



Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής
Σχολή Επιστημών Τροφίμων
Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ημιποσοτικός προσδιορισμός μαλακού σίτου σε σκληρό σίτο με real time pcr για έλεγχο νοθείας στην ελληνική αγορά ζυμαρικών

MSc Thesis

**Semiquantitative determination of common wheat in durum wheat
with real time pcr for adulteration test in the greek pasta market**

ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ/NAME OF STUDENT

Λάζαρος Φούντας

Lazaros Fountas

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

Δήμητρα Χούχουλα

Dimitra Houhoula

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2023



Faculty of Food Sciences
Department of Food Science and Technology

Master of Science
FOOD INNOVATION, QUALITY AND SAFETY

MSc THESIS

**Semiquantitative determination of common wheat in durum wheat
with real time pcr for adulteration test in the greek pasta market**

FOUNTAS LAZAROS
21030
lafountas@gmail.com

SUPERVISOR
HOUHOULA DIMITRA

AIGALEO 2023

Επιτροπή Αξιολόγησης Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας

Οι υπογράφωντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία (master thesis) με τίτλο **“Ημιοσοτικός προσδιορισμός μαλακού σίτου σε σκληρό σίτο με real time pcr για έλεγχο νοθείας στην ελληνική αγορά ζυμαρικών”** που παρουσιάστηκε από τον **ΦΟΥΝΤΑ ΛΑΖΑΡΟ**, υποψηφίου για τον μεταπτυχιακό τίτλο σπουδών στην **ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ** και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

Ημερομηνία

Χούχουλα Δήμητρα

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια (Επιβλέπουσα)

Γιαννακούρου Μαρία

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια (Μέλος Επιτροπής)

Λάζου Ανδριάννα

Επίκουρη Καθηγήτρια (Μέλος Επιτροπής)

Δήλωση περί λογοκλοπής/Copyright

Έχοντας πλήρη επίγνωση των συνεπειών του νόμου περί πνευματικής ιδιοκτησίας, δηλώνω ότι είμαι αποκλειστικός συγγραφέας της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Δηλώνω, επίσης, ότι αναλαμβάνω όλες τις συνέπειες, όπως αυτές νομίμως ορίζονται, στην περίπτωση που διαπιστωθεί διαχρονικά ότι η εργασία μου αυτή ή τμήμα αυτής αποτελεί προϊόν λογοκλοπής.

Φούντας Λάζαρος



Ευχαριστίες

Στην επιβλέπουσα Καθηγήτρια, κυρία Χούχουλα Δήμητρα εκφράζω τις θερμές ευχαριστίες μου για την εμπιστοσύνη, καθοδήγηση και το χρόνο που αφιέρωσε προκειμένου να ολοκληρωθεί με τον πληρέστερο τρόπο αυτή η εργασία. Θέλω επίσης να την ευχαριστήσω για την πολύ καλή συνεννόηση και την φιλική συνεργασία, που βοήθησαν στην αντιμετώπιση όλων των δυσκολιών.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους υπόλοιπους Καθηγητές της επιτροπής αξιολόγησης, κα Γιαννακούρου και κα Λάζου, για τον κόπο που κατέβαλαν κατά την αξιολόγηση της διατριβής.

Οφείλω να ευχαριστήσω τον αείμνηστο Πέτρο Πασχάλη πρώην ιδιοκτήτη των Εργαστηρίων AGENT και πρώην εργοδότη μου που μου επέτρεψε και διευκόλυνε την παρακολούθηση του μεταπτυχιακού προγράμματος αλλά και επέτρεψε την χρήση εξοπλισμού της AGENT για την πραγματοποίηση πειραμάτων της διπλωματικής εργασίας.

Θα ήταν παράβλεψη να μην ευχαριστήσω την κα Ευανθία Παπαπαύλου, για τη υποστήριξη, φιλική συνεργασία και προθυμία της να αντιμετωπιστούν τα προβλήματα καθ' όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος.

Τέλος θέλω να ευχαριστήσω την σύζυγο και την κόρη μου για την αμέριστη συμπαράσταση και υπομονή που επέδειξαν σε όλη τη διάρκεια αυτού του μεταπτυχιακού.

*Αφιερώνεται στην
Μαργαρίτα και την Ειρήνη*

Περίληψη

Τα ζυμαρικά σίτου φτιάχνονται κυρίως από σκληρό σιτάρι και αποτελούν σημαντικό κομμάτι της σύγχρονης διατροφής του ανθρώπου παγκοσμίως. Τα τυποποιημένα ζυμαρικά που αναφέρουν στην ετικέτα προϊόντος ότι φτιάχνονται από σκληρό σίτο (*Triticum durum*) οφείλουν, σύμφωνα με την νομοθεσία της Ελλάδας και άλλων χωρών, να φτιάχνονται αποκλειστικά από σιμιγδάλι ή άλευρο σκληρού σίτου. Εντούτοις, είναι πιθανό να λάβει χώρα νοθεία των ζυμαρικών σκληρού σίτου με το χαμηλότερης αξίας άλευρο μαλακού σίτου (*Triticum aestivum*). Στα πλαίσια αυτά και για τον έλεγχο κάθε απόπειρας νοθείας αναπτύχθηκαν τις τελευταίες δεκαετίες διάφορες μέθοδοι για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό του μαλακού σίτου σε ζυμαρικά σκληρού σίτου, όπως οι ανοσοχημικές, οι φασματοσκοπικές και οι μοριακές.

Σκοπός της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας, ήταν αρχικά η ανάπτυξη μιας μοριακής μεθόδου για την ανίχνευση και τον ημιποσοτικό προσδιορισμό του μαλακού σίτου σε δείγματα ζυμαρικών σκληρού σίτου. Μετά την ανάπτυξη της μεθόδου και την επαλήθευση της καταλληλότητας της, εφαρμόστηκε σε 27 δείγματα διαφόρων τύπων ζυμαρικών σκληρού σίτου της ελληνικής αγοράς λιανεμπορίου, προκειμένου να γίνει έλεγχος πιθανής νοθείας τους με μαλακό σίτο σε ποσοστό μεγαλύτερο του 3% w/w ως προς τον σκληρό σίτο των ζυμαρικών.

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε για την επίτευξη του παραπάνω σκοπού περιλαμβάνει αρχικά την απομόνωση του DNA με το εμπορικό kit Nucleospin Food (Macherey – Nagel) και ακολούθως εφαρμογή της τεχνικής της Real Time PCR για την ανίχνευση και τον ημιποσοτικό προσδιορισμό του μαλακού σίτου στα 27 δείγματα ζυμαρικών που επιλέχθηκαν για την συγκεκριμένη ερευνητική εργασία.

Με την χρήση του Nucleospin Food kit απομονώθηκε από τα δείγματα επαρκής ποσότητα DNA υψηλής καθαρότητας χωρίς την παρουσία παρεμποδιστών. Ακολούθως, η μέθοδος της Real Time PCR είχε ευαισθησία και εξειδίκευση 100%, ενώ η επαναληψιμότητα και η αναπαραγωγικότητα είχαν RSD% μικρότερη του 5%. Από την ανάλυση των δειγμάτων προέκυψε ότι και στα 27 δείγματα ζυμαρικών ανιχνεύθηκε η παρουσία μαλακού σίτου αλλά σε όλα το ποσοστό μαλακού σίτου ήταν μικρότερο του 3%. Πιο αναλυτικά, 2 δείγματα περιείχαν μαλακό σίτο σε ποσοστό μικρότερο του 3% και μεγαλύτερο του 1%, ενώ τα υπόλοιπα 25 δείγματα περιείχαν μαλακό σίτο σε ποσοστό μικρότερο του 1%.

Η μέθοδος που εφαρμόστηκε αποδείχτηκε κατάλληλη (fit for purpose) για τον ημιποσοτικό προσδιορισμό σε ζυμαρικά. Από την μελέτη των 27 δειγμάτων ζυμαρικών δεν διαπιστώθηκε στην Ελληνική αγορά ζυμαρικών εσκεμμένη νοθεία με μαλακό σίτο σε ποσοστό μεγαλύτερο του 3%. Η μέθοδος του ημιποσοτικού προσδιορισμού είναι αξιόπιστη, γρήγορη και χαμηλού κόστους συγκριτικά με άλλες χημικές αλλά και μοριακές μεθόδους. Τέλος θα πρέπει να τονισθεί ότι η καταπολέμηση της νοθείας των ζυμαρικών και παράλληλα η προστασία των καταναλωτών, απαιτεί τον διαρκή και συστηματικό έλεγχο της ελληνικής λιανικής αγοράς.

Abstract

Wheat pasta are mainly made from durum wheat and are an important part of the modern human diet worldwide. Commercial pasta products that state on the product label that they are made from durum wheat (*Triticum durum*) must, according to the legislation of Greece and other countries, be made exclusively from durum wheat semolina or flour. However, adulteration of durum wheat pasta with the lower value soft wheat (*Triticum aestivum*) flour may take place. In this context and in order to detect any attempted adulteration, various methods for the detection and quantification of common wheat in durum wheat pasta have been developed in recent decades, such as immunochemical, spectroscopic and molecular methods.

The aim of the MSc thesis was firstly to develop a molecular method for the detection and semiquantitative determination of soft wheat in durum wheat pasta samples. After the method was developed and verified as fit for purpose, it was applied to 27 samples of various types of pasta from the Greek retail market, in order to check for possible adulteration with soft wheat.

The method developed and applied in order to achieve the above objective, includes firstly the isolation of DNA with the commercial Nucleospin Food kit (Macherey - Nagel) and then the application of the Real Time PCR technique for the detection and semiquantitative determination of common wheat in 27 pasta samples selected for this research work.

The use of the Nucleospin Food Kit allowed the isolation of sufficient amount and high purity DNA from the samples, without the presence of inhibitors. The Real Time PCR method was 100% sensitive and specific, while repeatability and reproducibility showed RSD% less than 5%. The analysis of the samples showed that soft wheat was detected in all 27 samples of pasta but the percentage was less than 3%. More specifically, 2 samples contained soft wheat in a percentage less than 3% and more than 1%, while the remaining 25 samples contained soft wheat below 1% w/w.

The method applied proved to be fit for purpose for the semiquantitative determination of soft wheat in pasta. From the study of 27 pasta sample, no deliberate adulteration with soft wheat, at a percentage greater than 3%, was found in the Greek pasta market. The method of semiquantitative determination is reliable, fast and low cost compared to other chemical and molecular quantitative methods. Finally, it should be emphasized that the fight against pasta adulteration and the protection of consumers requires the continuous and systematic monitoring of the Greek retail market.

Περιεχόμενα

Δήλωση περί λογοκλοπής	iii
Ευχαριστίες.....	iv
Αφιερώσεις.....	v
Περίληψη.....	vi
Abstract	vii
Κατάλογος Πινάκων.....	x
Κατάλογος Εικόνων.....	xi
Κατάλογος Σχημάτων.....	xi
Κατάλογος Διαγραμμάτων.....	xii
Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή	1
Κεφάλαιο 2: Θεωρητικό υπόβαθρο.....	3
2.1. Σίτος και ζυμαρικά.....	3
2.2. Προέλευση και γενετική εξέλιξη του σίτου. Γενετικές διαφορές μεταξύ μαλακού και σκληρού σίτου.....	5
2.3. Νοθεία ζυμαρικών σκληρού σίτου με μαλακό σίτο και νομοθεσία.....	7
2.4. Τεχνικές ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης μαλακού σίτου σε σκληρό σίτο.....	9
2.5. Μελέτες νοθείας ζυμαρικών σκληρού σίτου σε άλλες χώρες.....	10
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	13
3.1. Επιλογή δειγμάτων ζυμαρικών προς ανάλυση.....	13
3.2. Ομογενοποίηση δειγμάτων.....	14
3.3. Απομόνωση DNA από δείγματα ζυμαρικών και υλικά αναφοράς.....	15
3.3.1. Αρχή μεθόδου απομόνωσης DNA.....	15
3.3.2. Εξοπλισμός.....	17
3.3.3. Αντιδραστήρια - Αναλώσιμα.....	17
3.3.4. Πρωτόκολλο απομόνωσης DNA.....	17
3.4. Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας απομονωμένου DNA.....	18
3.4.1. Εξοπλισμός.....	18
3.4.2. Αντιδραστήρια - Αναλώσιμα.....	18

3.4.3. Πρωτόκολλο προσδιορισμού συγκέντρωσης και καθαρότητας απομονωμένου DNA.....	19
3.5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR) για ανίχνευση και τον ημιποσοτικό προσδιορισμό μαλακού σίτου σε ζυμαρικά σκληρού σίτου.....	21
3.5.1. Αρχή τεχνικής της Real Time PCR.....	21
3.5.2. Εφαρμογή της Real Time PCR για την ανίχνευση και τον ημιποσοτικό προσδιορισμό μαλακού σίτου σε ζυμαρικά σκληρού σίτου.....	27
3.5.3. Εξοπλισμός.....	28
3.5.4. Αντιδραστήρια.....	28
3.5.5. Προετοιμασία αντιδράσεων Real Time PCR.....	29
3.6. Παρασκευή υλικών αναφοράς.....	32
3.7. Επαλήθευση καταλληλότητας μεθόδου απομόνωσης DNA.....	33
3.8. Επαλήθευση καταλληλότητας της μεθόδου Real Time PCR.....	34
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	37
4.1. Επαλήθευση καταλληλότητας μεθόδου απομόνωσης DNA.....	37
4.1.1. Προσδιορισμός συγκέντρωσης και ποιότητας απομονωμένου DNA.....	37
4.1.2. Έλεγχος για παρεμπόδιση λόγω υποστρώματος (Inhibition test)....	38
4.2. Επαλήθευση καταλληλότητας της μεθόδου Real Time PCR.....	42
4.2.1. Εξειδίκευση μεθόδου.....	42
4.2.2. Επαναληψιμότητα της μεθόδου.....	43
4.2.3. Προσδιορισμός του ορίου ανίχνευσης του μαλακού σίτου.....	44
4.2.4. Αναπαραγωγιμότητα και προσδιορισμός της τιμής ΔCt του υλικού αναφοράς 3% w/w μαλακού σίτου σε σκληρό σίτο.....	45
4.3. Αποτελέσματα ανάλυσης δειγμάτων ζυμαρικών, υλικών αναφοράς και εμβολιασμένων δειγμάτων.....	47
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	51
ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	54
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	59

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 2.1. Μελέτες νοθείας ζυμαρικών σκληρού σίτου με μαλακό σίτο σε αγορές λιανεμπορίου της Ιταλίας, Αργεντινής και Ιορδανίας.....	11
Πίνακας 3.1. Αναλυτικές πληροφορίες για τα είκοσι επτά δείγματα ζυμαρικών που συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη νοθείας.....	13
Πίνακας 3.2. Αλληλουχία εκκινητών/ιχνηθέτη (primers/probe) για το γονίδιο της πρωτεΐνης Waxy-D1 του μαλακού σίτου (<i>Triticum aestivum</i>).....	28
Πίνακας 3.3. Αλληλουχία εκκινητών/ιχνηθέτη (primers/probe) για το γονίδιο της πλούσιας σε προλίνη πρωτεΐνης (Proline Rich Protein, PRP) του σίτου (<i>Triticum</i>).....	29
Πίνακας 3.4. Master mix για την αλληλουχία του γονιδίου της πλούσιας σε προλίνη πρωτεΐνης (Proline Rich Protein, PRP) του σίτου (<i>Triticum</i>).....	29
Πίνακας 3.5. Master mix για την αλληλουχία του γονιδίου της πρωτεΐνης Waxy-D1 του μαλακού σίτου (<i>Triticum aestivum</i>).....	30
Πίνακας 3.6. Θερμοκρασιακό προφίλ για την Real Time PCR.....	31
Πίνακας 3.7. Υλικά αναφοράς που παρασκευάστηκαν για τον ημιποσοτικό προσδιορισμό μαλακού σίτου.....	32
Πίνακας 4.1. Συγκέντρωση και καθαρότητα απομονωμένου DNA δειγμάτων ζυμαρικών και σίτου (Οι διπλές τιμές συγκέντρωσης ή 260nm/280nm αντιστοιχούν στις δύο απομονώσεις ανά δείγμα).....	37
Πίνακας 4.2. Αποτελέσματα αντιδράσεων εξειδίκευσης για την αλληλουχία του γονιδίου PRP και Waxy-D1.....	42
Πίνακας 4.3. Αποτελέσματα αντιδράσεων επαναληψιμότητας για το 3% w/w μαλακό σε σκληρό σίτο.....	43
Πίνακας 4.4. Αποτελέσματα αντιδράσεων προσδιορισμού του ορίου ανίχνευσης του μαλακού σίτου	44
Πίνακας 4.5. Αποτελέσματα αντιδράσεων επαναληψιμότητας (υπο διαφορετικές συνθήκες) για το 3% μαλακό σε σκληρό σίτο.....	45
Πίνακας 4.6. Αποτελέσματα τιμών $\Delta C_{t_{WaxyD1-PRP}}$ για τα δείγματα ζυμαρικών που αναλύθηκαν.....	47
Πίνακας 4.7. Αποτελέσματα τιμών $\Delta C_{t_{WaxyD1-PRP}}$ για τα υλικά αναφοράς που αναλύθηκαν παράλληλα με τα δείγματα ζυμαρικών.....	48

Πίνακας 4.8. Αποτελέσματα τιμών $\Delta Ct_{WaxyD1-PRP}$ για τα εμβολιασμένα δείγματα που αναλύθηκαν παράλληλα με τα δείγματα ζυμαρικών.....49

Πίνακας 4.9. Συνοπτικός πίνακας των αποτελεσμάτων της ανίχνευσης και του ημιποσοτικού προσδιορισμού μαλακού σίτου σε 27 δείγματα ζυμαρικών σκληρού σίτου.....50

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 3.1. Συσκευή ομογενοποίησης Thermomix (Vorwerk & Co. KG).....15

Εικόνα 3.2. Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific).....20

Εικόνα 3.3. Φασματοφωτόμετρο Analytik Jena, μοντέλο Specord 50 Plus.....21

Εικόνα 3.4. Real Time PCR 7500 της Applied Biosystems και υπολογιστής για την καταγραφή και επεξεργασία των δεδομένων.....32

Εικόνα 3.5. Παράδειγμα ελέγχου για τυχόν παρεμποδίσεις λόγω υποστρώματος.....34

Εικόνα 4.1. Αποτελέσματα ελέγχου για παρεμποδίσεις (inhibition) λόγω υποστρώματος σε άλευρο σκληρού σίτου για το γονίδιο PRP.....39

Εικόνα 4.2. Αποτελέσματα ελέγχου για παρεμποδίσεις (inhibition) λόγω υποστρώματος σε ζυμαρικό σκληρού σίτου για το γονίδιο PRP.....40

Εικόνα 4.3. Αποτελέσματα ελέγχου για παρεμποδίσεις (inhibition) λόγω υποστρώματος σε άλευρο μαλακού σίτου για το γονίδιο Waxy-D1.....41

Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 2.1. Παραγωγή σίτου σε παγκόσμια κλίμακα. Απεικονίζεται η παραγωγή σίτου ανά χώρα σε μεγατόνους (Megatons, MT) για το έτος 2018, ενώ ξεχωρίζουν οι πέντε χώρες με την μεγαλύτερη παραγωγή.....3

Σχήμα 2.2. Κατανομή της παγκόσμιας παραγωγής ζυμαρικών.....5

Σχήμα 2.3. Φυλογένεση των εξημερωμένων ειδών σκληρού σίτου (*Triticum durum* Desf.) και μαλακού σίτου (*Triticum aestivum* L.).....6

Σχήμα 2.4. Γράφημα τιμών σκληρού (έντονο κόκκινο) και μαλακού σίτου (κόκκινο).....8

Σχήμα 3.1. Στάδια της μεθόδου απομόνωσης DNA με Nucleospin® Food kit.....16

Σχήμα 3.2. Σχηματική απεικόνιση των βημάτων που λαμβάνουν χώρα στους πρώτους κύκλους της PCR με αποτέλεσμα την εκθετική αύξηση της αλληλουχίας στόχου.....	22
Σχήμα 3.3. Στην παραπάνω καμπύλη απεικονίζονται οι τρεις φάσεις (εκθετική, γραμμική και πλατώ) της PCR.....	24
Σχήμα 3.4. Αρχή της τεχνικής Taqman. Διακρίνονται οι δύο εκκινητές (forward και reverse) και ο ιχνηθέτης στο εσωτερικό της αλληλουχίας στόχου. Η DNA πολυμεράση με την 5'-3' δράση εξωνουλεάσης υδρολύει τον ιχνηθέτη επιτρέποντας την απελευθέρωση της φθορίζουσας χρωστικής (®) στο 5' άκρο και την παραγωγή φθορισμού. Όσο περισσότερη ποσότητα της αλληλουχίας στόχου παράγεται τόσο περισσότερο αυξάνει και η ποσότητα του φθορισμού.....	25
Σχήμα 3.5. Σχηματική απεικόνιση της κινητικής της Real Time PCR.....	26

Κατάλογος Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 4.1. Διάγραμμα τιμών $\Delta Ct_{WaxyD1-PRP}$ του υλικού αναφοράς 3% w/w μαλακού σε σκληρό σίτο για τον προσδιορισμό της μέσης τιμής.....	46
--	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα ζυμαρικά σίτου φτιάχνονται κυρίως από σκληρό σιτάρι και αποτελούν σημαντικό κομμάτι της σύγχρονης διατροφής του ανθρώπου παγκοσμίως. Η αποκλειστική χρήση σκληρού σίτου προσδίδει στα ζυμαρικά τις καλές μαγειρικές και γευστικές ιδιότητες τους (Sissons, 2008). Τα τυποποιημένα ζυμαρικά που αναφέρουν στην ετικέτα προϊόντος ότι φτιάχνονται από σκληρό σίτο (*Triticum durum*) οφείλουν, σύμφωνα με την νομοθεσία της Ελλάδας αλλά και πολλών άλλων χωρών, να φτιάχνονται αποκλειστικά από σιμιγδάλι ή άλευρο σκληρού σίτου. Εντούτοις, είναι πιθανό να λάβει χώρα νοθεία των ζυμαρικών σκληρού σίτου με το χαμηλότερης αξίας άλευρο μαλακού σίτου (*Triticum aestivum*) που χρησιμοποιείται κυρίως στην παραγωγή ψωμιού. Λόγω των νομοθετικών περιορισμών αλλά και της αυξανόμενης απαίτησης των καταναλωτών για πληροφόρηση σχετικά με την αυθεντικότητα των τροφίμων που καταναλώνουν, αναπτύχθηκαν τις τελευταίες δεκαετίες διάφορες μέθοδοι για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό του μαλακού σίτου σε ζυμαρικά σκληρού σίτου, όπως οι ανοσοχημικές, οι φασματοσκοπικές και οι μοριακές.

Η τεχνική της Real Time PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου) είναι μια μοριακή τεχνική που επιτρέπει την γρήγορη, ευαίσθητη, εξειδικευμένη και χαμηλού κόστους ανίχνευση του DNA ζωικών και φυτικών ειδών σε τρόφιμα. Τα χαρακτηριστικά αυτά της Real Time PCR σε συνδυασμό με τις σύγχρονες τεχνικές απομόνωσης DNA ακόμη και από θερμικά επεξεργασμένα τρόφιμα, την καθιστούν ένα πολύτιμο εργαλείο σε σχέση με άλλες τεχνικές (π.χ. χρωματογραφικές, ανοσοχημικές, φασματοσκοπικές), που βασίζονται στην ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της νοθείας μέσω πρωτεϊνών ή λιπών (Casazza et al., 2012). Αυτός είναι και ο λόγος που η τεχνική της Real Time PCR κερδίζει καθημερινά έδαφος ως εργαλείο στην μάχη κατά της νοθείας και χρησιμοποιείται σήμερα σε μια πληθώρα εφαρμογών για τον έλεγχο της αυθεντικότητας των τροφίμων.

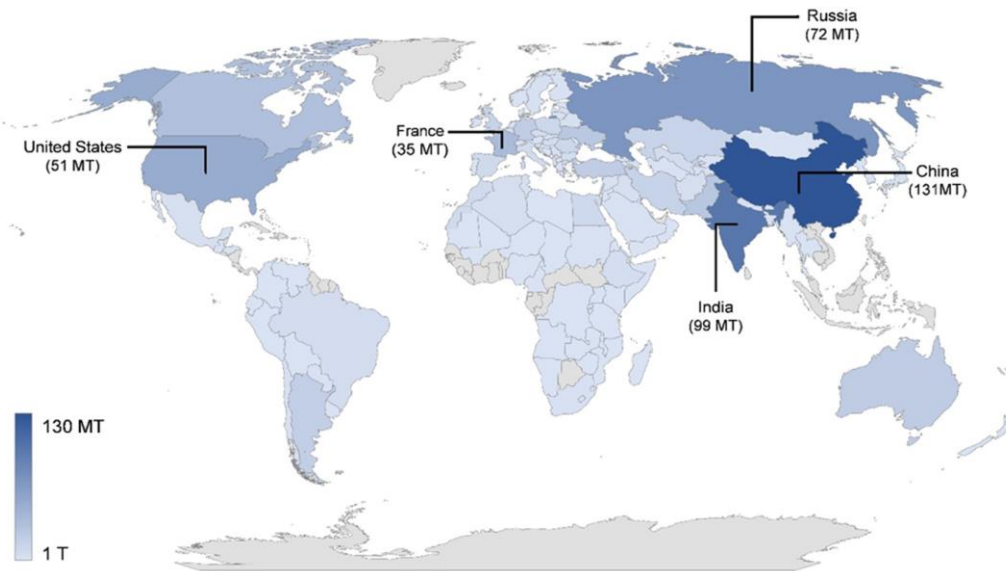
Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας, είναι αρχικά η ανάπτυξη μιας μοριακής μεθόδου για την ανίχνευση και τον ημιποσοτικό προσδιορισμό του μαλακού σίτου σε ζυμαρικά σκληρού σίτου. Ειδικότερα, η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει την διαδικασία απομόνωσης DNA από δείγμα ζυμαρικού και ακολούθως εφαρμογή της Real Time PCR προκειμένου να ανιχνευθεί DNA μαλακού σίτου και να γίνει ημιποσοτικός προσδιορισμός του. Μετά την ανάπτυξη της μεθόδου και την επαλήθευση της καταλληλότητας

της, ακολουθεί ο τελικός στόχος της εργασίας που είναι η εφαρμογή της μεθόδου σε δείγματα διαφόρων τύπων ζυμαρικών που παράγονται από διαφορετικές εταιρείες και διακινούνται στην ελληνική αγορά λιανεμπορίου, προκειμένου να γίνει έλεγχος πιθανής νοθείας τους με μαλακό σίτο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

2.1. Σίτος και ζυμαρικά

Το σιτάρι (*Triticum spp*) αποτελεί διαχρονικά μια από τις σπουδαιότερες τροφές για τον άνθρωπο. Αποτελεί το δεύτερο παγκοσμίως, σε καλλιέργεια και συγκομιδή, δημητριακό μετά το καλαμπόκι. Στο Σχήμα 2.1 απεικονίζεται η παραγωγή σίτου σε παγκόσμια κλίμακα για το έτος 2018, ενώ ξεχωρίζουν οι πέντε χώρες με την μεγαλύτερη παραγόμενη ποσότητα σε εκατομμύρια τόνους (Megatons, MT) (de Sousa et al., 2021 ; FAOSTAT). Τα κυριότερα εμπορικά είδη σίτου που καλλιεργούνται σήμερα, είναι ο μαλακός σίτος (*Triticum aestivum*) ο οποίος αντιστοιχεί σε ποσοστό 95% της παγκόσμιας καλλιέργειας και ο σκληρός σίτος (*Triticum durum*) ο οποίος καλλιεργείται στο υπόλοιπο 5%. Το μαλακό σιτάρι χρησιμοποιείται για την παρασκευή ψωμιού, μπισκότων και κέικ, ενώ ο σκληρός σίτος χρησιμοποιείται κυρίως στην μακαρονοποιία για την παρασκευή των ζυμαρικών (Arzani and Ashraf, 2017 ; Peña, 2002).

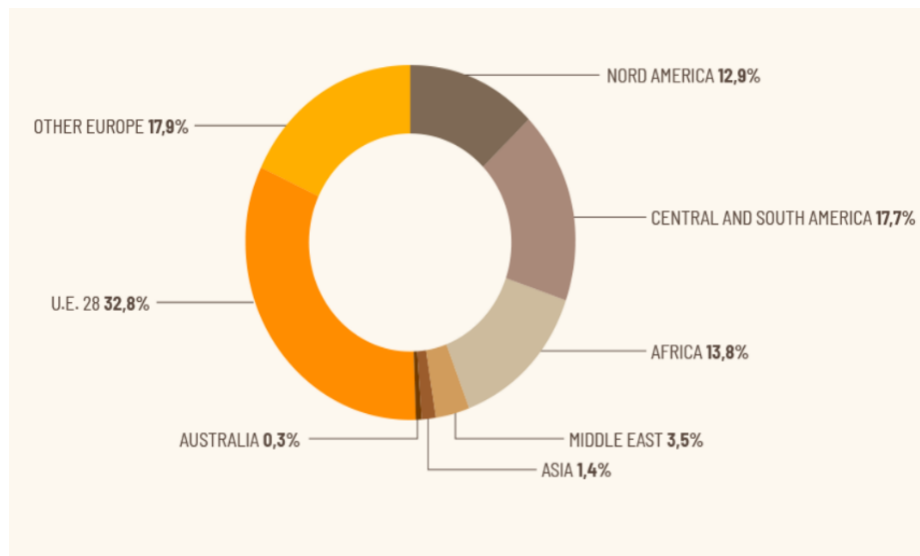


Σχήμα 2.1. Παραγωγή σίτου σε παγκόσμια κλίμακα. Απεικονίζεται η παραγωγή σίτου ανά χώρα σε μεγατόνους (Megatons, MT) για το έτος 2018, ενώ ξεχωρίζουν οι πέντε χώρες με την μεγαλύτερη παραγωγή (Πηγή: de Sousa et al., 2021 ; FAOSTAT).

Το γεγονός ότι το σκληρό σιτάρι (*Triticum durum*) τυγχάνει ιδιαίτερης προτίμησης ως πρώτη ύλη, στις περισσότερες χώρες, για την παρασκευή ζυμαρικών, είναι απόρροια των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών του που σε συνδυασμό με την διαδικασία παραγωγής τους εξασφαλίζουν ότι τα ζυμαρικά μετά το μαγείρεμα θα έχουν εξαιρετική συνοχή, υφή και γεύση. Μεταξύ αυτών των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών, σε σχέση με το μαλακό σίτο, περιλαμβάνονται το έντονο κίτρινο χρώμα του σιμιγδαλιού και το υψηλότερο κατά μέσο όρο ποσοστό πρωτεϊνών και υγρής γλουτένης (Dawe et al., 2000 ; Sissons, 2008 ; Žilić et al., 2011).

Τα στάδια παραγωγής ζυμαρικών περιλαμβάνουν αρχικά την άλεση του σκληρού σίτου σε μορφή σιμιγδαλιού. Στο σιμιγδάλι προστίθεται νερό (μπορούν επίσης να προστεθούν αυγά, γάλα ή λαχανικά) και ακολουθεί ανάμιξη μέχρι να σχηματιστεί ομοιογενής ζύμη η οποία με την διαδικασία της εξώθησης περνάει μέσα από ειδικές φόρμες που δίνουν το επιθυμητό σχήμα στα ζυμαρικά (μακαρόνια, πένες, βίδες κ.α). Έχοντας πάρει την τελική του μορφή, το ζυμαρικό οδηγείται σε ειδικούς θαλάμους όπου λαμβάνει χώρα ελεγχόμενη ξήρανση με ροή θερμού αέρα μέχρι η υγρασία του προϊόντος να μειωθεί στα κατάλληλα επίπεδα. Το μικρό ποσοστό της υγρασίας των ζυμαρικών επιτρέπει την διατήρησή τους για μεγάλο χρονικό διάστημα χωρίς να χάνεται παράλληλα η ποιοτική και διατροφική τους αξία. Τελευταίο στάδιο της παραγωγικής διαδικασίας αποτελεί η ψύξη των ζυμαρικών ώστε να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου και να συσκευαστούν (Sissons et al., 2012).

Σύμφωνα με στοιχεία του Διεθνή Οργανισμού Ζυμαρικών (International Pasta Organization), το έτος 2021 παρήχθησαν περίπου 16,9 εκατομμύρια τόνοι ζυμαρικών παγκοσμίως εκ των οποίων το 50,7% στην Ευρώπη (Σχήμα 2.2). Όσον αφορά την κατανάλωση ανά άτομο, η Ιταλία κατέλαβε την πρώτη θέση παγκοσμίως με κατανάλωση 23,5kg/έτος, ενώ η Ελλάδα την τέταρτη με 12,2kg/έτος. Επίσης σύμφωνα με την Ένωση των Οργανώσεων των Παραγωγών Προϊόντων Ζυμαρικών στην Ευρωπαϊκή Ένωση (UN.A.F.P.A., Union of the Organizations of Manufacturers of Pasta Products in the E.U.) και βάσει δεδομένων μέχρι και το Σεπτέμβριο του 2021, στην χώρα μας παρήχθησαν σε ένα έτος 195.000 τόνοι ζυμαρικών ενώ στην Ιταλία που βρίσκεται στην πρώτη θέση περίπου 3,9 εκατομμύρια τόνοι.



Σχήμα 2.2. Κατανομή της παγκόσμιας παραγωγής ζυμαρικών (Πηγή: International Pasta Organization, 2021, <https://internationalpasta.org/annual-report/>).

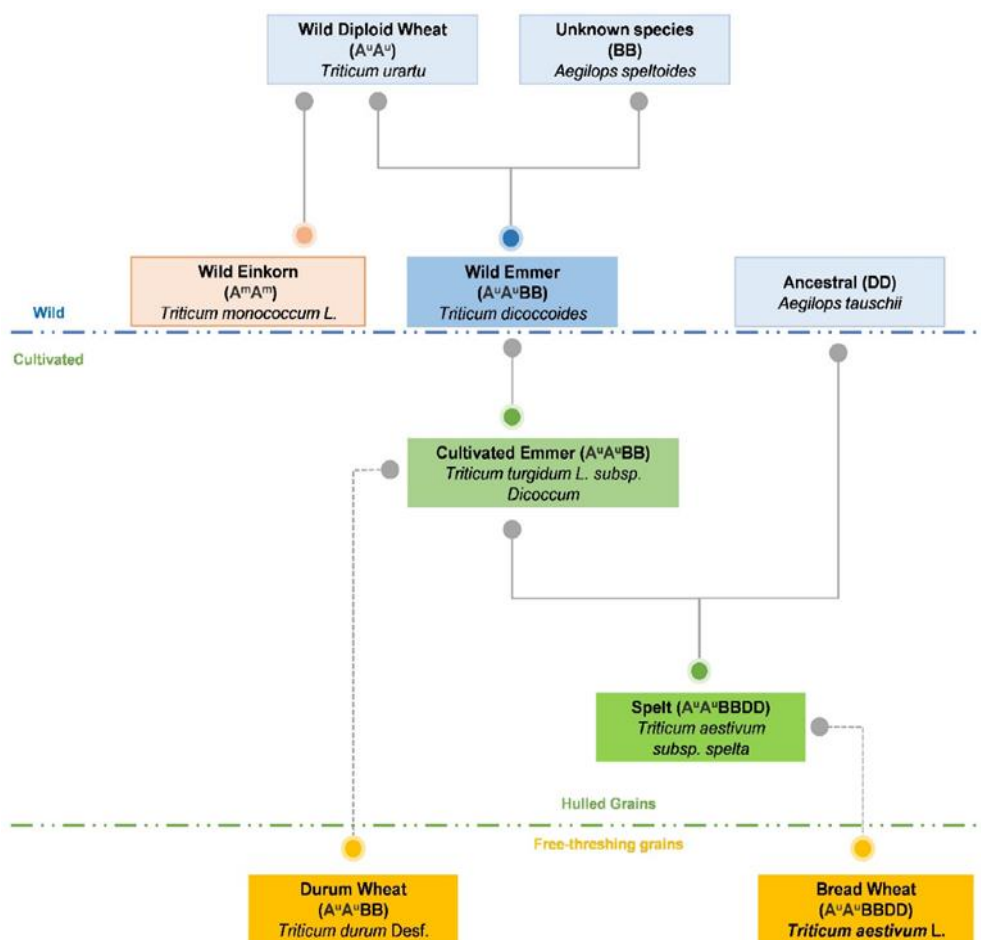
2.2. Προέλευση και γενετική εξέλιξη του σίτου. Γενετικές διαφορές μεταξύ μαλακού και σκληρού σίτου

Οι βασικοί τύποι γονιδιώματος που απαντώνται στα διάφορα είδη σίτου συμβολίζονται ως A, B, και D. Από γενετική άποψη το μαλακό σιτάρι (*Triticum aestivum*) είναι εξαπλοειδές (AABBDD, $2n = 6x = 42$) ενώ το σκληρό σιτάρι (*Triticum durum*) είναι τετραπλοειδές (AABB, $2n = 4x = 28$) δηλαδή στερείται του D γονιδιώματος (Matsuoka et al., 2012).

Η ιστορία της προέλευσης και γενετικής εξέλιξης των ειδών του σίτου (*Triticum spp*) ξεκινάει πολύ πίσω στον χρόνο. Στο σχήμα 2.3, φαίνονται τα στάδια της φυλογένεσης που οδήγησαν στα εξημερωμένα και οικονομικού ενδιαφέροντος σημερινά είδη του σκληρού (*Triticum durum* Desf.) και μαλακού σίτου (*Triticum aestivum* L.) ενώ παράλληλα διακρίνονται τα δύο γεγονότα πολυπλοειδισμού που έπαιξαν καθοριστικό ρόλο (de Sousa et al., 2021).

Ειδικότερα, το πρώτο ορόσημο αυτής της εξελικτικής διαδικασίας ήταν η διασταύρωση του άγριου είδους *Triticum urartu* (AA, $2n = 2x = 14$) με ένα προγονικό είδος του γένους *Aegilops* που εκτιμάται ότι ήταν το διπλοειδές *Aegilops speltoides* (BB, $2n = 2x = 14$). Όπως φαίνεται το *Aegilops speltoides* αποτέλεσε την πηγή του γονιδιώματος B στα

σημερινά είδη του σίτου. Αυτό το γεγονός πολυπλοειδισμού οδήγησε στο τετραπλοειδές άγριο είδος *Triticum dicoccoides* (δίκοκκο σιτάρι ή Emmer) που εξελίχθηκε ακολούθως στο είδος *Triticum turgidum* το οποίο άρχισε να καλλιεργείται πριν από 10.000 χρόνια στην Μέση Ανατολή (William et al., 2011). Η καλλιέργεια του τα τελευταία 10.000 χρόνια είχε ως αποτέλεσμα την σημερινή εξημερωμένη μορφή του τετραπλοειδούς σκληρού σίτου *Triticum durum*. Ακολούθως, η δεύτερη καθοριστική διασταύρωση έλαβε χώρα μεταξύ του καλλιεργούμενου είδους *Triticum turgidum* και του προγονικού είδους *Aegilops tauschii* (δότης του γονιδιώματος D) και οδήγησε στην εμφάνιση του εξαπλοειδούς (AAB-BDD) *Triticum aestivum* υποείδος *spelta* το οποίο μέσω της καλλιέργειας εξελίχθηκε στην σημερινή μορφή του μαλακού σίτου *Triticum aestivum* L. (International Wheat Genome Sequencing Consortium, 2014 ; de Sousa et al., 2021 ; Dubcovsky & Dvorak, 2007).



Σχήμα 2.3. Φυλογένεση των εξημερωμένων ειδών σκληρού σίτου (*Triticum durum* Desf.) και μαλακού σίτου (*Triticum aestivum* L.) (Πηγή: de Sousa et al., 2021)

Η απουσία του γονιδιώματος D από το σκληρό σίτο οδηγεί στο συμπέρασμα ότι γονίδια που εδράζονται στο γονιδίωμα D μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοριακοί δείκτες για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του μαλακού σίτου σε υπόστρωμα (άλευρο ή ζυμαρικά) σκληρού σίτου. Γονίδια δε που βρίσκονται στο γονιδίωμα A ή B και είναι κοινά και στα δύο είδη σίτου, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως γονίδια αναφοράς.

2.3. Νοθεία ζυμαρικών σκληρού σίτου με μαλακό σίτο και νομοθεσία

Η νοθεία των τροφίμων (food adulteration) είναι ένα διαρκώς αυξανόμενο φαινόμενο που λαμβάνει χώρα με διάφορες δόλιες και παραπλανητικές πρακτικές μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται είτε η προσθήκη ή αφαίρεση συστατικών είτε η αντικατάσταση με χαμηλότερης αξίας συστατικά με απώτερο σκοπό το οικονομικό όφελος. Αποτέλεσμα αυτών των πρακτικών είναι η ποιοτική ή/και ποσοτική τροποποίηση των τροφίμων σε σχέση με την ετικέτα προϊόντος, γεγονός που με την σειρά του οδηγεί στην παράβαση της νομοθεσίας και την παραπλάνηση των καταναλωτών (Momtaz et al., 2023).

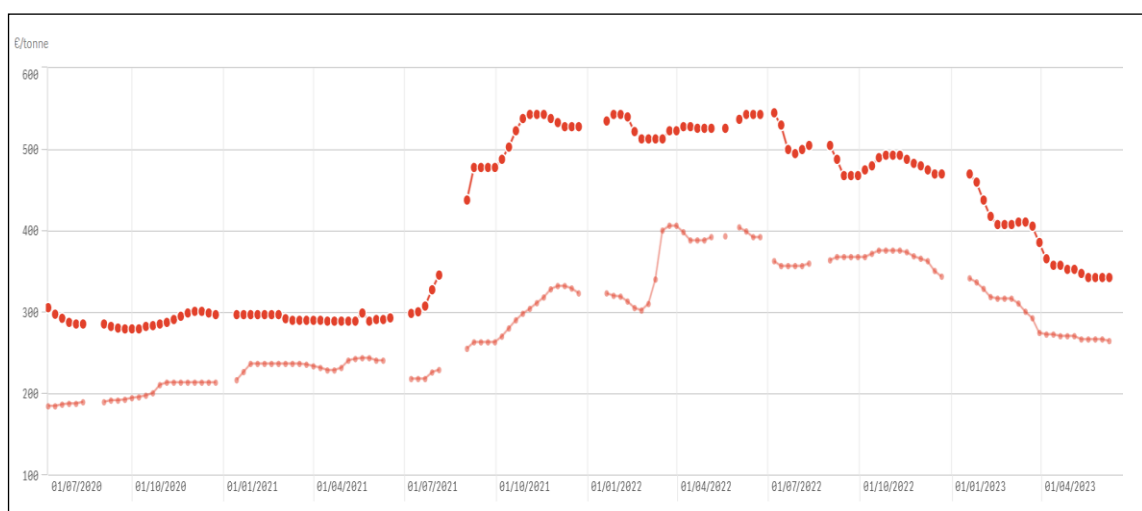
Ο νόμος 4235/2014 της εθνικής νομοθεσίας, ορίζει ως νοθευμένα τρόφιμα: «αυτά στα οποία προστέθηκαν ύλες συνήθως ευτελέστερης αξίας για κερδοσκοπία ή για καλύτερη εμφάνιση των προϊόντων, στην οποία δεν ανταποκρίνονται πραγματικά» (N.4235/2014, Εφημερίδα της Κυβερνήσεως).

Σύμφωνα με το άρθρο 115 του Κώδικα Τροφίμων και Ποτών ως «Ζυμαρικά χαρακτηρίζονται τα προϊόντα που παρασκευάζονται από σιμιγδάλι ή άλευρο ολικής άλεσης μακαρονοποιίας από σκληρό σίτο και νερό, χωρίς ζύμη, και ξηραίνονται σε ειδικούς θαλάμους με ελαφρά θέρμανση ή στον αέρα, χωρίς ψήσιμο. Επιτρέπεται η παρασκευή ζυμαρικών με αυγά, γάλα, λαχανικά ή σε μίγμα μεταξύ τους» (ΑΑΔΕ). Εκτός της χώρας μας και άλλες χώρες όπως η Γαλλία, η Ιταλία, η Τουρκία, η Ισπανία και η Αργεντινή, έχουν νομοθεσία σύμφωνα με την οποία τα ζυμαρικά σκληρού σίτου πρέπει να φτιάχνονται αποκλειστικά από σκληρό σίτο λαμβάνοντας βέβαια υπόψη ότι είναι πιθανή η τυχαία επιμόλυνση κατά την καλλιέργεια, συγκομιδή, μεταφορά ή άλεση του σκληρού σίτου, η Ιταλία και η Γαλλία έχουν θέσει ως επιτρεπόμενο όριο επιμόλυνσης, την παρουσία μαλακού σίτου σε ποσοστό που δεν υπερβαίνει το 3% του βάρους του σκληρού σίτου (άλευρο ή σιμιγδάλι) των ζυμαρικών (Alary et al., 2002 ; Carloni et al., 2017 ; Sezer et al., 2022). Παράλληλα και η Ευρωπαϊκή Επιτροπή (European Commission) έχει νομοθετήσει από το 1994 (ΕΚ

1222/1994 ; ΕΚ 578/2010) το όριο του 3% για ζυμαρικά σκληρού σίτου που εξάγονται εκτός της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

Προκειμένου και η χώρα μας να προσαρμοστεί στις νέες επιστημονικές εξελίξεις και κατόπιν πρότασης του ΕΦΕΤ, έγινε εισήγηση του Γενικού Χημείου του Κράτους προς το Ανώτατο Χημικό Συμβούλιο για την αναθεώρηση του άρθρου 115 του Κώδικα Τροφίμων και Ποτών που αφορά τα ζυμαρικά. Στα πλαίσια αυτά, τον Απρίλιο 2022 έγινε δημόσια διαβούλευση επί του σχεδίου αναθεώρησης. Σύμφωνα με το σχέδιο του αναθεωρημένου άρθρου 115, στην πρώτη ύλη για την παρασκευή ζυμαρικών σκληρού σίτου επιτρέπεται η παρουσία μαλακού σίτου σε ποσοστό που δεν υπερβαίνει το 3% του συνολικού βάρους αυτής (ΕΦΕΤ, 2022).

Βασικό κίνητρο για την νοθεία της πρώτης ύλης του σκληρού σίτου με μαλακό σίτο, αποτελεί η σημαντική διαφορά τιμής μεταξύ τους. Στο σχήμα 2.4 απεικονίζονται οι τιμές σκληρού και μαλακού σίτου στην αγορά εμπορευμάτων της Μπολόνια στην Ιταλία από τον Ιούλιο του 2020 έως τον Απρίλιο του 2023 (European Commission). Από το διάγραμμα παρατηρούμε ότι η τιμή του σκληρού σίτου για το παραπάνω διάστημα ήταν από 25% έως και 50% υψηλότερη της τιμής του μαλακού σίτου. Είναι χαρακτηριστική η αύξηση της τιμής του σκληρού σίτου πάνω από τα 500€/τόνο, κυρίως το 2022, λόγω του πολέμου στην Ουκρανία αλλά και την ενεργειακή κρίση.



Σχήμα 2.4. Γράφημα τιμών σκληρού (έντονο κόκκινο) και μαλακού σίτου (κόκκινο) (Πηγή: European Commission, <https://agridata.ec.europa.eu/extensions/DashboardCereals/ExtCereals Price.html#>)

2.4. Τεχνικές ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης μαλακού σίτου σε σκληρό σίτο

Λόγω των αυξανόμενων νομοθετικών απαιτήσεων που προαναφέρθηκαν αλλά και στα πλαίσια της διαρκούς απαίτησης των καταναλωτών για πληροφόρηση σχετικά με την προέλευση, την ασφάλεια και αυθεντικότητα των τροφίμων που καταναλώνουν, αναπτύχθηκαν τα προηγούμενα χρόνια διάφορες αναλυτικές μέθοδοι για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό του μαλακού σίτου σε ζυμαρικά σκληρού σίτου. Οι μέθοδοι αυτές μπορούν να χωριστούν σε τρεις κατηγορίες.

Η πρώτη περιλαμβάνει μεθόδους ηλεκτροφόρησης, χρωματογραφικές ή ανοσολογικές και ανιχνεύουν συγκεκριμένες πρωτεΐνες ή κλάσματα πρωτεϊνών που είναι χαρακτηριστικές του μαλακού σίτου, όπως αλβουμίνες και γλιαδίνες (Barnwell et al., 1994; Stevenson et al., 1994; Bonetti et al., 2004; Casazza et al., 2012). Δυστυχώς όμως, οι μέθοδοι που βασίζονται στον προσδιορισμό πρωτεϊνών έχουν κάποια βασικά μειονεκτήματα. Κυριότερο από αυτά αποτελεί το γεγονός ότι τα ζυμαρικά κατά την διάρκεια της παραγωγής τους και ειδικότερα κατά την διαδικασία ξήρανσης, υπόκεινται σε υψηλές θερμοκρασίες (70°-100°C) που έχουν ως αποτέλεσμα την μετουσίωση των πρωτεϊνών, περιορίζοντας έτσι σημαντικά την ικανότητα των μεθόδων αυτών να ανιχνεύουν και να ποσοτικοποιούν με αξιοπιστία την νοθεία του σκληρού σίτου στα ζυμαρικά. Επίσης η σύνθεση των πρωτεϊνών στους φυτικούς ιστούς εξαρτάται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες (θερμοκρασία, υγρασία, ηλιοφάνεια, έδαφος) που επικρατούν στον αγρό με αποτέλεσμα να επηρεάζεται το πρωτεϊνικό προφίλ και επομένως και το αποτέλεσμα της ανάλυσης (Carlioni et al., 2017).

Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει τεχνικές που βασίζονται στον διαχωρισμό και ποσοτικοποίηση λιπών, όπως των παλμιτικών στερολών με HPLC (Sarwar και McDonald, 1993) και στην ανάλυση με φασματοσκοπία υπερύθρου (Cocchi et al., 2006). Οι μέθοδοι όμως αυτές είτε στερούνται υψηλού ποσοστού εξειδίκευσης είτε υψηλής ευαισθησίας (Alary et al., 2002)

Η τελευταία κατηγορία περιλαμβάνει τεχνικές μοριακής βιολογίας όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και η PCR πραγματικού χρόνου οι οποίες βασίζονται στην ενίσχυση και ανίχνευση εξειδικευμένων αλληλουχιών οι οποίες βρίσκονται στο γονιδίωμα D το οποίο απαντάται στο μαλακό σίτο αλλά απουσιάζει από το σκληρό σίτο (Matsuoka et al., 2012 ; de Sousa et al., 2021). Μερικοί από τους εξειδικευμένους στόχους

που έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα για την ανίχνευση μαλακού σίτου είναι, το γονίδιο SSII-D της συνθετάσης του αμύλου (Matsuoka et al., 2012), γονίδια της γλιαδίνης ή γλουτελίνης (Terzi et al., 2003), το γονίδιο puroindoline-b (Alary et al., 2002), το γονίδιο της πρωτεΐνης Waxy-D1 (Imai et al., 2012), περιοχές του δορυφορικού DNA (Sonnante et al., 2009) και η επαναλαμβανόμενη αλληλουχία Dgas44 (Ibrahim et al., 2011).

Οι μοριακές μέθοδοι έχουν σημαντικά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις υπόλοιπες δύο κατηγορίες που προαναφέρθηκαν. Από την σύγκριση αυτή προκύπτει ότι αρχικά το DNA είναι εξαιρετικά πιο ανθεκτικό στην υψηλή θερμοκρασία σε σχέση με τις πρωτεΐνες με αποτέλεσμα μετά την θερμική επεξεργασία των ζυμαρικών να παραμένουν θραύσματα DNA κατάλληλου μεγέθους και ποιότητας για την ανάλυση με PCR. Βασικό χαρακτηριστικό της PCR ή Real Time PCR είναι η υψηλή εξειδίκευση και ευαισθησία που επιτρέπει την ανίχνευση πολύ χαμηλού ποσοστού νοθείας. Τέλος η τεχνική της PCR απαιτεί μικρές ποσότητες δείγματος ενώ είναι μια γρήγορη και μικρού κόστους ανάλυση (Carlioni et al., 2017).

2.5. Μελέτες νοθείας ζυμαρικών σκληρού σίτου σε άλλες χώρες

Στα πλαίσια της διερεύνησης του ποσοστού της νοθείας των ζυμαρικών, που σύμφωνα με την ετικέτα προϊόντος αποτελούνται αποκλειστικά από σκληρό σίτο, έχουν γίνει τις τελευταίες δεκαετίες έρευνες στο λιανεμπόριο ζυμαρικών και άλλων χωρών όπως της Ιταλίας (Casazza et al., 2012 ; Morcia et al., 2020), της Αργεντινής (De Girolamo et al., 2020) και της Ιορδανίας (Ibrahim et al., 2011). Στο πίνακα 2.1 παρουσιάζονται οι διαθέσιμες πληροφορίες των παραπάνω ερευνών σχετικά με τον αριθμό των δειγμάτων που αναλύθηκαν, την μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε και τα αποτελέσματα της.

Στις τρεις από τις τέσσερις μελέτες του πίνακα 2.1 χρησιμοποιήθηκε μοριακή τεχνική (PCR, Real Time PCR και digital PCR) για την ανάλυση των δειγμάτων, ενώ στην τέταρτη η ανοσοχημική τεχνική ELISA. Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα, και στις τέσσερις μελέτες ανιχνεύθηκε μαλακός σίτος στην πλειοψηφία (από 65,4% έως 100%) των δειγμάτων που αναλύθηκαν. Στην περίπτωση της Ιορδανίας δεν υπάρχουν περαιτέρω πληροφορίες σχετικά με το όριο ανίχνευσης της μεθόδου και τον αριθμό των δειγμάτων που ενδεχομένως περιείχαν μαλακό σίτο σε ποσοστό μεγαλύτερο του 3%.

Πίνακας 2.1. Μελέτες νοθείας ζυμαρικών σκληρού σίτου με μαλακό σίτο στο λιανεμπόριο της Ιταλίας, Αργεντινής και Ιορδανίας.

Χώρα λιανεμπορίου ζυμαρικών σκληρού σίτου	Αρ. δειγμάτων ζυμαρικών σκληρού σίτου που αναλύθηκαν	Μέθοδος	Όριο ανίχνευσης ή ποσοτικοποίησης	Αρ. δειγμάτων που ανιχνεύθηκε μαλακός σίτος	Αρ. δειγμάτων με μαλακό σίτο σε ποσοστό >3%	Αρ. δειγμάτων με μαλακό σίτο σε ποσοστό <3%
Ιορδανία ¹	26	Απομόνωση DNA με CTAB μέθοδο + PCR & gel electrophoresis	-	17 (65,4%)	-	9 (34,6%)
Ιταλία ²	13	Απομόνωση DNA με εμπορικό κιτ + Real Time PCR	0,1%	13 (100%)	4 (30,7%)	9 (69,2)
Αργεντινής ³	154	ELISA	0,1%	116 (75,3%)	53 (34,4%)	101 (65,6%)
Ιταλία ⁴	20	Απομόνωση DNA με εμπορικό κιτ + Digital PCR	0,1%	20 (100%)	0 (0%)	20 (100%)

¹ Ibrahim et al., 2011, ²Casazza et al., 2012, ³ De Girolamo et al., 2020, ⁴ Morcia et al., 2020

Από τον παραπάνω πίνακα, διαπιστώνουμε επίσης ότι και στις δύο εργασίες που πραγματοποιήθηκαν στην Ιταλία, ανιχνεύθηκε μαλακός σίτος σε όλα τα δείγματα ζυμαρικών που αναλύθηκαν. Στην περίπτωση δε της εργασίας των Casazza και συνεργατών (2012) προέκυψε ότι το 30,7% των δειγμάτων ζυμαρικών περιείχαν μαλακό σίτο σε ποσοστό μεγαλύτερο του 3% και ήταν αντικανονικά βάσει της Ιταλικής νομοθεσίας. Το εύρος της νοθείας σε αυτά τα δείγματα ήταν από 5,2% έως 6,1% μαλακού σίτου.

Τέλος από τα δεδομένα της έρευνας που πραγματοποιήθηκε στην αγορά της Αργεντινής σε 154 δείγματα ζυμαρικών, διαπιστώθηκε ότι το 34,4% των δειγμάτων (53 από 154) περιείχαν μαλακό σίτο σε ποσοστό μεγαλύτερο του 3%. Το γεγονός μάλιστα ότι 30 από αυτά τα δείγματα περιείχαν μαλακό σίτο σε ποσοστά από 10,1% έως και 28,1% υπο-

δηλώνει τον υψηλό βαθμό νοθείας και παραπλάνησης του καταναλωτή που παρατηρήθηκε στην αγορά λιανεμπορίου της Αργεντινής κατά την περίοδο που πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία των ζυμαρικών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Επιλογή δειγμάτων ζυμαρικών προς ανάλυση

Για την μελέτη της νοθείας του σκληρού σίτου (*Triticum durum*) με μαλακό σίτο (*Triticum aestivum*) επιλέχθηκαν, κατά την περίοδο Οκτώβριος 2022 με Φεβρουάριο 2023, είκοσι επτά δείγματα ζυμαρικών διαφόρων τύπων (μακαρόνια, βίδες, φιογκάκια, κριθαράκι, χυλοπίτες κ.α.) τα οποία είχαν παραχθεί από δεκατρείς εταιρείες της ελληνικής αγοράς ζυμαρικών και στα οποία περιλαμβάνονται επώνυμα προϊόντα και προϊόντα ιδιωτικής ετικέτας. Η προμήθεια (αγορά) τους έγινε από διαφορετικές αλυσίδες supermarket του ελληνικού λιανεμπορίου. Σε όλα τα παραπάνω ζυμαρικά υπάρχει επί της συσκευασίας δήλωση συστατικών σύμφωνα με την οποία περιέχουν αποκλειστικά 100% σκληρό σίτο. Στον πίνακα 3.1, φαίνονται οι πληροφορίες για τα είκοσι επτά δείγματα ζυμαρικών που αναλύθηκαν και συγκεκριμένα το είδος των ζυμαρικών, το κωδικοποιημένο όνομα του παραγωγού και η ημερομηνία λήξης.

Πίνακας 3.1. Αναλυτικές πληροφορίες για τα είκοσι επτά δείγματα ζυμαρικών που συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη νοθείας

A/A	ΕΙΔΟΣ ΖΥΜΑΡΙΚΟΥ	ΠΑΡΑΓΩΓΟΣ	ΗΜ/ΝΙΑ ΛΗΞΗΣ
1	Κοφτό μακαρονάκι	A	Απρ-25
2	Μακαρόνια Νο10	A	Ιουν-25
3	Μακαρόνια Νο6	A	Ιουλ-25
4	Μακαρόνια Νο6	A	Σεπ-25
5	Κοφτό μακαρονάκι	B	Απρ-25
6	Φιογκάκια	B	Φεβ-25
7	Μακαρόνια Νο10	Γ	Ιουν-25
8	Κριθαράκι χονδρό	Δ	Ιουλ-25
9	Βίδες	Δ	Οκτ-25

10	Μακαρόνια Νο10	B	Απρ-25
11	Μακαρόνια Νο10	E	Οκτ-25
12	Πένες	E	Οκτ-25
13	Χυλοπίτες	Z	Οκτ-24
14	Κριθαράκι μέτριο	Z	Μαΐ-25
15	Πένες Ριγέ	H	Σεπ-25
16	Κοχύλια	Θ	Σεπ-25
17	Παστίσιο Νο2	Θ	Αυγ-25
18	Πεταλούδες	I	Ιουλ-25
19	Μακαρόνια Νο6	I	Νοε-25
20	Farfalle Νο65	K	Ιουλ-25
21	Βίδες	E	Νοε-25
22	Μακαρόνια Νο6	Λ	Νοε-25
23	Πένες Ριγέ	E	Ιουλ-25
24	Μακαρόνια Νο7	K	Ιουν-25
25	Ριγατόνι	I	Νοε-25
26	Χυλοπίτες	M	Νοε-23
27	Χυλοπίτες	N	Μαΐ-24

3.2. Ομογενοποίηση δειγμάτων

Πρώτο στάδιο της ανάλυσης των δειγμάτων ζυμαρικών για νοθεία με μαλακό σίτο, ήταν η άλεση τους σε μορφή λεπτόκοκκου αλεύρου προκειμένου το δείγμα να γίνει ομοιογενές. Η άλεση (ομογενοποίηση) των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με την χρήση της συσκευής ομογενοποίησης Thermomix TM5 της Vorwerk & Co. KG (Εικόνα 3.1). Από κάθε δείγμα ζυμαρικών ομογενοποιήθηκαν 250 γραμμάρια. Για την αποφυγή επιμολύνσεων, μετά το

τέλος της κάθε ομογενοποίησης τα εξαρτήματα του κάδου ομογενοποίησης πλένονταν σχολαστικά με απορρυπαντικό, ξεπλένονταν με νερό και στέγνωναν πριν την επαναχρησιμοποίηση για το επόμενο δείγμα. Από το ομογενοποιημένο αλεύρο ελήφθη η αναλυτική ποσότητα για την περαιτέρω ανάλυση ανίχνευσης και ημιποσοτικού προσδιορισμού μαλακού σίτου.

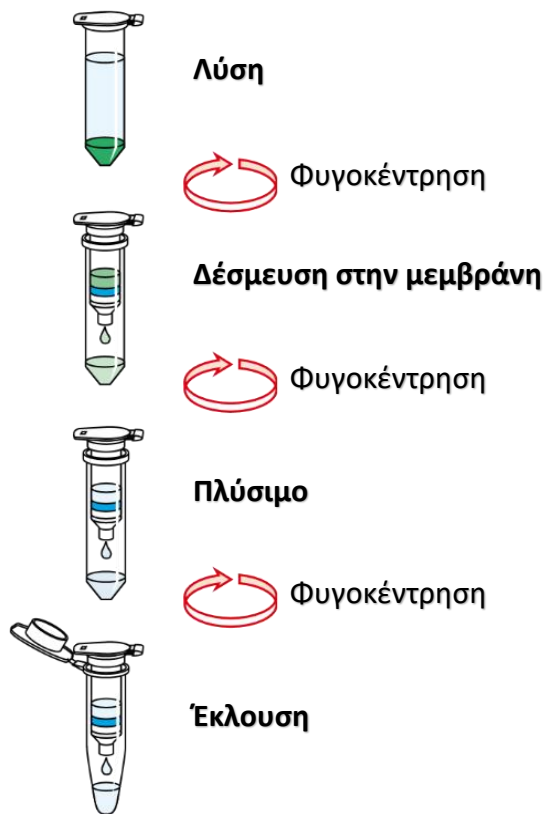


Εικόνα 3.1. Συσκευή ομογενοποίησης Thermomix (Vorwerk & Co. KG). (Προσαρμοσμένο από: α) www.backmarket.gr/el-gr/p/vorwerk-thermomix-tm5/89670b3a-cc18-4b1a-8e3d0217b2fc8fd8#l=11, β) www.alibaba.com/product-detail/Durum-Wheat-Semolina_62004577037.html και γ) www.freepik.com/premium-vector/realistic-pasta-types-farfalle-spaghetti-penne-macaroni-italian-cuisine-dish-dry-organic-pasta-vector-illustration-set-pasta-types-restaurant-menu-wheat-products-assortment_23801156.htm)

3.3. Απομόνωση DNA από δείγματα ζυμαρικών και υλικά αναφοράς

3.3.1. Αρχή μεθόδου απομόνωσης DNA

Η αρχή της μεθόδου απομόνωσης φαίνεται στο Σχήμα 3.1 και είναι η ακόλουθη. Αφού ομογενοποιηθεί το δείγμα ζυμαρικών σε μορφή λεπτόκοκκου αλεύρου, η απομόνωση του DNA ξεκινά με την επώαση 100mg του ομογενοποιημένου δείγματος με ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (Lysis buffer που περιέχει χαστροπικά άλατα και αποδιατακτικούς παράγοντες) και πρωτεϊνάση K που έχουν ως σκοπό την λύση των κυττάρων προκειμένου να ελευθερωθεί το κυτταρικό DNA. Επόμενο στάδιο ο καθαρισμός του μίγματος λύσης με φυγοκέντρηση, ώστε να απομακρυνθούν με καταβύθιση οι επιμολυντές και τα κυτταρικά υπολείμματα.



Σχήμα 3.1. Στάδια της μεθόδου απομόνωσης DNA με Nucleospin® Food kit (Προσαρμοσμένο από: εγχειρίδιο χρήσης του Nucleospin® Food kit της Macherey-Nagel, January 2022/Rev.14)

Το καθαρό υπερκείμενο αναμειγνύεται με ρυθμιστικό διάλυμα δέσμευσης (Binding buffer C4) και 100% αιθανόλη ώστε να δημιουργηθούν κατάλληλες ιοντικές συνθήκες. Το μίγμα μεταφέρεται σε κολώνα NucleoSprin® και φυγοκεντρείται με αποτέλεσμα την δέσμευση (λόγω των ειδικών ιοντικών συνθηκών) του DNA πάνω στην μεμβράνη πυριτίου της στήλης NucleoSprin® ενώ το υπόλοιπο διάλυμα διέρχεται από την κολώνα και απορρίπτεται. Ακολουθεί πλύσιμο της μεμβράνης με δύο διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα (Buffer CQW και Buffer C5) για την αποτελεσματική απομάκρυνση από την μεμβράνη πιθανών αναστολέων της PCR. Το καθαρό πλέον DNA απελευθερώνεται από την μεμβράνη και εκλύεται από την κολώνα με προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος χαμηλής περιεκτικότητας σε αλάτι ή απεσταγμένο νερό (που έχει προθερμανθεί στους 70°C) και φυγοκέντρηση. Το υδατικό διάλυμα DNA είναι πλέον κατάλληλο για την περαιτέρω ανάλυση της νοθείας με Real Time PCR (Macherey-Nagel, Nucleospin Food Kit, January 2022/Rev.14).

3.3.2. Εξοπλισμός

- Αυτόματες πιπέτες μεταβλητού όγκου (100-1000μl, 20-200μl, 2-20 μl και 1-10μl)
- Thermoblock κατάλληλο για σωλήνες 1,5ml και 2ml και λειτουργία στους 65°C
- Ζυγός ακρίβειας 0,001g για το ζύγισμα των δειγμάτων
- Φυγόκεντρος πάγκου για φυγοκέντρηση σωλήνων τύπου 1,5ml και 2ml
- Vortex

3.3.3. Αντιδραστήρια - Αναλώσιμα

- Nucleospin® Food kit (MACHEREY-NAGEL, Ref 740945.50)
- Αιθανόλη 100%
- Σωλήνες τύπου erpendorf 1,5ml και 2ml
- Ακρορύγχια για πιπέτες μεταβλητού όγκου

3.3.4. Πρωτόκολλο απομόνωσης DNA

Για την εκχύλιση του DNA χρησιμοποιήθηκε το NucleoSpin Food kit της MACHEREY – NAGEL GmbH (Macherey-Nagel, Nucleospin Food Kit, January 2022/Rev.14), το οποίο ενδείκνυται για εκχύλιση DNA από δείγματα τροφίμων φυτικής ή ζωϊκής προέλευσης. Η εκχύλιση πραγματοποιείται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συγκεκριμένα ακολουθούνται τα παρακάτω στάδια:

1. Μεταφορά 100mg ομογενοποιημένου δείγματος σε σωλήνα φυγοκέντρου τύπου erpendorf 2ml. Προσθήκη 550μl διαλύματος CF Lysis Buffer, 10μl πρωτεϊνάσης K και ανάμιξη. Στην περίπτωση ορισμένων δειγμάτων ενδέχεται να χρειαστεί η προσθήκη επιπλέον CF Lysis Buffer και (αναλογικά) πρωτεϊνάσης K προκειμένου να διαλυτοποιηθεί ολόκληρο το δείγμα.
2. Επώαση στους 65°C για 30min με ανάδευση ανά τακτά χρονικά διαστήματα.
3. Φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min σε >10.000g.
4. Μεταφορά υπερκείμενου σε νέο σωλήνα φυγοκέντρου τύπου erpendorf 2ml και προσθήκη ενός όγκου Buffer C4 και ενός όγκου αιθανόλης 100%. Ανάμιξη με vortex για 30 sec.
5. Μεταφορά 700 μl του δείγματος σε κολώνα NucleoSpin Food Column η οποία είναι τοποθετημένη σε ανάλογο πλαστικό συλλέκτη. Φυγοκέντρηση για 1min στα 11.000g.

- Απόρριψη του υγρού που πέρασε από την κολώνα στον πλαστικό συλλέκτη. Επαναλαμβάνεται η παραπάνω διαδικασία και για το υπόλοιπο του δείγματος.
6. Προσθήκη 400μl Buffer CQW στην κολώνα και φυγοκέντρηση για 1min στα 11.000g. Απόρριψη του υγρού που πέρασε από την κολώνα στον πλαστικό συλλέκτη.
 7. Προσθήκη 700μl Buffer C5 στην κολώνα και φυγοκέντρηση για 1min στα 11.000g. Απόρριψη του υγρού που πέρασε από την κολώνα στον πλαστικό συλλέκτη.
 8. Προσθήκη 200μl Buffer C5 στην κολώνα και φυγοκέντρηση για 2min στα 11.000g. Απόρριψη του υγρού που πέρασε από την κολώνα στον πλαστικό συλλέκτη.
 9. Μεταφορά της κολώνας σε νέο σωλήνα φυγοκέντρου τύπου erpendorf 1,5ml. Προσθήκη 100μl Elution Buffer CE (προθερμασμένο στους 70°C) στην κολώνα και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5min.
 10. Φυγοκέντρηση για 1min στα 11.000 g προκειμένου να γίνει έκλουση του DNA.
 11. Το απομονωμένο DNA φυλάσσεται στους 4°C για λίγες ημέρες ή στους -20°C για μεγαλύτερα διαστήματα.

3.4. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης και καθαρότητας απομονωμένου DNA

3.4.1. Εξοπλισμός

- Φθορισμόμετρο Qubit 2.0 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific)
- Φασματοφωτόμετρο Analytic Jena Specord 50 Plus
- Κυβέτες για φασματοφωτόμετρο
- Αυτόματες πιπέτες μεταβλητού όγκου (100-1000μl, 20-200μl, 2-20 μl και 1-10μl)

3.4.2. Αντιδραστήρια - Αναλώσιμα

- Qubit™ dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, Ref: Q32853)
- Σωλήνες τύπου erpendorf 0,5ml
- Απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό
- Σωλήνες τύπου erpendorf 1,5ml και 2ml
- Ακρορύγχια για πιπέτες μεταβλητού όγκου

3.4.3. Πρωτόκολλο προσδιορισμού συγκέντρωσης και καθαρότητας απομονωμένου DNA

Μετά την απομόνωση του DNA ακολουθεί το στάδιο του προσδιορισμού της συγκέντρωσης του προκειμένου να καθορισθεί και η απαιτούμενη ποσότητα που πρέπει να χρησιμοποιηθεί για την Real Time PCR. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA με φθορισμομετρία στηρίζεται στην ιδιότητα κάποιων φθοριζουσών χρωστικών ουσιών να εκπέμπουν φθορισμό μόνο όταν συνδέονται με το δίκλωνο DNA (Schweitzer C. and Scaiano J.C. 2003)

Για την μέτρηση της συγκέντρωσης των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το φθορισμόμετρο Qubit 2.0 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) που φαίνεται στην Εικόνα 3.2 και ακολουθήθηκαν οι οδηγίες χρήσης του κατασκευαστή (Qubit® 2.0 Fluorometer User Manual, Catalog no. Q32866, Rev. Date 4 October 2010, Invitrogen, 5791 Van Allen Way Carlsbad, CA 92008, USA). Σύμφωνα με αυτές:

1. Αναμιγνύουμε, σε σωλήνα φυγοκέντρου 2ml, το Qubit dsDNA BR reagent με το Qubit dsDNA BR buffer σε αναλογία 1:200 προκειμένου να φτιάξουμε το μίγμα χρήσης (working solution). Ο τελικός όγκος του working solution και του δείγματος ή standard είναι 200μl. Για κάθε standard λοιπόν απαιτούνται 190μl working solution και 10 μl standard ενώ για κάθε δείγμα από 195 working solution και 5μl δείγματος.
2. Ετοιμάζουμε δύο σωλήνες 0,5ml για τα standard και κατάλληλο αριθμό σωλήνων για τα δείγματα.
3. Μεταφέρουμε 190 μl working solution σε κάθε σωλήνα που θα χρησιμοποιηθεί ως standard.
4. Προσθέτουμε σε κάθε σωλήνα 10 μl του αντίστοιχου standard (standard #1 ή standard #2) και αναμιγνύουμε με vortex για 2-3 sec.
5. Μεταφέρουμε 195 μl working solution σε κάθε σωλήνα δείγματος και προσθέτουμε 5μl δείγματος. Αναμιγνύουμε με vortex για 2-3 sec.
7. Ακολουθεί επώαση των σωλήνων σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min.
8. Μετά την επώαση, στην αρχική οθόνη του φθορισμόμετρου επιλέγουμε τη δοκιμή "DNA" και στην συνέχεια τη δοκιμή "dsDNA Broad Range".
9. Επιλέγουμε την δημιουργία νέας καμπύλης.

10. Το πρόγραμμα μας ζητάει να εισάγουμε το σωλήνα με το standard #1 και στη συνέχεια το σωλήνα με το standard #2. Η βαθμονόμηση και η δημιουργία της καμπύλης αναφοράς έχει ολοκληρωθεί.

11. Στη συνέχεια εισάγουμε στο φθορισμόμετρο τους σωλήνες με τα δείγματα και καταγράφουμε την ένδειξη.

12. Το φθορισμόμετρο διαθέτει αυτοματοποιημένο σύστημα για την άμεση μετατροπή της ένδειξης του Qubit σε ng/μl.



Εικόνα 3.2. Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific)

Για τον ποιοτικό προσδιορισμό (καθαρότητα) του απομονωμένου DNA, ακολούθηθηκε η παρακάτω φωτομετρική μέθοδος (Sambrook et al, 1989) :

1. Αραιώνεται το δείγμα σε καθορισμένη αναλογία με απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό (π.χ. 4 μl δείγματος με 996μl νερό δηλαδή αραιώση 250 φορές)
2. Μετράται η οπτική πυκνότητα του αραιωμένου δείγματος (OD ή optical density) στα 260 nm και στα 280nm σε φασματοφωτόμετρο (Εικόνα 3.3)
3. Υπολογίζεται ο λόγος της απορρόφησης OD260/OD280

Ο προσδιορισμός της καθαρότητας του DNA γίνεται μέσω του λόγου της οπτικής πυκνότητας OD260/OD280 του δείγματος. Όσο ο λόγος αυτός τείνει στο 2 τόσο πιο κα-

θαρό είναι το δείγμα του DNA δηλαδή έχει απαλλαγεί από τις πρωτεΐνες και άλλους ανασταλτικούς παράγοντες που απορροφούν στα 280nm. Γενικά, λόγος μεγαλύτερος του 1.7 αντιστοιχεί σε καθαρό DNA, κατάλληλο για περαιτέρω μοριακές εφαρμογές.



Εικόνα 3.3. Φασματοφωτόμετρο Analytik Jena, μοντέλο Specord 50 Plus

3.5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR) για ανίχνευση και τον ημιποσοτικό προσδιορισμό μαλακού σίτου σε ζυμαρικά σκληρού σίτου

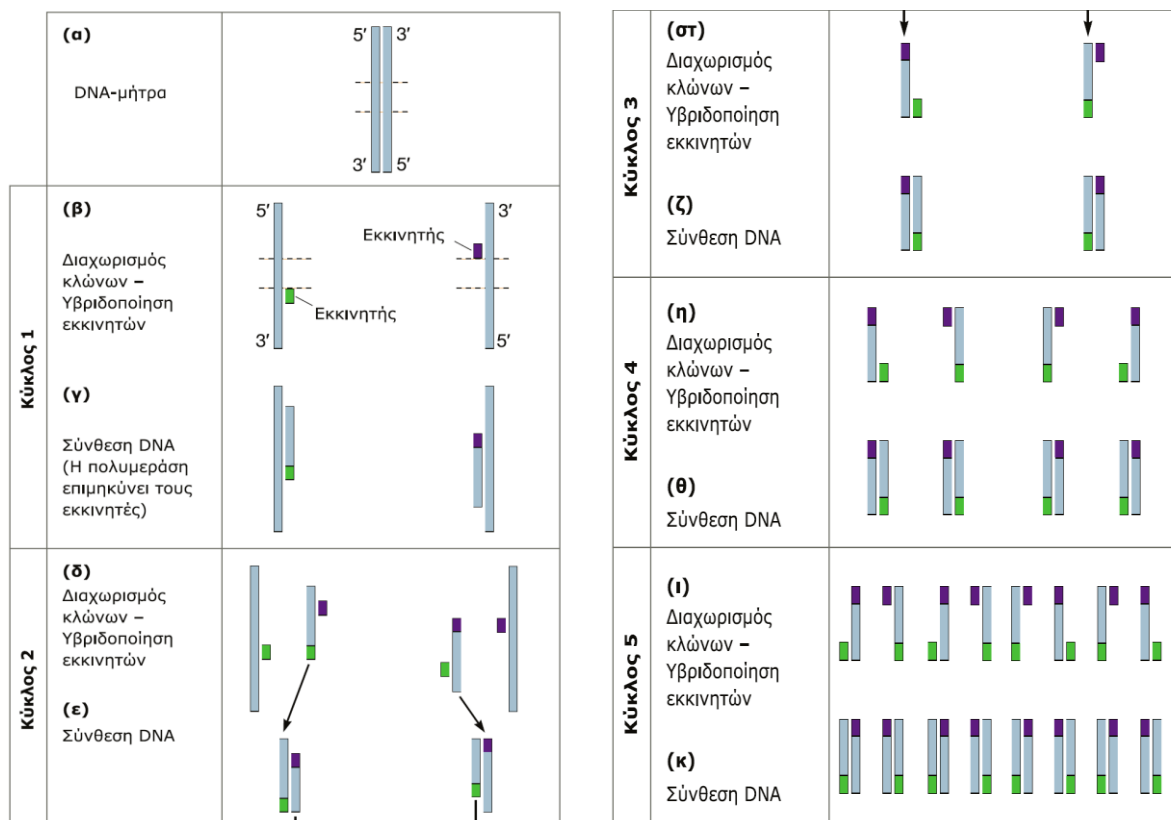
Τελευταίο στάδιο της ανάλυσης για την ανίχνευση και τον ημιποσοτικό προσδιορισμό του μαλακού σίτου σε ζυμαρικά σκληρού σίτου είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time – Polymerase Chain Reaction, Real Time PCR) η οποία και παρουσιάζεται παρακάτω.

3.5.1. Αρχή τεχνικής της Real Time PCR

Αρχικά θα πρέπει να αναλυθεί η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) η οποία είναι μια τεχνική που επιτρέπει την εκλεκτική ενίσχυση (παραγωγή πολυάριθμων αντιγράφων) ενός τμήματος DNA που βρίσκεται μεταξύ δύο περιοχών γνωστής αλληλουχίας. Η τεχνική PCR στηρίζεται στην ταυτόχρονη χρησιμοποίηση δύο ολιγονουκλεοτιδικών τμημάτων (εκκινήτων, primers) συμπληρωματικών προς τα 3' άκρα κάθε μονόκλωνης αλυσίδας του τμήματος DNA που επιθυμούμε να πολλαπλασιάσουμε εκλεκτικά.

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε πλαστικό σωλήνα που περιέχει δείγμα DNA, ρυθμιστικό διάλυμα, MgCl₂, δεοξυνουκλεοτίδια, δύο ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινήτες και

DNA πολυμεράση. Ο σωλήνας τοποθετείται σε ειδική συσκευή που προγραμματίζεται να τον θερμαίνει και να τον ψύχει ώστε να πραγματοποιούνται τα διάφορα στάδια της αντίδρασης. Αρχικά το δείγμα του DNA αποδιατάσσεται, κάτι που επιτυγχάνεται με θέρμανση στους 95°C. Ακολούθως το δείγμα ψύχεται στους 55 - 60°C, οπότε οι εκκινητές προσδένονται με τις συμπληρωματικές αλυσίδες του αποδιαταγμένου DNA. Στο τρίτο στάδιο το οποίο λαμβάνει χώρα στους 72°C, η πολυμεράση αντιγράφει το DNA επιμηκώνοντας τους εκκινητές. Αυτός ο κύκλος σύνθεσης - αποδιάταξης (ψύξης - θέρμανσης) επαναλαμβάνεται πολλές φορές (35 - 40 κύκλοι) πολλαπλασιάζοντας εκθετικά το DNA της περιοχής στόχου. Το κύριο προϊόν της αντίδρασης είναι δίκλωνο DNA με άκρα που ορίζονται από τα 5' άκρα των εκκινητών και μήκος που εξαρτάται από τη μεταξύ τους απόσταση. Επίσης παράγονται και άλλα μεγαλύτερου μήκους τμήματα, αλλά σε αμελητέο ποσοστό, αφού πολλαπλασιάζονται γραμμικά, ενώ η αλληλουχία στόχος εκθετικά (Saiki et al., 1985; Mullis and Faloona, 1987; Fountas, 2002) (Σχήμα 3.2).

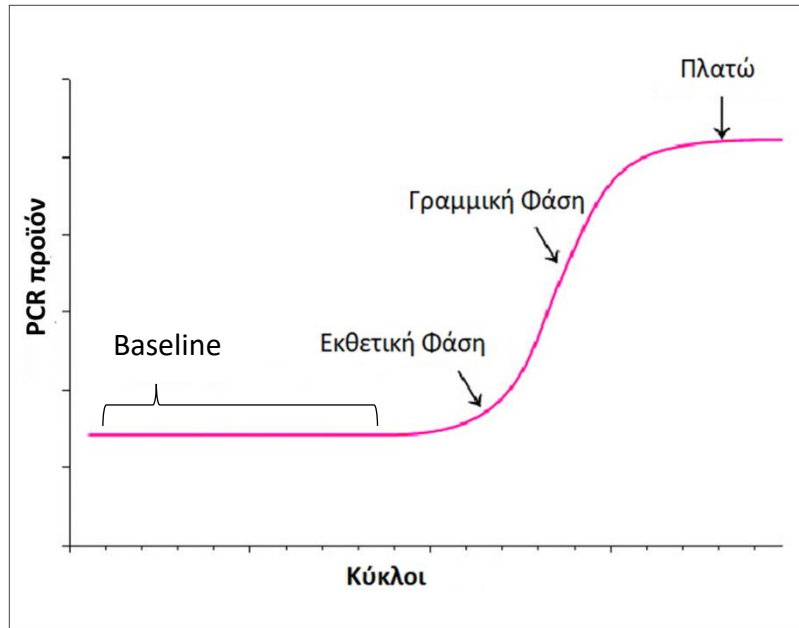


Σχήμα 3.2. Σχηματική απεικόνιση των βημάτων που λαμβάνουν χώρα στους πρώτους κύκλους της PCR με αποτέλεσμα την εκθετική αύξηση της αλληλουχίας στόχου (Πηγή: Κακάνη και συνεργάτες, 2010)

Για τον ποιοτικό έλεγχο των προϊόντων της PCR ακολουθεί η ηλεκτροφόρηση των αντιδράσεων σε πήκτωμα αγαρόζης, συνήθως 2%, με ρυθμιστικό διάλυμα 1X TBE και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο. Παράλληλα με τα δείγματα ηλεκτροφορείται και δείκτης μοριακού βάρους όπως π.χ. DNA του φάγου ΦΧ174 που έχει υποστεί πέψη με το περιοριστικό ένζυμο Hae III (θραύσματα μήκους 1.353, 1.078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118 και 78 bp) προκειμένου να διαπιστώσουμε αν το προϊόν της PCR είναι του αναμενόμενου μεγέθους. Το βρωμιούχο αιθίδιο κατά την ηλεκτροφόρηση προσδένεται στο δί-κλωνο DNA κάνοντας το ορατό όταν εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία.

Στην PCR, το αποτέλεσμα της ενίσχυσης του γονιδίου στόχου γίνεται μετά την ολοκλήρωση 35-40 κύκλων και απαιτεί την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης για να γίνει ορατό. Αντιθέτως στην PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR), που αποτελεί εξέλιξη της συμβατικής PCR, η αύξηση της ποσότητας της αλληλουχίας στόχου μετράται και απεικονίζεται καθώς προχωρά η αντίδραση, σε πραγματικό χρόνο. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της μέτρησης, σε κάθε κύκλο, της ποσότητας φθορισμού που εκπέμπει μια φθορίζουσα ουσία που είναι προσδεμένη σε ολιγονουκλεοτίδιο ιχνηθέτη (probe). Η αύξηση της ποσότητας φθορισμού είναι ανάλογη της αύξησης του παραγόμενου προϊόντος (αλληλουχίας) της PCR ενώ σχετίζεται άμεσα με την αρχική ποσότητα του DNA που προστέθηκε στην αντίδραση (Higuchi et al., 1993).

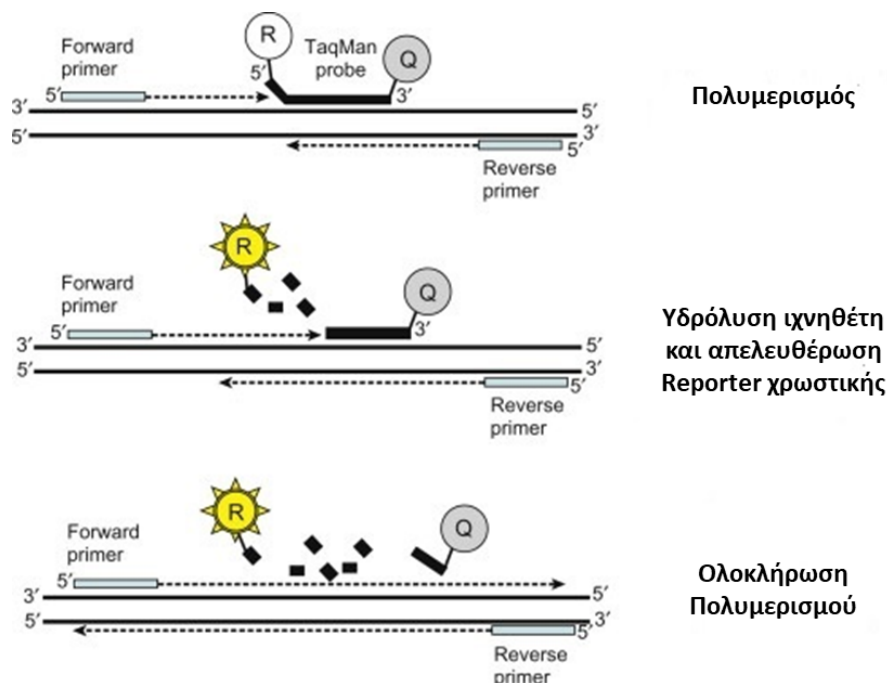
Από την μέτρηση του φθορισμού ανά κύκλο, προκύπτει η καμπύλη του Σχήματος 3.3. Βάσει αυτής η αντίδραση της PCR μπορεί να χωριστεί σε τρεις φάσεις: α) την εκθετική φάση, κατά την οποία τα αντιδραστήρια βρίσκονται σε περίσσεια και η απόδοση της αντίδρασης είναι η μέγιστη με αποτέλεσμα τον διπλασιασμό της αλληλουχίας στόχου ανά κύκλο, β) καθώς προχωρά η αντίδραση επέρχεται η γραμμική φάση, κατά την οποία η απόδοση της αντίδρασης μειώνεται λόγω της μείωσης της συγκέντρωσης των αντιδραστηρίων (dNTP`s, εκκινητές, ιχνηθέτης) αλλά και της μείωσης της ενζυμικής δραστηριότητας της Taq πολυμεράσης και γ) την φάση κορεσμού ή πλατώ όπου τα αντιδραστήρια της PCR έχουν εξαντληθεί οπότε και σταματάει ο πολλαπλασιασμός του γονιδίου στόχου (Nestorov et al., 2013).



Σχήμα 3.3. Στην παραπάνω καμπύλη απεικονίζονται οι τρεις φάσεις (εκθετική, γραμμική και πλατώ) της PCR. (Προσαρμοσμένο από: Nestorov et al., 2013)

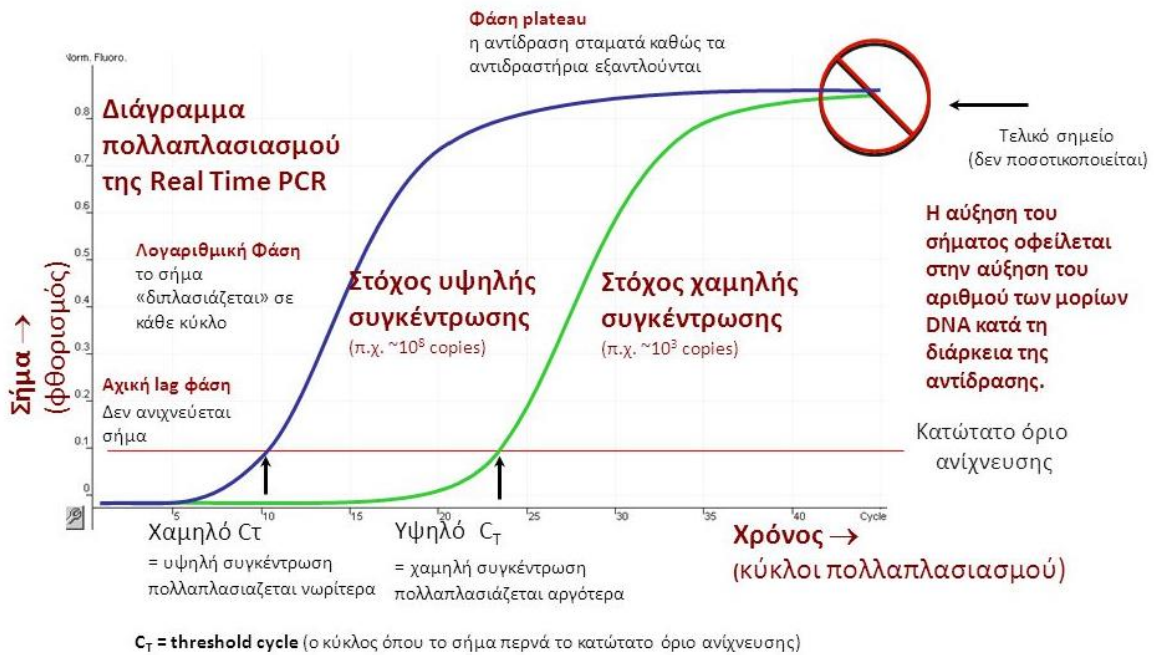
Υπάρχουν διάφορες τεχνικές φθορισμού που χρησιμοποιούνται στην Real Time PCR (SYBR green, Taqman, Molecular beacons, Scorpions) αλλά παρακάτω θα αναλυθεί η τεχνική Taqman που χρησιμοποιήθηκε στην εργασία αυτή. Στην περίπτωση της τεχνικής TaqMan, στην αντίδραση της Real Time PCR χρησιμοποιούνται δύο ολιγονουκλεοτίδια ως εκκινητές και ένα ολιγονουκλεοτίδιο ως ιχνηθέτης που προσδένεται στο εσωτερικό τμήμα (μεταξύ των εκκινητών) της αλληλουχίας που θα ενισχυθεί. Ο ιχνηθέτης φέρει στο 5' άκρο του μια χρωστική που φθορίζει (reporter dye) ενώ στο 3' άκρο είναι προσδεμένο ένα μόριο απόσβεσης (quencher). Όταν τα δύο μόρια είναι κοντά ο quencher εξουδετερώνει τον φθορισμό του reporter μέσω του φαινομένου FRET (Σχήμα 3.4) (Alcoba-Flórez et al., 2007). Βασικό ρόλο στην τεχνική TaqMan παίζει η 5'-3' δράση εξωνουκλεάσης της DNA πολυμεράσης που έχει ως αποτέλεσμα την υδρόλυση του ιχνηθέτη. Όταν λοιπόν ο ιχνηθέτης είναι ακέραιος, δεν προκύπτει φθορισμός. Καθώς όμως λαμβάνει χώρα ο πολυμερισμός από την DNA πολυμεράση ο ιχνηθέτης υδρολύεται με αποτέλεσμα την απομάκρυνση της reporter dye από τον quencher. Ακολουθεί παύση του φαινομένου εξουδετέρωσης της φθορίζουσας χρωστικής και εκπομπή φθορισμού από την reporter dye. Κατά την εξέλιξη της PCR και μετά από κάθε κύκλο, αυξάνονται τα μόρια του ιχνηθέτη που υδρολύονται και αντίστοιχα τα μόρια της φθορίζουσας χρωστικής που απελευθερώνονται

με παράλληλη αύξηση της έντασης του φθορισμού. Η ένταση αυτή είναι ανάλογη της παραγόμενης ποσότητας της αλληλουχίας στόχου και σχετίζεται άμεσα με την αρχική ποσότητα DNA που προστέθηκε στην Real Time PCR.



Σχήμα 3.4. Αρχή της τεχνικής Taqman. Διακρίνονται οι δύο εκκινητές (forward και reverse) και ο ιχνηθέτης στο εσωτερικό της αλληλουχίας στόχου. Η DNA πολυμεράση με την 5'-3' δράση εξωνουλεάσης υδρολύει τον ιχνηθέτη επιτρέποντας την απελευθέρωση της φθορίζουσας χρωστικής (®) στο 5' άκρο και την παραγωγή φθορισμού. Όσο περισσότερη ποσότητα της αλληλουχίας στόχου παράγεται τόσο περισσότερο αυξάνει και η ποσότητα του φθορισμού (Προσαρμοσμένο από Butler, 2012).

Στο Σχήμα 3.5, απεικονίζεται η κινητική της Real Time PCR για μια αλληλουχία στόχο σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις (χαμηλή και υψηλή συγκέντρωση). Σημαντική παράμετρος για την μετατροπή του φθορισμού σε μετρήσιμο μέγεθος είναι η τιμή Ct (threshold cycle), η οποία αντιστοιχεί στο αριθμό των κύκλων που απαιτούνται ώστε η ένταση του φθορισμού να ξεπεράσει το κατώφλι (threshold) πάνω από το οποίο γίνεται πλέον ανιχνεύσιμη. Όπως φαίνεται από τις δύο καμπύλες, όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση της αρχικής αλληλουχίας DNA στο δείγμα τόσο μικρότερη είναι η τιμή Ct (Wong et al, 2005). Δηλαδή η τιμή Ct είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του DNA στόχου που προστίθεται στην αντίδραση.



Σχήμα 3.5. Σχηματική απεικόνιση της κινητικής της Real Time PCR. (Πηγή: <https://slideplayer.gr/slide/4866602/>, Μαρία Σάτρα, Ε.ΔΙ.Π, Εργ. Βιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας)

Ανάλογα με το αντικείμενο και το τελικό στόχο μιας εργασίας ή ενός πειράματος, υπάρχουν δύο τρόποι για την ποσοτικοποίηση των δεδομένων που προκύπτουν από την Real Time PCR: α) Η πρώτη αφορά την απόλυτη ποσοτικοποίηση κατά την οποία κατασκευάζεται μια καμπύλη αναφοράς η οποία προκύπτει από τις διαδοχικές αραιώσεις ενός υλικού αναφοράς γνωστής συγκέντρωσης για το υπό μελέτη γονίδιο. Με χρήση της καμπύλης αναφοράς μπορούμε να προσδιορίσουμε την συγκέντρωση του σε άγνωστα δείγματα. β) Ο δεύτερος τρόπος είναι η σχετική ποσοτικοποίηση κατά την οποία συγκρίνεται η τιμή C_T του υπό μελέτη γονιδίου με εκείνη του ίδιου γονιδίου ενός υλικού αναφοράς (reference material). Εκτός από την τιμή C_T , για την σχετική ποσοτικοποίηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί και η τιμή ΔC_T που αντιστοιχεί στην διαφορά τιμής C_T του υπό μελέτη γονιδίου και της τιμής C_T ενός γονιδίου αναφοράς.

Η χρήση της τιμής ΔC_T έχει ως αποτέλεσμα την κανονικοποίηση (normalization) του αποτελέσματος ώστε να μην εξαρτάται από διαφορές στη συγκέντρωση DNA μεταξύ του δείγματος και του υλικού αναφοράς, γεγονός που επιτρέπει την άμεση και ακριβέστερη σύγκριση μεταξύ τους για την εξαγωγή του αποτελέσματος.

3.5.2. Εφαρμογή της Real Time PCR για την ανίχνευση και τον ημιποσοτικό προσδιορισμό μαλακού σίτου σε ζυμαρικά σκληρού σίτου

Η αρχή της μεθόδου της Real Time PCR για τον ημιποσοτικό προσδιορισμό του μαλακού σίτου στηρίζεται στην ανίχνευση ενός τμήματος της αλληλουχίας του γονιδίου της πρωτεΐνης Waxy-D1, που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 7 του γονιδιώματος D (Maryami, 2020), και επομένως απαντάται μόνο στο μαλακό σίτο (το γονιδίωμα D απουσιάζει στο σκληρό σίτο) και ενός τμήματος της αλληλουχίας του γονιδίου της πλούσιας σε προλίνη πρωτεΐνης PRP (Proline Rich Protein) η οποία απαντάται και στα δύο είδη σίτου .

Ειδικότερα, για την ανίχνευση των παραπάνω αλληλουχιών χρησιμοποιείται σύστημα μορίων εκκινητών/μόριο ιχνηθέτης (primers/probe) που ενισχύει:

- **Τμήμα του γονιδίου της πρωτεΐνης Waxy-D1 του μαλακού σίτου.** Το προϊόν της αντίδρασης έχει μέγεθος **102bp**
- **Τμήμα του γονιδίου της πλούσιας σε προλίνη πρωτεΐνης PRP (Proline Rich Protein) που απαντάται και στο σκληρό και το μαλακό σίτο (γονίδιο αναφοράς).** Το προϊόν της αντίδρασης έχει μέγεθος **117bp**.

Για την ανίχνευση του μαλακού σίτου χρησιμοποιείται η τιμή Ct_{WaxyD1} , ενώ για τον ημιποσοτικό προσδιορισμό χρησιμοποιείται η τιμή $\Delta Ct_{WaxyD1-PRP}$ που αντιστοιχεί στην διαφορά μεταξύ της τιμής Ct_{WaxyD1} του εξειδικευμένου για το μαλακό σίτο γονιδίου Waxy-D1 και της τιμής Ct_{PRP} του γονιδίου PRP για τον σίτο:

$$\Delta Ct_{WaxyD1-PRP} = Ct_{WaxyD1} - Ct_{PRP}$$

Αφού ολοκληρωθεί η αντίδραση της Real Time PCR ακολουθεί η ανάλυση των δεδομένων προκειμένου να προκύψουν οι τιμές Ct_{WaxyD1} , Ct_{PRP} και $\Delta Ct_{WaxyD1-PRP}$ των δειγμάτων και του υλικού αναφοράς (π.χ. άλευρο με ποσοστό 3% w/w μαλακού σίτου σε σκληρό σίτο) που αναλύεται παράλληλα με τα δείγματα. Δείγματα τα οποία η τιμή Ct_{WaxyD1} είναι μικρότερη ή ίση της τιμής του ορίου ανίχνευσης (βλέπε §3.8), περιέχουν μαλακό σίτο σε ποσοστό μεγαλύτερο ή ίσο του ορίου ανίχνευσης που προσδιορίστηκε. Εφόσον ανιχνευθεί μαλακός σίτος, ακολουθεί ο ημιποσοτικός προσδιορισμός του. Ζυμαρικά σκληρού σίτου στα οποία η τιμή $\Delta Ct_{WaxyD1-PRP}$ είναι μικρότερη από την τιμή $\Delta Ct_{WaxyD1-PRP}$ του υλικού αναφοράς 3% w/w, περιέχουν μαλακό σίτο σε ποσοστό μεγαλύτερο του 3%.

3.5.3. Εξοπλισμός

- Θερμικός Κυκλοποιητής Πραγματικού Χρόνου ABI 7500 Real-Time PCR System
- Φορητός Υπολογιστής με κατάλληλο λογισμικό για χειρισμό του οργάνου και επεξεργασία των δεδομένων.
- PCR plates
- Αυτόματες πιπέτες μεταβλητού όγκου (100-1000μl, 20-200μl, 2-20 μl και 1-10μl)
- Απαγωγός για προετοιμασία RT-PCR αντιδράσεων (PCR Workstation)
- Vortex
- Φυγόκεντρος πάγκου για φυγοκέντρωση σωλήνων τύπου 1,5ml και 2ml

3.5.4. Αντιδραστήρια

- Real-Time PCR Buffer - TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Φυλάσσεται στο ψυγείο σε θερμοκρασία 2-8°C
- Υλικά Αναφοράς (διάλυμα DNA 1%, 3% και 12% μαλακού σίτου σε σκληρό σίτο). Φυλάσσονται στο σκοτάδι στους 4°C.
- H₂O απεσταγμένο και αποστειρωμένο
- Ζεύγος μορίων εκκινητών (primers) και μόριο ιχνηθέτης (probe) για το γονίδιο της πλούσιας σε προλίνη πρωτεΐνης (Proline Rich Protein, PRP) και το γονίδιο της πρωτεΐνης Waxy-D1 του μαλακού σίτου. Φυλάσσονται στο σκοτάδι στους -20°C. Η αλληλουχία των εκκινητών και του ιχνηθέτη για κάθε αλληλουχία στόχο παρουσιάζονται παρακάτω στους Πίνακες 3.2 & 3.3 (Angers et al., 2013; Imai et al., 2012; Iida et al., 2005):

Πίνακας 3.2. Αλληλουχία εκκινητών/ιχνηθέτη (primers/probe) για το γονίδιο της πρωτεΐνης Waxy-D1 του μαλακού σίτου (*Triticum aestivum*)

Γονίδιο πρωτεΐνης Waxy-D1	
Όνομα	Αλληλουχία (5'-3')
Wx012-5'	5'- GGTCGCAGGAACAGAGGTGT-3'
Wx012-3'	5'- GGTGTTCTCCATTGCGAAA-3'
Wx012-T	5'-(FAM)- CAAGGCGGCCGAAATAGGTTGCC -(TAMRA)-3'

Πίνακας 3.3. Αλληλουχία εκκνητών/ιχνηθέτη (primers/probe) για το γονίδιο της πλούσιας σε προλίνη πρωτεΐνης (Proline Rich Protein, PRP) του σίτου (*Triticum*)

Γονίδιο Proline Rich Protein (PRP)	
Όνομα	Αλληλουχία (5'-3')
PRP8F	5'- GCACCCATGATGAGTACTACTATTCTGTA -3'
PRPds6R	5'- TGCAAACGAATAAAAGCATGTG -3'
PRP-Taq5	5'-(FAM)- CTGTGCACATGACTCAGTTGTTCTTTCGTG -(TAMRA)-3'

3.5.5. Προετοιμασία αντιδράσεων Real Time PCR

Η προετοιμασία των αντιδράσεων της Real Time PCR λαμβάνει χώρα σε κατάλληλο απαγωγό με UV λάμπα και HEPA φίλτρα (PCR Workstation) προκειμένου να αποφευχθούν οι επιμολύνσεις και ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα.

1. Η παρασκευή των διαλυμάτων mastermix για την αλληλουχία του γονιδίου PRP και Waxy-D1 γίνονται σε διαφορετικούς σωλήνες τύπου erpendorf 2ml.
2. Ο ολικός όγκος της αντίδρασης PCR είναι 25μl. Τα απαιτούμενα αντιδραστήρια για κάθε σύστημα RT-PCR αναφέρονται στους Πίνακες 3.4 & 3.5.

Πίνακας 3.4. Master mix για την αλληλουχία του γονιδίου της πλούσιας σε προλίνη πρωτεΐνης (Proline Rich Protein, PRP) του σίτου (*Triticum*)

Αντιδραστήριο	Τελική Συγκέντρωση	μl/αντίδραση
Applied Biosystems, TaqMan® Universal PCR Master Mix 2x	1 x	12.5
PRP8F (10μM)	500nM	1,25
PRPds6R (10μM)	500nM	1,25
PRP-Taq5 (Probe) (10μM)	200nM	0,50
H ₂ O	#	4,50
DNA (20ng/μl)	#	5,00
Τελικός όγκος αντίδρασης		25

Πίνακας 3.5. Master mix για την αλληλουχία του γονιδίου της πρωτεΐνης Waxy-D1 του μαλακού Σίτου (*Triticum aestivum*)

Αντιδραστήριο	Τελική Συγκέντρωση	μl/αντίδραση
Applied Biosystems, TaqMan® Universal PCR Master Mix 2x	1 x	12.5
Wx012-5' (10μM)	500nM	1,25
Wx012-3' (10μM)	500nM	1,25
Wx012-T (Probe) (10μM)	200nM	0,50
H ₂ O	#	4,50
DNA (20ng/μl)	#	5,00
Τελικός όγκος αντίδρασης		25

3. Όλα τα αναλώσιμα υλικά που χρησιμοποιούνται (σωλήνες φυγοκέντρου τύπου erpendorf, σωλήνες RT-PCR ή RT-PCR plates και ακρορύγχια) θα πρέπει να είναι κατάλληλα για χρήση σε αντιδράσεις RT-PCR. Θα πρέπει να είναι DNase-free και RNA-free ενώ για την αποφυγή επιμολύνσεων η προσθήκη του DNA σε κάθε αντίδραση RT-PCR πραγματοποιείται με χρήση filter tip.

4. Βγάζουμε από το ψυγείο και το καταψύκτη τα απαιτούμενα αντιδραστήρια τα οποία αφού αποψυχθούν αναδεύονται και φυγοκεντρώνονται σύντομα (5 sec, 10.000 rpm). Τα αντιδραστήρια τοποθετούνται και μεταφέρονται με cryo-box στους 4°C σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας.

5. Από τους Πίνακες 3.4 & 3.5 και με βάση τον αριθμό των αντιδράσεων, υπολογίζουμε την ποσότητα του κάθε αντιδραστήριου για την παρασκευή του master mix.

6. Σε διαφορετικούς σωλήνες φυγοκέντρου τύπου erpendorf 2ml (ένα για το γονίδιο PRP και ένα για το γονίδιο Waxy-D1) προσθέτουμε όλα τα αντιδραστήρια, εκτός από το DNA, για την παρασκευή κατάλληλης ποσότητας master mix.

7. Ανάδευση (vortex) των master mix και σύντομη φυγοκέντρωση (5 sec, 10.000 rpm).

8. Τα διαλύματα master mix μοιράζονται στα πηγαδάκια του plate ή στα tubes της Real Time PCR. Σε κάθε πηγαδάκι ή tube μεταφέρουμε 20 μl διαλύματος mastermix με βάση τον σχεδιασμό των θέσεων του κάθε δείγματος ή υλικού αναφοράς στο plate ή στα tubes.

9. Προσθέτουμε το DNA των δειγμάτων και των υλικών αναφοράς. Συγκεκριμένα προσθέτουμε 5μl διαλύματος συγκέντρωσης 20μl δηλαδή συνολική ποσότητα 100ng. Τέλος προσθέτουμε 5μl από το δείγμα ελέγχου της εκχύλισης (extraction control) και το H₂O ως τυφλό μάρτυρα (No template control).

10. Καλύπτουμε το plate με κατάλληλη μεμβράνη ή τα tubes με κατάλληλο καπάκι. Τινάζουμε προσεκτικά το plate ή φυγοκεντρούμε τα tubes φροντίζοντας να μην υπάρχουν φυσαλίδες στο διάλυμα.

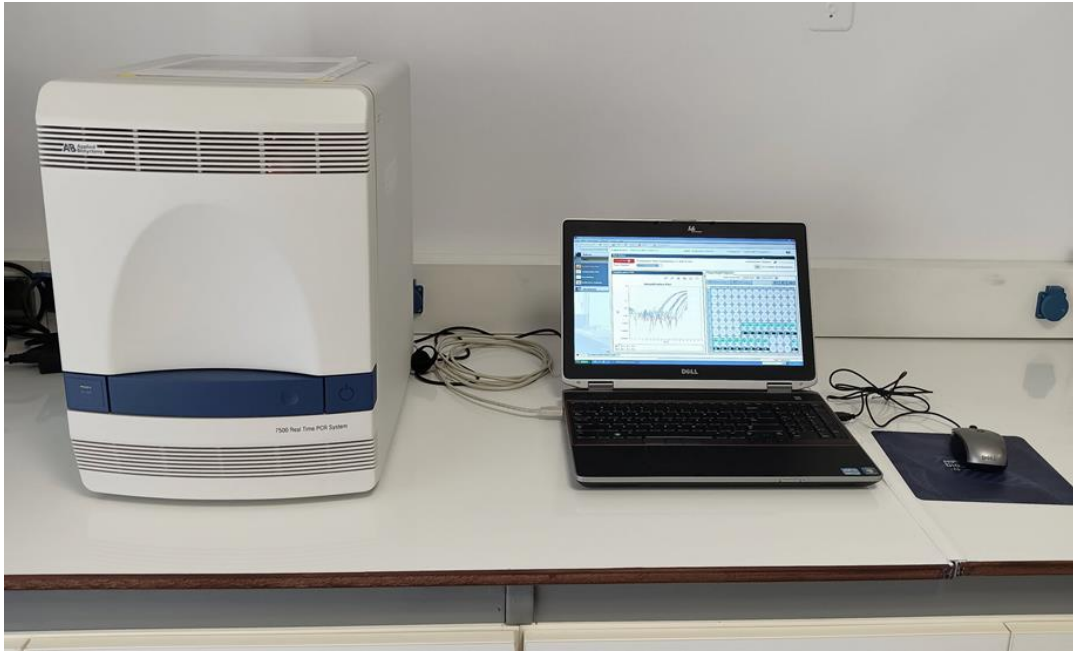
11. Τοποθετούμε το plate ή tubes στην Real Time PCR (Εικόνα 3.4). Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα και ο αριθμός των κύκλων για κάθε στάδιο, που χρησιμοποιήθηκε στην Real Time PCR για την ενίσχυση των γονιδίων PRP και Waxy-D1, φαίνεται στον παρακάτω Πίνακα 3.6.

Πίνακας 3.6. Θερμοκρασιακό προφίλ για την Real Time PCR

Στάδιο	T°C	Χρόνος (sec)	Κύκλοι
AmpErase® UNG	50	120	1x
Αρχική αποδιάταξη	95	600	1x
Πολλαπλασιασμός	95 60	15 60	40x

12. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης γίνεται ανάλυση των αποτελεσμάτων, με την χρήση του λογισμικού 7500 Software v2.0.6 (Applied Biosystems) προκειμένου να υπολογιστούν οι τιμές Ct_{WaxyD1} , Ct_{PRP} και $\Delta Ct_{WaxyD1-PRP}$ των δειγμάτων και του/των υλικών αναφοράς.

13. Δείγματα ζυμαρικών στα οποία η τιμή Ct_{WaxyD1} είναι μικρότερη ή ίση της τιμής του ορίου ανίχνευσης (βλέπε §3.8), περιέχουν μαλακό σίτο σε ποσοστό μεγαλύτερο ή ίσο του ορίου ανίχνευσης. Ακολούθως, δείγματα ζυμαρικών για τα οποία η τιμή $\Delta Ct_{WaxyD1-PRP}$ είναι μικρότερη από την τιμή $\Delta Ct_{WaxyD1-PRP}$ του υλικού αναφοράς π.χ. 3% w/w, περιέχουν μαλακό σίτο σε ποσοστό μεγαλύτερο του 3%.



Εικόνα 3.4. Real Time PCR 7500 της Applied Biosystems και υπολογιστής για την καταγραφή και επεξεργασία των δεδομένων.

3.6. Παρασκευή υλικών αναφοράς

Η παρασκευή των υλικών αναφοράς έγινε με χρήση μαλακού και σκληρού σίτου, η προμήθεια των οποίων έγινε από εταιρείες που δραστηριοποιούνται στο εμπόριο σίτου. Αρχικά έγινε άλεση του 100% μαλακού (*Triticum aestivum*) και 100% σκληρού σίτου (*Triticum durum*) σε μορφή λεπτόκοκκου αλεύρου, του ίδιου κοκκομετρικού μεγέθους. Ακολούθως πραγματοποιήθηκε πολύ καλή ανάμιξη κατάλληλων ποσοτήτων των παραπάνω αλεύρων μαλακού και σκληρού σίτου προκειμένου να παρασκευασθούν ομοιογενή υλικά αναφοράς (Πίνακας 3.7). Για την άλεση και ανάμιξη των αλεύρων χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Thermomix TM5 (βλέπε §3.2).

Πίνακας 3.7. Υλικά αναφοράς που παρασκευάστηκαν για τον ημιποσοτικό προσδιορισμό μαλακού σίτου.

Υλικό αναφοράς (% w/w μαλακού σίτου σε σκληρό σίτο)	Ποσότητα μαλακού σίτου (g)	Ποσότητα σκληρού σίτου (g)
1	2	198
3	6	194
12	24	176

3.7. Επαλήθευση καταλληλότητας μεθόδου απομόνωσης DNA

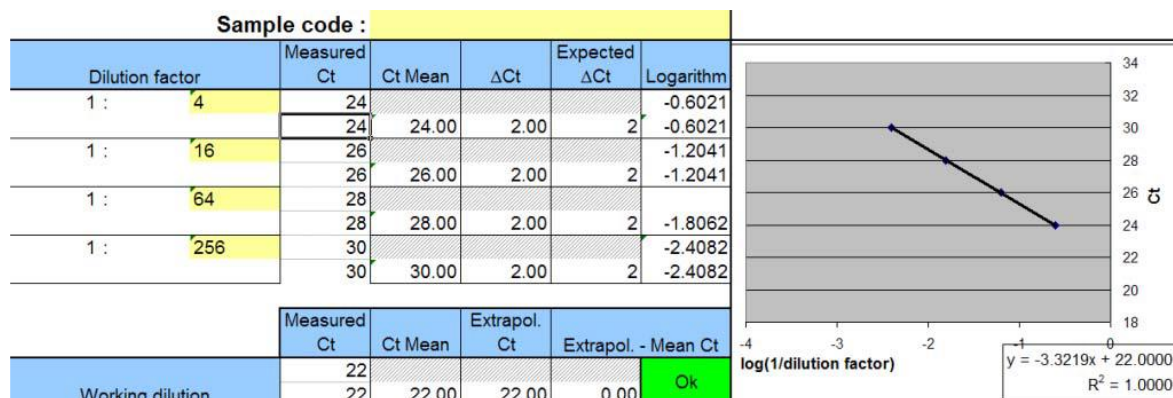
Προκειμένου να επαληθευτεί η καταλληλότητα της μεθόδου απομόνωσης (Nucleospin Food Kit) για την ανίχνευση και ημιοσοτικό προσδιορισμό μαλακού σίτου σε ζυμαρικά σκληρού σίτου, εξετάστηκαν οι παρακάτω παράμετροι:

⇒ Ποσότητα και ποιότητα απομονωμένου DNA

Έγινε αξιολόγηση της μεθόδου απομόνωσης του DNA όσον αφορά την συγκέντρωση (προσδιορισμός με Qubit fluorometer) και την ποιότητα του απομονωμένου DNA (φωτομετρικός προσδιορισμός του λόγου 260nm/280nm) από δείγματα ζυμαρικών και αλεύρου σίτου.

⇒ Έλεγχος για παρεμπόδιση λόγω υποστρώματος (Inhibition test)

Ο έλεγχος για τυχόν παρεμποδίσεις λόγω υποστρώματος (inhibition test) πραγματοποιήθηκε για να αξιολογηθεί η μέθοδος απομόνωσης του DNA και να προσδιοριστεί η κατάλληλη συγκέντρωση του DNA που πρέπει να χρησιμοποιείται στην Real Time PCR. Ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφεται στο τεχνικό εγχειρίδιο EUR 29015 EN (Hougs et al., 2017). Σύμφωνα με την διαδικασία αυτή πραγματοποιείται αρχικά απομόνωση από το προς ανάλυση υπόστρωμα (ζυμαρικά ή άλευρο σίτου) εις διπλούν. Το απομονωμένο DNA αραιώνεται αρχικά σε εκείνη την συγκέντρωση που προορίζεται να χρησιμοποιηθεί στην Real Time PCR (working solution ή συγκέντρωση DNA εργασίας). Από αυτό το αρχικό working solution, παρασκευάζεται μια τετραπλή σειρά αραιώσεων (1:4, 1:16, 1:64 και 1:256). Προκειμένου να εκτιμηθεί η απουσία αναστολέων, κάνουμε γραφική παράσταση των τιμών Ct των τεσσάρων αραιωμένων δειγμάτων (1:4 έως 1:256) σε συνάρτηση με τον λογάριθμο του συντελεστή αραιώσης (dilution factor) και υπολογίζεται η εξίσωση της καμπύλης με γραμμική παλινδρόμηση (Εικόνα 3.5). Η τιμή Ct που προκύπτει από τη γραμμική παλινδρόμηση (Extrapolated Ct) συγκρίνεται με την τιμή Ct του working solution. Αποδεκτή συγκέντρωση DNA (working solution) για την περαιτέρω ανάλυση, είναι εκείνη για την οποία πληρούνται τρεις προϋποθέσεις: η κλίση της καμπύλης πρέπει να είναι μεταξύ -3,6 και -3,1, ο συντελεστής προσδιορισμού R^2 να είναι ίσος ή μεγαλύτερος από 0,98 και η διαφορά μεταξύ της μετρούμενης Ct του working solution και της Extrapolated Ct τιμής να είναι μικρότερη από 0,5 κύκλους.



Εικόνα 3.5. Παράδειγμα ελέγχου για τυχόν παρεμποδίσεις λόγω υποστρώματος (Πηγή: Hougs et al., 2017, EUR 29015 EN)

3.8. Επαλήθευση καταλληλότητας της μεθόδου Real Time PCR

Για την επαλήθευση της καταλληλότητας της μεθόδου Real time PCR για την ανίχνευση και ημιοσοτικό προσδιορισμό μαλακού σίτου σε ζυμαρικά σκληρού σίτου, εξετάστηκαν οι παρακάτω παράμετροι:

⇒ Εξειδίκευση (Specificity)

Προκειμένου να επαληθευτεί ότι η αλληλουχία του γονιδίου Waxy-D1 απαντάται αποκλειστικά και μόνο στο μαλακό σίτο και όχι στο σκληρό σίτο ή σε άλλα φυτικά είδη, γεγονός που θα μπορούσε να οδηγήσει σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις Real Time PCR για την αλληλουχία Waxy-D1 στο μαλακό και σκληρό σίτο και επιπλέον στα εξής φυτικά είδη: σόγια, καλαμπόκι, ρύζι, βρώμη, κριθάρι, σίκαλη και ελαιοκράμβη. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ποσότητα 100ng από το κάθε φυτικό είδος.

Παράλληλα για να επαληθευτεί ότι η αλληλουχία του γονιδίου PRP απαντάται αποκλειστικά και μόνο στο σίτο και όχι σε άλλα φυτικά είδη, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις Real Time PCR για την αλληλουχία του γονιδίου PRP στο μαλακό και σκληρό σίτο καθώς και στα εξής φυτικά είδη: σόγια, καλαμπόκι, ρύζι, βρώμη, κριθάρι, σίκαλη και ελαιοκράμβη. Και στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιήθηκαν 100ng από το κάθε φυτικό είδος.

⇒ **Επαναληψιμότητα (Repeatability)**

Ανεξάρτητες μετρήσεις λαμβάνονται με την ίδια μέθοδο, σε ίδιο δείγμα, στο ίδιο εργαστήριο, από τον ίδιο αναλυτή, με τον ίδιο εξοπλισμό σε σύντομο χρονικό διάστημα. Για την επαλήθευση λοιπόν της επαναληψιμότητας χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα το υλικό αναφοράς 3% w/w μαλακός σίτος σε σκληρό σίτο. Από το υλικό αναφοράς απομονώθηκε DNA εις τετραπλούν και για κάθε απομόνωση έγιναν τρεις Real Time PCR επαναλήψεις. Για την εκτίμηση της επαναληψιμότητας χρησιμοποιήθηκε η σχετική τυπική απόκλιση (RSDr, Relative repeatability standard deviation). Αποδεκτή τιμή RSDr% είναι εκείνη που είναι μικρότερη ή ίση του 25% (Broeders et al., 2014).

⇒ **Το όριο ανίχνευσης (Limit of detection)**

Για τον προσδιορισμό του ορίου ανίχνευσης και της ευαισθησίας πραγματοποιήθηκαν δέκα RT-PCR επαναλήψεις με ποσότητα που αντιστοιχεί σε 10 αντίγραφα του γονιδιώματος του μαλακού σίτου. Αποδεκτό είναι το αποτέλεσμα εφόσον και οι δέκα επαναλήψεις δίνουν θετικό αποτέλεσμα.

⇒ **Αναπαραγωγιμότητα (Reproducibility)**

Ανεξάρτητες μετρήσεις λαμβάνονται με την ίδια μέθοδο, σε όμοιο δείγμα κάτω από όσο το δυνατόν διαφορετικές συνθήκες (χρονικό διάστημα ή διαφορετικός αναλυτής ή παρτίδα αντιδραστηρίων ή διαφορετικός εξοπλισμός ή διαφορετικό εργαστήριο). Και στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιείται η σχετική τυπική απόκλιση (RSDR, Reproducibility relative standard deviation) για την αξιολόγηση της αναπαραγωγιμότητας. Αποδεκτή τιμή RSDR% είναι εκείνη που είναι μικρότερη ή ίση του 25% (Broeders et al., 2014).

⇒ **Εμβολιασμός (spiking) δειγμάτων ζυμαρικών με γνωστή ποσότητα μαλακού σίτου.**

Ένας επιπλέον τρόπος παρακολούθησης της απόδοσης της μεθόδου είναι ο εμβολιασμός δειγμάτων ζυμαρικών με μαλακό σίτο. Για τον σκοπό αυτό έγινε ανάμιξη ποσότητας αλεύρου ζυμαρικού με γνωστή ποσότητα αλεύρου μαλακού σίτου. Ειδικότερα σε 88g ζυμαρικού προστέθηκαν 12g μαλακού σίτου και έγινε πολύ καλή ανάμιξη με

χρήση της συσκευής ομογενοποίησης Thermomix TM5 (βλέπε §3.2). Ακολούθησε απομόνωση DNA, εις διπλούν, από τα εμβολιασμένα δείγματα και αντιδράσεις Real Time PCR.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. Επαλήθευση καταλληλότητας μεθόδου απομόνωσης DNA

4.1.1. Προσδιορισμός συγκέντρωσης και ποιότητας απομονωμένου DNA

Στα πλαίσια αξιολόγησης της μεθόδου απομόνωσης DNA με το Nucleospin Food kit (Macherey - Nagel) από άλευρο σίτου ή ζυμαρικά, προσδιορίστηκε αρχικά η συγκέντρωση του απομονωμένου DNA με φθορισμομετρία και η ποιότητα του μέσω της φωτομετρικής μέτρησης του λόγου 260nm/280nm (Πίνακας 4.1).

Πίνακας 4.1. Συγκέντρωση και καθαρότητα απομονωμένου DNA δειγμάτων ζυμαρικών και σίτου (Οι διπλές τιμές συγκέντρωσης ή 260nm/280nm αντιστοιχούν στις δύο απομονώσεις ανά δείγμα)

A/A	Συγκέντρωση DNA (ng/μl)	260nm/280nm
Ζυμαρικό 1	98 & 113	2,0 & 1,9
Ζυμαρικό 2	94 & 79	1,9 & 1,9
Ζυμαρικό 3	47 & 48	1,9 & 1,9
Ζυμαρικό 4	67 & 68	1,9 & 1,8
Ζυμαρικό 5	71 & 63	1,9 & 1,9
Ζυμαρικό 6	48 & 51	1,8 & 1,8
Ζυμαρικό 7	57 & 54	2,0 & 1,9
Ζυμαρικό 8	51 & 53	2,0 & 2,0
Ζυμαρικό 9	72 & 72	1,9 & 1,8
Ζυμαρικό 10	60 & 56	1,9 & 2,0
Ζυμαρικό 11	74 & 83	1,8 & 1,8
Ζυμαρικό 12	90 & 90	1,9 & 1,9
Ζυμαρικό 13	142 & 120	1,9 & 1,8
Ζυμαρικό 14	63 & 52	1,9 & 1,9
Ζυμαρικό 15	90 & 77	1,8 & 1,9
Ζυμαρικό 16	92 & 88	1,9 & 2,0
Ζυμαρικό 17	77 & 79	1,8 & 1,9
Ζυμαρικό 18	154 & 142	1,9 & 1,9
Ζυμαρικό 19	106 & 111	1,8 & 1,9
Ζυμαρικό 20	56 & 60	1,8 & 1,8
Ζυμαρικό 21	118 & 125	1,9 & 1,8
Ζυμαρικό 22	114 & 111	1,9 & 1,9
Ζυμαρικό 23	108 & 103	1,8 & 2,0
Ζυμαρικό 24	88 & 91	1,9 & 1,8
Ζυμαρικό 25	70 & 73	1,9 & 2,0
Ζυμαρικό 26	154 & 143	1,9 & 1,9
Ζυμαρικό 27	155 & 152	1,9 & 1,8
Άλευρο σκληρού σίτου	155 & 158	1,9 & 2,0
Άλευρο μαλακού σίτου	156 & 151	2,0 & 2,0

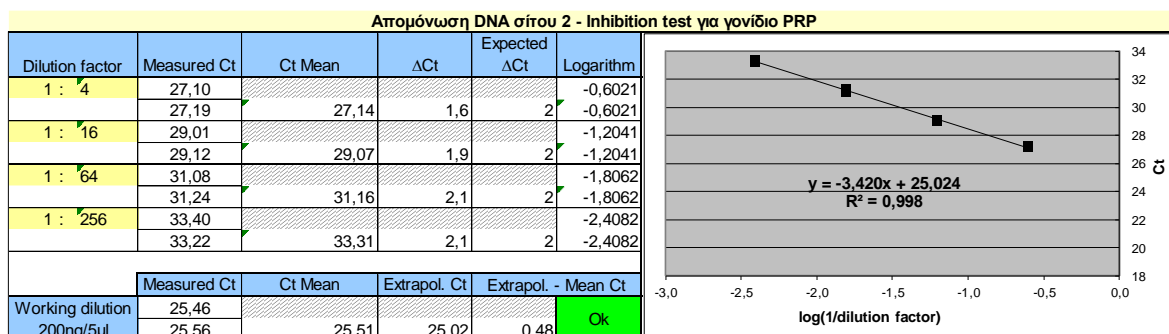
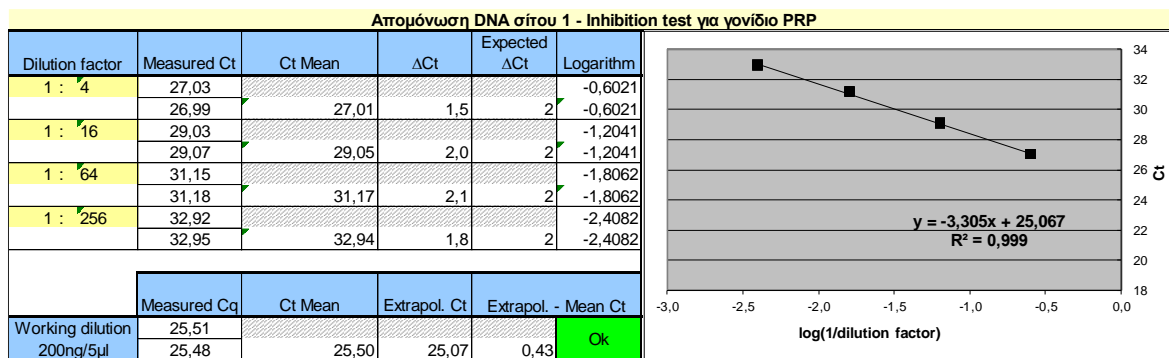
Από τις μετρήσεις του DNA, δειγμάτων και αλεύρων, προέκυψε ότι η συγκέντρωση του απομονωμένου DNA σε όλες τις περιπτώσεις ήταν μεγαλύτερη των 45ng/μl δηλαδή αρκετά μεγαλύτερη από την απαιτούμενη για την περαιτέρω ανάλυση με την Real Time PCR. Παράλληλα σε όλες τις περιπτώσεις, ο φωτομετρικός λόγος 260nm/280nm του DNA ήταν ίσος ή μεγαλύτερος του 1,8 που ισοδυναμεί με πολύ καθαρό DNA. Τα παραπάνω αποτελέσματα επαλήθευσαν ότι το Nucleospin Food Kit (Macherey – Nagel) που χρησιμοποιήθηκε, είναι κατάλληλο (fit for purpose) για την απομόνωση υψηλής συγκέντρωσης και ποιότητας DNA, από δείγματα ζυμαρικών και αλεύρων για τον έλεγχο νοθείας με μαλακό σίτο.

4.1.2. Έλεγχος για παρεμπόδιση λόγω υποστρώματος (Inhibition test)

Ο έλεγχος για τυχόν παρεμποδίσεις λόγω υποστρώματος (inhibition test) πραγματοποιήθηκε αρχικά σε άλευρο σκληρού σίτου και έγινε για την αλληλουχία του γονιδίου του σίτου PRP. Αποδεκτή συγκέντρωση DNA (working solution) για την περαιτέρω ανάλυση, είναι εκείνη για την οποία πληρούνται τρεις προϋποθέσεις: η κλίση της καμπύλης πρέπει να είναι μεταξύ -3,6 και -3,1, ο συντελεστής προσδιορισμού R^2 να είναι ίσος ή μεγαλύτερος από 0,98 και η διαφορά μεταξύ της μετρούμενης Ct του working solution και της Extrapolated Ct τιμής να είναι μικρότερη από 0,5 κύκλους Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.1, για working solution 200ng/5μl (40ng/μl) και οι τρεις παράμετροι ήταν αποδεκτές. Συγκεκριμένα:

- **Απομόνωση DNA σίτου 1 – Inhibition test για γονίδιο PRP:** Κλίση καμπύλης: -3,305, R^2 : 0,999 και Extrapolated Ct: 0,43
- **Απομόνωση DNA σίτου 2 – Inhibition test για γονίδιο PRP:** Κλίση καμπύλης: -3,420, R^2 : 0,998 και Extrapolated Ct: 0,48

Άρα για ποσότητα $\leq 200\text{ng}/5\mu\text{l}$ DNA σίτου δεν παρατηρείται καμία παρεμπόδιση για το γονίδιο PRP και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αντίδραση της Real Time PCR.

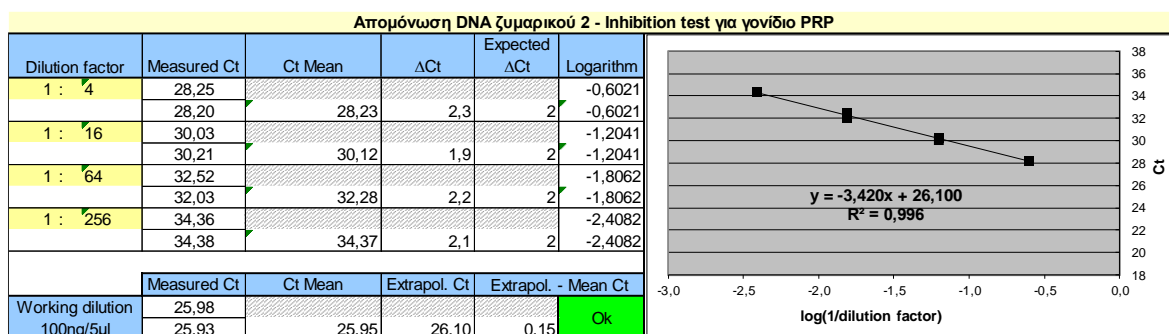
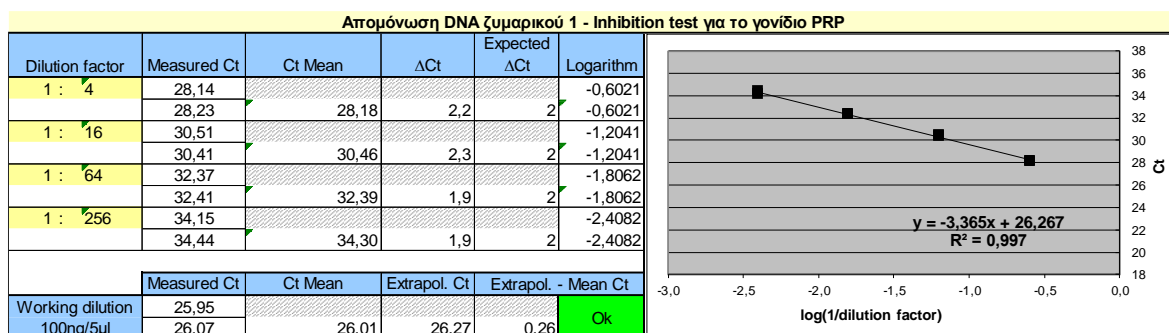


Εικόνα 4.1. Αποτελέσματα ελέγχου για παρεμποδίσεις (inhibition) λόγω υποστρώματος σε άλευρο σκληρού σίτου για το γονίδιο PRP (πάνω: Απομόνωση DNA 1, κάτω: Απομόνωση DNA 2).

Επειδή στο άλευρο σίτου παραπάνω, η extrapolated Ct τιμή για το γονίδιο PRP ήταν κοντά στο αποδεκτό όριο των 0,5 κύκλων (0,43 και 0,48), στην περίπτωση των ζυμαρικών για τον έλεγχο των παρεμποδίσεων για το γονίδιο PRP χρησιμοποιήθηκε working solution 100ng/5μl (20ng/μl). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.2, και οι τρεις παράμετροι (κλίση καμπύλης 3,1 έως 3,6, R² >0,98 και Extrapolated Ct <0,5 κύκλους) ήταν αποδεκτές. Συγκεκριμένα:

- **Απομόνωση DNA ζυμαρικού 1 – Inhibition test για γονίδιο PRP:** Κλίση καμπύλης: -3,365, R²: 0,997 και Extrapolated Ct: 0,26
- **Απομόνωση DNA ζυμαρικού 2 – Inhibition test για γονίδιο PRP:** Κλίση καμπύλης: -3,420, R²: 0,996 και Extrapolated Ct: 0,15

Άρα για ποσότητα ≤100ng/5μl DNA ζυμαρικού δεν παρατηρείται καμία παρεμπόδιση για το γονίδιο PRP και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αντίδραση της Real Time PCR.

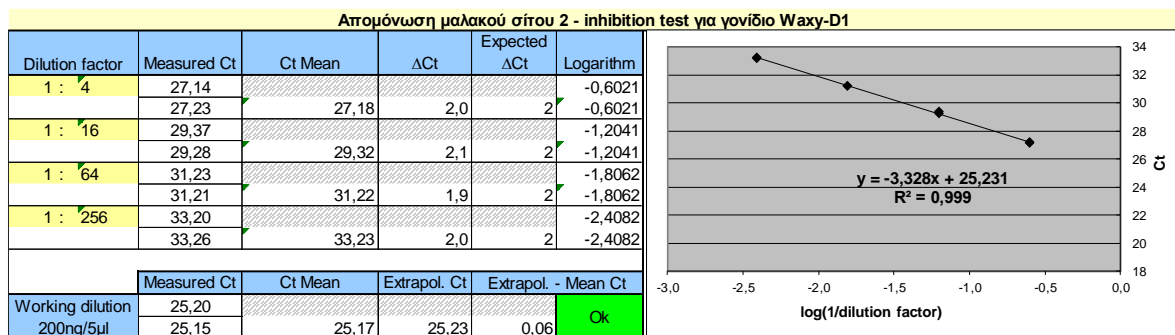
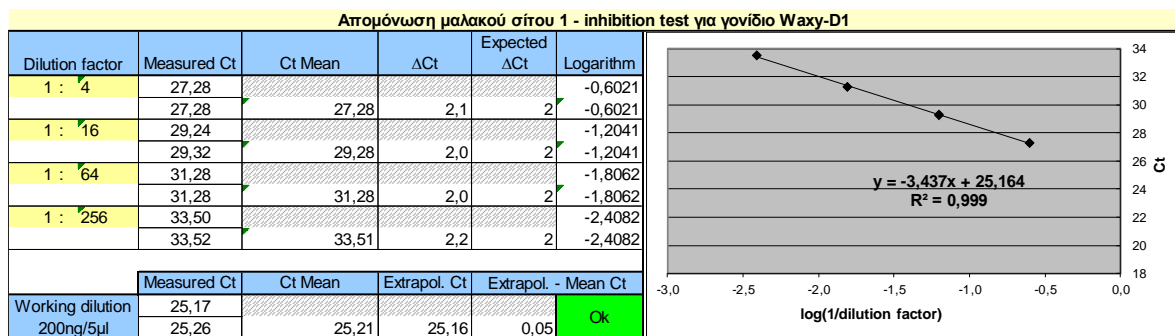


Εικόνα 4.2. Αποτελέσματα ελέγχου για παρεμποδίσεις (inhibition) λόγω υποστρώματος σε ζυμαρικό σκληρού σίτου για το γονίδιο PRP (πάνω: Απομόνωση DNA 1, κάτω: Απομόνωση DNA 2).

Εκτός του γονιδίου PRP, έλεγχος για τυχόν παρεμποδίσεις λόγω υποστρώματος (inhibition test) πραγματοποιήθηκε και για το γονίδιο Waxy-D1 σε άλευρο μαλακού σίτου. Από την παρακάτω Εικόνα 4.3, για working solution 200ng/5μl (40ng/μl) προκύπτει ότι και οι τρεις παράμετροι (κλίση καμπύλης 3,1 έως 3,6, $R^2 > 0,98$ και Extrapolated Ct $< 0,5$ κύκλους) ήταν αποδεκτές. Συγκεκριμένα:

- **Απομόνωση DNA μαλακού σίτου 1 – Inhibition test για γονίδιο Waxy-D1:** Κλίση καμπύλης: -3,437, R^2 : 0,999 και Extrapolated Ct: 0,05
- **Απομόνωση DNA μαλακού σίτου 2 – Inhibition test για γονίδιο Waxy-D1:** Κλίση καμπύλης: -3,328, R^2 : 0,999 και Extrapolated Ct: 0,06

Άρα για ποσότητα $\leq 200\text{ng}/5\mu\text{l}$ DNA σίτου δεν παρατηρείται καμία παρεμπόδιση για το γονίδιο Waxy-D1 και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αντίδραση της Real Time PCR.



Εικόνα 4.3. Αποτελέσματα ελέγχου για παρεμποδίσεις (inhibition) λόγω υποστρώματος σε άλευρο μαλακού σίτου για το γονίδιο Waxy-D1 (πάνω: Απομόνωση DNA 1, κάτω: Απομόνωση DNA 2).

Ο έλεγχος για τυχόν παρεμποδίσεις λόγω υποστρώματος (inhibition test) πραγματοποιήθηκε για να αξιολογηθεί η μέθοδος απομόνωσης και να προσδιοριστεί η κατάλληλη συγκέντρωση του DNA που πρέπει να χρησιμοποιείται στην Real Time PCR προκειμένου να μην υπάρχουν παρεμποδίσεις (inhibitions) που θα οδηγούσαν σε λανθασμένες τιμές $\Delta Ct_{WaxyD1-PRP}$ και επομένως σε λάθος ημιποσοτικό προσδιορισμό του μαλακού σίτου στα υλικά αναφοράς και στα υπό μελέτη δείγματα ζυμαρικών. Από τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκε και πάλι η καθαρότητα του απομονωμένου DNA με το kit που χρησιμοποιήθηκε, ενώ προέκυψε ότι για συγκέντρωση μικρότερη ή ίση των 20ng/μl (ποσότητα ≤ 100 ng ανά αντίδραση), τόσο για την αλληλουχία του γονιδίου PRP όσο και για την αλληλουχία του γονιδίου Waxy-D1, δεν παρατηρείται παρεμπόδιση στην Real Time PCR για δείγματα ζυμαρικών και αλεύρων σίτου (υλικών αναφοράς). Βάσει λοιπόν των παραπάνω πειραματικών δεδομένων, καθορίστηκε ότι η χρήση ποσότητας 100ng είναι κατάλληλη για τις αντιδράσεις της Real Time PCR και τον ημιποσοτικό προσδιορισμό του μαλακού σίτου στα υλικά αναφοράς και στα ζυμαρικά σκληρού σίτου.

4.2. Επαλήθευση καταλληλότητας της μεθόδου Real Time PCR

4.2.1. Εξειδίκευση μεθόδου

Τα αποτελέσματα από τις αντιδράσεις της Real Time PCR για το έλεγχο της εξειδίκευσης των αλληλουχιών για τα γονίδια Waxy-D1 και PRP παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.2. Όπως προαναφέρθηκε ο έλεγχος της εξειδίκευσης έγινε για ποσότητα 100ng από κάθε φυτικό είδος που αναλύθηκε.

Στις αντιδράσεις της αλληλουχίας για το γονίδιο PRP που ανιχνεύει μαλακό και σκληρό, θετικό αποτέλεσμα έδωσε ο σκληρός και ο μαλακός σίτος ενώ όλα τα άλλα φυτικά είδη που αναλύθηκαν έδωσαν αρνητικό αποτέλεσμα. Στην περίπτωση της αλληλουχίας για το γονίδιο Waxy-D1, που απαντάται αποκλειστικά και μόνο στο μαλακό σίτο, θετική αντίδραση παρατηρήθηκε για τον μαλακό σίτο ενώ ο σκληρός σίτος και τα υπόλοιπα φυτικά είδη έδωσαν αρνητικό αποτέλεσμα.

Η μέθοδος λοιπόν παρουσιάζει εξειδίκευση 100% για τις δύο αλληλουχίες στόχους που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση. Το γεγονός αυτό εξασφαλίζει την απουσία ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε εσφαλμένα αποτελέσματα και αποφάσεις.

Πίνακας 4.2. Αποτελέσματα αντιδράσεων εξειδίκευσης για την αλληλουχία του γονιδίου PRP και Waxy-D1

Φυτικό Είδος	Αλληλουχία γονιδίου PRP	Αλληλουχία γονιδίου Waxy-D1
Σκληρός σίτος (<i>Triticum durum</i>)	+	-
Μαλακός σίτος (<i>Triticum aestivum</i>)	+	+
Σόγια (<i>Glycine max</i>)	-	-
Καλαμπόκι (<i>Zea mays</i>)	-	-
Ρύζι (<i>Oryza sativa</i>)	-	-
Βρώμη (<i>Avena sativa</i>)	-	-
Κριθάρι (<i>Hordeum vulgare</i>)	-	-
Σίκαλη (<i>Secale cereale</i>)	-	-
Ελαιοκράμβη (<i>Brassica napus</i>)	-	-

+: θετικό αποτέλεσμα, - : αρνητικό αποτέλεσμα

4.2.2. Επαναληψιμότητα της μεθόδου

Για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα το υλικό αναφοράς 3% w/w μαλακός σίτος σε σκληρό σίτο. Από το υλικό αναφοράς απομονώθηκε DNA εις τετραπλούν και για κάθε απομόνωση έγιναν τρεις Real Time PCR επαναλήψεις. Οι τιμές $\Delta Ct_{WaxyD1-PRP}$ για τις δώδεκα συνολικά επαναλήψεις φαίνονται στον Πίνακα 4.3. Από αυτές υπολογίσθηκε η σχετική τυπική απόκλιση της επαναληψιμότητας RSDr, η τιμή της οποίας ήταν 2,8% δηλαδή πολύ μικρότερη από το όριο αποδοχής ($RSDr \leq 25\%$). Επαληθεύτηκε με αυτό τον τρόπο ότι η μέθοδος έχει την απαιτούμενη επαναληψιμότητα και ακρίβεια (precision) για την αξιόπιστη ανάλυση των δειγμάτων ζυμαρικών για πιθανή νοθεία με μαλακό σίτο.

Πίνακας 4.3. Αποτελέσματα αντιδράσεων επαναληψιμότητας για το 3% w/w μαλακό σε σκληρό σίτο

Well	Sample Name	Target Name	Ct	$\Delta Ct_{WaxyD1-Prp}$	SD	Mean $\Delta Ct_{WaxyD1-PRP}$	RSDr%
C7	3% μαλακός σε σκληρό σίτο (1)	Prp	26,07	4,64	0,13	4,76	2,82
D7	3% μαλακός σε σκληρό σίτο (1)	Waxy-D1	30,71				
C8	3% μαλακός σε σκληρό σίτο (1)	Prp	26,00	4,93			
D8	3% μαλακός σε σκληρό σίτο (1)	Waxy-D1	30,92				
C9	3% μαλακός σε σκληρό σίτο (1)	Prp	25,94	4,74			
D9	3% μαλακός σε σκληρό σίτο (1)	Waxy-D1	30,68				
C10	3% μαλακός σε σκληρό σίτο (2)	Prp	26,02	4,88			
D10	3% μαλακός σε σκληρό σίτο (2)	Waxy-D1	30,90				
C11	3% μαλακός σε σκληρό σίτο (2)	Prp	26,04	4,50			
D11	3% μαλακός σε σκληρό σίτο (2)	Waxy-D1	30,54				
C12	3% μαλακός σε σκληρό σίτο (2)	Prp	26,08	4,73			
D12	3% μαλακός σε σκληρό σίτο (2)	Waxy-D1	30,81				
E7	3% μαλακός σε σκληρό σίτο (3)	Prp	26,07	4,64			
F7	3% μαλακός σε σκληρό σίτο (3)	Waxy-D1	30,71				
E8	3% μαλακός σε σκληρό σίτο (3)	Prp	26,00	4,94			
F8	3% μαλακός σε σκληρό σίτο (3)	Waxy-D1	30,94				
E9	3% μαλακός σε σκληρό σίτο (3)	Prp	26,13	4,83			
F9	3% μαλακός σε σκληρό σίτο (3)	Waxy-D1	30,96				
E10	3% μαλακός σε σκληρό σίτο (4)	Prp	26,04	4,81			
F10	3% μαλακός σε σκληρό σίτο (4)	Waxy-D1	30,85				
E11	3% μαλακός σε σκληρό σίτο (4)	Prp	26,16	4,64			
F11	3% μαλακός σε σκληρό σίτο (4)	Waxy-D1	30,79				
E12	3% μαλακός σε σκληρό σίτο (4)	Prp	26,06	4,82			
F12	3% μαλακός σε σκληρό σίτο (4)	Waxy-D1	30,88				
G11	Extraction control	Prp	Undetermined				
H11	Extraction control	Waxy-D1	Undetermined				
G12	H2O	Prp	Undetermined				
H12	H2O	Waxy-D1	Undetermined				

4.2.3. Προσδιορισμός του ορίου ανίχνευσης του μαλακού σίτου

Για τον προσδιορισμό του ορίου ανίχνευσης της μεθόδου φτιάχτηκε διάλυμα με συγκέντρωση 10 αντιγράφων γονιδιώματος μαλακού σίτου ανά 5μl. Ακολούθως πραγματοποιήθηκαν δέκα Real Time PCR επαναλήψεις για την αλληλουχία του γονιδίου Waxy-D1 και για ποσότητα 10 αντιγράφων του γονιδιώματος του μαλακού σίτου. Στο Πίνακα 4.4 που ακολουθεί, παρουσιάζονται οι τιμές Ct_{WaxyD1} των δέκα επαναλήψεων. Όπως φαίνεται και οι δέκα επαναλήψεις έδωσαν θετικό αποτέλεσμα, καθορίζοντας τα 10 αντίγραφα μαλακού σίτου ως το απόλυτο όριο ανίχνευσης (absolute limit of detection) και επαληθεύοντας την υψηλή ευαισθησία της μεθόδου. Η μέση τιμή Ct_{WaxyD1} των δέκα επαναλήψεων που αντιστοιχεί στο όριο ανίχνευσης είναι 35,62 κύκλοι. Δεδομένου ότι 100ng σκληρού σίτου αντιστοιχούν σε 7899 αντίγραφα γονιδιώματος ($C_{value} \text{ Triticum durum} = 12,66rg$ σύμφωνα με Boyko et al., 1984), προκύπτει ότι το όριο ανίχνευσης μαλακού σε σκληρό σίτο είναι 0,1% $[(10/7899) \times 100 = 0,1\%]$.

Πίνακας 4.4. Αποτελέσματα αντιδράσεων προσδιορισμού του ορίου ανίχνευσης του μαλακού σίτου

Well	Sample Name	Target Name	Ct_{WaxyD1}	Mean Ct_{WaxyD1}
E2	10 αντίγραφα γονιδιώματος μαλακού σίτου	Waxy-D1	35,38	35,62
E3	10 αντίγραφα γονιδιώματος μαλακού σίτου	Waxy-D1	35,99	
E4	10 αντίγραφα γονιδιώματος μαλακού σίτου	Waxy-D1	35,25	
E5	10 αντίγραφα γονιδιώματος μαλακού σίτου	Waxy-D1	36,05	
E6	10 αντίγραφα γονιδιώματος μαλακού σίτου	Waxy-D1	35,24	
E7	10 αντίγραφα γονιδιώματος μαλακού σίτου	Waxy-D1	35,87	
E8	10 αντίγραφα γονιδιώματος μαλακού σίτου	Waxy-D1	35,72	
E9	10 αντίγραφα γονιδιώματος μαλακού σίτου	Waxy-D1	35,50	
E10	10 αντίγραφα γονιδιώματος μαλακού σίτου	Waxy-D1	35,53	
E11	10 αντίγραφα γονιδιώματος μαλακού σίτου	Waxy-D1	35,70	
E1	100 ng μαλακού σίτου	Waxy-D1	25,66	
E12	H2O	Waxy-D1	Undetermined	

4.2.4. Αναπαραγωγικότητα και προσδιορισμός της τιμής ΔCt του υλικού αναφοράς 3% w/w μαλακού σίτου σε σκληρό σίτο.

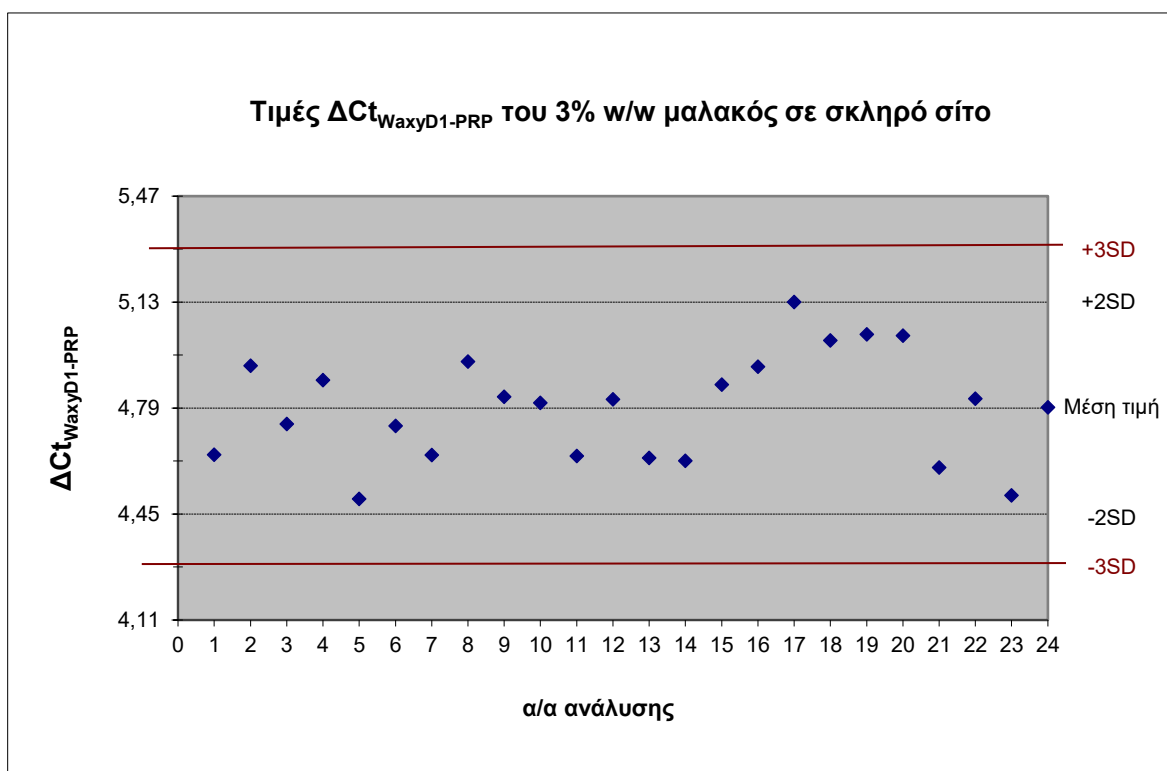
Για την επαλήθευση της αναπαραγωγικότητας επαναλήφθηκε η απομόνωση DNA που είχε πραγματοποιηθεί στο υλικό αναφοράς 3% w/w μαλακού σίτου σε σκληρό σίτο (βλέπε §4.2.2, Πίνακας 4.3). Συγκεκριμένα μετά από χρονικό διάστημα δεκαπέντε ημερών, πραγματοποιήθηκε ξανά απομόνωση DNA εις τετραπλούν και για κάθε απομόνωση έγιναν τρεις Real Time PCR επαναλήψεις. Αυτή την φορά όμως χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές μηχανικές πιπέτες και διαφορετική παρτίδα του Nucleospin Food kit και των αντιδραστηρίων της Real Time PCR. Τα αποτελέσματα της δεύτερης αυτή επανάληψης, υπό διαφορετικές συνθήκες αναπαραγωγικότητας, παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.5.

Πίνακας 4.5. Αποτελέσματα αντιδράσεων επαναληψιμότητας (υπο διαφορετικές συνθήκες) για το 3% μαλακό σε σκληρό σίτο

Well	Sample Name	Target Name	Ct	ΔCt _{WaxyD1-PRP}	SD	Mean ΔCt _{WaxyD1-PRP}	RSDr%
D1	3% μαλακός σε σκληρό σίτο_b (1)	Prg	25,87	4,63	0,20	4,83	4,18
E1	3% μαλακός σε σκληρό σίτο_b (1)	Waxy-D1	30,50				
D2	3% μαλακός σε σκληρό σίτο_b (1)	Prg	25,84	4,62			
E2	3% μαλακός σε σκληρό σίτο_b (1)	Waxy-D1	30,46				
D3	3% μαλακός σε σκληρό σίτο_b (1)	Prg	25,89	4,86			
E3	3% μαλακός σε σκληρό σίτο_b (1)	Waxy-D1	30,75				
D4	3% μαλακός σε σκληρό σίτο_b (2)	Prg	25,73	4,92			
E4	3% μαλακός σε σκληρό σίτο_b (2)	Waxy-D1	30,65				
D5	3% μαλακός σε σκληρό σίτο_b (2)	Prg	25,87	5,13			
E5	3% μαλακός σε σκληρό σίτο_b (2)	Waxy-D1	31,00				
D6	3% μαλακός σε σκληρό σίτο_b (2)	Prg	25,74	5,01			
E6	3% μαλακός σε σκληρό σίτο_b (2)	Waxy-D1	30,74				
D7	3% μαλακός σε σκληρό σίτο_b (3)	Prg	25,61	5,03			
E7	3% μαλακός σε σκληρό σίτο_b (3)	Waxy-D1	30,64				
D8	3% μαλακός σε σκληρό σίτο_b (3)	Prg	25,65	5,02			
E8	3% μαλακός σε σκληρό σίτο_b (3)	Waxy-D1	30,67				
D9	3% μαλακός σε σκληρό σίτο_b (3)	Prg	25,73	4,60			
E9	3% μαλακός σε σκληρό σίτο_b (3)	Waxy-D1	30,33				
D10	3% μαλακός σε σκληρό σίτο_b (4)	Prg	25,64	4,82			
E10	3% μαλακός σε σκληρό σίτο_b (4)	Waxy-D1	30,46				
D11	3% μαλακός σε σκληρό σίτο_b (4)	Prg	25,75	4,51			
E11	3% μαλακός σε σκληρό σίτο_b (4)	Waxy-D1	30,26				
D12	3% μαλακός σε σκληρό σίτο_b (4)	Prg	25,65	4,79			
E12	3% μαλακός σε σκληρό σίτο_b (4)	Waxy-D1	30,44				
C3	Extraction control	Prg	Undetermined				
C10	Extraction control	Waxy-D1	Undetermined				

Και σε αυτή την περίπτωση η σχετική τυπική απόκλιση της επαναληψιμότητας $RSD_r\%$ ήταν πολύ μικρότερη (4,20%) του ορίου αποδοχής ($RSD_r \leq 25\%$).

Χρησιμοποιώντας τις τιμές ΔCt του υλικού αναφοράς 3% w/w μαλακού σε σκληρό σίτο που προέκυψαν στις διαφορετικές χρονικές στιγμές και υπό διαφορετικές συνθήκες (§4.2.2 και 4.2.4), υπολογίσθηκε η σχετική τυπική απόκλιση της αναπαραγωγιμότητας $RSD_r\%$ και προσδιορίστηκε η μέση τιμή $\Delta Ct_{WaxyD1-PRP}$, δηλαδή η τιμή (κατώφλι) κάτω από την οποία ένα δείγμα ζυμαρικού περιέχει μαλακό σίτο σε ποσοστό μεγαλύτερο του 3% w/w και επομένως χαρακτηρίζεται ως αντικανονικό. Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 4.1 : α) η μέση τιμή $\Delta Ct_{WaxyD1-PRP}$ που αντιστοιχεί στο 3% μαλακού σε σκληρό σίτο, είναι 4,79 κύκλοι και β) η σχετική τυπική απόκλιση της αναπαραγωγιμότητας ήταν 3,6% και αρκετά μικρότερη του επιτρεπόμενου ορίου 25%. Παρατηρούμε επίσης ότι όλες οι τιμές ήταν εντός του εύρους $\pm 2SD$ και δεν υπήρξαν ακραίες τιμές (outliers).



Διάγραμμα 4.1. Διάγραμμα τιμών $\Delta Ct_{WaxyD1-PRP}$ του υλικού αναφοράς 3% w/w μαλακού σε σκληρό σίτο για τον προσδιορισμό της μέσης τιμής.

Είναι πολύ σημαντικό, στο σημείο αυτό, να επισημανθεί ότι η χαμηλή τιμή της σχετικής τυπικής απόκλισης, τόσο της επαναληψιμότητας όσο και της αναπαραγωγιμότητας, επαλήθευσε και την πολύ καλή ομοιογένεια του υλικού αναφοράς 3% w/w μαλακού

σε σκληρό σίτο, που παρασκευάστηκε με την διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο §3.6.

4.3. Αποτελέσματα ανάλυσης δειγμάτων ζυμαρικών, υλικών αναφοράς και εμβολιασμένων δειγμάτων.

Στους Πίνακες 4.6, 4.7 & 4.8 που ακολουθούν, παρατίθενται τα αποτελέσματα των τιμών Ct_{WaxyD1} , Ct_{PRP} και $\Delta Ct_{WaxyD1-PRP}$: α) των 27 δειγμάτων ζυμαρικών σκληρού σίτου που επιλέχθηκαν από την Ελληνική λιανική αγορά για την μελέτη νοθείας με μαλακό σίτο, β) των υλικών αναφοράς 1%, 3% και 12% w/w μαλακού σε σκληρό σίτο που αναλύθηκαν παράλληλα με τα δείγματα ζυμαρικών και γ) των δειγμάτων ζυμαρικών που εμβολιάστηκαν με μαλακό σίτο (88g ζυμαρικού + 12g μαλακού σίτου).

Πίνακας 4.6. Αποτελέσματα τιμών $\Delta Ct_{WaxyD1-PRP}$ για τα δείγματα ζυμαρικών που αναλύθηκαν

A/A	Είδος Ζυμαρικού	$Ct_{Waxy-D1}$ (κύκλοι)	Ct_{PRP} (κύκλοι)	$\Delta Ct_{WaxyD1-PRP}$ (κύκλοι)
1	Κοφτό μακαρονάκι	32,30	25,64	6,66
2	Μακαρόνια Νο10	32,06	25,71	6,35
3	Μακαρόνια Νο6	32,80	26,53	6,27
4	Μακαρόνια Νο6	32,45	26,17	6,28
5	Κοφτό μακαρονάκι	33,14	25,99	7,15
6	Φιογκάκια	34,65	26,34	8,31
7	Μακαρόνια Νο10	33,68	25,99	7,69
8	Κριθαράκι χονδρό	33,50	25,56	7,94
9	Βίδες	32,69	26,06	6,63
10	Μακαρόνια Νο10	32,87	26,23	6,64
11	Μακαρόνια Νο10	33,85	26,51	7,34
12	Πένες	32,60	26,01	6,59
13	Χυλοπίτες	32,82	25,99	6,83
14	Κριθαράκι μέτριο	32,93	26,44	6,49
15	Πένες Ριγέ	32,45	25,94	6,51

16	Κοχύλια	32,86	26,11	6,75
17	Παστίτσιο Νο2	33,84	26,59	7,25
18	Πεταλούδες	33,14	26,18	6,96
19	Μακαρόνια Νο6	32,13	26,20	5,93
20	Farfalle Νο65	33,32	26,75	6,57
21	Βίδες	32,40	25,98	6,42
22	Μακαρόνια Νο6	33,74	25,90	7,84
23	Πένες Ριγέ	32,98	25,70	7,28
24	Μακαρόνια Νο7	33,42	25,96	7,46
25	Ριγατόνι	31,63	25,93	5,70
26	Χυλοπίτες	33,06	25,85	7,21
27	Χυλοπίτες	33,35	25,88	7,47

Πίνακας 4.7. Αποτελέσματα τιμών $\Delta Ct_{WaxyD1-PRP}$ για τα υλικά αναφοράς που αναλύθηκαν παράλληλα με τα δείγματα ζυμαρικών.

A/A	Υλικό αναφοράς % w/w μαλακός σίτος σε σκληρό σίτο (ημερομηνία ανάλυσης)	$Ct_{Waxy-D1}$ (κύκλοι)	Ct_{PRP} (κύκλοι)	$\Delta Ct_{WaxyD1-PRP}$ (κύκλοι)
1	1% (14-12-23)	32,14	25,91	6,23
2	3% (11-11-22)	30,47	25,58	4,89
3	3% (21-11-22)	30,92	26,14	4,78
4	3% (14-12-22)	30,84	26,12	4,72
5	3% (31-01-23)	30,55	25,70	4,85
6	3% (01-02-23)	30,54	25,61	4,93
7	3% (23-02-23)	30,57	25,67	4,90
8	3% (27-02-23)	30,77	26,01	4,76
9	12% (14-12-23)	28,69	25,60	3,09

Πίνακας 4.8. Αποτελέσματα τιμών $\Delta Ct_{WaxyD1-PRP}$ για τα εμβολιασμένα δείγματα που αναλύθηκαν παράλληλα με τα δείγματα ζυμαρικών.

A/A	Δείγμα Ζυμαρικού εμβολιασμένο (88g ζυμαρικού + 12g μαλακού σίτου)	$Ct_{Waxy-D1}$ (κύκλοι)	Ct_{PRP} (κύκλοι)	$\Delta Ct_{WaxyD1-PRP}$ (κύκλοι)
1	Εμβολιασμένο δείγμα Ζυμαρικού Νο17	29,04	25,97	3,07
2	Εμβολιασμένο δείγμα Ζυμαρικού Νο24	29,02	26,07	2,95

Βάσει των δεδομένων που παρατίθενται στους παραπάνω πίνακες προέκυψαν τα ακόλουθα συμπεράσματα :

- ⇒ Όπως αναφέρθηκε στην § 4.2.3, το όριο ανίχνευσης της μεθόδου προσδιορίστηκε στα 10 αντίγραφα μαλακού σίτου ή 0,1% που αντιστοιχούν στους 35,62 κύκλους. Παρατηρώντας τις τιμές κύκλων Ct_{WaxyD1} των δειγμάτων του πίνακα 4.6 διαπιστώνουμε ότι σε όλα τα δείγματα η τιμή ήταν μικρότερη της αντίστοιχης τιμής του ορίου ανίχνευσης. Πρώτο λοιπόν βασικό συμπέρασμα της μελέτης είναι ότι και στα 27 δείγματα διαφόρων τύπων ζυμαρικών τα οποία είχαν παραχθεί από δεκατρείς εταιρείες της ελληνικής αγοράς ζυμαρικών και επιλέχθηκαν από διαφορετικές αλυσίδες supermarket του ελληνικού λιανεμπορίου, ανιχνεύθηκε η παρουσία μαλακού σίτου.
- ⇒ Στην περίπτωση των δύο εμβολιασμένων δειγμάτων (Πίνακας 4.8) στα οποία είχαν προστεθεί 12g σε 88g ζυμαρικού, δημιουργώντας ένα μίγμα ~12% w/w, η τιμή $\Delta Ct_{WaxyD1-PRP}$ ήταν περίπου ίση με εκείνη του υλικού αναφοράς 12% w/w (Πίνακας 4.7). Ο εμβολιασμός των δύο δειγμάτων επιβεβαίωσε για άλλη μια φορά την απουσία παρεμποδιστών (inhibitors) αλλά και την ακρίβεια της μεθόδου.
- ⇒ Όπως αναφέρθηκε στην §4.2.4, η μέση τιμή $\Delta Ct_{WaxyD1-PRP}$ που αντιστοιχεί στο 3% w/w μαλακού σε σκληρό σίτο είναι 4,79 κύκλοι. Από την σύγκριση των τιμών $\Delta Ct_{WaxyD1-PRP}$ των 27 δειγμάτων ζυμαρικών (Πίνακας 4.6) με την μέση τιμή του υλικού αναφοράς 3%, διαπιστώνουμε ότι καμία τιμή δεν ήταν μικρότερη των 4,79 κύκλων και επομένως κανένα δείγμα δεν περιέχει μαλακό σίτο σε ποσοστό μεγαλύτερο του 3%.
- ⇒ Η μέση τιμή $\Delta Ct_{WaxyD1-PRP}$ του υλικού αναφοράς 1% w/w μαλακού σε σκληρό σίτο, υπολογίστηκε ότι είναι 6,23 κύκλοι (Πίνακας 4.7). Συγκρίνοντας τις τιμές των 27 δειγ-

μάτων ζυμαρικών (Πίνακας 4.6) με την μέση τιμή του 1% w/w προκύπτει ότι τα δείγματα 19 και 25 είχαν τιμή μικρότερη των 6,23 κύκλων και επομένως περιέχουν μαλακό σίτο σε ποσοστό μεγαλύτερο του 1% και μικρότερο του 3%. Τα υπόλοιπα 25 δείγματα είχαν τιμές που αντιστοιχούν σε ποσοστό μαλακού σίτου μικρότερο του 1%.

Στον Πίνακα 4.9 συνοψίζονται τα αποτελέσματα του ημιποσοτικού προσδιορισμού μαλακού σίτου στα 27 δείγματα ζυμαρικών σκληρού σίτου.

Πίνακας 4.9. Συνοπτικός πίνακας των αποτελεσμάτων της ανίχνευσης και του ημιποσοτικού προσδιορισμού μαλακού σίτου σε 27 δείγματα ζυμαρικών σκληρού σίτου. Στην παρένθεση αναφέρεται το ποσοστό επί των 27 δειγμάτων που αναλύθηκαν.

Αριθμός δειγμάτων που αναλύθηκαν	27
Αριθμός δειγμάτων στα οποία ανιχνεύθηκε μαλακός σίτος με όριο ανίχνευσης 0,1%	27 (100%)
Αριθμός δειγμάτων με ποσοστό μαλακού σίτου >3%	0 (0%)
Αριθμός δειγμάτων με ποσοστό μαλακού σίτου <3% και >1%	2 (7,4%)
Αριθμός δειγμάτων με ποσοστό μαλακού σίτου <1%	25 (92,6%)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας αναλύθηκαν 27 δείγματα ζυμαρικών σκληρού σίτου (*Triticum durum*) για πιθανή νοθεία από μαλακό σίτο (*Triticum aestivum*). Τα δείγματα επιλέχθηκαν κατά την περίοδο Οκτώβριος 2022 με Φεβρουάριο 2023 και αποτελούνται από διάφορους τύπους ζυμαρικών (μακαρόνια, βίδες, φιογκάκια, κριθαράκι, χυλοπίτες κ.α.) που παρήχθησαν από δεκατρείς παραγωγούς της ελληνικής βιομηχανίας ζυμαρικών και στα οποία περιλαμβάνονται επώνυμα προϊόντα και προϊόντα ιδιωτικής ετικέτας. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι για κανένα από τα παραπάνω δείγματα δεν υπήρξε νοθεία με μαλακό σίτο σε ποσοστό μεγαλύτερο του ορίου 3% w/w. Εν` τούτοις σε όλα τα δείγματα ανιχνεύθηκε μαλακός σίτος ενώ σε δύο από αυτά το ποσοστό ήταν μεγαλύτερο του 1%. Η παρουσία μαλακού σίτου σε ποσοστό μικρότερο του 3% μπορεί να οφείλεται είτε σε εσκεμμένη προσθήκη είτε σε τυχαία επιμόλυνση του σκληρού σίτου: α) στον αγρό, β) κατά την αποθήκευση του, γ) κατά την μεταφορά του, δ) κατά την άλεση ή ε) στην γραμμή παραγωγής των ζυμαρικών.

Η ανίχνευση (όριο ανίχνευσης 0,1%) μαλακού σίτου σε όλα τα δείγματα ζυμαρικών που αναλύθηκαν σε αυτήν την εργασία συμφωνούν με τα αποτελέσματα των μελετών που πραγματοποιήθηκαν σε Ιταλία, Αργεντινή και Ιορδανία (βλέπε § 2.5) στις οποίες ανιχνεύθηκε μαλακός σίτος στην πλειοψηφία (από 65,4% έως 100%) των δειγμάτων της κάθε μελέτης. Σε αντίθεση όμως με την Ιταλία και την Αργεντινή, στην παρούσα διπλωματική εργασία δεν παρατηρήθηκαν φαινόμενα νοθείας μεγαλύτερα του 3%.

Ως προς την μέθοδο που αναπτύχθηκε και χρησιμοποιήθηκε για τον παραπάνω έλεγχο των ζυμαρικών, καταλήγουμε στα εξής συμπεράσματα:

A) Το Nucleospin Food kit (MACHEREY NAGEL) που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του DNA αποδείχτηκε ότι είναι κατάλληλο (fit for purpose) για άλευρα σίτου και επεξεργασμένα (μηχανικά και θερμικά) δείγματα ζυμαρικών. Η ποσότητα του απομονωμένου DNA ήταν μεγαλύτερη των 45ng/μl και η καθαρότητα του ήταν υψηλή δεδομένου ότι κατά την φωτομέτρηση ο λόγος 260nm/280nm ήταν ίσος ή μεγαλύτερος του 1,8 ενώ μέσω inhibition test δεν παρατηρήθηκε η παρουσία παρεμποδιστών της Real Time PCR λόγω του υποστρώματος.

B) Η μέθοδος της Real Time PCR που εφαρμόστηκε για την ανίχνευση και περαιτέρω ανάλυση του ημιποσοτικού προσδιορισμού του μαλακού σίτου, έδειξε ότι είναι κατάλληλη (fit for purpose) για το σκοπό αυτό. Ειδικότερα, οι επιλεγμένες αλληλουχίες στόχοι (PRP και Waxy-D1) και οι συνθήκες (αντιδραστήρια και θερμοκρασιακό προφίλ) των αντιδράσεων της Real Time PCR επαληθεύτηκαν επιτυχώς για παραμέτρους όπως η εξειδίκευση, η ευαισθησία, η επαναληψιμότητα και η αναπαραγωγιμότητα.

Βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι πρωταρχικά η ταχύτητα αφού μπορεί να πραγματοποιηθεί εντός της ημέρας και δευτερευόντως το χαμηλό κόστος της συγκριτικά με άλλες μεθόδους. Τα αποτελέσματα της εργασίας επιβεβαίωσαν τα μέχρι σήμερα βιβλιογραφικά δεδομένα σύμφωνα με τα οποία οι μοριακές μέθοδοι πλεονεκτούν έναντι των χημικών. Όπως αναφέρθηκε, το DNA είναι πολύ πιο ανθεκτικό στην υψηλή θερμοκρασία σε σχέση με τις πρωτεΐνες με αποτέλεσμα μετά την θερμική επεξεργασία των ζυμαρικών να παραμένει DNA κατάλληλου μεγέθους και ποιότητας για την ανάλυση με PCR. Παράλληλα, σημαντικό χαρακτηριστικό της Real Time PCR είναι η υψηλή εξειδίκευση και ευαισθησία που επιτρέπει την ανίχνευση πολύ χαμηλού ποσοστού νοθείας.

Η μέθοδος του ημιποσοτικού προσδιορισμού που αναπτύχθηκε έχει επίσης σημαντικό πλεονέκτημα έναντι των ποσοτικών μεθόδων με Real Time PCR που έχουν μέχρι σήμερα αναπτυχθεί για τον καθορισμό της νοθείας του σκληρού σίτου με όριο το 3%. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι ποσοτικές μέθοδοι απαιτούν την κατασκευή καμπυλών με πρότυπα υλικά αναφοράς προκειμένου να προσδιοριστεί αρχικά η ποσότητα του μαλακού και σκληρού σίτου και στην συνέχεια το ποσοστό του μαλακού σίτου στο δείγμα του ζυμαρικού. Η διαδικασία αυτή είναι πιο χρονοβόρα και μεγαλύτερου κόστους (περισσότερα υλικά αναφοράς και αναλώσιμα) σε σχέση με τον ημιποσοτικό προσδιορισμό που δεν απαιτεί κατασκευή καμπυλών ενώ χρειάζεται η χρήση ενός μόνο υλικού αναφοράς (3% w/w μαλακός σε σκληρό σίτο)

Θα πρέπει να επισημανθεί ότι τα αποτελέσματα της διπλωματικής εργασίας αντιπροσωπεύουν τον δειγματοληπτικό έλεγχο ενός τμήματος της παραγωγής και διάθεσης ζυμαρικών στην χώρα και δεν αποκλείουν την μελλοντική προσπάθεια νοθείας, άνω του 3%, των ζυμαρικών. Απαιτείται διαρκής και συστηματικός έλεγχος προκειμένου να εντοπίζονται πιθανές προσπάθειες νοθείας, να αποθαρρύνονται οι επιτήδειοι και να διασφαλίζεται η ποιότητα των τροφίμων και η προστασία των καταναλωτών.

Τέλος για τον ερευνητή που θα επιθυμούσε να συνεχίσει μελλοντικά στην Ελλάδα τις προσπάθειες που καταβλήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει: α) η εφαρμογή της παρούσας μεθόδου σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων ζυμαρικών και για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα δειγματοληψίας και β) η εφαρμογή του μοντέλου του ημιποσοτικού προσδιορισμού που χρησιμοποιήθηκε στα ζυμαρικά, για τον έλεγχο άλλων ειδών νοθείας των τροφίμων (π.χ. νοθεία κρέατος και προϊόντων του με ζωϊκά είδη που διαφέρουν από τα αναγραφόμενα συστατικά στην συσκευασία ή ανίχνευση παρουσίας ζωϊκών συστατικών σε προϊόντα vegan).

ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alary R., Serin A., Duviau M. P., Jourdrier P., & Gautier M. F. (2002). Quantification of common wheat adulteration of durum wheat pasta using real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR). *Cereal chemistry*, 79(4), 553-558.
- Alcoba-Flórez J., del Pilar Arévalo-Morales M., Pérez-Roth E., Laich F., Rivero-Pérez B., & Méndez-Álvarez S. (2007). Yeast molecular identification and typing. *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology*. Formatex Research Center, Extremadura, 535-546.
- Angers A, Bonfini L, Petrillo M, Patak Dennstedt A, Kreysa J. (2013). Literature and Bioinformatics Analyses of Wheat-specific Detection Methods. EUR 26393. Luxembourg (Luxembourg): *Publications Office of the European Union*, JRC86656
- Arzani A. & Ashraf M. (2017). Cultivated ancient wheats (*Triticum* spp.): A potential source of health-beneficial food products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(3), 477-488.
- Barnwell P., McCarthy P. K., Lumley I. D., & Griffin M. (1994). The use of reversed-phase high-performance liquid chromatography to detect common wheat (*Triticum aestivum*) adulteration of durum wheat (*Triticum durum*) pasta products dried at low and high temperatures. *Journal of cereal science*, 20(3), 245-252.
- Bonetti A., Marotti I., Catizone P., Dinelli G., Maietti A., Tedeschi P., & Brandolini V. (2004). Compared use of HPLC and FZCE for cluster analysis of *Triticum* spp and for the identification of *T. durum* adulteration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(13), 4080-4089.
- Boyko EV., Badaev NS., Maximov NG. & Zelenin AV. (1984). Does DNA content change in the course of Triticale breeding? *Cereal Research Communications* 12: 99-100.
- Broeders S., Huber I., Grohmann L., Berben G., Taverniers I., Mazzara M., Roosens N. & Morisset D. (2014). Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. *Trends in Food Science & Technology*, 37(2), 115-126.
- Butler J. M. (2012). DNA quantitation. *Advanced topics in forensic DNA typing: methodology*. Boston (MA): Elsevier, 49-67

- Carloni E., Amagliani G., Omiccioli E., Ceppetelli V., Del Mastro M., Rotundo L., Brandi G. & Magnani M. (2017). Validation and application of a quantitative real-time PCR assay to detect common wheat adulteration of durum wheat for pasta production. *Food chemistry*, 224, 86-91.
- Casazza A. P., Morcia C., Ponzoni E., Gavazzi F., Benedettelli S., & Breviario D. (2012). A reliable assay for the detection of soft wheat adulteration in Italian pasta is based on the use of new DNA molecular markers capable of discriminating between *Triticum aestivum* and *Triticum durum*. *Journal of cereal science*, 56(3), 733-740.
- Cocchi M., Durante C., Foca, G. Marchetti A., Tassi L., & Ulrici A. (2006). Durum wheat adulteration detection by NIR spectroscopy multivariate calibration. *Talanta*, 68(5), 1505-1511.
- Dawe P. R., Johnston K. W., & Dintheer W. (2000). Pasta mixing and extrusion. *Pasta and semolina technology*, 86-118
- De Girolamo A., Arroyo M. C., Cervellieri S., Cortese M., Pascale M., Logrieco A. F., & Lippolis V. (2020). Detection of durum wheat pasta adulteration with common wheat by infrared spectroscopy and chemometrics: A case study. *LWT – Food Science and Technology*, 127, 109368.
- de Sousa T., Ribeiro M., Sabença C., & Igrejas G. (2021). The 10,000-year success story of wheat!. *Foods*, 10(9), 2124.
- Dubcovsky J., & Dvorak J. (2007). Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication. *Science*, 316(5833), 1862-1866.
- European Commission, Directorate-General for Agriculture and Rural Development. Cereals prices. Data available online: <https://agridata.ec.europa.eu/extensions/DashboardCereals/ExtCerealsPrice.html#>
- FAOSTAT. Food and Agriculture Organization. Online Website: <https://www.fao.org/faostat/en/#home>
- Fountas L. (2022) Molecular analysis of the vitamin D and estrogen receptor in osteoporosis. PhD Thesis (doi: 10.12681/eadd/23214). National and Kapodistrian University of Athens
- Higuchi R., Fockler C., Dollinger G. and Watson R. (1993). Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. *Nat Biotechnol* 11, 1026–1030.

- Hougs L., Gatto F., Goerlich O., Grohmann L., Lieske K., Mazzara M., Narendja F., Ovesna J., Papazova N., Scholtens I., Žel J. (2017). Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods. EUR 29015 EN, Publication Office of the European Union, Luxembourg, 2017, ISBN 978-92-79-77310-5, doi:10.2760/645114, JRC 109940
- Ibrahim M. A., Al-Hmoud N. D., Al-Rousan H., & Hayek B. O. (2011). Detection of durum wheat pasta adulteration in the Jordanian Market by polymerase chain reaction technology. *Am. J. Food Technol*, 6, 492-499.
- Iida M., Yamashiro S., Yamakawa H., Hayakawa K., Kuribara H., Kodama T., Furui S., Akiyama H., Maitani T. and Hino A. (2005). Development of Taxon-Specific Sequences of Common Wheat for the Detection of Genetically Modified Wheat. *J. Agric. Food Chem.* 53, 6294-6300. DOI: 10.1021/jf0505731
- Imai S., Tanaka K., Nishitsuji Y., Kikuchi Y., Matsuoka Y., Arami S-I., Sato M., Haraguchi H., Kurimoto Y., Mano J., Furui S. and Kitta K. (2012). An Endogenous Reference Gene of Common and Durum Wheat for Detection of Genetically Modified Wheat. *Food Hyg. Saf. Sci.* 204 Vol. 53 203-210.
- International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC) (2014). A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome. *Science*, Vol:345, Issue:6194, p. 1251788-1.
- International Pasta Organization. Annual Report 2021. Retrieved May 2023. Data available online : <https://internationalpasta.org/annual-report/>
- Invitrogen (2010) Qubit® 2.0 Fluorometer User Manual, Catalog no. Q32866, Rev. Date 4 October 2010, Invitrogen, 5791 Van Allen Way Carlsbad, CA 92008).
- Macherey-Nagel (2022) User Manual for Nucleospin Food Kit: Genomic DNA from Food. January 2022/Rev.14
- Maryami Z., Azimi M. R., Guzman C., Dreisigacker S., & Najafian G. (2020). Puroindoline (Pina-D1 and Pinb-D1) and waxy (Wx-1) genes in Iranian bread wheat (*Triticum aestivum* L.) landraces. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 34(1), 1019-1027.

- Matsuoka Y., Arami S. I., Sato M., Haraguchi H., Kurimoto Y., Imai S., Tanaka K., Mano H., Furui S. & Kitta K. (2012). Development of methods to distinguish between durum/common wheat and common wheat in blended flour using PCR. *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, 53(5), 195-202.
- Momtaz M., Bubli S. Y., & Khan M. S. (2023). Mechanisms and Health Aspects of Food Adulteration: A Comprehensive Review. *Foods*, 12(1), 199.
- Morcia C., Bergami R., Scaramagli S., Ghizzoni R., Carnevali P., & Terzi V. (2020). A chip digital PCR assay for quantification of common wheat contamination in pasta production chain. *Foods*, 9(7), 911.
- Mullis K.B. and Faloona F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-350.
- Nestorov J., Matic G., Elaković I., & Tanić N. (2013). Gene Expression Studies: How to Obtain Accurate and Reliable Data by Quantitative Real-Time RT PCR. *Journal of Medical Biochemistry*. 32. 325–338. 10.2478/jomb-2014-0001.
- Peña R. J. (2002). Wheat for bread and other foods. *Bread wheat improvement and production. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome*, 483-542.
- Saiki R.K., Scharf S., Faloona F.A., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A. and Amheim N. (1985). Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anaemia. *Science* 230:1350-1354.
- Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. (1989). Molecular Cloning : A Laboratory Manual. Volumes 1,2,3. Second Edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. New York.
- Sarwar M., & McDonald C. E. (1993). Detection of bread wheat farina adulterant in durum wheat semolina and pasta dried at low, high, and ultra-high temperatures. *Cereal chemistry*, 70(4), 405-411.
- Schweitzer C. and Scaiano J.C. (2003). Selective binding and local photophysics of the fluorescent cyanine dye PicoGreen in double-stranded and single-stranded DNA. *Physical Chemistry Chemical Physics* 5 (21): 4911–4917.
- Sezer B., Unuvar A., Boyacı I. H., & Köksel H. (2022). Rapid discrimination of authenticity in wheat flour and pasta samples using LIBS. *Journal of Cereal Science*, Vol:104, 103435.
- Sissons M. (2008). Role of durum wheat composition on the quality of pasta and bread. *Food*, 2(2), 75-90.

- Sonnante G., Montemurro C., Morgese A., Sabetta W., Blanco A., & Pasqualone A. (2009). DNA microsatellite region for a reliable quantification of soft wheat adulteration in durum wheat-based foodstuffs by real-time PCR. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(21), 10199-10204.
- Stevenson A., McCarthy P. K., & Griffin M. (1994). Polyclonal antisera against unheated and heated common wheat specific gamma and omega gliadins for the detection of adulteration of durum wheat and durum wheat products with common wheats. *Food and Agricultural Immunology*, 6(4), 435-442.
- Sissons M.J., Abecassis J., Marchylo B., Carcea M. (2012). *Durum Wheat: Chemistry and Technology*; Second Edition; ISBN: 978-1-891127-65-6
- Terzi V., Malnati M., Barbanera M., Stanca A. M., & Faccioli P. (2003). Development of analytical systems based on real-time PCR for Triticum species-specific detection and quantitation of bread wheat contamination in semolina and pasta. *Journal of Cereal Science*, 38(1), 87-94.
- Wong M.L., & Medrano JF. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39(1), 75-85.
- UN.A.F.P.A. (Union of the Organizations of Manufacturers of Pasta Products in the E.U.) Data Available online: <https://www.pasta-unafpa.org/newt/unafpa/default.aspx?ID-CONTENT=102>
- William A., Alain B., & Maarten, V. G. (2011). *The world wheat book: a history of wheat breeding* (Vol. 2). Lavoisier, Paris, France.
- Žilić S., Barać M., Pešić M., Dodig D., & Ignjatović-Micić D. (2011). Characterization of proteins from grain of different bread and durum wheat genotypes. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(9), 5878-5894.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ΑΑΔΕ (Ανεξάρτητη Αρχή Δημοσίων Εσόδων). Κώδικας Τροφίμων και Ποτών. Διαθέσιμη έκδοση (ενημερωμένο έως Σεπτέμβριο 2021) διαδικτυακά: <https://www.aade.gr/rolites/ypiresies-genikoy-himeioy-toy-kratoys-ghk/trofima-ylika-se-epafi-me-trofima/himeio/kodikas-trofimon-kai-poton>.
- ΕΦΕΤ (Ενιαίος Φορέας Ελέγχου Τροφίμων) (2022) <https://www.efet.gr/index.php/el/enimerosi/anakoinoseis-ekdiloseis/anakoinoseis-cat/item/5126-dimosia-diavoylefsi-arthrou-115-ktp-zymarika>
- Κακάνη Ε., Αυγουστίνος Α. και Ματθιόπουλος Κ. (2010). Φυλλάδιο Εργαστηριακών Ασκήσεων μαθήματος Μοριακή Βιολογία Ι. *Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας*.
- ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 1222/94 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ της 30ής Μαΐου 1994 περί θεσπίσεως κοινών λεπτομερών κανόνων εφαρμογής του συστήματος επιστροφών κατά την εξαγωγή και των κριτηρίων καθορισμού του ύψους των, για ορισμένα γεωργικά προϊόντα, εξαγόμενα υπό μορφή εμπορευμάτων μη υπαγομένων στο παράρτημα ΙΙ της συνθήκης. *Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων*, Αριθ. L 136/5, 31-5-1994.
- ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΕ) αριθ. 578/2010 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ της 29ης Ιουνίου 2010 για την εφαρμογή του κανονισμού (ΕΚ) 1216/2009 του Συμβουλίου όσον αφορά το σύστημα χορήγησης επιστροφών κατά την εξαγωγή και τα κριτήρια καθορισμού του ύψους τους, για ορισμένα γεωργικά προϊόντα, εξαγόμενα υπό μορφή εμπορευμάτων μη υπαγομένων στο παράρτημα Ι της Συνθήκης. *Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης*, L 171/1, 6-7-2010.
- ΝΟΜΟΣ ΥΠ' ΑΡΙΘ. 4235 (2014). Διοικητικά μέτρα, διαδικασίες και κυρώσεις στην εφαρμογή της ενωσιακής και εθνικής νομοθεσίας στους τομείς των τροφίμων, των ζωοτροφών και της υγείας και προστασίας των ζώων και άλλες διατάξεις αρμοδιότητας του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων. *Εφημερίδα Της Κυβερνήσεως*. Τεύχος Πρώτο. Αριθμός Φύλλου 32 (11 Φεβρουαρίου 2014) σελ. 501-644.
- Σάτρα Μαρία, Ε.ΔΙ.Π, Εργ. Βιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. <https://slideplayer.gr/slide/4866602/>