

Διάκριση γάλακτος διαφορετικής ζωικής προέλευσης με μοριακές τεχνικές

Δρ Ευριδίκη Μπουκουβάλα, Εντεταλμένη Ερευνήτρια
Ινστιτούτο Κτηνιατρικών Ερευνών

Η νοθεία τροφίμων αποτελεί ένα βασικό πρόβλημα της σημερινής εποχής. Υπάρχουν δύο βασικές κατηγορίες νοθείας, η επικίνδυνη για την υγεία, στην οποία γίνεται χρήση ουσιών που φυσιολογικά απαγορεύεται η παρουσία τους στα τρόφιμα και η ακίνδυνη, όπου παρατηρείται αλλαγή των συγκεντρώσεων κάποιων συστατικών των τροφίμων. Σε αυτήν την περίπτωση νοθείας, τα βασικά συστατικά αντικαθίστανται με άλλα μικρότερης αξίας, οπότε ουσιαστικά εξαπατούν και ζημιώνουν τους καταναλωτές.

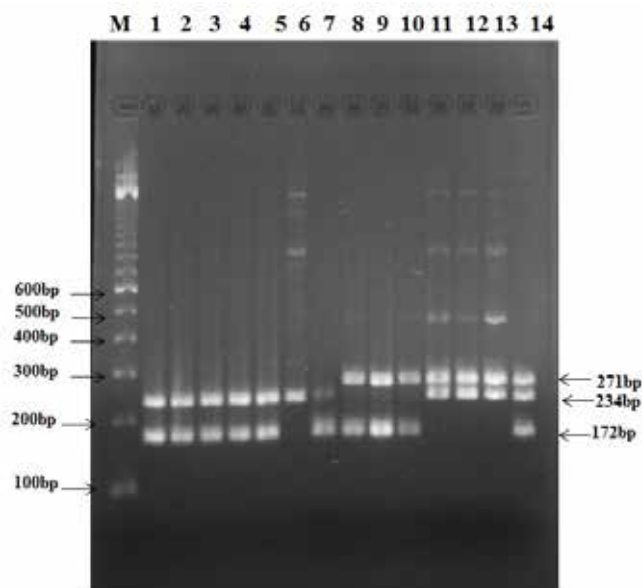
Ένα από τα βασικά προϊόντα που υπόκεινται σε νοθείες είναι το γάλα. Οι νοθείες που παρατηρούνται συνήθως στο γάλα είναι οι προσμίξεις γάλακτος διαφορετικής ζωικής προέλευσης, η αραίωση του γάλακτος με νερό, η χρήση σκόνης γάλακτος και σπανιότερα η χρήση κάποιων βλαβερών ουσιών όπως απορρυπαντικά, καυστική σόδα, μελαμίνη κ.ά.

Η αξιόπιστη ταυτοποίηση της νοθείας με την πρόσμιξη γάλακτος διαφορετικής προέλευσης αποτελεί κρίσιμη παράμετρο για τη στήριξη των εξαγωγικών δραστηριοτήτων των κτηνοτρόφων και των μονάδων παραγωγής τυροκομικών προϊόντων. Η προσθήκη γάλακτος βόειας προέλευσης στο πρόβειο γάλα που προορίζεται για την παραγωγή φέτας υπονομεύει όλη την προσπάθεια για την ανάδειξη και διατήρηση της φέτας ως «ναυαρχίδας» των ελληνικών εξαγωγίμων τυροκομικών προϊόντων. Αντίστοιχα, η πρόσμιξη αίγιου με πρόβειο σε αναλογίες διαφορετικές από τις επιτρεπόμενες, δημιουργεί κλίμα αναξιοπιστίας στην εσωτερική και εξωτερική αγορά. Οι υπάρχουσες μέθοδοι έχουν περιορισμένη αξιοπιστία, ιδιαίτερα όταν η πρόσμιξη είναι μεγαλύτερη από 20%. Επιπλέον, η αξιόπιστη χρήση τους συνδέεται άμεσα και με την ποιοτική σύσταση του γάλακτος, η οποία μεταβάλλεται και εξαρτάται από τη φυλή και την περίοδο γαλακτοπαραγωγής.

Με χρηματοδότηση της Γενικής Διεύθυνσης Διασφάλισης Ποιότητας Αγροτικών Προϊόντων πραγματοποιήθηκε το αυτοχρηματοδοτούμενο έργο «Αξιολόγηση μεθόδων ELISA και PCR ως τεχνικών διάκρισης γάλακτος διαφορετικής ζωικής προέλευσης (αγελαδινής, πρόβειας ή αίγιας)» με Επιστημονικά Υπεύθυνη την Τακτική Ερευνήτρια Δρα Λουκία Αικατερινιάδου του Ινστιτούτου Κτηνιατρικών Ερευνών (IKE) και σε συνεργασία με τη Δρα Χρύσα Ματαρά, Προϊσταμένη των Εργαστηρίων Ελέγχου Ποιότητας Γάλακτος (ΕΕΠΓ)-ΕΛΓΟ ΔΗΜΗΤΡΑ, την κ. Χριστίνα Τοπαλίδου Προϊσταμένη ΕΕΠΓ Δράμας και την κ. Χριστίνα Παπαγόρα, γεωπόνου-τεχνολόγου τροφίμων στο ΕΕΠΓ Δράμας.

Αντικείμενο του έργου είναι η ανάπτυξη νέων μοριακών μεθόδων ποιοτικής και ποσοτικής ταυτοποίησης της νοθείας του πρόβειου γάλακτος και η συγκριτική ανάλυση δειγμάτων αγελαδινού γάλακτος και γάλακτος πρόβειας και αίγιας προέλευσης με ELISA και συγκεκριμένα:

- Ποιοτικό προσδιορισμό αίγιου σε πρόβειο με τη μέθοδο των sticks.
- Ποσοτικό προσδιορισμό αίγιου σε πρόβειο με τη μέθοδο ELISA.



Εικόνα 1. Triplex PCR για ανίχνευση αγελαδινού, αίγιου και πρόβειου γάλακτος. Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε 2.5% ηλεκτροφορήσιμη agarόζη. M:100bp DNA ladder (Life technologies), 1: gDNA από Ring Test 1, 2: gDNA από Ring Test 2, 3: gDNA από Ring Test 3, 4: gDNA από Ring Test 4, 5: gDNA από Ring Test 5, 6: gDNA από Ring Test 6, 7: gDNA από Ring Test 7, 8: gDNA από Ring Test 8, 9: gDNA από Ring Test 9, 10: gDNA από Ring Test 10, 11: gDNA από Ring Test 11, 12: gDNA από Ring Test 12, 13: gDNA από Ring Test 13 και 14: 1:1:1 μείγμα από gDNA αγελαδινού, αίγιου και πρόβειου γάλακτος

- Πραγματοποίηση ring test από το IKE για την αξιολόγηση των εμπορικών kit ELISA του ποσοτικού προσδιορισμού αίγιου σε πρόβειο γάλα. Στο ringtest συμμετέχουν όλα τα σχετικά εργαστήρια της Γενικής Διεύθυνσης Διασφάλισης Ποιότητας Αγροτικών Προϊόντων.
- Εφαρμογή μεθόδου ELISA για τον προσδιορισμό της νοθείας του πρόβειου και αίγιου γάλακτος με αγελαδινό γάλα.
- Ανάπτυξη μοριακών μεθόδων. Το Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας/Μικροβιολογίας του IKE είναι υπεύθυνο για την ανάπτυξη μεθόδου PCR και Multiplex PCR με στόχο την ταυτοποίηση της προέλευσης του γάλακτος, καθώς και την ανάπτυξη πρωτοκόλλου qPCR για την ποσοτικοποίηση της νοθείας. Η ανάπτυξη μοριακών μεθόδων για την ανίχνευση της νοθείας είναι ιδιαίτερα σημαντική γιατί στοχεύει την ανίχνευση στο επίπεδο του είδους των ζώων, υπερπηδώντας το εμπόδιο της διαφοροποίησης που παρατηρείται μεταξύ των φυλών. Επίσης, καθιστούν δυνατή τη συλλογή δειγμάτων γάλακτος από όλα τα στάδια γαλακτοπαραγωγής, ακόμη και το πρωτόγαλα το οποίο αποτελεί περιοριστικό παράγοντα σε όλες τις υπόλοιπες μεθόδους.

Ring test

Το IKE πραγματοποίησε ένα ring test, με στόχο την αξιολόγηση τόσο των εμπορικών kit ELISA, όσο και των μοριακών μεθόδων που αναπτύχθηκαν στο εργαστήριο. Χρησιμοποιήθηκαν 13 δείγματα γάλακτος με προσμίξεις ή χωρίς των τριών ειδών γάλακτος διαφορετικής ζωικής προέλευσης.



Ποιοτική ανίχνευση της προέλευσης του γάλακτος

Στα δείγματα πραγματοποιήθηκε η εξαγωγή του γενωμικού DNA (PureLink Genomic DNA Mini Kit, Life technologies) αφού προηγήθηκε μια διαδικασία για την απομάκρυνση του λίπους και διάλυση της καζεΐνης του γάλακτος. Στις PCR χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση γάλακτος βόειας προέλευσης οι εκκινητές που αναφέρονται στην εργασία των Lahiff et al. (2001), οι οποίοι οδηγούν στην ενίσχυση ενός τμήματος 271bp του μιτοχονδριακού DNA. Η ανίχνευση του πρόβειου γάλακτος πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το ζευγάρι εκκινητών που αναφέρεται στην εργασία των Bottero et al. (2002), ενισχύοντας ένα τμήμα 172bp του μιτοχονδριακού 12S-16S rRNA. Η ανίχνευση του αίγειου γάλακτος πραγματοποιήθηκε στην απλή PCR με εκκινητές των Nagarra et al. (2009), βασιζόμενοι στην αλληλουχία της περιοχής D loop του μιτοχονδριακού DNA ενισχύοντας τμήμα 436bp, ενώ στη Multiplex PCR και στην QPCR εκκινητές που σχεδιάστηκαν στο εργαστήριο και ενισχύουν 234bp.

Αριθμός δείγματος	Αγελαδινό	Πρόβειο	Αίγειο
1	-	90% (45ml)	10% (5 ml)
2	-	80% (40 ml)	20% (10ml)
3	-	60% (30 ml)	40% (20ml)
4	-	30% (15 ml)	70% (35ml)
5	-	50% (25 ml)	50% (25ml)
6	-	-	100% (50ml)
7	-	100% (50ml)	-
8	50% (25ml)	50% (25ml)	-
9	30% (15ml)	70% (35ml)	-
10	70% (35ml)	30% (15ml)	-
11	50% (25ml)	-	50% (25ml)
12	30% (15ml)	-	70% (35ml)
13	70% (35ml)	-	30% (15ml)

Με την πραγματοποίηση απλής PCR στα 13 δείγματα του ring test ήταν δυνατή η αναγνώριση της προέλευσης του γάλακτος. Η χρήση του κάθε ζεύγους εκκινητών αναγνωρίζει την παρουσία ή όχι κάποιου από τα τρία είδη ζώων στο γενωμικό DNA των δειγμάτων, χωρίς τη δημιουργία μη εξειδικευμένων προϊόντων.

Το εργαστήριο μπόρεσε να αναπτύξει μια Multiplex PCR, ώστε να είναι ευκολότερη, γρηγορότερη και οικονομικότερη η ανίχνευση της προέλευσης του γάλακτος. Με τη χρήση της Multiplex PCR είναι δυνατή σε μια αντίδραση η ταυτόχρονη ανίχνευση της παρουσίας ενός, δύο ή και τριών ειδών γάλακτος διαφορετικής ζωικής προέλευσης. Στην Εικόνα 1, φαίνονται τα αποτελέσματα της Multiplex PCR στα 13 δείγματα του ring test και η ταυτοποίηση των ζωικών προελεύσεων του κάθε δείγμα-

τος, καθώς και ενός μείγματος των τριών ειδών.

Ποσοτική ανίχνευση της προέλευσης του γάλακτος

Με τη χρήση των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στη Multiplex PCR έγινε και η προσπάθεια ποσοτικοποίησης της νοθείας με qPCR και τη χρήση SYBR Green ως χρωστική. Απαραίτητη ήταν αρχικά η δημιουργία πρότυπων καμπυλών, που σχηματίστηκαν με την αραιώση δειγμάτων γενωμικού DNA προερχόμενα από 100% βόειας, πρόβειας και αίγειας προέλευσης γάλακτος. Οι πρότυπες καμπύλες που σχηματίστηκαν ήταν ικανοποιητικές, αλλά δυστυχώς υπήρχαν μεγάλες αποκλίσεις στις τιμές που προέκυπταν από την ποσοτικοποίηση των 13 δειγμάτων του ringtest.

Έγιναν προσπάθειες βελτιστοποίησης της μεθόδου, με τη δημιουργία πρότυπων καμπυλών από γάλατα αραιωμένα με νερό, αλλά και της εξαγωγής του γενωμικού DNA, γιατί σύμφωνα και με τη μέτρηση της συγκέντρωσης του εξαγόμενου DNA και την καταμέτρηση των σωματικών κυττάρων στα δείγματα, ήταν φανερή η έλλειψη σταθεροποίησης του αριθμού των σωματικών κυττάρων που εντοπίζονταν στα δείγματα. Το συγκεκριμένο πρόβλημα έχει παρατηρηθεί και από άλλους ερευνητές, εμποδίζοντας έτσι την ανάπτυξη μιας τέτοιας μοριακής μεθόδου για την ποσοτικοποίηση της νοθείας του γάλακτος.

Οι μοριακές τεχνικές λοιπόν, που αναπτύχθηκαν στο εργαστήριο καθιστούν εφικτή την ποιοτική ανίχνευση της νοθείας του γάλακτος. Ιδιαίτερως, η χρήση της Multiplex PCR την καθιστά ως μια μέθοδο γρήγορη και οικονομικά συμφέρουσα, που θα μπορούσε να αντικαταστήσει τη χρήση των sticks.

Η ποσοτική ανίχνευση με τη βοήθεια της qPCR, αν και πραγματοποιήθηκαν κάποιες βελτιώσεις στην εφαρμογή της, δεν μπορεί ακόμη να χρησιμοποιηθεί. Στο επόμενο στάδιο και σε συνεργασία με τεχνολόγους γάλακτος θα γίνει προσπάθεια αφαίρεσης του λίπους χωρίς να επηρεάζεται ο αριθμός των σωματικών κυττάρων με στόχο τη δημιουργία ενός σταθερού συστήματος αναφοράς.

