



ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ανίχνευση νοθείας σε κρεατοσκευάσματα

με μοριακές μεθόδους

Fraud detection in meat products with

Molecular methods

ΤΣΑΝΤΟΥ ΠΗΝΕΛΟΠΗ

ΚΟΥΡΟΣ ΘΩΜΑΣ

ΠΙΝΕΛΟΡΙ ΤΣΑΝΤΟΥ

ΚΟΥΡΟΣ THOMAS

ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ

ΔΗΜΗΤΡΑ ΧΟΥΧΟΥΛΑ

DIMITRA ΧΟΥΧΟΥΛΑ

ΑΙΓΑΛΕΩ 2022

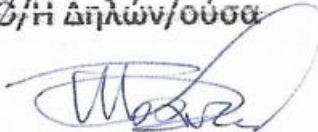
ΧΟΥΧΟΥΛΑ ΔΗΜΗΤΡΑ	ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ	
ΜΠΑΤΡΙΝΟΥ ΑΝΘΙΜΙΑ	ΜΕΛΟΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ	
ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΣ ΔΙΟΝΥΣΗΣ	ΜΕΛΟΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ	

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Τσαντού Πηνελόπη του Δημητρίου, με αριθμό μητρώου 18684047 φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστήμης Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».


Ό/η Δηλών/ούσα


ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο κάτωθι υπογεγραμμένος Κούρος Θωμάς του Χριστόφορου, με αριθμό μητρώου 18684006 φοιτητής του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστήμης Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Ο/Η Δηλών/ούσα
ΚΟΥΡΟΣ ΘΩΜΑΣ


Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο Πολυδύναμο Εργαστήριο του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής , υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας , κ. Δήμητρα Χούχουλα , την οποία θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε θερμά για την εμπιστοσύνη που έδειξε, αναθέτοντάς μας την εκτέλεση της παρούσας εργασίας. Επίσης, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε την Αλίκη Τσάκη για το χρόνο, την καθοδήγησή, τις υποδείξεις και τις διορθώσεις όσον αφορά το περιεχόμενο αυτής της εργασίας καθώς και την Δέσποινα Βουγιουκλάκη.

Περίληψη

Το κρέας και τα προϊόντα με βάση το κρέας κατέχουν μια αξιοσημείωτη θέση στη διατροφή του σύγχρονου ανθρώπου. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής, της διακίνησης και εμπορίας ποικίλων προϊόντων. Η αύξηση αυτή έχει δημιουργήσει τα τελευταία χρόνια τεράστια οικονομικά οφέλη για τη βιομηχανία κρέατος, γεγονός που την έχει οδηγήσει στην εφαρμογή αθέμιτων πρακτικών προς παραπλάνηση του καταναλωτή.

Η νοθεία του κρέατος αποτελεί φλέγον ζήτημα για τους καταναλωτές αλλά και για τις επιχειρήσεις από οικονομική, θρησκευτική, ηθική και διατροφική άποψη. Ταυτόχρονα λόγω και των διατροφικών σκανδάλων που έχουν δημιουργηθεί τα τελευταία χρόνια, αποτελεί επιτακτική ανάγκη η χρησιμοποίηση τεχνικών για την ταυτοποίηση ειδών κρέατος και η σωστή επισήμανση τους.

Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκαν μοριακές τεχνικές με βάση το DNA, για την ταυτοποίηση DNA κοτόπουλου σε δείγματα αλλαντικών γαλοπούλας. Χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR-RFLP) και RAPD-PCR. Οι μέθοδοι αυτοί κρίθηκαν αξιόπιστες και αποτελεσματικές για την ανίχνευση κοτόπουλου σε αλλαντικά γαλοπούλας, οπότε θα μπορούσαμε να πούμε ότι αποτελούν χρήσιμο εργαλείο για τον έλεγχο της νοθείας σε προϊόντα κρέατος.

Abstract

Meat and meat products have a remarkable place in the diet of modern man. This results in an increase in the production, distribution and marketing of various products. This increase has in recent years created enormous financial benefits for the meat industry, which has led it to apply unfair practices to mislead the consumer.

Meat adulteration is a burning issue for consumers but also for businesses from an economic, religious, ethical and nutritional point of view. At the same time, due to the nutritional scandals that have been created in recent years, it is imperative to use techniques to identify types of meat and label them correctly.

In the present study, DNA-based molecular techniques were applied to identify chicken DNA in turkey sausage samples. Polymerase Chain Reaction (PCR-RFLP) and RAPD-PCR methods were used. These methods were found to be reliable and effective for the detection of chicken in turkey sausages, so it could be said that they are a useful tool for the control of adulteration in meat products.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη

Abstract

1. Το κρέας

1.1. Γενικά

1.2. Ταξινόμηση προϊόντων κρέατος

1.3. Διατροφική αξία κρέατος

1.3.1. Εισαγωγή

1.3.2. Περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη και αξία πρωτεΐνης κρέατος

1.3.3. Περιεκτικότητα σε λίπος

1.3.4. Βιταμίνες και μέταλλα

1.3.4.1. Κρέας , μία πολύτιμη πηγή σιδήρου

1.3.4.2. Η βιταμίνη B12 στο κρέας

1.4. Παράγοντες που επηρεάζουν την αγορά κρέατος

1.5. Κατανάλωση κρέατος στον κόσμο και στην Ελλάδα

1.6. Νοθεία στο κρέας

1.6.1 Εισαγωγή

1.6.2. Περιπτώσεις νοθείας

1.7 Ιχνηλασιμότητα

2. Πειραματική πορεία – Μέθοδοι

2.1. Δείγματα

2.2. Απομόνωση του DNA

2.3. Ποσοτικοποίηση συγκέντρωσης DNA

2.4. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

2.5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction PCR)

2.6. Τυχαίως Πολλαπλασιαζόμενα Πολυμορφικά Τμήματα (Random Amplified Polymorphic DNA-RAPDs)

3. Αποτελέσματα

4. Συζήτηση

Βιβλιογραφία

1. Το κρέας

1.1. Γενικά

Με τον όρο κρέας χαρακτηρίζονται , με την ευρύτερη έννοια , όλα τα μέρη του σώματος των εδώδιμων θηλαστικών , πουλερικών και ψαριών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διατροφή του ανθρώπου , με τη στενότερη δε έννοια τα εδώδιμα μέρη των ομοιόθερμων μόνο ζώων. Πιο συγκεκριμένα , με τον όρο κρέας χαρακτηρίζεται το σύνολο των γραμμωτών μυών του σκελετού των σφαγίων ζώων , μαζί με τα οστά , το λιπώδη και συνδετικό ιστό, τα αγγεία , τα νεύρα , τους τένοντες και τα λεμφογάγγλια , δηλαδή το σύνολο του σφαγίου μετά την εκδορά , τον εκσπλαχνισμό και την αποκοπή του κεφαλιού και των ποδιών .(Ραμαντάνης , 2020)

Το κρέας αποτελεί μια πλήρης πρωτεϊνική τροφή , η οποία περιέχει όλα τα απαραίτητα αμινοξέα για τον ανθρώπινο οργανισμό. Το λίπος του κρέατος , το οποίο ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό ανάλογα με το είδος , τη ποιότητα και τη κοπή , είναι μια πολύτιμη πηγή ενέργειας ενώ ταυτόχρονα επηρεάζει τη γεύση , τη ζουμερότητα και τη τρυφερότητα του κρέατος . Διάφορα μέρη , όπως το συκώτι , η καρδιά και τα νεφρά αποτελούν εξαιρετικές πηγές βιταμινών και ιχνοστοιχείων που αφομοιώνονται πολύ εύκολα από τον ανθρώπινο οργανισμό .

1.2. Ταξινόμηση προϊόντων κρέατος

Τα προϊόντα που παράγονται από κρέας ταξινομούνται σε τέσσερες γενικές ομάδες:

- a) Την ομάδα Α που περιλαμβάνει τα προϊόντα με βάση το κρέας (προϊόντα αλλαντοποιίας).
- b) Την Ομάδα Β που περιλαμβάνει τα παρασκευάσματα κρέατος
- c) Την Ομάδα Γ που περιλαμβάνει τις ειδικές κονσέρβες κρέατος και κρέας, ή κρεατοσκευάσματα ή προϊόντα με βάση το κρέας σε συνδυασμό με άλλα τρόφιμα (έτοιμα φαγητά) και
- d) Την Ομάδα Δ που περιλαμβάνει τα παράγωγα κρέατος.

Η ομάδα Α χωρίζεται σε 4 κατηγορίες . Ειδικότερα , υπάρχει η κατηγορία Α1 η οποία περιλαμβάνει προϊόντα θερμικής επεξεργασίας , η κατηγορία Α2 η οποία περιλαμβάνει προϊόντα ζύμωσης και ωρίμανσης , η κατηγορία Α3 η οποία αποτελείται από προϊόντα μερικής ζύμωσης (ημίξηρα) και η κατηγορία Α4 η οποία περιλαμβάνει προϊόντα διπλής θερμικής επεξεργασίας . Επιπλέον , στη ομάδα Β διακρίνουμε τις εξής κατηγορίες :

- Κατηγορία Β1: Παρασκευάσματα από τεμάχια κρέατος . Στην ομάδα αυτή περιλαμβάνονται προϊόντα που παράγονται από τεμάχια κρέατος σε αυτοτελή κατάσταση (σνίτσελ) ή τοποθετημένα με ειδικό για το είδος του προϊόντος τρόπο (γύρος, σουβλάκι).
- Κατηγορία Β2 : Παρασκευάσματα από σύγκοπτο κρέας προσυσκευασμένα παρασκευάσματα νωπού κιμά.

- Κατηγορία B3 : Μορφοποιημένα παρασκευάσματα κρέατος .Η μορφοποίηση σχετίζεται με το σχήμα του τελικού προϊόντος που μπορεί να προκύψει με πίεση σε τεμάχιο κρέατος σε καλούπι είτε με την ένωση τεμαχίων με επιτρεπόμενες συνδετικές ύλες. Ενδεικτικά προϊόντα αποτελούν τα εξής : μορφοποιημένο σνίτσελ, μορφοποιημένο στήθος κοτόπουλο, κοτομπουκιές.

- Κατηγορία B4 : Μη θερμικά επεξεργασμένα νωπά προϊόντα (παραδοσιακά χωριάτικα λουκάνικα) . Στην κατηγορία αυτή υπάγονται μόνο λουκάνικα που ενθκεύονται σε βρώσιμα φυσικά περιβλήματα φυσικά και μπορούν να υποστούν κάπνιση μόνο για βελτίωση των οργανοληπτικών τους χαρακτήρων. Ως πρώτες ύλες μπορεί να χρησιμοποιηθούν όλα τα είδη των κρεάτων εκτός από το κρέας πουλερικών. Η μερική τους εξυγίανση πραγματοποιείται με την μερική αφυδάτωση και την ενδεχόμενη κάπνιση και την προσθήκη αλατιού ή μπαχαρικών. Δεν θεωρούνται έτοιμα προς βρώση τρόφιμα. Ενδεικτικό προϊόν αποτελεί το παραδοσιακό χωριάτικο λουκάνικο.

1.3. Διατροφική αξία κρέατος

1.3.1. Εισαγωγή

Το κρέας είναι μια συμπυκνωμένη πηγή θρεπτικών συστατικών , που παλαιότερα θεωρούνταν απαραίτητη για τη βέλτιστη ανθρώπινη ανάπτυξη . Αν και ορισμένα επιδημιολογικά δεδομένα έχουν αποκαλύψει μια πιθανή συσχέτιση μεταξύ της κατανάλωσής του και του αυξημένου κινδύνου για διάφορες μορφές καρκίνου, και καρδιαγγειακών παθήσεων, η κατανάλωση κρέατος ήταν σημαντική στην εξέλιξη του ανθρώπινου είδους, ιδιαίτερα του εγκεφάλου .

Σε γενικές γραμμές, το κρέας είναι μια σημαντική πηγή πολλών θρεπτικών συστατικών. Είναι ιδιαίτερα πλούσιο σε πρωτεΐνη υψηλής βιολογικής αξίας, καθώς και μικροθρεπτικά συστατικά όπως ο σίδηρος, το σελήνιο, ο ψευδάργυρος και η βιταμίνη B12. Τα κρέατα όπως το συκώτι είναι επίσης κρίσιμες πηγές βιταμίνης A και φολικού οξέος.

1.3.2. Περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη και αξία πρωτεΐνης κρέατος

Ο ρόλος του κρέατος, ιδιαίτερα του κόκκινου κρέατος, ως πηγή πρωτεΐνης είναι αδιαμφισβήτητος. Ωστόσο, η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη κρέατος μπορεί να ποικίλλει σημαντικά. Σύμφωνα με τα δεδομένα του διατροφικού πίνακα (Πίνακας 2) η μέση περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη είναι 22%, ωστόσο μπορεί να είναι τόσο υψηλή όσο 24,1% (στήθος κοτόπουλου) ή έως και 19,3% (κρέας πάπιας).

Επιπλέον, οι πρωτεΐνες του κρέατος μπορούν να διακριθούν από τη περιεκτικότητά τους σε απαραίτητα αμινοξέα. Υπάρχουν εκατόν ενενήντα γνωστά αμινοξέα, αν και μόνο είκοσι είναι απαραίτητα για τη σύνθεση πρωτεϊνών (Wu, 2009). Μέσα σε αυτό το είκοσι, οκτώ δεν μπορούν να παραχθούν από το ανθρώπινο σώμα που τα καθιστά απαραίτητα, επομένως πρέπει να παρέχονται από τη διατροφή. Τόσο τα απαραίτητα όσο και τα μη απαραίτητα αμινοξέα παρουσιάζονται στο Πίνακα 1.

Πίνακας 1 Απαραίτητα και μη απαραίτητα αμινοξέα

Essential amino acids	Non essential amino acids
Isoleucine	Alanine
Leucine	Asparagine
Lysine	Arginine
Methionine	Cysteine
Tryptophan	Aspartic acid
Treonine	Glutamic acid
Valine	Proline
Phenilalanine	Hystidine
	Tyrosin
	Serin
	Glycine

Ακόμα κι αν αυτά τα μη απαραίτητα αμινοξέα μπορούν να παραχθούν από τον ανθρώπινο οργανισμό, είναι υποχρεωτικό να υπάρχουν όλες οι απαραίτητες πρώτες ύλες για την παραγωγή τους. Η ανεπαρκής κατανάλωση αμινοξέων, οι πρωτογενείς μονάδες πρωτεϊνών, μπορεί να οδηγήσουν σε πρωτεϊνικό υποσιτισμό.

Η θρεπτική αξία κάθε τροφίμου μπορεί να καθοριστεί από την ποσότητα και την ποιότητα των πολλών αμινοξέων που υπάρχουν ή απουσιάζουν. Οι χορτοφάγοι πρέπει να συνδυάζουν δημητριακά και όσπρια για να λάβουν όλα τα απαραίτητα αμινοξέα. Δημητριακά όπως το ρύζι και το σιτάρι είναι ιδιαίτερα φτωχά σε λυσίνη ενώ τα όσπρια έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε μεθειονίνη (Elango, Ball, & Pencharz, 2009).

Πίνακας 2 Διατροφική σύσταση του κρέατος

Meat cut	Energy value (kcal)	Protein (g)	Fat (g)	Saturated fat (g)	Vitamin B12 (mcg)	Na (mg)	P (mg)	Fe (mg)	Zn (mg)
Chicken breast, skinless, raw	108	24.1	1.2	0.3	0.37	60	220	0.5	0.8
Chicken breast, raw	176	24.1	8.9	2.1	0.37	72	200	1	0.8
Chicken, average, raw	110	22.9	2	0.5	0.72	77	204	0.9	1
Beef, steak cuts, raw	122	20.9	4.3	1.8	2	60	169	1.4	3.6
Beef, loin, raw	114	21	3.3	1.4	2	60	145	1.5	3.6
Beef, calf, loin, raw	148	19.9	7.6	3.2	1.2	24	195	0.9	3
Pork, loin, raw	131	22.2	4.7	1.6	1	53	221	0.6	1.6
Pork, chop, raw	355	17.3	31.8	10.9	1	61	189	1.3	1.7
Pork, leg, raw	152	21	7.5	2,6	1	86	167	0.7	2.7
Turkey, breast, skinless, raw	105	23.4	1.3	0.3	1	63	210	0.7	0.6
Turkey, average, skinless, raw	137	20.5	6.1	2	2	49	210	2	1.6
Duck meat, average, skinless, raw	133	19.3	6.2	1.6	3	92	202	2.4	1.9
Mutton, chop or meat, raw	124	19.7	5	2.2	2	64	220	1.7	3.8

1.3.3. Περιεκτικότητα σε λίπος

Η περιεκτικότητα σε λιπαρά διαφέρει σημαντικά μεταξύ των κομματιών βόειου κρέατος λιανικής, των πουλερικών και σε άλλα προϊόντα κρέατος όπως παραπροϊόντα σφαγίων και σπescιαλιτέ όπως λουκάνικα, ζαμπόν, κ.λπ. Ο Πίνακας 2 συνοψίζει μερικές από τις κύριες διαφορές που μπορούν να παρατηρηθούν μεταξύ πολλών περικοπών. Το φιλέτο είναι η πιο άπαχη μερίδα και στο βόειο κρέας και στο χοιρινό ενώ το στήθος είναι γενικά το πιο άπαχο μέρος στο κρέας πουλερικών.

Το δέρμα είναι πιθανώς η κύρια πηγή λίπους στο κρέας πουλερικών, η περιεκτικότητα σε λίπος στα κύρια κομμάτια λιανικής από κοτόπουλο και γαλοπούλα κυμαίνεται από 1 έως 15% αλλά τα κοψίματα συμπεριλαμβανομένου του δέρματος είχαν υψηλότερες τιμές. Το στήθος της γαλοπούλας και του κοτόπουλου έχει παρόμοια περιεκτικότητα σε λίπος ενώ τα πόδια της γαλοπούλας τείνουν να έχουν υψηλότερη περιεκτικότητα σε λίπος από τα μπούτια κοτόπουλου .

Το μαγείρεμα μπορεί να έχει σημαντική επίδραση στην περιεκτικότητα σε λίπος και στα λιπαρά οξέα του κρέατος . Οι Gerber, Scheeder και Wenk (2009) έχουν δείξει σημαντικές απώλειες λίπους σε πολλά κομμάτια κρέατος που υποβάλλονται στο ψήσιμο στη σχάρα, ψήσιμο ή τηγάνισμα χωρίς προσθήκη λίπους. Συγκεκριμένα όσον αφορά τα λιπαρά, παρατηρήθηκε μια αύξηση στην αναλογία πολυακόρεστων /κορεσμένων, όπως επίσης αναφέρεται από τους Ono et al. (Ono, Berry, & Párogzay, 1985) πιθανώς επειδή τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα αποτελούν μέρος της κυτταρικής μεμβράνης και έτσι έχουν λιγότερη επαφή με τη θερμότητα.

1.3.4. Βιταμίνες και μέταλλα

Το κρέας είναι μια εξαιρετική πηγή πολλών βιταμινών και μετάλλων. Το κόκκινο κρέας παρέχει περίπου το 25% της συνιστώμενης διατροφικής πρόσληψης για ριβοφλαβίνη, βιταμίνη Β6 , νιασίνη, και παντοθενικό οξύ ανά 100 g και πρακτικά τα δύο τρίτα της ημερήσιας ανάγκης (DR) σε βιταμίνη Β12 στην ίδια ποσότητα .

Στα πουλερικά , το στήθος κοτόπουλου είναι καλή πηγή νιασίνης (100 γραμμάρια παρέχουν το 56% της ημερήσιας ανάγκης) και βιταμίνης Β6 (27% της ημερήσιας ανάγκης) ενώ 100 γραμμάρια στήθος γαλοπούλας παρέχει το 31% της ημερήσιας ποσότητας νιασίνης και το 29% της Β6.

Επιπλέον , το κρέας είναι μια από τις καλύτερες πηγές ψευδαργύρου, φωσφόρου , σεληνίου και σιδήρου . Τα άπαχα τεμάχια βόειου κρέατος παρέχουν περίπου το 37% του σεληνίου (της ημερήσιας ανάγκης), το 26% του ψευδάργυρου και το 20% του καλίου σε μερίδα 100 g .

Είναι πολύ σημαντικό να λάβουμε υπόψη την επίδραση των τεχνικών μαγειρέματος στην περιεκτικότητα βιταμινών και ιχνοστοιχείων καθώς μερικές μελέτες έχουν δείξει ότι κατά το μαγείρεμα υπάρχει απώλεια βιταμινών Β (Lombardi-Boccia, Lanzi και Aguzzi, 2005).

1.3.4.1. Κρέας , μία πολύτιμη πηγή σιδήρου

Ο σίδηρος αποτελεί βασικό συστατικό για την ανθρώπινη υγεία και η έλλειψη του οδηγεί σε βλάβη πολλών βιολογικών λειτουργιών καθώς και διαταραχή στην ανάπτυξη του παιδιού.

Η διατροφή παίζει ουσιαστικό ρόλο στην διατήρηση της ισορροπίας του σιδήρου . Ο σίδηρος μπορεί να βρεθεί σε μια ευρεία ποικιλία τροφίμων, ωστόσο υπάρχει σε δύο διαφορετικά μορφές: αιμικός σίδηρος και μη αιμικός σίδηρος. Ο αιμικός σίδηρος προέρχεται από αιμοσφαιρίνη και μυοσφαιρίνη, επομένως υπάρχει μόνο σε ζωικές τροφές. Είναι εξαιρετικά βιοδιαθέσιμο και απορροφάται εύκολα στον αυλό του εντέρου γιατί απορροφάται ως άθικτο μόριο από τα εντεροκύτταρα.

Ο μη αιμικός σίδηρος υπάρχει κυρίως στα λαχανικά, με σκούρα φύλλα όπως το σπανάκι και τα σταυρανθή λαχανικά, τα όσπρια και τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Η απορρόφηση του μη αιμικού σιδήρου μπορεί να επηρεαστεί σοβαρά και έχει χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα που κυμαίνεται από 2 έως 20% . (Turhan,Altunkaynak, & Yazici, 2004).

Παρόλα αυτά ο αιμικός σίδηρος, ακόμη και όταν καταναλώνεται σε μικρότερες ποσότητες, είναι δύο έως τρεις φορές περισσότερο βιοδιαθέσιμο και 15 έως 35% απορροφάται εύκολα. Το κρέας είναι ίσως η καλύτερη πηγή αιμικού σιδήρου.

Προηγούμενες μελέτες έχουν αναφέρει ότι το 26,2 έως 75,60% της περιεκτικότητάς του σε σίδηρο είναι αιμικός σίδηρος. Το βοδινό κρέας έχει την υψηλότερη περιεκτικότητα σε αίμη-σίδηρο, το φιλέτο μπορεί να έχει 45% (Kongkachuichai, Napatthalung, & Charoensiri, 2002), έως 77,58% ενώ η μέση αναφερόμενη τιμή ήταν 58,10%. Η περιεκτικότητα σε σίδηρο και αιμικό-σίδηρο είναι χαμηλότερη σε πιο ελαφριά κρέατα όπως το κοτόπουλο.

Το κρέας και τα προϊόντα κρέατος μπορούν να συμβάλουν έως και 18% των ημερήσιων αναγκών σε σίδηρο (Geissler & Singh, 2011) που το καθιστά σημαντικό σε μια υγιεινή ισορροπημένη διατροφή και ζωτικής σημασίας σε πρόληψη μιας από τις πιο κοινές διατροφικές ελλείψεις .

Ωστόσο, παρά τον ζωτικό του ρόλο στον ανθρώπινο οργανισμό, μια υπερβολική πρόσληψη σιδήρου μπορεί να είναι επικίνδυνη. Οι υψηλές δόσεις σιδήρου μπορούν να προκαλέσουν βλάβη στον εντερικό βλεννογόνο και οδηγεί σε συστηματική τοξικότητα (Mills & Curry, 1994).

Πρόσφατα, αρκετές μελέτες έχουν συσχετίσει πολύ υψηλές προσλήψεις σιδήρου με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου του παχέος εντέρου (Balder, Vogel, Jansen, & Weijenberg, 2006), καρδιαγγειακή νόσο , μόλυνση νευροεκφυλιστικές παθήσεις και φλεγμονή .

1.3.4.2. Η βιταμίνη B12 στο κρέας

Το κρέας είναι πολύτιμη πηγή βιταμινών του συμπλέγματος Β, ιδιαίτερα της Β12, η πιο σύνθετη και μεγαλύτερη βιταμίνη. Οι ζωικές τροφές θεωρούνται οι κύριες πηγές βιταμίνης Β12, ωστόσο μπορεί να βρεθεί και σε ορισμένους τύπους φυκιών.

Η απορρόφηση της βιταμίνης Β12 είναι αρκετά περίπλοκη. Χαμηλή διαιτητική πρόσληψη είναι πιθανώς η κύρια αιτία ανεπάρκειας βιταμίνης Β12. Ωστόσο, μπορεί επίσης να οφείλεται σε βλάβες της διαδικασίας απορρόφησης που προκαλούνται από γαστρική ατροφία και δυσαπορρόφηση από τα τρόφιμα, αρκετά συχνή σε ηλικιωμένους .

Αυστηρή χορτοφαγία σχετίζεται επίσης με χαμηλές τιμές πρόσληψης βιταμίνης Β12 (Πίνακας 3) Η έλλειψη βιταμίνης Β12 είναι η κύρια αιτία μεγαλοβλαστικής αναιμίας. Συνδέεται επίσης έντονα με υψηλά επίπεδα ομοκυστεΐνης στο αίμα που είναι παράγοντας κινδύνου καρδιαγγειακής νόσου (Green&Miller, 2005). Μπορεί επίσης να προκαλέσει καταθλιπτικά συμπτώματα καθώς και νευρολογική βλάβη .

Πίνακας 3 Σύγκριση διαίτας με βάση το κρέας και τα λαχανικά

High fiber content Possibly lower energy content Possibly higher antioxidant intake Possibly higher water content Lower saturated fat intake	Energy and nutrient dense food High biological value protein Best source for iron, zinc and complex B vitamins especially B12
Disadvantages of vegetarian diets	Disadvantages of meat consumption
Lower iron bioavailability Zinc and Vitamin B12 deficiency risk Lack of EPA + DHA sources Lower protein biological value	High fat content in some cuts Sodium content (processed meats) Other contaminants (hormones)

1.4. Παράγοντες που επηρεάζουν την αγορά κρέατος

Το μεγαλύτερο μέρος του πληθυσμού της γης καταναλώνει κρέας. Ωστόσο η προτίμηση του καταναλωτή για το κρέας και η ποσότητα που καταναλώνει επηρεάζεται σημαντικά από ορισμένους παράγοντες, οι σημαντικότεροι από τους οποίους είναι οι εξής:

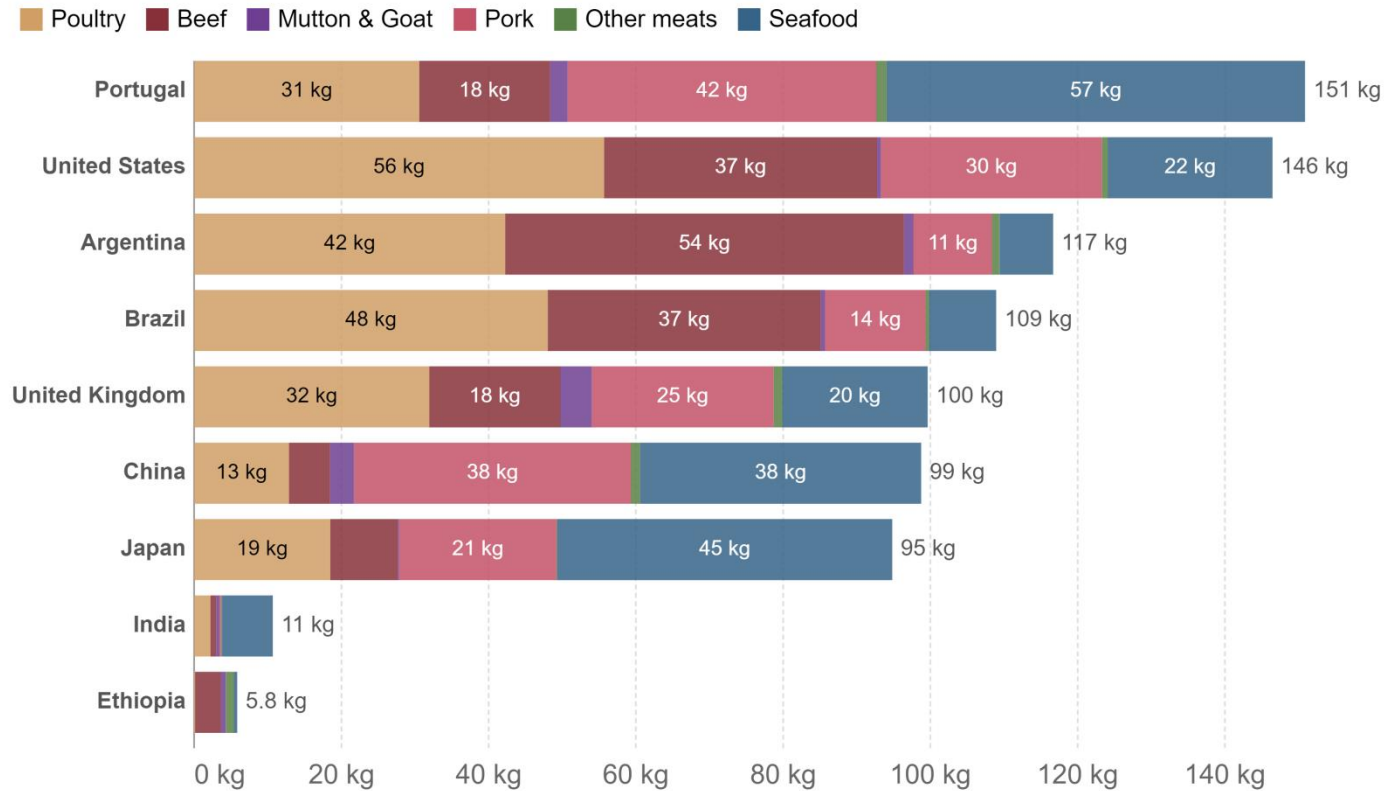
1. Οι θρησκευτικές, κοινωνικές και πολιτικές πεποιθήσεις.
2. Οι διατροφικές και διαιτητικές συνήθειες του καταναλωτικού κοινού.
3. Η τιμή πώλησης του κρέατος τόσο μεταξύ των διαφορετικών ειδών κρέατος, όσο και σε σύγκριση με τις τιμές των υποκατάστατων ή συμπληρωματικών προϊόντων κρέατος.
4. Το βιοτικό επίπεδο και το εισόδημα των καταναλωτών.
5. Οι προτιμήσεις του καθενός.
6. Η εμφάνιση του κρέατος κατά την αγορά του, καθώς και η τυποποίηση και το είδος επεξεργασίας.
7. Οι αντιλήψεις του καταναλωτικού κοινού για τις επιδράσεις του κρέατος στην υγεία του ανθρώπου.
8. Οι αντιλήψεις του καταναλωτικού κοινού για το βαθμό ικανοποίησης των προσδοκιών του από το μαγειρεμένο κρέας.
9. Η μεταχείριση των ζώων μέχρι την σφαγή τους.
10. Ο τρόπος εκτροφής των ζώων σε συνάρτηση με τις επιδράσεις στο περιβάλλον.
11. Τα διατροφικά σκάνδαλα.
12. Τοπικά ήθη και έθιμα.

1.5. Κατανάλωση κρέατος στον κόσμο και στην Ελλάδα

Σε ορισμένες περιπτώσεις, η κατανάλωση κρέατος μπορεί να είναι ευεργετική. Οι μέτριες ποσότητες κρέατος και γαλακτοκομικών μπορούν να βελτιώσουν την υγεία των ανθρώπων, ιδιαίτερα σε χώρες με χαμηλότερο εισόδημα, όπου οι δίαιτες μπορεί να μην έχουν ποικιλία. Αλλά σε πολλές χώρες, η κατανάλωση κρέατος υπερβαίνει κατά πολύ τα βασικά διατροφικά οφέλη. Στην πραγματικότητα, θα μπορούσε να είναι ένας κίνδυνος για την υγεία. Μελέτες έχουν συνδέσει την υπερβολική κατανάλωση κόκκινου και επεξεργασμένου κρέατος με αυξημένο κίνδυνο καρδιακών παθήσεων, εγκεφαλικού και ορισμένων τύπων καρκίνου. Η αντικατάσταση του κοτόπουλου με το βόειο κρέας ή το μπέικον θα μπορούσε να είναι ένα θετικό βήμα. Αυτή η ανταλλαγή είναι επίσης καλύτερη για το περιβάλλον, καθώς οι αγελάδες, ειδικότερα, είναι αναποτελεσματικοί μετατροπείς ζωοτροφών σε κρέας. Σε σύγκριση με το κοτόπουλο, το βόειο κρέας έχει τριπλάσια έως δέκα φορές μεγαλύτερη επίδραση στη χρήση γης, το νερό και τις εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου. Το χοιρινό είναι κάπου ανάμεσα στα δύο. Ένα μέλλον όπου η κατανάλωση κρέατος είναι βιώσιμη και ισορροπημένη μεταξύ των χωρών θα απαιτούσε σημαντικές αλλαγές.

Per capita meat consumption by type, 2017

Our World
in Data

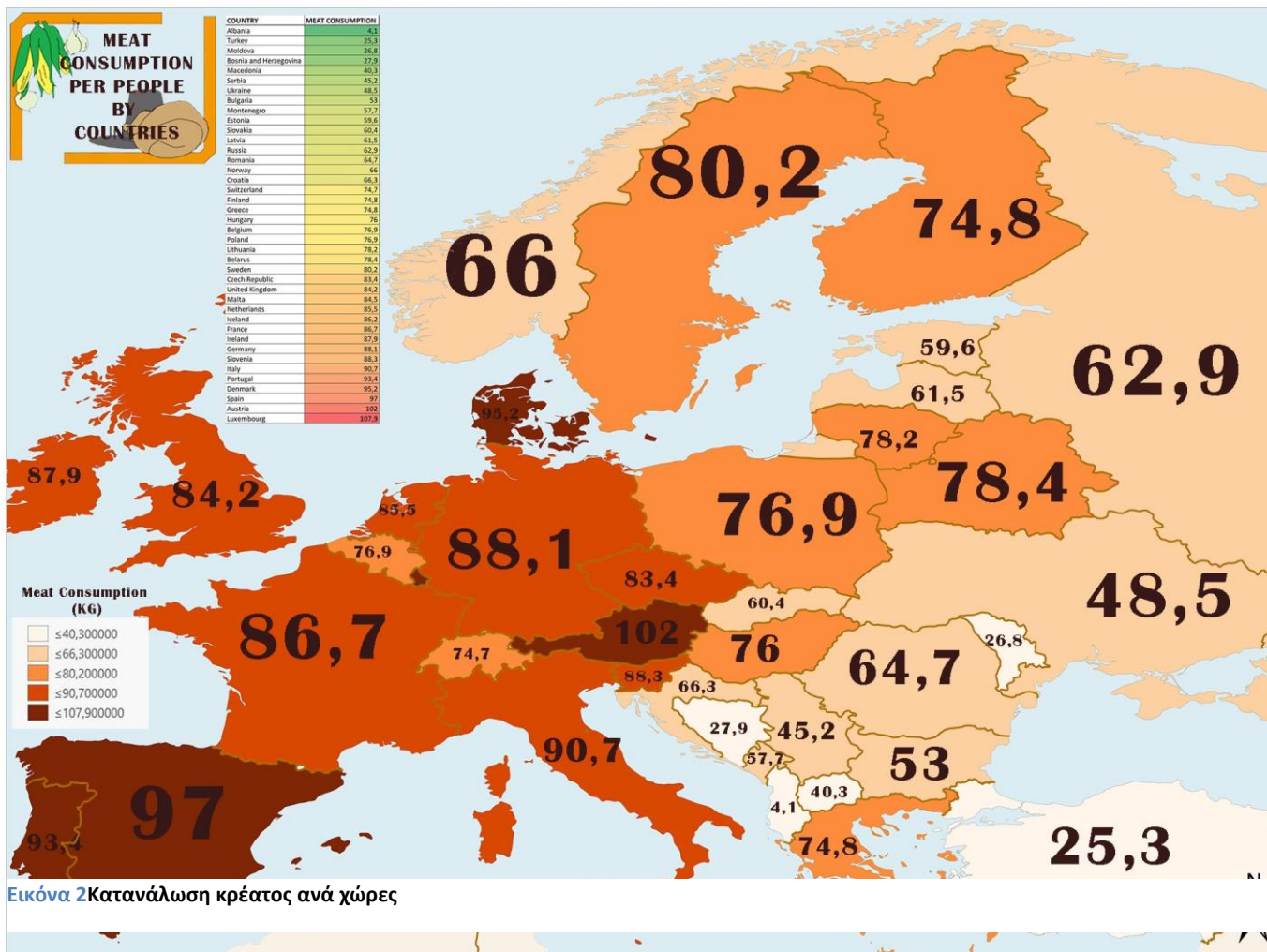


Source: Food and Agriculture Organization of the United Nations

OurWorldInData.org/meat-production • CC BY

Note: Data refers to meat 'available for consumption'. Actual consumption may be lower after correction for food wastage.

Εικόνα 1 Κατά κεφαλήν κατανάλωση κρέατος ανά τύπο, 2017



Εικόνα 2 Κατανάλωση κρέατος ανά χώρες

1.6. Νοθεία στο κρέας

1.6.1. Εισαγωγή

Η Απάτη στον τομέα των τροφίμων (Food Fraud) αποτελεί ένα φαινόμενο που περιλαμβάνει ένα ευρύ φάσμα δόλιων και παραπλανητικών πρακτικών, οι οποίες δεν περιορίζονται αποκλειστικά και μόνο στο τρόφιμο, αλλά αναφέρονται σε όλο το φάσμα της αγροτοδιατροφικής αλυσίδας. Σε αυτές περιλαμβάνονται πρακτικές, όπως η παραχάραξη, η νόθευση εγγράφων ή προϊόντων, η χρήση μη εγκεκριμένων μεθόδων ή διαδικασιών παραγωγής, η αντικατάσταση (ποιοτικά ή ποσοτικά), η διάλυση, η προσθήκη ή η αφαίρεση ενός συστατικού που οδηγούν στην ποσοτική διαφοροποίηση της σύστασης του τροφίμου οδηγώντας σε παραπλανητική επισήμανση.

Στο πλαίσιο της υφιστάμενης Εθνικής Νομοθεσίας (Ν. 4235/2014) νοθευμένα τρόφιμα ορίζονται ως: «αυτά στα οποία προστέθηκαν ύλες συνήθως ευτελέστερης αξίας για κερδοσκοπία ή για καλύτερη εμφάνιση των προϊόντων, στην οποία δεν ανταποκρίνονται πραγματικά».

1.6.2. Περιπτώσεις νοθείας

Προκειμένου να κατανοηθεί η σοβαρότητα της απάτης με βάση το κρέας παρακάτω παρουσιάζονται μερικά από τα μεγαλύτερα σκάνδαλα απάτης με κρέας που συνέβησαν τον τελευταίο καιρό:

- Στις 15 Ιανουαρίου 2013, αναφέρθηκε ότι η Αρχή Ασφάλειας Τροφίμων της Ιρλανδίας είχε εντοπίσει DNA αλόγου και χοίρου σε κατεψυγμένα μπιφτέκια βόειου κρέατος που πωλούνταν σε ιρλανδικά και βρετανικά σούπερ μάρκετ και εστιατόρια γρήγορου φαγητού. Κατά τη διάρκεια του διατροφικού αυτού σκανδάλου πραγματοποιήθηκαν επιδρομές και συλλήψεις στο Ηνωμένο Βασίλειο, τη Γαλλία και τη Δανία.
- Το 2013 στην Κίνα έγιναν περισσότερες από 900 συλλήψεις μετά από τις αρχές που κατέσχεσαν 20.000 τόνους παράνομου κρέατος, εξιχνιάζοντας 382 υποθέσεις εγκλημάτων που σχετίζονται με το κρέας σε διάστημα τριών μηνών. Σε μία από τις περιπτώσεις, διαπιστώθηκε ότι μια συμμορία έβγαζε κρέας αλεπούς, βιζόν και αρουραίων για πρόβειο κρέας. Η εν λόγω συμμορία κέρδισε πάνω από 1 εκατομμύριο λίρες σε διάστημα τεσσάρων ετών, παραποιώντας πρόβειο κρέας με αυτόν τον τρόπο.

1.7. Ιχνηλασιμότητα των τροφίμων

Η ιχνηλασιμότητα υπό την ευρεία της έννοια, ως η παρακολούθηση της ροής των πληροφοριών, βασίζεται στις στοιχειώδεις, γενικές απαιτήσεις που τίθενται στο άρθρο 18 του Κανονισμού Ε.Κ. 178/2002, αλλά και στις ειδικές πληροφορίες που απαιτούνται σε ορισμένους τομείς τροφίμων και οι οποίες τίθενται από ένα σύνολο ειδικών κατά περίπτωση Κανονισμών.

Η ιχνηλασιμότητα αποτελεί ένα εργαλείο διαχείρισης κινδύνου που επιτρέπει στους υπευθύνους των επιχειρήσεων και στις αρμόδιες αρχές να αποσύρουν ή /και να ανακαλούν μη ασφαλή προϊόντα. Η ιχνηλασιμότητα δεν εγγυάται από μόνη της την ασφάλεια των τροφίμων, αλλά στοχεύει στον περιορισμό ενός προβλήματος σχετικά με την ασφάλεια.

Η σκοπιμότητα της εστιάζεται στη:

- διευκόλυνση στοχευμένων αποσύρσεων & ανακλήσεων,
- διευκόλυνση της εκτίμησης του κινδύνου από τις ελεγκτικές αρχές.

Ωστόσο , τα παράπλευρα οφέλη από την εφαρμογής της σχετίζονται με την:

- παροχή ακριβούς πληροφόρησης στους καταναλωτές / αξιοπιστία πληροφοριών που παρέχονται σε ένα προϊόν
- δυνατότητα των αρχών να το χρησιμοποιούν ως εργαλείο στην εξακρίβωση φαινομένων απάτης - πραγματοποίηση δίκαιων ανταλλαγών μεταξύ επιχειρήσεων.

Η εφαρμογή της ιχνηλασιμότητας στον κλάδο των τροφίμων είναι πλέον υποχρεωτική. Οι επιχειρήσεις καλούνται να εφαρμόσουν συστήματα ιχνηλασιμότητας και η πολιτεία καλείται να ελέγξει τη συμμόρφωση των επιχειρήσεων με τις απαιτήσεις αυτές. Συμπερασματικά , η ιχνηλασιμότητα δε σχετίζεται μόνο με την ασφάλεια των τροφίμων αλλά προασπίζει ταυτόχρονα και τη ποιότητα.

2. Πειραματική πορεία – Μέθοδοι

2.1. Δείγματα

Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα εξής δείγματα : κοτόπουλο (*Gallus domesticus*) , γαλοπούλα (*Meleagris gallopavo dom.*), γαλοπούλα σε φέτες (δείγματα εμπορίου) , χοιρινό (*Sus domesticus*) . Χρησιμοποιώντας τα δείγματα κοτόπουλου και γαλοπούλας δημιουργήσαμε μίξεις των δυο αυτών ειδών . Οι αναλογίες επιλέχτηκαν έτσι ώστε να καλυφτούν όσο το δυνατόν περισσότεροι συνδυασμοί ενώ ταυτόχρονα να εξαχθούν χρήσιμες πληροφορίες . Από κάθε είδος χρησιμοποιήθηκε μικρή ποσότητα ιστού (περίπου 0,2 γραμμάρια) .

Πίνακας 4

Πίνακας 4. 1 ^η σειρά δειγμάτων		
Όνομασία δείγματος	% γαλοπούλα	% κοτόπουλο
K1	0	100
Γ1	100	0
M2	50	50
M3	75	25
M4	90	10
M5	95	5

Πίνακας 5

Πίνακας 5. 2^η σειρά δειγμάτων (εμπορίου)

Όνομασία δείγματος	Χαρακτηριστικό
Δ1	Βραστή γαλοπούλα με ελαιόλαδο
Δ2	Γαλοπούλα ψητή ,χωρίς γλουτένη, 2% λιπαρά
Δ3	Καπνιστή γαλοπούλα , χωρίς γλουτένη με άπαχο κρέας
Δ4	Καπνιστή γαλοπούλα
Δ5	Βραστή γαλοπούλα , χωρίς γλουτένη

Πίνακας 6

Πίνακας 6. 3^η σειρά δειγμάτων

Όνομασία δείγματος	Χαρακτηριστικό
P1	Χοιρινό (100%)
P2(Δ5)	Βραστή γαλοπούλα , χωρίς γλουτένη
P3(Δ4)	Καπνιστή γαλοπούλα
P4(Δ1)	Βραστή γαλοπούλα με ελαιόλαδο
P5	Φιλέτο καπνιστής γαλοπούλας
P6	Καπνιστή γαλοπούλα
P7	Καπνιστή γαλοπούλα
P8	Καπνιστή γαλοπούλα
P9(Δ3)	Καπνιστή γαλοπούλα , χωρίς γλουτένη με άπαχο κρέας

2.2. Απομόνωση του DNA

Για την απομόνωση ολικού DNA από τον ιστό (χρησιμοποιήθηκαν οι ποσότητες που αναφέρθηκαν προηγουμένως) , ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του Monarch Total DNA Miniprep Kit , το οποίο περιλαμβάνει δύο μέρη με τα εξής στάδια :

1^ο ΜΕΡΟΣ

- 1) Κόβουμε τον ιστό σε μικρά κομμάτια για να εξασφαλίσουμε γρήγορη λύση και υψηλές αποδόσεις. Ζυγίζουμε την κατάλληλη ποσότητα ιστού και την τοποθετούμε σε σωληνάριο μικροφυγοκέντρου των 1,5 ml. Να σημειωθεί πως το να χρησιμοποιηθεί μεγαλύτερη ποσότητα από την προτεινόμενη, δεν θα οδηγήσει σε καλύτερες ή μεγαλύτερες αποδόσεις. Εάν απαιτείται χρήση περισσότερων από το συνιστώμενο, χωρίζουμε το δείγμα σε 2 ή περισσότερες προετοιμασίες. Βεβαιωνόμαστε ότι το κατεψυγμένο υλικό παραμένει παγωμένο μέχρι να αναμειχθούν τα δείγματα με το ρυθμιστικό διάλυμα λύσης ιστών (Tissue Lysis Buffer) και την πρωτεΐνάση K. Τόσο ο σταθεροποιημένος όσο και ο φρέσκος ιστός πρέπει να διατηρούνται κρύοι ή σε πάγο κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας. Παρακάτω παρατίθεται πίνακας με τα είδη χρησιμοποιούμενου ιστού και τις απαραίτητες ποσότητες.

Πίνακας 7

ΕΙΔΟΣ ΙΣΤΟΥ	ΣΥΝΙΣΤΩΜΕΝΗ ΠΟΣΟΤΗΤΑ
ΟΥΡΑ ΤΡΩΚΤΙΚΟΥ	ΕΩΣ 25mg
ΕΓΚΕΦΑΛΟΣ	ΕΩΣ 12 mg
ΙΝΩΔΟΣ ΙΣΤΟΣ (ΜΥΕΣ, ΚΑΡΔΙΑ)	ΕΩΣ 25 mg
ΚΛΙΠΕΣ ΑΥΤΙΩΝ, ΔΕΡΜΑ	ΕΩΣ 10 mg
ΣΥΚΩΤΙ, ΠΝΕΥΜΟΝΑΣ	ΕΩΣ 15 mg
ΣΠΛΗΝΑ, ΝΕΦΡΟ	ΕΩΣ 10 mg

- 2) Προσθέτουμε πρωτεϊνάση K (σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα) και 200μl Tissue Lysis Buffer σε κάθε δείγμα. Ανακατεύουμε αμέσως με στροβιλισμό. Βεβαιωνόμαστε ότι τα σωματίδια ιστού μπορούν να κινούνται ελεύθερα στο μείγμα λύσης και δεν παραμένουν κολλημένα στο κάτω μέρος του σωλήνα. Όταν εργαζόμαστε με πολλά δείγματα, προετοιμάζουμε ένα κύριο μείγμα ρυθμιστικού διαλύματος λύσης ιστού και πρωτεΐνάσης K για να εξοικονομήσουμε τα βήματα της πιπέτας.

Πίνακας 8

ΕΙΔΟΣ ΙΣΤΟΥ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΠΡΩΤΕΪΝΑΣΗΣ K
ΕΓΚΕΦΑΛΟΣ, ΝΕΦΡΟ, ΔΕΡΜΑ ΚΛΙΠΕΣ ΑΥΤΙΩΝ	3μl
ΟΛΟΙ ΟΙ ΑΛΛΟΙ ΙΣΤΟΙ	10 μl

- 3) Επιάζουμε στους 56°C σε θερμικό μίξερ με ανάδευση σε πλήρη ταχύτητα (1400 rpm) μέχρι να διαλυθούν τελείως τα κομμάτια ιστού (συνήθως 30-60 λεπτά). Εάν ο χρόνος δεν είναι

περιορισμένος, η πρόσθετη επώαση έως και 3 ώρες μπορεί να βελτιώσει περαιτέρω τις αποδόσεις και να μειώσει το υπολειπόμενο RNA. Εάν δεν υπάρχει διαθέσιμος επωαστήρας με ανάδευση, χρησιμοποιούμε έναν στροφέα σωλήνα τοποθετημένο σε έναν επωαστήρα, αναδευόμενο υδατόλουτρο ή ένα θερμαντικό μπλοκ (αναδεύουμε τα δείγματα κάθε 5-15 λεπτά για να επιταχύνουμε τη λύση).

4) Το ακόλουθο βήμα μπορεί να παραλειφθεί όταν εργαζόμαστε με κατεψυγμένες ή φρέσκες ποσότητες ιστών <15 mg. Φυγοκεντρούμε για 3 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα ($>12000 \times g$) στα υπολείμματα σφαιριδίου. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε φρέσκο σωλήνα μικροφυγοκέντρωσης. Αυτό αποτρέπει τα υπολειπόμενα υπολείμματα από το να φράξουν τις θέσεις δέσμευσης της μεμβράνης και συμβάλλει στην επίτευξη της μέγιστης απόδοσης και καθαρότητας. Είναι ιδιαίτερα σημαντικό να εκτελέσουμε αυτό το βήμα εάν τα δείγματα είναι θολά, περιέχουν υπολειμματικά σωματίδια, όταν εργαζόμαστε με σταθεροποιητικό ιστό ή όταν εργαζόμαστε με εγκέφαλο ή ινώδεις ιστούς.

5) Προσθέτουμε 3 μ l RNase A στο προϊόν λύσης, αναδεύουμε καλά και επωάζουμε για τουλάχιστον 5 λεπτά στους 56°C με ανάδευση σε πλήρη ταχύτητα. Αυτό το βήμα μπορεί να παραλειφθεί εάν το χαμηλό ποσοστό συν-καθαρισμένου RNA δεν επηρεάζει τις μεταγενέστερες εφαρμογές.

- 6) Μετάβαση στο βήμα 1 του μέρους 2: Σύνδεση και έκλυση γονιδιωματικού DNA

2^ο ΜΕΡΟΣ

- 1) Προσθέτουμε 400 μl ρυθμιστικού διαλύματος δέσμησης gDNA (gDNA Binding Buffer) στο δείγμα και ανακατεύουμε καλά με παλμικό στροβιλισμό για 5-10 δευτερόλεπτα. Η σχολαστική ανάμειξη είναι απαραίτητη για βέλτιστα αποτελέσματα.
- 2) Μεταφέρουμε το μίγμα λύματος/ρυθμιστικού διαλύματος δέσμησης (σχεδόν 600 μl) σε μια στήλη καθαρισμού gDNA που έχει προειχθεί σε ένα σωλήνα συλλογής, χωρίς να αγγίξουμε την περιοχή της άνω στήλης. Προχωράμε αμέσως στο βήμα 3. Αποφύγετε τη μεταφορά αφρού που μπορεί να έχει σχηματιστεί κατά τη λύση
- 3) Κλείνουμε το καπάκι και φυγοκεντρούμε : πρώτα για 3 λεπτά στα 1000 x g για να δεσμευτεί το gDNA (δεν χρειάζεται να αδειάσουμε το σωλήνα συλλογής ή να αφαιρέσουμε από τη φυγόκεντρο) και στη συνέχεια για 1 λεπτό στη μέγιστη ταχύτητα (> 12000 x g) για να καθαρίσουμε τη μεμβράνη. Απορρίπτουμε το υγρό που έχει διελεύσει και το σωλήνα συλλογής.
- 4) Μεταφέρουμε τη στήλη σε νέο σωλήνα συλλογής και προσθέτουμε 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης gDNA (gDNA Wash Buffer). Κλείνουμε το καπάκι και το αναποδογυρίζουμε μερικές φορές έτσι ώστε το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης να φτάσει

στο καπάκι (δεν ανακατεύουμε). Φυγοκεντρούμε αμέσως για 1 λεπτό στη μέγιστη ταχύτητα και, στη συνέχεια, απορρίπτουμε το υγρό. Ο σωλήνας συλλογής μπορεί να χτυπηθεί σε μια χαρτοπετσέτα για να αφαιρέσουμε τυχόν υπολείμματα ρυθμιστικού διαλύματος πριν τον επαναχρησιμοποιήσουμε στο επόμενο βήμα.

- 5) Αντικαθιστούμε τη στήλη στο σωλήνα συλλογής. Προσθέτουμε 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης gDNA και κλείνουμε το καπάκι. Φυγοκεντρούμε αμέσως για 1 λεπτό στη μέγιστη ταχύτητα. Απορρίπτουμε το σωλήνα συλλογής και το υγρό.
- 6) Τοποθετούμε τη στήλη καθαρισμού gDNA σε σωληνάριο μικροφυγοκέντρου 1,5 ml χωρίς DNase (δεν περιλαμβάνεται). Προσθέτουμε 35-100 μl προθερμασμένο στους 60°C, ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης gDNA (gDNA Elution Buffer), κλείνουμε το καπάκι και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό. Συνιστάται έκλουση σε 100 μl, αλλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν μικρότεροι όγκοι και θα έχει ως αποτέλεσμα πιο συμπυκνωμένο DNA αλλά μειωμένη απόδοση (μείωση 20-25% όταν χρησιμοποιείται 35 μl). Η έκλουση με προθερμασμένο ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης θα μειώσει τις αποδόσεις κατά 20-40% και εξαλείφει την ανάγκη για δεύτερη έκλουση. Το ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (10 mM Tris-Cl, pH 9,0, 0,1 mM EDTA) προσφέρει ισχυρή προστασία έναντι της ενζυμικής αποικοδόμησης και είναι βέλτιστο για μακροχρόνια αποθήκευση του DNA. Ωστόσο, άλλα ρυθμιστικά διαλύματα χαμηλής περιεκτικότητας σε αλάτι ή νερό χωρίς νουκλεάση μπορούν να χρησιμοποιηθούν εάν προτιμάται.

7) Φυγοκεντρούμε στη μέγιστη ταχύτητα για 1 λεπτό ($> 12000 \times g$) για την έκλουση του gDNA.

2.3. Ποσοτικοποίηση συγκέντρωσης DNA

Η μέτρηση του DNA πραγματοποιείται φασματοφωτομετρικά μέσω της μέτρησης της απορρόφησης του υπεριώδους φωτός από τις

βάσεις των πυρηνικών οξέων (Εικόνα 3). Η ένδειξη στα 260nm επιτρέπει τον υπολογισμό της ποσότητας του DNA . Η απορρόφηση στα 260nm (OD)=1 αντιστοιχεί με 50μg/ml δίκλωνου DNA . Λαμβάνεται ακόμα μια ένδειξη στα 280nm . Ο λόγος OD260/ OD280 παρέχει τη δυνατότητα ελέγχου της καθαρότητας του DNA. Εάν ο λόγος OD260/ OD280 είναι 1.8-2.0 τότε το παρασκεύασμα θεωρείται καθαρό . Εάν ο λόγος OD260/ OD280 είναι κάτω από 1,8 τότε το παρασκεύασμα θεωρείται ότι έχει προσμίξεις από πρωτεΐνες . Εάν είναι πάνω από 2 τότε έχει προσμίξεις με RNA .

Διάφορες εταιρίες προσφέρουν απλά συστήματα εμπορικών αντιδραστηρίων για την απομόνωση του DNA . Στα πρωτόκολλα των εμπορικών αντιδραστηρίων (kits) , η απελευθέρωση των νουκλεϊκών οξέων πραγματοποιείται με την χρήση πρωτεασών . Το προϊόν λύσης των κυττάρων στην συνέχεια καθαρίζεται με την χρήση στήλης .

	2	3	
A	0,171	0,078	260
	0,094	0,041	280
	1,828	1,884	260/280
	171,131	78,049	ng/ μ L
B	0,149	0,101	260
	0,081	0,054	280
	1,833	1,868	260/280
	149,105	101,032	ng/ μ L
C	0,172	0,039	260
	0,092	0,022	280
	1,864	1,799	260/280
	172,22	38,813	ng/ μ L
D	0,093	0,002	260
	0,05	0,001	280
	1,85	2,641	260/280
	92,844	1,962	ng/ μ L

Εικόνα 3 Ποσοτικοποίηση DNA δειγμάτων

2.4. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης

Ο όρος ηλεκτροφόρηση περιγράφει τη μετακίνηση ενός φορτισμένου σωματιδίου κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Το φαινόμενο αποτελεί τη βάση μιας πολύ χρήσιμης αναλυτικής μεθοδολογίας για τον καθορισμό, το διαχωρισμό και την ταυτοποίηση πολλών βιολογικών μεγαλομορίων όπως πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA) καθώς και νουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων. Αυτά τα μόρια φέρουν ομάδες που έχουν τη δυνατότητα ιονισμού και κατ' επέκταση σε συγκεκριμένες συνθήκες pH καθαρό θετικό ή αρνητικό φορτίο που μπορεί να τα κάνει να κινηθούν μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο προς τον αντίθετο πόλο. (Χαρβάλου, Χούχουλα, 2020)

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μια τεχνική διαχωρισμού και εν συνεχεία προσδιορισμού μίγματος ουσιών μεγάλου μοριακού βάρους, όπως πχ. πρωτεϊνών, λιποπρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA), ενζύμων ή μορίων με μικρότερο μοριακό βάρος, όπως πεπτίδια, αμινοξέα.

Όταν μια διαφορά δυναμικού εφαρμοστεί σε δύο ηλεκτρόδια το ένα απέναντι από το άλλο μέσα σε ένα διάλυμα, δημιουργείται μια ένταση πεδίου E , η οποία ισούται με το πηλίκο της τάσης V που εφαρμόζεται στα ηλεκτρόδια, προς την απόσταση d μεταξύ των ηλεκτροδίων ($E=V/d$). Όταν ένα μόριο με ολικό φορτίο Q είναι αναγκασμένο να μετακινηθεί δια μέσου ενός πορώδους υλικού (πχ ενός πηκτώματος αγαρόζης ή πολυακρυλαμίδης το οποίο βρίσκεται μέσα στο διάλυμα) υπό την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου έντασης E , η κινητήριος δύναμη η οποία το καθοδηγεί προς τον αντίθετο πόλο είναι ίση με $E \cdot Q$. Υπάρχει επίσης μια δύναμη τριβής που παρεμποδίζει την κίνηση του φορτισμένου μορίου. Η δύναμη τριβής εξαρτάται από το μέγεθος και το σχήμα του μορίου, του ιξώδους του διαλύματος και του μεγέθους των

πόρων του πηκτώματος. Η ταχύτητα με την οποία θα κινηθεί τελικά το φορτισμένο μόριο δίνεται από την εξίσωση $v = E \cdot Q / f$ όπου f είναι ο συντελεστής τριβής που στα διαλύματα δίνετε από τον νόμο του Stoke: $f = 6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta$ όπου r η ακτίνα του μορίου και η το ιξώδες του μέσου.

Όταν εφαρμοστεί μια διαφορά δυναμικού στο παραπάνω σύστημα, μόρια με διαφορετικό καθαρό φορτίο αρχίζουν να διαχωρίζονται λόγω της διαφορετικής κινητικότητας τους. Μόρια με το ίδιο καθαρό φορτίο αλλά με διαφορετικό μέγεθος θα έχουν διαφορετική ταχύτητα λόγω των διαφορετικών δυνάμεων τριβής που ασκούνται σε αυτά και επομένως θα διαχωρίζονται. Μικρά μόρια θα μετακινούνται ταχύτερα μέσα από τους πόρους του πηκτώματος. Είναι προφανές ότι ρυθμίζοντας το μέγεθος των πόρων (αυξάνοντας ή μειώνοντας την συγκέντρωση αγαρόζης ή πολυακρυλαμίδης αντίστοιχα) μπορούμε να καθορίσουμε και την κινητικότητα των μορίων που θέλουμε να διαχωριστούν ή να επιλέξουμε εμείς το εύρος του μεγέθους των μορίων τα οποία στο συγκεκριμένης σύστασης πήκτωμα θα διαχωρίζονται ικανοποιητικά το ένα από το άλλο.

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται με ειδικό εξοπλισμό που συνίσταται από δύο μέρη. Τη μονάδα τάσης και τη μονάδα ηλεκτροφόρησης η οποία μπορεί να είναι είτε οριζόντιας (ηλεκτροφόρηση DNA και RNA μορίων) είτε κάθετης διάταξης (ηλεκτροφορήσεις που χρησιμοποιούν πηκτώματα πολυακρυλαμίδης).

Για τον διαχωρισμό νουκλεϊκών οξέων εκτός από ηλεκτροφορήσεις σε πηκτώματα αγαρόζης/πολυακρυλαμίδης υπάρχει και η ηλεκτροφόρηση μεταβαλλόμενου πεδίου από 0,8% έως 4% όπου επιτυγχάνεται καλύτερος διαχωρισμός πολύ μεγάλου μοριακού βάρους τμημάτων DNA. Πηκτώματα πολυακρυλαμίδης χρησιμοποιούνται επίσης για τον

διαχωρισμού πολύ μικρού μεγέθους μορίων DNA , 20-50 ζευγών νουκλεοτιδικών βάσεων καθώς και νουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων.

Τα νουκλεϊκά οξέα χαρακτηρίζονται από αρνητικό φορτίο, γεγονός το οποίο επιτρέπει την μετακίνησή τους προς το θετικό ηλεκτρόδιο εντός ενός ηλεκτρικού πεδίου. Η διαδικασία διαχωρισμού εξαρτάται από την ηλεκτρική τάση που εφαρμόζεται , τις ιδιότητες του πηκτώματος καθώς επίσης το φορτίο και το σχήμα του υπό ανάλυση μορίου. Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου για τον διαχωρισμό νουκλεϊκών οξέων εξαρτάται από το μέγεθος των μορίων του δείγματος αλλά και την επιθυμητή ικανότητα ανάλυσης. Οι πιο συχνές μέθοδοι ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιούν τα ακόλουθα συστήματα πηκτώματος: πήκτωμα αγαρόζης και πήκτωμα πολυακρυλαμίδης για υψηλής ανάλυσης διεργασίες.

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης είναι μια τυπική διαδικασία για τον διαχωρισμό τμημάτων DNA , τα οποία ποικίλουν σε μέγεθος. Η αγαρόζη είναι ένας πολυσακχαρίτης που προέρχεται από κόκκινα φύκη. Για την δημιουργία πηκτώματος, προστίθεται σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα και διαλυτοποιείται με την βοήθεια θέρμανσης. Η παρουσία πολλών ομάδων υδροξυλίου στο μόριο της αγαρόζης επιτρέπει την ανάπτυξη δεσμών υδρογόνου, οι οποίοι σταθεροποιούν το δίκτυο των μεγάλων πόρων στην μήτρα το πηκτώματος.

Η ταχύτητα με την οποία κινούνται τα τμήματα DNA κατά μήκος ενός πηκτώματος αγαρόζης στο οποίο εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο, εξαρτάται κυρίως από το μέγεθός τους. Τα μόρια γραμμικού δίκλωνου

DNA κινούνται με ταχύτητα που είναι αντιστρόφως ανάλογη με τον λογάριθμο του μοριακού τους βάρους. Εκτός από το μέγεθος των μορίων DNA, παράγοντες όπως οι ιδιότητες του ρυθμιστικού διαλύματος που χρησιμοποιείται, η συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα, η τάση του εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού ρεύματος καθώς επίσης και η διαμόρφωση των μορίων DNA επηρεάζουν την ταχύτητα μετακίνησης. Το DNA μπορεί να γίνει ορατό με τη χρήση ειδικών χρωστικών όπως το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr). Το βρωμιούχο αιθίδιο έχει την ικανότητα να συμπλέκεται με νουκλεϊκά οξέα και προσφέρει την δυνατότητα να εντοπιστούν εύκολα και γρήγορα τα διάφορα θραύσματα του γενετικού υλικού. Έπειτα λοιπόν από τον διαχωρισμό των θραυσμάτων με την διαδικασία της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή ακτινοβολείται με λυχνία υπεριώδους φωτός και έτσι μπορούν να γίνουν ορατές οι ζώνες DNA λόγω φθορισμού του EtBr. Η ταχύτητα μετακίνησης αυτών των διαφορετικών διαμορφώσεων εξαρτάται από την ποσότητα της θετικά φορτισμένης χρωστικής που παρεμβάλλεται στα μόρια DNA. Η φυσικώς απαντώμενη, ομοιοπολικά κλειστή και ιδιαίτερα υπερελικωμένη μορφή μπορεί, εξ' αιτίας των ενδομοριακών τάσεων, να δεσμεύσει περιορισμένη ποσότητα χρωστικής και να μετακινείται γρήγορα. Αντίθετα οι λιγότερο υπερελικωμένες, ομοιοπολικά κλειστές μορφές προσδένουν περισσότερο EtBr και επομένως μετακινούνται πιο αργά μεταξύ των άλλων. Το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο καθώς κάθε νουκλεοτίδιο φέρει μια αρνητικά φορτισμένη φωσφορική ομάδα. Για το λόγο αυτό, κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης κινείται προς το θετικό ηλεκτρόδιο (άνοδος). Σε γενικές γραμμές, η μετανάστευση των μορίων μέσα στο πήκτωμα είναι αντιστρόφως ανάλογη με τον λογάριθμο του

μήκους τους ή με τον αριθμό των ζευγών βάσεων τους. (Χαρβάλου , Χούχουλα ,2020).

Για την πραγματοποίηση του πειράματος χρησιμοποιήθηκε πηκτή αγαρόζης για την προετοιμασία της οποίας ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία :

- 1) Προετοιμασία του εκμαγείου στο οποίο θα στερεοποιηθεί η πηκτή .
- 2) Προετοιμασία της πηκτής . Παρασκευάστηκε διάλυμα 2%.
- 3) Βράσιμο του διαλύματος σε φούρνο μικροκυμάτων . Κατά το βράσιμο πρέπει να γίνεται συχνή ανάδευση του διαλύματος.
- 4) Προστίθενται 7ml βρωμιούχου αιθιδίου.
- 5) Τοποθέτηση του διαλύματος στο εκμαγείο.
- 6) Αφού πήξει το διάλυμα , αφαιρείται το χτενάκι για να σχηματιστούν οι θέσεις στις οποίες θα εισαχθεί το DNA.
- 7) Τοποθέτηση της πηκτής μαζί με τη μήτρα σε μια συσκευή ηλεκροφόρησης .
- 8) Εισαγωγή των δειγμάτων στις θέσεις της πηκτής
- 9) Ρύθμιση της τάσης (170V).

Μετά από περίπου 20-40 λεπτά είναι δυνατή η παρατήρηση των ζωνών του DNA στη πηκτή αφού τοποθετηθεί στη συσκευή UV.

2.5. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction PCR)

Η Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μία μέθοδος πολλαπλασιασμού DNA που πρωτοεμφανίστηκε το 1985 με σκοπό την παραγωγή πολλαπλών αντιγράφων μιας δεδομένης ακολουθίας βάσεων DNA. Η σύνθεση μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας γίνεται *in vitro* (δηλαδή σε δοκιμαστικό σωλήνα) και οδηγεί σε παραγωγή ποσότητας που ανιχνεύεται και ταυτοποιείται εύκολα. Η μέθοδος είναι απλή και γρήγορη, βασιζόμενη στο πρότυπο αντιγραφής του DNA, επομένως μία ειδική αλληλουχία DNA μπορεί από ένα μόνο αντίγραφο να πολλαπλασιαστεί σε λίγη ώρα σε ανιχνεύσιμα επίπεδα. Η διαδικασία αποτελείται από τρία στάδια, τα οποία επαναλαμβάνονται πολλές φορές με διαδοχικούς κύκλους αύξησης και μείωσης της θερμοκρασίας, σε έναν θερμοκυκλοποιητή. Ο θερμοκυκλοποιητής είναι μια θερμαντική πλάκα με δυνατότητα προγραμματισμού που μπορεί να εκτελεί κύκλους θέρμανσης και ψύξης μόνος του. Τα στάδια αυτά είναι κατά σειρά η αποδιάταξη, ο υβριδισμός, και η σύνθεση αντιγράφων DNA.

a) Αποδιάταξη

Αρχικά γίνεται διάσπαση του δίκλωνου DNA όπου το υπόστρωμα του DNA στόχου επωάζεται σε υψηλή θερμοκρασία περί τους 94-96°C. Σαν

αποτέλεσμα, σπάνε οι δεσμοί υδρογόνου που συνδέουν τις δύο πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες και τα μονόκλινα εκμαγεία που δημιουργούνται χρησιμεύουν ως μήτρες για την σύνθεση νέων συμπληρωματικών αλυσίδων

a) Υβριδισμός

Στο στάδιο αυτό γίνεται υβριδισμός των εκκινητών στο DNA στόχο (primer annealing). Οι εκκινητές (primers) είναι μικρά τμήματα ολιγονουκλεοτιδίων 15-30 βάσεων τα οποία προσδένονται λόγω συμπληρωματικότητας στις θέσεις έναρξης της αντιγραφής του DNA και είναι απαραίτητα για να ξεκινήσει η σύνθεση της αλυσίδας. Για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση σύνδεσης των εκκινητών με την συμπληρωματική αλληλουχία, είναι απαραίτητη η μείωση της θερμοκρασίας στους 40-60°C (εκεί κυμαίνεται η θερμοκρασία τήξης του εκκινητή).

a) Σύνθεση αντιγράφων DNA

Μετά την υβριδοποίηση των εκκινητών, ακολουθεί η επιμήκυνσή τους, όπου σε θερμοκρασία 72-74°C γίνεται σύνθεση DNA με βάση την συμπληρωματική αλληλουχία του υποστρώματος, από την Taq πολυμεράση. Η Taq πολυμεράση είναι μια DNA πολυμεράση που απομονώθηκε από το βακτήριο *Thermus aquaticus* και η ενζυμική δραστηριότητά της είναι 800 bp/min στους 75°C καθώς επίσης έχει διάρκεια ημιζωής περίπου 40 λεπτά στους 95°C. Η Taq πολυμεράση παρουσιάζει τις εξής ιδιότητες. Χρησιμοποιεί τις μονόκλινες αλυσίδες DNA ως μήτρα και επιμηκώνει τους εκκινητές. Επίσης δεν μετουσιώνεται κατά την διαδικασία της αποδιάταξης με αποτέλεσμα να μην είναι αναγκαία η προσθήκη πολυμεράσης σε κάθε νέο κύκλο. Έτσι λοιπόν, με

το τέλος της διεργασίας, θα έχουν παραχθεί δύο καινούριες αλυσίδες DNA πανομοιότυπες με την αρχική (μητρική).

Τα παραπάνω στάδια, πραγματοποιούνται σε κάθε θερμικό κύκλο όπου με κάθε τέλος του, διπλασιάζεται το προϊόν του προηγούμενου κύκλου. Οι κύκλοι που εκτελούνται σε μια PCR είναι περιορισμένοι και αυτό γιατί η παραγωγικότητα των κύκλων αντιγραφής μειώνεται λόγω εξάντλησης των εκκινητών και νουκλεοτιδίων, καθώς και μειωμένης ενζυμικής δραστηριότητας της Taq πολυμεράσης. Σαν κανόνας ισχύει ότι αν ο αριθμός των κύκλων είναι n , τότε η ποσότητα του DNA που αντιγράφεται είναι 2^n .

Για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση της PCR απαιτούνται ορισμένα αντιδραστήρια, για την *in vitro* αντιγραφή του DNA.

- **DNA στόχος:** για την επιτυχία της PCR θα πρέπει η αλληλουχία που θέλουμε να αντιγράψουμε, να είναι ακέραια.
- **Εκκινητές (primers):** Είναι ολιγονουκλεοτίδια συμπληρωματικά ως προς τα 5' και 3' άκρα των μονόκλωνων αλυσίδων DNA που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε. Για τον επιτυχή υβριδισμό των εκκινητών πρέπει να υπάρχει πλήρης ταύτιση με το DNA στόχο και καμία ομοιότητα με άλλες περιοχές – μη στόχους του DNA
- **Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs):** Είναι τα ουσιώδη δομικά στοιχεία για την δημιουργία αλυσίδων DNA (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) και πρέπει να βρίσκονται σε ίσες ποσότητες στο μίγμα για τη αποφυγή σφαλμάτων κατά την αντιγραφή.

- **DNA πολυμεράση:** Για την δράση του ενζύμου απαιτείται το μονόκλωνο πρότυπο-DNA και τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια. Η κατεύθυνση της σύνθεσης της νέας αλυσίδας είναι 5' – 3' .
- **Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer solution):** Διάλυμα αποτελούμενο από ορισμένα συστατικά για την βελτίωση και τη σταθερότητα της DNA πολυμεράσης. Τα συστατικά αυτά είναι : NaCl ή KCl (διευκόλυνση της ένωσης των εκκινητών στο DNA και ενίσχυση της DNA Taq πολυμεράσης), tris-HCl με pH 8,3 (20°C) διότι με αύξηση της θερμοκρασίας κατά την αντίδραση το pH κυμαίνεται μεταξύ 6,8 – 7,8 , ενώ η βέλτιστη δραστηριότητα της Taq πολυμεράσης είναι λίγο πάνω από το 8. Επίσης υπάρχουν ιόντα Mg^{++} , που επηρεάζουν τον υβριδισμό των εκκινητών, τη θερμοκρασία αποδιάταξης του DNA και την εξειδίκευση της πολυμεράσης, καθώς και μη ιοντικές επιφανειοδραστικές ουσίες (Tween 20 και TritonX-100), ζελατίνη ή ορολευκωματική (bovineserumalbumin-BSA) απαραίτητες για την δραστηριότητα του ενζύμου και μεγαλύτερη παραγωγή αμπλικονίου (προϊόν πολλαπλασιασμού).

Αν και η τεχνική PCR έχει πλέον ημιαυτοματοποιηθεί, απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή, ειδικό εργαστηριακό εξοπλισμό και ένα βαθμό δεξιότητας για την προετοιμασία του δείγματος και την επιτυχία της διεργασίας ανίχνευσης του DNA.

Πίνακας 9 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμημάτων DNA

Εκκινητής	Αλληλουχία
12SrRNA R	5'-GAG GGT GAC GGG CGG TGT GT-3'
12SrRNA F	5'-CAA ACT GGG ATT AGA TAC CCC ACT AT-3'

Για την διαδικασία της PCR αρχικά παρασκευάζεται ένα διάλυμα (mix) το οποίο θα περιέχει , ανά δείγμα , τις ποσότητες αντιδραστηρίων που παρουσιάζονται στον πίνακα 10 . Το διάλυμα παρασκευάζεται ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων . Έπειτα τοποθετούμε σε φιαλίδια erpendorf 10μl DNA. Ο συνολικός όγκος είναι 50 μl.

Πίνακας 10 Συστατικά αντίδρασης PCR για 7 δείγματα και ένα αρνητικό δείγμα

Αντιδραστήρια	Ποσότητες (ανά φιαλίδιο)
DNA	10μl
ddH ₂ O	13μl
Primer F	1μl
Primer R	1μl
Mix PCR	25μl

Στη συνέχεια μοιράζουμε σε κάθε erpendorf 40μl από το παραπάνω mix και 10μl DNA. Επίσης , σε ένα erpendorf δεν βάζουμε DNA καθώς αυτό αποτελεί τον μάρτυρα μας (Negative) . Τέλος τοποθετούμε τα δείγματα

στον θερμοκυκλοποιητή ο οποίος προγραμματίζεται να εκτελέσει το επιθυμητό πρόγραμμα θερμοκρασίας /χρόνου.

- Αρχική αποδιάταξη: 96°C για 4 min
- Αποδιάταξη: 94°C για 30 sec
- Υβριδοποίηση: 63°C για 30 sec
- Επιμήκυνση: 72°C για 30 sec
- Τελική επιμήκυνση: 72°C για 7 min

Μετά το πέρας της PCR γίνεται ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, για να ελέγξουμε την επιτυχία της διαδικασίας, όπως αναφέραμε προηγουμένως στην παράγραφο για την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.

2.6. Τυχαίως πολλαπλασιαζόμενα πολυμορφικά τμήματα (Random Amplified Polymorphic DNA-RAPDs)

Η μέθοδος του τυχαίου ενισχυμένου πολυμορφικού DNA (random amplification of polymorphic DNA RAPD) είναι ένα είδος PCR όπου τα τμήματα του DNA πολλαπλασιάζονται με τη χρήση τυχαίων εκκινήτων, συνήθως δεκαμερών, και ένα μόνο εκκίνητο ανά αντίδραση. Τα αντιγραφόμενα τμήματα του DNA δημιουργούνται μόνο στις περιοχές του γονιδιωματός που υβριδίζει ο εκκίνητος. Το μικρό μέγεθος του εκκινήτου του δίνει τη δυνατότητα να υβριδίζει σε εκατοντάδες θέσεις μέσα στο γονιδίωμα, και έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή και εμφάνιση ζωνών μετά από PCR.

Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR είναι τέτοιες ώστε να μπορούν να εμφανιστούν μέχρι και 20 ζώνες. Η ικανότητα αυτή των RAPD να παράγουν πολλαπλές ζώνες χρησιμοποιώντας έναν εκκίνητο έχει ως αποτέλεσμα την άμεση και ταχεία εξέταση και εκτίμηση πολλαπλών γενετικών τόπων με τη χρήση μόνο μερικών εκκινήτων σε ανεξάρτητες αντιδράσεις PCR.

Επιπρόσθετα, η μεθοδολογία RAPD είναι πολύ αποτελεσματική όχι μόνο ως προς τη σάρωση πληθυσμών και στην εύρεση ποικιλομορφίας της αλληλουχίας, αλλά επίσης και όταν αυτή χρησιμοποιείται για την εύρεση μοριακών δεικτών σε εξειδικευμένες περιοχές του γονιδιωματός.

Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι εξής εκκινήτες AGGACGCCTTCCGATACATG και CAGAAGGTCTTGGAGATGGC.

Για την διαδικασία της RAPD αρχικά παρασκευάζεται ένα διάλυμα (mix) το οποίο θα περιέχει, ανά δείγμα, τις ποσότητες αντιδραστηρίων που παρουσιάζονται στον πίνακα 11. Το διάλυμα παρασκευάζεται ανάλογα

με τον αριθμό των δειγμάτων . Έπειτα τοποθετούμε σε φιαλίδια erpendorf 10μl DNA. Ο συνολικός όγκος είναι 50 μl.

Πίνακας 11 Συστατικά διαδικασίας RAPD (7 δείγματα και 1 μάρτυρας)

Αντιδραστήρια	Ποσότητες(ανά φιαλίδιο)
DNA	10 μl
Primer 1	1,5 μl
Primer 2	1,5 μl
ddH ₂ O	12 μl
Mix	25 μl

Στη συνέχεια μοιράζουμε σε κάθε erpendorf 40μl από το παραπάνω mix και 10μl DNA. Επίσης , σε ένα erpendorf δεν βάζουμε DNA καθώς αυτό αποτελεί τον μάρτυρα μας (Negative) . Τέλος τοποθετούμε τα δείγματα στον θερμοκυκλοποιητή ο οποίος προγραμματίζεται να εκτελέσει το επιθυμητό πρόγραμμα θερμοκρασίας /χρόνου.

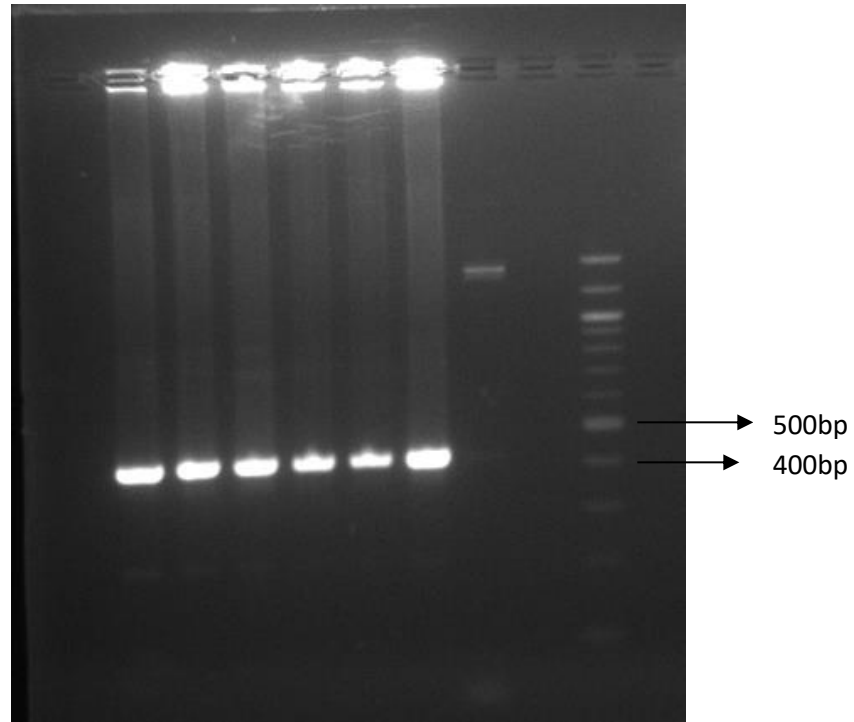
- I. μετουσίωση κλώνου στους 94°C για 1 min
- II. ανόπτωση εκκινήτη στους 47°C για 1 min
- III. επιμήκυνση εκκινήτη στους 72°C για 1 min

Μετά το πέρας της RAPD γίνεται ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, για να ελέγξουμε την επιτυχία της διαδικασίας,

όπως αναφέραμε προηγουμένως στην παράγραφο για την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.

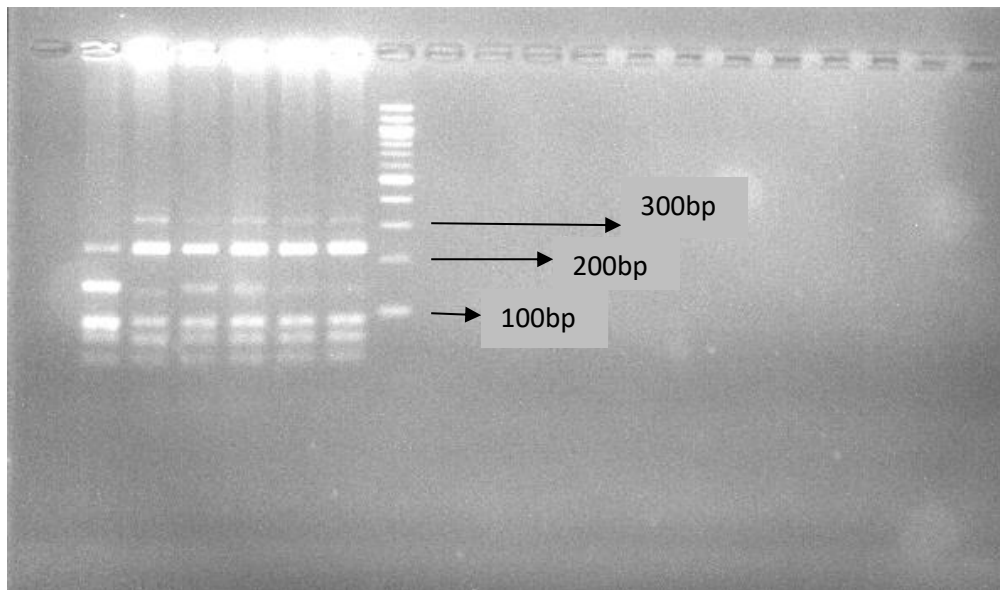
3. Αποτελέσματα

Για τη πραγματοποίηση της μεθόδου PCR χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα που αναφέρονται στο πίνακα 4 , με τη διαδικασία που αναφέρθηκε σε προηγούμενη ενότητα . Έπειτα, από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% εξήχθησαν τα παρακάτω αποτελέσματα.



Εικόνα4 Ηλεκτροφόρηση PCR (δείγματα του πίνακα 4) σε πηκτή αгарόζης.

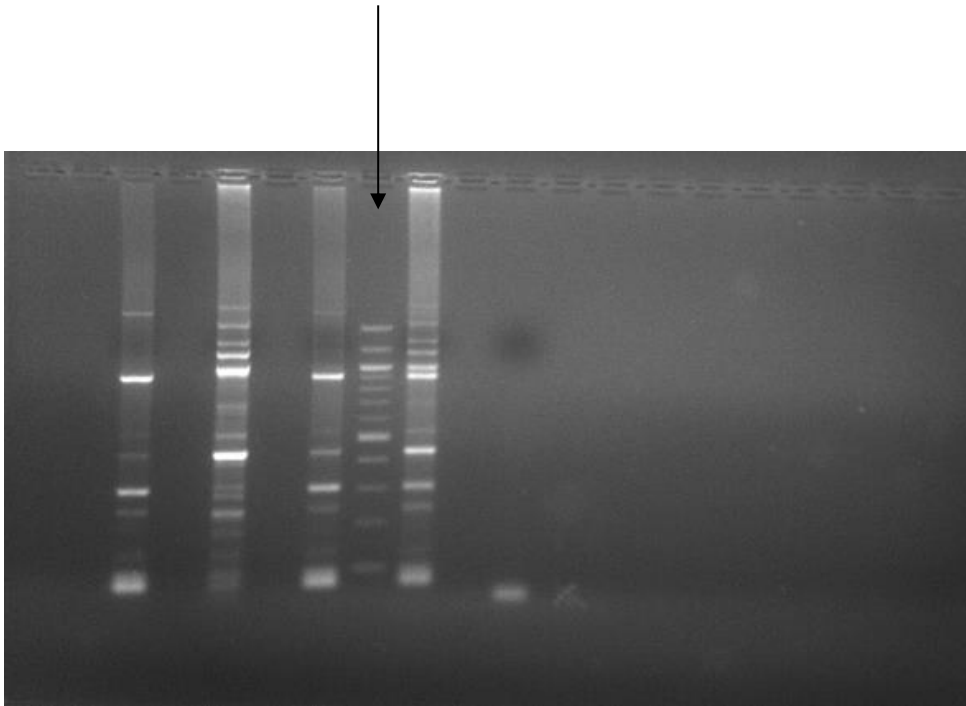
Στη συνέχεια , χρησιμοποιώντας το προϊόν PCR των δειγμάτων του πίνακα 4 , προστέθηκε το περιοριστικό ένζυμο *Acil* . Έπειτα, από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% εξήχθησαν τα παρακάτω αποτελέσματα.



Εικόνα 5 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR με περιοριστικό ένζυμο σε πηκτή αγαρόζης .(Πίνακας 4)

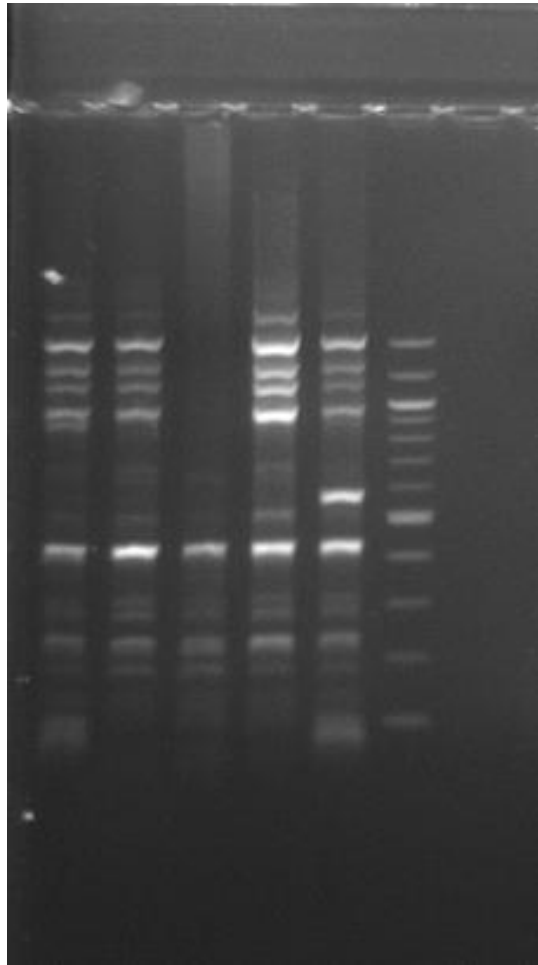
Επιπλέον , στα δείγματα του πίνακα 4 και συγκεκριμένα στα K1 , Γ1, M3, M5 εφαρμόστηκε η μέθοδος RAPD . Έπειτα, από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% εξαχθήκαν, τα παρακάτω αποτελέσματα.

Ladder ανά
100bp



Εικόνα 6 Ηλεκτροφόρηση της μεθόδου RAPD (δείγματα του πίνακα 4)

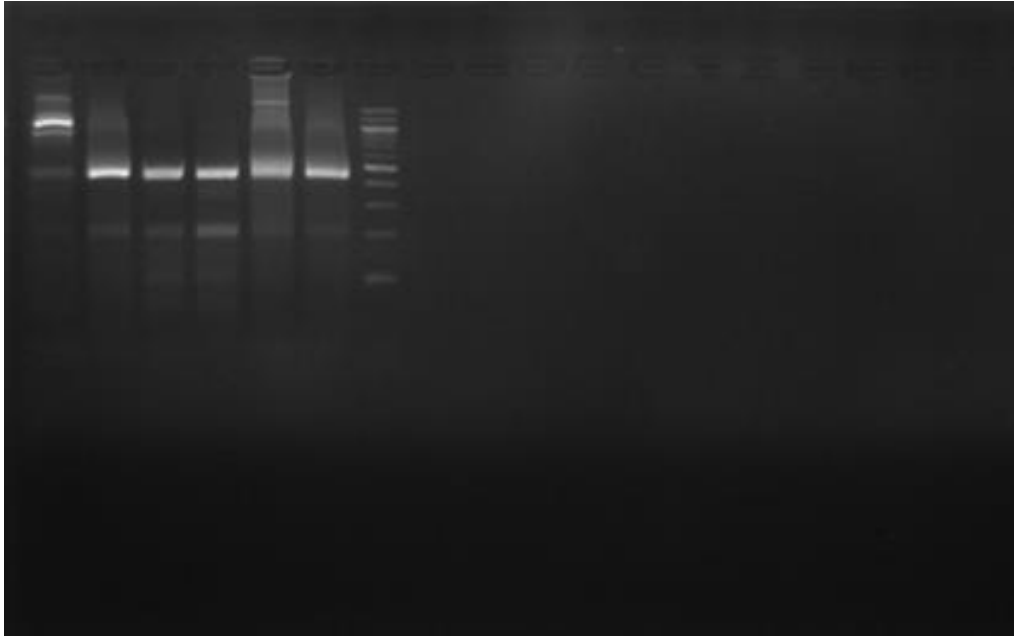
Στη δεύτερη φάση του πειράματος αναλύθηκαν δείγματα του εμπορίου όπου αναφέρονται στο πίνακα 5.



Εικόνα 7 Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων εμπορίου (πίνακας 5) της μεθόδου RAPD σε πήκτωμα αγαρόζης 2%

Negative

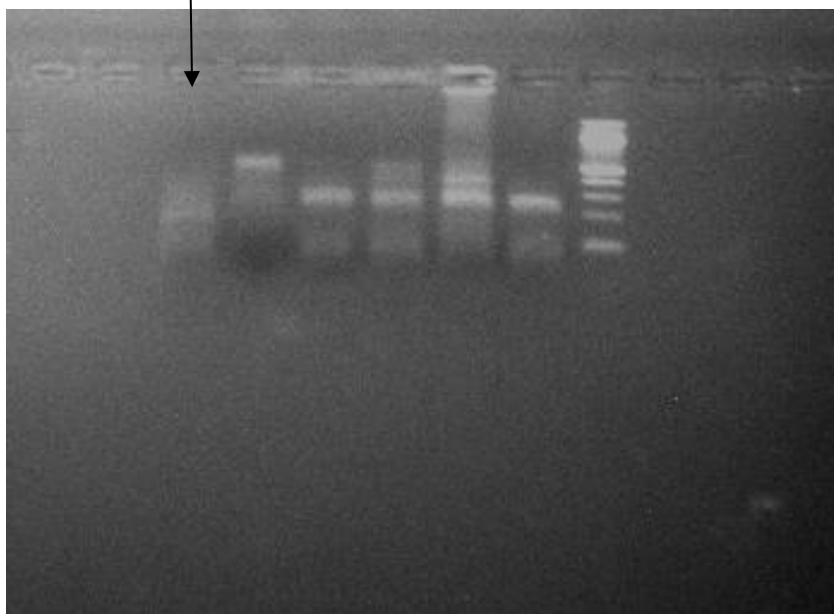




Εικόνα 8 Ηλεκτροφόρηση PCR (δείγματα του πίνακα 5) .

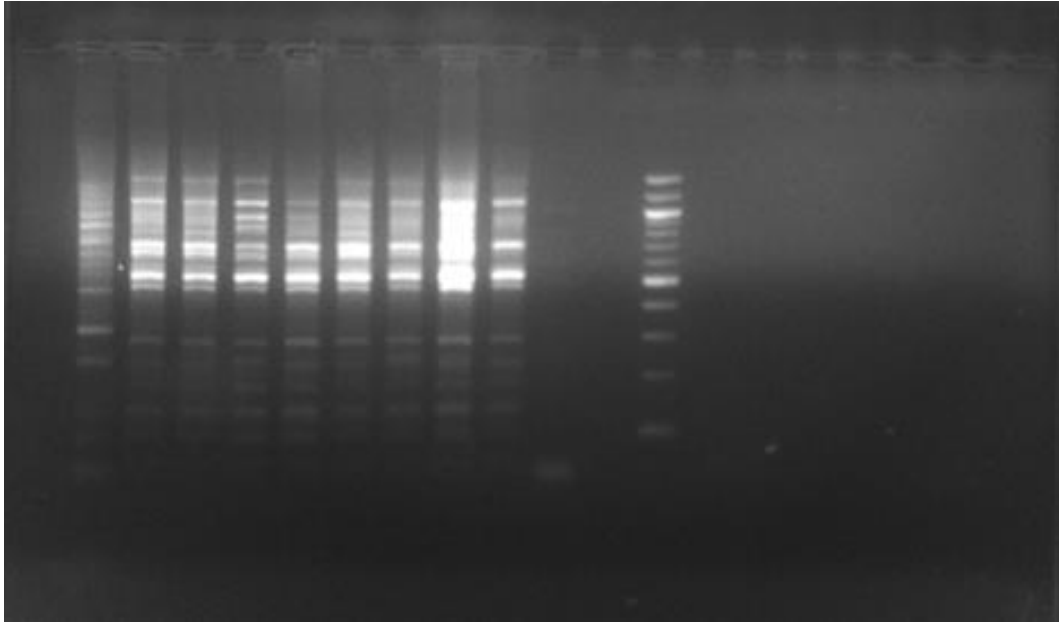
Κατά την εκτέλεση του πειράματος της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιήθηκε πειραματικό σφάλμα με αποτέλεσμα την επιμόλυνση του αρνητικού δείγματος όπως φαίνεται παραπάνω (πρώτο δείγμα) .

Negative

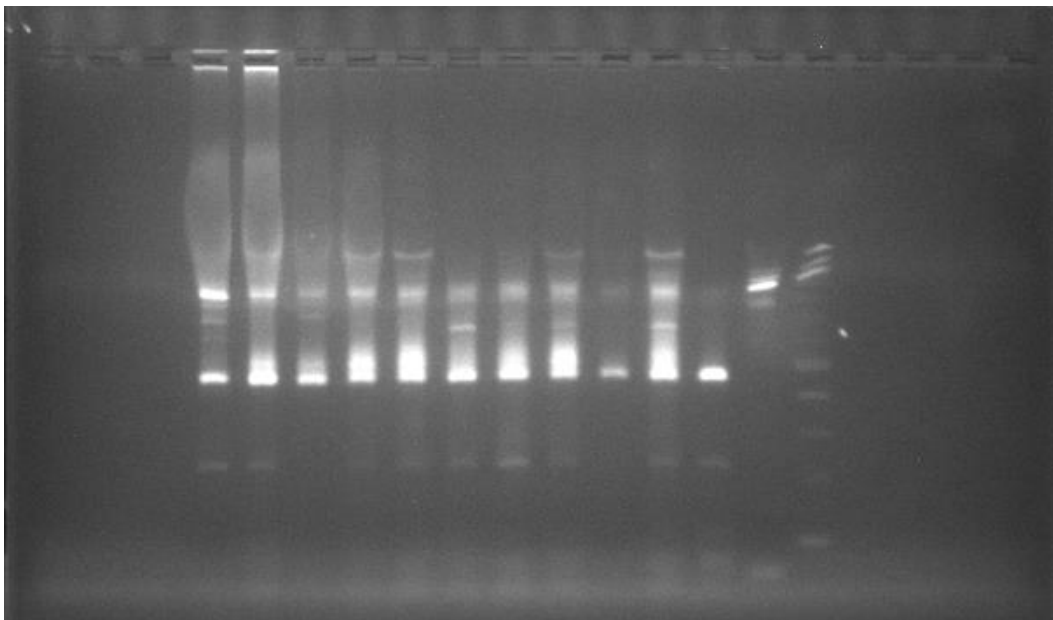


Εικόνα 9 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR με περιοριστικό ενζυμο σε πηκτή αγαρόζης .(Πίνακας 5)

Στη τελευταία φάση του πειράματος αναλύθηκαν δείγματα εμπορίου (πίνακας 6) και δείγμα χοιρινού κρέατος .

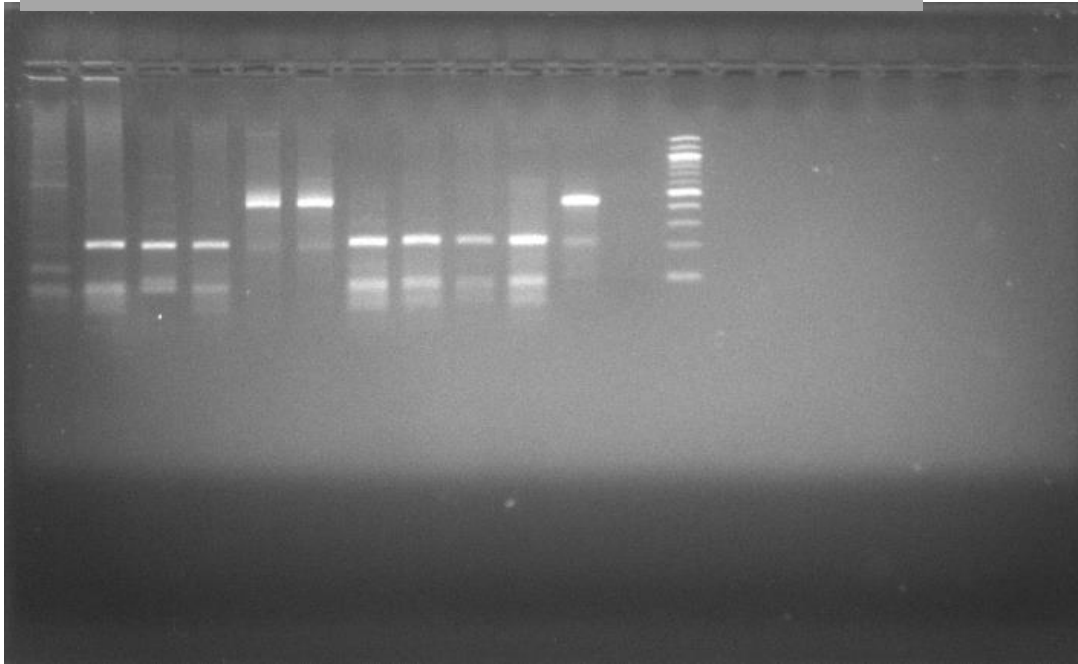


Εικόνα 11 Ηλεκτροφόρηση RAPD (δείγματα πίνακας 6)



Εικόνα 10 Ηλεκτροφόρηση PCR (δείγματα του πίνακα 6) .

K2 Γ2 P1 P2 P3 P4 P5 P6 P7 P8 P9 N Ladder ανά 100 bp



Εικόνα 12 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR με περιοριστικό ενζυμο σε πηκτή αγαρόζης .(Πίνακας 6)

4. Συζήτηση

Στη σύγχρονη κοινωνία , το κρέας και τα προϊόντα με βάση το κρέας αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι του καθημερινού διαιτολογίου του μέσου καταναλωτή. Τα τελευταία χρόνια , η κατανάλωση κρέατος αυξάνεται ολοένα και περισσότερο λόγω διαφόρων παραγόντων όπως η αύξηση του βιοτικού επιπέδου καθώς και των σύγχρονων διατροφικών συνηθειών του ανθρώπου . Αυτό έχει ως αποτέλεσμα πολλές φορές επιχειρήσεις που ασχολούνται με τη βιομηχανία κρέατος να χρησιμοποιούν μη ορθές πρακτικές με σκοπό το κέρδος όπως η αντικατάσταση κρέατος υψηλής εμπορικής αξίας με φθηνά υποκατάστατα και η παραπλανητική επισήμανση των ειδών.

Στη παρούσα μελέτη , εφαρμόστηκαν μοριακές τεχνικές με στόχο την μοριακή ταυτοποίηση διαφόρων ειδών κρέατος σε αλλαντικά γαλοπούλας. Πιο συγκεκριμένα , χρησιμοποιήθηκαν δυο μέθοδοι ανάλυσης του DNA , η PCR-RFLP τεχνική ανάλυση του μιτοχονδρίου 12s r RNA γονιδίου για ταυτοποίηση του κρέατος και των προϊόντων του καθώς και η μέθοδος RAPD-PCR. Οι τεχνικές αυτές ήταν αρκετά γρήγορες , οικονομικές και αξιόπιστες . Τα αποτελέσματα ήταν αρκετά ικανοποιητικά καθώς οι ζώνες ήταν σε μεγάλο βαθμό ευδιάκριτες.

Αναλύοντας τα αποτελέσματα , παρατηρούμε ότι το δείγμα P5 πιθανόν να είναι νοθευμένο με κοτόπουλο σε χαμηλό ποσοστό καθώς διακρίνεται μια αχνή ζώνη συγκρινόμενη με το δείγμα K2 . Επιπλέον , παρατηρείται μια ζώνη στα δείγματα P3 , P4 , P9 αρκετά υψηλότερη της αναμενόμενης λόγω πιθανού πειραματικού σφάλματος ή πιθανής νοθείας με κάποιο είδος κρέατος που δεν έχει ερευνηθεί στη παρούσα πτυχιακή μελέτη .

Βιβλιογραφία

Ξένη βιβλιογραφία

Pereira, P. M. D. C. C., & Vicente, A. F. D. R. B. (2013). Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet. *Meat science*, 93(3), 586-592.

Salter, A. (2018). The effects of meat consumption on global health. *Scientific and Technical Review*, 37(1).

Scollan, N. D., Price, E. M., Morgan, S. A., Huws, S. A., & Shingfield, K. J. (2017). Can we improve the nutritional quality of meat?. *Proceedings of the Nutrition Society*, 76(4), 603-618.

European Parliament. (2004). Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for on the hygiene of foodstuffs. *Off. J. Eur. Union*, 47, 139-206.

Nikolovska, R. C., Angeleska, A., Nikolovski, A., Dimitrievska, E. S., Treneska, V. P., & Sekovska, B. (2019). Detecting meat fraud in food supply chain. *Western Balkan Journal of Agricultural Economics and Rural Development (WBJAERD)*, 1(2322-2020-608), 125-133.

Williams, P. (2007). Nutritional composition of red meat. *Nutrition & Dietetics*, 64, S113-S119.

Calvo, J. H., Zaragoza, P., & Osta, R. (2001). Random amplified polymorphic DNA fingerprints for identification of species in poultry pate. *Poultry Science*, *80*(4), 522-524.

Ismail A. Abdul-Hassan and 2Ghufran J. Al-Aqeeli (2013) PCR-RFLP analysis of mitochondrial 12s r rna gene for identification of meat and meat products in some avian species

PARA PA, G. S., Wakchaure, R., Sharma, R., Mahajan, T., & Praveen, P. K. (2015). Rabbit meat has the potential of being a possible alternative to other meats as a protein source: A brief review. *Int J Phar Biomed Res*, *2*, 17-19.

Wu, G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids* **37**, 1–17 (2009).

Elango R, Ball RO, Pencharz PB. Amino acid requirements in humans: with a special emphasis on the metabolic availability of amino acids. *Amino Acids*. 2009 May;*37*(1):19-27. doi: 10.1007/s00726-009-0234-y. Epub 2009 Jan 21. PMID: 19156481.

Gerber N, Scheeder MR, Wenk C. The influence of cooking and fat trimming on the actual nutrient intake from meat. *Meat Sci*. 2009 Jan;*81*(1):148-54. doi: 10.1016/j.meatsci.2008.07.012. Epub 2008 Jul 19. PMID: 22063975.

Ono, K., Berry, B. W., & Paroczay, E. (1985). Contents and retention of nutrients in extra lean, lean and regular ground beef. *Journal of Food Science*, 50(3), 701-706.

Sally Grantham-McGregor, Cornelius Ani, A Review of Studies on the Effect of Iron Deficiency on Cognitive Development in Children, *The Journal of Nutrition*, Volume 131, Issue 2, February 2001, Pages 649S–668S, <https://doi.org/10.1093/jn/131.2.649S>

Hurrell, R., & Egli, I. (2010). Iron bioavailability and dietary reference values. *The American journal of clinical nutrition*, 91(5), 1461S-1467S.

Simpson RJ, McKie AT. Regulation of intestinal iron absorption: the mucosa takes control? *Cell Metab*. 2009 Aug;10(2):84-7. doi: 10.1016/j.cmet.2009.06.009. PMID: 19656486.

Turhan, S., Altunkaynak, T. B., & Yazici, F. (2004). A note on the total and heme iron contents of ready-to-eat doner kebabs. *Meat Science*, 67(2), 191-194.

Kongkachuichai, R., Napatthalung, P., & Charoensiri, R. (2002). Heme and nonheme iron content of animal products commonly consumed in Thailand. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15(4), 389-398.

Mills, K. C., & Curry, S. C. (1994). Acute iron poisoning. *Emergency medicine clinics of North America*, 12(2), 397-413.

Balder, H. F., Vogel, J., Jansen, M. C., Weijenberg, M. P., van den Brandt, P. A., Westenbrink, S., ... & Goldbohm, R. A. (2006). Heme and chlorophyll intake and risk of colorectal cancer in the Netherlands cohort study. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 15(4), 717-725.

Green, Ralph and Miller, Joshua W.. "Vitamin B12 deficiency is the dominant nutritional cause of hyperhomocysteinemia in a folic acid-fortified population" *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, vol. 43, no. 10, 2005, pp. 1048-1051.
<https://doi.org/10.1515/CCLM.2005.183>

Εικόνα 1

https://ourworldindata.org/grapher/per-capita-meat-type?country=CHN~USA~IND~ARG~PRT~ETH~JPN~GBR~BRA~OWID_WRL

Εικόνα 2

<https://www.mappr.co/thematic-maps/meat-consumption-by-countries/>

Ελληνική Βιβλιογραφία

Ραμαντάνης Σ. , (2020). Τεχνολογία κρέατος και προϊόντων του . Θεσσαλονικη : Εκδόσεις Συγχρονη Παιδεία

Αικατερίνη Χαρβάλου , Δήμητρα Χούχουλα (2020). Εισαγωγή στις Αρχές της Μοριακής Βιολογίας και Διαγνωστική Πρακτική. Εκδόσεις Τσότρας.

