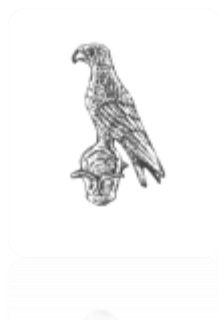


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ



Αντιοξειδωτική δράση και συγκέντρωση πεπτιδίων
υδατικών εκχυλισμάτων
Φέτας, Μετσοβόνη και συναφών τυριών

Δίπλωμα ειδίκευσης στη Χημεία, με κατεύθυνση στην Αναλυτική
Χημεία, Χημεία και Τεχνολογία Περιβάλλοντος και Τροφίμων

ΚΑΛΛΕ ΑΘΗΝΑ
ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΡΟΥΣΣΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ
ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2024

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία επικεντρώνεται σε τυριά άλμης και καπνιστά τυριά. Η σημασία που έχει η διατροφική αξία των τυριών για τους καταναλωτές, καθώς και η ιστορία και ο πολιτισμικός πλούτος που συνοδεύουν αυτά τα τυριά, μας οδήγησαν στην επιλογή του θέματος της εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον υπεύθυνο καθηγητή κ. Ιωάννη Ρούσση για την εμπιστοσύνη και την ανάθεση του θέματος έρευνας μου. Η καθοδήγησή του και η εμπειρία του αποτέλεσαν καθοριστικούς παράγοντες για την επιτυχή ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου προς τους συναδέλφους μου για τη στήριξη και την άψογη συνεργασία. Η συμβολή τους υπήρξε πολύ σημαντική για την εκπαίδευσή και την εξέλιξή μου.

Οι ευχαριστίες μου αποδίδονται και στις βιομηχανίες Δωδώνη, Καράλης, Μπίζιος, Ερυμάνθου Τομαράς, Βλάχα, Ίδρυμα Τοσίτσα, Παππάς και Βερμίου Μπέλας, που μας παρείχαν τα δείγματα και επομένως, συνέβαλλαν στην υλοποίηση της έρευνας μου.

Τέλος, θέλω να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου προς την οικογένειά μου και τους δικούς μου ανθρώπους. Η αγάπη και η αμέριστη υποστήριξή τους αποτέλεσαν την κινητήρια δύναμη πίσω από κάθε μου προσπάθεια και κάθε μου επιτυχία. Ένα μεγάλο ευχαριστώ και στον φίλο μου Σωκράτη για την υπομονή, την κατανόηση, και την καθοριστική στήριξη για την επίτευξη των στόχων μου.

Η έρευνα πραγματοποιήθηκε με υποστήριξη από το έργο «Ανάπτυξη ερευνητικών υποδομών για το σχεδιασμό, την παραγωγή και την ανάδειξη των χαρακτηριστικών ποιότητας και ασφάλειας των αγροδιατροφικών και βιολειτουργικών προϊόντων (ΕΥ-ΑΓΡΟΔΙΑΤΡΟΦΗ)» (MIS 5047235), που υλοποιείται στο πλαίσιο της δράσης «Ενίσχυση των Υποδομών Έρευνας και Καινοτομίας», που χρηματοδοτείται από το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα και Καινοτομία» (ΕΣΠΑ 2014–2020) και συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης).

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία έγινε αποτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης και της συγκέντρωσης πεπτιδίων υδατικών εκχυλισμάτων τυριού Φέτα και άλλων τυριών άλμης, καθώς και τυριού Μετσοβόνη και άλλων καπνιστών τυριών. Επίσης, αποτιμήθηκε η αντιφλεγμονώδης δράση των υδατικών εκχυλισμάτων των τυριών. Αναλύθηκαν τα υδατικά εκχυλίσματα τυριών Φέτα, γίδινων και αγελαδινών τυριών άλμης. Το Μετσοβόνη και τα άλλα καπνιστά τυριά, που αναλύθηκαν, παρασκευάστηκαν από αγελαδινό γάλα.

Η αντιοξειδωτική δράση των υδατικών εκχυλισμάτων των τυριών προσδιορίστηκε με τις μεθόδους Folin και FRAP, ενώ η συγκέντρωση πεπτιδίων προσδιορίστηκε με τις μεθόδους Bradford και Lowry. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ανά L υδατικού εκχυλίσματος. Η αντιφλεγμονώδης δράση αποτιμήθηκε με τη μέθοδο της λιποξυγενάσης και εκφράστηκε ως % αναστολή.

Αναλύθηκαν δείγματα ώριμων τυριών Φέτα (από Ήπειρο, Θεσσαλία, Δυτική Ελλάδα), δείγματα ώριμων γίδινων τυριών άλμης (από Ήπειρο, Θεσσαλία, Δυτική Ελλάδα) και δείγματα ώριμων αγελαδινών τυριών άλμης (από Ήπειρο, Θεσσαλία, Κεντρική Μακεδονία). Επίσης, έγινε ανάλυση δειγμάτων τυριού Φέτα (από Ήπειρο) κατά την ωρίμανση και διατήρηση του. Αναλύθηκαν δείγματα ώριμου τυριού Μετσοβόνη και δείγματα άλλων ώριμων καπνιστών τυριών (από Ήπειρο και Κεντρική Μακεδονία). Επίσης, αναλύθηκαν και δείγματα τυριού Μετσοβόνη κατά τη διατήρηση του (6 μηνών).

Τα υδατικά εκχυλίσματα των τυριών Φέτα και άλλων τυριών άλμης, καθώς και Μετσοβόνη και άλλων καπνιστών τυριών, παρουσίασαν αντιοξειδωτική δράση.

Τα υδατικά εκχυλίσματα των ώριμων τυριών Φέτα παρουσίασαν στατιστικά υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση από τα υδατικά εκχυλίσματα των ώριμων αγελαδινών τυριών άλμης (μέθοδοι Folin και FRAP). Τα υδατικά εκχυλίσματα των ώριμων τυριών Φέτα δεν παρουσίασαν στατιστικές σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση αμινοξέων και πεπτιδίων σε σύγκριση με τα υδατικά εκχυλίσματα ώριμων αγελαδινών τυριών άλμης. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι πιθανόν μπορεί να στοιχειοθετείται διαφοροποίηση των ώριμων τυριών Φέτα από τα ώριμα αγελαδινά τυριά άλμης με βάση την αντιοξειδωτική δράση των υδατικών εκχυλισμάτων τους.

Τα υδατικά εκχυλίσματα των ώριμων τυριών Φέτα παρουσίασαν στατιστικά υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση (μέθοδοι Folin και FRAP) και στατιστικά υψηλότερη συγκέντρωση αμινοξέων και πεπτιδίων (μέθοδοι Lowry και Bradford) από τα υδατικά εκχυλίσματα των ώριμων γίδινων τυριών άλμης. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι πιθανόν μπορεί να στοιχειοθετείται διαφοροποίηση των ώριμων τυριών Φέτα από τα ώριμα γίδινα τυριά άλμης με βάση την αντιοξειδωτική δράση και τη συγκέντρωση αμινοξέων και πεπτιδίων των υδατικών εκχυλισμάτων τους.

Τα υδατικά εκχυλίσματα των ώριμων τυριών Φέτα από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας παρουσίασαν κάποιες στατιστικά σημαντικές διαφορές στην αντιοξειδωτική δράση και στα επίπεδα των αμινοξέων και πεπτιδίων.

Τα υδατικά εκχυλίσματα του τυριού Φέτα κατά την ωρίμανση και διατήρηση του παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αύξηση στην αντιοξειδωτική δράση (μέθοδος Folin), είτε όχι (μέθοδος FRAP). Κατά την ωρίμανση και διατήρηση του τυριού Φέτα παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση στα επίπεδα αμινοξέων και πεπτιδίων (μέθοδος Lowry). Τα επίπεδα πεπτιδίων $> 3-5$ kDa (μέθοδος Bradford) εμφάνισαν διακυμάνσεις.

Τα υδατικά εκχυλίσματα του ώριμου τυριού Μετσοβόνη και άλλων ώριμων καπνιστών τυριών παρουσίασαν αντιοξειδωτική δράση (μέθοδοι Folin και FRAP) με κάποιες στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις. Επίσης, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση αμινοξέων και πεπτιδίων των υδατικών εκχυλισμάτων των τυριών (μέθοδοι Lowry και Bradford).

Κατά τη διατήρηση του τυριού Μετσοβόνη (3-6 μήνες) παρατηρήθηκε αύξηση στην αντιοξειδωτική δράση και στη συγκέντρωση αμινοξέων και πεπτιδίων (μέθοδος Lowry).

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν και ανά kg τυριού για αποτίμηση από διαιτητική άποψη. Τα αποτελέσματα ήταν ανάλογα με τα αποτελέσματα ανά L με κάποιες διαφοροποιήσεις.

Τα υδατικά εκχυλίσματα των τυριών Φέτα και άλλων τυριών άλμης, καθώς και Μετσοβόνη και άλλων καπνιστών τυριών, παρουσίασαν κάποια αντιφλεγμονώδη δράση.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	8
1.1. Ιστορική αναδρομή και ορισμός τυριού.....	8
1.2. Τυριά άλμης.....	10
1.3. Καπνιστά τυριά.....	11
1.4. Θετικές επιδράσεις του τυριού στην Υγεία.....	12
1.4.1. Αντιοξειδωτική δράση.....	12
1.4.2. Αντιφλεγμονώδης δράση.....	14
1.4.3. Άλλες θετικές επιδράσεις.....	14
1.5. Υδατικό εκχύλισμα τυριού και πεπτίδια.....	17
1.5.1. Πεπτίδια κατά την παρασκευή και ωρίμανση τυριών.....	17
1.5.2. Πεπτίδια και βιοδράσεις.....	20
1.6. Αρχή μεθόδων ανάλυσης υδατικού εκχυλίσματος τυριού.....	23
1.6.1. Λήψη υδατικού εκχυλίσματος τυριού.....	23
1.6.1. Μέθοδοι προσδιορισμού συγκέντρωσης πεπτιδίων.....	25
1.6.1. Μέθοδοι προσδιορισμού αντιοξειδωτικής δράσης.....	27
1.6.3. Μέθοδος προσδιορισμού αντιφλεγμονώδους δράσης.....	31
1.7. Σκοπός	32
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	33
2.1. Δείγματα.....	33
2.2. Αντιδραστήρια.....	33
2.3. Όργανα.....	33

2.4. Μέθοδοι προσδιορισμού πεπτιδίων, αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης, σε υδατικό εκχύλισμα τυριού.....	34
2.4.1. Λήψη υδατικού εκχυλίσματος τυριού.....	34
2.4.2. Προσδιορισμός pH.....	35
2.4.3. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πεπτιδίων με εφαρμογή της μεθόδου Bradford.....	35
2.4.4. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πεπτιδίων με εφαρμογή της μεθόδου Lowry.....	36
2.4.5. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης με εφαρμογή της μεθόδου Folin-Ciocalteu.....	37
2.4.6. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης με εφαρμογή της μεθόδου FRAP.....	38
2.4.7. Προσδιορισμός της αντιφλεγμονώδους δράσης με εφαρμογή της μεθόδου της λιποξυγενάσης.....	39
2.5. Στατιστική ανάλυση.....	40
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	41
3.1. Συγκέντρωση πεπτιδίων και αντιοξειδωτική δράση υδατικών εκχυλισμάτων τυριών άλμης.....	41
3.1.1. Τυριά Φέτα, αγελαδινά και γίδινα τυριά άλμης.....	41
3.1.2. Τυρί Φέτα κατά την ωρίμανση και διατήρηση του.....	49
3.2. Συγκέντρωση πεπτιδίων και αντιοξειδωτική δράση υδατικών εκχυλισμάτων καπνιστών τυριών.....	52
3.2.1. Τυρί Μετσοβόνη και άλλα καπνιστά τυριά από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας.....	52

3.2.2. Τυρί Μετσοβόνη κατά τη διατήρηση του.....	54
3.3. Αντιφλεγμονώδης δράση υδατικών εκχυλισμάτων τυριών.....	56
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	59
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	60

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. Ιστορική αναδρομή και ορισμός τυριού

Το τυρί πιστεύεται ότι αναπτύχθηκε στην «Εύφορη Ημισέληνο» μεταξύ του Τίγρη και του Ευφράτη, στο Ιράκ, περίπου 8.000 χρόνια πριν. Η λεγόμενη «Αγροτική Επανάσταση» προκλήθηκε με την εξημέρωση φυτών και ζώων. Πιθανώς, ο άνθρωπος συνειδητοποίησε σύντομα τη θρεπτική αξία του γάλακτος που παράγεται από τα εξημερωμένα ζώα και επινόησε την αξιοποίηση του μητρικού γάλακτος στην κατανάλωση των απογόνων του. Όμως, το γάλα αποτελεί επίσης μια πλούσια πηγή θρεπτικών συστατικών για να ευδοκimoύν τα βακτήρια, τα οποία προκαλούν μόλυνση του γάλακτος, όπως ορισμένα είδη χρησιμοποιούν τη λακτόζη του γάλακτος ως πηγή ενέργειας, παράγοντας γαλακτικό οξύ ως παραπροϊόν. Η βακτηριακή ανάπτυξη και η παραγωγή οξέος ευνοήθηκε κατά την αποθήκευση ή τη διάρκεια προσπαθειών ξήρανσης γάλακτος σε ζεστό, ξηρό κλίμα ως πρωτόγονη μορφή συντήρησης τροφίμων. Κατά την παραγωγή επαρκούς οξέος, οι κύριες πρωτεΐνες του γάλακτος, δηλαδή οι καζεΐνες συσσωρεύονται για να σχηματίσουν ένα πήκτωμα που παγιδεύει το λίπος. Έτσι τα πρώτα γαλακτοκομικά προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση στον κόσμο παρήχθησαν τυχαία. Παρόμοια προϊόντα είναι ιδιαίτερα δημοφιλή στη Μέση Ανατολή και παγκοσμίως. Τα πρώτα γαλακτοκομικά ζυμωμένα προϊόντα παρήχθησαν από έναν τυχαίο συνδυασμό γεγονότων, όπως η ικανότητα των γαλακτικών βακτηρίων να αναπτύσσονται στο γάλα και να παράγουν οξύ, επιτυγχάνοντας μείωση του pH έως το ισοηλεκτρικό σημείο των καζεϊνών, στο οποίο και πήζουν (1).

Η τυροκομία στην Ελλάδα έχει παράδοση χιλιετιών. Κατά τον 8^ο αιώνα π.Χ., στην «Οδύσσεια», ο Όμηρος περιέγραψε το βοσκό και τυροκόμο Πολύφημο του 12^{ου} αιώνα π.Χ., καθώς και τα τυριά του. Ο Διόδωρος (1^{ος} αιώνας π.Χ.), Έλληνας ιστορικός από τη Σικελία, έγραψε ότι ο Αριστέας, γιος του Απόλλωνα και εγγονός του Δία, που είχε μάθει την τέχνη της τυροκομίας από τις νύμφες, στάλθηκε από τους θεούς του Ολύμπου στους Έλληνες για να διδάξει την παρασκευή τυριού. Δεδομένης της αξίας του τυριού ως τροφής, δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι οι αρχαίοι Έλληνες θεωρούσαν το τυρί ως θεϊκή εφεύρεση και δώρο. Το τυρί που περιέγραψε ο Όμηρος ενδέχεται να είναι ο πρόγονος της Φέτας, και ήταν το κύριο τυρί που παρασκευάζεται στην Ελλάδα από τα αρχαία χρόνια. Εν τω μεταξύ, διάφοροι τύποι τυριών εξελίχθηκαν μέσα στους αιώνες έτσι ώστε τώρα, κάθε περιοχή και σχεδόν

κάθε νησί να έχει τη δική του μοναδική παράδοση τυροκομίας. Πολλά παραδοσιακά τυριά παρασκευάζονται ακόμα σε όλη την Ελλάδα. Μερικά είναι είδη τυριών της ίδιας ποικιλίας αλλά είναι γνωστά με διαφορετικά τοπικά ονόματα, καθώς ενδέχεται να έχουν διαφοροποίηση στα στάδια παρασκευής ή πιθανώς την ίδια διαδικασία παραγωγής. Είκοσι από αυτά αναγνωρίστηκαν ως τυριά προστατευόμενης ονομασίας προέλευσης (ΠΟΠ). Τα ελληνικά παραδοσιακά τυριά μπορούν να ομαδοποιηθούν σε πέντε κατηγορίες ανάλογα με την τεχνολογία παρασκευής τους: τυριά σε άλμη, μαλακά τυριά, ημίσκληρα, σκληρά τυριά και τυριά ορού γάλακτος (2).

Ο ορισμός του τυριού καθίσταται ιδιαίτερα πολύπλοκος λόγω της μεγάλης ποικιλίας των διαφόρων τύπων τυριού. Επομένως, υφίσταται δυσκολία στη διατύπωση ενός καθολικά αποδεκτού ορισμού για όλους τους τύπους τυριών. Ο Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) των Ηνωμένων Εθνών έδωσε τον ακόλουθο ορισμό: «Το τυρί είναι το προϊόν ωρίμανσης του πηγματος, απαλλαγμένο από το τυρόγαλα, που λαμβάνεται με την πήξη γάλακτος, κρέμας γάλακτος, αποβουτυρωμένου ή μερικώς αποβουτυρωμένου ή βουτυρωμένου γάλακτος ή συνδυασμού τους». Αυτός ο ορισμός δεν περιλαμβάνει τα τυριά ορού γάλακτος και εκείνα που παρασκευάζονται με πιο σύγχρονες διαδικασίες. Ένας δεύτερος ορισμός προστέθηκε για το τυρί ορού γάλακτος: «Τυρί τυρογάλακτος είναι το προϊόν που λαμβάνεται με ισχυρή θέρμανση του ορού γάλακτος με ή χωρίς προσθήκη γάλακτος ή κρέμας γάλακτος». Αν και οι διεθνείς οργανισμοί απαριθμούν τα ονόματα των τυριών, και μάλιστα την προέλευση, τη σύνθεση και άλλες λεπτομέρειες τους, οι ορισμοί και οι λεπτομέρειες δεν είναι απολύτως ικανοποιητικές για τον πρακτικό τυροκόμο, που χρειάζεται να γνωρίζει περισσότερα για μεμονωμένες ποικιλίες σε σχέση με το είδος του γάλακτος, μεθόδους παρασκευής και δυνατότητες εμπορίας. Η ποικιλομορφία και η πολυπλοκότητα των ποικιλιών τυριού θέτει προκλήσεις στην ταξινόμηση, συνήθως με βάση τις ιδιότητες υφής ή τις τεχνολογικές διαδικασίες. Η πιο απλή ταξινόμηση των τυριών είναι εκείνη σε πολύ σκληρά, σκληρά, ημί-σκληρα, μαλακά και φρέσκα (3).

Το τυρί είναι ένα τρόφιμο πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά και η διατροφική του αξία καθορίζεται από διάφορες παραμέτρους, όπως τον τύπο γάλακτος (είδος ζώου, φυλή, στάδιο γαλουχίας, περιεκτικότητα σε λιπαρά) και τις διαδικασίες παρασκευής και ωρίμανσης. Το τυρί περιέχει λίπος και καζεΐνες, τα οποία είναι συστατικά του γάλακτος, που κατακρατούνται στο τυρόπηγμα κατά την παρασκευή του. Επίσης,

περιέχει σχετικά μικρές ποσότητες των υδατοδιαλυτών συστατικών του γάλακτος, όπως πρωτεΐνες ορού γάλακτος, λακτόζη, ορισμένες βιταμίνες, που απομακρύνονται κυρίως με τον ορό γάλακτος. Επομένως, το τυρί αποτελείται κυρίως από λίπος, πρωτεΐνες και νερό, καθώς και βιταμίνες, μέταλλα και ιχνοστοιχεία (4, 5).

Το τυρί περιέχει υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη, η οποία κυμαίνεται μεταξύ 4% (τυρί κρέμα) και 40% (παρμεζάνα) ανάλογα με την ποικιλία του τυριού. Η θρεπτική αξία των πρωτεϊνών του τυριού δεν αλλάζει κατά την τυροκομία και η περιεκτικότητα της τείνει να ποικίλλει αντιστρόφως με την περιεκτικότητα σε λιπαρά. Η πρωτεΐνη του τυριού είναι σχεδόν 100% εύπεπτη, καθώς κατά τη φάση ωρίμανσης του τυριού υφίστανται διάσπαση της καζεΐνης σε υδατοδιαλυτά πεπτίδια και ελεύθερα αμινοξέα. Μεταξύ αυτών των πεπτιδίων, υπάρχει ένας αριθμός βιοδραστικών πεπτιδίων, τα οποία είναι ενεργά μόνο εφόσον απελευθερωθούν από τη μητρική τους πρωτεΐνη μέσω πρωτεόλυσης. Επίσης, εμφανίζουν ένα ευρύ φάσμα βιοδράσεων, όπως αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή, αντιφλεγμονώδης, αντιυπερτασική δράση κ.α. (4-7).

1.2. Τυριά άλμης

Ο όρος «τυριά άλμης» περιγράφει μια ομάδα των ειδών τυριού που ωριμάζουν και διατηρούνται σε άλμη για σημαντικό χρονικό διάστημα μέχρι την κατανάλωση τους (8). Το γίδινο τυρί άλμης και το αγελαδινό τυρί άλμης είναι τυριά από γίδινο και αγελαδινό γάλα, αντίστοιχα, τα οποία έχουν ωριμάσει και διατηρηθεί σε άλμη. Το γίδινο γάλα έχει λιγότερα αλλεργιογόνα και διαφορετική σύνθεση λιπαρών οξέων σε σύγκριση με το αγελαδινό (9).

Η Φέτα είναι το πιο διαδεδομένο ελληνικό τυρί που παράγεται από την ομηρική κιόλας εποχή και κατέχει εξέχουσα θέση σε ελληνική και διεθνή αγορά, με πρωτιά σε εξαγωγικές πωλήσεις. Το τυρί Φέτα ανήκει στην ομάδα των τυριών άλμης. Από το 2002, η Φέτα αποτελεί προϊόν προστατευόμενης ονομασίας προέλευσης (ΠΟΠ) στην Ευρωπαϊκή Ένωση. Σύμφωνα με τη σχετική νομοθεσία της ΕΕ, τα τρόφιμα ΠΟΠ πρέπει να συμμορφώνονται σε ορισμένες προδιαγραφές, οι οποίες είναι ονομασία, προέλευση και χαρακτηριστικά της πρώτης ύλης, περιγραφή της μεθόδου παραγωγής, ορισμό της γεωγραφικής περιοχής προέλευσης και παραγωγής, λεπτομέρειες για τις δομές επιθεώρησης και ειδικές λεπτομέρειες επισημάνσεως (10). Η Φέτα, λοιπόν, χαρακτηριζόμενη ως ΠΟΠ τυρί, πρέπει να παράγεται είτε αποκλειστικά από πρόβειο

γάλα είτε από μείγμα πρόβειου και γίδινου γάλακτος, όπου το γίδινο να είναι σε περιεκτικότητα έως και 30%, σε συγκεκριμένες περιοχές της Ελλάδας, μεταξύ των οποίων και η Ήπειρος (11). Η σύσταση και τα θρεπτικά χαρακτηριστικά της Φέτας εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες, όπως η σύσταση της πρώτης ύλης (γάλα), η μικροβιακή σύσταση του προϊόντος, η περιεκτικότητα σε αλάτι, καθώς και η διάρκεια και οι συνθήκες ωρίμανσης. Για παράδειγμα, η μέθοδος αλατίσματος, που ενδεχομένως διαφοροποιείται μεταξύ των παραγωγών, μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την περιεκτικότητα σε αλάτι και σε λιπαρά του τελικού προϊόντος. Επίσης, και οι συνθήκες και ο χρόνος ωρίμανσης επηρεάζουν την τελική σύσταση του τυριού, καθώς αυτοί οι παράγοντες καθορίζουν το είδος και την έκταση λιπόλυσης και πρωτεόλυσης (12). Η σύσταση του τυριού Φέτα κυμαίνεται από 47–56 % υγρασία, 22–28% λίπος και 15–18 % πρωτεΐνη (13).

1.3. Καπνιστά τυριά

Τα καπνιστά τυριά παρασκευάζονται από διάφορα είδη γάλακτος, αγελαδινό, πρόβειο και γίδινο, και παραδοσιακά καπνίζονται για να παραταθεί η διάρκεια ζωής του. Η διάρκεια ζωής του γάλακτος είναι μικρή και η κάπνιση έγινε ένας τρόπος παροχής ωφέλιμων θρεπτικών συστατικών, όπως το ασβέστιο, καθώς και δυνατότητα διατήρησης του λόγω απουσίας μέσων ψύξης. Πλέον, η κάπνιση εφαρμόζεται στο τυρί για να επιτευχθεί διαφοροποίηση και ιδιαιτερότητα του τυριού. Το τυρί μπορεί να καπνιστεί είτε με την προσθήκη ενώσεων αρώματος “καπνιστού” είτε παραδοσιακών σκευασμάτων καπνού (14).

Το Μετσοβόνη είναι ένα σκληρό, καπνιστό τυρί τύπου *pasta filata*, το οποίο παράγεται είτε από φρέσκο αγελαδινό γάλα είτε από μίγμα αγελαδινού, πρόβειου και γίδινου γάλακτος, όπου το πρόβειο και το γίδινο δεν υπερβαίνουν το 20% του μίγματος. Είναι ένα ιδιαίτερο τυρί που παράγεται στην περιοχή του Μετσόβου, στην Ήπειρο, και το όνομα του προέρχεται από την περιοχή προέλευσης του (11, 15). Η σύσταση του τυριού Μετσοβόνη κυμαίνεται από 33–38 % υγρασία, 28–32% λίπος και ~27 % πρωτεΐνη (13).

1.4. Θετικές επιδράσεις τυριού στην Υγεία

1.4.1. Αντιοξειδωτική δράση

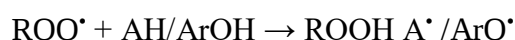
Το οξειδωτικό στρες είναι μια παθολογική κατάσταση, όπου οι δραστικές μορφές οξυγόνου/αζώτου (ROS/RNS) υπερισχύουν της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού, οδηγώντας σε οξειδωτικές αλλαγές σε βιολογικά μόρια, τραυματισμό των ιστών και αυξημένο κυτταρικό θάνατο. Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται από διάφορες ενδογενείς και εξωγενείς πηγές. Η ενεργοποίηση των κυττάρων του ανοσοποιητικού, η φλεγμονή, η ισχαιμία, η μόλυνση, ο καρκίνος, η υπερβολική άσκηση, το ψυχικό στρες και η γήρανση είναι υπεύθυνα για την ενδογενή παραγωγή ελεύθερων ριζών. Η παραγωγή εξωγενών ελεύθερων ριζών μπορεί να προκύψει από την έκθεση σε περιβαλλοντικούς ρύπους, βαρέα μέταλλα, ορισμένα φάρμακα, χημικούς διαλύτες, καπνό τσιγάρου, αλκοόλ και ακτινοβολίες. Οι εξωγενείς ενώσεις διεισδύουν στο σώμα, αποικοδομούνται ή μεταβολίζονται, δημιουργώντας ελεύθερες ρίζες ως υποπροϊόντα. Αυτή η κατάσταση συνδέεται με την ανάπτυξη διαφόρων νοσημάτων. Η μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης σε βιολογικά υγρά και τρόφιμα είναι σημαντική για την αγωγή νοσημάτων που σχετίζονται με οξειδωτικό στρες, τη σύγκριση του περιεχομένου αντιοξειδωτικών σε τρόφιμα και τον έλεγχο ποιότητας των προϊόντων (16,17).

Στην επιστήμη των τροφίμων, οι αντιοξειδωτικές ουσίες έχουν ένα ευρύτερο πεδίο εφαρμογής, καθώς εμποδίζουν τα λίπη στα τρόφιμα να υποστούν τάγγιση. Όπως ορίστηκε από το Ινστιτούτο της Ιατρικής, τα αντιοξειδωτικά είναι «ουσίες στα τρόφιμα που μειώνουν σημαντικά τις δυσμενείς επιδράσεις των δραστικών μορφών, όπως τις δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου, στη φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού». Επομένως, ένα αντιοξειδωτικό μπορεί να αποτρέψει τη συσσώρευση των δραστικών μορφών για να σταματήσει τις αλυσιδωτές αντιδράσεις των ελεύθερων ριζών ή τη δημιουργία των δραστικών μορφών οξυγόνου εξ αρχής. Τα αντιοξειδωτικά των τροφίμων συχνά περιλαμβάνουν αναστολείς ελευθέρων ριζών, χηλικοποιητές μετάλλων, αναστολείς οξειδωτικών ενζύμων και αντιοξειδωτικά ένζυμα. Η αυτοοξείδωση της ανόργανης ύλης προκαλείται από αλυσιδωτές αντιδράσεις ελευθέρων ριζών, ενώ κατά την οξείδωση σε ένα βιολογικό σύστημα μεσολαβεί κυρίως μια σειρά ενζύμων αναγωγής. Ωστόσο, η μη ενζυμική αυτοοξείδωση των λιπιδίων μπορεί να εμφανιστεί ακόμα και να οδηγήσει σε οξειδωτικό στρες. Το σύστημα αντιοξειδωτικής άμυνας αποτελείται από ενζυμικούς

αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς και από μη ενζυμικές αντιοξειδωτικές ουσίες. Ο Halliwell ορίζει τα βιολογικά αντιοξειδωτικά ως «μόρια, τα οποία βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με τα βιομόρια που προορίζονται να προστατεύσουν, παρεμποδίζοντας ή αναστέλλοντας την οξειδωτική καταστροφή των βιομορίων» (18, 19).

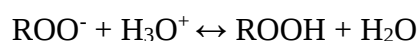
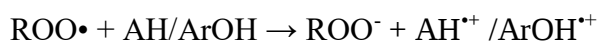
Βάσει των χημικών αντιδράσεων που πραγματοποιούνται, οι κύριοι μηχανισμοί δράσης των αντιοξειδωτικών διακρίνονται σε δύο κατηγορίες που περιλαμβάνουν τη μεταφορά υδρογόνου (HAT) και μεταφορά ηλεκτρονίου (ET).

Οι αναλύσεις που βασίζονται στη HAT μετρούν την ικανότητα που εμφανίζει ένα αντιοξειδωτικό να εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες με προσφορά πρωτονίου. Οι υπεροξειδικές ρίζες επιλέγονται γενικά ως δραστικές μορφές λόγω υψηλότερης βιολογικής συγγένειας και του μεγαλύτερου χρόνου ημιζωής τους σε σύγκριση με τις ρίζες υδροξυλίου και υπεροξειδίου. Ο μηχανισμός HAT αντιοξειδωτικής δράσης, όπου το άτομο υδρογόνου (H•) μιας φαινόλης (Ar-OH) μεταφέρεται σε μια ρίζα ROO•, συνοψίζοντας παρακάτω την αντίδραση:



, όπου η αρυλοξυ ρίζα, η οποία σχηματίζεται από την αντίδραση μεταξύ του αντιοξειδωτικού φαινόλης με την υπεροξειδική ρίζα, σταθεροποιείται συνήθως μέσω συντονισμού. Τα είδη AH και ArOH είναι τα προστατευόμενα βιομόρια και τα αντιοξειδωτικά, αντίστοιχα. Τα αντιοξειδωτικά πρέπει να δρουν πιο γρήγορα από τα βιομόρια με τις ελεύθερες ρίζες για την προστασία των τελευταίων από την οξείδωση.

Οι μηχανισμοί ET της αντιοξειδωτικής δράσης με μία βιολογικά σχετιζόμενη ρίζα βασίζεται στις αντιδράσεις:



, όπου οι αντιδράσεις γενικά θεωρείται ότι είναι σχετικά πιο αργές από εκείνες που βασίζονται σε HAT και εξαρτώνται τόσο από το διαλύτη όσο και από το pH. Η εξάρτηση από το pH είναι εμφανής από την παραπάνω αλληλουχία αντίδρασης του μηχανισμού ET. Για παράδειγμα, οι φαινολικές ενώσεις (Ar-OH), έχοντας ασθενώς

όξινες ομάδες $-OH$, διασπώνται σε μεγαλύτερο βαθμό σε υψηλότερο pH και εμφανίζουν ευαισθησία στην οξείδωση. Γενικά τα δυναμικά ιοντισμού των φαινολικών αντιοξειδωτικών μειώνονται με την αύξηση του pH, το οποίο προκαλεί αύξηση της ικανότητας προσφοράς ηλεκτρονίων ταυτόχρονα με αποπρωτονίωση. Οι αντιοξειδωτικές αναλύσεις με βάση τον τρισθενή σίδηρο που συμμορφώνονται με το μηχανισμό ET πρέπει να πραγματοποιηθούν σε όξινο pH για να αποφευχθεί η υδρόλυση του τρισθενούς σιδήρου. Η αρυλοξυ ρίζα ($ArO^{\cdot}$) στη συνέχεια οξειδώνεται σε κινόνη ($Ar=O$). Όσο πιο σταθερή είναι η αρυλοξυ ρίζα, τόσο πιο ευνοημένη είναι η οξείδωση από $ArOH$ σε $Ar=O$ λόγω μειωμένου δυναμικού οξειδοαναγωγής και το αντιοξειδωτικό είναι ισχυρότερο (16, 20).

1.4.2. Αντιφλεγμονώδης δράση

Η φλεγμονή σχετίζεται με ανάπτυξη ασθενειών, όπως καρκίνος, εγκεφαλικό επεισόδιο, καρδιαγγειακές και νευροεκφυλιστικές παθήσεις. Η συσσώρευση μεγάλων ποσοτήτων δραστικών μορφών οξυγόνου μπορεί να προκαλέσει φλεγμονή, που ενεργοποιεί την απελευθέρωση κυτοκινών και την συνεπακόλουθη ενεργοποίηση των λιποξυγενασών. Οι λιποξυγενάσες εμφανίζονται στον ανθρώπινο οργανισμό και σχετίζονται με την ενεργοποίηση φλεγμονών. Οι λιποξυγενάσες συμμετέχουν στην παραγωγή προσταγλανδινών και λευκοτριενίων, και επομένως, είναι συνδεδεμένες με την ανάπτυξη ασθενειών. Η αναστολή τους θεωρείται σημαντικό βήμα για την πρόληψη ασθενειών (21, 22).

1.4.3. Άλλες θετικές επιδράσεις

Η οδοντική τερηδόνα, η οποία προκαλείται κυρίως από την παραγωγή οξέος κατά τη διάρκεια της ζύμωσης των σακχάρων και των υδατανθράκων από τα βακτήρια της οδοντικής πλάκας, παραμένει ένα ευρέως διαδεδομένο πρόβλημα παρά τα βελτιωμένα μέτρα πρόληψης. Κατά την κατανάλωση ενός τροφίμου μπορεί συχνά να προκληθεί φθορά της επιφάνειας των δοντιών λόγω των οξέων. Η διατήρηση καλής στοματικής υγιεινής και η ύπαρξη μιας ισορροπημένης διατροφής είναι απαραίτητες για την προστασία του οδοντικού σμάλτου. Οι επιδράσεις των τυριών κατά της τερηδόνας οφείλονται σε διάφορα συστατικά. Κυρίως, το ασβέστιο και ο φώσφορος φαίνεται να περιορίζουν τη μείωση του pH της πλάκας, μειώνοντας την παραγωγή οξέος μετά την κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων. Η μασητική δραστηριότητα ενός κομματιού τυριού μετά την κατανάλωση σακχάρων αποκαθιστά γρήγορα το pH

της πλάκας σε ουδέτερο επίπεδο. Παρόλα αυτά, σημειώνεται ότι διάφορα είδη τυριού δεν είναι εξίσου αποτελεσματικά στη μείωση του pH της πλάκας. Τα ώριμα τυριά φαίνεται να προσφέρουν καλύτερη προστασία σε σύγκριση με τα φρέσκα. Η καζεΐνη παίζει σημαντικό ρόλο σε αυτήν τη διαδικασία. Επιλεκτικά τροποποιεί τη μικροβιακή σύνθεση της οδοντικής πλάκας. Τα φωσφοπεπτίδια της καζεΐνης αντιδρούν με υψηλές συγκεντρώσεις ασβεστίου και φωσφόρου, δημιουργώντας σύμπλοκα φωσφορικού ασβεστίου. Αυτά τα σύμπλοκα συμβάλλουν στην επαναμεταλοποίηση του οδοντικού σμάλτου και ενσωματώνονται σε προϊόντα, όπως οδοντόκρεμες και τσίχλες (4, 23, 24).

Η παχυσαρκία είναι υπεύθυνη για διάφορα προβλήματα της υγείας, καθώς αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας καρδιακής νόσου, υπέρτασης, διαβήτη, καρκίνου και άλλων μεταβολικών ανωμαλιών (25). Οι διατροφικές παρεμβάσεις είναι σημαντικές για μείωση του βάρους. Σε πείραμα, που εφαρμόστηκε σε αρουραίους, εξετάστηκαν οι επιδράσεις του τυριού τύπου Gouda στο μεταβολικό σύνδρομο. Από τη μελέτη προέκυψε σημαντική μείωση τους βάρους του λιπώδους ιστού του μεσεντερίου σε αρουραίους κατά τη διατροφή με τυρί με 20% λιπαρών σε σύγκριση με αρουραίους με παρόμοια διατροφή υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά που περιέχει καζεΐνη και βουτυρικό λίπος (26). Το ασβέστιο, ιδιαίτερα από γαλακτοκομικές πηγές, έχει σημειωθεί ότι παίζει ρόλο στη διαχείριση του βάρους, επηρεάζοντας δυνητικά τη μείωση του σωματικού λίπους. Ο μηχανισμός θα μπορούσε να περιλαμβάνει το σχηματισμό συμπλεγμάτων ασβεστίου και λιπαρών οξέων στο έντερο, οδηγώντας σε μειωμένη απορρόφηση και επηρεάζοντας παράγοντες, όπως ο κορεσμός και η πρόσληψη ενέργειας (27). Επιπλέον, ορισμένες βιοδραστικές ενώσεις σε γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως το CLA, μπορεί επίσης να επηρεάσουν τον έλεγχο του βάρους, αν και χρειάζεται περαιτέρω μελέτη σε ανθρώπους (28). Η κατανάλωση τυριού μπορεί να έχει ευεργετική κατασταλτική δράση στη συσσώρευση κοιλιακού λίπους, η οποία αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη του μεταβολικού συνδρόμου (4, 26).

Στις δυτικές χώρες η υπέρταση είναι ένας επικίνδυνος παράγοντας εκδήλωσης στεφανιαίας καρδιακής νόσου και εγκεφαλικού επεισοδίου. Σε αρκετές μελέτες τα γαλακτοκομικά προϊόντα έχουν επιδείξει ευεργετική επίδραση ως προς την αρτηριακή πίεση. Η αντίστροφη σχέση μεταξύ της πρόσληψης ασβεστίου και της αρτηριακής πίεσης ήταν πρώτη που προτάθηκε από διάφορες επιδημιολογικές

έρευνες στις αρχές της δεκαετίας του 1980, επειδή οι πληθυσμοί με χαμηλή πρόσληψη ασβεστίου είχαν συχνά αυξημένο επιπολασμό υπέρτασης (4). Οι Allender et al. έδειξαν σημαντική μείωση της συστολικής αρτηριακής πίεσης με συμπληρώματα ασβεστίου, τόσο για υπερτασικά άτομα όσο και για ένα συνολικό δείγμα (29). Ωστόσο, σύμφωνα με αυτούς τους συγγραφείς, το αποτέλεσμα είναι πολύ μικρό για να προσδιοριστεί η χρήση συμπληρωμάτων ασβεστίου για πρόληψη ή θεραπεία της υπέρτασης. Το ίδιο συμπέρασμα προέκυψε και από άλλες μελέτες αργότερα. Ωστόσο, η διατροφή με γαλακτοκομικά προϊόντα χαμηλών λιπαρών φαίνεται να μειώνει την επίπτωση της υπέρτασης με σημαντική επίδραση στην πρωτογενή πρόληψη καρδιαγγειακών παθήσεων. Εκτός από το ασβέστιο, το κάλιο και το μαγνήσιο φαίνονται επίσης να έχουν ευεργετική επίδραση στην αρτηριακή πίεση (30).

Η σημασία του τυριού είναι σημαντική για την ενίσχυση της υγείας των οστών, ειδικά για άτομα με δυσανεξία στη λακτόζη που πρέπει να περιορίζουν την πρόσληψη γαλακτοκομικών. Το τυρί, μια πλούσια πηγή ασβεστίου, έχει βρεθεί ότι ενισχύει την οστική πυκνότητα, όπως αποδείχθηκε σε μελέτες σε αρουραίους και παιδιά. Οι Kato et al. δείχνουν ότι η απορρόφηση του ασβεστίου του γάλακτος που λαμβάνεται με κατανάλωση τυριού ήταν σημαντικά ανώτερη, οδηγώντας σε υψηλότερη οστική πυκνότητα σε σύγκριση με το ασβέστιο γάλακτος, που λαμβάνεται μόνο του (31). Οι Cheng et al. υποστήριξαν τα αποτελέσματα των Kato et al. με τη μελέτη τους σε παιδιά 10-12 ετών (31, 32). Επιπλέον, ενώσεις, όπως το μαγνήσιο, η βιταμίνη D και τα βιοδραστικά πεπτίδια στο τυρί συμβάλλουν στην υγεία των οστών. Σε αντίθεση με τις ανησυχίες για το ότι ο φώσφορος στο τυρί επηρεάζει αρνητικά την οστική πυκνότητα, η έρευνα δείχνει ότι η κατάλληλη αναλογία ασβεστίου προς φώσφορο και η υψηλή πρόσληψη φωσφόρου δεν προάγει την οστική απορρόφηση. Επιπρόσθετα, μελέτες υποδεικνύουν πιθανή σχέση μεταξύ αντιυπερτασικών φαρμάκων, καταγμάτων των οστών και επίδρασης της αρτηριακής πίεσης στην οστική πυκνότητα, υποδηλώνοντας μια πιθανή σύνδεση μεταξύ της υπέρτασης και του κινδύνου οστεοπόρωσης. Αν και χρειάζεται περισσότερη έρευνα, τα δεδομένα υποδηλώνουν μια σχέση μεταξύ της αρτηριακής πίεσης, της πρόσληψης ασβεστίου και της υγείας των οστών σε άτομα, ειδικά γυναίκες με πρωτοπαθή υπέρταση (4, 33).

Το Παγκόσμιο Ταμείο Έρευνας για τον Καρκίνο και το Αμερικανικό Ινστιτούτο Έρευνας για τον Καρκίνο εξέτασαν μελέτες για τα τρόφιμα και τον καρκίνο,

επισημαίνοντας πιθανές συνδέσεις μεταξύ της κατανάλωσης τυριού και του καρκίνου του παχέος εντέρου και του προστάτη, αλλά τα στοιχεία ήταν περιορισμένα (34).

Ορισμένες ενώσεις στο τυρί, όπως το συζευγμένο λινολεϊκό οξύ (CLA) και τα σφιγγολιπίδια, γνωστά για τις πιθανές αντικαρκινικές τους ιδιότητες. Το CLA έχει δείξει αντι-μεταλλαξιογόνο δράση σε μελέτες και πιστεύεται ότι επηρεάζει διάφορα στάδια ανάπτυξης καρκίνου μέσω της τροποποίησης των κυτταρικών διεργασιών και της γονιδιακής έκφρασης (35). Ομοίως, τα σφιγγολιπίδια, που βρίσκονται σε αφθονία στα τυριά και τα γαλακτοκομικά, έχουν δείξει πολλά υποσχόμενα για τη μείωση των δεικτών του καρκίνου του παχέος εντέρου σε δοκιμές με ζώα και την πρόκληση κυτταρικού θανάτου σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα, υπονοώντας πιθανές αντικαρκινικές επιδράσεις στον άνθρωπο. Ωστόσο, ο προσδιορισμός των ακριβών ποσοτήτων αυτών των ενώσεων στα γαλακτοκομικά προϊόντα παραμένει δύσκολος λόγω της κατανομής τους στη μεμβράνη των σφαιριδίων του λίπους του γάλακτος (36).

1.5. Υδατικό εκχύλισμα τυριού και πεπτίδια

Το υδατικό εκχύλισμα τυριού περιέχει κυρίως μικρού και μεσαίου μεγέθους πεπτίδια, ελεύθερα αμινοξέα και άλατα. Το επίπεδο του υδατοδιαλυτού αζώτου χρησιμοποιείται ως δείκτης ωρίμανσης του τυριού, καθώς τείνει να αυξάνεται κατά την ωρίμανση (37, 38).

1.5.1. Πεπτίδια κατά την παρασκευή και ωρίμανση τυριών

Η ωρίμανση του τυριού επηρεάζει τόσο την υφή όσο και την ευχυμία των διαφόρων ειδών τυριού. Κατά την ωρίμανση η σκληρότητα του τυριού μειώνεται λόγω υδρόλυσης του καζεϊνικού πλέγματος του τυροπήγματος. Επίσης, μειώνεται η ενεργότητα νερού (a_w) του τυροπήγματος λόγω αλλαγών στη δέσμευση του νερού από το νέο καρβοξυλικό οξύ και τις αμινομάδες, που σχηματίζονται κατά την υδρόλυση. Η υφή του τυριού είναι σε μεγάλο βαθμό εξαρτώμενη από το pH και ο λόγος περιεκτικότητας σε καζεΐνη προς περιεκτικότητα σε υγρασία (νερό). Ο De Jong ανέφερε ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της σταθερότητας ενός τυριού και της ποσότητα άθικτης asI-καζεΐνης (45,46). Αυτό δικαιολογείται, καθώς τα προϊόντα διάσπασης των καζεϊνών είναι σε μεγάλο βαθμό υδατοδιαλυτά και δεν συμβάλουν στο πρωτεϊνικό σύμπλεγμα. Επίσης, κατά τη διάσπαση κάθε πεπτιδικού δεσμού, δύο

νέες ιοντικές ομάδες δημιουργούνται και η καθεμία από αυτές ανταγωνίζεται για το διαθέσιμο νερό στο σύστημα. Έτσι, το νερό που ήταν προηγουμένως διαθέσιμο για διαλυτοποίηση των αλυσίδων πρωτεΐνης θα δεσμευθεί από τις νέες ιοντικές ομάδες. Σχετικά χαμηλή υγρασία τυριού, όπως στην περίπτωση του τυριού Cheddar, τείνει επομένως να γίνεται όλο και πιο σκληρό με την ωρίμανση και πιο ανθεκτικό σε ελαφρές παραμορφώσεις (39, 40).

Δύο διακριτές φάσεις υπάρχουν στην ανάπτυξη της υφής κατά την ωρίμανση. Η πρώτη φάση εμφανίζεται στις πρώτες 7 έως 14 ημέρες, όταν η ελαστική υφή του τυροπήγματος μετατρέπεται γρήγορα σε μαλακότερο και πιο ομοιογενές προϊόν. Η πρωτεόλυση του δικτύου καζεϊνών τυριού, που συγκροτεί τη μικροδομή του τυριού, λαμβάνει χώρα. Το δίκτυο καζεϊνών εξασθενεί, όταν μόνο ένας απλός δεσμός υδρολύεται στο 20% περίπου της asI-καζεΐνης από τον πηκτικό παράγοντα για να δώσει το πεπτίδιο asI-I. Αυτό το πεπτίδιο υπάρχει, τουλάχιστον στα πρώιμα στάδια της ωρίμανσης, σε όλους τους τύπους τυριού. Η δεύτερη φάση περιλαμβάνει μια πιο σταδιακή αλλαγή στην υφή, όπως και η υπόλοιπη asI-καζεΐνη και οι άλλες καζεΐνες διασπώνται σε μία κλίμακα χρόνου, η οποία μετράται σε μήνες και όχι σε ημέρες. Κατά την εξέταση του εμπορικού τυριού Cheddar στις Ηνωμένες Πολιτείες, για παράδειγμα, έδειξαν ότι το 85% της asI-καζεΐνης ήταν ακόμα άθικτο σε τυρί ηλικίας 14 ημερών και το βασικό προϊόν υδρόλυσης, asI-I, αντιπροσώπευε το υπόλοιπο 15%. Σε τυρί ηλικίας 10 εβδομάδων, το 90% του asI- καζεΐνης είχε υδρολυθεί. Ωστόσο, το 95% της β-καζεΐνης, παρέμεινε ακόμα άθικτο μετά τις 10 εβδομάδες ωρίμανσης (41, 39).

Όσο χαμηλότερος είναι ο λόγος περιεκτικότητας σε υγρασία (νερό) προς περιεκτικότητα σε καζεΐνη, τόσο πιο σταθερή θα είναι η καζεΐνη στο τυρί. Μικρές αλλαγές σε αυτό το λόγο οδηγούν σε σχετικά μεγάλες αλλαγές, καθώς το νερό αλληλεπιδρά με τις καζεΐνες και προκύπτουν τα προϊόντα αποικοδόμησης τους. Η μείωση στην ενεργότητα του νερού συνεπάγεται σημαντική μείωση στο ρυθμό πρωτεόλυσης στο τυρί. Επιπλέον, ο λόγος περιεκτικότητας σε υπολείμματα πυτιάς προς περιεκτικότητα σε καζεΐνη είναι χαμηλότερος σε τυρί χαμηλής υγρασίας και ο ρυθμός αλλαγής της υφής είναι πιο αργός (39).

Η ωρίμανση του τυριού επηρεάζει και την ευχυμία, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως. Η πρωτεόλυση επηρεάζει άμεσα την ευχυμία των τυριών μέσω της

παραγωγής μικρού μεγέθους πεπτιδίων και αμινοξέων, όπου ορισμένα εκ των οποίων έχουν συνήθως πικρή γεύση. Επομένως, κατά την ωρίμανση απελευθερώνονται ενώσεις ευχάριστες στην ευχυμία του τυριού. Επίσης, τα ελεύθερα αμινοξέα, ως υποστρώματα καταβολικών αντιδράσεων, παράγουν σημαντικά ευχυμικά συστατικά. Τα πρωτεολυτικά ένζυμα των γαλακτικών βακτηρίων καταλύουν την πρωτεόλυση στο τυρί κατά την ωρίμανση. Η χυμοσίνη είναι ένζυμο της πυτιάς, που παραμένει στο τυρόπηγμα και μετά την αποστράγγιση του ορού γάλακτος. Η χυμοσίνη διασπά τη β-καζεΐνη σε επτά θέσεις, πολλές από τις οποίες βρίσκονται κοντά στην υδρόφοβη C-τερματική περιοχή της β-καζεΐνης. Η διάσπαση αυτών σε αυτές τις θέσεις (π.χ. Leu192–Tyr193) μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή υδρόφοβων πεπτιδίων μικρής αλυσίδας, τα οποία έχουν πικρή γεύση. Η κύρια θέση δράσης χυμοσίνης στην αs1-καζεΐνη (αs1-CN) είναι Phe23–Phe24, που έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή του μικρού πεπτιδίου (αs1-CN f1-23) που υδρολύεται γρήγορα από πρωτεΐνάσες των εκκινητών (42, 43). Η χυμοσίνη διασπά την αs1-καζεΐνη σε μια σειρά από διάφορες θέσεις, ιδιαίτερα στη συγκεκριμένη θέση Leu101–Lys102. Η αs2-καζεΐνη είναι πιο ανθεκτική στην υδρόλυση από χυμοσίνη σε σχέση με την αs1-καζεΐνη. Οι θέσεις διάσπασης της χυμοσίνης στην αs2-καζεΐνη είναι περιορισμένες στις υδρόφοβες περιοχές του (44). Η παρα-κ-καζεΐνη δεν υδρολύεται (45). Η πλασμίνη, που υπάρχει στο γάλα, έχει την ιδιαιτερότητα να περιορίζεται στους πεπτιδικούς δεσμούς του τύπου Lys–X, σε μικρότερο βαθμό Arg–X, και αποικοδομεί τις καζεΐνες με τη σειρά β-καζεΐνη $\approx$ αs2-καζεΐνη > αs1-καζεΐνη. Η κ-καζεΐνη φαίνεται να είναι ανθεκτική στη δράση αυτής της πρωτεΐνάσης (43). Η ειδικότητα της πλασμίνης στις β-, αs2- και αs1-καζεΐνες είναι γνωστές (46), αλλά το πιο σημαντικό υπόστρωμα στο τυρί είναι η β-καζεΐνη, που υδρολύεται από την πλασμίνη σε τρεις θέσεις, Lys28–Lys29, Lys105–His106 και Lys107–Glu108, για παραγωγή γ1-CN (β-CN f29–209), γ2-CN (β-CN f106–209), γ3-CN (β-CN f108–209), πρωτεόζη-πεπτόνη 8 (PP8) γρήγορη (β-CN f1-28), PP8 αργή (β-CN f29-105 και f29–107) και PP5 (β-CN f1–105 και 1–107). Η αs2-καζεΐνη είναι επίσης πολύ ευαίσθητη στη δράση της πλασμίνης και είναι πιθανό ότι η εξαφάνιση της πρωτεΐνης, η οποία παρατηρείται συχνά στο τυρί κατά την ωρίμανση, οφείλεται στη δράση της πλασμίνης, αν και αυτή η υπόθεση μένει να αποδειχθεί (43, 47).

1.5.2. Πεπτίδια και βιοδράσεις

Ο μηχανισμός της αντιοξειδωτικής δράσης των πεπτιδίων και των πρωτεϊνών δεν είναι ακόμη αρκετά σαφής. Τα πεπτίδια είναι πιο υποσχόμενα ως πρωτεϊνούχα αντιοξειδωτικά, καθώς έχουν δείξει ότι έχουν ουσιαστικά υψηλότερη δραστηριότητα από τις άθικτες πρωτεΐνες. Ενώ οι υδρολυμένες πρωτεΐνες έχουν καλή αντιοξειδωτική δράση, εξακολουθεί να μην είναι κατανοητό πώς επηρεάζει η σύνθεση των πεπτιδίων την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη διαδικασία της οξείδωσης. Επίσης, βρίσκεται ακόμα υπό συζήτηση εάν η αντιοξειδωτική δράση είναι αποτέλεσμα που εξελίσσεται από ένα μόνο αμινοξύ σε αλληλουχία πρωτεΐνης ή είναι αποτέλεσμα αλληλεπιδράσεων μεταξύ πολλαπλών πλευρικών αλυσίδων αμινοξέων, όπου οι περισσότεροι ερευνητές συμφωνούν με το τελευταίο (48, 49).

Οι αντιοξειδωτικές πρωτεΐνες και τα πεπτίδια προέρχονται εν μέρει από το ίδιο το γάλα, αλλά τα περισσότερα από αυτά σχηματίζονται κατά την παραγωγή του τυριού. Οι Parella et al. αναγνώρισαν την ήπια θερμική επεξεργασία του γάλακτος ως ένα στάδιο της επεξεργασίας του τυριού, κατά το οποίο θα μπορούσαν να απελευθερωθούν αντιοξειδωτικά πεπτίδια (50). Ωστόσο, η ωρίμανση του τυριού και η πρωτεόλυση αναγνωρίζονται ως τα κύρια στάδια σχηματισμού αντιοξειδωτικών. Τα αντιοξειδωτικά πεπτίδια προέρχονται κυρίως από καζεΐνες λόγω της δράσης των πεπτιδασών, που απελευθερώνονται τόσο από τους εκκινητές όσο και από τους μη εκκινητές LAB (51-53), υπολείμματα ενζύμων πυτιάς και ενδογενή ένζυμα γάλακτος, όπως η πλασμίνη (54). Το επίπεδο σχηματισμού τους εξαρτάται από τις συνθήκες ωρίμανσης και το στάδιο ωρίμανσης (55). Εκτός από τις καζεΐνες, οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος και τα προϊόντα της πρωτεόλυσης τους έχουν επίσης αντιοξειδωτική δράση (56, 57).

Οι Gupta et al. αξιολόγησαν τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των υδατικών εκχυλισμάτων τυριών Cheddar, που παρασκευάστηκαν με *Lactobacillus casei* ssp. *casei* 300, *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* 22 και χωρίς πρόσθετες καλλιέργειες. Έδειξαν ότι η αντιοξειδωτική δράση των υδατικών εκχυλισμάτων εξαρτάται από την περίοδο ωρίμανσης. Παρατήρησαν μια σταδιακή αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης έως και τους 4 μήνες ωρίμανσης, μετά μείωση και από τους 7 έως και 9 μήνες ωρίμανσης διατηρεί παρόμοιες τιμές (58). Σε μια άλλη τους μελέτη, οι ίδιοι συγγραφείς εντόπισαν δύο πεπτίδια υπεύθυνα για τις αντιοξειδωτικές

δραστηριότητες των υδατικών εκχυλισμάτων. Το ένα προέρχεται από το β-CN βοοειδών (VKEAMAPK) και το άλλο προέρχεται από αs1-CN βοοειδών (f(80-90)) (55). Επιπλέον, οι Pritchard et al. αξιολόγησαν την αναστολή της ρίζας DPPH από υδατικά εκχυλίσματα τριών διαφορετικών τυριών Cheddar Αυστραλίας. Τα κλάσματα πεπτιδίων με μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 10 kDa έδειξαν υψηλή αντιοξειδωτική δράση, αν και δεν ταυτοποιήθηκαν (59). Οι Pisanu et al. (2015) μελέτησαν τη σχέση μεταξύ πρωτεόλυσης τυριών από μη παστεριωμένο και παστεριωμένο πρόβειο γάλα και τις βιοδράσεις. Ανίχνευσαν 187 βιοενεργά πεπτίδια που προέρχονται από αs1-CN, β-CN και αs2-CN, όπου 9 εκ των οποίων εκδήλωσαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Αυτά τα πεπτίδια προήλθαν από τη β-CN, και πιο συγκεκριμένα από το θραύσμα 207-221 (QEPVLGPVRGPFIL) (60).

Οι Meira et al. μελέτησαν την αντιοξειδωτική δράση των υδατικών εκχυλισμάτων από τρία τυριά Βραζιλίας (τύπου Φέτας, Ροκφόρ και Pecorino) και δύο τυριά Ουρουγουάης (τύπου Pecorino Sardo και Cerrilano) και έδειξε αυτό το είδος τυριού προσδιόρισε ουσιαστικά την περιεκτικότητα και την αντιοξειδωτική δράση των υδατοδιαλυτών εκχυλισμάτων. Αντίστοιχα, το τυρί τύπου ροκφόρ είχε την υψηλότερη περιεκτικότητα και την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα (61). Οι Bottesini et al. εξέτασαν την αντιοξειδωτική ικανότητα του υδατικού εκχυλίσματος τυριού Parmigiano-Reggiano, πριν και μετά την *in vitro* πέψη. Παρατήρησαν ότι η αντιοξειδωτική δράση των υδατικών εκχυλισμάτων οφείλεται στα ελεύθερα αμινοξέα και σε μικρότερο βαθμό τα μικρά πεπτίδια (62).

Οι Erkaya και Şengul εξέτασαν την επίδραση της προσθήκης προβιοτικών καλλιιεργειών σε λευκό τυρί και τη μέθοδο συσκευασίας του στην αντιοξειδωτική δράση. Έδειξαν ότι η αντιοξειδωτική δράση, που προσδιορίστηκε μέσω DPPH, αυξήθηκε κατά την ωρίμανση και εμφάνισε το μέγιστο μετά από 60 ημέρες, αλλά και ότι η πιο ευνοϊκή ωρίμανση ήταν σε συσκευασία κενού (63). Οι Gandhi και Shah διερεύνησαν την επίδραση της μείωσης του αλατιού στα βιοενεργά χαρακτηριστικά του υδατικού εκχυλίσματος του λευκού τυριού Akawi. Παρατήρησαν ότι αυτή η παράμετρος δεν επηρέασε σημαντικά τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Ωστόσο, η αντιοξειδωτική δράση αυξήθηκε κατά τη διάρκεια 30 ημερών ωρίμανσης (64).

Οι πρωτεΐνες και τα πεπτίδια από γάλα έχουν δείξει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Οι Laakso και Lilius μελέτησαν την καζεΐνη και άλλες πρωτεΐνες γάλακτος για τον

πιθανό τους ρόλο ως «βιολογικοί αναστολείς». Η μελέτη αποδεικνύει ότι η καζεΐνη γάλακτος έχει άμεση επίδραση στον μηχανισμό της αναστολής της δράσης της λιποξυγενάσης (65). Σύμφωνα με τη μελέτη των Rival et al. προέκυψε ότι οι βόειες καζεΐνες και τα πεπτίδια, που προέρχονται από τις καζεΐνες, είναι αναστολείς της δράσης της λιποξυγενάσης (66). Η αντιφλεγμονώδης δράση εκχυλισμάτων και κλασμάτων πεπτιδίων (<3 και 3–10 kDa) που λαμβάνονται από γάλα που έχει υποστεί ζύμωση με ειδικά στελέχη *Lactobacillus plantarum*. Η αντιφλεγμονώδης δράση του εκχυλίσματος ή των κλασμάτων, που προσδιορίστηκε, δύνανται να αποδοθεί σε παρουσία πεπτιδίων, τα οποία απελευθερώνονται κατά τη ζύμωση γάλακτος από διαφορετικά στελέχη *Lactobacillus*. Αν και ο μηχανισμός αυτής της προστασίας δεν είναι ξεκάθαρος, έχει αναφερθεί ότι ορισμένα αμινοξέα σταθεροποιούν τις πρωτεΐνες μέσω ειδικής δέσμησης σε αυτές, παρέχοντας έτσι μια ασπίδα προστασίας έναντι παραγόντων που μπορεί να προκαλέσουν μετουσίωση, όπως η θερμότητα, οι ακραίες τιμές pH και το οξειδωτικό στρες (67).

Εκτός από το ασβέστιο, τα βιοενεργά πεπτίδια επιδρούνε ευεργετικά σε άτομα με προβλήματα υπέρτασης. Η ανασταλτική δράση του μετατρεπτικού ενζύμου της Αγγειοτενσίνης (ACE) εμφανίζεται ως μία από τις πιο ενδιαφέρουσες και διερευνημένες βιολογικές λειτουργίες μεταξύ των πεπτιδίων του τυριού. Το ACE είναι βασικό ένζυμο στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης, γιατί επιτρέπει τη μετατροπή της αγγειοτενσίνης I σε πολύ ισχυρή αγγειοσυσταλτική αγγειοτασίνη II και αδρανοποιεί την κατασταλτική δράση της βραδυκινίνης. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ανασταλτική δράση του ACE σε διάφορες ποικιλίες τυριού με διαφορετικά βιοενεργά πεπτίδια να είναι υπεύθυνα για αυτό αποτέλεσμα (68, 69). Τα τριπεπτίδια βαλυλ-προλυλ-προλίνη (VPP) και η ισολευκυλ-προλυλ-προλίνη (IPP) ανήκουν στην πιο ισχυρή ομάδα πεπτιδίων που αναστέλλει το ACE. Το VPP και το IPP είναι κρυπτογραφημένα στη β-καζεΐνη του γάλακτος. Πρωτεΐνάσες από τα βακτήρια γαλακτικού οξέος *L. helveticus* έχουν τη δυνατότητα να απελευθερώσουν αυτά τα δύο πεπτίδια από το γάλα που έχει υποστεί ζύμωση. Το γεγονός ότι το *L. helveticus* είναι ένα κοινό στέλεχος, που χρησιμοποιείται στην τυροκομία, και ότι κατά την ωρίμανση λαμβάνει χώρα έντονη πρωτεόλυση, οδήγησε στην υπόθεση ότι το τυρί μπορεί να εμφανίσει ανασταλτική δράση του ACE λόγω σχηματισμού των VPP και IPP. Βέβαια, απαιτείται περαιτέρω έρευνα για τον προσδιορισμό των βέλτιστων συγκεντρώσεων και επιδράσεων σε υπερτασικά άτομα (70). Οι Basiricò et al. διερεύνησαν τη μακροπρόθεσμη επίδραση της διατροφής με τυρί Parmigiano

Reggiano στην αρτηριακή πίεση σε υπερτασικούς αρουραίους. Η μελέτη έδειξε μια παροδική μείωση της πίεσης των αρουραίων τις πρώτες 35 ημέρες της θεραπείας. Το αποτέλεσμα έδειξε συσχέτιση με την ποσότητα τυριού που καταναλώθηκε (71). Οι Garbowska et al. χρησιμοποίησαν πρόσθετα στελέχη από το γένος *Lactobacillus*. Η περιεκτικότητα σε πεπτίδια αναστολείς του ACE παρατηρήθηκε να αυξάνει κατά τη διάρκεια 5 εβδομάδων ωρίμανσης. Τα αποτελέσματα της μελέτης δείχνουν ότι τα πρόσθετα στελέχη που χρησιμοποιούνται στην τυροκομία ενίσχυσαν τη σύνθεση πεπτιδίων με υποτασικές ιδιότητες *in vitro*. Ωστόσο, οι υποτασικές ιδιότητες των βιοδραστικών πεπτιδίων πρέπει να επιβεβαιωθούν υπό συνθήκες *in vivo* (72).

Σχετικά με την αντικαρκινική δράση των τυριών, οι Yasuda et al. έδειξαν μια πιθανή αντιπολλαπλασιαστική δράση των εμπορικών τυριών χρησιμοποιώντας κύτταρα ανθρώπινης προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας HL-60 ως μοντέλο. Η δοκιμασία πολλαπλασιασμού κυττάρων και τα ηλεκτροφορητικά πρότυπα του DNA αποκάλυψαν ότι τα τυριά υψηλής ωρίμανσης έχουν ισχυρές ανασταλτικές δράσεις στην ανάπτυξη και επαγωγή του κατακερματισμού του DNA στα κύτταρα HL-60 (73).

1.6. Αρχή μεθόδων ανάλυσης υδατικού εκχυλίσματος τυριού

1.6.1. Λήψη υδατικού εκχυλίσματος τυριού

Το υδατικό εκχύλισμα περιέχει πολλά μικρού και μεσαίου μεγέθους πεπτίδια, ελεύθερα αμινοξέα και τα οργανικά οξέα και τα άλατα τους. Η εκχύλιση με νερό διαχωρίζει αποτελεσματικά τα μικρά πεπτίδια από πρωτεΐνες και μεγάλα πεπτίδια. Σε πολλά τυριά, οι κύριοι πρωτεολυτικοί παράγοντες που είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή του υδατοδιαλυτού αζώτου (WSN) είναι η χυμοσίνη και σε μικρότερο βαθμό, η πλασμίνη. Οι πρωτεϊνάσες και οι πεπτιδάσες των εκκινητών παίζουν σχετικά μικρό ρόλο στην υδρόλυση των άθικτων καζεϊνών και των μεγάλων πολυπεπτιδίων σε υδατοδιαλυτά πεπτίδια, αν και είναι ενεργά σε πολλά από τα πεπτίδια που απελευθερώνονται από τη χυμοσίνη ή πλασμίνη. Το WSN ως % ποσοστό του συνολικού αζώτου ποικίλλει αναλόγως με την ποικιλία του τυριού και αυξάνει κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης: μια τυπική τιμή για το ώριμο τυρί Cheddar είναι ~25% (37). Σε ώριμο τυρί Φέτα (60 ημερών) το % WSN που υπολογίστηκε είναι $19,21 \pm 0,77$ και τυρί Φέτα κατά τη διατήρηση (120 ημερών) είναι $19,83 \pm 0,52$ (74). Επίσης, παρατηρήθηκε μεγάλη αύξηση του υδατοδιαλυτού αζώτου κατά την

ωρίμανση του τυριού Φέτα και μια μικρή αύξηση κατά την διατήρηση του και όπως αναφέρθηκε το WSN είναι δείκτης ωρίμανσης, επομένως είναι αναμενόμενο να αυξάνεται (75).

Η πρωτεόλυση τυριού μελετάται από τη μέτρηση των επιπέδων TCA-SN και PTA-SN κατά τη διάρκεια της γήρανσης (76). Το τριχλωροξικό οξύ (TCA) χρησιμοποιείται ευρέως για την κατακρήμνιση πρωτεϊνών. Συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 2 ή 2,5% έως 12% έχουν χρησιμοποιηθεί ανάλογα με τον επιθυμητό βαθμό κλασματοποίησης. Τα μεγαλύτερα πεπτίδια είναι διαλυτά στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις TCA. Δεν υπάρχει κατώτερο όριο κατακρήμνισης σχετικά με το μέγεθος του πεπτιδίου με διαλυτότητα σε TCA, αλλά τα πεπτίδια που μελετήθηκαν από τους Yvon et al περιείχαν λιγότερα από επτά αμινοξέα διαλυτά σε 12% TCA. Επομένως, προέκυψε ότι η διαλυτότητα των πεπτιδίων σχετίζεται με την υδροφοβικότητα (37, 77). Η πλειονοψηφία των διαλυτών πεπτιδίων σε 12% TCA, που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν από το τυρί Parmigiano-Reggiano, ήταν φωσφοπεπτίδια (78). Τυπικά, σε ένα ώριμο τυρί Cheddar το WSN είναι ~15% του συνολικού άζωτου και ~90% του WSN είναι διαλυτό σε 2,5% TCA, ενώ το 50-60% του υπερδιηθήματος, που συγκρατήθηκε από τη μεμβράνη 10 kDa, και το 100% του υπερδιηθήματος, που διαπέρασε τη μεμβράνη 10 kDa, είναι διαλυτό σε 2% TCA (37, 79). Σε ώριμο τυρί Φέτα (60 ημερών) το % TCA-SN, δηλαδή το διαλυτό άζωτο (SN) σε 12% TCA, που υπολογίστηκε είναι $11,46 \pm 0,34$ και σε διατηρημένο τυρί Φέτα (120 ημερών) είναι $12,42 \pm 0,54$. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι ~60% του WSN είναι διαλυτό σε 12% TCA (74).

Η καθίζηση πεπτιδίων σε ένα εκχύλισμα τυριού είναι απαραίτητη για να επιτευχθεί ποσοτικοποίηση των ελεύθερων αμινοξέων στο τυρί. Το φωσφοβολφραμικό οξύ (PTA) συμβάλει στην κατακρήμνιση πρωτεϊνών μόνο ελεύθερα αμινοξέα (εκτός από λυσίνη και αργινίνη) και πεπτίδια μικρότερα από περίπου 600 Da είναι διαλυτά σε 5% PTA. Το διαλυτό N σε PTA (1, 2,5, 5, 6 ή 6,5%) έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως ένας δείκτης ελεύθερων αμινοξέων στο τυρί. Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση PTA είναι 5% (37, 80). Σε ώριμο τυρί Φέτα (60 ημερών) το % PTA-SN, δηλαδή το διαλυτό άζωτο σε 5% PTA, που υπολογίστηκε είναι $4,18 \pm 0,49$ και σε διατηρημένο τυρί Φέτα (120 ημερών) είναι $4,74 \pm 0,48$. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι ~23% του WSN είναι ελεύθερα αμινοξέα και πεπτίδια μεγέθους μικρότερα από 600 Da (74).

1.6.2. Μέθοδοι προσδιορισμού συγκέντρωσης πεπτιδίων

Οι μέθοδοι που εφαρμόζονται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης πεπτιδίων είναι Kjeldahl, Biuret, TNBS, νινυδρίνης, Bradford και Lowry.

Στη μέθοδο Kjeldahl, μετά την πέψη σε πυκνό θειικό οξύ, το συνολικό οργανικό άζωτο μετατρέπεται σε θειικό αμμώνιο. Η αμμωνία σχηματίζεται και αποστάζεται σε διάλυμα βορικού οξέος υπό αλκαλικές συνθήκες. Τα βορικά ανιόντα που σχηματίζονται τιτλοδοτούνται με υδροχλωρικό οξύ, με το οποίο υπολογίζεται η περιεκτικότητα σε άζωτο που αντιπροσωπεύει την ποσότητα της ακατέργαστης πρωτεΐνης στο δείγμα. Οι περισσότερες πρωτεΐνες περιέχουν 16% άζωτο, επομένως ο γενικός συντελεστής μετατροπής είναι 6,25. Ωστόσο, μετράται επίσης το άζωτο από μη πρωτεϊνικά πρόσθετα ή επιμολυντές στα τρόφιμα, όπως η μελαμίνη στο γάλα (81, 82).

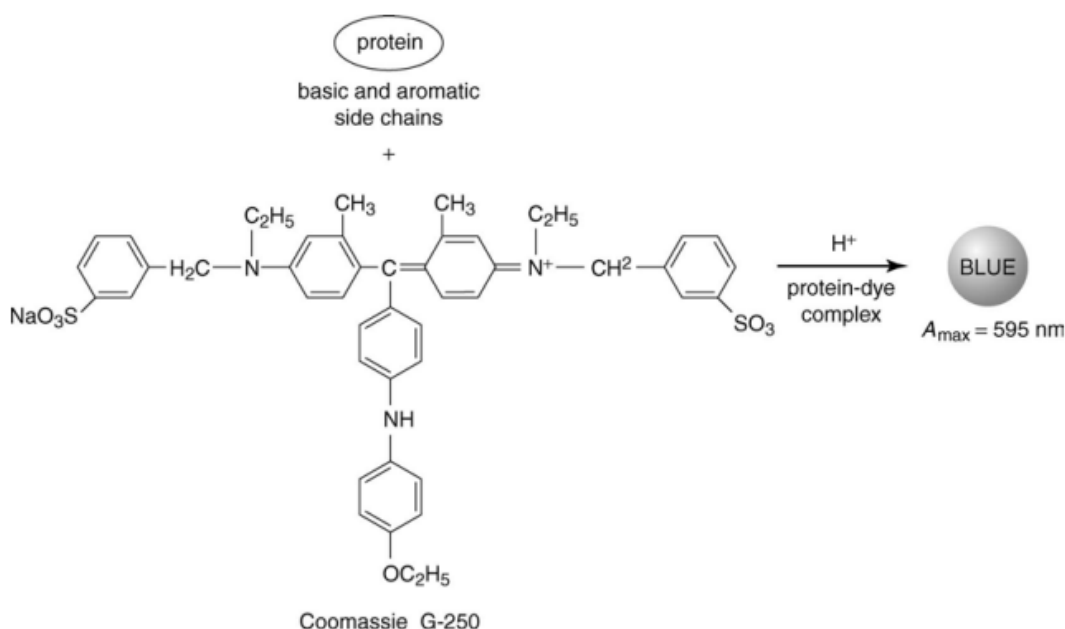
Κατά τη μέθοδο Biuret, υπό αλκαλικές συνθήκες πεπτιδικοί δεσμοί αντιδρούν με ιόντα χαλκού για να παράγουν ένα ιώδες-μωβ χρώμα, που η ένταση του μετράται στα 540 nm και σχετίζεται με το περιεχόμενο του δείγματος σε πρωτεΐνη. Αυτή η μέθοδος είναι γρήγορη και απλή με μικρή παρέμβαση από μη πεπτιδικές ή μη πρωτεϊνικές πηγές (81, 82).

Το τρινιτροβενζολοσουλφονικό οξύ (TNBS) αντιδρά με πρωτοταγείς αμινομάδες σε αλκαλικό pH 9,5, παράγοντας κίτρινο χρώμα. Η απορρόφηση μετράται στα 420 nm. Η μέθοδος TNBS χρησιμοποιείται για τη μέτρηση του αριθμού των αμινομάδων στο τυρί που ωριμάζει και ως εκ τούτου έγινε ένα άμεσο μέτρο πρωτεόλυσης (83).

Η μέθοδος νινυδρίνης χρησιμοποιείται ευρέως ως μία χρωματογραφική ανάλυση πεπτιδίων. Το αντιδραστήριο νινυδρίνης, το οποίο περιέχει οξικό λίθιο και διμεθυλοσουλφοξείδιο, αντιδρά με πρωτοταγείς αμινομάδες σε pH 5,2, παράγοντας ιώδες χρώμα. Η απορρόφηση μετράται στα 570 nm (83).

Η μέθοδος Bradford είναι μια ταχεία και ευαίσθητη μέθοδος για τη μέτρηση ποσοτήτων μικρογραμμαρίων πρωτεΐνης. Λόγω της ταχύτητάς, της ευαισθησίας και του μικρού αριθμού παρεμβολών, η μέθοδος Bradford έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την ανάλυση μικρών συγκεντρώσεων πρωτεϊνών και ενζύμων κατά τον καθαρισμό και χαρακτηρισμό τους. Το Coomassie Brilliant Blue G-250 δεσμεύεται με την πρωτεΐνη, έχοντας ως αποτέλεσμα την αλλαγή χρώματος από κόκκινο σε μπλε,

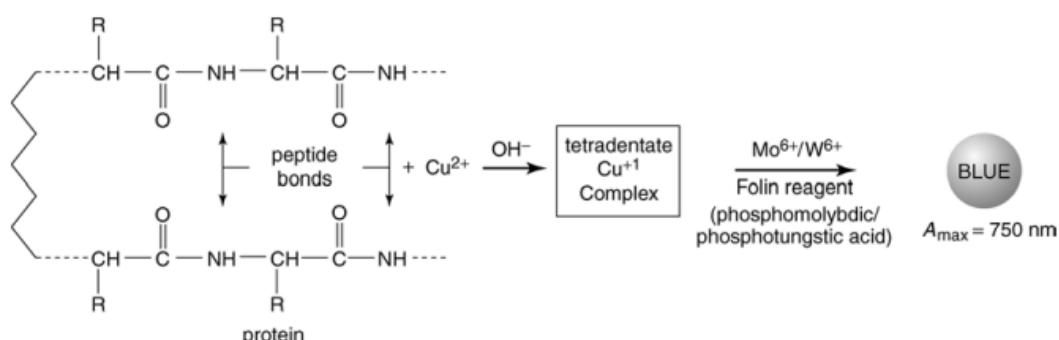
και το μέγιστο απορρόφησης της χρωστικής μετατοπίζεται από 465 σε 595nm. Η αλλαγή στην απορρόφηση στα 595nm είναι ανάλογη με την περιεκτικότητα πρωτεΐνης του δείγματος. Όπως και άλλες μεθόδους συσχέτισης με χρωστικές, η μέθοδος Bradford βασίζεται στη φύση των πρωτεϊνών. Κατά την οξείδωση του διαλύματος, που περιέχει την πρωτεΐνη, σε pH χαμηλότερο από το ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης, η χρωστική δημιουργεί ηλεκτροστατικούς δεσμούς. Η αποτελεσματικότητα της δέσμευσης ενισχύεται από τη υδροφοβική αλληλεπίδραση του μόριου της χρωστικής με την πολυπεπτιδική αλυσίδα που γειτνιάζει με θετικά φορτισμένα υπολείμματα στην πρωτεΐνη. Στην περίπτωση της μεθόδου Bradford, η χρωστική, που έχει δεσμευθεί στην πρωτεΐνη, εμφανίζει μια αλλαγή στο φάσμα απορρόφησης σε σχέση με τη μη δεσμευμένη χρωστική (84, 85).



Εικόνα 1. Η αντίδραση της χρωστικής με την πρωτεΐνη κατά τη μέθοδο Bradford (86).

Η μέθοδος Lowry έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών. Η μέθοδος βασίζεται στην αντίδραση διουρίας και περιλαμβάνει δύο στάδια. Πρώτον, ένα αλκαλικό μίγμα ιόντων χαλκού και τρυγικού καλιονατρίου (αντιδραστήριο Lowry) αντιδρά με πρωτεΐνες και έχει ως αποτέλεσμα την αναγωγή του Cu^{2+} σε Cu^+ και το σχηματισμό τετραοδοντικών συμπλεγμάτων χαλκού-πρωτεΐνης (αντίδραση διουρίας). Το δεύτερο βήμα περιλαμβάνει την προσθήκη του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu, το οποίο ανάγεται αναλογικά με τα χηλικά

σύμπλοκα χαλκού. Επομένως, σχηματίζεται ένα υδατοδιαλυτό προϊόν μπλε χρώματος, το οποίο μετράται στα 750 nm (84, 85).



Εικόνα 2. Τα δύο στάδια της μεθόδου Lowry (86).

Το κατώτερο όριο ανίχνευσης για τη μέθοδο Bradford είναι περίπου 3 έως 5 kDa και επομένως, μικρά πεπτίδια και αμινοξέα δεν δεσμεύονται. Η μέθοδος Lowry είναι ευαίσθητη στην παρουσία αμινοξέων και πεπτιδίων. Συνεπώς, οι τιμές συγκέντρωσης πρωτεΐνης, που προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο Bradford εμφανίζονται χαμηλότερες συγκριτικά με εκείνες με τη μέθοδο Lowry (87).

1.6.3. Μέθοδοι προσδιορισμού αντιοξειδωτικής δράσης

Οι μέθοδοι που εφαρμόζονται για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης είναι DPPH, ORAC, TEAC, Folin–Ciocalteu και FRAP.

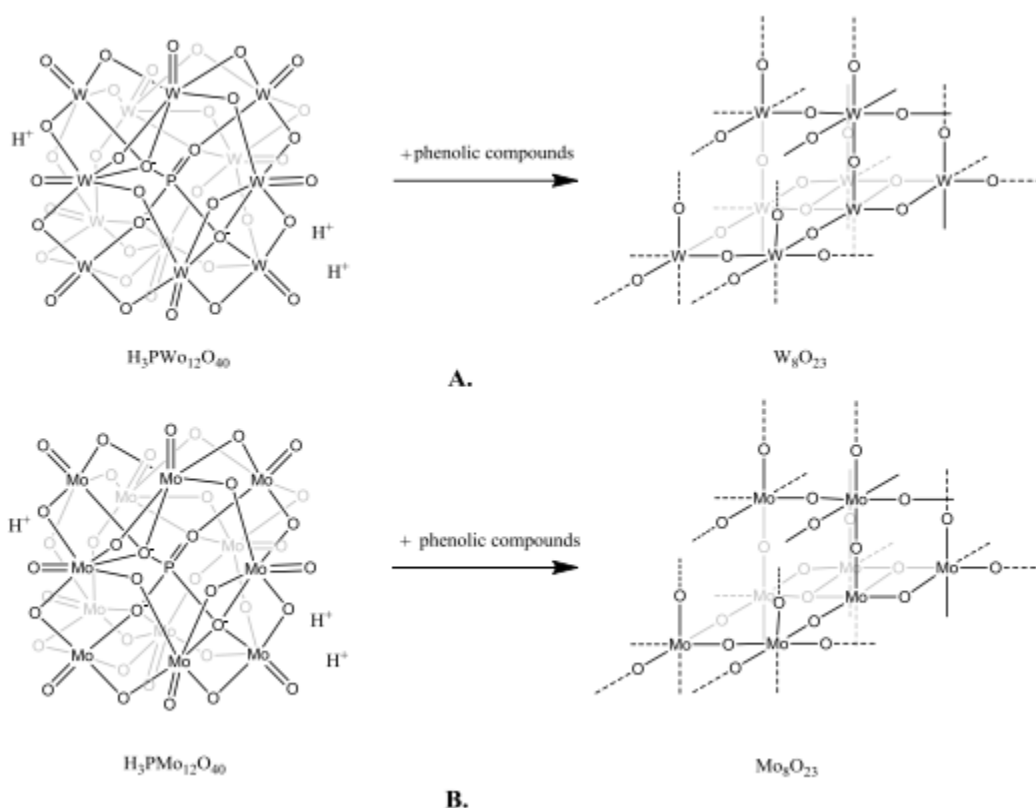
Η μέθοδος DPPH (2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζυλίο) είναι μέθοδος προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής δράσης και βασίζεται στη μέτρηση της αναγωγικής ικανότητας των αντιοξειδωτικών έναντι της ρίζας $\text{DPPH}^{\bullet}$. Η ρίζα $\text{DPPH}^{\bullet}$ είναι μία από τις λίγες σταθερές οργανικές ρίζες αζώτου και έχει σκούρο μωβ χρώμα. Οι αντιοξειδωτικές μέθοδοι βασίζονται σε μετρήσεις της απώλειας του χρώματος DPPH στα 515 nm μετά την αντίδραση με τα αντιοξειδωτικά και η αντίδραση παρακολουθείται με φασματοφωτόμετρο. Η αντίδραση του μίγματος παρακολουθείται στα 515 nm για 30 min ή έως ότου η απορρόφηση είναι σταθερή. Η μέθοδος είναι απλή και γρήγορη και χρειάζεται μόνο ένα φασματοφωτόμετρο, κάτι που εξηγεί την ευρεία χρήση του σε αντιοξειδωτικούς προσδιορισμούς. Ωστόσο, η ερμηνεία είναι περίπλοκη, καθώς ορισμένες ενώσεις των δειγμάτων μπορούν να επηρεάσουν τα αποτελέσματα (19, 20).

Η μέθοδος ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) μετράει την αντιοξειδωτική αναστολή των υπεροξειδικών ριζών, που προκαλείται από οξειδώσεις. Στη βασική μέθοδο, η υπεροξειδική ρίζα αντιδρά με έναν ανιχνευτή φθορισμού για να σχηματίσει ένα μη φθορίζον προϊόν, το οποίο μπορεί να ποσοτικοποιηθεί εύκολα με φθορισμό. Η μέθοδος ORAC παρέχει μια ελεγχόμενη πηγή υπεροξειδικών ριζών και οι αντιδράσεις των αντιοξειδωτικών με τα λιπίδια γίνονται τόσο στα τρόφιμα όσο και στα φυσιολογικά συστήματα. Μπορεί να προσαρμοστεί, ώστε να ανιχνεύει τόσο υδρόφιλα και υδρόφοβα αντιοξειδωτικά, αλλάζοντας την πηγή των ριζών και διαλύτη (19, 20).

Η μέθοδος TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) βασίζεται στην ικανότητα των αντιοξειδωτικών να εξουδετερώνουν τις ανθεκτικές ανιονικές ρίζες ABTS^{•+}. Σε αυτή τη μέθοδο το ABTS οξειδώνεται από υπεροξειδικές ρίζες ή άλλα οξειδωτικά σε κατιονική ρίζα ABTS^{•+}, που είναι έντονα χρωματισμένο, και η αντιοξειδωτική δράση μετράται ως η ικανότητα των δειγμάτων να μειώνουν το χρώμα αντιδρώντας απευθείας με τη ρίζα ABTS^{•+}. Τα αποτελέσματα της μεθόδου εκφράζονται σε σχέση με το Trolox. Ορισμένες τροποποιημένες μέθοδοι δεν έχουν χρησιμοποιήσει το όνομα "TEAC", αλλά στην πραγματικότητα μοιράζονται τον ίδιο μηχανισμό αντίδρασης και χρησιμοποιούν την ίδια κατιονική ρίζα, ABTS^{•+}. Η μέθοδος είναι απλή και έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλές έρευνες για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης. Το ABTS^{•+} αντιδρά γρήγορα με αντιοξειδωτικά, συνήθως εντός 30 min. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ένα ευρύ φάσμα pH και επίσης, το ABTS^{•+} είναι διαλυτό τόσο σε υδατικούς όσο και σε οργανικούς διαλύτες και δεν επηρεάζεται από την ιοντική ισχύ (19, 20).

Η μέθοδος Folin–Ciocalteu είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ολικών φαινολικών ενώσεων και την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των τροφίμων. Αρχικά, είχε προοριστεί για την ανάλυση των πρωτεϊνών, καθώς εμφάνιζε το πλεονέκτημα ότι το αντιδραστήριο αντιδρούσε με την τυροσίνη, η οποία έφερε φαινολική ομάδα, δημιουργώντας μπλε χρώμα με ένταση ανάλογη με την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη. Πολύ αργότερα, ο Singleton et al. επέκτεινε αυτή τη μέθοδο για την ανάλυση των ολικών φαινολικών ενώσεων. Η μέθοδος Folin–Ciocalteu εμφανίζει πολλά οφέλη, μεταξύ των οποίων ευκολία χρήσης, επαναληψιμότητα και ανθεκτικότητα. Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu αποτελεί ένα σύμπλεγμα φωσφομολυβδαινικού οξέος (H₃PMo₁₂O₄₀) και

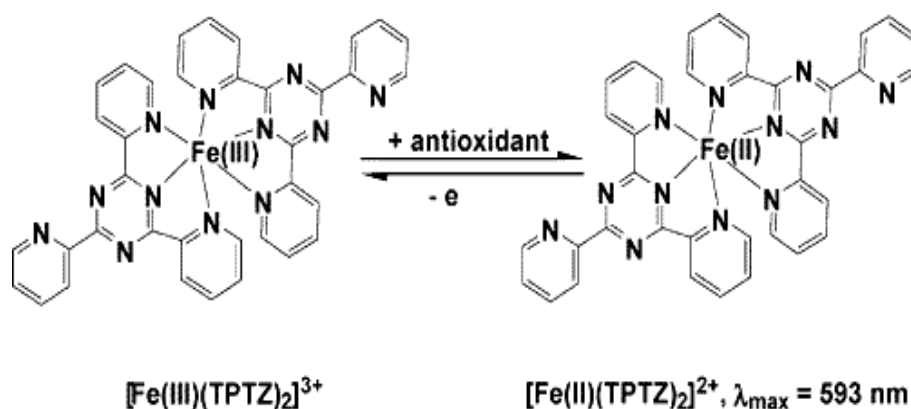
φωσφοβολφραμικού οξέος ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$), το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως για την *in vitro* χρωματομετρική ανάλυση φαινολικών και πολυφαινολικών αντιοξειδωτικών ενώσεων. Κατά την αντίδρασή του με τις φαινόλες, το αντιδραστήριο παράγει ένα έντονο μπλε χρώμα, το οποίο μπορεί να ανιχνευθεί και να μετρηθεί στην περιοχή των 760-765nm. Η αντίδραση μεταξύ του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu και των φαινολικών ενώσεων πραγματοποιείται σε pH 10, που επιτυγχάνεται με την προσθήκη ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3). Σε αυτές τις αλκαλικές συνθήκες, τα φαινολικά οξέα αποδίδουν το πρωτόνιο τους, δημιουργώντας ένα φαινολικό ιόν. Αυτό το φαινολικό ιόν είναι υπεύθυνο για την αναγωγή του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, το κεντρικό ιόν μολυβδαινίου δέχεται ένα ηλεκτρόνιο από το αντιοξειδωτικό, και αυτό οδηγεί στην αναγωγή του ιόντος Mo^{6+} σε Mo^{5+} . Τα ανιονικά παράγωγα του φωσφοβολφραμικού και φωσφομολυβδικού οξέος αλλάζουν χρώμα από κίτρινο σε μπλε. Τα οξείδια (W_8O_{23} και Mo_8O_{23}) είναι μπλε χρώματος, καθιστώντας την αντίδραση ευδιάκριτη και αποτελεσματική για την ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων (16, 88, 89).



Εικόνα 3. Αντιδράσεις του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu με φαινολικές ενώσεις με αποτέλεσμα την αναγωγή των Α. $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ σε W_8O_{23} , και Β. $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ σε Mo_8O_{23} (88).

Η μεθοδος της αντιοξειδωτικής ικανότητας αναγωγής του σιδήρου (FRAP) είναι μια κλασσική μέθοδος βασισμένη στη μεταφορά ηλεκτρονίου που μετρά τη αναγωγή του σύμπλοκου του τρισθενούς ιόντος σιδήρου (Fe^{3+}) σε σύμπλοκο του διςθενούς σιδήρου (Fe^{2+}) από αντιοξειδωτικά σε ένα όξινο περιβάλλον. Η αντιοξειδωτική δράση καθορίζεται με την αύξηση της απορρόφησης στα 593 nm, και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε σχέση με ένα πρότυπο αντιοξειδωτικού. Αντίστοιχα με άλλες μεθόδους βασισμένες στην ηλεκτρονική μεταφορά, η ανάλυση FRAP διεξάγεται σε όξινες συνθήκες pH 3,6 προκειμένου να διατηρηθεί η διαλυτότητα του σιδήρου και, κυρίως, να διευκολυνθεί η μεταφορά ηλεκτρονίων. Αυτό οδηγεί σε αύξηση της δυνατότητας οξειδοαναγωγής και οδηγεί σε αλλαγή στον κυρίαρχο μηχανισμό αντίδρασης (90). Η μέθοδος χαρακτηρίζεται από χαμηλό κόστος, ευαισθησία, επαναληψιμότητα, καθώς επίσης είναι ικανό να ελέγξει ένα ευρύ φάσμα βιολογικών συστημάτων, συμπεριλαμβανομένων υδατικών και οργανικών εκχυλισμάτων από φαρμακευτικά προϊόντα, τρόφιμα και φυτά, αλλά και κατά την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του ανθρώπινου πλάσματος, όπου και χρησιμοποιήθηκε αρχικά (91).

Σε χαμηλό pH, η αναγωγή ενός συμπλόκου τρισθενούς σιδήρου τριπυριδυλο-s-τριαζίνης (Fe^{3+} -TPTZ) σε μορφή διςθενούς σιδήρου, το οποίο έχει έντονο μπλε χρώμα, παρατηρείται κατά τη μέτρηση της μεταβολής της απορρόφησης στα 593 nm. Η αντίδραση είναι μη ειδική, δηλαδή κάθε ημιαντίδραση που έχει χαμηλότερο δυναμικό οξειδοαναγωγής, υπό τις ίδιες συνθήκες αντίδρασης, από εκείνη της ημιαντίδρασης $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ θα οδηγήσει τον τρισθενή σίδηρο σε διςθενή. Η αλλαγή στην απορρόφηση, επομένως, σχετίζεται άμεσα με τη συνδυασμένη ή «ολική» αναγωγική ισχύ των αντιοξειδωτικών-δοτών ηλεκτρονίων, που υπάρχουν στο μίγμα της αντίδρασης (92).



Εικόνα 4. Αντίδραση του συμπλόκου $[\text{Fe}^{3+}(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ με αντιοξειδωτικό κατά τη μέθοδο FRAP (19).

1.6.4. Μέθοδοι προσδιορισμού αντιφλεγμονώδους δράσης

Οι μέθοδοι που εφαρμόζονται για τον προσδιορισμό της αντιφλεγμονώδους δράσης είναι η αναστολή της κυκλοοξυγενάσης (COX), η αναστολή της παραγωγής νιτρικού οξέος (NO) και η αναστολή της λιποξυγενάσης (LOX).

Οι προσταγλανδίνες παράγονται από την οξείδωση του αραχιδονικού οξέος, η οποία καταλύεται από το ένζυμο COX. Τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (NSAID) ασκούν αναστρέψιμη αναστολή της COX μέσω της ανταγωνιστικής τους δράσης ως προς το αραχιδονικό οξύ. Η κινητική της αντίδρασης επομένως επηρεάζεται. Αυτή η αναστολή σχετίζεται με την κατανάλωση οξυγόνου παρουσία των NSAIDs και η κατανάλωση οξυγόνου είναι χαμηλότερη με την παρουσία τους. Οι COX-1 και COX-2 είναι ισοένζυμα, διαφορετικές πρωτεΐνες ικανές να καταλύουν την ίδια αντίδραση: Η COX-1 είναι υπεύθυνη για το βασικό επίπεδο των προσταγλανδινών και η COX-2 ενεργοποιείται από διάφορα ερεθίσματα που προκαλούνται από τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις (93).

Η αντιφλεγμονώδης δράση αξιολογήθηκε με βάση την παραγωγή νιτρικού οξειδίου (NO) σε κύτταρα μακροφάγων (RAW-264.7) που διεγείρονται από λιποπολυσακχαρίτες. Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα εκκρίνουν βιοδραστικούς φλεγμονώδεις μεσολαβητές συμπεριλαμβανομένου του νιτρικού οξειδίου (NO). Η ανεξέλεγκτη παραγωγή NO από τη διέγερση των μακροφάγων έχει εμπλακεί σε διάφορες φλεγμονώδεις ασθένειες. Σε μέσο καλλιέργειας μεταφέρονται κύτταρα που έχουν επεξεργαστεί με λιποπολυσακχαρίτη και διαφορετικές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος του δείγματος. Κατά τη φλεγμονή το νιτρικό οξύ οξειδώνεται σε

νιτρώδη. Τα νιτρώδη, που συσσωρεύονται στο μέσο καλλιέργειας, χρησιμοποιούνται ως δείκτης της παραγωγής NO, με βάση την αντίδραση Griess. Το μέσο κυτταρικής καλλιέργειας αναμιγνύεται με το αντιδραστήριο Griess (ίσοι όγκοι των 1% w/v σουλφανιλαμίδιο σε 5% v/v φωσφορικό οξύ και 0,1% w/v ναφθυλαιθυλενοδιαμίδιο-HCl), επωάζεται και στη συνέχεια μετράται η απορρόφηση στα 540 nm (94, 95).

Η λιποξυγενάση είναι ένα ένζυμο κλειδί στο μεταβολισμό πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και εμφανίζεται τόσο στο φυτικό όσο και στο ζωικό βασίλειο. Η λιποξυγενάση (LOX) είναι ένα ένζυμο που περιέχει μη αιμικό σίδηρο και πραγματοποιεί τη στερεο- και τοποειδική μετατροπή των 1,4-cis,cis διπλών δεσμών στα χειρόμορφα (cis, trans) συζευγμένα διενοϊκά μονοϋδροπεροξειδία. Η πιο εκτεταμένα μελετημένη μορφή του ένζυμου, είναι το ισοένζυμο 1 από τη σόγια. Αυτό το ένζυμο εμφανίζει έντονη προτίμηση για την οξυγόνωση του υποστρώματος, λινολεϊκού οξέος, στη θέση ω-6, όταν η αντίδραση πραγματοποιείται σε pH 9, παράγοντας 13-υδροπεροξύ-9,11-οκτανοϊκό οξύ. Επομένως, το λινολεϊκό οξύ χρησιμοποιείται συχνά ως υπόστρωμα για να μετρηθεί η αναστολή της δραστηριότητας της λιποξυγενάσης, καθώς το λινολεϊκό οξύ χρησιμοποιείται για να δράσει η λιποξυγενάση. Η % αναστολή αντιπροσωπεύει το βαθμό, όπου το τρόφιμο μπορεί να αναστείλει ή να μειώσει τη δράση της λιποξυγενάσης σε σύγκριση με ένα δείγμα αναφοράς. Συνήθως εκφράζεται ως ποσοστό, με υψηλότερες τιμές να υποδηλώνουν πιο αποτελεσματική αναστολή της δράσης της λιποξυγενάσης (21, 22).

1.7. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η αποτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης και της συγκέντρωσης πεπτιδίων υδατικών εκχυλισμάτων τυριού Φέτα και άλλων τυριών άλμης, και τυριού Μετσοβόνη και άλλων καπνιστών τυριών. Επίσης, αποτιμήθηκε η αντιφλεγμονώδης δράση.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. Δείγματα

Τα δείγματα τυριών, που χρησιμοποιήθηκαν, είναι τα εξής: α) τυρί Φέτα από τις εταιρείες, Δωδώνη (Ηπειρος 1), Καράλης (Ηπειρος 2), Μπίζιος (Ελασσόνα, Θεσσαλία), Ερυμάνθου Τομαράς (Αχαΐα, Δυτική Ελλάδα), β) γίδινο τυρί από τις εταιρείες, Δωδώνη (Ηπειρος 1), Καράλης (Ηπειρος 2), Έξαρχος (Ελασσόνα, Θεσσαλία), Ερυμάνθου Τομαράς (Αχαΐα, Δυτική Ελλάδα), γ) αγελαδινό τυρί από τις εταιρείες, Δωδώνη (Ηπειρος 1), Μπίζιος (Ελασσόνα, Θεσσαλία), η Βλάχα (Κεντρική Μακεδονία), δ) τυρί Μετσοβόνη από την εταιρεία Ίδρυμα Τοσίτσα (Ηπειρος), και ε) καπνιστά τυριά από τις εταιρείες, Παππάς (Ηπειρος) και Βερμίου Μπέλας (Κεντρική Μακεδονία).

2.2. Αντιδραστήρια

Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu ήταν από την εταιρεία Sigma-Chemicals (St. Louis, USA). Το οξικό οξύ ήταν από την εταιρεία Carlo Erba (Val de Reuil, France). Η 2,4,6-τρι(2-πυριδυλ)-1,3,5-τριαζίνη (TPTZ) ήταν από την εταιρεία Fluka ((Buchs, Switzerland). Υδροχλωρικό οξύ $\geq 37\%$, λιποξυγενάση, λινελαϊκό οξύ ήταν από την εταιρεία Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany). Το γαλλικό οξύ (άνυδρο), η αλβουμίνη βόειου ορού και το ανθρακικό νάτριο (άνυδρο) ήταν από την εταιρεία Merck (Darmstadt, Germany). Τα αντιδραστήρια καυστικό νάτριο, τρυγικό καλιονάτριο ήταν από την εταιρεία Mallinckrodt (St. Louis, New York). Ο θειικός χαλκός ήταν από την εταιρεία Ferak (Berlin, Germany). Το αντιδραστήριο Bradford ήταν από την εταιρεία Roti (Karlsruhe, Germany). Το L(+)-ασκορβικό οξύ (Βιταμίνη C) 99,7% και το βορικό οξύ ήταν από την εταιρεία Riedel-de Haën (Seelze, Germany). Η αιθανόλη $\geq 98\%$ ήταν από την εταιρεία Honeywell (North Carolina, USA).

2.3. Όργανα

• Ομογενοποιητής-Stomacher

Η ομογενοποίηση για παραλαβή υδατικού εκχυλίσματος τυριού πραγματοποιήθηκε σε Stomacher, Bag Mixer 400 (Puycapel, France).

- Φασματοφωτόμετρο

Οι μετρήσεις απορρόφησης πραγματοποιήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο ακριβείας τριών δεκαδικών ψηφίων, JENWAY 6505 UV/Vis (Stone, Staffordshire, UK), χρησιμοποιώντας κυψελίδες υάλινες και χαλαζία του 1 cm.

- Πεχάμετρο

Οι μετρήσεις pH πραγματοποιήθηκαν σε πεχάμετρο Consort C831 Multi-Parameter Analyser, ακριβείας δύο δεκαδικών ψηφίων (Turnhout, Belgium).

- Ζυγός

Οι ζυγίσεις έγιναν σε ηλεκτρονικό ζυγό, KERN ABS, 220g, d=0,1g, ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων ((Lohmar, Germany).

- Φυγόκεντρος

Η φυγοκέντρωση για τη λήψη εκχυλίσματος τυριού πραγματοποιήθηκε σε ψυχόμενη φυγόκεντρο, Hettich Zentrifugen MIKRO 22R (Tuttlingen, Germany).

2.4. Μέθοδοι προσδιορισμού πεπτιδίων, αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης σε υδατικό εκχύλισμα τυριού

2.4.1. Λήψη υδατικού εκχυλίσματος τυριού

Το υδατικό εκχύλισμα του τυριού παραλαμβάνεται με τη μέθοδο των Kuchroo και Fox (96, 97). Αρχικά, πραγματοποιείται προκατεργασία των δειγμάτων. Τα τυριά άλμης στραγγίζονται σε σκεύος με οπές για 45 min, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια ποσότητα άλμης, και εν συνεχεία, το τυρί ομογενοποιείται σε σακούλα τροφίμων. Τα καπνιστά τυριά μεταφέρονται σε χειροκίνητο τρίφτη τυριού, ώστε να λαμβάνεται σε τριμμένη μορφή και να μεταφερθεί σε σακούλα τροφίμων για ομογενοποίηση. Δείγμα τυριού (10 g) ομογενοποιείται με 20 mL απιονισμένο νερό σε Stomacher 400 για 5 min. Το ομογενοποιημένο δείγμα μεταφέρεται σε υδατόλουτρο στους 40°C για 1 h. Ακολούθως, πραγματοποιείται φυγοκέντρωση σε 5500rpm στους 4°C για 20 min. Τα υπερκείμενα διέρχονται από υαλοβάμβακα για απομάκρυνση του λίπους και εν συνεχεία, από φίλτρο Whatman No 42.

Το εκχύλισμα διέρχεται και από φίλτρο μεγέθους πόρων 0,45μm και αναλύεται σύμφωνα με τις μεθόδους Folin–Ciocalteu, Lowry, Bradford, FRAP και αντιφλεγμονώδους δράσης. Πριν πραγματοποιηθεί η εφαρμογή των μεθόδων, γίνεται μέτρηση του pH του υδατικού εκχυλίσματος με το πεχάμετρο Consort C831 Multi-Parameter Analyser.

2.4.2. Προσδιορισμός pH

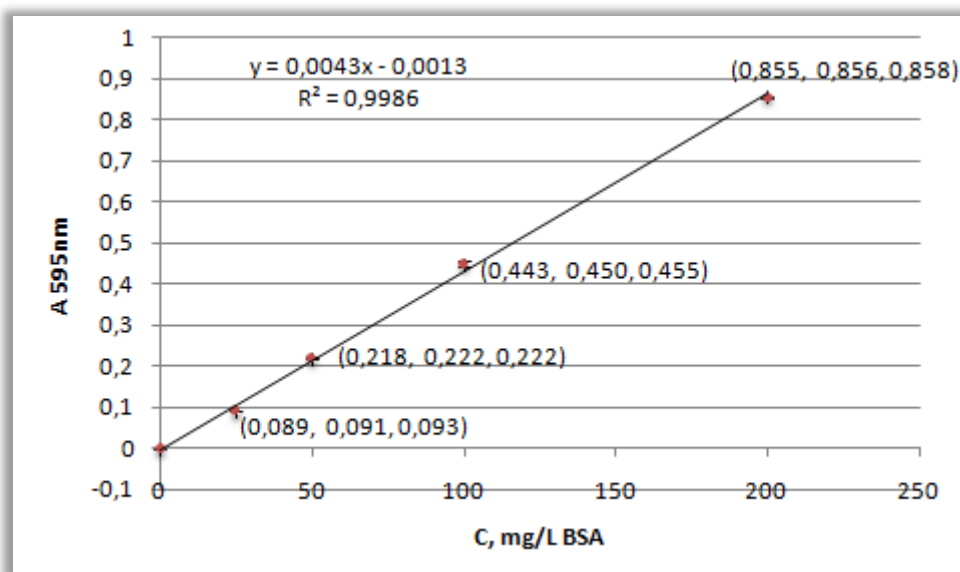
Ο προσδιορισμός pH των υδατικών εκχυλισμάτων τυριών γίνεται με τη χρήση πεχαμέτρου Consort C831, βυθίζοντας το ηλεκτρόδιο στο υδατικό εκχύλισμα των τυριών, που παρελήφθη και μετά την διέλευση του από φίλτρο μεγέθους πόρων 0,45 μm (98).

Οι τιμές pH των τυριών άλμης ήταν > 4,0 και των καπνιστών τυριών > 5,0.

2.4.3. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πεπτιδίων με εφαρμογή της μεθόδου Bradford

Η συγκέντρωση πεπτιδίων προσδιορίζεται με τη μέθοδο Bradford (96, 99). Σε Eppendorf μεταφέρονται 0,75 mL αντιδραστήριο Bradford (αραιωμένο με απιονισμένο νερό σε αναλογία 1:4) και 0,25 mL υδατικού εκχυλίσματος τυριού. Ακολουθεί ανάδευση σε vortex και παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min. Για το τυφλό, αντί για δείγμα προστίθενται απιονισμένο νερό, του οποίου το pH ρυθμίζεται με διάλυμα HCl 1 M σε 4 για τα τυριά άλμης ή 5 για τα καπνιστά τυριά. Μετρώνται οι απορροφήσεις στα 595 nm.

Τα αποτελέσματα πεπτιδίων εκφράζονται σε ισοδύναμα αλβουμίνης βόειου ορού (BSA) μέσω πρότυπης καμπύλης, η οποία προκύπτει από τα πρότυπα διαλύματα με συγκεντρώσεις 0, 25, 50, 100, 200 mg/L BSA μέσω διαδοχικών αραιώσεων, όπου η αραιώση τους πραγματοποιείται με οξινισμένο απιονισμένο νερό. Η περιεκτικότητα σε πεπτίδια του δείγματος εκφράζεται σε mg/L BSA με βάση την εξίσωση της ευθείας της πρότυπης καμπύλης, η οποία είναι $y=0,0043x-0,0013$, $R^2=0,9986$.



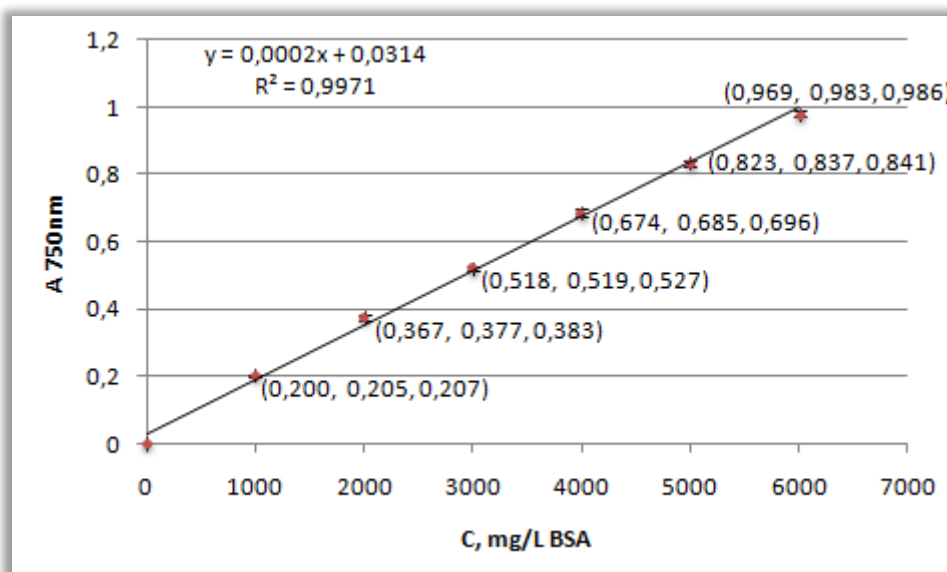
Σχήμα 1. Πρότυπη καμπύλη BSA για τον προσδιορισμό πεπτιδίων στη μέθοδο Bradford.

2.4.4. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πεπτιδίων με εφαρμογή της μεθόδου Lowry

Η συγκέντρωση αμινοξέων και πεπτιδίων προσδιορίζεται με τη μέθοδο Lowry (100, 101). Πριν από την ανάλυση, το αντιδραστήριο Lowry παρασκευάζεται με ανάμειξη 50 μερών αντιδραστηρίου A: 2% Na_2CO_3 σε 0,1 M NaOH και 1 μέρους αντιδραστηρίου B: 0,5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ σε 1% τρυγικό κάλιο. Σε Eppendorf των 2 mL μεταφέρονται 200 μL απιονισμένο νερό, του οποίου το pH ρυθμίζεται με διάλυμα HCl 1 M σε 4 για τα τυριά άλμης ή 5 για τα καπνιστά τυριά, και προστίθενται 50 μL υδατικού εκχυλίσματος. Ακολουθεί προσθήκη 1,25 mL αντιδραστηρίου Lowry και ανάδευση σε vortex, όπου ακολουθείται από 10 min παραμονής στο σκοτάδι. Μετά από τα 10 min, προστίθενται 0,25 mL αραιωμένο Folin (1 mL Folin αραιώνεται με 1 mL απιονισμένο νερό) και παραμονή στο σκοτάδι για 30 min. Για το τυφλό, αντί για δείγμα προστίθενται απιονισμένο νερό, του οποίου το pH ρυθμίζεται με διάλυμα HCl 1 M σε 4 για τα τυριά άλμης ή 5 για τα καπνιστά τυριά. Μετρώνται οι απορροφήσεις στα 595 nm.

Τα αποτελέσματα αμινοξέων και πεπτιδίων εκφράζονται σε ισοδύναμα αλβουμίνης βόειου ορού (BSA) μέσω πρότυπης καμπύλης, η οποία προκύπτει από τα πρότυπα διαλύματα με συγκεντρώσεις 0, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000 mg/L BSA μέσω διαδοχικών αραιώσεων, όπου η αραιώση τους πραγματοποιείται με οξινοσμένο απιονισμένο νερό. Η περιεκτικότητα σε αμινοξέα και πεπτίδια του

δείγματος εκφράζεται σε mg/L BSA με βάση την εξίσωση της ευθείας της πρότυπης καμπύλης, η οποία είναι $y=0,0002x+0,0314$, $R^2=0,9971$.



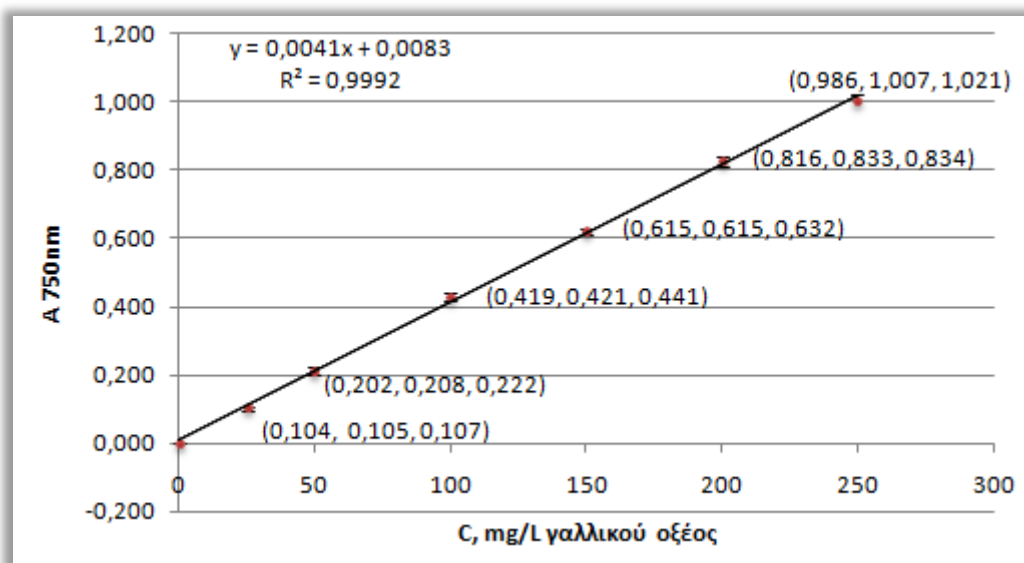
Σχήμα 2. Πρότυπη καμπύλη BSA για τον προσδιορισμό πρωτεϊνών και πεπτιδίων στη μέθοδο Lowry.

2.4.5. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης με εφαρμογή της μεθόδου Folin-Ciocalteu

Η αντιοξειδωτική δράση προσδιορίζεται με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu (102, 103). Σε δοκιμαστικό σωλήνα μεταφέρονται 1,9 mL απιονισμένο νερό, του οποίου το pH ρυθμίζεται με διάλυμα HCl 1 M σε 4 για τα τυριά άλμης ή 5 για τα καπνιστά τυριά, και προστίθενται 100 μ L υδατικού εκχυλίσματος τυριού. Προστίθενται 125 μ L αντιδραστηρίου Folin και γίνεται ανάδευση σε vortex. Μετά από 1 min, προστίθενται 380 μ L Na_2CO_3 20%, αναδεύονται στο vortex και υφίστανται 2 h παραμονή στο σκοτάδι. Για το τυφλό, αντί για δείγμα προστίθενται απιονισμένο νερό, του οποίου το pH ρυθμίζεται με διάλυμα HCl 1 M σε 4 για τα τυριά άλμης ή 5 για τα καπνιστά τυριά. Μετά τις 2 h μετρώνται οι απορροφήσεις στα 750 nm.

Η αντιοξειδωτική δράση εκφράζεται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος μέσω πρότυπης καμπύλης, η οποία προκύπτει από τα πρότυπα διαλύματα με συγκεντρώσεις 0, 25, 50, 100, 150, 200, 250 mg/L γαλλικού οξέος μέσω διαδοχικών αραιώσεων, όπου η αραιώση τους πραγματοποιείται με οξινοσμένο απιονισμένο νερό. Η αντιοξειδωτική

δράση του δείγματος εκφράζεται σε mg/L γαλλικού οξέος με βάση την εξίσωση της ευθείας της πρότυπης καμπύλης, η οποία είναι $y=0,0041x+0,0083$, $R^2=0,9992$.



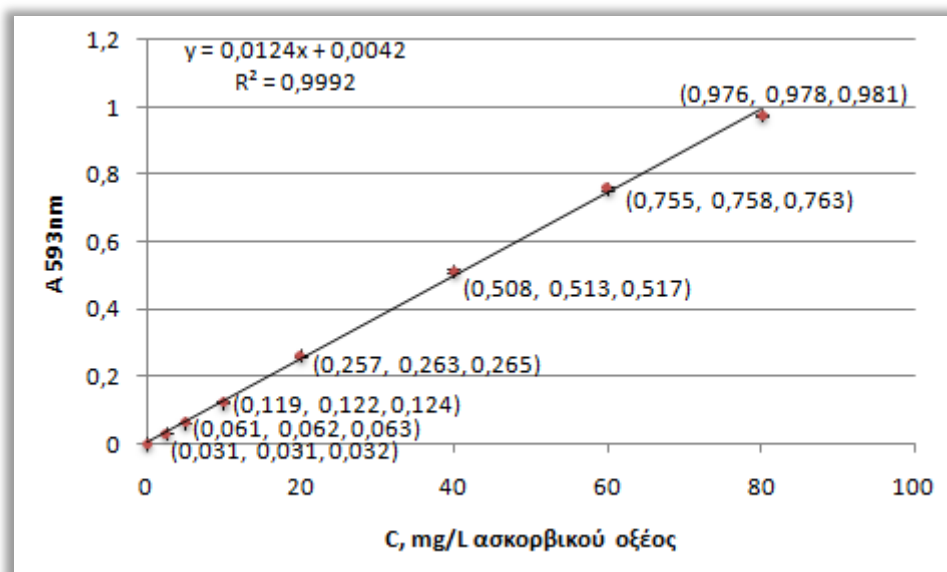
Σχήμα 3. Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος για τον προσδιορισμό αντιοξειδωτικής δράσης στη μέθοδο Folin.

2.4.6. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης με εφαρμογή της μεθόδου FRAP

Η αντιοξειδωτική δράση προσδιορίζεται με τη μέθοδο FRAP (97, 104). Προετοιμάζεται αντιδραστήριο 10:1:1 buffer οξικού οξέος 300 mM (pH 3,6): TPTZ 9 mM σε HCl 0,05 M : FeCl₃ 20 mM σε HCl 0,05M. Σε Eppendorf, μεταφέρονται 1,5 mL αντιδραστηρίου και 0,25 mL υδατικού εκχυλίσματος. Ακολουθεί ανάδευση σε vortex και αναμονή για 30 min στους 37 °C σε υδατόλουτρο. Για το τυφλό, αντί για δείγμα προστίθενται απιονισμένο νερό, του οποίου το pH ρυθμίζεται με διάλυμα HCl 1 M σε 4 για τα τυριά άλμης ή 5 για τα καπνιστά τυριά. Οι απορροφήσεις μετρώνται στα 593 nm.

Η αντιοξειδωτική δράση εκφράζεται σε ισοδύναμα ασκορβικού οξέος μέσω πρότυπης καμπύλης, η οποία προκύπτει από τα πρότυπα διαλύματα με συγκεντρώσεις 0, 2,5, 5, 10, 20, 40, 60, 80 mg/L ασκορβικού οξέος μέσω διαδοχικών αραιώσεων, όπου η αραιώση τους πραγματοποιείται με οξινοσμένο απιονισμένο νερό. Η αντιοξειδωτική δράση του δείγματος εκφράζεται σε mg/L ασκορβικού οξέος με βάση

την εξίσωση της ευθείας της πρότυπης καμπύλης, η οποία είναι $y=0,0124x+0,0042$, $R^2=0,9992$.



Σχήμα 4. Πρότυπη καμπύλη ασκορβικού οξέος για τον προσδιορισμό αντιοξειδωτικής δράσης στη μέθοδο FRAP.

2.4.7. Προσδιορισμός της αντιφλεγμονώδους δράσης με εφαρμογή της μεθόδου της λιποξυγενάσης

Η αντιφλεγμονώδης δράση προσδιορίζεται με τη μέθοδο αναστολής της λιποξυγενάσης (65, 105). Σε Eppendorf μεταφέρονται 900μl borate buffer 1 M pH=9 και προστίθενται 100μl δείγματος και 100 μL LOX (το οποίο έχει αραιωθεί σε borate buffer). Ακολουθεί vortex και παραμονή 5 min σε σκοτάδι. Μετά τα 5 min προστίθενται 100 μL λινολεϊκό οξύ 4,18 mM σε αιθανόλη. Η απορρόφηση παρακολουθείται για 20 min στα 234 nm και η απορρόφηση στα 20 min χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της αναστολής της δράσης της LOX. Το δείγμα αναφοράς περιέχει απιονισμένο νερό, του οποίου το pH ρυθμίζεται με διάλυμα HCl 1 M σε 4 για τα τυριά άλμης ή 5 για τα καπνιστά τυριά, αντί για δείγμα. Το τυφλό του δείγματος αναφοράς περιέχει αιθανόλη αντί για λινολεϊκό οξύ και απιονισμένο νερό, του οποίου το pH έχει ρυθμίζεται με διάλυμα HCl 1 M σε 4 για τα τυριά άλμης ή 5 για τα καπνιστά τυριά, αντί για δείγμα. Το τυφλό του δείγματος περιέχει αιθανόλη αντί για λινολεϊκό οξύ. Η αντιφλεγμονώδης δράση εκφράζεται ως η % αναστολή της δράσης της λιποξυγενάσης και υπολογίζεται από τη σχέση:

$$\% \text{Αναστολή} = (A_{\text{control}} - A_{\text{δείγματος}}) / A_{\text{control}}.$$

όπου το A_{control} και το $A_{\text{δείγματος}}$ αντιπροσωπεύουν την απορρόφηση των διαλυμάτων δείγματος αναφοράς και δείγματος, αντίστοιχα.

2.5. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω του προγράμματος IBM SPSS Statistics Version 28.0.1.0. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως Μέσος Όρος (MO) $\pm$ Τυπική Απόκλιση (TA).

Η στατιστική σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ των ώριμων τυριών άλμης, της Φέτας κατά την ωρίμανση και διατήρηση, και των ώριμων καπνιστών τυριών, έγινε με One-Way ANOVA, χρησιμοποιώντας το Duncan's post hoc test, και σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $p \leq 0,05$. Η στατιστική σύγκριση των αποτελεσμάτων του τυριού Μετσοβόνη μεταξύ 3 και 6 μηνών έγινε με το Paired-Samples T Test σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $p \leq 0,05$.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1. Συγκέντρωση πεπτιδίων και αντιοξειδωτική δράση υδατικών εκχυλισμάτων τυριών άλμης

3.1.1. Τυριά Φέτα, αγελαδινά και γίδινα τυριά άλμης

Στον Πίνακα 1 παρουσιάζεται η συγκέντρωση των πεπτιδίων, που προσδιορίστηκε σε υδατικό εκχύλισμα ώριμων τυριών Φέτα, ώριμων γίδινων τυριών άλμης και ώριμων αγελαδινών τυριών άλμης. Η συγκέντρωση πεπτιδίων προσδιορίστηκε με τις μεθόδους Bradford και Lowry, και εκφράστηκε σε mg BSA/L υδατικού εκχυλίσματος τυριού και /kg τυριού.

Πίνακας 1. Συγκέντρωση πεπτιδίων (μέθοδοι Bradford και Lowry) των υδατικών εκχυλισμάτων ώριμων τυριών άλμης, Φέτα, γίδινο και αγελαδινό.

Τυριά	Bradford (mg BSA/L υδατικού εκχυλίσματος τυριού)	Lowry (mg BSA/L υδατικού εκχυλίσματος τυριού)	Bradford (mg BSA/kg τυριού)	Lowry (mg BSA/kg τυριού)
Φέτα	1700 ^b ±490	3716 ^b ±773	2449 ^b ±675	5315 ^c ±995
Γίδινο	824 ^a ±54	2711 ^a ±343	1063 ^a ±197	3513 ^a ±717
Αγελαδινό	1859 ^b ±521	3329 ^{ab} ±979	2579 ^b ±720	4608 ^b ±1328

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως Μέσος όρος ± Τυπική απόκλιση. 12 διαφορετικά δείγματα τυριού Φέτα (n=12), 12 διαφορετικά δείγματα γίδινου τυριού (n=12), 9 διαφορετικά δείγματα αγελαδινού τυριού (n=9) αναλύθηκαν.

Οι διαφορετικοί εκθέτες a-c υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων κάθε στήλης (p<0,05).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα οποία είναι εκφρασμένα σε L υδατικού εκχυλίσματος, το ώριμο τυρί Φέτα διαφέρει στατιστικά σημαντικά στα επίπεδα αμινοξέων και πεπτιδίων από το ώριμο γίδινο τυρί άλμης (Bradford και Lowry). Το ώριμο τυρί Φέτα εμφανίζει υψηλότερη συγκέντρωση αμινοξέων και πεπτιδίων από το ώριμο γίδινο τυρί. Το ώριμο τυρί Φέτα δεν διαφέρει στατιστικά σημαντικά από το ώριμο αγελαδινό τυρί άλμης (Bradford και Lowry).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα οποία είναι εκφρασμένα σε kg τυριού, το ώριμο τυρί Φέτα διαφέρει στατιστικά σημαντικά στα επίπεδα αμινοξέων και πεπτιδίων από το ώριμο γίδινο τυρί άλμης (Bradford και Lowry). Η Φέτα εμφανίζει υψηλότερη συγκέντρωση αμινοξέων και πεπτιδίων από το γίδινο τυρί. Το ώριμο τυρί Φέτα δεν διαφέρει στατιστικά σημαντικά στα επίπεδα πεπτιδίων από το ώριμο αγελαδινό τυρί άλμης (Bradford). Όμως, το ώριμο τυρί Φέτα έχει υψηλότερα επίπεδα αμινοξέων και πεπτιδίων (Lowry) από το ώριμο αγελαδινό.

Η συγκέντρωση πεπτιδίων, η οποία προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Lowry, παρατηρήθηκε ότι είναι υψηλότερη σε σύγκριση με τη συγκέντρωση πεπτιδίων, η οποία προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford. Η διαφορά των τιμών μεταξύ των δύο μεθόδων οφείλεται στο κατώτερο όριο ανίχνευσης για τη μέθοδο Bradford, το οποίο είναι περίπου 3 έως 5 kDa. Επομένως, μικρά πεπτίδια και αμινοξέα δεν δεσμεύονται. Η μέθοδος Lowry όμως είναι ευαίσθητη στην παρουσία αμινοξέων και πεπτιδίων (87).

Στον Πίνακα 2 παρουσιάζεται η αντιοξειδωτική δράση, που προσδιορίστηκε σε υδατικό εκχύλισμα ώριμων τυριών Φέτα, ώριμων γίδινων τυριών άλμης και ώριμων αγελαδινών τυριών άλμης. Η αντιοξειδωτική δράση προσδιορίστηκε με τις μεθόδους Folin και FRAP, και εκφράστηκε σε mg GAE/L υδατικού εκχυλίσματος τυριού και /kg τυριού, και mg VC/L υδατικού εκχυλίσματος τυριού και /kg τυριού, αντίστοιχα.

Πίνακας 2. Αντιοξειδωτική δράση (μέθοδοι Folin και FRAP) των υδατικών εκχυλισμάτων ώριμων τυριών άλμης, Φέτα, γίδινο και αγελαδινό.

Τυριά	Folin (mg GAE/L υδατικού εκχυλίσματος τυριού)	FRAP (mg VC/L υδατικού εκχυλίσματος τυριού)	Folin (mg GAE/kg τυριού)	FRAP (mg VC/kg τυριού)
Φέτα	168 ^b ±27	36,8 ^b ±2,1	240 ^b ±30	53,0 ^b ±5,3
Γίδινο	126 ^a ±15	25,2 ^a ±4,7	164 ^a ±39	33,0 ^a ±9,6
Αγελαδινό	139 ^a ±37	25,4 ^a ±4,3	193 ^a ±50	35,1 ^a ±5,7

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως Μέσος όρος ± Τυπική απόκλιση. 12 διαφορετικά δείγματα τυριού Φέτα (n=12), 12 διαφορετικά δείγματα γίδινου τυριού (n=12), 9 διαφορετικά δείγματα αγελαδινού τυριού (n=9) αναλύθηκαν.

Οι διαφορετικοί εκθέτες a-c υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων κάθε στήλης (p<0,05).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα οποία είναι εκφρασμένα σε L υδατικού εκχυλίσματος, παρατηρούνται διαφορές ικανές να διαφοροποιούν το ώριμο τυρί Φέτα από ώριμα αγελαδινά τυριά άλμης, και το ώριμο τυρί Φέτα από τα ώριμα γίδινα τυριά άλμης. Η Φέτα προκύπτει να διαφέρει και από τα γίδινα και τα αγελαδινά τυριά άλμης στην αντιοξειδωτική δράση (Folin και FRAP). Η Φέτα εμφανίζει στατιστικά υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση και από τα αγελαδινά και τα γίδινα τυριά άλμης.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα οποία είναι εκφρασμένα σε kg τυριού, προκύπτουν παρόμοια αποτελέσματα. Το ώριμο τυρί Φέτα εμφανίζει στατιστικά υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση και από τα ώριμα αγελαδινά και γίδινα τυριά άλμης.

Σε μελέτη προέκυψε ότι αντιοξειδωτική δράση διέφερε μεταξύ των διαφορετικών ειδών γάλακτος, όπως αγελαδινού, γίδινου, πρόβειου, λόγω των διαφορών στη χημική τους σύστασης (106).

Στον Πίνακα 3 παρουσιάζεται η συγκέντρωση των πεπτιδίων, που προσδιορίστηκε σε υδατικό εκχύλισμα ώριμων τυριών Φέτα από διάφορες περιοχές της Ελλάδας. Η συγκέντρωση πεπτιδίων προσδιορίστηκε με τις μεθόδους Bradford και Lowry, και εκφράστηκε σε mg BSA/L υδατικού εκχυλίσματος τυριού και /kg τυριού.

Πίνακας 3. Συγκέντρωση πεπτιδίων (μέθοδοι Bradford και Lowry) των υδατικών εκχυλισμάτων ώριμου τυριού Φέτα από διάφορες περιοχές της Ελλάδας.

Περιοχή	Bradford (mg BSA/L υδατικού εκχυλίσματος τυριού)	Lowry (mg BSA/L υδατικού εκχυλίσματος τυριού)	Bradford (mg BSA/kg τυριού)	Lowry (mg BSA/kg τυριού)
Ήπειρος 1	1627 ^c ±28	3777 ^c ±114	2347 ^b ±96	5445 ^c ±68
Ήπειρος 2	1487 ^b ±55	2994 ^a ±74	2457 ^b ±62	4947 ^b ±51
Θεσσαλία	2468 ^d ±81	4890 ^d ±123	3401 ^c ±108	6738 ^d ±186
Δυτική Ελλάδα	1220 ^a ±31	3204 ^b ±96	1572 ^a ±58	4129 ^a ±167

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως Μέσος όρος ± Τυπική απόκλιση. 3 διαφορετικά δείγματα τυριού Φέτα (n=3) αναλύθηκαν για κάθε περιοχή.

Οι διαφορετικοί εκθέτες a-d υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων κάθε στήλης (p<0,05).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα οποία είναι εκφρασμένα σε L υδατικού εκχυλίσματος, όλες οι συγκρίσεις μεταξύ των ώριμων τυριών Φέτα διαφορετικών περιοχών εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα αμινοξέων και πεπτιδίων (Bradford και Lowry). Το τυρί Φέτα Θεσσαλίας εμφανίζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση πεπτιδίων, ακολουθεί Ήπειρος 1, Ήπειρος 2 και η Φέτα Δυτικής Ελλάδας είχε τη μικρότερη συγκέντρωση πεπτιδίων (Bradford). Το τυρί Φέτα Θεσσαλίας εμφανίζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση αμινοξέων και πεπτιδίων, ακολουθεί Ήπειρος 1, Δυτική Ελλάδα και η Φέτα Ηπείρου 2 είχε τη μικρότερη συγκέντρωση αμινοξέων και πεπτιδίων (Lowry).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα οποία είναι εκφρασμένα σε kg τυριού, τα δύο τυριά Φέτα Ηπείρου, 1 και 2, διαφέρουν στατιστικά σημαντικά από το τυρί Φέτα Θεσσαλίας και Δυτικής Ελλάδας, καθώς και η Φέτα Θεσσαλίας διαφέρει με τη Φέτα Δυτικής Ελλάδας. Το τυρί Φέτα Θεσσαλίας έχει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση πεπτιδίων και η Δυτική Ελλάδα είχε τη μικρότερη συγκέντρωση πεπτιδίων (Bradford). Όλες οι συγκρίσεις μεταξύ των ώριμων τυριών Φέτα διαφορετικών

περιοχών εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα αμινοξέων και πεπτιδίων (Lowry). Το τυρί Φέτα Θεσσαλίας εμφανίζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση αμινοξέων και πεπτιδίων, ακολουθεί Ήπειρος 1, Ήπειρος 2 και η Δυτική Ελλάδα είχε τη μικρότερη συγκέντρωση αμινοξέων και πεπτιδίων (Lowry).

Στον Πίνακα 4 παρουσιάζεται η αντιοξειδωτική δράση που προσδιορίστηκε σε υδατικό εκχύλισμα ώριμων τυριών Φέτα από διάφορες περιοχές της Ελλάδας. Η αντιοξειδωτική δράση προσδιορίστηκε με τις μεθόδους Folin και FRAP, και εκφράστηκε σε mg GAE/L υδατικού εκχυλίσματος τυριού και /kg τυριού, και mg VC/L υδατικού εκχυλίσματος τυριού και /kg τυριού, αντίστοιχα.

Πίνακας 4. Αντιοξειδωτική δράση (μέθοδοι Folin και FRAP) των υδατικών εκχυλισμάτων ώριμου τυριού Φέτα από διάφορες περιοχές της Ελλάδας.

Περιοχή	Folin (mg GAE/L υδατικού εκχυλίσματος τυριού)	FRAP (mg VC/L υδατικού εκχυλίσματος τυριού)	Folin (mg GAE/kg τυριού)	FRAP (mg VC/kg τυριού)
Ήπειρος 1	179 ^c ±7	37,2 ^b ±0,2	258 ^c ±7	53,7 ^b ±1,4
Ήπειρος 2	130 ^a ±3	35,4 ^a ±0,9	215 ^b ±8	58,6 ^c ±1,4
Θεσσαλία	201 ^d ±2	39,7 ^c ±0,6	277 ^d ±2	54,7 ^b ±1,4
Δυτική Ελλάδα	162 ^b ±4	34,9 ^a ±0,6	209 ^a ±8	44,9 ^a ±1,2

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως Μέσος όρος ± Τυπική απόκλιση. 3 διαφορετικά δείγματα τυριού Φέτα (n=3) αναλύθηκαν για κάθε περιοχή.

Οι διαφορετικοί εκθέτες a-d υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων κάθε στήλης (p<0,05).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα οποία είναι εκφρασμένα σε L υδατικού εκχυλίσματος, όλες οι συγκρίσεις μεταξύ των ώριμων τυριών Φέτα διαφόρων περιοχών διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους στην αντιοξειδωτική δράση (Folin). Η Φέτα Θεσσαλίας εμφανίζει υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση, ακολουθεί Ήπειρος 1, Δυτικής Ελλάδας και η Φέτα Ήπειρου 2 έχει τη χαμηλότερη αντιοξειδωτική δράση (Folin). Όλες οι συγκρίσεις μεταξύ των ώριμων τυριών Φέτα διαφόρων περιοχών, με εξαίρεση τη σύγκριση μεταξύ Ήπειρου 2 και Δυτικής Ελλάδας, διαφέρουν στατιστικά σημαντικά στην αντιοξειδωτική δράση (FRAP). Η Φέτα Θεσσαλίας εμφανίζει υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση και η Φέτα Ήπειρου 1 έχει τη χαμηλότερη αντιοξειδωτική δράση (FRAP).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα οποία είναι εκφρασμένα σε kg τυριού, όλες οι συγκρίσεις μεταξύ των ώριμων τυριών Φέτα διαφόρων περιοχών, με εξαίρεση τη σύγκριση μεταξύ Ήπειρου 2 και Δυτικής Ελλάδας, διαφέρουν στατιστικά σημαντικά στην αντιοξειδωτική δράση (Folin). Η Φέτα Θεσσαλίας εμφανίζει υψηλότερη

αντιοξειδωτική δράση, ακολουθεί Ήπειρος 1, ενώ η Δυτική Ελλάδα και η Ήπειρος 2 έχουν τη χαμηλότερη αντιοξειδωτική δράση (Folin). Όλες οι συγκρίσεις μεταξύ των ώριμων τυριών Φέτα διαφόρων περιοχών, με εξαίρεση τη σύγκριση μεταξύ Ηπείρου 1 και Θεσσαλίας, διαφέρουν στατιστικά σημαντικά στην αντιοξειδωτική δράση (FRAP). Η Φέτα Ηπείρου 2 εμφανίζει υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση και η Φέτα Δυτικής Ελλάδας έχει τη χαμηλότερη αντιοξειδωτική δράση (FRAP).

Στον Πίνακα 5 παρουσιάζεται η συγκέντρωση των πεπτιδίων, που προσδιορίστηκε σε υδατικό εκχύλισμα ώριμων γίδινων τυριών άλμης από διάφορες περιοχές της Ελλάδας. Η συγκέντρωση πεπτιδίων προσδιορίστηκε με τις μεθόδους Bradford και Lowry, και εκφράστηκε σε mg BSA/L υδατικού εκχυλίσματος τυριού και /kg τυριού.

Πίνακας 5. Συγκέντρωση πεπτιδίων (μέθοδοι Bradford και Lowry) των υδατικών εκχυλισμάτων ώριμου γίδινου τυριού άλμης από διάφορες περιοχές της Ελλάδας.

Περιοχή	Bradford (mg BSA/L υδατικού εκχυλίσματος τυριού)	Lowry (mg BSA/L υδατικού εκχυλίσματος τυριού)	Bradford (mg BSA/kg τυριού)	Lowry (mg BSA/kg τυριού)
Ήπειρος 1	782 ^a ±28	2200 ^a ±67	860 ^a ±15	2468 ^a ±54
Ήπειρος 2	808 ^a ±30	2662 ^b ±75	1311 ^c ±54	4314 ^d ±61
Θεσσαλία	805 ^a ±25	3007 ^c ±72	908 ^a ±34	3392 ^b ±23
Δυτική Ελλάδα	900 ^b ±35	2974 ^c ±51	1174 ^b ±30	3878 ^c ±16

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως Μέσος όρος ± Τυπική απόκλιση. 3 διαφορετικά δείγματα γίδινου τυριού (n=3) αναλύθηκαν για κάθε περιοχή. Οι διαφορετικοί εκθέτες a-d υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων κάθε στήλης (p<0,05).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα οποία είναι εκφρασμένα σε L υδατικού εκχυλίσματος, όλες οι συγκρίσεις μεταξύ των ώριμων γίδινων τυριών Δυτικής Ελλάδας με τις υπόλοιπες περιοχές εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα πεπτιδίων (Bradford). Το γίδινο τυρί Δυτικής Ελλάδας εμφανίζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση πεπτιδίων (Bradford). Όλες οι συγκρίσεις μεταξύ των ώριμων γίδινων τυριών διαφορετικών περιοχών, με εξαίρεση τη σύγκριση μεταξύ Θεσσαλίας και Δυτικής Ελλάδας, εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα αμινοξέων και πεπτιδίων (Lowry). Το γίδινο τυρί Θεσσαλίας και Δυτικής Ελλάδας εμφανίζουν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση αμινοξέων και πεπτιδίων, ακολουθεί η Ήπειρος 1, και η Ήπειρος 2 είχε τη μικρότερη συγκέντρωση αμινοξέων και πεπτιδίων.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα οποία είναι εκφρασμένα σε kg τυριού, όλες οι συγκρίσεις μεταξύ των ώριμων γίδινων τυριών διαφορετικών περιοχών, με εξαίρεση τη σύγκριση μεταξύ Ηπείρου 1 και Θεσσαλίας, εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα πεπτιδίων (Bradford). Το γίδινο τυρί Ηπείρου 2 έχει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση πεπτιδίων, ακολούθως το γίδινο Δυτικής Ελλάδας, και τα γίδινα Ηπείρου 1 και Θεσσαλίας είχαν τη μικρότερη συγκέντρωση πεπτιδίων (Bradford). Όλες οι συγκρίσεις μεταξύ των ώριμων γίδινων τυριών διαφορετικών περιοχών εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα αμινοξέων και πεπτιδίων (Lowty). Το γίδινο Ηπείρου 2 εμφανίζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση αμινοξέων και πεπτιδίων, ακολουθεί η Δυτική Ελλάδα, η Θεσσαλία και η Ήπειρος 1 είχε τη μικρότερη συγκέντρωση αμινοξέων και πεπτιδίων.

Στον Πίνακα 6 παρουσιάζεται η αντιοξειδωτική δράση που προσδιορίστηκε σε υδατικό εκχύλισμα ώριμων γίδινων τυριών άλμης από διάφορες περιοχές της Ελλάδας. Η αντιοξειδωτική δράση προσδιορίστηκε με τις μεθόδους Folin και FRAP, και εκφράστηκε σε mg GAE/L υδατικού εκχυλίσματος τυριού και /kg τυριού, και mg VC/L υδατικού εκχυλίσματος τυριού και /kg τυριού, αντίστοιχα.

Πίνακας 6. Αντιοξειδωτική δράση (μέθοδοι Folin και FRAP) των υδατικών εκχυλισμάτων ώριμου γίδινου τυριού άλμης από διάφορες περιοχές της Ελλάδας.

Περιοχή	Folin (mg GAE/L υδατικού εκχυλίσματος τυριού)	FRAP (mg VC/L υδατικού εκχυλίσματος τυριού)	Folin (mg GAE/kg τυριού)	FRAP (mg VC/kg τυριού)
Ήπειρος 1	110 ^a ±3	17,6 ^a ±0,1	121 ^a ±1	19,3 ^a ±0,6
Ήπειρος 2	129 ^c ±3	27,4 ^b ±0,5	208 ^d ±8	44,4 ^d ±1,2
Θεσσαλία	118 ^b ±1	27,5 ^{bc} ±0,8	133 ^b ±2	31,0 ^b ±0,5
Δυτική Ελλάδα	148 ^d ±4	28,5 ^c ±0,7	192 ^c ±3	37,3 ^c ±1,0

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως Μέσος όρος ± Τυπική απόκλιση. 3 διαφορετικά δείγματα γίδινου τυριού (n=3) αναλύθηκαν για κάθε περιοχή.

Οι διαφορετικοί εκθέτες a-d υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων κάθε στήλης (p<0,05).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα οποία είναι εκφρασμένα σε L υδατικού εκχυλίσματος, όλες οι συγκρίσεις μεταξύ των ώριμων γίδινων τυριών διαφόρων περιοχών διαφέρουν στατιστικά σημαντικά στην αντιοξειδωτική δράση (Folin). Το γίδινο Δυτικής Ελλάδας εμφανίζει υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση, ακολουθεί Ηπείρου 2, Θεσσαλίας και το γίδινο Ηπείρου 1 έχει τη χαμηλότερη αντιοξειδωτική δράση (Folin). Οι συγκρίσεις μεταξύ των ώριμων γίδινων τυριών Ηπείρου 1 με όλων των υπόλοιπων περιοχών, καθώς και μεταξύ Ηπείρου 2 και Δυτικής, διαφέρουν

στατιστικά σημαντικά στην αντιοξειδωτική δράση (FRAP). Το γίδινο τυρί Δυτικής Ελλάδας εμφανίζει υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση και γίδινο τυρί Ηπείρου 1 έχει τη χαμηλότερη αντιοξειδωτική δράση (FRAP).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα οποία είναι εκφρασμένα σε kg τυριού, όλες οι συγκρίσεις μεταξύ των ώριμων γιδίνων τυριών διαφόρων περιοχών διαφέρουν στατιστικά σημαντικά στην αντιοξειδωτική δράση (Folin και FRAP). Το γίδινο Ηπείρου 2 εμφανίζει υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση, ακολουθεί Δυτικής Ελλάδας, Θεσσαλίας και το γίδινο Ηπείρου 1 έχει τη χαμηλότερη αντιοξειδωτική δράση.

Στον Πίνακα 7 παρουσιάζεται η συγκέντρωση των πεπτιδίων, που προσδιορίστηκε σε υδατικό εκχύλισμα ώριμων αγελαδινών τυριών άλμης από διάφορες περιοχές της Ελλάδας. Η συγκέντρωση πεπτιδίων προσδιορίστηκε με τις μεθόδους Bradford και Lowry, και εκφράστηκε σε mg BSA/L υδατικού εκχυλίσματος τυριού και /kg τυριού.

Πίνακας 7. Συγκέντρωση πεπτιδίων (μέθοδοι Bradford και Lowry) των υδατικών εκχυλισμάτων ώριμου αγελαδινού τυριού άλμης από διάφορες περιοχές της Ελλάδας.

Περιοχή	Bradford (mg BSA/L υδατικού εκχυλίσματος τυριού)	Lowry (mg BSA/L υδατικού εκχυλίσματος τυριού)	Bradford (mg BSA/kg τυριού)	Lowry (mg BSA/kg τυριού)
Ήπειρος 1	1617 ^b ±34	2277 ^a ±70	2283 ^b ±79	3215 ^a ±54
Θεσσαλία	2542 ^c ±46	4520 ^c ±65	1942 ^a ±74	4366 ^b ±76
Κεντρική Μακεδονία	1418 ^a ±49	3190 ^b ±81	3512 ^c ±139	6244 ^c ±163

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως Μέσος όρος ± Τυπική απόκλιση. 3 διαφορετικά δείγματα αγελαδινού τυριού (n=3) αναλύθηκαν για κάθε περιοχή. Οι διαφορετικοί εκθέτες a-c υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων κάθε στήλης (p<0,05).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα οποία είναι εκφρασμένα σε L υδατικού εκχυλίσματος, όλες οι συγκρίσεις μεταξύ των ώριμων αγελαδινών τυριών διαφόρων περιοχών εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα αμινοξέων και πεπτιδίων (Bradford και Lowry). Το αγελαδινό τυρί Θεσσαλίας εμφανίζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση πεπτιδίων, ακολουθεί η Ήπειρος 1 και η Κεντρική Μακεδονία έχει τη μικρότερη συγκέντρωση πεπτιδίων (Bradford). Το αγελαδινό τυρί Θεσσαλίας εμφανίζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση αμινοξέων και πεπτιδίων, ακολουθεί η Κεντρική Μακεδονία και η Ήπειρος 1 έχει τη μικρότερη συγκέντρωση αμινοξέων και πεπτιδίων (Lowry).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα οποία είναι εκφρασμένα σε kg τυριού, όλες οι συγκρίσεις μεταξύ των ώριμων αγελαδινών τυριών διαφόρων περιοχών εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα αμινοξέων και πεπτιδίων (Bradford και Lowry). Το αγελαδινό τυρί Κεντρικής Μακεδονίας εμφανίζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση πεπτιδίων, ακολουθεί η Ήπειρος 1 και η Θεσσαλία έχει τη μικρότερη συγκέντρωση πεπτιδίων (Bradford). Το αγελαδινό τυρί Κεντρικής Μακεδονίας εμφανίζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση αμινοξέων και πεπτιδίων, ακολουθεί η Θεσσαλία και η Ήπειρος 1 έχει τη μικρότερη συγκέντρωση αμινοξέων και πεπτιδίων (Lowry).

Σε άλλη μελέτη, τα αγελαδινά τυριά είχαν σημαντικά επίπεδα πεπτιδίων, τα οποία προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο Lowry (55).

Η συγκέντρωση πεπτιδίων σε όλα τα τυριά άλμης, η οποία προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Lowry, παρατηρήθηκε ότι είναι υψηλότερη σε σύγκριση με τη συγκέντρωση πεπτιδίων, η οποία προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford. Η διαφορά των τιμών μεταξύ των δύο μεθόδων μπορεί να αποδοθεί στο κατώτερο όριο αντίχνευσης για τη μέθοδο Bradford, το οποίο είναι περίπου 3 έως 5 kDa και επομένως, μικρά πεπτίδια και αμινοξέα δεν δεσμεύονται. Η μέθοδος Lowry όμως είναι ευαίσθητη στην παρουσία αμινοξέων και πεπτιδίων (87).

Στον Πίνακα 8 παρουσιάζεται η αντιοξειδωτική δράση που προσδιορίστηκε σε υδατικό εκχύλισμα ώριμων αγελαδινών τυριών άλμης από διάφορες περιοχές της Ελλάδας. Η αντιοξειδωτική δράση προσδιορίστηκε με τις μεθόδους Folin και FRAP, και εκφράστηκε σε mg GAE/L υδατικού εκχυλίσματος τυριού και /kg τυριού, και mg VC/L υδατικού εκχυλίσματος τυριού και /kg τυριού, αντίστοιχα.

Πίνακας 8. Αντιοξειδωτική δράση (μέθοδοι Folin και FRAP) των υδατικών εκχυλισμάτων ώριμου αγελαδινού τυριού άλμης από διάφορες περιοχές της Ελλάδας.

Περιοχή	Folin (mg GAE/L υδατικού εκχυλίσματος τυριού)	FRAP (mg VC/L υδατικού εκχυλίσματος τυριού)	Folin (mg GAE/kg τυριού)	FRAP (mg VC/kg τυριού)
Ήπειρος 1	100 ^a ±3	19,7 ^a ±0,5	142 ^a ±5	27,8 ^a ±1,2
Θεσσαλία	184 ^c ±6	27,4 ^b ±0,6	182 ^b ±5	37,5 ^b ±1,5
Κεντρική Μακεδονία	133 ^b ±3	29,0 ^c ±0,7	254 ^c ±5	40,1 ^c ±1,2

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως Μέσος όρος ± Τυπική απόκλιση. 3 διαφορετικά δείγματα αγελαδινού τυριού (n=3) αναλύθηκαν για κάθε περιοχή.

Οι διαφορετικοί εκθέτες a-c υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων κάθε στήλης ($p < 0,05$).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα οποία είναι εκφρασμένα σε L υδατικού εκχυλίσματος, όλες οι συγκρίσεις μεταξύ των ώριμων αγελαδινών τυριών διαφόρων περιοχών διαφέρουν στατιστικά σημαντικά στην αντιοξειδωτική δράση (Folin και FRAP). Το αγελαδινό Θεσσαλίας εμφανίζει υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση, ακολουθεί Κεντρικής Μακεδονίας, και το αγελαδινό Ηπείρου 1 έχει τη χαμηλότερη αντιοξειδωτική δράση (Folin). Το αγελαδινό τυρί Κεντρικής Μακεδονίας εμφανίζει υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση, ακολουθεί Θεσσαλίας, και το αγελαδινό τυρί Ηπείρου 1 έχει τη χαμηλότερη αντιοξειδωτική δράση (FRAP).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα οποία είναι εκφρασμένα σε kg τυριού, όλες οι συγκρίσεις μεταξύ των ώριμων αγελαδινών τυριών διαφόρων περιοχών διαφέρουν στατιστικά σημαντικά στην αντιοξειδωτική δράση (Folin και FRAP). Το αγελαδινό τυρί Κεντρικής Μακεδονίας εμφανίζει υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση, ακολουθεί Θεσσαλίας, και το αγελαδινό τυρί Ηπείρου 1 έχει τη χαμηλότερη αντιοξειδωτική δράση.

Σύμφωνα με άλλους ερευνητές, αγελαδινά τυριά έχουν εμφανίσει αντιοξειδωτική δράση, η οποία προσδιορίστηκε με τη μέθοδο FRAP, και προέκυψε να αυξάνεται κατά την ωρίμανση (97).

3.1.2. Τυρί Φέτα κατά την ωρίμανση και διατήρηση του

Στον Πίνακα 9 παρουσιάζεται η συγκέντρωση των πεπτιδίων, που προσδιορίστηκε σε υδατικό εκχύλισμα Φέτα κατά την ωρίμανση και διατήρηση του. Η συγκέντρωση πεπτιδίων προσδιορίστηκε με τις μεθόδους Bradford και Lowry, και εκφράστηκε σε mg BSA/L υδατικού εκχυλίσματος τυριού και /kg τυριού.

Πίνακας 9. Συγκέντρωση πεπτιδίων (μέθοδοι Bradford και Lowry) των υδατικών εκχυλισμάτων τυριού Φέτα κατά την ωρίμανση και διατήρηση του.

Ηλικία, Ημέρες	Bradford (mg BSA/L υδατικού εκχυλίσματος τυριού)	Lowry (mg BSA/L υδατικού εκχυλίσματος τυριού)	Bradford (mg BSA/kg τυριού)	Lowry (mg BSA/kg τυριού)
2	2212 ^d ±43	2204 ^a ±62	3005 ^d ±118	2992 ^a ±28
16	1245 ^a ±72	2577 ^b ±63	1784 ^a ±101	3692 ^b ±91
60	1627 ^b ±28	3777 ^c ±114	2347 ^b ±96	5445 ^c ±68
120	1767 ^c ±64	4247 ^d ±113	2674 ^c ±77	6427 ^d ±132

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως Μέσος όρος $\pm$ Τυπική απόκλιση. 3 διαφορετικά δείγματα τυριού Φέτας ($n=3$) αναλύθηκαν για κάθε ηλικία τυριού. Οι διαφορετικοί εκθέτες a-d υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων κάθε στήλης ($p<0,05$).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα οποία είναι εκφρασμένα σε L υδατικού εκχυλίσματος, όλες οι συγκρίσεις μεταξύ των διαφόρων ηλικιών Φέτας διαφέρουν στατιστικά σημαντικά στα επίπεδα πεπτιδίων (Bradford και Lowry). Στο τυρί Φέτα μειώνεται η συγκέντρωση πεπτιδίων στις 16 ημέρες και εν συνεχεία, αυξάνεται κατά την ωρίμανση και διατήρηση του (Bradford). Οι συγκρίσεις μεταξύ των διαφόρων ηλικιών Φέτας διαφέρουν στατιστικά σημαντικά στα επίπεδα αμινοξέων και πεπτιδίων (Lowry). Στο τυρί Φέτα αυξάνεται η συγκέντρωση αμινοξέων και πεπτιδίων κατά την ωρίμανση και διατήρηση του (Lowry).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα οποία είναι εκφρασμένα σε kg τυριού, είναι παρόμοια.

Σε μία μελέτη, αγελαδινά τυριά είχαν σημαντικά επίπεδα πεπτιδίων, τα οποία προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο Lowry, και αυξήθηκαν κατά την παρασκευή, ωρίμανση και διατήρηση τους (55). Επίσης, σε άλλη μελέτη προσδιορίστηκαν τα επίπεδα πεπτιδίων με τη μέθοδο Bradford σε υδατικό εκχύλισμα τυριών άλμης. Σε όλα τα τυριά άλμης 10 ημερών παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων πεπτιδίων από την ημέρα παρασκευής τους, ενώ στη συνέχεια υπήρξε μεταβολή των πεπτιδίων ανάλογα με τη σύσταση άλμης (107). Η μείωση των πεπτιδίων στο τυρί άλμης 10 ημερών θα μπορούσε πιθανόν να οφείλεται στη μετανάστευση της διαλυτοποιημένης καζεΐνης και των πρωτεϊνών ορού του φρέσκου τυριού στο διάλυμα άλμης (74). Μια άλλη πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να οφείλεται στην μετακίνηση των διαλυτών μετάλλων στο τυρί κατά τη την αποθήκευση της στην άλμη, επηρεάζοντας έτσι τις πρωτεϊνικές διαμορφώσεις στο τυρί. Σε διάλυμα άλμης περιέχεται αλάτι και τα ιόντα νατρίου και χλωρίου μεταναστεύουν από την άλμη στο τυρί λόγω των διαφορών οσμωτικής πίεσης σε τυρί και άλμη (107).

Στον Πίνακα 10 παρουσιάζεται η αντιοξειδωτική δράση που προσδιορίστηκε σε υδατικό εκχύλισμα Φέτα κατά την ωρίμανση και διατήρηση του. Η αντιοξειδωτική δράση προσδιορίστηκε με τις μεθόδους Folin και FRAP, και εκφράστηκε σε mg GAE/L υδατικού εκχυλίσματος τυριού και /kg τυριού, και mg VC/L υδατικού εκχυλίσματος τυριού και /kg τυριού, αντίστοιχα.

Πίνακας 10. Αντιοξειδωτική δράση (μέθοδοι Folin και FRAP) των υδατικών εκχυλίσμάτων τυριού Φέτα κατά την ωρίμανση και διατήρηση του.

Ηλικία, Ημέρες	Folin (mg GAE/L υδατικού εκχυλίσματος τυριού)	FRAP (mg VC/L υδατικού εκχυλίσματος τυριού)	Folin (mg GAE/kg τυριού)	FRAP (mg VC/kg τυριού)
2	120 ^a ±3	32,5 ^a ±1,5	163 ^a ±7	44,0 ^a ±0,5
16	142 ^b ±5	35,6 ^{bc} ±0,7	203 ^b ±6	51,0 ^b ±1,3
60	179 ^c ±7	37,2 ^c ±0,2	258 ^c ±7	53,7 ^c ±1,4
120	217 ^d ±3	34,0 ^{ab} ±0,7	328 ^d ±7	51,5 ^{bc} ±1,4

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως Μέσος όρος ± Τυπική απόκλιση. 3 διαφορετικά δείγματα τυριού Φέτας (n=3) αναλύθηκαν για κάθε ηλικία τυριού.

Οι διαφορετικοί εκθέτες a-d υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων κάθε στήλης (p<0,05).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα οποία είναι εκφρασμένα σε L υδατικού εκχυλίσματος, όλες οι συγκρίσεις μεταξύ των διαφόρων ηλικιών Φέτας διαφέρουν στατιστικά σημαντικά στην αντιοξειδωτική δράση (Folin). Στο τυρί Φέτα αυξάνεται η αντιοξειδωτική του δράση κατά την ωρίμανση και διατήρηση του, εμφανίζοντας τη μέγιστη αντιοξειδωτική του δράση στις 120 ημέρες. Οι συγκρίσεις μεταξύ των ηλικιών Φέτας 2 και 16 ημερών, 2 και 60 ημερών, καθώς και 60 και 120 ημερών, διαφέρουν στατιστικά σημαντικά στην αντιοξειδωτική δράση (FRAP). Στο τυρί Φέτα η αντιοξειδωτική του δράση εμφανίζει διάφορες διακυμάνσεις (FRAP).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα οποία είναι εκφρασμένα σε kg τυριού, η αντιοξειδωτική δράση έδωσε παρόμοια αποτελέσματα (Folin). Η αντιοξειδωτική δράση αυξάνει κατά την ωρίμανση και παρέμεινε σταθερή κατά τη διατήρηση (FRAP).

Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι η συγκέντρωση πεπτιδίων αυξάνεται κατά την ωρίμανση και διατήρηση του τυριού Φέτα, καθώς και η αντιοξειδωτική δράση, που προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Folin. Η αντιοξειδωτική δράση, που προσδιορίστηκε με τη μέθοδο FRAP, εμφανίζει διακυμάνσεις.

Σύμφωνα με άλλους ερευνητές, αγελαδινά τυριά έχουν εμφανίσει αντιοξειδωτική δράση, η οποία προσδιορίστηκε με τη μέθοδο FRAP, και προέκυψε ότι αυξήθηκαν κατά την παρασκευή, ωρίμανση και διατήρηση (97).

3.2. Συγκέντρωση πεπτιδίων και αντιοξειδωτική δράση υδατικών εκχυλισμάτων καπνιστών τυριών

3.2.1. Τυρί Μετσοβόνη και άλλα καπνιστά τυριά από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας

Στον Πίνακα 11 παρουσιάζεται η συγκέντρωση των πεπτιδίων, που προσδιορίστηκε σε υδατικό εκχύλισμα ώριμου τυριού Μετσοβόνη και άλλων ώριμων καπνιστών τυριών από διάφορες περιοχές της Ελλάδας. Η συγκέντρωση πεπτιδίων προσδιορίστηκε με τις μεθόδους Bradford και Lowry, και εκφράστηκε σε mg BSA/L υδατικού εκχυλίσματος τυριού και /kg τυριού.

Πίνακας 11. Συγκέντρωση πεπτιδίων (μέθοδοι Bradford και Lowry) των υδατικών εκχυλισμάτων ώριμου τυριού Μετσοβόνη και άλλων ώριμων καπνιστών τυριών από διάφορες περιοχές της Ελλάδας.

Περιοχή	Bradford (mg BSA/L υδατικού εκχυλίσματος τυριού)	Lowry (mg BSA/L υδατικού εκχυλίσματος τυριού)	Bradford (mg BSA/kg τυριού)	Lowry (mg BSA/kg τυριού)
Μετσοβόνη	3277 ^c ±99	5850 ^b ±153	3636 ^b ±146	6493 ^b ±268
Ήπειρος	2550 ^a ±114	5110 ^a ±151	2817 ^a ±103	5647 ^a ±116
Κεντρική Μακεδονία	2872 ^b ±111	6677 ^c ±96	3528 ^b ±92	8205 ^c ±77

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως Μέσος όρος ± Τυπική απόκλιση. 3 διαφορετικά δείγματα καπνιστού τυριού (n=3) αναλύθηκαν για κάθε περιοχή. Οι διαφορετικοί εκθέτες a-c υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων κάθε στήλης (p<0,05).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα οποία είναι εκφρασμένα σε L υδατικού εκχυλίσματος, όλες οι συγκρίσεις μεταξύ του ώριμου Μετσοβόνη και των άλλων ώριμων καπνιστών τυριών διαφόρων περιοχών εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα αμινοξέων και πεπτιδίων (Bradford και Lowry). Το τυρί Μετσοβόνη εμφανίζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση πεπτιδίων και το καπνιστό τυρί Ηπείρου έχει τη μικρότερη συγκέντρωση πεπτιδίων (Bradford). Το καπνιστό τυρί Κεντρικής Μακεδονίας εμφανίζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση αμινοξέων και πεπτιδίων και η Ήπειρος έχει τη μικρότερη συγκέντρωση αμινοξέων και πεπτιδίων (Lowry).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα οποία είναι εκφρασμένα σε kg τυριού, το καπνιστό τυρί Ηπείρου εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά από το Μετσοβόνη και το καπνιστό Κεντρικής Μακεδονίας στα επίπεδα αμινοξέων και πεπτιδίων (Bradford και Lowry). Το Μετσοβόνη και το καπνιστό Κεντρικής Μακεδονίας έχουν

την υψηλότερη συγκέντρωση πεπτιδίων (Bradford). Τα αποτελέσματα για τη συγκέντρωση αμινοξέων και πεπτιδίων είναι παρόμοια με εκείνα ανά L (Lowry).

Η συγκέντρωση πεπτιδίων, η οποία προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Lowry, παρατηρήθηκε ότι είναι υψηλότερη σε σύγκριση με τη συγκέντρωση πεπτιδίων, η οποία προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford (87).

Στον Πίνακα 12 παρουσιάζεται η αντιοξειδωτική δράση που προσδιορίστηκε σε υδατικό εκχύλισμα ώριμου τυριού Μετσοβόνη και άλλων ώριμων καπνιστών τυριών από διάφορες περιοχές της Ελλάδας. Η αντιοξειδωτική δράση προσδιορίστηκε με τις μεθόδους Folin και FRAP, και εκφράστηκε σε mg GAE/L υδατικού εκχυλίσματος τυριού και /kg τυριού, και mg VC/L υδατικού εκχυλίσματος τυριού και /kg τυριού, αντίστοιχα.

Πίνακας 12. Αντιοξειδωτική δράση (μέθοδοι Folin και FRAP) των υδατικών εκχυλισμάτων ώριμου τυριού Μετσοβόνη και άλλων ώριμων καπνιστών τυριών από διάφορες περιοχές της Ελλάδας.

Περιοχή	Folin (mg GAE/L υδατικού εκχυλίσματος τυριού)	FRAP (mg VC/L υδατικού εκχυλίσματος τυριού)	Folin (mg GAE/kg τυριού)	FRAP (mg VC/kg τυριού)
Μετσοβόνη	291 ^b ±12	74,8 ^b ±1,9	323 ^b ±15	83,0 ^b ±2,9
Ήπειρος	230 ^a ±8	51,3 ^a ±2,1	253 ^a ±11	56,7 ^a ±1,8
Κεντρική Μακεδονία	294 ^b ±5	94,4 ^c ±0,8	360 ^c ±9	116 ^c ±3

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως Μέσος όρος ± Τυπική απόκλιση. 3 διαφορετικά δείγματα καπνιστού τυριού (n=3) αναλύθηκαν για κάθε περιοχή.

Οι διαφορετικοί εκθέτες a-c υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων κάθε στήλης (p<0,05).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα οποία είναι εκφρασμένα σε L υδατικού εκχυλίσματος, το ώριμο καπνιστό τυρί Ηπείρου διαφέρει στατιστικά σημαντικά και από το ώριμο τυρί Μετσοβόνη και το ώριμο καπνιστό τυρί Κεντρικής Μακεδονίας (Folin). Το Μετσοβόνη και το καπνιστό Κεντρικής Μακεδονίας έχουν την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση. Όλες οι συγκρίσεις μεταξύ του ώριμου Μετσοβόνη και των άλλων ώριμων καπνιστών τυριών διαφέρουν στατιστικά σημαντικά στην αντιοξειδωτική δράση (FRAP). Το καπνιστό τυρί Κεντρικής Μακεδονίας έχει την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση και το καπνιστό τυρί Ηπείρου έχει τη χαμηλότερη αντιοξειδωτική δράση (FRAP).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα οποία είναι εκφρασμένα σε kg τυριού, όλες οι συγκρίσεις μεταξύ των ώριμων καπνιστών τυριών διαφέρουν στατιστικά σημαντικά

στην αντιοξειδωτική δράση (Folin και FRAP). Το καπνιστό τυρί Κεντρικής Μακεδονίας έχει την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση και το καπνιστό τυρί Ηπείρου έχει τη χαμηλότερη αντιοξειδωτική δράση.

Σύμφωνα με άλλους ερευνητές, καπνιστά τυριά εμφανίζουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση, όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Folin (108, 109).

3.2.2. Τυρί Μετσοβόνη κατά τη διατήρηση του

Στον Πίνακα 13 παρουσιάζεται η συγκέντρωση των πεπτιδίων, που προσδιορίστηκε σε υδατικό εκχύλισμα ώριμου τυριού Μετσοβόνη κατά τη διατήρηση του. Η συγκέντρωση πεπτιδίων προσδιορίστηκε με τις μεθόδους Bradford και Lowry, και εκφράστηκε σε mg BSA/L υδατικού εκχυλίσματος τυριού και /kg τυριού.

Πίνακας 13. Συγκέντρωση πεπτιδίων (μέθοδοι Bradford και Lowry) των υδατικών εκχυλισμάτων ώριμου τυριού Μετσοβόνη κατά τη διατήρηση του.

Ηλικία, μήνες	Bradford (mg BSA/L υδατικού εκχυλίσματος τυριού)	Lowry (mg BSA/L υδατικού εκχυλίσματος τυριού)	Bradford (mg BSA/kg τυριού)	Lowry (mg BSA/kg τυριού)
3	3277 ^a ±99	5850 ^a ±153	3636 ^a ±146	6493 ^a ±268
6	3478 ^a ±70	7664 ^b ±103	3870 ^a ±40	8531 ^b ±332

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως Μέσος όρος ± Τυπική απόκλιση. 3 διαφορετικά δείγματα τυριού Μετσοβόνη (n=3) αναλύθηκαν για κάθε ηλικία. Οι διαφορετικοί εκθέτες a-b υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων κάθε στήλης (p<0,05).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα οποία είναι εκφρασμένα σε L υδατικού εκχυλίσματος, τα τυριά Μετσοβόνη 3 και 6 μηνών διαφέρουν στατιστικά σημαντικά στα επίπεδα αμινοξέων και πεπτιδίων (Bradford και Lowry). Η συγκέντρωση πεπτιδίων του Μετσοβόνη παραμένει σταθερή κατά τη διατήρηση του (Bradford). Επομένως, το υδατοδιαλυτό άζωτο, που είναι δείκτης ωρίμανσης, παραμένει σταθερό κατά τη διατήρηση του (Bradford). Η συγκέντρωση αμινοξέων και πεπτιδίων του Μετσοβόνη αυξάνεται κατά τη διατήρηση του (Lowry). Επομένως, το υδατοδιαλυτό άζωτο, που είναι δείκτης ωρίμανσης, αυξάνεται κατά τη διατήρηση του (Lowry).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα οποία είναι εκφρασμένα σε kg τυριού, είναι παρόμοια. Η συγκέντρωση πεπτιδίων του Μετσοβόνη παραμένει σταθερή κατά τη διατήρηση του (Bradford). Η συγκέντρωση αμινοξέων και πεπτιδίων του Μετσοβόνη αυξάνεται κατά τη διατήρηση του (Lowry).

Στον Πίνακα 14 παρουσιάζεται η αντιοξειδωτική δράση που προσδιορίστηκε σε υδατικό εκχύλισμα ώριμου τυριού Μετσοβόνη κατά τη διατήρηση του. Η αντιοξειδωτική δράση προσδιορίστηκε με τις μεθόδους Folin και FRAP, και εκφράστηκε σε mg GAE/L υδατικού εκχυλίσματος τυριού και /kg τυριού, και mg VC/L υδατικού εκχυλίσματος τυριού και /kg τυριού, αντίστοιχα.

Πίνακας 14. Αντιοξειδωτική δράση (μέθοδοι Folin και FRAP) των υδατικών εκχυλισμάτων ώριμου τυριού Μετσοβόνη κατά τη διατήρηση του.

Ηλικία, μήνες	Folin (mg GAE/L υδατικού εκχυλίσματος τυριού)	FRAP (mg VC/L υδατικού εκχυλίσματος τυριού)	Folin (mg GAE/kg τυριού)	FRAP (mg VC/kg τυριού)
3	291 ^a ±12	74,8 ^a ±1,9	323 ^a ±15	83,0 ^a ±2,9
6	437 ^b ±5	95,8 ^b ±2,7	487 ^b ±16	107 ^b ±2

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως Μέσος όρος ± Τυπική απόκλιση. 3 διαφορετικά δείγματα τυριού Μετσοβόνη (n=3) αναλύθηκαν για κάθε ηλικία. Οι διαφορετικοί εκθέτες a-b υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων κάθε στήλης (p<0,05).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα οποία είναι εκφρασμένα σε L υδατικού εκχυλίσματος, τα τυριά Μετσοβόνη 3 και 6 μηνών διαφέρουν στατιστικά σημαντικά στην αντιοξειδωτική δράση (Folin και FRAP). Η αντιοξειδωτική δράση του Μετσοβόνη αυξάνεται κατά τη διατήρηση του.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα οποία είναι εκφρασμένα σε kg τυριού, είναι παρόμοια.

Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι και η συγκέντρωση πεπτιδίων και η αντιοξειδωτική δράση αυξάνονται κατά τη διατήρηση του τυριού Μετσοβόνη.

Σύμφωνα με έρευνα, η αντιοξειδωτική δράση ενός καπνιστού τυριού παρατηρήθηκε να αυξάνεται κατά την διατήρηση (109).

3.3. Αντιφλεγμονώδης δράση υδατικών εκχυλισμάτων τυριών

Στους πίνακες 15-21 παρουσιάζεται η στατιστική επεξεργασία για την αντιφλεγμονώδη δράση των υδατικών εκχυλισμάτων των τυριών άλμης και των καπνιστών τυριών.

Πίνακας 15. Αντιφλεγμονώδης δράση υδατικού εκχυλίσματος ώριμων τυριών άλμης, Φέτα, γίδινου και αγελαδινού.

	Αντιφλεγμονώδης δράση (% Αναστολή)
Φέτα	7,48 ^b ±1,06
Γίδινο	5,49 ^a ±1,67
Αγελαδινό	4,29 ^a ±1,40

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως Μέσος όρος ± Τυπική απόκλιση. 12 διαφορετικά δείγματα τυριού Φέτα (n=12), 12 διαφορετικά δείγματα γίδινου τυριού (n=12), 9 διαφορετικά δείγματα αγελαδινού τυριού (n=9) αναλύθηκαν.

Οι διαφορετικοί εκθέτες a-c υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων κάθε στήλης (p<0,05).

Πίνακας 16. Αντιφλεγμονώδης δράση υδατικού εκχυλίσματος ώριμων τυριών Φέτα διαφορετικής προέλευσης.

Περιοχή	Αντιφλεγμονώδης δράση (% Αναστολή)
Ήπειρος 1	7,38 ^b ±0,19
Ήπειρος 2	8,73 ^d ±0,14
Θεσσαλία	7,88 ^c ±0,12
Δυτική Ελλάδα	5,95 ^a ±0,10

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως Μέσος όρος ± Τυπική απόκλιση. 3 διαφορετικά δείγματα τυριού Φέτας (n=3) αναλύθηκαν για κάθε περιοχή.

Οι διαφορετικοί εκθέτες a-d υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων κάθε στήλης (p<0,05).

Πίνακας 17. Αντιφλεγμονώδης δράση υδατικού εκχυλίσματος ώριμων γιδινων τυριών άλμης διαφορετικής προέλευσης.

Περιοχή	Αντιφλεγμονώδης δράση (% Αναστολή)
Ήπειρος 1	3,25 ^a ±0,06
Ήπειρος 2	7,67 ^d ±0,23
Θεσσαλία	6,00 ^c ±0,17
Δυτική Ελλάδα	5,07 ^b ±0,22

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως Μέσος όρος ± Τυπική απόκλιση. 3 διαφορετικά δείγματα γίδινου τυριού (n=3) αναλύθηκαν για κάθε περιοχή.

Οι διαφορετικοί εκθέτες a-d υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων κάθε στήλης (p<0,05).

Πίνακας 18. Αντιφλεγμονώδης δράση υδατικού εκχυλίσματος ώριμων αγελαδινών τυριών άλμης διαφορετικής προέλευσης.

Περιοχή	Αντιφλεγμονώδης δράση (% Αναστολή)
Ήπειρος 1	2,82 ^a ±0,13
Ήπειρος 2	4,03 ^b ±0,14
Κεντρική Μακεδονία	6,02 ^c ±0,22

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως Μέσος όρος ± Τυπική απόκλιση. 3 διαφορετικά δείγματα αγελαδινού τυριού (n=3) αναλύθηκαν για κάθε περιοχή.

Οι διαφορετικοί εκθέτες a-c υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων κάθε στήλης (p<0,05).

Πίνακας 19. Αντιφλεγμονώδης δράση υδατικού εκχυλίσματος τυριού Φέτα κατά την ωρίμανση και διατήρηση του.

Ηλικία, ημέρες	Αντιφλεγμονώδης δράση (% Αναστολή)
2	11,1 ^d ±0,5
16	7,62 ^c ±0,11
60	7,38 ^b ±0,19
120	5,00 ^a ±0,10

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως Μέσος όρος ± Τυπική απόκλιση. 3 διαφορετικά δείγματα τυριού Φέτας (n=3) αναλύθηκαν για κάθε ηλικία τυριού.

Οι διαφορετικοί εκθέτες a-d υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων κάθε στήλης (p<0,05).

Πίνακας 20. Αντιφλεγμονώδης δράση υδατικού εκχυλίσματος ώριμων καπνιστών τυριών διαφορετικής προέλευσης.

Περιοχή	Αντιφλεγμονώδης δράση (% Αναστολή)
Μετσοβόνε	10,6 ^b ±0,4
Ήπειρος	8,27 ^a ±0,29
Κεντρική Μακεδονία	12,2 ^c ±0,2

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως Μέσος όρος ± Τυπική απόκλιση. 3 διαφορετικά δείγματα καπνιστού τυριού (n=3) αναλύθηκαν για κάθε περιοχή.

Οι διαφορετικοί εκθέτες a-c υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων κάθε στήλης (p<0,05).

Πίνακας 21. Αντιφλεγμονώδης δράση υδατικού εκχυλίσματος τυριού Μετσοβόνε κατά τη διατήρησή του.

Ηλικία, Μήνες	Αντιφλεγμονώδης δράση (% Αναστολή)
3	10,6 ^a ±0,4
6	15,3 ^b ±0,5

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως Μέσος όρος ± Τυπική απόκλιση. 3 διαφορετικά δείγματα τυριού Μετσοβόνε (n=3) αναλύθηκαν για κάθε ηλικία.

Οι διαφορετικοί εκθέτες a-b υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων κάθε στήλης ($p < 0,05$).

Κατά τον προσδιορισμό της αντιφλεγμονώδους δράσης, το μείγμα δεν ήταν διαυγές, έτσι τα υδατικά εκχυλίσματα των τυριών αραιώθηκαν 2 φορές και επομένως, τα αποτελέσματα είχαν χαμηλές τιμές. Τα παραπάνω ευρήματα υποδηλώνουν ότι τα πεπτίδια στα υδατικά εκχυλίσματα των τυριών μπορεί να παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδη δράση.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Από τις αναλύσεις των υδατικών εκχυλισμάτων των ώριμων τυριών Φέτα, γίδινων και αγελαδινών τυριών άλμης, προκύπτει ότι:
 - μπορεί πιθανόν να στοιχειοθετηθεί διαφοροποίηση των τυριών Φέτα από τα γίδινα τυριά άλμης με βάση α) τα επίπεδα αντιοξειδωτικής δράσης, και β) τα επίπεδα αμινοξέων και πεπτιδίων.
 - το τυρί Φέτα μπορεί πιθανόν να διαφοροποιηθεί από τα αγελαδινά τυριά άλμης με βάση την αντιοξειδωτική δράση.
- Από τις αναλύσεις των υδατικών εκχυλισμάτων των ώριμων τυριών Φέτα από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας προκύπτει ότι μπορεί να υπάρχουν διαφορές των τυριών Φέτα από διαφορετικές περιοχές όσον αφορά α) τα επίπεδα αντιοξειδωτικής δράσης (μέθοδοι Folin και FRAP), και β) τα επίπεδα αμινοξέων και πεπτιδίων (μέθοδοι Lowry και Bradford).
- Από τις αναλύσεις των υδατικών εκχυλισμάτων του τυριού Φέτα προκύπτει ότι μπορεί πιθανόν να στοιχειοθετηθεί ότι κατά την ωρίμανση και διατήρηση του τυριού Φέτα υπάρχει αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης (μέθοδος Folin), όπως και στα επίπεδα αμινοξέων και πεπτιδίων (μέθοδος Lowry).
- Από τις αναλύσεις των υδατικών εκχυλισμάτων του ώριμου τυριού Μετσοβόνη και άλλων ώριμων καπνιστών τυριών προκύπτει ότι τα καπνιστά τυριά προσφέρουν αντιοξειδωτική δράση και μπορεί να υπάρχουν διαφοροποιήσεις μεταξύ των διαφόρων τυριών.
- Από τις αναλύσεις των υδατικών εκχυλισμάτων του τυριού Μετσοβόνη προκύπτει ότι μπορεί πιθανόν να στοιχειοθετηθεί ότι κατά τη διατήρηση του τυριού Μετσοβόνη υπάρχει αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης (μέθοδος Folin και FRAP), όπως και στα επίπεδα αμινοξέων και πεπτιδίων (μέθοδος Lowry).
- Τα υδατικά εκχυλίσματα των τυριών Φέτα, και αγελαδινών και γίδινων τυριών άλμης, καθώς και Μετσοβόνη και άλλων καπνιστών τυριών, παρουσιάζουν κάποια αντιφλεγμονώδη δράση.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Fox P.F. Cheese: An Overview. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 1–36, 1993.
2. Litopoulou-Tzanetaki E., Tzanetakis N. The Microfloras of Traditional Greek Cheeses. *Microbiology Spectrum*, 2, 2014.
3. Robinson R.K., Wilbey R.A. Cheese varieties. *Cheesemaking Practice*, 19–29, 1998.
4. Walther B., Schmid A., Sieber R., Wehrmuller K. Cheese in nutrition and health. *Dairy Science & Technology*, 88, 389–405, 2008.
5. Fox P.F., Guinee T.P., Cogan T.M., McSweeney P.L.H. *Fundamentals of Cheese Science*, 2nd ed., 715–723, 2017.
6. Tidona F., Criscione A., Guastella A.M., Zuccaro A., Bordonaro S., Marletta D. Bioactive peptides in dairy products. *Italian Journal of Animal Science* 8, 315–340, 2009.
7. López-Expósito I., Amigo L., Recio I. A mini-review on health and nutritional aspects of cheese with a focus on bioactive peptides. *Dairy Science & Technology*, 92, 419–438, 2012.
8. Moatsou G., Govaris A. White brined cheeses: A diachronic exploitation of small ruminants milk in Greece. *Small Ruminant Research*, 101, 113–121, 2011.
9. Pappa E. C., Kondyli E., Sotirakoglou K., Bosnea L., Mataragas M., Allouche L., Tsiplakou E., Pappas A. C. Farmers Profile and Characterization of Sheep and Goat Dairy Chain in Northwestern Greece. *Sustainability*, 13(2), 833, 2021.
10. Dias C., Mendes L. Protected Designation of Origin (PDO), Protected Geographical Indication (PGI) and Traditional Speciality Guaranteed (TSG): A bibliometric analysis. *Food Research International*, 103, 492–508, 2018.
11. Anifantakis E. *Greek Cheeses: A Tradition of Centuries*, 1st ed., 27–42, 1991.
12. Katsouri E., Magriplis E., Zampelas A., Nychas G.J., Drosinos E.H. Nutritional Characteristics of Prepacked Feta PDO Cheese Products in Greece: Assessment of Dietary Intakes and Nutritional Profiles. *Foods*, 9, 253, 2020.
13. Kontominas M.G., Roussis I.G., Chroneos I. Analysis of hard and soft Greek cheeses produced in Epiros. *Chimika Chronika*, 17, 131–142, 1988.
14. Ledesma E. Smoked Food. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, 201–243, 2017.

15. Litopoulou-Tzanetaki E., Tzanetakis N. The Microfloras of Traditional Greek Cheeses. *Microbiology Spectrum*, 2, 2014.
16. Apak R., Özyürek M., Güclü K., Çapanoglu E. Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 1. Classification, Physicochemical Principles, Mechanisms, and Electron Transfer (ET)-Based Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(5), 997–1027, 2016.
17. Pizzino G., Irrera N., Cucinotta M., Pallio G., Mannino F., Arcoraci V., Squadrito F., Altavilla D., Bitto A. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1–13, 2017.
18. Halliwell, B. How to characterize a biological antioxidant. *Free Radical Research Community*, 9, 1-32, 1990.
19. Huang D., Ou B., Prior R.L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841–1856, 2005.
20. Prior R.L., Wu X., Schaich K.. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290–4302, 2005.
21. Soler J., Saura P., García-López D., Masgrau L., Lluch J. M., González-Lafont À. How Can Linoleic Acid Be the Preferential Substrate of the Enzyme 15-Lipoxygenase-1? A QM/MM Approach. *The Journal of Physical Chemistry B*, 12, 1950–1960, 2015.
22. Lončarić M., Strelec I., Moslavac T., Šubarić D., Pavić V., Molnar M. Lipoxygenase Inhibition by Plant Extracts. *Biomolecules*, 11, 152, 2021.
23. Li A., Ma Y., Cui N., Zhang X., Zheng Q., Du P., Sun M. Research progress of milk and dairy products to prevent caries. *Journal of Functional Foods*, 110, 2023.
24. Shkembi B., Huppertz T. Impact of Dairy Products and Plant-Based Alternatives on Dental Health: Food Matrix Effects. *Nutrients*, 15, 1469, 2023.
25. Nammi S., Koka S., Chinnala K.M., Boini K.M. Obesity: An overview on its current perspectives and treatment options. *Nutrition Journal*, 3, 2004.
26. Higurashi S., Kunieda Y., Matsuyama H., Kawakami H. Effect of cheese consumption on the accumulation of abdominal adipose and decrease in serum adiponectin levels in rats fed a calorie dense diet. *International Dairy Journal*, 17, 1224–1231, 2007.

27. Zemel M.B., Shi H., Greer B., DiRienzo D., Zemel P.C., Regulation of adiposity by dietary calcium. *The FASEB Journal*, 14, 1132–1138, 2000.
28. Laso N., Brugué E., Vidal J., Ros E., Arnaiz J.A., Carné X., Vidal S., Mas S., Deulofeu R., Lafuente A. Effects of milk supplementation with conjugated linoleic acid (isomers cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12) on body composition and metabolic syndrome components. *British Journal of Nutrition* 98, 860–867, 2007.
29. Allender P.S., Cutler J.A., Follmann D., Cappuccio F.P., Pryer J., Elliott P., Dietary calcium and blood pressure: a metaanalysis of randomized clinical trials, *Annals of Internal Medicine*, 124, 825–831, 1996.
30. Massey L.K. Dairy food consumption, blood pressure and stroke. *The Journal of Nutrition*, 131, 1875–1878, 2001.
31. Kato K., Takada Y., Matsuyama H., Kawasaki Y., Aoe S., Yano H., Toba Y., Milk calcium taken with cheese increases bone mineral density and bone strength in growing rats, *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*, 66, 2342–2346, 2002.
32. Cheng S., Lyytikäinen A., Kroger H., Lamberg-Allardt C., Alen M., Koistinen A., Wang Q.J., Suuriniemi M., Suominen H., Mahonen A., Nicholson P.H.F., Ivaska K.K., Korpela R., Ohlsson C., Vaananen K.H., Tylavsky F., Effects of calcium, dairy product, and vitamin D supplementation on bone mass accrual and body composition in 10-12-y-old girls: a 2-y randomized trial. *American Journal of Clinical Nutrition*, 82, 1115–1126, 2005.
33. Heaney R.P. Sodium, Potassium, Phosphorus, and Magnesium. *Nutrition and Bone Health*, 327–344, 2015.
34. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective, Washington DC, AICR, 1–537, 2007.
35. Belury M.A. Inhibition of carcinogenesis by conjugated linoleic acid: Potential mechanisms of action, *Journal of Nutrition*, 132, 2995–2998, 2002.
36. Vesper H., Schmelz E.M., Nikolova-Karakashian M.N., Dillehay D.L., Lynch D.V., Merrill A.H. Sphingolipids in Food and the Emerging Importance of Sphingolipids to Nutrition. *The Journal of Nutrition*, 129, 1239–1250, 1999.
37. McSweeney P.L.H., Fox P.F. Chemical methods for the characterization of proteolysis in cheese during ripening. *Lait*, 77, 41–76, 1997.

38. Erkaya T., Şengul M. 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, 47–55, 2015.
39. De Jong L. Protein breakdown in soft cheese and its relation to consistency. 1-Proteolysis and consistency of Noordhollandse Meshanger cheese. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 30, 242-253, 1976.
40. Lawrence R.C., Creamer L.K., Gilles J. Texture Development During Cheese Ripening. *Journal of Dairy Science*, 70 (8), 1748-1760, 1987.
41. Stanley D.W., Emmons D.B. Cheddar cheese made with bovine pepsin. II. Texture-Microstructure-Composition Relationships. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 10, 78-84, 1977.
42. Creamer L.K., Olson N.F. Rheological evaluation of maturing Cheddar cheese. *Journal of Food Science*, 47, 631-636, 1982.
43. McSweeney P.L.H., Olson N.F., Fox P.F.; Healy A., Højrup P. Proteolytic specificity of chymosin on bovine α s1,-casein. *Journal of Dairy Research*, 60, 401–412, 1993.
44. McSweeney P.L.H. Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 57, 127–144, 2004.
45. McSweeney P.L.H, Olson N.F., Fox P.F. Proteolysis of bovine α s2-casein by chymosin. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 199, 429–432, 1994.
46. Green M.L., Foster P.M.D. Comparison of the rates of proteolysis during ripening of Cheddar cheeses made with calf rennet and swine pepsin as coagulants. *Journal of Dairy Research*, 41, 269–282, 1974.
47. Fox P.F., McSweeney P.L.H. Proteolysis in cheese during ripening. *Food Reviews International*, 12, 457–509, 1996.
48. Elias R.J., Kellerby S.S., Decker E.A. Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48, 430-441, 2008.
49. Barać M., Pešić M., Vučić T., Vasić M., Smiljanić M. White cheeses as a potential source of bioactive peptides. *Mljekarstvo*, 67, 3-16, 2017.
50. Parrella A., Caterino E., Cangiano M., Criscuolo E., Russo E., Lavorgna M., Isidori M. Antioxidant properties of different milk fermented with lactic acid

- bacteria and yeast. *International Journal of Food Science and Technology*, 47, 2493-2502, 2012.
51. Abadia-Garcia L., Cardador A., Martin del Campo S.T., Arvizu S.M., Castano-Tostado E., Regalado-Gonzalez C. Influence of probiotic strains added to cottage cheese on generation of potentially antioxidant peptides, antilisterial activity, and survival of probiotic microorganisms in simulated gastrointestinal conditions. *International Dairy Journal*, 33, 191-197, 2013.
 52. Mushtaq M., Gani A., Shetty P.H., Masoodi F.A., Ahmad M. Himalayan cheese (Kalari/kradi): effect of different storage temperatures on its physicochemical, microbiological and antioxidant properties. *LWT - Food Science and Technology*, 63, 837-845, 2015.
 53. Mushtaq M., Gani A., Masoodi F.A., Ahmad M. Himalayan cheese (Kalari/Kradi)- Effect of different probiotic strains on oxidative stability, microbiological, sensory and nutraceutical properties during storage. *LWT - Food Science and Technology*, 67, 74-81, 2016.
 54. Pihlanto A. Whey proteins and peptides: emerging properties to promote health. *Nutrafoods* 10, 29-42, 2011.
 55. Gupta A., Mann B., Kumar R., Sangwan R.. Antioxidant activity of Cheddar cheeses at different stages of ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 62, 339–347, 2009.
 56. Zulueta A., Maurizi A., Frigola A., Esteve M.J., Coli R., Burini G. Antioxidant capacity of cow milk, whey and deproteinized milk. *International Dairy Journal*, 19, 380-385, 2009.
 57. Power O., Jakeman P., FitzGerald R.J. Antioxidative peptides: enzymatic production, in vitro and in vivo antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides. *Amino Acids*, 44, 797-820, 2013.
 58. Gupta A., Mann B., Kumar R., Sangwan R.B. Identification of antioxidant peptides in Cheddar cheese made with adjunct culture *Lactobacillus casei* ssp *casei* 300. *Milchwissenschaft*, 65, 396-399, 2010.
 59. Pritchard S.R., Phillips M., Kailasapathy K. Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. , 43, 0–1548, 2010.
 60. Pisanu S., Pagnozzi D., Pes M., Pirisi A., Roggio T., Uzzau S., Addis M.F. Differences in the peptide profile of raw and pasteurised ovine milk cheese

- and implications for its bioactive potential. *International Dairy Journal* 42, 26-33, 2015.
61. Meira S.M. M., Daroit, D.J., Helfer, V.E., Corrêa, A.P.F., Segalin, J., Carro, S., Brandelli, A. Bioactive peptides in water-soluble extracts of ovine cheeses from Southern Brazil and Uruguay. *Food Research International* 48, 322-329, 2012.
 62. Bottesini C., Paoletta S., Lambertini F., Galaverna G., Tedeschi T., Dossena A., Marchelli R., Sforza S. Antioxidant capacity of water soluble extracts from Parmigiano-Reggiano cheese. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 64, 953-958, 2013.
 63. Erkaya T., Şengul M. 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, 47-55, 2015.
 64. Gandhi A., Shah N.P. Salt reduction in a model high-salt Akawi cheese: Effects on bacterial activity, pH, moisture, potential bioactive peptides, amino acids, and growth of human colon cells. *Journal of Food Science*, 81, H991-H1000, 2016.
 65. Laakso S., Lilius E.M. Milk casein: inhibitor of lipoxygenase-catalyzed lipid peroxidation. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 30, 913–916, 1982.
 66. Rival S.G., Fornaroli S., Boeriu C.G, Wichers H.J. Caseins and casein hydrolysates. 1. Lipoxygenase inhibitory properties. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 49, 287–294, 2001.
 67. Aguilar-Toalá J.E., Santiago-López L., Peres C.M., Peres C., Garcia H.S., Vallejo-Cordoba B., González-Córdova A.F., Hernández-Mendoza A. Assessment of multifunctional activity of bioactive peptides derived from fermented milk by specific *Lactobacillus plantarum* strains. *Journal of Dairy Science*, 100, 65–75, 2017.
 68. Saito T., Nakamura T., Kitazawa H., Kawai Y., Itoh T. Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. *Journal of Dairy Science*, 83, 1434–1440, 2000.
 69. Gómez-Ruiz J.Á., Taborda G., Amigo L., Recio I., Ramos M., Identification of ACE inhibitory peptides in different Spanish cheeses by tandem mass spectrometry. *European Food Research and Technology*, 223, 595–601, 2006.

70. Bütikofer U., Meyer J., Sieber R., Walther B., Wechsler D. Occurrence of the angiotensin-converting enzyme-inhibiting tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro in different cheese varieties of Swiss origin. *Journal of Dairy Science*, 91, 29–38, 2008.
71. Basiricò L., Morera P., Evangelista C., Galaverna G., Sforza S., Prandi B., Bernabucci U., Nardone A. Effect of Parmigiano Reggiano Consumption on Blood Pressure of Spontaneous Hypertensive Rats. *Dairy*, 3, 364-376, 2022.
72. Garbowska, M.; Pluta, A.; Berthold-Pluta, A.; Antihypertensive Peptide Activity in Dutch-Type Cheese Models Prepared with Different Additional Strains of *Lactobacillus* Genus Bacteria. *Applied Sciences*, 9, 1674, 2019.
73. Yasuda S., Ohkura N., Suzuki K., Yamasaki M., Nishiyama K., Kobayashi H., Hoshi Y., Kadooka Y., Igoshi K. Effects of highly ripened cheeses on HL-60 human leukemia cells: Antiproliferative activity and induction of apoptotic DNA damage. *Journal of Dairy Science*, 93, 1393-1400, 2010.
74. Katsiari M.C., Alichanidis E., Voutsinas L.P., Roussis I.G. Proteolysis in reduced sodium Feta cheese made by partial substitution of NaCl with KCl. *International Dairy Journal*, 10, 635-646, 2000.
75. Roussis I.G., Voudouris E.K., Kontominas M.G. Influence of lipolytic and proteolytic *Pseudomonas fluorescens* strain GR83 on the quality of Feta cheese. *Lebensmittel Wissenschaft Technologi -Food Science and Technology*, 21, 131-136, 1988.
76. Lalos G., Voutsinas L.P., Pappas C.P., Roussis I.G. Effect of a sub-pasteurization treatment of cold stored ewe's milk on the quality of Feta cheese. *Milchwissenschaft -Milk Science International*, 51, 78-82, 1996.
77. Yvon M., Chabanet C., Pélissier J.P. Solubility of peptides in trichloroacetic acid (TCA) solutions. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 34, 166-176.
78. Addeo F., Chianese L., Sacchi R., Spagna Musso S., Ferranti P., Malorni A. Characterization of the oligopeptides of Parmigiano-Reggiano cheese soluble in 120 g trichloroacetic acid/L. *Journal of Dairy Research*, 61, 365-374, 1994.
79. Reville W.J., Fox P.F. Soluble protein in Cheddar cheese. A comparison of analytical methods. *Irish Journal of Food Science and Technology*, 2, 67-76, 1978.

80. Bütikofer V., Rüegg M., Ardö Y. Determination of nitrogen fractions in cheese, evaluation of a collaborative study. *LWT - Food Science and Technology*, 26, 271-275, 1993.
81. Owusu-Apenten R. *Food Protein Analysis: Quantitative Effects on Processing*. CRC Press, New York, 118, 2002.
82. Jiang B., Tsao R., Li Y., Miao M. Food Safety: Food Analysis Technologies/Techniques. *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*, 273–288, 2014.
83. Pearce K.N., Karahalios D., Friedman M. Ninhydrin Assay For Proteolysis in Ripening Cheese. *Journal of Food Science*, 53, 432–435, 1988.
84. Chang K.C.S., Zhang Y. Protein Analysis. *Food Analysis*, 315–331, 2017.
85. Lu Y., Fu T.J. Performance of Commercial Colorimetric Assays for Quantitation of Total Soluble Protein in Thermally Treated Milk Samples. *Food Analytical Methods*, 13, 1337–1345, 2020.
86. Krohn R.I. The Colorimetric Detection and Quantitation of Total Protein. *Current Protocols in Toxicology*, 2005.
87. Lucarini A.C., Kilikian B.V. Comparative study of Lowry and Bradford methods: interfering substances. *Biotechnology Techniques*, 13, 149–154, 1999.
88. Bancuta O.R., Chilian A., Bancuta I., Ion R. M., Setnescu R., Setnescu T., Gheboianu A. Improvement of spectrophotometric method for determination of phenolic compounds by statistical investigations. *Romanian Journal of Physics*, 61, 1255-1264, 2016.
89. Christodoulou, M.C.; Orellana Palacios, J.C.; Hesami, G.; Jafarzadeh, S.; Lorenzo, J.M.; Domínguez, R.; Moreno, A.; Hadidi, M. Spectrophotometric Methods for Measurement of Antioxidant Activity in Food and Pharmaceuticals. *Antioxidants*, 11, 2213, 2022.
90. Zhong Y, Shahidi F. Methods for the assessment of antioxidant activity in foods. *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*, 287–333, 2015.
91. Christodoulou M.C., Orellana Palacios J.C., Hesami G., Jafarzadeh S., Lorenzo J.M., Domínguez R., Moreno A., Hadidi M. Spectrophotometric Methods for Measurement of Antioxidant Activity in Food and Pharmaceuticals. *Antioxidants*, 11, 2213, 2022.
92. Benzie F.F.I., Strain J.J. [2] Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for

- simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*, 299, 15-27, 1999.
93. Campanella L., Persio G.D., Pintore M, Tonnina D., Caretto N., Martini E., Lelo D. Determination of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) in Milk and Fresh Cheese Based on the Inhibition of Cyclooxygenase. *Food Technology and Biotechnology*, 47, 172–177, 2009.
 94. Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J., Skipper P.L., Wishnok J.S., Tannenbaum S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, 126, 131–138, 1982.
 95. Rafiq S., Huma N., Rakariyatham K., Hussain I., Gulzar N., Hayat, I. Anti-inflammatory and anticancer activities of water-soluble peptide extracts of buffalo and cow milk Cheddar cheeses. *International Journal of Dairy Technology*, 71(2), 432–438, 2017.
 96. Torres-Llanez M.J., González-Córdova A.F., Hernandez-Mendoza A., Garcia H.S., Vallejo-Cordoba B. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in Mexican Fresco cheese. *Journal of Dairy Science*, 94, 3794-3800, 2011.
 97. Perna A., Intaglietta I., Simonetti A., Gambacorta E. Short communication: Effect of genetic type on antioxidant activity of Caciocavallo cheese during ripening. *Journal of Dairy Science*, 98, 3690-3694, 2015.
 98. Tyl C., Sadler G.D. pH and Titratable Acidity. In: *Food Analysis*. Nielsen S. S. (ed.), Springer, New York, 392-396, 2017.
 99. Bradford M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254, 1976.
 100. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 1951.
 101. Ong L., Henriksson A., Shah N.P. Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity in Cheddar cheeses made with the addition of probiotic *Lactobacillus casei* sp. *Lait*, 87, 149-165, 2007.
 102. Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventós R.M. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178, 1999.

103. Munir M., Nadeem M., Mahmood Qureshi T., Gamlath C.J., Martin G.J.O., Hemar Y., Ashokkumar M. Effect of sonication, microwaves and high-pressure processing on ACE-inhibitory activity and antioxidant potential of Cheddar cheese during ripening. *Ultrasonics Sonochemistry*, 67, 2020.
104. Benzie I.F.F., Strain J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70–76, 1996.
105. Salvia-Trujillo L., Morales-de la Peña M., Rojas-Graü A., Martín-Belloso O. Changes in Water-Soluble Vitamins and Antioxidant Capacity of Fruit Juice–Milk Beverages As Affected by High-Intensity Pulsed Electric Fields (HIPEF) or Heat during Chilled Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 2011.
106. Stobiecka M., Król J., Brodziak A. Antioxidant Activity of Milk and Dairy Products. *Animals*, 12, 245, 2022.
107. Gandhi A., Shah N.-P. Salt Reduction in a Model High-Salt Akawi Cheese: Effects on Bacterial Activity, pH, Moisture, Potential Bioactive Peptides, Amino Acids, and Growth of Human Colon Cells. *Journal of Food Science*, 81, 2016.
108. Shaibanl M., AL-Mamary M., AL-Habori M. Total Antioxidant Activity and Total Phenolic Contents in Yemeni Smoked Cheese. *Malaysian Journal of Nutrition*, 12, 87-92, 2006.
109. Vosgan Z., Mihali C., Marian M., Dumuta A., Pop F., Mihalescu L. Evaluation of the Microbial Quality and Total Phenolic Content of a Local Smoked Cheese. *Bulletin UASVM Food Science and Technology*, 77, 2020.