



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Χρήση μοριακών δεικτών για την ανίχνευση
προσμείξεων σε προϊόντα ζωικής προέλευσης»**

«Use of molecular markers for the detection of adulteration in animal
origin products»

Σιάσιου Αικατερίνη

Λάρισα

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Σταμάτης Κωνσταντίνος	Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό (Ε.ΔΙ.Π) του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
Μαμούρης Ζήσης	Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
Μούτου Αικατερίνη	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον κ. Σταμάτη Κώστα, για την ευκαιρία που μου προσέφερε να εκπονήσω το συγκεκριμένο θέμα, την υπομονή του και την πολύτιμη βοήθεια του καθώς επίσης και την κ. Μούτου Αικ. και τον κ. Μαμούρη Ζήση για τη συμμετοχή τους στη τριμελή συμβουλευτική επιτροπή. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου και ιδιαίτερα τον υποψήφιο διδάκτορα Γιαννούλη Θέμη για την καθοδήγηση και τις συμβουλές τους.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την ευκαιρία που μου έδωσε να σπουδάσω και την στήριξη που παρείχε όλα αυτά τα χρόνια, καθώς και τις φίλες μου, οι οποίες ήταν δίπλα μου σε όλη τη διάρκεια της φοιτητικής ζωής.

1. Περιεχόμενα

Περίληψη	1
Abstract.....	2
Εισαγωγή	3
Προϊόντα ζωικής προέλευσης.....	3
Η σημασία του κρέατος στην διατροφή	4
Επεξεργασία κρέατος	5
1. Αλλαντικά	7
1.1 Γενικά στοιχεία	7
1.2 Πρώτες ύλες	8
1.3 Στάδια και διαδικασία παραγωγής αλλαντικών	9
1.4 Συσκευασία αλλαντικών	10
1.5 Ποιοτικός έλεγχος αλλαντικών	10
2. Ιχνηλασιμότητα τροφίμων	11
2.1. Η έννοια της ιχνηλασιμότητας	11
2.2. Το νομοθετικό πλαίσιο στην ΕΕ- Κανονισμός 178/2002	12
2.3. Κατευθυντήριες γραμμές της ΕΕ για την εφαρμογή της ιχνηλασιμότητας	13
2.4. Ιχνηλασιμότητα στα τρόφιμα.....	14
2.5. Μελέτες στην ιχνηλασιμότητα σε προϊόντα ζωικής προέλευσης	15
2.6 Συμπεράσματα	17
3. Μοριακοί δείκτες	17
4. Μιτοχονδριακό DNA	18
5. 16S rRNA ως μοριακός δείκτης	21
Χρήση του 16S rRNA.....	22
Σκοπός της εργασίας	23
6. Πειραματική πορεία- Μέθοδοι.....	23
6.1 Δείγματα	23
6.2 Απομόνωση DNA	23
6.3 Ηλεκτροφόρηση	25
6.3.1 Προετοιμασία του πηκτώματος αγαρόζης	25

6.3.2 Τοποθέτηση των δειγμάτων και ηλεκτροφόρηση	26
6.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	26
6.4.1 Στάδια της PCR.....	27
6.4.2 Τρεις φάσεις της PCR	28
6.4.3 Τα συστατικά της PCR	28
6.5. Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP).....	31
6.5.1. Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδης	32
6.5.2. Προετοιμασία των δειγμάτων και αποδιάταξη των προϊόντων PCR.....	33
6.5.3 Χρώση πηκτών πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο	34
7. Αποτελέσματα	34
Συζήτηση.....	38
Βιβλιογραφία	40

Περίληψη

Το κρέας και τα διάφορα προϊόντα που παράγονται από το κρέας αποτελούν πολύτιμα συστατικά της σύγχρονης διατροφής του ανθρώπου. Το κρέας, ως προϊόν διατροφής μπορεί να νοθεύεται με διάφορους τρόπους, κάτι που αποτελεί ένα σημαντικό ζήτημα. Η σωστή σήμανση και ιχνηλασιμότητα του κρέατος αποτελούν απαραίτητες προϋποθέσεις έτσι ώστε να επιτελείται ορθά η εμπορία των διαφόρων προϊόντων και η ορθή ενημέρωση των καταναλωτών.

Η πληροφόρηση του καταναλωτή ως προς την ποιότητα, περιεκτικότητα και προέλευση του προϊόντος θέτει ένα σημαντικό ζήτημα, καθώς υπάρχει μεγάλη ποικιλία προϊόντων κρέατος, που θα πρέπει να συνοδεύεται από πληθώρα πληροφοριών. Η οικονομική κρίση των τελευταίων ετών φαίνεται πως έχει επηρεάσει την ποιότητα των προϊόντων που έχουν ως πρώτη ύλη το κρέας, όπως τα αλλαντικά, κάτι το οποίο θα μας απασχολήσει στην παρούσα διπλωματική εργασία.

Συχνά το κέρδος αποτελεί σημαντικότερο παράγοντα από την ποιότητα. Η αυξημένη τιμή του κρέατος της γαλοπούλας σε σχέση με τα υπόλοιπα κρέατα και η μεγάλη ομοιότητα του ως προς το χρώμα, την υφή και τη γέυση με το κρέας από κότα, θεωρούνται οι κυριότεροι λόγοι που οδηγούν στην υιοθέτηση μιας επικερδούς τακτικής των αλλαντικών. Δεδομένου ότι το κρέας της γαλοπούλας είναι το υψηλότερο σε κόστος, η τακτική αυτή οδηγεί στην νοθεία των αλλαντικών γαλοπούλας με κρέας κότας, μοσχαριού ή χοίρου ούτως ώστε να μειώσουν το κόστος παραγωγής και να αυξήσουν το κέρδος.

Στην παρούσα πτυχιακή μελέτη εφαρμόστηκαν μοριακές τεχνικές με τη χρήση μοριακών δεικτών για την ποιοτική ανίχνευση άλλων ειδών κρέατος σε αλλαντικά γαλοπούλας. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε μιτοχονδριακό DNA που απομονώθηκε από 41 δείγματα αλλαντικών που προέρχονται από 16 διαφορετικές εταιρείες. Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε ήταν η PCR-SSCP (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης- ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας). Αρχικά, ένα τμήμα του μιτοχονδριακού γονιδίου 16S rRNA ενισχύθηκε με τη μέθοδο της PCR, το οποίο αποτελεί παγκόσμιο μοριακό δείκτη για την ταυτοποίηση ζωικών ειδών. Στη συνέχεια, το μονόκλωνο δείγμα DNA εξετάζεται παράλληλα με πρότυπα δείγματα με τη μέθοδο της SSCP και συγκρίνονται τα τελικά αποτελέσματα. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν έδειξαν νοθεία ορισμένων αλλαντικών ως προς την σύσταση του κρέατος, διότι εκτός από γαλοπούλα εντοπίστηκαν και άλλα είδη κρέατος.

Abstract

Meat and various products produced from meat are a valuable component of modern human nutrition. Meat, as a food product, can be adulterated in a variety of ways, which is an important issue. Correct labeling and traceability of meat are essential requirements for proper marketing of the various products and proper consumer information.

Consumer information on the quality, content and origin of the product poses an important issue as there is a wide variety of meat products, which should be accompanied by a wealth of information. The recent economic crisis has affected the products that use meat as raw material, such as cured meat products, which will interest us later in the thesis.

Often profit is a more important factor than quality. The increased price of turkey's meat compared to other types of meat and its great similarity to chicken's meat, lead to the adoption of a profitable tactic for the cured meat products. This tactic leads to the adulteration of turkey's cured meat products with chicken, veal or pig meat in order to reduce the cost of production and to increase profit margin.

In the present thesis, molecular techniques with the use of molecular markers have been applied, for the qualitative detection of other types of meat in turkey's cured meat products. The analysis took targeted the mitochondrial DNA which was isolated from 41 different samples of cured meat products that produced from 16 different companies. The technique applied was PCR-SSCP (Polymerase Chain Reaction- Single Strand Conformation Polymorphism). Initially, a section of mitochondrial gene 16S rRNA was amplified by PCR method, which is a global molecular marker for the identification of animal species. The monoclonal DNA sample is then screened in parallel with standard samples using the SSCP method and the final results are compared. The results obtained showed adulteration of turkey's cured meat products, as there were other types of meat beside turkey's meat in some samples.

Εισαγωγή

Προϊόντα ζωικής προέλευσης

Η ζωική παραγωγή αποτελεί την βάση για την πρώτη ύλη (γάλα, κρέας, αυγά) ενός μεγάλου μέρους της βιομηχανίας τροφίμων (Αρσένος 2016). Ως προϊόντα ζωικής προέλευσης ορίζεται κάθε προϊόν που προέρχεται από ζώα ή προϊόντα που έχουν στενή σχέση με ζώα και προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση. Σύμφωνα με τον Κανονισμό υπ' αρ. 853/2004 της Ευρωπαϊκής Επιτροπής, στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης περιλαμβάνονται (European Commission 2006):

1. Νωπά Κρέατα: Εκτρεφόμενα και Κυνηγιού
2. Προϊόντα Κρέατος
3. Γάλα και Γαλακτοκομικά προϊόντα
4. Πουλερικά
5. Αλιεύματα και προϊόντα υδατοκαλλιέργειας
6. Αυγά και λοιπά προϊόντα

Ως «κρέας» νοούνται τα τμήματα των ζώων τα οποία χρησιμοποιούνται ως τροφή για τον άνθρωπο (Lobbart, et al. 2011). Σε αυτά συμπεριλαμβάνονται:

- Το κρέας των μυών,
- Το αίμα, τα εντόσθια, το λεπτό και το παχύ έντερο, τα κόκαλα και τα μαλακά μέρη τους, ενώ στο χοιρινό περιλαμβάνεται και η χοντρή πέτσα,
- Το λίπος
- Κατεργασμένα ή επεξεργασμένα προϊόντα κρεατικών (κιμάς, ρολό, λουκάνικα κι αλλαντικά, ζωμούς κρέατος).

Νωπά κρέατα:

Το νωπό κρέας αναφέρεται σε κρέας που δεν έχει υποστεί καμία επεξεργασία συντήρησης εκτός από την ψύξη, την κατάψυξη ή την ταχεία κατάψυξη, συμπεριλαμβανομένου του κρέατος που συσκευάζεται υπό κενό ή σε ελεγχόμενες συνθήκες (European Commission 2006).

Προϊόντα κρέατος

Προϊόντα κρέατος χαρακτηρίζονται τα τρόφιμα, τα οποία παρασκευάζονται από κρέας με την ευρεία έννοια του όρου, δηλαδή από το σύνολο των ζωικών ιστών που είναι κατάλληλα για ανθρώπινη κατανάλωση μετά από κατάλληλη τεχνολογία. Τα

προϊόντα που παράγονται από κρέας ταξινομούνται σε τέσσερις γενικές ομάδες (European Commission 2006):

- Προϊόντα με βάση το κρέας (προϊόντα αλλαντοποιίας).
- Παρασκευάσματα κρέατος.
- Ειδικές κονσέρβες κρέατος και κρέας, ή κρεατοσκευάσματα ή προϊόντα με βάση το κρέας σε συνδυασμό με άλλα τρόφιμα(έτοιμα φαγητά) και
- Παράγωγα κρέατος

Γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα:

Το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση περιλαμβάνουν (European Commission 2006):

- Νωπό γάλα
- Γαλακτοκομικά προϊόντα
- Πρωτόγαλα
- Προϊόντα με βάση το πρωτόγαλα

Πουλερικά

Ο όρος πουλερικά αναφέρεται στα πτηνά τα οποία έχουν εξημερωθεί για τα αυγά και το κρέας τους. Περιλαμβάνουν κοτόπουλο, πάπια, χήνα, περιστέρι, γαλοπούλα, φραγκόκοτα, στρουθοκάμηλος κλπ (European Commission 2006).

Η σημασία του κρέατος στην διατροφή

Το κρέας αποτελεί βασικό κομμάτι της ανθρώπινης διατροφής. Η κατανάλωση κρέατος από τον άνθρωπο άρχισε όταν ακόμα ζούσε κάτω από πρωτόγονες συνθήκες (Γεωργάκης, Βαρελτζής και Αμβροσιάδης 2002). Αρχικά, η κατανάλωση του κρέατος ξεκίνησε μέσω του κυνηγιού μεγάλων αρπακτικών. Στην σημερινή εποχή, ο βαθμός κατανάλωσης κρέατος διαφέρει στις διάφορες περιοχές του κόσμου, ωστόσο είναι αρκετά αυξημένα με την αύξηση της κτηνοτροφίας και την παραγωγή οικόσιτων ζώων (Warriss 1999).

Μια σειρά θρεπτικών συστατικών απαραίτητων για την ανάπτυξη και τη βιωσιμότητα του ανθρώπινου οργανισμού παρέχονται στον άνθρωπο με το κρέας μέσω της διατροφής. Αρχικά, το κρέας είναι μια πλούσια πηγή αζωτούχων ενώσεων. Από τις ενώσεις αυτές το 95% είναι πρωτεΐνες, ενώ το υπόλοιπο 5% αποτελείται από ολιγοπεπτίδια και αμινοξέα. Οι πρωτεΐνες που περιέχονται στο κρέας είναι υψηλής βιολογικής αξίας καθώς περιέχουν αμινοξέα που είναι αναγκαία για τον ανθρώπινο οργανισμό (Ψαρουδάκη 2007).

Το κρέας περιέχει μεγάλη ποσότητα λιπιδίων, το οποίο είναι απαραίτητο για την προστασία των οστών και των οργάνων, βοηθά στη διατήρηση της θερμοκρασίας του σώματος και αποτελεί δομική ουσία των κυτταρικών μεμβρανών. Το λίπος είναι πολύ καλή πηγή ενέργειας, περιέχει λιποδιαλυτές βιταμίνες και εμφανίζει ισορροπία κορεσμένων και ακόρεστων λιπαρών οξέων (Ψαρουδάκη 2007).

Το κρέας παρέχει στον οργανισμό μια ποσότητα λιποδιαλυτών βιταμινών A, D, E, K και αποτελεί εξαιρετική πηγή βιταμινών του συμπλέγματος B και ιδίως B12, που είναι σημαντική για το νευρικό σύστημα (Ψαρουδάκη 2007).

Είναι, επίσης, καλή πηγή αιμικού σιδήρου, ενός τύπου σιδήρου που απορροφάται και αφομοιώνεται από το σώμα σε μεγαλύτερο ποσοστό σε σχέση με το σίδηρο που υπάρχει στα τρόφιμα φυτικής προέλευσης. Επιπλέον, αποτελεί καλή πηγή ψευδαργύρου, ένα στοιχείο απαραίτητο για την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή, που ενισχύει την άμυνα του οργανισμού και βοηθάει στην επούλωση των τραυμάτων, ενώ, παράλληλα, περιέχει φώσφορο, νάτριο, κάλιο και σελήνιο (Κοντομηνάς 2014).

Επεξεργασία κρέατος

Το κρέας θεωρείται ευαλλοίωτο λόγω της περιεκτικότητας του σε νερό και πρωτεΐνες, τα οποία είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη μικροβίων. Οι διεργασίες που υφίσταται στοχεύουν στη συντήρηση του κρέατος μέσω της ανασχεσης της δράσης των μικροοργανισμών και του περιορισμού διαφόρων φυσικοχημικών φαινομένων, αλλά και στην βελτίωση των οργανοληπτικών ιδιοτήτων και την παραγωγή προϊόντων με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά (Λαπιδάκης 2017). Για την παραγωγή προϊόντων με βάση το κρέας και παρασκευασμάτων κρέατος, μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι παρακάτω αναφερόμενες επεξεργασίες μόνες τους ή με συνδυασμό δύο ή/και περισσότερων εξ' αυτών, ανάλογα με το είδος των προϊόντων (ΕΦΕΤ 2014):

1. *Θερμική Επεξεργασία:* Είναι η επεξεργασία σε συνθήκες θερμοκρασίας και χρόνου τέτοιων που να επιφέρουν την μετουσίωση των πρωτεϊνών του κρέατος και μείωση ή εξάλειψη του μικροβιακού φορτίου ανάλογα με το είδος του προϊόντος και τον πιθανό συνδυασμό άλλων μεθόδων επεξεργασίας.
2. *Κάπνιση:* Νοείται η επεξεργασία των προϊόντων μέσα σε ειδικούς θαλάμους με έμμεσο ή άμεσο τρόπο, με καπνό υπό υγρή (υγρή κάπνιση) ή αέρια μορφή, ο οποίος στη δεύτερη περίπτωση προέρχεται από την ατελή καύση ξύλων ή ξυλωδών φυτών σε φυσική κατάσταση ή από άλλες ισοδύναμες μεθόδους (πχ. τριβή). Στα προϊόντα με βάση το κρέας, η κάπνιση συνδυάζεται πάντοτε με μια άλλη επεξεργασία που είναι συνήθως η

θέρμανση, ή η αφυδάτωση, ή η ζύμωση-ωρίμανση. Στα παρασκευάσματα κρέατος δεν συνοδεύεται από θερμική επεξεργασία ή αφυδάτωση και έχει ως στόχο να προσδώσει ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Απαγορεύεται η χρήση ξύλων κωνοφόρων δέντρων ή ξύλων ευρωτιώντων, χρωματισμένων, βερνικωμένων, κατεργασμένων ή εμποτισμένων με διάφορες ουσίες.

3. *Αλάτιση*: Νοείται η επεξεργασία με τη χρήση μαγειρικού άλατος σε ποσότητα ικανή να επιφέρει την δυνατότητα συντήρησης του προϊόντος. Η προσρόφηση και διάχυση του μαγειρικού άλατος στο προϊόν με βάση το κρέας γίνεται εν ξηρώ με τριβή, ή με εμβάπτιση του κρέατος σε άλμη, είτε με έγχυση άλμης στη μάζα του κρέατος ή ανάμιξη των τεμαχίων του κρέατος με την άλμη. Επιτρέπεται η αλάτιση με μείγμα μαγειρικού άλατος και διάφορων προσθέτων υλών που επιτρέπονται, υπό τους όρους των ειδικών προς τούτο διατάξεων.
4. *Μάλαξη*: Νοείται η ανάδευση εντός ειδικού εξοπλισμού ανάδευσης, τεμαχίων κρέατος στα οποία έχει γίνει έγχυση ενδομυϊκά ή προσθήκη διαλύματος άλατος (άλμης) με στόχο τη βελτίωση της Ικανότητας Συγκράτησης Νερού. Συνέπεια της μάλαξης είναι η δημιουργία πρωτεϊνικού εκχυλίσματος με συνδεδεμένες ιδιότητες, το οποίο με τη θέρμανση πήζει και στην τομή του έτοιμου προϊόντος εμφανίζεται ως λεπτοτεμαχισμένο κρέας.
5. *Ζύμωση- Ωρίμανση*: Νοείται η επεξεργασία που γίνεται κάτω από ειδικές μεταβαλλόμενες συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας και αερισμού, που ευνοούν την ανάπτυξη των επιθυμητών οξυγαλακτικών βακτηρίων και την παραγωγή οργανικών οξέων. Η πτώση της τιμής του pH που επέρχεται με τον τρόπο αυτό στη μάζα του κρέατος, συμβάλλει στη μετουσίωση των πρωτεϊνών του και την εξυγίανση του ετοιμού προϊόντος. Η ωρίμανση έπεται συνήθως της ζύμωσης, συνοδεύεται με μια ελαφρά ή έντονη αφυδάτωση και συμβάλλει στην ολοκλήρωση της παραγωγικής διαδικασίας των συγκεκριμένων προϊόντων με βάση το κρέας.
6. *Ξήρανση-Αφυδάτωση*: Νοείται η μείωση της ποσότητας του νερού που περιέχει το προϊόν με βάση το κρέας, σε ποσοστό που το καθιστά ικανό να συντηρηθεί ακόμη και σε συνθήκες περιβάλλοντος (ξήρανση) ή η πλήρης απομάκρυνσή του (αφυδάτωση). Πραγματοποιείται είτε με φυσικό τρόπο είτε με τη χρήση κατάλληλου εξοπλισμού.
7. *Μαρινάρισμα*: Νοείται η επεξεργασία (τοποθέτηση) του κρέατος μέσα σε μίγμα υγρών και στερεών συστατικών (μαρινάτα), το οποίο περιέχει κυρίως μπαχαρικά, καρυκεύματα και αρωματικά φυτά, κρασί, φυτικά έλαια και εδώδιμα οξέα κ.α. Η τοποθέτηση των τεμαχίων του κρέατος σε μαρινάτα, που περιέχει οξέα, επιφέρει μια μετουσίωση των πρωτεϊνών του και ταυτόχρονα συμβάλλει στη μερική ή ακόμη και πλήρη εξυγίανσή του.

8. Καρύκευση:

8.1. Ξηρή καρύκευση

Επιτρέπεται η προσθήκη καρυκευμάτων

8.2 Υγρή καρύκευση – Εμβάπτιση/ανάμιξη σε μίγμα υγρού με άλλα συστατικά

Ως υγρή καρύκευση περιγράφεται η εμβάπτιση σε μίγμα υγρού (πχ ελαίου) με άλλα συστατικά (πχ ρίγανη) τέτοιας φύσεως που δεν οδηγούν σε μετουσίωση των πρωτεϊνών του κρέατος.

9. Άλλες επεξεργασίες: Επιτρέπεται η χρήση και άλλων τεχνολογιών επεξεργασίας και συντήρησης, (πχ χρήση συνδυασμού θερμικής επεξεργασίας με υπερυψηλή πίεση) που δεν αναφέρονται στο παρόν άρθρο, αυτόνομα ή/και σε συνδυασμό με τις προαναφερόμενες, με την επιφύλαξη ειδικών διατάξεων που πιθανά απαγορεύουν τη χρήση τους (πχ απαγόρευση ακτινοβολήσης).

1. Αλλαντικά

Τα αλλαντικά ήταν το εκλεκτό ορεκτικό των αρχαίων προγόνων μας, οι οποίοι, μάλιστα πρώτοι είχαν επινοήσει τη μέθοδο παρασκευής και ωρίμανσης αυτών, μέσα σε πιθάρι και σε συνθήκες κενού αέρος. Τα αλλαντικά είναι τα παρασκευασμένα μίγματα ψιλοκομμένου κρέατος, συνδετικού ιστού και σε μερικές περιπτώσεις εντοσθίων, τα οποία κόβονται εύκολα ή μπορούν να επαλειφθούν. Η ποιότητα των αλλαντικών εξαρτάται από την ποιότητα της επεξεργασίας, αλλά κι από τα υλικά που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή τους (Μποσδίκος 2010).

1.1 Γενικά στοιχεία

Σύμφωνα με έρευνες που πραγματοποιήθηκαν το 2008 (Μποσδίκος 2010), η κατά κεφαλήν κατανάλωση αλλαντικών στην Ελλάδα αν και αυξήθηκε την πενταετία 2005-2009 είναι από τις μικρότερες στην Ευρώπη. Υπολογίστηκε σε περίπου 8kg έναντι 19kg που είναι ο μέσος όρος στην Ευρώπη. Ο βαθμός διείδυσης των εισαγόμενων αλλαντικών, μη συμπεριλαμβανομένων των κονσερβών, κυμάνθηκε από 8% έως 10% στο σύνολο στην Ελλάδα από διάφορες χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

Μέσω της παρασκευής των αλλαντικών εξυπηρετούνται δύο σημαντικοί σκοποί στη βιομηχανία και την οικοτεχνία του κρέατος, αφ' ενός η χρησιμοποίηση του κρέατος που πλεονάζει με μετατροπή του σε διατηρήσιμη μορφή, αφ' ετέρου η αξιοποίηση των δευτερευόντων προϊόντων της σφαγής των ζώων, όπως το αίμα, η καρδιά, το

συκώτι, η γλώσσα, τα νεφρά, το μυαλό τα οποία χρησιμοποιούνται για την παραγωγή των “αλλαντικών εντοσθίων”.

Μερικά είδη αλλαντικών, όπως είναι τα σαλάμια και τα λουκάνικα, συσκευάζονται κατάλληλα μέσα σε έντερα ή κύστες ή τεχνητούς σωλήνες και ασκούς από φυσικά υλικά π.χ τα τεχνητά έντερα από κυτταρίνη. Γενικά με την προσθήκη καρυκευμάτων, αρτυματικών υλικών μαγειρικού αλατιού κ.α τα αλλαντικά συγκροτούν ένα εύγευστο και καταναλωτικό προϊόν. Στα αλλαντικά επιτρέπεται η προσθήκη νιτρικών (μέχρι 1,5%) και των νιτρωδών αλάτων (μέχρι 0,2%) ως συντηρητικών και σταθεροποιητικών του χρώματος και του γλουταμινικού οξέος και φωσφορικών αλάτων (μέχρι 0,4%) καθώς και βιταμίνης C (μέχρι 0,1%), ενώ απαγορεύεται η προσθήκη της ντομάτας, η τεχνητή χρώση και ο τεχνητός αρωματισμός (Μποσδίκος 2010).

1.2 Πρώτες ύλες

Η πρώτη ύλη που θα χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή των αλλαντικών αποτελεί το σημαντικότερο κομμάτι σε αυτή την διαδικασία. Η βασικότερη πρώτη ύλη που χρησιμοποιείται είναι το κρέας. Για την παρασκευή των αλλαντικών χρησιμοποιείται βόειο, χοίρειο, κρέας αιγοπροβάτων, ενώ τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί η παραγωγή αλλαντικών από κρέας από κοτόπουλα καθώς και γαλοπούλας. Το κρέας πρέπει να προέρχεται από υγιή ζώα, τα οποία διατρέφονται σωστά. Έως ότου φτάσει η ώρα της αξιοποίησης του κρέατος, το κρέας πρέπει να ψύχεται και να διατηρείται σε σταθερή θερμοκρασία.

Εκτός από την βασική πρώτη ύλη που είναι το κρέας, για την παρασκευή των αλλαντικών χρησιμοποιούνται και δευτερεύοντα υλικά (ΕΦΕΤ 2014). Πιο συγκεκριμένα τα δευτερεύοντα υλικά που χρειάζονται για την παρασκευή των αλλαντικών αναγράφονται στον πίνακα 1.

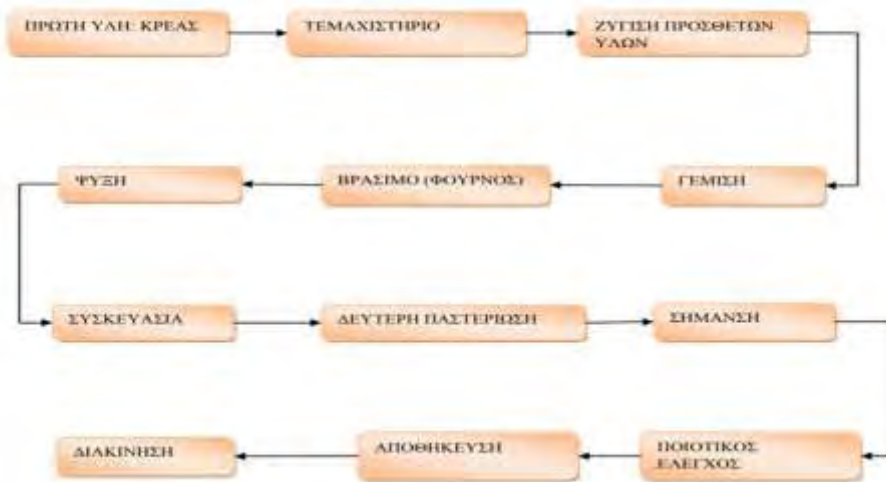
Πίνακας 1. Δευτερεύοντα υλικά για την παρασκευή αλλαντικών.

Δευτερεύοντα Υλικά
Νιτρικά και Νιτρώδη Άλατα
Άλατα οργανικών οξέων
Ασκορβικό οξύ
Άμυλο
Ενισχυτές γεύσης
Διάφορα σάκχαρα
Καρυκεύματα

Τα δευτερεύοντα υλικά αποθηκεύονται σε ειδικούς χώρους, έτσι ώστε να τηρούνται οι κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας.

1.3 Στάδια και διαδικασία παραγωγής αλλαντικών

Τα στάδια παραγωγής των αλλαντικών διαφέρουν σε κάθε βιομηχανία, ωστόσο τα βασικά στάδια στις αλλαντοβιομηχανίες απεικονίζονται στο διάγραμμα της εικόνας 1. Ωστόσο, παρακάτω παρουσιάζεται η παραγωγική διαδικασία για αλλαντικά γαλοπούλας.



Εικόνα 1. Βασικά στάδια παραγωγής αλλαντικών.

1.3.1 Διαδικασία παραγωγής αλλαντικών γαλοπούλας

Η παραγωγή των αλλαντικών γαλοπούλας ξεκινά από το ζωντανό πτηνό με την αναισθητοποίηση του και ολοκληρώνεται με την ψύξη του αλλαντικού. Μετά την αναισθητοποίηση, πραγματοποιείται ο ζεματισμός και η μείωση του μεγέθους των μυϊκών τεμαχίων της γαλοπούλας. Έπειτα, πραγματοποιείται ανάμειξη με όλο το νερό και το 40% των καρυκευμάτων μέχρι τη δημιουργία ενός ομοιογενούς μίγματος, το οποίο τοποθετείται στη ψύξη. Την επόμενη μέρα το κομμάτι κρέατος και το δέρμα που προορίζονται για το γαλάκτωμα θα πρέπει να τεμαχιστούν, να προστεθούν τα υπόλοιπα καρυκεύματα και κατά τη διάρκεια της ανάμειξης προστίθεται και ο πάγος. Το ρευστό υλικό που παράγεται τοποθετείται σε συσκευασία από κυτταρίνη ή πολυαιθυλένιο. Στη συνέχεια, τοποθετείται σε θάλαμο κάπνισης-ξήρασης-θερμικής επεξεργασίας. Η σημασία της θερμικής επεξεργασίας των αλλαντικών αυτών είναι κατά βάση η μείωση του αριθμού ή/και καταστροφή των αλλιογόνων μικροοργανισμών και των μικροοργανισμών που είναι υπεύθυνοι για τροφικές δηλητηριάσεις (*Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Clostridium botulinum*, *E. coli* κ.α) καθώς επίσης και η μετουσίωση

των πρωτεϊνών που οδηγεί σε αλλαντικά στερεότυπης σύστασης. Τέλος, το προϊόν ψύχεται (Ρήγας 2010).

1.4 Συσκευασία αλλαντικών

Η συσκευασία πρέπει να παρέχει όλες τις εγγυήσεις προστασίας τους από κάθε επιβλαβή εσωτερική ή εξωτερική επίδραση. Για αυτό τον λόγο η σύσταση των μέσων συσκευασίας των τροφίμων πρέπει να είναι τέτοιας φύσης ώστε:

α) Τα τρόφιμα να μη προσβάλλονται από το μέσο συσκευασίας, ούτε αυτό να προσβάλλεται με οποιοδήποτε τρόπο από τα εμπεριεχόμενα τρόφιμα,

β) Το μέσο συσκευασίας να μην επιφέρει αλλοιώσεις στην οσμή, τη γεύση ή την εμφάνιση των εμπεριεχομένων τροφίμων, ούτε να μεταφέρει σ' αυτά ουσίες επιβλαβείς για την υγεία του καταναλωτικού κοινού.

Τα συσκευασμένα αλλαντικά σημαίνονται με τα στοιχεία της γραμμής και της ώρας συσκευασίας, ενώ σε κάθε συσκευασία εντυπώνονται ευκρινώς η ημερομηνία λήξης και οι συνθήκες συντήρησης του προϊόντος.

Τα τελικά προϊόντα στο τμήμα του Ποιοτικού Ελέγχου ελέγχονται για το χρώμα, την όψη, τη γεύση και την υφή τους. Επίσης, ελέγχεται το προϊόν με τις κατάλληλες χημικές μεθόδους για την ασφάλεια του καταναλωτή (Γενικό Χημείο Κράτους Ανώτατο Χημικό Συμβούλιο 1987).

1.5 Ποιοτικός έλεγχος αλλαντικών

Το τμήμα του Ποιοτικού ελέγχου ελέγχει και πραγματοποιεί σε καθημερινή βάση ελέγχους σε κάθε φάση της παραγωγής των αλλαντικών αλλά και στα τελικά προϊόντα. Συγκεκριμένα διεξάγει:

- Αυστηρούς χημικούς και μικροβιολογικούς ελέγχους, καθώς και εξειδικευμένους ελέγχους, όπως ανίχνευση γενετικής τροποποίησης, στο σύνολο των εισερχόμενων πρώτων υλών της βιομηχανίας.
- Συνεχείς ποιοτικούς ελέγχους στο νερό που χρησιμοποιείται για την παρασκευή των προϊόντων.
- Συνεχή εκπαίδευση και ευαισθητοποίηση του προσωπικού σε θέματα υγιεινής και ασφάλειας.
- Εντατικούς ελέγχους στα τελικά προϊόντα πριν φτάσουν στον καταναλωτή.

Όλα τα προϊόντα που διατίθενται στην αγορά θα πρέπει να πληρούν τις προδιαγραφές ποιότητας που ορίζει ο Ελληνικός Κώδικας Τροφίμων και Ποτών και η νομοθεσία Ε.Ε.

Από το σημείο αυτό, και έχοντας την έγκριση του τμήματος Ποιοτικού Ελέγχου για την τήρηση των απαραίτητων συνθηκών κατά την παραγωγή, όπως ορίζονται από το HACCP της εταιρείας, τα αλλαντικά είναι έτοιμα προς διακίνηση (Τσακνής, et al. 2017).

2. Ιχνηλασιμότητα τροφίμων

2.1. Η έννοια της ιχνηλασιμότητας

Σύμφωνα με την πρόσφατη παγκόσμια συμφωνία στην CODEX ALIMENTARIUS (03/05/2004) η Ιχνηλασιμότητα ορίζεται επίσημα ως “Η ικανότητα παρακολούθησης της διακίνησης ενός τροφίμου κατά τις φάσεις της παραγωγής, επεξεργασίας και διανομής”. Στην πράξη ένα σύστημα ιχνηλασιμότητας είναι ένα ολοκληρωμένο σύστημα ταυτοποίησης, βασικός στόχος του οποίου είναι η δημιουργία μιας δυναμικής ταυτότητας για κάθε προϊόν, σε κάθε στάδιο της εφοδιαστικής αλυσίδας (από το χωράφι στο ράφι). Η ταυτότητα αυτή έχει τη μορφή ενός κωδικού πάνω στο προϊόν, καθώς και ενός αρχείου με πληροφορίες για το ιστορικό του προϊόντος και των συστατικών του, τόσο στα προηγούμενα και επόμενα στάδια της αλυσίδας, όσο και στο τρέχον στάδιο (Θεοδώρου 2005). Η ΕΕ με τον Κανονισμό Τροφίμων (178/2002) υποχρεώνει όλες τις επιχειρήσεις που παράγουν, τυποποιούν, αποθηκεύουν, διανέμουν τρόφιμα να διαθέτουν σύστημα ιχνηλασιμότητας (ΕΦΕΤ 2002).

Η ιχνηλασιμότητα σχετίζεται με τέσσερις διαφορετικούς τομείς σε κάθε έναν από τους οποίους εφαρμόζεται με σχετικές διαφοροποιήσεις. Έτσι, εκτός από ιχνηλασιμότητα σε προϊόντα, η ιχνηλασιμότητα εφαρμόζεται στα δεδομένα, στις διακριβώσεις και στην τεχνολογία της πληροφορικής και του προγραμματισμού (Κυριακίδης 2005).

Η εφαρμογή της ιχνηλασιμότητας προϋποθέτει την ανάπτυξη ενός συστήματος ιχνηλασιμότητας. Πρακτικά, ένα σύστημα ιχνηλασιμότητας δεν είναι τίποτα άλλο παρά ένας μηχανισμός καταγραφής και διατήρησης όλων των πληροφοριών που αφορούν τη διαδρομή που ακολούθησε μία συγκεκριμένη μονάδα ή παρτίδα ενός προϊόντος ή συστατικού από τον (τους) αρχικό(-ους) προμηθευτή(-τες) έως τον τελικό καταναλωτή (Κυριακίδης 2005).

Τα συστήματα ιχνηλασιμότητας:

- Δίνουν τις απαιτούμενες πληροφορίες για τον καλύτερο έλεγχο των διαδικασιών (π.χ. βέλτιστη χρήση πρώτων υλών, έλεγχος αποθεμάτων, προγραμματισμός παραγωγής, ποιοτικός έλεγχος κλπ.) για τους πελάτες, ελεγκτικούς φορείς κλπ.

- Βοηθούν στη διαχείριση περιπτώσεων κρίσεων (εντοπισμός προβλημάτων, εντοπισμός και απόσυρση ελαττωματικών παρτίδων κλπ.).
- Μπορούν να τεκμηριώσουν ανά πάσα στιγμή τους ισχυρισμούς της επιχείρησης για τις ιδιότητες των προϊόντων της (π.χ. ποιότητα, προέλευση κλπ.) (Θεοδώρου 2005).

2.2. Το νομοθετικό πλαίσιο στην ΕΕ- Κανονισμός 178/2002

Μετά από τα επανειλημμένα κρούσματα διατροφικών κρίσεων που ξέσπασαν τα τελευταία χρόνια στην Ευρώπη έγινε σαφές ότι οι υπάρχουσες δομές και τα συστήματα ελέγχου δεν επαρκούσαν για να εξασφαλίσουν την ασφάλεια των προϊόντων. Στη Λευκή Βίβλο για την ασφάλεια των τροφίμων (12-01-2000) αναφέρεται μεταξύ άλλων ότι «Μια επιτυχημένη πολιτική τροφίμων απαιτεί την ιχνηλασιμότητα των τροφίμων και ζωοτροφών και των συστατικών τους. Για να διευκολυνθεί η ιχνηλασιμότητα πρέπει να εισαχθούν οι κατάλληλες διαδικασίες.».

Δύο χρόνια μετά τη Λευκή Βίβλο δημοσιεύθηκε ο κανονισμός (ΕΚ) 178/2002 αυτός που είναι γνωστός απλά ως «Γενικός Νόμος Τροφίμων». Μεταξύ των άλλων που προβλέπει, δίνει τον ορισμό και τις γενικές κατευθύνσεις για την υποχρεωτική εφαρμογή της ιχνηλασιμότητας σε όλα τα τρόφιμα και τις ζωοτροφές. Ο Κανονισμός άρχισε να εφαρμόζεται στις αρχές του 2002, ενώ για ορισμένα άρθρα του η ισχύς μετατέθηκε για την 1.1.2005. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνεται και το άρθρο 18 που αφορά την ιχνηλασιμότητα. Ο κανονισμός δίνει και τον ορισμό της ιχνηλασιμότητας τροφίμων και ζωοτροφών. Σύμφωνα λοιπόν με αυτόν, ιχνηλασιμότητα είναι η ικανότητα ιχνηλάτησης (the ability to trace) και παρακολούθησης τροφίμων, ζωοτροφών και ζώων που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή τροφίμων ή ουσιών που πρόκειται ή αναμένεται να ενσωματωθούν σε τρόφιμα ή ζωοτροφές, σε όλα τα στάδια της παραγωγής, μεταποίησης και διανομής τους.

Το άρθρο 18 του κανονισμού περιγράφει το πλαίσιο των απαιτήσεων για την ανάπτυξη συστημάτων ιχνηλασιμότητας. Συγκεκριμένα προβλέπει τα εξής:

- 1) Η ιχνηλασιμότητα τροφίμων, ζωοτροφών και ζώων διασφαλίζεται σε όλα τα στάδια παραγωγής, μεταποίησης και διανομής.
- 2) Οι υπεύθυνοι των επιχειρήσεων τροφίμων και ζωοτροφών είναι σε θέση να αναγνωρίζουν τους προμηθευτές τους (για κάθε τι που έχουν προμηθευτεί και που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή τροφίμων ή να ενσωματωθεί σε τρόφιμα ή ζωοτροφές). Εγκαθιδρύουν συστήματα και διαδικασίες έτσι ώστε οι πληροφορίες αυτές να είναι διαθέσιμες στις αρχές.
- 3) Οι υπεύθυνοι των επιχειρήσεων τροφίμων και ζωοτροφών καθιερώνουν συστήματα και διαδικασίες για την αναγνώριση των άλλων επιχειρήσεων στις οποίες προμηθεύουν τα προϊόντα τους (και αυτές οι πληροφορίες πρέπει να είναι διαθέσιμες στις αρχές).

- 4) Τα τρόφιμα ή οι ζωοτροφές που διατίθενται στην αγορά της Κοινότητας πρέπει να φέρουν κατάλληλη επισήμανση ή σήμα αναγνώρισης έτσι ώστε να διευκολύνεται η ιχνηλασιμότητα τους.
- 5) Οι διατάξεις για την εφαρμογή των απαιτήσεων του άρθρου σε ότι αφορά συγκεκριμένους τομείς θεσπίζονται από ειδική μόνιμη επιτροπή την οποία αποτελούν εκπρόσωποι των κρατών μελών και στην οποία προεδρεύει εκπρόσωπος της Ευρωπαϊκής Επιτροπής.

Παρόλα αυτά, η διατύπωση του κανονισμού δεν δίνει στις εταιρίες ούτε και στις ελεγκτικές αρχές, σαφείς πληροφορίες για το πώς θα εφαρμοστεί η ιχνηλασιμότητα. Προκύπτουν ερωτηματικά όπως ποιο είναι το εύρος των πληροφοριών που θα πρέπει να συλλέγονται, για πόσο θα πρέπει να διατηρούνται οι πληροφορίες κλπ. Στο διάστημα που μεσολάβησε από τη δημοσίευση του κανονισμού έως την 1.1.2005, ημερομηνία έναρξης ισχύος της υποχρεωτικής ιχνηλασιμότητας, κάποια κράτη μέλη προχώρησαν στην ερμηνεία των απαιτήσεων αυτών. Άλλες χώρες έφτιαξαν εθνική νομοθεσία. Άλλες πάλι έχουν συντάξει οδηγίες για την εφαρμογή του άρθρου 18.

Ωστόσο οι περισσότερες χώρες προτίμησαν μια εναρμονισμένη προσέγγιση και κανόνες κοινούς για όλα τα κράτη μέλη. Έτσι, η Ευρωπαϊκή Επιτροπή εξέδωσε ερμηνευτικές οδηγίες με τις οποίες δίνονται οι κατευθύνσεις για την εφαρμογή της ιχνηλασιμότητας με βάση τα όσα ορίζει ο Κανονισμός και οι οποίες απευθύνονται τόσο στις επιχειρήσεις τροφίμων όσο και στις ελεγκτικές αρχές (ΕΦΕΤ 2002).

2.3. Κατευθυντήριες γραμμές της ΕΕ για την εφαρμογή της ιχνηλασιμότητας

Τα κυριότερα σημεία των κατευθυντήριων γραμμών της ΕΕ για την εφαρμογή της ιχνηλασιμότητας με βάση το άρθρο 18 του κανονισμού 178/2002 είναι:

- Οι επιχειρήσεις τροφίμων είναι υποχρεωμένες να γνωρίζουν από πού προμηθεύονται και σε ποιους προμηθεύουν τα προϊόντα τους. Ισχύει η αρχή -1/+1 ή one back/one forward, με άλλα λόγια επιβάλλεται η τήρηση στοιχείων για τον άμεσο προμηθευτή και τον άμεσο πελάτη.
- Η υποχρεωτική ιχνηλασιμότητα καλύπτει και τα συστατικά τροφίμων, τα πρόσθετα και τις αρωματικές ύλες.
- Η υποχρέωση καλύπτει όλες τις επιχειρήσεις που ασχολούνται με: πρωτογενή παραγωγή, μεταποίηση, βιομηχανική παραγωγή ή επεξεργασία, αποθήκευση, μεταφορά, διανομή και διάθεση τροφίμων.
- Δεν είναι υποχρεωτική η «εσωτερική ιχνηλασιμότητα». Ωστόσο οι επιχειρήσεις ενθαρρύνονται για την εφαρμογή της.

Στο είδος των πληροφοριών που πρέπει να συλλέγονται και να φυλάσσονται περιλαμβάνονται υποχρεωτικά: Η επωνυμία και η διεύθυνση του προμηθευτή (ή πελάτη), η φύση των προϊόντων που διακινήθηκαν καθώς και η ημερομηνία της διακίνησης. Συστήνεται ωστόσο να διατηρούνται επιπλέον και οι πληροφορίες που αφορούν την ποσότητα των προϊόντων και τους αριθμούς παρτίδας των προϊόντων, καθώς επίσης και επιπλέον στοιχεία που θα καθορίζει η κάθε επιχείρηση ανάλογα με το είδος της δραστηριότητας και το διαχειριστικό της σύστημα.

Το χρονικό διάστημα που θα πρέπει να φυλάσσονται οι πληροφορίες καθορίστηκε στα 5 χρόνια, με εξαίρεση τα προϊόντα που έχουν χρόνο ζωής μεγαλύτερο των 5 ετών (διατήρηση για χρονικό διάστημα ίσο με τον χρόνο ζωής και 6 μήνες επιπλέον) ή τα τελικά προϊόντα που φθάνουν στον τελικό καταναλωτή με ημερομηνία λήξης μικρότερη τριών μηνών ή χωρίς συγκεκριμένη ημερομηνία (διατήρηση για χρονικό διάστημα έως και 6 μήνες μετά την ημερομηνία παραγωγής ή παράδοσης).

Στο σημείο αυτό να διευκρινιστεί ότι η υπάρχουσα κάθετη ευρωπαϊκή νομοθεσία που αφορά απαιτήσεις ιχνηλασιμότητας σε συγκεκριμένους επί μέρους κλάδους (πχ βοοειδή-βόειο κρέας, γενετικώς τροποποιημένα τρόφιμα, προϊόντα αλιείας, αυγά κλπ), εξακολουθεί να υφίσταται και να εφαρμόζεται παράλληλα (Κυριακίδης 2005) .

2.4. Ιχνηλασιμότητα στα τρόφιμα

Στο τομέα των τροφίμων η ιχνηλασιμότητα σχετίζεται με την ασφάλεια των τροφίμων, αλλά όχι απαραίτητα μόνο με αυτήν. Έτσι, τους αντικειμενικούς στόχους που θέλουμε να επιτύχουμε εφαρμόζοντας την ιχνηλασιμότητα σε έναν κλάδο των τροφίμων τους διακρίνουμε σε αυτούς που σχετίζονται και σε αυτούς που δεν σχετίζονται με την ασφάλεια των τροφίμων. Επομένως, το σύστημα της ιχνηλασιμότητας που θα επιλεγεί για να εφαρμοστεί, θα πρέπει πρωτίστως να εξυπηρετεί τους στόχους της ιχνηλασιμότητας (Κυριακίδης 2005).

Είναι σαφές επομένως ότι το είδος και το εύρος των πληροφοριών θα διαφέρουν ανάλογα με τους στόχους και επιπλέον θα εξαρτώνται και από άλλους παράγοντες όπως:

- Η φύση του προϊόντος.
- Οι αγροτικές και βιομηχανικές πρακτικές.
- Οι προδιαγραφές που θέτει ο πελάτης.
- Οι απαιτήσεις της νομοθεσίας και των προτύπων.

Εξετάζοντας το επίπεδο της μεμονωμένης επιχείρησης, στις περισσότερες των περιπτώσεων αν όχι σε όλες μια μεμονωμένη επιχείρηση δεν μπορεί να «χτίσει» μια ιχνηλασιμότητα που να καλύπτει τη διαδρομή από το χωράφι έως το ράφι. Ωστόσο, η κάθε επιχείρηση έχει να παίξει το δικό της ρόλο στη συλλογή και διατήρηση των

πληροφοριών των σχετικών με τις πρώτες ύλες, τα συστατικά, τις διαδικασίες και τα προϊόντα που την αφορούν. Τρία είναι τα πεδία συλλογής πληροφοριών για μια επιχείρηση: Στοιχεία που αφορούν τους προμηθευτές, στοιχεία που αφορούν τους πελάτες και στοιχεία που αφορούν την παραγωγική διαδικασία.

Μια επιχείρηση που πρόκειται να εφαρμόσει ένα σύστημα ιχνηλασιμότητας θα πρέπει πρώτα απ' όλα να θέσει τους στόχους της δικής της ιχνηλασιμότητας. Σε κάθε περίπτωση, είναι υποχρεωτικοί οι στόχοι που θέτει η νομοθεσία. Από εκεί και πέρα, η κάθε επιχείρηση εννοείται ότι μπορεί να θέσει επιπλέον στόχους που θα εξυπηρετούν την ίδια. Στη συνέχεια θα πρέπει να προσδιοριστεί το είδος των πληροφοριών που θα συλλέγει, και να αναπτύξει ένα σύστημα καταγραφής και διατήρησης αυτών των πληροφοριών. Τέλος, θα πρέπει να υπάρχει περιοδική αξιολόγηση του συστήματος με βάση συγκεκριμένα κριτήρια. Εννοείται, ότι όλα αυτά εξαρτώνται εκτός των όσων είπαμε μέχρι τώρα και από το μέγεθος της επιχείρησης και το σύστημα διαχείρισης που ήδη διαθέτει.

Εάν όλες οι επιχειρήσεις που εμπλέκονται στην αλυσίδα παραγωγής και διακίνησης ενός προϊόντος, εφαρμόσουν ένα σύστημα ιχνηλασιμότητας, τότε αποκαθίσταται πλήρης ιχνηλασιμότητα σε όλη την αλυσίδα, από το χωράφι έως το πιάτο. Εάν ένας κρίκος της αλυσίδας δεν λειτουργεί, παύουμε να έχουμε ιχνηλασιμότητα. Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο η οποιαδήποτε νομοθεσία, δεν μπορεί να εξαιρεί κανένα ενδιάμεσο κρίκο της αλυσίδας.

Κλείνοντας αυτό το θεωρητικό μέρος περί ιχνηλασιμότητας, αξίζει να αναφερθούν οι παράγοντες που περιορίζουν την εφαρμογή της ιχνηλασιμότητας, οι οποίοι κατατάσσονται σε δύο κατηγορίες, στα τεχνικά προβλήματα και το κόστος.

Σε ότι αφορά το κόστος αυτό είναι δύσκολο να υπολογιστεί ακριβώς. Εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως το είδος του προϊόντος, ο όγκος των πληροφοριών, το μέγεθος της επιχείρησης κλπ.

Όσο λιγότερο προσδιορισμένη (χαρακτηρισμένη) είναι μία παρτίδα τόσο λιγότερες καταγραφές πληροφοριών απαιτούνται (λιγότερη ιχνηλασιμότητα- μικρότερο κόστος). Αλλά σε αυτήν την περίπτωση αντιστρόφως ανάλογη θα είναι η ποσότητα των προϊόντων που θα πρέπει να ανακληθούν (Κυριακίδης 2005).

2.5. Μελέτες στην ιχνηλασιμότητα σε προϊόντα ζωικής προέλευσης

Η έρευνα και οι πρακτικές επικεντρώνονται στην ανάπτυξη, επιβεβαίωση και εναρμόνιση των διαφόρων τεχνολογιών και μεθόδων που εμπλέκονται στη διαδικασία ιχνηλασιμότητας στα τρόφιμα (Raspor 2005). Οι κύριοι στόχοι είναι η κλιμάκωση, η εφαρμογή και η επιβεβαίωση των μεθόδων για την εξασφάλιση της γνησιότητας, την εγκυρότητα της επισήμανσης και την εφαρμογή του συστήματος

HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points) σε όλη την τροφική αλυσίδα. Ο σκοπός είναι να συνοψιστεί η επιστημονική και τεχνολογική βάση της ιχνηλασιμότητας. Η ανίχνευση και η παρακολούθηση των τροφίμων είναι πολύπλοκες διαδικασίες, οι οποίες πραγματοποιούνται με διάφορους (βιο)δείκτες, τεχνικές και συνθήκες σε διάφορες τεχνολογίες που παράγουν διάφορα τρόφιμα (μεταποιημένα, ημι-κατεργασμένα και ακατέργαστα). Έχοντας ως δεδομένο ότι τα τρόφιμα παράγονται με σκοπό την κατανάλωση από τον άνθρωπο ή τα ζώα, χρειάζονται κατάλληλοι δείκτες ώστε να γίνεται πλήρης έλεγχος σε όλη τη διαδικασία παραγωγής.

Τα επόμενα χρόνια πραγματοποιήθηκαν μελέτες για την ανάπτυξη και εφαρμογή μοριακών δεικτών στην ανίχνευση προσμίξεων. Λόγω της κατανάλωσης μεγάλων ποσοτήτων κρέατος γαλοπούλας και άλλων θηραμάτων, ήταν απαραίτητο να βρεθούν αποδοτικές τεχνικές για την ανίχνευση διαφόρων ειδών κρέατος. Σε μία μελέτη των Stamoulis και των συνεργατών του (2010), χρησιμοποιήθηκαν δείκτες για την ανίχνευση διαφόρων ειδών κρέατος σε δείγματα ακατέργαστου και μεταποιημένου κρέατος πουλερικών. Οι υποψήφιοι δείκτες ήταν δύο γονίδια του μιτοχονδριακού DNA, το κυτόχρωμα b (Cytochrome b) και το 12S ριβοσωμικό RNA (12S rRNA). Η πέψη του 12S rRNA από το περιοριστικό ένζυμο *Acil* διακρίνει με επιτυχία όλα τα είδη πτηνών, παράγοντας ειδικά πρότυπα για τα διάφορα είδη. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης ήταν ότι το 12S rRNA έδινε περισσότερες πληροφορίες στην ταυτοποίηση των πτηνών από το *Cytb* και αυτή η μέθοδος θεωρήθηκε επαρκής για την ανίχνευση μιγμάτων κρέατος (Stamoulis, et al. 2010).

Στη Μαλαισία πραγματοποιήθηκε μία μελέτη (Chuah, et al. 2016), στην οποία ελέγχθηκαν 143 προψημένα προϊόντα από βόειο κρέας και πουλερικά. Τρεις πολυπλεκτικές PCR έγιναν για την ανίχνευση των διαφόρων ειδών κρέατος. Η πρώτη χρησιμοποιούσε ως δείκτη το μιτοχονδριακό γονίδιο του κυτοχρώματος b (*cytB*) για την ανίχνευση κρέατος βουβαλιών, βοοειδών, αίγων και προβάτων. Η δεύτερη πολυπλεκτική PCR έγινε για την ανίχνευση κρέατος κοτόπουλου, πάπιας και χήνας χρησιμοποιώντας τα μιτοχονδριακά γονίδια 12S rRNA, *cytB* και *D-loop*. Και η τρίτη πολυπλεκτική PCR έγινε για την ανίχνευση κρέατος χοίρων, πιθήκων, σκύλων, αρουραίων και γατών, χρησιμοποιώντας την υπομονάδα 5 της αφυδρογονάσης NADH (ND5) για τη ανίχνευση κρέατος χοίρειου και πιθήκου, την υπομονάδα 6 της ATPase (ATPase 6) για την ανίχνευση κρέατος σκύλου και αρουραίου και *cytB* για κρέας από γάτα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα 112 από τα 143 προϊόντα που μελετήθηκαν είχαν λανθασμένη σήμανση για την ύπαρξη άλλων ειδών κρέατος. Από τα προϊόντα με λανθασμένη σήμανση:

- ✓ 17/28 ήταν λουκάνικα
- ✓ 3/4 ήταν αλλαντικά
- ✓ 6/8 ήταν μαγειρεμένο κρέας

- ✓ 19/25 παναρισμένα προϊόντα
- ✓ 48/56 ήταν στο κιμά
- ✓ 19/22 σε μπιφτέκια

DNA από βουβάλι βρέθηκε στα 40 από τα 58 προϊόντα που είχαν σημειωθεί για βόειο κρέας. Επίσης, μη σημασμένο DNA κοτόπουλου και βουβαλιού βρέθηκε σε 62/84 και 33/58 προϊόντα κοτόπουλου και βοδινού, αντίστοιχα. Συμπερασματικά, αυτή η μελέτη δείχνει ότι η πλειοψηφία των δειγμάτων δεν ακολουθούσε τη σήμανση των προϊόντων με βάση το κρέας είναι συνήθης στη Μαλαισία.

2.6 Συμπεράσματα

Η εφαρμογή της ιχνηλασιμότητας στον κλάδο των τροφίμων είναι πλέον υποχρεωτική. Οι επιχειρήσεις καλούνται να εφαρμόσουν συστήματα ιχνηλασιμότητας και η πολιτεία καλείται να ελέγξει τη συμμόρφωση των επιχειρήσεων με τις απαιτήσεις αυτές.

Αν περιοριστούμε στην ασφάλεια των τροφίμων τότε ο αντικειμενικός στόχος ενός συστήματος ιχνηλασιμότητας είναι: Να ταχτοποιήσει τη συγκεκριμένη ένοχη παρτίδα ενός προϊόντος καθώς και τις πρώτες ύλες που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή του και στη συνέχεια να αναζητήσει την παρτίδα αυτή (και κάθε ξεχωριστή μονάδα της συγκεκριμένης παρτίδας) μέσα στην αλυσίδα παραγωγής και διανομής μέχρι τον τελικό καταναλωτή.

Η ιχνηλασιμότητα δεν σχετίζεται μόνο με την ασφάλεια των τροφίμων αλλά προασπίζει και την ποιότητα. Οι επιχειρήσεις βρίσκονται μπροστά στην πρόκληση να προβλέψουν πιθανά κέρδη ή απώλειες και να διευρύνουν τους στόχους που οι ίδιες θα θέσουν για την εφαρμογή της ιχνηλασιμότητας, προχωρώντας πέρα από την υποχρεωτική απαίτηση για ασφάλεια και εγκαθιδρύοντας κατά συνέπεια συστήματα περισσότερο πλήρη, περισσότερο λεπτομερή.

3. Μοριακοί δείκτες

Εξαιτίας της μεγάλης προόδου που παρατηρείται τα τελευταία χρόνια στη μοριακή βιολογία, μπορούμε σήμερα να χρησιμοποιήσουμε μοριακές τεχνικές που μας διευκολύνουν πολύ στην προσπάθειά μας να επιλέξουμε, μέσα από έναν πληθυσμό, συγκεκριμένα άτομα που έχουν ορισμένους επιθυμητούς χαρακτήρες. Η επιλογή αυτή γίνεται σε μοριακό επίπεδο, με τη βοήθεια μοριακών δεικτών. Υπάρχουν δύο κατηγορίες μοριακών δεικτών: οι DNA και οι πρωτεϊνικοί δείκτες (Αναστασόπουλος 2004).

Οι κατηγορίες μοριακών δεικτών είναι:

- Πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικού θραύσματος (RFLP). Βασίζεται στη διερεύνηση του πολυμορφισμού χρωμοσωμικών περιοχών. Πολυμορφισμός προκύπτει από μετάλλαξη, έλλειψη ή προσθήκη βάσης στη χρωμοσωμική περιοχή.
- Μικροδορυφόροι (microsatellites). Βασίζεται στη ταυτοποίηση με μοριακούς δείκτες μικρών συνεχών επαναλήψεων απλών αλληλουχιών 2,3 ή 4 νουκλεοτιδίων.
- Τυχαίος πολλαπλασιασμός πολυμορφικού DNA (RAPD). Βασίζεται στην ανάπτυξη μοριακών δεικτών με τη χρήση τυχαίων εκκινήτων, με PCR, οπότε οι περιοχές στις οποίες υβριδίζεται ο δείκτης πολλαπλασιάζονται.
- Πολυμορφισμός μήκους ενισχυμένων τμημάτων DNA (AFLP). Βασίζεται στην επιλεκτική ενίσχυση μιας υποομάδας τμημάτων που έχουν παραχθεί μετά από πέψη του γονιδιωματικού DNA με ένζυμα περιορισμού.

Τα επιθυμητά χαρακτηριστικά των μοριακών δεικτών είναι:

- Παρουσία πολυμορφισμού,
- Κληρονομήσιμοι,
- Διάσπαρτοι μέσα στο γονιδίωμα
- Μικρό κόστος, χωρίς συνέπειες στον οργανισμό. (Τοκατλίδης, Σιναπίδου 2009)

Η χρήση των μοριακών δεικτών εφαρμόζεται για την εκτίμηση γενετικής παραλλακτικότητας, την καταγωγή ατόμων, τη γενετική αποτύπωση και την κατανόηση συστηματικών σχέσεων. Επιπλέον, οι μοριακοί δείκτες συνδυασμένοι με φαινοτυπικά γνωρίσματα μεγάλου ενδιαφέροντος μπορούν να χρησιμοποιηθούν για μοριακή βελτίωση, για χάρτες σύνδεσης και τις θέσεις ποσοτικών χαρακτηριστικών (Anne 2006).

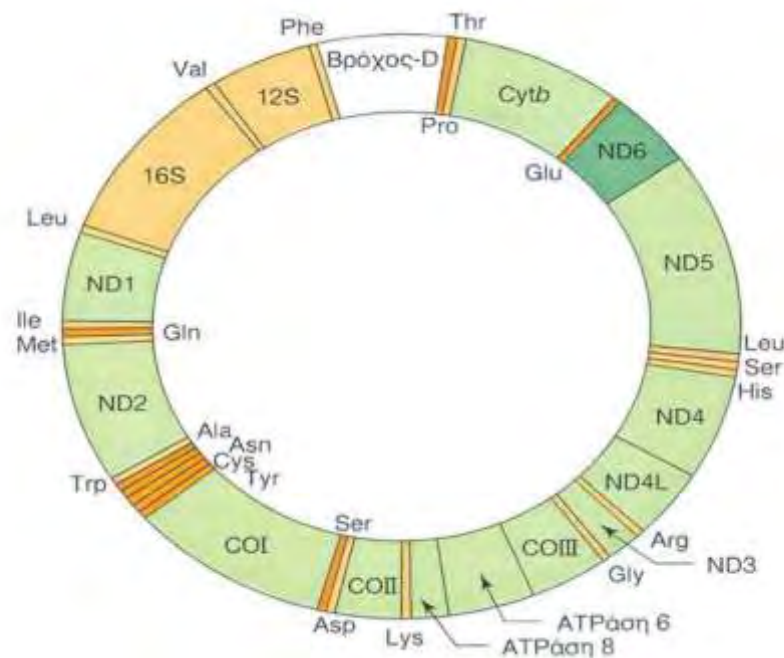
4. Μιτοχονδριακό DNA

Τα μιτοχόνδρια έχουν το δικό τους γονιδίωμα που βρίσκεται εκτός του πυρήνα. Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) είναι απλοειδές, δίκλωνο, κυκλικό μόριο. Έχει σχετικά μικρό μέγεθος (≈16kb) και μπορεί εύκολα να απομονωθεί. Η αλληλουχία των μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων παρουσιάζει μεγάλη ποικιλομορφία με διαφορετικό αριθμό γονιδίων ανάμεσα στα είδη.

Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα έχει προσδιοριστεί και κωδικοποιεί πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην οξειδωτική φωσφορυλίωση, καθώς και μόρια rRNA και tRNA. Στα ζώα, το μιτοχονδριακό γονιδίωμα κωδικοποιεί για 13 πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην οξειδωτική φωσφορυλίωση. Οι πρωτεΐνες αυτές καθορίζουν τις υπομονάδες των ενζύμων που εμπλέκονται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στην

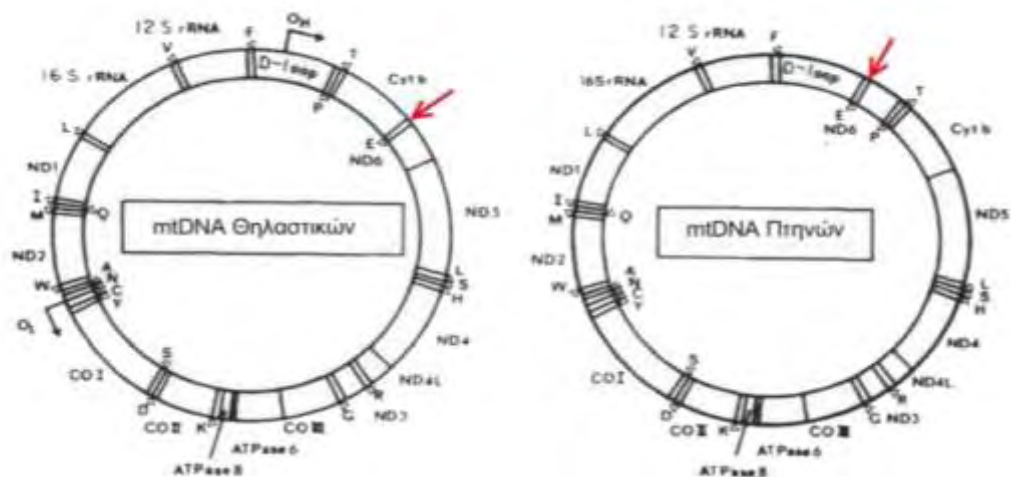
αναπνευστική αλυσίδα. Αποτελούνται από 7 υπομονάδες αφυδρογονάσης του NADH, 1 υπομονάδα του κυτοχρώματος b, 3 υπομονάδες της οξειδάσης του κυτοχρώματος c και 2 υπομονάδες της μιτοχονδριακής συνθάσης του ATP. Επίσης, υπάρχουν 24 γονίδια που κωδικοποιούν για ένα ώριμο προϊόν RNA: 22 μόρια tRNA και 2 μόρια rRNA (16S και 12S rRNA). Έχει προσδιοριστεί μια περιοχή, η οποία δεν κωδικοποιεί αλλά περιέχει τις αρχικές θέσεις αντιγράψης του mtDNA και τη μεταγραφή του σε RNA (Chinnery and Hudson, 2013)

Στην Εικόνα 2 φαίνεται ο χάρτης ενός μιτοχονδριακού γονιδιώματος.



Εικόνα 2. Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Το γονιδίωμα κωδικοποιεί τα 16s rRNA και 12s rRNA και 22 tRNA. Οι προσδιορισμοί των αμινοξέων για το tRNA σημειώνονται εξωτερικά του κύκλου για τα γονίδια που μεταγράφονται δεξιόστροφα. Ομοίως τα 13 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες υποδεικνύονται με σκούρο πράσινο (μεταγράφονται αριστερόστροφα) και ανοικτό πράσινο (μεταγράφονται δεξιόστροφα). Τα γονίδια κωδικοποιούν: Cytb, κυτόχρωμα b. ND1-6, συστατικά του συμπλόκου της αφυδρογονάσης του NADH. COI-III, υπομονάδες του συμπλόκου της οξειδάσης του κυτοχρώματος. ATPάση 6 και 8, πολυπεπτίδια του συμπλόκου της μιτοχονδριακής ATPάσης. Οι δύο υποκινητές εντοπίζονται στον βρόχο-D περιοχή η οποία εμπλέκεται και στην αντιγραφή του DNA.

Παρά την μεγάλη ομοιότητα μεταξύ των μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων, έχει βρεθεί (Desjardins and Morais 1999) ότι η δομή του διαφέρει ανάμεσα στα πτηνά και τα θηλαστικά στη θέση του γονιδίου του ND6, όπως φαίνεται στην εικόνα 3.



Εικόνα 3. Σύγκριση mtDNA θηλαστικών με το αντίστοιχο των πτηνών. Η διαφορά τους υποδεικνύεται με βέλος.

Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα εμφανίζει υψηλό ρυθμό μεταλλαγών κάτι το οποίο οδηγεί στη συσσώρευση πολυμορφισμών και τη δημιουργία ποικιλομορφίας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση των μιτοχονδρίων τόσο μεταξύ των ειδών αλλά και ανάμεσα στο ίδιο είδος. Γι' αυτό το μιτοχονδριακό DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση μικρών διαφορών ακόμη και σε άτομα με ίδιο πυρηνικό DNA (Slatkin 1994). Επίσης, ο ρυθμός εξέλιξης του mtDNA ποικίλει ανάμεσα στις διάφορες ομάδες οργανισμών.

Τα γονίδια του mtDNA με τη μεγαλύτερη προτίμηση σε μελέτες διαχωρισμού ειδών είναι τα: Cytb, COI, 12S και 16S rRNA και D-loop. Η επιλογή αυτών των γονιδίων στηρίζεται αφενός στη μεγάλη εξελικτική συντήρηση τους και αφετέρου στις επιμέρους διαφορές που παρουσιάζουν μεταξύ των ειδών.

Στον παρακάτω πίνακα παραθέτονται τα μειονεκτήματα και πλεονεκτήματα των μιτοχονδριακών γονιδίων-στόχων για μελέτες διαχωρισμού ειδών.

Πίνακας 2. Μειονεκτήματα και πλεονεκτήματα μιτοχονδριακών γονιδίων. (Φωτεινιάς 2015)

Γονίδιο-Στόχος	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα	Αναφορές
Κυτόχρωμα b	Συνήθως χρησιμοποιούνται σε φυλογενετικές μελέτες. Υψηλή δια-ειδική μεταβλητότητα.	Αδύνατο να διαχωρίσει στενά συγγενικά είδη.	Kvist (2000) Dooley et al. (2004) Zhang et al. (2007) Santos et al. (2012)

12S rRNA		Επαρκής μεταβλητότητα εντός και μεταξύ των ειδών.		Fajardo et al. (2008b) Martín et al. (2009) Rojas et al. (2010)
Περιοχή D-loop	D-	Υψηλό ποσοστό υποκατάστασης. Η πιο γρήγορα εξελισσόμενη περιοχή του mtDNA.		Sawyer et al. (2003) Fajardo et al. (2008a)
ND5		Υψηλή μεταβλητότητα μεταξύ των ειδών.	Σε κάποια γένη δεν είναι δυνατό να γίνει διαχωρισμός μεταξύ συγγενικών ειδών.	Farihah Liyana et al. (2009) Kesmen et al. (2009)
ND2		Επαρκής μεταβλητότητα και μεταξύ των ειδών.		Kesmen et al. (2009)
COI		Αλληλουχία που αποκλείει μεταξύ διαφόρων ευκαρυωτών.	Αυξημένος ρυθμός μεταλλαξιγένεσης.	Struder-Kypke and Lynn(2009)
16S rRNA		Περιέχει καλά συντηρημένες περιοχές. Πολύ χαμηλή μεταβλητότητα μεταξύ των ειδών. Συχνά χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη γενικών εκκινητών για είδη θηλαστικών, πτηνών και μηρυκαστικών.		Sawyer et al. (2003) Dalmasso et al. (2004) Chiappini et al. (2005) Kesmen et al. (2009)

5. 16S rRNA ως μοριακός δείκτης

Το γονίδιο 16S rRNA χρησιμοποιείται ιδιαίτερα για φυλογενετικές μελέτες, καθώς διατηρείται μεταξύ των διαφόρων ειδών. Το γονίδιο 16S rRNA είναι μικρό και μπορεί εύκολα να αντιγραφεί με PCR, να διαχωριστεί σε ηλεκτροφόρηση και να αλληλουχηθεί με διάφορες μεθόδους. Επιπλέον, εμφανίζει μικρότερο ρυθμό μεταλλαξιγένεσης από το COI, επομένως εμφανίζει μικρότερο βαθμό ενδοειδικού πολυμορφισμού.

Έτσι, ένα τμήμα του γονιδίου 16S rRNA παρουσιάζει :

- Πολυμορφισμό μεγέθους.
- Συντηρημένη αλληλουχία, κάτι το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση ειδών.

- Παρέχει τη δυνατότητα διάκρισης ειδών που δεν ανήκουν στο ίδιο είδος χωρίς να είναι απαραίτητη η αλληλούχηση τους.

Συνεπώς, το γονίδιο 16S rRNA πληροί τις προϋποθέσεις του παγκόσμιου μοριακού δείκτη για την ταυτοποίηση ζωικών ειδών (Sarri, et al. 2014).

Χρήση του 16S rRNA

Μια πρόσφατη μελέτη των Sarri και των συνεργατών της οδήγησε στο συμπέρασμα ότι ένα μικρό τμήμα του μιτοχονδριακού γονιδίου 16S rRNA αποτελεί έναν πολύ καλό δείκτη για την ανίχνευση ζωικών ειδών με PCR (Sarri, et al. 2014). Η μέθοδος αυτή είναι εύκολη στην εφαρμογή, ακριβής και χαμηλού κόστους και μπορεί εύκολα να ενσωματωθεί σε ιατροδικαστικές αναλύσεις. Η ικανότητα του συγκεκριμένου είδους εκκινητών να εντοπίζουν είδη ζώων μέσω μη επεμβατικών προσεγγίσεων θα μπορούσε να είναι πολύ χρήσιμη σε οικολογικές μελέτες.

Σχεδιάστηκαν ειδικά σετ εκκινητών εντός του 16S rRNA γονιδίου χρησιμοποιώντας βιοπληροφορικές μεθόδους βασισμένες στην ανάλυση μιτοχονδριακών αλληλουχιών από 150 είδη με πολύ απομακρυσμένα taxa, δεδομένα τα οποία ανακτήθηκαν από το GenBank. Οι πειραματικές προσεγγίσεις έδειξαν ότι μόνο ένα σετ εκκινητών ήταν κατάλληλο. Η επιβεβαίωση αυτών των αποτελεσμάτων έγινε έλεγχος σε 110 είδη ζώων με απομόνωση DNA και PCR. Με τη μέθοδο της SSCP ελέγχθηκαν οι πολυμορφισμοί εντός του τμήματος του γονιδίου 16S rRNA. Ενώ, παράλληλα για την επιβεβαίωση της χρησιμότητας τους έγιναν μελέτες και σε τρόφιμα.

Οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν για να ενισχύσουν το συγκεκριμένο τμήμα του μιτοχονδριακού DNA, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση προσμίξεων σε τρόφιμα, κάτι το οποίο θα αποτρέψει την εσφαλμένη σήμανση και περιγραφή των τροφίμων.

Σε μία ακόμα μελέτη που πραγματοποιήθηκε, μελετήθηκαν 348 προϊόντα διατροφής με το συγκεκριμένο τμήμα 16S rRNA, ως προς την ορθότητα της σήμανσης (Stamatis, et al. 2015). Τα προϊόντα αυτά ομαδοποιήθηκαν σε 7 ομάδες: γάλα, τροφές για κατοικίδια ζώα, συσκευασμένα λευκά τυριά, συσκευασμένα κίτρινα τυριά, τυριά ΠΟΠ, επεξεργασμένα κρέατα και κατεψυγμένα ψάρια. Εσφαλμένη αναγραφή ετικέτας υπήρχε και στις 7 ομάδες αλλά το ποσοστό της νοθείας διέφερε. Το χαμηλότερο ποσοστό (15%) βρέθηκε στα συσκευασμένα κίτρινα τυριά, το υψηλότερο (54%) στις τροφές για κατοικίδια ζώα. Το ποσοστό αυτό στα γάλατα ήταν 26%, στα συσκευασμένα λευκά τυριά 29%, στα τυριά ΠΟΠ 26%, στα κατεψυγμένα ψάρια 35% και στα επεξεργασμένα κρέατα 36%. Τα αποτελέσματα αυτά προκαλούν μία σύγχυση ως προς τον έλεγχο των τροφίμων που

πραγματοποιείται και έτσι γίνεται κατανοητό ότι είναι σημαντικό να εξεταστεί η πιστότητα της αναγραφής της ετικέτας, η βελτίωση και επέκταση των μεθόδων παρακολούθησης και να επαναπροσδιοριστούν οι πολιτικές επιβολής κυρώσεων για τις απάτες στα τρόφιμα. Ωστόσο, οι βιομηχανίες τροφίμων πρέπει να καθιερώσουν έναν δικό τους ακριβή και εκτεταμένο έλεγχο για τους μηχανισμούς επιθεώρησης.

Έκτοτε, ο συγκεκριμένος δείκτης του 16S rRNA χρησιμοποιείται αρκετά τόσο για μελέτες που σχετίζονται με αναλύσεις προσμίξεων σε προϊόντα ζωικής προέλευσης όσο και για μελέτες ταυτοποίησης ειδών.

Σκοπός της εργασίας

Οι μοριακές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στις αναλύσεις τροφίμων με απομόνωση DNA έχουν όλο και περισσότερες εφαρμογές τόσο για την ασφάλεια των τροφίμων όσο και για την ποιότητα και τη γνησιότητα τους.

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η ανάλυση των αλλαντικών γαλοπούλας ως προς την ποιότητα τους και συγκεκριμένα την ιχνηλασιμότητα και τον προσδιορισμό της προέλευσης των ειδών κρεάτων. Τα τελευταία χρόνια η παραγωγή αλλαντικών από κρέας γαλοπούλας αυξάνεται με ταχύτατους ρυθμούς. Ωστόσο, λόγω τους κόστους του συγκεκριμένου κρέατος, συχνά τα αλλαντικά γαλοπούλας νοθεύονται με την προσθήκη κρέατος από άλλα είδη ζώων.

Για τον σκοπό αυτό έγινε απομόνωση DNA από δείγματα αλλαντικών γαλοπούλας. Στη συνέχεια, ο μοριακός δείκτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ένα τμήμα του γονιδίου 16S rRNA του μιτοχondριακού γονιδιώματος. Για την τελική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (Single Strand Conformation Polymorphism).

6. Πειραματική πορεία- Μέθοδοι

6.1 Δείγματα

Για τον σκοπό της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν 41 δείγματα αλλαντικών γαλοπούλας που παρήχθησαν από 16 διαφορετικές ελληνικές εταιρείες. Τα δείγματα αγοράστηκαν από σούπερ μάρκετ στην περιοχή της Λάρισας.

6.2 Απομόνωση DNA

Για την απομόνωση ολικού DNA από αλλαντικά γαλοπούλας χρησιμοποιήθηκαν φέτες γαλοπούλας και το NucleoSpin® 96 Tissue Core Kit for Genomic DNA Extraction - Macherey-Nagel, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Αναλυτικότερα η απομόνωση περιλάμβανε τα παρακάτω στάδια:

Προετοιμασία δείγματος

Με ένα καθαρό μαχαίρι κόβουμε τη φέτα του αλλαντικού σε πολύ μικρά τμήματα και τοποθετούμε δείγμα βάρους 25mg σε φιαλίδια erpendorf των 1,5ml.

Δείγμα πριν τη λύση

Προσθέτουμε στο erpendorf 180μL Buffer T1 και 25μL Proteinase K. Προσέχουμε το διάλυμα αυτό να έχει καλύψει το δείγμα και στη συνέχεια, γίνεται έντονη ανάδευση του δείγματος (Vortex).

Έπειτα, επωάζουμε τα δείγματα στους 56°C για περίπου 2 ώρες υπό συνεχή ανάδευση μέχρι να διαλυθεί τελείως το δείγμα.

Δείγμα μετά τη λύση

Προσθέτουμε στα δείγματα 200μL Buffer B3. Αναδεύουμε τα δείγματα (Vortex) και τα επωάζουμε στους 70°C για 10 λεπτά.

Λόγω της θολότητας του δείγματος, φυγοκεντρούμε τα δείγματα για 5 λεπτά στα 11,000x g και μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε ένα νέο erpendorf.

Προσαρμογή των συνθηκών δέσμησης του DNA

Προσθέτουμε 210μL αιθανόλη (96-100%) στο δείγμα και αναδεύουμε έντονα (Vortex).

Δέσμηση DNA

Για κάθε δείγμα, τοποθετούμε μία στήλη NucleoSpin Tissue σε ένα φιαλίδιο συλλογής. Αδειάζουμε το περιεχόμενο του erpendorf στη στήλη και φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό στα 11,000x g. Αφαιρούμε το φιαλίδιο συλλογής και τοποθετούμε την στήλη σε ένα νέο φιαλίδιο συλλογής.

Διαδοχικές πλύσεις της μεμβράνης της στήλης

1^η πλύση: Προσθέτουμε 500μL Buffer BW στη στήλη και φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό στα 11,000x g. Αδειάζουμε το διάλυμα από το φιαλίδιο συλλογής και προσθέτουμε ξανά τη στήλη στο φιαλίδιο.

2^η πλύση: Προσθέτουμε 600μL Buffer B5 στη στήλη και φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό στα 11,000x g. Αδειάζουμε το διάλυμα από το φιαλίδιο συλλογής και προσθέτουμε ξανά τη στήλη στο φιαλίδιο.

Ξήρανση της μεμβράνης της στήλης

Φυγοκεντρούμε τη στήλη για 1 λεπτό στα 11,000x g. Με αυτόν τον τρόπο αφαιρείται η περίσσεια της αιθανόλης.

Έκλουση καθαρού DNA

Προσθέτουμε τη στήλη σε ένα erpendorf των 1,5ml και προσθέτουμε 100μL δις απεσταγμένο νερό, επωάζουμε 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό στα 11,000 x g.

Τέλος, αποθηκεύουμε το DNA στους 4°C για άμεση χρήση και στους -20°C για μελλοντική χρήση.

6.3 Ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια μέθοδος διαχωρισμού και ανάλυσης μορίων DNA, RNA και πρωτεϊνών σύμφωνα με το μέγεθος τους και το φορτίο τους.

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Η πιο συχνή μορφή ηλεκτροφόρησης είναι η ηλεκτροφόρηση μορίων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης. Η μέθοδος είναι απλή και αποτελεσματική και επιτρέπει τον διαχωρισμό μορίων DNA μεγέθους από 100bp έως 25kb. Χρησιμοποιείται ευρύτατα στις βιολογικές επιστήμες, σε τομείς όπως η μοριακή βιολογία, η ιατροδικαστική και η έρευνα.

Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης χωρίζεται σε τρία στάδια:

1. Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης, κατάλληλης συγκέντρωσης για το μέγεθος των μορίων του DNA που επιθυμούμε να διαχωρίσουμε.
2. Τοποθέτηση των δειγμάτων στις θέσεις υποδοχής τους στο πήκτωμα και εφαρμογή της κατάλληλης ηλεκτρικής τάσης στη δεξαμενή ηλεκτροφόρησης για τη βέλτιστη χρονική περίοδο για τον διαχωρισμό των μορίων DNA.
3. Χρώση του πηκτώματος (αν αυτή δεν έχει πραγματοποιηθεί κατά το στάδιο παρασκευής του) με κατάλληλες ουσίες που προσδένονται στο DNA και στη συνέχεια άμεση παρατήρηση και φωτογράφιση του σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας.

Η προσθήκη κατάλληλων χρωστικών επιτρέπει την παρατήρηση των διαχωρισμένων μορίων DNA σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (Παπανικολάου, et al. 2015)

6.3.1 Προετοιμασία του πηκτώματος αγαρόζης

Για την προετοιμασία της πηκτής αγαρόζης πραγματοποιήθηκε η εξής διαδικασία:

1. Προετοιμασία του εκμαγείου. Τοποθετούμε τα “χτενάκια” στις κατάλληλες θέσεις για να δημιουργηθούν τα “πηγαδάκια” και σφραγίζουμε τις δύο κενές πλευρές.
2. Προετοιμάζουμε την πηκτή. Για να παρασκευάσουμε πηκτή 1%, μετράμε συγκέντρωση αγαρόζης 0,3g την οποία διαλύουμε σε κωνική φιάλη με 50ml TAE 1x.
3. Θερμαίνουμε το διάλυμα σε φούρνο μικροκυμάτων με περιοδική ανάδευση.
4. Ανακινούμε το διάλυμα, το οποίο σταδιακά ψύχεται μέχρι να φτάσει στους 55-60°C.
5. Προσθέτουμε στο διάλυμα 1μL της χρωστικής SERVA© Electrophoresis GmbH, για να γίνουν ορατές οι ζώνες του DNA κατά την παρατήρηση της πηκτής στη συσκευή UV.
6. Τοποθετούμε το διάλυμα στο εκμαγείο.
7. Αφήνεται σε ηρεμία μέχρι να στερεοποιηθεί και στη συνέχεια τα “χτενάκια” απομακρύνονται.

6.3.2 Τοποθέτηση των δειγμάτων και ηλεκτροφόρηση

1. Η πηκτή μεταφέρεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία περιέχει TAE 1x. Το ρυθμιστικό αυτό διάλυμα πρέπει να καλύπτει την πηκτή της αγαρόζης.
2. Έπειτα, γίνεται η προετοιμασία των δειγμάτων. Σε 3μL DNA προσθέτουμε 3μL loading buffer. Το loading buffer αποτελείται από:
 - ✓ Bromophenol blue 0,1% w/v
 - ✓ TBE1x
 - ✓ Glycerol 8,7%
 - ✓ ddH₂O έως τα 10ml
3. Τοποθετήσαμε τα δείγματα στα “πηγαδάκια”.
4. Πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε 150 Volts και ακολούθησε οπτική παρατήρηση των δειγμάτων σε UV.

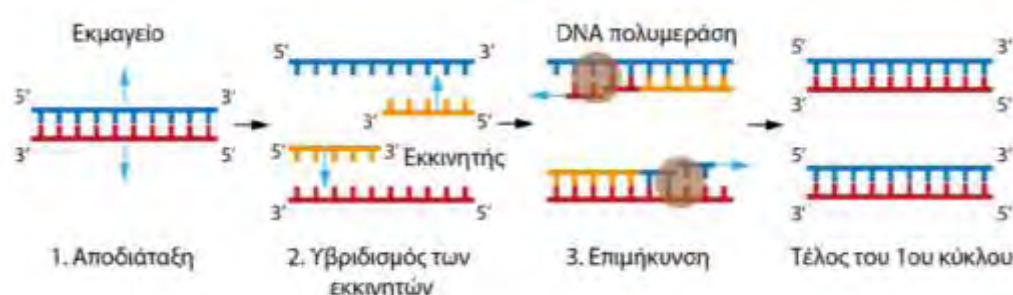
6.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) ανακαλύφθηκε το 1983 από τον βιοχημικό Kary Mullis και είναι ίσως η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος της μοριακής βιολογίας, με αναρίθμητες εφαρμογές τόσο σε ερευνητικό όσο και σε διαγνωστικό επίπεδο. Η PCR είναι μια ενζυμική μέθοδος ενίσχυσης συγκεκριμένων τμημάτων γενετικού υλικού in vitro. Κατά τη διάρκεια μιας τυπικής αντίδρασης PCR το επιθυμητό τμήμα γενετικού υλικού πολλαπλασιάζεται μέχρι και ένα τρισεκατομμύριο φορές, γεγονός που είναι απαραίτητο για μετέπειτα χειρισμούς (Παπανικολάου et al. 2015)

Η PCR συμπληρώνει την κλωνοποίηση του DNA καθώς επιτρέπει την επίτευξη του ίδιου αποτελέσματος–απομόνωση ενός καθορισμένου κλάσματος DNA- αλλά σε πολύ μικρότερο χρονικό διάστημα (μόλις λίγες ώρες). Η PCR συμπληρώνει αλλά δεν υποκαθιστά την κλωνοποίηση επειδή έχει τους δικούς της περιορισμούς: ο κυριότερος είναι η ανάγκη να γνωρίζουμε τουλάχιστον ένα μέρος της αλληλουχίας του κλάσματος προς απομόνωση.

6.4.1 Στάδια της PCR

Η αντίδραση PCR επιτελείται σε τρία στάδια, τα οποία επαναλαμβάνονται διαδοχικά:



Εικόνα 4. Στάδια της αντίδρασης PCR. (Παπανικολάου, Γ., Παλαιολόγου, Δ. 2015)

1. Αποδιάταξη: Οι δύο αλυσίδες του DNA διαχωρίζονται (αποδιατάσσονται) με θέρμανση σε θερμοκρασία 94-95°C για περίπου 30sec έως 1min.
2. Υβριδισμός εκκινητών: Με μείωση της θερμοκρασίας στους 53°C για περίπου 30sec έως 1min, οι εκκινητές υβριδίζονται στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο εκμαγείο DNA.
3. Επιμήκυνση: Για τη σύνθεση της νέας αλληλουχίας αυξάνουμε τη θερμοκρασία στους 72°C, τη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της Taq πολυμεράσης. Η πολυμεράση επιμηκύνει τους εκκινητές εισάγοντας τριφωσφωρικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) χρησιμοποιώντας της συμπληρωματική αλληλουχία DNA ως εκμαγείο.

Τα παραπάνω στάδια επαναλαμβάνονται 25 έως 35 φορές. Η PCR εκτελείται στον θερμικό κυκλοποιητή (Thermal cycler), συσκευή που φέρει θερμαινόμενη πλάκα που μπορεί να εναλλάσσει θερμοκρασίες με ταχύτητα και ακρίβεια. Ο θερμικός κυκλοποιητής είναι μια προγραμματιζόμενη συσκευή, στην οποία μπορούμε να ρυθμίσουμε την επιθυμητή θερμοκρασία και τη διάρκεια κάθε σταδίου αλλά και τη διαδοχή τους. Ένα τυπικό πρόγραμμα PCR στο θερμικό κυκλοποιητή για τον πολλαπλασιασμό ενός τμήματος DNA μεγέθους 500bp φαίνεται στον πίνακα 3 (Παπανικολάου et al. 2015).

Πίνακας 3. Συνθήκες PCR για την ενίσχυση ενός τμήματος DNA μεγέθους 500bp. (Παπανικολάου, Γ., Παλαιολόγου, Δ. 2015).

Στάδια της PCR	Θερμοκρασίας (°C)	Χρόνος
1. Αρχική αποδιάταξη	95	2-5 min
2. Αποδιάταξη	95	30-45 sec
3. Υβριδισμός εκκινητών	55-65	30-45 sec
4. Επιμήκυνση (1kb/min)	72	45 sec
<i>Επανάληψη σταδίων 2-4 για 30-35 φορές</i>		
5. Τελική επιμήκυνση	72	5 min

6.4.2 Τρεις φάσεις της PCR

Η διαδικασία της PCR χωρίζεται σε τρεις φάσεις:

1. Εκθετική (exponential) φάση: Μόλις έχει αρχίσει ο πολλαπλασιασμός της αλληλουχίας στόχου. Όλα τα αντιδραστήρια βρίσκονται σε επάρκεια και η αντίδραση είναι πολύ αποτελεσματική. Σε κάθε κύκλο διπλασιάζονται τα μόρια της αλληλουχίας στόχου.
2. Γραμμική (linear) φάση: Παρατηρείται μειωμένη παραγωγή αντιγράφων της αλληλουχίας στόχου εξαιτίας της μείωσης της ποσότητας των αντιδραστηρίων.
3. Φάση πλατώ (plateau): Δεν συντίθενται νέα μόρια DNA εξαιτίας της εξάντλησης ενός ή περισσότερων αντιδραστηρίων.

6.4.3 Τα συστατικά της PCR

Τα βασικά συστατικά για τη διενέργεια της αντίδρασης PCR είναι:

DNA πολυμεράση.

Η DNA πολυμεράση είναι ένα ένζυμο που υπάρχει σε όλους τους οργανισμούς (ευκαρυωτικοί, προκαρυωτικοί και ιοί) και συμμετέχει στην αντιγραφή του DNA. Δεν μπορεί να συνθέσει ένα νέο μόριο DNA, μπορεί όμως να αντιγράψει ένα υπάρχον που χρησιμοποιείται ως εκμαγείο. Η πολυμεράση που χρησιμοποιείται στην PCR έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Thermus aquaticus* (Taq), το οποίο έχει ως φυσικό περιβάλλον τις θερμές πηγές. Η Taq πολυμεράση έχει τη βασική ιδιότητα να παραμένει δραστική σε υψηλές θερμοκρασίες. Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της είναι 72°C, ενώ δεν καταστρέφεται από τη θέρμανση ακόμη και στους 95°C για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα.

Ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές

Οι εκκινητές (Primers) είναι ολιγονουκλεοτίδια που οριοθετούν το τμήμα του DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Ο σωστός σχεδιασμός των εκκινητών επηρεάζει σημαντικά το αποτέλεσμα της PCR. Υπάρχουν στο διαδίκτυο ειδικά λογισμικά που μας βοηθούν να σχεδιάσουμε εκκινητές, όπως το BLAST.

Οι εκκινητές είναι συνήθως ολιγονουκλεοτίδια 18-30 βάσεων. Μικρότεροι εκκινητές οδηγούν σε μη ειδικό υβριδισμό, ενώ μεγαλύτεροι εκκινητές έχουν μεγαλύτερη ειδικότητα, αλλά αυξάνεται η πιθανότητα δημιουργίας δευτερογενών δομών που μειώνουν την αποτελεσματικότητα του υβριδισμού.

Οι εκκινητές πρέπει να έχουν απόλυτη συμπληρωματικότητα προς την αλληλουχία στόχο, αλλά ελάχιστη έως καθόλου συμπληρωματικότητα μεταξύ τους.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα είναι:

Πίνακας 4. Αλληλουχία του τμήματος του μιτοχονδριακού γονιδίου του 16S rRNA που χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές. (Sarri, και συν. 2014)

16S rRNA Forward	5'- AYAAGACGAGAAGACCC- 3'
16S rRNA Reverse	5- GATTGCGCTGTTATTCC- 3'

Γενετικό υλικό-αλληλουχία στόχος

Ως αρχικό υλικό μπορεί να χρησιμοποιηθεί DNA ή RNA το οποίο θα έχει μεταγραφεί στην πιο σταθερή μορφή του, το συμπληρωματικό DNA (Complementary DNA, cDNA). Πολύ μικρές ποσότητες DNA είναι επαρκείς για τις περισσότερες αντιδράσεις PCR, ενώ μεγάλες ποσότητες DNA μπορεί να αναστείλει την αντίδραση. Για τη βέλτιστη απόδοση της PCR, το DNA πρέπει να είναι μακρομοριακό και υψηλής καθαρότητας, απαλλαγμένο από υπολείμματα αιθανόλης ή αλάτων που μπορούν να αναστείλουν την αντίδραση.

Ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης και Mg^{2+}

Το διάλυμα της αντίδρασης διατηρεί το pH και τη συγκέντρωση αλάτων στις βέλτιστες συνθήκες διεξαγωγής της αντίδρασης. Περιέχει επίσης ιόντα Mg^{2+} , που είναι απαραίτητος συμπαραγόντας της DNA πολυμεράσης.

Τα ιόντα Mg^{2+} σχηματίζουν διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs, το DNA εκμαγείο και του εκκινητές. Περίσσεια Mg^{2+} οδηγεί σε μη ειδική σύνδεση των εκκινητών με το DNA, αυξάνοντας τα μη ειδικά προϊόντα στην αντίδραση. Επίσης μειώνει την πιστότητα της αντιγραφής της Taq πολυμεράσης. Χαμηλές συγκεντρώσεις Mg^{2+} οδηγούν σε μείωση της ποσότητας του παραγόμενου προϊόντος.

Νουκλεοτίδια (dNTPs)

Τα δομικά μόρια που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας είναι τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (deoxynucleotide triphosphates, dNTPs). Τα dNTPs χρησιμοποιούνται ως ισομοριακό μίγμα των τεσσάρων νουκλεοτιδίων (ATP, TTP, CTP, GTP) (Παπανικολάου et al. 2015)

Στο πείραμα έπρεπε να υπολογίσουμε τις ποσότητες από το κάθε συστατικό που θα χρησιμοποιήσουμε. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι αρχικές και οι επιθυμητές συγκεντρώσεις.

Πίνακας 5. Αρχικές και επιθυμητές συγκεντρώσεις για την αντίδραση της PCR.

Αρχικές Συγκεντρώσεις	Επιθυμητές Συγκεντρώσεις
Buffer 10x	Buffer 1x
MgCl ₂ 25 mM	MgCl ₂ 2 mM
dNTPs 10 mM	dNTPs 0.2 mM
Primers 50pm/μl	Primers 0.6 pm/μl
Taq 5U/ μl	Taq 1U/ μl
H ₂ O	Έως 50 μl

Σε κάθε σωληνάκι errendorf η τελική ποσότητα θα πρέπει να είναι 50μl.

Κάνοντας τις πράξεις, υπολογίζεται ότι σε κάθε errendorf πρέπει να υπάρχουν οι παρακάτω ποσότητες:

Πίνακας 6. Τελικές ποσότητες για την αντίδραση της PCR.

Ποσότητες για PCR	
<i>Buffer</i>	5 μl
<i>MgCl₂</i>	1 μl
<i>dNTPs</i>	1 μl
<i>Primer Forward</i>	1 μl
<i>Primer Reverse</i>	1 μl
<i>Taq</i>	0.25 μl
<i>DNA</i>	2 μl
<i>H₂O</i>	38,75 μl

Για τη διαδικασία της PCR το πρώτο βήμα είναι η παρασκευή ενός κοινού διαλύματος (master mix). Το διάλυμα αυτό παρασκευάζεται ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων και περιέχει όλα τα συστατικά της PCR, εκτός από το DNA. Μετά την παρασκευή του, αναδεύεται το διάλυμα στο Vortex για να γίνει καλή ανάμιξη των συστατικών του.

Σε σωληνάκια errendorf τοποθετείται το δείγμα DNA και σε αυτά προσθέτουμε 48 μl από το master mix. Σε ένα άδειο errendorf, που δεν περιέχει DNA, προσθέτουμε 48 μl από το master mix, το δείγμα αυτό αποτελεί τον μάρτυρα με το οποίο συγκρίνουμε τα αποτελέσματα της PCR για πιθανές επιμολύνσεις. Τα errendorf

φυγοκεντρούνται και μεταφέρονται στον θερμοκυκλοποιητή, ο οποίος προγραμματίζεται να εκτελέσει το επιθυμητό πρόγραμμα θερμοκρασίας/χρόνου. Μετά την ολοκλήρωση του προγράμματος της PCR, θα πρέπει το τμήμα που θέλουμε να έχει ενισχυθεί.

Για τον έλεγχο της επιτυχίας της αντίδρασης PCR πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2%.

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε η αντίδραση της PCR για την ενίσχυση ενός τμήματος του 16S rRNA γονιδίου, το οποίο διαφοροποιείται ανάμεσα στα είδη, με σκοπό την ανίχνευση προσμίξεων σε αλλαντικά γαλοπούλας.

6.5. Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP)

Η ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας DNA (Single Strand Conformation Polymorphism/ SSCP) αποτελεί μία από τις κυριότερες μεθόδους ανίχνευσης των προϊόντων της PCR που παρουσιάζουν σημειακές μεταλλάξεις σε σχέση με το προϊόν του φυσικού τύπου (Orti, Hare and Avise 1997). Το DNA του δείγματος που μελετάται εξετάζεται και συγκρίνεται με το φυσιολογικό και με τα άλλα δείγματα.

Η SSCP αποτελεί σήμερα την απλούστερη και πιο χρησιμοποιούμενη μέθοδο ανίχνευσης μεταλλάξεων. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο ότι η διαμόρφωση του μονόκλωνου DNA που οφείλεται σε ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις είναι χαρακτηριστική για κάθε αλληλουχία DNA. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των μονόκλωνων μορίων του DNA εξαρτάται από τη διαμόρφωσή τους, η οποία σχετίζεται με το μέγεθος και τη σύστασή τους σε βάσεις. Επομένως, δύο μονόκλινα μόρια DNA που διαφέρουν έστω και ως προς μία βάση αποκτούν διαφορετική διαμόρφωση και μετακινούνται με διαφορετική ταχύτητα κατά την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης χωρίς αποδιατακτικούς παράγοντες (Orita, et al. 1989).

Έτσι για τον έλεγχο αυτό, ενισχύεται με PCR η περιοχή του DNA που πρέπει να ελεγχθεί για την ύπαρξη μεταλλάξεων ή πολυμορφισμού. Το προϊόν της PCR αποδιατάσσεται σε υψηλές θερμοκρασίες και φορτώνεται σε πηκτή πολυακρυλαμίδης συγκεκριμένης συγκέντρωσης και χωρίς αποδιατακτικούς παράγοντες. Όταν το τμήμα του DNA που ελέγχεται δε φέρει καμία μετάλλαξη, τότε η κινητικότητα όλων των μορίων είναι ίδια και συνήθως μετά τη χρώση της πηκτής εμφανίζονται δύο ζώνες που αντιστοιχούν στις δύο συμπληρωματικές αλυσίδες του DNA.

Το μεγάλο πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η δυνατότητα της να ανιχνεύει ακόμα και ελάχιστες διαφορές στην αλληλουχία του DNA ταυτόχρονα σε πολλά PCR προϊόντα.

Η μέθοδος αυτή επιλέχθηκε για την ανίχνευση πιθανών μεταβολών του γενετικού υλικού (μεταλλάξεων και πολυμορφισμών) του μιτοχονδριακού DNA, συγκεκριμένα του γονιδίου 16S rRNA, το οποίο μελετάμε στην παρούσα εργασία, σε αλλαντικά γαλοπούλας.

Η ανάλυση SSCP αποτελείται από τρία στάδια: την αποδιάταξη των προϊόντων της PCR, την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και τη χρώση της πηκτής.

6.5.1. Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδης

Στην ανάλυση SSCP, η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε πήκτωμα ακρυλαμίδης, ένα μονομερές το οποίο πολυμερίζεται σε μακριές αλυσίδες παρουσία ελεύθερων ριζών οι οποίες με τη σειρά τους διασυνδέονται παρουσία της N,N-μεθυλεν-δι-ακρυλαμίδης, ενός μορίου διασυνδέτη και έτσι σχηματίζεται ένα πορώδες πήκτωμα. Η θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιείται η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης παίζει σημαντικό ρόλο στην SSCP και αυτό γιατί υψηλές θερμοκρασίες μπορούν να μειώσουν το επίπεδο της διακριτικής ικανότητας, επομένως είναι πολύ σημαντικό η ηλεκτροφόρηση να πραγματοποιείται σε σταθερή θερμοκρασία. Ένας άλλος πολύ σημαντικός παράγοντας είναι το pH. Η προσθήκη γλυκερόλης στο πήκτωμα ακρυλαμίδης μειώνει το pH και το αποτέλεσμα είναι η αυξημένη ευαισθησία της SSCP (Kukita, et al. 1997). Επίσης το μήκος των τμημάτων επηρεάζει την ανάλυση SSCP και για βέλτιστα αποτελέσματα το μέγεθος των τμημάτων DNA θα πρέπει να εμπίπτει εντός του εύρους 150 με 300 bp. Ωστόσο, η παρουσία γλυκερόλης στο πήκτωμα μπορεί να επιτρέψει ανάλυση και μεγαλύτερου μεγέθους τμήματα DNA σε αποδεκτή ευαισθησία. Τέλος, σημαντική επίδραση στην διακριτική ικανότητα έχει το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος που επιλέγεται με βάση το μέγεθος του DNA και καθορίζεται από την συγκέντρωση του πηκτώματος (Sunnucks 2000).

Για την παρασκευή ενός πηκτώματος πολυακρυλαμίδης χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω διαλύματα:

Πίνακας 7. Σύσταση πηκτής πολυακρυλαμίδης που χρησιμοποιήθηκε στο συγκεκριμένο πείραμα.

Σύσταση πηκτής πολυακρυλαμίδης 12%

Acrylamide

7,5 gr

<i>bis- Acrylamide</i>	0,19 gr
<i>Glycerol 50%</i>	6,25 ml
<i>TBE 10x</i>	3,2 ml
<i>TEMED</i>	62,5 μl
<i>APS 20%</i>	375 μl
<i>dd H₂O</i>	62,5 ml

Η διαδικασία που ακολουθούμε είναι η εξής:

1. Προετοιμάζουμε την συσκευή παρασκευής του πηκτώματος.
2. Σε ποτήρι ζέσεως αναδεύουμε τα παραπάνω υλικά με μαγνητάκι, εκτός από το TEMED και το APS.
3. Φιλτράρουμε με διηθητικό χαρτί και σε έναν ογκομετρικό κύλινδρο ρίχνουμε προσεκτικά (ροή σταγόνας) το διάλυμα.
4. Συμπληρώνουμε μέχρι τα 62,5 ml με νερό και μεταφέρουμε το διάλυμα σε κωνική φιάλη.
5. Προσθέτουμε το TEMED και το APS. Τα διαλύματα αυτά πολυμερίζουν την ακρυλαμίδα. Μετά την προσθήκη γίνεται μια σύντομη ανάδευση του μίγματος, ρίχνουμε γρήγορα και προσεκτικά το διάλυμα στα ειδικά τζάμια, που χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό της πηκτής και τοποθετούμε τα ειδικά “χτενάκια” για να δημιουργηθούν πηγαδάκια.
6. Περιμένουμε να πήξει το διάλυμα, αφαιρούμε τα χτενάκια και καθαρίζουμε τα πηγαδάκια από τυχόν υπολείμματα πηκτώματος.
7. Μεταφέρουμε τα τζάμια που περιέχουν το πηκτωμα στη συσκευή ηλεκτρόφορησης και προσθέτουμε 0,5x TBE στη συσκευή.
8. Τοποθετούμε τα δείγματα στα πηγαδάκια και αρχίζει η ηλεκτροφόρηση στα 240V σε RT overnight.

6.5.2. Προετοιμασία των δειγμάτων και αποδιάταξη των προϊόντων PCR

Για την αποδιάταξη των τμημάτων DNA χρησιμοποιήθηκε αποδιατακτικό διάλυμα:

- ✓ Αποδιατακτικό διάλυμα
Formamide 95%
Bromophenol blue 0,05%
Xylene Cyanol 0,05%
NaOH 10mM

Σε 5 μl προϊόντος PCR προστίθενται 10μl αποδιατακτικού διαλύματος και τα δείγματα αποδιάσσονται για 7 min στους 99°C. Σκοπός της αποδιάταξης είναι η μετατροπή των δίκλωνων τμημάτων DNA σε μονόκλινα. Ακολουθώντας τα δείγματα τοποθετούνται σε πάγο όπου διατηρούνται σε μονόκλινη κατάσταση. Τέλος, με

μικροπιπέτα τοποθετούμε τα δείγματα στα πηγαδάκια του πηκτώματος πολυακρυλαμίδης.

6.5.3 Χρώση πηκτών πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο

Για την εμφάνιση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης γίνεται χρώση των πηκτών με νιτρικό άργυρο. Η τεχνική αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι ο άργυρος συνδέεται στο DNA και στη συνέχεια αντιδρά με την φορμαλδεΐδη, παρουσία βάσης. Οι ζωνώσεις του DNA εμφανίζονται με καφέ χρώμα σε κίτρινο φόντο (Sambrook et al. 2000). Για τη χρώση χρησιμοποιούνται τα εξής διαλύματα:

- ✓ Διάλυμα 1 (400ml)
EtOH 2%
Acetic acid 0,125%
ddH₂O ως τα 400ml

- ✓ Διάλυμα 2 (200ml)
Διάλυμα AgNO₃ 1 gr/lit

- ✓ Διάλυμα 3 (200ml)
NaOH 0,015 M
NaBH₄ 50 μM
Formaldehyde 0,2%
ddH₂O ως τα 200ml

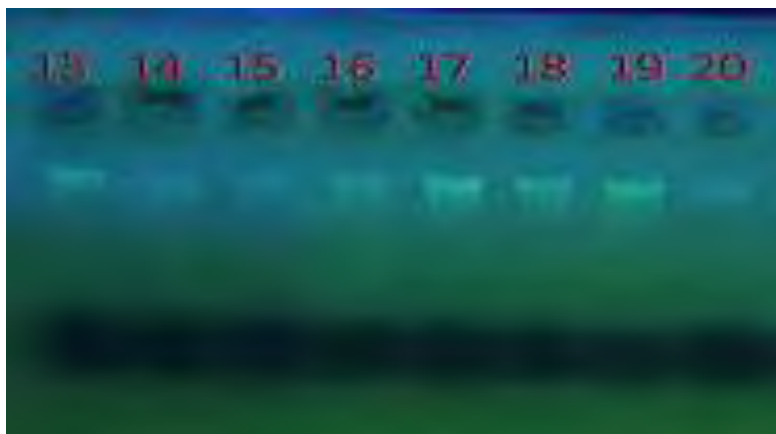
Στο πρώτο στάδιο της χρώσης, η πηκτή εμβαπτίζεται σε 200 ml του διαλύματος 1 και αναδεύεται για 1 min. Το διάλυμα 1 απομακρύνεται και η διαδικασία επαναλαμβάνεται. Ακολουθεί πλύση των πηκτών με απεσταγμένο νερό για 1 min υπό ανάδευση. Στο δεύτερο στάδιο, προστίθεται το διάλυμα νιτρικού αργύρου και η πηκτή επώαζεται για 10-15 min υπό ανάδευση. Στη συνέχεια, πραγματοποιούνται 2 πλύσεις με απεσταγμένο νερό, διάρκειας 1 min η κάθε μία υπό ανάδευση. Στο τρίτο στάδιο, προστίθεται το διάλυμα 3 και πραγματοποιείται ανάδευση μέχρι την εμφάνιση ορατών ζωνών στην πηκτή. Τέλος, πραγματοποιείται μια πλύση λίγων δευτερολέπτων με απεσταγμένο νερό.

7. Αποτελέσματα

Απομόνωση DNA

Η απομόνωση του DNA έγινε με τη διαδικασία που έχει αναφερθεί στο προηγούμενο κεφάλαιο και ο έλεγχος των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με

ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Στην εικόνα 5 παρουσιάζονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα της απομόνωσης σε πήκτωμα αγαρόζης.

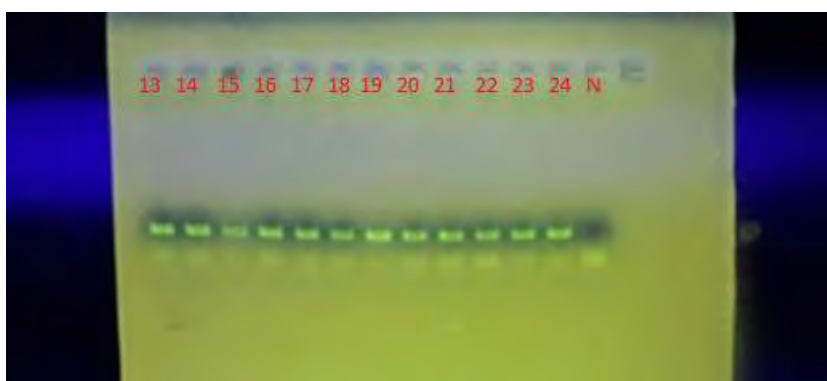


Εικόνα 5. Ενδεικτική απεικόνιση της ηλεκτροφόρησης γενωμικού DNA σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Στην εικόνα απεικονίζονται τα δείγματα 13 έως 22.

Η ένταση της φωτεινότητας και το πάχος κάθε ζώνης αποτελούν ένδειξη της ποσότητας του DNA που απομονώθηκε. Η ποσότητα που βρέθηκε είναι ικανοποιητική για τα δείγματα 13-20, οπότε προχωρήσαμε σε PCR.

Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Στη συνέχεια, με PCR πολλαπλασιάσαμε τμήμα του γονιδίου 16S rRNA του μιτοχονδρίου για όλα τα δείγματα, μετά από επιτυχή απομόνωση DNA. Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 2% για τον έλεγχο της ενίσχυσης επιθυμητού τμήματος του γονιδίου 16S rRNA. Η εικόνα 6 είναι ενδεικτική της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.

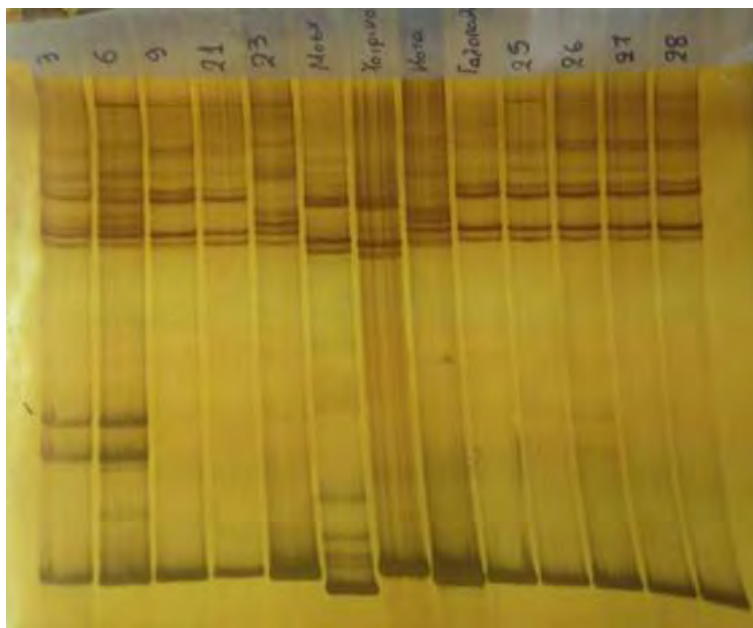


Εικόνα 6. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Η PCR ήταν επιτυχής για όλα τα δείγματα. Το Negative (N) χρησιμοποιείται ως αρνητικός μάρτυρας.

Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP)

Η SSCP πραγματοποιήθηκε για την ανίχνευση προσμίξεων σε αλλαντικά γαλοπούλας, χρησιμοποιώντας τα προϊόντα της PCR που ενισχύθηκαν.

Στην εικόνα 7 φαίνονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα μίας ανάλυσης SSCP (ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης), χρησιμοποιώντας ως πρότυπα το μοσχάρι, χοιρινό, κοτόπουλο και γαλοπούλα.



Εικόνα 7. Ανάλυση SSCP διαφόρων δειγμάτων.

Το αποτέλεσμα της SSCP είναι η ανίχνευση προσμίξεων με άλλα είδη κρέατος σε ορισμένα αλλαντικά γαλοπούλας.

Στον παρακάτω πίνακα αποτυπώνονται τα αποτελέσματα από όλα τα δείγματα.

Πίνακας 8. Αποτελέσματα και των 41 δειγμάτων ως προς την περιεκτικότητα στα είδη κρέατος.

Αριθμός Δείγματος	Ανίχνευση είδους κρέατος	Αριθμός Δείγματος	Ανίχνευση είδους κρέατος
Δείγμα 1	Γαλοπούλα	Δείγμα 22	Γαλοπούλα
Δείγμα 2	Γαλοπούλα	Δείγμα 23	Κότα
Δείγμα 3	Γαλοπούλα, Κότα	Δείγμα 24	Γαλοπούλα
Δείγμα 4	Γαλοπούλα	Δείγμα 25	Γαλοπούλα, Χοιρινό
Δείγμα 5	Γαλοπούλα	Δείγμα 26	Γαλοπούλα, Χοιρινό

Δείγμα 6	Γαλοπούλα,Κότα	Δείγμα 27	Γαλοπούλα
Δείγμα 7	Γαλοπούλα	Δείγμα 28	Γαλοπούλα
Δείγμα 8	Γαλοπούλα	Δείγμα 29	Γαλοπούλα
Δείγμα 9	Γαλοπούλα	Δείγμα 30	Γαλοπούλα
Δείγμα 10	Γαλοπούλα	Δείγμα 31	Γαλοπούλα
Δείγμα 11	Γαλοπούλα	Δείγμα 32	Γαλοπούλα
Δείγμα 12	Γαλοπούλα	Δείγμα 33	Γαλοπούλα
Δείγμα 13	Γαλοπούλα	Δείγμα 34	Γαλοπούλα
Δείγμα 14	Γαλοπούλα	Δείγμα 35	Γαλοπούλα
Δείγμα 15	Γαλοπούλα	Δείγμα 36	Γαλοπούλα
Δείγμα 16	Γαλοπούλα	Δείγμα 37	Γαλοπούλα
Δείγμα 17	Γαλοπούλα	Δείγμα 38	Χοιρινό,Κότα
Δείγμα 18	Γαλοπούλα	Δείγμα 39	Γαλοπούλα
Δείγμα 19	Γαλοπούλα	Δείγμα 40	Κότα
Δείγμα 20	Γαλοπούλα	Δείγμα 41	Γαλοπούλα
Δείγμα 21	Γαλοπούλα		

Για κάποια συσκευασμένα δείγματα είχαμε τα συστατικά που αναγράφονταν στην ετικέτα. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται αυτά τα δείγματα:

Πίνακας 9. Αναγραφόμενα συστατικά μερικών δειγμάτων και τα συστατικά που προέκυψαν μετά την ανάλυση.

Δείγμα	Αναγραφόμενα Συστατικά	Συστατικά που προέκυψαν μετά την ανάλυση
<i>Δείγμα 4</i>	Κρέας Γαλοπούλας(63%)	Γαλοπούλα
<i>Δείγμα 6</i>	Κρέας Γαλοπούλας(50%) και κρέας κότας (10%)	Γαλοπούλα και Κότα
<i>Δείγμα 11</i>	Κρέας Γαλοπούλας (60%)	Γαλοπούλα
<i>Δείγμα 12</i>	Κρέας Γαλοπούλας (70%)	Γαλοπούλα
<i>Δείγμα 13</i>	Φιλέτο Γαλοπούλας(55%)	Γαλοπούλα
<i>Δείγμα 24</i>	Φιλέτο Γαλοπούλας(90%)	Γαλοπούλα

Συζήτηση

Το κρέας αποτελεί σημαντικό κομμάτι της διατροφής των σύγχρονων ανθρώπων. Η αυξανόμενη κατανάλωση του τα τελευταία χρόνια οδήγησε στην υιοθέτηση μη σωστών πρακτικών, οι οποίες έχουν ως κύριο στόχο το κέρδος. Έχουν γίνει προσπάθειες συμμόρφωσης των βιομηχανιών με την θέσπιση νόμων και συστημάτων ιχνηλασιμότητας, κάτι το οποίο δεν είχε το επιθυμητό αποτέλεσμα. Η νοθεία του κρέατος παραμένει ένα πρόβλημα και έχει δημιουργηθεί η ανάγκη για την ανάπτυξη ενός συστήματος ελέγχου της νοθείας και ταυτοποίησης των ειδών.

Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκαν μοριακές τεχνικές με σκοπό την μοριακή ταυτοποίηση διαφόρων ειδών κρέατος σε αλλαντικά γαλοπούλας. Η διαδικασία στηρίχτηκε στον εντοπισμό σημειακών μεταλλάξεων μεταξύ των ειδών με τη διαδικασία της SSCP. Στόχος ήταν ο έλεγχος προσμίξεων σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης με μοριακούς δείκτες.

Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο PCR-SSCP, αναλύσαμε ένα τμήμα του γονιδίου 16S rRNA του μιτοχondριακού DNA. Η τεχνική αυτή είναι αξιόπιστη, γρήγορη και οικονομική. Τέσσερα είναι τα στάδια της μεθόδου: **1)** απομόνωση του mtDNA από αλλαντικά, **2)** ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος του γονιδίου 16S rRNA, **3)** αποδιάταξη των ενισχυμένων τμημάτων DNA, **4)** ηλεκτροφόρηση τους σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και εμφάνιση των αποτελεσμάτων.

Με τη μέθοδο της απομόνωσης λάβαμε αρκετά μεγάλη ποσότητα DNA. Αρκετά τμήματα του μιτοχondριακού DNA είναι συντηρημένα, δίνοντας τη δυνατότητα να χρησιμοποιήσουμε παγκόσμιους εκκινητές, για την ενίσχυση του τμήματος του γονιδίου 16S rRNA. Η χρήση των εκκινητών αυτών, απλοποιεί κατά πολύ την εφαρμογή της τεχνικής της PCR.

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και η εμφάνιση των αποτελεσμάτων, μετά από χρώση με νιτρικό άργυρο, ήταν ικανοποιητική, δίνοντας ευδιάκριτες ζωνώσεις.

Με την τεχνική SSCP καταφέραμε να διακρίνουμε και τα 4 είδη κρέατος (μοσχάρι, χοιρινό, κότα και γαλοπούλα) τόσο στα πρότυπα, όσο και εντός των δειγμάτων.

Από τα 41 δείγματα που ελέγχθηκαν, τα επτά ήταν νοθευμένα. Πιο συγκεκριμένα, δύο δείγματα περιείχαν κότα και γαλοπούλα, δύο δείγματα περιείχαν γαλοπούλα και χοιρινό, 2 δείγματα μόνο κότα και σε ένα δείγμα εντοπίστηκε χοιρινό και κότα. Δηλαδή, το 17% των δειγμάτων που ελέγχθηκαν, εντοπίστηκε νοθεία με

διαφορετικό είδος κρέατος. Κάτι τέτοιο οδηγεί στο συμπέρασμα ότι στη χώρα μας δεν γίνονται επαρκείς έλεγχοι ως προς την νοθεία των αλλαντικών.

Επιπρόσθετα, σύμφωνα με τα αναγραφόμενα συστατικά που είχαμε από ορισμένα δείγματα, μόνο 1 στα 7 δείγματα είχε λανθασμένη σήμανση. Δηλαδή, το 14% των δειγμάτων έχει λανθασμένη σήμανση.

Με τη μέθοδο και τα αποτελέσματα που αναφέραμε, φαίνεται ότι είναι εφικτός ο έλεγχος προσμίξεων κρεάτων σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Ο δείκτης που χρησιμοποιήσαμε είναι ικανός να εντοπίσει διαφορετικά είδη κρέατος μέσα σε ένα τρόφιμο. Κάτι τέτοιο θα μπορούσε να καταστήσει αυτόν τον μοριακό δείκτη πολύτιμο εργαλείο στον έλεγχο της αυθεντικότητας και την καταπολέμηση της νοθείας τροφίμων ζωικής προέλευσης κατά την πορεία της εμπορίας τους.

Ωστόσο, για την ποσοτικοποίηση της γαλοπούλας στα δείγματα αλλαντικών μπορεί να εφαρμοστεί Real-Time PCR. Στη Real-Time PCR, η μέτρηση της ποσότητας του προϊόντος πραγματοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω της παρακολούθησης της αύξησης του φθορισμού κάποιας φθορίζουσας ουσίας(π.χ. SYBR Green). Στη συγκεκριμένη περίπτωση, ο φθορισμός μετριέται σε κάθε κύκλο της PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot). Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος. Οι μετρήσεις για την ποσοτικοποίηση αφορούν την εκθετική φάση της αντίδρασης. Σημαντική παράμετρο για την ποσοτικοποίηση αποτελεί η τιμή Ct (threshold cycle). Πρόκειται για τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης ενίσχυσης που απαιτούνται ώστε η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού να προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο (threshold). Η τιμή του ορίου αυτού ορίζεται πάνω από την αντίστοιχη του μη-ειδικού σήματος (background). Η τιμή Ct είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος: όσο μικρότερη είναι η τιμή Ct τόσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος (Bustin et al., 2005; Kubista et al., 2006). Σύμφωνα με αυτά τα αποτελέσματα, δημιουργούνται καμπύλες ποσοτικοποίησης. Με τον καλύτερο συντελεστή συσχέτισης R^2 , χρησιμοποιείται η εξίσωση και υπολογίζεται η ποσότητα της γαλοπούλας. Γίνεται, έτσι, αντιληπτό ότι είναι δυνατή τόσο η ανάλυση των δειγμάτων ως προς την περιεκτικότητα τους όσο και η ποσοτικοποίηση των συστατικών τους.

Βιβλιογραφία

1. Anne, Chenuil. 2006. "Choosing the Right Molecular Genetic Markers for Studying Biodiversity: From Molecular Evolution to Practical Aspects." *Genetica* 127(1–3): 101–20.
2. Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR - A perspective. *J Mol Endocrinol.* 2005;34(3):597-601. doi:10.1677/jme.1.01755
3. Chinnery, Patrick Francis, and Gavin Hudson. 2013. "Mitochondrial Genetics." *British Medical Bulletin* 106(1): 135–59.
4. Chuah LO, He X Bin, Effarizah ME, Syahariza ZA, Shamila-Syuhada AK, Rusul G. Mislabelling of beef and poultry products sold in Malaysia. *Food Control.* 2016;62:157-164. doi:10.1016/j.foodcont.2015.10.030
5. Desjardins P, Morais R. Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome. A novel gene order in higher vertebrates. *J Mol Biol.* 1990;212(4):599-634. doi:10.1016/0022-2836(90)90225-B
6. European Parliament, Council of European Union. *Regulation (EC) No 853/2004 Laying down Specific Hygiene Rules for Food of Animal Origin.* Vol L 139.; 2004:55.

7. Kukita Y, Tahira T, Sommer SS, Hayashi K. SSCP analysis of long DNA fragments in low pH gel. *Hum Mutat.* 1997;10(5):400-407. doi:10.1002/(SICI)1098-1004(1997)10:5<400::AID-HUMU11>3.0.CO;2-3
8. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* 2006;27(2-3):95-125. doi:10.1016/j.mam.2005.12.007
9. Lobbert R. Τρόφιμα. Είδη, Ποιότητα, Εμπόριο. ISBN: 978-960-331-472-1. 2011. 5:139-160
10. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci.* 1989;86(8):2766-2770. doi:10.1073/pnas.86.8.2766
11. Ortí G, Hare MP, Avise JC. Detection and isolation of nuclear haplotypes by PCR-SSCP. *Mol Ecol.* 1997;6(6):575-580.
12. Raspor P. Bio-markers: Traceability in food safety issues. In: *Acta Biochimica Polonica.* Vol 52. ; 2005:659-664. doi:055203659 [pii]
13. Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition. *Cold Spring Harb Lab Press.* 2001;1-3:A2.3. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7557476>.
14. Sarri C, Stamatis C, Sarafidou T, et al. A new set of 16S rRNA universal primers for identification of animal species. *Food Control.* 2014;43:35-41. doi:10.1016/j.foodcont.2014.02.036
15. Slatkin M. Avise, J. C. (1993); Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman and Hall. Price £75.00. ISBN: 0-412-03771-8(hb). ISBN: 0-412-03981(pb). *J Evol Biol.* 1994;7(6):766-767. doi:10.1046/j.1420-9101.1994.7060766.x
16. Stamatis C, Sarri CA, Moutou KA, et al. What do we think we eat? Single tracing method across foodstuff of animal origin found in Greek market. *Food Res Int.* 2015;69:151-155. doi:10.1016/j.foodres.2014.12.033
17. Stamoulis P, Stamatis C, Sarafidou T, Mamuris Z. Development and application of molecular markers for poultry meat identification in food chain. *Food Control.* 2010;21(7):1061-1065. doi:10.1016/j.foodcont.2009.12.027
18. Sunnucks P. Efficient genetic markers for population biology. *Trends Ecol Evol.* 2000;15(5):199-203. doi:10.1016/S0169-5347(00)01825-5
19. Warriss PD. Meat science : an introductory text. *CABI Publ.* 2000:234-239. https://books.google.co.za/books/about/Meat_Science.html?id=mHvuFckPGikC&redir_esc=y.

Ελληνική Βιβλιογραφία

1. Αναστασόπουλος, Η. Σημειώσεις Βιοτεχνολογίας. Εκπαιδευτικό υλικό, Λάρισα:ΤΕΙ Λάρισας, 2004.
2. Αρσένος, Γ. Περιγραφή Στρατηγικών Δράσεων ΕΤΑΚ στην Ζωική παραγωγή για τα έτη 2016-2017. *Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας*, 2016.

3. ΓΕΝΙΚΟ ΧΗΜΕΙΟ ΚΡΑΤΟΥΣ ΑΝΩΤΑΤΟ ΧΗΜΙΚΟ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟ. «Κωδικοποίηση και μεταγλώττιση των διατάξεων του Κώδικα Τροφίμων και Ποτών με σύστημα κινητών φύλλων.» 1987.
4. Γεωργάκης, Σ.Α., Κ.Π. Βαρελτζής, και Ι.Α. Αμβροσιάδης. *Τεχνολογία τροφίμων ζωικής προέλευσης*. ISBN:960-357-040-0. 2002.
5. ΕΦΕΤ. «Καθορισμός των γενικών αρχών και απαιτήσεων της νομοθεσίας για τα τρόφιμα.» 2002.
6. ΕΦΕΤ. «Προϊόντα με βάση το κρέας-Παρασκευάσματα κρέατος.» Κώδικας Τροφίμων, 2014.
7. Θεοδώρου, Ε. «Συστήματα Ιχνηλασιμότητας Τροφίμων - Βασικές Αρχές, Στρατηγική Σημασία και Βήματα Υλοποίησης.» 2005.
8. Κοντομηνάς, Μ. «Χημεία Τροφίμων.Χημεία και Τεχνολογία Κρέατος.» Εκπαιδευτικό υλικό, Ιωάννινα, 2014.
9. Κυριακίδης, Σ. *Ιχνηλασιμότητα και ασφάλεια των τροφίμων*. Διημερίδα: «Διαχείριση Ασφάλειας στην Αλυσίδα Τροφίμων – Εφαρμογή HACCP. Εμπειρίες – Γενικό Χημείο του Κράτους - Διεύθυνση Τροφίμων, 2005.
10. Λαπιδάκης, Ν. «Το κρέας και τα προϊόντα του.» Εκπαιδευτικό υλικό, ΤΕΙ Κρήτης, 2017.
11. Μπισοδίκος, Δ. «Κατηγοριοποίηση και τεχνολογία αλλαντικών.» 2010.
12. Παπανικολάου, Γ., Παλαιολόγου, Δ. et al. Εργαστηριακές ασκήσεις γενετικής του ανθρώπου. ISBN:978-960-603-310-0. 2015. (7,8) 129- 165
13. Ρήγας, Κ. «Προσομοίωση και βελτιστοποίηση της θερμικής επεξεργασίας αλλαντικών (σαλαμιού γαλοπούλας) με τη χρήση υπολογιστικής ρευστοδυναμικής σε βιομηχανικό επίπεδο.» Μεταπτυχιακή Διατριβή, Αθήνα, 2010.
14. Τοτακλίδης,Ι., Σιναπίδου, Ε. «Γενετικά τροποποιημένα φυτά», Εκπαιδευτικό υλικό, 2009
15. Τσακνής, Ι., Τύμπης Δ., Γκόρτζη Ο., Λάλας Σ., Σουλιώτης Α., και Τσακάλη Ε. «Εστίαση,Έλεγχος ποιότητας και ασφάλειας των τροφίμων.» 30-60. 2017.
16. Φωτεινιάς, Ν. «Ανάπτυξη μεθόδου ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού αίγειου γάλακτος στη Φέτα.» Μεταπτυχιακή Διατριβή, Λάρισα, 2015.
17. Ψαρουδάκη, Α. «Εισαγωγή στην Επιστήμη της Διατροφής και Διαιτολογίας.» Εκπαιδευτικό υλικό, 2007.