



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

Διπλωματική Μελέτη

«Επίπεδα πολυμορφισμού της  $\alpha_{s2}$ -καζεΐνης σε  
ελληνικές αγελάδες Holstein»

**Στρατοπούλου Χριστίνα – Άννα**

Λάρισα, 2016

«Επίπεδα πολυμορφισμού της  $\alpha_{s2}$ -καζεΐνης σε ελληνικές  
αγελάδες Holstein»

«Level of Polymorphism in  $\alpha_{s2}$ -casein gene in Greek Holstein breed»

Διπλωματική μελέτη

**Στρατοπούλου Χριστίνα - Άννα**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

ΣΤΑΜΑΤΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)	Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό (Ε.ΔΙ.Π) του Εργαστηρίου Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
ΜΟΥΤΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ	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

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κύριο Σταμάτη Κωνσταντίνο για την ανάθεση του εξαιρετικά ενδιαφέροντος θέματος, μέσω του οποίου αποκόμισα σπουδαίες γνώσεις και εμπειρίες, αλλά και για την πολύτιμη βοήθειά του σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας αυτής.

Επιπλέον θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους τους υποψήφιους διδάκτορες του εργαστηρίου Γενετικής, Εξελικτικής και Συγκριτικής Βιολογίας και ιδιαίτερα τον Γιαννούλη Θεμιστοκλή για την προθυμία και την άριστη συνεργασία μας κατά την παραμονή μου στο εργαστήριο.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT	6
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
<u>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u>	<u>7</u>
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – ΤΟ ΓΑΛΑ</u>	<u>7</u>
1.1. Περιγραφή	7
1.1.1. Πρωτεΐνες του γάλακτος	7
1.1.2. Πρωτεΐνες του ορού	8
1.1.3. Καζεΐνες	9
1.1.4. Μικκύλια καζεϊνών	10
1.1.5. Λιπίδια του γάλακτος	11
1.1.6. Λακτόζη	12
1.1.7. Μέταλλα, ιχνοστοιχεία και βιταμίνες	12
1.2. Η Βοοτροφία στην Ελλάδα	13
1.3. Η φυλή Holstein-Friesian	14
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ</u>	<u>16</u>
2.1. Εισαγωγή στον γενετικό πολυμορφισμό των πρωτεϊνών του γάλακτος	16
2.2. Γενετικός πολυμορφισμός των καζεϊνών του γάλακτος	16
2.2.1. Τα γονίδια των καζεϊνών του γάλακτος	16
2.2.2. Ο πολυμορφισμός της α <sub>1</sub> - καζεΐνης	17
2.2.3. Ο πολυμορφισμός της α <sub>2</sub> - καζεΐνης	18
2.2.4. Ο πολυμορφισμός της β- καζεΐνης	19
2.2.5. Ο πολυμορφισμός της κ- καζεΐνης	19
2.2.6. Επίδραση του πολυμορφισμού στα ποιοτικά χαρακτηριστικά του γάλακτος	20
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – ΣΚΟΠΟΣ</u>	<u>22</u>
<u>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u>	<u>23</u>
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 – ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</u>	<u>23</u>
4.1. Απομόνωση DNA	23
4.2. Ενίσχυση τμήματος DNA με την τεχνική PCR	24
4.3. Ανάλυση SSCP	25
4.4. Καθαρισμός DNA	27
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u>	<u>28</u>
5.1. Απομόνωση DNA	28
5.2. Ενίσχυση τμήματος DNA με την τεχνική PCR	28
5.3. Ανάλυση SSCP	29
5.4. Αλληλούχηση	30
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 – ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u>	<u>32</u>
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	35

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε με στόχο τον έλεγχο του πολυμορφισμού του εξονίου 8 του γονιδίου *CSN1S2*, που κωδικοποιεί για την  $\alpha_{s2}$ -καζεΐνη του γάλακτος των βοοειδών. Για το σκοπό αυτό συλλέχθηκαν δείγματα αίματος από 60 αγελάδες της φυλής Holstein-Friesian, από μία φάρμα στη Θεσσαλία.

Η πειραματική διαδικασία περιλάμβανε τέσσερα βασικά στάδια. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε απομόνωση του DNA και ακολούθησε ενίσχυση του εξονίου 8, με τη χρήση κατάλληλων εκκινήτων. Τέλος, τα προϊόντα της PCR αναλύθηκαν με τη μέθοδο SSCP και αλληλούχηση. Στα δείγματα αυτά, ταυτοποιήθηκαν τρία πιθανά αλληλόμορφα (*CSN1S2\* $A$* , *BandC*). Ωστόσο, επιπλέον μελέτες είναι απαραίτητες για τον προσδιορισμό των γενετικών χαρακτηριστικών του κοπαδιού αυτού.

## ABSTRACT

This study was conducted in order to assess the polymorphism of exon 8 of the *CSN1S2* gene. *CSN1S2* encodes for the  $\alpha_{S2}$ -casein of bovine milk. In order to achieve that, 60 blood samples from Holstein-Friesian cows were collected. All cows came from one farm in Thessaly.

The experimental procedure included four major steps. DNA was extracted from blood samples and exon 8 was amplified using appropriate primers. PCR products were analyzed using SSCP method and sequencing.

Three possible alleles were identified (*CSN1S2*\*A, B and C). However, further work is needed in order to specify the genetic characteristics of the breed.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων φαίνεται να καθιερώθηκε από τους Ευρωπαίους πληθυσμούς πριν από περίπου 11,000 χρόνια. Μέχρι τότε το γάλα αποτελούσε ισχυρά τοξικό προϊόν για τους ανθρώπους, καθώς δεν είχαν τη δυνατότητα να παράγουν το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για τη διάσπαση της λακτόζης (λακτάση). Ωστόσο καθώς η καλλιέργεια της γης και η εκτροφή οικόσιτων ζώων άρχισε να αντικαθιστά το κυνήγι στην Κεντρική Ευρώπη, οι κτηνοτρόφοι επινόησαν τρόπους να μειώνουν την περιεκτικότητα του γάλακτος στο σάκχαρο αυτό μέσω ζύμωσής του. Μερικές χιλιάδες χρόνια αργότερα μια γονιδιακή μετάλλαξη που εξαπλώθηκε στην Ευρώπη είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή του ενζύμου λακτάση και έτσι κατέστησε τους ανθρώπους ικανούς να καταναλώνουν μεγάλες ποσότητες γάλακτος. Από τότε το γάλα αποτέλεσε πολύ σημαντικό στοιχείο της διατροφής των ανθρώπων λόγω της θερμιδικής του αξίας αλλά και των πολλαπλών ωφέλιμων συστατικών που περιέχει (Curry, 2013).

Σήμερα η κατανάλωση γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων θεωρείται αναπόσπαστο κομμάτι μιας υγιεινής και ισορροπημένης διατροφής. Δεν είναι τυχαίο άλλωστε το γεγονός ότι το γάλα αποτελεί την πρώτη τροφή όλων των θηλαστικών. Παρέχει στο νεογνό τόσο ενέργεια και θρεπτικά συστατικά όσο και αντισώματα για την προστασία του από λοιμώξεις.

## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – ΤΟ ΓΑΛΑ

#### 1.1. Περιγραφή

Το γάλα αποτελεί μίγμα πολλών συστατικών με κυριότερο κύριο το νερό, που μπορεί να ποικίλει σε συγκέντρωση από 68% στο γάλα του ταράνδου έως 91% στο γάλα του γαϊδάρου (FAO, 2013). Ειδικά το αγελαδινό γάλα αποτελείται κατά μέσο όρο από 87% νερό, 4-5% λακτόζη, 3% πρωτεΐνες, 3-4% λιπαρά, 0.8% μέταλλα και 0.1% βιταμίνες (Pereira, 2013).

##### 1.1.1. Πρωτεΐνες του γάλακτος

Το γάλα θεωρείται ως μια εξαιρετική πηγή πρωτεϊνών λόγω της αφθονίας αλλά και της ποιότητάς τους, καθώς είναι πλούσιες σε απαραίτητα για τον άνθρωπο αμινοξέα. Οι πρωτεΐνες του γάλακτος σχηματίζουν ένα ετερογενές μίγμα, που μπορεί να διαχωριστεί σε δύο κύριες κατηγορίες με βάση τα χημικά χαρακτηριστικά: τις πρωτεΐνες του ορού (~20%) και τις καζεΐνες (~80%). Γενικά οι καζεΐνες καταβυθίζονται σε pH = 4.6 και λόγω αυτής της ιδιότητάς τους είναι σημαντικές για της παρασκευή του τυριού. Το κλάσμα των πρωτεϊνών

του ορού αποτελείται από πρωτεΐνες περισσότερο ετερογενείς, που δεν καταβυθίζονται στη συγκεκριμένη τιμή pH (Miller et al, 2000).

### 1.1.2. Πρωτεΐνες του ορού

#### **β-λακτογλοβουλίνη (β-Lactoglobulin: β-Lg)**

Η β-λακτογλοβουλίνη είναι μια από τις πιο άφθονες πρωτεΐνες του αγελαδινού γάλακτος. Συγκεκριμένα αποτελεί το 50% των πρωτεϊνών του ορού και το 12% της συνολικής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες. Η πρωτεΐνη αυτή χαρακτηρίζεται από υψηλή διατροφική αξία, καθώς είναι πλούσια σε αμινοξέα που περιέχουν θείο και ιδιαίτερα κυστεΐνη.

Ο βιολογικός ρόλος της β-λακτογλοβουλίνης δεν είναι απόλυτα σαφής, αν και έχουν πραγματοποιηθεί πολλαπλές σχετικές μελέτες. Ωστόσο έχει προταθεί ότι η συγκεκριμένη πρωτεΐνη δεσμεύει τη ρετινόλη και να λειτουργεί ως μεταφορέας της από το ισχυρά όξινο περιβάλλον του στομάχου στο λεπτό έντερο. Από εκεί η ρετινόλη συνδέεται με μία εξειδικευμένη πρωτεΐνη δέσμευσης της ρετινόλης (Plasma Retinol-Binding Protein), η οποία μάλιστα έχει παρόμοια δομή με τη β-λακτογλοβουλίνη (McSweeney & Fox, 2013).

#### **α-λακταλβουμίνη (α-Lactalbumin: α-La)**

Πρόκειται για μεταλλοπρωτεΐνη φυσιολογικά συνδεμένη με ιόντα  $Ca^{2+}$ . Αντιπροσωπεύει το 20% του συνόλου των πρωτεϊνών του ορού στο αγελαδινό γάλα. Δεν περιέχει κυστεΐνη, αλλά είναι πλούσια σε θείο (~1.9%) και στο απαραίτητο για τον άνθρωπο αμινοξύ τρυπτοφάνη.

Η α-La έχει πολύ βασικό βιολογικό ρόλο καθώς αποτελεί συστατικό ενός ενζυμικού συμπλόκου, που καταλύει το τελικό βήμα της βιοσύνθεσης της λακτόζης (McSweeney & Fox, 2013).

#### **Αλβουμίνες του ορού (BSA)**

Ειδικά στο αγελαδινό γάλα έχει βρεθεί μικρή συγκέντρωση των συγκεκριμένων πρωτεϊνών (~0.1–0.4 g/ L), που πιθανόν να προέρχονται από το αίμα και δε φαίνεται να επηρεάζουν αισθητά τα χημικά χαρακτηριστικά του γάλακτος (McSweeney & Fox, 2013).

#### **Ανοσοσφαιρίνες**

Περιέχονται σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις (0.6–1 g/ L) στο αγελαδινό γάλα, αλλά είναι πολύ βασικές για την προστασία του νεογνού από λοιμώξεις. Οι IgG αποτελούν τις πιο άφθονες στο αγελαδινό γάλα, αλλά έχουν απομονωθεί επίσης ανοσοσφαιρίνες των τάξεων IgA και IgM. Οι ανοσοσφαιρίνες προέρχονται από τον ορό του αίματος και μεταφέρονται στο γάλα κυρίως μέσω ειδικών μορίων-μεταφορέων και σε μικρότερο ποσοστό διαπερνώντας τους διακυτταρικούς συνδέσμους (Stelwagen et al, 2009).

#### **Πρωτεόζες-Πεπτόνες**

Είναι ετερογενής ομάδα περισσότερων από 38 πεπτιδίων του γάλακτος, που προέρχονται κυρίως από την πρωτεολυτική διάσπαση των καζεϊνών και άλλων πρωτεϊνών. Το κοινό



χαρακτηριστικό των πεπτιδίων αυτών είναι η ανθεκτικότητά τους ζέπειτα από κατεργασία 30 λεπτών σε θερμοκρασία 90°C. Το μίγμα περιέχει κυρίως πεπτίδια αλλά και γλυκοπρωτεΐνες και φωσφοπρωτεΐνες και αντιπροσωπεύει περίπου το 10% των πρωτεϊνών του ορού (Sorensen & Petersen 1993).

### 1.1.3. Καζεΐνες

Πρόκειται για φωσφοπρωτεΐνες που βρίσκονται αποκλειστικά στο γάλα και αποτελούν το κύριο πρωτεϊνικό συστατικό του σε ποσοστό περίπου 80% στο αγελαδινό γάλα. Οι καζεΐνες του αγελαδινού γάλακτος διακρίνονται σε:  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  και  $\kappa$ . Έχουν την ιδιότητα να σχηματίζουν μικκύλια μέσω των οποίων μεταφέρουν ασβέστιο και φωσφόρο. Επιπλέον οι καζεΐνες διασπώνται με πρωτεόλυση σε βιο-δραστικά πεπτίδια με ποικίλα οφέλη για την υγεία (McSweeney & Fox, 2013).

#### **$\alpha_{s1}$ –καζεΐνη**

Αντιστοιχεί περίπου στο 40% της συνολικής ποσότητας καζεϊνών στο αγελαδινό γάλα. Πρόκειται για μία αρνητικά φορτισμένη πρωτεΐνη με υψηλή περιεκτικότητα σε φωσφόρο. Η πρωτεΐνη αναφοράς για αυτή την ομάδα είναι η  $\alpha_{s1}$ -CN B-8P, που αποτελείται από 199 αμινοξέα και το μοριακό βάρος της υπολογίζεται περίπου στα 23 kDA (McSweeney & Fox, 2013).

#### **$\alpha_{s2}$ –καζεΐνη**

Αντιστοιχεί στο 10% της συνολικής συγκέντρωσης καζεϊνών στο αγελαδινό γάλα. Η πρωτεΐνη αναφοράς για αυτή την ομάδα είναι η  $\alpha_{s2}$ -CN A-11P, που περιέχει 207 αμινοξικά κατάλοιπα. Πολλές ισομορφές της συγκεκριμένης πρωτεΐνης έχουν ταυτοποιηθεί με διαφορές στο βαθμό φωσφορυλίωσης.

Η δομή  $\alpha_{s2}$  – καζεΐνης περιλαμβάνει 4 διακριτές επικράτειες:

- ένα αρνητικά φορτισμένο αμινοτελικό άκρο, που την καθιστά το περισσότερο υδρόφιλο μέλος της οικογένειας των καζεϊνών
- μία κεντρική υδρόφοβη περιοχή
- μία ακόμα ανιονική υδρόφιλη περιοχή
- ένα θετικά φορτισμένο και ισχυρά υδρόφοβο καρβοξυτελικό άκρο (Farrell et al, 2004).

#### **$\beta$ –καζεΐνη**

Η πρωτεΐνη αναφοράς για τις  $\beta$ -καζεΐνες είναι η  $\beta$ -CN A<sup>2</sup>-5P, που αποτελείται από 209 αμινοξέα. Η  $\beta$ -καζεΐνη αποτελεί το πλέον υδρόφοβο μέλος της ομάδας των καζεϊνών κυρίως εξαιτίας του μεγάλου αριθμού καταλοίπων προλίνης (Walstra et al, 2006). Στην πραγματικότητα το C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης (κατάλοιπα 136-209) αποτελεί το τμήμα με τη μέγιστη υδροφοβικότητα. Το μεσαίο τμήμα (κατάλοιπα 41-135) και το N-τελικό άκρο (κατάλοιπα 1-40) χαρακτηρίζονται από μέτρια και μικρή υδροφοβικότητα αντίστοιχα (McSweeney & Fox, 2013).

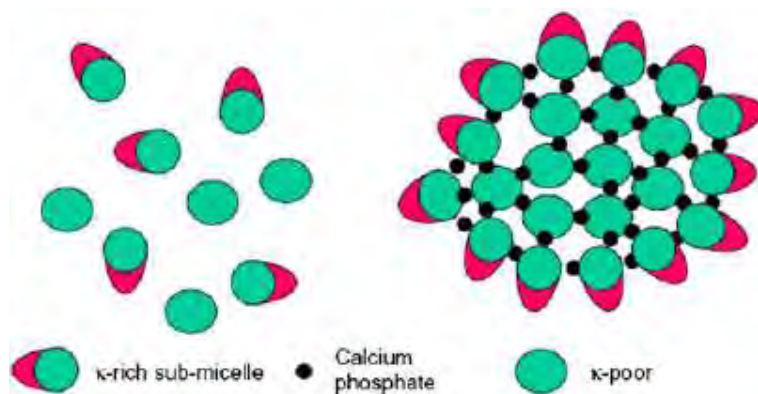
### κ – καζεΐνη

Πρόκειται για τη μικρότερη καζεΐνη και διαθέτει κάποια μοναδικά χημικά χαρακτηριστικά. Συγκεκριμένα επιδεικνύει χαμηλό βαθμό φωσφορυλίωσης, μικρή ευαισθησία σε Ασβέστιο, ενώ μπορεί να εμφανιστεί και σε γλυκοσυλιωμένη μορφή. Η πρωτεΐνη αναφοράς σε αυτή την περίπτωση είναι η κ-CN A1P, που δομείται από 169 αμινοξέα (McSweeney & Fox, 2013).

#### 1.1.4. Μικκύλια καζεϊνών

Τα μικκύλια είναι λειτουργικά συσσωματώματα μορίων καζεϊνών με διάμετρο 50-500 nm στο αγελαδινό γάλα. Ο μεγάλος όγκος των δομών αυτών οφείλεται κατά κύριο λόγο στην υψηλή περιεκτικότητά τους σε νερό (63%). Ένα τυπικό μικκύλιο σχηματίζεται από χιλιάδες μόρια καζεϊνών, τα οποία συσσωματώνονται σε μικρότερα θερμοδυναμικά σταθερά υπο-μικκύλια με σωματίδια φωσφορικού ασβεστίου. Οι αs- και β-καζεΐνες σχηματίζουν τον υδρόφοβο πυρήνα του μικκυλίου και εξωτερικά περιβάλλονται από την κ-καζεΐνη, που σταθεροποιεί το μικκύλιο (Εικόνα 1).

Η δομή των μικκυλίων εξυπηρετεί στους 3 βιολογικούς τους ρόλους: τον έλεγχο της καθίζησης του φωσφόρου στο μαστικό αδέν, την καταστολή του σχηματισμού αμυλοειδών ινών καζεϊνών στο μαστικό αδέν και την αύξηση παραμονής των μικκυλίων στον στόμαχο του νεογνού, ώστε να διευκολύνεται η απορρόφηση θρεπτικών. (Holt et al, 2013). Τα μικκύλια γενικά παραμένουν σταθερά σε μεγάλες θερμοκρασίες και διάφορες επεξεργασίες που επιδέχεται το γάλα, γι' αυτό και η μελέτη της δομής τους έχει απασχολήσει εκτενώς τους βιοχημικούς και τους τεχνολόγους τροφίμων τις τελευταίες δεκαετίες.



Εικόνα 1. Δομή μικκυλίου καζεΐνης. Η κ-καζεΐνη διαθέτει βασικό ρόλο στη σταθεροποίηση της δομής (de Kruijff et al, 2012).

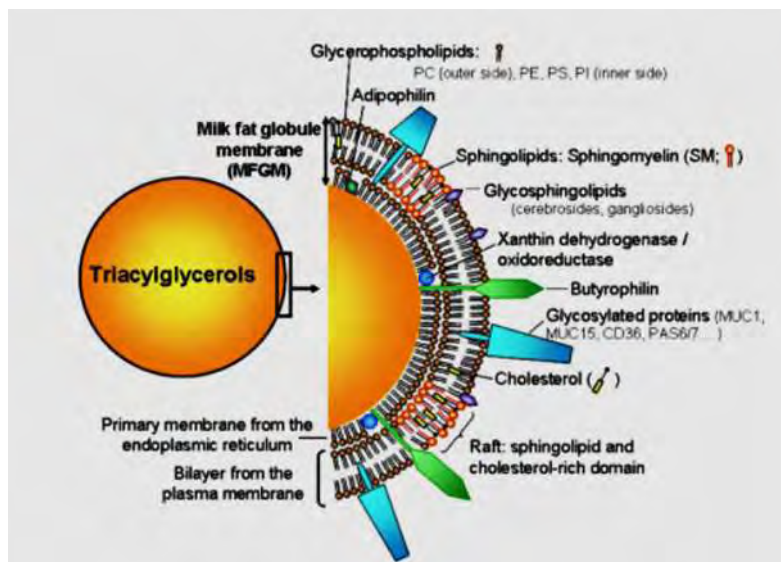
### 1.1.5. Λιπίδια του γάλακτος

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω το αγελαδινό γάλα περιέχει 3-4% λιπίδια, που εμφανίζονται με τη μορφή λιποσφαιριδίων. Το 98% της συνολικής περιεκτικότητας σε λιπαρά αντιπροσωπεύουν οι τριακυλογλυκερόλες, ενώ το υπόλοιπο 2% αποτελείται από διακυλογλυκερόλες, πολικά λιπίδια (κυρίως φωσφολιπίδια) και ελεύθερα λιπαρά οξέα. Η ποσότητα και η φύση των λιπαρών οξέων εξαρτώνται τόσο από το είδος όσο και το αναπτυξιακό στάδιο και τις διατροφικές συνήθειες του ζώου.

Το γάλα συνήθως θεωρείται ως πηγή ‘κακών’ λιπιδίων εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητάς του σε κορεσμένα λιπίδια, που αντιπροσωπεύουν συνολικά το 70-75% και έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση υπερχοληστερολαιμίας. Ωστόσο τα λιπίδια του γάλακτος είναι σημαντικά για την ανθρώπινη διατροφή για 3 κυρίως λόγους:

- Ο πρωταρχικός τους ρόλος είναι παροχή αξιοποιήσιμης ενέργειας ( $\sim 37 \text{ kJ} \cdot \text{g}^{-1}$ )
- Επιπλέον αποτελούν ‘διαλύτες’ για τη μεταφορά και απορρόφηση των λιποδιαλυτών βιταμινών, όπως οι A, D και E
- Τέλος τα γάλα περιέχει ορισμένα απαραίτητα λιπαρά οξέα, όπως το λινολεϊκό και το λινολενικό, που χρησιμοποιούνται ως πρόδρομα μόρια για τη βιοσύνθεση ορμονών και άλλων μεταβολιτών (Walstra et al, 2006).

Τα λιπίδια του γάλακτος ενώνονται προς σχηματισμό λιποσφαιριδίων, που περιβάλλονται από μεμβράνες. Οι εξωτερικές μεμβράνες αποτελούνται από πρωτεΐνες, φωσφολιπίδια, σφιγγολιπίδια, γλυκοπρωτεΐνες, χοληστερόλη και ένζυμα και δημιουργούν το φραγμό που προστατεύει τις τριακυλογλυκερόλες από την υδατική φάση του γάλακτος (Pereira, 2013). Στο παρακάτω σχήμα (Εικόνα 2) φαίνεται μια ενδεικτική δομή των λιποσφαιριδίων του γάλακτος.



Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση της δομής των λιποσφαιριδίων του αγελαδινού γάλακτος (Lopez et al, 2010).

### 1.1.6. Λακτόζη

Η λακτόζη αποτελεί τον πλέον άφθονο υδατάνθρακα στο αγελαδινό γάλα σε ποσοστό περίπου 4,8% του συνολικού όγκου. Το ποσοστό αυτό επηρεάζεται σημαντικά από τα ατομικά χαρακτηριστικά του ζώου (φυλή, κατάσταση υγείας, παρουσία λοιμώξεων) καθώς και την εποχή παραγωγής του γάλακτος (Fox, 1997).

Η λακτόζη είναι ένας αναγωγικός δισακχαρίτης, που συντίθεται στο μαστικό αδένα και αποτελείται από γλυκόζη και γαλακτόζη συνδεδεμένες με γλυκοσιδικό δεσμό. Ο πρωταρχικός της ρόλος στη διατροφή, όπως ισχύει γενικά για τα σάκχαρα, είναι η παροχή ενέργειας στο νεογνό. Ωστόσο η λακτόζη χαρακτηρίζεται από υψηλή διατροφική αξία και για τους ενήλικους, καθώς έχει συσχετιστεί με αύξηση της απορρόφησης του ασβεστίου από τον ανθρώπινο οργανισμό. Εκτός από τη λακτόζη το αγελαδινό γάλα περιέχει επιπλέον σάκχαρα σε μικρότερες ποσότητες, με κυριότερα τη γλυκόζη και τη Ν-ακετυλογλυκοζαμίνη (Fuquay et al, 2011).

### 1.1.7. Μέταλλα, ιχνοστοιχεία και βιταμίνες

Το γάλα περιέχει αξιοσημείωτες ποσότητες επιπλέον θρεπτικών ουσιών με βασικότερες το ασβέστιο, το σελήνιο, το μαγνήσιο και τις πολυάριθμες βιταμίνες. Στον πίνακα παρακάτω (Πίνακας 1) παρατίθενται συγκεντρωτικά τα θρεπτικά που περιέχονται στο γάλα, καθώς και η Συνιστώμενη Ημερήσια Πρόσληψη για καθένα από αυτά, για ενήλικα άτομα. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι τιμές συγκέντρωσης στο γάλα είναι ενδεικτικές και ποικίλουν σημαντικά ανάλογα με την εποχή, το είδος της τροφής αλλά και το γενετικό προφίλ του ζώου. Επομένως καθίσταται αναγκαία η επιλογή αλλά και η βελτίωση της ποιότητας του γάλακτος, όπως συζητείται παρακάτω.

#### **Ασβέστιο**

Το ασβέστιο δίκαια θεωρείται ως ένα από τα σημαντικότερα μέταλλα για την ανθρώπινη υγεία. Είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη και τη διατήρηση της υγείας των οστών και των δοντιών, ενώ συμμετέχει και σε άλλες φυσιολογικές διεργασίες, όπως η μυική συστολή και ο έλεγχος της απελευθέρωσης διάφορων ορμονών (<http://www.eufic.org/>). Το αγελαδινό γάλα αποτελεί την κύρια πηγή ασβεστίου για τον άνθρωπο, καθώς περιέχει περίπου 1g/l και έτσι καλύπτει το μεγαλύτερο ποσοστό της Συνιστώμενης Ημερήσιας Πρόσληψης.

#### **Σελήνιο**

Πρόκειται για ιχνοστοιχείο, δηλαδή χρειάζεται σε πολύ μικρές ποσότητες στον οργανισμό. Ωστόσο το απαραίτητο σελήνιο παρέχεται σχεδόν αποκλειστικά μέσω της διατροφής και επομένως η επαρκής πρόσληψή του είναι κρίσιμη για την υγεία. Το σελήνιο συμβάλλει ουσιαστικά στη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος, στην ενεργοποίηση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών και επιπλέον αποτελεί συστατικό ενός ενζυμικού συμπλόκου υπεύθυνου για στην επιδιόρθωση του DNA κατά την αντιγραφή. Η συγκέντρωση του

σεληνίου στο αγελαδινό γάλα ποικίλει σημαντικά και γι' αυτό θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη για την επιλογή του πλέον θρεπτικού. Πλούσιο σε σεληνίο γάλα θεωρείται αυτό που περιέχει 50-100  $\mu\text{g Se/l}$  (Haug, 2007).

### Μαγνήσιο

Το γάλα θεωρείται ως καλή πηγή μαγνησίου και συγκεκριμένα το περιέχει σε συγκέντρωση 100  $\text{mg/l}$ . Το μαγνήσιο συνεισφέρει στην ενεργοποίηση και στη δράση πολυάριθμων ενζύμων με αποτέλεσμα η παρουσία του να είναι απαραίτητη για την πραγματοποίηση περισσότερων από 300 βιοχημικών αντιδράσεων στον ανθρώπινο οργανισμό. Έτσι η ανεπάρκεια μαγνησίου στον οργανισμό μπορεί να επιφέρει σοβαρές συνέπειες για την υγεία, όπως οξειδωτικό στρες, νευρομυικές δυσλειτουργίες, ατονία και αδυναμία (<http://www.eufic.org/>).

Πίνακας 1. Θρεπτικά συστατικά του γάλακτος (Πληροφορίες από: <http://www.eufic.org/>, Haug et al. 2007)

Θρεπτικό Συστατικό	Συνιστώμενη Ημερήσια Πρόσληψη στην Ε.Ε.	Ενδεικτικές συγκεντρώσεις στο αγελαδινό γάλα
<b>Ασβέστιο (Ca)</b>	700mg	1 g/l
<b>Μαγνήσιο (Mg)</b>	150-500 mg	100 mg/l
<b>Σελήνιο (Se)</b>	55 $\mu\text{g}$	50-100 $\mu\text{g/l}$
<b>Ιώδιο (I)</b>	150 $\mu\text{g}$	160 $\mu\text{g/l}$
<b>Ψευδάργυρος (Zn)</b>	9.5 mg	4 mg/l
<b>Βιταμίνη Ε</b>	10mg	0.6 mg/l
<b>Βιταμίνη Α</b>	800 $\mu\text{g}$	280 $\mu\text{g/l}$
<b>Φολικό (Βιταμίνη Β9)</b>	400 $\mu\text{g}$	50 $\mu\text{g/l}$
<b>Βιταμίνη Β2</b>	1.6 mg	1.83mg/l
<b>Βιταμίνη Β12</b>	1 $\mu\text{g}$	4.4 $\mu\text{g/l}$

## 1.2. Η Βοοτροφία στην Ελλάδα

Ο όρος βοοτροφία αναφέρεται στον κλάδο της κτηνοτροφίας που αξιοποιεί την εκτροφή βοοειδών με στόχο την παραγωγή κυρίως γάλακτος και κρέατος (<http://www.agrogi.eu/>). Οι βοοτροφικές επιχειρήσεις διακρίνονται ανάλογα με την παραγωγική τους κατεύθυνση σε:

- ♦ Μονάδες εκτροφής αγελάδων γαλακτοπαραγωγής
- ♦ Μονάδες εκτροφής αγελάδων κρεατοπαραγωγής
- ♦ Μονάδες πάχυνσης μοσχαριών

Όσον αφορά στη γαλακτοπαραγωγή στην Ελλάδα σήμερα εκτρέφονται περίπου 633,656

βοοειδή και παράγονται περίπου 750,000 τόνοι αγελαδινού γάλακτος και 59,000 τόνοι βοείου - μοσχαρίσιου κρέατος κάθε έτος. Τα τελευταία χρόνια επικρατεί μια αύξηση στο μέγεθος των μονάδων γαλακτοπαραγωγής, ενώ ο συνολικός αριθμός των παραγωγών τείνει να μειώνεται. Η πλειοψηφία των γαλακτοπαραγωγών μονάδων βρίσκονται συγκεντρωμένες στη Μακεδονία, στη Θράκη και τη Θεσσαλία, ενώ μικρότερος αριθμός είναι κατανεμημένες στην Ήπειρο, στη Στερεά Ελλάδα, στην Πελοπόννησο και τα νησιά. Η κυρίαρχη φυλή εκτροφόμενων για γαλακτοπαραγωγή βοοειδών είναι οι αγελάδες Holstein (<http://www.minagric.gr/>).

### 1.3. Η φυλή Holstein-Friesian



Εικόνα 3. Αγελάδα Holstein-Friesian (<http://www.nationalgeographic.com/>).

Σχεδόν το 35% όλων των γαλακτοκομικών προϊόντων σήμερα παράγονται από τις αγελάδες Holstein-Friesian (FAO, 2013). Η φυλή αυτή κατάγεται από την Ευρώπη και συγκεκριμένα από τις περιοχές τις Βόρειας Ολλανδίας. Συνήθως αναγνωρίζονται εύκολα από το χαρακτηριστικό ασπρόμαυρο μοτίβο στο τρίχωμά τους (Εικόνα 3). Σπανιότερα συναντώνται ζώα με άσπρο-καφέ τρίχωμα, που διαθέτουν τυπικά μικρότερο σωματικό βάρος και χαμηλότερη παραγωγική απόδοση.

Οι αγελάδες Holstein πιστεύεται ότι επιλέχθηκαν για την παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων πριν από περίπου 2,000 χρόνια. Σήμερα είναι οι περισσότερο δημοφιλείς στους γαλακτοπαραγωγούς λόγω της υψηλής απόδοσής τους αλλά και της σχετικά μικρής περιεκτικότητας του γάλακτός τους σε λιπίδια. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2) αναφέρονται τα βασικά χαρακτηριστικά των αγελάδων Holstein στην Ελλάδα.

Πίνακας 2. Χαρακτηριστικά της φυλής Holstein στην Ελλάδα (Πληροφορίες από <http://www.holstein.gr/>, <http://www.moi.gov.cy/>).

Αριθμός γαλακτοπαραγωγικών ζώων	203,000
Βάρος αρσενικού ατόμου	1,000 kg
Βάρος θηλυκού ατόμου	600 kg
Ηλικία πρώτου τοκετού	27.6 μήνες
Διάρκεια παραγωγικής ζωής	27 μήνες
Αριθμός γαλακτικών περιόδων	2.9
Παραγωγή γάλακτος/ 3,2 γαλακτικές περιόδους	7,600 L
Περιεκτικότητα σε λίπος	3.83%
Περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη	3.32%
Περιεκτικότητα σε λακτόζη	4.89%

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ

### 2.1. Εισαγωγή στον γενετικό πολυμορφισμό των πρωτεϊνών του γάλακτος

Η πρώτη ανακάλυψη γενετικού πολυμορφισμού στις πρωτεΐνες του γάλακτος έγινε από τους Aschaffenburg και Drewry το 1957, οι οποίοι παρατήρησαν δύο διαφορετικά πρότυπα της β-λακτογλοβουλίνης έπειτα από ηλεκτροφόρηση. Από τότε έχουν γίνει πολλαπλές απόπειρες για ανακάλυψη περαιτέρω πολυμορφισμών στις πρωτεΐνες του γάλακτος κυρίως λόγω του οικονομικού ενδιαφέροντος που μπορεί να αποκομιστεί από τέτοιου είδους ανακαλύψεις. Οι παραλλαγές στην αμινοξική αλληλουχία μπορούν να επηρεάσουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του γάλακτος (π.χ. κατά την επεξεργασία προς παραγωγή τυριού) και επιπλέον έχουν συσχετιστεί με διαφορές στην ποιότητα και την παραγόμενη ποσότητα γάλακτος.

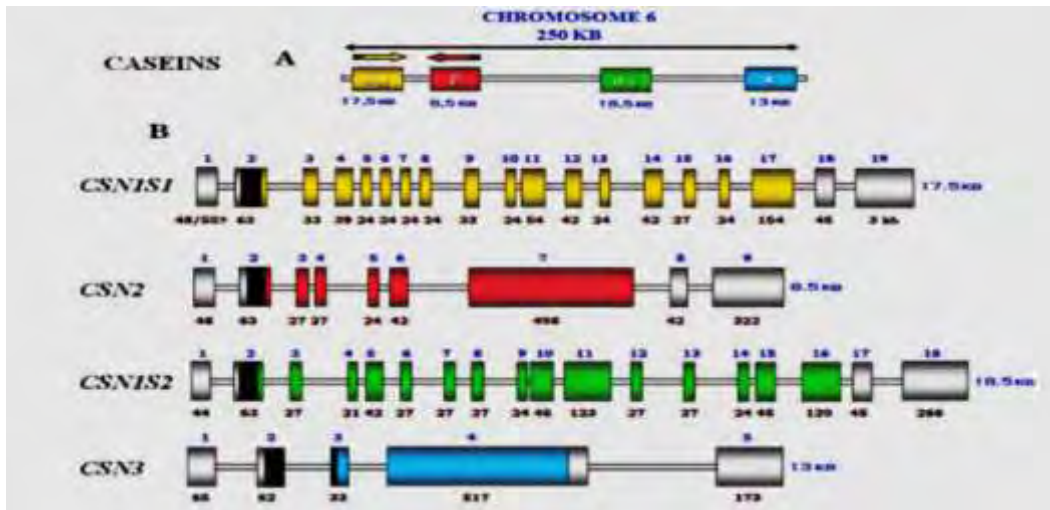
Τις τελευταίες δεκαετίες οι συνεχείς πρόοδοι της μοριακής βιολογίας οδήγησαν τους ερευνητές να επικεντρωθούν στη μελέτη της γονιδιακής αλληλουχίας των πρωτεϊνών του γάλακτος. Αυτές περιλαμβάνουν κυρίως πολυμορφισμούς νουκλεοτιδίου (SNPs) σε ποσοστό περίπου 83% αλλά και σύντομες ενθέσεις/απαλοιφές, διπλασιασμούς και μεταθέσεις τμημάτων (McSweeney & Fox, 2013).

### 2.2. Γενετικός πολυμορφισμός των καζεϊνών του γάλακτος

#### 2.2.1. Τα γονίδια των καζεϊνών του γάλακτος

Τα γονίδια των τεσσάρων καζεϊνών του αγελαδινού γάλακτος είναι οργανωμένα σε μία ομάδα 250 kb, που έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα 6, όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα (Εικόνα 4). Συγκεκριμένα τα γονίδια αυτά είναι τα: *CSN1S1*, *CSN2*, *CSN1S2*, *CSN3* και κωδικοποιούν για τις:  $\alpha_{S1}$ -CN,  $\beta$ -CN,  $\alpha_{S2}$ -CN και  $\kappa$ -CN αντίστοιχα (Caroli et al, 2009).





Εικόνα 4. Η οργάνωση των γονιδίων των καζεϊνών του γάλακτος στο χρωμόσωμα 6. Οι έγχρωμες περιοχές αντιστοιχούν στα εξόνια των γονιδίων. Το γκρι χρώμα αντιστοιχεί στις αμετάφραστες περιοχές, ενώ το μαύρο στις περιοχές που κωδικοποιούν για το σηματοδοτικό πεπτίδιο (Προσαρμογή από Caroli et al, 2009).

### 2.2.2. Ο πολυμορφισμός της α<sub>s1</sub>-καζεΐνης

Οι συνηθέστερες γενετικές παραλλαγές που έχουν ταυτοποιηθεί είναι η Α, που κυριαρχεί στις αγελάδες Holstein και η Β, που αποτελεί τη συνηθέστερα εμφανιζόμενη παραλλαγή στο είδος *Bos Taurus*. Επιπλέον παραλλαγές (C-H) έχουν αναγνωρισθεί σε συγκεκριμένες φυλές βοοειδών. Στον πίνακα παρακάτω (Πίνακας 3) φαίνονται οι διαφοροποιήσεις των παραλλαγών της α<sub>s1</sub>-καζεΐνης σε σχέση με τη βασική αλληλουχία (Farrell et al, 2004).

Πίνακας 3. Θέσεις και διαφορές στην αλληλουχία των παραλλαγών της α<sub>s1</sub>-καζεΐνης από *Bos Taurus* (Προσαρμογή από Farrell et al, 2004)

Protein <sup>1</sup>	Variant	Position and amino acid in the protein					
		14-26	53	51-58	59	66	192
α <sub>s1</sub> -CN (199)	A	Deleted					Glu
	B		Ala		Gln	SerP	Glu
	C						Gly
	D		ThrP				Glu
	E				Lys		Gly
	F					Leu	Glu
	G						Glu
	H		Deleted				Glu

### 2.2.3. Ο πολυμορφισμός της α<sub>2</sub>-καζεΐνης

Η οικογένεια των α<sub>2</sub>-καζεϊνών αντιπροσωπεύει περίπου το 10% του κλάσματος των καζεϊνών στο αγελαδινό γάλα. Αποτελείται από δύο κύριες και μερικές σπανιότερες ισομορφές, που διαφέρουν ως προς τα επίπεδα μετα-μεταφραστικής φωσφορυλίωσης.

Για το γονίδιο της α<sub>2</sub>-καζεΐνης έχουν περιγραφεί 4 παραλλαγές (A, B, C, D), όπως φαίνεται παρακάτω (Πίνακας 4).

Πίνακας 4. Θέσεις και διαφορές στην αλληλουχία των παραλλαγών της α<sub>2</sub>-καζεΐνης από *BosTaurus* (Προσαρμογή από Farrell et al, 2004)

Protein <sup>1</sup>	Variant	Position and amino acid in the protein			
α <sub>2</sub> -CN (207)	A	33 Glu	47 Ala	51-59	130 Thr
	B	Complete sequence not yet determined			
	C	Gly	Thr		Ile
	D			Deleted	

Η πρωτεΐνη αναφοράς για αυτή την ομάδα είναι η α<sub>2</sub>-CN A-11P (με όνομα καταχώρησης ExPASy: CAS2\_Bovine και αριθμό αρχείου: P02663), που κυριαρχεί στις περισσότερες δυτικές φυλές βοοειδών (Farrell et al, 2004). Η αλληλουχία της α<sub>2</sub>-CN A-11P δίνεται στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 5).

Πίνακας 5. Η αλληλουχία αμινοξέων της Alpha-s2-casein από *Bos Taurus* (<http://www.uniprot.org/>)

10	20	30	40	50
MKFFIFTCLL	AVALAKNTME	HVSSSEESII	SQETYKQEK	MAINPSKENL
60	70	80	90	100
CSTFCKEVVR	NANEEEEYSIG	SSSEESAeva	TEENKITVDD	KHYQKALNEI
110	120	130	140	150
NQFYQKFPQY	LQYLYQGPIV	LNPWDQVKRN	AVPITPTLNR	EQLSTSEENS
160	170	180	190	200
KKTVDMESTE	VFTKTKLTE	EENRNLNFK	KISQRYQKFA	LPQYLKTVYQ
210	220			
HQKAMKRWIQ	PKTKVIPYVR	YL		

#### 2.2.4. Ο πολυμορφισμός της β-καζεΐνης

Για την β-καζεΐνη έχουν ταυτοποιηθεί οι εξής 12 παραλλαγές: A<sup>1</sup>, A<sup>2</sup>, A<sup>3</sup>, B, C,D, E, F, G, H<sup>1</sup>, H<sup>2</sup>, I, όπως φαίνεται παρακάτω στον πίνακα 6. Η πιο συχνά εμφανιζόμενη παραλλαγή σε άτομα του είδους *Bos Taurus* είναι η A<sup>2</sup> (Caroli et al. 2009).

Πιο πρόσφατα δεδομένα αποκλείουν την παραλλαγή H<sup>1</sup>, καθώς η αντικατάσταση R25C, από την οποία προέκυψε η παραλλαγή, δεν επιβεβαιώθηκε έπειτα από δεύτερη προσπάθεια αλληλούχησης (McSweeney & Fox, 2013).

Πίνακας 6. Θέσεις και διαφορές στην αλληλουχία των παραλλαγών της β-καζεΐνης από *Bos Taurus* (Προσαρμογή από Farrell et al, 2004)

Protein <sup>1</sup>	Variant	Position and amino acid in the protein													
β-CN (209)	A <sup>1</sup>	18	25	35	36	37	67	72	88	93	106	122	137/138	152	?
	A <sup>2</sup>	SerP	Arg	SerP	Glu	Glu	His Pro	Gln	Leu	Met	His Gln	Ser	Leu/Pro	Pro	Gln
	A <sup>3</sup>						His					Arg			
	B			Ser		Lys	His								
	C						His								
	D	Lys													
	E					Lys									
	F						His								Leu
	G						His							Leu	
	H <sup>1</sup>		Cys						Ile						
	H <sup>2</sup>							Glu		Leu					Glu

#### 2.2.5. Ο πολυμορφισμός της κ-καζεΐνης

Συνολικά αναφέρονται στη βιβλιογραφία οι 11 παραλλαγές της κ-καζεΐνης που φαίνονται στον πίνακα 7 (A, B, C, E, F<sup>1</sup>, F<sup>2</sup>, G1, G2, H, I, J). Οι πιο κοινές από αυτές είναι οι A και B, που διαφέρουν μεταξύ τους συνολικά κατά 2 αμινοξέα (θέσεις 136 αι 148). Η παραλλαγή A κυριαρχεί στις περισσότερες φυλές οικόσιτων βοοειδών (Farrell et al, 2004).

Επιπλέον προτείνεται η ύπαρξη δύο επιπλέον παραλλαγών: K, που φέρει την αμινοξική αντικατάσταση D148A και L που φέρει την αντικατάσταση D148A καθώς και μία ένθεση 4 αμινοξέων (McSweeney & Fox, 2013).

Πίνακας 7. Θέσεις και διαφορές στην αλληλουχία των παραλλαγών της κ-καζεΐνης από *Bos Taurus* (Προσαρμογή από Farrell et al, 2004)

Protein <sup>1</sup>	Variant	Position and amino acid in the protein						
κ-CN (169)	A	10 Arg	97 Arg	104 Ser	135 Thr	136 Thr	148 Asp	155 Ser
	B							
	C		His					
	E							Gly
	F <sup>1</sup>						Val	
	F <sup>2</sup>	His					Ala	
	G <sup>1</sup>		Cys			Ile	Ala	
	G <sup>2</sup>					Ile	Ala	
	H							
	I			Ala		Ile		

## 2.2.6. Επίδραση του πολυμορφισμού στα ποιοτικά χαρακτηριστικά του γάλακτος

Κατά την επιλογή αγελάδων για μέγιστη παραγωγικότητα και βέλτιστη ποιότητα του γάλακτος είναι κρίσιμο να κατανοήσουμε το πώς αυτά τα χαρακτηριστικά εξαρτώνται από το γονιδιακό προφίλ των ζώων. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως οι κυριότερες πρωτεΐνες του γάλακτος εμφανίζουν γενετικό πολυμορφισμό και οι διάφορες γονιδιακές παραλλαγές που συναντώνται μπορούν να χρησιμεύσουν ως δείκτες της σύστασης του γάλακτος, των παραγωγικών χαρακτηριστικών αλλά και των τεχνολογικών ιδιοτήτων (Gustavsson et al, 2014). Παρακάτω αναγράφονται ορισμένα παραδείγματα που αποδεικνύουν τις παρατηρήσεις αυτές.

### Παρασκευή τυριού

Τα χαρακτηριστικά του γάλακτος που επηρεάζουν την παραγωγή του τυριού αποτελούν ίσως το πιο τυπικό παράδειγμα επίδρασης του γενετικού πολυμορφισμού στις ιδιότητες του γάλακτος. Η πλειοψηφία των σχετικών ερευνών επικεντρώνονται στην β αλλά και στην κ-καζεΐνη, η οποία καλύπτει την επιφάνεια του καζεϊνικού μικκυλίου και έτσι αποτελεί υπόστρωμα του υδρολυτικού ενζύμου χυμοσίνη, που χρησιμοποιείται κατά την παρασκευή του τυριού. Συγκεκριμένα έχει βρεθεί ότι η παραλλαγή Βτείνει να αντιδρά με τη χυμοσίνη ταχύτερα σε σχέση με την Α παραλλαγή, ενώ στα ετερόζυγα άτομα παρατηρείται ενδιάμεση συμπεριφορά. Η διαφορά στην ταχύτητα αντίδρασης συνδέεται με το μέγεθος του μικκυλίου που σχηματίζεται αλλά και με το βαθμό φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης. Οι λιγότερο κοινές παραλλαγές της κ-καζεΐνης επίσης επηρεάζουν την παραγωγή του τυριού και ιδιαίτερα τη διαδικασία πήξης (Di Stasio & Mariani, 2000).

### Βιοπεπίδια

Ακόμα έχει βρεθεί ότι οι γονιδιακές παραλλαγές καθορίζουν το είδος και τη συγκέντρωση των προερχόμενων από το γάλα βιοπεπτιδίων. Γενικά ο όρος βιοπεπίδια περιλαμβάνει τα τμήματα των πρωτεϊνών που είναι αρχικά ανενεργά, αλλά ενεργοποιούνται μετά την απελευθέρωσή τους μέσω ενζυμικής πρωτεόλυσης κατά την πέψη και αποκτούν δραστικό βιολογικό ρόλο. Οι πρωτεΐνες που λαμβάνονται μέσω της διατροφής αποτελούν

αξιοσημείωτη πηγή τέτοιων βιοπεπτιδίων (Meisel et al, 1989). Η βιολογική δραστηριότητα των πεπτιδίων που εμπεριέχονται στις πρωτεΐνες του γάλακτος φαίνεται να επηρεάζεται από διάφορες αντικαταστάσεις και απαλοιφές αμινοξέων των καζεϊνών. Έτσι οι διάφορες παραλλαγές των γονιδίων των καζεϊνών καταλήγουν στην απελευθέρωση διαφοροποιημένων βιοπεπτιδίων με ποικίλες επιδράσεις στα μεταβολικά μονοπάτια (Caroli et al, 2009). Για παράδειγμα από τη διάσπαση των πρωτεϊνικών προϊόντων των CSN2\*A2 και CSN2\*A3 απελευθερώνεται β-καζομορφίνη 7, που έχει συνδεθεί με την εμφάνιση διαβήτη τύπου I (Elliott et al, 1999).

### **Συγκέντρωση πρωτεϊνών**

Τέλος πολλαπλές μελέτες έχουν αποδείξει την εξάρτηση της συνολικής συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στο γάλα από την εμφάνιση των διαφορετικών αλληλομόρφων. Το 2014 ο Gustavsson και οι συνεργάτες του μελέτησαν ταυτόχρονα 3 φυλές αγελάδων (Swedish Red, Danish Holstein και Danish Jersey) και παρατήρησαν αξιοσημείωτες μεταβολές στις συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών ανάλογα με τη φυλή και το γονιδιακό προφίλ του ζώου από το οποίο προήλθε το γάλα. Επιπλέον, καθώς πολλές από τις πρωτεΐνες του γάλακτος αποτελούν πιθανά αλλεργιογόνα για τον άνθρωπο (κυρίως οι  $\alpha$ s<sub>1</sub>-CN,  $\alpha$ s<sub>2</sub>-CN, και β-LG), τα ευρήματα αυτά μπορούν να αξιοποιηθούν για την παραγωγή υποαλλεργικού γάλακτος (Caroli et al, 2009).

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν η διερεύνηση πιθανών πολυμορφισμών στο γονίδιο της  $\alpha_{s2}$ -καζεΐνης του γάλακτος, σε ελληνικές αγελάδες της φυλής Holstein. Συγκεκριμένα η ενισχύθηκε και μελετήθηκε η περιοχή εξονίου 8του γονιδίου *CSN1S2*, που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη  $\alpha_{s2}$ -Casein. Η έρευνα περιελάμβανε 58 δείγματα αίματος αγελάδων από μία κτηνοτροφική μονάδα στην περιοχή της Θεσσαλίας.

## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 – ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 4.1. Απομόνωση DNA

Η διαδικασία απομόνωσης του DNA από τα δείγματα αίματος έγινε ως εξής:

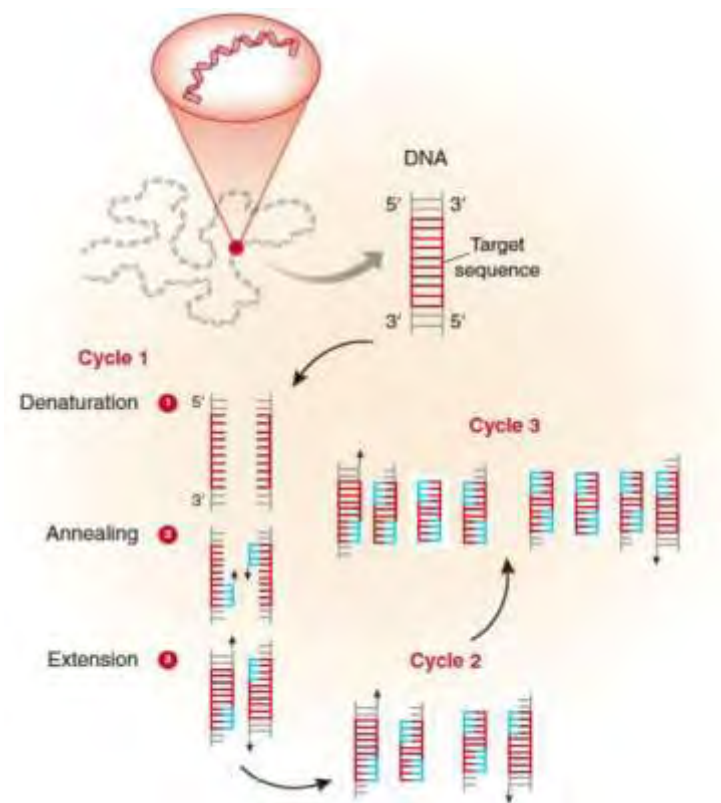
- ♦ Μεταφορά 0,5ml δείγματος αίματος σε erpendorf των 2ml
- ♦ Προσθήκη 1ml ρυθμιστικού διαλύματος 1XSSC και ανάδευση σε vortex
- ♦ Φυγοκέντρηση για 3 min στις 13,000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου
- ♦ Απομάκρυνση του υπερκειμένου και προσθήκη διαλυμάτων: 0,6 ml οξικό νάτριο 0,2 M, 50  $\mu$ l SDS 10%, 15  $\mu$ l διαλύματος πρωτεΐνάσης K (10mg/ml)
- ♦ Επώαση στους 55 °C υπό ανάδευση για περίπου 2h
- ♦ Προσθήκη στο erpendorf 1ml φαινόλης και ανάδευση σε vortex
- ♦ Φυγοκέντρηση για 10 min στις 13,000 rpm στους 4 °C
- ♦ Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέα erpendorf και απόρριψη του ιζήματος
- ♦ Προσθήκη 1ml χλωροφορμίου/ ισοαμυλικής αλκοόλης (24/1) και ανάδευση σε vortex
- ♦ Φυγοκέντρηση για 5 min στις 13,000 rpm στους 4 °C
- ♦ Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέα erpendorf και απόρριψη του ιζήματος
- ♦ Προσθήκη 1ml ισοπροπανόλης και επώαση για 20 min στους -20 °C
- ♦ Φυγοκέντρηση για 20 min στις 13,000 rpm στους 4 °C
- ♦ Αφαίρεση του υπερκειμένου (το DNA έχει κατακρημνιστεί) και προσθήκη 1 ml αιθανόλης 70%
- ♦ Φυγοκέντρηση για 5 min στις 13,000 rpm στους 4 °C
- ♦ Απόρριψη του υπερκειμένου και επώαση στους 50 °C ώστε να εξατμιστεί πλήρως η αιθανόλη
- ♦ Διαλυτοποίηση του ιζήματος σε 100  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O και αποθήκευση του δείγματος DNA στους -20 °C.

Μετά το πέρας της διαδικασίας ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων DNA σε πηκτή αгарόζης πυκνότητας 1.5%, με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου έτσι ώστε να ελεγχθεί το αποτέλεσμα και να καθοριστεί η ποσότητα του DNA των δειγμάτων θα υποβάλουμε σε PCR. Αναλυτικότερα η πηκτή αгарόζης κατασκευάστηκε ως εξής:

- ♦ TAE 1x: 50 ml
- ♦ Αγαρόζη: 0.8 g
- ♦ Βρωμιούχοαιθίδιο: 5  $\mu$ l

## 4.2. Ενίσχυση τμήματος DNA με την τεχνική PCR

Η PCR (Polymerase Chain Reaction) είναι μια τεχνική που αναπτύχθηκε κατά τη δεκαετία του 80' από τον Αμερικανό Kary Mullis και του χάρισε το Νόμπελ Χημείας λίγα χρόνια αργότερα. Η PCR αξιοποιεί τη δράση του ενζύμου DNA πολυμεράση, για να πολλαπλασιάσει *in vitro* επιθυμητά τμήματα DNA έως και δισεκατομμύρια φορές. Η μεγάλη ταχύτητα, το χαμηλό κόστος αλλά και οι πολλαπλές παραλλαγές που έχουν αναπτυχθεί καθιστούν την PCR μία από τις πιο δημοφιλείς τεχνικές μοριακής βιολογίας σήμερα. Η βασική αρχή της αντίδρασης PCR συνοψίζεται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Σχηματική αναπαράσταση ενός κύκλου PCR:

- 1) Αποδιάταξη των 2 κλώνων σε υψηλή θερμοκρασία
  - 2) Πτώση της θερμοκρασίας και πρόσδεση συμπληρωματικών εκκινητών
  - 3) Αύξηση σε κατάλληλη θερμοκρασία για τη δράση του ενζύμου και αντιγραφή του τμήματος DNA
- Η διαδικασία επαναλαμβάνεται σε κάθε κύκλο. (Garibyan et al, 2013)

Σχεδιάστηκαν κατάλληλοι εκκινητές έτσι ώστε να ενισχυθεί το εξόνιο8 του γονιδίου *CSN1S2*, χρησιμοποιώντας την αλληλουχία αναφοράς από τη βάση δεδομένων (as<sub>2</sub>-casein, exon8, GenBank: M94327). Στον πίνακα 8 φαίνεται η αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για να ενισχύσουμε την περιοχή των 160bp, η οποία περιλαμβάνει το



τμήμα των 27bp του εξονίου 8 της  $as_2$ - καζεΐνης καθώς και τμήματα των ιντρονίων 7 και 8.

Πίνακας 8: Εκκινητές ενίσχυσης του εξονίου 8 της  $as_2$ - καζεΐνης

ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ
CSN1S2EX8.FW	TGTTTGCATTTCTTCTGGTAAC
CSN1S2EX8.RV	ACAACAAATTACTIONACACACTGCTG

Η PCR αντίδραση πραγματοποιήθηκε με βάση τον ακόλουθο πίνακα αντιδραστηρίων:

Πίνακας 9. Αντιδραστήρια της PCR

Αντίδραση PCR για τελικό όγκο $V_T = 50 \mu\text{l}$	
Αντιδραστήριο	Όγκος ( $\mu\text{l}$ )
DNA	*
Buffer(5X)	10
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	6
dNTPs (40mM)	1
ForwardPrimer(50 pmoles/ $\mu\text{l}$ )	0.7
Reverse Primer(50 pmoles/ $\mu\text{l}$ )	0.7
Taq polymerase(5 units/ $\mu\text{l}$ )	0.25
H <sub>2</sub> O	Μέχρι να συμπληρωθούν 50 $\mu\text{l}$

\* Ο όγκος του δείγματος DNA εξαρτάται από τη συγκέντρωσή του, όπως καθορίστηκε από την προηγούμενη ηλεκτροφόρηση

### 4.3. Ανάλυση SSCP

Η SSCP (:Single-StrandConformationalPolymorphism)είναι ίσως η απλούστερη και πιο ευαίσθητη τεχνική σήμερα για την ανίχνευση μεταλλάξεων και γενετικών πολυμορφισμών. Συγκεκριμένα με την μέθοδο SSCP μπορούν εύκολα να προσδιοριστούν οι πολυμορφισμοί σε επίπεδο νουκλεοτιδίου (SNPs: SingleNucleotidePolymorphisms), οι οποίοι αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο ποσοστό της γενετικής ποικιλομορφίας στα γονιδιώματα των θηλαστικών. Η μέθοδος βασίζεται στην ιδιότητα του DNA να κινείται σε ένα gel πολυακρυλαμίδης ανάλογα με τη δομή του στο χώρο, η οποία εξαρτάται από την αλληλουχία του (Dong, 2005). Έτσι κάθε νουκλεοτιδική αλλαγή σε έναν κλώνο του DNA οδηγεί σε διαφορετική κινητικότητα και συνεπώς σε διαφορετικό πρότυπο ζωνώσεων έπειτα από ηλεκτροφόρηση.

Η τεχνική SSCP πραγματοποιήθηκε ως εξής:

### 1. Παρασκευή gel πολυακρυλαμίδης

- ✓ Για την παρασκευή ενός gel πολυακρυλαμίδης (12%) χρειάστηκαν:
    - ♦ 7.3 g Ακρυλαμίδη
    - ♦ 0.2gBis-Ακρυλαμίδη (N,N'-Methylenebisacrylamide)
    - ♦ 6 ml Γλυκερόλη 50%
    - ♦ 3.2 ml TBE 10x
  - ✓ Ακολούθησε διήθηση του διαλύματος και προσθήκη νερού έως ο τελικός όγκος να φτάσει τα 56 ml
  - ✓ Τέλος προστέθηκαν στο διάλυμα:
    - ♦ 65 μl TEMED
    - ♦ 400 μl APS 20%
  - ✓ Το διάλυμα τοποθετήθηκε σε κατάλληλο καλούπι έπειτα από ανάδευση
- ### 2. Προετοιμασία των δειγμάτων

Σε νέα eppendorf τοποθετήθηκαν:

- ♦ 6 μlPCR προϊόντος
- ♦ 10 μl Loading buffer

Η αποδιάταξη έγινε σε μηχανήμα PCR, επιλέγοντας κατάλληλο πρόγραμμα. Αμέσως μετά το τέλος της διαδικασίας τα δείγματα τοποθετήθηκαν στον πάγο, ώστε να αποφευχθεί η επαναδιάταξη των δύο κλώνων.

### 3. Ηλεκτροφόρηση

Τα δείγματα φορτώθηκαν στα πηγαδάκια του gel, συμπληρώθηκε επαρκής όγκος διαλύματος TBE 0,5x στο μηχανήμα και πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση για 20 h.

### 4. Χρωματισμός Gel Πολυακρυλαμίδης

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης ακολούθησε ο χρωματισμός του gel με την παρακάτω διαδικασία:

- ♦ Αρχικά το gel αφαιρέθηκε από το καλούπι, μεταφέρθηκε σε διάφανη πλαστική μεμβράνη μέσα σε κατάλληλο σκεύος και τοποθετήθηκε σε μηχανήμα ανάδευσης.
- ♦ Το πρώτο διάλυμα που προστέθηκε περιείχε 400 ml H<sub>2</sub>O + 1ml οξικού οξέος.Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για 2 διαδοχικές πλύσεις διάρκειας 3 λεπτών η κάθε μία.
- ♦ Ακολούθησε πλύση με 200ml διαλύματος AgNO<sub>3</sub> για 10min. Το διάλυμα παρασκευάστηκε με προσθήκη 1g σκόνης AgNO<sub>3</sub> σε 1 lH<sub>2</sub>O.
- ♦ Το gel ξεπλύθηκε 2 φορές με H<sub>2</sub>O.
- ♦ Το τελευταίο διάλυμα που παρασκευάστηκε περιείχε: 3gNaOH, 0.01 gNaBH<sub>4</sub>, 1 ml φορμαλδεΰδης και 200 mlH<sub>2</sub>O. Μετά την προσθήκη αυτού του διαλύματος το gel παρέμεινε στο μηχανήμα ανάδευσης αρκετή ώρα ώστε να εμφανιστούν καθαρά τα

πρότυπα των ζωνώσεων.

- ♦ Τέλος το gel ξεπλύθηκε με H<sub>2</sub>O και αφαιρέθηκε από το μηχάνημα ανάδευσης.

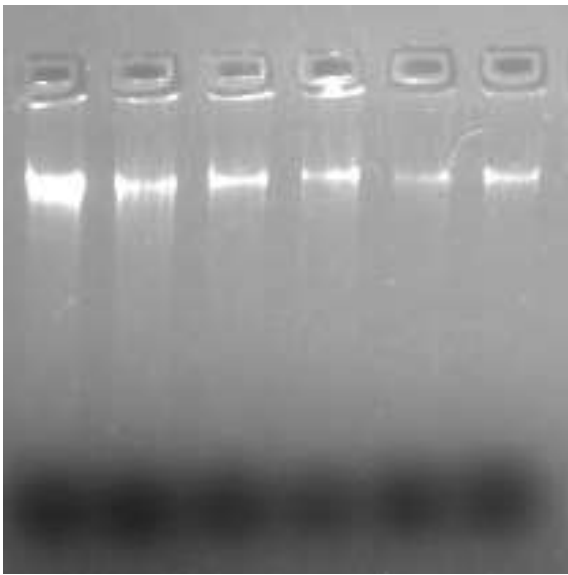
#### 4.4. Καθαρισμός DNA

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, κάποια δείγματα φάνηκαν να διαθέτουν μεταλλάξεις. Για να επιβεβαιωθούν και να προσδιοριστούν οι μεταλλάξεις είναι απαραίτητο να γίνει αλληλούχηση των πολυμορφικών αλληλουχιών. Έτσι τα PCR προϊόντα καθαρίστηκαν από υπολείμματα με βάση το κιτ καθαρισμού DNA (Gel & PCR clean-up, Macherey- Nagel) και ακολούθησε αποστολή τους για αλληλούχηση σε εξωτερικό εργαστήριο.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 5.1. Απομόνωση DNA

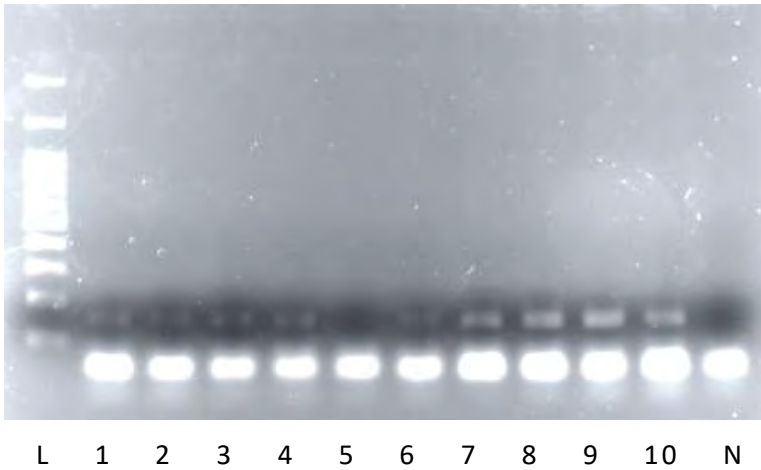
Η απομόνωση DNA από τα δείγματα αίματος πραγματοποιήθηκε με βάση το πρωτόκολλο που περιγράφηκε παραπάνω. Η επιτυχία της διαδικασίας ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε gel αгарόζης 1.5% w/v με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου (Εικόνα 6). Οι φωτεινές μπάντες που διακρίνονται παρακάτω αντιστοιχούν στο DNA που απομονώθηκε.



Εικόνα 6. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτη αгарόζης 1.5% (w/v). Απομόνωση από 6 δείγματα αίματος αγελάδας.

### 5.2. Ενίσχυση τμήματος DNA με την τεχνική PCR

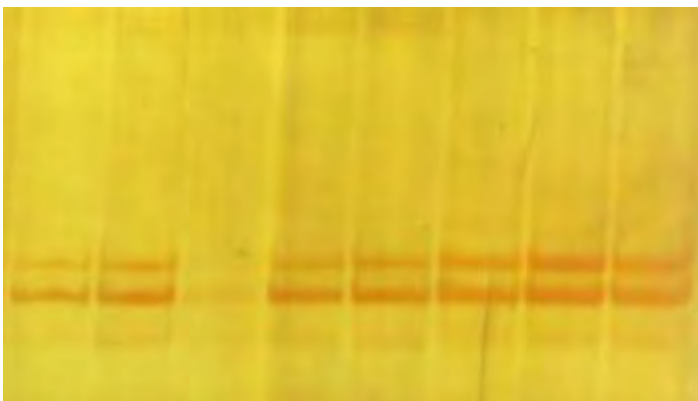
Χρησιμοποιώντας κατάλληλους εκκινητές (πίνακας 8) ενισχύθηκε το τμήμα του εξονίου 8 που επιθυμούσαμε. Η επιτυχία της μεθόδου επαληθεύτηκε με ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων σε gel αгарόζης 2% (Εικόνα 7). Για να υπολογιστεί το μήκος του τμήματος που ενισχύθηκε ηλεκτροφορούμε ταυτόχρονα και έναν ladder ή αλλιώς μάρτυρα γνωστού μοριακού βάρους (L).



Εικόνα 7. PCR προϊόντα σε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αραρόζης 2%, με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου.

### 5.3. Ανάλυση SSCP

Αφού πραγματοποιήθηκε η ενίσχυση της επιθυμητής περιοχής, έγινε ανάλυση SSCP των PCR προϊόντων. Τα αποδιαταγμένα δείγματα της PCR, ηλεκτροφορήθηκαν σε gel πολυακρυλαμίδης 12%, για περίπου 22h σε στα 220Volt. Παρακάτω παρουσιάζεται μία ενδεικτική εικόνα από gel πολυακρυλαμίδης μετά τον χρωματισμό της με νιτρικό άργυρο (Εικόνα 8).

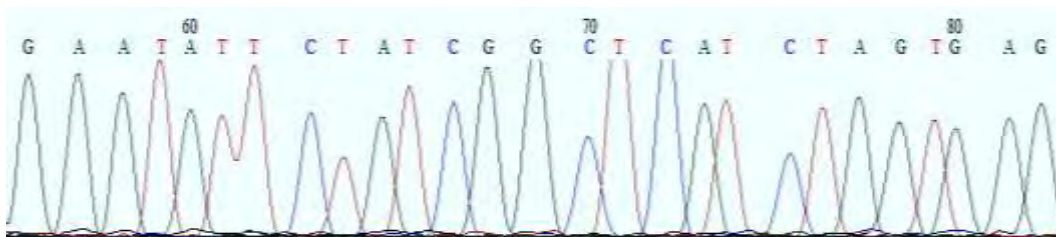


Εικόνα 8. Ανάλυση SSCP με ένα χαρακτηριστικό πρότυπο

Από την ανάλυση SSCP που πραγματοποιήθηκε στο σύνολο των δειγμάτων αποκαλύφθηκε ένα μόνο χαρακτηριστικό πρότυπο σε όλα τα δείγματα. Για την ταυτοποίηση αυτού του αλληλομόρφου ακολούθησε αλληλούχηση τριών δειγμάτων.

#### 5.4. Αλληλούχηση

Η αλληλούχηση πραγματοποιήθηκε και με τους δύο εκκινητές που είχαν σχεδιαστεί για την ενίσχυση του PCR προϊόντος, επομένως προέκυψαν δύο αλληλουχίες βάσεων για κάθε ένα δείγμα: μία που αντιστοιχεί τον εκκινητή της μεταγραφόμενης αλυσίδας και μία που αντιστοιχεί στον εκκινητή της συμπληρωματικής αλυσίδας. Το μέγεθος του τμήματος που προέκυψε για όλα τα δείγματα, μετά την αλληλούχηση, ήταν 160 bp. Τα αρχεία των ακολουθιών αναλύθηκαν με το πρόγραμμα BioEdit© και στη συνέχεια οι αλληλουχίες στοιχήθηκαν με τον αλγόριθμο ClustalX, για να βρεθούν οι περιοχές ομολογίας. Από την ανάλυση των χρωματογραφήματων του κάθε δείγματος δεν εντοπίστηκε θέση διαφοροποίησης των 2 αλληλουχιών (Εικόνα 9).



Εικόνα 9. Χρωματογράφημα της αλληλουχίας

Η αλληλουχία που προέκυψε είναι η ακόλουθη:

```

      10      20      30      40      50      60
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
csn1s2_EX8TTTGCATTTCCTTCTGGTAACCAGATTTATATTGTATATATTATTTTTC AAGGAATA

      70      80      90      100     110     120
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
csn1s2_EX8TTCTATCGGCTCATCTAGTGAAGTAAGAGACCTTTTCTTTTAACATCAAATAGCAAGTTC

      130     140     150     160
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
csn1s2_EX8ATCCAAAATA GATTTTCAGCAGTGTGTAGTAATTTGTTGT
```

Μεταφράζοντας την ακολουθία βάσεων σε αμινοξική ακολουθία, όπως φαίνεται παρακάτω, και στοιχίζοντας τη με την αμινοξική ακολουθία αναφοράς για την as2-καζεΐνη (UniProtKB

- CASA2\_BOVIN, accession: P02663), συμπεραίνουμε ότι η αμινοξική αλληλουχία του εξονίου 8 (θέσεις 51-59) που αναλύσαμε είναι παρόμοια με την αλληλουχία που εμφανίζουν οι παραλλαγές CSN1S2\*A, B και C της as2-καζεΐνης.

**CASA2\_BOVIN-P02663EYSIGSSSE**

**EX8\_protein**                    . . . . .

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως το εξόνιο 8 (θέσεις 51-59) είναι όμοιο στα αλληλόμορφα A, B, C, ενώ εμφανίζει μια απαλοιφή 9 αμινοξέων στην περίπτωση του αλληλομόρφου D (Πίνακας 10). Η παραλλαγή D εμφανίζεται με συχνότητα 0.088, 0.011 και 0.07 στις γαλλικές φυλές Vosgienne, Montbeliarde και Tarine αντίστοιχα. Η απαλοιφή φαίνεται να προέρχεται από εναλλακτικό μάτισμα του pre-mRNA της πρωτεΐνης. Μία πιθανή αιτία του εναλλακτικού ματίσματος είναι η μία μεταστροφή G→A στις θέσεις 51-59, που μεταβάλλει τη θέση ματίσματος του pre-mRNA (Bounioletal, 1993).

Πίνακας 10. Αμινοξικές αλλαγές στις παραλλαγές της as2-καζεΐνης (McSweeney & Fox, 2013)

Variant/allele	Position					GenBank accession	SwissProt accession	References
	8	33	47	51-59	130			
<b>A</b>	<b>SerP</b>	<b>Glu</b>	<b>Ala</b>		<b>Thr</b>	<b>M16644</b> <b>M94327</b>	<b>P02663</b>	Stewart <i>et al.</i> (1987) and Groenen <i>et al.</i> (1993)
<b>B</b>	<b>Phe</b>							Ibeagha-Awemu <i>et al.</i> (2007)
<b>C</b>		<b>Gly</b>	<b>Thr</b>		<b>Ile</b>			Mahé and Grosclaude (1982)
<b>D</b>				<b>DEL</b>				Bouniol <i>et al.</i> (1993a, b)

Variants are presented in different rows; amino acids in the *reference variant* are in boldface; amino acid modifications are given in the relevant column  
DEL: internal deletion of the corresponding sequence in the mature protein

Τα δείγματα που μελετήθηκαν στον παρόν πείραμα συνάδουν με τις παραλλαγές A, B και C, αλλά για να καθοριστεί η ακριβής παραλλαγή απαιτείται επιπλέον μελέτη άλλων εξονίων του γονιδίου *CSN1S2*.

Όπως φαίνεται στον πίνακα 10, οι τρεις παραλλαγές διακρίνονται μεταξύ τους από λίγες αμινοξικές διαφορές. Η A είναι οι πιο συχνά εμφανιζόμενη παραλλαγή στις κοινές φυλές οικόσιτων βοοειδών. Συγκεκριμένα, ο Formaggioni και οι συνεργάτες του (1999) μελέτησαν την κατανομή των παραλλαγών στα διαφορετικά είδη του γένους *Bos*, καταλήγοντας στα αποτελέσματα που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 11). Σε άτομα των ειδών *B.taurus* και *B. indicus* από την περιοχή του Νεπάλ εντοπίστηκαν οι παραλλαγές A και B. Στο είδος *B. grunniens* εμφανίστηκε επιπλέον η παραλλαγή C, αλλά δεν έχει γίνει αναφορά της παραλλαγής B στο συγκεκριμένο είδος. Τέλος η παραλλαγή D εντοπίστηκε σε δύο φυλές *B.taurus* από την περιοχή της Γαλλίας (Formaggioni et al. 1999). Ο Caroli και οι συνεργάτες του ανέφεραν συχνότητες 0.798 για την παραλλαγή A και 0.202 για την B. Η μελέτη περιελάμβανε 485 άτομα της φυλής Pinzgauer από την Αυστρία και τη Γερμανία, στα οποία δεν εντοπίστηκαν καθόλου τα αλληλόμορφα C, D (Carolietal. 2010). Η Ibeagha-Awemu και οι συνεργάτες της (2007) επιχείρησαν να διακρίνουν τα διαφορετικά αλληλόμορφα της as2-καζεΐνης με βάση τις διαφορές σε θέσεις αναγνώρισης ενζύμων περιορισμού. Στα αποτελέσματα τους κυριαρχεί η παραλλαγή A, με συχνότητες εμφάνισης ακόμα και



μεγαλύτερες από 0.9 σε πολλές φυλές βοοειδών της Κεντρικής και Νοτιοανατολικής Ευρώπης. Η συχνότητα της B παραλλαγής ποικίλει από 0 έως 0.385 σε άτομα της φυλής Nelore από τη Βραζιλία, ενώ για την παραλλαγή Danaφέρονται συχνότητες μικρότερες από 0,1 σε φυλές της Κεντρικής Ευρώπης. Δεν εντοπίστηκε η παραλλαγή C από τη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία (Ibeagha-Awemu et al. 2007).

Πίνακας 11. Παραλλαγές του γονιδίου CSN1S2 στα είδη Bos (Προσαρμογή από Formaggioni et al. 1999)

Variant	Year	Species (country)	Breeds (frequency)
( <sup>a</sup> ) A	1976	<i>B. taurus</i> <i>B. indicus</i> (Nepal)	
*B	1976	<i>B. indicus</i> <i>B. taurus</i> (Nepal)	<i>B. indicus</i> (0.34)
C	1976	<i>B. grunniens</i> (Mongolia)	(0.23)
D	1976 1978	<i>B. taurus</i> (France)	Montbéliarde (0.011), Vosgienne (0.088)

Το γάλα έχει αποτελέσει αντικείμενο μελετών διατροφής για πάρα πολλά χρόνια, καθώς περιέχει πολλαπλά οφέλιμα συστατικά με κυριότερο τις πρωτεΐνες. Γενικά η συγκέντρωση και η ποιότητα των πρωτεϊνών εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες και ποικίλουν σημαντικά στις διαφορετικές φυλές, στους πληθυσμούς αλλά και ανάμεσα στα άτομα. Ο γενετικός πολυμορφισμός, οι διατροφικές συνήθειες και η ηλικία του ζώου αποτελούν βασικούς παράγοντες που επηρεάζουν τη σύσταση του γάλακτος και έτσι έχουν πραγματοποιηθεί πολλαπλές προσπάθειες για βελτιστοποίηση των συνθηκών αυτών με στόχο την παραγωγή γάλακτος με τη μέγιστη θρεπτική αξία.

Τα τελευταία χρόνια επιχειρείται η επιλογή των γαλακτοπαραγωγικών ζώων με βάση το γενετικό τους προφίλ ως μέθοδος εμπλουτισμού του γάλακτος. Για το σκοπό αυτό η οικογένεια των γονιδίων των καζεϊνών στο χρωμόσωμα 6 έχει διαχωριστεί σε δύο επιμέρους ομάδες: η πρώτη περιλαμβάνει τα γονίδια CSN1S1, CSN2, CSN1S2 και η δεύτερη συγκροτείται αποκλειστικά από το γονίδιο CSN3. Η πρώτη ομάδα, που κληρονομείται ως απλότυπος, έχει βρεθεί να συνδέεται σημαντικά τόσο με την ποσότητα του παραγόμενου γάλακτος όσο και με την περιεκτικότητά του σε πρωτεΐνες. Για την δεύτερη ομάδα δεν υπάρχει αντίστοιχη συσχέτιση. Ο πολυμορφισμός στα γονίδια CSN2 και CSN1S2 αποτελεί την πιθανότερη αιτία των διαφοροποιήσεων, ενώ έχει ταυτοποιηθεί μία αντικατάσταση προλίνης από ιστιδίνη στη θέση 67 της β-καζεΐνης, που οδηγεί σε αύξηση της παραγωγικότητας και της πρωτεϊνικής περιεκτικότητας του γάλακτος (Nilsen et al, 2009). Επιπλέον μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε άτομα της φυλής Holstein-Friesian από την περιοχή της Ολλανδίας κατέληξε στο συμπέρασμα ότι ο γενετικός πολυμορφισμός των καζεϊνών επιδρά σημαντικά στη σύσταση του γάλακτος και συγκεκριμένα παρατηρήθηκε ότι η ταυτόχρονη επιλογή του αλληλομόρφου B της β-Lg και του CSN2\*A2 - CSN3\*B απλοτύπου οδηγεί στην παραγωγή

γάλακτος περισσότερο κατάλληλου για την παρασκευή τυριού (Heck et al, 2009).  
Λαμβάνοντας υπόψη τις πολλαπλές έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί, μπορούμε να καταλήξουμε στο συμπέρασμα ότι είναι δυνατόν να αυξηθεί η παραγωγή γάλακτος και να βελτιστοποιηθούν τα χαρακτηριστικά του, αν επιλεγθούν τα ζώα που εκτρέφονται με βάση το γενετικό τους προφίλ και ιδιαίτερα τον πολυμορφισμό των καζεϊνών (McSweeney & Fox, 2013).

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aschaffenburg R. & Drewry J. (1957)** Genetics of the b -lactoglobulins of cows' milk, Nature 180: 218
- Bouniol C., Printz C. & Mercier J. C. (1993)** Bovine  $\alpha_2$ -casein D is generated by exon VIII skipping, Gene Vol. 128(2):289-293
- Caroli A. M., Chessa S. & Erhardt G. J. (2009)** Milk protein polymorphisms in cattle: Effect on animal breeding and human nutrition, Journal of Dairy Science Vol. 92(11):5335-52
- Caroli A. M., Rizzi R., Lühken G. & Erhardt G. (2010)** Short communication: Milk protein genetic variation and casein haplotype structure in the Original Pinzgauer cattle, Journal of Dairy Science Vol. 93(3):1260-5
- Curry A. (2013)** Archaeology: The milk revolution |When a single genetic mutation first let ancient Europeans drink milk, it set the stage for a continental upheaval, Nature Vol. 500: 20-22
- De Kruif C. G., Huppertz T., Urban V. S. & Petukhov A. V. (2012)** Casein micelles and their internal structure, Advances in Colloid and Interface Science Vol. 172:36-52.
- Di Stasio L. & Mariani P. (2000)** The role of protein polymorphism in the genetic improvement of milk production, Zootechnica e Nutrizione Animale 2000 Vol. 26:69-90
- Dong Y. & Zhu H. (2005)** Single-Strand Conformational Polymorphism Analysis: Basic Principles and Routine Practice, Methods in Molecular Medicine Vol. 108:149-57
- Elliott R. B., Harris D. P., Hill J. P., Bibby N. J. & Wasmuth H. E. (1999)** Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus and cow milk: casein variant consumption, Diabetologia Vol. 42(3):292-6
- Farrell Jr M., Malin E. L., Brown E. M. & Mora-Gutierrez A. (2009)** Review of the chemistry of  $\alpha_{S2}$ -casein and the generation of a homologous molecular model to explain its properties, Journal of Dairy Science Vol. 92(4):1338-53
- Formaggioni P., Summer A., Malacarne M. & Mariani P. (1999)** Milk protein polymorphism: detection and diffusion of the genetic variants in Bos genus, Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria Vol. 19: 127-165
- Fox P. F. (1997)** ADVANCED DAIRY CHEMISTRY VOLUME 3: Lactose, water, salts and vitamins, 2<sup>nd</sup> Edition

**Fuquay J. W., Fox P. F. & McSweeney P. L. H. (2011)** Encyclopedia of dairy sciences

**Garibyan L. & Avashia N. (2013)** Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR), Journal of Investigative Dermatology Vol. 133(3):1-4

**Gustavsson F., Buitenhuis A.J. Johansson M., Bertelsen H. P., Glantz M., Poulsen N. A., Lindmark Månsson H., Stålhamma H., Larsen L.B., Bendixen C., Paulsson M. & Andrén A. (2014)** Effects of breed and casein genetic variants on protein profile in milk from Swedish Red, Danish Holstein, and Danish Jersey cows, Journal of Dairy Science Vol. 97(6):3866-77

**Haug A., Høstmark A. T. & Harstad O. M. (2007)** Bovine milk in human nutrition – a review, Lipids in Health and Disease Vol. 6, Issue 25: 22-33

**Heck J. M., Schennink A., van Valenberg H. J., Bovenhuis H., Visker M. H., van Arendonk J. A. & van Hooijdonk A. C. (2009)** Effects of milk protein variants on the protein composition of bovine milk, Journal of Dairy Science Vol.92(3):1192-202

**Holt C., Carver J. A., Ecroyd H. & Thorn D. C. (2013)** Invited review: Caseins and the casein micelle: their biological functions, structures, and behavior in foods, Journal of Dairy Science Vol. 96(10):6127–46

**Ibeagha-Awemu E. M., Prinzenberg E.M., Jann O. C., Luken G., Ibeagha A. E., Zhao X. & Erhardt G. (2007)** Molecular Characterization of Bovine CSN1S2\*B and Extensive Distribution of Zebu-Specific Milk Protein Alleles in European Cattle Journal of Dairy Science Vol. 90(7):3522-9

**Lopez C. Madec M. N. Jimenez-Flores R. (2010)** Lipid rafts in the bovine milk fat globule membrane revealed by the lateral segregation phospholipids and heterogeneous distribution of glycoproteins, Food Chemistry Vol. 120, Issue 1:22-33

**Mc Sweeney P. L. H. & Fox P. F. (2013)** Advanced Dairy Chemistry, Volume 1A: Proteins: Basic Aspects, 4<sup>th</sup> Edition

Milk and dairy products in human nutrition, Food and Agriculture Organization of THE UNITED NATIONS (2013)

**Miller G. D., Jarvis J. K. & McBean L. D. (2000)** Handbook of Dairy Foods and Nutrition, 2<sup>nd</sup> Edition

**Meisel H., Frister H. & Schlimme E. (1989)** Production and functionality of active peptides from milk, Journal of nutritional sciences

**Nilsen H., Olsen H. G., Hayes B., Sehested E., Svendsen M., Nome T., Meuwissen T. & Lien S. (2009)** Casein haplotypes and their association with milk production traits in Norwegian Red cattle, *Genetics Selection Evolution*, Issue 41:24

**Pereira P. C. (2013)** Milk nutritional composition and its role in human health, *Nutrition* Vol. 30(6):619-27

**Sorensen E. S. & Petersen T. E. (1993)** Purification and characterization of three proteins isolated from the proteose peptone fraction of bovine milk, *Journal of Dairy Science* Vol60(2):189-97

**Stelwagen K., Carpenter E., Haigh B., Hodgkinson A. & Wheeler T. T. (2009)** Immune components of bovine colostrum and milk, *Journal of Animal Science* 87:3-9

**Walstra P., Wouters J. T. M. & Geurts T. J. (2006)** *Dairy Science and Technology*, 2<sup>nd</sup> Edition

**Βακάκης Φ. (2008)** Ελληνική Βοοτροφία: Υφιστάμενη κατάσταση και προοπτικές, Γεωργία-Κτηνοτροφία, τεύχος 3

## ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΕΣ

ΑΓΡΟΓΗ – Γεωργία & Κτηνοτροφία: [http:// agrogi.eu/](http://agrogi.eu/) (Ιουν. 2016)

European Food Information Council: <http://www.eufic.org/> (Ιουν. 2016)

Ένωση Φυλής Χολστάν Ελλάδας: <http://www.holstein.gr/> (Ιουν. 2016)

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ & ΤΡΟΦΙΜΩΝ: <http://www.minagric.gr/> (Ιουν. 2016)

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΓΕΩΡΓΙΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΚΥΠΡΟΥ: <http://www.moi.gov.cy/> (Ιουν. 2016)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (Ιουν. 2016)

<http://www.uniprot.org/> (Ιουν. 2016)

<http://www.nationalgeographic.com/>