



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Μελέτη

*«Πολυμορφισμοί στο γονίδιο της κ-καζεΐνης του
γάλακτος, σε πρόβατα ελληνικών φυλών»*

Κουκιάσα Αιμιλία

**Εισηγήτρια : Μούτου Αικατερίνη,
Αναπλ. Καθ. Βιολογίας Σπονδυλωτών**

Λάρισα, 2015

Πολυμορφισμοί στο γονίδιο της κ-καζεΐνης του γάλακτος, σε πρόβατα ελληνικών φυλών

Μεταπτυχιακή ερευνητική μελέτη της φοιτήτριας

Κουκιάσα Αιμιλίας

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Μαμούρης Ζήσης, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών

Μούτου Αικατερίνη, Αναπλ. Καθ. Βιολογίας Σπονδυλωτών

Σαραφίδου Θεολογία, Επίκ. Καθ. Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών

Ευχαριστίες

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

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κα Μούτου Αικατερίνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την ανάθεση του θέματος της μεταπτυχιακής αυτής μελέτης, για τις συμβουλές της αλλά και την καθοδήγησή της κατά τη συγγραφή της παρούσης εργασίας. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον κ. Σταμάτη Κων/νο, μέλος Ε.ΔΙ.Π. του εργαστηρίου Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας για τη σημαντική βοήθεια και τη συνεχή καθοδήγηση που μου παρείχε κατά τη διενέργεια του πειραματικού μέρους της μελέτης.

Τέλος θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου και σε όλους τους υποψήφιους διδάκτορες του εργαστηρίου Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας, που με βοήθησαν κατά την παραμονή μου σε αυτό.

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν ο έλεγχος για την παρουσία πολυμορφισμού στο εξώνιο 4 του γονιδίου της κ-καζεΐνης (CSN3ex4) του γάλακτος, σε ελληνικές φυλές προβάτων. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήσαμε απομόνωση DNA σε μία σειρά 117 δειγμάτων από αίμα και γάλα προβάτων συνολικά 8 φυλών (Χίου, Άργους, Άρτα, Καλλαρύτικο, Καραγκούνικο, Μπούτσικο, Σαρακατσάνικο, Κατσικά). Έπειτα έγινε ενίσχυση PCR σε περιοχή 306 βάσεων του γονιδίου CSN3ex4 και στη συνέχεια υποβάλαμε τα PCR προϊόντα σε ανάλυση SSCP, κατά την οποία τα μονόκλωνα DNA διαμόρφωσαν δύο διαφορετικά ηλεκτροφορητικά πρότυπα σε πηκτή ακρυλαμίδης. Ακολούθησε αλληλούχιση των PCR προϊόντων ώστε να βρεθεί η ακριβής αλληλουχία των βάσεων και να αποκαλυφθεί πιθανός πολυμορφισμός.

Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι τα δύο διαφορετικά ηλεκτροφορητικά πρότυπα που εμφανίστηκαν αφορούν το ένα στην αλληλουχία αναφοράς (GenBank KC9631342) και το άλλο σε μία ετεροζυγωτία στη βάση 628 (A→T), η οποία παρατηρήθηκε σε 4 δείγματα. Η πολυμορφική αυτή θέση εντοπίζεται μέσα στην 3'-αμετάφραστη περιοχή και επομένως δεν μεταφράζεται στην κ-καζεΐνη.

Συμπερασματικά, προέκυψε ότι το γονίδιο της κ-καζεΐνης είναι καλά συντηρημένο στις ελληνικές φυλές προβάτων που εξετάστηκαν, κάτι που συνάδει με τη βιβλιογραφία για χαμηλό γενετικό πολυμορφισμό του γονιδίου CSN3 στα πρόβατα, σε αντίθεση με ό,τι παρατηρείται σε αγελάδες και αίγες όπου η εν λόγω θέση παρουσιάζεται περισσότερο πολυμορφική. Η ανάλυση SSCP αποδείχτηκε σπουδαίο εργαλείο στην ανίχνευση γενετικού πολυμορφισμού, παρόλα αυτά περαιτέρω ανάλυση σε επίπεδο πρωτεϊνικό καθίσταται απαραίτητη καθώς η κ-καζεΐνη υφίσταται πληθώρα μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, οι οποίες την καθιστούν ετερογενή στο πρωτεϊνικό επίπεδο.

Summary

The present study aimed at studying the extend of genetic polymorphism in the kappa-casein gene, exon 4 (CSN3ex4) derived from sheep of Greek origin. For that purpose, DNA from 117 blood and milk samples was isolated from a total of 8 different breeds including Chios, Argos, Arta, Karagkouniko, Sarakatsaniko, Boutsico and Katsika sheep. Amplification of a 350 bp region in the aforementioned gene was then conducted by means of PCR. The PCR products were later subjected to SSCP analysis, where single stranded DNA took two distinctive conformations in a polyacrylamide gel electrophoresis. Sequencing of the PCR products was then conducted to reveal the exact DNA sequence and to check for genetic polymorphism in our samples.

Results showed that the two electrophoretic patterns formed in SSCP where the reference sequence (GenBank KC963134) and an heterozygosity in the nucleotide base 628 (A→T), which appeared in 4 samples. This polymorphic site is positioned in the 3'-untranslated region and therefore does not translate into the kappa-casein protein.

In conclusion, the kappa-casein gene appeared to be greatly conserved among the Greek sheep breeds checked - an observation on par with other studies that mostly showed monomorphic patterns for the kappa-casein gene in sheep, contrary to what has been observed for other ruminants. SSCP analysis proved to be an adequate tool for scanning genetic polymorphism, even though subsequent analysis at the protein level should be conducted since kappa-casein is greatly being modified post-translation - modifications that result to it being highly heterogeneous at the protein level.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ:

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	1
---------------	---

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	2
---------------	---

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. <u>ΓΑΛΑ: ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΓΑΛΑΚΤΟΣ</u>	3
1. 1 Λίπος.....	3
1. 2 Πρωτεΐνες γάλακτος.....	4
1. 2. 1 Καζεΐνες.....	5
1. 2. 2 Πρωτεΐνες του ορού γάλακτος.....	7
1. 2. 3 Σύγκριση πρωτεϊνών πρόβειου γάλακτος με το αγελαδινό	7
1. 3 Λακτόζη και άλατα γάλακτος.....	7
2. <u>Η Κ-ΚΑΖΕΙΝΗ</u>	9
2. 1 Το γονίδιο της κ-καζεΐνης βοειδών & πολυμορφισμοί.....	10
3. <u>ΠΗΞΗ ΓΑΛΑΚΤΟΣ</u>	13
4. <u>ΕΛΛΗΝΙΚΕΣ ΦΥΛΕΣ ΠΡΟΒΑΤΩΝ</u>	15

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5. <u>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</u>	19
5. 1 DNA απομόνωση.....	19
5. 2 Ενίσχυση γονιδίου CSN3 με PCR.....	19
5. 3 Single str & conformation polymorphism (SSCP) ανάλυση.....	20
5. 4 Καθάρισμα PCR προϊόντων και αλληλούχηση.....	22
6. <u>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u>	23
6. 1 Απομόνωση DNA.....	23
6. 2 DNA ενίσχυση με PCR.....	24
6. 3 Ανάλυση SSCP (Single str & conformation polymorphism)	25
6. 4 Αλληλούχηση.....	26
6. 5 Συζήτηση.....	29
7. <u>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</u>	33
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	34

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Εδώ και 50 περίπου χρόνια που μελετήθηκε πρώτη φορά ο γενετικός πολυμορφισμός των πρωτεϊνών του γάλακτος από τους Aschaffenburg και Drewry (1955) (Aschaffenburg & Drewry, 1955), το πεδίο αυτό έχει προκαλέσει διεθνές ερευνητικό ενδιαφέρον χάρη στην πιθανή συσχέτιση του με ποσοτικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά του γάλακτος. Γονίδια των κύριων πρωτεϊνών του γάλακτος, όπως οι καζεΐνες, είναι συχνά αντικείμενο μελέτης, και αφορούν στα κυριότερα ζώα γαλακτοπαραγωγής με πρώτες τις αγελάδες, τα πρόβατα και τις κατσίκες. Καθώς οι προσπάθειες των ερευνητών στοχεύουν στην εύρεση εκείνου του γονότυπου που αποδίδει στο γάλα καλύτερα χαρακτηριστικά, που φέρει μεγαλύτερες αποδόσεις γαλακτοπαραγωγής αλλά και που δημιουργεί καλύτερες συνθήκες τυροκόμησης, μπορούμε να κατανοήσουμε την εμπορική σημασία της εύρεσης ενός τέτοιου αλληλομόρφου.

Είναι γνωστό εδώ και πολλές δεκαετίες ότι υπάρχουν πολλά κλάσματα καζεΐνης που διαφέρουν μεταξύ τους στη δομή, στην ηλεκτροφορητική κινητικότητα αλλά και ως προς την τεχνολογική τους συμπεριφορά. Αργότερα διαπιστώθηκε και η ύπαρξη γενετικών παραλλαγών τους (Anifantakis, 2004). Τα κυρία καζεϊνικά κλάσματα είναι τέσσερα (αs1-, αs2-, β- και κ- καζεΐνη), καθένα από τα οποία παρουσιάζει γενετικές παραλλαγές. Ο γενετικός πολυμορφισμός τους παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον κατά την τυροκομηση, αφού σχετίζεται με τη συνεκτικότητα του πηγματος, το χρόνο πήξης, την περιεκτικότητα του τυροπηγματος σε καζεΐνη και την αποδοχή σε τυρί (Moatsou et al., 2004). Η κ-καζεΐνη ειδικά, καθώς συνιστά μέρος της μονάδας του «καζεϊνικού μυκηλίου» (σύμπλοκο καζεϊνών με φωσφόρο και ασβέστιο), που αποτελεί τη βάση του πηγματος κατά την τυροκόμηση του γάλακτος, αποτελεί πρωτεΐνη εξαιρετικής σημασίας. Η σταθερότητα αυτών των μυκηλίων βασίζεται κυρίως στην διπολικότητα του μορίου της κ-καζεΐνης η οποία αποτελείται από ένα υδρόφοβο μόριο, την παρά-κ-καζεΐνη (που συνδέεται με το υδροφοβικό εσωτερικό του μορίου του μηκυλίου) και από ένα υδρόφιλο μόριο, το μακροπεπτιδίο ή γλυκομακροπεπτιδίο (CMP ή GMP), το οποίο αντιδρά με το περιβάλλον διάλυμα ώστε να σταθεροποιεί το μηκύλιο σε αυτό (υδρόφιλο). Συνήθως λοιπόν για να πετύχουμε την πήξη του γάλακτος σε τυρί αρκεί να σπάσουμε το μόριο της κ-καζεΐνης στο σημείο σύνδεσης μεταξύ της παρά-κ- καζεΐνης και του μακροπεπτιδίου.

Είναι εμφανές λοιπόν η νευραλγική αυτή θέση της κ-καζεΐνης στην τυροκόμηση του γάλακτος. Ένα μεγάλο μέρος από την παγκόσμια παραγωγή γάλακτος διατίθεται για την παραγωγή τυριού: στην παγκόσμια αγορά κυκλοφορούν πολλά είδη τυριών, από διάφορα είδη γάλακτος και με διάφορες τεχνολογίες παρασκευής. Ιδιαίτερα για τον ελλαδικό χώρο, η τυροκομία αποτελεί πολύ αξιολογικό κλάδο των τροφίμων και βέλτιστο τρόπο αξιοποίησης των μεγάλων ποσοτήτων πρόβειου και αιγείου γάλακτος που παράγονται στη χώρα μας. Η αιγο- και πρόβατο- τροφία για την χώρα μας παίζει κατά παράδοση πολύ σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση του γεωκτηνοτροφικού εισοδήματος: χάρη στις ιδιαίτερες εδαφοκλιματικές συνθήκες, η Ελλάδα αποτελεί ανταγωνιστική δύναμη στα αιγοπροβατοτροφικά προϊόντα, ενώ η αγελαδοτροφία είναι συγκριτικά πολύ λιγότερο προσαρμοσμένη (Hadjigeorgiou et al., 2002, Zygoiannis, 2006).

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε ο γενετικός πολυμορφισμός στο γονίδιο της κ-καζεΐνης γάλακτος ελληνικών φυλών προβάτων. Γενομικό DNA απομονώθηκε από δείγματα αίματος ή γάλακτος προβάτων και το εξώνιο 4 του γονιδίου της κ-καζεΐνης ενισχύθηκε με PCR. Με τη μέθοδο SSCP ανιχνεύθηκαν και διαχωρίστηκαν τα δείγματα τα οποία έδωσαν διαφορετικό ηλεκτροφορητικό πρότυπο και ακολούθησε αλληλούχισή τους για την εύρεση της ακριβούς DNA ακολουθίας.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η αξία του γάλακτος ως διατροφικό προϊόν για τον άνθρωπο έχει αναγνωριστεί από αρχαιολογικών χρόνων: από το θηλασμό των νεογνών μέχρι και τη δημιουργία γαλακτοκομικών προϊόντων, το γάλα αποτελούσε πάντα μέρος της ανθρώπινης καθημερινότητας και ήταν συνειφασμένο με την ευμάρεια και τη μητρική φροντίδα καθώς αποτελεί πηγή ενέργειας, θρεπτικών ουσιών αλλά και δομικών συστατικών για τον οργανισμό.

Με τη σειρά του, το τυρί, του οποίου η πρώτη δημιουργία χρονολογείται περίπου 8.000 χρόνια πριν, λόγω της υψηλής διατροφικής του αξίας και των εξαιρετικών οργανοληπτικών του χαρακτηριστικών αποτελεί ένα από τα σπουδαιότερα γαλακτοκομικά προϊόντα. Οι δύο κυριότερες εκδοχές που έχουν αναφερθεί για τη δημιουργία του πρώτου τυριού αφορούν, η πρώτη, στην τυχαία παρασκευή του κατά τη μεταφορά γάλακτος μέσα σε ένα ασκό από στομάχι προβάτου, ενώ η δεύτερη αναφέρει ότι η πρώτη παρασκευή γάλακτος δεν ήταν τυχαία αλλά αποτέλεσμα προσπάθειας του ανθρώπου να ανακαλύψει τρόπους διατήρησης των συστατικών του γάλακτος, όπως η ξήρανσή του σε αβαθή πήλινα ή ξύλινα δοχεία στον ήλιο. Και στις δύο περιπτώσεις πάντως υπήρξε η δημιουργία πηγμάτων, είτε λόγω της δράσης των ενζύμων του στομάχου του προβάτου είτε λόγω της ανάπτυξης βακτηρίων αντίστοιχα (Anifantakis, 2004, Kaminaridis & Moatsou, 2009)

Σήμερα χρησιμοποιείται κυρίως το αγελαδινό και δευτερευόντως το πρόβειο και το γίδινο γάλα στη γαλακτοκομία. Η σύστασή του διαφέρει ανάμεσα στα θηλαστικά, χωρίς να παύει να αποτελεί από τις πιο πλήρης και απλές φυσικές τροφές ανεξάρτητα της πηγής του.

Η παρούσα μελέτη χωρίζεται σε Γενικό και Ειδικό μέρος. Στο πρώτο παραθέτονται κάποιες γενικές πληροφορίες για το γάλα και τα συστατικά του, για την κ-καζεΐνη των βοειδών και τον πολυμορφισμό όπως έχει προκύψει από άλλες μελέτες. Στο δεύτερο μέρος αναπτύσσεται ο τρόπος εκτέλεσης του πειράματος που αναφέρθηκε παραπάνω, γίνεται η παρουσίαση των αποτελεσμάτων καθώς και η συζήτησή τους.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΓΑΛΑ: ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ

Το γάλα περιέχει νερό, λίπος, πρωτεΐνη (καζεΐνες, πρωτεΐνες του ορού & ένζυμα), υδατάνθρακες (κυρίως λακτόζη) και τέφρα (άλατα, βιταμίνες). Στο νερό είναι διαλυμένη η λακτόζη, οι πρωτεΐνες του ορού και σημαντικό μέρος ανόργανων στοιχείων (Πίνακας 1). Τα καζεϊνικά μηκύλια βρίσκονται σε κολλοειδή διασπορά ενώ το λίπος βρίσκεται με τη μορφή γαλακτώματος λίπους σε νερό (Mantis, 1993).

Το γάλα των πρώτων ημερών μετά τον τοκετό ονομάζεται πρωτόγαλα και διαφέρει από το κανονικό γάλα στη σύσταση και στις ιδιότητές του.

***Πίνακας 1:** Ποσοστιαία σύσταση (%) αγελαδινού, πρόβειου και γιδινού γάλακτος (Anifantakis, 2004)*

<i>Γάλα</i>	<i>Νερό</i>	<i>Λίπος</i>	<i>Πρωτεΐνη</i>	<i>Υδατάνθρακες</i>	<i>Τέφρα</i>
Αγελαδινό	87,3	3,8	3,3	4,9	0,7
Πρόβειο	81,4	7,6	5,6	4,5	0,9
Γιδινό	86,1	5,0	3,9	4,2	0,8

Πολλοί παράγοντες επιδρούν και επηρεάζουν την αναλογία των συστατικών του γάλακτος, οι σημαντικότεροι είναι η διατροφή, το είδος του ζώου, η φυλή, το στάδιο της γαλακτικής περιόδου και η εποχή. Η αναλογία αυτή των συστατικών του γάλακτος έχει άμεση επίδραση στην τυροκόμιση αλλά και την ποιότητα του τυριού (Ng-Kwai-Hang et al., 1992, Pulina et al., 2006)

1.1 Λίπος

Τα θηλαστικά έχουν μεγάλες διακυμάνσεις σε ό,τι αφορά την περιεκτικότητα σε λίπος του γαλακτός τους (Ofstedal & Iverson, 1995). Το λίπος του γάλακτος βρίσκεται με τη μορφή λιποσφαιρίων, για το λόγο αυτόν το γάλα μπορεί να θεωρηθεί ως γαλάκτωμα λίπους σε νερό: το γάλα χωρίς τα λιποσφαίρια συνιστά το πλάσμα γάλακτος και είναι ισοδύναμο με το άπαχο γάλα. Τα λιποσφαίρια αποτελούνται από έναν πυρήνα

τριγλυκεριδίων και μία μεμβράνη κυρίως πρωτεϊνικής φύσης, ενώ έχουν διάμετρο 0,1-10 μm . Η μεμβράνη των λιποσφαιρίων (μέσο πάχος 15 nm και 2-6 % της μάζας του λιποσφαιρίου) δρα ως γαλακτωματοποιητής, και βοηθά στη διασπορά του λίπους στο πλάσμα του γάλακτος ενώ, επίσης, προστατεύει τα λιπίδια του πυρήνα από τη λιπόλυση που οδηγεί σε αλλοίωση (Mather & Keenan, 1998). Το λίπος του γάλακτος αποτελείται κυρίως από τριγλυκερίδια με λιπαρά οξέα που έχουν 2-20 άτομα C και 0-4 διπλούς δεσμούς. Επίσης, σε μικρές συγκεντρώσεις περιέχει και άλλα λιπίδια, όπως φωσφολιπίδια, χοληστερόλη, ελεύθερα λιπαρά οξέα, διγλυκερίδια (Mantis, 1993).

Στο γάλα το περισσότερο από το 95 % των λιπιδίων βρίσκεται με τη μορφή λιποσφαιρίων που είναι διασπαρμένα στη φάση του ορού του γάλακτος. Με φυσικές μεθόδους, όπως με φυγοκέντρηση, το λίπος του γάλακτος εύκολα μπορεί εύκολα να διαχωριστεί από τα άλλα υπόλοιπα συστατικά του γάλακτος. Τα λιποσφαίρια έχουν την τάση να συσσωματώνονται και να ανεβαίνουν στην επιφάνεια του γάλακτος: με ομογενοποίηση επέρχεται σταθεροποίηση της διασποράς του λίπους, μειώνεται το μέγεθος των λιποσφαιρίων (μέση διάμετρος $<1\mu\text{m}$), και κατά συνέπεια αυξάνεται κατά πολύ ο αριθμός τους και η επιφάνειά τους (Belitz et al., 2012).

Εκτός από πηγή ενέργειας, το λίπος συνιστά πηγή δομικών συστατικών κυτταρικών μεμβρανών ενώ αποτελεί πηγή απαραίτητων λιπαρών οξέων (λινελαϊκό) όπως και λιποδιαλυτών βιταμινών (A, D, E, K). Επίσης, είναι αυτό που διαμορφώνει σε μεγάλο βαθμό τα ρεολογικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των προϊόντων γάλακτος (Kaminaridis & Moatsou, 2009).

1.2 Πρωτεΐνες γάλακτος

Οι πρωτεΐνες του γάλακτος αποτελούνται από δύο κύριες ομάδες, τις καζεΐνες και τις οροπρωτεΐνες. Η διακύμανση της περιεκτικότητας του γάλακτος σε ολικές πρωτεΐνες τοποθετείται μεταξύ 3,3 g/100ml και 3,9 g/100ml.

Κατά μέσο όρο, το πρωτεϊνικό κλάσμα αποτελείται κατά 75-80% από καζεΐνες και κατά 20-25% από οροπρωτεΐνες (Mantis, 1993). Στον Πίνακα 2 παρουσιάζεται η σύσταση των πρωτεϊνών του αγελαδινού πρόβειου και αίγιου γάλακτος.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Σύσταση των πρωτεϊνών του αγελαδινού, πρόβειου και αίγειου γάλακτος (Borková & Snaselova, 2005)

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

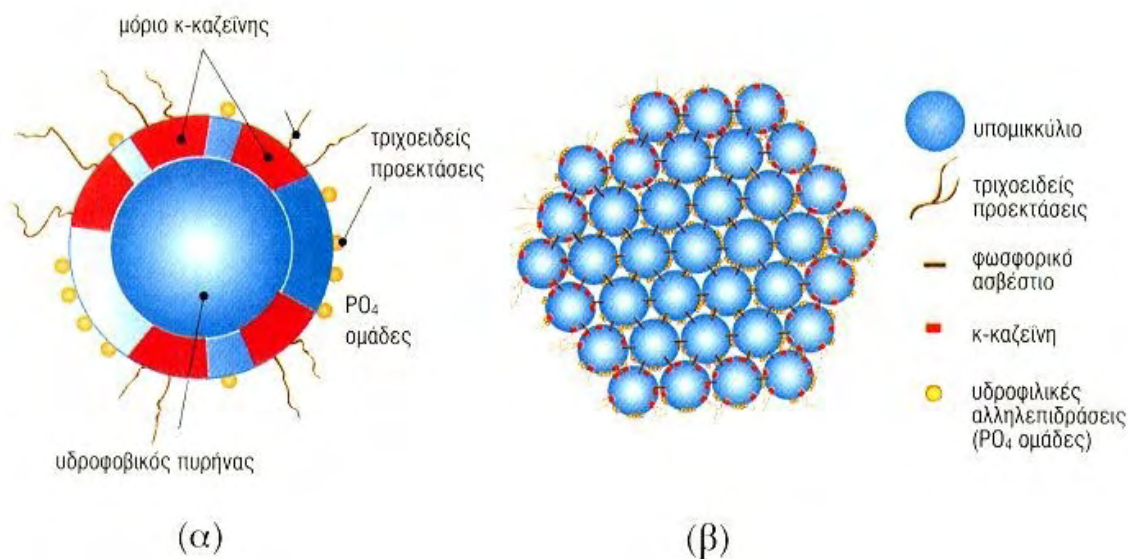
1. 2. 1 Καζεΐνες

Το αγελαδινό γάλα περιέχει περίπου 3,3 % w/v πρωτεΐνες. Από αυτές περίπου 80 % είναι καζεΐνες και περίπου 20 % πρωτεΐνες του ορού. Με οξίνιση στο pH 4,6 (ισοηλεκτρικό σημείο των καζεϊνών) καταβυθίζεται η καζεΐνη ενώ οι πρωτεΐνες του ορού παραμένουν διαλυτές (Sweeney & Fox, 2013). Οι κύριες καζεΐνες του γάλακτος (αγελαδινού) είναι οι α_{s1} -CN (38%) , α_{s2} -CN (10%) , β -CN (36%) και οι κ -CN (13%). Επίσης, στα πρόβατα, βρίσκονται και οι γ -καζεΐνες (3%) που προκύπτουν από υδρόλυση της β -καζεΐνης με δράση της πλασμίνης (φυσική πρωτεϊνάση του γάλακτος).

Περίπου το 95% του καζεϊνικού κλάσματος του γάλακτος είναι υπό την μορφή μεγάλων κολλοειδών συσσωματωμάτων, γνωστά ως μυκήλια. Αυτά είναι έντονα ενυδατωμένα, ενσωματώνοντας περίπου 2.0–4.0 g H₂O ανά γραμμάριο πρωτεΐνης. Το άνυδρο μέρος των μυκηλίων αποτελείται από 94% πρωτεΐνη (καζεΐνες, ένζυμα) και, κατά 6%, από ασβέστιο και φωσφόρο (κυριότερα) αλλά και μαγνήσιο (Fox et al., 2015). Η βιολογική λειτουργία του μυκηλίου είναι να μεταφέρει μεγάλες ποσότητες αδιάλυτου κολλοειδούς φωσφορικού ασβεστίου στα νεογνά σε υγρή μορφή και να σχηματίζει πήγμα στο στομάχι για πιο αποτελεσματική διατροφή (De Kruif & Holt, 2003).

Η γνώση της δομής των μυκηλίων των καζεϊνών είναι σημαντική γιατί αντιδράσεις που πραγματοποιούνται σε αυτά είναι βασικές για πολλές διεργασίες παραγωγής προϊόντων γάλακτος, με κυριότερη την τυροκομία. Όπως περιγράφουν πολλοί ερευνητές (Belitz et al., 2012, Holt, 1992, Walstra & Jenness, 1984), η μονάδα αυτού του καζεϊνικού μυκηλίου μπορεί να προσδιοριστεί ως μια σφαιροειδής κατασκευή που αποτελείται και από τους υπομικκύλια, τα οποία συγκρατούνται μεταξύ τους με γέφυρες κολλοειδούς φωσφορικού ασβεστίου, υδρόφοβες και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και δεσμούς

υδρογόνου (Fox et al., 2015). Κάθε υπομυκήλιο, το οποίο αποτελείται από 10-100 καζεϊνικά κλάσματα, έχει υδρόφοβο πυρήνα και ένα περίβλημα κυρίως από το υδρόφιλο καρβοξυτελικό άκρο της κ-καζεΐνης. Όσον αφορά στις γέφυρες κολλοειδούς φωσφορικού ασβεστίου, φαίνεται ότι πρόκειται για ηλεκτροστατικές δράσεις μεταξύ των αρνητικά φορτισμένων φωσφορικών ομάδων της καζεΐνης και των συσσωματωμάτων $\text{Ca}_9(\text{PO})_6$, τα οποία φορτίζονται θετικά προσροφώντας δύο Ca^{2+} από το περιβάλλον. Στην Εικόνα 1.2.1 φαίνεται η δομή του μυκηλίου και υπομυκηλίου των καζεϊνών.



Εικόνα 1: Δομή υπομυκηλίου (α) και μυκηλίου καζεΐνης (β) (Πηγή: Ανυφαντάκης, 2004)

Οι κ-καζεΐνες (υδρόφιλες) μαζί με τις αs1- αs2 καζεΐνες (υδρόφοβες) φαίνεται να είναι τοποθετημένες στην επιφάνεια της παραπάνω σφαίρας έτσι ώστε να αποφεύγεται η συγκόλληση των ομοιοπολικών μορίων. Ενώ στο κέντρο της σφαίρας είναι τοποθετημένες οι αs1- αs2 και β καζεΐνες, οι οποίες είναι υδρόφοβα μόρια (Holt, 1992). Η σταθερότητα αυτών των μυκηλίων βασίζεται κυρίως στην διπολικότητα του μορίου της κ-καζεΐνης η οποία αποτελείται από ένα υδρόφοβο μόριο, την παρά-κα-καζεΐνη που συνδέεται με το υδροφοβικό εσωτερικό του μορίου του μυκηλίου και από ένα υδρόφιλο μόριο, το μακροπεπτίδιο ή γλυκομακροπεπτίδιο (CMP ή GMP) το οποίο αντιδρά με το περιβάλλον διάλυμα ώστε να σταθεροποιεί το μυκήλιο σε αυτό. Συνήθως λοιπόν για να πετύχουμε την πήξη του γάλακτος σε τυρί αρκεί να σπάσουμε το μόριο της κ-καζεΐνης στο σημείο σύνδεσης μεταξύ της παρά-κ- καζεΐνης και του μακροπεπτιδίου. Στο αγελαδινό γάλα αυτό το σημείο βρίσκεται στο σημείο Phe105-Met106. Έτσι, όταν σπάσει αυτός ο δεσμός το μακροπεπτίδιο απελευθερώνεται στον όρο του γάλακτος και χάνεται η ιδιότητα του ως ισορροπιστής του διαλύματος με αποτέλεσμα να έχουμε το σχηματισμό πηγμάτων μεταξύ των μυκηλίων (Walstra & Jenness, 1984).

1. 2. 2 Πρωτεΐνες του ορού γάλακτος

Το πλάσμα γάλακτος ή άπαχο γάλα χωρίς την καζεΐνη ονομάζεται ορός γάλακτος. Όπως προαναφέρθηκε, το πρωτεϊνικό κλάσμα αποτελείται κατά 20-25% από οροπρωτεΐνες (Μάντης, 1993). Οι πρωτεΐνες του ορού είναι κυρίως σφαιρικές πρωτεΐνες και βρίσκονται στο γάλα ως μονομερή ή ολιγομερή.

Οι οροπρωτεΐνες, με βάση τη διαλυτότητά τους σε διάφορα μέσα, ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες, τις γαλακταλβουμίνες (που περιλαμβάνουν τη β-λακτοσφαιρίνη, την α-λακταλβουμίνη και την οροαλβουμίνη), τις γαλακτοανοσοσφαιρίνες (που περιλαμβάνουν την IgG1, την IgG2, την IgA και την IgM) και τις πρωτεόζες-πεπτόνες (Fox et al., 2015).

Στο γάλα, εκτός από τις κατηγορίες των πρωτεϊνών που αναφέρθηκαν υπάρχουν και άλλες, σε σημαντικά όμως μικρότερη αναλογία. Μερικές από αυτές τις πρωτεΐνες είναι η γαλακτοσιδερίνη, η λακτολίνη, οι πρωτεΐνες της μεμβράνης των λιποσφαιρίων και διάφορα ένζυμα (Anifantakis, 2004).

1. 2. 3 Σύγκριση πρωτεϊνών πρόβειου με το αγελαδινό

Το αγελαδινό γάλα περιέχει 4 κύριες καζεΐνες, τις αs1-CN, αs2-CN, β-CN και κ-CN ενώ το πρόβειο γάλα περιέχει τις ίδιες τέσσερις καζεΐνες αλλά και τις γ-καζεΐνες (3%) που προκύπτουν από υδρόλυση της β-καζεΐνης με δράση της πλασμίνης (φυσική πρωτεϊνάση του γάλακτος). Το σύστημα μυκηλίων του πρόβειου γάλακτος είναι όμοιο με του αγελαδινού, ενώ τα μυκήλια του πρόβειου γάλακτος έχουν μικρότερο μέγεθος, $D < 80$ nm (Park et al.). Επίσης, το πρόβειο γάλα θρομβώνει πιο γρήγορα και δίνει πιο σταθερό πηγμα από το αγελαδινό.

1. 3 Λακτόζη και άλατα γάλακτος

Στα υδατοδιαλυτά συστατικά του γάλακτος ανήκουν η λακτόζη, τα άλατα, οι βιταμίνες και διάφορες άλλες ενώσεις μικρού MB. Η λακτόζη, το χαρακτηριστικό ζάχαρο του γάλακτος, είναι διζαχαρίτης D-γλυκόζης και D-γαλακτόζης, με β- (1-4) γλυκοζιτικό

δεσμό και υδρολύεται από το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση. Το αγελαδινό και το πρόβειο γάλα περιέχουν περίπου 4,8 % λακτόζη και το γίδινο περίπου 4,3 % (Belitz et al., 2012).

Η λακτόζη θεωρείται σάκχαρο αναγωγικό, εφόσον η ημιακεταλική ομάδα της γλυκόζης είναι ελεύθερη. Στο γάλα υπάρχει με τους α- και β- ανωμερικούς τύπους (διαφέρουν ως προς τη θέση του -OH και του -H του C-1) σε ισορροπία. Με ήπια αναγωγή η ελεύθερη αλδευδομάδα της λακτόζης μετατρέπεται σε αλκοολική, και παράγεται η λακτιτόλη. Η λακτιτόλη έχει σχετικά γλυκιά γεύση, δεν μεταβολίζεται και βρίσκει εφαρμογή ως γλυκαντικό σε τρόφιμα χαμηλών θερμίδων (Walstra & Jenness, 1984).

Η λακτόζη έχει μικρότερη γλυκύτητα από τη γλυκόζη και τη ζαχαρόζη και ζυμώνεται (μεταβολίζεται) εύκολα από διάφορους μικροοργανισμούς, όπως τα γαλακτικά βακτήρια, που τη χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας. Από τις ζυμώσεις παράγονται ενώσεις με μικρότερο MB. Η πιο σημαντική ζύμωση στη γαλακτοκομία είναι η γαλακτική (ομογαλακτική και ετερογαλακτική), με σχηματισμό γαλακτικού οξέος. Το γαλακτικό οξύ μπορεί, επίσης, να ζυμωθεί από βακτήρια. Με την προπιονική ζύμωση μετατρέπεται σε προπιονικό οξύ και διοξείδιο του άνθρακα, το οποίο συγκεντρώνεται στη μάζα του τυριού και δημιουργεί χαρακτηριστικές οπές. Με την βουτυρική ζύμωση παράγεται βουτυρικό οξύ που έχει ανεπιθύμητη οσμή και αέρια διοξείδιο του άνθρακα και υδρογόνο που δημιουργούν φουσκάματα στα τυριά (Kaminaridis & Moatsou, 2009).

Επίσης, σε προϊόντα γάλακτος συμβαίνει και αλκολική ζύμωση της λακτόζης, όπως στο κεφίρ και το κουμίζ, που σχηματίζεται αλκοόλη μέχρι 2 % (Anifantakis, 2004).

Τα άλατα του γάλακτος είναι ανόργανα και οργανικά, απλά ή σύμπλοκα, μερικά ιονισμένα. Μεταξύ αυτών κύρια είναι τα φωσφορικά, κιτρικά, χλωριούχα, θειικά, ανθρακικά και δισανθρακικά άλατα K, Na, Ca και Mg.

Ως κύρια συστατικά του γάλακτος θεωρούνται οι πρωτεΐνες, το λίπος, η λακτόζη και τα άλατα καθώς αυτά κυρίως καθορίζουν τη διατροφική και εμπορική του αξία. Ως δευτερεύοντα συστατικά του γάλακτος θεωρούνται διάφορα λιπίδια εκτός από τα τριγλυκερίδια, μη πρωτεϊνικές αζωτούχες ενώσεις, βιταμίνες, ένζυμα, αέρια, και άλλα ενώ επιπλέον, στο γάλα βρίσκονται διάφοροι μικροοργανισμοί, όπως και σωματικά κύτταρα από τα ζώα.

2. Η Κ-ΚΑΖΕΪΝΗ

Η κ-καζεΐνη (κ-CN) είναι το κλάσμα που σταθεροποιεί όλες τις άλλες καζεΐνες έναντι των ιόντων ασβεστίου. Ανάμεσα στις καζεΐνες, η κ-καζεΐνη παρουσιάζει κάποια μοναδικά χαρακτηριστικά: είναι διαλυτή παρουσία ασβεστίου σε όλες τις θερμοκρασίες, είναι η μοναδική από τις κύριες καζεΐνες που περιέχει στο μόριό της υδατάνθρακες (γαλακτόζη 1,3%, γαλακτοζαμίνη 1,4% και σιαλικό οξύ 2,0%) και υπολείμματα κυστεΐνης και είναι η λιγότερο φωσφορυλιωμένη.

Η κ-CN του αγελαδινού γάλακτος έχει 169 κατάλοιπα αμινοξέων στο μόριό της ενώ ο αριθμός των σακχάρων που είναι ενωμένα στην πεπτιδική αλυσίδα είναι δυνατό να ποικίλει και κατά συνέπεια να ποικίλει το μοριακό βάρος και η ηλεκτροφορητική της ικανότητα. Περιέχει επίσης δύο κατάλοιπα κυστεΐνης, που της επιτρέπουν να συμμετέχει στους σουλφιδριλικούς και δισουλφιδικούς δεσμούς (Fox et al., 2015) και φέρει τον πολύ ευαίσθητο στη χυμοσίνη δεσμό Phe (105) – Met (106), ο οποίος όταν υδρολυθεί χάνεται η προστατευτική ιδιότητά της πάνω στις άλλες καζεΐνες, γεγονός που έχει σαν αποτέλεσμα την πήξη του γάλακτος. Ο λειτουργικός της ρόλος είναι να σταθεροποιεί τις άλλες καζεΐνες στο μυκήλιο (Mantis, 1993).

Η κ-καζεΐνη της αγελάδας έχει μοριακό βάρος 21.269 Da και 169 αμινοξέα, 3 φωσφορικές ομάδες και δύο κυστεΐνες ενώ η πρόβεια κ-CN έχει 21.438 MB, 171 αμινοξέα, 3 φωσφορικές ομάδες και δύο κυστεΐνες. Παρατίθενται οι ακολουθίες τους στους Πίνακες 2.1 και 2.2 αντίστοιχα.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.1: Αλληλουχία αμινοξέων κ-CN αγελάδας (1-21 a.a=signal peptide), UniProtKB - P02668 (CASK_BOVIN)

10	20	30	40	50
MMKSFFLVVT	ILALTLPLFLG	AQEQNQEQPI	RCEKDERFFS	DKIAKYIPIQ
60	70	80	90	100
YVLSRYPSTY	LNYYQQKPVA	LINNQFLPYP	YYAKPAAVRS	PAQILQWQVL
110	120	130	140	150
SNTVPAKSCQ	AQPTTMAPHP	HPHLSFMAIP	PKKNQDKTEI	PTINTIASGE
160	170	180	190	
PTSTPTTEAV	ESTVATLEDS	PEVIESPPEI	NTVQVTSTAV	

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.2: Αλληλουχία αμινοξέων κ-CN προβάτου (1-21 a.a=signal peptide), UniProtKB - P02669 (CASK_SHEEP)

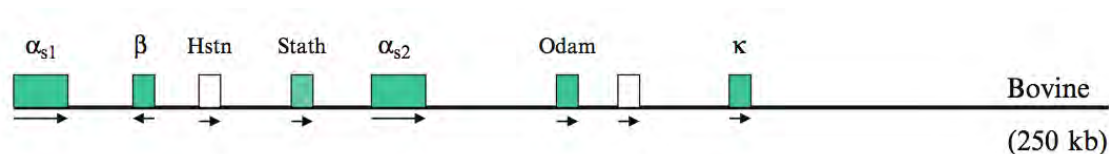
10	20	30	40	50
MMKSFFLVVT	ILALTLPLFLG	AQEQNQEQRI	CCEKDERFFD	DKIAKYIPIQ
60	70	80	90	100
YVLSRYPSYG	LNYYQQRPA	LINNQFLPYP	YYAKPVAVRS	PAQTLQWQVL
110	120	130	140	150
PNAVPAKSCQ	DQPTAMARHP	HPHLSFMAIP	PKKDQDKTEI	PAINTIASAE
160	170	180	190	
PTVHSTPTTE	AVVNAVDNPE	ASSESIASAP	ETNTAQVTST	EV

Η χυμοσίνη (πρωτεολυτικό ένζυμο) διασπά το δεσμό Phe105-Met106 (έχει επισημανθεί με κόκκινο στις παραπάνω ακολουθίες) και αποσταθεροποιεί το μυκήλιο, οπότε προκύπτουν η υδρόφοβη παρα-κ-καζεΐνη και το υδρόφιλο γλυκομακροπεπτίδιο (CMP ή GMP).

Από τις καζεΐνες, η κ-CN είναι η μόνη για την οποία έχει παρατηρηθεί μετα-μεταφραστική γλυκοζυλίωση με περίπου 60% να περιέχει έως 6 γλυκάνια. Οι περιοχές γλυκοζυλίωσης βρέθηκαν να είναι τα κατάλοιπα θρεονίνης στις θέσεις 121, 131, 133, 142, 145 και 165 για την αγελαδινή κ-CN και στις θέσεις 156, 158 ή 159 για την πρόβεια.

2.1 Το γονίδιο της κ-καζεΐνης βοειδών & πολυμορφισμοί

Τα γονιδια των καζεϊνών εδράζει στο χρωμόσωμα 6 στα βοοειδή και απαρτίζει ένα κομμάτι 250 kb συνολικά με τη σειρά των γονιδίων των καζεϊνών να είναι ως εξής: α -s1, β , α -s2 και κ (Gallagher et al., 1994).



Εικόνα 2.1: Οργάνωση του γενετικού τόπου των καζεϊνών των βοειδών. Τα πράσινα κουτιά αντιπροσωπεύουν τις μεταγραφικές μονάδες των γονιδίων (προσαρμογή από Sweeny & Fox, 2013).

Η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός του γονιδίου της κ-καζεΐνης στην αγελάδα έδειξε ότι η μεταγραφική μονάδα του γονιδίου αποτελείται από 5 εξώνια και το μήκος της (στην

αγελάδα) είναι 12.5 kb (Kapelinskaia et al., 1989, Alexander et al., 1988). Από τα 5 εξώνια, 3 είναι μικρά (65, 62 και 33 νουκλεοτίδια στα βοειδή), και κωδικοποιούν: την 5'-αμετάφραστη περιοχή (5'-UTR) (εξώνιο 1) και το πεπτίδιο σήματος (εξώνια 2 και 3) που είναι λίγο μεγαλύτερο (21 αντί για 15 βάσεις) στις σε-ασβέστιο-ευαίσθητες καζεΐνες. Επομένως, η πλειονότητα της ώριμης πρωτεΐνης κωδικοποιείται από το εξώνιο 4, καθώς το εξώνιο 5 κωδικοποιεί κι αυτό για την 3'-αμετάφραστη περιοχή (Feligini et al., 2005, Giambra & Erhardt, 2014).

Η πρωτεΐνη αναφοράς για την κ-καζεΐνη της αγελάδας είναι η κ-CN A-1P (UniProtKB - P02668). Όπως περιγράφεται από τους Sweeny & Fox (2013) στην ενότητα του πολυμορφισμού του κ-CN γονιδίου, έχουν βρεθεί συνολικά 11 πολυμορφισμοί στις αγελάδες, όμως μόνο οι δύο απαντούν με μεγάλη συχνότητα (Πίνακας 2.1.1). Οι δύο αυτές πιο κοινές γενετικές παραλλαγές έχουν χαρακτηριστεί ως Α και Β, με την Α να τείνει να είναι κυρίαρχη στις περισσότερες γαλακτοκομικές φυλές βοοειδών (Fox et al., 2015, Dyman & Glazko, 1997). Η κ-CN A-1P διαφέρει από τη Β παραλλαγή στην αντικατάσταση ενός καταλοίπου Thr από ένα κατάλοιπο Ile στη θέση 136, το οποίο επηρεάζει τη γλυκοζυλίωση, και ενός καταλοίπου Asp από ένα κατάλοιπο Ala στη θέση 148 (Ng-Kwai-Hang et al., 1992). Οι αντικαταστάσεις και των δύο αμινοξέων απαντούν στην περιοχή του μακροπεπτιδίου (106-169 αμινοξικά κατάλοιπα) που προκύπτει από την υδρόλυση της κ-CN από τη χυμοσίνη. Στο είδος *Bos indicus* (ασιατική αγελάδα), έχουν βρεθεί επιπλέον οι παραλλαγές C και E, οι οποίες διαφέρουν από την παραλλαγή Α ως προς την αντικατάσταση της His από την Arg στη θέση 97 και την αντικατάσταση της Gly από τη Ser στη θέση 155 (Dyman & Glazko, 1997, Ng-Kwai-Hang et al., 1992).

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.1: Κυριότερα αλληλόμορφα που έχουν βρεθεί στις αγελάδες (*Bos sp.*)

Αλληλόμορφο	Θέση 136	Θέση 148
A	<i>Thr</i>	<i>Asp</i>
B	<i>Ile</i>	<i>Ala</i>

Στα πρόβατα (*Ovis aries*) έχουν βρεθεί ελάχιστοι πολυμορφισμοί στο γονίδιο της κ-καζεΐνης: οι Ceriotti et al. (2004) εντόπισαν αντικατάσταση της σερίνης 125 σε λευκίνη (συχνότητα 0.015 στην ιταλική φυλή Sopravissana) (Ceriotti, 2004). Οι Feligini et. al (2005) εντόπισαν ένα SNP (Single Nuocleotide Polymorphism) στη θέση 237 του mRNA της κ-καζεΐνης του προβάτου (αλληλουχία αναφοράς: GenBank X51822), όπου μία θυμίνη αντικαταστάθηκε από μία κυτοσίνη στη θέση 237, δίνοντας μια συνώνυμη μεταλλαγή. Ο SNP βρέθηκε και στην ομόζυγη (φυλές Sarda, Pramenka) και στην ετερόζυγη κατάσταση (φυλή Pag). Οι παρατηρούμενες συχνότητες του αλληλομόρφου ήταν 0.12, 0.27 και 0.45 στις φυλές Pag, Sarda, Pramenka αντίστοιχα (Feligini et al., 2005). Οι Bastos et al. (2001) επιβεβαίωσαν την έλλειψη πολυμορφισμού της κ-καζεΐνης βρίσκοντάς τη μονομορφική (Bastos et al., 2001) μελετώντας μία ενδογενή φυλή προβάτου της Πορτογαλίας (Churra da Terra Quente), η οποία αποδείχτηκε ιδιαίτερα πολυμορφική για αρκετά απο τα υπόλοιπα γονίδια που εξετάστηκαν.

Μελέτες σε πρωτεϊνικό επίπεδο (ισοηλεκτρική εστίαση, τριχοειδής ηλεκτροφόρηση) έχουν δείξει διαφορετικές ηλεκτροφορητικές κινητικότητες λόγω διαφορετικού βαθμού γλυκοζυλίωσης και όχι διαφορετικής αμινοξικής ακολουθίας (Amigo, 2000, Park et al., 2007). Όπως προαναφέρθηκε, σε επίπεδο γονιδίου, δεν έχουν παρατηρηθεί πολλές γενετικές παραλλαγές (Ceriotti, 2004, Moiola et al., 1997, Park et al., 2007) του κ-CN, παρόλα αυτά οι μετα- μεταφραστικές τροποποιήσεις (γλυκοζυλίωση, φωσφορυλίωση) σε συγκεκριμένα δεκτικά αμινοξικά κατάλοιπα μπορούν να καθιστούν την κ-καζεΐνη περισσότερο ή λιγότερο δεκτική σε πηκτικά ένζυμα.

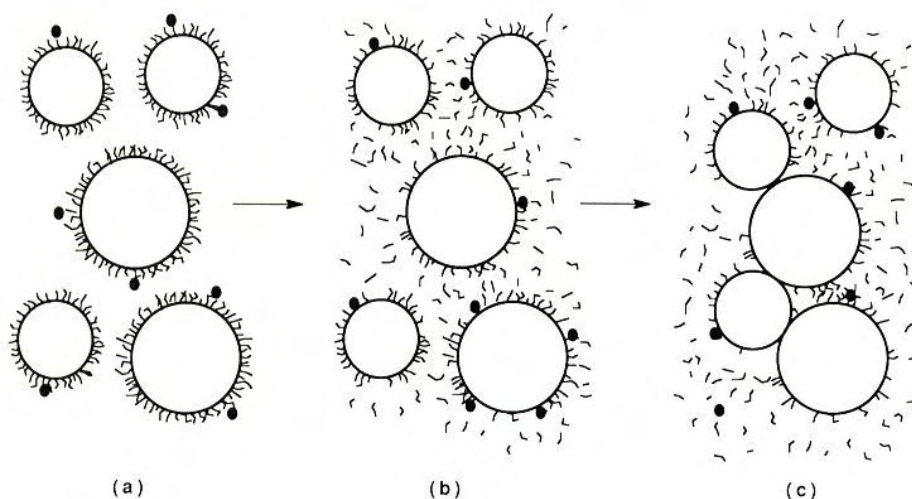
Επίσης, επειδή τα γονίδια όλων των καζεϊνών εντοπίζονται σε μια στενή χρωμοσωμική περιοχή, το ενδεχόμενο ασταθών συνδέσεων μεταξύ τους είναι μεγάλο (Ferretti et al., 1990, Threadgill & Womack, 1990). Έτσι οι πιθανές διαφορές στο φαινότυπο των πρωτεϊνών της οικογένειας ενός συγκεκριμένου βοειδούς μπορούν να ερμηνευτούν ως αποτέλεσμα των διαφορών γονιδιακής σύνδεσης μεταξύ των γονιδίων των καζεϊνών και των άλλων πρωτεϊνών του γάλακτος.

Η σημαντική αλληλουχία Phe(105)-Met(106) που, όπως προαναφέρθηκε, παίζει ρόλο στην πήξη του γάλακτος, διατηρείται σε όλα τα παρατηρούμενα αλληλόμορφα. Επίσης, όλες οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του κ-CN συμβαίνουν στο μέρος που αντιστοιχεί στο γλυκομακροπεπτίδιο (Sweeney & Fox, 2013).

3. ΠΗΞΗ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

Το πρώτο στάδιο στην τυροκόμηση είναι η πήξη του γάλακτος. Για την πλειονότητα των τυριών (περίπου 75%) αυτό επιτυγχάνεται με την προσθήκη στο γάλα μικρής ποσότητας πυτιάς (rennet) ή άλλων πηκτικών ενζύμων ενώ ο εναλλακτικός μηχανισμός πήξης πραγματοποιείται κατόπιν οξίνισης (Hyslop, 2003). Η πυτιά είναι το εκχύλισμα που λαμβάνεται από το τέταρτο στομάχι – ήνυστρο – μη απογαλακτισμένων μηρυκαστικών, κατά κύριο λόγο μοσχарιών. Σήμερα εκτός από πυτιά χρησιμοποιούνται και υποκατάστατά της όπως πεψίνη και πρωτεάσες. Κατασκευάζονται επίσης πυτιές από μικροοργανισμούς που έχουν την ιδιότητα να ενεργούν σχεδόν με τον ίδιο τρόπο όπως και η πυτιά που προέρχεται από τα ζώα (Anifantakis, 2004, Kaminaridis & Moatsou, 2009).

Η πήξη του γάλακτος με τη δράση της χυμοσίνης που περιέχεται στην πυτιά είναι το πρώτο στάδιο στην παρασκευή τυριών. Η προσθήκη χυμοσίνης στο γάλα (Εικόνα 3), επιφέρει στην αρχή περιορισμένες αλλαγές στα καζεϊνικά μυκήλια και στη συνέχεια το γάλα πήζει ταχύτατα. Η πήξη συμβαίνει σε δύο φάσεις, την ενζυμική και την μη ενζυμική φάση.



Εικόνα 3: Σχηματικό διάγραμμα της δράσης της χυμοσίνης (μικροί συμπαγείς μαύροι κύκλοι) στα καζεϊνικά μυκήλια: (α). Η κ-CN, που βρίσκεται στην επιφάνεια των μυκηλίων παραμένει άθικτη καθώς η χυμοσίνη προσκολλάται σε αυτά, (β). Μετά από μικρό χρονικό διάστημα αρκετό ποσοστό της κ-CN έχει υδρολυθεί και το αντίστοιχο ποσοστό του CMP βρίσκεται στο διάλυμα. Ωστόσο το ποσοστό της κ-CN που δεν έχει υδρολυθεί ακόμα δεν επιτρέπει τη συνένωση των μυκηλίων, (γ). Μετά από αρκετό χρονικό διάστημα, το μεγαλύτερο ποσοστό της κ-CN έχει υδρολυθεί και τα μυκήλια αρχίζουν να συσσωματώνονται (Hyslop, 2003).

Κατά την ενζυμική φάση η χυμοσίνη υδρολύει το δεσμό Phe 105-Met 106 της κ-καζεΐνης. Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε λίγα λεπτά ακόμη και στους περίπου 15 °C. Προϊόντα είναι η παρα-κ-καζεΐνη (1-105 αμινοξέα της κ-καζεΐνης, αμινοτελικό άκρο της κ-καζεΐνης), και το γλυκομακροπεπτίδιο (μακροπεπτίδιο) (106-160 αμινοξέα, καρβοξυτελικό άκρο της κ-καζεΐνης).

Έτσι, με την υδρόλυση της κ-καζεΐνης προκύπτει η παρακαζεΐνη (τροποποιημένη καζεΐνη) και το γλυκομακροπεπτίδιο. Στην παρακαζεΐνη περιλαμβάνεται και η παρα-κ-καζεΐνη που απελευθερώνεται με την ενζυμική υδρόλυση. Το γλυκομακροπεπτίδιο απομακρύνεται από την επιφάνεια των μυκηλίων των καζεϊνών. Επειδή είναι έντονα αρνητικά φορτισμένο, με την απομάκρυνσή του μειώνεται το αρνητικό φορτίο των μυκηλίων όπως και η ηλεκτροστατική άπωση μεταξύ τους. Επίσης, μειώνεται η επιφανειακή τους ενυδάτωση κατά περίπου 30 %. Το μακροπετίδιο ως υδατοδιαλυτό διαλύεται στον ορό του γάλακτος.

Όταν υδρολυθεί το περίπου 85 % της κ-καζεΐνης αρχίζει προοδευτικά η κροκίδωση των μυκηλίων, με ανάπτυξη υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων και γεφυρών ασβεστίου: έτσι δημιουργείται ένα τρισδιάστατο πρωτεϊνικό πλέγμα της παρακαζεΐνης. Η παρακαζεΐνη περιέχει και ανόργανα συστατικά και διατηρεί τα χαρακτηριστικά των μυκηλίων της.

Στην ακόλουθη μη ενζυμική φάση κατά την οποία απομακρύνεται ο ορός, τα ιόντα ασβεστίου είναι απαραίτητα (προστίθεται στο γάλα 10-20 g/100 mL). Η συσσωμάτωση των αποσταθεροποιημένων μυκηλίων των καζεϊνών παρουσία ιόντων ασβεστίου συμβαίνει σε θερμοκρασία > 20 °C.

Το πήγμα παρουσιάζει μεγάλη ικανότητα συναίρεσης: αυτή είναι η ιδιότητα του πήγματος να συρρικνώνεται και να αποβάλλει ορό (τυρόγαλα). Το πήγμα (τυρόπηγμα) παρουσιάζει ελαστικότητα και δεν θρυμματίζεται. Στο τυρόπηγμα περικλείονται τα λιποσφαίρια και μέρος του ορού του γάλακτος ενώ το γλυκομακροπεπτίδιο απομακρύνεται με το τυρόγαλα (Anifantakis, 2004).

4. ΕΛΛΗΝΙΚΕΣ ΦΥΛΕΣ ΠΡΟΒΑΤΩΝ

Η προβατοτροφία στην Ελλάδα αποτελεί σπουδαιότατο κλάδο της κτηνοτροφίας από αρχαιοτάτων χρόνων. Η μεγάλη ανάπτυξή της, όπως και της αιγοτροφίας, στη χώρα μας οφείλεται στις ιδιάζουσες φυσικές και οικονομικές συνθήκες: το 75% περίπου της συνολικής επιφάνειας της χώρας μας είναι ορεινές εκτάσεις, οι οποίες εμφανίζουν μεγάλη κλίση και πτωχή δενδρώδη βλάστηση. Παράλληλα οι κλιματολογικές συνθήκες ευνοούν τη φυσική βλάστηση μόνο κατά περιόδους μικρής διάρκειας (Zygoiannis, 2006). Με τέτοιες συνθήκες, τα μόνα παραγωγικά ζώα τα οποία μπορούν να εκτραφούν ήταν τα αιγοπρόβατα. Η έλλειψη επαρκούς εγχώριας παραγωγής χονδροειδών ζωοτροφών, λόγω γεωγραφικής θέσεως και ποιότητας εδάφους, είχε σαν αποτέλεσμα να θεωρείται η χώρα μας από ζωοτεχνικής πλευράς ως αιγοπροβατοτροφική (Hadjigeorgiou et al., 2002).

Η εκτροφή προβάτων στην Ελλάδα έχει σαν κύριο σκοπό το γάλα και την εξαρτώμενη από αυτό τυροκομία: όλες οι προβατίνες των εγχώριων φυλών αρμέγονται. Κάθε προσπάθεια βελτίωσης που γινότανε απέβλεπε στην αύξηση της γαλακτοπαραγωγικής ικανότητας, κατά κύριο λόγο. Παρόλα αυτά, η μέση ετήσια ανά κεφαλή παραγωγή γάλακτος παραμένει χαμηλή (140-160 κιλά) (Hadjigeorgiou et al., 2002, Rogdakis, 2002).

Από τα 9.000.000 πρόβατα που εκτρέφονται σήμερα στη χώρα μας, το 85% περίπου αποτελούν ζώα απροσδιόριστης φυλής. Αιτία της δυσάρεστης αυτής κατάστασης, καθώς και της εξαφάνισης του ντόπιου καθαρού γενετικού υλικού, θεωρείται η ανεξέλεγκτη διασταύρωση μεταξύ των φυλών και η απρογραμματίστη διάδοση της τεχνικής σπερματέγχυσης στον πρόβειο πληθυσμό της χώρας (Hadjigeorgiou et al., 2002).

Στην παρούσα μελέτη, εξετάσαμε για παρουσία πολυμορφισμού στο γονίδιο CSN3.4 σε συνολικά 117 δείγματα από γάλα ή/και αίμα προβάτων εγχώριων φυλών. Ακολουθεί παρακάτω μία σύντομη περιγραφή των γαλακτοπαραγωγικών χαρακτηριστικών της κάθε φυλής που συμπεριλήφθη στην παρούσα μελέτη.

1) Φυλή Άργους

Το πρόβατο Άργους πήρε το όνομά του από την περιοχή στην οποία αρχικά εκτρέφονταν, δηλαδή το πλούσιο σε βοσκές πεδινό τμήμα που περιβάλλει την πόλη του Άργους. Σήμερα εκτρέφεται σε περιορισμένο αριθμό. Το πρόβατο Άργους έχει καλή παραγωγικότητα με μέση ετήσια γαλακτοπαραγωγή η οποία υπερβαίνει τα 150 λίτρα/προβατίνα σε διάστημα άμελξης 150-180 ημερών. Θεωρείται πρόβατο μεγαλόσωμο. Έχει σωματικό βάρος 70 Kg για τα αρσενικά και 59 Kg τα θηλυκά. Ο δείκτης πολυδυμίας του κυμαίνεται στα 1,5-1,8, το σωματικό βάρος των αρνιών στον απογαλακτισμό ανέρχεται στα 12-13kg (Κέντρο Γενετικής Βελτίωσης Ζώων Αθήνας).

2) Φυλή Καλαρρύτικο

Η Καλαρρύτικη φυλή εκτρέφεται στους Καλαρύτες και το Συρράκο σε 18 ποίμνια με 6413 ζώα (στοιχεία του 2009). Ο δείκτης πολυδυμίας τους είναι 1,3–1,4. Η γαλακτοπαραγωγή τους κυμαίνεται στα 80- 100 kg ανά προβατίνα. Το σωματικό τους βάρος είναι 64 kg για τα κριάρια και 45 kg για τις προβατίνες (<http://www.gaiapedia.gr/>).

3) Φυλή Καραγκούνικο

Η Καραγκούνικη φυλή προβάτων εκπροσωπεί τον πεδινό τύπο της εγχώριας φυλής. Εκτρέφεται κυρίως στο δυτικό τμήμα της Θεσσαλίας. Ο συντελεστής πολυδυμίας είναι 1,36 και η γαλακτοπαραγωγή ανέρχεται στα 190 kg, περιεκτικότητας 7,4% σε λίπος. Το βάρος των ενηλίκων είναι 80 kg για τα αρσενικά και 60 kg για τα θηλυκά (Rogdakis, 2002).

4) Φυλή Κατσικά

Η φυλή Κατσικά δημιουργήθηκε προπολεμικά στην περιοχή του Κατσικά, ενός παραλίμνιου χωριού στο Ν. Ιωαννίνων, από διασταυρώσεις του ορεινού προβάτου Ηπείρου με το καραμάνικο πεδινό πρόβατο που είχε προέλευση την Κεντρική Τουρκία. Η πολυδυμία κυμαίνεται από 1,0-1,6 αρνιά ανά τοκετό. Ο μέσος όρος γαλακτοπαραγωγής κυμαίνεται από 90-170 κιλά γάλακτος και η μέση διάρκεια γαλακτοπαραγωγής κυμαίνεται από 140-180 ημέρες (<http://www.gaiapedia.gr/>).

5) Φυλή Ορεινό Ηπείρου (Μπούτσικο)

Το Μπούτσικο θεωρείται βελτίωση του γνήσιου Βλάχικου προβάτου. Ο συντελεστής πολυδυμίας είναι 1,1 και η γαλακτοπαραγωγή φτάνει τα 80 kg με περιεκτικότητα λίπους 7,6%. Η γαλακτοπαραγωγή των ελεγχόμενων Μπούτσικων προβάτων στο Κέντρο Γενετικής Βελτίωσης Ζώων (ΚΓΒΖ) Ιωαννίνων ανέρχεται στα 114 kg. Το βάρος των ενηλίκων προβάτων είναι 55 kg για τα αρσενικά και 45 kg για τα θηλυκά (Kominakis et al., 1998).

6) Φυλή Σαρακατσάνικο

Υποφυλή ορεινού τύπου με μικρό μέγεθος σώματος και δέκτη πολυδυμίας 1. Η γαλακτοπαραγωγή ανέρχεται στα 50 kg ανά προβατίνα ενώ το βάρος τους είναι στα 69kg για τα αρσενικά και 41kg για τα θηλυκά (<http://www.gaiapedia.gr/>).

7) Φυλή Φριζάρτα (Άρτας)

Το πρόβατο φυλής Φριζάρτα δημιουργήθηκε κατά την περίοδο 1960-1980 και προήλθε από τη διασταύρωση του εγχώριου πεδινού προβάτου Άρτας με κριούς της φυλής Ανατολικής Φρισιλανδίας, με τη χρήση της τεχνητής σπερματέγχυσης και τη συνεχή εφαρμογή της επιλογής των ομοιόμορφων και καλύτερων σε αποδόσεις προβατίνων και κριών, προσαρμοσμένων καλά στις τοπικές εδαφοκλιματικές συνθήκες. Το σωματικό του βάρος είναι 80-120 Kg για τα αρσενικά και 65-80 Kg για τα θηλυκά. Το πρόβατο Φριζάρτα σε σχέση με άλλα βελτιωμένα πρόβατα που εκτρέφονται στην Ελλάδα έχει μία από τις καλύτερες αναπαραγωγικές και παραγωγικές ιδιότητες. Η πολυδυναμία κυμαίνεται στο 1,7-1,8 περίπου, με την προϋπόθεση η διατροφή να είναι η ενδεδειγμένη. Η εμπορεύσιμη γαλακτοπαραγωγή ανέρχεται στα 200-350 Kg γάλακτος με λιποπεριεκτικότητα 5,5-6,8% (Κέντρο Γενετικής Βελτίωσης Ζώων Αθήνας).

8) Φυλή Χίου

Το πρόβατο της φυλής Χίου κατάγεται από το νότιο πεδινό τμήμα της νήσου Χίου. Σήμερα θεωρείται μία από τις πιο περιζήτητες φυλές για την αναβάθμιση των ποιμνίων και τα ζώα αναπαραγωγής πωλούνται σε ιδιαίτερα υψηλές τιμές. Το πρόβατο Χίου είναι από τα πιο μεγαλόσωμα ελληνικά πρόβατα με το μέσο σωματικό βάρος των αρσενικών είναι 87 κιλά και των θηλυκών 66 κιλά. Η πολυδυμία κυμαίνεται από 1,6-2,0 αρνιά ανά τοκετό ενώ είναι ζώο υψηλών αποδόσεων με μέση γαλακτοπαραγωγή 260 έως 380 κιλά αμελγόμενου γάλακτος για μέση περίοδο αρμέγματος 174-230 ημέρες (Κέντρο Γενετικής Βελτίωσης Ζώων Αθήνας).

Στον Πίνακα 4 φαίνεται συνολικά η μέση γαλακτοπαραγωγή των φυλών που εξετάστηκαν, όπως αναφέρονται παραπάνω.

***Πίνακας 4:** Μέσος όρος γαλακτοπαραγωγής ελληνικών φυλών προβάτων*

ΦΥΛΗ	Γαλακτοπαραγωγή (kg/προβατίνα)
Άρτα (Φριζάρτα)	275
Χίος	320
Καραγκούνικη	190
Κατσικά	130
Άργος	165
Σαρακατσάνικη	50
Καλαρρύτεκη	90
Μπούτσικο	80
Μέσος όρος	163 kg/προβατίνα

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1 DNA απομόνωση

Με τη βοήθεια του κιτ απομόνωσης Macherey-Nagel DNA-RNA-Protein purification kit απομονώσαμε DNA από γάλα ή/και αίμα προβάτων 8 διαφορετικών φυλών, με συνολικό άθροισμα δειγμάτων 117 (Πίνακας 5.1).

ΠΙΝΑΚΑΣ 5.1: Αριθμός δειγμάτων και αντιστοίχιση με τη φυλή

ΦΥΛΗ	ΔΕΙΓΜΑΤΑ
Άρτα	17
Χίος	34
Καραγκούνικη	12
Κατσικά	2
Άργος	5
Σαρακατσάνικη	2
Καλαρρύτικη	6
Μπούτσικο	39
ΣΥΝΟΛΟ	117

Το DNA που ανακτήθηκε αραιώθηκε με 100μl δις-απεσταγμένο νερό (ddH₂O) και αποθηκεύτηκε στους -4°C. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των DNA δειγμάτων σε πηκτή αгарόζης 1.6% (w/v) με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου έτσι ώστε να καθορίσουμε την ποσότητα DNA δείγματος που θα υποβάλουμε σε PCR.

5.2 Ενίσχυση γονιδίου CSN3 με PCR

Χρησιμοποιώντας κατάλληλους εκκινητές για το γονίδιο CSN3.4 που θέλουμε να ενισχύσουμε (γονίδιο κ-καζείνης, εξώνιο 4, GenBank: KC963134) κατασκευάσαμε ένα

πρωτόκολλο PCR. Στον Πίνακα 5.2 φαίνεται η αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για να ενισχύσουν την περιοχή των 306 ζευγών βάσεων από το σύνολο των 507 ζευγών βάσεων του εξωνίου 4 της κ-καζεΐνης.

Πίνακας 5.2: Εκκινητές ενίσχυσης τμήματος του εξωνίου 4 της κ-καζεΐνης

Εκκινητής	Αλληλουχία
CSN3_ex4b.fw	5'-TACTGTGCCTGCCAAGTCCT-3'
CSN3_ex4b.rv	3'-GCGTTGTCTTCTTTGATGTCTCC-5'

Μέσα σε 0.5 ml PCR tubes προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα DNA δείγματος (όπως υπαγόρευσε η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης) καθώς και: 5μl buffer TAE 10x, 1μl MgCl₂ 2.0 mM, 1μl διαλύματος dNTPs (25 μmol) , 0.2μl Taq πολυμεράσης (1.5 units) καθώς και 1μl από καθέναν από τους δύο εκκινητές (forward & reverse, 50pmol). Σε κάθε ένα σωληνάριο προσθέσαμε κατάλληλη ποσότητα απεσταγμένου νερού ώστε να έχουμε τελικό όγκο 50μl. Η ενίσχυση PCR πραγματοποιήθηκε σε ένα θερμοκυκλωτή Applied Biosystems Veriti, ξεκινώντας με 95°C για 5 λεπτά και συνεχίζοντας με 34 κύκλους θερμοκρασιών 95°C για 40'', 53°C για 40'' και 72°C για 40''. Τα PCR προϊόντα υποβλήθηκαν στη συνέχεια σε ηλεκτροφόρηση πηκτή αγαρόζης 2.0% (w/v) με TAE buffer 1x, χρησιμοποιώντας ladder 100bp (Fast Gene, Nippon Genetics) ως δείκτη του μοριακού βάρους για επιβεβαίωση του μήκους των PCR προϊόντων. Στις πηκτές αγαρόζης έγινε χρώση βρωμιούχου αιθιδίου (1 μl/ml TAE).

5.3 Single-strand conformation polymorphism (SSCP) ανάλυση

Η ανάλυση SSCP είναι από τις απλούστερες και περισσότερο χρησιμοποιημένες μεθόδους ανίχνευσης μεταλλαγών και DNA πολυμορφισμών: χρησιμοποιείται PCR για ενίσχυση της περιοχής του DNA που μας ενδιαφέρει και τα PCR προϊόντα διαχωρίζονται ως μονόκλωνα μόρια με ηλεκτροφόρηση σε μη αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (Orita et al., 1989).

Καθώς μία αλυσίδα μονόκλωνου DNA διπλώνει διαφορετικά συγκριτικά με μία άλλη αλυσίδα αν αυτές διαφέρουν σε μία βάση, οι επαγόμενες από μεταλλάξεις διαφορές στην τεταρτοταγή δομή του DNA έχουν ως αποτέλεσμα διαφορετικό κινητικό πρότυπο

ηλεκτροφόρησης. Αυτές οι μεταλλαγές ανιχνεύονται ως καινούργιες ζώνες και αποκαλύπτονται με αυτοραδιογραφία (ραδιενεργή ανίχνευση), με χρησιμοποίηση φθορίζοντων PCR εκκινητών (οι οποίοι με τη σειρά τους ανιχνεύονται με έναν αυτοματοποιημένο DNA αλληλουχητή) καθώς και με τη χρώση νιτρικού αργύρου (μη ραδιενεργές τεχνικές ανίχνευσης).

Η ανίχνευση πολυμορφισμών στην PCR-SSCP ανάλυση είναι γενικά υψηλή, >80% για τμήματα μικρότερα από 300bp (Hayashi, 1992, Hayashi & Yandell, 1993). Εφόσον η ευαισθησία της μεθόδου δεν είναι 100%, η απουσία καινούργιας ζώνης πολυμορφισμού δεν αποδεικνύει ότι δεν υπάρχει μεταλλαγή στο προς ανάλυση μόριο DNA. Γενικά, η ευαισθησία της PCR-SSCP μειώνεται όσο προχωράμε σε μεγαλύτερα κομμάτια DNA, με τα <300bp τμήματα να είναι το ιδανικό μέγεθος.

Εκτός του γεγονότος ότι η SSCP ανάλυση είναι απλή και γρήγορη, στα πλεονεκτήματα της ανάλυσης συγκαταλέγεται και η προσωπική επιλογή του ερευνητή της περιοχής που θα ελεγχθεί για μεταλλαγές, χρησιμοποιώντας τους κατάλληλους εκκινητές για την PCR, οι οποίοι θα ενισχύσουν το συγκεκριμένο κομμάτι.

Στους περιορισμούς της SSCP ανάλυσης πρέπει να αναφέρουμε ότι την ανίχνευση των διαφορετικών προτύπων ακολουθεί αλληλούχιση, καθώς η SSCP μας δείχνει μόνο ένα διαφορετικό ηλεκτροφορητικό πρότυπο και όχι την ακριβή μεταλλάξη που το προκάλεσε. Επιπλέον, δεν είναι σίγουρο ότι όλες οι μεταλλαγές σε μία βάση θα δώσουν διαφορετικό ηλεκτροφορητικό πρότυπο. Ο τελευταίος αυτός περιορισμός αναιρείται σημαντικά βελτιώνοντας τις αντιδράσεις της PCR αλλά και τις συνθήκες ηλεκτροφόρησης, αυξάνοντας έτσι την ευαισθησία της μεθόδου.

Στην παρούσα μελέτη τα PCR προϊόντα αναλύθηκαν με τη μέθοδο SSCP: σε σωληνάκια του 0.5ml τοποθετήθηκαν 10μl PCR προϊόντος και 10μl χρωστικής SSCP. Στη συνέχεια τα δείγματα αποδιατάχτηκαν με θέρμανση για 10 λεπτά στους 95°C και για να κρατηθεί ανοιχτή η αλυσίδα DNA τοποθετήθηκαν άμεσα σε πάγο. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης με buffer TBE 1x (6,2g ακρυλαμίδης & 0,16g bis-ακρυλαμίδης, με 6ml γλυκερόλης και 5ml buffer TBE 10X). Οι πηκτές τοποθετήθηκαν σε κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης στα 200V για 19-20 ώρες, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την αποπεράτωση του χρόνου ηλεκτροφόρησης ακολούθησε η χρώση των πηκτών με διαδοχικά ξεπλύματα των 200ml οξικού οξέος (1ml/400ml H₂O), 200ml νιτρικού αργύρου (1g/l) και 200ml απεσταγμένου νερού. Έπειτα επιδράσαμε στις πηκτές με το διάλυμα χρώσης (200ml) που περιείχε 3g NaOH, 1ml φορμαλδευδη και 0,10 g

NaBH₄, μέχρις ότου εμφανίστηκαν καθαρά όλες οι ζώνες ηλεκτροφόρησης.

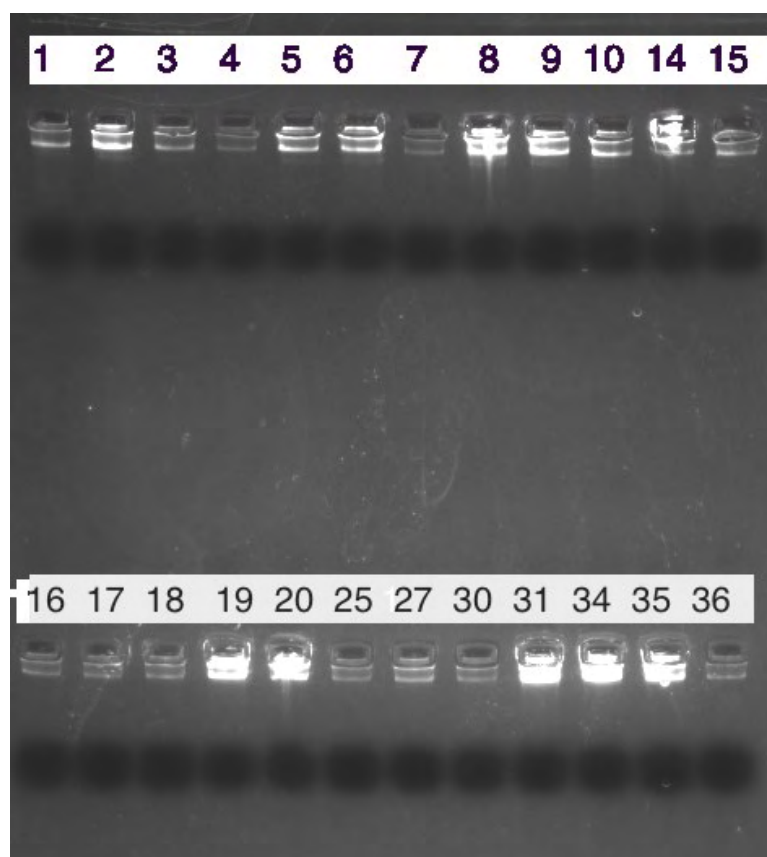
5. 4 Καθάρισμα PCR προϊόντων και αλληλούχιση

Η SSCP ανάλυση μας υποδεικνύει μόνο ότι μία μεταλλαγή υπάρχει, όχι όμως και ποιά ακριβώς είναι αυτή. Για το λόγο αυτό, καθάρισαμε τα PCR προϊόντα από τυχόν ρύπους και κατάλοιπα της PCR πραγματοποιώντας ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (2% w/v) και με τη βοήθεια ενός κιτ καθαρισμού DNA (Gel & PCR clean-up, Macherey-Nagel), παραλάβαμε τα καθαρά τελικά PCR προϊόντα τα οποία στη συνέχεια στάλθηκαν για αλληλούχιση σε εξωτερικό εργαστήριο.

6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

6.1 Απομόνωση DNA

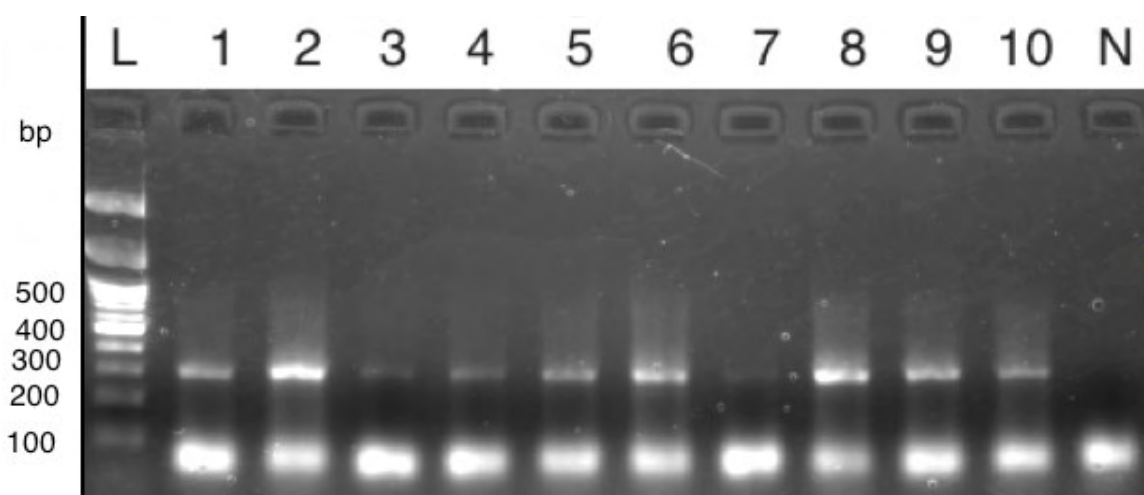
Από τα 117 δείγματα αίματος ή/και γάλακτος από ελληνικές φυλές προβάτων (Πίνακας 5.1), έγινε απομόνωση DNA, η οποία παρείχε καλής ποιότητας DNA, με τιμές συγκέντρωσης κατά μέσο όρο 150ng/μl και τιμές A260/A280 κοντά στο 2. Η ηλεκτροφόρηση του DNA σε πηκτή αгарόζης 1.6% (w/v) με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου εμφάνισε 2 διακριτές ζώνες: η μια ζώνη βρίσκεται ψηλότερα και είναι το πυρηνικό DNA, το οποίο είναι μεγάλου μεγέθους και εμφανίζεται περίπου μέσα στο πηγάδι της πηκτής, και η δεύτερη ζώνη, εμφανίζεται χαμηλότερα και είναι το μιτοχονδριακό DNA. Στην Εικόνα 6.1 παρουσιάζεται μία τυπική ηλεκτροφόρηση μετά την DNA απομόνωση.



Εικόνα 6.1: Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αгарόζης 1.6% (w/v). Απομόνωση από αίμα προβάτων φυλής Μπούτσικο. Παρατηρούμε μέσα στο πηγάδι το πυρηνικό DNA και τη δεύτερη φωτεινή ζώνη από κάτω του, το μιτοχονδριακό DNA.

6.2 DNA ενίσχυση με PCR

Με τη χρήση των κατάλληλων εκκινητών (Εικόνα 5.2) ενισχύθηκε το τμήμα των εξωνίου 4 (γονίδιο κ-καζεΐνης, εξώνιο 4, GenBank: KC963134). Για την επαλήθευση της επιτυχίας της μεθόδου, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2%, στην οποία ηλεκτροφορήθηκαν τα προϊόντα PCR παρουσία ενός μάρτυρα τμημάτων γνωστού μοριακού βάρους (ladder), για να υπολογιστεί το μήκος του τμήματος που ενισχύθηκε. Με βάση το ηλεκτροφορητικό πρότυπο, τα τμήματα που ενισχύθηκαν είχαν μήκος περίπου 300 ζευγών βάσεων. Η Εικόνα 6.2 δείχνει ένα τυπικό αποτέλεσμα μίας PCR ενίσχυσης του κομματιού του γονιδίου που μελετήσαμε.



Εικόνα 6.2: PCR προϊόντα σε ηλεκτροφόρηση πηκτή αγαρόζης 2%, με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου (Πηγή: προσωπικό αρχείο).

Ανάλυση της περιοχής του γονιδίου της κ-καζεΐνης (Baranyi et al., 1996) αποκαλύπτει μία καλά διατηρημένη αλληλουχία εξωνίων-ιντρονίων. Το εξώνιο 1 (65 bp) αποτελεί μία μικρή περιοχή της 5'-αμετάφραστης περιοχής (5'-UTR), το εξώνιο 2 (62 bp) περιλαμβάνει την υπόλοιπη 5'-αμετάφραστη περιοχή καθώς και 19 κωδικόνια (από τα 21) που συνιστούν το πεπτίδιο σήματος, ενώ το εξώνιο 3 (33 bp) κωδικοποιεί για το υπόλοιπο πεπτίδιο σήματος. Τέλος, το μεγαλύτερο μέρος της ώριμης πρωτεΐνης κωδικοποιείται από το εξώνιο 4 (507 bp) και η 3'-αμετάφραστη περιοχή κωδικοποιείται από το τελευταίο τμήμα του εξωνίου 4 και από ολόκληρο το εξώνιο 5 (165 bp).

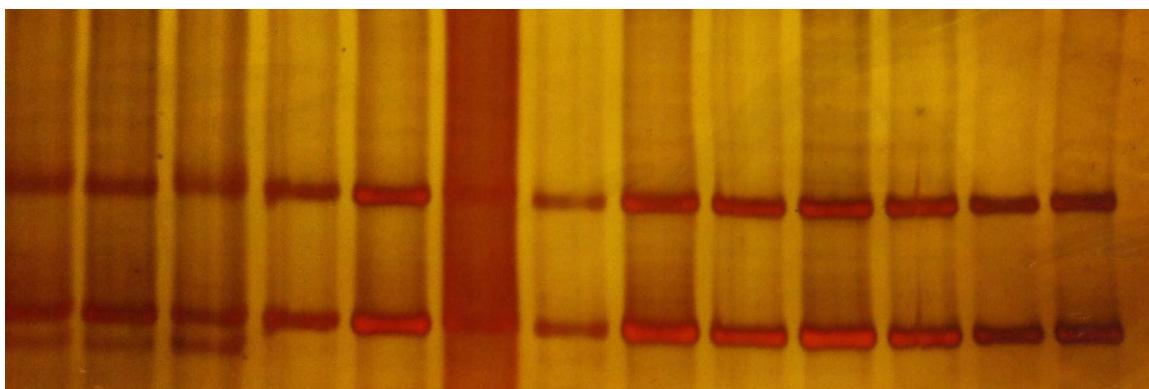
Η αλληλουχία των βάσεων ολόκληρου του εξωνίου 4 (GenBank: KC963134) φαίνεται στην Εικόνα 6.2.1 (Giambra & Erhardt, 2014).

```
1 tgaacctact gccaaagcaag agctgacagt cacaaggaaa ggtgcaatga tgaagagttt
61 ttctctagtt gtgactatcc tggcattgac cctgccattt ttgggtgccc aggagcaaaa
121 ccaggaacaa cgaatatgct gtgagaaaga tgaagattc ttcgatgaca aaatagccaa
181 atatatccca attcagtatg tgctgagtag gtatcctagt tatggactca attactacca
241 acagagacca gttgactaa ttaataatca atttctgcca taccatatt atgcgaagcc
301 agttgcagtt aggtcacctg cccaaactct tcaatggcaa gttttgcaa atgctgtgcc
361 tgccaagtcc tgccaagacc agccaactgc catggcacgt caccacacc cacatttata
421 atttatggcc attccaccaa agaaagatca ggataaaaca gaaatccctg ccatcaatac
481 cattgctagt gctgagccta cagtacacag tacacctacc accgaagcag tagtgaacgc
541 tgtagataat ccagaagctt cctcagaatc gattgagagt gcacctgaga ccaacacagc
601 ccaagttact tcaaccgagg tctaaaaact ctaaggagac atcaaagaag acaacgcagc
661 tctagctgaa accaaatgac tacttcaaac tatcctttgg ccagttgtct gccttcagtg
721 aacagagaat atgattttca c
```

Εικόνα 6.2.1: Η κωδική αλληλουχία του εξωνίου 4 της κ-καζεΐνης, όπως αναλύθηκε από Giambra & Erhardt (2014) [σκιαγραφημένη περιοχή]. Οι βάσεις από 47-109 αποτελούν την περιοχή του πεπτιδίου σήματος.

6.3 Ανάλυση SSCP (Single strand conformation polymorphism)

Κατόπιν της ενίσχυσης με PCR του επιθυμητού γονιδιακού τμήματος, όπως περιγράφηκε παραπάνω, αναλύσαμε τα PCR προϊόντα με τη μέθοδο SSCP. Τα αποδιαταγμένα δείγματα των προϊόντων PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 10% σε θερμοκρασία δωματίου για 20-21 ώρες. Η εμφάνιση των ζωνών μετά το τέλος της διαδικασίας αποκάλυψε 2 διαφορετικά πρότυπα (1 και 1+2). Στην SSCP ανάλυση, το DNA κινείται στην πηκτή ακρυλαμίδης σε μονόκλωνη κατάσταση, γι' αυτό συνήθως βλέπουμε δύο ζώνες για άτομα ομόζυγα και τέσσερις για άτομα ετερόζυγα. Η συνολική εικόνα που πήραμε από την SSCP ανάλυση που πραγματοποιήσαμε μας φανέρωσε ύπαρξη ετεροζυγωτίας σε 4 δείγματα από το σύνολο των 117 δειγμάτων – κάτι που παρακάτω επιβεβαιώνεται με την αλληλούχιση των δειγμάτων DNA. Μία τυπική εικόνα από την πηκτή πολυακρυλαμίδης μετά την χρώση με νιτρικό άργυρο, φαίνεται στην Εικόνα 6.3.



Εικόνα 6.3: Ανάλυση SSCP με τα δύο πρότυπα. Τα τρία πρώτα δείγματα από αριστερά αποτελούν το πρότυπο 1+2, ενώ τα υπόλοιπα το πρότυπο 1. Δείγματα από πρόβατα φυλής Κατσικά.

6.4 Αλληλούχηση

Η αλληλούχηση πραγματοποιήθηκε και με τους δύο εκκινητές, επομένως προέκυψαν δύο κατανομές βάσεων για κάθε ένα δείγμα: μία για τον εκκινητή της μεταγραφόμενης αλυσίδας και μία για τον εκκινητή της συμπληρωματικής της (forward & reverse primers). Το μέγεθος του τμήματος που προέκυψε για όλα τα δείγματα, μετά την αλληλούχηση, ήταν 263bp. Τα αρχεία των ακολουθιών αναλύθηκαν με το πρόγραμμα BioEdit[®] και οι αλληλουχίες στοιχήθηκαν με τον αλγόριθμο ClustalX για να βρεθούν οι περιοχές ομολογίας. Από την ανάλυση των ακολουθιών βρέθηκαν δύο διαφορετικές αλληλουχίες, από τον συνδιασμό των οποίων θα έπρεπε να προκύπτουν τρία διαφορετικά πρότυπα διαμόρφωσης SSCP: τα πρότυπα 1 και 2 της SSCP αντιστοιχούν σε αλληλουχίες ομοζυγωτικών ατόμων, ενώ το πρότυπο 1+2 αντιστοιχεί σε αλληλουχία ετεροζυγωτικών ατόμων. Στα δείγματά μας παρόλα αυτά δεν εντοπίστηκε το αλληλόμορφο 2 σε ομόζυγη κατάσταση, επομένως τα πρότυπα που πήραμε ήταν δύο (1 και 1+2). Η ετερόζυγη κατάσταση όπως προαναφέρθηκε παρατηρήθηκε σε 4 μόνο δείγματα των φυλών Κατσικά, Άρτα και Χίος.

Οι αλληλουχίες που προέκυψαν είναι εξής (παρατηρούμε την εμφάνιση ετεροζυγωτίας στο ζεύγων βάσεων 257):

```

      10      20      30      40      50      60      70
Allele 1  GCCAAGACCA GCCAAGCTGCC ATGGCAGCTC ACCCACACCC ACATTTATCA TTTATGGCCA TTCCACCAAA
Allele 2  .....

      80      90     100     110     120     130     140
Allele 1  GAAAGATCAG GATAAAACAG AAATCCCTGC CATCAATACC ATGCTAGTGT CTGAGCCTAC AGTACACAGT
Allele 2  .....

     150     160     170     180     190     200     210
Allele 1  ACACCTACCA CCGAAGCAGT AGTGAACGCT GTAGATAATC CAGAAGCTTC CTCAGAATCG ATTGCAGTGT
Allele 2  .....

     220     230     240     250     260
Allele 1  CACCTGAGAC CAACACAGCC CAAGTTACTT CAACCGAGGT CTAAAAACTC TAA
Allele 2  .....T.....

```

Μεταφράζοντας την παραπάνω ακολουθία βάσεων σε αμινοξική ακολουθία και στοιχίζοντας τη με την αμινοξική ακολουθία αναφοράς για την κ-καζεΐνη (UniProtKB: locus CASK_SHEEP, accession P02669), προέκυψε ότι η πολυμορφική θέση που βρέθηκε είναι εκτός της περιοχής που κωδικοποιεί για την ώριμη κ-καζεΐνη: οι τελευταίες 12 βάσεις της παραπάνω ακολουθίας δεν κωδικοποιούν για αμινοξέα καθώς φαίνεται πως αντιστοιχούν στο κομμάτι του εξωνίου 4 που είναι μέρος της 3'-αμετάφραστης περιοχής (Εικόνα 6.2.1). Σε μεγέθυνση η περιοχή αυτή των τελευταίων 12 βάσεων φαίνεται παρακάτω:

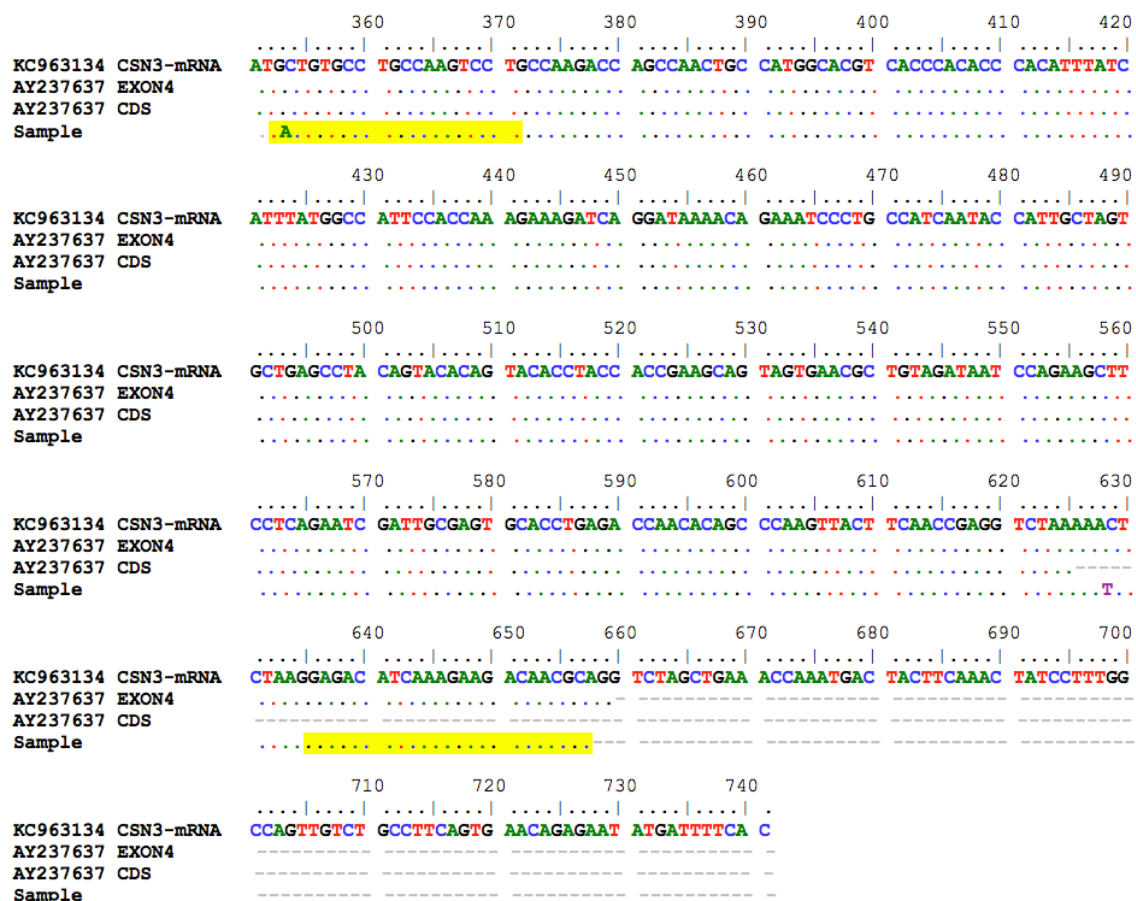
```

      255     260
Allele 1  ... |.. |..
           TAA AAA CTC TAA
           ↑
a.a seq:  Stop

      255     260
           ... |.. |..
Allele 2  TAA AAT CTC TAA
           ↑
a.a seq:  Stop

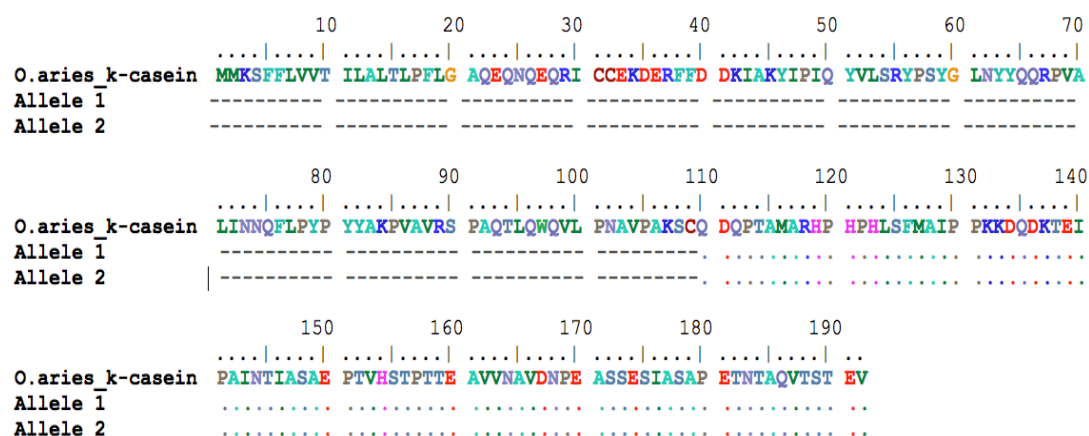
```

Στην Εικόνα 6.4 φαίνονται συγκεντρωτικά τμήμα των στοιχίσεων των ακολουθιών του mRNA της κ-CN (KC963134, Giambra et al.), του εξωνίου 4 της κ-CN, της κωδικής αλληλουχίας (AY237637, Feligini et al.) καθώς και ενός δείγματος της παρούσας μελέτης που εμφάνισε ετεροζυγωτία.



Εικόνα 6.4: Με κίτρινο χρώμα υποδεικνύονται οι περιοχές των εκκινήτων. Παρατηρούμε ότι η αλλαγή από A σε T που εντοπίσαμε στη βάση 628 είναι μόλις εκτός της κωδικής αλληλουχίας.

Ακολουθεί η μετάφραση των αλληλομόρφων της παρούσας μελέτης σε αμινοξέα και η στοίχισή τους με την αμινοξική ακολουθία αναφοράς για την κ-CN του προβάτου (UniProtKB: locus CASK_SHEEP, accession P02669).



Όπως προαναφέρθηκε, παρά τον σημαντικό ρόλο που η κ-καζεΐνη παίζει στη διαμόρφωση του καζεϊνικού μυκηλίου και τη διαδικασία της πήξης του γάλακτος, γνωρίζουμε λίγα για τον πολυμορφισμό της στα πρόβατα. Η πρόβεια κ-καζεΐνη έχει αλληλουχηθεί από το 1974 και βρέθηκε πως απαρτίζεται από 171 αμινοξικά κατάλοιπα (Jollès et al., 1974). Η κ-CN που απομονώθηκε με ηλεκτροφόρηση σε αλκαλικό pH δημιουργεί πέντε ζώνες της ίδιας αμινοξικής ακολουθίας αλλά με διαφορετικούς βαθμούς γλυκοζυλίωσης, με αποτέλεσμα διαφορετικές ηλεκτροφορητικές κινητικότητες (Soulier et al., 1975). Τα αποτελέσματα αυτά μας έχουν οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι η κ-CN παρουσιάζει έναν μη-γενετικό πολυμορφισμό: η βάση του πολυμορφισμού της έγκειται στον διαφορετικό βαθμό γλυκοζυλίωσης και φωσφορυλίωσης. Η γλυκοζυλίωση είναι μία πολύπλοκη μετα-μεταφραστική τροποποίηση που πραγματοποιείται σε κατάλοιπα Asn ή /και Ser/Thr, καθώς η κ-καζεΐνη φέρει Ο-συζευγμένα γλυκάνια σε διαφορετικά κατάλοιπα Ser (Harvey, 2005). Η σύνδεση αυτή των αλυσίδων ολιγοσακχαρίτων δημιουργεί μία δομική ετερογένεια που επηρεάζει την προσβασιμότητα των κ-CN αλυσίδων από τα ένζυμα πήξης. Επομένως, είναι σημαντικό να διενεργηθεί ένας πλήρης δομικός χαρακτηρισμός της γλυκοσιδικής συνιστώσας, ενώ, έχουν επιπλέον βρεθεί και τρεις πολυ-φωσφορυλιωμένες μορφές της κ-καζεΐνης (Ferranti et al., 1997).

6.5 Συζήτηση

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης παρουσίασαν σε επίπεδο γενετικό μία πολυμορφική θέση στο εξώνιο 4 του γονιδίου της κ-καζεΐνης, η οποία αφενώς βρέθηκε με πολύ χαμηλή συχνότητα και αφετέρου δεν αντιστοιχεί σε αλλαγή της αμινοξικής ακολουθίας της κ-καζεΐνης, καθώς ο εντοπισμός της είναι στην περιοχή που κωδικοποιεί για την 3'-UTR. Όπως προκύπτει από τη βιβλιογραφία, κάτι τέτοιο ήταν αναμενόμενο καθώς, αντίθετα με τις αγελάδες και τις κατσίκες, η πρόβεια πρωτεΐνη φαίνεται να είναι σπάνια πολυμορφική αφού ως τώρα μόνο δύο πολυμορφισμοί ανιχνεύθηκαν: μία αντικατάσταση Ser σε Leu, στη θέση 104 (GenBank AY444505) από τους Ceriotti et al. (2004) και ένα SNP (Single Nucleotide Polymorphism) στη θέση 237 του mRNA της κ-καζεΐνης του προβάτου, όπου μία θυμίνη αντικαταστάθηκε από μία κυτοσίνη ενώ δεν υπήρξε αμινοξική αλλαγή (GenBank | AY237637) από τους Feligini et. al (2005).

Παρόλα αυτά, ανάμεσα σε όλα τα είδη που έχουν μελετηθεί, μεγαλύτερη ετερογένεια έχει παρατηρηθεί για τις καζεΐνες παρά για τις πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι κατά την εξέλιξη οι καζεΐνες κράτησαν σταθερά μόνο

χαρακτηριστικά που ήταν απαραίτητα για την έκκριση τους στον αδένα του μαστού, για τη δημιουργία μυκηλίων και για να μεταβολίζονται εύκολα από το πεπτικό σύστημα (Ribadeau-Dumas, 1989). Η ετερογένεια αυτή αναδεικνύεται με την παρουσία γενετικών πολυμορφισμών (επίπεδο DNA), με το βαθμό φωσφορυλίωσης, με το βαθμό γλυκοζυλίωσης του κλάσματος της κ-CN αλλά και με την παρουσία πρωτεϊνών με διαφορετικό μήκος αλυσίδας (επίπεδο πρωτεϊνικό). Στον Πίνακα 6.4 παρακάτω συνοψίζονται όλοι οι γενετικοί πολυμορφισμοί που έχουν βρεθεί ως τώρα σε αγελάδες, κατσίκες και πρόβατα.

Πίνακας 6.4: Αριθμός γενετικών πολυμορφισμών που έχουν βρεθεί ως τώρα σε αγελάδες, κατσίκες και πρόβατα, προσαρμογή από (Ng-Kwai-Hang et al., 1992)

	<i>CSN1S1</i> (<i>as1</i>)	<i>CSN1S2</i> (<i>as2</i>)	<i>CSN2</i> (β)	<i>CSN3</i> (κ)	β - λακτογλοβουλ ίνη	α - λακταλβουμίνη
Αγελάδες	7 πολ/μοι	4 πολ/μοι	9 πολ/μοι	11 πολ/μοι	7 πολ/μοι	3 πολ/μοι
Κατσίκες	13 πολ/μοι	6 πολ/μοι	3 πολ/μοι	13 πολ/μοι	-	-
Πρόβατα	5 πολ/μοι	3 πολ/μοι	2 πολ/μοι	2 πολ/μοι	3 πολ/μοι	2 πολ/μοι

Συγκεκριμένα για το γονίδιο της κ-καζεΐνης στις φυλές προβάτων, φαίνεται πως αυτό είναι καλά συντηρημένο παρουσιάζοντας όμως μεγάλη ετερογένεια σε επίπεδο μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων (γλυκοζυλίωση, φωσφορυλίωση). Σε ό,τι αφορά άλλα είδη, η ανθρώπινη κ-καζεΐνη είναι γλυκοζυλιωμένη σε πολύ μεγάλο βαθμό, περιέχοντας στο μόριο της 40-60% υδατάνθρακες ενώ η κ-καζεΐνη των βοειδών είναι γλυκοζυλιωμένη κατά 10% (Alexander et al., 1988).

Είναι γνωστό ότι περιοχές που κωδικοποιούν απαραίτητες πρωτεΐνες ή RNA υφίσταται την πίεση της φυσικής επιλογής και άρα είναι πολύ περισσότερο διατηρημένες. Η κ-καζεΐνη εμπίπτει στην κατηγορία αυτή αναλογιζόμενοι τον σημαντικό ρόλο που παίζει στη σύσταση του γάλακτος αλλά και τη διατροφή των νεογνών. Μεγάλη διατήρηση της πρωτοταγούς δομής της κ-καζεΐνης παρατηρείται σε διαφορετικά είδη γύρω από τον ευαίσθητο σε πρωτεάσες δεσμό μεταξύ των αμινοξέων 105 και 106 (Mercier et al., 1976). Στα πρόβατα φαίνεται πως η αλληλουχία του εξωνίου 4 διατηρείται σε μεγάλο βαθμό, ενώ ο μόνος πολυμορφισμός που εντοπίστηκε σε πρωτεϊνικό επίπεδο αφορά σε

αμινοξύ στην θέση 104, ακριβώς πριν τον πεπτιδικό δεσμό που διασπά η χυμοσίνη. Την πεποίθηση ότι το εξώνιο 4 της πρόβειας κ-καζεΐνης είναι καλά συντηρημένο ενισχύει η μελέτη των Cronin et al. (1996) όπου βρέθηκε πως ο ρυθμός εξέλιξης της DNA ακολουθίας του εξωνίου 4 της κ-καζεΐνης υπολογίζεται στις 0.004 νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις ανά εκατομμύριο χρόνια (Cronin et al., 1996). Η εξελικτική πίεση καθώς και οι επίμονες προσπάθειες των εκτροφέων προβάτων για αυξημένα χαρακτηριστικά γαλακτοπαραγωγής και καλύτερη τυροκόμηση, φαίνεται πως οδήγησαν στη συντήρηση του εν λόγω γονιδίου σε επίπεδο DNA (Ceriotti, 2004).

Η χρησιμοποίηση νέων αναλυτικών μεθόδων έχει δώσει στους επιστήμονες ένα καλό εργαλείο στο πεδίο της ανίχνευσης γενετικών πολυμορφισμών στις πρωτεΐνες του γάλακτος προβάτων, παρόλα αυτά, τα έως τώρα ευρήματα είναι συγκεχυμένα αναφορικά με τη συσχέτιση τέτοιων πολυμορφισμών με την ποιότητα του γάλακτος και κανένα από αυτά δεν αφορά σε πολυμορφισμούς στην περιοχή της κ-καζεΐνης. Τα πιο εμπεριστατωμένα από αυτά είναι τα εξής (Amigo, 2000):

α) ο γονότυπος AA της β-λακτογλοβουλίνης δίνει καλύτερα χαρακτηριστικά τυροκόμησης συγκριτικά με τους άλλους γονότυπους της β-LG,

β) στην α_{s1} -CN, το αλληλόμορφο D είναι επιβλαβές στο πρόβειο γάλα καθώς φαίνεται να επιφέρει εγγενώς χαμηλότερη περιεκτικότητα σε καζεΐνη και χειρότερα τεχνολογικά χαρακτηριστικά στο γάλα,

γ) γάλατα που περιέχουν το γονότυπο CC της α_{s1} -CN δείχνουν τα καλύτερα τεχνολογικά χαρακτηριστικά γάλακτος εξαιτίας της μεγαλύτερης ποσότητας καζεΐνης.

Από τα ευρήματα αυτά συμπεραίνουμε ότι αλληλόμορφα που έχουν επίδραση στην ποσότητα των καζεϊνών έχουν άμεση επίδραση και στην ποιότητα του παραγόμενου γάλακτος. Έχοντας ως δεδομένο ότι το γονίδιο της κ-CN είναι σπάνια πολυμορφικό παίζοντας όμως μεγάλο ρόλο στα χαρακτηριστικά του γάλακτος, φαίνεται πως πολυμορφισμοί που εντοπίζονται σε άλλα γονίδια πρωτεϊνών γάλακτος που αποφέρουν μεγαλύτερες ποσότητες κ-CN δείχνουν και καλύτερα τεχνολογικά χαρακτηριστικά στο πρόβειο γάλα, όπως ταχύτερη πήξη στην τυροκόμηση. Στον παρακάτω Πίνακα 6.5 φαίνεται η ποσότητα των καζεϊνικών κλασμάτων αλλά και της ολικής πρωτεΐνης σε αγελαδινό, πρόβειο και αίγιο γάλα. Όπως προαναφέρθηκε και στον Πίνακα 1, το πρόβειο γάλα διαθέτει την μεγαλύτερη ποσότητα σε πρωτεΐνη και λίπος ανάμεσα σε αγελάδες και κατσίκες. Επίσης, η μεγαλύτερη ποσότητα σε καζεΐνες σε σχέση με την

ολική πρωτεΐνη στο πρόβειο γάλα εξηγεί γιατί είναι από το συχνότερα χρησιμοποιούμενο γάλα στην τυροκομία (Πίνακας 6.5).

Πίνακας 6.5: Αναλογία των κλασμάτων καζεΐνης σε νοπό αγελαδινό, πρόβειο και αίγιο γάλα (Huppertz et al., 2006)

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

^α g / 100g γάλακτος

^β % της ολικής καζεΐνης

^γ συμπεριλαμβάνονται και οι γ -καζεΐνες

7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα τελευταία 20 χρόνια έχει υπάρξει αμείωτο ενδιαφέρον στο πεδίο του πολυμορφισμού των πρωτεϊνών του γάλακτος – ιδιαίτερα των καζεϊνών – και αξιοσημείωτη πρόοδος έχει πραγματοποιηθεί στη διαλεύκανση των αλληλομόρφων εκείνων που προσδίδουν βελτιωμένα χαρακτηριστικά στο γάλα αγελάδων, προβάτων και αιγών. Η ανάλυση SSCP ως μέθοδος ανίχνευσης γενετικών πολυμορφισμών σε επίπεδο DNA αποδεικνύεται ένα πολύ χρήσιμο και αξιόπιστο εργαλείο στην έρευνα αυτή. Η μεγάλη λειτουργική σημασία της κ-καζεΐνης στη διαμόρφωση και σταθεροποίηση του καζεϊνικού μυκηλίου στο γάλα φαίνεται πως οδήγησε σε συντήρηση του εν λόγω γονιδίου, ιδιαίτερα στα πρόβατα – παρόλα αυτά, επιπλέον έρευνα πρέπει να πραγματοποιηθεί τόσο σε γενετικό όσο και σε επίπεδο πρωτεϊνικό που να αφορά σε πολλές και διαφορετικές φυλές προβάτων ανά τον κόσμο.

Σε μία χώρα όπως η Ελλάδα όπου επί χρόνια πραγματοποιούνταν αυθαίρετα πλήθος διασταυρώσεων στον πρόβειο πληθυσμό της χώρας (Hadjigeorgiou et al., 2002), είναι σημαντικό να μη χαθεί η γενετική ποικιλομορφία των εναπομεινάντων ντόπιων φυλών (Hall & Bradley, 1995). Η γνώση σε επίπεδο γενετικό του πολυμορφισμού των ελληνικών ντόπιων προβάτων είναι η αρχή για τη διατήρηση παραγωγικών χαρακτηριστικών αλλά και για τις μελλοντικές ανάγκες εκτροφής των προβάτων της χώρας μας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ALEXANDER, L. J., STEWART, A. F., MACKINLAY, A. G., KAPELINSKAYA, T. V., TKACH, T. M. & GORODETSKY, S. I. 1988. Isolation & characterization of the bovine k-casein gene. *European Journal of Biochemistry*, 178, 395-401.
- AMIGO, L., RECIO, I., RAMOS, M. 2000. Genetic polymorphism of ovine milk proteins: Its influence on technological properties of milk—A review. *International Dairy Journal*, 10, 135-149.
- ANIFANTAKIS, E. 2004. Τυροκομία: Χημεία, Φυσικοχημεία, Μικροβιολογία 608.
- ASCHAFFENBURG, R. & DREWRY, J. 1955. Occurrence of Different Beta-Lactoglobulins in Cow's Milk. *Nature*, 176, 218-219.
- BARANYI, M., ASZODI, A., DEVINOY, E., FONTAINE, M.-L., HOUDEBINE, L.-M. & BÖSZE, Z. 1996. Structure of the rabbit tc-casein encoding gene: expression of the cloned gene in the mammary gland of transgenic mice. *Gene*, 174, 27-34.
- BASTOS, E., CRAVADOR, A., AZEVEDO, J. & GUEDES-PINTO, H. 2001. Single strand conformation polymorphism (SSCP) detection in six genes in Portuguese indigenous sheep breed 'Churra da Terra Quente'. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 5, 7-15.
- BELITZ H., GROSCH W. & P., S. 2012. *Χημεία Τροφίμων*, Θεσσαλονίκη, Εκδόσεις Τζιόλα.
- BORKOVÁ, M. & SNASELOVA, J. 2005. Possibilities of different animal milk detection in milk & dairy products—a review. *Czech Journal Food Science*, 23, 41-50.
- CERIOTTI, G., CHESSA, S., BOLLA, P., BUDELLI, E., BIANCHI, L., DURANTI, E. & CAROLI, A. 2004. Single nucleotide polymorphisms in the ovine casein genes detected by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism. *Journal of Dairy Science*, 87, 2606-2613.
- CRONIN, M. A., STUART, R., PIERSON, B. J. & PATTON, J. C. 1996. K-Casein Gene Phylogeny of Higher Ruminants (Pecora, Artiodactyla). *Molecular Phylogenetics & Evolution*, 6, 295-311.
- DE KRUIF, C. G. & HOLT, C. 2003. Casein Micelle Structure, Functions & Interactions. In: FOX, P. F. & MCSWEENEY, P. L. H. (eds.) *Advanced Dairy Chemistry—I Proteins*. Springer US.
- DYMAN, T. N. & GLAZKO, V. I. 1997. [The polymorphism of the kappa-casein gene & its connection to economically valuable traits in cattle]. *Tsitol Genet*, 31, 114-9.
- FELIGINI, M., VLACO, S., CURIK, V. C., PARMA, P., GREPPI, G. & ENNE, G. 2005. A single nucleotide polymorphism in the sheep kappa-casein coding region. *J Dairy Res*, 72, 317-21.
- FERRANTI, P., GARRO, G., LAEZZA, P., CHIANESE, L. & ADDEO, F. 1997. IV. 11- Identification of ovine casein heterogeneity by HPLC & electro-spray mass spectrometry. *International Dairy Federation special issue*, 297-302.
- FERRETTI, L., LEONE, P. & SGARAMELLA, V. 1990. Long range restriction analysis of the bovine casein genes. *Nucleic acids research*, 18, 6829-6833.
- FOX, P. F., UNIACKE-LOWE, T., MCSWEENEY, P. L. H. & O'MAHONY, J. A. 2015. Milk Proteins. *Dairy Chemistry & Biochemistry*. Springer International Publishing.
- GALLAGHER, D. S., SCHELLING, C. P., GROENEN, M. M. A. & WOMACK, J. E. 1994. Confirmation that the casein gene cluster resides on cattle Chromosome 6. *Mammalian Genome*, 5, 524-524.

- GIAMBRA, I. J. & ERHARDT, G. 2014. Polymorphisms within ovine CSN3 identified by DNA- & mRNA- sequence analysis. *Animal genetics*, 45, 908-908.
- HADJIGEORGIOU, I., VALLER&, F., TSIMPOUKAS, K. & ZERVAS, G. 2002. The socio-economics of sheep & goat farming in Greece & the implications for future rural development. *Options Mediterraneennes Series B*, 39, 83-93.
- HALL, S. J. G. & BRADLEY, D. G. 1995. Conserving livestock breed biodiversity. *Trends in Ecology & Evolution*, 10, 267-270.
- HARVEY, D. J. 2005. Proteomic analysis of glycosylation: structural determination of N- & O-linked glycans by mass spectrometry. *Expert review of proteomics*, 2, 87-101.
- HAYASHI, K. 1992. [PCR-SSCP--rapid & easy detection of DNA-sequence changes]. *Hum Cell*, 5, 180-4.
- HAYASHI, K. & Y&ELL, D. W. 1993. How sensitive is PCR-SSCP? *Hum Mutat*, 2, 338-46.
- HOLT, C. 1992. Structure & stability of bovine casein micelles. *Advances in protein chemistry*, 43, 63-151.
- HUPPERTZ, T., UPADHYAY, V. K., KELLY, A. L. & TAMIME, A. Y. 2006. Constituents & properties of milk from different species. *Brined cheeses*, 1-42.
- HYSLOP, D. B. 2003. Enzymatic Coagulation of Milk. In: FOX, P. F. & MCSWEENEY, P. L. H. (eds.) *Advanced Dairy Chemistry—I Proteins*. Springer US.
- JOLLÈS, J., FIAT, A.-M., SCHOENTGEN, F., ALAIS, C. & JOLLÈS, P. 1974. The amino acid sequence of sheep κ A-casein: II. Sequence studies concerning the κ A-caseinoglycopeptide & establishment of the complete primary structure of the protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure*, 365, 335-343.
- KAMINARIDIS, G. & MOATSOU, G. 2009. *Γαλακτοκομία*, Αθήνα, Εκδόσεις EMBPYO.
- KAPELINSKAIA, T. V., TKACH, T. M., SMIRNOV, I. K. & GORODETSKIĬ, S. I. 1989. [The Bos taurus casein genes. Isolation & characterization of the kappa-casein gene]. *Genetika*, 25, 15-23.
- KOMINAKIS, A., ROGDAKIS, E. & KOUTSOTOLIS, K. 1998. Genetic parameters for milk yield & litter size in Boutsico dairy sheep. *Canadian Journal of Animal Science*, 78, 525-532.
- MANTIS, I. A. 1993. *Hygiene & technology of milk & milk products*, Thessaloniki, Kyriakides Brothers House Publishing.
- MATHER, I. & KEENAN, T. 1998. Origin & Secretion of Milk Lipids. *Journal of Mammary Gl& Biology & Neoplasia*, 3, 259-273.
- MERCIER, J.-C., CHOBERT, J.-M. & ADDEO, F. 1976. Comparative study of the amino acid sequences of the caseinomacropptides from seven species. *FEBS letters*, 72, 208-214.
- MOATSOU, G., SAMOLADA, M., KATSABEKI, A. & ANIFANTAKIS, E. 2004. Casein fraction of ovine milk from indigenous Greek breeds. *Le Lait*, 84, 285-296.
- MOIOLI, B., PILLA, F. & TRIPALDI, C. 1997. Detection of milk protein genetic polymorphisms in order to improve dairy traits in sheep & goats: a review. *Small Ruminant Research*, 27, 185-195.
- NG-KWAI-HANG, K. F., HAYES, J. F., MOXLEY, J. E. & MONARDES, H. G. 1992. Variation in Milk Protein Concentrations Associated with Genetic Polymorphism & Environmental Factors. *Journal of Dairy Science*, 70, 563-570.
- OFTEDAL, O. T. & IVERSON, S. J. 1995. Comparative analysis of nonhuman milks. A. Phylogenetic variation in the gross composition of milks. *H&book of milk composition*, 749-789.

- ORITA, M., SUZUKI, Y., SEKIYA, T. & HAYASHI, K. 1989. Rapid & sensitive detection of point mutations & DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*, 5, 874-9.
- PARK, Y. W., JUÁREZ, M., RAMOS, M. & HAENLEIN, G. F. W. Physico-chemical characteristics of goat & sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68, 88-113.
- PARK, Y. W., JUÁREZ, M., RAMOS, M. & HAENLEIN, G. F. W. 2007. Physico-chemical characteristics of goat & sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68, 88-113.
- PULINA, G., NUDDA, A., BATTACONE, G. & CANNAS, A. 2006. Effects of nutrition on the contents of fat, protein, somatic cells, aromatic compounds, & undesirable substances in sheep milk. *Animal Feed Science & Technology*, 131, 255-291.
- RIBADEAU-DUMAS, B. 1989. Structure & Variability of Milk Proteins. In: BARTH, C. A. & SCHLIMME, E. (eds.) *Milk Proteins*. Steinkopff.
- ROGDAKIS, E. 2002. *Εγχώριες φυλές προβάτων : Περιγραφή, φυλογένεια, γενετική βελτίωση, διαφύλαξη*, Αθήνα, ΑγροΤύπος ΑΕ.
- SOULIER, S., RIBADEAU-DUMAS, B. & DENAMUR, R. 1975. [Purification of kappa-caseins from sheep. Analysis of the glycan & peptide components (author's transl)]. *European journal of biochemistry / FEBS*, 50, 445-452.
- SWEENEY, P. L. H. & FOX, P. F. 2013. *Advanced Dairy Chemistry Volume 1A: Proteins: Basic Aspects*. New York: Springer.
- THREADGILL, D. W. & WOMACK, J. E. 1990. Genomic analysis of the major bovine milk protein genes. *Nucleic Acids Research*, 18, 6935-6942.
- WALSTRA, P. & JENNESS, R. 1984. *Dairy chemistry & physics*, John Wiley & Sons.
- ZYGOYIANNIS, D. 2006. Sheep production in the world & in Greece. *Small ruminant research*, 62, 143-147.