



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διπλωματική Μελέτη

**«Επίπεδα πολυμορφισμού της α_{s1} -καζεΐνης σε
ελληνικές αγελάδες Holstein»**

**«Level of Polymorphism in α_{s1} -casein gene in Greek
Holstein breed»**



Τρικαλινού Κωνσταντίνα

Λάρισα, 2018

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών
Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας
και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

ΜΟΥΤΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας
Σπονδυλωτών του Τμήματος Βιοχημείας
και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

ΣΤΑΜΑΤΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

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

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	4
Περίληψη.....	6
Abstract	7
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1 Ιστορική αναδρομή.....	8
1.2 Βοοτροφία στη Ελλάδα	9
1.3 Η Φυλή Holstein.....	11
1.4 Είδη γάλακτος:	12
1.5 Συστατικά του γάλακτος.....	13
1.5.1 Το λίπος του γάλακτος	15
1.5.2 Τα σάκχαρα του γάλατος	16
1.5.3 Πρωτεΐνες του γάλακτος	17
Καζεΐνη.....	18
Κλάσματα καζεΐνης.....	19
Μικκύλια	20
Πρωτεΐνες ορού του γάλακτος	24
Δευτερεύοντες Πρωτεΐνες	25
1.5.4 Λοιπά συστατικά του γάλακτος	27
1.6 Πολυμορφισμός πρωτεϊνών γάλακτος.....	28
1.6.1 Εισαγωγή.....	28
Ο πολυμορφισμός της α_{s1} -καζεΐνης.....	30
Ο πολυμορφισμός της α_{s2} -καζεΐνης.....	30
Ο πολυμορφισμός της β -καζεΐνης.....	31

Ο πολυμορφισμός της κ-καζεΐνης.....	32
1.7 ΣΚΟΠΟΣ.....	33
2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	34
2.1 Απομόνωση DNA.....	34
2.2 Τεχνική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR).....	35
2.3 Ανάλυση SSCP.....	36
2.4 Καθαρισμός DNA.....	37
3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	38
3.1 Απομόνωση DNA.....	38
3.2 Τεχνική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR).....	38
3.3 Ανάλυση SSCP.....	39
3.4 Αλληλούχηση.....	39
4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	41
5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	45

Περίληψη

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε με στόχο τον έλεγχο του πολυμορφισμού του εξονίου 4 του γονιδίου CSN1S1 που κωδικοποιεί για την α_{s1} -καζεΐνη του γάλακτος των βοοειδών. Για το σκοπό αυτό συλλέχθηκαν δείγματα αίματος από 94 αγελάδες της φυλής Holstein-Friesian, η οποία είναι η πιο διαδεδομένη φυλή γαλακτοπαραγωγής στη χώρα μας.

Η πειραματική διαδικασία περιλάμβανε απομόνωση του DNA και ενίσχυση της επιθυμητής περιοχής του εξονίου 4 με την τεχνική της PCR χρησιμοποιώντας τους κατάλληλους εκκινητές. Στη συνέχεια, τα προϊόντα PCR αναλύθηκαν με τη μέθοδο SSCP και ακολούθησε αλληλούχηση των PCR προϊόντων, έτσι ώστε να βρεθεί η ακριβής δομή της αλληλουχίας των βάσεων, αλλά και πιθανοί πολυμορφισμοί του εξονίου 4 της α_{s1} -καζεΐνης.

Από τα αποτελέσματα της αλληλούχησης δεν προέκυψε κανένας πολυμορφισμός για το σύνολο των ατόμων που μελετήσαμε. Έτσι, είναι απαραίτητο να αναλυθούν και τα υπόλοιπα εξόνια του γονιδίου, ώστε να βρεθούν ποιες παραλλαγές του γονιδίου εμφανίζονται στον πληθυσμό που ελέγξαμε.

Abstract

The present study was conducted to control polymorphism of exon 4 of the CSN1S1 gene coding for bovine milk α_{s1} -casein. For this purpose, 94 blood samples were collected from Holstein-Friesian cows, which is the most widespread dairy breed in our country.

The experimental process involved isolation of DNA and amplification of the desired region of exon 4 by the PCR technique using the appropriate primers. The PCR products were then analyzed by SSCP method and sequencing, so as to find the exact structure of the sequence of bases, but also possible polymorphisms of exon 4 of α_{s1} -casein.

Sequencing analysis did not reveal any polymorphism for all the individuals we studied. Thus, it is necessary to analyze the rest of exons of the gene to find out which variants of the gene appear in the population we tested.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το γάλα είναι ένα θρεπτικό, λευκό ή ελαφρώς κιτρινωπό υγρό, το οποίο αποτελεί βιολογικό έκκριμα των μαστών των θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπινου είδους που προορίζεται για τη διατροφή των νεογνών τους, καθώς αποτελεί τη μοναδική τροφή που μπορούν να καταναλώσουν μέχρι κάποια ηλικία. Η διά του θηλασμού απ' ευθείας μεταφορά του γάλακτος από τους μαστούς στο πεπτικό σύστημα των νεογνών αποτελεί το μικρότερο κύκλωμα παραγωγής - κατανάλωσης που σημειώνεται στη Φύση. (1)

Το γάλα δεν είναι ομοιογενές, αλλά μείγμα διάφορων οργανικών ουσιών και αποτελείται από νερό, λίπος, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, ένζυμα, άλατα και βιταμίνες. Μερικά από τα συστατικά αυτά, όπως το λίπος, είναι δυνατό να χωριστούν από το υπόλοιπο γάλα με μηχανικό τρόπο. (2)

1.1 Ιστορική αναδρομή

Η ιστορία του γάλακτος ξεκίνησε κατά την διάρκεια της Νεολιθικής Επανάστασης, όταν οι άνθρωποι έμαθαν για πρώτη φορά να καταναλώνουν γάλα από διαφορετικά θηλαστικά. Η ιστορία αυτή χρονολογείται το 9000 με 7000 π.Χ. στην Μεσοποταμία, στα οροπέδια του Ιράν και του Αφγανιστάν, όπου πραγματοποιήθηκε η εξημέρωση της κατσίκας και του προβάτου. Δύο χιλιάδες χρόνια αργότερα, εξημερώθηκαν και οι αγελάδες στις περιοχές της Μέσης Ανατολής και σε μερικά τμήματα της Αφρικής. Από τη νοτιοδυτική Ασία τα εξημερωμένα γαλακτοφόρα ζώα επεκτάθηκαν στην Ευρώπη (γύρω στο 7000 π.Χ., χωρίς όμως να φτάσουν στη Μεγάλη Βρετανία και τη Σκανδιναβία μέχρι το 4000 π.Χ.) και στη νότια Ασία (7000-5000 π.Χ.). Το 3500 με 3000 π.Χ. πραγματοποιήθηκε η εξημέρωση των ζώων και στην Αμερική. (3)

Το 1971, Ο ελληνικός Κώδικας Τροφίμων και Ποτών ορίζει ότι *«γάλα είναι το απηλλαγμένου πρωτογάλακτος προϊόν της ολοσχερούς, άνευ διακοπής αμέλξεως υγιώς έχοντος γαλακτοφόρου ζώου, διαβιούντος και διατρεφομένου από υγιεινούς όρους και μη ευρισκομένους εις κατάστασιν υπερκοπώσεως»*. (4) Δύο χρόνια αργότερα, το 1973, ο Διεθνής Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας (Food and Agriculture Organization, FAO) ορίζει το γάλα ως το *«φυσιολογικό έκκριμα του μαστού που παίρνεται από μία ή δύο αμέλξεις, χωρίς να προστεθεί ή να αφαιρεθεί τίποτε με στόχο την κατανάλωση ως υγρό ή για περαιτέρω επεξεργασία»*. (5)

Μπορεί η κατανάλωση του γάλακτος από διαφορετικά -από τον άνθρωπο- είδη θηλαστικών να τοποθετείται χρονικά τόσο παλιά, ωστόσο η παραγωγή του γάλακτος και των

γαλακτοκομικών προϊόντων επεκτάθηκε εμπορικά μετά το 1863. Η εμπορευματοποίηση αυτή οφείλεται στην ανακάλυψη αδρανοποίησης των παθογόνων βακτηρίων σε ποτά και φαγητά από τον Louis Pasteur. Η διαδικασία αυτή, που σήμερα είναι γνωστή ως «παστερίωση» («Pasteurization») προς τιμήν του Pasteur, αρχικά είχε ως στόχο τη διατήρηση της ποιότητας της μύρας και του κρασιού. Εκτός όμως αυτού, βρήκε μεγάλη πρακτική εφαρμογή στην παραγωγή, διακίνηση και τυποποίηση προϊόντων γάλακτος, με συνέπεια να εκτιναχθεί και η χρήση των γαλακτοκομικών προϊόντων στα ύψη. (6)

1.2 Βοοτροφία στη Ελλάδα

Η κτηνοτροφία είναι μία από τις πιο παλιές δραστηριότητες του ανθρώπου, την οποία αξιοποιούσε στην προσπάθειά του να εξασφαλίζει την απαραίτητη ποσότητα τροφής. Η κτηνοτροφία αποτελεί μια δραστηριότητα, η οποία είναι γνωστή από την νεολιθική εποχή με κέντρο ανάπτυξης τη Μέση Ανατολή και την ανατολική Μεσόγειο και τοποθετείται την ίδια εποχή που άρχισε να αναπτύσσεται και η γεωργία. Στην αρχή της η κτηνοτροφία απέβλεπε στο να εξασφαλίσει βασικό κρέας για την οικογένεια, καθώς το γάλα δεν το χρησιμοποιούσαν και μόνο ένα μικρό μέρος από τα προϊόντα αυτά είχαν σκοπό να γίνουν εμπορεύματα και να πουληθούν στην αγορά. Μια από τις πρώτες χώρες, που ανέπτυξε σημαντικά την κτηνοτροφία, ήταν και η Αγγλία. Μετά τη μεγάλη βιομηχανική επανάσταση που έγινε στη χώρα αυτή, όπου όλο και περισσότερος πληθυσμός άρχισε να δουλεύει στα εργοστάσια, άρχισε να δημιουργείται μεγάλη ζήτηση από διάφορα τρόφιμα και φυσικά κτηνοτροφικά προϊόντα. Έτσι, άρχισαν να δημιουργούνται οι φάρμες, που είχαν ως μοναδικό στόχο την εκτροφή των ζώων και την παραγωγή κτηνοτροφικών προϊόντων. Σε λίγα χρόνια, με την ανάπτυξη της βιομηχανίας στην υπόλοιπη Ευρώπη, άρχισαν παντού να δημιουργούνται φάρμες. Σήμερα, η κτηνοτροφία αποτελεί έναν από τους πιο δυναμικούς παραγωγικούς τομείς της χώρας. Η σημερινή κτηνοτροφική παραγωγή βασίζεται τόσο στην αύξηση τον αριθμού των ζώων, όσο και στην αύξηση της παραγωγικότητας και της απόδοσης των ζώων. (7)

Ένας σημαντικός κλάδος της Κτηνοτροφίας αποτελεί η Βοοτροφία, η οποία έχει ως αντικείμενο την εκτροφή, κυρίως των βοοειδών και βουβαλιών για την παραγωγή γάλακτος, κρέατος και δέρματος. Η έντονη ελλειμματικότητα που παρουσιάζει η χώρα μας σε προϊόντα του κλάδου της βοοτροφίας και τα τεράστια ποσά που ξοδεύουμε για την εισαγωγή τους, της προσδίδουν ιδιαίτερη σημασία για την εθνική μας οικονομία. (8)

Στην Ελλάδα εκτρέφονται περίπου 593.545 (ΕΛΣΤΑΤ 2015) βοοειδή, από τα οποία 138.823 αποτελούν αγελάδες γαλακτοπαραγωγής και 217.837 αποτελούν αγελάδες για παραγωγή βοοειδών πάχυνσης. Από το σύνολο αυτό, παράγονται περίπου 691.648 τόνοι

αγελαδινού γάλακτος που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση και 180.579 τόνοι βοείου - μοσχαρίσιου κρέατος. (9)

Στην Ελλάδα εκτρέφονται οι εξής εγχώριες φυλές:

- ✓ **Βραχυκερατική:** Εγχώρια φυλή με χαρακτηριστικά του *Bos taurus brachycerus* και οι περιοχές που εκτρέφονται είναι οι ορεινές περιοχές της Ηπείρου, της Αιτωλοκαρνανίας και της Κεφαλονιάς. Αποτελούν μικρόσωμα ζώα με λεπτά και βραχέα κέρατα. Είναι ζώο βραδείας ανάπτυξης, αλλά ανθεκτικό λιτοδίαιτο, μακρόβιο και υψηλής αναπαραγωγικής ικανότητας. (Εικόνα 1)
- ✓ **Κατερίνης:** Είναι αυτόχθονη φυλή που ανήκει στον τύπο των Ελληνικών Στεππικών φυλών βοοειδών. Περιοχή εκτροφής αποτελεί η Θεσσαλία. Είναι μετρίου μεγέθους βοοειδή, τα οποία φέρουν λυροειδή κέρατα. (Εικόνα 2)
- ✓ **Συκιάς:** Είναι αυτόχθονη φυλή που ανήκει στον τύπο των Ελληνικών Στεππικών φυλών βοοειδών και αποτελούν επίσης ζώα μετρίου μεγέθους. Περιοχή εκτροφής αποτελεί η Σιθωνία Χαλκιδικής. Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι ο πληθυσμός αυτός βρίσκεται σε κατάσταση εξαφάνισης. (Εικόνα 3) (10)



Εικόνα 1: Αγελάδα της φυλής Βραχυκερατική



Εικόνα 2: Αγελάδα της φυλής Κατερίνης



Εικόνα 3: Αγελάδα της φυλής Συκιάς

Εκτός από τις εγχώριες φυλές, υπάρχουν και οι γαλακτοπαραγωγικές φυλές, κυρίως η φυλή Holstein, η οποία εισήχθηκε στην Ελλάδα τη δεκαετία του 1950 και στις αρχές της δεκαετίας του 1980 έγινε εμφανής η υπεροχή της ως προς την γαλακτοπαραγωγική ικανότητα. Επιπλέον, υπάρχουν οι κρεατοπαραγωγικές φυλές, κυρίως Limousin και Blonde d.Aquitaine, καθώς και οι μικτής απόδοσης φυλές, όπως η Φαιά των Άλπεων (Schwyz) και η Simmental. Οι βοοτροφικές επιχειρήσεις, με βάση την παραγωγική τους κατεύθυνση, διακρίνονται σε: 1) μονάδες εκτροφής αγελάδων γαλακτοπαραγωγής, 2) μονάδες εκτροφής αγελάδων κρεατοπαραγωγής και 3) μονάδες πάχυνσης μοσχαριών. (8)

Όσον αφορά τον κλάδο της γαλακτοπαραγωγού αγελαδοτροφίας, κύριο χαρακτηριστικό του είναι η ταχεία αύξηση του μεγέθους των μονάδων και η αντίστοιχη μείωση του αριθμού των παραγωγών. Οι Έλληνες αγελαδοτρόφοι είναι ως επί το πλείστον νέοι επιχειρηματίες και έχουν ως στόχο τη δημιουργία κτηνοτροφικής παράδοσης για τα διάδοχα μέλη της οικογένειας. Η σύγχρονη ελληνική επιχειρηματική αγελαδοτροφία συγκεντρώνεται κυρίως στη Μακεδονία, τη Θράκη και τη Θεσσαλία, ενώ το υπόλοιπο των αγελαδοτροφικών

μονάδων κατανέμεται στην Ήπειρο, τη Στερεά Ελλάδα, την Πελοπόννησο και τα νησιά. (Εικόνα 4) (8)



Εικόνα 4: Περιοχές στις οποίες συγκεντρώνεται η σύγχρονη ελληνική επιχειρηματική γαλακτοπαραγωγός αγελαδοτροφία

1.3 Η Φυλή Holstein

Η φυλή Holstein κατάγεται από την Ευρώπη. Η κύρια ιστορική εξέλιξή της έλαβε χώρα σε δύο βόρειες περιοχές της σημερινής Ολλανδίας (The Netherlands), τη Βόρεια Ολλανδία (North Holland) και τη Φρισλανδία (Friesland), όπου επιλέγονταν επί αιώνες με στόχο την υψηλή γαλακτοπαραγωγική τους ικανότητα. Σήμερα, το όνομα Holstein χρησιμοποιείται σε όλες τις χώρες, παράλληλα όμως χρησιμοποιείται και το όνομα Fresian ή ασπρόμαυρη (κόκκινη) φυλή. (11)

Οι αγελάδες Holstein αναγνωρίζονται αμέσως από τον χρωματισμό τους που είναι κυρίως ασπρόμαυρος (Εικόνα 5), ενώ υπάρχουν και ζώα ασπροκόκκινα (Εικόνα 6), τα οποία μπορούν να προκύψουν ως απόγονοι ασπρόμαυρων εξαιτίας της παρουσίας και στους δύο γονείς ενός υποτελούς γονιδίου που δίνει αυτόν τον χρωματισμό μόνο σε ομόζυγη κατάσταση. Στην Ελλάδα ασπροκόκκινες αγελάδες εκτρέφονται μέσα σε αγέλες με ασπρόμαυρα ζώα, ενώ στο εξωτερικό υπάρχουν αγέλες με αποκλειστικά ασπροκόκκινα ζώα, όπου εκτιμώνται για τη μεγαλύτερη γενικά, ανθεκτικότητά τους με θυσία όμως, των υψηλών αποδόσεων. (12)



Εικόνα 5: Αγελάδα ασπρόμαυρη της φυλής Holstein



Εικόνα 6: Αγελάδα ασπροκόκκινη της φυλής Holstein

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η φυλή Holstein κέρδισε την προτίμηση των παραγωγών για την υψηλή της γαλακτοπαραγωγή που είναι, κατά μέσον όρο, ανώτερη από κάθε άλλη φυλή αγελάδων, αλλά με σχετικά μικρότερη περιεκτικότητα του γάλακτός της σε λίπος. Μεταξύ των γαλακτοπαραγωγικών φυλών δίνει επίσης, ικανοποιητική απόδοση σε κρέας μόσχων και ενήλικων ζώων. (13)

Σύμφωνα με τα στοιχεία της Ένωσης Φυλής Holstein Ελλάδας, οι αγελάδες στη χώρα μας παράγουν κατά μέσον όρο 8.510 gr. γάλακτος σε 305 ημέρες. Η περιεκτικότητα σε λίπος, πρωτεΐνη και λακτόζη είναι 3.83%, 3.32% και 4.89% αντίστοιχα. Οι αποδόσεις αυτές είναι απόλυτα συγκρίσιμες με τις αντίστοιχες αποδόσεις κτηνοτροφικά προηγμένων χωρών. (11)

Όπως ειπώθηκε παραπάνω, η φυλή Holstein έχει εισαχθεί στην Ελλάδα ήδη από το 1950, σε μικρούς αριθμούς, επειδή τότε δινόταν βάρος σε φυλές με γαλακτοπαραγωγική και κρεοπαραγωγική κατεύθυνση. Οι αγελάδες Holstein άρχισαν να διαδίδονται με ταχύ ρυθμό, όταν κατά το τέλος του 1970 και στις αρχές του 1980, εγκαταστάθηκαν αγελαδοτροφικές μονάδες κοντά στα μεγάλα αστικά κέντρα για την κάλυψη των αναγκών του πληθυσμού σε γάλα κάνοντας φανερή την υπεροχή της φυλής Holstein απέναντι στις άλλες φυλές ως προς τη γαλακτοπαραγωγή της. (12)

1.4 Είδη γάλακτος:

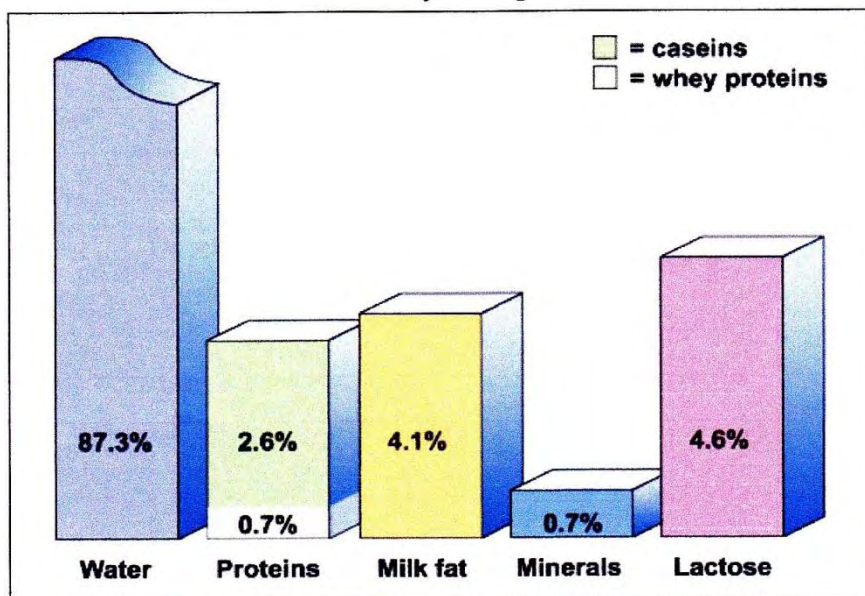
Το γάλα χωρίζεται σε διάφορους τύπους, ανάλογα με τα παρακάτω κριτήρια:

- **Γεύση:** ξινόγαλο, κακάο, με γεύσεις φρούτων
- **Ενίσχυση:** βιταμίνες, μέταλλα, ιχνοστοιχεία
- **Μέθοδος εκτροφής:** ζώα ελευθέρως βοσκής, ζώα σε κτηνοτροφική μονάδα
- **Μέθοδος παραγωγής:** οργανικό, βιολογικό

- **Σύνθεση:** πλήρες, χαμηλό σε λιπαρά
- **Συντήρηση:** διαρκείας, σε σκόνη
- **Συσκευασία:** μπουκάλι, χαρτόνι
- **Σύσταση:** χωρίς λακτόζη, υποαλλεργικό (14)

1.5 Συστατικά του γάλακτος

Το γάλα από τα διάφορα είδη ζώων (αγελαδινό, πρόβειο, γιδινό) παρουσιάζει μόνο ποσοτικές διαφορές ως προς τη σύσταση. Τα συστατικά που βρίσκονται σε μεγαλύτερες ποσότητες στο αγελαδινό γάλα παρουσιάζονται στην εικόνα 7. (15)



Εικόνα 7: Ποσότητες % των συστατικών του γάλακτος

Πίνακας 1: Ποσότητες % των συστατικών του γάλακτος σε διάφορα ζώα γαλακτοπαραγωγής

MILK COMPOSITION

Animals	Water %	Proteins %	Casein %	Whey %	Fat %	Lactose %	Ash %
Human	87.5	1	0.5	0.5	4.5	7.1	0.2
Buffalo	83-84	4	3.5	0.5	6-10	4.8	0.8
Cow	86-87	3.5	2.8	0.7	3.7	4.8	0.7
Goat	86.5	3.6	2.7	0.9	4	4.7	0.8
Sheep	82	4.6	3.9	0.7	7.2	4.8	0.8-0.9
Camel	86.5	3.6	2.7	0.9	4	5	0.5
Horse	88.8	2.5	1.3	1.2	1.9	6.2	0.5

Οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν τα συστατικά του γάλακτος είναι:

- Το είδος, η φυλή και το κληρονομικό δυναμικό του ζώου
- Η περίοδος της ημέρας και η θερμοκρασία περιβάλλοντος
- Η σωματική κατάσταση και η ηλικία του ζώου
- Η διάρκεια της ξηρής περιόδου
- Η συχνότητα των τοκετών και ο οργασμός
- Η κόπωση και η συμπεριφορά του ανθρώπου στα ζώα
- Η υγιεινή κατάσταση του ζώου και οι συνθήκες διατροφής
- Ο αριθμός των αμέλξεων ανά εικοσιτετράωρο, καθώς και ο τρόπος άμελξης
- Το στάδιο της γαλακτικής περιόδου (16)

Σημαντικό είναι να αναφερθούν τα κλάσματα του γάλακτος, δηλαδή οι έννοιες του ορού και του πλάσματος του γάλακτος. Συνεπώς, ορός του γάλακτος χαρακτηρίζεται το διήθημα που απομένει μετά την αφαίρεση του λίπους και των καζεϊνικών πρωτεϊνών του γάλακτος και περιέχει 0.6% πρωτεΐνες, οι οποίες συνίστανται από γαλακτογλοβουλίνες και γαλακτοαβουλίνες (80%), καθώς και από πρωτεόζες και πεπτόνες (20%). Παρά την αφαίρεση του λίπους, μικρές ποσότητες αυτού παραμένουν ενωμένες με τις πρωτεΐνες του ορού. Πλάσμα

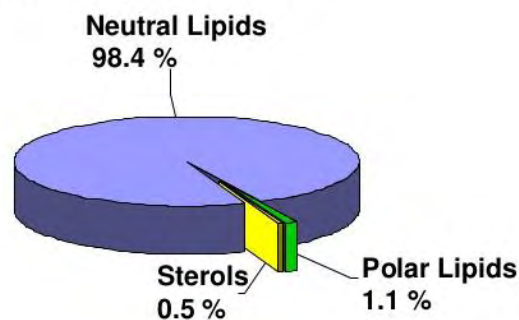
του γάλακτος χαρακτηρίζεται το διήθημα που απομένει μετά την πλήρη αποβουτύρωση του γάλακτος, το οποίο περιέχει το σύνολο σχεδόν, των πρωτεϊνών του γάλακτος. (16)

1.5.1 Το λίπος του γάλακτος

Λίπος του γάλακτος χαρακτηρίζεται το κλάσμα του γάλακτος που είναι διαλυτό στον αέρα και συνίσταται κυρίως από μίγμα τριγλυκεριδίων, καθώς και από φωσφολιποειδή, στερόλες, ελεύθερα λιπαρά οξέα, κήρους, σκουαλένια και λιποδιαλυτές βιταμίνες. (Εικόνα 8) Η εμπορική αξία του γάλακτος αποτιμάται ανάλογα με το περιεχόμενο λίπος, αλλά η θρεπτική αξία και των άλλων συστατικών του είναι μεγάλη. (17)

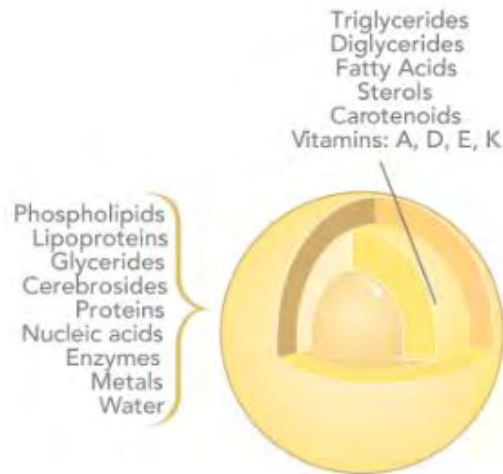
Milk lipids (Fat)

- 3.5 - 4.5% (i.e. 35-45 g/l) for bovine milk
- Simple and complex mixture



Εικόνα 8: Σύσταση λιπιδίων στο γάλα των βοοειδών

Το λίπος στο γάλα βρίσκεται υπό τη μορφή λιποσφαιρίων (Εικόνα 9) μεγέθους 0.1-20 μm σε περιεκτικότητα ~ 9×10^9 λιποσφαίρια ανά ml, δηλαδή η κάθε σταγόνα γάλακτος περιέχει περίπου ένα δισεκατομμύριο λιποσφαίρια. Τα λιποσφαίρια συνίστανται από μια μάζα τριγλυκεριδίων, η οποία αποτελεί τον πυρήνα του. Τα λιποσφαίρια αποτελούν με το νερό του γάλακτος κolloειδές σύστημα γαλακτώματος και η διατήρηση της κolloειδούς διασποράς οφείλεται στο ότι τα λιποσφαίρια περιβάλλονται από το περίβλημα μεμβράνης, το οποίο εμποδίζει τη συγκόλλησή τους και έτσι διατηρούν την ατομικότητά τους. Η μεμβράνη αποτελείται από μια διπλοστοιβάδα φωσφολιποειδών που έχει σε επαφή τα λιπόφιλα τμήματα των μορίων της και η οποία περιέχει και άλλα πολικά λιποειδή, όπως χοληστερόλη και βιταμίνες. (18)

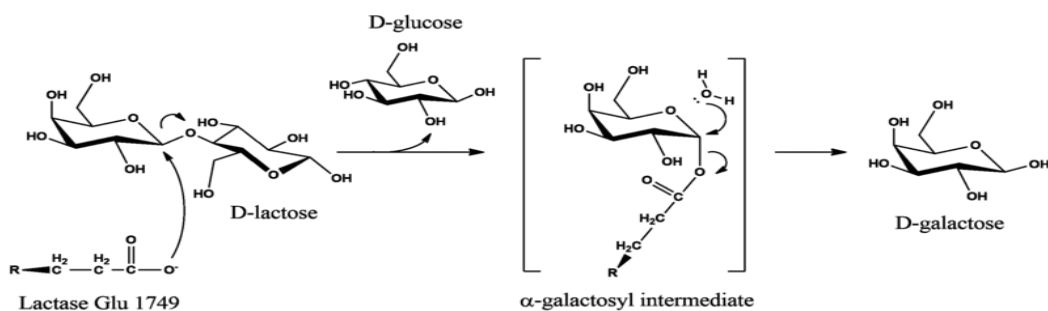


Εικόνα 9: Όψη ενός λιποσφαιρίου

Τα λιπαρά οξέα που είναι δεσμευμένα στα τριγλυκερίδια βρίσκονται σε πολύ μεγάλη ποικιλία, από C4 μέχρι και C22. Η μεγάλη ποικιλία των δεσμευμένων στα τριγλυκερίδια λιπαρών οξέων, καθώς και η μεγάλη ποικιλία των διαφόρων τριγλυκεριδίων του λίπους του γάλακτος, του προσδίδουν μια μοναδικότητα μεταξύ του συνόλου των λιπαρών υλών που συναντώνται στη φύση. Η μεγάλη ποικιλία των διαφόρων ειδών τριγλυκεριδίων σε σύγκριση με τον αριθμό των ειδών τριγλυκεριδίων των άλλων λιπών και ελαίων οφείλεται στο μεγαλύτερο αριθμό των λιπαρών οξέων που περιέχονται στα τριγλυκερίδια του βουτύρου. Στην ποικιλία αυτή οφείλεται και το χαμηλό σημείο τήξης του λίπους του γάλακτος (28-32°C), το οποίο σε συνδυασμό με τη λεπτή κατανομή του λίπους στα λιποσφαίρια, το καθιστά το πλέον εύπεπτο λιπαρό από όλες τις άλλες λιπαρές ύλες. (19)

1.5.2 Τα σάκχαρα του γάλακτος

Οι υδατάνθρακες, με κυριότερο τη λακτόζη ή αλλιώς γαλακτοσάκχαρο, καθώς και ίχνη άλλων σακχάρων, περιέχονται συνήθως στο γάλα σε ποσοστά μέχρι 5-6%. Η λακτόζη στο στομάχι του ανθρώπου παραμένει αναλλοίωτη και περνάει στο λεπτό έντερο, όπου διασπάται αργά σε γλυκόζη και γαλακτόζη από το ένζυμο λακτάση. (Εικόνα 9) (20)



Εικόνα 10: Διάσπαση της λακτόζης σε γαλακτόζη και γλυκόζη

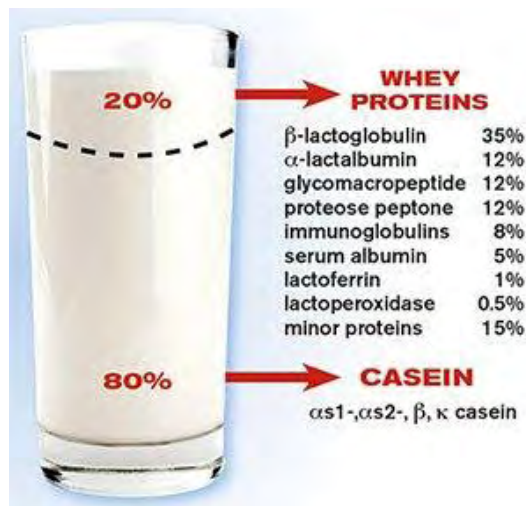
Στους ενήλικες, ένα μέρος της λακτόζης περνάει αναλλοίωτη και στο παχύ έντερο, όπου διασπάται από τη χλωρίδα του εντέρου προς γαλακτικό οξύ, το οποίο δεν είναι τοξικό για τον οργανισμό. Η διάσπαση αυτή ανταγωνίζεται την ανάπτυξη των μικροοργανισμών διάσπασης των πρωτεϊνών. (20)

Σε παθολογικές καταστάσεις, όπου ο οργανισμός δε διαθέτει το ένζυμο λακτάση και κατά συνέπεια υπάρχει πρόβλημα στη διάσπαση της λακτόζης, η τελευταία ζυμώνεται από τα βακτήρια του παχύ εντέρου, τα οποία δημιουργούν κράμπες, αέρια στα έντερα, καθώς και διάρροια. Εκτός όμως από τις προαναφερθείσες σχετικά, ήπιες παθολογικές καταστάσεις, η μακροχρόνια αποχή από την κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων και κατά συνέπεια και η απουσία λακτόζης μπορεί να προκαλέσει και πιο σοβαρές καταστάσεις, όπως οστεοπενία, οστεοπόρωση και υποσιτισμό. Η σοβαρότητα αυτών των καταστάσεων οφείλεται στην αδυναμία πρόσληψης από τον οργανισμό ασβεστίου, πρωτεϊνών, βιταμινών (A, B12, D), καθώς και ορισμένων μεταλλικών στοιχείων, όπως μαγνήσιο και ψευδάργυρος. (21)

1.5.3 Πρωτεΐνες του γάλακτος

Το γάλα αποτελεί μια πηγή πρωτεϊνών για τον άνθρωπο. Έχουν μελετηθεί κυρίως οι πρωτεΐνες του γάλακτος της αγελάδας, ενώ λιγότερο οι πρωτεΐνες του γάλακτος άλλων θηλαστικών. Οι κύριες πρωτεΐνες σε όλα τα είδη γάλακτος είναι οι καζεΐνες, η β-λακτογλοβουλίνη, η α-λακταλβουμίνη, η αλβουμίνη ορού και οι ανοσογλοβουλίνες. Όλες οι κύριες πρωτεΐνες (εκτός της αλβουμίνης και τις ανοσογλοβουλίνες) συντίθενται στα επιθηλιακά κύτταρα στο μαστικό αδένα από αμινοξέα που προέρχονται από το αίμα. (22)

Οι πρωτεΐνες μπορούν να ταξινομηθούν με διάφορους τρόπους ανάλογα με τις χημικές ή φυσικές τους ιδιότητες και τις βιολογικές τους λειτουργίες. Παραδοσιακά, οι πρωτεΐνες του γάλακτος διακρίνονταν στις καζεΐνες, τις πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος (Εικόνα 11) και τις δευτερεύοντες πρωτεΐνες. (23)



Εικόνα 11: Ποσότητες % των πρωτεϊνών του ορού του γάλακτος και της καζεΐνης στο γάλα

Οι τρεις αυτές κύριες ομάδες των πρωτεϊνών του γάλακτος διακρίνονται βάσει της διαφορετικής τους συμπεριφοράς και μορφής. Οι καζεΐνες καθιζάνουν εύκολα κατά την επεξεργασία του γάλακτος με το ένζυμο ρεννίνη ή σε χαμηλό pH, ενώ οι πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος παραμένουν συνήθως διαλυτές. Οι σφαιρικές πρωτεΐνες του ορού μεταυσιώνονται κατά την ήπια θέρμανση του γάλακτος, ενώ οι καζεΐνες παραμένουν σταθερές. Οι πρωτεΐνες της μεμβράνης των λιποσφαιρίων, που ανήκουν στην ομάδα των δευτερευόντων πρωτεϊνών, είναι προσκολλημένες στην επιφάνεια των λιποσφαιρίων και απελευθερώνονται μόνο κατά την εφαρμογή μηχανικής δύναμης, όπως για παράδειγμα κατά τη μετατροπή της κρέμας του γάλακτος σε βούτυρο. (24)

Καζεΐνη

Οι καζεΐνες (CN) είναι φωσφοπρωτεΐνες. Υπάρχουν σε όλα τα γάλατα ζωικής προέλευσης, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπινου με τη μορφή μικκυλίων (καζεϊνικά μικκύλια), δηλαδή ως μια μάζα πυκνών πρωτεϊνικών κόκκων. Στο αγελαδινό γάλα περίπου 80% των πρωτεϊνών είναι καζεΐνες (26 γραμμάρια ανά λίτρο γάλακτος) και συντίθενται στο μαστό, χωρίς να ανευρίσκονται πουθενά αλλού. Οι φωσφορικές ομάδες που είναι δεσμευμένες στα μόρια των καζεϊνών, δεσμεύουν το ασβέστιο (Ca^{+2}) σχηματίζοντας ιονικούς δεσμούς. Ακολούθως, εφόσον οι καζεΐνες φωσφορυλιωθούν, δημιουργούνται οι δεσμοί του ασβεστίου με τις φωσφορούχες ομάδες και αρχίζει ο πολυμερισμός των μορίων του μικκυλίου. Αυτή η δομή {καζεΐνη- PO_4 - Ca^{+2} - PO_4 -καζεΐνη} είναι σημαντική για το σχηματισμό των μικκυλίων. Άλλα χαρακτηριστικά των καζεϊνών είναι ότι περιέχουν υψηλή ποσότητα προλίνης, αποτελούν βασικό συστατικό των τυριών, δεν επηρεάζονται σημαντικά από τη θερμοκρασία (πιο ευαίσθητες στη θέρμανση είναι η α_{s2} - και η κ-καζεΐνη), η πυτιά (Σύμπλεγμα πηκτικών ενζύμων

που χρησιμοποιούνται στην πήξη γάλακτος για παραγωγή τυριού) προκαλεί πολύ μικρές μεταβολές στις καζεΐνες (η πιο ευαίσθητη στην πυτιά είναι η κ-καζεΐνη και ακολουθούν η α_{s1} - και η β -καζεΐνη) και έχουν ευαισθησία στο Ca^{2+} (εκτός της κ-καζεΐνης). (25)

Κλάσματα καζεΐνης

Σε μια προηγούμενη αναφορά (25), οι καζεΐνες διαφοροποιήθηκαν σύμφωνα με τη σχετική ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα σε αλκαλικά πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου ή αμύλου με ή χωρίς μερκαπτοαιθανόλη. Αργότερα, προτάθηκε η κατάργηση της χρήσης της ηλεκτροφόρησης ως βάσης για την ταξινόμηση των καζεϊνών και η ταξινόμησή τους έγινε με βάση την ομολογία των πρωταρχικών δομών τους χωρίζοντας τις καζεΐνες στις ακόλουθες οικογένειες: α_{s1} -, α_{s2} -, β -, κ- καζεΐνες. (26) Εκτός από την διαφορετική ηλεκτροφορητική ικανότητα που αντανακλά διαφορές στη δομή τους, τα κλάσματα αυτά διαφέρουν και στην συμπεριφορά τους απέναντι στην πυτιά. (27)

Το 1956 διαπιστώθηκε ότι η α-καζεΐνη δεν είναι ομοιογενής ουσία, αλλά σύμπλοκο καζεϊνών. Απομονώθηκαν αρχικά, δύο κλάσματα της, η α_s - και η κ-καζεΐνη που αργότερα διαπιστώθηκε ότι και αυτά ήταν ετερογενή. Έτσι, βρέθηκε ότι η α- αποτελείται από α_{s1} -καζεΐνη, αλλά και από άλλες σε μικρότερη αναλογία. Με την χρησιμοποίηση πλέον εξελιγμένων μεθόδων ηλεκτροφόρησης στην ταυτοποίηση, απομόνωση και καθαρισμό των κλασμάτων της καζεΐνης διαπιστώθηκε η ύπαρξη γενετικών παραλλαγών της. Στον Πίνακα 2 δίνονται τα διάφορα κλάσματα της καζεΐνης, η αναλογία του καθενός στο γάλα και οι γενετικές παραλλαγές τους. (28)

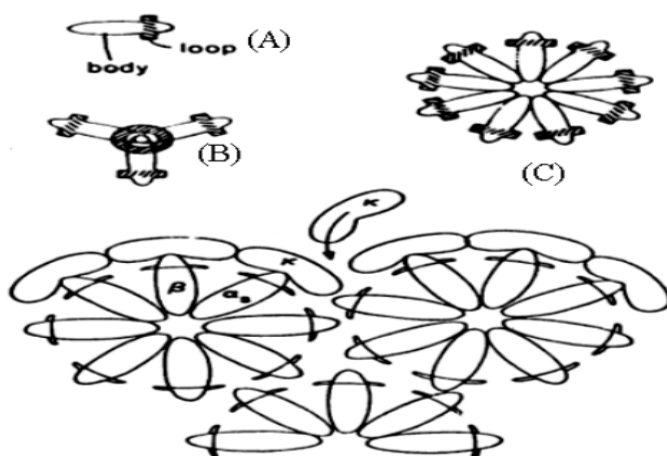
Πίνακας 2: Ποσότητες % των κλασμάτων της καζεΐνης και οι γενετικές παραλλαγές τους

Κλάσματα	% των συστατικών του γάλακτος	Γενετικές Παραλλαγές
α_{s1}	1,2-1,5	A, B, C, D, E
α_{s2}	0,3-0,4	A, B, C, D
B	0,9-1,1	A1, A2, A3, C, D, E
κ	0,2-0,4	A, B

Υπάρχουν πολλά πρότυπα πάνω στη δομή των μικκυλίων των καζεϊνών:

✓ Πρότυπο του *Waugh* και των συνεργατών του

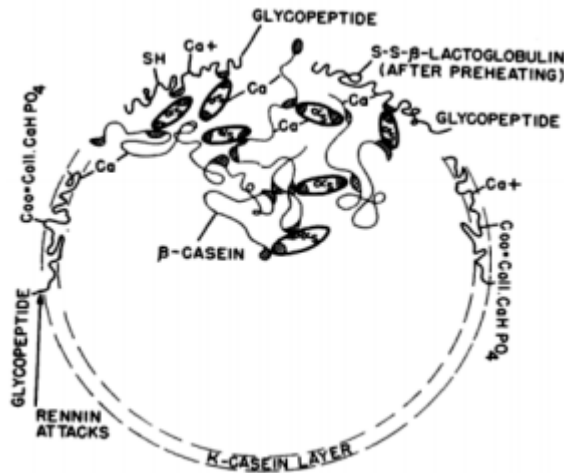
Το 1965 ο *Waugh* και οι συνεργάτες του πρότειναν ότι κάθε μικκύλιο της καζεΐνης αποτελείται από ένα πυρήνα περιορισμένου μεγέθους, αθροίσματα μονομερών των α_{s1} - και β -καζεϊνών και το φλοιό του: μικρές μονάδες που δημιουργούνται από την αλληλεπίδραση της α_s - ή β -καζεΐνης με την κ-καζεΐνη απουσία ασβεστίου. Ο φλοιός καλύπτει ομοιόμορφα ολόκληρο τον πυρήνα και έχει προσανατολισμένες τις μονάδες που τον αποτελούν κατά τέτοιο τρόπο, ώστε το μακροπεπτίδιο της κ-καζεΐνης να είναι εκτεθειμένο. Καθώς το μακροπεπτίδιο είναι έντονα υδρόφιλο και έχει μεγάλη συγγένεια με τον ορό του γάλακτος, η τάση των επιφανειών των μικκυλίων να αλληλεπιδρούν είναι περιορισμένη. Εξάλλου, υπάρχει έντονη αλληλεπίδραση μεταξύ του υδρόφοβου παρα-κ-τμήματος της κ-καζεΐνης και των α_{s1} - και β -καζεϊνών προς δημιουργία μικρών μονάδων του περιβλήματος του πυρήνα. (29)



Εικόνα 12: Μικκύλιο που ακολουθεί το Πρότυπο *Waugh*

✓ Πρότυπο *Rayens*

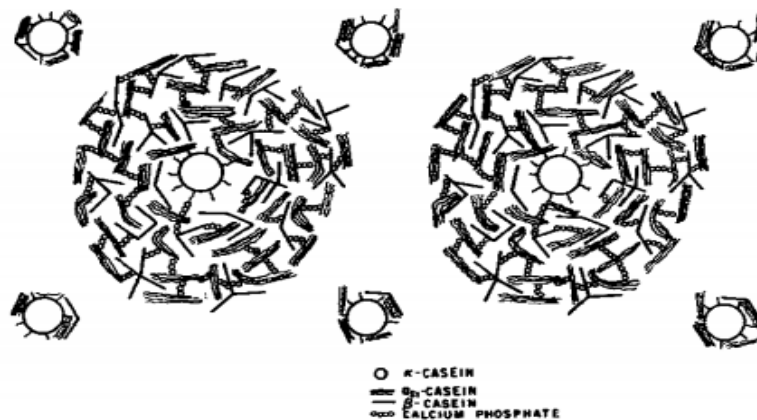
Ένα χρόνο μετά, το 1966, ο *Rayens* πρότεινε ένα δεύτερο μοντέλο για την δομή του μικκυλίου. Συγκεκριμένα, πρότεινε ότι ο πυρήνας του μικκυλίου αποτελείται από πυκνά διπλωμένα μόρια α_{s1} -καζεΐνης προσκολλημένα σε ένα χαλαρό δίκτυο β -καζεϊνών. Η επιφάνεια του μικκυλίου καλύπτεται με κ-καζεΐνες και σε αντίθεση με το μοντέλο του *Waugh*, το ασβέστιο εντοπίζεται τόσο στην επιφάνεια, όσο και στο εσωτερικό του μικκυλίου. (29)



Εικόνα 13: Μικκύλιο που ακολουθεί το Πρότυπο Payens

✓ Πρότυπο Parry και Carroll

Μερικά χρόνια αργότερα, το 1969, οι Parry και Carroll πρότειναν ότι τα μικκύλια αποτελούνται από πολυμερή α_s - και β - καζεϊνών που σχηματίζονται γύρω από ένα πυρήνα κ-καζεΐνης. Τα πολυμερή αυτά διατηρούνται μαζί με κολλοειδές φωσφορικό ασβέστιο. Η κ-καζεΐνη του πυρήνα δεν σχετίζεται με τη σταθερότητα των μικκυλίων στην περίπτωση αυτή. Οι παραπάνω ερευνητές προσδιόρισαν ότι η κ-καζεΐνη υπάρχει σαν διαλυτή, ενωμένη με μικρές ποσότητες των α_s - και β - καζεϊνών. (30)



Εικόνα 14: Μικκύλιο που ακολουθεί το Πρότυπο Parry και Carroll

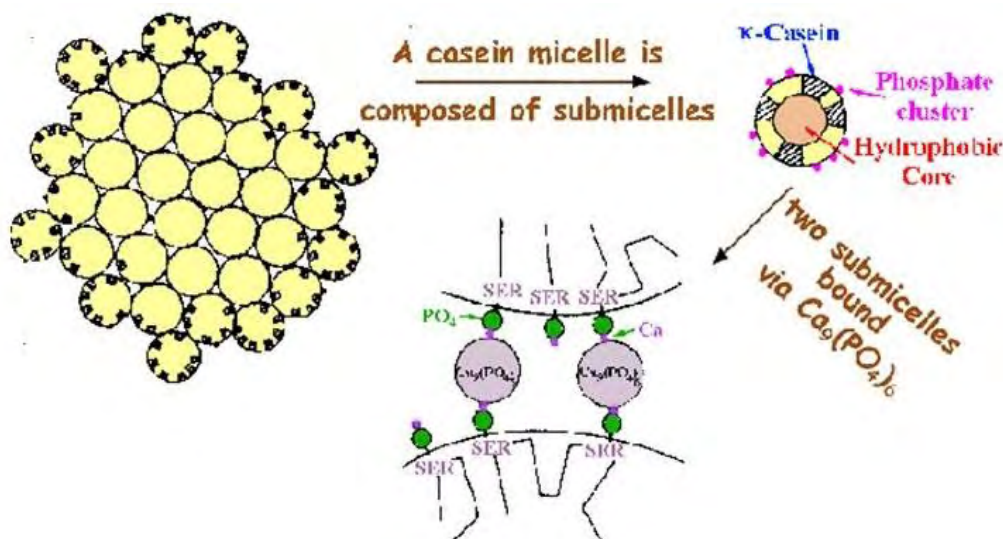
✓ Πρότυπο Raquin και συνεργάτες

Το τελευταίο μοντέλο που προτάθηκε για την δομή του μικκυλίου έγινε το 1987 από τον Raquin και τους συνεργάτες του. Σύμφωνα με αυτούς, ο πυρήνας του μικκυλίου λειτουργεί ως πλαίσιο για τις α_{s1} -καζεΐνες και το ασβέστιο και στον οποίο συνδέονται οι β -καζεΐνες με υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις. Ο πυρήνας του μικκυλίου περικυκλώνεται από σύνθετα

σωματίδια της α_{s1} -, α - και κ - καζεΐνης, όπου η τελευταία βρίσκεται συγκριτικά σε υψηλή αναλογία. (29)

Εκτός από τα βασικά μοντέλα που προτάθηκαν για την δομή του μικκυλίου, από το 1967 έως το 1989 προτάθηκαν και διάφορα μοντέλα για την δομή του υπο-μικκυλίου. (Εικόνα 15) (31)

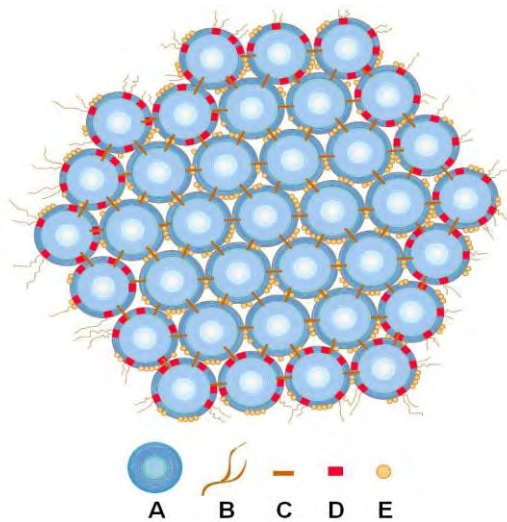
Γενικά, τα μικκύλια αποτελούνται από μεγάλο αριθμό μορίων διαφόρων κλασμάτων καζεϊνών που ενώνονται μεταξύ τους και σχηματίζουν πολυμερή. (32) Εξαιτίας της αφθονίας φωσφορικών ομάδων και υδρόφοβων περιοχών στο καζεϊνικό μόριο, τα πολυμερή των καζεϊνών είναι πολύ ιδιόμορφα και σταθερά. Τα πολυμερή αυτά αποτελούνται από εκατοντάδες ως χιλιάδες μόρια και σχηματίζουν ένα κολλοειδές διάλυμα στο οποίο οφείλεται το λευκό χρώμα του γάλακτος. (31)



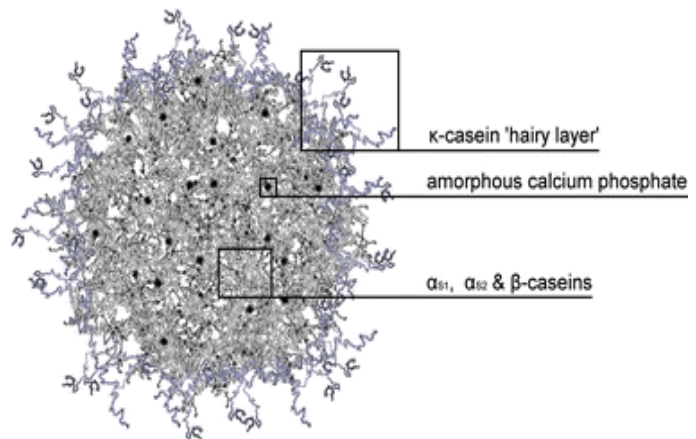
Εικόνα 15: Τα μικκύλια αποτελούνται από υπομικκύλια

Τα μικκύλια αποτελούνται από τις α -, β - και κ - καζεΐνες. Οι α -καζεΐνες είναι σε πολυφωσφορυλιωμένη μορφή (α_{s1} -, α_{s2} -, α_{s3} -, α_{s4} -, α_{s5} - και α_{s6} -) και κάποιες αποτελούν τις κύριες πρωτεΐνες στο γάλα (α_{s1} -, α_{s2} -). Η β -καζεΐνη είναι η κύρια πρωτεΐνη στο αγελαδινό γάλα, αλλά δευτερεύουσα στο ανθρώπινο γάλα. Η κ -καζεΐνη (α -γλυκοπρωτεΐνη) υπάρχει σε όλο το καζεϊνικό μικκύλιο και δρα ως σταθεροποιητής του μικκυλίου. (Εικόνες 16-17) (33)

Πιο συγκεκριμένα, η α_{s1} -καζεΐνη (μοριακό βάρος 23.000) έχει δυο υδροφοβικές περιοχές στο μόριο της, οι οποίες περιέχουν και υπολείμματα της προλίνης. Οι περιοχές διαχωρίζονται από μια πολική περιοχή, η οποία αποτελείται από 8 φωσφορικές ομάδες.



Εικόνα 16: Ένα καζεϊνικό μικκύλιο, Στη λεζάντα : A: ένα υπομικκύλιο, B: προεξέχουσα αλυσίδα, C: Φωσφορικό ασβέστιο, D: κ-καζεΐνη, E: φωσφορικές ομάδες



Εικόνα 17: Ένα καζεϊνικό μικκύλιο, όπως αυτό φαίνεται στο μικροσκόπιο

Επίσης, μπορεί να κατακρημνιστεί ως ίζημα σε χαμηλά επίπεδα ασβεστίου. Η α_{s2}-καζεΐνη έχει μοριακό βάρος 25.000 και αποτελείται από 199 υπολείμματα αμινοξέων, εκ των οποίων τα 10 είναι υπολείμματα προλίνης. Μπορεί να κατακρημνιστεί και αυτή σαν ίζημα σε χαμηλά επίπεδα ασβεστίου. Η β-καζεΐνη έχει μοριακό βάρος 24.000 και αποτελείται από 209 υπολείμματα αμινοξέων, εκ των οποίων τα 35 είναι υπολείμματα προλίνης. Αποτελείται από μια ισχυρά φορτισμένη περιοχή N και μια υδροφοβική περιοχή. Είναι πρωτεΐνη, η οποία δρα ως τασενεργό μόριο. Μπορεί να πολυμεριστεί ανάλογα με τη θερμοκρασία σε ένα μεγάλο πολυμερές στους 20°C, αλλά δεν πολυμερίζεται στους 4°C και είναι λιγότερο ευαίσθητη στην καταβύθιση με το ασβέστιο. Η κ-καζεΐνη με μοριακό βάρος 19.0000 και 20 υπολείμματα προλίνης είναι πολύ ανθεκτική στην κατακρήμνιση με ασβέστιο σταθεροποιώντας άλλες καζεΐνες. Κατά την τυροκόμιση, δρα στο δεσμό των υπολειμμάτων 105Phe - 106Met ελαχιστοποιώντας τη σταθερότητά της αφήνοντας ένα υδροφοβικό κομμάτι κ-καζεΐνης, το οποίο καλείται παρα-κ-καζεΐνη και αντίστοιχα ένα υδροφιλικό κομμάτι, το οποίο καλείται κ-καζεΐνο-γλυκομακροπεπτίδιο (GMP) ή πιο σωστά καζεΐνο-μακροπεπτίδιο (CMP). Το φωσφορικό ασβέστιο και οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομικκυλίων είναι υπεύθυνες για τη σταθερότητα των καζεϊνικών μικκυλίων. Τα υδρόφιλα τμήματα της κ-καζεΐνης περιέχουν ομάδες υδατανθράκων, οι οποίες προεξέχουν στην εξωτερική επιφάνεια των συμπλόκων των μικκυλίων δίνοντάς τους μία «τριχωτή» εμφάνιση και εμποδίζοντας τη συσσωμάτωσή τους. Η σπουδαιότητα της κ-καζεΐνης και των ομάδων υδατανθράκων της γίνεται φανερή κατά την παρασκευή τυριού. Η ρεννίνη που χρησιμοποιείται στο πρώτο στάδιο της τυροκόμησης, διασπά τον υδατάνθρακα από το μόριο της κ-καζεΐνης στην επιφάνεια των

μικκυλίων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα μικκύλια να παύουν να είναι διαλυτά και να αρχίζουν να συσσωματώνονται σχηματίζοντας το τυρόπηγμα. (34)

Πρωτεΐνες ορού του γάλακτος

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, ορός του γάλακτος είναι το θολό υποκίτρινο υγρό που παραμένει μετά την απομάκρυνση του λίπους και της καζεΐνης. Αποτελούν περίπου το 20% του πρωτεϊνικού κλάσματος του γάλακτος. Οι πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος γενικά και συγκεκριμένα η α-λακταλβουμίνη έχουν υψηλή βιολογική αξία. Η σύνθεση των αμινοξέων τους είναι πολύ κοντά σε αυτή που θεωρείται ως βέλτιστη από άποψη βιολογικής αξίας. Παράγωγα του ορού του γάλακτος χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων. Επιπλέον, μετουσιώνονται κατά την θέρμανση, με συνέπεια τη συσσωμάτωσή τους, κυρίως με τα καζεϊνικά μικκύλια, αλλά και σε βιομηχανική κλίμακα απομονώνονται με τεχνολογίες μεμβρανών. (35)

Οι πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος είναι ένας όρος που χρησιμοποιείται συχνά ως συνώνυμο των πρωτεϊνών του τυρογάλακτος, αλλά η χρήση του δεν πρέπει να περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος (τυρόγαλα) που παράγεται κατά την παρασκευή τυριού. Ο λόγος είναι ότι οι πρωτεΐνες του τυρογάλακτος περιέχουν πέρα από τις πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος και κομμάτια των μορίων των καζεϊνών, τα οποία οφείλονται στη δράση του ενζύμου ρεννίνη (πυτιά) στο γάλα της τυροκόμησης. Επίσης, το τυρόγαλα περιέχει ορισμένες από τις πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος σε μικρότερες συγκεντρώσεις από εκείνες που απαντούν στο γάλα, εξαιτίας της μετουσίωσης μέρους αυτών κατά την παστερίωση του γάλακτος που λαμβάνει χώρα πριν την τυροκόμηση. (36)

Οι πρωτεΐνες της ομάδας αυτής είναι πολύ διαλυτές και διακρίνονται στις ακόλουθες κατηγορίες:

- ***α-λακταλβουμίνη***

Αυτή η πρωτεΐνη μπορεί να θεωρηθεί ως η χαρακτηριστική πρωτεΐνη του ορού του γάλακτος. Απαντά στο γάλα όλων των θηλαστικών και παίζει σημαντικό ρόλο στη σύνθεση της λακτόζης. (37)

- ***β-λακτογλοβουλίνη***

Η πρωτεΐνη αυτή απαντά μόνο στα οπληφόρα ζώα και είναι η κύρια πρωτεΐνη του ορού του γάλακτος των αγελάδων. Με τη θέρμανση του γάλακτος στους 60°C ξεκινά η μετουσίωση των πρωτεϊνών, κατά την οποία η αντίδραση των θειούχων αμινοξέων της β-λακτογλοβουλίνης

παίζει εξέχοντα ρόλο. Σε υψηλές θερμοκρασίες ελευθερώνονται θειούχες ενώσεις, οι οποίες είναι κατεξοχήν υπεύθυνες για την οσμή και γεύση του θερμασμένου γάλακτος. (38)

- ***Ανοσοσφαιρίνες***

Οι ανοσοσφαιρίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην προστασία του νεογέννητου ζώου (ή ανθρώπινου βρέφους) ενάντια σε βακτήρια και ασθένειες. (37)

- ***Λακτοφερίνη***

Η λακτοφερίνη είναι μία γλυκοπρωτεΐνη που ανήκει στους μεταφορείς σιδήρου της οικογένειας των τρανσφερινών. Αρχικά, απομονώθηκε από το βόειο γάλα, αλλά απαντά και στο γάλα άλλων ζώων. Επιπροσθέτως, βρίσκεται και στις εξωκρινείς εκκρίσεις των θηλαστικών πέρα από το γάλα. Θεωρείται ως πολυ-λειτουργική πρωτεΐνη, καθώς φαίνεται ότι έχει διάφορους βιολογικούς ρόλους. Εξαιτίας της ικανότητάς της να δεσμεύει το σίδηρο, πιστεύεται ότι παίζει ρόλο στην απορρόφηση του σιδήρου από το βλεννογόνο του εντέρου των θηλαζόντων βρεφών. Επίσης, φαίνεται ότι έχει αντιβακτηριακή, αντική, αντιμυκητιακή, αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτική και ανοσορυθμιστική δράση, δραστηριότητες οι οποίες μελετώνται εκτενώς. (37)

- ***Λακτοπεροξειδάση***

Η λακτοπεροξειδάση έχει αναγνωριστεί ως αντιμικροβιακός παράγοντας στο γάλα, το σάλιο και τα δάκρυα. Πρόκειται για ένα φυσικό σύστημα άμυνας εναντίον των βακτηρίων μέσω της οξειδωσης των θειοκυανικών ιόντων (SCN-) από το υπεροξειδίο του υδρογόνου. Τα τελευταία είναι και τα δύο παρόντα στα βιολογικά υγρά και μαζί με τη λακτοπεροξειδάση αποτελούν το σύστημα της λακτοπεροξειδάσης (LP-s). Το LP-s έχει αποδειχθεί βακτηριοκτόνο ή βακτηριοστατικό σε μία ευρεία ποικιλία μικροοργανισμών, χωρίς να επιδρά στις πρωτεΐνες και τα ένζυμα των μικροοργανισμών που το παράγουν. (39)

Δευτερεύοντες Πρωτεΐνες

- ✓ ***Πρωτεΐνες των μεμβρανών***

Οι πρωτεΐνες των μεμβρανών είναι μία ομάδα πρωτεϊνών που σχηματίζει ένα προστατευτικό στρώμα γύρω από τα λιποσφαίρια, με συνέπεια τη σταθεροποίηση του γαλακτώματος των σταγονιδίων λίπους στο γάλα. Ορισμένες από τις πρωτεΐνες αυτές περιέχουν υπολείμματα λιπιδίων και για αυτό το λόγο καλούνται λιποπρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες της μεμβράνης της γλοβουλίνης είναι το μικρότερο κλάσμα των πρωτεϊνών του γάλακτος,

περίπου 1.5% επί του συνόλου των πρωτεϊνών. Τα λιπίδια και τα υδρόφοβα αμινοξέα των πρωτεϊνών των μεμβρανών έχουν ως συνέπεια τη διοργάνωση του μορίου των τελευταίων κατά τέτοιο τρόπο, ώστε τα υδρόφοβα τμήματά τους να προσανατολίζονται προς το λίπος και τα υδρόφιλα τμήματα προς το νερό. Ειδικότερα, τα φωσφολιπίδια και τα λιπολυτικά ένζυμα προσροφούνται στη μεμβράνη. (37)

✓ *Ένζυμα του γάλακτος*

Τα ένζυμα που απαντούν στο γάλα προέρχονται από το ζώο από το οποίο παράχθηκε το γάλα. Τα πρώτα συγκαταλέγονται στα φυσικά συστατικά του γάλακτος. Ορισμένα από τα ένζυμα του γάλακτος χρησιμοποιούνται κατά τον ποιοτικό του έλεγχο. Μεταξύ των σημαντικότερων είναι η περοξειδάση, η φωσφατάση και η λιπάση. (37)

Φωσφατάση

Η φωσφατάση έχει την ιδιότητα να διασπά ορισμένους εστέρες του φωσφορικού οξέος σε φωσφορικό οξύ και την αντίστοιχη αλκοόλη. Η παρουσία της φωσφατάσης στο γάλα μπορεί να ανιχνευτεί με την προσθήκη ενός εστέρα του φωσφορικού οξέος και ενός αντιδραστηρίου που οδηγεί σε αλλαγή του χρώματος αντιδρώντας με την αλκοόλη που απελευθερώνεται. Η φωσφατάση καταστρέφεται κατά την συνήθη παστερίωση του γάλακτος (72°C για 15-20 δευτερόλεπτα). Επομένως, το τεστ της φωσφατάσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επιβεβαίωση ότι επιτεύχθηκε η επιθυμητή θερμοκρασία κατά την παστερίωση. (37)

Λιπάση

Η λιπάση διασπά το λίπος σε γλυκερόλη και λιπαρά οξέα. Η περίσσεια ελεύθερων λιπαρών οξέων στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα οδηγεί σε ταγγή γεύση. Η δράση του ενζύμου αυτού φαίνεται στις περισσότερες περιπτώσεις να είναι αδύναμη, αν και το γάλα ορισμένων ζώων χαρακτηρίζεται από έντονη δραστηριότητα λιπάσης. Η ποσότητα της λιπάσης στο γάλα πιστεύεται ότι αυξάνεται προς το τέλος του γαλακτοπαραγωγικού κύκλου. Καμιά αντίδραση δεν λαμβάνει χώρα μεταξύ της λιπάσης του γάλακτος και των λιποσφαιρίων, εφόσον η μεμβράνη των τελευταίων παραμένει άθικτη. Με την καταστροφή όμως, της μεμβράνης των λιποσφαιρίων η λιπάση βρίσκει υπόστρωμα, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ελεύθερων λιπαρών οξέων. (31)

1.5.4 Λοιπά συστατικά του γάλακτος

Από τα υπόλοιπα συστατικά του γάλατος, τα πλέον ενδιαφέροντα είναι τα ακόλουθα:

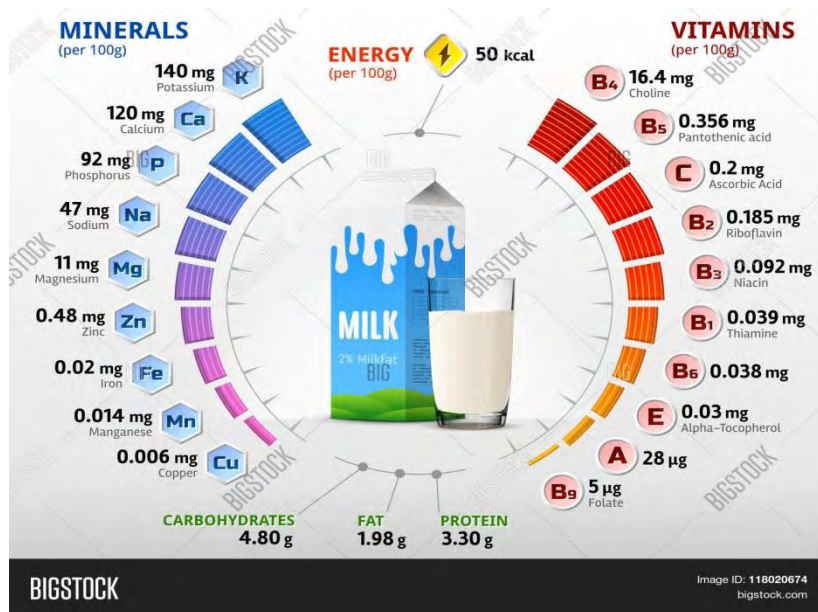
- **Βιταμίνες:** όλες τις υδατοδιαλυτές και λιποδιαλυτές, με κυριότερες τις παρακάτω:

Λιποδιαλυτές: A (Ρετινόλη), D και τις προβιταμίνες τους, καθώς και E

Υδατοδιαλυτές: B1 (θειαμίνη), B2 (ριβοφλαβίνη), B6 (πυροδοξάλη), B12, νιοτινικό οξύ, παντοθειικό οξύ, χολίνη, βιοτίνη και C (ασκορβικό οξύ)

- **Ανόργανα συστατικά:** είναι τα στοιχεία που περιέχονται είτε υπό τη μορφή οργανικών αλάτων, είτε ως ανόργανα σύμπλοκα. Κυρίως Ca, P καθώς και Na, K, Cl, S και σε μικρότερη αναλογία Mg, Cu, Fe, Zn, Mn και επίσης ίχνη άλλων στοιχείων
- **Αέρια:** CO₂, O₂ και N₂
- **Οργανικά οξέα:** γαλακτικό, βουτυρικό και οξικό που προέρχονται από τη ζύμωση του γαλακτοσάκχαρου από τους μικροοργανισμούς του γάλακτος καθώς και σε μικρότερη ποσότητα κιτρικό (0.18%)
- **Άλλα λιποειδή:** κυρίως καροτένια, χοληστερόλη και φωσφολιποειδή. Τα καροτένια έχουν κίτρινο χρώμα, αποτελούν την προβιταμίνη A και συμβάλλουν στο κίτρινο χρώμα του βουτύρου του γάλακτος. Η χοληστερόλη εμφανίζει σχετικά αυξημένη περιεκτικότητα στο γάλα, η οποία όμως δε μπορεί να θεωρηθεί ότι συμμετέχει καθοριστικά στην πρόκληση παθολογικών καταστάσεων, όπως αθηρωμάτωση και καρδιοπάθειες, αφού ο οργανισμός σχηματίζει αυξημένα ποσά χοληστερόλης, κυρίως από άλλους παράγοντες, όπως είναι η κατανάλωση κορεσμένων λιπών, το κάπνισμα καθώς και άλλα. Τα φωσφολιποειδή αποτελούν την κύρια λίθο της διπλοστοιβάδας της μεμβράνης των λιποσφαιρίων και συνίστανται κυρίως από λεκιθίνες και κεφαλίνες. (40)

Στην παρακάτω εικόνα δίνονται οι ποσότητες των μεταλλικών στοιχείων, αλλά και των βιταμινών που αντιστοιχούν σε 100gr γάλακτος.



Εικόνα 18: Μεταλλικά στοιχεία και βιταμίνες στο γάλα

1.6 Πολυμορφισμός πρωτεϊνών γάλακτος

1.6.1 Εισαγωγή

Η σύνθεση των πρωτεϊνών του γάλακτος ελέγχεται από γονίδια. Το τμήμα του DNA που αποτελεί ένα γονίδιο μεταγράφεται σε αγγελιοφόρο RNA και μεταφράζεται σε ένα πολυπεπίδιο, το οποίο με επιπλέον τροποποίηση, οδηγεί στο σχηματισμό μιας πρωτεΐνης. Η διαδικασία αυτή ακολουθείται και για το σχηματισμό κάθε μιας από τις πρωτεΐνες του γάλακτος. (43)

Μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους τα χρωμοσώματα παρουσιάζουν εξαιρετική ομοιότητα στα ζεύγη τους. Ωστόσο, σε τμήματα των χρωμοσωμάτων που αντιπροσωπεύουν τμήματα γονιδίων μπορεί να υφίσταται κάποια παραλλακτικότητα στην αλληλουχία των βάσεων του DNA. Αυτή η παραλλακτικότητα μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία συγκεκριμένων γονιδίων με περισσότερες από μια μορφές που ονομάζονται αλληλόμορφα. Όπου η γενετική παραλλαγή απαντάται συχνά (π.χ. τουλάχιστον 5% των γονιδιακών τόπων στα χρωμοσώματα έχουν ένα αλληλόμορφο διαφορετικό από αυτό που παρατηρείται συνήθως), τότε αναφερόμαστε στην παρουσία του φαινομένου του γενετικού πολυμορφισμού. Τα αυτοσωμικά χρωμοσώματα υφίστανται σε δύο αντίγραφα και επομένως υπάρχουν δύο αλληλόμορφα κάθε γονιδίου. Εάν αυτά τα αλληλόμορφα είναι όμοια μεταξύ τους, τότε το

άτομο είναι ομόζυγο για το συγκεκριμένο γονίδιο, ενώ σε περίπτωση που είναι διαφορετικά το άτομο είναι ετερόζυγο. (42)

Η ύπαρξη γενετικού πολυμορφισμού στις πρωτεΐνες του γάλακτος διαπιστώθηκε για πρώτη φορά από τους Aschaffenburg και Drewry (1955) και αφορούσε στη β-λακτογλοβουλίνη. Οι παραπάνω ερευνητές παρατήρησαν ότι τα δείγματα γάλακτος από διαφορετικές αγελάδες που υφίσταντο ηλεκτροφόρηση (σε φίλτρο χαρτιού, ρυθμιστικό διάλυμα βαρβιτόνης, pH 8.6, τάση 16V για 16 ώρες), παρήγαγαν μία ή δύο διαφορετικές ηλεκτροφορητικές δέσμες ή ένα μείγμα τους που προσδιορίστηκαν ως β1 και β2 (με σειρά μειωμένης κινητικότητας). Δύο χρόνια αργότερα, όταν ανακαλύφθηκε ότι η σύνθεση των δύο διαφορετικών τύπων της β-λακτογλοβουλίνης βρισκόταν υπό γενετικό έλεγχο, η ονομασία αντικαταστάθηκε από την αντίστοιχη A και B. (41)

Η ανακάλυψη των Aschaffenburg και Drewry αποτέλεσε το έναυσμα έντονης ερευνητικής δραστηριότητας με στόχο την περαιτέρω μελέτη του γενετικού πολυμορφισμού της β-λακτογλοβουλίνης, αλλά και της διερεύνησης της πιθανότητας ύπαρξης γενετικού πολυμορφισμού στις υπόλοιπες πρωτεΐνες του ορού, καθώς και στις διάφορες καζεΐνες. Αρχικά, οι προσπάθειες επικεντρώθηκαν στη διαμόρφωση μεθόδων προσδιορισμού των γενετικών αλληλόμορφων των πρωτεϊνών του γάλακτος, στη μελέτη του τρόπου με τον οποίο κληρονομούνται, καθώς και στη διακύμανση των συχνοτήτων των αλληλόμορφων των πρωτεϊνών του γάλακτος στις διάφορες φυλές των βοοειδών. (42)

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. Σύντομα, το διεθνές ενδιαφέρον στράφηκε στην εύρεση των γονιδιακών τόπων που συσχετίζονται με τα παραγωγικά χαρακτηριστικά του γάλακτος. Μέχρι σήμερα οι περισσότερες από τις μελέτες που πραγματοποιήθηκαν επικεντρώνονται στα γονίδια που ελέγχουν τη σύνθεση των τεσσάρων καζεϊνών (α_{s1} , α_{s2} , β , κ) καθώς και της β-λακτογλοβουλίνης. (42)

Τα γονίδια που καθορίζουν τις πρωτεΐνες του γάλακτος των βοοειδών εδράζονται στο χρωμόσωμα 6 του γονιδιώματός τους. (43)

Ο πολυμορφισμός της α_{s1} -καζεΐνης

Η οικογένεια της α_{s1} -καζεΐνης, η οποία αποτελείται περισσότερο από 40% των καζεϊνών στο γάλα των βοοειδών, αποτελείται από ένα σημαντικό και ένα δευτερεύον στοιχείο. Και οι δύο πρωτεΐνες είναι πολυπεπτίδια μονής αλυσίδας με την ίδια ακολουθία αμινοξέων, το οποίο καθιερώθηκε από τον Mercier et al. (1971) και τον Grosclaude et al. (1973) και διαφέρουν μόνο στο βαθμό φωσφορυλίωσής τους. Έχει βρεθεί η γενετική παραλλαγή **A** στις φυλές *Holstein Friesians*, *Red Holsteins* και *German Red*, η **B** που είναι μία κοινή παραλλαγή του είδους *Bos taurus*, η **C** που είναι η κυρίαρχη παραλλαγή στα είδη *Bos indicus* και *Bos grunniens*, η παραλλαγή **D** που βρέθηκε σε διάφορες φυλές *Bos taurus* της Γαλλίας και της Ιταλίας και η παραλλαγή **E** στο είδος *Bos grunniens*. Επίσης, έχουν χαρακτηριστεί τρεις νέες παραλλαγές, οι **F**, **G** και **H**. (26) Πιο συγκεκριμένα, η παραλλαγή A δημιουργείται μοναδικά ως αποτέλεσμα της παράλειψης εξονίου που προκαλείται από μετάλλαξη μιας βάσης, η οποία επηρεάζει τη στρατολόγηση του πρόδρομου mRNA. (38) Σε αυτήν την παραλλαγή σχηματίζονται μαλακά τυροπήγματα, ενώ με την παραλλαγή C τα τυροπήγματα που προκύπτουν είναι πιο μαλακά. (26)

Πίνακας 3: Οι γενετικές παραλλαγές της αγελαδινής α_{s1} -καζεΐνης και οι διαφορές τους (Farrell et al., 2004)

Πρωτεΐνη	Παραλλαγή	Θέση και αμινοξύ στην πρωτεΐνη					192
		14-26	53	51-58	59	66	
α_{s1} -CN (199 αμινοξέα)	A	Απαλοιφή					Glu
	B		Ala		Gln	SerP	Glu
	C						Gly
	D		PurP				Glu
	E				Lys		Gly
	F					Leu	Glu
	G						Glu
	H				Απαλοιφή		Glu

Ο πολυμορφισμός της α_{s2} -καζεΐνης

Η οικογένεια της α_{s2} -καζεΐνης αποτελεί περισσότερο από το 10% του κλάσματος καζεϊνών στο γάλα των βοοειδών. Οι επικρατέστερες μορφές στο γάλα των βοοειδών περιέχουν ένα διαμοριακό δισουλφιδικό δεσμό και διαφέρουν μόνο στο βαθμό φωσφορυλίωσης. Εκτός από την πιο κοινή παραλλαγή **CSN1S2*A**, η οποία έχει βρεθεί σε όλα τα είδη του γένους *Bos*, έχει βρεθεί η γενετική παραλλαγή **B** που είναι κοινή για τα είδη *Bos taurus*, *Bos indicus* και *Bos grunniens*, η **C** που έχει ταυτοποιηθεί στη φυλή *Zebu* (*Bos*

grunniens) της Μογγολίας (44) και η παραλλαγή **D** που έχει βρεθεί με χαμηλή συχνότητα σε ορισμένες Ευρωπαϊκές φυλές (*Bos taurus*) και στη φυλή *Namchi* (*Bos taurus*) της Αφρικής. Η παραλλαγή **A** είναι η πιο συχνή σε όλες τις φυλές που έχουν διερευνηθεί μέχρι τώρα και επιπλέον είναι η πιο σταθερή στις περισσότερες δυτικές φυλές. Τέλος, η α_{s2} -καζεΐνη είναι η πιο υδρόφιλη από όλες τις καζεΐνες και η αρχική της δομή μπορεί να χαρακτηριστεί από τέσσερις περιοχές: Μία N-τελική υδρόφιλη περιοχή με ανιονικές ομάδες, μία κεντρική υδρόφοβη περιοχή που ακολουθείται από άλλη υδρόφιλη περιοχή με ανιονικές ομάδες και μία C-τελική θετικά φορτισμένη υδρόφοβη περιοχή. (45)

Πίνακας 4: Οι γενετικές παραλλαγές της αγελαδινής α_{s2} -καζεΐνης και οι διαφορές τους (Farrell et al., 2004)

Πρωτεΐνη	Παραλλαγή	Θέση και αμινοξύ στην πρωτεΐνη			
		33	47	51-59	130
α_{s2} -CN (207 αμινοξεία)	A	Glu	Ala		Thr
	B	Η ολοκληρωμένη αλληλουχία δεν έχει καθοριστεί			
	C	Gly	Thr		Ile
	D			Απαλοιφή	

Ο πολυμορφισμός της β -καζεΐνης

Η οικογένεια της β -καζεΐνης, η οποία αποτελείται από πάνω από 45% των καζεϊνών στο γάλα των βοοειδών, είναι αρκετά περίπλοκη λόγω της δράσης της φυσικής πρωτεάσης Πλασμίνης του γάλακτος. Η παραλλαγή **A** είναι η κυρίαρχη σε όλα τα είδη *Bos* που έχουν μελετηθεί, ενώ οι παραλλαγές **C** και **D** έχουν μια λιγότερη φωσφορική ομάδα από τις υπόλοιπες. (46) Κύριο χαρακτηριστικό της β -καζεΐνης είναι ότι όλες οι παραλλαγές της προκύπτουν από γενετικό πολυμορφισμό, ο οποίος ευθύνεται και για την τροποποίηση της φωσφορυλίωσης στις παραλλαγές C και D. Επίσης, αποτελεί την πιο υδρόφοβη καζεΐνη από όλα τα κλάσματα καζεϊνών. (26)

Πίνακας 5: Οι γενετικές παραλλαγές της αγελαδινής β-καζεΐνης και οι διαφορές τους (Farrell et al., 2004)

Πρωτεΐνη	Παραλλαγή	Θέση και αμινοξύ στην πρωτεΐνη													
		18	25	35	36	37	67	72	88	93	106	122	137/138	152	?
β-CN (209 αμινοξέα)	A ¹						His								
	A ²	Ser ^P	Arg	Ser ^P	Glu	Glu	Pro	Glu	Leu	Met	His	Ser	Leu/Pro	Pro	Glu
	A ³										Glu				
	B						His					Arg			
	C			Ser		Lys	His								
	D	Lys													
	E				Lys										
	F						His								Leu
	G						His							Leu	
	H		Cys							Ile					
	HP								Glu		Leu				Glu
I										Leu					

Ο πολυμορφισμός της κ-καζεΐνης

Η οικογένεια της κ-καζεΐνης αποτελείται από ένα βασικό συστατικό χωρίς υδατάνθρακες και τουλάχιστον έξι δευτερεύοντα συστατικά. Οι πιο κοινές γενετικές παραλλαγές έχουν χαρακτηριστεί ως **A** και **B**, με την A να τείνει να είναι κυρίαρχη στις περισσότερες γαλακτοκομικές φυλές βοοειδών. Στο είδος *Bos indicus* έχουν βρεθεί επιπλέον οι παραλλαγές **C** και **E** (43), ενώ νέες γενετικές παραλλαγές έχουν χαρακτηριστεί ως **F1**, **F2**, **G1**, **G2**, **H**, **I** και **J**. (26)

Πίνακας 6: Οι γενετικές παραλλαγές της αγελαδινής κ-καζεΐνης και οι διαφορές τους (Farrell et al., 2004)

Πρωτεΐνη	Παραλλαγή	Θέση και αμινοξύ στην πρωτεΐνη							
		10	97	104	135	136	148	155	
κ-CN (169 αμινοξέα)	A	Arg	Arg	Ser	Thr	Thr	Asp	Ser	
	B					Ile	Ala		
	C		His						
	E							Gly	
	F ¹						Val		
	F ²	His				Ile	Ala		
	G ¹		Cys			Ile	Ala		
	G ²						Ala		
	H						Ile		
	I			Ala					
	J					Ile	Ala	Arg	

1.7 ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν η διερεύνηση πιθανών πολυμορφισμών στο γονίδιο της α_{S1} -καζεΐνης του γάλακτος σε ελληνικές αγελάδες της φυλής Holstein. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε το εξόνιο 4 του γονιδίου CSN1S1 που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη α_{S1} -καζεΐνη. Για την πραγματοποίηση του πειράματος, συμπεριλήφθηκαν δείγματα αίματος αγελάδων από μία κτηνοτροφική μονάδα στην περιοχή της Θεσσαλίας.

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Απομόνωση DNA

Για την απομόνωση του DNA από τα δείγματα αίματος έγινε η ακόλουθη διαδικασία:

- Μεταφορά 0,5 ml δείγματος αίματος σε eppendorf των 2 ml
- Προσθήκη 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος 1X SSC 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 μl SDS 10%, 15 μl διαλύματος πρωτεΐνάσης K (10 mg/ml)
- Επώαση στους 55 °C υπό ανάδευση για περίπου 2 h
- Προσθήκη στο eppendorf 1ml φαινόλης και ανάδευση σε vortex
- Φυγοκέντρηση για 10 min στις 13,000 rpm στους 4 °C
- Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέα eppendorf και απόρριψη του ιζήματος
- Προσθήκη 1 ml 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 eppendorf 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 μl ddH₂O και αποθήκευση του δείγματος DNA στους -20 °C.

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων DNA σε πηκτή αгарόζης πυκνότητας 1.5%, με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου. Για την κατασκευή της πηκτής αгарόζης χρησιμοποιήθηκαν 50 ml TAE 1x - 0.8 g αгарόζη - 5 μl βρωμιούχο αιθίδιο (10mg/ml)

2.2 Τεχνική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η PCR (Polymerase Chain Reaction) είναι μια τεχνική κατά την οποία πολλαπλασιάζονται *in vitro* επιθυμητά τμήματα DNA έως και δισεκατομμύρια φορές, με τη βοήθεια του ενζύμου DNA πολυμεράση. Χαρακτηρίζεται από μεγάλη ταχύτητα και χαμηλό κόστος.

Αρχικά, σχεδιάστηκαν κατάλληλοι εκκινητές έτσι ώστε να ενισχυθεί το εξόνιο 4 του γονιδίου CSN1S1. Στον πίνακα 7 φαίνεται η αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για να ενισχύσουμε την περιοχή των 163 bp, η οποία περιλαμβάνει το εξόνιο 4 της α_{s1} -καζεΐνης.

Πίνακας 7: Εκκινητές ενίσχυσης του εξονίου 4 της α_{s1} -καζεΐνης

Εκκινητής	Αλληλουχία
CSN1S1EX4.FW	ACATTCTCCTTTTCTGACTGTGT
CSN1S1EX4.RV	AGAAATTGAGTTGATTTTCCAGA

Στην PCR αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια για τελικό όγκο 50 μ l:

- 10 μ l Buffer (5X)
- 5 μ l $MgCl_2$ (25 mM)
- 1 μ l dNTPs (40 mM)
- 0.7 μ l Forward Primer (50 pmoles/ μ l)
- 0.7 μ l Reverse Primer (50 pmoles/ μ l)
- 0.25 μ l Taq polymerase (5 units/ μ l)
- H_2O μέχρι να συμπληρωθούν 50 μ l
- DNA: ο όγκος του εξαρτάται από τη συγκέντρωσή του, όπως καθορίστηκε από την προηγούμενη ηλεκτροφόρηση

Η διαδικασία της PCR περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- 1) Αποδιάταξη των δύο 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. (47)

2.3 Ανάλυση SSCP

Η SSCP (:Single-Strand Conformational Polymorphism) είναι μια τεχνική κατά την οποία ανιχνεύονται μεταλλάξεις και γενετικοί πολυμορφισμοί. Συγκεκριμένα, μπορούν εύκολα να προσδιοριστούν οι πολυμορφισμοί σε επίπεδο νουκλεοτιδίου (SNPs: Single Nucleotide Polymorphisms), οι οποίοι εντοπίζονται στα γονιδιώματα των θηλαστικών. Η μέθοδος βασίζεται στην ιδιότητα του DNA να κινείται σε ένα gel πολυακρυλαμίδης ανάλογα με τη δομή του στο χώρο. Έτσι, κάθε νουκλεοτιδική αλλαγή σε έναν κλώνο του DNA οδηγεί σε διαφορετική κινητικότητα και συνεπώς σε διαφορετικό πρότυπο ζωνώσεων, έπειτα από ηλεκτροφόρηση.

Για την παρασκευή ενός gel πολυακρυλαμίδης (12%) χρησιμοποιήθηκαν 14.8 g ακρυλαμίδα, 0.4 g Bis-Ακρυλαμίδα (N,N'-Methylenebisacrylamide), 12.5 ml γλυκερόλη 50% και 6.5 ml TBE 10x. Ακολούθησε διήθηση του διαλύματος και προσθήκη νερού έως ο τελικός όγκος να φτάσει τα 56 ml και προστέθηκαν στο διάλυμα 65 μl TEMED και 400 μl APS 20%. Τέλος, το διάλυμα τοποθετήθηκε σε κατάλληλο καλούπι έπειτα από ανάδευση.

Τοποθετήθηκαν 6 μl PCR προϊόντος και 10 μl Loading buffer σε νέα eppendorf. Στη συνέχεια, έγινε αποδιάταξη σε μηχανήμα PCR επιλέγοντας κατάλληλο πρόγραμμα. Αμέσως μετά, τα δείγματα τοποθετήθηκαν στον πάγο, ώστε να αποφευχθεί η επαναδιάταξη των δύο κλώνων. Έπειτα, τα δείγματα φορτώθηκαν στα πηγαδάκια του gel, συμπληρώθηκε επαρκής όγκος διαλύματος TBE 0,5x στο μηχανήμα και πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση για 20 h.

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 H₂O + 1ml οξικού οξέος. Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για 2 διαδοχικές πλύσεις διάρκειας 3 λεπτών η κάθε μία.
- ✓ Ακολούθησε πλύση με 200ml διαλύματος AgNO₃ για 10min. Το διάλυμα παρασκευάστηκε με προσθήκη 1g σκόνης AgNO₃ σε 1 l H₂O.
- ✓ Το gel ξεπλύθηκε 2 φορές με H₂O.
- ✓ Το τελευταίο διάλυμα που παρασκευάστηκε περιείχε: 3g NaOH, 0.01 g NaBH₄, 1 ml φορμαλδεΰδης και 200 ml H₂O. Μετά την προσθήκη αυτού του διαλύματος το gel

παρέμεινε στο μηχάνημα ανάδευσης αρκετή ώρα ώστε να εμφανιστούν καθαρά τα πρότυπα των ζωνώσεων.

- ✓ Τέλος το gel ξεπλύθηκε με H₂O και αφαιρέθηκε από το μηχάνημα ανάδευσης.

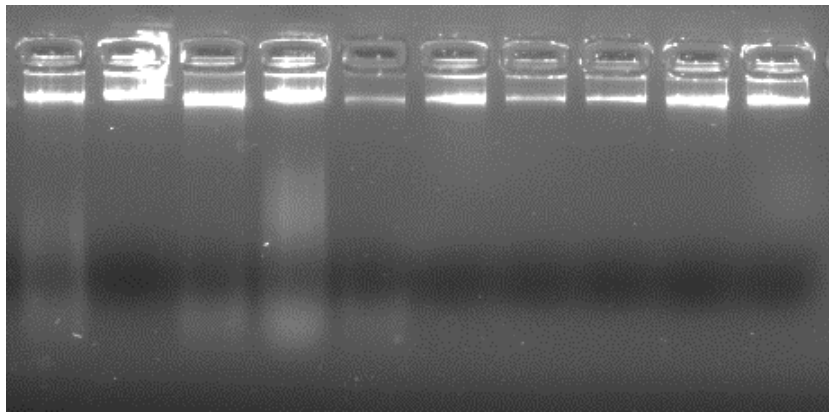
2.4 Καθαρισμός DNA

Για να προσδιοριστεί η αλληλουχία του τμήματος που ενισχύθηκε με την PCR, ορισμένα PCR προϊόντα καθαρίστηκαν από υπολείμματα με βάση το κιτ καθαρισμού DNA (Gel & PCR clean-up, Macherey - Nagel) και ακολούθησε αποστολή τους για αλληλούχιση σε εξωτερικό εργαστήριο.

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Απομόνωση DNA

Έγινε απομόνωση DNA από 94 δείγματα αίματος αγελάδας της γαλακτοπαραγωγικής φυλής Holstein. Πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε πήκτη αγαρόζης 1.5% (w/v) με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου. (Εικόνα 19) Οι φωτεινές μπάντες που διακρίνονται παρακάτω αντιστοιχούν στο DNA που απομονώθηκε.

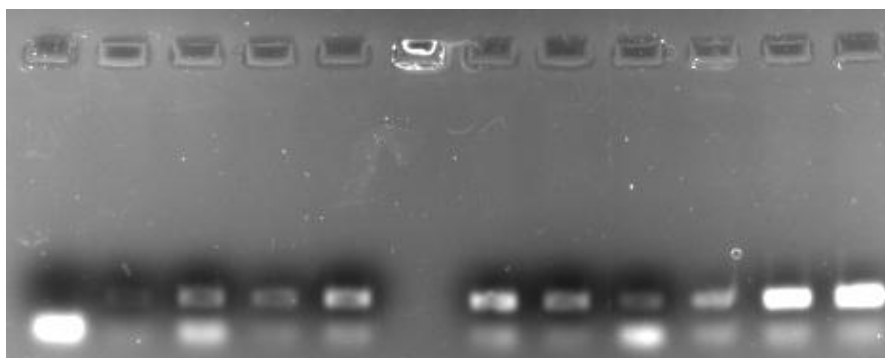


Εικόνα 19: Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτη αγαρόζης 1.5% (w/v)

3.2 Τεχνική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Χρησιμοποιώντας τους κατάλληλους εκκινητές που αναφέρθηκαν παραπάνω, ενισχύθηκε το τμήμα του εξονίου 4 που επιθυμούσαμε. Για να επαληθευτεί η επιτυχία της μεθόδου πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε πήκτη αγαρόζης 2%. (Εικόνα 20) Ακολούθως, ηλεκτροφορούμε μαζί με τα προϊόντα της PCR και έναν ladder ή αλλιώς μάρτυρα γνωστού μοριακού βάρους, ώστε να υπολογιστεί το μήκος του τμήματος που ενισχύθηκε.

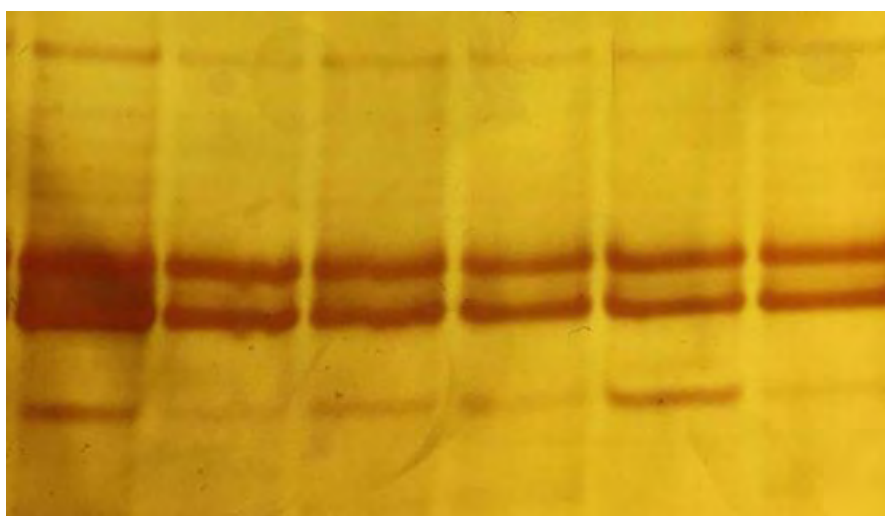
N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----



Εικόνα 20: Προϊόντα PCR σε ηλεκτροφόρηση πήκτη αγαρόζης 2% με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου

3.3 Ανάλυση SSCP

Αφού πραγματοποιήθηκε η ενίσχυση της επιθυμητής περιοχής του εξονίου 4 μέσω της μεθόδου PCR, έγινε ανάλυση SSCP των PCR προϊόντων. Τα αποδιαταγμένα δείγματα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε gel πολυακρυλαμίδης 12%, για περίπου 22h στα 220Volt. Κατά την SSCP ανάλυση, το DNA κινείται σε μονόκλωνη κατάσταση μέσα στην πηκτή πολυακρυλαμίδης, για αυτό παρατηρείται η ύπαρξη δύο ζωνών για τα ομόζυγα άτομα και τεσσάρων για τα ετερόζυγα άτομα. Παρακάτω παρουσιάζεται μία ενδεικτική εικόνα από gel πολυακρυλαμίδης μετά τον χρωματισμό της με νιτρικό άργυρο.



Εικόνα 21: Ανάλυση SSCP σε 6 προϊόντα PCR

Από την ανάλυση SSCP που πραγματοποιήθηκε στο σύνολο των δειγμάτων, ακολούθησε αλληλούχηση οκτώ αντιπροσωπευτικών δειγμάτων για την πιθανή ανίχνευση πολυμορφισμών.

3.4 Αλληλούχηση

Η αλληλούχηση πραγματοποιήθηκε και με τους δύο εκκινητές που είχαν επιλεχθεί για την ενίσχυση του PCR προϊόντος. Έτσι, προέκυψαν δύο αλληλουχίες βάσεων για κάθε ένα δείγμα: μία για τον εκκινητή της μεταγραφόμενης αλυσίδας και μία για τον εκκινητή της συμπληρωματικής αλυσίδας. Το μέγεθος του τμήματος που προέκυψε για όλα τα δείγματα, μετά την αλληλούχηση, ήταν 163bp. Τα αρχεία των ακολουθιών αναλύθηκαν με το πρόγραμμα BioEdit© και στη συνέχεια, οι αλληλουχίες στοιχίστηκαν με τον αλγόριθμο ClustalX για να βρεθούν οι περιοχές ομολογίας.

Η αλληλουχία του PCR προϊόντος μεγέθους 163bp, η οποία περιλαμβάνει και το εξόνιο 4 (13bp), είναι η εξής:

```
          10      20      30      40      50      60      70
As1-casein_X59856  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Sequence1         ACATTCTCCT TTTCTGACTG TGTTTTTCAC TTGTACAATT CACAATTAA TTCCTACAGG AAGTCCTCAA
Exon4             .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

          80      90      100     110     120     130     140
As1-casein_X59856  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Sequence1         TGAAAAATTA CTCAGGTTTT TTGTGCCAGT AAGTATATC TACTTCTTCT TCAATGACAA ATGTATTTTT
Exon4             .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

          150     160
As1-casein_X59856  .....|.....|
Sequence1         CTGAAAAAAT CAACTCAATT TCT
Exon4             .....|.....|
```

Εικόνα 22: Αλληλουχία του PCR προϊόντος

Μεταφράζοντας την παραπάνω αλληλουχία των 39 ζευγών βάσεων του εξονίου 4 σε αμινοξική ακολουθία και στοιχίζοντάς τη με την αμινοξική ακολουθία αναφοράς για την α_{s1} -καζεΐνη (UniProtKB: locusCASA1_BOVIN, accession P02662) προέκυψε ότι η αμινοξική αλληλουχία του εξονίου 4 (θέσεις 29-41) είναι ίδια με την πρότυπη αλληλουχία του γονιδίου της α_{s1} -καζεΐνης.

```
csn1s1_P02662      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
protein 1         MKLLILTCLVAVALARPKHPKIKHQGLPQEEVLNENLLRFVAPFPFVFGKEKVNELSKDIG
                   .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
                   EVLNENLLRFVAPFPFVFGKEKVNELSKDIG

          70      80      90      100     110     120
csn1s1_P02662      .....|.....|.....|.....|.....|.....|
protein 1         SESTEDQAMEDIKQMEAESISSSEIIVPNSVEQKHQKEDVPSERYLGYLEQLLRLLKKYK

          130     140     150     160     170     180
csn1s1_P02662      .....|.....|.....|.....|.....|.....|
protein 1         VPQLEIVPNSAERLHSMKEGIHAQQKEPMIGVNOELAYFYPELFRQFYQLDAYPSGAWY

          190     200     210
csn1s1_P02662      .....|.....|.....|
protein 1         YVPLGTQYTDAPSFSDIPNPIGSENSEKTTMPLW
```

Εικόνα 23: Αμινοξική αλληλουχία της α_{s1} -καζεΐνης

4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σήμερα, ένα από τα σημαντικότερα προϊόντα κατανάλωσης είναι το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Αν και οι απαιτήσεις της σημερινής κοινωνίας έχουν οδηγήσει στην παραγωγή και κατανάλωση πολλών και διαφορετικών ειδών γάλακτος, ένα από τα πιο σημαντικά είναι το αγελαδινό γάλα. Συνεπώς, η περαιτέρω ανάλυσή του θεωρείται πολύ σημαντική, καθώς μπορεί να επηρεάζει την ποιότητά του και ως εκ τούτου την υγεία του ανθρώπου.

Ένα από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών του γάλακτος που πρώτα επισημάνθηκε από τον Grosclaude et al. (1965) είναι η στενή σύνδεση των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις τέσσερις καζεΐνες. Έτσι, τα γονίδια της καζεΐνης οργανώνονται σε ένα σύμπλεγμα που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 6 και έχει διαχωριστεί σε δύο ομάδες: η μία ομάδα περιλαμβάνει τα γονίδια CSN1S1, CSN2, CSN1S2 και η άλλη ομάδα αποτελείται από το γονίδιο CSN3. Η ισχυρότερη σύνδεση εμφανίζεται μεταξύ των γονιδίων CSN1S1 και CSN2. Η πρώτη ομάδα που κληρονομείται ως απλότυπος, συνδέεται σημαντικά τόσο με την ποσότητα του παραγόμενου γάλακτος, όσο και με την περιεκτικότητά του σε πρωτεΐνες. Αντιθέτως, δεν έχει βρεθεί καμία συσχέτιση των χαρακτηριστικών του γάλακτος με το γονίδιο CSN3. (43)

Γενικά, οι έξι κύριες πρωτεΐνες του γάλακτος στα βοοειδή κωδικοποιούνται από γονίδια που χαρακτηρίζονται από αρκετές συνώνυμες και μη συνώνυμες μεταλλάξεις, με περισσότερες από 47 αναγνωρισμένες παραλλαγές. (48) Σε μια πρόσφατη ανασκόπηση, παρατηρήθηκαν εννέα διαφορετικές γενετικές παραλλαγές του γονιδίου CSN1S1 (A, B, C, D, E, F, G, H και I) στο γένος *Bos* (Πίνακας 4). Οι πρωτεϊνικές παραλλαγές διαφέρουν κυρίως, εξαιτίας απλών αντικαταστάσεων των αμινοξέων, με εξαίρεση την παραλλαγή A (44) και την παραλλαγή H, στις οποίες παρατηρείται απαλοιφή αμινοξέων στις περιοχές που κωδικοποιούνται από το εξόνιο 4 και 8, αντίστοιχα. (43)

Σήμερα, με την ανάπτυξη των μοριακών τεχνικών είναι δυνατός ο προσδιορισμός των γονιδιακών τύπων των πρωτεϊνών του γάλακτος, με αποτέλεσμα οι ερευνητές να έχουν δείξει σημαντικό ενδιαφέρον στη δυνατότητα χρησιμοποίησης των γενοτύπων των πρωτεϊνών του γάλακτος ως γενετικών δεικτών για την αύξηση της γαλακτοπαραγωγής και για την αλλαγή της σύνθεσης του γάλακτος. Επιπλέον, μεταλλάξεις εντός των μη κωδικών αλληλουχιών των καζεϊνών έχουν αποδειχθεί ότι επηρεάζουν την έκφραση της πρωτεΐνης και ως εκ τούτου, τη σύνθεση του γάλακτος και την τυροκομία. Ως αποτέλεσμα, η εμφάνιση αλληλομόρφων που σχετίζονται με μειωμένη περιεκτικότητα διαφόρων καζεϊνών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την

παραγωγή γάλακτος με συγκεκριμένες ιδιότητες, όπως είναι το υποαλλεργικό γάλα. Ακολούθως, οι παραλλαγές των πρωτεϊνών του γάλακτος είναι ένα χρήσιμο εργαλείο και για τον χαρακτηρισμό της φυλής, βάσει φυλογενετικών μελετών. (48)

Οι πρωτεΐνες γάλακτος παρέχουν στο νεογνό που θηλάζει μια πηγή αμινοξέων, ασβέστιο, αλλά και βιολογικά ενεργά πεπτίδια που ωφελούν την υγεία. Έτσι, κατά την τελευταία δεκαετία, η προσοχή των επιστημόνων έχει μετατοπιστεί στα απαραίτητα αμινοξέα για την ανθρώπινη διατροφή, σε πιο συγκεκριμένα ζητήματα ανθρώπινης υγείας που δεν περιορίζονται μόνο στο νεογνό, όπως η παρουσία βιοενεργών πεπτιδίων σε πρωτεΐνες γάλακτος και εμφάνιση αλλεργίας στις πρωτεΐνες του γάλακτος. Οι βιολογικές δραστηριότητες των πεπτιδίων που απελευθερώνονται από την πέψη της πρωτεΐνης του γάλακτος επηρεάζονται άμεσα από υποκαταστάσεις αμινοξέων ή από εσωτερικές απαλοιφές που προκύπτουν από γονιδιακές μεταλλάξεις. Ακολούθως, η ύπαρξη ελαττωματικών αλληλομόρφων που σχετίζονται με μειωμένη περιεκτικότητα σε διάφορες καζεΐνες είναι ενδιαφέρον για την παραγωγή υποαλλεργικού γάλακτος με χαμηλή περιεκτικότητα σε καζεΐνη. (43)

Οι Fiat and Jolles (1989) επανεξέτασαν τις δομικές και φυσιολογικές απόψεις των καζεϊνών, καθώς και την παρουσία βιοδραστικών πεπτιδίων, αλλά η ποσότητα πληροφοριών που αφορούν το βιολογικό αποτέλεσμα αυτών των ενώσεων *in vivo* ήταν ακόμη σπάνια την εποχή εκείνη. Τα βιοδραστικά πεπτίδια είναι συγκεκριμένα θραύσματα πρωτεϊνών που έχουν θετική επίδραση στις φυσιολογικές λειτουργίες ή καταστάσεις και μπορεί τελικά να επηρεάσουν την υγεία. (50) Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί ότι διακριτά πεπτίδια σε προϊόντα υδρόλυσης πρωτεϊνών μπορούν να επηρεάσουν διαφορετικά την εναπόθεση ασβεστίου στον οργανισμό και ότι η γενετική παραλλαγή εντός των εξεταζόμενων αλληλουχιών μπορεί να επηρεάσει τις βιολογικές τους δραστηριότητες. Έτσι, οι πολυμορφισμοί της πρωτεΐνης του γάλακτος και οι υποκαταστάσεις αμινοξέων που απαντώνται όχι μόνο στα βοοειδή, αλλά και στα αιγοειδή και στα πρόβατα, αυξάνουν σημαντικά την πιθανότητα ανακάλυψης νέων αλληλουχιών βιολογικά δραστικών πεπτιδίων. (43)

Όπως διαπίστωσαν οι Crittenden και Bennett (2005), παρά τις σημαντικές διαφορές στους τύπους και την αλληλουχία των πρωτεϊνών που υπάρχουν στο μηρυκαστικό και στο ανθρώπινο γάλα, στα περισσότερα άτομα το ανοσοποιητικό σύστημα είναι σε θέση να αναγνωρίσει αυτές τις πρωτεΐνες ως αβλαβείς και ανεκτικές. Σε μερικά άτομα, ωστόσο, το ανοσοποιητικό σύστημα γίνεται ευαίσθητο ως προς τις πρωτεΐνες του γάλακτος και προκαλείται μια καταστροφική φλεγμονώδη αντίδραση, για λόγους που δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητοί. Πρόσφατα, ο Wal (2004) δήλωσε ότι οι περισσότερες πρωτεΐνες γάλακτος μπορούν να θεωρηθούν ως πιθανά αλλεργιογόνα, καθώς αρκετοί επίτοποι έχουν περιγραφεί

μέχρι τώρα. Υπό αυτή την άποψη, υποκαταστάσεις αμινοξέων θα μπορούσαν να συμβούν στις περιοχές υψηλά συντηρημένων επίτοπων της πρωτεΐνης του γάλακτος και αυτό θα μπορούσε να περιορίσει το αλλεργιογόνο τους. Έτσι, η επιλογή ζώων με συγκεκριμένους πολυμορφισμούς μπορεί να είναι ένας τρόπος να μειωθεί θεωρητικά, η ανοσογονικότητα των πρωτεϊνών του γάλακτος. Επιπλέον, μπορεί να υποστηριχθεί ότι οι μεταλλάξεις που επηρεάζουν τη φωσφορυλίωση των καζεϊνών θα μπορούσαν να επηρεάσουν την ανοσογονικότητα των πρωτεϊνών. Καταλήγοντας, το γάλα από ζώα που φέρουν αλληλόμορφα «ασθενούς» ή «μηδενικού» CSN1S1 έχει αποδειχθεί ότι είναι κατάλληλο για επιλεγμένες ομάδες αλλεργικών ασθενών. (43)

Όπως έγινε αναφορά παραπάνω, οι απλότυποι της καζεΐνης καθώς και οι γενετικές παραλλαγές των πρωτεϊνών του γάλακτος χρησιμοποιήθηκαν επίσης, έντονα για τον χαρακτηρισμό των φυλών και ως δείκτες για μελέτες πληθυσμού και φυλογένιας. (49) Ο γονότυπος 30 φυλών βοοειδών από τέσσερις ηπείρους αποκάλυψε ότι οι συχνότητες απλοτύπου καζεΐνης κατανομούνται γεωγραφικά και καθορίζονται κυρίως από τις συχνότητες αλληλόμορφων στους τόπους CSN1S1 και CSN3. Η γενετική ποικιλομορφία των φυλών *Bos taurus* στην Ευρώπη βρέθηκε ότι μειώνεται σημαντικά από τα νότια προς τα βόρεια και από τα ανατολικά προς τα δυτικά. Η σύγκριση των φυλών *Bos taurus* και *Bos indicus* επέτρεψε την ταυτοποίηση αρκετών απλοτύπων του *B. indicus* που δεν βρέθηκαν σε άλλες φυλές του γένους *Bos*. (43)

Εκτός από την αξιολόγηση των φυλογενετικών σχέσεων, οι γενετικοί πολυμορφισμοί των πρωτεϊνών του γάλακτος έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για τη διερεύνηση της γενετικής ποικιλομορφίας εντός και μεταξύ των πληθυσμών για την εδραίωση της γεωγραφικής ποικιλομορφίας. Οι Tdlaoui Ouafi et al. (2002) έδειξαν ότι τα αλληλόμορφα CSN1S1 που σχετίζονται με υψηλό επίπεδο έκφρασης (κυρίως A και B) κυριαρχούν στις μαροκινές φυλές κατσίκας (74% και 94% στα Draa και Noire-Rahalli αντίστοιχα), ενώ το αλληλόμορφο E στις ευρωπαϊκές φυλές αίγας είναι σπάνιο (2-3%). (43)

Παρά τις σημαντικές προσπάθειες, υπήρξαν μόνο ελάχιστες επιτυχίες στον εντοπισμό των πολυμορφισμών που ευθύνονται για τη μεταβολή των χαρακτηριστικών του γάλακτος. Τα γονιδιωματικά εργαλεία, όπως chip SNP, έχουν χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση γονιδίων που εμπλέκονται στην έκφραση πολλών χαρακτηριστικών, συμπεριλαμβανομένων των χαρακτηριστικών των γαλακτοκομικών προϊόντων και την επιλογή γενετικά επιθυμητών ζώων. Ωστόσο, η μεταβολή της σύνθεσης της πρωτεΐνης του γάλακτος οφείλεται κυρίως σε μηχανισμούς διαφορετικούς από τους πολυμορφισμούς της πρωτεϊνικής αλληλουχίας.

Μηχανισμοί, όπως η ρύθμιση της μεταγραφής και της μετάφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες του γάλακτος, συμβάλλουν στη μεταβολή της σύνθεσης γάλακτος. Οι μεταλλάξεις που μεταβάλλουν τη δομή και την έκφραση της πρωτεΐνης και συνεπώς τη σύνθεση και τις ιδιότητες του γάλακτος έχουν βρεθεί σε κωδικοποιητικές αλληλουχίες, μη μεταφραζόμενες περιοχές, σε ενδογενείς καθώς και σε διαγονιδιακές περιοχές. Οι μεταλλάξεις επηρεάζουν κατά συνέπεια είτε το μήνυμα κωδικοποίησης ή την σταθερότητα του mRNA είτε και τα δύο οδηγώντας σε προϊόντα πρωτεΐνης μικρότερης ποσότητας ή ακόμη και στην απουσία αυτών (μηδενικά αλληλόμορφα). Έτσι, με την παραγωγή διαφορετικών μορφών mRNA από ένα μόνο γονίδιο προκύπτει η ποικιλομορφία και η πολυπλοκότητα του πρωτεϊνικού γάλακτος. (43)

Όσον αφορά την α_{s1} -καζεΐνη, μια εξάλειψη στο εξόνιο 12 του CSN1S1 φαίνεται να σχετίζεται σημαντικά με τις πρωτεΐνες, το λίπος και τη γεύση του γάλακτος. Ο φαινότυπος α_{s1} -CN BB έχει συσχετισθεί με υψηλές αποδόσεις γάλακτος και επομένως με υψηλή πρωτεϊνική απόδοση κατά τη διάρκεια της γαλουχίας. Ωστόσο, ο ίδιος ο φαινότυπος έχει συσχετισθεί με χαμηλή συγκέντρωση πρωτεΐνης στο γάλα. (25) Η σύγκριση των ιδιοτήτων των παραλλαγών B και C έδειξε ότι τα τυριά που παρασκευάζονται από γάλα που περιέχει α_{s1} -CN C σχηματίζουν πιο σκληρό πήγμα. (26) Αντιθέτως, η παραλλαγή A σχετίζεται με μαλακά πήγματα γάλακτος. Επιπλέον, οι αγελάδες που φέρουν το G αλληλόμορφο παράγουν λιγότερη α_{s1} -CN σε σύγκριση με τις άλλες καζεΐνες. (43)

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε ανάλυση του πολυμορφισμού του εξονίου 4 της α_{s1} -καζεΐνης σε ένα συγκεκριμένο πληθυσμό αγελάδων της φυλής Holstein-Friesian. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων βρέθηκε ότι το συγκεκριμένο εξόνιο είναι συντηρημένο στον πληθυσμό αυτό. Πιο συγκεκριμένα, προέκυψε μία αλληλουχία, η οποία αφού συγκρίθηκε, βρέθηκε ίδια με την αλληλουχία αναφοράς δεδομένων της UniProt. Επομένως, μπορεί να εντοπιστεί και στις εννέα διαφορετικές γενετικές παραλλαγές του γονιδίου CSN1S1 της α_{s1} -καζεΐνης. Ωστόσο, για την πλήρη ανάλυση της α_{s1} -καζεΐνης είναι απαραίτητη η ανάλυση και των υπολοίπων εξονίων, στα οποία έχουν αναφερθεί πολυμορφισμοί στη βιβλιογραφία. Αποτέλεσμα αυτής της ανάλυσης θα είναι η πλήρης χαρτογράφηση του συγκεκριμένου πληθυσμού όσον αφορά τις παραλλαγές της α_{s1} -καζεΐνης, με σκοπό την περαιτέρω συσχέτιση των παραλλαγών αυτών με διάφορα ποσοτικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά της παραγωγής του γάλακτος.

5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Γάλα - GAIApedia.
2. Thureen PJ. Neonatal Nutrition and Metabolism. Cambridge University Press; 2012. 485 p.
3. Curry A. Archaeology: The milk revolution. Nat News. 2013 Aug 1;500(7460):20.
4. ΓΕΝΙΚΟ ΧΗΜΕΙΟ ΤΟΥ ΚΡΑΤΟΥΣ.
5. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
6. Currier RW, Widness JA. A Brief History of Milk Hygiene and Its Impact on Infant Mortality from 1875 to 1925 and Implications for Today: A Review. J Food Prot. 2018 Sep 20;1713–22.
7. ΒΟΟΤΡΟΦΙΑ - Portal Ενημέρωσης Αγροτών-Πολιτών Περιφέρειας Ηπείρου.
8. Στοιχεία Γεωπονίας και Αγροτικής Ανάπτυξης (Γ Γενικού Λυκείου - Επιλογής).
9. Κεντρική Σελίδα ΕΛΣΤΑΤ.
10. Αυτόχθονες φυλές βοοειδών - GAIApedia.
11. Η Φυλή Χολστάν. 2010.
12. Η φυλή Holstein - GAIApedia.
13. Αγελάδες γαλακτοπαραγωγής – Αγροτικά Ζώα.
14. ΚΕΧΑΓΙΑΣ ΧΡΗΣΤΟΣ-ΚΟΥΛΟΥΡΗΣ ΣΠΥΡΟΣ. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΙ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ. ΙΩΝ.
15. Properties of Milk and Its Components.
16. Get the Facts: Types of Milk Explained. Milk Recipes and Other Healthy Breakfast Ideas.
17. Fox PF. Developments in Dairy Chemistry—2: Lipids. Springer Science & Business Media; 2012. 436 p.
18. Noble, RC. 1978. Digestion, absorption and transport of lipids in ruminant animals. Prog Lipid Res 17 55-91.
19. Wiking, L., Stagsted, J., Bjorck L., Nielsen, Jh., 2004. Milk fat globule size is affected by fat production in dairy cows. Int Dairy J 14909-13.
20. Miller GD, Jarvis JK, Council ND, McBean LD. Handbook of Dairy Foods and Nutrition. CRC Press; 2002. 450 p.
21. Fox P. F. (1997). ADVANCED DAIRY CHEMISTRY VOLUME 3: Lactose, water, salts and vitamins, 2nd Edition.

22. Panda H. Handbook on Milk and Milk Proteins. ASIA PACIFIC BUSINESS PRESS Inc.; 2011. 213 p.
23. Swaisgood HE, 1982. Chemistry of milk proteins. Page 1. In Developments in Dairy Chemistry-. 1 P F Fox Ed Appl Sci Lond Engl.
24. Bylund G. Dairy processing handbook. [Lund, Sweden: Tetra Pak Processing Systems AB; 1995. 436 p.
25. Park YW, Haenlein GFW. Milk and Dairy Products in Human Nutrition: Production, Composition and Health. John Wiley & Sons; 2013. 1275 p.
26. Farrell, M., H. Jr., Jimerez- Flores, R., Bleck, G. T., Brown, E M., Butler, J. E., Creamer, L. K., Hicks, C. L., Hollar, C. M., Ng-Kwai-Hang, K. F. and Swaisgood, H.E., 2004. Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk. Sixth Revis J Dairy Sci 87 1641-1674.
27. board N. Detailed Project Profiles on Dairy & Dairy Products (2nd Edn.). Niir Project Consultancy Services; 2012. 145 p.
28. Kelly D, Coutts AG. Early nutrition and the development of immune function in the neonate. Proc Nutr Soc. 2000 May;59(2):177–85.
29. Chanokphat P. Casein micelle structure: A concise review. Songklanakarin J Sci Technol. 2005 Jan 1;27.
30. Farrell HM. Models for Casein Micelle Formation. J Dairy Sci. 1973 Sep 1;56(9):1195–206.
31. Park YW, Haenlein GFW, Wendorff WL. Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals. John Wiley & Sons; 2017. 730 p.
32. Ανυφαντάκης, Εμμανουήλ Μ. Χημεία και ανάλυση του γάλακτος.
33. Jeantet R, Croguennec T, Schuck P, Brule G. Handbook of Food Science and Technology 3: Food Biochemistry and Technology. John Wiley & Sons; 2016. 441 p.
34. McKenzie H. Milk Proteins V2: Chemistry and Molecular Biology. Elsevier; 2012. 567 p.
35. Ward L. Whey Protein. Lulu.com; 2008. 74 p.
36. McSweeney PLH, Fox PF. Advanced Dairy Chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic Aspects, 4th Edition. Springer Science & Business Media; 2013. 558 p.
37. McKenzie H. Milk Proteins V1: Chemistry and Molecular Biology. Elsevier; 2012. 540 p.
38. R.J. WILKINS¹, AND H.W. DAVEY². Sequence variations in genes coding for bovine β -lactoglobulin and α S1 -casein.
39. Lewis Evans. Structural Reform: the Dairy Industry in New Zealand.
40. Μάντης, Α, 1993. Υγιεινή και Τεχνολογία του γάλακτος και των προϊόντων του. Εκδ Οικ Αδ Κυριακίδη 2η Εκδ Κεφ 1.
41. Aschaffenburg R and Drewry J, 1957. Genetics of the b-lactoglobulins of cow's milk. Nat 180 376- 378.

42. Dovic P. Genetic polymorphisms in milk protein genes and their impact on milk composition. *Adv Exp Med Biol.* 2000;480:225–30.
43. K. F. Ng-Kwai-Hang F. Grosclaude. Genetic Polymorphism of Milk Proteins.
44. Grosclaude F, Joudrier P, Mahé MF. A genetic and biochemical analysis of a polymorphism of bovine alpha S2-casein. *J Dairy Res.* 1979 Apr;46(2):211–3.
45. H. E. Swaisgood. Chemistry of the Caseins.
46. Gilbert Idolo Imafidon K.F. Ng-Kwai-Hang. Effect of genetic polymorphisms on the susceptibility of β -casein to calcium precipitation and stabilizing effects of κ -casein. ScienceDirect.
47. Garibyan L, Avashia N. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *J Invest Dermatol.* 2013 Mar;133(3):e6.
48. Caroli AM, Chessa S, Erhardt GJ. Invited review: milk protein polymorphisms in cattle: effect on animal breeding and human nutrition. *J Dairy Sci.* 2009 Nov;92(11):5335–52.
49. Abby Tompson, Mike Boland and Harjinder Singh. Milk Proteins: From Expression to Food.
50. Kitts DD, Weiler K. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Curr Pharm Des.* 2003;9(16):1309–23.