

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

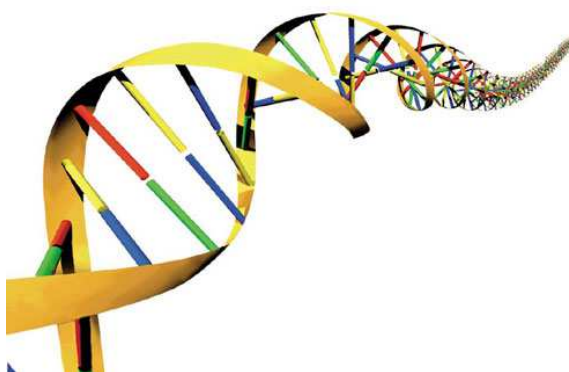
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ: ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ-ΠΟΙΟΤΗΤΑ
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ, ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΘΕΟΔΟΣΙΑΔΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

Ανάπτυξη και εφαρμογή μοριακών δεικτών για τον έλεγχο
ποιότητας και την ταυτοποίηση κίτρινων τυριών



ΛΑΡΙΣΑ, 2010

Ανάπτυξη και εφαρμογή μοριακών δεικτών για τον έλεγχο ποιότητας και την ταυτοποίηση κίτρινων τυριών

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ: (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)	ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
ΜΟΥΤΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ:	Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
ΣΑΡΑΦΙΔΟΥ ΘΕΟΛΟΓΙΑ:	Λέκτορα Μοριακής Βιολογίας Ζωικών Οργανισμών

Πρόλογος

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να εξετάσουμε αν υπάρχει νόθευση σε 39 διαφορετικά προϊόντα του εμπορίου τυποποιημένων κίτρινων τυριών. Η τεχνική που εφαρμόστηκε ήταν η PCR-SSCP. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε ένα τμήμα του γονιδίου 16s rRNA του μιτοχονδριακού DNA.

Η πτυχιακή διατριβή αποτελείται από δύο μέρη. Το πρώτο είναι το γενικό μέρος στο οποίο περιγράφεται η αναγκαιότητα της αναγνώρισης των συστατικών των κίτρινων τυριών με σκοπό να αποφευχθεί η νόθευση και η εξαπάτηση των καταναλωτών. Επίσης στο γενικό μέρος περιγράφεται η ιχνηλασιμότητα των τροφίμων και η εφαρμογή της σήμερα με τη βοήθεια μοριακών δεικτών, καθώς και λίγα λόγια γι' αυτούς. Στη συνέχεια γίνεται μια αναφορά στα χαρακτηριστικά των κίτρινων τυριών που μελετήθηκαν. Και τέλος, περιγράφονται οι λόγοι για τους οποίους χρησιμοποιήθηκε το 16s rRNA καθώς και λίγα λόγια για το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA).

Στο δεύτερο και ειδικό μέρος περιγράφονται τα υλικά και ο εξοπλισμός του εργαστηρίου, οι μέθοδοι και οι πειραματικές εργασίες που πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, τα αποτελέσματα αυτών των εργασιών καθώς και η συζήτηση των συμπερασμάτων που προέκυψαν.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν στην εκπόνηση αυτής της διπλωματικής εργασίας. Τον Καθηγητή κ. Ζήση Μαμούρη, Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την τιμή που μου έκανε και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση της εργασίας.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω θερμά όλη την ομάδα του εργαστηρίου Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας και ιδιαίτερα την υποψήφια Διδάκτορα, Ευαγγελία Κουτσογιαννούλη, για την συνεχή καθοδήγηση της και το ασταμάτητο ενδιαφέρον που έδειξε σ' όλα τα στάδια της διατριβής μου.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, την Επίκουρο Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Αικατερίνη Μούτου και τη Λέκτορα Μοριακής Βιολογίας Ζωικών Οργανισμών κα. Θεολογία Σαραφίδου. Τους ανωτέρω ευχαριστώ για τις υποδείξεις στο κείμενο της διατριβής μου.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον υποψήφιο Διδάκτορα Κωνσταντίνο Σταμάτη για την πολύτιμη βοήθεια του σ' όλη τη διάρκεια της διεξαγωγής του πειράματος και το φιλικό κλίμα συνεργασίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ο πολυμορφισμός μονόκλωνης διαμόρφωσης (SSCP) για να εξετάσουμε τα είδη γάλακτος που χρησιμοποιούνται στα τυποποιημένα προϊόντα κίτρινων τυριών. Σκοπός της εργασίας είναι η επαλήθευση των συστατικών που αναγράφονται στην ετικέτα, ώστε να γνωρίζει ο καταναλωτής εάν στα συγκεκριμένα προϊόντα υπάρχει νόθευση ή όχι. Συνολικά εξετάστηκαν 39 διαφορετικά προϊόντα με τυποποιημένα κίτρινα τυριά (δείγματα). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε ένα τμήμα του γονιδίου 16s rRNA του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) που απομονώθηκε από το κάθε ένα δείγμα ξεχωριστά.

Η τεχνική που εφαρμόστηκε ήταν η PCR-SSCP. Αρχικά με εκκινητές κοινούς για όλα τα δείγματα (universal primers), ενισχύθηκε με τη μέθοδο της PCR τμήμα του γονιδίου 16s rRNA μεγέθους 234bp όσον αφορά το πρόβατο (*Ovis aries*), 234bp όσον αφορά το μοσχάρι (*Bos taurus*), 235bp όσον αφορά το κατσίκι (*Capra hircus*). Ακολούθησε αποδιάταξη των προϊόντων της PCR, ηλεκτροφόρηση τους σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και χρώση της πηκτής για απεικόνιση των αποτελεσμάτων.

Η ανάλυση του τμήματος του γονιδίου 16s rRNA αποκάλυψε 4 πρότυπα, τα οποία εμφανίζονται στα τυποποιημένα προϊόντα κίτρινων τυριών. Από την ανάλυση αυτών των προτύπων (αποτελεσμάτων) συμπεραίνουμε ότι τα 7 από τα 39 προϊόντα παρουσιάζουν κάποιο είδος νόθευσης, είτε με την προσθήκη κάποιου είδους επιπλέον στο προϊόν, είτε με την χρήση ενός μόνο είδους ενώ στην ετικέτα αναφέρονται περισσότερα του ενός.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Γενικό μέρος.....	7
1.1 Ιχνηλασιμότητα τροφίμων.....	7
1.1.1 Μοριακοί δείκτες.....	10
1.1.2 Χρήση των βιοδεικτών στην ιχνηλασιμότητα τροφίμων.....	11
1.2 Χαρακτηριστικά των κίτρινων τυριών.....	14
1.2.1 Κασέρι.....	14
1.2.2 Γραβιέρα.....	15
1.2.3 Κεφαλοτύρι.....	15
1.2.4 Ένταμ - Γκούντα.....	16
1.2.5 Μοτσαρέλα.....	17
1.2.6 Παρμεζάνα.....	17
1.3 Μιτοχονδριακό DNA.....	19
1.4 16S rRNA	20
2. Ειδικό μέρος.....	24
2.1 Σκοπός μελέτης.....	24
2.2 Υλικά και μέθοδοι.....	25
3. Αποτελέσματα.....	39
4. Συζήτηση.....	44
5. Βιβλιογραφία.....	48

1.1 Ιχνηλασιμότητα τροφίμων

Ο τομέας των Ευρωπαϊκών τροφίμων γίνεται ολοένα και πιο πολύπλοκος εξαιτίας της παγκοσμιοποίησης και της διαθεσιμότητας νέων τεχνολογικών διαδικασιών. Η εμπιστοσύνη των καταναλωτών στα τρόφιμα είναι ακόμα χαμηλή, κάτι το οποίο οφείλεται στην πληθώρα κινδύνων που μπορούν να κρύβονται στα τρόφιμα. Οι καταναλωτές περιμένουν ασφαλή τρόφιμα και απαιτούν πληροφορίες για την προέλευση των τροφίμων τους (Van Rijswijk & Frewer, 2008).

Ως ιχνηλασιμότητα ορίζεται η ικανότητα ανίχνευσης (trace) του ιστορικού, της εφαρμογής και της θέσης ενός τροφίμου, μέσω καταγεγραμμένων πληροφοριών (ISO 8402:1994). Η ιχνηλασιμότητα συνδέει τα υλικά παραγωγής με την προέλευσή τους, τις διαδικασίες επεξεργασίας, τη διανομή και τη διάθεση στον τελικό πελάτη.

Σε μια αλυσίδα παραγωγής (production chain), διακρίνονται δυο επίπεδα ιχνηλασιμότητας:

- Εσωτερική ιχνηλασιμότητα (internal traceability): συνδέει τις πληροφορίες σχετικά με τις πρώτες ύλες και τις συνθήκες παραγωγής με το τελικό προϊόν, για κάθε στάδιο παραγωγής, επεξεργασίας και διανομής (door to door traceability).
- Ιχνηλασιμότητα αλυσίδας (B2B - chain traceability): εστιάζεται στις πληροφορίες που συνοδεύουν το προϊόν από ένα στάδιο της αλυσίδας στο επόμενο - κατά μήκος της αλυσίδας εφοδιασμού που περιλαμβάνει όλα τα στάδια παραγωγής, επεξεργασίας και διανομής.

Στον τομέα των τροφίμων η ιχνηλασιμότητα σχετίζεται με την ασφάλεια των τροφίμων, αλλά όχι απαραίτητα μόνο με αυτήν. Έτσι, τους αντικειμενικούς στόχους που θέλουμε να επιτύχουμε εφαρμόζοντας την ιχνηλασιμότητα σε ένα κλάδο των τροφίμων τους διακρίνουμε σε αυτούς που σχετίζονται και σε αυτούς που δεν σχετίζονται με την ασφάλεια των τροφίμων.

Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή, με την υιοθέτηση της περίφημης Λευκής Βίβλου, για την ασφάλεια των τροφίμων, από τις 12 Ιανουαρίου 2000, έχει θέσει, ως βασικό σκοπό της, την ασφάλεια των τροφίμων και την προστασία της υγείας του καταναλωτή. Όπως αναφέρεται, "η Νομοθεσία, για τα τρόφιμα, αποβλέπει στην προστασία των συμφερόντων των καταναλωτών και αποτελεί τη βάση, ώστε οι καταναλωτές να μπορούν να επιλέγουν, ενήμεροι, τα τρόφιμα, που καταναλώνουν" (Άρθρο 8). Αποσκοπεί, στην πρόληψη φαινομένων δόλιων πρακτικών ή πρακτικών εξαπάτησης, νόθευσης των τροφίμων και οποιονδήποτε άλλων πρακτικών, που ενδέχεται να παραπλανήσουν τον καταναλωτή.

Για να συμβούν τα παραπάνω, γίνεται υποχρεωτική, με βάση τον Κανονισμό 178/2002, η ιχνηλασιμότητα (Άρθρο 18), η δυνατότητα δηλαδή, ανίχνευσης και παρακολούθησης του "ιστορικού" του προϊόντος και των συστατικών του, καθώς επίσης και της πορείας του, προς το ράφι του καταναλωτή.

Με τη διαδικασία της ιχνηλασιμότητας περιορίζονται οι άσκοπες ανακλήσεις και αποσύρσεις, καθώς διευκολύνεται ο έλεγχος, από την πλευρά των μηχανισμών ελέγχου, έχοντας, ως αποτέλεσμα, τη διεξαγωγή αποσύρσεων και ανακλήσεων, που έχουν συγκεκριμένο στόχο. Έτσι, επιτυγχάνεται ο περιορισμός αδικαιολόγητων αρνητικών επιδράσεων, στο εμπόριο. Όσο πιο αποτελεσματικό είναι το σύστημα ιχνηλασιμότητας, σε μια επιχείρηση, τόσο πιο περιορισμένη και οικονομική θα είναι μια πιθανή απόσυρση, σε περίπτωση κρίσης. (http://www.kepka.org/Grk/info/Nutricion/nut003_025.htm)

Επιπλέον, τα συστήματα ιχνηλασιμότητας:

- Δίνουν τις απαιτούμενες πληροφορίες για τον καλύτερο έλεγχο των διαδικασιών (π.χ. βέλτιστη χρήση πρώτων υλών, έλεγχος αποθεμάτων, προγραμματισμός παραγωγής, ποιοτικός έλεγχος, κλπ.) για τους πελάτες, ελεγκτικούς φορείς, κλπ.
- Βοηθούν στη διαχείριση περιπτώσεων κρίσεων (εντοπισμός προβλημάτων, εντοπισμός και απόσυρση ελαττωματικών παρτίδων, κλπ).
- Μπορούν να τεκμηριώσουν ανά πάσα στιγμή τους ισχυρισμούς της

επιχείρησης για τις ιδιότητες των προϊόντων της (π.χ. ποιότητα, προέλευση, GMO's, κ.ο.κ.).

Για λόγους ασφάλειας των τροφίμων, μεταξύ άλλων εμπορικών λόγων, χρειάζεται να μπορούμε να ανιχνεύουμε αντικείμενα από το χωράφι μέχρι το πιάτο μας, το οποίο συνεπάγεται περίπλοκες λύσεις, οι οποίες δεν είναι πάντα πρακτικές και φτηνές. Παρ' όλα αυτά, η ιχνηλασιμότητα των τροφίμων έχει εμφανιστεί στο προσκήνιο ως ένας τρόπος παραγωγής και εμπορεύσεως τροφίμων (Raspor, 2001).

Τα τελευταία χρόνια, η τεχνολογία έχει κάνει την ιχνηλασιμότητα των τροφίμων εφικτή με πολλούς νέους και καινοτόμους τρόπους (Podgornik *et al.*, 1994).

Χαρακτηριστικά Συστημάτων Ιχνηλασιμότητας

Βασικό χαρακτηριστικό ενός συστήματος ιχνηλασιμότητας: η δυνατότητα αναγνώρισης οποιασδήποτε φυσικής μονάδας κινείται (παλέτες, κιβώτια, μονάδες προϊόντος).

Για να υπάρχει η δυνατότητα αναγνώρισης των διακινούμενων μονάδων, θα πρέπει αυτές να φέρουν κάποια σήμανση.

Είδη σήμανσης:

- Ετικέτες
- Σήμανση μηχανικής ανάγνωσης (machine readable labels)
 1. Γραμμωτοί κώδικες
 2. Portable Data Files (PDF)
 3. Radio Frequency Identification systems (RFID)

Γραμμωτοί κώδικες (bar codes):

- Συστήματα οπτικής ανάγνωσης πληροφοριών, βασισμένα σε ένα απλό σύστημα κωδικοποίησης που αποτελείται από γραμμές και κενά διαφορετικού πάχους

- Σύμβολο αποτελούμενο από σκοτεινές και φωτεινές γραμμές διαφορετικού πλάτους
- Διαβάζεται από ειδικά μηχανήματα ηλεκτρονικής οπτικής ανάγνωσης (scanners) και αντιπροσωπεύει κάποια δεδομένα όπως μέγεθος, τιμή, εταιρία παραγωγής προϊόντος κ.α.

Γραμμωτοί κώδικες (bar codes):

Οι σαρωτές (scanners) αναγνωρίζουν τα κενά μεταξύ των γραμμών διαφορετικού πάχους που αποτελούν τον κώδικα. Το σύστημα EAN.UCC ορίζει έξι πρότυπα κωδικών:

- Global Trade Identification Number (GTIN)
- Serial Shipping Container Code (SSCC)
- Global Location Number (GLN)
- Global Returnable Asset Identifier
- Global Individual Asset Identifier
- Global Service Relation Number

1.1.1 Μοριακοί δείκτες

Η μοριακή βιολογία τα τελευταία χρόνια παρουσιάζει μεγάλη πρόοδο. Αυτό μας επιτρέπει να χρησιμοποιήσουμε τεχνικές που διευκολύνουν προσπάθειες ταυτοποίησης ατόμων, ομάδων πληθυσμών και ειδών. Οι μοριακοί δείκτες βοηθούν στην επιλογή αυτή.

Με τον όρο μοριακός δείκτης εννοείται μια κληρονομούμενη παραλλαγή που μπορεί εύκολα να απομονωθεί, ποικίλλει μέσα ή μεταξύ των πληθυσμών και έχει αμελητέο αντίκτυπο στο φαινότυπο και συγκεκριμένα στην προσαρμοστικότητα. Γενικά, μπορούν να αλληλουχηθούν τμήματα DNA από πολλά άτομα. Ωστόσο, αυτή η διαδικασία θα ήταν απαγορευτικά ακριβή για μεγάλα δείγματα και σε κάθε περίπτωση είναι συνήθως μη απαραίτητη. Υπάρχουν δύο κατηγορίες μοριακών δεικτών, το DNA και οι πρωτεϊνικοί δείκτες (Barton et. al., 2007).

Η αφθονία, ο πολυμορφισμός, η εξειδίκευση για ορισμένο γενετικό τύπο, τα συγκυρίαρχα αλληλόμορφα, η διαδικασία παραγωγής είναι

ορισμένα από τα κριτήρια σύμφωνα με τα οποία επιλέγονται οι μοριακοί δείκτες.

Οι πρωτεϊνικοί δείκτες εμφανίστηκαν προτού εμφανιστούν οι DNA δείκτες και περιλαμβάνουν τα ισοένζυμα και τα αλληλοένζυμα. Η εφαρμογή πρωτεϊνικών δεικτών έχει πλεονεκτήματα καθώς δεν χρειάζονται εκκινητές ή σημαντές, είναι γρήγορη και εύκολη, με χαμηλό κόστος. Τα μειονεκτήματα της εφαρμογής τους είναι ότι δεν βρίσκονται σε αφθονία, έχουν χαμηλό πολυμορφισμό.

Οι DNA δείκτες είναι πολλοί και αφορούν γενετικούς πολυμορφικούς τύπους, μοναδιαίους στο γονιδίωμα, με περισσότερα του ενός αλληλόμορφα, οι οποίοι είναι δυνατόν να ανιχνευτούν με μοριακή ανάλυση. Γενικά, οι γενετικοί δείκτες απαιτούν ένα τρόπο ανίχνευσης συγκεκριμένων γενετικών τύπων και ένα τρόπο διαχωρισμού της ποικιλότητας σε αυτούς τους τύπους. Οι τεχνικές με τις οποίες ανιχνεύεται ο πολυμορφισμός στους δείκτες είναι η RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms), τα RAPD (Randomly Amplified DNA Polymorphisms), η AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms), η SSCP (Single Strand Conformation Polymorphisms), η ανάλυση μινιδορυφόρων (minisatellites) και μικροδορυφόρων (microsatellites) ή αλλιώς SSR (Simple Sequence Repeats), τα SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) και η DNA αλληλούχιση (DNA ή PCR Sequencing).

Στη συγκεκριμένη μελέτη επιλέχθηκε τμήμα του γονιδίου του 16S rRNA και εφαρμόστηκε η τεχνική PCR-SSCP. Η επιλογή του συγκεκριμένου δείκτη βασίστηκε στο γεγονός ότι το γονίδιο αυτό δεν παρουσιάζει αλλαγές μέσα στο ίδιο είδος, αλλά διαφέρει μεταξύ διαφορετικών ειδών.

1.1.2 Χρήση των βιοδεικτών στην ιχνηλασιμότητα τροφίμων

Η ιδέα της χρησιμοποίησης βιοδεικτών βασίζεται στο γεγονός ότι θα μπορούσαν να εξασφαλίσουν, σε ορισμένες περιπτώσεις, μια πιο ακριβέστερη μέθοδο για την αξιολόγηση της έκθεσης, και εν τέλει του κινδύνου (Schulte & Waters, 1999). Ενώ η χρήση των βιοδεικτών μπορεί

να μειώσει τη λανθασμένη ταξινόμηση, είναι επίσης πιθανό ότι το σφάλμα μέτρησης σ' ένα συγκεκριμένο βιοδείκτη μπορεί να μπερδέψει την κατάσταση (White, 1997; Saracci, 1997). Ωστόσο, με σωστή εργαστηριακή αντιμετώπιση, το πρόβλημα αυτό μπορεί να μειωθεί στο ελάχιστο. Η αξιοπιστία των βιοδεικτών αποτελεί το κλειδί για την εφαρμογή τους (Raspor, 2004).

Για την ιχνηλασιμότητα τροφίμων αναζητούνται βιοδείκτες που έχουν τα απαραίτητα χαρακτηριστικά. Τα τρία πιο βασικά χαρακτηριστικά είναι τα εξής: έκθεση, επίδραση και ευαισθησία. Οι βιοδείκτες έκθεσης υποδηλώνουν ότι έχει συμβεί έκθεση σε κάποια χημική ουσία αλλά δεν προσφέρουν γνώση των δυσμενών επιπτώσεων σε επίπεδο οργανισμού. Οι βιοδείκτες επίδρασης εκτιμούν αντιδράσεις και προσφέρουν πληροφορίες τόσο για την έκθεση όσο και για τις δυσμενείς επιπτώσεις.

Η αξιοπιστία και η πετυχημένη χρήση των βιοδεικτών απαιτούν έναν υψηλό βαθμό αναλυτικής ακρίβειας (Norton *et al.*, 2001) και γνώση της σημασίας τους στην σύνθεση των τροφίμων και την κατάστασή τους. Πρόσφατες εξελίξεις στη μοριακή βιολογία προσέφεραν νέα εργαλεία για τη χρήση πολλών βιοδεικτών, οι οποίοι δυνητικά θα είναι χρήσιμοι στην ιχνηλασιμότητα τροφίμων. Η ιδιαιτερότητα και η ευαισθησία πολλών βιοδεικτών, θα βελτιωθούν με την καθιέρωση νέων αναλυτικών μεθοδολογιών (Diemer *et al.*, 2002). Η εφαρμογή των νέων μεθόδων ανίχνευσης θα επεκτείνει την παρατήρηση από το επίπεδο χρωμοσωμάτων σε συγκεκριμένα γονίδια, σχετικά με τη διαδικασία ανίχνευσης (Hiroyasu *et al.*, 2002, Sharpless *et al.*, 2004).

Η απεικόνιση τεχνολογιών όπως ο μαγνητικός συντονισμός ή η Τομογραφία Εκπομπής Ποζιτρονίων (PET) (de Graaf *et al.*, 2004) και η Υπολογιστική τομογραφία εκπομπής απλών φωτονίων (SPECT) (Blankenberg, 2004), παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για μελέτες διότι αυτές οι μέθοδοι είναι μη-επεμβατικές και μπορούν να εντοπίσουν αλλαγές σε μοριακό επίπεδο. Τεχνολογίες όπως οι μικροσυστοιχίες DNA (Service, 2003), μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην ανίχνευση γονιδίων σε γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα (Vazquez *et al.*, 2004).

Οι επιστήμονες και η βιομηχανία έχουν αναγνωρίσει τις δυνατότητες των βιοδεικτών. Στην ιχνηλασιμότητα τροφίμων τα κριτήρια για τη

χρησιμοποίηση βιοδεικτών περιλαμβάνουν κατά πόσον οι βιοδείκτες προσθέτουν στην ποιότητα και στην αξιοπιστία και κατά πόσον μειώνουν την αβεβαιότητα. Οι βιοδείκτες που παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τους μηχανισμούς, υποστηρίζουν τη βιολογική αληθοφάνεια ή βοηθούν στην εκτίμηση του κινδύνου, αποτελούν τους πιο χρήσιμους.

Για να έχουμε το μέγιστο δυνατό αποτέλεσμα από τους βιοδείκτες, απαιτούνται βελτιώσεις όσον αφορά τη σχεδίαση και βελτιστοποίηση των εφαρμοσμένη πρωτοκόλλων. Όπως μπορούμε να δούμε έχει γίνει σημαντική δουλειά για την ενημέρωση και την τεχνική πλευρά του εντοπισμού και της παρακολούθησης (tracing and tracking). Οι βιοδείκτες εισέρχονται με αργά βήματα στην επιστήμη των τροφίμων και στην τεχνολογία, έχοντας μεγάλες προοπτικές για την προσθήκη αξίας τόσο στους παραγωγούς όσο και στους καταναλωτές (Raspor, 2005).

2.1 Χαρακτηριστικά κίτρινων τυριών

2.1.1. Κασέρι

Το Κασέρι είναι ένα παραδοσιακό Ελληνικό ημίσκληρο τυρί από πρόβειο και κατσικίσιο γάλα. Πιστεύεται ότι είναι μια εξέλιξη του Ιταλικού Caciocavallo. Στις μέρες μας, η συγκέντρωση του γάλακτος γίνεται συνήθως από τις μεγάλες γαλακτοβιομηχανίες από τις οποίες παρασκευάζεται και το τυρί. Παρασκευάζεται κυρίως στη Μακεδονία, τη Θεσσαλία, τη Θράκη και την Λέσβο. Έχει καταχωρηθεί ως Προϊόν Ονομασίας Προέλευσης (Π.Ο.Π.) με τον Καν.(ΕΟΚ)1107/96 της Ευρωπαϊκής. (<http://el.wikipedia.org/wiki/κασέρι>)

Το παραδοσιακό Κασέρι γίνεται από γάλα αιγοπρόβειο και σύμφωνα με τα δεδομένα του Κώδικα Τροφίμων, το κατσικίσιο δεν μπορεί να υπερβαίνει το 20% κατά βάρος του μίγματος γάλακτος προς τυροκόμηση.

Ξεχωρίζει από τα άλλα τυριά όχι μόνο από τη διαφορετική τεχνολογία του αλλά και από τα πολύ σημαντικά πλεονεκτήματα που έχει. Μπορεί να γίνεται από γάλα με αυξημένη οξύτητα, δηλαδή από γάλα που δεν είναι και τόσο καθαρό. Επίσης, προσφέρεται άριστα για κλίμα θερμό και εκεί όπου η παραγωγή άλλων τυριών θα ήταν προβληματική λόγω δυσμενών συνθηκών παραγωγής, διατήρησης και μεταφοράς του γάλακτος. Είναι εξαιρετικά πολύτιμο για παραγωγή τυριού από γάλα που μεταφέρεται από μακρινές αποστάσεις καθώς δεν πειράζει η μερική αύξηση της οξύτητας.

Όταν οι συνθήκες μεταφοράς είναι δύσκολες, το γάλα μπορεί να πήξει στον τόπο της παραγωγής του και να μεταφερθεί σαν κασερομάζα (μπασκί) στο τυροκομείο όπου στη συνέχεια θα επεξεργαστεί σε κασέρι. Αυτό έχει σαν μειονέκτημα ότι η τελική τυρομάζα έχει ανομοιογενή προέλευση και μπορεί να δυσχεραίνει την κανονική πορεία της ζύμωσης του μπασκίου. (Ζερφυρίδης, 2001)

2.1.2 Γραβιέρα

Η Γραβιέρα γίνεται από γάλα αγελαδινό αλλά στην Ελλάδα η περισσότερη Γραβιέρα παράγεται από πρόβειο ή αιγοπρόβειο γάλα και ιδίως στην Κρήτη, η Γραβιέρα της οποίας είναι ονομαστή σ' όλη τη χώρα.

Το γάλα για Γραβιέρα πρέπει να είναι πολύ καθαρό και φρέσκο. Παρόλα αυτά παστεριώνεται και καθαρίζεται με φυγοκέντρωση. Το τελευταίο απομακρύνει όλες τις ξένες ουσίες, συμβάλλει στην ελαστικότητα της πάστας του τυριού κι έτσι βελτιώνει το σχηματισμό και βοηθά στην καλύτερη κατανομή των ματιών του τυριού. Το γάλα που προορίζεται για Γραβιέρα πρέπει να είναι τελείως ελεύθερο από βακτήρια του γένους *Clostridium*, τα οποία προκαλούν ανεπιθύμητες γεύσεις και τρύπες στα τυριά.

Η Γραβιέρα από πρόβειο γάλα είναι πιο εύγευστη απ' ότι η Γραβιέρα από αγελαδινό γάλα. Εδώ δεν χρησιμοποιούνται καλλιέργειες και για να δημιουργηθούν τρύπες στο τυρί και να υπάρξει η σωστή γεύση, πρέπει κανείς να βασιστεί στη φυσική προπιονική μικροχλωρίδα του γάλακτος. Έτσι, το γάλα δεν παστεριώνεται ή θερμαίνεται ανεπαρκώς, για να μη σκοτωθεί η χρήσιμη μικροχλωρίδα και παρόλα αυτά η Γραβιέρα δεν αποκτά κανονικές τρύπες ή και αυτές που έχει δεν είναι αποκλειστικά προπιονικής προέλευσης. (Ζερφυρίδης, 2001)

Η ελληνική Γραβιέρα έχει πολύ πιο πικάντικη γεύση και άρωμα από τους εισαγόμενους τύπους, εξαιτίας του είδους του γάλακτος που χρησιμοποιείται και της επιτρεπόμενης βακτηριδιακής ανάπτυξης στην επιφάνεια του τυριού. Συνοψίζοντας, είναι ένα διαφορετικό είδος Γραβιέρας από αυτό που παράγεται στις άλλες χώρες. Περιέχει σχετικά υψηλά ποσοστά βουτυρικού οξέος, το οποίο δε θεωρείται ότι αποτελεί κανονικό συστατικό της Γραβιέρας που παράγεται εκτός Ελλάδος. (Ανυφαντάκης, 2004)

2.1.3 Κεφαλοτύρι

Το Κεφαλοτύρι είναι ένα παραδοσιακό Ελληνικό τυρί, που γίνεται από πρόβειο ή κατσικίσιο γάλα ή μίγματα αυτών. Τα κύρια χαρακτηριστικά του

παραδοσιακού αυτού τυριού είναι η μεγάλη σκληρότητα του, η αλμυρή του γεύση και το έντονο άρωμα.

Το σχήμα του τυριού είναι κυλινδρικό με διαστάσεις περίπου τριάντα εκατοστά διάμετρο και δέκα εκατοστά ύψος. Το βάρος του τυριού είναι γύρω στα 7 χιλιόγραμμα, υπάρχουν όμως και Κεφαλοτύρια μικρότερα ή μεγαλύτερα.

Παραδοσιακά, το Κεφαλοτύρι γίνεται είτε από αμιγές πρόβειο είτε από ανάμεικτο πρόβειο και κατσικίσιο γάλα. Σήμερα παράγεται σκληρό τυρί από αγελαδινό γάλα ή αιγοπρόβειο με αγελαδινό που ονομάζεται Κεφαλοτύρι. Η τεχνολογία του τυριού από αγελαδινό γάλα είναι δυσκολότερη από του αιγοπροβείου γάλακτος. Την τεχνολογία βεβαίως του τυριού δεν καθορίζει μόνο το είδος του γάλακτος αλλά και πλήθος άλλων παραγόντων όπως η εποχή του έτους, οι θερμοκρασίες που επικρατούν, οι ειδικότερες καιρικές συνθήκες, η διατροφή του ζώου, η ποιότητα του γάλακτος και προπαντός η οξύτητα του κτλ. Έτσι, η τεχνολογία του Κεφαλοτυριού, όπως και κάθε τυριού, προσαρμοζόμενη στις εκάστοτε συνθήκες μπορεί να παρουσιάσει πολλές παραλλαγές. Με τα σημερινά όμως μέσα επεξεργασίας του γάλακτος και τις δυνατότητες κλιματισμού χώρων, η τεχνολογία του μπορεί να είναι ενιαία με μικρές μόνο προσαρμογές στις ειδικές συνθήκες. (Ζερφυρίδης, 2001)

1.2.4 Ένταμ – Γκούντα (Edam-Gouda)

Το τυρί Ένταμ είναι από την ομώνυμη περιοχή της βορείου Ολλανδίας και είναι σχεδόν ίδιο με το τυρί Γκούντα που παράγεται στην ομώνυμη περιοχή της νοτίου Ολλανδίας. Αποτελούν τα κύρια τυριά της χώρας.

Είναι ημίσκληρα τυριά με ελαφριά, καθαρή γεύση, με συνεκτική δομή, λεία-βουτυρώδη υφή και με λίγες, μικρές τρύπες. Τα σχήματα στα οποία βγαίνουν είναι σαν του Κεφαλοτυριού, σχήμα μπάλας πιεσμένης ώστε να έχει δύο επίπεδες παράλληλες επιφάνειες και σχήμα φραντζόλας. Το γάλα είναι πάντοτε αγελαδινό. (Ζερφυρίδης, 2001)

1.2.5 Μοτσαρέλα

Η Μοτσαρέλα (ιταλικά: mozzarella) είναι μαλακό τυρί ιταλικής προέλευσης. Παρασκευάζεται στη νότια Ιταλία και στην αυθεντική της μορφή φτιάχνεται αποκλειστικά από γάλα του τοπικού νεροβούβαλου, αποτελώντας τυρί Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης. Μπορεί να φτιαχτεί όμως και από γάλα αγελάδας για την ευρεία κατανάλωση. Το χρώμα της είναι συνήθως κρεμώδες λευκό και έχει απαλή γεύση γάλακτος και χαρακτηριστική μυρωδιά, ενώ είναι αρκετά εύπλαστη. Χρησιμοποιείται στη μαγειρική, κυρίως ως υλικό πίτσας.

Περιέχει μεγάλα ποσοστά υγρασίας και γι' αυτό το λόγο σερβίρεται παραδοσιακά την ημέρα που παράγεται, αλλά μπορεί να διατηρηθεί σε άλμη μέχρι και μία εβδομάδα ή ακόμα και περισσότερο όταν σφραγίζεται σε συσκευασίες αεροστεγώς. Μοτσαρέλα με χαμηλή υγρασία μπορεί να διατηρηθεί στο ψυγείο για μέχρι και ένα μήνα, αν και υπάρχουν τυποποιημένες συσκευασίες μοτσαρέλας χαμηλής περιεκτικότητας σε υγρασία στις οποίες αναγράφεται διάρκεια ζωής ακόμα και μέχρι έξι μήνες. (<http://en.wikipedia.org/wiki/Mozzarella>)

1.2.6 Παρμεζάνα

Η παρμεζάνα είναι ένα σκληρό κοκκώδες τυρί, το οποίο πήρε το όνομα του από τις περιοχές της Ιταλίας στις οποίες παράγεται (Πάρμα, Μπολόνια, Μοδένα). Οι Ιταλοί έχουν κατοχυρώσει την ονομασία του ως προϊόν Προστατευμένης Ονομασίας Προέλευσης. Η παρμεζάνα παρασκευάζεται από αγελαδινό γάλα.

Έχει εξωτερικό χρώμα κίτρινο που χρυσίζει. Μέσα έχει κοκκώδη υφή, κιτρινωπή μορφή. Σε αντίθεση με τη μοτσαρέλα έχει ελάχιστη υγρασία, γίνεται σκληρότερο αμέσως μόλις έρθει σε επαφή με τον αέρα. Μεγάλο κυλινδρικό σχήμα. Ζυγίζει περί τα 25 κιλά. Η παρμεζάνα κόβεται δύσκολα. Ο σωστός τρόπος είναι το «άνοιγμα» στη μέση με ειδικές μικρές σφήνες. (<http://en.wikipedia.org/wiki/Parmigiano-Reggiano>)

ΚΙΤΡΙΝΑ ΤΥΡΙΑ



Εικόνα 1: Κασέρι



Εικόνα 2: Γραβιέρα



Εικόνα 3: Κεφαλοτύρι



Εικόνα 4: Ένταμ – Γκούντα



Εικόνα 5: Μοτσαρέλα



Εικόνα 6: Παρμεζάνα

1.3 Μιτοχονδριακό DNA

Τα μιτοχόνδρια είναι θεμελιώδη οργανίδια που συναντιούνται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα και χρησιμοποιούνται για το μεταβολισμό των βιολογικών μακρομορίων που προσλαμβάνουν οι οργανισμοί με τις τροφές. Έτσι, με τη βοήθεια των μιτοχονδρίων τα κύτταρα διασπούν τους υδατάνθρακες και τα λίπη συνθέτοντας χημική ενέργεια –μόρια τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP)- μέσω της διαδικασίας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Η διαδικασία αυτή αποτελεί την κυτταρική αναπνοή, είναι αερόβια και συντελείται διαμέσου ενός πολύπλοκου διαμεμβρανικού ενζύμου που βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου και ονομάζεται ATP-συνθετάση. Τα μιτοχόνδρια διαθέτουν DNA έτσι ώστε να μπορούν να αναπαράγονται χωρίς να χρειάζεται να διαιρεθεί το κύτταρο. Αυτή η σχετική αυτοδυναμία κάνει τους επιστήμονες να υποθέτουν πως προέρχονται από προκαρυωτικούς οργανισμούς που ενσωματώθηκαν σε ευκαρυωτικά κύτταρα, συμβιώνοντας με αυτά. (Alberts *et. al.*, 2000)

Το mtDNA είναι ένα μικρό πλασμίδιο μικρότερο από 20kb στα περισσότερα θηλαστικά που υπάρχει μόνο στα μιτοχόνδρια. Είναι ιδιαίτερα πολυμορφικό μέσα στα είδη και εξελίσσεται πολύ γρήγορα σε σχέση με το πυρηνικό DNA και γι' αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μελέτες γενετικής ποικιλότητας και φυλογενετικής δομής σ' ένα είδος. (Bruford *et. al.* 2003).

Τα γονιδιώματα των μιτοχονδρίων κωδικοποιούν πρωτεΐνες που συνδέονται με την οξειδωτική φωσφορυλίωση, μόρια rRNA και tRNA που χρησιμοποιούνται στα μιτοχόνδρια και λίγες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη μετάφραση.

Έχει προσδιοριστεί η αλληλουχία τουλάχιστον 200 μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων, τα περισσότερα εκ των οποίων κωδικοποιούν από 3 έως 37 πρωτεΐνες. Τα μιτοχονδριακά γονιδιώματα των ζώων, αποτελούνται από ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA και έχουν κατά κανόνα μόνο 13 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες μαζί με 22 tRNA ΚΑΙ 2 rRNA (Stryer, 1997).

Το mtDNA θεωρείται κατάλληλο για χρήση σε μελέτες διαχωρισμού ειδών για τους εξής λόγους:

- Η ποσότητα του ανά κύτταρο θεωρείται υπερεπαρκής αφού απαντάται περίπου σε 1000 αντίτυπα (1000 φορές περισσότερο από

το πυρηνικό DNA). Κάτι τέτοιο αυξάνει την πιθανότητα επιτυχούς ενίσχυσης με την τεχνική PCR, του επιθυμητού τμήματος του γονιδιώματος που μας ενδιαφέρει.

- Εξαιτίας της μητρικής του προελεύσεως και την απουσία ανασυνδυασμού κληρονομείται απαράλλακτο από γενιά σε γενιά.
- Ο μεγάλος αριθμός μεταλλαγής του (10 φορές υψηλότερος του πυρηνικού) έχει ως αποτέλεσμα την συσσώρευση πολυμορφισμών και την δημιουργία μεγάλης ποικιλομορφίας μεταξύ των μιτοχονδρίων, όχι μόνο μεταξύ των ειδών αλλά και ανάμεσα στο ίδιο είδος.

Τα γονίδια του mtDNA με την μεγαλύτερη προτίμηση σε μελέτες διαχωρισμού ειδών είναι τα : 16S και 12S rRNA, Cyt b και το D-Loop. Η επιλογή αυτών των γονιδίων στηρίζεται στο γεγονός ότι ο ρυθμός και ο τρόπος εξέλιξης τους είναι καλά κατανοητός και θεωρείται ότι είναι σχετικά σταθερός και όμοιος μεταξύ μεγάλωσμων χερσαίων ειδών (Bruford *et al.*, 2003).

1.4 16S rRNA

Το 16S rRNA αποτελεί συστατικό των προκαρυωτικών ριβοσωμάτων. Πολλαπλές ακολουθίες 16S rRNA μπορούν να υπάρχουν σε ένα μοναδικό βακτήριο. Έχει πολλαπλές λειτουργίες:

- Έχει δομικό ρόλο, δρώντας ως πλαίσιο στήριξης και ορίζοντας τις λειτουργίες των ριβοσωμικών πρωτεϊνών
- Αλληλεπιδρά με το 23S, βοηθώντας στο δέσιμο των δύο ριβοσωμικών υπομονάδων(50S+30S)
- Σταθεροποιεί σωστά τα κωδικόνια-αντικωδικόνια μέσω δεσμού υδρογόνου

Το 16S rRNA γονίδιο χρησιμοποιείται σε φυλογενετικές μελέτες αφού διατηρείται μεταξύ διαφορετικών ειδών βακτηρίων και αρχαίων. Επιπρόσθετα, το μιτοχονδριακό και το χλωροπλαστικό rRNA έχουν ενισχυθεί. Παγκόσμιοι εκκινητές PCR χρησιμοποιούνται για να ενισχύσουν το 16 S rRNA γονίδιο, το οποίο προσφέρει τη φυλογενετική πληροφορία.

(http://en.wikipedia.org/wiki/16S_ribosomal_RNA)

Το 16S RNA παίζει ενεργό ρόλο στην πρωτεϊνοσύνθεση. Η πρωτεΐνη S12 σταθεροποιεί τη δομή του 16S rRNA στην περιοχή όπου δεσμεύεται η στρεπτομυκίνη (αντιβιοτικό). Τα σημαντικά σημεία είναι ότι η περιοχή των θέσεων P/A επηρεάζει την πιστότητα της μετάφρασης: η πιστότητα της μετάφρασης μειώνεται ή βελτιώνεται μεταβάλλοντας τη δομή του 16S rRNA. Ο συνδυασμός των επιδράσεων της πρωτεΐνης S12 και της στρεπτομυκίνης στη δομή του rRNA εξηγεί τη συμπεριφορά διαφόρων μεταλλαγμάτων της S12, ορισμένα από τα οποία καθιστούν τη σωστή λειτουργία του ριβοσώματος εξαρτώμενη από την παρουσία στρεπτομυκίνης.

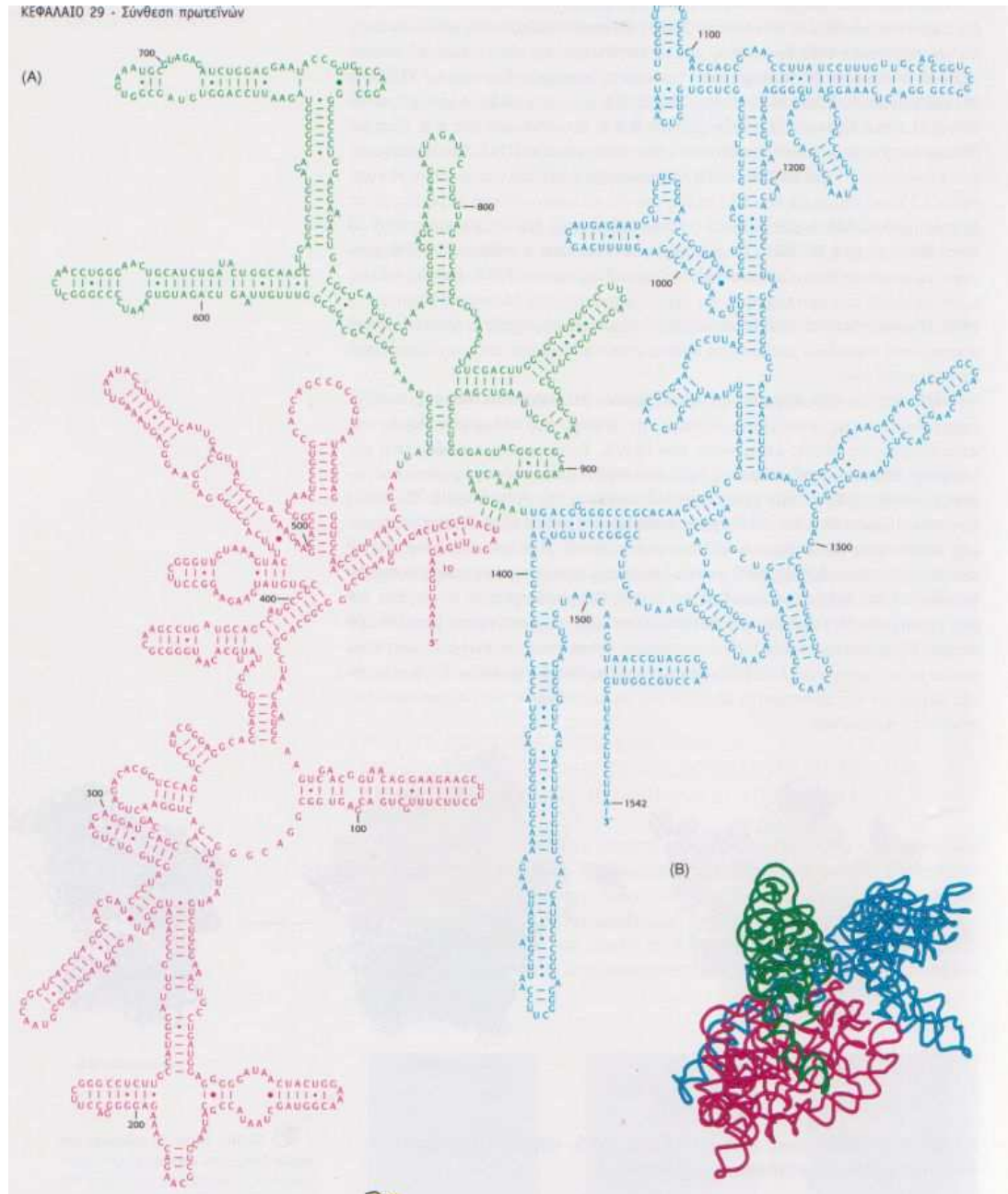
Σήμερα γνωρίζουμε, από την κρυσταλλική δομή του ριβοσώματος, ότι το 16S rRNA έχει τη δυνατότητα να δημιουργήσει επαφές με το αμινοακυλο-tRNA. Δύο βάσεις του 16S rRNA μπορεί να έρθουν σε επαφή με τη μικρή αύλακα της έλικας που σχηματίζεται από το ζευγάρωμα του αντικωδικονίου στο tRNA με τις δύο πρώτες βάσεις του κωδικονίου στο mRNA. Το σωστό ζευγάρωμα των βάσεων στις δύο πρώτες θέσεις κωδικονίου-αντικωδικονίου σταθεροποιεί άμεσα τη δομή. Ωστόσο, ο μηχανισμός αυτός δεν ελέγχει τις επαφές στην τρίτη θέση.

Η σταθεροποίηση των σωστά ζευγαρωμένων αμινοακυλο-tRNA μπορεί να έχει δύο συνέπειες. Συγκρατώντας το αμινοακυλο-tRNA στη θέση A, το εμποδίζει να διαφύγει πριν πραγματοποιηθεί το επόμενο στάδιο της πρωτεϊνοσύνθεσης. Ταυτόχρονα, η αλλαγή στη διαμόρφωση του rRNA ίσως αποτελεί το έναυσμα για το επόμενο στάδιο της αντίδρασης, που είναι η υδρόλυση του GTP από τον EF-Tu.

Το βασικό συμπέρασμα είναι ότι το rRNA δημιουργεί πολλές αλληλεπιδράσεις τόσο με το rRNA όσο και με το mRNA. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις επαναλαμβάνονται σε κάθε κύκλο σχηματισμού πεπτιδικού δεσμού (Lewin, 2004).

Τα γονίδια τα οποία ελέγχουν τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του rRNA μεταλλάσσονται αργά διά μέσου των εκατομμυρίων ετών της εξελικτικής πορείας, λόγω του σπουδαίου ρόλου τους. Μία μετάλλαξη που θα συνέβαινε σ' αυτά πιθανόν να άλλαζε την αλληλουχία των περισσότερων αν όχι όλων πρωτεϊνών που συντίθενται σ' ένα συγκεκριμένο οργανισμό. Πολλές από αυτές θα ήταν χωρίς αμφιβολία επιβλαβείς και επομένως θα

υπάρχει έντονη επιλογή ενάντια σε μετάλλαξη με επιπτώσεις τόσο μεγάλης έκτασης.



Εικόνα 7. Σχήμα αναδίπλωσης ριβοσωματικού RNA. (A) Η δευτεροταγής δομή του ριβοσωματικού RNA 16S που συνάγεται από συγκρίσεις αλληλουχιών και αποτελέσματα χημικών μελετών. (B) Η τριτοταγής δομή του RNA 16S που προσδιορίστηκε με κρυσταλλογραφία με ακτίνες Χ.

2.1 Σκοπός μελέτης

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ο πολυμορφισμός μονόκλωνης διαμόρφωσης (SSCP) για να εξετάσουμε τα είδη γάλακτος που χρησιμοποιούνται στα τυποποιημένα προϊόντα κίτρινων τυριών. Σκοπός της εργασίας είναι η επαλήθευση των συστατικών που αναγράφονται στην ετικέτα, ώστε να γνωρίζει ο καταναλωτής εάν στα συγκεκριμένα προϊόντα υπάρχει νόθευση ή όχι. Συνολικά εξετάστηκαν 39 διαφορετικά προϊόντα από τυποποιημένα κίτρινα τυριά (δείγματα). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε ένα τμήμα του γονιδίου 16s rRNA του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) που απομονώθηκε από το κάθε ένα δείγμα ξεχωριστά.

Η τεχνική που εφαρμόστηκε ήταν η PCR-SSCP. Αρχικά με εκκινητές κοινούς για όλα τα δείγματα (universal primers), ενισχύθηκε με την μέθοδο της PCR τμήμα του γονιδίου 16s rRNA μεγέθους 234bp όσον αφορά το πρόβατο (*Ovis aries*), 234bp όσον αφορά το μοσχάρι (*Bos taurus*), 235bp όσον αφορά το κατσίκι (*Capra hircus*). Ακολούθησε αποδιάταξη των προϊόντων της PCR, ηλεκτροφόρησή τους σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και χρώση της πηκτής για εμφάνιση των αποτελεσμάτων. Η ανάλυση έδειξε νόθευση σε 7 από τα 39 δείγματα, είτε με την προσθήκη κάποιου είδους επιπλέον στο προϊόν, είτε με την χρήση ενός μόνο είδους ενώ στην ετικέτα αναφέρονται περισσότερα του ενός.

Παρακάτω περιγράφονται τα υλικά και ο εξοπλισμός του εργαστηρίου, οι μέθοδοι και οι πειραματικές εργασίες που πραγματοποιήθηκαν τα αποτελέσματα αυτών των εργασιών καθώς και η συζήτηση των συμπερασμάτων που προέκυψαν.

2.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη είναι η εξής:

1. Συλλογή Δειγμάτων
2. Απομόνωση DNA
 - 2.1 Φωτομέτρηση UV-VIS
 - 2.2 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%
3. PCR
 - 3.1 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2%
4. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης
 - 4.1 Χρώση της πηκτής πολυακρυλαμίδης

1. Συλλογή Δειγμάτων

Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 39 δείγματα από 39 διαφορετικά προϊόντα τυποποιημένων κίτρινων τυριών, τα οποία κυκλοφορούν στα τοπικά καταστήματα ειδών διατροφής του Δήμου Βόλου καθώς και του Δήμου Ιωαννίνων. Τα προϊόντα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση PCR-SSCP αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα.

α/α	ΔΕΙΓΜΑΤΑ	
1	Σκληροτύρι Δεσκάτη Γρεβενών	πρόβειο
2	Σκληροτύρι Κορφοβούνι	πρόβειο
3	Gouda Milborna	αγελαδινό
4	Edamer LIOL	αγελαδινό
5	Ημίσκληρο Επίλεκτο	αγελαδινό
6	Gouda Ολλανδίας	αγελαδινό
7	Emmedal Ολλανδίας	αγελαδινό
8	Kerrygold Κεφαλοτύρι	αγελαδινό
9	Μακεδονικό	αγελαδινό
10	Γραβιέρα Νάξου	αγελαδινό-80%, πρόβειο-20%
11	Ημίσκληρο Κολιός	αγελαδινό
12	Milner	αγελαδινό
13	Arla – Δανέζικο τυρί	αγελαδινό
14	Κασέρι Ελάτης	πρόβειο
15	Edam Γερμανίας	αγελαδινό
16	Gouda Γερμανίας	αγελαδινό

17	Dirollo Adoro	αγελαδινό
18	Nounou Gouda	αγελαδινό
19	Ημίσκληρο Σεφόρμα	αγελαδινό
20	Τρικαλινό μπλοκ φάγε	Αγελαδινό - αιγοπρόβειο
21	Γραβιέρα Κρήτης ποπ τρύπας	πρόβειο
22	Provolone Dolce	αγελαδινό
23	Μοτσαρέλα Ιταλίας	αγελαδινό
24	Μάτης ημίσκληρο φόρμα	Αγελαδινό- αιγοπρόβειο
25	Γραβιέρα Μυτιλήνης	πρόβειο
26	Γραβιέρα Carrefour	πρόβειο
27	Mozarella Δανίας	αγελαδινό
28	Edam Valio	αγελαδινό
29	Mozarella Γερμανίας φραντζόλα	αγελαδινό
30	Atleet	αγελαδινό
31	Καπνιστό Βερμίου	αγελαδινό
32	Γραβιέρα Κρήτης Κριάρα	πρόβειο
33	Παρμεζάνα Regiano	αγελαδινό
34	Μοτσαρέλα Gambone	αγελαδινό
35	Κασέρι Κίσσα	πρόβειο
36	Gouda ΦΑΓΕ	αγελαδινό
37	Γραβιέρα Κρήτης ΦΑΓΕ	πρόβειο
38	Γραβιέρα Άρτας	πρόβειο
39	Gouda Rucker	αγελαδινό

Πίνακας 1. Τυποποιημένα προϊόντα κίτρινων τυριών τα οποία αναλύθηκαν.

2. Απομόνωση του DNA

Καθοριστικής σημασίας για τη μελέτη του DNA είναι η σωστή απομόνωσή του από τα κύτταρα των οργανισμών. Μια αποτελεσματική μέθοδος απομόνωσης πρέπει να δίνει αρκετή ποσότητα DNA, δηλαδή να είναι αποδοτική ποσοτικά αλλά και ποιοτικά δίνοντας DNA σε καλή κατάσταση, δηλαδή μη διασπασμένο σε μικρά κομμάτια. Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου εξαρτάται από το είδος και την ποσότητα των κυττάρων αλλά και από το είδος του DNA που πρέπει να απομονωθεί (πυρηνικό, μιτοχονδριακό, πλασμιδιακό).

Διαλύματα

1. Lysis buffer

- I.** 50mM Tris- HCl 2M, pH=8,0
- II.** 100mM EDTA
- III.** 100mM NaCl
- IV.** 1% SDS

2. Πρωτεΐνάση K (10 mg/ml)
3. Φαινόλη : Χλωροφόρμιο : Ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1)
4. Χλωροφόρμιο : Ισοαμυλική αλκοόλη (24:1)
5. CH₃COONa 0,2M
6. Αιθανόλη 100%

Διαδικασία

1. Τοποθέτηση 1g δείγματος αρκετά τεμαχισμένου σε σωληνάριο errendorf του 1,5ml και προσθήκη 700μl lysis buffer.
2. Προσθήκη 20μl πρωτεΐνάσης K στο δείγμα και ελαφρή ανάδευση.
3. Ολονύκτια (overnight) επώαση στους 55 °C με συνεχή ανακίνηση των δειγμάτων.
4. Προσθήκη 350μl φαινόλης και 350μl χλωροφόρμιο : ισοαμυλική αλκοόλη. Ανάδευση για 10 λεπτά και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13.000 στροφές στους 4 °C.
5. Μεταφορά της επάνω υδατικής φάσης σε νέο σωληνάριο errendorf του 1,5ml. Προσθήκη 350μl φαινόλης και 350μl χλωροφόρμιο : ισοαμυλική αλκοόλη. Ανάδευση για 10 λεπτά και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13.000 στροφές στους 4 °C.
6. Μεταφορά της επάνω υδατικής φάσης σε νέο σωληνάριο errendorf. Προσθήκη 700μl χλωροφόρμιο : ισοαμυλική αλκοόλη. Ανάδευση για 10 λεπτά και φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές για 10 λεπτά στους 4 °C.
7. Μεταφορά της επάνω υδατικής φάσης σε νέο σωληνάριο errendorf του 1,5ml. Προσθήκη 40μl οξικού νατρίου και 1ml 100% παγωμένη αιθανόλη.
8. Απομάκρυνση της αιθανόλης. Παραμονή των δειγμάτων για περίπου 1 ώρα στους 37 °C.
9. Αραίωση των δειγμάτων σε 100μl ddH₂O και επώαση overnight σε θερμοκρασία δωματίου.

Η διάσπαση των κυττάρων, από τα οποία θα απομονωθεί το DNA, γίνεται με το NaCl, το οποίο ρυθμίζει την ωσμωτική πίεση του κυττάρου. Πιο συγκεκριμένα, προκαλεί διόγκωση των κυττάρων και συνεπώς τη λύση τους. Η λύση των κυττάρων πρέπει να γίνεται σε κατάλληλο pH το οποίο ρυθμίζεται από το Tris – HCl (ρυθμιστικό διάλυμα). Το EDTA εμποδίζει τη δράση των νουκλεασών δεσμεύοντας με το χηλικό παράγοντα το Ca^{++} ή το Mg^{+} . Το EDTA μπορεί να δεσμεύσει 4 μονοσθενή ή 2 δισθενή κατιόντα. Το SDS είναι ιοντικό απορρυπαντικό που διασπά τη μεμβράνη του πυρήνα και αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες συμβάλλοντας έτσι στην προστασία του DNA από τις νουκλεάσες. Η πρωτεϊνάση K προκαλεί την πέψη των πρωτεϊνών. Η φαινόλη είναι ισχυρός αποδιατακτικός παράγοντας των πρωτεϊνών και διαχωρίζει τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια από τα νουκλεϊκά οξέα κατά την εκχύλιση του DNA. Το pH του διαλύματος της φαινόλης πρέπει να είναι μεγαλύτερο του 7 γιατί η κατανομή του DNA γίνεται κυρίως στη μεσόφαση σε όξινο περιβάλλον. Το χλωροφόρμιο καθιστά πιο εύκολο το διαχωρισμό των φάσεων λόγω μεγάλης πυκνότητας, μετουσιώνει τις πρωτεΐνες και απομακρύνει τη διαλυμένη φαινόλη από την υδατική φάση. Η ισοαμυλική αλκοόλη σταθεροποιεί το χλωροφόρμιο. Η παγωμένη αιθανόλη 100% αφυδατώνει και κατακρημνίζει με τη βοήθεια του οξικού νατρίου το DNA.

3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η PCR είναι μία *in vitro*, απλή, γρήγορη και ευαίσθητη τεχνική που επιτρέπει την επιλεκτική αντιγραφή ειδικών αλληλουχιών DNA από ένα σύνθετο μίγμα μορίων DNA. Χρησιμοποιείται ευρέως στην ιατρική και βιολογική έρευνα και έχει πολλές εφαρμογές όπως την ανίχνευση κληρονομικών ασθενειών, τη διάγνωση μολυσματικών ασθενειών, την κλωνοποίηση γονιδίων και τα τεστ πατρότητας. Η PCR εφευρέθηκε από τον Karry Mullis το 1983. Γι' αυτή του την εφεύρεση τιμήθηκε με το Βραβείο Νόμπελ Χημείας το 1993. Υπάρχουν τρία κύρια στάδια σε μία PCR τα οποία επαναλαμβάνονται για 30 ή 40 κύκλους. Η διαδικασία λαμβάνει χώρα σε έναν αυτοματοποιημένο κυκλοποιητή ο οποίος μπορεί να θερμαίνει και να ψύχει τα σωληνάρια *eppendorf* με το μίγμα της αντίδρασης σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα.

Διαδικασία

1. Αποδιάταξη στους 92-95°C:

Κατά τη διάρκεια της αποδιάταξης το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο και όλες οι ενζυμικές αντιδράσεις σταματούν, π.χ. η επιμήκυνση ενός μορίου από τον προηγούμενο κύκλο.

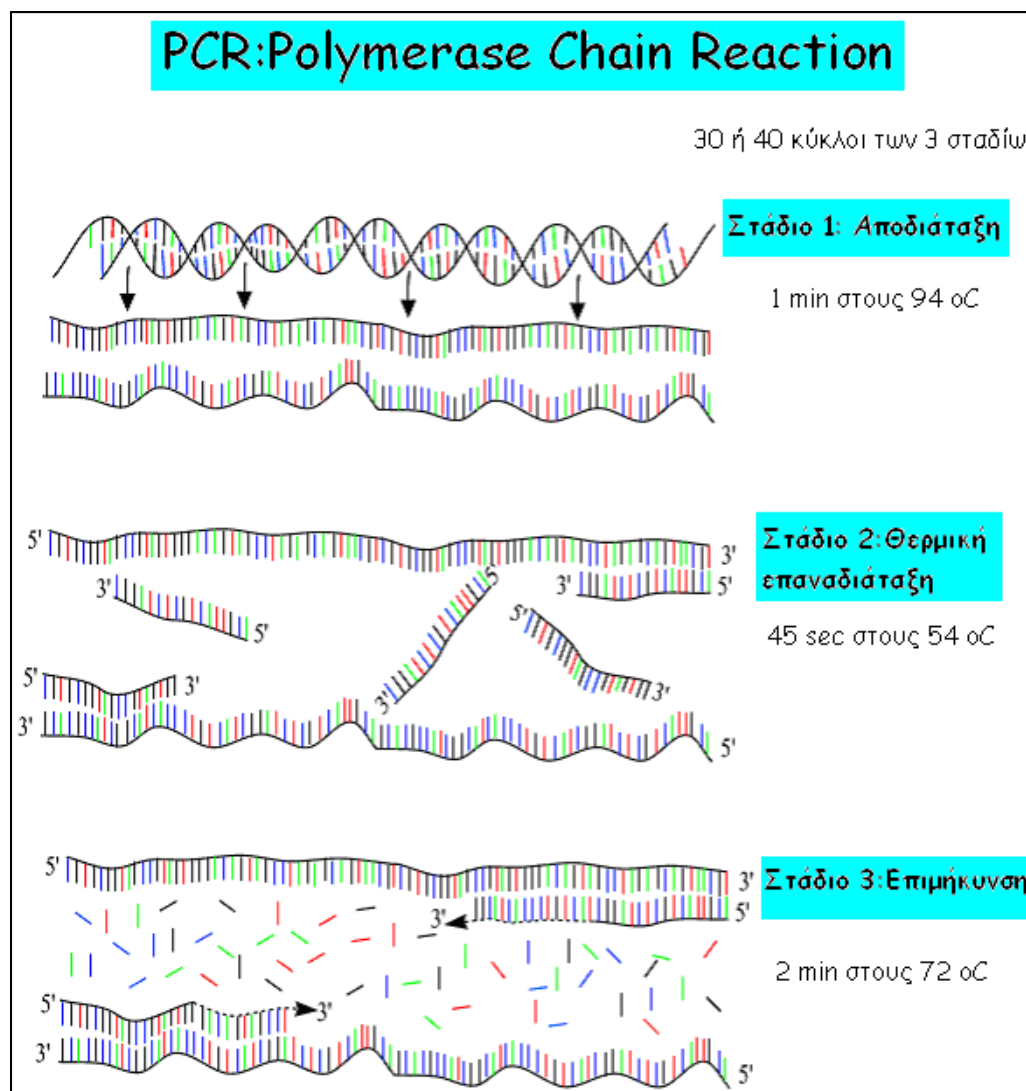
2. Θερμική επαναδιάταξη στους 50-65°C:

Ιοντικοί δεσμοί σχηματίζονται και διασπώνται συνεχώς μεταξύ των εκκινητών και των μονόκλωνων αλυσίδων. Οι πιο σταθεροί δεσμοί διαρκούν λίγο περισσότερο (στο σημείο όπου οι εκκινητές είναι ακριβώς συμπληρωματικοί με τις μονόκλωνες αλυσίδες) και σ' αυτό το μικρό διάστημα των δίκλωνων DNA (εκκινητής και μήτρα) η πολυμεράση μπορεί να προσδεθεί και να ξεκινήσει την αντιγραφή του μονόκλωνου DNA. Μόλις προστεθούν λίγες βάσεις ο ιοντικός δεσμός είναι πλέον τόσο ισχυρός μεταξύ του εκκινητή και της μήτρας που δεν μπορεί να σπάσει.

3. Επιμήκυνση στους 70-78°C:

Αυτή είναι η ιδανική θερμοκρασία για τη δράση της πολυμεράσης. Οι εκκινητές, στους οποίους προστέθηκαν λίγες βάσεις, έχουν ισχυρότερη ιοντική έλξη στη μήτρα από τις δυνάμεις που διασπούν αυτή την έλξη. Οι εκκινητές που δεν είναι τελείως συμπληρωματικοί με την αλληλουχία στην οποία έχουν προσδεθεί, αποδιατάσσονται (εξαιτίας της υψηλής θερμοκρασίας) και έτσι δεν αντιγράφεται αυτό το τμήμα. Οι βάσεις που προστίθενται στους εκκινητές είναι συμπληρωματικές με το μονόκλωνο μόριο του DNA και προστίθενται στο 3' άκρο του εκκινητή (η πολυμεράση προσθέτει τα νουκλεοτίδια σε μία κατεύθυνση 5' προς 3').

Η ευρεία χρήση της PCR οδήγησε στην ανάπτυξη πολλών τροποποιήσεων της που την προσαρμόζουν κάθε φορά στις απαιτήσεις των πειραμάτων. Μερικές από αυτές είναι: Inverse PCR, Nested PCR, Ligation-mediated PCR, RT-PCR, Assembly PCR, Asymmetric PCR, Quantitative PCR, Quantitative real-time PCR, Touchdown PCR, Colony PCR, RACE-PCR, Multiplex-PCR, Methylation Specific PCR. Πιο πρόσφατα έχουν αναπτυχθεί η Tail PCR και η Meta PCR.



Εικόνα 8: Τα στάδια που ακολουθούνται σε κάθε κύκλο της PCR.

Δύο βασικά αντιδραστήρια της PCR είναι οι εκκινητές και η πολυμεράση. Η επιλογή του μήκους της αλληλουχίας των εκκινητών και της θερμοκρασίας αποδιατάξεως ή τήξεως τους (T_m) εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Η T_m ενός εκκινητή ορίζεται ως η θερμοκρασία στην οποία οι μισές περιοχές-στόχοι των εκκινητών είναι κατειλημμένες. Η T_m αυξάνει όσο μεγαλώνει και το μήκος του εκκινητή. Εκκινητές με μικρό μήκος θα προσδένονται σε διάφορες θέσεις στο μόριο του DNA, με αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό ανεπιθύμητων γονιδίων. Υψηλές θερμοκρασίες, π.χ. πάνω από 80°C, μπορεί να προκαλέσουν προβλήματα στην DNA πολυμεράση καθώς είναι λιγότερο δραστική σε τέτοιες θερμοκρασίες. Το ιδανικό μήκος για τους εκκινητές είναι από 15 έως 40 νουκλεοτίδια με T_m από 55°C έως 65°C.

Για τις ανάγκες της PCR πρέπει να χρησιμοποιηθεί μία πολυμεράση η οποία θα είναι θερμοσταθερή, δηλαδή θα αντέχει την επαναλαμβανόμενη θέρμανση στους 94°C. Έτσι, δε χρειάζεται η προσθήκη πολυμεράσης σε κάθε κύκλο και η διαδικασία μπορεί να αυτοματοποιηθεί. Μία από τις πρώτες θερμοσταθερές πολυμεράσες είναι η Taq πολυμεράση η οποία ακόμη και σήμερα χρησιμοποιείται ευρύτατα. Η Taq πολυμεράση απομονώθηκε από το θερμόφιλο οργανισμό *Thermus aquaticus*. Ένα μειονέκτημα της Taq είναι ότι δεν έχει δράση 3'-5' εξωνουκλεάσης με αποτέλεσμα να μην μπορεί να διορθώσει τα λάθη που η ίδια κάνει κατά την επιμήκυνση του DNA. Αυτό το μειονέκτημα της Taq καλύπτουν δύο άλλες πολυμεράσες, η Pwo και η Pfu, που προέρχονται από αρχαία. Ωστόσο, αυτές οι πολυμεράσες επιμηκώνουν το DNA με πιο αργό ρυθμό από την Taq. Για τη σωστή δράση της πολυμεράσης απαιτείται ειδικό διάλυμα buffer και κατάλληλη συγκέντρωση διαλύματος MgCl₂.

Η PCR έχει εφαρμοστεί και για την ενίσχυση τμήματος DNA με μήκος 10kb. Ωστόσο, ο μέσος όρος των τμημάτων που ενισχύονται με την PCR είναι από μερικές εκατοντάδες έως μερικές χιλιάδες βάσεις.

Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου (Mullis et al., 1987) στηρίζεται στη χρήση των παρακάτω:

1. Μικρή ποσότητα DNA που χρησιμοποιείται ως εκμαγείο.
2. Ειδικό διάλυμα (buffer) για την πολυμεράση.
3. Διάλυμα MgCl₂ κατάλληλης συγκέντρωσης.
4. Ζεύγος συνθετικών νουκλεοτιδίων για την έναρξη της αντιγραφής (εκκινητές).
5. Κατάλληλο διάλυμα ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων.
6. Θερμοσταθερή Taq πολυμεράση.

Για τον πολλαπλασιασμό του γονιδίου 16S rRNA, στοχεύοντας πάντα στην απλοποίηση της όλης μεθόδου ταυτοποίησης, χρησιμοποιήσαμε παγκόσμιους εκκινητές. Οι εκκινητές αυτοί είναι σχεδιασμένοι από πολλά είδη πτηνών, θηλαστικών και ψαριών σε περιοχές που είναι συντηρημένες. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να μπορούν να δώσουν PCR προϊόν για πολλά διαφορετικά είδη. Για την PCR χρησιμοποιήθηκαν οι εξής εκκινητές:

<u>Εκκινητής</u>	<u>Αλληλουχία</u>
B-M.16sRNA.Fw	5' -AΥA AGA CGA GAA GAC CC-3'
B-M.16sRNA.Rv	5' -GAT TGC GCT GTT ATC CC-3'

Πίνακας 2. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμημάτων DNA. Όπου Υ = C or T

Ενισχύσαμε ένα τμήμα του, μεγέθους 234bp όσον αφορά το πρόβατο (*Ovis aries*), 234bp όσον αφορά το μοσχάρι (*Bos taurus*), 235bp όσον αφορά το κατσίκι (*Capra hircus*) και 239 βάσεων όσον αφορά το γουρούνι (*Sus scrofa*).

Ο ενζυμικός πολλαπλασιασμός πραγματοποιήθηκε σε συσκευή erppendorf. Το συνολικό διάλυμα της αντίδρασης είναι 50μl. Τα αντιδραστήρια που προστέθηκαν και οι ποσότητές τους έχουν ως εξής:

DNA	1000mg
Buffer (10x → 1x)	5μl
MgCl ₂ (50mM → 2mM)	2,5μl
dNTPs (10mM each)	1μl
Primer F (25pmoles/μl)	1μl
Primer R (25pmoles/μl)	1μl
Taq polymerase 5units/μl	0,2μl
Bovine Serum Albumine (BSA)	0,2μl
dd H ₂ O	38,1μl
Συνολικός όγκος	50 μl

Οι συνθήκες στις οποίες έλαβε χώρα η PCR είναι οι ακόλουθες:

Αρχική αποδιάταξη: 95°C για 4min

Αποδιάταξη: 95°C για 40sec

Συγκόλληση εκκινητή: 57°C για 50sec

Επιμήκυνση: 72°C για 40sec

Τελική επιμήκυνση: 72°C για 10min

4. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης

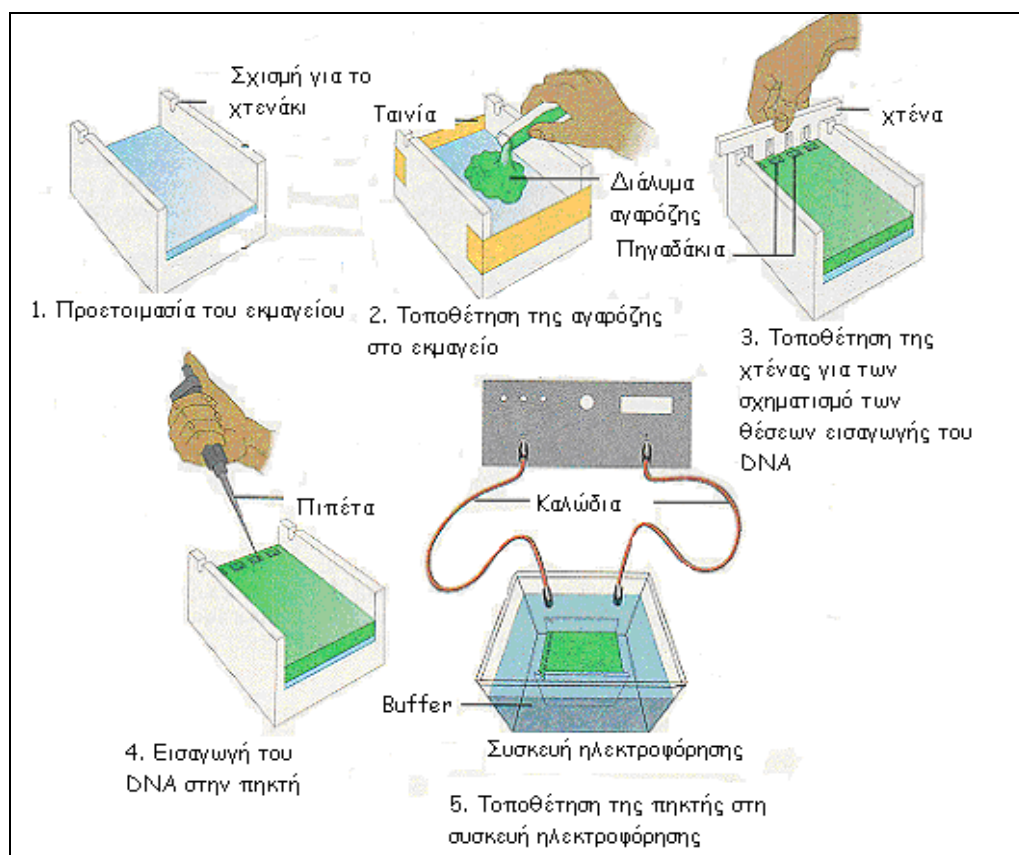
Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται στη μοριακή βιολογία για να διαχωρίσει τμήματα του DNA ανάλογα με το μέγεθός τους. Ακόμη, με τη μέθοδο αυτή υπολογίζεται το μέγεθος των τμημάτων που έχουν διαχωριστεί, συγκρίνοντάς τα με τμήματα γνωστού μεγέθους (DNA μάρτυρας μοριακών μεγεθών).

Βασική αρχή της μεθόδου είναι ότι τα αρνητικά φορτισμένα μόρια του DNA μετακινούνται μέσα στην πηκτή εξαιτίας του ηλεκτρικού πεδίου. Τα μικρά μόρια περνούν εύκολα και γρήγορα μέσα από τους πόρους της πηκτής. Τα μεγαλύτερα μόρια πρέπει να αλλάξουν διαμόρφωση για να περάσουν μέσα από τους πόρους και έτσι η κίνησή τους είναι πιο αργή. Επιπλέον, σημαντική είναι και η διαμόρφωση των μορίων στη μετακίνησή τους (κυκλικό, γραμμικό, υπερελικωμένο DNA). Η παρουσία του βρωμιούχου αιθιδίου στην πηκτή αναγκάζει τα μόρια να κινηθούν πιο αργά προς το θετικό πόλο. Όσο μεγαλύτερη είναι η τάση του πεδίου τόσο πιο γρήγορη είναι η μετακίνηση των μορίων. Η τάση όμως δε γίνεται να είναι πολύ υψηλή γιατί αναπτύσσονται μεγάλες θερμοκρασίες και προκαλείται το λιώσιμο της πηκτής.

Η βασική χρωστική στις πηκτές αгарόζης είναι το βρωμιούχο αιθίδιο, το οποίο έχει τη μοναδική ιδιότητα να φθορίζει στο υπεριώδες. Φορτώνοντας το DNA σε μία πηκτή που περιέχει αιθίδιο και εκθέτοντάς το στο υπεριώδες γίνονται ορατές οι διακριτές μπάντες του DNA καθώς αυτό παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA. Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι καρκινογόνο και απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή κατά το χειρισμό του. Για να καθιζάνει το DNA καθώς φορτώνεται στην πηκτή και για να είναι εύκολα ορατό στο υπεριώδες προστίθεται το διάλυμα φόρτωσης (loading buffer). Το κυανό του ξυλενίου και το μπλε της βρωμοφαινόλης χρησιμοποιούνται συνήθως. Τα loading buffers περιέχουν συνήθως γλυκερόλη, σουκρόζη και φυκόλη έτσι ώστε να καταβυθίζεται το DNA. Περιέχουν χρωστικές για να είναι εύκολη η παρατήρηση της προόδου της ηλεκτροφόρησης.

Τα κυριότερα buffers που χρησιμοποιούνται στις ηλεκτροφορήσεις αгарόζης είναι το TAE (Tris acetate EDTA) και το TBE (Tris borate EDTA).

Το ΤΑΕ προσφέρει καλύτερη ανάλυση για μεγάλα τμήματα DNA. Αυτό σημαίνει χαμηλότερη τάση, περισσότερος χρόνος αλλά καλύτερο προϊόν.



Εικόνα 9: Προετοιμασία της πηκτής αгарόζης.

Για την προετοιμασία της πηκτής αгарόζης ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

1. Προετοιμασία του εκμαγείου στο οποίο θα στερεοποιηθεί η πηκτή.
2. Προετοιμασία της πηκτής. Χρησιμοποιήθηκαν 0,6gr αгарόζης και 30ml ΤΑΕ 1x για την παρασκευή διαλύματος 2%.
3. Βράσιμο του διαλύματος σε φούρνο μικροκυμάτων. Κατά το βράσιμο πρέπει να γίνεται συχνή ανάδευση του διαλύματος.
4. Το διάλυμα ανακινείται έως ότου κρυώσει.
5. Προστίθενται 3μl βρωμιούχου αιθιδίου C=10mg/ml.
6. Τοποθέτηση του διαλύματος στο εκμαγείο.
7. Εισάγεται το χτενάκι στην πηκτή για να σχηματιστούν οι θέσεις στις οποίες θα εισαχθεί το DNA.
8. Όταν η πηκτή στερεοποιηθεί αφαιρείται το χτενάκι.

9. Τοποθέτηση της πηκτής μαζί με τη μήτρα σε μία συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει TAE 1x.
10. Ανάμειξη 3μl loading buffer με 5μl προϊόντος της αντίδρασης της PCR και στη συνέχεια εισαγωγή των δειγμάτων στις θέσεις της πηκτής. Η τάση ρυθμίζεται έτσι ώστε να είναι 70V. Μετά από περίπου 40 λεπτά είναι δυνατή η παρατήρηση των ζωνών του DNA στην πηκτή αφού τοποθετηθεί στη συσκευή UV.

Αποδιάταξη του DNA

Η αποδιάταξη του DNA είναι μία μέθοδος που μας επιτρέπει να διατηρήσουμε τα δείγματα του DNA σε μονόκλωνη κατάσταση για λίγη ώρα. Η αποδιάταξη είναι απαραίτητη για τα δείγματα που πρόκειται να αναλυθούν με τη μέθοδο SSCP. Η διαδικασία περιλαμβάνει μεταφορά μέρους του προϊόντος της PCR (6μl) σε νέο σωληνάριο erppendorf και προσθήκη 10μl αποδιατακτικού διαλύματος.

Αποδιατακτικό διάλυμα: 10ml, αποθήκευση στους 4°C

- I.** 95% formamide
- II.** 10mM NaOH
- III.** 0,05% Bromophenol blue
- IV.** 0,05% xylene cyanol
- V.** 10% glycerol

Στη συνέχεια τα erppendorf τοποθετούνται στον αυτοματοποιημένο κυκλοποιητή όπου επέρχεται η αποδιάταξή τους αφού μείνουν σε υψηλές θερμοκρασίες (95°C για 2 min, 97°C για 2 min και 99°C για 7 min). Μόλις τα δείγματα βγουν από τον κυκλοποιητή τοποθετούνται απευθείας στον πάγο για να διατηρήσουν για κάποιο χρονικό διάστημα τη μονόκλωνη κατάστασή τους.

4. Ανάλυση πολυμορφισμών διαμόρφωσης ενός κλώνου (SSCP)

Η ανάλυση πολυμορφισμών διαμόρφωσης ενός κλώνου είναι μία μέθοδος στην οποία σχηματίζονται μονόκλωνα DNAs από υλικό που έχει πολλαπλασιαστεί με PCR και στη συνέχεια αυτά διαχωρίζονται με βάση την

κινητικότητα τους στο πήκτωμα, που οφείλεται σε μετάλλαξη ενός και μόνο νουκλεοτιδίου. Η διαμόρφωση του κάθε κλώνου διαφέρει ελαφρώς ανάλογα με την ακριβή του αλληλουχία και αυτές οι διαφορές στη διαμόρφωση μπορούν να οδηγήσουν σε διαφορές στην κινητικότητα τους στο πήκτωμα (Orita et al., 1989).

Τα δείγματα του DNA για να διαχωριστούν φορτώνονται σε πηκτή πολυακρυλαμίδης. Η ακρυλαμίδα είναι ένα μονομερές το οποίο πολυμερίζεται σε μακριές αλυσίδες παρουσία ελεύθερων ριζών. Η αλυσίδα διασυνδέεται παρουσία ενός διασυνδέτη (crosslinker), συνήθως του N,N – methylenebisacrylamide και έτσι σχηματίζεται μία πορώδης πηκτή. Το μέγεθος των πόρων εξαρτάται από τη συγκέντρωση της ακρυλαμίδης.

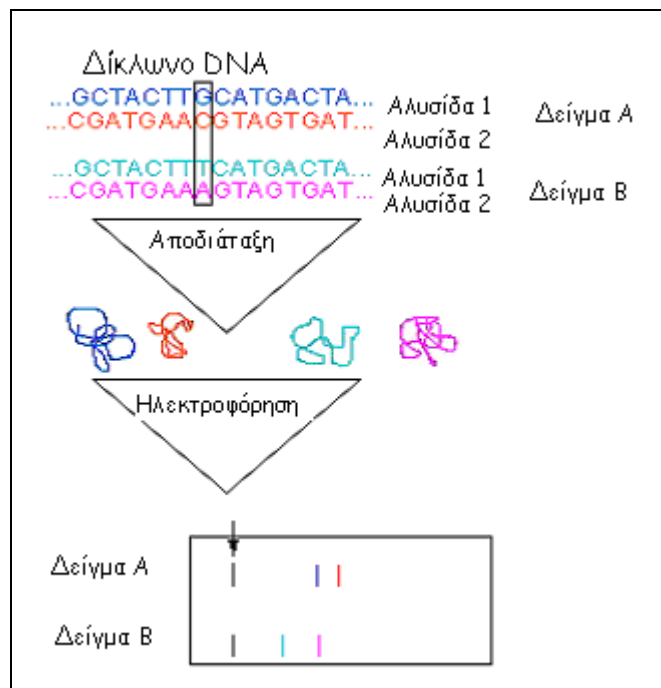
Για την παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης είναι απαραίτητο το μητρικό διάλυμα της ακρυλαμίδης (38,5%). Για την παρασκευή του προστίθενται 75gr ακρυλαμίδης και 2gr bis-ακρυλαμίδα σε 120ml H₂O. Αφού διαλυθεί η ακρυλαμίδα και η bis-ακρυλαμίδα, το διάλυμα διηθείται και συμπληρώνεται H₂O μέχρι τον όγκο των 200ml. Το διάλυμα μπορεί να φυλαχτεί στους 4°C για 10-15 ημέρες.

Για την παρασκευή 125ml πηκτής ακρυλαμίδης (10%) χρησιμοποιούνται:

1. 33ml μητρικού διαλύματος 38,5%
2. 10ml TBE 10x
3. 12,5ml γλυκερόλη 50%

Συμπληρώνεται H₂O μέχρι τον όγκο των 125ml ενώ προστίθενται στο διάλυμα 125μl N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED) και 650μl ammonium persulfate 20% (APS). Η διαδικασία του πολυμερισμού σταθεροποιείται από το TEMED ενώ το APS παρέχει τις ελεύθερες ρίζες.

Αφού στερεοποιηθεί η πηκτή εισάγεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης στην οποία προστίθεται TBE 0,5x. Στη συνέχεια φορτώνονται τα δείγματα τα οποία μόλις έχουν αφαιρεθεί από τον κυκλοποιητή και βρίσκονται στον πάγο για να διατηρηθεί η μονόκλωνη κατάσταση του DNA. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται overnight.



Εικόνα 8: Ανίχνευση μεταλλαγής μιας βάσης με τη μέθοδο SSCP.

Εικόνα 8: Ανίχνευση μεταλλαγής μιας βάσης με τη μέθοδο SSCP

Χρώση των πηκτών πολυακρυλαμίδης με την τεχνική χρώσης νιτρικού αργύρου (Silver Staining)

Για να γίνει ορατό το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης γίνεται χρώση των πηκτών της πολυακρυλαμίδης με την τεχνική silver staining (Ainsworth et al., 1990). Αρχικά, οι πηκτές τοποθετούνται σε δοχεία στα οποία προστίθενται 3 διαλύματα. Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται είναι:

Διάλυμα I: 8ml αιθανόλης και 0,5ml οξικό οξύ. Προσθήκη H₂O μέχρι τον όγκο των 400ml.

Διάλυμα II: 200ml AgNO₃ 1gr/lit.

Διάλυμα III: 3gr NaOH, 0,01gr NaBH₄, 1ml HCHO. Προσθήκη H₂O μέχρι τον όγκο των 200ml.

Αρχικά, προστίθενται 200ml του πρώτου διαλύματος για 3min. Στη συνέχεια, προστίθεται το υπόλοιπο διάλυμα για 3min. Μετά, προστίθεται το δεύτερο διάλυμα για 20min και τέλος, το τρίτο διάλυμα το οποίο διατηρείται μέχρι να εμφανιστούν οι ζώνες των δειγμάτων σε ικανοποιητικό βαθμό (περίπου 20min). Μεταξύ των διαλυμάτων γίνεται ξέπλυμα της πηκτής με απεσταγμένο νερό.

Στην τεχνική silver staining ο άργυρος συνδέεται στο DNA και στη συνέχεια αντιδρά με τη φορμαλδεΰδη παρουσία βάσης. Το DNA φαίνεται καφέ σε κίτρινο φόντο. Οι πηκτές μπορούν διατηρηθούν για αρκετό καιρό.

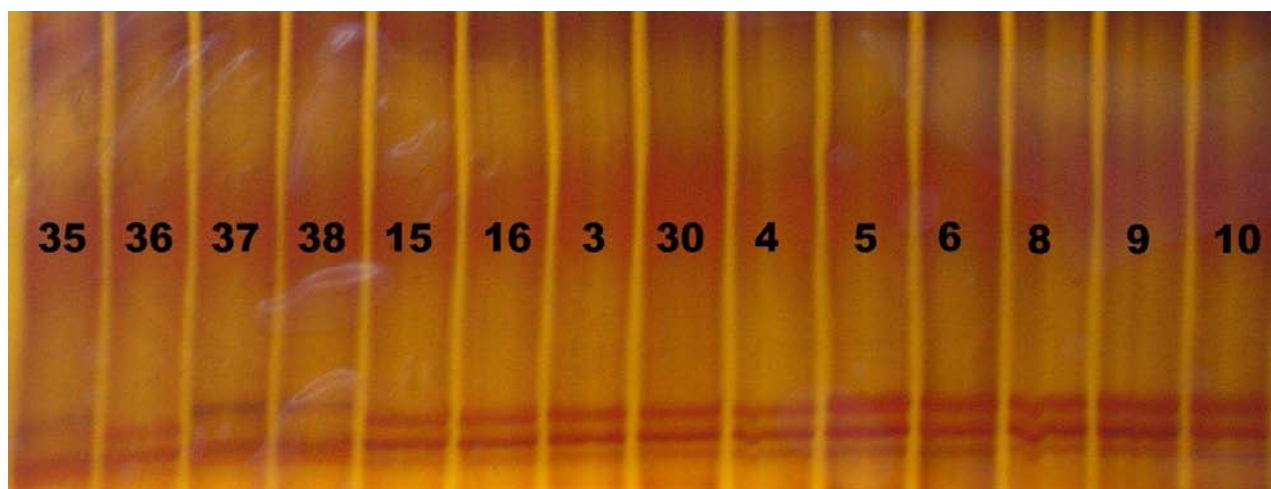
Μετά τη χρώση της πηκτής είναι δυνατή η παρατήρηση των προτύπων. Στα ετερόζυγα άτομα παρατηρούνται τέσσερις καλά διαχωρισμένες ζώνες ενώ στα ομόζυγα άτομα δύο. Η κάθε ζώνη αντιστοιχεί στη μία αλυσίδα του μορίου του DNA.

3. Αποτελέσματα

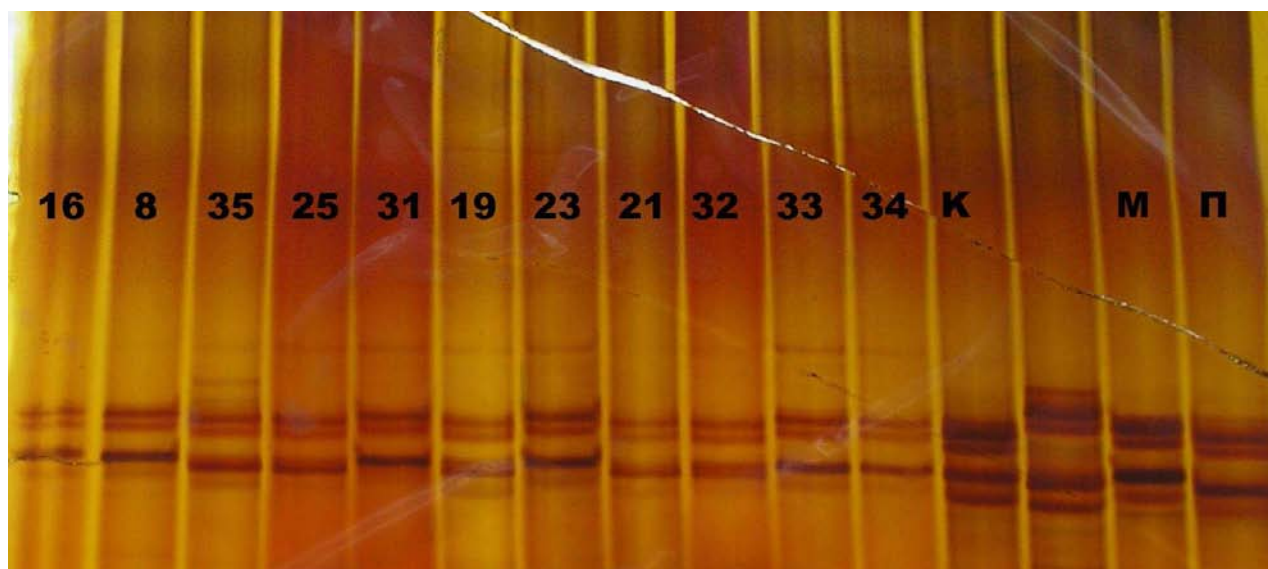
Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη ήταν όλα προϊόντα κατεργασμένα και τυποποιημένα και προέρχονται από τα τοπικά καταστήματα ειδών διατροφής του Δήμου Βόλου και του Δήμου Ιωαννίνων. Ο πίνακας 1, που αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, παρουσιάζει αναλυτικά και τα 39 προϊόντα που αναλύθηκαν καθώς επίσης και το είδος από το οποίο προέρχονται.

Με την διαδικασία της απομόνωσης του DNA, η διαδικασία της απομόνωσης έχει αναφερθεί στο προηγούμενο κεφάλαιο, το υλικό που λάβαμε, ήταν αρκετά καθαρό (απαλλαγμένο από πρωτεΐνες) και ικανό να δώσει ικανοποιητικά PCR προϊόντα. Ο ποιοτικός έλεγχος της απομόνωσης έγινε με την τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης.

Η εφαρμογή της μεθόδου PCR-SSCP στα 39 δείγματα τυποποιημένων κρεάτων αποκάλυψε 4 διαφορετικά πρότυπα. Κάθε πρότυπο αντιστοιχεί σε διαφορετικό συνδυασμό ειδών. Αυτό προκύπτει ύστερα από σύγκριση των ζωνώσεων των προτύπων που προέκυψαν από την απομόνωση των δειγμάτων μας (τυποποιημένα κρέατα), με τις ζωνώσεις από τις απομονώσεις γνωστών δειγμάτων (ειδών). Παρακάτω φαίνονται ενδεικτικά οι ηλεκτροφορήσεις κάποιων δειγμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμίδης καθώς επίσης και οι ηλεκτροφορήσεις των γνωστών δειγμάτων(ειδών).

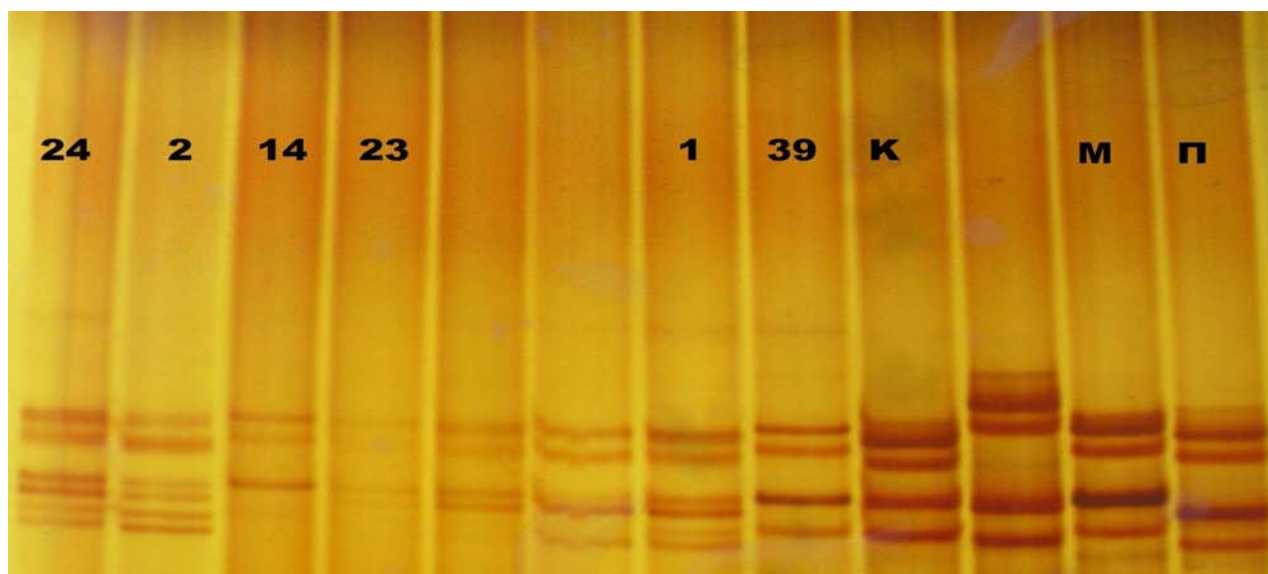


Εικόνα 10: Ηλεκτροφόρηση τυποποιημένων κίτρινων τυριών (δειγμάτων)



Εικόνα 11: Ηλεκτροφόρηση τυποποιημένων κίτρινων τυριών (δειγμάτων)

Τα Κ, Μ, Π αντιστοιχούν στα πρότυπα μας, όπου Κ=κατσίκι, Μ= μοςχάρι(αγελαδινό) και Π= πρόβειο.



Εικόνα 12: Ηλεκτροφόρηση τυποποιημένων κίτρινων τυριών (δειγμάτων)

Τα Κ, Μ, Π αντιστοιχούν στα πρότυπα μας, όπου Κ=κατσίκι, Μ= μοςχάρι (αγελαδινό) και Π= πρόβειο.

Στις εικόνες 10, 11 & 12 διακρίνονται κάποια πρότυπα που προέκυψαν από τις απομονώσεις των δειγμάτων (τυποποιημένα κίτρινα

τυριά). Η αρίθμηση που υπάρχει επάνω στη φωτογραφία αντιπροσωπεύει τα δείγματα που αναλύθηκαν. Στις εικόνες 11 & 12 διακρίνονται τα πρότυπα που προέκυψαν από τις απομονώσεις των γνωστών δειγμάτων (ειδών). Η αρίθμηση που υπάρχει επάνω στην φωτογραφία αντιπροσωπεύει τα γνωστά είδη τα οποία έχουν αναλυθεί. Συνολικά, όσον αφορά την ανάλυση των γνωστών ειδών, έχουν ελεγχθεί 5 διαφορετικά άτομα του ίδιου είδους ώστε να μπορούμε να είμαστε σίγουροι ότι τα πρότυπα που προέκυψαν ύστερα από την ανάλυση των γνωστών αυτών ειδών είναι ακριβής και δεν υπάρχει πολυμορφισμός. Τα γνωστά είδη τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπα για τον έλεγχο των τυποποιημένων προϊόντων είναι τα εξής: (1) πρόβατο (*Ovis aries*), (2) μοσχάρι (*Bos taurus*), (3) κατσίκι (*Capra hircus*).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα πρότυπα που αποκαλύφθηκαν είναι 4.

1. αγελαδινό
2. πρόβειο
3. πρόβειο-κατσικίσιο
4. αγελαδινό – πρόβειο

α/α	ΔΕΙΓΜΑΤΑ	Ετικέτα	Αποτέλεσμα
1	Σκληροτύρι Δεσκάτη Γρεβενών	πρόβειο	πρόβειο-κατσικίσιο
2	Σκληροτύρι Κορφοβούνι	πρόβειο	πρόβειο-αγελαδινό
3	Gouda Milborna	αγελαδινό	αγελαδινό
4	Edamer LIOL	αγελαδινό	αγελαδινό
5	Ημίσκληρο Επίλεκτο	αγελαδινό	αγελαδινό
6	Gouda Ολλανδίας	αγελαδινό	αγελαδινό
7	Emmedal Ολλανδίας	αγελαδινό	αγελαδινό
8	Kerrygold Κεφαλοτύρι	αγελαδινό	αγελαδινό
9	Μακεδονικό κασέρι	αγελαδινό	αγελαδινό
10	Γραβιέρα Νάξου	αγελαδινό - πρόβειο	αγελαδινό
11	Ημίσκληρο Κολιός	αγελαδινό	αγελαδινό
12	Milner	αγελαδινό	αγελαδινό
13	Arla – Δανέζικο τυρί	αγελαδινό	αγελαδινό
14	Κασέρι Ελάτης	πρόβειο	αγελαδινό
15	Edam Γερμανίας	αγελαδινό	αγελαδινό
16	Gouda Γερμανίας	αγελαδινό	αγελαδινό

17	Dirollo Adoro	αγελαδινό	αγελαδινό
18	Nounou Gouda	αγελαδινό	αγελαδινό
19	Ημίσκληρο Σεφόρμα	πρόβειο	πρόβειο-κατσικίσιο
20	Τρικαλινό μπλοκ φάγε	αγελαδινό - αιγοπρόβειο	αγελαδινό
21	Γραβιέρα Κρήτης ποπ τρύπας	πρόβειο	πρόβειο
22	Provolone Dolce	αγελαδινό	αγελαδινό
23	Μοτσαρέλα Ιταλίας	αγελαδινό	αγελαδινό
24	Μάτης ημίσκληρο φόρμα	αγελαδινό-αιγοπρόβειο	αγελαδινό - πρόβειο
25	Γραβιέρα Μυτιλήνης	πρόβειο	πρόβειο
26	Γραβιέρα Carrefour	πρόβειο	πρόβειο
27	Mozarella Δανίας	αγελαδινό	αγελαδινό
28	Edam Valio	αγελαδινό	αγελαδινό
29	Mozarella Γερμανίας φραντζόλα	αγελαδινό	αγελαδινό
30	Atleet	αγελαδινό	αγελαδινό
31	Καπνιστό Βερμίου	αγελαδινό	αγελαδινό
32	Γραβιέρα Κρήτης Κριάρα	πρόβειο	πρόβειο-κατσικίσιο
33	Παρμεζάνα Regiano	αγελαδινό	αγελαδινό
34	Μοτσαρέλα Gambone	αγελαδινό	αγελαδινό
35	Κασέρι Κίσσα	πρόβειο	πρόβειο
36	Gouda ΦΑΓΕ	αγελαδινό	αγελαδινό
37	Γραβιέρα Κρήτης ΦΑΓΕ	πρόβειο	πρόβειο
38	Γραβιέρα Άρτας	πρόβειο	πρόβειο
39	Gouda Rucker	αγελαδινό	αγελαδινό

Πίνακας 3. Προϊόντα τυποποιημένων κίτρινων τυριών που αναλύθηκαν καθώς και τα αποτελέσματα που προέκυψαν ύστερα από την ανάλυσή τους.

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων προκύπτει ότι 7 από τα 39 δείγματα που ελέγχθηκαν παρουσιάζουν ένα είδος νόθευσης είτε με την προσθήκη κάποιου είδους επιπλέον στο προϊόν, είτε με την χρήση ενός μόνο είδους ενώ στην ετικέτα αναφέρονται περισσότερα του ενός. Ο παραπάνω πίνακας παρουσιάζει τα προϊόντα που αναλύθηκαν, τη σύσταση τους, η οποία αναγράφεται επάνω στην ετικέτα των προϊόντων καθώς επίσης και τα αποτελέσματα ύστερα από την ανάλυση τους. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης παρουσιάζονται στην τέταρτη στήλη ενώ τα αναγραφόμενα συστατικά της ετικέτας παρουσιάζονται στην τρίτη στήλη.

Τα προϊόντα τα οποία έχουν υποστεί νόθευση όπως προκύπτει από τον πίνακα 2 είναι τα εξής:

1	Σκληροτύρι Δεσκάτη Γρεβενών	πρόβειο	πρόβειο-κατσικίσιο
2	Σκληροτύρι Κορφοβούνι	πρόβειο	αγελαδινό - πρόβειο
10	Γραβιέρα Νάξου	αγελαδινό - πρόβειο	αγελαδινό
14	Κασέρι Ελάτης	πρόβειο	αγελαδινό
19	Ημίσκληρο Σεφόρμα	πρόβειο	πρόβειο-κατσικίσιο
20	Τρικαλινό μπλοκ φάγε	Αγελαδινό - αιγοπρόβειο	αγελαδινό
32	Γραβιέρα Κρήτης Κριάρα	πρόβειο	πρόβειο-κατσικίσιο

Πίνακας 4: Προϊόντα τυποποιημένων κίτρινων τυριών τα οποία έχουν υποστεί νόθευση

4. Συζήτηση

Για ένα μεγάλο αριθμό παραδοσιακών προϊόντων ποιότητας είναι πολύ σημαντικό να αποδώσουν οι προσπάθειες για τον έλεγχο της ποιότητας και την αποτροπή της νόθευσης σ' όλη την αλυσίδα παραγωγής, από το «χωράφι ως το πιάτο του καταναλωτή».

Μετά τα πολλά διατροφικά σκάνδαλα των τελευταίων ετών, όλα τα εμπλεκόμενα πρόσωπα (παραγωγοί, αγρότες, μεταποιητές, έμποροι και καταναλωτές) συμφωνούν ότι το πιο σημαντικό θέμα είναι η ποιότητα των διατιθέμενων τροφίμων. Με τον όρο «ποιότητα» εννοείται ότι το προϊόν είναι ασφαλές για τον καταναλωτή, ότι έχει τα κατάλληλα οργανοληπτικά και διατροφολογικά χαρακτηριστικά που ικανοποιούν το μέσο καταναλωτή, είναι αυθεντικό και περιέχει ότι αναγράφεται στην επισήμανση της συσκευασίας.

Πλέον, είναι γεγονός η στροφή των καταναλωτών όλο και περισσότερο προς την υγιεινή διατροφή και μάλιστα σε προϊόντα υψηλής ποιότητας και διατροφικής αξίας, όσο γίνεται πιο αγνά και φρέσκα, με ελάχιστη μεταποίηση, παραδοσιακά και αυθεντικά. Το γεγονός αυτό έχει οδηγήσει σ' έναν αγώνα δρόμου από κράτη και επιχειρήσεις για την παραγωγή, ανάδειξη και προστασία παραδοσιακών προϊόντων (π.χ. Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης, ΠΟΠ, Προϊόντων Γεωγραφικής Ένδειξης, ΠΓΕ, βιολογικών) και για την τεκμηρίωση της αυθεντικότητας τους, καθώς θεωρούνται ιδιαίτερης σημασίας για τις εθνικές και τοπικές οικονομίες.

Γι' αυτούς τους λόγους κρίνεται ιδιαίτερης σημασίας η ανάπτυξη κατάλληλων μεθόδων ελέγχου της ποιότητας και της νοθείας σ' όλα τα κρίσιμα στάδια της παραγωγής και διάθεσης αυτών των προϊόντων. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η ανάπτυξη μεθόδων και τεχνολογιών που αφορούν την ταυτοποίηση και τη διάκριση των ειδών στα προϊόντα με την παράλληλη ανίχνευση πιθανών προσμίξεων καθώς και την ιχνηλασιμότητα με την έννοια του ελέγχου της προέλευσης των προϊόντων.

Η εσφαλμένη επισήμανση των συστατικών που χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα μπορεί να έχει αρνητικές επιπτώσεις. Από την μία πλευρά η εσφαλμένη επισήμανση των τροφίμων αποτελεί εμπορική απάτη όσον

αφορά των καταναλωτή, ιδίως όταν πρόκειται για αντικατάσταση ενός είδους από άλλο χαμηλότερης εμπορικής αξίας, ενώ από την άλλη μπορεί να έχει επιπτώσεις για την υγεία, ιδίως στην περίπτωση των καταναλωτών που έχουν ευαισθησία σε αδήλωτα αλλεργιογόνα. Επιπλέον, η εσφαλμένη επισήμανση, οδηγεί και σε εξαπάτηση ανθρώπων οι οποίοι έχουν θρησκευτικούς ή διαιτητικούς περιορισμούς. Επιπρόσθετα οι καταστάσεις κρίσης στα τρόφιμα (π.χ ΣΕΒ, γρίπη των πτηνών, η ασθένεια του αφθώδους πυρετού, ΓΤΟ, κ.λπ.), έχουν ευαισθητοποιήσει το κοινό όσον αφορά τη σύνθεση των προϊόντων διατροφής. Συνεπώς, επειδή οι ετικέτες δεν παρέχουν επαρκείς εγγυήσεις σχετικά με το πραγματικό περιεχόμενο ενός προϊόντος, είναι αναγκαία η αναγνώριση και η επικύρωση των συστατικών των προϊόντων των κίτρινων τυριών και όχι μόνο.

Στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια για την ανάπτυξη και εφαρμογή μιας μοριακής μεθόδου για την ταυτοποίηση των συστατικών που αναγράφονται στις ετικέτες των τυποποιημένων κίτρινων τυριών. Χρησιμοποιήσαμε μια τεχνική ανάλυσης του DNA και συγκεκριμένα την τεχνική PCR-SSCP. Με αυτή την τεχνική αναλύσαμε ένα τμήμα του γονιδίου 16S rRNA του μιτοχονδριακού DNA. Η τεχνική αυτή χαρακτηρίζεται από υψηλή επαναληψιμότητα, είναι αξιόπιστη, σχετικά γρήγορη και οικονομική. Αποτελείται από τέσσερα στάδια: 1) Απομόνωση του mtDNA από δείγματα κίτρινων τυριών, 2) Ενίσχυση των επιθυμητών γονιδιακών τόπων, 3) Αποδιάταξη των τμημάτων DNA, 4) Ηλεκτροφόρησή τους σε πηκτή πολυακρυλαμίδης για την εμφάνιση των αποτελεσμάτων.

Από μια πολύ μικρή ποσότητα δείγματος, με την μέθοδο της απομόνωσης, λάβαμε αρκετά μεγάλη ποσότητα ενιαίου mtDNA. Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα είναι αρκετά συντηρημένο μεταξύ των ειδών δίνοντας μας έτσι τη δυνατότητα να χρησιμοποιήσουμε για την ενίσχυση του τμήματος του γονιδίου "universal primers" οι οποίοι ανταποκρίθηκαν σε όλα τα είδη. Η χρήση των "universal primers" απλοποιεί κατά πολύ την εφαρμογή της τεχνικής της PCR. Ελαχιστοποιεί τον χρόνο σχεδίασης των εκκινητών και το κόστος απόκτησης τους, σε σύγκριση με την χρήση εκκινητών εξειδικευμένων στο κάθε είδος.

Η συγκεκριμένη μελέτη αποτελεί μια πρώτη προσπάθεια καταγραφής τυχόν νοθείας σε επεξεργασμένα γαλακτοκομικά προϊόντα. Το 16S rRNA

έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό των μικροβιακών κοινοτήτων που υπάρχουν στο τυρί Salers που παράγεται στη Γαλλία (Duthoit et al., 2003). Μικροβιακή οικολογία του γάλακτος και του τυριού εξετάστηκε και στην έρευνα των Delbes et al. (2007) όπου και πάλι ταυτοποιήθηκαν οι μικροβιακοί οργανισμοί χρησιμοποιώντας ως δείκτη το 16S rRNA και εφαρμόζοντας τη μέθοδο SSCP.

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψαν 4 πρότυπα: i) αγελαδινό ii) πρόβειο iii) πρόβειο-κατσικίσιο iv) αγελαδινό-πρόβειο. Από τα 39 δείγματα κίτρινων τυριών που αναλύθηκαν, τα 6 παρουσιάζουν ένα είδος νόθευσης είτε με την προσθήκη κάποιου είδους επιπλέον στο προϊόν, είτε με την χρήση ενός μόνο είδους ενώ στην ετικέτα αναφέρονται περισσότερα του ενός.

Από τα 39 δείγματα κίτρινων τυριών, τα 24 επιβεβαιώθηκαν ότι παρασκευάζονται με αγελαδινό γάλα, τα 6 με πρόβειο και 1 με αγελαδινό-πρόβειο. Στα υπόλοιπα 7 δείγματα, παρατηρήθηκε κάποιο είδος νόθευσης. Έτσι, 5 ανέγραφαν στην ετικέτα ότι παρασκευάζονται από πρόβειο γάλα από τα οποία τα 3 περιείχαν τελικά πρόβειο-κατσικίσιο γάλα, το ένα αγελαδινό και το άλλο πρόβειο-αγελαδινό γάλα. Τέλος, τα τελευταία 2 νοθευμένα δείγματα ανέγραφαν στην ετικέτα τους ότι περιέχουν αγελαδινό-πρόβειο ενώ η ανάλυση μας έδειξε ότι περιέχουν μόνο αγελαδινό.

Συμπερασματικά μπορούμε να πούμε πως, λόγω του υψηλού ποσοστού ταυτοποίησης που επιτεύχθηκε με αυτή την μέθοδο, ο δείκτης αυτός, έχει υψηλή ευαισθησία στα επεξεργασμένα προϊόντα κίτρινων τυριών και είναι ικανός να εντοπίσει διαφορετικά είδη γάλακτος μέσα στο κίτρινο τυρί. Δηλαδή, παρέχονται πλέον ενδείξεις σε δύο κατευθύνσεις: i) το 16S rRNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αξιόπιστος δείκτης διαχωρισμού μεταξύ διαφόρων ειδών και ii) μπορεί να απομονωθεί ικανοποιητική ποσότητα DNA ακόμη και από προϊόντα που έχουν υποστεί κατεργασία. Επιπλέον, η μέθοδος αυτή είναι γρήγορη και απλή. Κάτι τέτοιο θα μπορούσε να καταστήσει αυτό το μοριακό δείκτη πολύτιμο εργαλείο σε ελέγχους ρουτίνας, για την διαπίστωση των συστατικών των κίτρινων τυριών σε επιχειρήσεις εστίασης (εστιατόρια, ξενοδοχεία) αλλά και για την

αυθεντικότητα τυποποιημένων προϊόντων κίτρινων τυριών που πωλούνται σε καταστήματα ειδών διατροφής.

Άρα, η μέθοδος που αναπτύξαμε μπορεί να δώσει πολύ καλά αποτελέσματα για τη ταυτοποίηση των ειδών γάλακτος που περιέχονται στα κίτρινα τυριά και την ανίχνευση της όποιας νοθείας ακόμα και μικροποσοτήτων καθώς δείχνει να έχει καλή ευαισθησία. Εκείνο που θα ήταν ενδιαφέρον να διερευνηθεί είναι κατά πόσο η μέθοδος θα μπορούσε με τη χρήση των κατάλληλων προτύπων να δώσει και ποσοτικά αποτελέσματα για την ανάμιξη του κάθε είδους.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Bleve Gianluca, Rizzotti Lucia, Dellaglio Franco and Torriani Sandra, (2003). Development of Reverse Transcription (RT)-PCR and Real-Time RT-PCR Assays for Rapid Detection and Quantification of Viable Yeasts and Molds Contaminating Yogurts and Pasteurized Food Products. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 4116–4122
2. Bruford M., Bradley D., Luikart G., (2003). DNA Markers reveal the reveal the complexity of livestock domestication. *Nature* 2003. Vol.4 900-910
3. de Graaf C, Blom WA, Smeets PA, Stafleu A, Hendriks HF (2004) Biomarkers of satiation and satiety. *Am J Clin Nutr* **79**: 946–961.
4. Diemer J, Quetel CR, Taylor PD,(2002). Contribution to the certification of B, Cd, Cu, Mg and Pb in a synthetic water sample, by use of isotope-dilution ICP-MS, for Comparison 12 of the International Measurement Evaluation Programme. *Anal Bioanal Chem* **374**: 220–225.
5. Hiroyasu M, Ozeki M, Miyagawa-Hayashino A, Fujiwara Y, Hiai H, Toyokuni S (2002) Novel surrogate endpoint biomarker to evaluate agents for use in the chemoprevention of reactive oxygen species-associated cancer. *Redox Rep* **7**: 335–338.
6. Kagkli Dafni-Maria, Iliopoulos V, Stergiou V, Lazaridou A, and Nychas G-J, (2009). Differential *Listeria monocytogenes* Strain Survival and Growth in Katiki, a Traditional Greek Soft Cheese, at Different Storage Temperatures. *Applied And Environmental microbiology*, p. 3621–3626.
7. Lauri Andrea, Mariani O. Paola, (2008). Potentials and limitations of molecular diagnostic methods in food safety. *Genes Nutr* (2009) 4:1–12
8. Norton SM, Huyn P, Hastings CA, Heller JC (2001) Data mining of spectroscopic data for biomarker discovery. *Curr Opin Drug Discov Devel* **4**: 325–331.
9. Podgornik A, Štravs R, Koselj P, Leštan D, Raspor P,(1994). Bioprocess monitoring, control and data management so • ware SHIVA. *Prehrambeno-tehnol Biotehnol Rev* **32**: 181–186.
10. Raspor P (2004) Bio-markers as primary identifiers as needed for food safety and traceability of food items. In *2nd Central European Congress on Food, April 2004*,

Budapest, Hungary, p 1–11, CEFood Congress. Consumers, Nutrition, Safety, Technology.

11. Raspor Peter, (2005). Bio-markers: traceability in food safety issues. *Acta biochimica Polonica Vol. 52 No. 3/2005, 659–664.*

12. Raspor Peter, (2001). Biotechnology for 21st century — do we need it? In *Commodity Science in Global Quality Perspective: Products — Technology, Quality and Environment: Proceedings of the 13th IGWT Symposium, September 2001, Maribor, Slovenia*. Denac M, Musil V, Pregrad B, eds, Ekonomsko-Poslovna Fakulteta, p 1–6, Maribor.

13. Schulte PA, Waters M (1999) Using molecular epidemiology in assessing exposure for risk assessment. *Ann NY Acad Sci USA* **895**: 101–111.

14. Service RF (2003) Genetics and medicine. Recruiting genes, proteins for a revolution in diagnostics. *Science* **300**: 236–239.

15. Sharpless KE, Greenberg RR, Schantz MM, Welch MJ, Wise SA, Ihnat M (2004) Filling the AOAC triangle with food-matrix standard reference materials. *Anal Bioanal Chem* **378**: 1161–1167.

16. White E (1997) Effects of biomarker measurement error on epidemiological studies. In *Application of Biomarkers in Cancer Epidemiology*. Toniolo P, Boffe · a P, Shuler DEG, Rothman N, Hulka B, Pearce N, eds, pp 73–93, IARC Scientific Publications No. 142, Lyon.

17. Van Rijswijk Wendy, Frewer Lynn J., Menozzi Davide and Faioli Giusi (2007). Consumer perceptions of traceability: A cross-national comparison of the associated benefits. [Food Quality and Preference Volume 19, Issue 5](#), July 2008, Pages 452-464.

18. Vazquez JF, Perez T, Urena F, Gudín E, Albornoz J, Dominguez A (2004) Practical application of DNA fingerprinting to trace beef. *J Food Prot* **67**: 972–979.

19. Benjamin Lewin, GENES VIII (230), Ακαδημαϊκές εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε. Αλεξανδρούπολη.

20. Stryer Lubert, BIOΧΗΜΕΙΑ (916-917), Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης

21. Ανυφαντάκης Εμμανουήλ, (2004), Τυροκομία, Εκδόσεις Σταμούλη

22. Ζερφυρίδης Γρηγόρης Κ.,(2001), Τυροκομία, Εκδόσεις Γιαχούδη, Θεσσαλονίκη.
23. http://www.kepka.org/Grk/info/Nutricion/nut003_025.htm
24. <http://en.wikipedia.org/wiki/Mozzarella>
25. <http://en.wikipedia.org/wiki/Parmigiano-Reggiano>
26. http://en.wikipedia.org/wiki/16S_ribosomal_RNA

