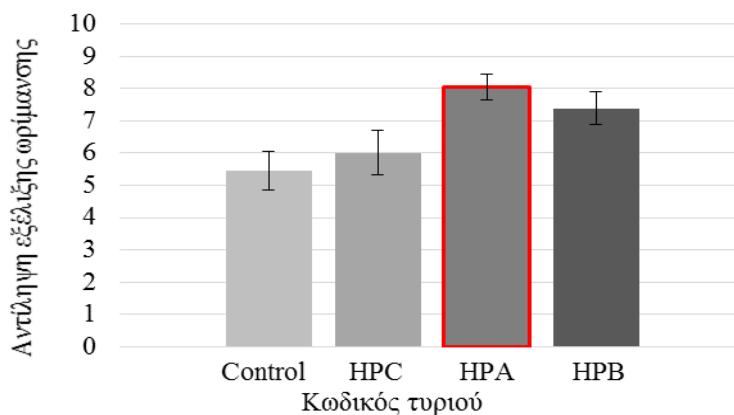
Η λιγότερο έντονη πικρή γεύση των τυριών HPA, HPB καθώς και των HPC θα μπορούσε να αποδοθεί σε πιθανή ενεργοποίηση μετά την εφαρμογή της ΥΠ ενζύμων των μικροοργανισμών εκκίνησης καθώς και των μικροοργανισμών μη εκκινητών των τυριών HPC, τα οποία οδήγησαν σε περαιτέρω υδρόλυση πεπτιδίων που επιφέρουν πικρή γεύση στο τυρί (Casal & Gomez, 1999).

Στο Σχήμα 5.50 β δίνεται επιπλέον σε κόκκινο πλαίσιο το δείγμα το οποίο απέσπασε την αρέσκεια για το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό του μεγαλύτερου ποσοστού των δοκιμαστών.

5.4.5.3.2. Αξιολόγηση των δειγμάτων ως προς το χαρακτηριστικό αντίληψη ωρίμανσης

Σε χρόνο 30 ημέρες αποθήκευσης (μέσος όρος τιμών 1 τυροκόμησης), ζητήθηκε από την ομάδα δοκιμαστών να αξιολογήσουν τα δείγματα ως προς το επίπεδο ωρίμανσης. Στο Σχήμα 5.51 παρατίθεται η βαθμολογία που έλαβαν τα τέσσερα τυριά ως προς το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό.

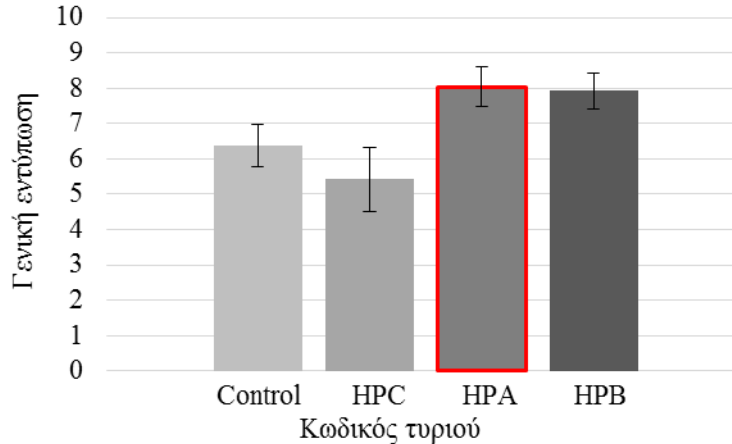
Την υψηλότερη βαθμολογία ως προς την ωριμότητα απέσπασαν τα τυριά HPA, με την ομάδα δοκιμαστών να αποδίδει στα συγκεκριμένα τυριά τα ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά ενός ώριμου τυριού. Ακολουθούν τα τυριά HPB με μικρή αλλά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$). Χαμηλότερες βαθμολογίες και σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) παρατηρήθηκαν για τα τυριά HPC και Control, με τα δεύτερα να λαμβάνουν τη μικρότερη βαθμολογία.



Σχήμα 5.51. Βαθμολόγηση ως προς την αντίληψη της εξέλιξης ωρίμανσης των τεσσάρων τυριών σε χρόνο 30 ημέρες αποθήκευσης (μέσος όρος τιμών 1 τυροκόμησης \pm stden) στον ψυχρό θάλαμο

5.4.5.4. Αξιολόγηση των δειγμάτων λευκού τυριού άλμης τύπου Φέτας ως προς τη γενική εντύπωση

Σε χρόνο 30 ημέρες αποθήκευσης (μέσος όρος τιμών 1 τυροκόμησης), ζητήθηκε από την ομάδα δοκιμαστών να αξιολογήσουν τα δείγματα ως προς τη γενική εντύπωση. Στο Σχήμα 5.52 παρατίθεται η βαθμολογία που έλαβαν τα τέσσερα τυριά ως προς το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό.



Σχήμα 5.52. Βαθμολόγηση ως προς τη γενική εντύπωση των τεσσάρων τυριών σε χρόνο 30 ημέρες αποθήκευσης (μέσος όρος τιμών 1 τυροκόμησης \pm std \pm dev) στον ψυχρό θάλαμο

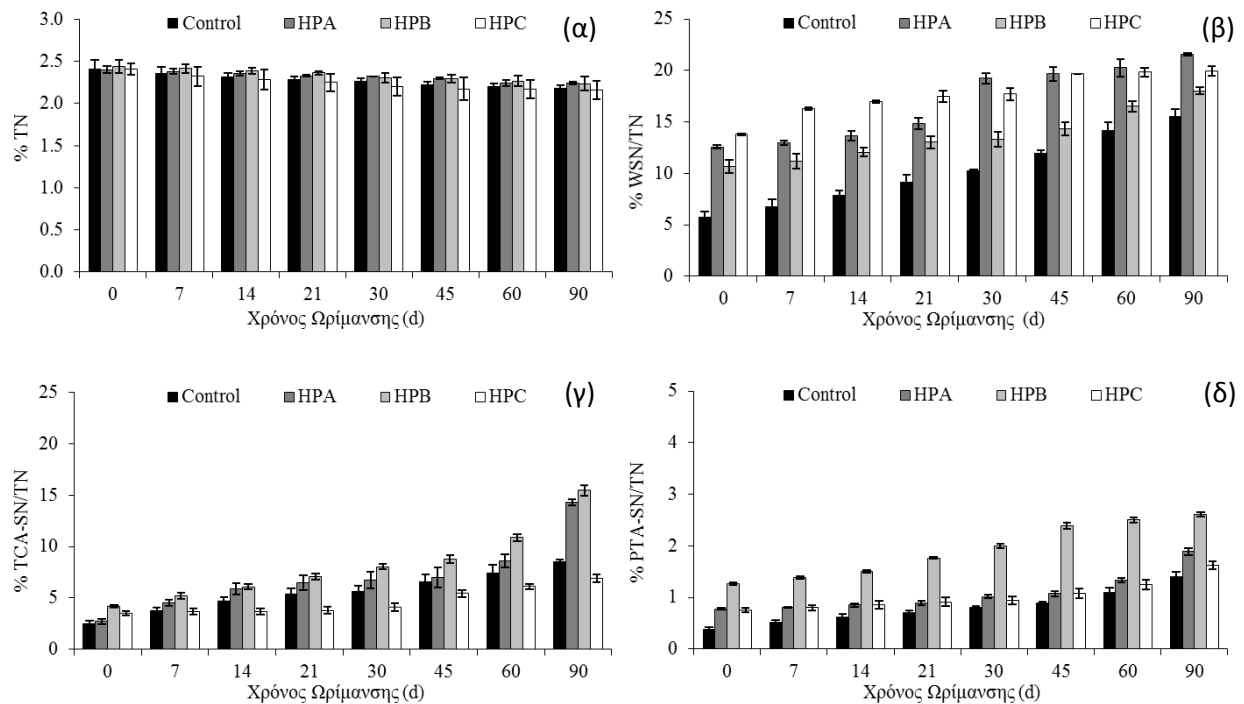
Την υψηλότερη βαθμολογία ως προς τη γενική εντύπωση απέσπασαν τα τυριά HPA, χωρίς όμως να υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές με τα τυριά HPB, είτε μεταξύ των δειγμάτων είτε μεταξύ των δοκιμαστών. Χαμηλότερες βαθμολογίες και σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) παρατηρήθηκαν για τα τυριά HPC και Control, με τα πρώτα να λαμβάνουν τη μικρότερη βαθμολογία.

Σε γενικά πλαίσια, τα τυριά HPA και HPB, τα οποία παρήχθησαν με προσθήκη καλλιέργειας εκκίνησης επεξεργασμένης με ΥΠ, εμφάνισαν υψηλότερα σκορ οργανοληπτικού ελέγχου αναφορικά με χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την εμφάνιση-χρώμα, την υφή-δομή και την οσμή-γεύση, καθ' όλη τη διάρκεια του δευτέρου σταδίου ωρίμανσης. Στα συγκεκριμένα τυριά δεν ανιχνεύτηκε πικρή γεύση ενώ εμφάνισαν το υψηλότερο βαθμολογικό σκορ αναφορικά με το επίπεδο ωρίμανσής τους μετά από αξιολόγηση στις 30 ημέρες δευτέρου σταδίου ωρίμανσης, το οποίο αντιστοιχούσε στο συγκεκριμένο χρόνο στο επίπεδο του ώριμου τυριού.

5.4.6. Μελέτη Παραγόντων Ωρίμανσης των Δειγμάτων Λευκού Τυριού Άλμης Τύπου Φέτας – Εξέλιξη της Πρωτεόλυσης

5.4.6.1. Προσδιορισμός αζωτούχων ενώσεων

Η εξέλιξη της πρωτεόλυσης αξιολογήθηκε μέσω προσδιορισμού των λόγων του υδατοδιαλυτού αζώτου προς το ολικό άζωτο (WSN/TN), του διαλυτού αζώτου σε 12% τριγλωροξικό οξύ προς το ολικό άζωτο (TCA-SN/TN) και του διαλυτού αζώτου σε 5% φωσφοροβολφραμικό οξύ προς το ολικό άζωτο (PTA-SN/TN), κατά τη διάρκεια του δευτέρου σταδίου ωρίμανσης (Σχήματα 5.53 α, β, γ και δ).



Σχήμα 5.53. Μεταβολή του **α)** Ολικού αζώτου (%TN) **β)** Υδατοδιαλυτού αζώτου προς το ολικό άζωτο (%WSN/TN) **γ)** Αζώτου διαλυτού σε 12% TCA προς το ολικό άζωτο (%TCA-SN/TN) και **δ)** Αζώτου διαλυτού σε 5% PTA προς το ολικό άζωτο (%PTA-SN/TN) των τυριών Control, HPA, HPB και HPC κατά τη διάρκεια του δευτέρου σταδίου ωρίμανσης (μέσος όρος δύο τυροκομήσεων \pm stdev)

Στο Σχήμα 5.53 α, απεικονίζεται η %μεταβολή του ολικού αζώτου για το καθένα από τα τέσσερα τυριά. Για όλα τα δείγματα παρατηρήθηκε μείωση της %περιεκτικότητας σε ολικό άζωτο καθ' όλη τη διάρκεια του δευτέρου σταδίου ωρίμανσης. Τα τυριά HPA και HPB εμφάνισαν τα υψηλότερα ποσοστά, χωρίς να υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, ενώ ακολουθούν τα δείγματα Control και HPC. Η μείωση του ολικού αζώτου που παρατηρήθηκε, μπορεί να αποδοθεί στη μετανάστευση διαλυτών αζωτούχων συστατικών στην άλμη (Zoidou et al., 2015, Maniou et al., 2013).

Σημαντική αύξηση ($p < 0.05$) των υδατοδιαλυτών αζωτούχων ενώσεων παρατηρήθηκε για όλα τα δείγματα. Η μεγαλύτερη αύξηση παρατηρήθηκε για τα τυριά HPA και HPC, ενώ το χαμηλότερο ποσοστό παρατηρήθηκε για τα δείγματα Control (Σχήμα 5.53 β). Ειδικότερα, κατά τη διάρκεια του 2^{ου} σταδίου της

ωρίμανσης, οι τιμές του υδατοδιαλυτού αζώτου εκφρασμένου ως %ποσοστό του ολικού αζώτου κυμάνθηκαν για τα δείγματα Control από 5.7% έως 15.5%, ενώ τα υπόλοιπα τυριά στα οποία εφαρμόστηκε η ΥΠ ξεκίνησαν από τιμές υψηλότερες του 10% και έφτασαν στο τέλος της ωρίμανσης έως και 21.6% (21.6% για το δείγμα HPA, 19.9% για το HPC και 18.0% για το HPB).

Τα υψηλότερα ποσοστά υδατοδιαλυτού αζώτου στο δείγμα HPC, μπορούν να αποδοθούν στην άμεση εφαρμογή της ΥΠ στα ενζυμικά πρωτεολυτικά συστήματα που δραστηριοποιούνται στο τυρί (Cheftel, 1992; Earnshaw, 1992).

Όπως προαναφέρθηκε και στην Παρ. 2.3.3.1.5, η %μεταβολή του κλάσματος SN/TN αποτελεί δείκτη της έκτασης της πρωτεόλυσης αλλά όχι του βάθους των συντελούμενων μεταβολών στις αζωτούχες ουσίες του τυριού. Δηλαδή σ' ένα τυρί μπορεί να προσδιορισθεί υψηλό κλάσμα SN/TN, χωρίς όμως να έχει προχωρήσει η διάσπαση των μεγάλων υδατοδιαλυτών κλασμάτων του προς άλλα απλούστερα, που είναι και τα σημαντικότερα όσον αφορά τη γεύση και το άρωμα του τυριού. Εκτίμηση του βάθους της ωρίμανσης μπορεί να γίνει με προσδιορισμό των μικρών πεπτιδίων, των ελεύθερων αμινοξέων και των προϊόντων διάσπασής τους. Τα μεγαλοπεπτιδία που παράγονται από τη δράση της πυτιάς επί των καζεϊνών, υδρολύονται από τις πρωτεάσες και πεπτιδάσες των καλλιέργειών εκκίνησης και μη, καθώς και την εναπομένουσα πυτιά, σε ολιγοπεπτιδία τα οποία εκφράζονται ως άζωτο διαλυτό σε 12% TCA (TCA-SN). Αύξηση της τάσης του συγκεκριμένου κλάσματος παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια του δεύτερου σταδίου ωρίμανσης για όλα τα τυριά. Η αύξηση αυτή παρατηρήθηκε από τις πρώτες ημέρες του δεύτερου σταδίου ωρίμανσης, με εξαίρεση τα τυριά HPC στα οποία εμφανίστηκε μετά από τις 21 ημέρες. Η επεξεργασία της καλλιέργειας εκκίνησης με ΥΠ (τυριά HPA και HPB), οδήγησε σε αύξηση της δευτερογενούς πρωτεόλυσης όπως φάνηκε από τα αυξημένα επίπεδα του διαλυτού αζώτου σε 12% TCA καθ' όλη της διάρκεια του δεύτερου σταδίου ωρίμανσης (Σχήμα 5.53 γ). Τα υψηλότερα ποσοστά εμφανίστηκαν στα τυριά HPB, με τα HPA να ακολουθούν. Οι χαμηλότερες τιμές εμφανίστηκαν στα τυριά HPC. Βάσει της διεθνούς βιβλιογραφίας, οι Costabel et al. (2016), μετά από επεξεργασία τυριού Reggianito σε πιέσεις 100 και 400 MPa, παρατήρησαν σημαντική αύξηση των κλασμάτων SN-pH 4.6 και TCA-SN στα επεξεργασμένα τυριά σε συνθήκες 400 MPa, 10 min και 400 MPa, 5 ή 10 min, αντίστοιχα, σε βαθμό που οι τιμές των δειγμάτων αναφορά στις 90 d ωρίμανσης αντιστοιχούσαν στις 60 d των επεξεργασμένων τυριών. Παρόμοιες τιμές αζώτου διαλυτού σε 12% TCA με αυτές των δειγμάτων αναφοράς της παρούσας διατριβής προέκυψαν από τους Nega και Moatsou (2012), που μελέτησαν την έκταση της πρωτεόλυσης σε 10 διαφορετικά ελληνικά τυριά του εμπορίου, μεταξύ των οποίων και Φέτα, (τιμή 9.9% στο τέλος της ωρίμανσης). Επιπρόσθετα, τα παρόντα αποτελέσματα για τα δείγματα αναφοράς (Control) είναι σε συμφωνία με τους Maniου et al. (2013) που μελέτησαν της επίδραση σε παράγοντες ωρίμανσης της προσθήκης τμήματος καλλιέργειας επεξεργασμένης με ΥΠ (200 MPa, στους 20°C για 12 min) κατά την παρασκευή λευκού τυριού τύπου Φέτας. Στην περίπτωση των επεξεργασμένων τυριών, το %ποσοστό του TCA-SN/TN κυμάνθηκε από 3.0% σε χρόνο 0 έως 9.7% στις 90 ημέρες, ενώ το αντίστοιχο δείγμα HPA της παρούσας διατριβής ξεκινώντας από ποσοστό 2.9% παρουσίασε μεγαλύτερη αύξηση στο 14.3% στις 90 ημέρες ωρίμανσης. Μεγαλύτερη αύξηση παρουσίασαν τα τυριά HPB με το %ποσοστό του TCA-SN/TN να κυμαίνεται από 4.2% έως 15.5%.

Οι O'Keeffe et al. (1976), αναφέρουν ότι για την παραγωγή του κλάσματος 12% TCA, ευθύνεται κυρίως η πυτιά αλλά και οι πρωτεϊνάσες και πεπτιδάσες των οξυγαλακτικών βακτηρίων συμβάλλουν σε σημαντικό βαθμό. Η εμφάνιση μεγαλύτερων ποσοστών του συγκεκριμένου κλάσματος στα δείγματα HPA και HPB, τα οποία παρασκευάστηκαν με προσθήκη επεξεργασμένων καλλιεργειών με ΥΠ, πιθανώς

υποδεικνύουν αύξηση της δραστηριότητας των περιεχομένων σε αυτές ενζύμων, τα οποία οδήγησαν σε αυξημένη υδρόλυση των μεγαλοπεπτιδίων. Τα χαμηλά ποσοστά που υπάρχουν στο δείγμα HPC συγκριτικά με τα τυριά στα οποία η ΥΠ εφαρμόστηκε στην καλλιέργεια (τυριά HPA και HPB) δείχνουν ότι τα αποτελέσματα της άμεση εφαρμογής της ΥΠ στην καλλιέργεια εκκίνησης διαφέρουν από αυτά που προκαλούνται όταν η ίδια καλλιέργεια δέχεται την επίδραση της πίεσης στο περιβάλλον του τυριού. Επιπλέον, πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι στην πρώτη περίπτωση η πίεση ασκείται στη μέγιστη ζωτικότητα των κυττάρων, ενώ στη δεύτερη η ζωτικότητα των κυττάρων είναι διάφορη της μέγιστης αλλά άγνωστη. Η περαιτέρω αποικοδόμηση των πεπτιδίων από τις πεπτιδάσες των βακτηρίων εκκίνησης και μη, σε πολύ μικρά πεπτίδια με μοριακό βάρος μικρότερο από 600 Da και αμινοξέα, εκφράζεται ως άζωτο διαλυτό σε 5% PTA (PTA-SN) (Jarret et al., 1982). Η μεταβολή του συγκεκριμένου κλάσματος συναρτήσει του χρόνου ωρίμανσης απεικονίζεται στο Σχήμα 5.53 δ. Αυξητική τάση του συγκεκριμένου κλάσματος παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια του δευτέρου σταδίου ωρίμανσης για όλα τα τυριά. Οι χαμηλότερες τιμές παρατηρήθηκαν για τα δείγματα Control. Υψηλότερες τιμές PTA-SN/TN από τα δείγματα αναφοράς παρατηρήθηκαν για τα τυριά HPC και HPA, με τα δεύτερα να εμφανίζουν πιο αυξημένες τιμές καθ' όλη τη διάρκεια του δευτέρου σταδίου ωρίμανσης ειδικά μετά τις 60 ημέρες. Ωστόσο μη σημαντικές στατιστικά διαφορές παρατηρήθηκαν μεταξύ των μέσων όρων των τιμών. Οι υψηλότερες τιμές PTA-SN/TN παρατηρήθηκαν για τα τυριά HPB με σημαντική διαφορά από τα υπόλοιπα δείγματα. Η διαφορά αυτή θα μπορούσε να αποδοθεί στην αύξηση της δραστηριότητας των αμινοπεπτιδασών της καλλιέργειας λόγω της εξ' ολοκλήρου επεξεργασίας της με ΥΠ, η οποία οδήγησε σε αυξημένη υδρόλυση των πεπτιδίων σε μικρά πεπτίδια και αμινοξέα.

Συνολικά θα μπορούσε να διατυπωθεί ότι, σχετική επιτάχυνση της πρωτεόλυσης παρατηρήθηκε για τα τυριά HPC συγκριτικά με τα δείγματα Control, με τα κλάσματα %SN/TN και %PTA-SN/TN να παρουσιάζουν αύξηση ως προς τα δείγματα Control στις 90 ημέρες δευτέρου σταδίου ωρίμανσης κατά 46.2% και 22.2%, αντίστοιχα.

Επιτάχυνση του σταδίου της πρωτεόλυσης παρατηρήθηκε στα τυριά HPA συγκριτικά με τα τυριά HPC και Control. Ειδικότερα τα κλάσματα %SN/TN, %TCA-SN/TN και %PTA-SN/TN των τυριών HPA παρουσίασαν αύξηση ως προς τα δείγματα Control στις 90 ημέρες δευτέρου σταδίου ωρίμανσης κατά 28.0%, 40.5% και 25.4%, αντίστοιχα.

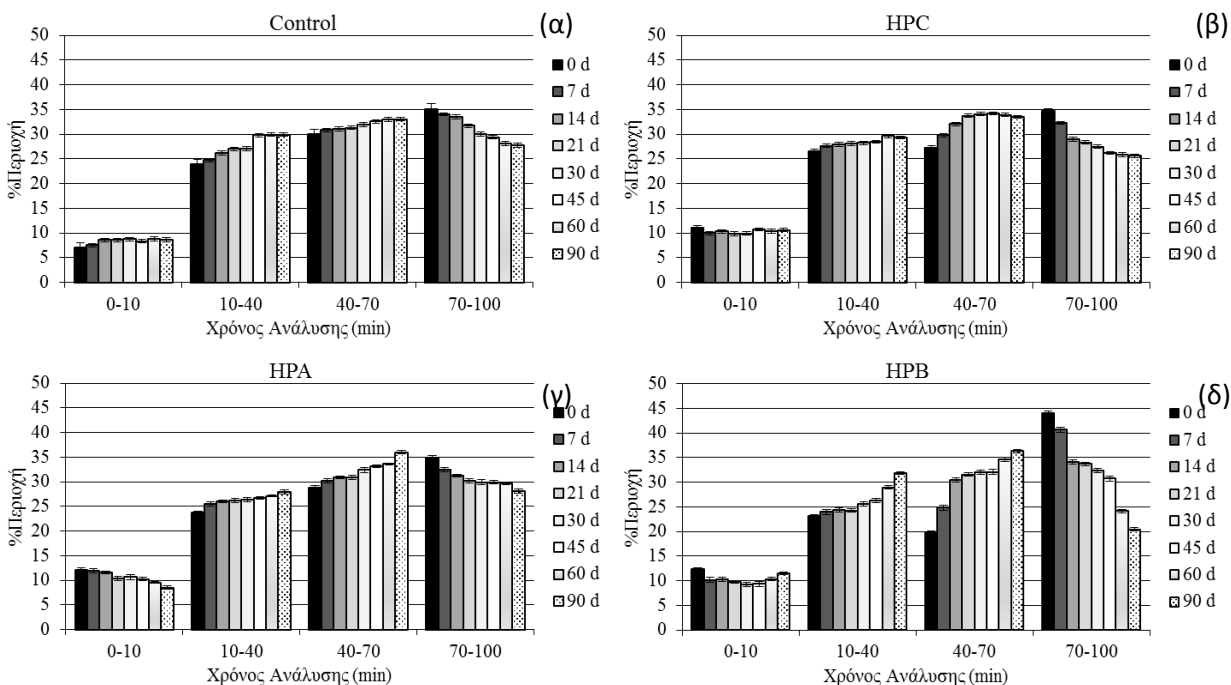
Η μεγαλύτερη επιτάχυνση της πρωτεόλυσης, βάσει των αποτελεσμάτων της περιεκτικότητας των αζωτούχων κλασμάτων, παρατηρήθηκε στα τυριά HPB συγκριτικά με όλα τα υπόλοιπα δείγματα. Στη συγκεκριμένη περίπτωση τα κλάσματα %SN/TN, %TCA-SN/TN και %PTA-SN/TN των τυριών HPB παρουσίασαν αύξηση ως προς τα δείγματα Control στις 90 ημέρες δευτέρου σταδίου ωρίμανσης κατά 13.9%, 45.0% και 46.0%, αντίστοιχα.

5.4.6.2. Ανάλυση πεπτιδίων

Τα υδατικά εκχυλίσματα (WSE) των τυριών Control, HPA, HPB και HPC, τα οποία παρελήφθησαν σε χρόνους δευτέρου σταδίου ωρίμανσης 0, 7, 14, 21, 30, 45, 60 και 90 ημέρες, αναλύθηκαν μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής ανάλυσης αντιστρεπτής φάσης (RP-HPLC).

Βάσει των Nega & Moatsou (2012), τα χρωματογραφήματα που παρελήφθησαν χωρίστηκαν σε 4 τμήματα. Το τμήμα 0, αντιστοιχεί στα πρώτα 10 min της ανάλυσης κατά τα οποία πραγματοποιείται έκλυση με 0% ακετονιτρίλιο. Στη φάση αυτή εκλύονται συστατικά του τυριού τα οποία δε συκρατούνται από τη στήλη χρωματογραφίας, όπως για παράδειγμα μερικά ελεύθερα αμινοξέα καθώς

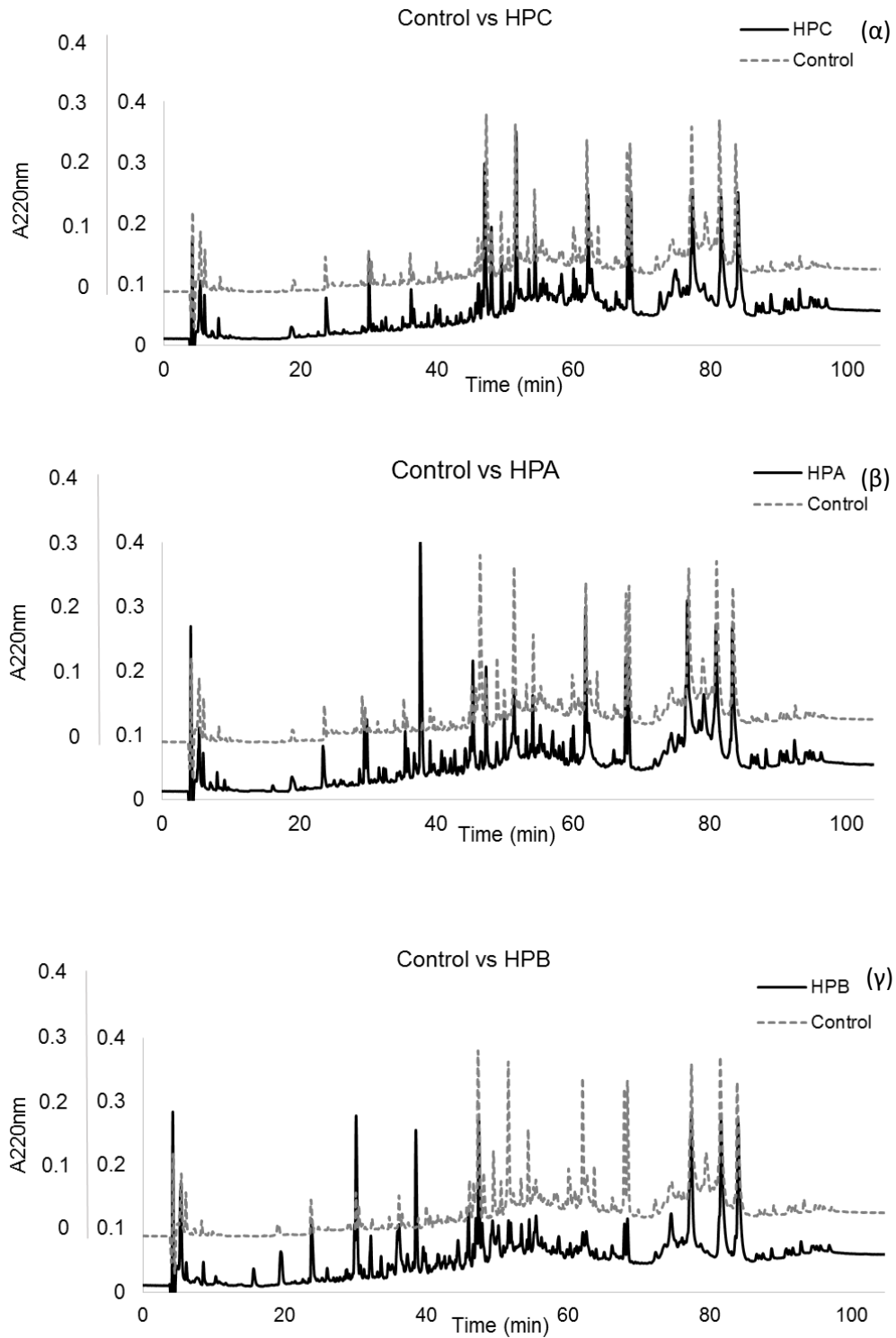
και μη-αζωτούχα διαλυτά συστατικά. Το τμήμα I, αντιστοιχεί σε έκλυση με περιεκτικότητα σε ακετονιτρίλιο 0-16%, το τμήμα II σε 16-32% ακετονιτρίλιο, το τμήμα III σε 32-48% ακετονιτρίλιο και το τμήμα IV σε 48-100% ακετονιτρίλιο. Σύμφωνα με τους Nega και Moatsou (2012), στο τμήμα IV, το οποίο αντιστοιχεί σε ποσότητα ακετονιτρίλιου $\geq 48\%$, εκλύονται μίγματα καζεϊνών και πρωτεϊνών ορού. Για όλα τα χρωματογραφήματα που παρελήφθησαν για τα τέσσερα τυριά κατά τη διάρκεια της ωρίμανσής τους, υπολογίστηκε για το κάθε τμήμα το %ποσοστό του εμβαδού της συνολικής περιοχής. Στα Σχήματα 5.54 α, β, γ και δ απεικονίζονται οι μεταβολές της %περιοχής για το κάθε τμήμα των χρωματογραφημάτων που λήφθηκαν κατά τη διάρκεια του δευτέρου σταδίου ωρίμανσης των τυριών Control, HPC, HPA και HPB, αντίστοιχα.



Σχήμα 5.54. Τμήματα των προφίλ RP-HPLC των κλασμάτων SN των τυριών **α)** Control **β)** HPC **γ)** HPA και **δ)** HPB, εκφρασμένα ως %ποσοστό της ολικής περιοχής, συναρτήσει του χρόνου ωρίμανσης (μέσος όρος 2 τυροκομήσεων \pm stdev)

Οι μεγαλύτερες μεταβολές κατά τη διάρκεια του δευτέρου σταδίου ωρίμανσης, παρατηρήθηκαν για τα τυριά HPB. Ειδικότερα για χρόνους ανάλυσης >70 min είναι εμφανής η σημαντική μείωση των μεγάλων πεπτιδίων με το χρόνο ωρίμανσης, τα οποία εκλύονται στο συγκεκριμένο τμήμα, συγκριτικά με τα υπόλοιπα τυριά. Ακολουθούν τα τυριά HPC και HPA ενώ τα τυριά Control εμφάνισαν τις μικρότερες μεταβολές.

Για την καλύτερη κατανόηση των μεταβολών που προκλήθηκαν στο τυρί από την εφαρμογή της ΥΠ, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των χρωματογραφημάτων (A_{220}) των τυριών HPA, HPB και HPC με τα τυριά Control σε χρόνο δευτέρου σταδίου ωρίμανσης 90 ημέρες (Σχήματα 5.55 α, β, γ).



Σχήμα 5.55. Συγκριτικά προφίλ RP-HPLC (A_{220}) των εκχυλισμάτων υδατοδιαλυτού αζώτου (SN) στις 90 d δευτέρου σταδίου ωρίμανσης για τα τυριά α) Control και HPC β) Control και HPA και γ) Control και HPB

Από τα χρωματογραφήματα γίνεται αντιληπτό ότι τα τέσσερα τυριά εμφανίζουν τις ίδιες κορυφές αλλά με διαφορετικό εμβαδό. Μείωση των κορυφών παρατηρείται σε χρόνους ανάλυσης >50 min και αντίθετα αύξησή τους σε χρόνους ανάλυσης <50 min που αντιστοιχεί σε μικρότερου μεγέθους και πιο υδρόφιλα πεπτίδια (Nega and Moatsou, 2012) και για τα τρία τυριά συγκριτικά με το δείγμα Control, με εντονότερη τη μεταβολή των τυριών HPB.

Στον Πίνακα 5.20. παρατίθεται η %περιοχή για το κάθε τμήμα των RP-HPLC χρωματογραφημάτων των εκχυλισμάτων των κλασμάτων SN των τεσσάρων τυριών για χρόνους 0 και 90 ημέρες του δευτέρου σταδίου ωρίμανσης. Επιπρόσθετα δίνεται ο λόγος 55-100 min / 10-55 min ο οποίος ονομάζεται λόγος υδρόφοβων (HB) προς υδρόφιλα πεπτίδια (HL), για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων αναφορικά με τη μείωση των μεγάλων και μεσαίων υδρόφοβων πεπτιδίων σε καθένα από τα τέσσερα τυριά.

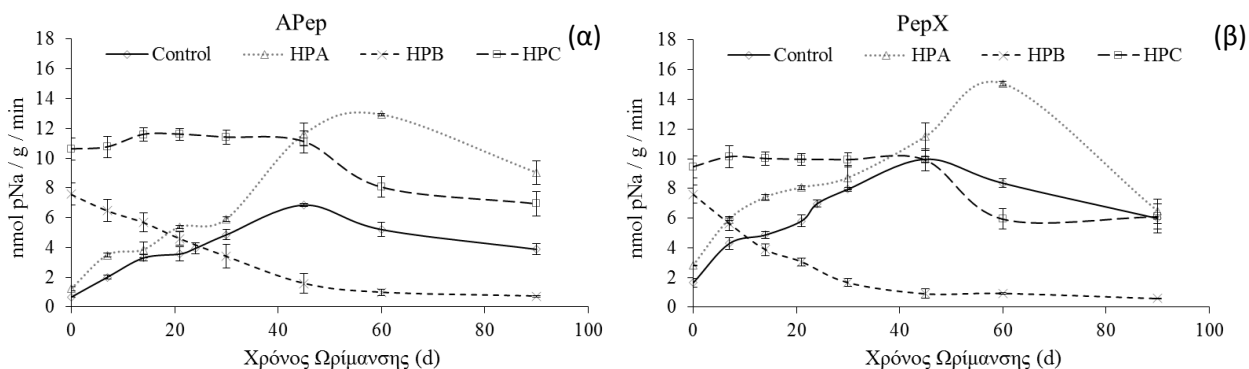
Πίνακας 5.20. Ποσοτικά χαρακτηριστικά των RP-HPLC χρωματογραφημάτων των εκχυλισμάτων των κλασμάτων SN των τεσσάρων τυριών, εκφρασμένα ως %ποσοστό της συνολικής περιοχής, για χρόνους ωρίμανσης 0 και 90 d

Τυρί	Χρόνος Ωρίμανσης (d)	Τμήμα 0 0-10 min 0% ACN	Τμήμα I 10-40 min 0-16% ACN	Τμήμα II 40-70 min 16-32% ACN	Τμήμα III 70-100 min 32-48% ACN	55-100 min / 10-55 min
Control	0	8.3±0.24	23.1±0.53	29.7±0.61	37.5±1.01	1.489±0.091
	90	9.5±0.31	27.1±0.49	32.9±0.75	29.1±0.60	1.025±0.075
HPC	0	10.7±0.39	26.8±0.76	27.4±0.86	34.5±0.95	1.796±0.097
	90	10.5±0.41	29.5±0.86	33.7±0.79	25.5±0.69	0.878±0.081
HPA	0	11.9±0.50	23.8±0.61	28.7±0.83	34.6±1.01	1.223±0.099
	90	10.3±0.30	30.7±0.77	35.9±0.99	26.8±0.63	0.765±0.074
HPB	0	12.3±0.50	23.3±0.59	20.2±0.63	43.9±1.28	1.718±0.103
	90	11.3±0.48	31.7±0.98	36.1±1.12	20.8±0.55	0.675±0.055

Είναι φανερό και από την αναλογία 55-100 min / 10-55 min ότι η επεξεργασία με ΥΠ είτε της καλλιέργειας, είτε του ίδιου του τυριού, ευνόησε τη μείωση των υδρόφοβων ή/και μεγάλου μεγέθους πεπτιδίων. Συγκεκριμένα, μετά από 90 ημέρες δευτέρου σταδίου ωρίμανσης ο λόγος της %περιοχής για χρόνους ανάλυσης 55-100 min προς την %περιοχή για χρόνους ανάλυσης 10-55 min, μειώθηκε σημαντικά (Σχήματα 5.55 α, β, γ, Πίνακας 5.20). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης πεπτιδίων είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη της εξέλιξης της πρωτεόλυσης βάσει της μεταβολής των αζωτούχων κλασμάτων. Τα ευνοϊκά αποτελέσματα της ανάλυσης πεπτιδίων των τυριών τα οποία έχουν υποστεί επεξεργασία με ΥΠ, θα μπορούσαν να αποδοθούν στην επίδραση της ΥΠ στη δραστηριότητα των πεπτιδασών των οξυγαλακτικών στελεχών τόσο στο περιβάλλον των καλλιεργείων εκκίνησης, όσο και στο περιβάλλον του τυριού (HPC τυριά), οι οποίες προκάλεσαν την περαιτέρω υδρόλυση των μεγαλοπεπτιδίων προς μικρότερα. Τα τυριά HPB τα οποία παρασκευάστηκαν με προσθήκη πλήρους επεξεργασμένης καλλιέργειας φάνηκε να εμφανίζουν τη μεγαλύτερη επιτάχυνση των μεταβολών που επιφέρουν την ωρίμανση του τυριού.

5.4.6.3. Προσδιορισμός της δραστηριότητας των αμινοπεπτιδασών APep και PepX

Οι δραστηριότητες των αμινοπεπτιδασών APep και PepX μετρήθηκαν σε όλα τα τυριά σε χρόνους δευτέρου σταδίου ωρίμανσης 0, 7, 14, 21, 30, 45, 60 και 90 ημέρες. Στα Σχήματα 5.56 α, β απεικονίζεται η μεταβολή της δραστηριότητας των αμινοπεπτιδασών APep και PepX, αντίστοιχα, κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των τυριών Control, HPA, HPB και HPC.



Σχήμα 5.56. Μεταβολή της δραστηριότητας των αμινοπεπτιδασών α) APep και β) PepX των τυριών Control , HPA, HPB και HPC κατά τη διάρκεια του δευτέρου σταδίου ωρίμανσης

Σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν στη συμπεριφορά των αμινοπεπτιδασών μεταξύ των διαφορετικών τυριών. Στα τυριά HPA, η δραστηριότητα των πεπτιδασών APep και PepX, φάνηκε να μεταβάλλεται παράλληλα με εκείνης των δειγμάτων Control, με τη διαφορά ότι στα τυριά HPA παρουσιάστηκαν υψηλότερες τιμές δραστηριότητας των δύο ενζύμων, καθ' όλη τη διάρκεια του δευτέρου σταδίου ωρίμανσης.

Οι δραστηριότητες των δύο ενζύμων, παρουσιάστηκαν αυξημένες στα τυριά HPB συγκριτικά με τα τυριά HPA και Control, την πρώτη ημέρα του δευτέρου σταδίου ωρίμανσης, αλλά εμφανίστηκε σταδιακή μείωσή τους μέχρι τις 40 ημέρες δευτέρου σταδίου ωρίμανσης. Η αυξημένη δραστηριότητα των αμινοπεπτιδασών στα τυριά HPA και HPB, δε φάνηκε να σχετίζεται με autolysis των κυττάρων της καλλιέργειας εκκίνησης εξ' αιτίας της επεξεργασίας με ΥΠ, καθώς το αρχικό μικροβιακό φορτίο των τυριών HPA, HPB και Control εμφανίστηκε σε παρόμοια επίπεδα (Σχήμα 5.40). Οι Katsaros et al. (2009), αναφέρουν ότι η επεξεργασία των στελεχών *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* και *L. lactis* σε συνθήκες ΥΠ 200 MPa, 20°C για 20 min, μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική αύξηση της δραστηριότητας των αμινοπεπτιδασών που περιέχουν, όπως προέκυψε και από προηγούμενο τμήμα της παρούσας διατριβής. Επιπλέον, στην περίπτωση των τυριών HPB, η αυξημένη δραστηριότητα των αμινοπεπτιδασών την πρώτη ημέρα του δευτέρου σταδίου ωρίμανσης, θα μπορούσε να αποδοθεί σε αύξηση της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης των μικροοργανισμών που προκλήθηκε εξ' αιτίας της επεξεργασίας με ΥΠ (Cheftel, 1992), με αποτέλεσμα τη μεταφορά των ενδοκυτταρικών αμινοπεπτιδασών στο εξωκυτταρικό περιβάλλον (Trujillo et al., 2000).

Τα τυριά HPC, φάνηκε να έχουν την πιο αυξημένη δραστηριότητα και για τις δύο αμινοπεπτιδάσες μέχρι τις 45 ημέρες δευτέρου σταδίου ωρίμανσης. Εφ' όσον η δραστηριότητα των αμινοπεπτιδασών φάνηκε αρκετά υψηλότερη συγκριτικά με τα υπόλοιπα δείγματα ακόμη και σε χρόνο όπου το μικροβιακό φορτίο εμφάνισε παρόμοιες τιμές, θα μπορούσε να αποδοθεί σε συνδυασμό της επίδρασης της ΥΠ στη λύση

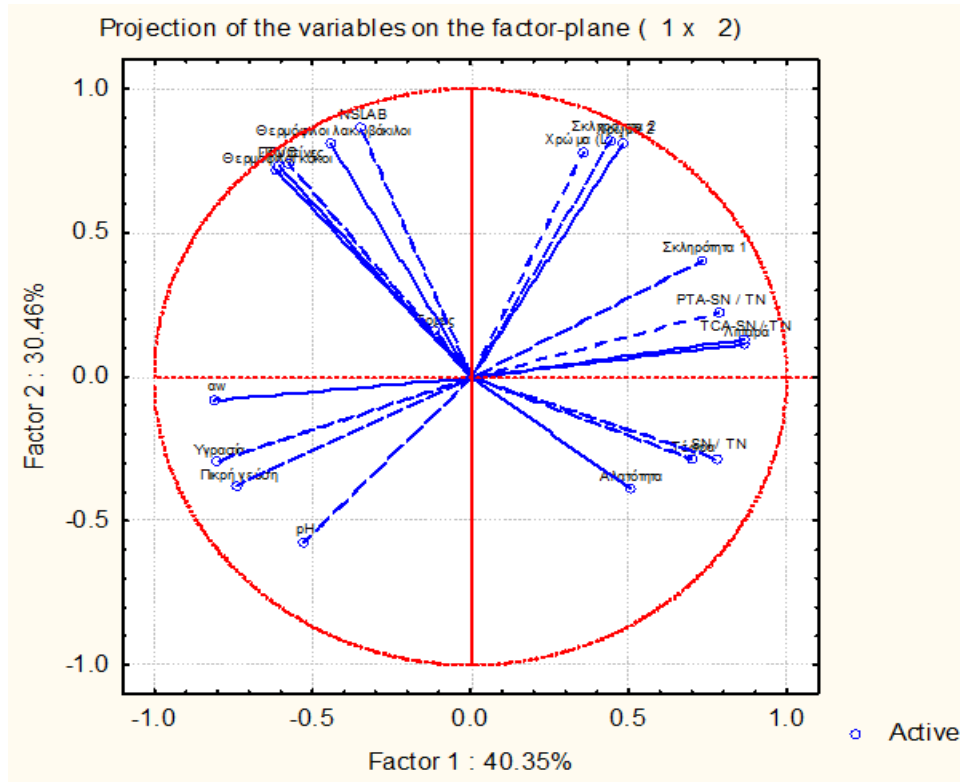
μέρους των κυττάρων (Cazalda et al., 2015) καθώς και στη δραστικότητα των ενζύμων που περιέχουν (ενεργοποίηση) (Katsaros et al., 2009). Θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι η επίδραση της ΥΠ στο τυρί HPC συνέβη στο περιβάλλον του τυριού παρουσία και του αλατιού, γεγονός που μπορεί να ενισχύει την αυτόλυση των βακτηριακών κυττάρων. Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας για τα τυριά HPC είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Moschoroulou et al. (2010) και Maniou et al. (2013), όπου στο επεξεργασμένο με ΥΠ τυρί Φέτα η δραστικότητα των αμινοπεπτιδασών (APep) παρουσίασε σταθεροποίηση μετά τις 15 d ωρίμανσης και πτώση μετά τις 60 d.

Η μείωση της δραστικότητας των αμινοπεπτιδασών μετά από 2 μήνες ωρίμανσης στην περίπτωση των τυριών HPA και Control, μετά από 45 ημέρες στην περίπτωση των τυριών HPC καθώς και η σταδιακή μείωση και σταθεροποίηση των τυριών HPB, θα μπορούσε να αποδοθεί σε απώλεια ενζύμου λόγω μεταφοράς του στην άλμη (Zoidou et al., 2015, Maniou et al., 2013).

5.4.7. Στατιστική Επεξεργασία Μετρήσεων – Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών (PCA)

Η μέθοδος PCA (Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών), αποτελεί γραμμική μέθοδο συμπίεσης δεδομένων, η οποία συνίσταται στον επαναπροσδιορισμό των συντεταγμένων ενός συνόλου δεδομένων σε ένα σύστημα συντεταγμένων καταλληλότερο για την επικείμενη ανάλυσή τους.

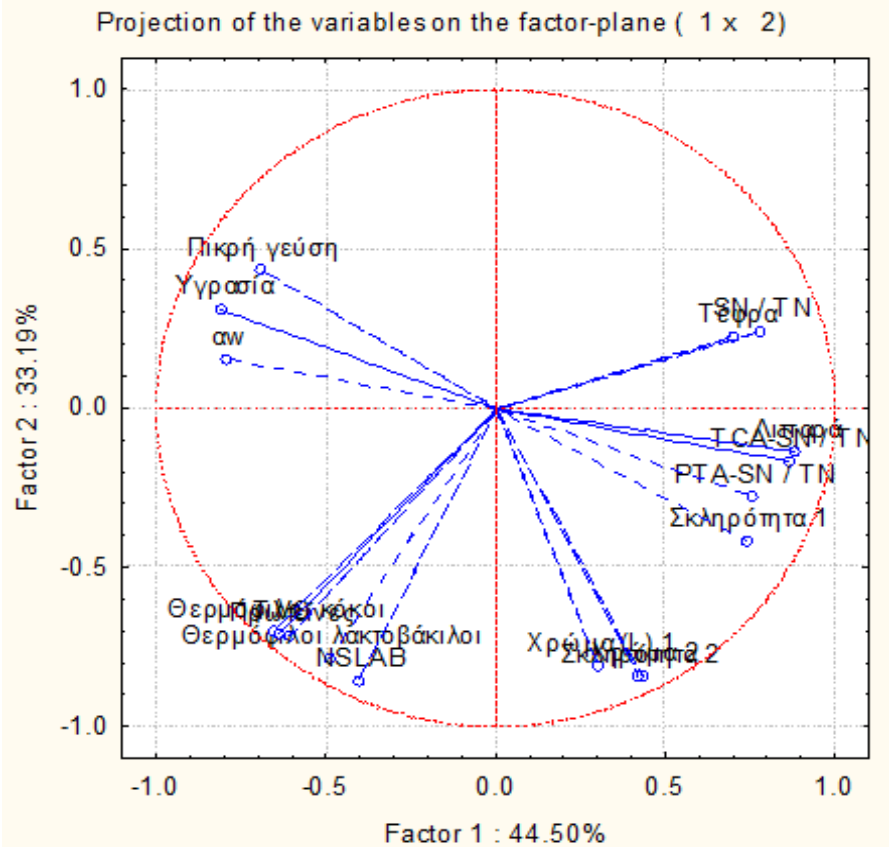
Στο Σχήμα 5.57. παρατίθεται το διάγραμμα ανάλυσης κυρίων συνιστωσών για τις προαναφερόμενες παραμέτρους. Με εφαρμογή της συγκεκριμένης μεθόδου με χρήση του προγράμματος Statistica 10.0, πραγματοποιήθηκε συσχέτιση μεταξύ των φυσικοχημικών παραμέτρων (υγρασία, λιπαρά, πρωτεΐνες, αλατοπεριεκτικότητα, aw, pH), των παραμέτρων υφής (σκληρότητα 1) και χρώματος (χρώμα 1), των βιοχημικών παραμέτρων (SN%, TCA-SN%, PTA-SN%), των μικροβιολογικών παραμέτρων (θερμόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι, θερμόφιλοι κόκκοι, ολική μικροβιακή χλωρίδα (TVC), βακτήρια εκτός των καλλιεργείων εκκίνησης (NSLAB)) και των οργανοληπτικών παραμέτρων (σκληρότητα 2, χρώμα 2, τομές, πικρή γεύση) που προσδιορίστηκαν για καθένα από τα τέσσερα δείγματα λευκού τυριού άλμης τύπου Φέτας, Control, HPA, HPB και HPC.



Σχήμα 5.57. Απεικόνιση της ανάλυσης κυρίων συνιστωσών (ΑΚΣ) κατά τη στατιστική ανάλυση των χαρακτηριστικών των δειγμάτων λευκού τυριού άλμης τύπου Φέτας (δείγματα τυριού HPA, HPB, HPC και Control)

Από το Σχήμα 5.57., προκύπτει ότι οι 2 κύριες συνιστώσες αντιπροσωπεύουν το 70.81% της ολικής διακύμανσης. Η πρώτη κύρια συνιστώσα (ΚΣ1) αντιπροσωπεύει το 40.35% και η δεύτερη κύρια συνιστώσα (ΚΣ 2) το 30.46%. Βάσει της προβολής τους στο θετικό άξονα (y) της ΚΣ1, η μεταβολή των NSLAB, των θερμοφίλων γαλακτοβακκίλων, της σκληρότητας και του χρώματος των τυριών βάσει του οργανοληπτικού ελέγχου κατά την ωρίμανσή τους, φαίνεται να έχει σημαντική επίδραση στην ΚΣ1. Βάσει της προβολής τους στον άξονα (x), η μεταβολή των βιοχημικών παραμέτρων SN/TN, TCA-SN/TN και PTA-SN/TN, τα λιπαρά, η ενεργότητα νερού (aw) και η υγρασία κατά την ωρίμανση των τυριών, φαίνεται να έχει σημαντική επίδραση στην ΚΣ2. Οι υπόλοιπες παράμετροι φαίνεται να έχουν παρόμοια επίδραση στις ΚΣ1 και ΚΣ2. Η μεταβολή του χρώματος των τυριών βάσει οργανοληπτικού ελέγχου και αντικειμενικής μέτρησης καθώς και η σκληρότητα των δειγμάτων βάσει οργανοληπτικού ελέγχου φαίνεται να συσχετίζονται μεταξύ τους ακριβώς όπως και οι πρωτεΐνες, οι θερμοφίλοι κόκοι και τα ολικά βακτήρια (TVC). Συσχέτιση εμφανίζεται επιπλέον μεταξύ των παραμέτρων TCA-SN/TN και PTA-SN/TN και λιπαρών των τυριών.

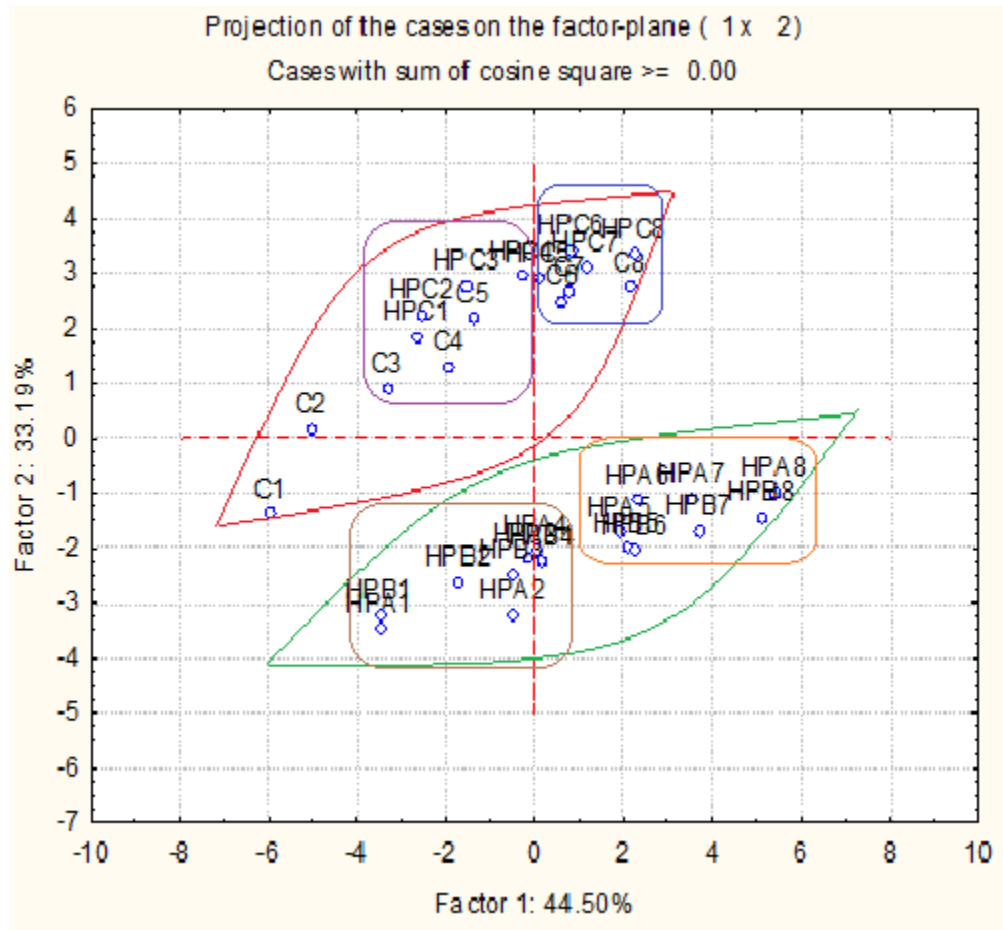
Μετά από αφαίρεση των παραμέτρων pH, αλατοπεριεκτικότητα και τομές, οι οποίες από το Σχήμα 5.64 φαίνεται ότι δεν έχουν επίδραση (μη σημαντικές), προέκυψε το Σχήμα 5.58.



Σχήμα 5.58. Δεύτερη απεικόνιση της ανάλυσης κυρίων συνιστωσών (ΑΚΣ) κατά τη στατιστική ανάλυση των χαρακτηριστικών των δειγμάτων λευκού τυριού άλμης τύπου Φέτας (δείγματα τυριού HPA, HPB, HPC και Control) μετά από αφαίρεση μη σημαντικών παραμέτρων

Στη συγκεκριμένη περίπτωση μετά από αφαίρεση των μη σημαντικών παραμέτρων, οι 2 κύριες συνιστώσες αντιπροσωπεύουν το 77.69% της ολικής διακύμανσης. Η πρώτη κύρια συνιστώσα (ΚΣ1) αντιπροσωπεύει το 44.50% και η δεύτερη κύρια συνιστώσα (ΚΣ 2) το 33.19%.

Μετά από ομαδοποίηση των τεσσάρων δειγμάτων λευκού τυριού άλμης τύπου Φέτας με χρήση του προγράμματος Statistica 10.0, παρατίθεται το Σχήμα 5.59.



Σχήμα 5.59. Ομαδοποίηση δειγμάτων μέσω της ανάλυσης κυρίων συνιστωσών (ΑΚΣ). Σημεία C1-C8 δείγματα Control, σημεία HPC1-HPC8 δείγματα HPC, σημεία HPA1-HPA8 δείγματα HPA, σημεία HPB1-HPB8 δείγματα HPB (όπου τα σημεία 1-8 αντιστοιχούν σε 0-90 d 2^{ου} σταδίου ωρίμανσης)

Από το παραπάνω σχήμα φαίνεται να σχηματίζονται δύο μεγάλες ομάδες μεταξύ των τυριών Control και HPC (κόκκινο περίγραμμα) και των HPA και HPB (πράσινο περίγραμμα). Από το σχηματισμό αυτό προκύπτει ότι τα τυριά που παρασκευάστηκαν με επεξεργασμένη καλλιέργεια εκκίνησης (HPA και HPB) εμφανίζουν παρόμοια χαρακτηριστικά κατά την εξέλιξη της ωρίμανσης καθώς και τα τυριά αναφοράς (Control) με τα τυριά τα οποία επεξεργάστηκαν με ΥΠ (HPB). Επιπλέον σε κάθε κύρια ομάδα φαίνεται να σχηματίζονται από δύο υποομάδες μεταξύ των δειγμάτων C3-C4-C5-HPC1-HPC2-HPC3-HPC4 (μωβ πλαίσιο) τα οποία αφορούν μικρούς χρόνους ωρίμανσης των συγκεκριμένων δειγμάτων και C6-C7-C8-HPC5-HPC6-HPC7-HPC8 (μπλε πλαίσιο) τα οποία αφορούν μεγάλους χρόνους ωρίμανσης καθώς και μεταξύ των δειγμάτων HPA1-HPA2-HPA3-HPA4-HPB1-HPB2-HPB3-HPB4 (χαμηλοί χρόνοι ωρίμανσης) (καφέ πλαίσιο) και HPA5-HPA6-HPA7-HPA8-HPB5-HPB6-HPB7-HPB8 (υψηλοί χρόνοι ωρίμανσης) (πορτοκαλί πλαίσιο). Με συνδυασμό των διαγραμμάτων των Σχημάτων 5.58 και 5.59, προκύπτει ότι τα δείγματα Control (C3-C5) και HPC (HPC1-HPC4) (μωβ πλαίσιο) σε χρόνους 2^{ου} σταδίου ωρίμανσης 14-30 d και 0-21 d, αντίστοιχα, εμφανίζουν υψηλές τιμές ενεργότητας νερού, υγρασίας και πικρής γεύσης. Αντίθετα τα συγκεκριμένα δείγματα εμφανίζουν χαμηλές τιμές των παραμέτρων ωρίμανσης TCA-SN/TN και PTA-SN/TN, λιπαρών και αντικειμενικής σκληρότητας. Τα

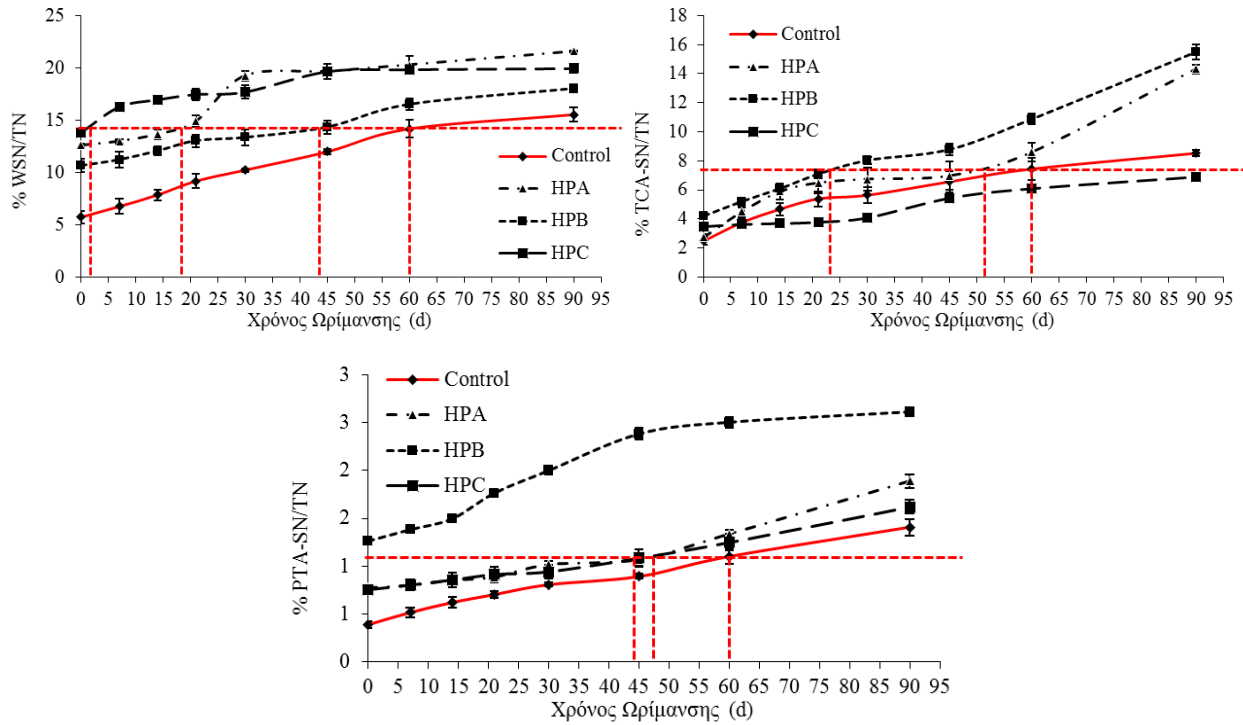
δείγματα Control (C6-C8) και HPC (HPC5-HPC8) (μπλε πλαίσιο) σε χρόνους 2^{ου} σταδίου ωρίμανσης 45-90 d και 30-90 d, αντίστοιχα, φαίνεται να εμφανίζουν χαμηλές τιμές φορτίου οξυγαλακτικών βακτηρίων αλλά και πρωτεϊνών. Όσον αφορά τα τυριά που παρασκευάστηκαν με επεξεργασμένη καλλιέργεια εκκίνησης προκύπτει ότι τα δείγματα HPA (HPA1-HPA4) και HPB (HPB1-HPB4) (καφέ πλαίσιο) σε χρόνους 2^{ου} σταδίου ωρίμανσης 0-21 d, εμφανίζουν υψηλές τιμές οξυγαλακτικών βακτηρίων και πρωτεϊνών. Τα δείγματα HPA (HPA5-HPA8) και HPB (HPB5-HPB8) (πορτοκαλί πλαίσιο) σε χρόνους 2^{ου} σταδίου ωρίμανσης 30-90 d, φαίνεται ότι εμφανίζουν χαμηλές τιμές υγρασίας και πικρής γεύσης καθώς και υψηλές τιμές των παραμέτρων αντικειμενικής σκληρότητας καθώς και των TCA-SN/TN και PTA-SN/TN που δείχνουν τη μεγαλύτερη εξέλιξη της πρωτεόλυσης στα συγκεκριμένα δείγματα.

5.4.8. Συνολική εκτίμηση και σύγκριση της εξέλιξης της πρωτεόλυσης των τυριών

Η εκτίμηση της εξέλιξης της ωρίμανσης λευκών τυριών άλμης τύπου Φέτας μπορεί να πραγματοποιηθεί συνεκτιμώντας διάφορους δείκτες όπως τα κλάσματα των αζωτούχων ενώσεων, την αναλογία σε υδροφοβα/υδροφιλα πεπτιδία καθώς και την οργανοληπτική εκτίμησή τους. Τόσο η Νομοθεσία όσο και η διεθνής βιβλιογραφία δεν προτείνουν συγκεκριμένους δείκτες εκτίμησης του επιπέδου ωρίμανσης των τυριών. Αντίθετα, ορίζεται ελάχιστος χρόνος ωρίμανσης για κάθε κατηγορία τυριού, με βασικό κριτήριο την ασφάλεια του καταναλωτή. Στα πλαίσια της συγκεκριμένης διατριβής και έχοντας ως στόχο την επιτάχυνση της ωρίμανσης λευκού τυριού άλμης τύπου Φέτας, πραγματοποιήθηκε εκτίμηση της ωρίμανσης και του αναγκαίου χρόνου ωρίμανσης των τεσσάρων μελετώμενων τυριών που παρασκευάστηκαν ως προς τους δείκτες που αναφέρθηκαν παραπάνω.

Σύμφωνα με το άρθρο 83/2014 του Κώδικα Τροφίμων και Ποτών, ο χρόνος ωρίμανσης της Φέτας είναι τουλάχιστον 2 μήνες. Συνεπώς οι τιμές που είχαν στις 60 ημέρες 2^{ου} σταδίου ωρίμανσης οι πρωτεολυτικοί δείκτες του δείγματος αναφοράς μπορούν να θεωρηθούν τιμές αναφοράς για την ωρίμανση όλων των τυριών του πειράματος.

Για τη σύγκριση του χρόνου ωρίμανσης των τυριών βάσει των τιμών των αζωτούχων κλασμάτων τους, παρατίθενται τα Σχήματα 5.60 α, β και γ. Με κόκκινη διακεκομμένη οριζόντια γραμμή φαίνεται το όριο σε κάθε δείκτη βάσει των ανωτέρω (τιμή για δείγμα αναφοράς μετά από 60 ημέρες ωρίμανσης στο ψυγείο), ενώ οι κάθετες κόκκινες γραμμές δείχνουν τη χρονική στιγμή που φτάνει την αντίστοιχη τιμή το κάθε πειραματικό τυρί.



Σχήμα 5.60. Σύγκριση του χρόνου ωρίμανσης επεξεργασμένου με ΥΠ λευκού τυριού άλμης (HPC) και τυριών με επεξεργασμένη καλλιέργεια εκκίνησης (HPA, HPB) με το τυρί αναφοράς (Control) ως προς τα αζωτούχα κλάσματα α) SN-TN/TN, β) TCA-SN/TN και γ) PTA-SN/TN

Στον Πίνακα 5.21 δίνονται οι χρόνοι ωρίμανσης των τριών τυριών (HPA, HPB, HPC) στα οποία έχει εφαρμοστεί ΥΠ, που προκύπτουν από τις τιμές των κλασμάτων των υδατοδιαλυτών αζωτούχων ενώσεων τους, με όριο τις αντίστοιχες τιμές του τυριού αναφοράς στις 60 d 2^{ου} σταδίου ωρίμανσης.

Πίνακας 5.21. Εκτίμηση του χρόνου 2^{ου} σταδίου ωρίμανσης των τυριών HPA, HPB και HPC, βάσει των αζωτούχων κλασμάτων τους με όριο τις τιμές του τυριού αναφοράς στις 60 d 2^{ου} σταδίου ωρίμανσης

ΤΥΠΙ	SN-TN/TN	TCA-SN/TN	PTA-SN/TN
CONTROL	60 d	60 d	60 d
HPA	18 d	52 d	47 d
HPB	40 d	25 d	0 d
HPC	5 d	~95 d	46 d

Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι η εξέλιξη της ωρίμανσης είναι μεγαλύτερη στο τυρί με την πλήρως επεξεργασμένη καλλιέργεια (HPB) με το χρόνο ωρίμανσης να είναι μικρότερος των δειγμάτων αναφοράς τουλάχιστον 2.5 φορές. Ακολουθούν τα τυριά που παρασκευάστηκαν με μέρος της καλλιέργειας εκκίνησης επεξεργασμένη με ΥΠ (HPA) με μικρότερο χρόνο ωρίμανσης έναντι των δειγμάτων αναφοράς κατά τουλάχιστον 1.2 φορές. Όσον αφορά το τυρί HPC, παρότι αρχικά φάνηκε να εξελίσσεται πιο γρήγορα από όλα τα δείγματα βάσει του δείκτη SN-TN/TN που εκφράζει την έκταση της πρωτεόλυσης, τελικά εμφανίστηκε να ακολουθεί το τυρί HPA κυρίως όσον αφορά το βάθος της πρωτεόλυσης (δείκτης PTA-SN/TN).

Η μεγαλύτερη εξέλιξη της πρωτεόλυσης στα τυριά HPA και HPB φάνηκε και από την ανάλυση κυρίων συνιστωσών μέσω της οποίας προέκυψε ότι σε χρόνους 2^{ου} σταδίου ωρίμανσης 30-90 d, τα συγκεκριμένα τυριά έχουν τις υψηλότερες τιμές των αζωτούχων κλασμάτων TCA-SN/TN και PTA-SN/TN.

Επιπρόσθετα, βάσει της διεθνούς βιβλιογραφίας, οι Nega & Moatsou (2012), μελέτησαν πρωτεολυτικούς δείκτες ωρίμανσης δέκα ειδών τυριού μεταξύ των οποίων και η Φέτα. Με χρήση ως όριο των τιμών των υδατοδιαλυτών αζωτούχων κλασμάτων SN-TN/TN (13.8), TCA-SN/TN (9.9) και PTA-SN/TN (4.1) που υπολογίστηκαν σε Φέτα εμπορίου (άγνωστης διάρκειας αποθήκευσης στον ψυχρό θάλαμο), στον Πίνακα 5.22, παρατίθενται οι αντίστοιχοι χρόνοι ωρίμανσης που υπολογίστηκαν για τα τέσσερα τυριά, Control, HPA, HPB και HPC.

Πίνακας 5.22. Εκτίμηση του χρόνου 2^{ου} σταδίου ωρίμανσης των τυριών Control, HPA, HPB και HPC, βάσει των αζωτούχων κλασμάτων τους με όριο τις αντίστοιχες τιμές Φέτας του εμπορίου (Nega & Moatsou, 2012)

ΤΥΠΙ	SN-TN/TN	TCA-SN/TN	PTA-SN/TN
CONTROL	50 d	>90 d	>90 d (1.41)
HPA	14 d	70 d	>90 d (1.90)
HPB	30 d	50 d	>90 d (2.62)
HPC	1 d	>90 d	>90 d (1.67)

Αντίστοιχα και σε αυτήν την περίπτωση, η εξέλιξη της ωρίμανσης φαίνεται ότι είναι μεγαλύτερη στο τυρί με την πλήρως επεξεργασμένη καλλιέργεια (HPB) με το χρόνο ωρίμανσης να είναι μικρότερος των δειγμάτων αναφοράς τουλάχιστον 2 φορές. Ακολουθούν τα τυριά που παρασκευάστηκαν με μέρος της καλλιέργειας εκκίνησης επεξεργασμένη με ΥΠ (HPA) με μειωμένο χρόνο ωρίμανσης έναντι των δειγμάτων αναφοράς κατά τουλάχιστον 1.5 φορές.

Όσον αφορά την ανάλυση πεπτιδίων των τεσσάρων τυριών, οι Nega & Moatsou (2012) υπολόγισαν μετά από ανάλυση με χρήση HPLC Φέτας του εμπορίου, το κλάσμα υδρόφοβων προς υδρόφιλα πεπτίδια (55-100/10-55) ίσο με 0.80. Θέτοντας ως όριο τη συγκεκριμένη τιμή στον Πίνακα 5.23 παρατίθενται οι χρόνοι ωρίμανσης που υπολογίστηκαν για τα τέσσερα τυριά, Control, HPA, HPB και HPC.

Πίνακας 5.23. Εκτίμηση του χρόνου 2^{ου} σταδίου ωρίμανσης των τυριών Control, HPA, HPB και HPC, βάσει του κλάσματος υδρόφοβων προς υδρόφιλα πεπτίδια (55-100/10-55) με όριο την αντίστοιχη τιμή Φέτας του εμπορίου (Nega & Moatsou, 2012)

Control	>90 d (1.025)*
HPA	75 d
HPB	60 d
HPC	>90 d (0.878)

*κλάσμα υδρόφοβων προς υδρόφιλα πεπτίδια (55-100/10-55) σε χρόνο ωρίμανσης 90 d στον ψυχρό θάλαμο

Από τον παραπάνω πίνακα γίνεται αντιληπτό ότι στο τυρί με την πλήρως επεξεργασμένη καλλιέργεια (HPB) ο λόγος υδρόφοβων προς υδρόφιλα πεπτίδια έχει σημαντική διαφορά έναντι των δειγμάτων αναφοράς, με το χρόνο ωρίμανσης να προσδιορίζεται μειωμένος κατά τουλάχιστον 1.5 φορά (1 μήνα).

Όσον αφορά την οργανοληπτική αξιολόγηση των τεσσάρων τυριών, μετά από ερώτηση ομάδας 15 εκπαιδευμένων δοκιμαστών, σε χρόνο 30 d 2^ο σταδίου ωρίμανσης, για την αντίληψη της εξέλιξης της ωρίμανσής τους, την υψηλότερη βαθμολογία ως προς την ωριμότητα απέσπασαν τα τυριά HPA, με την ομάδα δοκιμαστών να αποδίδει στα συγκεκριμένα τυριά τα ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά ενός ώριμου τυριού. Ακολούθησαν τα τυριά HPB με μικρή αλλά σημαντική διαφορά ($p<0.05$), ενώ χαμηλότερες βαθμολογίες και σημαντικές διαφορές ($p<0.05$) παρατηρήθηκαν για τα τυριά HPC και Control, με τα δεύτερα να λαμβάνουν τη μικρότερη βαθμολογία. Ως προς την αντίληψη της πικρής γεύσης αρκετά χαμηλές βαθμολογίες παρατηρήθηκαν για τα τυριά HPA και HPB ήδη από την αρχή του δευτέρου σταδίου ωρίμανσης, χωρίς να παρατηρούνται σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Ακολούθησαν, με σημαντική διαφορά ($p<0.05$) με τα πρώτα, τα τυριά HPC, ενώ η υψηλότερη ένταση πικρής γεύσης παρατηρήθηκε για τα τυριά Control με σημαντική διαφορά από τα υπόλοιπα δείγματα ($p<0.05$). Ως προς τη γενική εντύπωση, τις υψηλότερες βαθμολογίες πήραν τα τυριά HPA και HPB, χωρίς να υπάρχουν σημαντικές στατικά διαφορές μεταξύ τους.

5.4.9. Τεχνικοοικονομική Προσέγγιση της Εφαρμογής ΥΠ στην Παρασκευή Λευκού Τυριού Άλμης Τύπου Φέτας

Το επιπλέον κόστος της παρασκευής λευκού τυριού άλμης τύπου Φέτας τόσο στην περίπτωση επεξεργασίας της καλλιέργειας εκκίνησης (τυριά ΗΡΑ, ΗΡΒ) όσο και στην περίπτωση της επεξεργασίας με ΥΠ του ίδιου του τυριού, εξαρτάται από τον όγκο του δοχείου ΥΠ, την πλήρωση του δοχείου και το χρόνο παραμονής τους στην επιθυμητή πίεση και θερμοκρασία. Λαμβάνοντας υπόψη στοιχεία από την έρευνα των Mújica-Paz, (2011) και θεωρώντας ως παραδοχές ότι οι συνθήκες επεξεργασίας της καλλιέργειας ή του τυριού είναι 200 MPa, 20°C, 20 min, 30 min συνολικός χρόνος/κύκλο, 2 κύκλοι/ώρα και ποσοστό πλήρωσης του δοχείου περίπου στο 75%, μελετήθηκε η επίδραση της έντασης επεξεργασίας, καθώς και η δυναμικότητα της μονάδας ΥΠ στο κόστος επεξεργασίας του τελικού τυριού. Συνεπώς, για επεξεργασία της καλλιέργειας εκκίνησης στις προτεινόμενες συνθήκες επεξεργασίας ΥΠ (200 MPa, 20°C, 20 min) και χρησιμοποιώντας ως δεδομένα τα ακόλουθα:

- Δοχείο Υπερυψηλής Πίεσης Χωρητικότητας 5 L
- Ποσοστό πλήρωσης δοχείου 75%
- Χρόνος εφαρμογής πίεσης 20 min (συνολικός χρόνος/κύκλο 30 min)
- Ένταση επεξεργασίας 2000 h/έτος

Πάγιο κόστος εξοπλισμού 150.000 Ευρώ

Χρόνος απόσβεσης 5 χρόνια

Λειτουργικό κόστος 30.000 Ευρώ/έτος

θα μπορούσαν να επεξεργαστούν με ΥΠ περίπου 15 tn / χρόνο είτε καλλιέργειας εκκίνησης είτε έτοιμου τυριού.

Στην περίπτωση της επεξεργασίας του τυριού θα μπορούσαν να παραχθούν 15 tn προϊόντος/χρόνο με επιπλέον κόστος 4.00 Ευρώ/kg.

Στην περίπτωση της επεξεργασίας της καλλιέργειας εκκίνησης και συγκεκριμένα για την παρασκευή των τυριών ΗΡΑ, λαμβάνοντας υπόψη ότι επεξεργάστηκε με ΥΠ το 60% της καλλιέργειας εκκίνησης και κατά την τυροκόμηση έγινε προσθήκη ποσότητας 2.5% v/v, θα μπορούσαν να παραχθούν 1000 tn προϊόντος/χρόνο με επιπλέον κόστος 0.06 Ευρώ/kg. Στην περίπτωση των τυριών ΗΡΒ στα οποία η καλλιέργεια εκκίνησης που προστέθηκε ήταν εξ' ολοκλήρου επεξεργασμένη με ΥΠ, θα μπορούσαν να παραχθούν 500 tn προϊόντος/χρόνο με επιπλέον κόστος 0.12 Ευρώ/kg.

Φυσικά σε κάθε περίπτωση θα πρέπει να ληφθεί υπόψη το κέρδος που αναμένεται να προκύψει από τη μείωση του πάγιου κόστους του χρονοβόρου σταδίου της ωρίμανσης, το οποίο αναμένεται να υπερκαλύψει το επιπρόσθετο κόστος της επεξεργασίας με ΥΠ.

Από προφορικά στοιχεία που ελήφθησαν από μεγάλη ελληνική βιομηχανία παρασκευής γαλακτοκομικών προϊόντων προκύπτει ότι το κόστος που αφορά το στάδιο της ωρίμανσης του τυριού είναι δεσμευμένο κόστος και χωρίζεται σε κόστος δεσμευμένου κεφαλαίου και κόστος για χώρους και απαιτούμενη ενέργεια. Η βιομηχανία μπορεί και παράγει 50.000 tn / έτος διάφορα παραδοσιακά τυριά με επικρατέστερο τη Φέτα. Αν ο χρόνος ωρίμανσης μπορούσε να μειωθεί κατά 16%, για τη βιομηχανία αυτό θα σήμαινε κέρδος 45.000.000 Ευρώ / έτος ή κέρδος 0.9 Ευρώ / kg προϊόντος. Βάσει των αποτελεσμάτων της διατριβής, στην περίπτωση που ο χρόνος ωρίμανσης θα μειωνόταν κατά 50% το κέρδος θα ήταν 2.7 Ευρώ / kg προϊόντος. Αν γίνει η υπόθεση ότι μία μέση τιμή πώλησης της Φέτας είναι ~7.8 Ευρώ/ kg τότε το κέρδος θα ήταν περίπου 35%.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alexandrakis, Z., Katsaros, G., Stavros, Ph., Nounesis, G. & Taoukis, P. (2016). Inactivation kinetics and structural changes of high pressure treated actinidin. *International Journal of Agricultural Science and Technology, IJAST 7297*, Volume 2016, Open access DOI: Pending.
- Baranyi, J. & Roberts, T.A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 277–294.
- Böhm, G., Muhr, R. & Jaenicke, R. (1992). Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Engineering*, 5 (3), 191-195.
- Casal, V. & Gomez, R. (1999). Effect of high pressure on the viability and enzymatic activity of mesophilic lactic acid bacteria isolated from caprine cheese. *Journal of Dairy Science*, 82, 1092–1098.
- Calzada, J., Olmo, A., Picon, A. Gaya, P. & Nuñez, M. (2015). Effect of high-pressure processing on the microbiology, proteolysis, biogenic amines and flavour of cheese made from unpasteurized milk. *Food and Bioprocess Technology*, 8(2), 319-332.
- Capellas, M., Mor-Mur, M., Sendra, E. & Guamis, B. (2001). Effect of high-pressure processing on physico-chemical characteristics of fresh goats' milk cheese (Mató). *International Dairy Journal*, 11, 165–173.
- Cheftel, J.C. (1992). Effects of high hydrostatic pressure on food constituents: An overview. In C., R., K., & P. (Eds.), *High pressure and biotechnology*. Montrouge, France: John Libbey Eurotext, 195-209.
- Costabel, L., Bergamini, C., Vaudagna, S., Cuatrin, A., Audero, G. & Hynes, E. (2016). Effect of high-pressure treatment on hard cheese proteolysis. *Journal of Dairy Science*, 99 (6), 4220-4232.
- Earnshaw R. G. (1992). High pressure as a cell sensitizer: new opportunities to increase the efficiency of preservation processes. In: C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans & P. Masson, *High pressure and biotechnology*. London, UK: Coloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd, 224, 261-267.
- Foguel, D. & Silva, J.L. (1994). Cold denaturation of a repressor-operator complex: the role of entropy in protein-DNA recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 91(17), 8244-8247.
- Garde, S., Arqués, J. L., Gaya, P., Medina, M. & Nuñez, M. (2007). Effect of high-pressure treatments on proteolysis and texture of ewes' raw milk La Serena cheese. *International Dairy Journal*, 17, 1424–1433.
- Giannoglou, M., Katsaros, G. & Taoukis, P. (2016). Selective activation/inactivation of aminopeptidases of starter cultures of brine cheeses by high pressure and temperature. *Food and Bioprocess Technology*. <http://dx.doi.org/10.1007/s11947-016-1781-3> (FABT-D-16-00165).
- Heremans, K. (1982). High pressure effects on proteins and other biomolecules. *Annual Review on Biophysics and Bioengineering*, 11, 1–21.
- Jarret, W.D., Aston, J.W. & Dullely, J.R. (1982). A simple method for estimating free amino acids in Cheddar cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 37, 55-58.
- Juan, B., Ferragut, V., Guamis, B., Buffa, M. & Trujillo, A. J. (2004). Proteolysis of a highpressure treated ewe's milk cheese. *Milchwissenschaft*, 59, 616–619.

- Juan, B., Ferragut, V., Buffa, M., Guamis, B. & Trujillo, A. J. (2007a). Effects of high pressure on proteolytic enzymes in cheese: Relationship with the proteolysis of Ewe Milk Cheese. *Journal of Dairy Science*, 90, 2113–2125.
- Juan, B., Trujillo, A. J., Guamis, B., Buffa, M., & Ferragut V. (2007b). Rheological, textural and sensory characteristics of high-pressure treated semi-hard ewes' milk cheese. *International Dairy Journal*, 17, 248–254.
- Juan, B., Ferragut, V., Guamis, B. & Trujillo, A. J. (2008). The effect of high pressure treatment at 300 MPa on ripening of ewe's milk cheese. *International Dairy Journal*, 18, 129–138.
- Katsaros, G.I., Giannoglou, M.N. & Taoukis, P.S. (2009). Kinetic study of the combined effect of high hydrostatic pressure and temperature on the activity of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* aminopeptidases. *Journal of Food Science*, 74(5), 219–225.
- Maniou, D., Tsala, A., Moschopoulou, E., Giannoglou, M. & Taoukis, P. (2013). Effect of high-pressure-treated starter on ripening of Feta cheese. *Dairy Science and Technology*, 93, 11–20.
- Messens, W., Foubert, I., Dewettinck, K. & Huyghebaert, A. (1999). Transport of sodium chloride and water in Gouda cheese as affected by high-pressure brining. *International Dairy Journal*, 9, 569–576.
- Mozhaev, V.V., Heremans, K., Frank, J., Masson, P. & Balny, C. (1996). High pressure effects on protein structure and function. *Proteins*. 24. 81–91.
- Mújica-Paz, H., Valdez-Fragoso, A., Samson, C., Welti-Chanes, J. & Antonio Torres, J. (2011). High-pressure processing technologies for the pasteurization and sterilization of foods. *Food and Bioprocess Technology*, 4, 969–985.
- Nega, A. & Moatsou, G. (2012). Proteolysis and related enzymatic activities in ten Greek cheese varieties. *Dairy Science and Technology*, 92(1), 57–73.
- O’Keeffe, R.B., Fox, P.F. & Daly, C. (1976). Contribution of rennet and starter proteases to proteolysis in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Research*, 43, 97-107.
- Pavia, M., Trujillo, A. J., Guamis, B. & Ferragut, V. (2000). Effectiveness of high-pressure brining of Manchego-type cheese. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 33, 401–403.
- Rigolet, P., Mechin, I., Delage, M.M., & Chich, J.F. (2002). The structural basis for catalysis and specificity of the X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase from *Lactococcus lactis*. *Structure*, 10, 1383-1394.
- Saldo, J., Sendra, E. & Guamis, B. (2001). Hard cheese structure after a high hydrostatic pressure treatment at 50 MPa for 72 h applied to cheese after brining. *Le Lait*, 81, 625–635.
- Saldo, J., McSweeney, P. L. H., Sendra, E., Kelly, A. L. & Guamis, B. (2002). Proteolysis in caprine milk cheese treated by high pressure to accelerate cheese ripening. *International Dairy Journal*, 12, 35–44.
- Shah, N.P., Tsangalis, D., Donkor, O.N. & Versteeg, C. (2008). Effect of high pressure treatment on viability of *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* and *L. acidophilus* and the pH of fermented milk. *Milchwissenschaft*, 63(1), 11-14.
- Smit G. (2003). Dairy processing – Improving quality. *Woodhead publishing limited*, ch. 15, 19-22.

- Solis-Mendiola, S., Arroyo-Reyna, A. and Hernandez-Arana, A. (1992). Circular dichroism of cysteine proteinases from papaya latex. Evidence of differences in the folding of their polypeptide chains. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1118, 288-292.
- Trujillo, A.J., Capellas, M., Buffa, M., Royo, C., Gervilla, R., Felipe, X. & Guamis, B. (2000). Application of high pressure treatment for cheese production. *Food Research International*, 33, 311-316.
- Upadhyay, V.K., Huppertz, T., Kelly, A.L. & McSweeney, P.L.H. (2007). Use of high pressure treatment to attenuate starter bacteria for use as adjuncts for Cheddar cheese manufacture. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8, 485-492.
- Vidugiris, G.J.A. & Royer, C.A. (1998). Determination of the volume changes for the pressure-induced transitions of apomyoglobin between the native, molten globule and unfolded states. *Biophysical Journal*, 75(1), 463-470.
- Woody, R. (1995). Circular dichroism. *Methods in Enzymology*, 246, 34-71.
- Zidou, E., Plakas, N., Giannopoulou, D., Kotoula, M. & Moatsou, G. (2015). Effect of supplementation of brine with calcium on the Feta cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 68(3), 420-426.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Η τεχνολογία της Υπερυψηλής Πίεσης (ΥΠ) στη βιομηχανία έχει ήδη αρχίσει να αποτελεί στάδιο της επεξεργασίας αρκετών τροφίμων, είτε προς αντικατάσταση της θερμικής επεξεργασίας, είτε ως επιπλέον στάδιο για την παστερίωση προϊόντων εντός της συσκευασίας τους, για την παραλαβή και διάθεση τροφίμων υψηλής ποιότητας και αυξημένης διατηρησιμότητας.

Τα τελευταία χρόνια σε ερευνητικό επίπεδο έχει υπάρξει μεγάλο ενδιαφέρον για τη διερεύνηση της δυνατότητας ενσωμάτωσης της ΥΠ στην τυροκομία. Τα αποτελέσματα της έρευνας υπόσχονται αύξηση της διατηρησιμότητας, βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, μείωση της πικρής γεύσης και μείωση του χρόνου ωρίμανσης αρκετών τύπων τυριών ως αποτέλεσμα της μοναδικής ικανότητας της ΥΠ να προκαλεί ενεργοποίηση ενζύμων. Κατά την παρασκευή των τυριών και κυρίως κατά το στάδιο της ωρίμανσής τους, ένζυμα προερχόμενα από το γάλα τυροκόμησης, την προστιθέμενη πυτιά και τις καλλιέργειες εκκίνησης, δραστηριοποιούνται στη μάζα του τυριού και προκαλούν μεταξύ άλλων την υδρόλυση πρωτεϊνών προς παραγωγή ελεύθερων αμινοξέων. Τα ελεύθερα αμινοξέα μπορούν να μετατραπούν σε πτητικά συστατικά αρώματος, που συνδέονται με τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των τυριών. Η ενεργοποίηση των ενζύμων αυτών μέσω εφαρμογής ΥΠ είτε απευθείας στο ίδιο το τυρί, είτε στην πηγή προέλευσης των ενζύμων αυτών, όπως η καλλιέργεια εκκίνησης, θα μπορούσε να οδηγήσει στην παρασκευή τυριού βελτιωμένων χαρακτηριστικών σε μειωμένο χρόνο ωρίμανσης.

Η επιτυχής εφαρμογή της τεχνολογίας της ΥΠ στην τυροκομία απαιτεί τη συστηματική διερεύνηση της επίδρασης ενός ευρέως φάσματος συνθηκών επεξεργασίας με ΥΠ σε διάφορα στάδια της τυροκόμησης και τη διεξοδική ανάλυση ενός μεγάλου αριθμού παραμέτρων. Η παρούσα διδακτορική διατριβή είχε ως στόχο σε πρώτο στάδιο να καλύψει το κενό που υπάρχει στη γνώση της επίδρασης της εφαρμογής της τεχνολογίας της ΥΠ σε ένζυμα οξυγαλακτικών καλλιεργειών εκκίνησης που προστίθενται κατά την παρασκευή τυριών άλμης. Επιλέχθηκε η μελέτη των αμινοπεπτιδασών, οι οποίες έχουν καθοριστικό ρόλο στη διαμόρφωση των τελικών προϊόντων της πρωτεόλυσης και επομένως και των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των διαφόρων κατηγοριών τυριών. Απώτερος στόχος του συγκεκριμένου σταδίου ήταν η διερεύνηση και επιλογή κατάλληλων συνθηκών επεξεργασίας των αμινοπεπτιδασών με ΥΠ με σκοπό τη χρήση τους κατά την τυροκόμηση και την παραγωγή τυριού βελτιωμένων φυσικοχημικών, δομικών και οργανοληπτικών χαρακτηριστικών σε μικρότερο χρόνο ωρίμανσης.

Μελετήθηκε η επίδραση όλων των πιθανών συνδυασμών πιέσεων στο εύρος 100-450 MPa και ήπιων θερμοκρασιών στο εύρος 20-40°C, στη δραστηκότητα των αμινοπεπτιδασών PepX και PepN, των στελεχών *Lactococcus lactis* ACA-DC 0049, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105 και *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0022, οι οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί ως καλλιέργειες εκκίνησης κατά την παρασκευή τυριού Φέτας, καθώς και σε μείγμα τους σε αναλογία 2:1:1, αντίστοιχα. Βάσει των αποτελεσμάτων οι αμινοπεπτιδάσες εμφάνισαν διαφορετική συμπεριφορά ανάλογα με τις συνθήκες ΥΠ-θερμοκρασίας που εφαρμόστηκαν. Στις καλλιέργειες των στελεχών *L. bulgaricus* και *S. thermophilus* η δραστηκότητα των πεπτιδασών PepX και PepN αυξήθηκε για επεξεργασία σε πιέσεις μέχρι και 200 MPa, σε όλες τις θερμοκρασίες επεξεργασίας (20-40°C). Στην καλλιέργεια του στελέχους

L. lactis, η δραστηριότητα των πεπτιδασών PepX και PepN αυξήθηκε μετά από επεξεργασία σε πιέσεις μέχρι και 300 MPa και σε θερμοκρασίες μέχρι και 30°C. Εφαρμογή εντονότερων συνθηκών οδήγησε σε απενεργοποίηση των ενζύμων. Από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων προέκυψαν συνολικά μαθηματικά μοντέλα τόσο για το εύρος των συνθηκών ενεργοποίησης των πεπτιδασών όσο και για το εύρος των συνθηκών απενεργοποίησής τους που επιτρέπουν την πρόβλεψη της δραστηριότητας των πεπτιδασών στο συγκεκριμένο εύρος των συνθηκών επεξεργασίας. Για όλους τους μικροοργανισμούς που μελετήθηκαν επιλέχθηκαν ως βέλτιστες συνθήκες επεξεργασίας πίεση 200 MPa, θερμοκρασία 20°C και χρόνος επεξεργασίας 20 min βάσει της αύξησης της δραστηριότητας των πεπτιδασών PepX και PepN και λαμβάνοντας ταυτόχρονα υπόψη το εκτιμώμενο κόστος επεξεργασίας. Στις συγκεκριμένες συνθήκες, η δραστηριότητα των αμινοπεπτιδασών PepN και PepX αυξήθηκε κατά 72.6 και 74.5% αντίστοιχα για το στέλεχος του *L. bulgaricus*, 73.8 και 78.3% αντίστοιχα για το στέλεχος του *S. thermophilus*, 40.8 και 55.6% αντίστοιχα για το στέλεχος του *L. lactis* και 61.3 και 70.1% αντίστοιχα για το μείγμα τους (*Lactococcus lactis* ACA-DC 0049: *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0022: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105, 2:1:1).

Προς εμβάθυνση της έρευνας έγινε προσπάθεια για την αναζήτηση του μηχανισμού μεταβολής της δραστηριότητας των αμινοπεπτιδασών, εξαιτίας της ΥΠ. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε συστηματική μελέτη της επίδρασης της ΥΠ στη δραστηριότητα και τη δομή της καθαρής αμινοπεπτιδάσης PepX προερχόμενη από το στέλεχος του *S. thermophilus*, καθώς και συσχέτιση των πιθανών μεταβολών της δομής με τις μεταβολές της δραστηριότητας του ενζύμου. Η καθαρή PepX προσδιορίστηκε μετά από εφαρμογή ηλεκτροφορήσεων SDS-page και native-page ως διμερής πρωτεΐνη μοριακής μάζας 86 kDa. Για τη μελέτη της επίδρασης της ΥΠ στη δραστηριότητα της καθαρής PepX εφαρμόστηκαν όλοι οι πιθανοί συνδυασμοί πιέσεων και ήπιων θερμοκρασιών στα εύρη 100-450 MPa και 20-40°C. Η αμινοπεπτιδάση εμφάνισε διαφορετική συμπεριφορά ανάλογα με τις συνθήκες ΥΠ και θερμοκρασίας που εφαρμόστηκαν. Ειδικότερα, μετά από επεξεργασία σε πιέσεις 100-200 MPa και θερμοκρασίες 20-30°C, παρατηρήθηκε ενεργοποίηση του ενζύμου ενώ αντίθετα επεξεργασία σε εντονότερες συνθήκες οδήγησε σε απενεργοποίησή του. Τόσο η ενεργοποίηση όσο και η απενεργοποίηση του ενζύμου ακολούθησε κινητική πρώτης τάξης. Η καθαρή PepX εμφανίστηκε λιγότερο ευαίσθητη στην επεξεργασία με ΥΠ και θερμοκρασία συγκριτικά με τη μη καθαρή της μορφή. Μετά από επεξεργασία σε συνθήκες 200 MPa, 20°C για 20 min η δραστηριότητα της καθαρής PepX εμφανίστηκε υψηλότερη κατά 24.81% σε σύγκριση με την ανεπεξέργαστη καθαρή PepX. Για τη διερεύνηση της διαφορετικής συμπεριφοράς του συγκεκριμένου ενζύμου μετά από επεξεργασία του με ΥΠ σε διάφορες συνθήκες, μελετήθηκαν οι πιθανές δομικές μεταβολές που έχουν προκληθεί στο επεξεργασμένο ένζυμο με χρήση φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού (CD). Η ανάλυση των φασμάτων της ανεπεξέργαστης PepX στο άπω υπεριώδες αποκάλυψε ότι το 34.8% της δευτεροταγούς δομής της PepX αποτελείται από δομή α-έλικας, ενώ το 14.4% από β-πτυχωτά φύλλα και β-στροφές. Το φάσμα που λήφθηκε στο άπω υπεριώδες έδειξε πολύ μικρές δομικές μεταβολές στη δευτεροταγή δομή μετά από επεξεργασία της PepX στα 200 MPa σε αντίθεση με επεξεργασία του ενζύμου στα 450 MPa όπου παρατηρήθηκαν σημαντικές μη αντιστρεπτές μεταβολές της δευτεροταγούς του δομής.

Το φάσμα στο εγγύς υπεριώδες έδειξε σημαντικές μη αντιστρεπτές μεταβολές της τριτοταγούς δομής του ενζύμου για πιέσεις επεξεργασίας υψηλότερες των 100 MPa. Συμπερασματικά θα μπορούσε να διατυπωθεί ότι, μετά από επεξεργασία σε πίεση 200 MPa το ένζυμο φάνηκε να διατηρεί τη δευτεροταγή του δομή σε αντίθεση με την τριτοταγή του δομή, οδηγώντας πιθανώς το ένζυμο σε μία δομική

κατάσταση ευνοϊκή για τη δραστηριότητά του. Αύξηση της πίεσης επεξεργασίας (450 MPa) οδήγησε σε μη αντιστρεπτή μεταβολή της δευτεροταγούς και τριτοταγούς δομής του ενζύμου με αποτέλεσμα την ύπαρξη μιας μετουσιωμένης κατάστασης.

Η αξιολόγηση της επίδρασης της ΥΠ στο φορτίο και στην ικανότητα οξίνισης των καλλιεργείων εκκίνησης, είχε ως στόχο την προσθήκη κατά την τυροκόμηση οξυγαλακτικών καλλιεργείων με μειωμένη ικανότητα οξίνισης οι οποίες θα λειτουργούν ως φορείς ενζύμων σημαντικών για την ωρίμανση του συγκεκριμένου τύπου τυριού. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε μελέτη της μεταβολής του φορτίου και της ικανότητας οξίνισης των καλλιεργείων των συγκεκριμένων στελεχών *L. lactis*, *L. bulgaricus* και *S. thermophilus* καθώς και μείγματός τους σε αναλογία 2:1:1, μετά από επεξεργασία τους με ΥΠ στο εύρος πιέσεων 0.1-450 MPa σε συνδυασμό με θερμοκρασίες 20-40°C και για χρόνους επεξεργασίας 0-40 min. Το φορτίο των κυττάρων εξαρτήθηκε από τις συνθήκες επεξεργασίας με εντονότερες συνθήκες επεξεργασίας να οδηγούν σε μικρότερο αριθμό κυττάρων. Η επεξεργασία με ΥΠ οδήγησε σε μείωση του ρυθμού οξίνισης των τριών στελεχών, η οποία διαφοροποιήθηκε με τις συνθήκες επεξεργασίας. Εντονότερες συνθήκες επεξεργασίας οδήγησαν σε εντονότερη μείωση της ικανότητας οξίνισης των στελεχών. Σε συνθήκες επεξεργασίας 200 MPa, 20°C, 20 min η οξυπαραγωγική ικανότητα των στελεχών των *L. bulgaricus*, *S. thermophilus*, *L. lactis* καθώς και του μείγματός τους, μειώθηκε κατά 30.3, 44.8, 45.4% και 34.6%, αντίστοιχα. Συνδυάζοντας τα συγκεκριμένα αποτελέσματα της απενεργοποίησης των μικροοργανισμών εκκίνησης και της μείωσης της ικανότητας οξίνισής τους με τα αποτελέσματα της μεταβολής της δραστηριότητας των ενδοκυτταρικών αμινοπεπτιδασών τους, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι οι προεπιλεγθείσες βέλτιστες συνθήκες 200 MPa στους 20°C για χρόνο μεγαλύτερο από 10 min (20 min), επαρκούν για μείωση της ικανότητας οξίνισης κατά τουλάχιστον 30% με μη σημαντική ταυτόχρονη λύση των κυττάρων (<13% της αρχικής χλωρίδας).

Από τα αποτελέσματα της διατριβής όπως αναφέρθηκαν παραπάνω, προκύπτει το συμπέρασμα ότι η ΥΠ επιπλέον της ικανότητας να αυξάνει τη δραστηριότητα αμινοπεπτιδασών οξυγαλακτικών καλλιεργείων εκκίνησης, οδηγεί σε σημαντική μείωση της ικανότητας οξίνισης των καλλιεργείων, χωρίς όμως σημαντική κυτταρική απενεργοποίηση (διάρρηξη κυτταρικών μεμβρανών) που θα οδηγούσε σε διάχυση των ενδοκυτταρικών αμινοπεπτιδασών στο έξω σύστημα. Με βάση την παρατήρηση αυτή, είναι δυνατή η χρήση μεγαλύτερης ποσότητας καλλιέργειας εκκίνησης κατά την παρασκευή του τυριού, προσφέροντας μεγαλύτερη συγκέντρωση ενζύμων (αμινοπεπτιδασών), χωρίς ταυτόχρονα το σημαντικό πρόβλημα της έντονης οξίνισης (τα επεξεργασμένα με ΥΠ στελέχη έχουν μειωμένη ικανότητα οξίνισης) όπως στην περίπτωση προσθήκης μεγαλύτερης ποσότητας ανεπεξέργαστης καλλιέργειας.

Η εφαρμογή των αποτελεσμάτων της έρευνας στην παρασκευή λευκού τυριού άλμης τύπου Φέτας κρίθηκε απαραίτητη για την αξιολόγηση της επίδρασης της ΥΠ στα μικροβιολογικά, φυσικοχημικά, δομικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του συγκεκριμένου τύπου τυριού και τη διερεύνηση της πιθανής συμβολής της έρευνας στη βιομηχανία παρασκευής τυριού. Αντικείμενο του τελευταίου τμήματος της διατριβής αποτέλεσε α) η μελέτη της επίδρασης της προσθήκης επεξεργασμένης με ΥΠ (200 MPa, 20°C, 20 min) καλλιέργειας εκκίνησης *Lactococcus lactis* ACA-DC 0049: *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0022: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 0105, 2:1:1 κατά την τυροκόμηση λευκού τυριού άλμης τύπου Φέτας, β) η μελέτη της επίδρασης της προσθήκης της παραπάνω επεξεργασμένης με ΥΠ καλλιέργειας εκκίνησης κατά την τυροκόμηση ως συμπληρωματικής της μη επεξεργασμένης αντίστοιχης καλλιέργειας, καθώς και γ) η μελέτη της επίδρασης της επεξεργασίας με ΥΠ (200 MPa, 20°C, 20 min) του ίδιου του τυριού. Δείγματα αναφοράς (Control) μελετήθηκαν

παράλληλα. Η προσθήκη κατά την τυροκόμηση επεξεργασμένων με ΥΠ καλλιεργείων εκκίνησης στις συγκεκριμένες συνθήκες, οδήγησε σε αύξηση τη πρωτεόλυσης κατά το 2^ο στάδιο της ωρίμανσης του τυριού όπως φάνηκε από τα αυξημένα επίπεδα του υδατοδιαλυτού αζώτου σε 12% τριχλωροξικό οξύ και 5% φωσφοροβολφραμικό οξύ καθώς και από την ανάλυση των πεπτιδίων των εκχυλισμάτων τυριού. Επιπλέον, η ανάλυση πεπτιδίων έδειξε ότι η επεξεργασία με ΥΠ είτε της καλλιέργειας, είτε του ίδιου του τυριού, ευνόησε τη μείωση των υδρόφοβων ή/και μεγάλου μεγέθους πεπτιδίων. Η βαθμολογία της οργανοληπτικής αξιολόγησης των συγκεκριμένων τυριών εμφανίστηκε υψηλότερη κατά τη διάρκεια του 2^{ου} σταδίου ωρίμανσης συγκριτικά με τυρί το οποίο δεν είχε υποστεί κανενός είδους επεξεργασία (τυρί αναφοράς). Τα τυριά, τα οποία παρήχθησαν με προσθήκη καλλιέργειας εκκίνησης επεξεργασμένης με ΥΠ, εμφάνισαν υψηλότερες βαθμολογίες κατά τον οργανοληπτικό έλεγχο αναφορικά με την εμφάνιση-χρώμα, την υφή-δομή και την οσμή-γεύση. Στα συγκεκριμένα τυριά δεν ανιχνεύτηκε πικρή γεύση ενώ εμφάνισαν τις υψηλότερες βαθμολογίες σχετικά με το επίπεδο ωρίμανσής τους μετά από αξιολόγηση στις 30 ημέρες του δευτέρου σταδίου ωρίμανσης, το οποίο αντιστοιχούσε στο συγκεκριμένο χρόνο σε επίπεδο του συμβατικού τυριού μετά από 3 μήνες ωρίμανσης. Στο επεξεργασμένο με ΥΠ τυρί αν και προσδιορίστηκαν οι υψηλότερες δραστηριότητες των αμινοπεπτιδασών PepX και APep και η εξέλιξη της πρωτεόλυσής του βάσει των αζωτούχων ενώσεων και της ανάλυσης των πεπτιδίων φάνηκε αντίστοιχη των τυριών που παρασκευάστηκαν με μέρος επεξεργασμένης με ΥΠ καλλιέργειας, αυτό δε συμβάδισε με τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής αξιολόγησης των συγκεκριμένων δειγμάτων.

Λαμβάνοντας υπόψη την αξιολόγηση του κόστους που επιφέρει η ένταξη της ΥΠ ως στάδιο παρασκευής τυριού άλμης τύπου Φέτας, το κόστος ανέρχεται σε 0.012 €/kg στην περίπτωση επεξεργασίας μέρους της καλλιέργειας εκκίνησης, 0.014 €/kg στην περίπτωση πλήρους επεξεργασίας της προστιθέμενης καλλιέργειας εκκίνησης και σε 0.120 €/kg στην περίπτωση επεξεργασίας του τυριού. Το κόστος αυτό αναμένεται να υπερκαλυφθεί από τη μείωση του χρόνου ωρίμανσης και τη μείωση του πάγιου κόστους που αυτό αποφέρει.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν η προσθήκη επεξεργασμένης με ΥΠ καλλιέργειας εκκίνησης μπορεί να συντελέσει στην παρασκευή τυριού βελτιωμένων χαρακτηριστικών και να επιφέρει επιτάχυνση του σταδίου της πρωτεόλυσης και κατ'έπекταση επιτάχυνση της ωρίμανσης λευκού τυριού άλμης τύπου Φέτας, με αποτέλεσμα τη μείωση του κόστους της βιομηχανίας παρασκευής τυριού άλμης τύπου Φέτας και την απόδοση στον καταναλωτή ενός ποιοτικότερου προϊόντος.

ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Όπως έχει γίνει αντιληπτό, η εφαρμογή της ΥΠ μπορεί να επιφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα τόσο στη βιομηχανία παρασκευής τυριού όσο και στο καταναλωτικό κοινό. Επιπρόσθετα σημαντική προϋπόθεση για την εφαρμογή της ΥΠ στη βιομηχανία αποτελεί ο ακριβής σχεδιασμός της διεργασίας προς μείωση του μεγέθους των σφαλμάτων. Για το λόγο αυτό απαιτείται βελτίωση των συστημάτων ελέγχου πίεσης και θερμοκρασίας και δυνατότητα καταγραφής και ελέγχου της θερμοκρασίας του τροφίμου.

Ενδιαφέρον θα είχε η μελέτη της επίδρασης της ΥΠ στα γλυκολυτικά ένζυμα των οξυγαλακτικών καλλιεργείων που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή και η συσχέτιση των αποτελεσμάτων με εκείνα του προσδιορισμού της ικανότητας οξίνισης των στελεχών.

Επίσης μεγάλο ενδιαφέρον θα είχε η διερεύνηση της επίδρασης της ΥΠ στις ενθυλακωμένες πρωτεϊνάσες στην κυτταρική μεμβράνη των οξυγαλακτικών βακτηρίων για τις οποίες υπάρχουν ελάχιστες αναφορές καθώς και σε ενδοκυτταρικά ένζυμα άλλων οξυγαλακτικών καλλιεργείων τα οποία συνεισφέρουν στη

διαδικασία ωρίμανσης διαφόρων τύπων τυριών. Επιπρόσθετα, σημαντική κρίνεται η μελέτη της επίδρασης της ΥΠ στη χυμοσίνη η οποία έχει σημαντικό ρόλο στην παρασκευή και ωρίμανση των τυριών, η παρασκευή τυριού με επεξεργασμένη με ΥΠ χυμοσίνη και η μελέτη της εξέλιξης της πρωτεόλυσης και των χαρακτηριστικών του τυριού.

Τέλος θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί αντίστοιχη μελέτη με χρήση άλλων νέων τεχνολογιών όπως είναι τα παλλόμενα ηλεκτρικά πεδία. Για την επίδραση της συγκεκριμένης τεχνολογίας σε τυρί καθώς και σε ένζυμα τυριού, η γνώση βάσει της διεθνούς βιβλιογραφίας είναι περιορισμένη.

ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ**ΣΥΜΒΟΛΑ**

A	δραστικότητα ενζύμου σε χρόνο t ($\mu\text{eq H}^+ \text{min}^{-1} \text{mL}^{-1}$)
A_o	αρχική δραστικότητα ενζύμου (χρόνος μηδέν της επεξεργασίας) ($\mu\text{eq H}^+ \text{min}^{-1} \text{mL}^{-1}$)
E_a	ενέργεια ενεργοποίησης (kJ/mol)
$E_{a_{\text{ref}}}$	ενέργεια ενεργοποίησης σε P_{ref} (kJ/mol)
k	σταθερά του ρυθμού μεταβολής ευπαθούς παράγοντα (ενεργοποίησης/απενεργοποίησης ενζύμου) (min^{-1})
k_{ref}	σταθερά του ρυθμού ενεργοποίησης/απενεργοποίησης σε πίεση ή θερμοκρασία αναφοράς (min^{-1})
k_P	σταθερά του ρυθμού ενεργοποίησης/απενεργοποίησης σε πίεση P (min^{-1})
k_T	σταθερά του ρυθμού ενεργοποίησης/απενεργοποίησης σε θερμοκρασία T (min^{-1})
L	φωτεινότητα
a	παράμετρος χρώματος
b	παράμετρος χρώματος
ΔE	ολική μεταβολή χρώματος
n	τάξη αντίδρασης
P	πίεση (MPa)
pI	ισοηλεκτρικό σημείο
P_{ref}	πίεση αναφοράς (MPa)
R	παγκόσμια σταθερά των αερίων (8.314 J/mol K)
T	θερμοκρασία ($^{\circ}\text{C}$)
t	χρόνος (min)
T_{ref}	θερμοκρασία αναφοράς ($^{\circ}\text{C}$)
U	Unit
V_a	όγκος ενεργοποίησης (mL/mol)
$V_{a_{\text{ref}}}$	όγκος ενεργοποίησης σε T_{ref} (mL/mol)
V_o	όγκος δοχείου (L)
A	σταθερά που εκφράζει την επίδραση της πίεσης στον V_a ($\text{mL} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)
B	σταθερά που εκφράζει την επίδραση της θερμοκρασίας στην E_a (MPa^{-1})

ΔΕΙΚΤΕΣ

- o αρχική συνθήκη
 ref συνθήκη αναφοράς

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

- CD κυκλικός διχρωσμός
 CDNN λογισμικό που αναπτύχθηκε από το Institut für Biotechnologie, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg και προσδιορίζει το ποσοστό (%) του κάθε επιμέρους τύπου δευτεροταγούς δομής ως προς τη συνολική
 CFU μικροβιακός πληθυσμός (colony forming units)
 FAO Οργανισμός τροφίμων και Γεωργίας
 IDF Διεθνής Ομοσπονδία Γάλακτος
 LAP Λεύκιν-αμινοπεπτιδάσες
 CEP πρωτεΐνάσες ενθυλακωμένες στην κυτταρική μεμβράνη
 p-NA παρα-νιτροανιλιδίνη
 Rt χρόνος ωρίμανσης
 FDM λιπαρά επί ξηρής βάσης
 S/M αλάτι επί της υγρασίας
 CN καζεΐνη
 ACN ακετονιτρίλιο
 Pep πεπτιδάση
 APep αμινοπεπτιδάση
 TP ολικές πρωτεΐνες
 TN ολικό άζωτο
 WSN υδατοδιαλυτό άζωτο
 TCA τριγλωροξικό οξύ
 TCA-SN κλάσμα αζώτου διαλυτό σε 12% τριγλωροξικό οξύ
 PTA φωσφοροβολφραμικό οξύ
 PTA-SN άζωτο διαλυτό σε φωσφοροβολφραμικό οξύ
 ΥΠ Υπερυψηλή Υδροστατική Πίεση
 ΧΠΠ χρόνος πήξης με πυτιά
 ΑΚΣ ανάλυση κυρίων συνιστωσών