



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ-ΠΟΙΟΤΗΤΑ
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ, ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΗΣ
ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ανάπτυξη και εφαρμογή μοριακών δεικτών για τον έλεγχο ποιότητας και την
ταυτοποίηση φέτας



Πανυτσίδου Χρυσούλα

ΛΑΡΙΣΑ 2010

Ανάπτυξη και εφαρμογή μοριακών δεικτών για τον έλεγχο
ποιότητας και την ταυτοποίηση φέτας

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	Λέκτορας Μοριακής Βιολογίας Ζωικών Οργανισμών

Πρόλογος

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε, εάν υπάρχει νόθευση σε διαφορετικά προϊόντα του εμπορίου σε είδη φέτας και λευκού τυριού. 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 προϊόντων του κρέατος με σκοπό να αποφευχθεί η νόθευση και η εξαπάτηση των καταναλωτών. Επίσης αναλύεται η έννοια της ιχνηλασιμότητας ,παρατίθενται οι τρόποι παρασκευής της φέτας και του τελεμέ καθώς επίσης γίνεται αναφορά στη χρησιμότητα των μοριακών δεικτών. Τέλος δίδονται οι ιδιότητες του μιτοχονδριακού DNA.

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

Ευχαριστώ θερμά το κύριο Ζήση Μαμούρη Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ο οποίος μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με το παρών ενδιαφέρον θέμα.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον υποψήφιο Διδάκτορα Κωνσταντίνο Σταμάτη για τη μετάδοση πολύτιμων επιστημονικών γνώσεων που μου πρόσφερε σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης του πειράματος. Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω και στην υποψήφια Διδάκτορα Ευαγγελία Κουτσογιαννούλη για την πολύτιμη βοήθειά της στη διεξαγωγή του πειραματικού μέρους της εργασίας.

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 την Λέκτορα Μοριακής Βιολογίας Ζωικών Οργανισμών Σαραφίδου Θεολογία.

Τέλος ευχαριστώ όλους εκείνους που παρευρέθηκαν την ίδια χρονική περίοδο στο εργαστήριο για 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 φέτας και τελεμέ. 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 32 διαφορετικά προϊόντα τυποποιημένων λευκών τυριών (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 πρόβειο, κατσικίσιο και αγελαδινό γάλα. 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 φέτας και τελεμέ. Από την ανάλυση αυτών των προτύπων (αποτελεσμάτων) συμπεραίνουμε ότι κάποια από τα 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

Περίληψη.....	5
---------------	---

A' ΜΕΡΟΣ

Ιχνηλασιμότητα.....	7
Βιοδείκτες.....	10
16S-r RNA.....	11
Μιτοχονδριακό DNA(mtDNA)	13
Φέτα.....	16
Τελεμές.....	22

B ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Υλικά και Μέθοδοι.....	27
Συλλογή Δειγμάτων.....	27
Απομόνωση DNA σε δείγματα Φέτας-Λευκού τυριού.....	29
Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης.....	32
Φωτομέτρηση.....	35
Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης.....	35
Ανάλυση SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism).....	37
Αποδιάταξη PCR προϊόντων.....	37
Παρασκευή και ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμίδης.....	38
Χρώση πηκτής πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο	40
Αποτελέσματα.....	42
Συζήτηση.....	47
Βιβλιογραφία.....	50

A.ΜΕΡΟΣ

ΙΧΝΗΛΑΣΙΜΟΤΗΤΑ

Η ιχνηλασιμότητα των τροφίμων ορίζεται ως η ικανότητα να ιχνηλατούνται και να παρακολουθούνται τα τρόφιμα, η σίτιση και τα συστατικά σε όλα τα στάδια της παραγωγής, επεξεργασίας και διανομής (Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 2002). Υπάρχουν στη διεθνή βιβλιογραφία αρκετές μελέτες για τα συστήματα ιχνηλασιμότητας και οι προσεγγίσεις τους εξυπηρετούν διαφορετικούς στόχους (Wilson and Cllarke 1998, Mouseavi et al.2002, Bertolini et al 2006, Peres et al.2007 and Pindo et al.2007). Τα συστήματα ιχνηλασιμότητας που καταγράφονται στα ερευνητικά άρθρα ποικίλλουν στην πολυπλοκότητα και τα πιο εξεζητημένα αφορούν διάφορες βιολογικές τεχνολογίες. Οι περισσότερες μελέτες (Viaene and Verbeke 1998, Golan et al.2004, και Schwagele 2005) συγκλίνουν στο ότι η ιχνηλασιμότητα των τροφίμων μπορεί να μειώσει τα επίπεδα απογραφής υλικών, να ανιχνεύσει δυσκολίες στις παρασκευαστικές διαδικασίες και να βελτιώσει την αποδοτικότητα των διαδικασιών διανομής (Wang et al 2009)

Η έρευνα και η πρακτική εστιάζουν στην εξέλιξη, επικύρωση και εναρμόνιση των τεχνολογιών και μεθοδολογιών για να εξασφαλίσουν απόλυτη μέθοδο ιχνηλασιμότητας στην αλυσίδα τροφίμων. Οι βασικοί στόχοι είναι η κλιμάκωση, η εφαρμογή και επικύρωση των μεθόδων σε ολόκληρη τη τροφική αλυσίδα. Η επιβεβαίωση της αυθεντικότητας, η επικύρωση της ταυτοποίησης και εφαρμογή του HACCP σε ολόκληρη τη τροφική αλυσίδα. Η ιχνηλασιμότητα και η παρακολούθηση των τροφίμων είναι μια πολύπλοκη διαδικασία λόγω των βιοδεικτών, τεχνικών εφαρμογών και διαφορετικών περιστάσεων σε διαφορετικές τεχνολογίες που παράγουν διάφορες τροφές (επεξεργασμένα, ημι-επεξεργασμένα ή ωμά). Λόγω του ότι η τροφή παράγεται για ανθρώπινη ή ζωική κατανάλωση χρειαζόμαστε τους καταλλήλους

βιοδείκτες για να είναι σταθεροί και ιχνηλάσιμοι σε όλη την αλυσίδα παραγωγής.

Σύμφωνα με το Διεθνή Οργανισμό (International Organization for Standardization) η ιχνηλασιμότητα την ικανότητα ανίχνευσης τροφίμων και συστατικών σε όλα τα στάδια παραγωγής και μεταφοράς.

Ένα σύστημα ελέγχου της αλυσίδας παραγωγής θα πρέπει να είναι ικανό να ταυτοποιεί και να καταγράφει με ακρίβεια υλικά και επιδράσεις που βρίσκουν εφαρμογή στη τεχνολογία τροφίμων. (Raspor, 2005)

Τι πρέπει να ανιχνεύεται στην αλυσίδα τροφίμων?
1. Όλα τα υλικά και τα συστατικά που χρησιμοποιούνται
2. Η διαδικασία παραγωγής
3. Το εμπλεκόμενο προσωπικό

Τα συστήματα ιχνηλασιμότητας έχουν ένα ευρύτερο φάσμα και αποσκοπούν στο να καταγράφουν την ιστορία ενός προϊόντος πάνω σε ολόκληρη την αλυσίδα παραγωγής από τα πρωτογενή υλικά έως και το τελικό προϊόν προς κατανάλωση. Ο σκοπός αυτών των συστημάτων δεν περιορίζεται μόνο στην ικανότητα να ιχνηλατεί και να ανακαλύπτει παρτίδες προϊόντων υψηλού κινδύνου αλλά και να υποστηρίζει την ασφάλεια ποιότητας κατά την επεξεργασία προϊόντων.

Στόχοι ανίχνευσης και ιχνηλασιμότητας
1. Αύξηση της ασφάλειας στο προϊόν
2. Αναγνώριση της πιθανής πηγής μόλυνσης
3. Διευκόλυνση της διαδικασίας ανάκλησης προϊόντος
4. Έλεγχος κινδύνων δημόσιας υγείας που προέρχονται από τη κατανάλωση προϊόντος

Η ιχνηλασιμότητα σε προϊόντα διαφόρων ειδών ζώων είναι αναγκαία, γιατί ελαχιστοποιείται το ρίσκο νόθευσης, υπάρχει βελτίωση στην ανάκληση προϊόντων και επίσης ελέγχεται η ύπαρξη μόλυνσης ή ιού στα ζώα. Για την

ύπαρξη ενός σωστού συστήματος ιχνηλασιμότητας θα πρέπει αυτό να είναι σύντομο και ολοκληρωμένο. Για παράδειγμα, να μπορεί να εντοπίζει και να ελέγχει όλα τα ζώα-φάρμας σε σύντομο χρονικό διάστημα. Δηλαδή, σε περίπτωση διάδοσης ασθένειας να μπορεί να εντοπιστεί το πιθανό μολυσμένο ζώο, επομένως, την πηγή διάδοσης του προβλήματος. Αν το σύστημα ιχνηλασιμότητας ακολουθεί τα παραπάνω κριτήρια τότε οι υπεύθυνοι ποιότητας μπορούν να διασφαλίσουν τα προϊόντα τους.

Στην Ολλανδία καθώς και σε πολλές άλλες Ευρωπαϊκές χώρες η παρακολούθηση και η ιχνηλάτιση κάθε κατσικιού και προβάτου βασίζεται σε ετικέτες αυτιών και με ορατούς αριθμούς και σε καταχωρημένες εγγραφές ζώων. Σήμερα η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει εφαρμόσει μια ηλεκτρονική ταυτοποίηση και καταχώριση για ζώα που ακολουθούν τα Ευρωπαϊκά πρότυπα. (Κανονισμός 21/2004, EC 2004). (VELTHUIS and al 2006)

Η ιχνηλασιμότητα στα τρόφιμα είναι μία προσφάτως αναπτυσσόμενη ιδέα που αφορά τον έλεγχο ολόκληρης της αλυσίδας παραγωγής τροφίμων και επιτρέπει την εξιστόρηση όλης της διαδικασίας παραγωγής τους μέχρι την αρχική τους προέλευση. Αυτή η ευρέως χρησιμοποιούμενη ιδέα της ιχνηλασιμότητας των τροφίμων διαφέρει ελάχιστα από την ιδέα της γενετικής ιχνηλασιμότητας που χρησιμοποιείται σε αυτή καθώς και σε άλλες μελέτες. Με τον όρο γενετική ιχνηλασιμότητα περιγράφεται ο προσδιορισμός της γενετικής ταυτότητας των αρχικών υλικών που χρησιμοποιήθηκαν για τα μεταποιημένα προϊόντα που προέκυψαν. Κατοχυρώνοντας τη γενετική προέλευση των εδωδιμων προϊόντων επιτρέπεται η επαλήθευση της αυθεντικότητας πολύτιμων τροφίμων και αποθαρρύνεται η νοθεία με υλικά χαμηλότερου κόστους και αξίας (Testolin & Lain, 2005).

ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ

Γενετικός δείκτης είναι μια κληρονομούμενη παραλλαγή που χρησιμοποιείται για να κατανοηθούν τα γενετικά συμβάντα, ποικίλλει μέσα ή μεταξύ των πληθυσμών και η επίδραση του στο φαινότυπο και στην αρμοστικότητα είναι ελάχιστη. Ένας γενετικός δείκτης είναι ένα γονίδιο ή μια αλληλουχία DNA σε ένα γνωστό τόπο στο χρωμόσωμα και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να προσδιορίσει κύτταρα, άτομα ή είδη. Για να είναι χρήσιμος ένας βιοδείκτης, η κληρονομούμενη παραλλαγή πρέπει να είναι πολυμορφική, δηλαδή θα πρέπει να υπάρχουν τουλάχιστον δύο παραλλαγές στο υπό μελέτη σύστημα. Μονομορφικά τμήματα DNA έχουν μόνο μία μορφή και συνεπώς δεν είναι χρήσιμα σαν δείκτες.

Στην ουσία όταν χρησιμοποιούνται μοριακοί δείκτες δεν είναι ο ίδιος ο δείκτης που ενδιαφέρει αλλά ο προσδιορισμός του γενοτύπου ενός ατόμου. Οι γενετικοί δείκτες καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών, για παράδειγμα η εύρεση γονιδίων υπεύθυνων για την ποικιλομορφία στα ποσοτικά χαρακτηριστικά μιας ασθένειας, στη συναγωγή συμπερασμάτων για την πατρική ή γεωγραφική προέλευση ή για την ανίχνευση επιδράσεων της επιλογής.

Εκτός από τους γενετικούς δείκτες υπάρχουν και οι πρωτεϊνικοί δείκτες. Εμφανίστηκαν προτού εμφανιστούν οι DNA δείκτες και περιλαμβάνουν τα ισοένζυμα και τα αλληλοένζυμα. Η εφαρμογή πρωτεϊνικών δεικτών έχει πλεονεκτήματα καθώς είναι γρήγορη, εύκολη και με χαμηλό κόστος. Τα μειονεκτήματα της εφαρμογής τους είναι ότι δεν βρίσκονται σε αφθονία και συχνά έχουν χαμηλό πολυμορφισμό.

Οι DNA δείκτες είναι πολλοί και αφορούν γενετικούς πολυμορφικούς τρόπους με περισσότερες της μίας παραλλαγής, οι οποίοι είναι δυνατόν να ανιχνευτούν με μοριακή ανάλυση. Γενικά, οι γενετικοί δείκτες απαιτούν ένα τρόπο ανίχνευσης συγκεκριμένων γενετικών τρόπων και ένα τρόπο διαχωρισμού της ποικιλότητας σε αυτούς τους τρόπους. 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 VNTR (or Variable number tandem repeat), η ανάλυση μινιδορυφόρων (minisatellites) και μικροδορυφόρων (microsatellites) ή αλλιώς SSR (Simple Sequence Repeats), η STR (or Short tandem repeat), η SFP (or Single feature polymorphism), η DArT (Diversity Arrays Technology), 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.

16S-r RNA

Η ροή των γενετικών πληροφοριών στα φυσιολογικά κύτταρα είναι:



Αυτή η ροή των γενετικών πληροφοριών εξαρτάται από την πολύπλοκη αλληλοεξάρτηση ενζύμων και άλλων πρωτεϊνών με τα νουκλεϊκά οξέα. Η θεωρία του κόσμου του RNA του Walter Gilbert προτείνει αρχικά εμφανίστηκε το RNA το οποίο είχε και καταλυτικές ικανότητες. Σε δεύτερο στάδιο άρχισε η σύνθεση των πρωτεϊνών που εμφανίστηκαν ως καλύτερης ποιότητας ένζυμα ενώ τέλος εμφανίστηκε το DNA που αντικατέστησε το RNA ως γενετικό υλικό, γιατί η διπλή ελικοειδής δομή του είναι πιο σταθερή και σίγουρη αποθήκη γενετικών πληροφοριών. Σε αυτό το σημείο το RNA έμεινε με τους ρόλους που διατηρεί έως σήμερα ως φορέας πληροφοριών (mRNA), προσαρμοστής (tRNA) στην πρωτεϊνοσύνθεση και συστατικό συγκροτημάτων (rRNA στα ριβοσώματα) που συμμετέχουν στην υλοποίηση της γονιδιακής έκφρασης (Stryer, 1997).

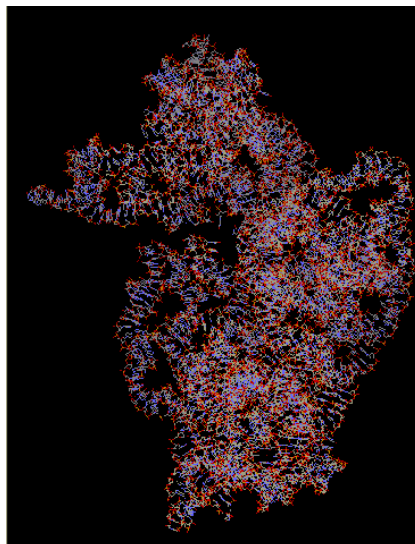
Το 16S rRNA περιέχεται στη μικρή υπομονάδα του προκαρυωτικού ριβοσώματος μαζί με 21 διαφορετικές πρωτεΐνες (συμβολίζονται S1 έως S21). Μελέτες ανασύστασης της υπομονάδας 30S έχουν δείξει ότι το 16S rRNA είναι ουσιώδες για τη συγκρότηση και τη λειτουργία της. Η απαίτηση αυτή είναι πολύ εξειδικευμένη, γιατί 16S rRNA από ζυμομύκητες το οποίο αναδιπλώνεται με παρόμοιο τρόπο δε μπορεί να υποκατασταθεί με 16S rRNA από *E. coli* (Stryer, 1997).

Το 16S rRNA παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στη σωστή έναρξη της πρωτεϊνوسύνθεσης σε προκαρυωτικούς οργανισμούς. Έχει βρεθεί ότι το 3' άκρο αυτού του RNA συστατικού της υπομονάδας 30S περιέχει μία αλληλουχία από μερικές βάσεις η οποία είναι συμπληρωματική προς την πλούσια σε πουρίνες περιοχή (αλληλουχία Shine-Dalgarno) των θέσεων έναρξης της πρωτεϊνوسύνθεσης των μορίων mRNA. Συνεπώς, το ζευγάρωμα των βάσεων του mRNA με το 3' άκρο του 16S rRNA προσδιορίζει το που θα αρχίσει η πρωτεϊνوسύνθεση (Stryer, 1997). Ακόμη, το 16S rRNA αλληλεπιδρά με το 23S, βοηθώντας στο δέσιμο των δύο ριβοσωμικών υπομονάδων ενώ έχει βρεθεί ότι η πιστότητα της μετάφρασης μειώνεται ή βελτιώνεται μεταβάλλοντας τη δομή του 16S rRNA (Lewin, 2004).

Τα γονίδια τα οποία ελέγχουν τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του rRNA μεταλλάσσονται αργά διά μέσου των εκατομμύριων ετών της εξελικτικής πορείας. Σήμερα είναι δυνατή η σύγκριση αυτών των αλλαγών στους διαφορετικούς οργανισμούς, δηλαδή το rRNA λειτουργεί σαν δείκτης της συγγένειας των οργανισμών. Μερικά τμήματα των μορίων του rRNA όλων των ζώντων μικροοργανισμών παραμένουν σχεδόν ανέπαφα, ανεξάρτητα πόσα χρόνια έχουν περάσει. Γι' αυτό το λόγο η ποσοστιαία διαφορά μεταξύ των άλλων τμημάτων του rRNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση συγγένειας μεταξύ των οργανισμών.

Τα γονίδια τα οποία ελέγχουν τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του rRNA μεταλλάσσονται αργά διά μέσου των εκατομμύριων ετών της εξελικτικής πορείας, λόγω του σπουδαίου ρόλου τους κατά τη σύνθεση των πρωτεϊνών. Μία μετάλλαξη που θα συνέβαινε σ' αυτά πιθανόν να άλλαζε την αλληλουχία των περισσότερων αν όχι όλων πρωτεϊνών που συντίθενται σ' ένα συγκεκριμένο οργανισμό σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια. Πολλές από αυτές θα

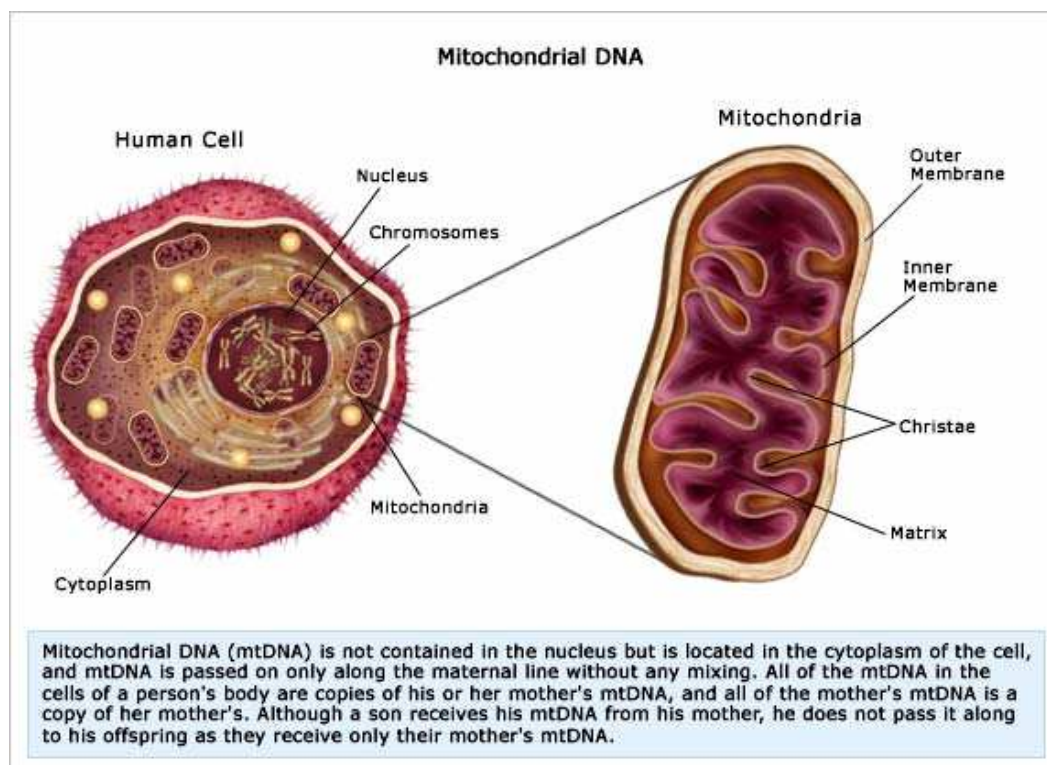
ήταν χωρίς αμφιβολία επιβλαβείς και επομένως θα υπάρχει έντονη επιλογή ενάντια σε μετάλλαξη με επιπτώσεις τόσο μεγάλης έκτασης.



Εικόνα 1: απεικόνιση 16S r RN

Το Μιτοχονδριακό DNA

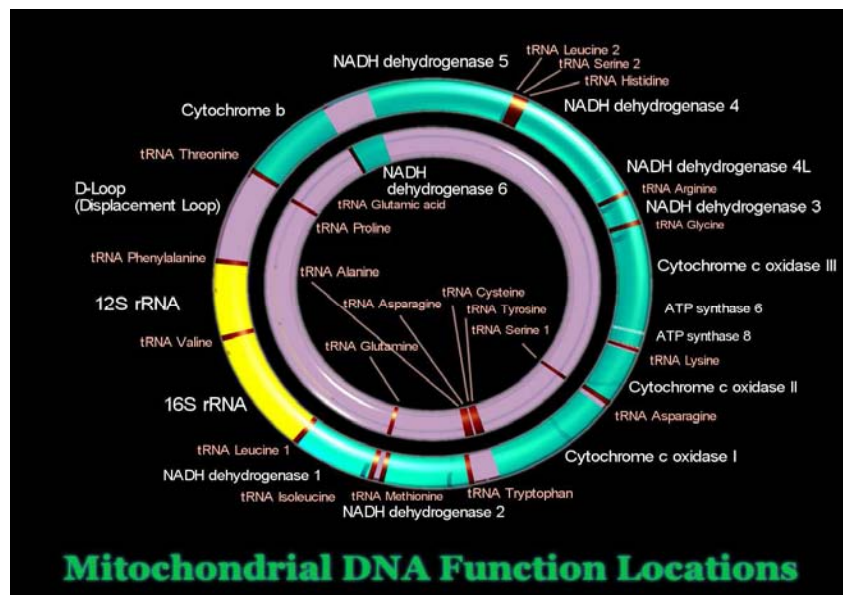
Τα μιτοχόνδρια είναι θεμελιώδη οργανίδια που συναντώνται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα και χρησιμοποιούνται για το μεταβολισμό των βιολογικών μακρομορίων που προσλαμβάνουν οι οργανισμοί με τις τροφές. Με τη βοήθεια των μιτοχονδρίων τα κύτταρα διασπούν υδατάνθρακες, λίπη συνθέτοντας χημική ενέργεια-μόρια ATP μέσω της διαδικασίας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Η διαδικασία αυτή αποτελεί την κυτταρική αναπνοή, είναι αερόβια και συντελείται διαμέσου του πολύπλοκου διαμεμβρανικού ενζύμου που ονομάζεται ATP-συνθάση. Τα γονιδιώματα των μιτοχονδρίων κωδικοποιούν πρωτείνες που συνδέονται με την οξειδωτική φωσφορυλίωση, μόρια rRNA και tRNA που χρησιμοποιούνται στα μιτοχόνδρια και λίγες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη μετάφραση.



Εικόνα 2 : Η δομή του μιτοχονδρίου

Το ζωικό mtDNA παρουσιάζει μια σαφή συντηρητικότητα ως προς τα γονίδια που περιέχει. Πράγματι, το mtDNA των σπονδυλωτών, εχινόδερμων και εντόμων περιλαμβάνει 13 γονίδια που μεταφράζονται σε πολυπεπτιδικές αλυσίδες, 2 γονίδια για ριβοσωμικά RNA (12s και 16s rRNA) και 22 γονίδια για μεταφορικά RNA (tRNA). Επίσης, υπάρχει μια περιοχή που δεν κωδικοποιεί, αλλά περιέχει τις αρχικές θέσεις για αντιγραφή του mtDNA και την μεταγραφή του σε RNA, γνωστή ως περιοχή ελέγχου ή βρόγχος D (D-loop). Τα μιτοχονδριακά γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες καθορίζουν υπομονάδες ενζύμων που εμπλέκονται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα (Εικόνα 6). Αυτά είναι: οι 7 υπομονάδες αφυδρογονάσης του NADH (ND 1, 2, 3, 4, 4L, 5, 6), μια υπομονάδα του κυτοχρώματος b, τρεις υπομονάδες της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (COI, COII, COIII) και δύο υπομονάδες της μιτοχονδριακής συνθετάσης του ATP (ΑΤάση 6, 8). Για τη λειτουργία των βιοχημικών αντιδράσεων των μιτοχονδρίων χρειάζονται περισσότερα ένζυμα, το μεγαλύτερο μέρος των οποίων ελέγχεται από το πυρηνικό DNA, συντίθεται στο κυτταρόπλασμα και εισάγεται στα μιτοχόνδρια. Προφανώς το εξαρτώμενο από τον πυρήνα

μιτοχονδριακό γονιδίωμα είναι αποτέλεσμα της προοδευτικής μεταφοράς του γενετικού ελέγχου στον πυρήνα από ένα προηγούμενο πιο σύνθετο και μεγαλύτερο μιτοχονδριακό γονιδίωμα (Wolstenholme, 1992).



Εικόνα 3: : Η διάταξη των γονιδίων στο μιτοχονδριακό DNA.

(<http://images.google.gr/images?svnum=10&hl=el&lr=&q=MITOCHONDRIAL+DNA+>)

Ο τρόπος με τον οποίο διαιρούνται τα μιτοχόνδρια, δηλαδή με αύξηση και διαχωρισμό στα δύο αποτελεί ένδειξη της βακτηριακής προέλευσής τους. Υπάρχουν ενδείξεις ότι τα μιτοχόνδρια εμφανίστηκαν πολύ πριν από ένα δισεκατομμύριο χρόνια, όταν ένα αερόβιο βακτήριο ενδοκυτταρώθηκε από ένα αρχέγονο αναερόβιο ευκαρυωτικό κύτταρο (Alberts, 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 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 μεγάλων χερσαίων ειδών (Bruford *et al.*, 2003).

ΦΕΤΑ

1. Γάλα

Για τη παραγωγή φέτας το πιο κατάλληλο γάλα είναι το πρόβειο. Σύμφωνα με τον τελευταίο κώδικα τροφίμων και μεταξύ των άλλων προδιαγραφών που προωθήθηκαν ώστε η φέτα να γίνει τυρί ΠΟΠ (Προστατευμένης Ονομασίας Προέλευσης) στην Ευρωπαϊκή Ένωση, το γάλα για τη παραγωγή φέτας επιτρέπεται να περιέχει μέχρι 30% κατσικίσιο γάλα. Η αναγνώριση αυτή της Ευρωπαϊκής Ένωσης ανατράπηκε από κάποια δικαστική απόφαση επειδή στην Ελλάδα η φέτα παράγεται σχεδόν παντού (σε όλη την ηπειρωτική Ελλάδα και στο Ν. Λέσβου). Η δικαστική απόφαση προκλήθηκε από τις βορειοευρωπαϊκές χώρες οι οποίες επέλεξαν να ονομάσουν φέτα το λευκό τυρί άλμης που παράγουν καθόσον η φέτα είχε το καλύτερο όνομα διεθνώς στη κατηγορία αυτών των τυριών.

Τα λευκά τυριά άλμης τα οποία παράγονται από άλλα είδη γάλακτος, ή διάφορες αναμείξεις μεταξύ τους, δεν μπορούν να φέρουν την ονομασία φέτα διότι έχουν διαφορετικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και κατατάσσονται στο τυρί Τελεμέ. Ο τελεμές από σκέτο κατσικίσιο γίνεται με δομή σκληρή και είναι πικάντικος. Ο τελεμές από σκέτο αγελαδινό γάλα γίνεται επίσης σκληρός και ευθρυπτος, το χρώμα είναι κιτρινωπό και η γεύση είναι ξινή και όχι πλούσια και ευχάριστη όπως της πραγματικής φέτας από πρόβειο γάλα. Το λευκό τυρί άλμης της Ε.Ε έχει τεχνολογία παραγωγής η οποία δεν έχει σχέση ούτε με της φέτας ούτε με του τελεμέ.

Παλιότερα επικρατούσε πλήρης σύγχυση ως προς τι είναι φέτα αφού κάθε λευκό τυρί λεγόταν φέτα. Η προέλευση του γάλακτος αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό γνώρισμα του κάθε τυριού διότι προσδίνει σε αυτό τα χαρακτηριστικά οργανοληπτικά του γνωρίσματα, γεύση, άρωμα, χρώμα, δομή και υφή.

Γρηγόρης Κ.Ζερφυρίδης Καθηγητής Τεχνολογίας Τροφίμων ΑΠΘ : Τεχνολογία Προϊόντων Γάλακτος Τυροκομία (Τόμος 1)2001.

Εμμανουήλ Μ. Ανυφαντάκης Καθηγητής Γαλακτοκομίας Γεωπ. Πανεπιστ. Αθηνών: Ελληνικά Τυριά

2. ΠΑΣΤΕΡΙΩΣΗ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

Παλιότερα το τυρί δημιουργούσε οξύτητα για στράγγισμα και ωρίμαζε από τη μικροχλωρίδα την οποία αποκτούσε από το περιβάλλον και κυρίως από τα σκευή και τα εργαλεία του τυροκομείου. Αυτές οι μικροχλωρίδες είναι ανεξέλεγκτες και εύκολα μπορούν να επιφέρουν δυσμενείς αλλοιώσεις στο τυρόπηγμα και στο τυρί. Αυτό το ελάττωμα άρχισε να ξεπερνιέται μόνο όταν το γάλα είναι καλής ποιότητας από άποψη μικροβιολογική αλλά και πάλι πρέπει να παστεριωθεί και να εξυγιανθεί για να σκοτωθούν τα μικρόβια που θα χαλούσαν το τυρί και να χρησιμοποιηθούν καλλιέργειες γνωστής βακτηρίωσης σύνθεσης. (Αληχανίδης Ευστάθιος Καθηγητής Γαλακτοκομίας ΑΠΘ : Χημεία και Φυσική Γάλακτος)

3. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΦΕΤΑΣ

Στις τυροκομικές μονάδες χρησιμοποιούν για καλλιέργεια τη γιαούρτη της οποίας οι μικροοργανισμοί είναι *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus bulgaricus*. Η ποιότητα του τυριού είναι απόλυτα συνηφασμένη από την εκλογή κατάλληλης καλλιέργειας. Μετά την επιλογή της καλλιέργειας θα πρέπει να εξασφαλισθούν οι συνθήκες που θα τη βοηθήσουν να αναπτυχθεί και να δώσει το συγκεκριμένο ρυθμό αύξησης της οξύτητας στο γάλα και στο τυρόπηγμα ώστε η καλλιέργεια να δράσει σωστά. Η καλλιέργεια της φέτας και γενικά των λευκών τυριών άλμης έχει τόσο θερμόφιλα όσο και μεσόφιλα βακτήρια καθώς η φέτα ωριμάζει στα πρώτα της στάδια στους 18°C όπου τα θερμόφιλα δρουν περιορισμένα.

{Γρηγόρης Κ.Ζερφυρίδης Καθηγητής Τεχνολογίας Τροφίμων ΑΠΘ : Τεχνολογία Προϊόντων Γάλακτος Τυροκομία (Τόμος 1)2001.}

4. ΠΗΞΗ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

Η πήξη του γάλακτος γίνεται με τη πυτιά. Το πήγμα που λαμβάνεται πρέπει να είναι αρκετά σφικτό ώστε να μην υπάρχουν απώλειες κατά τη μεταφορά του στα καλούπια και η φέτα να είναι συμπαγής ώστε να μην τρίβεται στους μετέπειτα χειρισμούς. Οι περισσότερες τυροκομικές μονάδες πήζουν το γάλα στους 32°C , στη περίπτωση όμως που το γάλα είναι λίγο ξινό ή ο καιρός είναι λίγο ζεστός ή το γάλα δεν έχει υποστεί παστερίωση σε

αυτή τη περίπτωση η πήξη γίνεται λίγους βαθμούς χαμηλότερα. Ανάλογα με τις συνθήκες αυτές όταν το γάλα είναι πολύ ξινό η θερμοκρασία μπορεί να φτάσει στους 25⁰ C. Σε αυτή τη περίπτωση επειδή λόγω της χαμηλής θερμοκρασίας το πήγμα γίνεται μαλακό, τρίβεται εύκολα και το τυρί κρατά περισσότερη υγρασία τα τυροκομεία θα πρέπει να έχουν τυρολέβητα διπλών τοιχωμάτων έτσι ώστε να μην υπάρχει απώλεια θερμότητας. {Αληχανίδης Ευστάθιος Καθηγητής Γαλακτοκομίας ΑΠΘ : Χημεία και Φυσική Γάλακτος}.

Αν η πυτιά είναι σε σκόνη πρέπει πρώτα να διαλυθεί σε καθαρό κρύο νερό, να προστεθεί λίγο αλάτι και να χρησιμοποιηθεί αμέσως. Διαλυμένη πυτιά σύντομα χάνει τη δύναμη της. Η υγρή πυτιά πρέπει επίσης να αραιώνεται σε νερό σε αναλογία 1:8 προτού μπει στο γάλα. Η εισαγωγή της πυτιάς γίνεται αργά αργά εφαρμόζοντας αργή ανάδευση για 2 λεπτά. Τέλος ανακόπτεται η κίνηση του γάλακτος μέσα στο καζάνι με αντίστροφη κίνηση του αναδευτήρα, σκεπάζεται το καζάνι για να μην κρυώσει το γάλα και δίνεται ο απαραίτητος χρόνος για τη πήξη του γάλακτος.

Γρηγόρης Κ.Ζερφυρίδης Καθηγητής Τεχνολογίας Τροφίμων ΑΠΘ : Τεχνολογία Προϊόντων Γάλακτος Τυροκομία (Τόμος 1)2001.

5. ΔΙΑΙΡΕΣΗ ΤΥΡΟΠΗΓΜΑΤΟΣ

Με την ολοκλήρωση της πήξης το τυρόπηγμα κόβεται σταυρωτά με τυροκόπτη που έχει κάθετα σύρματα σε αποστάσεις περίπου 2 εκατοστών. Όταν τελειώσει το κόψιμο η επιφάνεια του τυροπήγματος έχει τετράγωνα κομμάτια σε μέγεθος μικρού λουκουμιού που ανάμεσα τους αρχίζει να βγαίνει ο ορός (τυρόγαλα). Το τυρόπηγμα πρέπει πάντα να κόβεται με κάτι αιχμηρό και όχι να σπάει για να μη γίνονται τα κομμάτια του τυροπήγματος ακανόνιστα με τρίματα.

6. ΕΞΑΓΩΓΗ – ΚΑΛΟΥΠΙΑΣΜΑ – ΣΤΡΑΓΓΙΣΜΑ ΤΟΥ ΤΥΡΟΠΗΓΜΑΤΟΣ

Μετά το κόψιμο το τυρόπηγμα αφήνετε 5-10 λεπτά να ηρεμήσει για να βγει αρκετό τυρόγαλα. Αυτό το στάδιο δεν μπορεί να κρατήσει πολύ για να μην αποβάλει το τυρόπηγμα αρκετά υγρά και να γίνει το τυρί σκληρό.

Α. Στράγγισμα σε τσαντίλες (τυρόπανα)

Η τσαντίλα ή τυρόπανο ή τυρόρυθμος είναι ο παραδοσιακός τρόπος στραγγίσματος του τυροπήγματος για τη φέτα που δεν συνίσταται πλέον. Από άποψης παράδοσης καλό θα ήταν να επισημανθούν κάποιες λεπτομέρειες όπως οι τσαντίλες πρέπει να είναι βαμβακερές τετράγωνες, θα πρέπει να βρέχονται με κρύο νερό για να μη κολλάει το τυρί σ'αυτές να δένονται τα άκρα τους ανά δύο και να τοποθετούνται στο τραπέζι.

Το άνοιγμα της τσαντίλας και το κόψιμο του τυροπήγματος για να διευκολύνεται το στράγγισμα πρέπει να γίνεται το πολύ μία φορά διότι το έντονο ανακάτεμα του τυροπήγματος και το στράγγισμα θα κάνει το τυρί σκληρό και συμπαγές χωρίς να έχει τις αμυδαλοειδείς σχισμές στη δομή του. Μετά από λίγες ώρες δένεται η τσαντίλα για να γίνει το τυρί μπάλα. Μετά από 1-2 ώρες τοποθετούνται οι τσαντίλες πάνω στο τραπέζι η μία κοντά στην άλλη για να γίνουν ίσες από κάτω και να τετραγωνιστούν.

Β. Στράγγισμα σε καλούπια

Το στράγγισμα αυτό πλεονεκτεί σε σχέση με το στράγγισμα σε τσαντίλες. Το τυρί παίρνει σχήμα του καλουπιού και επομένως έχει πάντα την ίδια ομοιομορφία. Επίσης τα καλούπια πλένονται ευκολότερα και η συσκευασία εφαρμόζει ακριβώς στο περιέκτη.

Το καλούπι της φέτας είναι μεταλλικό από λευκοσίδηρο ή ψευδάργυρο. Τα τελευταία χρόνια κατασκευάζεται επίσης από πλαστικό ή ανοξείδωτη λαμαρίνα. Τα καλούπια που τοποθετούνται επάνω στη τυροτράπεζα είναι τόσα ώστε να χωρέσει το τυρόπηγμα του καζανιού. Με τη τρυπητή κουτάλα μεταφέρονται 2-3 κουταλιές τυρόπηγμα στο κάθε καλούπι. Μέχρι να φτάσει ο τυροκόμος στο τελευταίο θα πρέπει το τυρόπηγμα στο πρώτο καλούπι να έχει στραγγίσει αρκετά. Σε 1-2 ώρες μετά το γέμισμα μπαίνουν τα καλύμματα στα καλούπια και αναποδογυρίζονται για να διευκολύνεται το στράγγισμα. Η θερμοκρασία του στραγγίσματος όπως και του χώρου αλατίσματος πρέπει να είναι 18° C για να έχει καλύτερη ανάπτυξη οξύτητας και πιο γρήγορο στραγγισμα. Το τυρόπηγμα βέβαια μέσα στο καλούπι θα πρέπει να έχει θερμοκρασία 30° C και αργεί να κατέβει στη θερμοκρασία του θαλάμου. Κατά τη μείωση της θερμοκρασίας η καλλιέργεια έχει αρκετό χρόνο και καλή θερμοκρασία για να αναπτύξει οξύτητα και να διευκολύνει το στράγγισμα.

Όταν το τυρί θα έχει σφίξει αρκετά αφαιρείται το καλούπι και το τυρί κόβεται σε τέσσερις φέτες

Γρηγόρης Κ.Ζερφυρίδης Καθηγητής Τεχνολογίας Τροφίμων ΑΠΘ : Τεχνολογία Προϊόντων Γάλακτος Τυροκομία (Τόμος 1)2001.

7.ΑΛΑΤΙΣΜΑ ΦΕΤΑΣ

Το αλάτισμα της Φέτας γίνεται σε δύο φάσεις. Κατά την πρώτη φάση γίνεται ξηρό αλάτισμα του τυριού και κατά τη δεύτερη συμπληρώνεται το αλάτισμα σε άλμη.

A. Ξηρό αλάτισμα

Πριν ακόμα τοποθετηθούν οι φέτες πάνω στην τυροτράπεζα, απλώνεται πάνω σ' αυτήν λίγο χονδρόκοκκο αλάτι σαν καλαμπόκι ή ρεβίθι και πάνω σ' αυτό τοποθετούνται οι φέτες. Με το ίδιο αλάτι αλατίζεται και η επάνω επιφάνεια του τυριού. Αυτό είναι το πρώτο αλάτισμα και γίνεται συνήθως αργά το απόγευμα της ίδια ημέρας που έγινε η τυροκόμηση. Το επόμενο πρωί αναστρέφονται οι φέτες και αλατίζεται η επάνω επιφάνειά τους. Αυτό επαναλαμβάνεται κάθε 12 ώρες περίπου μέχρι να δοθούν 3-4 αλατίσματα από κάθε πλευρά ανάλογα με το πόσο χονδρές είναι οι φέτες και την ποσότητα του άλατος που ρίχνεται στο τυρί.

Η τελική περιεκτικότητα του τυριού σε αλάτι πρέπει να είναι τόση ώστε ο συντελεστής άλατος του τυριού να είναι 5-6%. Περισσότερο αλάτι (πάνω από 3% επί τυριού ως έχει) κάνει το τυρί αλμυρό χωρίς να είναι απαραίτητο διότι το pH του τυριού εντωμεταξύ του τυριού μειώνεται κάτω από 4,8 και εφόσον σήμερα υπάρχουν ευκολίες ψύξεως το τυρί δεν κινδυνεύει να χαλάσει. Εξάλλου η μεγάλη συγκέντρωση άλατος στο τυρί δρα ανασχετικά στη δραστηριότητά της καλλιέργειας.

Επειδή ο τρόπος αυτός της ωρίμανσης απαιτεί πολλές τυροτράπεζες και χώρο, οι φέτες συνήθως μετά από λίγες μέρες, τοποθετούνται προσωρινά σε ανοιχτά δοχεία ή βαρέλια και προστίθεται άλμη ώστε να καλυφθεί το τυρί. Μάλιστα εφαρμόζεται κάποια πίεση στην επιφάνεια του τυριού ώστε το τυρί να βρίσκεται συνεχώς στην άλμη.

B. Πυκνότητα άλμης αλατίσματος και διατήρησης της Φέτας

Το τυρί κατά την παραμονή του στις τυροτράπεζες δεν έχει συμπληρώσει ακόμη την πρόσληψη άλατος που χρειάζεται. Το υπόλοιπο αλάτι θα το προσλάβει από την άλμη η οποία προστίθεται στο δοχείο ή το βαρέλι συσκευασίας. Γι' αυτό η άλμη πρέπει να έχει υψηλότερη πυκνότητα από το συντελεστή άλατος του τυριού ώστε να προσδώσει αλάτι σ' αυτό ενώ συγχρόνως εξέρχεται υγρασία από το τυρί προς την άλμη. Δηλαδή κατά την παραμονή του τυριού στην άλμη το τυρί προσλαμβάνει αλάτι και η άλμη αραιώνεται μέχρι να επέλθει εξισορρόπηση του άλατος στην άλμη και το τυρί ή άλλως ο συντελεστής άλατος του τυριού και η περιεκτικότητα της άλμης σε αλάτι να γίνουν ίδια. Αυτή η διαδικασία χρειάζεται αρκετές μέρες για να ολοκληρωθεί ανάλογα με το μέγεθος των τεμαχίων του τυριού (καλουπιών). Θα πρέπει πάντοτε κατά την προσθήκη άλμης στο τυρί ο συντελεστής άλατος του τυριού να είναι μικρότερος από την πυκνότητα της άλμης διότι σε αντίθετη περίπτωση προκαλείται το φαινόμενο της απορρόφησης νερού από την άλμη για να επέλθει ισορροπία άλατος μεταξύ τυριού και άλμης με αποτέλεσμα να λασπίσει το τυρί. Έτσι η πυκνότητα της άλμης ρυθμίζεται ώστε το τελικό τυρί να έχει αλάτι 3-3,5% και η συγκέντρωση άλατος μέσα στο τυρί να είναι 5-6% η δε άλμη που περιβάλλει το τυρί να έχει πυκνότητα ίδια ή και λίγο μεγαλύτερη από το συντελεστή άλατος του τυριού.

Γρηγόρης Κ.Ζερφυρίδης Καθηγητής Τεχνολογίας Τροφίμων ΑΠΘ : Τεχνολογία Προϊόντων Γάλακτος Τυροκομία (Τόμος 1)2001

8.ΠΡΟΩΡΙΜΑΝΣΗ- ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΦΕΤΑΣ

Η ωρίμανση της Φέτας ουσιαστικά αρχίζει από τη στιγμή της δημιουργίας του τυροπήγματος και συνεχίζει μέχρι την κατανάλωσή της. Θα μπορούσε όμως να διαχωριστεί σε δύο περιόδους, στην περίοδο κατά την οποία βρίσκεται σε χώρο στους 18°C, το ωριμαντήριο όπου γίνεται και στράγγισμα και αλάτισμα και στην περίοδο κατά την οποία βρίσκεται στο ψυγείο όπου συνεχίζει η ωρίμανση με βραδύτερο ρυθμό. Η πρώτη περίοδος είναι πιο σύντομη από τη δεύτερη και χαρακτηρίζεται ως προωρίμανση.

Η Φέτα μένει στην προωρίμανση περίπου 15 μέρες μέχρι το τυρί να «κόψει» δηλαδή να αποβάλει τα υγρά του. Πρακτικά αυτό διαπιστώνεται με πίεση του τυριού προς τα κάτω μέσα στο δοχείο ώστε αυτό να βυθίζεται μέσα στην άλμη του και να ανασηκώνεται γρήγορα

9. ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ ΦΕΤΑΣ

Η οριστική τοποθέτηση του τυριού γίνεται παραδοσιακά σε βαρέλια και πιο πρακτικά σήμερα σε δοχεία. Αν και το τυρί αποκτά τελικά πιο πικάντικη και ευχάριστη γεύση στο βαρέλι παρά στο δοχείο εντούτοις φαίνεται πως επικράτησε το δοχείο διότι βρίσκεται εύκολα στην αγορά, οι εργάτες μπορούν να το χειρίζονται εύκολα διότι το βάρος του είναι συνολικά 19-20 χγρ με το περιεχόμενό του ενώ του βαρελιού είναι 50 χγρ, φορτώνεται και μεταφέρεται εύκολα και είναι φθηνότερο σε σύγκριση με το βαρέλι. Εξάλλου το τυρί μέσα στο δοχείο τοποθετείται χωρίς να αφήνει διάκενα όπως στο βαρέλι και επιπλέον το βαρέλι διαπνέει ή παρουσιάζει διαρροές της άλμης που περιέχει και κατά περιόδους θέλει συμπλήρωμα άλμης κατά τη διατήρησή του στο ψυγείο, δηλαδή γίνεται απογέμισμα άλμης. {Εμμανουήλ Μ. Ανυφαντάκης Καθηγητής Γαλακτοκομίας Γεωπ. Πανεπιστ. Αθηνών: Ελληνικά Τυριά}

ΤΕΛΕΜΕΣ-ΛΕΥΚΟ ΤΥΡΙ

Ο Τελεμές μοιάζει πολύ με την ελληνική φέτα, χαρακτηρίζεται σαν λευκό τυρί άλμης αλλά έχει διαφορά με τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της φέτας. Το τυρί αυτό ήρθε στην Ελλάδα από τους Έλληνες πρόσφυγες της Ρουμανίας. Γρήγορα διαδόθηκε η τεχνολογία του γιατί είναι ευκολότερη της Φέτας και διότι μπορεί να εφαρμοστεί με επιτυχία σε ύποπτα γάλατα για ξίνισμα και επίσης κατά το καλοκαίρι που τα τυριά μπορούν εύκολα να χαλάσουν. Το πλεονέκτημά τους οφείλεται στο ότι το αλάτισμα γίνεται με εμβάπτιση του τυριού σε άλμη όπου η πρόσληψη άλατος είναι γρηγορότερη

και η προφύλαξη του είναι καλύτερη. Υπάρχουν Εθνικές Προδιαγραφές για τον Τελεμέ (Υπουργική απόφαση 1994 313057/18-1-94 Φεκ 25/β/237-238)

1. ΓΑΛΑ—ΠΗΞΗ

Αγελαδινό γάλα παστεριώνεται, τυποποιείται και φέρεται στο τυρολέβητα σε θερμοκρασία 32^ο C. Στο γάλα προστίθεται καλλιέργεια όπως στη φέτα *Streptococcus lactis* και *Lactobacillus bulgaricus* σε αναλογία 1:3 αντίστοιχα. Η καλλιέργεια που χρησιμοποιούνταν από τα ελληνικά τυροκομεία ήταν η κοινή γιαούρτη. Ο συνδυασμός των παραπάνω καλλιιεργειών δίνει γρήγορη πτώση του pH. Στο γάλα προστίθεται χλωροφύλλη σαν αποχρωστικό και η ποσότητα εξαρτάται από τις οδηγίες του παρασκευαστή. Η ποσότητα είναι μεγαλύτερη την άνοιξη γιατί οι αγελάδες τρώνε χόρτα και το γάλα τους είναι πλούσιο σε καροτίνη ενώ το χειμώνα που τρέφονται με ξερά χόρτα. Η προσθήκη αυτή γίνεται για να εξαλειφθούν τα χρώματα της χλωροφύλλης και της καροτίνης που υπάρχουν μόνο στο αγελαδινό γάλα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα το τυρί που θα προκύψει θα είναι άσπρο και όχι κιτρινωπό. Τέλος στο γάλα προστίθεται διάλυμα 40% χλωριούχου ασβεστίου σε ποσότητα 200ml ανά τόνο γάλακτος και ακολουθεί η προσθήκη πυτιάς σε ποσότητα τέτοια που να κοπεί το τυρόπηγμα σε μία περίπου ώρα. Γρηγόρης Κ.Ζερφυρίδης Καθηγητής Τεχνολογίας Τροφίμων ΑΠΘ : Τεχνολογία Προϊόντων Γάλακτος Τυροκομεία (Τόμος 1)2001. Αληχανίδης Ευστάθιος Καθηγητής Γαλακτοκομίας ΑΠΘ : Χημεία και Φυσική Γάλακτος

2. ΔΙΑΙΡΕΣΗ ΤΥΡΟΠΗΓΜΑΤΟΣ- ΚΑΛΟΥΠΙΑΣΜΑ

Γενικά ακολουθούνται διαδικασίες παρόμοιες με της Φέτας μόνο που στο Τελεμέ αφήνεται το τυρόπηγμα περισσότερο χρόνο για στράγγισμα και συναίρεση καθόσον το αγελαδινό γάλα έχει περισσότερο ορό για στράγγισμα και ιδίως όταν τα στερεά συστατικά του γάλακτος είναι περιορισμένα. Ακολουθεί η εξαγωγή του τυροπήγματος από το καζάνι και η εισαγωγή του στα καλούπια για στράγγισμα. Τα καλούπια είναι ξύλινα ή μεταλλικά όπως της Φέτας. Γρηγόρης Κ.Ζερφυρίδης Καθηγητής Τεχνολογίας Τροφίμων ΑΠΘ : Τεχνολογία Προϊόντων Γάλακτος Τυροκομεία (Τόμος 1)2001.

3. ΑΛΑΤΙΣΜΑ- ΠΡΟΩΡΙΜΑΝΣΗ

Ο χώρος του αλατίσματος και της προωρίμανσης όπως και στη φέτα πρέπει να έχει θερμοκρασία 18^ο C. Η επιφάνεια των τυριών αλατίζεται με χονδρόκοκκο αλάτι. Επειδή τα τυριά βγάζουν συνεχώς τυρόγαλα η άλμη αραιώνεται στο 8% και μετά από 6-8 ώρες αφαιρείται μέρος της αραιής άλμης και αλατίζονται ξανά επιφανειακά οπότε η άλμη είναι 12%. Την επόμενη μέρα το τυρί έχει θερμοκρασία 20^ο C. στο κέντρο του και θα πρέπει η δράση της καλλιέργειας να είναι τέτοια ώστε το ρ Η του τυριού είναι κάτω του 5, ο συντελεστής άλατος πάνω από 2.5% και η υγρασία του είναι περίπου 62-65%. Την επόμενη μέρα το πρώι τα κομμάτια του τυριού βγαίνουν από την άλμη και μπαίνουν σε ανοικτά δοχεία σε τρεις στρώσεις. Στο πυθμένα του δοχείου καθώς και στην επιφάνεια κάθε στρώσης διαμοιράζεται χονδρόκοκκο αλάτι. Γρηγόρης Κ. Ζερφυρίδης Καθηγητής Τεχνολογίας Τροφίμων ΑΠΘ : Τεχνολογία Προϊόντων Γάλακτος Τυροκομία (Τόμος 1) 2001.

4. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΔΟΧΕΙΩΝ ΣΤΟ ΨΥΓΕΙΟ

Όταν το τυρί στα σφραγισμένα δοχεία αποκτήσει ρ Η κάτω από 4.8, συντελεστή άλατος περίπου 5% και υγρασία 54% τα δοχεία μπαίνουν στο ψυγείο σε θερμοκρασία 4-5 ^ο C όπου παραμένουν επί 2 μήνες.

Κριτήρια ελέγχου της τεχνολογίας Φέτας και Τελεμέ

Για να είναι επιτυχημένη η τεχνολογία λευκών τυριών άλμης πρέπει:

- Το γάλα να παστεριώνεται και τα διάφορα σκεύη και εργαλεία προπάντων ο τυρολέβητας να μην έχουν κολοβακτηριοειδή και ζύμες που προκαλούν πρώιμο ψίλλισμα στο τυρί. Επίσης το γάλα δεν πρέπει να έχει αερόβια σπορογόνα γιατί προκαλούν όψιμο ψίλλισμα στο τυρί, βουτυρική γεύση και φούσκωμα στα δοχεία.
- Η χρησιμοποίηση καλλιεργειών είναι απαραίτητη αφού το γάλα παστεριώνεται και θα πρέπει η πορεία της οξύτητας να είναι σταθερή.
- Το αλάτι είναι σημαντικό γιατί ρυθμίζει τη ποιότητα του τυριού περιορίζοντας τη δράση ανεπιθύμητων μικροοργανισμών. Για να είναι ασφαλές το τυρί θα πρέπει ο συντελεστής άλατος όταν βγαίνει από την άλμη να είναι 2,5% και του τελικού προϊόντος πάνω από 5%.

Η υγρασία του τυριού στις 24h είναι περίπου 60-62% {Γρηγόρης Κ.Ζερφυρίδης
Καθηγητής Τεχνολογίας Τροφίμων ΑΠΘ : Τεχνολογία Προϊόντων Γάλακτος Τυροκομία (Τόμος 1)2001.}

Συνήθη σφάλματα Φέτας και Τελεμέ

Τα συνήθη σφάλματα με τα λευκά τυριά άλμης είναι το λάσπισμα του τυριού και το φούσκωμα των δοχείων.

Το λάσπισμα της φέτας είναι η μετατροπή της σε μάζα κρεμώδη και μαλακή σαν λάσπη. Το συγκεκριμένο σφάλμα προκύπτει όταν το τυρί σκεπάζεται άωρο και τοποθετείται κατευθείαν στο ψυγείο. Κατά το λάσπισμα απορροφάται επίσης μέρος ή και όλη η άλμη του τυριού και συμβαίνει όταν ο συντελεστής άλατος του τυριού είναι μεγαλύτερος από αυτόν της άλμης του δοχείου. Επίσης η φέτα θα πρέπει δεν πρέπει ποτέ να πάει στο ψυγείο ανώριμη γιατί αλλιώς δεν θα έχει το χρόνο να αυτοεξυγιανθεί δηλαδή να σκοτωθούν οι παθογόνοι μικροοργανισμοί. Γι'αυτό η φέτα πρέπει να δίνεται για κατανάλωση μετά από δύο μήνες μετά τη παραγωγή της.

Φούσκωμα δοχείων παρατηρείται ακόμη και όταν τα δοχεία ψυχθούν κανονικά. Στις περιπτώσεις αυτές το φούσκωμα οφείλεται στα ψυχρότροφα αέρια που αναπτύσσουν τα ψυχρότροφα βακτήρια. (Τζανετάκης Ν, Καθηγητής Τεχνολογίας Τροφίμων ΑΠΘ: Μικροβιολογία Γάλακτος)

Διαφορές των τυριών Φέτα και Τελεμέ

ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	ΦΕΤΑ	ΤΕΛΕΜΕΣ
Γάλα	Πρόβειο	Αγελαδινό
Αλάτισμα	Αρχικό αλάτισμα ξηρό σε τυροτράπεζες	Αλάτισμα σε άλμη Απ'ευθείας
Πρωρίμανση	Με γλοιώδη ανάπτυξη Στην επιφάνεια	Χωρίς γλοιώδη ανάπτυξη Στην επιφάνεια
Συσκευασία	Σε βαρέλια κατά παράδοση Και σε δοχεία	Σε δοχεία
Γεύση	Κρεμώδης, πλούσια	Ξινή, πικάντικη
Δομή και υφή	Μαλακή πάστα με μικρές Αραιές αμυδαλοειδείς μηχανικές σχισμές	Σκληρή πάστα, ευθρηπτη
Χρώμα	Άσπρο	Άσπρο, ελαφρά υποκίτρινο
Σχήμα	Ορθογώνιο παραλληλεπίπεδο 23X11X6 εκ	Σχεδόν κύβος 11X11X8 εκ

Γρηγόρης Κ.Ζερφυρίδης Καθηγητής Τεχνολογίας Τροφίμων ΑΠΘ : Τεχνολογία Προϊόντων Γάλακτος Τυροκομία (Τόμος 1)2001.

B. ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Συλλογή δειγμάτων

Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 45 δείγματα από 45 διαφορετικά προϊόντα τυποποιημένης φέτας-τελεμέ, τα οποία κυκλοφορούν στα τοπικά καταστήματα ειδών διατροφής του Δήμου Βόλου. Τα προϊόντα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση SSCP-PCR αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα.

α/α	ΔΕΙΓΜΑΤΑ	
1.	Φέτα Κολιός	Κατσικίσιο
2.	Φέτα Μυτιλήνης	Πρόβειο- κατσικίσιο
3.	Φέτα Χωριό	Πρόβειο- κατσικίσιο
4.	Τσελιγγάτο	Πρόβειο- κατσικίσιο
5.	Φέτα Κλεισούρης	Πρόβειο- κατσικίσιο
6.	Λιβιάδι	Αγελαδινό
7.	Φέτα Παραδοσιακή Λουκά	Πρόβειο- κατσικίσιο
8.	Milner εν λευκώ	Πρόβειο- κατσικίσιο
9.	τυροβολάκι Μυτιλήνης	Πρόβειο - κατσικίσιο
10.	Φέτα Δωδώνης	Πρόβειο- κατσικίσιο
11.	Φέτα ΠΟΠ Δέλτα Ελασσόνας	Πρόβειο- κατσικίσιο
12.	Κατσικίσιο Τυρί "ΒΙΟ" Κουρέζα	Κατσικίσιο
13.	Μυζήθρα Σερίφου	Πρόβειο-κατσικίσιο
14.	Φέτα δοχείο Παρνασσός	Πρόβειο- κατσικίσιο
15.	Φέτα Ελασσόνας	Πρόβειο- κατσικίσιο
16.	Φέτα ΠΟΠ Ποιοτική Οδός	Πρόβειο- κατσικίσιο
17.	Λευκό τυρί Λαγκαδά	Αγελαδινό
18.	Φέτα Όλυμπος	Πρόβειο- κατσικίσιο

19.	Φέτα δοχείο Χαλκιδικής	Πρόβειο- κατσικίσιο
20.	Φέτα Μεβγάλ	Πρόβειο- κατσικίσιο
21.	Φέτα δοχείο Carrefour	Πρόβειο- κατσικίσιο
22.	Φέτα Γάλπο	Πρόβειο- κατσικίσιο
23.	Ανεβατό Χατζής Βερδικούσας	Κατσικίσιο
24.	Βερόπουλος λευκό τυρί	Αγελαδινό
25.	Φέτα Βαρελίσια Βερόπουλος	Πρόβειο- κατσικίσιο
26.	Ανθότυρο Πελοπόννησος	Πρόβειο
27.	Φέτα Πράππας ΠΟΠ	Πρόβειο- κατσικίσιο
28.	Φέτα Υφαντής	Πρόβειο- κατσικίσιο
29.	Φέτα Πίνδος	Πρόβειο- κατσικίσιο
30.	Φέτα Ψωμά	Πρόβειο
31.	Φέτα Γιαννώτας Τύρναβου	Πρόβειο-κατσικίσιο
32.	Φέτα Γιώτσας	Πρόβειο-κατσικίσιο

Απομόνωση DNA δείγματα φετας-λευκού τυριού

ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

Υλικά εργαστηρίου

- Αυτόματες πιπέτες ακριβείας των 1-1000μl και tips
- Φιαλίδια erpendorf των 1,5 και 2ml

Αντιδραστήρια

- Lysis buffer
- Πρωτεΐνάση K
- RNase A
- Φαινόλη 90%

- Χλωροφόρμιο
- Ισοαμλική Αλκοόλη
- Οξικό νάτριο (CH_3COONa , 3M)
- Απόλυτη αιθανόλη (EtOH)100%
- Αποστειρωμένο νερό (ddH_2O)

Συσκευές

- Κυλινδρικός αναδευτήρας
- Κλίβανος
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος
- Καταψύκτης
- Απαγωγός εστία εργασίας
- Ανακινητής Vortex

Για την απομόνωση ολικού DNA από τα δείγματα φέτας-τελεμέ ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο? Η διαδικασία που πραγματοποιήθηκε περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

Απομόνωση DNA

Για την απομόνωση ολικού DNA από φέτα-τελεμέ ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο των με κάποιες τροποποιήσεις. Η διαδικασία που πραγματοποιήθηκε περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

1. Τοποθέτηση 100mg ιστού αρκετά τεμαχισμένου σε σωληνάριο erpendorf (1,5ml) και προσθήκη 700μl lysis buffer (50mM Tris-HCl 2M, pH=8.0, 100mM EDTA, 100mM NaCl, 1% SDS).
2. Προσθήκη 20μl πρωτεΐνάσης K (10mg / ml) στο δείγμα και ήπια ανάδευση.

3. Ολονύκτια (overnight) επώαση στους 55°C με συνεχή ανακίνηση των δειγμάτων.
4. Προσθήκη 15μl RNase A (1mg/ml) και επώαση στους 37°C για 2 ώρες με συνεχή ανακίνηση των δειγμάτων.
5. 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 erpendorf 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.
7. Μεταφορά της επάνω υδατικής φάσης σε νέο σωληνάριο erpendorf. Προσθήκη 700μl χλωροφόρμιο : ισοαμυλική αλκοόλη. Ανάδευση για 10 λεπτά και φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές για 10 λεπτά στους 4°C.
8. Μεταφορά της επάνω υδατικής φάσης σε νέο σωληνάριο erpendorf του 1,5ml. Προσθήκη 40μl οξικού νατρίου (CH_3COONa , 3M) και 1ml 100% παγωμένη αιθανόλη.
9. Απομάκρυνση της αιθανόλης. Παραμονή των δειγμάτων για περίπου 1 ώρα στους 37°C.
10. Αραίωση των δειγμάτων σε 100μl ddH₂O και επώαση overnight σε θερμοκρασία δωματίου.

Η σωστή απομόνωση του DNA είναι καθοριστικής σημασίας για τη μελέτη του και περιλαμβάνει ποιοτικό και ποσοτικό χαρακτήρα. Μια αποτελεσματική μέθοδος απομόνωσης πρέπει να είναι αποδοτική ποσοτικά αλλά και ποιοτικά δίνοντας DNA σε καλή κατάσταση, δηλαδή μη διασπασμένο σε μικρά κομμάτια. 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 πρωτεΐνάση 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 επειδή είναι αδιάλυτο σε αυτούς τους οργανικούς διαλύτες.

Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης.

Εξοπλισμός

Υλικά εργαστηρίου

- Πιπέτες ακριβείας και τα αντίστοιχα tips
- Φιαλίδια erpendorf
- Στατώ

Αντιδραστήρια

Εκμαγείο DNA	1μl
dNTPs (10 mM each)	1μl

MgCl ₂ (50mM)	2μl
Buffer 10X	5μl
Εκκινητής Fw 50pmol/μl	1μl
Εκκινητής Rv 50pmol/μl	1μl
Taq DNA Polymerase 5U/μl	0,2μl
ddH ₂ O	38,8
Συνολικός όγκος	50μl

Πίνακας 3. Σύσταση διαλυμάτων αντιδράσεων.

Συσκευές

- Μη ψυχόμενη φυγόκεντρος
- Φασματοφωτόμετρο UV-VIS

Η τεχνική PCR βασίζεται σ' αυτόν τον επαναλαμβανόμενο κύκλο των τριών απλών αντιδράσεων, οι οποίες διαφέρουν στη θερμοκρασία και το χρόνο. Κάθε κύκλος αποτελείται από τα εξής στάδια:

1. Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA.
2. Υβριδισμός των εκκινητών με την αλληλουχία-στόχο.
3. Σύνθεση συμπληρωματικών κλώνων του DNA με επέκταση του 3' άκρου των εκκινητών με τη βοήθεια της Taq πολυμεράσης

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

Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμημάτων DNA. Όπου Y = C or T

Η διαδικασία που ακολουθούμε είναι η εξής:

1. Τοποθετούμε σε φιαλίδια erpendorf των 200μl, 1μl εκμαγείου DNA (προϊόν της απομόνωσης)
2. Ανάλογα του αριθμού των δειγμάτων παρασκευάζουμε ένα κοινό διάλυμα (master mix) η σύσταση του οποίου περιέχει τις ποσότητες αντιδραστηρίων ανά δείγμα που περιγράφονται στον παραπάνω

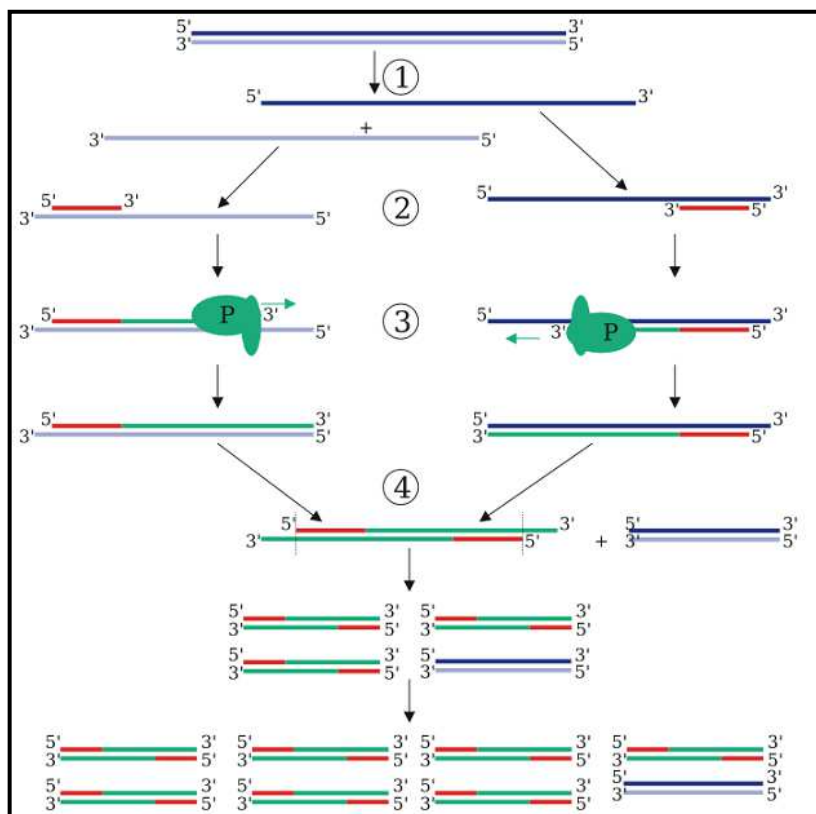
πίνακα. Το μόνο αντιδραστήριο που θα λείπει από το master mix θα είναι το εκμαγείο DNA το οποίο έχει τοποθετηθεί ήδη στα φιαλίδια erpendorf από το πρώτο βήμα.

3. Μοιράζουμε, σε κάθε erpendorf που περιέχει δείγμα, από 49μl του master mix. Η κάθε αντίδραση έχει τελικό όγκο 50μl.
4. Κλείνουμε καλά το καπάκι του φιαλιδίου και πραγματοποιείται μια σύντομη φυγοκέντρηση (spin).
5. Τοποθετούμε τα δείγματα στον θερμοκυκλοποιητή ο οποίος προγραμματίζεται να εκτελέσει το ακόλουθο πρόγραμμα θερμοκρασίας/χρόνου.

Στάδιο Αντίδρασης	Θερμοκρασία °C	Χρόνος
Αρχική Αποδιάταξη	95°C	4 min
Αποδιάταξη	95°C	40 sec
Συγκόλληση Εκκινήτων	53°C	50 sec
Επιμήκυνση	72°C	50 sec
Τελική Επιμήκυνση	72°C	10 min

Συνθήκες ενίσχυσης του τμήματος του γονιδίου 16S rRNA.

6. Ελέγχουμε την επιτυχία της διαδικασίας κάνοντας ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων σε πηκτή αγαρόζης 2%.
7. Παρατηρούμε την πηκτή πάνω από την συσκευή υπεριώδους φωτός.



Εικόνα: Τα στάδια που ακολουθούνται σε κάθε κύκλο της PCR. (1) Αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου DNA. (2) Συγκόλληση των εκκινητών στην αλληλουχία – στόχο. (3) Δράση της πολυμεράσης για τη σύνθεση των νέων μορίων DNA. (4) Εκθετική αύξηση των αντιγράφων.

Φωτομέτρηση

Εξοπλισμός για τον Ποσοτικό προσδιορισμό του εξαγόμενου DNA

Υλικά εργαστηρίου

- Πιπέτες ακριβείας των 2 και 100μl με τα αντίστοιχα tips
- Φιαλίδια erpendorf 500μl
- Στατώ
- Πλαστικές κυβέττες φωτομέτρησης οπτικής διαδρομής 10mm

Αντιδραστήρια

- Αποστειρωμένο ddH₂O

Συσκευές

- Μη ψυχόμενη φυγόκεντρος
- Φασματοφωτόμετρο UV-VIS

Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του απομονωμένου DNA υπολογίζεται μέσω της μέτρησης της απορρόφησης στα 260nm και 280nm με τη βοήθεια φασματοφωτόμετρου UV-VIS. Η φωτομέτρηση πραγματοποιείται μετά την αραίωση 1μl δείγματος απομονωμένου DNA σε 49μl ddH₂O.

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης.

Πρόκειται για την ευκολότερη μέθοδο διαχωρισμού και ελέγχου του DNA. Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό τμημάτων DNA ανάλογα με το μέγεθος τους, καθώς αυτά αρνητικά φορτισμένα κινούνται διαμέσου των πόρων της πηκτής υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου.

Στην συγκεκριμένη εργασία η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε τόσο για τον έλεγχο της ποιότητας της απομόνωσης όσο και των προϊόντων που προέκυψαν μετά την εφαρμογή της τεχνικής PCR. Στην πρώτη περίπτωση η εικόνα μας δίνει πληροφορίες για την ακεραιότητα ή τον κατακερματισμό του απομονωμένου DNA, αλλά επίσης και για την ποσότητα η οποία είναι

ανάλογη της έντασης. Όσον αφορά το προϊόν της PCR, η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης πραγματοποιείται για την ποσοτικοποίηση και τον έλεγχο της ποιότητας των προϊόντων (μη επιθυμητά τμήματα DNA μπορεί να ενισχύθηκαν κατά την διαδικασία της PCR).

Η διαδικασία που ακολουθούμε είναι η εξής:

1. Αρχικά ετοιμάζεται η ειδική συσκευή στην οποία τοποθετείται η πηκτή.
2. Στη συνέχεια ετοιμάζεται η πηκτή 2% χρησιμοποιώντας 0,6 gr αгарόζης και 30 ml από το buffer TAE 1x.
3. Θέρμανση του διαλύματος έτσι ώστε να διαλυθεί η αгарόζη (ταυτόχρονη ανακίνηση).
4. Το διάλυμα κρυώνει, προστίθεται 3μl βρωμιούχο αιθίδιο (10mg/ml) και στη συνέχεια τοποθετείται στην ειδική συσκευή.
5. Εισάγεται το χτενάκι της συσκευής έτσι ώστε να σχηματιστούν οι θέσεις της πηκτής στις οποίες θα εισαχθεί το DNA.
6. Αφήνουμε την αгарόζη να πήξει καλά για περίπου 30 min και αφαιρούνται τα χτενάκια.
7. Τοποθέτηση της πηκτής σε ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης η οποία περιέχει buffer TAE.
8. Ανάμειξη 3μl loading buffer με 5 μl προϊόντος της αντίδρασης της PCR και στη συνέχεια εισαγωγή των δειγμάτων στις θέσεις της πηκτής.
9. Παρέχουμε ρεύμα στο κύκλωμα προσέχοντας να διατηρούνται σταθερά τα Volt κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης ανάμεσα σε 80-100. Η ηλεκτροφόρηση διαρκεί περίπου 30 min. Διακόπτεται όταν είναι ικανοποιητική η απόσταση που έχει διατρέξει το μέτωπο της ταχέως κινούμενης χρωστικής του loading buffer μέσα στο πήκτωμα.
10. Πραγματοποιείται παρατήρηση του πηκτώματος κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία και ακολουθεί φωτογράφησή του και ακολούθως ανάλυση του αποτελέσματος.

Το διάλυμα πλήρωσης περιέχει μπλε της βρωμοφαινόλης που εξυπηρετεί ως δείκτης παρακολούθησης του μετώπου της ηλεκτροφόρησης, γλυκερόλη για την καθίζηση των δειγμάτων στα πηγάδια και EDTA για την δέσμευση των κατιόντων και την παύση οποιασδήποτε ενζυμικής

δραστικότητας. Το βρωμιούχο αιθίδιο έχει την ιδιότητα να φθορίζει στο υπεριώδες φως καθώς παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων DNA. Έτσι δίνει πρότυπα ζωνώσεων που αντιστοιχούν στην ποσότητα DNA που δεσμεύεται BrEt. Το TAE προσφέρει καλύτερη ανάλυση ρυθμίζοντας την ηλεκτρική αγωγιμότητα.

Ανάλυση SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism).

Η ανάλυση SSCP όπως έχει ήδη περιγραφεί βασίζεται στο διαχωρισμό μονόκλωνων τμημάτων DNA βάσει των διαφορών της κινητικότητας τους στο πήκτωμα η οποία μπορεί να προκαλείται από μετάλλαξη ενός και μόνο νουκλεοτιδίου. Η ανάλυση SSCP αποτελείται από τρία στάδια: την αποδιάταξη των προϊόντων της PCR, την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και την χρώση της πηκτής για την εμφάνιση των αποτελεσμάτων.

Αποδιάταξη PCR προϊόντων.

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 erpendorf και προσθήκη 10μl αποδιατακτικού διαλύματος (95% v/v φορμαμίδιο, 10mM NaOH, 0,05% v/v μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,05% v/v κυανού του ξυλενίου, 10% v/v γλυκερόλης, αποθήκευση στους 4°C)

Στη συνέχεια τα erpendorf τοποθετούνται στον αυτοματοποιημένο κυκλοποιητή όπου επέρχεται η αποδιάταξή τους αφότου μείνουν σε υψηλές θερμοκρασίες (95°C για 2 min, 97°C για 2 min, 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.

Εξοπλισμός -Παρασκευή και ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμίδης.

Υλικά εργαστηρίου

- Ποτήρι ζέσεως 200ml
- Μαγνήτης ανάδευσης
- Ογκομετρικοί κυλινδροι
- Χωνί μετάγγισης
- Χαρτί διήθησης

Για την παρασκευή των πηκτών πολυακρυλαμίδης χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα διαλύματα:

1) Διάλυμα ακρυλαμίδης 38,5% (200ml)

- Ακρυλαμίδα 75gr
- Bis – acrylamide 2gr
- ddH₂O έως τα 200ml

2) TBE 10x (2lt)

- Tris Base 216gr
- Boric Acid 110gr
- EDTA 16,6gr
- ddH₂O έως τα 2lt

3) Glycerol 50% v/v

4) APS 20% w/v

5) TEMED

Για την ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων χρησιμοποιείται πηκτή πολυακρυλαμίδης 10%. Οι ποσότητες των συστατικών που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή της πηκτής πολυακρυλαμίδης αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα. Οι ποσότητες αυτές αντιστοιχούν για την δημιουργία μιας πηκτής.

	10%
Acrylamide	6,1875gr
Bis – Acrylamide	0,165gr
Glycerol 50%	6,25 ml

TBE 10X	5ml
TEMED	62,5μl
APS 20%	300μl
H ₂ O	Έως τα 62,5ml
Συνολικός όγκος	62.5ml

Πίνακας 5. Ποσότητες συστατικών που χρειάζονται για την παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης

Συσκευές

- Συσκευή παρασκευής πηκτής πολυακρυλαμίδης
- Οριζόντιος μαγνητικός αναδευτήρας
- Συσκευή καθέτου ηλεκτροφόρησης

Η διαδικασία που ακολουθούμε είναι η εξής:

1. Προετοιμάζουμε την συσκευή παρασκευής της πηκτής.
2. Σε ποτήρι ζέσεως προσθέτουμε 6,1875gr Acrylamide + 0,165gr Bis – Acrylamide + 6,25ml Glycerol 50% + 5ml TBE 10x. Αναδεύουμε σε οριζόντιο αναδευτήρα μέχρι πλήρους διάλυσης των συστατικών.
3. Διηθούμε το διάλυμα με διηθητικό χαρτί εντός ογκομετρικού κυλίνδρου των 100ml.
4. Συμπληρώνουμε με ddH₂O έως τα 62,5ml και μεταφέρουμε το διάλυμα σε κωνική φιάλη .
5. Προσθέτουμε 62,5μl TEMED και 300μl APS 20% και γρήγορα, πριν πολυμεριστεί η ακρυλαμίδα και πήξει, περιχύουμε το διάλυμα στη συσκευή παρασκευής της πηκτής.
6. Τοποθετούμε την χτένα για την δημιουργία των πηγαδιών και περιμένουμε περίπου 45min ώστε η πηκτή να είναι έτοιμη για ηλεκτροφόρηση.

Η αρχή της μεθόδου δε διαφέρει από την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόξης μόνο που εδώ μιλάμε για κάθετη ηλεκτροφόρηση. Πλεονέκτημα έναντι της αгарόξης είναι ότι η πηκτή πολυακρυλαμίδης αναλόγως της πυκνότητας έχει μεγαλύτερη διαχωριστική ικανότητα, τα αποτελέσματα του

διαχωρισμού είναι πιο ευδιάκριτα και η πηκτή μπορεί να διατηρηθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα σε θερμοκρασία δωματίου.

Μετά τον πολυμερισμό της ακρυλαμίδης, ηλεκτροφορούνται τα αποδιατεταγμένα δείγματα με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος TBE 0,5X (προέρχεται από αραίωση 1:20 του TBE 10X). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται με τάση 220 volts στους 4°C για 12 με 16 ώρες.

Χρώση πηκτής πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο (Silver Staining).

ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

Υλικά εργαστηρίου

- Μεταλλικό δοχείο χρώσης
- Ογκομετρικοί κύλινδροι των 1000ml
- Ποτήρι ζέσεως των 500ml
- Μαγνήτης ανάδευσης

Αντιδραστήρια

- Αποστειρωμένο ddH₂O
- EtOH 100%
- Acetic acid 99%
- Νιτρικός άργυρος
- Υπεροξείδιο του Νατρίου (NaOH) 99%
- Βοροϋδρίδιο του Νατρίου (NaBH₄)
- Φορμαλδεϋδη 37%

Συσκευές

- Συσκευή οριζόντιας κυκλικής ανάδευσης-Ανακινούμενη πλάκα
- Οριζόντιος μαγνητικός αναδευτήρας
- Συσκευή πρόβολής πηκτής πολυακρυλαμίδης
- Ψηφιακή φωτογραφική μηχανή

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 και ξεπλένονται δύο φορές για 3 λεπτά με 200 ml διαλύματος μονιμοποίησης (10% αιθανόλη, 0,5% οξικό οξύ). Ακολουθούσε χρώση με 200 ml από 0,1% AgNO_3 για 20 λεπτά, ξέπλυμα με 200 ml απεσταγμένου νερού και στη συνέχεια εμφάνιση με 200 ml διαλύματος εμφάνισης [1,5% w/v NaOH, 0,8ml 37% φορμαλδεΰδη και 0,1gr Na(BH)_4] μέχρι οι ζώνες να γίνουν διακριτές. Οι πηκτές φωτογραφίζονταν και τοποθετούνταν στους 4°C.

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

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη ήταν όλα προϊόντα κατεργασμένα και τυποποιημένα και προέρχονται από τα τοπικά καταστήματα ειδών διατροφής του Δήμου Βόλου. Ο πίνακας 1, που αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, παρουσιάζει αναλυτικά και τα 54 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 δείγματα τυποποιημένης φέτας και λευκού τυριού 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).

ΔΕΙΓΜΑΤΑ

ΠΡΟΤΥΠΟ 1

1. δοχείο κατσίκισιο Κολιός	Κατσίκι+Πρόβατο
2. δοχείο Μυτιλήνη	Κατσίκι+Πρόβατο
3. Φέτα χωριό	Κατσίκι+Πρόβατο
4. τυρί τσελιγκάτο	Κατσίκι+Πρόβατο
5. Φέτα Κλεισούρας	Κατσίκι+Πρόβατο
8. Milner εν λευκώ	Κατσίκι+Πρόβατο
9. τυροβολάκι Μυτιλήνης	Κατσίκι+Πρόβατο
10. φέτα αιγοπρόβεια Δωδώνης	Κατσίκι+Πρόβατο
14. φέτα δοχείο Παρνασσός	Κατσίκι+Πρόβατο

15. φέτα δοχείο Ελασσόνας	Κατσίκι+Πρόβατο
18. φετα όλυμπος	Κατσίκι+Πρόβατο
19. φέτα δοχείο Χαλκιδικής	Κατσίκι+Πρόβατο
20. φέτα ΜΕΒΓΑΛ	Κατσίκι+Πρόβατο
21, τυρί φέτα δοχείο(Carrefour)	Κατσίκι+Πρόβατο
23. Ανεβατό Χατζής Βερδικούσα(Γίδινο)	Κατσίκι+Πρόβατο
25. Βαρελίσια Βερόπουλος	Κατσίκι+Πρόβατο
27. Πράππας	Κατσίκι+Πρόβατο
12. Κατσικίσιο Τυρί "ΒΙΟ" Κουρέζα	Κατσίκι+Πρόβατο
13. Μυζήθρα Σερίφου	Κατσίκι+Πρόβατο
28. Φέτα Υφαντής	Κατσίκι+Πρόβατο
31. Γιαννιώτας Τυρνάβου	Κατσίκι+Πρόβατο
32.Φέτα Γιώτσας	Κατσίκι+Πρόβατο

Στα παραπάνω τυριά με πρότυπα κατσίκι και πρόβατο ανιχνεύθηκε νοθεία στα παρακάτω:

- 1. Κατσικίσιο ΚΟΛΙΟΣ** (Ανιχνεύθηκε και πρόβατο).
- 2. Ανεβατό Χατζής Βερδικούσα Γίδινο** (Ανιχνεύτηκε και πρόβατο).
- 3. Κατσικίσιο τυρί ΒΙΟ Κουρέζας** (Ανιχνεύθηκε και πρόβατο).

ΔΕΙΓΜΑΤΑ

ΠΡΟΤΥΠΟ 2

11. φέτα ποπ δέλτα Ελασσόνας	Πρόβατο
16. φετα ποπ ποιοτική οδός	Πρόβατο
29. φέτα Πίνδος	Πρόβατο
7. Φέτα παραδοσιακή ΛΟΥΚΑ	Πρόβατο
26. Ανθότυρο Πελοπόννησος	Πρόβατο

Στα παραπάνω τυριά ανιχνεύθηκε μόνο το πρότυπο του προβάτου ενώ θα έπρεπε να έχει ανιχνευθεί και το πρότυπο του κατσικιού, πράγμα που σημαίνει ότι δεν χρησιμοποιήθηκε κατσικίσιο γάλα στη παρασκευή της Φέτας. Άρα έχουμε νόθευση των προϊόντων. Όσον αφορά τη σήμανση τους αναγράφεται στην ετικέτα τους ότι παρασκευάζεται από φρέσκο παστεριωμένο αιγοπρόβειο γάλα.

ΔΕΙΓΜΑΤΑ

ΠΡΟΤΥΠΟ 3

17. Λευκό τυρί αλμης λαγκαδα	Αγελαδινό
22. φέτα ΓΑΛΠΟ (πρόβειο-γίδινο)	Αγελαδινό
24. Βερόπουλος Αγελαδινός	Αγελαδινό
6. ΛΙΒΑΔΙ λευκό τυρί	Αγελαδινό

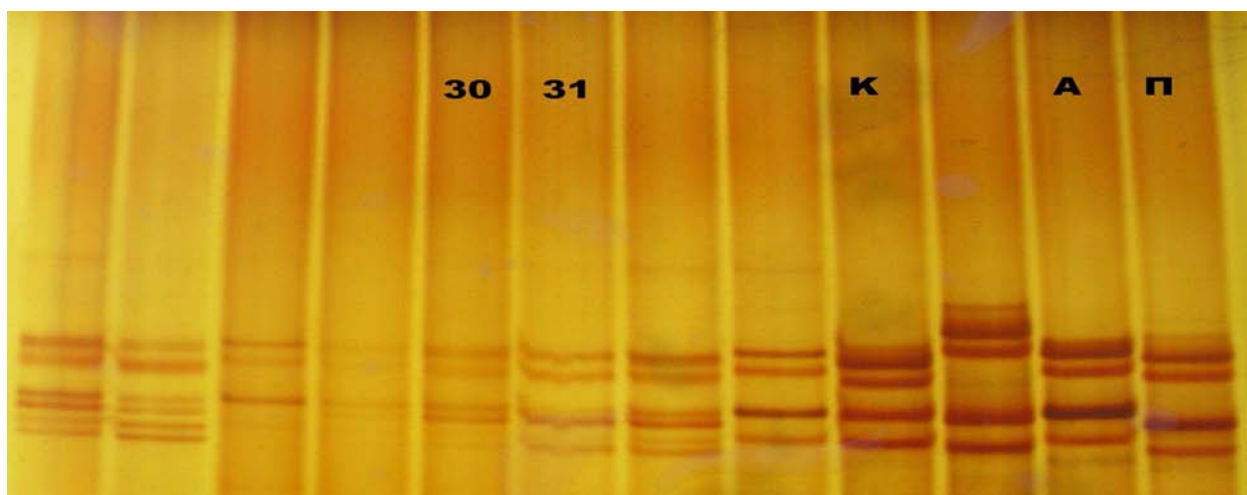
Στα παραπάνω παρατηρούμε ότι ενώ στο τυρί ΓΑΛΠΟ θα έπρεπε να ανιχνεύσουμε τα πρότυπα του προβάτου και του κατσικιού στη πραγματικότητα ανιχνεύσαμε αγελαδινό γάλα. Επομένως θα έπρεπε να ονομάζεται λευκό τυρί(τελεμές) και όχι φέτα. Καταλαβαίνουμε δηλαδή ότι οδηγεί σε παραπληροφόρηση των καταναλωτών.

ΔΕΙΓΜΑΤΑ

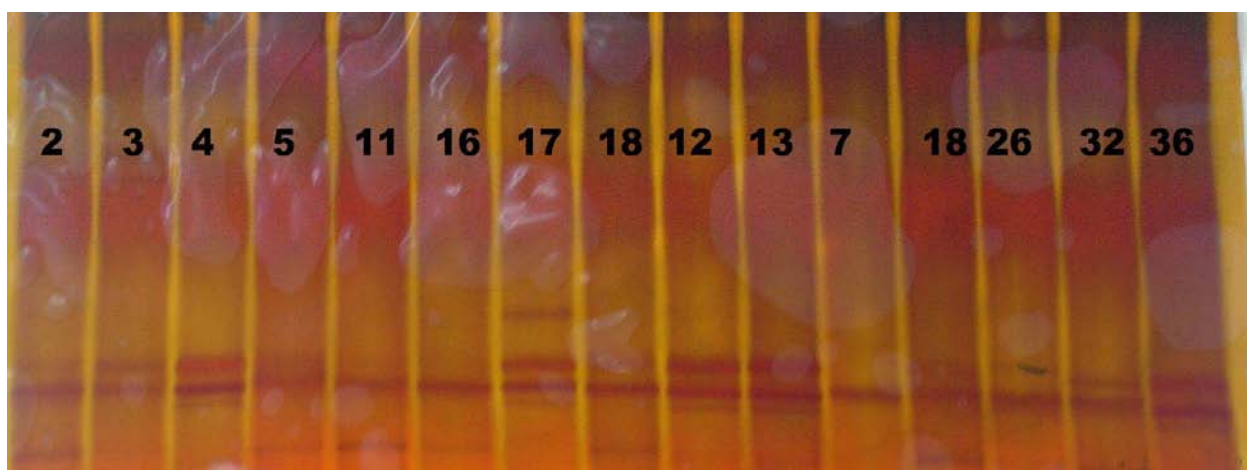
ΠΡΟΤΥΠΟ 4

30.Φέτα Ψωμά	Αγελαδινό και πρόβειο
--------------	-----------------------

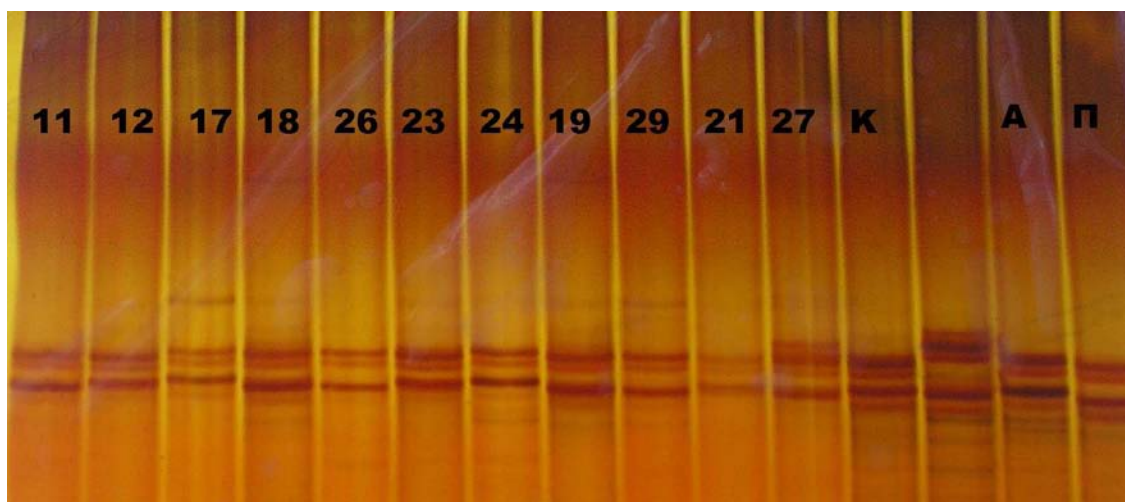
Η ετικέτα ανέγραφε ότι ήταν από αιγοπρόβειο ενώ στην πραγματικότητα ανιχνεύθηκε πρόβειο και αγελαδινό, πράγμα που σημαίνει ότι έχουμε νοθεία.



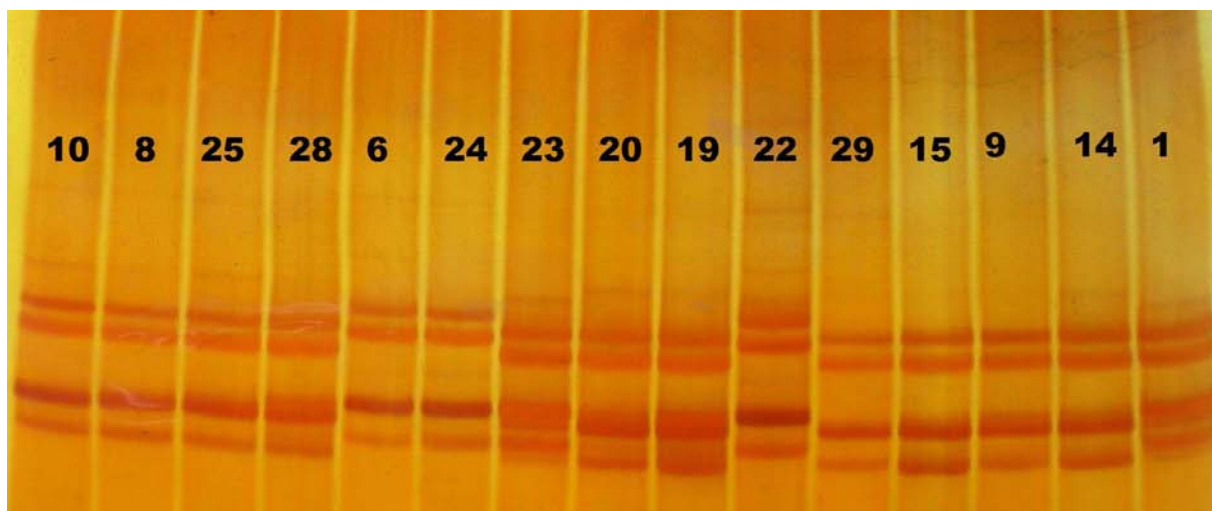
Εικόνα 4: Ηλεκτροφόρηση τυποποιημένων λευκών τυριών(δείγματα)



Εικόνα 5: Ηλεκτροφόρηση τυποποιημένων λευκών τυριών(δείγματα)



Εικόνα 6: Ηλεκτροφόρηση τυποποιημένων λευκών τυριών(δείγματα)



Εικόνα 7: Ηλεκτροφόρηση τυποποιημένων λευκών τυριών(δείγματα)

4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η Φέτα και ο τελεμές (λευκό τυρί) αποτελεί σήμερα τρόφιμο μείζονος ενδιαφέροντος για το κοινωνικό σύνολο και ιδιαίτερα για τους Έλληνες που αποτελεί εθνικό προϊόν. Λόγω του ότι η γαλακτοπαγωγική περίοδος των αιγοπροβάτων είναι από την Ιανουάριο έως τον Αύγουστο γι' αυτό και εκείνη την περίοδο γίνεται η παραγωγή φέτας πολλοί προσπαθούν να νοθεύσουν το προϊόν χρησιμοποιώντας και με αγελαδινό γάλα. Επομένως επειδή οι ετικέτες δεν παρέχουν επαρκείς εγγυήσεις σχετικά με το πραγματικό περιεχόμενο ενός προϊόντος για αυτό το λόγο κρίνεται απαραίτητη η εφαρμογή μιας αξιόπιστης μεθόδου εύρεσης και προέλευσης του γάλακτος.

Η αναγνώριση της προέλευσης του τυριού, αντιπροσωπεύει ένα τεράστιο τομέα του σύγχρονου ελέγχου της ποιότητας των τροφίμων σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Ένωση, η οποία έχει θεσπίσει μια σειρά από αυστηρές διαδικασίες όσον αφορά τον τρόπο με το οποίο περιγράφονται τα συστατικά των διαφόρων τυριών στις ετικέτες. Υπάρχουν δεκάδες είδη τυριών και η εμφάνιση του καθενός, η υφή και η γεύση τους εξαρτώνται κυρίως από την προέλευση του γάλακτος. Έτσι, σταδιακά, αναπτύσσονται μια σειρά από συγκεκριμένες, ευαίσθητες και εύκολα αναλυτικές μέθοδοι, οι οποίες βοηθούν στην αναγνώριση των ζώων που χρησιμοποιούνται στα διάφορα είδη τυριών, με σκοπό την εξακρίβωση των συστατικών που αναγράφονται στην ετικέτα.

Το ελληνικό τυρί, η φέτα, έχει κατοχυρωθεί από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή ως προστατευόμενη ονομασία προέλευσης (Π.Ο.Π.) το 2002, που σημαίνει ότι το όνομα «Φέτα» δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τυριά παρόμοιας σύστασης που παρασκευάζονται εκτός Ελλάδος αλλά και με διαφορετική διαδικασία από την παραδοσιακή. Παρασκευάζεται αποκλειστικά από γάλα προβάτου ή αιγοπρόβριο γάλα, δηλαδή μίγμα με γάλα κατσίκας έως και 30%. Μέχρι την κατοχύρωσή της παρασκευαζόταν με αυτήν την ονομασία και σε άλλες χώρες, ενώ ευρέως διαδεδομένη ήταν και η φέτα από αγελαδινό γάλα. Από την κατοχύρωσή της όμως ως Π.Ο.Π. δεν επιτρέπεται τυρί που περιέχει αγελαδινό γάλα και δεν έχει παρασκευαστεί στην Ελλάδα να ονομάζεται φέτα.

Η προέλευση και η αναγνώριση των ζώων στα επεξεργασμένα τυριά κρίνεται λοιπόν απαραίτητη για πολλούς λόγους και κυρίως, γιατί πρέπει να αναγνωρίζεται η νόθευση του τυριού, τις περισσότερες φορές από γάλα άλλων ζώων, ώστε να προστατεύεται ο καταναλωτής από προϊόντα των οποίων η σύσταση δεν είναι η αναγραφόμενη. Στη φέτα αυτό θα μπορούσε να συμβεί είτε με την προσθήκη αγελαδινού γάλατος το οποίο απαγορεύεται είτε με την παρασκευή της εξολοκλήρου από κατσικίσιο γάλα.

Σε αυτό ακριβώς το σημείο μπορεί να συμβάλλει η επιστήμη της Γενετικής με τις μεθόδους της μοριακής βιολογίας. Το γενετικό υλικό, το γνωστό σε όλους DNA, φέρει μοναδικές πληροφορίες για τον καθένα μας και κυρίως μπορεί και διαχωρίζει τα ζωικά είδη μεταξύ τους.

Στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια για τη μοριακή ταυτοποίηση ειδών φέτας-τελεμέ(λευκού τυριού) που αποτελούνται από τρία διαφορετικά είδη γάλακτος. Η διαδικασία στηρίχθηκε στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα και στο πολυμορφισμό που εμφανίζουν ορισμένοι γενετικοί του τύποι. 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: i) Απομόνωση του mtDNA από τον ιστό κρέατος, ii) την ενίσχυση των επιθυμητών γονιδιακών τόπων, iii) την αποδιάταξη των τμημάτων DNA, iv) την ηλεκτροφορήσή τους σε πηκτή πολυακρυλαμίδης για την εμφάνιση των αποτελεσμάτων.

Από μια πολύ μικρή ποσότητα τροφίμου, 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.

Σε αυτή τη μελέτη σε επίπεδο τεχνικής και μοριακού δείκτη 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.

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. Τέλος, έχει απομονωθεί DNA από ελαιόλαδο με σκοπό την απόδειξη ότι αρκετά μεγάλα τμήματα DNA μπορούν να απομονωθούν ύστερα από επεξεργασία και σε αυτά μπορεί να γίνει ενίσχυση μικροδορυφορικών τόπων (Testolin & Lain, 2005).

Συμπερασματικά, λοιπόν, όσον αφορά τη μεθοδολογία μπορεί να γίνει απομόνωση από κατεργασμένα τρόφιμα ενώ το 16S rRNA είναι αξιόπιστος δείκτης διαχωρισμού των ειδών. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης δείχνουν ότι παρατηρείται νόθευση στη φέτα και στο κατσικίσιο τυρί. Παρατηρήσαμε ότι 3 τα τρία δείγματα κατσικίσιου τυριού είχαν δεχθεί και πρόσμιξη πρόβειου κατά τη παρασκευή τους. Επίσης σε ένα δείγμα φέτας στο οποίο η ετικέτα του ανέγραφε αιγοπρόβειο ανιχνεύθηκε με τη μέθοδο που εφαρμόσαμε μόνο αγελαδινό. Τέλος 5 δείγματα με ετικέτα αιγοπρόβειου ανιχνεύθηκε μόνο πρόβειο. Συμπερασματικά παρατηρούμε ότι από τα 32 εξεταζόμενα δείγματα ανιχνεύσαμε νοθεία στα 9 είδη.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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, ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ (916-917), Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης
21. Ζερφυρίδης Γρηγόρης Κ.,(2001), Εκδόσεις Γιαχούδη, Θεσσαλονίκη.
22. http://www.kepka.org/Grk/info/Nutricion/nut003_025.htm
23. <http://en.wikipedia.org/wiki/Mozzarella>
24. <http://en.wikipedia.org/wiki/Parmigiano-Reggiano>
25. http://en.wikipedia.org/wiki/16S_ribosomal_RNA
26. Αληχανίδης Ευστάθιος Καθηγητής Γαλακτοκομίας ΑΠΘ : Χημεία και Φυσική Γάλακτος.