



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών**  
«Βιοτεχνολογία - Ποιότητα Διατροφής και Περιβάλλοντος»

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**  
«Προσδιορισμός προφίλ πρωτεϊνών και βιοπεπτιδίων τοπικών  
τυροκομικών προϊόντων στην περιοχή της Θεσσαλίας»

Δημήτριος Σ. Ζιώγκας  
Χημικός, Α.Π.Θ.

ΛΑΡΙΣΑ, 2022

«Προσδιορισμός προφίλ πρωτεϊνών και βιοπεπτιδίων τοπικών  
τυροκομικών προϊόντων στην περιοχή της Θεσσαλίας»

«Determination of protein profile and biopeptides of local cheese  
products in the region of Thessaly»

## **Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή**

- 1. Μαλισσιόβα Ελένη: Επίκουρη Καθηγήτρια, Ποιότητα, Ασφάλεια & Τεχνολογία Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.**
- 2. Μανούρας Αθανάσιος: Καθηγητής, Χημεία Τροφίμων, Χημεία Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα Διατροφής & Διαιτολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.**
- 3. Γιαννούλη Περσεφόνη: Επίκουρος Καθηγήτρια, Τεχνολογία και Ποιοτικός Έλεγχος Τροφίμων Φυτικής Προέλευσης, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.**

## Περίληψη

Το Κασέρι, το Μανούρι και ο Μπάτζος είναι ελληνικά ΠΟΠ παραδοσιακά τυριά που παράγονται και στην περιοχή της Θεσσαλίας από πρόβειο και κατσικίσιο γάλα. Για την ανάδειξη της διατροφικής αξίας των τυριών αυτών, μέσω της ανίχνευσης βιοπεπτιδίων, πραγματοποιήθηκε υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με UV-VIS και φασματομετρία μάζας. Και στα τρία είδη τυριού εντοπίστηκαν κυρίως βιοπεπτίδια αναστολείς του ενζύμου ACE και αναστολείς της DPP-IV αλλά και με αντιμικροβιακή, αντιδιαβητική, αντιυπερτασική, αντιθρομβωτική, αντιοξειδωτική και ανοσοτροποποιητική ή πολλαπλή δράση. Ως εκ τούτου, και τα τρία τυριά έχουν βιοδραστικές ιδιότητες που μπορεί να ωφελήσουν την υγεία των καταναλωτών. Τέλος, 5 πεπτίδια που εντοπίζονται στο Μπάτζο αλλά δεν είναι ακόμη γνωστή η δράση τους είναι τα FYPQLFRQF, QAI, QAIVQNNDSTEY, QLFRQF και THINKKIEK και μπορούν να αποτελέσουν υποσχόμενους βιοδείκτες για το Μπάτζο για την ανάδειξη του τυριού.

Λέξεις Κλειδιά: Κασέρι, Μανούρι, Μπάτζος, Τυρί, Βιοπεπτίδια, Βιοδείκτες, HPLC-MS

## Abstract

Kaseri, Manouri and Batzos are Greek PDO traditional cheeses that are also produced in the Thessaly region from sheep's and goat's milk. To highlight the nutritional value of these cheeses, liquid chromatography combined with UV-VIS and mass spectrometry was performed for the determination of biopeptides. In all three types of cheese, mainly biopeptides ACE enzyme inhibitors and DPP-IV inhibitors were identified, but also with antimicrobial, antidiabetic, antihypertensive, antithrombotic, antioxidant and immunomodulatory or multiple effects. Therefore, all three cheeses have bioactive properties that may benefit the health of consumers. Finally, 5 peptides found in Batzos but their activity is not known yet are FYPQLFRQF, QAI, QAIVQNNDSTEY, QLFRQF and THINKKIEK and they can be promising biomarkers for Batzos for the promotion of the cheese.

Key Words: Kaseri, Manouri, Batzos, Cheese, Biopeptides, Biomarkers, HPLC-MS

Περιεχόμενα	
Εισαγωγή .....	6
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ - ΤΥΡΟΚΟΜΙΑ .....	7
1.1 Γενικά .....	7
1.2 Η ιστορία της τυροκομίας .....	7
1.3 Παγκόσμια παραγωγή.....	9
1.4 Τυροκομικά προϊόντα και καταναλωτές .....	12
1.5 Κατηγορίες τυριών .....	14
1.6 Γεωγραφικές ενδείξεις τροφίμων και ποτών.....	16
1.6.1 ΠΟΠ τυριά της Ελλάδας.....	16
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ – ΤΥΡΟΚΟΜΙΚΑ ΠΟΠ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ .....	18
2.1 Μανούρι.....	18
2.1.1 Γενικά .....	18
2.1.2 Μέθοδος Παραγωγής.....	18
2.1.3 Μικροβιολογία Μανουριού .....	19
2.1.4 Μελέτες της σύστασης του μανουριού .....	20
2.2 Κασερι .....	20
2.2.1 Γενικά.....	20
2.2.2 Μέθοδος παραγωγής.....	21
2.2.3 Μικροβιολογία Κασεριού .....	21
2.2.4 Μελέτες της σύστασης του κασεριού .....	23
2.3 Μπάτζος.....	24
2.3.1 Γενικά.....	24
2.3.2 Μέθοδος παραγωγής.....	24
2.3.3 Μικροβιολογία Μπάτζου .....	25
2.3.4 Μελέτες της σύστασης του Μπάτζου .....	29
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ - ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΚΑΙ ΤΥΡΟΚΟΜΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ .	31
3.1 Καζεΐνες.....	34
3.2 Πρωτεΐνες ορού γάλακτος.....	35
3.3 Βιοπεπτίδια .....	37
3.4 Τα γαλακτοκομικά προϊόντα ως φορείς βιοδραστικών πεπτιδίων .....	38
3.4.1 ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ.....	39
3.5 Οφέλη βιοπεπτιδίων .....	40
3.5.1 Αντιδιαβητικά μέσα - Πεπτίδια-αναστολείς της DPP-IV:.....	41

3.5.2 Πεπτίδια με αντιυπερτασική δράση-Αναστολείς του ενζύμου ACE .....	41
3.5.3 Αντιθρομβωτικά πεπτίδια.....	43
3.5.4 Αντιοξειδωτικά Πεπτίδια .....	43
3.5.5 Βιοπεπτίδια με αντιμικροβιακές ιδιότητες .....	44
3.5.6 Βιοπεπτίδια με αντικαρκινική δράση.....	44
3.5.7 Βιοπεπτίδια με αντιπηκτική δράση.....	45
3.5.8 Βιοπεπτίδια με δράση παρόμοια με τα οπιούχα .....	45
3.5.9 Ανοσοτροποποιητικά πεπτίδια .....	46
3.5.10 Υποχοληστερολαιμικά Πεπτίδια.....	46
3.5.10 Πεπτίδια δέσμευσης μετάλλων.....	47
3.5.11 Βιοπεπτίδια - Βιοδείκτες .....	47
3.6 Παράγοντες που επηρεάζουν την περιεκτικότητα πρωτεϊνών και βιοπεπτιδίων .....	48
3.6.1 Θερμική επεξεργασία γάλακτος .....	48
3.6.2 Πηκτική ουσία .....	49
3.6.3 Καλλιέργειες εκκίνησης και συμπληρωματικές καλλιέργειες.....	49
3.6.4 Χρόνος ωρίμανσης.....	50
3.6.5 Οξύτητα.....	52
3.7 Μέθοδοι προσδιορισμού πρωτεϊνών και βιοπεπτιδίων.....	52
3.7.1 Φασματοσκοπική Ανίχνευση .....	54
3.7.2 Προφίλ πεπτιδομικής .....	55
3.7.3 Χρωματογραφία.....	55
3.7.4 Φασματομετρία Μάζας .....	55
3.7.5 Ενζυμική Ανοσοροφητική Δοκιμασία (ELISA).....	56
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ - ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ, ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	57
4.1. Δειγματοληψία .....	57
4.2 Πειραματική διαδικασία .....	58
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΕΜΠΤΟ - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	62
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΤΟ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ & ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	92
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	98
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	112

## Εισαγωγή

Η γενική ονομασία για την ομάδα προϊόντων διατροφής με βάση το γάλα που έχουν υποστεί ζύμωση ονομάζεται τυρί και παράγεται σε όλο τον κόσμο σε μεγάλη πληθώρα γεύσεων, υφών και μορφών (Fox et al., 2017). Το τυρί είναι η πιο ποικιλόμορφη ομάδα γαλακτοκομικών προϊόντων με την οικονομική διάσταση και το εμπόριο να παρουσιάζουν ενδιαφέρον σε εγχώριο αλλά και παγκόσμιο επίπεδο. Η Θεσσαλία κατέχει ένα σημαντικό κομμάτι της οικονομίας με πολλούς τοπικούς παραγωγούς που εντοπίζονται σε όλη την έκταση της. Πέρα όμως της οικονομικής άποψης, τα τυροκομικά προϊόντα παρέχουν αρκετά θρεπτικά συστατικά όπως τις πρωτεΐνες. Αυτές χωρίζονται σε καζεΐνες και πρωτεΐνες ορού γάλακτος και κατά την διάρκεια της παραγωγής ή της ωρίμανσης των τυροκομικών προϊόντων, δημιουργούνται πεπτίδια, ορισμένα από τα οποία έχουν συγκεκριμένα οφέλη για τον ανθρώπινο οργανισμό και ονομάζονται βιοδραστικά πεπτίδια. Μελέτες σε όλο τον κόσμο γίνονται τα τελευταία χρόνια τόσο για την απόδειξη των πλεονεκτημάτων της κατανάλωσης τροφίμων που περιέχουν βιοπεπτίδια, όσο και για την ανίχνευση τέτοιων μορίων στα διάφορα τυροκομικά προϊόντα. Σε ελληνικό επίπεδο όμως, δεν υπάρχουν για το μεγαλύτερο ποσοστό των ελληνικών τυροκομικών προϊόντων αντίστοιχες μελέτες.

Σκοπός λοιπόν της παρούσας εργασίας είναι να διερευνήσει το προφίλ των πεπτιδίων τοπικών τυριών στην περιοχή της Θεσσαλίας και κατά συνέπεια να αναδείξει την πιθανή βιοδραστικότητά τους.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ - ΤΥΡΟΚΟΜΙΑ

## 1.1 Γενικά

Η Διεθνής Ομοσπονδία Γάλακτος υπολόγισε ότι η παγκόσμια παραγωγή τυριού το 2015 ανήλθε συνολικά σε περίπου 23 εκατομμύρια τόνους και το 2021 ανήλθε σε περίπου 21,86 εκατομμύρια τόνους (IDF, 2016, [www.statista.com](http://www.statista.com)). Η παγκόσμια παραγωγή σε όλες τις ηπείρους περιελάμβανε τυρί που παρασκευαζόταν κυρίως από αγελαδινό γάλα. Το υπόλοιπο αποτελείται από τυριά άλλων ειδών (βουβαλίσιο, κατσικίσιο και πρόβειο) καθώς και από οικιακά τυριά και τυριά που προέρχονται από φάρμες που δεν εμφανίζονται στις εθνικές στατιστικές υπηρεσίες. Αξίζει να αναλυθεί πώς προέκυψε αυτό και πιο συγκεκριμένα, πού, πότε και γιατί ξεκίνησε η τυροκομία, πώς διαδόθηκε και εξελίχθηκε και πώς το τυρί απέκτησε τέτοια ποικιλομορφία, ευρεία διανομή και εξέχουσα θέση στην εποχή μας. Αν και η κατανόησή μας για την ιστορία του τυριού δεν είναι πλήρης, διάφορα κομμάτια μπορούν να σχηματίσουν το πλαίσιο για την παγκόσμια τυροκομία στον 21<sup>ο</sup> αιώνα.

## 1.2 Η ιστορία της τυροκομίας

Μέχρι πρόσφατα, η προέλευση του τυριού παρέμενε άγνωστη ως κομμάτι της αρχαίας προϊστορίας. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δύο δεκαετιών, ωστόσο, οι ρηξικέλευθες πρόοδοι σε ευρέως φάσματος πεδία έρευνας έχουν αποφέρει νέες γνώσεις σχετικά με τις πρώτες εμπειρίες της ανθρωπότητας με το τυρί (Kindstedt, 2017). Τα πρόβατα και οι κατσίκες εξημερώθηκαν για πρώτη φορά στις κοιλάδες του άνω Ευφράτη και του ποταμού Τίγρη της Νοτιοδυτικής Ασίας, όπως συνάγεται από τη μελέτη αρχαιολογικών σκελετικών υπολειμμάτων (Vigne & Helmer, 2007).

Η τυροκομία μπορεί να ξεκίνησε αμέσως μετά τις απαρχές της γαλακτοκομίας στην πρώιμη νεολιθική, η οποία παρείχε στους νέους αγρότες ένα ισχυρό διατροφικό κίνητρο για να διατηρήσουν πολιτισμικά τις γαλακτοπαραγωγικές τους πρακτικές κατά τη διάρκεια των μακρών χιλιετιών. Πιθανώς να ήταν παρόμοια με τα απλούστερα τυριά που εξακολουθούν να παράγονται παραδοσιακά από ημινομαδικά κοπάδια στη Νοτιοδυτική Ασία σήμερα: φρέσκα, μαλακά, πηγμένα με οξύ και πηκτικά οξέα, τα οποία μπορούν να αποξηρανθούν στον ήλιο και να διατηρηθούν για



μελλοντική χρήση (Gouin , 1997· Kindstedt, 2012). Το αποτέλεσμα όμως κατά τη διάρκεια χιλιετιών ήταν η εξέλιξη των μεγάλων οικογενειών τυριών, καθεμία από τις οποίες αποτελείται από φαινομενικά ατελείωτες παραλλαγές και ποικιλίες (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Χρονολογίες εμφάνισης μεγάλων ποικιλιών τυριών (Scott, 1986).

Gorgonzola	897	Cheddar	1500
Schabzieger	1000	Parmesan	1579
Roquefort	1070	Gouda	1697
Maroilles	1174	Gloucester	1783
Schwangenkase	1178	Stilton	1785
Grana	1200	Camembert	1791
Taleggio	1282	St. Paulin	1816

Κατά τον Μεσαίωνα και κατά την Αναγέννηση υπήρξε έντονη τυροκομική δραστηριότητα και εμφάνιση νέων ποικιλιών τυριών (Kindstedt, 2017). Επειδή η Ευρώπη περιλαμβάνει εξαιρετικά μεγάλη ποικιλομορφία όσον αφορά το κλίμα, την τοπογραφία και την ιθαγενή χλωρίδα, οι τυροκόμοι παρήγαγαν σε ένα ευρύ φάσμα μικροπεριβαλλόντων, το καθένα με τις δικές του ευκαιρίες και περιορισμούς, ανάλογα με που βρίσκονταν. Επιπλέον, οι κοινωνικές και οικονομικές διαφορές δημιούργησαν κίνητρα στους τυροκόμους να αναπτύξουν νέες πρακτικές και εξοπλισμό για να καλύψουν τις διαφορετικές ανάγκες τους (Kindstedt, 2017).

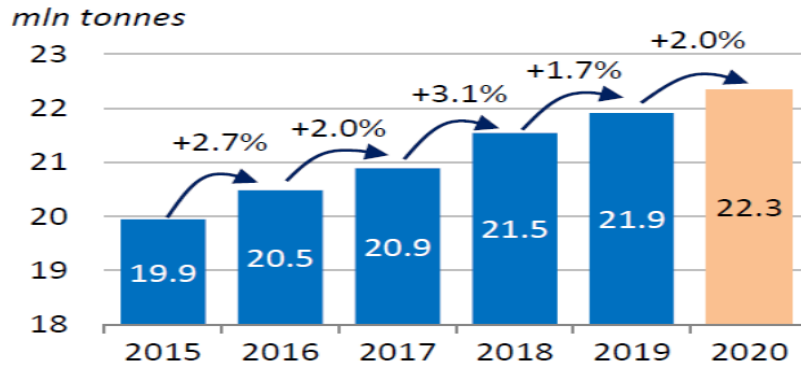
Κατά την σύγχρονη εποχή, ο 17<sup>ος</sup> αιώνας σηματοδότησε αναμφισβήτητα μια καμπή στην ιστορία του τυριού. Η βαθιά επιστημονική πρόοδος που σύντομα τόνωσαν τις επιστημονικές και βιομηχανικές επαναστάσεις, άρχισαν συλλογικά να αλλάζουν τις δυνάμεις της αγοράς που αντιμετώπιζαν οι σύγχρονοι τυροκόμοι, καθώς και την ικανότητα των τυροκόμων να ανταποκρίνονται στις δυνάμεις της αγοράς με τεχνικές καινοτομίες (Kindstedt, 2017).

Συμπερασματικά, η γεωργία χρονολογείται αρκετές χιλιάδες χρόνια, όταν ορισμένα φυτά και ζώα εξημερώθηκαν στη Μεσοποταμία και γάλα από κατσίκες, πρόβατα και βοοειδή καταναλωνόταν από τον άνθρωπο ως θρεπτικό συστατικό υψηλής ποιότητας. Επίσης το γάλα είναι ένα πολύ καλό υπόστρωμα ανάπτυξης για βακτήρια, μερικά από τα οποία παράγουν γαλακτικό οξύ, το οποίο κάνει το γάλα να

πήξει. Η παραγωγή τυριού εξαπλώθηκε σε όλο τον κόσμο και εξελίχθηκε σε τουλάχιστον 1000 ποικιλίες έχοντας βάση το αγρόκτημα μέχρι τα μέσα του δέκατου ένατου αιώνα. Ωστόσο, σε εργοστάσια με εξαιρετικά ανεπτυγμένη τεχνολογία παράγονται οι κύριες ποικιλίες (Fox et al., 2017).

### **1.3 Παγκόσμια παραγωγή**

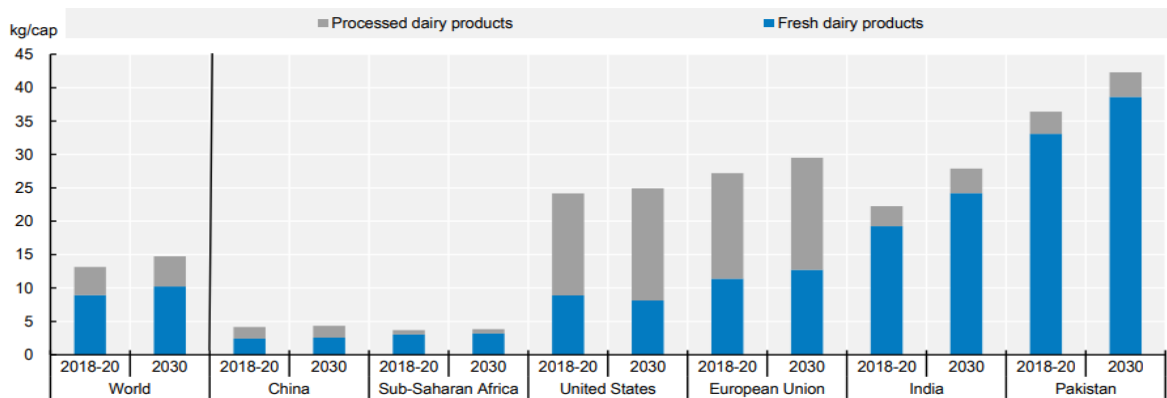
Η έκθεση για την παγκόσμια γαλακτοκομική κατάσταση για το 2021 δημοσιεύτηκε τον Οκτώβριο του 2021 από τη Διεθνή Ομοσπονδία Γαλακτοκομικών (IDF). Παρέχει μια γενική έρευνα και επισκόπηση της παγκόσμιας γαλακτοκομικής βιομηχανίας του προηγούμενου έτους. Η παραγωγή των γαλακτοκομικών προϊόντων που έχουν υποστεί ζύμωση το 2020, μειώθηκε κατά 0,3%, μακριά από τη μέση ανοδική τάση της δεκαετίας του 3,2%. Η παγκόσμια παραγωγή τυριού αυξήθηκε κατά 2,0% σε 22,3 εκατομμύρια τόνους, κάτι που είναι σύμφωνο με τον ετήσιο ρυθμό αύξησης 2,2% τα τελευταία 10 χρόνια. Στην Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) των 28, τον μεγαλύτερο παραγωγό τυριού στον κόσμο, η παραγωγή αυξήθηκε κατά 1,9%, στις ΗΠΑ, τον δεύτερο μεγαλύτερο παραγωγό, η αύξηση ήταν πιο μέτρια με 0,9% και στη Βραζιλία την τρίτη μεγαλύτερη παραγωγό τυριού, η παραγωγή αυξήθηκε κατά 2,8%. Στην Τουρκία, η οποία βρίσκεται στο νούμερο τέσσερα, η παραγωγή αυξήθηκε κατά 8,6% μετά από πτώση το 2019. Η πιθανή αρνητική επίδραση στην κατανάλωση τυριού στη βιομηχανία υπηρεσιών τροφίμων στις χώρες της ΕΕ των 28 λόγω της κρίσης COVID-19, αντιμετωπίστηκε από την εφαρμογή του καθεστώτος ενίσχυσης για την ιδιωτική αποθεματοποίηση από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή, το οποίο συνέβαλε στη διατήρηση της δυναμικής παραγωγής τυριού στις περισσότερες από τις χώρες της ΕΕ των 28. Επιπλέον, η αύξηση της κατά κεφαλήν κατανάλωσης οφείλεται κυρίως στο κατά κεφαλήν εισόδημα και στις προτιμήσεις των καταναλωτών τυριού στη Βόρεια Αμερική, το Ισραήλ και την Ευρώπη με κατανάλωση περισσότερων από 20 κιλά ετησίως.



Εικόνα 1: Παγκόσμια παραγωγή τυριού (IDF World Dairy Situation 2021)

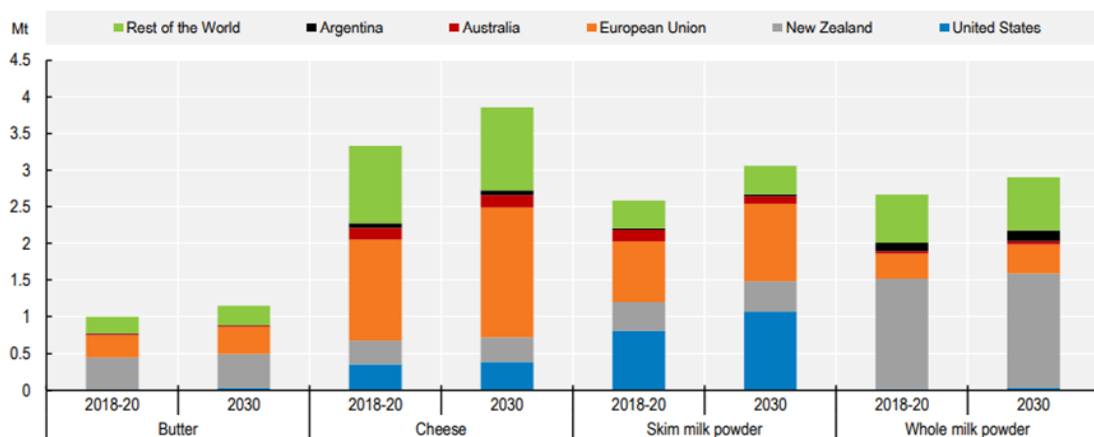
Ο Οργανισμός Οικονομικής Συνεργασίας και Ανάπτυξης (OECD) και ο Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών (FAO) στις «ΑΓΡΟΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ 2022 – 2031» περιγράφουν τις εξελίξεις της αγοράς και τις μεσοπρόθεσμες προβλέψεις για τις παγκόσμιες αγορές γαλακτοκομικών προϊόντων για την περίοδο 2022-31. Οι προβλέψεις καλύπτουν την κατανάλωση, την παραγωγή, το εμπόριο και τις τιμές για το γάλα, τα φρέσκα γαλακτοκομικά προϊόντα, το βούτυρο, το τυρί, το αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη και το πλήρες γάλα σε σκόνη.

Το μεγαλύτερο μέρος της γαλακτοκομικής παραγωγής καταναλώνεται με τη μορφή φρέσκων γαλακτοκομικών προϊόντων, τα οποία είναι μη επεξεργασμένα ή ελαφρώς επεξεργασμένα. Το μερίδιο των φρέσκων γαλακτοκομικών προϊόντων στην παγκόσμια κατανάλωση αναμένεται να αυξηθεί την επόμενη δεκαετία λόγω της έντονης αύξησης της ζήτησης στην Ασία και την Αφρική, λόγω της αύξησης του πληθυσμού και του εισοδήματος. Στις ανεπτυγμένες χώρες, η κατά κεφαλήν κατανάλωση προβλέπεται να αυξηθεί μέτρια το 2030, σε αντίθεση με τις αναπτυσσόμενες χώρες. Οι καταναλωτικές προτιμήσεις των ανεπτυγμένων χωρών τείνουν προς τα μεταποιημένα προϊόντα, ενώ στις αναπτυσσόμενες χώρες τα φρέσκα γαλακτοκομικά προϊόντα αποτελούν πάνω από τα 3/4 της μέσης κατά κεφαλήν κατανάλωσης γαλακτοκομικών σε στερεά γάλακτος (Εικ. 2).



**Εικόνα 2: Κατά κεφαλήν κατανάλωση επεξεργασμένων και φρέσκων γαλακτοκομικών προϊόντων σε στερεά γάλακτος.**

Όσον αφορά την εξαγωγή τυροκομικών προϊόντων, φαίνεται ότι η Ευρώπη κατέχει την πρώτη θέση παγκοσμίως και το διάστημα 2018-2020 και εκτιμάται η ίδια θέση, με ταυτόχρονη αύξηση της ποσότητας των εξαγωγών (σε τόνους), το επόμενο διάστημα, μέχρι το 2030 όπως φαίνεται στην Εικ. 3.



**Εικόνα 3: Εξαγωγές γαλακτοκομικών προϊόντων ανά περιοχή.**

Όπως προβλέπεται, ο κύριος παγκόσμιος εξαγωγέας τυριού θα συνεχίσει να είναι η Ευρωπαϊκή Ένωση, ακολουθούμενη από τις Ηνωμένες Πολιτείες και τη Νέα Ζηλανδία. Προβλέπεται ότι το μερίδιο της Ευρωπαϊκής Ένωσης στις παγκόσμιες εξαγωγές τυριού θα είναι περίπου 46% έως το 2030, υποστηριζόμενο από τις αυξημένες εξαγωγές τυριού στον Καναδά μέσω της Συνολικής Οικονομικής και Εμπορικής Συμφωνίας (CETA) το 2017 και στην Ιαπωνία μετά την επικύρωση της διμερούς εμπορικής συμφωνίας το 2019.

Αναλυτικότερα, η Ευρωπαϊκή Ένωση ήταν μακράν ο κορυφαίος παραγωγός τυριού παγκοσμίως, με όγκο παραγωγής περίπου 10,35 εκατομμύρια τόνους τυριού (Statistica, 2021; Shahbandeh, 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 κατσικίσιο 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 παράγαγε τα περισσότερα τυριά (22%), ακολουθούμενη από τη Γαλλία (19%) και την Ιταλία (12%). Το 70% του συνόλου του τυριού που παράγεται στην ΕΕ παράχθηκε από 5 χώρες (Γερμανία, Γαλλία, Ιταλία, Ολλανδία και Πολωνία) (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 94 % όλων των γαλακτοκομείων στην Ελλάδα μάζευαν λιγότερους από 5000 τόνους γάλα ετησίως και περίπου το 70 % των γαλακτοκομείων στην Ιταλία (Eurostat, 2020).

Τέλος, η Περιφέρεια της Θεσσαλίας κατέχει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή τυροκομικών προϊόντων. Ο αριθμός των τυροκομείων ανέρχεται σε 53 και παράγουν κυρίως φέτα, 30% επί του συνόλου σε εθνικό επίπεδο (Αντωνιάδου, 2016).

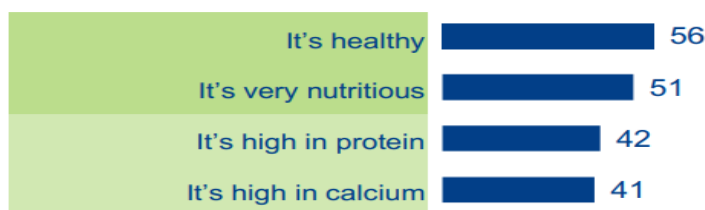
#### **1.4 Τυροκομικά προϊόντα και καταναλωτές**

Στην Παγκόσμια Έκθεση Τυριού 2021 (Tetra Pak, 2021), αναφέρεται ότι η κατανάλωσή τυριού έχει αυξηθεί καθώς περνούν περισσότερο χρόνο στο σπίτι κατά τη διάρκεια της πανδημίας. Παγκοσμίως, περισσότερο από το ένα τρίτο των συμμετεχόντων αναφέρει ότι η κατανάλωσή τους έχει αυξηθεί.

Η υψηλότερη αναφερόμενη αύξηση είναι στο κίτρινο τυρί, με το σχεδόν 40% παγκοσμίως να λέει ότι τρώει περισσότερο. Το χαμηλότερο είναι το λευκό τυρί, αλλά ακόμα και για αυτό, το 29% των καταναλωτών παγκοσμίως δηλώνουν ότι τρώνε περισσότερο. Γενικά, οι καταναλωτές αναγνωρίζουν τους διαφορετικούς τύπους τυριών, αλλά δεν τους συσχετίζουν με μάρκες ή μορφές.

Βέβαια δεν αφορά μόνο την πανδημία. Το ένα τρίτο των ερωτηθέντων λέει ότι η κατανάλωση τυριού θα αυξηθεί επίσης στο μέλλον. Το επεξεργασμένο τυρί που δεν απλώνεται παρουσιάζει το υψηλότερο ποσοστό προβλεπόμενης αυξημένης κατανάλωσης (37%).

Το τυρί θεωρείται ευρέως από τους καταναλωτές ως υγιεινό, με πάνω των μισών ερωτηθέντων (56%) να κάνει αυτή τη συσχέτιση (Εικ. 4). Θεωρείται επίσης θρεπτικό (51%) και πλούσιο σε πρωτεΐνη (42%) και σε Ca (41%). Πράγματι, η υγιεινή του αναφέρεται ως ο νούμερο 2 λόγος κατανάλωσης, αν και αυτό ξεπερνά κατά πολύ η νοστιμιά, όπως αναφέρεται από το 25% των ερωτηθέντων (Εικ. 5).



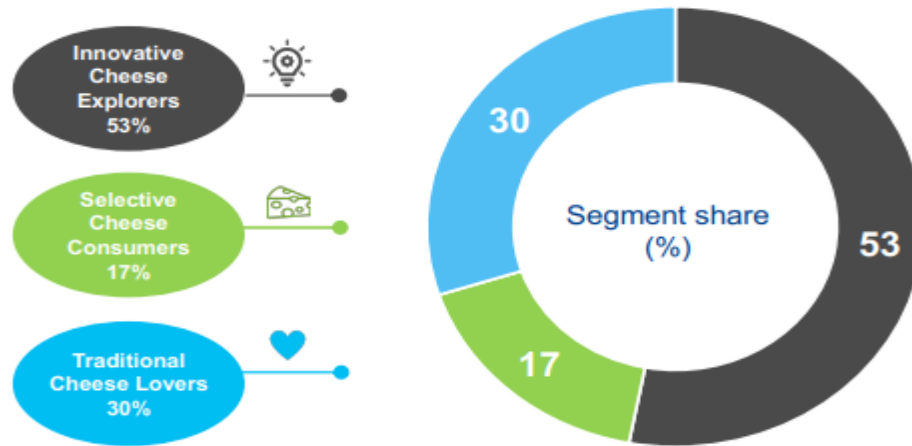
Εικόνα 4: Ποσοστιαίες συσχετίσεις με το τυρί παγκοσμίως.



Εικόνα 5: Λόγοι κατανάλωσης τυροκομικών παγκοσμίως.

Επιπλέον, δίνεται η δυνατότητα χωρισμού της παγκόσμιας αγοράς στους εξής τρεις τύπους καταναλωτών (Εικ. 6):

1. Καινοτόμοι εξερευνητές τυριών (Innovative Cheese Explorers, 53%)
2. Επιλεκτικοί καταναλωτές (Selective Consumers, 17%)
3. Λάτρεις του παραδοσιακού τυριού (Traditional Cheese Lovers, 30%)



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση των 3 τύπων καταναλωτών παγκοσμίως.

## 1.5 Κατηγορίες τυριών

Το τυρί είναι ένα από τα πιο πολύπλοκα και ποικίλα τρόφιμα που καταναλώνονται σήμερα. Τρία στοιχεία αποτελούν το οικοσύστημα του τυριού: παράγοντες ωρίμανσης, που αποτελούνται από ένζυμα και μικροοργανισμούς, τη σύνθεση του φρέσκου τυριού και τις περιβαλλοντικές συνθήκες κατά την ωρίμανση. Αυτοί οι παράγοντες καθορίζουν όχι μόνο την ποιότητα του τελικού τυροκομικού προϊόντος αλλά και την τεράστια ποικιλία τυριών που παράγονται παγκοσμίως. Απαιτείται μια σφαιρική προσέγγιση για την ταξινόμηση των τυριών καθώς υπάρχουν διάφορες προσεγγίσεις. Ορισμένα συστήματα ταξινόμησης βασίζονται σε μικροβιολογικά κριτήρια και άλλα βασίζονται σε περιγραφές των τεχνολογιών που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή τυριού (Almena-Aliste & Mietton, 2014).

Στον Codex Alimentarius παρατίθενται οι παρακάτω πίνακες που κατατάσσουν τα τυριά σε κατηγορίες όσον αφορά την σκληρότητά τους (Πίνακας 2) και την λιποπεριεκτικότητά τους (Πίνακας 3).

Πίνακας 2: Κατηγορίες τυριών με βάση την σκληρότητα.

Υγρασίας σε βάση χωρίς λιπαρά (%) (MFFB%)	Χαρακτηρισμός
<51	Πολύ σκληρό
49-56	Σκληρό
54-69	Ημισκληρο
>67	Μαλακό

Πίνακας 3: Κατηγορίες τυριών με βάση την λιποπεριεκτικότητα.

Λιποπεριεκτικότητα (%) (FDM)	Χαρακτηρισμός
$\geq 60$	Πολύ λιπαρό
$\geq 45$ και $< 60$	Πλήρους λιπαρότητας
$\geq 25$ και $< 45$	Μέσης λιπαρότητας
$\geq 10$ και $< 25$	Μερικώς αποβουτυρωμένο
$< 10$	Αποβουτυρωμένο

Επιπλέον δίνεται η δυνατότητα κατηγοριοποίησης ανάλογα και με τον τρόπο ωρίμανσης σε τυριά: ωρίμανσης, ωρίμανσης με μύκητες, μη ωρίμανσης/Φρέσκα και σε άλμη/ωρίμανση και συντήρηση σε άλμη.

Σύμφωνα με το Άρθρο 83 «Τυροκομικά προϊόντα» του Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (ΚΤΠ) τα τυριά κατηγοριοποιούνται σε:

- Τυριά από γάλα με ωρίμανση σε: πολύ σκληρά τυριά, σκληρά τυριά, ημισκληρα τυριά, μαλακά τυριά, λευκά τυριά άλμης, υπόλοιπα μαλακών τυριών
- Τυριά από γάλα χωρίς ωρίμανση
- Τυριά από τυρόγαλα με ή χωρίς ωρίμανση



## 1.6 Γεωγραφικές ενδείξεις τροφίμων και ποτών

Ανακαλύπτοντας τα ευρωπαϊκά τρόφιμα και ποτά που προστατεύονται από συστήματα γεωγραφικών ενδείξεων, σύμφωνα με την Γενική Διεύθυνση Γεωργίας και Αγροτικής Ανάπτυξης, αντικατοπτρίζουν την πολιτιστική πολυμορφία και τα πλούσια εδάφη της Ευρωπαϊκής ηπείρου. Τα συστήματα γεωγραφικών ενδείξεων της ΕΕ προστατεύουν την ειδική τεχνογνωσία, τις προϋποθέσεις γνησιότητας και τις γεωργοπεριβαλλοντικές συνθήκες. Οι γεωγραφικές ενδείξεις περιλαμβάνουν προστατευόμενες γεωγραφικές ενδείξεις (ΠΓΕ) και προστατευόμενες ονομασίες προέλευσης (ΠΟΠ) (Εικ. 7). Τα συστήματα αυτά προστατεύουν την ονομασία ενός προϊόντος που προέρχεται από μια συγκεκριμένη περιοχή και παράγεται σύμφωνα με συγκεκριμένη, παραδοσιακή διαδικασία. Όσον αφορά τις ΠΟΠ, τα ακατέργαστα συστατικά πρέπει να προέρχονται από την περιφέρεια καταγωγής στην οποία πρέπει να λαμβάνουν χώρα όλα τα στάδια παραγωγής. Όσον αφορά τις ΠΓΕ, τουλάχιστον ένα από τα στάδια της παραγωγής, της μεταποίησης ή της παρασκευής, πραγματοποιείται στη συγκεκριμένη περιοχή.



Εικόνα 7: Ενδείξεις ΠΟΠ & ΠΓΕ.

### 1.6.1 ΠΟΠ τυριά της Ελλάδας

Σύμφωνα με το Άρθρο 83 (ΚΤΠ) καθώς και τον «ΚΑΤΑΛΟΓΟ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΟΜΕΝΗΣ ΟΝΟΜΑΣΙΑΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ (ΠΟΠ) & ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΟΜΕΝΗΣ ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗΣ ΕΝΔΕΙΞΗΣ (ΠΓΕ)» στα πλαίσια του Καν. (ΕΟΚ) αριθ. 510/06 του Συμβουλίου του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, τα ΠΟΠ και ΠΓΕ προϊόντα της Ελλάδας είναι 22 και 1 αντιστοίχως. Πιο συγκεκριμένα είναι τα εξής:

Σκληρά και ημίσκληρα τυριά:

1. Αρσενικό Νάξου
2. Γραβιέρα Αγράφων
3. Γραβιέρα Κρήτης
4. Γραβιέρα Νάξου
5. Κασέρι
6. Κεφαλογραβιέρα
7. Λαδοτύρι Μυτιλήνης
8. Μετσοβόνη
9. Μπάτζος
10. Σαν-Μιχάλη
11. Σφέλα
12. Φορμαέλα Αραχώβης Παρνασσού

Μαλακά τυριά και τυριά αλοιφώδους υφής:

1. Ανεβατό
2. Γαλοτύρι
3. Καλαθάκι Λήμνου
4. Κατίκι Δομοκού
5. Κοπανιστή
6. Κρασοτύρι Κω/ Τυρί της Πόσιας (ΠΓΕ)
7. Ξύγαλο Σητείας ή Ξίγαλο Σητείας
8. Πηχτόγαλο Χανίων
9. Φέτα

Τυριά τυρογάλακτος

1. Μανούρι
2. Ξυνομυζήθρα Κρήτης

Στην περιοχή της Θεσσαλίας παράγονται 6 εξ αυτών και πιο συγκεκριμένα τα:  
Μανούρι, Φέτα, Μπάτζος, Κασέρι, Γραβιέρα Αγράφων και Γαλοτύρι.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ – ΤΥΡΟΚΟΜΙΚΑ ΠΟΠ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

### 2.1 Μανούρι

#### 2.1.1 Γενικά

Το μανούρι είναι τυρί ορού γάλακτος που παρασκευάζεται στη Θεσσαλία, τη Δυτική και Κεντρική Μακεδονία και είναι ένα μαλακό τυρί ορού γάλακτος με μέγιστη υγρασία 60% και ελάχιστο λίπος σε ξηρά ουσία 70%. Η συνολική τεχνολογία της παρασκευής του μανουριού παρουσιάζει κοινά με τη διαδικασία παρασκευής της μυζήθρας, αλλά η τελική περιεκτικότητα σε υγρασία είναι χαμηλότερη στο Μανούρι. Το καθεστώς ΠΟΠ για το Μανούρι αναγνωρίστηκε από την ΕΚ το 1996 (ΕΚ, 1996). Παρασκευάζεται από ορό γάλακτος με την προσθήκη πρόβειου και κατσικίσιου γάλακτος ή/και κρέμας από πρόβειο. Είναι μαλακό τυρί ορού γάλακτος, κυλινδρικού σχήματος, διαμέτρου 10–12 cm και ύψους 20–30 cm. Το μανούρι έχει συμπαγές, κλειστό σώμα και πλούσια γεύση με κρεμώδεις, λιπαρές νότες ((Litoroulou-Tzanetaki & Tzanetakis, 2011; Papademas et al., 2017).

#### 2.1.2 Μέθοδος Παραγωγής

Τα βήματα παραγωγής είναι τα εξής (Papademas et al., 2017):

- Προετοιμασία ορού γάλακτος και γάλακτος: Ο ορός γάλακτος από τα ημίσκληρα και σκληρά τυριά από πρόβειο και κατσικίσιο γάλα φιλτράρεται και η κρέμα γάλακτος ή/και το αιγοπρόβειο γάλα, έτσι ώστε η περιεκτικότητα σε λιπαρά να είναι τουλάχιστον 2,5%.
- Πήξη: Η πήξη πραγματοποιείται με θέρμανση στους 88°C–90°C για 40–45 λεπτά. Όταν η θερμοκρασία του ορού γάλακτος φτάσει τους 70°C–75°C, προστίθεται αλάτι σε ποσοστό 1%, καθώς και πλήρες γάλα ή κρέμα γάλακτος έως και 25%. Οι ποσότητες πλήρους γάλακτος ή/και κρέμας πρέπει να είναι τέτοιες που να διασφαλίζουν ότι το τελικό προϊόν περιέχει, τουλάχιστον, 70% FDM. Η κροκίδωση των πρωτεϊνών ορού γάλακτος ξεκινά στους 80°C και η θέρμανση

συνεχίζεται στους 88°C–90°C. Το τυρόπηγμα αφήνεται για 15-30 λεπτά σε αυτή τη θερμοκρασία.

- Στραγγίσμο του τυροπήγματος: Το τυρόπηγμα μεταφέρεται με τυρόπανα σε καλούπια και στραγγίζεται για 4-5 ώρες.
- Ωρίμανση: Πραγματοποιείται σε ψυκτικούς θαλάμους (4°C–5°C).

### 2.1.3 Μικροβιολογία Μανουριού

Ο Bintsis (2021b) μελέτησε τα είδη ζυμών που απομονώνονται από μαλακά τυριά συμπεριλαμβανομένου και του μανουριού. Σε αυτό εντοπίστηκαν: *Candida intermedia*, *Candida mogii*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia farinose*, *Pichia membranefasciens*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspota delbrueckii*, *ZygosSaccharomyces rouxii*.

Στην μελέτη των Lioliou et al. (2001) και Litopoulou-Tzanetaki & Tzanetakis (2011) επιλεγμένες μικροβιακές ομάδες μετρήθηκαν σε όλη τη διάρκεια της αποθήκευσης για 20 ημέρες στους 4°C στο μανούρι. Οι αριθμοί όλων των μικροβιακών ομάδων αυξήθηκαν κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης με υψηλότερα επίπεδα στα τυριά που παρασκευάζονται το καλοκαίρι σε σχέση με αυτά που παρασκευάζονται την άνοιξη. Επιπλέον, οι μικροοργανισμοί αναπτύχθηκαν καλύτερα στις επιφάνειες του τυριού παρά στο εσωτερικό, ιδιαίτερα το καλοκαίρι. Τα στελέχη των Enterobacteriaceae ήταν κυρίως *Hafnia* και σταφυλόκοκκοι. Υπήρχε μεγάλη ποικιλία ειδών ζυμομυκήτων, αλλά κυριαρχούσαν οι *Debaryomyces hansenii* και *Pichia membranefasciens*. Τα στελέχη των εντεροβακτηριδίων, των σταφυλόκοκκων και, σε μικρότερο βαθμό, των ζυμομυκήτων ήταν πρωτεολυτικά. Φαίνεται επίσης ότι το λίπος του γάλακτος δεν αποικοδομήθηκε σε μεγάλο βαθμό από τη λιπολυτική δραστηριότητα των στελεχών. Τα κύρια ένζυμα που ανιχνεύθηκαν σε επιλεγμένα στελέχη των Enterobacteriaceae ήταν η αμινοπεπτιδάση λευκίνης και η φωσφοϋδρολάση.

## 2.1.4 Μελέτες της σύστασης του μανουριού

Οι Kaminarides et al. (2013) μελέτησαν την επίδραση του προστιθέμενου γάλακτος και κρέμας στις φυσικοχημικές και ρεολογικές ιδιότητες αλλά και στις πτητικές ενώσεις του μανουριού. Η προσθήκη γάλακτος στον ορό γάλακτος έδειξε ότι αύξησε τη σκληρότητα του τυριού, ενώ η προσθήκη κρέμας μείωσε τη σκληρότητα. Παρατηρήθηκε επίσης ότι το τυρί ορού γάλακτος που παράγεται με 79% ορό γάλακτος, 15% γάλα και 6% κρέμα γάλακτος είχε την υψηλότερη συγκέντρωση αρωματικών συστατικών. Αλδεϋδες, κετόνες, οξέα, εστέρες, υδρογονάνθρακες, θειούχες ενώσεις και φουράνια ήταν μεταξύ άλλων οι πτητικές αρωματικές ενώσεις των τυριών ορού γάλακτος.

Ο Andrikopoulos et al. (2003) μελέτησαν τις συγκεντρώσεις χοληστερόλης σε βάση νεπού βάρους (f.w.) (mg/100 g) στο μανούρι (99,5, με εύρος 83,9–115,2). Επίσης μετρήθηκαν οι μέσες τιμές (g/100 g f.w.) κορεσμένων, μονοακόρεστων και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων ήταν στο μανούρι με 34,1, 9,4 & 1,3 αντιστοίχως. Τα επίπεδα του γαλακτικού οξέως επίσης ήταν χαμηλά και τα trans ισομερή 1,57–2,17 g/100 g f.w. Υπολογίστηκε και εξαιρετικά υψηλή αναλογία λιπαρών προς πρωτεΐνη (6,77), με ταυτόχρονη χαμηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη (κάτω από 15% σε ξηρό βάρος) και χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό.

Σε μία πολύ πιο πρόσφατη μελέτη, το μανούρι έχει το υψηλότερο λίπος σε ξηρή ουσία (FDM) από όλα τα ΠΟΠ τυροκομικά της χώρας όπως παρατήθετε στο Παράρτημα 1 (Danezis et al., 2020).

## 2.2Κασερι

### 2.2.1 Γενικά

Το κασέρι είναι ένα παραδοσιακό ελληνικό τυρί τύπου «PASTA FILATA» με ευχάριστη γεύση, που παρασκευάζεται από πρόβειο γάλα ή μείγματα αιγοπρόβειου γάλακτος. Το τυρί εμφανίστηκε στην Ελλάδα στα τέλη του 19<sup>ου</sup> αιώνα, αρχικά στη Θεσσαλία αλλά η παρασκευή του εξαπλώθηκε και σε άλλες περιοχές της χώρας (Litoroulou-Tzanetaki & Tzanetakis, 2011).

## 2.2.2 Μέθοδος παραγωγής

Για την τυροκόμηση του κασεριού χρησιμοποιούνται πρόβειο ή μείγματα αυτού με αιγοπρόβειο ή βόειο γάλα (5–10%). Το γάλα πήζει στους 32 °C, το πήγμα κόβεται και συνήθως ψήνεται στους 38 °C. Το τυρόπηγμα κόβεται σε μεγάλα κομμάτια και το «μπασκί» αφήνεται να στραγγίσει και να ωριμάσει για 8–24 ώρες στους 18–20 °C. Το ώριμο «μπασκί» κόβεται σε μικρές λεπτές ομοιόμορφες φέτες, οι οποίες μπαίνουν σε ένα καλάθι (καφινέλο). Το καλάθι βυθίζεται σε νερό (στους ~70 °C), όπου περιστρέφεται κατά κάποιο τρόπο, προκειμένου να διευκολυνθεί η διείδυση του νερού μεταξύ των φετών. Το τυρί γίνεται έτσι μία απαλή ελαστική μάζα και η ομοιομορφία του επιτυγχάνεται με την σχολαστική ανάμειξή του με μια ξύλινη κουτάλα. Στη συνέχεια, το τυρί κόβεται σε κομμάτια, κόβεται σε σχήμα σφαιρών και εισάγεται στα καλούπια, όπου το τυρί παραμένει για 2-4 ημέρες. Το τυρί αλατίζεται κάθε 2-3 μέρες, μέχρι να δεχτεί 12 έως 14 αλάτισμα. Η ωρίμανση στο «ζεστό» δωμάτιο (18 °C) διαρκεί τουλάχιστον 70 ημέρες. Στη συνέχεια μεταφέρεται σε ψυκτικές αποθήκες (0–2 °C) (Litopoulou-Tzanetaki & Tzanetakis, 2011 ; Teneva-Angelova et al., 2018)

## 2.2.3 Μικροβιολογία Κασεριού

Το pH του φρέσκου τυριού είναι 5 ή μεγαλύτερο και αυξάνεται ελαφρώς κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης. Η περιεκτικότητα σε λιπαρά σε ξηρή ύλη είναι περίπου 45%, η συγκέντρωση άλμης του ώριμου τυριού είναι περίπου 3% και η υγρασία κυμαίνεται μεταξύ 42 και 46%. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτελούν την κυρίαρχη μικροχλωρίδα κατά την ωρίμανση του τυριού ( $10^7$  cfu/g) και οι εντερόκοκκοι υπάρχουν σε αρκετά υψηλά επίπεδα ( $10^4$ – $10^6$  cfu/g), ανάλογα με την ποιότητα του γάλακτος. Οι σταφυλόκοκκοι, τα κολοβακτηρίδια και οι ζύμες μειώνονται κατά την ωρίμανση. Στο φρέσκο τυρί οι *pediococci* και οι λακτοβάκιλλοι αποτελούν το 25% της κυρίαρχης μικροχλωρίδας των οξυγαλακτικών βακτηρίων και οι εντερόκοκκοι είναι το μισό του μισού μικροβιακού πληθυσμού. Με την πρόοδο της ωρίμανσης, η μικροχλωρίδα των

οξυγαλακτικών βακτηρίων αποτελείτε από: pediococci 50%, εντερόκοκκοι 30% και γαλακτοβάκιλλοι 20% (Litoroulou-Tzanetaki & Tzanetakis, 2011).

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια και *Enterococcus* spp. βρέθηκαν να είναι η κυρίαρχη μικροχλωρίδα στο κασέρι κατά την ωρίμανση και πιο συγκεκριμένα οι *P. pentosaceus* και *P. acidilactici*, *E. hirae*, *E. faecium*, *E. durans* και *E. Gallinarium*. το ενζυμικό σύστημα πρέπει να μελετηθεί περαιτέρω προκειμένου να επιλεγούν τα κατάλληλα στελέχη για πρόσθετη καλλιέργεια στο τυρί κασέρι (Bintsis, 2021a).

Οι Anastasiou et al. (2007) μελέτησαν την απόδοση του *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 ως καλλιέργεια εκκίνησης στην παραγωγή τυριού κασέρι και βρέθηκε ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετο στην παραγωγή τυριού κασέρι.

Μία ακόμα μελέτη σχετικά με τον τρόπο επαγωγής της βιοσύνθεσης της μακεδοκίνης, του αντιβιοτικού που παράγεται από τον *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198. Το χημικά συντιθέμενο θραύσμα α<sub>51</sub>-καζεΐνης 37-55 (2,253,65 Da) αποδείχθηκε ότι είναι ικανό να επάγει τη βιοσύνθεση της μακεδοκίνης. Αυτή είναι η πρώτη φορά που αναφέρεται ότι θραύσματα αποικοδόμησης πρωτεΐνης γάλακτος παρουσιάζει δραστηριότητα επαγωγής βακτηριοκίνης (Georgalaki et al., 2010).

Επιπλέον ως μοναδικοί εκκινητές στην παρασκευή Κασεριού δύσκολα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν τα στελέχη *Strep. macedonicus*. Ωστόσο, θα μπορούσαν να συμβάλουν στην υδρόλυση του λίπους του γάλακτος και στην αποικοδόμηση του κιτρικού οξέος, αλλά και στη δευτερογενή υδρόλυση της καζεΐνης γάλακτος λόγω των πεπτιδολυτικών τους δράσεων (Georgalaki et al., 2000).

## 2.2.4 Μελέτες της σύστασης του κασεριού

Οι Nega & Moatsou, (2012) μελέτησαν την πρωτεόλυση και τις σχετικές ενζυματικές δραστηριότητες σε δέκα ελληνικές ποικιλίες τυριού, ανάμεσα τους και το κασέρι. Αναλύθηκαν η φυσικοχημική σύνθεση, η έκταση της πρωτεόλυσης (προφίλ κλάσματος αζώτου και υγρής χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης υψηλής απόδοσης (RP-HPLC) (του διαλυτού κλάσματος τυριού) και οι υπολειμματικές δραστηριότητες χυμοσίνης και πλασμίνης.

Τέλος, η μελέτη των Andrikopoulos et al. (2003) για την αναλογία λίπους/πρωτεΐνης έδειξε σχετικά υψηλότερη περιεκτικότητα σε λιπαρά του ελληνικού τυριού σε σύγκριση με παρόμοια είδη τυριών άλλων ευρωπαϊκών χωρών. Μια συσχέτιση μεταξύ της περιεκτικότητας σε χοληστερόλη και λίπος βρέθηκε, αν και η συσχέτιση ήταν ασθενέστερη σε μεμονωμένες ποικιλίες τυριού. Επιπλέον, μια τάση μείωσης των αναλογιών χοληστερόλης/λίπους και χοληστερόλης/ενέργειας με αυξανόμενη περιεκτικότητα σε λιπαρά υποδηλώνει ότι τα ελληνικά τυριά μπορεί να μην είναι πλούσια με χοληστερόλη όπως φαίνεται και στον Πίνακα 4.

Cheese variety	Water content (%)	Fat (%)	Protein (%)	Ash (%)	Lactic acid (%)	Salt (%)
Kasseri	43.1 (2.6)	27.9 (2.7)	24.1 (0.5)	3.8 (0.6)	1.0 (0.3)	1.3 (0.1)
Manouri	39.0 (6.2)	50.1 (5.1)	7.4 (0.6)	1.9 (0.7)	0.3 (0.2)	1.4 (0.7)
Cheese variety	Cholesterol (mg/100 g)	Energy (kcal/100 g)	Cholesterol/Fat (mg/g)	Cholesterol /energy (mg/1000 kcal)	Fat/protein	
Kasseri	90.8 (10.9)	395 (27.5)	3.27 (0.51)	230 (29.9)	1.16 (0.12)	
Manouri	99.5 (22.1)	504 (58.3)	1.97 (0.24)	196 (21.2)	6.77 (0.16)	

**Πίνακας 4: Περιεκτικότητα σε χοληστερόλη και συνολική σύνθεση των ελληνικών τυριών (Andrikopoulos et al., 2003).**



## 2.3 Μπάτζος

### 2.3.1 Γενικά

Ο Μπάτζος είναι ένα τυρί ημίσκληρο, λευκό, με χαμηλά λιπαρά, σε άλμη, με ξινή και ελαφρώς πικάντικη γεύση και μεγάλο αριθμό «τρυπών» στο σώμα. Παρασκευάζεται είτε από κατσικίσιο γάλα, είτε από πρόβειο γάλα ή μείγματα των δύο. Το τυρί φτιάχνεται στο σπίτι με την παραδοσιακή μέθοδο καθώς και σε κρεμοποιεία της Δυτικής Μακεδονίας και της κοντινής Θεσσαλίας, με τροποποιήσεις της παραδοσιακής μεθόδου και τεχνολογικές καινοτομίες (Litoroulou-Tzanetaki & Tzanetakis, 2011; Teneva-Angelova et al., 2018).

Ο Μπάτζος ανήκει στα «τυριά άλμης». Με τον όρο αυτό περιγράφεται η ομάδα των ποικιλιών τυριού που ωριμάζουν και διατηρούνται σε άλμη για σημαντικό χρονικό διάστημα, δηλαδή μέχρι την κατανάλωση. Τα λευκά τυριά άλμης (WBCs) είναι μια υποκατηγορία τους που περιλαμβάνει τυριά που παρασκευάζονται από τυρόπηγμα που δεν υποβάλλονται σε καμία θερμική επεξεργασία, όπως η φέτα, ο μπάτζος και παρόμοιες ποικιλίες τυριών που παράγονται στην Ελλάδα. Έχουν ιδιαίτερα αισθητηριακά και υφικά χαρακτηριστικά. Η γεύση τους είναι ελαφρώς όξινη και αλμυρή, ακόμα και πικάντικη και έχουν καθαρό λευκό χρώμα. Καταναλώνονται μετά από περίοδο ωρίμανσης άνω των 2 μηνών σε άλμη (Alichanidis & Polychroniadou, 2008).

### 2.3.2 Μέθοδος παραγωγής

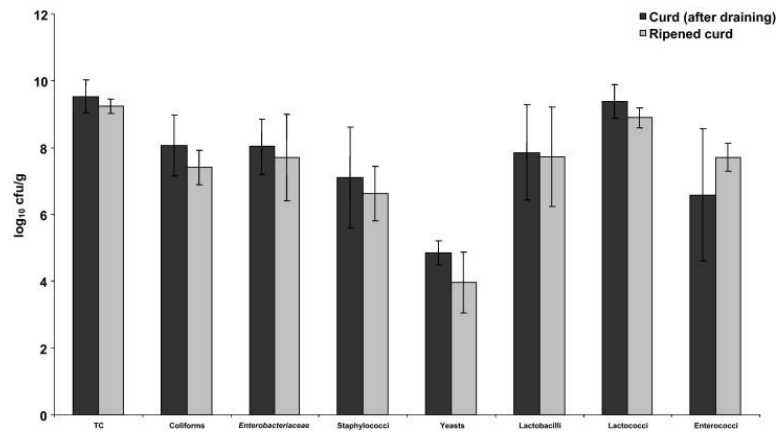
Κατά την παραγωγή του, το γάλα δεν υποβάλλεται σε θερμική επεξεργασία και η πήξη πραγματοποιείται εντός 50 λεπτών στους 28–30 °C. Όταν το γάλα αρχίσει να πήζει, ο παραγωγός «χτυπά» το γάλα με ένα ξύλινο ραβδί για 150-200 φορές. Το γάλα αφήνεται στη συνέχεια να πήξει για περίπου 40 λεπτά πριν χτυπηθεί ξανά για 300-350 φορές. Κατά τη διάρκεια αυτών των σταδίων χτυπήματος, ένα μεγάλο ποσοστό λίπους μεταφέρεται στον ορό γάλακτος. Αυτή η διαδικασία έχει παρουσιαστεί αναλυτικά από τους Nikolaou et al. (2002) και Psoni et al. (2006b), οι οποίοι αναφέρουν ότι αυτή η χειραγώγηση στοχεύει στην παραγωγή ορού γάλακτος με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά (>2,5%). Στη

συνέχεια, το τυρόπηγμα αφήνεται να καθίσει για 30 λεπτά, αλλά ορισμένοι τυροκόμοι εφαρμόζουν θερμοκρασίες 42–45 °C, πριν τοποθετήσουν το τυρόπηγμα, το κόψουν σε κατάλληλα κομμάτια, σε πανιά τυριού και το κρεμάσαν για να στραγγίσουν και να ωριμάσουν για 24 ώρες. Το στραγγισμένο τυρόπηγμα αφήνεται στους 16–18 °C για 2 ημέρες μέχρι να εμφανιστούν τρύπες αερίου. Στη συνέχεια, κόβεται σε φέτες το ωριμασμένο τυρόπηγμα, αλατίζεται με χοντρό αλάτι, τοποθετείται σε τενεκέδες και σκεπάζεται με άλμη (10–12%) και διατηρούνται στις ψυκτικές αποθήκες για τουλάχιστον τρεις μήνες. Το τυρί μπορεί να καταναλωθεί φρέσκο ή αποθηκεύεται σε δροσερά δωμάτια (Litoroulou-Tzanetaki & Tzanetakis, 2011; Moatsou & Govaris, 2011).

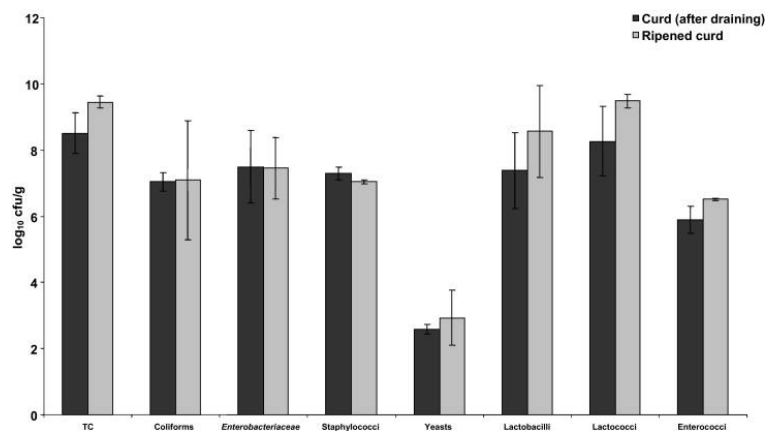
### 2.3.3 Μικροβιολογία Μπάτζου

Οι Psoni et al., (2006a) μελέτησαν την γονοτυπική και φαινοτυπική ετερογένεια σε *Enterococcus* από τον Μπάτζο και τα απομονωμένα στελέχη εντερόκοκκων φαίνεται να είναι σημαντικά ως βοηθητικοί εκκινητές. Επιπλέον, στην ποιότητα του τυριού κατά την ωρίμανση συμβάλει η εξωκυτταρική πρωτεολυτική δράση των εντερόκοκκων, λόγω της ικανότητά τους να αποδομούν τις καζεΐνες και να σχηματίζουν πρόδρομες ενώσεις αρωματικών ενώσεων και να αναστέλλουν ανεπιθύμητους μικροοργανισμούς, *E. durans* και *E. faecium*, που βρίσκονται στον Μπάτζο.

Οι Litoroulou-Tzanetaki & Tzanetakis, (2011) βρήκαν ότι οι μικροβιακές τιμές στο τυρόπηγμα του τυριού μπάτζος από πρόβειο γάλα το καλοκαίρι (Εικ. 9) ήταν υψηλότεροι από ό,τι στο τυρόπηγμα των τυριών της άνοιξης (Εικ. 8) για όλες τις μικροβιακές ομάδες εκτός από τους σταφυλόκοκκους (Nikolaou et al., 2002). Τα οξυγαλακτικά βακτήρια, τα εντεροβακτηρίδια και τα κολοβακτηρίδια είναι τα κύρια συστατικά της μικροχλωρίδας κατά την ωρίμανση αλλά μειώθηκαν ταχύτερα στα τυριά που παρασκευάζονται το καλοκαίρι. Αυτό πιθανώς σχετίζεται με δύο λόγους: i) με τις χαμηλότερες τιμές pH των τυριών που παρασκευάζονται το καλοκαίρι και ii) τον υψηλότερο αριθμό οξυγαλακτικών βακτηρίων που υπάρχει στα τυρόπηγμα των καλοκαιρινών τυριών.



Εικόνα 8: Μικροβιακές ομάδες στο τυρόπηγμα του τυριού Μπάτζος από νωπό πρόβειο γάλα, που παρασκευάζεται την άνοιξη.



Εικόνα 9: Μικροβιακές ομάδες στο τυρόπηγμα του τυριού Μπάτζος από νωπό πρόβειο γάλα, που παρασκευάζεται το καλοκαίρι. Μέσος όρος δύο δοκιμών τυροκομίας.

Μεταξύ των οξυγαλακτικών βακτηρίων που κυριαρχούν στα τυριά που παρασκευάζονται το καλοκαίρι. Την άνοιξη οι εντερόκοκκοι ήταν τα πιο άφθονα βακτήρια και πιο συγκεκριμένα *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* Lb. *Paraplantarum* και *Enterococcus faecium*. Ο *Lactococcus lactis subsp. lactis* βρέθηκε μόνο στα τυρόπηγμα των τυριών της άνοιξης.

Οι Psoni et al., (2003) μελέτησαν τις αλλαγές της μικροβιακής χλωρίδας στον Μπάτζο κατά την ωρίμανση. Από νωρίς στην ωρίμανση καταγράφηκαν υψηλές μετρήσεις εντεροβακτηριδίων και κολοβακτηριδίων, αλλά τα επίπεδά τους μειώθηκαν σημαντικά κατά την ωρίμανση και την αποθήκευση. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια κυριαρχούσαν έναντι των άλλων μικροβιακών ομάδων καθ' όλη τη διάρκεια της ωρίμανσης, καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου γαλουχίας. Φαίνεται ότι ο κύριος παράγοντας που ρύθμιζε τη μικροβιακή επιβίωση είναι η υψηλή περιεκτικότητα του τυριού σε NaCl. Δεν παρατηρήθηκαν

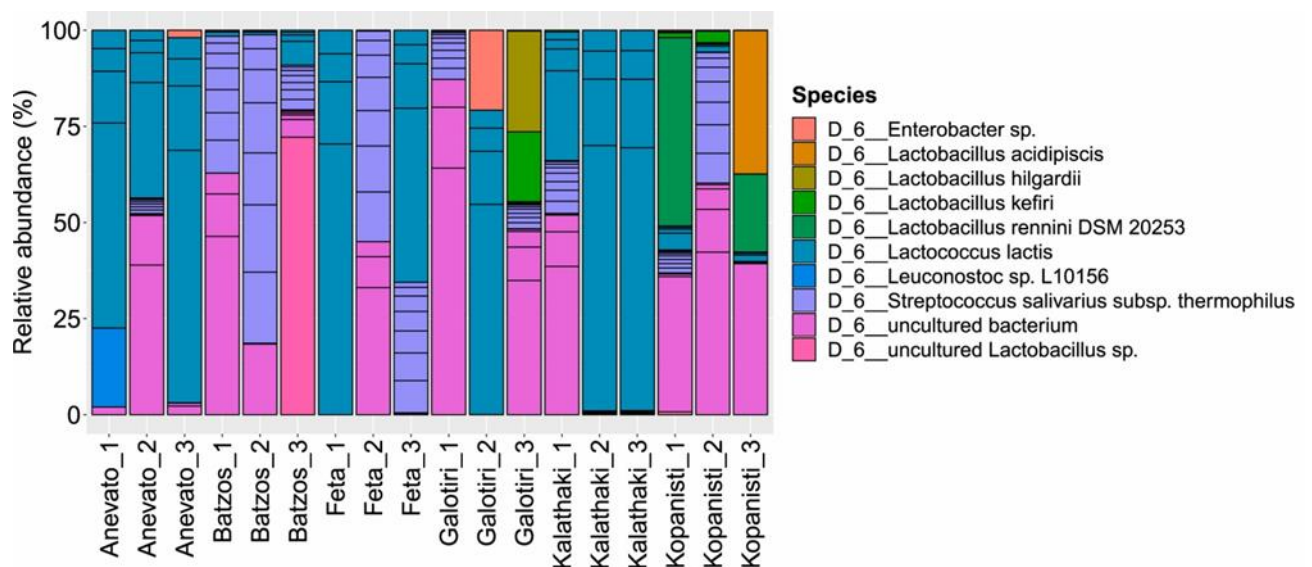
σημαντικές διαφορές στις μετρήσεις που σχετίζονται με την εποχή που ωρίμασαν και αποθηκεύτηκαν τα τυριά. Ωστόσο, η εποχή φαίνεται να επηρέασε τη σύνθεση της γαλακτικής μικροχλωρίδας με το χειμώνα οι εντερόκοκκοι να είναι άφθονοι σε αντίθεση με την άνοιξη και το καλοκαίρι.

Επίσης οι Psoni et al., (2006b) σύγκριναν πειραματικά τυριά που παρασκευάστηκαν από νωπό (R), νωπό με εκκινητή (RS), παστεριωμένο με εκκινητή (PS) και τυποποιημένο, παστεριωμένο με καλλιέργεια εκκίνησης (PSS) κατσικίσιο γάλα για να μελετηθεί η επίδραση του εκκινητή και της παστερίωσης στην ποιότητα του τυριού Μπάτζος. Τα στελέχη *Lactococcus lactis subsp lactis* από τυρί νωπό γάλα που χρησιμοποιήθηκε ως εκκινητής πολλαπλασιάστηκαν σημαντικά μόνο στο τυρί PSS. Η θερμική επεξεργασία μείωσε τα επίπεδα των περισσότερων μικροβιακών ομάδων. Ωστόσο, οι μετρήσεις του συνολικού αριθμού μικροοργανισμών (TC) και των οξυγαλακτικών βακτηρίων ήταν υψηλότερες στο τυρί PSS και αυτό συνοδεύτηκε από χαμηλότερο pH. Έτσι, καταγράφηκε υψηλότερο ποσοστό μείωσης των ανεπιθύμητων μικροοργανισμών στο τυρί PSS. Η αποδόμηση της αs-καζεΐνης ήταν στο  $R > RS$  και στο  $PS > PSS$ , ενώ καταγράφηκε μικρή μείωση της β-καζεΐνης κατά την ωρίμανση και την αποθήκευση. Οι αναλογίες αμινοξέων και προϊόντων λιπόλυσης αυξήθηκαν κατά την ωρίμανση και την αποθήκευση.

Οι Meng et al., (2018) ασχολήθηκαν με τον τεχνολογικό χαρακτηρισμό του *Lactobacillus* σε ημίσκληρα κατσικίσια τυριά όπως ο μπάτζος από διάφορες μεσογειακές περιοχές για πιθανή χρήση του ως μη εκκινητήρια καλλιέργεια. Αυτά τα απομονωμένα στελέχη αναγνωρίστηκαν αρχικά ως λακτοβάκιλλοι με βάση το ποσοστό επιτυχίας ευθυγράμμισης με την αλληλουχία 16S rDNA. Ανάμεσά τους, 3 δείγματα Μπάτζου ταυτοποιήθηκαν ως *Lb. paracasei* και 1 κατηγοριοποιήθηκαν ως *Lb. Rhamnosus*.

Με την εξέλιξη της τεχνολογίας και στον τομέα της ανάλυσης τροφίμων, πλέον χρησιμοποιούνται πιο σύγχρονες τεχνικές. Οι Michailidou et al., (2021) ανέλυσαν έξι δημοφιλή προϊόντα ΠΟΠ τυριού για αξιολόγηση της μικροβιακής τους κοινότητας χρησιμοποιώντας την τεχνολογία Next Generation Sequencing, όπου προσδιορίστηκε η αλληλουχία του γονιδίου 16S rRNA και του διαχωριστή ITS για προκαρυώτες και μύκητες, αντίστοιχα. Οι δείκτες ποικιλότητας άλφα αποκάλυψαν υψηλότερο πλούτο σε βακτηριακά είδη για ορισμένα τυριά (Κοπανιστή, Μπάτζος) και φτωχό για άλλα (φέτα, Γαλοτύρι). Τα αποτελέσματα

έδειξαν τα οξυγαλακτικά βακτήρια επικράτησαν των βακτηριακών πληθυσμών σε όλα τα δείγματα, ενώ για τους μύκητες επικράτησαν τα μέλη των οικογενειών Saccharomycetaceae, Dipodascaceae και Debaryomycetaceae (Εικ. 10). Εντοπίστηκαν αρκετά άλλα γένη που συνθέτουν το μικροβίωμα κάθε προϊόντος οδηγώντας στη δημιουργία των μοναδικών οργανοληπτικών ιδιοτήτων των ελληνικών τυριών ΠΟΠ. Τα δεδομένα που παράγονται μπορούν να υποστηρίξουν την ελληνική επωνυμία και αξιοποιώντας τα τυροκομικά προϊόντα για τα ελληνικά τυριά ΠΟΠ, δημιουργώντας μια βασική μικροβιακή υπογραφή σε κάθε τύπο τυριού.



Εικόνα 10: Ανάλυση της προκαρυωτικής κοινότητας στα ελληνικά τυριά ΠΟΠ με αλληλούχιση του γονιδίου 16S rRNA (Michailidou et al., 2021).

Οι Rhoades et al., (2021) προσδιόρισαν τα μικροβιολογικά χαρακτηριστικά των ελληνικών ΠΟΠ και διερευνήθηκαν απομονωμένα βακτήρια. Τα υψηλότερα επίπεδα βακτηρίων δεικτών κοπράνων, πιθανώς *Listeria* spp. και ο πιθανώς *Staphylococcus aureus* καταγράφηκαν όλα στο τυρί Μπάτζος, Επίσης μετρήσεις βακτηρίων γαλακτικού οξέος ήταν σημαντικά χαμηλότερες μόνο στον Μπάτζο σε σχέση με άλλα ΠΟΠ τυριά που αναλύθηκαν στην παρούσα εργασία. Τέλος, ο Μπάτζος ήταν το πιο μολυσμένο, έχοντας τόσο την υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης κολοβακτηριδίων (2/3 δείγματα) και εντερόκοκκων (3/3 δείγματα) και τις υψηλότερες μετρήσεις σε μεμονωμένα δείγματα.

### 2.3.4 Μελέτες της σύστασης του Μπάτζου

Οι Litopoulou-Tzanetaki & Tzanetakis, (2011) αναφέρουν στη μελέτη τους ότι η υδρόλυση τόσο της *as*- όσο και της *β*-καζεΐνης (CN) προχώρησε πιο γρήγορα την άνοιξη παρά το καλοκαίρι. Η *as*-CN αποικοδομείται πιο γρήγορα σε σχέση με την *β*-CN. Τα προϊόντα λιπόλυσης αυξήθηκαν σταδιακά με την αποθήκευση και συσσωρεύτηκαν σε υψηλότερα επίπεδα στο τυρί που παρασκευάζεται το καλοκαίρι. Επιπλέον, οι Teneva-Angelova et al., (2018) ανέλυσαν τις φυσικοχημικές παραμέτρους παραδοσιακών βαλκανικών τυριών όπως του Μπάτζου, Κασεριού και Μανουριού.

Τέλος, πρόσφατα, οι Danezis et al., (2020) μελέτησαν τα ελληνικά τυριά ΠΟΠ, ένα μη ΠΟΠ και ένα δυνητικό ΠΟΠ για το προφίλ λιπαρών οξέων (FA) και τις διάφορες φυσικοχημικές παραμέτρους, όπως υγρασία, λίπος σε ξηρή ουσία (FDM), περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη, pH και περιεκτικότητα σε αλάτι. Αναλύθηκαν σκληρά και ημίσκληρα τυριά. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το προφίλ FA σε συνδυασμό με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες γνησιότητας που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διατήρηση των παραδοσιακών πρακτικών. Για παράδειγμα, τα ποσοστά υγρασίας ήταν 49,4%, οι τιμές λιπαρών κυμαίνονταν στο 20,3% και η αναλογία των ακόρεστων λιπαρών οξέων (UFA) μετρήθηκε 27,9 για τον Μπάτζο.

Πιο συγκεκριμένα, για σκληρά και ημίσκληρα τυριά τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) σε φθίνουσα σειρά ήταν Σφέλα > Κεφαλογραβιέρα > Κασέρι > Λαδοτύρι Μυτιλήνης > Φορμαέλλα Αράχοβας Παρνασού > Γραβιέρα Αγράφων > Μετσοβόνη > Γραβιέρα Νάξου > Μαστέλο > Μπάτζος > Σαν Μιχάλη. Παρομοίως, για τα μαλακά, αλειφόμενα και ορού γάλακτος, το περιεχόμενο PUFA σε φθίνουσα σειρά είναι το Κοπανιστή > Ξυνομυζήθρα Κρήτης > Λευκό Τυρί > Καλαθάκι Λίμνου > Μανούρι > Φέτα > Ξύγαλο Σητείας > Γαλοτύρι > Κατίκι Δομικού > Πηχτόγαλο Χανίων > Ανεβατό.

Για σκληρά και ημι-σκληρά τυριά, η αναλογία κορεσμένων λιπαρών οξέων (SFA) σε ανερχόμενη σειρά ήταν Σφέλα < Φορμαέλλα Αράχοβας Παρνασού < Κασέρι < Κεφαλογραβιέρα < Σαν Μιχάλη < Γραβιέρα Κρήτης < Λαδοτύρι Μυτιλήνης < Μετσοβόνη < Γραβιέρα Νάξου < Γραβιέρα Αγράφων < Μπάτζος και για μαλακά, αλειμμένα τυριά και τυριά ορού γάλακτος

Κοπανιστή < Λευκό τυρί < Μανούρι < Ξύγαλο Σητείας < Ξυνομυζήθρα Κρήτης < Καλαθάκι Λήμνου < Φέτα.

Επομένως, η Κοπανιστή παρουσιάζει την καλύτερη αναλογία SFA/UFA με διαφορά (0,874) μεταξύ των μελετημένων τυριών ενώ ο Μπάτζος την υψηλότερη (2,58) λόγω της υψηλότερης περιεκτικότητας σε SFA. Τα λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας (SCFA) κυμαίνονταν από 3,34% (Κοπανιστή) έως 13,9% (Μπάτζος). Τέλος, η περιεκτικότητα σε υγρασία του Μπάτζου μετρήθηκε 49,4% (Danezis et al., 2020).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ - ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΚΑΙ ΤΥΡΟΚΟΜΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Οι πρωτεΐνες αποτελούν μια κύρια κατηγορία συστατικών γάλακτος, που περιλαμβάνει πάνω από 400 διαφορετικούς τύπους (Lu, 2013). Το γάλα περιέχει περίπου 3,5% πρωτεΐνη. Η συγκέντρωση αλλάζει σημαντικά κατά τη διάρκεια της γαλουχίας, ιδιαίτερα κατά τις πρώτες ημέρες μετά τον τοκετό. Η φυσική λειτουργία των πρωτεϊνών γάλακτος είναι να προμηθεύουν τα νεαρά θηλαστικά με τα απαραίτητα αμινοξέα που απαιτούνται για την ανάπτυξη των μυϊκών και άλλων ιστών που περιέχουν πρωτεΐνες, και με έναν αριθμό βιολογικά ενεργών πρωτεϊνών, π.χ. ανοσοσφαιρίνες, πρωτεΐνες που δεσμεύουν βιταμίνες και μέταλλα και διάφορες πρωτεϊνικές ορμόνες. Διαφορά αντικατοπτρίζεται στην περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη του γάλακτος ανά είδος, η οποία κυμαίνεται από ~1 έως ~24%. Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες του γάλακτος σχετίζεται άμεσα με τον ρυθμό ανάπτυξης των νέων αυτού του είδους, αντανακλώντας τις απαιτήσεις της πρωτεΐνης για ανάπτυξη (Fox et al., 2015).

Οι πρωτεΐνες στο γάλα μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δύο καλά καθορισμένες ομάδες (Εικ. 11). Κατά την οξίνιση σε pH 4,6 (το ισοηλεκτρικό pH) στους περίπου 30 °C, περίπου το 80% της συνολικής πρωτεΐνης στο βόειο γάλα καθιζάνει εκτός διαλύματος και αυτό το κλάσμα ονομάζεται πλέον ισοηλεκτρική (όξινη) καζεΐνη. Οι πρωτεΐνες που παραμένουν διαλυτές κάτω από αυτές τις συνθήκες αναφέρονται ως πρωτεΐνη ορού γάλακτος ή ορού ή μη καζεϊνικό άζωτο. Η αναλογία της καζεΐνης προς τις πρωτεΐνες ορού γάλακτος δείχνει μεγάλες διαφορές μεταξύ των ειδών. στο μητρικό ανθρώπινο γάλα, η αναλογία είναι ~40:60 ενώ στο γάλα της αγελάδας, της κατσίκας, του προβάτου και του βουβάλου είναι ~80:20. Πιθανώς, αυτές οι διαφορές αντικατοπτρίζουν τις διατροφικές και φυσιολογικές απαιτήσεις των νέων αυτών των ειδών. Οι Fox et al (2015) επισημάνουν ότι υπάρχουν πολλές σημαντικές διαφορές μεταξύ των καζεϊνών και των πρωτεϊνών ορού γάλακτος, από τις οποίες οι ακόλουθες είναι ίσως οι πιο σημαντικές, ειδικά από βιομηχανική ή τεχνολογική άποψη:

1. Σε αντίθεση με τις καζεΐνες, οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος δεν καθιζάνουν από το διάλυμα όταν το pH του γάλακτος ρυθμιστεί στο 4,6. Αυτό το χαρακτηριστικό

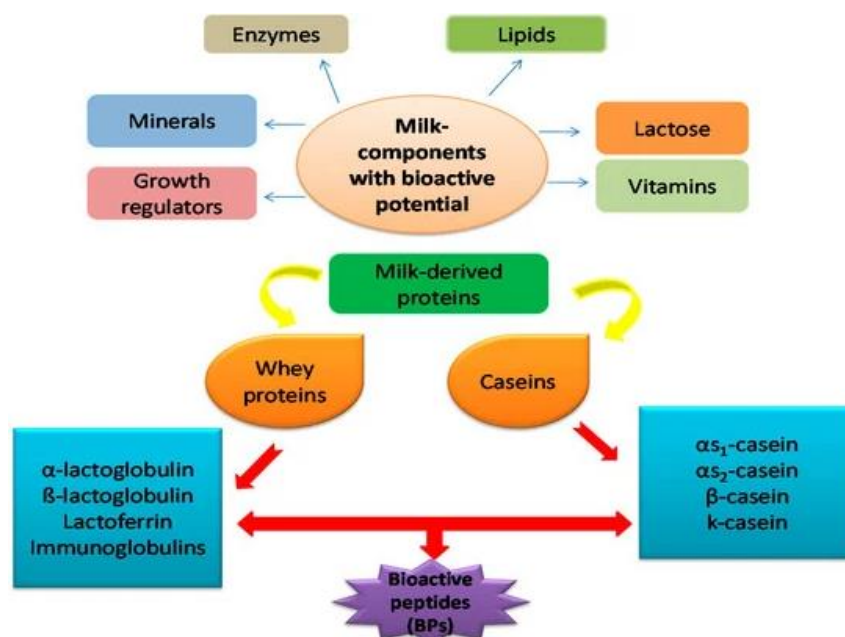


χρησιμοποιείται ως ο συνήθης λειτουργικός ορισμός της καζεΐνης. Αυτή η διαφορά στις ιδιότητες των δύο ομάδων πρωτεΐνης γάλακτος αξιοποιείται στην παρασκευή βιομηχανικής καζεΐνης και ορισμένων ποικιλιών τυριού (π.χ. Cottage και Cream cheese). Μόνο το κλάσμα καζεΐνης της πρωτεΐνης γάλακτος ενσωματώνεται κανονικά σε αυτά τα προϊόντα, ενώ οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος χάνονται στον ορό γάλακτος.

2. Η χυμοσίνη και κάποιες άλλες πρωτεΐνάσες (γνωστές ως πυτιά) προκαλούν μια πολύ ελαφριά, ειδική αλλαγή στην καζεΐνη, με αποτέλεσμα την πήξή της παρουσία  $\text{Ca}^{2+}$ . Οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος δεν υφίστανται τέτοια αλλαγή. Η πήξη της καζεΐνης μέσω της δράσης της πυτιάς αξιοποιείται στην παρασκευή των περισσότερων ποικιλιών τυριού και της καζεΐνης πυτιάς. οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος χάνονται στον ορό γάλακτος.
3. Η καζεΐνη είναι πολύ σταθερή στις υψηλές θερμοκρασίες. Το γάλα μπορεί να θερμανθεί στο φυσικό του pH (~6,7) στους 100°C για 24 ώρες χωρίς πήξη και αντέχει στη θέρμανση στους 140°C για έως και 20 λεπτά. Τέτοιες σοβαρές θερμικές επεξεργασίες προκαλούν πολλές αλλαγές στο γάλα, π.χ. παραγωγή οξέων από λακτόζη με αποτέλεσμα μείωση του pH και αλλαγές στην ισορροπία αλάτων, που τελικά προκαλούν την καθίζηση της καζεΐνης. Οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος, από την άλλη πλευρά, είναι σχετικά ασταθείς στη θερμότητα και μετουσιώνονται πλήρως με θέρμανση στους 90°C για 10 λεπτά.
4. Οι καζεΐνες είναι φωσφοπρωτεΐνες που περιέχουν, κατά μέσο όρο, 0,85% φώσφορο, ενώ οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος δεν περιέχουν φώσφορο. Οι φωσφορικές ομάδες είναι υπεύθυνες για πολλά από τα σημαντικά χαρακτηριστικά της καζεΐνης, ιδιαίτερα για την ικανότητά της να δεσμεύει σχετικά μεγάλες ποσότητες Ca, καθιστώντας την μια πολύ θρεπτική πρωτεΐνη, ειδικά για νεαρά ζώα. Ο φώσφορος, ο οποίος εστεροποιείται στην πρωτεΐνη μέσω της υδροξυλομάδας της σερίνης, αναφέρεται γενικά ως οργανικός φώσφορος. Μέρος του ανόργανου φωσφόρου στο γάλα συνδέεται επίσης με την καζεΐνη με τη μορφή κολλοειδούς φωσφορικού ασβεστίου (~57 % του ανόργανου φωσφόρου). Το φωσφορικό άλας της καζεΐνης συμβάλλει σημαντικά στην αξιοσημείωτα υψηλή θερμική σταθερότητά της και στην προκαλούμενη από το ασβέστιο πήξη της αλλοιωμένης από πυτιά καζεΐνης.
5. Η καζεΐνη είναι χαμηλή σε θείο (0,8 %) ενώ οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος είναι σχετικά πλούσιες (1,7 %) σε θείο. Οι διαφορές στην περιεκτικότητα σε θείο

γίνονται πιο εμφανείς αν αναλογιστούν τα επίπεδα μεμονωμένων αμινοξέων που περιέχουν θείο. Το θείο της καζεΐνης υπάρχει κυρίως στη μεθειονίνη, με πολύ χαμηλή συγκέντρωση κυστεΐνης. Στην πραγματικότητα, οι κύριες καζεΐνες περιέχουν μόνο μεθειονίνη. Οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος περιέχουν σημαντικές ποσότητες κυστεΐνης και κυστίνης εκτός από μεθειονίνη και αυτά τα αμινοξέα είναι υπεύθυνα, εν μέρει, για πολλές από τις αλλαγές που συμβαίνουν στο γάλα κατά τη θέρμανση και τη βελτιωμένη θερμική σταθερότητα του γάλακτος που έχει προθερμανθεί πριν από την αποστείρωση.

6. Η καζεΐνη συντίθεται στον μαστικό αδένα και δεν βρίσκεται πουθενά αλλού στη φύση. Μερικές από τις πρωτεΐνες ορού γάλακτος (β-λακτοσφαιρίνη και α-λακταλβουμίνη) συντίθενται επίσης στον μαστικό αδένα, ενώ άλλες (π.χ. αλβουμίνη ορού βοοειδών και ορισμένες ανοσοσφαιρίνες) προέρχονται από το αίμα.
7. Οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος είναι μοριακά διασκορπισμένες σε διάλυμα ή έχουν απλές τεταρτοταγείς δομές, ενώ οι καζεΐνες έχουν πολύπλοκη τεταρτοταγή δομή και υπάρχουν στο γάλα ως μεγάλα κολλοειδή συσσωματώματα, που αναφέρονται ως μικκύλια, με μάζα σωματιδίων  $10^6$ – $10^9$  Da.
8. Και οι δύο ομάδες πρωτεΐνης - καζεΐνης και ορού γάλακτος - είναι ετερογενείς και η καθεμία περιέχει πολλές διαφορετικές πρωτεΐνες.



Εικόνα 11: Κύρια βιοενεργά συστατικά του γάλακτος με ιδιότητες υγείας (Punia et al, 2020).

### 3.1 Καζεΐνες

Η καζεΐνη βοοειδών περιέχει τέσσερα διαφορετικά γονιδιακά προϊόντα, που ονομάζονται  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - και  $\kappa$ -καζεΐνες που αντιπροσωπεύουν περίπου το 37, 10, 35 και 12 % της ολικής καζεΐνης, αντίστοιχα (Fox et al., 2015).

1. Όλες οι καζεΐνες έχουν υψηλή περιεκτικότητα (35–45 %) σε άπολα αμινοξέα (Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Pro) και αναμένεται να είναι ελάχιστα διαλυτές σε υδατικά συστήματα, αλλά η υψηλή περιεκτικότητα σε φωσφορικά ομάδες, το χαμηλό επίπεδο αμινοξέων που περιέχουν θείο και η υψηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες στην περίπτωση της  $\kappa$ -καζεΐνης αντισταθμίζουν την επίδραση των άπολων αμινοξέων. Οι καζεΐνες είναι, στην πραγματικότητα, αρκετά διαλυτές: διαλύματα που περιέχουν έως και 20 % πρωτεΐνη μπορούν να παρασκευαστούν σε νερό στους 80–90°C. Μια υψηλή θερμοκρασία είναι απαραίτητη για να αντισταθμιστεί το υψηλό ιξώδες, το οποίο είναι ο περιοριστικός παράγοντας στην παρασκευή διαλυμάτων καζεϊνικού άλατος. Το υψηλό ιξώδες είναι μια αντανάκλαση της υψηλής ικανότητας δέσμευσης νερού (WBC) της καζεΐνης, δηλαδή περίπου 2,5 g πρωτεΐνης  $\text{H}_2\text{O g}^{-1}$ . Τέτοιο υψηλό WBC δίνει στην καζεΐνη πολύ επιθυμητές λειτουργικές ιδιότητες για ενσωμάτωση σε διάφορα τρόφιμα, π.χ. λουκάνικα και άλλα θρυμματισμένα προϊόντα κρέατος, στιγμιαία επιδόρπια, συνθετικές κρέμες σαντιγί, κ.λπ., και μεγάλες ποσότητες καζεΐνης χρησιμοποιούνται εμπορικά για αυτούς τους σκοπούς.
2. Όλες οι καζεΐνες έχουν πολύ υψηλή περιεκτικότητα σε προλίνη: 17, 10, 35 και 20 υπολείμματα Pro ανά mole  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - και  $\kappa$ -καζεϊνών, αντίστοιχα. Τέτοια υψηλά επίπεδα προλίνης έχουν ως αποτέλεσμα πολύ χαμηλή περιεκτικότητα σε δομές  $\alpha$ -έλικας ή  $\beta$ -φύλλων στις καζεΐνες. Οι καζεΐνες είναι, επομένως, άμεσα επιρρεπείς σε πρωτεόλυση χωρίς προηγούμενη μετουσίωση, για παράδειγμα, από οξύ ή θερμότητα. Ίσως αυτό είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό στη διατροφή των νεογνών.
3. Ως ομάδα, οι καζεΐνες έχουν ανεπάρκεια σεθειούχα αμινοξέα που περιορίζει τη βιολογική τους αξία. Οι  $\alpha_{s1}$ - και  $\beta$ -καζεΐνες δεν περιέχουν κυστεΐνη ή κυστίνη, ενώ οι  $\alpha_{s2}$ - και  $\kappa$ -καζεΐνες έχουν δύο υπολείμματα κυστεΐνης ανά mole, τα οποία κανονικά υπάρχουν ως διαμοριακά δισουλφίδια. Η κύρια

πρωτεΐνη που περιέχει θείο στο βόειο γάλα είναι η πρωτεΐνη ορού γάλακτος β-λακτοσφαιρίνη (β-Ig), η οποία περιέχει δύο ενδομοριακά δισουλφίδια και μία ομάδα σουλφυδρυλίου. Κανονικά, η σουλφυδρυλική ομάδα είναι εσωτερικά του μορίου και δεν αντιδρά. Μετά από μετουσίωση, π.χ. με θερμότητα πάνω από 75 °C, η ομάδα -SH της β-Ig εκτίθεται και αντιδρά και υφίσταται ανταλλαγή σουλφυδρυλοδισουλφιδίου με κ-καζεΐνη (και πιθανώς με α<sub>s2</sub>-καζεΐνη και α-λακταλβουμίνη επίσης) με πολύ σημαντικές επιπτώσεις σε ορισμένες από τις τεχνολογικά σημαντικές φυσικοχημικές ιδιότητες του γάλακτος, π.χ. θερμική σταθερότητα και πήξη πυτιάς.

4. Οι καζεΐνες, ιδιαίτερα η α<sub>s2</sub>-καζεΐνη, είναι πλούσιες σε λυσίνη, ένα απαραίτητο αμινοξύ στο οποίο πολλές φυτικές πρωτεΐνες είναι ανεπαρκείς. Κατά συνέπεια, η καζεΐνη και το αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη είναι πολύ καλά συμπληρώματα διατροφής για πρωτεΐνες δημητριακών που έχουν έλλειψη λυσίνης. Λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε λυσίνη, η καζεΐνη και τα προϊόντα που την περιέχουν μπορεί να υποστούν εκτεταμένο μη ενζυματικό μαύρισμα Maillard κατά τη θέρμανση παρουσία αναγωγικού σακχάρου.

### 3.2 Πρωτεΐνες ορού γάλακτος

Περίπου το 20 % της συνολικής πρωτεΐνης του βοείου γάλακτος ανήκει σε μια ομάδα πρωτεϊνών που αναφέρονται ως πρωτεΐνες ορού γάλακτος ή ορού ή μη καζεϊνικό άζωτο (Fox et al., 2015).

Η β-λακτοσφαιρίνη (β-Lg) είναι μια κύρια πρωτεΐνη στο βόειο γάλα, που αντιπροσωπεύει περίπου το μισό της συνολικής πρωτεΐνης ορού γάλακτος ή το 12% της συνολικής πρωτεΐνης του γάλακτος και ήταν μεταξύ των πρώτων πρωτεϊνών που κρυσταλλώθηκαν. Η β-Lg είναι η κύρια πρωτεΐνη ορού γάλακτος (WP) στα βοοειδή, πρόβεια, αιγοπρόβεια και βουβαλίσια γάλατα, αν και υπάρχουν μικρές διαφορές μεταξύ των ειδών. Πριν από μερικά χρόνια, πίστευαν ότι το β-Lg εμφανίζεται μόνο στο γάλα των μηρυκαστικών, αλλά είναι πλέον γνωστό ότι εμφανίζεται στο γάλα και άλλων ειδών όπως του καγκουρό, του δελφινιού και άλλων ειδών. Ωστόσο, η β-Ig δεν εμφανίζεται στο γάλα ανθρώπου, αρουραίου, ποντικού ή ινδικού χοιριδίου, στο οποίο το α-la είναι το κύριο WP. Οι δύο κύριες γενετικές παραλλαγές της β-Ig των

βοοειδών είναι η A και η B με άλλες 11 παραλλαγές να εμφανίζονται λιγότερο συχνά (Sawyer, 2013; Fox et al., 2015).

Η  $\alpha$ -λακταλβουμίνη ( $\alpha$ -La) αντιπροσωπεύει περίπου το 20% των πρωτεϊνών του βόειου ορού γάλακτος (3,5% της συνολικής πρωτεΐνης γάλακτος) και είναι η κύρια πρωτεΐνη στο ανθρώπινο γάλα. Το  $\alpha$ -La είναι μια μικρή πρωτεΐνη με μοριακή μάζα ~ 14 kDa (Fox et al., 2015).

Συνοπτικά, υπάρχουν σε ένα ευρύ φάσμα συγκεντρώσεων και μπορούν να ομαδοποιηθούν σε τρεις κύριες κατηγορίες (Bär et al., 2019) :

1. τις πρωτεΐνες μικκυλίου καζεΐνης (CasMPs, 80-85%), οργανωμένες ως υπερμοριακές, δυναμικές δομές που ονομάζονται μικκύλια καζεΐνης, που εγκλωβίζουν το κολλοειδές φωσφορικό ασβέστιο (McMahon & Oommen, 2013)
2. τις πρωτεΐνες ορού γάλακτος (WPs, 13–18%), διαλυμένες στην υδατική φάση. και
3. πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη μεμβράνη του λίπους του γάλακτος (MFGMPs, 1–2%), μια διπλή στοιβάδα φωσφολιπιδίων που ενσωματώνει πρωτεΐνες που προστατεύουν τα λιπώδη σφαιρίδια από τη συνένωση και τη λιπόλυση.

Η σημασία και τα μοναδικά βιολογικά χαρακτηριστικά, καθώς και η αυξανόμενη οικονομική αξία, του γάλακτος από μικρά ελληνικά μηρυκαστικά προσελκύει συνεχώς το ενδιαφέρον τόσο της επιστημονικής κοινότητας όσο και της βιομηχανίας. Στην έρευνα του Anagnostopoulos et al. (2016) συνολικά, εντοπίστηκαν περισσότερες από 1300 πρωτεϊνικές ομάδες στον ορό γάλακτος από ελληνικές φυλές, αναφέροντας για πρώτη φορά το πιο λεπτομερές σύνολο δεδομένων πρωτεϊνών αυτού του πολύτιμου βιολογικού υλικού. Τα δεδομένα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για να ρυθμίσουν τα μελλοντικά βήματα στη βελτιστοποίηση των χαρακτηριστικών και των χαρακτηριστικών των προϊόντων πρόβειου γάλακτος καθώς και για την ιχνηλασιμότητα των γαλακτοκομικών προϊόντων των ελληνικών φυλών. Τέλος, η συγκριτική ανάλυση των δεδομένων θα μπορούσε να οδηγήσει σε νέα γαλακτοκομικά προϊόντα με συγκεκριμένα διατροφικά χαρακτηριστικά για την ανθρώπινη υγεία (Anagnostopoulos et al., 2016).

### 3.3 Βιοπεπτίδια

Η πρόοδος στις γονιδιωματικές και βιοτεχνολογικές επιστήμες έχει ανακατευθύνει τον τρόπο διατροφής, από μια δίαιτα βασισμένη σε θερμίδες και θρεπτικά συστατικά, στην εφαρμογή δόσεων συγκεκριμένων βιοδραστικών ενώσεων για τη θεραπεία ασθενειών. Δηλαδή, εκτός από τη θρεπτική αξία, μια δίαιτα που βασίζεται στη βιολογική επίδραση της τροφής μπορεί να θεωρηθεί ως λειτουργική διατροφή. Οι πρωτεΐνες και τα πεπτίδια με βιολογική δραστηριότητα είναι σημαντικοί τομείς μελέτης και ανάπτυξης νέων τροφίμων (Martinez et al., 2022).

Η αύξηση πολλών κοινών ασθενειών, εξ αιτίας του τρόπου ζωής, όπως το έμφραγμα του μυοκαρδίου, οι καρδιαγγειακές διαταραχές, το εγκεφαλικό επεισόδιο, η υπέρταση, ο διαβήτης και η αθηροσκλήρωση έχει γίνει μια σοβαρή παγκόσμια ανησυχία. Οι πρόσφατες εξελίξεις στον τομέα της πρωτεομικής που προσφέρουν υποσχόμενες λύσεις για την επίλυση τέτοιων προβλημάτων υγείας διεγείρουν τις χρήσεις των βιοπεπτιδίων ως ενός από τους θεραπευτικούς παράγοντες για την ανακούφιση των παραγόντων κινδύνου που σχετίζονται με ασθένειες. Τα λειτουργικά πεπτίδια παράγονται τυπικά από πρωτεΐνη μέσω ενζυματικής υδρόλυσης υπό συνθήκες *in vitro* ή *in vivo* χρησιμοποιώντας διαφορετικά είδη πρωτεολυτικών ενζύμων. Μια σειρά βιολογικών δράσεων, συμπεριλαμβανομένων των αντιοξειδωτικών, αντιυπερτασικών, αντιδιαβητικών και ανοσοτροποποιητικών έχει αποδοθεί σε διαφορετικούς τύπους βιοπεπτιδίων που προέρχονται από διάφορες πηγές τροφίμων. Στην πραγματικότητα, τα βιοπεπτίδια είναι διατροφικά και λειτουργικά σημαντικά για τη ρύθμιση ορισμένων φυσιολογικών λειτουργιών στο σώμα. Ωστόσο, αυτά πρέπει ακόμη να μελετηθούν εκτενώς όσον αφορά την παραγωγή τους μέσω προηγμένων στρατηγικών, μηχανισμών δράσης και πολλαπλών βιολογικών λειτουργιών και να αξιολογηθούν οι σχέσεις δομής βιοπεπτιδίου-βιολογικής λειτουργικότητας (Saadi et al., 2015).

Κατά την τελευταία δεκαετία, θεμελιώδεις μελέτες έχουν ανοίξει ένα νέο πεδίο έρευνας που ασχολείται με βιοδραστικές ή βιογενείς ουσίες που προέρχονται από τρόφιμα. Έχουν δοθεί πολυάριθμοι ορισμοί για τα βιοδραστικά πεπτίδια και ένας από τους καταλληλότερους θα μπορούσε να είναι ο ακόλουθος:

Συστατικά (γνήσια ή παραγόμενα) τροφίμων έτοιμων για κατανάλωση που μπορεί να ασκούν ρυθμιστική δραστηριότητα στον ανθρώπινο οργανισμό, ανεξάρτητα από τις θρεπτικές τους λειτουργίες (Meisel, 2001).

Επιπλέον είναι συγκεκριμένα θραύσματα πρωτεϊνών που έχουν ευεργετικές επιδράσεις στις λειτουργίες ή καταστάσεις του σώματος (Kitts & Weiler, 2003). Τα βιολογικά ενεργά πεπτίδια που προέρχονται από πρωτεΐνες τροφίμων είναι συγκεκριμένα θραύσματα πρωτεΐνης που έχουν θετικό αντίκτυπο στις λειτουργίες του σώματος (Bernabucci et al., 2014). Οι πρωτεΐνες γάλακτος είναι επί του παρόντος οι κύριοι πρόδρομοι βιολογικά ενεργών πεπτιδίων.

### **3.4 Τα γαλακτοκομικά προϊόντα ως φορείς βιοδραστικών πεπτιδίων**

Το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα παρέχουν μια πλούσια πηγή πολύτιμων πρωτεϊνών, μετάλλων και βιταμινών. Η διατροφική σημασία των πρωτεϊνών περιλαμβάνει μακροθρεπτικές καθώς και λειτουργικές πτυχές. Εκτός από τις βιοδραστικές πρωτεΐνες, τα γαλακτοκομικά προϊόντα μπορεί επίσης να παρέχουν βιοενεργά πεπτίδια έχουν απομονωθεί από διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση (Rizzello et al., 2005).

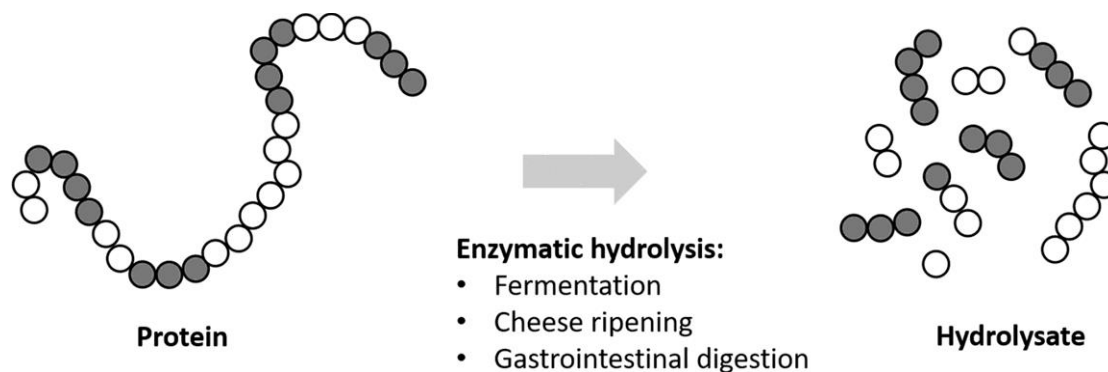
Τα γαλακτοκομικά προϊόντα μπορεί να περιέχουν βιοενεργά πεπτίδια λόγω της πρωτεολυτικής δράσης των φυσικών ενζύμων στο γάλα ή από εξωγενή ένζυμα και από ένζυμα από μικροβιακές καλλιέργειες και παράγονται κανονικά κατά την επεξεργασία γαλακτοκομικών προϊόντων. Η παρουσία αυτών των φυσιολογικών πεπτιδίων στα γαλακτοκομικά προϊόντα τα εμπλουτίζει και τους προσδίδει ορισμένες λειτουργικές ιδιότητες. Ενώ αυτά τα πεπτίδια από τα γαλακτοκομικά προϊόντα δεν είναι τόσο ισχυρά όσο τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται συνήθως στη θεραπεία των σχετικών παθήσεων, τα γαλακτοκομικά προϊόντα με μέτρια βιοδραστικότητα αποτελούν μια φυσικά λειτουργική ομάδα τροφίμων που είναι επιθυμητή στην καθημερινή διατροφή. Οι περισσότερες από τις αναφορές σχετικά με τη βιολογική δραστηριότητα αυτών των πεπτιδίων φαίνεται να περιστρέφονται γύρω από τον έλεγχο της υπέρτασης, πιθανώς λόγω της τεράστιας επικράτησης της σε όλο τον κόσμο (Choi et al., 2012; Dimitrov et al., 2015; Korhonen, 2009).

Οι πρωτεΐνες γάλακτος αναγνωρίζονται ως οι κύριες πηγές βιολογικά ενεργών πεπτιδίων. Τα βιοενεργά πεπτίδια που προέρχονται από πρωτεΐνες γάλακτος περιέχουν 2 έως 20 αμινοξέα στη δομή τους και μπορούν να έχουν διάφορες

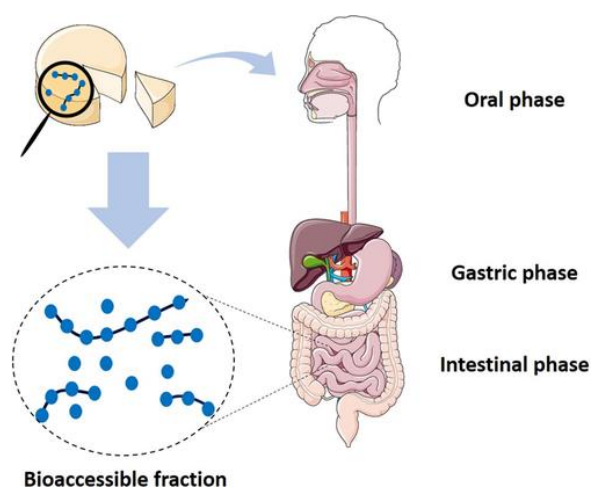
βιολογικές λειτουργίες όπως αντιμικροβιακή, αντιυπερτασική, αντιοξειδωτική, ανοσοτροποποιητική, οπιοειδή και δεσμευτική δράση μετάλλων (Baptista & Gigante, 2021). Έτσι, αυτά τα πεπτίδια μπορούν να δράσουν στο γαστρεντερικό, καρδιαγγειακό, ενδοκρινικό, ανοσοποιητικό και κεντρικό νευρικό σύστημα (Park, 2009).

### 3.4.1 ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ

Τα βιοενεργά πεπτίδια που προέρχονται από το γάλα υπάρχουν στην ανενεργή ή λανθάνουσα μορφή τους στη δομή της πρόδρομης πρωτεΐνης και μπορούν να απελευθερωθούν μέσω της ζύμωσης του γάλακτος από πρωτεολυτικά οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB), της ενζυματικής υδρόλυσης κατά την τυροκομία και την ωρίμανση ή με υδρόλυση πρωτεϊνών και πεπτίδια κατά τη γαστρεντερική πέψη (Εικ. 12, 13) (Hernández-Ledesma et al., 2011).



Εικόνα 12: Σχηματική αναπαράσταση ενζυματικής υδρόλυσης πεπτιδίων στην επεξεργασία, την ωρίμανση και την πέψη του τυριού. Οι γκρι αλληλουχίες αντιπροσωπεύουν κρυπτογραφημένα βιοενεργά πεπτίδια (Baptista & Gigante, 2021).



Εικόνα 13: Σχηματική αναπαράσταση ενζυματικής υδρόλυσης πεπτιδίων στις φάσεις της γαστρεντερικής πέψης (Baptista & Gigante, 2021).



Στη διαδικασία τυροκόμησης, οι καλλιέργειες έχουν την κύρια λειτουργία της παραγωγής γαλακτικού οξέος από τη λακτόζη. Η οξίνιση είναι απαραίτητη στη διαδικασία παραγωγής καθώς ευνοεί τη δραστηριότητα του πηκτικού, συμβάλλει στην αποβολή του ορού γάλακτος από το τυρόπηγμα και αποτρέπει την ανάπτυξη ανεπιθύμητων βακτηρίων (Fox et al., 2004). Στη διαδικασία ζύμωσης, τα οξυγαλακτικά βακτήρια υδρολύουν τις πρωτεΐνες του γάλακτος, οδηγώντας στην απελευθέρωση πεπτίδια και αμινοξέα που χρησιμοποιούνται ως πηγές αζώτου για την ανάπτυξή τους, η οποία μπορεί να οδηγήσει στην απελευθέρωση βιοδραστικών πεπτιδίων (Hernández-Ledesma et al., 2011).

### 3.5 Οφέλη βιοπεπτιδίων

Ορισμένα από τα οφέλη της κατανάλωσης βιοπεπτιδίων είναι ότι μπορούν να δράσουν ως (Meisel 2005; Hartmann & Meisel 2007; Tidona et al. 2009):

- Αντιδιαβητικά μέσα, αναστολείς της διπεπτιδυλοπεπτιδάσης-4 (DPP-IV inhibitory).
- Πεπτίδια με αντιυπερτασική δράση, αναστολείς του ενζύμου ACE (Angiotensin-converting enzyme) (ACE-inhibitory).
- Βιοπεπτίδια με αντιμικροβιακές ιδιότητες (Antimicrobial).
- Βιοπεπτίδια με αντιπηκτική δράση (Anticoagulant).
- Βιοπεπτίδια με δράση παρόμοια με τα οπιούχα (Opioid-like).
- Βιοπεπτίδια με αντικαρκινική δράση (Anticancer).
- Ανοσοτροποποιητικά πεπτίδια (Immunomodulatory).
- Αντιοξειδωτικά πεπτίδια (Antioxidant).
- Αντιθρομβωτικά πεπτίδια (Antithrombotic).
- Υποχοληστερολαιμικά πεπτίδια (Hypocholesterolemic).
- Πεπτίδια δέσμησης μετάλλων (Mineral binding).
- Βιοδείκτες (biomarkers).
- Βιοπεπτίδια οστεοπροστατευτικά (Osteoprotective) καθώς και για την προστασία του εντέρου μέσω της διέγερσης της απελευθέρωσης βλέννας.

### **3.5.1 Αντιδιαβητικά μέσα - Πεπτίδια-αναστολείς της DPP-IV:**

Ένα από τα ένζυμα του σώματος που εμπλέκονται στη ρύθμιση του επιπέδου της γλυκόζης είναι το DPP-IV. Αυτό το ένζυμο εμπλέκεται στην επίδραση της ινκρετίνης μετά την κατανάλωση γεύματος. Οι ινκρετίνες, όπως το GLP-1 και το εξαρτώμενο από τη γλυκόζη ινσουλινοτροπικό πολυπεπτίδιο (GIP), είναι ορμόνες που μειώνουν τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα διεγείροντας την έκκριση ινσουλίνης και αναστέλλοντας την απελευθέρωση γλυκαγόνης. Το GIP εξυπηρετεί πολλές πρόσθετες λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης της προαγωγής της ανάπτυξης και της επιβίωσης των παγκρεατικών β-κυττάρων και της διέγερσης της λιπογένεσης (McIntosh et al., 2009). Αυτή η επίδραση παρεμποδίζεται από το DPP-IV, επομένως η αναστολή του DPP-IV παρατείνει το αποτέλεσμα της ινκρετίνης και μειώνει το μεταγευματικό επίπεδο γλυκόζης στο αίμα (Iwaniak et al., 2020).

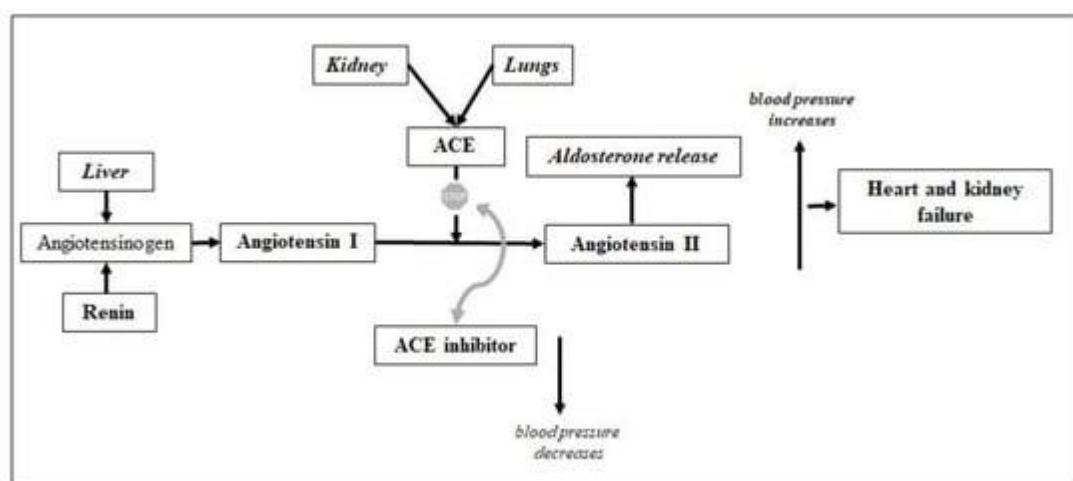
Οι αντιδιαβητικές ιδιότητες των πεπτιδίων μπορεί επίσης να προκύψουν από την ικανότητά τους να αναστέλλουν την α-γλυκοσιδάση. Η α-γλυκοσιδάση είναι ένα ένζυμο που βρίσκεται στο όριο της βούρτσας των εντεροκυττάρων της νήστιδας στο λεπτό έντερο και είναι ένα βασικό ένζυμο στη διάσπαση των υδατανθράκων. Διασπά τους υδατάνθρακες σε γλυκόζη που απορροφάται εύκολα. Έτσι, μία από τις προληπτικές στρατηγικές του διαβήτη τύπου 2 είναι η μείωση της μεταγευματικής υπεργλυκαιμίας καθυστερώντας την απορρόφηση γλυκόζης μέσω της αναστολής της α-γλυκοσιδάσης. Οι αναστολείς της α-γλυκοσιδάσης παίζουν επίσης κρίσιμο ρόλο στην έκκριση του GLP-1 σε υγιείς και διαβητικούς ασθενείς, λόγω της παρατεταμένης δράσης της ινκρετίνης (Patil et al., 2015).

### **3.5.2 Πεπτίδια με αντιπερτασική δράση-Αναστολείς του ενζύμου ACE**

Το ACE είναι ένα ένζυμο πεπτιδυλοδιπεπτιδάσης που έχει την ικανότητα να διασπά το καρβοξυλικό τερματικό άκρο του υποστρώματος που μπορεί να ρυθμίζει μια αύξηση της αρτηριακής πίεσης μετατρέποντας την αγγειοτενσίνη I σε μια ενεργή πεπτιδική ορμόνη αγγειοτενσίνη II. Αυτό διεγείρει την απελευθέρωση αλδοστερόνης, ως αποτέλεσμα της οποίας η συγκέντρωση νατρίου γίνεται υψηλή και η αρτηριακή πίεση ανεβαίνει. Αλλά τα αντιπερτασικά πεπτίδια είναι σε θέση να αναστείλουν το ACE για να ελέγξει την αύξηση της αρτηριακής πίεσης (Korhonen & Pihlanto, 2007). Οι αναστολείς ACE είναι δι- ή τρι-πεπτίδια που περιέχουν προλίνη, λυσίνη ή αργινίνη στο καρβοξυτελικό άκρο τους. Η βιοδραστική αλληλουχία αμινοξέων που εμφανίζει

αντιυπερτασική δράση απομονώνεται κυρίως από βόειες και ανθρώπινες καζεΐνες (Mohanty et al., 2016).

Η ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης που λαμβάνει χώρα στον οργανισμό περιλαμβάνει διάφορους τρόπους δράσης του ACE. Περιλαμβάνουν συστήματα ρενίνης-αγγειοτενσίνης, κινίνης-νιτρικού οξειδίου και ουδέτερης ενδοπεπτιδάσης. Το πρώτο (RAS, σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης), που ονομάζεται επίσης σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης (RAAS), θεωρείται ως το κύριο στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης. Εν συντομία, η ρενίνη ενεργοποιεί το αγγειοτενσινογόνο και απελευθερώνει την αγγειοτασίνη I. Στη συνέχεια, το ACE (Εικ. 14) μετατρέπει την αγγειοτενσίνη I σε αγγειοτασίνη II (γνωστή ως ισχυρό αγγειοσυσταλτικό) και προκαλεί την απελευθέρωση αλδοστερόνης. Επιπλέον, η αύξηση της αρτηριακής πίεσης που προκαλείται από την αγγειοτενσίνη II προκαλεί ορισμένες δυσλειτουργίες όπως βλάβες στα όργανα του σώματος που οδηγούν π.χ. σε καρδιακή και νεφρική ανεπάρκεια. Έτσι, η δράση των αναστολέων των υποδοχέων MEA ή των πεπτιδίων που αναστέλλουν το MEA συμβάλλει στη μείωση της αρτηριακής πίεσης (Iwaniak et al., 2014)



Εικόνα 14: Σύντομη περιγραφή του μηχανισμού δράσης του ACE και των αναστολέων του σύμφωνα με τους Iwaniak et al. 2014.

Τα πεπτιδία αναστολέα ACE είναι φυσικά προληπτικά που προέρχονται από τρόφιμα και χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της υπέρτασης και θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε μείωση της ανάγκης για φάρμακα που έχουν ισχυρές παρενέργειες.

(Mohanty et al., 2016). Οι πρωτεΐνες του γάλακτος έχουν αναφερθεί ως η δεξαμενή των αναστολέων ACE εδώ και πολλά χρόνια. Οι πιο γνωστές αλληλουχίες είναι οι VPP και IPP που ταυτοποιούνται σε β- και κ-καζεΐνη, αντίστοιχα. Λόγω του αντιυπερτασικού τους δυναμικού που δοκιμάστηκε σε ζώα και ανθρώπους, έγιναν συστατικά σε εμπορικά προϊόντα (Hrynkiwicz et al., 2019).

### **3.5.3 Αντιθρομβωτικά πεπτίδια**

Συστατικά που προέρχονται από τρόφιμα όπως τα πεπτίδια μπορεί να είναι καλοί υποψήφιοι για αντιθρομβωτική δράση λόγω των ελάχιστων παρενεργειών τους. Οι πρωτεΐνες των τροφίμων μπορούν να θεωρηθούν ως πρόδρομοι βιοδραστικών πεπτιδίων (Minkiewicz & Dziuba, 2008). Πιο συγκεκριμένα, αναστέλλουν τη συσσώρευση αιμοπεταλίων και τη σύνδεση του ινωδογόνου στους υποδοχείς της επιφάνειας των αιμοπεταλίων (Korhonen & Pihlanto, 2006).

### **3.5.4 Αντιοξειδωτικά Πεπτίδια**

Οι ελεύθερες ρίζες εμπλέκονται σε πολλές διαδικασίες σηματοδότησης, δηλαδή ως προστασία του οργανισμού από μολύνσεις. Έτσι, η συσσώρευση ελεύθερων ριζών στον οργανισμό μπορεί να οδηγήσει σε ανεπιθύμητη κυτταρική βλάβη. Τα οξειδωμένα κύτταρα μπορούν στη συνέχεια να ξεκινήσουν αρκετές δυσλειτουργίες του σώματος όπως π.χ. ταχεία γήρανση, αθηροσκλήρωση, αρθρίτιδα, διαβήτης και καρκίνο. Είναι το λεγόμενο οξειδωτικό στρες που ορίζεται ως η διαδικασία σχηματισμού μορίων υψηλής αντίδρασης (δηλαδή δραστικών ειδών οξυγόνου-ROS). Προκειμένου να δράσουμε ενάντια στην καταστροφική δραστηριότητα των ROS, είναι σημαντικό να αναζητήσουμε ενώσεις που προέρχονται από τη διατροφή που δρουν ως αντιοξειδωτικά (Sarmadi & Ismail, 2010)

Πολλά πεπτίδια γάλακτος παίζουν επίσης ρυθμιστικό ρόλο στον οξειδωτικό μεταβολισμό που είναι απαραίτητος για την επιβίωση των κυττάρων και προκαλεί οξειδωτικές αλλαγές παράγοντας ελεύθερες ρίζες (Mohanty et al., 2016).

Επιπλέον, τα αντιοξειδωτικά πεπτίδια που προέρχονται από το γάλα αποτελούνται από πέντε έως έντεκα υδρόφοβα αμινοξέα, συμπεριλαμβανομένης της προλίνης, της ιστιδίνης, της τυροσίνης ή της τρυπτοφάνης, τα οποία είναι ευρέως καταναμεμημένα μεταξύ των καζεϊνών σε υδρόλυση από πρωτεολυτικά ένζυμα (Korhonen & Pihlanto, 2003). Μπορούν να λειτουργήσουν με αδρανοποίηση ή αποτροπή σχηματισμού ριζών (Wong & Kitts, 2003), ιδιαίτερα, οι ελεύθερες ρίζες

που απελευθερώνονται από πεπτίδια καζεΐνης μπορεί να επηρεάσουν τη δραστηριότητα αδρανοποίησης (Rival et al., 2001) και επίσης να αναστέλλουν την ενζυμική και μη ενζυμική υπεροξειδωση των λιπιδίων.

### **3.5.5 Βιοπεπτίδια με αντιμικροβιακές ιδιότητες**

Εξ ορισμού, τα αντιμικροβιακά βιοπεπτίδια είναι βιολογικά ενεργά θραύσματα που αποτελούνται από λιγότερα από 50 υπολείμματα αμινοξέων με μοριακή μάζα μικρότερη από 10 kDa (Saadi et al., 2015). Μπορούν να επιδείξουν αποτελεσματικό ρόλο στην άμυνα του ξενιστή ενάντια στα πιο συχνά παθογόνα βακτήρια που αλληλεπιδρούν άμεσα με αυτά και επομένως τα σαρώνουν. Έχουν αναφερθεί αρκετές μέθοδοι για τον προσδιορισμό του βιολογικού ρόλου των βιοδραστικών πεπτιδίων από προϊόντα υδρόλυσης πρωτεϊνών και μεταξύ αυτών των μεθόδων, έχουμε συγκεκριμένα τη δοκιμασία διάχυσης αγάρ, η οποία ονομάζεται ανάλυση ζώνης αναστολής (Hickey et al., 2003). Η βάση αυτής της μεθόδου είναι η ικανότητα των διαμορφωμένων βιολογικών ουσιών να καθαρίζουν και να εξαλείφουν τη βακτηριακή ανάπτυξη στα τυποποιημένα στερεά μέσα προσδιορίζοντας την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) μετά τον κατάλληλο χρόνο επώασης. Τα αντιμικροβιακά βιοενεργά πεπτίδια που προέρχονται από το γάλα έχει αναφερθεί ότι αναστέλλουν πολλά θετικά κατά Gram και αρνητικά κατά Gram παθογόνα, συμπεριλαμβανομένων των *Escherichia coli* MTCC82, *Aeromonas hydrophila* ATCC7966, *Salmonella typhi* MTCC3216, *Bacillus cereus* ATCC10702, *Salmonella typhimurium* SB300, *S. enteritidis* 125109, *Staphylococcus aureus* MTCC 96 (Mohanty et al., 2014) και ελέγχουν πολλές μικροβιακές λοιμώξεις.

### **3.5.6 Βιοπεπτίδια με αντικαρκινική δράση**

Στη θεραπεία της έρευνας για τον καρκίνο, τα φυσικά βιοϋλικά, όπως τα υδρολύματα πρωτεϊνών, ενδέχεται να επιδεικνύουν κεντρικό βιολογικό ρόλο κατά των καρκινικών κυττάρων στοχεύοντάς τα και απομακρύνοντάς τα από τον πολλαπλασιασμό τους, ιδιαίτερα τα αντιγόνα που σχετίζονται με τον όγκο (Noguchi et al., 2012). Τα βιοπεπτίδια έχουν γίνει εναλλακτικά μόρια σε σύγκριση σε άλλα αποτελεσματικά φάρμακα λόγω της άποψης ασφάλειας που έχει δείξει για την ανθρώπινη υγεία. Τα πεπτίδια που έχουν την ικανότητα να επάγουν την απόπτωση σε κύτταρα όγκου εμπλέκονται ως αποτελεσματικοί αντικαρκινικοί παράγοντες (Mader et al., 2007)

### **3.5.7 Βιοπεπτίδια με αντιπηκτική δράση**

Πριν από πολλά χρόνια, τα εμπορικά αντιπηκτικά έχουν χρησιμοποιηθεί για θεραπευτικούς σκοπούς, ιδιαίτερα σε φαρμακευτική αγωγή και άλλες θρομβωτικές διαταραχές. Οι παρενέργειες αυτών των εμπορικών αντιπηκτικών συμπεριλαμβανομένης της κουμαρίνης, της βαρφαρίνης και της ηπαρίνης έχουν αναγνωριστεί όπως η θρομβοπενία και η αιμορραγία. Έτσι, τα προτεινόμενα ζητήματα ώθησαν τους επιστήμονες να εκμεταλλευτούν φυσικά προϊόντα ως εναλλακτικές πηγές για εμπορικά αντιπηκτικά (Hylek et al., 2007). Λόγω της πολυπλοκότητας της διαδικασίας της ομοιοστάσης, ο φαρμακολόγος και οι επιστήμονες τροφίμων αναδιατυπώνουν σήμερα μεγάλες προσπάθειες για την εκμετάλλευση φυσικών βιοδραστικών ενώσεων που προέρχονται από υλικά τροφίμων προκειμένου να βλάψουν τη συγκεκριμένη βιολογική λειτουργία που σχετίζεται με την πήξη του αίματος. Ο ρόλος των βιοπεπτιδίων ως φυσικών προστατευτικών είναι ένας από τους θεραπευτικούς παράγοντες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μείωση της αιμορραγίας ταυτόχρονα για την αναγέννηση και την ανασύσταση των κατεστραμμένων περιοχών στο τοίχωμα του αιμοφόρου αγγείου (Saadi et al, 2015).

### **3.5.8 Βιοπεπτίδια με δράση παρόμοια με τα οπιούχα**

Τα οπιοειδή πεπτίδια εξ ορισμού είναι ένα είδος πεπτιδίου που μπορεί να βρεθεί στο βόειο γάλα και αναφέρεται ότι διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στο νευρικό δίκτυο του ανθρώπινου σώματος, το οποίο κωδικοποιείται από γονίδια που είναι υπεύθυνα για τη δημιουργία δραστηριότητας που μοιάζει με οπιούχο και μπορεί να εμφανίσει τρόπο ομοιότητας δράση της μορφίνης (Sánchez et al., 2017). Αυτός ο τύπος πεπτιδίου δρα προσκολλώντας σε στοχευόμενο κυτταρικό υποδοχέα και μεταξύ αυτών των υποδοχέων, για παράδειγμα τον μ-υποδοχέα, ο οποίος μπορεί να προκαλέσει τις συναισθηματικές συμπεριφορές και βρέθηκε ότι καταστέλλει επίσης την κινητικότητα του εντέρου. Ένας άλλος υποδοχέας που σχετίζεται με τη ρύθμιση της πρόσληψης τροφής ονομάζεται «κ-υποδοχέας», αυτοί οι τύποι βιοδεικτών είναι στις περισσότερες περιπτώσεις ενεργοί είτε παίζοντας ένα ρόλο ως ανταγωνιστικοί είτε αγωνιστικοί σύμφωνα με το συγκεκριμένο αμινοτελικό άκρο τους που εμπλέκεται στην αλυσίδα της αλληλουχίας. Η παρουσία αμινοξέος τυροσίνης στη Ν-τελική αλληλουχία ακολουθούμενη από αρωματικά αμινοξέα στην τρίτη ή τέταρτη

θέση της αλυσίδας αλληλουχίας μπορεί να οδηγήσει σε αυτό το πρωτότυπο δομής που έχει ταχεία συγγένεια με τους υποδοχείς οπιοειδών (Teschemacher, 2003).

Επιπλέον, ανταγωνιστές οπιοειδών που βρίσκονται στη βόεια κ-καζεΐνη είναι γνωστοί ως κασοξίνες. είναι συνδέτες του μ-υποδοχέα οπιοειδών, οι οποίοι βρέθηκαν να είναι πιο δραστικοί μετά τη μεθοξυλιοποίηση του C-τελικού άκρου. (Teschemacher et al., 1997).

### **3.5.9 Ανοσοτροποποιητικά πεπτίδια**

Τα γλυκοπεπτίδια, οι ορμόνες και τα πεπτιδικά θραύσματα των ανοσοσφαιρινών θεωρούνται συνήθως ως ανοσοτροποποιητικά πεπτίδια που ρυθμίζουν τις κυτταρομεσολαβούμενες και χυμικές ανοσοποιητικές λειτουργίες (Agyei & Danquah, 2012; Mohanty et al., 2016). Για αυτούς τους λόγους, όλες οι προσπάθειες αναδιατυπώνονται για να εξασφαλιστούν τα στοιχεία τους στις πρακτικές χρήσεις (π.χ. *in vivo* επαλήθευση) για να εξασφαλιστεί μια καλή αναπαραγωγιμότητα αυτών των δραστικών ουσιών από άποψη φαρμακοκινητικής, θεραπευτικής και ανοσοτροποποιητικής αποτελεσματικότητας. Ωστόσο, οι ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες των βιοπεπτιδίων φαίνεται ότι δεν έχουν ακόμη εκτιμηθεί σε σύγκριση με αυτές που παρουσιάζονται για αντιοξειδωτικές και αντιυπερτασικές λειτουργίες. Αυτό οφείλεται ίσως στις πολλές προκλήσεις που προέκυψαν κατά την πρακτική εφαρμογή, ειδικά κατά τη διάρκεια της μελέτης *in vivo*, η οποία βασίζεται κυρίως στην αξιολόγηση της κυτταρικής καλλιέργειας και επίσης, λόγω της πολυπλοκότητας της χημικής αντίδρασης και του μηχανισμού που προκύπτει από το τέλος των πρωτογενών και δευτερογενών μεταβολιτών μέσα στο ζωντανό σύστημα. Περιορισμένες γνώσεις έχουν αναπτυχθεί σχετικά με τις ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες των βιοπεπτιδίων (Saadi et al, 2015).

### **3.5.10 Υποχοληστερολαιμικά Πεπτίδια**

Ορισμένα προϊόντα υδρόλυσης που προέρχονται από πεπτίδια/πρωτεΐνες εμφανίζουν δράση ενάντια στις δυσλειτουργίες των μεταβολικών λιπιδίων και η επίδρασή τους δοκιμάστηκε σε κυτταρικά συστήματα και ζωικά μοντέλα (Udenigwe & Rouvinen-Watt, 2015) Από όσο γνωρίζουμε, δεν εντοπίστηκαν πεπτίδια που να δρουν ως υπολιπιδαιμικά στα τυριά. Όταν σκεφτόμαστε το γάλα, οι περισσότερες μελέτες σχετικά με την «αντιχοληστερολαιμική τους δράση» που έχουν γίνει μέχρι τώρα, αφορούσαν τις πρωτεΐνες ορού γάλακτος. Η κατάποση πρωτεΐνης ορού

γάλακτος παρατηρήθηκε να συσχετίζεται με σημαντική μείωση των επιπέδων ολικής χοληστερόλης σε αρουραίους που τρέφονταν με δίαιτες χωρίς χοληστερόλη και δίαιτες εμπλουτισμένες σε χοληστερόλη (Hsieh et al., 2015). Η δράση της β-λακτοσφαιρίνης που μειώνει τη χοληστερόλη οφειλόταν στην παρουσία δύο κύριων βιοπεπτιδίων, της λακτοστατίνης (LACT) και της β-λακτοτενσίνης (HLRL) (Nagaoka, 2019).

### 3.5.10 Πεπτίδια δέσμησης μετάλλων

Τα φωσφοπεπτίδια είναι οι κυριότεροι εκπρόσωποι αυτής της κατηγορίας βιοδραστικών πεπτιδίων που απελευθερώνονται από την υδρόλυση της καζεΐνης, κυρίως με θρυψίνη, και ονομάζονται καζεΐνοφωσφοπεπτίδια (CPPs) και προέρχονται από την *in vitro* και/ή *in vivo* πέψη της  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$  ή  $\beta$ -καζεΐνης (Meisel et al., 2003). Η την δέσμηση απαραίτητων στοιχείων για τον οργανισμό ενισχύεται από τα βιοπεπτίδια αυτά 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).

Μια ομάδα τριών υπολειμμάτων φωσφοσερίνης που ακολουθούνται από δύο υπολείμματα γλουταμικού οξέος (SerP-SerP-SerP-Glu-Glu) αποτελεί τον μηχανισμό της δράσης των CPPs (Michaelidou, 2008). Αυτή η αλληλουχία παράγει, στο εντερικό pH, έναν αρνητικά φορτισμένο πυρήνα, υπεύθυνο για τη δέσμηση μετάλλων (Ca, Zn, Mg) και για την αντίσταση αυτών των πεπτιδίων στα πρωτεολυτικά γαστρεντερικά ένζυμα (Michaelidou, 2008). Επίσης, η παθητική διάχυση του ασβεστίου (Ca) *in vivo* αυξάνεται λόγω της διαλυτότητας του στο φυσιολογικό pH του απομακρυσμένου λεπτού εντέρου (Michaelidou, 2008).

### 3.5.11 Βιοπεπτίδια - Βιοδείκτες

Οι Sforza et al. (2008) χρησιμοποίησαν πρωτεολυτικά ολιγοπεπτίδια ως μοριακούς δείκτες για την παρουσία αγελαδινού γάλακτος σε φρέσκα τυριά που προέρχονται από πρόβειο γάλα. Η μέθοδος τους βασίζεται στην υγρή χρωματογραφία / φασματομετρία μάζας (LC/MS) για την ανάλυση του ολιγοπεπτιδικού κλάσματος και έδειξε ότι τα πεπτίδια  $\alpha_{s1}$ CNf(1-14) και  $\alpha_{s1}$ CNf(1-23), που προέρχονται από  $\alpha_{s1}$ -καζεΐνη προβάτων και αγελάδων από η πρωτεολυτική δράση των αρχικών βακτηρίων γαλακτικού οξέος και της χυμοσίνης, είναι καλοί μοριακοί δείκτες για την ταχεία αξιολόγηση της παρουσίας αγελαδινού γάλακτος σε φρέσκα τυριά από πρόβειο γάλα



διότι σε όλα τα τυριά που αναλύθηκαν η παρουσία αγελαδινού γάλακτος, ακόμη και σε 1%, θα μπορούσε εύκολα να προσδιοριστεί με την ανίχνευση των πεπτιδίων που προέρχονται από την καζεΐνη των αγελάδων.

### **3.6 Παράγοντες που επηρεάζουν την περιεκτικότητα πρωτεϊνών και βιοπεπτιδίων**

Αν και βιοενεργά πεπτίδια μπορούν να βρεθούν σε εμπορικά ώριμα τυριά ως αποτέλεσμα της πρωτεόλυσης που συμβαίνει φυσικά στην παρασκευή και ωρίμανση αυτών των γαλακτοκομικών προϊόντων, η κατανόηση των επιδράσεων πολλών παραγόντων που επηρεάζουν το σχηματισμό και τη σταθερότητα αυτών των πεπτιδίων μπορεί να επιτρέψει στα τυριά να σχεδιαστούν με μέγιστη βιοδραστικότητα. Όλοι οι παράγοντες που επηρεάζουν το ενζυματικό προφίλ και, κατά συνέπεια, η πρωτεόλυση μπορούν επίσης να επηρεάσουν την απελευθέρωση βιοδραστικών πεπτιδίων στα ώριμα τυριά. Η θερμική επεξεργασία του γάλακτος, ο τύπος του πηκτικού, οι χρησιμοποιούμενες γαλακτικές καλλιέργειες και ο χρόνος ωρίμανσης είναι παραδείγματα παραγόντων που έχουν ήδη αναφερθεί ως σημαντικοί για το σχηματισμό βιοδραστικών πεπτιδίων στα τυριά (Sieber et al., 2010; Timón et al., 2019).

#### **3.6.1 Θερμική επεξεργασία γάλακτος**

Η θερμική επεξεργασία του γάλακτος επηρεάζει άμεσα το ενζυματικό προφίλ των τυριών, είτε με την αδρανοποίηση των ενζύμων του γάλακτος είτε με τη μείωση της ποικιλίας της μικροχλωρίδας του γάλακτος (Grappin & Beuvier, 1997) που έχει ως αποτέλεσμα διαφορετικά προφίλ πεπτιδίων στα τυριά που λαμβάνονται από ωμό και παστεριωμένο γάλα (Galli et al, 2019). Αξιολογώντας 44 εμπορικά τυριά διαφορετικών ποικιλιών, οι Bütikofer et al (2007) παρατήρησαν υψηλότερη συγκέντρωση αντιπερτασικών τριπεπτιδίων VPP (Val-Pro-Pro) και IPP (Ile-Pro-Pro) σε τυριά που παρασκευάζονται από νωπό γάλα, σε σύγκριση με τυριά που λαμβάνονται από παστεριωμένο γάλα, το οποίο αποδόθηκε στην πρωτεολυτική δράση πρωτεϊνών και πεπτιδίων οι οποίες μπορούν να επιταχύνουν την αποδόμηση των καζεϊνών σε μικρά πεπτίδια. Ομοίως, σε μια μελέτη υπό ελεγχόμενες συνθήκες. Οι Gómez-Ruiz et al. (2002) βρήκαν υψηλότερη ανασταλτική δράση του ACE στο τυρί Manchego ωριμασμένο για 8 μήνες που λαμβάνεται από νωπό γάλα σε σύγκριση με τυριά που παρασκευάζονται με παστεριωμένο γάλα και με την

προσθήκη διαφορετικών γαλακτικών καλλιεργειών. Η ίδια τάση παρατηρήθηκε από τους Pisanu et al. (2015) που αξιολόγησαν το προφίλ πεπτιδίων του τυριού από πρόβειο γάλα που λαμβάνεται από νωπό και παστεριωμένο γάλα και παρατήρησε μεγαλύτερη αφθονία ανοσοτροποποιητικών και ανασταλτικών του ΜΕΑ πεπτιδίων σε τυριά που λαμβάνονται από νωπό γάλα.

### 3.6.2 Πηκτική ουσία

Η πηκτική ουσία παίζει σημαντικό ρόλο στην πρωτογενή πρωτεόλυση που συμβαίνει στα αρχικά στάδια της ωρίμανσης του τυριού. Η χυμοσίνη, το κύριο συστατικό των πηκτικών που χρησιμοποιούνται συνήθως στην παρασκευή τυριών που λαμβάνονται με ενζυματική πήξη, υδρολύει τον δεσμό  $\alpha_{s1}$ -καζεΐνης Phe<sub>23</sub>-Phe<sub>24</sub> και τον δεσμό  $\beta$ -καζεΐνης Leu<sub>192</sub>-Tyr<sub>193</sub> στην αρχή της ωρίμανσης του τυριού (Fox et al., 2004). Αυτή η υδρόλυση έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση των πεπτιδίων  $\alpha_{s1}$ -CN (f1-23) και  $\beta$ -CN (f193-209), αντίστοιχα, και τα δύο αναγνωρίζονται ως βιοδραστικά (Rojas-Ronquillo et al., 2012). Λαμβάνοντας υπόψη την επίδραση του πηκτικού στην πρωτεόλυση, η επιλογή του πηκτικού μπορεί να επηρεάσει το πεπτιδικό προφίλ και βιοδραστικότητα ωριμασμένων τυριών, όπως καταδεικνύεται από μια πρόσφατη μελέτη που αξιολόγησε τις επιδράσεις διαφορετικών πηκτικών (ζωική ρενίνη, μικροβιακό πηκτικό και *Cynara cardunculus*, ένα πηκτικό φυτικής προέλευσης) στην αντιοξειδωτική δράση του σκληρού τυριού και βρήκε μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση στα τυριά που ελήφθησαν από πηκτικό μικροβιακής προέλευσης (Timón et al., 2019).

### 3.6.3 Καλλιέργειες εκκίνησης και συμπληρωματικές καλλιέργειες

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν ένα πολύπλοκο πρωτεολυτικό σύστημα που αποτελείται από πρωτεϊνάσες και πεπτιδάσες που παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρωτεόλυση που λαμβάνει χώρα στην ωρίμανση των τυριών (Kunji et al., 1996). Οι καλλιέργειες εκκίνησης που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία τυροκομίας διαδραματίζουν επομένως σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό του προφίλ πεπτιδίου στα τυριά. Λαμβάνοντας υπόψη την πολυπλοκότητα των πρωτεολυτικών συστημάτων των πιο διαφορετικών οξυγαλακτικών βακτηρίων και τη σημασία αυτών των ενζυματικών προφίλ στην απελευθέρωση βιοπεπτιδίων, η χρήση πρωτεολυτικών επικουρικών καλλιεργειών που παράγουν ένζυμα με εξειδίκευση στην υδρόλυση

πρωτεϊνών γάλακτος και την απελευθέρωση βιοδραστικών πεπτιδίων έχει θεωρηθεί ως στρατηγική για την ανάπτυξη λειτουργικών τυριών (Erkaya & Şengul, 2015).

Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων που έχουν υποστεί ζύμωση, συμπεριλαμβανομένων των *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis subsp lactis*, *Lactococcus lactis subsp cremoris*, *Lactobacillus delbrueckii subsp cremoris*, *Lactococcus lactis subsp cremoris*, *Lactobacillus delbrueckii al. Plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* και *Lactobacillus acidophilus* (Rasika et al., 2015) είναι γνωστό ότι είναι αποτελεσματικά στην απελευθέρωση βιοδραστικών πεπτιδίων από πρωτεΐνες γάλακτος (Kocak et al., 2020).

Στην έρευνα των Kocak et al., (2020) μια μικτή εμπορική καλλιέργεια εκκίνησης που περιείχε *Lactococcus lactis subsp lactis* και *Lactococcus lactis subsp cremoris* (Τυρί ελέγχου, A) συνδυάστηκε με τρεις πρόσθετες καλλιέργειες συμπεριλαμβανομένων *Lactobacillus casei* (Τυρί B), *Lactobacillus plantarum* (Τυρί C) και *Lactobacillus bulgaricus* (Τυρί D) παρασκευή λευκού τυριού άλμης με κατσικίσιο γάλα. Η χρήση πρόσθετης καλλιέργειας δεν επηρέασε σημαντικά το pH και την ακαθάριστη χημική σύνθεση εκτός από τις αζωτούχες ενώσεις. Ωστόσο, η χρήση συμπληρωματικών καλλιεργειών στην τυροκομία έδειξε πιθανή αύξηση στην ανασταλτική και αντιοξειδωτική δράση του ACE παράλληλα με την αύξηση των υδατοδιαλυτών αζωτούχων ενώσεων μέχρι την 60<sup>η</sup> ημέρα ωρίμανσης. Η υψηλότερη αντιοξειδωτική και ανασταλτική δράση του ACE ανιχνεύθηκε στο τυρί D (62,55%) και στο τυρί B (51,95%), αντίστοιχα. Όλα τα δείγματα τυριού έδειξαν σχεδόν παρόμοιο πεπτιδικό προφίλ. Ωστόσο, παρατηρήθηκαν ποσοτικές διαφορές. Συμπερασματικά, η χρήση συμπληρωματικών καλλιεργειών στην παραγωγή τυριού κατσικίσιου γάλακτος με άλμη, συμβάλλει στην αύξηση της ανασταλτικής δράσης του ACE και της αντιοξειδωτικής δράσης.

#### **3.6.4 Χρόνος ωρίμανσης**

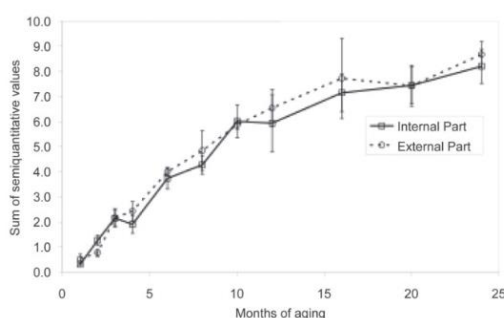
Ο χρόνος ωρίμανσης και, κατά συνέπεια, ο βαθμός πρωτεόλυσης είναι επίσης παράγοντες που καθορίζουν τη βιοδραστικότητα των τυριών καθώς η εξέλιξη της ωρίμανσης σχετίζεται με την απελευθέρωση και την επακόλουθη υδρόλυση βιοδραστικών πεπτιδίων. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει την επίδραση του χρόνου

στην εξέλιξη της πρωτεόλυσης και την επακόλουθη τροποποίηση του προφίλ πεπτιδίων των τυριών κατά την ωρίμανση (Galli et al. 2019).

Τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν από τους διάφορους συγγραφείς υποδηλώνουν την ανάγκη προσδιορισμού των χρόνων ωρίμανσης που είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη των μέγιστων βιοδραστηριοτήτων σε κάθε ποικιλία τυριού, λαμβάνοντας υπόψη τα ειδικά χαρακτηριστικά κάθε διαδικασίας και τις συνθήκες ωρίμανσης που έχουν ως αποτέλεσμα διαφορετικά ενζυματικά προφίλ και δραστηριότητες (Baptista & Gigante, 2021).

Για παράδειγμα στην μελέτη των Loffi et al., (2021) τα ελεύθερα αμινοξέα και τα πεπτίδια, όπως αναμενόταν, αυξήθηκαν με την ωρίμανση, λόγω πρωτεόλυσης, με τα δείγματα με χαμηλή περιεκτικότητα σε άλατα να παρουσιάζουν ελαφρώς ταχύτερη αύξηση σε σύγκριση με τα τυπικά, υπονοώντας μια ελαφρώς επιταχυνόμενη πρωτεολυτική διαδικασία. Ωστόσο, τα τυριά με χαμηλή περιεκτικότητα σε αλάτι και τα συμβατικά τυριά μοιράστηκαν παρόμοια αισθητικά προφίλ και στις δύο περιόδους ωρίμανσης.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από μία άλλη εργασία των Sforza et al., (2012) το πεπτιδικό κλάσμα του τυριού Parmigiano-Reggiano εξελίσσεται συνεχώς κατά την ωρίμανση (Εικ. 15). Η παραγωγή και η αποικοδόμηση πεπτιδίων κατά την ωρίμανση είναι μια πολύ περίπλοκη διαδικασία που ελέγχεται από πολλά διαφορετικά ένζυμα. Αυτά τα βιοχημικά συμβάντα καταλήγουν σε πεπτίδια που είναι τα υποστρώματα για περαιτέρω επεξεργασία σε βραχύτερα πεπτίδια και ελεύθερα αμινοξέα.



**Εικόνα 15:** Η άύξηση των πεπτιδίων κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης (χωριστά οι τιμές που αντιστοιχούν στα εσωτερικά και εξωτερικά μέρη του κεφαλιού του τυριού) (Sforza et al., 2012).

### 3.6.5 Οξύτητα

Ο έλεγχος του pH της όξινης γέλης είναι σημαντικός, καθώς αυτή η παράμετρος επηρεάζει τις πρωτεΐνες του τυριού, τη δευτερογενή δομή τους και το τυρί κρέμα που προκύπτει. Στην μελέτη των Ong et al., (2020) η μείωση του pH οδήγησε σε μια πιο πυκνή μικροδομή και πιο σκληρό τυρί. Η μεγαλύτερη απώλεια πρωτεΐνης ορού γάλακτος σε χαμηλό pH πιθανότατα συνέβαλε στην αύξηση της σκληρότητας του τυριού.

### 3.7 Μέθοδοι προσδιορισμού πρωτεϊνών και βιοπεπτιδίων

Οι πρωτεΐνες του γάλακτος έχουν υψηλή αξία από τεχνολογική άποψη καθώς και για τις ευεργετικές τους φυσιολογικές επιδράσεις. Ως εκ τούτου, η ανάλυση των διαφορετικών ατομικών προφίλ πρωτεϊνών στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον, όχι μόνο για τη βιομηχανία γάλακτος αλλά και για τη διατροφική έρευνα καθώς και για την εφαρμοσμένη βιοτεχνολογία (Bär et al., 2019).

Για την ανάλυση των πρωτεϊνών γάλακτος έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως οι εξής μέθοδοι (Andrei, 2006):

- 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).

Έχει διαπιστωθεί ότι για την καλύτερη ανάλυση των δειγμάτων, γίνεται χρήση συνδυασμού κάποιων από τις παραπάνω μεθόδους. Αυτό συνήθως περιλαμβάνει τη χρήση διαχωριστικών τεχνικών όπως για παράδειγμα υγρή χρωματογραφία (LC) σε συνδυασμό με MS (Dallas et al., 2015). Πρόσφατα, βιοενεργά πεπτίδια και οι αλληλουχίες τους σε ομογενοποιημένα δείγματα γάλακτος βρέθηκαν με την χρήση υγρής χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC) σε συνδυασμό με MS και υγρή χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης (HILIC) (Giacometti & Tomljanovic, 2017).

Η παρουσία βιοδραστικών πεπτιδίων αναφέρονται σε εμπορικά γαλακτοκομικά προϊόντα όπως τα γάλατα που έχουν υποστεί ζύμωση, τα γιαούρτια και τα τυριά. Τα τελευταία χρόνια, ωστόσο, έχει παρατηρηθεί βελτίωση στην κατανόηση των μηχανισμών σχηματισμού βιοπεπτιδίων, επιτρέποντας την αποσαφήνιση των επιδράσεων πολλών παραγόντων στην απελευθέρωση πεπτιδίων και στην ανάπτυξη βιοδραστικότητας στα τρόφιμα. Αυτή η βελτίωση της γνώσης ήταν δυνατή λόγω της ανάπτυξης πεπτιδομικών μελετών και, ειδικότερα, της χρήσης τεχνικών φασματομετρίας μάζας που επιτρέπουν την αποσαφήνιση των μοριακών δομών με ακριβή τρόπο και σε σύντομο χρονικό διάστημα (Baptista & Gigante, 2021; Saadi et al., 2015; Sewald and Jakubke, 2002). Ως εκ τούτου, θα πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή και θα πρέπει να ληφθούν υπόψη πολλές από τις μεθόδους προετοιμασίας που προτείνονται για τον προσδιορισμό βιοδραστικών πεπτιδίων. Τυπικά, η μεταβλητότητα στα μοριακά βάρη, τα φορτία, τη συγγένεια των βιοδραστικών πεπτιδίων κατά τον διαχωρισμό προκαλεί πολλά εμπόδια. Αυτά ξεπερνιούνται για παράδειγμα με τη χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (SEC) που είναι γνωστή με τον περιορισμό της όσον αφορά την ικανότητα διαχωρισμού (Sewald and Jakubke, 2002). Μεταξύ των κυριότερων διαφορετικών τεχνικών που χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση της πρωτεΐνης είναι η εκχύλιση με διαλύτη και επίσης με τη χρήση διαφορετικών συστημάτων αλατούχου διαλύματος. Ένα από τα απλούστερα παραδείγματα στην κινητή φάση που χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό πεπτιδίων από ζυμωμένα προϊόντα υδρόλυσης πρωτεϊνών είναι ένα μείγμα των τριών στοιχείων που περιλαμβάνουν το τριφθοροξικό οξύ (TFA), το νερό και το ακετονιτρίλιο (Wang and de Meija, 2005). Ακολουθούν αρκετά στάδια αναλόγως ξεκινώντας με φυγοκέντρηση και στη συνέχεια διήθηση του υπερκειμένου και τέλος λυοφιλοποίηση του δείγματος για περαιτέρω καθαρισμό και διαχωρισμό με υγρή χρωματογραφία.

Για παράδειγμα, η HPLC είναι το κοινό εργαλείο για τον διαχωρισμό βιοδραστικών ενώσεων. Ωστόσο, η προηγμένη τεχνολογία επέτρεψε τον γρήγορο διαχωρισμό αυτών των ενώσεων με τη χρήση στηλών RP-HPLC που διευκολύνουν τον διαχωρισμό μεταξύ των ανιχνευόμενων γεγονότων, ιδιαίτερα από ένα μείγμα πρωτεϊνικών υδρολύσεων. Αντίθετα, η εφαρμογή κανονικής HPLC προτιμάται στην περίπτωση που τα στοχευόμενα βιοενεργά πεπτίδια είναι υδρόφιλα πεπτίδια. Άλλες χρωματογραφικές τεχνικές συμπεριλαμβανομένης της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης

(CE), της τριχοειδούς ισοηλεκτρικής εστίασης (CIEF) και της χρωματογραφίας ανταλλαγής ιόντων (IEC) θα μπορούσαν να φτάσουν στον διαχωρισμό των πεπτιδίων με βάση τις συγγένειες φορτίσεώς τους είτε θετικά είτε αρνητικά φορτισμένα βιοενεργά πεπτίδια (Wang and de Mejia, 2005; Sánchez-Rivera et al., 2014). Για τον διαχωρισμό των πεπτιδίων με βάση το μοριακό βάρος στα υδατικά συστήματα διαχωρισμού συνιστάται η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (SEC) που ονομάζεται καθώς και η χρωματογραφία διήθησης γέλης (GFC), ενώ για τα συστήματα μη υδατικού διαχωρισμού προτιμάται η χρωματογραφία γέλης-χρωματογραφία διείσδυσης (Wang and de Mejia, 2005). Η χρωματογραφία διείσδυσης γέλης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό του πεπτιδικού κλάσματος με διαφορετικά μοριακά μεγέθη από την πέψη του φαγόπυρου (Li et al., 2002). Άλλες τεχνικές διαχωρισμού και κλασματοποίησης που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην τροχιά καθαρισμού είναι η υπερδιήθηση, η κρυστάλλωση και η χρωματογραφία καταμερισμού (Sewald and Jakubke, 2002). Στη συνέχεια αναφέρονται πιο αναλυτικά ορισμένες τεχνικές.

### **3.7.1 Φασματοσκοπική Ανίχνευση**

Φασματοσκοπία είναι η μελέτη της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας ή των κυμάτων υπερήχων σε φυσικά συστήματα στα οποία μεταδίδονται ή παράγονται. Διάφορες φασματοσκοπικές τεχνικές όπως η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού χαμηλής ανάλυσης, η φασματοσκοπία UV-VIS, η υπέρυθρη φασματοσκοπία, η φασματοσκοπία υπερήχων, η φασματοσκοπία μικροκυμάτων, η ατομική φασματοσκοπία και η φασματοσκοπία μικροκυμάτων χρησιμοποιούνται για την εξέταση γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων. Στη βιομηχανία γάλακτος η υπέρυθρη φασματοσκοπία είναι η πιο αποτελεσματική και ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική όπου βασίζεται στην απορρόφηση της ακτινοβολίας από το δείγμα και ορίζεται από το μήκος κύματος του φωτός, συνήθως στο μέσο υπέρυθρο και στο εγγύς υπέρυθρο. Παρέχει ταυτόχρονη ανίχνευση όλων των βασικών συστατικών του γάλακτος με απλό, γρήγορο, ακριβή και φιλικό προς το περιβάλλον τρόπο. Κατά την επεξεργασία της σκόνης γάλακτος, η περιεκτικότητα σε υγρασία και νερό μπορεί να ελεγχθεί απευθείας στον θάλαμο ξήρανσης και επίσης η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και λίπος (Li-Chan, 2007, Punia et al., 2020).

### **3.7.2 Προφίλ πεπτιδομικής**

Η πρωτεομική είναι η μεγάλης κλίμακας μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης, των αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης ή των μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων. Σε αντίθεση με άλλες μεθοδολογίες που αναλύουν μερικές πρωτεΐνες κάθε φορά, η πρωτεϊνομική μπορεί να αναλύσει χιλιάδες πρωτεΐνες σε ένα μόνο πείραμα. Αυτή η ικανότητα ανάλυσης χιλιάδων πρωτεϊνών μπορεί να αποδείξει πώς τα κύτταρα μπορούν να ανταποκριθούν δυναμικά στις αλλαγές στο περιβάλλον τους. Η πρωτεομική είναι ένα ισχυρό εργαλείο για την αναγνώριση των πρωτεϊνών και μελετά τον εντοπισμό τους, τις λειτουργίες, τις τροποποιήσεις και τις πιθανές αλληλεπιδράσεις ή σύμπλοκα που μπορούν να σχηματίσουν. Η πρωτεομική στοχεύει στην ανάλυση πολλών πρωτεϊνών κάθε φορά, σε αντίθεση με την παραδοσιακή ταυτοποίηση μιας πρωτεΐνης (Punia et al., 2020).

### **3.7.3 Χρωματογραφία**

Ο διαχωρισμός πεπτιδίων μπορεί να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας διαφορετικές χρωματογραφικές μεθόδους εξαιρετικά επιλεκτικές και παρέχουν διαχωρισμό υψηλής ανάλυσης όπως χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων (IEC) και χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (SEC). Το βασικό πρόβλημα είναι το υπερβολικό κόστος των τεχνικών αυτών και η διαχείριση των αποβλήτων διαλυτών. Ακριβώς όπως η πεπτιδομική, οι χρωματογραφικές τεχνικές έχουν επίσης ερευνητικές εφαρμογές και χρησιμοποιούνται ευρέως (Agyei et al., 2016; Punia et al., 2020)

### **3.7.4 Φασματομετρία Μάζας**

Οι καινοτομίες και οι ουσιαστικές βελτιώσεις έχουν οδηγήσει στην εξέλιξη πολλών διαφοροποιημένων αναλυτικών τεχνικών στον τομέα της αναλυτικής χημείας για την απομόνωση και τον καθαρισμό ενώσεων χαμηλής συγκέντρωσης. Μια τέτοια τεχνική υψηλής ευκρίνειας είναι η φασματομετρία μάζας (MS) που είναι ικανή να εκτελεί ανάλυση σύνθετων μιγμάτων ενώ ανιχνεύει πολλές διακριτές κατηγορίες αναλυτών σε ένα ευρύ φάσμα συγκεντρώσεων (Schrader et al., 2014). Τα δεδομένα που παράγονται μέσω του MS πρέπει να αναλυθούν χρησιμοποιώντας παραλλαγμένους αλγόριθμους, λογισμικό και βάσεις δεδομένων. Αυτές οι διάφορες πλατφόρμες ανάλυσης παρέχουν την επεξεργασία τεράστιων δεδομένων με αυτοματοποιημένο και χωρίς αποκλεισμούς τρόπο (Punia et al., 2020).



### **3.7.5 Ενζυμική Ανοσοροφητική Δοκιμασία (ELISA)**

Ο ανοσοπροσροφητικός προσδιορισμός (ELISA) είναι η πιο κοινή μέθοδος ανάλυσης των συστατικών του γάλακτος που βασίζεται σε ανοσοδοκιμασία και έχει πλεονεκτήματα χαμηλού κόστους, υψηλής ειδικότητας και γρήγορης χρήσης. Είναι εύκολη στο χειρισμό, αξιόπιστη, γρήγορη και αυτόματη διαδικασία (Bottero et al., 2002). Κυρίως, η παρουσία μη καταγεγραμμένου γάλακτος σε μεμονωμένα ζώα μπορεί να παρατηρηθεί με δύο απλές μεθόδους ELISA: ELISA σάντουιτς και έμμεση ELISA με τις διαφορετικές παραλλαγές τους. Η ανάπτυξη και η πρακτική χρήση των ανοσοενζυματικών προσεγγίσεων εξαρτώνται κυρίως από την αναγνώριση ανοσογόνων, πειραματικά μοντέλα, μεθόδους που βασίζονται στο ανοσοποιητικό, τη συνοχή των αντισωμάτων που χρησιμοποιούνται ή πιθανώς χρησιμοποιούνται, την ακρίβεια και την αξιοπιστία του μηχανισμού απόδειξης (Levieux & Venien, 1994) Το αγελαδινό και το κατσικίσιο γάλα μπορεί να δοκιμαστεί σε μείγματα γάλακτος χρησιμοποιώντας πολυκλωνικά και μονοκλωνικά αντισώματα που παράγονται για την καταπολέμηση πρωτεϊνών, καζεϊνών ή πρωτεϊνών ορού γάλακτος (Punia et al., 2020).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ - ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ, ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

### 4.1. Δειγματοληψία

Αρχικά, έγινε μία διαδικτυακή αναζήτηση για τα τυροκομεία της Περιφέρειας Θεσσαλίας τα οποία παράγουν τα ΠΟΠ τυροκομικά Κασέρι, Μανούρι και Μπάτζο. Η πλειοψηφία των τυροκομείων παράγει Κασέρι και Μανούρι, αλλά μόνο ένα παράγει Μπάτζο. Επιλέχθηκαν σημεία πώλησης τυροκομικών προϊόντων της πόλης της Λάρισας όπου είχαν Μπάτζο και εντοπίστηκαν τελικά 2 δείγματα Μπάτζου, ένα από παραγωγό της Λάρισας και ένα από παραγωγό των Γρεβενών. Επιπλέον επιλέχθηκαν 3 δείγματα Κασεριού και 3 δείγματα από Μανούρι θεσσαλικών τυροκομείων.

Τα δείγματα μετά την παραλαβή τους, διαχωρίστηκαν σε μικρότερα δοχεία, σημειώθηκε ο κωδικός του καθενός ξεχωριστά, για το Κασέρι «Κ», για το Μανούρι «Μ» και για τον Μπάτζο «ΜΡ» (Πίνακας 5). Έπειτα, η αποθήκευση έγινε σε κατάψυξη, στους -20°C, προκειμένου να διατηρηθούν αναλλοίωτα. Για κάθε ανάλυση γινόταν απόψυξη ενός δείγματος σε θερμοκρασία δωματίου ή στο ψυγείο από την προηγούμενη ημέρα.

ΚΑΣΕΡΙ	ΜΑΝΟΥΡΙ	ΜΠΑΤΖΟΣ
K_1	M_1	MP_1
K_2	M_2	MP_2
K_3	M_3	

**Πίνακας 5: Κωδικοί δειγμάτων.**

## 4.2 Πειραματική διαδικασία

Για την ανάλυση των δειγμάτων και τον προσδιορισμό των βιοπεπτιδίων πραγματοποιήθηκε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης και φασματομετρία μάζας (HPLC-MS). Χρησιμοποιήθηκε το όργανο Agilent 1200 series HPLC), με στήλη C18 (250 x 4,6 mm – 5,0 μm). Η HPLC ήταν συνδεδεμένη με το φασματόμετρο Agilent 6130 Quadrupole LC/MS (Εικ 16).



Εικόνα 16: HPLC (αριστερά) και LC/MS (δεξιά).

Για τα διαλύματα έκλουσης ή αλλιώς κινητές φάσεις (mobile phases) χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια:

- Υπερκάθαρο νερό (H<sub>2</sub>O, New P. Nix Power I, Human Corporation).
- Ακετονιτρίλιο (ACN, CHEM-LAB, Zedelgem, Belgium).
- Τριφθοροξικό οξύ (TFA, LABKEM, Barcelona, Spain).

Οι δύο κινητές φάσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- Mobile Phase A: H<sub>2</sub>O - TFA (0,1% v/v).
- Mobile Phase B: ACN - TFA (0,1% v/v).

Στα δείγματα από Μανούρι, λόγω της φύσης του προϊόντος, αρχικά εφαρμόστηκαν τέσσερις διαφορετικές μεθόδους επεξεργασίας του δείγματος μία από την βιβλιογραφία (Pritchard et al., 2010) και τρεις παραλλαγές, πιο συγκεκριμένα σχετικά με την εφαρμογή ή όχι θερμότητας καθώς και την αναλογία δείγματος-νερού κατά την διαδικασία της ομογενοποίηση (Πίνακας 6). Τελικά αποφασίστηκε ότι η αναλογία δείγματος – νερού 50-50 και η θέρμανση στους 40°C για 60 min είναι η καταλληλότερη.

Αριθμός μεθόδου	Ποσοστό δείγματος	Ποσοστό νερού	Θέρμανση στους 40°C
1	25	75	OXI
2	50	50	OXI
3	25	75	ΝΑΙ
4	50	50	ΝΑΙ

**Πίνακας 6: Μέθοδοι επεξεργασία δειγμάτων από Μανούρι.**

Τα δείγματα από το Κασέρι και τον Μπάτζο που προορίζονταν για ανάλυση με HPLC-MS, αφού έφτασαν σε θερμοκρασία δωματίου και τεμαχίστηκαν, ζυγίστηκαν σε ζυγό ακριβείας (25g) και αναμείχθηκαν με 75ml νερού στους 40°C με ανάδευση για 60 min (Pritchard et al., 2010),

Έπειτα όλα τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 4000 rpm (Heraeus MEGAFUGE 11R, Thermo Scientific), για 30 min στους 4°C. Αφού αφαιρέθηκε το στρώμα του λίπους από πάνω, το υπερκείμενο υγρό φυγοκεντρήθηκε δεύτερη φορά στις 4000 rpm, για 30 min στους 4°C και έπειτα πέρασε από φίλτρο σύριγγας 0,45 μm. Στην συνέχεια, μεταφέρθηκαν σε φιαλίδια κατάλληλα για την HPLC και αποθηκεύτηκαν στο ψυγείο μέχρι να γίνει η ανάλυση τους και έπειτα στην κατάψυξη όπου μπορούν να διατηρηθούν στους -20°C.

Οι ρυθμίσεις που έγιναν στην HPLC-MS ήταν:

- Όγκος έγχυσης δείγματος: 5  $\mu$ l
- Ρυθμός ροής: 0,5 ml/min
- Συνολική διάρκεια της μεθόδου: 50 min
- Μήκος κύματος σήματος: 220 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 7) καταγράφεται όλη η μέθοδος και οι αναλογίες των κινητών φάσεων σε συνάρτηση με τον χρόνο διάρκειας της μεθόδου.

Time (min)	Mobile Phase A (H <sub>2</sub> O/TFA)	Mobile Phase B (ACN/TFA)
0-10	100	0
10-20	75	25
20-30	50	50
30-40	25	75
Stop time 50 min		

**Πίνακας 7: Μέθοδος προγράμματος διαχωρισμού HPLC**

Μέσω προγράμματος, ήταν δυνατή η εξαγωγή των αναφορών των αποτελεσμάτων στις μορφές δεδομένων: TXT, XLS, CSV, DIF και PDF.

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.systemsbiology.net:8080/proteomicsToolkit/FragIonServlet.html>
- <https://mbpdb.nws.oregonstate.edu/>
- <https://biochemia.uwm.edu.pl/biopep-uwm/>
- <https://omicsbase.com/BioDADPep/biodadpep-search/>

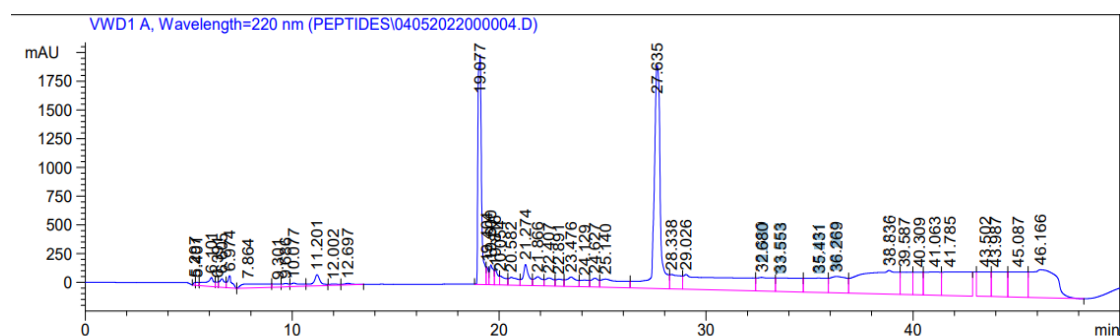
Προκειμένου να γίνει η ταυτοποίηση των πεπτιδίων με βάση τις μάζες στην εφαρμογή [web.expasy.org/findpept](https://web.expasy.org/findpept/) επιλέχθηκαν οι παράμετροι: [M+H]<sup>+</sup>, Average, Mass Tolerance  $\pm$  0.5, και για την επιβεβαίωση ύπαρξης των πεπτιδίων και των θραυσμάτων των πεπτιδίων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

Πρωτεΐνες	Πρόβειου γάλακτος	Κατσικίσιου γάλακτος
β-Καζεΐνη	P11839 (CASB_SHEEP)	P33048 (CASB_CAPHI)
κ-Καζεΐνη	P02669 (CASK_SHEEP)	P02670 (CASK_CAPHI)
α <sub>S1</sub> -Καζεΐνη	P04653 (CASA1_SHEEP)	P18626 (CASA1_CAPHI)
α <sub>S2</sub> -Καζεΐνη	P04654 (CASA2_SHEEP)	P33049 (CASA2_CAPHI)
β-λακτοσφαιρίνη	P67976 (LACB_SHEEP)	P02756 (LACB_CAPHI)
α-λακταλβουμίνη	P09462 (LALBA_SHEEP)	P00712 (LALBA_CAPHI)

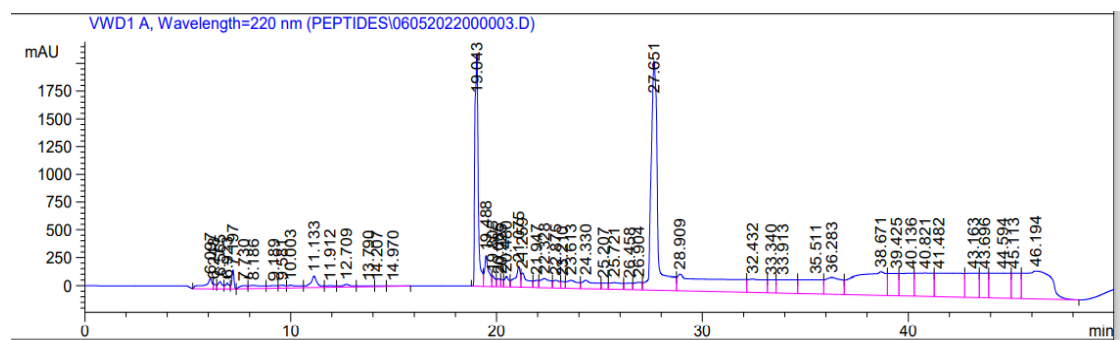
**Πίνακας 8:** Κωδικοί και ονόματα πρωτεϊνών UniProtKB.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΕΜΠΤΟ - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

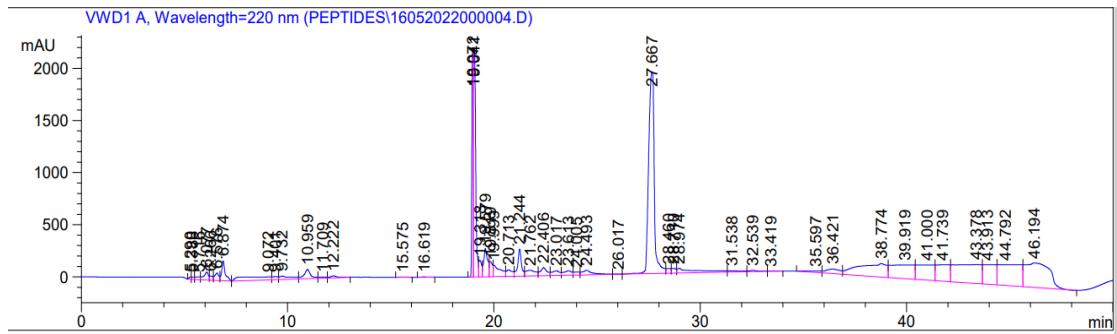
Από τα χρωματογραφήματα της HPLC που παρατίθενται παρακάτω, φαίνονται οι χρόνοι έκλυσης των πεπτιδίων κατά την διάρκεια της μεθόδου που ακολουθήθηκε και εντοπίζονται μικροδιαφορές και ομοιότητες μεταξύ των δειγμάτων ανά είδος τυριού, οι οποίες πιθανά οφείλονται στις διαφοροποιήσεις μεταξύ των τυροκομείων 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 (Εικ. 17-24).



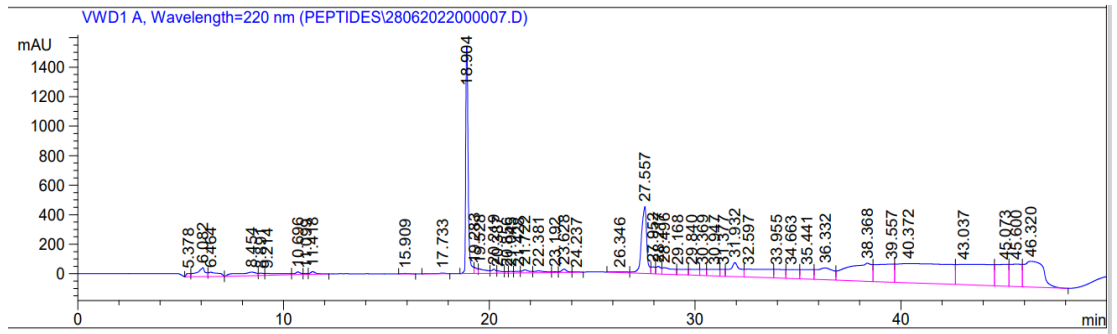
Εικόνα 17: Χρωματογράφημα του δείγματος K\_1.



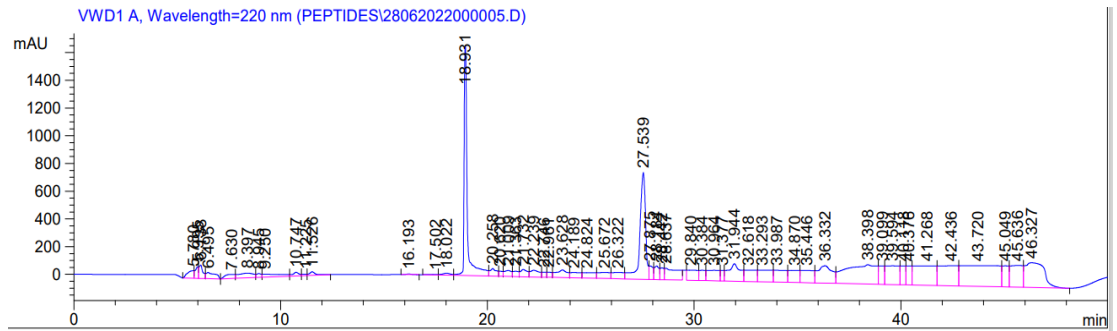
Εικόνα 18: Χρωματογράφημα του δείγματος K\_2.



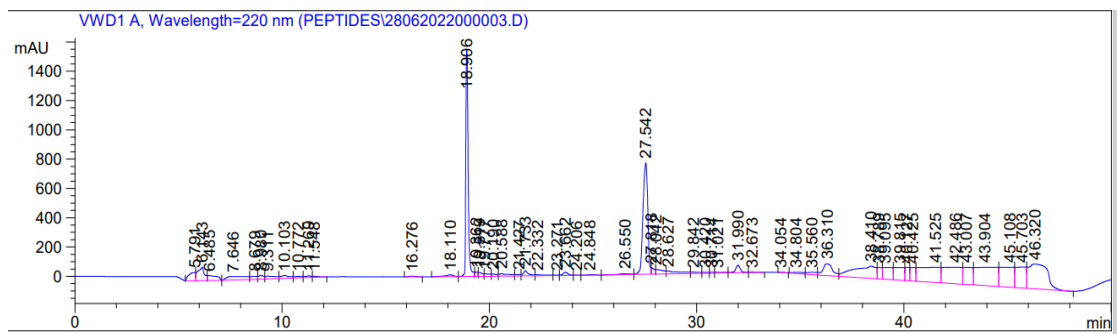
Εικόνα 19: Χρωματογράφημα του δείγματος K\_3.



Εικόνα 20: Χρωματογράφημα του δείγματος M\_1.

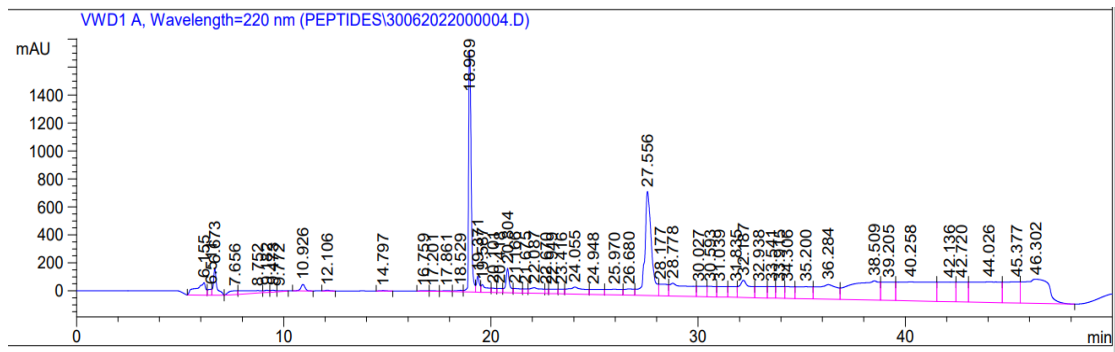


Εικόνα 21: Χρωματογράφημα του δείγματος M\_2.

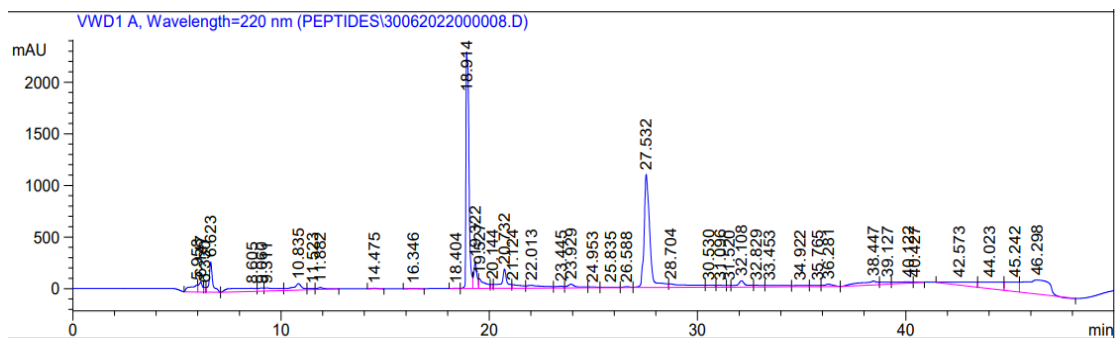


Εικόνα 22: Χρωματογράφημα του δείγματος M\_3.





**Εικόνα 23: Χρωματογράφημα του δείγματος MP\_1.**



**Εικόνα 24: Χρωματογράφημα του δείγματος MP\_2.**

Επιπλέον, από την ανάλυση, λαμβάνονται και οι μάζες των πεπτιδίων και των θραυσμάτων των πεπτιδίων που περιέχονται στα δείγματα. Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα και σύμφωνα με τις παραμέτρους που επιλέχθηκαν, το εύρος των μαζών είναι 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 7). Οι τιμές των μαζών που επαναλαμβάνονται αρκετές φορές απορρίπτονται είτε ως θόρυβος, είτε ως μάζες των κινητών φάσεων. Για παράδειγμα στην Εικ. 25, οι τιμές των μαζών απορρίπτονται διότι επαναλαμβάνονται συνεχώς κατά την διάρκεια της μεθόδου.

37.877	1702213	640.70 I
		639.80 I
		353.40 I
		352.40 I
		101.20 I
38.315	3587252	640.75 I
		639.80 I
		353.40 I
		352.40 I
		274.35 I
		101.15 I
38.667	1241735	640.75 I
		639.80 I
		353.40 I
		352.40 I
		101.20 I
38.857	723360	640.75 I
		639.80 I
		353.40 I
		352.40 I
		101.15 I
39.039	1713378	640.80 I
		639.80 I
		353.40 I
		352.40 I
		101.20 I
39.548	689816	640.75 I
		639.80 I
		353.40 I
		352.40 I
		101.20 I
39.704	979618	640.75 I
		639.80 I
		353.40 I
		352.45 I
		101.20 I

**Εικόνα 25:** Παράδειγμα των τιμών μαζών που επαναλαμβάνονται και απορρίπτονται από την ανάλυση.

Στις παρακάτω εικόνες καταγράφονται ενδεικτικά τα πεπτίδια και τα θραύσματα πεπτιδίων που εντοπίστηκαν στα δείγματα MP\_2 (από αιγοπρόβειο γάλα) (Εικ 26-27) 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 η θέση του θραύσματος, και τέλος στην έκτη στήλη η πρωτεϊνική του προέλευση.

Μάζα	Μάζα πεπτιδίου	Διαφορά μαζών	Αλληλουχία πεπτιδίου	Θραύσμα	Είδος πρωτεΐνης	Μάζα	Μάζα πεπτιδίου	Διαφορά μαζών	Αλληλουχία πεπτιδίου	Θραύσμα	Είδος πρωτεΐνης
839.000	838.979	-0.021	(Y)QEPVLGPV(R)	207-214	CASB_SHEEP	974.950	974.959	0.009	(G)AQEQNQEQ(R)	21-28	CASK_SHEEP
974.950	975.132	0.182	(H)QPPQLPPT(V)	161-169	CASB_SHEEP	974.950	975.043	0.092	(S)IASAPETNTA(Q)	176-185	CASK_SHEEP
974.950	975.172	0.222	(F)LLYQEPVL(G)	204-211	CASB_SHEEP	974.950	975.135	0.185	(Y)YQQRVAL(I)	64-71	CASK_SHEEP
974.950	975.190	0.240	(P)PFLQREIM(G)	101-108	CASB_SHEEP	1.382.850	1.382.601	-0.248	(A)LINNQFLPYP(Y)	71-81	CASK_SHEEP
1.110.900	1.111.329	0.429	(I)THINKKIEK(F)	39-47	CASB_SHEEP	1.382.850	1.382.648	-0.201	(Q)RVALINNOFLP(Y)	67-78	CASK_SHEEP
1.110.900	1.111.347	0.446	(P)LPVQSWMH(Q)	152-160	CASB_SHEEP	1.444.600	1.444.624	0.024	(Q)DKTEIPAINTIASA(E)	136-149	CASK_SHEEP
1.110.900	1.111.347	0.446	(V)PKHKEMPFP(K)	119-127	CASB_SHEEP	1.444.600	1.444.633	0.032	(Y)YQQRVALINNOQ(F)	64-75	CASK_SHEEP
1.246.900	1.247.301	0.400	(R)EQEELNVVGET(V)	17-27	CASB_SHEEP						
1.246.900	1.247.387	0.487	(E)LNVVGETVESLS(S)	21-32	CASB_SHEEP						
1.382.850	1.382.426	-0.424	(E)KFSSEEQQTE(D)	47-57	CASB_SHEEP						
1.382.850	1.382.426	-0.424	(I)EKFSSEEQQT(E)	46-56	CASB_SHEEP						
1.382.850	1.382.558	-0.291	(Y)PFTGPIPNLQPN(I)	76-88	CASB_SHEEP						
1.444.600	1.444.834	0.233	(I)MGVPKVETMVPK(H)	108-120	CASB_SHEEP						
Μάζα	Μάζα πεπτιδίου	Διαφορά μαζών	Αλληλουχία πεπτιδίου	Θραύσμα	Είδος πρωτεΐνης	Μάζα	Μάζα πεπτιδίου	Διαφορά μαζών	Αλληλουχία πεπτιδίου	Θραύσμα	Είδος πρωτεΐνης
491.000	490.533	-0.466	(Q)KEDV(P)	98-101	CASA1_SHEEP	839.000	839.003	0.002	(K)NMAIHPR(K)	41-47	CASA2_SHEEP
519.000	518.544	-0.456	(A)EEQL(H)	132-135	CASA1_SHEEP	839.000	839.024	0.024	(G)PIVLNPW(D)	119-125	CASA2_SHEEP
519.000	518.590	-0.409	(E)NSGKI(T)	205-209	CASA1_SHEEP	974.950	975.091	0.141	(I)NPFYQKF(P)	102-108	CASA2_SHEEP
567.000	566.588	-0.412	(Q)YTDAP(S)	188-192	CASA1_SHEEP	974.950	975.194	0.243	(H)PRKEKLT(T)	46-53	CASA2_SHEEP
567.000	566.594	-0.406	(G)NPAHQ(K)	142-146	CASA1_SHEEP	1.110.900	1.111.150	0.250	(L)STSEENSKT(I)	145-154	CASA2_SHEEP
703.000	702.742	-0.258	(E)DVPSE(R)	100-105	CASA1_SHEEP	1.246.900	1.247.393	0.492	(K)ITVDDKHQK(A)	87-96	CASA2_SHEEP
703.000	702.930	-0.070	(G)KITMPL(W)	208-213	CASA1_SHEEP	1.246.900	1.247.393	0.492	(V)KITVDDKHQK(K)	86-95	CASA2_SHEEP
839.000	838.935	-0.064	(N)SAEQYI(Q)	90-96	CASA1_SHEEP	1.382.850	1.382.429	-0.421	(V)RNADEEYSIR(S)	61-71	CASA2_SHEEP
839.000	838.984	-0.015	(P)QLFRQF(Y)	163-168	CASA1_SHEEP	1.382.850	1.382.521	-0.328	(L)NPWDQVQRNAGP(F)	123-134	CASA2_SHEEP
1.246.900	1.246.408	-0.491	(F)PEVFRKENIN(E)	44-53	CASA1_SHEEP	1.382.850	1.382.574	-0.276	(S)QEIVKQKNMA(I)	33-43	CASA2_SHEEP
1.246.900	1.246.453	-0.446	(Y)YFQLFRQF(Y)	160-168	CASA1_SHEEP	1.444.600	1.444.494	-0.105	(E)YSIRSSSESAEV(A)	68-80	CASA2_SHEEP
1.382.850	1.382.395	-0.455	(I)GSESIEDQAMEDA(K)	60-72	CASA1_SHEEP	1.444.600	1.444.578	-0.021	(A)EVAPEEVKITVDD(K)	79-91	CASA2_SHEEP
1.382.850	1.382.654	-0.195	(A)LARPKRPIKHQGL(L)	14-25	CASA1_SHEEP	1.444.600	1.444.629	0.029	(A)LNEINQFYQKF(P)	98-108	CASA2_SHEEP
1.382.850	1.382.654	-0.195	(L)ARPKRPIKHQGL(S)	15-26	CASA1_SHEEP	1.444.600	1.444.735	0.134	(H)QKAMKPWTQPK(N)	203-214	CASA2_SHEEP
1.444.600	1.444.627	0.027	(Q)GLSSEVLNENLLR(F)	25-37	CASA1_SHEEP						
1.444.600	1.444.686	0.085	(N)PIGSENSGKITMPL(W)	200-213	CASA1_SHEEP						
1.444.600	1.444.757	0.156	(R)LKYNVPQLEIV(P)	116-127	CASA1_SHEEP						
Μάζα	Μάζα πεπτιδίου	Διαφορά μαζών	Αλληλουχία πεπτιδίου	Θραύσμα	Είδος πρωτεΐνης	Μάζα	Μάζα πεπτιδίου	Διαφορά μαζών	Αλληλουχία πεπτιδίου	Θραύσμα	Είδος πρωτεΐνης
839.000	838.932	-0.067	(V)LVLDTDY(K)	111-117	LACB_SHEEP	491.000	490.533	-0.466	(A)EQLT(K)	20-23	LALBA_SHEEP
974.950	974.999	0.049	(E)NSAEPEQSL(A)	127-135	LACB_SHEEP	491.000	490.533	-0.466	(K)DLKD(Y)	33-36	LALBA_SHEEP
974.950	975.191	0.240	(L)ACGVQAIIVT(Q)	13-22	LACB_SHEEP	491.000	491.434	0.434	(K)DDQN(P)	82-85	LALBA_SHEEP
974.950	975.218	0.268	(D)YKYYLLF(C)	117-123	LACB_SHEEP	703.000	702.742	-0.258	(A)IVQNN(D)	60-65	LALBA_SHEEP
1.246.900	1.246.408	-0.491	(I)RLAFNPQTLEG(Q)	166-176	LACB_SHEEP	839.000	838.889	-0.111	(K)FLDDDLT(D)	99-105	LALBA_SHEEP
1.246.900	1.246.492	-0.408	(A)PLRVVVEELK(P)	56-65	LACB_SHEEP	839.000	838.935	-0.064	(L)KDLKDYG(G)	32-38	LALBA_SHEEP
1.246.900	1.246.492	-0.408	(P)LRVYVEELK(P)	57-66	LACB_SHEEP	839.000	838.935	-0.064	(L)KDYGGVSL(P)	35-42	LALBA_SHEEP
1.246.900	1.247.367	0.467	(A)GTWVHSLAMAASD(I)	35-46	LACB_SHEEP	839.000	838.935	-0.064	(D)LKDYGGVSL(L)	34-41	LALBA_SHEEP
1.444.600	1.444.604	0.004	(L)AFNPQTLEGQCHV	168-180	LACB_SHEEP	839.000	839.027	0.027	(Y)WLAHKA(C)	123-129	LALBA_SHEEP
1.444.600	1.444.624	0.024	(I)DALNENKVLVLDT(D)	103-115	LACB_SHEEP	974.950	975.259	0.308	(V)SLLVGLIF(H)	6-14	LALBA_SHEEP
1.444.600	1.444.624	0.024	(D)ALNENKVLVLDT(Y)	104-116	LACB_SHEEP	1.110.900	1.111.254	0.354	(K)CEVFQELKD(L)	25-33	LALBA_SHEEP
1.444.600	1.444.642	0.042	(W)HSLAMAASDSLDD(A)	38-51	LACB_SHEEP	1.382.850	1.382.426	-0.424	(T)QAIQVQNNSTDEY(G)	58-69	LALBA_SHEEP
1.444.600	1.444.670	0.070	(K)IPAVFKIDALNEN(K)	96-108	LACB_SHEEP	1.382.850	1.382.573	-0.276	(D)YGGVSLPEWVCTA(F)	37-49	LALBA_SHEEP
1.444.600	1.444.714	0.113	(A)PLRVVVEELKPT(P)	56-67	LACB_SHEEP	1.444.600	1.444.676	0.075	(L)DKVGINYWLAKIA	116-127	LALBA_SHEEP
1.444.600	1.444.714	0.113	(P)LRVYVEELKPT(E)	57-68	LACB_SHEEP						
1.444.600	1.444.757	0.156	(E)ALEKFDKALKALP(M)	150-162	LACB_SHEEP						
1.444.600	1.444.800	0.200	(E)KTKIPAVFKIDAL(N)	93-105	LACB_SHEEP						

Εικόνα 26: Πεπτίδια δείγματος MP\_2 β-καζεΐνης, κ-καζεΐνης, αs1- καζεΐνης, αs2- καζεΐνης, β-λακτοσφαιρίνης και α-λακταλβουμίνης πρόβειου γάλακτος.





Πεπτίδια καθώς και θραύσματα αυτών ανιχνεύτηκαν στα δείγματα που αναλύθηκαν με την μέθοδο HPLC.MS. Παρατηρείται πως αρκετά από τα πεπτίδια που προσδιορίστηκαν μέσω της μάζας είναι ίδια στις πρωτεΐνες του πρόβειου και του κατσικίσιου γάλακτος. Παρόλα αυτά, υπάρχουν και πεπτίδια που δεν είναι κοινά. Επίσης, η παρουσία κάποιου θραύσματος πεπτιδίου, πιθανότατα υποδηλώνει και την παρουσία του πεπτιδίου στα δείγματα, ακόμα και μάζας μεγαλύτερης των 2000m/z που μετρήθηκαν στο εργαστήριο.

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 βιοδραστητικότητα τους σε βιβλιογραφικές πηγές. Στους πίνακες που ακολουθούν καταγράφονται τα βιοπεπτίδια που εντοπίστηκαν στα δείγματα - από Κασέρι (Πίνακες 9-11), από Μανούρι (Πίνακες 12-14) και από Μπάτζο (Πίνακες 15-16) - 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 βιοδραστητικότητα των βιοπεπτιδίων εφόσον είναι διαθέσιμη.

Αλληλουχία πεπτιδίου	Πρωτεΐνη	Θραύσμα	Μάζα πεπτιδίου/ θραύσματος (Da)	Είδος γάλακτος	Βιοδραστικότητα	Αναφορά
NAGPFTPT	CASA2_SHEEP/ CASA2_CAPHI	131-138	803.800	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	Antibacterial	(LopezExposito et al., 2006)
NENLLR	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	32-37	758.852	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
ENLLRF	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	33-38	790.900	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	ACE inhibitory	(Quirós et al., 2005)
IVLNPWDQVKRNAGPF	CASA2_SHEEP/ CASA2_CAPHI	123-130	1.854.200	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	Antidiabetic	(Gong et al., 2020)
NPWDQVKRNAGP	CASA2_SHEEP/ CASA2_CAPHI	123-134	1.382.521	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
TQTPVVVPPFLQPEIMG	CASB_SHEEP / CASB_CAPHI	93-109	1.854.214	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
PPFLQPEI	CASB_SHEEP / CASB_CAPHI	100-107	941.114	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
VVVPFLQ	CASB_SHEEP / CASB_CAPHI	97-104	899.121	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
TQTPVVVP	CASB_SHEEP / CASB_CAPHI	93-100	840.995	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	DPP-IV inhibitory	(Nongonierma et al., 2017)
PPFLQPE	CASB_SHEEP / CASB_CAPHI	100-106	827.955	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	Antioxidant	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności”)
FL	CASB_SHEEP / CASB_CAPHI	102-103	279.359	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	DPP-IV inhibitory	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności”)
QVKRNAGPFTPTVNRE	CASA2_SHEEP/ CASA2_CAPHI	127-142	1.815.042	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-

QVQRNA	CASA2_SHEEP/ CASA2_CAPHI	127-132	715.830	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
PTVNRE	CASA2_SHEEP/ CASA2_CAPHI	137-142	715.784	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
PTVNR	CASA2_SHEEP/ CASA2_CAPHI	137-141	586.668	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
PTVN	CASA2_SHEEP/ CASA2_CAPHI	137-140	430.481	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
FT	CASA2_SHEEP/ CASA2_CAPHI	135-136	267.304	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	renin inhibitor	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności”)
KFQSEEQQTED	CASB_SHEEP / CASB_CAPHI	47-58	1.497.515	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
KFQSEEQQTE	CASB_SHEEP / CASB_CAPHI	47-57	1.382.426	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	DPP-IV inhibitory	(Nongonierma et al., 2017)
AIPPKDQDKT	CASK_SHEEP / CASK_CAPHI	128-138	1.241.430	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
IPPKDQD	CASK_SHEEP / CASK_CAPHI	129-136	941.072	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
PKKDQDK	CASK_SHEEP / CASK_CAPHI	131-137	858.970	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
PPKKDQD	CASK_SHEEP / CASK_CAPHI	130-136	827.912	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
KDQDK	CASK_SHEEP / CASK_CAPHI	133-137	633.320	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	antithrombotic	(Qian et al., 1995)
IPPKK	CASK_SHEEP / CASK_CAPHI	129-133	582.764	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-

DQD	CASK_SHEEP / CASK_CAPHI	134-136	377.331	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
-----	----------------------------	---------	---------	------------------------	---	---

**Πίνακας 9: Βιοπεπτίδια δείγματος K\_1.**

Αλληλουχία πεπτιδίου	Πρωτεΐνη	Θραύσμα	Μάζα πεπτιδίου/ θραύσματος (Da)	Είδος γάλακτος	Βιοδραστικότητα	Αναφορά
INKKIEKFAQSEEQQQ	CASB_SHEEP / CASB_CAPHI	41-55	1.878.092	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
IEKFAQSEEQ	CASB_SHEEP / CASB_CAPHI	45-53	1.138.219	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	DPP-IV inhibitory	(Nongonierma et al., 2017)
FQSEE	CASB_SHEEP / CASB_CAPHI	48-52	639.639	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
KFAQSE	CASB_SHEEP / CASB_CAPHI	47-51	638.698	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
EKFQS	CASB_SHEEP / CASB_CAPHI	46-50	638.698	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
EKFQ	CASB_SHEEP / CASB_CAPHI	46-49	551.620	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
KFQS	CASB_SHEEP / CASB_CAPHI	47-50	509.582	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
INK	CASB_SHEEP / CASB_CAPHI	41-43	374.460	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
SEE	CASB_SHEEP / CASB_CAPHI	50-52	364.332	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-



QSE	CASB_SHEEP / CASB_CAPHI	49-51	363.347	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
HKEMPFPKYPVEP	CASB_SHEEP / CASB_CAPHI	121-133	1.599.888	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	DPP-IV inhibitory	(Nongonierma et al., 2017)
HKE	CASB_SHEEP / CASB_CAPHI	121-123	413.453	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
PFP	CASB_SHEEP / CASB_CAPHI	125-127	360.433	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	ACE inhibitory	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności”)
LSFMAIPPKDQD	CASK_SHEEP / CASK_CAPHI	124-136	1.490.757	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	antithrombotic	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności”)
IPPKDQ	CASK_SHEEP / CASK_CAPHI	129-135	825.983	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
AIPPK	CASK_SHEEP / CASK_CAPHI	128-132	525.668	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
QFYQKFPQYLQ	CASA2_SHEEP/ CASA2_CAPHI	103-113	1.490.701	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
YQKFPQY	CASA2_SHEEP/ CASA2_CAPHI	105-111	974.103	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	ACE inhibitory	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności”)
EKFDKALKALPMHIR	LALBA_SHEEP / LALBA_CAPHI	152-166	1.798.199	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
EKFDKA	LALBA_SHEEP / LALBA_CAPHI	152-157	737.830	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-

KALPM	LALBA_SHEEP / LALBA_CAPHI	159-163	559.744	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	DPP-IV inhibitory	(Lacroix, Meng, Cheung, & Li-Chan, 2016)
LPM	LALBA_SHEEP / LALBA_CAPHI	161-163	360.491	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	Antioxidant	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności”)
LKA	LALBA_SHEEP / LALBA_CAPHI	158-160	331.435	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	ACE inhibitory	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności”)
CC	CASK_SHEEP / CASK_CAPHI	31-32	225.300	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-

**Πίνακας 10: Βιοπεπτίδια δείγματος K\_2.**

Αλληλουχία πεπτιδίου	Πρωτεΐνη	Θραύσμα	Μάζα πεπτιδίου/ θραύσματος (Da)	Είδος γάλακτος	Βιοδραστικότητα	Αναφορά
AQSLVYPFTGPIPNLSP	CASB_SHEEP / CASB_CAPHI	70-86	1.802.080	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
TGPIPN	CASB_SHEEP / CASB_CAPHI	78-83	597.652	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	ACE-inhibitory	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności”)
DAYPSGAWYYLPLGTQY	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	172-188	1.966.156	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
YLPLG	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	181-185	562.686	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-

LPL	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	182-184	342.458	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	DPP-IV inhibitory	(Lacroix, Meng, Cheung, & Li- Chan, 2016)
GTQ	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	185-187	305.310	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
QKEDVPSERYLGYLEQL	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI		2.067.263	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	PEP inhibitor, antiamnestic	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności”)
PSERYLGY	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	102-109	985.084	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
SERYLGY	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	103-109	887.967	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
RYLGY	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	105-109	671.773	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	ACE inhibitory	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności”)
RY	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	105-106	338.386	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	Antioxidant, ACE inhibitory	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności”)
KTKIPAVFKIDALNEN	LACB_SHEEP/ LACB_CAPHI	93-108	1.802.123	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
IPAVFKIDA	LACB_SHEEP/ LACB_CAPHI	96-104	1.086.655	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	DPP-IV inhibitory	(Lacroix et al., 2014)
IPAVFK	LACB_SHEEP/ LACB_CAPHI		673.403	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	ACE inhibitor, DPP-IV inhibitory	(Silveira et al., 2013)
VFKID	LACB_SHEEP/ LACB_CAPHI	99-103	621.754	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-

AVFK	LACB_SHEEP/ LACB_CAPHI	98-101	464.585	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
KTK	LACB_SHEEP/ LACB_CAPHI	93-95	376.476	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
NEN	LACB_SHEEP/ LACB_CAPHI	106-108	376.346	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	Antioxidant	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności”)
QYVLSRY	CASK_SHEEP / CASK_CAPHI	50-56	929.063	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
RY	CASK_SHEEP / CASK_CAPHI	55-56	338.386	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	Antioxidant, ACE inhibitory	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności”)
TIASAEPTVHSTPTTEAIV	CASK_SHEEP / CASK_CAPHI	145-163	1.925.116	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	PEP inhibitor , antiamnestic	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności”)
ASAEPTVHSTPT	CASK_SHEEP / CASK_CAPHI	147-158	1.198.275	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
SAEPTVHST	CASK_SHEEP / CASK_CAPHI	148-156	928.974	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
SAE	CASK_SHEEP / CASK_CAPHI	148-150	306.295	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
RELEELNVPGEIVESLSSEESITRINK	CASB_SHEEP / CASB_CAPHI	16-43	3.158.470	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	immunomodulating	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności”)

RELEELNVPGEIVESLSSEESITR	CASB_SHEEP / CASB_CAPHI	16-40	2.803.032	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	binding	("BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności")
IVESLSSEESITR	CASB_SHEEP / CASB_CAPHI	27-40	1.537.663	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	DPP-IV inhibitory	(Nongonierma et al., 2017)
VESLSSEE	CASB_SHEEP / CASB_CAPHI	28-36	966.974	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
LTQTPVVVPPF	CASB_SHEEP / CASB_CAPHI	92-102	1.198.447	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	DPP-IV inhibitory	(Nongonierma et al., 2017)
QTPVVVPPF	CASB_SHEEP / CASB_CAPHI	94-102	984.183	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
VPLGTQYTDAPSFSDIP	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	182-198	1.807.961	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	PEP inhibitor	("BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności")
QYTDAPSF	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	187-194	928.973	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
YTDAPSFS	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	188-195	887.921	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
TQYTDA	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	186-191	698.707	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
QYTDA	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	187-191	597.602	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
TDAPS	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	189-193	490.490	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
TDA	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	189-191	306.295	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-

LPL	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	182-184	342.458	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	DPP-IV inhibitory	(Lacroix, Meng, Cheung, & Li- Chan, 2016)
-----	-----------------------------	---------	---------	------------------------	-------------------	---

**Πίνακας 11: Βιοπεπτίδια δείγματος K\_3.**

Αλληλουχία πεπτιδίου	Πρωτεΐνη	Θραύσμα	Μάζα πεπτιδίου/ θραύσματος (Da)	Είδος γάλακτος	Βιοδραστικότητα	Αναφορά
VPSERY	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	101-106	749.804	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	ACE inhibitory	(Ruiz, Ramos & Recio, 2004)
VPSE	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	101-104	431.466	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
SE	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	103-104	235.216	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	stimulating	(“BIOPEP- UWM – Katedra Biochemii Żywności”)
VP	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	101-102	215.272	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	ACE inhibitory	(“BIOPEP- UWM – Katedra Biochemii Żywności”)
YIQKEDVPSERYLGY	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	95-109	1.861.061	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
VPSE	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	101-104	431.466	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-

YLG	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	106-108	352.410	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	Antioxidant	("BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności")
LGY	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	107-109	352.400	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	antioxidant, ACE inhibitory	("BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności")
YL	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	106-107	295.358	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	DPP-III inhibitor	("BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności")
KE	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	98-99	276.312	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	DPP-IV inhibitory	("BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności")
IQ	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	96-97	260.313	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	DPP-IV inhibitory	("BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności")
SE	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	103-104	235.216	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	stimulating	("BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności")
PQPLPPT	CASB_SHEEP	163-169	749.885	Πρόβειο	-	-
QPLPPT	CASB_SHEEP	164-169	652.366	Πρόβειο	DPP-IV inhibitory	(Nongonierma & FitzGerald, 2016)
QPLP	CASB_SHEEP	164-167	454.546	Πρόβειο	-	-
VEELKPTPEGDLEIL	LACB_SHEEP/ LACB_CAPHI	61-75	1.681.891	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	binding	("BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności")
VEELKP	LACB_SHEEP/ LACB_CAPHI	61-66	714.836	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
EELK	LACB_SHEEP/ LACB_CAPHI	62-65	518.587	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-

EE	LACB_SHEEP/ LACB_CAPHI	62-63	277.254	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	stimulating	("BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności")
LK	LACB_SHEEP/ LACB_CAPHI	64-65	260.356	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	Antioxidant	("BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności")
ETMVPKHKEMPFKYP	CASB_SHEEP / CASB_CAPHI	115-130	1.960.359	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
HKEMPFKYP	CASB_SHEEP / CASB_CAPHI	121-130	1.273.640	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	DPP-IV inhibitory	("BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności")
VPKHKEMPF	CASB_SHEEP / CASB_CAPHI	118-126	1.113.363	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
EMPFKY	CASB_SHEEP / CASB_CAPHI	123-129	912.091	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
KHKE	CASB_SHEEP / CASB_CAPHI	120-123	541.627	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
PKH	CASB_SHEEP / CASB_CAPHI	119-121	381.455	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
EMP	CASB_SHEEP / CASB_CAPHI	123-125	376.447	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
KE	CASB_SHEEP / CASB_CAPHI	122-123	276.312	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	DPP-IV inhibitory	("BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności")
EIVPNSAEERLH	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	87-96	1.393.511	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	ACE inhibitory	("BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności")
IVPNS	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	86-90	529.613	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-



PNS	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	88-90	317.321	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
PN	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	88-89	230.243	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	DPP-IV inhibitory	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności”)
AE	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	91-92	219.217	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	DPP-IV inhibitory	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności”)
WCKDDQNPHS	LALBA_SHEEP / LALBA_CAPHI	79-88	1.229.500	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	DPP-IV inhibitory	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności”)
CKDDQNPH	LALBA_SHEEP / LALBA_CAPHI	80-87	957.005	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
CKD	LALBA_SHEEP / LALBA_CAPHI	80-82	365.424	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
WC	LALBA_SHEEP / LALBA_CAPHI	79-80	308.375	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	DPP-IV inhibitory	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności”)
PH	LALBA_SHEEP / LALBA_CAPHI	86-87	253.280	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	ACE inhibitory	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności”)
CK	LALBA_SHEEP / LALBA_CAPHI	80-81	250.336	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-

HS	LALBA_SHEEP / LALBA_CAPHI	87-88	243.242	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	DPP-IV inhibitory	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności”)
NP	LALBA_SHEEP / LALBA_CAPHI	85-86	230.243	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	DPP-IV inhibitory	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności”)

**Πίνακας 12: Βιοπεπτίδια δείγματος M\_1.**

Αλληλουχία πεπτιδίου	Πρωτεΐνη	Θραύσμα	Μάζα πεπτιδίου/ θραύσματος (Da)	Είδος γάλακτος	Βιοδραστικότητα	Αναφορά
QKEDVPSERYLGYLEQL	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	98-113	2.067.263	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	antiamnestic, PEP inhibitor	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności”)
YIQKEDVPSERYLGY	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	95-109	1.861.061	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
VPSERYLG	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	101-108	921.040	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
VPSERYL	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	101-107	863.989	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
PSERYLG	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	102-108	821.908	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
IQKED	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	96-100	632.691	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-

VPSE	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	101-104	431.466	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
YLG	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	106-108	352.410	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	Antioxidant	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności”)
LGY	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	107-109	352.400	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	antioxidant, ACE inhibitory	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności”)
YL	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	106-107	295.358	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	DPP-III inhibitor	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności”)
KE	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	98-99	276.312	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	DPP-IV inhibitory	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności”)
IQ	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	96-97	260.313	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	DPP-IV inhibitory	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności”)
SE	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	103-104	235.216	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	stimulating	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności”)
KAGSSSSSEEIVPNSAEQ	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	76-93	1.807.865	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
KAGSSSSSEEIVPNS	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	76-90	1.479.540	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
SSSSSEEIVPNSA	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	79-91	1.294.314	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
SEEIVPNSAE	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	83-92	1.075.117	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-

KAGSSSSS	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	76-83	710.718	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
VPNSAEQ	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	87-93	744.779	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
SSSSSE	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	79-84	583.529	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
SSSSE	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	80-84	496.451	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
SSSSS	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	79-83	454.414	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
EQ	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	92-93	276.269	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
KA	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	76-77	218.276	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	DPP-IV inhibitory	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności”)
AE	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	91-92	219.217	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	DPP-IV inhibitory	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności”)
VDQHQAAMKPWTQPK TNAIPYVRYL	CASA2_SHEEP/ CASA2_CAPHI	199-223	3.013.494	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	antibacterial	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności”)
HQKAMKPWTQPKTNA	CASA2_SHEEP/ CASA2_CAPHI	202-216	1.765.917	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
QPKTNAIPYVR	CASA2_SHEEP/ CASA2_CAPHI	211-221	1.286.722	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
KAMKPWTQP	CASA2_SHEEP/ CASA2_CAPHI	204-212	1.086.576	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-

AMKPWTQPK	CASA2_SHEEP/ CASA2_CAPHI	205-213	1.086.576	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
PYVRYL	CASA2_SHEEP/ CASA2_CAPHI	218-223	809.431	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	Antioxidant, ACE inhibitor	(Quirós et al., 2005)
PYVRY	CASA2_SHEEP/ CASA2_CAPHI	218-222	697.367	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
QHQA	CASA2_SHEEP/ CASA2_CAPHI	201-205	611.326	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
QPK	CASA2_SHEEP/ CASA2_CAPHI	211-213	372.224	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
KTN	CASA2_SHEEP/ CASA2_CAPHI	213-215	362.203	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
NAI	CASA2_SHEEP/ CASA2_CAPHI	215-217	317.182	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
YL	CASA2_SHEEP/ CASA2_CAPHI	222-223	295.165	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	ACE inhibitory	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności”)
QK	CASA2_SHEEP/ CASA2_CAPHI	203-204	275.171	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	ACE inhibitory	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności”)
TQ	CASA2_SHEEP/ CASA2_CAPHI	210-211	248.124	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	ACE inhibitory	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności”)
KT	CASA2_SHEEP/ CASA2_CAPHI	213-214	248.160	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	DPP-IV inhibitory	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności”)
VD	CASA2_SHEEP/ CASA2_CAPHI	199-200	233.113	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	DPP-IV inhibitory	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii

						Żywności’)
KA	CASA2_SHEEP/ CASA2_CAPHI	204-205	218.150	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	DPP-IV inhibitory	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności’)
NA	CASA2_SHEEP/ CASA2_CAPHI	215-216	204.098	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	DPP-IV inhibitory	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności’)
AI	CASA2_SHEEP/ CASA2_CAPHI	216-217	203.139	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	ACE inhibitory	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności’)

**Πίνακας 13: Βιοπεπτίδια δείγματος M\_2.**

Αλληλουχία πεπτιδίου	Πρωτεΐνη	Θραύσμα	Μάζα πεπτιδίου/ θραύσματος (Da)	Είδος γάλακτος	Βιοδραστικότητα	Αναφορά
TSEENSKKTIDM EST	CASA2_SHEEP / CASA2_CAPHI	146-160	1.700.812	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
MES	CASA2_SHEEP / CASA2_CAPHI	157-159	366.409	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
ENS	CASA2_SHEEP / CASA2_CAPHI	149-151	349.320	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
SAPETNTAQVTS	CASK_SHEEP	178-189	1.206.251	Πρόβειο	-	-

SAPET	CASK_SHEEP	178-182	504.517	Πρόβειο	-	-
AQV	CASK_SHEEP	185-187	317.365	Πρόβειο	-	-
NTA	CASK_SHEEP	183-185	305.310	Πρόβειο	-	-
AQ	CASK_SHEEP	185-186	218.232	Πρόβειο	-	-
TAQVTST	CASK_SHEEP / CASK_CAPHI	184-190	707.758	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	antithrombotic	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności”)
VTST	CASK_SHEEP / CASK_CAPHI	187-190	407.444	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
VPSERY	CASA1_SHEEP	101-106	750.900	Πρόβειο	ACE inhibitory	(Ruiz, Ramos & Recio, 2004)
MHQPPQPL	CASB_SHEEP / CASB_CAPHI	159-166	947.106	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	DPP-IV inhibitory	(Zhang, Chen, Ma, & Chen, 2015)
HQP	CASB_SHEEP / CASB_CAPHI	160-162	381.411	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-

**Πίνακας 14: Βιοπεπτίδια δείγματος M\_3.**

Αλληλουχία πεπτιδίου	Πρωτεΐνη	Θραύσμα	Μάζα πεπτιδίου/ θραύσματος (Da)	Είδος γάλακτος	Βιοδραστικότητα	Αναφορά
VALALAREQEELNVV	CASB_SHEEP / CASB_CAPHI	10-24	1.654.904	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
EELNVV	CASB_SHEEP / CASB_CAPHI	19-24	702.782	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-

NVV	CASB_SHEEP / CASB_CAPHI	22-24	331.392	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
QAIVQNNDSTEY	LALBA_SHEEP / LALBA_CAPHI	58-69	1.382.426	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
QAI	LALBA_SHEEP / LALBA_CAPHI	58-60	331.392	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
FYPQLFRQF	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	160-168	1.246.453	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
QLFRQF	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	163-168	838.984	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
QF	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	167-168	294.100	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	renin inhibitor	("BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności")
PRKEKLCT	CASA2_SHEEP/ CASA2_CAPHI	46-53	975.194	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
LCT	CASA2_SHEEP/ CASA2_CAPHI	51-53	336.426	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
NPAHQ	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	142-146	566.594	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
NP	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	142-143	212.228	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	DPP-IV inhibitory	("BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności")
NAVPA	CASK_SHEEP / CASK_CAPHI	102-106	471.533	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-



NA	CASK_SHEEP / CASK_CAPHI	102-103	204.205	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	DPP-IV inhibitory	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności”)
VPKS	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	127-130	430.524	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
PKS	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	128-130	331.392	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
THINKKIEK	CASB_SHEEP / CASB_CAPHI	39-47	1.111.329	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
EK	CASB_SHEEP / CASB_CAPHI	46-47	276.312	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	ACE inhibitory, DPP-IV inhibitory	(Zhao et al, 2021)
KI	CASB_SHEEP / CASB_CAPHI	44-45	260.100	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	DPP-IV inhibitory	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności”)
KHKE	CASB_SHEEP / CASB_CAPHI	120-123	541.627	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
KE	CASB_SHEEP / CASB_CAPHI	122-123	276.312	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	DPP-IV inhibitory	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności”)
LPLGT	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	182-186	500.615	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
GT	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	185-186	177.100	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	ACE inhibitory	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności”)

**Πίνακας 15: Βιοπεπτίδια δείγματος MP\_1.**

Αλληλουχία πεπτιδίου	Πρωτεΐνη	Θραύσμα	Μάζα πεπτιδίου/ θραύσματος (Da)	Είδος γάλακτος	Βιοδραστικότητα	Αναφορά
QAIVQNNDSTEY	LALBA_SHEEP / LALBA_CAPHI	58-69	1.382.426	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
QAIV	LALBA_SHEEP / LALBA_CAPHI	58-61	430.524	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
QAI	LALBA_SHEEP / LALBA_CAPHI	58-60	331.392	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
ST	LALBA_SHEEP / LALBA_CAPHI	66-67	207.206	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	ACE inhibitory	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności”)
AI	LALBA_SHEEP / LALBA_CAPHI	59-60	203.100	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	ACE inhibitory	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności”)
FYPQLFRQF	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	160-168	1.246.453	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-

QLFRQF	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	163-168	838.984	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
THINKKIEK	CASB_SHEEP / CASB_CAPHI	39-47	1.111.329	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
HIN	CASB_SHEEP / CASB_CAPHI	40-42	383.427	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
EK	CASB_SHEEP / CASB_CAPHI	46-47	276.312	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	ACE inhibitory, DPP-IV inhibitory	(Zhao et al, 2021)
PIGSENSGKITMPL	CASA1_SHEEP	200-213	1.444.686	Πρόβειο	-	-
KITMPL	CASA1_SHEEP	208-213	702.930	Πρόβειο	-	-
NSGKI	CASA1_SHEEP	205-209	518.590	Πρόβειο	-	-
IGS	CASA1_SHEEP	201-203	276.312	Πρόβειο	-	-
SE	CASA1_SHEEP	203-204	235.216	Πρόβειο	stimulating	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności”)
QPPQPLPPT	CASB_SHEEP	161-169	975.132	Πρόβειο	-	-
QPPQP	CASB_SHEEP	161-165	566.634	Πρόβειο	-	-
CLVAVALARPKHPIKHQGLP	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	8 27	2.165.497	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	antiamnestic	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności”)
VAVAL	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	10 14	472.605	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
VAV	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	10 12	288.367	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	ACE inhibitory	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności”)

IASAE	CASK_SHEEP / CASK_CAPHI	146-150	490.533	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	-	-
AS	CASK_SHEEP / CASK_CAPHI	147-148	177.180	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	DPP-IV inhibitory	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności”)
YLG	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	106-108	352.410	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	anxiolytic-like peptide	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności”)
YL	CASA1_SHEEP/ CASA1_CAPHI	106-107	295.358	Πρόβειο/ Κατσικίσιο	ACE inhibitory	(“BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności”)

**Πίνακας 16: Βιοπεπτίδια δείγματος MP\_2.**

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΤΟ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ & ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στα δείγματα που αναλύθηκαν βρέθηκαν συνολικά 86, 85 και 41 πεπτίδια για το Κασέρι, Μανούρι και Μπάτζο αντιστοίχως. Από αυτά, το 36% κατά μέσο όρο είναι βιοπεπτίδια με γνωστή λειτουργική δράση ενώ για τα υπόλοιπα δεν γίνεται κάποια βιβλιογραφική αναφορά σε άρθρα και στις βιβλιοθήκες που αναφέρθηκαν στα προηγούμενα κεφάλαια.

Πιο συγκεκριμένα για το Κασέρι βρέθηκαν 31 βιοπεπτίδια (Πίνακας 17) και 55 πεπτίδια που βιβλιογραφικά δεν έχουν αναφερθεί. Από τα βιοπεπτίδια, σχεδόν το ένα τρίτο (32,3%) δρουν ως αναστολείς της DPP-IV, το 19,4% ως αναστολείς του ενζύμου ACE, το 13% έχουν πολλαπλή δράση και το 9,7% έχουν αντιοξειδωτική δράση. Από τα υπόλοιπα βρέθηκαν 2 βιοπεπτίδια με αντιθρομβωτική δράση και από ένα με αντιβακτηριδιακή, αντιδιαβητική, δέσμευσης μετάλλων, αναστολείς της PEP, ανοσοτροποποιητικό και αναστολέας ρενίνης δράση.

Επιπλέον τα βιοπεπτίδια RY (πολλαπλή δράση ως αντιοξειδωτικό και αναστολέας του ενζύμου ACE) και LPL (αναστολέας της DPP-IV) εμφανίζονται στα 2 από τα τρία δείγματα.

Βιοδραστικότητα	Βιοπεπτίδια	Ποσοστό %
DPP-IV inhibitory	10	32,3
ACE inhibitory	6	19,4
Πολλαπλή δράση	4	12,9
Antioxidant	3	9,7
Antithrombotic	2	6,5
Antidiabetic	1	3,2
Antioxidant, ACE inhibitory	1	3,2
Antibacterial	1	3,2
Metal binding	1	3,2
immunomodulating	1	3,2
PEP inhibitor	1	3,2
Σύνολο	31	100

Πίνακας 17: Ποσοστά πεπτιδίων με βάση την βιοδραστικότητά τους στο Κασέρι.

Όσο αφορά το Μανούρι, από τα 85 πεπτίδια που βρέθηκαν τα 34 είναι βιοπεπτίδια γνωστά για την δράση τους (Πίνακας 18) και 51 πεπτίδια που δεν είναι γνωστά η δράση τους. Από τα βιοπεπτίδια, το 44% δρουν ως αναστολείς της DPP-IV, το 20,6 % ως αναστολείς του ενζύμου ACE και το 11,8 % έχουν πολλαπλή δράση. Από τα υπόλοιπα βρέθηκαν 2 βιοπεπτίδια με αντιοξειδωτική δράση, δύο με διεγερτική δράση και από ένα με αντιθρομβωτική, αντιβακτηριδιακή, δέσμευσης μετάλλων και αναστολείς της DPP-III

<b>Βιοδραστικότητα</b>	<b>Βιοπεπτίδια</b>	<b>Ποσοστό %</b>
DPP-IV inhibitory	15	44,1
ACE inhibitory	7	20,6
Πολλαπλή δράση	4	11,8
Stimulating	2	5,9
Antioxidant	2	5,9
Metal binding	1	2,9
DPP - III inhibitor	1	2,9
Antithrombotic	1	2,9
Antibacterial	1	2,9
Σύνολο	34	100,0

**Πίνακας 18: Ποσοστά πεπτιδίων με βάση την βιοδραστικότητα τους στο Μανούρι.**

Τα βιοπεπτίδια SE (διεγερτικό), KE (αναστολείς της DPP-IV), YL (αναστολείς της DPP-III και ACE) και VPSE επαληθεύονται στο 100% των δειγμάτων. Το τελευταίο βιοπεπτίδιο δεν έχει γνωστή βιολογική δράση. Επιπλέον, τα βιοπεπτίδια VPSERY (αναστολέας του ενζύμου ACE), YLG, LGY (αντιοξειδωτικά) και AE, IQ (αναστολείς της DPP-IV) εντοπίζονται σε δύο από τα τρία δείγματα από το τυρί Μανούρι.

Τέλος για τον Μπάτζο, εντοπίστηκαν συνολικά 41 πεπτίδια και βρέθηκε ότι τα 15 είναι βιοπεπτίδια γνωστά για την δράση τους (Πίνακας 19) και 26 είναι πεπτίδια που δεν είναι γνωστά η δράση τους. Από τα βιοπεπτίδια βρέθηκα ότι το ένα τρίτο δρουν ως αναστολείς της DPP-IV και το άλλο ένα τρίτο δρουν ως αναστολείς του ενζύμου ACE. Επιπλέον βρέθηκε ένα βιοπεπτίδιο με διεγερτική δράση, ένα που δρα ως αναστολέας ρενίνης, ένα πεπτίδιο που μοιάζει με αγχολυτικό, ένα με αντιαμνησιακή δράση και ένα με πολλαπλή δράση (αναστολέας του ενζύμου ACE και αναστολέας της DPP-IV).

<b>Βιοδραστικότητα</b>	<b>Βιοπεπτίδια</b>	<b>Ποσοστό %</b>
DPP-IV inhibitory	5	33,3
ACE inhibitory	5	33,3
stimulating	1	6,7
renin inhibitor	1	6,7
anxiolytic-like peptide	1	6,7
antiamnestic	1	6,7
Πολλαπλή δράση	1	6,7
Σύνολο	15	100

**Πίνακας 19: Ποσοστά πεπτιδίων με βάση την βιοδραστικότητα τους στο Μπάτζο.**

Το βιοπεπτίδιο EK εντοπίζεται και στα δύο δείγματα Μπάτζου και έχει πολλαπλή δράση (αναστολέας του ενζύμου ACE και αναστολέας της DPP-IV).

Επιπλέον υπάρχουν 5 πεπτίδια που εντοπίζονται και στα δύο δείγματα αλλά δεν είναι γνωστή η δράση τους. Αυτά είναι τα: FYPQLFRQF, QAI, QAIVQNNNSTEY, QLFRQF και THINKKIEK.

Συνολικά 9 πεπτίδια εντοπίζονται σε τουλάχιστον δύο διαφορετικά είδη τυριού. Πιο αναλυτικά τα: AI, KE, KHKE, NA, NP, QKEDVPSERYLGYLEQL, SE, YL και YLG.

Ένα ακόμα ενδιαφέρον παρουσιάζει η σύγκριση των δειγμάτων ως προς τον αριθμό των αμινοξέων των βιοπεπτιδίων που εντοπίστηκαν (Πίνακας 20). Πιο συγκεκριμένα, και στα τρία είδη τυριού τα ποσοστά των τριπεπτιδίων και των τετραπεπτιδίων επί του συνολικού αριθμού των προσδιοριζόμενων πεπτιδίων κυμαίνονταν στα ίδια επίπεδα, περίπου 16-19% και 5-7% αντιστοίχως. Αξιοσημείωτο είναι επίσης ότι το 60,5% των βιοπεπτιδίων από το κασέρι περιέχουν τουλάχιστον 6 αμινοξέα.

<b>Αριθμός αμινοξέων</b>	<b>Κασέρι</b>		<b>Μανούρι</b>		<b>Μπάτζος</b>	
	<b>Πλήθος</b>	<b>Ποσοστό %</b>	<b>Πλήθος</b>	<b>Ποσοστό %</b>	<b>Πλήθος</b>	<b>Ποσοστό %</b>
<b>2</b>	<b>4</b>	<b>4,7</b>	<b>24</b>	<b>28,2</b>	<b>12</b>	<b>29,3</b>
<b>3</b>	<b>14</b>	<b>16,3</b>	<b>14</b>	<b>16,5</b>	<b>8</b>	<b>19,5</b>
<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4,7</b>	<b>5</b>	<b>5,9</b>	<b>3</b>	<b>7,3</b>
<b>5</b>	<b>12</b>	<b>14,0</b>	<b>9</b>	<b>10,6</b>	<b>7</b>	<b>17,1</b>
<b>5&lt;</b>	<b>52</b>	<b>60,5</b>	<b>33</b>	<b>38,8</b>	<b>11</b>	<b>26,8</b>
<b>Σύνολο</b>	<b>86</b>	<b>100</b>	<b>85</b>	<b>100</b>	<b>41</b>	<b>100</b>

**Πίνακας 20: Ποσοστά πεπτιδίων σε σχέση με τον αριθμό αμινοξέων.**

Βιοπεπτίδια αναστολείς του ενζύμου ACE έχουν ανιχνευτεί σε διάφορα τυριά παγκοσμίως όπως: στο τυρί Gorgonzola (Gobbetti et al., 2004), Edam και Emmental (Ryhanen et al., 2001), φέτα, Cheddar, Camembert (FitzGerald et al., 2004), Havarti (Meisel & Bockelmann, 1999), Mozzarella (Meisel, 2005), Grana Padano, Maasdam (Stuknytė et al., 2015), Valdeón (Sánchez-Rivera et al., 2014),

Στην παρούσα εργασία αναλύθηκαν για πρώτη φορά τα ελληνικά ΠΟΠ τυριά κασέρι, μανούρι και μπάτζος ως προς το βιοπεπτιδικό προφίλ τους, οπότε δίνεται η δυνατότητα σύγκρισης των αποτελεσμάτων με άλλα τυροκομικά προϊόντα. Όσο αφορά το κασέρι, δύο βιοπεπτίδια, τα ENLLRF και PYVRYL, έχουν βρεθεί και στο κεφίρ (Quirós et al., 2005), τα βιοπεπτίδια KDQDK, MAIPPK και MAIPPKK (μέσω του LSFMAIPPKKDQD) εντοπίζονται στα τυριά Roquefort, Peccorino Romano και Manchego (Hernández-Ledesma et al., 2011) και το βιοπεπτίδιο PFP ανιχνεύτηκε στο ισπανικό ημίσκληρο τυρί Manchego (Iwaniak, & Mogut, 2020). Επιπλέον το βιοπεπτίδιο RYLGY που μελετήθηκε στην εργασία των Basiricò et al., (2021) σχετικά με την επίδραση της κατανάλωσης του ιταλικού τυριού Parmigiano Reggiano στην αρτηριακή πίεση υπερτασικών αρουραίων ανιχνεύτηκε και στα δείγματα του κασεριού. Δύο βιοπεπτίδια που ανιχνεύονται στο τυρί Manchego, τα VPSERY και VPSERYL, ανιχνεύονται και στο μανούρι (Ruiz, Ramos & Recio, 2004).

Η ομάδα των Novak et al. (2021) μελέτησε πως με την χρήση οξυγαλακτικών βακτηρίων επηρεάζεται το περιεχόμενο των βιοπεπτιδίων, ευνοώντας την απελευθέρωση πεπτιδίων που προέρχονται από β-καζεΐνη μέσω πρωτεολυτικής δραστηριότητας σε αποξηραμένα φρέσκα τυριά συμβάλλοντας στην προστιθέμενη αξία του τελικού ζυμωμένου προϊόντος. Επιπλέον, οι Abedin et al. (2022) ασχολήθηκαν με τον χαρακτηρισμό των ανασταλτικών και αντιοξειδωτικών πεπτιδίων της ACE στο σκληρό τυρί chhurpi των Ιμαλαΐων και ανίχνευσαν πάνω από 1400 πεπτίδια, συγκεκριμένα 1473, θραύσματα των αS1, αS2, β-, κ-καζεΐνων, α-λακταλβουμίνης και β-λακτοσφαιρίνης, από τα οποία 60 είναι βιοπεπτίδια. Την ίδια χρονιά, οι Stobiecka et al., (2022) ασχολήθηκαν με την αντιοξειδωτική δραστηριότητα του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων στα τυριά Burgos, Gouda και Cheddar.

Οι Iwaniak et al. (2021), ανέλυσαν το δυναμικό αναστολής των ACE και DPP-IV του τυριού Gouda με τροποποιημένη περιεκτικότητα σε β-καζεΐνη. Η ίδια βάση δεδομένων που χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα εργασία (BIOPEP-UWM)



χρησιμοποιήθηκε για την πρόβλεψη της παρουσίας αναστολέων των ACE και DPP-IV σε αλληλουχίες β-καζεΐνης. Αρκετά από αυτά τα βιοπεπτίδια που ανιχνεύτηκαν στο τυρί Gouda βρέθηκαν και στα τρία τυριά της παρούσας εργασία και πιο συγκεκριμένα στο Μανούρι τα: AE, AI, HS, IQ, KA, KE, KT, NA, NP, PH, PN, QK, SE, TQ, VD, VP, YL, YLG, PYVRYL, στο Κασέρι τα: FL, RY, LPL, RYLG, και στο Μπάτζο τα: AI, AS, EK, GT, KE, KI, NA, NP, QF, SE, YL, VAV, YLG.

Το πρωτεϊνικό προφίλ των τυριών δεν μπόρεσε να αποτυπωθεί λόγω έλλειψης προτύπων και για αυτό κατά την διαδικασία της ανάλυσης των αποτελεσμάτων των μαζών επιλέχθηκαν οι 6 πρωτεΐνες:  $\alpha_{s1}$ -  $\alpha_{s2}$ -  $\beta$ - κ- καζεΐνες,  $\beta$ -λακτοσφαιρίνη, και α-λακταλβουμίνη χωρίς να αποκλείεται η ύπαρξη και άλλων πρωτεϊνών στα δείγματα. οι οποίες θα μπορούσαν να προσδιοριστούν με ακρίβεια σε περαιτέρω, αναλύσεις με την χρήση των κατάλληλων μεθόδων. Η ανίχνευση των βιοπεπτιδίων πραγματοποιήθηκε με την χρήση της HPLC-MS, και ο χαρακτηρισμός τους έγινε με την χρήση έγκριτων, δωρεάν διαδικτυακών εφαρμογών (MBPDB, BIOPEP-UWM, BioDADPeP).

Μερικές προτάσεις για μελλοντική έρευνα είναι:

- Στα δείγματα ανιχνεύτηκαν πεπτίδια τα οποία δεν έχουν γνωστή βιοδραστικότητα αλλά είναι πολύ πιθανό να παρουσιάζουν και αυτά κάποια συγκεκριμένη βιολογική δράση, η οποία να ωφελεί την υγεία των καταναλωτών.
- Απομόνωση πεπτιδίων και έλεγχος για την πιθανή ή όχι βιοδραστικότητά τους.
- Ποσοτικός προσδιορισμός τόσο των πρωτεϊνών όσο και των βιοπεπτιδίων, αλλά και ορισμένων αμινοξέων όπως για παράδειγμα του M (με μάζα 150,2), N (με μάζα 133,15), Y (με μάζα 182,2) και F (με μάζα 166,2).
- Η κατεργασία των δειγμάτων θα μπορούσε να γίνει και με άλλα πρωτόκολλα ανάλυσης όπως για παράδειγμα την χρήση ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (Meira et al., 2012) ή HCl (Nega & Moatsou, 2012).
- Η ποσοστιαία ανάλυση των πεπτιδίων ως προς τον αριθμό των αμινοξέων που αποτελούνται θα μπορούσε μελλοντικά να εξεταστεί για την ανάδειξη των τυροκομικών προϊόντων.
- Τέλος, τα πεπτίδια EK, FYPQLFRQF, QAI, QAI VQNNDSTEY, QLFRQF και THINKKIEK που εντοπίζονται στον Μπάτζο επειδή δεν εντοπίζονται στα υπόλοιπα είδη τυριού που εξετάστηκαν, με περαιτέρω μελέτη, αν εξεταστούν και

άλλα είδη τυριών της ελληνικής αγοράς, θα μπορούσε η μη ύπαρξη των συγκεκριμένων πεπτιδίων σε άλλα τυροκομικά προϊόντα να αναδείξει αυτά τα πεπτίδια ως βιοδείκτες για το τυρί του Μπάτζου.

Συμπερασματικά μπορούμε να πούμε ότι:

- Ο συνδυασμός των μεθόδων HPLC - UV-VIS & MS φανερώνουν τον διατροφικό πλούτο και των τριών διαφορετικών ειδών τυριού, που παράγονται και στην θεσσαλική γη.
- Η ύπαρξη των βιοπεπτιδίων από θραύσματα των  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - και  $\kappa$ -καζεϊνών, πρωτεΐνες ορού γάλακτος όπως η  $\beta$ -λακτοσφαιρίνη και η  $\alpha$ -λακταλβουμίνη.
- Τα βιοπεπτίδια που ανιχνεύτηκαν εμφανίζουν πληθώρα δράσεων όπως αντιοξειδωτική, αντιθρομβωτική, αναστολείς της ACE και DPP-IV.
- Πιθανή χρήση πεπτιδίων στην περίπτωση του Μπάτζου ως βιοδείκτες (FYPQLFRQF, QAI, QAIVQNNDSTEY, QLFRQF και THINKKIEK)

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. “BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności.” BIOPEP-UWM – Katedra Biochemii Żywności, [biochemia.uwm.edu.pl/biopep-uwm](http://biochemia.uwm.edu.pl/biopep-uwm). Accessed 16 Sept. 2022.
2. Abedin, M. M., Chourasia, R., Phukon, L. C., Singh, S. P., & Rai, A. K. (2022). Characterization of ACE inhibitory and antioxidant peptides in yak and cow milk hard chhurpi cheese of the Sikkim Himalayan region. *Food chemistry: X*, 13, 100231.
3. Agyei, D., & Danquah, M. K. (2012). Rethinking food-derived bioactive peptides for antimicrobial and immunomodulatory activities. *Trends in Food Science & Technology*, 23(2), 62-69.
4. Agyei, D., Ongkudon, C. M., Wei, C. Y., Chan, A. S., & Danquah, M. K. (2016). Bioprocess challenges to the isolation and purification of bioactive peptides. *Food and Bioprocess Processing*, 98, 244-256.
5. Alichanidis, E., & Polychroniadou, A. (2008). Characteristics of major traditional regional cheese varieties of East-Mediterranean countries: a review. *Dairy Science and Technology*, 88(4-5), 495-510.
6. Alimentarius, C. (1978). Codex general standard for cheese (Codex STAN 283–1978). Joint FAO. WHO Food Standards Program, FAO, Rome.
7. Almena-Aliste, M., & Mietton, B. (2014). Cheese classification, characterization, and categorization: a global perspective. *Microbiology spectrum*, 2(1), 2-1.
8. Anagnostopoulos, A. K., Katsafadou, A. I., Pierros, V., Kontopodis, E., Fthenakis, G. C., Arsenos, G., & Tsangaris, G. T. (2016). Dataset of milk whey proteins of three indigenous Greek sheep breeds. *Data in brief*, 8, 877-880.
9. Anastasiou, R., Georgalaki, M., Manolopoulou, E., Kandarakis, I., De Vuyst, L., & Tsakalidou, E. (2007). The performance of *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 as starter culture in Kasserli cheese production. *International Dairy Journal*, 17(3), 208-217.
10. Andrei, S. (2006). ANALYTICAL METHODS USED FOR MILK PROTEINS SEPARATION AND IDENTIFICATION (minireview). *Buletin USAMV-CN*, 63, 16-20.
11. 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(2), 155-167.
12. Baptista, D. P., & Gigante, M. L. (2021). Bioactive peptides in ripened cheeses: Release during technological processes and resistance to the gastrointestinal tract. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(10), 4010-4017.
  13. Baptista, D. P., Salgaço, M. K., Sivieri, K., & Gigante, M. L. (2020). Use of static and dynamic in vitro models to simulate Prato cheese gastrointestinal digestion: Effect of *Lactobacillus helveticus* LH-B02 addition on peptides bioaccessibility. *LWT*, 134, 110229.
  14. 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.
  15. Basiricò, L., Morera, P., Evangelista, C., Galaverna, G., Sforza, S., Prandi, B., ... & Nardone, A. (2022). Effect of Parmigiano Reggiano Consumption on Blood Pressure of Spontaneous Hypertensive Rats. *Dairy*, 3(2), 364-376.
  16. Bernabucci, U., Catalani, E., Basiricò, L., Morera, P., & Nardone, A. (2014). In vitro ACE-inhibitory activity and in vivo antihypertensive effects of water-soluble extract by Parmigiano Reggiano and Grana Padano cheeses. *International Dairy Journal*, 37(1), 16-19.
  17. Bintsis, T. (2021a). The microbiology of Kasserli cheese during the maturation. *World Journal of Advanced Research and Reviews*, 10(3), 157-167.
  18. Bintsis, T. (2021b). Yeasts in different types of cheese. *AIMS microbiology*, 7(4), 447.
  19. Bottero, M. T., Civera, T., Anastasio, A., Turi, R. M., & Rosati, S. (2002). Identification of cow's milk in "buffalo" cheese by duplex polymerase chain reaction. *Journal of food protection*, 65(2), 362-366.
  20. 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.
  21. Bütikofer, U., Meyer, J., Sieber, R., & Wechsler, D. (2007). Quantification of the angiotensin-converting enzyme-inhibiting tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro in hard, semi-hard and soft cheeses. *International Dairy Journal*, 17(8), 968-975.
  22. Camerini, S., Montepeloso, E., Casella, M., Crescenzi, M., Marianella, R. M., & Fuselli, F. (2016). Mass spectrometry detection of fraudulent use of cow whey in

- water buffalo, sheep, or goat Italian ricotta cheese. *Food Chemistry*, 197, 1240-1248.
23. Choi, J., Sabikhi, L., Hassan, A., & Anand, S. (2012). Bioactive peptides in dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, 65(1), 1-12.
  24. Curry, A. (2013). The milk revolution. *Nature*, 500 (7460), 20–22.
  25. 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.
  26. Danezis, G. P., Tsiplakou, E., Pappa, E. C., Pappas, A. C., Mavrommatis, A., Sotirakoglou, K., ... & Zervas, G. (2020). Fatty acid profile and physicochemical properties of Greek protected designation of origin cheeses, implications for authentication. *European Food Research and Technology*, 246(9), 1741-1753.
  27. Dimitrov, Z., Chorbadjiyska, E., Gotova, I., Pashova, K., & Ilieva, S. (2015). Selected adjunct cultures remarkably increase the content of bioactive peptides in Bulgarian white brined cheese. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(1), 78-83.
  28. Erkaya, T., & Şengul, M. (2015). Bioactivity of water soluble extracts and some characteristics of white cheese during the ripening period as effected by packaging type and probiotic adjunct cultures. *Journal of Dairy Research*, 82(1), 47-55.
  29. FitzGerald, R. J., Murray, B. A., & Walsh, D. J. (2004). Hypotensive peptides from milk proteins. *The Journal of nutrition*, 134(4), 980S-988S.
  30. Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. (2017). Cheese: historical aspects. In *Fundamentals of cheese science* (pp. 1-10). Springer, Boston, MA.
  31. Fox, P. F., McSweeney, P. L., Cogan, T. M., & Guinee, T. P. (Eds.). (2004). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Volume 1: General Aspects*. Elsevier.
  32. Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. L. H., & O'Mahony, J. A. (2015). Milk proteins. In *Dairy chemistry and biochemistry* (pp. 145-239). Springer, Cham.
  33. Galli, B. D., Baptista, D. P., Cavalheiro, F. G., Negrão, F., Eberlin, M. N., & Gigante, M. L. (2019). Peptide profile of Camembert-type cheese: Effect of heat

- treatment and adjunct culture *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Food Research International*, 123, 393-402.
34. Georgalaki, M. D., Sarantinopoulos, P., Ferreira, E. S., De Vuyst, L., Kalantzopoulos, G., & Tsakalidou, E. (2000). Biochemical properties of *Streptococcus macedonicus* strains isolated from Greek Kasseri cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 88(5), 817-825.
  35. Georgalaki, M., Papadelli, M., Chassioti, E., Anastasiou, R., Aktypis, A., De Vuyst, L., ... & Tsakalidou, E. (2010). Milk protein fragments induce the biosynthesis of macedocin, the lantibiotic produced by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(4), 1143-1151.
  36. Giacometti, J., & Buretić-Tomljanović, A. (2017). Peptidomics as a tool for characterizing bioactive milk peptides. *Food chemistry*, 230, 91-98.
  37. Global cheese report 2021, Tetra Pak , 2021,  
<https://www.tetrapak.com/content/dam/tetrapak/publicweb/gb/en/about/documents/Cheese-consumer-research-report.pdf>
  38. Gobetti, M., Minervini, F., & Rizzello, C. G. (2004). Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *International Journal of Dairy Technology*, 57(2-3), 173-188.
  39. Gómez-Ruiz, J. Á., Ramos, M., & Recio, I. (2002). Angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheeses manufactured with different starter cultures. *International Dairy Journal*, 12(8), 697-706.
  40. Gong, P. X., Wang, B. K., Wu, Y. C., Li, Q. Y., Qin, B. W., & Li, H. J. (2020). Release of antidiabetic peptides from *Stichopus japonicus* by simulated gastrointestinal digestion. *Food chemistry*, 315, 126273.
  41. Gouin, P. (1997). Ancient oriental dairy techniques derived from archaeological evidence. *Food and Foodways*, 7 (3), 157–188.
  42. Grappin, R., & Beuvier, E. (1997). Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. *International Dairy Journal*, 7(12), 751-761.
  43. Hernández-Ledesma, B., del Mar Contreras, M., & Recio, I. (2011). Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. *Advances in colloid and interface science*, 165(1), 23-35.

44. Hernández-Ledesma, B., Ramos, M., & Gómez-Ruiz, J. Á. (2011). Bioactive components of ovine and caprine cheese whey. *Small Ruminant Research*, 101(1-3), 196-204.
- Hickey, R. M., Twomey, D. P., Ross, R. P., & Hill, C. (2003). Production of enterolysin A by a raw milk enterococcal isolate exhibiting multiple virulence factors. *Microbiology*, 149(3), 655-664.
45. Hryniewicz, M., Iwaniak, A., Bucholska, J., Minkiewicz, P., & Darewicz, M. (2019). Structure–Activity Prediction of ACE Inhibitory/Bitter Dipeptides—A Chemometric Approach Based on Stepwise Regression. *Molecules*, 24(5), 950.
46. Hsieh, C. C., Hernández-Ledesma, B., Fernández-Tomé, S., Weinborn, V., Barile, D., & de Moura Bell, J. M. L. N. (2015). Milk proteins, peptides, and oligosaccharides: effects against the 21st century disorders. *BioMed research international*, 2015.
47. <https://www.statista.com/statistics/1120911/cheese-production-worldwide>, Shahbandeh, Jan 10, 2022.
48. Hylek, E. M., Evans-Molina, C., Shea, C., Henault, L. E., & Regan, S. (2007). Major hemorrhage and tolerability of warfarin in the first year of therapy among elderly patients with atrial fibrillation. *Circulation*, 115(21), 2689-2696.
49. International Dairy Federation (2016). *Bulletin of the International Dairy Federation 485/2016 – The World Dairy Federation*, Brussels, Belgium
50. Iwaniak, A., & Mogut, D. (2020). Metabolic syndrome-preventive peptides derived from milk proteins and their presence in cheeses: A review. *Applied Sciences*, 10(8), 2772.
51. Iwaniak, A., Minkiewicz, P., & Darewicz, M. (2014). Food-originating ACE inhibitors, including antihypertensive peptides, as preventive food components in blood pressure reduction. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(2), 114-134.
52. Iwaniak, A., Mogut, D., Minkiewicz, P., Żulewska, J., & Darewicz, M. (2021). Gouda Cheese with Modified Content of  $\beta$ -Casein as a Source of Peptides with ACE-and DPP-IV-Inhibiting Bioactivity: A Study Based on In Silico and In Vitro Protocol. *International journal of molecular sciences*, 22(6), 2949.
53. Kaminarides, S., Nestoratos, K., & Massouras, T. (2013). Effect of added milk and cream on the physicochemical, rheological and volatile compounds of Greek whey cheeses. *Small Ruminant Research*, 113(2-3), 446-453.

54. Kindstedt, P. S. (2012). *Cheese and Culture. A History of Cheese and Its Place in Western Civilization*. Chelsea Green Publ., White River Jct.
55. Kindstedt, P. S. (2017). The history of cheese. *Global Cheesemaking Technology: Cheese Quality and Characteristics*, 1-19.
56. 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(16), 1309-1323.
57. Kocak, A., Sanli, T., Anli, E. A., & Hayaloglu, A. A. (2020). Role of using adjunct cultures in release of bioactive peptides in white-brined goat-milk cheese. *Lwt*, 123, 109127.
58. Korhonen, H. (2009). Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of functional foods*, 1(2), 177-187.
59. Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2003). Food-derived bioactive peptides-opportunities for designing future foods. *Current pharmaceutical design*, 9(16), 1297-1308.
60. Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: production and functionality. *International dairy journal*, 16(9), 945-960.
61. 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.
62. Kunji, E. R., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B., & Konings, W. N. (1996). The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70(2), 187-221.
63. Lacroix, I. M., & Li-Chan, E. C. (2014). Isolation and characterization of peptides with dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity from pepsin-treated bovine whey proteins. *Peptides*, 54, 39-48.
64. 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.
65. Levieux, D., & Venien, A. (1994). Rapid, sensitive two-site ELISA for detection of cows' milk in goats' or ewes' milk using monoclonal antibodies. *Journal of Dairy Research*, 61(1), 91-99.



66. Li, C. H., Matsui, T., Matsumoto, K., Yamasaki, R., & Kawasaki, T. (2002). Latent production of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from buckwheat protein. *Journal of Peptide Science: An Official Publication of the European Peptide Society*, 8(6), 267-274.
67. Li-Chan, E. C. (2007). Vibrational spectroscopy applied to the study of milk proteins. *Le Lait*, 87(4-5), 443-458.
68. Lioliou, K., Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetakis, N., & Robinson, R. K. (2001). Changes in the microflora of Manouri, a traditional Greek whey cheese, during storage. *International Journal of Dairy Technology*, 54(3), 100-106.
69. Litopoulou-Tzanetaki, E., & Tzanetakis, N. (2011). Microbiological characteristics of Greek traditional cheeses. *Small Ruminant Research*, 101(1-3), 17-32.
70. Loffi, C., Bortolazzo, E., Garavaldi, A., Musi, V., Reverberi, P., Galaverna, G., ... & Tedeschi, T. (2021). Reduction in the Brining Time in Parmigiano Reggiano Cheese Production Minimally Affects Proteolysis, with No Effect on Sensory Properties. *Foods*, 10(4), 770.
71. López-Expósito, I., Gómez-Ruiz, J. Á., Amigo, L., & Recio, I. (2006). Identification of antibacterial peptides from ovine  $\alpha$ 2-casein. *International Dairy Journal*, 16(9), 1072-1080.
72. Lu, J. (2013). *The biology of milk synthesis from a proteomics perspective*. Wageningen University and Research.
73. Mader, J. S., Richardson, A., Salsman, J., Top, D., de Antueno, R., Duncan, R., & Hoskin, D. W. (2007). Bovine lactoferricin causes apoptosis in Jurkat T-leukemia cells by sequential permeabilization of the cell membrane and targeting of mitochondria. *Experimental cell research*, 313(12), 2634-2650.
74. Martínez Leo, E. E., Rojas Herrera, R. A., & Segura Campos, M. R. (2022). Biopeptides with Neuroprotective Effect in the Treatment of Neuroinflammation Induced by Adiposity-based Chronic Disease. *Food Reviews International*, 38(5), 1017-1032.
75. McIntosh, C. H., Widenmaier, S., & Kim, S. J. (2009). Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (gastric inhibitory polypeptide; GIP). *Vitamins & Hormones*, 80, 409-471.

76. McMahon, D. J., & Oommen, B. S. (2013). Casein micelle structure, functions, and interactions. In *Advanced dairy chemistry* (pp. 185-209). Springer, Boston, MA.
77. 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.
78. Meisel, H. (2001). Bioactive peptides from milk proteins: a perspective for consumers and producers. *Australian Journal of Dairy Technology*, 56(2), 83.
79. Meisel, H. (2005). Biochemical properties of peptides encrypted in bovine milk proteins. *Current medicinal chemistry*, 12(16), 1905-1919.
80. Meisel, H., & Bockelmann, W. (1999). Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropho-functional properties. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76(1), 207-215.
81. 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.
82. Meng, Z., Zhang, L., Xin, L., Lin, K., Yi, H., & Han, X. (2018). Technological characterization of *Lactobacillus* in semihard artisanal goat cheeses from different Mediterranean areas for potential use as nonstarter lactic acid bacteria. *Journal of dairy science*, 101(4), 2887-2896.
83. Michaelidou, A. M. (2008). Factors influencing nutritional and health profile of milk and milk products. *Small Ruminant Research*, 79(1), 42-50.
84. 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.
85. Minkiewicz, P., Dziuba, J., Darewicz, M., Iwaniak, A., Dziuba, M., & Nałęcz, D. (2008). Food peptidomics. *Food Technology and Biotechnology*, 46(1), 1-10.
86. Moatsou, G., & Govaris, A. (2011). White brined cheeses: A diachronic exploitation of small ruminants milk in Greece. *Small Ruminant Research*, 101(1-3), 113-121.
87. Moatsou, G., Kandarakis, I., Moschopoulou, E., Anifantakis, E., & Alichanidis, E. (2001). Effect of technological parameters on the characteristics of kasseri cheese made from raw or pasteurized ewes' milk. *International Journal of Dairy Technology*, 54(2), 69-77.

88. 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.
89. Mohanty, G., & Das, S. (2014). Kokila. *Indian Literature*, 58(5 (283)), 72-80.
90. Nagaoka, S. (2019). Structure–function properties of hypolipidemic peptides. *Journal of Food Biochemistry*, 43(1), e12539.
91. Nega, A., & Moatsou, G. (2012). Proteolysis and related enzymatic activities in ten Greek cheese varieties. *Dairy science & technology*, 92(1), 57-73.
92. Nikolaou, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., & Robinson, R. K. (2002). Changes in the microbiological and chemical characteristics of an artisanal, low-fat cheese made from raw ovine milk during ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 55(1), 12-17.
93. Noguchi, T., Kato, T., Wang, L., Maeda, Y., Ikeda, H., Sato, E., ... & Nishikawa, H. (2012). Intracellular tumor-associated antigens represent effective targets for passive immunotherapy. *Cancer research*, 72(7), 1672-1682.
94. 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.
95. Nongonierma, A. B., Lalmahomed, M., Paoletta, S., & FitzGerald, R. J. (2017). Milk protein isolate (MPI) as a source of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides. *Food chemistry*, 231, 202-211.
96. Nongonierma, A. B., Mooney, C., Shields, D. C., & FitzGerald, R. J. (2013). Inhibition of dipeptidyl peptidase IV and xanthine oxidase by amino acids and dipeptides. *Food Chemistry*, 141(1), 644-653.
97. Novak, J., Butorac, K., Leboš Pavunc, A., Banić, M., Butorac, A., Lepur, A., ... & Kos, B. (2021). A Lactic Acid Bacteria Consortium Impacted the Content of Casein-Derived Biopeptides in Dried Fresh Cheese. *Molecules*, 27(1), 160.
98. OECD/FAO. (2021). OECD-FAO agricultural outlook 2021–2030. <https://www.fao.org/3/CC0308EN/Dairy.pdf>
99. Ong, L., Pax, A. P., Ong, A., Vongsvivut, J., Tobin, M. J., Kentish, S. E., & Gras, S. L. (2020). The effect of pH on the fat and protein within cream cheese and their influence on textural and rheological properties. *Food chemistry*, 332, 127327.

100. Papademas, P., Bintsis, T., Alichanidis, E., & Ardö, Y. (2017). Whey cheeses (heat coagulated). *Global Cheesemaking Technology: Cheese Quality and Characteristics*, 446-452.
101. Park, Y. W. (Ed.). (2009). *Bioactive components in milk and dairy products*. John Wiley & Sons.
102. Patil, P., Mandal, S., Tomar, S. K., & Anand, S. (2015). Food protein-derived bioactive peptides in management of type 2 diabetes. *European journal of nutrition*, 54(6), 863-880.
103. 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.
104. Pritchard, S. R., Phillips, M., & Kailasapathy, K. (2010). Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. *Food research international*, 43(5), 1545-1548.
105. Psoni, L., Kotzamanides, C., Andrighetto, C., Lombardi, A., Tzanetakis, N., & Litopoulou-Tzanetaki, E. (2006a). Genotypic and phenotypic heterogeneity in *Enterococcus* isolates from Batzos, a raw goat milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 109(1-2), 109-120.
106. Psoni, L., Tzanetakis, N., & Litopoulou-Tzanetaki, E. (2003). Microbiological characteristics of Batzos, a traditional Greek cheese from raw goat's milk. *Food Microbiology*, 20(5), 575-582.
107. Psoni, L., Tzanetakis, N., & Litopoulou-Tzanetaki, E. (2006b). Characteristics of Batzos cheese made from raw, pasteurized and/or pasteurized standardized goat milk and a native culture. *Food control*, 17(7), 533-539.
108. 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.
109. Qian, Z. Y., Jollès, 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 (BBA)-General Subjects*, 1243(1), 25-32.

110. Quirós, A., Hernández-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.
111. Recio, I., & Visser, S. (2000). Antibacterial and binding characteristics of bovine, ovine and caprine lactoferrins: a comparative study. *International Dairy Journal*, 10(9), 597-605.
112. Rhoades, J., Anastasiou, I., Michailidou, S., Koinidis, A., Doulgerakis, C., Alexa, E. A., ... & Likotrafiti, E. (2021). Microbiological analysis of Greek Protected Designation of Origin cheeses and characterisation of the isolated lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 123, 105183.
113. Rival, S. G., Boeriu, C. G., & Wichers, H. J. (2001). Caseins and casein hydrolysates. 2. Antioxidative properties Peroral calcium dosage of infants. *Acta Med. Scand*, 55, 247-255.
114. Rizzello, C. G., Losito, I., Gobbetti, M., Carbonara, T., De Bari, M. D., & Zambonin, P. G. (2005). Antibacterial activities of peptides from the water-soluble extracts of Italian cheese varieties. *Journal of Dairy Science*, 88(7), 2348-2360.
115. Rojas-Ronquillo, R., Cruz-Guerrero, A., Flores-Nájera, A., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz, L., Reyes-Grajeda, J. P., ... & García-Garibay, M. (2012). Antithrombotic and angiotensin-converting enzyme inhibitory properties of peptides released from bovine casein by *Lactobacillus casei* Shirota. *International Dairy Journal*, 26(2), 147-154.
116. Ruiz, J. Á. G., Ramos, M., & Recio, I. (2004). Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity of peptides isolated from Manchego cheese. Stability under simulated gastrointestinal digestion. *International dairy journal*, 14(12), 1075-1080.
117. 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.
118. Saadi, S., Saari, N., Anwar, F., Hamid, A. A., & Ghazali, H. M. (2015). Recent advances in food biopeptides: Production, biological functionalities and therapeutic applications. *Biotechnology advances*, 33(1), 80-116.
119. Sánchez, A., & Vázquez, A. (2017). Bioactive peptides: A review. *Food Quality and Safety*, 1(1), 29-46.

120. Sánchez-Rivera, L., Diezhandino, I., Gómez-Ruiz, J. Á., Fresno, J. M., Miralles, B., & Recio, I. (2014). Peptidomic study of S panish blue cheese (Valdeón) and changes after simulated gastrointestinal digestion. *Electrophoresis*, 35(11), 1627-1636.
121. 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.
122. Sarmadi, B. H., & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, 31(10), 1949-1956.
123. Sawyer, L. (2013).  $\beta$ -Lactoglobulin. In *Advanced dairy chemistry* (pp. 211-259). Springer, Boston, MA.
124. Schrader, M., Schulz-Knappe, P., & Fricker, L. D. (2014). Historical perspective of peptidomics. *EuPA Open Proteomics*, 3, 171-182.
125. Scott R (1986) *Cheesemaking Practice*, 2nd edn. Elsevier Applied Science Publishers, London
126. Sewald, N., & Jakubke, H. D. (2015). *Peptides: chemistry and biology*. John Wiley & Sons.
127. Sforza, S., Aquino, G., Cavatorta, V., Galaverna, G., Mucchetti, G., Dossena, A., & Marchelli, R. (2008). Proteolytic oligopeptides as molecular markers for the presence of cows' milk in fresh cheeses derived from sheep milk. *International dairy journal*, 18(10-11), 1072-1076.
128. Sforza, S., Cavatorta, V., Lambertini, F., Galaverna, G., Dossena, A., & Marchelli, R. (2012). Cheese peptidomics: A detailed study on the evolution of the oligopeptide fraction in Parmigiano-Reggiano cheese from curd to 24 months of aging. *Journal of dairy science*, 95(7), 3514-3526.
129. Sieber, R., Bütikofer, U., Egger, C., Portmann, R., Walther, B., & Wechsler, D. (2010). ACE-inhibitory activity and ACE-inhibiting peptides in different cheese varieties. *Dairy Science & Technology*, 90(1), 47-73.
130. 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.
131. Statistica (2021). Annual cheese production worldwide from 2015 to 2021, <https://www.statista.com/statistics/1120911/cheese-production-worldwide/>

132. Stobiecka, M., Król, J., & Brodziak, A. (2022). Antioxidant Activity of Milk and Dairy Products. *Animals*, 12(3), 245.
133. Stuknytè, M., Cattaneo, S., Masotti, F., & De Noni, I. (2015). Occurrence and fate of ACE-inhibitor peptides in cheeses and in their digestates following in vitro static gastrointestinal digestion. *Food chemistry*, 168, 27-33.
134. Teneva-Angelova, T., Balabanova, T., Boyanova, P., & Beshkova, D. (2018). Traditional Balkan fermented milk products. *Engineering in Life Sciences*, 18(11), 807-819.
135. Teschemacher, H. (2003). Opioid receptor ligands derived from food proteins. *Current pharmaceutical design*, 9(16), 1331-1344.
136. Teschemacher, H., Koch, G., & Brantl, V. (1997). Milk protein-derived opioid receptor ligands. *Peptide Science*, 43(2), 99-117.
137. Tidona, F., Criscione, A., Guastella, A. M., Zuccaro, A., Bordonaro, S., & Marletta, D. (2009). Bioactive peptides in dairy products. *Italian Journal of Animal Science*, 8(3), 315-340.
138. Timón, M. L., Andrés, A. I., Otte, J., & Petró, M. J. (2019). Antioxidant peptides (< 3 kDa) identified on hard cow milk cheese with rennet from different origin. *Food Research International*, 120, 643-649.
139. Udenigwe, C. C., & Rouvinen-Watt, K. (2015). The role of food peptides in lipid metabolism during dyslipidemia and associated health conditions. *International journal of molecular sciences*, 16(5), 9303-9313.
140. Vigne, J. D., & Helmer, D. (2007). Was milk a “secondary product” in the Old World Neolithisation process? Its role in the domestication of cattle, sheep and goats. *Anthropozoologica*, 42(2), 9-40.
141. Wang, W., & De Mejia, E. G. (2005). A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 4(4), 63-78.
142. Weniinger, B., Alram-Stern, E., Bauer, E., Clare, L., Danzeglocke, U., Jöris, O., Kubatzki, C., Rollefson, G., Todorova, H. & van Andel, T. (2006). Climate forcing due to the 8200 cal yr BP event observed at Early Neolithic sites in eastern Mediterranean. *Quaternary Research*, 66, 401–420.
143. Zhao, L., Zhang, M., Pan, F., Li, J., Dou, R., Wang, X., ... & Cai, S. (2021). In silico analysis of novel dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides released from *Macadamia integrifolia* antimicrobial protein 2 (MiAMP2) and the possible

pathways involved in diabetes protection. Current research in food science, 4, 603-611.

144. Αντωνιάδου, Ε. (2016). Καταγραφή και δυναμική των τυροκομείων στην Περιφέρεια Θεσσαλίας. Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης.
145. Γενική Διεύθυνση Γεωργίας και Αγροτικής Ανάπτυξης (2022) [https://agriculture.ec.europa.eu/farming/geographical-indications-and-quality-schemes/geographical-indications-food-and-drink\\_el](https://agriculture.ec.europa.eu/farming/geographical-indications-and-quality-schemes/geographical-indications-food-and-drink_el)
146. Ευρωπαϊκή Επιτροπή (2017). CETA – μια εμπορική συμφωνία που θέτει νέα πρότυπα για το παγκόσμιο εμπόριο [https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/el/MEMO\\_17\\_271](https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/el/MEMO_17_271)
147. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΟΜΕΝΗΣ ΟΝΟΜΑΣΙΑΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ (ΠΟΠ) & ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΟΜΕΝΗΣ ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗΣ ΕΝΔΕΙΞΗΣ, (ΠΓΕ) Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, (2022) <http://minagric.gr/index.php/el/for-farmer-2/2012-02-02-07-52-07/ellinikaproionta/1270-tiria>

Διαδικτυακές πηγές

148. <https://www.uniprot.org/>
149. <https://web.expasy.org/findpept/>
150. <http://db.systemsbiology.net:8080/proteomicsToolkit/FragIonServlet.html>
151. <https://mbpdb.nws.oregonstate.edu/>
152. <https://biochemia.uwm.edu.pl/biopep-uwm/>
153. <https://omicsbase.com/BioDADPep/biodadpep-search>



# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Φυτικοχημική ανάλυση σκληρών και ημισκληρών τυριών (Danezis et al., 2020).

	Batzos	Formaella Arachovas Parnassou	Graviera Agrafon	Graviera Kriti	Graviera Naxou	Kasseri	Kefalo-graviera	Ladotyri Mytilinis	Mastelo	Metsovone	San Michali	Sfela	SEM	P value
Number of samples	2	4	2	11	3	8	11	3	2	2	2	2		
pH	5.37 <sup>b</sup>	5.88 <sup>cd</sup>	5.42 <sup>bc</sup>	5.45 <sup>bc</sup>	5.50 <sup>bc</sup>	5.43 <sup>bc</sup>	5.39 <sup>b</sup>	5.27 <sup>b</sup>	6.24 <sup>d</sup>	5.43 <sup>bc</sup>	5.75 <sup>bc</sup>	4.76 <sup>a</sup>	0.110	<0.001
Moisture%	49.4 <sup>d</sup>	38.5 <sup>ab</sup>	37.2 <sup>ab</sup>	35.2 <sup>a</sup>	36.8 <sup>ab</sup>	38.2 <sup>ab</sup>	36.3 <sup>a</sup>	35.1 <sup>a</sup>	40.4 <sup>b</sup>	37.6 <sup>ab</sup>	35.3 <sup>a</sup>	44.0 <sup>c</sup>	0.886	<0.001
Fat%	20.3 <sup>b</sup>	27.5 <sup>b</sup>	31.0 <sup>cd</sup>	33.7 <sup>cd</sup>	32.8 <sup>cd</sup>	31.9 <sup>cd</sup>	33.1 <sup>cd</sup>	35.3 <sup>c</sup>	30.3 <sup>bc</sup>	32.3 <sup>cd</sup>	28.0 <sup>b</sup>	29.8 <sup>bc</sup>	0.694	<0.001
FDM%	40.1 <sup>a</sup>	44.7 <sup>ab</sup>	49.4 <sup>bc</sup>	52.0 <sup>c</sup>	51.9 <sup>c</sup>	51.6 <sup>c</sup>	52.0 <sup>c</sup>	54.5 <sup>c</sup>	50.8 <sup>c</sup>	51.7 <sup>c</sup>	43.3 <sup>ab</sup>	53.0 <sup>c</sup>	0.816	<0.001
NaCl%	3.95 <sup>c</sup>	1.52 <sup>a</sup>	1.84 <sup>ab</sup>	1.46 <sup>a</sup>	1.85 <sup>ab</sup>	2.08 <sup>ab</sup>	2.71 <sup>b</sup>	2.11 <sup>ab</sup>	1.82 <sup>ab</sup>	1.78 <sup>ab</sup>	2.11 <sup>ab</sup>	4.11 <sup>c</sup>	0.313	<0.001
Proteins%	24.6 <sup>c</sup>	28.6 <sup>bc</sup>	26.4 <sup>ab</sup>	25.9 <sup>ab</sup>	24.8 <sup>a</sup>	24.5 <sup>a</sup>	24.1 <sup>a</sup>	24.7 <sup>a</sup>	24.2 <sup>a</sup>	25.4 <sup>ab</sup>	30.4 <sup>c</sup>	23.2 <sup>a</sup>	0.822	0.001
C <sub>4:0</sub>	0.140	0.103	0.205	0.162	0.203	0.094	0.136	0.073	0.055	0.095	0.090	0.135	0.042	0.599
C <sub>6:0</sub>	1.21	0.945	1.40	1.22	1.52	0.896	1.10	0.937	1.00	1.03	0.690	0.960	0.198	0.605
C <sub>8:0</sub>	2.59	1.53	2.21	2.01	1.77	1.55	1.90	1.92	1.80	1.43	0.765	1.66	0.253	0.144
C <sub>10:0</sub>	9.85 <sup>b</sup>	6.05 <sup>ab</sup>	8.71 <sup>b</sup>	6.94 <sup>ab</sup>	5.29 <sup>ab</sup>	6.60 <sup>ab</sup>	7.43 <sup>b</sup>	6.77 <sup>ab</sup>	6.22 <sup>ab</sup>	5.08 <sup>ab</sup>	2.59 <sup>a</sup>	6.28 <sup>ab</sup>	0.745	0.010
C <sub>11:0</sub>	0.120	0.093	0.125	0.084	0.073	0.083	0.111	0.083	0.055	0.060	0.040	0.070	0.016	0.146
C <sub>12:0</sub>	5.10	4.45	5.39	4.14	3.95	4.08	4.57	4.26	3.74	3.73	2.92	3.68	0.348	0.107
C <sub>14:0</sub>	11.5	11.9	12.1	11.4	11.1	10.9	11.4	10.9	10.9	11.0	10.9	10.8	0.358	0.624
C <sub>16:1</sub>	0.380	0.553	0.515	0.503	0.653	0.505	0.545	0.477	1.03	0.505	0.750	0.655	0.084	0.081
C <sub>18:0</sub>	0.970	1.01	1.18	1.06	1.03	1.07	1.20	1.04	1.13	1.15	1.18	1.21	0.052	0.065
C <sub>18:1</sub>	0.330	0.285	0.300	0.287	0.257	0.295	0.317	0.287	0.275	0.315	0.410	0.255	0.021	0.082
C <sub>16:0</sub>	28.4 <sup>ab</sup>	28.2 <sup>ab</sup>	26.5 <sup>a</sup>	27.3 <sup>a</sup>	29.9 <sup>ab</sup>	26.9 <sup>a</sup>	26.4 <sup>a</sup>	26.9 <sup>a</sup>	30.8 <sup>ab</sup>	29.7 <sup>ab</sup>	32.5 <sup>b</sup>	27.0 <sup>a</sup>	0.785	0.001
C <sub>16:1</sub>	1.21	1.68	1.27	1.33	1.50	1.34	1.40	1.21	1.41	1.60	1.58	1.33	0.100	0.180
C <sub>17:0</sub>	0.780 <sup>ab</sup>	0.520 <sup>a</sup>	0.725 <sup>ab</sup>	0.663 <sup>ab</sup>	0.600 <sup>ab</sup>	0.711 <sup>b</sup>	0.766 <sup>b</sup>	0.667 <sup>ab</sup>	0.640 <sup>ab</sup>	0.770 <sup>ab</sup>	0.705 <sup>ab</sup>	0.745 <sup>ab</sup>	0.040	0.005
C <sub>17:1</sub>	0.270	0.223	0.205	0.229	0.203	0.278	0.261	0.187	0.285	0.275	0.270	0.280	0.026	0.329
C <sub>18:0</sub>	11.1 <sup>ab</sup>	9.60 <sup>a</sup>	10.1 <sup>ab</sup>	11.2 <sup>ab</sup>	12.2 <sup>ab</sup>	12.1 <sup>ab</sup>	10.7 <sup>ab</sup>	12.5 <sup>ab</sup>	12.6 <sup>ab</sup>	12.1 <sup>ab</sup>	13.6 <sup>b</sup>	11.8 <sup>ab</sup>	0.536	0.007
Trans-C <sub>18:1</sub>	0.450	1.41	0.815	0.797	0.633	0.969	1.13	1.22	0.620	1.01	0.655	1.10	0.205	0.266
Trans-11 C <sub>18:1</sub>	1.29 <sup>a</sup>	3.09 <sup>bc</sup>	2.43 <sup>ab</sup>	2.60 <sup>ab</sup>	1.89 <sup>ab</sup>	2.57 <sup>ab</sup>	2.91 <sup>bc</sup>	2.51 <sup>ab</sup>	1.36 <sup>a</sup>	2.31 <sup>ab</sup>	2.36 <sup>ab</sup>	3.85 <sup>c</sup>	0.303	0.011
Cis-9 C <sub>18:1</sub>	19.5	21.6	19.3	21.6	21.4	22.0	20.4	21.1	20.6	21.3	23.1	20.8	0.972	0.722
C <sub>18:2n-6</sub>	0.31 <sup>abc</sup>	0.678 <sup>bc</sup>	0.66 <sup>abc</sup>	0.607 <sup>abc</sup>	0.370 <sup>abc</sup>	0.546 <sup>abc</sup>	0.665 <sup>c</sup>	0.507 <sup>abc</sup>	0.270 <sup>ab</sup>	0.410 <sup>abc</sup>	0.235 <sup>a</sup>	0.595 <sup>abc</sup>	0.063	<0.001
C <sub>18:2n-6</sub>	2.44 <sup>b</sup>	2.89 <sup>ab</sup>	2.82 <sup>ab</sup>	2.73 <sup>ab</sup>	2.91 <sup>ab</sup>	3.18 <sup>b</sup>	2.97 <sup>ab</sup>	3.27 <sup>b</sup>	2.47 <sup>a</sup>	2.93 <sup>ab</sup>	2.32 <sup>a</sup>	2.76 <sup>ab</sup>	0.148	0.019
C <sub>18:3n-6</sub>	0.040 <sup>ab</sup>	0.038 <sup>ab</sup>	0.040 <sup>ab</sup>	0.040 <sup>ab</sup>	0.043 <sup>ab</sup>	0.063 <sup>b</sup>	0.048 <sup>ab</sup>	0.050 <sup>ab</sup>	0.100 <sup>c</sup>	0.040 <sup>ab</sup>	0.030 <sup>ab</sup>	0.015 <sup>a</sup>	0.008	0.005
C <sub>18:3n-3</sub>	0.590 <sup>abc</sup>	0.648 <sup>abc</sup>	0.970 <sup>abc</sup>	0.736 <sup>abc</sup>	0.463 <sup>ab</sup>	0.805 <sup>bc</sup>	1.00 <sup>c</sup>	0.750 <sup>abc</sup>	0.930 <sup>abc</sup>	0.805 <sup>abc</sup>	0.245 <sup>a</sup>	1.13 <sup>b</sup>	0.096	<0.001
Cis-9, trans-11 C <sub>18:2</sub>	0.635 <sup>a</sup>	1.53 <sup>bc</sup>	1.20 <sup>ab</sup>	1.28 <sup>ab</sup>	0.930 <sup>ab</sup>	1.27 <sup>ab</sup>	1.44 <sup>bc</sup>	1.24 <sup>ab</sup>	0.670 <sup>a</sup>	1.14 <sup>ab</sup>	1.16 <sup>ab</sup>	1.90 <sup>c</sup>	0.149	0.010
Trans-10, cis-12 C <sub>18:2</sub>	0.090	0.048	0.045	0.060	0.010	0.028	0.064	0.047	0.025	0.045	0.045	0.035	0.017	0.366
C <sub>20:0</sub>	0.185	0.140	0.11	0.168	0.117	0.168	0.140	0.153	0.165	0.140	0.120	0.180	0.018	0.351

	Batzos	Formaella Arachovas Parnassou	Graviera Agrafon	Graviera Kriti	Graviera Naxou	Kasseri	Kefalo-graviera	Ladotyri Mytilinis	Mastelo	Metsovone	San Michali	Sfela	SEM	P value
C <sub>20:2</sub>	0.030	0.053	0.07	0.074	0.117	0.059	0.092	0.060	0.015	0.075	0.040	0.100	0.020	0.256
C <sub>20:3n-3</sub>	0.360 <sup>b</sup>	0.245 <sup>ab</sup>	0.295 <sup>abc</sup>	0.298 <sup>bc</sup>	0.220 <sup>ab</sup>	0.240 <sup>ab</sup>	0.230 <sup>ab</sup>	0.250 <sup>ab</sup>	0.190 <sup>a</sup>	0.230 <sup>ab</sup>	0.270 <sup>bc</sup>	0.230 <sup>ab</sup>	0.024	0.034
C <sub>20:3n-6</sub>	0.030 <sup>a</sup>	0.053 <sup>ab</sup>	0.030 <sup>a</sup>	0.031 <sup>a</sup>	0.093 <sup>bc</sup>	0.040 <sup>a</sup>	0.023 <sup>a</sup>	0.033 <sup>a</sup>	0.045 <sup>ab</sup>	0.065 <sup>abc</sup>	0.110 <sup>c</sup>	0.010 <sup>a</sup>	0.008	<0.001
C <sub>20:4</sub>	n.d.	0.010	n.d.	0.013	0.160	0.018	0.005	n.d.	n.d.	n.d.	0.045	n.d.	0.030	0.211
C <sub>20:5</sub>	n.d.	0.005	n.d.	0.012	0.060	0.026	0.034	0.023	0.025	0.030	0.015	n.d.	0.015	0.520
C <sub>21:0</sub>	n.d.	0.058	0.085	0.083	0.043	0.101	0.072	0.077	0.075	0.075	0.040	0.045	0.017	0.148
C <sub>22:0</sub>	n.d.	0.068 <sup>ab</sup>	0.030 <sup>a</sup>	0.076 <sup>ab</sup>	0.083 <sup>ab</sup>	0.158 <sup>b</sup>	0.130 <sup>ab</sup>	0.113 <sup>ab</sup>	0.145 <sup>ab</sup>	0.135 <sup>ab</sup>	0.055 <sup>ab</sup>	0.135 <sup>ab</sup>	0.028	0.039
C <sub>22:2</sub>	n.d.	0.020 <sup>ab</sup>	n.d.	0.040 <sup>ab</sup>	0.083 <sup>ab</sup>	0.155 <sup>ab</sup>	0.099 <sup>ab</sup>	0.047 <sup>ab</sup>	n.d.	0.085 <sup>ab</sup>	0.030 <sup>ab</sup>	0.160 <sup>b</sup>	0.035	0.047
C <sub>22:6</sub>	0.060 <sup>b</sup>	0.033 <sup>ab</sup>	0.050 <sup>b</sup>	0.039 <sup>ab</sup>	0.013 <sup>a</sup>	0.040 <sup>ab</sup>	0.051 <sup>b</sup>	0.040 <sup>ab</sup>	0.035 <sup>ab</sup>	0.040 <sup>ab</sup>	n.d.	0.065 <sup>b</sup>	0.008	0.016
C <sub>23:0</sub>	0.155	0.155	0.185	0.165	0.033	0.101	0.177	0.190	0.165	0.175	0.060	0.085	0.033	0.091
C <sub>26:0</sub>	n.d.	0.058	n.d.	0.046	0.047	0.075	0.047	0.060	0.095	0.075	0.090	0.035	0.015	0.069
C <sub>26:1</sub>	n.d.	0.020	n.d.	0.004	0.007	0.029	0.003	0.013	0.010	0.020	0.025	n.d.	0.010	0.518
SCFA <sup>1</sup>	13.9 <sup>c</sup>	8.72 <sup>ab</sup>	12.6 <sup>bc</sup>	10.4 <sup>bc</sup>	8.85 <sup>ab</sup>	9.22 <sup>bc</sup>	10.7 <sup>bc</sup>	9.783 <sup>abc</sup>	9.13 <sup>bc</sup>	7.69 <sup>ab</sup>	4.17 <sup>a</sup>	9.09 <sup>abc</sup>	1.115	0.036
MCFA <sup>2</sup>	46.7	46.1	45.8	44.6	46.6	43.7	44.4	43.8	47.2	46.4	48.2	43.4	1.082	0.244
LCFA <sup>3</sup>	11.4 <sup>abc</sup>	10.1 <sup>a</sup>	10.5 <sup>ab</sup>	11.7 <sup>bc</sup>	12.5 <sup>bc</sup>	12.7 <sup>bc</sup>	11.3 <sup>abc</sup>	13.1 <sup>bc</sup>	13.3 <sup>bc</sup>	12.7 <sup>bc</sup>	13.9 <sup>c</sup>	12.2 <sup>abc</sup>	0.576	0.015
MUFA <sup>4</sup>	23.4	28.9	24.8	27.3	26.5	27.9	27.0	27.0	25.6	27.3	29.2	28.2	1.081	0.339
PUFA <sup>5</sup>	4.58 <sup>a</sup>	6.24 <sup>ab</sup>	6.18 <sup>ab</sup>	5.96 <sup>ab</sup>	5.48 <sup>ab</sup>	6.47 <sup>b</sup>	6.71 <sup>b</sup>	6.31 <sup>ab</sup>	4.77 <sup>a</sup>	5.88 <sup>ab</sup>	4.55 <sup>a</sup>	6.99 <sup>b</sup>	0.357	0.004
SFA <sup>6</sup>	72.1	64.9	69.0	66.7	68.0	65.6	66.3	66.7	69.6	66.8	66.3	64.8	1.136	0.096
UFA <sup>7</sup>	27.9	35.1	31.0	33.3	32.0	34.4	33.7	33.3	30.4	33.2	33.7	35.2	1.136	0.096
SFA/UFA <sup>8</sup>	2.58 <sup>b</sup>	1.92 <sup>a</sup>	2.24 <sup>ab</sup>	2.01 <sup>ab</sup>	2.13 <sup>ab</sup>	1.91 <sup>a</sup>	1.97 <sup>a</sup>	2.00 <sup>ab</sup>	2.31 <sup>b</sup>	2.01 <sup>ab</sup>	1.97 <sup>a</sup>	1.85 <sup>a</sup>	0.091	0.017
AI <sup>9</sup>	2.85	2.38	2.60	2.32	2.45	2.18	2.28	2.25	2.57	2.34	2.35	2.11	0.113	0.111

**Table 2** Proportions (%) of total fatty acids and physicochemical analysis results of soft, spread and whey cheeses

	Anevato	Feta	Gakotyri	Kalathaki Limnou	Katiki Domokou	Kopanisti	Manouri	Pichtogalo Chanion	White cheese	Xygalos Siteias	Xynomyzithra Kritis	SEM	P value
Number of samples	3	17	4	3	3	5	4	5	9	3	4		
pH	4.22 <sup>ab</sup>	4.36 <sup>b</sup>	3.83 <sup>a</sup>	4.13 <sup>ab</sup>	4.31 <sup>ab</sup>	4.49 <sup>b</sup>	5.70 <sup>c</sup>	4.41 <sup>b</sup>	4.47 <sup>b</sup>	4.08 <sup>ab</sup>	4.30 <sup>ab</sup>	0.110	<0.001
Moisture%	68.0 <sup>de</sup>	54.9 <sup>b</sup>	74.0 <sup>de</sup>	55.9 <sup>bc</sup>	75.0 <sup>de</sup>	62.9 <sup>c</sup>	41.0 <sup>a</sup>	62.9 <sup>c</sup>	58.0 <sup>bc</sup>	78.5 <sup>e</sup>	63.7 <sup>cd</sup>	1.894	<0.001
Fat%	16.5 <sup>bc</sup>	25.8 <sup>d</sup>	10.9 <sup>a</sup>	24.3 <sup>d</sup>	11.3 <sup>ab</sup>	19.2 <sup>cd</sup>	49.4 <sup>e</sup>	19.6 <sup>cd</sup>	20.8 <sup>cd</sup>	8.83 <sup>a</sup>	17.4 <sup>bc</sup>	1.833	<0.001
FDM%	51.3 <sup>ab</sup>	57.2 <sup>b</sup>	41.9 <sup>a</sup>	55.2 <sup>ab</sup>	45.3 <sup>ab</sup>	50.1 <sup>ab</sup>	83.4 <sup>e</sup>	52.6 <sup>ab</sup>	48.7 <sup>ab</sup>	40.6 <sup>a</sup>	47.6 <sup>ab</sup>	2.692	<0.001
NaCl%	1.45 <sup>abc</sup>	2.48 <sup>c</sup>	1.17 <sup>ab</sup>	2.93 <sup>c</sup>	1.09 <sup>ab</sup>	2.76 <sup>c</sup>	1.46 <sup>abc</sup>	0.83 <sup>a</sup>	2.25 <sup>bc</sup>	1.62 <sup>abc</sup>	1.97 <sup>abc</sup>	0.244	<0.001
Proteins%	12.6 <sup>abc</sup>	15.0 <sup>bc</sup>	8.24 <sup>a</sup>	16.1 <sup>bc</sup>	8.54 <sup>a</sup>	11.6 <sup>ab</sup>	8.27 <sup>a</sup>	15.70 <sup>bc</sup>	16.2 <sup>c</sup>	9.02 <sup>a</sup>	15.6 <sup>bc</sup>	0.911	0.001
C <sub>40</sub>	0.120 <sup>ab</sup>	0.074 <sup>a</sup>	0.090 <sup>a</sup>	0.237 <sup>c</sup>	0.027 <sup>a</sup>	0.070 <sup>a</sup>	0.205 <sup>bc</sup>	0.106 <sup>ab</sup>	0.100 <sup>ab</sup>	0.107 <sup>ab</sup>	0.090 <sup>a</sup>	0.029	0.012
C <sub>60</sub>	1.31 <sup>b</sup>	1.02 <sup>b</sup>	0.978 <sup>ab</sup>	1.43 <sup>b</sup>	0.537 <sup>ab</sup>	0.394 <sup>a</sup>	0.963 <sup>ab</sup>	1.23 <sup>b</sup>	1.08 <sup>b</sup>	0.943 <sup>ab</sup>	0.973 <sup>ab</sup>	0.144	0.005
C <sub>80</sub>	2.43 <sup>b</sup>	2.07 <sup>b</sup>	2.01 <sup>b</sup>	2.21 <sup>b</sup>	1.36 <sup>ab</sup>	0.668 <sup>a</sup>	1.54 <sup>ab</sup>	2.14 <sup>b</sup>	1.86 <sup>b</sup>	1.58 <sup>ab</sup>	1.77 <sup>ab</sup>	0.201	<0.001
C <sub>100</sub>	9.53 <sup>c</sup>	7.64 <sup>bc</sup>	8.48 <sup>bc</sup>	7.77 <sup>bc</sup>	7.47 <sup>bc</sup>	2.17 <sup>a</sup>	6.90 <sup>b</sup>	8.74 <sup>bc</sup>	7.08 <sup>b</sup>	6.55 <sup>b</sup>	7.58 <sup>bc</sup>	0.614	<0.001
C <sub>110</sub>	0.087 <sup>ab</sup>	0.099 <sup>b</sup>	0.120 <sup>b</sup>	0.103 <sup>b</sup>	0.107 <sup>ab</sup>	0.034 <sup>a</sup>	0.085 <sup>ab</sup>	0.110 <sup>b</sup>	0.089 <sup>ab</sup>	0.067 <sup>ab</sup>	0.105 <sup>b</sup>	0.014	0.026
C <sub>120</sub>	4.70	4.39	5.27	4.64	5.07	3.32	4.20	5.16	4.19	3.71	4.63	0.521	0.485
C <sub>140</sub>	11.3 <sup>b</sup>	11.0 <sup>b</sup>	12.0 <sup>b</sup>	11.6 <sup>b</sup>	13.0 <sup>b</sup>	5.20 <sup>a</sup>	11.4 <sup>b</sup>	12.6 <sup>b</sup>	10.6 <sup>b</sup>	11.0 <sup>b</sup>	11.7 <sup>b</sup>	0.690	<0.001
C <sub>141</sub>	0.353 <sup>ab</sup>	0.525 <sup>b</sup>	0.583 <sup>b</sup>	0.620 <sup>b</sup>	0.527 <sup>b</sup>	0.210 <sup>a</sup>	0.603 <sup>b</sup>	0.392 <sup>ab</sup>	0.563 <sup>b</sup>	0.433 <sup>ab</sup>	0.528 <sup>b</sup>	0.055	<0.001
C <sub>150</sub>	0.823 <sup>ab</sup>	1.10 <sup>b</sup>	1.18 <sup>b</sup>	1.25 <sup>b</sup>	1.24 <sup>b</sup>	0.496 <sup>a</sup>	1.16 <sup>b</sup>	1.03 <sup>b</sup>	0.993 <sup>b</sup>	0.993 <sup>b</sup>	1.15 <sup>b</sup>	0.108	0.004
C <sub>151</sub>	0.250 <sup>ab</sup>	0.236 <sup>ab</sup>	0.295 <sup>b</sup>	0.357 <sup>b</sup>	0.310 <sup>b</sup>	0.096 <sup>a</sup>	0.310 <sup>b</sup>	0.160 <sup>ab</sup>	0.263 <sup>b</sup>	0.237 <sup>ab</sup>	0.295 <sup>ab</sup>	0.034	0.002
C <sub>160</sub>	27.8 <sup>b</sup>	27.2 <sup>b</sup>	28.7 <sup>b</sup>	26.1 <sup>b</sup>	30.0 <sup>b</sup>	20.1 <sup>a</sup>	27.2 <sup>b</sup>	30.4 <sup>b</sup>	26.1 <sup>b</sup>	29.7 <sup>b</sup>	27.2 <sup>b</sup>	1.178	<0.001
C <sub>161</sub>	1.16 <sup>ab</sup>	1.33 <sup>b</sup>	1.40 <sup>b</sup>	1.43 <sup>b</sup>	1.46 <sup>b</sup>	0.664 <sup>a</sup>	1.38 <sup>b</sup>	1.30 <sup>b</sup>	1.27 <sup>b</sup>	1.30 <sup>b</sup>	1.34 <sup>b</sup>	0.121	0.014
C <sub>170</sub>	0.603 <sup>ab</sup>	0.725 <sup>b</sup>	0.730 <sup>b</sup>	0.830 <sup>b</sup>	0.787 <sup>b</sup>	0.248 <sup>a</sup>	0.765 <sup>b</sup>	0.588 <sup>ab</sup>	0.698 <sup>b</sup>	0.723 <sup>b</sup>	0.730 <sup>b</sup>	0.070	<0.001
C <sub>171</sub>	0.180 <sup>ab</sup>	0.259 <sup>b</sup>	0.233 <sup>ab</sup>	0.350 <sup>b</sup>	0.227 <sup>ab</sup>	0.066 <sup>a</sup>	0.258 <sup>b</sup>	0.242 <sup>b</sup>	0.294 <sup>b</sup>	0.227 <sup>ab</sup>	0.233 <sup>ab</sup>	0.031	<0.001
C <sub>180</sub>	12.3 <sup>b</sup>	12.3 <sup>b</sup>	9.97 <sup>ab</sup>	10.7 <sup>ab</sup>	10.2 <sup>ab</sup>	7.91 <sup>a</sup>	11.7 <sup>ab</sup>	9.06 <sup>a</sup>	11.2 <sup>ab</sup>	10.9 <sup>ab</sup>	10.7 <sup>ab</sup>	0.773	0.004
Trans-C <sub>18:1</sub>	0.557 <sup>ab</sup>	0.886 <sup>ab</sup>	1.61 <sup>b</sup>	0.643 <sup>ab</sup>	1.10 <sup>ab</sup>	0.456 <sup>a</sup>	0.848 <sup>ab</sup>	0.942 <sup>ab</sup>	0.897 <sup>ab</sup>	1.20 <sup>ab</sup>	1.07 <sup>ab</sup>	0.178	0.038
Trans-11 C <sub>18:1</sub> *	1.27	2.48	2.36	2.23	1.90	2.60	2.38	2.39	2.78	2.51	2.86	0.563	0.952
Cis-9 C <sub>18:1</sub>	20.8	20.3	18.1	21.0	18.8	21.7	21.7	18.5	23.2	21.6	19.9	1.784	0.712
C <sub>18:2n-6</sub>	0.290 <sup>ab</sup>	0.545 <sup>bc</sup>	0.645 <sup>bc</sup>	0.673 <sup>c</sup>	0.470 <sup>bc</sup>	0.110 <sup>a</sup>	0.520 <sup>b</sup>	0.338 <sup>bc</sup>	0.464 <sup>bc</sup>	0.527 <sup>bc</sup>	0.580 <sup>bc</sup>	0.056	<0.001
C <sub>18:2n-6c</sub>	2.28 <sup>a</sup>	2.65 <sup>a</sup>	2.42 <sup>a</sup>	2.73 <sup>a</sup>	2.47 <sup>a</sup>	28.8 <sup>b</sup>	2.73 <sup>a</sup>	2.26 <sup>a</sup>	2.80 <sup>a</sup>	2.45 <sup>a</sup>	2.95 <sup>a</sup>	1.926	<0.001
C <sub>18:3n-6</sub>	0.043 <sup>a</sup>	0.035 <sup>a</sup>	0.063 <sup>a</sup>	0.020 <sup>a</sup>	0.053 <sup>a</sup>	0.258 <sup>b</sup>	0.048 <sup>a</sup>	0.032 <sup>a</sup>	0.089 <sup>a</sup>	0.027 <sup>a</sup>	0.043 <sup>a</sup>	0.039	0.017
C <sub>18:3n-3</sub>	0.540 <sup>a</sup>	0.835 <sup>a</sup>	0.683 <sup>a</sup>	0.940 <sup>a</sup>	0.753 <sup>a</sup>	2.19 <sup>a</sup>	0.883 <sup>a</sup>	0.512 <sup>a</sup>	0.910 <sup>a</sup>	0.773 <sup>a</sup>	0.893 <sup>a</sup>	0.276	0.037
Cis-9, trans-11 C <sub>18:2</sub>	0.627	1.22	1.17	1.10	0.937	1.28	1.18	1.18	1.37	1.24	1.41	0.277	0.953
Trans-10, cis-12, C <sub>18:2</sub>	0.033 <sup>a</sup>	0.046 <sup>a</sup>	0.018 <sup>a</sup>	0.067 <sup>a</sup>	0.073 <sup>a</sup>	0.190 <sup>b</sup>	0.038 <sup>a</sup>	n.d.	0.073 <sup>a</sup>	0.077 <sup>a</sup>	0.065 <sup>a</sup>	0.017	<0.001
C <sub>200</sub>	0.127	0.144	0.125	0.083	0.163	0.098	0.170	0.118	0.149	0.197	0.163	0.021	0.166
C <sub>20:2</sub>	0.023 <sup>a</sup>	0.078 <sup>ab</sup>	0.073 <sup>ab</sup>	0.100 <sup>b</sup>	0.043 <sup>ab</sup>	0.024 <sup>a</sup>	0.063 <sup>ab</sup>	0.028 <sup>a</sup>	0.067 <sup>ab</sup>	0.053 <sup>ab</sup>	0.093 <sup>b</sup>	0.016	0.041

**Table 2** (continued)

	Anevato	Feta	Gakotyri	Kalathaki Limnou	Katiki Domokou	Kopanisti	Manouri	Pichtogalo Chanion	White cheese	Xygalos Siteias	Xynomyzithra Kritis	SEM	P value
C <sub>20:3n-3</sub>	0.313 <sup>b</sup>	0.222 <sup>ab</sup>	0.150 <sup>a</sup>	0.270 <sup>ab</sup>	0.217 <sup>ab</sup>	0.348 <sup>b</sup>	0.263 <sup>ab</sup>	0.214 <sup>ab</sup>	0.173 <sup>a</sup>	0.190 <sup>ab</sup>	0.245 <sup>ab</sup>	0.031	0.008
C <sub>20:3n-6</sub>	n.d.	0.026	0.015	0.027	0.017	0.042	0.025	0.008	0.076	0.023	0.033	0.015	0.060
C <sub>20:4</sub>	n.d.	0.021	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.012	0.093	0.090	0.026	0.357
C <sub>20:5</sub>	n.d.	0.035 <sup>ab</sup>	0.045 <sup>b</sup>	0.027 <sup>ab</sup>	0.040 <sup>ab</sup>	n.d.	0.015 <sup>ab</sup>	n.d.	0.042 <sup>ab</sup>	n.d.	0.050 <sup>b</sup>	0.011	0.010
C <sub>21:0</sub>	0.020 <sup>ab</sup>	0.088 <sup>ab</sup>	0.095 <sup>ab</sup>	0.103 <sup>b</sup>	0.080 <sup>ab</sup>	0.036 <sup>ab</sup>	0.088 <sup>ab</sup>	0.010 <sup>a</sup>	0.091 <sup>ab</sup>	0.083 <sup>ab</sup>	0.085 <sup>ab</sup>	0.020	0.048
C <sub>22:0</sub>	n.d.	0.099 <sup>abc</sup>	0.130 <sup>bc</sup>	0.057 <sup>bc</sup>	0.140 <sup>bc</sup>	0.022 <sup>ab</sup>	0.125 <sup>bc</sup>	0.018 <sup>ab</sup>	0.128 <sup>bc</sup>	0.167 <sup>c</sup>	0.135 <sup>bc</sup>	0.030	0.017
C <sub>22:2</sub>	0.043 <sup>ab</sup>	0.134 <sup>b</sup>	0.103 <sup>ab</sup>	0.040 <sup>ab</sup>	n.d.	0.024 <sup>ab</sup>	0.125 <sup>bc</sup>	0.016 <sup>ab</sup>	0.092 <sup>ab</sup>	0.060 <sup>ab</sup>	0.040 <sup>ab</sup>	0.032	0.037
C <sub>22:6</sub>	0.037 <sup>ab</sup>	0.038 <sup>ab</sup>	0.028 <sup>ab</sup>	0.043 <sup>ab</sup>	0.040 <sup>ab</sup>	0.004 <sup>a</sup>	0.050 <sup>b</sup>	0.024 <sup>ab</sup>	0.054 <sup>b</sup>	0.027 <sup>ab</sup>	0.045 <sup>b</sup>	0.010	0.050
C <sub>23:0</sub>	0.067 <sup>ab</sup>	0.087 <sup>ab</sup>	0.135 <sup>abc</sup>	0.133 <sup>bc</sup>	0.257 <sup>c</sup>	0.028 <sup>a</sup>	0.168 <sup>bc</sup>	0.076 <sup>ab</sup>	0.131 <sup>abc</sup>	0.153 <sup>bc</sup>	0.220 <sup>bc</sup>	0.030	0.001
C <sub>24:0</sub>	n.d.	0.032 <sup>ab</sup>	0.060 <sup>ab</sup>	0.050 <sup>ab</sup>	0.077 <sup>b</sup>	0.076 <sup>b</sup>	0.030 <sup>ab</sup>	0.004 <sup>a</sup>	0.062 <sup>ab</sup>	0.017 <sup>ab</sup>	0.065 <sup>ab</sup>	0.013	0.004
C <sub>24:1</sub>	n.d.	0.008	n.d.	n.d.	0.010	0.002	0.0025	0.010	0.008	0.010	0.015	0.005	0.658
SCFA <sup>1</sup>	13.5 <sup>a</sup>	10.9 <sup>bc</sup>	11.7 <sup>bc</sup>	11.7 <sup>bc</sup>	9.51 <sup>b</sup>	3.34 <sup>a</sup>	9.68 <sup>b</sup>	12.3 <sup>bc</sup>	10.2 <sup>bc</sup>	9.25 <sup>b</sup>	10.5 <sup>bc</sup>	0.889	<0.001
MCFA <sup>2</sup>	45.2 <sup>b</sup>	44.4 <sup>b</sup>	47.8 <sup>b</sup>	44.5 <sup>b</sup>	50.1 <sup>b</sup>	29.4 <sup>a</sup>	44.6 <sup>b</sup>	49.8 <sup>b</sup>	42.6 <sup>b</sup>	46.2 <sup>b</sup>	45.4 <sup>b</sup>	2.036	<0.001
LCFA <sup>3</sup>	12.5 <sup>ab</sup>	12.8 <sup>b</sup>	10.5 <sup>ab</sup>	11.1 <sup>ab</sup>	11.0 <sup>ab</sup>	8.17 <sup>a</sup>	12.3 <sup>ab</sup>	9.29 <sup>a</sup>	11.7 <sup>ab</sup>	11.5 <sup>ab</sup>	11.3 <sup>ab</sup>	0.797	0.004
MUFA <sup>4</sup>	24.5	26.0	24.6	26.6	24.3	25.8	27.5	24.0	29.3	27.5	26.2	1.563	0.429
PUFA <sup>5</sup>	4.22 <sup>a</sup>	5.88 <sup>a</sup>	5.40 <sup>a</sup>	6.03 <sup>a</sup>	5.13 <sup>a</sup>	33.3 <sup>b</sup>	5.92 <sup>a</sup>	4.61 <sup>a</sup>	6.23 <sup>a</sup>	5.53 <sup>a</sup>	6.54 <sup>a</sup>	2.157	<0.001
SFA <sup>6</sup>	71.2 <sup>b</sup>	68.1 <sup>b</sup>	70.0 <sup>b</sup>	67.4 <sup>b</sup>	70.6 <sup>b</sup>	40.9 <sup>a</sup>	66.6 <sup>b</sup>	71.4 <sup>b</sup>	64.5 <sup>b</sup>	67.0 <sup>b</sup>	67.3 <sup>b</sup>	2.683	<0.001
UFA <sup>7</sup>	28.8 <sup>a</sup>	31.9 <sup>a</sup>	30.0 <sup>a</sup>	32.7 <sup>a</sup>	29.5 <sup>a</sup>	59.1 <sup>b</sup>	33.4 <sup>a</sup>	28.6 <sup>a</sup>	35.5 <sup>a</sup>	33.0 <sup>a</sup>	32.7 <sup>a</sup>	2.683	<0.001
SFA/UFA <sup>8</sup>	2.49 <sup>b</sup>	2.16 <sup>b</sup>	2.35 <sup>b</sup>	2.07 <sup>b</sup>	2.43 <sup>b</sup>	0.874 <sup>a</sup>	2.00 <sup>b</sup>	2.54 <sup>b</sup>	1.91 <sup>b</sup>	2.09 <sup>b</sup>	2.06 <sup>b</sup>	0.160	<0.001
AI <sup>9</sup>	2.71 <sup>bc</sup>	2.39 <sup>bc</sup>	2.75 <sup>bc</sup>	2.37 <sup>bc</sup>	3.02 <sup>c</sup>	0.984 <sup>b</sup>	2.30 <sup>bc</sup>	3.07 <sup>c</sup>	2.15 <sup>b</sup>	2.43 <sup>bc</sup>	2.41 <sup>bc</sup>	0.200	<0.001