Πανεπιστήμιο Κρήτης

Σχολή Θετικών Επιστημών

Τμήμα Χημείας

Πτυχιακή Εργασία

« Μελέτη της επίδρασης του τύπου του γάλακτος στην χημική σύσταση και τα χαρακτηριστικά της Κρητικής γραβιέρας με τη φασματοσκοπία NMR »

Θεολογία Τσιγαδά (Α.Μ. 2151)

Εργαστήριο Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού

Υπεύθυνος Καθηγητής: Απόστολος Σπύρος

Ηράκλειο, Φεβρουάριος 2019

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στον καθηγητή κ. Απόστολο Σπύρο, για την εμπιστοσύνη του στην ανάθεση του θέματος της διπλωματικής μου εργασίας, την παροχή υποδομών και τη συνεχή καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια αυτής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ευαγγελία Ράλλη για τις χρήσιμες συμβουλές της και την απεριόριστη βοήθειά της στα πρώτα μου βήματα στο εργαστήριο.

Τέλος, ευχαριστώ την Έφη Μανωλοπούλου και τον Γιώργο Κανακαράκη για την υπομονή τους και την βοήθειά τους για την ολοκλήρωση τις εργασίας μου.

Περιεχόμενα

1.Εισαγωγή.....σελ.4

2.Θεωρία NMR.....σελ. 6

3.Σκοπός της Εργασίας.....σελ. 8

4.Αποτελέσματα-Συζητηση.....σελ. 14

5.Συμπεράσματα.....σελ. 27

6.Βιβλιογραφία.....σελ. 27

1.Εισαγωγή

Ιστορία του τυριού και της τυροκομίας.

Κανείς δεν ξέρει στην πραγματικότητα πότε πρωτοεμφανίστηκε η τυροκομία στην κόσμο. Κάποιες θεωρίες στηρίζονται σε δημοφιλής μύθους που χρονολογούνται περίπου στα 4.000 χρόνια πριν, ενώ άλλες βασίζονται σε αρχαιολογικά ευρήματα που τοποθετούνται χρονικά στην Νεολιθική εποχή. Η ιστορία του τυριού συνδέεται με την εξημέρωση των πρώτων μηρυκαστικών που φαίνεται ότι έγινε στα οροπέδια του σημερινού Ιράν κάπου στο 8.000 π.χ. Ένας μύθος περιγράφει έναν Άραβα έμπορο που έπρεπε να διασχίσει την έρημο, και μετέφερε γάλα μέσα σε ασκί φτιαγμένο από το στομάχι του προβάτου. Ο Όμηρος στην Οδύσσεια αναφέρει τον βοσκό Πολύφημο , οποίος ασχολούνταν με την τυροκομία.

Σύμφωνα με έρευνα του Πανεπιστημίου του Bristol, η τυροκομία ξεκίνησε κάπου στην Νεολιθική εποχή, αρκετά πριν την ιστορία με το άραβα έμπορο. Βρήκαν ίχνη από λίπος γάλακτος σε κομμάτια αρχαίων κεραμικών, που υποτίθεται ότι χρησιμοποιούνταν σαν στραγγιστήρες γάλακτος, στην Πολωνία, και υπολόγισαν ότι ο άνθρωπος έφτιαχνε τυρί, εδώ και 7.500 χρόνια.

Άλλη θεωρία που φαίνεται να έχει βάση, ισχυρίζεται ότι η τυροκομία και το τυρί ήρθαν στην Ευρώπη από τους Άριους, νομαδικά κτηνοτροφικά φύλα που προέρχονταν από την Κεντρική Ασία. Η τυροκομία γνώρισε μεγάλη ανάπτυξη κατά τους Ρωμαϊκούς χρόνους και διαδόθηκε σε όλη την Ευρώπη από τους Ρωμαίους κατακτητές. Πάντως τα περισσότερα από τα τυριά που ξέρουμε σήμερα πρωτοεμφανίστηκαν τον Μεσαίωνα. Η μαζική παραγωγή πυτιάς φαίνεται ότι άρχισε γύρω στο 1860, ενώ η βιομηχανική παραγωγή τυριών άρχισε τον 20ο αιώνα [1].

Θρεπτική αξία του τυριού.

Το τυρί είναι πολύ ωφέλιμο για τον ανθρώπινο οργανισμό, καθώς στα συστατικά του συμπεριλαμβάνονται οι βιταμίνες, το ασβέστιο, το λίπος, η λακτόζη, η καζεΐνη, υδατάνθρακες, σάκχαρα και πρωτεΐνες. Τα ίδια συστατικά έχει και το γάλα, από το οποίο παράγεται. Το πλεονέκτημά του είναι ότι έχει πολύ μικρότερο όγκο από το γάλα και συνέπεια αυτού είναι να απορροφάται καλύτερα από τον οργανισμό.

Τα σκληρά τυριά έχουν και τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ασβέστιο καθώς επίσης και μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη όπου φθάνει και το 30%, ποσοστό που ξεπερνάει κάποιες φορές και αυτή του κρέατος. Το τυρί έχει τεράστια θρεπτική αξία. Είναι πλούσιο σε πρωτεΐνες, ασβέστιο, βιταμίνη Α και D, βιταμίνη του συμπλέγματος Β, φώσφορο. Τα τυριά περιέχουν μικρά ποσά λακτόζης γι' αυτό και μπορούν να καταναλωθούν από άτομα με δυσανεξία στη λακτόζη.

Τα μαλακά τυριά έχουν 50% λιγότερη λακτόζη από το γάλα, ενώ στα σκληρά τυριά η περιεκτικότητα σε λακτόζη μειώνεται ακόμη περισσότερο. Αυτό συμβαίνει λόγω της ζύμωσης που υφίσταται η λακτόζη κατά την παρασκευή του τυριού με αποτέλεσμα να γίνονται πιο φιλικά στο πεπτικό σύστημα. Το τυρί είναι πλούσια πηγή πρωτεΐνης υψηλής βιολογικής αξίας και παρέχει όλα τα απαραίτητα αμινοξέα. Λόγω της ωρίμανσης που υφίσταται το τυρί, η πρωτεΐνη διασπάται με αποτέλεσμα να αφομοιώνεται πλήρως από τον οργανισμό και να είναι περισσότερο εύπεπτο. Το υψηλό ποσοστό του τυριού σε πρωτεΐνες βοηθά στην ανάπτυξη του μυϊκού ιστού και στην αποκατάσταση των φθαρμένων ιστών του οργανισμού. Επίσης, το τυρί και τα τυροκομικά προϊόντα περιέχουν σημαντικές ποσότητες βιταμινών του συμπλέγματος Β που είναι απαραίτητες για την ομαλή λειτουργία του νευρικού συστήματος.

Μεταξύ άλλων, τα τυριά αποτελούν εξαιρετική πηγή ασβεστίου. Η περιεκτικότητα των τυριών σε ασβέστιο ποικίλλει ανάλογα με το είδος και με την υγρασία που περιέχουν και τον τρόπο παρασκευής τους. Στις περισσότερες περιπτώσεις το 60γρ τυριού μας παρέχουν το 30-60% της συνιστώμενης ημερήσιας πρόσληψης.[2]

Γραβιέρα Κρήτης[3]

Η ονομασία «ΓΡΑΒΙΕΡΑ ΚΡΗΤΗΣ» (GRAVIERA KRITIS) αναγνωρίζεται ως προστατευόμενη ονομασία προέλευσης (Π.Ο.Π.) για το τυρί που παράγεται παραδοσιακά στην Κρήτη, από γάλα πρόβειο ή μίγμα αυτού με γίδινο. Το γάλα το οποίο χρησιμοποιείται για την παρασκευή αυτού του τυριού πρέπει να προέρχεται αποκλειστικά από τις περιοχές των νομών Χανίων, Ρεθύμνης, Ηρακλείου και Λασιθίου .

Προϋποθέσεις του προς τυροκόμηση τυριού:

- Το γάλα το οποίο χρησιμοποιείται για την παρασκευή του τυριού « ΓΡΑΒΙΕΡΑ ΚΡΗΤΗΣ» (GRAVIERA KRITIS) πρέπει να πληροί τις εξής προϋποθέσεις:

i. Να προέρχεται από φυλές προβάτων και αιγών παραδοσιακά εκτρεφόμενων και προσαρμοσμένων στην περιοχή παρασκευής του τυριού αυτού και η διατροφή τους να βασίζεται στην χλωρίδα της περιοχής αυτής (νομοί Χανίων, Ρεθύμνης, Ηρακλείου και Λασιθίου).

ii. Σε περίπτωση χρησιμοποίησης γίδινου γάλακτος, αυτό δεν πρέπει να υπερβαίνει το 20% κατά βάρος.

iii. Να προέρχεται από αμέλξεις που γίνονται 10 ημέρες τουλάχιστον μετά τον τοκετό .

iv. Να είναι καλής ποιότητας και πλήρες, θερμασμένο ή παστεριωμένο .

- Απαγορεύεται η παρασκευή τυριού «ΓΡΑΒΙΕΡΑ ΚΡΗΤΗΣ» από άλλο είδος γάλακτος πλην των προαναφερθέντων. Στο προς τυροκόμηση γάλα απαγορεύεται η συμπύκνωση, η προσθήκη σκόνης ή συμπυκνώματος γάλακτος , πρωτεϊνών γάλακτος , καζεϊνικών αλάτων, χρωστικών, συντηρητικών και αντιβιοτικών ουσιών.
- Στο προς τυροκόμηση γάλα προστίθεται παραδοσιακή πυτιά ή άλλα ένζυμα με ανάλογη δράση. Επιτρέπεται η προσθήκη άβλαβων οξυγαλακτικών καλλιεργειών βακτηριών, καθώς και χλωριούχου ασβεστίου μέχρι 20gr/100kg γάλακτος.

Στα μέσα συσκευασίας που περιέχουν τυρί «ΓΡΑΒΙΕΡΑ ΚΡΗΤΗΣ» (GRAVIERA KRITIS) αναγράφονται υποχρεωτικά οι ακόλουθες ενδείξεις:

- "ΓΡΑΒΙΕΡΑ ΚΡΗΤΗΣ" (GRAVIERA KRITIS)"
- Προστατευόμενη ονομασία προέλευσης (Π.Ο.Π.)
- Τυρί
- Η επωνυμία και ή έδρα του παραγωγού-συσκευαστή
- Το βάρος του περιεχομένου.
- Η ημερομηνία παραγωγής.
- Στοιχεία ελέγχου που αναλύονται ως εξής:
  i. Τα γράμματα ΓΡ-ΚΡ.
  ii. Ο αύξων αριθμός του μέσου συσκευασίας
  iii. Η ημερομηνία παραγωγής

2.Θεωρία NMR[4,5]

Ο Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR) είναι ένα φαινόμενο που συμβαίνει όταν πυρήνες ορισμένων ατόμων τοποθετούνται εντός ενός ομογενούς, στατικού μαγνητικού πεδίου και διεγείρονται από ένα δεύτερο ταλαντευόμενο μαγνητικό πεδίο. Οι περισσότεροι πυρήνες εμφανίζουν το φαινόμενο NMR, άλλοι, οι λιγότεροι, όχι. Αυτό εξαρτάται από το εάν οι πυρήνες έχουν μαγνητικές ιδιότητες, όπως αυτές αντανακλώνται στην ιδιότητα του σπιν.

Ένα βασικό γνώρισμα του NMR είναι ότι η συχνότητα συντονισμού μιας συγκεκριμένης ουσίας είναι ευθέως ανάλογη της έντασης του εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου. Αυτό το γνώρισμα χρησιμοποιείται στις τεχνικές απεικόνισης· αν ένα δείγμα τοποθετηθεί σε ανομοιογενές μαγνητικό πεδίο, τότε οι συχνότητες συντονισμού των πυρήνων του δείγματος εξαρτώνται από το πού βρίσκονται στο πεδίο. Επειδή η ανάλυση της τεχνικής απεικόνισης εξαρτάται από το μέγεθος της βαθμίδωσης του μαγνητικού πεδίου, γίνονται πολλές

προσπάθειες για την ανάπτυξη αυξημένης έντασης πεδίου, χρησιμοποιώντας συχνά υπεραγωγούς. Η αποτελεσματικότητα του NMR μπορεί επίσης να βελτιωθεί χρησιμοποιώντας υπερπόλωση και/ή χρησιμοποιώντας δισδιάστατες, τρισδιάστατες ή υψηλότερων διαστάσεων τεχνικές πολλαπλής συχνότητας.

Η αρχή του NMR περιλαμβάνει συνήθως δύο διαδοχικά βήματα:

- Τη στοίχιση (πόλωση) των πυρηνικών μαγνητικών σπιν σε ένα εφαρμοζόμενο, σταθερό μαγνητικό πεδίο H_0.
- Τη διαταραχή αυτής της στοίχισης των πυρηνικών σπιν χρησιμοποιώντας έναν ηλεκτρομαγνητικό παλμό, συνήθως ραδιοφωνικής συχνότητας (RF). Η απαιτούμενη συχνότητα διαταραχής εξαρτάται από το στατικό μαγνητικό πεδίο (H_0) και τους πυρήνες της παρατήρησης.

Τα δύο πεδία επιλέγονται, συνήθως, ώστε να είναι κάθετα μεταξύ τους, επειδή αυτό μεγιστοποιεί την ένταση σήματος του NMR. Η τελική απόκριση από τον συνολικό μαγνητισμό (M) των πυρηνικών σπιν είναι το φαινόμενο που χρησιμοποιείται στη φασματοσκοπία NMR και τη μαγνητική τομογραφία. Και οι δύο χρησιμοποιούν έντονα εφαρμοζόμενα μαγνητικά πεδία (H_0) για να πετύχουν διασπορά και πολύ υψηλή σταθερότητα ώστε να δώσουν φασματική ανάλυση, οι λεπτομέρειες της οποίας περιγράφονται από τις χημικές μετατοπίσεις (chemical shifts), το φαινόμενο Ζέεμαν (Zeeman effect) και τις μετατοπίσεις Νάιτ (Knight shifts) (στα μέταλλα).

Εφαρμογές NMR

Η φασματοσκοπία NMR παρέχει τις περισσότερες πληροφορίες για τον προσδιορισμό των δομών των ενώσεων μέσα στο δείγμα και μαζί με άλλες αναλυτικές τεχνικές (Φασματομετρία μάζας, υπεριώδους κ.α.) μπορεί να γίνει ταυτοποίηση μιας ένωσης. Ανάλογα με το φάσμα , μπορούμε να λάβουμε πληροφορίες για τον αριθμό πρωτονίων, τον αριθμό ανθράκων, του χημικού περιβάλλοντος, της δομης της ένωσης στον χώρο, ακόμα και προσμίξεων στο δείγμα. Στα παραπάνω, σημαντικό ρόλο παίζει και η ολοκλήρωση των κορυφών. Έτσι, μπορεί να γίνει προσδιορισμός και άγνωστων ενώσεων. Κατ' επέκταση, η φασματοσκοπία αυτή είναι χρήσιμο εργαλείο στην συνθετική χημεία, στην ανίχνευση τρισδιάστατων δομών βιολογικών μορίων, στην χημεία πολυμερών , στην παρασκευή φαρμάκων και σε όποιο κλάδο είναι απαραίτητη η γνώση της δομής μίας ένωσης. Τέλος, η εφαρμογή της φασματοσκοπίας NMR στην ιατρική ειναι αδιαμφισβητητη καθώς η μαγνητική τομογραφία χρησιμοποιώντας το

φαινομενο NMR μπορεί να απεικονίσει το εσωτερικό του ανθρώπινου σώματος χωρίς να υπάρξουν τομές και χωρίς επικίνδυνη ακτινοβολία.

Όσον αφορά τα τυριά, έχουν γίνει αναλύσεις ιταλικών τυριών με χρήση της φασματοσκοπίας NMR. Στην ποιοτική ανάλυση του υδατικού εκχυλίσματος του τυριού *Parmigiano Reggiano* [6] έγινε ανίχνευση των κύριων ενώσεων με την βοήθεια και δισδιάστατων φασμάτων NMR. Η ανάλυση με τη φασματοσκοπία NMR του τυριού *Mozzarella di Bufala Campana* παρείχε χρήσιμές παραμέτρους για την εξακρίβωση της προστατευόμενης ονομασίας προέλευσης του τυριού αυτού. Η ποιοτική ανάλυση του λιπιδικού εκχυλίσματος των τυριών *Pecorino Sardo* [7]και *Asiago d'Allevo* ήταν χρήσιμη για την εξακρίβωση λιπαρών οξέων και διακυλογλυκερολών στα τυριά αυτά. Έχει γίνει έρευνα σχετικά με την αποικοδόμηση του τυριού σε σχέση με την διαφορετική τεχνολογία συσκευασίας αλλά και με την απόσταση από το κέντρο της μάζας του τυριού με την χρήση φασματοσκοπίας NMR.

Επιλογή Τεχνικής NMR

Η επιλογή της τεχνικής NMR έγινε διότι απαιτείται η διατήρηση του τυριού στην ακέραιη του μορφή. Οποιαδήποτε κατεργασία θα καθιστούσε αδύνατη την ανίχνευση ευαίσθητων ουσιών λόγω καταστροφής τους, π.χ. λόγω υψηλών θερμοκρασιών που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση με την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας (GC). Επίσης, η τεχνική NMR απαιτεί λιγότερο χρόνο και αποτελεί πολύ ικανή τεχνική για την ανάλυση πολύπλοκων μειγμάτων οργανικών ενώσεων. Ωστόσο , έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία πειράματα με την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας GC-MS για την ανίχνευση των πτητικών ενώσεων στις οποίες βασίζεται η γεύση του τυριού *Provola de*

Nebrodi.

3. Σκοπός της Εργασίας.

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε με σκοπό την μελέτη της επίδρασης του τύπου του γάλακτος στη χημική σύσταση αλλά και τα χαρακτηριστικά της Κρητικής γραβιέρας κατά τη διάρκεια της ωρίμανσής της, με τη βοήθεια της φασματοσκοπίας NMR .

Διαδικασία Παρασκευής Γραβιέρας

Στην παρούσα εργασία έγινε τυροκόμηση και παρασκευάστηκαν πέντε διαφορετικά δείγματα γραβιέρας, με διαφορετικές αναλογίες πρόβειου γάλατος ,το οποίο δόθηκε από παραγωγό, και σκόνης γάλα. Το πρώτο περιείχε 100% πρόβειο γάλα, , το δεύτερο 75%

πρόβειο γάλα και 25% σκόνη, το τρίτο 50% πρόβειο γάλα και 50% σκόνη, το τέταρτο 25% πρόβειο γάλα και 75% σκόνη και το πέμπτο 100% σκόνη γάλα. Η διαδικασία όπου ακολουθήθηκε για την παρασκευή των παραπάνω δειγμάτων ήταν η εξής:

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε παστερίωση του γάλατος, δηλαδή έγινε θέρμανση μέχρι τους 65ºC για 30', ανακατεύοντας συνεχώς για να μην καεί το γάλα.

Εικόνα 1: Πρόβειο γάλα 100% κατά τη διάρκεια στης παστερίωσης.

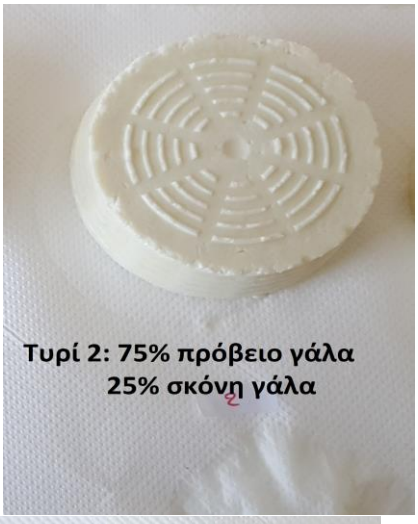
Έπειτα, το γάλα αφέθηκε να κρυώσει μέχρι τους 35ºC και προστέθηκε 0,008gr καλλιέργεια (starter graviea-Dalton). Αφέθηκε ξανά για 10', ώστε να ενεργήσει η οξυγαλακτική, δηλαδή να πέσει το pH. Στη συνέχεια, επαναφέρθηκε η θερμοκρασία στους 35ºC, απομακρύνθηκε το γάλα από την φωτιά και μέσα σε μισό ποτήρι νερό προστέθηκαν 0,08gr πυτιά μαζί με μισό κουταλάκι αλάτι και όλα μαζί προστέθηκαν στο γάλα. Το σκεύος όπου περιείχε το γάλα σκεπάστηκε και αφέθηκε για 45' μέχρι να πήξει.

Εικόνα 2: Πρόβειο γάλα 100% κατά τη διάρκεια του "κοψίματος".

Μετά το πέρας των 45’ με ένα σύρμα μαγειρικής ¨κόπηκε¨ το τυρόπηγμα σε κομματάκια, αναθερμάνθηκε μέχρι τους 48°C και μόλις ενοποιήθηκε τοποθετήθηκε σε καλούπι. Τέλος, το τυρόπηγμα πιέστηκε ώστε να φύγει το υγρό. Στα δείγματα γραβιέρας τοποθετήθηκε βάρος έως 15 κιλά και παρέμειναν στα καλούπια για 24 ώρες. Έπειτα αφαιρέθηκαν τα καλούπια και αλατίστηκαν από όλες τις πλευρές για τρείς μέρες. Τα δείγματα παρέμειναν σε χώρο με χαμηλή θερμοκρασία 10-13 ^{o}C, για να ωριμάσουν σε τρεις μήνες. Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε για όλα τα δείγματα που παρασκευάστηκαν.

Παρακάτω παρατίθενται οι εικόνες των πέντε τυριών που παρασκευάστηκαν. Οι διαφορές τους γίνονται αντιληπτές με μία πρώτη ματιά από το χρώμα των τυριών, καθώς η γραβιέρα από 100% πρόβειο γάλα έχει ένα ελαφρύ κίτρινο χρώμα σε σχέση με την γραβιέρα από 100% σκόνη γάλα , η οποία είναι λευκή. Επίσης, παρατηρήθηκε και διαφορές στην υφή των τυριών, αφού όσο μεγάλωνε η αναλογία σε σκόνη γάλα στα δείγματα οι γραβιέρες γίνονταν όλο και πιο μαλακές.

Τυρί 1 : 100% Πρόβειο γάλα


Τυρί 2: 75% πρόβειο γάλα
25% σκόνη γάλα

Τυρί 3: 50% πρόβειο γάλα
50% σκόνη γάλα

Τυρί 4: 25% πρόβειο γάλα
75% σκόνη γάλα

Τυρί 5: 100% σκόνη γάλα

Πειραματική Διαδικασία

Στην εργασία όπου πραγματοποιήθηκε αναλύθηκαν πέντε δείγματα Γραβιέρας: : Δείγμα 1 : 100% Πρόβειο Γάλα

Δείγμα 2 : 75% πρόβειο γάλα- 25% σκόνη γάλα

Δείγμα 3 : 50% πρόβειο γάλα- 50% σκόνη γάλα

Δείγμα 4: 25% πρόβειο γάλα- 75% σκόνη γάλα

Δείγμα 5: 100% Σκόνη Γάλα

Αρχικά , τα 5 αυτά δείγματα, αφού καταψύχθηκαν, κόπηκαν σε κύβους και στην συνέχεια τοποθετήθηκαν σε λυοφιλυωτή Telstar Freeze-Dryer Cryodos -50 για 16 ώρες, έτσι ώστε να αποβληθεί όσο το δυνατόν περισσότερη υγρασία. Στην συνέχεια, τα δείγματα κονιορτοποιήθηκαν με υγρό άζωτο. Από το δείγμα, ποσότητα περίπου 0,30 gr και 1ml υπερκάθαρου νερού εισήχθησαν σε 4 φιαλίδια Eppendorf των 1,5ml. Μετά από λουτρό υπερήχων για 30', τα διαλύματα φυγοκεντρήθηκαν στις 14000 rpm για 10'. Από τις 2 φάσεις που δημιουργήθηκαν, η πάνω φάση είναι η υδατική, η οποία και αφαιρέθηκε με προσοχή μόνο από τα 3 φιαλίδια Eppendorf, προστέθηκε σε σφαιρική φιάλη των 100ml. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε τρεις φορές. Η υδατική φάση που συλλέχθηκε, καταψύχθηκε για να τοποθετηθεί στο freeze-dryer για 16 ώρες έτσι ώστε να εξατμιστεί ο διαλύτης. Στην συνέχεια, το δείγμα που απέμεινε τοποθετήθηκε σε φιαλίδια Eppendorf των 1,5ml μαζί με 700μl D_2O/TSP και τοποθετήθηκαν σε λουτρό υπερήχων για 30' και έπειτα φυγοκεντρήθηκαν στις 14000 rpm για 10'. Τέλος τα δείγματα διηθήθηκαν απευθείας μέσα σε σωλήνα NMR για την λήψη του φάσματος.

Στη φάση που έμεινε στα φιαλίδια Eppendorf μετά την φυγοκέντρηση στην παραπάνω διαδικασία, τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για 30' αφού πρώτα προστέθηκε 1ml $CHCl_3$. Μετά τους υπέρηχους τα διαλύματα φυγοκεντρήθηκαν για 10' στις 10.000 rpm. Δημιουργήθηκαν 2 φάσεις από τις οποίες αφαιρέθηκε η υδατική και τοποθετήθηκε σε σφαιρικές φιάλες των 100ml. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε τρεις φορές. Το δείγμα στα φιαλίδια αφέθηκε να ξηρανθεί μέχρι ξηρού υπό κενό. Τέλος, προστέθηκε 700μl $CDCl_3$/TMS , το δείγμα τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για 30' και διηθήθηκε απευθείας μέσα σε σωλήνα NMR για την λήψη του φάσματος.

Όλα τα φάσματα ^1H NMR λήφθηκαν σε φασματογράφο (Avance-500) λειτουργικής συχνότητας 500 MHz. Μετά τον μετασχηματισμό Fourier έγινε διόρθωση της γραμμής βάσης του φάσματος (baseline correction) με ένα πολυώνυμο πέμπτης τάξης και ακολούθησε διόρθωση φάσης μηδενικής και πρώτης τάξης. Όλες οι χημικές μετατοπίσεις των σημάτων ^1H

NMR αναφέρονται στην κλίμακα δ έχοντας την πρότυπη ουσία (TSP) σε χημική μετατόπιση δ 0.0 ppm.

Η διαδικασία της τυροκόμησης πραγματοποιήθηκε στις 18/3/2019 για τα δείγματα 2,3,4 και στις 19/3/2019 για τα δείγματα 1και 5.

Για την διεξαγωγή της έρευνας λήφθηκαν δείγματα σε πέντε διαφορετικές περιόδους της ωρίμανσης και για τα πέντε δείγματα:

- 1η δειγματοληψία (Α δείγματα) : 19/3/2019 για τα 2,3,4 και 20/3/2019 για τα 1 και 5 (1η ημέρα παραγωγής).
- 2η δειγματοληψία (Β δείγματα): 1/4/2019 για τα 2,3,4 και 2/4/2019 για τα 1 και 5 (13η ημέρα ωρίμανσης).
- 3η δειγματοληψία (Γ δείγματα) : 15/4/2019 για τα 2,3,4 και 16/4/2019 για τα 1 και 5 (1ος μήνας ωρίμανσης).
- 4η δειγματοληψία (Δ δείγματα) : 17/4/2019 για τα 1,2,3,4,5 (2ος μήνας ωρίμανσης).
- 5η δειγματοληψία (Ε δείγματα) : 18/6/2019 για τα 1,2,3,4,5 (3ος μήνας ωρίμανσης).

Εικόνα 3: Γραβιέρα από 100% πρόβειο γάλα μετά από 3 μήνες ωρίμανσης.

4.Αποτελέσματα-Συζητηση

Στην παρούσα εργασία τα αποτελέσματα, που αναφέρονται προέκυψαν από την ανάλυση μιας σειράς φασμάτων 1D και 2D NMR που λήφθηκαν για κάθε δείγμα.

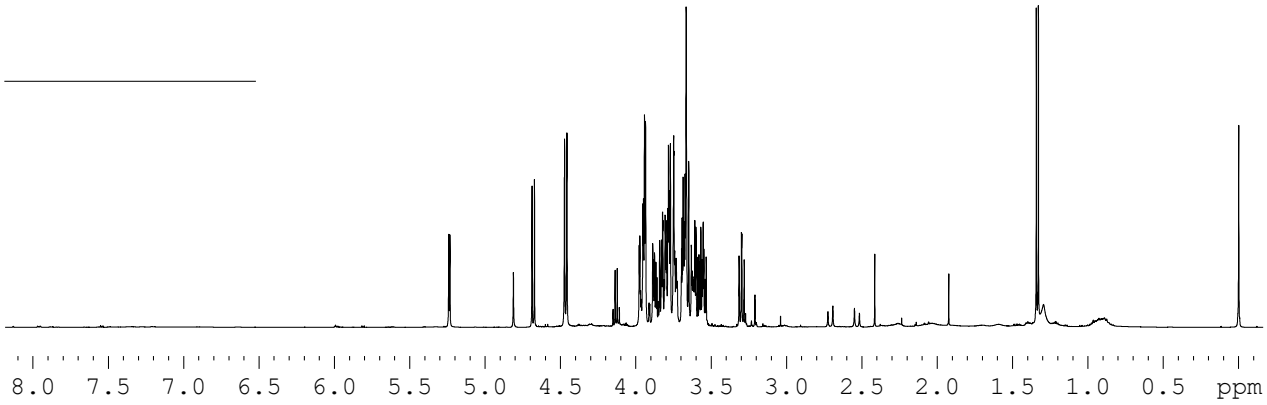
Φάσματα 1D NMR : ^{1}H και ^{13}C

Φάσματα 2D NMR: gCOSY, gHSQC, gHMBC.

4.1 Ανάλυση φασμάτων υδατικού εκχυλίσματος γραβιέρας στο δείγμα με 100% πρόβειο γάλα (1Α) .

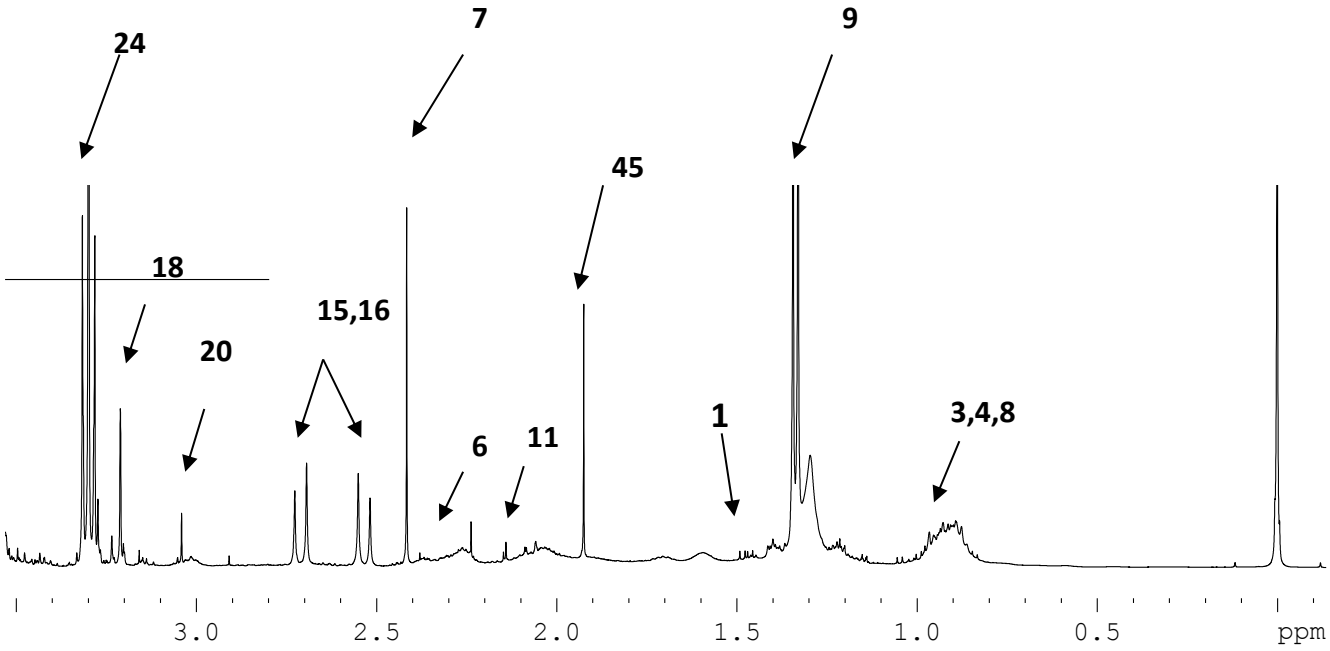
Στην ενότητα αυτή παρουσιάζονται τα φάσματα NMR των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των ενώσεων του υδατικού μέρους του τυριού.

Στο φάσμα NMR του σχήματος 1 μπορούμε να διακρίνουμε μια πληθώρα αμινοξέων και σακχάρων (δ 3,5-4,0) που περιέχονται στη γραβιέρα καθώς και το βασικό οξύ που αναμένεται, το λακτικό οξύ (δ 1,337 και δ 4,129). Επίσης, παρατηρούνται οι κορυφές των αιθυλίων των αμινοξέων κιτρικό οξύ (δ 2,53 και δ 2,709), και ηλεκτρικό οξύ (δ 2,417). Ευδιάκριτες, ακόμη είναι και οι κορυφές των σακχάρων, της α και β-λακτόζης σε δ 3,5-4,0 και πιο ευδιάκριτες είναι της α-λακτόζης (δ 5,236) αλλά και της β-λακτόζης (δ 3,29 και δ 4,680).



Σχήμα 4: Φάσμα ^{1}H του τυριού με 100% πρόβειο γάλα (1 Α) σε D_2O-TSP την πρώτη μέρα παραγωγής.

Αναλυτικότερα,

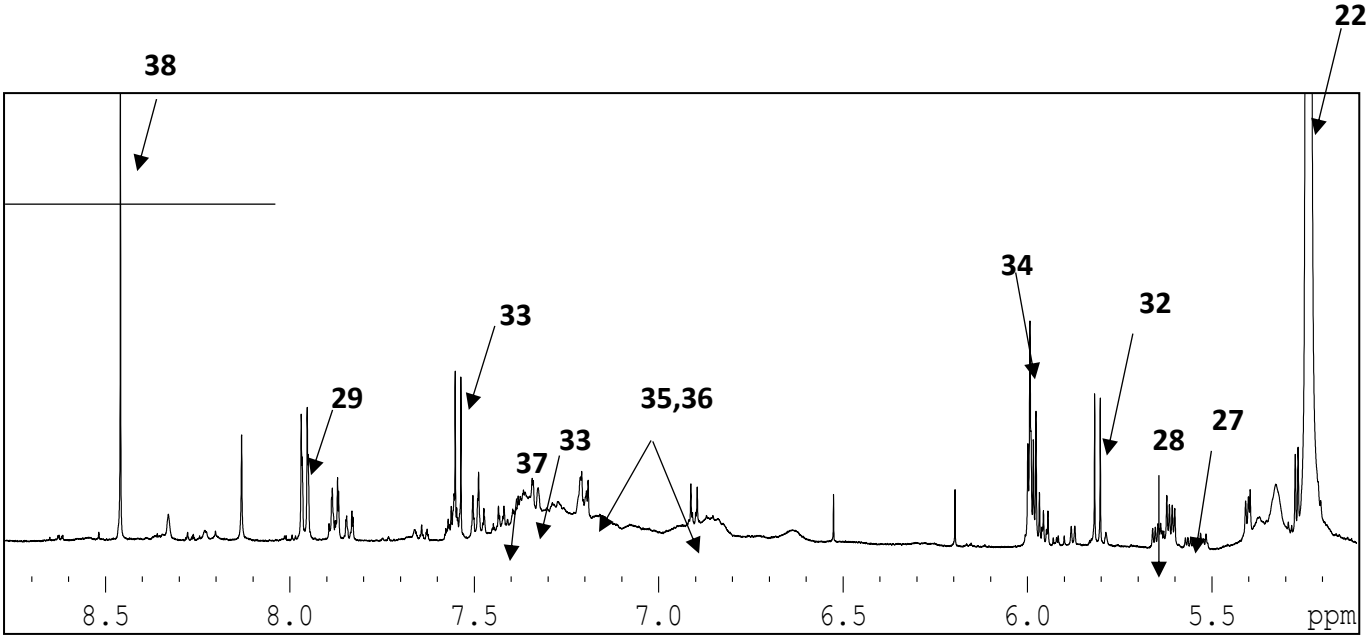


Σχήμα 2: Φάσμα ^1H του τυριού με 100% πρόβειο γάλα (1 Α) σε D_2O-TSP. Αλειφατική περιοχή και Περιοχή Κορεσμένων δευτεροταγών και τριτοταγών Πρωτονίων και Περιοχή μεθυλοκετονικών Πρωτονίων.

Στο σχήμα 2, διακρίνονται: η διπλή κορυφή των πρωτονίων στον β-C του λακτικού σε δ 1,337, η διπλή κορυφή των πρωτονίων στον β-C στης αλανίνης σε δ 1,484. Στην περιοχή δ 0,9-1,05 εμφανίζονται οι δύο διπλές κορυφές των πρωτονίων στους γ-C και γ'-C της βαλίνης σε δ 0,995 και 1,047 αντίστοιχα. Ανάμεσα στις δύο διπλές κορυφές της βαλίνης παρατηρείται

η διπλή κορυφή των πρωτονίων του β'-C σε δ 1,014 της ισολευκίνης. Στα αριστερά παρατηρείται η απλή κορυφή των πρωτονίων του μεθυλίου του οξικού οξέος σε δ 1,925. Τέλος, υπάρχει μία απλή κορυφή των ισοδύναμων πρωτονίων των 2,3-C του ηλεκτρικού οξέος στα δ 2,417. Ωστόσο, αξίζει να επισημανθούν οι δύο διπλές κορυφές του κιτρικού οξέος σε δ 2,534 και 2,709 αντίστοιχα, η απλή κορυφή της μεθειονίνης στα δ 2,142 που αντιστοιχεί στον β-C και δ-C της, η απλή κορυφή της ο-ακετυλοχολίνης σε δ 2,145 και η απλή κορυφή του πυρουβικού οξέος σε δ 2,375.

Ακολουθούν οι κορυφές του ασπαραγινικού οξέος στην περιοχή δ 2,8- 2,9. Στην συνέχεια ακολουθούν οι εξής κορυφές: σε δ 2,908 η απλή κορυφή των πρωτονίων των μεθυλίων της τριμεθυλαμίνης , η τριπλή κορυφή των πρωτονίων του ε-C της λυσίνης σε δ 3,031, η απλή κορυφή της κρεατίνης σε δ 3,039, οι δύο διπλές κορυφές των πρωτονίων του β-C της φαινυλαλανίνης σε δ 3,204, μαζί με την απλή κορυφή της χολίνης σε δ 3,211 και η απλή κορυφή των πρωτονίων του betaine σε δ 3,272. Από την μέση του φάσματος και προχωρώντας προς τα αριστερά γίνεται πιο δύσκολη η ανάθεση των κορυφών οι οποίες ανήκουν κατά κύριο λόγω σε κορυφές των σακχάρων. Ωστόσο, υπάρχουν κάποιες κορυφές που ξεχωρίζουν ως προς την ένταση τους αλλά και ως προς την ελάχιστη αλληλεπικάλυψη με άλλες κορυφές. Έτσι, διακρίνουμε την τετραπλή κορυφή των πρωτονίων του 2-C της β-λακτόζης σε δ 3,299.



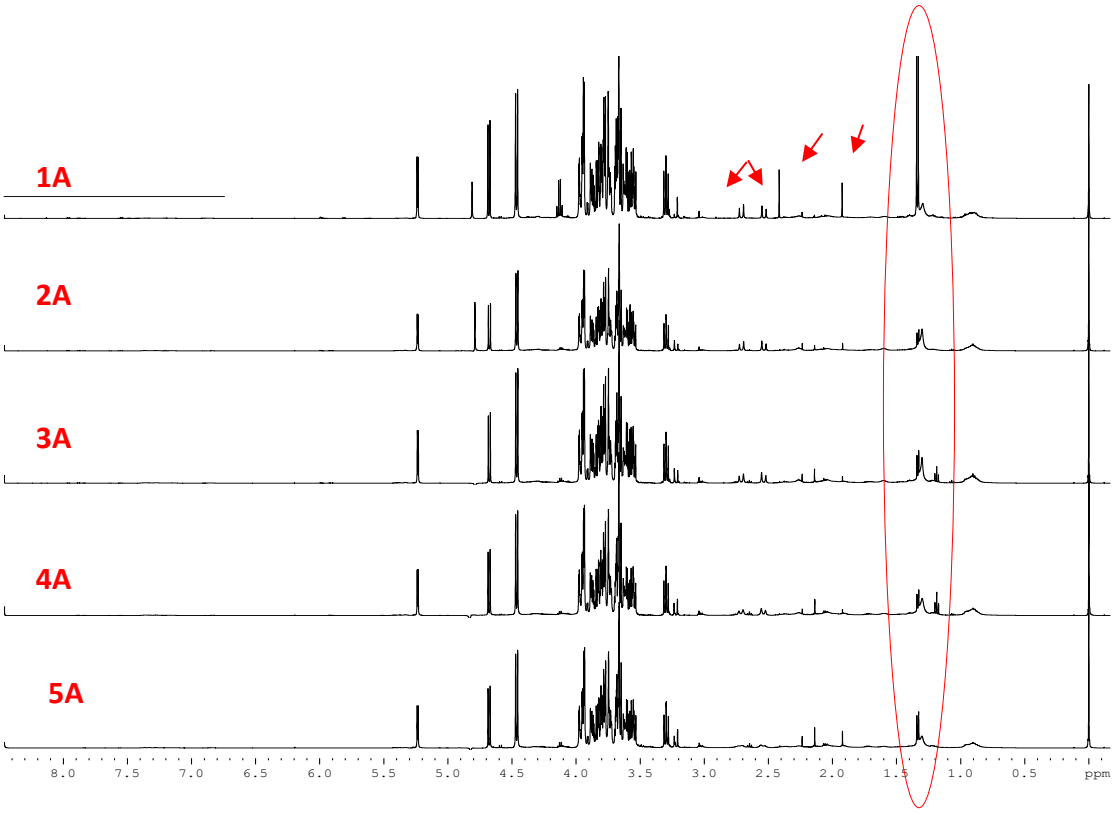
Σχήμα 3: Φάσμα ^{1}H του τυριού με 100% πρόβειο γάλα (1 Α) σε D_2O-TSP. Συνέχεια της περιοχής των δευτεροταγών Πρωτονίων και Περιοχή Πρωτονίων δίπλα σε Καρβοξύλιο.

Ανάμεσα στις κορυφές των σακχάρων και στην τετραπλή κορυφή του λακτικού οξέος σε δ 4,129, βρίσκονται, με πολλές επικαλύψεις, οι κορυφές των πρωτονίων των α-C των: ισολευκίνη, λευκίνη, λυσίνη, γλουταμινικό οξύ (όπως και τα πρωτόνιά της στον β-C), ασπαρτικό οξύ, φαινυλαλανίνη. Αριστερά της τετραπλής του λακτικού οξέος βρίσκεται η διπλή κορυφή των πρωτονίων του 1'-C της α+β- λακτόζης σε δ 4,465, η διπλή κορυφή του 1-C της β-γαλακτόζης σε δ 4,587, η διπλή κορυφή του1-C της β-λακτόζης σε δ 4,680 και η διπλή κορυφή του 1-C της α-λακτόζης. Συνεχίζοντας και πάλι αριστερά από τις κορυφές των προαναφερθέντων αμινοξέων γίνονται εμφανείς και οι κορυφές της UDP-γλυκόζης και UDP-γαλακτόζης σε δ 5,610 και 5,649,αντίστοιχα. Επιπροσθέτως, στο δείγμα παρατηρείται, ο 1-C της ουρακίλης σε δ 5,809 και ο 2-C σε δ 7,543, η τετραπλή κορυφή της ουριδίνης σε δ 5,911. Προχωρώντας, προς τις τελευταίες κορυφές του φάσματος γίνονται αντιληπτές οι πολλαπλές κορυφές του βενζοϊκού οξέος σε δ 7,837, όπως επίσης άλλη μία κορυφή της UDP- γαλακτόζης σε δ 7,962, κορυφές της νιασίνης (δ 8,271 , 8,623 , 8,95) και η απλή κορυφή του φορμικού οξέος σε δ 8,459.

Αυτές οι κορυφές όπως και οι υπόλοιπες ταυτοποιήθηκαν με την χρήση δισδιάστατων φασμάτων COSY, HSQC, HMBC.

4.2 Σύγκριση φασμάτων του υδατικού εκχυλίσματος γραβιέρας στα πέντε δείγματα τυριού την πρώτη ημέρα παραγωγής (1Α έως 5Α).

Στην ενότητα αυτή παρουσιάζονται τα φάσματα και των πέντε τυριών που παράχθηκαν με διαφορετικές αναλογίες πρόβειου γάλακτος και σκόνης γάλα, των οποίων το δείγμα λήφθηκε την πρώτη ημέρα παρασκευής τους. Η σύγκριση αυτή , σκοπό έχει την μελέτη των διαφορών που εμφανίζονται στα φάσματα όσο αυξάνεται η ποσότητα του γάλακτος σε σκόνη.



Σχήμα 4: Φάσματα ^{1}H των 5 τυριών σε όλες τις αναλογίες πρόβειου γάλακτος και σκόνης γάλα την πρώτη μέρα παρασκευής τους σε D_2O-TSP.

Αναλυτικότερα, στο παραπάνω σχήμα (σχήμα 4) όσο προχωράμε από πάνω προς τα κάτω, δηλαδή όσο αυξάνεται η ποσότητα της σκόνης γάλα στη γραβιέρα οι εντάσεις στις κορυφές των κύριων ουσιών που υπάρχουν στο τυρί ολοένα και μειώνονται. Πιο συγκεκριμένα, η κύρια διαφορά που παρατηρείται είναι η μείωση του λακτικού οξέος (δ 1,337 και 4,129), το οποίο αποτελεί βασικό συστατικό στα τυριά γενικότερα. Βλέπουμε ότι από το δεύτερο δείγμα και έπειτα όπου άρχισε η προσθήκη της σκόνης γάλα η κορυφή του λακτικού σταδιακά μειώνεται μέχρι που σχεδόν εξαφανίζεται. Ακόμη, οι διπλές κορυφές του κιτρικού οξέος (δ 2,534 και 2,709) σταδιακά μικραίνουν μέχρι που στο πέμπτο δείγμα (100% σκόνη γάλα) εξαφανίζεται εντελώς. Επιπροσθέτως, παρατηρείται ότι το ηλεκτρικό οξύ σε δ 2,417 υπάρχει μόνο στο πρώτο δείγμα σε μεγάλη ποσότητα, από το δεύτερο δείγμα και μετά η ποσότητα του είναι ελάχιστη έως ότου εξαφανίζεται από το τρίτο δείγμα και μετά. Το οξικό οξύ, επίσης υπόκεινται μείωση στην ένταση της κορυφής του όσο προχωράμε προς τα κάτω στο σχήμα (δ 1,925). Σημαντικό είναι να επισημανθεί ότι, στα δείγματα 2, 3 και 4 εμφανίζεται μια νέα τριπλή κορυφή στα δ 1,069 περίπου ,όπου πιθανόν να ανήκει στο 2-οξοβουτυρικό οξύ, όπως ταυτοποιήθηκε και από τα δυσδιάστατα φάσματα. Η ύπαρξη της ένωσης αυτής μόνο σε αυτά τα τρία τυριά, και όχι στα υπόλοιπα δύο πιθανόν να οφείλεται σε κάποιο λάθος κατά τη διάρκεια της τυροκόμισης. Όπως επίσης, σε τεχνικό λάθος κατά την τυροκόμιση οφείλεται

και η εμφάνιση αιθανόλης μόνο στα δείγματα 3 και 4 σε δ 1,19. Γενικότερα, οι διαφορές στα υδατικά εκχυλίσματα δεν ήταν πολλές, οι κύριες διαφορές ήταν στην ένταση των κορυφών ειδικά των αμινοξέων και των σακχάρων, πράγμα απόλυτα λογικό από τη στιγμή που αναμείχθηκε το πρόβειο γάλα με τη σκόνη γάλακτος.

Στη συνέχεια παρουσιάζεται ο πίνακας των αποτελεσμάτων με τις χημικές μετατοπίσεις των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν με τη φασματοσκοπία NMR στο υδατικό εκχύλισμα της γραβιέρας.

<u>Πίνακας 1:</u> Χημικές μμετατοπίσεις ενώσεων του τυριού γραβιέρα Κρήτης από 100% πρόβειο γάλα (1Α) σε υδατικό διαλύτη D_2O.

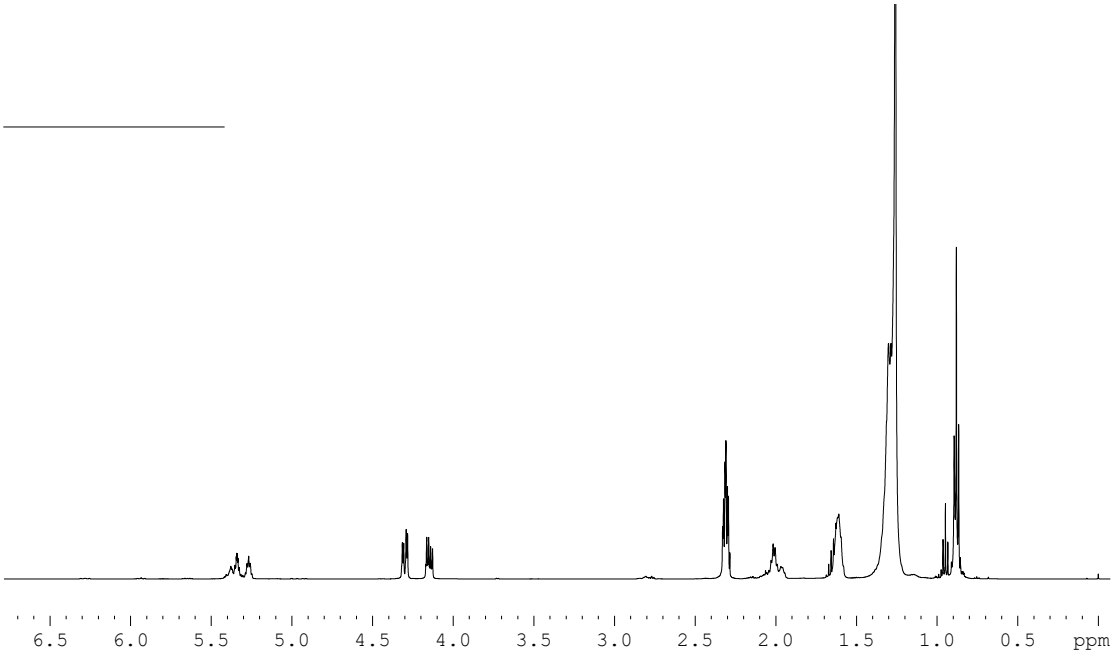
	Ένωση	***Ανάθεση***	***^{1}H ppm***
1	Αλανίνη	**β-CH3**	1,484
2	Ασπαρτικό Οξύ	**β′-CH2**	2,794
3	Βαλίνη	**γ-CH3**	0,9956
4	Βαλίνη	**γ′-CH3**	1,047
5	Γλουταμινικό Οξύ	**β,β′-CH2**	2, 084
6	Γλουταμινικό Οξύ	**γ,γ′-CH2**	2,359
7	Ηλεκτρικό Οξύ	**2,3 CH2**	2,417
8	Ισολευκίνη	**δ-CH3**	1,014
9	Λακτικό οξύ	**β-CH3**	1,337
10	Λακτικό οξύ	**α-CH**	4,129
11	Μεθειονίνη	**-CH3**	2,141
12	Μεθειονίνη	**γ-CH2**	2,647
13	Ο-Ακετυλοχολίνη	**α-CH3**	2,145
14	Ακετόνη	**α-CH3**	2,237
15	Κιτρικό οξύ	**α-CH2**	2,534

16	Κιτρικό οξύ	**β-CH2**	2,709
17	Τριμεθυλαμίνη	**α-CH3**	2,908
18	Χολίνη	**α – CH3**	3,211
19	Betaine	**α – CH3**	3,272
20	Κρεατίνη	**α-CH3**	3,039
21	Πυρουβικό οξύ	**α-CH3**	2,375
22	α-Λακτόζη	**1'-CH**	4,465
23	α-Λακτόζη	**1-CH**	5,236
24	β-Λακτόζη	**2-CH**	3,299
25	β-Λακτόζη	**1'-CH**	4,465
26	β-Λακτόζη	**1-CH**	4,681
27	UDP-γλυκόζη	**1-CH**	5,610
28	UDP-γαλακτόζη	**1-CH**	5,649
29	UDP-γαλακτόζη	**=CH-N**	7,962
30	α-γαλακτόζη	**1-CH**	5,266
31	β-γαλακτόζη	**1-CH**	4,587
32	Ουρακίλη	**α-CH**	5,809
33	Ουρακίλη	**β-CH**	7,543
34	Ουριδίνη	**=CH**	5,911
35	Τυροσίνη	**3,5-CH**	6,903
36	Τυροσίνη	**2,6-CH**	7,196
37	Φαινυλαλανίνη	**3,5-CH**	7,425
38	Φορμικό	**HCOO**	8,459
39	Λευκίνη	**δ,δ'-CH3**	0,95
40	Λυσίνη	**β,β'-CH2**	1,731
41	Λυσίνη	**γ-CH2**	3,030

42	Νιασίνη	**α-CH**	8,271
43	Νιασίνη	**γ-CH**	8,623
44	Νιασίνη	**δ-CH**	8,95
45	Οξικό οξύ	**α-CH3**	1,925
46	Benzoate	**2,6-CH**	7,837

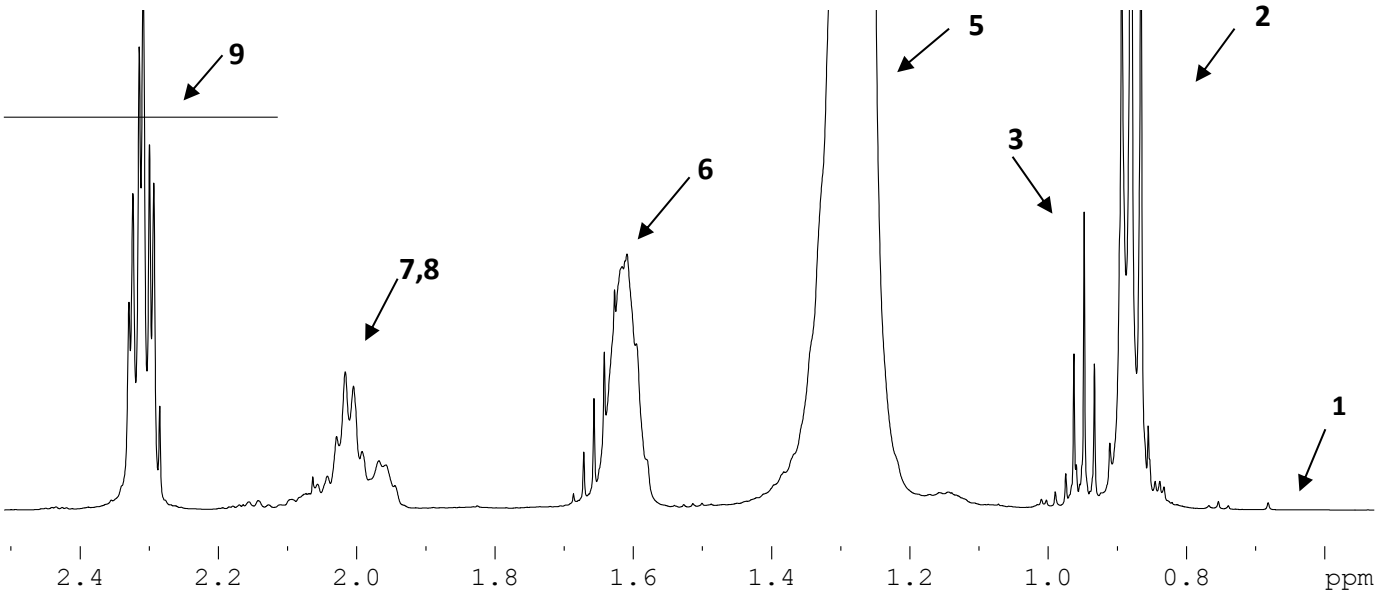
4.3 Ανάλυση φασμάτων του εκχυλίσματος με χλωροφόρμιο της γραβιέρας στο δείγμα με 100% πρόβειο γάλα (1A) .

Στην ενότητα αυτή παρατίθενται τα φάσματα NMR των δειγμάτων της γραβίερας που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των ενώσεων του οργανικού μέρους του τυριού σε διαλύτη $CDCl_3$. Στο φάσμα NMR του σχήματος 5 γίνονται αντιληπτές οι κορυφές των λιπαρών οξέων, τόσο των κορεσμένωνν όσο και των ακόρεστων που υπάρχουν στο δείγμα τυριού που μελετήθηκε.



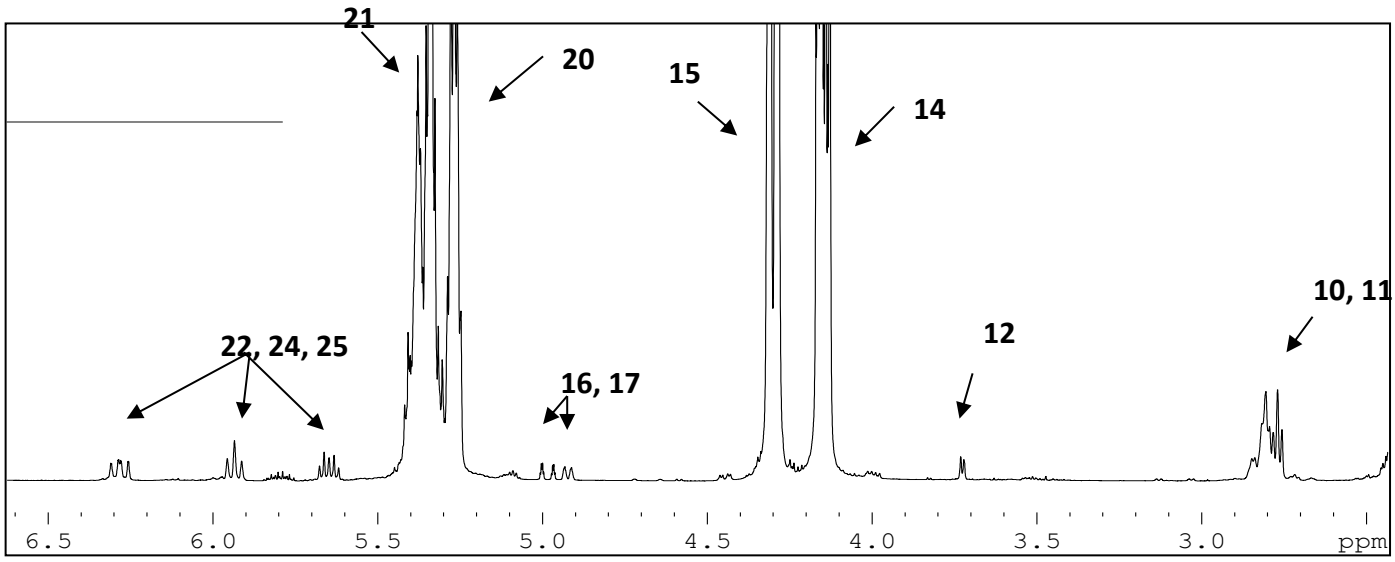
Σχήμα 5: Φάσμα ^1H NMR σε διαλύτη $CDCl_3$ –TMS του τυριού με 100% πρόβειο γάλα (1A).

Αναλυτικότερα,



Σχήμα 6: Φάσμα ^1H NMR σε διαλύτη $CDCl_3$ –TMS του τυριού με 100% πρόβειο γάλα (1A). Περιοχή κορεσμένων και ακόρεστων λιπαρών οξέων σε δ 0,8-2,4.

Στο σχήμα 5, διακρίνονται η απλή κορυφή του μεθυλίου (-CH_3) της χοληστερόλης σε δ 0,6803 , η τριπλή κορυφή όλων των μεθυλίων όλων των λιπαρών οξέων, εκτός των n-3 και του βουτυρικού οξέος, των οποίων οι κορυφές παρατηρούνται αμέσως μετά σε δ 0,973 και 0,947 αντίστοιχα. Η μεγάλη κορυφή στα δ 1,257 αντιστοιχεί στα -$(CH_2)_n$ – όλων των λιπαρών οξέων και αμέσως μετά στα δ 1,634 παρατηρείται η πολλαπλή κορυφή των –OOC-CH_2-**$\underline{CH_2}$** των λιπαρων οξέων. Συνεχίζοντας, προς τα αριστερά διακρίνουμε τις κορυφές των ακόρεστων trans- και cis- λιπαρών οξέων (δ 1,964 και 2,009 , αντίστοιχα),ακολουθούν οι κορυφές των –OCO-**$\underline{CH_2}$** των λιπαρών οξέων σε δ 2,307 και των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, λινολεϊκό και λινολενικό (δ 2,760 και 2,805).



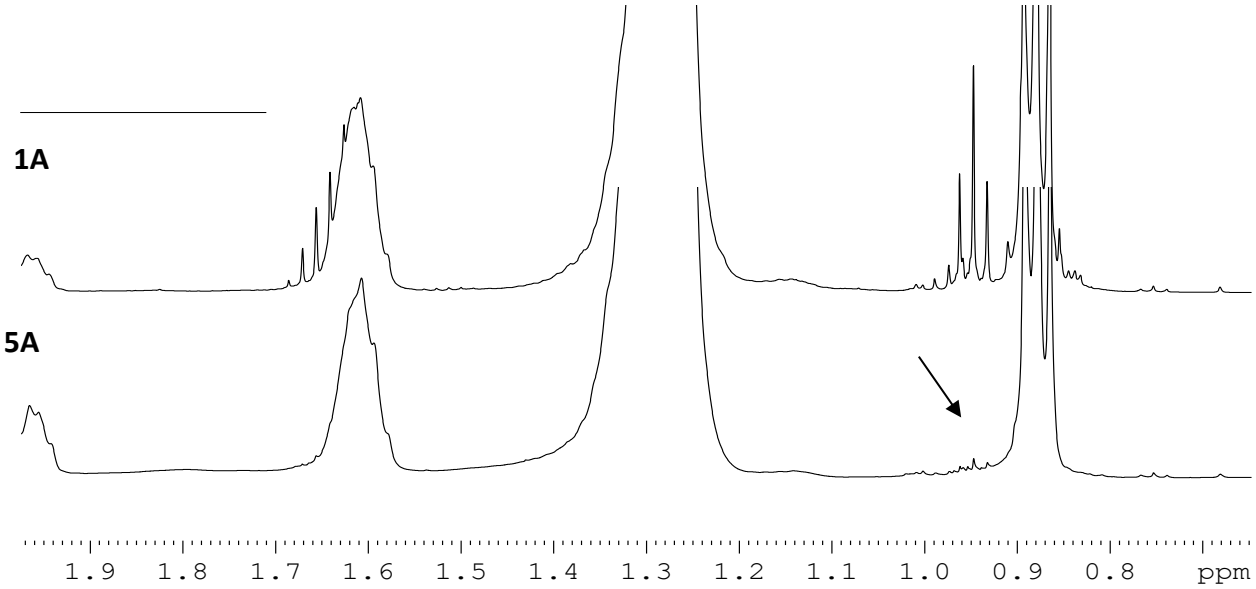
Σχήμα 7: Φάσμα ^{1}H NMR σε διαλύτη $CDCl_3$ –TMS του τυριού με 100% πρόβειο γάλα (1A). Περιοχή κορεσμένων και ακόρεστων λιπαρών οξέων σε δ 2,8-6,5.

Όσο προχωράμε σε μεγαλύτερα ppm από τη μέση του φάσματος και έπειτα, βλέπουμε τις κορυφές της γλυκερόλης των 1,2-διγλυκεριδίων (DAG), καθώς και των τριγλυκεριδίων (TAG) σε δ 4,144 και 4,299. Σημαντικό είναι να επισημανθεί ότι στο δείγμα βρέθηκε καπρολεΐκό οξύ (δ 4,921 και 4,983) και CLA (δ 5,645 , 5,933 , 6,281). Τέλος, διακρίνονται οι πολλαπλές κορυφές των ακόρεστων –cis και –trans λιπαρών οξέων στην περιοχή δ 5,3-5,6.

4.4 Σύγκριση φασμάτων του εκχυλίσματος με χλωροφόρμιο της γραβιέρας στα δείγματα από 100% πρόβειο γάλα (1A) και 100% σκόνη γάλα (5A) .

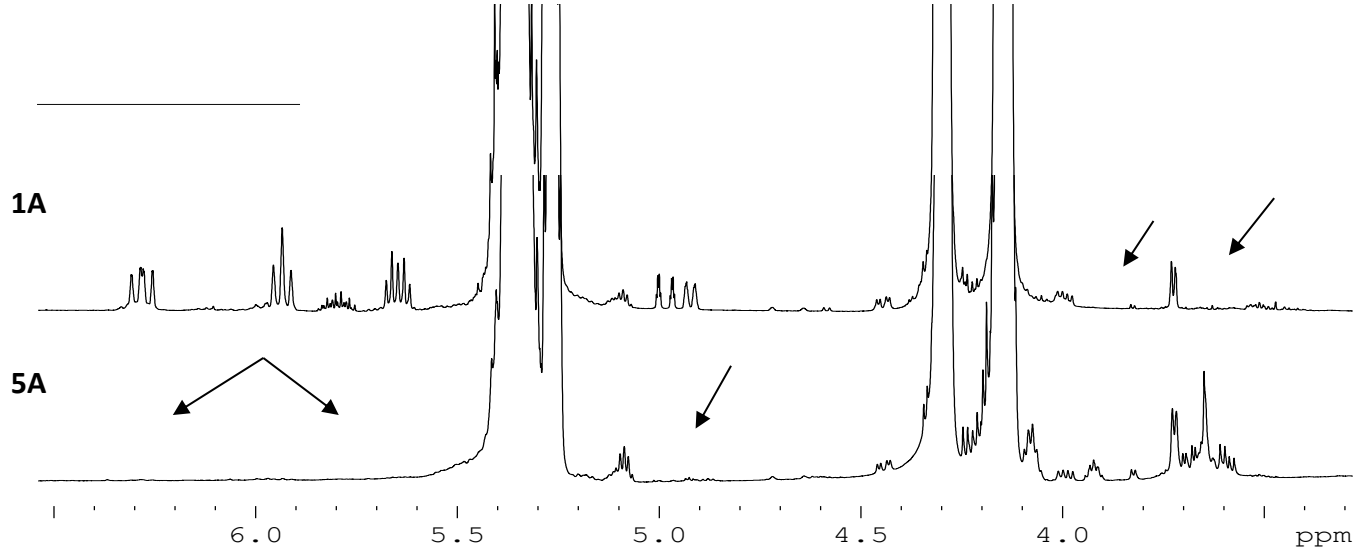
Σε αυτή την ενότητα γίνεται σύγκριση των φασμάτων του εκχυλίσματος με χλωροφόρμιο των δειγμάτων της γραβιέρας που παράχθηκαν από 100% πρόβειο γάλα (1A) και 100% σκόνη γάλα (5A) την πρώτη μέρα παραγωγής τους.

Στο σχήμα 8 παρατηρούνται οι διαφορές που υπάρχουν στην περιοχή δ 0,9-1,9, οι οποιές όπως γίνεται αντιληπτό δεν είναι πολλές. Είναι φανερό ότι στο δείγμα από 100% σκόνη γάλα απουσιάζει στα δ 0,947 η τριπλή κορυφή του βουτυρικού οξέος, πράγμα το οποίο είναι λογικό, αφού η σκόνη γάλα είναι αποβουτυρωμένη.



Σχήμα 8: Φάσματα H^1 NMR σε διαλύτη CDCl3-TMS των τυριών με 100% πρόβειο γάλα και 100% σκόνη γάλα. Περιοχή κορεσμένων και ακόρεστων λιπαρών οξέων.

Συνεχίζοντας προς τα αριστερά καθώς προχωράμε σε μεγαλύτερα ppm οι διαφορές μεταξύ των φασμάτων γίνονται ακόμη περισσότερες. Στην αρχή κιόλας των φασμάτων του σχήματος 9, παρατηρείται ότι στο φάσμα του δείγματος από σκόνη (5A) εμφανίζονται μονογλυκερίδια (δ 3,5-3,8) καθώς και 1,3-διγλυκεριδίων (1,3-DAG) σε δ 4,081, ουσίες που απουσιάζουν από το δείγμα με 100% πρόβειο γάλα. Σημαντική διαφορά μεταξύ των φασμάτων είναι η απουσία καπρολεϊκού οξέος και CLA από το φάσμα του δείγματος 5A. Οι διαφορές αυτές μεταξύ των δύο δειγμάτων της γραβιέρας όπου παράχθηκε, οφείλονται στην αλλαγή της σύστασης των ουσιών που υπάρχουν στο πρόβειο γάλα και στη σκόνη γάλα, αφού το δεύτερο έχει υποστεί επεξεργασία μέχρι να έρθει σε κονιορτοποιημένη μορφή. Στη σκόνη γάλα έχει αφαιρεθεί όλη η υγρασία που υπάρχει στο γάλα καθώς επίσης έχει αποβουτυρωθεί, πράγμα το οποίο δικαιολογεί την απουσία των συγκεκριμένων ενώσεων.



Σχήμα 9: Φάσματα H^1 NMR σε διαλύτη CDCl3-TMS των τυριών με 100% πρόβειο γάλα και 100% σκόνη γάλα. Περιοχή κορεσμένων και ακόρεστων λιπαρών οξέων.

Στη συνέχεια παρουσιάζεται ο πίνακας των αποτελεσμάτων με τις χημικές μμετατοπίσεις των ενώσεων που τακτοποιήθηκαν με τη φασματοσκοπία NMR στο οργανικό εκχύλισμα της γραβιέρας.

<u>Πίνακας 2:</u> Χημικές μμετατοπίσεις ενώσεων του τυριού γραβιέρα Κρήτης από 100% πρόβειο γάλα (1Α) σε οργανικό διαλύτη $CDCl_3$.

	Ένωση	**Άτομο**	**Ανάθεση**	**^{1}H ppm**
1	Χοληστερόλη		**-CH_3**	0,6803
2	Λ.Ο. εκτός n-3/Βουτυρικό οξύ	ω1	**-CH_3**	0,8787
3	Βουτυρικό Λιπαρό Οξύ	Η4	**-CH_3**	0,9474
4	Όλα τα n-3 Λιπαρά Οξέα	ω1	**-CH3**	0,9734
5	Όλα τα Λιπαρά Οξέα		**-(CH_2)n-**	1,2579
6	Όλα τα Λιπαρά Οξέα	Η3	**-OOH-CH_2-<u>CH</u> <u>2-</u>**	1,634

7	Ακόρεστα -trans Λ.Ο.		**-CH_2-CH=CH-**	1,9645
8	Ακόρεστα -cis Λ.Ο.		**-CH_2-CH=CH-**	2,0091
9	Όλα τα Λιπαρά Οξέα	H2	**-OOH-$\underline{CH_2}$-CH 2**	2,3076
10	Πολυακόρεστα Λ.Ο. (λινολεϊκό)	H11	**=CH-CH_2-CH=**	2,7604
11	Πολυακόρεστα Λ.Ο. (λινολενικό)	H11 H14	**=CH-CH_2-CH=**	2,805
12	Γλυκερόλη-1,2-DAG		**HO-$\underline{CH_2}$-CH-**	3,724
13	Γλυκερόληl-1,3-DAG		**-CH_2-OOC-**	4,0813
14	Γλυκερόλη-TAG		**-CH_2-OOC-**	4,1447
15	Γλυκερόλη-TAG		**-CH_2-OOC-**	4,2999
16	Καπρολεϊκό Οξύ	H10a	**=CH**	4,9212
17	Καπρολεϊκό Οξύ	H10b	**=CH**	4,9836
18	Γλυκερόλη-1,2-DAG		**-CH-OOC-**	5,0916
19	Γλυκερόλη-TAG		**-CH-OOC-**	5,2669
20	Ακόρεστα -cis Λ.Ο.		**-CH=CH-**	5,3377
21	Ακόρεστα -trans Λ.Ο.		**-CH=CH-**	5,3774
22	Συζευγμένο Λινολεϊκό Οξύ (CLA)	H12	**-CH=**	5,6455
23	Καπρολεϊκό Οξύ	H9	**-CH=CH_2**	5,7888
24	Συζευγμένο Λινολεϊκό Οξύ (CLA)	H10	**-CH=**	5,9338
25	Συζευγμένο Λινολεϊκό Οξύ (CLA)	H11	**-CH=**	6,2812
26	Γλυκερόλη-1-MAG		**-CH2-OH**	3,5929
27	Γλυκερόλη-1-MAG		**-CH2-O-R**	3,9221

28	Γλυκερόλη-2-MAG		**-CH2-OH**	3,8243

Πίνακας 2: Χημικές μμετατοπίσεις ενώσεων του τυριού γραβιέρα Κρήτης από 100% πρόβειο γάλα (1Α) σε οργανικό διαλύτη $CDCl_3$.

5.Συμπεράσματα

Για την ανάλυση καθώς και τον προσδιορισμό της χημικής σύστασης της γραβιέρας συνιστάται η φασματοσκοπία NMR. Μέσω της ανάλυσης του υδατικού εκχυλίσματος της γραβιέρας, με την μέθοδο αυτή, καθίσταται εφικτός ο προσδιορισμός των υδατοδιαλυτών συστατικών της γραβιέρας, ενώ η μελέτη του εκχυλίσματος της γραβιέρας με χλωροφόρμιο, καθιστά δυνατή την ανάλυση της λιπιδικής σύστασης. Να σημειωθεί πως η μέθοδος αυτή μπορεί να οδηγήσει στον ποσοτικό προσδιορισμό της χημικής σύστασης της γραβιέρας, προϋποθέτοντας προηγουμένως την χρήση κατάλληλου εσωτερικού προτύπου. Στην συγκεκριμένη εργασία, έγινε μελέτη της επίδρασης του τύπου του γάλακτος στην χημική σύσταση και τα χαρακτηριστικά της γραβιέρας με τη βοήθεια της φασματοσκοπίας NMR. Ύστερα, από τη μελέτη διαπιστώθηκε πως αυτή η μέθοδος είναι απόλυτα αποτελεσματική στην έρευνα μας, καθώς μέσω των φασμάτων έγιναν αντιληπτές οι διαφορές μεταξύ των πέντε δειγμάτων όπου μελετήθηκαν. Οι διαφορές όπου παρατηρήθηκαν στα υδατικά διαλύματα ήταν κυρίως στις εντάσεις των κορυφών ,καθώς όσο αυξανόταν η αναλογία σε σκόνη γάλα οι κύριες ουσίες του γάλακτος ολοένα και μειώνονταν. Η μείωση αυτή είναι λογική αφού το γάλα έχει υποστεί επεξεργασία μέχρι να φτάσει σε κονιορτοποιημένη μορφή. Όσον αναφορά τα διαλύματα του χλωροφορμίου οι διαφορές ήταν ακόμη περισσότερες αφού στα φάσματα των δειγμάτων από σκόνη γάλακτος παρατηρήθηκαν η εξαφάνιση ορισμένων λιπαρών, καθώς και η εμφάνιση νέων. Η έρευνα αυτή, απεδείχθη πολύ χρήσιμη διότι έγιναν γνωστές οι ενώσεις που εμφανίζονται όταν στο τυρί υπάρχει σκόνη γάλακτος, πράγμα το οποίο είναι παράνομο, ειδικά όταν πρόκειται για Π.Ο.Π. προϊόντα.

6.Βιβλιογραφία

1. Συλλογικό έργο, Εγκυκλοπαίδεια 2002, έκδ. 1984, τ. 20, σελ.98.

2. Αχαϊκή Παραδοσιακή Τυροκομία-Χελμός Α.Ε.-Παραδοσιακά Τυριά, «Ο ρόλος του τυριού στη διατροφή»,February 9,2016,p 1

3. ΓΡΑΒΙΕΡΑ ΚΡΗΤΗΣ (GRAVIERA KRITIS), Απόφαση 313047/14.1.94. του Υπουργού Γεωργίας (ΦΕΚ 16/Β/14.1.1994), Άρθρο 1,2,4,5, << Τροποποίηση άρθου 83 του Κώδικα Τροφίμων>>.

4. Structural biology : practical NMR applications (2nd ed.). Springer. p. 67. ISBN 978-1-4614-3964-6. Retrieved 7 December 2018.

5. Ράλλη Ε. (2013), Ανάπτυξη μεθοδολογίας για την ανάλυση της Κρητικής γραβιέρας με τη Φασματοσκοπία NMR, Διπλωματική Εργασία, Εργαστήριο φασματοσκοπίας NMR, Τμήμα Χημείας, Παν. Κρήτης, p.8-9.

6. R. Consonni, L.R. Cagliani, Ripening and geographical characterization of Parmigiano Reggiano cheese by ^{1}H NMR spectroscopy, Talanta 76 (2008): 200–205.

7. P. Scano, R. Anedda, M. P. Melis, M. A. Dessi',A. Lai, T. Roggio, ^{1}H- and ^{13}C-NMR Characterization of the Molecular Components of the Lipid Fraction of Pecorino Sardo Cheese, J Am Oil Chem Soc 88(2011) : 1305–1316

8. Alessandra Bordoni, Gianfranco Picone, Elena Babini, Massimiliano Vignali, Francesca Danesi, Veronica Valli, Mattia Di Nunzio, Luca Laghi and Francesco Capozzi, NMR comparison of in vitro digestion of Parmigiano Reggiano cheese aged 15 and 30 months,Magn.Reson.Chem,2011,p61-70

9. Barbara Nieva-Echevarria, Encarnacion Goicoechea, Maria J.Manzanos, Maria D. Guillen, A method based on ^{1}H NMR spectral data useful to evaluate the hydrolysis level in complex lipid mixtures, Food Research International 66 (2014),379-387.

10. S. de Angelis Curtis, R. Curini, M. Delfini, E. Brosio a, F. D'Ascenzo, B. Bocca, Amino acid profile in the ripening of Grana Padano cheese: NMR study,Food Chemistry 71 (2000): 495±502