



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ  
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΝΟΘΕΙΑΣ  
ΣΕ ΚΑΙΝΟΤΟΜΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

ΣΚΡΕΤΑ ΓΡΑΜΜΑΤΗ

ΧΗΜΙΚΟΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΛΑΡΙΣΑ, 2022



UNIVERSITY OF THESSALY  
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY  
AND BIOTECHNOLOGY

POSTGRADUATE MASTERS STUDIES IN  
TOXICOLOGY

POSTGRADUATE THESIS

DEVELOPMENT OF MOLECULAR METHODS OF IDENTIFICATION  
FOOD FRAUD IN INNOVATIVE MILK PRODUCTS

SKRETA GRAMMATI  
CHEMIST, UNIVERSITY OF IOANNINA

LARISA, 2022

### **Τριμελής εξεταστική επιτροπή**

- 1. Μαμουρής Ζήσης**, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών - Πρύτανης Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, επιβλέπων καθηγητής.
- 2. Μούτου Αικατερίνη**, Καθηγήτρια, Αναπληρώτρια Πρόεδρος Βιολογία Σπονδυλωτών, μέλος.
- 3. Γιαννούλης Θεμιστοκλής**, Επίκουρος καθηγητής Γονιδιωματικής, εξέλιξης και Βιοποικιλότητας, μέλος.

## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Μαμούρη Ζήση, Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών και Πρύτανη του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για τη δυνατότητα που μου έδωσε για την εκπόνηση της μεταπτυχιακής μου διατριβής στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας. Ευχαριστώ μέσα από καρδιάς τον κ. Γιαννούλη Θεμιστοκλή, Επίκουρος Καθηγητής Γονιδιωματικής, Εξέλιξης και Βιοποικιλότητας για την εμπιστοσύνη του στο πρόσωπό μου αλλά και την άψογη καθοδήγησή στην εκπόνηση αυτής της εργασίας. Ακόμη ευχαριστώ την κα. Μούτου Αικατερίνη, Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών, μέλος της τριμελή συμβουλευτική επιτροπής για την βοήθειά της αλλά και την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας. Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Διδάκτορα Καλεμκερίδου Μαρία για όλες τις χρήσιμες συμβουλές, την συνεχή βοήθεια, καθοδήγηση αλλά και την κατανόηση του δύσκολου προγράμματός μου σε όλη τη διάρκεια υλοποίησης της παρούσας εργασίας. Ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου «Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας» για το κλίμα συνεργασία και τη φιλική τους διάθεση. Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στην αδερφή μου, Ιωάννα και στους γονείς μου, Χρυσούλα και Απόστολο, που με υποστηρίζουν και είναι στο πλευρό μου σε κάθε μου βήμα.



## Περίληψη

Οι πρωτεΐνες του αγελαδινού γάλακτος έχουν απασχολήσει σε μεγάλο βαθμό τους επιστήμονες καθώς κατέχουν σημαντικό κομμάτι στην διατροφή του ανθρώπου. Έχουν βρεθεί πολλές γενετικές τροποποιήσεις που έχουν προσελκύσει τεράστιο ενδιαφέρον. Τα τελευταία χρόνια μεγάλη συζήτηση γίνεται την περίπτωση του A1/A2 γάλακτος. Υποστηρίζεται πως η πέψη της παραλλαγής A1 της β-καζεΐνης (CSN2) απελευθερώνει το μόριο της β-καζομορφίνης 7(BCM-7) και αυτό με την σειρά του μπορεί να προκαλέσει δυσμενή αποτελέσματα στην υγεία του ανθρώπου από αλλεργίες, διαβήτη τύπου I μέχρι και καρδιοπάθειες. Ήδη στην παγκόσμια αγορά κυκλοφορούν προϊόντα με τον τίτλο " Γάλα A2 " και δηλώνουν πως είναι απαλλαγμένα από την A1 και περιέχουν αποκλειστικά A2 β-καζεΐνη που δεν έχει παρατηρηθεί να προκαλεί τα ίδια δυσμενή αποτελέσματα με την A1. Τα προϊόντα αυτά χαρακτηρίζονται ως καινοτόμα προϊόντα γάλακτος και συνίσταται η ανάπτυξη μεθόδων ταυτοποίησης της ύπαρξης αποκλειστικά και μόνο A2 β-καζεΐνης. Έτσι αναπτύχθηκε μία ευαίσθητη μέθοδος εντοπισμού των αλληλόμορφων A1 και A2 του γονιδίου της β-καζεΐνης στο αίμα αγελάδων και στο γάλα αγελάδων, για δημιουργία κοππαδιών που θα φέρουν αποκλειστικά το αλληλόμορφο A2 β-καζεΐνης. Η μέθοδος ονομάζεται High resolution Melting (HRM) και μέσω αυτής μπορούν να ανιχνευθούν οι γονότυποι σε δείγματα αίματος και γάλακτος ώστε να προστατευθούν οι καταναλωτές από πιθανή νοθεία καινοτόμων προϊόντων γάλακτος.

Λέξεις κλειδιά : Γάλα A1/A2, β-καζεΐνη (CNS2), β-καζομορφίνη (BCM-7), HRM, νοθεία τροφίμων.

## Abstract

Cow's milk proteins have greatly concerned scientists as they hold an important part in the human diet. Many genetic modifications have been found that have incited interest. In recent years, there has been a lot of discussion about the case of A1/A2 milk. It is claimed that the digestion of the A1 variant of  $\beta$ -casein (CSN2) releases the  $\beta$ -casomorphin 7 (BCM-7) and this can cause adverse effects on human health from allergies and type I diabetes to heart diseases. There are already products on the world market with the indication "A2 Milk" and they claim to be free of A1  $\beta$ -casein and only contain A2 variant which has not been observed to cause the same adverse effects as A1. These products are characterized as innovative milk products and the development of methods to identify the presence of A2  $\beta$ -casein alone is recommended. Thus, a sensitive method was developed to identify the A1 and A2 alleles of the  $\beta$ -casein gene in the blood of cows and in the milk of cows, to create herds that will exclusively carry the A2 allele of  $\beta$ -casein. The method is called High resolution Melting (HRM) and through it the genotypes can be detected in the blood and milk of cows samples in order to protect consumers from possible adulteration of innovative milk products.

Keywords: Milk A1 / A2,  $\beta$ -casein (CNS2), b-casomorphine (BCM-7), HRM, food fraud.

### Συντομογραφίες

ΕΦΕΤ : Ενιαίος Φορέας Ελέγχου Τροφίμων

FAO : Food and Agriculture Organization

WHO: World Health Organization

EFSA : European Food Safety Authority

BRC : British Retail Consortium

IFS : International Food Standard

DNA : Deoxyribonucleic acid

CSN2 : Casein Beta

BCM-7 : beta-casomorphin 7

PCR : *polymerase chain reaction*

RT- PCR : *real time polymerase chain reaction*

qPCR : Quantitative Polymerase Chain Reaction

SSCP : Single-stranded conformation polymorphism

ACRS-PCR : artificially created restriction site Polymerase Chain Reaction

rhAmp : Genotyping design tool

HRM : high-resolution melting

HPLC (LC) : *High-performance (liquid chromatography)*

HRMS (MS) : High-resolution (mass spectrometry)

ELISA : Enzyme-linked Immunosorbent Assay

UV/Vis : ultraviolet–visible spectrophotometry

TAE : Tris base, acetic acid and EDTA

SNP : single nucleotide



## Εικόνες

Εικόνα 1 Παγκόσμια παραγωγή γάλακτος 2019 .....	13
Εικόνα 2 Παγκόσμια παραγωγή γάλακτος 2021 .....	14
Εικόνα 3 Παράγοντες που επηρεάζουν χημική σύσταση γάλακτος.....	16
<i>Εικόνα 4 Χημεία αγελαδινού γάλακτος.....</i>	<i>18</i>
Εικόνα 5 Πρωτεΐνες στο γονιδίωμα βοοειδών[9]. .....	19
Εικόνα 6 Πολυμορφισμοί β-καζεΐνης [15].....	20
<i>Εικόνα 7 Γάλα Α1 και Α2 .....</i>	<i>21</i>
<i>Εικόνα 8 Μεταβολισμός Α1,Α2 γάλακτος[20]. .....</i>	<i>22</i>
Εικόνα 9 BCM-7 .....	22
Εικόνα 10 BCM-7 και υγεία.....	23
Εικόνα 11 Προϊόντα γάλακτος Α2 .....	24
Εικόνα 12 Νοθεία τροφίμων .....	26
Εικόνα 13 Διαχωρισμός κλώνων αλυσίδας DNA .....	28
Εικόνα 14 Στάδια HRM ανάλυσης .....	28
Εικόνα 15 Κανονικοποιημένη καμπύλη φθορισμού .....	29
<i>Εικόνα 16 Απομόνωση DNA.....</i>	<i>31</i>
<i>Εικόνα 17 Ηλεκτροφόρηση DNA.....</i>	<i>32</i>
<i>Εικόνα 18 Φασματοφωτόμετρο Quawell [36] .....</i>	<i>33</i>
Εικόνα 19 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων αίματος.....	38
Εικόνα 20 Διάγραμμα φθορισμού ανά κύκλο αντίδρασης-πρότυπα δείγματα. ....	41
Εικόνα 21 Διάγραμμα φθορισμού/θερμοκρασίας - πρότυπα δείγματα. ....	42
Εικόνα 22 Κανονικοποιημένο διάγραμμα φθορισμού/θερμοκρασίας – πρότυπα δείγματα. ....	42
Εικόνα 23 Διάγραμμα θερμοκρασιών τήξης – πρότυπα δείγματα. ....	43
Εικόνα 24 Διαφορετικό διάγραμμα φθορισμού/θερμοκρασίας – πρότυπα δείγματα. ....	43
Εικόνα 25 Διάγραμμα φθορισμού ανά κύκλο αντίδρασης-άγνωστα δείγματα αίματος. .....	44
Εικόνα 26 Διάγραμμα φθορισμού/θερμοκρασίας – άγνωστα δείγματα αίματος.....	44
Εικόνα 27 Κανονικοποιημένο διάγραμμα φθορισμού/θερμοκρασίας – άγνωστα δείγματα αίματος. ....	45
Εικόνα 28 Διάγραμμα θερμοκρασιών τήξης – άγνωστα δείγματα αίματος. ....	45
Εικόνα 29 Διαφορετικό διάγραμμα φθορισμού/θερμοκρασίας – άγνωστα δείγματα αίματος.....	45
Εικόνα 30 Αποτελέσματα λογισμικού Qiagen κατάταξης σε γονότυπους α)Με πρότυπα δείγματα β)Χωρίς πρότυπα δείγματα .....	46

Εικόνα 31 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων γάλακτος .....	47
Εικόνα 32 Διάγραμμα φθορισμός ανά κύκλο αντίδρασης-δείγματα γάλακτος (1). ....	48
Εικόνα 33 Διάγραμμα φθορισμού/θερμοκρασίας – δείγματα γάλακτος (1).....	48
Εικόνα 34 Κανονικοποιημένο διάγραμμα φθορισμού/θερμοκρασίας – δείγματα γάλακτος (1).....	48
Εικόνα 35 Διάγραμμα θερμοκρασιών τήξης – δείγματα γάλακτος (1) .....	49
Εικόνα 36 Διαφορετικό διάγραμμα φθορισμού/θερμοκρασίας – δείγματα γάλακτος (1) .....	49
Εικόνα 37 Διάγραμμα φθορισμός ανά κύκλο αντίδρασης-δείγματα γάλακτος (2). ....	51
Εικόνα 38 Διάγραμμα φθορισμού/θερμοκρασίας – δείγματα γάλακτος (2).....	51
Εικόνα 39 Κανονικοποιημένο διάγραμμα φθορισμού/θερμοκρασίας – δείγματα γάλακτος (2).....	51
Εικόνα 40 Διάγραμμα θερμοκρασιών τήξης – δείγματα γάλακτος (2) .....	52
Εικόνα 41 Ποσοστά εμπιστοσύνης γονοτυπικής κατάταξης του οργάνου Qiagen – δείγματα γάλακτος (2) .....	52
Εικόνα 42 Γονοτύπηση άγνωστων δειγμάτων .....	54
Εικόνα 43 Αναλογικά αποτελέσματα.....	54

#### Πίνακες

Πίνακας 1 Χημική σύσταση γάλακτος δανεισμένο από[7]. .....	15
Πίνακας 2 Χημική σύσταση γάλακτος διαφόρων ειδών αγελάδων. ....	15
Πίνακας 3 Χημική σύσταση αγελαδινού γάλακτος[7].....	17
Πίνακας 4 Εκκινητές αντίδρασης .....	34
Πίνακας 5 Σύσταση αντίδρασης HRM .....	35
Πίνακας 6 Αραιώσεις δειγμάτων γάλακτος.....	37
Πίνακας 7 Ποσοτικοποίηση Qubit, Quawell .....	39
Πίνακας 8 Ποσοτικοποίηση Quawell.....	39
Πίνακας 9 Αραιώσεις γάλακτος.....	47
Πίνακας 10 Ποσοστά εμπιστοσύνης γονοτυπικής κατάταξης του οργάνου Qiagen – δείγματα γάλακτος (1) .....	49
Πίνακας 11 Συγκεντρώσεις δειγμάτων γάλακτος (2).....	50

# Περιεχόμενα

Περίληψη.....	6
Abstract .....	7
<i>Συνοτομογραφίες</i> .....	8
Εικόνες .....	9
Πίνακες.....	10
1. Εισαγωγή .....	13
1.1. Γάλα.....	13
1.2 Χημική σύσταση γάλακτος .....	15
1.3 Αγελαδινό γάλα.....	17
1.3.1 Πρωτεΐνες Αγελαδινούς Γάλακτος .....	19
1.3.2 Καζεΐνες αγελαδινού γάλακτος.....	19
1.3.3 Πολυμορφισμοί της β-καζεΐνης .....	20
1.3.4 Καζεΐνη Α1 και β-καζομορφίνη 7 .....	22
1.4 Γάλα Α1 και Α2 β-καζεΐνης .....	23
1.5 Μέθοδοι ταυτοποίησης Α1 και Α2 β-καζεΐνης.....	25
1.5.1 Χημικοί μέθοδοι .....	25
1.5.2 Μοριακοί μέθοδοι.....	25
1.6 Νοθεία .....	26
1.7 Υψηλή ανάλυση Καμπύλης Τήξεως – High Resolution Melting-HRM .....	28
1.8 Σκοπός .....	30
2. Πειραματικό .....	31
2.1. Απομόνωση DNA από δείγματα αίματος.....	31
2.2. Ποσοτικοποίηση DNA από δείγματα αίματος .....	32
2.2.1. Φασματοφωτομετρία Quawell .....	33
2.2.2. Φθορισμομετρία Qubit .....	33
2.3. Ανάλυση High-Resolution Melt (HRM) σε δείγματα αίματος.....	34
2.3.1 Επιλογή εκκινητών .....	34
2.3.2 Προετοιμασία δειγμάτων.....	34
2.3.2 Real-time PCR ακολουθούμενη από ανάλυση HRM.....	36
2.4. Αραιώσεις σε δείγματα γάλακτος.....	36
2.5. Απομόνωση DNA από δείγματα γάλακτος .....	37
2.6. Ανάλυση HRM σε δείγματα γάλακτος .....	37
3. Αποτελέσματα .....	38
3.1. Απομόνωση DNA σε δείγματα αίματος .....	38

3.2. Ποσοτικοποίηση DNA σε δείγματα αίματος.....	38
3.3. Ανάλυση HRM σε δείγματα αίματος.....	40
3.4 Αραιώσεις- Απομονώσεις- Ποσοτικοποιήσεις δειγμάτων γάλακτος.....	47
3.5 Ανάλυση HRM σε δείγματα γάλακτος .....	48
4. Συζήτηση .....	53
5. Συμπέρασμα.....	54
6. Βιβλιογραφία.....	55

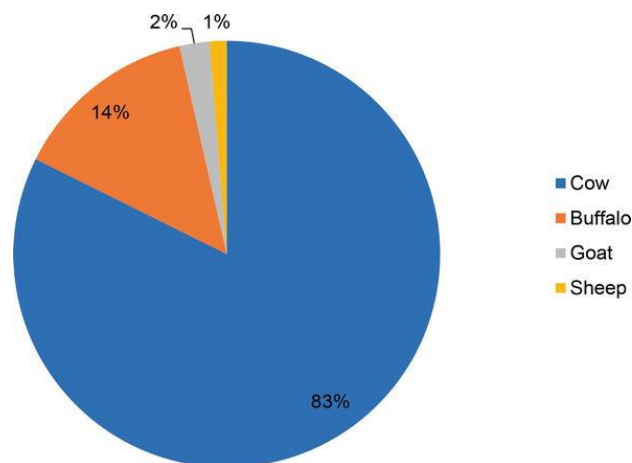
## 1. Εισαγωγή

### 1.1. Γάλα

Ο Κώδικας Τροφίμων και Ποτών ορίζει ως γάλα το προϊόν που είναι απαλλαγμένο από το πρωτόγαλα και είναι αποτέλεσμα του ολοσχερούς, χωρίς διακοπή αρμέγματος υγιούς γαλακτοφόρου ζώου, που ζει και τρέφεται υπό υγιεινούς όρους και που δεν βρίσκεται σε κατάσταση υπερκόπωσης [1].

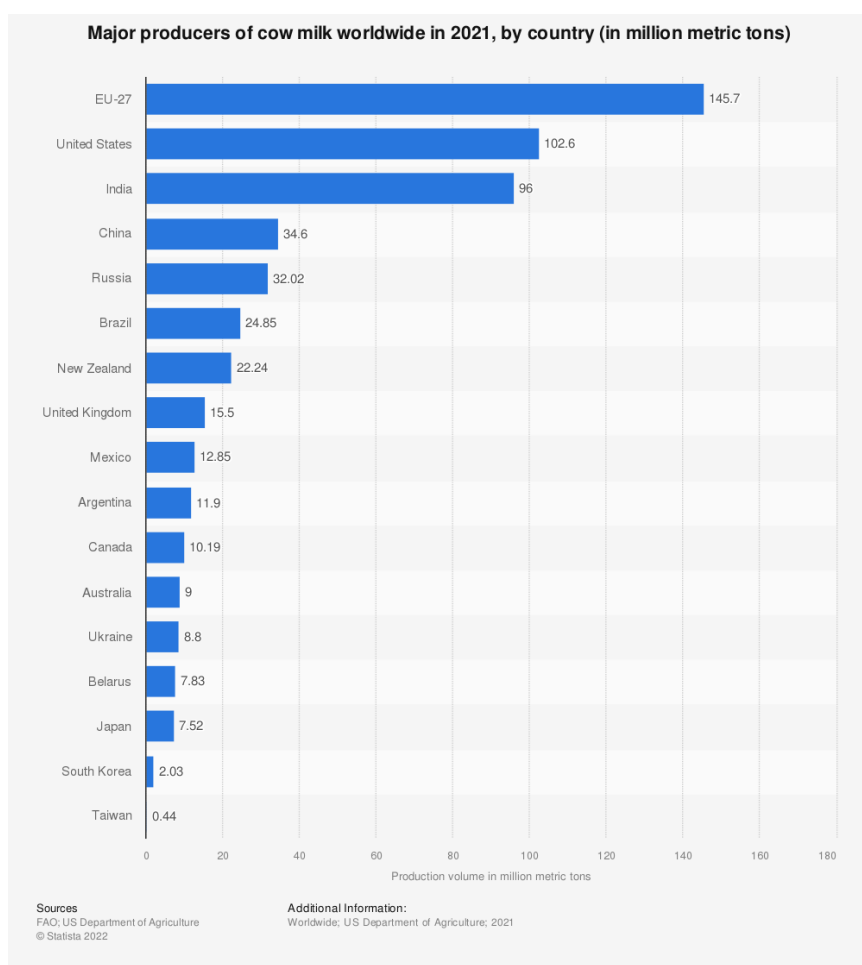
Ο FAO/WHO ορίζει ως γάλα το φυσιολογικό έκκριμα του μαστού που λαμβάνεται από μία ή δύο αρμέξεις χωρίς να προστεθεί ή να αφαιρεθεί τίποτα.

Γάλα, γενικότερα, είναι το έκκριμα των μαστικών αδένων των θηλυκών θηλαστικών. Περισσότερα από 2000 θηλαστικών μπορούν να παράγουν γάλα, παρόλα αυτά λίγα είναι εκείνα που η ανατομία τους, τους επιτρέπει να χρησιμοποιηθούν για ευρεία παραγωγή γάλακτος. Η αγελάδα αποτελεί το καλύτερο παράδειγμα ικανότητας αποθήκευσης γάλακτος στους μαστούς γι' αυτό και κατατάσσεται πρώτη στην ιεραρχία των γαλακτοφόρων ζώων [2]. Αυτός είναι και ο κύριος λόγος που στις μέρες μας αναφερόμαστε με τον όρο “γάλα” στο αγελαδινό γάλα.



Εικόνα 1 Παγκόσμια παραγωγή γάλακτος 2019  
<https://www.intechopen.com/hapters/65796>

Η παγκόσμια παραγωγή γάλακτος για το 2021 ανερχόταν στους 928 εκατομμύρια τόνους [3] εκ των οποίων οι 544 εκατομμύρια τόνοι αφορούσαν το αγελαδινό γάλα [4]. Στην Ευρώπη η παραγωγή αγελαδινού γάλακτος ήταν περίπου 145 εκατομμύρια τόνοι, με την Γερμανία να σημειώνει παραγωγή 31 εκατομμύρια τόνους και έτσι να αναδεικνύεται η κύρια παραγωγός χώρα για την Ευρώπη [5]. Το γάλα βοοειδών για το 2019 αποτελούσε το 83% της συνολικής παραγωγής γάλακτος και ακολουθούν με 15% το βουβαλίσιο γάλα [6].



Εικόνα 2 Παγκόσμια παραγωγή γάλακτος 2021

<https://www.statista.com/statistics/268191/cow-milk-production-worldwide-top-producers/>

## 1.2 Χημική σύσταση γάλακτος

Το γάλα προορίζεται για τη διατροφή του νεογνού του κάθε θηλαστικού ζώου που το παράγει. Περιέχει σχεδόν όλα τα θρεπτικά συστατικά που είναι απαραίτητα για την διατήρηση της ζωής. Η χημική σύστασή του γάλακτος στα διάφορα είδη γαλακτοφόρων ζώων διαφέρει ποσοτικά ως προς τα διάφορα συστατικά του. Τα κύρια συστατικά του είναι το νερό, το λίπος, οι πρωτεΐνες, η λακτόζη και τα διάφορα ιχνοστοιχεία (Πίνακας 1) [7].

<i>Percentage w/w</i>						
<i>Γάλα</i>	<i>Πρωτεΐνη</i>	<i>Καζεΐνη</i>	<i>Πρωτεΐνη ορού</i>	<i>Ζάχαρο</i>	<i>Λίπος</i>	<i>Τέφρα</i>
Ανθρώπου	0,9	0,4	0,5	7,1	4,5	0,2
Αγελάδος	3,2	2,6	0,6	4,6	3,9	0,7
Βουβάλου	3,8	3,2	0,6	4,8	7,4	0,8
Κατσίκας	3,2	2,6	0,6	4,3	4,5	0,8
Προβάτου	4,6	3,9	0,7	4,8	7,2	0,9
Καμήλας	3,6	2,7	0,9	5,0	4,0	0,8
Γάτας	7,0	3,8	3,2	4,8	4,8	0,6
Σκύλου	7,4	4,8	2,6			

Πίνακας 1 Χημική σύσταση γάλακτος δανεισμένο από[7].

Η χημική σύσταση του γάλακτος μπορεί να διαφέρει ακόμη και μεταξύ του ίδιου είδους ζώου.

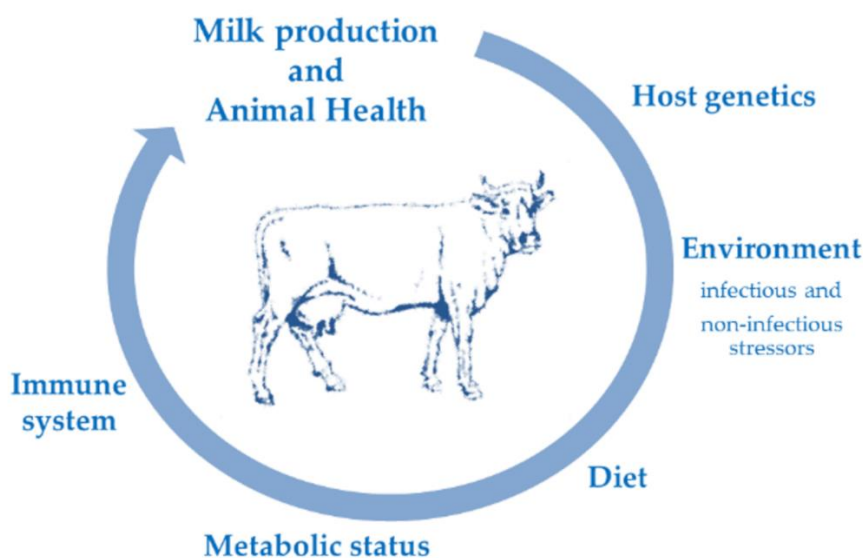
<i>Percentage w/w</i>					
<i>Αγελάδα</i>	<i>Πρωτεΐνη</i>	<i>Λακτόζη</i>	<i>Λίπος</i>	<i>Τέφρα</i>	<i>Ολικά στερεά</i>
Indian subcontinent	3,3	4,9	4,6	0,7	13,5
Borana	3,3	4,9	5,4	0,8	14,5
East African Zebu	3,3	4,7	5,5	0,8	14,3
Jersey	4,0	4,8	5,2	0,8	14,5
Holstein-USA	3,3	4,9	3,4	0,7	12,3

Πίνακας 2 Χημική σύσταση γάλακτος διαφόρων ειδών αγελάδων.

<https://www.fao.org/3/t0251e/T0251E01.htm#ch>

Οι κύριοι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την σύσταση του γάλακτος είναι:

- το είδος και η φυλή του ζώου,
- η ηλικία του,
- η σωματική κατάσταση και γενικότερα η κατάσταση υγείας του ζώου
- το σωματικό του βάρος
- η κυοφορία ή πιθανή ασθένεια του μαστού,
- το είδος της διατροφής του ζώου,
- η ώρα αλλά και η εποχή του χρόνου κατά την οποία γίνεται η άρμεξη,
- η υγρασία και η θερμοκρασία του περιβάλλοντος που βρίσκεται το ζώο,
- το χρόνο που μεσολαβεί μεταξύ δύο διαδοχικών αρμέξεων [8].



Εικόνα 3 Παράγοντες που επηρεάζουν χημική σύσταση γάλακτος

<https://www.mdpi.com/2076-2615/10/8/1397/htm>



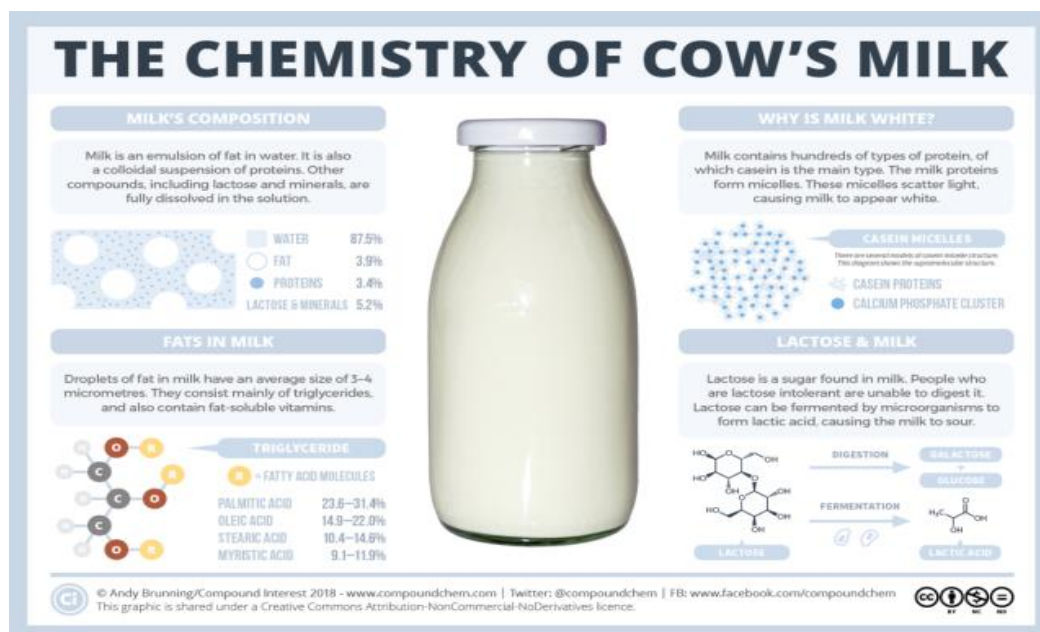
### 1.3 Αγελαδινό γάλα

Το κύριο συστατικό του αγελαδινού γάλακτος είναι το νερό, με ποσοστό 85-90%. Το υπόλοιπο μέρος αποτελείται από τα ολικά στερεά τα οποία χωρίζονται σε διάφορα κλάσματα.

<i>Κύριο Συστατικό</i>	<i>Εύρος Διακύμανσης</i>	<i>Μέση Τιμή</i>
Νερό	85,5-89,5	87,5
Ολικά Στερεά	10,5-14,5	13
Λίπος	2,5-6	3,9
Πρωτεΐνες	2,9-5,0	3,4
Λακτόζη	3,6-5,5	4,8
Ανόργανη ύλη	0,6-0,9	0,8

*Πίνακας 3 Χημική σύσταση αγελαδινού γάλακτος[7].*

1. Το κλάσμα της λακτόζης είναι το σάκχαρο που βρίσκεται στο γάλα και ανήκει στη κατηγορία των υδατανθράκων, οι οποίοι αποτελούν την βασικότερη πηγή ενέργειας για τον άνθρωπο.
2. Το κλάσμα των λιπαρών του γάλακτος αποτελεί ένα μίγμα από εστέρες των λιπαρών οξέων, που ονομάζονται τριγλυκερίδια, που συντελούνται από μία αλκοόλη που ονομάζεται γλυκερόλη και διάφορα λιπαρά οξέα. Τα λιπαρά οξέα μπορεί να είναι κορεσμένα ή ακόρεστα (τουλάχιστον ένα διπλό δεσμό μεταξύ ανθράκων).
3. Το κλάσμα των ανόργανων συστατικών, των οποίων η συνολική συγκέντρωση αποτελεί λιγότερο από το 1% του γάλακτος. Τα σημαντικότερα από τα ανόργανα συστατικά είναι το ασβέστιο, το νάτριο, το κάλιο και το μαγνήσιο και εμφανίζονται υπό μορφή φωσφορικών, χλωριούχων, κιτρικών ή καζεϊνικών αλάτων.
4. Και τέλος το κλάσμα των πρωτεϊνών , στο οποίο οφείλει και το λευκό του χρώμα.

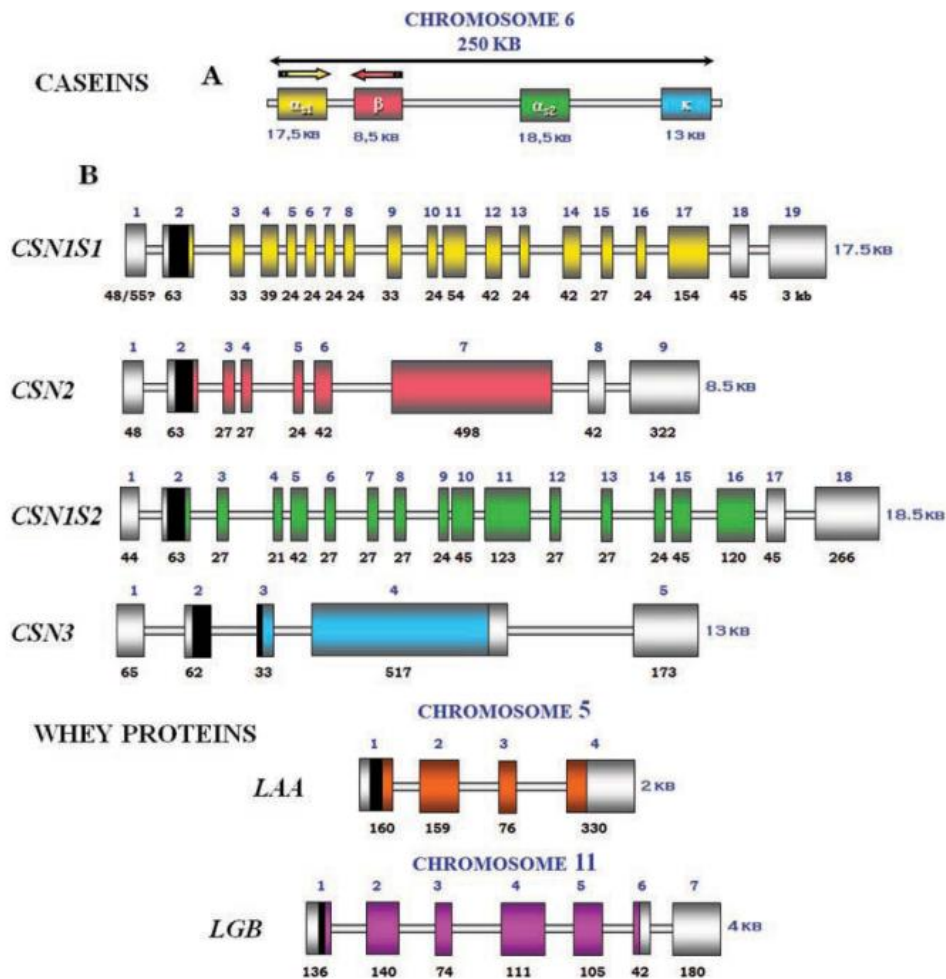


Εικόνα 4 Χημεία αγελαδινού γάλακτος

[\(https://www.compoundchem.com/2018/06/02/milk/\)](https://www.compoundchem.com/2018/06/02/milk/)

### 1.3.1 Πρωτεΐνες Αγελαδινούς Γάλακτος

Οι πρωτεΐνες του γάλακτος έχουν κεντρίσει το επιστημονικό ενδιαφέρον καθώς κατέχουν σημαντικό κομμάτι στην ανθρώπινη διατροφή. Το κλάσμα των πρωτεϊνών είναι ένα ετερογενές μείγμα πρωτεϊνών. Αρχικά απομονώθηκαν τρία κύρια κλάσματα η καζεΐνη, η γαλακταλβουμίνη και η γαλακτογλοβουλίνη. Σήμερα, μελέτες έδειξαν ότι αποτελείται από περισσότερα κλάσματα [7].



Εικόνα 5 Πρωτεΐνες στο γονιδίωμα βοοειδών[9].

### 1.3.2 Καζεΐνες αγελαδινού γάλακτος

Οι καζεΐνες αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό των πρωτεϊνών. Το 1939 ο Mellander χρησιμοποίησε την ηλεκτροφόρηση για να αποδείξει ότι αποτελείται από τρία κλάσματα  $\alpha$ -,  $\beta$ - και  $\gamma$ - καζεΐνη. Αργότερα διαπιστώθηκε πως η  $\alpha$ -καζεΐνη αποτελείται από δύο συστατικά που ονομάστηκαν  $\alpha_s$ - και  $\kappa$ -καζεΐνη [7].

### 1.3.3 Πολυμορφισμοί της β-καζεΐνης

Γενετικό πολυμορφισμός είναι η μια αλλαγή στην αλληλουχία του DNA η οποία μπορεί να σχετίζεται με αλλαγή ενός μονονουκλεοτιδίου (SNP), ή και σε έναν αριθμό επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών DNA [10].

Η β-καζεΐνη κατέχει περίπου το 30% του κλάσματος των καζεϊνών. Έχει αποδειχθεί, μέσω της γονοτύπησης με PCR, πως υπάρχουν 13 γενετικές τροποποιήσεις για την β-καζεΐνη με πιο γνωστές να είναι οι μορφές A1, A2, A3 και B. Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα αλληλόμορφα A1 (201-CAT-203, GenBank: JX273430.1) και A2 (201-CCT-203, GenBank: JX273429.1) καθώς έχουν μεγάλες επιρροές στην υγεία του ανθρώπου [11],[12].

Η πρώτη μορφή που εντοπίστηκε ήταν αυτή της A2 β-καζεΐνης. Τα τελευταία 1000χρόνια παρατηρήθηκε μια φυσική μετάλλαξη σε μια ράτσα Ευρωπαϊκής αγελάδας και ονομάστηκε A1 β-καζεΐνη. Με την πάροδο του χρόνου αυτή η μετάλλαξη εγκαθιδρύθηκε με αποτέλεσμα να υπάρχει πλέον το αγελαδινό γάλα με A1 καζεΐνη[13].

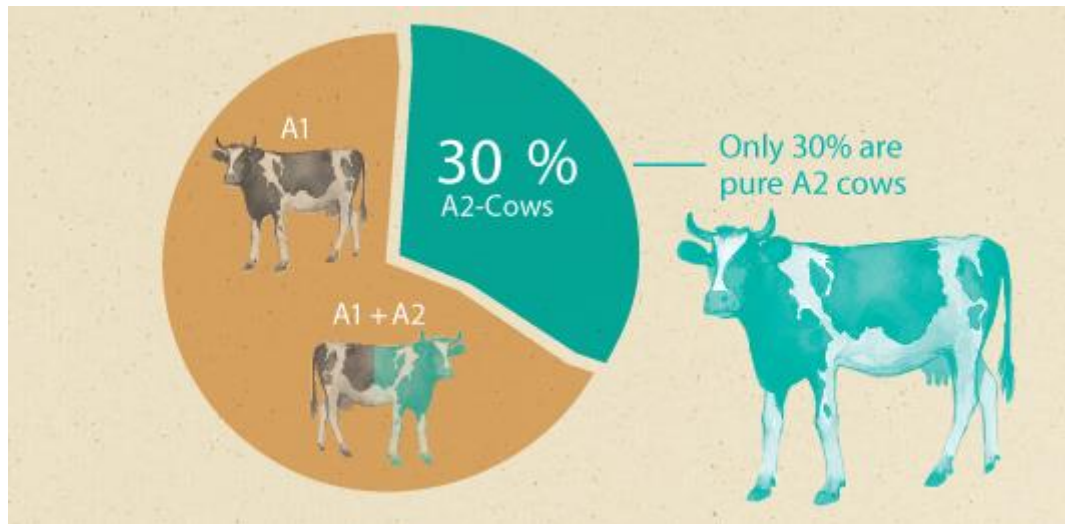
Ο πολυμορφισμός παρατηρήθηκε σε αλλαγή της αλληλουχίας του DNA από CCT σε CAT η οποία χαρτογραφείται στο 6<sup>ο</sup> χρωμόσωμα και προκαλεί μια αλλαγή στο 67<sup>ο</sup> αμινοξύ της αλυσίδας των 209 αμινοξέων, όπου η προλίνη(A2) αντικαταστήθηκε από την ιστιδίνη(A1) [14].

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

Εικόνα 6 Πολυμορφισμοί β-καζεΐνης [15]

Υπάρχουν κάποια είδη αγελάδων που παράγουν A2 γάλα όπως Jerseys, Guernsey, Asian and African ενώ κάποιες άλλα παράγουν A1 όπως Holstein and Ayrshire [13]. Η ομοζυγωτία A1A1 και A2A2 στα αλληλόμορφα

του γονίδιο της β-καζεΐνης στο αίμα των αγελάδων, παρέχουν γάλα A1 και A2 αντίστοιχα, ενώ η ετεροζυγωτία A1A2 παρέχει γάλα A1A2 [13]. Μελέτες έχουν δείξει πως σήμερα μόνο το 30% του παγκόσμιου πληθυσμού αγελάδων είναι ομόζυγο για την A2 β-καζεΐνη και δίνει αποκλειστικά γάλα A2A2 [16].

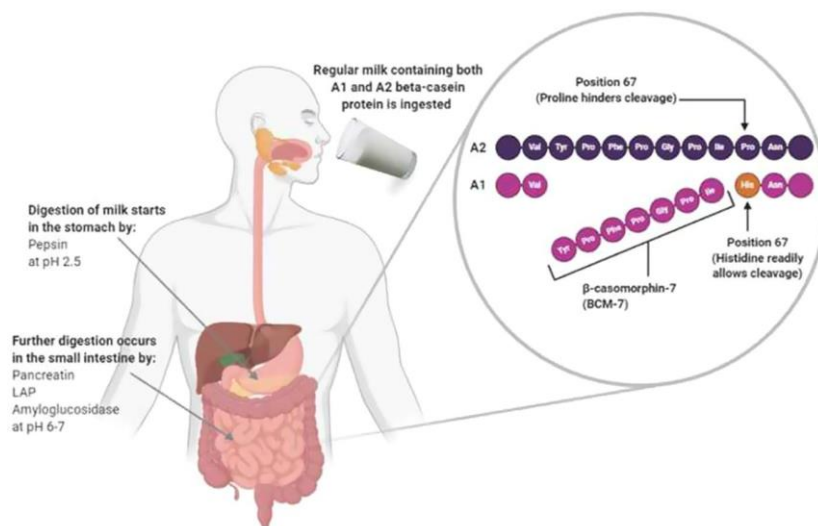


Εικόνα 7 Γάλα A1 και A2

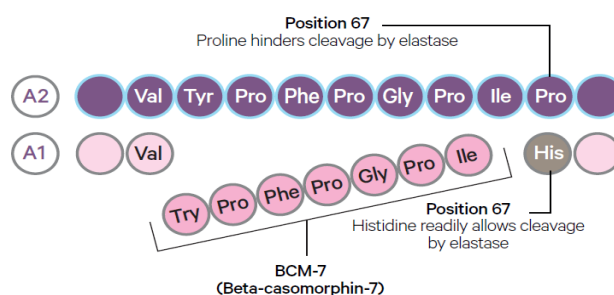
<https://www.etherio.org/post/holle-%CE%BD%CE%AD%CE%BF-%CE%B2%CF%81%CE%B5%CF%86%CE%B9%CE%BA%CF%8C-%CE%B3%CE%AC%CE%BB%CE%B1-%CE%B1%CF%80%CF%8C-%CE%B1%CE%B3%CE%B5%CE%BB%CE%AC%CE%B4%CE%B5%CF%82-%CE%B12>

### 1.3.4 Καζεΐνη Α1 και β-καζομορφίνη 7

Η ύπαρξη της ιστιδίνης στο μόριο της Α1 β-καζεΐνης, αλλά και στη Β και C β-καζεΐνης οδηγεί μέσω της ενζυμικής υδρόλυσης στην απελευθέρωση της β-καζομορφίνης 7(BCM-7). Παράγεται ύστερα από την δράση της πεπτίνης, της παγκρεατικής ελαστάσης και της αμινιπεπτιδάσης της λευκίνης. Ο πεπτιδικός δεσμός μεταξύ λευκίνης και ιστιδίνης υδρολύεται και απελευθερώνεται η BCM-7. Σε αντίθεση με την Α2 β-καζεΐνη που δεν υπάρχει ο δεσμός λευκίνης και ιστιδίνης οπότε δεν είναι εύκολη η υδρόλυσή της. Η BCM-7 είναι ένα δραστικό ολιγοπεπτίδιο των 7 αμινοξέων, Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile, με οπιοειδή δράση που θα μπορούσε να επηρεάσει το κεντρικό νευρικό σύστημα, το καρδιαγγειακό σύστημα, το πεπτικό και το ανοσοποιητικό σύστημα [12], [17], [18],[19]. Ο παραπάνω μηχανισμός δεν παρατηρήθηκε με την ύπαρξη της προλίνης στο μόριο της Α2 καζεΐνης.



Εικόνα 8 Μεταβολισμός Α1,Α2 γάλακτος[20].



Εικόνα 9 BCM-7

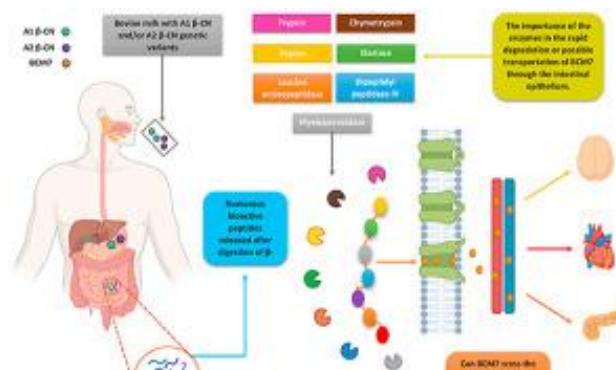
<https://a2milknutrition.com/a1-a2-protein-explained>

#### 1.4 Γάλα A1 και A2 β-καζεΐνης

Παρ'όλο που δεν έχει βρεθεί ο ακριβής μηχανισμός δράσης της BCM-7, μελέτες έχουν δείξει επιρροή του οργανισμού πειραματόζων αλλά και ανθρώπων σε αυξημένη συγκέντρωσή της μέσω της πρόσληψής του γάλακτος A1.

Το σύνδρομο αιφνίδιου βρεφικού θανάτου που προκαλεί των θανάτων των βρεφών συσχετίζει την κατανάλωση A1 γάλακτος με την εμφάνισή του καθώς και αυτισμό και σχιζοφρένια. Επιπλέον παρατηρήθηκε σε παιδιά που είχαν πρόσβαση σε γάλα A1 και όχι A2 η εμφάνιση διαβήτη τύπου 1. Το παραπάνω επιβεβαιώνεται ύστερα από πειράματα σε μη παχύσαρκα διαβητικά ποντίκια στα οποία βρέθηκε διαβήτης τύπου 1. Η BCM-7 επηρεάζει πολλούς οπιοειδούς υποδοχείς στο νευρικό, ενδοκρινικό και ανοσοποιητικό σύστημα. Ύστερα από μελέτη σε μωρά κουνέλια έδειξε πως η BCM-7 σχετίζεται με την οξείδωση της χαμηλής πυκνότητας χοληστερόλης προς της εμφάνιση αθηροσκλήρυνσης αλλά και θνησιμότητας από καρδιαγγειακά προβλήματα.

Η δυσανεξία στην λακτόζη και η αλλεργία στην πρωτεΐνες τους γάλακτος παρουσιάζουν ομοιότητες για αυτό και πολλές φορές συγχέονται παρόλα αυτά είναι δύο διαφορετικά προβλήματα υγείας. Έπειτα από παρακολούθηση έχει βρεθεί σε βρέφη μετά από κατανάλωση γάλακτος A1 να εμφανίζουν αλλεργικά συμπτώματα. Παρατηρήθηκαν ανωμαλίες στο πεπτικό σύστημα, διάρροια, έμετος, δυσκοιλιότητα και παλινδρόμηση. Στο αναπνευστικό σύστημα, θορυβώδης αναπνοή, βήχας, καταρροή και στο δέρμα εξανθήματα, κνίδωση, ξηρό, φολιδωτό ή κνησμώδες δέρμα [12], [13], [15], [17], [21].



Εικόνα 10 BCM-7 και υγεία

Ο EFSA παρά την ύπαρξη μελετών και επιδημιολογικών στοιχείων θεωρεί πως στοιχεία που έχουν συλλεχθεί συγχέονται και δεν υπάρχουν επαρκή και έγκυρα αποτελέσματα ώστε να ορίσει πως η BCM-7 είναι επιβλαβής για τον οργανισμό των ανθρώπων [17].

Παρά την μη αποδοχή του EFSA να αναγνωρίσει πως τα στοιχεία επαρκούν ώστε να καταχωρηθεί η BCM7 επιβλαβής για την υγεία του ανθρώπου, (ως εκ τούτου την μην ανάγκη για διαχωρισμό του γάλακτος σε κατηγορίες) πολλοί είναι εκείνοι οι επιστήμονες αλλά και επαγγελματίες στο χώρο της Γαλακτοβιομηχανίας που θεωρούν απαραίτητο τον διαχωρισμό του γάλακτος σύμφωνα με την πρωτεΐνη που περιέχει. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι αυτά του λανσαρίσματος του γάλακτος A2 στην αγορά της Αυστραλίας, της ΗΠΑ, του Καναδά (<https://www.a2milk.com/>), του A-Zwei στην Γερμανία (<https://www.a2milch.at/was-ist-a2-milch/>), καθώς και του βιολογικού βρεφικού γάλακτος A2 (<https://www.etherio.org/post/holle>).



Εικόνα 11 Προϊόντα γάλακτος A2



### 1.5 Μέθοδοι ταυτοποίησης A1 και A2 β-καζεΐνης

Ο διαχωρισμός της A1 β-καζεΐνης από την A2 β-καζεΐνη αποτελεί σημαντικό πεδίο ανάπτυξης έρευνας μετά από τις ενδείξεις για σημαντική επιρροή στην υγεία του ανθρώπου.

Οι μέθοδοι ταυτοποίησης χωρίζονται σε δύο κατηγορίες. Τις χημικές μεθόδους που περιλαμβάνουν ανοσολογικές, χρωματογραφικές και φασματοσκοπικές τεχνικές αλλά και σε συνδυασμό των τεχνικών. Καθώς και μοριακές μέθοδοι όπως PCR και παραλλαγές αυτής.

#### 1.5.1 Χημικοί μέθοδοι

Σε μία μελέτη χρησιμοποιήθηκε ένας έμμεσος τρόπος ανίχνευσης της παρουσίας των αλληλόμορφων A1 και A2. Με τις μεθόδους HPLC-MS και HRMS-UV , αλλά και μεμονωμένα χρωματογραφικές και φασματοσκοπικές, ανιχνεύθηκε η BCM-7 ως προϊόν ενζυμικής υδρόλυσης της A1 β-καζεΐνης. Η BCM-7 αποτελεί όμως παράγωγο της ενζυμικής υδρόλυσης της B και C β-καζεΐνης, επίσης. Επομένως, η μέθοδος θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για ανίχνευσή καθαρά και μόνο BCM-7 η οποία είναι πιθανή να παρουσιάζει δυσμενής αποτελέσματα τον οργανισμό των ανθρώπων και όχι για τον διαχωρισμό A1 και A2 β-καζεΐνης [22].

Μία άλλη μέθοδος είναι η ανοσολογική. Οι ανοσολογικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται ευρέως καθώς είναι μέθοδοι που δεν χρειάζονται εξειδικευμένο εξοπλισμό, είναι γρήγορες και σχετικά οικονομικές .Μέσω ενός ειδικού κίτ που μπορεί εύκολα να δώσει αποτέλεσμα ως προς την ύπαρξη του γονιδίου για A1 χωρίς όμως να μας παρέχει πληροφορία ως προς την ομοζυγία ή ετεροζυγία του αλληλόμορφου [23].

#### 1.5.2 Μοριακοί μέθοδοι

Η συχνότερη και παλαιότερη μέθοδος ανίχνευσης A1 ή A2 αλληλόμορφών της β-καζεΐνης είναι η ACRS-PCR. Αν και είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος, είναι αρκετά χρονοβόρα χωρίς βέβαια αποτελέσματα. Μια άλλη μέθοδος είναι η αλληλική διάκριση χρησιμοποιώντας ανιχνευτές TaqMan. Αυτή η μέθοδος είναι πιο αποτελεσματική, αξιόπιστη και 100φορές πιο ευαίσθητη από την ACRS-PCR [24]. Ακόμη μια μέθοδος που έχει χρησιμοποιηθεί είναι η τεχνική SSCP [25] .

Τέλος οι πιο ευαίσθητες και αξιόπιστες τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί για ανίχνευση των A1 και A2 αλληλόμορφων της Β-καζείνης είναι οι τεχνικές της HRM και η rhAmp, με την rhAmp να αναδεικνύεται ελάχιστα πιο ευαίσθητη από την HRM [19]. Παρακάτω θα μελετηθεί εκτενέστερα η μέθοδος HRM.

## 1.6 Νοθεία

Νοθεία ορίζεται οποιαδήποτε αλλαγή έχει υποστεί το τρόφιμο το οποίο το καθιστά εκτός των απαιτούμενων προδιαγραφών του και θα μπορούσε να θέσει τον καταναλωτή σε οποιαδήποτε μορφής κινδύνου όπως οικονομικό, υγειονομικό αλλά και ηθικό.

Κατά τον ΕΦΕΤ ορίζεται ως νοθεία ή απάτη τροφίμων ένα ευρύ φάσμα δόλιων ή παραπλανητικών τεχνικών και αναφέρεται σε όλη την αγροτοδιατροφική αλυσίδα [26].

Η νοθεία στα τρόφιμα μπορεί να διαχωριστεί σε τρεις κατηγορίες 1) την αντικατάσταση, η οποία ορίζεται ως η πλήρης ή μερική αντικατάσταση ενός συστατικού τροφίμου από ένα άλλο φθηνότερο, εν αγνοία του καταναλωτή, 2) την προσθήκη, η οποία ορίζεται ως η προσθήκη μη εγκεκριμένης ουσίας κατώτερης ποιότητας, εν αγνοία του καταναλωτή και 3) την αφαίρεση, η οποία ορίζεται ως η αφαίρεση ενός αυθεντικού και υψηλής διατροφικής συστατικού τροφίμου, εν αγνοία του καταναλωτή [27]. Κατά την νομοθεσία της Ευρωπαϊκής ένωσης υπάρχουν περισσότερες κατηγορίες που θα μπορούσε να κατηγοριοποιηθεί η νοθεία. Αυτές είναι:

- Η υποκατάσταση,
- η διάλυση,
- η παραχάραξη,
- η παραπλανητική επισήμανση (mislabeling),
- η απόκρυψη (concealment),
- η γκρίζα αγορά (grey market) και

μη εγκεκριμένες βελτιστοποιήσεις [28].



[https://knowledge4policy.ec.europa.eu/food-fraud-quality/topic/food-fraud\\_en](https://knowledge4policy.ec.europa.eu/food-fraud-quality/topic/food-fraud_en)

Επιπρόσθετα, μεγάλοι ελεγκτικοί φορείς πιστοποίησης στον τομέα των τροφίμων έχουν προσθέσει ειδικές διατάξεις στα προγράμματά τους με ελέγχους που αποσκοπούν στην διατήρηση της αυθεντικότητας του τροφίμου σε όλα τα στάδια της παραγωγής τους , από τον γεωργό έως τον τελικό καταναλωτή. Σημαντικά παραδείγματα αποτελούν ο φορέας πιστοποίησης ποιότητας BRC [29] και το IFS [30].

Σύμφωνα με μελέτες αλλά και φορείς της Ευρωπαϊκής Ένωσης τα πιο κοινά τρόφιμα που υπόκεινται κάποιοι τύπου νοθεία από τις προαναφερόμενες είναι το ελαιόλαδο, το γάλα, το μέλι, ο κρόκος, ως το ακριβότερο μπαχαρικό, ο χυμός πορτοκαλιού και μήλου, κρασί, το εκχύλισμα βανίλιας και τα ψάρια [28].

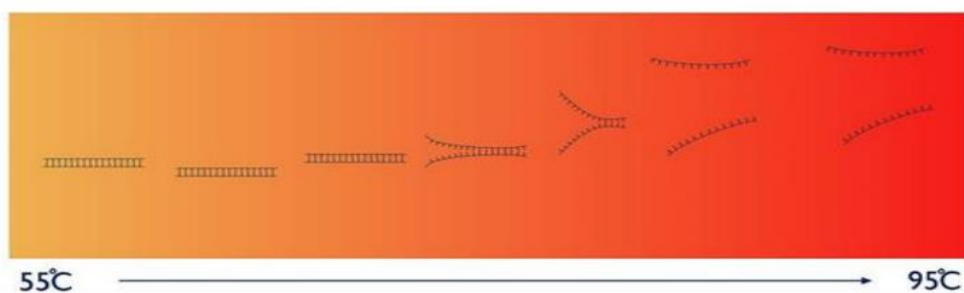
Όπως έχει προαναφερθεί, η ευρεία κατανάλωση του γάλακτος (ο FAO αναφέρει πως 6 δις άνθρωποι σε αναπτυσσόμενες χώρες καταναλώνουν γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα [31]) λόγω της υψηλής θρεπτικής αξίας του τόσο από βρέφη όσο και από ενήλικες δημιουργεί επιτακτική ανάγκη για διατήρηση της αυθεντικότητάς του αλλά και ασφαλούς κατανάλωσής του. Κυριότερη αιτία νοθείας για το γάλα είναι οικονομική. Χαρακτηριστικά σημαντικό παράδειγμα νοθείας σε γάλα που κλόνισε την παγκόσμια κοινότητα είναι το σκάνδαλο με το κινέζικο γάλα το 2008 , νοθεία με μελανίνη σε βρεφικό γάλα που είχε ως αποτέλεσμα να στοιχίσει την ζωή σε 6 βρέφη [32]. Η επιτακτικότητα για ανίχνευση της νοθείας στο γάλα γίνεται άμεσα ευδιάκριτη.

Υπάρχουν διάφοροι μέθοδοι ανάλυσης που χρησιμοποιούνται για την ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση της νοθείας στο γάλα. Οι πιο κοινά μέθοδοι ανίχνευσης ξένων πρωτεϊνών είναι η ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) και η χρωματογραφική μέθοδος LC (Liquid Chromatography). Ενώ η PCR αντίδραση, αλλά και παραλλαγές αυτής, χρησιμοποιείται για την ανίχνευση νοθείας από προσθήκη διαφορετικού είδους γάλακτος [32].

### 1.7 Υψηλή ανάλυση Καμπύλης Τήξεως – High Resolution Melting-HRM

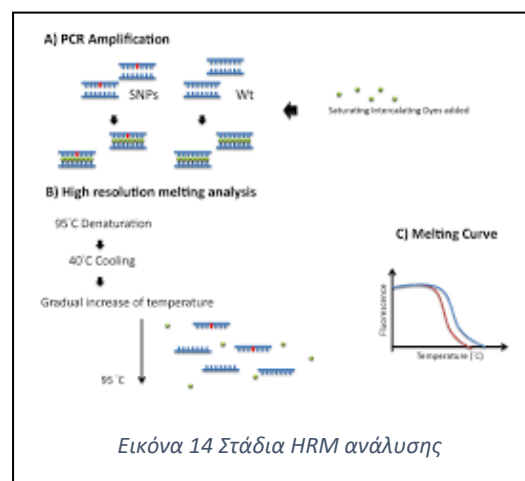
Η Υψηλής Ανάλυσης Καμπύλης Τήξης HRM (High-Resolution Melting) αποτελεί μια μοντέρνα παραλλαγή της PCR ανάλυσης. Είναι μία καινοτόμος τεχνική ταυτοποίησης σημειακών μεταλλάξεων, η οποία βασίζεται στην ανάλυση της τήξης του DNA. Έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την ανίχνευση πολυμορφισμών σε αλληλουχίες νουκλεϊκών οξέων και παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις εναλλακτικές μοριακές μεθόδους. Είναι μία γρήγορη, οικονομική και εύχρηστη μέθοδος σε σχέση με τις άλλες παρόμοιες μεθόδους. Έχει χρησιμοποιηθεί για την γονοτύπηση, χαρτογράφηση γονιδιώματος και διάκριση μεταξύ των ειδών. Εμφανίζει μεγάλη εφαρμογή στην ιατρική για την ανίχνευση μεταλλάξεων γονιδίων που αφορούν τον καρκίνο, στη γεωργική βιομηχανία αλλά και στη πιστοποίηση φυτικών προϊόντων [33].

Βασίζεται στον διαχωρισμό των κλώνων της δίκλωνης αλυσίδας του DNA σε μονόκλινα υπό αύξηση της θερμοκρασίας τους δηλαδή θερμοκρασία τήξης (melting temperature). Η θερμοκρασία τήξης ουσιαστικά είναι η θερμοκρασία που το μόριο χάνει την ελικοειδή μορφή του.



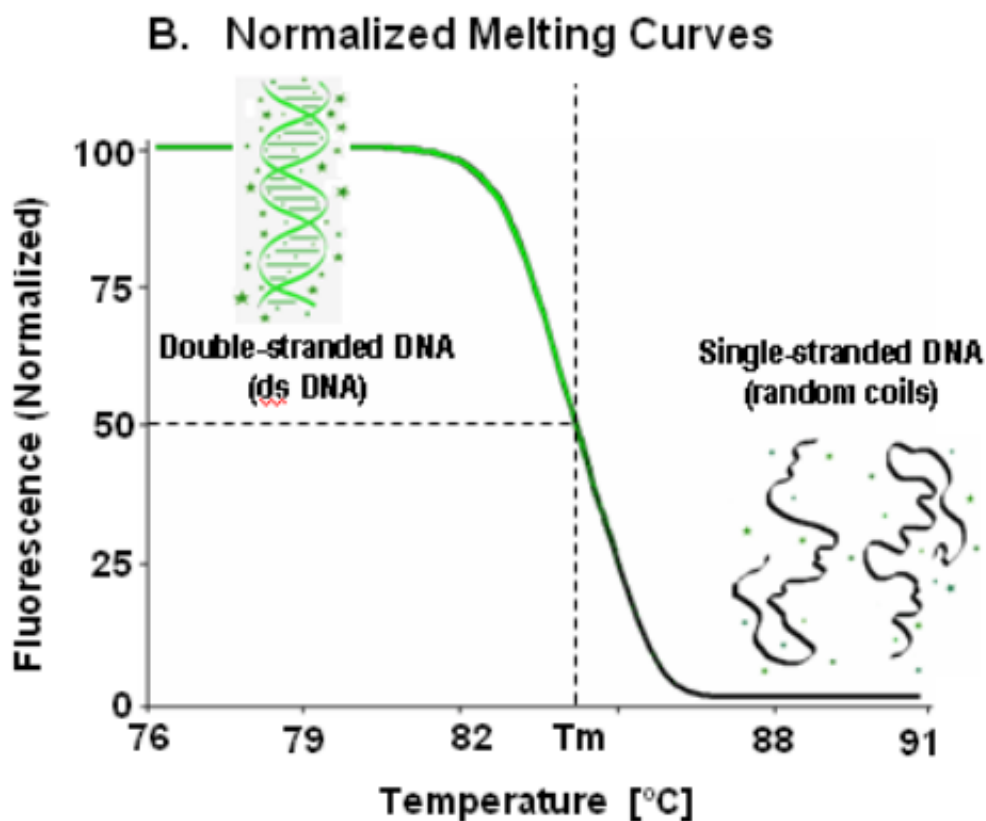
Εικόνα 13 Διαχωρισμός κλώνων αλυσίδας DNA

Πραγματοποιείται σε τρία στάδια. Αρχικά πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχία-στόχος παρουσία παρεμβαλόμενης θερμοανθεκτικής χρωστικής η οποία φθορίζει μόνο όταν είναι προσδεμένη σε δίκλινο μόριο DNA.



Εικόνα 14 Στάδια HRM ανάλυσης

Ο φθορισμός μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ποσοτικοποίηση της ενίσχυσης του DNA. Έπειτα, στο ίδιο κλειστό σύστημα, αύξηση της θερμοκρασίας πραγματοποιεί τήξη του DNA, η δίκλωνη αλυσίδα μετατρέπεται σε μονόκλωνη και έτσι ο φθορισμός να αρχίσει να μειώνεται καθώς η χρωστική αποδεσμεύεται από το δίκλωνο μόριο [34], [35].



Εικόνα 15 Κανονικοποιημένη καμπύλη φθορισμού  
<https://www.gene-quantification.de/hrm-dyes-index.html>

Επειδή πρόκειται για τεχνική κλειστού συστήματος, δεν τίθενται θέματα επιμόλυνσης μεταξύ των διαφόρων σταδίων της αντίδρασης. Σημαντική σημείωση είναι πως για να πραγματοποιηθεί και να αναλυθεί η αντίδραση χρειάζεται η ύπαρξη ενός τουλάχιστον δείγματος γνωστού γονότυπου.

Ένα από τα πιο χρήσιμα χαρακτηριστικά της HRM είναι ότι δίνει την δυνατότητα να συγκρίνουμε τους γονότυπους διαφορετικών ατόμων τόσο μεταξύ τους όσο και με την πρότυπη καμπύλη. Οι καμπύλες τήξης δύο δειγμάτων που έχουν τη ίδια νουκλεοτιδική αλληλουχία θα εφάπτονται πλήρως η μια της άλλης, ωστόσο εάν υπάρχει διαφορά ακόμη και σε ένα ζεύγος βάσεων, η θερμοκρασία και συνεπώς η καμπύλη τήξης θα αλλάξει.

Ακόμη σε περίπτωση που υπάρχουν τρεις γονότυποι για ένα γονίδιο, δύο ομόζυγοι και ένας ετερόζυγος μπορεί να γίνει ανίχνευση.

Επιπλέον, σημαντική πληροφορία είναι πως κατά την πειραματική πορεία η συγκέντρωση του DNA των δειγμάτων πρέπει να είναι ίδια σε όλα τα δείγματα και η τοποθέτησή τους καθώς και όλων των αντιδραστηρίων πρέπει ακριβώς στον ίδιο όγκο κατά το πιπετάρισμα. Οι καμπύλες που μπορούμε να εξάγουμε για να μελετήσουμε την HRM είναι η καμπύλη φθορισμού-κύκλων αντίδρασης RT-PCR και φθορισμού-θερμοκρασίας αλλά και η καμπύλη τήξης των δειγμάτων.

### 1.8 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι ο εντοπισμός της ελάχιστης συγκέντρωσης γάλα τύπου A1, όπου περιέχει A1 β-καζεΐνη, σε δείγματα γάλακτος A2, όπου περιέχουν αποκλειστικά A2 β-καζεΐνη.

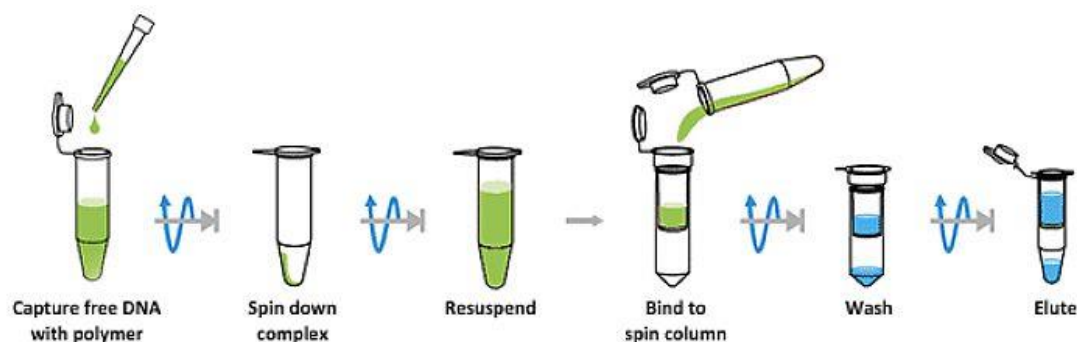
## 2. Πειραματικό

Για την πραγματοποίηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας λήφθηκαν 52 δείγματα, 23 δείγματα αίματος από 23 διαφορετικές αγελάδες. Καθώς και 29 δείγματα γάλακτος από αραιώσεις δύο διαφορετικού τύπου γάλακτος, A1 και A2, που είχαν κατηγοριοποιηθεί σε πρότερα στάδια της πειραματικής πορείας. Η λήψη των δειγμάτων έγινε χωρίς τον τραυματισμό ή βλάβη κάποιου ζώου.

### 2.1. Απομόνωση DNA από δείγματα αίματος

Απαρχή της πειραματική διαδικασία είναι η απομόνωση γενετικού υλικού, DNA, από τα δείγματα αίματος των αγελάδων. Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε με το kit της Invitrogen PureLink® Genomic DNA Kit (1820-01,02/1821-04) ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή.

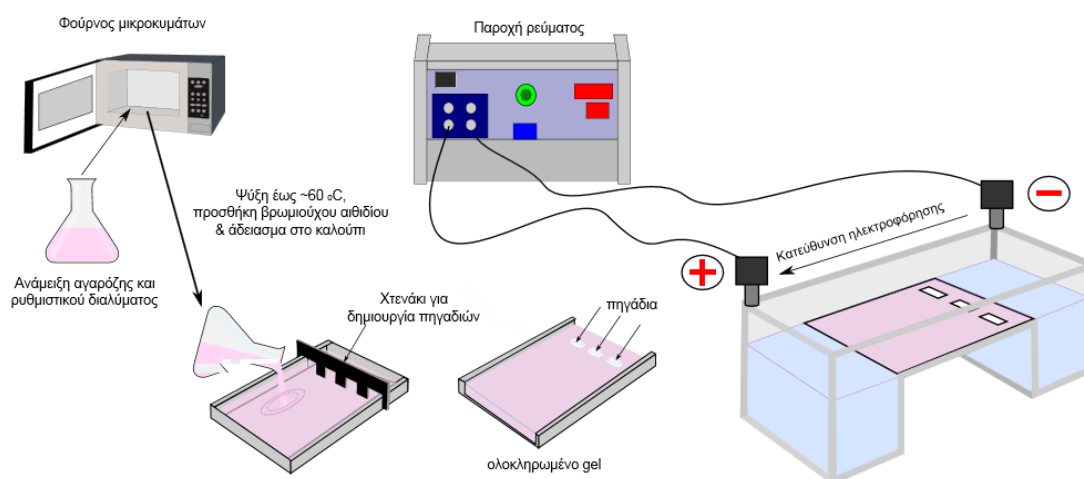
Ειδικότερα, χρησιμοποιήθηκαν 200μl αίματος, στα οποία προστέθηκαν 20μl πρωτεϊνάση K, 20μl RNase A ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2min. Προστέθηκαν 200μl PureLink® Genomic lysis Buffer και πραγματοποιήθηκε ανάδευση με vortex. Ακολούθησε επώαση στους 55°C για 20min, φυγοκέντρηση και προσθήκη 200μl αιθανόλης. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν, έγιναν πλύσεις με διαλύματα 500μl Buffer 1 και 2 και τέλος προστέθηκε 60μl elution buffer.



Εικόνα 16 Απομόνωση DNA

(<https://www.westburg.eu/free-circulating-dna-extraction>)

Για τον ποιοτικό έλεγχο της διαδικασίας απομόνωσης πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v. Για τη δημιουργία του πηκτώματος αναμίχθηκε σκόνη αγαρόζης 0,5gr, με ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1X , περίπου 50ml. Το μίγμα θερμάνθηκε μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη. Ψύχθηκε και προστέθηκε βρωμιούχο αιθίδιο. Στη συνέχεια, το μίγμα τοποθετήθηκε σε κατάλληλο εκμαγείο με ειδικές υποδοχές “πηγαδάκια”, δημιουργήθηκε το πήκτωμα και προστέθηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Προστέθηκαν 3ml χρωστικής και 3ml δείγματος σε κάθε υποδοχή. Τέλος εφαρμόστηκε τάση στα 100V στα άκρα της συσκευής για 20min και παρατηρήθηκαν τα αποτελέσματα-μπάντες υπό λάμπα UV.



Εικόνα 17 Ηλεκτροφόρηση DNA

<https://repository.kallipos.gr/handle/11419/4126>

## 2.2. Ποσοτικοποίηση DNA από δείγματα αίματος

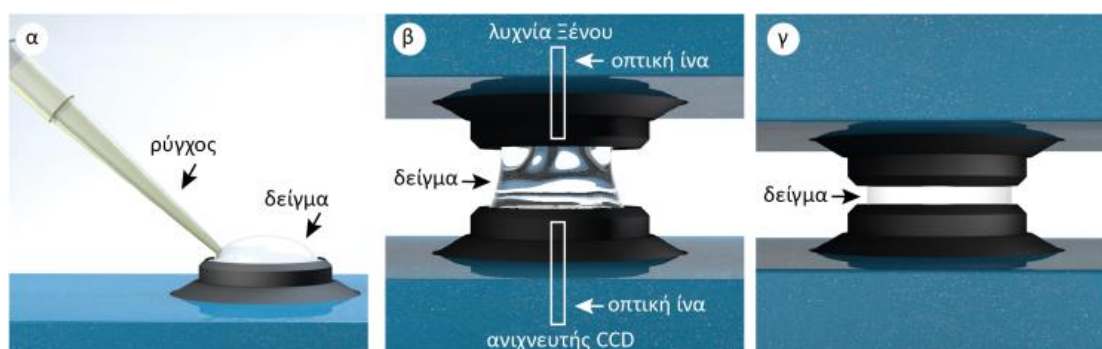
Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του DNA που απομονώθηκε αλλά και των αραιώσεων που θα πραγματοποιηθούν έπειτα στην πειραματική πορεία χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι. Η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων αποτελεί σημαντικό κομμάτι στην πειραματική πορεία καθώς η ανάλυση HRM απαιτεί συγκεκριμένη συγκέντρωση DNA ώστε να πραγματοποιηθεί με τις σωστές προδιαγραφές. Οι αρχές των μεθόδων ελέγχου της συγκέντρωσης που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- φασματοφωτομετρία υπεριώδους
- φασματοφθρισμομετρία



### 2.2.1. Φασματοφωτομετρία Quawell

Το φασματοφωτόμετρο UV/Vis που χρησιμοποιήθηκε ονομάζεται Quawell είναι ένα όργανο μέτρησης μικρού όγκου. Λειτουργεί με βάση ειδικό σύστημα συγκράτησης του δείγματος ανάμεσα σε δύο επιφάνειες βασισμένα στην επιφανειακή τάση, χωρίς τη χρήση κυπελίδων. Η απαιτούμενη ποσότητα δείγματος για την πραγματοποίηση της μέτρησης είναι 2 μl και το δείγμα χρησιμοποιείται χωρίς καμία προηγούμενη αραίωση. Αρχικά ρυθμίστηκε το όργανο με χρήση τυφλού δείγματος (blank) το οποίο είναι H<sub>2</sub>O και έπειτα μετρήθηκαν τα δείγματα. Όπως και στα άλλα φασματοφωτόμετρα, μετρείται η απορρόφηση του δείγματος στα 260 nm και στα 280 nm. Τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του δείγματος (λόγος A<sub>260nm</sub>/A<sub>280nm</sub>) παρουσιάζονται αυτόματα στην οθόνη του υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος με το σύστημα. Ως πηγή ακτινοβολίας χρησιμοποιήθηκε λυχνία ξένου [36]. Είναι μία μέθοδος γρήγορη και ακριβής.



Εικόνα 18 Φασματοφωτόμετρο Quawell [36]

### 2.2.2. Φθορισμομετρία Qubit

Η Qubit είναι μία μέθοδος ποσοτικοποίησης με τη χρήση φθορισμού. Φθορισμός ονομάζεται η ιδιότητα που έχουν ορισμένα άτομα ή μόρια, όταν απορροφούν ακτινοβολία ορισμένου μήκους κύματος, να εκπέμπουν ακτινοβολία υψηλότερου μήκους κύματος μετά από σύντομο χρονικό διάστημα (<1/100.000 sec) καλούμενο και διάρκεια ζωής του φθορισμού. Κατά τον φθορισμό η εκπομπή ακτινοβολίας σταματάει μόλις διακοπεί η προσπίπτουσα ακτινοβολία. Χρησιμοποιεί φθορίζουσες χρωστικές για να προσδιοριστεί η συγκέντρωση των νουκλεϊκών οξέων στα δείγματα.

Το ειδικό kit που χρησιμοποιήθηκε για αυτήν την μέθοδο ποσοτικοποίησης ήταν το Qubit™ dsDNA BR Assay Kit της Invitrogen™. Τα δείγματα προετοιμάστηκαν με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή. Χρησιμοποιήθηκαν 2μl από το κάθε δείγμα.

Κατά την πειραματική πορεία παρατηρήθηκε επαναληψιμότητα και ακρίβεια και με τις δύο μεθόδους ποσοτικοποίησης. Παρ' όλα αυτά η μέθοδος που επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί στο μείζον μέρος της πειραματικής διαδικασίας ήταν η ποσοτικοποίηση με Quawell ως πιο γρήγορη και εξίσου αξιόπιστη.

### 2.3. Ανάλυση High-Resolution Melt (HRM) σε δείγματα αίματος

#### 2.3.1 Επιλογή εκκινητών

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του τμήματος γονιδίου στο στάδιο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-PCR ή qPCR) στην ανάλυση HRM ήταν της εταιρίας Eurofins. Οι εκκινητές λήφθηκαν λυοφιλιωμένοι και συγκέντρωσης 500pmol/μl. Έχουν τους κωδικούς, για τον πρόσθιο εκκινητή ή forward F H596 27-4412-1/2 A1A2\_HRM\_F και για τον αντίστροφο εκκινητή ή reverse R H518 27-4412-2/2 A1A2\_HRM\_R. Οι αλληλουχίες τους είναι οι εξής :

<b>Εκκινητής</b>	<b>Αλληλουχία</b>
Forward	5'- AGA TTT GTT TTC CTT CTT TCC AGG-3'
Reverse	5'-GGA TGT TTT GTG GGA GGC TG -3'

Πίνακας 4 Εκκινητές αντίδρασης

#### 2.3.2 Προετοιμασία δειγμάτων

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω η ανάλυση HRM απαιτεί συγκεκριμένη συγκέντρωση DNA επομένως πρώτο στάδιο της προετοιμασίας ήταν οι αραιώσεις τόσο των δειγμάτων DNA που απομονώθηκαν όσο και των εκκινητών. Η επιθυμητή συγκέντρωση για τα δείγματα είναι 10ng/μl και για τους εκκινητές είναι τα 10pmol/μl.

Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 25μl τα οποία αποτελούνταν από τα ακόλουθα :

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Όγκος ανά αντίδραση (μl)</i>
2x HRM PCR Master Mix *	12,5
Πρόσθιος εκκινητής	1,75
Αντίστροφος εκκινητής	1,75
RNase-free H <sub>2</sub> O	Ποικίλει
Απομονωμένο DNA	Ποικίλει
Σύνολο	25

Πίνακας 5 Σύσταση αντίδρασης HRM

\*Το Master Mix για την ανάλυση HRM αποτελείται από την HotStarTaq Plus η οποία είναι μια τροποποιημένη μορφή της DNA πολυμεράσης, μια ανασυνδυασμένη DNA πολυμεράση 94 kDa που αρχικά απομονώθηκε από το *Thermus aquaticus*, και κλωνοποιήθηκε σε *E. Coli*. Από το Type-it HRM PCR Novel PCR buffer ένα ρυθμιστικό διάλυμα για εξαιρετικά ειδική ενίσχυση για την επακόλουθη HRM. Επιπλέον περιέχει την ειδική φθορίζουσα χρωστική EvaGreen που δεσμεύεται σε dsDNA, επιτρέπει την υψηλή απόδοση και ενίσχυση PCR και είναι ιδανική για HRM ανάλυση. Το διάλυμα Q- Solution για επιτυχή ενίσχυση των γονιδιωματικών κομματιών. Και τέλος το master mix περιέχει μείγμα dNTP, δηλαδή, dATP, dCTP, dGTP και dTTP εξαιρετικά καθαρής ποιότητας και νερό χωρίς RNase (RNase-free water) κατάλληλο για την ανάλυση HRM.

Ο όγκος του RNase-free water ποικίλει ανάλογα με τον όγκος DNA που επιλέχθηκαν για την αντίδραση. Στην παρούσα πειραματική πορεία πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με διάφορους όγκους DNA από 1μl έως 9μl και παρατηρήθηκε πως η αντίδραση είναι πιο αποτελεσματικός σε όγκο DNA 2μl. Η τελική ποσότητα των συστατικών για τα αναλώσιμα της αντίδρασης υπολογίστηκαν με βάση τον αριθμό των δειγμάτων (n+1 όπου n=ο αριθμός των δειγμάτων) που θα γίνουν κάθε φορά, συμπεριλαμβανομένου του αρνητικού μάρτυρα. Η επιπλέον ποσότητα προστέθηκε για λόγους ασφαλείας. Ο αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε για να βεβαιωθούμε ότι δεν υπήρξε επιμόλυνση.

### 2.3.2 Real-time PCR ακολουθούμενη από ανάλυση HRM

Η real-time PCR ακολουθούμενη από ανάλυση HRM πραγματοποιήθηκε με το όργανο Rotor-Gene® Q cycler της QIAGEN, σύμφωνα με το Type-it HRM PCR Kit της QIAGEN, σε τελικό όγκο αντίδρασης 25μl.

#### Στάδια αντίδρασης

1. Πρώτο στάδιο ήταν η πραγματοποίηση της Real-Time PCR. Αρχικά έγινε ενεργοποίηση της HotStarTaq Plus DNA πολυμεράσης με θέρμανσης στους 95°C για 5min. Η συγκεκριμένη πολυμεράση είναι ανενεργή σε θερμοκρασία δωματίου κάτι που κάνει την προετοιμασία ευκολότερη και εμποδίζει τον σχηματισμό διμερών . Στην συνέχεια έχουμε το πρώτο βήμα του κύκλου της αντίδρασης που είναι η αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου DNA όπου πραγματοποιείται στους 95°C για 10 sec και έπειτα ο υβριδισμός των μονόκλωνων με τους εκκινήτες στους 55°C για 30 sec. Τα στάδια της qPCR επαναλήφθηκαν για 45 κύκλους.
2. Εφόσον το DNA πολλαπλασιάστηκε, ακολούθησε η ανάλυση HRM. Προκειμένου να βρεθεί η θερμοκρασία τήξης (Tm) του προϊόντος πρώτα ορίστηκε ένα εύρος θερμοκρασιών που περιλαμβάνει εκείνη στην οποία οι δύο κλώνοι του DNA διαχωρίζονται. Η ανάλυση HRM ξεκίνησε στους 65°C με σταδιακή άνοδο της θερμοκρασίας έως τους 95°C. Αυτή η διαδικασία διήρκεσε περίπου 40min .Αφού ολοκληρώθηκε η διαδικασία της HRM ακολούθησε η ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω του προγράμματος που παρέχει ο κατασκευαστής.

### 2.4. Αραιώσεις σε δείγματα γάλακτος

Έπειτα από την ανάλυση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης HRM προέκυψαν τρεις ομάδες δειγμάτων με τους αναμενόμενους διαφορετικούς γονότυπους, A1A1,A1A2,A2A2 σύμφωνα με τα πρότυπα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν. Από τα δείγματα που προέκυψαν με γονότυπο A1A1 και A2A2 επιλέχθηκε τυχαία ένα δείγμα από κάθε ομάδα αντίστοιχα και πραγματοποιήθηκαν οι παρακάτω αραιώσεις.

Έπειτα ακολούθησαν απομονώσεις DNA από τα μείγματα γάλακτος, ποσοτικοποίηση και ανάλυση HRM με τον τρόπο που εξηγήθηκαν πρότερα.

<b>% γάλακτος A1A1 σε A2A2</b>	<b>Όγκος γάλακτος A1A1(μl)</b>	<b>Όγκος γάλακτος A2A2(μl)</b>	<b>Συνολικός όγκος(μl)</b>
100/0	200	0	200
90/10	180	20	200
80/20	160	40	200
70/30	140	60	200
60/40	120	80	200
50/50	100	100	200
40/60	80	120	200
30/70	60	140	200
20/80	40	160	200
19/81	38	162	200
18/82	36	164	200
17/83	34	166	200
16/84	32	168	200
15/85	30	170	200
14/86	28	172	200
13/87	26	174	200
12/88	24	176	200
11/89	22	178	200
10/90	20	180	200
9/91	18	182	200
8/92	16	184	200
7/93	14	186	200
6/94	12	188	200
5/95	10	190	200
4/96	8	192	200
3/97	6	194	200
2/98	4	196	200
1/99	2	198	200
0/100	0	200	200

Πίνακας 6 Αραιώσεις δειγμάτων γάλακτος

## 2.5. Απομόνωση DNA από δείγματα γάλακτος

Η απομόνωση γενετικού υλικού, DNA, από τα δείγματα γάλακτος των αγελάδων πραγματοποιήθηκε με το kit της Invitrogen PureLink® Genomic DNA Kit (1820-01,02/1821-04) ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή σε 200μl δείγματος γάλακτος.

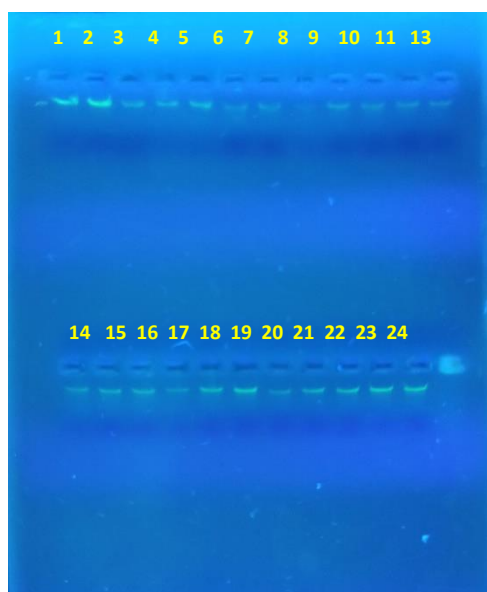
## 2.6. Ανάλυση HRM σε δείγματα γάλακτος

Η ανάλυση HRM σε δείγματα γάλακτος πραγματοποιήθηκε κατά παρόμοιο τρόπο και με τα δείγματα αίματος.

### 3.Αποτελέσματα

#### 3.1.Απομόνωση DNA σε δείγματα αίματος

Ο ποιοτικός έλεγχος, μέσω της διαδικασίας της ηλεκτροφόρησης γενετικού υλικού, που απομονώθηκε από δείγματα αίματος αγελάδων, ανέδειξε πως η διαδικασία ήταν επιτυχής. Σε όλα τα δείγματα είναι διακριτές οι ζώνες του τμήματος DNA που απομονώθηκε ( Εικόνα 19).



Εικόνα 19 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων αίματος

#### 3.2.Ποσοτικοποίηση DNA σε δείγματα αίματος

Σημαντικό κομμάτι στην πειραματική πορεία είναι η ποσοτικοποίηση του απομονωμένου DNA καθώς αυτό θα χρησιμοποιηθεί έπειτα για την ανάλυση HRM, η οποία απαιτεί συγκεκριμένη συγκέντρωση γενετικού υλικού.

Αρχικά, έγινε ποσοτικοποίηση μέσω των μεθόδων Qubit και Quawell σε ορισμένα δείγματα και λήφθηκαν τα αποτελέσματα (Πίνακας 7). Παρατηρώντας πως και οι δύο μέθοδοι έφεραν παρόμοια αποτελέσματα, επιλέχθηκε ως κύρια μέθοδος ποσοτικοποίησης στα επόμενα βήματα της πειραματικής πορείας να είναι η μέθοδος Quawell ως πιο γρήγορη και οικονομική.

<b>Δείγμα</b>	<b>Concentration(ng/ul)</b>	
	<b>Qubit</b>	<b>Quawell</b>
4	13,3	14,1
5	29,3	31,4
14	10,3	12
15	9,85	8,7

Πίνακας 7 Ποσοτικοποίηση Qubit, Quawell

Φωτομετρήθηκαν όλα τα δείγματα DNA που απομονώθηκαν και τα αποτελέσματα είναι τα εξής :

<b>Δείγμα</b>	<b>Quawell</b>			
	<b>Abs260</b>	<b>Abs280</b>	<b>260/280</b>	<b>C(ng/ul)</b>
1	0,997	0,643	1,55	49,8
2	1,508	0,965	1,56	75,4
3	0,415	0,336	1,24	20,8
4	0,282	0,175	1,61	14,1
5	0,629	0,373	1,68	31,4
6'	0,442	0,369	1,2	22,1
7_1	0,392	0,31	1,26	19,6
8'	0,58	0,43	1,35	29
9'	0,566	0,43	1,32	28,3
10	0,367	0,295	1,24	18,4
11_2	0,496	0,405	1,22	24,8
13'	0,584	0,43	1,36	29,2
14	0,24	0,198	1,21	12
15	0,174	0,141	1,23	8,7
16	0,32	0,249	1,28	16
17'	0,473	0,356	1,33	23,7
18	0,37	0,276	1,34	18,5
19	0,576	0,437	1,32	28,8
20'	0,453	0,333	1,36	22,7
21	0,431	0,328	1,31	21,6
22	0,496	0,433	1,15	24,8
23	0,424	0,266	1,59	21,2
24	0,463	0,299	1,55	23,2

Πίνακας 8 Ποσοτικοποίηση Quawell

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των φωτομετρήσεων έγινα οι κατάλληλες αραιώσεις, χρησιμοποιώντας τον Νόμο της Αραιώσης, ώστε να προκύψουν δείγματα με συγκέντρωση 10ng/μl. Τα δείγματα φωτομετρήθηκαν και πάλι για να διακριβωθεί η τελική τους συγκέντρωση.

Δείγμα	C(ng/ul)	
	Αρχική	Αραιώση
1	49,8	15,5
2	75,4	20,4
3	20,8	12,3
4	14,1	17,1
5	31,4	11,4
6'	22,1	6,4
7_1	19,6	12,7
8'	29	11,1
9'	28,3	7,9
10	18,4	9,1
11_2	24,8	9,7
13'	29,2	14
14	12	10,8
15	8,7	13,8
16	16	15,4
17'	23,7	23,8
18	18,5	12,2
19	28,8	9,8
20'	22,7	9,4
21	21,6	9,7
22	24,8	16,6
23	21,2	20,2
24	23,2	19,1

Πίνακας 9 Ποσοτικοποίηση Quawell

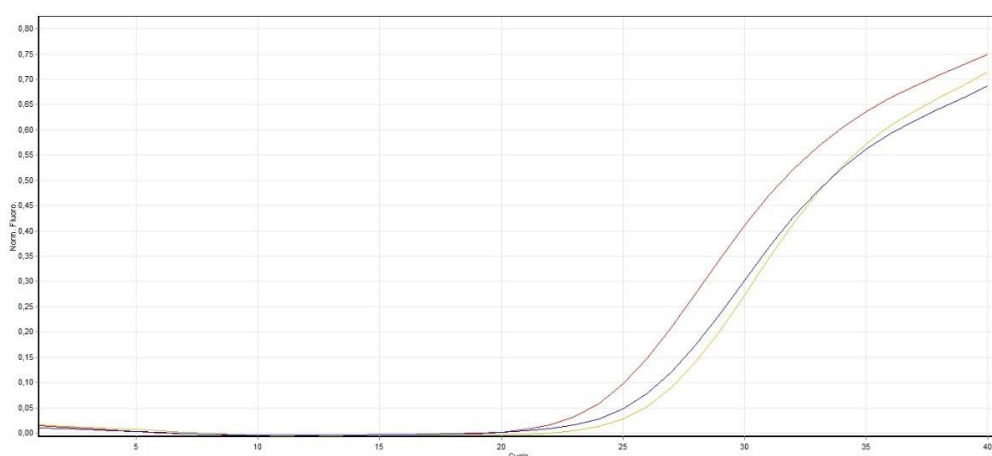
Πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις και στους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την qPCR σε τελική συγκέντρωση 10μmol/μl.

### 3.3.Ανάλυση HRM σε δείγματα αίματος

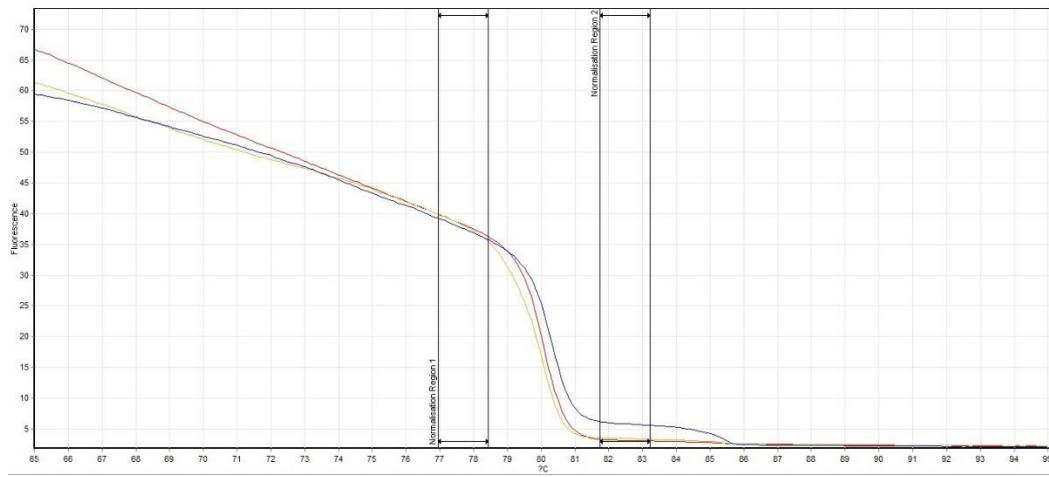
Η ύπαρξη δειγμάτων γνωστού γονότυπου είναι σημαντική για την εξαγωγή αποτελεσμάτων. Στην παρούσα πειραματική πορεία χρησιμοποιήθηκαν δείγματα που έχουν γονοτυπηθεί με αλληλούχηση νέας γενιάς και είναι δείγματα που εμφανίζουν και τους τρεις διαφορετικούς γονότυπους δηλαδή δύο ως προς ομοζυγία και μια ως προς ετεροζυγία ως προς το γονίδιο της β-καζεΐνη, A1A1-A2A2-A1A2 αντίστοιχα.



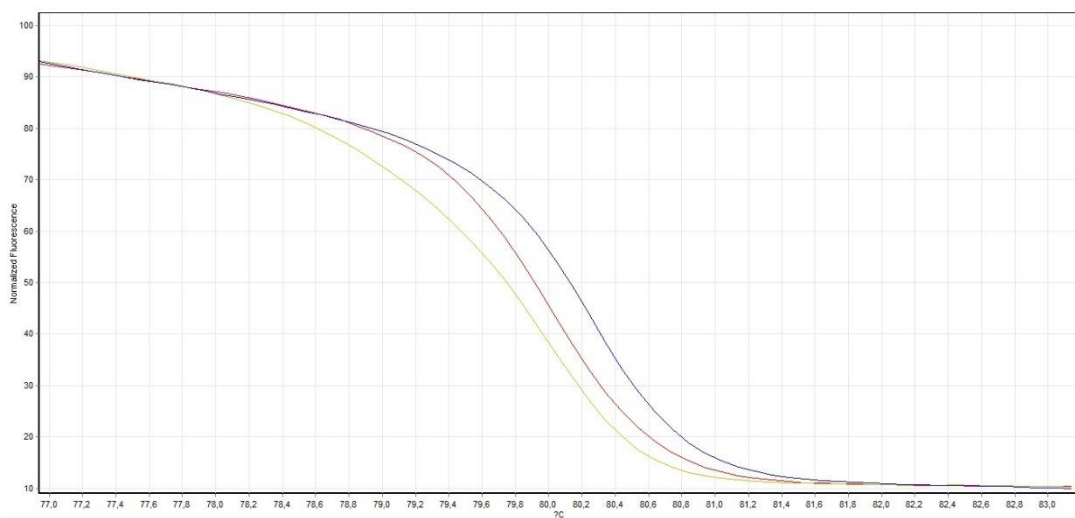
Πραγματοποιήθηκε ανάλυση HRM για τα γνωστά δείγματα για να παρατηρηθεί η εικόνα που παρουσιάζουν κατά την ανάλυση. Αρχικά η qPCR αντίδραση ήταν επιτυχής καθώς ο εκθετικός πολλαπλασιασμός των δειγμάτων άρχισε σε παρόμοιο αριθμό κύκλου της αντίδρασης (Εικόνα 20). Από τα αποτελέσματα της HRM παρατηρούμε την εμφάνιση τριών διαφορετικών καμπύλων με εμφανείς διαφορές στις κανονικοποιημένες καμπύλες φθορισμού (Εικόνα 22) αλλά και στην θερμοκρασία τήξης τους (Εικόνα 23). Σημαντικό είναι το γεγονός πως για την καμπύλη A1A2 παρατηρείται μια διαφοροποίηση στην καμπύλη τήξης κάτι που θα βοηθήσει στο να ξεχωρίσουμε πιο εύκολα τα δείγματα με γονότυπο A1A2. Παρουσιάζεται μια μικρότερη καμπύλη η παρουσία της οποίας για τα άγνωστά μας δείγματα θα είναι μάρτυρας πως το δείγματα κατατάσσεται με γονότυπο A1A2. Επιπλέον από το διαφορετικό διάγραμμα της HRM βλέπουμε πως αν ορίσουμε ως κατώφλι το δείγμα με γονότυπο A1A1 τότε η καμπύλη για το δείγμα με γονότυπο A2A2 εμφανίζεται πάνω και αριστερά μετατοπισμένη ενώ το δείγμα με γονότυπο A1A2 εμφανίζεται κάτω από το κατώφλι και μετατοπισμένο αριστερά (Εικόνα 24) Το αποτέλεσμα είναι το αναμενόμενο και από την βιβλιογραφία [19],[37].



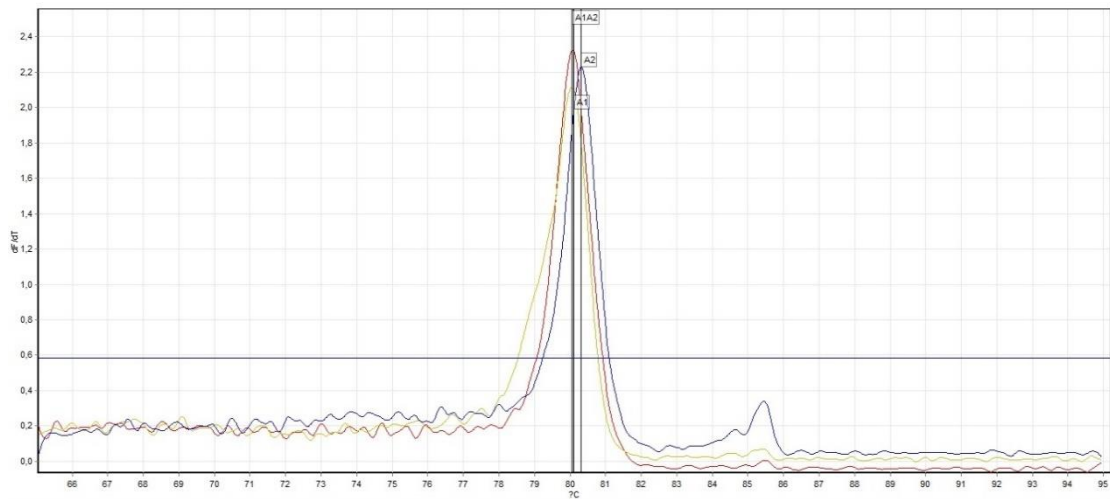
Εικόνα 20 Διάγραμμα φθορισμού ανά κύκλο αντίδρασης-πρότυπα δείγματα.



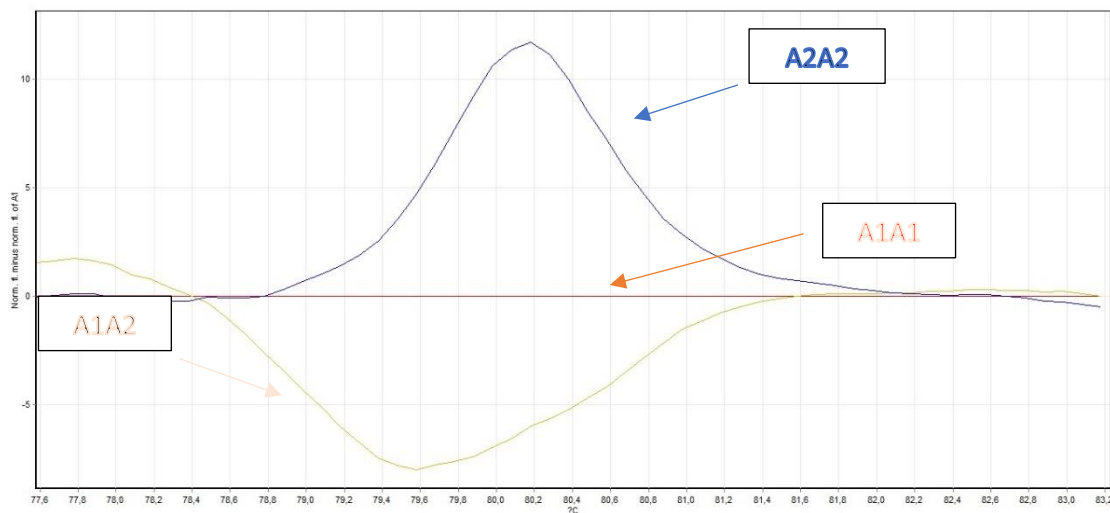
Εικόνα 21 Διάγραμμα φθορισμού/θερμοκρασίας - πρότυπα δείγματα.



Εικόνα 22 Κανονικοποιημένο διάγραμμα φθορισμού/θερμοκρασίας – πρότυπα δείγματα.



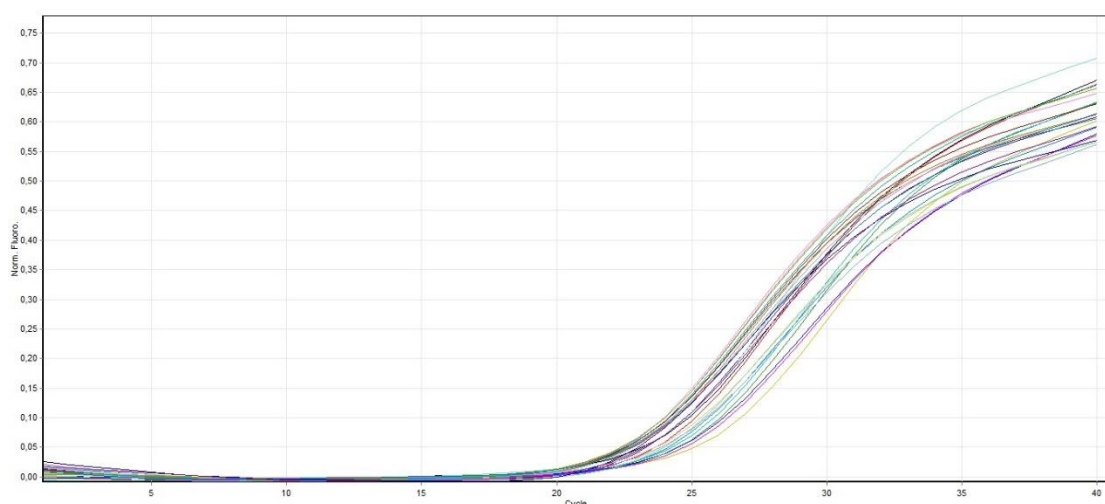
Εικόνα 23 Διάγραμμα θερμοκρασιών τήξης – πρότυπα δείγματα.



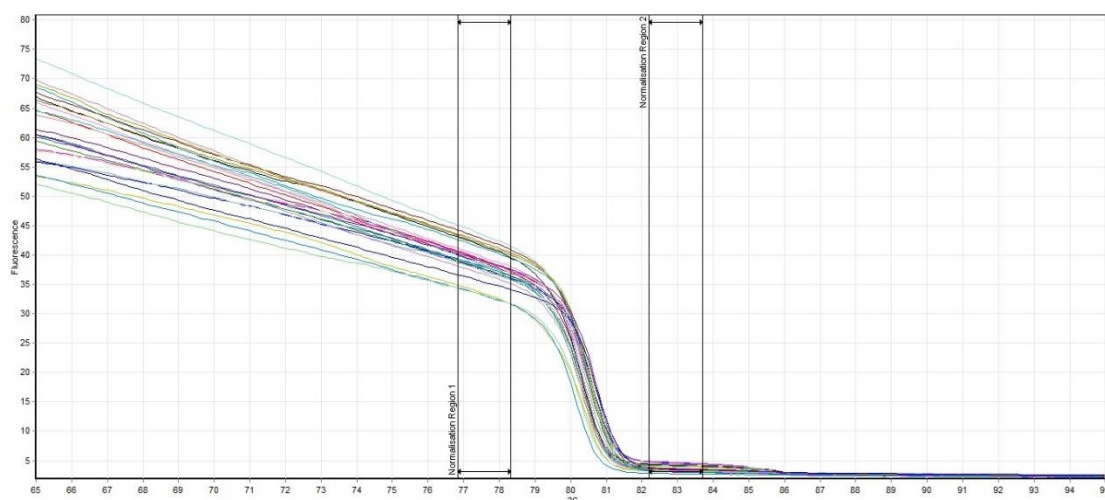
Εικόνα 24 Διαφορετικό διάγραμμα φθορισμού/θερμοκρασίας – πρότυπα δείγματα.

Έπειτα ακολούθησε ανάλυση HRM για τα άγνωστα δείγματα αίματος αγελάδων με σκοπό την ομαδοποίηση τους σύμφωνα με τα γνωστά-πρότυπα δείγματα ως εκ τούτου και την αυτόματη γονοτύπησή τους. Τα δείγματα DNA συγκρίνονται και ομαδοποιούνται βάσει γονοτυπικής ομοιότητας. Το λογισμικό της εταιρίας Qiagen εξετάζει την ομοιότητα που παρουσιάζουν οι καμπύλες και βάση των θερμοκρασιών τήξης όλων των δειγμάτων ομαδοποιεί εκείνα που εμφανίζουν τιμή εμπιστοσύνης, δηλαδή πιθανότητα τα δείγματα αυτά να έχουν όμοιο γονότυπο ως προς τα πρότυπα δείγματα τουλάχιστον 80% (Confidence %  $\geq$  80).

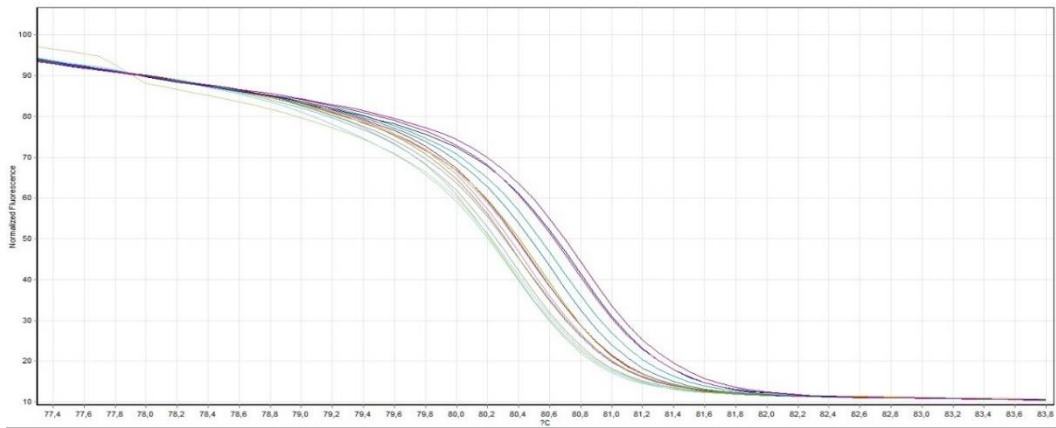
Εξίσου και εδώ παρατηρούμε πως η αντίδραση qPCR στο πρώτο στάδιο της ανάλυσης ήταν επιτυχής για όλα τα δείγματα (Εικόνα 25). Επιπλέον, από το διαφορετικό διάγραμμα όπως και στα πρότυπα δείγματα πάνω από το κατώφλι έχουμε τα δείγματα με γονότυπο A2A2 και κάτω από το κατώφλι τα δείγματα με γονότυπο A1A2 ενώ τα δείγματα που είναι κοντά στο κατώφλι είναι τα δείγματα με γονότυπο A1A1 (Εικόνα 29). Κατά την ανάλυση HRM βλέπουμε την ομαδοποίηση τους στα πρότυπα δείγματα με τον κάτωθι τρόπο:



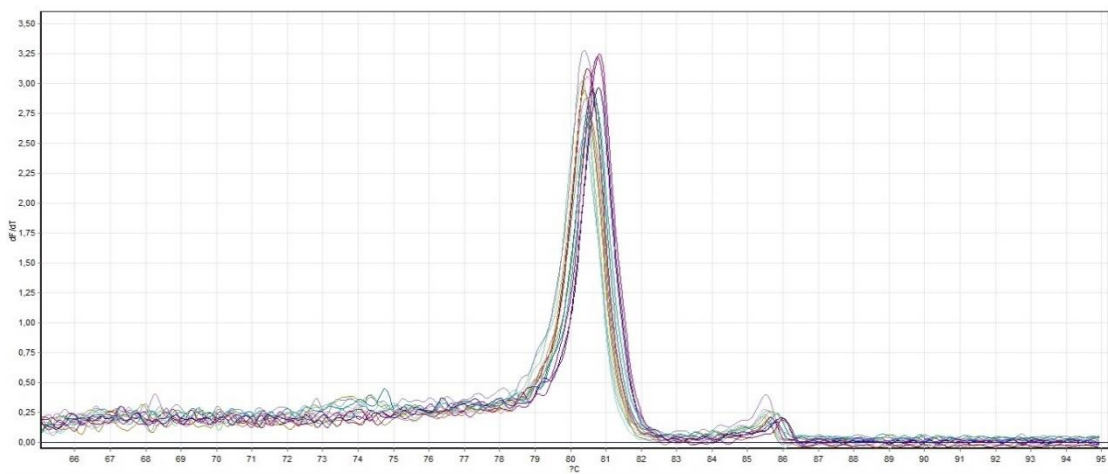
Εικόνα 25 Διάγραμμα φθορισμού ανά κύκλο αντίδρασης-άγνωστα δείγματα αίματος.



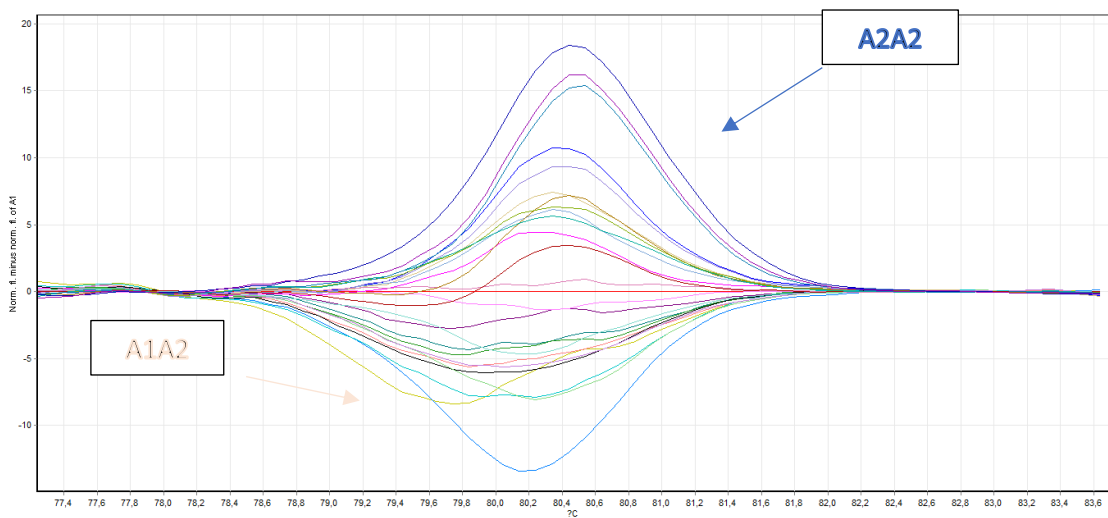
Εικόνα 26 Διάγραμμα φθορισμού/θερμοκρασίας – άγνωστα δείγματα αίματος.



Εικόνα 27 Κανονικοποιημένο διάγραμμα φθορισμού/θερμοκρασίας – άγνωστα δείγματα αίματος.



Εικόνα 28 Διάγραμμα θερμοκρασιών τήξης – άγνωστα δείγματα αίματος.



Εικόνα 29 Διαφορετικό διάγραμμα φθορισμού/θερμοκρασίας – άγνωστα δείγματα αίματος.

α)

β)

Με πρότυπα δείγματα			Χωρίς πρότυπα δείγματα		
Δείγμα	Genotype	Confidence %	Δείγμα	Genotype	Confidence %
2664	A1	100	2664	A1	99,25
163	A1A2	100	163	A1A2	94,32
8008	A2	100	8008	A2	71,76
1	A1	93,17	1	A1	89,62
2	A1	98,67	2	A1	96,62
3	A1A2	67,76	3	A1A2	81,1
4	A1	80,12	4	A1A2	81,66
5	A1A2	90,01	5	A1A2	91,74
6'	A1A2	84,1	6'	A1A2	85,32
7_1	A2	86,64	7_1	A2	100
8'	A1A2	92,22	8'	A1A2	94,82
9'	A1A2	94,32	9'	A1A2	100
10	A2	91,4	10	A2	92,3
11_2	A1A2	86,3	11_2	A1A2	96,73
13'	A1	81,76	13'	A1A2	79,26
14	A2	83,05	14	A2	97,57
15	A2	98,58	15	A2	80,27
16	A1A2	88,04	16	A1A2	92,08
17'	A1	99,25	17'	A1	100
18	A1	92,44	18	A2	96,04
19	A2	86	19	A2	93,52
20'	A2	88	20'	A2	94,04
21	A2	83,29	21	A2	96
22	A2	80,79	22	A2	36,3
23	A2	51,8	23	A2	15,15
24	A2	74,83	24	A2	30,37

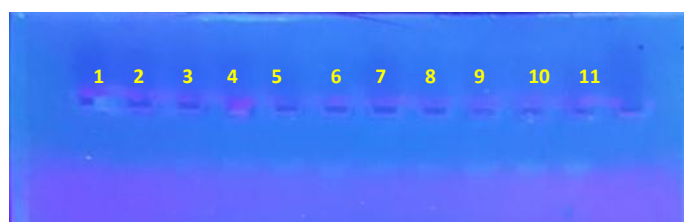
Εικόνα 30 Αποτελέσματα λογισμικού Qiagen κατάταξης σε γονότυπους α)Με πρότυπα δείγματα β)Χωρίς πρότυπα δείγματα

Ακόμη παρατηρείτε πως και χωρίς την ύπαρξη των προτύπων δειγμάτων τα άγνωστα δείγματα θα μπορούσαν να χωριστούν σε τρεις κατηγορίες κάτι που συμπίπτει με τους τρεις διαφορετικούς γονότυπους που αναμένουμε (Εικόνα 30). Τα δείγματα ομαδοποιήθηκαν ακριβώς όπως και με την ύπαρξη προτύπων, με μόνη εξαίρεση δύο δείγματα. Επιπλέον παρατηρούμε πως ακόμη και τα πρότυπα ομαδοποιήθηκαν με σωστή αντιστοιχία γονοτύπων στα άγνωστα δείγματα κάτι που καταδεικνύει την αποτελεσματικότητα της μεθόδου.

### 3.4 Αραιώσεις- Απομονώσεις- Ποσοτικοποιήσεις δειγμάτων γάλακτος

Αφού ολοκληρώθηκε η ομαδοποίηση των δειγμάτων στα πρότυπα δείγματα και ουσιαστικά η γονοτυπησή τους, επιλέχθηκαν τα δείγματα αγελάδων 1 και 7 με γονότυπο A1A1 και A2A2 αντίστοιχα.

Πραγματοποιήθηκαν αρχικά οι αραιώσεις γάλακτος των αντίστοιχων ζώων και οι απομονώσεις γενετικού υλικού με επιτυχία όπως φαίνεται και από το gel αгарόζης, και έπειτα οι ποσοτικοποιήσεις όπως φαίνεται στον πίνακα. Ακολούθησε ανάλυση HRM. Τα πρότυπα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την αντίδραση ήταν τα δείγματα αίματος των αγελάδων 1(A1A1) και 7(A2A2) των οποίων έγιναν και οι αραιώσεις των γαλάτων.



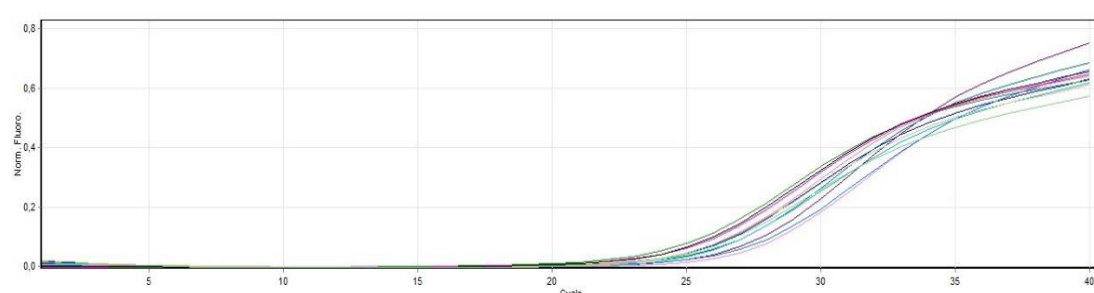
Εικόνα 31 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων γάλακτος

% γάλακτος A1A1 σε A2A2	Vγάλακτος A1A1(μl)	Vγάλακτος A2A2(μl)	Συνολικός V(μl)	C(ng/ul)	
				Αρχική	Αραίωση
100/0	200	0	200	10,2	7,8
90/10	180	20	200	22	8,8
80/20	160	40	200	29	14,5
70/30	140	60	200	16,7	9,1
60/40	120	80	200	14,2	10,8
50/50	100	100	200	11,6	10,9
40/60	80	120	200	12,5	11,3
30/70	60	140	200	16,2	8,8
20/80	40	160	200	36,5	15,1
10/90	20	180	200	24,4	8,4
0/100	0	200	200	18,2	11

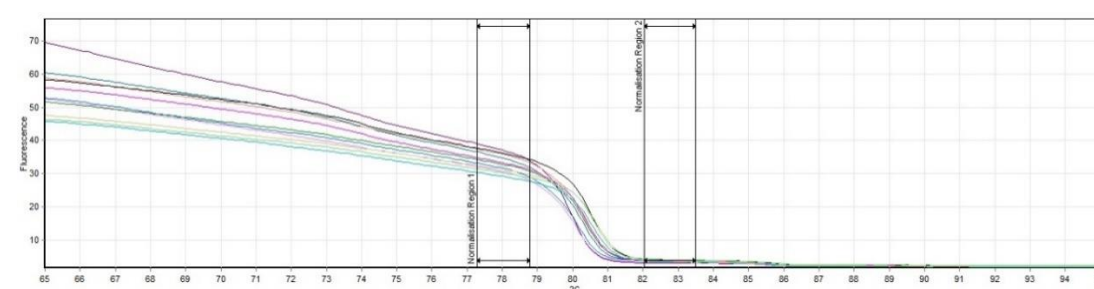
Πίνακας 9 Αραιώσεις γάλακτος

### 3.5 Ανάλυση HRM σε δείγματα γάλακτος

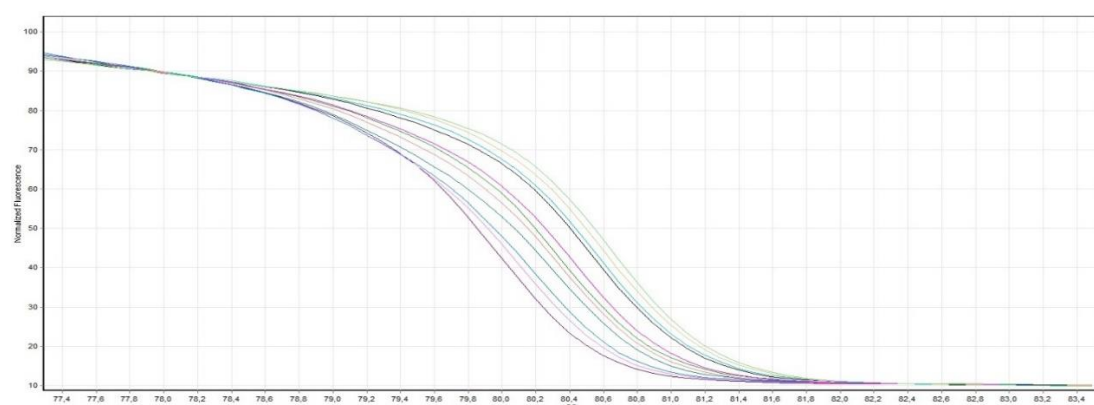
Και εδώ παρατηρείται επιτυχία στην αντίδραση qPCR αλλά και στην ανάλυση HRM καθώς τα αποτελέσματα ήταν σύμφωνα με τις αραιώσεις που πραγματοποιήθηκαν. Η τιμή εμπιστοσύνης του λογισμικού που κατατάσσει στο A1A1 τα δείγματα μειώνεται καθώς αυξάνεται το ποσοστό A2A2 σε A1A1 και αντίστοιχα αυξάνεται καθώς αυξάνεται το A2A2 σε A1A1 επομένως τα κατατάσσει στο A2A2 ( Πίνακας 10). Τέλος, σημαντικό είναι πως σε ποσοστό 50% και από τα δύο είδη, το λογισμικό δεν μπορεί να τα κατατάξει σε συγκεκριμένο γονότυπο και τα εμφανίζει ως variation.



Εικόνα 32 Διάγραμμα φθορισμός ανά κύκλο αντίδρασης-δείγματα γάλακτος (1).

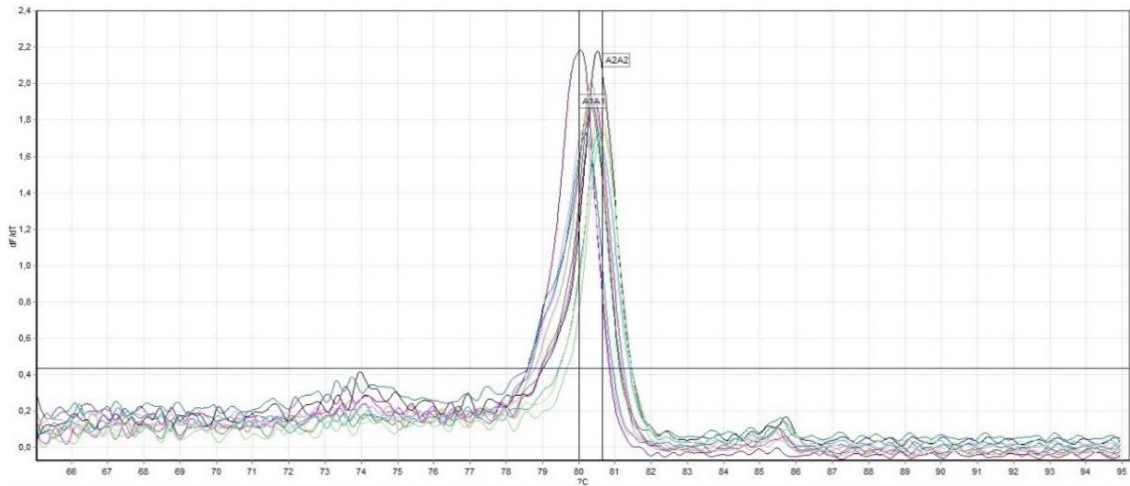


Εικόνα 33 Διάγραμμα φθορισμού/θερμοκρασίας – δείγματα γάλακτος (1)

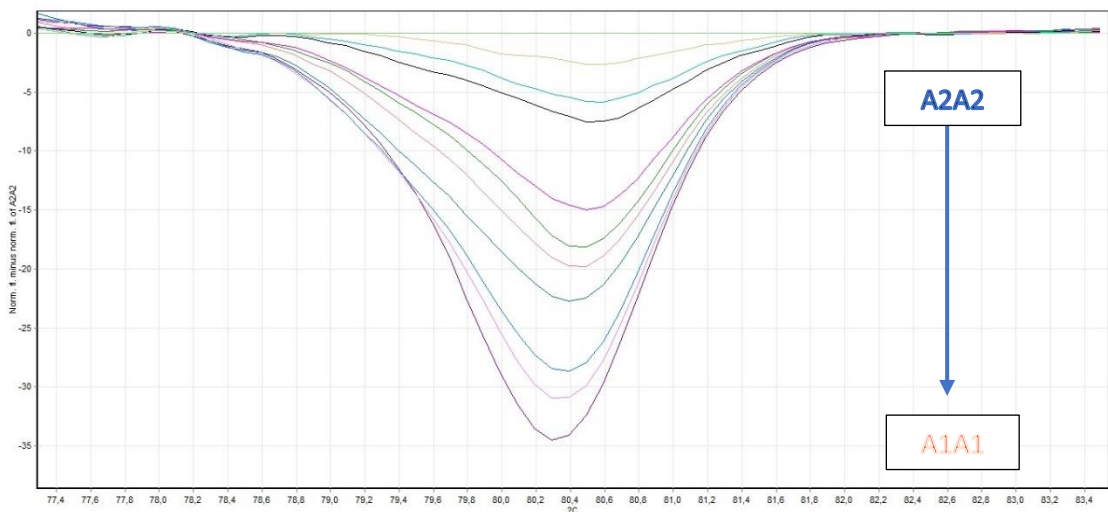


Εικόνα 34 Κανονικοποιημένο διάγραμμα φθορισμού/θερμοκρασίας – δείγματα γάλακτος (1)





Εικόνα 35 Διάγραμμα θερμοκρασιών τήξης – δείγματα γάλακτος (1)



Εικόνα 36 Διαφορετικό διάγραμμα φθορισμού/θερμοκρασίας – δείγματα γάλακτος (1)

Name	Genotype	Confidence %
100/0	A1A1	100
90/10	A1A1	91,15
80/20	A1A1	78,59
70/30	A1A1	40,15
60/40	A1A1	15,66
50/50	Variation	
40/60	A2A2	11,03
30/70	A2A2	59,78
20/80	A2A2	75,06
10/90	A2A2	95,07
0/100	A2A2	100

Πίνακας 10 Ποσοστά εμπιστοσύνης γονοτυπικής κατάταξης του οργάνου Qiagen – δείγματα γάλακτος (1)

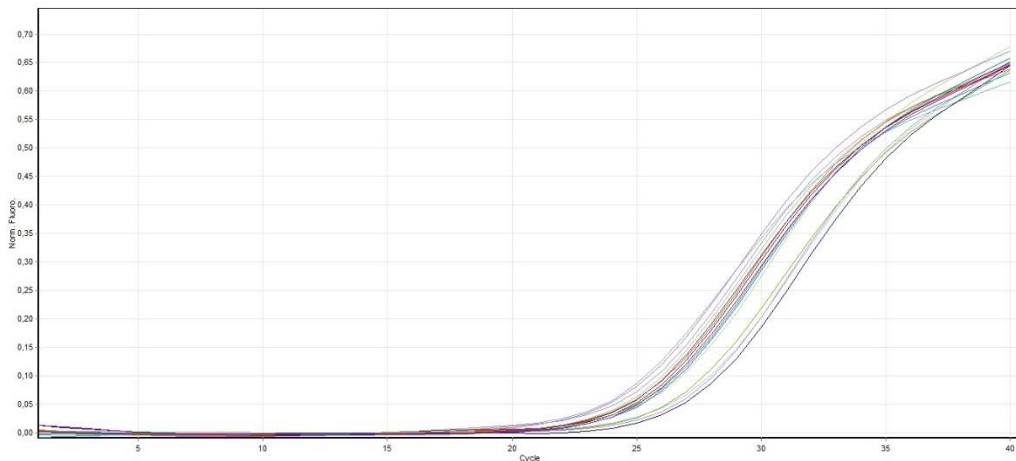
Σε αναλογία 10/90 A1A1 σε A2A2 παρατηρούμε πως η τιμή εμπιστοσύνης αυξάνεται ραγδαία σε σχέση με την αναλογία 30/70 και το ποσοστό είναι τόσο ικανοποιητικό που θα μπορούσαμε να πούμε πως μιλάμε για δείγμα γάλακτος καθαρά A2A2. Κάτι τέτοιο όμως δεν ισχύει καθώς το ποσοστό 10% είναι ένα μεγάλο ποσοστό για νοθεία. Έτσι διερευνήθηκε περαιτέρω, με περισσότερες αραιώσεις, το ελάχιστο ποσοστό A1A1 που θα μπορούσε να προστεθεί σε A2A2 και να μας δώσει νοθευμένο προϊόν ελεγμένο με ανάλυση HRM.

Πραγματοποιήθηκαν οι παρακάτω αραιώσεις, απομονώσεις και ακολούθως η HRM ανάλυση.

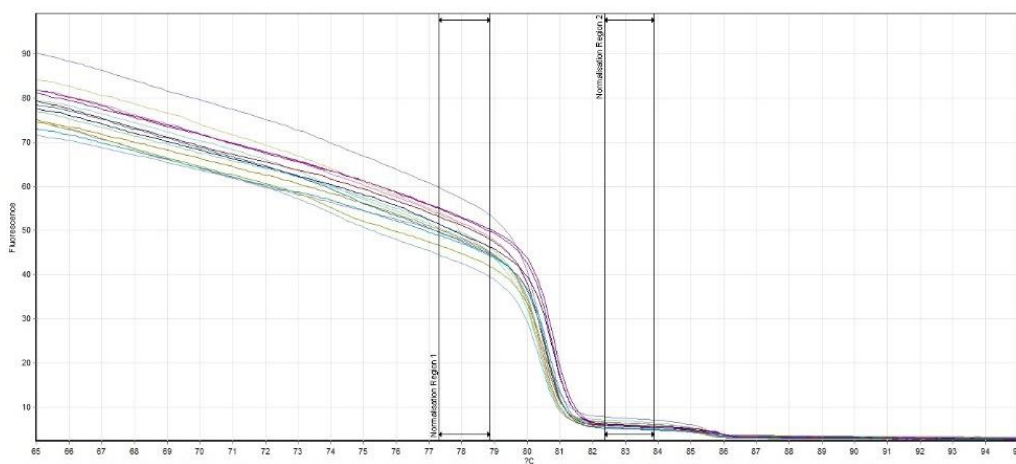
%γάλακτος A1A1 σε A2A2	V <sub>γάλακτος A1A1</sub> (μl)	V <sub>γάλακτος A2A2</sub> (μl)	Συνολικός V(μl)	C(ng/ul)	
				Αρχική	Αραίωση
19/81	38	162	200	22,9	7,2
18/82	36	164	200	21,4	12,6
17/83	34	166	200	22,6	14,5
16/84	32	168	200	31,7	9,8
15/85	30	170	200	46,1	7,7
14/86	28	172	200	19,2	8,7
13/87	26	174	200	61,6	11
12/88	24	176	200	19,6	11
11/89	22	178	200	16,6	8,5
9/91	18	182	200	88,9	15,8
8/92	16	184	200	21,9	12,3
7/93	14	186	200	25	9,6
6/94	12	188	200	27,9	14,2
5/95	10	190	200	69,3	10,5
4/96	8	192	200	31,1	16,6
3/97	6	194	200	27,7	7,7
2/98	4	196	200	79,9	8,1
1/99	2	198	200	29,8	15,6

Πίνακας 11 Συγκεντρώσεις δειγμάτων γάλακτος (2)

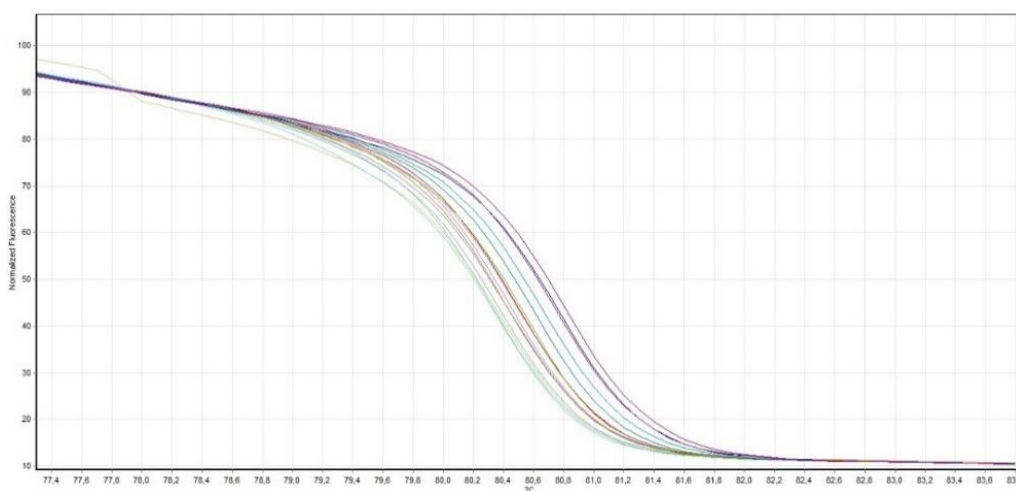
Η αντίδραση qPCR ήταν επιτυχής (Εικόνα 37). Η τιμή εμπιστοσύνης του λογισμικού για ποσοστό 1% και 2% A1A1 σε A2A2, είναι αρκετά υψηλή ώστε να μπορεί να το αναγνωρίσει ως γάλα A2A2 (Εικόνα 41). Ενώ τιμή για ποσοστό 3% δεν είναι τόσο ικανοποιητική επομένως κατατάσσετε ως γάλα A1A2 (Εικόνα 41). Επομένως παρατηρούμε με την ανάλυση HRM πως το ελάχιστο ποσοστό που θα μπορούσε να ανιχνευθεί γάλα A1A1 σε γάλα A2A2 είναι 2%.



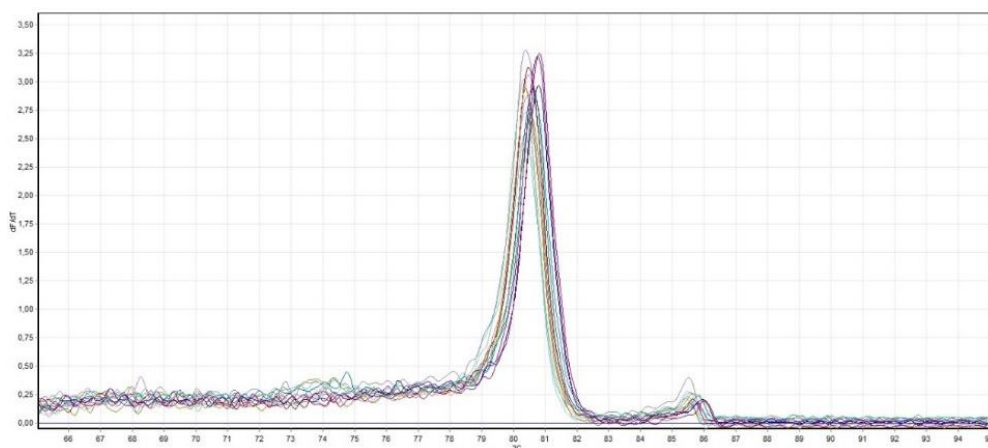
Εικόνα 37 Διάγραμμα φθορισμός ανά κύκλο αντίδρασης-δείγματα γάλακτος (2).



Εικόνα 38 Διάγραμμα φθορισμού/θερμοκρασίας – δείγματα γάλακτος (2)



Εικόνα 39 Κανονικοποιημένο διάγραμμα φθορισμού/θερμοκρασίας – δείγματα γάλακτος (2)



Εικόνα 40 Διάγραμμα θερμοκρασιών τήξης – δείγματα γάλακτος (2)

100/0	A1	100,00
3	A1A2	100,00
6/94	A1A2	11,57
5/95	A2	10,78
4/96	A2	54,26
3/97	A2	29,19
2/98	A2	90,48
1/99	A2	88,90
0/100	A2	100,00

Εικόνα 41 Ποσοστά εμπιστοσύνης γονοτυπικής κατάταξης του οργάνου Qiagen – δείγματα γάλακτος (2)

#### 4.Συζήτηση

Το αγελαδινό γάλα είναι ένα τρόφιμο το οποίο καταναλώνεται από 6 δις ανθρώπων παγκοσμίως σύμφωνα με στοιχεία της Eurostat. Η ευρεία χρήση του αγελαδινού γάλακτος επιτάσσει και την ασφαλή κατανάλωσή του. Μελέτες έχουν δείξει πως το αλληλόμορφο A1 της β-καζεΐνης μπορεί να απελευθερώσει το μόριο της β-καζόμορφίνης 7, το οποίο αποδεικνύεται πως έχει πολύ σοβαρές επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου. Για αυτόν τον λόγο δημιουργήθηκε η ανάγκη για εύρεση ενός πιο υγιούς, εναλλακτικού τύπου γάλακτος από το συμβατικό. Το γάλα με το αλληλόμορφο A2 της β-καζεΐνης, γάλα A2, γίνεται όλο και πιο δημοφιλές μεταξύ των καταναλωτών και των παραγωγών. Καινοτόμα προϊόντα κυκλοφορούν ήδη στις αγορές του κόσμου. Η προστασία της αυθεντικότητάς του από διάφορα μέσα νοθείας με συμβατό γάλα οδήγησε στην ανάπτυξη χημικών και μοριακών μεθόδων καθαρότητάς του. Η ανάλυση HRM αποτελεί μια νέα μοριακή μέθοδο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για γονοτύπηση δειγμάτων.

Η διπλωματική αυτή εργασία αποτελεί από τις πρώτες προσπάθειες χρήσης της ανάλυσης HRM εύρεση των αλληλόμορφων της β-καζεΐνης σε δείγματα γάλακτος. Οι περισσότεροι ερευνητές επικεντρώθηκαν στον εντοπισμό των συχνοτήτων εμφάνισης αυτών των γονότυπων στα ζώα. Αν και μπόρεσαν να γονοτυπηθούν δείγματα αίματος αγελάδων, η ανάπτυξη μιας ταχείας και ευαίσθητης μεθόδου ταυτοποίησης δειγμάτων γάλακτος αποτελεί το επίκεντρο αυτής της εργασίας.

Τέλος, υπάρχει ανάγκη να γίνουν αντίστοιχες μελέτες και για άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα βοοειδούς φύσης καθώς και ο έλεγχος γνησιότητας αυτών των πιο υγιούς, εναλλακτικών και ακριβών εμπορικά γαλακτοκομικών προϊόντων πρέπει να γίνονται προκειμένου να αποφευχθεί η εξαπάτηση και η παραπλάνηση των καταναλωτών στο μέλλον.

## 5. Συμπέρασμα

Συμπερασματικά, αυτή η μελέτη έδειξε πως η ανάλυση HRM μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέθοδος ανίχνευσης γονότυπου A1A1, A1A2, A2A2 του γονιδίου της β-καζεΐνης σε δείγματα καινοτόμων προϊόντων γάλακτος. Τα αποτελέσματα της επέδειξαν με βεβαιότητα την ύπαρξη του A1 αλληλόμορφου σε δείγματα A2 έως και ποσοστό 10% καθώς επίσης και σε μικροποσότητες έως και 2%. Ως εκ τούτου μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέθοδος ανίχνευσης νοθεία προϊόντων γάλακτος A2A2 με A1A1.

Δείγμα	Με πρότυπα δείγματα		Χωρίς πρότυπα δείγματα		Αποτέλεσμα
	Genotype	Confidence %	Genotype	Confidence %	
2664	A1	100	A1	99,25	-
163	A1A2	100	A1A2	94,32	-
8008	A2	100	A2	71,76	-
1	A1	93,17	A1	89,62	A1
2	A1	98,67	A1	96,62	A1
3	A1A2	67,76	A1A2	81,1	A1A2
4	A1	80,12	A1A2	81,66	A1
5	A1A2	90,01	A1A2	91,74	A1A2
6'	A1A2	84,1	A1A2	85,32	A1A2
7_1	A2	86,64	A2	100	A2
8'	A1A2	92,22	A1A2	94,82	A1A2
9'	A1A2	94,32	A1A2	100	A1A2
10	A2	91,4	A2	92,3	A2
11_2	A1A2	86,3	A1A2	96,73	A1A2
13'	A1	81,76	A1A2	79,26	A1
14	A2	83,05	A2	97,57	A2
15	A2	98,58	A2	80,27	A2
16	A1A2	88,04	A1A2	92,08	A1A2
17'	A1	99,25	A1	100	A1
18	A1	92,44	A2	96,04	variation
19	A2	86	A2	93,52	A2
20'	A2	88	A2	94,04	A2
21	A2	83,29	A2	96	A2
22	A2	80,79	A2	36,3	A2
23	A2	51,8	A2	15,15	A2
24	A2	74,83	A2	30,37	A2

Εικόνα 42 Γονοτύπηση άγνωστων δειγμάτων

A1A1	5/23
A2A2	10/23
A1A2	7/23

Εικόνα 43 Αναλογικά αποτελέσματα

## 6. Βιβλιογραφία

- [1] "أ. د. بس. ب. الأشعث/السجستاني، "سنن أبي داود 3-1 مع الفهارس ج 1 and م. ع. ا. ا. الشيخ،" no. 0, pp. 1–30, 2016, [Online]. Available: <https://books.google.co.id/books?id=XJ10DwAAQBAJ>.
- [2] B. Faye and G. Konuspaveva, "The sustainability challenge to the dairy sector – The growing importance of non-cattle milk production worldwide," *Int. Dairy J.*, vol. 24, no. 2, pp. 50–56, 2012, doi: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.12.011>.
- [3] C. Smith, "Milk and Milk Products," *Britain's Food Supplies Peace War*, no. November, pp. 32–63, 2021, doi: 10.4324/9781003212478-3.
- [4] "ab3fe64e43b156c86c7a7a78cde2dea956577668 @ www.statista.com." [Online]. Available: <https://www.statista.com/statistics/268191/cow-milk-production-worldwide-top-producers/>.
- [5] "37abe476c508a5aabe07faa4968cd918a2830de2 @ www.clal.it." [Online]. Available: [https://www.clal.it/en/?section=produzioni\\_popolazione](https://www.clal.it/en/?section=produzioni_popolazione).
- [6] OCDE, "Index @ Www.Oecd-Ilibrary.Org." 2019, [Online]. Available: <https://www.oecd-ilibrary.org/sites/4b46f4a4-en/index.html?itemId=/content/component/4b46f4a4-en#>.
- [7] S. P. Belitz H.D. ,Grosch W., *Food Chemistry*, 4th ed. Τζιόλας.
- [8] I. Repository and I. Centre, "Επίπεδα πολυμορφισμού της β - καζεΐνης σε ελληνικές αγελάδες Holstein- Friesian Level of Polymorphism in β - casein gene in in Holstein - Friesian Cattle," 2022.
- [9] A. M. Caroli, S. Chessa, and G. J. Erhardt, "Invited review: Milk protein polymorphisms in cattle: Effect on animal breeding and human nutrition," *J. Dairy Sci.*, vol. 92, no. 11, pp. 5335–5352, 2009, doi: 10.3168/jds.2009-2461.
- [10] "genetic-polymorphism @ www.sciencedirect.com." [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/genetic->

polymorphism.

- [11] R. Dai *et al.*, “Identification of alleles and genotypes of beta-casein with DNA sequencing analysis in Chinese Holstein cow.,” *J. Dairy Res.*, vol. 83, no. 3, pp. 312–316, Aug. 2016, doi: 10.1017/S0022029916000303.
- [12] M. Duarte-Vázquez, C. García-Ugalde, L. M. Villegas-Gutiérrez, B. E. García-Almendárez, and J. L. Rosado, “Production of cow’s milk free from beta-casein a1 and its application in the manufacturing of specialized foods for early infant nutrition,” *Foods*, vol. 6, no. 7, pp. 1–15, 2017, doi: 10.3390/foods6070050.
- [13] P. Boro, B. C. Naha, D. P. Saikia, and C. Prakash, “Review Article A1 AND A2 MILK & ITS IMPACT ON HUMAN HEALTH,” *Int. J. Sci. Nat.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–5, 2016.
- [14] K. Olenski, S. Kamiński, J. Szyda, and A. Cieslinska, “Polymorphism of the beta-casein gene and its associations with breeding value for production traits of Holstein-Friesian bulls,” *Livest. Sci.*, vol. 131, no. 1, pp. 137–140, 2010, doi: 10.1016/j.livsci.2010.02.023.
- [15] Y. W. Park and G. F. W. Haenlein, “A2 Bovine Milk and Caprine Milk as a Means of Remedy for Milk Protein Allergy,” *Dairy*, vol. 2, no. 2, pp. 191–201, 2021, doi: 10.3390/dairy2020017.
- [16] “holle-νέο-βρεφικό-γάλα-από-αγελάδες-α2 @ www.etherio.org.” [Online]. Available: <https://www.etherio.org/post/holle-νέο-βρεφικό-γάλα-από-αγελάδες-α2>.
- [17] R. J. F. H. J. T. K. Y. L. R. C. T. L. I. T. D. T. R. W. Ivano De Noni, “Review of the potential health impact of β-casomorphins and related peptides,” *EFSA J.*, vol. 7, no. 2, p. 231r, 2009, [Online]. Available: <http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2009.231r>.
- [18] Y. W. Park, “Hypo-allergenic and therapeutic significance of goat milk,” *Small Rumin. Res.*, vol. 14, no. 2, pp. 151–159, 1994, doi: [https://doi.org/10.1016/0921-4488\(94\)90105-8](https://doi.org/10.1016/0921-4488(94)90105-8).
- [19] R. Giglioti, G. Gutmanis, L. M. Katiki, C. H. Okino, M. C. de Sena



- Oliveira, and A. E. Vercesi Filho, "New high-sensitive rhAmp method for A1 allele detection in A2 milk samples," *Food Chem.*, vol. 313, no. November 2019, p. 126167, 2020, doi: 10.1016/j.foodchem.2020.126167.
- [20] T. S. Edwards, K. L. Dawson, J. I. Keenan, and A. S. Day, "A simple method to generate  $\beta$ -casomorphin-7 by in vitro digestion of casein from bovine milk," *J. Funct. Foods*, vol. 85, p. 104631, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104631>.
- [21] R. D. Stacey J. Bell D.Sc., G. T. Grochoski, and A. J. Clarke, "Health Implications of Milk Containing  $\beta$ -Casein with the A2 Genetic Variant," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 46, no. 1, pp. 93–100, 2006, doi: 10.1080/10408390591001144.
- [22] I. Givens, P. Aikman, T. Gibson, and R. Brown, "Proportions of A1, A2, B and C  $\beta$ -casein protein variants in retail milk in the UK," *Food Chem.*, vol. 139, no. 1–4, pp. 549–552, 2013, doi: 10.1016/j.foodchem.2013.01.115.
- [23] "007542225f1f8e531d86e30f675af8429cc17bf3 @ www.eurofinsus.com." [Online]. Available: <https://www.eurofinsus.com/food-testing/services/testing-services/dairy/a1a2-casein-determination/>.
- [24] I. Manga and J. Dvořák, "Taq man allelic discrimination assay for A1 and A2 alleles of the bovine CSN2 gene," *Czech J. Anim. Sci.*, vol. 55, no. 8, pp. 307–312, 2010, doi: 10.17221/89/2009-cjas.
- [25] O. JANN, G. CERIOTTI, A. CAROLI, and G. ERHARDT, "A new variant in exon VII of bovine  $\beta$ -casein gene (CSN2) and its distribution among European cattle breeds," *J. Anim. Breed. Genet.*, vol. 119, no. 1, pp. 65–68, 2002, doi: <https://doi.org/10.1046/j.1439-0388.2002.00318.x>.
- [26] "paraplanisi-notheia @ www.efet.gr." [Online]. Available: <https://www.efet.gr/index.php/el/consumers/paraplanisi-notheia>.
- [27] N. Τροφίμων, "Μικροβιολογία Τροφίμων."

- [28] “food-fraud\_en @ knowledge4policy.ec.europa.eu.” [Online]. Available: [https://knowledge4policy.ec.europa.eu/food-fraud-quality/topic/food-fraud\\_en](https://knowledge4policy.ec.europa.eu/food-fraud-quality/topic/food-fraud_en).
- [29] “adaec6742052c709447f7ffef14e5884e456b70d @ www.brcgs.com.” [Online]. Available: <https://www.brcgs.com/product/global-standard-food-safety-issue-8-understanding-vulnerability-assessment/p-683/>.
- [30] “Product Fraud Mitigation.”
- [31] H. Montgomery, S. A. Haughey, and C. T. Elliott, “Recent food safety and fraud issues within the dairy supply chain (2015–2019),” *Glob. Food Sec.*, vol. 26, no. October, 2020, doi: 10.1016/j.gfs.2020.100447.
- [32] T. Azad and S. Ahmed, “Common milk adulteration and their detection techniques,” *Int. J. Food Contam.*, vol. 3, no. 1, 2016, doi: 10.1186/s40550-016-0045-3.
- [33] C. XIONG *et al.*, “ITS2 barcoding DNA region combined with high resolution melting (HRM) analysis of Hyoscyami Semen, the mature seed of *Hyoscyamus niger*,” *Chin. J. Nat. Med.*, vol. 14, no. 12, pp. 898–903, 2016, doi: 10.1016/S1875-5364(17)30014-6.
- [34] Qiagen, “Type-it® HRM™ PCR Handbook,” *Qiagen Sample Assay Technol.*, vol. 24, no. 4501263, 2012.
- [35] Applied Biosystems, “A Guide to High Resolution Melting ( HRM ) Analysis Heterozygote Temperature ( C ) Hom - wild type Hom - varia,” no. C, 2009.
- [36] Γ. Παπανικολάου and Δ. Παλαιολόγου, “Κεφάλαιο 6 Έλεγχος Της Ποιότητας Και Μέτρηση Της Συγκέντρωσης Των Νουκλεϊκών Οξέων,” *Εργαστηριακес Ασκησεις Γενετικης Του Ανθρωπου*, p. 84, 2013, [Online]. Available: [https://repository.kallipos.gr/bitstream/11419/646/1/02\\_chapter\\_06.pdf](https://repository.kallipos.gr/bitstream/11419/646/1/02_chapter_06.pdf).
- [37] L. J. Royo, A. del Cerro, F. Vicente, A. Carballal, and B. de la Roza-Delgado, “An accurate high-resolution melting method to genotype bovine  $\beta$ -casein,” *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 238, no. 2, pp. 295–

298, 2014, doi: 10.1007/s00217-013-2101-z.