



Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών  
Agricultural University of Athens

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

της φοιτήτριας Σταυρούλας Αλεξανδράκη

Εισηγήτρια: Μοάτσου Γ., Λέκτορας

Εξεταστική Επιτροπή: Κανδαράκης Ι., Αναπληρωτής καθηγητής  
Τσακαλίδου Ε., Καθηγήτρια  
Καμινარიδης Σ., Αναπληρωτής Καθηγητής  
Δροσινός Ε.Χ., Επίκουρος Καθηγητής

ΜΑΪΟΣ 2009 - ΑΘΗΝΑ

**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**«ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΙΓΕΙΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ**

**ΣΕ ΠΡΟΒΕΙΟ ΓΑΛΑ ΚΑΙ ΤΥΡΙ**

**Μεταπτυχιακή ερευνητική μελέτη της φοιτήτριας**

**Σταυρούλας Αλεξανδράκη**

## Ευχαριστίες

Μέσα από αυτή τη σελίδα θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους που συνέβαλαν με οποιοδήποτε τρόπο στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμότατα την κα Γ. Μοάτσου, Λέκτορα του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, για την ανάθεση του θέματος της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης, για τις συμβουλές της και την συνεχή καθοδήγησή της κατά τη διεξαγωγή του πειράματος και κυρίως για τη διάθεση του πολύτιμου χρόνου της κατά τη συγγραφή της μελέτης. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την κα Μοσχοπούλου Α. για τη σημαντική βοήθεια που μου παρείχε κατά τη διενέργεια του πειραματικού μέρους της μελέτης. Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω τους τυροκόμους κ. Χ. Γραμματικάκη και κ. Θ. Πάσχο για τη συμβολή και τη βοήθεια τους κατά την πραγματοποίηση των τυροκομιέσεων, καθώς επίσης και τον κ. Η. Γραμματικά.

Τέλος θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου και σε όλους τους εργαζόμενους στο εργαστήριο Γαλακτοκομίας, που με βοήθησαν κατά την παραμονή μου σε αυτό.

## Περίληψη

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν ο προσδιορισμός του ποσοστού του αίγειου γάλακτος στο γάλα της τυροκόμησης με βάση την παρα-κ-καζεΐνη των τυριών. Επιπλέον, μελετήθηκε η σταθερότητα της παρα-κ-καζεΐνης κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν πειραματικές τυροκομήσεις τυριών τύπου Φέτας από μίγματα πρόβειου και αίγειου γάλακτος (0-40% αίγειο γάλα), το καζεϊνικό κλάσμα των οποίων αναλύθηκε με κατιοανταλλακτική HPLC σε διάφορα στάδια της ωρίμανσής τους. Οι παρα-κ-καζεΐνες των δύο ειδών γάλακτος διαχωρίστηκαν αποτελεσματικά με τη χρωματογραφική μέθοδος που εφαρμόστηκε. Επιπλέον, μελετήθηκε η εξέλιξη της πρωτεόλυσης με τη μέθοδος TNBS.

Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι παρά το χαμηλό pH των τυριών, το οποίο είναι ευνοϊκό για τη δράση της υπολειμματικής χυμοσίνης, τουλάχιστον το 60% της παρα-κ-καζεΐνης παραμένει ακέραιο στα τυριά μετά από 120 ημέρες ωρίμανσης. Ο ποσοτικός προσδιορισμός του αίγειου γάλακτος βασίστηκε στην επιφάνεια των κορυφών που αντιστοιχούσαν στην αίγεια και πρόβεια παρα-κ-καζεΐνη, καθώς και στη σύσταση των γαλάτων που χρησιμοποιήθηκαν για το πείραμα. Τα αποτελέσματα ήταν επιτυχή με πολύ μικρές αποκλίσεις από τις πραγματικές τιμές, ενώ οι τυπικές αποκλίσεις των προσδιορισμών ήταν μικρότερες από το 5% των μέσων όρων.

Συμπερασματικά, προέκυψε ότι η παρα-κ-καζεΐνη αποτελεί αξιόπιστο δείκτη προσδιορισμού του είδους του γάλακτος και ότι η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί με επιτυχία ακόμα και σε αυτό το τυρί με το ιδιαίτερα χαμηλό pH. Στα πλεονεκτήματά της περιλαμβάνονται η ταχύτητα, ο σχετικά απλός αναλυτικός εξοπλισμός που απαιτείται και η δυνατότητά της να προσδιορίζει τρία είδη γάλακτος ταυτόχρονα.

## Summary

The aim of the present study was the determination of the percentage of caprine milk in the cheesemilk based on the para- $\kappa$ -casein fraction of cheese. In addition, the stability of para- $\kappa$ -casein throughout ripening was studied. For this purpose experimental cheesemakings of Feta cheese were carried out, using cheesemilk mixtures of ovine and caprine milk (from 0 to 40% caprine milk). The casein fractions of cheeses in different stages of ripening was analysed by means of cation exchange HPLC. The evolution of proteolysis was studied by means of the TNBS method. Ovine and caprine para- $\kappa$ -caseins were well separated each other by the chromatographic method used.

According to the results, at least 60% of para- $\kappa$ -casein is non-hydrolysed after 120 days of ripening, despite the low pH of this cheese type that is favourable for the action of residual chymosin. The quantification of caprine milk was based on the area of the ovine and caprine para- $\kappa$ -casein peaks and on the composition of milks used for the experimental cheesemakings. Quantitative results were very close to the real values and the standard deviation were always lower than 5% of the means.

In conclusion, the para- $\kappa$ -casein has been found a reliable indicator for the determination of cheesemilk kind. Furthermore, the present method can be successfully used even in cheese types with low pH, whereas it is also rather fast, it does not demand complicated analytical instrumentation and has the potential of simultaneous determination of three different milk kinds.

# Περιεχόμενα

## Πρόλογος

### Κεφάλαιο 1: Οι καζεΐνες του αγελαδινού, του πρόβειου και του αίγειου γάλακτος

1.1	Σύσταση, ιδιότητες και δομή των μικκολίων.....	1
1.2	Μηχανισμός πήξης του γάλακτος.....	5
1.3	Γενικά χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών αγελαδινού, πρόβειου και αίγειου γάλακτος.....	6
1.4	Χαρακτηριστικά της κύριας δομής των καζεϊνών.....	7
1.5	Οι καζεΐνες του αγελαδινού γάλακτος.....	8
1.6	Οι καζεΐνες του πρόβειου γάλακτος.....	14
1.6.1	Επίδραση του γενετικού πολυμορφισμού των καζεϊνών στις τεχνολογικές ιδιότητες του πρόβειου γάλακτος.....	17
1.7	Οι καζεΐνες του αίγειου γάλακτος.....	17
1.7.1	Επίδραση του γενετικού πολυμορφισμού των καζεϊνών στις τεχνολογικές ιδιότητες του αίγειου γάλακτος .....	23
1.8	Διαφορές μεταξύ αγελαδινού, πρόβειου και αίγειου γάλακτος.....	24
1.8.1	Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά.....	24
1.8.2	Ιδιότητες πήξης.....	26

### Κεφάλαιο 2: Μέθοδοι προσδιορισμού πρωτεϊνών και ανίχνευσης νοθείας

2.1	Ηλεκτροφορητικές τεχνικές.....	30
2.1.1	Κατακόρυφη ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου.....	30
2.1.2	Ισοηλεκτρικός εστιασμός.....	37
2.1.3	Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση.....	39
2.2	Χρωματογραφικές τεχνικές.....	42
2.2.1	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης.....	42

2.2.2	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ανεστραμμένης φάσης.....	43
2.2.3	Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής.....	47
2.2.4	Χρωματογραφία υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων.....	52
2.3	Ανοσοχημικές μέθοδοι.....	53
2.4	Τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης.....	58

### **Κεφάλαιο 3: Τεχνολογία παρασκευής τυριού Φέτας**

3.1	Παραγωγή και αξιοποίηση αιγοπρόβειου γάλακτος στην Ελλάδα.....	66
3.2	Γενικά χαρακτηριστικά και στάδια παρασκευής του τυριού Φέτα.....	67
3.2.1	Προετοιμασία γάλακτος τυροκόμησης.....	68
3.2.2	Προσθήκη $\text{CaCl}_2$ .....	69
3.2.3	Προσθήκη καλλιεργειών.....	69
3.2.4	Προσθήκη πωτιάς και πήξη του γάλακτος.....	70
3.2.5	Διαίρεση και ανάπαυση του τυροπήγματος.....	71
3.2.6	Εξαγωγή και στράγγιση του τυροπήγματος.....	71
3.2.7	Αλάτισμα.....	72
3.2.8	Ωρίμανση των τυριών.....	73

### **Κεφάλαιο 4: Υλικά και μέθοδοι**

4.1	Παρασκευή πρότυπων παρα-κ-καζεϊνών.....	75
4.1.1	Παρασκευή ακατέργαστης (crude) κ-καζεΐνης.....	75
4.1.2	Καθαρισμός της crude κ-καζεΐνης.....	76
4.1.2.1	Παρασκευή ρυθμιστικών διαλυμάτων.....	76
4.1.2.2	Προετοιμασία δείγματος.....	76
4.1.2.3	Συνθήκες έκλυσης.....	76
4.1.3	Υδρόλυση της ακατέργαστης (crude) κ-καζεΐνης.....	77
4.2	Προετοιμασία πρότυπων λυοφιλωμένων μιγμάτων γάλακτος.....	77
4.3	Παρασκευή και δειγματοληψία τυριών Φέτας.....	78
4.3.1	Παραλαβή του καζεϊνικού κλάσματος από τα τυριά.....	80

4.3.2	Χρωματογραφική ανάλυση.....	80
4.3.2.1	Παρασκευή ρυθμιστικών διαλυμάτων.....	80
4.3.2.2	Συνθήκες έκλουσης.....	81
4.4	Προσδιορισμός της υγρασίας των δειγμάτων των τυριών - Μέθοδος της αποξήρανσης σε κλίβανο.....	81
4.5	Προσδιορισμός της πρωτεόλυσης των τυριών - Μέθοδος TNBS.....	82
4.6	Στατιστική ανάλυση.....	83

## **Κεφάλαιο 5: Αποτελέσματα και συζήτηση**

5.1	Εξέλιξη της ωρίμανσης των τυριών.....	84
5.1.1	Μεταβολή του pH των τυριών.....	84
5.1.2	Μεταβολή της υγρασίας των τυριών.....	85
5.1.3	Εξέλιξη της πρωτεόλυσης στα τυριά.....	86
5.2	Προσδιορισμός του είδους του γάλακτος της τυροκόμησης.....	90
5.2.1	Αναλύσεις του καζεϊνικού κλάσματος πρότυπων μιγμάτων γάλακτος.....	90
5.2.2	Μεταβολή της παρα-κ-καζεΐνης κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης.....	94
5.2.3	Προσδιορισμός του είδους του γάλακτος της τυροκόμησης.....	97
5.3	Συμπεράσματα.....	105
	<b>Βιβλιογραφία.....</b>	<b>106</b>



## Πρόλογος

Τα τυριά, λόγω υψηλής διατροφικής αξίας και εξαιρετικών οργανοληπτικών χαρακτηριστικών αποτελούν ένα από τα σπουδαιότερα γαλακτοκομικά προϊόντα. Εκατοντάδες είδη τυριών παράγονται σε παγκόσμια κλίμακα, τα οποία διαφοροποιούνται ως προς την τεχνολογία παρασκευής τους. Στην Ελλάδα, η παραγωγή τυριών αποτελεί πολύ αξιόλογο κλάδο των τροφίμων και βέλτιστο τρόπο αξιοποίησης των μεγάλων ποσοτήτων πρόβειου και αίγειου γάλακτος που παράγονται στη χώρα μας. Το σημαντικότερο ελληνικό τυρί, από άποψη παραγωγής αλλά και παράδοσης, είναι η Φέτα, τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της οποίας εκτιμώνται από τους καταναλωτές σε διεθνές επίπεδο. Σύμφωνα με τις προδιαγραφές που αναφέρονται στον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών για την παραγωγή της, παρασκευάζεται από πρόβειο γάλα ή από μίγματά του με αίγιο, με συμμετοχή του δεύτερου σε ποσοστό μέχρι 30%. Συχνά όμως το ποσοστό του αίγειου γάλακτος είναι υψηλότερο από αυτό που επιτρέπεται κυρίως λόγω εποχικών ελλείψεων του πρόβειου γάλακτος. Η προσθήκη άλλου είδους γάλακτος στο γάλα της τυροκόμησης της Φέτας, αποτελεί παράνομη πράξη, καθώς αποφέρει κέρδος στο νοθευτή, επηρεάζει τις τεχνολογικές ιδιότητες κατά την παρασκευή του τυριού και σε πολλές περιπτώσεις μπορεί να προκαλέσει αλλεργιογόνες αντιδράσεις στους καταναλωτές.

Το πρόβλημα της προσθήκης αγελαδινού γάλακτος ή πρωτεϊνών του στο γάλα της τυροκόμησης της Φέτας έχει αντιμετωπιστεί αναλυτικά με την επίσημη μέθοδο του ισοηλεκτρικού εστιασμού των  $\gamma$ -καζεϊνών. Ωστόσο, οι πρωτεΐνες του αίγειου και του πρόβειου γάλακτος παρουσιάζουν περιορισμένες διαφορές, γεγονός που καθιστά δύσκολη τη μεταξύ τους διάκριση. Επίσης, είναι γνωστό ότι η εφαρμογή του ισοηλεκτρικού εστιασμού για τη διάκριση των παρα-κ-καζεϊνών των δύο αυτών ειδών δεν δίνει ασφαλή αποτελέσματα εξαιτίας της εμφάνισης πολλαπλών αλληλοεπικαλυπτόμενων ζωνών. Έτσι, η παρούσα μελέτη σχεδιάστηκε με σκοπό την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό του είδους γάλακτος της τυροκόμησης Φέτας με βάση την παρα-κ-καζεΐνη, με τη χρήση μιας εύκολα εφαρμόσιμης χρωματογραφικής μεθόδου. Στα πλαίσια της έρευνας αυτής μελετήθηκε επιπλέον η επίδραση της ωρίμανσης στην παρα-κ-καζεΐνη, που αποτελεί την κρισιμότερη παράμετρο για την αξιολόγησή της ως δείκτη νοθείας.

# Κεφάλαιο 1

## Οι καζεΐνες του αγελαδινού, του πρόβειου και του αίγειου γάλακτος

Η καζεΐνη είναι χαρακτηριστική πρωτεΐνη του γάλακτος, στο οποίο απαντά υπό μορφή κολλοειδούς φωσφοροκαζεϊνικού ασβεστίου. Εδώ και πολλές δεκαετίες είναι γνωστό ότι υπάρχουν πολλά κλάσματα καζεΐνης που διαφέρουν μεταξύ τους στη δομή, στην ηλεκτροφορητική κινητικότητα αλλά και ως προς την τεχνολογική τους συμπεριφορά. Αργότερα διαπιστώθηκε και η ύπαρξη γενετικών παραλλαγών τους (Ανυφαντάκης, 2004). Τα κύρια καζεϊνικά κλάσματα είναι τέσσερα ( $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - και  $\kappa$ -καζεΐνη), καθένα από τα οποία παρουσιάζει γενετικές παραλλαγές. Ο γενετικός πολυμορφισμός τους παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον κατά την τυροκόμηση, αφού σχετίζεται με τη συνεκτικότητα του πηγματος, το χρόνο πήξης, την περιεκτικότητα του τυροπήγματος σε καζεΐνη και την απόδοση σε τυρί (Moatsou *et al.* 2008; Pirisi *et al.*, 1999β).

### 1.1 Σύσταση, ιδιότητες και δομή των μικκυλίων

Οι καζεΐνες υπάρχουν στο γάλα ως πολυμερή, κατά κύριο λόγο με οργανωμένη μορφή μικροσκοπικών σφαιρικών τεμαχιδίων, που ονομάζονται καζεϊνικά μικκύλια και απαρτίζονται από  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - και  $\kappa$ -καζεΐνες και ανόργανα συστατικά μεταξύ των οποίων κυριαρχούν το ασβέστιο και ο φώσφορος. Τα μικκύλια περιέχουν περίπου 70% νερό και 30% στερεά συστατικά από τα οποία 92% είναι καζεΐνες και 8% διάφορα άλατα (Ανυφαντάκης, 2004; Walstra *et al.*, 2006).

Επίσης στο γάλα υπάρχουν προϊόντα πρωτεόλυσης των τεσσάρων βασικών καζεϊνών. Οι  $\gamma$ -καζεΐνες και ορισμένες πρωτεόζες-πεπτόνες είναι κλάσματα της  $\beta$ -καζεΐνης, που προέρχονται από τη δράση της πλασμίνης. Οι μεν πρώτες περιλαμβάνονται στο καζεϊνικό κλάσμα ενώ οι δευτέρες στο κλάσμα των πρωτεϊνών του ορού (Walstra *et al.*, 2006).

Στον Πίνακα 1-1 παρουσιάζεται η κατανομή των μεμονωμένων καζεϊνικών κλασμάτων σε νωπό αγελαδινό, πρόβειο και αίγειο γάλα. Παρατηρούμε ότι η  $\alpha_s$ -καζεΐνη είναι η κύρια καζεΐνη στο αγελαδινό και στο πρόβειο γάλα ενώ στο αίγειο γάλα κυριαρχεί η  $\beta$ -καζεΐνη (Huppertz *et al.*, 2006).

**ΠΙΝΑΚΑΣ 1-1:** Αναλογία των κλασμάτων καζεΐνης σε νοπό αγελαδινό, πρόβειο και αίγιο γάλα (Πηγή: Huppertz *et al.*, 2006)

Είδος γάλακτος	Αγελαδινό γάλα	Πρόβειο γάλα	Αίγιο γάλα
Ολική πρωτεΐνη <sup>α</sup>	3,6	5,5	3,1
Καζεΐνες σε σχέση με την ολική πρωτεΐνη <sup>α</sup>	2,88	4,40	2,48
α <sub>s1</sub> -καζεΐνη <sup>β</sup>	38	16	5
α <sub>s2</sub> -καζεΐνη <sup>β</sup>	10	15	25
β-καζεΐνη <sup>β, γ</sup>	39	47	50
κ-καζεΐνη <sup>β</sup>	13	7	20

<sup>α</sup> g / 100g γάλακτος

<sup>β</sup> % της ολικής καζεΐνης

<sup>γ</sup> συμπεριλαμβάνονται και οι γ-καζεΐνες

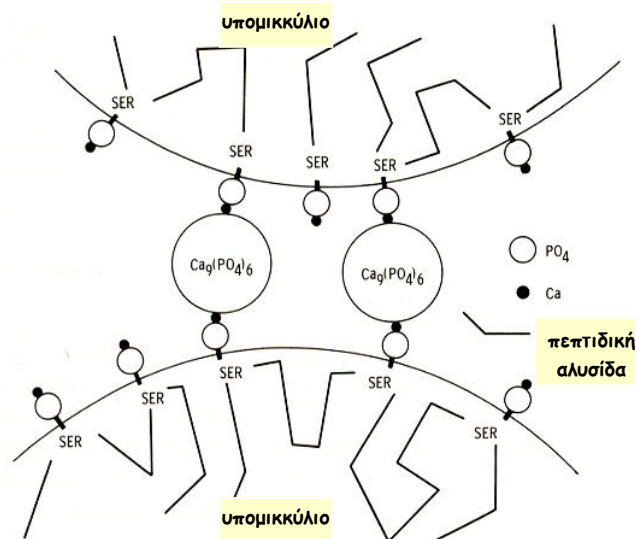
Σε μορφή μικκυλίων απαντά στο γάλα το 90% περίπου της καζεΐνης του. Το υπόλοιπο 10% είναι σε διαλυτή μορφή. Μεταξύ των δύο μορφών υπάρχει δυναμική σχέση που επηρεάζεται από την ποσότητα των ιόντων ασβεστίου και φωσφόρου του γάλακτος. Με αυξομείωση των τελευταίων είναι δυνατόν να αυξομειωθεί η μια μορφή καζεΐνης έναντι της άλλης, γιατί το φαινόμενο είναι αντιστρεπτό. Εάν μειωθεί η συγκέντρωση των ιόντων ασβεστίου, για παράδειγμα, το μέγεθος των μικκυλίων μειώνεται και αυξάνεται η περιεκτικότητα του γάλακτος σε διαλυτή καζεΐνη. Το αντίθετο συμβαίνει με την αύξησή του (Ανυφαντάκης, 2004). Στον πίνακα 1-2 παρουσιάζεται η κατανομή του ασβεστίου και του φωσφόρου μεταξύ της διαλυτής και της κolloειδούς φάσης στο αγελαδινό, πρόβειο και αίγιο γάλα.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 1-2:** Κατανομή του ασβεστίου και του φωσφόρου (%) μεταξύ διαλυτής και κolloειδούς φάσης στο αγελαδινό, πρόβειο και αίγιο γάλα (Πηγή: Huppertz *et al.*, 2006)

Είδος γάλακτος	Ασβέστιο		Φώσφορος	
	Διαλυτή φάση	Κolloειδής φάση	Διαλυτή φάση	Κolloειδής φάση
Αγελαδινό	32	68	53	47
Πρόβειο	20	80	39	61
Αίγιο	34	66	41	59

Τα μικκόλια (Σχήμα 1-2) είναι σφαιρικά, με διάμετρο 50-300 nm, έχουν M.W. περίπου 10<sup>8</sup> kDa και είναι αρνητικά φορτισμένα. Ο μεγάλος όγκος τους οφείλεται στην ενυδάτωση των υπομικκυλίων, περίπου 2 g νερό/g καζεΐνης (Fox & McSweeney, 1998), στις

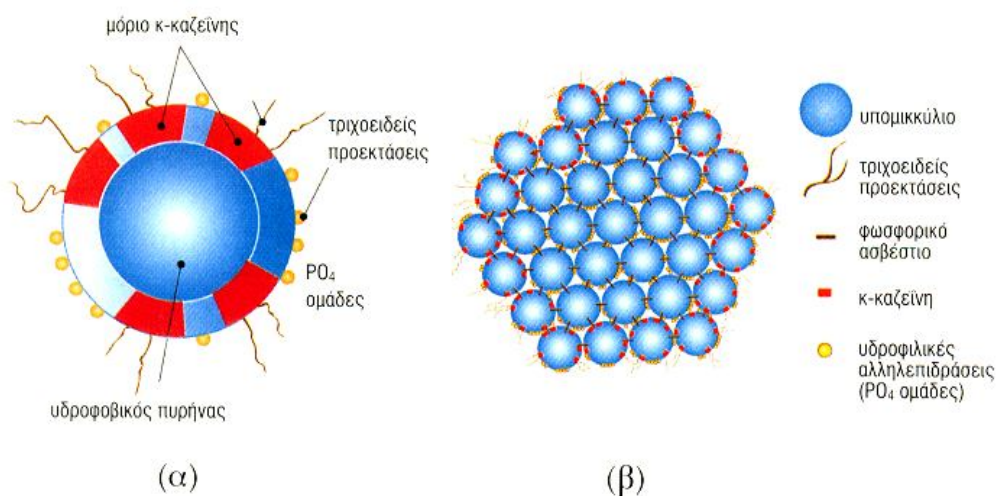
υδρόφιλες ομάδες των καζεϊνών στην επιφάνεια των μικκυλίων και στην ανώμαλη επιφάνεια των τελευταίων (Walstra *et al*, 2006; Fox & McSweeney, 1998). Κάθε καζεϊνικό μικκύλιο αποτελείται από υπομικκύλια, τα οποία συγκρατούνται μεταξύ τους με γέφυρες κολλοειδούς φωσφορικού ασβεστίου, υδρόφοβες και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και δεσμούς υδρογόνου (Fox & McSweeney, 1998; Fox and Brodtkorb, 2008). Όσον αφορά στις γέφυρες κολλοειδούς φωσφορικού ασβεστίου, φαίνεται ότι πρόκειται για ηλεκτροστατικές δράσεις μεταξύ των αρνητικά φορτισμένων φωσφορικών ομάδων της καζεΐνης και των συσσωματωμάτων  $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$ , τα οποία φορτίζονται θετικά προσροφώντας δύο  $\text{Ca}^{2+}$  από το περιβάλλον. Όταν πάνω από το 22% των φωσφοεστερικών ομάδων έχουν συνδεθεί έτσι ανά δύο, παράγονται τα μικκύλια (Πολυχρονιάδου, 1989). Υπάρχουν περίπου 25.000 φωσφορικά υπολείμματα ανά μικκύλιο, από τα οποία το 40% περίπου φαίνεται ότι συνδέεται σε ζευγάρια μέσω  $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$ , όπως φαίνεται στην Εικόνα 1-1 (Oakenfull *et al.*, 1997).



Εικόνα 1-1: Σχηματικό διάγραμμα της ένωσης δύο υπομικκυλίων με ομάδες  $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$  (Πηγή: Schmidt, 1982)

Τα **υπομικκύλια** (Εικόνα 1-2) αποτελούνται από 12-150 μόρια καζεϊνών, έχουν σφαιρική μορφή, διάμετρο 15-20 nm και μοριακό βάρος που κυμαίνεται από 250.000 ως 2.000.000 Da. Στο σχηματισμό τους συμμετέχουν όλα τα καζεϊνικά κλάσματα. Περιλαμβάνουν έναν υδροφοβικό πυρήνα, πλούσιο σε  $\alpha_{\text{S1-}}$ ,  $\alpha_{\text{S2-}}$  και  $\beta$ -καζεΐνες, που καλύπτεται από ένα υδρόφιλο φλοιό, στον οποίο συμμετέχει οπωσδήποτε η κ-καζεΐνη

(Ανυφαντάκης, 2004). Η κ-καζεΐνη, που αποτελεί περίπου το 12% της ολικής καζεΐνης, μπορεί να σταθεροποιήσει ευαίσθητες στα  $Ca^{++}$  καζεΐνες, που αντιστοιχούν στο δεκαπλάσιο της μάζας της (Fox and Brodtkorb, 2008). Πολλές εκατοντάδες ή και χιλιάδες υπομικκυλίων ενώνονται μεταξύ τους με γέφυρες κολλοειδούς φωσφορικού ασβεστίου και δημιουργούν τα μικκύλια (Ανυφαντάκης, 2004). Πιθανότατα η παρουσία φωσφορικού ασβεστίου μειώνει το ηλεκτρικό φορτίο των υπομικκυλίων και τα σταθεροποιεί περισσότερο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, να έλκουν το ένα το άλλο και τελικά να συνενώνονται. Δύο υπομικκύλια που πλησιάζουν το ένα το άλλο, έτσι ώστε η πεπτιδική αλυσίδα της κ-CN, που προεξέχει τουλάχιστον στο ένα από τα δύο, να βρίσκεται ανάμεσά τους, δε θα μπορέσουν να συσσωματωθούν (Walstra *et al*, 1999). Η συνένωση αυτή διευκολύνεται από την παρουσία θέσεων φωσφοροσερίνης στην πεπτιδική αλυσίδα των καζεϊνών. Όταν καλυφθεί ολόκληρη η επιφάνειά τους, σταματά η ανάπτυξη του μικκυλίου (Ανυφαντάκης, 2004). Επομένως η συσσωμάτωση των υπομικκυλίων συνεχίζεται μέχρι να σχηματιστεί ένα σχεδόν σφαιρικό συσσωμάτωμα και κατά τέτοιο τρόπο ώστε αυτά που περιέχουν περισσότερη κ-CN να συγκεντρώνονται στην επιφάνεια των μικκυλίων ενώ αυτά που υπολείπονται σε κ-CN, να βρίσκονται στο εσωτερικό τους (Fox & McSweeney, 1998).

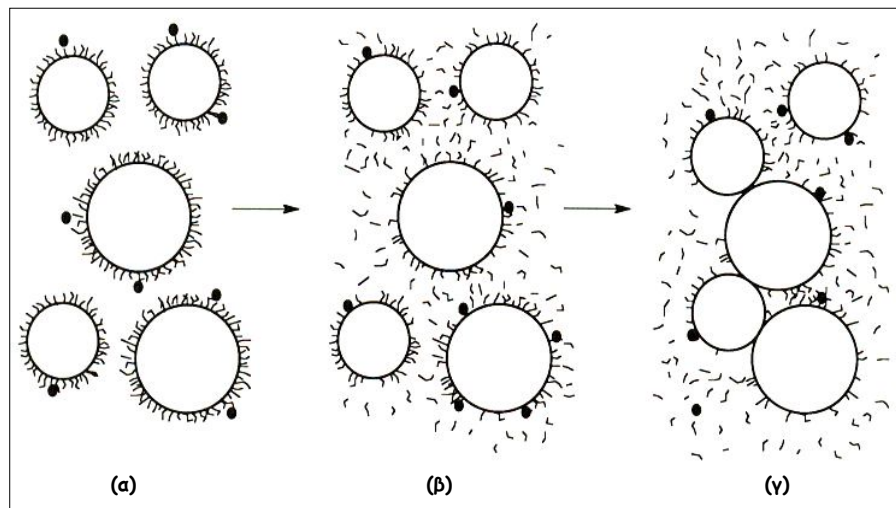


Εικόνα 1-2: Δομή υπομικκυλίου (α) και μικκυλίου καζεΐνης (β) (Πηγή: Ανυφαντάκης, 2004)

## 1.2 Μηχανισμός πήξης του γάλακτος

Με τον όρο πήξη του γάλακτος εννοούμε μια σειρά αλλαγών στις φυσικοχημικές του ιδιότητες, οι οποίες υπό ορισμένες συνθήκες, προκαλούν μεταβολές στα μικρόλια των καζεϊνών του που οδηγούν τελικά στη δημιουργία του τυροπήγματος. Οι αλλαγές αυτές είναι δυνατόν να προκληθούν είτε με οξίνιση είτε με χρήση πρωτεολυτικών ενζύμων που περιέχονται στην πτυιά (Ανυφαντάκης, 2004).

Η προσθήκη χυμοσίνης στο γάλα (Εικόνα 1-3), επιφέρει στην αρχή περιορισμένες αλλαγές στα καζεϊνικά μικρόλια και στη συνέχεια το γάλα πήζει ταχύτατα (Dalglish, 1999).



**Εικόνα 1-3:** Σχηματικό διάγραμμα της δράσης της χυμοσίνης (μικροί συμπαγείς μαύροι κύκλοι) στα καζεϊνικά μικρόλια: **(α)**. Η κ-CN, που βρίσκεται στην επιφάνεια των μικρολίων παραμένει άθικτη καθώς η χυμοσίνη προσκολλάται σε αυτές, **(β)**. Μετά από μικρό χρονικό διάστημα αρκετό ποσοστό της κ-CN έχει υδρολυθεί και το αντίστοιχο ποσοστό του CMP βρίσκεται στο διάλυμα. Ωστόσο το ποσοστό της κ-CN που δεν έχει υδρολυθεί ακόμα δεν επιτρέπει τη συνένωση των μικρολίων, **(γ)**. Μετά από αρκετό χρονικό διάστημα, το μεγαλύτερο ποσοστό της κ-CN έχει υδρολυθεί και τα μικρόλια αρχίζουν να συσσωματώνονται (Πηγή: Dalglish, 1999)

Η διαδικασία της πήξης χωρίζεται σε τρία στάδια. Στο πρώτο στάδιο, η κ-καζεΐνη των μικρολίων, δέχεται την πρωτεολυτική δράση των πρωτεασών της πτυιάς και η διάσπασή της δίνει δύο πεπτίδια με διαφορετικές ιδιότητες, το καζεϊνομακροπεπτίδιο (CMP) και την παρα-κ-καζεΐνη. Η προοδευτική υδρόλυση της κ-καζεΐνης κατά το πρώτο

στάδιο, οδηγεί σε μεταβολή των ιδιοτήτων των μικκυλίων, έτσι ώστε αυτά να μπορούν να συσσωματωθούν. Η φάση της συσσωμάτωσης αποτελεί το δεύτερο στάδιο (Dalglish, 1982). Επειδή το γάλα αρχίζει να πήζει πριν η ενζυμική υδρόλυση της κ-καζεΐνης ολοκληρωθεί (Dalglish, 1999), είναι σημαντικό να καθοριστεί η έκταση της υδρόλυσης της κ-καζεΐνης ώστε να παρατηρηθεί αποτελεσματική συσσωμάτωση. Έχει βρεθεί ότι μέχρι να υδρολυθεί το 80% της κ-καζεΐνης, ο ρυθμός της συσσωμάτωσης είναι αμελητέος. Αφού υδρολυθεί το 80% η συσσωμάτωση των καζεϊνών αυξάνεται ταχύτατα για να φτάσει σ' ένα μέγιστο όταν όλες οι κ-καζεΐνες έχουν υδρολυθεί. Φαίνεται λοιπόν ότι υπάρχει μια οριακή τιμή της κ-καζεΐνης που έχει υδρολυθεί κάτω της οποίας τα μικκύλια δεν μπορούν να συσσωματωθούν. Το τρίτο στάδιο αυτής της δράσης περιλαμβάνει διαδικασίες όπως είναι η συναίρεση (αποβολή ορού από το πήγμα) και μη συγκεκριμένες πρωτεολύσεις των καζεϊνών στο πήγμα (Dalglish, 1982).

Στην πράξη η ενζυμική πήξη του γάλακτος χωρίζεται σε δύο φάσεις, την ενζυμική που αφορά στην υδρόλυση της κ-καζεΐνης και την μη-ενζυμική που αφορά στη δημιουργία ενός συνεκτικού δικτύου τροποποιημένων μικκυλίων που συνδέονται με γέφυρες ασβεστίου (Fox & McSweeney, 1998).

### **1.3 Γενικά χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών αγελαδινού, πρόβειου και αίγειου γάλακτος**

Η μέση περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη του πρόβειου γάλακτος (5.8% w/w) είναι μεγαλύτερη από αυτή του αίγειου (4.6% w/w) και του αγελαδινού (3.3% w/w). Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη ποικίλλει ευρέως μεταξύ των ειδών και επηρεάζεται από τη φυλή, την περίοδο της γαλακτοπαραγωγής, τη διατροφή, το κλίμα, την εποχή και την υγιεινή κατάσταση του μαστού (μαστιτίδες). Το αίγιο και το πρόβειο γάλα περιέχει περίπου 0,7-1,0% και 0,4-0,8% N αντίστοιχα, το οποίο είναι κατανομημένο σε κλάσματα, που παρουσιάζουν μεγάλη τεχνολογική και διατροφική σημασία. Οι πρωτεΐνες στο πρόβειο γάλα αποτελούν το 95% του ολικού N, ενώ 5% είναι το μη πρωτεϊνικό N. Το αίγιο γάλα έχει μεγαλύτερο ποσοστό μη πρωτεϊνικού N και λιγότερο καζεϊνικό N απ' ότι το πρόβειο και το αγελαδινό γάλα.

Οι κύριες πρωτεΐνες στο πρόβειο και στο αίγιο γάλα είναι ίδιες όπως και στο αγελαδινό, διαφέρουν όμως ως προς τα ποιοτικά τους χαρακτηριστικά. Γενικά, οι πρωτεΐνες του γάλακτος εμφανίζονται σε δύο διακριτές φάσεις. Όπως προαναφέρθηκε, η

μία είναι μία ασταθής μικκυλιακή φάση που αποτελείται από καζεΐνες, ως μικκύλια σε διασπορά. Συνδέονται μεταξύ τους με φωσφορικό ασβέστιο και μικρές ποσότητες Mg, Na, P και κιτρικών αλάτων, και διαθλούν το φως προσδίδοντας στο γάλα το λευκό του χρώμα. Η άλλη είναι μια διαλυτή φάση που αποτελείται από πρωτεΐνες του ορού (κυρίως β-γαλακτογλοβουλίνη, α-γαλακτοαλβουμίνη, οροαλβουμίνη). Οι καζεΐνες κατακρημνίζονται σε pH 4.6 σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ κάτω από τις ίδιες συνθήκες οι πρωτεΐνες του ορού παραμένουν διαλυτές (Park et al., 2007).

Στον Πίνακα 1-3 παρουσιάζεται η σύσταση των πρωτεϊνών του αγελαδινού πρόβειου και αίγειου γάλακτος.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 1-3:** Σύσταση των πρωτεϊνών του αγελαδινού, πρόβειου και αίγειου γάλακτος (Πηγή: Borkova & Snaselova, 2005)

Συστατικό (g/100 g)	Αγελαдино γάλα	Πρόβειο γάλα	Αίγειο γάλα
Ολική πρωτεΐνη	3,2	4,6	3,2
Καζεΐνες	2,6	3,9	2,6
Πρωτεΐνες του ορού	0,6	0,7	0,6

#### 1.4 Χαρακτηριστικά της κύριας δομής των καζεϊνών

Παρακάτω παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά της κύριας δομής των καζεϊνών του γάλακτος:

**1. Φωσφορυλίωση:** όλες οι καζεΐνες είναι φωσφορυλιωμένες σε κυμαινόμενο βαθμό στα υπολείμματα σερίνης (SerP) και περιστασιακά στα υπολείμματα θρεονίνης. Οι γενετικές παραλλαγές των κ-, α<sub>s1</sub>- και β-καζεϊνών περιέχουν συνήθως έναν χαρακτηριστικό αριθμό φωσφορυλιωμένων υπολειμμάτων σερίνης και συγκεκριμένα 1, 8 ή 9 και 4 ή 5 αντίστοιχα. Οι α<sub>s2</sub>-καζεΐνες παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη διακόμανση στην έκταση της φωσφορυλίωσης (Swaisgood, 1992).

**2. Γλυκοζυλίωση:** είναι χαρακτηριστικό της κ-CN και είναι ο λόγος στον οποίο οφείλεται η εκτεταμένη ανομοιογένεια των πρωτεϊνών αυτής της οικογένειας. Ωστόσο η μη γλυκοζυλιωμένη περιοχή αποτελεί το κύριο συστατικό της. Στο κανονικό γάλα οι υδατάνθρακες αποτελούνται από τρεις μονοσακχαρίτες: το σιαλικό οξύ (NeuAc), τη γαλακτόζη (Gal) και τη γαλακτοζαμίνη (GalNAc). Τα υπολείμματα υδατανθράκων εμφανίζονται με τη μορφή τρι- ή τετρασακχαριτών (Swaisgood, 1992). Έτσι λοιπόν τα



μικρού μεγέθους συστατικά της κ-CN μπορεί να περιέχουν μεταβλητό αριθμό των τελευταίων, οι οποίοι είναι ενωμένοι σε ένα τουλάχιστον από τα τέσσερα υπολείμματα θρεονίνης, κυρίως όμως παρουσιάζονται στο υπόλειμμα Thr<sup>133</sup> (Eigel *et al.*, 1984; Jolles *et al.*, 1972; Mercier *et al.*, 1973). Οι διαφορές για την κ-CN εντοπίζονται κυρίως στο καρβόξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης, το καζεΐνομακροπεπίδιο (CMP). Αντίθετα η περιοχή που περιέχει τον πεπτιδικό δεσμό 105-106, ο οποίος είναι ευαίσθητος στη δράση της χυμοσίνης, είναι εντοπωσιακά ίδια και στα τρία είδη γάλακτος (Alichanidis & Polychroniadou, 1996).

**3. Υπολείμματα κυστεΐνης:** υπάρχουν δύο υπολείμματα κυστεΐνης στην αλληλουχία αμινοξέων των κ- και α<sub>s2</sub>-καζεΐνών, που τους επιτρέπουν να συμμετέχουν στο σχηματισμό ενδομοριακών σουλφυδρικών - δισουλφιδικών δεσμών (Swaisgood, 1992).

**4. Σχετικά υψηλά ποσοστά υπολειμμάτων προλίνης:** κυρίως στις β-καζεΐνες (35 στη β-CN, 20 στην κ-CN, 17 στην α<sub>s1</sub>-CN και 10 στην α<sub>s2</sub>-CN), τα οποία επηρεάζουν τη δομή της πρωτεΐνης, αφού διακόπτουν την α-ελικοειδή και β-πτυχωτή δομή και εμφανίζονται συνήθως στις β-τροφές (Swaisgood, 1992).

**5. Γενετικός πολυμορφισμός:** οφείλεται σε διαφορές ως προς τα υπολείμματα αμινοξέων ή σε απαλοιφές τμημάτων της πεπτιδικής αλυσίδας που μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα και διαφορές στη γλυκοζυλίωση, στο ηλεκτρικό φορτίο, στο μοριακό βάρος και στην υδροφοβία (Pirisi *et al.*, 1999β).

## 1.5 Οι καζεΐνες του αγελαδινού γάλακτος

Το αγελαδινό γάλα περιέχει 24-28 g/L καζεΐνη (Swaisgood, 1992). Οι τέσσερις κύριες καζεΐνες, α<sub>s1</sub>-, α<sub>s2</sub>-, β- και κ-, βρίσκονται σε αναλογία 39:10:36:13 (Borkova & Snaselova, 2005).

Η αγελαδινή α<sub>s1</sub>-καζεΐνη περιλαμβάνει 199 υπολείμματα αμινοξέων (Eigel *et al.*, 1984) και αντιπροσωπεύει το 40% του καζεΐνικού κλάσματος. Αποτελείται από ένα μεγάλο και ένα μικρό συστατικό. Οι δύο πρωτεΐνες είναι πολυπεπίδια μονής αλυσού με την ίδια αλληλουχία αμινοξέων που διαφέρουν μόνο στο βαθμό της φωσφορυλίωσης. Το μικρότερο συστατικό περιέχει ένα επιπλέον φωσφορυλιωμένο υπόλειμμα σερίνης στη θέση 41. Η πρωτεΐνη αναφοράς για αυτή την ομάδα είναι η α<sub>s1</sub>-CN B-8P, η οποία δεν περιέχει υπολείμματα κυστεΐνης. Η γενετική παραλλαγή A βρέθηκε στις φυλές Holstein Friesians, Red Holsteins και German Red, η B είναι η κυρίαρχη παραλλαγή στο είδος *Bos Taurus*, η C

είναι κυρίαρχη παραλλαγή στα είδη *Bos indicus* και *Bos grunniens*, η παραλλαγή D βρέθηκε σε διάφορες φυλές της Γαλλίας και της Ιταλίας και η παραλλαγή E στο είδος *Bos grunniens*. Επίσης έχουν χαρακτηριστεί τρεις νέες γενετικές παραλλαγές οι F, G και H. (Farrell *et al.*, 2004). Στον Πίνακα 1-4 παρουσιάζονται οι διαφορές μεταξύ των γενετικών παραλλαγών της αγελαδινής  $\alpha_{s1}$ -καζεΐνης.

**Πίνακας 1-4:** Θέσεις και διαφορές αμινοξέων στις γενετικές παραλλαγές της αγελαδινής  $\alpha_{s1}$ -καζεΐνης (Πηγή: Farrell *et al.*, 2004)

Πρωτεΐνη	Παραλλαγή	Θέση και αμινοξύ στην πρωτεΐνη					
		14-26	53	51-58	59	66	192
$\alpha_{s1}$ -CN (199 αμινοξέα)	A	Απαλοιφή					Glu
	B		Ala		Gln	SerP	Glu
	C						Gly
	D		ThrP				Glu
	E				Lys		Gly
	F					Leu	Glu
	G						Glu
	H				Απαλοιφή		Glu

Ο φαινότυπος  $\alpha_{s1}$ -CN BB έχει συσχετιστεί με υψηλότερες αποδόσεις σε γάλα και επομένως υψηλότερη απόδοση σε πρωτεΐνη κατά την γαλακτοπαραγωγή. Ωστόσο ο ίδιος φαινότυπος έχει συσχετιστεί και με χαμηλή πρωτεΐνοπεριεκτικότητα στο γάλα. Φαίνεται ότι τα άτομα που φέρουν τον αλληλόμορφο G παράγουν λιγότερη  $\alpha_{s1}$ -CN και περισσότερες από τις άλλες καζεΐνες –οι ομόζυγες αγελάδες (GG) παράγουν 55% λιγότερη  $\alpha_{s1}$ -CN.

Η γενετική παραλλαγή A παρουσιάζει χαρακτηριστικά πολύ διαφορετικά από αυτά των άλλων παραλλαγών, γεγονός που οφείλεται στην απαλοιφή των 13 υπολειμμάτων αμινοξέων, αφού έτσι εξαφανίζονται τα περισσότερα από τα υδροφοβικά υπολείμματα στη N-τελική περιοχή, μεταξύ των οποίων και της αλληλουχίας Phe-Phe-Val, η οποία υδρολύεται από τη χυμοσίνη κατά την ωρίμαση των τυριών. Επομένως αυτή η πρωτεΐνη έχει μειωμένη υδροφοβία και δεν συσσωματώνεται εκτενώς παρουσία ασβεστίου. Έχει παρατηρηθεί λοιπόν ότι τα μη συνεκτικά πήγματα δημιουργούνται σε γάλατα που περιέχουν  $\alpha_{s1}$ -CN A. Τυριά που παρασκευάζονται από γάλα που περιέχουν τη γενετική

παραλλαγή  $\alpha_{s1}$ -CN C, σχηματίζουν πιο συνεκτικό πήγμα σε σχέση με γάλα που περιέχει τη γενετική παραλλαγή  $\alpha_{s1}$ -CN B (Farrell *et al.*, 2004).

Η  $\alpha_{s2}$ -καζεΐνη περιλαμβάνει 207 αμινοξέα (Eigel *et al.*, 1984), αντιπροσωπεύει το 10% του καζεϊνικού κλάσματος και αποτελείται από 2 μεγάλα και πολλά μικρότερα συστατικά (Farrell *et al.*, 2004). Είναι η ομάδα των καζεϊνών που παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη διακόμευση στην έκταση της φωσφορυλίωσης και είναι οι πιο υδρόφιλες με αποτέλεσμα να είναι πιο ευαίσθητες στα ιόντα ασβεστίου απ' ό,τι οι  $\alpha_{s1}$ -CN (Walstra *et al.*, 2006). Η πρωτεΐνη αναφοράς γι' αυτή την ομάδα είναι η  $\alpha_{s2}$ -CN A-11P, ένα πολυπεπτιδίο μονής αλυσού με έναν ενδομοριακό δισουλφυδικό δεσμό μεταξύ των υπολειμμάτων κυστεΐνης 36 και 40 (Farrell *et al.*, 2004). Οι 4 γνωστές γενετικές παραλλαγές έχουν χαρακτηριστεί ως A, B, C και D (Πίνακας 1-5). Οι παραλλαγές A, B και D έχουν βρεθεί στο είδος *Bos Taurus* (Eigel *et al.*, 1984).

**Πίνακας 1-5:** Θέσεις και διαφορές αμινοξέων στις γενετικές παραλλαγές της αγελαδινής  $\alpha_{s2}$ -καζεΐνης (Πηγή: Farrell *et al.*, 2004)

Πρωτεΐνη	Παραλλαγή	Θέση και αμινοξύ στην πρωτεΐνη			
		33	47	51-59	130
$\alpha_{s2}$ -CN (207 αμινοξέα)	A	Glu	Ala		Thr
	B	Η ολοκληρωμένη αλληλουχία δεν έχει καθοριστεί			
	C	Gly	Thr		Ile
	D			Απαλοιφή	

Η αγελαδινή  $\beta$ -καζεΐνη περιλαμβάνει 209 υπολείμματα αμινοξέων (Eigel *et al.*, 1984) αντιπροσωπεύει το 45% του καζεϊνικού κλάσματος και είναι αρκετά περίπλοκη λόγω της δράσης της πλασμίνης, που είναι ενδογενές ένζυμο του γάλακτος. Η δράση της τελευταίας οδηγεί στο σχηματισμό των  $\gamma_1$ -,  $\gamma_2$ - και  $\gamma_3$ -CN, τα οποία είναι κλάσματα της  $\beta$ -CN και αποτελούνται από τα υπολείμματα 29-209, 106-209 και 108-209 αντίστοιχα (Farrell *et al.*, 2004). Τα αμινοτελικά κλάσματα της  $\beta$ -CN που απελευθερώνονται από την πλασμίνη, είναι οι πρωτεόζες-πεπτόνες, τα συστατικά 5, 8-slow και 8-fast (Eigel *et al.*, 1984) που αντιστοιχούν στα υπολείμματα 1-105 ή 1-107, 1-28 και 29-105 ή 107 αντίστοιχα (Farrell *et al.*, 2004).

Η πρωτεΐνη αναφοράς γι' αυτή την ομάδα είναι η A<sup>2</sup>-5P, που αποτελείται από μία μονή πολυπεπτιδική αλυσίδα που δεν περιλαμβάνει υπολείμματα κυστεΐνης. Η γενετική

παραλλαγή A είναι η κυρίαρχη σε όλα τα είδη του γένους *Bos* που έχουν μελετηθεί. Οι παραλλαγές C και D έχουν μία λιγότερη φωσφορική ομάδα από τις υπόλοιπες (Eigel *et al.*, 1984). Κύριο χαρακτηριστικό της β-καζεΐνης είναι ότι όλες οι παραλλαγές προκύπτουν από γενετικό πολυμορφισμό, ο οποίος ευθύνεται και για τροποποίηση της φωσφορυλίωσης στις παραλλαγές C και D. Πρόσφατα ανακαλύφθηκαν νέες “σιωπηλές” παραλλαγές της β-CN. Η β-CN F-5P περιέχει ένα υπόλειμμα Leu αντί για Pro στη θέση 152 της β-CN A<sup>1</sup> (Visser *et al.*, 1995), η β-CN G-5P η οποία είναι παρόμοια με την β-CN A<sup>1</sup> και F περιέχει ένα υπόλειμμα Leu αντί για Pro στη θέση 137 ή 138 (Dong & Ng-Kwai-Hong, 1998) και η β-CN H<sup>1</sup> που διαφέρει από την παραλλαγή A<sup>2</sup> με αντικατάσταση του υπολείμματος Arg στη θέση 25 από το υπολείμματα Cys και του υπολείμματος Leu στη θέση 88 από το υπόλειμμα Ile (Farrell *et al.*, 2004). Οι Senocq *et al.* (2002) ανακάλυψαν τη γενετική παραλλαγή H<sup>2</sup>, που διαφέρει από την παραλλαγή A<sup>2</sup> σε δύο γνωστές θέσεις - αντικατάσταση της Met στη θέση 93 από τη Leu και της Gln στη θέση 72 από τη Glu- και από αντικατάσταση της Gln από τη Glu στην αλληλουχία 114-169. Τέλος η παραλλαγή I περιλαμβάνει την αντικατάσταση της Met στη θέση 93 από τη Leu στην παραλλαγή H<sup>2</sup>. Από όλες τις καζεΐνες η β-CN είναι η πιο υδρόφοβη (Swaisgood, 1982).

Στον Πίνακα 1-6 παρουσιάζονται οι διαφορές μεταξύ των γενετικών παραλλαγών της αγελαδινής β-καζεΐνης.

**Πίνακας 1-6:** Θέσεις και διαφορές αμινοξέων στις γενετικές παραλλαγές της αγελαδινής β-καζεΐνης (Πηγή: Farrell *et al.*, 2004)

Πρωτεΐνη	Παραλλαγή	Θέση και αμινοξύ στην πρωτεΐνη													
		18	25	35	36	37	67	72	88	93	106	122	137/138	152	?
β-CN (209 αμινοξέα)	A <sup>1</sup>						His								
	A <sup>2</sup>	SerP	Arg	SerP	Glu	Glu	Pro	Gln	Leu	Met	His	Ser	Leu/Pro	Pro	Gln
	A <sup>3</sup>										Gln				
	B						His					Arg			
	C			Ser		Lys	His								
	D	Lys													
	E				Lys										
	F						His								Leu
	G						His						Leu		
	H <sup>1</sup>		Cys							Ile					
	H <sup>2</sup>								Glu		Leu				Glu
I										Leu					

Η κ-καζεΐνη είναι το κλάσμα που σταθεροποιεί όλες τις άλλες καζεΐνες έναντι των ιόντων ασβεστίου. Είναι διαλυτή παρουσία ασβεστίου σε όλες τις θερμοκρασίες και η μοναδική από τις κύριες καζεΐνες που περιέχει στο μόριό της υδατάνθρακες -γαλακτόζη 1,3%, γαλακτοζαμίνη 1,4% και σιαλικό οξύ 2,0%- και υπολείμματα κυστεΐνης. Η κ-CN του αγελαδινού γάλακτος, περιέχει δύο υπολείμματα κυστεΐνης, που της επιτρέπουν να συμμετέχει στους σουλφιδρικούς και δισουλφιδικούς δεσμούς (Swaisgood, 1982). Ο αριθμός των υπολειμμάτων σακχάρων που είναι ενωμένα στην πεπτιδική αλυσίδα είναι δυνατό να ποικίλει και κατά συνέπεια ποικίλει το μοριακό βάρος και η ηλεκτροφορητική της ικανότητα. Έχει 169 υπολείμματα αμινοξέων στο μόριο της. Περιέχει τον πολύ ευαίσθητο στη χυμοσίνη δεσμό Phe (105) – Met (106), ο οποίος όταν υδρολυθεί χάνεται η προστατευτική ιδιότητα της πάνω στις άλλες καζεΐνες, γεγονός που έχει σαν αποτέλεσμα την πήξη του γάλακτος (Ανυφαντάκης & Καλαντζόπουλος, 1993).

Η κ-CN που έχει απομονωθεί από το γάλα, αποτελείται από ένα μίγμα πολυμερών τα οποία πιθανόν συγκρατούνται μεταξύ τους με ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς (Walstra & Jenness, 1984). Τελευταία όμως έχει ταυτοποιηθεί ένα είδος κ-CN με δύο SerP και χωρίς υδατάνθρακες (Vreeman *et al.*, 1977). Περίπου τα 2/3 των μορίων της κ-CN περιέχουν μια ομάδα υδατάνθρακα, η οποία είναι εστεροποιημένη σε ένα από τα υπολείμματα θρεονίνης και περιέχει γαλακτοζαμίνη και γαλακτόζη, και ένα ή δύο υπολείμματα N-ακετυλ-νευραμινικού οξέος (NANA) (Walstra *et al.*, 2006). Έχουν ταυτοποιηθεί τρία διαφορετικά ολιγομερή υδατανθράκων που συνδέονται στο υπόλειμμα Thr<sup>133</sup>. Η σερίνη 141 μπορεί επίσης να είναι γλυκοζυλιωμένη (Swaisgood, 1992; Zevaco & Ribadeau – Dumas, 1984). Σε μίγμα κ-CN, έχει βρεθεί ότι το κλάσμα που είναι ελεύθερο υδατανθράκων αντιστοιχεί στο 34%, το άθροισμα των κλασμάτων με 1 ή 2 ομάδες NeuAc είναι 30%, των κλασμάτων με 3 ή 4 ομάδες NeuAc είναι 18% και των κλασμάτων με 5 ή 6 ομάδες NeuAc είναι 6% (Vreeman *et al.*, 1986). Το σημείο φωσφορύλιωσης του αγελαδινού CMP είναι η SerP<sup>149</sup> (Rasmussen *et al.*, 1997).

Η πρωτεΐνη αναφοράς για αυτή την ομάδα είναι η κ-CN A-1P. Οι δύο πιο κοινές γενετικές παραλλαγές έχουν χαρακτηριστεί ως A και B, με την A να τείνει να είναι κυρίαρχη στις περισσότερες γαλακτοκομικές φυλές βοοειδών (Farrell *et al.*, 2004). Η κ-CN A-1P διαφέρει από τη B παραλλαγή στην αντικατάσταση ενός υπολείμματος Thr από ένα υπόλειμμα Ile στη θέση 136, το οποίο επηρεάζει τη γλυκοζυλίωση, και ενός υπολείμματος Asp από ένα υπόλειμμα Ala στη θέση 148 (Ng-Kwai-Hang & Grosclaude, 1992). Οι αντικαταστάσεις και των δύο αμινοξέων απαντούν στην περιοχή του μακροπεπτιδίου

(106-169 κ-CN) που προκύπτει από την υδρόλυση της κ-CN από τη χυμοσίνη. Στο είδος *Bos Indicus* (ασιατική αγελάδα), έχουν βρεθεί επιπλέον οι παραλλαγές C και E, οι οποίες διαφέρουν από την παραλλαγή A ως προς την αντικατάσταση της His από την Arg στη θέση 97 και την αντικατάσταση της Gly από τη Ser στη θέση 155 (Ng-Kwai-Hang & Grosclaude, 1992). Σε pH 8,6, ηλεκτροφόρησης με αλκαλικό pH (8,6), υπό την παρουσία μερκαπτοαιθανόλης και ουρίας, και οι δύο παραλλαγές έδωσαν πολλαπλές ζώνες με την A παραλλαγή να παρουσιάζει τη μεγαλύτερη κινητικότητα (Eigel *et al.*, 1984). Η C κ-CN, βρίσκεται στο επίπεδο της A κ-CN, και συγκεκριμένα ελαφρώς πάνω από αυτή, η C παρακ-CN κινείται πιο αργά από την A και B παρακ-CN, ενώ ο ρυθμός κίνησης των A και E κ-CN είναι σχεδόν παρόμοιος σε pH 8,6 (Miranda *et al.*, 1993).

Στον Πίνακα 1-7 παρουσιάζονται οι διαφορές μεταξύ των γενετικών παραλλαγών της αγελαδινής κ-καζεΐνης.

**Πίνακας 1-7:** Θέσεις και διαφορές αμινοξέων στις γενετικές παραλλαγές της αγελαδινής κ-καζεΐνης (Πηγή: Farrell *et al.*, 2004)

Πρωτεΐνη	Παραλλαγή	Θέση και αμινοξύ στην πρωτεΐνη						
		10	97	104	135	136	148	155
κ-CN (169 αμινοξέα)	A	Arg	Arg	Ser	Thr	Thr	Asp	Ser
	B					Ile	Ala	
	C		His					
	E							Gly
	F <sup>1</sup>						Val	
	F <sup>2</sup>	His				Ile	Ala	
	G <sup>1</sup>		Cys			Ile	Ala	
	G <sup>2</sup>						Ala	
	H					Ile		
	I				Ala			
J					Ile	Ala	Arg	

Οι νέες γενετικές παραλλαγές έχουν χαρακτηριστεί ως F<sup>1</sup>, F<sup>2</sup>, G<sup>1</sup>, G<sup>2</sup>, H, I και J. Η παραλλαγή κ-CN F<sup>1</sup> διαφέρει από την κ-CN A στην αντικατάσταση της Asp στη θέση 148 από τη Val ενώ οι παραλλαγές κ-CN F<sup>2</sup> και G<sup>1</sup> διαφέρουν από την κ-CN B στην αντικατάσταση της Arg στη θέση 10 από την His και της Arg στη θέση 97 από την Cys, αντιστοίχα. Οι παραλλαγές κ-CN G<sup>2</sup>, που βρέθηκε στο είδος *Bos grunniens*, H και I διαφέρουν από την κ-CN A στην αντικατάσταση της Asp στη θέση 148 από την Ala, της Thr στη θέση 136 από την Ile και της Ser στη θέση 104 από την Ala, αντιστοίχα. Τέλος, η παραλλαγή κ-CN J, που βρέθηκε στο είδος *Bos Taurus*, φαίνεται ότι προέκυψε από την

παραλλαγή της κ-CN Β με αντικατάσταση της Ser στη θέση 155 από την Arg. Είναι ενδιαφέρον να παρατηρήσουμε ότι από τις 11 γνωστές γενετικές παραλλαγές οι 8 παρουσιάζονται στην περιοχή του γλυκομακροπεπτιδίου, σχετικά μακριά από το δεσμό που υδρολύει η χυμοσίνη. Αυτές οι μεταλλάξεις κομούνται μεταξύ των θέσεων 136-155. Στις παραλλαγές C, F<sup>2</sup> και G<sup>1</sup> οι διαφορές παρατηρούνται στην περιοχή της παρα-κ-καζεΐνης (Farrell *et al.*, 2004).

Στον Πίνακα 1-8 παρουσιάζονται τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των καζεϊνών του αγελαδινού γάλακτος

**Πίνακας 1-8:** Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των καζεϊνών του αγελαδινού γάλακτος (Πηγή: Walstra *et al.*, 2006)

Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά	Καζεΐνες			
	α <sub>s1</sub> -	α <sub>s2</sub> -	β-	κ-
Υπολείμματα προλίνης / mole	17	10	35	20
Υπολείμματα κυστεΐνης / mole	0	2	0	2
Αναλογία %	36	10	34	13
Διαλυτότητα				
☛ 0-4 °C	αδιάλυτη	αδιάλυτη	διαλυτή	διαλυτή
☛ 20-25 °C	αδιάλυτη	αδιάλυτη	αδιάλυτη	διαλυτή
Αμινοξέα (αριθμός / μόριο)	199	207	209	169
Μοριακό βάρος	23.600	25.200	24.000	19.000
Φορτίο σε pH 6,6	-20,9	-14,8	-12,3	-3,0
Ευαισθησία				
☛ στη χυμοσίνη	+	-	+	+++
☛ στο Ca	++	+++	+	-
Υδατάνθρακες	-	-	-	+
Υπολείμματα κυστεΐνης	-	2	-	2
Φωσφοσερίνες	8-9	10-13	5	1-2

## 1.6 Οι καζεΐνες του πρόβειου γάλακτος

Οι καζεΐνες (α<sub>s1</sub>-, α<sub>s2</sub>-, β- και κ-CN) είναι οι κύριες πρωτεΐνες στο πρόβειο γάλα (αποτελούν το 76-83% της ολικής πρωτεΐνης). Η ετερογένεια τους καθορίζεται είτε από την παρουσία γενετικών παραλλαγών είτε από άλλους παράγοντες όπως είναι το διακριτό επίπεδο φωσφορυλίωσης, οι διαφορές στην έκταση της γλυκοζυλίωσης του κλάσματος της κ-CN και η συνύπαρξη πρωτεϊνών με αλυσίδες διαφορετικού μήκους (Park *et al.*, 2007).

Οι [Chianese et al. \(1996\)](#) με τη βοήθεια βελτιωμένων ηλεκτροφορητικών τεχνικών, σε συνδυασμό με ανοσοβιολογικές μεθόδους και φασματομετρία μαζών ταυτοποίησαν πέντε πολυμορφικές παραλλαγές της πρόβειας  $\alpha_{s1}$ -καζεΐνης, τις Α-Ε. Με ισοηλεκτρικό εστιασμό παρατηρείται προοδευτική αύξηση στα ισοηλεκτρικά σημεία των παραλλαγών της από την Α στην Ε ([Amigo et al., 2000](#)). Η παραλλαγή  $\alpha_{s1}$ -CN C διαφέρει από την παραλλαγή  $\alpha_{s1}$ -CN A στην αντικατάσταση του αμινοξέος Ser από το αμινοξύ Pro στη θέση 13, που καθορίζει την απώλεια της φωσφορικής ομάδας στην περιοχή 12 της πεπτιδικής αλυσίδας ([Park et al., 2007](#)). Μια επιπλέον αντικατάσταση, αυτή της SerP από την Asn στη θέση 68, προκαλεί την απώλεια και των δύο φωσφορικών ομάδων στα υπολείμματα Ser<sub>64</sub> και Ser<sub>66</sub> στην παραλλαγή  $\alpha_{s1}$ -CN D ([Amigo et al., 2000](#)). Η τελευταία είναι η γενετική παραλλαγή που παρουσιάζει τη μικρότερη φωσφορυλίωση. Ο μικρότερος αριθμός φωσφορικών ομάδων εξηγεί το μεγαλύτερο χρόνο μετανάστευσης στην τριχοειδή ηλεκτροφόρηση σε όξινο pH και την αργή μετανάστευση σε αλκαλική πηκτή πολυακρυλαμιδίου ([Park et al., 2007](#)). Όσον αφορά στην κατανομή των παραλλαγών της  $\alpha_{s1}$ -CN μεταξύ των διαφορετικών φυλών, η παραλλαγή D είναι η πιο γνωστή. Έχει βρεθεί σε πολλές φυλές με εξαιρετικά χαμηλή συχνότητα. Η παραλλαγή C είναι αυτή που έχει μελετηθεί συχνότερα σε όλες τις φυλές και τις διασταυρώσεις, ενώ η σπανιότερη παραλλαγή E έχει βρεθεί μόνο σε μερικές φυλές προβάτων ([Amigo et al., 2000](#)).

Όσον αφορά στην πρόβεια  $\alpha_{s2}$ -καζεΐνη, έχει αναφερθεί η ύπαρξη δύο γενετικών παραλλαγών, των  $\alpha_{s2}$ -CN A και  $\alpha_{s2}$ -CN B, που σε επίπεδο αμινοξέων διαφέρουν μεταξύ τους στην αντικατάσταση των αμινοξέων Asn<sub>49</sub> και Lys<sub>200</sub> από τα αμινοξέα Asp<sub>49</sub> και Asn<sub>200</sub> αντίστοιχα. Σε πρωτεϊνικό επίπεδο, ανακαλύφθηκε μια παραλλαγή της στη φυλή Manchega. Αυτή η παραλλαγή χαρακτηρίστηκε από δύο επιπλέον ζώνες με υψηλή ανοδική κινητικότητα σε αλκαλική και όξινη ηλεκτροφόρηση, που είναι ενδεικτικό του μικρότερου M.B. σε σχέση με αυτό της κοινής  $\alpha_{s2}$ -καζεΐνης. Το γεγονός αυτό επαληθεύτηκε από την SDS-PAGE του γρήγορου κλάσματος της  $\alpha_{s2}$ -CN. Δείγματα που περιείχαν αυτή τη γρήγορη παραλλαγή, με τριχοειδή ηλεκτροφόρηση, έδωσαν μια επιπλέον κορυφή με μικρότερο χρόνο μετακίνησης από εκείνης της κοινής  $\alpha_{s2}$ -CN. Επίσης η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση επέδειξε μεγάλη ετερογένεια της τελευταίας, αφού εκτός από τις 2 κύριες κορυφές, παρατηρήθηκαν και άλλες μικρότερες. Αυτή η ετερογένεια μπορεί να οφείλεται στο διαφορετικό βαθμό φωσφορυλίωσης της πολυπεπτιδικής αλυσίδας ([Amigo et al., 2000](#)).



Η πρόβεια **β-καζεΐνη** αποτελείται από 209 αμινοξέα και παρατηρείται μη γενετικός πολυμορφισμός που οφείλεται στο διαφορετικό βαθμό φωσφορυλίωσης, με 6 και 5 φωσφορικές ομάδες για τη β<sub>1</sub> και β<sub>2</sub> αντίστοιχα. Έχουν περιγραφεί τρεις γενετικές παραλλαγές, οι A, B και C. Η μόνη διαφορά στην αλληλουχία μεταξύ των παραλλαγών A και C είναι η αντικατάσταση του αμινοξέος Glu στη θέση 2 στην παραλλαγή A από το αμινοξύ Gln στην παραλλαγή C (Park *et al.*, 2007). Η παρουσία πολύ-φωσφορυλιωμένων μορφών της β-CN μπορεί να επηρεάζει τη σταθερότητα του μικκυλίου όπως επίσης και τη διαθεσιμότητα και την κατανομή του Ca στο γάλα. Αυτό οφείλεται στην ικανότητα των μορφών της β-CN, που είναι φωσφορυλιωμένες σε διαφορετικό βαθμό, να δεσμεύουν διαφορετικές ποσότητες Ca. Από την άλλη πλευρά, το στάδιο της γαλακτοπαραγωγής, η υγεία και η ηλικία καθώς επίσης και η διαθεσιμότητα P, παίζουν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό του επιπέδου φωσφορυλίωσης της β-CN σε μεμονωμένα γάλατα (Amigo *et al.*, 2000).

Η **κ-καζεΐνη** αποτελείται από 171 υπολείμματα αμινοξέων. Απομονώθηκε με ηλεκτροφόρηση σε αλκαλικό pH και απέδωσε 5 ζώνες της ίδιας σύστασης αμινοξέων αλλά με διαφορετικό βαθμό γλυκοζυλίωσης, με αποτέλεσμα τις διαφορετικές ηλεκτροφορητικές κινητικότητες. Το ίδιο αποτέλεσμα προέκυψε όταν τα δείγματα αναλύθηκαν με ισοηλεκτρικό εστιασμό και τριχοειδή ηλεκτροφόρηση (Amigo *et al.*, 2000). Δεν έχουν βρεθεί γενετικές παραλλαγές (Moioli *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2007), αλλά παρατηρείται μη γενετικός πολυμορφισμός λόγω του διαφορετικού βαθμού γλυκοζυλίωσης σε 3 διαφορετικά υπολείμματα Thr (θέσεις 135, 137 και 138) και φωσφορυλίωσης σε δύο περιοχές, Ser P<sup>151</sup> και Ser P<sup>168</sup> (Park *et al.*, 2007). Η γλυκοζυλίωση είναι μια σύνθετη μεταμεταφραστική τροποποίηση που παρατηρείται στα υπολείμματα Asn και/ή Ser/Thr. Η κ-CN μεταφέρει Ο-συζευγμένα γλυκάνια σε διαφορετικά υπολείμματα Ser. Οι αλυσίδες των ολιγοσακχαριτών παρουσιάζουν δομική ετερογένεια που επηρεάζει τη δεκτικότητα της κ-CN στα πηκτικά ένζυμα. Επιπλέον έχουν αναφερθεί 3 πολύ-φωσφορυλιωμένες μορφές κ-CN (Amigo *et al.*, 2000).

Τέλος το κλάσμα της ολικής καζεΐνης περιέχει επίσης τις **γ-καζεΐνες**, προϊόν πρωτεόλυσης των β-CN από την πλασμίνη (Park *et al.*, 2007).

### 1.6.1 Επίδραση του γενετικού πολυμορφισμού των καζεϊνών στις τεχνολογικές ιδιότητες του πρόβειου γάλακτος

Στο πρόβειο γάλα ενδιαφέρον παρουσιάζει ο πολυμορφισμός της  $\beta$ -LG και της  $\alpha_{s1}$ -CN (Amigo *et al.*, 2000). Πιο συγκεκριμένα από τις γενετικές παραλλαγές της πρόβειας  $\alpha_{s1}$ -CN, μόνο η D παραλλαγή έχει επιβεβαιωθεί ότι είναι επιζήμια για το πρόβειο γάλα αφού έχει συσχετιστεί με μειωμένη περιεκτικότητα σε καζεΐνη και φτωχές ιδιότητες πήξης. Ο αλληλόμορφος D είναι πολύ σπανιος με συχνότητες που κυμαίνονται μεταξύ 0 και 0,03 γεγονός που δεν του παρέχει την ευκαιρία επιλογής (Amigo *et al.*, 2000; Barillet, 2007).

Έχει βρεθεί ότι ο πιο κοινός γονότυπος σε ομόζυγη κατάσταση για την  $\alpha_{s1}$ -CN είναι οι παραλλαγές C και D. Επίσης μελετήθηκε η συσχέτιση μεταξύ των γονοτύπων CC, CD και DD και των τεχνολογικών ιδιοτήτων του γάλακτος (Moioli *et al.*, 2007). Γενικά, τα δείγματα γάλακτος που περιέχουν την CC  $\alpha_{s1}$ -CN, παρουσιάζουν βέλτιστη τεχνολογική συμπεριφορά λόγω μεγαλύτερης ποσότητας καζεΐνης (Amigo *et al.*, 2000). Πιο συγκεκριμένα, το CC γάλα είχε μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε καζεΐνη από τα γάλατα CD και DD, είχε μεγαλύτερη αναλογία πρωτεΐνης/λίπους και καζεϊνικά μικκώλια με μικρότερη διάμετρο. Το DD γάλα είχε αξιοσημείωτα μικρότερη περιεκτικότητα σε  $\alpha_{s1}$ -CN. Οι κύριες διαφορές όμως παρουσιάστηκαν στο σχηματισμό του πήγματος. Πειραματικές τυροκομήσεις έδειξαν ότι το γάλα CC είχε καλύτερες ιδιότητες πήξης από τα γάλατα CD και DD. Τυριά της 1<sup>ης</sup> ημέρας και πλήρως ώριμα παρουσίασαν διαφορετική αναλογία λίπους/ξηράς ουσίας και διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα της  $\alpha_{s1}$ -CN, χαρακτηριστικά που ήταν χαμηλότερα για το τυρί DD (Moioli *et al.*, 2007).

Όσον αφορά στον πολυμορφισμό της  $\beta$ -LG, φαίνεται ότι επηρεάζει θετικά την περιεκτικότητα σε  $\beta$ -LG ( $\beta$ -LG A > B) και αρνητικά την ποσότητα της καζεΐνης. Τέλος για την παραγωγή τυριού, γάλα με κ-CN B είναι προτιμότερο από γάλα με κ-CN-A (Amigo *et al.*, 2000).

## 1.7 Οι καζεΐνες του αίγειου γάλακτος

Οι κύριες καζεΐνες του αίγειου γάλακτος είναι οι ίδιες με αυτές του πρόβειου και του αγελαδινού (Park *et al.*, 2007). Η συσταση όμως του αίγειου γάλακτος διαφέρει μεταξύ των διαφόρων φυλών και είναι γνωστό ότι το γάλα των Ελληνικών αυτόχθονων φυλών

περιέχει περισσότερο λίπος και πρωτεΐνη (κυρίως καζεΐνη) σε σχέση με το γάλα των βελτιωμένων διεθνών φυλών. Αν και η απόδοση σε γάλα των αυτόχθονων φυλών είναι χαμηλή, το γάλα αυτό φαίνεται καταλληλότερο για τυροκόμηση με τη χρήση πουτιάς, ενώ το γάλα των βελτιωμένων φυλών χρησιμοποιείται κυρίως για την παραγωγή φρέσκων τυριών όξινης πήξης (Μοάτσου *et al.*, 2008).

Το γονίδιο της  $\alpha_{s1}$ -καζεΐνης είναι ισχυρά πολυμορφικό και τα διαφορετικά αλληλόμορφα επηρεάζουν την περιεκτικότητα του αίγιου γάλακτος σε πρωτεΐνη. Κατά μέσο όρο η  $\alpha_{s1}$ -CN αντιπροσωπεύει το 10% της ολικής καζεΐνης, αλλά μπορεί να ποικίλλει από 0-25% ανάλογα με τον γονότυπο του ζώου (Jordana *et al.*, 1996). Μελέτες για τον πολυμορφισμό της αίγιας  $\alpha_{s1}$ -CN αποκάλυψαν την ύπαρξη 14 αλληλόμορφων γονιδίων τα οποία αντιστοιχούν σε 7 ηλεκτροφορητικές παραλλαγές. Οι διαφορετικοί ρυθμοί σύνθεσης της συνδέονται με τις διαφορετικές παραλλαγές (Roncada *et al.*, 2002).

Οκτώ από τους αλληλόμορφους που έχουν ταυτοποιηθεί στο αίγιο γάλα (A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>4</sub>, C, H και L) σχετίζονται με υψηλό ποσοστό παραγωγής της  $\alpha_{s1}$ - (3.5g/l γάλακτος), δύο (E και I) με ενδιάμεσο ποσοστό (1.1-1.7g/l γάλακτος) και δύο (F και G) με χαμηλό ποσοστό (0,45g/l γάλακτος). Οι αλληλόμορφοι O<sub>1</sub> και O<sub>2</sub> χαρακτηρίζονται ως μηδενικοί και δεν παράγουν  $\alpha_{s1}$ -CN στο αίγιο γάλα (Moatsou *et al.*, 2004d; Park *et al.*, 2007). Οι Marletta *et al.* (2007) και οι Moatsou *et al.* (2006, 2007) αναφέρουν επιπλέον την ύπαρξη των αλληλόμορφων M (“ισχυρό”), D (“ενδιάμεσο”) και N (μηδενικό). Γάλα που παράγεται από αίγες με διαφορετικούς γονότυπους, παρουσιάζει διακύμανση στην ποσότητα της  $\alpha_{s1}$ -CN που ποικίλλει από 7 g · L<sup>-1</sup>, για τις αίγες που φέρουν ομόζυγα ισχυρά αλληλόμορφα, έως 0,9 g · L<sup>-1</sup> και 0 g · L<sup>-1</sup> για τα αδύναμα και τα μηδενικά ομόζυγα αλληλόμορφα, αντίστοιχα (Marletta *et al.* 2007). Οι ισχυροί αλληλόμορφοι δίνουν μεγαλύτερη απόδοση σε τυρί αφού η ποσότητα των ολικών καζεϊνών στο αίγιο γάλα συσχετίζεται θετικά με την ποσότητα της  $\alpha_{s1}$ -CN (Roncada *et al.* 2002).

Επομένως ο γονότυπος της  $\alpha_{s1}$ -καζεΐνης επηρεάζει την ολική καζεϊνοπεριεκτικότητα στο αίγιο γάλα αφού επηρεάζει το επίπεδο έκκρισης της. Το μειωμένο επίπεδο έκφρασης της δεν αντισταθμίζεται από αύξηση στα επίπεδα των άλλων καζεϊνών. Επίσης υπάρχουν σημαντικές διαφορές στα μη πρωτεϊνικά κλάσματα, τη λακτόζη, το ολικό Ca και την περιεκτικότητα σε P μεταξύ των γαλάτων με υψηλή και χαμηλή περιεκτικότητα σε  $\alpha_{s1}$ -καζεΐνη. Η κατανομή του μεγέθους των μικκυλίων έδειξε ότι γάλατα με χαμηλή περιεκτικότητα σε  $\alpha_{s1}$ -καζεΐνη χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερα μικκύλια απ’ ότι τα γάλατα με υψηλή περιεκτικότητα. Η αναλογία της κ-καζεΐνης αυξήθηκε με τη μείωση της

διαμέτρου των μικκυλίων. Το αντίθετο παρατηρήθηκε για τις β- και α<sub>s2</sub>-καζεΐνες. Ωστόσο η περιεκτικότητα σε α<sub>s1</sub>-καζεΐνη μειώθηκε με τη μείωση του μεγέθους των μικκυλίων σε γάλατα με τις παραλλαγές B/E, ενώ στην παραλλαγή F υπήρξε μια μικρή αύξηση στις σχετικές ποσότητες της α<sub>s1</sub>-καζεΐνης στα μικρότερα μικκύλια. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η α<sub>s1</sub>-καζεΐνη, από την οποία απουσιάζει ένα σύνολο υπολειμμάτων φωσφοσερίνης, μπορεί να εντοπίζεται στην επιφάνεια των μικκυλίων. Η αναλογία Ca/P στα μικκύλια παρέμεινε σταθερή (Tziboula & Horne, 1999).

Οι Moatsou *et al.* (2004d, 2008) αναφέρουν ότι οι αλληλόμορφοι A και B που σχετίζονται με υψηλή περιεκτικότητα του αίγιου γάλακτος σε α<sub>s1</sub>-καζεΐνη, κυριαρχούν στις τοπικές φυλές της Μεσογείου και της Αφρικής, ενώ στη Γαλλία και την Ισπανία το “ενδιάμεσο” αλληλόμορφο E συναντάται πιο συχνά. Οι Γαλλικές και οι φυλές που έχουν εξελιχθεί σε διεθνείς παρουσιάζουν υψηλή συχνότητα των ελαττωματικών αλληλόμορφων F, E και O. Πιο συγκεκριμένα στις φυλές Alpine και Saanen ο αλληλόμορφος A έχει συχνότητα 10% ενώ οι αλληλόμορφοι E και F έχουν συχνότητα 40% (Moioli *et al.*, 1998).

Στον Πίνακα 1-9 παρουσιάζονται οι γενετικές παραλλαγές της αίγιας α<sub>s1</sub>-καζεΐνης καθώς και τα διαφορετικά αμινοξέα σε κάθε μία από αυτές.

**Πίνακας 1-9:** Θέσεις και διαφορές αμινοξέων στις γενετικές παραλλαγές της αίγιας α<sub>s1</sub>-καζεΐνης (Πηγή: Marletta *et al.*, 2007)

Πρωτεΐνη	Παραλλαγή	Θέση και αμινοξύ στην πρωτεΐνη										
		1	8	14-26	16	59-69	59-95	66	77	90	100	195
α <sub>s1</sub> -CN (199 αμινοξέα)	A								Gln			
	B <sub>1</sub>	Arg	His		Leu			Ser	Glu	Arg	Arg	Thr
	B <sub>2</sub>				Pro							
	B <sub>3</sub>				Pro						Lys	
	B <sub>4</sub>				Pro						Lys	
	C		Ile		Pro						Lys	Ala
	D				Pro	Απαλοιφή						
	E				Pro						Lys	Ala
	F				Pro		Απαλοιφή					
	G			Απαλοιφή					Gln			
	H	Lys							Gln			
	I	δεν έχει χαρακτηριστεί										
	L					Pro					His	
M								Leu				

Για την  $\alpha_2$ -καζεΐνη στο αίγιο γάλα, έχουν ταυτοποιηθεί επτά αλληλόμορφοι, που παρουσιάζουν τρία διαφορετικά ποσοτικά επίπεδα σύνθεσης (Marletta *et al.* 2007). Τα αλληλόμορφα A (πρωτεΐνη αναφοράς), B, C, E, και F αποδίδουν κανονική περιεκτικότητα σε  $\alpha_2$ -CN (2,5g/1 γάλακτος) (Trujillo *et al.*, 2000a), και χαρακτηρίζονται από την αντικατάσταση ενός μόνο αμινοξέος (Marletta *et al.* 2007). Το D αλληλόμορφο προκαλεί μειωμένη περιεκτικότητα σε  $\alpha_2$ -CN (Trujillo *et al.*, 2000a). Πρόκειται για ένα σπάνιο ελαττωματικό αλληλόμορφο που αποτελείται από 205 υπολείμματα αμινοξέων και χαρακτηρίζεται από την απάλειψη των υπολειμμάτων 122-124 (Pro-Thr-Val) και την αντικατάσταση της Thr στη θέση 121 από την Asn, σε σχέση με την παραλλαγή A. Τέλος, το O αλληλόμορφο αποτελείται από 109 υπολείμματα αμινοξέων και δίνει μη ανιχνεύσιμα επίπεδα αυτής της καζεΐνης στο αίγιο γάλα (Marletta *et al.* 2007).

Στον Πίνακα 1-10 παρουσιάζονται οι γενετικές παραλλαγές της αίγιας  $\alpha_2$ -καζεΐνης καθώς και τα διαφορετικά αμινοξέα σε κάθε μία από αυτές.

**Πίνακας 1-10:** Θέσεις και διαφορές αμινοξέων στις γενετικές παραλλαγές της αίγιας  $\alpha_2$ -καζεΐνης (Πηγή: Marletta *et al.*, 2007)

Πρωτεΐνη	Παραλλαγή	Θέση και αμινοξύ στην πρωτεΐνη					
		7	64	121	122-124	167	193
$\alpha_2$ -CN (208 αμινοξέα)	A	Val	Glu	Thr		Lys	Pro
	B		Lys				
	C					Ile	
	D			Asn	Διαγραφή		
	E					Ile	Arg
	F	Ile					
	O						
	(109 αμινοξέα)						

Η αίγια  $\beta$ -καζεΐνη, αντιστοιχεί ποσοτικά στο κύριο κλάσμα των καζεϊνών του αίγιου γάλακτος (Jandal, 1996, Moiola *et al.*, 1998). Αποτελείται από δύο συστατικά ίδιου M.B, παρουσιάζει δύο επίπεδα φωσφορυλίωσης (5 και 6) (Trujillo *et al.*, 2000a) -αν και έχουν αναφερθεί και άλλες μορφές (3P και 4P) (Marletta *et al.* 2007)- περιλαμβάνει 207 αμινοξέα και παρουσιάζει ομολογία 90% με την αγελαδινή παραλλαγή A<sup>2</sup> (Trujillo *et al.*, 2000a). Ο πολυμορφισμός της έχει μελετηθεί και έχουν βρεθεί πολλοί αλληλόμορφοι που εκφράζουν διαφορετικά επίπεδα περιεκτικότητας στο αίγιο γάλα. Αυτή η ετερογένεια εξαρτάται από την πολλαπλή φωσφορυλίωση της πεπτιδικής αλυσίδας, αλλά μερικά είδη

αίγειου γάλακτος μπορεί να στερούνται πλήρως αυτής της πρωτεΐνης. Μελέτες σχετικές με τη συμπεριφορά κατά την ενζυμική πήξη μεμονωμένων γαλάτων χωρίς β-CN, έδειξαν ότι απαιτείται μεγαλύτερος χρόνος (15-25 min) απ' ό τι στο κανονικό γάλα (4-7 min) και παρατηρήθηκε δημιουργία ασθενέστερου πηγματος (Chianese *et al.*, 1993; Park *et al.*, 2007).

Οι γενετικές της παραλλαγές έχουν χαρακτηριστεί ως A (πρωτεΐνη αναφοράς), A1 ("σιωπηλό" αλληλόμορφο), O', O, B, C, D και E (Πίνακας 1-11). Το αλληλόμορφο E χαρακτηρίστηκε πρόσφατα από τους Moatsou *et al.* (2007). Τα αλληλόμορφα O' και O, είναι μηδενικά και είναι υπεύθυνα για τη απουσία ή για τη μειωμένη ποσότητα (50%) της β-CN στο αίγιο γάλα. Το αλληλόμορφο C διαφέρει από το A στην αντικατάσταση της Ala στη θέση 177 από τη Val και το D διαφέρει από το C στην αντικατάσταση της Val στη θέση 207 από την Asn. Τέλος, το αλληλόμορφο E διαφέρει από το A στην αντικατάσταση της Ser στη θέση 166 από την Tyr και φαίνεται ότι βρίσκεται συγκεκριμένα στις αίγες της φυλής Frisa (Marletta *et al.* 2007).

**Πίνακας 1-11:** Θέσεις και διαφορές αμινοξέων στις γενετικές παραλλαγές της αίγιας β-καζεΐνης (Πηγή: Marletta *et al.*, 2007; Moatsou *et al.*, 2007)

Πρωτεΐνη	Παραλλαγή	Θέση και αμινοξύ στην πρωτεΐνη		
		166	177	207
$\alpha_{s2}$ -CN (207 αμινοξέα)	A	Ser	Ala	Val
	O'	Δεν έχει χαρακτηριστεί		
	(166 αμινοξέα)			
	B			
	C		Val	
	D		Val	Asn
E	Tyr			

Η αίγια **κ-καζεΐνη** περιέχει 171 υπολείμματα αμινοξέων, 2 φωσφορικές ομάδες και παρουσιάζει ομολογία 84% με την αντίστοιχη αγελαδινή -την παραλλαγή A. Φαίνεται ότι αποτελείται, όπως και η πρόβεια και η αγελαδινή, από πολλά κλάσματα που έχουν όμοιες πεπτιδικές αλυσίδες και διαφορετική περιεκτικότητα υδατανθράκων (Trujillo *et al.*, 2000a). Πρόσφατα ο αριθμός των αλληλόμορφων που ταυτοποιήθηκαν αυξήθηκε σε 16, από τους οποίους οι 13 αντιστοιχούν σε παραλλαγές πρωτεϊνών και 3 σε "σιωπηλές" μεταλλάξεις (Moioli *et al.*, 2007). Οι γενετικές της παραλλαγές έχουν χαρακτηριστεί ως A (πρωτεΐνη αναφοράς), B, C, D, E, F και G. Οι νέες παραλλαγές F και G βρέθηκαν μόνο σε Ιταλικές φυλές. Μεταξύ των 7 γενετικών παραλλαγών που έχουν χαρακτηριστεί, μόνο η B βρέθηκε

σε όλους του πληθυσμούς που μελετήθηκαν και είναι το κυρίαρχο αλληλόμορφο, εκτός από τη φυλή Canaria, όπου το αλληλόμορφο A είναι πιο συχνό. Η διαφορά μεταξύ των παραλλαγών F και G περιλαμβάνει την αντικατάσταση ενός μόνο αμινοξέος, της Val από την Ile, στη θέση 65 της πρωτεΐνης. Η παραλλαγή F παρουσιάζει τα αμινοξέα Val και Pro στις θέσεις 65 και 159 αντίστοιχα, συνδυασμός που δεν έχει παρατηρηθεί στις παραλλαγές που έχουν ήδη αναφερθεί (Yahyaoui et al. 2003). Επιπλέον έχουν χαρακτηριστεί και οι αλληλόμορφοι H, I, J, K, L και M. (Marletta et al., 2007)

Στον Πίνακα 1-12 παρουσιάζονται οι γενετικές παραλλαγές της αίγαιας κ-καζεΐνης καθώς και τα διαφορετικά αμινοξέα σε κάθε μία από αυτές.

**Πίνακας 1-12:** Θέσεις και διαφορές αμινοξέων στις γενετικές παραλλαγές της αίγαιας κ-καζεΐνης (Πηγή: Yahyaoui et al., 2003; Marletta et al., 2007)

Πρωτεΐνη	Παραλλαγή	Θέση και αμινοξύ στην πρωτεΐνη									
		44	53	61	65	90	119	145	156	159	
κ-CN (171 αμινοξέα)	A	Gln	Asn	Tyr	Val	Asp	Val	Val	Ala	Ser	
	B						Ile				
	C				Asp		Ile		Val	Pro	
	D	Arg			Ile		Ile			Pro	
	E					Gly	Ile				
	F						Ile			Pro	
	G				Ile		Ile			Pro	
	H		Ser				Ile				
	I					Ile	Ile				
	J			Cys			Ile				
	K	Arg					Ile				
	L					Ile	Ile			Pro	
	M						Asn	Ile	Ala	Pro	

Οι Marletta et al. (2007) αναφέρουν ότι οι παραλλαγές που βρέθηκαν στο είδος *Capra hircus*, διαχωρίζονται σε δύο ομάδες ανάλογα με το ισοηλεκτρικό τους σημείο (IP): A<sup>IEF</sup> (A, B, B', B'', C, C', F, G, H, I, J, L - IP = 5.29) και B<sup>IEF</sup> (D, E, K, M - IP = 5.66). Οι παραλλαγές B', B'' και C' είναι "σιωπηλά" αλληλόμορφα. Παρατηρήθηκε ότι η ομάδα B<sup>IEF</sup> των γενετικών παραλλαγών της κ-CN σχετίζεται με την υψηλότερη περιεκτικότητα καζεΐνης στο γάλα απ'ότι η ομάδα A<sup>IEF</sup>.

### 1.7.1 Επίδραση του γενετικού πολυμορφισμού των καζεϊνών στις τεχνολογικές ιδιότητες του αίγειου γάλακτος

Ο εκτεταμένος γενετικός πολυμορφισμός των καζεϊνών του αίγειου γάλακτος και η συσχέτισή του με τις τεχνολογικές του ιδιότητες έχει μελετηθεί, κυρίως για την  $\alpha_{s1}$ -CN (Raynal-Ljutovac *et al.*, 2005). Ο πολυμορφισμός της αίγειας  $\alpha_{s1}$ -καζεΐνης (AA>EE>FF) έχει σημαντική επίδραση στην περιεκτικότητα του γάλακτος σε καζεΐνη, στην ολική πρωτεΐνη ανά γαλακτική περίοδο, στη λιποπεριεκτικότητα του γάλακτος καθώς επίσης και στις ιδιότητες τυροκόμησης, όπως είναι η συνεκτικότητα και ο ρυθμός σκλήρυνσης του πηγματος και στην τυροκομική απόδοση (Amigo *et al.*, 2000; Moatsou *et al.*, 2004d, 2007, 2008).

Στη Γαλλία κατά τη διάρκεια των τελευταίων 20 χρόνων έγινε επιλογή ζώων τα οποία κατείχαν τους ισχυρούς αλληλόμορφους της  $\alpha_{s1}$ -CN με αποτέλεσμα την αύξηση της περιεκτικότητας του αίγειου γάλακτος σε πρωτεΐνη (κυρίως καζεΐνη) και λίπος (αύξηση 5 g/l και 3 g/l αντίστοιχα). Η αύξηση αυτή είχε θετική επίδραση στην απόδοση του γάλακτος σε τυρί. Η σύσταση του γάλακτος έχει επίσης άμεση επίδραση στις ιδιότητες οξίνισης. Υψηλό ποσοστό πρωτεϊνών και αλάτων ευνοούν τη δράση των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Επίσης γάλα με υψηλή περιεκτικότητα κυρίως σε καζεΐνη παρουσιάζει ισχυρές ρυθμιστικές ιδιότητες (Raynal-Ljutovac *et al.*, 2005).

Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τη μελέτη της επίδρασης των αλληλόμορφων A, E και F της  $\alpha_{s1}$ -CN του αίγειου γάλακτος στις τεχνολογικές του ιδιότητες επιβεβαιώνουν ότι η περιεκτικότητα σε  $\alpha_{s1}$ -CN επηρεάζεται από τον γονότυπο (Feligini *et al.*, 2005b), με τον FF να παράγει τη μικρότερη ποσότητα. Γάλα από αίγες ομόζυγες για τον αλληλόμορφο A της  $\alpha_{s1}$ -CN παρουσιάζει υψηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη, καζεΐνη και λίπος και υψηλότερη αναλογία καζεΐνης/πρωτεΐνης από γάλα αιγών ομόζυγων για τον αλληλόμορφο F. Επομένως το γάλα AA υπερέχει του FF όσον αφορά στις τεχνολογικές ιδιότητες -συνεκτικότητα πηγματος, ικανότητα ενζυμικής πήξης και απόδοση σε τυρί. Αξιοσημειώτες είναι οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στην απόδοση πειραματικών τυριών (+7,4% μεταξύ των γαλάτων AA και EE και +14,8% μεταξύ των γαλάτων AA και FF). Αντίθετα η γεύση των τυριών EE και FF ήταν λιγότερο δριμεία από τη γεύση του τυριού AA, ίσως λόγω της διαφορετικής λιποπεριεκτικότητας και της μειωμένης λιπόλυσης, χαρακτηριστικά που σχετίζονται με τους διαφορετικούς αλληλόμορφους της  $\alpha_{s1}$ -CN. Πιθανότατα ο γονότυπος της  $\alpha_{s1}$ -CN επηρεάζει και την περιεκτικότητα του



αίγειου γάλακτος σε λίπος (Barillet, 2007; Moioli *et al.*, 2007). Επιπλέον οι Pierre *et al.* (1998) αναφέρουν ότι γάλα που προέρχεται από αίγες ομόζυγες για τον αλληλόμορφο O έχει μηδενική συγκέντρωση σε  $\alpha_{s1}$ -καζεΐνη. Όσον αφορά στις τεχνολογικές του ιδιότητες παρουσιάζει μικρότερο ρυθμό σκλήρυνσης και μικρότερη συνεκτικότητα πηγματος σε σχέση με πηγμα γάλακτος από αίγες ομόζυγες για τον αλληλόμορφο A. Ωστόσο δεν παρατηρήθηκε διαφοροποίηση στο χρόνο πήξης.

Τέλος, όσον αφορά στις αυτόχθονες Ελληνικές φυλές αιγών, υπάρχει μεγάλη αναλογία «δυνατών» γονοτύπων, περιορισμένη εμφάνιση των «μεσαίων» και πολύ περιορισμένη εμφάνιση μηδενικών παραλλαγών των καζεϊνών με αποτέλεσμα την πλούσια σύσταση των εν λόγω γαλάτων (Moatsou *et al.*, 2004d, 2007, 2008).

## **1.8 Διαφορές μεταξύ αγελαδινού, πρόβειου και αίγειου γάλακτος**

### **1.8.1 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά**

Το πρόβειο και το αίγιο γάλα χρησιμοποιούνται στη χώρα μας, σχεδόν στο σύνολό τους, για τυροκόμηση. Κατά συνέπεια οι καζεΐνες τους, που αποτελούν το σκελετό όλων των τυριών, παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Τα δύο είδη γάλακτος παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στην καζεΐνοπεριεκτικότητά τους από το αγελαδινό. Πέραν των ποσοστικών, οι καζεΐνες των τριών ειδών γάλακτος παρουσιάζουν και ποιοτικές διαφορές. Και στα τρία είδη υπάρχουν 4 κύρια καζεϊνικά κλάσματα, τα οποία χαρακτηρίζονται ως  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - και  $\kappa$ -καζεΐνες ανάλογα με την ταχύτητα που κινούνται κατά την ηλεκτροφόρησή τους σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Όμως η ταχύτητα κίνησης των αντίστοιχων κλασμάτων είναι διαφορετική. Τις μεγαλύτερες διαφορές παρουσιάζει το αγελαδινό γάλα, τα καζεϊνικά κλάσματα του οποίου, ιδιαίτερα η  $\alpha_{s1}$ -καζεΐνη, κινούνται ταχύτερα των αντίστοιχων του πρόβειου και του αίγειου γάλακτος. Μεταξύ των δύο τελευταίων οι διαφορές είναι πολύ μικρές και συχνά δυσδιάκριτες.

Πέραν αυτών και η δομή των μορίων των καζεϊνικών κλασμάτων τους διαφέρει. Περιέχουν διαφορετικό αριθμό αμινοξέων στο μόριο τους, ενώ και η πρωτοταγής δομή τους εμφανίζει διαφορές στην αλληλοχία τους. Η καζεΐνη υπάρχει στο πρόβειο και αίγιο γάλα, όπως και στο αγελαδινό σε μορφή μικκυλίων παρόμοιας δομής όμως οι διαστάσεις τους είναι είναι διαφορετικές. Αυτά του αίγειου γάλακτος είναι μεγαλύτερα, 255 nm έναντι 193 nm και 175 nm του πρόβειου και του αγελαδινού αντίστοιχα. Διαφορές

παρατηρούνται και στη δομή των μικκυλίων τους, στο βαθμό ενυδάτωσής τους και στην περιεκτικότητά τους σε ανόργανα συστατικά. Στα μικκύλια των καζεϊνών του αγελαδινού γάλακτος υπερέχει το άθροισμα των  $\alpha_{s1}$ - και  $\alpha_{s2}$ -καζεϊνών, ενώ σε αυτά του πρόβειου και αίγειου γάλακτος το άθροισμα των  $\beta$ - και  $\gamma$ -καζεϊνών. Στον Πίνακα 1-13 συνοψίζονται οι διαφορές στα μόρια των καζεϊνών και στα μικκύλια των τριών ειδών γάλακτος που έχουν αντανάκλαση στις τυροκομικές τους ιδιότητες.

**Πίνακας 1-13:** Χαρακτηριστικά των μορίων και μικκυλίων καζεϊνών αγελαδινού, πρόβειου και αίγειου γάλακτος (Πηγή: [Ανυφαντάκης, 2004](#); [Μοιάτσου, προσωπική επικοινωνία](#))

Χαρακτηριστικά	Γάλα		
	Αγελαδινό	Πρόβειο	Αίγειο
<b>1. Μόρια</b>			
✦ Υπολείμματα αμινοξέων / μόριο			
$\alpha_{s1}$ -καζεΐνη	199	199	199
$\alpha_{s2}$ -καζεΐνη	207	208	208
$\beta$ -καζεΐνη	209	207	207
$\kappa$ -καζεΐνη	169	171	171
✦ Αριθμός διαφορών υπολειμάτων αμινοξέων μεταξύ των ειδών γάλακτος			
	Αγελαδινό / Αίγειο	Αγελαδινό / Πρόβειο	Αίγειο / Πρόβειο
$\alpha_{s1}$ -καζεΐνη	25	24	6
$\alpha_{s2}$ -καζεΐνη	25	27	4
$\beta$ -καζεΐνη	21	-	-
$\kappa$ -καζεΐνη	27	25	8
<b>2. Μικκύλια</b>			
✦ Σχετική αναλογία καζεϊνών (% του συνόλου)			
$\alpha_{s1}$ - και $\alpha_{s2}$ -	48	36	27
$\beta$ - και $\gamma$ -	40	50	55
$\kappa$ -	12	14	18
✦ Μέση διάμετρος ( $\mu\text{m}$ )	175	202	255
✦ Βαθμός ενυδάτωσης	1,9	1,83	1,75
✦ Άλατα (mg / g)			
Ασβέστιο	29	33	36
Ανόργανος φώσφορος	12	13	15

### 1.8.2 Ιδιότητες πήξης

Οι [Raynal-Ljutovac et al. \(2007\)](#) αναφέρουν ότι το γάλα των μικρών μηρυκαστικών, λόγω της διαφορετικής βιοχημικής του σύνθεσης, έχει μικρή κολλοειδή σταθερότητα με αποτέλεσμα μικρότερους χρόνους ενζυμικής πήξης. Ο μηχανισμός της ενζυμικής και όξινης πήξης τους δεν παρουσιάζει διαφορές. Παρ' όλα αυτά, στην περίπτωση του αίγειου γάλακτος έχει διαπιστωθεί πήξη του με πυτιά στους 2-4°C, αν διατηρηθεί για μερικές ώρες, κάτι που δεν συμβαίνει στα δύο είδη γάλακτος. Η συμπεριφορά αυτή αποδίδεται στη μικρότερη σταθερότητα των μικκυλίων του αίγειου γάλακτος. Το πρόβειο γάλα είναι πολύ ευαίσθητο στη χυμοσίνη και εξ' αιτίας της μεγάλης αναλογίας β-/α<sub>s</sub>-CN η πήξη του πραγματοποιείται πολύ πιο γρήγορα απ' ότι στο αγελαδινό. Αυτός είναι και ο λόγος που για την πήξη αγελαδινού και πρόβειου γάλακτος στον ίδιο χρόνο απαιτείται μικρότερη ποσότητα χυμοσίνης στη δεύτερη περίπτωση. Επιπλέον δεν υπάρχει ανάγκη προσθήκης CaCl<sub>2</sub> κατά την τυροκόμηση ([Alichanidis & Polychroniadou, 1996](#)). Ωστόσο στην πράξη χρησιμοποιείται αφού θεωρείται ότι βελτιώνει τις τυροκομικές του ιδιότητες ([Ανυφαντάκης, 2004](#)). Η θέρμανση του πρόβειου γάλακτος σε υψηλές θερμοκρασίες, επιμηκύνει σε μικρό βαθμό το χρόνο πήξης του με πυτιά σε αντίθεση με το αγελαδινό. Ο ρυθμός σχηματισμού του πήγματος είναι επίσης υψηλός, αλλά η περίοδος της συναίρεσης είναι μεγαλύτερη ([Alichanidis & Polychroniadou, 1996](#)) γιατί η αυξημένη λιποπεριεκτικότητα έχει την τάση να μειώνει τη συστολή των μικκυλίων της καζεΐνης με αποτέλεσμα να μειώνεται η τάση αποβολής του ορού ([Γλωσσιώτης, 1984](#)). Αυτές οι διαφορές οφείλονται στη μεγαλύτερη περιεκτικότητα του πρόβειου γάλακτος σε καζεΐνη και κολλοειδές ασβέστιο ([Alichanidis & Polychroniadou, 1996](#)). Το τυρόπηγμα πρόβειου γάλακτος στραγγίζει λιγότερο σε σχέση με αυτό του αγελαδινού και του αίγειου γάλακτος ([Calvo & Balcones, 2000](#)), εξ' αιτίας της μεγαλύτερης περιεκτικότητας του σε ολικά στερεά, καζεΐνη και λίπος. Είναι πολύ πιο συνεκτικό, σε σχέση με το αγελαδινό, και αυτό το γεγονός επηρεάζει την περίοδο αλατίσματος που είναι μεγαλύτερη. Ωστόσο ο ρυθμός διάχυσης του αλατιού είναι μικρότερος ([Alichanidis & Polychroniadou, 1996](#)).

Το αίγειο γάλα, ιδιαίτερα αυτό που λαμβάνεται από βελτιωμένες φυλές, υστερεί σε τυροκομικές ιδιότητες σε σύγκριση με το αγελαδινό και ακόμη περισσότερο με το πρόβειο. Δίνει μικρότερη απόδοση σε τυρί, σε σχέση με το πρόβειο γάλα ([Kaminarides et al., 2000](#)) γιατί το τυρόπηγμα του είναι λιγότερο συνεκτικό και έχει την τάση να θρυμματίζεται και να δημιουργεί μικρά τεμαχίδια τα οποία χάνονται στο τυρόγαλα ([Ανυφαντάκης, 2004](#)). Η απώλεια πρωτεΐνης από το πήγμα αίγειου γάλακτος επηρεάζεται σημαντικά από τη

λιποπεριεκτικότητα (Calvo & Balcones, 2000). Αναφέρεται ότι η απόδοση σε τυρί Φέτα που παρασκευάστηκε από πρόβειο γάλα και από μίγμα 75% πρόβειου και 25% αίγειου γάλακτος ήταν 25,6% και 22,6% αντίστοιχα (Anifantakis & Moatsou, 2006). Οι Tsigkros *et al.* (2003) παρατήρησαν ότι η σκλήρυνση του τυριού σχετίζεται με την αύξηση του ποσοστού του αίγειου γάλακτος. Επιπλέον, το αίγειο γάλα στραγγίζει περισσότερο από το αγελαδινό και το πρόβειο με συνέπεια να δίδει τυριά με μικρότερη υγρασία. Τα παραπάνω εξηγούν και το γεγονός χρήσης του αίγειου γάλακτος περισσότερο στην παρασκευή τυριών στα οποία η πήξη επιτυγχάνεται κατά κύριο λόγο με βιολογική οξίνιση. Η οξίνιση στο αίγειο γάλα και η πτώση του pH εξελίσσονται με ταχύτερο ρυθμό, το πήγμα που λαμβάνεται στραγγίζει λιγότερο, έχει μικρότερο ιξώδες και πρωτότυπα ευχάριστα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (Ανυφαντάκης, 2004).

## Κεφάλαιο 2

### Μεθοδοι προσδιορισμού καζεϊνών και ανίχνευσης νοθείας

Είναι γνωστό ότι οι τιμές αγοράς του αγελαδινού και πρόβειου γάλακτος διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους και ότι τα προϊόντα του τελευταίου εκτιμούνται ιδιαίτερα από το καταναλωτικό κοινό σε πολλά μέρη του κόσμου. Συνέπεια των παραπάνω είναι η τάση που παρατηρείται, να προστίθεται συχνά αγελαδινό γάλα στο πρόβειο ή να προσφέρονται προϊόντα που περιέχουν αγελαδινό γάλα ως πρόβεια με σκοπό την αύξηση του κέρδους (Ανυφαντάκης *et al.*, 1986). Σε ευρύτερο πλαίσιο, στις μεσογειακές χώρες, κατά την παρασκευή ευρέως διαδεδομένων παραδοσιακών τυριών όπως τα Manchego, Roquefort, Φέτα, Pecorino, παρατηρείται αντικατάσταση μέρους του πρόβειου γάλακτος από αίγαιο, λόγω της διαφορετικής τιμής μεταξύ των δύο ειδών γάλακτος (Haza *et al.*, 1999). Γίνεται έτσι μια μορφή νοθείας που δεν ενέχει μεν σοβαρό κίνδυνο για την υγεία του καταναλωτή, αποτελεί όμως παράνομη ενέργεια που αποφέρει κέρδος στο νοθευτή (Ανυφαντάκης *et al.*, 1986). Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι πρέπει να δηλώνεται το είδος του γάλακτος, ώστε να είναι ενήμεροι οι καταναλωτές που μπορεί να παρουσιάζουν ορισμένες αλλεργίες (Moatsou, 2009). Επιπλέον, η αντικατάσταση αυτή μπορεί να επιφέρει σοβαρό πρόβλημα κατά την παρασκευή των τυριών, αφού η σύσταση του γάλακτος επηρεάζει το χρόνο πήξης με πυτιά, το ρυθμό σχηματισμού πηγματος, τη συνεκτικότητα καθώς επίσης και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος (Haza *et al.*, 1999). Η νοθεία μπορεί να πραγματοποιηθεί τόσο σε επίπεδο παραγωγών όσο και σε επίπεδο εργοστασίων και επομένως η διαπίστωσή της πρέπει να γίνεται τόσο στο νωπό γάλα, που παραδίδει ο παραγωγός, όσο και στο τελικό προϊόν (Ανυφαντάκης *et al.*, 1986).

Οι σύγχρονες μέθοδοι ανίχνευσης νοθείας βασίζονται στην ανάλυση των διαφορετικών πρωτεϊνικών κλασμάτων των γαλακτοκομικών προϊόντων, τα οποία συχνά, ανάλογα με το είδος του ζώου προέλευσης, συμπεριφέρονται διαφορετικά κατά την εφαρμογή διαφορετικών αναλυτικών μεθόδων (Ramos, 1984). Μέχρι σήμερα έχουν δοκιμαστεί διάφορες τεχνικές για τη διαπίστωση της νοθείας στο γάλα και τα προϊόντα του με κομινόμενο βαθμό επιτυχίας. Το ενδιαφέρον των ερευνητών έχει συγκεντρωθεί τα τελευταία χρόνια στην ηλεκτροφόρηση και στην ανοσοβιολογική ανάλυση. Τα ηλεκτροφορητικά πρότυπα των πρωτεϊνών του ορού έχουν χρησιμοποιηθεί για τον

προσδιορισμό της νοθείας ενός είδους γάλακτος με άλλο. Περισσότερο ενδιαφέροντα αποτελέσματα όμως λήφθηκαν με ηλεκτροφόρηση των καζεϊνών σε διάφορα μέσα. Η χρησιμοποίηση ανοσοβιολογικών τεχνικών κερδίζει όλο και περισσότερο το ενδιαφέρον των επιστημόνων, στην προσπάθεια τους να εξασφαλίσουν μια απλούστερη και ταχύτερη μέθοδο από την ηλεκτροφόρηση (Ανυφαντάκης *et al.*, 1986). Ωστόσο, η ανίχνευση της νοθείας ενός είδους γάλακτος με άλλο που βασίζεται στην ανάλυση των πρωτεϊνών του γάλακτος, είναι εξαιρετικά πολύπλοκη αφού η σύσταση τους ποικίλλει τόσο μεταξύ των διαφόρων ειδών όσο και μεταξύ του ίδιου είδους. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών του γάλακτος περιπλέκεται από την ύπαρξη γενετικού και μη γενετικού πολυμορφισμού και από την τεχνολογική επεξεργασία του γάλακτος (Borkova & Snaselova, 2005). Στον Πίνακα 2-1 παρουσιάζονται συστατικά των πρωτεϊνών που χρησιμοποιούνται ως δείκτες για την ανίχνευση διαφόρων τύπων ζωικού γάλακτος και οι αντίστοιχες αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 2-1:** Παραδείγματα συστατικών των πρωτεϊνών που χρησιμοποιούνται ως δείκτες για την ανίχνευση διαφόρων τύπων ζωικού γάλακτος (Borkova & Snaselova, 2005)

Τεχνική	Συστατικό δείκτης
<b>Ηλεκτροφορητικές</b>	
Κατακόρυφη ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμίδιου	αγελαδινή παρα-κ-καζεΐνη αγελαδινή α <sub>s1</sub> -καζεΐνη αγελαδινή α-καζεΐνη
Ισοηλεκτρικός εστιασμός	αγελαδινές γ2- και γ3-καζεΐνες, μέθοδος αναφοράς της ΕΕ αίγεια και πρόβεια παρα-κ-καζεΐνη
Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση	αίγεια α-γαλακταλβουμίνη και αγελαδινή β-γαλακτοβλοβουλίνη Α αγελαδινή α <sub>s1</sub> -καζεΐνη
<b>Ανοσοχημικές μέθοδοι</b>	
Εμμεση ELISA	αγελαδινή κ-καζεΐνη αγελαδινή ανοσογλοβουλίνη G αίγεια α <sub>s2</sub> -καζεΐνη αγελαδινή β-καζεΐνη αγελαδινή α <sub>s1</sub> -καζεΐνη
Sandwich ELISA	αγελαδινή β-καζεΐνη αίγεις πρωτεΐνες του ορού αγελαδινή β-γαλακτοβλοβουλίνη
<b>Χρωματογραφία</b>	
RP HPLC	αγελαδινή, αίγεια και πρόβεια β-γαλακτογλοβουλίνη αγελαδινή α-γαλακταλβουμίνη και β-γαλακτογλοβουλίνη Β αγελαδινή α-καζεΐνη
HIC	Αγελαδινή, αίγεια και πρόβεια α <sub>s1</sub> -, α <sub>s2</sub> - και κ-καζεΐνη

## 2.1 Ηλεκτροφορητικές τεχνικές

### 2.1.1 Κατακόρυφη ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου

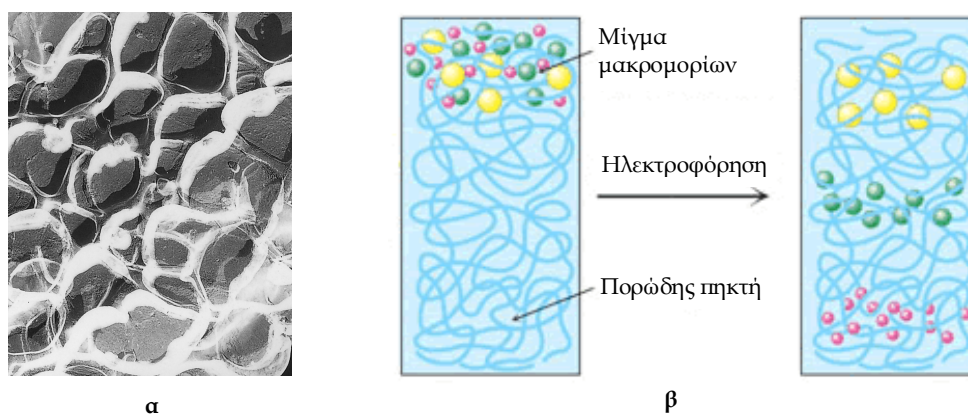
Η ηλεκτροφόρηση εφαρμόζεται εκτενέστατα στη μελέτη των πρωτεϊνών του γάλακτος και των προϊόντων του και ιδιαίτερα στο διαχωρισμό των καζεϊνών στα επιμέρους κλάσματά τους (Μοάτσου, 2001). Η ταξινόμηση των καζεϊνών πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφορητική ανάλυση, ενώ μέσω αυτής ανιχνεύθηκαν μικρότερα συστατικά τους όπως οι  $\gamma 1$ -,  $\gamma 2$ -,  $\gamma 3$ - και παρα-κ-καζεΐνες (Borkova & Snaselova, 2005).

Αποτέλεσμα μιας ηλεκτροφορητικής ανάλυσης μπορεί να είναι είτε η απεικόνιση του βαθμού υδρόλυσης των καζεϊνών κατά τη διάρκεια της ωρίμασης των τυριών, είτε η απεικόνιση των γενετικών παραλλαγών και ακόμη η ανίχνευση των μιγμάτων γάλακτος από τα οποία έχει παρασκευασθεί ένα γαλακτοκομικό προϊόν. Η τελευταία αυτή εφαρμογή βασίζεται στη διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα των  $\alpha_{s1}$ -καζεϊνών των διαφορετικών ειδών γάλακτος. Η μέθοδος μπορεί να εφαρμοσθεί για την ανίχνευση προσθήκης αγελαδινού γάλακτος σε πρόβειο ή αίγιο γάλα και γιασούρτι. Όμως στα τυριά και ιδιαίτερα στα πολύ ώριμα είναι αμφίβολη η αποτελεσματικότητά της καθώς η  $\alpha_{s1}$ -καζεΐνη υδρολύεται κατά κανόνα εκτεταμένα κατά τη διάρκεια της ωρίμασης των περισσότερων κατηγοριών τυριών με αποτέλεσμα πολλά προϊόντα αποδόμησης τους να παρουσιάζουν παρόμοια ηλεκτροφορητική κινητικότητα με την αγελαδινή  $\alpha_{s1}$ -CN. Φαίνεται ότι η κατακόρυφη ηλεκτροφόρηση μπορεί να εφαρμοσθεί για την ανίχνευση προσθήκης αγελαδινών καζεϊνών στα τυριά μόνο με την ανάλυση των παρα-κ-καζεϊνών, οι οποίες είναι σχετικά σταθερές κατά την ωρίμαση (Μοάτσου, 2001).

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis - PAGE) περιλαμβάνει το διαχωρισμό μεμονωμένων μορίων βάσει τόσο του ηλεκτρικού τους φορτίου όσο και του μεγέθους τους. Στην PAGE, οι πρωτεΐνες έχουν αρνητικό ή θετικό φορτίο, ανάλογα με το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται και κινούνται με ταχύτητα ανάλογη του φορτίου και του μεγέθους τους (Borkova & Snaselova, 2005). Σ' ένα διάλυμα, η κινητικότητα μιας πρωτεΐνης αυξάνεται όσο το pH του ρυθμιστικού διαλύματος απέχει περισσότερο από το ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης. Επειδή η πλειοψηφία των πρωτεϊνών έχει ισοηλεκτρικό σημείο σε εύρος pH 4-7,5, καλύτερος διαχωρισμός τους επιτυγχάνεται σε αλκαλικές πηκτές με εύρος pH 8-9. Με μεταβολή του pH, αυξάνουν είτε τα αρνητικά (υψηλό pH) είτε τα θετικά φορτία (χαμηλό

pH) στο μόριο των πρωτεϊνών. Όταν διαλύματα πρωτεϊνών τοποθετηθούν σε ισχυρά ηλεκτρικά πεδία, τα μόρια τους κινούνται προς την κάθοδο, εάν υπερισχύσουν τα θετικά φορτία, ή την άνοδο, εάν υπερισχύουν τα αρνητικά φορτία. Η ταχύτητα κίνησης των πρωτεϊνών, μάλιστα, είναι τόσο μεγαλύτερη όσο ισχυρότερο είναι το ηλεκτρικό πεδίο και όσο περισσότερα φορτία φέρει το μόριο κάθε πρωτεΐνης. Με τον τρόπο αυτό διαχωρίζονται οι πρωτεΐνες ενός μίγματος (Assenat, 1967).

Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου έχει σταθερή σύσταση, η οποία μπορεί να μεταβάλλεται κατά βούληση, παρουσιάζει μεγάλη μηχανική αντοχή και είναι διαφανής (Μοάτσου, 2001). Επιπλέον είναι χημικώς αδρανής και μπορεί να περιλαμβάνει πρόσθετα όπως η ουρία. Πλεονέκτημά της είναι ότι συγκρατεί έναν εξαιρετικά χαμηλό αριθμό φορτισμένων ομάδων και επομένως μπορούν να χρησιμοποιηθούν ισχυρά ηλεκτρικά πεδία κατά την ανάλυση (Assenat, 1967). Αποτελεί ένα τρισδιάστατο πλέγμα, το πορώδες του οποίου μπορεί να μεταβάλλεται. Χρησιμεύει ως υπόστρωμα για την κίνηση των πρωτεϊνών εντός ηλεκτρικού πεδίου αλλά και ως μοριακό κόσκινο που μεταβάλλει την κινητικότητα των μορίων ανάλογα με το μέγεθός τους (Εικόνα 2-1) (Μοάτσου, 2001).



**Εικόνα 2-1:** α. Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο πηκτής πολυακρυλαμιδίου

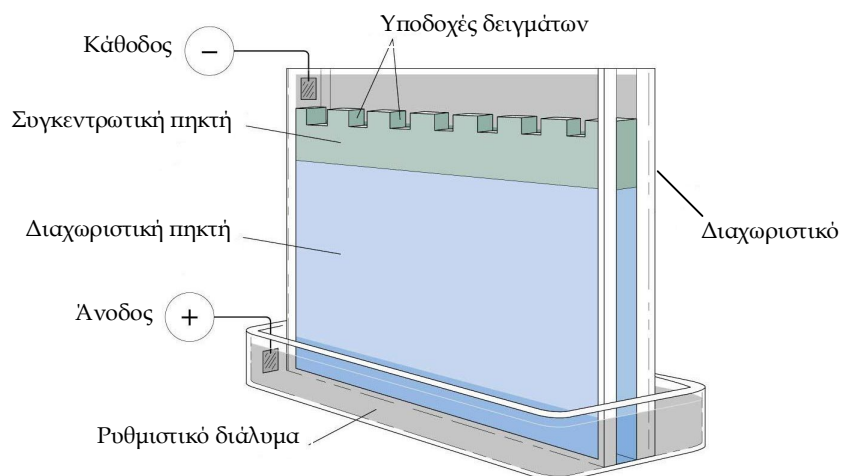
(Πηγή: <http://en.wikipedia.org/wiki/SDS-PAGE>) και β. Σχηματική αναπαράσταση του πορώδους της πηκτής και του διαχωρισμού μίγματος μακρομορίων με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης

(Πηγή: [www.imb-jena.de/.../proteins\\_purification.html](http://www.imb-jena.de/.../proteins_purification.html))

Η πηκτή σχηματίζεται από τον πολυμερισμό μονομερών αλυσίδων ακρυλαμιδίου (acrylamide) προς μακριές αλυσίδες πολυακρυλαμιδίου και διασταύρωση των αλυσίδων με τη χρήση ενός λειτουργικού μονομερούς, συνήθως N,N' μεθυλένο-bis-ακρυλαμιδίου (bis-acrylamide), το οποίο αποτελεί τον παράγοντα διασταύρωσης του πλέγματος. Η



αντίδραση πολυμερισμού παράγει τυχαίες αλυσίδες πολυακρυλαμιδίου που συμπεριλαμβάνουν ένα μικρό ποσοστό μορίων Bis. Τα τελευταία μπορούν να αντιδράσουν με ομάδες σε άλλες αλυσίδες σχηματίζοντας διασταυρώσεις με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός τρισδιάστατου πλέγματος. Η συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου καθορίζει το μέσο μήκος των πολυμερών αλυσίδων, ενώ η συγκέντρωση του Bis καθορίζει το εύρος του σχηματισμού διακλαδώσεων. Τα δύο συστατικά είναι εξίσου σημαντικά και καθορίζουν τις ιδιότητες της πηκτής όπως είναι η πυκνότητα, η ελαστικότητα, η μηχανική αντοχή και το μέγεθος των πόρων. Το μέγεθος των πόρων της πηκτής πολυακρυλαμιδίου μεταβάλλεται, μεταβάλλοντας απλά τη συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου και/ή το ποσοστό των διασταυρώσεων (Assenat, 1967). Για να γίνει ο πολυμερισμός και να σχηματισθεί η πηκτή είναι απαραίτητη η παρουσία ελεύθερων ριζών στο μίγμα τους η οποία εξασφαλίζεται με χημικό τρόπο (καταλύτες). Σε αυτή την περίπτωση προστίθενται στο διάλυμα ακρυλαμιδίου, το υπερθειικό αμμώνιο (ammonium persulfate ή APS) μαζί με τον καταλύτη N, N, N', N' tetramethyl ethylene diamine (TEMED). Το ακρυλαμίδιο διαλύεται σε αλκαλικό ρυθμιστικό διάλυμα και η πηκτή που προκύπτει τοποθετείται μεταξύ δύο ηλεκτροδίων, στα οποία εφαρμόζεται διαφορά δυναμικού (V) και τα οποία βρίσκονται βυθισμένα σε ρυθμιστικό διάλυμα, μέσω των ιόντων του οποίου εξασφαλίζεται η ροή ηλεκτρικού ρεύματος μέσα στην πηκτή (Μοάτσου, 2001).



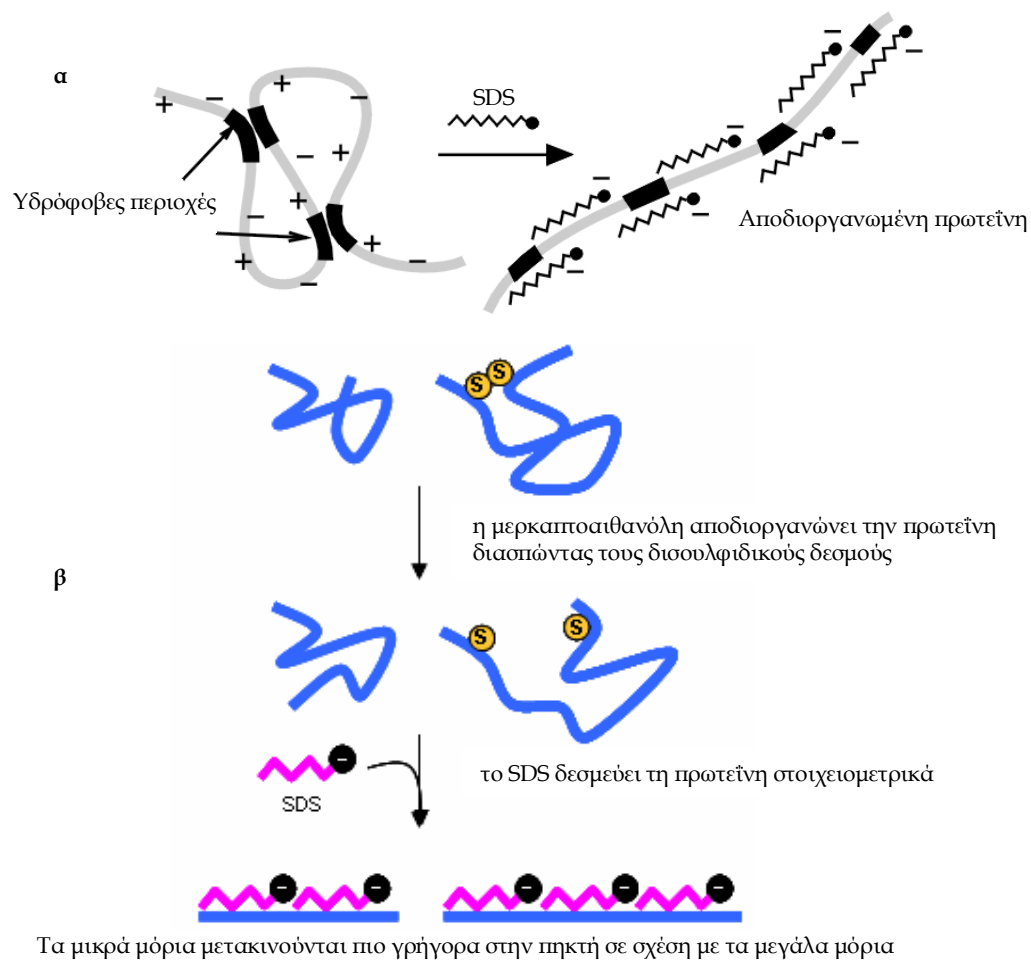
**Εικόνα 2-2:** Σχηματική παρουσίαση κατακόρυφης ασυνεχούς ηλεκτροφόρησης σε πηκτή ακρυλαμιδίου  
(Πηγή: [www.siumed.edu/.../protein\\_methods.htm](http://www.siumed.edu/.../protein_methods.htm))

Ένα κλασικό σύστημα ασυνεχούς ηλεκτροφόρησης περιλαμβάνει μία πηκτή, η οποία αποτελείται από δύο μέρη (Εικόνα 2-2). Στο κατώτερο και μεγαλύτερο μέρος της

αποτελείται από πηκτή με μεγαλύτερη συγκέντρωση μονομερούς ακρυλαμιδίου και υψηλότερο pH (8,9), η οποία ονομάζεται διαχωριστική πηκτή. Το υπόλοιπο της πηκτής αποτελείται από πηκτή με σημαντικά χαμηλότερη συγκέντρωση μονομερούς ακρυλαμιδίου και χαμηλότερο pH (6,9-7,6) που ονομάζεται συγκεντρωτική πηκτή. Τα διαλυτοποιημένα δείγματα των πρωτεϊνών εισάγονται στο ανώτερο σημείο του ηλεκτροφορητικού συστήματος, το οποίο βρίσκεται μεταξύ δύο ηλεκτροδίων που είναι βυθισμένα σε ρυθμιστικό διάλυμα tris-γλυκίνης με pH 8,3. Μέσω των ηλεκτροδίων εφαρμόζεται διαφορά δυναμικού (V), οπότε ηλεκτρικό ρεύμα με τη μορφή ροής ιόντων διέρχεται μέσω της πηκτής (Μοάτσου, 2001).

Οι περισσότερες πρωτεΐνες συμπεριφέρονται ως ανιόντα σε αλκαλικό pH και επομένως κινούνται προς την άνοδο. Για να διαχωριστεί ένα μίγμα πρωτεϊνών απαιτείται στις περισσότερες περιπτώσεις η χρήση ισχυρών μέσων για την αποδιοργάνωση της δομής τους (Μοάτσου, 2001). Η ουρία και ο ανιονικός διαλύτης δωδέκυλο-θειικό νάτριο (SDS) έχουν την ιδιότητα διάλυσης πολλών τύπων πρωτεϊνών και αποδιάταξης πολυμερών πρωτεϊνών σε πολυπεπτιδικά συστατικά (Borkova & Snaselova, 2005). Η διάλυση των πρωτεϊνών σε μεγάλες συγκεντρώσεις ουρίας (6-8M) έχει ως αποτέλεσμα την εξάλειψη των υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων και την αποσταθεροποίηση των Η-δεσμών ενώ η β-μερκαπτοαιθανόλη (Εικόνα 2-3) ή η διθειοθρεϊτόλη χρησιμοποιείται για τη διάσπαση των SH-δεσμών. Συνήθως είναι απαραίτητη και η παρουσία ουρίας στην πηκτή ( $\geq 4M$ ) για την αποφυγή της επαναδημιουργίας μέρους των Η-δεσμών κατά τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης (Μοάτσου, 2001). Το SDS δεσμεύεται σε μεμονωμένα μόρια πρωτεϊνών και τους προσδίδει ισχυρό αρνητικό φορτίο εξουδετερώνοντας έτσι τις διαφορές στο ολικό φορτίο (Εικόνα 2-3). Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός πραγματοποιείται μόνο βάσει του μοριακού βάρους. Αντίθετα, με την εφαρμογή ουρίας, οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται βάσει του φορτίου (Borkova & Snaselova, 2005).

Ο Furtado (1983) χρησιμοποίησε την PAGE για την ανίχνευση νοθείας αίγειου γάλακτος με αγελαδινό. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα μίγματα παστεριωμένου αίγειου και αγελαδινού γάλακτος. Στα αποτελέσματα των μιγμάτων προέκυψε μια προπορευόμενη ζώνη, η οποία δεν εμφανίζεται στο αμιγώς αίγειο γάλα και η οποία κατέχει την ίδια ηλεκτροφορητική κινητικότητα με τη αγελαδινή  $\alpha_{s1}$ -CN. Επιπλέον βρέθηκε ότι το εμβαδό της ζώνης είναι άμεσα ανάλογο με την ποσότητα του αγελαδινού γάλακτος που προστέθηκε στο αίγειο γάλα.



Εικόνα 2-3: Αποδιοργάνωση πρωτεΐνης από την β-μερκαπτοαιθανόλη και το SDS

α. (Πηγή: [www.chem.uoa.gr/vocabulary/Vocabularyview.asp?key=SDS%2DPAGE+%28SDS%2Dpolyacrylamide+gel+electrophoresis%29](http://www.chem.uoa.gr/vocabulary/Vocabularyview.asp?key=SDS%2DPAGE+%28SDS%2Dpolyacrylamide+gel+electrophoresis%29)), β. (Πηγή: [www.steve.gb.com/science/chromatography\\_elect...](http://www.steve.gb.com/science/chromatography_elect...))

Μεταξύ των καζεϊνικών κλασμάτων στα τυριά, η παρα-κ-καζεΐνη φαίνεται ότι είναι η καταλληλότερη για την ανίχνευση της προέλευσης του γάλακτος της τυροκόμησης, αφού δεν επηρεάζεται σημαντικά από την πρωτεόλυση κατά την ωρίμαση των τυριών. Ωστόσο οι διαφορές στις αλληλουχίες των αμινοξέων μεταξύ των πρόβειων, αίγιων και αγελαδινών παρα-κ-καζεϊνών είναι περιορισμένες (Moatsou, 2009). Οι Ανυφαντάκης *et al.* (1985) διαμόρφωσαν μια ηλεκτροφορητική μέθοδο για την ανίχνευση προσθήκης αγελαδινού γάλακτος σε τυριά Φέτα, που παρασκευάστηκαν από νωπό ή παστεριωμένο πρόβειο και αγελαδινό γάλα και μίγματα αυτών. Η ανίχνευση βασίστηκε στη διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα της αγελαδινής παρα-κ-καζεΐνης σε σχέση με αυτή της αντίστοιχης πρόβειας. Μετά την υδρόλυση της κ-καζεΐνης, η μονομερής παρα-κ-καζεΐνη

έχει διπλάσιο μοριακό βάρος από το γλυκομακροπεπτίδιο, είναι θετικά φορτισμένη, σε αντίθεση με τις φυσικές καζεΐνες του γάλακτος, και επομένως κατά την ηλεκτροφόρηση κινείται προς τη κάθοδο, με την αγελαδινή παρα-κ-καζεΐνη να κινείται ταχύτερα από την πρόβεια. Το pH του ρυθμιστικού διαλύματος των ηλεκτροδίων προσαρμόζεται στο 7,9 αφού σ' αυτή την τιμή του pH επιτυγχάνεται καλύτερος διαχωρισμός των παρα-κ-καζεϊνών (Ανυφαντάκης *et al.*, 1986). Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι είναι δυνατός ο προσδιορισμός της νοθείας πρόβειου τυριού Φέτας με αγελαδινό γάλα σε ποσοστό  $\geq 5\%$ , ακόμα και για ώριμα τυριά ηλικίας 300 ημερών. Επιπλέον δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των αποτελεσμάτων για τυριά που παρασκευάστηκαν από νωπό ή παστεριωμένο γάλα (Ανυφαντάκης *et al.*, 1985). Επίσης, με τη νέα μέθοδο προσδιορίστηκε ποιοτικά και με κάποια προσέγγιση ποσοτικά η νοθεία με αγελαδινό γάλα σε ποσοστό  $\geq 5\%$  τυριών Κεφαλοτύρι και Κασέρι ηλικίας τουλάχιστον 4 μηνών (Ανυφαντάκης *et al.*, 1986).

Οι Mayer & Hörtner (1992) χρησιμοποίησαν τη μέθοδο της ασυνεχούς ανοδικής ηλεκτροφόρησης των β-καζεϊνών σε όξινο pH, για τον προσδιορισμό αγελαδινών καζεϊνών σε γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα. Η μέθοδος επιτρέπει το διαχωρισμό της αγελαδινής β-καζεΐνης από τις αντίστοιχες πρόβειες και αίγιες. Κατά την ανάλυση δεν ανιχνεύθηκαν ενδιάμεσες ζώνες ως αποτέλεσμα της ωρίμασης ή της επεξεργασίας των προϊόντων. Ο ποσοτικός προσδιορισμός, που κυμαίνεται σε εύρος 5-70% αγελαδινής καζεΐνης σε σχέση με τη ολική καζεΐνη, επιτεύχθηκε με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των ζωνών σε συνδυασμό με πρότυπες καμπύλες που κατασκευάστηκαν βάσει της αναλογίας των εμβαδών των κορυφών αγελαδινής/πρόβειας και αγελαδινής/αίγιας καζεΐνης.

Οι Kaminarides *et al.* (1995) χρησιμοποίησαν την PAGE για την ανίχνευση προσθήκης αγελαδινού γάλακτος σε πρόβειο τυρί Χαλούμι. Ως κριτήριο της νοθείας χρησιμοποιήθηκαν τα αποτελέσματα της μέτρησης της οπτικής πυκνότητας της ζώνης της αγελαδινής  $\alpha_{s1}$ -καζεΐνης. Η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό προσθήκης αγελαδινού γάλακτος σε ποσοστό 2,5-5% σε τυρί Χαλούμι ηλικίας μέχρι 40 ημερών.

Οι Tamine *et al.* (1999) απέδειξαν με τη βοήθεια της τεχνικής PAGE την προσθήκη αγελαδινού γάλακτος ( $\geq 25\%$ ) σε αίγιο Kishk. Η ανάλυση βασίστηκε στην κινητικότητα της αγελαδινής  $\alpha_{s1}$ -καζεΐνης. Η ανίχνευση του βαθμού νοθείας απέτυχε χρησιμοποιώντας μεθόδους όπως οι SDS-PAGE, RP-HPLC και χρωματογραφία ανιο-ανταλλαγής λόγω της εκτεταμένης πρωτεόλυσης των καζεϊνών στο προϊόν.

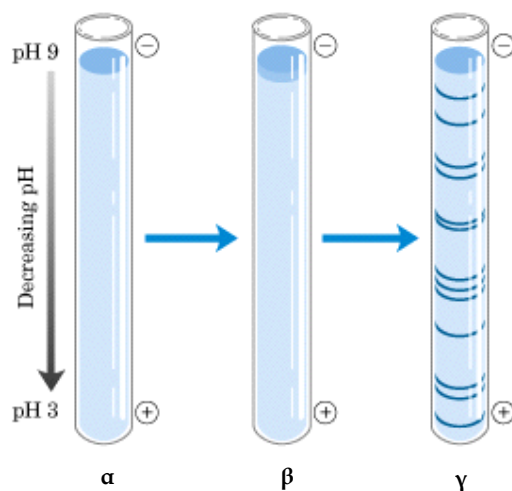
Οι [Kaminarides and Koukiassa \(2002\)](#), χρησιμοποίησαν την urea-PAGE για την ανίχνευση νοθείας πρόβειου γιαουρτιού με αγελαδινό γάλα, χρησιμοποιώντας ως δείκτη την αγελαδινή παρα-κ-καζεΐνη μετά από υδρόλυση των δειγμάτων με πυτιά. Για το σκοπό αυτό παρασκευάστηκαν γιαούρτια από αγελαδινό και πρόβειο γάλα και από πρότυπα μίγματα των δύο ειδών γάλακτος. Η εκτίμηση του αγελαδινού γάλακτος στο γιαούρτι βασίστηκε στην οπτική πυκνότητα της ζώνης της αγελαδινής παρα-κ-καζεΐνης, η οποία διαχωρίστηκε ευδιάκριτα και παρουσίασε μια γραμμική σχέση με το ποσοστό του αγελαδινού γάλακτος στα δείγματα. Τα αποτελέσματα επέτρεψαν την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε ποσοστό  $\geq 1\%$  ανεξάρτητα από την περιεκτικότητα του δείγματος σε υγρασία και λίπος.

Οι [Veloso et al. \(2002\)](#) εφάρμοσαν την τεχνική της urea-PAGE για την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε αίγιο και πρόβειο γάλα. Επιτεύχθηκε ανίχνευση σε ποσοστό  $\geq 5\%$ . Η ίδια τεχνική εφαρμόστηκε για την εκτίμηση της έκτασης της πρωτεόλυσης των καζεϊνών σε ώριμα τυριά 30d, που παρασκευάστηκαν σύμφωνα με την παραδοσιακή τεχνολογία του τυριού Terrincho από αγελαδινό και πρόβειο γάλα και μίγματα αυτών, καθώς και για την ανίχνευση του είδους του γάλακτος ([Veloso et al., 2004](#)). Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των ζωνών των καζεϊνών έδειξε ότι στα πρόβεια τυριά η  $\alpha_{s1}$ -CN μειώθηκε σημαντικά κατά την ωρίμαση των 30 d με την εμφάνιση ζωνών υψηλότερης ηλεκτροφορητικής κινητικότητας ενώ οι ζώνες των αγελαδινών καζεϊνών παρέμειναν σχεδόν ίδιες. Επίσης ήταν εφικτή η ανίχνευση της προσθήκης σε ποσοστό 10% αγελαδινού γάλακτος μέχρι την 30<sup>η</sup> ημέρα της ωρίμασης των τυριών χρησιμοποιώντας ως δείκτη της νοθείας την αγελαδινή  $\alpha_{s1}$ -CN. Η μέθοδος αποδείχθηκε πιο ευαίσθητη από την RP-HPLC, με την οποία ήταν δυνατή η ανίχνευση προσθήκης σε ποσοστό  $\geq 20\%$ .

Ο [Mayer \(2005\)](#) χρησιμοποίησε την urea-PAGE σε γνωστά μίγματα γάλακτος από διαφορετικά είδη και σε πειραματικά τυριά διαφορετικών ηλικιών για την ανίχνευση του αγελαδινού γάλακτος και τον προσδιορισμό του ποσοστού του τελευταίου στα πειραματικά τυριά. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι η αγελαδινή  $\alpha_{s1}$ -CN μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για την παρουσία αγελαδινού γάλακτος τόσο σε πρόβειο όσο και σε αίγιο γάλα. Ωστόσο για τα ώριμα τυριά που παρουσιάζουν κάποιο βαθμό πρωτεόλυσης, η τεχνική δεν είναι κατάλληλη, αφού πολλά προϊόντα αποδόμησης των καζεϊνών κατά την ωρίμαση, παρουσιάζουν ηλεκτροφορητική κινητικότητα παρόμοια με αυτή της αγελαδινής  $\alpha_{s1}$ -CN.

### 2.1.2 Ισοηλεκτρικός εστιασμός

Ο ισοηλεκτρικός εστιασμός (IEF) είναι μια ηλεκτροφορητική τεχνική με την οποία διαχωρίζεται ένα μίγμα πρωτεϊνών υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο (pI). Με την τεχνική αυτή οι πρωτεΐνες κινούνται σε ένα υπόστρωμα με βαθμίδωση pH στο οποίο έχει εφαρμοσθεί διαφορά δυναμικού (V) μέχρι να συναντήσουν το pH στο οποίο τα θετικά τους φορτία εξισώνονται με τα αρνητικά (pI), οπότε η κίνησή τους σταματά, ακινητοποιούνται και εστιάζονται σε στενές ζώνες (Εικόνα 2-4).



**Εικόνα 2-4:** Τεχνική του ισοηλεκτρικού εστιασμού: **α.** Στην πηκτή ενσωματώνεται ένα διάλυμα αμφολυτών και μετά την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου δημιουργείται στο υπόστρωμα βαθμίδωση pH, **β.** Εφαρμόζεται το προς ανάλυση διάλυμα πρωτεϊνών υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, **γ.** Μετά από χρώση, φαίνεται ότι οι πρωτεΐνες κατανέμονται στην πηκτή ανάλογα με το ισοηλεκτρικό του σημείο (pI)

(Πηγή: [www.biochem.arizona.edu/classes/bioc462/462a/...](http://www.biochem.arizona.edu/classes/bioc462/462a/))

Συνηθέστερα χρησιμοποιείται πηκτή ακρυλαμιδίου, στην οποία έχει διαμορφωθεί κατάλληλη βαθμίδωση pH με την ενσωμάτωση αμφολυτών. Όταν η πηκτή αυτή συνδεθεί με ηλεκτρόδια καθόδου και ανόδου στα οποία εφαρμόζεται διαφορά δυναμικού, οι αμφολύτες είναι η κύρια πηγή ιόντων στο σύστημα. Επομένως κινούνται ανάλογα με την κατανομή των φορτίων τους προς την άνοδο ή την κάθοδο μέχρι το ισοηλεκτρικό τους σημείο κι έτσι προκύπτει η βαθμίδωση pH στην πηκτή (Μοάτσου, 2001). Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών ανάλογα με το ισοηλεκτρικό τους σημείο είναι ιδιαίτερα κατάλληλος για

την ανάλυση καζεϊνών που παρουσιάζουν πολλές γενετικές παραλλαγές (Borkova & Snaselova, 2005).

Ο IEF αποτελεί επίσημη μέθοδο αναφοράς της Ευρωπαϊκής Κοινότητας (Κανονισμός 1081/96) για την ανίχνευση νωπού και θερμικώς επεξεργασμένου αγελαδινού γάλακτος και καζεϊνικών αλάτων σε φρέσκα και ώριμα τυριά που παρασκευάστηκαν από πρόβειο, αίγιο γάλα ή μίγματα αυτών. Βασίζεται στην ανίχνευση των γ-καζεϊνών μετά από πλασμινόλυση και πιο συγκεκριμένα στα διαφορετικά ισοηλεκτρικά σημεία των γ2- και γ3-καζεϊνών σε σχέση με αυτά των αντίστοιχων πρόβειων και αίγιων (Moatsou, 2009). Τα ισοηλεκτρικά τους σημεία βρίσκονται σε pH μεταξύ 6,5-7,5 (Borkova & Snaselova, 2005). Πρότυπα δείγματα με 0% και 1% αγελαδινό γάλα αναλύονται ταυτόχρονα με τα άγνωστα δείγματα. Ο ποσοτικός προσδιορισμός του αγελαδινού γάλακτος βασίζεται στην ένταση των ζωνών των γ2- και γ3-καζεϊνών σε σύγκριση με τις αντίστοιχες ζώνες των πρότυπων δειγμάτων. Η μέθοδος είναι κατάλληλη για ανίχνευση νοθείας σε τυρί, αφού δεν επηρεάζεται από τη θερμική επεξεργασία του γάλακτος ή του τυροπήγματος και από την έκταση της πρωτεόλυσης (Moatsou, 2009) και επιτρέπει την ανίχνευση προσθήκης σε ποσοστό  $\geq 0,5\%$ . Μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι ο προσδιορισμός νοθείας πρόβειου γάλακτος με γίδινο και αντίστροφα δεν είναι εφικτός (Borkova & Snaselova, 2005). Επιπλέον δεν είναι ακριβής όσον αφορά στον ποσοτικό προσδιορισμό όταν το επίπεδο της νοθείας είναι υψηλό, γιατί υπάρχουν αποκλίσεις καθώς η ένταση των ζωνών αυξάνεται (Moatsou, 2009).

Ο IEF των παρα-κ-καζεϊνών για την ανίχνευση πρόβειων, αίγιων και αγελαδινών πρωτεϊνών στο γάλα της τυροκόμησης χρησιμοποιήθηκε εκτεταμένα και εφαρμόστηκε σε μοντέλα τυριών. Γενικά αυτή η μέθοδος φαίνεται κατάλληλη για την ανίχνευση αγελαδινών παρα-κ-καζεϊνών σε σκληρά τυριά και σε τυριά που ωριμάζουν με μύκητες. Ωστόσο μια ζώνη με ισοηλεκτρικό σημείο παρόμοιο με αυτό της παρα-κ-καζεϊνης έχει ανιχνευθεί στις κατατομές πρόβειων τυριών. Επομένως ο IEF των παρα-κ-καζεϊνών δε φαίνεται κατάλληλη μέθοδος για την ανίχνευση μικρών ποσοτήτων πρόβειας ή αίγιας παρα-κ-καζεϊνης, αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση μεγάλων ποσοστών νοθείας ( $\geq 10\%$  αίγιου γάλακτος) (Moatsou, 2009).

### 2.1.3 Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση

Η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (CE) χρησιμοποιείται τα τελευταία χρόνια χρόνια όλο και περισσότερο στην ανάλυση των πρωτεϊνών του γάλακτος και αναφέρεται ότι παρουσιάζει μεγάλες δυνατότητες για την ανάλυση πολύπλοκων μιγμάτων πεπτιδίων. Ο διαχωρισμός βασίζεται στο καθαρό φορτίο, στη μάζα και στην υδροδυναμική ακτίνα (ακτίνα Stokes) των πεπτιδίων. Αντίθετα με τη συμβατική ηλεκτροφόρηση, στην οποία οι πρωτεΐνες και τα πεπτίδια στην ηχητή εμφανίζονται με χρώση, η CE χρησιμοποιεί συνεχή παρακολούθηση με UV απορρόφηση που επιτρέπει την ανίχνευση μικρών πεπτιδίων τα οποία δε γίνονται ορατά με χρώση (McSweeney & Fox, 1997). Παρουσιάζει πλεονεκτήματα μεταξύ των οποίων αναφέρονται η ταχύτητα διαχωρισμού, οι μικρές ποσότητες που απαιτούνται για την ανάλυση και ο αυτοματισμός της τεχνικής, χαρακτηριστικά που επιτρέπουν τόσο την άμεση ανίχνευση των συστατικών που διαχωρίζονται όσο και την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό τους προσδιορισμό. Η μέθοδος εφαρμόζεται σε πολύ λεπτά τριχοειδή με εσωτερική διάμετρο που κυμαίνεται μεταξύ 10 και 100μm. Η μεγάλη επιφάνεια των τριχοειδών σε σχέση με τον όγκο του ρυθμιστικού διαλύματος επιτρέπουν τη γρήγορη απαγωγή της θερμότητας που αναπτύσσεται λόγω του φαινομένου Joule, οπότε είναι εφικτή η αύξηση της εφαρμοζόμενης διαφοράς δυναμικού (V) και η σημαντική μείωση του χρόνου ανάλυσης (Corradini & Cavazza, 1998). Πρόσφατα, η μέθοδος της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιήθηκε σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών (CE/MS) (Müller *et al.*, 2008). Περιλαμβάνει διάφορες τεχνικές διαχωρισμού, οι οποίες είναι οι εξής (McSweeney & Fox, 1997):

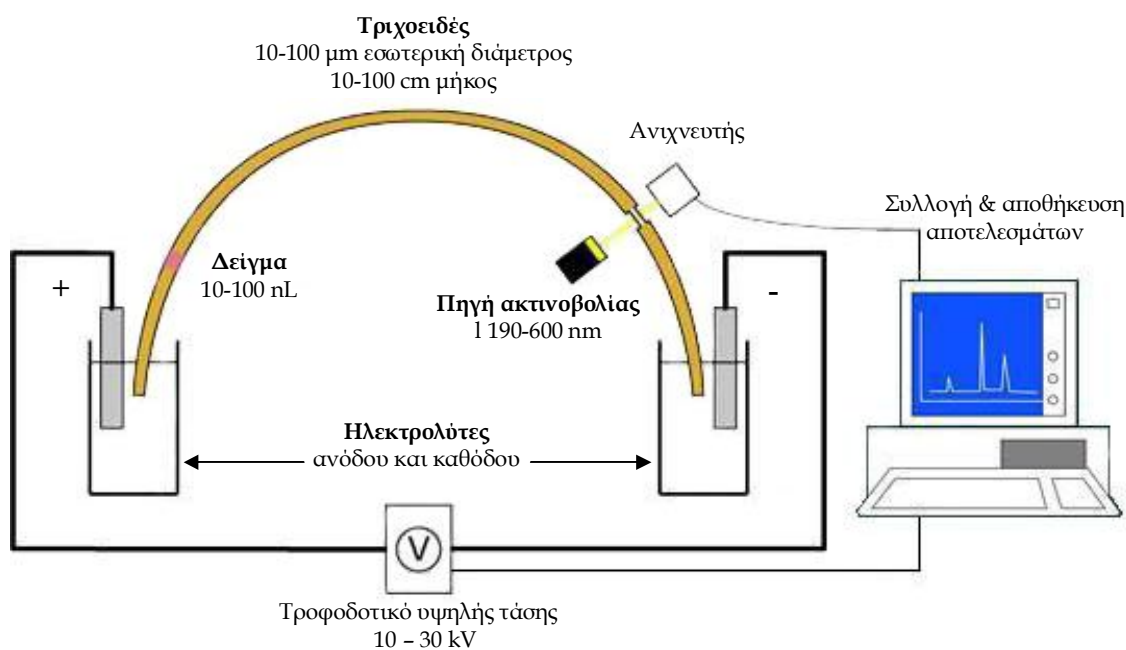
1. Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση ζώνης (Capillary Zone Electrophoresis - CZE)
2. Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση ηχητής (Capillary Gel Electrophoresis - CGE)
3. Μικκυλιακή Ηλεκτροκινητική Χρωματογραφία (Micellar Electrokinetic Chromatography - MEKC)
4. Τριχοειδής ηλεκτροχρωματογραφία (Capillary ElectroCromatography - CEC)
5. Τριχοειδής Ισοηλεκτρικός Εστιασμός (Capillary IsoElectring Focusing - CIEF)
6. Τριχοειδής Isotachopheresis (Capillary IsoTachoPhoresis - CITP)

Από τις παραπάνω τεχνικές, η Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση Ζώνης (CZE) χρησιμοποιείται πιο εκτεταμένα. Σε αυτή τη μέθοδο επιλέγεται ένα κατάλληλο υποβάθρο ηλεκτρολυτών, το οποίο δημιουργείται από ένα ρυθμιστικό διάλυμα, για να διατηρήσει τη σταθερότητα του pH, εξασφαλίζοντας τη διέλευση του ρεύματος. Η εκλεκτικότητα



βελτιστοποιείται με την επιλογή του κατάλληλου pH, επομένως ο χρόνος ανάλυσης εξαρτάται από τη συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος, το μήκος των τριχοειδών, τη θερμοκρασία και την εφαρμοζόμενη διαφορά δυναμικού (Corradini & Cavazza, 1998).

Στην Εικόνα 2-5 παρουσιάζεται η οργανολογία που χρησιμοποιείται συνήθως στην αναλυτική μέθοδο της CE.



Εικόνα 2-5: Τυπική οργανολογία τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης

(Πηγή: [www.richardcarbonaro.com/projects/CE.html](http://www.richardcarbonaro.com/projects/CE.html); [www.chnola-research.org/.../capillary.htm](http://www.chnola-research.org/.../capillary.htm))

Οι Cattaneo *et al.* (1996) χρησιμοποίησαν την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση ζώνης για την ανίχνευση προσθήκης αγελαδινού γάλακτος σε πρόβειο και αίγιο γάλα. Ως δείκτης χρησιμοποιήθηκε η αγελαδινή  $\alpha_{s1}$ -καζεΐνη και επιτεύχθηκε ο προσδιορισμός προσθήκης σε ποσοστό  $\geq 8\%$ . Οι Lee *et al.* (2001) χρησιμοποιώντας την παραπάνω τεχνική, κατάφεραν να βελτιώσουν το όριο ανίχνευσης σε ποσοστό  $\geq 1\%$  αγελαδινού γάλακτος σε νωπό και ανασυσταμένο γάλα.

Οι Recio *et al.* (1997) μελέτησαν τον πολυμορφισμό των πρωτεϊνών του αγελαδινού, πρόβειου και αίγιου γάλακτος με τη χρήση της CE. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε υδρόφιλο επικαλυμένο τριχοειδές και ρυθμιστικό διάλυμα χαμηλού pH με ουρία. Η μέθοδος επέτρεψε την ταυτοποίηση των διαφορετικών γενετικών παραλλαγών στην ολική

καζεΐνη του αγελαδινού, πρόβειου και αίγειου γάλακτος. Επιπλέον επιτεύχθηκε εξαιρετικός διαχωρισμός των πρωτεϊνών με διαφορετικό βαθμό φωσφορυλίωσης και ακόμα και οι γενετικές παραλλαγές που διέφεραν μόνο κατά ένα αμινοξύ διαχωρίστηκαν ικανοποιητικά.

Οι *Izco et al. (1999)* μελέτησαν την αξιοπιστία της CE ως αναλυτικής μεθόδου χρησιμοποιώντας ένα εμπορικό πρότυπο ολικής πρόβειας καζεΐνης και ένα μίγμα του προτύπου με ολική καζεΐνη από πρόβειο γάλα. Τα αποτελέσματα απέδειξαν ότι η τεχνική της CE μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ποσοτικό προσδιορισμό των καζεϊνών του πρόβειου γάλακτος.

Οι *Molina et al. (1999)* χρησιμοποίησαν τη μέθοδο της CE για το διαχωρισμό και την ανάλυση των καζεϊνικών κλασμάτων σε μίγματα αγελαδινού, πρόβειου και αίγειου γάλακτος. Οι διαφορές μεταξύ των ηλεκτροφορητικών κατατομών των κλασμάτων των καζεϊνών κάθε είδους επέτρεψαν την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό του είδους του γάλακτος σε μίγματα από δύο ή και από τα τρία είδη γάλακτος. Οι κύριες συνιστώσες της παλινδρόμησης και η ανάλυση παλινδρόμησης ελαχίστων τετραγώνων χρησιμοποιήθηκαν για τη προσέγγιση του ποσοστού του γάλακτος κάθε είδους σε κάθε μίγμα. Ως μεταβλητές χρησιμοποιήθηκαν τα εμβαδά των κορυφών της αγελαδινής και πρόβειας  $\alpha_{s1}$ -CN, της πρόβειας και αίγειας κ-CN, της αγελαδινής  $\beta$ -CN A<sup>1</sup> και A<sup>2</sup> και της πρόβειας και αίγειας  $\beta_2$ -CN και  $\beta_1$ -CN. Η μέση τετραγωνική ρίζα των σφαλμάτων προσέγγισης ήταν μικρότερη από 2,4% σε όλες τις περιπτώσεις.

Οι *Molina et al. (2000)* χρησιμοποίησαν την CE για την ανάλυση των καζεϊνικών κλασμάτων και των προϊόντων υδρόλυσης τους σε τυριά τύπου Iberico που παρασκευάστηκαν από αγελαδινό, πρόβειο και αίγειο γάλα. Τα ηλεκτροφορογραφήματα των τυριών που προέκυψαν ήταν χαρακτηριστικά, ανάλογα με το είδος του γάλακτος που χρησιμοποιήθηκε, και τα κύρια συστατικά τους ταυτοποιήθηκαν. Η αίγεια παρα-κ-καζεΐνη και η αγελαδινή β-καζεΐνη, οι οποίες εκλούστηκαν στην αρχή και στο τέλος των ηλεκτοφορογραφημάτων αντίστοιχα, ήταν ενδεικτικές του είδους του γάλακτος.

Η CE χρησιμοποιήθηκε από τους *Recio et al. (2004)* για την ανίχνευση προσθήκης αίγειου και αγελαδινού γάλακτος σε πρόβειο τυρί Χαλούμι χρησιμοποιώντας την αίγεια παρα-κ-καζεΐνη και την αγελαδινή  $\alpha_{s1}$ -καζεΐνη ως δείκτες για το αίγειο και το αγελαδινό γάλα αντίστοιχα. Η αναλυτική μέθοδος σε συνδυασμό με την στατιστική ανάλυση ήταν έγκυρη για την εκτίμηση προσθήκης αίγειου και αγελαδινού γάλακτος σε ποσοστό  $\geq 2\%$  και  $\geq 5\%$  αντίστοιχα, τόσο σε φρέσκα όσο και σε ώριμα τυριά. Ο ποσοτικός προσδιορισμός

των χαμηλών ποσοστών του αίγειου γάλακτος ( $\leq 2\%$ ), ήταν δύσκολος λόγω της ατελούς διάκρισης μεταξύ της αίγειας παρα-κ-καζεΐνης και της πρόβειας  $\alpha_2$ -καζεΐνης. Ωστόσο η εφαρμογή σταδιακής πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης (Stepwise Multiple Linear Regression - SMLR) επέτρεψε μια αποδεκτή εκτίμηση ακόμα και για μικρά ποσοστά αίγειου γάλακτος με τυπικό σφάλμα 2,14%. Η [Moatsou \(2009\)](#) αναφέρει ότι παρόμοιες πολυμεταβλητές στατιστικές αναλύσεις έχουν χρησιμοποιηθεί από τους [Rodríguez-Nogales & Vázquez \(2007\)](#) για την προσέγγιση του ποσοστού του είδους του γάλακτος σε μίγματα αγελαδινού, πρόβειου και αίγειου γάλακτος, χρησιμοποιώντας το εμβαδό 13 επιλεγμένων κορυφών από τα προφίλ της τριχοειδούς ηλεκτροφορήσης ενός φρέσκου τυριού. Η μέση τετραγωνική ρίζα των σφαλμάτων προσέγγισης ήταν 2,2%.

## 2.2 Χρωματογραφικές τεχνικές

### 2.2.1 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Η υγρή χρωματογραφία εφαρμόζεται εκτεταμένα για το διαχωρισμό των πρωτεϊνικών κλασμάτων πολλών ειδών γάλακτος. Η μέθοδος αυτή έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της νοθείας ενός είδους γάλακτος με άλλο βάσει του διαφορετικού χρόνου έκλυσης των καζεϊνών.

Η διαδικασία ανάλυσης ενός δείγματος με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας περιγράφεται παρακάτω. Καθώς η κινητή φάση προωθείται προς την στήλη με τη βοήθεια της αντλίας, το δείγμα εισάγεται στο σύστημα με ένεση στην μονάδα εισαγωγής δείγματος ακριβώς πριν τη στήλη. Έτσι, η κινητή φάση, περιέχοντας και μία μικρή ποσότητα δείγματος, εισέρχεται στην στενή, κυλινδρική, γεμισμένη χρωματογραφική στήλη. Καθώς το δείγμα κινείται μέσα στη στήλη, με τη βοήθεια της κινητής φάσης, τα συστατικά του διαχωρίζονται και όταν εκλύονται, σε διαφορετικούς χρόνους, η ύπαρξή τους καταγράφεται από έναν ανιχνευτή. Η ύπαρξη μοντέλων χρωματογραφημάτων για συγκεκριμένες ουσίες κάνει δυνατή την ταυτοποίηση των συστατικών των δειγμάτων, βάσει των χρόνων ή των ποσοτήτων έκλυσης. Η ποσότητα του κάθε συστατικού προσδιορίζεται από το ύψος ή την περιοχή της κορυφής του στο χρωματογράφημα. Ένας καλός διαχωρισμός καθορίζεται από τον κατάλληλο τύπο στήλης, την κατάλληλη κινητή φάση και το κατάλληλο χρωματογραφικό σύστημα για το δείγμα που αναλύεται ([Strobel & Heineman, 1989](#)).

### 2.2.2 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ανεστραμμένης φάσης (RP-HPLC)

Η χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντιστρόφου φάσης (RP-HPLC), είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος και έχει αναφερθεί ότι το 75% των διαχωρισμών με HPLC πραγματοποιούνται σύμφωνα με αυτή την τεχνική. Ο όρος «ανεστραμμένη φάση» αναφέρεται στη χρήση μιας μη πολικής στατικής φάσης και μιας πολικής κινητής φάσης, το αντίστροφο δηλαδή από ότι ισχύει στη χρωματογραφία κανονικής φάσης (Robards *et al.*, 1994). Με τη μέθοδο της RP-HPLC τα συστατικά διαχωρίζονται βάσει του υδρόφοβου χαρακτήρα τους. Πιο συγκεκριμένα, προσκολλούνται στη στήλη ανεστραμμένης φάσης κατά την έκλυση με την υδατική κινητή φάση και εκλύονται από αυτή κατά την έκλυση με την οργανική κινητή φάση. Τα πεπτίδια διαχωρίζονται εφαρμόζοντας γραμμική αύξηση του οργανικού διαλύτη κατά τη διάρκεια της ανάλυσης. Όταν αναλύεται κάποιο άγνωστο συστατικό, είναι βέλτιστο η ανάλυση να ξεκινάει με 100% υδατική κινητή φάση και να καταλήγει βαθμιαία σε κινητή φάση που περιέχει 60% οργανικό διαλύτη μέσα σε χρονική διάρκεια μιας ώρας ([www.ionsource.com](http://www.ionsource.com)).

Η κάθε στήλη επιλέγεται ώστε να έχει τις κατάλληλες προδιαγραφές ανάλογα με την ανάλυση που θα πραγματοποιηθεί. Τα χαρακτηριστικά, βάσει των οποίων διαχωρίζονται οι διάφορες στήλες μεταξύ τους είναι το μέγεθος τους, το μέγεθος των κόκκων και πόρων και το είδος της στατικής φάσης. Οι στήλες είναι κυλινδρικές και οι χαρακτηριστικές τους διαστάσεις έχουν τη μορφή εσωτερική διάμετρος x μήκος. Μπορεί να είναι είτε μακριές είτε κοντές. Μία κοντή στήλη ανεστραμμένης φάσης μπορεί να λειτουργήσει σχεδόν το ίδιο καλά με μία μακρύτερη, όσον αφορά στο διαχωρισμό των συστατικών ενός δείγματος, κάτι που είναι ιδιαίτερα σημαντικό αφού οι πιο κοντές στήλες είναι γενικά πιο φθηνές και ανεβάζουν μικρότερη πίεση σε σχέση με τις μακρύτερες. Η λειτουργία της στήλης σε χαμηλή πίεση παρέχει μεγαλύτερη ελευθερία ρύθμισης του ρυθμού ροής των διαλυτών, ο οποίος εξαρτάται από την εσωτερική διάμετρο της στήλης. Συνήθως, οι πιο κοντές στήλες χρησιμοποιούνται για γρήγορες χρωματογραφικές αναλύσεις με υψηλότερο ρυθμό ροής από το συνηθισμένο ([www.ionsource.com](http://www.ionsource.com)).

Οι πιο κοινές στήλες είναι πληρωμένες με κόκκους διοξειδίου του πυριτίου. Μεγάλοι κόκκοι προκαλούν χαμηλότερη πίεση συστήματος, σε σχέση με τους μικρότερους. Ωστόσο οι μικροί κόκκοι παρουσιάζουν μεγαλύτερη ικανότητα διαχωρισμού. Επειδή οι κόκκοι του διοξειδίου του πυριτίου διαλύονται σε υψηλά pH, συνιστάται η χρήση διαλυτών με pH μικρότερο του 7. Η στατική φάση συνήθως κατασκευάζεται από υδρόφοβες αλυσίδες

αλκυλίων ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ). Υπάρχουν τρία συνηθισμένα μήκη αλυσίδων, οι  $\text{C}_4$ ,  $\text{C}_8$  και  $\text{C}_{18}$ . Η  $\text{C}_4$  χρησιμοποιείται συνήθως για πρωτεΐνες, ενώ η  $\text{C}_{18}$  για πεπτίδια ή μικρά μόρια. Η γενική ιδέα είναι ότι στο μεγαλύτερο πρωτεϊνικό μόριο είναι πιθανότερο να υπάρχουν περισσότερα υδρόφοβα σημεία τα οποία είναι πιθανό ν'αλληλεπιδράσουν με την στήλη και επομένως μία αλυσίδα μικρότερου μήκους είναι πιο κατάλληλη ([www.ionsource.com](http://www.ionsource.com)).

Στα συστήματα ανεστραμμένης φάσης το νερό δεν μπορεί να ενυδατώσει τις μη πολικές (υδρόφοβες) αλκυλικές ομάδες και δεν αντιδρά μ'αυτές με κανένα τρόπο. Αποτελεί λοιπόν την πιο ασθενή κινητή φάση με αποτέλεσμα τον αργό ρυθμό έκλουσης του δείγματος. Όσο περισσότερο είναι το νερό στην κινητή φάση τόσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος κατακράτησης. Τα διάφορα συστατικά ενός μίγματος κατακρατούνται καλύτερα στην επιφάνεια της στήλης όσο λιγότερο υδατοδιαλυτά (μη πολικά) είναι. Επίσης ο χρόνος κατακράτησης αυξάνεται όσο αυξάνεται ο αριθμός των ατόμων άνθρακα δηλαδή όσο αυξάνεται η επιφάνεια επαφής μεταξύ του μορίου του δείγματος και της στατικής φάσης (Meyer, 1994). Η σωστή επιλογή της κινητής φάσης θεωρείται ο πιο σημαντικός παράγοντας στη βελτιστοποίηση του διαχωρισμού στην τεχνική αντιστρόφου φάσης, αφού ο έλεγχος του τελευταίου επιτυγχάνεται πιο συχνά μεταβάλλοντας τη σύσταση της κινητής φάσης (Robards, 1994). Η κινητή φάση γενικά αποτελείται από μίγματα νερού ή υδατικών ρυθμιστικών διαλυμάτων με διάφορους διαλύτες που μπορούν να αναμιχθούν με το νερό (Meyer, 1994). Οι διαλύτες ανεστραμμένης φάσης, κατά συνθήκη, συνδέονται με τα κανάλια A και B της HPLC. Ο διαλύτης A είναι ο υδατικός (νερό) και ο διαλύτης B είναι οργανικός (ακετονιτρίλιο, μεθανόλη, προπανόλη). Ο διαλύτης A είναι γενικά υπερκάθαρο νερό με 0,1% οξύ ενώ ο διαλύτης B αποτελείται από έναν από τους τρεις οργανικούς διαλύτες που προαναφέρθηκαν με 0,1% οξύ. Το οξύ αποτελεί πηγή πρωτονίων και χρησιμοποιείται για τη βελτίωση του σχήματος της χρωματογραφικής κορυφής. Τα κοινώς χρησιμοποιούμενα οξέα είναι το φορμικό οξύ, το τριφθοροξικό οξύ (TFA) και το οξικό οξύ. Το δείγμα, κανονικά, υφίσταται ανασύσταση μέσα στον διαλύτη A για να μεγιστοποιηθεί η σύνδεση του με τη στήλη ([www.ionsource.com](http://www.ionsource.com)).

Στο τέλος κάθε ανάλυσης η στήλη πρέπει να αντισταθμίζεται, δηλαδή ο διαλύτης που τη διαπερνάει να ρυθμίζεται στην αρχική υψηλά υδατική σύσταση του, ώστε να είναι έτοιμος ο χρωματογράφος να ξεκινήσει άμεσα την επόμενη ανάλυση. Ο συνηθής χρόνος για την πραγματοποίησή της αντιστάθμισης είναι 20 min. Τέλος, αν εκτελούνται αυτόματες αναλύσεις για μεγάλο χρονικό διάστημα, οι κορυφές των χρόνων έκλουσης

μπορεί να μετακινηθούν όταν αλλάζει η θερμοκρασία του περιβάλλοντος. Πολλά συστήματα HPLC συμπεριλαμβάνουν τη δυνατότητα ρύθμισης της θερμοκρασίας της στήλης. Η πιο συνηθισμένη θερμοκρασία ανάλυσης είναι 40 °C, η οποία προστατεύει τη στήλη ακόμα και από πολύ μεγάλες διακυμάνσεις της περιβαλλοντικής θερμοκρασίας. Επιπρόσθετα, η θερμοκρασία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη βελτίωση του διαχωρισμού, αφού είναι γνωστό ότι οι υψηλότερες θερμοκρασίες παρέχουν πιο οξείες κορυφές και ταχύτερη έκλυση των συστατικών του δείγματος ([www.ionsource.com](http://www.ionsource.com)).

Η μέθοδος της RP-HPLC έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα από πολλούς ερευνητές για τον διαχωρισμό των κύριων καζεϊνικών κλασμάτων των διαφόρων ειδών γάλακτος, για την ταυτοποίηση των πολυμορφικών του παραλλαγών και για την ανίχνευση νοθείας σε γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα. Οι [Jaubert & Martin \(1992\)](#) χρησιμοποίησαν τη RP-HPLC για τον διαχωρισμό των κύριων καζεϊνών του αίγιου γάλακτος. Η ταυτοποίηση των κλασμάτων που διαχωρίστηκαν με την παραπάνω μέθοδο πραγματοποιήθηκε με αλκαλική και SDS-PAGE και επιβεβαιώθηκε με ανάλυση πρότυπων καζεϊνών, τα οποία προετοιμάστηκαν με τη χρήση κατιον-ανταλλακτικής χρωματογραφίας. Η μέθοδος επέτρεψε τον διαχωρισμό των γενετικών παραλλαγών των  $\alpha_{s1}$ - και  $\alpha_{s2}$ -καζεϊνών. Οι [Visser et al. \(1995\)](#) χρησιμοποίησαν τη RP-HPLC για την μελέτη του κλάσματος της αγελαδινής β-καζεΐνης και κατάφεραν να ταυτοποιήσουν μια νέα γενετική παραλλαγή, τη β-CN F-5P, ενώ οι [Trujillo et al. \(2000b, 2000a\)](#) χρησιμοποίησαν τη μέθοδο σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών (ESI-MS) για την ανάλυση των κύριων πρωτεϊνών του πρόβειου (καζεΐνες, β-γαλακτογλοβουλίνη, α-γαλακταλβουμίνη) και αίγιου (καζεΐνες, β-γαλακτογλοβουλίνη, α-γαλακταλβουμίνη, οροαλβουμίνη) γάλακτος. Οι ερευνητές κατάφεραν να μελετήσουν την πολυπλοκότητα των παραπάνω πρωτεϊνών που σχετίζεται με τον γενετικό πολυμορφισμό, με τις μετα-μεταφραστικές αλλαγές (φωσφορυλίωση και γλυκοζυλίωση) και με την ύπαρξη πολλαπλών μορφών τους.

Σε πολλές περιπτώσεις η RP-HPLC έχει χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη των καζεϊνικών κλασμάτων πρόβειου και αίγιου γάλακτος από αυτόχθονες Ελληνικές φυλές. Πιο συγκεκριμένα έχει χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη των καζεϊνικών κλασμάτων του πρόβειου γάλακτος από αυτόχθονες Ελληνικές φυλές ([Moatsou et al., 2004c](#)), για τη μελέτη της σύστασης και του πολυμορφισμού των πρωτεϊνών του αίγιου γάλακτος της φυλής Σκοπέλου ([Moatsou et al., 2006](#)) και σε συνδυασμό με ESI-MS για τη μελέτη της αίγιας β-καζεΐνης σε γάλα αυτόχθονων Ελληνικών φυλών. Επιπλέον με τη χρήση των μεθόδων RP-HPLC/ESI-MS, MALDI-MS και NanoESI MS/MS χαρακτηρίστηκε μια νέα παραλλαγή

της αίγειας β-καζεΐνης, η β-CN E (Moatsou *et al.*, 2007). Επίσης η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για τη συγκριτική μελέτη των πρωτεϊνών του αίγειου γάλακτος, όσον αφορά στα ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά τους, από αυτόχθονες Ελληνικές και διεθνείς φυλές (Moatsou *et al.*, 2008).

Οι Bonfatti *et al.* (2008), περιέγραψαν μια νέα μέθοδο RP-HPLC για το διαχωρισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των πιο κοινών γενετικών παραλλαγών των πρωτεϊνών του αγελαδινού γάλακτος. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας 40 νωπά μεμονωμένα δείγματα γάλακτος από αγελάδες τεσσάρων διαφορετικών φυλών και πρότυπη αποβουτυρωμένη σκόνη γάλακτος BCR-063R. Οι πιο κοινές γενετικές παραλλαγές των καζεϊνών και των πρωτεϊνών του ορού ανιχνεύθηκαν και διαχωρίστηκαν σε λιγότερο από 40min με εξαίρεση τις as1-CN B και as1-CN C.

Οι Veloso *et al.* (2002) χρησιμοποίησαν τη RP-HPLC-UV για το διαχωρισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των αγελαδινών κ-, α- και β-καζεϊνών. Η ίδια τεχνική χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό των ομόλογων πρόβειων και αίγειων καζεϊνών. Τα επιμέρους διαφορετικά χρωματογραφήματα των τριών ειδών γάλακτος, χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση προσθήκης αγελαδινού γάλακτος σε πρόβειο και αίγειο γάλα. Η ανάλυση επέτρεψε την ανίχνευση προσθήκης αγελαδινού γάλακτος σε αίγειο γάλα σε ποσοστό  $\geq 5\%$ , βάσει του εμβαδού της κορυφής της α-καζεΐνης. Η ανίχνευση την προσθήκης δεν ήταν εφικτή στην περίπτωση του πρόβειου γάλακτος. Οι ερευνητές αναφέρουν ότι η μέθοδος της urea-PAGE παρουσίασε μεγαλύτερη ευαισθησία όσον αφορά στην ανίχνευση της νοθείας του γάλακτος, ωστόσο η HPLC ήταν πιο αποτελεσματική όσον αφορά στα ποσοτικά αποτελέσματα.

Οι Moatsou *et al.* (2003) χρησιμοποίησαν τη RP-HPLC για την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε αίγειο γάλα με βάση το καζεΐνομακροπεπτιδίο (CMP). Με ανάλυση διαλυτών κλασμάτων σε pH 4,4 που προέρχονταν από διαφορετικά ποσοστά ανάμιξης του αγελαδινού γάλακτος με αίγειο, τα οποία προηγουμένως είχαν υδρολυθεί με πυτιά, επιτεύχθηκε ταυτοποίηση και ποσοτικός προσδιορισμός του αγελαδινού CMP, που επέτρεψαν την ανίχνευση προσθήκης αγελαδινού γάλακτος σε ποσοστό  $\geq 2,5\%$ . Η ένταση της θερμικής επεξεργασίας του γάλακτος δεν είχε σημαντική επίδραση στα ποιοτικά και ποσοτικά αποτελέσματα της ανάλυσης. Αναφέρεται ότι οι πρότυπες καμπύλες των ποσοτικών αποτελεσμάτων μιγμάτων γάλακτος γνωστής σύστασης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό αγελαδινού γάλακτος εντός συγκεκριμένων ορίων.

Οι *Sforza et al. (2008)* χρησιμοποίησαν την υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μαζών (LC/MS) για τον προσδιορισμό της προέλευσης του γάλακτος (αγελαδινό ή πρόβειο) σε φρέσκα πρόβεια πειραματικά τυριά τύπου Pecorino. Ως δείκτες της ανάλυσης χρησιμοποιήθηκαν δύο μικρά πεπτιδία, που προήλθαν από την υδρόλυση της  $\alpha_{s1}$ -καζεΐνης ( $\alpha_{s1}$ -CN f1-14 και f1-23) στα τυριά και τα οποία διαφοροποιούνται ελαφρώς στο αγελαδινό και στο πρόβειο γάλα. Η μέθοδος επέτρεψε με ευκολία την ανίχνευση των πεπτιδίων από τις αγελαδινές καζεΐνες στα τυριά που αναλύθηκαν, ακόμα και όταν η συγκέντρωση του αγελαδινού γάλακτος ήταν πολύ χαμηλή ( $\leq 1\%$ ). Οι ερευνητές αναφέρουν ότι η μέθοδος αυτή μπορεί να αποτελέσει μια απλούστερη εναλλακτική των επίσημων ηλεκτροφορητικών μεθόδων.

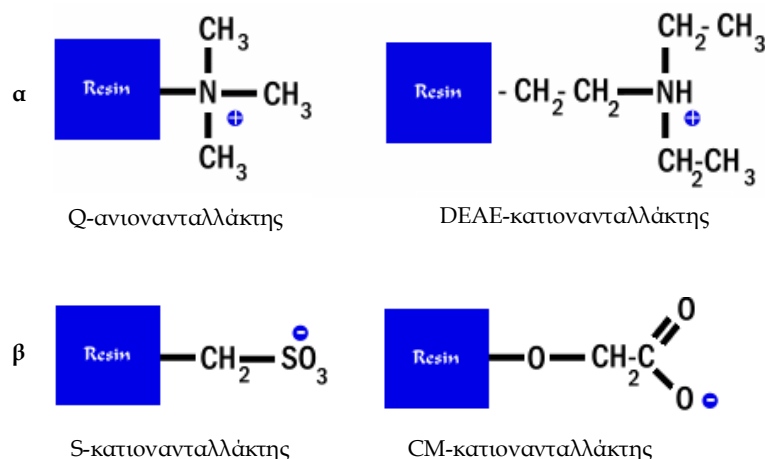
Τέλος, οι *Bonnizi et al. (2009)* χρησιμοποίησαν την RP-HPLC για το διαχωρισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των κύριων καζεϊνικών κλασμάτων του αγελαδινού γάλακτος. Η ταυτοποίηση των καζεϊνών πραγματοποιήθηκε με ESI-MS. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης καθιστούν τη μέθοδο κατάλληλη για τον αποτελεσματικό διαχωρισμό και ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό των καζεϊνικών κλασμάτων του αγελαδινού γάλακτος. Επιπλέον παρέχει τη δυνατότητα χρήσης απλοποιημένων αναλυτικών συνθηκών και ταχύτερο διαχωρισμό.

### 2.2.3 Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής

Η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής (IEC) βασίζεται στις ισχυρές αλληλεπιδράσεις φορτίων μεταξύ των πρωτεϊνών του δείγματος και της στατικής φάσης, που έχουν ως συνέπεια μεγαλύτερους χρόνους ανάλυσης και πλατιές χρωματογραφικές κορυφές.

Η IEC διακρίνεται σε χρωματογραφία κατιο-ανταλλαγής (CEC), στην οποία θετικά φορτισμένα ιόντα προσδένονται σ' ένα αρνητικά φορτισμένο υπόστρωμα και σε χρωματογραφία ανιο-ανταλλαγής (AEC), στην οποία τα ιόντα που προσδένονται στο υπόστρωμα είναι αρνητικά φορτισμένα και η λειτουργική ομάδα της στατικής φάσης είναι θετικά φορτισμένη. Στην Εικόνα 2-6 φαίνονται τα κοινώς χρησιμοποιούμενα υποστρώματα στη χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής ([www.ionsource.com](http://www.ionsource.com)).

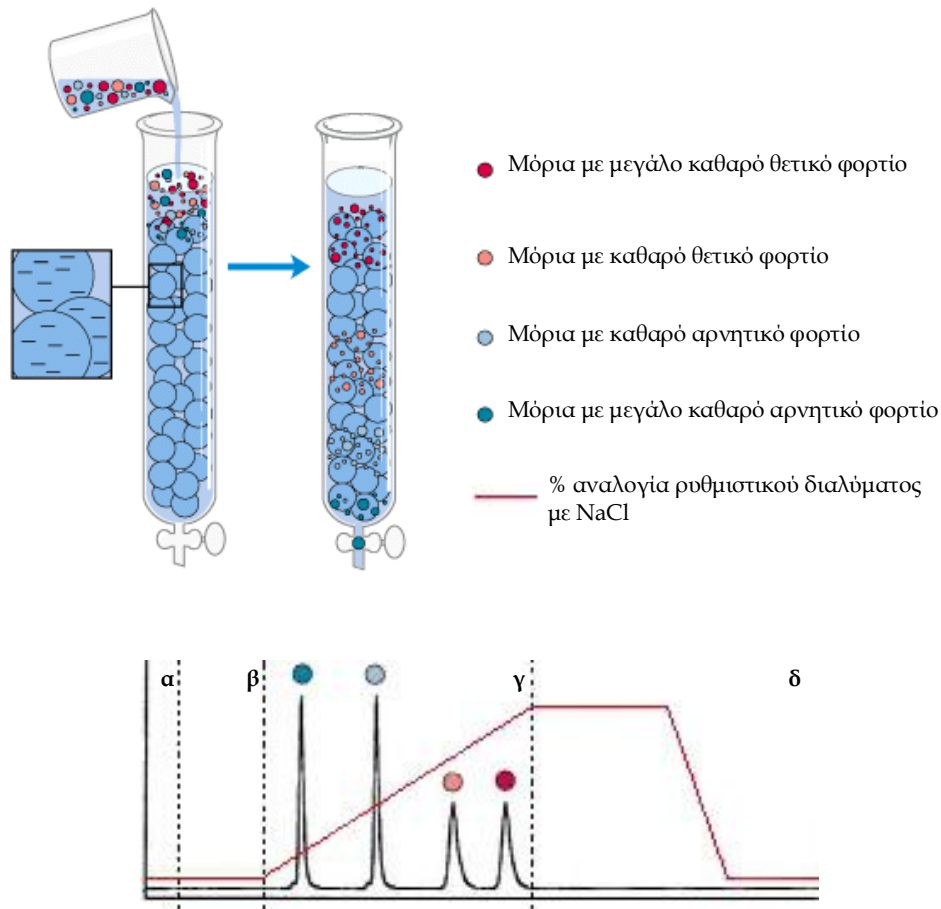




**Εικόνα 2-6:** Κοινώς χρησιμοποιούμενα υποστρώματα στη χρωματογραφία **α.** ανιο-ανταλλαγής και **β.** κατιο-ανταλλαγής (Πηγή: [www.proteinchemist.com/tutorial/iec.htm](http://www.proteinchemist.com/tutorial/iec.htm))

Το δείγμα φέρεται στο εσωτερικό της στήλης μέσω ρυθμιστικού διαλύματος χαμηλής ιοντικής δύναμης, που εξασφαλίζει την προσρόφηση των συστατικών του δείγματος στην στατική φάση και στη συνέχεια τα μόρια εκλούνται με τη χρήση ενός δεύτερου διαλύματος έκλουσης του οποίου η ιοντική δύναμη αυξάνει γραμμικά. Εναλλακτικά, το pH του διαλύματος έκλουσης μπορεί να τροποποιηθεί έτσι ώστε να προσδώσει στην πρωτεΐνη ή στο υποστρώμα φορτίο το οποίο δεν επιτρέπει πλέον την αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-υποστρώματος με αποτέλεσμα την έκλουση του μορίου. Τυπικά η χρωματογραφία κατιοντοανταλλαγής πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας ρυθμιστικά διαλύματα σε εύρος pH 4-7 ([www.ionsource.com](http://www.ionsource.com)).

Όπως προαναφέρθηκε, ο διαχωρισμός στη χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής βασίζεται στην αντιστρεπτή προσρόφηση φορτισμένων διαλυμένων μορίων σε ακινητοποιημένες ομάδες ανταλλαγής ιόντων με αντίθετο φορτίο. Οι περισσότερες αναλύσεις διεξάγονται σε τέσσερα κύρια στάδια, τα οποία παρουσιάζονται σχηματικά στην Εικόνα 2-7 ([www5.gelifesciences.com/APTRIX/upp00919.nsf/4a0f132842ea4d354a25685d0011fa04/4a555d526b88731ac1256e92003e865c/\\$FILE/GE\\_Ion%20Exchange.swf](http://www5.gelifesciences.com/APTRIX/upp00919.nsf/4a0f132842ea4d354a25685d0011fa04/4a555d526b88731ac1256e92003e865c/$FILE/GE_Ion%20Exchange.swf)).



**Εικόνα 2-7:** Σχηματική αναπαράσταση της αρχής διαχωρισμού στη χρωματογραφία κατιον-ανταλλαγής: α. εξισορρόπηση της στατικής φάσης, β. εφαρμογή του δείγματος, γ. έκλουση, δ. αντιστάθμιση της στήλης

(Πηγή: [www.biochem.arizona.edu/classes/bioc462/462a/...](http://www.biochem.arizona.edu/classes/bioc462/462a/...))

Αρχικά πραγματοποιείται εξισορρόπηση της στατικής φάσης στις επιθυμητές αρχικές συνθήκες. Όταν αυτή επιτευχθεί, όλες οι φορτισμένες ομάδες της στατικής φάσης, είναι συνδεδεμένες με ανταλλάξιμα ιόντα αντίθετου φορτίου. Ακολουθεί η εφαρμογή του δείγματος και η έκπλυση, με σκοπό τη δέσμευση των μορίων στόχων και την έκπλυση όλων των αδέσμευτων υλικών. Το ρυθμιστικό διάλυμα του δείγματος πρέπει να έχει το ίδιο pH και την ίδια ιοντική δύναμη με το αρχικό ρυθμιστικό διάλυμα για να μπορέσουν να δεσμευτούν όλες οι κατάλληλα φορτισμένες πρωτεΐνες. Κατά την έκλουση, τα βιομόρια απελευθερώνονται από τη στατική φάση ανταλλαγής ιόντων με τροποποίηση της σύστασης των διαλυμάτων έκλουσης. Ο πιο κοινός τρόπος είναι η αύξηση της ιοντικής δύναμης με NaCl ή άλλο απλό αλάτι, με σκοπό την αποσύνδεση των δεσμευμένων

πρωτεϊνών. Η εκρόφιση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται ανάλογα με τον αριθμό των φορτισμένων ομάδων στην επιφάνειά τους. Το τελικό βήμα, είναι η αντιστάθμιση της στήλης, κατά την οποία απομακρύνονται όλα τα μόρια που είναι ακόμα προσροφημένα. Έτσι εξασφαλίζεται ότι η χωρητικότητα της στατικής φάσης είναι πλήρως διαθέσιμη για την επόμενη ανάλυση ([www5.gelifesciences.com/APTRIX/upp00919.nsf/4a0f132842ea4d354a25685d0011fa04/4a555d526b88731ac1256e92003e865c/\\$FILE/GE\\_Ion%20Exchange.swf](http://www5.gelifesciences.com/APTRIX/upp00919.nsf/4a0f132842ea4d354a25685d0011fa04/4a555d526b88731ac1256e92003e865c/$FILE/GE_Ion%20Exchange.swf)).

Οι [Kaminarides & Anifantakis \(1993\)](#), χρησιμοποίησαν μια ισχυρά ανιο-ανταλλακτική στήλη για το διαχωρισμό των καζεϊνών αγελαδινού, πρόβειου και αίγειου γάλακτος και αναφέρουν ότι η σχηματιζόμενη κορυφή έκλυσης της  $\alpha_{s1}$ -καζεΐνης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για την ανίχνευση προσθήκης αγελαδινού γάλακτος σε πρόβειο και αίγειο γάλα.

Οι [Mayer et al. \(1997\)](#) χρησιμοποίησαν τη χρωματογραφία κατιο-ανταλλαγής για την παρα-κ-καζεΐνη προκειμένου να προσδιορίσουν το ποσοστό αγελαδινού, πρόβειου και αίγειου γάλακτος σε πειραματικά τυριά Camembert που παρασκευάστηκαν από μίγματα αυτών. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε μια ασθενής στήλη κατιο-ανταλλαγής και οι παρα-κ-καζεΐνες των τριών ειδών γάλακτος διαχωρίστηκαν ικανοποιητικά κάτω από τις ίδιες χρωματογραφικές συνθήκες. Καθώς η μέθοδος δεν επηρεάστηκε σημαντικά από το βαθμό της ωρίμασης, φαίνεται κατάλληλη για τον προσδιορισμό του ποσοστού του αγελαδινού, πρόβειου και αίγειου γάλακτος σε τυριά που παρασκευάστηκαν από μίγματα των τριών ειδών γάλακτος. Ωστόσο, ο ποσοτικός προσδιορισμός της νοθείας μπορεί να γίνει μόνο κατά προσέγγιση, αφού το εκτιμώμενο ποσοστό του αγελαδινού γάλακτος στα τυριά επηρεάζεται σημαντικά από το καζεϊνικό περιεχόμενο του πρόβειου και αίγειου γάλακτος που χρησιμοποιήθηκαν στην τυροκόμηση.

Οι [Volitaki & Kaminarides \(2001\)](#) χρησιμοποίησαν την μέθοδο της ανιο-ανταλλακτικής HPLC για την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε πρόβειο τυρί Χαλούμι βάσει των γ-καζεϊνών, μετά από υδρόλυση των καζεϊνών του τυριού με πλασμίνη. Για το σκοπό αυτό παρασκευάστηκαν τυριά από αγελαδινό και πρόβειο γάλα και πρότυπα μίγματα των δύο ειδών γάλακτος. Οι χρωματογραφικές κορυφές των αγελαδινών γ-CN διαχωρίστηκαν ξεκάθαρα από αυτές των αντίστοιχων πρόβειων. Επιπλέον το εμβαδό της κορυφής παρουσίασε γραμμική σχέση με το ποσοστό του αγελαδινού γάλακτος στα μίγματα. Οι ερευνητές αναφέρουν ότι η μέθοδος επιτρέπει την ανίχνευση της προσθήκης

αγελαδινού γάλακτος σε ποσοστό  $\geq 1\%$  σε πρόβειο τυρί Χαλούμι τόσο κατά την 1<sup>η</sup> ημέρα όσο και σε τυριά ηλικίας 40 ημερών σε άλημη.

Οι [Moatsou et al. \(2004a\)](#) εφάρμοσαν την παραπάνω μέθοδο για την ανίχνευση αίγειας καζεΐνης σε πρόβειο τυρί Χαλούμι. Για το σκοπό αυτό παρασκευάστηκε τυρί Χαλούμι από διαφορετικά μίγματα πρόβειου, αίγειου και αγελαδινού γάλακτος. Τα καζεϊνικά κλάσματα του τυριού αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας κατιο-ανταλλακτική HPLC για την παρα-κ-καζεΐνη. Η ανίχνευση της αίγειας καζεΐνης στο τυρί βασίστηκε στους χρόνους έκλουσης και στο εμβαδό των κορυφών της αίγειας και πρόβειας παρα-κ-CN. Το όριο ανίχνευσης του αίγειου γάλακτος ήταν 5% (w/w). Τα εκτιμώμενα ποσοστά της αίγειας παρα-κ-CN που ανιχνεύθηκε στο τυρί ήταν μικρότερα από τα αντίστοιχα ποσοστά του αίγειου γάλακτος στο γάλα της τυροκόμησης. Ωστόσο τα επίπεδα της αίγειας παρα-κ-CN στο τυρί φαίνεται ότι συσχετίζονται σημαντικά με το επίπεδο του αίγειου γάλακτος στο μίγμα πρόβειου-αίγειου γάλακτος που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του τυριού. Στην περίπτωση ανάλυσης άγνωστων δειγμάτων για την ανίχνευση της προσθήκης αίγειου ή αγελαδινού γάλακτος απαιτείται η χρήση του IEF των  $\gamma$ - και παρα-κ-καζεϊνών, μετά από υδρόλυση των καζεϊνών με πλασμίνη, αφού η κατιο-ανταλλακτική HPLC δεν επέτρεψε τον προσδιορισμό της αγελαδινής παρα-κ-καζεΐνης λόγω της ταυτόχρονης έκλουσης αυτής με την πρόβεια και αίγεια  $\alpha_{s2}$ -καζεΐνη.

Ο [Mayer \(2005\)](#) χρησιμοποίησε την ανιο-ανταλλακτική HPLC για την ανίχνευση προσθήκης αγελαδινού γάλακτος σε πρόβειο γάλα. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι η αγελαδινή  $\alpha_{s1}$ -CN μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για την ανίχνευση της νοθείας. Επιπλέον, χρησιμοποιώντας πρότυπα μίγματα αγελαδινού και πρόβειου γάλακτος, η κορυφή της αγελαδινής  $\alpha_{s1}$ -CN μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση του ποσοστού του αγελαδινού γάλακτος στα μίγματα. Η μέθοδος δεν φαίνεται κατάλληλη για την ανίχνευση νοθείας σε τυριά, καθώς η  $\alpha_{s1}$ -CN υδρολύεται ταχύτατα κατά την ωρίμαση πολλών τύπων τυριών. Ωστόσο, το πεπτιδίο  $\alpha_{s1}$ -I ( $\alpha_{s1}$ -CN f24-199) έχει χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για την ανίχνευση νοθείας σε τυρί Gouda. Τα αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού εξαρτώνται από το στάδιο ωρίμασης του τυριού ([Moatsou, 2009](#)). Ο ίδιος ερευνητής ([Mayer, 2005](#)) εφάρμοσε τη μέθοδο της κατιον-ανταλλακτικής HPLC για το διαχωρισμό αγελαδινών, πρόβειων και αίγειων καζεϊνών σε τυριά Tilsit 9 εβδομάδων που παρασκευάστηκαν από μίγματα των τριών ειδών γάλακτος. Αν και παρατηρήθηκαν πρωτεολυτικές αλλαγές κατά την ωρίμαση, οι κορυφές των παρα-κ-CN διαχωρίστηκαν ικανοποιητικά ακόμα και σε υπερώριμα τυριά.

#### 2.2.4 Χρωματογραφία υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων

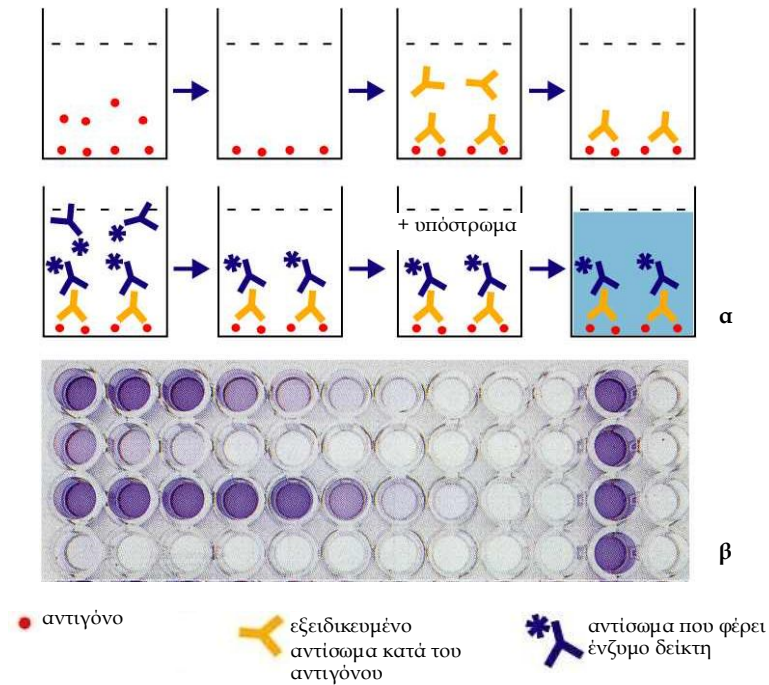
Η χρωματογραφία υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων (Hydrophobic Interaction Chromatography - HIC) είναι μια εξειδικευμένη μέθοδος ανεστραμμένης φάσης που επιτρέπει την κατακράτηση πρωτεϊνών σε ήπια υδρόφοβη στατική φάση. Αυτός ο τύπος χρησιμοποιείται συνήθως για το διαχωρισμό πρωτεϊνών γιατί παρέχει ικανοποιητική ανάλυση και ανάκτηση βιοενεργών πρωτεϊνών. Στη HIC, οι πρωτεΐνες δεσμεύονται σε μια τροποποιημένη υδρόφοβη επιφάνεια χρησιμοποιώντας κινητή φάση με υψηλή ιοντική δύναμη και στη συνέχεια εκλύονται με γραμμική μείωση της ιοντικής δύναμης. Στην κινητή φάση χρησιμοποιούνται αποκλειστικά υδατικά διαλύματα και στους παράγοντες που επηρεάζουν την έκλυση περιλαμβάνονται η συγκέντρωση και το είδος του ρυθμιστικού αλατιού, το pH του ρυθμιστικού διαλύματος, η παρουσία επιφανειοδραστικών ουσιών, η θερμοκρασία της στήλης και η λειτουργικότητα της στατικής φάσης. Το κύριο πλεονέκτημα της HIC, όταν συγκρίνεται με τη συμβατική χρωματογραφία ανεστραμμένης φάσης, είναι ότι λόγω της χρήσης υδατικών διαλυμάτων αποφεύγεται η μετουσίωση των πρωτεϊνών. Επειδή οι πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους υπό συνθήκες υψηλής ιοντικής δύναμης, καλύτερη ανάλυση στη HIC επιτυγχάνεται όταν ως δείγμα χρησιμοποιείται υλικό που προηγουμένως έχει καθαριστεί μερικώς. Συνήθως η HIC χρησιμοποιείται ως δευτερεύουσα μέθοδος διαχωρισμού -αυτή η τεχνική χρωματογραφίας είναι ιδιαίτερα κατάλληλη όταν έχει προηγηθεί κατακρήμνιση με θειικό αμμώνιο. Οι συμβατικές στήλες ανεστραμμένης φάσης είναι πολύ υδρόφοβες -μεγάλος χρόνος κατακράτησης- για να χρησιμοποιηθούν με καθαρά υδατικά διαλύματα. Τα υλικά της στατικής φάσης στη HIC έχουν μεγαλύτερο μέγεθος πόρων (1000 Å) από τις στήλες ανεστραμμένης φάσης και είναι αποτέλεσμα δεσμών χαμηλής πυκνότητας μεταξύ των λειτουργικών ομάδων C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub>, φαινυλομάδας, C<sub>5</sub> ή διόλης με διοξείδιο του πυριτίου (silica) επικαλυμένο με πολυαμίδιο ή πηκτή όπως Sepharose ή πολυμεθυλοακρυλικό. Οι δεσμοί χαμηλής πυκνότητας, παράγουν στατικές φάσεις οι οποίες είναι ελαφρώς λειτουργικές με αποτέλεσμα μικρή ως μεσαία υδροφοβία, ενώ η μεγάλη διάμετρος των πόρων επιτρέπει την ταχεία διάχυση των πρωτεϊνών (Robards *et al.*, 1994).

Οι Bramanti *et al.* (2003) χρησιμοποίησαν τη HIC για το διαχωρισμό και τον προσδιορισμό των α<sub>s1</sub>-, α<sub>s2</sub>-, β- και κ-καζεΐνών σε νωπό αγελαδινό, πρόβειο και αίγιο γάλα χρησιμοποιώντας τη στήλη Propyl (Eichrom) παρουσία 8M ουρίας στην κινητή φάση. Η HIC σε συνδυασμό με ισχυρά μέσα μετουσίωσης οδήγησε σε ικανοποιητικό διαχωρισμό και ποσοτικό προσδιορισμό των α<sub>s1</sub>-, α<sub>s2</sub>-, β- και κ-καζεΐνών σε εμπορικά

δείγματα νωπού γάλακτος και τυριών. Πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι οι καζεΐνες στα τυριά παρουσίασαν τον ίδιο αριθμό κορυφών όπως και οι μη υδρολυμένες καζεΐνες του γάλακτος. Η αναλογία των εμβαδών των κορυφών των καζεϊνών ( $\alpha_{s1}/\kappa$ ,  $\alpha_{s2}/\beta$ ,  $\beta/\kappa$  και  $\alpha_{s2}/\alpha_{s1}$ ) χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση και την εκτίμηση της σύστασης των μιγμάτων. Οι ερευνητές αναφέρουν ότι η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση προσθήκης αγελαδινού γάλακτος σε πρόβειο και αίγιο γάλα.

### 2.3 Ανοσοχημικές μέθοδοι

Οι μέθοδοι ανοσοπροσδιορισμού θεωρούνται εξαιρετικές για την αντικατάσταση των συμβατικών αναλυτικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση του είδους του γάλακτος. Για την ανίχνευση μιγμάτων γάλακτος χρησιμοποιούν κυρίως πολυκλωνικά αντισώματα έναντι πρωτεϊνών του ορού, ακατέργαστων (crude) καζεϊνών, μικρών πεπτιδίων πρωτεϊνών γάλακτος ή ανοσογλοβουλινών. Ωστόσο το ενδιαφέρον για αυτές τις μεθόδους οφείλεται στα πλεονεκτήματά τους: ευαισθησία, εξειδίκευση και μικρό κόστος (Haza *et al.*, 1999). Από το 1990, η μέθοδος ELISA, που είναι η συντομογραφία του όρου Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ενζυμική ανοσοπροσοροφητική μέθοδος προσδιορισμού) είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική ανοσοπροσδιορισμού για την ανίχνευση γάλακτος από διαφορετικά είδη. Είναι μία απλή, ευαίσθητη, γρήγορη και αξιόπιστη μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό αντιγόνων και αντισωμάτων. Βασίζεται στην παραγωγή χρώματος από ένα αντισωμα ή αντιγόνο που φέρει ένα ένζυμο-δείκτη, το οποίο προκαλεί υδρόλυση ενός χρωμογόνου υποστρώματος. Μπορεί να ανιχνεύσει 10 pg/ml αντιγόνου και η ευαισθησία της εξαρτάται από τη συγγένεια των διαθέσιμων αντισωμάτων και την τεχνική διαμόρφωσης της ανάλυσης. Η συγκέντρωση του παραγόμενου υποστρώματος είναι άμεσα ανάλογη με τη συγκέντρωση τόσο των προτύπων που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση όσο και του αντιγόνου που περιέχεται στο αναλυόμενο δείγμα. Η μέθοδος ELISA συνήθως πραγματοποιείται σε εμπορικά πλακίδια 96-μικροκυψελίδων (πηγάδια) που επιτρέπουν τη χρήση μικρών όγκων δείγματος και την ταυτόχρονη, ταχεία ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων (Εικόνα 2-8). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης λαμβάνονται από ειδικά σχεδιασμένα πολυδιαυλικά φωτόμετρα (Moatsou and Anifantakis, 2003).

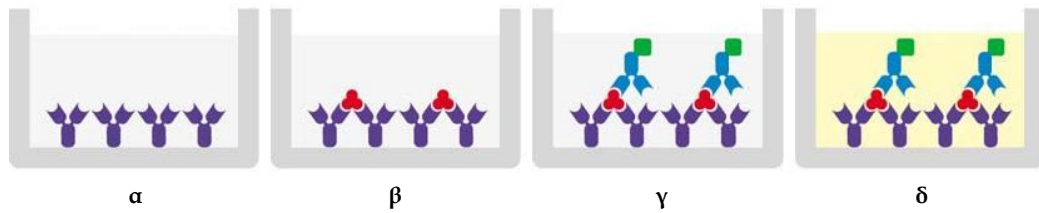


**Εικόνα 2-8:** α. Σχηματική αναπαράσταση της έμμεσης τεχνικής ELISA και β. Εμπορικό πλακίδιο στο οποίο έχει εφαρμοστεί η ανάλυση. Οι μικροκυψελίδες μωβ χρώματος αντιστοιχούν σε θετική δοκιμή (Πηγή: [www.microvet.arizona.edu/.../ToolBox/elisa.html](http://www.microvet.arizona.edu/.../ToolBox/elisa.html))

Οι μέθοδοι ELISA, ανάλογα με την τεχνική διαμόρφωσης τους διακρίνονται σε (Moatsou and Anifantakis, 2003):

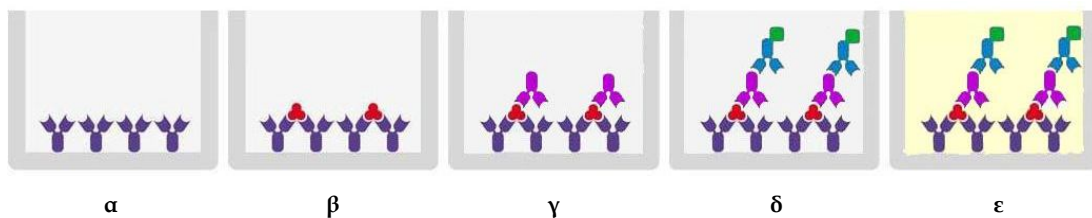
1. Άμεσες, στις οποίες το αντίσωμα ή το αντιγόνο είναι προσδεμένο σε στερεή φάση και αντιδρά άμεσα με ένα συζυγές αντιγόνο ή αντίσωμα, αντίστοιχα, που φέρει ένζυμο δείκτη.
2. Έμμεσες, στις οποίες τα αντισώματα ενός συγκεκριμένου είδους αντιδρούν με αντιγόνα που είναι προσδεμένα σε μια στερεή φάση. Τα αντισώματα που δεσμεύονται ανιχνεύονται με την προσθήκη αντι-ορού που φέρει ένα ένζυμο-δείκτη (Εικόνα 2-8).
3. Sandwich-ELISAs, που μπορεί να είναι άμεσες ή έμμεσες. Στην άμεση ανάλυση, τα αντισώματα είναι προσδεμένα σε στερεή φάση για να δεσμεύσουν τα αντιγόνα. Η ανίχνευσή τους πραγματοποιείται με τη χρήση εξειδικευμένου για το αντιγόνο ορού, που φέρει ένα ένζυμο-δείκτη. Το αντιγόνο πρέπει να έχει τουλάχιστον 2 αντιγονικές περιοχές (Εικόνα 2-9). Στην έμμεση ανάλυση το αντίσωμα ανίχνευσης προέρχεται από διαφορετικό είδος σε σχέση με το αντίσωμα δέσμευσης. Ένα αντίσωμα αντι-είδους που

φέρει ένζυμο-δείκτη προσδένεται στο εξειδικευμένο αντίσωμα ανίχνευσης και όχι στο αντίσωμα δέσμευσης (Εικόνα 2-10).



**Εικόνα 2-9:** Σχηματική αναπαράσταση της άμεσης τεχνικής sandwich ELISA.

- α. μικροκυψελίδα που φέρει αντίσωμα δέσμευσης, β. προσθήκη αντιγόνου της αναλυόμενης ουσίας, γ. προσθήκη αντισώματος ανίχνευσης που φέρει ένζυμο, δ. προσθήκη υποστρώματος ενζύμου και αποχρωματισμός (Πηγή: [www.new-science-press.com/.../illustrations/6/](http://www.new-science-press.com/.../illustrations/6/))



**Εικόνα 2-10:** Σχηματική αναπαράσταση της έμμεσης τεχνικής sandwich ELISA.

- α. μικροκυψελίδα που φέρει αντίσωμα δέσμευσης, β. προσθήκη αντιγόνου της αναλυόμενης ουσίας, γ. προσθήκη εξειδικευμένου αντισώματος ανίχνευσης, δ. προσθήκη αντισώματος αντι-ειδους που φέρει ένζυμο, ε. προσθήκη υποστρώματος ενζύμου και αποχρωματισμός (Πηγή: [www.new-science-press.com/.../illustrations/6/](http://www.new-science-press.com/.../illustrations/6/))

4. Ανταγωνιστικές, που μπορεί να είναι άμεσες ή έμμεσες και αντισώματος ή αντιγόνου. Δύο αντιδρώντα (αντισώματα ή αντιγόνα) προσπαθούν να προσδεθούν σ'ένα τρίτο. Περιλαμβάνουν την ταυτόχρονη προσθήκη των δύο ανταγωνιστών.

Εκτός από την ταυτοποίηση του είδους του γάλακτος σε γαλακτοκομικά προϊόντα, η μέθοδος ELISA, έχει χρησιμοποιηθεί επίσης για την ανίχνευση και τον ανοσοβιολογικό χαρακτηρισμό μεμονωμένων καζεϊνών ή κλασμάτων τους με τη χρήση αντιπεπτιδικών αντισωμάτων, για την παρακολούθηση της πρωτεόλυσης κατά την ωρίμαση των τυριών, για την αξιολόγηση των προϊόντων της αντίδρασης Maillard (λακτόζη-καζεΐνη) σε θερμικά επεξεργασμένο γάλα και σκόνη γάλακτος, για την ανίχνευση υπολειμματικής



χυμοσίνης στο τυρί ή για τον προσδιορισμό φυσικών και θερμικώς αλλοδομημένων πρωτεϊνών του ορού (Moatsou and Anifantakis, 2003).

Ο μεγάλος βαθμός ομοιότητας μεταξύ ομόλογων καζεϊνών από διαφορετικά είδη έχει ως αποτέλεσμα τη δυσκολία διαχωρισμού τους με ανοσοβιολογικές μεθόδους. Επιπλέον, η πρωτεόλυση κατά την ωρίμαση των τυριών πιθανόν να τροποποιεί τα αντιγονικά τους χαρακτηριστικά. Ωστόσο, η ανοσοβιολογική δραστικότητα των καζεϊνών δεν επηρεάζεται από τη θέρμανση. Επομένως είναι οι πιο κατάλληλες για χρήση σε ανοσοβιολογικές μεθόδους για την ανίχνευση μιγμάτων γάλακτος σε θερμικώς επεξεργασμένα γαλακτοκομικά προϊόντα (Moatsou and Anifantakis, 2003). Οι τεχνικές ELISA που βασίζονται στα αντισώματα έναντι των αγελαδινών ανοσογλοβουλινών δεν φαίνονται κατάλληλες, αφού δεν είναι εφικτή η ανίχνευση της προσθήκης θερμικώς επεξεργασμένου γάλακτος ή καζεϊνικών αλάτων, ενώ οι μέθοδοι ELISA που χρησιμοποιούν εξειδικευμένα αντισώματα για τις αγελαδινές γ-CN είναι πιο κατάλληλες (Mayer, 2005)

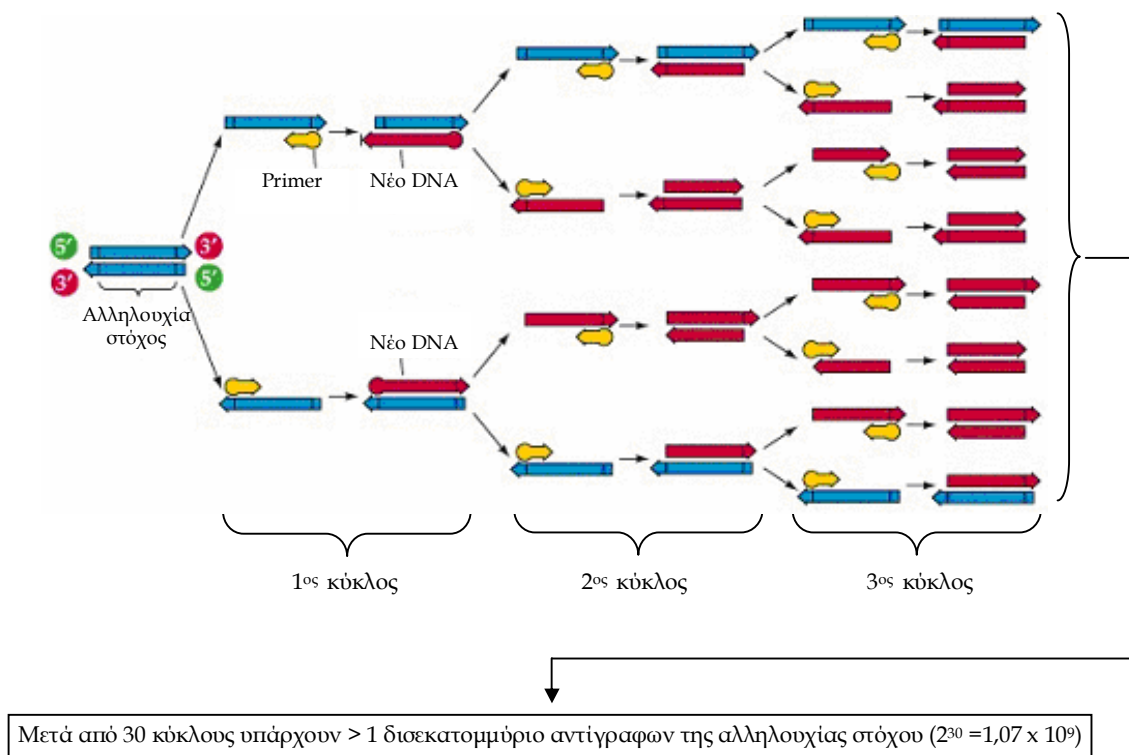
Οι Rodriguez *et al.* (1991) διαμόρφωσαν μια έμμεση τεχνική ELISA για την ανίχνευση διαφόρων ποσοστών αίγειου γάλακτος (1-25%) σε πρόβειο γάλα και τυρί. Η μέθοδος χρησιμοποιεί πολυκλωνικά αντισώματα έναντι των αίγειων καζεϊνών. Η ανάλυση δειγμάτων πρόβειου γάλακτος και τυριού που περιείχαν διαφορετικές ποσότητες αίγειου γάλακτος επηρέασε το χρώμα που αναπτύχθηκε από την ενζυμική τροποποίηση του υποστρώματος και παρατηρήθηκαν σαφείς διαφορές της οπτικής πυκνότητας, ανάλογες με την ποσότητα του προστιθέμενου αίγειου γάλακτος. Οι Rodriguez *et al.* (1993) διαμόρφωσαν μια sandwich ELISA τεχνική για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό αγελαδινού γάλακτος σε πρόβειο γάλα και τυρί με τη χρήση πολυκλωνικών αντισωμάτων έναντι των αγελαδινών καζεϊνών. Αναφέρεται ότι η μέθοδος έχει όριο ανίχνευσης 0,5-15% και 0,5-25% αγελαδινού γάλακτος σε πρόβειο γάλα και τυρί αντίστοιχα. Οι Richter *et al.* (1997) ανέπτυξαν μια έμμεση ανταγωνιστική τεχνική ELISA για την ανίχνευση 0,1% αγελαδινού γάλακτος και καζεϊνικών αλάτων σε πρόβειο και αίγειο γάλα και τυρί. Η μέθοδος χρησιμοποιεί πολυκλωνικά αντισώματα έναντι των γ<sub>3</sub>-καζεϊνών και δεν επηρεάστηκε από την ένταση της θερμικής επεξεργασίας του αγελαδινού γάλακτος. Πειραματικές μελέτες αναφέρουν ότι πολυκλωνικά αντισώματα έναντι του β-CN f1-284P φωσφοπεπτιδίου, που προέρχεται από την αγελαδινή β-CN από τη δράση της πλασμίνης, μπορεί να είναι κατάλληλη για την ανίχνευση αγελαδινής καζεϊνης σε πρόβεια και αίγεια φρέσκα γαλακτοκομικά προϊόντα (Pizzano *et al.*, 2000). Επίσης, έχουν

χρησιμοποιηθεί ως αντιγόνα, πολυκλωνικά αντισώματα έναντι συνθετικών πεπτιδίων που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένες περιοχές των πρωτεϊνών γάλακτος και είναι συζευγμένα σε φορείς (Moatsou, 2009). Τεχνικές που χρησιμοποιούν πολυκλωνικά αντισώματα έναντι του συνθετικού αγελαδινού κλάσματος της  $\alpha_{s1}$ -καζεΐνης ( $\alpha_{s1}$ -CN f140-149), έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε πρόβειο γάλα και τυρί με όρια ανίχνευσης 0,125% και 0,5% αντίστοιχα. Η μέθοδος δεν επηρεάστηκε από τη θερμική επεξεργασία του αγελαδινού γάλακτος ή από το βαθμό ωρίμανσης του τυριού (Rolland *et al.*, 1993). Πολυκλωνικά αντισώματα έναντι του συνθετικού 139-152 πεπτιδίου της αγελαδινής κ-καζεΐνης (κ-CN f139-152) έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση αγελαδινού CMP σε γάλα και τυρί που παρασκευάστηκε από μίγμα πρόβειου ή αίγειου γάλακτος με νωπό ή θερμικώς επεξεργασμένο αγελαδινό γάλα. Το όριο ανίχνευσης έχει εκτιμηθεί σε 0,25% αγελαδινού γάλακτος (Moatsou, 2009).

Η τεχνολογία του υβριδώματος για την παραγωγή μονοκλωνικών, μονοειδικών αντισωμάτων (MAbs) έναντι των πρωτεϊνών του γάλακτος ή των κλασμάτων τους μπορεί να εξαλείψει την αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών από διαφορετικά είδη. (Moatsou, 2009). Μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της αίγειας  $\alpha_{s2}$ -καζεΐνης έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό αίγειου γάλακτος σε πρόβειο γάλα (Haza *et al.*, 1996) και πρόβειο τυρί (Haza *et al.*, 1999). Το όριο ανίχνευσης των μεθόδων και στις δύο περιπτώσεις ανέρχεται σε 0,5% αίγειου γάλακτος. Ανοσοβιολογικές μέθοδοι που χρησιμοποιούν μονοκλωνικά αντισώματα έναντι των αγελαδινών κ-CN έχουν εφαρμοστεί σε αυτοματοποιημένο οπτικό βιοαισθητήρα για την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε αίγειο και πρόβειο γάλα με όριο ανίχνευσης 0,1% και εύρος μέτρησης 0,1-10% αγελαδινού γάλακτος. Η μέθοδος αυτή έχει προταθεί ως γρήγορο σύστημα ελέγχου του νωπού γάλακτος πριν την παρασκευή γαλακτοκομικών προϊόντων (Haasnoot *et al.*, 2004). Τέλος, οι Lopez-Calleja *et al.* (2007c) χρησιμοποίησαν μια έμμεση τεχνική ELISA, που αξιοποιεί ένα μονοκλωνικό αντίσωμα (AH4) έναντι της αγελαδινής β-καζεΐνης, για την ανίχνευση μικρού ποσοστού αγελαδινού γάλακτος ( $\geq 1\%$ ) σε πρόβειο και αίγειο τυρί.

## 2.4 Τεχνική της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction - PCR)

Η PCR είναι μια τεχνική ενίσχυσης για τη δημιουργία μεγάλων ποσοτήτων μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA *in vitro*. Μια τυπική διαδικασία PCR περιλαμβάνει 30 ή περισσότερους επιτυχείς κύκλους (Εικόνα 2-11), καθένας από του οποίους αποτελείται από 3 στάδια: αποδιάταξη της αλληλουχίας στόχου του DNA στους 95 °C, μετουσίωση στους 55 °C και *in vitro* σύνθεση DNA στους 75 °C (Εικόνα 2-12).

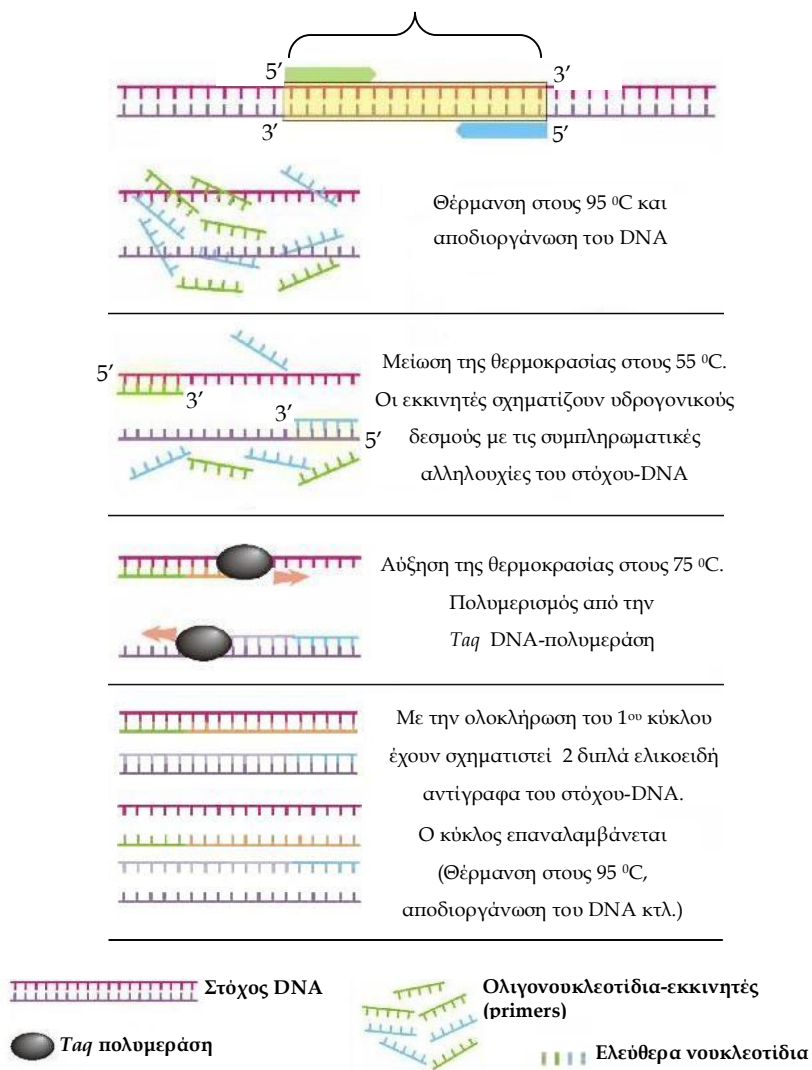


**Εικόνα 2-11:** Σχηματική αναπαράσταση των επαναλαμβανόμενων κύκλων στην τεχνική PCR

(Πηγή: [www.odec.ca/projects/2005/anna5m0/public\\_html/methods.htm](http://www.odec.ca/projects/2005/anna5m0/public_html/methods.htm))

Τα βασικά συστατικά που συμμετέχουν στα παραπάνω στάδια είναι η αλληλουχία στόχος στο δείγμα DNA, μήκους 100-35000 bp, δύο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια εκκινητές (primers) -καθολικοί ή εξειδικευμένοι- σε άφθονη ποσότητα, τα οποία είναι συμπληρωματικά των άκρων της αλληλουχίας του στόχου-DNA, μια θερμοανθεκτική DNA-πολυμεράση (*Taq* DNA-πολυμεράση) και τέσσερα δεσοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs). Οι τεχνικές PCR παρουσιάζουν πλεονεκτήματα έναντι των τεχνικών ELISA όσον αφορά

στην ευαισθησία και στην καταλληλότητα για την ανάλυση επεξεργασμένων προϊόντων (Moatsou, 2009).



Εικόνα 2-12: Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων ενός κύκλου στην τεχνική PCR (Πηγή: [universe-review.ca/R11-16-DNAsequencing.htm](http://universe-review.ca/R11-16-DNAsequencing.htm))

Τα δείγματα γάλακτος αποτελούν κατάλληλη πηγή καθαρού DNA λόγω της περιεκτικότητάς τους σε σωματικά κύτταρα, που αποτελούνται κυρίως από λευκοκύτταρα και δευτερευόντως από επιθηλιακά κύτταρα. Αυτό το DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα για την ενίσχυση συγκεκριμένης αλληλουχίας του χρησιμοποιώντας την τεχνική PCR (Mafra *et al.*, 2008; Moatsou *et al.*, 2009). Το DNA των σωματικών κυττάρων

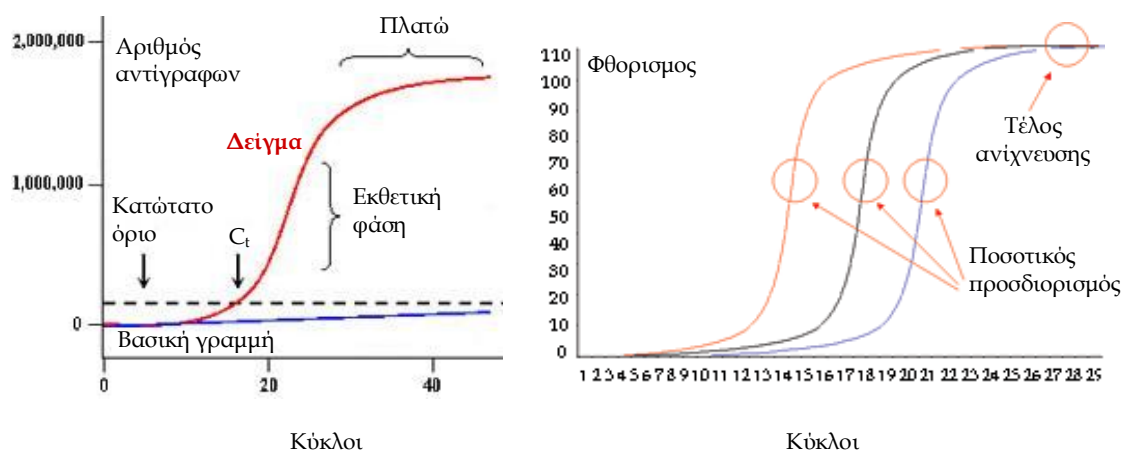
είναι σχετικά σταθερό καθώς φαίνεται ότι δεν επηρεάζεται από τις συνθήκες επεξεργασίας του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων -θερμική επεξεργασία διαφόρων εντάσεων, συμπύκνωση, ξήρανση, ενζυμική ή όξινη πήξη, ζύμωση και ωρίμαση του τυριού- που εφαρμόζονται για την επιμήκυνση του χρόνου διάρκειας ζωής τους ή για την ανάπτυξη ειδικών χαρακτηριστικών και πιθανόν να μεταβάλλουν τη φύση του γαλακτοκομικού προϊόντος (Moatsou, 2009). Ο Mayer (2005) αναφέρει ότι ο έλεγχος της νοθείας με τη χρήση της τεχνικής PCR είναι επιτυχής ακόμα και στις περιπτώσεις ώριμων τυριών και θερμικώς επεξεργασμένων γαλακτοκομικών προϊόντων για την ανίχνευση αγγελαδινών καζεϊνικών αλάτων σε πρόβειο και αίγιο τυρί, χρησιμοποιώντας εξειδικευμένους εκκινητές (primers).

Πρώτο βήμα της εφαρμογής των μοριακών τεχνικών είναι η απομόνωση DNA ελεύθερου παρεμποδιστών από τα γαλακτοκομικά δείγματα. Για το λόγο αυτό λαμβάνεται με φυγοκέντρηση ίζημα κυττάρων από δείγματα γάλακτος. Η λύση των κυττάρων πραγματοποιείται με ρυθμιστικό διάλυμα εξαγωγής, και ακολουθεί επεξεργασία με χλωροφόρμιο/μεθανόλη. Τελικώς το DNA λαμβάνεται μετά από καθίζηση με αιθανόλη ή με απορρόφηση σε κόκκους διοξειδίου του πυριτίου. Η εξαγωγή του DNA από το τυρί πραγματοποιείται με ομογενοποίησή του σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl με pH 7,5-8,0 παρουσία ισοκυανικής γουανιδίνης (guanidium isocyanate), EDTA, β-μερκαπτοαιθανόλη ή SDS. Μετά την προσθήκη κρύας αιθανόλης, πραγματοποιείται περαιτέρω καθαρισμός με χρήση spin column ή με απορρόφηση σε κόκκους διοξειδίου του πυριτίου που ακολουθείται από επαναλαμβανόμενα βήματα έκπλυσης. Συχνά μετά την πέψη του δείγματος του τυριού, πραγματοποιείται λύση με την K πρωτεΐνάση και το λύμα των κυττάρων μπορεί να καθαριστεί με προσθήκη χλωροφορμίου ή με καθίζηση με αιθανόλη ή/και με τη χρήση spin column, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή του kit. Το δεύτερο βήμα είναι η αποτελεσματική ενίσχυση με την τεχνική PCR ενός κατάλληλου στόχου της αλληλουχίας του DNA. Το μιτοχονδριακό DNA (mt) έχει βρεθεί πιο κατάλληλο από το πυρηνικό για την ενίσχυση με την τεχνική PCR. Οι αιτίες γι' αυτό είναι ότι τα αντιγραφα του πρώτου σ' ένα κύτταρο είναι περίπου 1000 φορές περισσότερα από τα αντιγραφα του δεύτερου, έχουν κατάλληλο μήκος και περιέχουν μεγάλο αριθμό μεταλλάξεων που προσδιορίζουν τις διαφορές μεταξύ των ειδών. Το τρίτο βήμα των μοριακών τεχνικών είναι η ανίχνευση των προϊόντων ενίσχυσης (amplicons), τα οποία αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης που βαθμονομείται με ταυτόχρονη ανάλυση ενός δείκτη MB που περιέχει κλάσματα γνωστού μεγέθους. Η χρώση των πηκτών

πραγματοποιείται με βρωμιούχο αιθίδιο και για την οπτική τους απεικόνιση χρησιμοποιείται ακτινοβολία UV. Ο ποσοτικός προσδιορισμός του είδους του γάλακτος στα γαλακτοκομικά προϊόντα βασίζεται στην ένταση της αντίστοιχης ζώνης του ενισχυμένου DNA-στόχου (Moatsou, 2009). Επιπρόσθετα μπορούν να χρησιμοποιηθούν μέθοδοι επιβεβαίωσης ή περαιτέρω ανάλυσης των προϊόντων ενίσχυσης, όπως πέψη των τελευταίων με επιλεκτικές ενδονουκλεάσες που ονομάζεται πολυμορφισμός μήκους θραυσμάτων εκ περιορισμού (Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP) ή ανάλυση πολυμορφισμού της δομής μονού κλώνου (Single Stranded Conformational Polymorphism - SSCP) που βασίζεται στην ηλεκτροφορητική κινητικότητα των προϊόντων ενίσχυσης σε μορφή μονής και διπλής αλυσού (Bania *et al.*, 2001; Mafra *et al.*, 2008).

Στην απλή PCR, ο ποσοτικός προσδιορισμός σχετίζεται με τη ζώνη που προκύπτει από την ενίσχυση της αλληλουχίας στόχου του είδους γάλακτος που έχει χρησιμοποιηθεί για νοθεία. Στη διπλή PCR χρησιμοποιούνται οι εντάσεις των ζωνών και των δύο στόχων, με σκοπό την εξομάλυνση του υπολογισμού ή της ταυτόχρονης ανίχνευσης των δύο ειδών γάλακτος σ' ένα γαλακτοκομικό προϊόν. Η τεχνική αυτή προτείνεται ως απλή και ακριβής προσέγγιση ποσοτικού προσδιορισμού για την υπέρβαση των διακυμάνσεων που μπορεί να παρατηρηθούν κατά την προετοιμασία του δείγματος, αφού η ποσότητα του κλάσματος στόχου σχετίζεται με το άθροισμα της ποσότητας των δύο στόχων.

#### Καμπύλες ενίσχυσης



**Εικόνα 2-13:** Ανίχνευση των προϊόντων ενίσχυσης στην τεχνική real-time PCR (Πηγή: [www.rt-pcr.com/](http://www.rt-pcr.com/); <http://www.eppendorfna.com/int/index.php?l=131&action=products&contentid=99&sitemap=2.5.1.5>)

Οι τεχνικές PCR σε πραγματικό χρόνο (real-time PCR) έχουν εφαρμοστεί επιτυχώς για τον ποσοτικό προσδιορισμό μιας αλληλουχίας στόχου σε γαλακτοκομικό δείγμα με την απλή ή τη διπλή τεχνική. Η ανίχνευση βασίζεται στη συνεχή παρακολούθηση με φθορισμό κατά τη διάρκεια της PCR ενίσχυσης και επομένως δεν υπάρχει ανάγκη για ηλεκτροφόρηση σε πηκτή (Εικόνα 2-13). Η αύξηση του φθορισμού είναι ανάλογη της ποσότητας των ενισχυμένων DNA-στόχων που παράγονται. Η ανίχνευση του είδους του γάλακτος βασίζεται στον υπολογισμό του βασικού κύκλου (Ct) κατά τον οποίο ανιχνεύεται στατιστικά σημαντικός φθορισμός (Moatsou, 2009).

Οι τεχνικές PCR έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα και για τη μελέτη του γενετικού πολυμορφισμού των καζεϊνών. Οι Barroso *et al.* χρησιμοποίησαν την PCR-SSCP για την ανίχνευση των γενετικών παραλλαγών A, B, C και E της αγελαδινής κ-καζεΐνης (1998) και των γενετικών παραλλαγών A1, A2, A3 και B της αγελαδινής β-καζεΐνης (1999). Επίσης οι David & Deutch (1992) χρησιμοποίησαν την τεχνική της εξειδικευμένης αλληλουχίας PCR (Allele-Specific PCR, ASPCR) για τη διάκριση των γενετικών παραλλαγών B και C της αγελαδινής α<sub>s1</sub>-καζεΐνης. Η μέθοδος επιβεβαιώθηκε με ισοηλεκτρικό εστιασμό των α<sub>s1</sub>-καζεϊνών. Επιπλέον με αυτή τη μέθοδο μπορούν να προσδιοριστούν οι γονότυποι των κ-καζεϊνών.

Όμως η συχνότερη εφαρμογή της στην ανάλυση γαλακτοκομικών προϊόντων αφορά στην ανίχνευση νοθείας ενός είδους γάλακτος με άλλο. Οι Bania *et al.* (2001) παρουσίασαν μια τεχνική για την ανίχνευση νοθείας αίγειου γάλακτος με αγελαδινό. Η μέθοδος βασίστηκε σε εξειδικευμένους εκκινητές (primers, 274 bp) για το κυτόχρωμα b του αγελαδινού DNA. Οι Lopez-Calleja *et al.* (2004) χρησιμοποίησαν τη μέθοδο για την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε πρόβειο και αίγειο γάλα, χρησιμοποιώντας εκκινητές (primers) με στόχο το μιτοχονδριακό 12S rRNA γονίδιο. Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε νοπιά, παστεριωμένα και αποστειρωμένα μίγματα αγελαδινού/πρόβειου και αγελαδινού/αίγειου γάλακτος και επέτρεψε την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε ποσοστό 0,1%. Οι Lopez-Calleja *et al.* (2005b) εφάρμοσαν την μέθοδο για την ανίχνευση αίγειου γάλακτος σε πρόβειο γάλα χρησιμοποιώντας εξειδικευμένους εκκινητές (primers, 122 bp) για το αίγειο γάλα, με στόχο το μιτοχονδριακό 12S rRNA γονίδιο. Η ανάλυση νοπών και θερμικώς επεξεργασμένων μιγμάτων πρόβειου/αίγειου γάλακτος επέτρεψε την ανίχνευση αίγειου γάλακτος σε ποσοστό 0,1%. Οι Cheng *et al.* (2006) χρησιμοποίησαν τη μέθοδο για την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος ή σκόνης γάλακτος σε αίγειο γάλα ή σκόνη γάλακτος με όριο ανίχνευσης 0,1% και στις δύο περιπτώσεις, χρησιμοποιώντας

εκκινητές (primers, 271 bp) με στόχο το αγελαδινό μιτοχονδριακό DNA. Οι [Kotowicz et al. \(2007\)](#) εφάρμοσαν μια διπλή PCR για την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε αίγιο γάλα χρησιμοποιώντας δύο ζεύγη εκκινητών (primers) που αναγνωρίζουν τις αλληλουχίες της περιοχής του μιτοχονδριακού βρόγχου εκτόπισης (D-loop). Η τεχνική αποδείχθηκε εξειδικευμένη και ευαίσθητη και επέτρεψε την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε ποσοστό  $\leq 1\%$ . Οι [Bottero et al. \(2003\)](#) εφάρμοσαν την πολλαπλή PCR χρησιμοποιώντας εξειδικευμένους εκκινητές (primers) με στόχο τα μιτοχονδριακά 12S και 16S rRNA γονίδια. Η μέθοδος επέτρεψε την ταυτόχρονη ανίχνευση αγελαδινού, πρόβειου και αίγιου γάλακτος σε γαλακτοκομικά προϊόντα με ευαισθησία 0,5%. Οι [Lopez-Calleja et al. \(2007b, 2007a\)](#) χρησιμοποίησαν την τεχνική real-time PCR για την ανίχνευση και τον ποσοστικό προσδιορισμό αγελαδινού και αίγιου γάλακτος σε νωπά και θερμικώς επεξεργασμένα μίγματα αγελαδινού/πρόβειου και αίγιου/πρόβειου γάλακτος αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας δύο ζεύγη εκκινητών (primers) με στόχο το μιτοχονδριακό 12S rRNA γονίδιο. Η μέτρηση των προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ενός φθορίζοντος ανιχνευτή διπλής ένδειξης (TaqMan), ο οποίος ενισχύει την παρουσία DNA από κάθε θηλαστικό που υπάρχει στο δείγμα, με σκοπό τον ενδογενή έλεγχο, αφού η τιμή  $C_t$  που προκύπτει χρησιμοποιείται για την εξομάλυνση των αποτελεσμάτων. Η μέθοδος επέτρεψε την ανίχνευση και τον ποσοστικό προσδιορισμό αγελαδινού και αίγιου γάλακτος σε νωπά και θερμικώς επεξεργασμένα μίγματα πρόβειου/αγελαδινού και πρόβειου/αίγιου γάλακτος, σε εύρος 0,5-10% και 0,6-10% αντίστοιχα.

Επίσης πολλοί ερευνητές έχουν χρησιμοποιήσει την τεχνική της PCR για την ανίχνευση νοθείας σε τυριά. Οι [Plath et al. \(1997\)](#) ανέπτυξαν μεθόδους για τη διάκριση των γονιδίων της  $\beta$ -καζεΐνης αγελαδινού, πρόβειου και αίγιου γάλακτος. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι η τεχνική PCR-RFLP παρουσίασε μεγαλύτερη ευαισθησία από την PCR-SSCP, επιτρέποντας την ανίχνευση 0,5% αγελαδινού γάλακτος σε πρόβειο και αίγιο τυρί. Οι [Maudet & Taberlet \(2001\)](#) ανέπτυξαν μια νέα μέθοδο για την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε αίγιο τυρί βάσει του μιτοχονδριακού DNA. Η μέθοδος παρουσίασε μεγάλη ευαισθησία, με όριο ανίχνευσης  $\leq 0,1\%$  σε αγελαδινό γάλα. Οι [Stefos et al. \(2004\)](#) περιέγραψαν μια τεχνική PCR-RFLP για την ανίχνευση 1% και 2,5% αγελαδινού γάλακτος σε πρόβειο τυρί Φέτα και γιαούρτι, αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας εκκινητές (primers) με στόχο το μιτοχονδριακό κυτόχρωμα b. Οι [Díaz et al. \(2007\)](#) εφάρμοσαν την τεχνική για την ανίχνευση αίγιου γάλακτος σε πρόβειο τυριά χρησιμοποιώντας εκκινητές (primers, 122 bp) με στόχο το μιτοχονδριακό 12S rRNA



γονίδιο με όριο ανίχνευσης 1% αίγειου γάλακτος. Οι [Lopez-Calleja et al. \(2005c\)](#) εφάρμοσαν την μέθοδο για την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε πρόβειο και αίγειο τυρί χρησιμοποιώντας εξειδικευμένους εκκινητές (primers, 223 bp) με στόχο το μιτοχονδριακό 12S rRNA γονίδιο. Η μέθοδος επέτρεψε την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε ποσοστό 1%. Οι [Mafra et al. \(2004\)](#) χρησιμοποίησαν την τεχνική της διπλής PCR για την ανίχνευση νωπού, θερμικώς επεξεργασμένου και σκόνης αγελαδινού γάλακτος σε πρόβεια τυριά με στόχο τα μιτοχονδριακά 12S και 16S rRNA γονίδια, για τη δημιουργία θραυσμάτων διαφορετικού μήκους. Η μέθοδος επέτρεψε τόσο την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε ποσοστό 0,1%, όσο και τον ποσοτικό προσδιορισμό σε εύρος 1-50%. Η ίδια τεχνική χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση αγελαδινού και αίγειου γάλακτος σε αίγειο τυρί με τη χρήση εκκινητών (primers) με στόχο τα μιτοχονδριακά 12S rRNA γονίδια. Οι ερευνητές αναφέρουν την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε ποσοστό 0,1% και τον ποσοτικό προσδιορισμό σε εύρος 1-60% ([Mafra et al., 2007](#)). Ο ποσοτικός προσδιορισμός και στις δύο περιπτώσεις βασίστηκε σε καμπύλες εξομάλυνσης που προέκυψαν από γραφικές παραστάσεις της σχετικής έντασης του φθορισμού σε συνάρτηση με το ποσοστό του είδους του γάλακτος στα πειραματικά τυριά.

Πολλές μελέτες με βάση την μέθοδο PCR αφορούν στη νοθεία βουβαλινού γάλακτος και τυριού Mozzarella με αγελαδινό γάλα. Οι [Lopez-Calleja et al. \(2005a\)](#) χρησιμοποίησαν την τεχνική PCR για την ανίχνευση αγελαδινού DNA σε μίγματα με βουβαλινό γάλα και σε τυρί Mozzarella που παρασκευάστηκε από μίγματα γάλακτος χρησιμοποιώντας εξειδικευμένους εκκινητές (primers, 346 bp) με στόχο το μιτοχονδριακό 12S rRNA γονίδιο. Η ανάλυση, τόσο στην περίπτωση του γάλακτος όσο και την περίπτωση του τυριού, επέτρεψε την ανίχνευση αγελαδινού DNA με όριο 0,1%. Οι [Feligini et al. \(2005a\)](#) χρησιμοποίησαν την μέθοδο για την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε τυρί Mozzarella από βουβαλινό γάλα βάσει του μιτοχονδριακού DNA. Η μέθοδος έχει όριο ανίχνευσης 0,5% σε αγελαδινό γάλα. Οι [Otaviano et al. \(2005\)](#) χρησιμοποίησαν το γονίδιο της β-καζεΐνης ως μοριακό δείκτη για την ανίχνευση νοθείας τυριού Mozzarella με αγελαδινό γάλα. Η μέθοδος επέτρεψε την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε ποσοστό 1%. Οι [Rea et al. \(2001\)](#) χρησιμοποίησαν μια διπλή PCR τεχνική για την ταυτόχρονη ταυτοποίηση αγελαδινού και βουβαλινού DNA σε γάλα και τυρί Mozzarella με στόχο το κυτόχρωμα b γονίδιο. Η ανάλυση επέτρεψε την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος με όριο 1%.

Τέλος, για την ανίχνευση νοθείας έχουν χρησιμοποιηθεί ανοσοχημικές μέθοδοι σε συνδυασμό με μεθόδους ανάλυσης DNA. Οι [Klotz & Einspanier \(2001\)](#) χρησιμοποίησαν

την τεχνική PCR-LCR (Ligase Chain Action) -EIA (Enzyme Immunoassay), που βασίστηκε στην ανίχνευση ενός συγκεκριμένου νουκλεοτιδίου στο DNA του αγελαδινού γάλακτος (*Bos taurus*, γονίδιο β-καζεΐνης, θέση 8411) στο DNA πρόβειου, αίγιου και βουβαλινού γάλακτος. Η μέθοδος επέτρεψε την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε ποσοστό 5%.

### Τεχνολογία παρασκευής τυριού Φέτας

#### 3.1 Παραγωγή και αξιοποίηση αιγοπρόβειου γάλακτος στην Ελλάδα

Χαρακτηριστικό της ελληνικής αιγοπροβατοτροφίας αποτελεί η ύπαρξη μεγάλου αριθμού μικρών εκμεταλλεύσεων εκτατικής μορφής. Στις εκμεταλλεύσεις αυτές, που είναι διάσπαρτες σε ολόκληρη τη χώρα και κατά κύριο λόγο σε ορεινές και ημιορεινές περιοχές, εκτρέφονται ζώα εγχώριων φυλών, μεταξύ των οποίων δεσπόζουν οι ντόπιες αυτόχθονες φυλές, η διατροφή των οποίων σε μεγάλο βαθμό στηρίζεται στη βόσκηση. Τα ζώα αυτά είναι μικρόσωμα, ανθεκτικά στις ασθένειες και προσαρμοσμένα στις δύσκολες εδαφοκλιματικές συνθήκες της χώρας. Η γαλακτική τους περίοδος διαρκεί 5-7 μήνες, από Δεκέμβριο μέχρι Ιούνιο. Το 50% περίπου της γαλακτοπαραγωγής τους λαμβάνεται τους μήνες Μάρτιο, Απρίλιο και Μάιο (Ανυφαντάκης & Καλαντζόπουλος, 1984; Ανυφαντάκης, 2004), και επομένως οι περισσότερες τυροκομικές επιχειρήσεις στην Ελλάδα λειτουργούν εποχικά. Η μέση ετήσια παραγωγή γάλακτος ανά ζώο είναι πολύ χαμηλή. Ανέρχεται περίπου στα 95 kg για τα πρόβατα και 125 kg για τις αίγες, το γάλα όμως που παράγουν είναι πολύ πλούσιο σε πρωτεΐνες και λίπος (Anifantakis & Moatsou, 2006).

Περίπου το 80% του πρόβειου και ~60% του αίγειου γάλακτος που παράγεται στην Ελλάδα, χρησιμοποιείται για τυροκόμηση και κυρίως για την παραγωγή τυριού Φέτας. Το αιγοπρόβειο γάλα παρουσιάζει μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη, λίπος και στερεά συστατικά από το αγελαδινό, γεγονός που επηρεάζει την απόδοση και τις ιδιότητες του τυριού. Από τα δύο είδη γάλακτος απουσιάζει το καροτένιο και το τυρί που προκύπτει είναι από τη φύση του λευκό. Το λίπος του αιγοπρόβειου γάλακτος είναι πηγή συστατικών που συνεισφέρουν στη γεύση και το άρωμα του ώριμου τυριού. Συγκεκριμένα περιέχει σημαντικές ποσότητες καπροϊκού ( $C_{6:0}$ ), καρυλικού ( $C_{8:0}$ ) και καπρινικού ( $C_{10:0}$ ) οξέος, τα οποία συμβάλλουν στην τυπική πικάντικη, πιπεράτη γεύση της Φέτας (Anifantakis & Moatsou, 2006).

### 3.2 Γενικά χαρακτηριστικά και στάδια παρασκευής του τυριού Φέτα

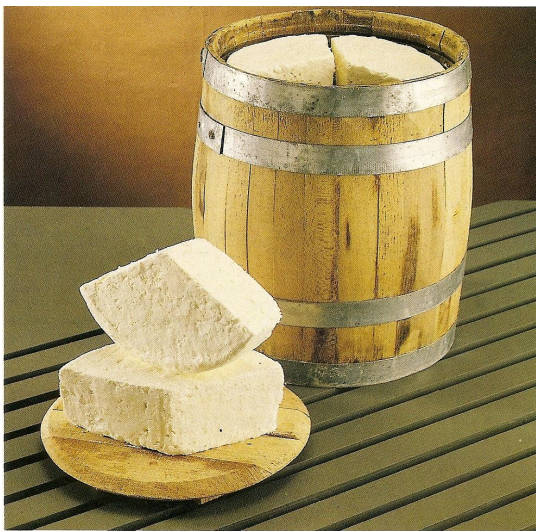
Το τυρί Φέτα είναι ένα λευκό τυρί υψηλής ποιότητας, που παρασκευάζεται σύμφωνα με συγκεκριμένη τεχνολογία από πρόβειο γάλα ή από μίγμα πρόβειου και αίγειου γάλακτος, το οποίο ωριμάζει και αποθηκεύεται σε άλμη. Έχει αλμυρή, ελαφρώς όξινη γεύση και ευχάριστα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Η τεχνολογία παρασκευής του περιλαμβάνει στράγγιση με βαρύτητα, επιφανειακό ξηρό αλάτισμα, προσωρινή συσκευασία και προ-ωρίμανση στους 14-18 °C για δύο εβδομάδες ή μέχρι τιμής pH 4,4-4,6 και υγρασία μικρότερη από 56 g/100 g. Τελικά το τυρί μεταφέρεται σε ψυκτικούς θαλάμους και ωριμάζει για τουλάχιστον 60 ημέρες. Η περίοδος προ-ωρίμανσης αποτελεί ουσιαστικό στάδιο για το σχηματισμό των τελικών φυσικοχημικών και οργανοληπτικών ιδιοτήτων του τυριού.

Το όνομα Φέτα κατοχυρώθηκε ως Προστατευμένη Ονομασία Προέλευσης (ΠΟΠ) με τον κανονισμό 1829/2002 της Ευρωπαϊκής Επιτροπής με βάση τις εξής προδιαγραφές (Anifantakis & Moatsou, 2006):

1. Το τυρί Φέτα είναι ένα μαλακό τυρί, χωρίς επιδερμίδα, λευκού χρώματος και ελαφρώς όξινης γεύσης. Χαρακτηριστικό της δομής του είναι η παρουσία λίγων μηχανικών σχισμών.
2. Παρασκευάζεται από πρόβειο γάλα ή από μίγματα του με αίγειο γάλα, το οποίο δεν υπερβαίνει το 30% της ολικής ποσότητας του γάλακτος τυροκόμησης. Το γάλα της τυροκόμησης πρέπει να παράγεται αποκλειστικά στις γεωγραφικές περιοχές Μακεδονίας, Θράκης, Ηπείρου, Θεσσαλίας, Στερεάς Ελλάδας, Πελοποννήσου και Λέσβου.
3. Απαγορεύεται η χρήση συμπυκνωμένου γάλακτος και η προσθήκη σκόνης γάλακτος, συμπυκνώματος πρωτεϊνών και καζεϊνικών αλάτων στο γάλα της τυροκόμησης, καθώς επίσης και η χρήση χρωστικών και συντηρητικών.
4. Η μέγιστη υγρασία πρέπει να είναι 56 g/100 g και το ελάχιστο λίπος επί ξηρού 43 g/100 g.
5. Η περίοδος ωρίμανσης πρέπει να διαρκεί τουλάχιστον 60 ημέρες.

Η Φέτα διατηρείται μέσα σε άλμη χαμηλής πυκνότητας και συσκευάζεται ερμητικά σε ξύλινα βαρέλια καθαρού βάρους 50-60 kg (Εικόνα 3-1) ή σε λευκοσιδηρά δοχεία καθαρού βάρους 16-18 kg. Τα τυροτεμάχια έχουν σχήμα τριγωνικό και βάρος ~3 kg

(ξύλινα βαρέλια) ή σχήμα κύβου και βάρος ~1 kg (λευκοσιδηρά δοχεία). Στο ελληνικό εμπόριο το τυρί αυτό, που καλύπτει το 80% περίπου της κατανάλωσης των μαλακών τυριών, κυκλοφορεί με τη μορφή δύο ποιοτικών παραλλαγών, τη μαλακή Φέτα (πιο «γλυκεία» επειδή περιέχει περισσότερη υγρασία και λιγότερο αλμυρή, ελαφρώς υπόξινη, με πλούσιο άρωμα και λίγο πικάντικη γεύση) και τη σκληρή Φέτα (λίγο πιπεράτη, περισσότερο αλμυρή, με πολύ τονισμένη γεύση και άρωμα) (Κυριακόπουλος, 1995).



Εικόνα 3-1: Τυρί φέτα σε βαρέλι (Πηγή: Anifantakis, 1991)

### 3.2.1 Προετοιμασία γάλακτος τυροκόμησης

Το πρόβειο γάλα παραδίδεται στις γαλακτοβιομηχανίες μια φορά την ημέρα το χειμώνα και στις αρχές της άνοιξης, και στη συνέχεια δύο φορές την ημέρα ως το τέλος της γαλακτικής περιόδου. Για την παραγωγή καλής ποιότητας τυριού Φέτα, η οξύτητα του γάλακτος πρέπει να είναι μικρότερη από 0,23 g/100 ml γαλακτικού οξέος και το pH ≥ 6.5. Η λιποπεριεκτικότητα του γάλακτος συνήθως ποικίλλει μεταξύ 6,5-8 g/100 g ανάλογα με την εποχή και προτείνεται να προσαρμόζεται στα 6,0 g/100 g. Η πιο κατάλληλη αναλογία καζεΐνης/λίπος είναι 0,72.

Αρχικά το γάλα διηθείται και τυποποιείται. Ακολουθεί παστερίωση σε πλακοειδή εναλλάκτη θερμότητας (θερμοκρασία 72-73 °C για 15 sec) ή σε τυρολέβητα διπλών τοιχωμάτων ανοιχτού τύπου (θερμοκρασία 68 °C για 10 min). Σε πολλές περιπτώσεις το

γάλα θερμαίνεται σε ανοικτή δεξαμενή στους 63-65 °C για 3-20 min (θέρμισμα). Στη συνέχεια ψύχεται στη θερμοκρασία πήξεως (32-36 °C) (Anifantakis & Moatsou, 2006).

### 3.2.2 Προσθήκη $CaCl_2$

Το αιγοπρόβειο γάλα περιέχει ικανοποιητικές ποσότητες ασβεστίου. Με την παστερίωση όμως μια ποσότητα αυτού συνήθως αδιαλυτοποιείται και κατακρημνίζεται (Κυριακόπουλος, 1995). Στην περίπτωση που παρουσιάζεται ανάγκη προσθήκης, προστίθεται στο τυροκομούμενο γάλα  $CaCl_2$  (μέχρι 0,2 g/kg γάλακτος), πριν την προσθήκη της πωτιάς, για τη διασφάλιση καλύτερης πήξης και τη δημιουργία συνεκτικού πηγματος (Anifantakis & Moatsou, 2006).

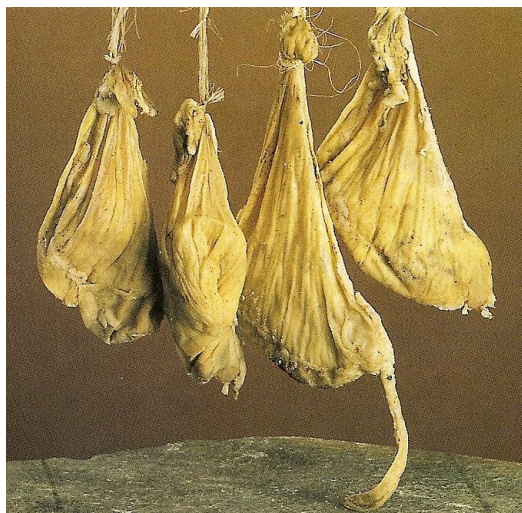
### 3.2.3 Προσθήκη καλλιεργείων

Η προσθήκη της καλλιέργειας εκκίνησης πραγματοποιείται 15-30 min πριν από την προσθήκη πωτιάς με σκοπό την οξίνιση του πηγματος. Τα μικρά τυροκομεία χρησιμοποιούν συνήθως γιαούρτι ως καλλιέργεια εκκίνησης (*Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* σε αναλογία 1:1 και σε ποσότητα ~0,3 ml/100 ml), επειδή είναι ευκολότερη η προετοιμασία και η συντήρηση. Στα μεγάλα εργοστάσια παραγωγής τυριού Φέτας, χρησιμοποιούνται ευρέως μεσόφιλες καλλιέργειες εκκίνησης (*Lactococcus lactis* subsp *lactis* και *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*) ή μίγμα μεσόφιλων και θερμόφιλων καλλιεργείων (*Lactococcus lactis* subsp *lactis* και *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) σε ποσότητα μέχρι 0,5 ml/100 ml. Τα είδη των μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται ως καλλιέργεια εκκίνησης, η αναλογία στην οποία προστίθενται, ο χρόνος που μεσολαβεί από τον εμβολιασμό μέχρι την προσθήκη της πωτιάς και η θερμοκρασία του γάλακτος της τυροκόμησης είναι παράμετροι που επηρεάζουν το ρυθμό οξίνισης του πηγματος (Anifantakis & Moatsou, 2006).

### 3.2.4 Προσθήκη ποτιάς και πήξη του γάλακτος

Η ποτιά προστίθεται στο γάλα της τυροκόμησης 15-30 min μετά τον εμβολιασμό του με την καλλιέργεια εκκίνησης. Η ποσότητα της προστιθέμενης ποτιάς πρέπει να είναι κατάλληλη για την πήξη του γάλακτος και τη δημιουργία συνεκτικού πηγματος, το οποίο διαιρείται μετά από 50 min (Anifantakis & Moatsou, 2006).

Σε πολλές περιπτώσεις χρησιμοποιείται η παραδοσιακή εγχώρια ποτιά. Η εγχώρια ποτιά παρασκευάζεται με τη χρήση ολόκληρου του ήνυστρου μη απογαλακτισμένων αρνιών και κατσικιών, συμπεριλαμβανομένων των ζωικών ιστών και του πηγμένου γάλακτος από ζώα που τρέφονται αποκλειστικά με γάλα (Εικόνα 3-2).



Εικόνα 3-2: Ήνυστρο από αρνούς μικρής ηλικίας (Πηγή: Anifantakis, 1991)

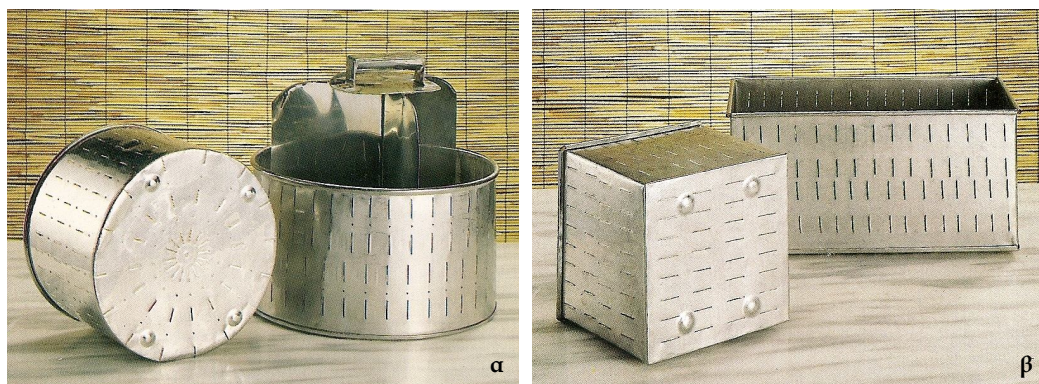
Μετά από ξήρανση, τα ήνυστρα κόβονται σε μικρά κομμάτια, τοποθετούνται σε άλμη (10 g/100 g) σε αναλογία 1:7 (ήνυστρο/άλμη), παραμένουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για περίπου 26-36 h και περιοδικά αναδεύονται. Ακολουθεί φυγοκέντρηση ή διήθηση για την απομάκρυνση των ιστών των ήνυστρων και των πηγμάτων γάλακτος που τυχόν υπάρχουν. Το εκχύλισμα που απομένει αποτελεί ένα παρασκεύασμα ποτιάς. Η ανάπτυξη του ευχάριστου αρώματος και της πικεράτης γεύσης της παραδοσιακής Φέτας που παρασκευάζεται με εγχώρια ποτιά μπορεί να αποδοθεί στη λιπασική δράση των προγαστρικών εστερασών. Σε μεγάλα τυροκομεία, η παραδοσιακή εγχώρια ποτιά έχει αντικατασταθεί μερικώς ή πλήρως από την εμπορική μοσχαρίσια ποτιά. Σε πολλές περιπτώσεις χρησιμοποιείται μίγμα των δύο τύπων ποτιάς σε αναλογία 1:3 (παραδοσιακή/εμπορική) (Anifantakis & Moatsou, 2006).

### 3.2.5 Διαίρεση και ανάπαυση του τυροπήγματος

Αφού ολοκληρωθεί η πήξη του γάλακτος, περίπου 50 min μετά την προσθήκη της πυτιάς, το πήγμα διαιρείται σε κύβους ακμής 2-3 cm και αφήνεται σε ηρεμία για περίπου 10 min ώστε να αποβάλει από τη μάζα του μεγαλύτερη ποσότητα τυρογάλακτος, το οποίο στη συνέχεια απομακρύνεται (Anifantakis & Moatsou, 2006).

### 3.2.6 Εξαγωγή και στράγγιση του τυροπήγματος

Μετά την ανάπαυση του τυροπήγματος, το τελευταίο μεταφέρεται προσεκτικά σε μεταλλικά ανοξείδωτα ή πλαστικά, ορθογώνια ή κυλινδρικά καλούπια (Εικόνα 3-3), τα οποία φέρουν μεγάλο αριθμό οπών σε όλη την επιφάνεια τους για να διευκολύνεται η στράγγιση του πήγματος. Σε περίπτωση που τυρί πρόκειται να συσκευασθεί σε βαρέλια, χρησιμοποιούνται κυλινδρικά καλούπια, ενώ αν η συσκευασία γίνει σε λευκοσιδηρά δοχεία, χρησιμοποιούνται τα ορθογώνια.



Εικόνα 3-3: Καλούπια για τυρί Φέτα που συσκευάζεται α. σε ξύλινα βαρέλια και β. σε λευκοσιδηρά δοχεία

(Πηγή: Anifantakis, 1991)

Τα καλούπια γεμίζονται σταδιακά, γιατί σε αντίθετη περίπτωση η αποβολή ορού καθυστερεί. Η σταδιακή μεταφορά του πήγματος στα καλούπια έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μικρών σχισμών στη μάζα του τυριού, που είναι χαρακτηριστικό του τυριού Φέτα. Αφού τοποθετηθεί το τυρόπηγμα στα καλούπια, τα τελευταία αφήνονται με κλίση πάνω σε τυροτράπεζα και περιστρέφονται περιοδικά για να διευκολυνθεί η απομάκρυνση του τυρογάλακτος (Εικόνα 3-4). Μετά από 2-3 h, τα καλούπια αναστρέφονται στην



τυροτράπεζα και αφήνονται για 2-3 h σε θερμοκρασία 14-18 °C για να ολοκληρωθεί η στράγγιση (Anifantakis & Moatsou, 2006).



Εικόνα 3-4: Παραδοσιακός τρόπος στράγγισης του πήγματος τυριού Φέτα που θα ωριμάσει σε ξύλινα βαρέλια (Πηγή: Anifantakis & Moatsou, 2006)

### 3.2.7 Αλάτισμα

Αφού ολοκληρωθεί η συναίρεση του πήγματος, το τελευταίο εξάγεται από τα καλούπια και τεμαχίζεται σε κομμάτια  $\sim 12 \times 10 \times 10$  cm, τα οποία τοποθετούνται το ένα δίπλα στο άλλο σε τυροτράπεζα και αλατίζονται. Για το αλάτισμα χρησιμοποιείται καθαρό χονδρόκοκκο αλάτι, το οποίο διαλύεται αργά. Το λεπτόκοκκο αλάτι, διαλύεται γρήγορα με αποτέλεσμα η επιφάνεια του τυριού να γίνεται πολύ σκληρή και η αποβολή του ορού να καθυστερεί (Anifantakis & Moatsou, 2006).

Το επόμενο πρωί, τα τεμάχια αναποδογυρίζονται και αλατίζονται. Το pH του τυριού στο στάδιο αυτό πρέπει να είναι γύρω στο 5,0 (Κυριακόπουλος, 1995). Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται κάθε 12 h και συνολικά 4 φορές έτσι ώστε η κάθε επιφάνεια των τυροτεμαχίων να αλατιστεί εις διπλούν. Η τελική συγκέντρωση του αλατιού στην τυρομάζα πρέπει να είναι  $\sim 3$  g/100 g (Anifantakis & Moatsou, 2006).

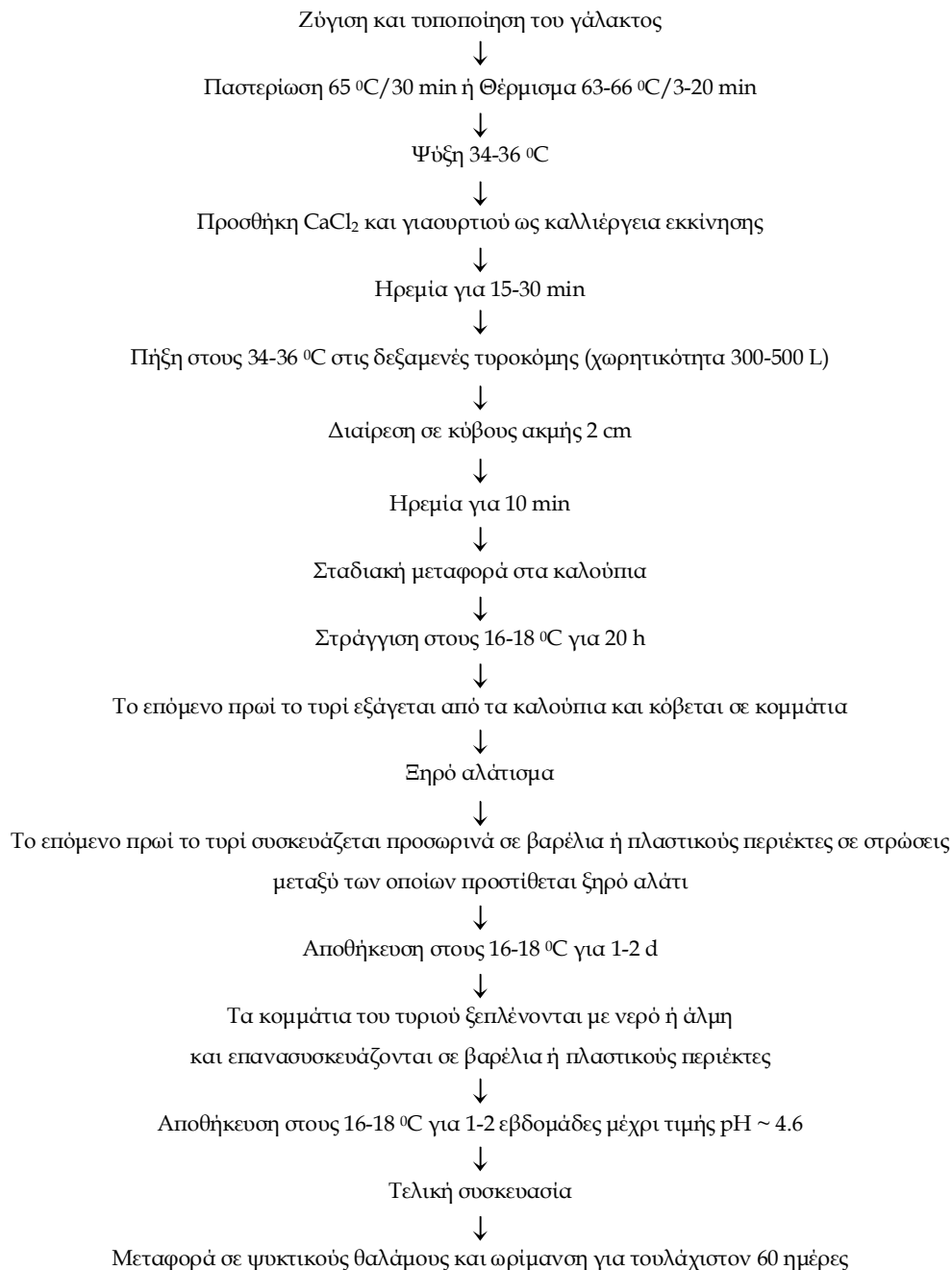
Μετά το αλάτισμα, τα τυροτεμάχια αφήνονται στην τυροτράπεζα και αναποδογυρίζονται κάθε 24 h μέχρι η επιφάνεια τους να γίνει «γλοιώδης», χαρακτηριστικό που οφείλεται στην ανάπτυξη βακτηρίων και ζυμών. Αυτοί οι

μικροοργανισμοί θεωρείται ότι συνεισφέρουν σημαντικά στην ωρίμανση του τυριού και επομένως στην ανάπτυξη των ειδικών οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του προϊόντος. Τα τυροτεμάχια τοποθετούνται προσωρινά σε ανοιχτά ξύλινα βαρέλια ή σε πλαστικούς περιέκτες και αλατίζονται. Στη συνέχεια μεταφέρονται κάθε 2 ημέρες από το ένα βαρέλι σε άλλο για να διευκολυνθεί ή απομακρυνθεί το ορό και παράλληλα αλατίζονται (Anifantakis & Moatsou, 2006). Πολλά από τα παραπάνω στάδια σήμερα έχουν απαλοιφθεί και συχνά το αλάτισμα των κομματιών των φρέσκων τυριών δε γίνεται σε τυροτράπεζα, αλλά σε δοχεία, όπου τα τυροτεμάχια συσκευάζονται προσωρινά.

### 3.2.8 Ωρίμανση των τυριών

Μετά από 4-5 ημέρες, δεδομένου ότι το  $pH \leq 4,6$  και η υγρασία  $\leq 56$  g/100 g, τα τυροτεμάχια καθαρίζονται προσεκτικά με τη χρήση νερού ή άλμης και μιας μαλακής βούρτσας. Στη συνέχεια, τοποθετούνται προσεκτικά και συσκευάζονται σε στρώσεις σε ξύλινα βαρέλια χωρητικότητας περίπου 50 kg, έτσι ώστε να μην υπάρχουν κενά μεταξύ τους. Τα ξύλινα βαρέλια, λόγω του υψηλού τους κόστους και της δυσκολίας χειρισμού τους, έχουν αντικατασταθεί από λευκοσιδηρά δοχεία μικρότερης χωρητικότητας στα οποία το τυρί συσκευάζεται με προσθήκη άλμης (8 g NaCl /100 ml). Τα βαρέλια σφραγίζονται και μεταφέρονται σε θαλάμους με υψηλή ΣΥ, όπου παραμένουν για 10 περίπου ημέρες ώστε να ολοκληρωθεί η ωρίμανση στους 16-18 °C. Το καπάκι κάθε βαρελιού φέρει μια οπή η οποία είναι ερμητικά σφραγισμένη με φελλό. Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης ο φελλός απομακρύνεται περιοδικά για τη διαφυγή των αερίων λόγω της μικροβιακής δράσης και επανατοποθετείται αμέσως για να αποτραπεί η είσοδος αέρα που προάγει την επιφανειακή ανάπτυξη των μυκήτων στα τυροτεμάχια που δεν καλύπτεται από άλμη. Κατά διαστήματα πραγματοποιείται κύλιση των βαρελιών και συμπλήρωση με άλμη 5%. Στη συνέχεια μεταφέρονται σε ψυκτικούς θαλάμους με θερμοκρασία 3-4 °C και υψηλή σχετική υγρασία (95-100%), όπου παραμένουν για 2 μήνες από την ημερομηνία παρασκευής, οπότε και ολοκληρώνεται η ωρίμασή τους. Αν το pH είναι χαμηλότερο από 4,4-4,6, το τυρί αποκτά όξινη γεύση, παρατηρείται απώλεια υγρασίας και θρυμματίζεται κατά τον τεμαχισμό ενώ σε υψηλότερο pH η διάρκεια συντήρησης μειώνεται (Anifantakis & Moatsou, 2006).

Παρακάτω (Εικόνα 3-5) παρουσιάζεται σχηματικά ο συνηθέστερος τρόπος παρασκευής Φέτας με μηχανοποιημένο τρόπο, που ακολουθεί τις βασικές αρχές της παραδοσιακής τεχνολογίας.



Εικόνα 3-5: Διάγραμμα ροής παραγωγής τυριού Φέτας (Πηγή: Anifantakis & Moatsou, 2006)

## Κεφάλαιο 4

### Υλικά και μέθοδοι

#### 4.1 Παρασκευή πρότυπων παρα-κ-καζεϊνών

Ως πρότυπα, για τη σύγκριση των κορυφών της παρα-κ-καζεΐνης από τα δείγματα των τυριών, χρησιμοποιήθηκαν καθαρές λυοφιλωμένες καζεΐνες αγελαδινού, πρόβειου και αίγειου γάλακτος και μίγματα αυτών, που παρασκευάστηκαν στο Εργαστήριο Γαλακτοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

##### 4.1.1 Παρασκευή ακατέργαστης (*crude*) κ-καζεΐνης

Για την παρασκευή πρότυπων παρα-κ-καζεϊνών χρησιμοποιήθηκε ακατέργαστη (*crude*) κ-καζεΐνη αγελαδινού, πρόβειου και αίγειου γάλακτος, που παρασκευάστηκε στο Εργαστήριο Γαλακτοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, όπως περιγράφεται παρακάτω.

Αρχικά παρασκευάζεται η ολική ισοηλεκτρική καζεΐνη (*whole isoelectric casein*) ως εξής: χρησιμοποιείται αγελαδινό γάλα (3 L), το οποίο υπόκειται σε φυγοκέντρωση υπό ψύξη (4 °C) για την απομάκρυνση του λίπους. Στο αποκορυφωμένο γάλα προστίθεται HCl 1 N (pH~ 4.4-4.2). Ακολουθεί διήθηση από τουλουπάνι και προσθήκη νερού στο ίζημα. Στη συνέχεια προστίθεται NaOH 1 N για επαναδιάλυση του ιζήματος (pH~ 7.0-7.5) και HCl 1 N (pH~ 4.4-4.2) για κατακρήμνιση της καζεΐνης. Επαναλαμβάνεται η διήθηση από τουλουπάνι και στη συνέχεια ακολουθεί εις τριπλούν έκπλυση του ιζήματος με νερό, προσθήκη NaOH 1 N (pH~ 7.0-7.5) για επαναδιάλυση του ιζήματος, κατακρήμνιση με HCl 1 N (pH~ 4.4-4.2) και τέλος διήθηση από τουλουπάνι.

Μετά την ολοκλήρωση της παραπάνω διαδικασίας παραλαμβάνονται 350 g ισοηλεκτρικής καζεΐνης η οποία διατηρείται στην κατάψυξη. Την επομένη προστίθεται στο ίζημα 1 L ουρίας 6,6 M, πραγματοποιείται οξίνιση με προσθήκη 200 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7 N, προστίθενται 2 L νερό (επιθυμητό pH διαλύματος 1,3-1,5) και το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία για 2 h, μετά την πάροδο των οποίων παρατηρείται κροκκίδωση. Ακολουθεί διήθηση εις διπλούν και το ίζημα που λαμβάνεται αποτελεί ακατέργαστο (*crude*) μίγμα α<sub>s</sub>- και β-καζεΐνη, ενώ στο υπερκείμενο βρίσκεται η κ-καζεΐνη.

Για να παραλάβουμε την ακατέργαστη (crude) κ-καζεΐνη, σε 1 L από το υπερκείμενο προστίθενται 132 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1 M. Ακολουθεί διήθηση και συλλογή του ιζήματος το οποίο διαλύεται σε νερό με την παράλληλη προσθήκη NaOH 1 N (pH~ 7.5). Ένας όγκος από το παραπάνω διάλυμα αναμιγνύεται με 2 όγκους καθαρής αιθανόλης. Στη συνέχεια προστίθεται οξικό αμμώνιο 1 M σε 75% του παραπάνω διαλύματος μέχρι να σχηματιστεί ένα τυπικό κολλώδες ιζημα -όχι περισσότερο γιατί το ιζημα θα επαναδιαλυθεί. Το ιζημα (ακατέργαστη -crude- κ-καζεΐνη) διαλύεται σε νερό με την προσθήκη NaOH 1 N (pH~ 7.5) και ακολουθεί διαπύδηση και λυοφιλίωση.

#### **4.1.2 Καθαρισμός της crude κ-καζεΐνης**

Τα κλάσματα της κ-καζεΐνης που λήφθηκαν με την παρακάτω μέθοδο, αφαλατώθηκαν με διαπίδυση. Χρησιμοποιήθηκε μεμβράνη με όριο διαχωρισμού 12000 Da (Sigma). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε λυοφιλίωση των κλασμάτων.

##### **4.1.2.1 Παρασκευή ρυθμιστικών διαλυμάτων**

Ρυθμιστικό διάλυμα A: 20 mmol οξικό νάτριο, ουρία 6 M (360 g),  $\text{NaN}_2$  0.03%, ρύθμιση pH με HCl 1 N (τελικό pH = 5.0), διήθηση από φίλτρο 0,45  $\mu\text{m}$

Ρυθμιστικό διάλυμα B: 20 mmol οξικό νάτριο, ουρία 6 M (360 g), 1 M NaCl,  $\text{NaN}_2$  0.03%, ρύθμιση pH με HCl 1 N (τελικό pH = 5.0), διήθηση από φίλτρο 0,45  $\mu\text{m}$

##### **4.1.2.2 Προετοιμασία δείγματος**

300 mg ακατέργαστης (crude) κ-καζεΐνης διαλύονται σε 70 ml ρυθμιστικού διαλύματος A, ακολουθεί προσθήκη 400 ml β-μερκαπτοαιθανόλης και ρύθμιση του pH με NaOH 1 N (pH~ 7.0). Το δείγμα αναδεύεται για 1<sup>1/2</sup> h και ακολουθεί ρύθμιση του pH με HCl 1 N (τελικό pH = 5.0)

##### **4.1.2.3 Συνθήκες έκλυσης**

Ο καθαρισμός της ακατέργαστης (crude) κ-καζεΐνης πραγματοποιήθηκε σε αυτοματοποιημένο σύστημα καθαρισμού πρωτεϊνών (WATERS 650 E, Advanced protein purification system), εφοδιασμένο με σύστημα απαέρωσης με ήλιο, αντλία τεσσάρων

διαλυτών (WATERS 600 Controller), έναν ανιχνευτή (Water 486 Tunable absorbance detector) και ένα σύστημα εισαγωγής του δείγματος. Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν με το λογισμικό MILLENIUM v.2.15 (1994, WATERS).

**Στήλη:** Χρησιμοποιήθηκε η στήλη SP Sepharose Hiload 26/10

**Συνθήκες έκλουσης:** Η έκλουση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος με ροή 3 ml/min χρησιμοποιώντας τους διαλύτες Α και Β ως εξής: 100% Α για 15 min, 0-30% Β σε 230 min, 30%B για 15 min και τέλος 100% Β για 30 min.

**Ποσότητα δείγματος:** 3 ml

**Καταγραφή εκλούσματος:** Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 280 nm.

#### **4.1.3 Υδρόλυση της ακατέργαστης (crude) κ-καζεΐνης**

10 mg ακατέργαστης (crude) κ-καζεΐνης διαλύονται σε 1 ml κιτρικού τρινάτριου 0,1 M (pH = 6.6). Στο δείγμα προστίθενται 40 μl διάλυμα πυτιάς 0,2% (σε κιτρικό τρινάτριο 0,1 M, pH = 6.6). Ακολουθεί ανάδευση και επώαση στους 37 ° C για 1 h. Μετά την ολοκλήρωση της επώασης, πραγματοποιείται διαίρεση του πηγματος και φυγοκέντρωση (10.000 x g / 10 min). Μετά τη φυγοκέντρωση το υπερκείμενο, που αποτελεί το κλάσμα του CMP, απορρίπτεται. Το ίζημα, που αποτελεί το κλάσμα της παρα-κ-καζεΐνης, διαλύεται σε 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος Α (παράγραφος 4.4.1). Στο δείγμα προστίθενται 30 μl μερκαπτοαιθανόλη. Ακολουθεί πολύ καλή διάλυση σε λουτρό υπερήχων για 20 min και επώαση στους 37 ° C για 1 h. Όταν το δείγμα γίνει διαυγές, ενδεικτικό της πλήρους διάλυσης, πραγματοποιείται φυγοκέντρωση (10.000 x g / 10 min). Τελευταίο βήμα της διαδικασίας είναι η διήθηση του δείγματος με φίλτρο 0,45 mm. Αναλύονται 130 μl.

#### **4.2 Προετοιμασία πρότυπων λυοφιλωμένων μιγμάτων γάλακτος**

Μίγματα αγελαδινού, πρόβειου και αίγειου γάλακτος, με ανάμιξη των τριών ειδών γάλακτος κατά βάρος, παρασκευάστηκαν στο Εργαστήριο Γαλακτοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, τα οποία μετά την αποκορύφωσή τους λυοφιλώθηκαν. Στον Πίνακα 4-1 παρουσιάζεται η σύσταση των μιγμάτων και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την ανασύστασή τους σε 40 ml απεσταγμένο νερό. Κάθε πειραματικό μίγμα παρασκευάστηκε εις τριπλούν από γάλατα τριών διαφορετικών ημερών.

**Πίνακας 4-1:** Κωδικός, σύσταση και συγκεντρώσεις ανασύστασης λυοφιλωμένων μιγμάτων γάλακτος

Κωδικός	Σύσταση	Συγκέντρωση ανασύστασης (g) / 40 ml
M1	100% πρόβειο γάλα	4,40
M2	70% πρόβειο γάλα + 30% αίγειο γάλα	4,16
M3	50% πρόβειο γάλα + 50% αίγειο γάλα	4,00
M4	40% πρόβειο γάλα + 40% αίγειο γάλα + 20% αγελαδινό γάλα	3,84
M5	50% πρόβειο γάλα + 50% αγελαδινό γάλα	3,80
M6	100% αγελαδινό γάλα	3,20
M7	100% αίγειο γάλα	3,60

Η ανασύσταση των λυοφιλωμένων μιγμάτων γάλακτος πραγματοποιείται σε 40 ml απεσταγμένο νερό. Ακολουθεί καλή ανάδευση και θέρμανση ως τους 35<sup>0</sup> C. Σε αυτή τη θερμοκρασία προστίθεται υδατικό διάλυμα πυτιάς 5% (800 μl). Το δείγμα αναδεύεται και επώαζεται στους 37<sup>0</sup> C για 1 h. Μετά την ολοκλήρωση της επώασης, ακολουθεί διαίρεση του πηγματος και τοποθέτηση του σε τουλουπάνι για την αποβολή του ορού. Η στράγγιση διαρκεί 1 d υπό ψύξη στους 4<sup>0</sup> C. Την επόμενη μέρα το δείγμα είναι έτοιμο για την παραλαβή της παρα-κ-καζεΐνης όπως περιγράφεται στην παράγραφο 4.3.

### 4.3 Παρασκευή και δειγματοληψία τυριών Φέτας

Τρεις πειραματικές τυροκομήσεις τυριού τύπου Φέτα πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Γαλακτοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Σε κάθε δοκιμή παρασκευάστηκαν πέντε (5) τυριά από νωπό, μη-τυποποιημένο πρόβειο και αίγειο γάλα και μίγματα αυτών. Τα μίγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των τυριών φαίνονται στον Πίνακα 4-2.

**Πίνακας 4-2:** Σύσταση (g · 100<sup>-1</sup>) διαφορετικών ειδών γάλακτος που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή πειραματικών τυριών στο Εργαστήριο Γαλακτοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

Είδος γάλακτος	Κωδικός τυριού				
	A	B	C	D	E
Πρόβειο γάλα	100	90	80	70	60
Αίγειο γάλα	0	10	20	30	40

Σε κάθε πείραμα, έγινε παραλαβή του πρόβειου και αίγειου γάλακτος, παστερίωση στους 68 °C / 10 min, ψύξη στους 34 °C, προσδιορισμός της σύστασης των δύο ειδών

γάλακτος (Milkoscan) και μέτρηση του pH. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ζύγιση και προετοιμασία κάθε μίγματος στον αντίστοιχο τυρολέβητα. Τα μίγματα είχαν τη σύσταση που αναφέρεται στον Πίνακα 4-2. Από κάθε μίγμα έγινε παραλαβή δείγματος (50-60 ml), από το οποίο προσδιορίστηκε η σύσταση του κάθε μίγματος (Milkoscan) και το οποίο συντηρήθηκε στην κατάψυξη.

Σε κάθε τυρολέβητα προστέθηκαν  $\text{CaCl}_2$  (2 g / 20 Kg) και 90 ml ανασυσταμένης καλλιέργειας/20 Kg (~ 0,23 U/τυρολέβητα). Χρησιμοποιήθηκε οξυγαλακτική καλλιέργεια Direct - High Acid MOT82DC, 60% *Lactococcus lactis* και 40% thermophilic (*S. thermophilus*:*Lb. bulgaricus*, 3:1), η οποία είχε προηγουμένως διαλυθεί σε παστεριωμένο και ψυγμένο πρόβειο γάλα σε αποστειρωμένο δοχείο. Η ανασυσταμένη καλλιέργεια είχε πηκτική δύναμη 1,3 U / 500 ml γάλακτος.

Μετά την προσθήκη των παραπάνω τα μίγματα στους τυρολέβητες αφήθηκαν σε ηρεμία για 20 min. Ακολούθησε μέτρηση του pH σε όλους τους τυρολέβητες και προσθήκη πυτιάς 0,6 g / 20 Kg σε καθέναν από αυτούς. Μετά την ολοκλήρωση της πήξης πραγματοποιήθηκε η διαίρεση και μετά από παραμονή 10 min σε ηρεμία για, το διαιρεμένο πήγμα μεταφέρθηκε στα οποία είχε προστεθεί αλάτι. Η προσωρινή συσκευασία των τυριών πραγματοποιήθηκε την επομένη της τυροκόμησης. Η οριστική συσκευασία πραγματοποιήθηκε μετά από δύο εβδομάδες περίπου σε πλαστικούς περιέκτες των 400g. Πραγματοποιήθηκε παραλαβή δειγμάτων εις τριπλούν κατά τη 2<sup>η</sup>, 15<sup>η</sup>, 60<sup>η</sup>, και 120<sup>η</sup> ημέρα μετά την τυροκόμηση τα οποία διατηρήθηκαν στην κατάψυξη έως την ανάλυση τους, με σκοπό την απομόνωση και ανάλυση του καζεϊνικού τους κλάσματος.

Στους Πίνακες 4-3 και 4-4 παρουσιάζονται η μέση σύσταση του πρόβειου και αίγειου γάλακτος και των μιγμάτων τους που τυροκομήθηκαν και οι συνθήκες τυροκόμησης, αντίστοιχα.

**Πίνακας 4-3:** Μέση σύσταση πρόβειου και αίγειου γάλακτος και των μιγμάτων τους

Γάλα τυροκόμησης	Λιπος	Πρωτεΐνες	Λακτόζη
Πρόβειο (Π)	5,30 ± 0,03	5,27 ± 0,08	4,83 ± 0,07
Αίγειο (Α1)	3,80 ± 0,26	3,20 ± 0,23	4,42 ± 0,07
Μίγμα Β (90%Π + 10%Α1)	5,17 ± 0,08	5,11 ± 0,06	4,71 ± 0,17
Μίγμα C (0%Π + 20%Α1)	4,99 ± 0,06	4,90 ± 0,07	4,70 ± 0,17
Μίγμα D (70%Π + 30%Α1)	4,85 ± 0,09	4,72 ± 0,08	4,67 ± 0,18
Μίγμα E (60%Π + 40%Α1)	4,65 ± 0,15	4,51 ± 0,08	4,65 ± 0,18



**Πίνακας 4-4:** Συνθήκες τυροκόμησης τυριών τύπου Φέτα

Γάλα τυροκόμησης	pH	Θερμοκρασία πήξης (°C)	Χρόνος πήξης (min)	Χρόνος διαίρεσης (min)	pH 2 <sup>ης</sup> ημέρας	
					pH	T (°C)
Πρόβειο (A)	6,31 ± 0,10	39,0 ± 0,0	9,0 ± 1,7	36,7 ± 5,7	4.97 ± 0.07	22.3 ± 0.6
Μίγμα B	6,33 ± 0,11	37,7 ± 0,6	8,3 ± 1,5	35,3 ± 4,0	5.00 ± 0.06	22.3 ± 0.6
Μίγμα C	6,32 ± 0,11	38,7 ± 1,5	8,3 ± 1,5	35,0 ± 4,4	4.98 ± 0.03	22.3 ± 0.6
Μίγμα D	6,32 ± 0,11	38,7 ± 1,5	8,7 ± 1,2	35,0 ± 4,4	4.92 ± 0.03	22.3 ± 0.6
Μίγμα E	6,33 ± 0,10	38,7 ± 1,5	8,7 ± 1,2	34,7 ± 4,6	4.89 ± 0.02	22.3 ± 0.6

#### 4.3.1 Παραλαβή του καζεϊνικού κλάσματος από τα τυριά

5 g από το εκάστοτε δείγμα τυριού διαλύονται σε 50 ml ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού τρινάτριου 0,1 M και pH 6,6 υπό συνεχή ανάδευση και ήπια θέρμανση ώσπου το διάλυμα να γίνει διαυγές. Ακολουθεί κατακρήμνιση της καζεΐνης με ρύθμιση του pH του δείγματος σε 4,6 με HCl 18%. Έπειτα από καλή ανάδευση το δείγμα διαμοιράζεται σε φυγοκεντρικά φιαλίδια και ακολουθεί φυγοκέντρηση (10.000 x g / 10 min). Μετά τη φυγοκέντρηση το υπερκείμενο απορρίπτεται. Ποσότητα 2 g από το ίζημα διαλύεται σε 14 ml ρυθμιστικού διαλύματος A (παράγραφος 4.4.1). Στο δείγμα προστίθενται 210 μl μερκαπτοαιθανόλη. Ακολουθεί πολύ καλή διάλυση με έντονη ανάδευση και θέρμανση. Όταν το δείγμα γίνει διαυγές, ενδεικτικό της πλήρους διάλυσης, ακολουθεί ρύθμιση του pH (~ 6,0) με NaOH 1 N, τοποθέτηση του δείγματος σε erpendorf και φυγοκέντρηση (10.000 x g / 10 min). Τελευταίο βήμα της διαδικασίας είναι η διήθηση του δείγματος από φίλτρο 0,45 mm.

#### 4.3.2 Χρωματογραφική ανάλυση

##### 4.3.2.1 Παρασκευή ρυθμιστικών διαλυμάτων

Ρυθμιστικό διάλυμα A: 5 M ουρία, 10 mM μηλονικό οξύ, ρύθμιση pH διαλύματος στο 6 με NaOH 1 N

Ρυθμιστικό διάλυμα B: 5 M ουρία, 10 mM μηλονικό οξύ, 0,5M NaCl, ρύθμιση pH διαλύματος στο 6 με NaOH 1 N

#### 4.3.2.2 Συνθήκες έκλουσης

Η ανάλυση του δείγματος έγινε σε αυτοματοποιημένο σύστημα HPLC (WATERS, USA) εφοδιασμένο με σύστημα απαέρωσης με ήλιο, με μια αντλία ανάμιξης τεσσάρων διαλυτών (WATERS 600), έναν ανιχνευτή συστοιχίας φωτοдиодων (diode array UV/Vis, WATERS 996), ένα σύστημα αυτόματου δειγματολήπτη (WATERS 717, USA) και υπολογιστή. Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν με το λογισμικό MILLENIUM v.2.15 (1994, WATERS).

**Στήλη:** Χρησιμοποιήθηκε η στήλη Macrosphere Ion Exchange Column WCX 7  $\mu\text{m}$

**Συνθήκες έκλουσης:** Η έκλουση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος με ροή 1 ml/min χρησιμοποιώντας τους διαλύτες A και B ως εξής: 100% A για 5 min, 0-80% B σε 20 min, 80-100%B σε 6 min, 100% B για 7 min, 0-100% A σε 1 min και τέλος 100% A για 21 min.

**Ποσότητα δείγματος:** 130  $\mu\text{l}$

**Καταγραφή εκλούσματος:** Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 280 nm.

Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

#### 4.4 Προσδιορισμός της υγρασίας των δειγμάτων των τυριών - Μέθοδος της αποξηράνσης σε κλίβανο

Για τον προσδιορισμό της υγρασίας, συγκεκριμένη ποσότητα τυριού αποξηραίνεται σε κλίβανο στους 105 °C όπως περιγράφεται παρακάτω. 10-20g αλατιού και μια γυάλινη ράβδος με πεπλατυσμένα άκρα, που έχουν προηγουμένως αποξηρανθεί σε κλίβανο 105 $\pm$ 1 °C, τοποθετούνται με δοσομετρικό κουτάλι σε πορσελάνινη κάψα, η οποία έχει επίσης αποξηρανθεί. Προσεκτικά και με τη χρήση λαβίδας, η κάψα και το περιεχόμενό της τοποθετούνται σε ξηραντήριο για να αποκτήσουν θερμοκρασία περιβάλλοντος, χωρίς να επιτραπεί η πρόσληψη υγρασίας. Λαμβάνεται με ακρίβεια mg το απόβαρο της κάψας και του περιεχομένου της και η μέτρηση καταγράφεται. Στη συνέχεια προστίθενται γρήγορα 3 g περίπου από το ομογενοποιημένο δείγμα τυριού με τη βοήθεια κουταλιού μέσα στην κάψα, λαμβάνεται το μικτό βάρος της και η μέτρηση καταγράφεται. Ακολουθεί καλή ανάμιξη του δείγματος τυριού με το αλάτι με τη βοήθεια της γυάλινης ράβδου, έτσι ώστε να γίνει ομοιόμορφη κατανομή του περιεχομένου στον διατιθέμενο χώρο της κάψας. Η

κάψα και το περιεχόμενο της τοποθετούνται στον κλίβανο  $105 \pm 1$  °C για την αποξήρανση. Μετά από 15-20 ώρες περίπου οι κάψες και το περιεχόμενό τους εξάγονται από τον κλίβανο, και αφού κρυώσουν στο ξηραντήριο, ζυγίζονται με ακρίβεια mg και η μέτρηση καταγράφεται.

Η υγρασία του τυριού υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο:

$$\% \text{ ξηρή ουσία} = \frac{\text{μικτό βάρος μετά την ξήρανση} - \text{απόβαρο κάψας}}{\text{μικτό βάρος πριν την ξήρανση} - \text{απόβαρο κάψας}}$$

$$\% \text{ υγρασία} = 100 - \% \text{ ξηρή ουσία}$$

Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν.

#### 4.5 Προσδιορισμός της πρωτεόλυσης των τυριών - Μέθοδος TNBS

Η μέθοδος TNBS είναι μια απλή, γρήγορη και ευαίσθητη φωτομετρική μέθοδος που αναπτύχθηκε για την παρακολούθηση της πρωτεόλυσης κατά την ωρίμαση των τυριών. Βασίζεται στην αντίδραση των α-αμινομάδων που απελευθερώνονται από την υδρόλυση των καζεϊνών του τυριού με το αντιδραστήριο TNBS (trinitrobenzenesulphonic acid). Η αντίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό προϊόντων που απορροφούν ισχυρά σε μήκος κύματος 420 nm. Με τη μέθοδο αυτή προσδιορίστηκαν οι ελεύθερες αμινομάδες σε διαλύματα των τυριών. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε βασίστηκε σε αυτή που περιγράφεται από την [Polychroniadou \(1988\)](#).

Ένα g δείγματος τυριού διαλύεται σε 20 ml ρυθμιστικού διαλύματος βορικού (0.1 M  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  σε 0.1 M NaOH, pH 9.5). Ακολουθεί θέρμανση στους 45 °C για 15 min υπό ανάδευση και φυγοκέντρηση (3.000xg / 20min). Στη συνέχεια 6 ml από το υπερκείμενο αραιώνονται ως τα 100 ml με απεσταγμένο νερό. Από αυτή την αραιώση, 0,5 ml προστίθεται σε 0,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος βορικού και ακολουθεί η προσθήκη του αντιδραστηρίου TNBS (1 ml, 1 mg/ml). Έπειτα από σχολαστική ανάμιξη, το διάλυμα επωάζεται στους 37 °C για 60 min. Τα πρότυπα προετοιμάστηκαν με 0,5 ml απεσταγμένο νερό αντί για εκχύλισμα τυριού. Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη 2 ml

διαλύματος 0,1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  με 1,5 M  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  και μετράται η απορρόφηση σε μήκος κύματος 420 nm. Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

#### **4.6 Στατιστική ανάλυση**

Η επίδραση του σταδίου ωρίμανσης, οι διάφορες μεταβλητές καθώς και η συσχέτιση μεταξύ τους μελετήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού Statgraphics Plus για Windows v.2.1 (1995, Manugistics, Inc., Rockville, Maryland 20852, USA)

## Κεφάλαιο 5

### Αποτελέσματα και συζήτηση

#### 5.1 Εξέλιξη της ωρίμανσης των τυριών

##### 5.1.1 Μεταβολή του pH των τυριών

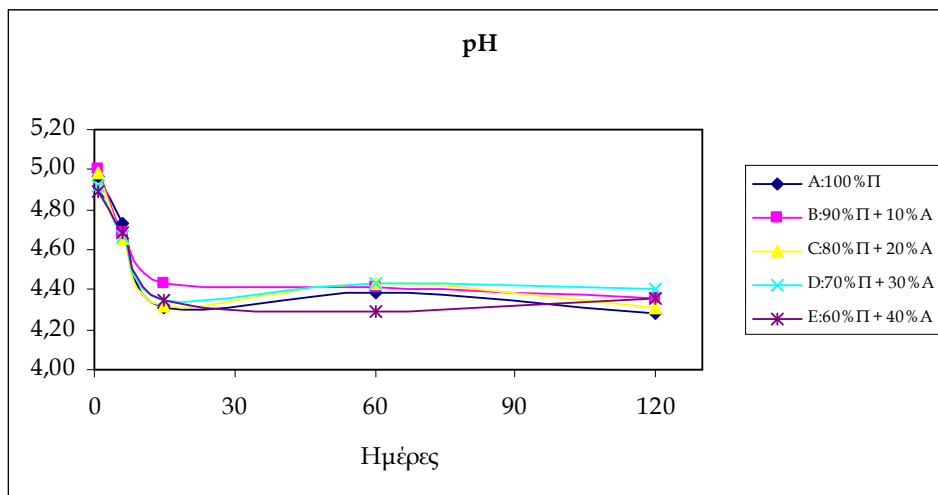
Όπως φαίνεται στον Πίνακα 5.1, το αυξημένο ποσοστό του αίγειου γάλακτος στο γάλα της τυροκόμησης προκάλεσε στατιστικά σημαντική αύξηση της ταχύτητας οξίνισης του πηγματος το πρώτο 24-ωρο. Μάλιστα, το pH του τυριού E (60%Π+40%A) διατηρήθηκε χαμηλότερα μέχρι την 60<sup>η</sup> ημέρα (Εικόνα 5.1).

**Πίνακας 5-1:** Μεταβολή του pH κατά τη διάρκεια ωρίμανσης των τυριών από μίγματα πρόβειου (Π) και αίγειου (Α) γάλακτος (μέσοι όροι τριών τυροκομήσεων ± τοπική απόκλιση)

Ημέρες ωρίμανσης	pH				
	Τυρί A 100% Π	Τυρί B 90%Π + 10%A	Τυρί C 80%Π + 20%A	Τυρί D 70%Π + 30%A	Τυρί E 60%Π + 40%A
1	4.97 ± 0.07 <sup>b</sup>	5.00 ± 0.06 <sup>b</sup>	4.98 ± 0.03 <sup>b</sup>	4.92 ± 0.03 <sup>a,b</sup>	4.89 ± 0.02 <sup>a</sup>
6	4.73 ± 0.03 <sup>a</sup>	4.68 ± 0.05 <sup>a</sup>	4.66 ± 0.07 <sup>a</sup>	4.67 ± 0.08 <sup>a</sup>	4.68 ± 0.07 <sup>a</sup>
15	4.31 ± 0.02 <sup>a</sup>	4.43 ± 0.04 <sup>a</sup>	4.32 ± 0.14 <sup>a</sup>	4.37 ± 0.07 <sup>a</sup>	4.35 ± 0.08 <sup>a</sup>
60	4.38 ± 0.29 <sup>a</sup>	4.41 ± 0.08 <sup>a</sup>	4.43 ± 0.20 <sup>a</sup>	4.43 ± 0.09 <sup>a</sup>	4.29 ± 0.11 <sup>a</sup>
120	4.28 ± 0.11 <sup>a</sup>	4.36 ± 0.06 <sup>a</sup>	4.31 ± 0.09 <sup>a</sup>	4.40 ± 0.06 <sup>a</sup>	4.36 ± 0.10 <sup>a</sup>

Οι τιμές στην ίδια γραμμή του Πίνακα με διαφορετικούς εκθέτες διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (LSD, P<0.05)

Γενικά οι μεταβολές του pH των τυριών από την 15<sup>η</sup> ημέρα και μετά είχαν παρόμοιες τάσεις (Εικόνα 5-1). Παρατηρούμε ότι κάποια από τα τυριά παρουσιάζουν μικρότερη τιμή pH κατά τη 15<sup>η</sup> ημέρα της ωρίμανσης, κατά την οποία πραγματοποιήθηκε η οριστική συσκευασία και η μεταφορά τους σε ψυκτικό θάλαμο, σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή κατά την 60<sup>η</sup> ημέρα της ωρίμανσης. Ωστόσο η διαφορά αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική. Η οξίνιση πρακτικά σταθεροποιήθηκε κατά τη διάρκεια της δεύτερης φάσης της ωρίμανσης, οπότε και πρακτικά σταθεροποιήθηκε σε τιμές pH ~4.4.



**Εικόνα 5-1:** Μεταβολή του pH κατά την ωρίμαση των τυριών από από μίγματα πρόβειου (Π) και αιγείου (Α) γάλακτος

### 5.1.2 Μεταβολή της υγρασίας των τυριών

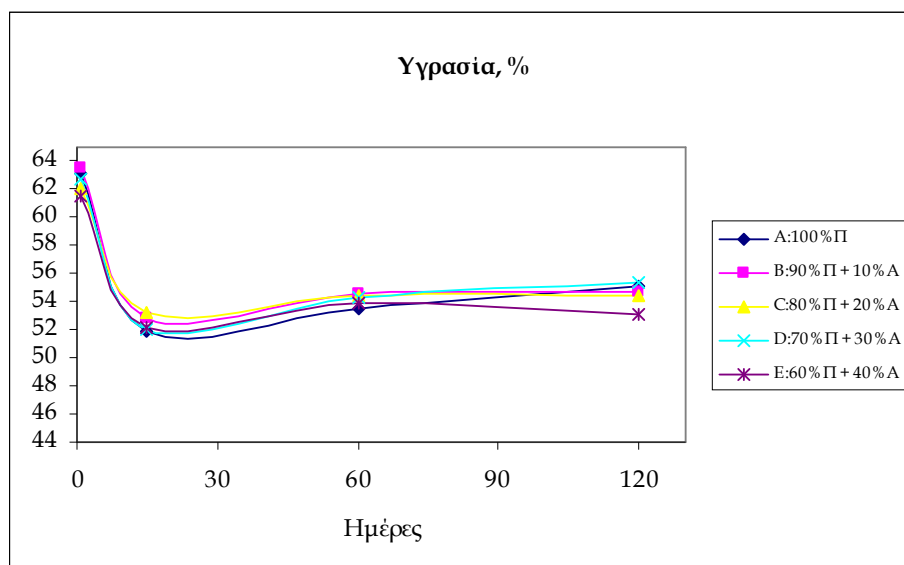
Η μεταβολή της υγρασίας των τυριών παρουσιάζεται στον Πίνακα 5.2. Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα οι τιμές της υγρασίας των τυριών δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους σε όλα τα στάδια της ωρίμανσης. Επομένως το ποσοστό του αιγείου γάλακτος στο γάλα της τυροκόμησης δεν επηρέασε την τελική υγρασία των τυριών.

**Πίνακας 5-2:** Μεταβολή της υγρασίας (%) κατά τη διάρκεια ωρίμανσης των τυριών από μίγματα πρόβειου (Π) και αιγείου (Α) γάλακτος (μέσοι όροι τριών τυροκομήσεων ± τυπική απόκλιση)

Ημέρες ωρίμασης	Υγρασία %				
	Τυρί Α 100% Π	Τυρί Β 90%Π + 10%A	Τυρί C 80%Π + 20%A	Τυρί D 70%Π + 30%A	Τυρί E 60%Π + 40%A
1	63,19 ± 2,35 <sup>a</sup>	63,55 ± 1,89 <sup>a</sup>	62,03 ± 0,55 <sup>a</sup>	62,71 ± 0,89 <sup>a</sup>	61,51 ± 0,91 <sup>a</sup>
15	51,95 ± 1,27 <sup>a</sup>	52,89 ± 1,60 <sup>a</sup>	53,19 ± 1,83 <sup>a</sup>	52,02 ± 3,19 <sup>a</sup>	52,17 ± 0,46 <sup>a</sup>
60	53,50 ± 2,37 <sup>a</sup>	54,53 ± 0,82 <sup>a</sup>	54,37 ± 2,17 <sup>a</sup>	54,27 ± 1,65 <sup>a</sup>	53,91 ± 1,76 <sup>a</sup>
120	55,04 ± 2,57 <sup>a</sup>	54,64 ± 1,11 <sup>a</sup>	54,39 ± 0,93 <sup>a</sup>	55,42 ± 1,21 <sup>a</sup>	53,04 ± 2,37 <sup>a</sup>

Οι τιμές στην ίδια γραμμή του Πίνακα με διαφορετικούς εκθέτες διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (LSD, P<0.05)

Οι τιμές pH των τυριών συσχετίζονται γραμμικά στατιστικά σημαντικά ( $P < 0.01$ ) με τις τιμές της υγρασίας τους ( $R = 0,680$ ). Επομένως, η πτώση του pH ευνοεί την αποβολή υγρασίας, γι' αυτό και η υγρασία μεταβάλλεται πολύ έντονα κατά την 1<sup>η</sup> φάση της ωρίμανσης, κατά την οποία συμβαίνει και η ταχύτερη πτώση του pH. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 5.2, η υγρασία των τυριών αυξάνει μετά την 15<sup>η</sup> ημέρα και μέχρι την 60<sup>η</sup>, δηλαδή κατά τη 2<sup>η</sup> φάση της ωρίμανσης των τυριών στο ψυγείο. Αυτό σημαίνει ότι είτε το pH των τυριών κατά την έναρξη της φάσης αυτής δεν ήταν αρκετά χαμηλό ( $pH \leq 4.6$ ), είτε ότι υπήρχε διαφορά μεταξύ της περιεκτικότητας του τυριού σε αλάτι στην υγρή φάση και της αλατοπεριεκτικότητας της άλμης. Πάντως σε κάθε περίπτωση, η υγρασία ήταν εντός των προδιαγραφών που ισχύουν για το τυρί Φέτα (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, 2003).



Εικόνα 5-2: Μεταβολή της υγρασίας κατά την ωρίμανση των τυριών Φέτα από μίγματα πρόβειου (Π) και αίγειου (Α) γάλακτος

### 5.1.3 Εξέλιξη της πρωτεόλυσης στα τυριά

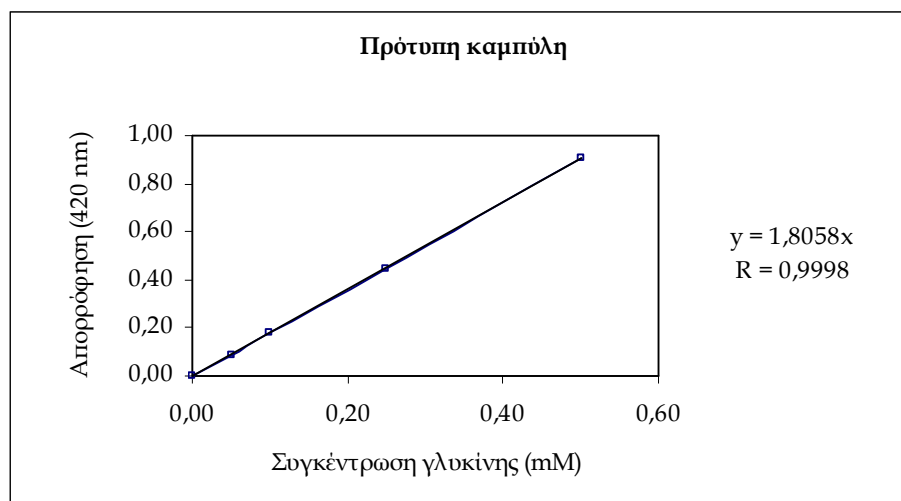
Η εξέλιξη της πρωτεόλυσης των τυριών αξιολογήθηκε με τη μέθοδο TNBS (παρ. 4.5), η οποία είναι μια απλή, γρήγορη και ευαίσθητη φωτομετρική μέθοδος που αναπτύχθηκε για την παρακολούθηση της πρωτεόλυσης κατά την ωρίμανση των τυριών. Βασίζεται στην αντίδραση των α-αμινομάδων, οι οποίες απελευθερώνονται από την υδρόλυση των καζεϊνών του τυριού, με το αντιδραστήριο TNBS (trinitrobenzenesulphonic acid). Η αντίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό προϊόντων που απορροφούν ισχυρά

σε μήκος κύματος 420 nm. Με τη μέθοδο αυτή προσδιορίστηκαν οι ελεύθερες αμινομάδες σε διαλύματα των τυριών (Polychroniadou, 1988).

Στον Πίνακα 5-3 και στην Εικόνα 5-3 παρουσιάζονται οι απορροφήσεις ( $A_{420}$ ) πρότυπων διαλυμάτων γλυκίνης και η πρότυπη καμπύλη που προέκυψε, αντίστοιχα, η οποία χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των ελεύθερων αμινομάδων στα τυριά.

Πίνακας 5-3: Απορροφήσεις πρότυπων διαλυμάτων γλυκίνης

Συγκέντρωση γλυκίνης (mM)	Απορρόφηση (420 nm)
0,05	0,09 ± 0,0008
0,1	0,18 ± 0,0001
0,25	0,44 ± 0,0021
0,5	0,91 ± 0,0016



Εικόνα 5-3: Πρότυπη καμπύλη απορροφήσεων διαλυμάτων γλυκίνης γνωστής συγκέντρωσης

Στον Πίνακα 5-4 και στην Εικόνα 5-4 παρουσιάζεται η εξέλιξη της πρωτεόλυσης των τυριών, όπως αξιολογήθηκε με τη μέθοδο TNBS (παρ. 4.5). Στον Πίνακα 5-5 και στην Εικόνα 5-5 η συγκέντρωση των ελεύθερων αμινομάδων στα τυριά εκφράζεται σε mM γλυκίνης βάσει της πρότυπης καμπύλης (Εικόνα 5-3).

Την 1<sup>η</sup> ημέρα ωρίμανσης (Πίνακες 5-4 & 5-5), οι ελεύθερες αμινομάδες των τυριών δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, αν και τα τυριά με περισσότερο πρόβειο γάλα είχαν μεγαλύτερη περιεκτικότητα. Μέχρι την 15<sup>η</sup> ημέρα, δηλαδή κατά την

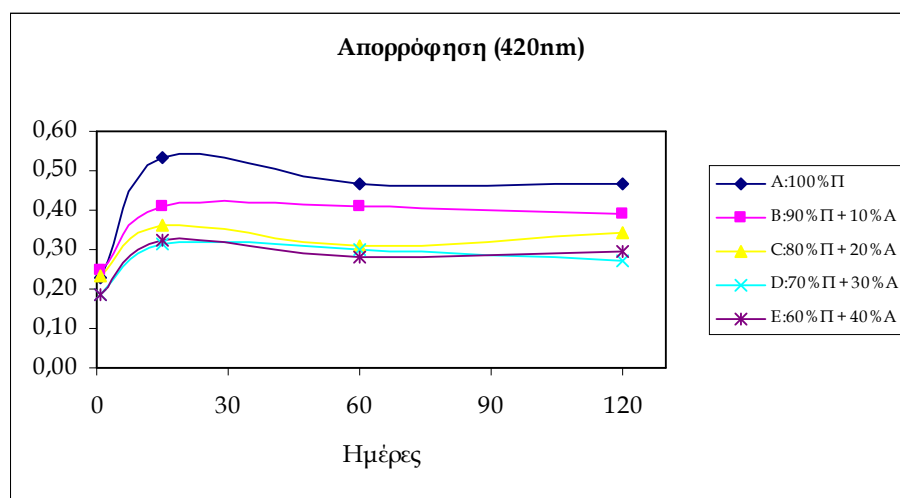


πρώτη φάση ωρίμανσης, το κλάσμα αυτό αυξήθηκε πολύ έντονα. Στην περίπτωση αυτή το πρόβειο τυρί (A) παρουσίασε στατιστικά σημαντικές υψηλότερες τιμές σε σχέση με τα άλλα τυριά ακολουθούμενο από το τυρί με 10% αίγαιο γάλα (B). Η τάση αυτή συνεχίστηκε μέχρι την 120<sup>η</sup> ημέρα και μπορεί να αποδοθεί στη σύσταση του πρωτεϊνικού κλάσματος του πρόβειου γάλακτος.

**Πίνακας 5-4:** Εξέλιξη της πρωτεόλυσης ( $A_{420}$  nm) κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των τυριών από μίγματα πρόβειου (Π) και αίγειου (A) γάλακτος (μέσοι όροι τριών τυροκομήσεων  $\pm$  τυπική απόκλιση)

Ημέρες ωρίμανσης	Απορρόφηση (420nm)				
	Τυρί A 100% Π	Τυρί B 90%Π + 10%A	Τυρί C 80%Π + 20%A	Τυρί D 70%Π + 30%A	Τυρί E 60%Π + 40%A
1	0,23 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	0,25 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	0,23 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	0,19 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	0,19 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>
15	0,54 $\pm$ 0,05 <sup>c</sup>	0,41 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	0,36 $\pm$ 0,02 <sup>a,b</sup>	0,31 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,32 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>
60	0,46 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	0,41 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup>	0,31 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,30 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,28 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>
120	0,47 $\pm$ 0,08 <sup>c</sup>	0,39 $\pm$ 0,07 <sup>b,c</sup>	0,34 $\pm$ 0,03 <sup>a,b</sup>	0,27 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	0,30 $\pm$ 0,01 <sup>a,b</sup>

Οι τιμές στην ίδια γραμμή του Πίνακα με διαφορετικούς εκθέτες διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (LSD,  $P < 0.05$ )



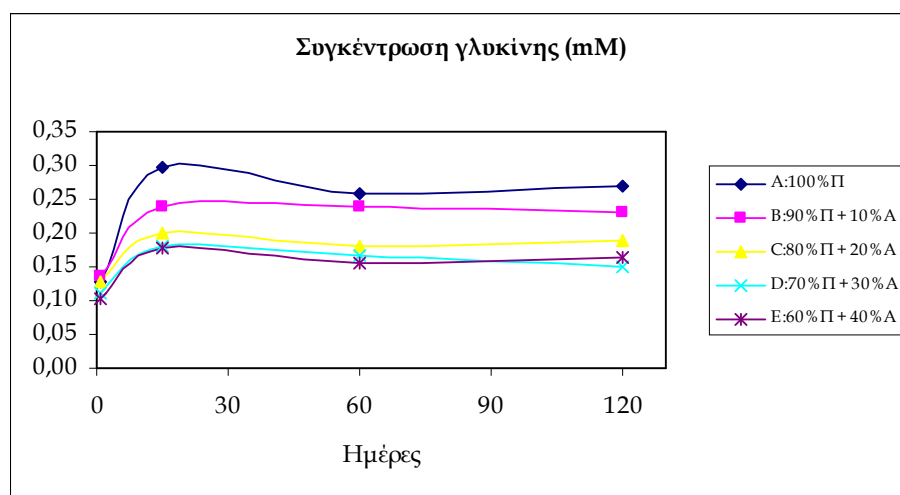
**Εικόνα 5-4:** Εξέλιξη της πρωτεόλυσης κατά την ωρίμανση των τυριών Φέτα από μίγματα πρόβειου (Π) και αίγειου (A) γάλακτος

Η έντονη αυτή αύξηση είναι αναμενόμενη σε αυτή τη φάση κατά την οποία είναι γνωστό ότι εξελίσσεται το μεγαλύτερο μέρος της υδρόλυσης των καζεϊνών στη Φέτα. Η πλειοψηφία των μικρών και μεσαίων πεπτιδίων συσσωρεύονται στη Φέτα κατά τη

διάρκεια της 1ης φάσης της ωρίμανσης και αντιστοιχούν περίπου στα 2/3 του διαλυτού αζώτου (Polychroniadou, 1994; Valsamaki *et al.*, 2000; Moatsou *et al.*, 2002; Michaelidou *et al.*, 2003) Η συσσώρευση των προϊόντων της υδρόλυσης φαίνεται να σταματά μετά την μεταφορά των τυριών στο ψυγείο. Στην περίπτωση του πρόβειου τυριού παρατηρείται και μικρή μείωση της περιεκτικότητάς τους. Προφανώς συμβαίνει αφενός μεν διάχυση των μικρομοριακών προϊόντων της πρωτεόλυσης στην άλμη (Alichanidis *et al.* 1984; Michaelidou *et al.*, 2005), αφετέρου δε περαιτέρω καταβολισμός τους προς πιητικά συστατικά (McSweeney & Sousa, 2000).

**Πίνακας 5-5:** Εξέλιξη της πρωτεόλυσης (mM γλυκίνης) κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των τυριών από μίγματα πρόβειου (Π) και αίγειου (Α) γάλακτος, με βάση την πρότυπη καμπύλη της Εικόνας 5-3 (μέσοι όροι τριών τυροκομήσεων ± τοπική απόκλιση)

Ημέρες ωρίμανσης	Συγκέντρωση γλυκίνης (mM)				
	Τυρί Α	Τυρί Β	Τυρί C	Τυρί D	Τυρί E
	100% Π	90%Π + 10%A	80%Π + 20%A	70%Π + 30%A	60%Π + 40%A
1	0,13 ± 0,037	0,14 ± 0,019	0,13 ± 0,025	0,11 ± 0,018	0,10 ± 0,011
15	0,30 ± 0,022	0,24 ± 0,040	0,20 ± 0,008	0,18 ± 0,014	0,18 ± 0,006
60	0,26 ± 0,016	0,24 ± 0,046	0,18 ± 0,015	0,17 ± 0,007	0,16 ± 0,007
120	0,27 ± 0,033	0,23 ± 0,035	0,19 ± 0,011	0,15 ± 0,002	0,16 ± 0,006



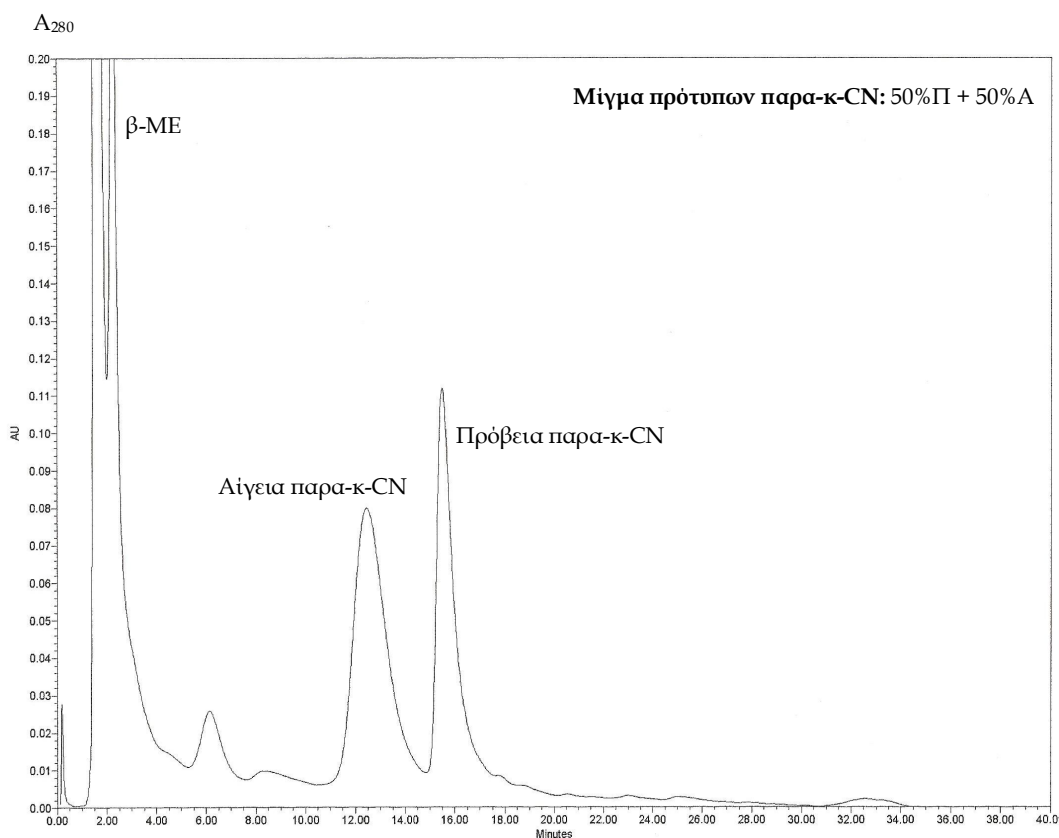
**Εικόνα 5-5:** Εξέλιξη της πρωτεόλυσης κατά την ωρίμανση των τυριών Φέτα από μίγματα πρόβειου (Π) και αίγειου (Α) γάλακτος. Οι απορροφήσεις είναι εκφρασμένες σε mM γλυκίνης, με βάση την πρότυπη καμπύλη της Εικόνας 5-4

Η συσσώρευση των προϊόντων της πρωτεόλυσης εκφρασμένες ως  $A_{280}$  ή ως mM γλυκίνης (Πίνακες 5.4 & 5.5 αντίστοιχα) συσχετίζεται γραμμικά αρνητικά ( $P < 0.01$ ) με την υγρασία των τυριών ( $R = -0.646$ ).

## 5.2 Προσδιορισμός του είδους του γάλακτος της τυροκόμησης

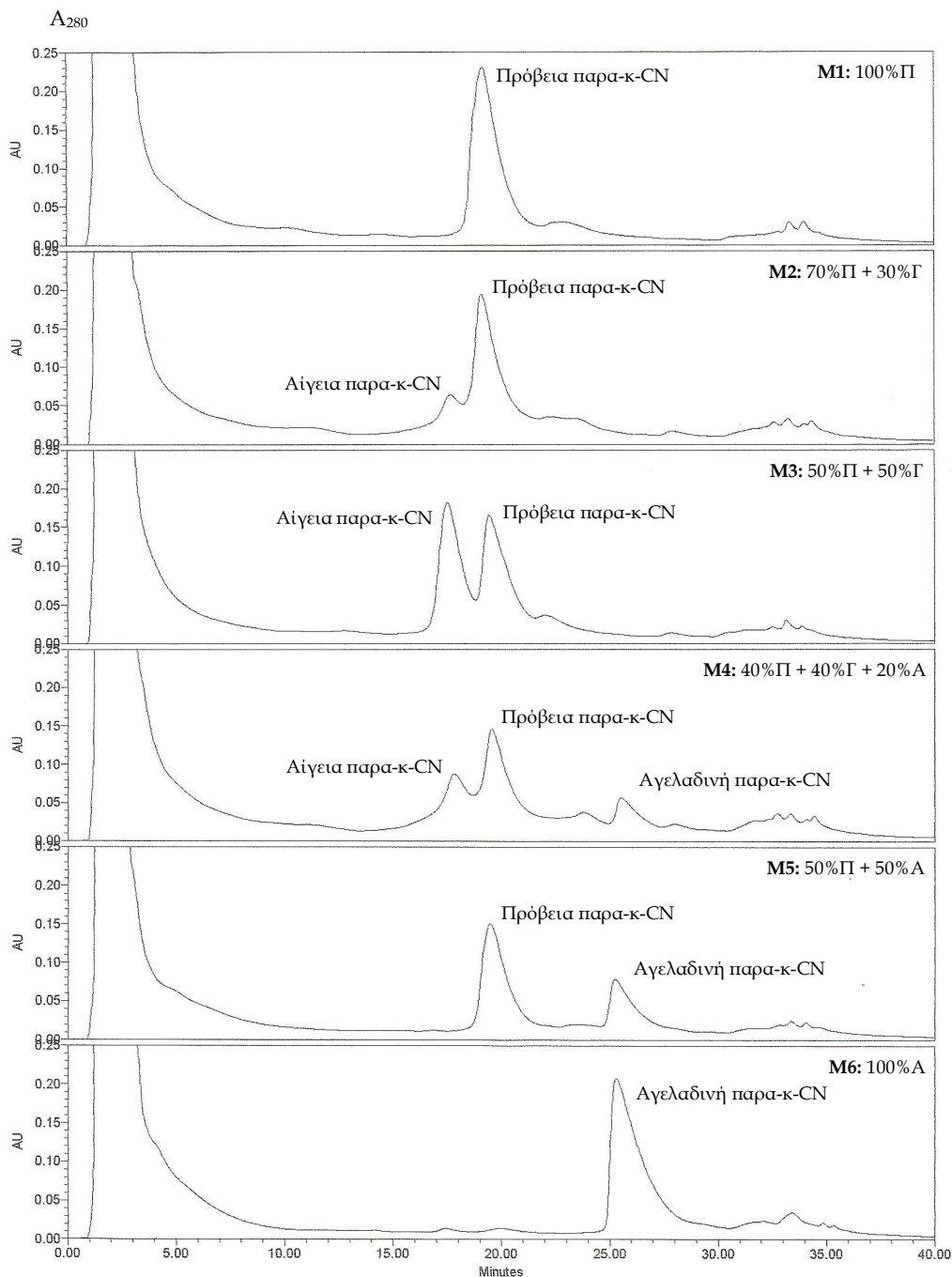
### 5.2.1 Αναλύσεις του καζεϊνικού κλάσματος πρότυπων μιγμάτων γάλακτος

Η χρωματογραφική κατατομή του καζεϊνικού κλάσματος πρότυπων παρα-κ-καζεϊνών πρόβειου και αίγειου γάλακτος σε στήλη κατιοανταλλαγής, που προήλθαν από υδρόλυση με χυμοσίνη των αντίστοιχων καθαρών κ-καζεϊνών (παράγραφος 4.1.3), παρουσιάζεται στην Εικόνα 5-6.



**Εικόνα 5-6:** Χρωματογραφική κατατομή του καζεϊνικού κλάσματος πρότυπων παρα-κ-καζεϊνών πρόβειου (Π) και αίγειου (Α) γάλακτος, σε στήλη κατιοανταλλαγής. Οι συνθήκες έκλυσης περιγράφονται στην παρ. 4.5.  $A_{280}$ : απορρόφηση στα 280 nm,  $\beta$ -ME:  $\beta$ -μερκαπτοαιθανόλη

Οι χρωματογραφικές κατατομές του παρακαζεινικού κλάσματος πρότυπων μιγμάτων πρόβειου, αίγειου και αγελαδινού γάλακτος, που προήλθαν από υδρόλυση με χυμοσίνη των κ-καζεϊνών τους (παρ. 4.2), παρουσιάζονται στην Εικόνα 5-7.



**Εικόνα 5-7:** Χρωματογραφικές κατατομές του καζεϊνικού κλάσματος των παρα-κ-καζεϊνών πρότυπων μιγμάτων πρόβειου (Π), αίγειου (Γ) και αγελαδινού (Α) γάλακτος, σε στήλη κατιοανταλλαγής. Οι συνθήκες έκλουσης περιγράφονται στην παρ. 4.5.  $A_{280}$ : απορρόφηση στα 280 nm

Με βάση τις αναλύσεις των πρότυπων μιγμάτων γάλακτος διαμορφώθηκε η τελική μέθοδος ανάλυσης. Οι μέσοι χρόνοι κατακράτησης των παρα-κ-καζεϊνών των τριών ειδών γάλακτος παρουσιάζονται στον Πίνακα 5-6.

**Πίνακας 5-6:** Χρόνοι κατακράτησης της παρα-κ-καζεΐνης των τριών ειδών γάλακτος

Χρόνοι έκλουσης παρα-κ-καζεΐνης (min)		
Πρόβεια	Αίγεια	Αγελαδινή
18,726 ± 0,801	17,065 ± 0,410	25,014 ± 0,920

Όπως φαίνεται από τις κατατομές και τους χρόνους κατακράτησης του Πίνακα 5-6, οι κορυφές των τριών παρα-κ-καζεϊνών διαχωρίστηκαν σαφώς η μια από την άλλη με την ασθενώς κατιοανταλλακτική στήλη Macrosphere Ion Exchange Column WCX 7  $\mu\text{m}$ . Η παρα-κ-καζεΐνη είναι η μόνη καζεΐνη που σε ουδέτερο και αλκαλικό pH είναι θετικά φορτισμένη. Στο pH 6,0 της παρούσας ανάλυσης, κατακρατείται μέσω των θετικά φορτισμένων ομάδων της στο υλικό πλήρωσης της κατιοανταλλακτικής στήλης. Η ένταση αυτής της σύνδεσης εξαρτάται από τον αριθμό των φορτισμένων ομάδων. Επομένως κάθε μία από τις παρα-κ-καζεΐνες διαφοροποιείται ανάλογα με την αμινοξική της ακολουθία (Mercier *et al.*, 1976; Furet *et al.*, 1990; Miranda *et al.*, 1993; Trujillo *et al.*, 2000a). Η αγελαδινή παρα-κ-καζεΐνη διαφέρει από την πρόβεια ως προς 9 αμινοξέα (στις θέσεις 8, 10, 19, 46, 65, 73, 82, 90 και 94), κατακρατείται εντονότερα και χρειάζεται μεγαλύτερη συγκέντρωση NaCl για την έκλουσή της. Αντίθετα οι διαφορές μεταξύ αίγειας και πρόβειας παρα-κ-καζεΐνης είναι πολύ περιορισμένες, μόλις 5 αμινοξέα (στις θέσεις 2, 7, 8, 82 και 94) με αποτέλεσμα να εκλύονται σε πολύ κοντινούς χρόνους. Παρ' όλα αυτά, με την παρούσα μέθοδο, επιτεύχθηκε μια μέση διαφορά ~1,6 min μεταξύ των δύο χρόνων κατακράτησης, ενώ οι τοπικές αποκλίσεις ήταν χαμηλές, μικρότερες από το 4% των μέσων τιμών.

Στον Πίνακα 5-7, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού της σύστασης των μιγμάτων. Ο προσδιορισμός βασίστηκε στο εμβαδόν των σχετικών κορυφών, το οποίο «κανονικοποιήθηκε» λαμβάνοντας υπόψη τις σχετικές διαφορές στις πρωτεϊνοπεριεκτικότητες των γαλάτων που χρησιμοποιήθηκαν.

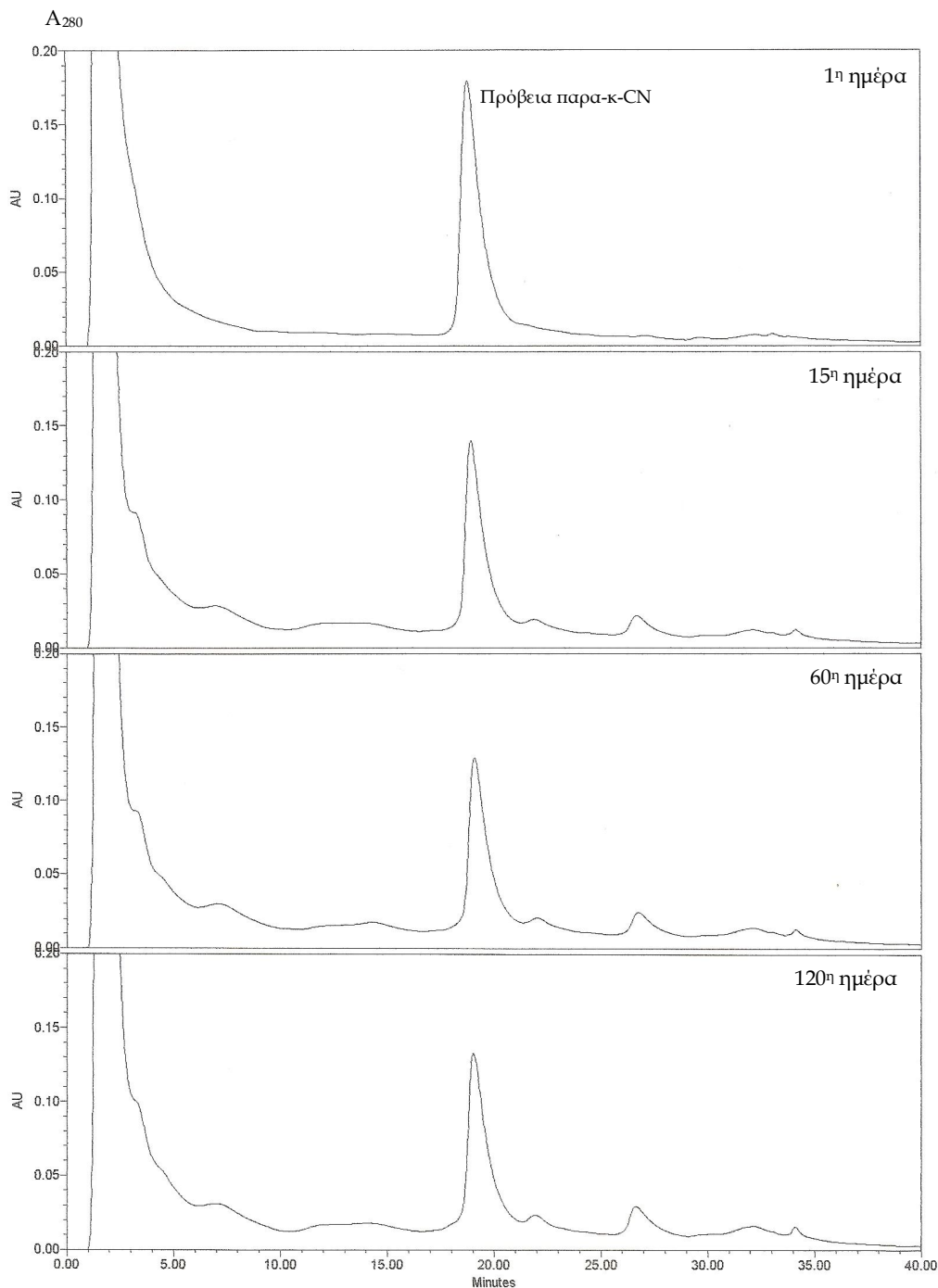
**Πίνακας 5-7:** Προσδιορισμός της πρόβειας, αίγειας και αγελαδινή παρα-κ-καζεΐνης σε πρότυπα μίγματα πρόβειου (Π), αίγειου (Α) και αγελαδινού (ΑΓ) γάλακτος (μέσοι όροι τριών πειραματικών παρασκευών ± τυπική απόκλιση)

Κωδικός και σύσταση μίγματος	Εμβαδό κορυφών παρα-κ-καζεΐνης των τριών ειδών γάλακτος (* 10 <sup>6</sup> )		
	Πρόβειο γάλα	Αίγειο γάλα	Αγελαδινό γάλα
<b>M2: 70%Π + 30%Α</b>	70,7 ± 3,3	29,3 ± 3,3	-
<b>M3: 50%Π + 50%Α</b>	51,9 ± 9,1	48,1 ± 9,1	-
<b>M4: 40%Π + 40%Α + 20%ΑΓ</b>	42,0 ± 4,5	41,9 ± 5,1	16,1 ± 0,6
<b>M5: 50%Π + 50%ΑΓ</b>	53,8 ± 7,6	-	46,2 ± 7,6

Τα αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού ήταν πολύ κοντά στα πραγματικά και κατέστη δυνατός ο ταυτόχρονος προσδιορισμός και των τριών ειδών γάλακτος. Όμως η διαδικασία για την προετοιμασία του δείγματος ήταν αρκετά πολύπλοκη αφού απαιτούσε επιπλέον πήξη με πυτιά και απομόνωση του παρα-καζεϊνικού κλάσματος των γαλάτων. Η πολυπλοκότητα αυτή μπορεί να λειτουργήσει ως ένας επιπλέον παράγοντας σφάλματος για τις μετρήσεις, γεγονός που απεικονίζεται στις σχετικά μεγάλες τυπικές αποκλίσεις που παρατηρήθηκαν σε ορισμένες περιπτώσεις.

### 5.2.2 Μεταβολή της παρα-κ-καζεΐνης κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης

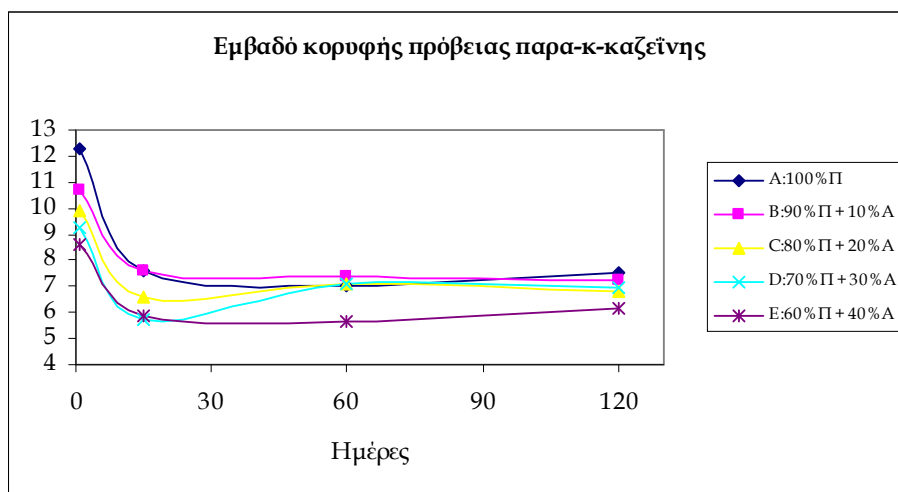
Στους Πίνακες 5-8 & 5-9 και στις Εικόνες 5-8 & 5-9 παρουσιάζονται οι μεταβολές της πρόβειας παρα-κ-καζεΐνης κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των πειραματικών τυριών τύπου Φέτα.



**Εικόνα 5-8:** Μεταβολή της παρα-κ-καζεΐνης των πειραματικών τυριών τύπου Φέτα από πρόβειο γάλα κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης. Οι συνθήκες έκλυσης περιγράφονται στην παρ. 4.5.  $A_{280}$ : απορρόφηση στα 280 nm

**Πίνακας 5-8:** Μεταβολή της πρόβειας παρα-κ-καζεΐνης κατά την ωρίμανση των τυριών από μίγματα πρόβειου (Π) και αίγιου (Α) γάλακτος (μέσοι όροι τριών τυροκομήσεων  $\pm$  τυπική απόκλιση)

Ημέρες ωρίμανσης	Εμβαδό κορυφής της πρόβειας παρα-κ-καζεΐνης (* 10 <sup>6</sup> )				
	Τυρί Α	Τυρί Β	Τυρί C	Τυρί D	Τυρί Ε
	100% Π	90%Π + 10%A	80%Π + 20%A	70%Π + 30%A	60%Π + 40%A
1	12,30 $\pm$ 3,21	10,68 $\pm$ 2,22	9,90 $\pm$ 1,62	9,23 $\pm$ 1,93	8,58 $\pm$ 2,71
15	7,60 $\pm$ 1,00	7,57 $\pm$ 1,83	6,58 $\pm$ 0,63	5,72 $\pm$ 1,46	5,87 $\pm$ 0,62
60	7,05 $\pm$ 0,53	7,40 $\pm$ 0,35	7,07 $\pm$ 0,95	7,10 $\pm$ 1,15	5,68 $\pm$ 0,53
120	7,50 $\pm$ 0,26	7,25 $\pm$ 0,30	6,78 $\pm$ 0,51	6,92 $\pm$ 0,48	6,13 $\pm$ 0,53



**Εικόνα 5-9:** Μεταβολή της πρόβειας παρα-κ-καζεΐνης κατά την ωρίμανση των τυριών Φέτα από μίγματα πρόβειου (Π) και αίγιου (Α) γάλακτος

Όπως φαίνεται, η παρα-κ-καζεΐνη μειώνεται σχετικά γρήγορα κατά την 1<sup>η</sup> φάση της ωρίμανσης και κατόπιν παραμένει γενικά σταθερή. Επίσης, μεταβάλλεται γενικά αντίθετα με τη συγκέντρωση των ελεύθερων αμινομάδων (Πίνακες 5-4 & 5-5, Εικόνες 5-4 & 5-5). Από τα αποτελέσματα προκύπτει (Πίνακας 5-9) ότι μετά από 120 ημέρες ωρίμανσης έχει παραμείνει στο τυρί το 60-75% της αρχικής ποσότητας της παρα-κ-καζεΐνης. Ο κύριος πρωτεολυτικός παράγοντας στα τυριά τύπου Φέτας, στα οποία συμβαίνει ταχεία οξίνιση και έχουν και υψηλή υγρασία αναμένεται να είναι η υπολειμματική χυμοσίνη (Anifantakis & Moatsou, 2006). Η χυμοσίνη είναι ένας από τους κύριους πρωτεολυτικούς



παράγοντες που δραστηριοποιούνται κατά την ωρίμανση των τυριών και η παρα-κ-καζεΐνη περιέχει ευαίσθητους στη χυμοσίνη πεπτιδικούς δεσμούς (McSweeney, 2004). Σε ρυθμιστικό διάλυμα με pH 6,6, η υδρόλυση της αγελαδινής παρα-κ-καζεΐνης από τη χυμοσίνη είναι περιορισμένη και αυξάνει σε  $\text{pH} \leq 5,6$  και ιδιαίτερα σε  $\text{pH} \leq 4,5$  (Coolbear *et al.*, 1996; Reid *et al.*, 1997). Υπάρχουν ελάχιστες αναφορές σχετικά με πεπτιδία που προέρχονται από την παρα-κ-καζεΐνη σε υδατοδιαλυτό εκχύλισμα τυριών, τα οποία μάλιστα έχουν μικρή συνεισφορά στο σύνολο των πεπτιδίων (Ferranti *et al.*, 1997; Alli *et al.*, 1998; Michaelidou *et al.*, 1998). Στην περίπτωση της Φέτας και λαμβάνοντας υπόψη τις συνθήκες που επικρατούν στο τυρί, η χυμοσίνη μπορεί να θεωρηθεί υπεύθυνη για τη σχετικά έντονη υδρόλυση της παρα-κ-καζεΐνης που παρατηρήθηκε κατά την πρώτη φάση της ωρίμανσης. Άλλωστε έχει ήδη αναφερθεί, ότι στο τέλος της πρώτης φάσης της ωρίμανσης έχει υδρολυθεί το 30-50% της  $\alpha_{s1}$ -καζεΐνης (Moatsou *et al.*, 2002, 2004b; Valsamaki *et al.*, 2000; Sarantinopoulos *et al.*, 2002). Επιπλέον, πολλά κύρια πεπτιδία του διαλυτού κλάσματος της Φέτας, προέρχονται από το N-τελικό άκρο της  $\alpha_{s1}$ -καζεΐνης, που είναι η περιοχή «δράσης» της χυμοσίνης (Michaelidou *et al.*, 1998).

**Πίνακας 5-9:** Υπολειμματική παρα-κ-καζεΐνη σε διάφορα στάδια της ωρίμανσης των τυριών από μίγματα πρόβειου (Π) και αίγειου (Α) γάλακτος (μέσοι όροι τριών τυροκομήσεων  $\pm$  τοπική απόκλιση)

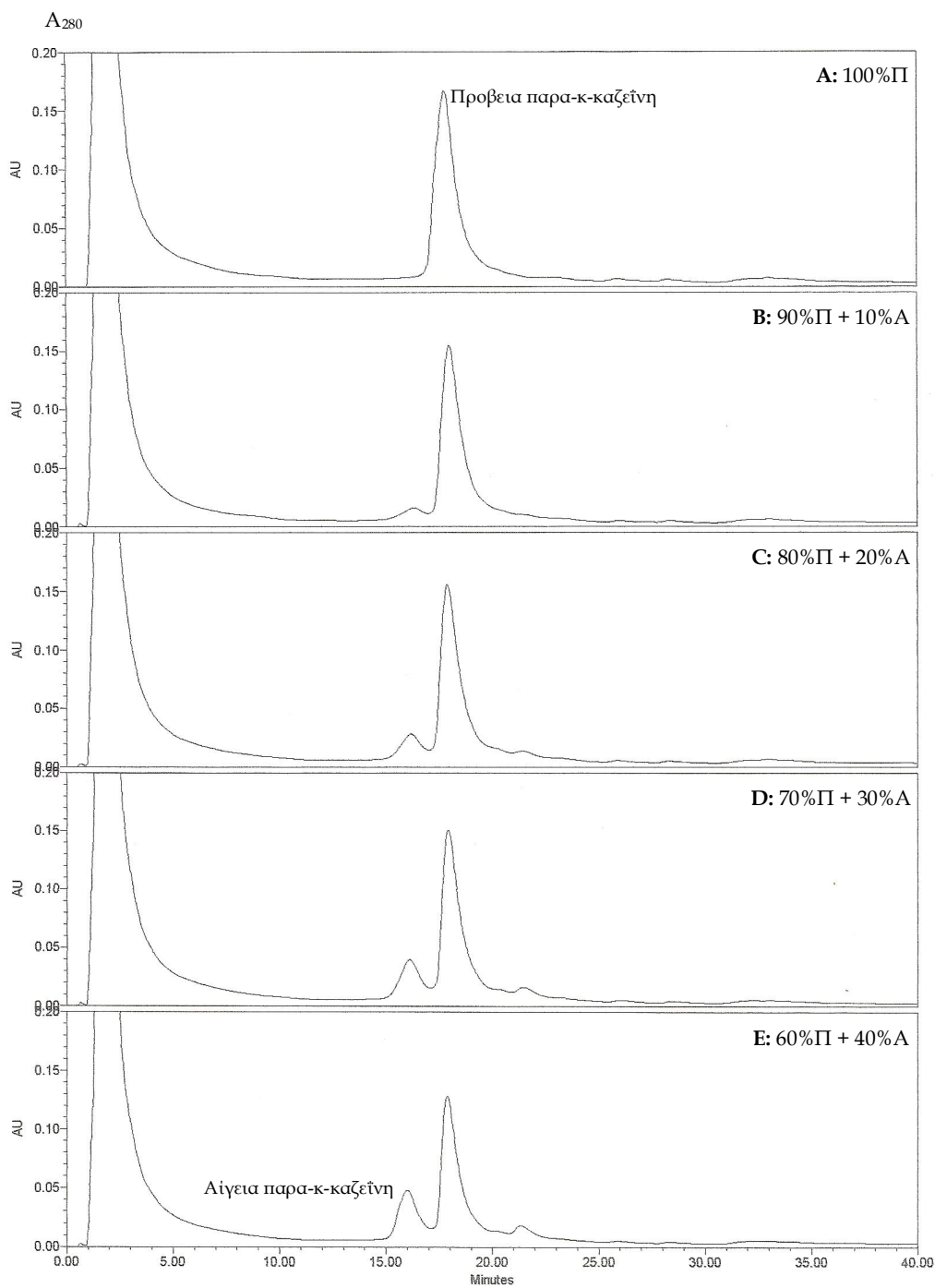
Ημέρες ωρίμανσης	Υπολειμματική παρα-κ-καζεΐνη				
	Τυρί Α	Τυρί Β	Τυρί C	Τυρί D	Τυρί E
	100% Π	90%Π + 10%A	80%Π + 20%A	70%Π + 30%A	60%Π + 40%A
1	100	100	100	100	100
15	62	71	66	62	68
60	57	69	71	77	66
120	61	68	68	75	71

Η ποσότητα της παρα-κ-καζεΐνης συσχετίζεται στατιστικά σημαντικά γραμμικά ( $P < 0.01$ ) θετικά με το pH των τυριών ( $R = 0.600$ ), δηλαδή η πτώση του pH, η οποία ευνοεί τη δράση της χυμοσίνης (όξινη πρωτεάση) συνδέεται με τη μείωση της κορυφής της παρα-κ-καζεΐνης. Φαίνεται όμως ότι οι συνθήκες που επικρατούν κατά τη δεύτερη φάση της ωρίμανσης, με κυριότερη τη θερμοκρασία, δεν ευνοούν τη δράση του υπολειμματικού

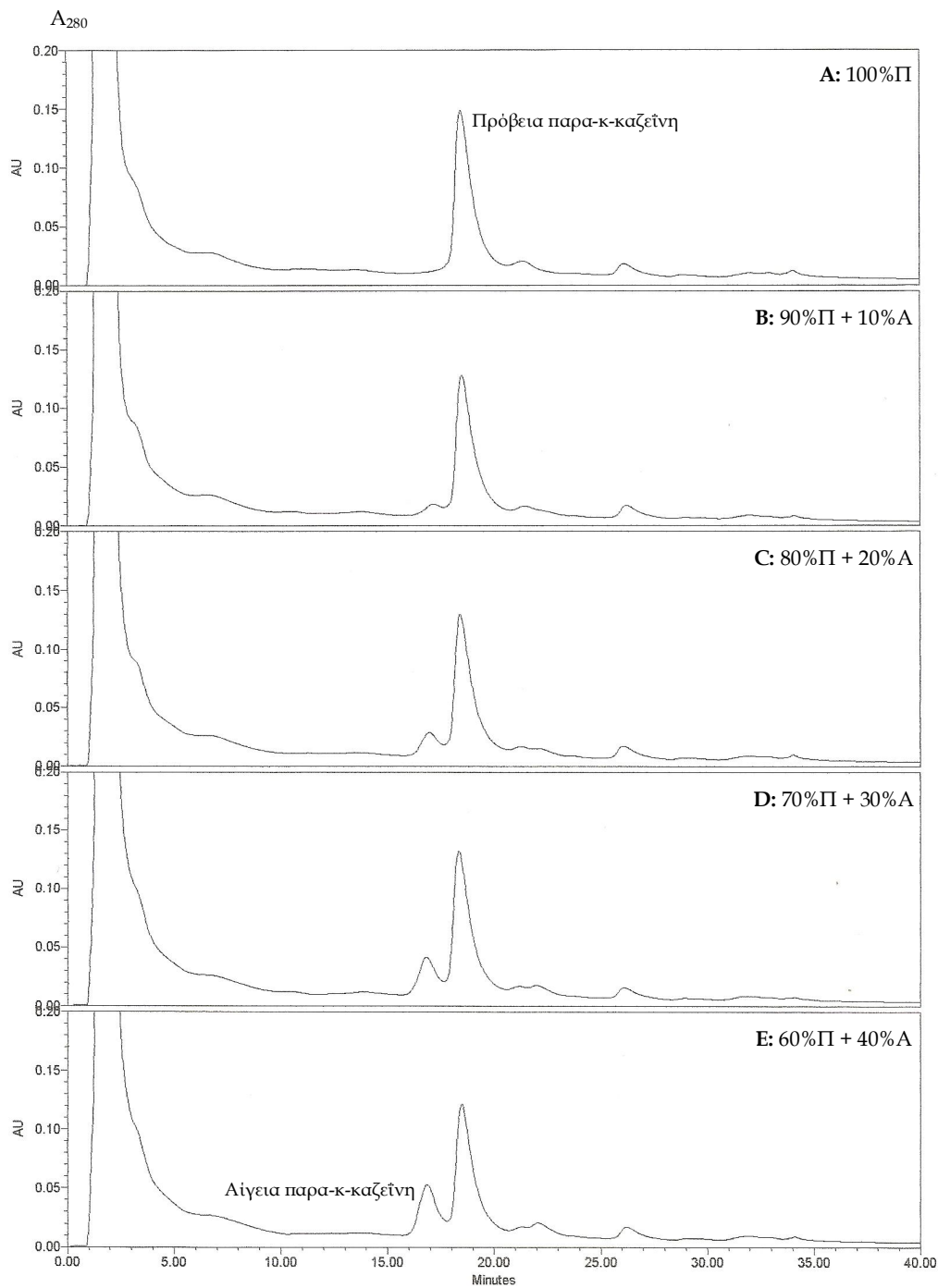
ενζύμου και έτσι παραμένει αρκετή ποσότητα άθικτης (μη υδρολυμένης) παρα-κ-καζεΐνης στο τυρί. Προφανώς αναμένεται σε τυριά άλλου τύπου, στα οποία οι συνθήκες για τη χυμοσίνη δεν είναι ευνοϊκές (π.χ. σκληρά τυριά με υψηλότερο pH) να υπάρχει περισσότερη άθικτη παρα-κ-καζεΐνη. Επομένως, οι μέθοδοι που βασίζονται στην ανίχνευσή της φαίνονται κατάλληλες για την περίπτωση των τυριών. Αυτό ισχύει ιδιαίτερα στην περίπτωση αναζήτησης των αίγειων καζεϊνών στο τυρί, οι οποίες δεν μπορούν να ανιχνευθούν με την επίσημη μέθοδο ανίχνευσης της νοθείας που είναι ο ισοηλεκτρικός εστιασμός των γ-καζεϊνών ([Κανονισμός 1081/96](#)).

### ***5.2.3 Προσδιορισμός του είδους του γάλακτος της τυροκόμησης***

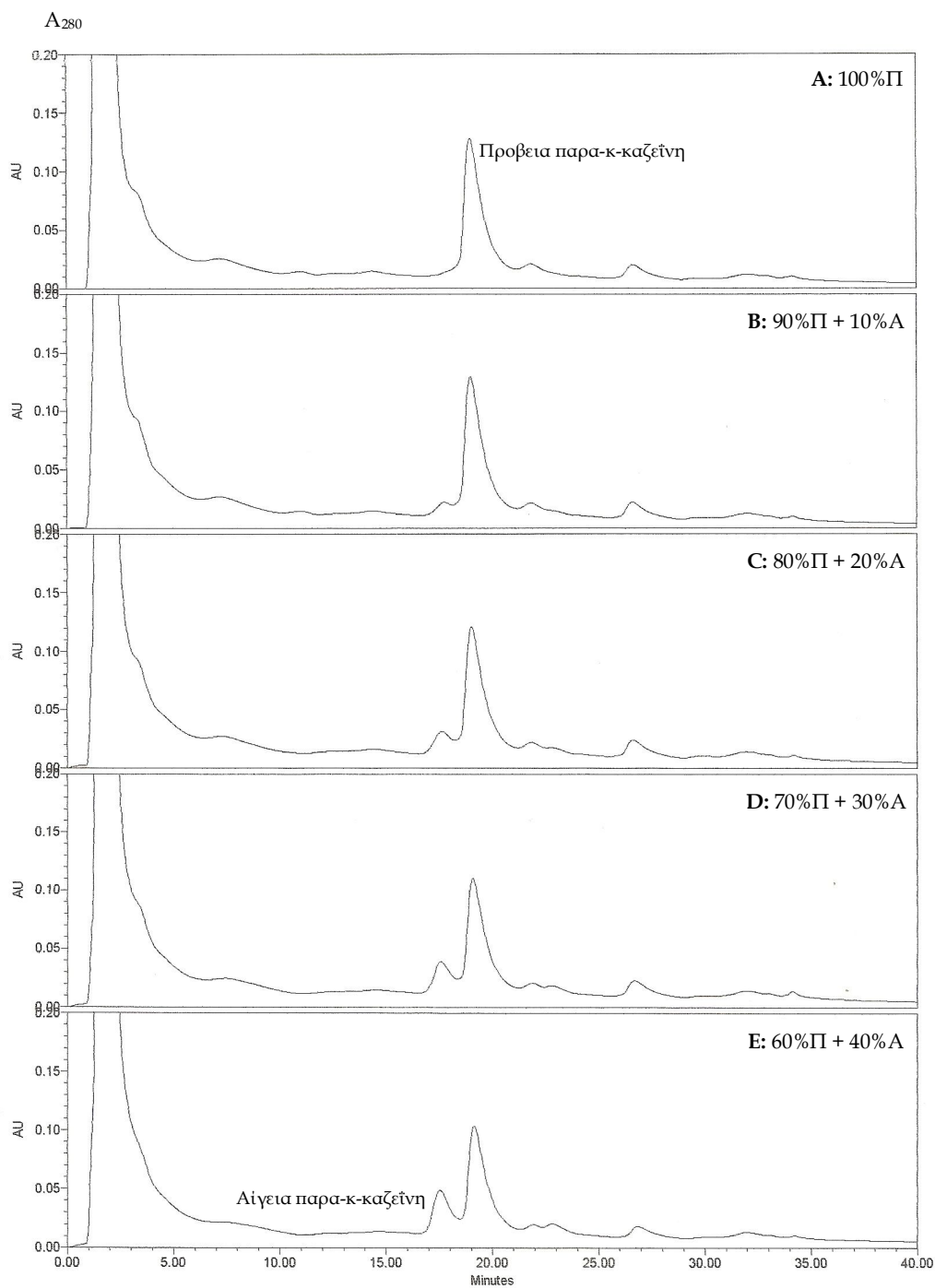
Οι χρωματογραφικές κατατομές του καζεϊνικού κλάσματος των πειραματικών τυριών τύπου Φέτα από πρόβειο και αίγιο γάλα, που προέκυψαν από ανάλυση σε στήλη κατιοανταλλαγής, κατά την 1<sup>η</sup>, 15<sup>η</sup>, 60<sup>η</sup> και 120<sup>η</sup> ημέρα της ωρίμανσης, παρουσιάζονται στις Εικόνες 5-10, 5-11, 5-12 και 5-13, αντίστοιχα. Από τις χρωματογραφικές κατατομές είναι σαφές ότι στο τυρί από πρόβειο γάλα δεν υπάρχει κορυφή με χρόνο κατακράτησης σχετικό με αυτόν της αίγειας παρα-κ-καζεΐνης σε κανένα στάδιο της ωρίμανσης.



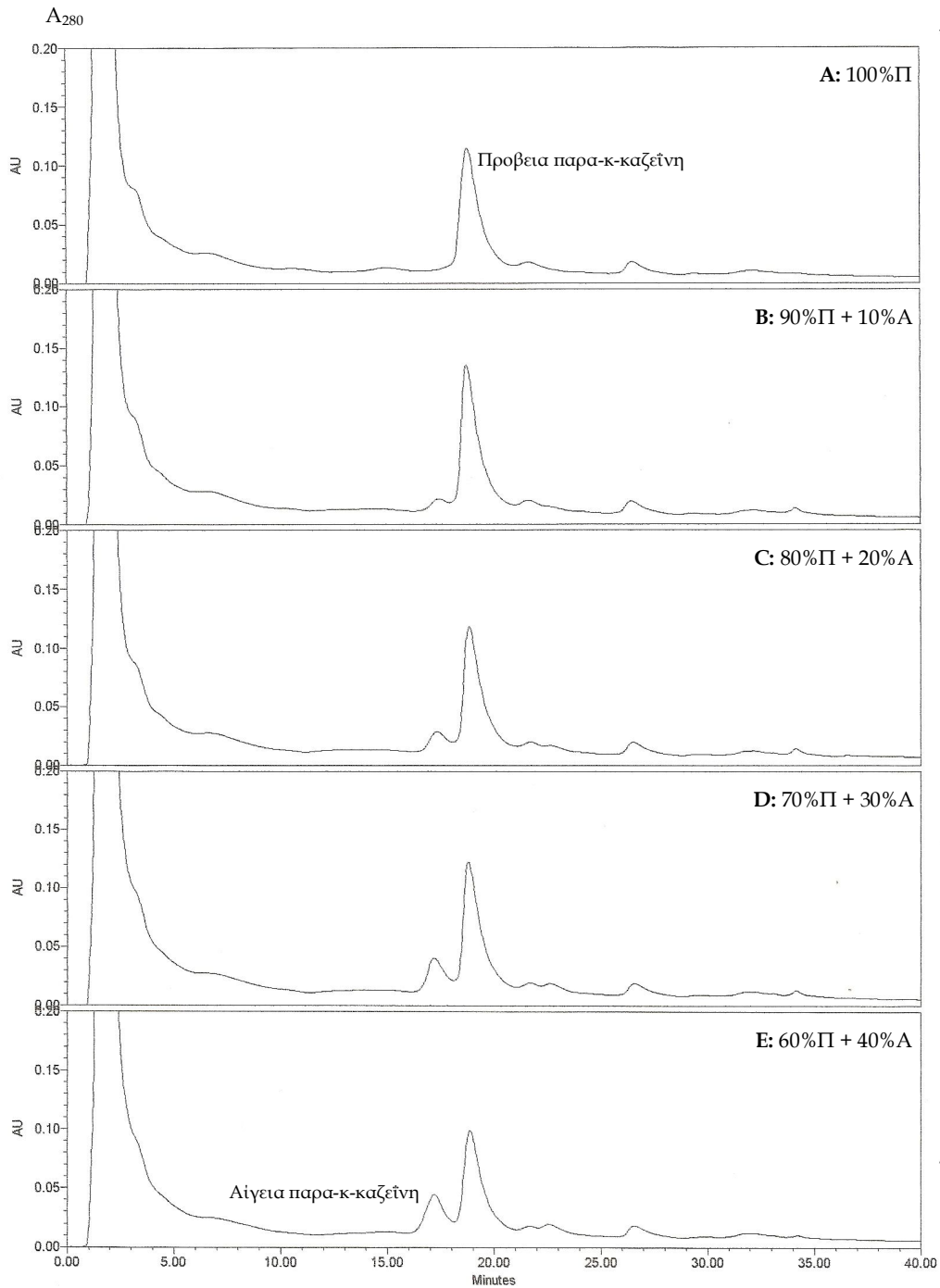
**Εικόνα 5-10:** Χρωματογραφικές κατατομές του καζεϊνικού κλάσματος των παρα-κ-καζεϊνών των πειραματικών τυριών τύπου Φέτα από πρόβειο (Π) και αίγιο (Α) γάλα, 1<sup>ης</sup> ημέρας σε στήλη κατιοανταλλαγής. Οι συνθήκες έκλουσης περιγράφονται στην παρ. 4.5.  $A_{280}$ : απορρόφηση στα 280 nm



**Εικόνα 5-11:** Χρωματογραφικές κατατομές του καζεϊνικού κλάσματος των παρα-κ-καζεϊνών των πειραματικών τυριών τύπου Φέτα από πρόβειο (Π) και αίγιο (Α) γάλα, 15<sup>ης</sup> ημέρας σε στήλη κατιοανταλλαγής. Οι συνθήκες έκλουσης περιγράφονται στην παρ. 4.5.  $A_{280}$ : απορρόφηση στα 280 nm



**Εικόνα 5-12:** Χρωματογραφικές κατατομές του καζεϊνικού κλάσματος των παρα-κ-καζεϊνών των πειραματικών τυριών τύπου Φέτα από πρόβειο (Π) και αίγιο (Α) γάλα, 60<sup>ης</sup> ημέρας σε στήλη κατιοανταλλαγής. Οι συνθήκες έκλουσης περιγράφονται στην παρ. 4.5.  $A_{280}$ : απορρόφηση στα 280 nm



**Εικόνα 5-13:** Χρωματογραφικές κατατομές του καζεϊνικού κλάσματος των παρα-κ-καζεϊνών των πειραματικών τυριών τύπου Φέτα από πρόβειο (Π) και αίγιο (Α) γάλα, 120<sup>ης</sup> ημέρας σε στήλη κατιοανταλλαγής. Οι συνθήκες έκλουσης περιγράφονται στην παρ. 4.5. A<sub>280</sub>: απορρόφηση στα 280 nm

Ο διαχωρισμός της παρα-κ-καζεΐνης ήταν καλύτερος από αυτόν που αναφέρεται από τους Mayer *et al.* (1997) και Moatsou *et al.*, (2004a), οι οποίοι ανέλυσαν τυριά Camembert και Χαλούμι αντίστοιχα σε κατιοανταλλακτική στήλη τύπου ιηκτής. Στον Πίνακα 5-10 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού της αίγειας παρα-κ-καζεΐνης. Ο υπολογισμός έγινε με βάση το εμβαδόν των κορυφών των παρα-κ-καζεΐνών του πρόβειου και του αίγειου γάλακτος. Συγκεκριμένα η αίγεια παρα-κ-καζεΐνη εκφράστηκε ως ποσοστό του συνόλου τους: (αίγεια παρα-κ-καζεΐνη/ αίγεια+πρόβεια παρα-κ-καζεΐνη) x 100.

Όμως για την αντιστοίχιση αίγειας καζεΐνης και βάρους του αίγειου γάλακτος στο μίγμα της τυροκόμησης πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι τα δύο είδη γάλακτος, που αποτελούσαν τα μίγματα που τυροκομήθηκαν, διαφέρουν σημαντικά ως προς την πρωτεϊνοπεριεκτικότητα. Έτσι λαμβάνοντας υπόψη τον παράγοντα αυτό έγινε διόρθωση των αποτελεσμάτων με βάση τη σύσταση των γαλάτων του κάθε πειράματος (Πίνακας 4-3). Όπως προέκυψε από τη στατιστική ανάλυση η ωρίμανση των τυριών δεν επηρέασε στατιστικά σημαντικά τα αποτελέσματα.

**Πίνακας 5-10:** Προσδιορισμός του ποσοτού της αίγειας παρα-κ-καζεΐνης στο σύνολο της παρα-κ-καζεΐνης των τυριών από μίγματα πρόβειου (Π) και αίγειου (Α) γάλακτος (μέσοι όροι τριών τυροκομήσεων ± τυπική απόκλιση)

Τυριά	% Αίγειας καζεΐνης			
	1 <sup>η</sup> ημέρα	15 <sup>η</sup> ημέρα	60 <sup>η</sup> ημέρα	120 <sup>η</sup> ημέρα
<b>Φέτα Α: 100%Π</b>	0	0	0	0
<b>Φέτα Β: 90%Π + 10%Α</b>	5,10 ± 0,80 <sup>a</sup>	5,53 ± 0,30 <sup>a</sup>	5,60 ± 0,34 <sup>a</sup>	5,97 ± 0,15 <sup>a</sup>
<b>Φέτα Γ: 80%Π + 20%Α</b>	11,50 ± 0,35 <sup>a</sup>	11,43 ± 0,96 <sup>a</sup>	11,53 ± 0,57 <sup>a</sup>	12,53 ± 0,81 <sup>a</sup>
<b>Φέτα Δ: 70%Π + 30%Α</b>	18,83 ± 0,42 <sup>a</sup>	18,40 ± 0,26 <sup>a</sup>	18,83 ± 0,42 <sup>a</sup>	19,07 ± 0,61 <sup>a</sup>
<b>Φέτα Ε: 60%Π + 40%Α</b>	26,97 ± 0,86 <sup>a</sup>	26,77 ± 2,44 <sup>a</sup>	25,83 ± 1,36 <sup>a</sup>	26,20 ± 1,11 <sup>a</sup>

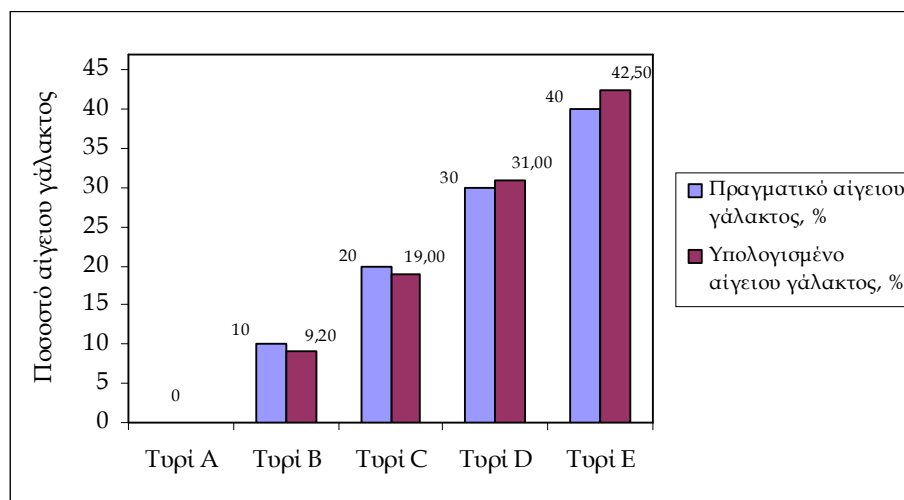
Οι τιμές στην ίδια γραμμή του Πίνακα με διαφορετικούς εκθέτες διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (LSD, P<0.05)

Τα τελικά αποτελέσματα σχετικά με το ποσοστό του αίγειου γάλακτος στο γάλα της τυροκόμησης, μετά την «κανονικοποίηση» παρουσιάζονται στον Πίνακα 5-11 και στις Εικόνες 5-14 & 5-15. Ο ποσοτικός προσδιορισμός ήταν εξαιρετικά επιτυχής, καθώς οι πειραματικές τιμές ήταν πολύ κοντά στις πραγματικές και οι τυπικές αποκλίσεις ήταν μικρές και κυμαίνονταν από 2,5-5% των μέσων όρων.

**Πίνακας 5-11:** Προσδιορισμός του ποσοστού του αίγειου γάλακτος στο γάλα της τυροκόμησης μετά από διόρθωση του ποσοστού της αίγιας παρα-κ-καζεΐνης με βάση τις πρωτεϊνοπεριεκτικότητες των δύο ειδών γάλακτος (μέσοι όροι τριών τυροκομήσεων ± τυπική απόκλιση)

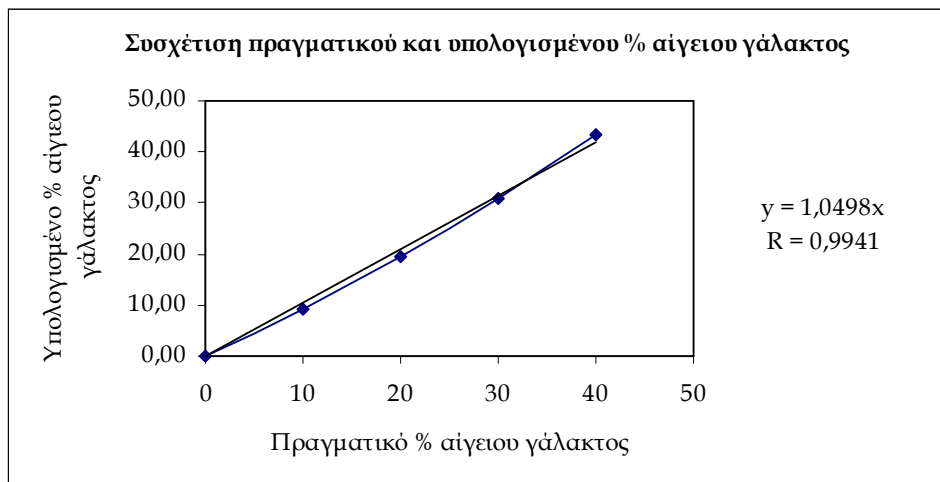
Τυριά	Αίγειο γάλα στο μίγμα της τυροκόμησης (%)	% Αίγειου γάλακτος στο γάλα της τυροκόμησης			
		1 <sup>η</sup> ημέρα	15 <sup>η</sup> ημέρα	60 <sup>η</sup> ημέρα	120 <sup>η</sup> ημέρα
<b>Φέτα Α: 100%Π</b>	<b>0</b>	0	0	0	0
<b>Φέτα Β: 90%Π + 10%A</b>	<b>10</b>	8,9 ± 1,0 <sup>a</sup>	9,1 ± 0,5 <sup>a</sup>	9,2 ± 0,4 <sup>a</sup>	9,8 ± 0,4 <sup>a</sup>
<b>Φέτα Γ: 80%Π + 20%A</b>	<b>20</b>	18,9 ± 0,5 <sup>a</sup>	18,8 ± 1,3 <sup>a</sup>	19,0 ± 1,0 <sup>a</sup>	20,6 ± 0,8 <sup>a</sup>
<b>Φέτα Δ: 70%Π + 30%A</b>	<b>30</b>	31,1 ± 1,2 <sup>a</sup>	30,4 ± 1,3 <sup>a</sup>	31,0 ± 1,2 <sup>a</sup>	31,4 ± 1,0 <sup>a</sup>
<b>Φέτα Ε: 60%Π + 40%A</b>	<b>40</b>	44,4 ± 1,1 <sup>a</sup>	44,0 ± 2,2 <sup>a</sup>	42,5 ± 2,2 <sup>a</sup>	43,2 ± 1,6 <sup>a</sup>

Οι τιμές στην ίδια γραμμή του Πίνακα με διαφορετικούς εκθέτες διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (LSD, P<0.05)



**Εικόνα 5-14:** Σύγκριση πραγματικού και υπολογισμένου ποσοστού αίγειου γάλακτος κατά την 60<sup>η</sup> ημέρα ωρίμανσης των πειραματικών τυριών τύπου Φέτα από μίγματα πρόβειου (Π) και αίγειου (Α) γάλακτος





**Εικόνα 5-15:** Συσχέτιση πραγματικού και υπολογισμένου ποσοστού αίγειου γάλακτος

Τέλος, η συσχέτιση μεταξύ πραγματικών και υπολογισμένων ποσοστών αίγειου γάλακτος είναι γραμμική, περνά από το 0 και έχει εξαιρετικά υψηλό συντελεστή ( $R=0,994$ ).

### 5.3 Συμπεράσματα

Από τα ευρήματα της παρούσας μελέτης προέκυψε ότι:

1. Το ποσοστό του αίγειου γάλακτος στο γάλα της τυροκόμησης Φέτας δεν επηρέασε την υγρασία και το pH των τυριών.
2. Η αύξηση του αίγειου γάλακτος στο γάλα της τυροκόμησης σε ποσοστό  $\geq 20\%$  φαίνεται να επιβραδύνει τη συσσώρευση των ελεύθερων αμινομάδων κατά την πρώτη φάση της ωρίμανσης των τυριών.
3. Η παρα-κ-καζεΐνη υδρολύεται με ταχείς ρυθμούς κατά το πρώτο στάδιο της ωρίμανσης, δηλαδή τις δύο πρώτες εβδομάδες, πριν την τοποθέτηση των τυριών στο ψυγείο. Στη συνέχεια, και μέχρι τις 120 ημέρες παραμένει πρακτικά σταθερή.
4. Παρά το όξινο pH και το σχετικά υψηλό ποσοστό υγρασίας των τυριών, που αναμένεται να ευνοεί τη δράση της χυμοσίνης, το 61-75% της αρχικής ποσότητας παραμένει άθικτο μετά από 120 ημέρες ωρίμανσης στη Φέτα.
5. Η άθικτη παρα-κ-καζεΐνη, αποτέλεσε πολύ αξιόπιστο δείκτη για τον προσδιορισμό του αίγειου γάλακτος στο μίγμα της τυροκόμησης, με βάση τη χρωματογραφική ανάλυση του παρακαζεϊνικού κλάσματος των τυριών.
6. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν πολύ αποτελεσματική σε ότι αφορά στο διαχωρισμό των παρόμοιων παρα-κ-καζεϊνών του πρόβειου και του αίγειου γάλακτος, λαμβάνοντας υπόψη ότι οι παρα-κ-καζεΐνες των δύο ειδών γάλακτος διαφέρουν μόνο ως προς 5 αμινοξέα.

Συμπερασματικά, η παρα-κ-καζεΐνη αποτελεί αξιόπιστο δείκτη προσδιορισμού του είδους του γάλακτος και η παρούσα μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί με ασφάλεια για τον προσδιορισμό του αίγειου γάλακτος στο τυρί Φέτα, στο οποίο, όπως προαναφέρθηκε επιτρέπεται η συμμετοχή του μέχρι 30%. Στα πλεονεκτήματά της μεθόδου περιλαμβάνονται η ταχύτητα και ο σχετικά απλός αναλυτικός εξοπλισμός που απαιτείται. Η στήλη και το σύστημα έκλουσης που εφαρμόστηκαν έδωσαν καλύτερο διαχωρισμό σε σχέση με αυτόν που αναφέρεται για την ανάλυση παρα-κ-καζεϊνών από άλλα τυριά. Επιπλέον προέκυψε ότι υπάρχει και η δυνατότητα ταυτόχρονης ανίχνευσης του αγελαδινού γάλακτος. Πρέπει τέλος να σημειωθεί ότι η στήλη ήταν εξαιρετικά σταθερή σε όλη τη διάρκεια των αναλύσεων, χωρίς να παρουσιάζει προβλήματα σχετικά με την πίεση του συστήματος και το pH των εκλουσμάτων.

## Ξενογλώσση Βιβλιογραφία

- Alichanidis, E., Anifantakis, E. M., Polychroniadou, A. and Nanou, M. (1984) *Suitability of some microbial coagulants for Feta cheese manufacture*. Journal of Dairy Research, **51**, 141-147
- Alichanidis, E. and Polychroniadou, A. (1996) *Special features of dairy products from ewe and goat milk from the physicochemical and organoleptic point of view*. In: Proceedings, Production and Utilization of Ewe and Goat Milk, Crete, Greece, Oct. 19-21, 1995, International Dairy Federation Publ., Brussels, Belgium, 21-43
- Alli, I., Okoniewska, M., Gibbs, B. F., and Konishi, Y. (1998) *Identification of peptides in Cheddar cheese by Electrospray Ionization Mass Spectrometry*. International Dairy Journal, **8**, 643-649
- Amigo, L., Recio, I. and Ramos, M. (2000) *Genetic polymorphism of ovine milk proteins: its influence on technological properties of milk – A review*. International Dairy Journal, **10**, 135-149
- Anifantakis, E. M. (1991) *Greek Cheeses, a Tradition of Centuries*. National Dairy Committee of Greece, Athens, 27-42
- Anifantakis, E. M. and Moatsou, G. (2006) *Feta and Other Balkan Cheeses*. In: Brined cheeses, (edr A. Y. Tamine), Blackwell Publishing Ltd, 43-76
- Assenat, L. (1967) *Contribution à l'étude d'une méthode d'identification des laits et des fromages au moyen de l'électrophorèse sur gel de polycrylamide*. Le Lait, **47**, 495-502
- Bania, J., Ugorski, M., Polanowski, A. and Adamczyk, E. (2001) *Application of polymerase chain reaction for detection of goats' milk adulteration by milk of cow*. J. Dairy Res., **68**, 333-336
- Barillet, F. (2007) *Genetic improvements for dairy production in sheep and goats*. Small Ruminant Research, **70**, 60-75
- Barroso, A., Dunner, S. and Canon, J. (1998) *Technical Note: Detection of Bovine Kappa-Casein Variants A, B, C and E by Means of Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP)*. J. Anim. Sci., **76**, 1535-1538
- Barroso, A., Dunner, S. and Canon, J. (1999) *Technical Note: Use of PCR-Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis for Detection of Bovine  $\beta$ -Casein Variants A1, A2, A3 and B*. J. Anim. Sci., **77**, 2629-2632

- Bonfatti, V., Grigoletto, L., Cecchinato, A., Gallo, L. and Garnier, P. (2008) *Validation of a new reversed-phase high-performance liquid chromatography method for separation and quantification of bovine milk protein genetic variants*. Journal of Chromatography A, **1195**, 101-106
- Bonizzi, I., Buffoni, J. N. and Feligini, M. (2009) *Quantification of bovine casein fractions by direct chromatographic analysis of milk. Approaching the application to a real production context*. Journal of Chromatography A, **1216**, 165-168
- Borkova, M. and Snaselova, J. (2005) *Possibilities of different animal milk detection in milk and dairy products – a review*. Czech J. Food Sci., **23**, 41-50
- Bottero, M. T., Civera, T., Nucera, D., Rosati, S., Sacchi, P., and Turi, R. M. (2003) *A multiplex polymerase chain reaction for the identification of cows', goats' and sheep's milk in dairy products*. International Dairy Journal, **13**, 277-282
- Bramanti, E., Sortino, C., Onor, M., Beni, F. and Raspi, G. (2003) *Separation and determination of denatured  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - and  $\kappa$ -caseins by hydrophobic interaction chromatography in cows', ewes' and goats' milk, milk mixtures and cheeses*. Journal of Chromatography A, **994**, 59-74
- Calvo, M. M. and Balcones E. (2000) *Some Factors Influencing the Syneresis of Bovine, Ovine and Caprine Milks*. J. Dairy Sci. , **83**, 1733-1739
- Cattaneo, T. M. P., Nigro, F. and Greppi, G. F. (1996) *Analysis of cow, goat and ewe milk mixtures by capillary zone electrophoresis (CZE): preliminary approach*. Milchwissenschaft, **51**, 616-619
- Cheng, Y.-H., Chen, S.-D. and Weng, C.-F. (2006) *Investigation of goats' milk adulteration with cows' milk by PCR*. Asian-australasian journal of animal sciences, **19**, 1503-1507
- Chianese, L., Garro, G., Mauriello, R., Laezza, P., Ferranti, P. and Addeo, F. (1996) *Occurrence of five ovine  $\alpha_{s1}$ -casein variants in ovine milk*. Journal of Dairy Research, **63**, 49-59
- Chianese, L., Garro, G., Nicolai, M. A., Mauriello, R., Ferranti, P., Pizzano, R., Cappuccio, U., Laezza, P., Addeo, F., Ramunno, L., Rando, A. and Rubino, R. (1993) *The nature of  $\beta$ -casein heterogeneity in caprine milk*. Lait, **73**, 533-547
- Coolbear, K. P., Elgar, D. F., Coolbear, T. and Ayers, J. S. (1996) *Comparative study of methods for the isolation and purification of bovine  $\kappa$ -casein and its hydrolysis by chymosin*. Journal of Dairy Research, **63**, 61-71

- Corradini, C. and Cavazza, A. (1998) *Application of capillary zone electrophoresis (CZE) and micellar electrokinetic chromatography (MEKC) in food analysis*. Italian Journal of Food Science, **10**, 299-316
- Dalgleish, D. G. (1982) *The enzymatic coagulation of milk*, In: Developments in Dairy Chemistry - 1: Proteins (ed P. F. Fox), Appl. Sci. Publ., London, p. 169
- Dalgleish, D. G. (1999) *The enzymatic coagulation of milk*, In: Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol. 1, 2<sup>nd</sup> ed. (ed P. F. Fox), Chapman & Hall, London, 69-100
- David, V. A. and Deutch, A. H. (1992) *Detection of bovine  $\alpha_{s1}$ -casein genomic variants using the allele-specific polymerase chain reaction*. Animal Genetics, **23**, 425-429
- Diaz, I. L.-C., González Alonso, I., Fajardo, V., Martin, I., Hernandez, P., García Lacarra, T. and Martin de Santos, R. (2007) *Application of a polymerase chain reaction to detect adulteration of ovine cheeses with caprine milk*. Eur. Food Res. Technol., **225**, 345-349
- Dong, C. and Ng-Kwai-Hang, F. K. (1998) *Characterization of a Non-electrophoretic Genetic Variant of  $\beta$ -Casein by Peptide Mapping and Mass Spectrometric Analysis*. Int. Dairy Journal, **8**, 967-972
- Eigel, W. N., Butler, J. E., Ernstrom, C. A., Farrell, H. M. Jr, Harwalkar, V. R., Jennes, R., McL Whitney, R. (1984) *Nomenclature of proteins of cow's milk: Fifth Revision*, Journal of Dairy Science, **67**, 1599-1631
- Farrell, M. H. Jr., Jimenez-Flores, R., Bleck, G. T., Brown, E. M., Butler, J. E., Creamer, L. K., Hicks, C. L., Hollar, C. M., Ng-Kwai-Hang, K. F. and Swaisgood, H. E. (2004) *Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk-Sixth Revision*. J. Dairy Sci., **87**, 1641-1674
- Feligini, M., Bonizzi, I., Curic, V. C., Parma, P., Greppi, G. F. and Enne, G. (2005a) *Detection of Adulteration in Italian Mozzarella Cheese Using Mitochondrial DNA Templates as Biomarkers*. Food Technol. Biotechnol., **43**, 91-95
- Feligini, M., Frati, S., Curic, V. C., Brambilla, A., Parma, P., Curic, I., Greppi, G. F. and Enne, G. (2005b) *Caprine  $\alpha_{s1}$ -Casein Polymorphism: Characterization of A, B, E and F Variants by Means of Various Biochemical and Molecular Techniques*, Food Technol. Biotechnol., **43**, 123-132
- Ferranti, P., Itolli, E., Barone, F., Malorni, A., Garro, G., Laezza, P., Chianese, L., Migliaccio, F., Stingo, V. and Addeo F. (1997) *Combined high resolution chromatographic techniques (FPLC and HPLC) and mass spectrometry-based identification of peptides and proteins in Grana Padano cheese*. Le Lait, **81**, 463-474

- Fox, P. F. and Brodtkorb, A. (2008) *The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance*. International Dairy Journal, **18**, 677-684
- Fox, P. F. and McSweeney, P. L. H. (1998) *Dairy Chemistry & Biochemistry*. London, UK: Blackie Academic & Professional
- Furet, J. P., Mercier, J. C., Soulier, S., Gaye, P., Hue-Delahaie, D. and Vilotte, J. L. (1990) Nucleic Acids Research, **18**, 5286
- Furtado, M. M. (1983) *Detection of Cow Milk in Goat Milk by Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, J Dairy Sci, **66**, 1822-1824
- Haasnoot, W., Smits, N. G. E., Kemmeres-Voncken, A. E. M. and Bremer, M. G. E. G. (2004) *Fast biosensor immunoassays for the detection of cows' milk in the milk of ewes and goats*. Journal of Dairy Research, **71**, 322-329
- Haza, A. I., Morales, P., Martín, R., García, T., Anguita, G., González, I., Sanz, B. and Hernández, P. E. (1996) *Development of Monoclonal Antibodies against Caprine  $\alpha_{s2}$ -Casein and Their Potential for Detecting the Substitution of Ovine Milk by Caprine Milk by an Indirect Elisa*. J. Agric. Food Chem., **44**, 1756-1761
- Haza, A. I., Morales, P., Martín, R., García, T., Anguita, G., Sanz, B. and Hernández, P. E. (1999) *Detection and quantification of goat's cheese in ewe's cheese using a monoclonal antibody and two ELISA formats*. J. Sci. Food Agric., **79**, 1043-1047
- Huppertz, T., Upadhyay, V. K., Kelly, A. L. and Tamime, A. Y. (2006) *Constituents and Properties of Milk from Different species*. In: Brined cheeses, (edr A. Y. Tamime), Blackwell Publishing Ltd, 1-42
- Izco, J. M., Ordóñez, A. I., Torre, P. and Barcina, Y. (1999) *Validation of capillary electrophoresis in the analysis of ewe's milk casein*. Journal of Chromatography A, **832**, 239-246
- Jandal, J. M. (1996) *Comparative aspects of goat and sheep milk*. Small Ruminant Research, **22**, 177-185
- Jaubert, A. and Martin, P. (1992) *Reverse-phase HPLC analysis of goat caseins. Identification of  $\alpha_{s1}$  and  $\alpha_{s2}$  genetic variants*. Lait, **72**, 235-247
- Jolles, J. F., Schoentgen, F., Alais, C. and Jolles, P., (1972) *Studies on the primary structure of cow kappa-casein: the primary sequence of cow para-kappa-casein*. Chimia, **26**, 645
- Jordana, J., Amills, M., Diaz, E., Angulo, C., Serradilla, J. M. and Sanchez, A. (1996) *Gene frequencies of caprine  $\alpha_{s1}$ -casein polymorphism in Spanish goat breeds*. Small Ruminant Research, **20**, 215-221

- Kaminarides, S., Rogoti, E. and Mallatou H. (2000) *Comparison of the characteristics of halloumi cheese made from ovine milk, caprine milk or mixtures of these milks*. International Journal of Dairy Technology, **53**, 100-105
- Kaminarides, S. E. and Anifantakis, E. M. (1993) *Comparative study of the separation of casein from bovine, ovine and caprine milks using HPLC*. Journal of Dairy Research, **60**, 495-504
- Kaminarides, S. E., Kandarakis, J. G. Moschopoulou, E. (1995) *Detection of bovine milk in ovine Halloumi cheese by electrophoresis of  $\alpha_{s1}$ -casein*. Australian Journal of Dairy Technology, **50**, 58-61
- Kaminarides, S. E. and Koukiassa, P. (2002) *Detection of bovine milk in ovine yoghurt by electrophoresis of para- $\kappa$ -casein*. Food Chemistry, **78**, 56-55
- Klotz, A. and Einspanier, R. (2001) *Development of a DNA-based screening method to detect cow milk in ewe, goat and buffalo milk and dairy products using PCR-LCR-EIA-technique*. Milchwissenschaft, **56**, 67-70
- Kotowicz, M., Adamczyk, E. and Bania, J. (2007) *Application of a duplex-PCR for detection of cows' milk in goats' milk*. Ann. Agric. Environ. Med., **14**, 215-218
- Lee, S. J., Chen, M. Ch. and Lin, Ch. W. (2001) *Detection of cows' milk in goats' by capillary zone electrophoresis*. Australian Journal of Dairy Technology, **56**, 24-27
- López-Calleja, I., Alonso, I. G., Fajardo, V., Rodríguez, M. A., Hernández, P. E., García, T. and Martín, R. (2005a) *PCR detection of cows' milk in water buffalo milk and mozzarella cheese*. International Dairy Journal, **15**, 1122-1129
- López-Calleja, I., González, I., Fajardo, V., Martín, I., Hernández, P. E., García, T. and Martín, R. (2005b) *Application of Polymerase Chain Reaction to Detect adulteration of Sheep's Milk with Goats' Milk*. J. Dairy Sci., **88**, 3115-3120
- López-Calleja, I., González, I., Fajardo, V., Martín, I., Hernández, P. E., García, T. and Martín, R. (2007a) *Quantitative detection of goats' milk in sheep's milk by real-time PCR*. Food Control, **18**, 1466-1473
- López-Calleja, I., González, I., Fajardo, V., Martín, I., Hernández, P. E., García, T. and Martín, R. (2007b) *Real-time TaqMan PCR for quantitative detection of cows' milk in ewes' milk mixtures*. International Dairy Journal, **17**, 729-736
- López-Calleja, I. M., González, I., Fajardo, V., Hernández, P. E., García, T. and Martín, R. (2007c) *Application of an indirect ELISA and a PCR technique for detection of cows' milk in sheep's and goats' milk cheeses*. International Dairy Journal, **17**, 87-93

- López-Calleja, I., González, I., Fajardo, V., Rodríguez, M. A., Hernández, P. E., García, T. and Martín, R. (2004) *Rapid Detection of Cows' Milk in Sheeps' and Goats' Milk by a Species-Specific Polymerase Chain Reaction Technique*. J. Dairy Sci., **87**, 2839-2845
- Mafra, I., Ferreira, I. M. P. L. V. O., Faria, M. A., and Oliveira, B. P. P. (2004) *A Novel Approach to the Quantification of Bovine Milk in Ovine Cheeses Using a Duplex Polymerase Chain Reaction Method*. J. Agric. Food Chem., **52**, 4943-4947
- Mafra, I., Ferreira, I. M. P. L. V. O. and Oliveira, M. B. P. P. (2008) *Food authentication by PCR-based methods*. Eur. Food Res. Technol., **227**, 649-665
- Mafra, I., Roxo, A., Ferreira, I. and Oliveira, M. B. (2007) *A duplex polymerase chain reaction for the quantitative detection of cows' milk in goats' milk cheese*. International Dairy Journal, **17**, 1132-1138
- Marletta, D., Crioscione, A., Bordonaro, S., Guastella, A. M. and D'Urso, G. (2007) *Casein polymorphism in goat's milk*. Lait, **87**, 491-504
- Maudet, C. and Taberlet, P. (2001) *Detection of cows' milk in goats' cheeses inferred from mitochondrial DNA polymorphism*. Journal of Dairy Research, **68**, 229-235
- Mayer, H. K. (2005) *Milk species identification in cheese varieties using electrophoretic, chromatographic and PCR techniques*. International Dairy Journal, **15**, 595-604
- Mayer, H. K., Heidler, D. and Rockenbauer, C. (1997) *Determination of the Percentages of Cows', Ewes' and Goats' Milk in Cheese by Isoelectric Focusing and Cation-exchange HPLC of  $\gamma$ - and Para- $\kappa$ -Caseins*. Int. Dairy Journal, **7**, 619-628
- Mayer, W. and Hörtnner, H. (1992) *Discontinuous electrophoresis of B-caseins for the determination of bovine caseins in milk and dairy products*. Electrophoresis, **13**, 803-804
- McSweeney, P. L. H. (2004) *Biochemistry of cheese ripening*. International Journal of Dairy Technology, **57**, 127-144
- McSweeney, P. L. H. and Fox, P. F. (1997) *Chemical methods for the characterization of proteolysis in cheese during ripening*. Lait, **77**, 41-76
- McSweeney, P. L. H. and Sousa, M. J. (2000) *Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheese during ripening. A review*. Lait, **80**, 293-324
- Mercier, J. C., Brignon, G. and Ribadeau Dumas, B., (1973) *Structure primaire de la caséine  $\kappa$ B bovine*. Eur. J. Biochem., **35**, 222-235
- Mercier, J. C., Chobert, J. M. and Addeo, F. (1976) *Comparative study of the amino acid sequences of the caseinomacropptide from seven species*. FEBS Letters, **72**, 208-214



- Meyer, V. R. (1994) *Practical High Performance Liquid Chromatography*, 2<sup>nd</sup> ed., John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, England, 144-155
- Michaelidou, A., Alichanidis, E., Polychroniadou, A. and Zerfiridis, G. (2005) *Migration of water-soluble nitrogenous compounds of Feta cheese from the cheese blocks into the brine*. International Dairy Journal, **15**, 663-668
- Michaelidou, A., Alichanidis, E., Urlaub, H., Polychroniadou A. and Zerfiridis, G. K. (1998) *Isolation and Identification of Some Major Water-soluble Peptides in Feta Cheese*. Journal of Dairy Science, **81**, 3109-3116
- Michaelidou, A., Katsiari, M. C., Kondyli, E., Voutsinas, L. P. and Alichanidis, E. (2003) *Effect of a commercial adjust culture on proteolysis in low-fat Feta-type cheese*. International Dairy Journal, **13**, 179-189
- Miranda, G., Anglade, P., Mahe, M. F. & Erhard, G. (1993) *Biochemical characterization of the bovine genetic  $\kappa$ -casein C and E variants*. Animal Genetics, **24**, 27-31
- Moatsou, G. (2009) *Detection of adulterations: identification of milk origin*. In: Handbook of Dairy Foods Analysis, (eds Leo M. L. Nollet & Fidel Toldra), CRC Press, in press
- Moatsou, G. and Anifantakis, E. (2003) *Recent developments in antibody-based analytical methods for the differentiation of milk from different species*. International Journal of Dairy Technology, **56**, 133-138
- Moatsou, G., Hatzinaki, A., Psathas, G and Anifantakis, E. (2004a) *Detection of caprine casein in ovine Halloumi cheese*. International Dairy Journal, **14**, 219-226
- Moatsou, G., Kandarakis, I. and Fournarakou, S. (2003) *Detection of bovine milk in caprine milk by Reversed-Phase HPLC of caseinomacropeptides*. Milchwissenschaft, **58**, 274-277
- Moatsou, G., Massouras, T., Kandarakis, I. and Anifantakis E (2002) *Evolution of proteolysis during the ripening of traditional Feta cheese*. Lait, **82**, 601-611
- Moatsou, G., Mollé, D., Moschopoulou, E. and Gagnaire, V. (2007) *Study of Caprine  $\beta$ -casein using Reversed-phase High-performance Liquid Chromatography and Mass Spectroscopy: Identification of a New Genetic Variant*. Proteins J., **26**, 562-568
- Moatsou, G., Moschopoulou, Georgala, Aik., Zoidou, E., Kandarakis, I., Kaminarides, S. and Anifantakis, E. (2004b) *Effect of artisanal liquid rennet from kids and lambs abomasa on the characteristics of Feta cheese*. Food chemistry, **88**, 517-525
- Moatsou, G., Moschopoulou, E., Mollé, D., Gagnaire, V., Kandarakis, I. and Léonil, J. (2008) *Comparative study of the protein fraction of goat milk from the Indigenous breed and from international breeds*. Food Chemistry, **106**, 509-520

- Moatsou, G., Samolada, M., Katsabeki, A. and Anifantakis, E. (2004c) *Casein fractions of ovine milk from indigenous Greek breeds*. Lait, **84**, 285-296
- Moatsou, G., Samolada, M., Pangiotou, P. and Anifantakis, E. (2004d) *Casein fractions of bulk milks from different caprine breeds*. Food Chemistry, **87**, 75-81
- Moatsou, G., Vamvakaki, A.-N., Mollé, D., Anifantakis, E. and Léonil, J. (2006) *Protein composition and polymorphism in the milk of Skopelos goats*. Lait, **86**, 345-357
- Moioli, B., Andrea, M. D and Pilla, F. (2007) *Candidate genes affecting sheep and goat milk quality*. Small Ruminant Research, **68**, 179-192
- Moioli, B., Pilla, F. and Tripaldi, C. (1998) *Detection of milk protein genetic polymorphism in order to improve dairy traits in sheep and goats: a review*. Small Ruminant Research, **27**, 185-195
- Molina, E., De Frutos, M. and Ramos, M. (2000) *Capillary electrophoresis characterization of the casein fraction of cheeses made from cows', ewes' and goats' milk*. Journal of Dairy Research, **67**, 209-216
- Molina, E., Martín-Álvarez, P. J. and Ramos, M. (1999) *Analysis of cows', ewes' and goats' milk mixtures by capillary electrophoresis: quantification by multivariate regression analysis*. International Dairy Journal, **9**, 99-105
- Müller, L., Barták, P., Bednář, P., Fryšová, I., Ševčík, J. and Lemr, K. (2008) *Capillary electrophoresis - mass spectrometry – a fast and reliable tool for the monitoring of milk adulteration*. Electrophoresis, **29**, 2088-2093
- Ng-Kwai-Hang, K. F. & Grosclaude, F. (1992) *Genetic polymorphism of milk proteins*. In: Advanced Dairy Chemistry-1: Proteins, (edr P.F. Fox) Elsevier Science Publishers LTD, Essex, England, 405-455
- Oakenfull, D., Pearce, T. and Burley, W. R. (1997) *Protein gelation*. In: Food Proteins And Their Applications, (eds S. Damodaran & A. Paraf), Marcel Dekker, Inc., New York, 111-142
- Otaviano, A. R., Lima, A. L. F., Laureano, M. M. M., Sena, J. A. D., de Albuquerque, L. G. and Tonhati, H. (2008)  *$\beta$ -casein gene polymorphism permits identification of bovine milk mixed with bubaline milk in mozzarella cheese*. Genetics and Molecular Biology, **31**, 902-905
- Park, Y. W., Juarez, M., Ramos, M. and Haenlein, G. F. W. (2007) *Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk*. Small Ruminant Research, **68**, 88-113

- Pierre, A., Le Quéré, J.-L., Riaublanc, A., Le Graët, Y., Demaizères, D. and Michel, F. (1998) *Composition and physico-chemical characteristics of goat milks containing the A or O<sub>as1</sub> casein variants*. Lait, **78**, 191-202
- Pirisi, A., Piredda, G., Papoff, C. M. di Salvo, R., Rintus, S., Garro, G., Ferranti, P. and Chianese, L. (1999) *Effects of sheep alpha s-1 casein CC, CD and DD genotypes on milk composition and cheesemaking properties*, J. Dairy Res., **66**, 409-419
- Pizzano, R., Nikolai, M. A., Padovano, P., Ferranti, P., Barone, F. and Addeo F. (2000) *Immunochemical Evaluation of Bovine  $\beta$ -Casein and Its 1-28 Phosphopeptide in Cheese during Ripening*. J. Agric. Food Chem., **48**, 4555-4560
- Plath, A., Krause, I. and Einspanier, R. (1997) *Species identification in dairy products by three different DNA-based techniques*. Z. Lebensm. Unters. Forsch. A, **205**, 437-441
- Polychroniadou, A. (1988) *A simple procedure using trinitrobenzenesulphonic acid for monitoring proteolysis in cheese*. Journal of Dairy Research, **55**, 585-596
- Polychroniadou, A. (1994) *Objective indices of maturity of Feta and Teleme cheese*. Milchwissenschaft, **49**, 376-379
- Ramos, M. (1984) Update on existing analytical methods for detecting mixtures of cow's, ewe's and goat's milk. IDF Bulletin 181, Brussels
- Rasmussen, L. K., Sorensen, E. S., Petersen, T. E., Nielsen, N. C. and Thomsen, J. K. (1997) *Characterization of phosphate sites in native ovine, caprine and bovine casein micelles and their caseinomacropptides: a solid-state phosphorus-31 nuclear magnetic resonance and sequence and mass spectrometric study*. Journal of Dairy Science, **80**, 607-614
- Raynal-Ljutovac, K., Gaborit, P. and Lauret, A. (2005) *The relationship between quality criteria of goat milk, its technological properties and the quality of the final products*. Small Ruminant Research, **60**, 167-177
- Raynal-Ljutovac, K., Park, Y. W., Gaucheron, F. and Bouhallab, S. (2007) *Heat stability and enzymatic modifications of goat and sheep milk*. Small Ruminant Research, **68**, 207-220
- Rea, S., Chikuni, K., Branciari, R., Sangamayya, R. S., Ranucci, D. and Avellini, P. (2001) *Use of duplex polymerase chain reaction (duplex-PCR) technique to identify bovine and water buffalo milk used in making mozzarella cheese*. Journal of Dairy Research, **68**, 689-698
- Recio, I., Garcia-Risco, M. R., Amigo, L., Molina, E., Ramos, M. and Martin Alvarez, P. J. (2004) *Detection of Milk Mixtures in Halloumi Cheese*. J. Dairy Sci., **87**, 1595-1600

- Recio, I., Pérez-Rodríguez, M.-L., Ramos, M. and Amigo, L. (1997) *Capillary electrophoretic analysis of genetic variants of milk proteins from different species*. Journal of Chromatography A, **768**, 47-56
- Reid, J. R., Coolbear, T., Ayers, J. S. and Coolbear, K. P. (1997) *The action of chymosin on  $\kappa$ -casein and its macropeptide: Effect of pH and analysis of the products of secondary hydrolysis*. International Dairy Journal, **7**, 559-569
- Richter, W., Krause, I., Graf, C., Sperrer, I., Schwarzer, C. and Klostermeyer H. (1997) *An indirect competitive Elisa for the detection of cows' milk and caseinate in goats' and ewes' milk and cheese using polyclonal antibodies against bovine  $\gamma$ -caseins*. Z. Lebensm. Unters Forsch. A, **204**, 21-26
- Robards, K., Haddad, P. R. and Jackson, P. E. (1994) *Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods*. Academic Press Inc., London, U.K., 305-379
- Rodríguez, E., Martín, R., García, T., Azcona, J. I., Sanz, B. and Hernández, P. E. (1991) *Indirect ELISA for detection of goats' milk in ewes' milk and cheese*. International Journal of Food Science and Technology, **26**, 457-465
- Rodríguez, E., Martín, R., García, T., González, I. Morales, P., Sanz, B. and Hernández, P. E. (1993) *Detection of cows' milk in ewes' milk and cheese by a sandwich enzyme-linked immynosorbent assay (ELISA)*. Journal of the Science of Food and Agriculture, **61**, 175-180
- Rodríguez-Nogales, J. M. and Vázquez, F. (2007) *Application electrophoretic and chemometric analysis to predict the bovine, ovine and caprine milk percentages in Panela cheese, an unripened cheese*. Food Control, **18**, 580-586
- Rolland, M. P., Bitri, L. and Besancon, P. (1993) *Polyclonal antibodies with predetermined specificity against bovine alpha s1-casein: application to the detection of bovine milk in ovine milk and cheese*. J. Dairy Res., **60**, 413
- Roncada, P., Gaviraghi, A., Liberatori, S., Canas, B., Bini, L. and Greppi, G. F. (2002) *Identification of caseins in goat milk*. Proteomics, **2**, 723-726
- Sarantinopoulos, P., Kalantzopoulos, G. and Tsakalidou, E. (2002) *Effect of Enterococcus faecium on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Greek Feta cheese*. International Journal of Food Microbiology, **76**, 93-105
- Schmidt, D. G. (1982) *Association of caseins and casein micelle structure*. In: Developments in Dairy Chemistry - 1: Proteins, (edr P. F. Fox), Applied Science Publishers LTD, Essex, England, 61-86

- Senocq, D., Dupont, D., Rolet-Repecaud, O. and Levieux, D. (2002) *ELISA for monitoring the cleavage of b-casein at site Lys<sup>28</sup>-Lys<sup>29</sup> by plasmin during Comte cheese ripening*. Journal of Dairy Research, **69**, 491-500
- Sforza, S., Aquino, G., Cavatorta, V., Galaverna, G., Mucchetti, G., Dossena, A. and Marchelli, R. (2008) *Proteolytic oligopeptides as molecular markers for the presence of cows' milk in fresh cheeses derived from sheep milk*. International Dairy Journal, **18**, 1072-1076
- Stefos, G., Argyrokastritis, A., Bizelis, I., Moatsou, G., Anifantakis, E. and Rogdakis, E. (2004) *Detection of bovine mitochondrial DNA specific sequences in Feta cheese and ovine yogurt by PCR-RFLP*. Milchwissenschaft, **59**, 509-511
- Strobel, H. A. and Heineman, W. R. (1989) *Chemical Instrumentation: A Systematic Approach*. John Wiley & Sons Inc., Canada, 927-958
- Swaigood, H. E. (1982) *Chemistry of milk protein*. In: *Developments in Dairy Chemistry*, (ed. P. F. Fox), Appl. Sci. Pub., London, 1
- Swaigood, H. E. (1992) *Chemistry of caseins*. In: *Advanced Dairy Chemistry-1: Proteins*. (edr P.F. Fox), Elsevier Science Publishers LTD, Essex, England, 63-110
- Tamine, A. Y., Barclay, M. N. I., Law, A. J. R., Leaver, G., Anifantakis, E. M. and O'Connor, T. P. O. (1999) *Kishk - a dried fermented milk/cereal mixture. Assessment of a variety of protein analytical techniques for determining adulteration and proteolysis*. Lait, **79**, 331-339
- Trujillo, A. J., Casals, I. and Guamis, B. (2000a) *Analysis of Major Caprine Milk Proteins by Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography and Electrospray Ionization-Mass Spectrometry*. J. Dairy Sci., **83**, 11-19
- Trujillo, A. J., Casals, I. and Guamis, B. (2000b) *Analysis of major ovine milk proteins by reverse-phase high-performance liquid chromatography and flow injection analysis with electrospray ionization mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, **870**, 371-380
- Tsigkros, D., Folland, E., Moate, R. and Brennan, C.S. (2003) *Feta cheese texture: the effect of caprine and ovine milk concentration*. International Journal of Dairy Technology, **56**, 233-236
- Tziboula, A. and Horne, S. D. (1999) *The role of  $\alpha_{s1}$ -casein in the structure of caprine casein micelles*. International Dairy Journal, **9**, 173-178
- Valsamaki, K., Michaelidou, A. and Polychroniadou, A. (2000) *Biogenic amine production in Feta cheese*. Food Chemistry, **71**, 259-266
- Veloso, A. C. A., Teixeira, N. and Ferreira, I. M. P. L. V. O. (2002) *Separation and quantification of the major casein fractions by reverse-phase high-performance liquid*

- chromatography and urea-polyacrylamide gel electrophoresis. Detection of milk adulterations. Journal of Chromatography A*, **967**, 209-218
- Veloso, A. C. A., Teixeira, N., Peres, A. M., Mendonça, Á. and Ferreira I. M. P. L. V. O. (2004) *Evaluation of cheese authenticity and proteolysis by HPLC and urea-polyacrylamide gel electrophoresis. Food Chemistry*, **87**, 289-295
- Visser, S., Slangen, J. C., Lagerwerf, M. F., Van Dongen, D. W. and Haverkamp, J. (1995) *Identification of a new genetic variant of bovine  $\beta$ -casein using reversed-phase high-performance liquid chromatography and mass spectrometric analysis. Journal of Chromatography A*, **711**, 141-150
- Volitaki, A. J. and Kaminarides, S. E. (2001) *Detection of bovine milk in ovine Halloumi cheese by HPLC analysis of cheese caseins hydrolysed by plasmin. Milchwisswnachft*, **56**, 207-210
- Vreeman, H. J., Both, P., Brinkhauis, J. A. and van der Spek, C. A. (1977) *Purification and some physicochemical properties of bovine kappa-casein. Biochimica et Biophysica Acta*, **491**, 93-103
- Vreeman, H. J., Visser, S., Slangen, C. J. and van Riel, J. A. M. (1986) *Characterization of bovine  $\kappa$ -casein fractions and the kinetics of chymosin-induced macropeptide release from carbohydrate-free and carbohydrate-containing fractions determined by high-performance gel-permeation chromatography. Biochemical Journal*, **240**, 87-97
- Walstra, P., Geurts, T. J., Noomen, A., Jellema, A. and van Boekel, M. A. J. S. (1999) *Dairy technology*. Marcal Dekker Inc., New York
- Walstra, P. and Jenness, R. (1984) *Dairy Chemistry and Physics*. J. Wiley & Sons, New York, 112-113
- Walstra, P., Wouters, J. T. M. and Guerts, T. J. (2006) *Dairy Science and Technology*, (2<sup>nd</sup> edition), Boca Raton FL, USA: CRC Press
- Yahyaoui, M. H., Angiolillo, A., Pilla, F., Sanchez, A. and Folch, J. M. (2003) *Characterization and Genotyping of th Captine  $\kappa$ -Casein Fractions. J. Dairy Sci.*, **86**, 2715-2720
- Zevaco, C. and Ribadeau-Dumas, B. (1984) *A study on the carbohydrate binding sites of bovine  $\kappa$ -casein using high performance liquid chromatography, Milchwissenschaft*, **39**, 206-210

## Ελληνική Βιβλιογραφία

- Ανυφαντάκης, Ε. Μ. (2004) *Τυροκομία*, Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα
- Ανυφαντάκης, Ε. Μ. & Καλαντζόπουλος, Γ. Κ. (1984) *Το πρόβειο και γίδινο γάλα και η αξιοποίησή του*, Επιμορφωτικό σεμινάριο στη Γαλακτοκομία, Αθήνα 16-20 Ιανουαρίου, Κείμενα Ομιλιών, Τόμος Α', 99-130
- Ανυφαντάκης, Ε. και Καλαντζόπουλος, Γ. (1993) *Γαλακτοκομία*, τόμος πρώτος, Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα-Πειραιάς
- Ανυφαντάκης, Ε. Μ., Καλατζόπουλος, Γ. Κ., Βουτινάς, Λ. και Μασούρας, Θ. (1985) *Μελέτη μεθόδων προσδιορισμού της νοθείας φέτας πρόβειου γάλακτος με αγελαδινό*. Πρακτικά Πρώτου Πανελληνίου Συνεδρίου Τροφίμων με θέμα «Σύγχρονη Τεχνολογία και Ποιοτικός Έλεγχος», 311-328
- Ανυφαντάκης, Ε. Μ., Κανδαράκης, Ι. Γ., Μοάτσου, Γ. και Μοσχοπούλου, Α. (1986) *Μια νέα μέθοδος προσδιορισμού της νοθείας των πρόβειων τυριών φέτα, κεφαλοτύρι και κασέρι με αγελαδινό γάλα*. Δελτίο Εθνικής Επιτροπής Γάλακτος (Ε.Ε.Γ.Ε.), Τεύχος 1<sup>ο</sup>, Έτος 3<sup>ο</sup>, 52-57
- Γλωσσιώτης, Ν. (1984) *Προϊόντα από πρόβειο γάλα*, Επιμορφωτικά σεμινάρια στη Γαλακτοκομία, Αθήνα 5-9 Νοεμβρίου, Θεσσαλονίκη 12-16 Νοεμβρίου, Κείμενα Ομιλιών, Τόμος Β', 233-237
- Κανονισμός Επιτροπής (1996) *Μέθοδος αναφοράς για την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος και καζέϊνικών αλάτων σε τυριά που παρασκευάζονται από πρόβειο, κατσικίσιο ή βουβαλίσιο γάλα ή από μείγματα πρόβειου, κατσικίσιου ή βουβαλίσιου γάλακτος*. ΕΚ Αριθ. 1081/96, 14 Ιουνίου 1996, Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, 142, 15-25
- Κυριακόπουλος Π. Ι. (1995) *Η τυροκομία στην πράξη*, Τρίανα Εκδοτική, Αθήνα, 143-151
- Κώδικας Τροφίμων, Ποτών και Αντικειμένων Κοινής Χρήσης (2003) Μέρος Α' - Τρόφιμα & Ποτά, Τόμος 2. Ελληνική Δημοκρατία, Υπουργείο Οικονομίας και Οικονομικών, Γενικό Χημείο του Κράτους
- Μοάτσου, Γ. (2001) *Εργαστηριακές Σημειώσεις «Τεχνολογία Γάλακτος II»*
- Μοάτσου, Γ., Μοσχοπούλου, Α., Βαμβακάκη, Α.-Ν., Mollé, D., Gagnaire, V., Κανδαράκης, Ι., Ανυφαντάκης, Ε. και Léonil, J. (2008) *Χαρακτηριστικά του αίγειου γάλακτος αυτόχθονων Ελληνικών φυλών*. Συνθετική εργασία, 1<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Επιστημονικό Συνέδριο για το γάλα και τα προϊόντα του Ε.Ε.Γ.Ε., Αθήνα, 9 & 10 Οκτωβρίου 2008
- Πολυχρονιάδου, Α. (1989) *Το ασβέστιο του γάλακτος και ο ρόλος του στη δομή του μικκυλίου*, Επιστήμη και Τεχνολογία Γάλακτος, 6 (2), 35-54

## Ηλεκτρονικές Πηγές

<http://en.wikipedia.org/wiki/SDS-PAGE>

[http://www5.gelifesciences.com/APTRIX/upp00919.nsf/4a0f132842ea4%20d354a25685d0011fa04/4a555d526b88731ac1256e92003e865c/\\$FILE/GE\\_Ion%20Exchange.swf](http://www5.gelifesciences.com/APTRIX/upp00919.nsf/4a0f132842ea4%20d354a25685d0011fa04/4a555d526b88731ac1256e92003e865c/$FILE/GE_Ion%20Exchange.swf)

<http://www.biochem.arizona.edu/classes/bioc462/462a/...>

<http://www.chem.uoa.gr/vocabulary/Vocabularyview.asp?key=SDS%2DPAGE+%28SDS%2Dpolyacrylamide+gel+electrophoresis%29>

<http://www.chnola-research.org/.../capillary.htm>

<http://www.eppendorfna.com/int/index.php?l=131&action=products&contentid=99&sitemap=2.5.1.5>

<http://www.ionsource.com>

[http://www.imb-jena.de/.../proteins\\_purification.html](http://www.imb-jena.de/.../proteins_purification.html)

<http://www.microvet.arizona.edu/.../ToolBox/elisa.html>

<http://www.new-science-press.com/.../illustrations/6/>

[http://www.odec.ca/projects/2005/anna5m0/public\\_html/methods.htm](http://www.odec.ca/projects/2005/anna5m0/public_html/methods.htm)

<http://www.proteinchemist.com/tutorial/iec.html>

<http://www.richardcarbonaro.com/projects/CE.html>

<http://www.rt-pcr.com/>



[http://www.siumed.edu/.../protein\\_methods.htm](http://www.siumed.edu/.../protein_methods.htm)

[http://www.steve.gb.com/science/chromatography\\_elect...](http://www.steve.gb.com/science/chromatography_elect...)

<http://universe-review.ca/R11-16-DNAsequencing.htm>