

**«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ - ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»**



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Μελέτη

**«Επίπεδα πολυμορφισμού της β-καζεΐνης σε ελληνικές αγελάδες
Holstein-Friesian»**

Ντινούλη Ανδρομάχη

Λάρισα, 2018

**Επίπεδα πολυμορφισμού της β-καζεΐνης σε ελληνικές
αγελάδες Holstein- Friesian**

Level of Polymorphism in β-casein gene in in Holstein -
Friesian Cattle

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της προπτυχιακής διπλωματικής μου εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλλαν με οποιοδήποτε τρόπο στην ολοκλήρωση της.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κα Μούτου Αικατερίνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιου Θεσσαλίας, για την ανάθεση του θέματος της μεταπτυχιακής αυτής μελέτης, για τις συμβουλές της αλλά και την καθοδήγησή της κατά τη συγγραφή της παρούσης εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον κ. Σταμάτη Κων/νο, μέλος Ε.ΔΙ.Π. του εργαστηρίου Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας που με βοήθησε κατά την παραμονή μου σε αυτό.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην Κωνσταντίνα Σαρρή υποψήφια διδάκτορα του εργαστηρίου Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας, για τη σημαντική βοήθεια και τη συνεχή καθοδήγηση που μου παρείχε κατά τη διενέργεια του πειραματικού μέρους της μελέτης.

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Μούτου Αικατερίνη, *Αναπλ. Καθ. Βιολογίας Σπονδυλωτών*

Μαμούρης Ζήσης, *Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών*

Σαραφίδου Θεολογία, *Επικ. Καθ. Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών*

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι πολυμορφισμοί είναι μικρές αλλαγές στην αλληλουχία του DNA, δηλαδή σε ένα συγκεκριμένο τμήμα της αλυσίδας του DNA μια βάση υποκαθίσταται από μια άλλη. Οι πολυμορφισμοί είναι συνηθισμένες μεταλλάξεις και υπάρχουν φυσιολογικά στο DNA του κάθε οργανισμού. Οι περισσότεροι από αυτούς τους πολυμορφισμούς δεν επηρεάζουν άμεσα την υγεία ή την ανάπτυξη ενός οργανισμού. Ορισμένοι από αυτούς όμως έχουν αποδειχθεί σημαντικοί για διερεύνηση, καθώς μπορεί να έχουν σημαντική εμπορική σημασία και κάποιοι από αυτούς μπορεί να έχουν επίδραση στην ανθρώπινη υγεία. Οι καζεΐνες, είναι συχνά αντικείμενο μελέτης, στα ζώα γαλακτοπαραγωγής με στόχο την εύρεση του γονότυπου που αποδίδει στο γάλα καλύτερα ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά αλλά και που δημιουργεί καλύτερες συνθήκες τυροκόμησης.

Στην παρούσα μελέτη ελέγχθηκε ο πολυμορφισμός του εξωνίου 7, της β-καζεΐνης (CSN2) των βοοειδών της φυλής Holstein. Για το σκοπό αυτό έγινε η απομόνωση DNA 75 δειγμάτων αίματος αγελάδων της φυλής Holstein. Η επιθυμητή περιοχή του εξωνίου 7 ενισχύθηκε με την μέθοδο PCR σε περιοχή που αποτελείται από 209 ζεύγη βάσεων του γονιδίου της β-καζεΐνης. Τα προϊόντα PCR αναλύθηκαν με τη μέθοδο SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism), σε πηκτική πολυακρυλαμίδης. Από τα αποτελέσματα της SSCP ανάλυσης που πραγματοποιήθηκε, προέκυψαν 3 γενότυποι, οι A1, A2 και A1/A2. Με μεγαλύτερη συχνότητα εμφανίστηκε ο γενότυπος A1/A2, στη συνέχεια ο A2 και κατόπιν ο A1. Συνεπώς, η συχνότητα εμφάνισης του πολυμορφισμού A² της β-καζεΐνης εμφανίστηκε σε μεγαλύτερο βαθμό από τη συχνότητα πολυμορφισμού A¹.

Summary

Polymorphisms are small changes in the DNA sequence where one base is substituted by another. Polymorphisms are common mutations and commonly existing in the DNA of each organism. Most of these polymorphisms do not directly affect the health or development of an organism. But some of them have proved to be important for investigation, as they can have significant commercial significance and also some impact on the human health. Caseins are often the subject of studies in dairy animals in order to find the genotype that yields better qualitative and quantitative characteristics to milk but also creates better cheese-making conditions.

In this study, the polymorphism of exon 7 of bovine β -casein (CSN2) was tested. For this purpose, DNA was extracted from 75 blood samples of Holstein cows. The desired region of exon 7 was amplified by PCR resulting in a 209 bp product. The PCR products were analyzed by the Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) method, on a polyacrylamide gel. From the results of the SSCP analysis, 3 genotypes were detected A1, A2 and A1 / A2. The most frequent genotype was A1 / A2, followed by A2 and A1. Therefore, the frequency of beta-casein polymorphism A² occurred at a greater proportion than the polymorphism frequency A¹.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1. Η αξία του γάλακτος.....	1
1.2. Παράγοντες που επηρεάζουν τη σύσταση και την ποιότητα του γάλακτος.....	2
1.3. Χημική σύσταση γάλακτος.....	3
1.3.1. Λίπος.....	4
1.3.2. Πρωτεΐνες	5
1.3.3. Καζεΐνες	6
1.3.4. Πρωτεΐνες ορού γάλακτος.....	8
1.3.5. β-Καζεΐνες	10
1.3.6. Σάκχαρα.....	11
1.3.7. Λακτόζη	12
1.3.8. Υπόλοιπα σάκχαρα.....	12
1.3.9. Άλατα.....	13
1.3.10. Ιχνοστοιχεία.....	14
1.3.11. Ένζυμα.....	15
1.3.12. Βιταμίνες.....	17
1.3.13. Λοιπά συστατικά γάλακτος.....	18
1.4. Πολυμορφισμός πρωτεϊνών γάλακτος.....	19
1.4.1. Πολυμορφισμοί στα γονίδια της β- καζεΐνης του αγελαδινού γάλακτος.....	21
1.5. Η φυλή Holstein -Friesian.....	23
1.6. Σκοπός.....	25

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	26
2.1. Απομόνωση DNA.....	26
2.2. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη.....	27
2.3. Ενίσχυση τμήματος DNA με την τεχνική PCR.....	28
2.4. Ανάλυση SSCP.....	30
2.5. Αλληλούχιση προϊόντων PCR.....	32
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	33
3.1. Απομόνωση DNA.....	33
3.2. Ενίσχυση τμήματος DNA με την τεχνική PCR.....	33
3.3. Ανάλυση SSCP.....	34
3.4. Αλληλούχιση προϊόντων PCR.....	35
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	38
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	42
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	44
6.1. Ελληνική βιβλιογραφία.....	44
6.2. Ξένη Βιβλιογραφία	44

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η αξία του γάλακτος

Γάλα, σύμφωνα με τον ελληνικό Κώδικα Τροφίμων και Ποτών, είναι το απαλλαγμένο πρωτογάλακτος προϊόν, που προέρχεται από την ολοσχερή και χωρίς διακοπή άμελξη γαλακτοφόρου ζώου, που είναι υγιές, διαβιώνει και διατρέφεται κάτω από υγιεινούς όρους και δεν βρίσκεται σε κατάσταση υπερκόπωσης (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών 2017). Το γάλα εκκρίνεται από όλα τα θηλαστικά θηλυκού γένους. Χρησιμοποιείται κυρίως για την διατροφή των βρεφών αλλά και των ενήλικων ατόμων. Στη φύση υπάρχουν πάνω από 4500 διαφορετικά είδη θηλαστικών που ακολουθούν αυτή τη διεργασία (Sweeny & Fox, 2013).

Κατά τη διάρκεια της εποχής των παγετώνων το γάλα ήταν τοξικό για τους ενήλικες επειδή, σε αντίθεση με τα παιδιά, δεν μπορούσαν να παράγουν το ένζυμο λακτάση, που απαιτείται για τη διάσπαση της λακτόζης, το βασικό σάκχαρο του γάλακτος. Αρκετά χρόνια αργότερα, μια γονιδιακή μετάλλαξη που εξαπλώθηκε σε όλη την Ευρώπη, έδωσε την ικανότητα στους ανθρώπους να παράγουν λακτάση και να πίνουν γάλα για όλη τους τη ζωή. Καθώς η καλλιέργεια της γης και η εκτροφή οικόσιτων ζώων άρχισε να αντικαθιστά το κυνήγι στην Ευρώπη οι κτηνοτρόφοι άρχισαν να επινοούν τρόπους για να μειώσουν την περιεκτικότητα του γάλακτος σε λακτόζη, μέσω ζύμωσης του. Από τότε το γάλα αποτέλεσε πολύ σημαντικό στοιχείο της διατροφής των ανθρώπων, λόγω της θερμιδικής του αξίας αλλά και λόγω των πολλαπλών ωφέλιμων συστατικών που περιέχει (Curry, 2013). Οι κύριες απαιτήσεις από το γάλα είναι κυρίως σε ενέργεια (η οποία παρέχεται κυρίως από τα λίπη και τη λακτόζη), σε απαραίτητα αμινοξέα καθώς και από αμινομάδες υπεύθυνες για τη σύνθεση αμινοξέων, λιπαρά οξέα, βιταμίνες, ανόργανα συστατικά

καθώς και άλλα ιχνοστοιχεία και ουσίες όπως η ταυρίνη και το νερό (Sweeny & Fox, 2013).

Ένα από τα κύρια προϊόντα που προέρχονται από το γάλα και είναι μέρος της καθημερινής μας διατροφής λόγω της υψηλής διατροφικής του αξίας και των εξαιρετικών οργανοληπτικών του χαρακτηριστικών, είναι τα τυροκομικά προϊόντα. Η ανακάλυψη της τυροκόμησης λέγεται πως έγινε μάλλον τυχαία, περίπου 8.000 χρόνια πριν, όταν έμποροι της Μέσης Ανατολής χρειάστηκε να μεταφέρουν γάλα σε ασκό από στομάχι προβάτου στην έρημο. Βέβαια άλλοι υποστηρίζουν ότι η πρώτη παρασκευή γάλακτος δεν ήταν τυχαία αλλά αποτέλεσμα προσπάθειας του ανθρώπου να ανακαλύψει τρόπους διατήρησης των συστατικών του γάλακτος, όπως η ξήρανσή του σε αβαθή πήλινα ή ξύλινα δοχεία στον ήλιο. Η παραγωγή τυροκομικών προϊόντων ξεκίνησε σε μικρές οικογενειακές βιοτεχνίες. Η ανάπτυξη όμως της κτηνοτροφίας καθώς και η απόκτηση γνώσεων χημείας και μικροβιολογίας άλλαξαν τον τρόπο παρασκευής. Η παρασκευή τυροκομικών προϊόντων γίνεται πλέον σε υπερσύγχρονες εγκαταστάσεις όπου τυροκομείται κυρίως αιγοπρόβειο και αγελαδινό γάλα (Ανυφαντάκης, 2004, Kaminaridis & Moatsou, 2009).

1.2 Παράγοντες που επηρεάζουν τη σύσταση και την ποιότητα του γάλακτος

Η βασική χημική σύσταση του γάλακτος παρόλο που δεν παρουσιάζει μεγάλες διακυμάνσεις εξαρτάται από τους παρακάτω παράγοντες:

- Το είδος του ζώου
- Τη φυλή του ζώου
- Την ατομικότητα του ζώου

- Τις διακυμάνσεις στη σύσταση του γάλακτος από ημέρα σε ημέρα
- Το στάδιο της γαλακτικής περιόδου
- Τις ασθένειες των μαστών
- Τη διατροφή των ζώων
- Τη θρεπτική κατάσταση των ζώων
- Την εποχή του έτους
- Το στάδιο του αρμέγματος
- Το σωματικό βάρος
- Την υγρασία του περιβάλλοντος
- Τον οίστρο
- Την κυοφορία
- Την άσκηση
- Το χρονικό διάστημα μεταξύ των αρμεγμάτων
- Τη διάρκεια της ξηράς περιόδου
- Τη θερμοκρασία περιβάλλοντος (Jenness, 1974, Κατσαούνης, 1979, Κεχαγιάς, 1997)

1.3 Χημική σύσταση του γάλακτος

Η σύσταση του γάλακτος των διαφόρων ζώων παρουσιάζει μόνο ποσοτικές διαφορές ως προς τα βασικά συστατικά του. Τα κύρια συστατικά του γάλακτος είναι το νερό, το λίπος, οι πρωτεΐνες, η λακτόζη και τα ιχνοστοιχεία. Εκτός των βασικών συστατικών υπάρχουν και άλλα σε ίχνη, όπως είναι ένζυμα, ορμόνες, φωσφολιπίδια και αέρια (Πίνακας 1) (Bylund, 1995, Ζούλφος, 2010).

Πίνακας 1. Τα κύρια συστατικά του γάλακτος (Bylund, 1995).

Συστατικά Γάλακτος	Εύρος διακύμανσης	Μεσοσταθμικά
Νερό	85,5 – 89,5	87,5
Ολικά στερεά	10,5 – 14,5	13,0
Λίπος	2,5 – 6,0	3,9
Πρωτεΐνες	2,9 – 5,0	3,4
Λακτόζη	3,6 – 5,5	4,8
Ιχνοστοιχεία	0,6 – 0,9	0,8

1.3.1 Λίπος

Το λίπος, η αλλιώς κρέμα γάλακτος, είναι το πιο αντιπροσωπευτικό παράδειγμα ενός γαλακτωματοποιητή λίπους μέσα σε νερό. Το λίπος μέσα στο γάλα συναντάται με τη μορφή λιποσφαιρίων. Είναι μικρά σφαιρίδια ομοιόμορφα διεσπαρμένα μέσα στον ορό του γάλακτος. Η διάμετρος τους κυμαίνεται από 0,1 έως 20μm. Η μέση διάμετρος των λιποσφαιρίων είναι 3-4μm και σε 1ml γάλακτος συναντάμε περίπου 15 δισεκατομμύρια λιποσφαίρια (Bylund, 1995).

Πίνακας 2. Ποσοστό λίπους των λιποσφαιρίων (Kurtz, 1974)

Είδος Λιπιδίων	% Ολικού Λίπους
Τριγλυκερίδια	95 - 96
Διγλυκερίδια	1,26 - 1,59
Μονογλυκερίδια	0,016 - 0,038
Κετοξυγλυκερίδια	0,85 - 1,28
Υδροξυγλυκερίδια	0,60 - 0,78
Ελεύθερα λιπαρά οξέα	0,1 - 0,44
Φωσφολιπίδια	0,8 - 1,00
Σφιγγολιπίδια	0,06
Στερόλες	0,22 - 0,41
Λιποδιαλυτές βιταμίνες και καροτενοειδή	0,0031 - 0,004

Το λίπος του γάλακτος αποτελείται από τριγλυκερίδια ως κύριο συστατικό.

Επίσης, υπάρχουν μόνο και δι-γλυκερίδια, λιπαρά οξέα, στερόλες, καροτενοειδή (στα οποία οφείλει και το υποκίτρινο χρώμα του το λίπος) και λιποδιαλυτές βιταμίνες (A,D,E,K). Η μεμβράνη των λιποσφαιρίων αποτελείται από φωσφολιπίδια, λιποπρωτεΐνες, γλυκολιπίδια, πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα, ένζυμα, ιχνοστοιχεία (μέταλλα) και δεσμευμένο νερό (Πίνακας 2). Η χημική σύσταση και το πάχος της μεμβράνης δεν είναι σταθερά καθώς τα στοιχεία της αλληλεπιδρούν διαρκώς με τον περιβάλλοντα ορό γάλακτος. Τα λιποσφαίρια εκτός του ότι είναι τα μεγαλύτερα σωματίδια στο γάλα είναι και τα πιο ελαφριά. Έτσι, έχουν την τάση όταν το γάλα παραμένει σε κατάσταση ηρεμίας να ανεβαίνουν στην επιφάνεια (Μάντης 2000).

1.3.2 Πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες του γάλακτος συμπεριλήφθηκαν απο νωρίς στη δίαιτα του ανθρώπου και σήμερα είναι απο τις πιο διαδεδομένες πρωτεΐνες των τροφίμων. Οι πρωτεΐνες του γάλακτος μπορούν να διαιρεθούν σε δυο μεγάλες κατηγορίες, τις καζεΐνες και τις πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος. Ο όρος καζεΐνη χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά το 1830 από τον Braconnot, ο οποίος ανέπτυξε μια μέθοδο για την παρασκευή της πρωτεΐνης από το γάλα με τη μέθοδο της καθύζησης (Braconnot, 1830).

Καζεΐνες είναι η φωσφοροπρωτεΐνες, εκείνες οι οποίες καταβυθίζονται απο νωπό αποβουτυρωμένο γάλα μετά απο οξίνιση σε pH 4,6 και σε θερμοκρασία 20°C ενώ οι υπόλοιπες πρωτεΐνες που παραμένουν διαλυτές κάτω απο αυτές τις συνθήκες είναι οι πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος (Jenness et al., 1956).

Φυσικά και χημικά οι δυο αυτές ομάδες πρωτεΐνων διαφέρουν πολύ μεταξύ τους και στην πράξη, στο γάλα βρίσκονται σε δυο εντελώς διαφορετικές φάσεις. Οι καζεΐνες βρίσκονται ως κολλοειδή συσσωματώματα που περιεχουν μερικές χιλιάδες μονομερή

μόρια, ενώ οι πρωτεΐνες του ορού είναι ελεύθερες στο διάλυμα (Sweeny & Fox, 2013). Το αγελαδινό γάλα περιέχει έξι κύριες πρωτεΐνες, τέσσερις καζεΐνες (α_1 , α_2 -, β - και κ - καζεΐνες) και δύο πρωτεΐνες ορού γάλακτος. Σε αναλογία περίπου 33g πρωτεΐνης ανα λίτρο αγελαδινού γάλακτος, τα 27g είναι καζεΐνες και τα υπόλοιπα 6g είναι πρωτεΐνες ορού (Hanusova et al., 2010).

1.3.3 Καζεΐνες

Οι καζεΐνες είναι μια ετερογενής ομάδα πρωτεϊνών με τέσσερις διαφορετικές πολυπετιδικές αλυσίδες. Η κατηγοριοποίηση και η ονομασία τους έγινε παλαιότερα σύμφωνα με τη σχετική ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα σε αλκαλική πηκτή πολυακρυλαμιδίου ή αμύλου που περιέχει ουρία με ή χωρίς 2-μερκαπτοαιθανόλη. Επειδή όμως πλέον είναι γνωστή η αλληλουχία αμινοξέων στο μόριο τους προτάθηκε η ονομασία τους να γίνεται σύμφωνα με αυτήν και έτσι οι καζεΐνες κατατάσσονται στις οικογένειες α_1 -, α_2 -, β - και κ -καζεΐνες (De Kruijff & Holt, 2003).

Οι κυριότερες καζεΐνες είναι:

α_1 -καζεΐνη (CSN1S1): αποτελεί το 1,2-1,5% των συστατικών του γάλακτος και διαθέτει υψηλό αρνητικό φορτίο και υψηλό φωσφορικό περιεχόμενο. Στο αγελαδινό γάλα αποτελεί το 39-46% των συνολικών καζεϊνών.

α_2 -καζεΐνη (CSN1S2): αποτελεί το 0,3-0,4% των συστατικών του γάλακτος, περιέχει δυο τμήματα κυστεΐνης και καμία ομάδα υδατανθράκων. Είναι ευαίσθητη σε κατιόντα ασβεστίου. Στο αγελαδινό γάλα αποτελεί το 8-11% των συνολικών καζεϊνών.

β -καζεΐνη (CSN2): αποτελεί το 0,9-1,1% των συστατικών του γάλακτος και το 39-46% των συνολικών καζεϊνών. Είναι η πλέον υδρόφοβη καζεΐνη και περιέχει σε

μεγάλο ποσοστό προλίνη. Στο αγελαδινό γάλα αποτελεί το 25-35% των συνολικών καζεϊνών. Θα αναλυθεί ο ρόλος της διεξοδικά παρακάτω.

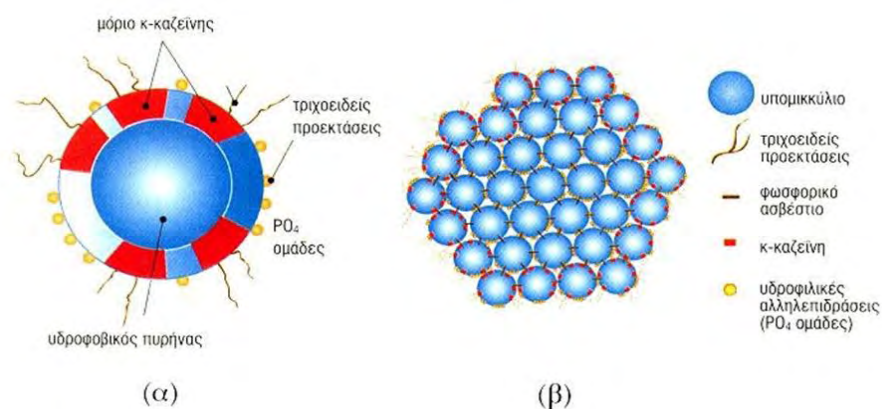
γ-καζεΐνη: είναι προϊόν αποικοδόμησης της β-καζεΐνης στο γάλα και ποικίλει ανάλογα με την ηλικία και τη θερμοκρασία διατήρησης του γάλακτος.

κ-καζεΐνη (CSN2): αποτελεί το 0,2-0,4% των συστατικών του γάλακτος και το 15% των συνολικών καζεϊνών. Διαφέρει σε μεγάλο βαθμό από τις υπόλοιπες καζεΐνες. Στο αγελαδινό γάλα αποτελεί το 8-15% των συνολικών καζεϊνών (Jenness et al., 1956, Eigel et al., 1984, Roginski, 2003).

Οι καζεΐνες αποτελούν το 80% των πρωτεϊνών στο αγελαδινό γάλα (Niki et al., 1994, Martien et al., 1994) και βρίσκονται με τη μορφή καζεϊνικών μικκυλίων. Τα καζεϊνικά αυτά τεμαχίδια περιέχουν μόρια διαφόρων καζεϊνών που δημιουργούν σύμπλοκα με ιόντα ασβεστίου, φωσφορικό ασβέστιο και μικρές ποσότητες κιτρικών. Ο ρόλος του φωσφορικού ασβεστίου φαίνεται να έχει σχέση με το σχηματισμό και τη δομή του μικκυλίου. Το ασβέστιο εκτός του δομικού του ρόλου, επιβραδύνει την μεταφορά συστατικών του μικκυλίου από και προς το διάλυμα του γάλακτος προσφέροντας μεγαλύτερη σταθερότητα. Τα καζεϊνικά μικκύλια είναι ανομοιομορφα τόσο ως προς το μέγεθος όσο και ως προς το μοριακό τους βάρος. Το μέγεθος τους κυμαίνεται από 10 έως 250 nm και το μοριακό τους βάρος από 10^6 έως 10^9 Daltons (Bylund, 1995, Fox et al., 2005).

Υπάρχουν διάφορες θεωρίες για την ακριβή δομή και λειτουργία του καζεϊνικού μικκυλίου. Η πλέον αποδεκτή είναι αυτή η οποία θεωρεί ότι τα καζεϊνικά μικκύλια αποτελούνται από μικρότερα συσσωματώματα καζεϊνών που ονομάζονται υπομικκύλια. Τα υπομικκύλια είναι στη σύνθεση τους ετερογενή και αποτελούνται από

περίπου 30 μόρια καζεΐνων. Τα υπομικκύλια που είναι πλούσια σε κ-καζεΐνη βρίσκονται στην επιφάνεια, ενώ τα περισσότερο υδρόφοβα υπομικκύλια βρίσκονται στο εσωτερικό του καζεϊνικού μικκυλίου (Εικόνα 1) (Linderstrom-Lang, 1929).



Εικόνα 1. Δομή υπομικκυλίου (α) & μικκυλίου (β) καζεΐνης (Ανυφαντάκης, 2004)

1.3.4 Πρωτεΐνες ορού γάλακτος

Ο όρος «πρωτεΐνες ορού» χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει την ομάδα των πρωτεϊνών που παραμένουν διαλυτές στον ορό του γάλακτος μετά από καταβύθιση των καζεϊνών σε pH 4,6 στους 20°C (Mantis, 1993, Ανυφαντάκης, 2004). Η β-λακτοσφαιρίνη (LGB), η α-λακταλβουμίνη (LALBA), τα γλυκομακροπεπτίδια (GMP), η αλβουμίνη βόειου ορού (BSA), οι ανοσοσφαιρίνες (IgGs) και τα κλάσματα πρωτεοζών-πετονών όπως γαλακτοϋπεροξειδάση, λυσοζύμη και γαλακτοφερρίνη είναι οι χαρακτηριστικές πρωτεΐνες του ορού (Farrell et al., 2004). Αντιπροσωπεύουν περίπου το 17-20% των αζωτούχων ουσιών του γάλακτος της αγελάδας. Οι πρωτεΐνες του ορού είναι πλούσιες σε κυστεΐνη και έτσι διορθώνουν την ανεπάρκεια των καζεϊνών ως προς το αμινοξύ αυτό (Mantis, 1993, Bylund, 1995, Ανυφαντάκης, 2004).

Αναλυτικότερα:

αλβουμίνη βόειου ορού (BSA): έχει τις ίδιες φυσικές και ανοσογενετικές

ιδιότητες με την αλβουμίνη του ορού του αίματος της αγελάδας. Αποτελεί το 0,01-0,04% των συστατικών του γάλακτος και έχει μοριακό βάρος περίπου 66.000 (Brodbeck et al., 1967).

α-λακταλβουμίνη (LALBA): αποτελεί το 0,06-0,17% των συστατικών του γάλακτος. Είναι ένα συνένζυμο που είναι απαραίτητο στη σύνθεση της λακτόζης. Διαθέτει ένα μη εκτεθειμένο άκρο που προορίζεται για σύνδεση με κατιόν ασβεστίου. Το ασβέστιο συνδέεται στο άκρο αυτό και έτσι σταθεροποιεί τη στερεοδιάταξη της πρωτεΐνης. Η αφαίρεση του ασβεστίου ή η μείωση του pH στο 4, που χαλαρώνει το δεσμό με το ασβέστιο, προκαλεί μια τετηγμένη κατάσταση σφαιριδίων και έτσι η πρωτεΐνη υπόκειται σε αντιστρεπτή μετουσίωση σε χαμηλή θερμοκρασία. Η α-γαλακταλβουμίνη παρουσιάζει πλήρη μετουσίωση κατά τη θερμική επεξεργασία εάν δεν υπάρχει κάποια άλλη πρωτεΐνη κατά τη θέρμανση (Brodbeck et al., 1967).

β-λακτοσφαιρίνη (LGB): αποτελεί την κύρια οροπρωτεΐνη και εμφανίζεται σε ποσοστό 0,2-0,4% των συστατικών του γάλακτος. Οι ιδιότητες της τείνουν να επικρατήσουν έναντι των ιδιοτήτων των οροπρωτεϊνών. Η διαλυτότητα της εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το pH και την ιοντική ισχύ. Δεν καθιζάνει κατά την οξίνιση του γάλακτος, γεγονός που ισχύει και για τις άλλες πρωτεΐνες του ορού (Saweyr, 2003).

ανοσοσφαιρίνες (IgGs): είναι αντισώματα που συντίθενται για την εξουδετέρωση ειδικών αντιγόνων και παράγονται κυρίως στο αίμα. Οι ανοσοσφαιρίνες είναι μεγάλα μόρια γλυκοπρωτεϊνών ετερογενούς σύνθεσης, ακόμη και στην ίδια κατηγορία. Αυτό συμβαίνει διότι σχηματίζονται από διαφορετικά κύτταρα που το καθένα μπορεί να παράγει διαφορετικές πεπτιδικές αλυσίδες (Marchalonis et al., 1998).

γλυκομακροπεπίδια (GMP): το γλυκομακροπεπίδιο, αναφέρεται και ως

μακροπεπτιδίο καζεΐνης. Είναι μια πρωτεΐνη παρούσα στον ορό γάλακτος σε ποσοστό 10-15% λόγω της δράσης της χυμοσίνης στην καζεΐνη κατά την παρασκευή του τυριού. Το GMP είναι παρόν μόνο όταν χρησιμοποιείται χυμοσίνη κατά την επεξεργασία. Είναι πλούσιο σε αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας και στερείται αρωματικών αμινοξέων όπως η φαινυλαλανίνη, η τρυπτοφάνη και η τυροσίνη (Walstra & Jenness 1984).

πρωτεόζες-πεπτόνες: είναι ετερογενής ομάδα περισσότερων από 38 πεπτιδίων του γάλακτος, που προέρχονται κυρίως από την πρωτεολυτική διάσπαση των καζεϊνών και άλλων πρωτεϊνών. Το κοινό χαρακτηριστικό των πεπτιδίων αυτών είναι η ανθεκτικότητά τους έπειτα από κατεργασία 30 λεπτών σε θερμοκρασία 90°C. Το μίγμα περιέχει κυρίως πεπτιδία αλλά και γλυκοπρωτεΐνες και φωσφοπρωτεΐνες και αντιπροσωπεύει περίπου το 10% των πρωτεϊνών του ορού (Sorensen & Petersen, 1993).

1.3.5 β-Καζεΐνες

Οι β-καζεΐνες (CSN2) αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό πρωτεϊνών στο αγελαδινό γάλα, περίπου το 30% (Boro et al., 2016). Είναι μια από τις κυριότερες πρωτεΐνες η οποία μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τη γενετική σύνθεση των αγελάδων (Hanusova et al., 2010). Η πρωτεΐνη αναφοράς για τις β- καζεΐνες είναι η β-CN A²-5P η οποία αποτελείται από 209 αμινοξέα (Sweeny & Fox, 2013). Η απεικόνιση της παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.

Οι β-καζεΐνες είναι οι πιο υδρόφοβες πρωτεΐνες από όλες τις καζεΐνες. Αυτό παρουσιάζει μεγάλο τεχνολογικό ενδιαφέρον ιδίως στις τεχνικές τυροκόμησης. Ο υδρόφοβος χαρακτήρας των β-καζεϊνών εξασθενεί όταν η θερμοκρασία του γάλακτος είναι χαμηλή. Σε χαμηλές θερμοκρασίες καθυστερεί η δράση της χυμοσίνης και οδηγεί σε πιο μαλακό τυρόπηγμα. Όταν οι β-καζεΐνες αποχωριστούν από το καζεϊνικό

μικκύλιο τότε υδρολύονται σχετικά εύκολα από διάφορες πρωτεάσες στο γάλα. Με τη διάσπαση της μετατρέπεται σε γ-καζεΐνη και πεπτόνες τα οποία χάνονται στον ορό του γάλακτος. Επίσης, η διάσπαση των β-καζεΐνων μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία πικρών πεπτιδίων που μπορεί να επηρεάσουν την τελική γεύση των προϊόντων (Bylund, 1995).

1	10	20
Arg-Glu-Leu-Glu-Glu-Leu-Asn-Val- Pro- Gly-Glu- Ile- Val-Glu-SerP-Leu-SerP-SerP-SerP-Glu-		
21	30	40
Glu- Ser- Ile- Thr-Arg- Ile- Asn-Lys- Lys- Ile- Glu-Lys- Phe-Gln-SerP-Glu- Glu- Gln- Gln- Gln-		
41	50	60
Thr-Glu-Asp-Glu-Leu-Gln-Asp-Lys- Ile- His- Pro- Phe- Ala-Gln- Thr- Gln- Ser- Leu- Val- Tyr-		
61	70	80
Pro- Phe- Pro- Gly- Pro- Ile- Pro-Asn- Ser- Leu-Pro-Gln-Asn- Ile- Pro- Pro- Leu- Thr- Gln- Thr-		
81	90	100
Pro- Val- Val- Val- Pro- Pro- Phe-Leu-Gln- Pro-Glu- Val-Met-Gly- Val- Ser- Lys- Val- Lys- Glu-		
101	110	120
Ala-Met-Ala- Pro- Lys- His- Lys-Glu-Met-Pro- Phe- Pro- Lys-Tyr- Pro- Val- Glu- Pro- Phe- Thr-		
121	130	140
Glu- Ser- Gln- Ser- Leu- Thr- Leu- Thr- Asp-Val-Glu-Asn-Leu-His- Leu- Pro- Leu- Pro- Leu- Leu-		
141	150	160
Gln- Ser- Trp- Met- His- Gln- Pro- His- Gln- Pro-Leu-Pro- Pro- Thr- Val- Met- Phe- Pro- Pro- Gln-		
161	170	180
Ser- Val- Leu- Ser- Leu- Ser- Gln- Ser- Lys- Val-Leu-Pro- Val- Pro- Gln- Lys- Ala- Val- Pro- Tyr-		
181	190	200
Pro- Gln- Arg- Asp- Met- Pro- Ile- Gln- Ala- Phe- Leu- Leu- Tyr- Gln- Glu- Pro- Val- Leu- Gly- Pro-		
201		
Val- Arg- Gly- Pro- Phe- Pro- Ile- Ile- Val		

Εικόνα 2. Αλληλουχία αμινοξέων της β-καζεΐνης (Sweeny & Fox, 2013)

1.3.6 Σάκχαρα

Το γάλα περιέχει ελεύθερα σάκχαρα που σχηματίζονται από μικρό αριθμό εξοζών ή παραγώγων τους καθώς και σάκχαρα δεσμευμένα στις γλυκοπρωτεΐνες.

Από χημική άποψη διακρίνονται σε:

- Ουδέτερα σάκχαρα: λακτόζη και πολυσακχαρίτες που περιέχουν λακτόζη και φρουκτόζη. Μπορούν να βρεθούν σε ελεύθερη ή συνδυασμένη μορφή.
- Αζωτούχα σάκχαρα: αμινο-ακετυλιωμένες γλυκοζαμίνη και γαλακτοζαμίνη.

Είναι πάντα συνδεδεμένα με ουδέτερα σάκχαρα.

- Οξίνα σάκχαρα: σιαλικά οξέα. Είναι πάντα συνδεδεμένα με ουδέτερα ή αζωτούχα σάκχαρα (Belitz et al., 2012).

1.3.7 Λακτόζη

Το μεγαλύτερο και κυρίαρχο ρόλο στο γάλα παίζει η λακτόζη. Είναι το μόνο ελεύθερο σάκχαρο που υπάρχει σε σημαντικές ποσότητες σχεδόν σε όλα τα γάλατα. Είναι το πιο απλό και πιο σταθερό σε αναλογία μεγάλο συστατικό. Στο γάλα της αγελάδας η λακτόζη κυμαίνεται από 4,4-5,2% δηλαδή αποτελεί το 50-52% του στερεού υπολείμματος άνευ λίπους. Η λακτόζη φαίνεται πως είναι παράγοντας που περιορίζει την έκκριση γάλακτος. Από βιολογική άποψη, η λακτόζη διακρίνεται από τα κοινά σάκχαρα λόγω της σταθερότητας της στον κύκλο της θρέψης. Τα ειδικά ένζυμα που εξασφαλίζουν την υδρόλυση της λακτόζης είναι πολύ λίγα και όχι ιδιαίτερα δραστήρια. Η λακτόζη δεν είναι απλά μια πηγή ενέργειας για τον άνθρωπο και τα ζώα καθώς αποτελεί την μόνη πηγή γαλακτόζης που είναι συστατικό των νευρικών ιστών (Καμινάρης & Μοάτσου, 2009).

1.3.8 Υπόλοιπα Σάκχαρα

Εκτός από τη λακτόζη υπάρχουν σε μικρά ποσά αρκετοί μονοσακχαρίτες, ουδέτεροι ή όξινοι ολιγοσακχαρίτες καθώς και σάκχαρα δεσμευμένα με πρωτεΐνες ή πεπτίδια. Από τους μονοσακχαρίτες βρίσκονται η γλυκόζη και η γαλακτόζη σε ποσά από 10-20mg/100ml και η μυο-ινοσιτόλη. Επίσης, βρέθηκαν οι υδατάνθρακες φρουκτόζη, η N-ακετυλογλυκοζαμίνη, η N-ακετυλογαλακτοζαμίνη και το N-ακετυλονευραμινικό οξύ, είτε ως ελεύθερα σάκχαρα είτε κυρίως ως ολιγοσακχαρίτες, γλυκοπεπτίδια ή γλυκοπρωτεΐνες. Το συνολικό N-ακετυλονευραμινικό οξύ ανέρχεται

στο γάλα αγελάδας σε 10-30mg %, στο πρωτόγαλα 100-230mg % και στο πρωτόγαλα της γυναίκας 100-425 mg % (Abrahamson, 2015).

Γλυκοπεπτίδια έχουν απομονωθεί από το πρωτόγαλα της αγελάδας και της γυναίκας και βρέθηκαν να περιέχουν γαλακτόζη, γλυκοζαμίνη, γαλακτοζαμίνη και ν-ακετυλονευραμινικό οξύ. Οι ουδέτεροι ολιγοσακχαρίτες που έχουν ανιχνευθεί αποτελούνται από γλυκόζη, γαλακτόζη, φρουκτόζη και N-ακετυλογλυκοζαμίνη και στο γάλα αγελάδας περιέχονται σε αναλογία 1-2g/l, ενώ στις γυναίκας σε ποσότητα 10-25g/l (Jenness, 1974).

Οι όξινοι ολιγοσακχαρίτες που ταυτοποιήθηκαν, αποτελούνται από N-ακετυλονευραμινικό οξύ και σε μερικές περιπτώσεις από N- γλυκολυλ-νευραμινικό οξύ (σιαλικά οξέα). Οι πρωτεΐνες του γάλακτος που περιέχουν υδατάνθρακες είναι οι κ-καζείνες, οι ανοσοσφαιρίνες, η ποικιλία Drought-Master της β-A λακτογλοβουλίνης και οι πρωτεΐνες της μεμβράνης του λιποσφαιρίου (Walstra & Jenness, 1984).

1.3.9 Άλατα

Το γάλα περιέχει αρκετά μεταλλικά στοιχεία, είτε σε ιονική μορφή, είτε δεσμευμένα σε άλλα συστατικά είτε με μορφή οργανικών η ανόργανων αλάτων. Από τα κατιόντα τα κυριότερα είναι το Ca⁺⁺, το Na⁺⁺, το K⁺ και το Mg⁺⁺, ενώ από τα ανιόντα το Cl⁻ ο P⁻ και τα κιτρικά (Πίνακας 3) (Zamberlin et al., 2012).

Η σχέση λακτόζης και αλάτων φαίνεται ότι παραμένει σταθερή στα διάφορα γάλατα και αυτό έχει σχέση με τη διατήρηση της ωσμωτικής πίεσης του γάλακτος σε τιμές ίδιες με εκείνες του αίματος. Σχετικά με την κατάσταση με την οποία βρίσκονται στο γάλα τα κυριότερα από τα στοιχεία του πίνακα 3 είναι γνωστό ότι τα κάλιο, νάτριο

και χλώριο βρίσκονται κυρίως ως ελεύθερα ιόντα, ενώ το ασβέστιο και το μαγνήσιο μόνο σε μικρό ποσοστό, είναι σε ιονισμένη μορφή. Στο γάλα αγελάδας το 20% του ασβεστίου είναι δεσμευμένο στις καζεΐνες σε συνδυασμό με το φώσφορο, το 50% είναι σε ανόργανη κολλοειδή μορφή και το 30% σε ιονισμένη μορφή (Zamberlin et al., 2012).

Πίνακας 3. Μεταλλικά στοιχεία αγελαδινού γάλακτος (Zamberlin et al., 2012).

Μεταλλικά στοιχεία γάλακτος αγελάδας (mg)	
Ασβέστιο	123
Μαγνήσιο	12
Νάτριο	58
Κάλιο	141
Χλώριο	119
Φώσφορο	95
Κιτρικό	160
Θείο	30

Συβεπώς, το γάλα είναι κορεσμένο από φωσφορικό και κιτρικό ασβέστιο. Σχετικά με το φώσφορο, το 30% περίπου είναι σε ανόργανη διαλυτή μορφή, το 20% είναι δεσμευμένο στα μόρια των καζεϊνών, το 40% σε κολλοειδή ανόργανη μορφή και το υπόλοιπο 10% περίπου είναι δεσμευμένο σε λιπίδια. Το κιτρικό οξύ είναι σημαντικό συστατικό του γάλακτος. Ενώνεται με το ασβέστιο και έτσι διατηρείται η διαλυτότητα του φωσφορικού ασβεστίου. (Καμινάρησης & Μοάτσου, 2009).

1.3.10 Ιχνοστοιχεία

Το φυσικό γάλα περιέχει ένα σημαντικό αριθμό στοιχείων σε πολύ μικρές ποσότητες (Πίνακας 4). Για πολλά από αυτά δε μπορούμε να πούμε με βεβαιότητα αν είναι κανονικά στοιχεία του γάλακτος ή είναι επιμολύνσεις. Ένα στοιχείο μπορεί να είναι απαραίτητο στον οργανισμό επειδή μπορεί να συμμετέχει σε μια ενζυματική

δράση, αλλά το ίδιο στοιχείο πάνω από μια ορισμένη συγκέντρωση μπορεί να γίνει τοξικό συχνά λόγω δέσμευσης του ενεργού κέντρου ενός ενζύμου (Pereira, 2014).

Πίνακας 4. Ιχνοστοιχεία αγελαδινού γάλακτος (Pereira, 2014).

Στοιχείο	Ακραίες τιμές (µg/kg)	Μέση Περιεκτικότητα (µg/kg)	Στοιχείο	Ακραίες τιμές (µg/kg)	Μέση Περιεκτικότητα (µg/kg)
Αργίλιο	50-2100	500	Λίθιο	1-29	Ιχνη
Αρσενικό	10-400	50	Μαγνήσιο	3-370	20
Βάριο	1-110	Ιχνη	Υδράργυρος	<0,1	Ιχνη
Βόριο	30-800	200	Μολυβδένιο	5-150	70
Βρώμιο	60-25000	600	Νικέλιο	0-180	30
Κάδμιο	1-160	<0,5	Ρουβίδιο	100-3400	2000
Καίσιο	3-46	6	Σελήνιο	4-1200	40
Χρώμιο	5-82	15	Πυρίτιο	1300-7000	1400
Κοβάλτιο	0-20	1	Άργυρος	1-54	Ιχνη
Χαλκός	10-1200	25	Στρόντιο	5-2000	170
Φθόριο	20-700	180	Κασσίτερος	0-1000	Ιχνη
Ιώδιο	5-700	50	Τιτάνιο	2-500	Ιχνη
Σίδηρος	100-2400	200	Βανάδιο	1-310	0,1
Μόλυβδος	1-500	<5	Ψευδάργυρος	220-19000	3900

1.3.11 Ένζυμα

Τα ένζυμα που βρίσκονται φυσιολογικά στο γάλα παράγονται από τα κύτταρα του μαστού και δεν έχει αποδειχθεί εάν παίζουν κάποιο ιδιαίτερο ρόλο ή πρέπει να θεωρείται ότι εισάγονται τυχαία κατά τη διαδικασία της έκκρισης του γάλακτος. Τα ένζυμα που παράγονται από μικροοργανισμούς δε θεωρούνται ως συστατικά του γάλακτος (Whitaker, 2003). Ενδιαφέρον από άποψη υγιεινής και τεχνολογίας του γάλακτος παρουσιάζουν τα παρακάτω:

Αλκαλική Φωσφατάση: εντοπίζεται στη μεμβράνη των λιποσφαιρίων. Είναι θερμοευαίσθητη, αλλά περισσότερο ανθεκτική από τα μη σπορογόνα παθογόνα

βακτήρια. Η αδρανοποίησή της κατά τη θέρμανση του γάλακτος υποδηλώνει και την καταστροφή των παθογόνων βακτηρίων.

Λιπάσες: υπάρχουν κατά 90% στα μικύλια της καζεΐνης. Διασπών τα τριγλυκερίδια του λίπους του γάλακτος, οπότε ελευθερώνονται λιπαρά οξέα, γλυκερόλη, μονογλυκερίδια και διγλυκερίδια, μεταβολές που επηρεάζουν τη συντήρηση του γάλακτος και των προϊόντων του, προσδίδοντάς του τη γεύση. Οι λιπάσες αδρανοποιούνται μερικώς κατά την παστερίωση και πλήρως κατά την αποστείρωση του γάλακτος. Η δράση τους περιορίζεται σε θερμοκρασία μικρότερη από τους 10°C.

Καταλάση: χρησιμοποιείται στη διάγνωση του γάλακτος που προέρχεται από ζώα που πάσχουν από μαστίτιδα, διότι τότε η δραστηριότητά της αυξάνεται κατά 10-15 φορές. Η καταλάση προέρχεται από τον ορό του αίματος.

Οξειδάση Ξανθίνης: δεν αδρανοποιείται στη θερμοκρασία παστερίωσης, αλλά σε θερμοκρασία μεγαλύτερη από 80°C, γι' αυτό και χρησιμοποιείται για να διαπιστωθεί εάν το γάλα έχει υποστεί βρασμό. Η δραστηριότητά της αυξάνεται με αύξηση του αριθμού των σωματικών κυττάρων στο γάλα.

Πρωτεάσες: παρότι ανευρίσκονται σε μικρή συγκέντρωση στο γάλα, παίζουν κάποιο ρόλο στη διάσπαση των πρωτεϊνών κατά τη συντήρηση του παστεριωμένου γάλακτος. Απαντούν σε αλκαλική και όξινη μορφή και φέρονται συνδεδεμένες με τις καζεΐνες. Στο γάλα όμως υπάρχουν και μικροβιακής προέλευσης πρωτεάσες.

Υπεροξειδάση: συντίθεται στο μαστό και είναι ποσοτικά το πρώτο ένζυμο του γάλακτος (1% των οροπρωτεϊνών). Η υπεροξειδάση του γάλακτος, σε συνδυασμό με τα θειοκυανικά άλατα και το υπεροξειδίο του υδρογόνου, είναι σημαντική λόγω της

αντιμικροβιακής της δράσης.

Λυσοζύμη: είναι ένα ένζυμο το οποίο υδρολύει γλυκοζιτικούς δεσμούς των κυτταρικών τοιχωμάτων των Gram θετικών βακτηρίων. Ανευρίσκεται σε μικρή αναλογία, 13μg/100mL και απενεργοποιείται μερικώς με την παστερίωση. Φαίνεται απίθανο το ένζυμο αυτό να έχει αντιμικροβιακή δράση σε γάλατα, που έχουν υποστεί επεξεργασία και η επίδρασή του είναι πιθανώς μικρή στο νοπό γάλα. (Whitaker, 2003).

1.3.12 Βιταμίνες

Το γάλα περιέχει όλες σχεδόν τις βιταμίνες, άλλες σε ικανοποιητική ποσότητα και άλλες σε ίχνη. Από τις λιποδιαλυτές βιταμίνες, η Α υπάρχει κυρίως ως εστέρας του παλμιτικού οξέος και η D ως μίγμα D2 και D3. Η βιταμίνη E απαντά κυρίως ως α-τοκοφερόλη, ενώ η βιταμίνη K ανευρίσκεται μόνο σε ίχνη. Το γάλα δεν είναι καλή πηγή της βιταμίνης C (ασκορβικό οξύ). Από τις υδατοδιαλυτές βιταμίνες, εκείνες του συμπλέγματος Β ανευρίσκονται σταθερές στο γάλα των μηρυκαστικών, ανεξάρτητα από τη διακύμανση της περιεκτικότητάς τους στις ζωοτροφές. Το άπαχο γάλα, το γάλα με λίγα λιπαρά, καθώς και το πλήρες γάλα, περιέχουν την ίδια ποσότητα βιταμινών (Bulgari et al., 2013).

Όπως παρατηρούμε από τον πίνακα 5 σε κάποιες βιταμίνες η κατανάλωση ενός λίτρου γάλακτος καλύπτει της ημερήσιες ανάγκες του ανθρώπου.

Πίνακας 5. Βιταμίνες αγελαδινού γάλακτος (Bulgari et al., 2013)

Βιταμίνες	Περιεκτικότητα (mg/L)	Ενδεικτική Συνιστώμενη Ημερήσια Πρόσληψη
Βιταμίνη Α	1,1	1
Βιταμίνη D	0,0006	0,005
Βιταμίνη Ε	0,98	10
Βιταμίνη Κ	0,01	0,08
Θειαμίνη (Β1)	0,44	1,4
Ριβοφλαβίνη (Β2)	1,75	1,6
Νιασίνη	0,94	18
Παντοθενικό οξύ	3,46	5
Βιταμίνη Β6	0,64	2,2
Βιοτίνη	0,031	0,15
Φυλλικό Οξύ	0,050	0,4
Βιταμίνη Β12	0,0043	0,003
Βιταμίνη C	21	60

1.3.13 Λοιπά συστατικά γάλακτος

Ορμόνες: πρόκειται για τις φυσικές ορμόνες του ίδιου του γαλακτοπαραγωγού ζώου, οι οποίες απαντούν και στο γάλα σε πολύ μικρές ποσότητες και κυμαίνονται ανάλογα με το στάδιο της γαλακτοπαραγωγής. Έχει διαπιστωθεί ύπαρξη προλακτίνης, τεστοστερόνης, προγεστερόνης και οιστρογόνων (Sweeny & Fox, 2013).

Αλδεΐδες, κετόνες και αλειφατικά οξέα: απαντούν σε συνολικό ποσό που κυμαίνεται από 10 έως 20 mg/100mL. Έχει ταυτοποιηθεί η ύπαρξη ακετογλουταρικού οξέος, γαλακτικού οξέος, μυρμηκικού οξέος, φορμαλδεΐδης, ακεταλδεΐδης και ακετόνης (Baticz et al., 2003).

Μη πρωτεϊνικής φύσης αζωτούχες ουσίες: το συνολικό μη πρωτεϊνικό άζωτο δεν υπερβαίνει τα 20-30 mg/100 mL και προέρχεται κυρίως από ενώσεις, όπως η αμμωνία, η ουρία και το ουρικό οξύ (Sweeny & Fox, 2013).

Θειούχες ενώσεις: είναι διάφορες διμεθυλο-σουλφόνες, θειοκυανικές ρίζες κ.α. που παίζουν ρόλο στην αντιμικροβιακή δράση του νοπού γάλακτος (Kalac, 2012).

Χρωστικές: πρόκειται κυρίως για καροτένια που δίνουν υποκίτρινο χρώμα στο λίπος καθώς επίσης και για ριβοφλαβίνη που προσδίδει την πρασινοκίτρινη απόχρωση στο αποβουτυρωμένο γάλα (Kalac, 2012).

Αέρια: το γάλα περιέχει οξυγόνο, διοξείδιο του άνθρακα και άζωτο έως 5% του όγκου του (Sharma et al., 2011).

Κύτταρα: το γάλα περιέχει φυσιολογικά έως 500.000 λευκοκύτταρα και επιθηλιακά κύτταρα ανά mL και ο αριθμός αυτός αυξάνεται σε περίπτωση μαστίτιδας (Sharma et al., 2011).

1.4 Πολυμορφισμός πρωτεϊνών γάλακτος

Η σύνθεση των πρωτεϊνών του γάλακτος ελέγχεται από γονίδια. Το τμήμα του DNA που αποτελεί ένα γονίδιο μεταγράφεται σε αγγελιοφόρο RNA και μεταφράζεται σε ένα πολυπεπίδιο, το οποίο με επιπλέον τροποποίηση, οδηγεί στο σχηματισμό μιας πρωτεΐνης. Η διαδικασία αυτή ακολουθείται και για το σχηματισμό κάθε μιας από τις πρωτεΐνες του γάλακτος (Mantis, 1993).

Μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους τα χρωμοσώματα παρουσιάζουν εξαιρετική ομοιότητα στα ζεύγη τους. Ωστόσο, σε τμήματα των χρωμοσωμάτων που αντιπροσωπεύουν τμήματα γονιδίων μπορεί να υφίσταται κάποια παραλλακτικότητα στην αλληλουχία των βάσεων του DNA. Αυτή η παραλλακτικότητα μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία συγκεκριμένων γονιδίων με περισσότερες από μια μορφές, που ονομάζονται αλληλόμορφα. Όπου η γενετική παραλλαγή απαντάται συχνά (π.χ. τουλάχιστον 5% των γονιδιακών τόπων στα χρωμοσώματα έχουν ένα αλληλόμορφο διαφορετικό από αυτό που παρατηρείται συνήθως) τότε αναφερόμαστε στην παρουσία του φαινομένου του γενετικού πολυμορφισμού. Τα αυτοσωμικά χρωμοσώματα

υφίστανται σε δύο αντίγραφα και επομένως υπάρχουν δύο αλληλόμορφα κάθε γονιδίου. Εάν αυτά τα αλληλόμορφα είναι όμοια μεταξύ τους τότε το άτομο είναι ομόζυγο (ή ομοζύγωτο) για το συγκεκριμένο γονίδιο, ενώ σε περίπτωση που είναι διαφορετικά το άτομο είναι ετερόζυγο (ή ετεροζύγωτο) (Mantis, 1993).

Ο γενετικός πολυμορφισμός των πρωτεϊνών του γάλακτος παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον για την κτηνοτροφία, λόγω των σχέσεων του με τα χαρακτηριστικά της παραγωγής, της σύνθεσης και την ποιότητα του γάλακτος (Amigo et al., 2000). Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει και κατά την τυροκόμηση, καθώς σχετίζεται με την συνεκτικότητα του πηγματος, τον χρόνο πήξης, την περιεκτικότητα του πηγματος σε καζεΐνη και την απόδοση σε τυρί (Pirisi et al., 1999, Moatsou et al., 2008).

Η ύπαρξη γενετικού πολυμορφισμού στις πρωτεΐνες του γάλακτος διαπιστώθηκε για πρώτη φορά από τους Aschaffenburg και Drewry (1955) και αφορούσε στη β-λακτογλοβουλίνη. Οι παραπάνω ερευνητές παρατήρησαν ότι τα δείγματα γάλακτος από διαφορετικές αγελάδες που υφίσταντο ηλεκτροφόρηση (σε φίλτρο χαρτιού, ρυθμιστικό διάλυμα βαρβιτόνης, pH 8,6, τάση 16V, για 16 ώρες), παρήγαγαν μία ή δύο διαφορετικές ηλεκτροφορητικές δέσμες ή ένα μείγμα τους που προσδιορίστηκαν ως β1 και β2 (με σειρά μειούμενης κινητικότητας) (Aschaffenburg & Drewry, 1957). Δύο χρόνια αργότερα, όταν ανακαλύφθηκε ότι η σύνθεση των δύο διαφορετικών τύπων της β-λακτογλοβουλίνης βρισκόταν υπό γενετικό έλεγχο, η ονομασία αντικαταστάθηκε από την αντίστοιχη Α και Β (Aschaffenburg & Drewry, 1957).

Η ανακάλυψη των Aschaffenburg και Drewry αποτέλεσε το έναυσμα έντονης ερευνητικής δραστηριότητας με στόχο την περαιτέρω μελέτη του γενετικού πολυμορφισμού της β-λακτογλοβουλίνης αλλά και της διερεύνησης της πιθανότητας ύπαρξης γενετικού πολυμορφισμού στις υπόλοιπες οροπρωτεΐνες, καθώς και στις

διάφορες καζεΐνες (Aschaffenburg & Drewry, 1957). Αρχικά, οι προσπάθειες επικεντρώθηκαν στη διαμόρφωση μεθόδων προσδιορισμού των γενετικών αλληλόμορφων των πρωτεϊνών του γάλακτος, στη μελέτη του τρόπου με τον οποίο κληρονομούνται, καθώς και στη διακύμανση των συχνοτήτων των αλληλόμορφων των πρωτεϊνών του γάλακτος στις διάφορες φυλές των βοοειδών. Σύντομα το διεθνές ενδιαφέρον στράφηκε στην εύρεση των γονιδιακών τόπων που συσχετίζονται με τα παραγωγικά χαρακτηριστικά του γάλακτος. Μέχρι σήμερα οι περισσότερες από τις μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί επικεντρώνονται στα γονίδια που ελέγχουν τη σύνθεση των τεσσάρων καζεϊνών (α_1 , α_2 , β , κ) καθώς και της β -λακτογλοβουλίνης (Πίνακας 6) (Swaisgood, 1992).

Πίνακας 6. Γενετικές παραλλαγές των καζεϊνών (Swaisgood, 1992)

Καζεΐνες	α_1	α_2	β	κ
% των συστατικών του γάλακτος	1,2 – 1,5	0,3 – 0,4	0,9 – 1,1	0,2 – 0,4
Γενετικές Παραλλαγές	A, B, C, D, E	A, B, C, D	A1, A2, A3, C, D, E	A, B

1.4.1. Πολυμορφισμοί στα γονίδια της β -καζεΐνης του αγελαδινού γάλακτος

Από τις διαφορετικές μορφές των β -καζεϊνών ο πολυμορφισμός A είναι ο κυρίαρχος. Έχουν ανιχνευτεί αρκετές παραλλαγές οι οποίες φαίνονται στον πίνακα 7.

Υπάρχουν 13 διαφορετικοί πολυμορφισμοί, ανάλογα με τη φυλή, οι οποίοι είναι οι: A1, A2, A3, B, C, D, E, F, H1, H2, I, G. Υπάρχει και άλλος ένας πολυμορφισμός ο A4 ο οποίος ανιχνεύτηκε σε αγελάδες στη Νότια Κορέα αλλά η αντικατάσταση νουκλεοτιδίων δεν έχει ακόμη επιβεβαιωθεί (Kaminski et al., 2007).

Πίνακας 7. Θέσεις και αλλαγές των αμινοξέων στο μόριο της β-καζεΐνης αναλόγως του πολυμορφισμού (Kaminski et al, 2007).

Beta-casein variants	Change in amino acid sequence													
	18	25	35	36	37	67	72	88	93	106	117	122	137	138
A2	Ser-P	Arg	Ser-P	Glu	Glu	Pro	Glu	Leu	Gln	His	Gln	Ser	Leu	Pro
A1						His								
A3										Gln				
B						His						Arg		
C			Ser		Lys	His								
D	Lys													
E				Lys										
F						His								Leu
G						His						Leu		
H1		Cys						Ile						
H2							Glu			Leu				Glu
I										Leu				

Από όλες αυτές τις μορφές οι πιο διαδεδομένες στο αγελαδινό γάλα είναι η A1 και η A2 με λιγότερο συχνά την B ενώ η A3 και η C συναντιούνται σπάνια (Farell et al., 2004). Οι δυο πολυμορφισμοί A1 και A2 είναι πολύ διαδεδομένοι στις ευρωπαϊκές φυλές αγελάδων και κυρίως στις Holstein. Ο A1 πολυμορφισμός διαφέρει σε σχέση με τον A2 μόνο σε μια αμινομάδα στην 67^η θέση της πεπτιδικής αλυσίδας, με την αντικατάσταση της Ιστιδίνης με την Προλίνη (Bonsing et al. 1988, Elliot et al. 1999, McLachlan 2001). Η αναλογία του πολυμορφισμού στις αγελάδες καθορίζονται από ένα ζευγάρι γονιδίων στο χρωμόσωμα 6 (Rijnkels 2002). Οι αγελάδες μεταφέρουν δυο αντίγραφα του γονιδίου της β-καζεΐνης. Μπορεί να είναι A2A2 ή A1A1 (ομοζυγωτικά) ή A1A2 (ετεροζυγωτικά). Κανένα από τα δύο μέρη δεν είναι κυρίαρχο σε σχέση με το άλλο, αλλά λειτουργούν αναλογικά και αθροιστικά το ένα με το άλλο. Κατά συνέπεια μια αγελάδα A1A2 θα παράξει A1 και A2 β-καζεΐνες σε ίσες ποσότητες ενώ κατά αντιστοιχία μια αγελάδα A1A1 θα παράξει μόνο A1 β-καζεΐνες. Στις βόρειες ευρωπαϊκές φυλές όπως είναι οι Holstein κυριαρχούν οι A1 και A2 αλληλουχίες (Boro et al., 2016).

Στο λεπτό έντερο του ανθρώπινου οργανισμού, η πέψη του γάλακτος που περιέχει A1 β-καζεΐνη, απελευθερώνει ένα βιοενεργό πεπτίδιο 7 αμινοξέων που ονομάζεται beta-casomorphin 7 (BCM-7), ενώ η προλίνη στο γάλα A2 στη θέση 67 αποτρέπει τη διάσπαση σε αυτή τη συγκεκριμένη θέση και δημιουργεί πεπτίδιο BCM-9 (Roginski 2003, Kostya et al. 2004). Πιστεύεται ότι η BCM-7 είναι ο κύριος παράγοντας που προκαλεί διαταραχές υγείας που σχετίζονται με το γάλα A1. Ωστόσο, η A2 β-καζεΐνη δεν συνδέθηκε με κανένα από αυτά (Kaminski et al., 2007).

1.5 Η φυλή Holstein-Friesian

Η φυλή Holstein κατάγεται από την Ευρώπη. Η κύρια ιστορική εξέλιξή της έλαβε χώρα σε δύο βόρειες περιοχές της σημερινής Ολλανδίας (The Netherlands), τη Βόρεια Ολλανδία (North Holland) και τη Φριςλανδία (Friesland) όπου επιλέγονταν επί αιώνες με στόχο την υψηλή γαλακτοπαραγωγή.

Η εξέλιξη της φυλής συνεχίστηκε στον Νέο Κόσμο, όπου η πρώτη ασπρόμαυρη αγελάδα αφίχθηκε στη Βοστώνη, περίπου στα 1850, με ένα Ολλανδικό ιστιοφόρο. Ακολούθησαν και άλλες εισαγωγές ζώων από την Ολλανδία αλλά οι παραγωγοί των ΗΠΑ διέκοψαν ήδη από το τέλος του προ-προηγούμενου αιώνα τις μαζικές εισαγωγές, ίδρυσαν Ένωση Παραγωγών με δικό τους γενεαλογικό βιβλίο και επιλέγοντας ζώα με υψηλές αποδόσεις διαμόρφωσαν την δική τους φυλή στην οποία έδωσαν το όνομα Holstein. Σήμερα, το όνομα αυτό χρησιμοποιείται σε όλες τις χώρες, παράλληλα όμως χρησιμοποιείται και το όνομα Friesian ή ασπρόμαυρη (-κόκκινη) φυλή.

Οι αγελάδες Holstein αναγνωρίζονται αμέσως από τον χρωματισμό τους που είναι κυρίως ασπρόμαυρος ενώ υπάρχουν και ζώα ασπροκόκκινα, τα οποία μπορούν να προκύψουν ως απόγονοι ασπρόμαυρων εξαιτίας της παρουσίας και στους δύο γονείς

ενός υποτελούς γονιδίου που δίνει αυτόν τον χρωματισμό μόνο σε ομοζύγωτη κατάσταση. Στην Ελλάδα, ασπροκόκκινες αγελάδες εκτρέφονται μέσα σε αγέλες με ασπρόμαυρα ζώα ενώ στο εξωτερικό υπάρχουν αγέλες με αποκλειστικά ασπροκόκκινα ζώα, όπου εκτιμώνται για τη μεγαλύτερη γενικά ανθεκτικότητά τους με θυσία όμως των υψηλών αποδόσεων.

Η φυλή Holstein κέρδισε την προτίμηση των παραγωγών για την υψηλή της γαλακτοπαραγωγή που είναι, κατά μέσον όρο, ανώτερη από κάθε άλλη φυλή αγελάδων αλλά με σχετικά μικρότερη περιεκτικότητα του γάλακτός της σε λίπος. Μεταξύ των γαλακτοπαραγωγικών φυλών δίνει επίσης ικανοποιητική απόδοση σε κρέας μόσχων και ενήλικων ζώων.

Σύμφωνα με τα στοιχεία της Ένωσης Φυλής Holstein Ελλάδας, οι αγελάδες στη χώρα μας παράγουν κατά μέσον όρο 8.510 kg γάλακτος σε 305 ημέρες. Η περιεκτικότητα σε λίπος, πρωτεΐνη και λακτόζη είναι 3,83%, 3,32% και 4,89% αντίστοιχα και ο μέσος αριθμός σωματικών κυττάρων είναι 396.000. Η ηλικία πρώτου τοκετού είναι 27,6 μήνες (2,3) έτη, η ηλικία απομάκρυνσης 54,6 μήνες (4,6 έτη), ο αριθμός των γαλακτικών περιόδων μέχρι την απομάκρυνση 2,9 έτη, η διάρκεια της παραγωγικής ζωής 27 μήνες (2,3 έτη), το μεσοδιάστημα τοκετών 451 ημέρες και το διάστημα ανοικτών ημερών (από τον τοκετό μέχρι τη σύλληψη) 159 ημέρες (Ένωση Φυλής Holstein Ελλάδος).

Οι αποδόσεις αυτές είναι απόλυτα συγκρίσιμες με τις αντίστοιχες αποδόσεις κτηνοτροφικά προηγμένων χωρών. Η μέση γαλακτοπαραγωγή του συνολικού πληθυσμού στις Ηνωμένες Πολιτείες είναι 10.158 kg με 3,64% περιεκτικότητα λίπους και 3,05% πρωτεΐνης ενώ ο αριθμός των γαλακτικών περιόδων μέχρι την απομάκρυνση είναι 2,75. Είναι η πιο διαδεδομένη φυλή στις ΗΠΑ, τον Καναδά, την Αυστραλία, την

Νότια Αμερική και τη Νότια Αφρική και σε πολλές χώρες της Ευρώπης, με συνολικό πληθυσμό πολλών δεκάδων εκατομμυρίων (Paulson et al., 2015).

1.6 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανίχνευση των αλληλομόρφων και η συχνότητα του πολυμορφισμού των γενοτύπων του εξωνίου 7 του γονιδίου CSN2, το οποίο κωδικοποιεί για την β-καζεΐνη, σε δείγματα ελληνικών αγελάδων Holstein. Τέλος, να συγκριθούν τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας με άλλες έρευνες στις οποίες έχει εφαρμοστεί παρόμοια προσέγγιση.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Απομόνωση DNA

Αρχικά, για τον εντοπισμό του πολυμορφισμού του γονιδίου της β-καζεΐνης έγινε απομόνωση του DNA από δείγματα αίματος αγελάδων, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Budowle (1990). Συνολικά απομονώθηκε DNA από 75 δείγματα της φυλής αγελάδων Holstein.

Η απομόνωση του DNA έγινε ως εξής:

- Μεταφορά 1ml δείγματος αίματος σε eppendorf των 2ml
- Προσθήκη 1ml ρυθμιστικού διαλύματος SSC 1x, ανάδευση σε vortex και φυγοκέντρηση για 3min στις 13,000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου
- Απομάκρυνση του υπερκειμένου και προσθήκη 0,6ml οξικού νατρίου 0,2M, 50μl SDS 10%, 15μl διαλύματος πρωτεΐνάσης K (10mg/ml) και επώαση στους 55 °C υπό ανάδευση για 2 ώρες
- Προσθήκη 1ml φαινόλης, ανάδευση σε vortex και φυγοκέντρηση για 10min στις 13,000 rpm στους 4°C
- Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέα eppendorf
- Προσθήκη 1ml χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1), ανάδευση σε vortex και φυγοκέντρηση για 5min στις 13,000 rpm στους 4°C
- Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέα eppendorf
- Προσθήκη 1ml ισοπροπανόλης, επώαση για 20min στους -20°C και φυγοκέντρηση για 20min στις 13,000rpm στους 4°C, ώστε να γίνει κατακρήμνιση του DNA

- Αφαίρεση του υπερκλειμένου, προσθήκη 1ml αιθανόλης 70% και φυγοκέντρωση για 5min στις 13,000rpm στους 4°C
- Απόρριψη του υπερκλειμένου και επώαση στους 50°C ώστε να εξατμιστεί πλήρως η αιθανόλη
- Διαλυτοποίηση του ιζήματος σε 100μl ddH₂O και αποθήκευση του δείγματος DNA στους -20°C.

2.2 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια απλή και γρήγορη τεχνική. Χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό μακρομορίων με βάση το ηλεκτρικό φορτίο των μορίων και το μοριακό τους βάρος μετά από εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου σε κατάλληλη πηκτή. Επομένως, είναι εύκολος ο διαχωρισμός δύο ή και περισσότερων τμημάτων DNA διαφορετικού μεγέθους.

Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας απομόνωσης των δειγμάτων DNA ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου ώστε να καθοριστεί η ποσότητα του DNA των δειγμάτων που θα υποβληθεί σε PCR.

Για την δημιουργία της πηκτής αγαρόζης χρησιμοποιήθηκαν τα κάτωθι:

- Buffer TAE 1x: 40ml
- Αγαρόζη: 0,4gr
- Βρωμιούχο αιθίδιο: 4μl

Αρχικά παρασκευάστηκε διάλυμα TAE 1x με αραιώση του πυκνού διαλύματος 50x. Κατόπιν, για την προετοιμασία της πηκτής χρησιμοποιήθηκαν 0,4gr αγαρόζης και

40ml TAE 1x για την παρασκευή διαλύματος 1%. Αφού το διάλυμα ομογενοποιήθηκε με θέρμανση προστέθηκαν 4μl βρωμιούχου αιθιδίου. Το διάλυμα τοποθετήθηκε στο εκμαγείο και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν και τα κατάλληλα χτενάκια για τον σχηματισμό των θέσεων, στις οποίες θα τοποθετηθεί το DNA. Μετά την σταθεροποίηση της πηκτής τα χτενάκια αφαιρέθηκαν και η πηκτή τοποθετήθηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, όπου προστέθηκαν TAE 1x, έως ότου καλυφθεί. Στη συνέχεια, ακολούθησε η προετοιμασία των δειγμάτων DNA. Αναμίχθηκαν 3μl loading buffer με 5μl DNA, τοποθετήθηκαν στις θέσεις της πηκτής και ακολούθησε η φόρτωση της συσκευής με την ανάλογη τάση ρεύματος 100Volt σε θερμοκρασία 25°C. Με το πέρασμα του χρόνου οι ζώνες του DNA είναι εμφανείς στην πηκτή. Για την καλύτερη οπτικοποίηση των τμημάτων του DNA η πηκτή τοποθετείται σε UV. Τα δείγματα που δίνουν θετικό αποτέλεσμα (ανίχνευση ζωνών) χρησιμοποιούνται για ανάλυση SSCP.

2.3 Ενίσχυση τμήματος DNA με την τεχνική PCR

Η τεχνική PCR εξασφαλίζει την παραγωγή πολλών αντιγράφων ενός αρχικού τμήματος DNA. Για να γίνει ανάλυση των μεταλλάξεων ή των πολυμορφισμών σε μοριακό επίπεδο, είναι απαραίτητος μεγάλος αριθμός αντιγράφων του υπό μελέτη τμήματος. Η PCR είναι μια πολύ γρήγορη και οικονομική τεχνική που χρησιμοποιείται για να πολλαπλασιάσει με ακρίβεια μικρά τμήματα του DNA. Απαραίτητη προϋπόθεση για την εφαρμογή της είναι να γνωρίζουμε την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων εκατέρωθεν του τμήματος του DNA που θέλουμε να αντιγράψουμε. Οι αλληλουχίες αυτές χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση δύο συμπληρωματικών ολιγονουκλεοτιδίων-εκκινητών (primers) που θα αποτελέσουν τα πρωταρχικά τμήματα για το σχηματισμό συμπληρωματικών τμημάτων DNA.

Για την ενίσχυση του γονιδίου CSN2 χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλοι εκκινητές

δημιουργώντας το πρωτόκολλο PCR που περιγράφεται στη συνέχεια. Η αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμήματος του εξωνίου 7 της β-καζεΐνης παρουσιάζονται στον πίνακα 8.

Πίνακας 8. Εκκινητές ενίσχυσης τμήματος του εξωνίου 7 της β-καζεΐνης

Εκκινητής	Αλληλουχία
CSN2.ex7.sm.fw	5'-CCTTCTTTCCAGGATGAACTCC-3'
CSN2.ex7.sm.rv	3'-TGTGCTTAGGAGCCATAGCC-5

Τα συστατικά της αντίδρασης PCR φαίνονται στον πίνακα 9.

Πίνακας 9. Συστατικά αντίδρασης PCR

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
DNA	~ 200ng
Buffer 10x	5μl
MgCl ₂ (2mM)	4μl
dNTPs (10mM each)	1μl
Primer Fw (50pmol/μl)	0,8μl
Primer Rw (50pmol/μl)	0,8μl
Taq DNA 5U/μl	0,3μl
ddH ₂ O	έως τα 50μl

Ένας πλήρης κύκλος μιας PCR αντίδρασης περιλαμβάνει τρία στάδια:

- Αποδιάταξη του DNA
- Υβριδοποίηση των εκκινητών στο DNA εκμαγείο
- Επιμήκυνση των εκκινητών

Η ενίσχυση τμήματος της αντίδρασης PCR πραγματοποιήθηκε σε έναν θερμοκυκλοποιητή ξεκινώντας από τους 95°C για 5 λεπτά ώστε να γίνει η αρχική

αποδιάταξη των κλώνων. Κατόπιν, ακολούθησαν 34 κύκλοι ως εξής: αποδιάταξη στους 95°C για 40 δευτερόλεπτα, θερμική επαναδιάταξη στους 53°C για 40 δευτερόλεπτα και επιμήκυνση στους 72°C για 40 δευτερόλεπτα. Τέλος, έγινε η τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10 λεπτά.

Στη συνέχεια, για να ελεγχθεί η επιτυχία της διαδικασίας τα προϊόντα PCR υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης 2% w/v.

2.4 Ανάλυση SSCP

Η ανάλυση SSCP είναι απλή, οικονομική και μπορεί να ανιχνεύσει μεταλλάξεις και πολυμορφισμούς, χρησιμοποιώντας μία μόνο αντίδραση PCR (Sunnucks et al., 2000). Η PCR χρησιμοποιείται για την ενίσχυση της περιοχής ενδιαφέροντος. Κατά την ανάλυση, τα τμήματα DNA διαχωρίζονται ως μονόκλιωνα μόρια με ηλεκτροφόρηση σε μη αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμιδίου (Orita et al, 1989). Η κάθε αλυσίδα του μονόκλωνου DNA διπλώνει διαφορετικά από την οποιαδήποτε άλλη αλυσίδα, ακόμη και εάν διαφέρουν ως προς μία μόνο βάση και οι δυο αλυσίδες οδηγούνται σε διαφορετικές κινητικότητες στο πήκτωμα. Αυτές οι διαμορφώσεις εξαρτώνται από το μήκος του κλώνου και την αλληλουχία του. Ως εκ τούτου, μια μετάλλαξη σε μια συγκεκριμένη θέση νουκλεοτιδίου στην πρωτογενή αλληλουχία μπορεί να μεταβάλει τη διαμόρφωση του μορίου (Gasser et al., 2007). Αυτές οι μεταλλάξεις ανιχνεύονται ως εμφάνιση διαφορετικών ζωνών στο πήκτωμα.

Η ανάλυση SSCP πραγματοποιείται σε 3 στάδια:

- Αποδιάταξη των προϊόντων της PCR
- Ηλεκτροφόρηση σε πολυακρυλαμίδη
- Χρώση για ανάδειξη των αποτελεσμάτων

Gel πολυακρυλαμίδης

Για την παρασκευή της πηκτής πολυακρυλαμίδης χρησιμοποιήθηκαν 5gr ακρυλαμίδα, 0,12gr Bis-Ακρυλαμίδα, 6ml Γλυκερόλης 50%, 5ml TBE 10x και 50ml απεσταγμένου νερού. Στη συνέχεια το διάλυμα διηθήθηκε και ακολούθησε η προσθήκη απεσταγμένου νερού έως ότου ο τελικός όγκος να φτάσει τα 63ml. Κατόπιν της καλής ανάδευσης, στο διάλυμα προστέθηκαν 63μl TEMED και 400μl APS 20% και τοποθετήθηκε σε κατάλληλο καλούπι.

Αποδιάταξη

Σε νέα Eppendorf τοποθετήθηκαν 7μl προϊόντος PCR, και 10μl Loading Buffer, για την αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων. Επιλέγοντας το κατάλληλο πρόγραμμα (θέρμανση για 10 λεπτά στους 95°C) ακολούθησε η αποδιάταξη στη συσκευή PCR. Με την ολοκλήρωση της αποδιάταξης τα δείγματα τοποθετήθηκαν απ' ευθείας σε πάγο για την αποφυγή της επαναδιάταξης των δύο κλώνων DNA.

Ηλεκτροφόρηση

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης, σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10% και συμπληρώθηκε επαρκής όγκος διαλύματος TBE 0,5x. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 200V για 19-20 ώρες, σε θερμοκρασία δωματίου.

Χρώση με νιτρικό άργυρο

Με την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης ακολούθησε η χρώση των gel. Αρχικά το gel αφαιρέθηκε από τη συσκευή και τοποθετήθηκε σε διάφανη πλαστική μεμβράνη η οποία τοποθετήθηκε σε συσκευή ανάδευσης και ακολούθησαν διαδοχικές πλύσεις.

Το πρώτο διάλυμα αποτελούνταν από 400ml απεσταγμένου νερού και 0,5ml οξικού οξέος. Με το συγκεκριμένο διάλυμα πραγματοποιήθηκαν δύο διαδοχικές πλύσεις διάρκειας τριών λεπτών η καθεμία. Στη συνέχεια ακολούθησε πλύση με διάλυμα 200ml νιτρικού αργύρου (1g AgNO₃ /1lt H₂O) για δέκα λεπτά και τέλος δυο πλύσεις με απεσταγμένο νερό. Κατόπιν, έγινε πλύση των πηκτών με διάλυμα χρώσης το οποίο αποτελούνταν από: 3g NaOH, 0,01g NaBH₄, 1ml φορμαλδεΰδης και 200ml νερό, έως ότου γίνουν εμφανείς όλες οι ζώνες ηλεκτροφόρησης. Τέλος, έγινε πλύση με νερό.

2.5 Αλληλούχιση προϊόντων PCR

Η ανάλυση SSCP μας δείχνει διαφορές σε ηλεκτροφορητικά πρότυπα και όχι την ακριβή μεταλλαγή που τα προκάλεσε. Για αυτό τον λόγο είναι απαραίτητη η αλληλούχιση των PCR προϊόντων. Με τη βοήθεια του κιτ καθαρισμού DNA (Gel & PCR clean-up, Macherey-Nagel) έγινε καθαρισμός των PCR προϊόντων από τυχόν υπολείμματα των αντιδραστηρίων της PCR και στη συνέχεια τα δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχιση σε εξωτερικό εργαστήριο.

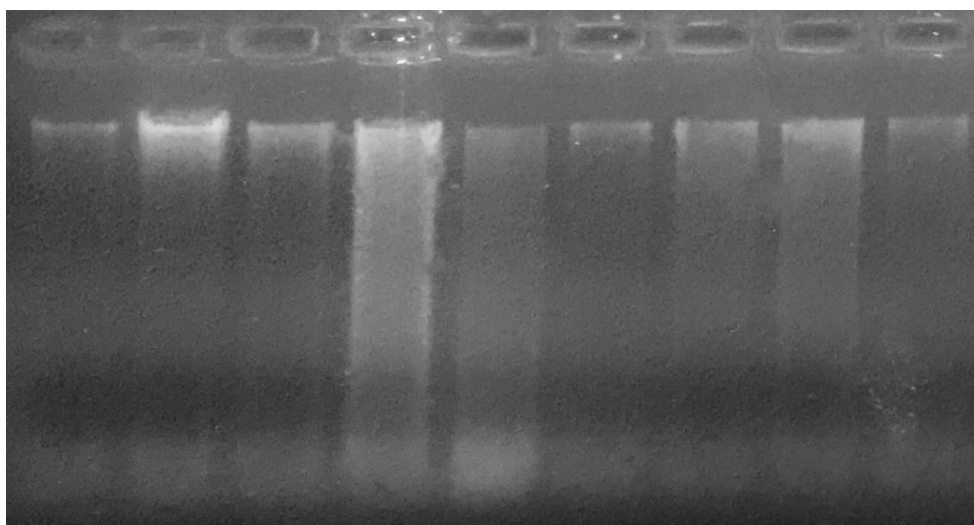
Μετά την εμφάνιση των ζωνών στο πήκτωμα, ακολούθησε σύγκριση των προτύπων των διαφορετικών ατόμων, ώστε να γίνει προσδιορισμός των ατόμων που φέρουν κοινά πρότυπα και αυτών που διαφέρουν μεταξύ τους. Κατόπιν της ομαδοποίησης των ατόμων, επιλέχθηκαν 2 αντιπροσωπευτικά άτομα από κάθε πρότυπο, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας κάθε ομάδας.

Τα αποτελέσματα λήφθηκαν με τη μορφή χρωματογραφήματος, μέσω του οποίου μπορούν να εξαχθούν οι επιθυμητές αλληλουχίες των διαφορετικών προτύπων SSCP που επιλέχθηκαν.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Απομόνωση DNA

Η απομόνωση του DNA παρείχε καλής ποιότητας δείγματα, με τιμές συγκέντρωσης κατά μέσο όρο 200ng/μl. Για τον έλεγχο των δειγμάτων ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου. Ενδεικτικά, αποτελέσματα που προέκυψαν από την ηλεκτροφόρηση 9 δειγμάτων, παρουσιάζονται στην εικόνα 3. Οι δυο ζώνες που εμφανίστηκαν αποτελούν το πυρηνικό και το μιτοχονδριακό DNA. Το πυρηνικό DNA βρίσκεται στην ζώνη η οποία εντοπίζεται στο πηγάδι της πηκτής και το μιτοχονδριακό εμφανίζεται στη δεύτερη ζώνη η οποία εντοπίζεται χαμηλότερα.

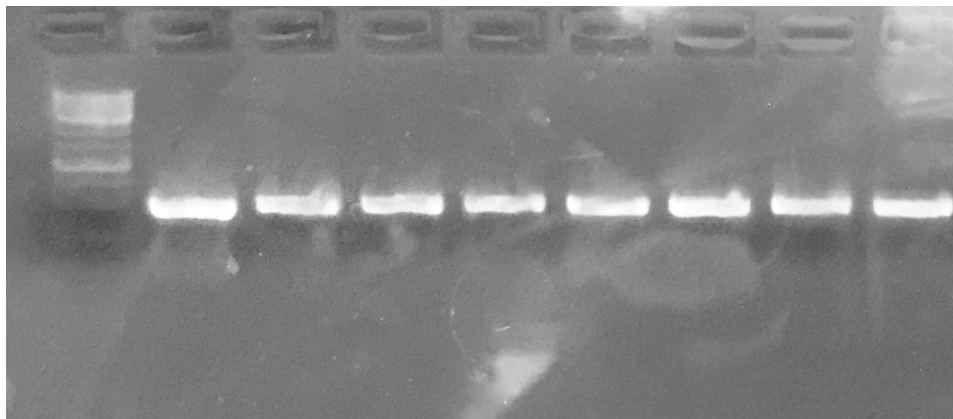


Εικόνα 3. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου 9 δειγμάτων της φυλής Holstein.

3.2 Ενίσχυση τμήματος DNA με την τεχνική PCR

Η ενίσχυση του εξωνίου 7 της β-καζεΐνης πραγματοποιήθηκε με τους εκκινητές του πίνακα 8. Για τον έλεγχο της επιτυχίας της μεθόδου τα προϊόντα PCR υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης 2% w/v, ώστε να ευνοηθεί ο διαχωρισμός μικρών

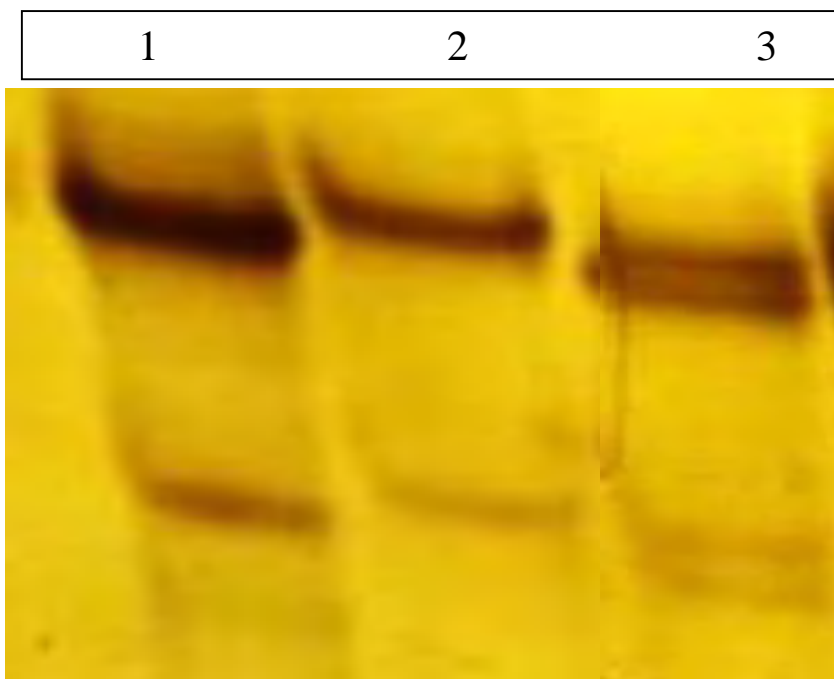
μορίων. Κατά την ηλεκτροφόρηση, πέραν των προϊόντων PCR προστέθηκε και ένας μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους (ladder), ώστε να υπολογιστεί το τμήμα που ενισχύθηκε (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πηκτή αгарόζης 2% w/v με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου

3.3 Ανάλυση SSCP

Τα ενισχυμένα τμήματα PCR αποδιατάχθηκαν και ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10% στα 200V για 19-20 ώρες. Στην ανάλυση SSCP τα τμήματα DNA διαχωρίζονται ως μονόκλιωνα μόρια με ηλεκτροφόρηση στην πηκτή πολυακρυλαμίδιου. Για τον λόγο αυτό τα ομόζυγα άτομα εμφανίζονται στην πηκτή με δυο ζώνες και τα ετερόζυγα με τέσσερις ζώνες. Από την ανάλυση SSCP, για το σύνολο των δειγμάτων, προέκυψαν τρία διαφορετικά πρότυπα ηλεκτροφόρησης, δύο ομόζυγα και ένα ετερόζυγο πρότυπο, που προκύπτει από την ετεροζυγωτία των 2 πρώτων. Ενδεικτική απεικόνιση των τριών προτύπων παρουσιάζεται στην εικόνα 5.



Εικόνα 5. Αποτελέσματα ανάλυσης SSCP . Τα πρότυπα 1 και 2 είναι ομόζυγα και το πρότυπο 3, ετερόζυγο

Για την ταυτοποίηση των αλληλομόρφων ακολούθησε η αλληλούχιση των δειγμάτων.

3.4 Αλληλούχιση προϊόντων PCR

Η αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε με τους δύο εκκινητές που επιλέχθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου 7 της β-καζεΐνης. Επομένως, προέκυψαν δυο αλληλουχίες βάσεων, μια για τον εκκινητή της μεταγραφόμενης και μια για τον εκκινητή της συμπληρωματικής αλυσίδας. Τα χρωματογραφήματα των ακολουθιών αναλύθηκαν με το πρόγραμμα BioEdit και οι αλληλουχίες στοιχήθηκαν με τον αλγόριθμο ClustalX ώστε να βρεθούν τα τελικά αποτελέσματα για την αλληλούχιση του κάθε δείγματος.

Οι αλληλουχίες που προέκυψαν από τα τρία διαφορετικά πρότυπα SSCP, αντιστοιχούν σε τρεις διαφορετικούς γενότυπους (A1, A2, A1/A2) οι οποίοι προέρχονται από δύο διαφορετικά αλληλόμορφα. Τα αλληλόμορφα A1 και A2 που

προέκυψαν μετά την αλληλούχιση αντιστοιχούν σε αλληλουχίες ομοζυγωτικών ατόμων και ο γενότυπος A1/A2 σε αλληλουχίες ετεροζυγωτικών ατόμων, που προκύπτουν από τις δύο ομόζυγες αλληλουχίες, A1 και A2.

Οι πολυμορφισμοί που προέκυψαν παρουσιάζονται στο κίτρινο πλαίσιο της εικόνας 6, στην 86^η θέση. Υπογραμμισμένες είναι οι αλληλουχίες των εκκινήτων και με μικρά γράμματα απεικονίζεται το τμήμα του πρόσθιου εκκινήτη που είναι συμπληρωματικό με τμήμα εσωνίου. Συνεπώς, ο A1 πολυμορφισμός διαφέρει σε σχέση με τον A2 μόνο σε μια αμινομάδα στην 67^η θέση της πεπτιδικής αλυσίδας, με την αντικατάσταση της Ιστιδίνης (CAT) με την Προλίνη (CCT).

```

A1 ccttctttccagGATGAACTCCAGGATAAAAATCCACCCTTTGCCAGACACAGTCTCTAGTCTATCCCTTCCCTGGGCCCATCCAAACAGCCTCCCAC
A1/A2 ccttctttccagGGATGAACTCCAGGATAAAAATCCACCCTTTGCCAGACACAGTCTCTAGTCTATCCCTTCCCTGGGCCCATCCAAACAGCCTCCCAC
A2 ccttctttccagGGATGAACTCCAGGATAAAAATCCACCCTTTGCCAGACACAGTCTCTAGTCTATCCCTTCCCTGGGCCCATCCAAACAGCCTCCCAC

A1 AAAACATCCCTCCTCTTACTCAAACCCCTGTGGTGGTGCCGCCTTTCCTTCAGCCTGAAGTAATGGGAGTCTCCAAAAGTGAAGGAGGCTATGGCTCCTAA
A1/A2 AAAACATCCCTCCTCTTACTCAAACCCCTGTGGTGGTGCCGCCTTTCCTTCAGCCTGAAGTAATGGGAGTCTCCAAAAGTGAAGGAGGCTATGGCTCCTAA
A2 AAAACATCCCTCCTCTTACTCAAACCCCTGTGGTGGTGCCGCCTTTCCTTCAGCCTGAAGTAATGGGAGTCTCCAAAAGTGAAGGAGGCTATGGCTCCTAA

A1 GCACA
A1/A2 GCACA
A2 GCACA

```

76 aa

```

A1 PSFQDELQDKIHPFAQTQSLVYFPFGPIHNSLPQNIPLLTQTPTVVVPPFLQPEVMGVSKVKEAMAPKH
A2 PSFQDELQDKIHPFAQTQSLVYFPFGPIPNNSLPQNIPLLTQTPTVVVPPFLQPEVMGVSKVKEAMAPKH

```

Εικόνα 6. Η κωδική αλληλουχία του εξωνίου 7.

Για το σύνολο των 75 δειγμάτων, προέκυψε ότι, το 42,6% των δειγμάτων ακολούθησαν το γενότυπο A1/A2, το 33,4% το γενότυπο A2 και το 24% το γενότυπο A1. Στον πίνακα 10 παρουσιάζονται οι συχνότητες γενοτύπων και πολυμορφισμών του εξωνίου 7 της CSN2.

Πίνακας 10. Συχνότητες γενοτύπων και πολυμορφισμών CSN2

Πολυμορφισμοί του εξωνίου 7				
Γενότυποι	Αριθμός Δειγμάτων	Συχνότητα Γενότυπου	Πολυμορφισμός	Συχνότητα πολυμορφισμού
A1A1	18	0,24	A ¹	0,453
A1A2	32	0,426	A ²	0,547
A2A2	25	0,334		

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων έγινε σύγκριση και στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης, με παρόμοιες μελέτες πάνω στους πολυμορφισμούς της β-καζεΐνης σε αγελάδες της φυλής Holstein.

Αρκετές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για τον πολυμορφισμό της β-καζεΐνης σε αγελάδες. Για παράδειγμα, οι Kaminski et al. (2007) κάνανε μια διεξοδική ανάλυση του πολυμορφισμού των β-καζεϊνών σε αγελάδες της φυλής Holstein διαφορετικών χωρών. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν ήταν ότι ο A^2 πολυμορφισμός υπερίσχυε του A^1 και παρουσίαζε μεγάλη απόκλιση από τον B, στο σύνολο των χωρών. Από το σύνολο των αποτελεσμάτων, η μεγαλύτερη συχνότητα πολυμορφισμού του A^2 εμφανίστηκε στην Πολωνία παρουσιάζοντας μεγάλη απόκλιση από την A^1 (Kaminski et al., 2007). Αναλυτικότερα τα αποτελέσματα της έρευνας παρουσιάζονται στον πίνακα 11.

Πίνακας 11: Πολυμορφισμοί β-καζεΐνης στη φυλή Holstein - Friesian διαφόρων χωρών (Kaminski et al., 2007)

Χώρα	Αριθμός Δειγμάτων	B	A ¹	A ²
Αμερική	526	0,010-0,060	0,310-0,660	0,240-0,620
Αμερική	6000	0,010-0,040	0,310-0,490	0,490-0,620
Ουγγαρία	768	0,107	0,418	0,47
Γερμανία	229	0,026	0,472	0,496
Πολωνία	143		0,402	0,598
Νέα Ζηλανδία	3761		0,465	0,510
Νορβηγία	306	0,010	0,400	0,490

Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και από την μελέτη των Olenski et al. (2011), η οποία διεξάχθηκε στην Πολωνία μέσω της ανάλυσης του εξωνίου 7 για διαφορετικές αλληλουχίες σε αγελάδες της φυλής Holstein. Και σε αυτή την έρευνα ο πολυμορφισμός A² εμφανίστηκε σε ποσοστό 67% έναντι του πολυμορφισμού A¹ (Πίνακας 12) (Olenski et al., 2011).

Επιπλέον, το αλληλόμορφο A2 εμφάνιζε μεγαλύτερο ποσοστό σε σχέση με αυτό των υπολοίπων πολυμορφισμών και σε μελέτη που έγινε για τις αγελάδες Holstein στη Νοτιοδυτική Γερμανία (Cardak, 2005).

Πίνακας 12. Πολυμορφισμοί του εξωνίου 7 (Olenski et al., 2011).

Γενότυποι	Αριθμός Δειγμάτων	Συχνότητα Γενοτύπου	Πολυμορφισμός	Συχνότητα Πολυμορφισμού
A1A1	79	0,122	A ¹	0,33
A1A2	277	0,436	A ²	0,67
A2A2	294	0,452		

Συνεπώς, τα παραπάνω αποτελέσματα των ερευνών, παρόλες τις μικρές αποκλίσεις, παρουσιάζουν μια όμοια εικόνα όσον αφορά στους πολυμορφισμούς της φυλής Holstein και συμπίπτουν με τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας.

Ωστόσο, αρκετές έρευνες έχουν εμφανίσει διαφορετικά αποτελέσματα. Οι Hanusova et al. (2010) σε έρευνα τους σε αγελάδες και σε ταύρους της φυλής Holstein στη Σλοβακία, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ο πολυμορφισμός A¹ παρατηρήθηκε περίπου κατά 13% σε υψηλότερη συχνότητα έναντι του A² στις αγελάδες (Πίνακας 13) και αντίστοιχα κατά 20% στους ταύρους (Πίνακας 14) (Hanusova et al., 2010). Οι Manga et al. (2006) δείχνουν μια πολύ μικρότερη συχνότητα εμφάνισης του πολυμορφισμού A¹ σε αγελάδες Holstein της Τσεχίας (Manga et al., 2006). Επίσης, σε

δείγμα 6460 αγελάδων στο Κεμπέκ του Καναδά οι Ng-Kwai-Hang et al. (1992) παρατήρησαν μια ισορροπία μεταξύ των δυο πιο διαδεδομένων πολυμορφισμών A¹ και A² (Hang et al., 1992).

Πίνακας 13. Συχνότητα εμφάνισης γενοτύπων σε αγελάδες Holstein (Hanusova et al., 2010).

Γενότυποι	Αριθμός Δειγμάτων	Συχνότητα Γενοτύπου	Πολυμορφισμός	Συχνότητα Πολυμορφισμού
A1A1	12	0,130	A ¹	0,545
A1A2	76	0,830	A ²	0,419
A2A2	4	0,040		

Πίνακας 14. Συχνότητα εμφάνισης γενοτύπων σε ταύρους Holstein (Hanusova et al., 2010)

Γενότυποι	Αριθμός Δειγμάτων	Συχνότητα Γενοτύπου	Πολυμορφισμός	Συχνότητα Πολυμορφισμού
A1A1	1	0,2	A ¹	0,6
A1A2	4	0,8	A ²	0,4
A2A2	0	0,0		

Προκειμένου να έχουμε μια ολοκληρωμένη εικόνα για τον πολυμορφισμό, ήταν σημαντικό να γίνει συσχέτιση της φυλής Holstein σε σχέση με άλλες φυλές. Οι Ramesha et al. (2016) μελέτησαν 9 διαφορετικές φυλές αγελάδων. Το συμπέρασμα που προέκυψε ήταν ότι ο πολυμορφισμός A2 υπερίσχυε με μεγάλη διαφορά έναντι του A1, στο σύνολο όλων των φυλών. Μάλιστα, οι 4 από τις 9 φυλές που μελετήθηκαν δεν εμφάνισαν καθόλου τον πολυμορφισμό A¹ (Πίνακας 15) (Ramesha et al., 2016). Αντίστοιχα, ο A¹ πολυμορφισμός βρέθηκε να είναι απών σε αγελάδες φυλών με προέλευση από Ασία, Αφρική και Ινδία (Ng-Kwai-Hang & Grosclaude, 2002). Επίσης, στη σλαβική φυλή Pinqau αναφέρθηκαν υψηλές συχνότητες του αλληλομόρφου A2

από τους Hanusova et al. (2009) και τους Miluchova et al. (2009). Παρόμοια, υψηλότερες συχνότητες του αλληλομόρφου A2 βρέθηκε στις αγελάδες Simmentaler από τη Νοτιοδυτική Γερμανία (Cardak, 2005).

Πίνακας 15. Συχνότητα εμφάνισης πολυμορφισμού σε διαφορετικές φυλές αγελάδων (Ramesha et al., 2016).

Φυλή	Αριθμός Δειγμάτων	Συχνότητα Γενότυπου			Συχνότητα Πολυμορφισμού	
		A1A1	A1A2	A2A2	A ¹	A ²
Malnat Gida	104	0.000	0.029	0.971	0.014	0.986
Deoni	40	0.000	0.000	1.000	0.000	1.000
HF	59	0.000	0.338	0.662	0.169	0.831
HF crossbred	17	0.000	0.588	0.412	0.294	0.706
Jersey	39	0.000	0.153	0.847	0.077	0.923
Kasargod	48	0.000	0.083	0.917	0.042	0.958
Khillar	12	0.000	0.000	1.000	0.000	1.000
Murrah(B)	47	0.000	0.000	1.000	0.000	1.000
Surti(B)	25	0.000	0.000	1.000	0.000	1.000

Ενώ λοιπόν στις υπόλοιπες φυλές αγελάδων κατά κύριο λόγο υπάρχει κυριαρχία του πολυμορφισμού A2, στις φυλές Holstein υπάρχουν πολλά δεδομένα διαφορετικά μεταξύ τους τα οποία δε δίνουν καθαρή εικόνα πάρα μόνο ότι υπάρχει μια σαφώς αυξημένη συχνότητα εμφάνισης του πολυμορφισμού A1, κάτι το οποίο δεν προέκυψε από την υπάρχουσα μελέτη.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι πολυμορφισμοί της β-καζεΐνης σε αγελάδες της φυλής Holstein-Friesian παρουσιάζουν αρκετά σημαντικές διακυμάνσεις κυρίως όσον αφορά τους δυο κυριότερους πολυμορφισμούς A1 και A2.

Η δημιουργία της φυλής Holstein έγινε με καθαρό στόχο τη δημιουργία ενός ζώου με μεγάλη γαλακτοπαραγωγική ικανότητα. Σήμερα, με τη χρήση των μοριακών τεχνικών γίνεται προσδιορισμός των γονιδιακών τύπων των πρωτεϊνών του γάλακτος, με αποτέλεσμα τη χρησιμοποίηση των γενοτύπων των πρωτεϊνών του γάλακτος ως γενετικών δεικτών για την αύξηση της γαλακτοπαραγωγής και για την βελτιστοποίηση της σύνθεσης του γάλακτος. Τόσο το χαρακτηριστικό αυτό, όσο και η εντατικοποίηση της άμελξης, με την χαμηλή κινητικότητα των ζώων κυρίως και τον εγκλεισμό τους στο μεγαλύτερο χρόνο της ζωής τους, φαίνεται να έχουν επίδραση στα είδη και στη συχνότητα εμφάνισης των πολυμορφισμών.

Τα τελευταία χρόνια, που οι ποσότητες και οι ανάγκες σε γάλα συνεχώς αυξάνουν, αρχίζουν να γίνονται ανησυχητικοί συσχετισμοί μεταξύ των πολυμορφισμών των πρωτεϊνών του γάλακτος και της ανθρώπινης υγείας. Στο βωμό της υπερκατανάλωσης και της εντατικοποίησης πάντα θα υπάρχουν συνέπειες. Οι πολυμορφισμοί της β-καζεΐνης αποτελούν ένα πολύ σημαντικό παράγοντα και έχουν επίδραση στην ανθρώπινη υγεία. Η σύνθεση της β-καζεΐνης έχει μελετηθεί αρκετά όσον αφορά στη συσχέτιση της με προβλήματα της ανθρώπινης υγείας. Για παράδειγμα, έχει βρεθεί ότι οι πολυμορφισμοί A1 και B παράγουν ένα βιοενεργό πεπτίδιο, το οποίο ανήκει στην κατηγορία των οπιούχων την β-καζομορφίνη-7 (BCM-7), στο λεπτό έντερο κατά τη διαδικασία της πέψης υπεύθυνο για προβλήματα της ανθρώπινης υγείας όπως διαβήτη τύπου 1, αυτισμού, σχιζοφρένειας και καρδιακών παθήσεων. Αντίθετα, το γάλα με

πολυμορφισμό β-καζεΐνης A2 έχει βρεθεί ότι δεν προκαλεί παρόμοια προβλήματα στην ανθρώπινη υγεία (Woodford, 2007, Mishra et al., 2009, Sodhi et al., 2012). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως μερικές φυλές της Αφρικής όπως οι Masai (Ανατολική Αφρική) και οι Samburu (Βόρεια Κένυα) δεν έχουν καμία εμφάνιση καρδιακών νόσων παρόλο το ότι η διατροφή τους είναι πλούσια σε γάλα αγελάδων. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το γάλα που καταναλώνουν προέρχεται από αγελάδες της φυλής Zebu η οποία έχει αποκλειστικά τον πολυμορφισμό A² (McLachlan, 2001).

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αλλά και τις πολλαπλές έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί, μπορούμε να καταλήξουμε στο συμπέρασμα ότι οι πολυμορφισμοί της β-καζεΐνης της φυλής Holstein φέρουν ακόμη μεγάλες διακυμάνσεις, οι οποίες δεν έχουν ποσοτικοποιηθεί και δεν έχουν ερευνηθεί επαρκώς. Βέβαια, για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων θα πρέπει να γίνει πλήρης χαρτογράφηση της φυλής Holstein όσον αφορά τις παραλλαγές της β-καζεΐνης ώστε να γίνει συσχετισμός των διαφόρων ποιοτικών και ποσοτικών χαρακτηριστικών του γάλακτος αλλά και με τις επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία. Παρόλα τα οφέλη που μπορεί να παρουσιάζουν κάποιοι συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί στην τυροκόμηση του γάλακτος και στην παραγόμενη ποσότητα αυτού, η χρηστικότητα και η σημαντικότητα των συγκεκριμένων πολυμορφισμών θα πρέπει να οδηγήσουν το συντομότερο στη δημιουργία ασφαλών συμπερασμάτων, τα οποία θα φέρουν σίγουρα θετικά αποτελέσματα στην οικονομία, στην υγεία αλλά θα συμβάλλουν και στη βελτιστοποίηση του επιπέδου διαβίωσης του ανθρώπου.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

6.1 ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ανυφαντάκης Ε. (2004). Τυροκομία: Χημεία, Φυσικοχημεία, Μικροβιολογία.

Belitz H., Grosch W., Schieberle P. (2012). Χημεία Τροφίμων, Θεσσαλονίκη, Εκδόσεις Τζιόλα.

Ένωση Φυλής HOLSTEIN Ελλάδας. Στατιστικά στοιχεία φυλής από τον επίσημο ιστότοπο.

Ζούλφος Κ. (2010) Τεχνολογία Γάλακτος.

Καμιναρίδης Γ., Μοάτσου Γ. (2009). Γαλακτοκομία, Αθήνα, Εκδόσεις Έμβρυο.

Κατσαούνης Ν. (1979). Βοοτροφία. Εκδοτικός Οίκος Αδελφών Κυριακίδη Α.Ε. Θεσσαλονίκη.

Κεχαγιάς Χ. (1997). Ποιότητα γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων, Εκδόσεις Ίων.

Κώδικας τροφίμων και ποτών. (2016). Άρθρο 80.

Μάντης, Ι.Α. (2000). Υγιεινή και Τεχνολογία γάλακτος και των προϊόντων του, Εκδόσεις Αφοί Κυριακίδη Α.Ε.

6.2 ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abrahamson A. (2015). Galactose In dairy Products Publikation/Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för livsmedelsvetenskap, no 401 Uppsala Amigo, L.,

Recio, I. , Ramos, M. 2000. Genetic polymorphism of ovine milk proteins: Its influence on technological properties of milk-A review. *International Dairy Journal*, 10: 135-149.

Aschaffenburg R., Drewry J. (1955). Occurrence of Different Beta-Lactoglobulins in Cow's Milk. *Nature*, 176: 218-219.

Baticz O., Tomskozi S. and Vida L. (2002). Concentrations of citrate and ketone bodies in cows raw milk . *Periodica Polytechnica Ser. Chem. Eng.* Vol 46: 93-104.

Bonsing J., Ring J. M., Stewart A. F., MacKinley A. G. (1988). Complete nucleotide sequence of the bovine beta casein gene. *Aust. J. Biol. Sci.*, vol 41:527-537.

Boro P., Chantra B.N., Prakash, S.D., Prakash C. (2016). A1 and A2 milk & its impact on human health *I.J.S.N* vol 7:1-5.

Braconnot H. (1830). Memoire sur le caseum et sur le lait; nouvelles ressources qu'ils peuvent offrir a la societe, *Ann. Chim. Phys.*, 43:347.

Brodbeck U., Denton W. L., Tanahashi N., Ebner K. E. (1967). The isolation and identification of the B protein of lactose synthetase as α -lactalbumin. *J. Biol. Chem.*, vol 242: 1391-1397.

Bulgari O., Caroli A. M., Chessa S., Rizzi R., Gigliotti C. (2013). Variation of Vitamin D in Cows milk and Interaction with β - Lactoglobulin. *Molecules Journal* vol 18:10122-10131.

Bylund C. (1995). *Dairy Processing Handbook -Tetra Pack.*

Cardak A. D. (2005). Effects of genetic variants in milk protein on yield and composition from Holstein-Friesian and Simmentaler cows. *South African Journal of Animal Science*, vol. 35 (1): 41-47.

Curry A. (2013). The milk Revolution. *International weekly Journal of Science* vol.500: 20-22.

De Kruif C. G., Holt C. (2003). Casein Micelle Structure, Functions & Interactions. *In: Fox, P. F. & McSweeney, P. L. H. (eds.) Advanced Dairy Chemistry-1 Proteins. Springer US.*

Elliott R. B., Harris D. P., Hill J. P., Bibby N. J., Wasmuth H. E. (1999). Type I (insulindependent) diabetes mellitus and cow milk: casein variant consumption. *Diabetologia* 42: 292–296.

Eigel W. N, Butler J. E., Ernstrom C. A., Farrell H.M., Halwarkar V. R., Jenness R., Whitney R. M. (1984). Nomenclature of proteins of cow's milk: fifth revision. *J Dairy Sci* 67: 1599-1631.

Farrell H. M. Jr., Jimenez - Flores R., Bleck G. T., Brown E. M., Butler J. E., Creamer L. K. (2004) Nomenclature of the proteins of cows milk 6th revision, *J Dairy Sci*, vol 87: 292-296.

Fox L. K., Kirk J. H., Britten A. (2005). *Mycoplasma mastitis: A review of transmission and control. J. Vet. Med.* 52:153-160.

Gasser B. R., Hu M., Chilton N. B., Canbell B. E. (2007). Single-strand conformation polymorphism (SSPC) for the analysis of genetic variation. *Nature Publishing Group.*

Hanusova E., Huba J., Oravcova M., Polak P., Vrtkova I. (2010). Genetic Variants of Beta- Casein in Holstein Dairy Cattle in Slovakia. *Slovak J. Anim.Sci.* 43(2): 63-66.

Hanusova E., Huba J., Oravcová M., Polák P., Peškovičová D, Manga I. (2009). Milk production traits of Slovak Pinzgau cattle in dependence on beta casein genotypes. In: *Perspectives of cattle and horses breeding in Slovakia. Int. conf.: Nitra, SR, 17-18 September 2009: proc.. In: Acta fytotechnica et Zootechnica - Supplement, 2009, vol. 12, p. 28-30. ISSN 1335-258X.*

Hayashi K., Yell D. W. (1993). How sensitive is PCR-SSCP? *Hum Mutat*, 2: 338-46.

Jenness R., Larson B. L., McMeekin T. L., Swanson A. M., Whitnah C. H, Whitney R. M. (1956). Nomenclature of the proteins of bovine milk. *J. Dairy Sci.* 39:536-541.

Jenness R. (1974). The composition of milk (In "Lactation" Vol. III. pp 3-101, B. L. Larson and V. R. Smith ed. Acad. Press. London).

Kakavas V. K., Plageras P., Vlachos A., Papaioannou A., Noulas A. (2008). PCR-SSCP: A method for the molecular analysis of genetic diseases. *Mol. Biotechnol.* Vol 38: 155-163.

Kalac P. (2012). Carotenoids, ergosterols and tocopherols in fresh and perserved herbage and their transfer to bovine milk fat and antipode tissues : A review. *Journal Of Agrobiology* 29: 1-13.

Kaminski A., Cieslinka A., Kostyra E. (2007). Polymorphsim of bovine beta-casein and it spotential effect on human health *J. Appl Genet*, vol 48: 189-198.

Kostyra E., Sienkiewicz-Szlapka E., Jarmolowska B., Krawczuk S., Kostyra H. (2004). Opioid peptides derived from milk proteins. *Pol J Nutr Sci* 13/54: 25–35. 56: 262–272.

Kurtz F. E. (1974). The lipids of milk: composition and properties. In *Fundamentals of Dairy Chemistry* (2nd Edition). Eds. Webb, B.H. and Johnson, A.H. AVI Publishing Company, Westport, Conn., USA. pp 1-17.

Linderstorm-Lang K., Kodama S. (1929). Studies on casein III. On the fractionation of casein. *Compt. Rend. Trav. Lab Carlsberg. Ser. Chim.* 17:1-116.

McLachlan C. N. (2001). Beta-casein A1, ischaemic heart disease mortality, and other illnesses. *Med Hypotheses*.

Manga I., Říha J., Dvorák J. (2006). Comparison of influence markers CSN3 and CSN2 on milk performance traits in Czech Spotted and Holstein cattle tested at first, fifth and higher lactation. *Acta fytotechnica and zootechnica*, vol. 9: 13-15.

Mantis I. A. (1993). *Hygiene & technology of milk & milk products*, Thessaloniki, Kyriakides Brothers House Publishing.

Marchalonis J. J., Schluter S. F., Bernstein R. M., Shen S., Edmundson A. B. (1998). Phylogenetic emergence and molecular evolution of the immunoglobulin family. *Immunol. Res.* 47: 113-122. In: Sweeney, P. L. H. & Fox, P. F. 2013. *Advanced Dairy Chemistry Volume 1A: Proteins: Basic Aspects*.

Martien A. M., Groenen J., van der Poel J. (1994). Regulation of expression of milk protein genes: a review. *Livest Prod Sci* 38: 61-78.

Mercier J. C., Chobert J. M., Addeo F. (1976). Comparative study of the amino acid sequences of the caseinomacropptides from seven species. *FEBS letters*, 72:208-214.

Miluchova M., Trakovicka A., Gabor G. (2009). Analysis of polymorphism of beta casein of Slovak Pinzgau cattle by PCR-RFLP for alleles A1 and A2. *Lucrări stiintifice Zootehnie si Biotehnologii*, 42(2): 288-292.

Mishra B. P., Mukesh M., Prakash B., Sodhi M., Kapila R., Kishore A., Kataria R. S., Joshi B. K., Rasool T. J., Bujarbaruah K. M. (2009). Status of milk protein, β -casein variants among Indian milch animals. *Indian Journal of Animal Sciences* 79 (7): 722-725.

Moatsou G., Samolada M., Katsampekis A., Anyfantakis E. (2004). Casein fraction of Ovine milk from indigenous Greek breeds. *Lait* vol 84: 285-296.

Ng-Kwai-Hang, K.F. and Grosclaude, F. (2002). Genetic polymorphism of milk proteins. In Fox PF and McSweeney PLH (eds). *Advanced Dairy Chemistry* 16, 737-814.

Ng-Kwai-Hang K. F., Grosclaude F. (1992). Genetic polymorphism of milk proteins. Pages 405-455 in *Advanced Dairy Chemistry-1 Proteins*. P. F. Fox, ed. Elsevier Applied Science, New York, NY.

Niki R., Kim G. Y., Kimura T., Takahashi K., Koyama K., Nishinari K. (1994). Physical properties and microstructure of rennet gels from casein micelles of different sizes. *Milchwissenschaft* 49: 325–329.

Olenski K., Cieslinka A., Suckocki T., Szyda J., Kaminski S. (2011). Polymorphism in coding and regulatory sequences of beta-casein gene is associated with milk production traits in Holstein-Friesian cattle. *Animal Science Papers and Reports*, 30: 5-12. Institute of Genetics and Animal Breeding.

Orita M., Suzuki Y., Sekiya T., Hayashi K. (1989). Rapid & sensitive detection of point mutations & DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*, 5: 874-9.

Paulson J., Salfer J., Newell S., Santi E. (2015). *Learning About Dairy*. University of Minnesota.

Pereira P.C. (2014). Milk nutritional composition and its role on human health. *Nutrition Journal* 30: 619-627.

Ramesha P. K., Rao A., Basavaraju M., Alex R. (2016). Genetic Variants of β -casein in Cattle and Buffalo Breeding Bulls in Karnataka state of India. *Indian Journal of Biotechnology* vol 15: 178-181.

Rijnkels M. (2002). Multispecies comparison of the casein gene loci and evolution of the casein gene family . *Journal of Mammary Gland Biology Neoplasia*, 7: 327-345.

Roginski H. (2003). *Encyclopedia of dairy sciences*. Academic Press, London.

Sawyer L. (2003). B-Lactoglobulin, in *Advanced Dairy Chemistry vol I: Proteins* 3rd edition, P.F.Fox and P.L.H McSweeney, eds., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 319-386.

Sharma N., Singh K., Bhadwal M. S. (2011). Relationship of somatic cell count and mastitis: An Overview, *Asian-Aust J. Anim. Sci.* 24: 429-438.

Sodhi M., Mukesh M., Kataria R.S., Mishra B., Joshii B. K. (2012). Milk Proteins and Human Health: A1/A2 Hypothesis. *Indian J. Endocrinol Metab.* 16: 856.

Sorensen E.S., Petersen T.E. (1993). Purification and characterization of three proteins isolated from the proteose peptone fraction of bovine milk. *J. Dairy Res.* 60: 189-1297.

Sunnucks P., Wilson A. C., Beheregaray L. B. (2000) SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Molecular Ecology*, 9: 1699-1710.

Swaissgood H. E. (1992). Chemistry of the caseins. *Advanced dairy chemistry-1: proteins.* Fox PF, Elsevier, London: 63-77.

Sweeney P. L. H., Fox P. F. (2013). *Advanced Dairy Chemistry Volume 1A: Proteins: Basic Aspects.* New York: Springer.

Walstra P., Jenness R. (1984). *Dairy Chemistry and Physics.* John Wiley and Sons, New York.

Whitaker J. R. (2013). *Handbook of food enzymology,* Marvel Decker Inc, New York.

Woodford K. B. (2011). *Milk Proteins and Human Health: A1 versus A2 Beta-casein.* An Address to the General Practitioners Conference, Sydney.

Zamberlin S., Antunac N., Havranek J., Samarjiza D. (2012). Mineral Elements in milk and Dairy products, *Mljekarstvo*, 62: 111-125.