



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ

ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»

***Ανάπτυξη μεθόδου ανίχνευσης και ποσοτικού
προσδιορισμού αίγειου γάλακτος στην Φέτα***

Νικόλαος Ι. Φωτεινιάς

Λάρισα: Ιούνιος 2015

Επιβλέπων: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μούτου Αικατερίνη

Τριμελής Εξεταστικής Επιτροπή

ΜΟΥΤΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ	ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ	Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
ΣΑΡΑΦΙΔΟΥ ΘΕΟΛΟΓΙΑ	Επ. Καθ. Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών

Περιεχόμενα

Περίληψη	1
ABSTRACT	2
Ευχαριστίες	3
1.Εισαγωγή.....	4
1.1 Νοθεία του γάλακτος	4
1.2 Τα τυροκομικά προϊόντα ως Διατροφικό προϊόν.....	5
2. Προϊόντα Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (ΠΟΠ).....	6
2.1 Γενικά.....	6
2.2 Ελληνικά τυριά Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (ΠΟΠ)	7
2.3 Το Νομικό πλαίσιο για τα ΠΟΠ προϊόντα σήμερα	8
3. Η Φέτα.....	10
3.1 Γενικά.....	10
3.2 Ιστορία του τυριού και της Φέτας.....	10
3.3 Ελληνική Νομοθεσία για την Φέτα	11
3.4. Η Νομιμοποίηση της Φέτας στην Ευρωπαϊκή Ένωση	13
3.5 Εμπορευματοποίηση της Φέτας Διεθνώς	15
4.Επισήμανση –Ιχνηλασιμότητα τροφίμων.....	16
4.1 Επισήμανση τροφίμων σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό (ΕΚ) 1169/2011.....	16
4.2 Επισήμανση τυροκομικών προϊόντων.....	16
4.3 Επισήμανση Φέτας (προϊόντων ΠΟΠ)	19
4.4 Ιχνηλασιμότητα τροφίμων Ζωικής Προελεύσεως.....	19
4.5 Μέθοδοι ταυτοποίησης γαλακτοκομικών προϊόντων	22
5.Μοριακοί δείκτες	23
6. Μιτοχονδριακό DNA.....	25
6.1 Γενικά.....	25

6.2 Γονίδια που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των ειδών	28
6.3 Η επίδραση της φύσης του γονιδίου-στόχου στην Real Time PCR με βάση την ταυτοποίηση του DNA.....	30
7. Σκοπός της εργασίας.....	31
8. Πειραματική πορεία - Μέθοδοι.....	31
8.1 Δείγματα.....	32
8.2 Απομόνωση DNA	36
8.3 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.....	37
8.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης - PCR (polymerasechainreaction).....	41
8.5 RealTimePCR.....	47
8.5.1 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς	53
8.5.2 Καμπύλη αποδιάταξης.....	55
8.5.3 Αναλυτική μέθοδος Real-TimePCR	56
8.5.4 Ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος	57
8.5.5 Υπολογισμοί	58
9. Αποτελέσματα	59
9.1 Απομόνωση DNA	59
9.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	60
9.3 Έλεγχος απόδοσης της αντίδρασης	61
9.4 Έλεγχος για διασταυρούμενη αντιδραστικότητα.....	61
9.5 Έλεγχος της απόδοσης της αντίδρασης σε μίγματα αίγας και πρόβειου.....	62
9.6 Κατασκευή καμπύλης ποσοτικοποίησης αίγιου DNA.....	63
9.7 Ποσοτικοποίηση δειγμάτων DNA από τυριά.....	65
9.8 Έλεγχος παρουσίας αγελαδινού γάλακτος	66
10. Συζήτηση.....	67
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	71

Περίληψη

Λόγω της ποικιλομορφίας των προϊόντων που διατίθενται στην αγορά και της πληθώρας των πληροφοριών που τα αφορούν, ο καταναλωτής θα πρέπει, προκειμένου να κάνει καλύτερες επιλογές, να διαθέτει σαφείς και συνοπτικές πληροφορίες για την καταγωγή του προϊόντος. Η οικονομική κρίση των τελευταίων ετών φαίνεται ως τώρα, πως δεν επηρέασε τα προϊόντα που προσφέρουν υψηλή προστιθέμενη αξία ποιότητας όπως τα Τυριά ΠΟΠ και ειδικότερα τη Φέτα, η οποία και θα μας απασχολήσει στην συνέχεια της μεταπτυχιακής εργασίας.

Το παραγόμενο κέρδος συχνά υπερσχύει του κριτηρίου της ποιότητας. Η αυξημένη τιμή του πρόβειου γάλακτος, καθώς και η εποχική διακύμανση στην διαθεσιμότητά του, θεωρούνται οι κυριότεροι λόγοι που οδηγούν στην υιοθέτηση μιας επικερδούς τακτικής των παρασκευαστών τυριών, η οποία συνίσταται στην νοθεία των πιο ακριβών γαλάκτων με αγελαδινό ή αίγαιο ούτως ώστε να μειώσουν το κόστος παραγωγής και να αυξήσουν το περιθώριο κέρδους.

Οι διατροφικές κρίσεις των τελευταίων χρόνων φέρνουν στο προσκήνιο την ασφάλεια των τροφίμων. Νομοθεσίες που ορίζουν εκτενώς την ασφάλεια παραγωγής, την ιχνηλασιμότητα και τη διατροφική επισήμανση, μπορούν να φαλκιδευτούν για το προσωπικό όφελος.

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία, εφαρμόστηκαν μοριακές τεχνικές με την χρήση μοριακών δεικτών, για την ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση του αίγειου γάλακτος σε δείγματα τυριού Φέτας. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο μιτοχονδριακό DNA που απομονώθηκε από τα 14 δείγματα τυριού που χρησιμοποιήθηκαν (13 Φέτας, 1κατσικίσιουΤυριού). Οι τεχνικές που εφαρμόστηκαν ήταν η PCR και η Real-time PCR. Αρχικά σχεδιάστηκαν οι εκκινητές και έγινε έλεγχος της καταλληλότητάς τους με την μέθοδο PCR για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου 12SrRNA της Αίγας. Παράλληλα έγινε και έλεγχος ότι οι συγκεκριμένοι εκκινητές δεν ενισχύουν αλληλουχίες άλλων ζωικών ειδών. Στην συνέχεια με την μέθοδο της Real-time PCR χρησιμοποιώντας την χρωστική SYBR Green προσδιορίστηκε η κατάλληλη συγκέντρωση των εκκινητών, η οποία μας έδωσε την καλύτερη απόδοση αντίδρασης (Efficiency, E).Εφαρμόζοντας την ίδια τεχνική στην καλύτερη συγκέντρωση εκκινητών ελέγχτηκε η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα μεταξύ των ειδών αίγας, προβάτου, μοσχαριού, χοιρινού, γαλοπούλας, κοτόπουλου και της Φέτας. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε έλεγχος της απόδοσης της αντίδρασης σε μίγματα αίγας και πρόβειου δημιουργώντας δύο διαφορετικές καμπύλες αναφοράς για την ποσοτικοποίηση του Αίγειου DNA στα άγνωστα δείγματα. Για την ολοκλήρωση του πειράματος πραγματοποιήθηκε στα δείγματα και έλεγχος της παρουσίας αγελαδινού γάλακτος.

Με την χρήση του γονιδίου 12srRNA και την μέθοδο Real-Time PCR χρησιμοποιώντας την χρωστική SYBR Green διαπιστώθηκε ότι είναι εφικτή η δημιουργία καμπύλης αναφοράς για την ποσοτικοποίηση DNA σε άγνωστα δείγματα. Τέλος, η μέθοδος αυτή κρίθηκε αποτελεσματική για την ταυτοποίηση και ανίχνευση του Αίγειου γάλακτος σε τελικό προϊόν Φέτας, οπότε την καθιστά χρήσιμο εργαλείο για τον έλεγχο της νοθείας στα τυροκομικά προϊόντα.

ABSTRACT

Due to the variety of the products which are available on the market and the plethora of information which concern them, the consumer should be in possession of specific and concise information in order to make better choices. The recent economic crisis, which hasn't up till now affected the products that offer a high added value of quality such as Cheese PDO (Protected Denomination of Origin) and mainly Feta Cheese, will interest us later in the thesis.

The produced profit usually overrides the criterion of quality. The increased price of sheep's milk, as well as the seasonal fluctuation in its availability, lead to the adoption of a profitable tactic for the cheese producers, which consists of the adulteration of the most expensive milk with cow or goat milk in order to reduce the cost of production and to increase profit margin.

The dietary crisis of the last few years raises the question of the safety of the products. Legislation that defines extensively the security of production, the traceability and the dietary labelling, could be circumscribed for personal profit.

In the present thesis, molecular techniques with the use of molecular markers have been applied, for the qualitative and quantitative detection of goat's milk in samples of Feta Cheese. The analysis took targeted the mitochondrial DNA which was isolated from 14 different samples of cheese (13 Feta Cheese, 1 Goat's Cheese). The techniques applied were the PCR and the Real-time PCR. Initially the primers were designed and then there was a checking of their appropriateness with the PCR method for the amplification of a part of the caprine gene 12srRNA. In the meantime, there was a check that these particular primers do not cross-amplify the sequence of other animal species. Subsequently, using Real-time PCR and SYBR Green, the optimal concentration of primers was determined which ensures the best reaction efficiency (E). Applying the same technique to the same concentration of primers there was a check on the cross reactivity among the species of sheep, beef, pork, turkey, chicken and Feta. Afterwards, there was a check on the performance of the reaction in mixtures of goat and sheep creating two different curves of reference for the quantity of the unknown samples of caprine DNA. For the completion of the experiment a check on the presence of cow milk was applied on the samples.

With the use of the gene 12s rRNA and the method Real-Time PCR with SYBR Green it was found that the construction of a curve of reference for quantifying caprine DNA in unknown samples was feasible. Finally, this method was effective for the identification and detection of goat's milk in a final product of Feta, and it can be considered as a useful tool for the checking of fraud in dairy products.

Ευχαριστίες

Η ολοκλήρωση της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας δε θα ήταν εφικτή χωρίς την βοήθεια ορισμένων ανθρώπων τους οποίους και θα ήθελα να ευχαριστήσω.

Ευχαριστώ την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μούτου Αικατερίνη τον Καθηγητή Ζήση Μαμούρη και την επίκουρο Καθηγήτρια Σαραφίδου Θεολογία για την ευκαιρία που μου έδωσαν να ασχοληθώ, στα πλαίσια αυτής της εργασίας, με ένα τόσο σημερινό και ενδιαφέρον θέμα, που άπτεται άμεσα και με το επαγγελματικό μου πεδίο.

Επίσης, την επιβλέπουσα καθηγήτρια Κα Μούτου Αικατερίνη για την υπομονή, την επιστημονική καθοδήγησή της, και τις υποδείξεις κατά τη διάρκεια της εκπόνησης του μεταπτυχιακού.

Ευχαριστώ τον διδάκτορα κ. Σταμάτη Κωνσταντίνο, και όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την πολύτιμη βοήθεια αλλά και για την ευχάριστη ατμόσφαιρα συνεργασίας στο χώρο του εργαστηρίου.

Τον “συνοδοιπόρο” κατά την διάρκεια του μεταπτυχιακού Χρήστο, καθώς εργαστήκαμε στο πειραματικό μέρος ως ομάδα και καταφέραμε να περατώσουμε αυτό που ξεκινήσαμε σε μια στιγμή αδυναμίας.

Τέλος ευχαριστώ θερμά την οικογένειά μου για την αμέριστη ηθική στήριξη, για την ατέλειωτη υπομονή και επιμονή με την οποία με περιέβαλλαν σε όλη την διάρκεια του μεταπτυχιακού.

Λάρισα Ιούλιος 2015

Νικόλαος Ι. Φωτεινιάς

1. Εισαγωγή

Σύμφωνα με τον ορισμό του Codex Alimentarius (FAO/WHO, 1973) «Τυρί είναι το νωπό ή ώριμο προϊόν που προέρχεται από τη στράγγιση, ύστερα από πήξη του πλήρους, μερικώς αποβουτυρωμένου ή άπαχου γάλακτος ή βουτυρογάλακτος ή μίγματος ορισμένων ή όλων αυτών των προϊόντων»

Ο Ελληνικός Κώδικας Τροφίμων και Ποτών (1998) περιορίζει την έννοια του τυριού μόνο στο ώριμο προϊόν καθώς ορίζει ότι «Τα τυριά, είναι τα προϊόντα ωρίμανσης του πήγματος (στάλπης) που είναι απαλλαγμένο από το τυρόγαλα στον επιθυμητό κάθε φορά βαθμό και τα οποία παρασκευάστηκαν, με την επενέργεια πυτιάς ή άλλων ενζύμων που δρουν ανάλογα σε γάλα (νωπό ή παστεριωμένο, αγελάδος, προβάτου, κατσίκας, βουβάλου και μίγματα αυτών) ή σε μερικώς αποβουτυρωμένο γάλα ή σε μίγμα αυτών ή/και σε μίγματα αυτών με κρέμα γάλακτος (αφρόγαλα)».

Ο άνθρωπος μπόρεσε, μάλλον τυχαία στην αρχή, να παρασκευάσει τυρί, αφού η κύρια μεταβολή που υφίσταται το γάλα όταν παραμένει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος είναι η οξίνιση η οποία επιφέρει την πήξη του (Μάντης, 1993).

Στην Ελλάδα σήμερα στην κατεύθυνση της παραγωγής του τυριού δραστηριοποιούνται **624** πιστοποιημένες μονάδες παραγωγής γαλακτοκομικών προϊόντων Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (ΠΟΠ)εγκεκριμένων από τον Ο.Π.Ε.ΓΕ.Π (διακριτός τίτλος Agrocept) από τις οποίες **256** είναι τυροκομία με βασική παραγωγική κατεύθυνση την Φέτα (Στοιχειά από το Μητρώο Εγκεκριμένων επιχειρήσεων και δικαιούχων χρήσης των ενδείξεων ΠΟΠ/ΠΓΕ. (Τελευταία ενημέρωση μητρώου: 8-4-2015) (http://www.agrocert.gr/photos/kanonismoieuenosis/cfiles/tyria_8-4-2015.xls)

1.1 Νοθεία του γάλακτος

Το γάλα, το τυρί και τα άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα καταναλώνονται ευρέως σε παγκόσμια κλίμακα. Το γάλα που χρησιμοποιείται για την παρασκευή τέτοιων προϊόντων προέρχεται από διαφορετικά ζωικά είδη όπως αγελαδινό, πρόβειο, αίγαιο και βουβαλίσιο. Ενώ το τυρί που παράγεται από αγελαδινό γάλα, κυριαρχεί στην αγορά των περισσότερων χωρών, ένα σημαντικό μέρος της παγκόσμιας αγοράς καταλαμβάνουν και τα τυριά που παράγονται από άλλα ζωικά είδη. Συγκεκριμένα οι μεσογειακές χώρες, ανάμεσα στις οποίες και η Ελλάδα, παράγουν υψηλής ποιότητας παραδοσιακά τυριά, τα οποία προέρχονται από αίγαιο, πρόβειο ή βουβαλίσιο γάλα (π.χ. φέτα, ροκφόρ και μοτσαρέλα). Η σύσταση του γάλακτος διαφορετικών ζωικών ειδών επηρεάζει τη χαρακτηριστική γεύση και τις οργανοληπτικές ιδιότητες του κάθε τυριού (Haza *et al.*, 1996).

Η χρήση γάλακτος άλλου ζωικού είδους σε διάφορες αναλογίες από εκείνου που καθιερωμένα παράγεται το κάθε είδος τυριού (και τα χαρακτηρίζει) αποτελεί **νοθεία**. Έτσι συνήθως αναμειγνύονται ποσότητες γάλακτος από διαφορετικά ζωικά

είδη με σκοπό κυρίως την μείωση του κόστους παραγωγής. Η αυξημένη τιμή του γάλακτος, καθώς και η εποχική διακύμανση στην διαθεσιμότητα του πρόβειου και του αίγειου γάλακτος, οδηγούν στην υιοθέτηση μιας επικερδούς τακτικής των παρασκευαστών τυριών, η οποία συνίσταται στην νοθεία των πιο ακριβών γαλάτων με αγελαδινό, ούτως ώστε να μειώσουν το κόστος παραγωγής και να αυξήσουν το περιθώριο κέρδους (Maudet & Taberlet, 2001). Έτσι, για την προστασία και τη στήριξη της εμπιστοσύνης του καταναλωτή θεσπίστηκαν νόμοι, σύμφωνα με τους οποίους τα τυριά πρέπει να είναι αυθεντικά και η ετικέτα να δηλώνει απόλυτα το περιεχόμενό τους (Moatsou & Anifantakis, 2003). Επομένως αποτελεί **αναγκαιότητα η δυνατότητα** της ακριβούς εκτίμησης των ζωικών ειδών γάλακτος που χρησιμοποιούνται στα γαλακτοκομικά προϊόντα, κυρίως για τα υψηλής ποιότητας τυριά που παρασκευάζονται αποκλειστικά με πρόβειο ή αίγιο γάλα, πολλά από τα οποία έχουν χαρακτηριστεί από τον Ευρωπαϊκό κανονισμό ως προϊόντα ΠΟΠ(Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης, (Bottero *et al.*, 2002).

1.2 Τα τυροκομικά προϊόντα ως Διατροφικό προϊόν

Ως τρόφιμο το τυρί είναι εύπεπτο και άριστης θρεπτικής αξίας. Είναι συμπυκνωμένο και πλούσιο σε υψηλής βιολογικής αξίας λευκώματα, τα οποία σε μεγάλο ποσοστό έχουν διασπαστεί και είναι εύκολη η πέψη τους. Περιέχει επίσης άλατα και τα περισσότερα είδη τυριών είναι πλούσια σε ασβέστιο και φώσφορο καθώς και λιποδιαλυτές βιταμίνες. Είναι φτωχό σε λακτόζη (<1%) αλλά πλούσιο σε λίπος (>20%) γεγονός που το κάνει μη επιθυμητό στα πλαίσια της σύγχρονης διατροφής (Μάντης 1993).

Τα τυριά περιέχουν μικρά ποσά λακτόζης γι' αυτό και μπορούν να καταναλωθούν από άτομα με δυσανεξία στη λακτόζη. Τα μαλακά τυριά έχουν 50% λιγότερη λακτόζη από το γάλα, ενώ στα σκληρά τυριά η περιεκτικότητα μειώνεται ακόμα περισσότερο. Αυτό συμβαίνει λόγω της ζύμωσης που υφίσταται η λακτόζη κατά την παρασκευή του τυριού με αποτέλεσμα να γίνονται πιο φιλικά στο πεπτικό σύστημα.

Το τυρί είναι πλούσια πηγή πρωτεΐνης υψηλής βιολογικής αξίας και περιέχει όλα τα απαραίτητα αμινοξέα. Λόγω της ωρίμανσης που υφίσταται η πρωτεΐνη διασπάται με αποτέλεσμα να αφομοιώνονται πλήρως από τον οργανισμό και να είναι περισσότερο εύπεπτο. Το υψηλό ποσοστό του τυριού σε πρωτεΐνες βοηθά στην αποκατάσταση των φθαρμένων ιστών του οργανισμού. Επίσης το τυρί και τα τυροκομικά προϊόντα περιέχουν σημαντικές ποσότητες βιταμινών του συμπλέγματος Β που είναι απαραίτητες για την ομαλή λειτουργία του νευρικού συστήματος.

Μεταξύ των άλλων, τα τυριά αποτελούν εξαιρετική πηγή ασβεστίου. Στις περισσότερες περιπτώσεις τα 60gr τυριού μας παρέχουν το 30-60% της συνιστώμενης ημερήσιας πρόσληψης. Γενικά όσο πιο σκληρό είναι το τυρί (π.χ.

παρμεζάνα, γραβιέρα) τόσο περισσότερο ασβέστιο περιέχει. Το ασβέστιο που προέρχεται από το τυρί είναι άμεσα απορροφήσιμο από το εντερικό μας σύστημα γι' αυτό και πρέπει αν καταναλώνεται από άτομα με αυξημένες ανάγκες σε ασβέστιο όπως τα παιδιά όπου κατά την παιδική τους ηλικία δομούν το μυϊκό και σκελετικό τους σύστημα, οι έγκυες ή οι θηλάζουσες, άτομα με οστεοπόρωση και οστεοπενία.

2. Προϊόντα Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (ΠΟΠ)

2.1 Γενικά

Στα πλαίσια του επαναπροσανατολισμού της Κοινής Αγροτικής Πολιτικής (ΚΑΠ), και με την άμεση εφαρμογή από της 14 Ιουλίου 1992 του Κανονισμού 2081/92 οι αγρότες απέκτησαν τη δυνατότητα να στραφούν σε μορφές ολοκληρωμένης ανάπτυξης της υπαίθρου, μέσω της διαφοροποίησης της γεωργικής παραγωγής.

Ο Ευρωπαϊκός Κανονισμός (Ε.Κ) 2081/92 θέσπισε για πρώτη φορά το καθεστώς, για την προστασία των γεωγραφικών ενδείξεων και των ονομασιών προέλευσης των γεωργικών προϊόντων και των τροφίμων όπως είναι τα Προϊόντα Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (ΠΟΠ), Προστατευόμενης Γεωγραφικής Ένδειξης (ΠΓΕ). Το 2006 με στόχο τη βελτίωση του συστήματος, ο παραπάνω κανονισμός αντικαταστάθηκε από τον Ε.Κ. 510/06, χωρίς ωστόσο να μεταβληθεί το πεδίο εφαρμογής του και η σκοπιμότητά του.

Επιπλέον, με την εφαρμογή των ανωτέρω Κανονισμών και σύμφωνα με τα αναφερόμενα στη δεύτερη αιτιολογική σκέψη του Ε.Κ 510/2006 παρέχεται αφενός στους παραγωγούς (ιδίως των μειονεκτικών και απομακρυσμένων περιοχών) η δυνατότητα να προωθήσουν ευκολότερα προϊόντα τους που παρουσιάζουν εξειδικευμένα χαρακτηριστικά, πετυχαίνοντας καλύτερες τιμές στην αγορά και βελτιώνοντας έτσι το εισόδημά τους και αφ' ετέρου στους καταναλωτές να αγοράζουν προϊόντα ποιοτικά, με εγγυήσεις για τη παραγωγή, επεξεργασία και τη γεωγραφική καταγωγή τους.

Ονομασία Προέλευσης

Ως «Ονομασία Προέλευσης» νοείται το όνομα μιας περιοχής, ενός συγκεκριμένου τόπου ή σε εξαιρετικές περιπτώσεις μιας χώρας, το οποίο χρησιμοποιείται στην περιγραφή ενός γεωργικού προϊόντος ή ενός τροφίμου που κατάγεται από αυτήν την περιοχή, τον συγκεκριμένο τόπο ή τη χώρα, του οποίου η ποιότητα ή τα χαρακτηριστικά οφείλονται κυρίως ή αποκλειστικά στο γεωγραφικό περιβάλλον, που περιλαμβάνει τους φυσικούς και ανθρώπινους παράγοντες και

του οποίου η παραγωγή, η μεταποίηση και η επεξεργασία λαμβάνουν χώρα στην οριοθετημένη γεωγραφική περιοχή.

Γεωγραφική Ένδειξη

Ως «Γεωγραφική Ένδειξη» νοείται το όνομα μιας περιοχής, ενός συγκεκριμένου τόπου ή σε εξαιρετικές περιπτώσεις μιας χώρας, το οποίο χρησιμοποιείται στην περιγραφή ενός γεωργικού προϊόντος ή ενός τροφίμου που κατάγεται από αυτήν την περιοχή, το συγκεκριμένο τόπο ή τη χώρα, του οποίου η συγκεκριμένη ποιότητα, η φήμη ή άλλο χαρακτηριστικό μπορούν να αποδοθούν στη γεωγραφική αυτή καταγωγή και του οποίου η παραγωγή ή/και μεταποίηση ή/και η επεξεργασία πραγματοποιούνται στην οριοθετημένη περιοχή.

2.2 Ελληνικά τυριά Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης(ΠΟΠ)

Στη χώρα μας έως σήμερα έχουν καταχωρηθεί 70 συνολικά ονομασίες προϊόντων ΠΟΠ συγκεκριμένα: έχουν καταχωρηθεί 21 τυριά, 16 ελαιόλαδα, 15 φρούτα-λαχανικά-ξηροί καρποί, 10 επιτραπέζιες ελιές, 2 κρέατα και 6 λοιπά προϊόντα, όπως είναι για παράδειγμα ο κρόκος Κοζάνης.

Οι καταχωρημένες ονομασίες τυριών ΠΟΠ της χώρας μας αναφέρονται στον Πίνακα 1 επίσης αναφέρεται και η Ελληνική και Ευρωπαϊκή νομοθεσία που τα διέπει.

Πίνακας 1. Ελληνικά τυριά ΠΟΠ και οι αντίστοιχες αναφορές τους στην Ελληνική και Ευρωπαϊκή νομοθεσία

A/A	ΠΡΟΙΟΝ / ΟΝΟΜΑΣΙΑ	Κατηγορία αναγνώρισης	ΕΥΡΩΠΑΙΚΟΣ ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ	ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΠΡΟΔΙΑΓΡΑΦΕΣ
1	Ανεβατό	ΠΟΠ	Ε.Κ. 1107.96	313060 / 14-01-1994 (ΦΕΚ 24/18.01.94)
2	Γαλοτύρι	ΠΟΠ	Ε.Κ. 1107.96	313031 / 11-01-1994 (ΦΕΚ 8/11-01-94)
3	Γραβιέρα Αγράφων	ΠΟΠ	Ε.Κ. 1107.96	313045 / 14-01-1994 (ΦΕΚ 16/14-01-94)
4	Γραβιέρα Κρήτης	ΠΟΠ	Ε.Κ. 1107.96	313047 / 14-01-1994 (ΦΕΚ 16/14-01-94)
5	Γραβιέρα Νάξου	ΠΟΠ	Ε.Κ. 1107.96	313071 / 18-01-1994 (ΦΕΚ 23/18-01-94) &
6	Καλαθάκι Λήμνου	ΠΟΠ	Ε.Κ. 1107.96	313044 / 14-01-1994 (ΦΕΚ 16/14-01-94)
7	Κασέρι	ΠΟΠ	Ε.Κ. 1107.96	313027 / 11-01-1994 (ΦΕΚ 8/11-01-94)

8	Κατίκι Δομοκού	ΠΟΠ	Ε.Κ. 1107.96	313048 / 14-01-1994 (ΦΕΚ 16/14-01-94)
9	Κεφαλογραβιέρα	ΠΟΠ	Ε.Κ. 1107.96	313032 / 11-01-1994 (ΦΕΚ 8/11-01-94)
10	Κοπανιστή	ΠΟΠ	Ε.Κ. 1107.96 Ε.Κ. 433/13	Official Journal L148 12.06.1996
11	Λαδοτύρι Μυτιλήνης	ΠΟΠ	Ε.Κ. 1107.96	313058/17-01-1994 (ΦΕΚ 25/18-01-94)
12	Μανούρι	ΠΟΠ	Ε.Κ. 1107.96	313028 / 11-01-1994 (ΦΕΚ 8/11-01-94)
13	Μετσοβόνε	ΠΟΠ	Ε.Κ. 1107.96	313070 / 18-01-1994 (ΦΕΚ 23/18-01-94)
14	Μπάτζος	ΠΟΠ	Ε.Κ. 1107.96	313057/17-01-1994 (ΦΕΚ 25/18-01-94)
15	Ξυνομυζήθρα Κρήτης	ΠΟΠ	Ε.Κ. 1107.96	313051 / 14-01-1994 (ΦΕΚ 18/14-01-94)
16	Πηχτόγαλο Χανίων	ΠΟΠ	Ε.Κ. 1107.96	313062 / 17-01-1994(ΦΕΚ 24/18.01.94)
17	Σαν Μιχάλη	ΠΟΠ	Ε.Κ. 1107.96	313069 / 18-01-1994 (ΦΕΚ 23/18-01-94)
18	Φέτα	ΠΟΠ	Ε.Κ. 1107.96	313025 / 11-01-1994 (ΦΕΚ 8/11-01-1994)
19	Σφέλα	ΠΟΠ	Ε.Κ. 1107.96	313056/17-01-1994 (ΦΕΚ 25/18-01-94)
20	Φορμαέλλα Αράχωβας	ΠΟΠ	Ε.Κ. 1107.96	313063/17-01-1994 (ΦΕΚ 25/18-01-94)
21	Εύγαλο Σητείας ή Ξίγαλο Σητείας	ΠΟΠ	Ε.Κ. 766/11	C312/2010 ΣΕΛ.25 (L200/2011 σελ.12)

Αξίζει να σημειωθεί ότι τα μόνα κρέατα που έχουν έως σήμερα καταχωρηθεί ως ΠΟΠ στην Ελλάδα είναι το Αρνάκι Ελασσόνας και το Κατσικάκι Ελασσόνας, στοιχείο ιδιαίτερα σημαντικό για την προώθηση της τοπικής και όχι μόνο κτηνοτροφίας.

2.3 Το Νομικό πλαίσιο για τα ΠΟΠ προϊόντα σήμερα

Το νομικό πλαίσιο που διέπει τα ΠΟΠ προϊόντα διέπεται από την κοινοτική και την εθνική νομοθεσία που εναρμονίζονται μεταξύ τους.

Σε επίπεδο κοινοτικής νομοθεσίας ισχύει:

- ✓ Ο Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 510/2006 του Συμβουλίου της 20ης Μαρτίου 2006 για την προστασία των γεωγραφικών ενδείξεων και των ονομασιών προέλευσης των γεωργικών προϊόντων και των τροφίμων.

- ✓ Ο **Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1898/2006** της Επιτροπής της 14ης Δεκεμβρίου 2006 σχετικά με τη θέσπιση λεπτομερών κανόνων εφαρμογής του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 510/2006 του Συμβουλίου για την προστασία των γεωγραφικών ενδείξεων και των ονομασιών προέλευσης των γεωργικών προϊόντων και των τροφίμων.
- ✓ Και ο **Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 628/2008** της Επιτροπής, της 2^{ας} Ιουλίου 2008, για την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1898/2006.

Σε εθνικό επίπεδο, η τήρηση των προδιαγραφών καταχώρισης των προϊόντων ΠΟΠ καθορίζεται:

- ✓ από την Κοινή Υπουργική Απόφαση ΚΥΑ **261611/22.03.2007**(ΦΕΚ 406 τ.Β 22-03-2007) σύμφωνα με την οποία γίνεται ο καθορισμός συμπληρωματικών μέτρων για την εφαρμογή του Καν. (ΕΚ) 510/2006 του Συμβουλίου της 20ης Μαρτίου 2006 «για την προστασία των γεωγραφικών ενδείξεων και των ονομασιών προέλευσης των γεωργικών προϊόντων και των τροφίμων» και του Καν.(ΕΚ) 1898/2006 της Επιτροπής της 23ης Δεκεμβρίου 2006 «σχετικά με τη θέσπιση λεπτομερών κανόνων εφαρμογής του κανονισμού υπ' αριθμ. 510/2006 για την προστασία των γεωγραφικών ενδείξεων και των ονομασιών προέλευσης των γεωργικών προϊόντων και των τροφίμων»
- ✓ Η τροποποίηση αυτής με την υπ' αριθμ. **290398/21.04.2008** Κοινή Υπουργική Απόφαση, περί καθορισμού συμπληρωματικών μέτρων για την εφαρμογή του Καν. (ΕΚ) 510/2006 του Συμβουλίου της 20.3.2006 «για την προστασία των γεωγραφικών ενδείξεων και των ονομασιών προέλευσης των γεωργικών προϊόντων και των τροφίμων» και του Καν. (ΕΚ) 1898/2006 της Επιτροπής της 23.12.2006 «σχετικά με τη θέσπιση λεπτομερών κανόνων εφαρμογής του υπ' αριθμ.510/2006 κανονισμού για την προστασία των γεωγραφικών ενδείξεων και των ονομασιών προέλευσης των γεωργικών προϊόντων και των τροφίμων» (ΦΕΚ αριθ. 694/21-04-2008 τεύχος Β)
- ✓ Η Κοινή Υπουργική Απόφαση **318764/21-8-2008** (ΦΕΚ 1683 τ. Β' 21-08-2008)που τροποποιεί την ΚΥΑ 261611/2007.
- ✓ Ο **Κώδικας Τροφίμων και Ποτών (Κ.Τ.Π.)**, Έκδοση της Διεύθυνσης Τροφίμων του Γενικού Χημείου του Κράτους (Γ.Χ.Κ.), 2009.
Μέρος Α: Τρόφιμα και Ποτά
Κεφάλαιο ΙΧ: Γάλα, αυγά και προϊόντα από αυγά
Άρθρο 83, Ενότητα Δ', Τυριά Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (ΠΟΠ).

3.Η Φέτα

3.1 Γενικά

Η φέτα είναι το πατροπαράδοτο ελληνικό τυρί και παρασκευάζεται στην χώρα μας από αρχαιοτάτων χρόνων από πρόβειο ή αιγοπρόβειο γάλα. Η φέτα ανήκει στην κατηγορία των μαλακών λευκών τυριών άλμης, δηλαδή ωριμάζει και συντηρείται στην άλμη.

Η φέτα σήμερα κατέχει μία εξέχουσα θέση ανάμεσα στα προϊόντα ΠΟΠ της χώρας μας, όχι μόνο γιατί είναι κατά παράδοση αναπόσπαστο κομμάτι των διατροφικών συνηθειών του Έλληνα καταναλώνοντας σταθερά πάνω από 12χλγ. Φέτας ετησίως/άτομο, αλλά κυρίως γιατί αποτελεί ένα εθνικό προϊόν-έμβλημα, με τεράστιες εξαγωγικές δυνατότητες (<http://www.cheesenet.gr/greek-html/cheeses/feta.htm>).

3.2 Ιστορία του τυριού και της Φέτας

Όπως αναφέρεται παραπάνω, ο άνθρωπος μπόρεσε, μάλλον τυχαία στην αρχή, να παρασκευάσει τυρί, αφού η κύρια μεταβολή που υφίσταται το γάλα όταν παραμένει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος είναι η οξίνιση η οποία επιφέρει την πήξη του (Μάντης, 1993).

Από την ελληνική μυθολογία γνωρίζουμε ότι η τέχνη της τυροκομίας δόθηκε ως πολύτιμο δώρο στους θνητούς από τους θεούς του Ολύμπου. Σύμφωνα με άλλο μύθο, η ανακάλυψη του τυριού χρεώνεται στον Αριστέα, γιο του Απόλλωνα. Ο θεός Ερμής κατατάσσεται μεταξύ των ποιμενικών θεοτήτων και αποκαλείται «τυρευτής» (ο κατασκευαστής του τυριού).

Ο Όμηρος στην Οδύσσεια γράφει για την παρασκευή τυριού από αιγοπρόβειο γάλα από τον Κύκλωπα Πολύφημο, ο οποίος όταν επέστρεψε στην σπηλιά του με το κοπάδι του, έκλεισε την είσοδο με έναν μεγάλο βράχο και ξεκίνησε να αρμέγει τις κατσίκες και τις προβατίνες, κατόπιν έπηξε το μισό «αστραφτερό από λευκότητα» γάλα και έβαλε το τυρόπηγμα σε πλεκτά καλάθια τα οποία ωρίμαζαν μέσα στην σπηλιά του.

Σε κείμενα των Σουμέριων και της Παλαιάς Διαθήκης αναφέρεται το τυρί και μάλιστα σαν πολύτιμο τρόφιμο αγαθό. Με την πάροδο των ετών ο άνθρωπος μπόρεσε να παρασκευάσει πολλά είδη τυριών, ώστε σήμερα να παρασκευάζονται ανά τον κόσμο πολλές δεκάδες από διαφορετικά είδη τυριών και με πολλές ποικιλίες το καθένα. Έτσι σήμερα υπάρχουν περισσότερα από 2.000 διαφορετικά ονόματα τυριών (Scott 1981).

Το όνομα «φέτα» πιθανώς είναι ιταλικής προέλευσης (fetta) και από μια αναφορά του 17ου αιώνα θεωρείται το είδος αυτού του τυριού που κοβόταν σε φέτες για να τοποθετηθεί στα βαρέλια.

Από την 19^η αιτιολογική σκέψη της Αιτιολογικής Έκθεσης της Επιτροπής στις 14 Ιουνίου 2002 αναφέρονται «ότι κατά την προσχώρηση της Ελλάδας στην Κοινότητα, το 92 % περίπου της κατανάλωσης του τυριού «φέτα» στην Κοινότητα πραγματοποιείτο στην Ελλάδα. Στη συνέχεια, καταγράφηκε μία σταδιακή αύξηση της κατανάλωσης στα άλλα κράτη μέλη έτσι ώστε η Ελλάδα να αντιπροσωπεύει έκτοτε το 73 % περίπου της κοινοτικής κατανάλωσης του τυριού «φέτα». Με την κατανομή της κατανάλωσης σε κάθε κράτος μέλος ανά άτομο και ανά έτος,Τέλος στην Ελλάδα, ανέρχεται σε 10,500 χλγ. ανά άτομο και ανά έτος, ήτοι το 85,64 % της κοινοτικής κατανάλωσης».

Όπως και να ξεκίνησε η παρασκευή της Φέτας ή όπως και να πήρε την ονομασία της, η Φέτα παραμένει το Εθνικό προϊόν διότι αποτελεί εδώ και για πολλά χρόνια το μοχλό ανάπτυξης των ελληνικών εξαγωγών τυροκομικών προϊόντων.

3.3 Ελληνική Νομοθεσία για την Φέτα

Ειδικές προδιαγραφές για τη Φέτα είχαν συμπεριληφθεί στο άρθρο 83 του Κώδικα Τροφίμων και Ποτών το 1988. Η αναγνώριση της Φέτας ως προϊόν Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (ΠΟΠ) στην Ελλάδα κατοχυρώθηκε με την υπογραφή της Υπουργικής Απόφασης 313025/11.01.1994 (ΦΕΚ 8 τ.Β' /11-1-1994) σύμφωνα με την οποία στα Άρθρα 1 & 2 αναφέρεται ότι το γάλα που χρησιμοποιείται για την παρασκευή της φέτας πρέπει να πληροί τις εξής προϋποθέσεις:

- Η ονομασία Φέτα, αναγνωρίζεται ως ΠΟΠ αποκλειστικά το λευκό τυρί άλμης που παράγεται παραδοσιακά στην Ελλάδα.
- πρέπει να προέρχεται αποκλειστικά από τις περιοχές Μακεδονίας, Θράκης, Ηπείρου, Θεσσαλίας, Στερεάς Ελλάδας, Πελοποννήσου και το νομό Λέσβου.
- Από φυλές αιγοπροβάτων παραδοσιακά εκτρεφόμενες και προσαρμοσμένες στην περιοχή παρασκευής της και η διατροφή τους πρέπει να βασίζεται στην χλωρίδα της εν λόγω περιοχής.
- Το χρησιμοποιούμενο γίδινο γάλα δεν μπορεί να υπερβαίνει το 30% κατά βάρος.
- Η λιποπεριεκτικότητα του γάλακτος πρέπει να είναι τουλάχιστον 6% κατά βάρος.
- Το pH του γάλακτος πρέπει να είναι τουλάχιστον 6,5.
- Η πήξη του γάλακτος πρέπει να γίνεται εντός 48 ωρών από την άμελξη. Το γάλα μέχρι την πήξη διατηρείται σε ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας.
- Το γάλα πρέπει να προέρχεται από αμέλξεις, που γίνονται 10 ημέρες τουλάχιστον μετά τον τοκετό.
- Το γάλα πρέπει να είναι καθαρό, αγνό, υγιεινό, πλήρες.
- Το γάλα πρέπει να είναι νωπό ή παστεριωμένο.

- Απαγορεύεται η παρασκευή Φέτας από άλλο είδος γάλακτος, πλην των ανωτέρω καθοριζομένων.
- Στο προς τυροκόμιση για παρασκευή Φέτας γάλα απαγορεύεται η συμπύκνωση, η προσθήκη σκόνης ή συμπυκνώματος γάλακτος, πρωτεϊνών γάλακτος, καζεϊνικών αλάτων καθώς και η προσθήκη χρωστικών και συντηρητικών ουσιών.
- Στο προς τυροκόμιση γάλα για παρασκευή Φέτας προστίθενται παραδοσιακή πυτιά ή άλλα ένζυμα με ανάλογη δράση. Όταν το γάλα παστεριώνεται προστίθενται αβλαβείς οξυγαλακτικές καλλιέργειες βακτηρίων, καθώς και χλωριούχο ασβέστιο, μέχρι 20 g/100 Kg γάλακτος.

Η Τεχνολογία παρασκευής της φέτας αναφέρεται στο Άρθρο 3 της Υπουργικής Απόφασης 313025/11.01.1994 (ΦΕΚ 8 τ. Β'/11-1-1994) .

Παραδοσιακά η παρασκευή της Φέτας περιλάμβανε τη χρησιμοποίηση νωπού γάλακτος, την παρουσία φυσικών και αυτόχθονων βακτηρίων, τη χρήση φυσικής πυτιάς και χειροποίητων σκευών από ξύλο και χαλκό, την ωρίμαση της σε φυσικούς χώρους και το φυσικό σχηματισμό του προϊόντος. Στην πραγματικότητα, η Φέτα από νωπό γάλα ωριμάζει γρηγορότερα, αναπτύσσοντας πιο πλούσιο άρωμα και είναι σαφώς πιο εύγευστη από τη Φέτα με παστεριωμένο γάλα.

Η τάση που υπάρχει σήμερα στην παγκόσμια αγορά, για σταθερή ποιότητα και γεύση χωρίς συγχρόνως να χάνεται ο ιδιαίτερος χαρακτήρας ενός προϊόντος καθώς και η διασφάλιση της δημόσιας υγείας, αναγκάζει τους παραγωγούς τυριών να καταφύγουν στην θερμική επεξεργασία του γάλακτος. Με τη θερμική επεξεργασία καταστρέφεται το μεγαλύτερο μέρος της μικροχλωρίδας του νωπού γάλακτος με αποτέλεσμα την απώλεια της τυπικής και έντονης γεύσης της.

Η Σύσταση της φέτας αναφέρεται στο Άρθρο 4 της ανωτέρω Υπουργικής Απόφασης και έχει συγκεκριμένα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά: μέγιστη υγρασία 58%, ελάχιστη λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού 43% και είναι μαλακό τυρί που μπορεί να κόβεται σε φέτες. Έχει χρώμα λευκό, σχήμα σφηνοειδές ή ορθογώνιο παραλληλεπίπεδο, με ή χωρίς οπές σχήματος ακανόνιστο που κατανέμονται σε ολόκληρη την μάζα του, συμπαγή σύσταση χωρίς επιδερμίδα και διατίθεται σε διάφορες διαστάσεις και βάρη. Απαγορεύεται η προσθήκη συντηρητικών και αντιβιοτικών ουσιών στο τυρί και την άλμη.

Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της Φέτας σύμφωνα με την 36^η αιτιολογημένη σκέψη του προσβαλλόμενου κανονισμού 1107/1996 αναφέρει μια σειρά παραγόντων που δείχνουν ότι τα χαρακτηριστικά της φέτας οφείλονται κυρίως στο οριοθετημένο γεωγραφικό περιβάλλον. Ειδικότερα διατυπώνεται ότι η γεωγραφική περιοχή που προκύπτει από τη διοικητική οριοθέτηση καθώς και οι απαιτήσεις των προδιαγραφών του προϊόντος παρουσιάζουν επαρκή ομοιογένεια.

Η εκτατική βοσκή και η διαχείμανση, οι οποίες αποτελούν τους ακρογωνιαίους λίθους της εκτροφής προβατίνων και αιγών που χρησιμοποιούνται για την προμήθεια της πρώτης ύλης του τυριού «φέτα», αποτελούν καρπό μιας πατρογονικής παράδοσης που επιτρέπει την προσαρμογή στις κλιματικές μεταβολές και στις συνέπειές της στη διαθέσιμη βλάστηση. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη αυτόχθονων φυλών αιγοπροβάτων μικρού μεγέθους, πολύ λιτοδίαιτων και ανθεκτικών, οι οποίες μπορούν να επιζήσουν σε ένα ελάχιστο γενναιόδωρο από ποσοτικής απόψεως περιβάλλον το οποίο, ωστόσο, είναι ποιοτικά προικισμένο με μία άκρως διαφοροποιημένη ειδική χλωρίδα, η οποία χαρίζει στο τελικό προϊόν ιδιαίτερο άρωμα και γεύση. Η όσμωση μεταξύ των προαναφερόμενων φυσικών παραγόντων και των ειδικών ανθρωπίνων παραγόντων, ιδιαίτερα η παραδοσιακή μέθοδος παρασκευής που απαιτεί οπωσδήποτε στράγγισμα χωρίς πίεση, χάρισε στο τυρί «φέτα» την εξαιρετική διεθνή φήμη.

3.4 Η Νομιμοποίηση της Φέτας στην Ευρωπαϊκή Ένωση

Σύμφωνα με τα αναφερόμενα της Αιτιολογημένης Έκθεσης που υποβλήθηκε στις 14 Ιουνίου 2002 για την αναγνώριση της Φέτας, ως προϊόν Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (ΠΟΠ) στην Ευρωπαϊκή Ένωση (Ε.Ε.), μας γνωστοποιούνται τα παρακάτω:

- ❖ το 1992, ξεκινά η εφαρμογή του Ευρωπαϊκού Κανονισμού 2081/92.
- ❖ Στις 21 Ιανουαρίου 1994, οι ελληνικές αρχές κοινοποίησαν την ονομασία «Φέτα» στην Επιτροπή προκειμένου να καταχωρηθεί ως Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης (ΠΟΠ).
- ❖ Στις 15 Νοεμβρίου 1994, η επιστημονική επιτροπή γνωμοδότησε, με τέσσερις ψήφους υπέρ και τρεις κατά, αφού έλαβε ιδιαίτερα υπόψη τα στοιχεία που της είχαν παρασχεθεί, ότι η ονομασία «Φέτα» πληροί τις προϋποθέσεις καταχώρισης.
- ❖ Στις 20 Ιανουαρίου 1996, η Επιτροπή ζήτησε από την Επιτροπή Προστατευόμενων Ονομασιών Προέλευσης (ΠΟΠ) να γνωμοδοτήσει επί του σχεδίου του κανονισμού που περιελάμβανε, μεταξύ άλλων, τη «Φέτα» ως «ΠΟΠ».
- ❖ Κατά τη διάρκεια του Συμβουλίου των Υπουργών Γεωργίας της 20ης Μαΐου 1996, η Δανία, η Γερμανία, η Γαλλία, η Ιρλανδία, η Αυστρία, η Φινλανδία και η Σουηδία αντιτάχθηκαν στα προτεινόμενα μέτρα. Η Ελλάδα, η Ισπανία, η Πορτογαλία, η Ιταλία, το Λουξεμβούργο, το Βέλγιο και οι Κάτω Χώρες τάχθηκαν υπέρ των μέτρων. Ως εκ τούτου, εφόσον το Συμβούλιο δεν εξέδωσε γνώμη, εξέδωσε τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1107/96 της Επιτροπής (η Φέτα κατοχυρώθηκε ως ΠΟΠ) με έναρξη ισχύος από Ιουνίου 1996.

- ❖ Με αιτήσεις που υπέβαλαν το 1996, το Βασίλειο της Δανίας (C-289/96), η Ομοσπονδιακή Δημοκρατία της Γερμανίας (C-293/96) και η Γαλλική Δημοκρατία (C-299/96) κατέθεσαν προσφυγές για ακύρωση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1107/96 της Επιτροπής, ο οποίος καταχωρούσε την ονομασία «Φέτα» ως ΠΟΠ.
- ❖ Το Δικαστήριο των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων με απόφασή του της 16ης Μαρτίου 1999, αποφάσισε τη μερική ακύρωση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1107/96 και εξέδωσε, στις 25 Μαΐου 1999, τον κανονισμό (ΕΚ) 1070/99 με τον οποίο η ονομασία «φέτα» διεγράφη από το μητρώο προστατευομένων ονομασιών προελεύσεως και από το παράρτημα του κανονισμού 1107/96.
- ❖ στις 15 Οκτωβρίου 1999, η Επιτροπή έστειλε στα κράτη μέλη ερωτηματολόγιο σχετικά με την παρασκευή και την κατανάλωση των τυριών που φέρουν την ονομασία «φέτα».
- ❖ Τα στοιχεία που συγκεντρώθηκαν διαβιβάστηκαν στην επιστημονική επιτροπή και στις 24 Απριλίου 2001, η εν λόγω επιτροπή συνήγαγε ομόφωνα το συμπέρασμα ότι η ονομασία «Φέτα» δεν αποτελεί κοινή ονομασία.
- ❖ Στις 16 Μαΐου 2002 η επιτροπή κανονιστικών ρυθμίσεων γνωμοδοτεί επί του νέου σχεδίου κανονισμού. Λαμβανομένου υπόψη του αποτελέσματος της ψηφοφορίας (47 ψήφοι υπέρ: Πορτογαλία, Βέλγιο, Ελλάδα, Ισπανία, Ιταλία, Λουξεμβούργο, Κάτω Χώρες, Σουηδία, Φινλανδία, 23 ψήφοι κατά: Δανία, Γερμανία, Ηνωμένο Βασίλειο και 17 αποχές: Γαλλία, Αυστρία, Ιρλανδία).
- ❖ Η Επιτροπή αναγνώρισε ότι η «Φέτα» παράγεται επί του παρόντος σε πολλά κράτη μέλη. Ωστόσο, αυτό δε σημαίνει ότι το προϊόν είναι κοινό. Δεν θεωρεί ότι η ποσότητα των 8 τόνων που παράγεται στο Ηνωμένο Βασίλειο είναι μεγάλη. Επιπλέον, 14 από τα 18 αγγλικά λεξικά αναφέρονται στη «Φέτα» ως ελληνικό τυρί, τα υπόλοιπα αναφέρονται σ' ένα προϊόν καταγωγής Ελλάδας, Μέσης Ανατολής ή Βαλκανίων. Συνεπώς, είναι δύσκολο να υποστηριχθεί στο Ηνωμένο Βασίλειο η άποψη ότι η ονομασία «Φέτα» είναι κοινή ονομασία.

Επίσης συνεκτιμώντας την νομοθεσία του κάθε κράτους μέλους για την παραγωγή φέτας καθώς και τις διατροφικές συνήθειες του κάθε πληθυσμού κατέληξε στα παρακάτω:

1. Η ονομασία «Φέτα», (Feta) καταχωρείται στο μητρώο προστατευομένων ονομασιών προέλευσης και προστατευομένων γεωγραφικών ενδείξεων που προβλέπεται στο άρθρο 6 παράγραφος 3 του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 2081/92, ως Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης (ΠΟΠ).
2. Στο παράρτημα του Κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1107/96, στη στήλη «τυριά» και «Ελλάδα» του μέρους Α, προστίθεται η ονομασία «Φέτα» (Feta).

Με την Αιτιολογημένη Έκθεση που υποβλήθηκε από την Επιτροπή στις 14 Ιουνίου 2002 εκδόθηκε ο Κανονισμός 1829/2002 στις 14 Οκτωβρίου 2002, η

εφαρμογή του οποίου αρχίζει από την ημέρα της δημοσίευσής του στην Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων.

Ωστόσο ο δρόμος για την αναγνώριση της φέτας ως Ελληνική δεν τελειώνει εδώ.

Στις 30 Δεκεμβρίου 2002 η Ομοσπονδιακή Δημοκρατία της Γερμανίας και το Βασίλειο της Δανίας υποστηριζόμενοι από τη Γαλλική Δημοκρατία, το Ηνωμένο Βασίλειο της Μεγάλης Βρετανίας και της Βόρειας Ιρλανδίας κατέθεσαν προσφυγές ακύρωσης του κανονισμού (ΕΚ) 1829/2002 της Επιτροπής, κατά της Επιτροπής των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, υποστηριζόμενης από την Ελληνική Δημοκρατία.

Επί της ουσίας βάσει των στοιχείων που προσκομίστηκαν, θεμιτώς μπορεί να συναχθεί ότι οι καταναλωτές στα κράτη μέλη αντιλαμβάνονται τη φέτα ως τυρί συνδεδεμένο με την Ελλάδα, ακόμα και αν στην πραγματικότητα έχει παραχθεί σε άλλο κράτος μέλος ως εκ τούτου το δικαστήριο των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων εξέδωσε απόφαση με την οποία δικαιώνει την Ευρωπαϊκή Επιτροπή για την επανακαταχώρηση της φέτας στο Κοινοτικό μητρώο.

3.5 Εμπορευματοποίηση της Φέτας Διεθνώς

Το 2012 στον διαγωνισμό World Championship Cheese Contest για τυριά από ολόκληρο τον κόσμο που διεξάγεται στις ΗΠΑ στην κατηγορία της φέτας (FETA) υπήρχαν συμμετοχές από χώρες που παράγουν «Φέτα» και βραβεύτηκαν «φέτες» από Δανία, Νότια Αφρική, Καναδά, Αυστρία, Ρουμανία και Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής!

Τι και αν η Ελλάδα κέρδισε την νομική μάχη για την παραγωγή φέτας. Η «φέτα» συνεχίζει να παράγεται ανενόχλητη και να απλώνεται σε ολόκληρο τον κόσμο. Η Κοινοτική Νομοθεσία καθίσταται υποχρεωτική και στις τρίτες χώρες με τις οποίες η ΕΕ υπογράφει εμπορικές συμφωνίες. Η «φέτα» ωστόσο συνεχίζει να παράγεται χωρίς κανένα εμπόδιο σε Αμερική, Δανία, Αυστραλία, Καναδά, Νότια Αφρική .



α



β



γ

Εικόνα 1: Φέτες εξωτερικού και Ευρωπαϊκής Ένωσης με αναγραφή του ονοματος Φέτα και πλατισιομένη με Ελληνικά ονόματα και σύμβολα. α. USA, β. Δανίας, γ. Αργεντινής.

4.Επισήμανση –Ιχνηλασιμότητα τροφίμων

4.1 Επισήμανση τροφίμων σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό (ΕΚ) 1169/2011

Από τις 13 Δεκεμβρίου του 2014 εφαρμόζεται ο Καν. (ΕΚ) 1169/2011 ο οποίος αποτελεί τη βάση για την εξασφάλιση υψηλού επιπέδου προστασίας των καταναλωτών όσον αφορά τις πληροφορίες για τα τρόφιμα. Θεσπίζει τις γενικές αρχές, απαιτήσεις και υποχρεώσεις που διέπουν τις πληροφορίες για τα τρόφιμα και ειδικότερα την επισήμανση των τροφίμων. Καθορίζει τα μέσα για την κατοχύρωση του δικαιώματος πληροφόρησης των καταναλωτών, λαμβάνοντας υπόψη, την ανάγκη προστασίας των συμφερόντων των παραγωγών και της παραγωγής ποιοτικών προϊόντων.

Ο κανονισμός ισχύει για τους υπευθύνους επιχειρήσεων τροφίμων σε όλα τα στάδια της τροφικής αλυσίδας, εφόσον αφορούν την παροχή πληροφοριών για τα τρόφιμα στους καταναλωτές.

Ενσωματώνει κατ' αρχήν βασικά στοιχεία της ισχύουσας νομοθεσίας σχετικά με την επισήμανση, τα οποία αποτελούν πολύτιμο κεκτημένο όσον αφορά στην πληροφόρηση των καταναλωτών. Οι βασικές απαιτήσεις σχετικά με τις ισχύουσες υποχρεωτικές ενδείξεις παραμένουν οι ίδιες. Ορισμένες από τις απαιτήσεις έχουν επικαιροποιηθεί προκειμένου να ληφθούν υπόψη οι νέες εξελίξεις στον τομέα των πληροφοριών για τα τρόφιμα.

Σύμφωνα με τα οριζόμενα της παραγράφου 1 του άρθρου 9 του κανονισμού είναι υποχρεωτική για τα τυροκομικά προϊόντα και ειδικότερα την Φέτα η αναγραφή των ενδείξεων που αναφέρονται στις παρακάτω ενότητες 4.2 και 4.3.

Ο καν. (ΕΕ) 1169/2011 ισχύει από τις 13 Δεκεμβρίου 2011 και εφαρμόζεται από την **13^η Δεκεμβρίου 2014**, εξαιρουμένου του άρθρου **9 παράγραφος 1 στοιχείο ιβ)**, το οποίο αφορά στην υποχρεωτική διατροφική επισήμανση και το οποίο εφαρμόζεται από τη **13η Δεκεμβρίου 2016**.

4.2 Επισήμανση τυροκομικών προϊόντων

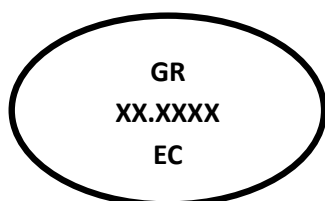
Η επισήμανση αφορά στις ενδείξεις, τα εμπορικά σήματα, τις εικόνες ή τα σύμβολα που αναφέρονται σε ένα τρόφιμο και εμφανίζονται πάνω σε κάθε συσκευασία – ετικέτα του τροφίμου.

Η επισήμανση δεν πρέπει να οδηγεί σε πλάνη τον καταναλωτή όσον αφορά τα χαρακτηριστικά του τροφίμου και ιδίως τη φύση την ταυτότητα, τις ιδιότητες, τη

σύνθεση τη ποσότητα τη διατηρησιμότητα (χρόνο ζωής), τον τόπο παραγωγής ή παρασκευής τον τρόπο παρασκευής ή λήψης .

Για τα τυροκομικά προϊόντα οι υποχρεωτικές ενδείξεις όπως αυτές καθορίζονται στο άρθρο 11 του Κ.Τ.Π. και στις επιμέρους παραγράφους του άρθρου 83 του Κ.Τ.Π. περιλαμβάνουν τα παρακάτω:

- **Ονομασία πώλησης**
- **κατηγορία τυριού** (π.χ. ημίσκληρο τυρί, λευκό τυρί άλμης, τυρί τυρογάλακτος κ.λπ.)
- **είδος γάλακτος ή είδη γάλακτος**(ποσοστά) που παρασκευάστηκε το τυρί
- **(από) παστεριωμένο γάλα** ή νωπό γάλα (μόνο για τα "Λευκά τυριά άλμης")
- **ιδιαίτερες συνθήκες συντήρησης και χρήσης**
- **ελάχιστο λίπος** (υπολογισμένο σε ξηρή ουσία)
- **μέγιστη υγρασία**
- **ελάχιστο ξηρό υπόλειμμα** (μόνο για τα ανακατεργασμένα τυριά)
- **ημερομηνία παραγωγής και ημερομηνία ελάχιστης διατηρησιμότητας**
- **χώρα προέλευσης - παραγωγής**
- **έδρα του τυροκομείου** (μόνο για τα τυριά ΠΟΠ)
- **σήμανση πιστοποίησης** για τα προϊόντα Π.Ο.Π., Π.Γ.Ε. και το σήμα πιστοποίησης του Ο.Π.Ε.Γ.Ε.Π. (διακριτός τίτλος Agrocert για τα προϊόντα αυτά.
- **σήμα καταλληλότητας – αναγνώρισης** (αλφαριθμητικός κωδικός)
Το σήμα αναγνώρισης έχει ωοειδές σχήμα και περιλαμβάνει
 - το όνομα της χώρας, δηλαδή της Ελλάδας, ολογράφως **GREECE** ή σε συντομογραφία **GR**
 - τον κωδικό έγκρισης της εγκατάστασης (κωδικός αριθμός νομού **XX** και κωδικός αριθμός εγκατάστασης **XXXX**) και
 - την συντομογραφία της Ε.Ε. (π.χ. **EC, CE**).



- **κάθε συστατικό ή τεχνολογικό βοήθημα που προκαλεί αλλεργίες ή δυσανεξίες** και χρησιμοποιείται στην παραγωγή ή παρασκευή ενός τροφίμου και εξακολουθεί να υπάρχει στο τελικό προϊόν ακόμη και σε τροποποιημένη μορφή.
- **καθαρή ποσότητα** του τροφίμου

- **οδηγίες χρήσης** εφόσον η παράλειψή τους θα δυσχέραινε τη σωστή χρήση του τροφίμου
- ένδειξη που επιτρέπει την **αναγνώριση της παρτίδας**.
- **πρόσθετα**, είτε έχουν προστεθεί στη μάζα του τυριού είτε υπάρχουν στην επιδερμίδα του τυριού και επίσης με οδηγίες, όπου χρειάζονται, π.χ. όταν η επιδερμίδα έχει ναταμικίνη θα δίνονται οδηγίες στον καταναλωτή μέχρι ποιο βάθος θα καθαρίζει το τυρί.
- **ποσοστό άλατος** (μόνο στα νωπά – φρέσκα και ανακατεργασμένα)

Προαιρετικές ενδείξεις:

- **Διατροφική δήλωση** (υποχρεωτική από 13-12-2016) - θερμίδες σε Kcal ή KJ/100g - πρωτεΐνες - ποσοστό άλατος - ασβέστιο -βιταμίνες
- κάθε άλλη σχετική ένδειξη που θα είναι σύμφωνη με τα άρθρα 10 και 11 του Κ.Τ. και δεν θα οδηγεί σε πλάνη τον καταναλωτή.

Οι πινακίδες με τις ενδείξεις πρέπει να παραμένουν στα μέσα συσκευασίας μέχρι να τελειώσει το περιεχόμενο τυρί. Οι ενδείξεις θα αναγράφονται σταθερά, ευανάγνωστα και ανεξίτηλα με οποιοδήποτε τρόπο σε κάθε μονάδα παραγωγής (κεφάλι, βαρέλι, δοχείο κ.λ.π.)

Η μελάνη που χρησιμοποιείται για την αναγραφή των ενδείξεων, ειδικά στα κεφάλια των σκληρών τυριών για την αναγραφή της ημερομηνίας παραγωγής:

- **να μην μεταφέρει τοξικές ουσίες** ή και καρκινογόνες ανόργανες ή οργανικές ουσίες π.χ. βαρέα μέταλλα κ.λ.π
- **να μην διαχέεται στο τυρί σε βάθος μεγαλύτερο από 2 χιλιοστά**

Σε περίπτωση που τα τυριά πωλούνται εκτός συσκευασίας π.χ. σε δίσκους (σύνηθες για τα μαλακά τυριά), τότε πρέπει να τοποθετηθεί κινητή πινακίδα επάνω στο τυρί στην οποία θα αναγράφονται οι ενδείξεις που προβλέπονται για αυτές τις περιπτώσεις από την 14/89 Αγορανομική Διάταξη. Απαγορεύεται η ύπαρξη κάτω από την ίδια πινακίδα ή η συνύπαρξη μέσα στο ίδιο δίσκο τυριών: i. διαφορετικής κατηγορίας ii. ίδιας κατηγορίας αλλά διαφορετικής ποιότητας και iii. διαφορετικής χώρας παραγωγής.

Σύμφωνα με τα οριζόμενα του άρθρου 34 της Υπουργικής Απόφασης Α2-718(ΦΕΚ 2090 τ. Β΄ 31-7-2014) για τους λιανοπωλητές τυροκομικών προϊόντων ισχύουν τα παρακάτω: έχουν την υποχρέωση τήρησης πινακίδων όπως προβλέπονται στο Κεφάλαιο 1 –Τήρηση Πινακίδων της ίδιας απόφασης σε συνδυασμό με τα προβλεπόμενα στο άρθρο 83 του Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (Τυροκομικά Προϊόντα) για την τήρηση των πινακίδων αυτών και των ενδείξεων που απαιτούνται.

Οι λιανοπωλητές λευκών τυριών άλμης, υποχρεούνται να αναγράφουν στο περιτύλιγμα το είδος του τυριού (π.χ. ΦΕΤΑ ΠΟΠ ή τελεμές ή λευκό τυρί άλμης).

4.3 Επισήμανση Φέτας (προϊόντων ΠΟΠ)

Για τα τυριά προστατευόμενης ονομασίας προέλευσης (Π.Ο.Π.) προκειμένου να διασφαλιστεί η αναγνωρισιμότητα του προϊόντος, αλλά και η δυνατότητα ιχνηλασιμότητάς τους από τους ελεγκτικούς φορείς στην ενότητα Δ του άρθρου 83 του Κ.Τ.Π. περιγράφονται οι ειδικές προδιαγραφές τους και γίνεται ιδιαίτερη αναφορά στις απαιτήσεις επισήμανσης τους.

Επιπλέον των προαναφερομένων πρέπει να αναγράφονται:

- τα δύο αρχικά γράμματα της λέξης φέτα (π.χ. **ΦΕ** = φέτα), που προσδιορίζουν την ονομασία του τυριού.
- Επιπλέον των ενδείξεων που απαιτούνται για κάθε προϊόν ΠΟΠ/ΠΓΕ είναι υποχρεωτική η **σήμανση Πιστοποίησης** από τον Ο.Π.Ε.Γ.Ε.Π (με διακριτό τίτλο AGROCERT).



Τα στοιχεία ελέγχου που αναγράφονται στη συσκευασία αναλύονται ως εξής:

(παράδειγμα **ΦΕ-0001-15/07/2014**)

- τα δύο πρώτα γράμματα της ονομασίας προέλευσης: **ΦΕ**
- ο αύξων αριθμός του μέσου συσκευασίας. Ο αριθμός αυτός παρέχεται από τον Οργανισμό Πιστοποίησης & Επίβλεψης Γεωργικών Προϊόντων (Ο.Π.Ε.Γ.Ε.Π.) κατόπιν σχετικής αίτησης του υπεύθυνου της επιχείρησης και σύμφωνα με τα όσα ορίζονται για την παραγωγή και εμπορία των τυριών Π.Ο.Π.
- η ημερομηνία παραγωγής

Τα στοιχεία ελέγχου αναγράφονται με ευθύνη του συσκευαστή κατόπιν έγγραφης άδειας της αρμόδιας Διεύθυνσης Γεωργίας, η οποία τηρεί ειδικό βιβλίο παρακολούθησης και ελέγχου ανά παραγωγό φέτας.

Τονίζεται τέλος ότι οι ενδείξεις (•Τυρί, •Φέτα, •Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης (ΠΟΠ), •Βάρος, •Ημερομηνία παραγωγής) αναγράφονται υποχρεωτικά και σε κάθε συνοδευτικό έγγραφο διακίνησης του προϊόντος.

4.4 Ιχνηλασιμότητα τροφίμων Ζωικής Προελεύσεως

Η Ευρωπαϊκή Ένωση, με τα οριζόμενα του Άρθρου 18 του Κανονισμού(Ε.Κ) 178/2002, ο οποίος τέθηκε σε ισχύ την 1^η Ιανουαρίου 2005, εισήγαγε επίσημα την έννοια της Ιχνηλασιμότητας (Ανιχνευσιμότητα) στα τρόφιμα και όρισε το νομικό πλαίσιο της εφαρμογής της, σε παραγωγούς, επιχειρήσεις και Κράτη-Μέλη (Κ-Μ).

Η ιχνηλασιμότητα αποτελεί ένα εργαλείο διαχείρισης κινδύνου που επιτρέπει στους υπευθύνους των επιχειρήσεων και στις αρμόδιες ελεγκτικές αρχές να αποσύρουν ή /και να ανακαλούν μη ασφαλή προϊόντα. Η ιχνηλασιμότητα δεν εγγυάται από μόνη της την ασφάλεια των τροφίμων, αλλά στοχεύει στον περιορισμό ενός προβλήματος σχετικά με την ασφάλεια.

Η σκοπιμότητά της εστιάζεται στην:

- διευκόλυνση στοχευμένων αποσύρσεων & ανακλήσεων,
- διευκόλυνση της εκτίμησης του κινδύνου από τις ελεγκτικές αρχές.

Ωστόσο, τα παράπλευρα οφέλη από την εφαρμογή της σχετίζονται με την:

- παροχή ακριβούς πληροφόρησης στους καταναλωτές / αξιοπιστία πληροφοριών που παρέχονται σε ένα προϊόν
- δυνατότητα των ελεγκτικών αρχών να το χρησιμοποιούν ως εργαλείο στην εξακρίβωση φαινομένων απάτης
- πραγματοποίηση δίκαιων ανταλλαγών μεταξύ επιχειρήσεων.

Σύμφωνα με την πρόσφατη συμφωνία στην **CODEX ALIMENTARIUS (2004)** η ιχνηλασιμότητα ορίζεται επίσημα ως «Η ικανότητα παρακολούθησης της διακίνησης ενός τροφίμου κατά τις ειδικές φάσεις παραγωγής, επεξεργασίας και διανομής».

Η ιχνηλασιμότητα υπό την ευρεία της έννοια, θεωρείται η παρακολούθηση της ροής των πληροφοριών, βασίζεται στις στοιχειώδεις και γενικές απαιτήσεις που ορίζονται στο άρθρο 18 του Κανονισμού Ε.Κ. 178/2002, αλλά και σε ένα σύνολο ειδικών κατά περίπτωση Κανονισμών.

Σύμφωνα με το ανωτέρω άρθρο η ιχνηλασιμότητα καθίσταται υποχρεωτική για όλες τις επιχειρήσεις τροφίμων. Οι υπεύθυνοι των επιχειρήσεων τροφίμων απαιτείται να διαθέτουν και να εφαρμόζουν σύστημα ιχνηλασιμότητας προσαρμοσμένο στις δικές τους ανάγκες με στόχο την παρακολούθηση της φυσικής ροής των προϊόντων. Στο Άρθρο δεν καθορίζεται στον υπεύθυνο της εγκατάστασης ο τρόπος επίτευξης του αποτελέσματος αυτού. Για αυτόν ακριβώς το λόγο παρέχεται μεγάλη ευελιξία στις επιχειρήσεις σχετικά με τον τρόπο εφαρμογής της απαίτησης αυτής.

Οι FBOs (Food Business Operators: Υπεύθυνοι των Επιχειρήσεων Τροφίμων) πρέπει να είναι σε θέση να προσδιορίζουν από ποιον και σε ποιον έγινε η προμήθεια ενός προϊόντος, καθώς και να διαθέτουν συστήματα και διαδικασίες για την ταχεία παροχή των σχετικών πληροφοριών στις αρμόδιες αρχές, όταν αυτές το ζητήσουν.

Είναι προφανές ότι η απαίτηση της ιχνηλασιμότητας βασίζεται στην προσέγγιση «ένα βήμα πίσω – ένα βήμα μπροστά».

Συγκεκριμένα:

-Προς τα εμπρός (Downstream) ιχνηλασιμότητα: ξεκινώντας από μια συγκεκριμένη παρτίδα πρώτης ύλης (Lot), να φτάσουμε στον εντοπισμό όλων των παρτίδων των

τελικών προϊόντων που παρήχθησαν, καθώς και ο προσδιορισμός του τελικού σημείου διάθεσης.

- **Προς τα πίσω (Upstream)** ιχνηλασιμότητα: γνωρίζοντας την παρτίδα του τελικού προϊόντος (Lot) και του σημείου διάθεσης, να μπορούμε να ανιχνεύσουμε τις πρώτες ύλες που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή του, καθώς και το ή τα σημεία παραγωγής και επεξεργασίας.

Παρά τις γενικές απαιτήσεις της νομοθεσίας, οι κρίσεις στον τομέα των τροφίμων αποκάλυψαν ότι τα υφιστάμενα συστήματα δεν επαρκούσαν για την πλήρη ιχνηλασιμότητα του τροφίμου και σε πολλές περιπτώσεις οι FBOs δεν κατείχαν τις απαραίτητες πληροφορίες για να εξασφαλιστεί ότι τα συστήματά τους ήταν επαρκή, ιδίως στον τομέα των τροφίμων ζωικής προέλευσης. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα να καταγραφούν μεγάλες οικονομικές απώλειες, λόγω έλλειψης ταχείας και πλήρους ιχνηλασιμότητας.

Εξαιτίας των ανωτέρω, η Ευρωπαϊκή Επιτροπή προχώρησε στη θέσπιση ορισμένων κανόνων για τον τομέα των τροφίμων ζωικής προέλευσης, έτσι ώστε να διασφαλιστεί η σωστή εφαρμογή των απαιτήσεων του άρθρου 18, με την έκδοση του Εκτελεστικού Κανονισμού 931/2011.

Ο εν λόγω κανονισμός εφαρμόζεται στα ζωικά τρόφιμα που ορίζονται ως μη μεταποιημένα και μεταποιημένα στο άρθρο 2 παράγραφος 1 του καν. Ε.Κ. 852/2004, ενώ δεν εφαρμόζεται σε τρόφιμα που περιέχουν τόσο προϊόντα φυτικής προέλευσης, όσο και μεταποιημένα προϊόντα ζωικής προέλευσης.

Σύμφωνα με τον ανωτέρω Κανονισμό οι FBOs υποχρεούνται να διατηρούν και κατά συνέπεια να μπορούν να διαθέτουν (σε επιχειρήσεις πελάτες ή/και στις αρχές) τις εξής πληροφορίες:

1. Επακριβής περιγραφή τροφίμου
2. Όγκος ή ποσότητα τροφίμου
3. Το όνομα και διεύθυνση του υπεύθυνου τροφίμου από τον οποίο απεστάλη το τρόφιμο
4. Όνομα και διεύθυνση αποστολέα (ιδιοκτήτη), αν διαφέρει από τον υπεύθυνο επιχείρησης από τον οποίο απεστάλη το τρόφιμο
5. Όνομα και διεύθυνση του υπευθύνου επιχείρησης τροφίμων στον οποίο αποστέλλεται το τρόφιμο
6. Όνομα και διεύθυνση του αποστολέα (ιδιοκτήτη), αν διαφέρει από τον υπεύθυνο επιχείρησης στον οποίο απεστάλη το τρόφιμο
7. Στοιχεία παρτίδας, φορτίου ή αποστολής κατά περίπτωση
8. Ημερομηνία αποστολής

Η εφαρμογή ενός συστήματος ιχνηλασιμότητας από την επιχείρησή, εκτός από την ικανοποίηση των νομοθετικών απαιτήσεων, πρέπει να εφαρμόζει και ένα σύστημα πρόληψης, μέσω της ανάκλησης των προϊόντων που τυχόν παρουσιάζουν

πρόβλημα, προφυλάσσοντας το καταναλωτικό κοινό αλλά και την επιχείρηση από δυσάρεστες καταστάσεις.

Έμφαση πρέπει να δίνεται στη **δυνατότητα παρακολούθησης της φυσικής ροής** των προϊόντων και όχι μόνο της εμπορικής. Η εμπειρία προηγούμενων χρόνων έχει δείξει ότι η ιχνηλάτηση της εμπορικής ροής μέσω τήρησης τιμολογίων δεν ήταν επαρκής για την παρακολούθηση της φυσικής ροής των προϊόντων, καθώς αυτά θα μπορούσαν π.χ. να έχουν σταλεί για αποθήκευση ή να μην έχουν εν γένει διακινηθεί με εμπορική συναλλαγή. Για το λόγο αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό το σύστημα της ιχνηλασιμότητας να είναι σχεδιασμένο κατά τρόπο, ώστε να παρακολουθεί τη φυσική ροή των προϊόντων.

4.5 Μέθοδοι ταυτοποίησης γαλακτοκομικών προϊόντων

Ένα σύστημα ιχνηλασιμότητας τροφίμων απαιτεί την ταυτοποίηση όλων των φυσικών οντοτήτων και τοποθεσιών από τα οποία προέρχεται το προϊόν, δηλαδή που παράγεται, που επεξεργάζεται, συσκευάζεται, αποθηκεύεται και διανέμεται, συμπεριλαμβάνοντας έτσι όλους τους εμπλεκόμενους στην αλυσίδα (Regattieri et al., 2007). Επιπλέον, κάθε επιχείρηση σε οποιοδήποτε στάδιο της αλυσίδας τροφίμων θα πρέπει να μπορεί να ταυτοποιήσει τα προϊόντα και τις πρώτες ύλες τις, καθώς και τους προμηθευτές και πελάτες του, να μπορεί να συσχετίσει αυτούς μεταξύ τους και να καταγράφει και αρχειοθετεί τις σχετικές πληροφορίες (Αρβανιτογιάννης, 2006).

Η σύνθεση και η ποιότητα του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων πρέπει να ελέγχονται, ώστε να εξασφαλίζεται η αυστηρή τήρηση των σχετικών απαιτήσεων, οι οποίες έχουν καθοριστεί στο πλαίσιο των ρυθμίσεων που προβλέπει ο Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1255/1999.

Οι μέθοδοι αναφοράς που χρησιμοποιούνται για τους εν λόγω ελέγχους είναι συχνά μέθοδοι που δημοσιεύονται από διεθνείς οργανισμούς, όπως η Ευρωπαϊκή Επιτροπή Τυποποίησης (CEN), η Διεθνής Ομοσπονδία Γάλακτος (IDF), ο Διεθνής Οργανισμός Τυποποίησης (ISO) και η Ένωση Αναγνωρισμένων Αναλυτικών Χημικών (AOAC International), και επικαιροποιούνται ανά τακτά χρονικά διαστήματα από τους οργανισμούς αυτούς. Σε ορισμένες περιπτώσεις έχει θεσπιστεί κοινοτική μέθοδος αναφοράς, ενώ σε άλλες, δεν καθορίζεται μέθοδος αναφοράς στις κοινοτικές διατάξεις. Για να εξασφαλιστεί η ενιαία εφαρμογή εργαστηριακών ελέγχων στην Κοινότητα πρέπει να καταρτιστεί πίνακας μεθόδων αναφοράς και να προβλεφθεί η προσαρμογή του πίνακα αυτού από την Επιτροπή, όταν κρίνεται απαραίτητο.

Πρέπει επίσης να θεσπιστούν κοινές διαδικασίες για να εξασφαλιστεί μια ενιαία πρακτική κατά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των αναλύσεων, την οργανοληπτική αξιολόγηση των σχετικών προϊόντων και την επανεξέταση των αποτελεσμάτων που έχουν αμφισβητηθεί.

Μέχρι σήμερα για τον έλεγχο της νοθείας του γάλακτος έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες τεχνικές ανίχνευσης που βασίζονται στον έλεγχο των πρωτεϊνών καθώς και στην ανίχνευση αλληλουχιών του DNA. Τέτοιες μέθοδοι είναι η ηλεκτροφόρηση, ο ισοηλεκτρικός εστιασμός (IEF), η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (CE), η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ανεστραμμένης φάσης (RP HPLC), η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ιοντοανταλλαγής (IE HPLC), η χρωματογραφία υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων (HIC), οιοανοσοχημικές μέθοδοι (ELISA), η φασματομετρία μαζών, η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR και η ποσοτική ανάλυση σε πραγματικό χρόνο Real-time PCR.

Με τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό (ΕΚ)273/2008 στο πλαίσιο των ρυθμίσεων που προβλέπονται από την κοινή οργάνωση της αγοράς στον τομέα του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων, θεσπίζονται ορισμένες μέθοδοι αναφοράς που πρέπει να χρησιμοποιούνται για τη χημική, φυσική και μικροβιολογική ανάλυση, καθώς και για την οργανοληπτική αξιολόγηση του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων.

Αναλυτικότερα, στο παράρτημα ΙΧ του Κανονισμού αναφέρεται η αναλυτική μέθοδος αναφοράς για την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος και καζεϊνικών αλάτων σε τυριά που παρασκευάζονται αποκλειστικά από γάλα προβάτων, αιγών ή βουβάλων και μείγματα γάλακτος προβάτων, αιγών και βουβάλων.

Ειδικότερα η ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος και καζεϊνικών αλάτων πραγματοποιείται με ισοηλεκτρική εστίαση γ-καζεϊνών μετά από πλάσμινολυση. Η μέθοδος είναι κατάλληλη για ευαίσθητη και εξειδικευμένη ανίχνευση φυσικού και θερμικά κατεργασμένου αγελαδινού γάλακτος και καζεϊνικών αλάτων σε νωπά και ώριμα τυριά από γάλα προβάτων, αιγών ή βουβάλων και μείγματα γάλακτος προβάτων, αιγών και βουβάλων. Η μέθοδος δεν είναι κατάλληλη για την ανίχνευση της νοθείας του γάλακτος και των τυριών με συμπυκνώματα πρωτεϊνών ορού αγελαδινού γάλακτος που έχουν υποστεί θερμική κατεργασία.

Στην Ελλάδα για το 2014 ο Ενιαίος Φορέας Ελέγχου Τροφίμων (ΕΦΕΤ) πραγματοποίησε 65 δειγματοληψίες σε ΠΟΠ τυριά που κυκλοφορούν στην Ελληνική αγορά. Τα δείγματα αυτά ελέγχθηκαν για το είδος γάλακτος που παρασκευάστηκαν και την επισήμανση που φέραν. Οι έλεγχοι των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν στα εργαστήρια του Γενικού Χημείου του Κράτους με την μέθοδο, «ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος και καζεϊνικών αλάτων σε τυριά από πρόβειο – κατσικίσιο ή βουβαλίσιο γάλα ή από μίγμα αυτών», σύμφωνα με τα οριζόμενα του Κανονισμού (ΕΚ) 273/2008.

5.Μοριακοί δείκτες

Οι μοριακοί δείκτες είναι τμήματα DNA, χωρίς άμεση επίδραση στο φαινότυπο, που παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ των προς μελέτη ατόμων, η

ανάδειξη των οποίων χρησιμοποιείται για την μελέτη της κληρονομικότητας χαρακτηριστικών και της ποικιλομορφίας μεταξύ των ατόμων πληθυσμών (Fanourakis *et al.*, 2004)

Οι μοριακοί δείκτες θα πρέπει να συγκεντρώνουν τα περισσότερα από τα παρακάτω γνωρίσματα ώστε να παρουσιάζουν τη μέγιστη χρησιμότητα (Χατζόπουλος, 2001):

- Παρουσία πολυμορφισμού (όσο το δυνατόν περισσότερων αλληλομόρφων για κάθε γενετικό τόπο).
- Απλή κληρονομικότητα, που στην ιδανική περίπτωση ελέγχεται από ένα γενετικό τόπο με συγκυρίαρχα αλληλόμορφα.
- Υψηλός συντελεστής κληρονομικότητας.
- Σταθερός φαινότυπος κάτω από ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες καθώς αξιοποιείται ο πολυμορφισμός που παρουσιάζεται στην αλληλουχία βάσεων του DNA και όχι στην παραλλακτικότητα έκφρασης των γονιδίων.
- Διασπορά και στην ιδανική περίπτωση ισοκατανομή σε ολόκληρο το γονιδίωμα.
- Ανεξαρτησία μεταξύ της βιωσιμότητας και του φαινοτύπου των φυτών.
- Η μεθοδολογία αναγνώρισης να μην κοστίζει πολύ.

Οι μοριακοί δείκτες καθορίζονται από δύο συνιστώσες:

- Την περιοχή του DNA που πρόκειται να «καλύψουν».
- και την τεχνική που χρησιμοποιείται για την εύρεση της διαφοροποίησης.

Τα κριτήρια για την επιλογή του κατάλληλου μοριακού δείκτη διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες:

- Το επίπεδο της διαφοροποίησης.
- Τη φύση της πληροφορίας, η οποία πρέπει να προσδιορίζεται σύμφωνα με το επιστημονικό ερώτημα.
- Κάποια πρακτικά κριτήρια, τα οποία έχουν να κάνουν κυρίως με τον εξοπλισμό του εκάστοτε εργαστηρίου και την εμπειρία του ερευνητή.

Μετά την ανακάλυψη της μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction – PCR) αναπτύχθηκαν νέες μέθοδοι μοριακών δεικτών που βασίζονται στον *in vitro* πολλαπλασιασμό τμημάτων DNA. Οι πρώτοι μοριακοί δείκτες, που χρησιμοποιήθηκαν από τους επιστήμονες ήταν αρχικά οι δείκτες Πολυμορφισμού Μεγέθους Περιοριστικού Θραύσματος (RFLP) (Botstein *et al.*, 1980). Πρόκειται για μοριακό δείκτη, ο οποίος βασίζεται στην παραγωγή διαφορετικού μήκους περιοριστικών θραυσμάτων μετά από πέψη του DNA με περιοριστικά ένζυμα. Η ικανότητα των μορίων DNA να παραμένουν σταθερά στη θερμική επεξεργασία, η παρουσία τους σε κάθε κύτταρο, η ειδική για

κάθε είδος αλληλουχία νουκλεοτιδίων, τα έχουν προωθήσει τελευταία στην κορυφή των αναλύσεων ταυτοποίησης ειδών.

Ακολούθησαν το 1990 οι δείκτες Τυχαίου Πολλαπλασιασμού Πολυμορφικού DNA (RAPD) (Williams *et al.* 1990). Πρόκειται για μοριακούς δείκτες που βασίζονται στο διαφορικό πολλαπλασιασμό, με τη βοήθεια της PCR, τυχαίων αλληλουχιών ενός δείγματος DNA με εκκινητές που αποτελούνται από μικρές ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες (συνήθως 8-10 βάσεις). Στη συνέχεια, εμφανίστηκαν οι μοριακοί δείκτες όπως οι ISSRs, AFLPs, IFLPs. Σήμερα, ένας μεγάλος αριθμός μοριακών δεικτών, όπως π.χ. οι SSRs, SCARs, MAS και άλλοι, βρίσκεται στη διάθεση των ερευνητών.

Τα πλεονεκτήματα του DNA ως μοριακού δείκτη είναι:

- α) Είναι γενικά πιο πολυμορφικό.
- β) Είναι πιο σταθερό, οπότε πιο εύκολο στη συλλογή και αποθήκευση δειγμάτων αλλά και πιο ανθεκτικό όταν πρόκειται για αναλύσεις επεξεργασμένων κρεάτων.
- γ) Ειδικά, μετά την ανάπτυξη της μεθόδου της PCR (Mullis & Fallona, 1987) και τη δυνατότητα πλέον, της ενίσχυσης και πολλαπλασιασμού μέσω της PCR, ειδικών ακολουθιών-στόχων DNA με καθορισμένους εκκινητές, μπορεί να γίνει ανάλυση, ακόμα και σε δείγματα που υπάρχει πολύ μικρή ποσότητα DNA προς ανίχνευση. Επιπλέον, η ευαισθησία και η εξειδίκευση της PCR μπορεί να βελτιωθεί σημαντικά με την ενσωμάτωση και υβριδισμό εσωτερικού ανιχνευτή (Mohd *et al.*, 2012).

Μπορούμε να διαχωρίσουμε τις παραπάνω αναλυτικές μεθόδους που χρησιμοποιούν τους μοριακούς γενετικούς δείκτες (DNA- δείκτες) σε δυο κατηγορίες:

- Αναλυτικές μέθοδοι που βασίζονται στην συμβατική PCR (PCR-RFLPs, SSCP, RAPDs, AFLPs, SSRs).
- Στη Real-time PCR

6. Μιτοχονδριακό DNA

6.1 Γενικά

Το μιτοχονδριακό DNA έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στο παρελθόν για φυλογενετικές αναλύσεις, καθώς και για μελέτες πληθυσμών και ιατροδικαστικής. Ιδιαίτερα για την περίπτωση της φυλογένεσης η χρήση/σύγκριση του μιτοχονδριακού DNA θεωρείται πολύ πιο αποτελεσματική από ότι η χρήση ενός πυρηνικού γονιδίου (Boore *et al.*, 2005).

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

1) Ο αριθμός των αντιγράφων του mtDNA στα κύτταρα είναι εξαιρετικά υψηλός (εκατοντάδες έως χιλιάδες) σε σχέση με τα αντίγραφα του πυρηνικού DNA (ένα στους απλοειδείς και δύο στους διπλοειδείς οργανισμούς) (Futuyama 1991).

2) Ο μητρικός τρόπος κληρονομικότητας του mtDNA, υποδηλώνει ότι μόνο ένας τύπος μιτοχονδρίου είναι παρών σε κάθε άτομο. Έτσι το μιτοχονδριακό DNA κάθε οργανισμού, με εξαίρεση πιθανές μεταλλαγές, είναι πανομοιότυπο με το αντίστοιχο της μητέρας του.

3) Δεν ανασυνδυάζεται, δηλαδή οι τυχόν ανασυνδυασμοί που λαμβάνουν χώρα στο πυρηνικό DNA, δεν εμφανίζονται στο μιτοχονδριακό DNA και έτσι οι διαφοροποιήσεις που παρατηρούνται είναι καθαρά αποτέλεσμα μεταλλαγών και όχι ανασυνδυασμών (Hagelberg 1994). Ορισμένες μελέτες αναφέρουν φαινόμενα ανασυνδυασμού στο μύδι *Mytilus galloprovincialis* (Ladoukakis & Zouros, 2001).

4) Έχει απλή γενετική δομή και σχετικά εύκολο να δουλευτεί σε εργαστηριακό επίπεδο. Το μικρό του μέγεθος σε συνδυασμό με την συντηρημένη διευθέτηση των γονιδίων σε αυτό υποδηλώνει ότι πολλά ζευγάρια γενικευμένων εκκινητών (universal primers) θα είναι σε θέση να πολλαπλασιάσουν περιοχές του mtDNA σε ένα μεγάλο εύρος σπονδυλωτών και ασπονδύλων.

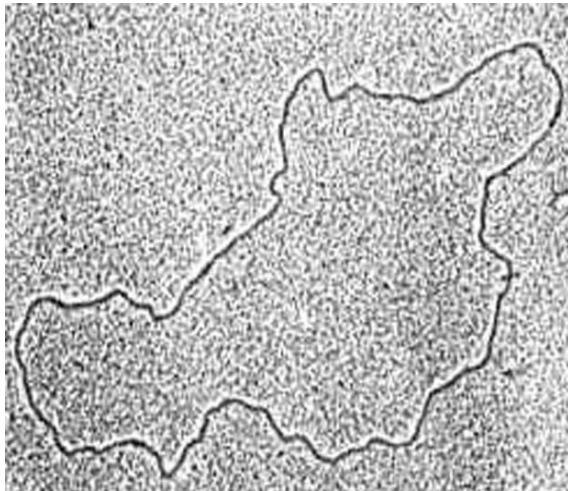
5) Έχει γρήγορο ρυθμό εξέλιξης. Το mtDNA φαίνεται να εξελίσσεται 5-10 φορές ταχύτερα συγκρινόμενο με το μοναδικό (μη επαναλαμβανόμενο) πυρηνικό DNA (scnDNA, single copy nuclear DNA). Επιπλέον, διαφορετικές περιοχές του mtDNA εξελίσσονται με διαφορετικούς ρυθμούς παρέχοντας ένα ευρύ φάσμα περιοχών αλληλουχιών οι οποίες μπορούν να επιλεγούν ως στόχος, ανάλογα με τον σκοπό της μελέτης (Kvist, 2000).

6) Διάφορα στοιχεία που χαρακτηρίζουν το πυρηνικό DNA, όπως τα μεταθετά στοιχεία, τα ψευδογονίδια, τα ιντρόνια και το επαναληπτικό DNA απουσιάζουν από το mtDNA (Awise et al. 1987).

Το μιτοχονδριακό DNA είναι ένα μικρό, δίκλωνο, κυκλικό, υπερελικωμένο μόριο που υπάρχει σε πολλά αντίγραφα μέσα στα μιτοχόνδρια (Εικ. 2). Το μέγεθος του κυμαίνεται από 16 έως 20 χιλιάδες ζεύγη βάσεων (Moritz et al. 1987)

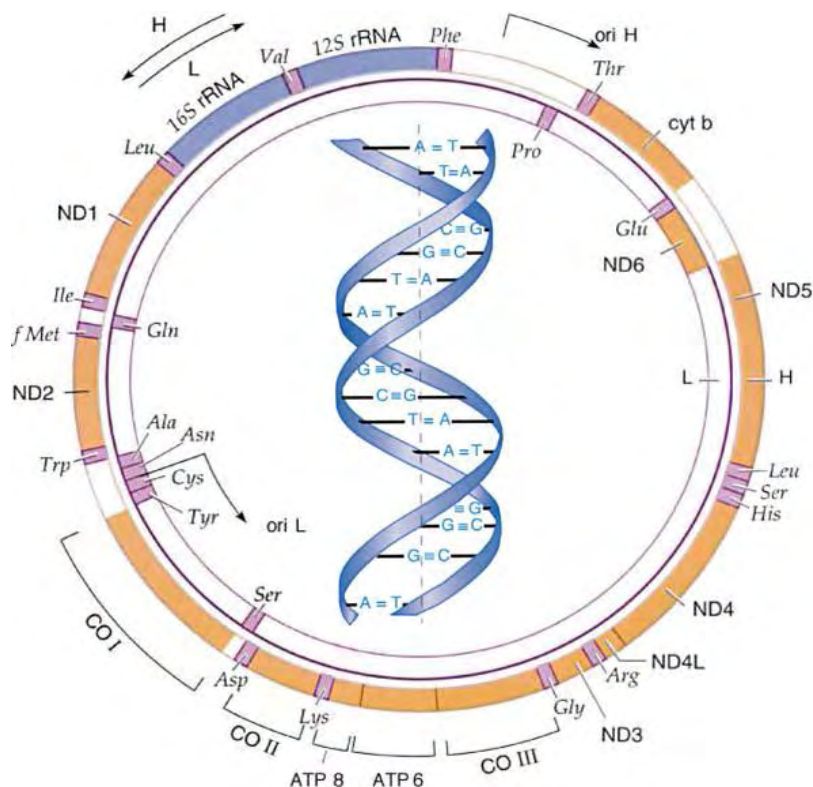
Το κυκλικό σχήμα του μιτοχονδριακού DNA συμβάλλει στην μεγαλύτερη σταθερότητα στο χρόνο, δεδομένου ότι είναι λιγότερο ευαίσθητο στην αποικοδόμηση σε σύγκρισή με το πυρηνικό DNA (Gefrides et al, 2011). Αυτό οδηγεί σε αυξημένη επιβίωση του mtDNA σε ιδιαίτερα επεξεργασμένα τρόφιμα, που υπόκεινται στις ακραίες συνθήκες της επεξεργασίας τροφίμων. Επιπλέον, μερικά αντίγραφα των γονιδιωμάτων mtDNA, περίπου 2-10 αντίγραφα, οργανώνονται σε νουκλεοειδή (Bogenhagen, 2009) με αποτέλεσμα την ύπαρξη πολύ υψηλού αριθμού αντιγράφων του mtDNA σε ένα συγκεκριμένο κύτταρο. Σε αντίθεση, μόνο ένα αντίγραφο του nDNA υπάρχει στον πυρήνα του κάθε κυττάρου. Αυτό

εξασφαλίζει μεγαλύτερη ευαισθησία στην ανίχνευση του mtDNA σε σύγκριση με τις δοκιμές με nDNA (Gefridew & Welch, 2011).



Εικόνα 2 : Ζωικό μιτοχονδριακό DNA (mtDNA)

Σε όλα τα πολυκύτταρα ζώα που έχουν μελετηθεί, καθώς και σε μερικά πρωτόζωα, το mtDNA περιλαμβάνει την ίδια ομάδα γονιδίων και αποτελείται από 37 γονίδια: 22 γονίδια μεταφορικών RNA (tRNA), 13 πρωτεϊνικά γονίδια, 2 ριβοσωμικά RNA (rRNA) και την περιοχή ελέγχου (D-loop) που είναι μη κωδική και ελέγχει την αντιγραφή του DNA και τη μεταγραφή του RNA (Avisé et al., 1987) (Εικ. 3).



Εικόνα 3: Απεικόνιση mtDNA και των γονιδίων που περιέχει.

Από τα παραπάνω εύκολα γίνεται κατανοητό γιατί στην εργασία επιλέχτηκε το mtDNA ως δείκτης για την ποσοτική και ποιοτική ανάλυση των ειδών και είναι επαρκές για τη διαφοροποίηση ακόμη και σε στενά μεταξύ τους συγγενικά είδη (Kocher et al., 1989).

6.2 Γονίδια που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των ειδών

Η παρουσία πολλαπλών αντιγράφων του mtDNA σε ένα κύτταρο βελτιώνει σημαντικά την ευαισθησία του συστήματος PCR όταν τα κύτταρα υποβάλλονται σε ακραίες συνθήκες επεξεργασίας (Rojas et al., 2010). Το όριο ανίχνευσης που επιτυγχάνεται με το mtDNA με βάση το σύστημα της PCR είναι γενικά πολύ χαμηλό, λιγότερο από 5fg όταν το DNA στόχος είναι γονίδιο το 12S rRNA όπως καταδεικνύεται από τους Rojas et al. (2010) και 40 fg όταν χρησιμοποιούμε για DNA το κυτόχρωμα b σύμφωνα με τους López-Andreo et al. (2006). Επιπλέον, οι ειδικοί εκκινητές PCR για διάφορα είδη που προέρχονται από μιτοχονδριακά γονίδια μπορούν να ανιχνεύσουν τόσο χαμηλό ποσό όπως 0.1pg του DNA (Kesmen et al., 2009). Πολλές μελέτες χρησιμοποίησαν το κυτοχρώμα b που υπάρχει στο μιτοχονδριακό DNA καθώς οι αλληλουχίες του κυτοχρώματος b έχουν δείξει ότι διαφέρουν κατά έναν αριθμό νουκλεοτιδίων ακόμη και μεταξύ στενά συγγενικών ειδών (Herman L. 2001, Bottero et al., 2003).

Άλλα γονίδια του mtDNA που έχουν χρησιμοποιηθεί ως μοριακοί δείκτες για την ποιοτική και ποσοτική ταυτοποίηση ειδών, είναι η περιοχή D-loop (Monteil-Sosa et al., 2000), το 16S rRNA (Sawyer et al., 2003) τα γονίδια των υπομονάδων της αφυδρογονάσης NADH (Herman 2001). Στον Πίνακα 2 που ακολουθεί παρουσιάζονται συνοπτικά τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα των μιτοχονδριακών γονιδίων-στόχων.

Ωστόσο, αρχικά εξακολουθούσαν να υπάρχουν σημαντικά προβλήματα με τη χρήση της PCR για ποσοτικοποίηση (Woolfe & Primrose, 2004) και ο αριθμός των μιτοχονδρίων σε οποιοδήποτε κύτταρο μπορεί να διαφέρει σημαντικά ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου. Όταν η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ένα μη-μιτοχονδριακό δείκτη, η PCR ήταν σε θέση να ανιχνεύσει νοθεία γάλακτος 0,5% (Klotz & Einspanier, 2001).

Τόσο για το γάλα όσο και τα γαλακτοκομικά προϊόντα, έχει αναφερθεί ότι στα μηρυκαστικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγή του DNA, δεδομένου ότι περιέχει μεγάλο αριθμό σωματικών κυττάρων, κυρίως λευκοκυττάρων αλλά επίσης και επιθηλιακά κύτταρα από το άρμεγμα, τα οποία περιέχουν γονιδιωματικό DNA κατάλληλο για την εφαρμογή της PCR (Bottero et al., 2003).

Υπάρχουν αρκετές αναφορές που βασίζονται στην ενίσχυση της PCR από διάφορες περιοχές του μιτοχονδριακού γονιδιώματος (De et al., 2011; Pegels et al., 2011) και έχουν δείξει ότι μέθοδοι που βασίζονται στο DNA είναι πιο ευαίσθητες από τις μεθόδους που ελέγχουν την πρωτεΐνη ή το λιπαρό οξύ και ως εκ τούτου η

PCR μπορεί να εφαρμοσθεί αξιόπιστα για την αναγνώριση των ειδών σε ένα ευρύ φάσμα των γαλακτοκομικών προϊόντων (Bottero & Dalmaso, 2011).

Επίσης, το μιτοχονδριακό γονίδιο ND2 χρησιμοποιήθηκε στο σχεδιασμό ενός είδους εκκινητή TaqMan για την διερεύνηση των ειδών (Herman, 2001).

Πίνακας 2. τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα των μιτοχονδριακών γονιδίων-στόχων για την PCR

Γονίδιο Στόχος	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα	Αναφορές
Κυτόχρωμα b	Συνήθως χρησιμοποιούνται σε φυλογενετικές μελέτες. Υψηλή δια-ειδική μεταβλητότητα.	Αδύνατο να διαχωρίσει στενά συγγενικά είδη	Kvist (2000) Dooley et al. (2004) Zhang et al. (2007) Santos et al. (2012)
12S rRNA	Επαρκής μεταβλητότητα εντός και μεταξύ των ειδών.		Fajardo et al. (2008b) Martín et al. (2009) Rojas et al. (2010)
Περιοχή D-loop	Υψηλό ποσοστό υποκατάστασης. Η πιο γρήγορα εξελισσόμενη περιοχή του mtDNA		Sawyer et al. (2003) Fajardo et al. (2008a)
ND5	Υψηλή μεταβλητότητα μεταξύ των ειδών	Σε κάποια γένη δεν είναι δυνατό να γίνει διαχωρισμός μεταξύ συγγενικών ειδών.	Fariha Liyana et al. (2009) Kesmen et al. (2009)
ND2	Επαρκής μεταβλητότητα και μεταξύ των ειδών		Kesmen et al. (2009)
ATPase6/ ATPase8	Επαρκής μεταβλητότητα μεταξύ των ειδών		
16S rRNA	Περιέχει καλά συντηρημένες περιοχές. Πολύ χαμηλή μεταβλητότητα μεταξύ των ειδών. Συχνά χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη γενικών εκκινητών για είδη θηλαστικών, πτηνών και μηρυκαστικών.		Sawyer et al. (2003) Dalmaso et al. (2004) Chiappini et al. (2005) Kesmen et al. (2009)

6.3 Η επίδραση της φύσης του γονιδίου-στόχου στην Real Time PCR με βάση την ταυτοποίηση του DNA

Οι συμβατικές τεχνικές PCR επιτρέπουν την ποιοτική ανίχνευση των διαφόρων ζωικών ειδών σε ένα μίγμα, αλλά δεν είναι κατάλληλες να κάνει ποσοτικό προσδιορισμό του ζωικού ιστού στο προϊόν.

Οι πιο πρόσφατες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην χρήση της PCR πραγματικού χρόνου για την αναγνώριση των ειδών στο κρέας και την ποσοτικοποίηση του (Lahiff et al., 2002; Mendoza-Romero et al., 2004; Sawyer et al., 2003). Έχει αναφερθεί ότι για την ανάλυση του μιτοχονδριακού DNA του επιλεγμένου γονιδίου απαιτούνται μόνο 10 μόρια mtDNA για τον επιτυχή εντοπισμό, αλλά απαιτούνται πολύ περισσότερα αντίγραφα πυρηνικού DNA (nDNA), υποδεικνύοντας έτσι την μεγαλύτερη ευαισθησία του mtDNA έναντι του nDNA στην Real-Time PCR (Andréasson et al., 2002). Η Real – Time PCR είναι ευρέως αποδεκτή ως μια ισχυρή δοκιμασία για την αναγνώριση των ειδών και την ποσοτικοποίηση των μορίων του νουκλεϊκού οξέος. Το γεγονός αυτό οφείλεται:

- στην υψηλότερη ευαισθησία της και εξειδίκευση
- μεγαλύτερη δυναμική περιοχή ανίχνευσης,
- και λιγότερος κίνδυνος επιμόλυνσης στο δείγμα

Η real-time PCR χρησιμοποιήθηκε από τους Lopez-Calleja et al. (2007a,b) για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό αγελαδινού και αίγιου γάλακτος σε νωπά και θερμικώς επεξεργασμένα μίγματα αγελαδινού/πρόβειου και αίγιου/πρόβειου γάλακτος

αντίστοιχα. Για τους σκοπούς του πειράματος χρησιμοποιήσαν δύο ζεύγη εκκινητών με στόχο το μιτοχονδριακό 12S rRNA γονίδιο. Η μέτρηση των προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ενός φθορίζοντος ανιχνευτή TaqMan. Η μέθοδος επέτρεψε την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό αγελαδινού και αίγιου γάλακτος σε νωπά και θερμικώς επεξεργασμένα μίγματα πρόβειου/αγελαδινού και πρόβειου/αίγιου γάλακτος, σε εύρος 0,5-10% και 0,6-10% αντίστοιχα.

Η τεχνική της PCR-RFLP χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση 1% και 2,5% αγελαδινού γάλακτος σε πρόβειο τυρί Φέτα και γιαούρτης, αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας εκκινητές με στόχο το μιτοχονδριακό κυτόχρωμα b, (Stefos et al., 2004). Η ίδια τεχνική χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση αίγιου γάλακτος σε πρόβειο τυρί χρησιμοποιώντας εκκινητές με στόχο το μιτοχονδριακό 12S rRNA γονίδιο με όριο ανίχνευσης 1% αίγιου γάλακτος (Díaz et al., 2007). Η ίδια μέθοδος χρησιμοποιήθηκε από τους Lopez-Calleja et al. (2007c) για την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε πρόβειο και αίγιο τυρί χρησιμοποιώντας εξειδικευμένους εκκινητές με στόχο το μιτοχονδριακό 12S rRNA γονίδιο. Η μέθοδος επέτρεψε την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε ποσοστό 1%.

Η τεχνική της PCR χρησιμοποιήθηκε και για την ανίχνευση νωπού, θερμικώς επεξεργασμένου καθώς και σκόνης αγελαδινού γάλακτος σε πρόβεια τυριά. Για τους σκοπούς του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές με στόχο τα μιτοχονδριακά 12S και 16S rRNA γονίδια. Η μέθοδος επέτρεψε τόσο την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε ποσοστό 0,1%, όσο και τον ποσοτικό προσδιορισμό σε εύρος 1-50%. Η ίδια τεχνική χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση αγελαδινού και αίγιου γάλακτος σε αίγιο τυρί με τη χρήση εκκινητών με στόχο τα μιτοχονδριακά 12S rRNA γονίδια (Mafra et al., 2004). Οι ίδιοι ερευνητές αναφέρουν την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε ποσοστό 0,1% και τον ποσοτικό προσδιορισμό σε εύρος 1-60% (Mafra et al., 2007).

7. Σκοπός της εργασίας

Οι μοριακές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για αναλύσεις τροφίμων με την απομόνωση του DNA έχουν όλο και περισσότερες εφαρμογές τόσο για την ασφάλεια των τροφίμων (παθογόνοι μικροοργανισμοί, αλλεργιογόνα) όσο και για την ποιότητα και την γνησιότητα τους (παρουσία Γενετικά Τροποποιημένων, νοθεία ελαιολάδου και γαλακτοκομικών, είδη κρέατος, halal, άλογο σε μοσχάρι, κοτόπουλο σε γαλοπούλα).

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου εφαρμογής της μεθόδου της Real-Time PCR, για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό του γάλακτος Αίγας σε έτοιμη προς κατανάλωση Φέτα (ΠΟΠ) η οποία κυκλοφορεί στην Ελληνική αγορά.

Ο μοριακός δείκτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το γονίδιο 12SrRNA του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η PCR και η Real-Time PCR. Για τον σκοπό αυτό διεξήχθησαν μια σειρά πειραμάτων με στόχο την δημιουργία πρότυπων καμπύλων αναφοράς με την χρωστική SYBR Green. Σχεδιάστηκαν ειδικοί εκκινητές και προσδιορίστηκε η απόδοση της αντίδρασης. Η καμπύλη αναφοράς κατασκευάστηκε με αναλογία αίγιου DNA 5-100%. Τέλος, τα δείγματα Φέτας που εξετάστηκαν ελέγχθηκαν και για πιθανή νοθεία με αγελαδινό γάλα με την Real-Time PCR.

8. Πειραματική πορεία - Μέθοδοι





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






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






8.1 Δείγματα.

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τις ανάγκες της μελέτης ήταν δεκατρία(13) τυριά Φέτας (ΠΟΠ) που παρήχθησαν με την παραδοσιακή τεχνική της φέτας σε διάφορα τυροκομεία της Χώρας και ένα (1) κατσικίσιο τυρί. Τα δείγματα αγοράστηκαν από επώνυμη αλυσίδα καταστημάτων σούπερ μάρκετ της Λάρισας. Στον Πίνακα 3 καταγράφεται η επισήμανση που έφερε η συσκευασία του κάθε δείγματος.

Πίνακας 3. Η επισήμανση που υπήρχε στη συσκευασία του κάθε δείγματος.

	ΕΜΠΟΡΙΚΗ ΕΠΩΝΥΜΙΑ	ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΕΙΔΟΣ	ΑΛΦΑΡΙΘΜΙ ΤΙΚΟΣ ΑΡΙΘΜΟΣ ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣ ΗΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΦΕ	LOT	Διατροφική Επισήμανση	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑΣ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΞΗΣ
	ΧΩΡΙΟ Φέτα	Αποκλειστικά από φρέσκο παστεριωμένο αιγοπρόβειο γάλα. Λίπος επί ξηρού 43% min, Υγρασία 56% max	φέτα	GR 20.385EC	106463/08- 03-2014		NAI	8/3/2014	9/10/2014	9/5/2015
	Carrefour Φέτα	Από 100% φρέσκο αιγοπρόβειο γάλα. Αλάτι πυτιά, καλλιέργεια, Λίπος επί ξηρού 43% min, Υγρασία 56% max	φέτα	GR 50.3.20 EC	5304		NAI	5/8/2014	26/11/2014	5/8/2015
	Μαίναλο Φέτα Ορεινής Πελοποννήσου	Από παστεριωμένο αιγοπρόβειο γάλα. Αλάτι πυτιά, καλλιέργεια, Λίπος επί ξηρού 43% min, Υγρασία 56% max	φέτα	GR 05.2151 EC	102646		NAI	17/2/2014	14/10/2014	12/4/2015
	Μικρά Τυροκομεία	Παραδοσιακό τυρί Φέτα από 100% φρέσκο παστεριωμένο αιγοπρόβειο γάλα. Λίπος επί ξηρού 43% min, Υγρασία 56% max	φέτα	GR 31.2.1042EC	323754/08- 04-2014		NAI	8/4/2014	8/10/2014	7/7/2015

	ΕΜΠΟΡΙΚΗ ΕΠΩΝΥΜΙΑ	ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΕΙΔΟΣ	ΑΛΦΑΡΙΘΜΙ ΤΙΚΟΣ ΑΡΙΘΜΟΣ ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣ ΗΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΦΕ	LOT	Διατροφική Επισήμανση	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑΣ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΞΗΣ
	Φέτα ΜΕΒΓΑΛ	Τυρί από φρέσκο παστεριωμένο γάλα. Πρόβειο και κατσικίσιο	φέτα	ΔΕΝ ΑΝΑΓΡΑΦΕΤ ΑΙ	368983		ΌΧΙ	10/4/2014	24/6/2014	24/12/2014
	ΗΠΕΙΡΟΣ η Νόστιμη Φέτα	Από παστεριωμένο πρόβειο και γίδινο γάλα. Λίπος επί ξηρού 43% min, Υγρασία 56% max	φέτα	GR 41.2.303 EC	1089288 N		ΝΑΙ	1/6/2014	28/11/2014	28/5/2015
	Λεβέτι Φέτα Βαρελίσια	Ελληνικό από φρέσκο παστεριωμένο αιγοπρόβειο γάλα. Λίπος επί ξηρού 43% min, Υγρασία 56% max	φέτα	ΔΕΝ ΑΝΑΓΡΑΦΕΤ ΑΙ	36227		ΌΧΙ	3/5/2014	31/7/2014	3/5/2015
	ΧΩΡΙΟ βιολογική	Από 100% Ελληνικό παστεριωμένο αιγοπρόβειο γάλα βιολογικής γεωσργίας. Υγρασία 56% max, Λίπος επί ξηρού 43% min	φέτα	GR 20.385 EC	104809/19- 06-2013		ΝΑΙ	19/6/2013	25/8/2014	25/4/2015
	ΦΕΤΑ Όλυμπος	Παστεριωμένο αιγ/βειο γάλα. Αλάτι, πυτιά καλλιέργεια. Υγρασία 56% max, Λίπος επί ξηρού 48% min	φέτα	GR 46.2.1 EC	1203317/1- 7-2014	501311	ΝΑΙ	1/7/2014	13/11/2014	13/5/2015

	ΕΜΠΟΡΙΚΗ ΕΠΩΝΥΜΙΑ	ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΕΙΔΟΣ	ΑΛΦΑΡΙΘΜΙ ΤΙΚΟΣ ΑΡΙΘΜΟΣ ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣ ΗΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΦΕ	LOT	Διατροφική Επισήμανση	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑΣ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΞΗΣ
	ΦΕΤΑ ΚΑΣΤΟΡΙΑΣ	Παράγεται από πρόβειο γάλα 70% και γίδινο γάλα 30% Υγρασία 56% max, Λίπος επί ξηρού 43% min	φέτα	GR 02.2062EU	1331		ΌΧΙ	18/3/2014	10/10/2014	10/4/2015
	Φέτα ΔΩΔΩΝΗ	Από 100% φρέσκο Παστεριωμένο αιγοπρόβειο γάλα. Υγρασία 56% max, Λίπος επί ξηρού 43% min	φέτα	GR 20.2.200EU	619303	1804	ΝΑΙ	18/4/2014	22/12/2014	18/12/2015
	ΦΕΤΑ Mr Grand	ΦΕΤΑ Τυρί σε άλμη κομμένη σε φέτες ΠΟΠ	φέτα	GR 40.90EU	103912/05- 07-14		ΌΧΙ	5/7/2014		16/6/2015
	Delfi Greek feta	Από παστεριωμένο αιγοπρόβειο γάλα. Υγρασία 56% max, Λίπος επί ξηρού 43% min	φέτα	GR 31.2.1037EU	47909		ΌΧΙ	23/7/2014	23/10/2014	23/7/2015
	Κατσικίσιο	Παστεριωμένο κατσικίσιο γάλα πρόβειο γάλα έως 20%. Αλάτι, καλλιέργεια, πυτιά. Υγρασία 56% max, Λίπος επί ξηρού 45% min	Κατσικίσιο	GR26.2.663E C			ΝΑΙ	12/6/2014		20/5/2015

8.2 Απομόνωση DNA

Για την απομόνωση ολικού DNA χρησιμοποιήθηκαν 100mg από κάθε δείγμα Φέτας και το PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen Inc σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή).

Αναλυτικότερα η απομόνωση περιλάμβανε τα παρακάτω στάδια:

1. Με ένα κεκλιμένο μαχαιρίδιο κόβουμε την Φέτα και συνεχίζουμε παίρνοντας ξύσμα απαλά από την επιφάνεια τομής ώστε το ληφθέν δείγμα να είναι εύκολο προς επεξεργασία στο επόμενο στάδιο και βάρους 100mg. Το δείγμα το τοποθετούμε σε φιαλίδια erpendorf των 1,5ml.
2. Προσθέτουμε στο erpendorf 1000μl διαλύματος SSC1X(Αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμαNaCl και Κιτρικού Νατρίου με υπερκάθαρο νερό, και προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος HCl συγκέντρωσης 1M μέχρι το pH να γίνει ουδέτερο pH:7)
3. Έντονη ανάδευση του δείγματος στο Vortex μέχρι να διαπιστώσουμε την διάλυση των 100mg τυριού.
4. Φυγοκεντρούμε στις 10000 στροφές για 3 λεπτά και απομακρύνουμε το λίπος που σχηματίστηκε επιφανειακά στο υγρό μίγμα.
5. Προσθέτουμε 180μl Genomic Digestion buffer και 20 μl πρωτεΐνωση K (10mg/ml) και αναδεύουμε στο Vortex μέχρι να διαλυθεί το ίζημα που σχηματίστηκε από την φυγοκέντρωση.
6. Για την αποφυγή ατυχήματος ή διαρροής υγρού διαλύματος στο στάδιο που ακολουθεί σκεπάζουμε το καπάκι του erpendorf με ταινία Parafilm.
7. Επωάζουμε τα δείγματα στους 55°C για περίπου 1,5 ώρες υπό συνεχή ανάδευση μέχρι να διαλυθεί τελείως το δείγμα.



8. Αφαιρούμε την ταινία Parafilm που τοποθετήσαμε αρχικά και φυγοκεντρούμε τα δείγματα στις 13000 στροφές για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
9. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο υγρό σε νέο καθαρό φιαλίδιο erpendorf των 2ml χωρίς να μεταφέρουμε το υποκείμενο ίζημα που σχηματίστηκε από την φυγοκέντρωση.
10. Προσθέτουμε 20μl RNase A και αναδεύουμε στο vortex.

11. Προσθέτουμε 200μl Genomic lysis / binding buffer ,επαναλαμβάνουμε την ανάδευση στο vortex.
12. Προσθέτουμε 200μl αιθανόλη 96% - 100% και αναδεύουμε έντονα στο vortex.
13. Μεταφέρουμε το μίγμα σε ειδικά erpendorf με στήλες διαχωρισμού.
14. Φυγοκεντρούμε στις 14000 στροφές για 1,5λεπτά.
15. Η στήλη διαχωρισμού μεταφέρεται σε καθαρό erpendorf.
16. Προσθέτουμε 450μl Wash buffer 1 και επαναλαμβάνουμε το βήμα 14
17. Αδειάζουμε το υποκείμενο υγρό και προσθέτουμε στη στήλη 450μl Wash buffer 2 και φυγοκεντρούμε στις 14000 στροφές για 3,5 λεπτά.
18. Τοποθετούμε τη στήλη σε erpendorf των 1,5ml και προσθέτουμε 60μl Elution buffer.
19. Τέλος φυγοκεντρούμε, για 1,5 λεπτά στις 14000 στροφές.
20. Απομακρύνουμε την στήλη και το "διάλυμα" DNA είναι έτοιμο.
21. Αποθηκεύουμε το απομονωμένο DNA στους 4°C για άμεση χρήση και στους -20°C για μελλοντική.



8.3 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Πρόκειται για μια διαδικασία διαχωρισμού τμημάτων DNA που μας δίνει την δυνατότητα να πάρουμε πληροφορίες για το μέγεθος των γραμμικών μορίων, την ποιότητα αλλά και την ποσότητα του DNA.

Η αγαρόζη είναι πολυσακχαρίτης που απαντάται σε φύκια. Διαλυτοποιείται στο νερό σε υψηλές θερμοκρασίες και σχηματίζει καθώς ψύχεται, πήκτωμα.

Η πηκτή αγαρόζης ως ηλεκτροφορητικό μέσο είναι η στατική φάση και αποτελείται από ένα πυκνό δίκτυο ουδέτερων πολυσακχαριτών (επαναλαμβανομένων μονάδων αγαρόζης), των οποίων οι αλυσίδες, σχηματίζουν πόρους κατά το σχηματισμό της πηκτής. Από τους πόρους αυτούς θα κινηθούν τα τμήματα των θραυσμάτων του DNA στην ηλεκτροφόρηση από την κάθοδο προς την άνοδο (Εικ. 4).

Στην παρούσα εργασία, η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε σε δύο φάσεις. Αρχικά μετά την απομόνωση του DNA από τα δείγματα Τυριών που χρησιμοποιήθηκαν, για τον έλεγχο του DNA και στην συνέχεια, μετά την ολοκλήρωση της PCR, για τον έλεγχο της επιτυχίας της αντίδρασης.

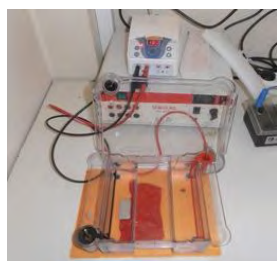
Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης διαχωρίζει τα τμήματα DNA ανάλογα με το μέγεθος και τη στερεοδιάταξή τους (πχ. η υπερελικωμένη κυκλική μορφή, η

ανοιχτή κυκλική μορφή και η γραμμική μορφή DNA του ίδιου μοριακού βάρους έχουν διαφορετική κινητικότητα σε πηκτώματα αγαρόζης καθώς μεταβάλετε η τριβή τους με την στατική φάση και άρα μεταβάλετε η διαχωριστική ικανότητα του πηκτώματος).

Η θέση του DNA στο πήκτωμα προσδιορίζεται άμεσα με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου, μίας ένωσης που δεσμεύεται στο DNA και φθορίζει υπό την επίδραση του υπεριώδους φωτός (Εικ. 5). Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι καρκινογόνο και απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή κατά το χειρισμό του.

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.

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων απαιτείται η προσθήκη loading buffer ώστε να γίνεται εφικτή η παρακολούθηση της μετακίνησης των δειγμάτων κατά την ηλεκτροφόρηση, και να κατακάθονται τα δείγματα στις θέσεις της πηκτής λόγω της μεγαλύτερης πυκνότητάς τους. Τα loading buffers περιέχουν ως επί το πλείστον γλυκερόλη, σουκρόζη και φυκόλη έτσι ώστε να καταβυθίζεται το DNA καθώς και χρωστικές για να είναι εύκολη η παρατήρηση της προόδου της ηλεκτροφόρησης. Οι χρωστικές που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι το κυανό του ξυλενίου και το μπλε της βρωμοφαινόλης. Τα κυριότερα ρυθμιστικά διαλύματα (buffers) που χρησιμοποιούνται στις ηλεκτροφορήσεις αγαρόζης είναι το TAE (Tris acetate EDTA) και το TBE (Tris borate EDTA). Το TAE προσφέρει καλύτερη ανάλυση για μεγάλα τμήματα DNA. Αυτό σημαίνει χαμηλότερη τάση, περισσότερος χρόνος αλλά καλύτερο προϊόν. Επίσης Το TAE έχει μικρότερη ρυθμιστική ικανότητα και εξαντλείται εύκολα σε παρατεταμένες ηλεκτροφορήσεις.



Εικόνα 4: Συσκευή ηλεκτροφόρησης



Εικόνα 5: Συσκευή υπεριώδους

Η συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα καθορίζεται κυρίως από το μέγεθος του DNA που θα αναλυθεί (Πίνακας 4). Χαμηλές συγκεντρώσεις χρησιμοποιούνται στον διαχωρισμό μεγάλων μορίων DNA, ενώ υψηλές συγκεντρώσεις αγαρόζης στην ανάλυση μορίων μικρού μεγέθους.

Πίνακας 4. Συγκεντρώσεις αγαρόζης για τον διαχωρισμό διαφόρων μεγεθών DNA

Αγαρόζη (% w/v)	DNA μέγεθος (kb)
0,3	5-60
0,5	1-30
0,7	0,8-12
1,0	0,5-10
1,2	0,4-7
1,5	0,2-3
2,0	0.1-2

Για την τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω διαλύματα:

TAE 50x (500ml)

Tris Base 2M

Acetic Acid 7,7%

EDTA 0,05M

ddH₂O έως τα 500ml

Loading buffer 6x (10ml)

Bromophenol blue 0.1% w/v

TBE 1X

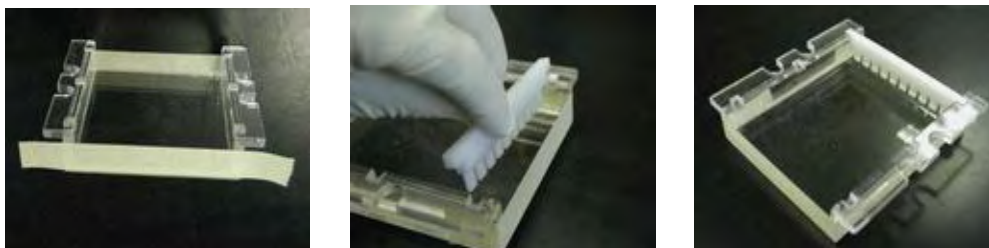
Glycerol 8,7%

ddH₂O έως τα 10ml

Αρχικά, παρασκευάζουμε διάλυμα TAE 1x αραιώνοντας το πυκνό διάλυμα 50x (20ml σε τελικό όγκο 1lt).

Για την προετοιμασία της πηκτής αγαρόζης ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

1. Προετοιμασία του εκμαγείου στο οποίο θα στερεοποιηθεί η πηκτή(Εικ. 6).



Εικόνα 6: Προετοιμασία εκμαγείου

2. Προετοιμασία της πηκτής. Σε κωνική φιάλη ζυγίσαμε 1g αγαρόζης και προσθέσαμε 50ml TAE 1x για την παρασκευή διαλύματος 2%.
3. Θέρμανση του διαλύματος σε φούρνο μικροκυμάτων. Κατά τη θέρμανση πρέπει να γίνεται περιοδικά ανάδευση του διαλύματος μέχρι να γίνει διαυγές.
4. Το διάλυμα ανακινείται έως ότου κρυώσει στους 55° - 60°C.
5. Προστίθενται 5μl βρωμιούχου αιθιδίου (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. Ηρεμία του πηκτώματος (πάχος 3–5 mm) σε θερμοκρασία δωματίου για 30–40 λεπτά.

9. Όταν η πηκτή στερεοποιηθεί απομακρύνεται το χτενάκι.



10. Τοποθέτηση της πηκτής μαζί με τη μήτρα σε μία συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει TAE 1x.
11. Στην περίπτωση του ελέγχου της απομόνωσης αναμειγνύουμε 3μl loading buffer με 2μl DNA, στην περίπτωση ελέγχου της αντίδρασης της PCR αναμειγνύουμε 3μl loading buffer με 5μl DNA (προϊόν της PCR) και στη συνέχεια εισαγωγή των δειγμάτων στις θέσεις της πηκτής.

12. Το δείγμα μεταφέρετε στο πηγάδι εισάγοντας την άκρη του ακρορρύγχιου και αδειάζοντας το δείγμα αργά. Προσοχή χρειάζεται να μην τρυπήσει το πηγάδι με το ακρορρύγχιο.



Η τάση στην συσκευή ηλεκτροφόρησης ρυθμίζεται στα 100V. Μετά από περίπου 40 λεπτά είναι δυνατή η παρατήρηση των ζωνών του DNA στην πηκτή αφού τοποθετηθεί στη συσκευή UV.

Για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης το gel τοποθετείται σε ένα θάλαμο, όπου κάτω από UV light και με τη βοήθεια του βρωμιούχου αιθιδίου τα τμήματα του DNA γίνονται ορατά. Με την κάμερα που είναι ενσωματωμένη στο θάλαμο υπάρχει δυνατότητα για λήψη φωτογραφιών. Όλοι οι χειρισμοί γίνονται με έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή με τον οποίο ο θάλαμος είναι συνδεδεμένος.

8.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης - PCR (polymerase chain reaction).

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) είναι μια μέθοδος που αναπτύχθηκε το 1985 από τους Mullis και Silverstein και άρχισε να χρησιμοποιείται ευρέως το 1987 με την χρήση θερμοανθεντικών DNA πολυμερασών. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης(PCR) είναι μία μέθοδος της βιοχημείας και μοριακής βιολογίας η οποία επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA *in vitro*, μέσω της ενζυμικής αναπαραγωγής του DNA καθώς τα συγκεκριμένα θραύσματα DNA μπορούν να πολλαπλασιαστούν σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα απουσία ζωντανών κυττάρων.

Είναι μια σχετικά απλή μέθοδος πολλαπλασιασμού μιας επιλεγμένης από τους εκκινητές αλληλουχίας DNA με τη βοήθεια του ενζύμου DNA-πολυμεράση και επιτυγχάνεται με επαναλαμβανόμενους κύκλους τριών διαδοχικών αντιδράσεων, που επιτελούνται σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Η τεχνική της PCR θεωρείται εξαιρετικά ευαίσθητη, δεδομένου ότι το τελικό προϊόν της ανέρχεται στο ένα δισεκατομμύριο αντίγραφα της αρχικής αλληλουχίας. Οι παραλλαγές αυτής της τεχνικής αναπτύχθηκαν σταδιακά και ικανοποιούν διαφορετικές εργαστηριακές απαιτήσεις, που σχετίζονται με την ευαισθησία, τη σύγκριση και ποσοτικοποίηση, την ειδικότητα και ακρίβεια της τεχνικής.

Παρά την επανάσταση της επιστημονικής έρευνας, η αρχή της βασικής μεθόδου της PCR είναι αρκετά απλή και περιλαμβάνει μια αντίδραση τριών σταδίων, της θερμικής μετουσίωσης, την υβριδοποίηση των εκκινητών και την επέκταση των εκκινητών.

Μια τυπική αντίδραση ενισχύσεως αποτελείται από:

- το DNA στόχο
- μια θερμοσταθερή DNA πολυμεράση
- δυο εκκινητές ολιγονουκλεοτιδίων
- τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτιδίου (dNTPs)
- ρυθμιστικό διάλυμα
- και το μαγνήσιο.

Η PCR βασίζεται στον ενζυμικό πολλαπλασιασμό μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA που οριοθετείται δεξιά και αριστερά από δύο **εκκινητές-ολιγονουκλεοτίδια (primers)**. Η αλληλουχία του κάθε εκκινητή είναι συμπληρωματική προς τη μία από τις δύο αλυσίδες του δίκλωνου DNA-εκμαγείου. Η αλληλουχία αυτή χρησιμοποιείται για το σχεδιασμό δυο συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων, ενός συμπληρωματικού προς το 3' άκρο της μιας αλυσίδας του DNA και ενός συμπληρωματικού προς το 3' άκρο της άλλης αλυσίδας. Τα ολιγονουκλεοτίδια αυτά μήκους 20-30 βάσεων χρησιμοποιούνται ως πρωταρχικά τμήματα (εκκινητές) για σύνθεση DNA *in vitro* και οριοθετούν τα άκρα του τελικού προϊόντος. Αυτό το κομμάτι θα επιλεγεί και θα πολλαπλασιαστεί πολλές φορές με τη συνεργασία άλλων μορίων. Συγκεκριμένα, μια **Taq DNA πολυμεράση**, η οποία βάσει ενός πρότυπου δίκλωνου DNA και παρουσία κατάλληλου **ρυθμιστικού διαλύματος** και ενός ζεύγους ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών, των τεσσάρων τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (**dNTPs** : dATP, dCTP, dGTP, dTTP), και ιόντων Μαγνησίου (**Mg⁺⁺**) συνθέτει εκατομμύρια νέα πιστά αντίγραφα μόρια DNA, ως προς εκείνο το τμήμα της ακολουθίας του αρχικού εκμαγείου, το οποίο περικλείεται ανάμεσα στους DNA εκκινητές.

Οι εκκινητές, όπως αναφέρθηκε, καθορίζουν τα όρια της περιοχής που πρόκειται να ενισχυθεί. Το ρυθμιστικό διάλυμα καθορίζει το ιοντικό περιβάλλον (κυρίως το pH) της αντίδρασης στο βέλτιστο για τη δράση της πολυμεράσης. Ιδανικό pH θεωρείται γύρω στο 8,4 ενώ για μήτρα μεγάλου μήκους προτείνεται το pH 9,0. Τα ιόντα μαγνησίου μετέχουν στη διαδικασία υβριδισμού των εκκινητών.

Τα dNTPs συνιστούν τα δομικά υλικά των μορίων DNA που θα συντεθούν, ενώ επίσης προσφέρουν και την ενέργεια για την επιμήκυνση. Η όλη αντίδραση σχηματισμού των νέων μορίων καταλύεται από το ένζυμο πολυμεράση. Η Taq πολυμεράση προέρχεται από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus*, είναι θερμοσταθερή διατηρώντας την δραστηρότητά της σε θερμοκρασία 95°C για τουλάχιστον 40 λεπτά (Mullis et al., 1987).

Για την διαδικασία της PCR το πρώτο βήμα είναι η παρασκευή ενός κοινού διαλύματος (master mix). Ο τρόπος υπολογισμού των ποσοτήτων αντιδραστηρίων ανά δείγμα, καθώς και οι συνολικές ποσότητες στο κοινό διάλυμα παρουσιάζονται στο Πρωτόκολλο PCR (Πίνακες 5-7) που ακολουθεί. Το διάλυμα (master mix) παρασκευάζεται ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων που θα χρησιμοποιηθούν.

Πίνακας 5. Συγκεντρώσεις μητρικών Διαλυμάτων και τελικές Συγκεντρώσεις ανά δείγμα

Διαλύματα	Συγκέντρωση ανά δείγμα	Ποσότητα ανά δείγμα (50 µl)	Συνολικός όγκος mastermix(µl) (x15)
Taq Buffer 10X	1X		

MgCl₂100mM	2mM		
dNTPs 40mM	0,8mM		
Forward Primer 50μM	1μM		
Reverse Primer 50μM	1μM		
Taq 5u/μl	0,02 units		
ddH₂O			
PCR Mix			
DNA template	50ng	2	
total		50	

Πίνακας 6. Υπολογισμός όγκου κάθε διαλύματος ανά δείγμα

Διαλύματα	Συγκέντρωση ανά δείγμα	Ποσότητα ανά δείγμα (50 μl)	Συνολικός όγκος mastermix (μl) (x15)
Taq Buffer 10X	1X	5	
MgCl₂100mM	2mM	1	
dNTPs 40mM	0,8mM	1	
Forward Primer 50μM	1μM	1	
Reverse Primer 50μM	1μM	1	
Taq 5u/μl	0,02 units	0,2	
ddH₂O		38,8	
PCR Mix		48	
DNA template	50ng	2	
total		50	

*dNTPs: 40mM x V1= 0,8mM x 50μl => V1= 1μl

Πίνακας 7. Υπολογισμός Συνολικού όγκου δείγματος

Διαλύματα	Συγκέντρωση ανά δείγμα	Ποσότητα ανά δείγμα (50 μl)	Συνολικός όγκος mastermix(μl) (x15)
Taq Buffer 10X	1X	5	75
MgCl₂100mM	2mM	1	15
dNTPs 40mM	0,8mM	1	15
Forward Primer 50μM	1μM	1	15
Reverse Primer 50μM	1μM	1	15
Taq 5u/μl	0,02 units	0,2	3
ddH₂O		38,8	582
PCR Mix		48	
DNA template	50ng	2	
total		50	

**Συνολικός αριθμός αντιδράσεων = Αριθμός των δειγμάτων + 10% π.χ.
14δείγματα + 10%≈15 αντιδράσεις**

Μετά τον υπολογισμό του τελικού διαλύματος και την παρασκευή του, αναδεύεται το δείγμα στο Vortex για να γίνει καλή ανάμιξη των συστατικών του.

Σε φιαλίδια erppendorf τοποθετείται το δείγμα DNA, το οποίο είναι συγκέντρωσης 50-250ng/μl. Στη συνέχεια μοιράζουμε σε κάθε erppendorf που περιέχει το DNA, από 49μl του τελικού διαλύματος. Επίσης, σε ένα erppendorf το οποίο δεν περιέχει DNA βάζουμε το τελικό διάλυμα (μάρτυρας) ώστε να συγκρίνουμε το προϊόν PCR με τον μάρτυρα. Τα erppendorf φυγοκεντρώνονται και μεταφέρονται στον θερμοκυκλοποιητή, ο οποίος προγραμματίζεται να εκτελέσει το επιθυμητό πρόγραμμα θερμοκρασίας /χρόνου. Η διαδικασία πραγματοποιείται σε κύκλους (συνήθως 35-40). Ο κάθε κύκλος έχει ως αποτέλεσμα εκθετικό πολλαπλασιασμό του DNA-στόχου. Έτσι ο DNA-στόχος, από αρχική ποσότητα δείγματος μη ανιχνεύσιμου με κλασικές τεχνικές υβριδισμού, ενισχύεται σε σημείο που να γίνει ευρέως ανιχνεύσιμος.

Η διαδικασία της PCR χωρίζεται σε τρεις φάσεις:

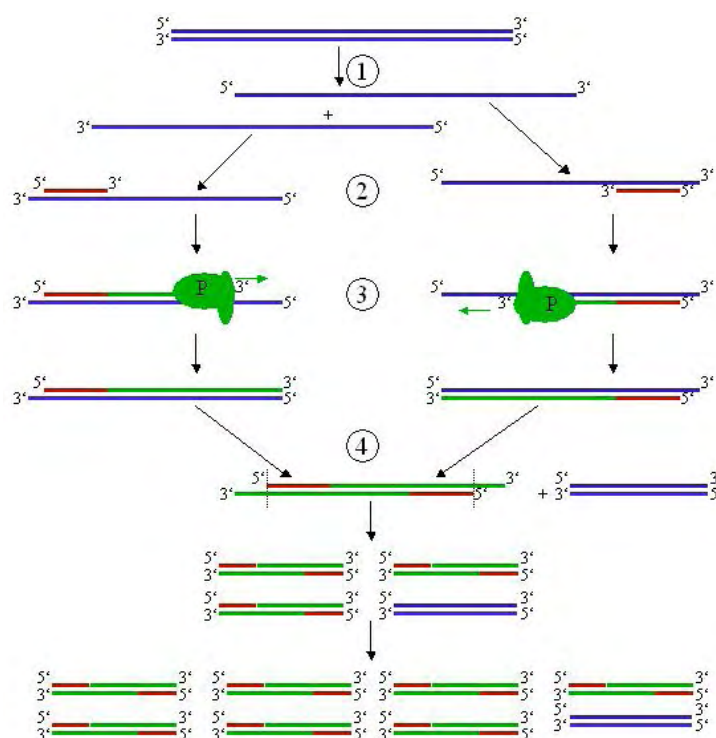
- **Εκθετική (exponential) φάση:** Είναι η φάση κατά την οποία έχει αρχίσει ο πολλαπλασιασμός της προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA. Σ' αυτή την φάση η αντίδραση είναι πολύ αποτελεσματική και σε κάθε κύκλο διπλασιάζεται η προεπιλεγμένη αλληλουχία DNA.
- **Γραμμική (linear) φάση:** Η φάση στην οποία παρατηρείται μειωμένη παραγωγή αντιγράφων της αλληλουχίας DNA εξαιτίας της μείωσης της ενεργότητας των αντιδραστηρίων.
- **Φάση Plateau:** Στη φάση αυτή έχει σταματήσει η αντίδραση PCR καθώς και η παραγωγή νέων αντιγράφων εξαιτίας της εξάντλησης των αντιδραστηρίων (Applied Biosystems).

Η τεχνική της PCR πραγματοποιείται σε κύκλους (Εικ. 7). Κάθε κύκλος της πραγματοποιείται σε τρία στάδια και έχει ως αποτέλεσμα τον εκθετικό πολλαπλασιασμό του DNA στόχου.

- **Στάδιο Αποδιάταξης (denaturation):** το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο. Η θέρμανση του διαλύματος σε υψηλή θερμοκρασία (94°-95°C), για ορισμένο χρονικό διάστημα (συνήθως ένα με δύο λεπτά) προκαλεί διαχωρισμό των δύο κλώνων του DNA (διάσπαση των δεσμών υδρογόνου).
- **Στάδιο Υβριδοποίησης των εκκινητών (annealing):** εδώ γίνεται η σύνδεση των εκκινητών σε καθένα από τους δύο κλώνους του DNA. Η θερμοκρασία στο στάδιο αυτό εξαρτάται από τις θερμοδυναμικές ιδιότητες των εκκινητών (50°-65°C). Στην περίπτωση που η θερμοκρασία που εφαρμόζεται

είναι λάθος, μπορεί να προκαλέσουμε τη μη σύνδεση των εκκινητών στο μητρικό DNA.

- **Στάδιο επιμήκυνσης (extension):**(συνήθως 70°-72°C) στο οποίο εκδηλώνεται η ενζυμική δράση της πολυμεράσης και πραγματοποιείται η σύνθεση των συμπληρωματικών αλυσίδων με επιμήκυνση των υβριδισμένων εκκινητών με κατεύθυνση 5'-3', χρησιμοποιώντας τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια και έχοντας ως εκμαγείο τις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA. Στο τέλος του σταδίου αυτού έχουν διπλασιαστεί τα μόρια DNA της περιοχής υπό ενίσχυση και ολοκληρώνεται ένας κύκλος της αντίδρασης PCR.



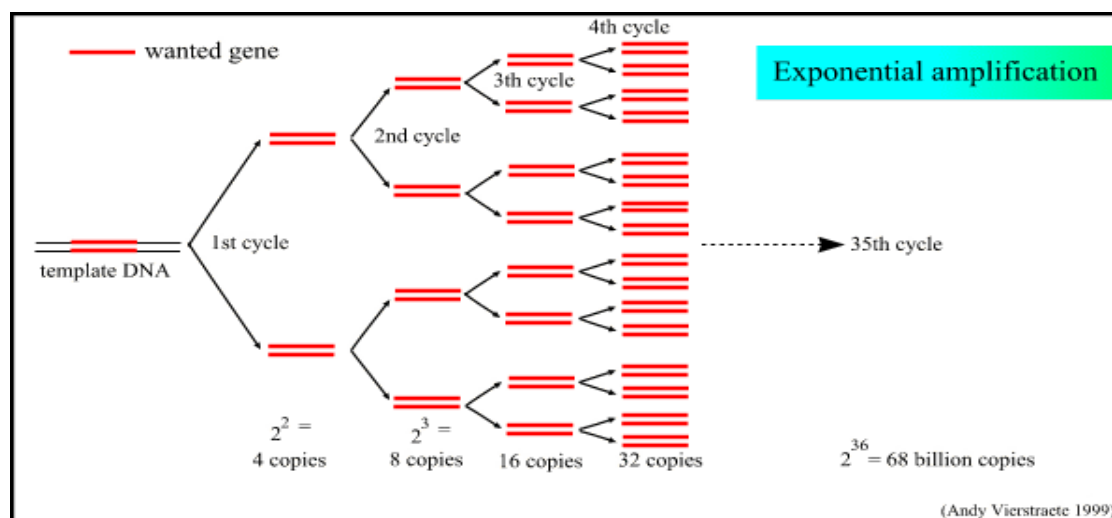
Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση της PCR.

Για τις ανάγκες της συγκεκριμένης εργασίας το επιθυμητό πρόγραμμα συνθηκών θερμοκρασίας / χρόνου που εκτελέστηκε ξεκινούσε με ένα στάδιο αρχικής αποδιάταξης (95°C για 10' λεπτά), ώστε να πραγματοποιηθεί πλήρης αποχωρισμός των αλυσίδων του ολικού DNA. Στην συνέχεια ακολουθήθηκαν τα στάδια της αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης. Η διάρκεια του κάθε σταδίου ήταν 40'' και ο συνολικός χρόνος του κάθε κύκλου δεν υπερέβαινε συνήθως τα δύο λεπτά (2'). Το πρόγραμμα PCR περιλάμβανε 35 κύκλους (Πίνακας 8). Μετά το τέλος των 35 κύκλων υπήρχε μία τελική φάση επιμήκυνσης (72°C για 10' λεπτά) προκειμένου να γίνει πλήρης σύνθεση όλων των μορίων που έχουν

συντεθεί από τη διαδικασία. Ο συνολικός χρόνος εκτέλεσης της μεθόδου διήρκεσε λιγότερο από δύο ώρες για να πάρουμε τελικός έναν ενισχυμένο της τάξεως των 2^{35} μορίων (Εικ.8).

Πίνακας 8: Συνθήκες χρόνου και θερμοκρασίας ανά φάση και στάδιο που εφαρμόστηκαν στη μελέτη

PCR Συνθήκες			
Στάδιο	°C	Χρόνος	
Πρώτο Βήμα	95 °C	10'	1 κύκλος
Αποδιάταξης	95 °C	40''	35 κύκλοι
Υβριδοποίησης	53 °C- 55° C	40''	
Επιμήκυνσης	72 °C	40''	
Τελικό βήμα	72 °C	10'	1 κύκλος
Αριθμός κύκλων	35		



Εικόνα 8: Εκθετικός πολλαπλασιασμός του DNA-στόχου

(<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20EN/Session06.pdf>)

Το κύριο προϊόν της εκθετικής αυτής αντίδρασης είναι ένα δίκλωνο τμήμα DNA του οποίου τα άκρα ορίζονται από τα 5' άκρα των εκκινητών και έχει μήκος ίσο με την απόσταση των εκκινητών.

Για τον πολλαπλασιασμό του γονιδίου 12S rRNA χρησιμοποιήσαμε τους εκκινητές 12S RNA Fw και 12S RNA Rv. Η αλληλουχία των εκκινητών παρουσιάζεται στον Πίνακα 9.

Πίνακας 9. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμημάτων DNA αίγας.

12S rRNA Fw	5' - GAAAGTAACCCTACTGCAGCT -3'
12S rRNA Rv	5' - GGCGAATAATTTTGTTCCTG-3'

Μετά την ολοκλήρωση της PCR γίνεται ανίχνευση του DNA χρησιμοποιώντας ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, ώστε να ελεγχτεί η επιτυχία της PCR.

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε η αντίδραση της PCR με σκοπό να εξακριβωθεί η εξειδίκευση των εκκινητών σε συγκεκριμένη ακολουθία 12S rRNA του mtDNA αίγας και να αποκλειστεί η περίπτωση της νοθείας με την προσθήκη γάλακτος άλλων ειδών ζώων πλην του προβάτου που προβλέπεται από τη νομοθεσία κατά την παρασκευή της φέτας.

8.5 Real-Time PCR

Η real-time PCR πρωτοεμφανίστηκε το 1993 από τον Higuchi και τους συνεργάτες του. Η μέθοδος είναι παρόμοια με αυτή της συμβατικής PCR, με τη διαφορά ότι η ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος μετριέται σε κάθε κύκλο διότι συνδέεται με φθορίζουσα χρωστική που ανιχνεύεται από την συσκευή.

Παρόλο που η μέθοδος της Real-time PCR στηρίζεται στις βασικές αρχές της PCR παρουσιάζει μεγαλύτερη ακρίβεια, αποδοτικότητα και απαιτείται λιγότερος χρόνος απ' ότι η PCR δίνοντας την δυνατότητα παρακολούθησης της πορείας σύνθεσης του DNA σε κάθε κύκλο της αντίδρασης. Το διάλυμα της αντίδρασης της Real-Time PCR αποτελείται από τα ίδια αντιδραστήρια με αυτά της συμβατικής PCR έκτος από τους μηχανισμούς ανίχνευσης DNA που αφορούν την προσθήκη συγκεκριμένων χρωστικών (Houghton et al, 2006).

Τα δείγματα προς ανάλυση παρακολουθούνται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης με την βοήθεια ενός ενσωματωμένου αυτοματοποιημένου μηχανισμού ειδικού για την Real-time PCR το οποίο παρέχει την δυνατότητα να μετράται ο φθορισμός που εκπέμπεται από τους ιχνηθέτες δηλαδή την σήμανση των αντιγράφων με φθορίζοντα μόρια, από τα πρώτα στάδια της αντίδρασης (εκθετική φάση). Στη συνέχεια το σήμα ανίχνευσης του DNA μεταβιβάζεται στον υπολογιστή μετά από κάθε κύκλο της αντίδρασης προς ανάλυση και ποσοτικοποίηση με την χρήση του κατάλληλου λογισμικού.

Η Real-Time PCR πραγματοποιείται σε ένα μικρό αρχικό δείγμα μονόκλωνου ή δίκλωνου DNA. Για να πραγματοποιηθεί χρειάζεται η παρουσία:

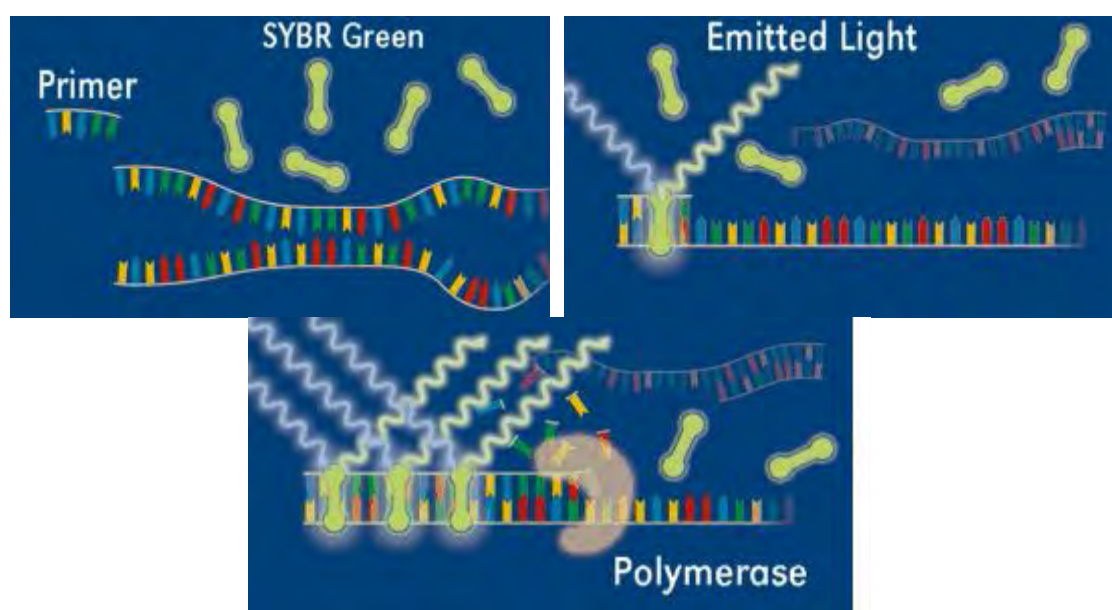
- **Δύο ολιγονουκλεϊκών εκκινητών**, που υβριδίζονται με την αλληλουχία-στόχο DNA, που πρόκειται να ενισχυθεί.
- **Μόρια dNTPs** των τεσσάρων τριφωσφορικών δεοξυ-νουκλεοτιδίων (**dNTPs** : dATP, dCTP, dGTP, dTTP), τα οποία είναι προτιμότερο να προμηθεύονται μαζί με την DNA πολυμεράση από τον ίδιο προμηθευτή.

- **Ένζυμο DNA πολυμεράση** (Taq πολυμεράση) η οποία είναι σταθερή σε υψηλές θερμοκρασίες, και έχει καθοριστικό ρόλο στην επίδοση της αντίδρασης της Real-Time PCR. Ένας από τους κυριότερους παράγοντες που επηρεάζουν την εξειδίκευση της Real-Time PCR, είναι το γεγονός ότι η Taq DNA πολυμεράση έχει υπολειμματική δράση σε χαμηλές θερμοκρασίες. Οι εκκινητές είναι δυνατόν να υβριδίζονται μη επιλεκτικά στο DNA, επιτρέποντας έτσι στην πολυμεράση να συνθέτει μη επιλεκτικά προϊόντα. Αυτό μπορεί να ελαχιστοποιηθεί με τη χρήση ενός "θερμού εκκινητή", ο οποίος εξασφαλίζει ότι η DNA πολυμεράση δεν είναι ενεργή στο αρχικό στάδιο της αποδιάταξης του DNA.
- **Ιόντα μαγνησίου**, ως χλωριούχο μαγνήσιο ή θειϊκό μαγνήσιο, σε συγκεντρώσεις μεταξύ 3-6 mM (για την Real-time PCR χρησιμοποιείται συγκέντρωση 3 mM). Απουσία ελεύθερου μαγνησίου στην αντίδραση η DNA πολυμεράση θα είναι ανενεργή, καθώς μετέχουν στη διαδικασία υβριδισμού των εκκινητών.
- **Το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης της PCR** είναι υπεύθυνο για την δημιουργία ενός περιβάλλοντος με κατάλληλο pH και ιοντική ισχύ για βέλτιστη δραστηριότητα της DNA πολυμεράσης. Λόγω των διαφορετικών απαιτήσεων των διάφορων DNA πολυμερασών τα ρυθμιστικά διαλύματα της αντίδρασης διατίθενται συνήθως μαζί με την DNA πολυμεράση και πιο συχνά ως συμπυκνωμένο διάλυμα 10X.
- **Οι εκκινητές (primers)** είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, συνήθως 18-24 βάσεων, τα οποία χρησιμοποιούνται από την πολυμεράση ως εναρκτήρια τμήματα για την σύνθεση του DNA. Σχεδιάζονται κατά τέτοιο τρόπο ώστε να υβριδοποιούνται (προσδένονται) στα άκρα της αλληλουχίας-στόχου με το ελεύθερο 3' υδροξύλιό τους προσανατολισμένο προς το εσωτερικό του τμήματος DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί κατά την αντίδραση PCR. Ο σωστός σχεδιασμός των εκκινητών αποτελεί μια κρίσιμη παράμετρο για την επιτυχία της αντίδρασης. Οι δύο εκκινητές πρέπει να έχουν παραπλήσια θερμοκρασία αποδιάταξης (T_m) ώστε να υβριδοποιούνται στα άκρα της αλληλουχίας-στόχου στην ίδια θερμοκρασία. Προσοχή θα πρέπει να δοθεί στην ακολουθία των νουκλεοτιδίων των εκκινητών ώστε να αποφευχθεί η συμπληρωματικότητα και ο υβριδισμός μεταξύ τους (primer-dimer). Για τον σχεδιασμό της αλληλουχίας των εκκινητών, υπάρχουν διαθέσιμα λογισμικά για την ανάλυση των αλληλουχιών-στόχων, και με βάση αυτά είναι δυνατός ο ακριβής σχεδιασμός των εκκινητών.

Στην ποσοτική πραγματικού χρόνου PCR, η ενίσχυση του γονιδίου στόχου παρακολουθείται με αυξημένο σήμα φθορισμού το οποίο επιτρέπει την άμεση αξιολόγηση των αποτελεσμάτων μετά την εφαρμογή της PCR χωρίς επιπλέον

βήματα ανίχνευσης. Για την μέθοδο αυτή είναι διαθέσιμα δύο μορφές συσχέτισμού των PCR προϊόντων με το σήμα φθορισμού.

Η πρώτη μέθοδος είναι να χρησιμοποιούν χρωστικές παρεμβολής φθορισμού όπως SYBR Green (López-Andreo et al., 2006; Walker et al., 2003). Αυτός ο τύπος της χρωστικής συνδέονται με όλα τα δίκλινα DNA που είναι παρόν, συμπεριλαμβανομένων και των οποιαδήποτε μη-ειδικών προϊόντων της PCR. Η ουσία αυτή φθορίζει έντονα πράσινο χρώμα και διεγείρεται με ακτινοβολία μήκους κύματος 497 nm και εκπέμπει στα 520 nm. Σημειώνεται ότι η SYBR green δεν φθορίζει όταν βρίσκεται ελεύθερη στο διάλυμα. Ωστόσο, η ενσωμάτωσή της στο DNA κατά τη σύνθεσή του, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού (Εικόνα 13) (Wilhelm et al., 2003).



Εικόνα 13: Περιγραφή της λειτουργίας της χρωστικής SYBR green (I) Όταν η χρωστική βρίσκεται ελεύθερη στο διάλυμα δεν παράγεται φθορισμός. (II) Η ενσωμάτωσή της στο DNA κατά τη σύνθεσή του σε συνδυασμό με τη διεγερσή της με ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού. (III) Η ένταση του φθορισμού αυτού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος.

([http://nemertes.lis.upatras.gr/jspui/bitstream/10889/6196/1/Nemertes_Essa\(f\).pdf](http://nemertes.lis.upatras.gr/jspui/bitstream/10889/6196/1/Nemertes_Essa(f).pdf))

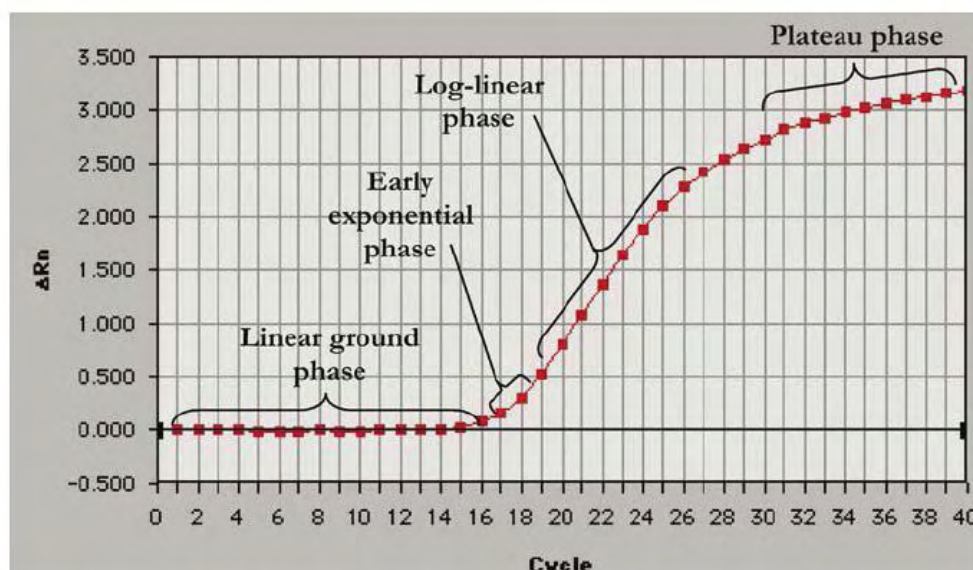
Η ένταση του φθορισμού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος. Επομένως η ένταση του σήματος σε κάθε βήμα της αντίδρασης PCR αυξάνει καθώς αυξάνει και η συγκέντρωση του προϊόντος. Το γεγονός αυτό παρέχει μια απλή και αξιόπιστη μέθοδο ελέγχου της real-time PCR. Ακόμη ένα πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η χρήση μη τροποποιημένων αφετηριών, η οποία διευκολύνει τον σχεδιασμό και την σύνθεση των αφετηριών με χαμηλό κόστος σε σχέση με τις άλλες μεθόδους real-time PCR. Επιπλέον η SYBR green επιτρέπει και ποιοτική ανάλυση, με βάση τη μελέτη της καμπύλης αποδιάταξης του προϊόντος, δεδομένου ότι κάθε προϊόν ανάλογα με το μέγεθος του έχει μια χαρακτηριστική θερμοκρασία τήξης (T_m). Η θερμοκρασία τήξης (T_m)

μπορεί να χρησιμοποιηθεί επομένως ως διαγνωστικό στοιχείο, εφόσον η αναπαραγωγή του πειράματος γίνεται κάτω από αυστηρά καθορισμένες συνθήκες.

Το κύριο μειονέκτημα της χρωστικής SYBR green είναι ότι συνδέεται και στα μη ειδικά προϊόντα, με αποτέλεσμα να αυξάνεται τεχνητά το σήμα φθορισμού και εσφαλμένα αυξάνονται οι τιμές του δείγματος (Wilhelm et al., 2003). Γι' αυτό το λόγο πρέπει να γίνεται σαφής διαφοροποίηση μεταξύ ειδικών και μη ειδικών προϊόντων, όταν χρησιμοποιούμε ανάλυση της καμπύλης αποδιάταξης.

Η δεύτερη πιο ακριβής και αξιόπιστη μέθοδος είναι η χρήση φθορισμού με ανιχνευτές. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί έναν πρόσθετο εκκινητή, τον ανιχνευτή, ο οποίος δεσμεύεται επίσης ειδικά με την αλληλουχία DNA στόχο κατά το στάδιο συγκολλησεως. Το σύμπλοκο ανιχνευτή – υποστρώματος είναι η βάση για την μέθοδο TaqMan (Hird et al., 2004; Krcmar & Rencova, 2005; Rodriguez, Garcia, Gonzalez, Hernandez, & Martyn, 2005; Zhang, Fowler, Scott, Lawson, & Slater, 2007).

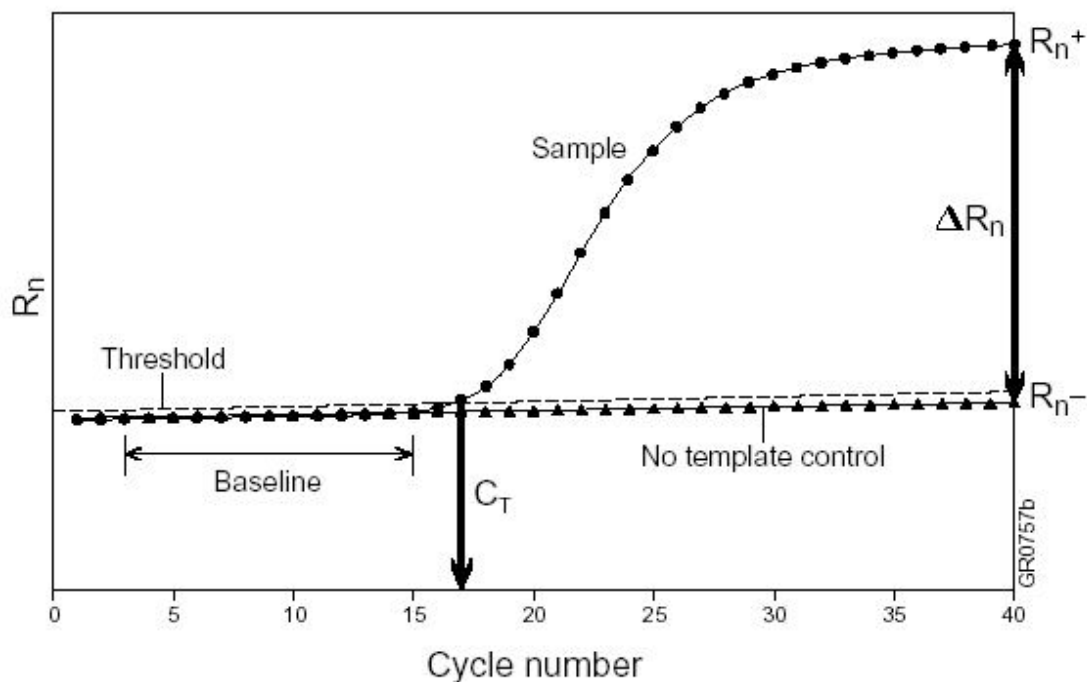
Από την ανάγνωση της έντασης φθορισμού σε κάθε κύκλο σχηματίζεται η **καμπύλη ενίσχυσης** που χωρίζεται σε τρεις φάσεις: την εκθετική, τη γραμμική και τη φάση κορεσμού (Εικ. 9). Κατά την εκθετική φάση (exponential phase), σε κάθε κύκλο της αντίδρασης πραγματοποιείται ακριβής διπλασιασμός του προϊόντος, καθώς όλα τα απαραίτητα για την PCR συστατικά (π.χ. dNTPs, εκκινητές, πολυμεράση) βρίσκονται σε περίσσεια (100% αποδοτικότητα). Καθώς συνεχίζεται η αντίδραση, επέρχεται η γραμμική φάση (log-linear phase) κατά την οποία κάποια από τα αντιδραστήρια αρχίζουν να εξαντλούνται, ενώ παράλληλα συσσωρεύονται, σταδιακά, αναστολείς. Στη συγκεκριμένη φάση, η αντίδραση της ενίσχυσης επιβραδύνεται, καθώς μειώνεται η αποδοτικότητα της και τελικά σταματάει εντελώς, οπότε η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε σημείο κορεσμού (plateau phase). Το σημείο κορεσμού διαφέρει μεταξύ των δειγμάτων και εξαρτάται από τις κινητικές των αντιδράσεών τους.



Εικόνα 9:Χαρακτηριστική καμπύλη ενίσχυσης, όπου διακρίνονται η εκθετική (Exponential) η γραμμική (Logline) και η φάση κορεσμού(plateau)
(http://d1mqv16b9gxt7.cloudfront.net/images/22_INTRO-PCR-GR_re.pdf)

Η ένταση φθορισμού λοιπόν, αντανακλά την ποσότητα των σχηματισμένων προϊόντων. Οι τιμές φθορισμού στα πρώιμα στάδια της εκθετικής φάσης ενίσχυσης μπορούν να αποτελέσουν ένα αξιόπιστο και επαναλήψιμο μέτρο ποσοτικού προσδιορισμού, των ενισχυμένων ποσοτήτων DNA από το πρότυπο δείγμα.

Η πρώτη σημαντική αύξηση στην ποσότητα του προϊόντος της PCR (**Ct - threshold cycle**) σχετίζεται με την αρχική ποσότητα του DNA που υπάρχει στο δείγμα (Εικ. 10). Η γραμμή **Threshold** είναι το σημείο στο οποίο ξεχωρίζει έντονα το φθορίζον σήμα των προϊόντων της Real time PCR από το υπόβαθρο, ενώ ο κύκλος κατά την διάρκεια του οποίου, το δείγμα θα φτάσει την γραμμή Threshold ονομάζεται **Threshold cycle (Ct)** ή **τιμή Ct** (Applied Biosystems, Introduction to Quantitative PCR Methods and Applications Guide, Stratagene). Όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα της αρχικής αλληλουχίας DNA στο κάθε δείγμα τόσο νωρίτερα θα εμφανιστεί η τιμή **Ct** για κάθε δείγμα, δηλαδή αναλογικά η Ct θα είναι μικρότερη (Wong et al, 2005).



Εικόνα 10: Το σημείο κατά το οποίο το κάθε δείγμα εισέρχεται στην εκθετική φάση της αντίδρασης, ορίζεται ως το «κατώφλι» μεταβολής του ρυθμού αύξησης της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος (Threshold Cycle ή CT). Με την οριοθέτηση του σημείου threshold γίνεται πιο εύκολος ο προσδιορισμός της τιμής Ct

(<http://www.hms.org.gr/updocuments/%CE%9C%CE%9F%CE%A1%CE%99%CE%91%CE%9A%CE%95%CE%A3%20%CE%A4%CE%95%CE%A7%CE%9D%CE%99%CE%9A%CE%95%CE%A3%202012.pdf>)

Για να είναι πιο ακριβή τα αποτελέσματα, στις αντιδράσεις της Real-Time PCR, θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί σε κάθε σειρά δειγμάτων και δείγματα ελέγχου. Αυτά διακρίνονται σε θετικά ή αρνητικά δείγματα.

- Τα θετικά δείγματα ελέγχου, είναι επιβεβαιωμένα με την παρουσία του DNA που αναζητάτε και δίνουν συνεχείς αναδιπλασιασμούς με παραγωγή προϊόντων, άρα και συνεχή αναλογική αύξηση στην ένταση φθορισμού, ενώ σε διαφορετική περίπτωση θα υποδηλώνει κάποιο πρόβλημα στην αντίδραση ή στα χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια.
- Τα αρνητικά δείγματα ελέγχου είναι αυτά όπου απουσιάζει το DNA δηλαδή δεν δίνουν προϊόντα αναδιπλασιασμού, άρα δεν παρατηρείται αύξηση φθορισμού. Τα αρνητικά δείγματα περιέχουν όλα τα υλικά του διαλύματος αντίδρασης, εκτός του DNA (συνήθως χρησιμοποιείται δισαπεσταγμένο ddH₂O αντί του αντίστοιχου όγκου DNA). Χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο επιμόλυνσης του διαλύματος της αντίδρασης με ξένο DNA, για την ανίχνευση μη ειδικών προϊόντων ή την υποβάθμιση ανιχνευτών.

Για τους σκοπούς της παρούσας εργασίας, χρησιμοποιήθηκαν αρνητικά δείγματα, δηλ δείγματα χωρίς παρουσία DNA, ταυτόχρονα με τα προς εξέταση δείγματα.

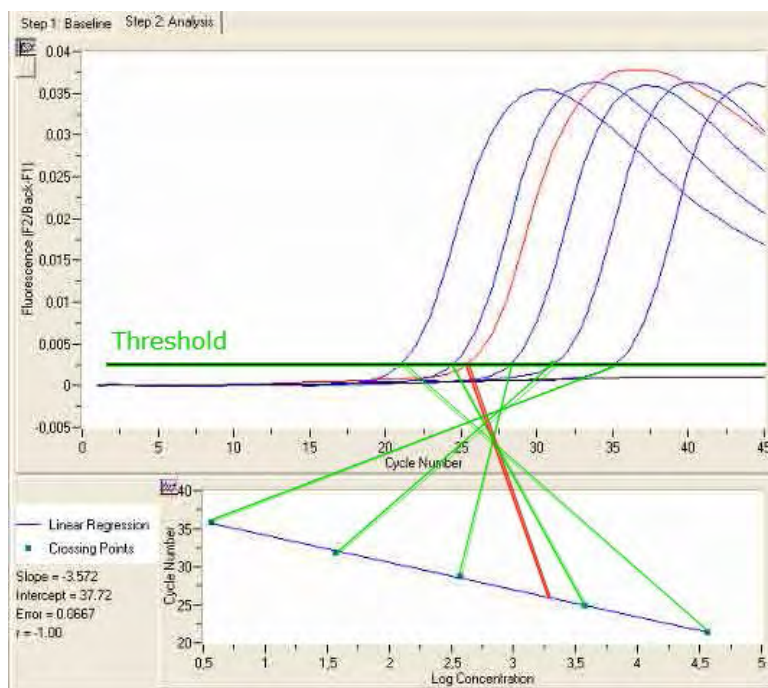
Όλες οι συσκευές της Real-time PCR συνδυάζουν την τεχνολογία της συμβατικής PCR για την παραγωγή - πολλαπλασιασμό προϊόντων με τα συστήματα για παραγωγή, ανίχνευση και ανάλυση του φθορίζον σήματος που παράγεται κατά την διάρκεια της αντίδρασης. Υπάρχουν πολλές εταιρείες που διαθέτουν συσκευές Real-Time PCR και το κόστος της κάθε μιας διαφέρει ανάλογα με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά (Fraga et al, 2008)

8.5.1 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς

Ανάλογα με τον σκοπό του πειράματος, είτε απαιτείται να υπολογιστεί με ακρίβεια η ποσότητα του γονιδίου-στόχου στο δείγμα είτε δεν είναι απαραίτητο για το πείραμα να μετρηθεί με ακρίβεια η αρχική ποσότητα της αλληλουχίας στο δείγμα, χρησιμοποιούμε αντίστοιχα δύο διαφορετικές μεθόδους, την απόλυτη ποσοτικοποίηση (Absolute quantification) ή την σχετική ποσοτικοποίηση (Relative quantification).

Η μέθοδος της απόλυτης ποσοτικοποίησης παρέχει μεγαλύτερη ακρίβεια στην ποσοτικοποίηση των δειγμάτων της Real-time PCR και χρησιμοποιείται όταν είναι απαραίτητο να μετρηθεί η ακριβής ποσότητα της αλληλουχίας στο δείγμα. Βασίζεται στην δημιουργία και στην χρήση μιας πρότυπης καμπύλης αναφοράς (Standard curve) με την οποία συγκρίνεται το φθορίζον σήμα που εκπέμπεται κατά την διάρκεια της αντίδρασης. Απαιτούνται τουλάχιστον 5 σημεία (γνωστές συγκεντρώσεις) που να καλύπτουν το εύρος των συγκεντρώσεων των υπό μελέτη δειγμάτων. Για την δημιουργία της καμπύλης αναφοράς θα πρέπει να επιλεγεί μια γνωστή συγκέντρωση-μάρτυρα, (Stratagene, 2006). Αυτή τη συγκέντρωση-μάρτυρα θα υποβληθεί σε μια σειρά διαδοχικών αραιώσεων και στη συνέχεια τα αραιωμένα δείγματα θα περάσουν από τις ίδιες συνθήκες της Real-Time PCR μαζί με τα πειραματικά δείγματα.

Παράδειγμα: Ενισχύουμε με την Real-Time PCR πέντε δείγματα, γνωστών συγκεντρώσεων, και αναζητούμε την συγκέντρωση ενός αγνώστου δείγματος. Όπως αναμένεται, όσο λιγότερα αντίγραφα DNA περιέχονται στο κάθε δείγμα, τόσο περισσότεροι κύκλοι απαιτούνται για να εισέλθει η αντίδραση στην εκθετική της φάση και να ανιχνευθεί το παραγόμενο σήμα που αντιστοιχεί στην μεταβολή του ρυθμού αύξησης της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος. Στο παράδειγμα που αναφέρεται, η πρότυπη καμπύλη αναφοράς απεικονίζεται στην Εικόνα 11.



Εικόνα 11: Σχηματική αναπαράσταση υπολογισμού πρότυπης καμπύλης αναφοράς και υπολογισμός συγκεντρώσεως αγνώστου δείγματος. (<http://routsias-lab.gr/files/Download/%CE%9C%CE%BF%CF%81%CE%B9%CE%B1%CE%BA%CE%AD%CF%82%20%CF%84%CE%B5%CF%87%CE%BD%CE%B9%CE%BA%CE%AD%CF%82.pdf>)

Για να είναι ακριβής ο ποσοτικός προσδιορισμός των αγνώστων δειγμάτων, θα πρέπει οι τιμές των Ct που δίνουν, να εμπίπτουν στο εύρος των συγκεντρώσεων της πρότυπης καμπύλης αναφοράς, στο οποίο αυτή είναι ευθεία γραμμή. Εάν η καμπύλη αναφοράς τείνει να γίνει μη γραμμική σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, τότε αυτό υποδηλώνει ότι έχει φτάσει στο όριο ανίχνευσης για την συγκεκριμένη δοκιμή. Η γραμμικότητα της καμπύλης, υποδηλώνεται με το **συντελεστή συσχέτισης R^2** , οι τιμές του οποίου πρέπει να είναι $R^2 > 0,985$.

Η γραμμικότητα της καμπύλης αναφοράς, επίσης υποδηλώνει ότι η απόδοση του αναδιπλασιασμού (**Efficiency, E**) σε κάθε κύκλο είναι σταθερή και θα πρέπει να είναι μεταξύ 90-110%. Απόδοση της αντίδρασης (**Efficiency, E**) 100%, σημαίνει τέλει αναδιπλασιασμό σε κάθε κύκλο της αντίδρασης. Εάν η απόδοση είναι χαμηλή <90%, ή υψηλή > 110%, σημαίνει ότι η αντίδραση τείνει να επιβραδυνθεί, παρουσία αναστολέων, μη ιδανικών εκκινητών ή ύπαρξη μη ευνοϊκών συνθηκών αντίδρασης. Τιμές απόδοσης υψηλές > 110%, υποδηλώνουν πιθανά πειραματικά σφάλματα (πχ ακατάλληλα αντιδραστήρια, μη σωστές αραιώσεις).

Η απόδοση της αντίδρασης **E** μας δίνεται από την εξίσωση,

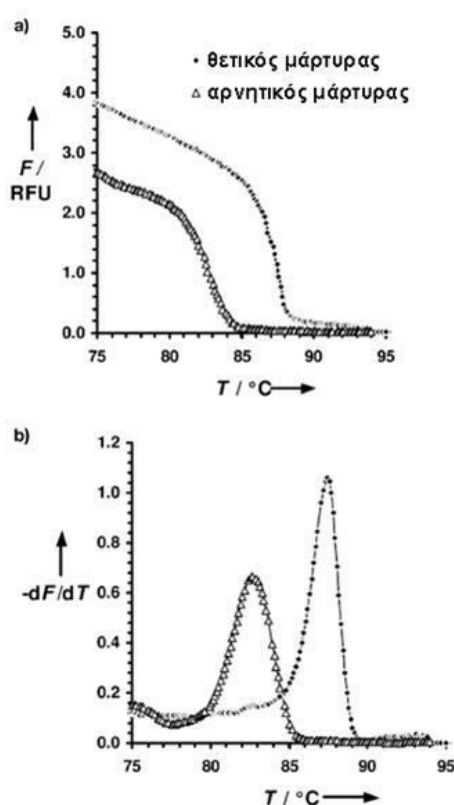
$$E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$$

όπου **Slope**, η τιμή της κλίσης της πρότυπης καμπύλης

Λαμβάνοντας λοιπόν υπόψη όλα τα παραπάνω για την βελτιστοποίηση της αντίδρασης της καμπύλης αναφοράς αλλά και των δειγμάτων, μπορούμε να συγκρίνουμε τις τιμές C_t των δειγμάτων και από την καμπύλη αναφοράς, να υπολογίσουμε την αρχική συγκέντρωση του υπό μελέτη δείγματος.

8.5.2 Καμπύλη αποδιάταξης

Μία ακόμη δυνατότητα που παρέχει η τεχνολογία της Real-Time PCR είναι η κατασκευή της **καμπύλης αποδιάταξης (Melting curve ή Dissociation curve)** με την οποία μπορεί να γίνει αξιολόγηση των προϊόντων της αντίδρασης, να δούμε δηλαδή αν τα προϊόντα είναι επιθυμητά ή όχι. Η κατασκευή της καμπύλης αυτής βασίζεται στην θερμοκρασία αποδιάταξης (**melting temperature, T_m**) των προϊόντων της αντίδρασης (Houghton et al, 2006). Η T_m είναι η θερμοκρασία αποδιάταξης των νουκλεϊκών οξέων και είναι ανάλογη με το ποσοστό GC (γουανίνη-κυτοσίνη) στο εκάστοτε μελετώμενο δίκλωνο μόριο, από την απόλυτη σειρά των βάσεων στη μελετώμενη αλληλουχία και από το μήκος της.



Εικόνα 12: Αποτελέσματα ανάλυσης της καμπύλης αποδιάταξης ενός θετικού και ενός αρνητικού μάρτυρα. α) Δεδομένα της καμπύλης αποδιάταξης. Η αρχική μικρή πτώση οφείλεται στη θερμοκρασία την εξαρτώμενη από τη χρωμογόνο, ενώ η επόμενη απότομη πτώση αναπαριστά την διαδικασία τήξης του προϊόντος. β) Αναπαράσταση της κορυφής τήξης από τα δεδομένα της καμπύλης της (α). (Wilhelm J et al 2003) Η υψηλότερη κορυφή αντιστοιχεί στην θερμοκρασία αποδιάταξης του επιθυμητού προϊόντος. Η πρώτη χαμηλότερη κορυφή αντιστοιχεί στη θερμοκρασία αποδιάταξης των διμερών εκκινητών (Wilhelm J et al 2003).

Σύμφωνα με την Εικόνα 12ο θετικός μάρτυρας περιέχει το ειδικό προϊόν της PCR με $T_m=87.5^{\circ}\text{C}$, ενώ ο αρνητικός περιέχει διμερή εκκινητών με χαμηλότερο $T_m=83^{\circ}\text{C}$.

Τα προϊόντα σε μία αντίδραση πρέπει να έχουν την ίδια θερμοκρασία αποδιάταξης, εκτός και αν υπάρχει επιμόλυνση ή τμήματα που προέρχονται από ένωση μεταξύ εκκινητών ή από τμήματα προερχόμενα από τοποθέτηση των εκκινητών σε παρόμοιες συμπληρωματικές αλληλουχίες (Hund, 2006). Εάν τα προϊόντα έχουν την ίδια θερμοκρασία αποδιάταξης, τότε στην καμπύλη θα εμφανιστεί μία μόνο κορυφή, ενώ αν στα προϊόντα υπάρχουν και τμήματα DNA διαφορετικού μεγέθους, τότε θα παρατηρηθούν στην καμπύλη και άλλες κορυφές που θα αντιστοιχούν σε διαφορετικές θερμοκρασίες αποδιάταξης.

8.5.3 Αναλυτική μέθοδος Real-Time PCR

Για την τεχνική της Real-Time PCR με την χρωστική SYBR Green το πρώτο βήμα είναι η δημιουργία ενός κοινού διαλύματος (master mix). Δύο διαφορετικές αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκαν για την ολοκλήρωση της παρούσας έρευνας (Πίνακες 10-11).

Πίνακας 10. Συστατικά αντίδρασης Real Time PCR με SYBR Green και συγκέντρωση εκκινητών 300 nM από αρχικό διάλυμα εκκινητών 10 μM

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
SYBR Green	21,5 μl
Primer Fw	1,3 μl
Primer Rv	1,3 μl
ddH ₂ O	15,9 μl
DNA	3,0 μl

Πίνακας 11. Συστατικά αντίδρασης Real-Time PCR με SYBR Green και συγκέντρωση εκκινητών 400 nM από αρχικό διάλυμα εκκινητών 10 μM

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
SYBR Green	21,5 μl
Primer Fw (400nM)	1,7 μl
Primer Rv (400nM)	1,7 μl
ddH ₂ O	15,1 μl
DNA	3,0 μl

Μετά την δημιουργία του κοινού διαλύματος όπως αναφέραμε στην συνέχεια προσθέτουμε 3 μl DNA στα erpendorf και μοιράζουμε σε κάθε erpendorf που περιέχει το DNA, από 40μl του master mix. Επίσης, σε ένα erpendorf το οποίο δεν περιέχει DNA βάζουμε master mix (μάρτυρας) ώστε να συγκρίνουμε το προϊόν PCR με τον μάρτυρα. Αμέσως μετά χωρίζουμε την ποσότητα των 43 μl του κάθε erpendorf στην μέση (για την επαλήθευση της μεθόδου), δηλαδή 21,5μl και την τοποθετούμε στα ειδικά erpendorf για την Real-Time PCR και τα τοποθετούμε στην συσκευή η οποία προγραμματίζεται να εκτελέσει το επιθυμητό πρόγραμμα θερμοκρασίας / χρόνου για 30 κύκλους, συμπεριλαμβάνοντας και ένα τελικό πρόγραμμα για την καμπύλη αποδιάταξης (dissociation curve).

95°C για 3min	→	αρχικό στάδιο αποδιάταξης
95°C για 30sec	}	για 30 κύκλους
61°C για 1 min		
72°C για 1 min		
95°C για 1 min	}	συνέχεια για καμπύλη αποδιάταξης
55°C για 30sec		
95°C για 30sec		

8.5.4 Ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος

Για τον πολλαπλασιασμό του γονιδίου 12S rRNA για την ανίχνευση του αγελαδινού γάλακτος χρησιμοποιήσαμε τους παρακάτω εκκινητές που είναι ειδικοί για την ενίσχυση του 12SrRNA τους είδους *Bostaurus*.

Πίνακας 12. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμημάτων DNA βοδινού

12S rRNA Fw	5' - ATGACGAAAGTGACCCTACAATAGCC-3'
12S rRNA Rv	5' - ATTTTGTTTATGTAATTATCTGT-3'

Ο έλεγχος έγινε με την μέθοδο της Real-Time PCR χρησιμοποιώντας την χρωστική SYBR Green και 300 nM εκκινητών. Παρασκευάστηκε η αντίδραση του Πίνακα 13 και για δείγμα χρησιμοποιήθηκε DNA σε ποσότητα 2μl.

Πίνακας 13. Συστατικά αντίδρασης Real-Time PCR με SYBR Green και συγκέντρωση εκκινητών *Bostaurus* 300 nM

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
SYBR Green	10 μl
Primer Fw (10μM)	0,6 μl
Primer Rv (10M)	0,6 μl
ddH ₂ O	6,8 μl
DNA	2 μl
Τελικός Όγκος	20 μl

8.5.5 Υπολογισμοί

Οι μαθηματικές εξισώσεις που χρησιμοποιούνται στις περισσότερες μεθόδους για την ανάλυση των δεδομένων που λαμβάνονται από την Real-Time PCR που προέρχονται από τη βασική φόρμουλα που περιγράφει την ενίσχυση PCR στην εκθετική φάση της αντίδρασης είναι η εξής:

$$X_n = X_0 * (E+1)^n \quad (1)$$

όπου το X_n είναι ποσότητα του προϊόντος της PCR σε n κύκλους, X_0 είναι η αρχική ποσότητα του εκμαγείου και E είναι η απόδοση της αντίδρασης η οποία μπορεί να έχει τιμή μεταξύ 0 και 1. Στην Real-Time PCR που χρησιμοποιείται φθορισμός γίνεται δεκτό ότι η συσσώρευση του φθορισμού της χρωστικής αναφοράς είναι ανάλογη προς την συσσώρευση του προϊόντος ενίσχυσης της PCR και η εξίσωση (1) μπορεί να γραφεί

$$R_n = R_0 * (E+1)^n \quad (2)$$

και ο αρχικός φθορισμός υπολογίζεται ως εξής

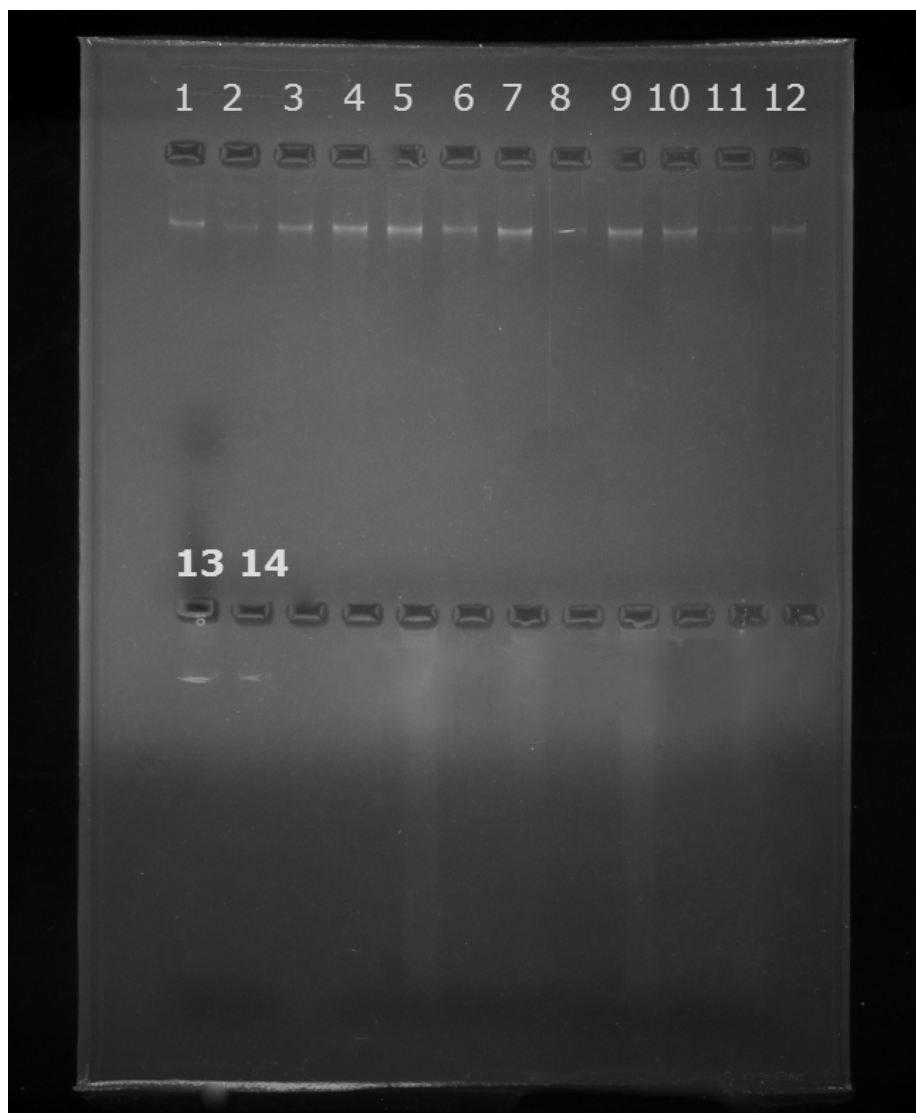
$$R_0 = R_n / (E+1)^n \quad (3)$$

η παράμετρος R_n είναι η ένταση του φθορισμού της χρωστικής αναφοράς σε κύκλο n , και η παράμετρος R_0 είναι το θεωρητικό σημείο έναρξης του φθορισμού το οποίο είναι ανάλογο προς την ποσότητα του αρχικού εκμαγείου. Έτσι, η τιμή R_0 αντιπροσωπεύει την ποσότητα στόχου που εκφράζεται σε αυθαίρετες μονάδες φθορισμού.

9. Αποτελέσματα

9.1 Απομόνωση DNA

Η απομόνωση του DNA έγινε με την διαδικασία που έχει αναφερθεί στην ενότητα 8.2 και ο έλεγχος των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Στην Εικόνα 15 παρουσιάζονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα της απομόνωσης σε πήκτωμα αγαρόζης.



Εικόνα 15:Απομόνωση DNA από τα 13 δείγματα Φέτας και ένα δείγμα κατσικίσιου τυριού Νο 14

Η ένταση της φωτεινότητας και το πάχος κάθε ζώνης αποτελούν ένδειξη της ποσότητας του DNA που απομονώθηκε. Η ποσότητα που απομονώθηκε από όλα τα δείγματα είναι ικανοποιητική, οπότε προχωρήσαμε στη PCR.

Η συγκέντρωση DNA στα δείγματα προσδιορίστηκε με φασματοφωτόμετρο και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 14.

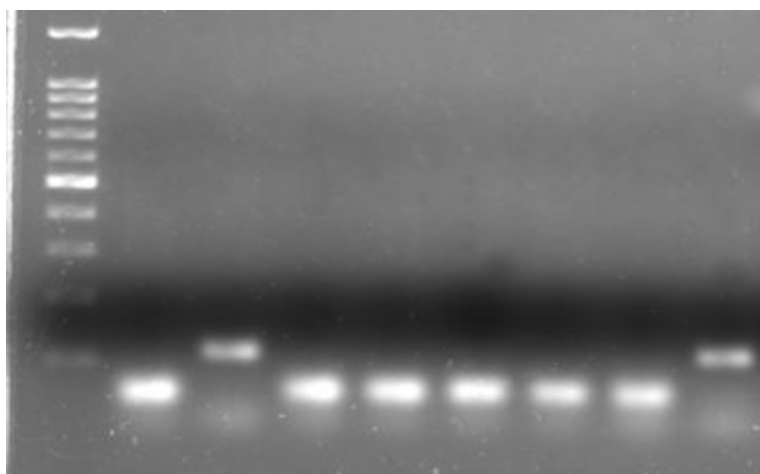
Πίνακας 14. Ποσοτική ανάλυση των δεκατεσσάρων δειγμάτων

A/A	Ποσότητα ng/μl DNA	A/A	Ποσότητα ng/μl DNA
1	213	8	88
2	185	9	67
3	250	10	50
4	129	11	114
5	114	12	173
6	89	13	209
7	117	14	80

9.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Ο αρχικός έλεγχος της καταλληλότητας των εκκινητών που σχεδιάστηκαν έγινε με την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου 12SrRNA του μιτοχονδρίου σε δείγματα Προβάτου, Αίγας, Μοσχαριού, Γαλοπούλας, Κοτόπουλου, καθώς και σε τυρί Φέτας. Τα προϊόντα της PCR ηλεktροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 2%, για τον έλεγχο της ενίσχυσης του επιθυμητού τμήματος του γονιδίου 12SrRNA και την εκτίμηση του μεγέθους του προϊόντος της PCR. Στην Εικόνα 17 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ενίσχυσης του γονιδίου 12SrRNA σε διαφορετικά είδη ζώων.

L Neg A Π Μ Χ Γ Κ Φ



Εικόνα 17: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πηκτή αγαρόζης. Στην θέση L ladder, Π πρόβατο, Α αίγα, Μ μοσχάρι, Χ χοίρος, Γ γαλοπούλα, Κ κοτόπουλο, Φ φέτα.

Από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR παρατηρούμε ότι οι εκκινητές που χρησιμοποιήσαμε πολλαπλασιάζουν αλληλουχίες DNA προβάτου και Αίγας και τα μείγματα προβάτου - Αίγας και καμία άλλη αλληλουχία από τα άλλα είδη.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η δημιουργία καμπύλης αναφοράς με την μέθοδο της Real-Time PCR και την χρήση ανιχνευτών SYBR Green. Για να φτάσουμε στον σκοπό μας χρειάστηκε να περάσουμε από τα παρακάτω στάδια.

9.3 Έλεγχος απόδοσης της αντίδρασης

Πρώτα έπρεπε να ελεγχθεί ποια συγκέντρωση εκκινητών (Fw, Rv) θα εξασφάλιζε την καλύτερη απόδοση αντίδρασης. Γι' αυτόν τον λόγο ελέγχθηκαν δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις εκκινητών Capra, 300nM και 400nM, σε διαδοχικές αραιώσεις 1:5, 1:10, 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000 δείγματος DNA αίγας με τη μέθοδο της Real-Time PCR και την χρωστική SYBR Green. Ο σχεδιασμός καμπύλης απόδοσης της αντίδρασης (άξονας $y=Ct$, άξονας $x=\log$ αραιώσης) έδειξε ότι η απόδοση της αντίδρασης είναι σταθερή ($R^2 \approx 1$) στο εύρος των αραιώσεων που χρησιμοποιήθηκε και τα στοιχεία της δίνονται στον Πίνακα 15. Από την κλίση της καμπύλης υπολογίσαμε την απόδοση της αντίδρασης σύμφωνα με την εξίσωση 8.5.1.

Πίνακας 15. Χαρακτηριστικά καμπυλών απόδοσης σε αντιδράσεις με δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις εκκινητών σε διαδοχικές αραιώσεις Κατσικίσιου DNA

Είδος	Συγκέντρωση εκκινητών	R2	Σημείο τομής (intercept)	slope κλίση	απόδοση efficiency
Αίγα	300 nM	0,9818	11,520	-3,281	1,0174
Αίγα	400 nM	0,9862	11,112	-3,4009	0,9681

Στον Πίνακα 15 παρατηρούμε τη βέλτιστη απόδοση της αντίδρασης σε συγκέντρωση εκκινητών 300 nM, η οποία και επιλέχθηκε για να συνεχίσουμε την υπόλοιπη πειραματική πορεία.

9.4 Έλεγχος για διασταυρούμενη αντιδραστικότητα

Χρησιμοποιώντας την συγκέντρωση εκκινητών η οποία μας έδωσε την καλύτερη απόδοση αντίδρασης (300 nM) έγινε έλεγχος για την διασταυρούμενη αντιδραστικότητα μεταξύ των ειδικών εκκινητών αίγειου και DNA Προβάτου, Χοιρινού, Βοδινού, Κοτόπουλου, Γαλοπούλας, και Φέτας. Συγκεκριμένα ο έλεγχος έγινε με εκκινητές Αίγας που χρησιμοποιήθηκαν στα υπόλοιπα πέντε είδη για να ελέγξουμε αν πολλαπλασιάζουν την αλληλουχίες των ειδών αυτών. Ο έλεγχος έγινε με την μέθοδο της Real-Time PCR χρησιμοποιώντας την χρωστική SYBR Green. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 16.

Πίνακας 16.Αποτελέσματα Ct (Threshold cycle) με εκκινητές Αίγειου (300 nM) σε DNA από Αίγα, Πρόβατο, Μοσχάρι, Χοιρινό, Κοτόπουλο, Γαλοπούλα και Φέτα

DNA	Εκκινητές Αίγειου (300 nM), Ct
Αίγα	17,40
	17,03
Πρόβατο	27,39
	27,30
Μοσχάρι	30,34
	30,04
Χοιρινό	26,64
	26,54
Κοτόπουλο	25,45
	24,36
Γαλοπούλα	24,58
	24,25
Φέτα	25,19
	25,03

Στον Πίνακα 16 παρατηρείται ότι οι εκκινητές της Αίγας ανιχνεύουν μετά από πολλούς κύκλους (Ct) DNA από Πρόβατο, Μοσχάρι, Χοιρινό, Κοτόπουλο, Γαλοπούλα κάτι που μας δίνει το δικαίωμα να συνεχίσουμε το πείραμα με τους συγκεκριμένους εκκινητές χωρίς να έχουμε το πρόβλημα της διασταυρούμενης αντιδραστικότητας. Εντύπωση προκάλεσε το γεγονός ότι η ανίχνευση του Αίγειου DNA στην Φέτα δεν ήταν στα αναμενόμενα όρια ανίχνευσης αλλά μην ξεχνάμε ότι η Φέτα μπορεί να περιέχει έως 30% Αίγειο γάλα, χωρίς να αποκλείεται από τον παρασκευαστή της Φέτας η χρήση κατώτερου ποσοστού με συνέπεια την ελάχιστη παρουσία Αίγειου DNA στο συγκεκριμένο δείγμα.

9.5 Έλεγχος της απόδοσης της αντίδρασης σε μίγματα αίγας και πρόβειου

Μετά την απομόνωση του DNA από κρέας προβάτου (*Ovis aries*) και αίγας (*Capra prisca*) για τις ανάγκες της εργασίας δημιουργήσαμε αναμείξεις και των δύο ειδών. Τα μίγματα αυτά περιείχαν τα δύο είδη σε διάφορες αναλογίες. Οι αναλογίες επιλέχθηκαν έτσι ώστε να καλυφθούν όσο το δυνατόν περισσότεροι συνδυασμοί. Στον Πίνακα 17 που ακολουθεί παρουσιάζονται τα μίγματα DNA (Προβάτου, Αίγας) που δημιουργήθηκαν σε διαφορετικές αναλογίες.

Πίνακας 17. Αναμείξεις των δύο ζωικών ειδών DNA (προβάτου - αίγα) σε διάφορες ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν

A/A Μείγματος	Πρόβατο	Αίγα	A/A Μείγματος	Πρόβατο	Αίγα
1	100mg	0mg	7	40mg	60mg
2	95mg	5mg	8	20mg	80mg
3	90mg	10mg	9	10mg	90mg
4	80mg	20mg	10	5mg	95mg
5	60mg	40mg	11	0mg	100mg
6	50mg	50mg			

Στόχος αυτού του πειράματος ήταν να ελεγχθεί η συγκέντρωση των εκκινητών που εξασφάλιζε τη βέλτιστη απόδοση ενίσχυσης του αίγειου DNA σε μίγματα. Γι' αυτόν τον λόγο ελέγχθηκαν δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις εκκινητών *Capra*, 300nM και 400nM, σε διαδοχικές αραιώσεις 1:5, 1:10, 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000 μίγματος DNA αίγας και προβάτου (1:1) με τη μέθοδο της Real-Time PCR και την χρωστική SYBR Green. Ο σχεδιασμός καμπύλης απόδοσης της αντίδρασης (άξονας $y=Ct$, άξονας $x=\log$ αραιώσης) έδειξε ότι η απόδοση της αντίδρασης είναι σταθερή ($R^2 \approx 1$) στο εύρος των αραιώσεων που χρησιμοποιήθηκε και τα στοιχεία της δίνονται στον Πίνακα 18. Από την κλίση της καμπύλης υπολογίσαμε την απόδοση της αντίδρασης σύμφωνα με την εξίσωση 8.5.1.

Πίνακας 18. Χαρακτηριστικά καμπυλών απόδοσης σε αντιδράσεις με δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις εκκινητών σε διαδοχικές αραιώσεις μίγματος DNA αίγας και προβάτου (1:1)

Είδος	Συγκέντρωση εκκινητών	R^2	Σημείο τομής (intercept)	slope κλίση	Απόδοση efficiency
Αίγα	200 nM	0.9979	11.756	-33.789	0.9768
Αίγα	300 nM	0.9681	11.680	-32.613	1.0259

Η απόδοση της αντίδρασης $E = 1,0259$ σε συνδυασμό με τον πολύ καλό συντελεστή συσχέτισης $R^2 = 0,9681$ μας επιτρέπουν να χρησιμοποιήσουμε τους εκκινητές με συγκέντρωση **300 nM** για το τελικό στάδιο του πειράματος μας δηλαδή για την ποσοτικοποίηση του DNA σε δείγματα.

9.6 Κατασκευή καμπύλης ποσοτικοποίησης αίγειου DNA

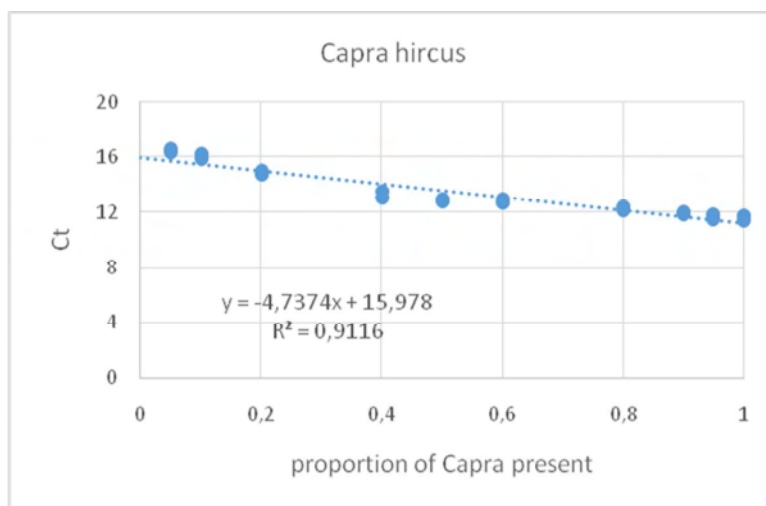
Για την κατασκευή της καμπύλης ποσοτικοποίησης κατσικίσιου DNA σε άγνωστα δείγματα αξιοποιήθηκε η σειρά δειγμάτων που παρασκευάστηκε από

μίγματα αίγειου και πρόβειου DNA (Πίνακας 17). Η συγκέντρωση των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε ήταν 300nM που εξασφάλιζε τη βέλτιστη απόδοση σε δείγματα μιγμάτων. Από αυτό το στάδιο καθορίστηκε και μια σταθερή τιμή Threshold=2000, η οποία θα χρησιμοποιείται και για όλους τους προσδιορισμούς σε άγνωστα δείγματα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Πίνακα 19. Χρησιμοποιώντας τις τιμές Ct και την απόδοση της αντίδρασης E, υπολογίστηκε το αρχικό επίπεδο φθορισμού R_0 , σύμφωνα με την εξίσωση 8.5.5.

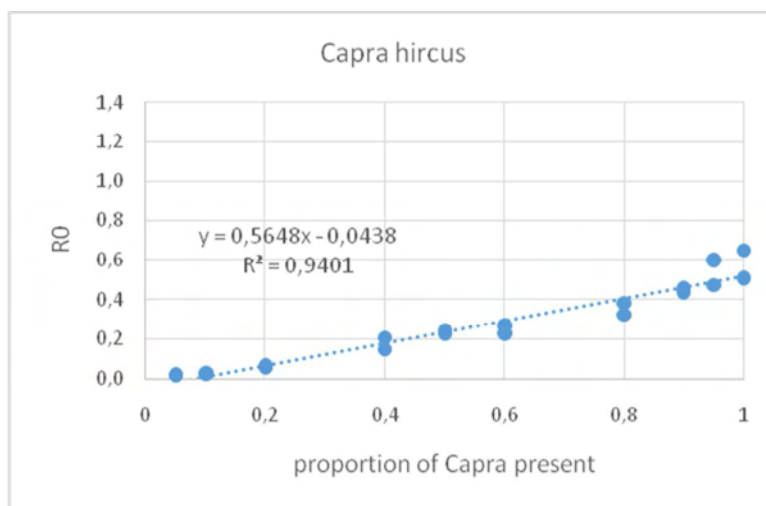
Πίνακας 19. Αποτελέσματα Ct και φθορισμού (R_0) ανίχνευσης αίγειου DNA με ειδικούς εκκινητές (300nM) σε διαφορετικά μίγματα Αίγειου και Πρόβειου

Ποσοστό	Ct	R0
0	26,34	
0	26,31	
0,05	16,31	0,021
0,05	16,52	0,018
0,1	15,86	0,028
0,1	16,19	0,022
0,2	14,92	0,055
0,2	14,69	0,065
0,4	13,05	0,205
0,4	13,53	0,146
0,5	12,93	0,223
0,5	12,82	0,241
0,6	12,9	0,228
0,6	12,67	0,268
0,8	12,41	0,322
0,8	12,17	0,381
0,9	11,98	0,436
0,9	11,92	0,454
0,95	11,53	0,598
0,95	11,87	0,471
1	11,42	0,646
1	11,76	0,509

Από τα δεδομένα του Πίνακα 19 δημιουργήσαμε δύο διαγράμματα:



Διάγραμμα 1: Καμπύλη ποσοτικοποίησης αίγειου DNA σε μίγματα σύμφωνα με τιμές Ct.



Διάγραμμα 2: Καμπύλη ποσοτικοποίησης αίγειου DNA σε μίγματα σύμφωνα με τιμές R0.

Το Διάγραμμα 1 έχει στον άξονα y τους αριθμούς Ct και στον άξονα x το ποσοστό αίγειου DNA που είναι παρών στο δείγμα, ενώ το Διάγραμμα 2 έχει στον άξονα y τα επίπεδα φθορισμού R0. Οι συντελεστές συσχέτισης R^2 υποδεικνύουν ότι και στις δύο περιπτώσεις οι καμπύλες ποσοτικοποίησης είναι γραμμικές, όπως είναι επιθυμητό. Η καμπύλη αναφοράς φθορισμού δίνει μεγαλύτερο συντελεστή συσχέτισης $R^2 = 0.9401$ από την καμπύλη αναφοράς των τιμών Ct $R^2 = 0.9116$.

Το γενικό συμπέρασμα των αποτελεσμάτων είναι ότι η ποσοτικοποίηση του DNA με βάση τις τιμές φθορισμού μας δίνει πιο ακριβή αποτελέσματα από την ποσοτικοποίηση με τιμές Ct (Threshold cycle) και προκρίνεται για χρήση στην ποσοτικοποίηση άγνωστων δειγμάτων.

9.7 Ποσοτικοποίηση δειγμάτων DNA από τυριά

Από το Διάγραμμα 2 προκύπτει ότι η εξίσωση για την ποσοτικοποίηση αίγειου DNA σε άγνωστα δείγματα είναι η ακόλουθη:

$$\text{Ποσοστό αίγειου DNA (\%)} = (R0 + 0.0438)/0.5648 \times 100$$

Στη συνέχεια τα εμπορικά δείγματα φέτας εξετάστηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν με βάση αυτή την εξίσωση (Πίνακας 20).

Πίνακας 20. Αποτελέσματα Ct και φθορισμού (R0) ανίχνευσης αίγειου DNA με ειδικούς εκκινητές (300nM) σε δείγματα φέτας

Δείγματα	Ct	R0	Ποσοστό κατσίκισιου DNA (%)
Φέτα ΧΩΡΙΟ	21,45	0,000555	7,9
Φέτα Carrefour	21,73	0,000456	7,8
Φέτα Μαίναλο	20,66	0,000968	7,9
Φέτα Μικρά	22,54	0,000258	7,8
Φέτα ΜΕΒΓΑΛ	24,12	0,000085	7,8
Φέτα ΗΠΕΙΡΟΣ	21,42	0,000567	7,9
Φέτα Λεβέτη	25,53	0,000031	7,8
Φέτα ΧΩΡΙΟ	22,21	0,000325	7,8
Φέτα Όλυμπος	21,45	0,000555	7,9
Φέτα ΚΑΣΤΟΡΙΑΣ	20,84	0,000853	7,9
Φέτα ΔΩΔΩΝΗ	22,69	0,000232	7,8
Φέτα Mr Grand	20,56	0,001038	7,9
Delfi Greek feta	23,06	0,000179	7,8
Κατσίκισιο	22,78	0,000218	7,8
Negative	No Ct		

9.8 Έλεγχος παρουσίας αγελαδινού γάλακτος

Επίσης στα δεκατέσσερα (14) δείγματα πραγματοποιήθηκε έλεγχος παρουσίας Αγελαδινού γάλακτος και ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε δείγμα DNA Μοσχάρι.

Σε κανένα από τα δείγματα που ελέγχθηκαν δεν μας άφησε την υποψία της παρουσίας Αγελαδινού γάλακτος όπως παρουσιάζονται τα αποτελέσματα στον Πίνακα 21 που ακολουθεί.

Πίνακας 21: Αποτελέσματα Ct (Threshold cycle) με εκκινητές Bos (300 nM) σε DNA από τα δεκατέσσερα (14) δείγματα Φέτας χρησιμοποιώντας έναν Θετικό και έναν Αρνητικό μάρτυρα.

Δείγματα	DNA	Bos 300nM (Ct)
Φέτα ΧΩΡΙΟ	2μl	27,88
Φέτα Carrefour	2μl	27,37
Φέτα Μαίναλο	2μl	27,86
Φέτα Μικρά Τυροκομεία	2μl	27,45
Φέτα ΜΕΒΓΑΛ	2μl	27,76
Φέτα ΗΠΕΙΡΟΣ	2μl	27,19
Φέτα Λεβέτη Βαρελίσια	2μl	27,28
Φέτα ΧΩΡΙΟ βιολογική	2μl	27,12
Φέτα Όλυμπος	2μl	27,44
Φέτα ΚΑΣΤΟΡΙΑΣ	2μl	27,43
Φέτα ΔΩΔΩΝΗ	2μl	26,61
Φέτα Mr Grand	2μl	27,32
Delfi Greek feta	2μl	26,93
Κατσικίσιο	2μl	26,88
DNA Μοσχάρι	2μl	13,98
Negative	2μl ddH ₂ O	27,25

10. Συζήτηση

Σήμερα ένας σταθερά αυξανόμενος αριθμός καταναλωτών στην Ελλάδα και το εξωτερικό δίνει προτεραιότητα, όσον αφορά τη διατροφή του, μάλλον στην ποιότητα παρά στην ποσότητα. Η προώθηση προϊόντων που παρουσιάζουν ορισμένα χαρακτηριστικά μπορεί να αποτελέσει σημαντικό πλεονέκτημα για την αγροτική οικονομία της χώρας. Ειδικότερα σε όλα τα γαλακτοκομικά προϊόντα που κυκλοφορούν στην αγορά πάντα υπάρχει ο τρόπος να χρησιμοποιηθούν οικονομικότερες πρώτες ύλες άλλου ζωικού είδους και σε διάφορες αναλογίες από εκείνο που καθιερωμένα χαρακτηρίζει το κάθε είδος.

Το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων στοχεύοντας τόσο στην διασφάλιση της αυθεντικότητας όλων των προϊόντων Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (ΠΟΠ) και ιδιαίτερα της Φέτας όσο και στην προστασία του καταναλωτή από αθέμιτες πρακτικές, θέσπισε ένα σύστημα πιστοποίησης και ελέγχου των προϊόντων ΠΟΠ σύμφωνα με το οποίο ο Οργανισμός Πιστοποίησης

και Επίβλεψης Γεωργικών Προϊόντων (Ο.Π.Ε.Γ.Ε.Π.) είναι ο αρμόδιος φορέας για τον έλεγχο των προϊόντων αυτών. Για τον λόγο αυτό σε συνεργασία με τις τοπικές Δ/νσεις Αγροτικής Οικονομίας και Κτηνιατρικής (Δ.Α.Ο.Κ.) διενεργεί ελέγχους τόσο στα σημεία παραγωγής όσο και στα σημεία πώλησης των προϊόντων αυτών. Τον πρώτο χρόνο ελέγχου (2007) επιβλήθηκαν πρόστιμα σε δέκα επιχειρήσεις οι οποίες διαπιστώθηκε, κατόπιν ελέγχων, ότι είχαν υποπέσει σε παρατυπίες και παραβάσεις, σχετικά με την επισήμανση και διακίνηση προϊόντων ΠΟΠ. Η κυριότερη παράβαση που διαπιστώθηκε σε επιχείρηση και επιβλήθηκε πρόστιμο αξίας 75.000€ βρισκόνταν στην Αργολίδα όπου διακινούσε λευκό τυρί ως ΦΕΤΑ. <http://www.paseges.gr/el/news/Kampanes-se-tyrokomikes-epiheirhseis-aro-to-YPAAT>. Το δεύτερο χρόνο ελέγχου (2008) οι παραβάσεις που διαπιστωθήκαν ήταν εννέα από τις οποίες οι δύο που αφορούσαν την νοθεία σε αιγοπρόβειο γάλα δηλαδή η αναλογία πρόβειου-γίδινου γάλακτος δεν επέτρεπε την παραγωγή τυριού ΦΕΤΑ, εντοπίστηκαν στην Αχαΐα. Το 2009 διαπιστώθηκαν δεκαπέντε παραβάσεις –παρατυπίες που αφορούσαν μη τήρηση όλων των προδιαγραφών για παραγωγή φέτας και σε μία περίπτωση για χρήση 100% γίδινου γάλακτος.

Έλεγχος επίσης των τυριών ΠΟΠ, σχετικά με την τήρηση των προδιαγραφών παρασκευής τους πραγματοποιείται και στα έτοιμα προς κατανάλωση γαλακτοκομικά προϊόντα από το Πολυετές Ολοκληρωμένο Εθνικό Σχέδιο Ελέγχου (ΠΟΕΣΕ) του Υπουργείου Παραγωγικής Ανασυγκρότησης Περιβάλλοντος και Ενέργειας (Υ.Π.Α.Π.ΕΝ). Σκοπός του προγράμματος ήταν η διασφάλιση της σύνθεσης, της επισήμανσης και της αυθεντικότητάς των τυριών ΠΟΠ. Ο έλεγχος ξεκίνησε από το 2006. Από την επεξεργασία των πρώτων αποτελεσμάτων προκύπτουν τα αποτελέσματα του Πίνακα 22.

Πίνακας 22: Διενέργεια ελέγχων Π.Ο.Ε.Σ.Ε. κατά τα έτη 2006-2010

Έτος	Δείγματα/ΠΟΠ	Αριθμός μη συμμορφώσεων	Ποσοστό % μη συμμορφώσεων
2006	/99	18	18
2007	/99	10	10
2008	/116	1	0,9
2009	/99	3	3
2010	/10	1	10
2011	192/90	2	2,2
2012	212/100	18	8,5
2013	186/70	28	15

Ως προς τα παραπάνω εύκολα γίνεται αντιληπτή, η μεγίστη σημασία που αποκτά ο έλεγχος, για την διερεύνηση της σύστασης των ΠΟΠ προϊόντων. Ως εκ τούτου απαιτείται η αναγκαιότητα μιας μεθόδου ελέγχου, σύμφωνα με την οποία θα διασφαλίζονται γρήγορα και αξιόπιστα αποτελέσματα.

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία ανέπτυξε και αξιολόγησε ένα πρωτόκολλο εφαρμογής της μεθόδου της Real-Time PCR, για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό του γάλακτος Αίγας σε έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα Φέτας (ΠΟΠ) τα οποία κυκλοφορούν στην Ελληνική αγορά.

Οι τεχνικές που εφαρμόστηκαν ήταν η PCR και η Real-Time PCR. Ο μοριακός δείκτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το γονίδιο 12srRNA του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Για τον σκοπό αυτό διεξήχθησαν μια σειρά πειραμάτων με στόχο την δημιουργία πρότυπων καμπύλων αναφοράς με την μέθοδο της Real-time PCR χρησιμοποιώντας την χρωστική SYBR Green.

Αρχικά σχεδιάστηκαν οι εκκινητές και με την μέθοδο της PCR πολλαπλασιάσαμε τμήμα του γονιδίου 12s rRNA του μιτοχονδρίου για όλα τα δείγματα (13 Φέτας, 1 κατσικίσιου Τυριού). Παράλληλα έγινε και έλεγχος ότι οι συγκεκριμένοι εκκινητές δεν ενισχύουν αλληλουχίες άλλων ζωικών ειδών όπως προβάτου, μοσχαριού, γαλοπούλας, κοτόπουλου, καθώς και σε τυρί Φέτας.

Με την μέθοδο της Real-time PCR χρησιμοποιώντας την χρωστική SYBR Green προσδιορίστηκε η καταλληλότερη συγκέντρωση των εκκινητών στα 300nM όπου σε αυτή την συγκέντρωση μας έδωσε την καλύτερη απόδοση αντίδρασης (Efficiency, $E=1,0174$).

Επίσης με την μέθοδο αυτή έγινε έλεγχος της διασταυρούμενης αντιδραστικότητας μεταξύ των ειδών προβάτου, μοσχαριού, χοιρινού, γαλοπούλας, κοτόπουλου και της Φέτας όπου εξάγεται το συμπέρασμα ότι οι εκκινητές ανιχνεύουν την Αίγα στους 17 κύκλους (Ct) αλλά τα άλλα ζωικά είδη ανιχνεύονται μετά από 24 κύκλους (Ct). Εντύπωση προκάλεσε το γεγονός ότι η ανίχνευση του Αίγειου DNA στην Φέτα δεν ήταν στα αναμενόμενα όρια ανίχνευσης αλλά γνωρίζοντας ότι η Φέτα μπορεί να περιέχει έως και μηδενικά ποσοστά αίγειου δεν μας προκάλεσε καμία ανησυχία για την συνέχιση του πειράματος.

Ο έλεγχος της απόδοσης της αντίδρασης σε μίγμα DNA αίγας και πρόβειου σε αραιώσεις από 5% έως 95% μας έδωσε $E= 1,0259$ σε συνδυασμό με τον πολύ καλό συντελεστή συσχέτισης $R^2 = 0,9681$. Το γεγονός αυτό μας επέτρεψε να χρησιμοποιήσουμε τους εκκινητές στην συγκέντρωση των 300 nM για το τελικό στάδιο του πειράματος. Για την δημιουργία της καμπύλης ποσοτικοποίησης καθορίστηκε μια σταθερή τιμή Threshold=2000. Με τον τρόπο αυτό σχηματίστηκαν η καμπύλη φθορισμού R_0 και η καμπύλη των τιμών Ct. **Και στις δύο περιπτώσεις οι καμπύλες ποσοτικοποίησης παρουσιάζονται γραμμικές, αλλά η αποτελεσματικότερη ήταν αυτή που σχηματίστηκε με βάση τις τιμές φθορισμού R_0 καθώς έδινε μεγαλύτερο συντελεστή συσχέτισης $R^2 = 0.9401$ και τα αποτελέσματά της ήταν περισσότερο ακριβή.**

Για τον έλεγχο παρουσίας αγελαδινού γάλακτος στα δείγματα φέτας εφαρμόστηκε η τεχνική της Real-time PCR χρησιμοποιώντας την χρωστική SYBR Green με εκκινητές που παρουσιάστηκαν από προηγούμενους ερευνητές του

εργαστήριου. Τα αποτελέσματα εμφάνισαν ότι σε κανένα δείγμα τυριού δεν υπήρχε πρόσμιξη με αγελαδινό γάλα.

Στο τέλος του πειράματος έγινε η ποσοτικοποίηση αίγειου DNA στα εμπορικά δείγματα τυριού. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που ανιχνεύθηκαν έκπληξη προκάλεσε το γεγονός ότι όλοι οι παρασκευαστές Φέτας χρησιμοποιούσαν την ίδια αναλογία 7,8-7,9% πρόσμιξης Αίγειου γάλακτος για την παραγωγή της Φέτας.

Το δείγμα Νο 14 το οποίο χαρακτηριζόταν από τον παρασκευαστή ως Κατσικίσιο Τυρί και στα συστατικά της συσκευασίας αναφέρονταν “Παστεριωμένο κατσικίσιο γάλα πρόβειο γάλα έως 20%”. Επίσης ανιχνεύτηκε 7,9% Αίγειο γάλα.

Από τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα που προέκυψαν καταλήγουμε στα τα εξής συμπεράσματα:

- Με την χρήση του γονιδίου 12s rRNA και την μέθοδο Real-Time PCR χρησιμοποιώντας την χρωστική SYBR Green διαπιστώθηκε ότι είναι εφικτή η δημιουργία καμπύλης αναφοράς για την ποσοτικοποίηση DNA σε άγνωστα δείγματα τυριού. Η μέθοδος αυτή κρίθηκε αποτελεσματική για την ταυτοποίηση και ανίχνευση του Αίγειου γάλακτος σε τελικό προϊόν Φέτας καθώς και σε διάφορα τυριά.
- Επίσης αντιλαμβανόμαστε ότι οι παρασκευαστές τυροκόμοι προσέχουν ιδιαίτερα τα ποσοστά του πρόβειου και του Αίγειου γάλακτος για την παρασκευή της Φέτας (προϊόν ΠΟΠ) χρησιμοποιώντας σταθερά τις ίδιες αναλογίες πρόσμιξης γάλακτος ώστε να πετύχουν την ίδια υφή και γεύση στην Φέτα.
- Για το μεμονωμένο δείγμα του Κατσικίσιου τυριού που εξετάστηκε στα πλαίσια της εργασίας η μεγάλη διαφορά του χρησιμοποιούμενου ποσοστού Αίγειου γάλακτος (7,8%) από την αναγραφόμενη σύσταση της συσκευασίας (>80%) μας διαβεβαιώνει ότι οι τυροκόμοι ενώ καταβάλουν προσπάθεια για τον έλεγχο και την σταθερότητα των ΠΟΠ προϊόντων τους, στα οποία γνωρίζουν ότι και θα ελεγχθούν από διάφορους φορείς, αμελούν τα τυριά στα οποία δεν αναγράφεται η ένδειξη ΠΟΠ και θα ελεγχθούν ελάχιστα.

Τα παραπάνω συμπεράσματα μπορούν να έχουν τόσο θεωρητική όσο και πρακτική αξία. Η γνώση της αποτελεσματικότητας και της διακριτικής ικανότητας των γενετικών δεικτών που παρουσιάζονται σε αυτή την μεταπτυχιακή διατριβή μπορεί να εφαρμοστεί στην πράξη μελλοντικά, καθώς την καθιστά ένα χρήσιμο εργαλείο για τον έλεγχο της νοθείας στα τυροκομικά προϊόντα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Andréasson, H., Gyllensten, U., & Allen, M. (2002). Real-time DNA quantification of nuclear and mitochondrial DNA in forensic analysis. *Bio Techniques*, 33, 402–411.

Applied Biosystems, “Real-Time PCR vs Traditional PCR”. Applied Biosystems. Σελ 1-15.. Διαθέσιμοonline:http://www6.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/rtpcr_vs_tradpcr.pdf.

Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A., Saunders, N.C., 1987. Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* 18, 489-522

Avise, J.C. 1994. *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. Chapman & Hall, New York (511 pp.).

Bogenhagen, D. F. (2009). Biochemical isolation of mtDNA nucleoids from animal Cells. In J. A. Stuart (Ed.), *Mitochondrial DNA: Methods and protocols* (pp. 3–14). (2nd ed.). New York: Humana Press.

Bottero, M. T., & Dalmaso, A. (2011). Animal species identification in food products: Evolution of biomolecular methods. *The Veterinary Journal*, 190(1), 34–38.

Bottero, M. T., Civera, T., Nucera, D., Rosati, S., Sacchi, P., & Turi, R. M. (2003). A multiplex polymerase chain reaction for the identification of cows', goats' and sheep's milk in dairy products. *International Dairy Journal*, 13(4), 277–282.

Bottero, M. T., Civera, T., Anastasio, A., Turi, R. M., & Rosati, S. (2002). Identification of cows' milk in “buffalo” cheese by duplex polymerase chain reaction. *Journal of Food Protection*, 65, 362–366

Botstein, D., K. L. White, M. Skolnick and R. W. Davis, 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314-331.

Boore JL, Macey JR, Medina M (2005) Sequencing and comparing whole mitochondrial genomes of animals. *Molecular Evolution: Producing the Biochemical Data, Part B Volume 395*. San Diego: Elsevier Academic Press Inc. 311–348.

De, S., Brahma, B., Polley, S., Mukherjee, A., Banerjee, D., Gohaina, M., et al. (2011). Simplex and duplex PCR assays for species specific identification of cattle and buffalo milk and cheese. *Food Control*, 22(5), 690–696.

Diaz, S., Lavorel, S., Chapin II, F.S., Tecco, P.A., Gurvich, D.E. and Grigulis, K. 2007. *Functional Diversity at the Crossroads between Ecosystem Functioning and Environmental Filters*. In: Canadell, J.G., Pitelka, L.F., Pataki, D. (eds.) *Terrestrial Ecosystems in a Changing World*. The IGBP Series, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. pp.103–113.

Fanourakis N., H. Pavlikaki and C.P. Navarro, 2004. Genetic relationships of different Greek landraces of cucumber. *Euphytica Plant breeding* 136: 143-147

Fraga D., Meulia T. and Fenster S., (2008). "Real Time PCR". John Wiley & Sons, Inc. Current Protocols Essential Laboratory Techniques. Unit 10.3., 1-34.

Futuyama D.J (1991) In plant-Animal Interactions :Evolutionary Ecology in Tropical Temperate regions pp.431-454 Wiley, New York

Gefridis, L., & Welch, K. (2011). Forensic biology: Serology and DNA. In A. Mozayani, & C. Noziglia (Eds.), The forensic laboratory handbook procedures and practice (pp. 16–49). (2nd ed.). London: Humana Press.

Gloffke W., 2003. "Quantitative PCR Update". The Scientist. Vol 17, No 8, Σελ 41. Διαθέσιμο online: <http://f1000scientist.com/>. Τελευταία πρόσβαση 14/10/2009.

Gurdeniz, G., & Ozen, B. (2009). ...Detection of cows' milk in goat's cheeses inferred from mitochondrial DNA polymorphism. Journal of Dairy Research. 68:229–235.

Hagelberg, E. 1994: Ancient DNA studies. *Evolutionary Anthropology* 2: 199-207.

Haza, A. I., Morales, P., Martin, R., Garcia, T., Anguita, G., Gonzalez, I., Sanz, B., Hernandez P. E. (1996), Development of monoclonal antibodies against caprine alpha (S2)-casein and their potential for detecting the substitution of ovine milk by caprine milk by an indirect ELISA. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44(7), 1756–1761

Herman, L. (2001). Determination of the animal origin of raw food by species-specific PCR. Journal of Dairy Research, 68, 429–436.

Houghton S. and Cockerill F., 2006. "Real Time PCR: Overview and applications". Surgery, Vol 139, No 1, Σελ. 1-5.

Hird, H., Goodier, R., Schneede, K., Boltz, C., Chisholm, J., Lloyd, J., et al. (2004). Truncation of oligonucleotide primers confers specificity on real time-PCR assays for food authentication. Food Additives and Contaminants, 21(11), 1035–1040.

Hunt M. (2006) Real time PCR tutorial - Copyright 2006, The Board of Trustees of the University of South Carolina Houghton S. and Cockerill F., 2006. "Real Time PCR: Overview and applications". Surgery, Vol 139, No 1, 1-5.

Kesmen, Z., Gulluce, A., Sahin, F., & Yetim, H. (2009). Identification of meat species by TaqMan-based real-time PCR assay. Meat Science, 82, 444–449.

Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Pääbo S et al. (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. Proc Natl Acad Sci USA 86: 6196–6200.

Klotz, A. & Einspanier, R. (2001). Development of a DNA based screening method to detect cow milk in ewe, goat and buffalo milk and dairy products using PCR-LCREIA-technique. *Milchwissenschaft – Milk Science International*, 56, 67–70.

Krcmar, P., & Rencova, E. (2005). Quantitative detection of species-specific DNA in feedstuffs and fish meals. *Journal of Food Protection*, 68(6), 1217–1221.

Kvist, L. (2000). *Phylogeny and phylogeography of European Parids* (pp. 51). Oulu, Finland: University of Oulu.

Lagoudakis, E. D., Zouros, E. (2001). Direct evidence for homologous recombination in the Mussel (*Mytilus galloprovincialis*) mitochondrial DNA. *Molecular Biology and Evolution* 18: 1168-1175.

LAHIFF S., GLENNON M., LYG J., SMITH T., SHILTON N., MAHER M., 2002. Real-time polymerase chain reaction detection of bovine DNA in meat and bone meal samples. *J Food Prot* 65(7), 1158-1165.

López-Andreo M., Garrido-Pertierra, A., & Puyet, A. (2006). Evaluation of post-polymerase chain reaction melting temperature analysis for meat species identification in mixed DNA samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 3978–3973.

López-Calleja, I., González, I., Fajardo, V., Martín, I., Hernández, P. E., García, T. and Martín, R. **(2007a)** Quantitative detection of goats' milk in sheep's milk by real-time PCR. *Food Control*, **18**, 1466-1473

López-Calleja, I., González, I., Fajardo, V., Martín, I., Hernández, P. E., García, T. and Martín, R. **(2007b)** Real-time TaqMan PCR for quantitative detection of cows' milk in ewes' milk mixtures. *International Dairy Journal*, 17, 729-736

López-Calleja, I. M., González, I., Fajardo, V., Hernández, P. E., García, T. and Martín, R. **(2007c)** *Application of an indirect ELISA and a PCR technique for detection of cows' milk in sheep's and goats' milk cheeses*. *International Dairy Journal*, 17, 87-93

Mafrá, I., Ferreira, I. M. P. L. V. O. and Oliveira, M. B. P. P. (2008) *Food authentication by PCR-based methods*. *Eur. Food Res. Technol.*, 227, 649-665

Mafrá, I., Ferreira, I. M. P. L. V. O., Faria, M. A., and Oliveira, B. P. P. (2004) *A Novel*

Mafrá, I., Roxo, A., Ferreira, I. and Oliveira, M. B. (2007) A duplex polymerase chain reaction for the quantitative detection of cows' milk in goats' milk cheese. *International Dairy Journal*, 17, 1132-1138

Mayer, H. K. (2005) Milk species identification in cheese varieties using electrophoretic, chromatographic and PCR techniques. *International Dairy Journal*, 15, 595-604

Mendoza-Romero L, Verkaar ELC, Savelkoul PH, Catsburg A, Aarts HJM, Buntjer JB, Lenstra JA. 2004. Real-time PCR detection of ruminant DNA. *Journal of Food Protection* 67:550–554.

Moatsou, G. (2009) *Detection of adulterations: identification of milk origin*. In: Handbook of Dairy Foods Analysis, (eds Leo M. L. Nollet & Fidel Toldra), CRC Press, in press Approach to the Quantification of Bovine Milk in Ovine Cheeses Using a Duplex Polymerase Chain Reaction Method. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 4943-4947

Moatsou, G., and Anifantakis, E. (2003), Recent developments in antibody based analytical methods for the differentiation of milk from different species. *International Journal of Dairy Technology*, 56(3), 133–138

Monteil-Sosa, J. F., Ruiz-Pesini, E., Montoya, J., Roncalis, P., López-Pérez, M. J., & Pérez-Martos, A. (2000). Direct and highly species-specific detection of pork meat and fat in meat products by PCR amplification of mitochondrial DNA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2829–2832.

Mohd Hazim, M. Y., Shuhaimi, M., Che Man, Y. B., Abdul, O., & Nur Fadhilah, K. M. (2012). Detection of raw pork targeting porcine-specific mitochondrial Cytochrome B gene by molecular beacon probe Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Food Analytical Methods*, 5, 422–429

Moritz, C., T. E. Dowling & W. M. Brown . 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: Relevance for population biology and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 18:269-292 .

Mullis, K., Fallona, F. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase chain reaction. *Methods Enzymol*, 155: 335-350.

Mullis KB and Faloona FA (1987) "Specific Synthesis of DNA in vitro via a Polymerase -Catalyzed Chain Reaction." *Methods in Enzymology* vol. 155(F) pp. 335–50

Pegels, N., Gonzalez, I., Martvn, I., Rojas, M., Garcva, T., & Martvn, R. (2011). Applicability assessment of a real-time PCR assay for the specific detection of bovine, ovine and caprine material in feedstuffs. *Food Control*, 22(8), 1189–1196.

Regattieri, A., Gamberi, M., and Manzini, R. (2007): "Traceability of food products: General framework and experimental evidence", *Journal of Food Engineering*, No.81, pp. 347-356

Rodriguez, M. A., Garcva, T., Gonzalez, I., Hernandez, P. E., & Martvn, R. (2005). TaqMan real-time PCR for detection and quantitation of pork in meat mixtures. *Meat Science*, 70, 113–120.

Rojas, M., González, I., Pavón, M. A., Pegels, N., Lago, A., Hernández, P. E., et al. (2010). Novel TaqMan real-time polymerase chain reaction assay for verifying the

authenticity of meat and commercial meat products from game birds. *Food Contaminants and Additives*, 27, 749–763.

Sawyer, J., Wood, C., Shanahan, D., Gout, S., & McDowell, D. (2003). Real-time PCR for quantitative meat species testing. *Food Control*, 14, 579–583

Scott R. 1981 Cheese making practice. April. Sci.Publ.Ltd.London

Somma, M. Querci . JRC European Commission. The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms. Session 6. The Polymerase Chain Reaction (PCR)

Stefos, G., Argyrokastritis, A., Bizelis, I., Moatsou, G., Anifantakis, E. and Rogdakis, E. (2004) Detection of bovine mitochondrial DNA specific sequences in Feta cheese and ovine yogurt by PCR-RFLP. *Milchwissenschaft*, 59, 509-511

Stratagene, 2006. “Introduction to Quantitative PCR”. Stratagene, La Jolla, CA. Σελ. 3-8, 9-11, 23-26.

Wilhelm, J.E., M. Hilton, Q. Amos, and W. Henzel. 2003. Cup is an eIF4E binding protein required for both the translational repression of *oskar* and the recruitment of Barentsz. *J. Cell Biol.* 163:1197–1204.

Wilhelm M, Kunzmann V, Eckstein S, Reimer P, Weissinger F, Ruediger T *et al.* Gammadelta T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies. *Blood* 2003; **102**: 200–206

Wilhelm J, Pingoud A. Real–Time Polymerase Chain Reaction. *ChemBioChem* 2003, 4, 1120-1128

Wong M. L. and Medrano J. F., 2005. “ Real Time PCR for m-RNA quantitation”. Εκδόσεις Biotechniques. Έδρα Hillsborough. Vol 39, σελ 75-85. Διαθέσιμο online: http://www.biotechniques.com/multimedia/archive/00011/BTN_A_05391RV01_O_11901a.pdf.

Woolfe, M. & Primrose, S. (2004). Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. *Trends in Biotechnology*, 22, 222–226.

Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.

Zhang, C.-L., Fowler, M. R., Scott, N. W., Lawson, G., & Slater, A. (2007). A TaqMan real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks and cheeses. *Food Control*, 18, 1149–1158.

ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΕΣ

http://www6.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/rtpcr_vs_tradpcr.pdf.

<http://www.agrool.gr/files/molmar.pdf>

http://www.agrocert.gr/photos/kanonismoi euenosis/cfiles/tyria_8-4-2015.xls

<http://www.cheesenet.gr/greek-html/cheeses/feta.htm>

http://d1mqv16b9gxt7.cloudfront.net/images/22_INTRO-PCR-GR_re.pdf

<http://eureka.lib.teithe.gr:8080/bitstream/handle/10184/7027/Karatsinidou%20Maria.pdf?sequence=1>

http://www.efet.gr/images/efet_res/docs/library/plans-expos/erel2013.pdf

<http://www.fetamania.gr/greek-html/history.htm>

<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20EN/Session06.pdf>

<http://www.hms.org.gr/updocuments/%CE%9C%CE%9F%CE%A1%CE%99%CE%91%CE%9A%CE%95%CE%A3%20%CE%A4%CE%95%CE%A7%CE%9D%CE%99%CE%9A%CE%95%CE%A3%202012.pdf>

<http://www.logodiatrofis.gr/2012-06-28-06-36-18/2012-06-28-06-59-52/1092-to-tyri-sth-diatrofh-mas>

<http://www.minagric.gr/index.php/el/eservicesmenu-2/183-greek-content/pop-pge>

[http://nemertes.lis.upatras.gr/jspui/bitstream/10889/6196/1/Nemertes_Essa\(f\).pdf](http://nemertes.lis.upatras.gr/jspui/bitstream/10889/6196/1/Nemertes_Essa(f).pdf)

<http://routsiaslab.gr/files/Download/%CE%9C%CE%BF%CF%81%CE%B9%CE%B1%CE%BA%CE%AD%CF%82%20%CF%84%CE%B5%CF%87%CE%BD%CE%B9%CE%BA%CE%AD%CF%82.pdf>

<http://www.tovima.gr/finance/article/?aid=687859>

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Αρβανιτογιάννης, Ι.Σ., Τζούρος Ν. (2006): *Το νέο πρότυπο ποιότητας & ασφάλειας τροφίμων ISO 22000. Παρουσίαση & Ερμηνεία*, Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης
Μάντης Ι. Αντώνης Υγιεινή και τεχνολογία του γάλακτος και των προϊόντων του. Θεσ/νικη 1993

Πακάκη Β., Μαγουλάς Α., Κασαπίδης Π. Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας και Γενετικής, Ελληνικό Κέντρο Θαλάσσιων Ερευνών
9th Symposium on Oceanography & Fisheries, 2009

Χατζόπουλος Π. 2001. Βιοτεχνολογία Φυτών. Εκδόσεις ΕΜΒΡΥΟ και Πολυδεύκης
Χατζόπουλος, Δεύτερη έκδοση 2004.

Φωτογραφίες

Ελντέμ Σαδίκογλου, Εργαστήριο Αναπτυξιακής Βιολογίας και Μοριακής Νευροβιολογίας. Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης http://d1mqv16b9gxt7.cloudfront.net/images/26_GR-gDNA_re.pdf