



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του  
Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας  
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ  
ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»

ΜΕΛΕΤΗ ΕΡΜΙΟΝΗ

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΦΙΛ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΤΟΥ  
ΠΑΡΑΔΟΣΙΑΚΟΥ ΤΥΡΙΟΥ «ΤΣΑΛΑΦΟΥΤΙ»

2022

---

Προσδιορισμός προφίλ πρωτεϊνών και βιοπεπτιδίων του  
παραδοσιακού τυριού «Τσαλαφούτι»

Determination of protein profile and biopeptides of traditional  
cheese «Tsalafouti»

Τριμελής Επιτροπή:

Μαλισσιόβα Ελένη: Επίκουρη Καθηγήτρια, Ποιότητα, Ασφάλεια & Τεχνολογία Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Μανούρας Αθανάσιος: Καθηγητής, Χημεία Τροφίμων με έμφαση στη Χημεία Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα Διατροφής & Διαιτολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Γιαννούλη Περσεφόνη: Επίκουρος Καθηγήτρια, Τεχνολογία και Ποιοτικός Έλεγχος Τροφίμων Φυτικής Προέλευσης,

## Περίληψη

Το Τσαλαφούτι είναι ένα παραδοσιακό αλειψώδες τυρί που παράγεται στις περιοχές των Αγράφων και των Τζουμέρκων από αιγοπρόβειο γάλα. Τα τελευταία χρόνια, το προϊόν αυτό έχει έρθει στο προσκήνιο, λόγω της προσπάθειας που καταβάλλεται για να σημανθεί με ετικέτα γεωγραφικής ένδειξης (ΠΟΠ/ΠΓΕ). Για να αναδειχθεί η διατροφική αξία του, δείγματα του τυριού, αναλύθηκαν ως προς το πρωτεϊνικό τους προφίλ με την χρήση ηλεκτροφόρησης (SDS-PAGE), και πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των βιοπεπτιδίων με HPLC-MS και χαρακτηρισμός της βιοδραστικότητας τους. Αποδείχθηκε πως το Τσαλαφούτι περιέχει κλάσματα των καζεϊνών και πρωτεΐνες του ορού γάλακτος. Τα βιοπεπτίδια που εντοπίστηκαν στο Τσαλαφούτι, παρουσιάζουν αντιμικροβιακή, αντιδιαβητική, αντιυπερτασική, αντιθρομβωτική, αντιοξειδωτική και ανοσοτροποποιητική δράση, καθώς βρέθηκαν και βιοπεπτίδια αναστολείς του ενζύμου ACE και αναστολείς της διπεπτιδυλοπεπτιδάσης-4 (DPP-IV). Συμπερασματικά, το Τσαλαφούτι είναι ένα παραδοσιακό τυροκομικό προϊόν, το οποίο διαθέτει βιοδραστικές ιδιότητες, και μπορεί να ωφελήσει την υγεία των καταναλωτών.

Λέξεις Κλειδιά: Τσαλαφούτι, Τυρί, Ελληνικό, Πρωτεΐνες, Βιοπεπτίδια, SDS-PAGE, HPLC-MS

## Abstract

Tsalafouti is a traditional spreadable cheese produced in the areas of Agrafa and Tzoumerka, using goat's and sheep's milk. In recent years, this product has come to the fore, due to the effort made to be labeled with Geographical Indications (PDO/PGI). To feature the cheese's nutritional value, cheese samples were analyzed to determine their protein profile using electrophoresis (SDS-PAGE), and the biopeptides were determined by HPLC-MS and characterized by their bioactivity. Tsalafouti has been shown to contain caseins and whey proteins. The biopeptides found in Tsalafouti show antimicrobial, antidiabetic, antihypertensive, antithrombotic, antioxidant and immunomodulatory effects, as well as, biopeptides-inhibitors of ACE enzyme and dipeptidyl-4 (DPP-IV). In conclusion, Tsalafouti is a traditional cheese product, which possesses bioactive properties, and can benefit the health of consumers.

Key Words: Tsalafouti, Cheese, Greek, Proteins, Biopeptides, SDS-PAGE, HPLC-MS

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγή
  - 1.1. Ιστορία τυροκόμησης
  - 1.2. Τυροκόμηση στην Ελλάδα - ΠΟΠ τυριά
  - 1.3. Το Τσαλαφούτι
    - 1.3.1. Παράδοση-λαογραφία
    - 1.3.2. Τρόπος παρασκευής (Παραδοσιακός, Βιομηχανικός)
    - 1.3.3. Χαρακτηριστικά Τσαλαφουτιού
    - 1.3.4. Διαφορές από παρόμοια είδη τυριού
  - 1.4. Προσπάθειες για πιστοποίηση ΠΟΠ
2. Πρωτεΐνες γάλακτος και τυροκομικών προϊόντων
  - 2.1. Παράγοντες που επηρεάζουν την περιεκτικότητα πρωτεϊνών στο τυρί
  - 2.2. Βιοπεπτίδια τυροκομικών προϊόντων
  - 2.3. Οφέλη βιοπεπτιδίων
  - 2.4. Τρόποι προσδιορισμού πρωτεϊνών και βιοπεπτιδίων
3. Πειραματικό Μέρος- Υλικά και μέθοδοι
  - 3.1. Δειγματοληψία
  - 3.2. Πειραματική διαδικασία
4. Αποτελέσματα
5. Συζήτηση αποτελεσμάτων
6. Συμπεράσματα
7. Βιβλιογραφία
8. Παραρτήματα

## 1. Εισαγωγή

Το γάλα αποτελεί την πρώτη τροφή των περισσότερων θηλαστικών από την στιγμή που θα γεννηθούν έως και αρκετούς μήνες μετά, έως ότου τα νεαρά ζώα να είναι ικανά να τρέφονται με την ανάλογη τροφή με βάση το είδος στο οποίο ανήκουν. Το ίδιο συμβαίνει και με τα νεογνά των ανθρώπων τα οποία θηλάζουν από την μητέρα για τους πρώτους μήνες τους ζωής τους, και σε αντίθεση με τα άλλα θηλαστικά, οι άνθρωποι συνεχίζουν να καταναλώνουν γάλα καθ' όλη τη διάρκεια τους ζωής τους, αλλά όχι το μητρικό. Το γάλα αυτό μπορεί να είναι αγελαδινό, πρόβειο, κατσικίσιο, ή γαϊδουριών. Είναι μια πλήρης τροφή για τον άνθρωπο καθώς αποτελείται από πρωτεΐνες, λίπη, νερό, βιταμίνες, μέταλλα, σάκχαρα και αλάτι (O'Mahony & Fox, 2013).

Επειδή το γάλα είναι ένα πολύ ευαλλοίωτο προϊόν, για να καταφέρουν να το διατηρήσουν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, οι άνθρωποι έχουν εφεύρει διάφορες μεθόδους, όπως η παστερίωση, η συμπύκνωση, η ζύμωση κ.α. Έτσι, το γάλα μετατρέπεται σε διαφορετικά τελικά προϊόντα, όπως το βούτυρο, το γιαούρτι και το τυρί. Με τις παραπάνω μεθόδους, δεν αυξάνεται μόνο η διάρκεια ζωής των προϊόντων, αλλά και η διατροφική τους αξία, η γεύση τους, και επιπλέον γίνονται πιο εύπεπτα (Roberts et al., 2005). Η παρασκευή του τυριού είναι ένα από τα πιο κλασικά παραδείγματα συντήρησης τροφίμων. Σύμφωνα με το γενικό πρότυπο του CODEX ALIMENTARIUS, το τυρί είναι ένα προϊόν ωρίμανσης ή φρέσκο, μαλακό, ημίσκληρο, σκληρό ή πολύ σκληρό, το οποίο δύναται να επικαλυφθεί και στο οποίο η αναλογία πρωτεΐνης ορού γάλακτος/καζεΐνης δεν υπερβαίνει αυτή του γάλακτος, και λαμβάνεται από:

1. Πήξη εξ ολοκλήρου ή εν μέρει της πρωτεΐνης του γάλακτος (αποβουτυρωμένο ή μη), της κρέμας, του ορού γάλακτος ή του βουτυρογάλακτος ή οποιουδήποτε συνδυασμού αυτών, μέσω της δράσης πυτιάς ή άλλων κατάλληλων πηκτικών παραγόντων καθώς και με μερική αποστράγγιση του ορού γάλακτος που προκύπτει από την πήξη, ενώ παράλληλα, τηρείται η αρχή ότι η τυροκομία έχει ως αποτέλεσμα την συγκέντρωση πρωτεΐνης γάλακτος (ιδίως της καζεΐνης) και ότι κατά συνέπεια, η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη του τυριού θα είναι σαφώς υψηλότερη από το επίπεδο πρωτεΐνης του μείγματος από τα παραπάνω υλικά από τα οποία παρασκευάστηκε το τυρί, και/ή
2. Τεχνικές επεξεργασίας που περιλαμβάνουν την πήξη της πρωτεΐνης του γάλακτος, δίνοντας τελικό προϊόν παρόμοιο σε φυσικά, χημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά με το προϊόν που ορίζεται στο (1).

Το τυρί παράγεται σε όλο τον κόσμο σε ένα ευρύ φάσμα γεύσεων, ποικιλιών, υφών και σχημάτων, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως τελικό προϊόν στη διατροφή του ανθρώπου και ως σημαντικό συστατικό σε διάφορα τρόφιμα. Τα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι πολύ δημοφιλή σε όλο τον κόσμο και έχουν υψηλή εμπορική αξία στη βιομηχανία τροφίμων (Lei & Sun, 2019). Η διαδικασία παρασκευής του τυριού περιλαμβάνει μερική αφυδάτωση, η οποία μαζί με την προσθήκη αλατιού και τη μείωση του pH, προσδίδει ένα συντηρήσιμο προϊόν ασφαλές για κατανάλωση (Chandan & Karoor, 2011). Η χαρακτηριστική γεύση του τυριού προέρχεται από μικροβιακούς, ενζυμικούς και χημικούς μετασχηματισμούς (Karali et al., 2012).

Μπορεί η παρασκευή τυριού να ξεκίνησε προκειμένου να εκμεταλλευτούν οι άνθρωποι το γάλα που δεν μπορούσαν να διατηρήσουν για μεγάλο χρονικό διάστημα, αλλά κατέληξε να αποτελεί ένα βασικό προϊόν διατροφής, και σε κάποιες περιπτώσεις, ένα προϊόν υψηλής γαστρονομικής και πολιτιστικής αξίας. Σε διάφορες περιοχές του κόσμου η ταυτότητα, η ιστορία, η κουλτούρα και ο τρόπος ζωής των ανθρώπων αντανακλάται στις διατροφικές τους συνήθειες και στα αγαθά που παράγουν. Αυτό είναι ιδιαίτερα εμφανές στην περίπτωση του τυριού.

Σήμερα, απαριθμούνται περισσότερες από 1.400 ποικιλίες τυριών στην Παγκόσμια Βάση Δεδομένων Εμπορίου Τυριού, περίπου 400 από τις οποίες είναι οι πιο αναγνωρισμένες (Chandan & Karoor p. 225, 2011). Πιθανά, κανένα άλλο τρόφιμο που προκύπτει από ζύμωση δεν ξεκινά από μία τόσο απλή πρώτη ύλη τους το γάλα, ώστε να καταλήγει σε προϊόντα που έχουν τόσο μεγάλη ποικιλία χρωμάτων, γεύσεων, υφών και εμφάνισης τους το τυρί (Hutkins, 2008). Ένα σύνολο παραγόντων όπως το έδαφος, η τοπογραφία, το κλίμα και η βλάστηση συμβάλλουν άμεσα στην ιδιαίτερη γεύση του τυριού και εκφράζουν την ιστορία των ανθρώπων που το παρασκευάζουν για αιώνες, διατηρώντας μια παράδοση αρκετών γενεών (Fontenele et al., 2017). Η μεγάλη ποικιλία είναι ουσιαστικά αποτέλεσμα της ιστορικής, γεωγραφικής και περιβαλλοντικής προέλευσης. Οι ποικιλίες οφείλουν τη ξεχωριστή γεύση και την υφή τους στη χρήση γάλακτος διαφόρων θηλαστικών, τα διαφορετικά συστατικά, τις διαδικασίες επεξεργασίας, τις συνθήκες ωρίμανσης και την τελική σύνθεση του τυριού (Chandan & Karoor, 2011). Οι διάφορες ποικιλίες τυριού παρασκευάζονται από το γάλα αρκετών θηλαστικών. Οι αγελάδες παράγουν περίπου το 85% της παγκόσμιας παροχής γάλακτος, ακολουθούμενες από τα βουβάλια στο 11% και τα αιγοπρόβατα με 4% (Fox, 2003a).

Λόγω της μεγάλης ποικιλίας των τυριών που παράγονται παγκοσμίως είναι πολύ δύσκολο να ταξινομηθούν σε κατηγορίες και να μην υπάρχουν αποκλίσεις. Τα

τυριά σύμφωνα με τους Chandan και Karoor (2011) μπορούν να ταξινομηθούν με διάφορους τρόπους, ως εξής:

- Με βάση τη διαδικασία παρασκευής και τη διαδικασία ωρίμανσης
- Με βάση το εάν το τυρί ωριμάζει, και το είδος της ωρίμανσης.
- Με βάση την περιεκτικότητα σε υγρασία, τη σταθερότητα και τους μικροοργανισμούς που συμμετέχουν.

Με βάση τις διάφορες τεχνολογικές μεταχειρίσεις και τα ειδικά χαρακτηριστικά των τυριών οι Κεχαγιάς και Τσάκαλη (2017) τα κατατάσσουν στις εξής κατηγορίες:

- Πλαθόμενα τυριά (pasta filata) τους η mozzarella, το provolone και το κασέρι.
- Τυριά τυρογάλακτος (Μυζήθρα, Ανθότυρο, Μανούρι, Ricotta)
- Τυριά άλμης (Φέτα, Τελεμές, Domiati)
- Τυριά τύπου Emmental με οπές τους η Γραβιέρα
- Τυριά με εμφανή ανάπτυξη μικροοργανισμών εσωτερικά ή εξωτερικά (Camembert, Brie, Roquefort)
- Ανακατεργασμένα τυριά (τηγμένα, αλειφώδη)

Σύμφωνα με τις προδιαγραφές του Codex Alimentarius παρατίθενται οι παρακάτω πίνακες που κατατάσσουν τα τυριά σε κατηγορίες όσον αφορά την σκληρότητά τους (πίνακας 1), την λιποπεριεκτικότητα (πίνακας 2) και τον τρόπο ωρίμανσης (πίνακας 3).

Υγρασία (%)	Χαρακτηρισμός
<51	Πολύ σκληρό
49-56	Σκληρό
54-69	Ημισκληρο
>67	Μαλακό

Πίνακας 1. Κατηγορίες τυριών με βάση την σκληρότητα τους.

Λιποπεριεκτικότητα (%)	Χαρακτηρισμός
≥60	Πολύ λιπαρό
≥45 και <60	Πλήρους λιπαρότητας
≥25 και <45	Μέσης λιπαρότητας
≥10 και <25	Μερικώς αποβουτυρωμένο
<10	Αποβουτυρωμένο

Πίνακας 2. Κατηγορίες τυριών με βάση την λιποπεριεκτικότητά τους.



Ωρίμανσης
Ωρίμανσης με μύκητες
Μη Ωρίμανσης/Φρέσκο
Σε άλμη/ωρίμανση και συντήρηση σε άλμη

Πίνακας 3. Κατηγορίες τυριών με βάση την ωρίμανση τους.

Ωστόσο, όπως προαναφέρθηκε, λόγω της τεράστιας ποικιλίας διαφορετικών χαρακτηριστικών των τυριών που παρασκευάζονται σε όλο τον κόσμο, αλλά και εξαιτίας της παραγωγής καινοτόμων τυροκομικών προϊόντων πολύ συχνά υπάρχουν αποκλίσεις από αυτές τις κατηγορίες.

Το 2021, η παγκόσμια παραγωγή τυριού ανήλθε σε περίπου 21,86 εκατομμύρια τόνους. Η Ευρωπαϊκή Ένωση ήταν μακράν ο κορυφαίος παραγωγός τυριού παγκοσμίως, με όγκο παραγωγής περίπου 10,35 εκατομμύρια τόνους τυριού (<https://www.statista.com/statistics/1120911/cheese-production-worldwide>, Shahbandeh, Jan 10, 2022). Ενώ σύμφωνα με στοιχεία της Eurostat για το 2017, τα κράτη μέλη τους Ε.Ε. χρησιμοποίησαν 17,4 εκ. τόνους αποβουτυρωμένου γάλακτος μαζί με 58,1 εκ. τόνους πλήρους γάλακτος για να παράγουν 10,2 εκ. τόνους τυριού. Πάνω από το 90% του τυριού παράχθηκε από αγνό αγελαδινό γάλα, 2% από πρόβειο ή κασικίσιο γάλα. Το φρέσκο τυρί αντιπροσώπευε το μεγαλύτερο μερίδιο της συνολικής παραγωγής τυριού τους Ε.Ε. (34%), ακολουθούμενο από το ημίσκληρο τυρί (26%) και το σκληρό τυρί (19%). Χαρακτηριστικό είναι ότι μεταξύ των κρατών μελών τους Ε.Ε. η Γερμανία παρήγαγε τα περισσότερα τυριά (22%), ακολουθούμενη από τη Γαλλία (19%) και την Ιταλία (12%). Η Γερμανία, η Γαλλία, η Ιταλία, η Ολλανδία και η Πολωνία μαζί παρήγαγαν το 70% του συνόλου του τυριού που παράγεται στην ΕΕ (Eurostat, 2019). Σύμφωνα με την Ελληνική Στατιστική Υπηρεσία και την ετήσια γεωργική έρευνα που διεξήχθη για το 2021 στην Ελλάδα παράχθηκαν περίπου 140 χιλιάδες τόνοι τυριού. Το 2018 υπήρχαν περίπου 4.900 γαλακτοκομικές επιχειρήσεις σε ολόκληρη την Ε.Ε. Αξιόλογο είναι ότι μόνο η Ιταλία είχε σχεδόν 1.200 γαλακτοκομεία και η Ελλάδα περίπου 800. Τα περισσότερα από αυτά είναι σχετικά μικρά, συλλέγοντας λιγότερους από 5.000 τόνους γάλα το χρόνο. Για παράδειγμα, το 70 % των γαλακτοκομείων στην Ιταλία μάζευαν λιγότερους από 5000 τόνους γάλα ετησίως και περίπου το 94 % όλων των γαλακτοκομείων στην Ελλάδα (Eurostat, 2020).

## Στόχος

Στόχος της παρούσας διπλωματικής διατριβής ήταν η αποτύπωση του πρωτεϊνικού προφίλ και των βιοπεπτιδίων στο παραδοσιακό τυρί Τσαλαφούτι, και η ανάδειξη αυτού του μοναδικού προϊόντος ως ένα τρόφιμο υψηλής διατροφικής αξίας, το οποίο μπορεί να ωφελήσει την υγεία του καταναλωτή μέσω των βιοπεπτιδίων. Επίσης, τα παραπάνω σε συνδυασμό με την πιθανότητα να ενταχθεί στα προϊόντα με γεωγραφική ένδειξη, μπορούν να δώσουν στο Τσαλαφούτι την αναγνώριση που αξίζει από τους καταναλωτές, και επιπλέον το παραδοσιακό αυτό τυρί θα αποκτήσει προστιθέμενη εμπορική αξία, κάτι πιθανά να αποτελέσει μεγάλο πλεονέκτημα για τους παραγωγούς, αλλά και για τις κοινωνίες των περιοχών όπου παράγεται.

### 1.1. Ιστορία τυροκόμησης

Μέσα από μία σύντομη ιστορική αναδρομή στην τυροκόμηση, από τις απαρχές του ανθρώπινου πολιτισμού έως και σήμερα, γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι τα τυροκομικά προϊόντα, είτε στην πιο απλοϊκή τους μορφή είτε έπειτα από περισσότερο πολύπλοκες διεργασίες, αποτέλεσαν βασικό και αναπόσπαστο κομμάτι της καθημερινής διατροφής των ανθρώπων.

Τα πρόβατα και οι κασίδες εξημερώθηκαν για πρώτη φορά στις κοιλάδες του Ευφράτη και του ποταμού Τίγρη στη Νοτιοδυτική Ασία, όπου συνάγεται από την αρχαιολογική μελέτη σκελετικών υπολειμμάτων. Ομοίως, τα βοοειδή φαίνεται πως εξημερώθηκαν στις λεκάνες του Ευφράτη ελαφρώς αργότερα, πάλι με βάση αρχαιοζωολογικές αναλύσεις (Vigne, 2011). Έτσι, άφθονα έμμεσα αρχαιοζωολογικά στοιχεία δείχνουν ότι η γαλακτοκομία ασκούνταν σχεδόν από την αρχή τους Νεολιθικής εποχής, όταν τα ζώα εξημερώθηκαν για πρώτη φορά (Kindstedt, 2018). Ωστόσο, αποτελέσματα μελετών υποδηλώνουν έντονα ότι η παρουσία υπολειμμάτων λίπους γάλακτος που διαπιστώθηκε στα αρχαία σκεύη, αποτελεί ενδεικτικά σημάδια συμπυκνωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων, όπως το βούτυρο και το τυρί (Kindstedt, 2018).

Ευρήματα των Salque et al. (2012, 2013) επιβεβαιώνουν ότι οι νεολιθικοί αγρότες πριν από περίπου 7.000 χρόνια χρησιμοποιούσαν κόσκινα στην τυροκομία με παρόμοιο τρόπο που εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται ακόμα και σήμερα σε ορισμένες παραδοσιακές κοινωνίες. Οι ενήλικες της πρώιμης νεολιθικής εποχής είχαν δυσανεξία στη λακτόζη και χρειάστηκαν αρκετές χιλιάδες χρόνια από την έναρξη της παραγωγής γαλακτοκομικών προϊόντων προτού να καθιερωθεί ευρέως η ανοχή στη λακτόζη τους ενήλικες, κάτι που έγινε για πρώτη φορά στον ανθρώπινο πληθυσμό, στην Κεντρική Ευρώπη, λίγο μετά την 6<sup>η</sup> χιλιετία π.Χ. (Burger et al., 2007; Curry, 2013, Itan et al., 2009, Leonardi et al., 2012).

Η επεξεργασία του γάλακτος σε προϊόντα με μειωμένη λακτόζη, όπως το βούτυρο, και ιδιαίτερα το τυρί, θα είχε καταστήσει προσβάσιμο ένα σημαντικό μέρος του συνόλου των θρεπτικών ουσιών του γάλακτος στον ενήλικο πληθυσμό της νεολιθικής εποχής (Kindstedt, 2018). Ωστόσο, μόνο μερικές χιλιάδες χρόνια μετά την έναρξη της τυροκομίας, οι πληροφορίες για τα τυριά και την παρασκευή τους, άρχισαν να καταγράφονται, καθώς αναδύθηκαν οι πρώτοι πολιτισμοί της ανθρωπότητας. Τα παλαιότερα γνωστά παραδείγματα πρώτης καταγραφής, που χρονολογούνται από τα τέλη τους 4<sup>ης</sup> χιλιετίας π.Χ., προέρχονται από την Ουρούκ, την πρώτη μεγάλη πόλη-κράτος του Σουμερίου πολιτισμού της Μεσοποταμίας (Kindstedt, 2018). Επιπλέον, το τυρί έχει χρησιμοποιηθεί από τους Σουμερίους, τους Χετταίους, αλλά και στον Ελληνικό και Ρωμαϊκό πολιτισμό ως στοιχείο λατρείας μέσω θυσιών προς τους θεούς (Kindstedt, 2012; McCormick, 2012).

Τα πρώτα οριστικά στοιχεία για την τυροκομία με χρήση πυτιάς, δεν εμφανίζονται στα αρχαιολογικά αρχεία μέχρι την άνοδο του πολιτισμού των Χετταίων, κατά την ύστερη Εποχή του Χαλκού (Kindstedt, 2018). Σύμφωνα με τον Neils (2008) οι Έλληνες αποκαλούσαν το τυρί που παρήγαγαν ως «φρέσκο τυρί», που συνόδευε το κύριο πιάτο του ελληνικού γεύματος, το οποίο αποτελούνταν από ψωμί και χυλό δημητριακών. Το «φρέσκο τυρί» πιθανότατα ήταν ένα απλό πηχτό τυρί, άψητο, μη συμπιεσμένο ή ελαφρά πιεσμένο, επιφανειακά αλατισμένο ή σε άλμη, πηγμένο με πυτιά και παράγεται από πρόβειο ή κατσικίσιο γάλα ή μείγματα των δύο, όπως τα φρέσκα λευκά τυριά που παράγονται ακόμα στις περιοχές του Αιγαίου και της Ανατολικής Μεσογείου (Kamber, 2008). Τα τυριά στην Αθήνα και στις άλλες πόλεις-κράτη στην αρχαία Ελλάδα ήταν πιθανώς παραλλαγές βασικού «φρέσκου τυριού» που, όταν αποθηκεύονταν και ωρίμαζαν σε κεραμικά βάζα που περιείχαν άλμη, μετατρέπονταν στα αρωματικά λευκά τυριά τύπου φέτας, πανταχού παρόντα σε όλες τις περιοχές του Αιγαίου και των Βαλκανίων και παρέμειναν έτσι μέχρι σήμερα (Anifantakis & Moatsou, 2006).

Την εποχή της Ρωμαϊκής Αυτοκρατορίας, ο μπρούτζινος ή σιδερένιος τρίφτης τυριών είχε γίνει ένα απαραίτητο σκεύος στη ρωμαϊκή κουζίνα. Οι Ρωμαίοι αναγνώριζαν επίσημα δύο κατηγορίες τυριών για φορολογικούς σκοπούς: το *caseus mollis*, ή μαλακό τυρί, και το *caseus aridus*, ή ξηρό τυρί (Kindstedt, 2018). Το τυρί αποτελούσε βασικό στοιχείο της διατροφής του ρωμαϊκού στρατού, και παρατηρείται συχνά από αρχαιολογικές έρευνες η εμφάνιση διάτρητων κεραμικών καλουπιών σε ρωμαϊκά οχυρά σε όλη την Ευρώπη, κάτι που δείχνει ότι η παρασκευή του σκληρού τυριού πεκορίνο γινόταν συχνά επί τόπου, ίσως και από τους ίδιους τους στρατιώτες σε περιόδους ειρήνης. (Niblett, Manning & Saunders, 2006). Ωστόσο, οι Ρωμαίοι δεν ήταν οι πρώτοι που εισήγαγαν την τυροκομία στην Ευρώπη. Αντίθετα, παρουσιάζεται συχνά έντονη τυροκομική δραστηριότητα μεταξύ των Κέλτικων λαών που κατέκτησαν, και πολλά τυριά από τις επαρχίες μεταφέρθηκαν στη Ρώμη, όπου και απέκτησαν αστρική φήμη (Kindstedt, 2018).

Κατά τον Μεσαίωνα, τα μεγάλα αρχοντικά και τα μοναστήρια ήταν τα κυριότερα κέντρα τυροκομικής δραστηριότητας, όπου εμφανίστηκαν νέες ποικιλίες και καθιερώθηκαν πολλά διαφορετικά είδη τυριών. Η Ευρωπαϊκή ήπειρος περιλαμβάνει ποικίλα φυσικά περιβάλλοντα, όσον αφορά το κλίμα, την τοπογραφία, την χλωρίδα κ.α., έτσι οι τυροκόμοι των αρχοντικών και των μοναστηριακών τυροκομείων αντιμετώπιζαν ένα ευρύ φάσμα ευκαιριών και περιορισμών, ανάλογα με το πού βρίσκονταν (Kindstedt, 2018). Οι αγροτικές οικογένειες, αποτελούσαν το εργατικό δυναμικό των μεγάλων φέουδων της Ευρώπης και είχαν συνήθως τη δυνατότητα να εκτρέφουν μια ή δύο αγελάδες, που παρείχαν μικρές αλλά ζωτικές ποσότητες γάλακτος για την επιβίωση της οικογένειας.

Οι γυναίκες των αγροτικών οικογενειών συνδύαζαν πολλαπλά αρμέγματα όταν έφτιαχναν τυρί λόγω της μικρής διαθέσιμης γάλακτος, κάτι που ευνοούσε την ανάπτυξη υψηλών πληθυσμών βακτηρίων στο τυρόγαλα. Τελικό αποτέλεσμα ήταν η παραγωγή τυριών υψηλής υγρασία και χαμηλού pH. Η προέλευση των περισσότερων τυριών με ώριμη μούχλα, τα οποία είναι τόσο αγαπητά στη Βορειοδυτική Ευρώπη είχαν σχεδόν σίγουρα τους ρίζες τους στις αγροτικές κοινότητες των μεγάλων αρχοντικών και, αργότερα, στα χωριά που προέκυψαν από τη διάλυση των φέουδων (Kindstedt, 2012). Στις περιοχές της Βορειοδυτικής Ευρώπης, οι Βενεδικτίνοι μοναχοί τυροκόμοι εφάρμοσαν τεχνικές παρασκευής τυριού, παρόμοιες με αυτές των αγροτικών οικογενειών των αρχοντικών, με πήξη με πυτιά, χωρίς βρασμό και πίεση, αλατίζοντας την επιφάνεια του τυριού, αλλά κατέληξαν σε ένα πολύ διαφορετικό αποτέλεσμα. Τα τυριά αυτά συχνά αναφέρονται και ως μοναστηριακά τυριά.

Την ίδια χρονική περίοδο σε διάφορες χώρες της ευρωπαϊκής ηπείρου αναπτύχθηκαν με παρόμοιες τεχνικές πολλά είδη τυριού με πολύ διαφορετικά τους χαρακτηριστικά, κυρίως εξαιτίας των διαφορετικών συνθηκών ωρίμανσης. Την εποχή αυτή συνέβη μια αλλαγή στη γεωμετρία του τυριού, καθώς τα μικρά κυλινδρικά τυριά της αγγλοσαξονικής περιόδου εξελίχθηκαν σε μεγαλύτερα τυριά σε σχήμα τροχού μέχρι το τέλος του Μεσαίωνα ( π.χ. Gouda περίπου 7 κιλά, Παρμεζάνα περίπου 40 κιλά) (Kindstedt, 2012).

Ο 17<sup>ος</sup> αιώνας αποτέλεσε ένα κρίσιμο σημείο καμπής στην ιστορία του τυριού, που εγκαινίασε τη σύγχρονη εποχή. Η εκρηκτική αύξηση του αστικού πληθυσμού σε ταχέως αναπτυσσόμενες πόλεις τους το Λονδίνο, η δημιουργία παγκόσμιων εμπορικών δικτύων από μεγάλες ευρωπαϊκές δυνάμεις, ο ανταγωνισμός για αποικισμό Ανατολής και Δύσης, καθώς και η έναρξη του Διαφωτισμού, οδήγησε σε βαθιά επιστημονική πρόοδο που σύντομα εφαρμόστηκε στην βιομηχανική επανάσταση που ακολούθησε. Έτσι άρχισαν συλλογικά να αλλάζουν οι συνθήκες της αγοράς που καλούνταν να αντιμετωπίσουν οι σύγχρονοι τυροκόμοι, οι οποίοι προκειμένου να ανταποκριθούν, ανέπτυξαν νέες, καινοτόμες για την εποχή, τεχνικές τυροκόμησης. Οι καινοτομίες αυτές έδιναν έμφαση στην βελτιστοποίηση, στο μέγεθος της παραγωγής, στην αποτελεσματικότητα και κυρίως στο κόστος. Κατ' αυτό τον τρόπο άνοιξε ο δρόμος για την βιομηχανοποίηση της τυροκομίας και την παραγωγή τυριού σε μεγάλες ποσότητες.

Η παραδοσιακή βιοτεχνική τυροκομία παρέμεινε συχνά σε γεωγραφικά απομονωμένες περιοχές της Ευρώπης, καθώς και σε περιοχές με εκτάσεις που δεν είναι κατάλληλες για περαιτέρω γεωργικούς σκοπούς (εκτάσεις μικρής έκτασης, μη αρδευόμενες, μεγάλης κλίσης), εκτός από την εκτροφή αιγοπροβάτων. Η παραδοσιακή τυροκομία συνέχισε να εφαρμόζεται και σε πιο προσιτές και εύφορες περιοχές στην Ευρώπη, όπου επικρατούσε έντονος πολιτιστικός συντηρητισμός και αποτελούσε αναπόσπαστο στοιχείο της τοπικής κοινωνίας (Kindstedt, 2018). Τα τυριά που παράγονται σε μικρές τοπικές βιοτεχνίες σε μικρή κλίμακα δεν επιδέχονται εξοικονόμηση κόστους παραγωγής, καθιστώντας τα πολύ πιο ακριβά στον καταναλωτή από τα βιομηχανικά τυριά (Bouma, Durham and Meunier-Goddik, 2014, Nicholson & Stephenson, 2007). Επιπλέον, η παραδοσιακή τυροκομία χρησιμοποιεί πρακτικές και εξοπλισμό που έρχονται σε αντίθεση με τα ταχέως εξελισσόμενα παγκόσμια πρότυπα υγιεινής και ασφάλειας, θέτοντας περαιτέρω απειλές για τη συνέχιση της ύπαρξής της (Licitra, 2010).

Τα παραδοσιακά τυριά προσφέρουν συλλογικά μια ποικιλία φυσικών και αισθητηριακών χαρακτηριστικών που, αναμφισβήτητα, που δεν παρουσιάζονται στα βιομηχανικά τυριά (Licitra, 2010). Αυτή η ποικιλομορφία, έχει βοηθήσει να

τωνωθεί το ενδιαφέρον των καταναλωτών και η προθυμία τους να πληρώσουν ένα αυξημένο τίμημα για μια νέα γενιά βιοτεχνικών τυριών, που παράγονται με παραδοσιακούς τρόπους σε μικρή κλίμακα, αλλά που συχνά χρησιμοποιούν προηγμένες πρακτικές και τεχνολογίες που εναρμονίζονται με τους κανονισμούς δημόσιας υγείας διατηρώντας παράλληλα τον παραδοσιακό χαρακτήρα του τυριού. Επιπλέον, η προθυμία του κοινού να πληρώσει περισσότερα για τα βιοτεχνικά τυριά ενθαρρύνεται μερικώς και από τις αξίες των καταναλωτών, όπως είναι η βιωσιμότητα και η διαχείριση του περιβάλλοντος, η καλή μεταχείριση των ζώων, η εγγύτητα με τη φύση κ.λπ., τα οποία συνδέονται με τα παραδοσιακά τοπικά τυροκομία (Wang et al., 2015).

Συμπερασματικά, η σύγχρονη τυροκομία εξελίχθηκε μέσα στους αιώνες από τα πρώτα χρόνια που ο άνθρωπος σχημάτισε κοινωνίες και εξελίχθηκε ο πολιτισμός. Οι άνθρωποι ανά τον κόσμο προσαρμόσαν τις τεχνικές τυροκόμησης στο κλίμα της εκάστοτε περιοχής, στις διατροφικές συνήθειες και την κουλτούρα των κατοίκων των περιοχών αυτών, και την ανέπτυξαν με την εφαρμογή των επιστημονικών και τεχνολογικών επιτευγμάτων, έτσι ώστε σήμερα να παράγονται τυριά με χαμηλό κόστος και αυξημένα επίπεδα υγιεινής σε βιομηχανική κλίμακα, ή παραδοσιακά τυριά με την χρήση βιώσιμων πρακτικών και τεχνικών που κληρονομήθηκαν από παλαιότερες γενιές, σε μικρότερη κλίμακα, άλλα διατηρώντας την αυθεντικότητα τους ταυτόχρονα με το υψηλό επίπεδο υγιεινής και ασφάλειας.

## 1.2. Τυροκόμηση στην Ελλάδα- ΠΟΠ τυριά

Η Ελλάδα έχει ένα μοναδικό τοπίο, βρίσκεται στο σταυροδρόμι της Ευρώπης με την Ασία και την Αφρική. Η γη επεκτείνεται σε αποστάσεις έως και 1200 km σε μια κυρίως ορεινή ηπειρωτική χώρα. Η χώρα έχει μια πολύ μεγάλη ακτογραμμή (13.676 km) και κοντά στα 3.000 νησιά (Theodoridis et. al, 2021). Η Ελλάδα υπήρξε μια σχεδόν αποκλειστικά αγροτική χώρα, όπου μέχρι τη δεκαετία του 1960 η πλειοψηφία του πληθυσμού ζούσε σε αγροτικές περιοχές απασχολούμενοι ως γεωργοί και κτηνοτρόφοι, διατηρώντας τις παραδοσιακές συνήθειες στον τρόπο ζωής, τη γεωργία και την διατροφή. Όλοι αυτοί οι παράγοντες συγκλίνουν για να δημιουργήσουν μια πολύ μεγάλη συλλογή και ένα πολύ δυνατό χαρτοφυλάκιο μοναδικών και χαρακτηριστικών προϊόντων διατροφής (Theodoridis et. al, 2021). Στην κατηγορία αυτή ανήκουν και τα ελληνικά παραδοσιακά τυροκομικά προϊόντα.

Η τυροκομία στην Ελλάδα έχει παράδοση χιλιετιών, κάτι που καταδεικνύουν τόσο τα ομηρικά έπη (8<sup>ος</sup> αιώνας π.Χ.), περιγράφοντας τον Κύκλωπα Πολύφημο ως βοσκό και τυροκόμο, όσο και ιστορικοί, όπως ο Διόδωρος (Diodorus Siculus, 1<sup>ος</sup> αιώνας π.Χ.), που έγραψε ότι ο Αριστέας, γιος του Απόλλωνα και εγγονός του Δία, που είχε μάθει την τέχνη της τυροκομίας από τις νύμφες, στάλθηκε από τους θεούς να διδάξει τους Έλληνες πώς να παρασκευάζουν το τυρί (Litoroulou-Tzanetaki and Tzanetakis, 2014). Η μεγάλη διατροφική αξία του τυριού ήταν η κύρια αιτία που έδινε την πεποίθηση στους αρχαίους Έλληνες ότι η γνώση της τυροκομίας αποτελούσε δώρο των θεών προς τους ανθρώπους.

Το τυρί αναμειγμένο με μέλι χρησίμευε ως γέμιση για ένα από τα αγαπημένα επιδόρπια των αρχαίων Ελλήνων, γνωστό ως πλακούντας. Αυτό το τυρί πιθανότατα ήταν ένα απλό φρέσκο τυρί καθόλου ή ελαφρά στραγγισμένο, επιφανειακά αλατισμένο ή αλατισμένο σε άλμη, που παράγονταν από πρόβειο ή κατσικίσιο γάλα ή μείγματα των δύο με την χρήση πυτιάς, όπως τα φρέσκα λευκά τυριά που παράγονται ακόμα σε περιοχές του Αιγαίου και της Ανατολικής Μεσογείου (Kamber, 2008). Τα εξαιρετικά τοπικά τυριά αποτελούσαν αρκετές φορές είδη θαλάσσιου εμπορίου και ορισμένα μάλιστα απέκτησαν αστρική φήμη και αναγνωρίστηκαν από τον τόπο προέλευσής τους, όπως αυτά από την Κύθνο και την Χίο (Migeotte, 2009). Πολλά από τα τυριά που μεταφέρονταν από τα νησιά στην Αθήνα ήταν πιθανά παραλλαγές του απλού φρέσκου τυριού τα οποία, όταν αποθηκεύονταν και ωρίμαζαν σε κεραμικά βάζα που περιείχαν άλμη, μετατράπηκαν στα αρωματικά λευκά τυριά άλμης τύπου φέτας που διαδόθηκαν σε διάφορες περιοχές του Αιγαίου και των Βαλκανίων και παρέμειναν έτσι μέχρι και σήμερα (Anifantakis & Moatsou, 2006, Kamber, 2008).

Πολλά διαφορετικά είδη τυριών εξελίχθηκαν με το πέρασμα των αιώνων στην Ελλάδα, ως αποτέλεσμα σήμερα κάθε περιοχή και σχεδόν κάθε νησί να έχουν την δική τους ξεχωριστή παράδοση στην τυροκομία και να παράγουν ιδιαίτερα, μοναδικά, τυροκομικά προϊόντα. Στην Ελλάδα παράγονται παραδοσιακά διάφορα είδη τυριών, κυρίως με γνώμονα τα είδη των μηρυκαστικών που εκτρέφονται σε κάθε περιοχή. Αυτός είναι και ο λόγος που η συντριπτική πλειοψηφία των ελληνικών τυριών παρασκευάζονται κυρίως από πρόβειο ή κατσικίσιο γάλα (περίπου 15 εκατομμύρια μικρά μηρυκαστικά εκτρέφονται στην Ελλάδα) (Michailidou et. al, 2021). Η Ελλάδα είναι η πρώτη μεταξύ των ευρωπαϊκών χωρών σε πληθυσμό αιγών και Τρίτη στην παραγωγή κατσικίσιου γάλακτος (FAO, 2018). Χαρακτηριστικό είναι πως η πλειοψηφία του γάλακτος που παραδόθηκε στα γαλακτοκομεία στην Ελλάδα το 2019 προήλθε από προβατίνες και κασικές (55,4%) (Eurostat, 2020). Στην Ελλάδα, το κατσικίσιο γάλα προστίθεται συχνά στο πρόβειο ή στο αγελαδινό



γάλα για την παραγωγή διαφορετικών τύπων τυριών, ή χρησιμοποιείται για την παραγωγή αμιγώς κατσικίσου τυριού.

Ορισμένα από τα είδη τυριού είναι τοπικά, χειροποίητα τρόφιμα, και η γνώση για την παραγωγή αυτών έχει μεταλαμπαδευτεί από τη μια γενιά στην άλλη και παρασκευάζονται είτε στα σπίτια, είτε από τους ίδιους τους κτηνοτρόφους, ενώ μερικές τοπικές παραδοσιακές ποικιλίες παρασκευάζονται σε μικρά εργοστάσια και βιοτεχνίες από παστεριωμένο γάλα, εμπορική πτυιά και εκκινητές ζύμωσης (Bozouidi et. al, 2016). Τα τυριά αυτά μπορεί να είναι παρόμοια με τις παραδοσιακές εκδοχές τους, αλλά και πολύ διαφορετικά από αυτές. Η παράδοση της τυροκομίας είναι βαθιά ριζωμένη στις κτηνοτροφικές περιοχές, όπου ακόμη και σήμερα κάποιες οικογένειες παρασκευάζουν τυρί για ίδια κατανάλωση με τον πατροπαράδοτο τρόπο.

Στην Ελλάδα υπάρχει μεγάλη ποικιλία παραδοσιακών γαλακτοκομικών προϊόντων, μερικά από τα οποία δεν είναι γνωστά στο ευρύ κοινό. Παρασκευάζονται από αγελαδινό, πρόβειο ή κατσικίσιο γάλα ή μείγματα αυτών και χαρακτηρίζονται από τη μοναδική, ιδιαίτερη γεύση και το πλούσιο άρωμά τους. Τα παραδοσιακά γαλακτοκομικά και τυροκομικά προϊόντα αποτελούν πέρα από σημαντική πολιτιστική κληρονομιά για τις περιοχές όπου παράγονται, και μοχλό οικονομικής ανάπτυξης. Επιπλέον, η διατήρηση της παραδοσιακής τυροκομίας αποτελεί σε κάποιες περιπτώσεις κίνητρο για την διατήρηση του ντόπιου πληθυσμού στην επαρχία και βελτίωση του τρόπου ζωής των ανθρώπων. Σε αυτή την κατεύθυνση κινείται και η αγροτική πολιτική της Ευρωπαϊκής Ένωσης, που επικεντρώνεται στη βελτίωση της ανταγωνιστικότητας του γεωργικού και δασικού τομέα, στη βελτίωση του περιβάλλοντος και της υπαίθρου, στη βελτίωση της ποιότητας ζωής στις αγροτικές περιοχές και στην ενθάρρυνση της διαφοροποίησης της αγροτικής οικονομίας (Commission of the European Communities 2005).

Ένας από τους τρόπους για την επίτευξη των στόχων της αγροτικής ανάπτυξης της Ε.Ε είναι τα ποιοτικά αγροδιατροφικά προϊόντα και ειδικότερα οι γεωγραφικές ενδείξεις (GIs). Οι πιστοποιημένες γεωγραφικές ενδείξεις στην Ε.Ε περιλαμβάνουν τις Προστατευόμενες Ονομασίες Προέλευσης (ΠΟΠ) και τις Προστατευόμενες Γεωγραφικές Ενδείξεις (ΠΓΕ) (Vakoufaris, 2010). Τα προϊόντα αυτά χαρακτηρίζονται από μεγάλη συμβολική αξία (Nygard and Storstad, 1998) και σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορούν να θεωρηθούν ως πολιτιστικοί δείκτες (Belletti and Marescotti, 2003). Βοηθούν επιπλέον στη διατήρηση της παραδοσιακής τεχνογνωσίας και της πολιτιστικής κληρονομιάς (Tregear et al. 1998). Οι γεωγραφικές ενδείξεις ΠΟΠ και ΠΓΕ ορίζονται ως εξής:



- Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης (ΠΟΠ): περιλαμβάνει γεωργικά προϊόντα και τρόφιμα (τρόφιμα και κρασί) που παράγονται, μεταποιούνται και παρασκευάζονται σε μια δεδομένη γεωγραφική περιοχή, έχουν τον ισχυρότερο δυνατό δεσμό με τον τόπο παραγωγής, χρησιμοποιώντας τοπικά συστατικά και αναγνωρισμένη μεθοδολογία (European Commission, 2012).
- Προστατευόμενη Γεωγραφική Ένδειξη (ΠΓΕ): περιλαμβάνει γεωργικά προϊόντα και τρόφιμα (τρόφιμα και κρασί) που συνδέονται στενά με τη γεωγραφική περιοχή, με ένα τουλάχιστον από τα στάδια παραγωγής, μεταποίησης ή προετοιμασίας να λαμβάνει χώρα στην περιοχή αυτή, δίνοντας έμφαση στη σχέση μεταξύ της συγκεκριμένης γεωγραφικής περιοχής και του ονόματος του προϊόντος (Commission of the European Communities 2008).

Η εφαρμογή τους πολιτικής των ΠΟΠ-ΠΓΕ ξεκίνησε το 1992 και εμπνεύστηκε από πρώην εθνικά συστήματα, όπως η ονομασία d'origine controle'e στη Γαλλία (Folkesson 2005).

Τα παραδοσιακά τυροκομικά προϊόντα έχουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, τα οποία συνδέονται με μια συγκεκριμένη γεωγραφική θέση καθώς και με τις ιστορικές και τοπικές πολιτιστικές παραδόσεις της περιοχής παραγωγής τους. Η διατήρηση και η ανάπτυξη της παραγωγής τους είναι σημαντική αφού μπορεί να αποφέρει πολλά οικονομικά, περιβαλλοντικά και κοινωνικά οφέλη (Pappa et.al, 2022). Η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει αποδώσει το σήμα ΠΟΠ σε περισσότερα από 180 τυριά που αντιπροσωπεύουν σχετικά μεγάλο μερίδιο τους παγκόσμιας αγοράς τυριού (Lora et.al, 2020).

Η Ελλάδα κατέχει ένα αρκετά σημαντικό αριθμό προϊόντων (τρόφιμα και οίνοι) με ετικέτες είτε ΠΟΠ, είτε ΠΓΕ. Τα τυριά είναι η κατηγορία τροφίμων με το τρίτο υψηλότερο μερίδιο σε ετικέτες ποιότητας στην Ελλάδα (23 εγγραφές επί του συνόλου 116 εγγραφών, 19%). Τα φρούτα, τα λαχανικά και τα δημητριακά (49 εγγραφές, 43%) βρίσκονται στην πρώτη θέση και τα έλαια και λίπη κατηγορίας 3 αντιστοιχούν στο 28% και βρίσκονται στη δεύτερη θέση (e-Ambrosia, 2021).

Συνολικά 23 ελληνικά τυριά με ετικέτα ποιότητας είναι εγγεγραμμένα στην Επίσημη Βάση Δεδομένων τους ΕΕ e-Ambrosia για τρόφιμα, γεωργικά προϊόντα, κρασί, οινοπνευματώδη ποτά και αρωματισμένο κρασί. Τα εγγεγραμμένα τυριά είναι τα εξής: Φέτα ΠΟΠ, Καλαθάκι Λήμνου ΠΟΠ, Γαλοτύρι ΠΟΠ, Κατίκι Δομοκού ΠΟΠ, Κοπανιστή ΠΟΠ, Ανεβάτο ΠΟΠ, Πιχτόγαλο Χανίων ΠΟΠ, Ξιγάλο Σητείας ΠΟΠ, Γραβιέρα Κρήτης ΠΟΠ, Γραβιέρα Νάξου ΠΟΠ, Γραβιέρα. Αγράφων ΠΟΠ, Αρσενικό ΠΟΠ, Κεφαλογραβιέρα ΠΟΠ, Λαδοτύρι Μυτιλήνης ΠΟΠ, Μετσοβόνε ΠΟΠ, Μπάτζος ΠΟΠ, Κρασοτύρι Κω ΠΓΕ, Κασσέρι ΠΟΠ, Σφέλα ΠΟΠ, Σαν Μιχάλη ΠΟΠ,

Φορμαέλλα Αράχωβας Παρνασσού ΠΟΠ, Μανούρι ΠΟΠ (Μα) και Ξυνομυζήθρα Κρήτης ΠΟΠ. Μόνο η Ιταλία, η Γαλλία και η Ισπανία έχουν περισσότερα γαλακτοκομικά προϊόντα ΠΟΠ. Η Φέτα είναι το πιο δημοφιλές ελληνικό τυρί τόσο εγχώρια όσο και στο εξωτερικό, και κατέχει ένα αρκετά σημαντικό ποσοστό των ελληνικών εξαγωγών τροφίμων. Παρόλα αυτά και άλλα ελληνικά παραδοσιακά τυριά χαίρουν εκτίμησης από καταναλωτές και γίνονται γνωστά σε διάφορους λαούς και αυτό οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στις ετικέτες ΠΟΠ και ΠΓΕ.

Τα ελληνικά τυριά ΠΟΠ είναι γνωστά για την ποιότητα και τη θρεπτική τους αξία, σε συνδυασμό με τα ιδιαίτερα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά, που πιστεύεται ότι προέρχονται από το πρόβειο και κατσικίσιο γάλα που χρησιμοποιείται ευρέως για την παρασκευή τους (Andrikopoulos et al., 2003, Samelis et al., 2010, Zlatanov et al., 2002). Η ποιότητα των ελληνικών τυριών (χαρακτηριζόμενα ή μη ως ΠΟΠ ή ΠΓΕ) επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως η μεγάλη ποικιλία ενδημικών φυτών που διατίθενται για βοσκή στα ζώα, το τοπικό μικροκλίμα, οι τοπικές φυλές ζώων, καθώς και οι παραδοσιακές πρακτικές κατά την επεξεργασία του γάλακτος και την τυροκόμηση (Litoroulou-Tzanetaki Tzanetakis, 2011, 2014).

Οι καταναλωτές ενδιαφέρονται για πολλά χαρακτηριστικά των γαλακτοκομικών και των τυροκομικών προϊόντων, όπως η γεωγραφική προέλευση, η φυλή των γαλακτοπαραγωγών ζώων και οι ζωοτροφές που καταναλώνουν αυτά (Danezis et al., 2016, Karoui, 2017). Επιπλέον, οι καταναλωτές στις μέρες μας είναι ιδιαίτερα ευαισθητοποιημένοι με την διατήρηση του φυσικού και παραδοσιακού περιβάλλοντος, με την ευζωία των ζώων, καθώς και με την διατήρηση των παραδόσεων στις διάφορες περιοχές.

Τα χαρακτηριστικά που προαναφέρθηκαν είναι πολύ σημαντικά για τους σύγχρονους καταναλωτές, οι οποίοι στην πλειοψηφία αναζητούν όλο και περισσότερο τα παραδοσιακά ποιοτικά προϊόντα, τα οποία συμβάλλουν στην διατήρηση ενός υγιούς διαιτολογίου. Αναζητούν λοιπόν προϊόντα πιστοποιημένα ως προς την παροχή των χαρακτηριστικών αυτών, και είναι ακόμα διατιθέμενοι να επιβαρυνθούν πιθανά και με επιπλέον κόστος. Τα ΠΟΠ και τα ΠΓΕ προϊόντα λοιπόν έχουν ενσωματωμένες αυτές τις πληροφορίες, και εάν αυτό θεωρείται πολύτιμο από τους καταναλωτές, τότε έχουν και υψηλότερη τιμή στην αγορά (Marsden et al., 2000, Renting et al., 2003).

## 1.3. Το Τσαλαφούτι

### 1.3.1. Παράδοση-Λαογραφία

Το Τσαλαφούτι είναι ένα ελληνικό αλειψώδες φρέσκο τυρί με απαλή-κρεμώδη υφή, ήπιο άρωμα και ελαφρώς όξινη και αλμυρή γεύση που παράγεται από πρόβειο συνήθως γάλα, παρόλα αυτά σε κάποιες περιοχές προσθέτουν και γίδινο γάλα στο πρόβειο (<https://www.dairynews.gr/2018/12/27/φτιάχνοντας-το-φημισμένο-τσαλαφούτι/>), χωρίς να ακολουθείται συγκεκριμένη αναλογία αυτών, όπως στην Φέτα (30% γίδινο και 70% πρόβειο γάλα) (ΕΦΕΤ, 2012). Η εκτροφή των γαλακτοπαραγωγών ζώων είναι εκτατική και αυτό προσδίδει ιδιαίτερη γεύση και ποιότητα στο Τσαλαφούτι. Αυτό το τυρί παράγεται παραδοσιακά, αλλά με μικρές παραλλαγές ωστόσο, στα ορεινά και ημιορεινά των Αγράφων και των Τζουμέρκων (Koutsoukis et al., 2017). Ως οριοθετημένη γεωγραφική περιγραφή για την παραγωγή και τυποποίηση του τυριού είναι οι ορεινοί όγκοι των Αγράφων, του Ορεινού Βάλτου, της Αργιθέας, του Ασπροποτάμου και των Τζουμέρκων και οι παρακείμενες σε αυτούς περιοχές (Παϊσιάδης, 2022, [www.agrotypos.gr](http://www.agrotypos.gr)).

Το Τσαλαφούτι καταναλώνεται σήμερα είτε ως ορεκτικό ή συνοδευτικό του κυρίως γεύματος, είτε χρησιμοποιείται σε διάφορες συνταγές σε σαλάτες, ζυμαρικά πίτες κ.α. (<https://cibum.gr/nea/istoria-trofimon/ti-einai-to-tsalafoyti/>) Η λαογραφία των περιοχών αυτών καταδεικνύει πως το Τσαλαφούτι το έφτιαχναν τους καλοκαιρινούς μήνες οι ίδιοι οι κτηνοτρόφοι, αλλά και οι ντόπιοι κάτοικοι των ορεινών χωριών και οικισμών, και επειδή το τελευταίο γάλα της γαλακτικής περιόδου ήταν λίγο σε ποσότητα και αρκετά λιπαρό («παχύ» όπως το αποκαλούν οι κτηνοτρόφοι) το αξιοποιούσαν για να φτιάχνουν το Τσαλαφούτι (Αθανάσιος Κουρής, 2020, [www.dairy-services.com/made-in-theodoriana/](http://www.dairy-services.com/made-in-theodoriana/)).

### 1.3.2. Τρόπος παρασκευής (Παραδοσιακός, Βιομηχανικός)

Οι Koutsoukis et. al, το 2017, σε μία από τις ελάχιστες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί για το συγκεκριμένο είδος τυριού, περιέγραψαν την παραδοσιακή διαδικασία παραγωγής που ακολουθείται για να παραχθεί το Τσαλαφούτι, όπως αυτή έχει περάσει από γενιά σε γενιά, και παρατίθεται παρακάτω:

1. Συλλέγεται το γάλα που έχει αρμεχθεί και στραγγίζεται με σκοπό την απομάκρυνση ξένων σωμάτων τους τρίχες ζώων κ.λπ. που ενδέχεται να πέσουν στο γάλα κατά το άρμεγμα.
2. Το γάλα θερμαίνεται στη φωτιά με ταυτόχρονη ανάδευση και μόλις βράσει (φουσκώσει) (περίπου τους 85 με 90° C), αποσύρεται από τη φωτιά.
3. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη μικρής ποσότητας αλατιού είτε κατά τη διάρκεια της θέρμανσης ή στο τέλος της.
4. Το γάλα αφού κρυώσει, μεταφέρεται σε πλαστικά ή ξύλινα δοχεία, τα οποία τοποθετούνται σε δροσερά και σκιερά μέρη με χαμηλή θερμοκρασία, όπως σπήλαια, κοντά σε ρυάκια ή σε τρεχούμενο νερό ή ακόμα και θαμμένα μέσα στο έδαφος, με τέτοιο τρόπο ώστε το χείλος του δοχείου να προεξέχει.
5. Το τυρί αναδεύεται καθημερινά.
6. Είναι πιθανό να προστεθεί στα δοχεία και επιπλέον ποσότητα γάλακτος από επόμενα αρμέγματα, αφού πρώτα έχει ολοκληρωθεί η προαναφερθείσα διαδικασία.
7. Η διάρκεια της ωρίμανσης για το Τσαλαφούτι είναι περίπου 5-6 ημέρες και τότε το τυρί είναι έτοιμο για κατανάλωση.

Η διάρκεια ωρίμανσης είναι πιθανό να είναι και μεγαλύτερη, έως και 20 μέρες, και εξαρτάται από τον βαθμό πήξης του τυριού. Η παραπάνω διαδικασία παρόλα αυτά μπορεί να διαφέρει σε κάποια σημεία από περιοχή σε περιοχή. Για παράδειγμα σε κάποιες περιπτώσεις γίνεται προσθήκη πυτιάς στο γάλα ή γιαουρτιού, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να υπάρξει και μερική στράγγιση για να αποκτήσει το τυρί μία πιο πηκτή υφή.

Το Τσαλαφούτι σήμερα δεν παράγεται μόνο από τους κτηνοτρόφους-τυροκόμους και από κατοίκους των περιοχών αυτών για οικιακή κατανάλωση, άλλα και σε μεγαλύτερη κλίμακα από μικρά τυροκομεία στην ευρύτερη περιοχή των Αγράφων και των Τζουμέρκων, όπου παράγουν Τσαλαφούτι σε μεγαλύτερες ποσότητες και το διαθέτουν σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας. Αυτό είχε ως

αποτέλεσμα η διαδικασία παραγωγής του να διαφοροποιηθεί σε κάποιον βαθμό από τον παραδοσιακό, πατροπαράδοτο τρόπο.

Αρκετά από τα τυροκομεία που παράγουν Τσαλαφούτι, προκειμένου να καλύψουν την αγορά για όλο το έτος ή τουλάχιστον για τους περισσότερους μήνες, αναγκάστηκαν να ξεφύγουν από τον περιορισμό της παραγωγής του μόνο το καλοκαίρι. Το γάλα που χρησιμοποιούν τους υπόλοιπους μήνες δεν είναι τόσο 'παχύ', και προέρχεται από σταβλισμένα ζώα που τρέφονται με ζωοτροφές και δεν βοσκούν την τοπική χλωρίδα. Επακόλουθο είναι λοιπόν κάποια από τα χαρακτηριστικά του γάλακτος, και του τυριού εν γένει να είναι διαφορετικά. Ωστόσο υπάρχουν τυροκομεία που παράγουν το Τσαλαφούτι μόνο τους μήνες Ιούνιο-Αύγουστο στην προσπάθεια τους να διατηρήσουν την παράδοση του τυριού.

Επιπλέον, αρκετοί είναι οι τυροκόμοι οι οποίοι προσθέτουν φυσική πτυιά στο γάλα ή το στραγγίζουν ελαφρώς προκειμένου να αποκτήσει το Τσαλαφούτι μία πιο πηχτή υφή. Ακόμα, κάτι που διαφοροποιεί την παραδοσιακή διαδικασία παραγωγής από την διαδικασία που ακολουθείται από τα τυροκομεία είναι ο χρόνος ωρίμανσης του προϊόντος (κυμαίνεται από 5 ημέρες έως και 5 μήνες από τυροκομείο σε τυροκομείο), και η θερμοκρασία κατά την ωρίμανση, η οποία είναι υψηλότερη (περίπου 19° C) όταν η διάρκεια της ωρίμανσης είναι μικρή, και χαμηλότερη (περίπου 2-4° C) όταν η ωρίμανση διαρκεί για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Επιπλέον η ωρίμανση, όπως γίνεται εύκολα αντιληπτό, δεν γίνεται πλέον σε πηγές και ποτάμια όπως παραδοσιακά έκαναν οι κτηνοτρόφοι, άλλα σε σύγχρονα ψυγεία και εγκαταστάσεις. Στην συνέχεια αφού ωριμάσει το Τσαλαφούτι είναι έτοιμο για κατανάλωση. Το τυρί συσκευάζεται από τους τυροκόμους σε ποικίλες συσκευασίες και διατίθεται είτε σε ντόπια τυροπωλεία, είτε σε τυροπωλεία και σε άλλες περιοχές.

### 1.3.3. Χαρακτηριστικά Τσαλαφουτιού

Το Τσαλαφούτι, όπως έχει ήδη αναφερθεί είναι ένα λευκό, αλειψώδες, ελαφρώς όξινο και αλμυρό τυρί με κρεμώδη βουτυράτη υφή που παράγεται είτε από αμιγώς πρόβειο γάλα, είτε από μίξη πρόβειου και γίδινου γάλακτος. Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του τσαλαφουτιού διαφοροποιούνται πολύ λόγω των παραλλαγών που υπάρχουν, και εξαρτώνται από την διαδικασία παραγωγής που ακολουθείται, το είδος του γάλακτος που χρησιμοποιείται, την εποχή που παίρνουν οι τυροκόμοι το γάλα, και τους παράγοντες τους την τροφή των ζώων, την φυλή που ανήκουν κ.α. Σύμφωνα με έρευνα του ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ και τους Δρ. Ελένης Χ. Παππά το

2018, μελετώντας για πρώτη φορά το παραδοσιακό Τσαλαφούτι από τα Θεοδωριανά Άρτας και το Καρπενήσι καταγράφηκαν τα εξής: υγρασία 78,5%, λίπος 10,3%, αλάτι 0,34% για το Τσαλαφούτι στα Θεοδωριανά, ενώ το Τσαλαφούτι στο Καρπενήσι είχε τιμές 68%, 14,9% και 1,54% αντίστοιχα.

Μια ταυτόχρονη έρευνα πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο μας, στα πλαίσια μεταπτυχιακής διατριβής, από 12 δείγματα τυροκόμων από διάφορες περιοχές που παράγουν Τσαλαφούτι. Η υγρασία κυμαινόταν από 66,77% έως και 79,95%, η αλατότητα από 1,43% έως 2,27%, οι πρωτεΐνες (% ολικές πρωτεΐνες) από 5,3% έως 13,8%, η οξύτητα (% γαλακτικό οξύ) από 1,34% έως 1,99% και λίπος από 7% έως 13%. Αυτό που μπορεί να γίνει εύκολα αντιληπτό, είναι ότι υπάρχουν αρκετά μεγάλες διαφορές στα χαρακτηριστικά του τυριού ιδιαίτερα όσον αφορά την υγρασία, τις πρωτεΐνες και το λίπος. Οι διαφοροποιήσεις αυτές, μπορεί να έχουν αναπτυχθεί, είτε κατά την παραγωγή, είτε στην πρώτη ύλη που χρησιμοποιείται, και καθίστανται εμφανείς και στα αποτελέσματα των αναλύσεων των τυριών.

#### 1.3.4. Διαφορές από παρόμοια είδη τυριού

Τα όξινα τυριά σχηματίζουν μια ξεχωριστή ομάδα μαλακών, αλειφώδων τυριών, χαμηλού pH (pH 3,5 έως 5,0), αλλά υψηλής υγρασίας, που παράγονται βιομηχανικά ή βιοτεχνικά (μικρά τυροκομεία), και καταναλώνονται φρέσκα ή έπειτα από ωρίμανση (Gérard et. al, 2018). Αρκετές παραδοσιακές ποικιλίες τέτοιου είδους τυριών παράγονται στην Ελλάδα από ωμό, παστεριωμένο ή βραστό γάλα, αγελαδινό, πρόβειο, κατσικίσιο ή μείγμα των παραπάνω. Παράγονται με την χρήση πτυιάς και/ή την πήξη με οξίνιση του θερμικά επεξεργασμένου γάλακτος (Lapidakis and Fragkiadakis, 2021).

Λόγω των διαφορετικών διαδικασιών τυροκόμησης που ακολουθείται, η θρεπτική σύνθεση του κάθε μαλακού τυριού μπορεί να διαφέρει. Αυτό οφείλεται στα χαρακτηριστικά και την ποιότητα του γάλακτος που χρησιμοποιείται, στον τρόπο παραγωγής του, και μπορεί τους να επηρεαστεί από την περίοδο παραγωγής και από την επιλογή και την ανάμειξη των ειδών γάλακτος (Lean, 2006, pp. 85-86). Οι διαφορές στην διαδικασία παραγωγής των τυριών, έχουν ως αποτέλεσμα να υπάρχει μεγάλη ποικιλία από μαλακά, αλειφώδη τυριά, τα οποία έχουν υψηλή

υγρασία (60–80%) και λιπαρά σε ξηρή βάση (40–55%), συνήθως χαμηλό αλάτι (0,8–1,8%) και pH ~4,5 (Lapidakis and Fragkiadakis, 2021).

Στην Ελλάδα παράγονται αρκετά τυριά τους τους κατηγορίας, και μάλιστα σε μερικά από αυτά έχει δοθεί η σήμανση γεωγραφικής ένδειξης (ΠΟΠ/ΠΓΕ). Ως προϊόντα ΠΟΠ έχουν χαρακτηριστεί το Γαλοτύρι, το Κατίκι Δομοκού, το Ξίγαλο Σητείας, η Κοπανιστή, το Ανεβατό και το Πιχτόγαλο Χανίων, τα οποία είναι μαλακά αλειφώδη λευκά τυριά, με τα περισσότερα από αυτά να παράγονται από πρόβειο ή αιγοπρόβειο γάλα. Παρόμοιο με τα τυριά αυτά, κυρίως ως προς την υφή τους και κάποια κοινά βήματα κατά την διαδικασία παραγωγής, καθώς και στην προέλευση του γάλακτος που χρησιμοποιείται, είναι το Τσαλαφούτι. Μία σύντομη αναφορά στα χαρακτηριστικά και στην διαδικασία παραγωγής των μαλακών αυτών ΠΟΠ τυριών θα καταδείξει τις διαφορές που υπάρχουν με το Τσαλαφούτι και θα αναδείξει την μοναδικότητα του ως παραδοσιακό προϊόν.

Το Γαλοτύρι είναι ένα μαλακό αλειφώδες τυρί με όξινη γεύση που φτιάχνεται από πρόβειο και γίδινο γάλα στο τέλος της γαλακτικής περιόδου. Παράγεται κυρίως σε περιοχές της Ηπείρου (Ιωάννινα, Μέτσοβο), αλλά και σε άλλες περιοχές τους ηπειρωτικής χώρας. Το γάλα στραγγίζεται, βράζεται και στη συνέχεια αφήνεται σε ένα δοχείο (πήλινο ή χάλκινο). Μετά από 24 ώρες, αλατίζεται (4% NaCl) και αφήνεται για ακόμα 2 ημέρες, και έπειτα μεταφέρεται σε δερμάτινους σάκους ή βαρέλια, όπου το τυρί αφήνεται για ωρίμανση για διάστημα 3 μηνών. Σε κάποιες περιοχές οι τυροκόμοι προσθέτουν και μικρή ποσότητα πτυιάς (Hatzikamari et. al, 1999, Michailidou et. al, 2021). Στην περιοχή τους Θεσσαλίας συνήθως, όταν αναφέρονται στο Γαλοτύρι εννοούν κομμάτια μαλακής φέτας τα οποία τοποθετούνται σε πηχτό λιπαρό πρόβειο γάλα (σχεδόν κρέμα), ενώ το τυρί σεββίρεται χωρίς να στραγγιστεί.

Το Κατίκι Δομοκού είναι ένα ακόμα μαλακό τυρί που φτιάχνεται στην περιοχή του Δομοκού, αλλά και σε άλλα μέρη της ορεινής Ελλάδας, από κατσικίσιο και πρόβειο γάλα. Το γάλα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου (20 έως 22°C) να ξινίσει και να πήξει με ή χωρίς πτυιά. Στη συνέχεια στραγγίζεται, προστίθεται αλάτι (1%) και το τυρί διατηρείται στο ψυγείο μέχρι να καταναλωθεί (Litoroulou-Tzanetaki and Tzanetakis, 2014). Συχνά, λόγω της ομοιότητας που έχει το Κατίκι Δομοκού με το Τσαλαφούτι, θεωρείται ότι πρόκειται για το ίδιο τυρί, κάτι που δεν ισχύει και γίνεται αντιληπτό αν παρατηρήσει κανείς την διαδικασία παραγωγής των δύο τυριών και τις διαφορές που υπάρχουν.

Ένα ελληνικό παραδοσιακό τυρί, που αναγνωρίστηκε ως ΠΟΠ το 2011 είναι το Ξύγαλο Σητείας. Πρόκειται για ένα μαλακό τυρί, που παράγεται στην περιοχή της Σητείας Κρήτης. Είναι τυρί που παράγεται με οξίνιση του πρόβειου ή αιγοπρόβειου



γάλακτος. Το γάλα προαιρετικά παστεριώνεται και στη συνέχεια ψύχεται στους 25°C. Προστίθεται αλάτι σε μέγιστη ποσότητα 2% κατά βάρος, όξινες βακτηριακές καλλιέργειες, και μικρές ποσότητες φυσικής πτυιάς, και η ωρίμανση του διαρκεί τουλάχιστον 1-2 μήνες. Το τελικό προϊόν έχει ελαφρώς όξινη γεύση, χαρακτηριστικό άρωμα, λευκή απόχρωση και κρεμώδη υφή (Lapidakis and Fragkiadakis, 2021).

Η Κοπανιστή είναι ακόμα ένα παραδοσιακό ελληνικό μαλακό αλειψώδες τυρί Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (ΠΟΠ). Παρασκευάζεται αποκλειστικά στο κυκλαδίτικο νησιωτικό σύμπλεγμα του Αιγαίου, και κυρίως στα νησιά Σύρο, Τήνο και Μύκονο. Παράγεται από αγελαδινό γάλα (πολύ σπάνια και αιγοπρόβειο) και ωριμάζει για 1-2 μήνες με τη βοήθεια επιφανειακής μούχλας, η οποία ζυμώνεται περιοδικά στην τυρομάζα (Litoroulou-Tzanetaki Tzanetakis, 2011). Το αποτέλεσμα είναι ένα μαλακό τυρί με πολύ έντονη πιπεράτη γεύση και τα κύρια χαρακτηριστικά του είναι η έντονη αλμυρή και πιπεράτη γεύση, η απαλή υφή και η πλούσια γεύση που προσεγγίζει αυτή του ροκφόρ (Karali et. al, 2013).

Ως προϊόν Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης έχει χαρακτηριστεί από το 1994 ένα ακόμα ελληνικό παραδοσιακό αλειψώδες τυρί, το Ανεβάτο (γνωστό και ως Ανιβατό, ή Νιβατό). Παράγεται από ωμό πρόβειο ή αιγοπρόβειο γάλα στις ορεινές περιοχές της Δυτικής Μακεδονίας, της βορειοδυτικής Ελλάδας και σε γειτονικές περιοχές της Θεσσαλίας (Hatzikamari et. al, 1999). Το παραδοσιακό αυτό τυρί έχει ευχάριστη γεύση, ειδικά όταν παρασκευάζεται από κατσικίσιο γάλα (Xanthopoulos et. al, 2000). Για την παρασκευή του προστίθεται πτυιά στο γάλα που λαμβάνεται το πρωί και το απόγευμα, όπου η τυρομάζα έχει ανέβει στην επιφάνεια του δοχείου, είναι έτοιμο για στράγγιση και αλάτισμα. Τέλος το τυρί αφήνεται να ωριμάσει για τουλάχιστον 2 μήνες.

Το τελευταίο μαλακό αλειψώδες τυρί που εμφανίζει ομοιότητες με το Τσαλαφούτι είναι το Πιχτόγαλο Χανίων. Στο Πιχτόγαλο Χανίων, που παράγεται στην περιοχή των Χανίων Κρήτης όπως προσδίδει και η ονομασία του, δόθηκε η σήμανση ΠΟΠ το 1996. Παρασκευάζεται από πρόβειο ή αιγοπρόβειο γάλα, το οποίο αφήνεται να ξινίσει για 24 ώρες. Το τυρί στραγγίζεται, προστίθεται αλάτι στο 1% και το προϊόν είναι έτοιμο για κατανάλωση. Είναι αλμυρό και ξινό στη γεύση, έχει γαλακτώδη επίγευση και χαρακτηριστικό άρωμα γιαουρτιού (Lapidakis and Fragkiadakis, 2021).

Παρόλο που τα μαλακά παραδοσιακά ΠΟΠ τυριά που παράγονται στην Ελλάδα συχνά έχουν αρκετές ομοιότητες τόσο μεταξύ τους, όσο και με το Τσαλαφούτι, που μελετάται στην συγκεκριμένη διατριβή, εμφανίζουν και ορισμένες διαφορές στην παραγωγική διαδικασία, στο είδος του γάλακτος, και εν τέλει στα χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος. Οι διαφορές αυτές αναδεικνύουν την μοναδικότητα του κάθε



τυριού και μαρτυρούν την παράδοση του κάθε τόπου, όπου παράγονται αυτά τα ξεχωριστά παραδοσιακά τυριά.

#### 1.4. Προσπάθειες για πιστοποίηση ΠΟΠ

Το Τσαλαφούτι είναι ένα τυροκομικό τοπικό παραδοσιακό προϊόν μεγάλης πολιτισμικής και οικονομικής αξίας. Η πιστοποίηση του προϊόντος με σήμανση Γεωγραφικής Ένδειξης (GI) θα μπορούσε να αποφέρει πολλά πιθανά οφέλη τόσο στις τοπικές επιχειρήσεις που το παράγουν, όσο και στις τοπικές κοινωνίες. Η αναγνώριση του τυριού σύμφωνα με τους ντόπιους τυροκόμους θα είχε θετικό αντίκτυπο όσον αφορά την ζήτηση του τυριού τόσο στην Ελλάδα, όσο και στο εξωτερικό. Επίσης, η παραδοσιακή διαδικασία παραγωγής του θα μπορούσε να αποτελέσει πόλο έλξης για αγροτουρισμό στις περιοχές αυτές που το παράγουν.

Η Περιφέρεια Δυτικής Ελλάδος έχει εκδώσει απόφαση χρηματοδότησης για την διερεύνηση των προϋποθέσεων λήψης σήματος Γεωγραφικής Ένδειξης για 10 τοπικά αγροτικά προϊόντα (Απόφαση 153/2021– Περιφέρεια Δυτικής Ελλάδας), εκ των οποίων και το Τσαλαφούτι. Σε περίπτωση που πληροί τις προϋποθέσεις αυτές, έπειτα θα γίνει η κατάθεση του φακέλου που έχει ξεκινήσει ήδη να ετοιμάζεται. (<https://www.dairynews.gr/2022/06/22/%cf%83%cf%84%ce%bf%ce%bd-%ce%b4%cf%81%cf%8c%ce%bc%ce%bf-%cf%84%ce%bf%cf%85-%cf%80%ce%bf%cf%80-%cf%84%ce%bf-%cf%84%cf%83%ce%b1%ce%bb%ce%b1%cf%86%ce%bf%cf%8d%cf%84%ce%b9/?fbclid=IwAR140LF4Ekwujuh8KPufmQYTHhf9Ao3wNzscBfsyj2ErJ4XyzDkKZkHRCiw>)

## 2. Πρωτεΐνες γάλακτος και τυροκομικών προϊόντων

Η υγιεινή, ισορροπημένη και θρεπτική διατροφή είναι πολύ σημαντική για την καλή υγεία και ευεξία των ανθρώπων. Οι πρωτεΐνες είναι θεμελιώδη συστατικά του ανθρώπινου σώματος και μία δίαιτα πλούσια σε πρωτεΐνες είναι πρωταρχικής σημασίας για τον άνθρωπο, διότι αποτελούν τα βασικά μακρομόρια που απαιτούνται για τη σωστή μεταβολική λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού (Singh et. al, 2018). Οι πρωτεΐνες είναι μια εξαιρετικά σημαντική κατηγορία φυσικών

ενώσεων που είναι απαραίτητες για τις διαδικασίες τους ζωής. Επιτελούν ποικίλες λειτουργίες στους ζωντανούς οργανισμούς, από την δόμηση του οργανισμού, έως την αναπαραγωγή (Kukonics & Németh, 2013). Οι πρωτεΐνες που λαμβάνονται μέσω της τροφής παρέχουν στον ανθρώπινο οργανισμό το άζωτο και αμινοξέων προκειμένου να συνθέσει μόνος του τις κατάλληλες για αυτόν πρωτεΐνες (Dziuba & Dziuba, 2014). Επιπλέον, οι πρωτεΐνες αποτελούν και πηγή ενέργειας για τον οργανισμό. Σημαντικότερη πηγή πρωτεϊνών για τον άνθρωπο είναι τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης, όπως το κρέας, το ψάρι, το γάλα και άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα (τυρί, γιαούρτι, βούτυρο), αλλά και κάποια φυτικής προέλευσης, όπως τα όσπρια και τα δημητριακά.

Το γάλα είναι ένα έκκριμα του αδένων των θηλαστικών, του οποίου τα φυσικά χαρακτηριστικά και η σύνθεση ποικίλλουν μεταξύ των ειδών. Είναι ένα σύνθετο γαλάκτωμα (λάδι σε νερό) που περιέχει λίπος, πρωτεΐνες, λακτόζη, μέταλλα, ένζυμα, κύτταρα, ορμόνες, ανοσοσφαιρίνες και βιταμίνες (Balthazar et al. 2017). Οι πρωτεΐνες του γάλακτος αντιπροσωπεύουν μια από τις μεγαλύτερες συνεισφορές του στην διατροφή του ανθρώπου. Οι πρωτεΐνες αποτελούν μια κύρια κατηγορία συστατικών γάλακτος, που περιλαμβάνει πάνω από 400 διαφορετικούς τύπους (Lu, 2013). Το γάλα περιέχει εκατοντάδες είδη πρωτεϊνών, τα περισσότερα από αυτά σε πολύ μικρές ποσότητες, οι οποίες μπορούν να ταξινομηθούν με διάφορους τρόπους ανάλογα με τις χημικές ή φυσικές τους ιδιότητες, ή τις βιολογικές τους λειτουργίες (Kukonics & Németh, 2013).

Φυσικοχημικά, το γάλα είναι ένα πολύ περίπλοκο υγρό, και τα συστατικά του γάλακτος εμφανίζονται σε τρεις φάσεις. Ποσοτικά, το μεγαλύτερο μέρος του γάλακτος είναι ένα υδατικό διάλυμα λακτόζης, οργανικών και ανόργανων αλάτων, βιταμινών και άλλων μικρών μορίων. Σε αυτό το υδατικό διάλυμα βρίσκονται διασκορπισμένες οι πρωτεΐνες, μερικές σε μοριακό επίπεδο (πρωτεΐνες ορού γάλακτος μεγέθους 3-6 nm), και άλλες ως μεγάλα κολλοειδή συσσωματώματα, με διάμετρο από 50 έως 600 nm (οι καζεΐνες) (Fox, 2017). Οι πρωτεΐνες του γάλακτος κατανέμονται μεταξύ διαφορετικών φάσεων, δηλαδή καζεΐνες που υπάρχουν σε μικκύλια (κολλοειδή συσσωματώματα), πρωτεΐνες ορού γάλακτος σε διαλυτή μορφή και οι πρωτεΐνες MFGM (milk fat globule membrane) συνδεδεμένες στη μεμβράνη των λιπιδίων (0,1-10 μm) (El-Salam, 2014). Η πολυπλοκότητα του πρωτεώματος του γάλακτος προκύπτει από την υψηλή εξελικτική απόκλιση, την παρουσία των πολυάριθμων γενετικών παραλλαγών και τις μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις (Gagnaire et al., 2009, Bendixen et al., 2011).

Επίσης, στο γάλα πέρα από τις κύριες πρωτεΐνες που προαναφέρθηκαν, υπάρχουν και οι δευτερεύουσες πρωτεΐνες. Περισσότερες από 200 δευτερεύουσες

πρωτεΐνες υπάρχουν στο γάλα, και περίπου 60 από αυτές είναι ενδογενή ένζυμα. Μερικές από τις σημαντικότερες δευτερεύουσες πρωτεΐνες είναι οι ανοσοσφαιρίνες, η λακτοφερρίνη, η τρανσφερρίνη, η φερριτίνη, οι πεπτόνες, η προλακτίνη και η πρωτεΐνη που είναι υπεύθυνη για την δέσμευση του φολικού οξέος (Kukonics & Németh, 2013).

Οι καζεΐνες υποδιαιρούνται σε α-, β-, γ- και κ- καζεΐνες. Οι αλληλουχίες των καζεϊνών είναι παρόμοιες, καθώς η γ-καζεΐνη προέρχεται από τη β-καζεΐνη. Οι α-καζεΐνες ομαδοποιούνται σε  $as_0$ ,  $as_1$  και  $as_2$ . Οι καζεΐνες σχηματίζουν μικκύλια, δηλαδή είναι οργανωμένες ως υπερμοριακές, δυναμικές δομές που ονομάζονται μικκύλια καζεΐνης, τα οποία παγιδεύουν το κολλοειδές φωσφορικό ασβέστιο (McMahon & Oommen, 2013). Σύμφωνα με τον Fox (2017) τους από τις κυριότερες ιδιότητες των καζεϊνών είναι οι εξής:

- Είναι αρκετά μικρά μόρια, με μοριακές μάζες 20–25 kDa.
- Όλες είναι φωσφορυλιωμένες
- Οι φωσφορικές ομάδες εστεροποιούνται ως μονοεστέρες τους σερίνης και οι περισσότερες εμφανίζονται ως συσσωματώματα.
- Μόνο οι καζεΐνες  $as_2$ - και κ- περιέχουν κυστίνη, η οποία κανονικά υπάρχει ως ενδιάμεσο μόριο στους δισουλφιδικούς δεσμούς, και απουσία της από  $as_1$ - και β-καζεΐνες αυξάνει την ευκαμψία αυτών των μορίων.
- Όλες οι καζεΐνες, ειδικά η Β-καζεΐνη, περιέχουν σχετικά υψηλά επίπεδα προλίνης. Η παρουσία υψηλού επιπέδου προλίνης περιορίζει τον σχηματισμό δευτεροταγών δομών.
- Οι καζεΐνες έχουν χαμηλά επίπεδα δευτεροταγών και τριτοταγών δομών.
- Οι καζεΐνες έχουν υψηλή επιφανειακή υδροφοβικότητα λόγω της ανοιχτής δομής τους. Τα υδρόφοβα υπολείμματα δεν κατανέμονται όμως ομοιόμορφα στις μοριακές αλληλουχίες, αλλά εμφανίζονται ως υδρόφοβα ή υδρόφιλα μπαλώματα, δίνοντας στις καζεΐνες τόσο υδρόφιλες, όσο και υδρόφοβες δομές που τις καθιστούν επιφανειακά ενεργά μόρια.
- Η κ-καζεΐνη είναι γλυκοσυλιωμένη, ενώ οι  $as_1$ -,  $as_2$ - και β-καζεΐνες δεν είναι.
- Όλες οι καζεΐνες παρουσιάζουν γενετικό πολυμορφισμό που περιλαμβάνει συνήθως την υποκατάσταση ενός ή δύο αμινοξέων, ή και σπάνια την εξάλειψη ενός ολόκληρου τμήματος.

Η κατηγορία των πρωτεϊνών του ορού γάλακτος στο βόειο, πρόβειο, γίδινο και βουβαλίσιο γάλα, περιλαμβάνει τέσσερις κύριες πρωτεΐνες: την β-λακτοσφαιρίνη (, 50 %), την α-λακταλβουμίνη (α-Ia, 20 %), την αλβουμίνη του ορού αίματος (BSA,

10 %) και τις ανοσοσφαιρίνες (Ig, 10%, κυρίως IgG1, και σε μικρότερες ποσότητες IgG2, IgA και IgM). Οι β-Ig και α-la συντίθενται στον μαστικό αδένα των γαλακτοπαραγωγών ζώων. Οι BSA και IgG εισάγονται από το αίμα, αλλά οι IgA και IgM περιέχονται μόνο στο γάλα (Fox, 2017). Μεταξύ των άλλων, περιλαμβάνουν έναν μακρύ κατάλογο ενζύμων, ορμονών, αυξητικών παραγόντων, μεταφορέων θρεπτικών ουσιών και παραγόντων αντοχής σε ασθένειες (Kukonics and Németh, 2013). Σε αντίθεση με τις καζεΐνες, οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος διαθέτουν υψηλά επίπεδα δευτεροταγών, τριτοταγών και τεταρτοταγών δομών. Επίσης, είναι τυπικές σφαιρικές πρωτεΐνες και μετουσιώνονται με θέρμανση, δεν είναι φωσφορυλιωμένες, και δεν είναι ευαίσθητες στο  $Ca^{2+}$  (Fox, 2017).

Όσον αφορά την τυροκόμηση του γάλακτος, οι πρωτεΐνες παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο. Η παραγωγή του τυριού ανεξαρτήτως είδους, σχετίζεται άμεσα με την πήξη του γάλακτος και τον σχηματισμό του πηγματος, σε μεγαλύτερο, είτε σε μικρότερο βαθμό. Το πήγμα σχηματίζεται με την μετουσίωση των πρωτεϊνών με ποικίλους τρόπους (θερμοκρασία, οξίνιση, πρωτεολυτικά ένζυμα ή αλλιώς πυτιά, αλκοόλη, και εγκλωβίζει το λίπος (Κεχαγιάς και Τσάκαλη, p. 275, 2017). Σε pH 4,6 (ισοηλεκτρικό σημείο) τους 20 °C οι καζεΐνες καθιζάνουν και σχηματίζουν πήγμα, ενώ υπό αυτές τις συνθήκες οι πρωτεΐνες του ορού παραμένουν διαλυτές στον ορό (Fox, 2017). Οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος από την άλλη, δεν εμπλέκονται άμεσα στην παραγωγή του τυριού, έμμεσα όμως, αλληλοεπιδρούν με την κ-καζεΐνη εξαιτίας της θερμότητας με αποτέλεσμα να καθυστερεί η πήξη. Ωστόσο, παίζουν ρόλο στην παραγωγή τυριών από τον ορό γάλακτος (whey cheeses), όπως το τυρί cottage.

## 2.1. Παράγοντες που επηρεάζουν την περιεκτικότητα πρωτεϊνών στο τυρί

Οι πρωτεΐνες όπως έχει προηγουμένως αναφερθεί είναι ένα από τα βασικότερα συστατικά του γάλακτος επηρεάζοντας την θρεπτική του αξία, αλλά και τις ιδιαιτερότητες που προσδίδουν κατά την τυροκόμηση, στα διάφορα είδη τυριού. Ο καίριος ρόλος της περιεκτικότητας του γάλακτος σε πρωτεΐνες είναι εμφανής και από το γεγονός ότι, σε κάποιες χώρες, η ολική πρωτεΐνη είναι ένα από τα κύρια ποιοτικά κριτήρια που λαμβάνονται υπόψη στην διαμόρφωση της τιμής του αιγοπρόβειου γάλακτος. (Raynal-Ljutovac et al., 2005; Pirisi et al., 2007).

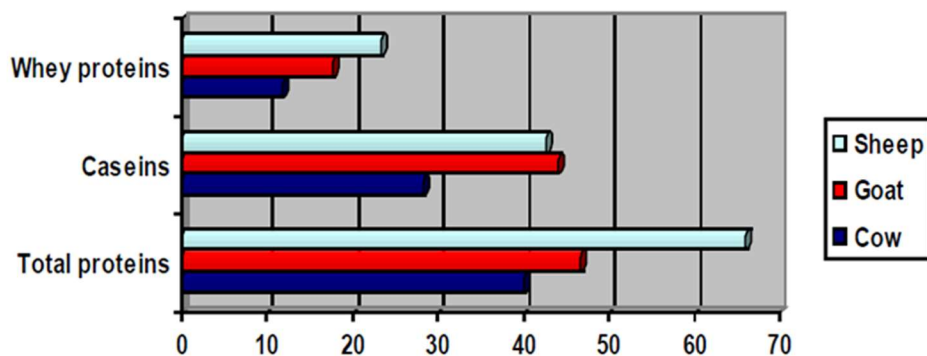
Η περιεκτικότητα των πρωτεϊνών, τόσο ποσοτικά, όσο και ποιοτικά στα διάφορα είδη τυριών επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες που συνδέονται με την βασική πρώτη ύλη, το γάλα, αλλά και από μερικούς παράγοντες που σχετίζονται με τις διαδικασίες τυροκόμησης και μεταχείρισης του γάλακτος. Το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα υφίστανται χημικές αλλαγές κατά την επεξεργασία και την αποθήκευση, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν επιδείνωση των λειτουργικών ιδιοτήτων, καθώς και των θρεπτικών τους ιδιοτήτων (El-Salam, 2014).

Η περιεκτικότητα του γάλακτος σε πρωτεΐνες επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως το ζώο (είδος, ηλικία, υγεία), την φυλή, τις ζωοτροφές, τα σχήματα διατροφής των γαλακτοπαραγωγών ζώων, την τεχνολογία αρμέγματος, την εποχή, τον οίστρο των ζώων, την τοποθεσία εκτροφής, τον αριθμό των γεννηθέντων ζώων, το στάδιο της γαλουχίας, την ώρα της ημέρας που γίνεται το άρμεγμα κ.λπ. (Kukonics and Németh, 2013, (Tamime et al., 2011, Claeys et al., 2014). Η σύνθεση του γάλακτος, επηρεάζει την απόδοση, την ποιότητα και τα λειτουργικά χαρακτηριστικά του τυριού (Farkye, 2004).

Η αύξηση της παραγωγής γάλακτος λόγω γενετικής βελτίωσης των ζώων μειώνει την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη στο γάλα (Bobe et al., 2007). Επιπλέον, ο αριθμός των γεννηθέντων ζώων επηρεάζει θετικά την ποσότητα των πρωτεϊνών στο γάλα (Bendelja et al., 2011), καθώς και η ηλικία των γαλακτοπαραγωγών ζώων, που όπως αναφέρουν οι Wood et al., το 2003, η περιεκτικότητα των πρωτεϊνών στο γάλα αυξάνεται με την ηλικία έως την Πέμπτη γαλουχία. Τέλος, την πρωτεΐνη του γάλακτος επηρεάζει, τόσο η εποχή παραγωγής, εμφανίζοντας υψηλότερα επίπεδα το φθινόπωρο και το χειμώνα σε σύγκριση με την άνοιξη και το καλοκαίρι, όσο και η ώρα της ημέρας, παρουσιάζοντας χαμηλότερες τιμές το πρωί από ότι το βράδυ (Bendelja et al., 2011).

Η προέλευση του γάλακτος είναι μέγιστης σημασίας όσον αφορά το πρωτεϊνικό προφίλ του και την περιεκτικότητα των πρωτεϊνών σε αυτό. Το πρόβειο γάλα περιέχει σχεδόν διπλάσια πρωτεΐνη από το κατσικίσιο και το αγελαδινό. Στην Εικόνα 1. παρουσιάζονται οι διαφορές στο πρωτεϊνικό προφίλ του αγελαδινού, κατσικίσιου και πρόβειου γάλακτος. Η συνολική περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη μπορεί να κυμαίνεται από 2,6 g/l έως 4,1 g/l για το κατσικίσιο γάλα, και από 4,7 g/100 g έως 7,2 g/100 g για το πρόβειο γάλα (Raynal-Ljutovac et. al, 2008). Το πρόβειο γάλα έχει υψηλότερη περιεκτικότητα σε σερίνη, αλανίνη, ιστιδίνη, βαλίνη και λυσίνη, ενώ η περιεκτικότητα σε κυστίνη και γλυκίνη είναι χαμηλότερη (Balhazar et. al, 2017). Η υψηλή θρεπτική αξία του πρόβειου γάλακτος σχετίζεται κυρίως με την περιεκτικότητα σε προλίνη, η οποία επηρεάζει την παραγωγή αιμοσφαιρίνης (Molík et al., 2012). Επιπροσθέτως, τα μικκύλια καζεΐνης από το πρόβειο και το κατσικίσιο

γάλα έχουν υψηλότερους βαθμούς ανοργανοποίησης και είναι λιγότερο ενυδατωμένα και θερμικά σταθερά από ότι τα μικκύλια καζεΐνης του αγελαδινού γάλακτος (Raynal-Ljutovac et al., 2007).



Εικόνα 1. Προφίλ των πρωτεϊνών αγελαδινού κατσικίσιου και πρόβειου γάλακτος (Cozma et al., 2011)

Στην περίπτωση του γιαουρτιού, καθώς και άλλων γαλακτομικών προϊόντων που προέρχονται από ζύμωση, όλα τα συστατικά της πρώτης ύλης συμβάλλουν στη θρεπτική αξία του τελικού προϊόντος, ενώ στο τυρί τα συστατικά που παρουσιάζουν ενδιαφέρον εξαρτώνται σε μεγαλύτερο βαθμό από τη μέθοδο παρασκευής του τυριού (Michaelidou, 2008). Το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα, κατά την επεξεργασία και την αποθήκευση υφίστανται χημικές αλλαγές, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν επιδείνωση των λειτουργικών ιδιοτήτων και των θρεπτικών τους ιδιοτήτων. Αυτές οι αντιδράσεις περιλαμβάνουν την αντίδραση Maillard, την οξειδωση των λιπιδίων, τη λιπόλυση, την πρωτεόλυση και τη διασύνδεση πρωτεϊνών (El-Salam, 2014). Σημαντικό ρόλο τόσο στην ποιοτική όσο και στην ποσοτική πρωτεϊνική σύσταση των τυροκομικών προϊόντων διαδραματίζει η διαδικασία που ακολουθείται, όπως η στράγγιση του τυρογάλακτος, ο τρόπος πήξης, η ωρίμανση, η θερμοκρασία και η διάρκεια αποθήκευσης.

Η πρωτεόλυση, σύμφωνα με τον Farkye (2014) είναι η πιο περίπλοκη διαδικασία κατά την τυροκόμηση, η έκταση της οποίας εξαρτάται από το είδος του τυριού. Τα γενικά στάδια αντίδρασης είναι:

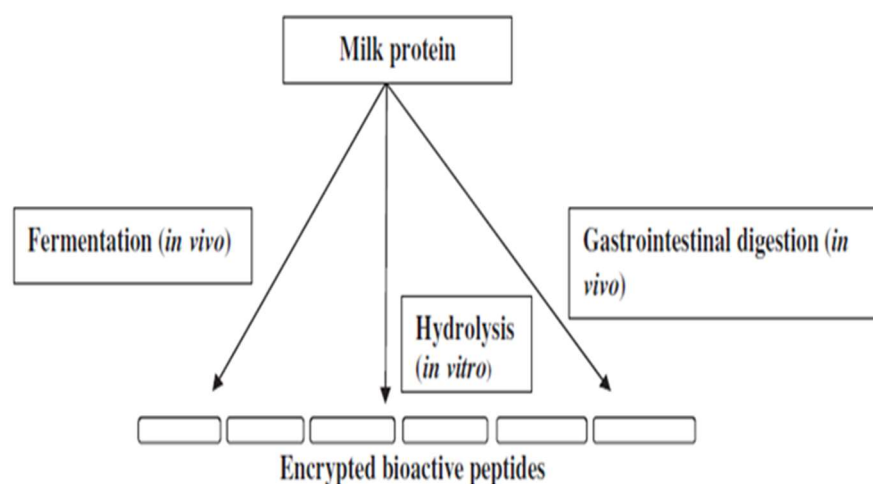
1. Αρχική υδρόλυση καζεΐνων σε μεγάλα πεπτιδία.
2. Διάσπαση των μεγάλων πεπτιδίων από πρωτεϊνάσες και πεπτιδάσες σε μεσαία και μικρά πεπτιδία.
3. Περαιτέρω υδρόλυση των μεσαίων και μικρών πεπτιδίων από πεπτιδάσες σε διπεπτιδία, τριπεπτιδία και ελεύθερα αμινοξέα.

Κατά την αντίδραση Maillard, η λακτόζη συνδέεται με τις πρωτεΐνες στις αμινομάδες της λυσίνης οδηγώντας στο σχηματισμό πιο σταθερών δομών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη πεπτικότητα των πρωτεϊνών και τη βιοδιαθεσιμότητα της λυσίνης (Erbersdobler & Somoza, 2007). Οι διεργασίες αυτές, είναι οι κυριότερες που καθορίζουν την ποσότητα και την ποιότητα των πρωτεϊνών στα τυροκομικά προϊόντα.

## 2.2 Βιοπεπτίδια τυροκομικών προϊόντων

Οι πρωτεΐνες τροφίμων μπορούν να ασκήσουν την φυσιολογική τους δράση, είτε άμεσα είτε, έμμεσα μετά την αποικοδόμησή τους, σε θραύσματα (πεπτίδια). Τα πεπτίδια αντιπροσωπεύουν μια αρκετά ετερογενή κατηγορία ενώσεων και τα χαρακτηριστικά τους εξαρτώνται από την σύνθεση τους σε αμινοξέα και από το μήκος της αλυσίδας (Tidona et. al, 2009). Τα βιοπεπτίδια έχουν οριστεί ως συγκεκριμένα θραύσματα πρωτεΐνης που έχουν θετικό αντίκτυπο στις λειτουργίες ή τις συνθήκες του σώματος και είναι πιθανό τελικά να επηρεάσουν την υγεία του ανθρώπου (Haque and Chand, 2001). Τα βιοδραστικά αυτά πεπτίδια βρίσκονται κρυπτογραφημένα σε πρωτεΐνες γάλακτος και απελευθερώνονται με ενζυματική υδρόλυση *in vivo*, κατά τη γαστρεντερική πέψη, κατά την επεξεργασία των τροφίμων ή από μικροβιακά ένζυμα στα προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση (Εικόνα 2.). Επιπλέον, τα στοιχεία ότι οι πρωτεΐνες του γάλακτος αποτελούν κύρια πηγή πολλών βιοπεπτιδίων, με διαφορετικές σημαντικές φυσιολογικές λειτουργίες, αποδεικνύουν ότι ο ρόλος τους δεν είναι μόνο να τρέφεται το νεογνό αλλά και να ρυθμίζεται η πλήρης ανάπτυξη του σώματος του (Zabielski, 2007).





Εικόνα 2. Πιθανοί μηχανισμοί για την απελευθέρωση βιοενεργών πεπτιδίων από πρωτεΐνες γάλακτος (Mohanty et al., 2016)

Πεπτίδια με διάφορες βιοδραστικότητες έχουν εντοπιστεί σε πολλά γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως σε υδρολύματα πρωτεϊνών γάλακτος, σε γάλα που έχει υποστεί ζύμωση και σε πολλές ποικιλίες τυριού (Gobbetti et. al, 2002· Korhonen and Pihlanto-Leppla, 2004). Λόγω της φυσιολογικής και φυσικοχημικής τους ευελιξίας, τα πεπτίδια του γάλακτος θεωρούνται εξαιρετικά σημαντικά συστατικά για την παραγωγή τροφίμων που προάγουν την υγεία ή για φαρμακευτικές εφαρμογές.

Τα βιοπεπτίδια παράγονται από διάφορες διατροφικές πρωτεΐνες κατά τη γαστρεντερική πέψη και τη ζύμωση, αλλά το γάλα θεωρείται ως η κύρια πηγή βιοπεπτιδίων, με συγκεκριμένες θρεπτικές, αισθητηριακές και λειτουργικές ιδιότητες. Σύμφωνα με την έρευνα των Nielsen et, al (2017) σε βάση δεδομένων, τα περισσότερα βιοπεπτίδια προέρχονται από τις κύριες πρωτεΐνες γάλακτος: 36% β-καζεΐνη, 13% α<sub>s1</sub>-καζεΐνη, 11% β-λακτοσφαιρίνη, 10% κ-καζεΐνη, 8% α<sub>s2</sub>-καζεΐνη και 5% α-λακταλβουμίνη, ενώ από τις δευτερεύουσες πρωτεΐνες γάλακτος, η λακτοφερρίνη αποτελούσε το 15% , και λιγότερο από το 1% από τις δευτερεύουσες πρωτεΐνες όπως είναι η αλβουμίνη ορού.

Η βιοδραστικότητα του γάλακτος οφείλεται κυρίως στην παρουσία της λυσοζύμης, της λακτοφερρίνης, των αυξητικών παραγόντων και των ορμονών, οι οποίες εκκρίνονται στην ενεργή τους μορφή από τον μαστικό αδένα των θηλαστικών (Tidona et. al, 2009). Πληθώρα φυσικά σχηματιζόμενων βιοπεπτιδίων βρίσκονται σε γαλακτοκομικά προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση, όπως το γιαούρτι, το



ξινόγαλα και το τυρί (Atanasova and Ivanova, 2014). Η δραστηριότητα αυτών των βιολειτουργικών πεπτιδίων βασίζεται στην εγγενή σύνθεση των αμινοξέων και την αλληλουχία τους. Το μέγεθος των ενεργών αλληλουχιών μπορεί να ποικίλλει από δύο έως είκοσι κατάλοιπα αμινοξέων και πολλά πεπτίδια είναι γνωστό ότι έχουν πολυλειτουργικές ιδιότητες (Meisel and FitzGerald 2003).

Οι πρωτεΐνες του γάλακτος, οι καζεΐνες καθώς και οι πρωτεΐνες ορού, επιδρούν στην υγεία των ανθρώπων μέσω της λανθάνουσας βιολογικής δραστηριότητας, η οποία ενεργοποιείται κατά την υδρόλυση των πρωτεϊνών από ορισμένα πρωτεολυτικά ένζυμα, και την μετατροπή τους σε πεπτίδια (Michaelidou, 2008). Τα πεπτίδια που απελευθερώνονται ονομάζονται βιοπεπτίδια, καθώς είναι ικανά να ρυθμίζουν συγκεκριμένες φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού και μπορούν να παραχθούν από τους πρόδρομες πρωτεΐνες με τους ακόλουθους τρόπους: (α) ενζυματική υδρόλυση από πεπτικά ένζυμα ή ένζυμα που προέρχονται από μικροοργανισμούς ή φυτά και (β) ζύμωση γάλακτος με πρωτεολυτικές καλλιέργειες εκκίνησης (Korhonen and Pihlanto, 2006). Κάποιες φορές, αυτές οι διεργασίες μπορεί να επικαλύπτονται, καθώς η πρωτεολυτική δράση των ενζύμων μπορεί να ξεκινήσει κατά την παραγωγή του τροφίμου, και να συνεχιστεί εντός του οργανισμού μετά την κατανάλωση (Tidona et al., 2009).

Τα διάφορα είδη τυριών που παράγονται ανά τον κόσμο και καταναλώνονται από τους ανθρώπους σε σημαντικές ποσότητες, είναι από τα βασικότερα είδη γαλακτοκομικών προϊόντων, στα οποία περιέχονται βιοπεπτίδια. Η παρουσία των πεπτιδίων, που σχηματίζονται φυσικά στο τυρί, εξαρτάται από μια λεπτή ισορροπία μεταξύ του σχηματισμού τους και της αποδόμησής τους από τα πρωτεολυτικά ένζυμα, τα οποία εμπλέκονται στην διαδικασία ωρίμανσης του τυριού (Michaelidou, 2008). Σημαντική μεταβολική δραστηριότητα εμφανίζεται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του γάλακτος με πρωτεόλυση. Η μικροβιακή πρωτεόλυση είναι εξειδικευμένη, οδηγώντας στην απελευθέρωση πολύ ισχυρών βιοδραστικών πεπτιδίων, λόγω του γεγονότος ότι τα βακτήρια γαλακτικού οξέος βασίζονται σε ένα σύνθετο πρωτεολυτικό σύστημα, το οποίο μπορεί να επηρεάσει την πιθανή απελευθέρωση βιοπεπτιδίων (Muro et. al, 2011). Επιπλέον, η πρωτεόλυση που συμβαίνει στην διάρκεια ωρίμανσης του τυριού οδηγεί στο σχηματισμό βιοπεπτιδίων, των οποίων η βιοδραστικότητα εξαρτάται από το στάδιο της ωρίμανσης. Σύμφωνα με τους Ryhänen et. al. (2001) είναι πιθανό η συγκέντρωση των βιοπεπτιδίων να αυξάνεται με την διάρκεια ωρίμανσης του τυριού.

Ως εκ τούτου, τα βιοπεπτίδια γάλακτος και γαλακτοκομικών και τυροκομικών προϊόντων δύνανται να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στη βελτίωση της υγείας των ανθρώπων, ενισχύοντας την άμυνα του οργανισμού και μειώνοντας την

πιθανότητα εμφάνισης πολλών σημαντικών και συχνών ασθενειών. Στην ενότητα που ακολουθεί αναλύονται επιμέρους οι κατηγορίες βιοπεπτιδίων με βάση την βιοδραστικότητα τους, καθώς και τα οφέλη που παρέχουν στην υγεία του ανθρώπινου οργανισμού.

## 2.3 Οφέλη βιοπεπτιδίων

Το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι ζωτικής σημασίας για τη διατροφή του ανθρώπου και είναι γνωστά ως φορείς αμινοξέων, πρωτεϊνών, λίπους, υδατοδιαλυτών βιταμινών, ασβεστίου, λιπαρών οξέων και πολλών άλλων βιοδραστικών ενώσεων μεγάλης σημασίας για διάφορες βιοχημικές και φυσιολογικές λειτουργίες (Rai & Da Silva, 2017). Πολλές μελέτες έχουν ωστόσο εστιάσει στην δράση των βιοπεπτιδίων και στα οφέλη που παρέχουν στον ανθρώπινο οργανισμό.

Τα βιοπεπτίδια προέρχονται, τόσο από τις καζεΐνες (συμπεριλαμβανομένων των  $\alpha_1$ - $\alpha_2$ - $\beta$ - και  $\kappa$ -καζεΐνης), όσο και από τις πρωτεΐνες ορού γάλακτος (συμπεριλαμβανομένης της  $\alpha$ -λακταλβουμίνης, της  $\beta$ -λακτοσφαιρίνης και της λακτοφερρίνης) (Nielsen et al., 2017). Τα βιολογικά ενεργά πεπτίδια έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκονται σε διάφορες δραστηριότητες που επηρεάζουν το πεπτικό, το καρδιαγγειακό, το ανοσοποιητικό και το νευρικό σύστημα. Συγκεκριμένα, τα αντιυπερτασικά, αντιοξειδωτικά, αντιθρομβωτικά και υποχοληστερολαιμικά πεπτίδια επηρεάζουν το καρδιαγγειακό σύστημα, τα οπιοειδή πεπτίδια, με αγωνιστική ή ανταγωνιστική δράση, ρυθμίζουν το νευρικό σύστημα, ενώ τα πεπτίδια που δεσμεύουν τα μέταλλα, τα αντιορεκτικά και τα αντιμικροβιακά ασκούν τη δράση τους στο γαστρεντερικό σύστημα (Michaelidou, 2008, Kitts & Weiler, 2003, Rizzello et al., 2005, Korhonen & Pihlanto, 2006). Επιπλέον, πολλά πεπτίδια που προέρχονται από πρωτεΐνες γάλακτος επιδεικνύουν περισσότερους από έναν τύπους δραστηριότητας και αναφέρονται ως πολυλειτουργικά πεπτίδια (López-Exposito, et al., 2007).

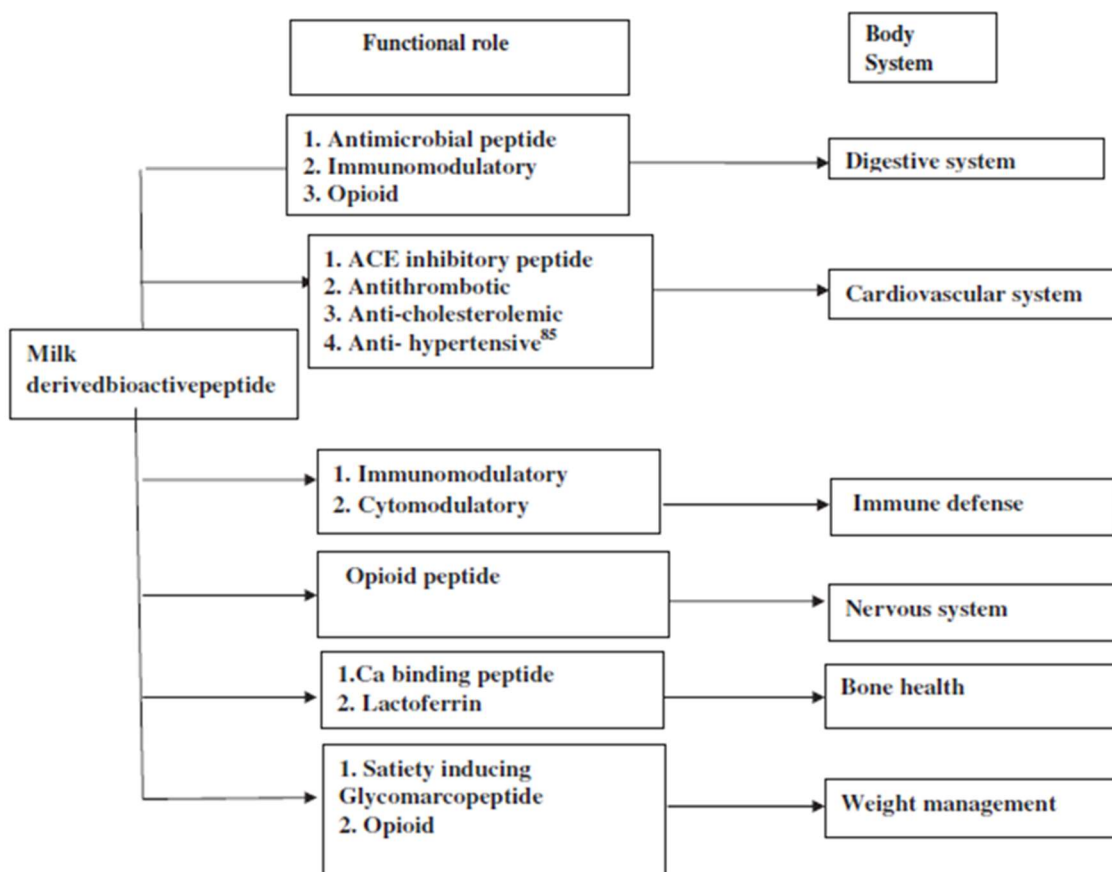
Προκειμένου να ασκήσουν την φυσιολογική τους δράση, τα βιοενεργά πεπτίδια πρέπει να φτάσουν στις θέσεις-στόχους, στην πλευρά του αυλού της εντερικής οδού ή σε συγκεκριμένα περιφερειακά όργανα μετά την απορρόφηση. Τα βιοπεπτίδια, τα οποία δρουν ως βιολογικοί ρυθμιστές ή νευροδιαβιβαστές, μπορεί να εκφράζουν μια ποικιλία λειτουργιών, είτε στο γαστρεντερικό σωλήνα, στο εντερικό επιθήλιο ή μετά από συστηματική απορρόφηση στην κυκλοφορία (Shimizu, 2004).

Τα βιοπεπτίδια των πρωτεϊνών γάλακτος έχουν διαχωριστεί με βάση την βιολογική τους δράση (Εικόνα 3) στις εξής κατηγορίες:

- Πεπτίδια-Αναστολείς του ενζύμου ACE (Angiotensin-converting enzyme) /Αντιυπερτασικά πεπτίδια: Ρυθμίζουν την αρτηριακή πίεση και την ισορροπία των υγρών και των αλάτων στο σώμα (Korhonen & Pihlanto, 2006, Ricci, Artacho & Olalla, 2010).
- Ανοσοτροποποιητικά πεπτίδια: Ενισχύουν τις λειτουργίες του ανοσοποιητικού των κυττάρων, τη σύνθεση των αντισωμάτων και τις ρυθμίσεις του κυτοχρώματος, επίσης, μπορούν να μειώσουν τις αλλεργικές αντιδράσεις και να ενισχύσουν την ανοσία του βλεννογόνου στο γαστρεντερικό σωλήνα (Kamou et al., 2010).
- Κυτταροτροποποιητικά πεπτίδια: Ρυθμίζουν τη βιωσιμότητα (π.χ. πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση) διαφορετικών τύπων κυττάρων. Ενώ, μαζί με τα ανοσοτροποποιητικά πεπτίδια, συμβάλλουν προστατευτικά στην ανάπτυξη όγκων (Kamou et al., 2010).
- Οπιοειδή πεπτίδια: Ρυθμίζουν τη λειτουργία του εντέρου, ενισχύουν την καθαρή απορρόφηση του νερού και των ηλεκτρολυτών και δρουν ως αντιδιαρροϊκοί παράγοντες (Hartmann & Meisel, 2007).
- Αντιμικροβιακά πεπτίδια: Δρουν ενάντια σε διαφορετικά Gram-θετικά και Gram-αρνητικά παθογόνα βακτήρια και μύκητες (López-Exposito, Amigo & Recio, 2007).
- Αντιϊικά πεπτίδια: Αναστέλλουν την δράση ανθρώπινων απλό ιών, όπως ο ιός του έρπητα και ο HIV (Kamou et al., 2010).
- Αντιθρομβωτικά πεπτίδια: Αναστέλλουν τη συσσώρευση αιμοπεταλίων και τη σύνδεση του ινωδογόνου στους υποδοχείς της επιφάνειας των αιμοπεταλίων (Korhonen & Pihlanto, 2006).
- Πεπτίδια δέσμωσης μετάλλων: Προωθούν την επαναμεταλλοποίηση του σμάλτου των δοντιών έπειτα από βλάβες, ενισχύουν την απορρόφηση ασβεστίου από το έντερο (Hartmann & Meisel, 2004).
- Αντιοξειδωτικά πεπτίδια: Αποτρέπουν την ενζυματική και μη ενζυματική υπεροξειδωση των απαραίτητων λιπαρών οξέων (Hartmann & Meisel, 2007).
- Υποχοληστερολαιμικά πεπτίδια: Ρυθμίζουν τα επίπεδα χοληστερόλης στο αίμα (Korhonen & Pihlanto, 2006).
- Πεπτίδια-αναστολείς της διπεπτιδυλοπεπτιδάσης-4 (DPP-IV inhibitory): Μειώνουν τα μετά-γευματικά επίπεδα γλυκόζης και διεγείρουν την

απελευθέρωση ινσουλίνης σε υγιή άτομα και άτομα με διαβήτη τύπου II (Tirapano et al., 2011).

- Πεπτίδια με αντιελκογόνο δράση: Προστατεύουν το βλεννογόνο του στομάχου από ελκώδεις βλάβες (Tavares et al., 2011).



Εικόνα 3. Ο ρόλος των βιοπεπτιδίων γάλακτος στον οργανισμό (Mohanty et al., 2015)

Παρακάτω αναλύονται οι σημαντικότερες κατηγορίες βιοδραστικών πεπτιδίων, ο ρόλος τους, η προέλευση τους, καθώς και ο μηχανισμός δράσης τους:

Πεπτίδια-Αναστολείς του ενζύμου ACE (Angiotensin-converting enzyme)/Αντιυπερτασικά πεπτίδια/ Αντιθρομβωτικά

Μεταξύ των βιοδραστικών πεπτιδίων που προέρχονται από πρωτεΐνες γάλακτος, αυτά που δρουν στη μείωση της αρτηριακής πίεσης λαμβάνουν ιδιαίτερη προσοχή. Η υπέρταση είναι ο κύριος παράγοντας κινδύνου που σχετίζεται με τις

καρδιαγγειακές νόσους (Michaelidou, 2008). Το επιστημονικό ενδιαφέρον έχει επικεντρωθεί στα πεπτίδια που μπορούν να μειώσουν την αρτηριακή πίεση σε υπερτασικούς ασθενείς, καθώς η υπέρταση είναι μια ασθένεια που αυξάνεται με ιδιαίτερα υψηλούς ρυθμούς, ειδικά στις ανεπτυγμένες χώρες (FitzGerald et al., 2004).

Δεδομένου λοιπόν, ότι η υπέρταση γίνεται ολοένα πιο διαδεδομένη παγκοσμίως, οι ερευνητές έχουν επικεντρωθεί κυρίως στην αξιολόγηση των αντιυπερτασικών πεπτιδίων και στον τρόπο δράσης τους έναντι καρδιαγγειακών νοσημάτων (Mohanty et al., 2016). Τα πεπτίδια-αναστολείς του ACE που προέρχονται από τρόφιμα παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον, καθώς αποτελούν φυσική πρόληψη για τον έλεγχο της υπέρτασης, και θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε μείωση της χρήση φαρμάκων, που είναι γνωστό ότι πιθανά να έχουν ισχυρές παρενέργειες (Punia et al., 2020). Τα βιοπεπτίδια που προέρχονται από το γάλα, ή άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα, επιδρούν στο καρδιαγγειακό σύστημα, κυρίως μέσω αντιθρομβωτικών, αντιυπερτασικών, και πεπτιδίων-αναστολέων του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης I.

Τα αντιυπερτασικά βιοπεπτίδια αναστέλλουν το ένζυμο μετατροπής της αγγειοτενσίνης I (ACE, angiotensin converting enzyme, EC 3.4.15.1), που εμπλέκεται στο σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης, και το οποίο ρυθμίζει μερικώς την αρτηριακή πίεση (Clare & Swaisgood, 2000). Αυτό το ένζυμο είναι υπεύθυνο για τη μετατροπή της αγγειοτενσίνης I σε αγγειοτενσίνη II, η οποία είναι ένα ισχυρό αγγειοσυσταλτικό (Tidona et. al, 2009), καθώς και για την αποικοδόμηση της βραδυκινίνης, η οποία έχει αγγειοδιασταλτική δράση (Coates, 2003). Η αναστολή του ενζύμου αυτού, μπορεί να ασκήσει υποτασική δράση, και μπορεί επίσης να επηρεάσει διαφορετικά ρυθμιστικά συστήματα που εμπλέκονται στο ανοσοποιητικό και στη δραστηριότητα του νευρικού συστήματος (Meisel, 1997).

Οι πρωτεΐνες του γάλακτος έχουν χαρακτηριστεί ως σημαντική πηγή βιοπεπτιδίων αναστολέων του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης I, είτε από τις καζεΐνες του γάλακτος (καζοκινίνες), είτε από τις πρωτεΐνες του ορού γάλακτος (λακτοκινίνες) (FitzGerald, Murray & Walsh, 2004). Διαφορετικοί τύποι τυριού πρόβειου γάλακτος και γιαουρτιού πρόβειου γάλακτος έχουν περιγραφεί ως πηγές ανασταλτικών πεπτιδίων του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης (ACE), τα περισσότερα προέρχονται από τη β-υπομονάδα της καζεΐνης (Papadimitriou et al., 2007, Meira et al., 2012). Τέλος, η δράση αυτή ανιχνεύθηκε και σε πεπτίδια που αντιστοιχούν σε αλληλουχίες τόσο της β-λακτοσφαιρίνης όσο και της α-λακταλβουμίνης (Mullally, Meisel, & FitzGerald, 1996). Οι αναστολείς του ACE είναι

διπεπτιδία ή τριπεπτιδία που περιέχουν προλίνη, λυσίνη ή αργινίνη στο καρβοξυτελικό άκρο τους (Mohanty et al., 2015).

Όπως τα αντιυπερτασικά πεπτιδία, έτσι και τα αντιθρομβωτικά συμβάλλουν στην πρόληψη καρδιαγγειακών νόσων που τόσο απασχολούν τις σύγχρονες κοινωνίες. Τα αντιθρομβωτικά πεπτιδία υπάρχουν στο γάλα και στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην πήξη του γάλακτος, οι οποίοι ορίζονται από την αλληλεπίδραση της κ-καζεΐνης με τη χυμοσίνη και οι μηχανισμοί πήξης του αίματος, που ορίζονται από την αλληλεπίδραση του ινωδογόνου με τη θρομβίνη, είναι παρόμοιοι (Clare & Swaisgood, 2000). Από αυτή την άποψη, το καρβοξυτελικό τελικό δωδεκαπεπτιδίο της γ-αλυσίδας του ανθρώπινου ινωδογόνου και το εντεκαπεπτιδίο από την κ-καζεΐνη, εμφανίζουν δομικές και λειτουργικές ομοιότητες (Clare & Swaisgood, 2000).

Τα αντιθρομβωτικά πεπτιδία προέρχονται επίσης, από κ-καζεΐνογλυκοπεπτιδία που έχουν απομονωθεί από το γάλα διάφορων ζωικών ειδών. Τα καρβοξυτελικά υπολείμματα της κ-καζεΐνης, ή του κ-καζεΐνογλυκοπεπτιδίου, μειώνουν την επαγόμενη, από τη θρομβίνη και το κολλαγόνο, συσσώρευση αιμοπεταλίων στο αίμα (Qian et al., 1995), με αποτέλεσμα την μείωση της πιθανότητας δημιουργίας θρόμβων. Τα καζεΐνομακροπεπτιδία από πρόβειο γάλα έχει αναφερθεί ότι παρουσιάζουν ιδιότητες κατά της συσσώρευσης αιμοπεταλίων και η δράση αυτή αυξήθηκε μετά από υδρόλυση με θρυψίνη (Qian et al., 1995). Τέλος, η επαγόμενη από τη θρομβίνη συσσώρευση αιμοπεταλίων, αναστέλλεται με πεπτιδία που προέρχονται από την πέψη της λακτοφερρίνης με πεψίνη (Clare & Swaisgood, 2000).

#### Ανοσοτροποποιητικά πεπτιδία/Κυτταροτροποποιητικά πεπτιδία

Μία ακόμα κατηγορία βιοπεπτιδίων, που προέρχονται από το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα, με βάση την δράση τους στον ανθρώπινο οργανισμό, είναι τα ανοσοτροποποιητικά πεπτιδία. Σύμφωνα με τους Punia et al. (2020), ανοσοτροποποιητικά πεπτιδία προέρχονται από διάσπαση, τόσο των καζεϊνών, όσο και των πρωτεϊνών ορού γάλακτος. Τα ανοσοτροποποιητικά βιοπεπτιδία, επηρεάζουν το ανοσοποιητικό σύστημα, καθώς και τις αποκρίσεις πολλαπλασιασμού των κυττάρων (Clare & Swaisgood, 2000). Η δράση των πεπτιδίων αυτών, σχετίζεται με τη διέγερση και τον πολλαπλασιασμό των ανθρώπινων λεμφοκυττάρων, τη φαγοκυτταρική δραστηριότητα των μακροφάγων, τη σύνθεση αντισωμάτων και τη ρύθμιση της κυτοκίνης (Clare et al., 2003).

Τα ανοσοτροποποιητικά βιοπεπτίδια, που αποτελούν προϊόντα υδρόλυσης της καζεΐνης, αποδείχθηκε, ότι αυξάνουν τη φαγοκυτταρωτική δραστηριότητα των ανθρώπινων μακροφάγων, και δρουν έναντι της γήρανσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων (Fiat et al., 1993). Επίσης, αρκετά πεπτίδια από β-καζεΐνη, τα οποία ήταν υπεύθυνα για φαγοκυτταρώσεις στους ανθρώπους, ανέστειλαν τη μόλυνση από *Klebsiella pneumoniae* σε ποντίκια in vivo (Migliore-Samour & Jolle's, 1988). Επιπλέον, τα γλυκοπεπτίδια, οι ορμόνες και τα θραύσματα πεπτιδίων που προέρχονται από ανοσοσφαιρίνες (Ig) ορίζονται γενικά ως τα ανοσοτροποποιητικά βιοενεργά πεπτίδια, τα οποία μεσολαβούν στο χυμικό και κυτταρικό ανοσοποιητικό σύστημα του σώματος. Ενώ, το γλυκομακροπεπτίδιο (GMP) και τα παράγωγά του έχει αποκαλυφθεί, ότι εκτελούν βασικές ανοσοτροποποιητικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένων των ανοσοκατασταλτικών επιδράσεων στην παραγωγή αντισωμάτων ανοσοσφαιρίνης G (IgG) (Manso & Lopez-Fandin, 2004). Τέλος πολλαπλή βιοδραστικότητα φαίνεται πως έχουν οι καζοκίνες, οι οποίες όπως έχει ήδη αναφερθεί δρουν ως αναστολείς του ενζύμου ACE, υπεύθυνο για την αδρανοποίηση της βραδυκίνης, μιας ορμόνης με επίδραση στο ανοσοποιητικό σύστημα (Clare & Swaisgood, 2000).

Τα κυτταροτροποποιητικά βιοπεπτίδια σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού, αφού δρουν αναστέλλοντας την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων, μέσω της ενεργοποίησης και της διέγερσης των ικανών κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος (Meisel & FitzGerald, 2003). Επιπλέον, ορισμένα κυτταροτροποποιητικά βιοπεπτίδια, που προέρχονται από  $\alpha_{s1}$ -καζεΐνη, έχουν επιδείξει κυτταροτοξική δράση έναντι πολλών κυτταρικών σειρών. Αυτά τα κυτταροτοξικά βιοπεπτίδια θεωρούνται πολύτιμα υλικά για την ανάπτυξη αντισηπτικών και καρκινοστατικών φαρμάκων (Kameli-Alamdari & Ehsani, 2017).

#### Αντιμικροβιακά/Αντιικά πεπτίδια

Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες του γάλακτος είναι ευρέως αναγνωρισμένες εδώ και πολλά χρόνια και αποδίδεται κυρίως σε ανοσοσφαιρίνες, στη λακτοφερρίνη, στη λακτοϋπεροξειδάση και στη λυσοζύμη (Atanasova & Ivanova, 2010). Οι πρωτεΐνες αυτές, εκκρίνονται στην ενεργή τους μορφή από τον μαστικό αδένα (Tidona et al., 2009). Έτσι, παρέχεται προστασία από τα παθογόνα μικρόβια στα νεογνά που θηλάζουν. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι οι πρωτεΐνες του γάλακτος δύναται να δράσουν και ως πρόδρομοι αντιμικροβιακών βιοπεπτιδίων, και με αυτόν τον τρόπο ενισχύουν τη φυσική άμυνα του οργανισμού έναντι των παθογόνων εισβολέων (Atanasova & Ivanova, 2010), όπως βακτήρια μύκητες, αλλά και ιούς. Ακόμη, έχει



αναφερθεί ότι οι βιοδραστικές πρωτεΐνες και τα βιοπεπτίδια που προέρχονται από το γάλα, μπορούν να παράσχουν μη ανοσολογική άμυνα και έλεγχο των μικροβιακών λοιμώξεων στον ανθρώπινο οργανισμό (McCann et al., 2005). Οι Tomita et al. (1991) ανέφεραν για πρώτη φορά την ενζυματική απελευθέρωση αντιβακτηριακών πεπτιδίων από την πρόδρομη λακτοφερρίνη.

Τα βιοπεπτίδια αυτά μπορούν να ασκήσουν αντιμικροβιακή δράση παρόμοια με τα αντιβιοτικά, με πιθανή εφαρμογή τους ως φυσικές εναλλακτικές λύσεις (Hayes et al., 2007), είτε εξαλείφοντας, είτε καταστέλλοντας την ανάπτυξη των παθογόνων μικροοργανισμών (Kameli-Alamdari & Ehsani 2017). Τα αντιμικροβιακά βιοπεπτίδια μπορεί να προέρχονται από διάφορες πρωτεΐνες που περιέχονται στο γάλα, συμπεριλαμβανομένων της  $\alpha_{s1}$ -καζεΐνης και της  $\alpha_{s2}$ -καζεΐνης (Pritchard, 2012). Επίσης, διάφορα αντιβακτηριακά πεπτίδια προέρχονται από  $\alpha$ -λακταλβουμίνη και  $\beta$ -λακτοσφαιρίνη (Pellegrini et al., 2001) και  $\kappa$ -καζεΐνη (Malkoski et al., 2001).

Τα αντιμικροβιακά πεπτίδια είναι θετικά φορτισμένα ολιγοπεπτίδια, μήκους 12-50 αμινοξέων και σχηματίζουν δευτερεύουσες δομές, οι οποίες περιλαμβάνουν  $\alpha$ -έλικες,  $\beta$ -φύλλα, βρόχους ή παραμένουν ως εκτεταμένα ολιγοπεπτίδια (Wang et al., 2016). Τα αντιμικροβιακά πεπτίδια δρουν μέσω διαφόρων μηχανισμών, αλλά κοινό χαρακτηριστικό τους είναι η αλληλεπίδρασή τους με την κυτταρική μεμβράνη-στόχο, με αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητας της μεμβράνης, ενώ το θετικό τους φορτίο ευνοεί την έλξη με την αρνητικά φορτισμένη μικροβιακή κυτταρική μεμβράνη (Mohanty et al., 2016).

Ένα από τα ισχυρότερα αντιμικροβιακά πεπτίδια που έχουν περιγραφεί, αντιστοιχεί σε ένα θραύσμα της πρωτεΐνης ορού γάλακτος, την λακτοφερρίνη, το οποίο ονομάζεται λακτοφερρικήνη (LFcin), ενώ, και άλλες πρωτεΐνες του ορού γάλακτος όπως η  $\alpha$ -λακταλβουμίνη και η  $\beta$ -λακτοσφαιρίνη έχουν επίσης θεωρηθεί ως πιθανοί πρόδρομοι αντιβακτηριακών πεπτιδίων (Atanasova & Ivanova, 2010). Η λακτοφερρικήνη εμφανίζει βακτηριοκτόνες ιδιότητες πιο ισχυρές από την άπεπτη λακτοφερρίνη, υποδηλώνοντας ότι το πολύ μικρότερο μέγεθος του μπορεί να διευκολύνει την πρόσβαση σε θέσεις στόχους στη μικροβιακή επιφάνεια (Meisel, 1998). Επιπλέον, θεωρείται ότι η λακτοφερρικήνη μπορεί να δράσει τόσο κατά των Gram-θετικών, όσο και κατά των Gram-αρνητικών βακτηρίων (Lopez-Esposito & Recio, 2006), αναστέλλοντας τη σύνθεση των βακτηριακών πρωτεϊνών. Παράλληλα, παρουσιάζει αντιμυκητιακές, αντικαρκινικές και αντιϊκές ιδιότητες, λόγω της πλούσιας αναλογίας σε τρυπτοφάνη και αργινίνη, καθώς και αντιφλεγμονώδεις και ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες λόγω της θετικά φορτισμένης περιοχής του μορίου (Vogel et al., 2002). Επιπροσθέτως, ως αντιβακτηριακά, έχουν ταυτοποιηθεί



και πεπτίδια, τα οποία αποτελούν προϊόν υδρόλυσης της  $\alpha_2$ -καζεΐνης από πεψίνη (Lopez-Exposito et al., 2006).

Ένα ακόμα βιοπεπτίδιο με αντιμικροβιακή δράση είναι η καζεκιδίνη, το οποίο λαμβάνεται με πέψη της καζεΐνης με χυμοσίνη σε ουδέτερο pH, και είναι ένα από τα πρώτα βιοπεπτίδια που απομονώθηκαν και παρουσίασαν *in vitro* δράση έναντι των *Staphylococcus*, *Sarcina*, *Bacillus subtilis*, *Diplococcus pneumoniae* και *Streptococcus pyogenes* (Lahon & Regelson, 1996).

Τέλος, πολλά βιοπεπτίδια παρουσιάζουν αντιική δράση εναντίων πολλών παθογόνων ιών που προσβάλλουν τον ανθρώπινο οργανισμό. Για παράδειγμα, πεπτίδια που προέρχονται από την λακτοφερρίνη εμφανίζουν αντιική δράση κατά των ιών της πολιομυελίτιδας, της ηπατίτιδας C, B και G, του ιού του απλού έρπητα, του HIV-1, καθώς και των ροταϊών (Farnaud & Evans, 2003, Pan et al., 2007). Επιπρόσθετα, και συνεργικά με τα βιοπεπτίδια, ορισμένες άθικτες πρωτεΐνες γάλακτος μπορούν να συμμετάσχουν στην άμυνα του ξενιστή, με αντιική δράση να έχει αναφερθεί *in vivo* σε ποντίκια και αρουραίους (Pan et al., 2006).

### Οπιοειδή πεπτίδια

Μελέτες έχουν αναδείξει, ότι η κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων δύναται να προκαλέσει αλληλεπιδράσεις με το νευρικό σύστημα μέσω της δράσης των οπιοειδών βιοπεπτιδίων (Tidona et al., 2009). Πρόκειται για σύμπλοκα που συνδέονται με υποδοχείς και παρουσιάζουν αγωνιστική ή ανταγωνιστική δράση, τα οποία εντοπίζονται στο νευρικό, ενδοκρινικό και ανοσοποιητικό σύστημα, καθώς και στο γαστρεντερικό σωλήνα των θηλαστικών (Brantl, 1984), και μπορούν να αλληλεπιδράσουν είτε με ενδογενή σύμπλοκα (που συντίθενται φυσιολογικά από τον οργανισμό), ή με εξωγενή (που εισάγονται στον οργανισμό μέσω της τροφής) (Tidona et al., 2009). Μέσω αυτής της αλληλεπίδρασης, μπορούν να επηρεάσουν την αρτηριακή πίεση, τη διακύμανση της θερμοκρασίας του σώματος, την απώλεια όρεξης, τη σεξουαλική συμπεριφορά καθώς και να φέρουν αλλαγές στο κεντρικό ή περιφερικό νευρικό σύστημα (Molina & Abumrad, 1994, Dziuba et al., 1999).

Υπάρχουν κυρίως τρεις τύποι υποδοχέων οπιοειδών: ο τύπος  $\mu$  που ρυθμίζει τη συναισθηματική συμπεριφορά και την εντερική κινητικότητα, ο τύπος  $\delta$  που σχετίζεται με τη συναισθηματική συμπεριφορά και ο τύπος  $\kappa$  που ρυθμίζει την ήρεμη κατάσταση του ατόμου, και την όρεξη (Tidona et al., 2009). Όπως ήδη αναφέρθηκε, τα οπιοειδή βιοπεπτίδια μπορούν να παρουσιάσουν αγωνιστική ή ανταγωνιστική δράση. Τα οπιοειδή πεπτίδια με αγωνιστική δράση, ρυθμίζουν την ανάπτυξη και τη λειτουργία των κυττάρων που εμπλέκονται στο κεντρικό νευρικό

σύστημα (Calvo et al., 2000), ενώ αυτά με ανταγωνιστική δράση μπορούν να καταστείλουν την δράση της εγκεφαλίνης και άλλων ενδογενών και εξωγενών συμπλόκων με αγωνιστική δράση (Nielsen et al., 2017).

Από τα πρώτα οπιοειδή πεπτιδία γάλακτος που ανακαλύφθηκαν, είναι οι β-καζομορφίνες (Teschemacher, 2003), που είναι θραύσματα β-καζεΐνης μεταξύ των θέσεων 60 και του 70 στην σειρά των αμινοξέων, κυρίως f (60-63), f (60-64), f (60-65), f (60-66) και f (60-70), τα οποία ταξινομούνται και ως σύμπλοκα υποδοχέα τύπου μ (Smacchi & Gobetti, 2000, Koch, Wiedemann & Teschemacher, 1985) και ονομάζονται έτσι λόγω της ομοιότητας τους με την μορφίνη. Οι β-καζομορφίνες μπορούν να ρυθμίζουν την απορρόφηση των αμινοξέων και τη μεταφορά ηλεκτρολυτών επιβραδύνοντας τον χρόνο της εντερικής διέλευσης τους (Meisel & Schlimme, 1994). Επιπλέον, οι β-καζομορφίνες μπορούν να μεταφερθούν μέσω των νεογνικών μεμβρανών των βλεννογόνων που ρυθμίζουν τις φυσιολογικές αποκρίσεις, και μπορούν να προκαλέσουν ύπνο και ηρεμία στα παιδιά (Calvo et al., 2000).

Βιοπεπτιδία που επηρεάζουν το νευρικό σύστημα είναι επίσης οι εξορφίνες (που ονομάζονται φορμόνες ή ορμόνες τροφίμων), και πρόκειται κυρίως για πεπτιδία που προέρχονται από την  $\alpha_{s1}$ -καζεΐνη, τα οποία παρουσιάζουν ιδιότητες παρόμοιες με το όπιο (μορφίνη) (Meisel and Schlimme, 1990). Οι εξορφίνες μπορούν να προκαλέσουν άπνοια και ακανόνιστη αναπνοή, να ρυθμίσουν το μοτίβο του ύπνου, καθώς και να διεγείρουν την απελευθέρωση της ινσουλίνης και της σωματοστατίνης. (Χυ, 1998). Πλήθος στοιχείων, καταδεικνύουν, ότι τα οπιοειδή πεπτιδία μειώνουν την όρεξη για τροφή σε πολλά ζωικά είδη, συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπων, και μπορούν έτσι να αποτελέσουν πιθανή θεραπεία κατά της παχυσαρκίας (Clapham et al., 2001).

Επίσης, με την ενζυματική πρωτεόλυση της α-λακτοαλβουμίνης, μπορεί να απελευθερωθεί η α-λακτορφίνη που συνδέεται με υποδοχείς οπιοειδών και έχει δραστηριότητες παρόμοιες με τα οπιοειδή πεπτιδία. Τέλος, μια άλλη κατηγορία βιοπεπτιδίων, που δρουν ανταγωνιστικά και καταστέλλουν την δράση των αγωνιστικών πεπτιδίων, είναι οι καζοξίνες, πηγή προέλευσης των οποίων είναι η κ- και η  $\alpha_{s1}$ -καζεΐνη (Chiba et al., 1989).

### Πεπτιδία δέσμμευσης μετάλλων

Οι κυριότεροι εκπρόσωποι αυτής της κατηγορίας βιοδραστικών πεπτιδίων είναι τα φωσφοπεπτιδία που απελευθερώνονται από την υδρόλυση της καζεΐνης, κυρίως με θρυψίνη, και ονομάζονται καζεΐνοφωσφοπεπτιδία (CPPs). Τα βιοπεπτιδία αυτά

ενισχύουν την δέσμευση απαραίτητων στοιχείων για τον οργανισμό και επιτρέπουν την πρόληψη διαφόρων ασθενειών που προκαλούνται από την έλλειψή τους, όπως η οστεοπόρωση, η τερηδόνα, η υπέρταση και η αναιμία (Tidona et al., 2009). Επίσης, τα καζεΐνοφωσφοπεπτίδια έχουν την δυνατότητα να καθαρίζουν τις ελεύθερες ρίζες περοξυλίου, καθώς και να καθιστούν χηλικά, μέταλλα μεταπτώσεως ασβεστίου, σιδήρου, χαλκού και ψευδαργύρου (Diaz et al., 2003, Diaz & Decker, 2004), και να δρουν ως αντιοξειδωτικά.

Τα καζεΐνοφωσφοπεπτίδια, προέρχονται από την *in vitro* και/ή *in vivo* πέψη της  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$  ή  $\beta$ -καζεΐνης (Meisel et al., 2003). *In vivo* προέρχονται από την πέψη της καζεΐνης από πρωτεάσες του γαστρεντερικού, και *in vitro* παράγονται από την πρωτεολυτική υδρόλυση του καζεϊνικού νατρίου, με πέψη με ένζυμα όπως η χυμοσίνη και με υδρόλυση από την αλκαλάση (Kim et al., 2007). Παράγονται έτσι, πεπτίδια με ποικίλα επίπεδα αμινοξέων όπως γλυκίνη, σερίνη, γλουταμικό οξύ, ιστιδίνη, τυροσίνη, προλίνη και λευκίνη (Kim et al., 2007).

Ο μηχανισμός της δράσης των CPPs φαίνεται να σχετίζεται με την παρουσία, στην αλληλουχία των αμινοξέων τους, μιας ομάδας τριών υπολειμμάτων φωσφοσερίνης που ακολουθούνται από δύο υπολείμματα γλουταμικού οξέος (SerP-SerP-SerP-Glu-Glu) (Michaelidou, 2008, Meisel et al., 1997). Αυτή η αλληλουχία παράγει, στο εντερικό pH, έναν αρνητικά φορτισμένο πυρήνα, υπεύθυνο για τη δέσμευση μετάλλων (Ca, Zn, Mg) και για την αντίσταση αυτών των πεπτιδίων στα πρωτεολυτικά γαστρεντερικά ένζυμα (Michaelidou, 2008, Clare & Swaisgood, 2000). Επίσης, λόγω της αλληλουχίας αυτής, αυξάνεται η παθητική διάχυση του ασβεστίου (Ca) *in vivo*, αυξάνοντας τη διαλυτότητα του στο φυσιολογικό pH του απομακρυσμένου λεπτού εντέρου (Michaelidou, 2008).

### Αντιοξειδωτικά πεπτίδια

Η υπερβολική παρουσία ελεύθερων ριζών στον οργανισμό έχει ως αποτέλεσμα την πρόκληση οξειδωτικής βλάβης. Όταν συμβαίνει αυτό, οι κυτταρικές πρωτεΐνες, τα λιπίδια των μεμβρανών, το DNA και τα ένζυμα καταστρέφονται, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε διάφορες ασθένειες όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, ο διαβήτης, η αθηροσκλήρωση, η οξειδωτική βλάβη του DNA, μπορεί να προκαλέσει ακόμα και καρκίνο (Halliwell & Whiteman, 2004). Τα αντιοξειδωτικά πεπτίδια από γαλακτοκομικά προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση, μπορούν είτε να αποτρέψουν το σχηματισμό ελεύθερων ριζών, είτε να καθαρίσουν τις υπάρχουσες ελεύθερες ρίζες ή τα υπεροξειδία που εμπλέκονται στην διαδικασία της οξειδωσης των

λιπιδίων της μεμβράνης, των κυτταρικών πρωτεϊνών, του DNA και των ενζύμων (Pihlanto, 2006).

Τα αντιοξειδωτικά βιοπεπτίδια που έχουν αναγνωρισθεί έχουν μήκος 2 έως 14 αμινοξέων (Nielsen et al., 2017). Έχει διαπιστωθεί, ότι τα περισσότερα αντιοξειδωτικά πεπτίδια περιέχουν υδρόφοβα αμινοξέα στο άζωτο-τελικό άκρο και/ή στο καρβοξύ-τελικό άκρο και προλίνη, ιστιδίνη ή τυροσίνη εντός της αλληλουχίας τους (Li & Li, 2013). Τα υδρόφοβα τμήματα πιθανά αυξάνουν την αλληλεπίδραση μεταξύ των βιοπεπτιδίων και των ριζών λιπαρών οξέων. Η ιστιδίνη είναι υπεύθυνη για την χήλωση και την παγίδευση των ριζών και η τυροσίνη μπορεί να δώσει υδρογόνο, και έτσι να μειώσει τις ελεύθερες ρίζες (Li & Li, 2013). Τα περισσότερα αντιοξειδωτικά βιοπεπτίδια φαίνεται να προέρχονται από την υδρόλυση της καζεΐνης, από πρωτεολυτικά ένζυμα (Korhonen και Pihlanto, 2003, Suetsuna et al., 2000, Rival et al., 2001).

Τα βιοπεπτίδια με αντιοξειδωτική δράση αποτελούν φυσική λύση έναντι των τεχνητών αντιοξειδωτικών που χρησιμοποιούνται (περιορισμένα σε πολλές χώρες), και μπορεί να έχουν δυσμενείς επιπτώσεις στον οργανισμό. Φυσικές ουσίες, όπως οι βιταμίνες (C και E), η β-καροτίνη και τα αντιοξειδωτικά ενζυμικά συστήματα (καταλάση, υπεροξειδική δισμουτάση και υπεροξειδάση γλουταθειόνης), χρησιμοποιούνται για την παραγωγή φυσικών αντιοξειδωτικών πεπτιδίων (Lindmark-Månsson & Åkesson, 2000). Σε αυτή την κατηγορία των φυσικών αντιοξειδωτικών ουσιών ανήκουν και τα αντιοξειδωτικά βιοπεπτίδια του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων.

#### Πεπτίδια-αναστολείς της διπεπτιδυλοπεπτιδάσης-4 (DPP-IV inhibitory)

Ο διαβήτης τύπου 2, είναι η πιο διαδεδομένη μορφή διαβήτη, και μια από τις ταχύτερα αναπτυσσόμενες ασθένειες παγκοσμίως, και χαρακτηρίζεται από την παρουσία υπεργλυκαιμίας κατά τη νηστεία, καθώς και από μετά-γευματική υπεργλυκαιμία (Sebokova et al., 2007). Το DPP-IV είναι μια διπεπτιδυλοπεπτιδάση, η οποία υδρολύει και αδρανοποιεί τις ορμόνες ινκρετίνης, το εξαρτώμενο από τη γλυκόζη ινσουλινοτροπικό πολυπεπτίδιο (GIP), το πεπτίδιο-1 (GLP-1) που μοιάζει με γλυκαγόνο, και το πεπτίδιο YY (PYY) (Nongonierma & FitzGerald, 2016). Εκφράζεται τόσο σε μεμβρανικές, όσο και σε διαλυτές μορφές σε διάφορα κύτταρα, ιδιαίτερα όμως στους επιθηλιακούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του ήπατος, των νεφρών και του εντέρου (Lambeir et al., 2003, Lorey et al., 2003, Thoma et al., 2003).

Οι ινκρετίνες, και τα πεπτίδια GIP και GLP-1, αποτελούν θεραπείες του διαβήτη τύπου 2. Ωστόσο, έχουν πολύ σύντομο χρόνο ημιζωής, λόγω της νεφρικής αποικοδόμησης και πρωτεολυτικής διάσπασης τους από το ένζυμο διπεπτιδυλοπεπτιδάση (DPP)-IV (EC 3.4.14.5) (Mentlein, 2005). Παρόλα αυτά, η αναστολή του DPP-IV μπορεί να αποτρέψει την αποικοδόμηση τους, επιτρέποντας έτσι τη διατήρηση της ινσουλινοτροπικής τους δραστηριότητας κατά τη μεταγευματική φάση (Drucker, 2006). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει, ότι τα πεπτίδια που προέρχονται από πρωτεΐνες γάλακτος έχουν την ικανότητα να αναστείλουν την δράση του DPP-IV (Silveira et al., 2013, Tulipano et al., 2011, Lacroix & Li-Chan, 2012).

Τα πεπτίδια αυτά κυμαίνονται σε μήκος από 2 έως 14 αμινοξέα, και μισές από τις αλληλουχίες περιέχουν προλίνη στη δεύτερη θέση από το άζωτο-τελικό άκρο, υποδεικνύοντας ένα πιθανό δομικό μοτίβο για πεπτίδια αναστολείς του DPP-IV (Nielsen et al., 2017). Και καθώς οι πρωτεΐνες γάλακτος είναι πλούσιες σε υπολείμματα προλίνης, ένας μεγάλος αριθμός, μη αναγνωρισμένων ανασταλτικών πεπτιδίων DPP-IV είναι πιθανό να υπάρχουν στις αλληλουχίες των πρωτεϊνών γάλακτος (Nielsen et al., 2017). Επίσης, Επιπλέον, μελέτη που πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της βάσης δεδομένων BIOPEP, για την αξιολόγηση των γαλακτοκομικών πρωτεϊνών ως πηγές βιοδραστικών πεπτιδίων, έδειξε ότι οι δύο βιολογικές ιδιότητες που εμφανίζονται με την υψηλότερη συχνότητα σχετίζονται με την αντιυπερτασική δραστηριότητα και με ανασταλτική δράση κατά του DPP-IV (Dziuba et al., 2009).

## 2.4 Τρόποι προσδιορισμού πρωτεϊνών και βιοπεπτιδίων

Η φυσική, μικροβιολογική και χημική εξέταση των γαλακτοκομικών προϊόντων αποτελεί προαπαιτούμενο εργαλείο για την αξιολόγηση και την παρακολούθηση της ποιότητας τους, για τον προσδιορισμό της σύνθεσης τους, της υφής τους, τον έλεγχο της τυποποίησης τους, και για την παρακολούθηση καθ' όλη την διαδικασία της παραγωγής τους (Bhattacharya et al., 2019). Με την πάροδο των ετών, έχουν αναπτυχθεί πολυάριθμες εξελιγμένες τεχνικές, ικανές να αξιολογούν κύρια και δευτερεύοντα συστατικά, μολύνσεις και άλλες αλλαγές που προκαλούνται κατά την επεξεργασία των γαλακτοκομικών προϊόντων (Punia et al., 2020).

Ο προσδιορισμός των πρωτεϊνών και των πεπτιδίων των γαλακτοκομικών προϊόντων είναι καίριας σημασίας λόγω της μεγάλης τους συνεισφοράς στην

ποιότητα των προϊόντων και στην θρεπτική τους αξία, είτε ως άθικτες πρωτεΐνες, είτε ως πεπτίδια, που εμφανίζουν βιοδραστικότητα. Επιπρόσθετα, οι περισσότερες μεθοδολογίες που ακολουθούνται σήμερα για τον έλεγχο της αυθεντικότητας σε γαλακτοκομικά προϊόντα, βασίζονται στην ανάλυση και τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών του γάλακτος (Stanciuc & Râpeanu, 2010).

Οι μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για την ανάλυση των πρωτεϊνών γάλακτος ήταν: τεχνικές ηλεκτροφόρησης σε gel πολυακρυλαμίδης με ουρία (UREA-PAGE) ή δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS-PAGE) και ισοηλεκτρική εστίαση (IEF), υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) σε διαφορετικά συστήματα όπως χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων, χρωματογραφία υδρόφοβης αλληλεπίδρασης και χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, ανοσολογικές μέθοδοι (π.χ. ELISA), φασματοφωτομετρία UV-VIS, καθώς και φασματομετρία μάζας (MS) (Andrei, 2006). Ενώ, πολλές φορές για την καλύτερη ανάλυση των δειγμάτων, γίνεται χρήση συνδυασμού κάποιων από τις παραπάνω μεθόδους. Αυτό συνήθως περιλαμβάνει τη χρήση διαχωριστικών τεχνικών (π.χ. τριχοειδή ηλεκτροφόρηση (CE) ή υγρή χρωματογραφία (LC)) σε συνδυασμό με MS (Dallas et al., 2015, Panchaud, Affolter & Kussmann, 2012). Πρόσφατα, ένας συνδυασμός CE, LC, όπως υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC), MS και υγρή χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης (HILIC), βρέθηκε ότι αποκαλύπτει βιοενεργά πεπτίδια και τις αλληλουχίες τους σε ομογενοποιημένα δείγματα γάλακτος (Giacometti & Tomljanovic, 2017). Στην συνέχεια ακολουθεί μία σύντομη αναφορά στις βασικότερες μεθόδους που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό και την ανάλυση των πρωτεϊνών και των πεπτιδίων σε γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα.

Η ηλεκτροφόρηση σε gel πολυακρυλαμίδης (PAGE) έχει εφαρμοστεί ευρέως στη μελέτη πρωτεϊνών γάλακτος και μεγάλων πεπτιδίων που προέρχονται από το γάλα (Recio & López-Fandiño, 2009). Ο διαχωρισμός τους γίνεται είτε με βάση την αναλογία μάζας προς φορτίο (PAGE ή ουρία-PAGE), είτε με βάση το ισοηλεκτρικό σημείο κατά μήκος μιας βαθμίδας τιμών pH (ισοηλεκτρική εστίαση (IEF)), ή με βάση το μοριακό βάρος (ηλεκτροφόρηση σε gel δωδεκυλοθειικού νατρίου-πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)) (Recio & López-Fandiño, 2009). Ωστόσο, επειδή τα πεπτίδια είναι ουσίες μικρού μοριακού βάρους, η ανάλυση τους με τις κλασσικές μεθόδους ηλεκτροφόρησης δεν είναι ικανοποιητική και για αυτό το λόγο, αυτού του είδους οι μέθοδοι μεμονωμένα, βρίσκουν κυρίως εφαρμογή σε ποιοτικούς προσδιορισμούς πρωτεϊνών. Επίσης, για καλύτερη ανάλυση πολλές φορές χρησιμοποιείται η ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων, που αποτελεί συνήθως συνδυασμό IEF με SDS-PAGE. Τέλος, η ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς ζώνης (CE),



η οποία εκμεταλλεύεται την αναλογία της μάζας προς το φορτίο, έχει επίσης αποδειχθεί ως ένα σημαντικό εργαλείο διαχωρισμού πεπτιδίων και πρωτεϊνών (Pora, Mant & Hodges, 2006).

Ο προσδιορισμός των πεπτιδίων, μπορεί να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας διαφορετικές μεθόδους χρωματογραφίας που περιλαμβάνουν τη χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων (IEC), τη χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (SEC), την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), την χρωματογραφία υδρόφοβης αλληλεπίδρασης (HILIC), την χρωματογραφία συγγένειας και την παρασκευαστική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC) (Sánchez-Rivera et al., 2014), η οποία διαχωρίζει τα μικρά πεπτίδια αποτελεσματικότερα από ότι άλλα είδη χρωματογραφίας (Mohanty et al., 2015). Κατά τη χρωματογραφία, τα δείγματα εκλούνται με σταθερούς ρυθμούς ροής με την βοήθεια των εκλουστικών διαλυμάτων στη στήλη και τα κλάσματα αμινοξέων συλλέγονται αυτόματα, και η απεικόνιση τους κατανέμεται με κορυφές στο χρωματογράφημα κατά σειρά, με βάση τον χρόνο έκλουσης.

Η φασματομετρία μάζας (MS) έχει αναδειχθεί ως ένα πολύ σημαντικό εργαλείο για την ανάλυση πρωτεϊνών και πεπτιδίων, κυρίως λόγω της υψηλής ευαισθησίας και ευκρίνειας, της ταχύτητας του, την δυνατότητα ανάλυσης που παρέχει για μικρού μεγέθους και πολύπλοκα δείγματα, ενώ ταυτόχρονα μπορεί να ανιχνεύει πολλές διακριτές κατηγορίες αναλυτών σε ένα ευρύ φάσμα συγκεντρώσεων (Recio & López-Fandiño, 2009, Schrader, Schulz-Knappe & Fricker, 2014). Η λειτουργία του φασματομέτρου μαζών βασίζεται στον σχηματισμό ιόντων στην αέρια φάση, είτε στην περιοχή υψηλού κενού, είτε αμέσως πριν την είσοδο του δείγματος στην περιοχή αυτή, και στον διαχωρισμό των ιόντων (Watson & Edrada-Ebel, p. 202, 2012). Ο σχηματισμός των ιόντων γίνεται συνήθως με ηλεκτροψεκασμό (ESI) , με πρόσκρουση ηλεκτρονίων (EI) ή με εκρόφηση με λέιζερ υποβοηθούμενος από υλικό μήτρας (MALDI), ενώ ο διαχωρισμός των ιόντων γίνεται με τις τεχνικές μαγνητικού τομέα, τετράπολου, σχάσης με χρόνο πτήσης (TOF) και παγίδας ιόντων.

Σύμφωνα με τους Recio & López-Fandiño (2009), τα όργανα που χρησιμοποιούνται ευρέως στην ανάλυση πεπτιδίων γάλακτος αποτελούνται από συνδυασμούς εισόδων, πηγών ιόντων και αναλυτών μάζας, και προκύπτουν τέσσερεις τύποι:

1. Φασματόμετρο μάζας: HPLC-ηλεκτροψεκασμός-τετράπολο.
2. Φασματόμετρο μάζας: HPLC-ηλεκτροψεκασμός-παγίδα ιόντων.
3. Φασματόμετρο μάζας: HPLC-ηλεκτροψεκασμός-τετράπολο- χρόνος πτήσης.
4. Φασματόμετρο MALDI-TOF.

Τα δεδομένα που λαμβάνονται μέσω του MS αναλύονται χρησιμοποιώντας ειδικούς αλγόριθμους, λογισμικό και βάσεις δεδομένων, και έτσι γίνεται εφικτή η επεξεργασία τεράστιων δεδομένων με αυτοματοποιημένο και χωρίς αποκλεισμούς τρόπο (Punia et al., 2020).

Μία ακόμα μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ανάλυση των πρωτεϊνών και των πεπτιδίων του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων είναι η φασματοσκοπία. Διάφορες φασματοσκοπικές τεχνικές, όπως φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού χαμηλής ανάλυσης, φασματοσκοπία UV-VIS, φασματοσκοπία υπέρυθρης ακτινοβολίας, φασματοσκοπία υπερήχων, ατομική φασματοσκοπία και φασματοσκοπία μικροκυμάτων χρησιμοποιούνται επί του παρόντος για την εξέταση γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων (Punia et al., 2020). Η τεχνική αυτή βασίζεται στην απορρόφηση ακτινοβολίας από το δείγμα και ορίζεται από το μήκος κύματος του φωτός, συνήθως στο μέσο υπέρυθρο και στο εγγύς υπέρυθρο, και παρέχει ταυτόχρονη ανίχνευση όλων των βασικών συστατικών του γάλακτος με απλό, γρήγορο, ακριβή και φιλικό προς το περιβάλλον τρόπο (Punia et al., 2020).

Συνηθέστερα, χρησιμοποιείται η τεχνική φασματοσκοπίας υπέρυθρης ακτινοβολίας (IR) και η παραλλαγή της, φασματοσκοπία υπέρυθρης ακτινοβολίας κατά Fourier (FT-IR), όπου σύμφωνα με την αρχή της μεθόδου, η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία διέρχεται από ένα δείγμα και απορροφάται από τους δεσμούς των μορίων του δείγματος εξαναγκάζοντας τους σε δονήσεις τάσης και κάμψης, και το απορροφούμενο μήκος κύματος, είναι χαρακτηριστικό του δεσμού που το απορροφά (Watson & Edrada-Ebel, p. 113, 2012). Συχνά επίσης χρησιμοποιείται η φασματοσκοπία Raman η οποία είναι συμπληρωματική στην IR και FT-IR, και δεν απαιτεί μεγάλη κατεργασία δείγματος. Ωστόσο, μειονεκτεί έναντι των κλασσικών, επειδή μπορεί να υπάρξει ανεπαρκής ανάλυση αν τα δείγματα είναι σε διάλυμα, και δεν ενδείκνυται ως τεχνική ποσοτικοποίησης (Watson & Edrada-Ebel, p. 156, 2012).

Τέλος, κάποιες φορές για την μελέτη των πρωτεϊνών και των πεπτιδίων χρησιμοποιούνται και ανοσολογικές μέθοδοι και κυρίως ELISA (enzyme linked immunosorbent assay). Η μέθοδος ELISA έχει εφαρμοστεί κυρίως στην ανίχνευση αλλεργιογόνων, ενώ για την ανίχνευση πεπτιδίων προτιμάται η «ανταγωνιστική δοκιμασία ELISA» (Recio & López-Fandiño, 2009). Πλεονεκτήματα της ELISA είναι το χαμηλό κόστος, η υψηλή ειδικότητα και αξιοπιστία, και η ευκολία χρήσης (Popelka et al., 2002). Παρόλα αυτά, και σύμφωνα με τους Monaci et al. (2006) η πλειονότητα των ανοσολογικών τεχνικών επικεντρώνεται περισσότερο στην



παρουσία ανέπαφων πρωτεϊνών, και λιγότερο στην ανάπτυξη αναλύσεων για την ανίχνευση πεπτιδίων που προέρχονται από το γάλα.

### 3. Πειραματικό Μέρος- Υλικά και μέθοδοι

#### 3.1. Δειγματοληψία

Αρχικά, αναζητήθηκαν μέσω διαδικτύου τα τυροκομεία στα οποία παράγεται το Τσαλαφούτι. Εντοπίστηκαν 5 τυροκομεία, εκ των οποίων 3 βρίσκονται στην Περιφερειακή Ενότητα Αιτωλοακαρνανίας, 1 στην Περιφερειακή Ενότητα Ευρυτανίας, και 1 στην Περιφερειακή Ενότητα Καρδίτσας, τα οποία ήταν πρόθυμα να παραχωρήσουν πληροφορίες για την παραγωγική τους μονάδα, και κυρίως στοιχεία σχετικά με το Τσαλαφούτι.

Στη συνέχεια, συντάχθηκαν ερωτηματολόγια προκειμένου να αντληθούν πληροφορίες όσο αναφορά τα τυροκομεία και το μέγεθος της παραγωγής τους, τα χαρακτηριστικά του παραδοσιακού αυτού τυριού, τις πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται (είδος γάλακτος, καλλιέργειες εκκινητών, πυτιά κλπ.), την διαδικασία παραγωγής που ακολουθείται για το Τσαλαφούτι (στάδια παραγωγής, χρόνος ωρίμανσης, θερμοκρασίες βρασμού ωρίμανσης, αποθήκευσης κλπ.), και άλλα στοιχεία σχετικά με την συσκευασία, την διάθεση και την αποθήκευση του τυριού.

Επίσης, στο ερωτηματολόγιο υπήρχαν ερωτήματα σχετικά με την λαογραφία και την παράδοση γύρω από το Τσαλαφούτι, αλλά και σχετικά με την πιθανή πιστοποίηση του τυριού με σήμα Γεωγραφικής Ένδειξης (ΠΟΠ ή ΠΓΕ) και τα οφέλη που ενδέχεται να επιφέρει κάτι τέτοιο στους παραγωγούς. (Αναλυτικά το ερωτηματολόγιο που συμπληρώθηκε από τους τυροκόμους παρατίθεται στο παράρτημα 1.)

Επιπλέον ζητήθηκε από όσους τυροκόμους είχαν την δυνατότητα, να στείλουν τα απαραίτητα δείγματα για τις αναλύσεις. Συνολικά συγκεντρώθηκαν δώδεκα δείγματα, ποσότητας ενός κιλού, εκ των οποίων, τα έντεκα προέρχονταν από τυροκομεία και το ένα είχε παραχθεί με τον παραδοσιακό πατροπαράδοτο τρόπο για οικιακή κατανάλωση, με τόπο προέλευσης το χωριό Βλάσι, ένα ορεινό χωριό του Δήμου Αργιθέας, στην Περιφερειακή Ενότητα Καρδίτσας. Επειδή το Τσαλαφούτι παράγεται κυρίως τους καλοκαιρινούς μήνες, τα δείγματα είχαν

παραχθεί από Μάιο έως και Οκτώβριο, και κάποια εκ των τυροκομείων κατάφεραν να στείλουν από τρία έως και πέντε δείγματα, που παράχθηκαν διαφορετικούς μήνες, μέσα σε αυτό το χρονικό διάστημα, προκειμένου να ελεγχθούν για τυχόν διαφορές στο τελικό προϊόν.

Τα δείγματα μετά την παραλαβή τους, διαχωριστήκαν σε μικρότερα δοχεία, σημειώθηκε ο κωδικός του καθενός ξεχωριστά, ένα γράμμα για την προέλευση του δείγματος και ένας αριθμός που δηλώνει τον μήνα παραγωγής (Πίνακας 4). Στην συνέχεια, αποθηκεύτηκαν σε κατάψυξη, περίπου στους  $-20^{\circ}\text{C}$ , προκειμένου να διατηρηθούν αναλλοίωτα. Για κάθε ανάλυση γινόταν απόψυξη ενός δείγματος σε θερμοκρασία δωματίου ή στο ψυγείο από την προηγούμενη ημέρα.

<b>Μάιος</b>	<b>Ιούνιος</b>	<b>Ιούλιος</b>	<b>Αύγουστος</b>	<b>Σεπτέμβριος</b>	<b>Οκτώβριος</b>
<b>Σ5</b>	<b>Ζ6</b>	<b>Β7</b>	<b>Σ8</b>	<b>Σ9</b>	<b>Β10</b>
<b>Α5</b>	<b>Σ6</b>	<b>Σ7</b>	<b>Π8</b>	-	-
-	<b>Κ6</b>	-	-	-	-
-	<b>Β6</b>	-	-	-	-

Πίνακας 4. Δείγματα τυριού.

### 3.2. Πειραματική διαδικασία

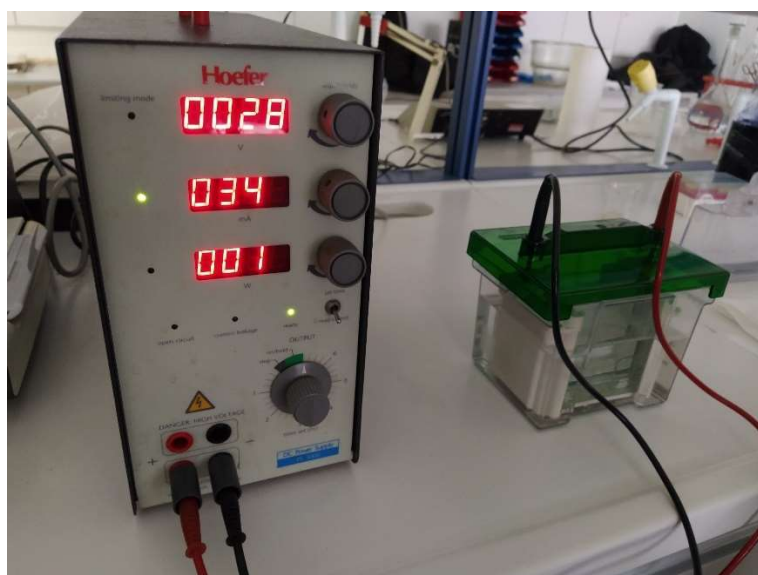
Για την ανάλυση των δειγμάτων και τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών και των βιοπεπτιδίων ακολουθήθηκαν δύο μέθοδοι: Ηλεκτροφόρηση σε gel πολυακρυλαμίδης με δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS-PAGE), και υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης και φασματομετρία μάζας (HPLC-MS).

#### Υλικά

Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε η BioRad Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis Cell (Εικόνες 4 & 5). Και για τη την παρασκευή των gel ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της Bio-Rad Laboratories (2014).



Εικόνα 4.



Εικόνα 5.

### Για ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE:

Για το gel:

1. 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)
  - Tris buffer
  - Πυκνό HCl
  - Απεσταγμένο νερό
2. 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)
  - Tris buffer
  - Πυκνό HCl

- Απεσταγμένο νερό
  
- 3. 10% SDS (w/v)
  - SDS
  - Απεσταγμένο νερό
  
- 4. 50% Glycerol (v/v)
  - Glycerol 100%
  - Απεσταγμένο νερό
  
- 5. Ammonium persulfate 10%
  - Ammonium persulfate
  - Απεσταγμένο νερό
  
- 6. 30% Acrylamide/bis
  - Acrylamide
  - Bis-acrylamide
  - Απεσταγμένο νερό

Για το ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος:

- 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)
- 50% Glycerol
- 10% SDS
- 2-mercaptoethanol
- Μπλε βρωμοφαινόλης 1%
- Απεσταγμένο νερό
- Για το διάλυμα ηλεκτροδίων:
  - Tris buffer
  - Glycine
  - SDS (0,1%)
  - Απεσταγμένο νερό
- Για το διάλυμα χρώσης πηκτικής:
  - Coomassie Blue
  - Methanol
  - Glacial acetic acid
  - Απεσταγμένο νερό

Για το διάλυμα αποχρωματισμού πηκτής:

- Methanol
- Glacial acetic acid
- Απεσταγμένο νερό

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5) καταγράφεται η συνταγή σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Bio-Rad για την παρασκευή των gel επιστοίβασης και διαχωρισμού.

<b>Διαλύματα</b>	<b>Stacking Gel 4% (Επιστοίβασης)</b>	<b>Resolving Gel 12% (Διαχωρισμού)</b>
<b>30% Acrylamide/bis</b>	1,98 ml	6 ml
<b>0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)</b>	3,78 ml	-
<b>1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)</b>	-	3,75 ml
<b>10% SDS</b>	150 $\mu$ l	150 $\mu$ l
<b>Απεσταγμένο νερό</b>	9 ml	5,03 ml
<b>TEMED</b>	15 $\mu$ l	7,5 $\mu$ l
<b>10% Ammonium persulfate</b>	75 $\mu$ l	75 $\mu$ l
<b>Συνολικός όγκος</b>	15 ml	15 ml

Πίνακας 5. Συνταγή παρασκευής των gel επιστοίβασης και διαχωρισμού.

Για HPLC-MS:

Χρησιμοποιήθηκε η Agilent 1200 series HPLC (Εικόνα 6.), με στήλη C18 (250 x 4,6 mm – 5,0  $\mu$ m). Η HPLC ήταν συνδεδεμένη με το φασματόμετρο Agilent 6130 Quadrupole LC/MS (Εικόνα 7). Τα δύο εκλουστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν A: TFA σε υπερκάθαρο νερό (0,1% v/v) και B: 0,09% v/v TFA σε ακετονιτρίλιο και υπερκάθαρο νερό σε αναλογία 90:10. Για υπερκάθαρο νερό χρησιμοποιήθηκε το New P. Nix Power I της Human Corporation.



Εικόνα 6. HPLC



Εικόνα 7. LC/MS

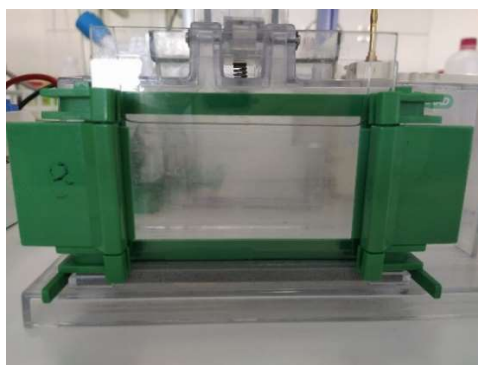
Επίσης για την επεξεργασία των δειγμάτων, χρειάστηκε να φυγοκεντρηθούν και να φιλτραρισθεί το υπερκείμενο πρώτα από χάρτινο φίλτρο και ύστερα από ειδικό φίλτρο σύριγγας 0,45  $\mu\text{m}$  για να είναι αρκετά καθαρό το δείγμα για τις αναλύσεις, να αποκόψουμε τα μεγάλα μόρια και να παραμείνουν οι πρωτεΐνες και τα πεπτίδια.

## Μέθοδοι

Τα πρωτόκολλα που ακολουθήθηκαν τόσο για την επεξεργασία των δειγμάτων προς ανάλυση, όσο και για την ανάλυση αυτή καθ' αυτή και τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών και των πεπτιδίων, βασίστηκαν σε αρκετές βιβλιογραφικές πηγές, όμως τροποποιήθηκαν αρκετά λόγω της ιδιαίτερης ταυτότητας του προϊόντος. Το Τσαλαφούτι είναι ένα μαλακό φρέσκο τυρί, το οποίο δεν στραγγίζεται, ή στραγγίζεται ελάχιστα επομένως δεν χρειάζεται να πολτοποιηθεί. Το υπερκείμενο που προκύπτει από την φυγοκέντρηση περιέχει τα κλάσματα των πρωτεϊνών που υπάρχουν στο τυρί ή πεπτίδια αυτών.

### Ηλεκτροφόρηση:

Για την προετοιμασία των δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση, ζυγίστηκαν 5 g τυριού σε ζυγό ακριβείας και στην συνέχεια μεταφέρθηκαν σε φυγόκεντρο, όπου φυγοκεντρήθηκαν για 25 λεπτά σε 4000 rpm στους 20° C. Στην συνέχεια, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και πέρασε από φίλτρο χαρτιού. Έπειτα, ετοιμάστηκαν τα gel διαχωρισμού και επιστοίβασης, χωρίς το ammonium persulfate (APS) και το TEMED, και συναρμολογήθηκε το σάντουιτς με τις γυάλινες πλάκες. Αμέσως μετά, προστέθηκαν το APS και το TEMED και έγινε η έκχυση των gel μεταξύ των πλακών, πρώτα του gel διαχωρισμού (12%) και λίγο αργότερα, περίπου 15-20 λεπτά, προκειμένου να μην αναμειχθούν, προστίθεται το gel επιστοίβασης και η χτένα για τις θέσεις των δειγμάτων, και αφήνονται περίπου μία ώρα για να πολυμεριστούν πλήρως (Εικόνες 7α και 7β).



Εικόνα 7α. Gel διαχωρισμού



Εικόνα 7β. Gel επιστοίβασης

Ενώ πολυμεριζόταν το gel, έγινε η περαιτέρω προετοιμασία των δειγμάτων, όπου από το υπερκείμενο που είχε φιλτραριστεί, πήραμε 0,5 ml και προσθέσαμε σε αυτό 1 ml από το ρυθμιστικό διάλυμα του δείγματος που είχαμε ήδη ετοιμάσει, και τα αφήσαμε για 5 min μέσα σε ζεστό νερό. Εν συνεχεία, τοποθετήσαμε τις πλάκες με το gel στην συσκευή ηλεκτροφόρησης και την γεμίσαμε μέχρι το κατάλληλο σημείο με το διάλυμα ηλεκτροδίων, έπειτα αφαιρέσαμε την χτένα και με μία πιπέτα παστέρ προσθέσαμε τα δείγματα στις διαμορφωμένες θέσεις στο gel επιστοίβασης. Η ηλεκτροφόρηση έτρεξε για 30–40 min έως το δείγμα να καλύψει το gel σε όλο το μήκος του, στα 180 V και 30 mA (Εικόνα 8).





Εικόνα 8. Συνθήκες ηλεκτροφόρησης

Αφού τελείωσε η ηλεκτροφόρηση το gel μεταφέρθηκε στο διάλυμα χρωστικής (Coomassie blue) και αφέθηκε για 1h και μετά τοποθετήθηκε στο διάλυμα αποχρωματισμού (Εικόνα 9.) για 5 h, ενώ κάθε 1h γινόταν αλλαγή του διαλύματος αποχρωματισμού. Τα έτοιμα αποχρωματισμένα gel τοποθετήθηκαν στο ψυγείο μέσα σε αποταγμένο νερό.



Εικόνα 9. Gel μέσα σε δοχείο με διάλυμα αποχρωματισμού

### HPLC-MS:

Τα δείγματα του τυριού που προορίζονταν για ανάλυση με HPLC-MS, ζυγίστηκαν σε ζυγό ακριβείας (5 g) φυγοκεντρήθηκαν στις 4000 rpm, για 25 min στους 20° C. Αφού αφαιρέθηκε το στρώμα του λίπους από πάνω, το υπερκείμενο υγρό πέρασε από φίλτρο χαρτιού και έπειτα από φίλτρο σύριγγας 0,45 μm. Στην



συνέχεια, μεταφέρθηκε σε φιαλίδια κατάλληλα για την HPLC και αποθηκεύτηκαν στο ψυγείο μέχρι να γίνει η ανάλυση τους. Χρησιμοποιήθηκαν δύο εκλουστικά διαλύματα (A: TFA σε υπερκάθαρο νερό (0,1% v/v), B: 0,09% v/v TFA σε ακετονιτρίλιο και υπερκάθαρο νερό σε αναλογία 90:10), και η στήλη ήταν C18 (250 x 4,6 mm – 5,0 μm).

Οι ρυθμίσεις που έγιναν στην HPLC-MS ήταν:

- Όγκος έγχυσης δείγματος: 5 μl
- Ρυθμός ροής: 0,5 ml/min
- Συνολική διάρκεια της μεθόδου: 60 min
- Μήκος κύματος σήματος: 230 nm
- Πλάτος κορυφής: > 0,1 min
- Θερμοκρασία αερίου: 300 °C μέγιστη 350 °C
- Εύρος μάζας: 100-2000 m/z
- Λειτουργία Ιονισμού: API-ES
- Πολικότητα: Θετική

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6.) καταγράφεται όλη η μέθοδος και οι αναλογίες των εκλουστικών διαλυμάτων σε συνάρτηση με τον χρόνο διάρκειας της μεθόδου.

<b>Time (min)</b>	<b>A (Water/TFA)</b>	<b>B (ACN/TFA/Water)</b>
0	100%	0
10	100%	0
10.10	75%	25%
20	75%	25%
20.10	50%	50%
30	50%	50%
30.10	25%	75%
40	25%	75%
40.10	0	100%
50	0%	100%
Stop time 60 min		

Πίνακας 6. μέθοδος HPLC-MS

Η αναφορά των αποτελεσμάτων εξάγονταν στις εξής μορφές δεδομένων, TXT., XLS., CSV, και DIF. Επίσης έγινε η μετατροπή των χρωματογραφημάτων και των γραφημάτων μάζας σε PDF.

#### 4. Αποτελέσματα

Από τα ερωτηματολόγια που συμπληρώθηκαν από τους παραγωγούς του παραδοσιακού τυριού «Τσαλαφούτι» προκύπτει ο παρακάτω πίνακας (Πίνακας 7.), όπου συγκεντρώνονται οι σημαντικότερες απαντήσεις που δόθηκαν σχετικά με το ιδιαίτερο αυτό τυροκομικό προϊόν, την προέλευση και την παραγωγή του.

Παραγωγοί/ Ερωτήματα	Παραγωγός δείγματος Σ	Παραγωγός δείγματος Β	Παραγωγός δείγματος Ζ	Παραγωγός δείγματος Κ	Παραγωγός δείγματος Α*	Παραγωγός δείγματος Π**
<b>Είδος γάλακτος</b>	Πρόβειο/Γίδινο (Καλοκαίρι) Πρόβειο/Γίδινο/Αγ ελαδινό (Χειμώνα)	Αιγοπρόβειο (80% πρόβειο /20% γίδινο)	Πρόβειο	Πρόβειο	Αιγοπρόβειο	Πρόβειο
<b>Φυλές ζώων</b>	Ντόπιες/ Εξωτερικού	Ντόπιες	Ντόπιες	Ντόπιες	-	Ντόπιες
<b>Περιοχή εκτροφής</b>	Καρδίτσα/ Εκτατική εκτροφή και σταβλισμένα ζώα	Παρατριχώνεια Παραχελωίτιδα περιοχή /Εκτατική εκτροφή	Περδικάκι Αμφιλοχίας/ Εκτατική εκτροφή (καλοκαίρι) και σταβλισμένα ζώα (χειμώνα)	Δήμος Αγράφων το 80%, Δήμος Καρπενησίου 20%/Από Μάρτιο έως Σεπτέμβριο εκτατική εκτροφή	Αμφιλοχία	Άγραφα/ Εκτατική εκτροφή
<b>Μήνες παραγωγής</b>	Όλο το χρόνο	Όλο το χρόνο	Απρίλιο- Μάιο	Όλο τον χρόνο εκτός από Αύγουστο και Σεπτέμβριο	-	Ιούλιο- Αύγουστο
<b>Χαρακτηρι στικά γάλακτος</b>	Όμοια με το γάλα για γιαούρτι και φέτα	7,49% λίπος, pH 6,67, λακτόζη	Πρωινό/ φρέσκο γάλα	Πρωινό γάλα/ Λιποπεριεκτι- κότητα 6,5-7,8%	-	-

		5,14%, πρωτεΐνη 5,88%				
<b>Αλάτι</b>	1,5-2%	3%	4,6-5 Kg σε 55 Kg γάλα	2%	-	-
<b>Τρόπος πήξης</b>	Θερμόφιλες καλλιέργειες/μεσόφιλες καλλιέργειες /ή με ή χωρίς πτυιά/ή με συνδυασμό των 3	Πήξη με φυσική πτυιά	Πήξη με πτυιά	Πήξη με πτυιά	-	Οξίνιση
<b>Χρήση πτυιάς</b>	Με ή χωρίς πτυιά	Προσθήκη φυσικής πτυιάς	Προσθήκη πτυιάς	Προσθήκη πτυιάς	-	Όχι
<b>Χρήση καλλιιεργειών/ εκκινητών</b>	Καλλιέργειες μεσόφιλες ή θερμόφιλες	Όχι	Χρήση καλλιέργειας	Όχι	-	Όχι
<b>Θερμοκρασία ωρίμανσης</b>	-	0-4°C	18-20°C	8-10°C για 2-3 ημέρες	-	Θερμοκρασία περιβάλλοντος (παραγωγή με τον παραδοσιακό τρόπο)
<b>Χρόνος ωρίμανσης</b>	Καθόλου ωρίμανση έως λίγες ώρες	Έως την διάθεση του προϊόντος	1-1,5 ώρες	1 μήνα στο ψυγείο	-	1-2 Εβδομάδες
<b>Ποιοτικός έλεγχος</b>	Μικροβιολογική, χημική /εξωτερικό εργαστήριο	Ενδιάμεσοι/ τελικοί έλεγχοι, παρακολούθηση διαγράμματος ροής και κρίσιμων σημείων ελέγχου	Εμπειρικά	Έλεγχοι στο χημείο στο γάλα τυροκόμησης και στο προϊόν 2 φορές τον χρόνο	-	Οικιακή παραγωγή/ Εμπειρικά
<b>Χρόνος ζωής</b>	25 ημέρες	10 ημέρες	Κλειστή συσκευασία 3 μήνες και 2-3	2 μήνες στο ψυγείο	-	1-2 μήνες σε κλειστό δοχείο στο ψυγείο

			ημέρες από το άνοιγμα			
--	--	--	-----------------------	--	--	--

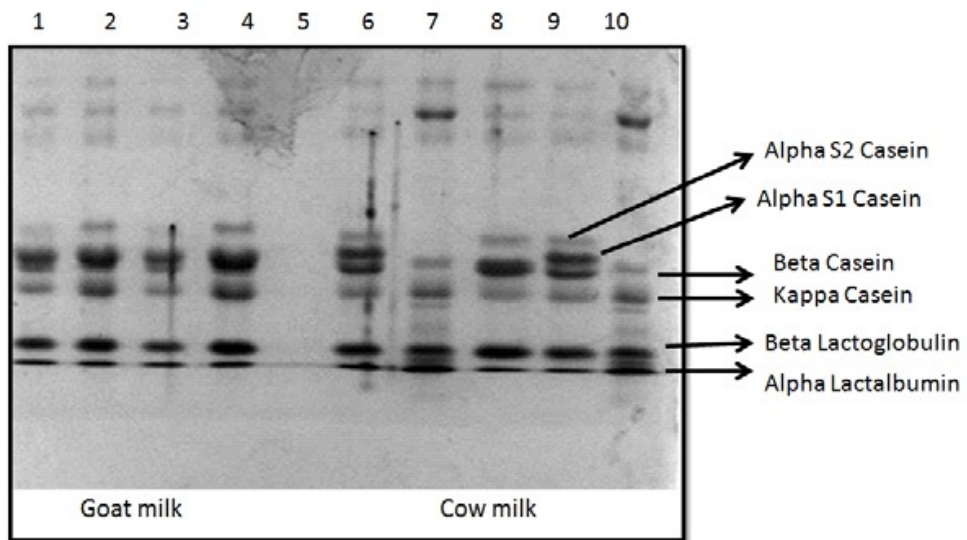
Πίνακας 7. Στοιχεία που προκύπτουν από τις απαντήσεις των τυροκομείων στο Ερωτηματολόγιο. \* Δεν απαντηθηκε ερωτηματολόγιο, και τα στοιχεία αντλήθηκαν από την ιστοσελίδα του τυροκομείου. \*\* Πρόκειται για προϊόν οικιακής εμπειρικής παραγωγής.

Σύμφωνα με τα στοιχεία που μας έδωσαν οι παραγωγοί όσον αφορά την λαογραφία του προϊόντος, το όνομα του, προέρχεται πιθανότερα, από την διαδικασία του βουτήγματος του ψωμιού ή παξιμαδιού στο τυρί. Στην Κεντρική Ελλάδα, στη Λιβαδιά, και στη Θήβα, το Τσαλαφούτι αναφέρεται και ως ψωμοτύρι.

Επιπλέον, όσον αφορά τις απαντήσεις που λάβαμε στις ερωτήσεις σχετικά με την πιστοποίηση του τυριού ως προϊόν ΠΟΠ, ήταν αρκετά διαφορετικές. Οι περισσότεροι τυροκόμοι πιστεύουν πως δύσκολα θα μπορέσει να πιστοποιηθεί ως ΠΟΠ, διότι, η διαδικασία παραγωγής που ακολουθείται διαφέρει από περιοχή σε περιοχή και από τυροκομείο σε τυροκομείο. Επίσης κάποιοι από αυτούς δήλωσαν ακόμα, πως σε περίπτωση πιστοποίησης του προϊόντος, πιθανά η παραγωγή του Τσαλαφουτιού δεν θα τους συμφέρει και δεν θα μπορέσουν να ακολουθήσουν τους κανόνες παραγωγής, που θέτει μία τέτοια πιστοποίηση. Τέλος οι περισσότεροι τυροκόμοι θεωρούν πως η πιθανή πιστοποίηση του τυριού με ετικέτα Γεωγραφικής Ένδειξης, θα αυξήσει την αναγνωρισιμότητα του προϊόντος και την ζήτηση, συνεπώς και την τιμή του στην αγορά.

## Ηλεκτροφόρηση (SDS-PAGE)

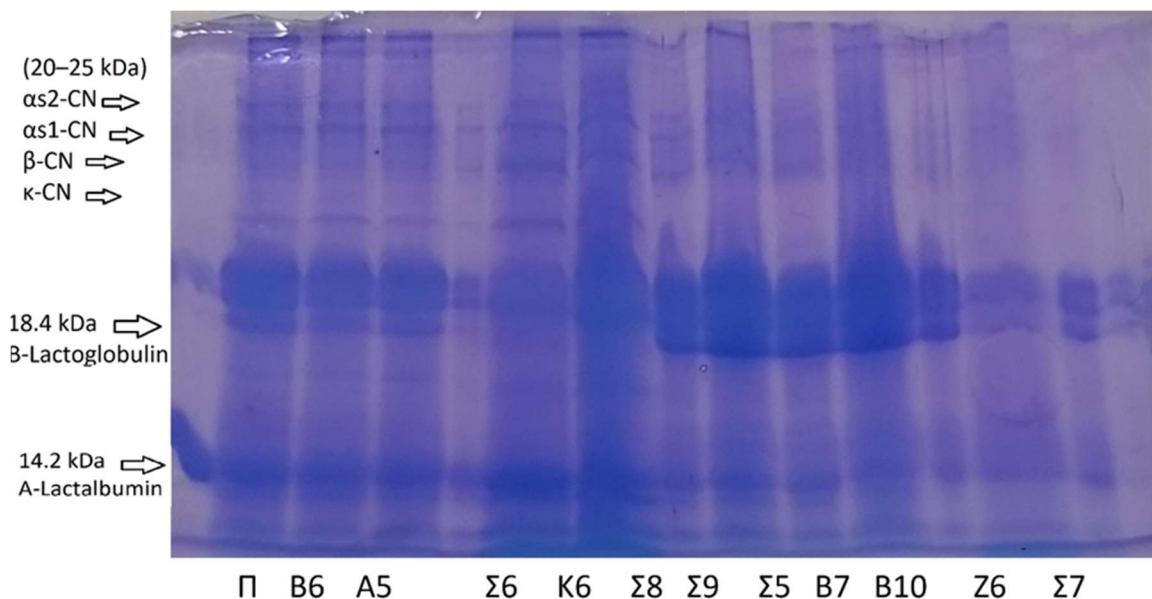
Τα αποτελέσματα από την ηλεκτροφόρηση αναλύθηκαν κατά προσέγγιση, λόγω έλλειψης προτύπων για όλες τις πρωτεΐνες. Υπήρχε στην διάθεση μας μόνο ένα πρότυπο πρωτεΐνης, αυτό της α- λακταλβουμίνης, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς διότι έχει το χαμηλότερο μοριακό βάρος από τις βασικές πρωτεΐνες (14.2 kDa). Με βάση λοιπόν αυτό το πρότυπο, καθώς και με σύγκριση των gel από την ηλεκτροφόρηση με εικόνες gel ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών γάλακτος από την βιβλιογραφία (Sharma, Rout & Singh, 2017, Costa et al., 2014)(Εικόνες 10 και 11 αντίστοιχα), προσδιορίστηκαν οι κύριες πρωτεΐνες που περιέχονται στα δείγματα του παραδοσιακού τυριού Τσαλαφούτι (Εικόνα 12).



Εικόνα 10. Διαχωρισμός πρωτεϊνών κατσικίσιου και αγελαδινού γάλακτος με SDS- PAGE (Sharma, Rout & Singh, 2017,).



Εικόνα 11. SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών αγελαδινού γάλακτος (Costa et al., 2014).



Εικόνα 12. Gel ηλεκτροφόρησης και οι κύριες πρωτεΐνες που περιέχονται στα δείγματα του τυριού.

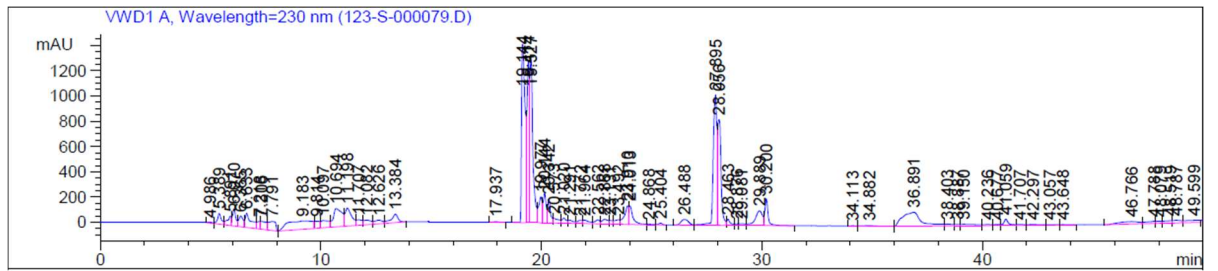
Από το gel φαίνεται ότι στα δείγματα του τυριού περιέχονται οι κύριες πρωτεΐνες γάλακτος: κ-καζεΐνη, β-καζεΐνη, αs1-καζεΐνη, αs2-καζεΐνη (μοριακό βάρος καζεϊνών 20-25 kDa), β-λακτοσφαιρίνη (18.4 kDa) και α-λακταλβουμίνη (14.2 kDa). Αυτό επιβεβαιώνεται (και θα αναλυθεί περαιτέρω) και από τα αποτελέσματα της HPLC-MS, όπου ταυτοποιήθηκαν στα δείγματα από το Τσαλαφούτι πεπτιδία, ή θραύσματα πεπτιδίων, των πρωτεϊνών αυτών.

## HPLC-MS

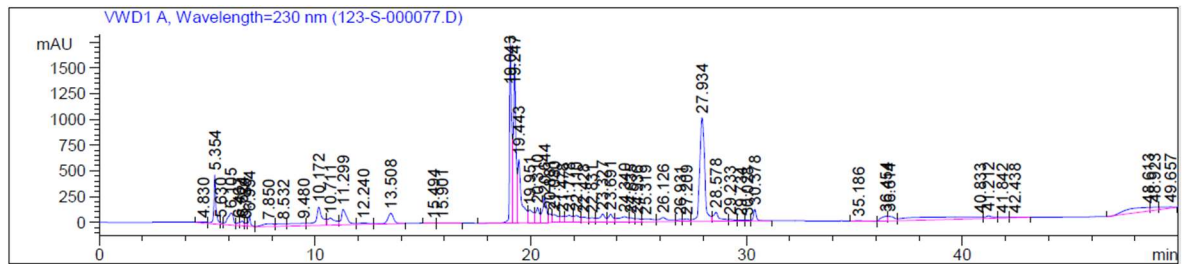
Από τα χρωματογραφήματα της HPLC που παρατίθενται παρακάτω, φαίνονται οι χρόνοι κατακράτησης των πεπτιδίων κατά την διάρκεια της μεθόδου που ακολουθήθηκε και εντοπίζονται μικροδιαφορές και ομοιότητες μεταξύ των δειγμάτων, οι οποίες πιθανά οφείλονται στις διαφοροποιήσεις μεταξύ των τυροκομείων κατά την διαδικασία παραγωγής, καθώς και στις πρώτες ύλες. Στους χρόνους αυτούς, στους οποίους εντοπίζονται οι κορυφές στα χρωματογραφήματα της HPLC, λαμβάνονται και οι μάζες από την MS, γεγονός που διασταυρώνεται και από την αναφορά των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται μετά το τέλος της μεθόδου για κάθε δείγμα (Εικόνες 13-24).



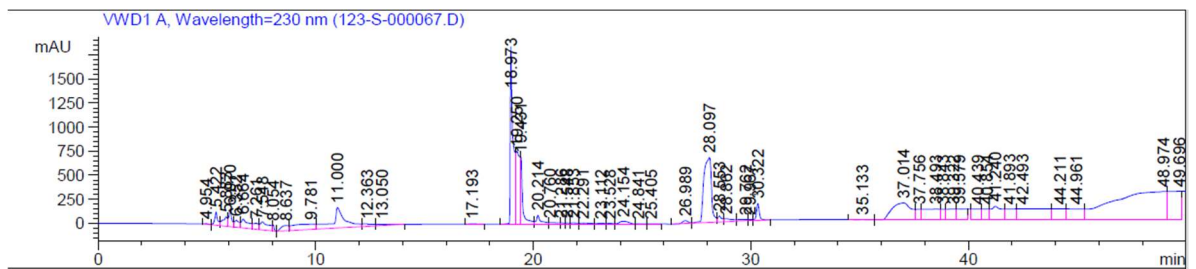




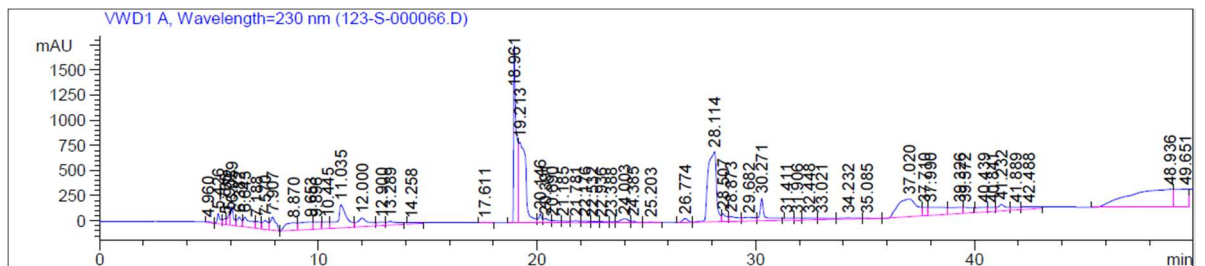
Εικόνα 17. Χρωματογράφημα του δείγματος B7.



Εικόνα 18. Χρωματογράφημα του δείγματος Z6.

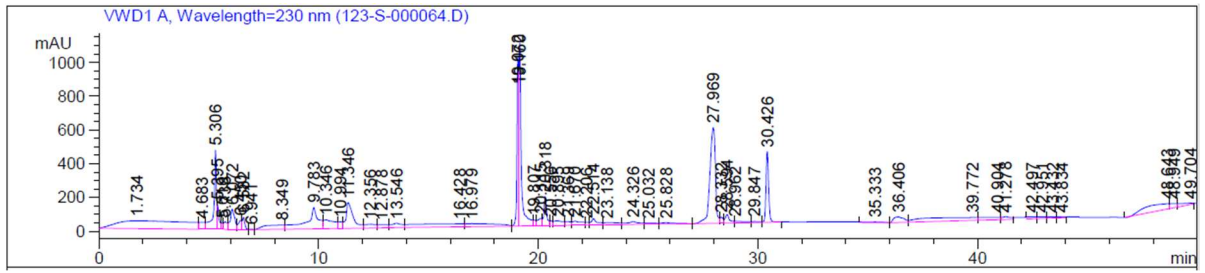


Εικόνα 19. Χρωματογράφημα του δείγματος S8.

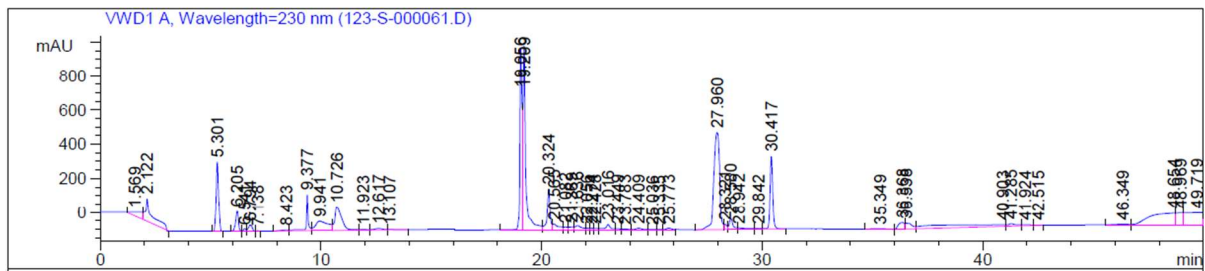


Εικόνα 20. Χρωματογράφημα του δείγματος S9.

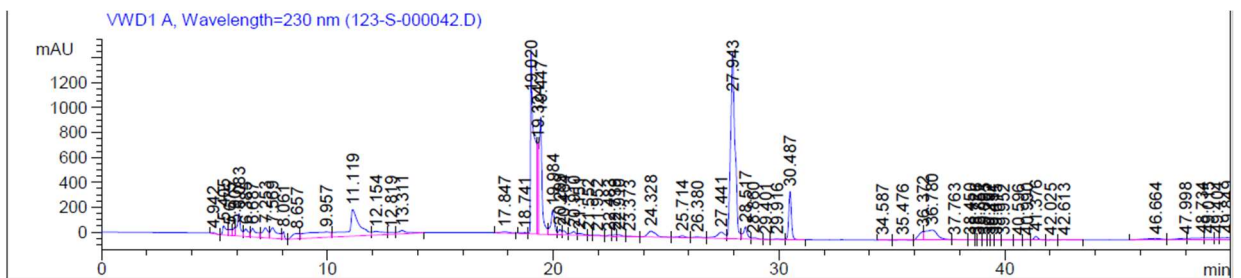




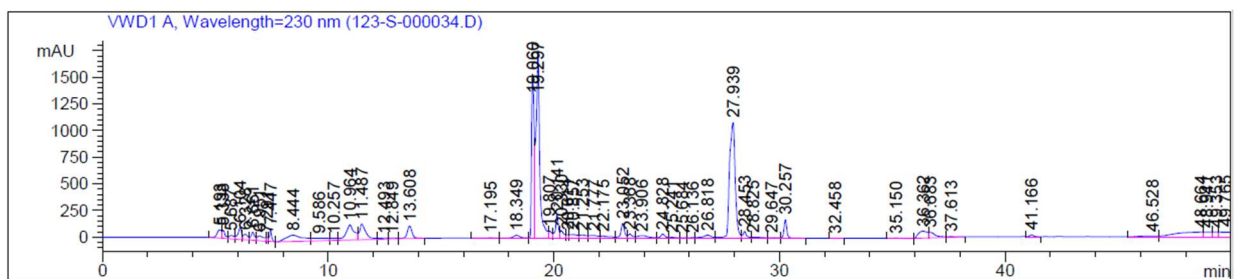
Εικόνα 21. Χρωματογράφημα του δείγματος Σ6.



Εικόνα 22. Χρωματογράφημα του δείγματος Π8.

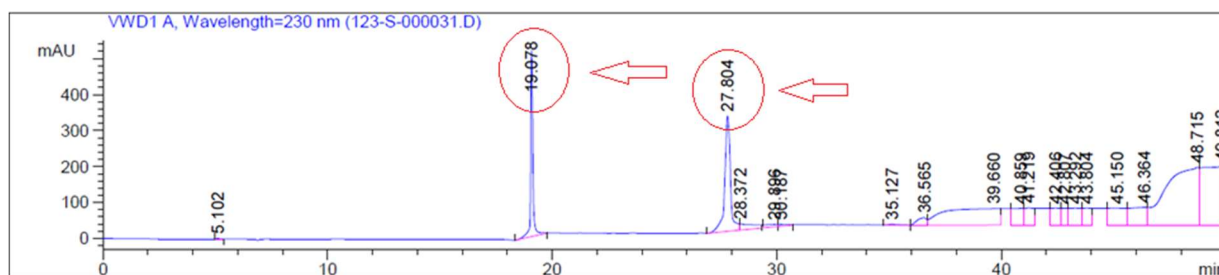


Εικόνα 23. Χρωματογράφημα του δείγματος Κ6



Εικόνα 24. Χρωματογράφημα του δείγματος Β10.

Επιπλέον, στην HPLC-MS αναλύθηκε και το πρότυπο της α-λακταλβουμίνης, και από το χρωματογράφημα προέκυψαν δύο κύριες κορυφές οι οποίες είναι παρούσες στα χρωματογραφήματα των δειγμάτων. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει μερικώς και τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ηλεκτροφόρηση (SDS-PAGE) (Εικόνα 25.).



Εικόνα 25. Χρωματογράφημα προτύπου α-λακταλβουμίνης (HPLC-MS).

Επιπλέον, από την HPLC-MS λαμβάνονται και οι μάζες των πεπτιδίων και των θραυσμάτων των πεπτιδίων που περιέχονται στα δείγματα από το Τσαλαφούτι. Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα και σύμφωνα με τις παραμέτρους που επιλέχθηκαν, το εύρος των μαζών κυμαινόνταν από 100 έως 2.000 m/z. Στην αναφορά που εξάγεται έπειτα από την ανάλυση του κάθε δείγματος, καταγράφεται η μάζα που ανιχνεύεται, σε όλο το χρονικό διάστημα που διαρκεί η επιλεγμένη μέθοδος (Πίνακας 6.). Στο παράρτημα 2., παρατίθενται ενδεικτικά οι πρώτες σελίδες της αναφοράς 2 δειγμάτων, που εξάγεται σε μορφή TXT. Οι τιμές των μαζών που επαναλαμβάνονται αρκετές φορές απορρίπτονται είτε ως θόρυβος, είτε ως μάζες των εκλουστικών διαλυμάτων. Για παράδειγμα στην εικόνα (Εικόνα 26.), οι τιμές των μαζών που βρίσκονται σε κόκκινο πλαίσιο απορρίπτονται διότι επαναλαμβάνονται συνεχώς κατά την διάρκεια της μεθόδου.

46.998	38892812	384.40 I
		383.40 I
		145.20 I
		132.20 I
		114.20 I
47.430	8687088	383.40 I
		146.20 I
		145.20 I
		132.20 I
		131.20 I
		114.20 I
48.062	68351848	633.60 I
		383.40 I
		256.35 I
		162.20 I
		146.20 I
		145.20 I
		132.20 I
		131.20 I
		114.20 I
48.190	15651632	659.55 I
		649.55 I
		634.60 I
		633.60 I
		469.40 I
		383.40 I
		332.40 I
		279.20 I
		258.30 I
		256.35 I
		162.20 I
		146.20 I
		145.20 I
		132.20 I
		131.20 I
114.20 I		
105.10 I		

Εικόνα 26. Παράδειγμα των τιμών μαζών που επαναλαμβάνονται και απορρίπτονται από την ανάλυση.

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων των μαζών από την HPLC-MS, και τον προσδιορισμό των βιοπεπτιδίων, χρησιμοποιήθηκαν οι εξής ελεύθερες online εφαρμογές:

- <https://www.uniprot.org/>
- <https://web.expasy.org/findpept/>
- <http://db.systemsbio.org:8080/proteomicsToolkit/FragIonServlet.html>
- <https://mbpdb.nws.oregonstate.edu/>

- <https://biochemia.uwm.edu.pl/biopep-uwm/>
- <https://omicsbase.com/BioDADPep/biodadpep-search/>

Προκειμένου να γίνει η ταυτοποίηση των πεπτιδίων με βάση τις μάζες στην εφαρμογή [web.expasy.org/findpept](http://web.expasy.org/findpept) επιλέχθηκαν οι παράμετροι: [M+H]<sup>+</sup>, Average, Mass Tolerance ± 0.5, και για την επιβεβαίωση ύπαρξης των πεπτιδίων και των θραυσμάτων των πεπτιδίων στα δείγματα, στην εφαρμογή ProteomicsToolkit επιλέχθηκαν οι εξής παράμετροι: Mass type: Average, Charge state: +1 και Ion types: B & Y. Στην εφαρμογή [web.expasy.org/findpept](http://web.expasy.org/findpept) εξετάστηκαν τα πεπτίδια των βασικών πρωτεϊνών που προέκυψαν από την ηλεκτροφόρηση, με την χρήση των κωδικών τους ονομάτων (ID) από την βάση δεδομένων UniProtKB (Πίνακας 8.).

Πρωτεΐνες	Πρόβειου Γάλακτος	Κασικίσιου Γάλακτος
β-Καζεΐνη	P11839	P33048
κ-Καζεΐνη	P02669	P02670
α <sub>S1</sub> -Καζεΐνη	P04653	P18626
α <sub>S2</sub> -Καζεΐνη	P04654	P33049
β-λακτοσφαιρίνη	P67976	P02756
α-λακταλβουμίνη	P09462	P00712

Πίνακας 8. Κωδικοί πρωτεϊνών UniProtKB.

Στις παρακάτω εικόνες καταγράφονται ενδεικτικά τα πεπτίδια και τα θραύσματα πεπτιδίων που εντοπίστηκαν στα δείγματα Π8 (μόνο από πρόβειο γάλα) (Εικόνες 27-29.) και Α5 (από αιγοπρόβειο γάλα) (Εικόνες 30-35.), σύμφωνα με την διαδικασία που προαναφέρθηκε. Η ίδια μεθοδολογία ακολουθήθηκε και για τα υπόλοιπα δείγματα. Στην πρώτη στήλη των πινάκων που παρουσιάζονται στις εικόνες, βρίσκεται η τιμή της μάζας που είχαμε, στην δεύτερη η τιμή της μάζας του πεπτιδίου, στην τρίτη η απόκλιση των δύο τιμών μαζών, στην τέταρτη στήλη καταγράφεται η αλληλουχία του πεπτιδίου, στην Πέμπτη στήλη η θέση του θραύσματος, και τέλος στην έκτη στήλη η πρωτεϊνική του προέλευση.



Μάζα	Μάζα πεπτιδίου	Διαφορά μαζών	Αλληλουχία πεπτιδίου	Θραύσμα	Πρωτεΐνη	Μάζα	Μάζα πεπτιδίου	Διαφορά μαζών	Αλληλουχία πεπτιδίου	Θραύσμα	Πρωτεΐνη
633.600	633.632	0.032	(T)EDELQ(D)	57-61	β-casein sheep	286.350	286.351	0.000	(R)PVA(L)	68-70	k-casein sheep
633.600	633.635	0.035	(E)EQQQT(E)	52-56	β-casein sheep	286.350	286.351	0.000	(K)PVA(V)	85-87	k-casein sheep
633.600	633.635	0.035	(E)QQQTE(D)	53-57	β-casein sheep	286.350	286.351	0.000	(N)AVP(A)	103-105	k-casein sheep
633.600	633.676	0.075	(V)VGETVE(S)	24-29	β-casein sheep	286.350	286.351	0.000	(A)VPA(K)	104-106	k-casein sheep
557.700	557.710	0.010	(L)VALAIA(R)	10-15	β-casein sheep	402.400	402.427	0.027	(R)SPAQ(T)	90-93	k-casein sheep
232.200	232.259	0.059	(L)NV(V)	22-23	β-casein sheep	402.400	402.470	0.070	(V)PAKS(C)	105-108	k-casein sheep
232.200	232.262	0.062	(V)RG(P)	215-216	β-casein sheep	402.400	402.470	0.070	(E)AVVN(A)	161-164	k-casein sheep
284.400	284.338	-0.062	(P)KH(K)	120-121	β-casein sheep	402.400	402.470	0.070	(A)VNV(A)	162-165	k-casein sheep
284.400	284.338	-0.062	(K)HK(E)	121-122	β-casein sheep	402.400	402.470	0.070	(V)VNAV(D)	163-166	k-casein sheep
286.350	286.351	0.000	(V)LGP(V)	211-213	β-casein sheep	633.600	633.679	0.078	(P)KKDQD(K)	132-136	k-casein sheep
286.350	286.351	0.000	(T)GPI(P)	79-81	β-casein sheep	633.600	633.679	0.078	(K)KDQD(K)	133-137	k-casein sheep
286.350	286.351	0.000	(K)AVP(Q)	192-194	β-casein sheep	633.600	633.679	0.078	(T)NTAQV(S)	183-188	k-casein sheep
314.400	314.405	0.004	(V)NVP(P)	98-100	β-casein sheep	633.600	633.679	0.078	(E)TNTAQV(T)	182-187	k-casein sheep
314.400	314.405	0.004	(T)PVV(V)	96-98	β-casein sheep	863.000	862.958	-0.042	(P)KKDQDK(T)	132-138	k-casein sheep
332.400	332.420	0.019	(V)LSL(S)	178-180	β-casein sheep						
341.300	341.387	0.086	(F)PPQ(S)	173-175	β-casein sheep						
342.400	342.458	0.058	(N)ILP(L)	89-91	β-casein sheep						
342.400	342.458	0.058	(I)LPL(T)	90-92	β-casein sheep						
342.400	342.458	0.058	(H)LPL(P)	150-152	β-casein sheep						
342.400	342.458	0.058	(P)LPL(V)	152-154	β-casein sheep						
342.400	342.458	0.058	(F)PIL(V)	219-221	β-casein sheep						

Εικόνα 27. Πεπτιδία δείγματος P8 β-καζείνης και κ-καζείνης.

Μάζα	Μάζα πεπτιδίου	Διαφορά μαζών	Αλληλουχία πεπτιδίου	Θραύσμα	Πρωτεΐνη	Μάζα	Μάζα πεπτιδίου	Διαφορά μαζών	Αλληλουχία πεπτιδίου	Θραύσμα	Πρωτεΐνη
163.100	163.153	0.052	(I)GS(E)	60-61	as1 casein sheep	204.200	204.205	0.005	(Y)QG(P)	117-118	as2 casein sheep
163.100	163.153	0.052	(A)GS(S)	78-79	as1 casein sheep	204.200	204.205	0.005	(R)NA(D)	62-63	as2 casein sheep
163.100	163.153	0.052	(P)SG(A)	176-177	as1 casein sheep	204.200	204.205	0.005	(R)NA(G)	131-132	as2 casein sheep
163.100	163.153	0.052	(I)GS(E)	202-203	as1 casein sheep	204.200	204.205	0.005	(T)NA(I)	215-216	as2 casein sheep
163.100	163.153	0.052	(N)SG(K)	206-207	as1 casein sheep	232.200	232.259	0.059	(T)VN(R)	139-140	as2 casein sheep
204.200	204.205	0.005	(H)QG(L)	24-25	as1 casein sheep	284.400	284.338	-0.062	(A)KH(K)	16-17	as2 casein sheep
204.200	204.249	0.048	(S)GK(I)	207-208	as1 casein sheep	284.400	284.338	-0.062	(K)HK(M)	17-18	as2 casein sheep
232.200	232.259	0.059	(Y)NV(P)	120-121	as1 casein sheep	284.400	284.338	-0.062	(D)KH(Y)	92-93	as2 casein sheep
232.200	232.259	0.059	(A)VN(Q)	153-154	as1 casein sheep	286.350	286.351	0.000	(Q)GPI(V)	118-120	as2 casein sheep
286.350	286.351	0.000	(L)PLG(T)	183-185	as1 casein sheep	286.350	286.351	0.000	(E)VAP(E)	80-82	as2 casein sheep
286.350	286.351	0.000	(N)PIG(S)	200-202	as1 casein sheep	342.400	342.375	-0.025	(E)HVS(S)	21-23	as2 casein sheep
286.350	286.351	0.000	(V)VAP(F)	40-42	as1 casein sheep	360.350	360.393	0.042	(V)RNA(D)	61-63	as2 casein sheep
332.400	332.333	-0.066	(V)PSE(R)	102-104	as1 casein sheep	360.350	360.393	0.042	(K)RNA(G)	130-132	as2 casein sheep
332.400	332.376	-0.023	(Q)ELA(Y)	156-158	as1 casein sheep	402.400	402.473	0.073	(K)NRL(N)	175-177	as2 casein sheep
341.300	341.346	0.046	(K)HQG(L)	23-25	as1 casein sheep	402.400	402.473	0.073	(N)RLN(F)	176-178	as2 casein sheep
342.400	342.458	0.058	(Y)LPL(G)	182-184	as1 casein sheep	468.500	468.576	0.076	(A)LAKH(K)	14-17	as2 casein sheep
360.350	360.390	0.039	(E)NIN(E)	51-53	as1 casein sheep	545.500	545.572	0.071	(N)PWDQ(V)	124-127	as2 casein sheep
360.350	360.390	0.039	(A)VNQ(E)	153-155	as1 casein sheep	863.000	863.000	0.000	(Q)YLQYLY(Q)	111-116	as2 casein sheep
360.350	360.430	0.080	(S)EVL(N)	29-31	as1 casein sheep						
360.350	360.430	0.080	(E)EIV(P)	85-87	as1 casein sheep						
360.350	360.430	0.080	(L)EIV(P)	125-127	as1 casein sheep						
360.350	360.433	0.082	(A)PFP(E)	42-44	as1 casein sheep						
402.400	402.470	0.070	(V)PKSA(E)	128-131	as1 casein sheep						
469.400	469.471	0.071	(Q)YTDA(P)	188-191	as1 casein sheep						
628.600	628.662	0.062	(K)HQGLSS(E)	23-28	as1 casein sheep						
863.000	862.957	-0.042	(K)YNVQLE(I)	119-125	as1 casein sheep						

Εικόνα 28. Πεπτιδία δείγματος P8 as1- καζείνης και as2- καζείνης.



Μάζα	Μάζα πεπτιδίου	Διαφορά μαζών	Αλληλουχία πεπτιδίου	Θραύσμα	Πρωτεΐνη	Μάζα	Μάζα πεπτιδίου	Διαφορά μαζών	Αλληλουχία πεπτιδίου	Θραύσμα	Πρωτεΐνη
204.200	204.205	0.005	(E)GQ(C)	176-177	b-Lg sheep	163.100	163.153	0.052	(T)SG(Y)	53-54	a-La sheep
204.200	204.249	0.048	(M)KG(L)	26-27	b-Lg sheep	232.200	232.259	0.059	(Y)GGV(S)	38-40	a-La sheep
286.350	286.351	0.000	(I)PAV(F)	97-99	b-Lg sheep	284.400	284.338	-0.062	(A)HK(A)	126-127	a-La sheep
314.400	314.361	-0.038	(K)PTP(E)	66-68	b-Lg sheep	332.400	332.420	0.019	(V)SLL(L)	6-8	a-La sheep
332.400	332.376	-0.023	(I)IAE(K)	90-92	b-Lg sheep	360.350	360.390	0.039	(Q)INN(K)	74-76	a-La sheep
332.400	332.376	-0.023	(N)EAL(E)	149-151	b-Lg sheep	360.350	360.390	0.039	(I)VQN(N)	61-63	a-La sheep
332.400	332.376	-0.023	(E)ALE(K)	150-152	b-Lg sheep	360.350	360.430	0.080	(K)ILD(K)	114-116	a-La sheep
332.400	332.420	0.019	(D)ISL(L)	47-49	b-Lg sheep	402.400	402.470	0.070	(K)VGIN(Y)	118-121	a-La sheep
332.400	332.420	0.019	(I)SLL(D)	48-50	b-Lg sheep	402.400	402.473	0.073	(S)RNI(C)	89-91	a-La sheep
332.400	332.420	0.019	(I)IVT(Q)	20-22	b-Lg sheep	468.500	468.576	0.076	(W)LAHK(A)	124-127	a-La sheep
342.400	342.377	-0.023	(T)WH(S)	37-38	b-Lg sheep	468.500	468.576	0.076	(A)HKAL(C)	126-129	a-La sheep
360.350	360.430	0.080	(G)LDI(Q)	28-30	b-Lg sheep	469.400	469.471	0.071	(S)TEYG(L)	67-70	a-La sheep
360.350	360.430	0.080	(S)ILD(A)	49-51	b-Lg sheep	577.450	577.528	0.077	(V)QNNDS(T)	62-66	a-La sheep
360.350	360.433	0.083	(E)NKV(L)	108-110	b-Lg sheep	578.500	578.553	0.052	(L)DDDLT(D)	101-105	a-La sheep
402.400	402.427	0.027	(A)QSAP(L)	53-56	b-Lg sheep	578.500	578.553	0.052	(D)DDLTD(D)	102-106	a-La sheep
557.700	557.710	0.010	(L)LALGLA(L)	6-11	b-Lg sheep	578.500	578.553	0.052	(D)DLTDD(I)	103-107	a-La sheep
557.700	557.710	0.010	(L)ALGLA(A)	7-12	b-Lg sheep						
557.700	557.710	0.010	(A)LGLALA(C)	8-13	b-Lg sheep						
634.600	634.623	0.022	(K)WENGE(C)	79-83	b-Lg sheep						

Εικόνα 29. Πεπτιδία δείγματος Π8 β-λακτοσφαιρίνης και α-λακταλβουμίνης.

Μάζα	Μάζα πεπτιδίου	Διαφορά μαζών	Αλληλουχία πεπτιδίου	Θραύσμα	Πρωτεΐνη	Μάζα	Μάζα πεπτιδίου	Διαφορά μαζών	Αλληλουχία πεπτιδίου	Θραύσμα	Πρωτεΐνη
230.300	230.243	-0.056	(I)PN(S)	82-83	b casein goat	230.300	230.243	-0.056	(I)PN(S)	82-83	b casein sheep
284.350	284.294	-0.055	(M)HQ(P)	160-161	b casein goat	284.350	284.294	-0.055	(M)HQ(P)	160-161	b casein sheep
284.350	284.338	-0.012	(P)KH(K)	120-121	b casein goat	284.350	284.338	-0.012	(P)KH(K)	120-121	b casein sheep
284.350	284.338	-0.012	(K)HK(E)	121-122	b casein goat	284.350	284.338	-0.012	(K)HK(E)	121-122	b casein sheep
314.400	314.405	0.004	(V)VVP(P)	98-100	b casein goat	314.400	314.361	-0.038	(L)PPT(V)	167-169	b casein sheep
314.400	314.405	0.004	(T)PVV(V)	96-98	b casein goat	314.400	314.405	0.004	(V)VVP(P)	98-100	b casein sheep
342.400	342.458	0.058	(N)ILP(L)	89-91	b casein goat	314.400	314.405	0.004	(T)PVV(V)	96-98	b casein sheep
342.400	342.458	0.058	(I)LPL(T)	90-92	b casein goat	342.400	342.458	0.058	(N)ILP(L)	89-91	b casein sheep
342.400	342.458	0.058	(H)LPL(P)	150-152	b casein goat	342.400	342.458	0.058	(I)LPL(T)	90-92	b casein sheep
342.400	342.458	0.058	(P)LPL(V)	152-154	b casein goat	342.400	342.458	0.058	(H)LPL(P)	150-152	b casein sheep
342.400	342.458	0.058	(F)PIL(V)	219-221	b casein goat	342.400	342.458	0.058	(P)LPL(V)	152-154	b casein sheep
360.400	360.433	0.032	(M)PFP(K)	125-127	b casein goat	342.400	342.458	0.058	(F)PIL(V)	219-221	b casein sheep
360.400	360.433	0.032	(M)PFP(Q)	172-174	b casein goat	360.400	360.433	0.032	(M)PFP(K)	125-127	b casein sheep
360.400	360.433	0.032	(G)PFP(I)	217-219	b casein goat	360.400	360.433	0.032	(M)PFP(Q)	172-174	b casein sheep
360.400	360.433	0.032	(V)PPF(L)	100-102	b casein goat	360.400	360.433	0.032	(G)PFP(I)	217-219	b casein sheep
418.500	418.429	-0.070	(P)QRD(M)	195-197	b casein goat	360.400	360.433	0.032	(V)PPF(L)	100-102	b casein sheep
418.500	418.470	-0.030	(Q)AQL(V)	70-73	b casein goat	418.500	418.429	-0.070	(P)QRD(M)	195-197	b casein sheep
510.450	510.524	0.073	(K)FQSE(E)	48-51	b casein goat	418.500	418.470	-0.030	(Q)AQL(V)	70-73	b casein sheep
558.600	558.611	0.011	(N)SLPQN(I)	84-88	b casein goat	558.600	558.611	0.011	(N)SLPQN(I)	84-88	b casein sheep
558.600	558.611	0.011	(P)NSLPQ(N)	83-87	b casein goat	558.600	558.611	0.011	(P)NSLPQ(N)	83-87	b casein sheep
558.600	558.655	0.054	(L)SQPKV(L)	181-185	b casein goat	558.600	558.655	0.054	(L)SQPKV(L)	181-185	b casein sheep
633.600	633.632	0.032	(T)EDELQ(D)	57-61	b casein goat	878.000	877.967	-0.033	(Q)SLTLTQVE(K)	139-146	b casein sheep
633.600	633.635	0.035	(E)EQQT(E)	52-56	b casein goat	878.000	878.074	0.073	(P)FLOPEIM(G)	102-108	b casein sheep
633.600	633.635	0.035	(E)QQTE(D)	53-57	b casein goat						
633.600	633.676	0.075	(V)VGETVE(S)	24-29	b casein goat						
647.600	647.659	0.059	(R)EQEEL(N)	17-21	b casein goat						
878.000	877.967	-0.033	(Q)SLTLTQVE(K)	139-146	b casein goat						
878.000	878.074	0.073	(P)FLOPEIM(G)	102-108	b casein goat						

Εικόνα 30. Πεπτιδία δείγματος Α5 β-καζεΐνης πρόβειου και κατσικίσου γάλακτος.



Μάζα	Μάζα πεπτιδίου	Διαφορά μαζών	Αλληλουχία πεπτιδίου	Θραύσμα	Πρωτεΐνη	Μάζα	Μάζα πεπτιδίου	Διαφορά μαζών	Αλληλουχία πεπτιδίου	Θραύσμα	Πρωτεΐνη
204.200	204.205	0.005	(P)NA(V)	102-103	k-casein sheep	230.300	230.243	-0.056	(L)PN(T)	101-102	k casein goat
204.200	204.205	0.005	(V)NA(V)	164-165	k-casein sheep	230.300	230.243	-0.056	(D)NP(E)	168-169	k casein goat
230.300	230.243	-0.056	(L)PN(A)	101-102	k-casein sheep	342.400	342.375	-0.025	(T)VHS(T)	153-155	k casein goat
230.300	230.243	-0.056	(D)NP(E)	168-169	k-casein sheep	342.400	342.458	0.058	(Y)IPI(Q)	47-49	k casein goat
342.400	342.375	-0.025	(T)VHS(T)	153-155	k-casein sheep	360.400	360.390	-0.010	(L)INN(Q)	72-74	k casein goat
360.400	360.390	-0.010	(L)INN(Q)	72-74	k-casein sheep	384.400	384.470	0.070	(L)SFM(A)	125-127	k casein goat
384.400	384.470	0.070	(L)SFM(A)	125-127	k-casein sheep	402.350	402.427	0.077	(R)SPAQ(T)	90-93	k casein goat
418.500	418.426	-0.073	(V)NAVD(N)	164-167	k-casein sheep	408.400	408.434	0.033	(N)NQF(L)	74-76	k casein goat
418.500	418.426	-0.073	(N)AVDN(P)	165-168	k-casein sheep	418.500	418.470	-0.030	(P)AINT(I)	142-145	k casein goat
418.500	418.470	-0.030	(P)AINT(I)	142-145	k-casein sheep	418.500	418.470	-0.030	(I)NTIA(S)	144-147	k casein goat
418.500	418.470	-0.030	(I)NTIA(S)	144-147	k-casein sheep	418.500	418.470	-0.030	(N)TAQV(T)	184-187	k casein goat
418.500	418.470	-0.030	(N)TAQV(T)	184-187	k-casein sheep	418.500	418.470	-0.030	(T)AQV(T)	185-188	k casein goat
418.500	418.470	-0.030	(T)AQV(T)	185-188	k-casein sheep	558.600	558.615	0.014	(V)RSPAQ(T)	89-93	k casein goat
558.600	558.615	0.014	(V)RSPAQ(T)	89-93	k-casein sheep	605.600	605.667	0.067	(P)YPPY(A)	79-82	k casein goat
605.600	605.665	0.065	(Q)DKTEI(P)	136-140	k-casein sheep	633.600	633.679	0.078	(P)KKDQD(K)	132-136	k casein goat
605.600	605.667	0.067	(P)YPPY(A)	79-82	k-casein sheep	633.600	633.679	0.078	(K)KDKD(K)	133-137	k casein goat
633.600	633.679	0.078	(P)KKDQD(K)	132-136	k-casein sheep	633.600	633.679	0.078	(T)NTAQV(T)	183-188	k casein goat
633.600	633.679	0.078	(K)KDKD(K)	133-137	k-casein sheep	633.600	633.679	0.078	(E)TNTAQV(T)	182-187	k casein goat
633.600	633.679	0.078	(T)NTAQV(T)	183-188	k-casein sheep	647.600	647.619	0.018	(Q)EQNQ(E)	23-27	k casein goat
633.600	633.679	0.078	(E)TNTAQV(T)	182-187	k-casein sheep	661.600	661.689	0.089	(I)VNTVDN(P)	163-168	k casein goat

Εικόνα 31. Πεπτίδια δείγματος A5 κ-καζείνης πρόβειου και κασικίσιου γάλακτος.

Μάζα	Μάζα πεπτιδίου	Διαφορά μαζών	Αλληλουχία πεπτιδίου	Θραύσμα	Πρωτεΐνη	Μάζα	Μάζα πεπτιδίου	Διαφορά μαζών	Αλληλουχία πεπτιδίου	Θραύσμα	Πρωτεΐνη
204.200	204.205	0.005	(H)QG(L)	24-25	as1 casein sheep	204.200	204.249	0.048	(S)GK(T)	207-208	as1 casein goat
204.200	204.249	0.048	(S)GK(I)	207-208	as1 casein sheep	230.300	230.243	-0.056	(V)PN(E)	31-32	as1 casein goat
230.300	230.243	-0.056	(V)PN(S)	88-89	as1 casein sheep	230.300	230.243	-0.056	(V)PN(S)	88-89	as1 casein goat
230.300	230.243	-0.056	(G)NP(A)	142-143	as1 casein sheep	230.300	230.243	-0.056	(G)NP(A)	142-143	as1 casein goat
230.300	230.243	-0.056	(I)PN(P)	198-199	as1 casein sheep	230.300	230.243	-0.056	(I)PN(P)	198-199	as1 casein goat
230.300	230.243	-0.056	(P)NP(I)	199-200	as1 casein sheep	230.300	230.243	-0.056	(P)NP(I)	199-200	as1 casein goat
284.350	284.294	-0.055	(K)HQ(G)	23-24	as1 casein sheep	284.350	284.294	-0.055	(A)HQ(K)	145-146	as1 casein goat
284.350	284.294	-0.055	(A)HQ(K)	145-146	as1 casein sheep	284.350	284.338	-0.012	(P)KH(P)	18-19	as1 casein goat
284.350	284.338	-0.012	(P)KH(P)	18-19	as1 casein sheep	360.400	360.390	-0.010	(E)NIN(E)	51-53	as1 casein goat
284.350	284.338	-0.012	(I)KH(Q)	22-23	as1 casein sheep	360.400	360.390	-0.010	(A)VNQ(E)	153-155	as1 casein goat
360.400	360.390	-0.010	(E)NIN(E)	51-53	as1 casein sheep	360.400	360.430	0.030	(E)EIV(P)	85-87	as1 casein goat
360.400	360.390	-0.010	(A)VNQ(E)	153-155	as1 casein sheep	360.400	360.430	0.030	(L)EIV(P)	125-127	as1 casein goat
360.400	360.430	0.030	(S)EVL(N)	29-31	as1 casein sheep	360.400	360.433	0.032	(A)PFP(E)	42-44	as1 casein goat
360.400	360.430	0.030	(E)EIV(P)	85-87	as1 casein sheep	408.400	408.388	-0.012	(K)AGSSS(S)	77-81	as1 casein goat
360.400	360.430	0.030	(L)EIV(P)	125-127	as1 casein sheep	418.500	418.470	-0.030	(P)LGTT(Q)	184-187	as1 casein goat
360.400	360.433	0.032	(A)PFP(E)	42-44	as1 casein sheep	469.400	469.471	0.071	(Q)YTDA(P)	188-191	as1 casein goat
408.400	408.388	-0.012	(K)AGSSS(S)	77-81	as1 casein sheep						
418.500	418.470	-0.030	(P)LGTT(Q)	184-187	as1 casein sheep						
418.500	418.513	0.013	(S)GKIT(M)	207-210	as1 casein sheep						
469.400	469.471	0.071	(Q)YTDA(P)	188-191	as1 casein sheep						
662.600	662.674	0.073	(E)SIEDQA(M)	63-68	as1 casein sheep						

Εικόνα 32. Πεπτίδια δείγματος A5 as1- καζείνης πρόβειου και κασικίσιου γάλακτος.



Μάζα	Μάζα πεπτιδίου	Διαφορά μαζών	Αλληλουχία πεπτιδίου	Θραύσμα	Πρωτεΐνη	Μάζα	Μάζα πεπτιδίου	Διαφορά μαζών	Αλληλουχία πεπτιδίου	Θραύσμα	Πρωτεΐνη
204.200	204.205	0.005	(Y)QG(P)	117-118	as2 casein sheep	204.200	204.205	0.005	(Y)QG(P)	117-118	as2 casein goat
204.200	204.205	0.005	(R)NA(D)	62-63	as2 casein sheep	204.200	204.205	0.005	(R)NA(N)	62-63	as2 casein goat
204.200	204.205	0.005	(R)NA(G)	131-132	as2 casein sheep	204.200	204.205	0.005	(N)AN(E)	63-64	as2 casein goat
204.200	204.205	0.005	(T)NA(I)	215-216	as2 casein sheep	204.200	204.205	0.005	(R)NA(G)	131-132	as2 casein goat
230.300	230.243	-0.056	(L)NP(W)	123-124	as2 casein sheep	204.200	204.205	0.005	(T)NA(I)	215-216	as2 casein goat
284.350	284.294	-0.055	(D)QH(Q)	201-202	as2 casein sheep	230.300	230.243	-0.056	(L)NP(W)	123-124	as2 casein goat
284.350	284.294	-0.055	(Q)HQ(K)	202-203	as2 casein sheep	284.350	284.294	-0.055	(D)QH(Q)	201-202	as2 casein goat
284.350	284.338	-0.012	(A)KH(K)	16-17	as2 casein sheep	284.350	284.294	-0.055	(Q)HQ(K)	202-203	as2 casein goat
284.350	284.338	-0.012	(K)HK(M)	17-18	as2 casein sheep	284.350	284.338	-0.012	(A)KH(K)	16-17	as2 casein goat
284.350	284.338	-0.012	(D)KH(Y)	92-93	as2 casein sheep	284.350	284.338	-0.012	(K)HK(M)	17-18	as2 casein goat
342.400	342.375	-0.025	(E)HVS(S)	21-23	as2 casein sheep	284.350	284.338	-0.012	(D)KH(Y)	92-93	as2 casein goat
360.400	360.393	-0.007	(V)RNA(D)	61-63	as2 casein sheep	360.400	360.393	-0.007	(V)RNA(N)	61-63	as2 casein goat
360.400	360.393	-0.007	(K)RNA(G)	130-132	as2 casein sheep	360.400	360.393	-0.007	(K)RNA(G)	130-132	as2 casein goat
384.400	384.412	0.011	(M)EHV(S)	20-22	as2 casein sheep	384.400	384.412	0.011	(M)EHV(S)	20-22	as2 casein goat
408.400	408.434	0.033	(I)NQF(Y)	102-104	as2 casein sheep	408.400	408.434	0.033	(I)NQF(Y)	102-104	as2 casein goat
418.500	418.429	-0.070	(V)NRE(Q)	140-142	as2 casein sheep	418.500	418.429	-0.070	(V)NRE(Q)	140-142	as2 casein goat
418.500	418.470	-0.030	(K)TNAI(P)	214-217	as2 casein sheep	418.500	418.470	-0.030	(K)TNAI(P)	214-217	as2 casein goat
558.600	558.568	-0.031	(M)EHVSS(S)	20-24	as2 casein sheep	558.600	558.568	-0.031	(M)EHVSS(S)	20-24	as2 casein goat
558.600	558.658	0.057	(E)VVRNA(D)	59-63	as2 casein sheep	558.600	558.609	0.008	(V)APEEI(K)	81-85	as2 casein goat
577.500	577.525	0.024	(R)NADEE(E)	62-66	as2 casein sheep	558.600	558.658	0.057	(E)VVRNA(N)	59-63	as2 casein goat
605.600	605.622	0.022	(E)ESAeva(P)	76-81	as2 casein sheep	605.600	605.622	0.022	(E)ESAeva(P)	76-81	as2 casein goat
605.600	605.668	0.068	(E)ENSKK(T)	149-153	as2 casein sheep	605.600	605.668	0.068	(E)ENSKK(T)	149-153	as2 casein goat
661.600	661.686	0.086	(S)SSEPI(N)	24-29	as2 casein sheep	661.600	661.686	0.086	(S)SSEPI(N)	24-29	as2 casein goat
878.000	877.929	-0.071	(I)TVDDKHY(Q)	88-94	as2 casein sheep	878.000	877.929	-0.071	(I)TVDDKHY(Q)	88-94	as2 casein goat
878.000	877.972	-0.028	(A)LNEINQF(Y)	98-104	as2 casein sheep	878.000	877.972	-0.028	(A)LNEINQF(Y)	98-104	as2 casein goat
						878.000	878.077	0.077	(P)RKEKLT(T)	47-53	as2 casein goat

Εικόνα 33. Πεπτιδία δείγματος A5 as2- καζέινης πρόβειου και κατσικίσου γάλακτος.

Μάζα	Μάζα πεπτιδίου	Διαφορά μαζών	Αλληλουχία πεπτιδίου	Θραύσμα	Πρωτεΐνη	Μάζα	Μάζα πεπτιδίου	Διαφορά μαζών	Αλληλουχία πεπτιδίου	Θραύσμα	Πρωτεΐνη
204.200	204.205	0.005	(E)GQC(C)	176-177	b-Lg sheep	204.200	204.205	0.005	(E)GQC(C)	176-177	b-Lg goat
204.200	204.249	0.048	(M)KG(L)	26-27	b-Lg sheep	204.200	204.249	0.048	(M)KG(L)	26-27	b-Lg goat
230.300	230.243	-0.056	(F)NP(T)	170-171	b-Lg sheep	230.300	230.243	-0.056	(F)NP(T)	170-171	b-Lg goat
314.400	314.361	-0.038	(K)PTP(E)	66-68	b-Lg sheep	314.400	314.361	-0.038	(K)PTP(E)	66-68	b-Lg goat
342.400	342.377	-0.023	(T)WH(S)	37-38	b-Lg sheep	360.400	360.430	0.030	(G)LDI(Q)	28-30	b-Lg goat
360.400	360.430	0.030	(G)LDI(Q)	28-30	b-Lg sheep	360.400	360.430	0.030	(S)LLD(A)	49-51	b-Lg goat
360.400	360.430	0.030	(S)LLD(A)	49-51	b-Lg sheep	360.400	360.433	0.033	(E)NKV(L)	108-110	b-Lg goat
360.400	360.433	0.033	(E)NKV(L)	108-110	b-Lg sheep	360.400	360.491	0.091	(A)LPM(H)	161-163	b-Lg goat
384.400	384.473	0.073	(L)PMH(I)	162-164	b-Lg sheep	402.350	402.427	0.077	(A)QSAP(L)	53-56	b-Lg goat
402.350	402.427	0.077	(A)QSAP(L)	53-56	b-Lg sheep	418.500	418.470	-0.030	(E)QSLA(C)	133-136	b-Lg goat
418.500	418.470	-0.030	(E)QSLA(C)	133-136	b-Lg sheep	558.600	558.695	0.095	(K)VLVLD(T)	110-114	b-Lg goat
558.600	558.673	0.072	(W)HSLAM(A)	38-42	b-Lg sheep	558.600	558.698	0.098	(D)IQKVA(G)	30-34	b-Lg goat
558.600	558.695	0.095	(K)VLVLD(T)	110-114	b-Lg sheep	605.600	605.665	0.065	(A)ASDISL(L)	44-49	b-Lg goat
605.600	605.579	-0.021	(P)EVDNE(A)	145-149	b-Lg sheep	633.600	633.681	0.081	(Q)KWENG(E)	78-82	b-Lg goat
605.600	605.665	0.065	(A)ASDISL(L)	44-49	b-Lg sheep	878.000	877.990	-0.009	(E)NGECAQKK(I)	81-88	b-Lg goat
633.600	633.681	0.081	(Q)KWENG(E)	78-82	b-Lg sheep	878.000	878.012	0.012	(V)YVEELKP(T)	60-66	b-Lg goat
878.000	877.990	-0.009	(E)NGECAQKK(I)	81-88	b-Lg sheep	878.000	878.074	0.074	(I)IVTQTMKG(L)	20-27	b-Lg goat
878.000	878.012	0.012	(V)YVEELKP(T)	60-66	b-Lg sheep	878.000	878.074	0.074	(I)VTQTMKGL(D)	21-28	b-Lg goat
878.000	878.074	0.074	(I)IVTQTMKG(L)	20-27	b-Lg sheep						
878.000	878.074	0.074	(I)VTQTMKGL(D)	21-28	b-Lg sheep						

Εικόνα 34. Πεπτιδία δείγματος A5 β-λακτοσφαιρίνης πρόβειου και κατσικίσου γάλακτος.



Μάζα	Μάζα πεπτιδίου	Διαφορά μαζών	Αλληλουχία πεπτιδίου	Θραύσμα	Πρωτεΐνη	Μάζα	Μάζα πεπτιδίου	Διαφορά μαζών	Αλληλουχία πεπτιδίου	Θραύσμα	Πρωτεΐνη
230.300	230.243	-0.056	(Q)NP(H)	85-86	a-La sheep	230.300	230.243	-0.056	(Q)NP(H)	85-86	a-La goat
284.350	284.338	-0.012	(A)HK(A)	126-127	a-La sheep	284.350	284.338	-0.012	(A)HK(A)	126-127	a-La goat
360.400	360.390	-0.010	(Q)INN(K)	74-76	a-La sheep	360.400	360.390	-0.010	(Q)INN(K)	74-76	a-La goat
360.400	360.390	-0.010	(I)VQN(N)	61-63	a-La sheep	360.400	360.390	-0.010	(I)VQN(N)	61-63	a-La goat
360.400	360.430	0.030	(K)ILD(K)	114-116	a-La sheep	360.400	360.430	0.030	(K)ILD(K)	114-116	a-La goat
384.400	384.470	0.070	(M)MSF(V)	2-4	a-La sheep	384.400	384.470	0.070	(M)MSF(V)	2-4	a-La goat
469.400	469.471	0.071	(S)TEYG(L)	67-70	a-La sheep	418.500	418.470	-0.030	(L)DKVG(I)	116-119	a-La goat
510.450	510.524	0.073	(K)DYGGV(S)	36-40	a-La sheep	469.400	469.471	0.071	(S)TEYG(L)	67-70	a-La goat
558.600	558.655	0.054	(T)QAIVQ(N)	58-62	a-La sheep	510.450	510.524	0.073	(K)DYGGV(S)	36-40	a-La goat
577.500	577.528	0.027	(V)QNNDS(T)	62-66	a-La sheep	558.600	558.655	0.054	(T)QAIVQ(N)	58-62	a-La goat
578.500	578.553	0.052	(L)DDDLT(D)	101-105	a-La sheep	577.500	577.528	0.027	(V)QNNDS(T)	62-66	a-La goat
578.500	578.553	0.052	(D)DDLTD(D)	102-106	a-La sheep	578.500	578.553	0.052	(L)DDDLT(D)	101-105	a-La goat
578.500	578.553	0.052	(D)DLTDD(I)	103-107	a-La sheep	578.500	578.553	0.052	(D)DDLTD(D)	102-106	a-La goat
647.600	647.662	0.062	(H)ATQAEQ(L)	16-21	a-La sheep	578.500	578.553	0.052	(D)DLTDD(I)	103-107	a-La goat
878.000	878.099	0.099	(M)SFVSLLLV(G)	3-10	a-La sheep	647.600	647.662	0.062	(H)ATQAEQ(L)	16-21	a-La goat
						878.000	878.059	0.058	(E)VFGKLD(L)	27-33	a-La goat
						878.000	878.099	0.099	(M)SFVSLLLV(G)	3-10	a-La goat

Εικόνα 35. Πεπτίδια δείγματος Α5 α-λακταβουμίνης πρόβειου και κατσικίσου γάλακτος.

Στα δείγματα που αναλύθηκαν βρέθηκαν πεπτίδια και θραύσματα αυτών, τα οποία υπάρχουν στα δείγματα μας. Αυτό που παρατηρείται, είναι πως αρκετά από τα πεπτίδια είναι ίδια στις πρωτεΐνες του πρόβειου και του κατσικίσου γάλακτος, παρόλα αυτά υπάρχουν και τα πεπτίδια που δεν είναι κοινά. Επίσης, η παρουσία κάποιου θραύσματος πεπτιδίου, πιθανότατα υποδηλώνει και την παρουσία του πεπτιδίου στα δείγματα από το Τσαλαφούτι.

Στην συνέχεια τα πεπτίδια ή τα θραύσματα των πεπτιδίων που ταυτοποιήθηκαν, ελέγχθηκαν ως προς την βιολογική τους δράση στις εφαρμογές MBPDB, BIOPEP-UWM και BioDADPeP. Επίσης, τα πεπτίδια που βρέθηκαν στα δείγματα ελέγχθηκαν για την βιοδραστικότητα τους σε βιβλιογραφικές πηγές. Στους πίνακες που ακολουθούν καταγράφονται τα βιοπεπτίδια που εντοπίστηκαν στα δείγματα του τυριού Τσαλαφούτι, η πρωτεΐνη από την οποία προέρχονται, η θέση στην οποία εντοπίζεται (θραύσμα της πρωτεΐνης), το είδος του γάλακτος από όπου προέρχεται η πρωτεΐνη (πρόβειο, κατσικίσιο), καθώς και η βιοδραστικότητα των βιοπεπτιδίων (Πίνακες 9-20).

Δείγμα: Z6						
Αλληλουχία πεπτιδίου	Πρωτεΐνη	Θραύσμα	Μάζα πεπτιδίου/ θραύσματος (Da)	Είδος γάλακτος	Βιοδραστικότητα	Αναφορά
MHQPPQPL	β-καζεΐνη	159-166	947.106/ 341.300 (QPP)	Πρόβειο	DPP-IV inhibitory	(Zhang, Chen, Ma, & Chen, 2015)
SPTVMFPPQSVL	β-καζεΐνη	165-178	1302.536/ 430.450 (PQSV)	Πρόβειο	DPP-IV inhibitory	(Zhang, Chen, Ma, & Chen, 2015)
QEPVLGVRGP FP	β-καζεΐνη	207-219	1392.601/ 475.500 (VRGPF)	Πρόβειο	Antidiabetic	(Gong et al., 2020), (Guha et al, 2021)
KVLILA	β-καζεΐνη	2-7	656.700	Πρόβειο	ACE inhibitory	(Wang et al., 2011)
TAQVTSTEV	κ-καζεΐνη	184-192	934.981 /707.700 (TAQVTST)	Πρόβειο	Antithrombotic	(Qian et al., 1995)
SDIPNPIGSE	αs1- καζεΐνη	195-204	1028.066/ 502.500 (PIGSE)	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	Antidiabetic	(Gong et al., 2020)
VPSERY	αs1- καζεΐνη	101-106	750.900	Πρόβειο	ACE inhibitory	(Ruiz, Ramos & Recio, 2004)
VRYL	αs2- καζεΐνη	220-223	550.800	Πρόβειο	ACE-inhibitory	(Ruiz, Ramos & Recio, 2004)
KFAWPQ	αs2- καζεΐνη	189-194	776.900	Πρόβειο	ACE-inhibitory	(Quirós et al., 2005)
LKGYGGVSLPE	a-La	34-44	1119.265/ 232.200 (GGV)	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	DPP-IV inhibitory	(Lacroix, Meng, Cheung, & Li-Chan, 2016)

Πίνακας 9. Βιοπεπτιδία δείγματος Z6.

Δείγμα: Σ7						
Αλληλουχία πεπτιδίου	Πρωτεΐνη	Θραύσμα	Μάζα πεπτιδίου/ θραύσματος (Da)	Είδος γάλακτος	Βιοδραστικότητα	Αναφορά
QTPVVVPPF	β-καζεΐνη	94-102	983.200	Πρόβειο	Immunomodulatory	(Hayes et. al, 2007)

NAGPFTPT	αs2-καζεΐνηη	131-138	803.800	Πρόβειο	Antibacterial	(Lopez-Exposito et al., 2006)
YAKPVA	κ-καζεΐνηη	82-87	647.600	Πρόβειο	ACE-inhibitory	(Miguel et al., 2010)
LKKISQ	αs2-καζεΐνηη	180-185	716.600	Πρόβειο/ Κατσεικίσιο	Antimicrobial	(Lopez-Exposito et al., 2006)
NPWDQVKR	αs2-καζεΐνηη	123-130	1042.144/ 659.350 (NPWDQ)	Κατσεικίσιο	Antidiabetic	(Gong et al., 2020)
LKGYGGVSLPE	α-La	34-44	1119.265/ 658.100 (GGVSLPE)	Πρόβειο/ Κατσεικίσιο	DPP-IV inhibitory	(Lacroix, Meng, Cheung, & Li-Chan, 2016)
IPIQY	κ-καζεΐνηη	47-51	633.600	Κατσεικίσιο	DPP-IV inhibitory	(Nongonierma & FitzGerald, 2014)
GPFPILV	β-καζεΐνηη	216-222	741.911/ 342.400 (PIL)	Κατσεικίσιο	DPP-IV inhibitory	(Zhang et al., 2015)

Πίνακας 10. Βιοπεπτιδία δείγματος Σ7.

<b>Δείγμα: Κ6</b>						
<b>Αλληλουχία πεπτιδίου</b>	<b>Πρωτεΐνη</b>	<b>Θραύσμα</b>	<b>Μάζα πεπτιδίου/ θραύσματος (Da)</b>	<b>Είδος γάλακτος</b>	<b>Βιοδραστικότητα</b>	<b>Αναφορά</b>
TGPIPN	β-καζεΐνηη	78-83	597.652/ 383.200 (GPIP)	Πρόβειο	ACE-inhibitory	Recio & Visser, 2000)
GPFPILV	β-καζεΐνηη	216-222	741.911/ 342.400 (PIL)	Πρόβειο	DPP-IV inhibitory	(Zhang et al., 2015)
SPTVMFPPQSVL	β-καζεΐνηη	167-178	1302.536/ 430.400 (PQSV)	Πρόβειο	DPP-IV inhibitory	(Zhang, Chen, Ma, & Chen, 2015)

MHQPPQL	β-καζεΐνη	159-166	947.106/ 454.350 (PQPL)	Πρόβειο	DPP-IV inhibitory	(Zhang, Chen, Ma, & Chen, 2015)
VPSERY	αs1-καζεΐνη	101-106	750.750	Πρόβειο	ACE inhibitory	(Ruiz, Ramos & Recio, 2004)
VDQHQQAMKPWTQ-PKTNAIPYVRYL	αs2-καζεΐνη	184-208	3013.491/ 628.500 (PWTQP)	Πρόβειο	Antibacterial	(Lopez-Exposito et al., 2006)
VLVLDTDYK	B-Lg	110-118	1065.213/ 659.600 (VLVLDT)	Πρόβειο	DPP-IV inhibitory/ ACE inhibitory	(Nongonierma et al., 2017)

Πίνακας 11. Βιοπεπτιδία δείγματος Κ6.

<b>Δείγμα: Σ6</b>						
<b>Αλληλουχία πεπτιδίου</b>	<b>Πρωτεΐνη</b>	<b>Θραύσμα</b>	<b>Μάζα πεπτιδίου/ θραύσματος (Da)</b>	<b>Είδος γάλακτος</b>	<b>Βιοδραστικότητα</b>	<b>Αναφορά</b>
PPKKDQDKTEVPA	κ-καζεΐνη	130-142	1452.608/ 341.300 (PPK)	Κατσικίσιο	Antimicrobial	(Almaas et al., 2011)
ASAEPVH	κ-καζεΐνη	147-154	810.844/ 474.250 (ASAEP)	Κατσικίσιο	Antimicrobial	(Almaas et al., 2011)
PTVHSTPTTE	κ-καζεΐνη	151-160	1069.118/ 635.400 (STPTTE)	Κατσικίσιο	Antimicrobial	(Almaas et al., 2011)
ENLLRF	αs1-καζεΐνη	33-38	790.900/ 662.600 (NLLRF)	Κατσικίσιο	ACE-inhibitory	(Quirós et al., 2005)
NPWDQVQR	αs2-καζεΐνη	123-130	1042.144/ 830.800 (WDQVQR)	Κατσικίσιο	Antidiabetic	(Gong et al., 2020)

KDQDK	κ-καζεΐνη	133-137	633.600	Πρόβειο	Antithrombotic	(Qian et al., 1995)
SDIPNPIGSENSEK	αs1-καζεΐνη	195-208	1486.536/ 668.600 (DIPNPI)	Κατσικίσιο	Antibacterial	(Hayes et al., 2013)

Πίνακας 12. Βιοπεπτιδία δείγματος Σ6

<b>Δείγμα: B6</b>						
<b>Αλληλουχία πεπτιδίου</b>	<b>Πρωτεΐνη</b>	<b>Θραύσμα</b>	<b>Μάζα πεπτιδίου/ θραύσματος (Da)</b>	<b>Είδος γάλακτος</b>	<b>Βιοδραστικότητα</b>	<b>Αναφορά</b>
SPTVMFPPQSVL	β-καζεΐνη	167-178	1302.536/ 304.200 (STP)	Πρόβειο	DPP-IV inhibitory	(Zhang, Chen, Ma, & Chen, 2015)
YQEPVLGP	β-καζεΐνη	206-213	1302.536/ 739.600 (QEPVLGP)	Κατσικίσιο	Antioxidant/ Antidiabetic	(Gong et al., 2020)
SDIPNPIGSE	αs1-καζεΐνη	195-204	1028.066/ 668.700 (DIPNP)	Κατσικίσιο	Antidiabetic	(Gong et al., 2020)
KDQDK	κ-καζεΐνη	133-137	633.600	Πρόβειο	Antithrombotic	(Qian et al., 1995)
DAQSAPLR	B-Lg	51-58	858.000	Κατσικίσιο	Antimicrobial	(Almaas et al., 2011)
TGPIP	β-καζεΐνη	78-83	597.652/ 383.200 (GPIP)	Πρόβειο	ACE-inhibitory	(Greerlings et al., 2006)
NPWDQVKR	αs2-καζεΐνη	123-130	1042.144/ 659.600 (NPWDQ)	Κατσικίσιο	Antidiabetic	(Gong et al., 2020)
YPPY	κ-καζεΐνη	79-82	605.500	Πρόβειο	DPP-IV inhibitory/ ACE-inhibitory/ Opioid	(Nongonierma et al., 2013a,b,c, 2014a,b, and 2016)

YLAHK	a-La	104–108	630.600	Κατσικίσιο	ACE-inhibitory	(Recio & Visser, 2000)
LKPTPEGD	B-Lg	46-53	969.085/ 314.350 (PTP)	Κατσικίσιο	ACE-inhibitory	(Hernandez-Ledesma et al., 2002)

Πίνακας 13. Βιοπεπτιδία δείγματος Β6.

<b>Δείγμα: Σ9</b>						
<b>Αλληλουχία πεπτιδίου</b>	<b>Πρωτεΐνη</b>	<b>Θραύσμα</b>	<b>Μάζα πεπτιδίου/ θραύσματος (Da)</b>	<b>Είδος γάλακτος</b>	<b>Βιοδραστικότητα</b>	<b>Αναφορά</b>
MHQPPQL	β-καζεΐνη	159-166	947.106/ 341.300 (QPP)	Πρόβειο	DPP-IV inhibitory	(Zhang, Chen, Ma, & Chen, 2015)
ASAEPTVH	κ-καζεΐνη	147-154	810.844/ 473.400 (ASAEP)	Κατσικίσιο	Antimicrobial	(Almaas et al., 2011)
SDIPNPIGSENSEK	αs1-καζεΐνη	195-208	1028.066/ 502.450 (PIGSE)	Κατσικίσιο	Antibacterial	(Hayes et al., 2013)
SPTVMFPPQSVL	β-καζεΐνη	167-178	1302.536/ 778.400 (SPTVMFP)	Πρόβειο	DPP-IV inhibitory	(Zhang, Chen, Ma, & Chen, 2015)
KDQDK	κ-καζεΐνη	133-137	633.600	Πρόβειο	Antithrombotic	(Qian et al., 1995)
NPWDQVKR	αs2-καζεΐνη	123-130	659.500 (NPWDQ) 402.400 (VKR)	Κατσικίσιο	Antidiabetic	(Gong et al., 2020)
LKGYGGVSLPE	a-La	34-44	1119.265/ 1.046.300 (GGVSLPEWVC)	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	DPP-IV inhibitory	(Lacroix, Meng, Cheung, & Li-Chan, 2016)
YLAHK	a-La	104–108	630.600	Κατσικίσιο	ACE-inhibitory	(Recio & Visser, 2000)
LKPTPEGD	B-Lg	46-53	855.926/ 628.600 (KPTPEG)	Κατσικίσιο	ACE-inhibitory	(Hernandez-Ledesma et al., 2002)

ALPMHIR	B-Lg	142 – 148	837.037/ 360.350 (LPM)	Πρόβειο	ACE-inhibitory	(Chobert et al., 2005)
---------	------	-----------	------------------------------	---------	----------------	------------------------

Πίνακας 14. Βιοπεπτίδια δείγματος Σ9

Δείγμα: Π8						
Αλληλουχία πεπτιδίου	Πρωτεΐνη	Θραύσμα	Μάζα πεπτιδίου/ θραύσματος (Da)	Είδος γάλακτος	Βιοδραστικότητα	Αναφορά
KDQDK	κ-καζεΐνη	133-137	633.600	Πρόβειο	Antithrombotic	(Qian et al., 1995)
VPSERY	αs1-καζεΐνη	101-106	749.804/ 863.000 (VPSERYL)	Πρόβειο	ACE inhibitory	(Ruiz, Ramos & Recio, 2004)
SPTVMFPPQSVL	β-καζεΐνη	167-178	1302.536/ 341.300 (PPQ) 360.350 (FPP)	Πρόβειο	DPP-IV inhibitory	(Zhang, Chen, Ma, & Chen, 2015)
NPWDQVKR	αs2-καζεΐνη	123-127	1042.144/ 659.550 (NPWDQ)	Πρόβειο	Antidiabetic	(Gong et al., 2020)
IPAVF	B-Lg	96-100	545.662/ 286.350 (PAV)	Πρόβειο	DPP-IV inhibitory	(Silveira et al., 2013)
TGPIPN	β-καζεΐνη	78-83	597.652/ 286.350 (GPI)	Πρόβειο	ACE-inhibitory	(Greerlings et al., 2006)

Πίνακας 15. Βιοπεπτίδια δείγματος Π8.

Δείγμα: A5						
Αλληλουχία πεπτιδίου	Πρωτεΐνη	Θραύσμα	Μάζα πεπτιδίου/ θραύσματος (Da)	Είδος γάλακτος	Βιοδραστικότητα	Αναφορά



SLPQ	β-καζεΐνη	84-87	443.484/ 558.600 (NSLPQ)	Πρόβειο/ Κασικίσιο	ACE-inhibitory	(Greerlings et al., 2006)
MHQPPQL	β-καζεΐνη	159-166	947.106/ 284.350 (HQ)	Πρόβειο/ Κασικίσιο	DPP-IV inhibitory	(Zhang, Chen, Ma, & Chen, 2015)
SPTVMFPPQSVL	β-καζεΐνη	167-178	1302.536/ 360.400 (FPP)	Πρόβειο/ Κασικίσιο	DPP-IV inhibitory	(Zhang, Chen, Ma, & Chen, 2015)
NPWDQVKR	αs2-καζεΐνη	123-130	1302.536/ 230.300 (NP)	Κασικίσιο	Antidiabetic	(Gong et al., 2020)
INNQLPYPY	κ-καζεΐνη	72-81	1268.415/ 360.400 (INN)	Κασικίσιο	DPP-IV inhibitory	(Zhang, Chen, Ma, & Chen, 2015)
ALNEINQF	αs2-καζεΐνη	96-104	948.026/ 878.000 (LNEINQF)	Κασικίσιο	Antimicrobial	(Recio & Visser, 2000)
TAQVTSTEV	κ-καζεΐνη	184-192	934.981/ 418.500 (TAQV)	Πρόβειο/ Κασικίσιο	Antithrombotic	(Qian et al., 1995)
LKPTPEGD	B-Lg	64-72	855.926/ 314.400 (PTP)	Πρόβειο/ Κασικίσιο	DPP-IV inhibitory	(Lacroix et al., 2016)

Πίνακας 16. Βιοπεπτιδία δείγματος Α5.

<b>Δείγμα: B7</b>						
<b>Αλληλουχία πεπτιδίου</b>	<b>Πρωτεΐνη</b>	<b>Θραύσμα</b>	<b>Μάζα πεπτιδίου/ θραύσματος (Da)</b>	<b>Είδος γάλακτος</b>	<b>Βιοδραστικότητα</b>	<b>Αναφορά</b>
KFAWPQ	αs2-καζεΐνη	174–179	775.887/ 550.500 (KFAW)	Κασικίσιο	ACE-inhibitory	(Quir'os et al., 2005)
YPFTGPIPN	β-καζεΐνη	60–68	1005.12/ 286.400 (GPI)	Κασικίσιο	Antimicrobial	(Rizzello et al., 2005)
SLSSSEESITH	β-καζεΐνη	30-40	1176.184/ 477.300 (EESI)	Κασικίσιο	Antidiabetic	(Gong et al., 2020)
SDIPNPIGSE	αs1-καζεΐνη	195-204	1028.066/ 286.400 (PIG)	Κασικίσιο	Antidiabetic	(Gong et al., 2020)
NPWDQVKR	αs2-καζεΐνη	123-130	1042.144/ 402.400 (VKR)	Κασικίσιο	Antidiabetic	(Gong et al., 2020)
MHQPPQL	β-καζεΐνη	159-166	947.106/ 454.400 (PQPL)	Πρόβειο	DPP-IV inhibitory	(Zhang, Chen, Ma, & Chen, 2015)

ALPMHIR	B-Lg	142 – 148	837.037/ 384.200 (LPM)	Πρόβειο	ACE-inhibitory	(Chobert et al., 2005)
LKGYGGVSLPE	a-La	34-44	1119.265/ 536.600 (LKGYG)	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	DPP-IV inhibitory	(Lacroix, Meng, Cheung, & Li-Chan, 2016)
KDQDK	κ-καζεΐνη	133-137	633.600	Πρόβειο	Antithrombotic	(Qian et al., 1995)
PYVRYL	αs2-καζεΐνη	203–208	809.800	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	Antibacterial/ ACE-inhibitory/ Antihypertensive	(L´opez-Exp´osito et al., 2006)/ (Quir´os et al., 2005)/(Recio et al., 2005)

Πίνακας 17. Βιοπεπτιδία δείγματος B7.

<b>Δείγμα: B10</b>						
<b>Αλληλουχία πεπτιδίου</b>	<b>Πρωτεΐνη</b>	<b>Θραύσμα</b>	<b>Μάζα πεπτιδίου/ θραύσματος (Da)</b>	<b>Είδος γάλακτος</b>	<b>Βιοδραστικότητα</b>	<b>Αναφορά</b>
MHQPQPL	β-καζεΐνη	159-166	947.106/ 381.200 (HQP)	Πρόβειο	DPP-IV inhibitory	(Zhang, Chen, Ma, &, 2015)
SDIPNPIGSE	αs1-καζεΐνη	195-204	1028.066/ 1544.500 (APSFSDIPNPIGS EN)	Κατσικίσιο	Antidiabetic	(Gong et al., 2020)
NPWDQVKR	αs2-καζεΐνη	123-130	1042.144/ 1854.200 (IVLNPWDQVKRN AGPF)	Κατσικίσιο	Antidiabetic	(Gong et al., 2020)
LKALPMH	B-Lg	158-164	809.024/ 331.200 (KAL)	Κατσικίσιο	DPP-IV inhibitory/ ACE-inhibitory	(Lacroix, Meng, Cheung, & Li-Chan, 2016)
GFPILV	β-καζεΐνη	216-222	741.911/ 342.400 (PIL)	Κατσικίσιο	DPP-IV inhibitory	(Zhang et al., 2015)
LKGYGGVSLPE	a-La	34-44	1119.265/ 431.300 (GGVSL)	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	DPP-IV inhibitory	(Lacroix, Meng, Cheung, & Li-Chan, 2016)
KDQDK	κ-καζεΐνη	133-137	633.600	Πρόβειο	Antithrombotic	(Qian et al., 1995)

YQEPVLGP	β-καζεΐνη	206-213	901.997/ 649.600 (LYQEP)	Κασικίσιο	Antioxidant/ Antidiabetic	(Gong et al., 2020)
----------	-----------	---------	-----------------------------	-----------	------------------------------	------------------------

Πίνακας 18. Βιοπεπτιδία δείγματος B10.

<b>Δείγμα: Σ5</b>						
<b>Αλληλουχία πεπτιδίου</b>	<b>Πρωτεΐνη</b>	<b>Θραύσμα</b>	<b>Μάζα πεπτιδίου/ θραύσματος (Da)</b>	<b>Είδος γάλακτος</b>	<b>Βιοδραστικότητα</b>	<b>Αναφορά</b>
KDQDK	κ-καζεΐνη	133-137	633.600	Πρόβειο	Antithrombotic	(Qian et al., 1995)
NPWDQVKR	αs2-καζεΐνη	123-130	1042.144/ 545.400 (PWDQ) 402.400 (VKR)	Κασικίσιο	Antidiabetic	(Gong et al., 2020)
ASAEPTVH	κ-καζεΐνη	147-154	810.844/ 376.200 (ASAE)	Κασικίσιο	Antimicrobial	(Almaas et al., 2011)
PTVHSTPTE	κ-καζεΐνη	151-160	1069.118/ 541.600 (HSTPT)	Κασικίσιο	Antimicrobial	(Almaas et al., 2011)
LKGYGGVSLPE	α-La	34-44	1119.265/ 231.300 (GGV)	Πρόβειο/ Κασικίσιο	DPP-IV inhibitory	(Lacroix, Meng, Cheung, & Li- Chan, 2016)
ENLLRF	αs1-καζεΐνη	33-38	791.00	Κασικίσιο	ACE-inhibitory	(Quirós et al., 2005)
YAKPVA	κ-καζεΐνη	82-87	647.600	Πρόβειο	ACE-inhibitory	(Miguel et al., 2010)
LKKISQ	αs2-καζεΐνη	180-185	715.874/ 446.500 (KIS)	Πρόβειο/ Κασικίσιο	Antimicrobial	(Lopez-Exposito et al., 2006)
YLAHK	α-La	104-108	630.727/ 468.450 (LAHK)	Κασικίσιο	ACE-inhibitory	(Recio & Visser, 2000)

Πίνακας 19. Βιοπεπτιδία δείγματος Σ5.

<b>Δείγμα: Σ8</b>						
<b>Αλληλουχία πεπτιδίου</b>	<b>Πρωτεΐνη</b>	<b>Θραύσμα</b>	<b>Μάζα πεπτιδίου/ θραύσματος (Da)</b>	<b>Είδος γάλακτος</b>	<b>Βιοδραστικότητα</b>	<b>Αναφορά</b>

SDIPNPIGSE	αs1-καζεΐνη	195-204	1028.066/ 555.700 (DIPNP)	Κασικίσιο	Antidiabetic	(Gong et al., 2020)
KFAWPQ	αs2-καζεΐνη	189-194	775.887/ 429.550 (WPQ)	Πρόβειο	ACE-inhibitory	(Quirós et al., 2005)
KDQDK	κ-καζεΐνη	133-137	633.600/ 261.800 (KD)	Πρόβειο	Antithrombotic	(Qian et al., 1995)
LKGYGGVSLPE	a-La	34-44	1119.265/ 261.800 (GVS)	Πρόβειο/ Κασικίσιο	DPP-IV inhibitory	(Lacroix, Meng, Cheung, & Li-Chan, 2016)
YLAHK	a-La	104–108	630.700	Κασικίσιο	ACE-inhibitory	(Recio & Visser, 2000)
PYVRYL	αs2-καζεΐνη	203–208	809.945/ 338.100 (RY)	Πρόβειο/ Κασικίσιο	Antibacterial/ ACE-inhibitory/ Antihypertensive	(López-Expósito et al., 2006)/ (Quirós et al., 2005)/ (Recio et al., 2005)
LLF	B-Lg	103 – 105	391.494/ 555.700 (YLLF)	Κασικίσιο	ACE-inhibitory	(Hernández-Ledesma et al., 2002)
YAKPVA	κ-καζεΐνη	82-87	647.600	Πρόβειο	ACE-inhibitory	(Miguel et al., 2010)
ASAEPVH	κ-καζεΐνη	147-154	810.844/ 218.100 (AE)	Κασικίσιο	Antimicrobial	(Almaas et al., 2011)

Πίνακας 20. Βιοπεπτίδια δείγματος Σ8.

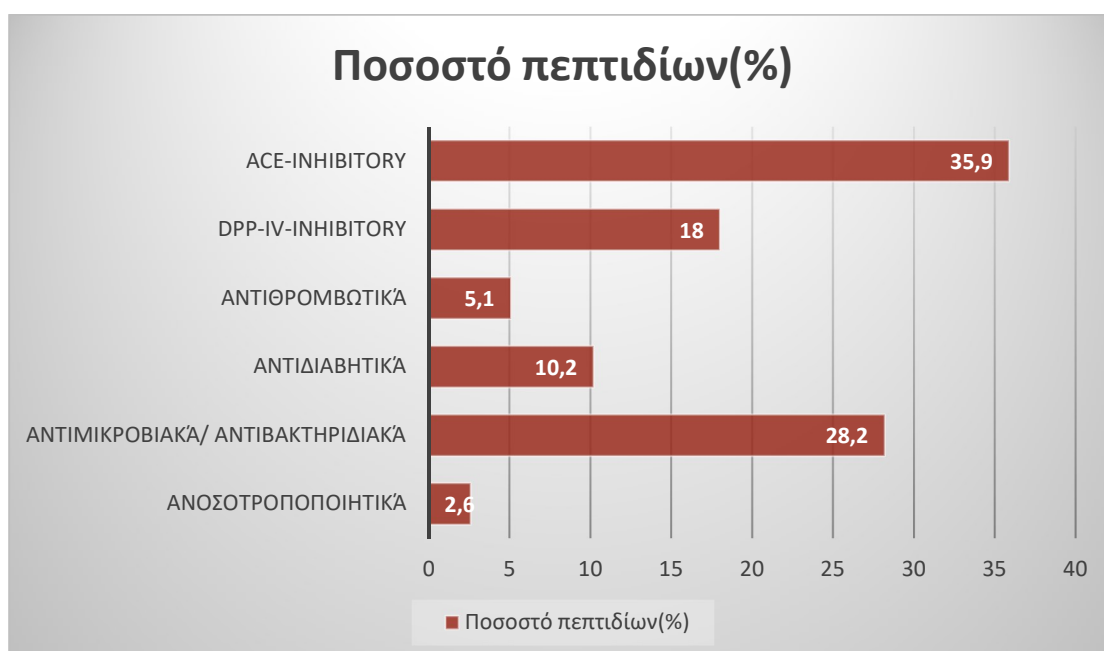
## 5. Συζήτηση αποτελεσμάτων

Από τα αποτελέσματα των αναλύσεων που έγιναν στο παραδοσιακό τυρί Τσαλαφούτι για τον προσδιορισμό του προφίλ πρωτεϊνών (ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE) και βιοπεπτιδίων (HPLC-MS), όπως επίσης και από τα συμπεράσματα που λαμβάνονται από την διαδικασία παρασκευής του τυριού σύμφωνα με τους παραγωγούς (υψηλή υγρασία, ελάχιστη έως μηδαμινή στράγγιση, μικρός χρόνος ωρίμανσης), στο Τσαλαφούτι περιέχονται, τόσο τα κλάσματα των καζεϊνών, όσο και οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος, όπως οι α-λακταλβουμίνη και η β-λακτοσφαιρίνη. Επιπλέον, είναι βάσιμο να υποθεθεί, πως στο τυρί περιέχονται και άλλες πρωτεΐνες που ανήκουν στις πρωτεΐνες του ορού γάλακτος, όπως είναι η αλβουμίνη του ορού αίματος και οι ανοσοσφαιρίνες, καθώς και άλλες μικρότερης σημασίας πρωτεΐνες και ένζυμα.

Στα δείγματα που αναλύθηκαν, βρέθηκαν συνολικά 39 διαφορετικά βιοπεπτίδια από όλο το εύρος των πρωτεϊνών που περιέχονται στο Τσαλαφούτι. Επίσης, πέρα από αυτά τα βιοπεπτίδια που καταγράφονται στους πίνακες (8-19), βρέθηκαν και θραύσματα άλλων βιοπεπτιδίων, τα οποία μαρτυρούν και την πιθανή παρουσία τους στο Τσαλαφούτι. Από τα 39 αυτά βιοπεπτίδια, 14 είναι αναστολείς του ενζύμου ACE (ACE-inhibitory), 7 είναι αναστολείς της διπεπτιδυλοπεπτιδάσης-4 (DPP-IV-inhibitory), 11 παρουσιάζουν αντιμικροβιακή/ αντιβακτηριδιακή δράση, 4 εμφανίζουν αντιδιαβητική δράση και 2 αντιθρομβωτική, 2 παρουσιάζουν πολλαπλή βιολογική δραστηριότητα (ACE-inhibitory, Αντιδιαβητικά, Αντιοξειδωτικά, Οπιοειδή κλπ.), και τέλος 1 από αυτά, ανήκει στα ανοσοτροποποιητικά βιοπεπτίδια (Πίνακας 21). Τα μεγαλύτερα ποσοστά βιοπεπτιδίων στα δείγματα αφορούν βιοπεπτίδια αναστολείς του ενζύμου ACE, (35,9%), και βιοπεπτίδια με αντιμικροβιακή δράση (28,2%), οπού μαζί αποτελούν πάνω από το 60% των συνολικών βιοπεπτιδίων στα δείγματα από το Τσαλαφούτι (στα στοιχεία του Πίνακα 21. βασίζεται και το Διάγραμμα 1.).

Βιοδραστικότητα	Βιοπεπτίδια	(%)
ACE-inhibitory	14	35,9%
DPP-IV-inhibitory	7	18,0%
Αντιθρομβωτικά	2	5,1%
Αντιδιαβητικά	4	10,2%
Αντιμικροβιακά/ Αντιβακτηριδιακά	11	28,2%
Ανοσοτροποποιητικά	1	2,6%
Σύνολο	39	100%

Πίνακας 21. Ποσοστά πεπτιδίων με βάση την βιοδραστικότητά τους.



Διάγραμμα 1. Ποσοστά πεπτιδίων με βάση την βιοδραστικότητά τους.

Αξιοσημείωτο είναι επίσης το γεγονός, πως σε αρκετά από τα δείγματα του τυριού, εμφανίζονται τα ίδια βιοπεπτίδια, κάτι που μπορεί να προκύπτει από τις ντόπιες φυλές ζώων από όπου προέρχεται το γάλα που χρησιμοποιούν οι περισσότεροι παραγωγοί, από την διατροφή των ζώων (σταβλισμένα τον χειμώνα και εκτατική εκτροφή το καλοκαίρι), καθώς και από τις παρόμοιες μεθόδους παραγωγής που ακολουθούνται για το Τσαλαφούτι. Στον πίνακα 22., καταγράφονται τα βιοπεπτίδια με την μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης στα δείγματα, καθώς και σε ποια δείγματα έχουν εντοπιστεί. Όπως φαίνεται από τον

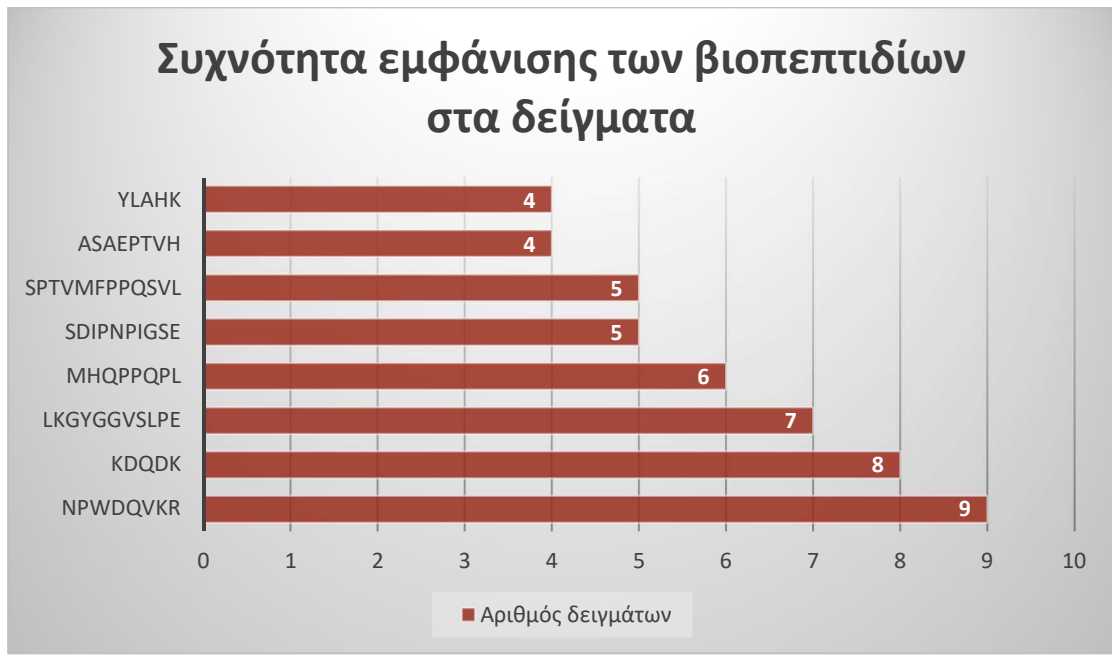
πίνακα υπάρχουν πεπτίδια που εμφανίζονται στην πλειοψηφία των δειγμάτων, όπως τα NPWDQVKR, KDQDK, LKGYGGVSLPE, τα οποία παρουσιάζουν αντιδιαβητική δράση, αντιθρομβωτική δράση και ανασταλτική δράση κατά της διπεπτιδυλοπεπτιδάσης-4, αντίστοιχα.

Επίσης, το βιοπεπτίδιο ASAERTVH, εντοπίζεται μόνο στα Σ δείγματα (Σ8, Σ5, Σ6, Σ9, εκτός του Σ7). Πρόκειται για βιοπεπτίδιο της κ-καζεΐνης, από κασικίσιο γάλα, και παρουσιάζει αντιμικροβιακές ιδιότητες. Το γεγονός ότι το βιοπεπτίδιο αυτό το εντοπίζουμε μόνο στα Σ δείγματα μπορεί να οφείλεται, σύμφωνα με τις απαντήσεις του ερωτηματολογίου στην χρήση γάλακτος από μη ντόπιες φυλές ζώων, στην βλάστηση της περιοχής που τρέφονται τα ζώα, στην μηδαμινή ωρίμανση που υφίσταται το τυρί ή σε άλλους παράγοντες που σχετίζονται με την παραγωγική διαδικασία. Ακόμη, αξίζει να αναφερθεί, πως δεν διαφαίνεται κάποια διαφορά όσον αφορά τα βιοπεπτίδια, σε σχέση με τον μήνα παραγωγής του τυριού, τουλάχιστον ποιοτικά, διότι δεν πραγματοποιήθηκε ποσοτική ανάλυση.

<b>Βιοπεπτίδια</b>	<b>Δείγματα</b>
NPWDQVKR	9 Δείγματα: Σ7, Σ6, B6, Σ9, Π8, A5, B7, B10, Σ5
KDQDK	8 Δείγματα: Σ8, Σ5, B10, B7, Π8, Σ9, B6, Σ6
LKGYGGVSLPE	7 Δείγματα: Σ8, Σ5, B10, B7, Σ9, Σ7, Z6
MHQPPQPL	6 Δείγματα: Z6, K6, Σ9, A5, B7, B10
SDIPNPIGSE	5 Δείγματα: Z6, B6, B7, B10, Σ8
SPTVMFPPQSVL	5 Δείγματα: Z6, K6, Σ9, Π8, A5
ASAERTVH	4 Δείγματα: Σ8, Σ5, Σ6, Σ9
YLAHK	4 Δείγματα: Σ8, Σ5, Σ9, B6

Πίνακας 22. Βιοπεπτίδια με την μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης στα δείγματα από το Τσαλαφούτι.





Διάγραμμα 2. Βιοπεπτιδία με την μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης στα δείγματα από το Τσαλαφούτι.

#### Βιοπεπτιδία σε τυροκομικά προϊόντα από αιγοπρόβειο γάλα

Οι περισσότερες έρευνες (Korhonen & Pihlanto, 2006; Pritchard et al., 2010) αναφέρουν ότι τα βιοενεργά πεπτιδία παρουσιάζουν μια ποικιλία φυσιολογικών λειτουργιών, όπως ανοσοτροποποιητική, αντιθρομβωτική, αντιοξειδωτική, δέσμευση ανόργανων ουσιών, αντιυπερτασική και αντιμικροβιακή δράση. Από τα αποτελέσματα, προκύπτει πως στο Τσαλαφούτι περιέχονται πεπτιδία που διαθέτουν ποικίλη βιολογική δραστικότητα, και επιφέρουν οφέλη στην ανθρώπινη υγεία με διάφορους τρόπους. Αρκετά είδη τυριών από πρόβειο, γίδινο ή αιγοπρόβειο γάλα έχουν αναλυθεί ως προς την περιεκτικότητά τους σε βιοπεπτιδία, ωστόσο αλειψώδη τυριά όπως το Τσαλαφούτι, ή παρόμοια με αυτό τυριά όπως το κατίκι και το γαλοτύρι δεν έχουν μελετηθεί για τον προσδιορισμό των βιοπεπτιδίων τους.

Στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα που προέρχονται από διαφορετικές φυλές και είδη ζώων εντοπίζονται μοναδικά βιοδραστικά πεπτιδία, που προσφέρουν ένα ευρύ φάσμα αλληλουχιών, για τον έλεγχο πιθανής ύπαρξης πεπτιδίων με λειτουργικά χαρακτηριστικά ιατρικού και επιστημονικού ενδιαφέροντος (Wang et al., 2016). Το πρόβειο και κατσικίσιο γάλα βρέθηκε να είναι

πλούσιο σε βιοδραστικά πεπτίδια που προέρχονται κυρίως από α-, β- και κ-καζεΐνες (Atanasova & Ivanova, 2010).

Για παράδειγμα σε έρευνα των Tomazou et al. (2019), διερευνήθηκαν τα αντιμικροβιακά βιοπεπτίδια, έπειτα από αξιολόγηση της σταθερότητάς τους σε περιβάλλον παρόμοιο με το εντερικό, και χαρακτήρισαν το αντιμικροβιακό «φορτίο» του ενδιαφερόμενου πρωτεόματος. Η φέτα είναι ένα ημί-μαλακό, λευκό, σε άλμη, ΠΟΠ παραδοσιακό ελληνικό τυρί (EU L277/2002), το οποίο παρασκευάζεται από πρόβειο ή μείγματα πρόβειου και γίδινου γάλακτος (έως 30%) (Bouroutzika et al., 2021). Στην φέτα εντοπίστηκαν 63 και 64 αντιμικροβιακά πεπτίδια από το γάλα προβάτων και αιγών αντίστοιχα, που χρησιμοποιείται για την παρασκευή της φέτας (Tomazou et al., 2019). Επιπρόσθετα, ερευνώντας τη σχέση μεταξύ της πρωτεόλυσης των τυριών που παράγονται από ωμό και παστεριωμένο πρόβειο γάλα και της βιοδραστικότητας, οι Pisanu et al. (2015) ανίχνευσαν 187 βιοπεπτίδια που προέρχονται από α<sub>1</sub>-καζεΐνη, β-καζεΐνη και α<sub>2</sub>-καζεΐνη. Τα 9 από τα πεπτίδια που ανιχνεύθηκαν εκδήλωσαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και ήταν προϊόν πρωτεόλυσης της β-καζεΐνης, και πιο συγκεκριμένα προήλθαν από το θραύσμα f207-221 (QEPVLGPVRGPFIL). Μικρότερα θραύσματα από το παραπάνω θραύσμα εντοπίζουμε και εμείς στα δείγματα από το Τσαλαφούτι. Τέλος, υπάρχουν μελέτες για βιοδραστικά πεπτίδια που εστιάζουν είτε σε τυριά από πρόβειο γάλα, είτε σε τυριά από κατσικίσιο γάλα.

#### Εναλλακτικοί τρόποι προσδιορισμού πρωτεϊνών και πεπτιδίων

Πέρα από τις μεθόδους που ακολουθήθηκαν στην παρούσα διατριβή για τον προσδιορισμό πρωτεϊνών και βιοπεπτιδίων, υπάρχουν και άλλες μέθοδοι που αναφέρονται στην σχετική βιβλιογραφία. Μερικά παραδείγματα χρήσης άλλων μεθόδων αναφέρονται παρακάτω. Οι Öztürk & Akin (2017) χρησιμοποίησαν υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (RP-HPLC) για τον προσδιορισμό του προφίλ των πεπτιδίων του τυριού Tulum. Την ίδια μέθοδο χρησιμοποίησαν για τον προσδιορισμό των πεπτιδίων στο πρόβειο τυρί Scamorza και οι Albenzio et al. (2015).

Για την ταυτοποίηση του πρωτεόματος στη φέτα οι Tomazou et al. (2019) έκαναν χρήση 1-D nano LC-MS/MS. Ενώ, οι Silva et al. (2016) προσδιόρισαν το πρωτεϊνικό προφίλ του τυριού «Coalho» χρησιμοποιώντας ηλεκτροφόρηση (SDS-PAGE), και το προφίλ των πεπτιδίων του τυριού, χρησιμοποιώντας MALDI-TOF. Επίσης για το τυρί Teleme (Pappa et al., 2007), οι πρωτεΐνες και τα πεπτίδια διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση 2 διαστάσεων και ταυτοποιήθηκαν

χρησιμοποιώντας MALDI/TOF-MS και ακόμα, έγινε διαχωρισμός με υγρή χρωματογραφία και ταυτοποίησή μέσω αλληλουχίας αμινοξέων χρησιμοποιώντας αποδόμηση Edman, όπου τα πεπτιδία εντοπίστηκαν με βάση το πιο άφθονο αμινοξύ που απελευθερώνεται μετά από κάθε κύκλο αποδόμησης, και ταυτοποιήθηκαν με MS.

## 6. Συμπεράσματα

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στόχος της παρούσας εργασίας είναι η ανάλυση των πρωτεϊνών και των βιοπεπτιδίων στο Τσαλαφούτι, καθώς και η ανάδειξη της ποιότητας, της διατροφικής αξίας και της ευεργετικής δράσης, των βιοπεπτιδίων που περιέχονται σε αυτό, στην υγεία των ανθρώπων που το καταναλώνουν. Πρόκειται για ένα μοναδικό παραδοσιακό τυροκομικό προϊόν, το οποίο παράγεται εδώ και πολλές γενιές στην περιοχή των Αγράφων και των Τζουμέρκων, κατά παράδοση από τους κτηνοτρόφους και τις οικογένειες τους, από πρόβειο ή αιγοπρόβειο γάλα κατά τους θερινούς κυρίως μήνες. Η διαδικασία ωστόσο, που ακολουθείται για την παραγωγή του στα περισσότερα τυροκομεία σήμερα διαφέρει αρκετά σε σχέση με τον τρόπο παραγωγής του τυριού, όπως γινόταν παραδοσιακά από τους κτηνοτρόφους. Παραδείγματος χάρη, η χρήση πτυτίας και καλλιεργείων, καθώς και ο τρόπος ωρίμανσης του τυριού.

Επιπροσθέτως, τα τελευταία χρόνια γίνονται προσπάθειες για να σημανθεί το Τσαλαφούτι με ετικέτα Γεωγραφικής Ένδειξης (ΠΟΠ/ΠΓΕ), γεγονός που θα προσδώσει στο προϊόν προστιθέμενη εμπορική αξία, αναγνωρισιμότητα, και θα ωφελήσει ποικιλοτρόπως τις τοπικές κοινωνίες των περιοχών όπου παράγεται. Ο συνδυασμός του πιθανού χαρακτηρισμού του ως ΠΟΠ ή ΠΓΕ και της αποδεδειγμένης διατροφικής αξίας του, δύναται να ταξιδέψουν το Τσαλαφούτι σε όλη την Ελλάδα, αλλά και να βρει θέση στα ράφια ευρωπαϊκών και άλλων αγορών. Ωστόσο, κάτι τέτοιο σύμφωνα με τις απαντήσεις των τυροκόμων στα ερωτηματολόγια, θα φέρει και δυσκολίες στα τυροκομεία, τα οποία για να συνεχίσουν να παράγουν το Τσαλαφούτι θα πρέπει να προσαρμόσουν τον τρόπο παραγωγής στα πρότυπα ενός ΠΟΠ προϊόντος.

Κατά τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν με ηλεκτροφόρηση (SDS-PAGE) και HPLC-MS, δεν υπήρχε η δυνατότητα να προσδιοριστούν επακριβώς όλες οι πρωτεΐνες που περιέχονται στο Τσαλαφούτι, λόγω έλλειψης προτύπων, για αυτό και ο προσδιορισμός του πρωτεϊνικού προφίλ έγινε κατά προσέγγιση με βάση την βιβλιογραφία και το μοναδικό πρότυπο που υπήρχε στην διάθεση μας (α-

λακταλβουμίνη). Αυτό βέβαια δεν αποκλείει την παρουσία και άλλων πρωτεϊνών και ενζύμων στο Τσαλαφούτι, οι οποίες θα μπορούσαν να προσδιοριστούν με ακρίβεια σε περαιτέρω, αναλύσεις με την χρήση των κατάλληλων μεθόδων. Τα βιοπεπτίδια προέκυψαν με την χρήση της HPLC-MS, και ο χαρακτηρισμός τους έγινε με την χρήση έγκριτων, δωρεάν διαδικτυακών εφαρμογών (MBPDB, BIOPEP-UWM, BioDADPeP).

Στο Τσαλαφούτι, βρέθηκαν βιοπεπτίδια με αντιμικροβιακή/αντιβακτηριδιακή δράση (ASAEPVH, SDIPNPIGSENSEK, ALNEINQF, PPKKDQDKTEVPA, PTVHSTPTTE, LKKISQ, NAGPFTPT, PFTGPIPN, DAQSAPLR, VDQHQBAMKPWTQPKTNAIPYVRYL, PVRYL), τα οποία ενισχύουν τη φυσική άμυνα του οργανισμού έναντι των παθογόνων εισβολέων (Atanasova & Ivanova, 2010), όπως βακτήρια μύκητες, αλλά και ιούς. Ακόμη, εντοπίστηκαν αντιδιαβητικά (SLSSEESITH, QEPVLGPVRGFPF, SDIPNPIGSE, NPWDQVKR), αντιθρομβωτικά (KDQDK, TAQVTSTEV) και αντιυπερτασικά βιοπεπτίδια (PVRYL), τα οποία μπορούν να συνεισφέρουν στην πρόληψη κατά των καρδιαγγειακών νόσων, οι οποίες αποτελούν έναν από τους σημαντικότερους κινδύνους για την υγεία των ανθρώπων στον δυτικό κόσμο. Επίσης, στα δείγματα από το Τσαλαφούτι βρέθηκαν βιοπεπτίδια με αντιοξειδωτική (YQEPVLGP) και ανοσοτροποποιητική (QTPVVPPF) δράση, καθώς και βιοπεπτίδια αναστολείς του ενζύμου μετατροπής της αγγιοτενσίνης I (ACE, angiotensin converting enzyme, EC 3.4.15.1) (YLAHK, LKPTPEGD, ALPMHIR, SLPQ, KVLILA, VRYL, KFAWPQ, ENLLRF, YPYY, YAKPVA, VGPIPN, VPSERY, LLLF, VLVLDTDYK) και αναστολείς της διπεπτιδυλοπεπτιδάσης-4 (DPP-IV) (MHQPPQPL, LKGYGGVSLPE, INNQFLPYPY, IPIQY, GPFPIVL, IPAVF, SPTVMFPPQSVL, VLVLDTDYK). Επιπλέον, στα εξεταζόμενα από το Τσαλαφούτι δείγματα, βρέθηκαν και θραύσματα βιοπεπτιδίων που υποδηλώνουν την πιθανή παρουσία τους στο τυρί.

Επίσης στα δείγματα περιέχονται και άλλα πεπτίδια, όπως καταγράφεται και στους ενδεικτικούς πίνακες στις εικόνες (14-25) των δειγμάτων Π8 και Α5, τα οποία όμως δεν έχουν εξεταστεί ως προς κάποια βιοδραστικότητα, και είναι πολύ πιθανό να παρουσιάζουν και αυτά κάποια συγκεκριμένη βιολογική δράση, η οποία να ωφελεί την υγεία των καταναλωτών. Σε επόμενες έρευνες, θα μπορούσαν να απομονώσουν τα πεπτίδια αυτά και να τα ελέγξουν για πιθανή βιοδραστικότητα.

Η βιοδραστικότητα των πεπτιδίων που περιέχονται στο Τσαλαφούτι, όπως και ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών και των πεπτιδίων, μπορεί να αποτελέσει αντικείμενο μελλοντικής έρευνας. Ακόμα, μπορεί να χαρακτηριστεί το προϊόν με σήμανση ισχυρισμού υγείας, ο οποίος επιτρέπεται από την ευρωπαϊκή ένωση, εφόσον, τα οφέλη είναι επιστημονικά αποδεδειγμένα, και τηρούνται οι

κανόνες της ΕΕ όσον αφορά την επισήμανση, την παρουσίαση και τη διαφήμιση των προϊόντων (Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1924/2006), και μπορεί να αυξήσει περισσότερο την αξία του Τσαλαφουτιού. Τέλος, επιπλέον μελλοντικές αναλύσεις στο Τσαλαφούτι, αλλά και σε άλλα ελληνικά, παραδοσιακά είδη τυριών, ΠΟΠ ή ΠΓΕ, θα αναδείξουν την διατροφική και εμπορική αξία τους, και θα αποτελέσουν μοχλό ανάπτυξης της ελληνικής υπαίθρου, συμβάλλοντας σημαντικά στην βελτίωση του βιοτικού επιπέδου των κατοίκων.

## 7. Βιβλιογραφία

1. Abd El-Salam, M. H. (2014). Application of proteomics to the areas of milk production, processing and quality control—A review. *International Journal of Dairy Technology*, 67(2), 153-166.
2. Affolter, M., Grass, L., Vanrobaeys, F., Casado, B., & Kussmann, M. (2010). Qualitative and quantitative profiling of the bovine milk fat globule membrane proteome. *Journal of Proteomics*, 73, 1079-1088.
3. Albenzio, M., Santillo, A., Marino, R., Della Malva, A., Caroprese, M., & Sevi, A. (2015). Identification of peptides in functional Scamorza ovine milk cheese. *Journal of Dairy Science*, 98(12), 8428-8432.
4. Alimentarius, C. (1978). Codex general standard for cheese (Codex STAN 283–1978). Joint FAO. *WHO Food Standards Program, FAO, Rome*.
5. Almaas, M.; Berner, V.; Holno, H.; Langsrud, T.; Vegarud, G.E. Degradation of whey from caprine milk by human proteolytic enzymes and the resulting antibacterial effect against *Listeria monocytogenes*. *Small Rumin. Res.* 2008, 79, 11–15.
6. Andrei, S. (2006). ANALYTICAL METHODS USED FOR MILK PROTEINS SEPARATION AND IDENTIFICATION (minireview). *Buletin USAMV-CN*, 63, 16-20.
7. Andrikopoulos, N. K., Kalogeropoulos, N., Zerva, A., Zerva, U., Hassapidou, M., & Kapoulas, V. M. (2003). Evaluation of cholesterol and other nutrient parameters of Greek cheese varieties. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16, 155-167.
8. Anifantakis EM. 1991. Greek Cheeses: A Tradition of Centuries. National Dairy Committee of Greece, Athens, Greece
9. Anifantakis, E. M. & Moatsou, G. (2006). Feta and other Balkan Cheeses. In Tamime, A. (ed.), *Brined Cheeses*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford.
10. Atanasova, J., Moncheva, P., & Ivanova, I. (2014). Proteolytic and antimicrobial activity of lactic acid bacteria grown in goat milk. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 28(6), 1073-1078.
11. Bachmann, H. P., Bütikofer, U., & Sieber, R. (2003). Über das Vorkommen von bioaktiven Peptiden in Käse. *Mitt. Lebensm. Hyg*, 94, 136-154.
12. Balthazar, C. F., Pimentel, T. C., Ferrão, L. L., Almada, C. N., Santillo, A., Albenzio, M., ... & Cruz, A. G. (2017). Sheep milk: physicochemical characteristics and relevance for functional food development. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 16(2), 247-262.

13. Bär, C., Mathis, D., Neuhaus, P., Dürr, D., Bisig, W., Egger, L., & Portmann, R. (2019). Protein profile of dairy products: Simultaneous quantification of twenty bovine milk proteins. *International Dairy Journal*, *97*, 167-175.
14. Barać, M., Pešić, M., Stanojević, S., Vasić, M., Vučić, T., Smiljanić, M., & Žilić, S. (2016). Protein profiles and total antioxidant capacity of water soluble and insoluble protein fractions of white cow cheese at different stage of ripening. *Mljekarstvo*, *66*(3), 187-197.
15. Belletti, G. and Marescotti, A., 2003. DOLPHINS WP 3 synthesis report: link between origin labelled products and rural development. Programme DOLPHINS, Le Mans, France: INRA-UREQUA.
16. Bendelja, D., Prpić, Z., Mikulec, N., Ivkić, Z., Havranek, J., & Antunac, N. (2011). Milk urea concentration in Holstein and Simmental cows. *Mljekarstvo*, *61*(1), 45.
17. Bendixen, E., Danielsen, M., Hollung, K., Gianazza, E., & Miller, I. (2011). Farm animal proteomics—a review. *Journal of proteomics*, *74*(3), 282-293.
18. Bhaskar G.V., Singh H. & Blazey N.D. (2001) Milk protein products and processes. World Patent Application No. WO 01/41578 A1
19. Bhattacharya, M., Salcedo, J., Robinson, R. C., Henrick, B. M., & Barile, D. (2019). Peptidomic and glycomic profiling of commercial dairy products: identification, quantification and potential bioactivities. *NPJ science of food*, *3*(1), 1-13.
20. Blazey N.D., Dybing S.T., Knights R.J. & Huang I.-Lo. (2001) Methods for producing cheese and cheese products. United States of America Patent Application No. 6177128
21. Bobe, G., Zimmerman, S., Hammond, E. G., Freeman, A. E., Porter, P. A., Luhman, C. M., & Beitz, D. C. (2007). Butter composition and texture from cows with different milk fatty acid compositions fed fish oil or roasted soybeans. *Journal of dairy science*, *90*(6), 2596-2603.
22. Bouma, A., Durham, C. A., and Meunier-Goddik, L. (2014). Start-up and operating costs for artisan cheese companies. *Journal of Dairy Science*, *97*, 3964–3972.
23. Bouroutzika, E., Proikakis, S., Anagnostopoulos, A. K., Katsafadou, A. I., Fthenakis, G. C., & Tsangaris, G. T. (2021). Proteomics Analysis in Dairy Products: Cheese, a Review. *Applied Sciences*, *11*(16), 7622.
24. Bozoudi, D., Torriani, S., Zdragas, A., & Litopoulou-Tzanetaki, E. (2016). Assessment of microbial diversity of the dominant microbiota in fresh and mature PDO Feta cheese made at three mountainous areas of Greece. *LWT-Food Science and Technology*, *72*, 525-533.



25. Brantl V. Novel opioid peptides derived from human beta-casein: human beta-casomorphins. *Eur J Pharmacol.* 1984 Oct 30;106(1):213-4. doi: 10.1016/0014-2999(84)90702-7. PMID: 6529969.
26. Burger, J., Kirchner, M., Bramanti, B., Haak, W. & Thomas, M. G. (2007). Absence of the lactase-persistence-associated allele in early Neolithic Europeans. *PNAS*, 104 (10), 3736–3741.
27. Calvo C.F., Cesselin F., Gelman M., Glowinski J. Identification of an opioid peptide secreted by rat embryonic mixed brain cells as a promoter of macrophage migration. *Eur. J. Neurosci.* 2000;12:2676–2684.
28. Carrasco-Castilla, J., Hernández-Álvarez, A. J., Jiménez-Martínez, C., Gutiérrez-López, G. F., & Dávila-Ortiz, G. (2012). Use of proteomics and peptidomics methods in food bioactive peptide science and engineering. *Food Engineering Reviews*, 4(4), 224-243.
29. Chandan, R. C., & Kapoor, R. (2011). Principles of cheese technology. *Dairy ingredients for food processing*, 225.
30. Chen, B., Lewis, M. J., & Grandison, A. S. (2014). Effect of seasonal variation on the composition and properties of raw milk destined for processing in the UK. *Food Chemistry*, 158, 216-223. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.118>
31. Chiba, H., Tani, F., & Yoshikawa, M. (1989). Opioid antagonist peptides derived from  $\kappa$ -casein. *Journal of Dairy Research*, 56(3), 363-366.
32. Chobert, J.-M.; El-Zahar, K.; Sitohy, M.; Dalgalarondo, M.; M? etro, F.; Choizat, Y.; Haertl? e, T. Angiotension I-converting-enzyme (ACE)-inhibitory activity of tryptic peptides of ovine  $\beta$ -lactoglobulin and milk yoghurt obtained by using different starters. *Lait* 2005, 85, 141–152.
33. Choi, J., Sabikhi, L., Hassan, A., & Anand, S. (2012). Bioactive peptides in dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, 65(1), 1-12.
34. Claeys, W. L., Verraes, C., Cardoen, S., De Block, J., Huyghebaert, A., Raes, K., ... & Herman, L. (2014). Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits. *Food control*, 42, 188-201.
35. Clapham, J. C., Arch, J. R., & Tadayyon, M. (2001). Anti-obesity drugs: a critical review of current therapies and future opportunities. *Pharmacology & therapeutics*, 89(1), 81-121.
36. Clare, D. A., & Swaisgood, H. E. (2000). Bioactive milk peptides: a prospectus. *Journal of Dairy Science*, 83(6), 1187-1195

37. Clare, L., Rohling, E. J., Weninger, B. & Hilpert, J. (2008). Warfare in Late Neolithic/Early Chalcolithic Pisidia, Southwest Turkey. Climate induced social unrest in the late 7th millennium cal bc. *Documenta Praehistorica*, 35, 65–92.
38. Coates, D. (2003). The angiotensin converting enzyme (ACE). *The international journal of biochemistry & cell biology*, 35(6), 769-773.
39. Commission of the European Communities, 2005. Council Regulation No 1698/05 EC of 20 September 2005 on support for rural development by the European Agricultural Fund for rural development, Official Journal of the European Communities L 277, 21 October 2005.
40. Commission of the European Communities, 2008. Green paper on agricultural product quality: product standards, farming requirements and quality schemes. Brussels, Belgium: Commission of the European Communities.
41. Contreras, M. M., Carrón, R., Montero, M. J., Ramos, M., & Recio, I. (2009). Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity. *International Dairy Journal*, 19, 566–573.
42. Correa, A.P.E.; Daroit, D.J.; Coelho, J.; Meira, S.M.M.; Lopes, F.C.; Segalin, J.; Risso, P.H.; Brandelli, A.C. Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. *J. Sci. Food Agric.* 2011, 91, 2247–2254.
43. Costa, W. K. A. D., Souza, E. L. D., Beltrao-Filho, E. M., Vasconcelos, G. K. V., Santi-Gadelha, T., de Almeida Gadelha, C. A., ... & Magnani, M. (2014). Comparative protein composition analysis of goat milk produced by the Alpine and Saanen breeds in northeastern Brazil and related antibacterial activities. *PLoS One*, 9(3), e93361.
44. Cozma, A., Andrei, S., Miere, D., Filip, L., & Loghin, F. (2011). Proteins profile in milk from three species of ruminants. *Notulae Scientia Biologicae*, 3(1), 26-29.
45. Curry, A. (2013). The milk revolution. *Nature*, 500 (7460), 20–22
46. Curry, A. (2013). The milk revolution. *Nature*, 500 (7460), 20–22.
47. Dallas, D. C., Guerrero, A., Parker, E. A., Robinson, R. C., Gan, J., German, J. B., ... & Lebrilla, C. B. (2015). Current peptidomics: applications, purification, identification, quantification, and functional analysis. *Proteomics*, 15(5-6), 1026-1038.
48. Danezis, G. P., Pappas, A. C., Tsiplakou, E., Pappa, E. C., Zacharioudaki, M., Tsagkaris, A. S., ... & Georgiou, C. A. (2020). Authentication of Greek Protected Designation of Origin cheeses through elemental metabolomics. *International Dairy Journal*, 104, 104599.

49. Danezis, G. P., Tsagkaris, A. S., Camin, F., Brusic, V., & Georgiou, C. A. (2016). Food authentication: Techniques, trends and emerging approaches. *TRAC Trends in Analytical Chemistry*, 85, 123-132.
50. Díaz, M., & Decker, E. A. (2004). Antioxidant mechanisms of caseinophosphopeptides and casein hydrolysates and their application in ground beef. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(26), 8208-8213.
51. Díaz, M., Dunn, C. M., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2003). Use of caseinophosphopeptides as natural antioxidants in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(8), 2365-2370.
52. Drucker, D. J. (2006). The biology of incretin hormones. *Cell metabolism*, 3(3), 153-165.
53. Dziuba, B., & Dziuba, M. (2014). Milk proteins-derived bioactive peptides in dairy products: molecular, biological and methodological aspects. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 13(1), 5-26.
54. Dziuba, M., Dziuba, B., & Iwaniak, A. (2009). Milk proteins as precursors of bioactive peptides. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 8(1), 71-90.
55. e-Ambrosia. European Commission 2022, <https://ec.europa.eu/info/food-farming-fisheries/food-safety-and-quality/certification/quality-labels/geographical-indications-register/>
56. Erbersdobler, H. F., & Somoza, V. (2007). Forty years of furosine—Forty years of using Maillard reaction products as indicators of the nutritional quality of foods. *Molecular nutrition & food research*, 51(4), 423-430.
57. European Commission, 2012 European Commission Regulation (EU) No 1151/2012 of the European Parliament and of the Council of 21st November 2012 on quality schemes for agricultural products and foodstuffs Off. J., L343 (2012), pp. 1-29
58. European Commission. Publication of an application pursuant to Article 6(2) of Council Regulation (EC) No 510/2006 on the protection of geographical indications and designations of origin for agricultural products and foodstuffs. Off. J. Eur. Union 2010, 312/25, 19–24.
59. Eurostat. Agriculture, forestry and fishery statistics, 2020 edition, Luxembourg: Publications Office of the European Union. doi:10.2785/496803
60. Expósito, Iván & Recio, Isidra. (2006). Antibacterial activity of peptides and folding variants from milk proteins. *International Dairy Journal*. 16. 1294-1305. 10.1016/j.idairyj.2006.06.002.
61. FAO, S. (2016). FAOSTAT database. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

62. FAO; UNEP. Breed Descriptions, Conservation of Animal Genetic Resources, Project No. FP/1108–76–02(833) with the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) as Cooperating Agency; FAO: Rome, Italy, 1979; ISBN 92-5-100507-9. Available online: <https://www.fao.org/3/x6508e/X6508E04.htm#ch3.E.11>.
63. Farkye, N. Y. (2004). Cheese technology. *International Journal of Dairy Technology*, 57(2-3), 91-98.
64. Farnaud, S., & Evans, R. W. (2003). Lactoferrin—a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Molecular immunology*, 40(7), 395-405.
65. Fiat, A. M., Migliore-Samour, D., Jollès, P., Drouet, L., Sollier, C. B. D., & Caen, J. (1993). Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities. *Journal of Dairy Science*, 76(1), 301-310.
66. Fitzgerald G F and Murray B A (2006) Bioactive peptides and lactic fermentations. *International Journal of Dairy Technology* 59 118–125.
67. FitzGerald R J, Murray B A and Walsh D J (2004) Hypotensive peptides from milk proteins. *Journal of Nutrition* 134 980S–988S.
68. FitzGerald, R. J., & Meisel, H. (2003). Milk protein hydrolysates and bioactive peptides. In *Advanced dairy chemistry—1 Proteins* (pp. 675-698). Springer, Boston, MA.
69. FitzGerald, R. J., Murray, B. A., & Walsh, D. J. (2004). Hypotensive peptides from milk proteins. *The Journal of nutrition*, 134(4), 980S-988S.
70. Folkesson, C., 2005. Geographical indications and rural development in the EU. Thesis (MSc). Lund University, Sweden
71. Fontenele, M. A., do SR Bastos, M., Dos Santos, K. M., Bemquerer, M. P., & do Egito, A. S. (2017). Peptide profile of Coalho cheese: A contribution for Protected Designation of Origin (PDO). *Food chemistry*, 219, 382-390.
72. Fourkiotis A, Vafiadou E, Litopoulou- Tzanetaki E, Tzanetakis N. 2004. Microflora of traditional cheese Katiki Domokou. In 20th Medical Congress of Armed Forces.
73. Gagnaire, V., Jardin, J., Jan, G., & Lortal, S. (2009). Invited review: Proteomics of milk and bacteria used in fermented dairy products: From qualitative to quantitative advances. *Journal of dairy science*, 92(3), 811-825.
74. Geerlings, A.; Villar, I.C.; Zarco, F.H.; Sánchez, M.; Vera, R.; Gomez, A.Z.; Boza, J.; Duarte, J. Identification and characterization of novel angiotension converting enzyme inhibitors obtained from goat milk. *J. Dairy Sci.* 2006, 89, 3326–3335.

75. Gerasi, E., Litopoulou-Tzanetaki, E., & Tzanetakis, N. (2003). Microbiological study of Manura, a hard cheese made from raw ovine milk in the Greek island Sifnos. *International journal of dairy technology*, 56(2), 117-122.
76. Giacometti, J., & Buretić-Tomljanović, A. (2017). Peptidomics as a tool for characterizing bioactive milk peptides. *Food chemistry*, 230, 91-98.
77. Gobbetti M, Minervini F and Rizzello C G (2004) Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *International Journal of Dairy Technology* 57 173–188.
78. Gobbetti, M., Morea, M., Baruzzi, F., Corbo, M. R., Matarante, A., Considine, T., ... & Fox, P. F. (2002). Microbiological, compositional, biochemical and textural characterisation of Caciocavallo Pugliese cheese during ripening. *International Dairy Journal*, 12(6), 511-523.
79. Gomez-Ruiz J A, Ramos M and Recio I (2002) Angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheeses manufactured with different starter cultures. *International Dairy Journal* 12 697–706.
80. Gomez-Ruiz J A, Taborda G, Amigo L, Recio I and Ramos M (2006) Identification of ACE-inhibitory peptides in different Spanish cheeses by tandem mass spectrometry. *European Food Research and Technology* 223 595–601.
81. Gomez-Ruiz, J. A., Ramos, M., & Recio, I. (2004). Identification and formation of angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheese by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1054, 269-277.
82. Grandjouan, C., Markson, E. & Rotroff, S. I. (1989). Hellenistic relief molds from the Athenian agora. *Hesperia Suppl.*, Vol. 23. American School of Classical Studies at Athens, Princeton.
83. Greek Codex Alimentarius. (1998). Official Journal of the Hellenic Republic Vol. B no 899 article 83 paragraph D3C. Athens: National Printing Office.
84. Halliwell, B., & Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *British journal of pharmacology*, 142(2), 231-255.
85. Haque, E., Chand, R. Antihypertensive and antimicrobial bioactive peptides from milk proteins. *Eur Food Res Technol* **227**, 7–15 (2008).  
<https://doi.org/10.1007/s00217-007-0689-6>
86. Hartmann, R., & Meisel, H. (2004). Caseinophosphopeptides and their cell modulating potential. *Biofactors*, 21(1-4), 73-78.
87. Hartmann, R., & Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 18,163-169.

88. Hatzikamari M, Litopoulou-Tzanetaki E and Tzanetakis N (1999) Microbiological characteristics of Anevato: a traditional Greek cheese. *Journal of Applied Microbiology* **87** 595–601.
89. Hayes, M., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., & Ross, R. P. (2007). Putting microbes to work: dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part II: bioactive peptide functions. *Biotechnology Journal*, 2, 435-449.
90. Hernandez-Ledesma, B., Amigo, L., Ramos, M., & Recio, I. (2004). Angiotensin converting enzyme inhibitory activity in commercial fermented products. Formation of peptides under simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1504-1510.
91. Hernandez-Ledesma, B., Miralles, B., Amigo, L., Ramos, M., & Recio, I. (2005). Identification of antioxidant and ACE-inhibitory peptides in fermented milk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 1041-1048.
92. Hindcasting Polyacrylamide Gels, from Bio-Rad's comprehensive Electrophoresis Guide (bulletin 6040).
93. <https://cibum.gr/nea/istoria-trofimon/ti-einai-to-tsalafoyti/>
94. <https://www.agrotypos.gr/metapoiisi/galaktokomika/to-tyri-tsalafouti-apo-ta-oreinatis-pindou-paei-gia-pop>
95. <https://www.dairy-services.com/%CF%80%CF%8E%CF%82-%CF%86%CF%84%CE%B9%CE%AC%CF%87%CE%BD%CE%B5%CF%84%CE%B1%CE%B9-%CF%84%CE%BF-%CE%B3%CE%BD%CE%AE%CF%83%CE%B9%CE%BF-%CF%84%CF%83%CE%B1%CE%BB%CE%B1%CF%86%CE%BF%CF%8D%CF%84%CE%B9/>
96. <https://www.statista.com/statistics/1120911/cheese-production-worldwide/>Global cheese production 2015-2021, Published by M. Shahbandeh, Jan 10, 2022
97. Hutkins, R. W. (2008). *Microbiology and technology of fermented foods*. John Wiley & Sons.
98. Itan, Y., Powell, A., Beaumont, M. A., Burger, J. & Thomas, M. G. (2009). The origins of lactase persistence in Europe. *PLOS Computational Biology*, 5 (8), 1–13, e1000491.
99. Izquierdo-González, J. J., Amil-Ruiz, F., Zazzu, S., Sánchez-Lucas, R., Fuentes-Almagro, C. A., & Rodríguez-Ortega, M. J. (2019). Proteomic analysis of goat milk kefir: Profiling the fermentation-time dependent protein digestion and identification of potential peptides with biological activity. *Food chemistry*, 295, 456-465.



100. J. Atanasova & I. Ivanova (2010) Antibacterial Peptides from Goat and Sheep Milk Proteins, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 24:2, 1799-1803, DOI: 10.2478/V10133-010-0049-8.
101. J. Boyazoglu and P. Morand-Fehr, Mediterranean dairy sheep and goat products and their quality. A critical review, *Small Ruminant Research*, 40, 2001, 1 - 11.
102. Kabelová, I., Dvořáková, M., Čížková, H., Dostálek, P., & Melzoch, K. (2009). Determination of free amino acids in cheeses from the Czech market. *Czech J Food Sci*, 27(3), 143-150.
103. Kamali Alamdari, E., & Ehsani, M. R. (2017). Antimicrobial peptides derived from milk: A review. *Journal of Food Biosciences and Technology*, 7(1), 49-56.
104. Kamber, U. (2008). The traditional cheeses of Turkey: Cheeses common to all regions. *Food Reviews International*, 24, 1–38.
105. Kamou, S.M.; Cheison, S.C.; Chen, W.; Liu, X.M.; Lu, R-R. Alpha-lactalbumin, its production technologies and bioactive peptides. *Comp. Rev. Food Sci. Saf.* 2010, 9, 197–212.
106. Kamou, S.M.; Lu, R.; Chen, W.; Liu, X.; Tian, F.; Shen, Y.; Gao, T. Functional significance of bioactive peptides derived from milk proteins. *Food Rev. Int.* 2010, 26, 386–401.
107. Karali, F., Georgala, A., Massouras, T., & Kaminarides, S. (2013). Volatile compounds and lipolysis levels of Kopanisti, a traditional Greek raw milk cheese. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(8), 1845-1851.
108. Karoui, R. (2017). Methodologies for the characterization of the quality of dairy products. *Advances in Food & Nutrition Research*, 82, 237-275.
109. Kehagias, Christos & Tsakali, Efstathia. (2017). Επιστήμη και Τεχνολογία Γάλακτος και Γαλακτοκομικών Προϊόντων.
110. Kim, S. B., Seo, I. S., Khan, M. A., Ki, K. S., Lee, W. S., Lee, H. J., ... & Kim, H. S. (2007). Enzymatic hydrolysis of heated whey: iron-binding ability of peptides and antigenic protein fractions. *Journal of Dairy Science*, 90(9), 4033-4042.
111. Kindstedt, P. S. (2012). *Cheese and Culture. A History of Cheese and Its Place in Western Civilization*. Chelsea Green Publ., White River Jct.
112. Kindstedt, P. S. (2017). The history of cheese. *Global Cheesemaking Technology: Cheese Quality and Characteristics*, 1-19.
113. Kitts, D. D., & Weiler, K. (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1309-1323.

114. Koch, G., Wiedemann, K. & Teschemacher, H. Opioid activities of human  $\beta$ -casomorphins. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **331**, 351–354 (1985).  
<https://doi.org/10.1007/BF00500818>
115. Korhonen, H. (2009). Milk-derived bioactive peptides: from science to applications. *Journal of Functional Foods*, 1, 177-187.
116. Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2003). Food-derived bioactive peptides-opportunities for designing future foods. *Current pharmaceutical design*, 9(16), 1297-1308.
117. Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: production and functionality. *International dairy journal*, 16(9), 945-960.
118. Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2007). Technological options for the production of health promoting proteins and peptides derived from milk and colostrum. *Current Pharmaceutical Design*, 13(8), 829–843.
119. Korhonen, H., & Pihlanto-Leppälä, A. (2004). Milk-derived bioactive peptides: formation and prospects for health promotion. *Handbook of functional dairy products*, 109-124.
120. Korhonen, H., Pihlanto-Leppala, A., Rantamaki, P., & Tupasela, T. (1998). Impact of processing on bioactive proteins and peptides. *Trends in Food Science and Technology*, 9, 307-319.
121. Koutsoukis, C., Voidarou, C., Demertzis, P. G., & Akrida-Demertzi, K. (2017). Effect of the composition of grazing matter on the quality characteristics of the traditional greek dairy product "Tsalafouti". *J. Environ. Sci. Toxicol. Food Technol*, 11, 79-84.
122. Kukovics, S., & Németh, T. (2013). Milk major and minor proteins, polymorphisms and non-protein nitrogen. *Milk and dairy products in human nutrition: Production, composition and health*, 80-110.
123. Lacroix, I. M., & Li-Chan, E. C. (2012). Evaluation of the potential of dietary proteins as precursors of dipeptidyl peptidase (DPP)-IV inhibitors by an in silico approach. *Journal of Functional Foods*, 4(2), 403-422.
124. Lacroix, I. M., & Li-Chan, E. C. (2015). Comparison of the susceptibility of porcine and human dipeptidyl-peptidase IV to inhibition by protein-derived peptides. *Peptides*, 69, 19-25.
125. Lacroix, I. M., Meng, G., Cheung, I. W., & Li-Chan, E. C. (2016). Do whey protein derived peptides have dual dipeptidyl-peptidase IV and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities? *Journal of Functional Foods*, 21, 87-96.

126. Lahov, E., & Regelson, W. (1996). Antibacterial and immunostimulating casein derived substances from milk: casecidin, isracidin peptides. *Food and Chemical Toxicology*, 34, 131-145.
127. Lambeir, A. M., Durinx, C., Scharpé, S., & De Meester, I. (2003). Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 40(3), 209-294.
128. Lazăr, C., Pelmus, R., Ghiță, E., & Rotar, M. C. (2018). IDENTIFICATION OF MILK COMPOSITION AND PROTEINS POLYMORPHISM CORRELATED WITH CHEESE QUALITY, TO SELECT THE BEST CARPATINA GOATS. *Lucrări Științifice-Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară, Seria Zootehnie*, 69, 8-13.
129. Lean, M. E. (2006). *Fox and Cameron's Food Science, Nutrition & Health*. CRC Press.
130. Lei, T., & Sun, D. W. (2019). Developments of nondestructive techniques for evaluating quality attributes of cheeses: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 88, 527-542.
131. Leonardi, M., Gerbault, P., Thomas, M. G. & Burger, J. (2012). *International Dairy Journal*, 22, 88–97.
132. Li, Y. W., & Li, B. (2013). Characterization of structure–antioxidant activity relationship of peptides in free radical systems using QSAR models: Key sequence positions and their amino acid properties. *Journal of Theoretical Biology*, 318, 29-43.
133. Licitra, G. (2010). World wide traditional cheeses: Banned for business? *Dairy Science & Technology*, 90, 357–374.
134. Lindmark-Månsson, H., & Åkesson, B. (2000). Antioxidative factors in milk. *British journal of Nutrition*, 84(S1), 103-110.
135. Litopoulou-Tzanetaki, E., & Tzanetakis, N. (2011). Microbiological characteristics of Greek traditional cheeses. *Small Ruminant Research*, 101(1-3), 17-32.
136. Litopoulou-Tzanetaki, E., & Tzanetakis, N. (2014). The microfloras of traditional Greek cheeses. *Microbiology Spectrum*, 2(1), 2-1.
137. Lopez-Exposito, I., Gomez-Ruiz, J. A., Amigo, L., & Recio, I. (2006). Identification of antibacterial peptides from ovine alpha s2-casein. *International Dairy Journal*, 16, 1072–1080.
138. López-Expósito, I., Miralles, B., Amigo, L., & Hernández-Ledesma, B. (2017). Health effects of cheese components with a focus on bioactive peptides.

- In *Fermented foods in health and disease prevention* (pp. 239-273). Academic Press.
139. López-Expósito, I., Quirós, A., Amigo, L., & Recio, I. (2007). Casein hydrolysates as a source of antimicrobial, antioxidant and antihypertensive peptides. *Le Lait*, 87(4-5), 241-249.
  140. Lora, I., Zidi, A., Magrin, L., Prevedello, P., & Cozzi, G. (2020). An insight into the dairy chain of a Protected Designation of Origin cheese: the case study of Asiago cheese. *Journal of dairy science*, 103(10), 9116-9123.
  141. Lorey, S., Stöckel-Maschek, A., Faust, J., Brandt, W., Stiebitz, B., Gorrell, M. D., ... & Neubert, K. (2003). Different modes of dipeptidyl peptidase IV (CD26) inhibition by oligopeptides derived from the N-terminus of HIV-1 Tat indicate at least two inhibitor binding sites. *European journal of biochemistry*, 270(10), 2147-2156.
  142. Lu, J. (2013). The biology of milk synthesis from a proteomics perspective (PhD Thesis). Wageningen, the Netherlands: Wageningen University.
  143. M. H. Abd El-Salam & S. El-Shibiny (2013) Bioactive Peptides of Buffalo, Camel, Goat, Sheep, Mare, and Yak Milks and Milk Products, *Food Reviews International*, 29:1, 1-23, DOI: 10.1080/87559129.2012.692137.
  144. M. Shahbandeh, Jan 19, 2021, Statista.com
  145. Malkoski, M., Dashper, S. G., O'Brien-Simpson, N. M., Talbo, G. H., Macris, M., Cross, K. J., & Reynolds, E. C. (2001). Kappacin, a novel antibacterial peptide from bovine milk. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(8), 2309-2315.
  146. Mangano, K. M., Bao, Y., & Zhao, C. (2019). Nutritional properties of whey proteins. *Whey Protein Production, Chemistry, Functionality, and Applications*, 103-140.
  147. Manso, M. A., & Lopez-Fandino, R. (2004).  $\kappa$ -Casein macropeptides from cheese whey: Physicochemical, biological, nutritional, and technological features for possible uses. *Food Reviews International*, 20(4), 329-355.
  148. Manso, M.A.; Escudero, C.; Aligo, M.; López-Fandino, R. Platelet aggregation inhibitory activity of bovine, ovine and caprine  $\kappa$ -casein macropeptides and their tryptic hydrolyzates. *J. Food Protect.* 2002, 65, 1992–1996.
  149. Marsden, T., Banks, J., & Bristow, G. (2000). Food supply chain approaches: exploring their role in rural development. *Sociologia ruralis*, 40(4), 424-438.
  150. Massouras, T., Pappa, E. C., & Mallatou, H. (2006). Headspace analysis of volatile flavour compounds of Teleme cheese made from sheep and goat milk. *International journal of dairy technology*, 59(4), 250-256.
  151. McCann, K. B., Shiell, B. J., Michalski, W. P., Lee, A., Wan, J., Roginski, H., & Coventry, M. J. (2005). Isolation and characterisation of antibacterial peptides

- derived from the f (164–207) region of bovine  $\alpha$ 2-casein. *International Dairy Journal*, 15(2), 133-143.
152. McCormick, F. (2012). Cows, milk and religion: The use of dairy produce in early societies. *Anthropozoologica*, 47 (2), 99–111.
153. McCormick, F. (2012). Cows, milk and religion: The use of dairy produce in early societies. *Anthropozoologica*, 47 (2), 99–111.
154. McMahon, D. J., & Oommen, B. S. (2013). Casein micelle structure, functions, and interactions. In *Advanced dairy chemistry* (pp. 185-209). Springer, Boston, MA.
155. Meira, S. M. M., Daroit, D. J., Helfer, V. E., Corrêa, A. P. F., Segalin, J., Carro, S., & Brandelli, A. (2012). Bioactive peptides in water-soluble extracts of ovine cheeses from Southern Brazil and Uruguay. *Food Research International*, 48(1), 322-329.
156. Meisel H & Schlimme E (1994) Inhibitors of angiotensin-converting-enzyme derived from bovine casein (casokinins). In *b-Casomorphins and Related Peptides: Recent Developments*, pp. 27±33 [V Brantl and H Teschemacher, editors]. Weinheim: VCH.
157. Meisel, H. (1997). Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. *Peptide Science*, 43(2), 119-128.
158. Meisel, H. (1998). Overview on milk protein-derived peptides. *International Dairy Journal*, 8, 363-373.
159. Meisel, H., & FitzGerald, R. J. (2003). Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. *Current pharmaceutical design*, 9(16), 1289-1296.
160. Meisel, H., & Schlimme, E. (1990). Milk proteins: precursors of bioactive peptides. *Trends in Food Science & Technology*, 1, 41-43.
161. Meisel, H., Fairweather-Tait, S., FitzGerald, R. J., Hartmann, R., Lane, C. N., McDonagh, D., ... & Wal, J. M. (2003). Detection of caseinophosphopeptides in the distal ileostomy fluid of human subjects. *British Journal of Nutrition*, 89(3), 351-358.
162. Mentlein, R. (2005). Therapeutic assessment of glucagon-like peptide-1 agonists compared with dipeptidyl peptidase IV inhibitors as potential antidiabetic drugs. *Expert opinion on investigational drugs*, 14(1), 57-64.
163. Michaelidou, A. M. (2008). Factors influencing nutritional and health profile of milk and milk products. *Small Ruminant Research*, 79(1), 42-50.
164. Michaelidou, A., Alichanidis, E., Urlaub, H., Polychroniadou, A., & Zerfiridis, G. K. (1998). Isolation and identification of some major water-soluble peptides in Feta cheese. *Journal of Dairy Science*, 81(12), 3109-3116.

165. Michailidou, S., Pavlou, E., Pasentsis, K., Rhoades, J., Likotrafiti, E., & Argiriou, A. (2021). Microbial profiles of Greek PDO cheeses assessed with amplicon metabarcoding. *Food Microbiology*, *99*, 103836.
166. Migeotte, L., translated by J. Lloyd. (2009). *The Economy of the Greek cities. From the Archaic Period to the Early Roman Empire*. University of California Press, Berkeley.
167. Migliore-Samour, D., & Jolles, P. (1988). Casein, a prohormone with an immunomodulating role for the newborn?. *Experientia*, *44*(3), 188-193.
168. Miguel, M., Recio, I., Ramos, M., Delgado, M. A., & Aleixandre, M. A. (2006). Antihypertensive effect of peptides obtained from *Enterococcus faecalis*-fermented milk in rats. *Journal of Dairy Science*, *89*, 3352-3359.
169. Mistry, V. V. (2001). Low fat cheese technology. *International dairy journal*, *11*(4-7), 413-422.
170. Moatsou, G.; Samolada, M.; Katsabaki, A.; Anifantakis, E. Casein fractions of ovine milk from indigenous Greek breeds. *Lait* 2004, *84*, 285–296.
171. Mohanty, D. P., Mohapatra, S., Misra, S., & Sahu, P. S. (2016). Milk derived bioactive peptides and their impact on human health—A review. *Saudi journal of biological sciences*, *23*(5), 577-583.
172. Mohanty, D., Jena, R., Choudhury, P. K., Pattnaik, R., Mohapatra, S., & Saini, M. R. (2016). Milk derived antimicrobial bioactive peptides: a review. *International Journal of Food Properties*, *19*(4), 837-846.
173. Molik, E., Bonczar, G., Misztal, T., Zebrowska, A., & Zieba, D. (2012). The effect of the photoperiod and exogenous melatonin on the protein content in sheep milk. *Milk protein*, *12*, 325-340.
174. Molimard P., Spinnler H.E., Review: compounds involved in the flavor of surface mold-ripened cheeses: origins and properties, *J. Dairy Sci.* *79* (1996) 169–184.
175. Molina, P. E., & Abumrad, N. N. (1994). Gut-derived proteolysis during insulin-induced hypoglycemia: the pain that breaks down the gut. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, *18*(6), 549-556.
176. Monaci, L., Tregoat, V., van Hengel, A. J., & Anklam, E. (2006). Milk allergens, their characteristics and their detection in food: A review. *European Food Research and Technology*, *223*(2), 149-179.
177. Mullally, M. M., Meisel, H., & FitzGerald, R. J. (1996). Synthetic peptides corresponding to a-lactalbumin and b-lactoglobulin sequences with angiotensin-1-converting enzyme inhibitory activity. *Biological Chemistry-Hoppe Seyler*, *377*(4), 259-260.



178. Muro Urista, C., Álvarez Fernández, R., Riera Rodriguez, F., Arana Cuenca, A., & Tellez Jurado, A. (2011). Production and functionality of active peptides from milk. *Food Science and Technology International*, 17(4), 293-317.
179. Neils, J. (2008). *The British Museum Concise Introduction to Ancient Greece*. Univ. Michigan Press, Ann Arbor.
180. Niblett, R., Manning, W. & Saunders, C. (2006). Verulamium: Excavations within the Roman town 1986–88. *Britannia*, 37, 53–188.
181. Nicholson, C. & Stephenson, M. W. (2007). Financial performance value-added dairy operations in New York, Vermont and Wisconsin. <http://purl.umn.edu/9732>.
182. Nicoleta, Stanciuc & Rapeanu, Gabriela. (2010). An overview of bovine  $\alpha$ -lactalbumin structure and functionality. *Annals of the University Dunarea de Jos of Galati. Fascicle VI : Food Technology*. 34.
183. Nielsen, S. D., Beverly, R. L., Qu, Y., & Dallas, D. C. (2017). Milk bioactive peptide database: A comprehensive database of milk protein-derived bioactive peptides and novel visualization. *Food chemistry*, 232, 673-682. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.056>
184. Nongonierma, A. B., & FitzGerald, R. J. (2014). Susceptibility of milk protein-derived peptides to dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) hydrolysis. *Food Chemistry*, 145, 845-852.
185. Nongonierma, A. B., & FitzGerald, R. J. (2016). Structure activity relationship modelling of milk protein-derived peptides with dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory activity. *Peptides*, 79, 1-7.
186. Nongonierma, A. B., & FitzGerald, R. J. (2017). Strategies for the discovery and identification of food protein-derived biologically active peptides. *Trends in Food Science & Technology*, 69, 289-305.
187. Nygard, B. and Storstad, O., 1998. De-globalization of food markets? Consumer perceptions of safe food: the case of Norway. *Sociologia Ruralis*, 38 (1), 35–53.
188. O'mahony, J. A., & Fox, P. F. (2013). Milk proteins: Introduction and historical aspects. In *Advanced dairy chemistry* (pp. 43-85). Springer, Boston, MA.
189. Olson, N.F. 2003. "Types of Cheese." *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 2nd ed. Vol. 2. Caballero B., Trugo, L.C., Finglas, P.M. (eds). Academic Press, New York, NY. 1046 – 1051
190. Ourailoglou, D., Athanasiadis, V., Bozinou, E., Salakidou, C., Evmorfopoulos, E., & Lalas, S. (2021). Manufacturing process and physicochemical analysis of Kariki: a traditional cheese from the Island of Tinos, Greece. *International Food Research Journal*, 28(2).

191. ÖZTÜRK, H. İ., & Akin, N. (2017). Comparison of some functionalities of water-soluble peptides derived from Turkish cow and goat milk Tulum cheeses during ripening. *Food Science and Technology*, 38, 674-682.
192. Pan, Y., Lee, A., Wan, J., Coventry, M. J., Michalski, W. P., Shiell, B., & Roginski, H. (2006). Antiviral properties of milk proteins and peptides. *International Dairy Journal*, 16(11), 1252-1261.
193. Pan, Y., Rowney, M., Guo, P., & Hobman, P. (2007). Biological properties of lactoferrin: an overview. *Australian Journal of Dairy Technology*, 62(1), 31.
194. Panchaud, A., Affolter, M., & Kussmann, M. (2012). Mass spectrometry for nutritional peptidomics: How to analyze food bioactives and their health effects. *Journal of proteomics*, 75(12), 3546-3559.
195. Papadimitriou, C.G.; Vafopouleu-Mastro, J.; Annaki, A.; Silva, S.V.; Gomes, A.M.; Malcata, F.X.; Alichanidis, E. Identification of peptides in traditional and probiotic sheep milk yoghurt with angiotension-I-converting-enzyme (ACE)-inhibitory activity. *Food Chem.* 2007, 105, 647–656.
196. Pappa, E. C., Bontinis, T. G., Samelis, J., & Sotirakoglou, K. (2022). Assessment of the Microbiological Quality and Biochemical Parameters of Traditional Hard Xinotyri Cheese Made from Raw or Pasteurized Goat Milk. *Fermentation*, 8(1), 20.
197. Pappa, E. C., Kandarakis, I., & Mallatou, H. (2007). Effect of different types of milks and cultures on the rheological characteristics of Teleme cheese. *Journal of Food Engineering*, 79(1), 143-149.
198. Pappa, E. C., Robertson, J. A., Rigby, N. M., Mellon, F., Kandarakis, I., & Mills, E. N. C. (2008). Application of proteomic techniques to protein and peptide profiling of Teleme cheese made from different types of Milk. *International Dairy Journal*, 18, 605–614.
199. Park, Y.W., Juarez, M., Ramos, M. & Haenlein, G.F.W. (2007) Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research* 68, 88–113.
200. Paul, M., Nuñez, A., Van Hekken, D. L., & Renye, J. A. (2014). Sensory and protein profiles of Mexican Chihuahua cheese. *Journal of food science and technology*, 51(11), 3432-3438.
201. Pellegrini, A., Dettling, C., Thomas, U., & Hunziker, P. (2001). Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine  $\beta$ -lactoglobulin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1526(2), 131-140.

202. Pihlanto, A. (2006). Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal*, 16(11), 1306-1314.
203. Pirisi, A., Lauret, A., & Dubeuf, J. P. (2007). Basic and incentive payments for goat and sheep milk in relation to quality. *Small ruminant research*, 68(1-2), 167-178.
204. Pisanu, S., Pagnozzi, D., Pes, M., Pirisi, A., Roggio, T., Uzzau, S., & Addis, M. F. (2015). Differences in the peptide profile of raw and pasteurised ovine milk cheese and implications for its bioactive potential. *International Dairy Journal*, 42, 26-33.
205. Popa, T. V., Mant, C. T., & Hodges, R. S. (2006). Ion-interaction–capillary zone electrophoresis of cationic proteomic peptide standards. *Journal of Chromatography A*, 1111(2), 192-199.
206. Pritchard, S. R. (2012). *Isolation and characterisation of bioactive peptides derived from milk and cheese* (Doctoral dissertation, University of Western Sydney (Australia)).
207. Pritchard, S. R., Phillips, M., & Kailasapathy, K. (2010). Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. *Food research international*, 43(5), 1545-1548.
208. Punia, H., Tokas, J., Malik, A., Sangwan, S., Baloda, S., Singh, N., ... & Mor, V. S. (2020). Identification and detection of bioactive peptides in milk and dairy products: Remarks about agro-foods. *Molecules*, 25(15), 3328.
209. Qian, Z. Y., Jolles, P., Migliore-Samour, D., & Fiat, A. M. (1995). Isolation and characterization of sheep lactoferrin, an inhibitor of platelet aggregation and comparison with human lactoferrin. *Biochimica et Biophysica Acta, Reviews on Biomembranes*, 1243(1), 25–32.
210. Quiros, A., del Mar Contreras, M., Ramos, M., Amigo, L., & Recio, I. (2009). Stability to gastrointestinal enzymes and structure-activity relationship of beta-casein-peptides with antihypertensive properties. *Peptides*, 30(10), 1848–1853.
211. Quiros, A., Hernandez-Ledesma, B., Ramos, M., Amigo, L., & Recio, I. (2005). Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from caprine kefir. *Journal of Dairy Science*, 88(10), 3480–3487.
212. Rai, M.; Da Silva, S.S. *Nanotechnology for Bioenergy and Biofuel Production*; Springer International Publishing: Berlin/Heidelberg, Germany, 2017.
213. Raynal-Ljutovac, K., Gaborit, P., & Lauret, A. (2005). The relationship between quality criteria of goat milk, its technological properties and the quality of the final products. *Small Ruminant Research*, 60(1-2), 167-177.

214. Raynal-Ljutovac, K., Lagriffoul, G., Paccard, P., Guillet, I., & Chilliard, Y. (2008). Composition of goat and sheep milk products: An update. *Small ruminant research*, 79(1), 57-72.
215. Raynal-Ljutovac, K., Park, Y. W., Gaucheron, F., & Bouhallab, S. (2007). Heat stability and enzymatic modifications of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68, 207-220.
216. Recio, I., Moreno, F. J., & López-Fandiño, R. (2009). Glycosylated dairy components: their roles in nature and ways to make use of their biofunctionality in dairy products. In *Dairy-Derived Ingredients* (pp. 170-211). Woodhead Publishing.
217. Recio, I.; Quirós, A.; Hernández-Ledesma, B.; Gómez-Ruiz, I.A.; Miguel, M.; Amigo, L.; López-Expósito, I.; Ramos, M.; Aleixandre, A. Bioactive peptides identified in enzyme hydrolysates from milk caseins and procedure for their obtention. U. S. Patent, PT/20100048464, February 25, 2010.
218. Renting, H., Marsden, T. K., & Banks, J. (2003). Understanding alternative food networks: exploring the role of short food supply chains in rural development. *Environment and planning A*, 35(3), 393-411.
219. Ricci, I., Artacho, R., & Olalla, M. (2010). Milk protein peptides with angiotensin I-converting enzyme inhibitory (ACEI) activity. *Critical reviews in food science and nutrition*, 50(5), 390-402.
220. Rival, S. G., Fornaroli, S., Boeriu, C. G., & Wichers, H. J. (2001). Caseins and casein hydrolysates. 1. Lipoxygenase inhibitory properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(1), 287-294.
221. Rizzello, C. G., Losito, I., Gobbetti, M., Carbonara, T., De Bari, M. D., & Zambonin, P. (2005). Antibacterial activities of peptides from the water-soluble extracts of Italian cheese varieties. *Journal of Dairy Science*, 88, 2348-2360.
222. Roberts, T. A., Cordier, J. L., Gram, L., Tompkin, R. B., Pitt, J. I., Gorris, L. G. and Swanson, K. M. 2005. Milk and dairy products. In International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) (ed). *Microorganisms in Foods 6: Microbial Ecology of Food Commodities*, p. 643-715. United States: Springer.
223. Ryhänen, E. L., Pihlanto-Leppälä, A., & Pahkala, E. (2001). A new type of ripened, low-fat cheese with bioactive properties. *International Dairy Journal*, 11(4-7), 441-447.
224. Salque, M., Bogucki, P. I., Pyzel, J., Sobkowiak-Tabaka, I., Grygiel, R., Szmyt, M. & Evershed, R. P. (2013). Earliest evidence for cheese making in the sixth millennium bc in northern Europe. *Nature*, 493 (7433), 522–525.
225. Salque, M., Radi, G., Tagliacozzo, A., Pino Uria, B., Wolfram, S., Hohhle, I., Stäuble, H., Whittle, A., Hoffmann, D., Pechtl, J., Schade-Lindig, S., Eisenhauer,

- U., and Evershed, R. P. (2012). New insights into the Early Neolithic economy and management of animals in Southern and Central Europe revealed using lipid residue analyses of pottery vessels. *Anthropozoologica*, 47 (2), 45–61.
226. Samelis, J., Kakouri, A., Pappa, E. C., Matijasic, B. B., Georgalaki, M. D., Tsakalidou, E., et al. (2010). Microbial stability and safety of traditional Greek Graviera cheese: Characterization of the lactic acid bacterial flora and culture-independent detection of bacteriocin genes in the ripened cheeses and their microbial consortia. *Journal of Food Protection*, 73, 1294-1303.
227. Sánchez-Rivera, L., Martínez-Maqueda, D., Cruz-Huerta, E., Miralles, B., & Recio, I. (2014). Peptidomics for discovery, bioavailability and monitoring of dairy bioactive peptides. *Food Research International*, 63, 170-181.
228. Schrader, M., Schulz-Knappe, P., & Fricker, L. D. (2014). Historical perspective of peptidomics. *EuPA Open Proteomics*, 3, 171-182.
229. Sebokova, E., Christ, A. D., Boehringer, M., & Mizrahi, J. (2007). Dipeptidyl peptidase IV inhibitors: the next generation of new promising therapies for the management of type 2 diabetes. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 7(6), 547-555.
230. Sharma, G., Rout, D. P., & Singh, G. (2017). Characterization of goat milk protein and comparison of milk proteins using polyacrylamide gel electrophoresis. *International Journal of Scientific Engineering and Applied Science*, 4, 2395-3470.
231. Shimizu, M. (2004). Food-derived peptides and intestinal functions. *Biofactors*, 21(1-4), 43-47.
232. Silva S V and Malcata F X (2005) Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal* 15 1–15.
233. Silva, R. A., Bezerra, V. S., Pimentel, M. D. C. B., Porto, A. L. F., Cavalcanti, M. T. H., & Filho, J. L. L. (2016). Proteomic and peptidomic profiling of Brazilian artisanal 'Coalho'cheese. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(13), 4337-4344.
234. Silva, R. A., Lima, M. S. F., Viana, J. B. M., Bezerra, V. S., Pimentel, M. C. B., Porto, A. L. F., ... & Lima Filho, J. L. (2012). Can artisanal "Coalho" cheese from Northeastern Brazil be used as a functional food. *Food Chemistry*, 135(3), 1533-1538.
235. Silveira, S. T., Martínez-Maqueda, D., Recio, I., & Hernández-Ledesma, B. (2013). Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides generated by tryptic hydrolysis of a whey protein concentrate rich in  $\beta$ -lactoglobulin. *Food chemistry*, 141(2), 1072-1077.

236. Singh, H. (2004). Heat stability of milk. *International Journal of Dairy Technology*, 57, 111-119.
237. Singh, J., Rastogi, A., Kundu, D., Das, M., & Banerjee, R. (2018). A New Perspective on Fermented Protein Rich Food and Its Health Benefits. *Principles and Applications of Fermentation Technology*, 417-436.
238. Smacchi, E., & Gobbetti, M. (2000). Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzymes. *Food Microbiology*, 17(2), 129-141.
239. Soodam, K., & Guinee, T. P. (2018). The case for milk protein standardisation using membrane filtration for improving cheese consistency and quality. *International Journal of Dairy Technology*, 71(2), 277-291.
240. Suetsuna, K., Ukeda, H., & Ochi, H. (2000). Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *The Journal of nutritional biochemistry*, 11(3), 128-131.
241. Sun, N., Wu, H., Du, M., Tang, Y., Liu, H., Fu, Y., & Zhu, B. (2016). Food protein-derived calcium chelating peptides: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 58, 140-148.
242. Swaisgood H.E., 1992. Chemistry of caseins. In: *Advanced dairy chemistry – I. Proteins*. Ed. P.F. Fox. Elsevier Appl. Sci. New York, 63-110.
243. Tamime, A. Y., Wszolek, M., Božanić, R., & Özer, B. (2011). Popular ovine and caprine fermented milks. *Small Ruminant Research*, 101(1-3), 2-16.
244. Tavares T.G., Contreras M.M., Amorim M., Martin-Alvarez P.J., Pentado M.E., Recio, I., Malcata, F.X., 2011. Optimisation, by response surface methodology, of degree of hydrolysis and antioxidant and ACE-inhibitory activities of whey protein hydrolysates obtained with cardoon extract. *Int. Dairy J.* 21 (12), 926-933.
245. Teschemacher, H. (2003). Opioid receptor ligands derived from food proteins. *Current pharmaceutical design*, 9(16), 1331-1344.
246. Theodoridis, G., Pechlivanis, A., Thomaidis, N. S., Spyros, A., Georgiou, C. A., Albanis, T., ... & FoodOmicsGR\_RI Consortium. (2021). FoodOmicsGR\_RI: A consortium for comprehensive molecular characterisation of food products. *Metabolites*, 11(2), 74.
247. Thoma, C., Krause, I. & Kulozik, U. (2006) Precipitation behaviour of caseinomacropptides and their simultaneous determination with whey proteins by RP-HPK. *International Dairy Journal* 16, 285–293.
248. Thoma, R., Löffler, B., Stihle, M., Huber, W., Ruf, A., & Hennig, M. (2003). Structural basis of proline-specific exopeptidase activity as observed in human dipeptidyl peptidase-IV. *Structure*, 11(8), 947-959.



249. Tidona F, Criscione A, Guastella A-M, Zuccaro A, Bordonaro S and Marletta D, (2009) Bioactive peptides in dairy products. *Italian Journal of Animal Science* 8 315–340.
250. Tomazou, M., Oulas, A., Anagnostopoulos, A. K., Tsangaris, G. T., & Spyrou, G. M. (2019). In silico identification of antimicrobial peptides in the proteomes of goat and sheep milk and feta cheese. *Proteomes*, 7(4), 32.
251. Tome, D., Bos, C., Mariotti, F., & Gaudichon, C. (2002). Protein quality and FAO/WHO recommendations. *Sciences des aliments*, 22(4), 393-405.
252. Tomita, M., Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., & Kawase, K. (1991). Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. *Journal of dairy science*, 74(12), 4137-4142.
253. Trani, A., Loizzo, P., Cassone, A., & Faccia, M. (2017). Process/Product Control: Analysis of Cheese by Proteomics Techniques. *Advances in Dairy Products*, 202.
254. Tregear, A., Kuznetsov, S., and Moxey, A., 1998. Policy initiatives for regional foods: some insights from consumer research. *Food Policy*, 23 (5), 383–394.
255. Tulipano, G., Sibilia, V., Caroli, A. M., & Cocchi, D. (2011). Whey proteins as source of dipeptidyl dipeptidase IV (dipeptidyl peptidase-4) inhibitors. *Peptides*, 32(4), 835-838.
256. Vakoufari, H. (2010). The impact of Ladotyri Mytilinis PDO cheese on the rural development of Lesvos island, Greece. *Local Environment*, 15(1), 27-41.
257. Vedamuthu, E. R., & Washam, C. (1983). Cheese. *Biotechnology. Volume 5. Food and feed production with microorganisms*, 231-313.
258. Vigne, J.-D. (2011). The origins of animal domestication and husbandry: A major change in the history of humanity and the biosphere. *Comptes Rendus Biologies*, 334, 171–181.
259. Vogel, H. J., Schibli, D. J., Jing, W., Lohmeier-Vogel, E. M., Epand, R. F., & Epand, R. M. (2002). Towards a structure-function analysis of bovine lactoferricin and related tryptophan-and arginine-containing peptides. *Biochemistry and Cell Biology*, 80(1), 49-63.
260. Wang, G., Li, X., & Wang, Z. (2016). APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic acids research*, 44(D1), D1087-D1093.
261. Wang, Q., Thompson, E. & Parsons, R. (2015). Preferences for farmstead, artisan, and other cheese attributes from a conjoint study in the Northeast United States. *International Food and Agribusiness Management Review*, 18 (2), 17–36.

262. Wood, G. M., Boettcher, P. J., Jamrozik, J., Jansen, G. B., & Kelton, D. F. (2003). Estimation of genetic parameters for concentrations of milk urea nitrogen. *Journal of Dairy Science*, 86(7), 2462-2469.
263. Xanthopoulos, V., Polychroniadou, A., Litopoulou-Tzanetaki, E., & Tzanetakis, N. (2000). Characteristics of Anevato cheese made from raw or heat-treated goat milk inoculated with a lactic starter. *LWT-Food Science and Technology*, 33(7), 483-488.
264. Yüksel, Z., & Erdem, Y. K. (2010). Detection of the milk proteins by RP-HPLC. *GIDA-Journal of Food*, 35(1), 5-11.
265. Zabielski, R. (2007). Hormonal and neural regulation of intestinal function in pigs. *Livestock Science*, 108(1-3), 32-40.
266. Zhang, Y., Chen, R., Ma, H., & Chen, S. (2015). Isolation and identification of dipeptidyl peptidase IV-inhibitory peptides from trypsin/chymotrypsin-treated goat milk casein hydrolysates by 2D-TLC and LC-MS/MS. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 63(40), 8819–8828.
267. Zlatanov, S., Laskaridis, K., Feist, C., & Sagredos, A. (2002). CLA content and fatty acid composition of Greek Feta and hard cheeses. *Food Chemistry*, 78, 471-477.
268. ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) ΑΡΙΘ. 1924/2006 ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ της 20 Δεκεμβρίου 2006 σχετικά με τους ισχυρισμούς διατροφής και υγείας που διατυπώνονται στα τρόφιμα.
269. Παππά Ε., (2018), Φτιάχνοντας το φημισμένο τσαλαφούτι, Dairynews.gr

## 8. Παραρτήματα

### Παράρτημα 1.

#### **ΕΡΩΤΗΜΑΤΟΛΟΓΙΟ**

Επωνυμία τυροκομείου/γαλακτοβιομηχανίας/βιοτεχνίας:

Διεύθυνση:

Τ.Κ.:

Τηλέφωνο:

e-mail:

1. Τι είδη γάλακτος χρησιμοποιείτε;  
α) Αν χρησιμοποιείτε μίγμα, σε τι αναλογίες είναι;
2. Σε ποιες περιοχές γίνεται η εκτροφή των γαλακτοπαραγωγών ζώων; Ποιο είναι το σύστημα εκτροφής τους; Από τι αποτελείται η διατροφή τους;
3. Από ποιες φυλές ζώων προέρχεται το γάλα;
4. Σε ποιο στάδιο της γαλακτικής περιόδου προμηθεύετε το γάλα για την παρασκευή του τυριού; Ποιούς μήνες είναι η παραγωγή του τυριού;
5. Καταψύχετε το γάλα για να έχετε διαθέσιμο όλο το χρόνο τυρί;
6. Ποια είναι η ποσότητα του γάλακτος που επεξεργάζεστε;
7. Ποια είναι τα χαρακτηριστικά του γάλακτος τυροκόμησης (λιποπεριεκτικότητα, pH, κ.λπ);

8. Περιγραφή της παραγωγικής διαδικασίας
9. Τι χειρισμούς κάνετε στο γάλα τυροκόμησης; (Καθαρισμός, θέρμισμα, τυποποίηση, παστερίωση, ομογενοποίηση κ.λπ)
10. Ποια είναι η θερμοκρασία και ο χρόνος της θερμικής επεξεργασίας που εφαρμόζετε;
11. Πόσο αλάτι προσθέτετε;
12. Πώς γίνεται η πήξη του γάλακτος; Πόσο διαρκεί; Σε τι θερμοκρασία πραγματοποιείται;
13. Γίνεται προσθήκη καλλιεργειών-εκκινητών; Ποια στελέχη χρησιμοποιείτε; Σε τι μορφή είναι οι καλλιέργειες; Πότε προστίθενται και σε τι ποσότητα; Σε τι θερμοκρασία είναι το γάλα;
14. Προσθέτετε πτυιά/ κάποια άλλα ένζυμα/ πηκτικά παρασκευάσματα; Σε τι μορφή (σκόνη, υγρή); Σε ποιο στάδιο της παρασκευής (θερμοκρασία/ pH); Σε τι ποσότητα;
15. Σε τι θερμοκρασία ψύχετε το γάλα μετά την θερμική επεξεργασία;
16. Χρησιμοποιείτε πρόσθετα, τεχνολογικά βοηθήματα; (χλωριούχο ασβέστιο, γαλακτικό οξύ-ρύθμιση pH;)

17. Ποια είναι η θερμοκρασία και η διάρκεια ωρίμανσης; Πού πραγματοποιείται η ωρίμανση;
18. Γίνεται περαιτέρω επεξεργασία του πηγματος; Π.χ. Παστερίωση, ομογενοποίηση;
19. Ποιες είναι οι προδιαγραφές του τελικού προϊόντος (υγρασία/ λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού) ;
20. Τι ποιοτικούς ελέγχους κάνετε κατά την διάρκεια της παρασκευής και στο έτοιμο προς κατανάλωση τυρί;
21. Τι συσκευασίες χρησιμοποιείτε (πόσων γραμμαρίων);
22. Ποιες είναι οι συνθήκες αποθήκευσης (θερμοκρασία);
23. Ποιος είναι ο χρόνος ζωής του προϊόντος;
24. Πώς σερβίρεται;
25. Ποια είναι η ποσότητα του τελικού προϊόντος που παράγετε ετησίως;
26. Πού το διανέμετε (εντός/εκτός Ελλάδας);

27. Υπάρχουν κάποιες τοπικές παραδόσεις σχετικά με το «Τσαλαφούτι»; Κάποια λαογραφικά στοιχεία;

28. Ποια πιστεύετε ότι είναι τα οφέλη από την καταχώρηση του «Τσαλαφούτι» ως προϊόν ΠΟΠ;

29. Υπάρχει δυνατότητα παραχώρησης δειγμάτων για τα πειράματα;



## Παράρτημα 2.

Data File C:\CHEM32\1\DATA\PEPTIDES\010322-000004.D  
Sample Name: P8  
Instrument 1 3/1/2022 2:47:47 AM Mary

=====  
Acq. Operator : Mary  
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 1  
Injection Date : 3/1/2022 1:46:50 AM Inj : 1  
Inj Volume : 5 µl  
Acq. Method : C:\CHEM32\1\METHODS\PEPTIDES HPLC METHO  
Last changed : 3/1/2022 1:45:22 AM by Mary  
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\PEPTIDES HPLC METHOD.M  
Last changed : 3/1/2022 2:46:55 AM by Mary  
MS Signal: MSD1 TIC, MS File,ES-API, Scan, Frag: 70  
Spectra averaged over upper half of peaks.  
Noise Cutoff: 1000 counts.  
Reportable Ion Abundance: > 10%.

Retention Time (MS)	MS Area	Mol. Weight or Ion
0.081	1002360	145.20 I 114.20 I
0.181	189783	145.20 I
0.300	340421	145.20 I 114.20 I
0.463	689611	145.20 I
0.580	708657	145.20 I
0.740	913394	145.20 I
0.839	290021	145.20 I
0.914	435025	145.20 I
0.996	612920	145.20 I
1.088	58800	145.20 I
1.174	446103	145.20 I
1.263	523032	145.20 I
1.388	1658623	863.00 I 145.20 I
1.614	659710	145.20 I
1.830	2210637	145.20 I

2.049	1002869	145.20 I
2.244	690699	145.20 I
2.423	1761935	145.20 I
2.609	774257	145.20 I
2.774	1187068	145.20 I
2.998	782411	145.20 I
3.111	682486	145.20 I
3.273	1258862	145.20 I
3.471	1004623	145.20 I
3.567	444179	145.20 I
3.660	495000	145.20 I
3.772	1305015	145.20 I
3.872	1006741	145.20 I
3.984	1939584	145.20 I
4.176	1100529	145.20 I
4.403	2139556	145.20 I
4.502	1862104	145.20 I
4.638	736566	145.20 I
4.730	1553880	145.20 I
4.885	2187423	145.20 I
5.089	2943039	145.20 I
5.220	1203064	145.20 I
5.337	1976624	145.20 I
5.768	20659656	383.20 I 203.10 I 145.20 I
6.118	6014164	365.15 I 334.20 I 167.20 I 145.20 I

Retention Time (min)	Sample ID	Abundance	Ionization	Retention Time (min)	MS Area	Mol. Weight or Ion
6.264	7798588	430.90 I				
		365.10 I				
		295.00 I				
		167.20 I				
		159.00 I				
		146.20 I				
		145.20 I				
		136.20 I				
6.770	30343958	369.20 I				
		338.10 I				
		145.20 I				
7.018	2545177	145.20 I				
7.172	1991067	145.20 I				
7.241	1436570	145.20 I				
7.330	5155988	145.20 I				
7.603	2330899	145.20 I				
7.776	3464664	145.20 I		0.083	1595414	145.25 I
7.925	2252197	145.20 I		0.294	846569	145.20 I
8.038	3833215	593.50 I		0.494	633310	145.20 I]
		145.20 I				114.20 I
8.168	3813279	273.30 I		0.611	1697437	627.10 I
		145.20 I				145.20 I
8.273	2342207	145.20 I		0.757	870016	145.20 I
8.419	5304597	1082.60 I		0.892	312605	145.20 I
		557.70 I				
		145.20 I		1.047	835666	145.20 I
8.676	5267186	145.20 I]		1.147	532725	145.20 I
8.774	4348059	145.20 I		1.259	2292028	454.70 I
						145.20 I
8.977	5951620	145.20 I				114.20 I
9.254	4177144	145.20 I		1.519	966759	145.20 I
9.396	3943444	145.20 I		1.682	841349	145.20 I
9.570	3173742	145.20 I		1.804	681241	145.20 I
9.672	4166300	145.20 I		1.903	312835	145.20 I
9.860	3382565	145.20 I		2.045	1250962	145.20 I

2.529	498639	145.20 I	5.768	8344225	384.20 I 383.20 I
2.611	1743673	187.50 I 145.20 I			203.10 I 145.20 I
2.760	679804	145.20 I	5.886	6498038	383.15 I 203.10 I
2.851	485041	145.20 I			145.20 I 113.40 I
2.934	865216	145.20 I	5.996	2649031	365.10 I 145.20 I
3.029	547844	145.20 I			
3.173	1674768	145.20 I	6.234	13411030	365.15 I 167.20 I
3.336	603731	145.20 I			145.20 I
3.438	1400491	561.10 I 145.20 I	6.480	3295571	145.20 I
			6.753	30339922	369.20 I 338.10 I
3.533	715635	145.20 I			145.20 I
3.601	663890	145.20 I	7.011	721344	145.20 I
3.717	905932	145.20 I	7.172	3367220	285.80 I 145.20 I
3.817	1581729	145.20 I			
4.081	1771266	145.20 I	7.287	960834	145.20 I
4.178	736185	145.20 I	7.409	3711598	427.60 I 145.20 I
4.311	1515229	145.20 I	7.597	1372249	145.20 I
4.493	1834761	145.20 I	7.741	4129638	545.00 I 145.20 I
4.753	1983112	145.20 I			
4.883	1093330	145.20 I	7.855	1962596	145.20 I
5.008	1172737	145.20 I	7.936	2044245	145.20 I
5.124	4780698	691.10 I 369.50 I 145.20 I	8.120	791947	145.20 I
			8.207	1020490	1063.20 I 145.20 I
5.285	319558	145.20 I	8.286	995449	145.20 I
5.388	691953	145.20 I	8.371	2339342	145.20 I
5.595	1718374	171.10 I 145.20 I	8.622	3675658	145.20 I