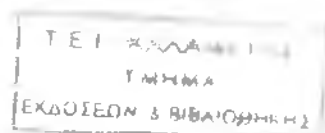


**ΑΝΩΤΑΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ
ΙΔΡΥΜΑ (Α.Τ.Ε.Ι.) ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:

**«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΜΟΝΟΦΑΣΙΚΗΣ
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΙΚΟΥ
ΠΕΔΙΟΥ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ
ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ»**



ΣΠΟΥΔΑΣΤΗΣ: ΜΑΡΙΝΟΣ ΤΣΕΤΣΕΝΕΚΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΙΩΑΝΝΗΣ ΚΑΠΟΛΟΣ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2011

Περιεχόμενα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1. Το γάλα.....	4
1.1 Φυσικοχημικές & Φυσικές ιδιότητες του γάλακτος.....	5
1.2 Θρεπτική αξία του γάλακτος.....	6
1.3 Υποκατάστατα του γάλακτος.....	7
1.4 Προϊόντα του γάλακτος.....	7
1.5 Είδη του γάλακτος.....	11
1.6 Συστατικά του γάλακτος.....	13
1.7 Πρωτεΐνες του γάλακτος.....	16
1.8 Επεξεργασία γάλακτος.....	17

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2. Γενική περιγραφή του Συστήματος Μονοφασικής Χρωματογραφίας Φυγοκεντρικού πεδίου.....	20
2.1 Γενικά.....	20
2.2 Γενικές Αρχές της Μ.Χ.Π.....	22
2.3 Γενικές Αρχές της Μ.Χ.Φ.Π.....	23
2.4 Στερική Μ.Χ.Π.....	25

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3. Μ.Χ.Φ.Π: Χαρακτηρισμός μεγέθους συστατικών τροφίμων.....	28
3.1 Υλικά & μέθοδοι.....	28
3.1.1 Όργανα που χρησιμοποιήθηκαν.....	28
3.1.2 Πρότυπα πολυστερίνης.....	28
3.1.3 Δείγματα γάλακτος.....	29
3.2 Αποτελέσματα.....	29
3.2.1 Βαθμονόμηση της στήλης της Μ.Χ.Φ.Π.....	29
3.2.2 Πληροφορίες μεγέθους σωματιδίων των δειγμάτων γάλακτος.....	30
3.3 Συμπέρασμα.....	35

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

4. Το μέγεθος των σωματιδίων & η σταθερότητα του U.H.T γάλακτος αγελαδινού, σιτηρών & δημητριακών.....	36
4.1 Εισαγωγή.....	36
4.2 Υλικά & μέθοδοι.....	37
4.3 Αποτελέσματα.....	39
4.4 Συζήτηση.....	44
4.5 Συμπέρασμα.....	45

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

5. Χαρακτηρισμός μεγέθους λιποσφαιριδίων θερμικά επεξεργασμένου αγελαδινού γάλακτος με τη Μ.Χ.Φ.Π.....	47
5.1 Εισαγωγή.....	47
5.2 Υλικά & μέθοδοι.....	47
5.3 Αποτελέσματα & Συζήτηση.....	47
5.4 Συμπέρασμα.....	57

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

6. Χρήση Μ.Χ.Φ.Π & PCS για χαρακτηρισμό μικυλλίων καζεΐνης.....	58
6.1 Εισαγωγή.....	58
6.2 Υλικά & μέθοδοι.....	59
6.3 Αποτελέσματα.....	59
6.4 Συζήτηση.....	62

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

7. Η προσρόφηση των πρωτεΐνων του γάλακτος σε λατέξ πολυστερίνης. Μια μελέτη που βασίζεται στη Μ.Χ.Φ.Π & στη dynamic light scattering.....	64
7.1 Υλικά & μέθοδοι.....	64
7.2 Αποτελέσματα.....	66
7.3 Συμπεράσματα.....	70

Βιβλιογραφία.....	71
--------------------------	-----------

1. Το Γάλα

Το γάλα είναι μία πλούσια υψηλής θρεπτικής αξίας τροφή. Περιέχει πολλά θρεπτικά συστατικά, μερικά από τα οποία είναι τόσο σπάνια, ώστε δεν υπάρχουν πουθενά στη φύση. Δεν είναι τυχαίο λοιπόν, ότι το γάλα έχει σαν προορισμό να χρησιμεύει ως πρώτη, αλλά και μοναδική, τροφή για το νεογέννητο. Η μεγάλη θρεπτική του αξία οφείλεται όχι μόνο στις πρωτεΐνες, αλλά και σε άλλες θρεπτικές ύλες, όπως είναι το ασβέστιο, ο φώσφορος, διάφορες βιταμίνες, υδατάνθρακες και πολλά άλλα ακόμα συστατικά [1,2].

Το γάλα είναι η χαρακτηριστική έκκριση του μαστού των θηλαστικών ζώων και προορίζεται από τη φύση να αποτελέσει τη μοναδική τροφή των νεογνών τους στα πρώτα στάδια της ζωής τους. Καθένα από τα περισσότερα από 4.000 είδη θηλαστικών παράγει γάλα με χημική σύσταση προσαρμοσμένη στις διατροφικές ανάγκες του νεογνού του. Ο άνθρωπος, εκτός από το μητρικό γάλα που χρησιμοποιεί κατά τους πρώτους μήνες της ζωής του, χρησιμοποιεί και το γάλα άλλων θηλαστικών και μάλιστα σε όλες τις ηλικίες του. Τα πρώτα ζώα που εξημέρωσε για το σκοπό αυτό, 8.000-10.000 χρόνια πριν, ήταν πιθανόν τα πρόβατα και οι αίγες. Κατόπιν εξημερώθηκαν τα βοοειδή, τα οποία είναι σήμερα τα κύρια γαλακτοπαραγωγικά ζώα στον πλανήτη [3].

Σύμφωνα με τον Codex Alimentarius του FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), ως γάλα ορίζεται η φυσιολογική έκκριση του μαστού που λαμβάνεται από μία ή περισσότερες αμέλξεις, χωρίς καμία προσθήκη ή αφαίρεση, η οποία προορίζεται να καταναλωθεί ως πόσιμο γάλα ή για περαιτέρω επεξεργασία [2].

Σύμφωνα με τον Ελληνικό Κώδικα Τροφίμων και Ποτών, γάλα είναι το απαλλαγμένο από πρωτόγαλα προϊόν που προέρχεται από την ολοσχερή και χωρίς διακοπή άμελξη γαλακτοφόρου ζώου, το οποίο είναι υγιές και ζει και διατρέφεται κάτω από υγιεινές συνθήκες. Επιπλέον περιέχει τουλάχιστον 3,15% λίπος και 8,25% στερεά συστατικά χωρίς λίπος [4].

Ακόμα, με τον όρο «γάλα» νοείται το αγελαδινό, νωπό, πλήρες γάλα, που δεν έχει υποστεί αφυδάτωση ή συμπύκνωση και δεν περιέχει άλλες ουσίες που έχουν προστεθεί από έξω. Εφόσον το γάλα δεν προέρχεται από αγελάδα θα πρέπει να αναφέρεται αν είναι **κατσίκας, προβάτου, ή ανάμικτο προβάτου- κατσίκας** [5].

Η παραγωγή γάλακτος στα 15 κράτη μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης από το 1990 και έπειτα παραμένει σταθερή σε επίπεδα που κυμαίνονται γύρω στους 155 εκατομμύρια τόνους. Ο κύριος όγκος της παραγωγής, περίπου το 90%, απορροφάται από τις γαλακτοβιομηχανίες. Η παραγωγή προϊόντων που διατηρούνται για μικρό χρονικό διάστημα, όπως παστεριωμένο γάλα, γιαούρτι, κρέμα γάλακτος κ.ά. αποτελούν περίπου το 25% του συνόλου του γάλακτος, τα προϊόντα που μπορούν να διατηρηθούν, όπως τυριά σκληρά και ημίσκληρα περίπου το 24%, βούτυρο περίπου 34%, συμπυκνωμένο γάλα περίπου 4% και σκόνη γάλακτος περίπου το 5%. Η αυτοκατανάλωση υπολογίζεται ότι δεν υπερβαίνει σε ποσοστό το 3% του συνόλου. Ο κύριος όγκος της παραγωγής γάλακτος στην Ευρωπαϊκή Ένωση αναφέρεται σε αγελαδινό γάλα. Το αιγοπρόβειο γάλα παράγεται κυρίως στην Ελλάδα και πλησιάζει τους 1.200.000 τόνους. Η παραγωγή όλων των ειδών γάλακτος στη χώρα μας είναι περίπου 1.900.000 τόνοι, ενώ η παραγωγή φέτας και άλλων μαλακών τυριών είναι περίπου 154.000 τόνοι. Η συνολική κατανάλωση γάλακτος είναι περίπου 600.000 τόνοι από τους οποίους το 57% καταναλώνεται ως παστεριωμένο, ενώ η κατανάλωση τυριών διαφόρων κατηγοριών είναι 230.000 τόνοι [5].

1.1 Φυσικές και φυσικοχημικές ιδιότητες του γάλακτος

Το γάλα είναι ένα λευκό ή λευκοκίτρινο, θολό υγρό.

1. Χρώμα: Το χρώμα του γάλακτος επηρεάζεται από τη σκέδαση και απορρόφηση του φωτός από τα λιποσφαιρίδια και τα μικκύλια των πρωτεϊνών. Μία κιτρινωπή χροιά οφείλεται στα καροτένια που βρίσκονται στη λιπαρή φάση και προέρχονται από τη βοσκή.

2. Γεύση: Το γάλα, όταν προέρχεται από υγιή ζώα, έχει γεύση ευχάριστη και ελαφρώς υπόγλυκη λόγω της λακτόζης. Προς το τέλος της γαλακτικής περιόδου ή σε περίπτωση που το ζώο έχει προσβληθεί από μαστίτιδα η περιεκτικότητα του γάλακτος σε λακτόζη μειώνεται, ενώ αυξάνεται η συγκέντρωση των αλάτων που περιέχει. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, η γεύση του γάλακτος να γίνεται υφάλμυρη.

3. Πυκνότητα και ειδικό βάρος: Η πυκνότητα του γάλακτος κυμαίνεται μεταξύ 1,029-1,039 g/mL στους 15 βαθμούς κελσίου. Το ειδικό βάρος του γάλακτος είναι το βάρος ανά μονάδα όγκου αυτού (ενός ml ή ενός λίτρου) και διαμορφώνεται από το ειδικό βάρος των επιμέρους συστατικών του. Το ειδικό βάρος του γάλακτος

επιηρεάζεται από την περιεκτικότητα σε στερεά συστατικά, το βαθμό ενυδάτωσης των πρωτεϊνών του, τη θερμοκρασία και τη σχέση υγρού προς στερεό λίπος.

4. Σημείο πήξης: Το σημείο πήξεως του γάλακτος κυμαίνεται μεταξύ -0,53 έως -0,55 βαθμούς κελσίου. Αποτελεί μια μάλλον σταθερή τιμή για τον έλεγχο νοθείας του γάλακτος με νερό.

5. Σημείο ζέσεως: Το γάλα βράζει στους 100,15- 100,17 βαθμούς κελσίου και αυτό οφείλεται στα υδατοδιαλυτά συστατικά του.

6. Οξύτητα και pH: Το pH του φρέσκου γάλακτος είναι 6,5-6,75. Το γάλα κατά τη διάρκεια του αρμέγματος είναι ελαφρά όξινο, λόγω της καζεΐνης, της αλβουμίνης, των φωσφορικών και κιτρικών ενώσεων και του CO₂ που περιέχει. Η οξύτητα αυτή καλείται αρχική οξύτητα.

7. Ο δείκτης διάθλασης και η ειδική αγωγιμότητα: Ο δείκτης διάθλασης του γάλακτος είναι 1,3410-1,3480, και η ειδική αγωγιμότητα είναι $4-5,5 \times 10^{-3} \text{ ohm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [3,6].

1.2 Θρεπτική αξία του γάλακτος

Το γάλα, όπως αναφέρθηκε, προορίζεται να θρέψει τα νεογνά των θηλαστικών που το παράγουν. Για αυτό τον λόγο περιέχει όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά, που το καθιστούν μια πλήρης τροφή που η σύνθεσή της είναι προσαρμοσμένη στις ανάγκες κάθε είδους. Αποτελεί πλούσια πηγή υψηλής βιολογικής αξίας πρωτεϊνών, βιταμινών κυρίως ριβοφλαβίνης και απαραίτητων για τον οργανισμό στοιχείων όπως Ca, P κ.α. Ειδικότερα η πρωτεΐνη του γάλακτος θεωρείται η δεύτερη σε βιολογική αξία μετά την πρωτεΐνη των αυγών και βαθμολογούνται με 0,9 σε σχέση με τις πρωτεΐνες του αυγού που βαθμολογούνται με 1. Οι πρωτεΐνες του γάλακτος παρουσιάζουν μια υστέρηση σε θειούχα αμινοξέα, όπως μεθειονίνη, κυστεΐνη, σε μεγαλύτερο βαθμό στην καζεΐνη παρά στις πρωτεΐνες του τυρογάλακτος. Ένα μεγάλο όμως μέρος του πληθυσμού της Ασίας και Αφρικής και μικρότερο της Αμερικής και Ευρώπης παρουσιάζουν δυσανεξία στο γάλα (lactose intolerance), λόγω ελαττωμένης παραγωγής του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση (λακτάση), απαραίτητου για την πέψη του γάλακτος. Συμπτώματα της δυσανεξίας είναι το φούσκωμα (λόγω παραγωγής CO₂ από διάφορους μικροοργανισμούς), διάρροια, πόνοι στην κοιλιά [6,7].

1.3 Υποκατάστατα γάλακτος (Imitation milk)

Στις αγορές ασιατικών και άλλων χωρών κυκλοφορούν υποκατάστατα (απομιμήσεις) γάλακτος, που μοιάζουν με το γάλα (**imitation milks**) αλλά δεν περιέχουν λίπος γάλακτος, ούτε άλλα συστατικά προερχόμενα από γάλα. Άλλωστε η τιμή του λίπους του γάλακτος (βούτυρο, κρέμα γάλακτος) είναι αρκετά υψηλή και για αυτό το λόγο η παραγωγή και εμπορία των μαργαρινών είναι πολύ διαδεδομένη. Τα υποκατάστατα γάλακτος παρασκευάζονται από παράγωγα καζεΐνης ή πρωτεΐνη σόγιας, φυτικές λιπαρές ύλες και ενισχύονται με βιταμίνες. Έχουν διατροφική αξία και προσφέρονται σε χαμηλότερη τιμή απ' ότι το φυσικό γάλα [6].

1.4 Προϊόντα γάλακτος

1. Κρέμα Γάλακτος: Το λίπος του γάλακτος μπορεί να διαχωριστεί και να χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή διαφόρων προϊόντων. Η εργασία παραλαβής του λίπους ή κρέμας ή κορυφής του γάλακτος λέγεται **αποκορύφωση**. Στο παρελθόν γινόταν με φυσικό τρόπο, αφήναν, δηλαδή, το γάλα σε ηρεμία για αρκετές ώρες και το λίπος, επειδή είναι ελαφρότερο από τα άλλα συστατικά ανέβαινε στην κορυφή και το παρελάμβαναν. Σήμερα, γίνεται με τη βοήθεια ειδικών φυγοκεντρικών διαχωριστήρων (κορυφολόγων). Η κρέμα που παραλαμβάνεται παστεριώνεται ή αποστειρώνεται, συσκευάζεται και διακινείται κατά τρόπο ανάλογο με το γάλα.

Η κρέμα γάλακτος ή αφρόγαλα ή ανθόγαλα ή καϊμάκι που προσφέρεται για κατανάλωση διακρίνεται σε διάφορους τύπους ανάλογα με την περιεκτικότητα της σε λίπος. Οι συνηθισμένοι τύποι περιέχουν λίπος τουλάχιστον α) 10%, β) 25%, γ) 40% [5].

2. Βούτυρο: Το βούτυρο παράγεται από την κρέμα γάλακτος με τη διαδικασία της αποβουτύρωσης ή βουτυροποίησης. Η βουτυροποίηση γίνεται με την τοποθέτηση της κρέμας σε ειδικούς κάδους (βουτυροκάδους) ή σε βουτυροποιητικές μηχανές συνεχούς παραγωγής βουτύρου. Η κρέμα κτυπιέται, σπάνε τα λιποσφαίρια, ενώνονται μεταξύ τους και έτσι δημιουργείται το βούτυρο με ταυτόχρονη αποβολή νερού (βουτυρόγαλα). Έτσι, από την κρέμα που είναι γαλάκτωμα λίπους σε νερό, προκύπτει το βούτυρο που είναι γαλάκτωμα νερού σε λίπος.

Το βούτυρο που έχει παραληφθεί αποκλειστικά και μόνο με τον τρόπο που αναφέρθηκε παραπάνω, χαρακτηρίζεται ως **νωπό βούτυρο**. Η σύσταση του βουτύρου είναι 80-82% λίπος, 0,5-2% άλλα μη λιπαρά συστατικά και 15-18% νερό.

Το νωπό βούτυρο συσκευάζεται με τη βοήθεια ειδικών μηχανών. Τα υλικά συσκευασίας που χρησιμοποιούνται είναι συνήθως το αλουμίνιο σε φύλλα, αδιάβροχο χαρτί με εσωτερική επένδυση πλαστικού φιλμ ή πλαστικό. Αν στη συσκευασία δεν αναφέρεται το είδος του ζώου από το οποίο προέρχεται το γάλα, το βούτυρο θεωρείται αγελάδας. Το βούτυρο θεωρείται ευαλλοίωτο προϊόν και πρέπει να συντηρείται σε ψυγείο [5].

3. Γιαούρτι: Το γιαούρτι είναι ένα ημιστέρεο ζυμώμενο προϊόν γάλακτος. Παρασκευάζεται από νωπό γάλα, κυρίως αγελάδας ή πρόβειο, το οποίο πήζει με την επίδραση οξυγαλακτικών καλλιεργιών. Οι βασικοί μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή του γιαουρτιού είναι ο *Lactobacillus vulgaricus* και *Streptococcus thermophilus*.

Το γάλα που προορίζεται για την παρασκευή γιαουρτιού θερμαίνεται στους 85-90 °C για 30-50 λεπτά της ώρας. Στη συνέχεια ψύχεται σε θερμοκρασία 42-45 °C και προστίθεται η οξυγαλακτική καλλιέργεια (0,5-3% της ποσότητας του γάλακτος). Μετά την προσθήκη της καλλιέργειας, το γάλα αναμιγνύεται καλά και επωάζεται για 2-3 ώρες. Οι μικροοργανισμοί προκαλούν ζύμωση της λακτόζης και παράγουν γαλακτικό οξύ με συνέπεια να μειωθεί το pH του γάλακτος σε τιμές κάτω από το 4,6. Στο όξινο αυτό περιβάλλον αρχίζει συσσωμάτωση (ιζηματοποίηση) της καζεΐνης του γάλακτος και η δημιουργία έτσι ενός πήγματος που παγιδεύει το νερό και τα υπόλοιπα συστατικά.

Οι διάφοροι τύποι γιαουρτιού που κυκλοφορούν στην αγορά διαφοροποιούνται κατά κύριο λόγο από την περιεκτικότητά τους σε λίπος, την υφή, τον τρόπο παρασκευής, την περιεκτικότητά τους σε πρόσθετα υλικά όπως φρούτα κλπ. Οι κυριότεροι τύποι γιαουρτιού που κυκλοφορούν στη χώρα μας είναι οι εξής: παραδοσιακό γιαούρτι, βιομηχανικό γιαούρτι παραδοσιακού τύπου, συνεκτικό γιαούρτι φυσικό ή με φρούτα, αναμιγμένο γιαούρτι με ή χωρίς φρούτα, στραγγισμένο γιαούρτι σακούλας ή φυγοκέντρισης ή υπερδιήθησης [5,7].

4. Τυριά: Ως τυρί ορίζεται το προϊόν που λαμβάνεται από το πήγμα του γάλακτος αγελάδας ή και άλλων ζώων ή και μιγμάτων αυτών και το οποίο πήγμα λαμβάνεται

από την πήξη της καζεΐνης με ενζυμική δράση (συνήθως ρεννίνη), ή με οξύ (συνήθως γαλακτικό οξύ), ή συνδυασμό αυτών και με ή χωρίς περαιτέρω επεξεργασία του πήγματος με θερμότητα, πίεση, αλάτιση και ωρίμανση (ζύμωση) με επιλεγμένους μικροοργανισμούς. Η παρασκευή του τυριού περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- Προκατεργασία του γάλακτος: Το γάλα πρέπει να διηθηθεί και να στανταριστεί (τυποποιηθεί). Παραδοσιακά η διήθηση γίνεται με ειδικά φίλτρα, ενώ στις σύγχρονες βιομηχανικές μονάδες χρησιμοποιούνται φυγοκεντρικές συσκευές. Αποτέλεσμα όλης αυτής της διαδικασίας είναι η απομάκρυνση των ξένων υλών. Ακολουθεί θερμική επεξεργασία (συνήθως παστερίωση) για την ελάττωση του μικροβιακού φορτίου. Ομογενοποίηση δεν πραγματοποιείται διότι αυξάνει ο αριθμός των λιποσφαιριδίων ελαττούμενου μεγέθους, και έτσι αυξάνει η συνολική τους επιφάνεια που προσροφούν τα μικκύλια καζεΐνης. Με την προσθήκη ρεννίνης το λαμβανόμενο πήγμα είναι πολύ ασθενές και η τάση για τάγγιση του λίπους μεγαλύτερη.

-Πρόσθετα: Ως πρόσθετα στο τυρί χρησιμοποιούνται το χλωριούχο ασβέστιο, νιτρικά, χρώμα, λιπάσες, υπεροξειδίο του υδρογόνου. Το CaCl_2 βοηθά στην πήξη και ελαττώνει το απαιτούμενο ποσό της ρεννίνης. Το KNO_3 ή NaNO_3 για να ελέγξει τα ανεπιθύμητα αποτελέσματα του *Clostridium tyrobutyricum* σε τυριά, όπως το edam, gouda, κ.α. Επειδή το χρώμα του γάλακτος ποικίλει από εποχή σε εποχή, μπορεί να προστεθεί χρώμα, όπως το Annato, β-καροτένιο και πάπρικα για να στανταρισθεί το χρώμα του τυριού. Το H_2O_2 χρησιμοποιείται εναλλακτικά αντί της παστερίωσης. Οι λιπάσες με την παστερίωση του γάλακτος απενεργοποιούνται. Προσθήκη λιπασών γίνεται όταν επιδιώκεται υδρόλυση των λιπών για τη λήψη της κατάλληλης γεύσης στο τυρί.

-Εμβολιασμός γάλακτος με γαλακτικά βακτήρια και ωρίμανση του: Τα γαλακτικά βακτήρια ζυμώνουν λακτόζη, παράγουν γαλακτικό οξύ που χαμηλώνει το pH. Το χαμήλωμα του pH βοηθά στην πήξη του γάλακτος, στη συνέρεση, εμποδίζει την ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων, και συνεισφέρει στη δομή και άρωμα του τυριού. Μετά τον εμβολιασμό του, το γάλα παραμένει για περίπου 1 ώρα στους $30\text{ }^\circ\text{C}$ για να αναπτυχθεί η απαιτούμενη οξύτητα (ωρίμανση γάλακτος).

-Πήξη: Η πήξη του γάλακτος είναι ο σχηματισμός του πηκτώματος που δημιουργείται από την σταθεροποίηση των μικκυλίων και την εν συνεχεία συσσωμάτωσή τους δεσμεύοντας λίπος και νερό. Η πήξη επιτυγχάνεται με α) ένζυμα (ρεννίνη ή χυμοσίνη), β) οξέα και γ) συνδυασμός θέρμανσης και οξίνισης.

-Επεξεργασία τυροπήγματος: Μετά την ολοκλήρωση της πήξης του γάλακτος, το τυρόπηγμα κόβεται σε κομμάτια προκειμένου να απομακρυνθεί η εγκλωβισμένη υγρασία και το τυρόπηγμα αρχίζει να συρρικνώνεται.

-Ωρίμανση τυριού: Το τεμαχισμένο πήγμα τοποθετείται σε άλμη ή αλατίζεται, και μετά αφήνεται να ωριμάσει. Η ωρίμανση εξαρτάται από τη σύνθεση του πήγματος, την υγρασία του, τους περιεχόμενους και προστιθέμενους μικροοργανισμούς και τις εξωτερικές συνθήκες του χώρου ωρίμανσης [5,6,7].

5. Παγωτό: Παγωτό είναι το προϊόν που παρασκευάζεται από γάλα στο οποίο προστίθεται λίπος, ζάχαρη, γλυκαντικές, αρωματικές, χρωστικές ουσίες, σταθεροποιητές, γαλακτωματοποιητές, καφές, κακάο ή σοκολάτα, μετά από ειδική επεξεργασία και κατάψυξη.

Ανάλογα με τον τύπο του παγωτού που πρόκειται να παρασκευαστεί, αναμιγνύονται τα διάφορα συστατικά σε συγκεκριμένες αναλογίες και το ρευστό μίγμα που δημιουργείται παστεριώνεται και ομογενοποιείται. Στη συνέχεια το μίγμα διατηρείται σε θερμοκρασία 4-5 °C για χρονικό διάστημα 6-24 ώρες. Η φάση αυτή χαρακτηρίζεται ως ωρίμανση του μίγματος. Μετά την ωρίμανση, το μίγμα καταψύχεται στους -5 έως -6 °C και παράλληλα αναδεύεται έντονα για να αποκτήσει όγκο. Μετά την έξοδο του μίγματος από τον καταψύκτη, συσκευάζεται με ταυτόχρονη προσθήκη φρούτων, ξηρών καρπών, σιροπιών ή άλλων συστατικών που επιτρέπει η νομοθεσία ανάλογα με τον επιδιωκόμενο τύπο παγωτού. Στη συνέχεια, το συσκευασμένο παγωτό καταψύχεται σε ειδικά τούνελ στους 40 °C και τέλος, συντηρείται σε ψυκτικούς θαλάμους θερμοκρασίας -20 °C έως -25 °C [5].

6. Ποτά ζυμωμένου γάλακτος: Με την χρήση μικτών καλλιιεργειών μικροοργανισμών παράγονται αεριούχα (CO₂) αλκοολούχα ποτά όπως kefir, kumiss. Η καλλιέργεια kefir αποτελείται από *Saccharomyces delbrueckii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torula*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Acetobacter aceti*, κ.α. και προκαλεί διάφορες ζυμώσεις στο γάλα και τυρόγαλα αποδίδοντας διάφορα προϊόντα, όπως αλκοόλη, γαλακτικό οξύ, CO₂, κ.α. Οι καλλιέργειες και τα ποτά kefir και kumiss είναι προϊόντα του Καυκάσου και Τουρκιστάν [6].

1.5 Είδη γάλακτος

Υπάρχουν πολλά είδη γάλακτος που χρησιμοποιεί ο άνθρωπος για τις διατροφικές του συνήθειες και χρήσεις, όπως:

α) Γάλα μακράς διάρκειας ή γάλα U. H. T.: Η προσπάθεια για μακρόχρονη συντήρηση του γάλακτος, οδήγησε στην παραγωγή αρχικά του αποστειρωμένου γάλακτος και στη συνέχεια ενός τύπου που χαρακτηρίστηκε ως γάλα μακράς διάρκειας (long life) ή γάλα UHT (Ultra High Temperature). Το γάλα UHT είναι αυτό που έχει παραχθεί με θέρμανση νεπού γάλακτος σε θερμοκρασία πάνω από 135 °C για ένα (1) τουλάχιστον δευτερόλεπτο, με σκοπό την καταστροφή όλων των μικροοργανισμών και των σπορίων τους, και έχει συσκευαστεί ασηπτικά σε αδιαφανή δοχεία. Το γάλα αυτό διατηρείται για μεγάλο χρονικό διάστημα (6 μήνες με 1 χρόνο), διαφέρει όμως από το παστεριωμένο, γιατί έχει υποστεί έντονη θέρμανση. Η μέθοδος UHT αλλοιώνει τη γεύση και μειώνει, σε σχέση με το παστεριωμένο, τις θρεπτικές ιδιότητες του γάλακτος [5].

β) Συμπυκνωμένο γάλα (γάλα εβαπορέ): Το γάλα εβαπορέ είναι ο πλέον διαδεδομένος τύπος συμπυκνωμένου γάλακτος. Προκύπτει από την συμπύκνωση κατά 2 φορές περίπου του νεπού γάλακτος. Το νεπό γάλα διηθείται, συμπυκνώνεται με θέρμανση στους 48-60 °C υπό κενό. Ενισχύεται με βιταμίνη D, ομογενοποιείται για να αποφευχθεί διαχωρισμός του λίπους (αποκορύφωση), ψύχεται, συσκευάζεται σε κατάλληλα (από λευκοσίδηρο) δοχεία και αποστειρώνεται στους 115 για 15 min [6].

γ) Συμπυκνωμένο σακχαρούχο γάλα: Το συμπυκνωμένο σακχαρούχο γάλα δεν αποστειρώνεται, αλλά ο πολλαπλασιασμός των βακτηρίων εμποδίζεται από την υψηλή συγκέντρωση του σακχάρου. Το συμπυκνωμένο σακχαρούχο γάλα παρασκευάζεται από παστεριωμένο γάλα που συμπυκνώνεται υπό κενό και μετά προστίθεται σουκρόζη συγκέντρωσης περίπου 63% [6].

δ) Σκόνη γάλακτος: Η σκόνη γάλακτος προκύπτει από την αφυδάτωση πλήρους ημιαποβουτυρωμένου ή αποβουτυρωμένου γάλακτος. Η υγρασία της σκόνης γάλακτος είναι περίπου 2%. Η αφυδάτωση του γάλακτος και η μετατροπή του σε

σκόνη γίνεται είτε με τη μέθοδο τυμπάνων, όπου το γάλα στρώνεται σε λεπτό φιλμ στην εξωτερική επιφάνεια μεταλλικών τυμπάνων (κυλίνδρων) που θερμαίνονται εσωτερικά, είτε με τη μέθοδο ξήρανσης με ψεκασμό. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται περισσότερο είναι αυτή με ψεκασμό. Το γάλα ψεκάζεται και σχηματίζει νέφος στο εσωτερικό ειδικών θαλάμων, στους οποίους υπάρχει ρεύμα θερμού αέρα (150-200 °C). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ταχύτερη αφυδάτωση των σταγονιδίων χωρίς η θερμοκρασία των συστατικών του γάλακτος να ξεπεράσει τους 55 °C. Το γάλα μετά την αφυδάτωση λειοτριβείται και συσκευάζεται σε κουτιά ή σε μεγάλες συσκευασίες (βαρέλια, σάκους) από υλικά (λευκοσίδηρος, αλουμίνιο, χαρτί με εσωτερική επένδυση από πλαστικό φιλμ κλπ) κατάλληλα να έρθουν σε επαφή με το προϊόν. Η θρεπτική αξία του γάλακτος σε σκόνη είναι λιγότερο ή περισσότερο μειωμένη σε σχέση με το παστεριωμένο, ανάλογα με τη θερμοκρασία στην οποία γίνεται η αφυδάτωση [5].

ε) Φρέσκο γάλα χαμηλών λιπαρών: Με τη βοήθεια κατάλληλης φυγοκεντρικής συσκευής το φρέσκο γάλα μπορεί να διαχωριστεί σε κρέμα και αποβουτυρωμένο γάλα (1%, 2% λίπος). Επειδή με την απομάκρυνση του λίπους απομακρύνεται και μέρος των λιποδιαλυτών βιταμινών, συνηθίζεται η προσθήκη βιταμινών A και D [6].

στ) Γάλα με βιταμίνη D: Στο γάλα προστίθεται, επί πλέον της υπάρχουσας, βιταμίνη D για τις ανάγκες των παιδιών. Αν το γάλα ακτινοβοληθεί με ακτινοβολία UV, οι ενώσεις sterol και 7-dehydrocholesterol μετατρέπονται σε βιταμίνη D3, αλλά το ποσό της βιταμίνης D είναι περιορισμένο. Πιο συνήθης και αποτελεσματική είναι η προσθήκη της βιταμίνης D στο γάλα [6].

ζ) Γάλα χαμηλής περιεκτικότητας σε νάτριο: Για περιπτώσεις ανθρώπων με υψηλή πίεση απαιτούνται τροφές χαμηλής περιεκτικότητας σε νάτριο. Η απομάκρυνση του νατρίου γίνεται με ιονανταλλακτικές ρητίνες και αντικαθίσταται από κάλιο [6].

η) Γάλα χαμηλής περιεκτικότητας σε λακτόζη: Η λακτόζη κανονικά υδρολύεται από τη λακτάση σε γλυκόζη και γαλακτόζη που εύκολα απορροφούνται από το λεπτό έντερο. Πολλοί άνθρωποι παρουσιάζουν δυσανεξία στο γάλα, επειδή παράγουν χαμηλά ποσά λακτάσης, που υδρολύει μερικώς τη λακτόζη σε γλυκόζη και γαλακτόζη. Η απομείνισα λακτόζη δεν απορροφάται από το λεπτό έντερο και

περνάει στο παχύ, όπου εκεί υφίσταται μικροβιακή ζύμωση προκαλώντας εντερική δυσφορία. Ένας τρόπος να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα είναι να επεξεργαστεί το γάλα με λακτάση [6].

1.6 Συστατικά γάλακτος

Οι σημαντικότεροι παράγοντες που επιδρούν και επηρεάζουν τη σύσταση του γάλακτος είναι:

1. Το είδος και η φυλή του ζώου
2. Το κληρονομικό δυναμικό του ζώου
3. Ο αριθμός των αμέλξεων ανά 24ωρο
4. Η περίοδος της ημέρας
5. Η σωματική κατάσταση του ζώου
6. Η διάρκεια της ξηρής περιόδου
7. Η συχνότητα των τοκετών
8. Ο οργανισμός
9. Η ηλικία του ζώου
10. Η κόπωση και η συμπεριφορά του ανθρώπου στα ζώα
11. Η υγιεινή κατάσταση του ζώου
12. Οι συνθήκες διατροφής

Το γάλα περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό συστατικών και είναι η τροφή που η φύση προόρισε για τη διατροφή και η γρήγορη ανάπτυξη των νεογέννητων θηλαστικών. Μερικά από αυτά υπάρχουν σε σημαντικές ποσότητες και χαρακτηρίζονται ως κύρια συστατικά, ενώ άλλα, τα οποία είναι τα περισσότερα σε αριθμό, σε πολύ μικρές ποσότητες, ονομάζονται δευτερεύοντα.

Τα **κύρια συστατικά** του γάλακτος είναι νερό, λίπος, πρωτεΐνες, σάκχαρα και ανόργανα άλατα του νατρίου, καλίου, ασβεστίου και μαγνησίου.

Τα **δευτερεύοντα συστατικά** του γάλακτος είναι κυρίως λιποδιαλυτές βιταμίνες, υδατοδιαλυτές βιταμίνες, χρωστικές, ένζυμα, στερόλες, αέρια, αντισώματα, μικροοργανισμοί κ.α. [1,2].

Πίνακας 1: Τα κύρια συστατικά του γάλακτος

<u>Συστατικό</u>	<u>Περιεκτικότητα</u>
Νερό	85-88 %
Λίπος	2,5-6,0%
Πρωτεΐνες	3,3-3,9%
Λακτόζη	1,0-7%
Ανόργανα άλατα	0,75%

- **Νερό:** Η περιεκτικότητα του γάλακτος σε νερό κυμαίνεται από 85 έως 88 %. Σε όλα τα γάλατα αποτελεί το συστατικό με τη μεγαλύτερη αναλογία. Εξάιρεση αποτελεί το γάλα ορισμένων θαλάσσιων θηλαστικών, στα οποία το λίπος είναι περισσότερο από το νερό. Πρέπει να γίνει κατανοητό ότι μεγάλο ποσοστό των υπόλοιπων συστατικών του γάλακτος βρίσκονται διαλυμένα ή αιωρούμενα στο νερό [4].

- **Λίπος:** Το λίπος του γάλακτος αποτελείται σε ποσοστό 98 έως 99 % από τριγλυκερίδια. Το υπόλοιπο ποσοστό του λίπους το αποτελούν διγλυκερίδια, μονογλυκερίδια, γλυκερίδια κετοοξέων και υδροοξέων, φωσφολιπίδια, σφιγγολιπίδια, στερόλες και ελεύθερα λιπαρά οξέα. Έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερα από 80 διαφορετικά λιπαρά οξέα, όπως το παλμιτικό, στεατικό, μυριστικό, βουτυρικό, καπρυλικό, καπρονικό, καπρινικό, λαυρινικό, κ.α. Η περιεκτικότητα του γάλακτος σε λίπος κυμαίνεται από 2,5 έως 6% αν και ο Ελληνικός κώδικας δέχεται σαν μικρότερη το 3,5%. Το λίπος στο γάλα βρίσκεται υπό μορφή λιποσφαιριδίων, διαμέτρου 0,1-10 μμ. Τα σφαιρίδια αυτά σταθεροποιούνται από στρώμα φωσφολιπιδίων και πρωτεϊνών. Από τις πιο χαρακτηριστικές ιδιότητες του γάλακτος είναι η συσσωμάτωση και η άνοδος των σφαιριδίων του λίπους στην επιφάνεια του προϊόντος, γνωστή ως αποκορύφωση, οπότε σχηματίζεται η λεγόμενη «κρέμα» του γάλατος. Η αποκορύφωση συντελείται σε 20-30 min στους 4 °C. Ο σχηματισμός της «κρούστας» αυτής αποφεύγεται με την ομογενοποίηση του γάλακτος, η οποία συνίσταται στην ελάττωση του μεγέθους των λιποσφαιριδίων [4,6,7].

- **Πρωτεΐνες:** Οι πρωτεΐνες του γάλακτος είναι υψηλής βιολογικής αξίας, υπερέχουν από τις άλλες ζωικές πρωτεΐνες εκτός από αυτές του αυγού. Το γάλα περιέχει αζωτούχες ενώσεις που κατανέμονται σε πρωτεΐνες (95%) και άλλες αζωτούχες μη

πρωτεϊνικές ενώσεις (5%). Η κύρια πρωτεΐνη που περιέχει το γάλα είναι η καζεΐνη. Η περιεκτικότητα του γάλακτος σε πρωτεΐνες κυμαίνεται από 3,3 έως 3,9g/ 100 ml.

- **Λακτόζη:** Η λακτόζη είναι ο χαρακτηριστικός υδατάνθρακας του γάλακτος. Αποτελείται από 1 μόριο γαλακτόζης και 1 μόριο γλυκόζης. Η περιεκτικότητα της λακτόζης στο γάλα ποικίλλει από 1,0% (στο γάλα του ποντικού) μέχρι 7,0% (στο γάλα της γυναίκας). Η λακτόζη απαντά σε δύο ισομερείς μορφές: την α και β-λακτόζη. Οι δύο αυτές μορφές διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη γλυκύτητα και τις άλλες φυσικές ιδιότητες (στροφική ικανότητα, διαλυτότητα κ.τ.λ.). Η λακτόζη παίζει σημαντικό ρόλο στην απορρόφηση του ασβεστίου από το έντερο, καθώς επίσης βοηθά στο μεταβολισμό του ασβεστίου.

-**Ανόργανα άλατα:** Το γάλα περιέχει αρκετά μεταλλικά στοιχεία, είτε ελεύθερα είτε δεσμευμένα σε άλλα συστατικά. Στην πλειονότητά τους είναι φωσφορικά, νιτρικά, θειικά, ανθρακικά και δισανθρακικά άλατα Na, Ca και Mg [3].

- Τα δευτερεύοντα συστατικά

-**Βιταμίνες:** Το γάλα περιέχει τις λιποδιαλυτές βιταμίνες, όπως τις A, E, D, K, καθώς και το σύμπλεγμα των βιταμινών B και τη βιταμίνη C.

-**Χρωστικές:** Το γάλα περιέχει χρωστικές, όπως τα καροτίνη τα οποία δίνουν υποκίτρινο χρώμα στο λίπος και την ριβοφλαβίνη, η οποία προσδίδει την πρασινοκυανή απόχρωση στο απόχρωση στο αποβουτυρωμένο γάλα [4].

-**Ένζυμα:** Ένα πλήθος ενζύμων υπάρχει στο γάλα, είτε είναι ενδογενή του γάλακτος προερχόμενα κυρίως από εκκρίσεις των μικροοργανισμών του γάλακτος, είτε εισέρχονται στο γάλα πριν ή μετά την άρμεξη και είναι βακτηριακής προέλευσης. Συμμετέχουν στις διαδικασίες παραγωγής των γαλακτομικών προϊόντων, ως καταλύτες, και διακρίνονται σε υδρολυτικά (φωσφατάσες, λιπάσες, πρωτεάσες, κ.α) και σε οξειδοαναγωγικά (ρεδουκτάσες, καταλάσες, υπεροξειδάσες, κ.α.) [6].

1.7 Πρωτεΐνες γάλακτος

Το γάλα περιέχει εκατοντάδες είδη πρωτεϊνών που οι περισσότερες βρίσκονται σε πολύ μικρές ποσότητες, οι οποίες μπορούν να ταξινομηθούν με διάφορους τρόπους ανάλογα με τις χημικές ή φυσικές τους ιδιότητες και τις βιολογικές τους λειτουργίες. Τελικά, οι πρωτεΐνες του γάλακτος ταξινομήθηκαν σε καζεΐνες, πρωτεΐνες ορού γάλακτος (95%) και άλλες αζωτούχες μη πρωτεϊνικές ενώσεις, όπως αμινοξέα, αμμωνία, ουρία κλπ (5%).

-Καζεΐνη: Η καζεΐνη αποτελεί την πιο ενδιαφέρουσα ομάδα πρωτεϊνών, και αντιστοιχεί στο 78% του συνολικού αζώτου του γάλακτος. Απαντά στο γάλα με τη μορφή κολλοειδών συσσωματωμάτων (μικκυλίων) μέσου μεγέθους 1200Å και είναι σύνθετη πρωτεΐνη που περιέχει στο μόριο της φωσφορικό οξύ, ασβέστιο και μικρή ποσότητα υδατανθράκων. Η καζεΐνη με ηλεκτροφόρηση βρέθηκε πως αποτελείται από τρία διαφορετικά κλάσματα που ονομάστηκαν α, β- και γ- καζεΐνες. Αργότερα διαπιστώθηκε πως η α-καζεΐνη αποτελείται από 2 συστατικά που ονομάστηκαν αs- και κ-καζεΐνη. Τα πιο πάνω συστατικά αποτελούν αντίστοιχα το 55% (αs-), 25% (β-), 15% (κ-), και 5% (γ-) της συνολικής καζεΐνης. Οι διάφορες καζεΐνες διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το μοριακό βάρος, την ποσότητα του φωσφορικού οξέος, το είδος και τον αριθμό των αμινοξέων που περιέχουν, τη στερεοχημική τους δομή, την ευαισθησία που παρουσιάζουν έναντι του Ca^{2+} . Η καζεΐνη στο γάλα βρίσκεται στο γάλα με τη μορφή του καζεΐνικού ασβεστίου και καταβυθίζεται εύκολα στο ισοηλεκτρικό της σημείο (pH=4,6).

-Πρωτεΐνες του ορού γάλακτος: Οι πρωτεΐνες που περιέχονται στο υπερκείμενο του γάλακτος μετά την κατακρήμιση σε pH 4,6 συλλογικά, ονομάζονται πρωτεΐνες ορού γάλακτος. Αυτές οι σφαιρικές πρωτεΐνες είναι περισσότερο ευδιάλυτες στο νερό από ότι οι καζεΐνες και υποβάλλονται σε μετουσίωση. Οι εγγενείς πρωτεΐνες ορού γάλακτος έχουν καλή πήξη και κρεμάδεις ιδιότητες. Η μετουσίωση αυξάνει την ικανότητα να κρατεί τους δεσμούς νερού. Οι πρωτεΐνες ορού είναι η β-γαλακτογλοβουλίνη και η α-γαλακτοαλβουμίνη.

-β-γαλακτογλοβουλίνη: Η ομάδα αυτή, συμπεριλαμβανομένων οκτώ γενετικών παραλλαγών, περιλαμβάνει περίπου το μισό του συνόλου των πρωτεϊνών του ορού γάλακτος. Η β-γαλακτογλοβουλίνη έχει δύο εσωτερικούς δισουλφιδικούς δεσμούς

και μία ελεύθερη θείο ομάδα. Η προσαρμογή περιλαμβάνει σημαντική δευτερεύουσα δομή, και υπάρχει φυσικά ως μια συνδεδεμένη αλυσίδα. Στο Ισοηλεκτρικό Σημείο, οι έλεγχοι συνδέονται περισσότερο με τα octamers, αλλά σε pH κάτω του 3,4, διασπώνται σε μονομερή.

-α-γαλακταλβουμίνη: Η α-γαλακταλβουμίνη είναι μια μεταλλοπρωτεΐνη ασβεστίου. Το ασβέστιο βοηθά στη συγκράτηση της δομής της πρωτεΐνης. Με τους δισουλφιδικούς δεσμούς της ανέπαφους, όπως παρουσιάζεται στο γάλα, μπορεί να συγκρατήσει τη δομή της ή να την επαναφέρει, χωρίς να υποστεί μη ανάστροφες αλλαγές, εκτός σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες [7,8,9,10].

1.8 Επεξεργασία γάλακτος

Η επεξεργασία του γάλακτος, έχει ως σκοπό να ληφθούν τα κατάλληλα μέτρα από τη στιγμή του αρμέγματος ως την κατανάλωση του, περιορίζοντας τις αρρώστιες.

A. Συλλογή: Η συλλογή και η συντήρηση του γάλακτος στο στάβλο πρέπει να γίνεται κατά τέτοιο τρόπο, ώστε αυτό, αμέσως μετά την **άμελξη** να προστατεύεται από επιμολύνσεις, από χημική ρύπανση και να παρεμποδίζεται ο πολλαπλασιασμός του αρχικού μικροβιακού φορτίου του γάλακτος. Για αυτό, αμέσως μετά την άμελξη πρέπει να γίνεται **φιλτράρισμα** του γάλακτος, μεταφορά σε καθαρά γαλακτοκομικά δοχεία ή δεξαμενές που έχουν εξυγιανθεί.

Έπειτα, τα βακτήρια που υπάρχουν στο γάλα πολλαπλασιάζονται γρήγορα σε θερμοκρασία άνω των 13°C, ενώ κάτω από την θερμοκρασία αυτή ο ρυθμός επιβραδύνεται σημαντικά. Το γάλα πρέπει να ψυχθεί σε θερμοκρασία 4 °C το αργότερο μέσα σε 2 ώρες μετά την άμελξη. Αν το γάλα δεν είναι δυνατό να συντηρηθεί σε ψύξη μέσα στο στάβλο, τότε πρέπει να μεταφερθεί μέσα σε 2-3 ώρες στο εργοστάσιο ή σε σταθμό συγκέντρωσης γάλακτος. Η ψύξη του γάλακτος στο στάβλο επιτυγχάνεται συνήθως με τοποθέτηση των γαλακτοδοχείων σε ψυχρό νερό ή σε δεξαμενές ψύξης (παγολεκάνες).

B. Παραλαβή και ποιοτικός έλεγχος του νωπού γάλακτος: Το νωπό γάλα είναι ένα από τα πλέον ευαλλοίωτα τρόφιμα, η ποιότητα του οποίου μεταβάλλεται εύκολα προς το χειρότερο. Επιπλέον, αν ληφθεί υπόψη ότι το τρόφιμο αυτό προσφέρεται εύκολα

για νοθεία, κυρίως με την προσθήκη νερού ή την αφαίρεση λίπους, γίνεται αντιληπτό γιατί είναι απαραίτητος ο ποιοτικός έλεγχος του, πριν από κάθε επεξεργασία του. Ο έλεγχος αυτός γίνεται κατά την παραλαβή του στο σταθμό συγκέντρωσης και κυρίως στο εργοστάσιο και από τα αποτελέσματα του κρίνεται αν το γάλα θα γίνει αποδεκτό για ανθρώπινη κατανάλωση, κατατάσσεται σε ποιότητες και διαμορφώνεται η τιμή του σε επίπεδο παραγωγού.

Ο ποιοτικός έλεγχος του γάλακτος βασίζεται σε μια σειρά χημικών και μικροβιολογικών αναλύσεων. Οι κυριότερες χημικές αναλύσεις του γάλακτος είναι ο προσδιορισμός λίπους, πρωτεΐνης και ολικών στερεών. Οι σημαντικότερες μικροβιολογικές αναλύσεις είναι: η εκτίμηση της μικροβιακής ποιότητας με τη μέτρηση του συνολικού αριθμού μικροοργανισμών ή έμμεσα με τη μέθοδο του κυανού του μεθυλενίου, μέτρηση κολοβακτηριδίων, μέτρηση θερμοφίλων, θερμοάντοχων και ψυχρότροφων βακτηρίων. Άλλες αναλύσεις απαραίτητες στον ποιοτικό έλεγχο του νοπού γάλακτος είναι ο έλεγχος για την ύπαρξη αντιβιοτικών, ειδικού βάρους και ο έλεγχος νοθεία με τον προσδιορισμό του σημείου πήξης.

Γ. Διήθηση: Η διήθηση έχει ως σκοπό την απομάκρυνση ξένων σωμάτων από το γάλα με τη χρήση φυγοκεντρικών διηθητήρων - διαχωριστήρων, που έχουν τη δυνατότητα να κάνουν και διαχωρισμό του λίπους (κορυφή). Το λίπος διαχωρίζεται σε πρώτη φάση από το γάλα και στη συνέχεια προστίθεται πάλι σε αυτό σε τέτοια αναλογία, ώστε το τελικό προϊόν να έχει πάντα σταθερή λιποπεριεκτικότητα.

Δ. Παστερίωση: Η παστερίωση έχει ως σκοπό να καταστρέψει όλους τους επικίνδυνους μικροοργανισμούς, που πιθανόν να προκαλέσουν πρόβλημα στον καταναλωτή. Η παστερίωση καταστρέφει επίσης τη λιπάση και άλλα ένζυμα του γάλακτος. Για να θεωρείται ένα γάλα παστεριωμένο πρέπει να θερμανθεί τουλάχιστον στους 71,7 °C για 15 δευτερόλεπτα ή σε κάθε άλλο ισοδύναμο συνδυασμό θερμοκρασίας - χρόνου. Αμέσως μετά την παστερίωση, το γάλα ψύχεται σε θερμοκρασία κάτω από τους 4°C και έπειτα το τοποθετούμε στο ψυγείο.

Ε. Ομογενοποίηση: Το λίπος έχει την τάση να ανέβει στην επιφάνεια του γάλακτος και να σχηματίζει ένα στρώμα λίπους (κορυφή), το οποίο πολλές φορές δεν είναι επιθυμητό για ορισμένα προϊόντα. Αυτό αντιμετωπίζεται με τη διαδικασία της ομογενοποίησης κατά την οποία τα λιποσφαίρια (globules) σπάνε σε μικρότερα και

κατανέμονται ομοιόμορφα στον όγκο του γάλακτος. Έτσι, μειώνεται η ταχύτητα ανόδου του λίπους στην επιφάνεια και στην πράξη το ομογενοποιημένο γάλα δεν σχηματίζει κορυφή. Η ομογενοποίηση επιτυγχάνεται με τους ομογενοποιητές.

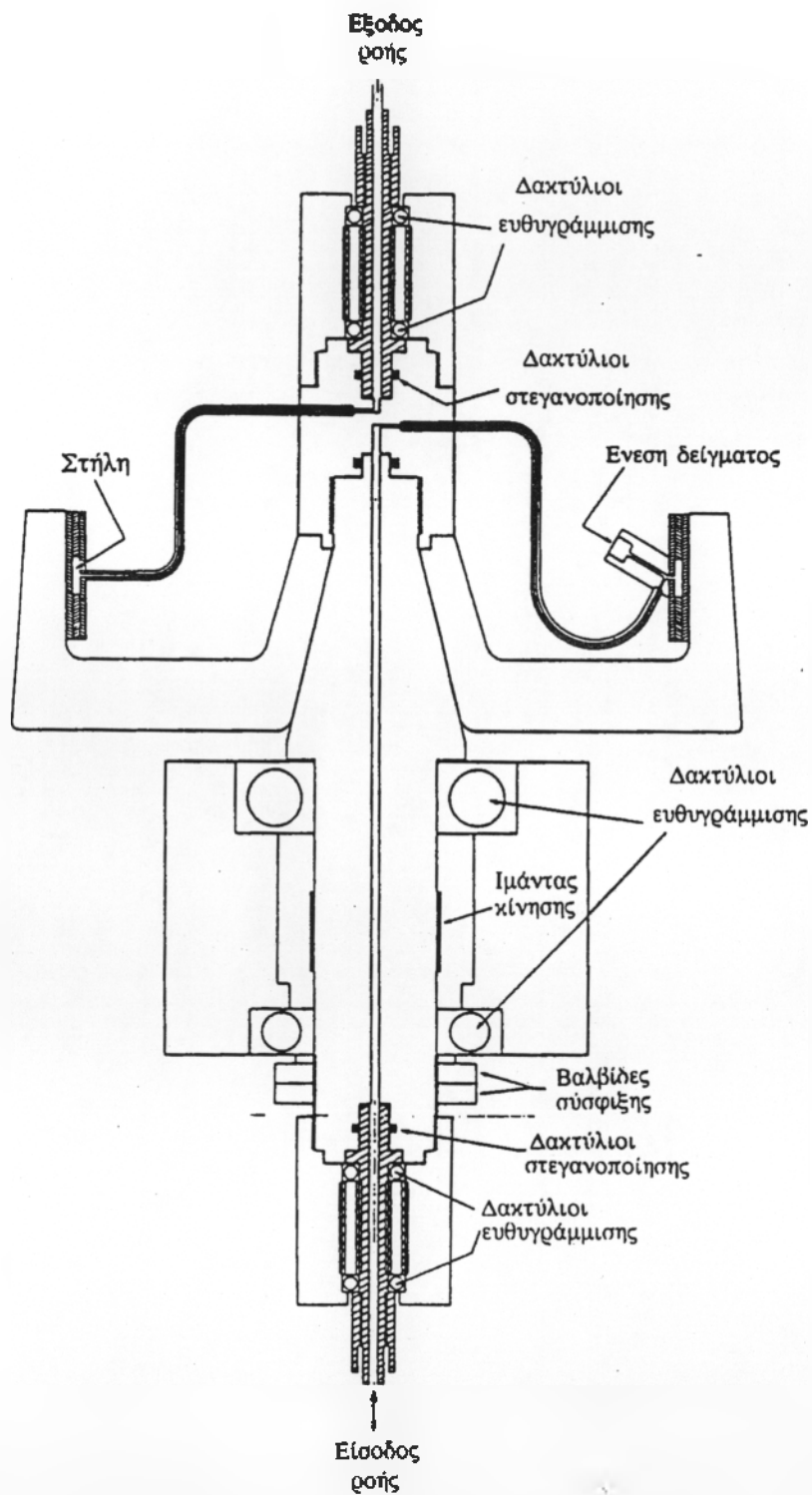
ΣΤ. Συσκευασία: Για τη συσκευασία χρησιμοποιούνται κυρίως μικρά κουτιά που σχηματίζονται από νεότερα υλικά συσκευασίας που προέρχονται από συνδυασμό λεπτών φύλλων και μεμβρανών διαφόρων υλικών όπως πλαστικές ύλες, αλουμίνιο, χαρτί. Τα κουτιά αυτά σχηματίζονται τη στιγμή του γεμίσματος από ειδική μηχανή. Πάνω στη συσκευασία γράφονται η ημερομηνία παστερίωσης του γάλακτος, καθώς και η ημερομηνία μέγιστης διατηρησιμότητας [5].

2. Γενική περιγραφή του συστήματος της Μονοφασικής Χρωματογραφίας Φυγοκεντρικού Πεδίου.

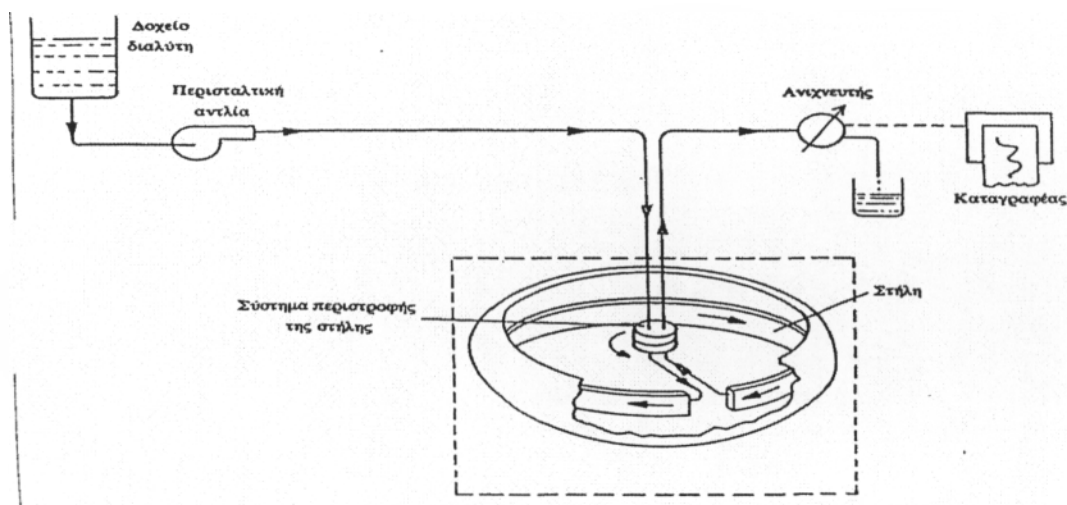
2.1 Γενικά

Το όλο σύστημα της Μονοφασικής Χρωματογραφίας Φυγοκεντρικού Πεδίου (ΜΧΦΠ) αποτελείται από μία συνδεσμολογία κατάλληλων συσκευών. Η σημαντικότερη από αυτές, η οποία αποτελεί και την αναλυτική περιοχή του συστήματος, είναι η στήλη. Αυτή αποτελείται από δύο στιλβωμένες λωρίδες χάλυβα με ορισμένες διαστάσεις, μεταξύ των οποίων τοποθετείται μία τρίτη λωρίδα χάλυβα (ή από άλλο υλικό όπως Teflon ή Goretex) που έχει το επιθυμητό πάχος και η οποία κόβεται σε σχήμα ορθογωνίου παραλληλογράμμου, ώστε να δώσει τις επιθυμητές διαστάσεις της στήλης. Οι τρεις λωρίδες χάλυβα συγκολλούνται και τοποθετούνται στην περιφέρεια ενός φυγοκεντρικού δίσκου. Η στήλη συνδέεται με το υπόλοιπο μέρος του συστήματος μέσω οπών που υπάρχουν στην είσοδο και την έξοδο αυτής (Σχ.1). Το υπόλοιπο σύστημα αποτελείται από αντλία για τη σταθερή παροχή του φέροντος διαλύτη, σύστημα εισαγωγής δείγματος, ανιχνευτή, καταγραφέα, συλλέκτη δείγματος και συσκευή για τη μέτρηση της ροής του διαλύτη (Σχ.2). Ο φυγοκεντρικός δίσκος, στο εσωτερικό μέρος του οποίου προσαρμόζεται η στήλη, έχει διάφορες διαστάσεις, ανάλογα με τις επιθυμητές διαστάσεις της στήλης.

Η μετάβαση της ροής από τα ακίνητα στα κινητά μέρη της στήλης γίνεται μέσω ελαστικών δακτυλίων (seals) οι οποίοι αποτρέπουν τις διαρροές. Αυτοί είναι συνήθως κατασκευασμένοι από ένα μίγμα αιθυλενίου και προπυλενίου που τους παρέχει μεγάλο χρόνο ζωής. Το μειονέκτημά τους είναι ότι δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν οργανικοί διαλύτες διότι προκαλούν διόγκωση των ελαστικών δακτυλίων και κατά συνέπεια διαρροές στο σύστημα. Ο διαλύτης εισέρχεται στο σύστημα από το κάτω μέρος του, κινείται προς τα άνω δια μέσω της οπής ενός κυρίου στελέχους από χρώμιο (στιλβωμένο ικανοποιητικά), διέρχεται μέσω της στήλης και εξέρχεται αυτής από το πάνω μέρος του συστήματος.



Σχήμα 1: Σχηματική αναπαράσταση της στήλης ενός συστήματος ΜΧΦΠ.



Σχήμα 2: Σχηματικό διάγραμμα του συστήματος ΜΧΦΠ με όλες τις απαραίτητες συσκευές.

2.2 Γενικές αρχές της Μονοφασικής Χρωματογραφίας Πεδίου

Η Μονοφασική Χρωματογραφία Πεδίου (ΜΧΠ) καλείται επίσης και χρωματογραφία μιας φάσης [11,12] ή, ακόμα, χρωματογραφία πόλωσης [13] καθώς ο διαχωρισμός γίνεται σε έναν αγωγό ρευστού που περιέχει μόνο μία φάση, σχεδόν αποκλειστικά μια υγρή φάση, αν και η χρήση μιας αέριας φάσης έχει αναφερθεί [14] ενώ έχουν γίνει προσπάθειες και για διαχωρισμό με χρήση μιας υπερκρίσιμης ρευστής φάσης [15,16]. Μία σταθερή ροή αυτής της υγρής φάσης επιτρέπει τη μεταφορά των συστατικών του δείγματος κατά μήκος της στήλης διαχωρισμού. Όλες οι επιμέρους τεχνικές της ΜΧΠ χαρακτηρίζονται από το γεγονός ότι μία δύναμη εφαρμόζεται στα μόρια ή τα σωματίδια των συστατικών του δείγματος σε κατεύθυνση κάθετη ως προς τη διεύθυνση κίνησης της ροής. Μία τέτοια δύναμη προκύπτει από ένα εξωτερικά εφαρμοζόμενο πεδίο, λόγος για τον οποίο δόθηκε η ονομασία Μονοφασική Χρωματογραφία Πεδίου αρχικά από τον Giddings [14], αλλά μπορεί επίσης να προέλθει και από μία κάθετη ροή ή τις υδροδυναμικές αλληλεπιδράσεις των μορίων ή των σωματιδίων με τη ροή.

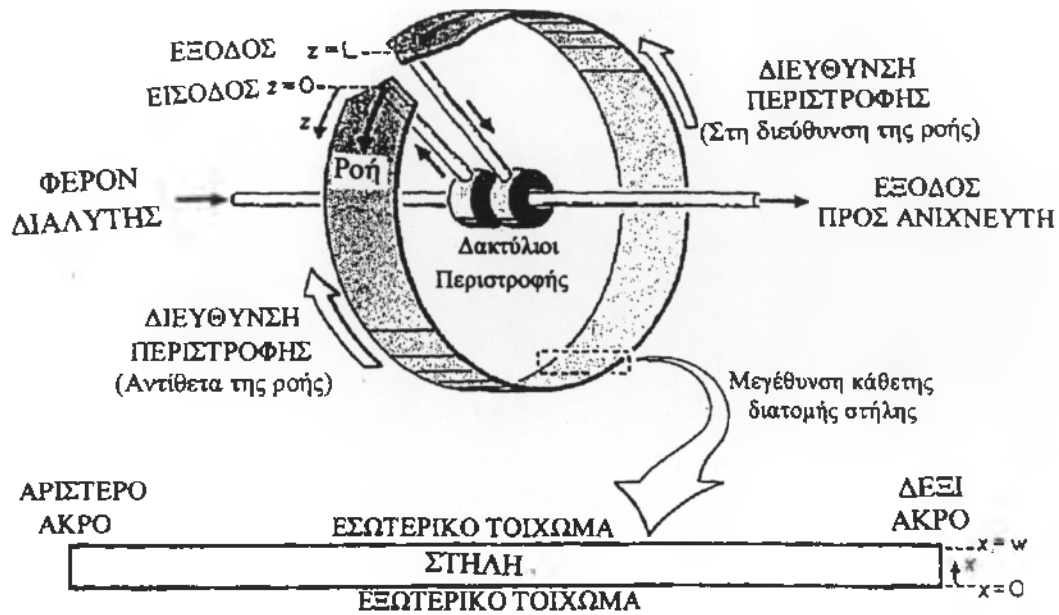
Αν και η επίτευξη ενός διαχωρισμού με τη ΜΧΠ μπορεί να προκληθεί με διάφορες μεθόδους, η μέθοδος της ανάπτυξης ζωνών έκλουσης είναι η πιο ευρέως εφαρμοζόμενη, με εξαίρεση μία αναφορά για μετωπική ανάλυση με τη ΜΧΠ [17].

Μία μικρή ποσότητα δείγματος εισάγεται στην είσοδο της χρωματογραφικής στήλης, διάφορες ζώνες ανάλυσης αναπτύσσονται εντός της στήλης καθώς τα διάφορα συστατικά μεταφέρονται με διαφορετικό τρόπο από τη ροή του φέροντος διαλύτη και διαφορετικοί χρόνοι έκλουσης αυτών των ζωνών παρατηρούνται από έναν κατάλληλο ανιχνευτή συνδεδεμένο στην έξοδο της στήλης. Το χρωματογράφημα, που είναι η καταγραφή του σήματος του ανιχνευτή έναντι του χρόνου από την είσοδο του δείγματος στη στήλη, εμφανίζεται ως η επίτευξη περισσότερο ή λιγότερο συμμετρικών ζωνών ή ως ένα σύνολο ατελώς διαχωρισμένων ζωνών.

Η ΜΧΠ είναι κυρίως μια αναλυτική μέθοδος διαχωρισμού. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το χαρακτηρισμό ενός πλήθους φυσικοχημικών παραμέτρων, όπως η μάζα και το μοριακό βάρος των αναλυόμενων σωματιδίων, η πυκνότητα, η διάμετρος, το επιφανειακό φορτίο, ο συντελεστής διάχυσης και ο συντελεστής θερμικής διάχυσης. Μέχρι τώρα έχει εφαρμοστεί σε μία μεγάλη κλίμακα μακρομορίων, κολλοειδών και δειγμάτων ιδιαίτερης βιομηχανικής και περιβαλλοντικής αξίας καθώς επίσης και σε βιοϊατρικά και βιολογικά δείγματα [18].

2.3 Μονοφασική Χρωματογραφία Φυγοκεντρικού Πεδίου

Στην περίπτωση της Μονοφασικής Χρωματογραφίας Φυγοκεντρικού Πεδίου (ΜΧΦΠ) μία δύναμη πολλαπλάσια της βαρύτητας ελευθερώνεται με τη χρήση μιας φυγοκέντρου. Τότε, η στήλη δεν έχει μια επίπεδη γεωμετρία, όπως συμβαίνει στις περισσότερες από τις άλλες επιμέρους τεχνικές της ΜΧΠ, αλλά είναι καμπυλωμένη εντός ενός καλαθιού μιας φυγοκέντρου με μία σταθερή ακτίνα περιστροφής, π.χ. σε μία σταθερή απόσταση από το άξονα περιστροφής, όπως φαίνεται στο Σχ.3. Η δύναμη του πεδίου που ασκείται στα σωματίδια του δείγματος είναι, σε όλες τις θέσεις εντός της στήλης, απευθείας κάθετη στις συντεταγμένες της ροής.



Σχήμα 3: Σχηματικό διάγραμμα ενός συστήματος ΜΧΦΠ

Η φυγοκεντρική δύναμη, F_f , που εφαρμόζεται σε ένα σωματίδιο δίνεται, σύμφωνα με το νόμο του Newton, από τη σχέση

$$F_f = m_{eff} G \quad (1)$$

ή αλλιώς

$$F_f = v_p \Delta \rho G \quad (2)$$

με

$$\Delta \rho = \rho_p - \rho_l \quad (3)$$

όπου ρ_p και ρ_l είναι αντίστοιχα οι πυκνότητες των σωματιδίων και του φέροντος διαλύτη, $\Delta \rho$ η διαφορά πυκνότητας μεταξύ σωματιδίων και διαλύτη, G η επιτάχυνση της φυγοκέντρου και m_{eff} η αποτελεσματική μάζα ενός σωματιδίου του δείγματος η οποία σχετίζεται με την πραγματική μάζα του σωματιδίου, m , ως

$$m_{eff} = m \frac{\Delta \rho}{\rho_p} \quad (4)$$

Αν R_{acc} η ακτίνα καμπυλότητας του τοιχώματος συσσώρευσης του δείγματος, (εσωτερικό ή εξωτερικό τοίχωμα όταν $\Delta \rho < 0$ ή $\Delta \rho > 0$, αντίστοιχα) και Ω η γωνιακή ταχύτητα περιστροφής, το G δίνεται ως

$$G = \Omega^2 R_{acc} \quad (5)$$

με

$$\Omega = \frac{2\pi \text{rpm}}{60} \quad (6)$$

και rpm ο αριθμός των περιστροφών ανά λεπτό. Έτσι, η θεμελιώδης παράμετρος λ στη ΜΧΦΠ θα δίνεται από τη σχέση

$$\lambda = \frac{kT}{m_{eff} G w} \quad (7\alpha)$$

ή

$$\lambda = \frac{kT}{v_p \Delta\rho G w} \quad (7\beta)$$

ή ακόμα

$$\lambda = \frac{6kT}{\pi d_v^3 \Delta\rho G w} \quad (7\gamma)$$

όπου d_v η διάμετρος ισοδύναμου όγκου του σωματιδίου, δηλαδή η διάμετρος μίας σφαίρας που έχει τον ίδιο όγκο v_p με το σωματίδιο, και η οποία δίνεται από τη σχέση

$$d_v = \left(\frac{6v_p}{\pi} \right)^{1/3} \quad (8)$$

Είναι ενδιαφέρον να σημειώσουμε ότι, σύμφωνα με το κλασικό μοντέλο συγκράτησης, η ΜΧΦΠ επιτρέπει τον άμεσο προσδιορισμό της αποτελεσματικής μάζας των σωματιδίων όταν οι πειραματικές συνθήκες λειτουργίας T , G και w είναι καθορισμένες. Αν η $\Delta\rho$ είναι γνωστή, ο όγκος του σωματιδίου, και κατ' επέκταση η διάμετρος ισοδύναμου όγκου, μπορούν να προσδιοριστούν.

2.4 Στερική Μονοφασική Χρωματογραφία Πεδίου

Όταν σφαιρικά σωματίδια μικρού μεγέθους αναλύονται κάτω από σταθερή ισχύ πεδίου, π.χ. με τη ΜΧΦΠ, ο χρόνος έκλουσης αυξάνει με το μέγεθος των σωματιδίων. Πράγματι, το λ μειώνεται με την αύξηση του d και το ίδιο κάνει και το R , το οποίο είναι μια μονότονη συνάρτηση του λ . Εντούτοις, καθώς το μέγεθος του

σωματιδίου αυξάνει, η θεώρηση των σωματιδίων ως σημειακών μαζών καθίσταται εσφαλμένη και ο στερικός παράγοντας άπωσης των σωματιδίων από το τοίχωμα συσσώρευσης λόγω του μεγέθους τους θα πρέπει να ληφθεί υπόψη. Αυτός ο παράγοντας οδηγεί σε τροποποίηση της έκφρασης του λόγου συγκράτησης και σε ταχύτητες υψηλότερες από την αναμενόμενη, αν θεωρούσαμε τα σωματίδια σημειακές μάζες. Τότε, ο λόγος συγκράτησης R αυξάνει με το μέγεθος του σωματιδίου. Υπάρχει μία κρίσιμη διάμετρος σωματιδίου, d_{inv} , πάνω από την οποία παρατηρείται αυτή η εναλλαγή των φαινομένων και η οποία εξαρτάται από την ένταση του εφαρμοζόμενου πεδίου [19,20,21,22].

Για σωματίδια με διαμέτρους μεγαλύτερες από την d_{inv} ο λόγος συγκράτησης αυξάνει με τη διάμετρο [23]. Επειδή η εξάρτηση της συγκράτησης από το μέγεθος του σωματιδίου μετά το κρίσιμο σημείο διαφέρει δραστικά από ότι στην κατάσταση λειτουργίας Brown, και επειδή υπάρχει μία ποιοτική συμφωνία με τη συγκράτηση λόγω στερικών φαινομένων, αυτή η κατάσταση λειτουργίας ονομάζεται *στερική κατάσταση λειτουργίας*. Η Μονοφασική Χρωματογραφία Βαρυτικού Πεδίου-MXBP- (η εκδοχή της ΜΧΦΠ όταν η εφαρμοζόμενη δύναμη ισούται με μία βαρύτητα) βρέθηκε ότι είναι σε λογική ποιοτική συμφωνία με το μοντέλο της στερικής κατάστασης λειτουργίας [24].

Ο υπολογισμός της δύναμης ανύψωσης που δρα σε ένα σφαιρικό σωματίδιο είναι ένα σύνθετο πρόβλημα δυναμικής ρευστών το οποίο δεν έχει επιλυθεί πλήρως σε συνθήκες λειτουργίας του συστήματος της ΜΧΠ. Για το λόγο αυτό δεν υπάρχει κανένα εντελώς ικανοποιητικό μοντέλο λειτουργίας για τη συμπεριφορά της ΜΧΠ στη στερική περιοχή. Ωστόσο, η δύναμη ανύψωσης φαίνεται να είναι εκθετικά ανάλογη της διαμέτρου του σωματιδίου ($F_f \propto d^3$ στη ΜΧΦΠ) και ανάλογη με το τετράγωνο της μέσης ταχύτητας ροής, γεγονός που εξηγεί γιατί αυτή η δύναμη γίνεται σημαντική μόνο για σχετικά μεγάλα σωματίδια και σχετικά υψηλές ροές [25, 26, 27, 28, 29]. Εξαρτάται επίσης από τη θέση του σωματιδίου στο εσωτερικό της στήλης της ΜΧΠ [30]. Η δράση της δύναμης ανύψωσης έχει ως αποτέλεσμα ο λόγος συγκράτησης των σωματιδίων να αυξάνει με την αύξηση του μεγέθους, και κατά συνέπεια τα μεγαλύτερα σωματίδια να εκκλύονται πρώτα. Τέλος, ο λόγος συγκράτησης αυξάνει με την αύξηση της ροής και με τη μείωση της ισχύος του πεδίου, όπως φαίνεται από μεγάλο αριθμό πειραματικών παρατηρήσεων [31,32].

$$\lim_{\alpha, \lambda \rightarrow 0} R_{ste} = 6\alpha + 6\lambda \quad (9)$$

Στην περίπτωση αυτή ο λόγος συγκράτησης θα δίνεται από την Εξ. (9), το όριο της οποίας οδηγεί στη σχέση

$$R = 6\gamma_{corr} \frac{d}{2w} \quad (10)$$

όπου ο συντελεστής γ_{corr} είναι παράγοντας διόρθωσης, σχετίζεται με την ελάττωση της ταχύτητας των σωματιδίων λόγω της καταναλισκόμενης περιστροφικής ενέργειας και έχει τιμή μικρότερη της μονάδας.

3. Μονοφασική Χρωματογραφία φυγοκεντρικού πεδίου: Χαρακτηρισμός μεγέθους συστατικών τροφίμων

Οι διάφοροι τύποι γάλακτος που μελετώνται στη συγκεκριμένη εργασία προέρχονται από δημητριακά και από γάλα αγελάδας. Τα δείγματα του γάλακτος των δημητριακών περιλάμβαναν καλαμπόκι, ρύζι, γάλα σόγιας, ενώ το αγελαδινό γάλα περιλάμβανε σοκολατούχο και πλήρες, φρέσκο γάλα.

3.1. Υλικά και μέθοδοι

3.1.1 Όργανα που χρησιμοποιήθηκαν

Στο πείραμα αυτό το σύστημα ΜΧΦΠ που χρησιμοποιήθηκε ήταν μοντέλο S-101 Particle/Colloid Fractionator από την Postnova Analytik (Γερμανία). Τα χαρακτηριστικά αυτού του τύπου χρωματογράφου, ήταν τα εξής: το μήκος της στήλης ήταν 89,5 cm, το πλάτος ήταν 2,0 cm και το πάχος 0,0254 cm ενώ η ακτίνα περιστροφής ήταν 15,1 cm. Ο όγκος της στήλης υπολογίστηκε στα 4,45 mL. Η κινητή φάση εισήχθη στη στήλη της ΜΧΦΠ μέσω αντλίας HPLC (μοντέλο PN1122, Postnova Analytik). Η εξασθένηση της έντασης φωτός λόγω των εκλούμενων σωματιδίων πραγματοποιούνταν από έναν ανιχνευτή ο οποίος λειτουργούσε σε σταθερό μήκος κύματος 254 nm (UV-2000 Spectra SYSTEM). Δείγματα των 20 μL ενίονταν στο χώρο εισαγωγής του δείγματος (Rheodyne model 7725i loop injector). Η κινητή φάση αποτελείτο από διπλά απεσταγμένο απιονισμένο νερό περιεκτικότητας 0.1% (v/v) σε FL-70 ως επιφανειοδραστική ουσία (Fisher Scientific Ltd., Leicestershire, UK) και 0.02% w/v σε αζίδιο του νατρίου (Merck, Darmstadt, Germany) ως βακτηριοκτόνο. Το pH της κινητής φάσης ρυθμίστηκε στο 10, μετά την προσθήκη ποσότητας 0.02 mol /L NaOH. Τα κλάσματα των δειγμάτων του γάλακτος αναλύθηκαν στην κανονική κατάσταση λειτουργίας της ΜΧΦΠ.

3.1.2 Πρότυπα πολυστερίνης.

Εκτός από τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτό το πείραμα, χρησιμοποιήθηκαν ακόμη ως πρότυπα σωματίδια σφαίρες πολυστυρολίου με διαμέτρους 0,35, 0,53, 0,72

και 1 μm (Fluka Chemie GmbH, Ελβετία). Τα τελευταία χρησιμοποιήθηκαν για την βαθμονόμηση (καλιμπράρισμα) της στήλης της ΜΧΦΠ στην κανονική λειτουργία. Η πυκνότητα του πολυστυρολίου ήταν 1.05 g cm^{-3} . Τα πρότυπα δείγματα διαλύθηκαν στην κινητή φάση σε κατάλληλες συγκεντρώσεις πριν την εισαγωγή τους στη στήλη της ΜΧΦΠ.

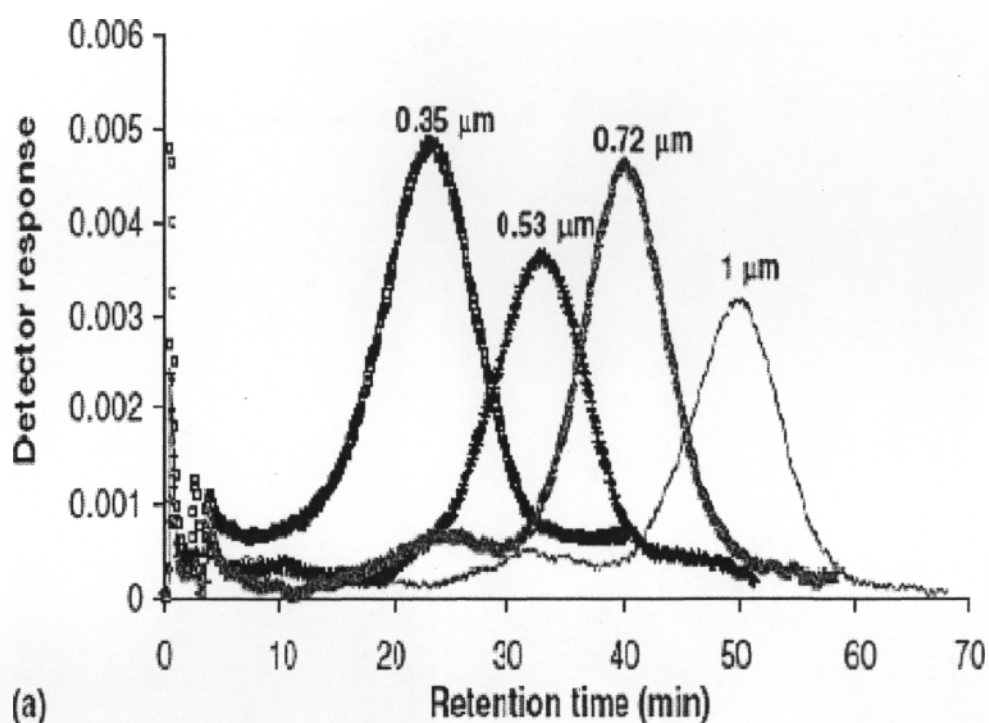
3.1.3 Δείγματα γάλακτος.

Δύο διαφορετικοί τύποι γάλακτος χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα. Εξετάστηκαν διάφορα είδη γάλακτος δημητριακών τα οποία προέρχονταν από δημητριακά όπως καλαμπόκι, ρύζι και σόγια. Για λόγους σύγκρισης των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε και αγελαδινό γάλα που περιλάμβανε σοκολάτα καθώς και φρέσκο πλήρες γάλα. Όλα τα δείγματα είχαν φιλτραριστεί μέσω φίλτρου μεμβράνης 0,45 μm (Altech) για την αφαίρεση των μεγάλων σωματιδίων. Τα δείγματα που φιλτραρίστηκαν, διαλύθηκαν πριν την εισαγωγή τους στη στήλη της ΜΧΦΠ, για να αποφευχθεί υπερφόρτωση. Όλα τα δείγματα διαλύθηκαν 10 φορές στην κινητή φάση, εκτός από αυτό του γάλακτος του καλαμποκιού που διαλύθηκε 2 φορές. Οι πυκνότητες όλων των δειγμάτων γάλακτος θεωρείται ότι είχαν την ίδια τιμή ($1,05 \text{ g cm}^{-3}$) με τα σωματίδια πολυστυρολίου.

3.2 Αποτελέσματα

3.2.1 Βαθμονόμηση της στήλης της ΜΧΦΠ..

Για την βαθμονόμηση της στήλης της ΜΧΦΠ, χρησιμοποιήθηκαν σφαίρες πολυστυρολίου με γνωστά τα μεγέθη σωματιδίων τους. Τα διαγράμματα αυτά απεικονίζονται στο Σχ.4. Κάνοντας βαθμονόμηση της στήλης της ΜΧΦΠ με αυτά τα πρότυπα βρέθηκε η εξής καμπύλη βαθνομόσης για την κανονική λειτουργία κατακράτησης: $\log t_r = 0,770 \log d + 1,7$, $R^2 = 0.984$, όπου t_r , είναι ο χρόνος κατακράτησης και d είναι η τιμή της διαμέτρου. Η συνάρτηση αυτή χρησιμοποιήθηκε για να μετατραπούν οι χρόνοι κατακράτησης των διαγραμμάτων του γάλακτος σε τιμές διαμέτρου [33].

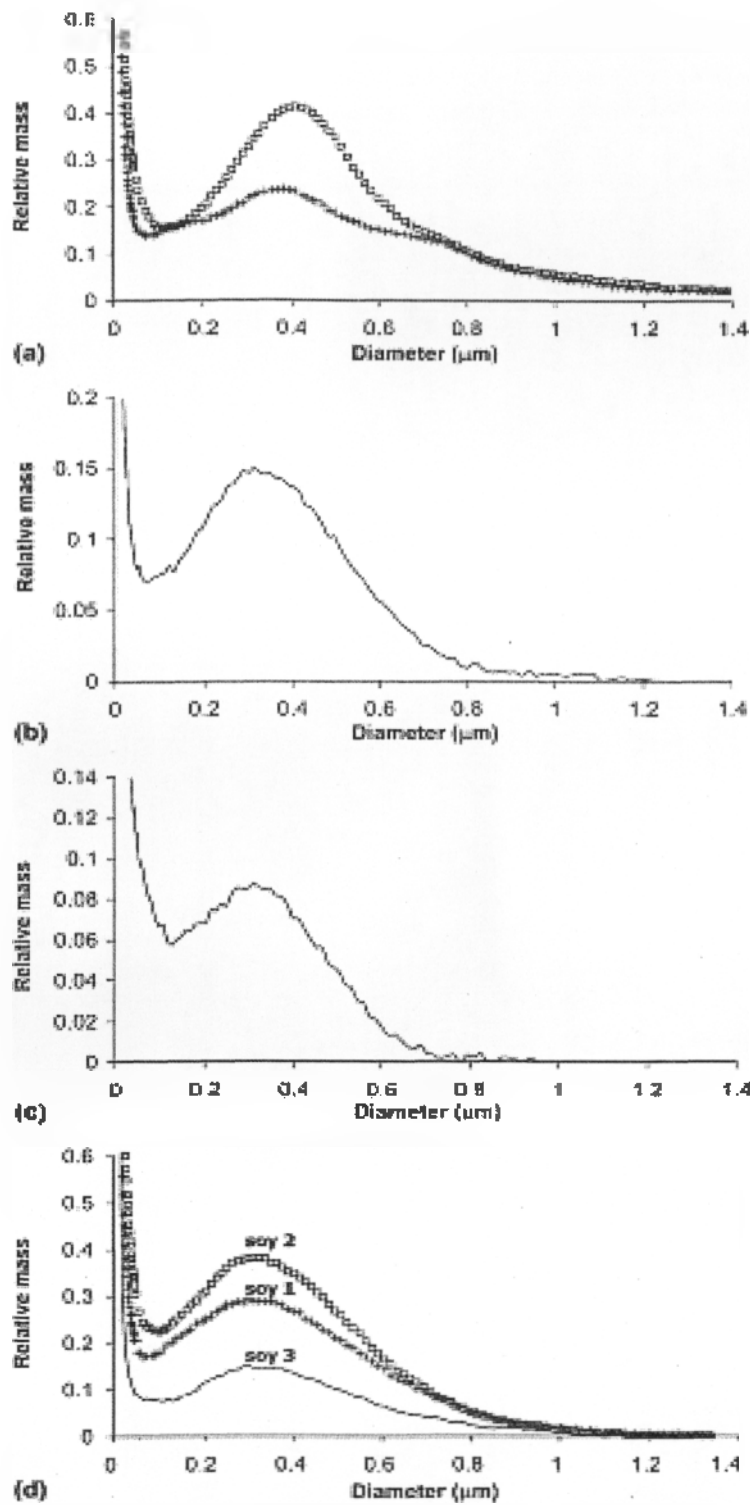


Σχήμα 4: Διάγραμμα πρότυπων σωματιδίων πολυστυρολίου που χρησιμοποιούνται για την βαθμονόμηση της στήλης ΜΧΦΠ σε κανονική λειτουργία.

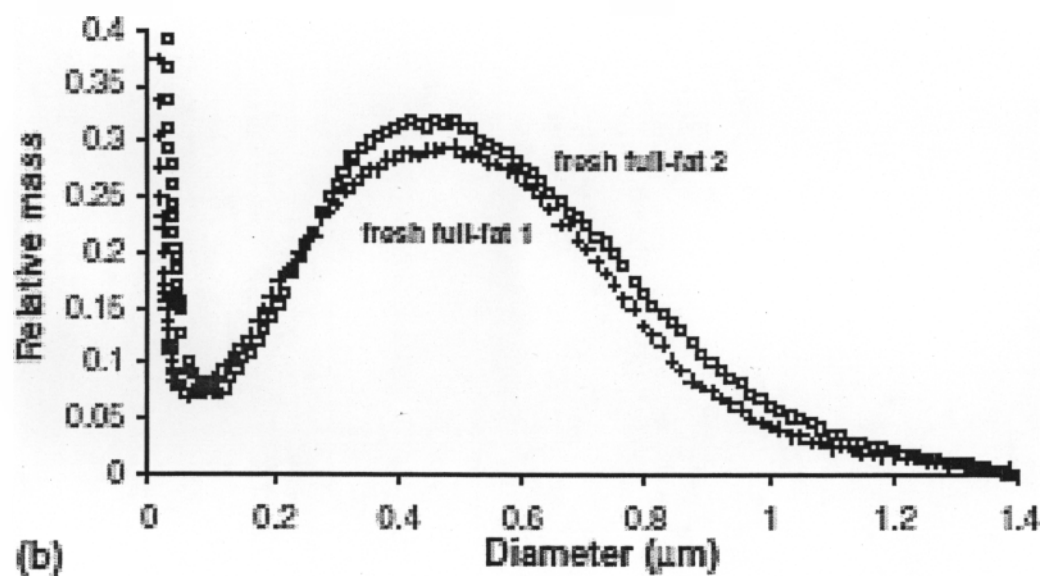
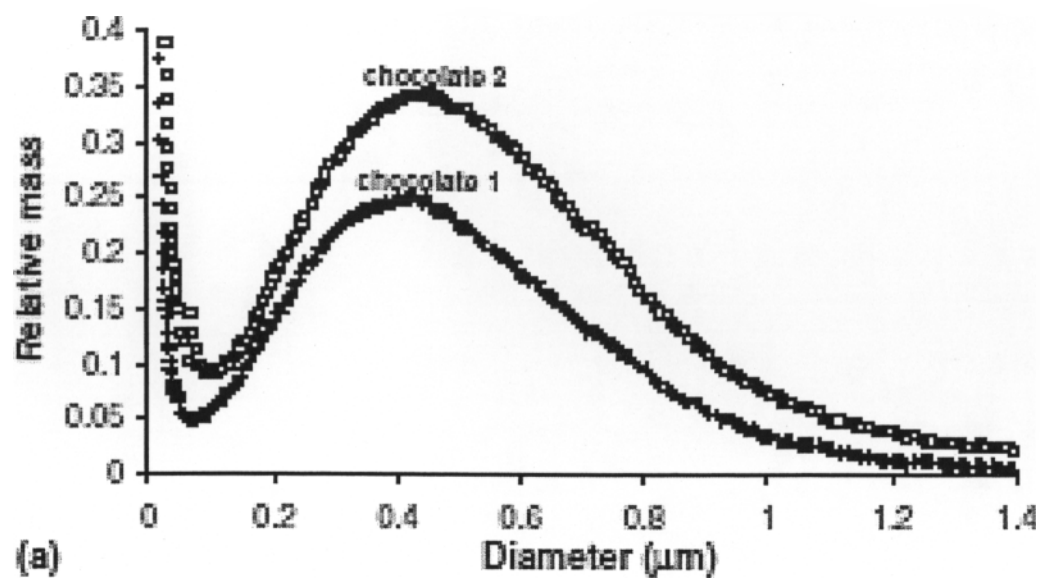
3.2.2 Πληροφορίες μεγέθους σωματιδίων των δειγμάτων γάλακτος

Η κατανομή του μεγέθους των δειγμάτων γάλακτος εμφανίζονται στα Σχ.5 και Σχ.6. Στο Σχ.5 παρουσιάζονται οι κατανομές του μεγέθους των σωματιδίων του γάλακτος των δημητριακών, και στο Σχ.6 παρουσιάζονται οι κατανομές του αγελαδινού γάλακτος. Όλα τα δείγματα του γάλακτος, εμφάνισαν μια ευρεία κατανομή μεγέθους, η οποία πιθανώς να οφείλεται στην παρουσία των λιποσφαιριδίων ($> 0,1 \mu\text{m}$) και των μυκελίων καζεΐνης ($< 0,1 \mu\text{m}$). Είναι πιθανό τα μόρια των πρωτεϊνών του γάλακτος λόγω των μικρών τους διαμέτρων να συνεκλούνται.

Τα περισσότερα δείγματα παρουσιάζουν μια απλή κατανομή μεγέθους, ενώ το δείγμα γάλακτος-καλαμπόκι 2 παρουσίασε μια μικρή απόκλιση από την απλή κατανομή μεγέθους [34,35].



Σχήμα 5: Κατανομή μεγέθους των δειγμάτων του γάλακτος των δημητριακών, όπου (α) γάλα καλαμποκιού, (β) job tear γάλα, (γ) γάλα ρυζιού και (δ) γάλα σόγιας.



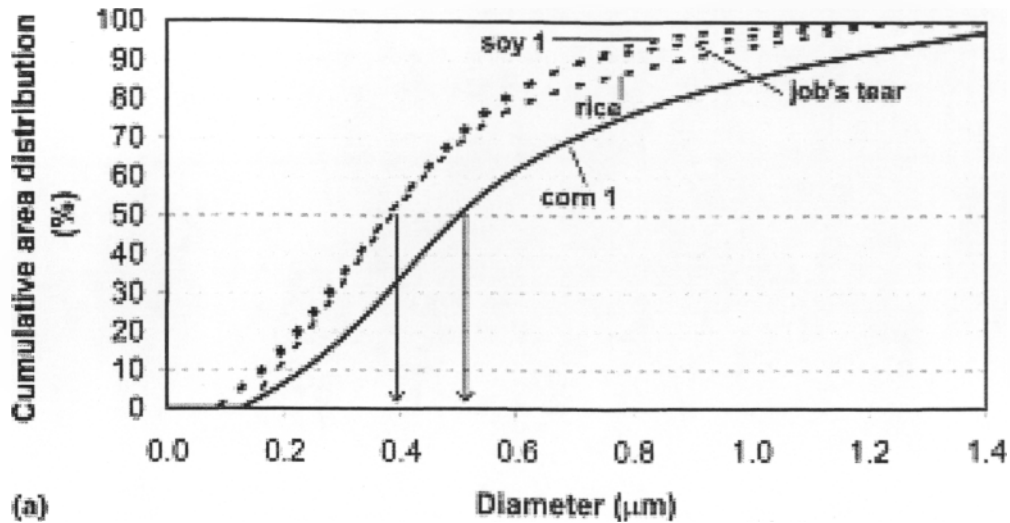
Σχήμα 6: Κατανομή μεγέθους των δειγμάτων του αγελαδινού γάλακτος, (α) για το σοκολατούχο γάλα 1 και 2 και (β) για το πλήρες φρέσκο γάλα 1 και 2.

Πίνακας 2: Πληροφορίες του μεγέθους σωματιδίων των δειγμάτων του γάλακτος.

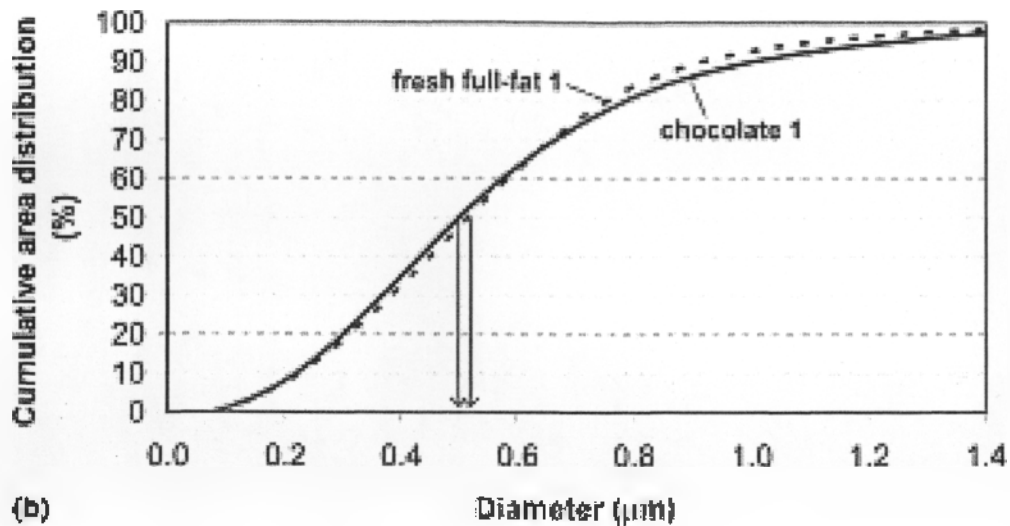
	d_p (μm)	d_{mean} (μm)	Ρυθμικότητα (%CV)
<i>Cereal milk</i>			
Corn 1	0.40	0.50	58.0
Corn 2	0.38	0.47	54.9
Joh's tear	0.33	0.38	53.9
Rice	0.31	0.38	55.8
Soy 1	0.32	0.38	57.9
Soy 2	0.32	0.42	56.7
Soy 3	0.33	0.44	58.2
<i>Non-cereal milk</i>			
Chocolate 1	0.42	0.50	59.0
Chocolate 2	0.44	0.53	52.8
Fresh full fat 1	0.46	0.51	52.0
Fresh full fat 2	0.46	0.52	47.1

Στον Πιν.2, παρουσιάζονται τα μεγέθη των σωματιδίων που αντιστοιχούν στο μέγιστο της κορυφής έκλυσης (d_p). Όπως παρατηρούμε οι τιμές d_p του αγελαδινού γάλακτος είναι μεγαλύτερες από αυτές του γάλακτος των δημητριακών. Τα περισσότερα γάλατα δημητριακών παρουσιάζουν τιμές d_p που κυμαίνονται από 0.31 έως 0,33 μm, ενώ το γάλα του καλαμποκιού έδωσε τιμές κοντά στα 0,4 μm. Το αγελαδινό γάλα, εμφανίζει τιμές άνω του 0.40 μm που κυμαίνονται από 0,42–0,46 μm. Οι μεγαλύτερες τιμές d_p που εμφανίζει το γάλα του καλαμποκιού σε σύγκριση με άλλα δημητριακά γάλακτος είναι ότι το γάλα του καλαμποκιού που εξετάζεται σε αυτό το πείραμα, είναι μείγμα μεταξύ καλαμποκιού και αγελαδινού γάλακτος. Τα συστατικά του γάλακτος του καλαμποκιού είναι 97% γάλα καλαμποκιού, 2% ζάχαρη και 1% γάλα σε σκόνη.

Για να υπολογιστεί το μέσο μέγεθος των σωματιδίων (d_{mean}) των δειγμάτων γάλακτος, οι κατανομές των διαμέτρων (σχήματα 5 και 6) έδωσαν τις αθροιστικές καμπύλες που δίνονται το σχήμα 7 [36,37].



(a)



(b)

Σχήμα 7: Αθροιστική καμπύλη κατανομής για: (α) δείγματα γάλακτος των δημητριακών, όπου οι διακεκομμένες γραμμές αντιπροσωπεύουν το job tear, ρύζι, σόγια γάλακτος, ενώ η συνεχής γραμμή το καλαμπόκι 1. (β) δείγματα αγελαδινού γάλακτος, όπου οι διακεκομμένες γραμμές αντιπροσωπεύουν το πλήρες φρέσκο γάλα 1, ενώ η συνεχής γραμμή το σοκολατούχο γάλα 1. Οι γραμμές βέλους υποδεικνύουν την τιμή της μέσης διαμέτρου (d_{mean}).

Η d_{mean} ορίζεται ως το μέγεθος των σωματιδίων στο 50 % του συνόλου της αθροιστικής καμπύλης κατανομής. Οι τιμές αυτές παρατίθενται στον πίνακα 2. Σε όλες τις περιπτώσεις, οι τιμές d_{mean} ήταν μεγαλύτερες από τις τιμές d_p . Παρόμοια με τις τιμές d_p , το αγελαδινό γάλα παρουσίασε μεγαλύτερες d_{mean} τιμές και ακολουθεί το καλαμπόκι και η σόγια, αντίστοιχα. Γάλα από ρύζι παρουσίασε μικρότερες d_{mean} τιμές. Επίσης η διαφορά των παραπάνω τιμών είναι και μια ένδειξη της αίσθησης που

αφήνουν στο στόμα αυτά τα δυο είδη γάλατος, δηλαδή το αγελαδινό και αυτό από τα δημητριακά. Όπως αποδεικνύεται το αγελαδινό αφήνει καλύτερη αίσθηση στο στόμα, κάτι το οποίο οφείλεται στο ότι οι τιμές d_p και d_{mean} του γάλατος των δημητριακών είναι περίπου στα 0,3 μm , μεγέθη που προσδίδουν στο στόμα αίσθηση με χαρακτηριστικά ανάμεσα στην κρεμμώδη και υδατική γεύση. Συνεπώς απαιτείται ποιοτικός έλεγχος ώστε το μέγεθος των σωματιδίων να είναι τέτοιο (0,4-0,5 μm) που να εξασφαλίζεται η κατάλληλη γεύση.

Επίσης μετρήθηκε η πολυμοριακότητα των κατανομών μεγέθους του γάλακτος. Η τιμή της πολυμοριακότητας παριστάνεται με ένα συντελεστή διακύμανσης εκφρασμένο επί τοις εκατό (% CV). Η τιμή του % CV υπολογίστηκε μετρώντας την επι τοις εκατό αναλογία της τυπικής απόκλισης (σ) της διαμέτρου των σωματιδίων προς την μέση διάμετρο. Οι παραπάνω τιμές παρουσιάζονται στον πίνακα 2. Μικρές τιμές υποδηλώνουν καλή ομοιογένεια, ενώ μεγαλύτερες φανερώσουν υψηλό βαθμό ετερογένειας.

Το συμπέρασμα λοιπόν είναι ότι οι μικρότερες τιμές πολυμοριακότητας του αγελαδινού γάλακτος από αυτές του γάλακτος των δημητριακών, οφείλονται στο ότι το αγελαδινό γάλα παρασκευάστηκε με τη διαδικασία της ομογενοποίησης. Αντίθετα, το γάλα των δημητριακών παρασκευάστηκε από την διάλυση των σπόρων των φυτών μέσω μηχανικής άλεσης, μέσω της οποίας η ομοιογένεια είναι περισσότερο δύσκολο να επιτευχθεί [38,39].

3.3 Συμπέρασμα

Η τεχνική της ΜΧΦΠ κρίθηκε ικανή για τον χαρακτηρισμό του μεγέθους των σωματιδίων των τροφίμων,. Η τεχνική αυτή μπορεί να εφαρμοστεί με επιτυχία στις περιοχές των μm και nm και για αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί στις επιστήμες των τροφίμων. Η νέα έννοια του συντελεστή διόγκωσης που προκύπτει από τα πειράματα θα μπορούσε να είναι μια εναλλακτική προσέγγιση της μελέτης της ικανότητας κατακράτησης νερού ή των ιδιοτήτων διόγκωσης των διαφόρων συστατικών των τροφίμων.

4. Το μέγεθος των σωματιδίων και η σταθερότητα του UHT γάλακτος αγελαδινού, σιτηρών και δημητριακών.

4.1 Εισαγωγή

Τα γάλατα των δημητριακών και των σιτηρών, τα οποία παράγονται από σπόρους και δημητριακά, είναι γνωστά εδώ και αρκετά χρόνια. Ωστόσο, υπάρχουν και άλλα είδη γάλακτος όπως αυτά που έχουν παραχθεί από ρεβίθια, καλαμπόκι, κεχρί και σίκαλη [40].

Τις τελευταίες 2 δεκαετίες, η κατανάλωση του γάλακτος σιτηρών και δημητριακών στον δυτικό κόσμο έχει αυξηθεί, λόγω του αυξημένου ενδιαφέροντος περί υγιεινής διατροφής των καταναλωτών. Πιο πρόσφατα, προέκυψαν στην αγορά γάλατα από ρύζι και βρώμη. Συγκριτικά με το αγελαδινό γάλα, το γάλα των δημητριακών και σιτηρών δεν έχει χοληστερόλη ή λακτόζη, και είναι κατάλληλο για τα άτομα που κάνουν δίαιτα, για τους χορτοφάγους, για τους διαβητικούς, για εκείνους που παρουσιάζουν δυσανεξία στην λακτόζη και για βρέφη [41].

Το γάλα, των σιτηρών, των δημητριακών και το αγελαδινό, είναι κολλοειδή γαλακτώματα και αιωρήματα, δηλαδή διασπορές σωματιδίων ή σταγονιδίων με τουλάχιστον μια τους διάσταση να είναι από 1nm έως 1 μm. Τα γαλακτώματα γάλακτος δημιουργούνται από σταγονίδια λίπους και σταθεροποιούνται από επιφανειακώς δραστικά αντιδραστήρια όπως είναι οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια. Τα εναιωρήματα αποτελούνται από αδιάλυτα, στερεά σωματίδια όπως είναι μη διαλυτές πρωτεΐνες, άμυλο, ίνες και άλλα κυτταρικά υλικά, τα οποία αιωρούνται στο υδατικό διάλυμα [42].

Στα εναιωρήματα τα σωματίδια μπορούν να συσσωματωθούν και τελικά να καθιζάνουν. Στα γαλακτώματα ο συνολικός αριθμός των σωματιδίων, το μέγεθος τους όπως και η κατανομή τους στο χώρο είναι δυνατόν να αλλάξουν. Η σταθερότητα του γαλακτώματος έχει να κάνει με το μέγεθος των σταγονιδίων και το βαθμό συσσωμάτωσής τους. Το γάλα δημητριακών και σιτηρών παρασκευάζεται με διάλυση των σπόρων του φυτού, κάτι το οποίο συνεπάγεται ανομοιομορφία στο μέγεθος και τη σύσταση των σωματιδίων, εν αντιθέσει με το αγελαδινό γάλα. Το μέγεθος των δημητριακών και των σπόρων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον τρόπο με τον οποίο λειοτριβούνται [43]. Η παρουσία μεγαλύτερου μεγέθους σωματιδίων επηρεάζει

τη σταθερότητα των διαφόρων ειδών γάλακτος και μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα στη μεταφορά της θερμότητας όπως επίσης στην εφύγρανση του υλικού, με αποτέλεσμα την πιθανή, αναποτελεσματική καταστροφή των μικροβίων. Η ομογενοποίηση είναι ένας τρόπος αύξησης της σταθερότητας του αγελαδινού γάλατος και των γαλάτων σόγιας [44].

Η βακτηριακή αλλοίωση είναι ένας περιοριστικός παράγοντας για το χρόνο ζωής του UHT γάλατος διότι η θερμική επεξεργασία γίνεται με σκοπό την καταστροφή όσο το δυνατόν περισσότερων μικροβίων [45]. Έτσι, οι φυσικοχημικές αντιδράσεις που πραγματοποιούνται στο γάλα μειώνουν το χρόνο ζωής του. Επίσης, η θερμική επεξεργασία είναι δυνατόν να αλλοιώσει τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια τα οποία σταθεροποιούν το γαλάκτωμα. Κατά αυτόν τον τρόπο μπορεί να επηρεαστεί και η σταθερότητα των λιπαρών σταγονιδίων με αποτέλεσμα την αύξηση του μεγέθους τους με την πάροδο του χρόνου και τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία γάλατος με κρεμμώδη σύσταση. Μεταβολές στις πρωτεΐνες μπορεί να οδηγήσουν σε ζελατινοποίηση ή και σε καταβύθιση των στερεών.

Το άμυλο που βρίσκεται στα φυτά απαιτεί θέρμανση για να διαλυτοποιηθεί, ταυτόχρονα αυξάνεται και το ιξώδες του, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η σταθερότητα του γάλατος των δημητριακών και συνεπώς και ο χρόνος ζωής του [46].

Η βελτιστοποίηση της παστεροποίησης και η σταθεροποίηση των γαλακτωμάτων έναντι στο διαχωρισμό είναι απαραίτητες για την παρασκευή γάλατος με μεγάλους χρόνους ζωής.

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι η μελέτη της σταθερότητας και του χρόνου ζωής γάλατος δημητριακών.

Τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής σε συνδυασμό με τα μεγέθη των στερεών σωματιδίων και σταγονιδίων θα βοηθήσουν στην κατανόηση των μηχανισμών που επηρεάζουν τη σταθερότητα ενός γάλατος και θα αυξήσουν το χρόνο ζωής του.

4.2 Υλικά και μέθοδοι

Σε αυτό το πείραμα, χρησιμοποιήθηκαν 4 διαφορετικοί τύποι UHT γάλακτος. Το γάλα των δημητριακών και των σιτηρών προέρχονταν από βρώμη, ρύζι και σόγια. Αγελαδινό γάλα χωρίς λακτόζη, χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα αναφοράς. Τα συστατικά των διαφόρων ειδών γάλατος που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3: Ανάλυση των συστατικών του UHT γάλακτος.

Συμπλκ	Ingredients	Product name
Bacore milk Soy milk	Bacore milk, enzyme (lactase), (3.3% fat) Soy protein, sunflower oil, maltodextrin, cane sugar, potassium phosphates of calcium, potassium and magnesium, food acid (E32), vitamins (B2, B1, A, B12), filtered water added, (3.4% fat)	Estelle's, lactose free Sanitation, soyaud
Buc milk Oat milk	Wholegrain brown rice, sunflower oil, sea salt, filtered water, (1.1% fat) Whole oats, canola oil, lecithin and filtered water, (2.0% fat)	Pureinvest, Assiék, nes; Pureinvest, oat

Οι κατανομές μεγέθους των σωματιδίων μετρήθηκαν μέσω τεχνικών σκέδασης του φωτός με τη βοήθεια συσκευής (Malvern Mastersizer E) με φακό των 45mm. Επειδή το όργανο αυτό απαιτεί μια σχεδόν διαφανή ουσία είναι απαραίτητο τα διάφορα είδη γάλακτος να αραιωθούν πριν την έναρξη μετρήσεων.

Τα δείγματα αραιώθηκαν με νερό βρύσης, νερό αποσταγμένο και ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο περιείχε 5mM CaCl₂, 50 mM NaCl και 20 mM ιμιδαζόλης σε pH 7,0, το οποίο είναι γνωστό ότι διατηρεί την κατανομή του μεγέθους των σωματιδίων. Καθώς δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στο μέγεθος των σωματιδίων ανάμεσα στα δείγματα που είχαν αραιωθεί με αποσταγμένο νερό, με νερό βρύσης και με ρυθμιστικό διάλυμα, όλες οι μετρήσεις έγιναν σε δείγματα που είχαν αραιωθεί με νερό βρύσης [47].

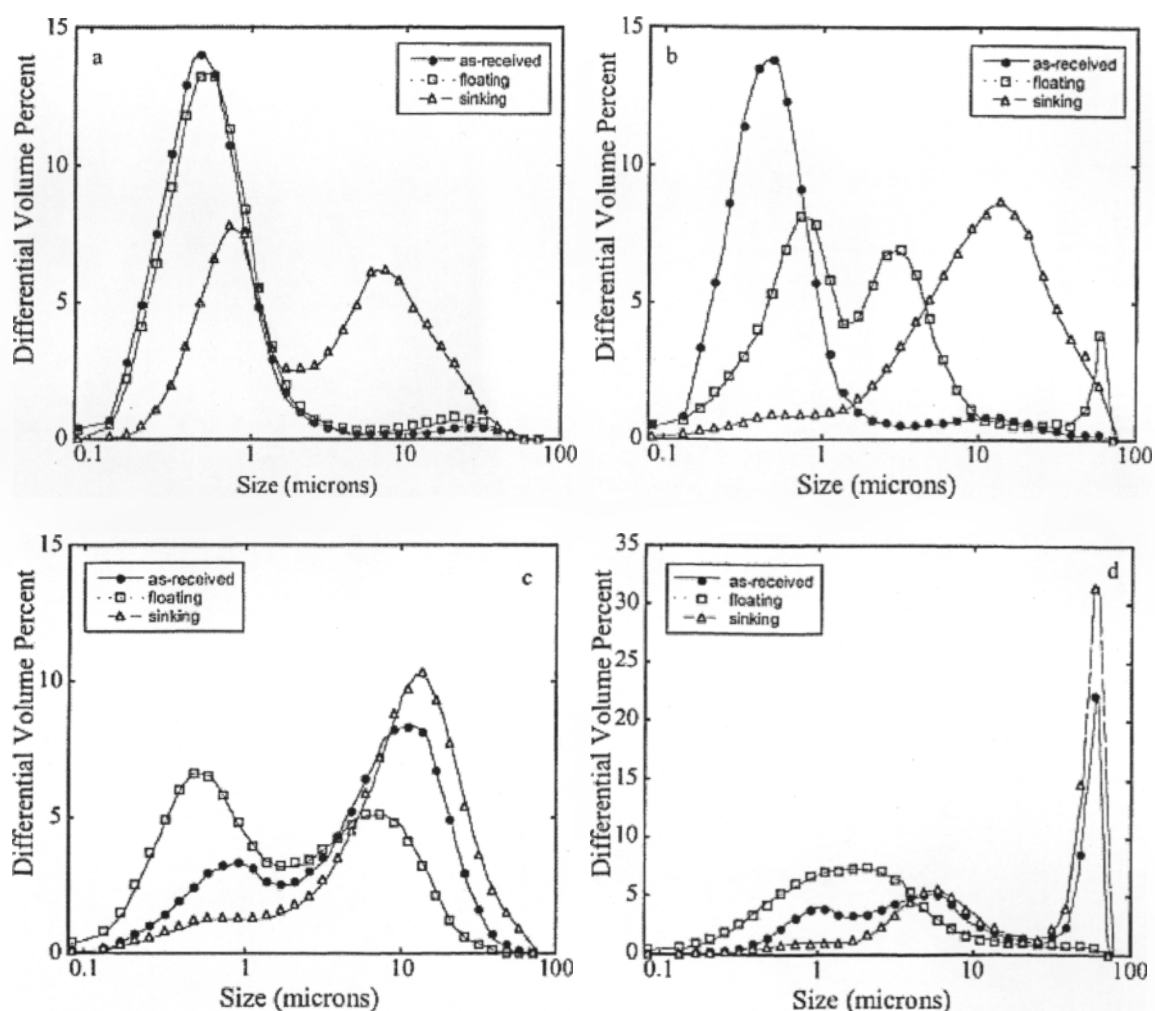
Σε κάθε δείγμα γάλακτος πραγματοποιήθηκε μια αρχική μέτρηση. Στη συνέχεια όλα τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 30 λεπτά στα 500rpm (43g) ώστε να διαχωριστούν τα σταγονίδια λίπους από τα μη-λιπαρά στερεά.. Μετά τη φυγοκέντρωση τα λιγότερο λιπαρά σφαιρίδια ανέβηκαν στην επιφάνεια του γάλακτος, ενώ οι πρωτεΐνες στον πάτο. Κατόπιν προσδιορίστηκαν οι κατανομές μεγέθους των σωματιδίων προκειμένου να διευκρινιστεί ποιου μεγέθους σωματίδια αντιστοιχούν στις στερεές πρωτεΐνες του γάλακτος και ποια στα λιπαρά σταγονίδια. Ακολούθησε οπτική μικροσκοπία ώστε να επιβεβαιωθούν τα προηγούμενα αποτελέσματα.

Η σταθερότητα των δειγμάτων προσδιορίστηκε με έναν αναλυτή θολερότητας τύπου Coulter Quickscan. Ο αναλυτής αυτός σκανάρει ολόκληρο το δείγμα με ακτίνα μήκους κύματος στο εγγύς υπέρυθρο και μετράει το ποσοστό του φωτός που σκεδάζεται ή εκπέμπεται από το δείγμα ως συνάρτηση του χρόνου. Για τα θολά δείγματα του γάλακτος μόνο οι μετρήσεις του σκεδαζόμενου φωτός αποδείχτηκαν χρήσιμες. Μεταβολές στα επίπεδα σκεδασμού συνδέονται με μεταβολές στην ομογένεια, στο μέγεθος και στη συγκέντρωση των σωματιδίων και συνεπώς με τη

σταθερότητα του γάλατος. Αύξηση της έντασης σκεδασμού φανερώνει πως έχει επίσης αυξηθεί η συγκέντρωση των σωματιδίων, το μέγεθος ή ο βαθμός ανάκλασης. Οι μετρήσεις έγιναν σε θερμοκρασία δωματίου με διαλείμματα των δέκα λεπτών για διάστημα μεγαλύτερο των 2h. Τέλος οι μετρήσεις για τη σταθερότητα πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον δυο φορές και έδωσαν τα ίδια αποτελέσματα κάθε φορά.

4.3 Αποτελέσματα

Οι κατανομές μεγέθους των σωματιδίων παρουσιάζονται στο σχήμα 8.



Σχήμα 8: Οι κατανομές μεγέθους των σωματιδίων για, (α) αγελαδινό γάλα, (β) γάλα σόγιας, (γ) γάλα βρώμης και (δ) ρύζι γάλακτος.

Τα σωματίδια με μέγεθος μεγαλύτερο των 3 μm αναφέρονται ως μεγάλα (σε αυτήν την εργασία), ενώ αυτά με μέγεθος μικρότερο των 3 μm ως μικρά. Το αγελαδινό γάλα

και το γάλα σόγιας περιείχαν μικρό κλάσμα μεγάλων σωματιδίων. Αντίθετα το γάλα βρώμης περιείχε διπλάσιο αριθμό μεγάλων σωματιδίων από ότι μικρών και τέλος το γάλα ρυζιού περιείχε ακόμα λιγότερα μικρά σωματίδια.

Παρατηρώντας κανείς προσεκτικά τις κατανομές παρατηρεί ότι τα μικρού μεγέθους σωματίδια επιπλέουν μετά τη φυγοκέντρωση ενώ τα μεγάλα καθιζάνουν. Τα μικρού μεγέθους σωματίδια είναι λιγότερο πυκνά από το νερό και πρόκειται για λιποσφαιρίδια ή λιπαρά σταγονίδια γαλακτώματος, ενώ τα μεγαλύτερου μεγέθους σωματίδια έχουν μεγαλύτερη πυκνότητα από το νερό και είναι πρωτεΐνες, άμυλο, ίνες και άλλα κυτταρικά προϊόντα.

Στο σχήμα 8 παρατηρούνται κάποιες ανωμαλίες. Η εξήγησή τους δίνεται παρακάτω. Στο σχήμα 8α το βυθιζόμενο κλάσμα του αγελαδινού γάλατος περιείχε και μικρά και μεγάλα σωματίδια. Αυτό οφείλεται στο ότι ο αριθμός των μεγάλων σωματιδίων στο αγελαδινό γάλα είναι μικρός και έτσι είναι δύσκολο να πάρει κανείς δείγμα από το βυθιζόμενο κλάσμα χωρίς να πάρει και μικρότερου μεγέθους επιπλέοντα κομμάτια.

Στα σχήματα 8b (γάλα σόγιας) και 8c (γάλα βρώμης), το κομμάτι που επιπλέει περιείχε κάποια μεγάλα σωματίδια και στην περίπτωση του γάλατος σόγιας, μερικά πολύ μεγάλου μεγέθους σωματίδια (γύρω στα 50 μ m). Η παρουσία αυτών των μεγάλων σωματιδίων στο κλάσμα των επιπλέοντων σωματιδίων, τα οποία δεν υπήρχαν στο αρχικό δείγμα είναι πολύ πιθανό να οφείλονται σε συγχώνευση ή συσσωμάτωση των μικρών λιπαρών σταγονιδίων μετά από τη διαδικασία της φυγοκέντρωσης.

Συχνά είναι πιο βολικό να εκφράσουμε μια περίπλοκη κατανομή μεγέθους σωματιδίων με τη βοήθεια της μέσης ή διάμεσης τιμής. Στον πίνακα 4

Πίνακας 4: Η μέση τιμή ($d_{3,2}$) και η διάμεσος τιμή (d_{50}) των κατανομών του μεγέθους των σωματιδίων των γαλάκτων σε (μ m).

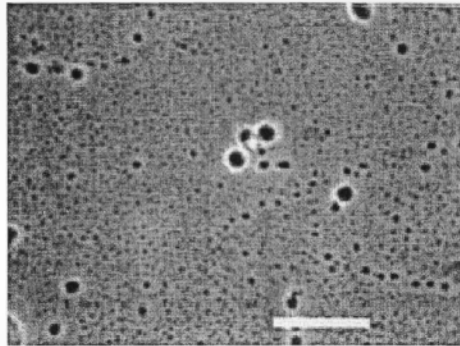
Milk	As-received		Floating portion		Sinking portion	
	$d_{3,2}$ (μ m)	d_{50} (μ m)	$d_{3,2}$ (μ m)	d_{50} (μ m)	$d_{3,2}$ (μ m)	d_{50} (μ m)
Bovine	0.45	0.43	0.50	0.60	1.21	2.63
Soy	0.42	0.47	1.02	1.33	3.01	10.3
Oat	1.55	6.11	0.70	1.99	2.87	10.5
Rice	2.52	6.64	1.22	2.19	4.90	30.0

παρουσιάζονται οι μέσες τιμές ($d_{3,2}$) και οι διάμεσες τιμές (d_{50}) όπως αυτές υπολογίστηκαν μετά από τρεις μετρήσεις. Η σειρά για τα μελετηθέντα δείγματα

γάλακτος είναι κατά σειρά μειούμενης μέσης τιμής μεγέθους σωματιδίων: γάλα με ρύζι > βρώμης > σόγιας>αγελαδινό [48].

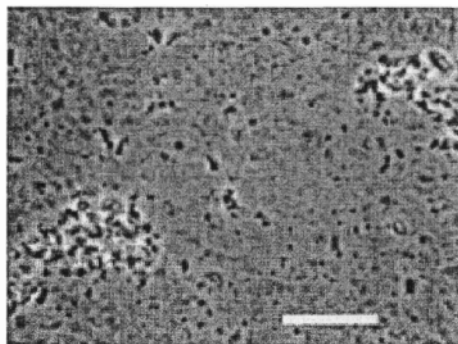
Τα αποτελέσματα της μικροσκοπικής ανάλυσης επαλήθευσαν τις παραπάνω μετρήσεις. Το αγελαδινό γάλα είχε τα μικρότερα σωματίδια και οι κατανομές των μεγεθών ήταν πιο στενές από αυτές των άλλων τύπων γάλατος.

Το γάλα σόγιας είχε παρόμοια εμφάνιση με αυτή του αγελαδινού γάλατος.



Σχ.9: Αντιπροσωπευτική εικόνα των σωματιδίων στο αγελαδινό γάλα με την χρήση οπτικού μικροσκοπίου αντίθετης φάσης.

Στο Σχ. 9 παρουσιάζεται μια αντιπροσωπευτική εικόνα των σωματιδίων στο αγελαδινό γάλα. Το γάλα βρώμης και ρυζιού περιέχει σωματίδια παρόμοιου μεγέθους με αυτά του Σχ. 9, αλλά και συγκροτήματα σωματιδίων τα οποία δεν συναντώνται στο αγελαδινό γάλα και στο γάλα σόγιας. Η απουσία αυτών εξηγεί γιατί αυτά τα δυο είδη γάλατος εμφανίζουν σημαντικά μικρότερες μέσες τιμές μεγέθους. Στο Σχ. 10 παρουσιάζεται μια αντιπροσωπευτική εικόνα κάποιων συγκροτημάτων σωματιδίων που περιέχονται στο γάλα βρώμης.

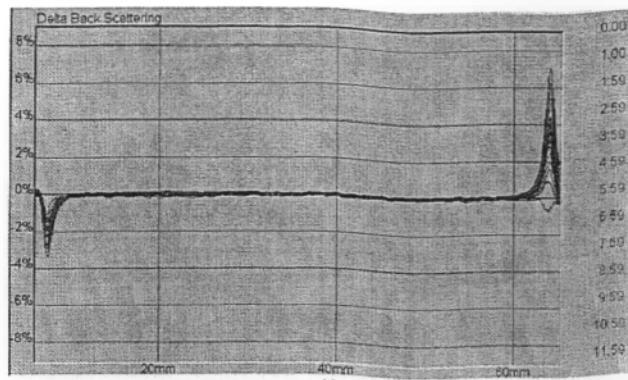


Σχ.10: Συγκροτήματα σωματιδίων που παρουσιάζονται στο γάλα βρώμης με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου αντίθετης φάσης.

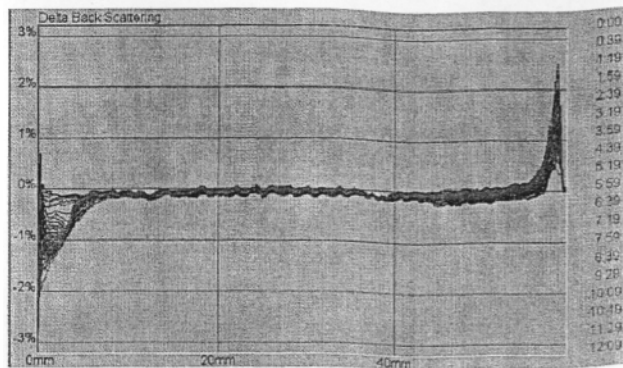
Η αστάθεια στα γάλατα προκαλείται είτε με την κρεμοποίησή τους (όταν λιποσφαιρίδια συγκεντρώνονται στην επιφάνεια) είτε με το σχηματισμό ιζήματος (στερεά σωματίδια συγκεντρώνονται στον πυθμένα του δοχείου). Η μεταφορά των σωματιδίων παρατηρήθηκε από μετρήσεις της θολότητας. Μεταβολές στην ένταση σκεδασμού για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα παρουσιάζονται στο σχήμα 11.

Το αγελαδινό γάλα και τα γάλατα σόγιας κρεμοποιήθηκαν (σχήμα 11a και 11b). Η αύξηση του σκεδασμού στην κορυφή του δείγματος (κοντά στα 60 nm) φανερώσει αύξηση της συγκέντρωσης των σωματιδίων στην κορυφή του σωλήνα του δείγματος. Η μείωση του σκεδασμού στο κάτω μέρος του σωλήνα υποδηλώνει μείωση της συγκέντρωσης των σωματιδίων στον πυθμένα του σωλήνα. Είναι φανερό πως τα σωματίδια μετανάστευσαν από τον πυθμένα στην κορυφή του σωλήνα μέσα στο χρονικό διάστημα των 12 ωρών της μέτρησης.

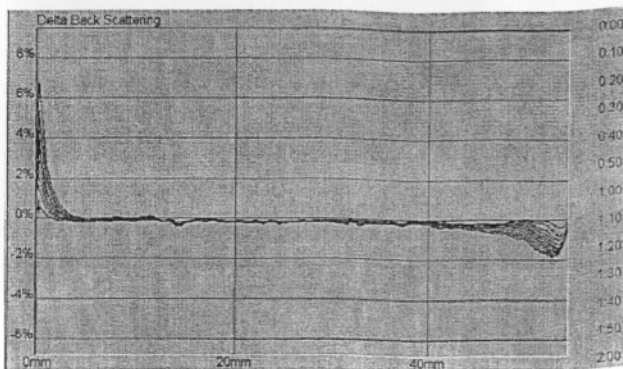
Στο γάλα βρώμης και ρυζιού παρατηρήθηκε καθίζηση (σχήμα 11c και 11b), ενώ λόγω της μικρότερης περιεκτικότητάς του σε λιπαρά δεν παρατηρήθηκε σε αυτά κρεμοποίηση (πίνακας 3). Σε αυτή την περίπτωση η ένταση σκεδασμού στο κάτω μέρος του δείγματος ήταν αυξημένη λόγω ενός ολοένα και μεγαλύτερου αριθμού σωματιδίων κινούμενων προς τον πυθμένα του δοχείου. Εξάλλου η διαύγεια στην κορυφή του δείγματος φανερώσει μείωση της συγκέντρωσης των σωματιδίων εκεί. Η έκταση του φαινομένου αυτού στο αγελαδινό γάλα και στα γάλατα σόγιας ήταν σε μικρότερο βαθμό και διήρκεσε για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από ότι στο γάλα ρυζιού. Το γάλα βρώμης είχε παρόμοια συμπεριφορά με το γάλα ρυζιού, όμως τα φαινόμενα καθίζησης και διαύγασης ήταν λιγότερο έντονα.



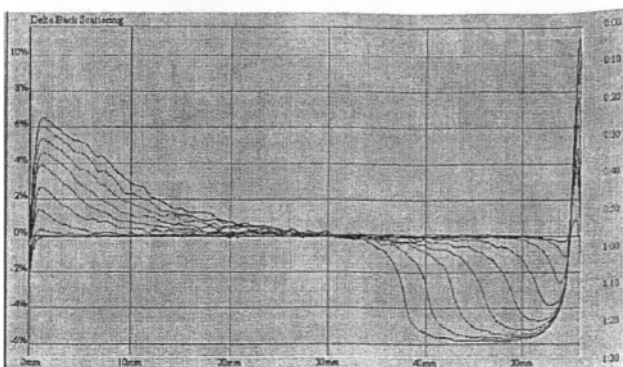
(a)



(b)



(c)



(d)

Σχήμα 11: Delta Backscattering σε σχέση με το μέγεθος δείγματος για (a) αγελαδινό γάλα (12 h), (b) γάλα σόγιας (12 h), (c) γάλα βρώμης (2 h) και (d) γάλα ρυζιού (2 h). Τα 0 mm αντιστοιχούν στο κάτω όριο του δείγματος (sample bottom) και τα περίπου 55–60 mm στο άνω όριο του δείγματος (sample top). Οι αριθμοί στο δεξιό μέρος των γραφικών παραστάσεων απεικονίζουν το χρόνο κάθε σάρωσης.

4.4 Συζήτηση

Τα γάλατα με ρύζι και βρώμη περιείχαν κλάσματα μεγάλων σωματιδίων πυκνότερων του νερού (σχήμα 8c και 8d). Επίσης διέθεταν λιγότερα λιπαρά σε σχέση με τα γάλατα αγελάδας και σόγιας, τα οποία περιείχαν πολύ μικρό ποσοστό μεγάλων σωματιδίων πυκνότερα του νερού. Τα γάλατα αυτά σε μικρό βαθμό είχαν κρεμμώδη σύσταση.

Οι μικρές ταχύτητες κρεμοποίησης και διαύγασης οφείλονται στο μικρό μέγεθος των λιπαρών σφαιριδίων του αγελαδινού γάλατος και του γάλατος σόγιας. Πιθανή κρεμοποίηση είναι πιθανόν να πραγματοποιηθεί και στα γάλατα βρώμης και σόγιας (σχήμα 8c και 8d, λόγω της παρουσίας μεγαλύτερων επιπλέοντων σωματιδίων), είναι όμως δύσκολο να παρατηρηθεί λόγω της τάσης που έχουν αυτών των τύπων γάλατος να καθιζάνουν. Τη μεγαλύτερη σταθερότητα τόσο έναντι της καθίζησης όσο και έναντι της κρεμοποίησης, παρουσίασε το αγελαδινό γάλα, λόγω των μικρών ποσοτήτων μεγάλου μεγέθους σωματιδίων και μικρού μεγέθους λιπαρών σφαιριδίων. Η ταχύτητα με την οποία τα σωματίδια και τα σταγονίδια καταβυθίζονται ή κρεμοποιούνται εξαρτάται από το μέγεθος του σωματιδίου, το ιξώδες του διαλύτη και την διαφορά πυκνότητας μεταξύ των σωματιδίων και του διαλύτη. Για μικρού μεγέθους σωματίδια και μικρές διαφορές πυκνότητας (όπως συμβαίνει και στο γάλα) ισχύει :

$$v_T = \frac{(P_p - P_L)d_g^2}{18\mu} \quad (11)$$

όπου V_T είναι η τελική ταχύτητα,

P_p, P_L οι πυκνότητες σωματιδίου και διαλύτη αντίστοιχα

g η επιτάχυνση της βαρύτητας

d η διάμετρος του σωματιδίου

μ το ιξώδες του νερού.

Η πυκνότητα της πρωτεΐνης υπολογίστηκε στα 1.16 gr/cm^3 , των λιπαρών σταγονιδίων στα $0,92 \text{ gr/cm}^3$ και του διαλύτη ίδια με του νερού (1 gr/cm^3)

Οι τιμές V_T παρουσιάζονται στον πίνακα 3 [49].

Πίνακας 5: Τελικές ταχύτητες και σταθερές καθίζησης (mm/min) για τα διάφορα είδη γάλακτος.

	Hevine milk	Oat milk	Rice milk	Soy milk
Terminal velocity—cream	0.0007	—	—	0.0027
Clarification rate—cream	0.0012	—	—	0.0038
Terminal velocity—sediment	—	0.043	0.125	—
Clarification rate—sediment	—	0.040	0.205	—

Η ταχύτητα στην διεπιφάνεια ανάμεσα στο διαυγές τμήμα και στο θολό του εναιωρήματος συνδέεται άμεσα με την ταχύτητα των σωματιδίων. Η ταχύτητα της διεπιφάνειας μπορεί να προσδιοριστεί από τα αποτελέσματα των μετρήσεων Quickscan όπως φαίνεται στο σχήμα 11.

Οι ρυθμοί διαύγασης (ραφινάρισματος) παρουσιάζονται στον πίνακα 5. Όπως φαίνεται υπάρχει ποιοτικός συσχετισμός ανάμεσα στις τελικές ταχύτητες όπως αυτές υπολογίστηκαν από τα μεγέθη των σωματιδίων και τους ρυθμούς ραφινάρισματος όπως αυτοί καθορίστηκαν από τις μετρήσεις θολρότητας.

Γίνεται φανερό πως τα είδη γάλατος που περιέχουν μικρότερου μεγέθους σταγονίδια και σωματίδια παραμένουν σταθερά για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Τα λιγότερο σταθερά γάλατα θα ωφεληθούν από άλεση και κονιοποίηση των μη λιπαρών στερεών συστατικών τους προκειμένου να παραχθούν καλύτερου μεγέθους σωματίδια. Επιπλέον δουλειά απαιτείται για να διευκρινιστεί η επίδραση της θερμοκρασίας και του χρόνου παστερίωσης (UHT) στην ικανότητα των επιφανειακώς δραστικών μοριών να παράγουν σταθερά γαλακτώματα [50].

4.5 Συμπέρασμα

Η κολλοειδής σταθερότητα του αγελαδινού γάλακτος αλλά και του γάλατος των δημητριακών και των σιτηρών ποικίλουν, ανάλογα με τα συστατικά και τις συνθήκες επεξεργασίας και αποθήκευσής τους.

Τα αποτελέσματα αυτά φανερώνουν ότι υπάρχει συσχετισμός μεταξύ σταθερότητας και μεγέθους των σωματιδίων του γάλακτος. Μικρού μεγέθους λιπαρά σταγονίδια και

στερεές πρωτεΐνες δίνουν σταθερά γάλατα και το αντίστροφο. Οι μετρήσεις του σκεδασμού σε ένα δείγμα παρείχαν μια αξιόπιστη και γρήγορη ένδειξη της σταθερότητας του δείγματος. Η μελέτη του μεγέθους των σωματιδίων μπορεί να δώσει μια ακριβή ένδειξη της σταθερότητας του δείγματος χωρίς τη μεσολάβηση μεγάλου χρονικού διαστήματος. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν μέσω οπτικής μικροσκοπίας.

5. Χαρακτηρισμός μεγέθους λιποσφαιριδίων θερμικά επεξεργασμένου αγελαδινού γάλακτος με τη μονοφασική χρωματογραφία φυγοκεντρικού πεδίου.

5.1 Εισαγωγή

Το γάλα είναι ένα σχετικά σύνθετο κολλοειδές σύστημα του οποίου ο πρωτεύων βιολογικός ρόλος είναι να θρέφει τα νεαρά θηλαστικά. Αποτελείται από λιποσφαιρίδια και καζεϊνικά μικύλια που είναι διεσπαρμένα σε ένα υδατικό μέσο που περιέχει πρωτεΐνες, λακτόζη, ιχνοστοιχεία και βιταμίνες. Μία σημαντική παράμετρος που επηρεάζει την εμφάνιση, τη γεύση, το χρόνο ζωής και γενικά την ποιότητα του γάλακτος είναι το μέγεθος των λιποσφαιριδίων που περιέχει και η οποία καθορίζεται ως ένα βαθμό από τις συνθήκες επεξεργασίας του προϊόντος.

5.2 Υλικά και Μέθοδοι

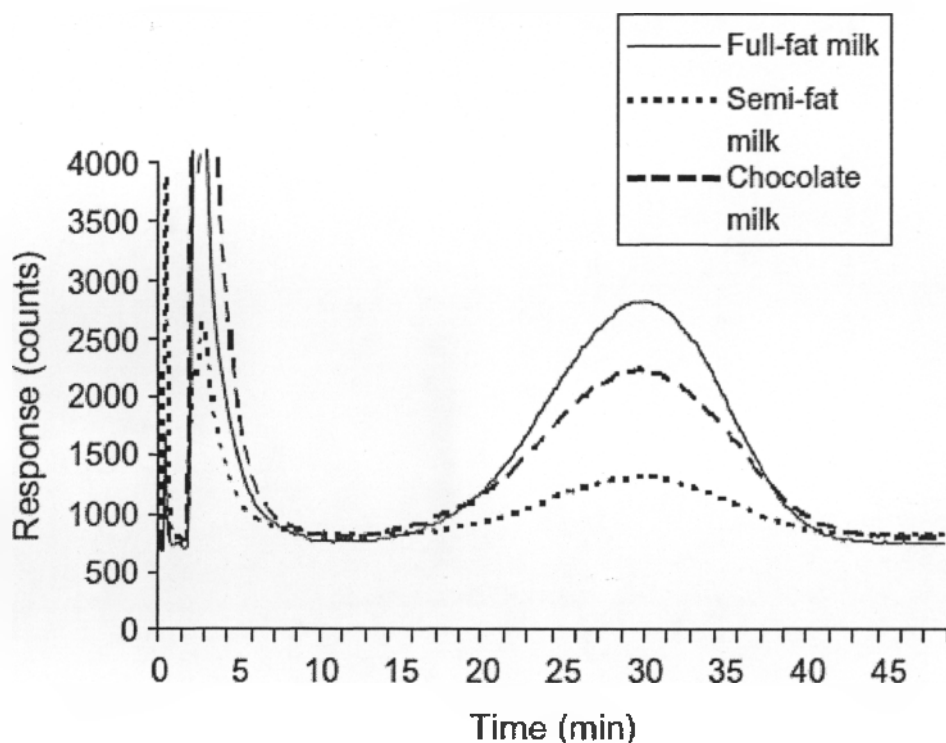
Ομογενοποιημένο αγελαδινό γάλα (πλήρες, μερικώς αποβουτυρωμένο και σοκολατούχο) χρησιμοποιήθηκε σε αυτή την μελέτη. Το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε για την μονοφασική χρωματογραφία φυγοκεντρικού πεδίου ήταν το S-101 Particle/Colloid fractionator από την Postnova Analytik (Germany). Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών (Native PAGE) έγινε σύμφωνα με την μέθοδο του Laemmli με μικρές τροποποιήσεις χρησιμοποιώντας το V10-CDC σύστημα ηλεκτροφόρησης (SCIE-PLAS, U.K.). Το οπτικό μικροσκόπιο που χρησιμοποιήθηκε για την παρατήρηση των λιποσφαιριδίων ήταν Primo star (Carl Zeiss, Germany).

5.3 Αποτελέσματα και Συζήτηση

Προκειμένου να προσδιοριστεί ο ρόλος των λιποσφαιριδίων στο γάλα, πήραμε φρακτογραφήματα γάλακτος διαφορετικής λιπιδιακής σύστασης υπό τις ίδιες πειραματικές συνθήκες.

Όπως φαίνεται και στο Σχ. 12 η μόνη κορυφή που εμφανίζεται είναι αυτή που αντιστοιχεί στα λιποσφαιρίδια που βρίσκονται διασπαρμένα στο γάλα. Οι πρωτεΐνες

και οι καζεΐνες δεν μπορούσαν να ανιχνευτούν υπό τις παρούσες πειραματικές συνθήκες, πιθανότατα επειδή συνεκλούνται. Όπως ήταν αναμενόμενο, η περιεκτικότητα σε λίπος, καθορίζει το μέγεθος της κορυφής και έτσι για το πλήρες γάλα (3,5% σε λίπος) το μέγεθος της κορυφής ήταν μεγαλύτερο από αυτό του σοκολατούχου (3,0% σε λίπος) και από αυτό που αντιστοιχούσε στο ημι-πλήρες (1,0% σε λίπος). Έτσι επιβεβαιώθηκε ότι η κορυφή που εμφανίζεται μετά από 15 λεπτά οφείλεται στην ύπαρξη των λιποσφαιριδίων.

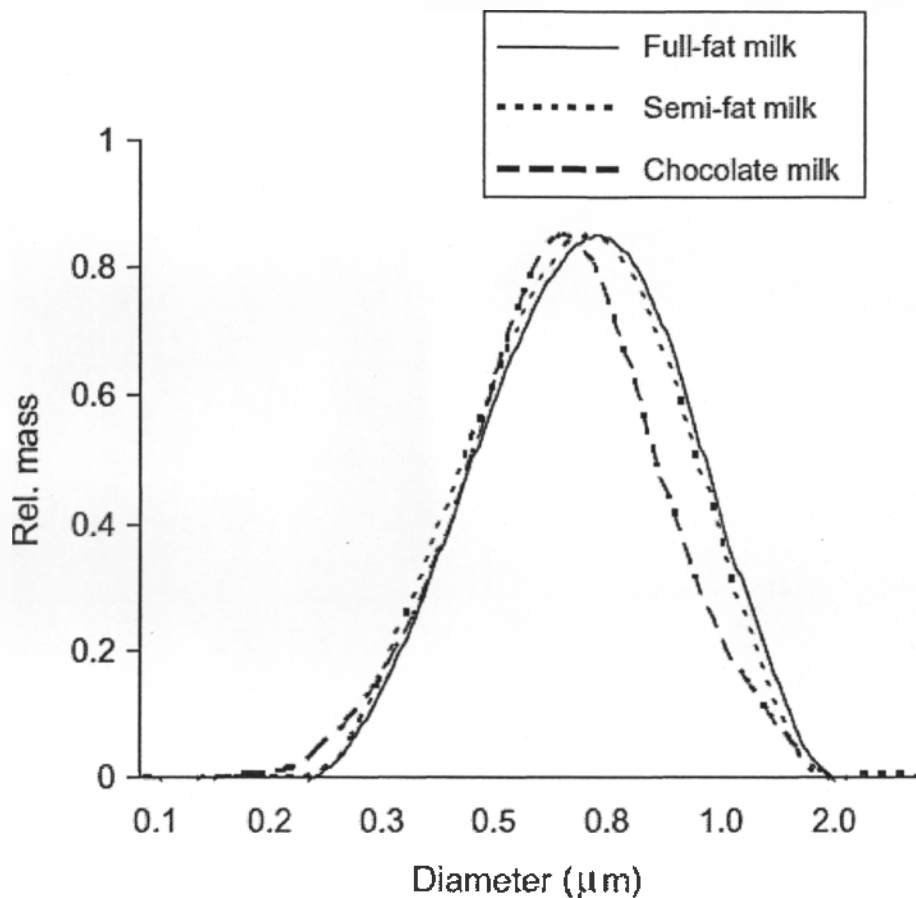


Σχήμα 12: Αντιπροσωπευτικά διαγράμματα του πλήρους γάλακτος (3,5%), του ημι-πλήρους γάλακτος (1,0%) και του σοκολατούχου γάλακτος (3,0%) που αραιώθηκαν από τον ίδιο παράγοντα (14x) που δείχνουν ότι οι κορυφές αντιστοιχούν σε λιποσφαιρίδια.

Τα λιποσφαιρίδια είναι φυσικά συστήματα τα οποία δεν είναι ομοιόμορφα σε μέγεθος [51]. Όπως είναι αναμενόμενο για ομογενοποιημένα προϊόντα, τα περισσότερα από τα λιποσφαιρίδια των δειγμάτων γάλακτος που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη έχουν μέγεθος $< 1\mu\text{m}$. Οι κατανομές μεγέθους ήταν εντός των θεωρητικών ορίων ($< 1\mu\text{m}$), παρόλο που οι τιμές των δειγμάτων γάλακτος που δεν υπεβλήθησαν σε

θερμική επεξεργασία βρέθηκαν μεγαλύτερες σε σχέση με τις αντίστοιχες άλλων ερευνητών που χρησιμοποίησαν την ίδια μέθοδο.

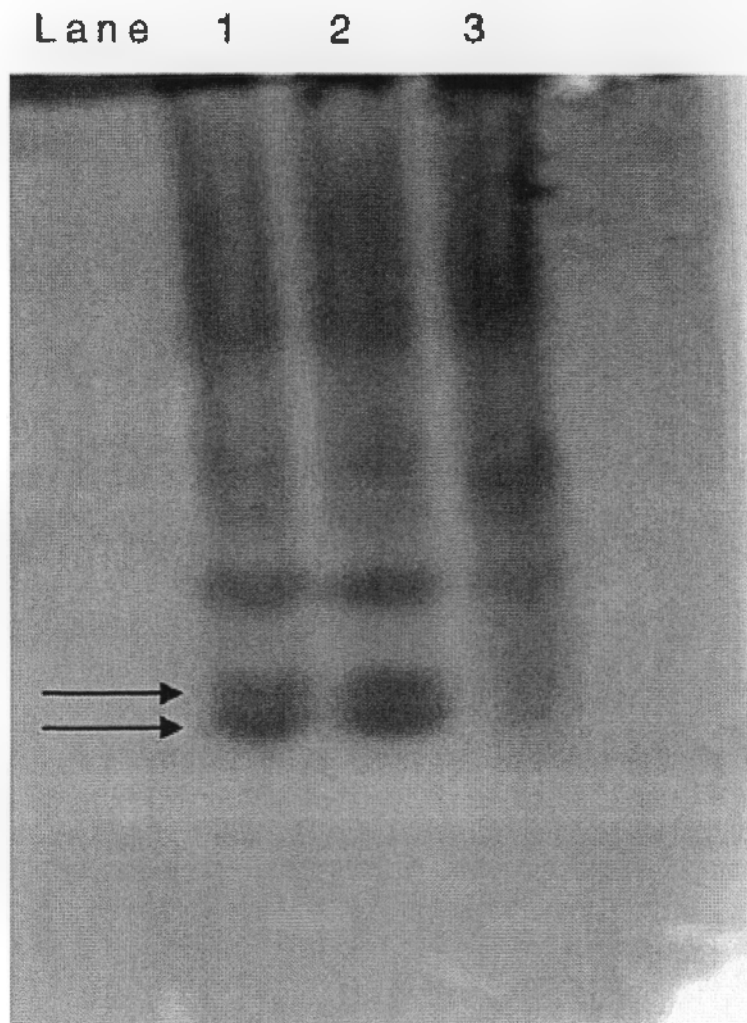
Επιπρόσθετα, το σοκολατούχο γάλα έδωσε μικρότερη μέση διάμετρο σωματιδίου σε σχέση με το πλήρες γάλα. Όπως φαίνεται στο σχήμα 13, οι κατανομές μεγέθους των μη θερμικώς επεξεργαζόμενων δειγμάτων γάλακτος έδειξαν ότι το σοκολατούχο γάλα εμφάνιζε τη μικρότερη μέση διάμετρο ($0,734\pm 0,013$) μm και ακολουθούσε το ημιπλήρες ($0,805\pm 0,004$) μm και στη συνέχεια το πλήρες γάλα ($0,823\pm 0,012$) μm .



Σχήμα 13: Η μέση διάμετρος των σωματιδίων του μη θερμικά επεξεργασμένου πλήρους γάλακτος, ημιπλήρους γάλακτος και του σοκολατούχου γάλακτος.

Επιπλέον τα μη θερμικώς επεξεργασμένα δείγματα γάλακτος μελετήθηκαν και μέσω της μεθόδου Native Page για λόγους σύγκρισης. Βρέθηκε ότι το πλήρες και το ημιπλήρες γάλα περιέχουν πάνω κάτω την ίδια ποσότητα πρωτεϊνών (γραμμές 1 και 2), κάτι που δεν παρατηρήθηκε και για το σοκολατούχο γάλα. Όπως φαίνεται και στο σχήμα 14, η ένταση των ζωνών των πρωτεϊνών (υποδεικνύονται από τα βέλη) είναι

παρόμοιες για το πλήρες και το ημιπλήρες γάλα. Στο σοκολατούχο γάλα είναι μικρότερης έντασης. Συνεπώς μπορούμε να υποθέσουμε ότι οι διαφορές των τριών αυτών τύπων γάλατος οφείλονται στη διαφορετική τους πρωτεϊνική σύσταση.

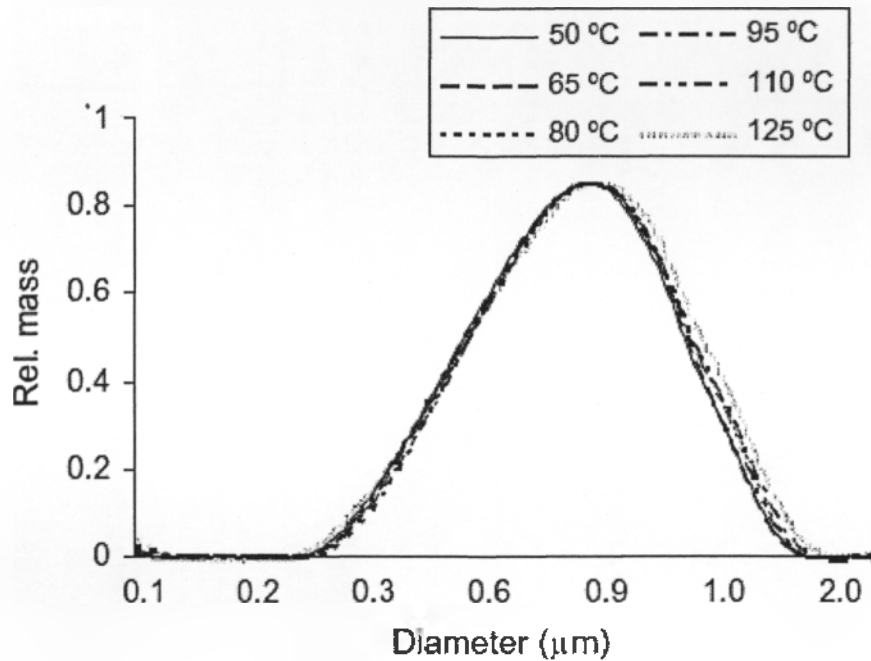


Σχήμα 14: Το Native Page των μη θερμικά επεξεργασμένων δειγμάτων γάλακτος: λωρίδα 1:πλήρες γάλα, λωρίδα 2:ημι-πλήρες γάλα και λωρίδα 3:σοκολατούχο γάλα.

Επίδραση της θερμικής επεξεργασίας στο μέγεθος των σωματιδίων.

Το δραστικό μέγεθος των σωματιδίων του ομογενοποιημένου γάλατος αυξήθηκε στα περισσότερα δείγματα όταν αυτά θερμάνθηκαν σε θερμοκρασίες $> 50^{\circ}\text{C}$ για 1 ώρα. Στο πλήρες και στο ημιπλήρες γάλα παρατηρήθηκε μια μικρή αλλά σταθερή αύξηση στο μέσο μέγεθος των σωματιδίων με αύξηση της θερμοκρασίας. Όπως φαίνεται και στο σχήμα 15 το μέσο μέγεθος των λιποσφαιριδίων στο πλήρες αυξάνεται από $(0,861 \pm 0,001) \mu\text{m}$ (50°C) σε $(0,901 \pm 0,001) \mu\text{m}$ (125°C). Ελαφρώς μεγαλύτερη αύξηση παρατηρείται στο ημιπλήρες γάλα όπου από $(0,845 \pm 0,003) \mu\text{m}$ (50°C) φτάνουμε σε

($0,917 \pm 0,003$) σε (125°C). Συνεπώς το μέγεθος των λιποσφαιριδίων αυξάνεται στο μεν πλήρες γάλα γύρω στα 40 nm (4,65%) και για το δε ημιπλήρες γάλα στα 72 nm (8,52%) κατά τη θέρμανση από τους (50°C) - 125°C .



Σχήμα 15: Επίδραση της θερμικής επεξεργασίας στην κατανομή μεγέθους των σωματιδίων του πλήρους γάλακτος. Το μέσο μέγεθος των σωματιδίων, των λιποσφαιριδίων έχει αφαιρεθεί από τα υψηλότερα σημεία της κάθε κορυφής.

Είναι φανερό ότι τόσο στα δείγματα πλήρους όσο και σε αυτά από ημιπλήρες γάλα η θερμοκρασία παίζει σημαντικό ρόλο στο μέγεθος των λιποσφαιριδίων. Η κατανομή του μεγέθους και στα δυο είδη γάλακτος στους 50°C για 1 ώρα διαφέρει ($P < 0,05$) από αυτή στους 125°C για 1 ώρα. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και από άλλους ερευνητές [52,53]. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η συμπεριφορά αυτή φανερώνει την ευαισθησία των πρωτεϊνικών μορίων σε υψηλές θερμοκρασίες (μετουσίωση και συσσώρευση) [54].

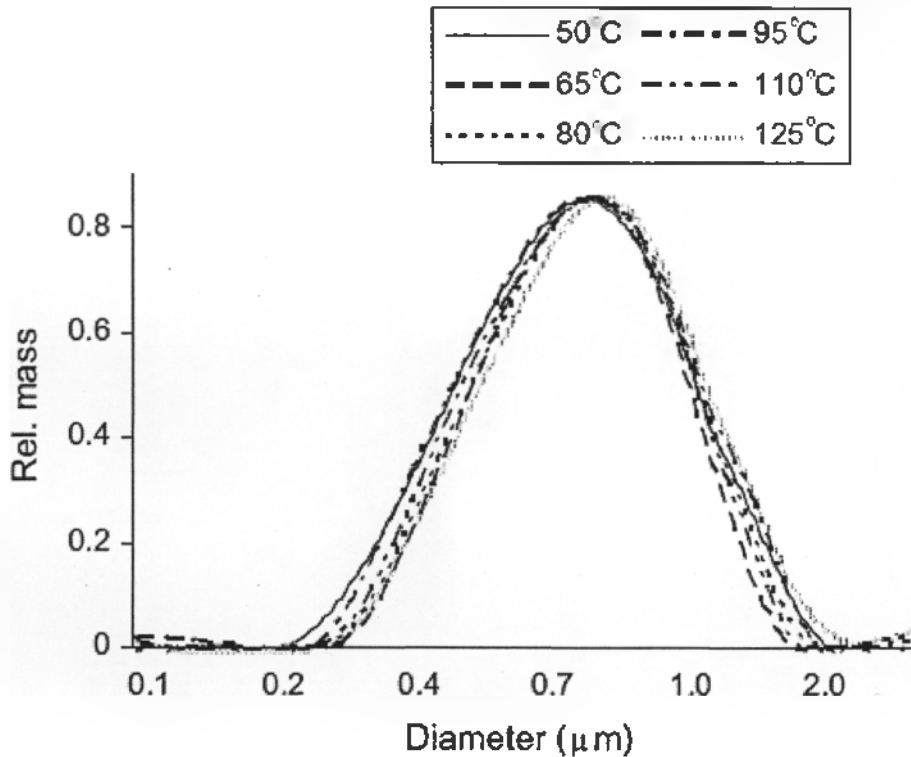
Η θερμική επεξεργασία του γάλακτος χρησιμοποιείται ευρέως ώστε να τροποποιηθούν οι ιδιότητες των πρωτεϊνών του γάλακτος, κάτι βέβαιο που επηρεάζει και τις ιδιότητες του τελικού προϊόντος. Η κύρια αλλαγή που πραγματοποιείται κατά τη θερμική επεξεργασία του γάλακτος είναι η μετουσίωση των πρωτεϊνών. Πάνω από μια κρίσιμη θερμοκρασία το πρωτεϊνικό μόριο ξεδιπλώνεται, εκθέτοντας έτσι τη μη πολική

πλευρά του. Κατά αυτόν τον τρόπο προσδίδεται υδροφοβικός χαρακτήρας στην επιφάνεια των γαλακτωματοποιημένων σταγονιδίων και ενισχύονται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνικών μορίων [55]. Το ξεδίπλωμα της πρωτεϊνικής αλυσίδας είναι το πρώτο βήμα για την μετουσίωση η οποία είναι μερικώς αντιστρεπτή. Αντίθετα, το επόμενο στάδιο που είναι η συσσωμάτωση είναι μη αντιστρεπτή και εξαρτάται από το χρόνο και τη θερμοκρασία [56]. Για τη θερμοκρασία των πρωτεϊνικών μορίων, η θερμοκρασία του ξεδιπλώματος τους κυμαίνεται από 60-80⁰C. Συγκεκριμένα για την α-λακταλβουμίνη και για την αλβουμίνη που περιέχονται στον αγελαδινό ορό γάλακτος (BSA) είναι 60-65⁰C, ενώ για την β-λακτογλοβουλίνη είναι 75-80⁰C [57]. Οι θερμοκρασίες μετουσίωσης που αναφέρονται στην βιβλιογραφία συμφωνούν με τα αποτελέσματα της Native Page.

Οι ζώνες των πρωτεϊνών, οι υποδεικνυόμενες με τα βέλη, οι οποίες είναι εμφανέστερες όταν τα δείγματα θερμαίνονται στους 50⁰C για 1 ώρα, εξαφανίζονται για θερμοκρασίες μεγαλύτερες ή ίσες των 95⁰C. Αυτό αποτελεί ένδειξη του ότι μερικές από τις πρωτεΐνες στο πλήρες και στο ημιπλήρες γάλα ξεδιπλώνονται εξαιτίας της θέρμανσης, εκθέτουν τα υδροφοβικά τους τμήματα τα οποία προηγουμένως ήταν κρυμμένα με αποτέλεσμα να σχηματίζονται μεγάλου μοριακού βάρους συσσωμάτωμα. Οι θερμοκρασίες στις οποίες εμφανίστηκε η μεγαλύτερη αύξηση στη μέση διάμετρο των λιποσφαιριδίων ήταν υψηλότερες από αυτές που αναμένονταν θεωρητικά. Παρόλα αυτά κάτι τέτοιο μπορεί να οφείλεται στο ότι σε αυτή τη μελέτη το πρωτεϊνικό μόριο βρίσκεται προσροφημένο (ομογενοποιημένο γάλα) και όχι στην κανονική, φυσική κατάσταση όπως όταν βρίσκεται σε υδατικό μέσο. Σταθεροποιημένα γαλακτώματα πρωτεϊνών βρέθηκε ότι καταβυθίζονται μετά από θέρμανση καθώς οι πρωτεϊνικοί σχηματισμοί συνδέουν τα σταγονίδια σε ένα δίκτυο [58]. Οι μετουσιωμένες εξαιτίας της θέρμανσης πρωτεΐνες, σχηματίζουν σύμπλοκα με μικύλλια καζεΐνης, λόγω του αυξανόμενου υδροφοβικού χαρακτήρα, τα οποία εμφανίζονται περισσότερο ενισχυμένα σε υψηλότερες θερμοκρασίες από ότι σε χαμηλότερες. Επομένως οι αυξήσεις του μεγέθους των σωματιδίων που παρατηρήθηκαν σε αυτή την εργασία πιθανόν να οφείλονται στην θερμικά προκαλούμενη μετουσίωση και στις ελκτικές αλληλεπιδράσεις των υδροφοβικών τμημάτων των μετουσιωμένων πρωτεϊνικών μορίων. Όπως φαίνεται και στα σχήματα 15 και 16 η «ουρά» στα μεγέθη των μεγαλύτερων σταγονιδίων αυξάνεται αυξανόμενου και του βαθμού μετουσίωσης του πρωτεϊνικού μορίου, ενώ η κορυφή

παραμένει σχεδόν σταθερή. Αυτό αποτελεί μια επιπλέον ένδειξη ότι στο υπό μελέτη σύστημα πιθανώς να πραγματοποιείται συγχώνευση των λιπαρών σταγονιδίων.

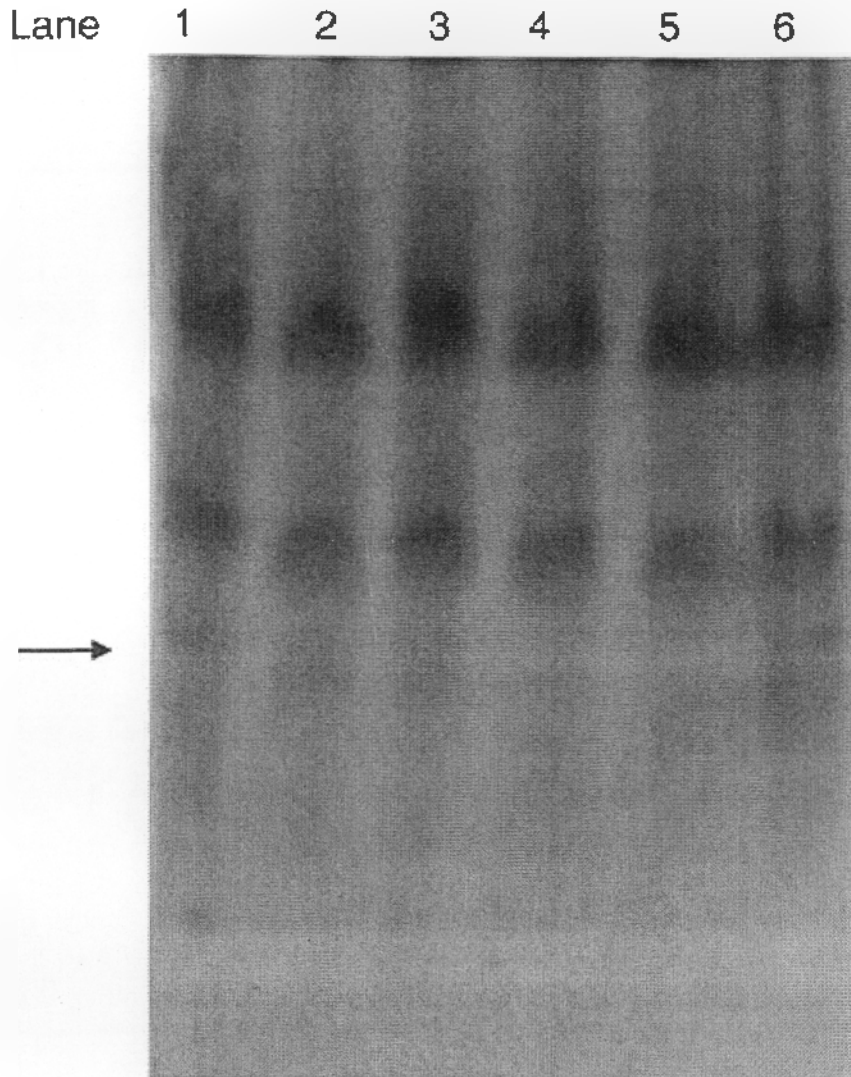
Από την άλλη το σοκολατούχο γάλα φαίνεται να είναι πιο ευαίσθητο στην θέρμανση σε σχέση με το πλήρες και το ημιπλήρες. Το μέγεθος των σωματιδίων αυξάνει σημαντικά ($P < 0,05$) στο γάλα αυτό όταν θερμανθεί από τους 50°C έως τους 110°C .



Σχήμα 16: Επίδραση της θερμικής επεξεργασίας στην κατανομή μεγέθους των σωματιδίων του ημι-πλήρους γάλακτος. Το μέσο μέγεθος των σωματιδίων, των λιποσφαιριδίων έχει αφαιρεθεί από τα υψηλότερα σημεία της κάθε κορυφής.

Πιο συγκεκριμένα όταν θερμαίνεται στους 50°C το μέσο μέγεθος των σωματιδίων του σοκολατούχου γάλακτος είναι $(0,830 \pm 0,003)$ μm , ενώ στους 110°C τα λιποσφαιρίδια είναι $(0,934 \pm 0,007)$ μm κατά μέσο όρο. Αυτό αντιστοιχεί σε 104 nm (12,53%) αύξηση, κατά μέσο όρο, του μεγέθους των σταγονιδίων. Αυτό οφείλεται στο ότι το σοκολατούχο γάλα είναι περισσότερο θερμικά ασταθές λόγω της σύστασής του και επομένως πιο ευαίσθητο κατά τη θερμική του επεξεργασία. Παρόλα αυτά, το σοκολατούχο γάλα όταν υποβληθεί σε υψηλότερη θερμοκρασία (125°C), τότε η μέση διάμετρος των σωματιδίων πέφτει στα $(0,793 \pm 0,008)$ μm . Παρόμοιες αναφορές

υπάρχουν και στη βιβλιογραφία [55]. Είναι δυνατό να παρατηρηθεί μετουσίωση, αλληλεπιδράσεις μεταξύ μορίων προσροφούμενων στην ίδια σταγόνα ή μεταξύ μορίων προσροφούμενων σε διαφορετικές σταγόνες. Σύμφωνα με τους μελετητές Monahan, Mc Clements και German (1996) σε θερμοκρασίες 50-110⁰C πραγματοποιούνταν αλληλεπιδράσεις μεταξύ μορίων προσροφούμενων σε διαφορετικά σταγονίδια σε μεγαλύτερο βαθμό με αποτέλεσμα την καταβύθισή τους ενώ σε υψηλότερες θερμοκρασίες συνέβαινε το αντίστροφο με αποτέλεσμα να παρατηρείται σε μικρότερο βαθμό καταβύθιση. Έχει διατυπωθεί και ένας δεύτερος μηχανισμός προκειμένου να ερμηνευτεί η ελάττωση του μεγέθους των σωματιδίων πάνω από μια συγκεκριμένη θερμοκρασία [55]. Σύμφωνα με τον μηχανισμό αυτό τα πρωτεϊνικά μόρια ξεδιπλώνονται μερικώς κάτω από μια συγκεκριμένη θερμοκρασία με αποτέλεσμα ο υδροφοβικός χαρακτήρας της επιφάνειας της σταγόνας να οδηγήσει σε συσσωμάτωσή τους. Σε υψηλότερες θερμοκρασίες οι πρωτεΐνες ξεδιπλώνονται εντελώς και είναι περισσότερο εύκαμπτες [59]. Έτσι, εύκολα αναδιατάσσονται όλα τα μη πολικά τους τμήματα προς την λιπαρή φάση με αποτέλεσμα ο υδροφοβικός χαρακτήρας της επιφάνειάς τους να μειώνεται σημαντικά και να μην οδηγούμαστε σε συσσωμάτωση. Στο σχήμα 17 φαίνεται ο βαθμός επίδρασης της θερμοκρασίας στην μετουσίωση των πρωτεϊνών του σοκολατούχου γάλακτος.



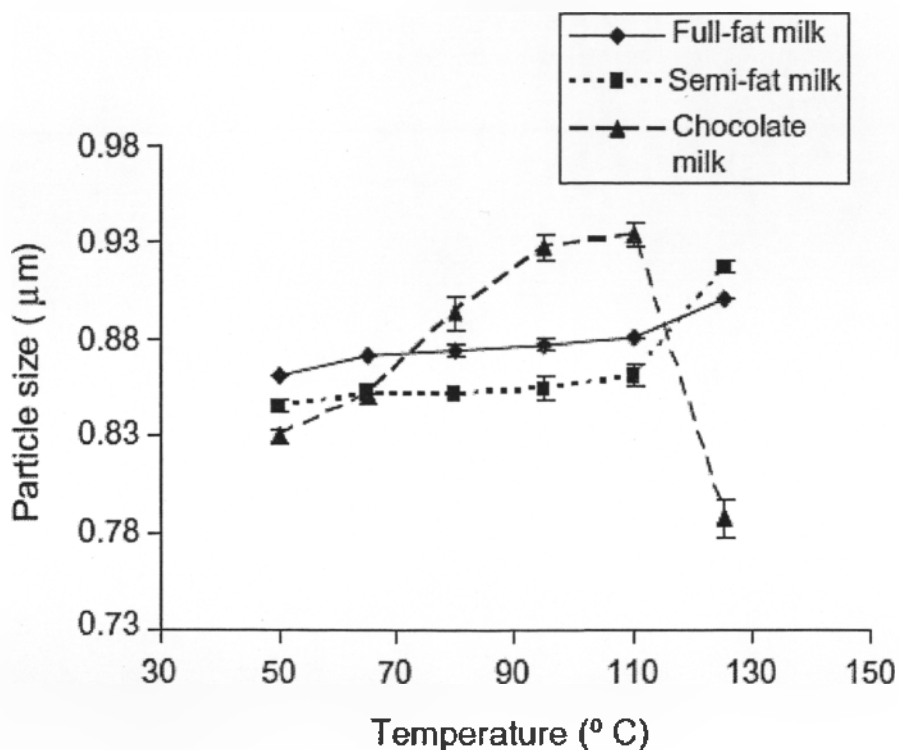
Σχήμα 17: Το NATIVE PAGE του θερμικά επεξεργασμένου σοκολατούχου γάλακτος: γραμμή 1: 50°C, γραμμή 2: 65°C γραμμή 3: 80°C, γραμμή 4: 95°C, γραμμή 5: 110°C, γραμμή 6: 125°C.

Όταν τα δείγματα θερμανθούν πάνω από τους 80°C, η πρωτεΐνη (η υποδεικνυόμενη από το βέλος) δεν είναι ανιχνεύσιμη.

Το φαινόμενο αυτό μπορεί να προκληθεί με αύξηση της θερμοκρασία από 50-125°C σε άλλες πρωτεΐνες του γάλακτος ανάλογα με τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Παρόλα αυτά η Native Page υποδεικνύει ότι οι συνθήκες θέρμανσης (θερμοκρασία και χρόνος) επηρεάζει το βαθμό μετουσίωσης των πρωτεϊνών και πιθανώς να επιδρά στο σχηματισμό μεγάλου μοριακού βάρους συσσωματωμάτων. Από την άλλη μεριά οι ολοένα και αυξανόμενες θερμοκρασίες μπορεί να οδηγήσουν σε εκτεταμένη

μετουσίωση των πρωτεϊνών και συνεπώς αδιαλυτότητα. Επομένως, η απότομη μείωση της μέσης σωματιδιακής διαμέτρου των λιποσφαιριδίων μπορεί να συνδέεται με τη μειωμένη ικανότητα διάλυσης των μετουσιωμένων πρωτεϊνών. Επιπλέον, η θερμική επεξεργασία ανάλογα με το βαθμό θέρμανσης μπορεί να είναι υπεύθυνη για θερμομηχανικές αλλοιώσεις των λιποσφαιριδίων στα δείγματα του γάλακτος.

Θερμική επεξεργασία με υψηλές θερμοκρασίες παρήγαγε αυξημένα επίπεδα ελεύθερων λιπών και μεταβολές στην μεμβράνη του σφαιριδίου. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι τα θερμικώς επεξεργασμένα λιποσφαιρίδια στους 125⁰C ήταν πολύ λίγα όταν παρατηρήθηκαν με μικροσκόπιο σε σχέση με την εικόνα άλλων δειγμάτων. Το σχήμα 18 δείχνει την αλλαγή του μεγέθους των σωματιδίων, ανάλογα με τη θερμοκρασία για όλους τους τύπους αγελαδινού γάλατος που μελετήθηκαν σε αυτή την εργασία. Είναι προφανές ότι το σοκολατούχο γάλα εμφανίζει μια αύξηση στο μέσο μέγεθος των σωματιδίων όταν θερμαίνεται στους 110⁰C για 1 ώρα, ενώ η διάμετρος του λιποσφαιριδίου ελαττώνεται απότομα όταν αυτό θερμανθεί στους 125⁰C. Από την άλλη τα δείγματα από πλήρες και ημιπλήρες γάλα έχουν παρόμοια συμπεριφορά κατά την θερμική τους επεξεργασία. Στο σχήμα 18 παρουσιάζονται ενδεικτικές πληροφορίες σχετικά με το πώς οι συνθήκες του πειράματος και πιο συγκεκριμένα η θερμοκρασία μπορεί να επηρεάσει τη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης, κάτι το οποίο καθορίζει τις φυσικοχημικές ιδιότητες ενός προϊόντος όπως το γάλα. Η γνώση της συμπεριφοράς των δειγμάτων γάλατος σε διάφορες συνθήκες μπορεί να αποδειχθεί χρήσιμο εργαλείο στην προσπάθεια δημιουργίας προϊόντων με καλύτερες ιδιότητες.



Σχήμα 18: Σύγκριση της μέσης διαμέτρου των σωματιδίων του πλήρους, ημι-πλήρους και του σοκολατούχου γάλακτος που επηρεάστηκαν από την θέρμανση. Οι μπάρες σφάλματος αντιπροσωπεύουν τις τυπικές αποκλίσεις με βάση τα 3 δείγματα.

5.4 Συμπέρασμα

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης καταδεικνύουν την χρησιμότητα της μονοφασικής χρωματογραφίας φυγοκεντρικού πεδίου για τον χαρακτηρισμό κολλοειδών συστημάτων όπως είναι τα γαλακτώματα στα τρόφιμα. Το μέσο μέγεθος των λιποσφαιριδίων του γάλακτος αυξήθηκε στις περισσότερες περιπτώσεις κατόπιν θερμικής επεξεργασίας, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών του γάλακτος και εν συνεχεία στον σχηματισμό συμπλόκων από πρωτεΐνες που βρίσκονται στην επιφάνεια των λιποσφαιριδίων. Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για να αποσαφηνίσουν τον ρόλο των επιμέρους συστατικών στην αποσταθεροποίηση του γάλακτος που υποβάλλεται σε θερμική επεξεργασία.

6. Η χρήση της μονοφασικής χρωματογραφίας φυγοκεντρικού πεδίου και της PCS για τον χαρακτηρισμό των μικυλλίων καζεΐνης.

6.1 Εισαγωγή

Το σύνολο της καζεΐνης και του φωσφορικού ασβεστίου στο γάλα, γνωστά ως μικύλλια καζεΐνης περιέχουν περισσότερο από το 95% των καζεϊνών του γάλακτος μαζί με το ασβέστιο και τον ανόργανο φώσφορο. Τα σωματίδια αυτά είναι σχεδόν σφαιρικά με διάμετρο 10-300 nm, τα οποία διαθέτουν μια ανοιχτή δομή με τον ενδιάμεσο χώρο να περιέχει ορό γάλακτος, κάτι το οποίο επιτρέπει εύκολη είσοδο σε ευδιάλυτα μόρια [60]. Οι πυκνότητες των ενυδατωμένων μορίων που αναφέρονται στη βιβλιογραφία, ποικίλλουν από 1,06-1,11 gr/ml [61]. Τα σωματίδια είναι εξαιρετικά ογκώδη με voluminosity περίπου 4 ml/gr καζεΐνης και περιέχουν περίπου 3,3 g νερού ανά γραμμάριο καζεΐνης [62].

Το νερό είναι το κυριότερο συστατικό των σωματιδίων και βρίσκεται σε ισορροπία με τον εξωτερικό ορό του γάλακτος. Η σύνθεση της φάσης του ορού, επιδρά στην σύνθεση της κολλοειδούς φάσης. Προσθήκη αλάτων, συμπλεκτικών αντιδραστηρίων ασβεστίου, θερμική επεξεργασία και αλλαγή του pH, όλα επιδρούν στην ανακατανομή του ασβεστίου, του φωσφόρου και της καζεΐνης μεταξύ των σωματιδίων και του ορού. Οι αλλαγές αυτές είναι αντιστρεπτές και επιδρούν περιορισμένα στην διάμετρο των σωματιδίων, όπως διαπιστώθηκε και από την PCS. Υπάρχουν όρια στην αντιστρεπτικότητα των αλλαγών που προκαλούνται στα μικύλλια. Έχει βρεθεί ότι το μέγεθος των σωματιδίων, αποτελεί ένδειξη της αντιστρεπτικότητας των αλλαγών στην κατανομή των συστατικών μεταξύ σωματιδίων και ορού [63].

Για την εφαρμογή της μεθόδου ΜΧΦΠ, προκειμένου να προσδιοριστεί η κατανομή του μεγέθους των σωματιδίων, είναι απαραίτητες οι σχετικές πυκνότητες των σωματιδίων και του μέσου, στο οποίο έχουν διασπαρθεί.

Για πορώδη συστήματα, όπως είναι τα μικύλλια καζεΐνης του γάλακτος, οι τιμές του μεγέθους των σωματιδίων, της σύστασης και της πυκνότητας, εξαρτώνται από τον τρόπο που κανείς ορίζει τα σωματίδια.

Σε αυτή την εργασία, το σωματίδιο έχει οριστεί ως μια υδροδυναμική μονάδα, η ισοδύναμη διάμετρος (a) της οποίας συνδέεται με το συντελεστή διάχυσης (D) του

σωματιδίου, τη θερμοκρασία (T) και το ιξώδες (η) του μέσου, μέσω της εξίσωσης Boltzmann:

$$a = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (12)$$

Κατά αυτόν τον τρόπο η κατανομή μεγέθους σωματιδίων, όπως αυτή καθορίζεται από την ΜΧΦΠ συνδέεται άμεσα με το συντελεστή διάχυσης D και τη δραστική διάμετρο, όπως αυτή προσδιορίστηκε με τη βοήθεια της μεθόδου PCS. Έτσι παρέχονται, όλες οι απαραίτητες πληροφορίες για τον απόλυτο προσδιορισμό, τόσο της κατανομής του μεγέθους του σωματιδίου, όσο και της πυκνότητας του σωματιδίου.

Το αντικείμενο αυτής της εργασίας, είναι να μελετήσει την επίδραση της σύνθεσης/σύστασης στην κατανομή του μεγέθους και στην πυκνότητα των σωματιδίων του αποβουτυρωμένου γάλακτος με διάμετρο των 50 nm [64].

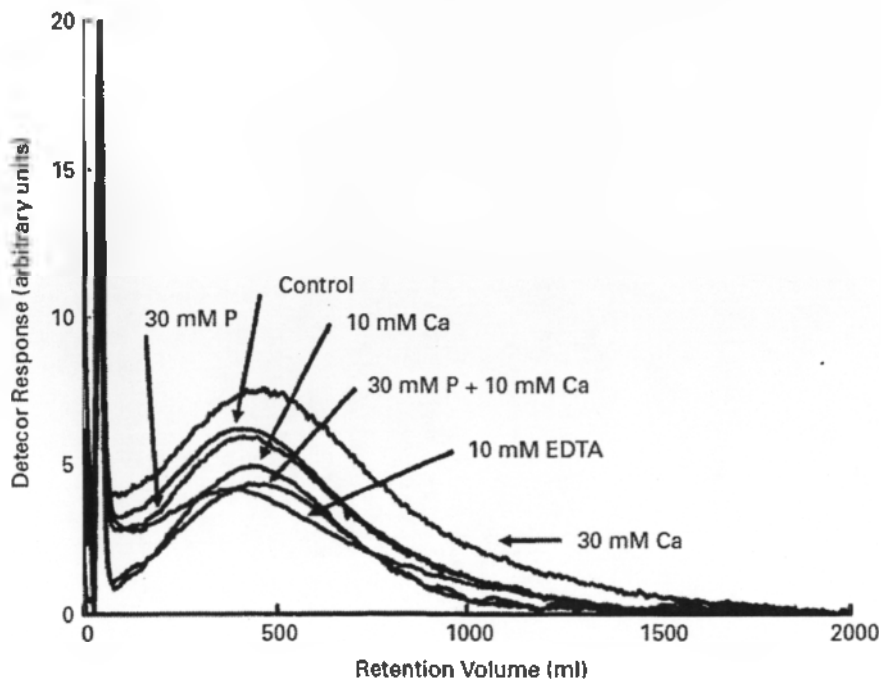
6.2 Υλικά και Μέθοδοι

Υλικά

- Σκόνη αποβουτυρωμένου γάλακτος
- Έξι διαφορετικά διαλύματα γάλακτος με διαφορετικές ποσότητες ασβεστίου, φωσφόρου ή EDTA το καθένα [65].
- Συνθετικό γάλα: παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο Jeness and Koops (1962) με λακτόζη (50 g/l) και το διάλυμα φιλτραρίστηκε με τη βοήθεια φίλτρου 0.22 μm (GS), ώστε να απομακρυνθεί σωματιδιακή ύλη.

6.3 Αποτελέσματα

Στα διαγράμματα του σχήματος 19, παρουσιάζεται η απορρόφηση της κινητής φάσης καθώς αυτή απομακρύνεται από τον χρωματογραφικό θάλαμο, ως συνάρτηση του όγκου συγκράτησης (ο όγκος της κινητής φάσης που απαιτείται για την έκλυση μιας ουσίας από την χρωματογραφική στήλη) και για τα έξι διαφορετικά δείγματα γάλακτος. Παρόλο, που τα διαγράμματα δεν διαφέρουν και πολύ το ένα από το άλλο, παρατηρείται μια μικρή αύξηση στην τιμή του όγκου συγκράτησης, που αντιστοιχεί στη μέγιστη τιμή της καμπύλης στα διαλύματα γάλακτος, τα οποία περιέχουν CaCl_2 και 30 mmol Pi και 10 mmol Ca/kg γάλακτος, μια μείωση σε αυτά που περιέχουν 10 mmol EDTA/kg γάλακτος και καμία αλλαγή σε αυτά με 30mmol Pi/kg γάλακτος.



Σχήμα 19: Μη-κανονικοποιημένα διαγράμματα αιωρημάτων γάλακτος με ή χωρίς πρόσθετα όπως καθορίζεται από την ΜΧΦΠ.

Οι πυκνότητες των μικυλλίων καζεΐνης όπως αυτές προσδιορίστηκαν από τις PCS και SdFFF.

Οι τιμές της πυκνότητας των σωματιδίων που απαιτούνται για να χρησιμοποιηθούν στον προσδιορισμό της κατανομής του μεγέθους των σωματιδίων $N(a)$ από τα διαγράμματα της SdFFF προκειμένου η δραστική διάμετρος να ταιριάζει με τις τιμές που προέκυψαν από την PCS παρουσιάζονται στον πίνακα 6, μαζί με τις τιμές του μέσου όρου της διαμέτρου των σωματιδίων [63].

Οι τιμές των παραμέτρων (α_0 , β) για καθένα από τα έξι δείγματα υπολογίστηκαν με τη βοήθεια της σχέσης:

$$N(a) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\alpha\beta}} e^{-0.5 \left(\frac{\ln(a/a_0)}{\beta} \right)^2} \quad (13)$$

(Όπου $N(a)$ = κλάσμα σωματιδίων με διαμέτρους μεταξύ των τιμών a και $a+\delta$, πίνακας 6).

(Η παράμετρος α_0 αντιστοιχεί στη μέση διάμετρο των σωματιδίων, ενώ η παράμετρος β αντιστοιχεί στην τυπική απόκλιση του $\ln(a)$ ως προς το $\ln(\alpha_0)$, όταν η $N(a)$ παριστάνεται ως συνάρτηση του $\ln(a)$).

Πίνακας 6: Οι υπολογισμένες πυκνότητες μικυλίου και οι μέσες αριθμητικές διαμέτροι με βάση συνδυαστικά δεδομένα από PCS και PSD της ΜΧΦΠ

Additions to milk (mmol/kg milk)	micellar densities (g cm ⁻³)	mean diameter (nm)	ln-normal distribution	
			a ₀ (nm)	β
Control (none)	1.066	121	112.0	0.340
10 Ca	1.079	121	113.4	0.364
30 Ca	1.072	119	109.5	0.356
30 P _i	1.066	127	113.7	0.353
30 P _i +10 Ca	1.059	140	132.5	0.359
10 EDTA	1.059	124	116.5	0.332

Pooled σ_0 of micellar densities=0.004

Equation for the normalised ln-normal distribution function

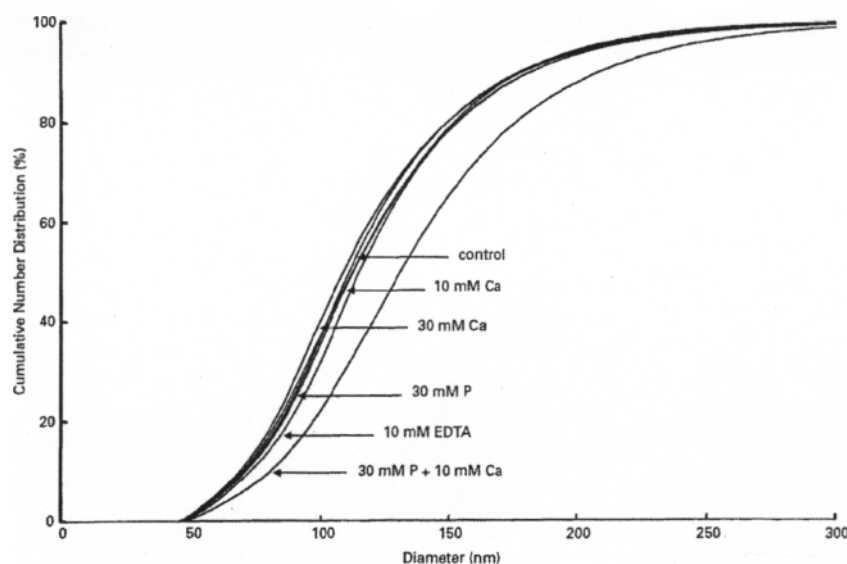
$$N(x)/(nm^{-1}) = 1 / (\sigma_0 \langle nm \rangle) \{ 1 / \sqrt{2\pi} \} \exp\{ -0.5(\ln(x/a_0)/\beta)^2 \}$$

the parameter a₀ – the median particle diameter

Pooled σ_0 (a₀)=0.5 nm

Pooled σ_0 (β)=0.01

Στο σχήμα 20 παρουσιάζονται οι κατανομές του μεγέθους των σωματιδίων.



Σχήμα 20. Αθροιστική καμπύλη κατανομής για σωματίδια διαμέτρου >50 nm για τα διάφορα δείγματα αμύλου. Οι διαμέτροι υπολογίστηκαν με τις πυκνότητες του πίνακα 6.

Κατά τον υπολογισμό της κατανομής του μεγέθους των σωματιδίων βρέθηκε ότι για το γάλα ελέγχου (δείγμα γνωστής σύστασης για τον έλεγχο οργάνου ή μεθόδου), το 8% της φαινομενικής απορρόφησης A των σωματιδίων οφειλόταν σε απορρόφηση και το 92% σε σκέδαση, ενώ για το γάλα που περιέχει 10 mmol EDTA/kg γάλακτος η συνεισφορά της απορρόφησης και του σκεδασμού στην φαινομενική απορρόφηση των σωματιδίων ήταν 7% και 93% αντίστοιχα. Επίσης, πρέπει να σημειωθεί ότι κατά τον προσδιορισμό της δραστικής διαμέτρου από την κατανομή του μεγέθους των σωματιδίων μελετήθηκαν τα μεγαλύτερα των σωματιδίων.

6.4 Συζήτηση

Οι διαφορετικές τιμές των όγκων συγκράτησης στα διαγράμματα του σχήματος 19, οφείλονται είτε σε αλλαγές στην κατανομή του μεγέθους των σωματιδίων, είτε σε αλλαγές στην πυκνότητα των σωματιδίων ή και στα δυο είδη μεταβολών.

Ωστόσο, οι τιμές των μέσων διαμέτρων (πίνακας 6) και των κατανομών του μεγέθους των σωματιδίων (σχήμα 20) δείχνουν ότι, εξαιρούμενης της περίπτωσης του γάλακτος στο οποίο είχαν προστεθεί 30 mmol Pi και 10 mmol Ca/kg γάλακτος, δεν υπάρχουν μεγάλες διαφορές στην κατανομή του μεγέθους των σωματιδίων. Αυτό φανερώνει μια χαλαρότητα στη δομή των μυκλλίων με ταυτόχρονη αλλαγή στη σύνθεση του μυκλλίου. Εξαιρεση αποτελεί το δείγμα γάλακτος, στο οποίο έχει προστεθεί 30mmol Pi και 10 mmol Ca/kg γάλακτος. Οι μεταβολές στις τιμές της δραστικής διαμέτρου είναι μικρή και συνδέονται ποιοτικά με την συγκέντρωση της CCP και της καζεΐνης στη δομή του μυκλλίου(πίνακας 7).

Πίνακας 7: Επίδραση των πρόσθετων υλών για τη σύνθεση, την δραστική διάμετρο και την ένταση της σκέδασης των μυκλλίων της καζεΐνης.

Additives to Milk (mmol/kg milk)	Casein in Micelles (g/kg milk)	CCP (g/kg milk)	Effective Diameter (nm)	Scattering Intensity (a.u.)
Control (none)	23.72	2.80	193	201 ± 11
10 Ca	27.21	2.61	193	187 ± 8
30 Ca	26.94	3.44	202	202 ± 5
30 Pi	26.11	2.97	198	277 ± 8
30 Pi + 10 Ca	27.04	3.86	209	186 ± 9
10 EDTA	28.07	1.10	199	153 ± 5

† Data from Edrington et al., 2001
 ‡ Data from Edrington et al., 2000. Note that the effective diameter of 110 nmol Ca/kg milk given in Edrington et al. is 110 nmol Ca/kg milk.

Εξαίρεση και εδώ αποτελεί το δείγμα του γάλακτος στο οποίο έχει προστεθεί 30 mmol Pi και 10mmol Ca/kg γάλακτος. Για να είναι παρατηρήσιμες οι αλλαγές στην τιμή της δραστικής διαμέτρου πρέπει να πραγματοποιηθεί μια σημαντική αλλαγή στο μέγεθος των μεγαλύτερων σωματιδίων ή μια μεγαλύτερη αλλαγή στο κλάσμα των μικρότερων σωματιδίων [65].

Η μικρή επίδραση στην κατανομή του μεγέθους των σωματιδίων των μεταβολών, των μικκυλίων Ca^{2+} και Pi (πίνακας 7) αποδεικνύει ότι τα μικκύλια μοιάζουν με ισχυρά ενυδατώμενους σπόγγους και διαθέτουν πορώδη δομή. Κατά την απομάκρυνση ή την ενσωμάτωση σημαντικής ποσότητας CCP και καζεΐνης, αυτό που αλλάζει δεν είναι το μέγεθος ή ο αριθμός των σωματιδίων αλλά το πορώδες και οι πυκνότητες των σωματιδίων.

Η ιδέα της αύξησης του πορώδους των μικκυλίων καζεΐνης μετά την προσθήκη EDTA είχε επίσης προταθεί το 1996 (Wade), μέσω μιας μελέτης βασιζόμενης στην ηλεκτροακουστική. Στο δείγμα γάλακτος με τα 30mmol Pi και 10mmol Ca/kg γάλακτος, παρατηρήθηκε μια αύξηση της CCP, ενώ στα μικκύλια καζεΐνης παρατηρήθηκε μια ομοιόμορφη διόγκωση των σωματιδίων, όπως άλλωστε προκύπτει από την κατανομή του μεγέθους των σωματιδίων, αύξηση στην δραστική διάμετρο (πίνακας 7) και μικρή μείωση στην πυκνότητα του μικκυλίου (πίνακας 6).

Το γεγονός ότι η προσθήκη 10 mmol EDTA /kg γάλακτος, δεν προκαλεί αλλαγές στην κατανομή του μεγέθους των σωματιδίων και στην δραστική διάμετρο επιβεβαιώνεται και από μια παλαιότερη εργασία (1988, Griffin et al.). Εξάλλου τα παραπάνω επικυρώνονται και από παρατηρήσεις στη διάμετρο του μικκυλίου σε τιμές Ph από 5.5 έως 6.5, παρόλο που σημαντικές ποσότητες CCP και καζεΐνης είχαν διαλυτοποιηθεί [66].

Τέλος, οι παρατηρούμενες (PCS) δραστικές διαμέτροι των μικκυλίων καζεΐνης για το γάλα ελέγχου, καθώς και τα δείγματα του γάλακτος στα οποία είχαν προστεθεί ασβέστιο και χηλικά αντιδραστήρια ασβεστίου αντίστοιχα συμφωνούν με τις βιβλιογραφικές [60].

Επίσης, η μέση πυκνότητα του μικκυλίου, όπως αυτή υπολογίστηκε (SdFFF, PCS) για το γάλα ελέγχου συμφωνεί με την βιβλιογραφική τιμή 1.063 gr/ml [61].

7. Η προσρόφηση των πρωτεϊνών του γάλακτος σε λατέξ πολυστερίνης. Μια μελέτη που βασίζεται στην μονοφασική χρωματογραφία φυγοκεντρικού πεδίου και στην dynamic light scattering

7.1 Υλικά και μέθοδοι

- Δείγματα PS
- BLG
- BCN: Απομόνωση του κλάσματος της καζεΐνης από αποβουτυρωμένο γάλα με καθίζηση οξέος, ακολουθούμενη από χρωματογραφία σε στήλη S Sepharose-FF με ρυθμιστικό διάλυμα αποτελούμενο από οξικό 20Mm και ουρία 6M σε Ph5. Με τον τρόπο αυτό διαχωρίστηκαν οι 4 διαφορετικές καζεΐνες. Το κλάσμα της BCN απομονώθηκε και υπέστη διάλυση και στη συνέχεια λυοφιλοποίηση. Περαιτέρω ανάλυση με χρήση υγρής χρωματογραφίας πρωτεϊνών δεν έδειξε την παρουσία άλλων πρωτεϊνών [67].
- Οι πυκνότητες και των 2 μελετώμενων πρωτεϊνών είναι 1.365gr/ml, ενώ αυτές του λατέξ και του ρυθμιστικού διαλύματος είναι 1.053gr/ml και 0.997g/ml αντίστοιχα [68].

PCS: Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια ενός φασματοφωτόμετρου με γωνία σκεδασμού 90^0 , σε θερμοκρασία 25^0C . Για τα πειράματα, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα λατέξ (20Mm ιμιδαζόλης, Ph=7), στα οποία προστέθηκαν 20ml διαλύματος BCN 10mg/ml.

Η διάμετρος των σωματιδίων πολυστυρολίου μετρήθηκε πριν και μετά την προσθήκη της πρωτεΐνης. Στη συνέχεια το μίγμα φυγοκεντρήθηκε και το υπερκείμενο υγρό απομακρύνθηκε. Κατόπιν, τα σωματίδια λατέξ αναμείχθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο όμως αυτή τη φορά δεν περιείχε καθόλου πρωτεΐνη. Αυτή η διαδικασία της έκπλυσης επαναλήφθηκε έξι φορές και η διάμετρος του συμπλέγματος λατέξ-πρωτεΐνης μετρήθηκε και συγκρίθηκε με τις αρχικές τιμές [69].

- **Προσδιορισμός της προσροφημένης πρωτεΐνης**

Δυο μέθοδοι χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της ποσότητας πρωτεΐνης που προσροφήθηκε από μια συγκεκριμένη ποσότητα σωματιδίων λατέξ.

Με την πρώτη μέθοδο μετρήθηκε η συνολική ποσότητα πρωτεΐνης που προσλήφθηκε από τα σωματίδια. Η συγκέντρωση ενός δοθέντος διαλύματος πρωτεΐνης, προσδιορίστηκε με τη μέθοδο ανάλυσης αμινοξέος.

AAA: Amino Acid Analysis

Σε δείγματα 1ml το καθένα, τα οποία περιείχαν τα διαλύματα πρωτεΐνης συγκέντρωσης 1.6mg/ml προστέθηκαν 100ml 10% w/v περιεκτικότητας σωματιδίων λατέξ.

Τα δείγματα εισήχθησαν σε ένα περιστρεφόμενο αναδευτήρα για 10 λεπτά και στη συνέχεια ακολούθησε φυγοκέντρωση. Προσδιορίστηκε η πρωτεΐνη στο υπερκείμενο υγρό με τη βοήθεια της AAA μεθόδου και έτσι το ποσό της προσροφούμενης πρωτεΐνης, βρέθηκε από τη διαφορά συγκέντρωσης πριν και μετά την έκθεση της πρωτεΐνης στα σωματίδια λατέξ.

Η δεύτερη μέθοδος περιλαμβάνει τον προσδιορισμό του ποσού της πρωτεΐνης που προσροφήθηκε από τα σωματίδια. Τα επιστρωμένα σωματίδια λατέξ εκπλύθηκαν προσεκτικά. Η θολρότητα (turbidity) του εκπλυμένου αιωρήματος προσδιορίστηκε φασματοσκοπικά, ενώ το δείγμα υπεβλήθη σε ανάλυση αμινοξέος (AAA), αφού πρώτα υπέστη ξήρανση στο κενό και σε χαμηλή θερμοκρασία. Η AAA διαδικασία πραγματοποιείται με 20lit υδρόλυση του αποξηραμένου δείγματος σε διάλυμα HCl 6M στους 105°C. Κατόπιν εισάγεται φαινυλικός εστέρας για να ακολουθήσει υγρή χρωματογραφία αντιστρεπτής φάσης. Το ολικό ποσό πρωτεΐνης καθορίζεται από το εμβαδόν της επιφάνειας των κορυφών [70,71].

Μικροθερμιδομετρία

Η θερμική σταθερότητα των δύο πρωτεϊνών, τόσο σε διαλύματα τους, όσο και σε σύμπλοκα με σωματίδια λατέξ τύπου PS προσδιορίστηκε με τη βοήθεια διαφορικού θερμιδομέτρου (Model 4207, Hart Scientific).

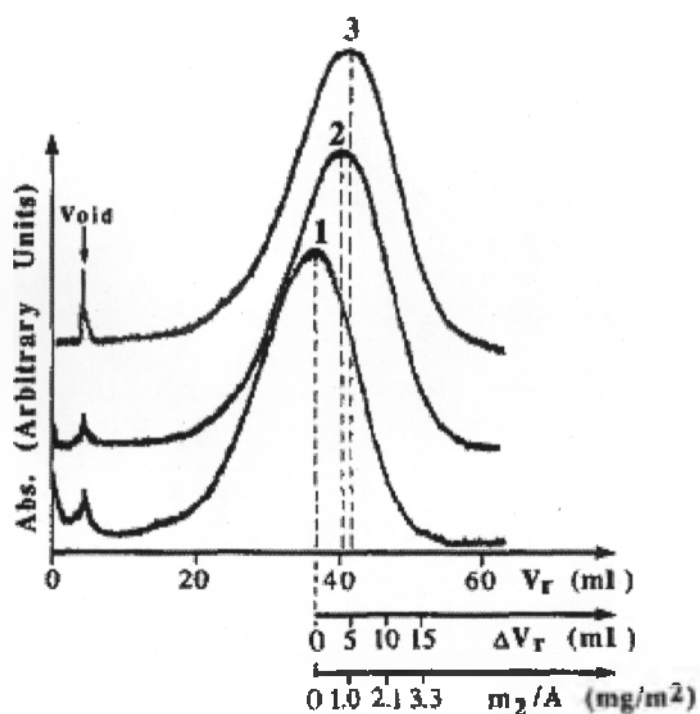
Η πρωτεΐνη διαλυτοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα ιμιδαζόλης 20mM και Ph=7.

Κατόπιν, στις τρεις κυψελίδες χωρητικότητας 1.0 ml η καθεμία προστέθηκε το παραπάνω διάλυμα της πρωτεΐνης συγκέντρωσης 12mg/ml και στη συνέχεια άρχισε η αύξηση της θερμοκρασίας κατά 1°C/ min.

Η θερμιδομετρική ενθαλπία ΔH cal προσδιορίστηκε με ολοκλήρωση της καμπύλης θερμοχωρητικότητας [72].

7.2 Αποτελέσματα

Οι δυο πρωτεΐνες BCN και BLG προσροφήθηκαν σε σωματίδια λατέξ τύπου PS διαμέτρου 272nm σε διαλύματα που περιείχαν 8 mg/ml πρωτεΐνη και 1% w/v λατέξ. Η προσρόφηση ήταν γρήγορη και για τις δύο πρωτεΐνες, όπως φαίνεται και στο σχήμα 21.



Σχήμα 21: Διαγράμματα των PS μη-επιστρωμένων και των PS επιστρωμένων σωματιδίων με ονομαστική διάμετρο των 272 nm. Οι γραμμές 1-3 αντιπροσωπεύουν τα μη-επιστρωμένα, τα BCN-επιστρωμένα και τα BLG-επιστρωμένα, αντίστοιχα. Οι παράμετροι της ΜΧΦΠ που χρησιμοποιήθηκαν, ήταν: ένταση πεδίου 173g, ταχύτητα ροής 2,9 ml/min. Η ΔV , εκφράζει το πλεόνασμα του όγκου κατακράτησης που προκαλείται από την απορρόφηση των πρωτεϊνών, ανάλογα με τη μάζα που προσροφάται ανα μονάδα επιφάνειας.

Η εξίσωση: $m_2 \approx [6kT/V_0Gw(1 - \rho_3/\rho_2)]\Delta V_i$ (14) που συνδέει την προσροφούμενη μάζα και την διαφορά που υπάρχει στον όγκο κατακράτησης μεταξύ των μη επιστρωμένων σωματιδίων και των επιστρωμένων φανερώνει τις ομοιότητες που υπάρχουν ως προς το ποσοστό προσρόφησης των δύο πρωτεϊνών. Μια πιο ακριβής εκτίμηση της πρόσληψης καθεμίας από τις δύο πρωτεΐνες από τα σωματίδια λατέξ, προκύπτει από την εξίσωση 15 και 16, σε συνδυασμό με τους μετρούμενους όγκους κατακράτησης των μη-επιστρωμένων σωματιδίων και των συμπλεγμάτων λατέξ-BCN και λατέξ-BLG αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα των εξισώσεων 15 και 16 για τις επιφανειακές συγκεντρώσεις των δύο πρωτεϊνών, παρουσιάζονται στον πίνακα 8 [72,73].

$$C_s = a^6 \frac{\pi^5 n_0^4}{4\lambda^4} \left(\frac{(n^2 - 1)}{(n^2 + 2)} \right)^2 \int_0^\pi (1 + \cos^2 \theta) \sin \theta P(\theta) d\theta \quad (15)$$

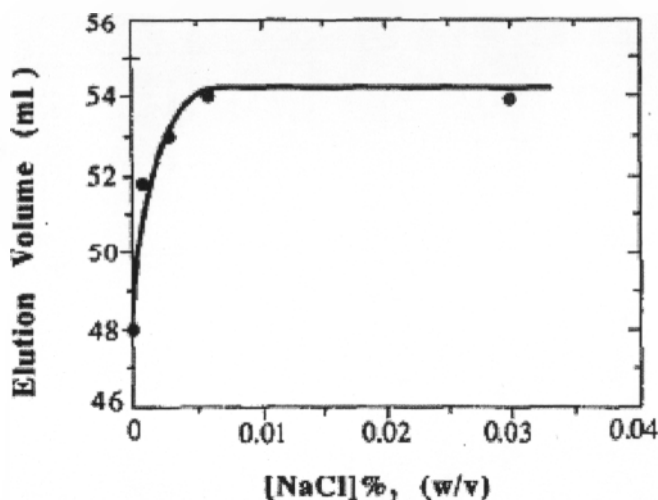
$$A(a) = \frac{N(a)}{\ln 10} \left[\varepsilon_a a^3 + \varepsilon_s a^6 \int_0^\pi (1 + \cos^2 \theta) \sin \theta P(\theta) d\theta \right] \ell \quad (16)$$

Πίνακας 8: Επιφανειακές συγκεντρώσεις Γ για τις δύο πρωτεΐνες σε PS latex υπολογισμένες με τέσσερις διαφορετικές μεθόδους: Γ_{FFF} με τη ΜΧΦΠ, $\Gamma_{FFF/AAA}$ με την AAA σε σωματίδια μετά από κλασμάτωση, $\Gamma_{AAA}(W)$ με την AAA σε σωματίδια μετά από προσρόφηση, $\Gamma_{AAA}(T)$ με την AAA από το υπερκείμενο πριν και μετά την προσρόφηση των πρωτεϊνών.

Proteins	Mol.wt. (dalton)	Γ_{FFF} (mg/m ²)	$\Gamma_{FFF/AAA}$ (mg/m ²)	$\Gamma_{AAA}(W)$ (mg/m ²)	$\Gamma_{AAA}(T)$ (mg/m ²)	δ (PCS, nm)
BCN	23 000	1.00	1.28	1.26	2.99	10
BLG	18 000	0.88	1.06	1.00	4.12	3

Είναι φανερό πως οι συγκεντρώσεις αυτές των δύο πρωτεϊνών είναι παρόμοιες, κάτι που γίνεται περισσότερο εμφανές αν οι συγκεντρώσεις αυτές εκφραστούν σε μονάδες επιφάνειας/μόριο. Ωστόσο, κάποιες πηγές λαθών μπορούν να επηρεάσουν την ακρίβεια των μετρήσεων της μεθόδου SdFFF. Καταρχήν, είναι γνωστό ότι σε κινητές φάσεις χαμηλής ιονικής ισχύος μπορεί να εμφανιστούν απώσεις Coulomb μεταξύ των σωματιδίων του δείγματος και του χρωματογραφικού θαλάμου. Τα αποτελέσματα

των απώσεων αυτών, είναι η πρόωρη έκλυση του δείγματος, το μέγεθος ή η μάζα του οποίου εμφανίζεται μικρότερη της πραγματικής τιμής. Μελέτη των παραπάνω σε σύμπλεγμα προσρόφησης BCN και σωματιδίων λατέξ τύπου PS και διαμέτρου 272nm έδωσαν το σχήμα 22 (παρόμοια καμπύλη εμφανίζεται και για την BLG).



Σχήμα 22: Επίδραση της ιονικής ισχύος από τον όγκο έκλυσης των επιστρωμένων καζεϊνών PPS σωματιδίων. Το πλατό έχει επιτευχθεί για συγκεντρώσεις άλατος άνω του 0.015% (w/v).

Παρατηρώντας το σχήμα προκύπτει ότι πρόωρη έκλυση εμφανίζεται σε κινητές φάσεις χαμηλής ιονικής ισχύος, ενώ η σταδιακή αύξηση της ιονικής ισχύος I οδηγεί σε μια τιμή πλατώ (σταθερή) του όγκου κατακράτησης. Κάτι τέτοιο υποδεικνύει πως για αυτή την τιμή της ιονικής ισχύος, οι απώσεις Coulomb των σωματιδίων του δείγματος και του χρωματογραφικού θαλάμου είναι μηδενικές. Αυτή η τιμή πλατώ, χρησιμοποιείται στον υπολογισμό των συγκεντρώσεων επιφάνειας, όπως αυτές εμφανίζονται στον πίνακα 8.

Μια δεύτερη πηγή λαθών είναι η περίπτωση ανακατανομής της προσροφούμενης πρωτεΐνης από την επιφάνεια των σωματιδίων στον χρωματογραφικό θάλαμο κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού (fractionation). Για τον λόγο αυτό στην περίπτωση του συμπλέγματος BCN-PS, χρησιμοποιήθηκαν κινητές φάσεις αποτελούμενες αποκλειστικά από ρυθμιστικό διάλυμα ιμιδαζόλης ή μεταφορείς στους οποίους είχε προστεθεί διάλυμα διαλυτής BCN 2 mg/ml [73,74].

Προκειμένου, να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα της SdFFF μεθόδου χρησιμοποιήθηκε και μια δεύτερη μέθοδος αυτή της ανάλυσης αμινοξέος. Κατά τη μέθοδο αυτή, δείγματα λατέξ τύπου PS γνωστών συγκεντρώσεων, επώαστηκαν με διαλύματα καθεμίας των δύο πρωτεϊνών (8.03 και 7.79 mg/ml αντίστοιχα). Τα διαλύματα των πρωτεϊνών εξετάστηκαν πριν και μετά την έκθεση τους στα σωματίδια λατέξ. Επιπλέον, τα επιστρωμένα σωματίδια απομακρυνθήκαν από το υπερκείμενο διάλυμα με φυγοκέντρηση και ακολούθησε έκπλυση τους με ρυθμιστικό διάλυμα ιμιδαζόλης, προκειμένου να απομακρυνθούν τα χαλαρώς προσροφούμενα μόρια πρωτεΐνης. Επιπλέον, προκειμένου να καθοριστεί η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στην επιφάνεια των σωματιδίων λατέξ διαμέτρου 272nm, τα δύο συμπλέγματα λατέξ-πρωτεΐνης εξετάστηκαν και με τη βοήθεια της μεθόδου PCS. Τα αποτελέσματα της μεθόδου αυτής επιβεβαίωσαν καταρχάς τις διαφορές που είχαμε παρατηρήσει προηγούμενα με τη χρήση της SdFFF. Έτσι, ενώ οι συγκεντρώσεις επιφάνειας των BCN και BLG βρέθηκαν παρόμοιες, εντοπίστηκαν διαφορές στην προέκτασή τους στον χώρο. Πράγματι, το στρώμα της BLG έχει πάχος από 2 έως 3 nm, ενώ αυτό της BCN μέχρι και 15 nm. Η τελευταία τιμή επιβεβαιώθηκε και από πειράματα στα οποία τα συμπλέγματα λατέξ-πρωτεΐνης εκπλύθηκαν αρκετές φορές, οπότε ενώ το πάχος του στρώματος πριν την έκπλυση είχε υπολογιστεί στα 13.5nm, μετά την έκπλυση βρέθηκε 9,5nm. Προφανώς, η έκπλυση προκάλεσε μείωση του ποσοστού της προσροφούμενης πρωτεΐνης στην επιφάνεια των σωματιδίων λατέξ, ωστόσο το πάχος του στρώματος της προσροφούμενης πρωτεΐνης, δεν μειώθηκε κατά τρόπο ανάλογο των μορίων της πρωτεΐνης που απομακρύνθηκαν λόγω έκπλυσης. Παρά το ότι τα μοριακά τους βάρη δε διαφέρουν και πολύ, οι δύο πρωτεΐνες δομικά διαφέρουν σημαντικά. Το μόριο της BCN, είναι πιο εύκαμπτο και διαθέτει μια υδροφοβική <ουρά > στην οποία οφείλεται η προσρόφηση της BCN σε λιπαρές και μη πολικές επιφάνειες. Το υπόλοιπο υδροφιλικό τμήμα του μορίου στρέφεται προς το υδατικό περιβάλλον.

Αντίθετα, το μόριο της BLG, με τη βοήθεια της Κρυσταλλογραφίας μέσω ακτινών X, βρέθηκε ότι αναδιπλώνεται στην σταθερή β-barrel μορφή. Πιστεύεται, ότι η BLG μετά την προσρόφηση της σε μια υδροφοβική επιφάνεια υφίσταται μια δομική αναμόρφωση. Ωστόσο η θερμοδομετρική ανάλυση δείγματος BLG, το οποίο είχε προσροφηθεί σε σωματίδια λατέξ τύπου PS και διαμέτρου 90nm, δεν έδειξε σημαντικές αλλαγές στη δομή του μορίου μετά την προσρόφηση. Μάλιστα, η θερμοκρασία τήξης της πρωτεΐνης στην προσροφημένη κατάσταση βρέθηκε ελαφρώς

μεγαλύτερη κατά (2.6°C) από την αντίστοιχη της πρωτεΐνης σε διάλυμα. Σε αυτά τα πειράματα μελετήσαμε την προσρόφηση δύο πρωτεϊνών με παρόμοιο μήκος ανθρακικής αλυσίδας. Βρέθηκε ότι και οι δύο προσροφώνται επιφανειακά περίπου στον ίδιο βαθμό. Ωστόσο, η μια από τις δυο πρωτεΐνες δεν παρουσιάζει σημαντικές αλλαγές στην δομή της, όταν βρίσκεται στην προσροφημένη κατάσταση. Αντίθετα, η δεύτερη είναι πιο εύκαμπτη και επιτρέπει στις υδροφιλικές ουρές των μορίων της να εισχωρήσουν στον υδατικό διαλύτη που περιβάλλει το σύμπλεγμα πρωτεΐνης-σωματιδίων λατέξ [75].

7.3 Συμπεράσματα

Η δυνατότητα της ακριβούς μέτρησης της συγκέντρωσης επιφάνειας και του πάχους στρώματος προσρόφησης των μακρομορίων είναι απαραίτητη για την κατανόηση της συμπεριφοράς τους στην προσροφημένη κατάσταση. Για παράδειγμα στην περίπτωση των επιφανειοδραστικών ουσιών, η δυνατότητα τους να δημιουργούν σταθερά γαλακτώματα είναι άμεσα συνδεδεμένη με την ικανότητα τους να αλληλεπιδρούν τόσο με την υδατική όσο και με τη λιπαρή φάση.

Στη συγκεκριμένη εργασία, η επιφανειοδραστική πρωτεΐνη του γάλακτος β-καζεΐνη, συγκρίνεται ως προς την προσρόφηση της με την πιο άκαμπτη δομικά β-γαλακτογλοβουλίνη. Με τη βοήθεια της μεθόδου SdFFF, υπολογίσαμε την συγκέντρωση επιφάνειας προσρόφησης και των δύο πρωτεϊνών και βρέθηκε ότι διαφέρουν σημαντικά. Τα αποτελέσματα της παραπάνω μεθόδου επιβεβαιώθηκαν και από τη μέθοδο της ποσοτικής ανάλυσης αμινοξέος. Για τον καθορισμό των συγκεντρώσεων επιφάνειας, με τη χρήση της μεθόδου SdFFF, δεν είναι απαραίτητη να γνωρίζουμε την ποσότητα της επιφάνειας του κolloειδούς που εκτίθεται στην πρωτεΐνη. Από τις μετρήσεις προέκυψε αύξηση της μάζας ανα σωματίδιο. Αυτή η αύξηση που συνδέεται με την πρόσληψη πρωτεΐνης δεν μπορεί να καθοριστεί από την SdFFF, καθώς η πυκνότητα του συμπλέγματος της απορρόφησης δεν είναι γνωστή. Αντίθετα, με την χρήση της μεθόδου PCS παρατηρείται ότι η β-καζεΐνη προσροφάται πέντε φορές περισσότερο από την συμπαγέστερη β-γαλακτογλοβουλίνη.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

- 1.Κεχαγιάς Χ., <<Τεχνολογία γάλακτος και Γαλακτομικών προϊόντων>>, Εκδόσεις Τ.Ε.Ι Αθηνών, Αθήνα(1997), σελ.18-26.
- 2.Ανυφαντάκης Μ.,Ε., <<Μέθοδοι εξετάσεων του γάλακτος και των Προϊόντων του>>, Εκδόσεις Α.Σταμούλης, Πειραιάς(1992), σελ.87-88.
- 3.Στέλιος Καμινναρίδης, Γκόλφω Μοάτσου, <<Γαλακτοκομία>>, Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα(2009), σελ.23-26.
4. Κυπαρισσίου Π., Μαζαράκη Σ., Παπακωνσταντίνου Μ. <<Γνωρίζοντας τα τρόφιμα>>, Εκδόσεις Les Livres du Tourisme, Αθήνα(2005), σελ.44-47.
- 5.Υπουργείο Εθνικής Παιδείας και Θρησκευμάτων, <<Αρχές Επεξεργασίας Τροφίμων>>, Εκδόσεις ΟΕΔΒ, Αθήνα(1999), σελ.299-312.
- 6.Κούτικας Α.,Κανελλάκη Α., <<Χημεία και Τεχνολογία Τροφίμων>>, Εκδόσεις Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα(2005), σελ.344-347,352-360.
7. Βουδούρης Ε., Κοντομηνάς Μ., <<Εισαγωγή στη Χημεία των Τροφίμων>>, Εκδόσεις ΟΕΔΒ, Αθήνα(2000), σελ.221,225-231.
8. <http://www.milkfacts.info/Milk Composition/Protein.htm> (12/5/2011)
9. <http://www.food-info.net/uk/protein/milk.htm>
- 10.Τζία Κ., Τσιαπούρης Α., <<HACCP>>, Εκδόσεις Παπασωτηρίου, Αθήνα(1996), σελ.121.
11. J. C. Giddings, *Dynamics of Chromatography. Part 1. Principles and Theory*, Arnold London, Marcel Dekker, New York, 1965.
12. J. C. Giddings, *Pure Appl. Chem.*, 51, 1459 (1979).
13. J. C. Giddings, Y. H. Yoon and M. N. Myers, *Anal. Chem.*, 47, 126 (1975).
14. J. C. Giddings, P. S. Williams and R. Beckett, *Anal. Chem.*, 59, 28 (1987).
15. J. C. Giddings and K. D. Caldwell, *Physical Methods of Chemistry*, B. W. Rossiter and J. F. Hamilton, Eds., Vol. 3B, Wiley, New York, 1989, p. 867.
16. M. E. Hovingh, G. H. Thomson and J. C. Giddings, *Anal Chem.*, 42, 195 (1970).
17. J. C. Giddings, *J. Chem. Phys.*, 49, 81 (1968).
18. A Einstein, *Investigations on the Theory of Brownian Movement* (1905). Dover Publications, New York, 1956,p.165
19. J. C. Giddings, *Separ. Sci.*, 8, 567 (1973).
20. L. F. Kesner and J. C. Giddings, *High Performance Liquid Chromatography*, P. R. Brown and R. A. Hartwick, Eds., Wiley, New York, 1989, p. 601.
21. L. K. Smith, M. N. Myers and J. C. Giddings, *Anal. Chem.*, 49, 1750 (1977).

22. J. C. Giddings, *Sep. Sci. Technol.*, **24**, 755 (1989).
23. J. C. Giddings, *Anal. Chem.*, **62**, 2306 (1990).
24. M. E. Schimpf, M. N. Myers and J. C. Giddings, *J. Appl. Polym. Sci.*, **33**, 117 (1987).
25. P. Reschiglian, M. Martin, C. Contado and F. Dondi, *J. Liq. Chromatogr. & Rel Tech.*, **20**, 2723 (1997).
26. J. C. Giddings, *Sep. Sci. Technol.*, **13**, 241 (1978); Corrigendum, *Sep Sci Technol.*, **14**, 869 (1979).
27. P. S. Williams, J. C. Giddings, *Anal. Chem.*, **66**, 4215 (1994).
28. B. P. Ho and L. G. Leal, *J. Fluid Mech.*, **65**, 365 (1974).
29. P. Ganatos, R. Pfeffer and S. Weinbaum, *J. Fluid Mech.*, **99**, 755 (1980).
30. A. J. Goldman, R. G. Cox and H. Brenner, *Chem. Eng. Sci.*, **22**, 653 (1967).
31. M. Chaoui, Ph. D. Thesis, Université Pierre et Marie Curie, Paris (1995).
32. M. Chaoui and F. Feuillebois, presented at the 19th International Congress of Theoretical and Applied Mechanics, Kyoto, 1996.
33. Giddings, J. C., Moon, M. H., Williams, P. S., & Myers, M. N. (1991). Particle size distribution by sedimentation/steric field-flow fractionation: development of a calibration procedure based on density compensation. *Analytical Chemistry*, **63**, 1366–1372.
34. Jussila, M. A., Yohannes, G., & Riekkola, M.-L. (1997). Flow fieldflow fractionation in the study of dairy products. *Journal of Microcolumn Separations*, **9**, 601–609.
35. Singer, N. S. (1996). Microparticulated proteins as fat mimetics. In S. Roller & S. A. Jones (Eds.), *Handbook of fat replacers* (pp. 175–189). New York: CRC Press.
36. Ratanathanawongs, S. K., & Giddings, J. C. (1994). Rapid size characterization of chromatographic silicas by flow field-flow fractionation. *Chromatographia*, **38**, 545–554.
37. Siripinyanond, A., & Barnes, R. M. (2002). Flow field-flow fractionation-inductively coupled plasma mass spectrometry of chemical mechanical polishing slurries. *Spectrochimica Acta Part B*, **57**, 1885–1896.
38. Tester, R. F., & Morrison, W. R. (1990). Swelling and gelatinization of cereal starches II. Waxy rice starches. *Cereal Chemistry*, **67**, 558–563.

39. Li, J.-Y., & Yeh, A-I. (2001). Relationship between thermal, rheological characteristics and swelling power for various starches. *Journal of Food Engineering*, 50, 141–148.
40. Tamime, A. Y., & O'Connor, T. P. (1995). Kishk—a dried fermented milk/cereal mixture. *International Dairy Journal*, 5(2), 109–118.
41. Kwok, K. C., & Niranjana, K. (1995). Review: effect of thermal processing on soymilk. *International Journal of Food Science and Technology*, 30, 263–295
42. Dickinson, E. (1992). *An introduction to food colloids*. Melbourne: Oxford University Press
43. Dickinson, E., & Stainsby, G. (1988). *Emulsion stability in advances in emulsions and foams*. London: Elsevier Applied Science
44. Durand, A., & Hosken, R. W. (1999). Effects of homogenisation on the stability of a model soy food emulsion. *Proceedings of the 27th Australasian Chemical Engineering Conference (Chemeca99)*, 746–752.
45. Reuter, H. (1993). *Fundamentals of UHT and HTST sterilisation of foodstuffs*. In H. Reuter (Ed.), *Aseptic processing of foods*. Pennsylvania: Technomic Publishing Inc.
46. Fennema, O. R. (1996). *Food chemistry* (3rd ed). New York: Marcel Dekker Inc.
47. Strawbridge, K. B., Ray, E., Hallett, F. R., Tosh, S. M., & Dagleish, D. T. (1995). Measurement of particle size distribution in milk homogenized by microfluidizer: Estimation of populations of particles with Radii of Less than 100 nm. *J. Colloid Interface Sci.*, 171, 392–398.
48. Kelly, E. G., & Spottiswood, D. J. (1995). *Introduction to mineral processing*. Australian Mineral Foundation
49. Demirag, K., Elmaci, Y., & Altug, T. (1999). Formulation and quality evaluation of reduced sugar and reduced calorie Kazandibi. *Journal of Food Quality*, 22(1), 101–108.
50. Martensson, O., Oste, R., & Holst, O. (2000). Lactic acid bacteria in an oatbased non-dairy milk substitute: fermentation characteristics and exopolysaccharide formation. *Lebensmittel- Wissenschaft-und-Technologie*, 33(8), 525–530.

51. ten Grotenhuis, E., Tuinier, R., & de Kruif, C. G. (2003). Phase stability of concentrated dairy products. *Journal of Dairy Science*, 86, 764–769.
52. Dickinson, E., & Parkinson, E. L. (2004). Heat-induced aggregation of milk protein-stabilized emulsions: Sensitivity to processing and composition. *International Dairy Journal*, 14, 635–645.
53. Millqvist-Fureby, A., Elofsson, U., & Bergenst hl, B. (2001). Surface composition of spray-dried milk protein-stabilised emulsions in relation to pre-heat treatment of proteins. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 21, 47–58.
54. Euston, S. R., Finnigan, S. R., & Hirst, R. L. (2002). Kinetics of droplet aggregation in heated whey-protein stabilised emulsions: Effect of polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 16, 499–505.
55. Demetriades, K., Coupland, J. N., & McClements, D. J. (1997). Physical properties of whey protein-stabilised emulsions as affected by heating and ionic strength. *Journal of Food Science*, 62(3), 342–347.
56. Owusu Apenten, R. K. (1998). The effect of protein unfolding stability on their rates of irreversible denaturation. *Food Hydrocolloids*, 12, 1–8.
57. Paulsson, M., & Dejmek, P. (1990). Thermal denaturation of whey proteins in mixtures with caseins studied by differential scanning calorimetry. *Journal of Dairy Science*, 95, 590–600.
58. Siliwinski, E. L., Roubos, P. J., Zoet, F. D., van Boeckel, M. A. J. S., & Wouters, J. T. M. (2003). Effect of heat on physicochemical properties of whey protein stabilised emulsions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 31, 231–242.
59. Dalgleish, G. D. (1996). Food emulsions. In J. Sjoblom (Ed.), *Emulsions and Emulsion Stability* (pp. 287–325). New York: Marcel Dekker.
60. Lin SHC, Dewan RK, Bloomfield VA & Morr CV 1971 Inelastic light scattering study of the size distribution of bovine milk casein micelles. *Biochemistry* 10 4788–4793

61. Kirchmeier O 1973 Arrangement of components, electric charge and interaction energies of casein particles. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 27 191–198
62. Walstra P & Jenness R 1984 *Dairy Chemistry and Physics*. New York: Wiley-Interscience
63. Udabage P, McKinnon IR & Augustin MA 2000 Mineral and casein equilibria in milk: effects of added salts and calcium chelating agents. *Journal of Dairy Research* 67 361–370
64. McKinnon IR, Beckett R, Udabage P & Augustin MA 1999 The use of field flow fractionation in the characterization of casein micelles. *International Dairy Journal* 9 391–392
65. Udabage P, McKinnon IR & Augustin MA 2001 Effects of mineral salts and calcium chelating agents on the gelation of renneted skim milk. *Journal of Dairy Science* 84 1569–1575
66. Visser J, Minihan A, Smits P, Tjan SB & Heertje I 1986 Effects of pH and temperature on the milk salt system. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 40 351–368
67. C. M. Hollar, A. J. R. Law, D. G. Dalgleish and R. J. Brown, *J. Dairy Sci.*, 74 (1991) 2403-2409.
68. D. T. Davies and A. J. R. Law, *J. Dairy Res.*, 54 (1987) 369-376.
69. D. E. Koppel, *J. Chem. Phys.*, 57 (1972) 48144820.
70. R. L. Henrikson and S. C. Meredith, *Anal. Biochem.*, 136 (1984) 65-74.
71. G. Yan, G. Nyquist, K. D. Caldwell, R. Payor and E. C. McGraw, *Znv. Ophthalm. Vis. Sci.*, submitted for publication.
72. E. Dickinson, E. W. Robson and G. Stainsby, *J. Chem. Soc. Farad. Trans. I*, 79 (1983) 2937-2952.
73. D. G. Dalgleish, E. Dickinson and R. H. Whyman, *J. Colloid ZnterJ: Sci.*, 108 (1985) 174-179.
74. Y. Mori, K. Kimura and M. Tanigaki, *Anal. Chem.*, 62 (1990) 2668-2672.
75. D. G. Dalgleish and J. Leaver, *J. Colloid Znterf. Sci.*, 141 (1991) 288-294.