



ΔΗΜΟΚΡΙΤΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΡΑΚΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

Μοριακή Βιοτεχνολογία και Διατροφή

Δρ. Α. ΓΑΛΑΝΗΣ
agalanis@mbg.duth.gr

Μοριακές τεχνικές με εφαρμογή στη Βιοτεχνολογία τροφίμων

Επισήμανση τροφίμων

Γενικές διατάξεις επισήμανσης τροφίμων

Η βασική νομοθετική πράξη που ρυθμίζει θέματα επισήμανσης, παρουσίασης και διαφήμισης των τροφίμων είναι η Οδηγία 2000/13/ΕΚ.

Άρθρο 1

1. Η παρούσα οδηγία αφορά την επισήμανση των τροφίμων που προορίζονται να παραδοθούν ως έχουν στον τελικό καταναλωτή, καθώς επίσης και ορισμένα ζητήματα σχετικά με την παρουσίαση και τη διαφήμισή τους.
2. Η παρούσα οδηγία εφαρμόζεται επίσης και στα τρόφιμα που προορίζονται να παραδοθούν στα εστιατόρια, νοσοκομεία, κυλικεία και άλλες παρόμοιες μονάδες ομαδικής εστίασης, εφεξής καλούμενες «μονάδες ομαδικής εστίασης».
3. Κατά την έννοια της παρούσης οδηγίας νοείται ως:
 - α) «επισήμανση»: οι μνείες, ενδείξεις, εμπορικά ή βιομηχανικά σήματα, εικόνες ή σύμβολα που αναφέρονται σ' ένα τρόφιμο και φέρονται σε κάθε συσκευασία, έγγραφο, πινακίδα, ετικέττα, δακτύλιο ή περιλαίμια που συνοδεύουν ή αναφέρονται στο τρόφιμο αυτό.
 - β) «προσυσκευασμένο τρόφιμο»: η μονάδα πωλήσεως που προορίζεται να παρουσιασθεί ως έχει στον τελικό καταναλωτή και στις μονάδες ομαδικής εστίασης και που αποτελείται από ένα τρόφιμο και τη συσκευασία, μέσα στην οποία έχει τροποποιηθεί πριν από την προσφορά του προς πώληση, εφ' όσον η συσκευασία αυτή το καλύπτει ολικά ή μερικά, αλλά κατά τρόπο που να μην είναι δυνατόν να τροποποιηθεί το περιεχόμενο, χωρίς να ανοιχτεί ή ένα τροποποιηθεί η συσκευασία.

Άρθρο 2

1. Η επισήμανση και οι τρόποι σύμφωνα με τους οποίους πραγματοποιείται δεν πρέπει:

α) να είναι φύσεως τέτοιας, ώστε να οδηγεί σε πλάνη τον αγοραστή, ιδίως:

i) ως προς τα χαρακτηριστικά του τροφίμου και ιδίως τη φύση, την ταυτότητα, τις ιδιότητες, την σύνθεση, την ποσότητα, τη διατηρησιμότητα, την καταγωγή ή προέλευση, τον τρόπο παρασκευής ή λήψεως,

ii) με την απόδοση από τρόφιμο αποτελεσμάτων ή ιδιοτήτων που δεν έχει,

iii) με τον υπαινιγμό ότι το τρόφιμο έχει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, ενώ στην πραγματικότητα όλα τα παρόμοια τρόφιμα έχουν αυτά τα ίδια χαρακτηριστικά.

β) με την επιφύλαξη των κοινοτικών διατάξεων σχετικά με τα φυσικά μεταλλικά νερά και με τα τρόφιμα ειδικής διατροφής, να αποδίδει σε τρόφιμο ιδιότητες πρόληψης, αγωγής και θεραπείας οποιασδήποτε ανθρώπινης ασθένειας ή να επικαλείται τις ιδιότητες αυτές.

2. Το Συμβούλιο, σύμφωνα με τη διαδικασία που προβλέπεται στο άρθρο 95 της συνθήκης συντάσσει κατάλογο, επιδεχόμενο περαιτέρω διεύρυνση, στον οποίο περιέχονται αναφορές των οποίων η χρήση, κατά την έννοια της παραγράφου 1, πρέπει να απαγορευθεί ή να περιορισθεί.

3. Οι απαγορεύσεις ή οι περιορισμοί που προβλέπονται στις παραγράφους 1 και 2 εφαρμόζονται επίσης:

- α) στην παρουσίαση των τροφίμων και ιδίως στο σχήμα ή στην όψη που δίνεται σ' αυτά ή στη συσκευασία τους, στο υλικό συσκευασίας που χρησιμοποιήθηκε, στον τρόπο που είναι τροποποιημένα καθώς επίσης και στο χώρο εκθέσεώς τους,
- β) στη διαφήμιση.

Άρθρο 3

1. Η επισήμανση των τροφίμων περιλαμβάνει, σύμφωνα με τους όρους και υπό την επιφύλαξη των παρεκλίσεων που προβλέπονται στα άρθρα 4 έως 17, τις ακόλουθες υποχρεωτικές ενδείξεις:

1. την ονομασία πωλήσεως·
2. τον κατάλογο των συστατικών·
3. την ποσότητα ορισμένων συστατικών ή κατηγοριών συστατικών σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 7·
4. την καθαρή ποσότητα, για τα προσυσκευασμένα τρόφιμα·
5. την ημερομηνία ελάχιστης διατηρησιμότητας ή στην περίπτωση των τροφίμων που είναι μικροβιολογικώς εξαιρετικά αλλοιώσιμα, την τελική ημερομηνία ανάλωσης·
6. τις ιδιαίτερες συνθήκες διατηρήσεως και χρήσεως·
7. το όνομα ή την εμπορική επωνυμία και τη διεύθυνση του κατασκευαστή ή του συσκευαστή ενός πωλητή εγκατεστημένου στο εσωτερικό της Κοινότητας.

Εν τούτοις, τα κράτη μέλη μπορούν, για το βούτυρο που παράγεται στην επικράτειά τους να μην απαιτούν παρά μόνον την ένδειξη του κατασκευαστή, του συσκευαστή ή του πωλητή.

Υπό την επιφύλαξη της πληροφόρησης που προβλέπεται στο άρθρο 24, τα κράτη μέλη ανακοινώνουν στην Επιτροπή και στα άλλα κράτη μέλη κάθε μέτρο που λαμβάνουν δυνάμει του δεύτερου εδαφίου·

8. τον τόπο καταγωγής ή προελεύσεως στις περιπτώσεις που η παράλειψη της ενδείξεως αυτής θα ήταν δυνατόν να δημιουργήσει στον καταναλωτή εσφαλμένη εντύπωση σχετικά με τον πραγματικό τόπο καταγωγής ή προελεύσεως του τροφίμου·
 9. οδηγίες χρήσεως στην περίπτωση στην οποία η παράλειψή τους δεν θα επέτρεπε τη σωστή χρήση του προϊόντος·
 10. για τα ποσά με περιεκτικότητα σε οινόπνευμα μεγαλύτερη από 1,2 % κατ' όγκο, η αναγραφή του κτηθέντος κατ' όγκο αλκοολικού τίτλου.
2. Κατά παρέκκλιση της παραγράφου 1, τα κράτη μέλη μπορούν να διατηρήσουν για την εθνική τους παραγωγή τις εθνικές διατάξεις που επιβάλλουν την ένδειξη της επιχειρήσεως παρασκευής ή συσκευασίας.
3. Οι διατάξεις του παρόντος άρθρου δεν επηρεάζουν τις ειδικότερες ή γενικότερες διατάξεις σχετικά με τα μέτρα και σταθμό (μετρολογία).

Ειδικές διατάξεις επισήμανσης τροφίμων

Αλλεργιογόνα συστατικά

Η Οδηγία 2003/89/ΕΚ, η οποία τροποποιεί την Οδηγία 2000/13/ΕΚ, παραθέτει έναν κατάλογο αλλεργιογόνων συστατικών, τα οποία όταν χρησιμοποιούνται στα προσσκευασμένα τρόφιμα οφείλουν υποχρεωτικά να αναγράφονται στην επισήμανση των τροφίμων, καθώς θεωρείται ότι ενδέχεται να προκαλέσουν αλλεργίες σε ευαίσθητες ομάδες πληθυσμού ή ευπαθή άτομα.

Πρόσθετα

[Οδηγία 94/54/ΕΚ](#) της Επιτροπής σχετικά με την αναγραφή, στην επισήμανση ορισμένων τροφίμων, υποχρεωτικών ενδείξεων πέραν των προβλεπόμενων από την οδηγία 79/112/ΕΟΚ του Συμβουλίου. Τελευταία τροποποίηση έγινε με την :

[Οδηγία 2004/77/ΕΚ](#) της Επιτροπής, για την τροποποίηση της οδηγίας 94/54/ΕΚ σχετικά με την επισήμανση ορισμένων τροφίμων που περιέχουν γλυκυρριζικό οξύ και το μετά αμμωνίου άλας του.

Διατροφική επισήμανση

[Οδηγία 2008/100/ΕΚ](#) της Επιτροπής, για την τροποποίηση της οδηγίας 90/496/ΕΟΚ του Συμβουλίου σχετικά με τους κανόνες της διατροφικής επισήμανσης των τροφίμων, όσον αφορά τις συνιστώμενες ημερήσιες τροφικές δόσεις, τους συντελεστές μετατροπής σε ενεργειακή αξία και τους ορισμούς.

[Οδηγία 90/496/ΕΟΚ](#) του Συμβουλίου, σχετικά με τους κανόνες επισήμανσης των τροφίμων όσον αφορά τις τροφικές τους ιδιότητες.

Αναγραφή ποσοστού ενός συστατικού (Quantitative Ingredient declaration, QUID)

Βόειο κρέας

Τρόφιμα που περιέχουν κινίνη ή / και καφεΐνη

Κακάο - Σοκολάτα

Αναγνώριση Παρτίδας

Δηλούμενο βάρος προσυσκευασμένων τροφίμων

Οι καταναλωτές σε όλη την Ευρωπαϊκή Ένωση έχουν στη διάθεσή τους μια ολοένα αυξανόμενη ποικιλία τροφίμων, κυρίως σε ό,τι αφορά βιομηχανικά επεξεργασμένα και προπαρασκευασμένα προϊόντα. Επομένως, καθίσταται ολοένα και πιο δύσκολο να κάνει κάποιος υγιεινές επιλογές, οι οποίες βασίζονται σε ορθή ενημέρωση, τη στιγμή που βρίσκεται στους διαδρόμους των σουπερμάρκετ. Η επισήμανση των τροφίμων ίσως είναι ένας γρήγορος οδηγός ενημέρωσης των καταναλωτών σε σχέση με το θρεπτικό περιεχόμενο διαφόρων προϊόντων. Παρ' όλα αυτά, η σημερινή χρήση τους και τα πραγματικά αποτελέσματα που έχουν στη διαμόρφωση των τελικών επιλογών που φτάνουν στο καλάθι του σουπερμάρκετ, παραμένουν άγνωστα. Επιπλέον, οι διαφορετικοί τρόποι ενημέρωσης των καταναλωτών (πίνακες διατροφής, η «σήμανση των φαναριών», οι Ενδεικτικές Ημερήσιες Προσλήψεις (GDA), λογότυπα που αφορούν την υγεία, κ.ά.) μπορούν να επιφέρουν διαφορετικά αποτελέσματα.

Για να αναφερθούμε λεπτομερώς στις δυνατότητες της επισήμανσης τροφίμων ως χρήσιμης πηγής διατροφικής ενημέρωσης, το μικρό συλλογικό πρόγραμμα FLABEL θα εξετάσει τους διαφορετικούς παράγοντες, οι οποίοι οδηγούν από τη διαθεσιμότητα των ετικετών στις επιδράσεις στη διατροφική πρόσληψη. Το FLABEL χρηματοδοτείται από το 7^ο ευρωπαϊκό κοινοτικό πλαίσιο.

Το πρόγραμμα FLABEL είναι μία ερευνητική κοινοπραξία, στην οποία συμμετέχουν 12 συνεργάτες (ακαδημαϊκοί, μη κυβερνητικές οργανώσεις, πωλητές λιανικής) από 8 διαφορετικές Ευρωπαϊκές χώρες, και το οποίο συγκεντρώνει εξειδικευμένες γνώσεις γύρω από τους τομείς της διατροφής, της συμπεριφοράς του καταναλωτή, των οικονομικών και της έρευνας αγοράς.

Ξεκινώντας με την αξιολόγηση της ισχύουσας πρακτικής που εφαρμόζεται για τη διατροφική επισήμανση στην Ευρωπαϊκή Ένωση (27) και την Τουρκία, το FLABEL συγκεκριμένα στοχεύει να ανακαλύψει αν οι διατροφικές πληροφορίες επηρεάζουν τους καταναλωτές στην επιλογή των τροφίμων, πόσο δυνατή είναι αυτή η επιρροή, υπό ποιες συνθήκες εμφανίζεται, ποιοι παράγοντες είναι υπεύθυνοι για την εμφάνισή της, καθώς και αν το αποτέλεσμα διαφέρει ανάμεσα σε διάφορες ομάδες καταναλωτών.

<http://www.flabel.org/en/>



Research Consortium Partners

European Food Information Council (EUFIC)

University of Aarhus

University of Surrey

Wageningen University

Agricultural University of Athens

Universität des Saarlandes

European Association of Craft, Small and Medium-sized
Enterprises (UEAPME)

Tesco Stores Ltd

Confederation of Family Organisations in the European
Union (COFACE)

Euro Coop

University of Warsaw

Dokuz Eylul University

Στο πλαίσιο αυτό, οι στρατηγικοί στόχοι του προγράμματος είναι οι εξής:

Να καθοριστεί πώς οι διατροφικές πληροφορίες που υπάρχουν στις ετικέτες των τροφίμων επηρεάζουν τις διατροφικές επιλογές, τις συνήθειες των καταναλωτών και άλλα θέματα υγείας που σχετίζονται με το φαγητό, αναπτύσσοντας και εφαρμόζοντας ένα ενιαίο ερμηνευτικό πλαίσιο, που θα ενσωματώνει τόσο τις πληροφορίες της ετικέτας όσο και άλλους παράγοντες.

Να παρέχει τις επιστημονικές βάσεις για τη χρήση των διατροφικών πληροφοριών που υπάρχουν στις ετικέτες τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων των επιστημονικών αρχών για την αξιολόγηση της επιρροής των διαφορετικών συστημάτων επισήμανσης, με στόχο να χρησιμοποιηθούν από κοινού από ιδρύματα της Ευρωπαϊκής Ένωσης, από βιομηχανίες τροφίμων, κυρίως από μικρές και μεσαίου μεγέθους επιχειρήσεις, καθώς και από άλλα ενδιαφερόμενα μέρη (stakeholders).

Τα αποτελέσματα

Ένας ευρωπαϊκός χάρτης με τις διατροφικές πληροφορίες που υπάρχουν στις ετικέτες τροφίμων σε όλες τις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης, ο οποίος θα δείχνει σε ποιον βαθμό υπάρχει σήμερα διαθρεπτική επισήμανση στις συσκευασίες σε διαφορετικά μέρη της Ένωσης.

Πληροφορίες σχετικά με το πώς ακριβώς οι καταναλωτές κατανοούν και διαβάζουν τις ετικέτες τροφίμων, ποιες είναι οι πιο ελκυστικές και ενημερωτικές ετικέτες, και ποιος είναι ο καλύτερος τρόπος για να επιτευχθεί μία ισορροπία ανάμεσα στην παροχή απλών αλλά και άρτιων διατροφικών πληροφοριών, διευκολύνοντας κατά αυτόν τον τρόπο μια ελεύθερη και ενημερωμένη επιλογή.

Πληροφορίες για τον τρόπο χρήση της ετικέτας τροφίμων στην καθημερινή πρακτική. Αυτό θα βασιστεί σε παρατηρήσεις μέσα στα καταστήματα πώλησης και σε δεδομένα που προκύπτουν από τα μηχανήματα σάρωσης σε καταστήματα λιανικής πώλησης, καταλήγοντας σε πληροφορίες σχετικά με το πώς οι διατροφικές ετικέτες μπορούν να διαμορφώσουν και να επηρεάσουν τις καταναλωτικές τάσεις.

Τα αποτελέσματα

Στοιχεία σε σχέση με το πώς οι καταναλωτές διαμορφώνουν απόψεις για το πόσο υγιεινά είναι τα προϊόντα και πώς οι διατροφικές πληροφορίες που υπάρχουν στις ετικέτες αλληλεπιδρούν με άλλες πληροφορίες που εμπλέκονται σε αυτή τη διαδικασία, συμπεριλαμβανομένων των μέσων μαζικής ενημέρωσης, της διαφήμισης και της σχολικής εκπαίδευσης.

Στοιχεία σε σχέση με το πώς οι ετικέτες τροφίμων μπορούν να επηρεάσουν θετικά τη διατροφική πρόσληψη των παιδιών, βάσει του ρόλου που παίζουν οι διατροφικές πληροφορίες στις αποφάσεις που λαμβάνονται σχετικά με τα τρόφιμα από τις οικογένειες με παιδιά.

Επιστημονικά τεκμηριωμένες προτάσεις βέλτιστων πρακτικών διατροφικής σήμανσης, οι οποίες έχουν δοκιμαστεί σε πραγματικές συνθήκες. Ένα σύνολο βέλτιστων πρακτικών για την αξιολόγηση της επίδρασης της διατροφικής επισήμανσης στην επιλογή προϊόντων από τους καταναλωτές.

Μοριακές τεχνικές με εφαρμογή στη Βιοτεχνολογία τροφίμων

Σε αντίθεση με τις προϋπάρχουσες κλασικές μικροβιολογικές τεχνικές που βασίζονται κυρίως στη φαινοτυπική καταγραφή και παρατήρηση, με αποτέλεσμα τη περιορισμένη διακριτική ικανότητα, οι μοριακές τεχνικές στηρίζονται στη γονοτυπική ανάλυση των μικροοργανισμών. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιούνται μελέτη και χαρακτηρισμός των γενετικών δεικτών των μικροοργανισμών μέσω κατάλληλης επεξεργασίας του γενετικού τους υλικού (DNA). Μια από τις πιο αποτελεσματικές και αξιόπιστες τεχνικές είναι η δοκιμή της Πολλαπλής Αλυσιδωτής Αντίδραση Πολυμεράσης (Multiplex Polymerase Chain Reaction – MPCR).

Η PCR πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR) επίσης αποτελεί μια πολύ ισχυρή μοριακή τεχνική ανίχνευσης μικροοργανισμών. Βασίζεται στη καταγραφή της ενίσχυσης του DNA-στόχου σε πραγματικό χρόνο με τη χρήση κατάλληλης φθορίζουσας χρωστικής. Έτσι, γίνεται άμεση καταγραφή του αποτελέσματος χωρίς να απαιτείται περαιτέρω επεξεργασία των προϊόντων της αντίδρασης (διαχωρισμός σε πήκτωμα αγαρόζης). Παράλληλα, το δυναμικό εύρος διάγνωσης και η ευαισθησία της μεθόδου είναι υψηλότερα ενώ τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα που ενδεχομένως να παρατηρηθούν σε σχέση με τη συμβατική PCR είναι μειωμένα κατά 99.9%. Η Real-Time PCR έχει χρησιμοποιηθεί για την μοριακή ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. plantarum* και *L. reuteri* με χρήση ανιχνευτών ειδικών για τμήμα του ριβοσωμικού γονιδίου 16S αυτών των στελεχών αλλά και με ανάλογο τρόπο για την ταυτοποίηση στελεχών *L. acidophilus*.

Στη περίπτωση που το γονιδίωμα των μικροοργανισμών που πρόκειται να μελετηθούν δεν είναι γνωστό μπορεί να χρησιμοποιηθεί η τεχνική RAPD PCR (Τυχαία Ενίσχυση Πολυμορφικού DNA PCR ή Random Amplified Polymorphic DNA PCR). Σύμφωνα με την εν λόγω τεχνική, η αντίδραση PCR πραγματοποιείται με εκκινητές τυχαίας αλληλουχίας, μήκους 8-12 βάσεων. Συνήθως απαιτούνται 3 με 6 αντιδράσεις με διαφορετικούς εκκινητές ώστε να προκύψει ένα μοναδικό πρότυπο για κάθε εξεταζόμενο οργανισμό, μετά το διαχωρισμό σε πήκτωμα αγαρόζης των προϊόντων της αντίδρασης PCR. Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου περιλαμβάνονται η υψηλή ακρίβεια της ανάλυσης, ο χαμηλός χρόνος ολοκλήρωσης της μελέτης καθώς και το σχετικά χαμηλό κόστος των αντιδραστηρίων. Η RAPD PCR έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση και ταυτοποίηση διαφόρων λακτοβακίλων σε καλλιέργειες γιαούρτης καθώς και σε άλλα προβιοτικά τρόφιμα.

Τέλος, οι DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis - ηλεκτροφόρηση πηκτώματος σε διαβάθμιση αποδιατακτικού παράγοντα) και TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis ηλεκτροφόρηση πηκτώματος σε διαβάθμιση θερμοκρασίας) είναι PCR βασιζόμενες μοριακές τεχνικές που επιτρέπουν την ανάλυση και ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών ετερόλογων πληθυσμών, χωρίς να προαπαιτείται διαχωρισμός των μικροβιακών καλλιεργειών. Για παράδειγμα, η τεχνική DGGE έχει με επιτυχία χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση στελεχών *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* και *S. thermophilus* σε ανθρώπινο εντερικό περιεχόμενο ύστερα από κατανάλωση προβιοτικής γιαούρτης, γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό για την επιβεβαίωση της δράσης του προβιοτικού τροφίμου.

Παρόμοιες μελέτες έχουν αναφερθεί και για τη χρήση της τεχνικής TGGE.

Η δοκιμή της Πολλαπλής Αλυσιδωτής Αντίδραση Πολυμεράσης (Multiplex Polymerase Chain Reaction – MPCR)

Αρχικά, γίνεται συγκριτική μελέτη της αλληλουχίας ενός καθολικού γονιδίου με σκοπό την ανίχνευση πολυμορφικών θέσεων, δηλαδή χαρακτηριστικών για το στέλεχος προς διερεύνηση γενετικών περιοχών. Στη συνέχεια, βάση των πολυμορφικών αυτών θέσεων σχεδιάζονται οι αντίστοιχοι εκκινητές για τη δοκιμή MPCR. Παράλληλα γίνεται απομόνωση γενετικού υλικού από τους μικροοργανισμούς, το οποίο θα χρησιμοποιηθεί ως μήτρα για την αντίδραση πολυμερισμού. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε ειδική συσκευή (θερμικός κυκλοποιητής) και το αποτέλεσμα μπορεί να γίνει γνωστό σε λιγότερο από μία ώρα. Η MPCR χαρακτηρίζεται για τη ταχύτητα, την υψηλή επαναληψιμότητα και τη διακριτική ικανότητα της. Πρόσφατα, έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση του *L. casei* ATCC 393 σε καλλιέργειες προβιοτικών τροφίμων αλλά και σε βιολογικά δείγματα.

Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol

BioTechniques 23:504-511 (September 1997)

**O. Henegariu, N.A. Heerema,
S.R. Dlouhy, G.H. Vance and
P.H. Vogt¹**

Indiana University, Indianapo-
lis, IN, USA and ¹Heidelberg
University, Heidelberg,
Germany

Optimization of Multiplex Reaction Components

Amount of primer (Step 5, B and C). Initially, equimolar primer concentrations of 0.2–0.4 μM each were used in the multiplex PCR (Figure 3c), but there was uneven amplification, with some of the products barely visible even after the reaction was optimized for the cycling conditions. Overcoming this problem required changing the proportions of various primers in the reaction, with an increase in the amount of primers for the “weak” loci and a decrease in the amount for the “strong” loci. The final concentration of the primers (0.04–0.6 μM) varied considerably among the loci and was established empirically.

dNTP and MgCl₂ concentrations (Step 5D).

dNTP. The significance of the dNTP concentration was tested in a multiplex PCR test with primer mixture Y-4. Magnesium chloride concentration was kept constant (3 mM), while the dNTP concentration was increased stepwise from 50–1200 μM each (Figure 4b). The best results were at 200 and 400 μM each dNTP, values above which the amplification was rapidly inhibited. Lower dNTP concentration (50 μM) allowed PCR amplification but with visibly lower amounts of products. dNTP stocks are sensitive to thawing/freezing cycles. After 3–5 such cycles, multiplex PCRs often did not work well; products became almost completely invisible. To avoid such problems, small aliquots (2–4 μL, 10–20 reactions) of dNTP (25 mM each) can be made and kept frozen at -20°C and centrifuged before use. This “low stability” of dNTP is not so obvious when single loci are amplified.

MgCl₂. A recommended magnesium chloride concentration in a standard PCR is 1.5 mM at dNTP concentrations of around 200 μM each. To test the influence of magnesium chloride, a multiplex PCR (mixture Y-3) was performed, keeping dNTP concentration at 200 μM and gradually increasing magnesium chloride from 1.8–10.8 mM (Figure 4c). Amplification became more specific (unspecific bands disappeared), and the products acquired comparable intensities (at 10.8 mM). In PCRs with up to 20 mM MgCl₂, products became barely visible, as if the reactions were inhibited (not shown).

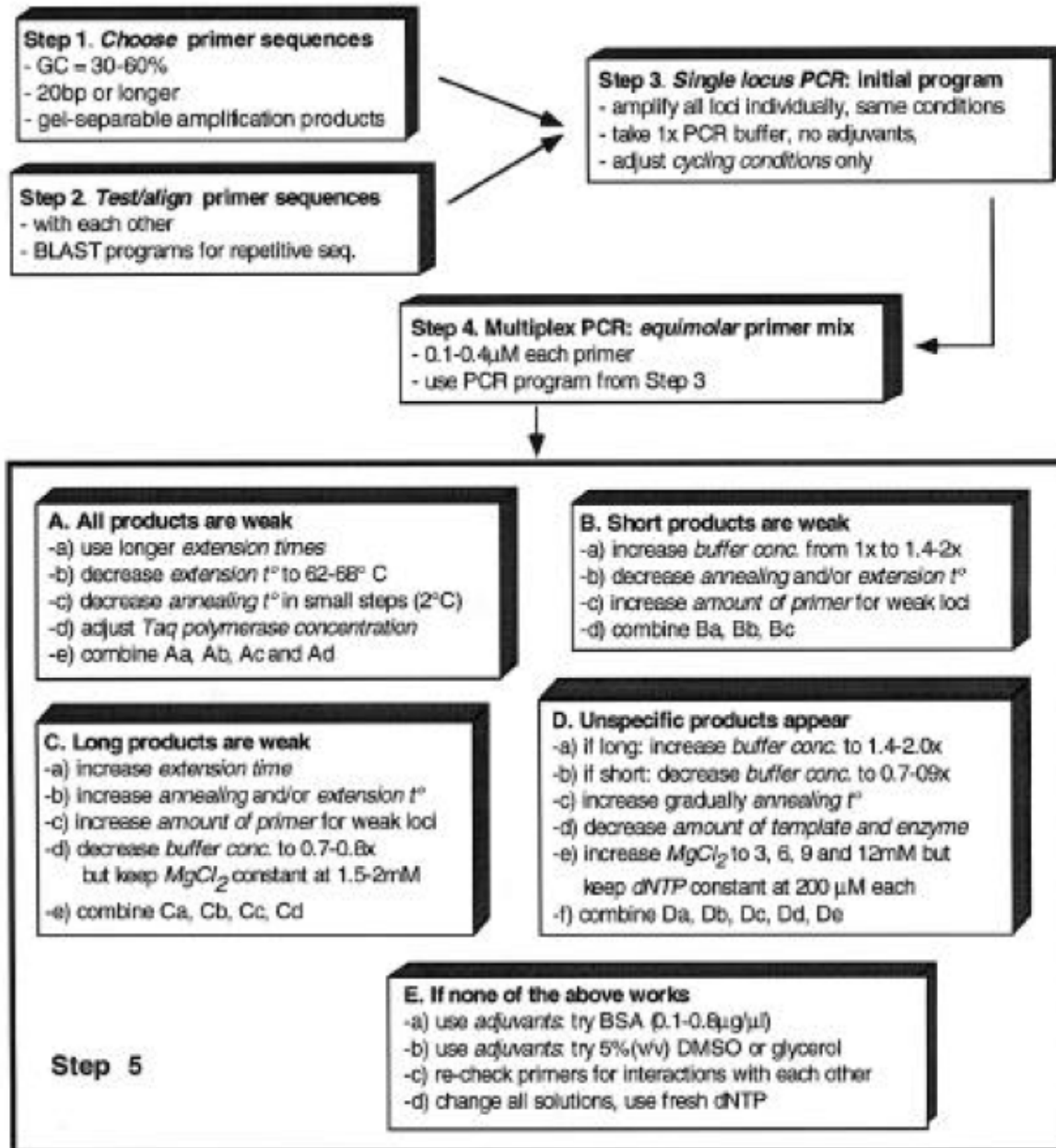
Amount of template DNA and *Taq* DNA polymerase (Step 5, A and D).

At DNA template quantities between 30 and 500 ng/25 μ L reaction, mixture Y-3* showed no significant differences (Figure 4f); however, below 30 ng the amount of some of the products decreased. When the amount of template DNA is very low (pg of DNA), efficient and specific amplification can be obtained by further lowering the annealing temperature, sometimes by as much as 10°–12°C (data not shown).

Different concentrations of *Taq* DNA Polymerase (Perkin-Elmer) were tested using primer mixture Y-3 (Figure 5a). The most efficient enzyme concentration seemed to be around 0.4 μ L or 2 U/25 μ L reaction volume. Too much enzyme, possibly because of the high glycerol concentration in the stock solution, resulted in an unbalanced amplification of various loci and a slight increase in the background. Five native *Taq* DNA polymerases, from five different sources, performed similarly on mixture Y-4 in 1.6 \times PCR buffer using 2 U/25 μ L (Figure 5b).

We have presented a series of examples of testing various parameters to optimize multiplex PCR. Optimal combination of two of these parameters, annealing temperature and KCl (salt) concentration, is essential in any PCR to obtain highly specific amplification products. Magnesium chloride concentration needs only to be proportional to the amount of dNTP, and these values can be constant for any reaction. Although gradually increasing magnesium chloride concentrations may further influence the reaction, the other two parameters mentioned seem to be much more important in obtaining specific, high yields of PCR product(s). In multiplex PCR, adjusting primer amount for each locus is also essential. Figure 1 illustrates a rational approach for developing efficient multiplex PCRs. The list of various factors that can influence the reaction is by no means complete. Nevertheless, optimization of the parameters as presented in this work should provide a basic way of approaching some of the common problems of multiplex PCR.

Multiplex PCR: step-by-step protocol



Rapid Detection and Identification of Probiotic *Lactobacillus casei* ATCC 393 by Multiplex PCR

Journal of
Molecular Microbiology
and Biotechnology

Athanasios Karapetsas Eleftherios Vavoulidis Alex Galanis

Raphael Sandaltzopoulos Yiannis Kourkoutas

Department of Molecular Biology and Genetics, Democritus University of Thrace, Alexandroupolis, Greece

Table 1. List of *Lactobacillus* strains included in this study

Reference strains	Collection No.	Accession No.	Bases at diagnostic sites (78, 156, 189)
<i>Lactobacillus acetotolerans</i>	DSM 20749	AF429666	A-T-T
<i>Lactobacillus acidipiscis</i>	DSM 15836	AJ621719	T-A-T
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	DSM 20079	AY424311	T-A-T
<i>Lactobacillus alimentarius</i>	DSM 20249	AY424318	T-A-T
<i>Lactobacillus amylophilus</i>	DSM 20533	AY424319	G-A-C
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	DSM 20531	AY424312	C-A-T
<i>Lactobacillus bif fermentans</i>	DSM 20003	AY424320	T-T-C
<i>Lactobacillus brevis</i>	DSM 20054	AY424329	T-A-C
<i>Lactobacillus buchneri</i>	DSM 20057	AY571676	T-C-A
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC 393	AY424336	G-C-T
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC 11578	n.a.	n.a.
<i>Lactobacillus casei</i>	DN114001	n.a.	n.a.
<i>Lactobacillus casei</i>	BB-12	n.a.	n.a.
<i>Lactobacillus casei</i>	CCC B1241	AF429642	C-A-C
<i>Lactobacillus casei</i>	DSA-FB2	AY424335	C-A-C
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC 4913	AF429654	T-A-C
<i>Lactobacillus casei</i>	CCC B1205	AF429631	C-A-C
<i>Lactobacillus casei</i>	DSA 145	AY424333	C-A-C
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC 334	AY424332	C-A-C
<i>Lactobacillus casei</i>	CCC 95G2L	AF429701	C-A-C
<i>Lactobacillus casei</i>	DSA 15	AY424334	C-A-C
<i>Lactobacillus casei</i>	I18C	AF429649	C-A-C
<i>Lactobacillus casei</i>	CCC B9657	AF429644	C-A-C
<i>Lactobacillus casei</i>	I03	AF429647	C-A-C
<i>Lactobacillus coryniformis</i>	DSM 20001	AY424321	C-T-T
<i>Lactobacillus crispatus</i>	DSM 20584	AY424313	T-T-T
<i>Lactobacillus curvatus</i>	DSA 32Y	AY424348	T-T-A
<i>Lactobacillus cypricasei</i>	DSM 15353	AJ621720	T-A-T
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis</i>	DSM 20072	AY424322	C-T-C
<i>Lactobacillus durianis</i>	DSM 15802	AJ621721	T-T-T
<i>Lactobacillus farciminis</i>	DSM 20184	AY424323	A-T-C
<i>Lactobacillus fermentum</i>	DSA FB5	AY424325	C-T-C
<i>Lactobacillus fructivorans</i>	DSM 20203	AF429681	C-C-A
<i>Lactobacillus gallinarum</i>	DSM 10532	AY571675	T-T-T
<i>Lactobacillus gasseri</i>	DSM 20243	AY424314	T-T-A
<i>Lactobacillus helveticus</i>	DSM 20075	AY424315	T-T-T
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	DSM 20571	AF429699	T-T-A
<i>Lactobacillus homohiochii</i>	ATCC 15434	AF429685	T-T-T

<i>L. zeae</i>	GGCGACCAAGGCAGC G	CTTCGGTTTCATCTT CC	CTGATTGCGGACG CC
<i>L. paracasei</i>	AGCAACTAAGGCTG CC	CGTCCGTTTCTTCCT CA	CTGATTGCCGACG CC
<i>L. ingluviei</i>	GGCTACGGCCGCAG CC	CTTCGATCTCTGCTG CG	TTGATTGCGGACG CA
<i>L. kefir</i>	GGCTACCGAGACTG T	CTTCTGTTTCATCAG T	TTAATTGCTGATG CA
<i>L. acetotolerans</i>	AGCTACTGCAGCCG T	CTTCAGTTTCATCAT T	TTAATCGCTGACG T
<i>L. casei</i> ATCC 393	5'... GGCGACCAAGGCAGC G ⁷⁸	CTTCGGTTTCATCTT CC ¹⁵⁶	CTGATTGCGGACG T ¹⁸⁹ ...3'

Fig. 1. The *hsp60* gene sequence containing the diagnostic nucleotides (in bold) targeted by the novel primers designed in this study.

Table 2. Oligonucleotide primers used in this study

Primer	Primer sequence (5'→3')	Length bp	Optimal amount pmol
p78F	GGCGACCAAGGCAGCG	16	10
p156F	CTTCGGTTTCATCTTCC	17	50
p189R	GGCCAAC TTTTCCATA	17	50
LacF	AGCAGTAGGGAATCTTCCA	19	10
LacR	ATTYCACCGCTACACATG	18	10

Table 3. Specificity of primers designed for multiplex PCR on *Lactobacillus* strains

Reference strain	Specificity of primer pairs		
	p78F/ p189R (144 bp)	p156F/ p189R (67 bp)	LacF/ LacR (340 bp)
<i>L. casei</i> ATCC 393	+	+	+
<i>L. acetotolerans</i> DSM 20749	-	-	+
<i>L. ingluviei</i> DSM 15946	-	-	+
<i>L. paracasei</i> DSM 5622	-	-	+
<i>L. zeae</i> DSM 20178	-	-	+

The expected size of PCR products is indicated.

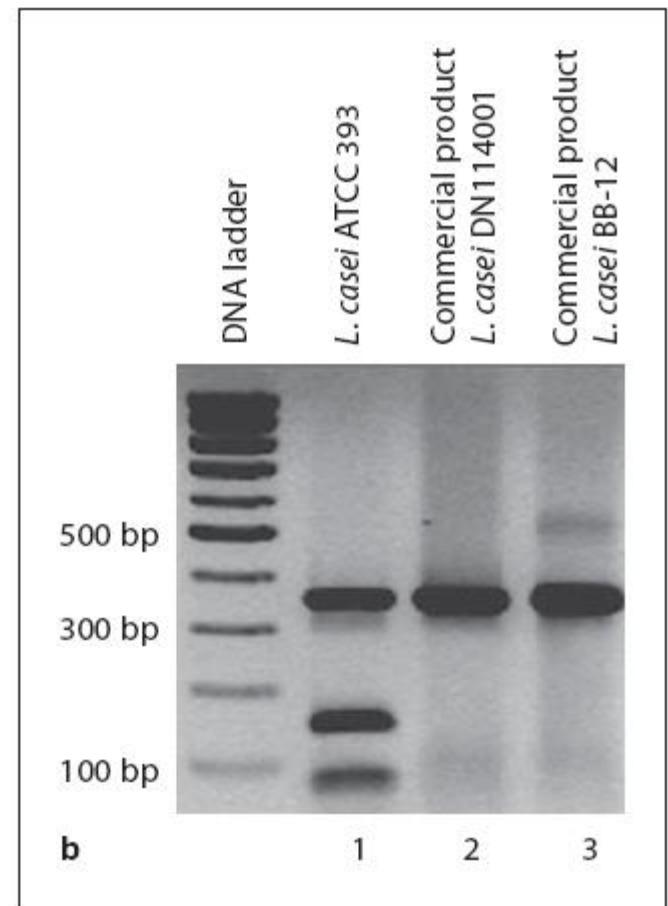
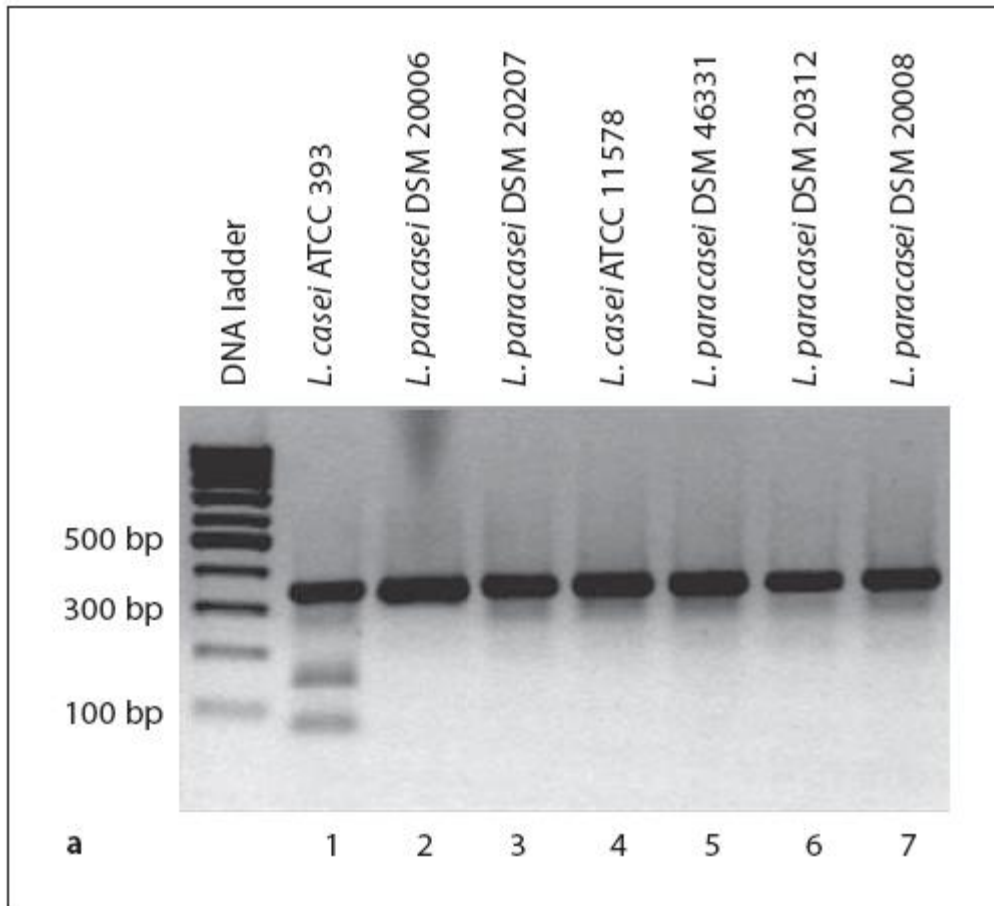


Fig. 3. Multiplex PCR assay of *L. casei* and *L. paracasei* strains (a) and two commercial probiotic products containing *L. casei* DN114001 and *L. casei* BB-12 (b).



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Journal of Microbiological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jmicmeth



Note

A new methodology for rapid detection of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* based on multiplex PCR

Anastasios Nikolaou, Georgia Saxami, Yiannis Kourkoutas, Alex Galanis*

Applied Microbiology and Molecular Biotechnology Research Group, Department of Molecular Biology and Genetics, Democritus University of Thrace, Alexandroupolis, GR 68100, Greece

Effect of Probiotic-Fermented Milk Administration on Gastrointestinal Survival of *Lactobacillus casei* ATCC 393 and Modulation of Intestinal Microbial Flora

Marianthi Sidira^a Alex Galanis^a Petros Ypsilantis^b Athanasios Karapetsas^a
Zoi Progaki^a Constantinos Simopoulos^b Yiannis Kourkoutas^a

DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) **(Ηλεκτροφόρηση πηκτώματος διαβαθμισμένης συγκέντρωσης παράγοντα αποδιάταξης)**

Η DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) (Ηλεκτροφόρηση πηκτώματος διαβαθμισμένης συγκέντρωσης παράγοντα αποδιάταξης) είναι μια μοριακή τεχνική ανίχνευσης πολυμορφισμών τμημάτων DNA. Η τεχνική είναι ιδιαίτερα ισχυρή και αποτελεσματική για την ανίχνευση μεταλλάξεων σε γονίδια αλλά και ταυτοποίηση μικροοργανισμών που παρουσιάζουν υψηλό βαθμό συγγένειας. Η ανίχνευση πολυμορφισμών τμημάτων DNA είναι επίσης εφικτή με την αντίδραση PCR (polymerase chain reaction) (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης) χρησιμοποιώντας εξειδικευμένους εκκινητές. Στις περιπτώσεις όμως που τα προϊόντα της PCR είναι παρόμοιου μεγέθους, ο διαχωρισμός τους σε πήκτωμα αγαρόζης καθίσταται τεχνικά μη εφικτός. Αντίθετα, στην τεχνική DGGE, ο διαχωρισμός των τμημάτων DNA γίνεται σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης διαβαθμισμένης συγκέντρωσης αποδιατακτικού παράγοντα που καθιστά το διαχωρισμό των τμημάτων εφικτό.

Πιο συγκεκριμένα ο διαχωρισμός αρχικά γίνεται βάση μεγέθους αλλά στη συνέχεια με την αύξηση της συγκέντρωσης του αποδιατακτικού παράγοντα του πηκτώματος το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο (αποδιατάσσεται) με αποτέλεσμα η ταχύτητα κίνησης του στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης κατά την ηλεκτροφόρηση να μειώνεται. Έτσι ακόμα και δύο τμήματα DNA που διαφέρουν σε μία μόνο βάση αποδιατάσσονται σε διαφορετική συγκέντρωση, κινούνται διαφορετικά στο πήκτωμα και τελικά διαχωρίζονται. Η τεχνική DGGE έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλές μελέτες σχετικές με τη βιοτεχνολογία τροφίμων καθώς δίνει τη δυνατότητα πλήρους ταυτοποίησης της μικροβιακής χλωρίδας σε δείγματα τροφίμων με μεγάλη ακρίβεια και ταχύτητα.



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com



Journal of Microbiological Methods 56 (2004) 297–314

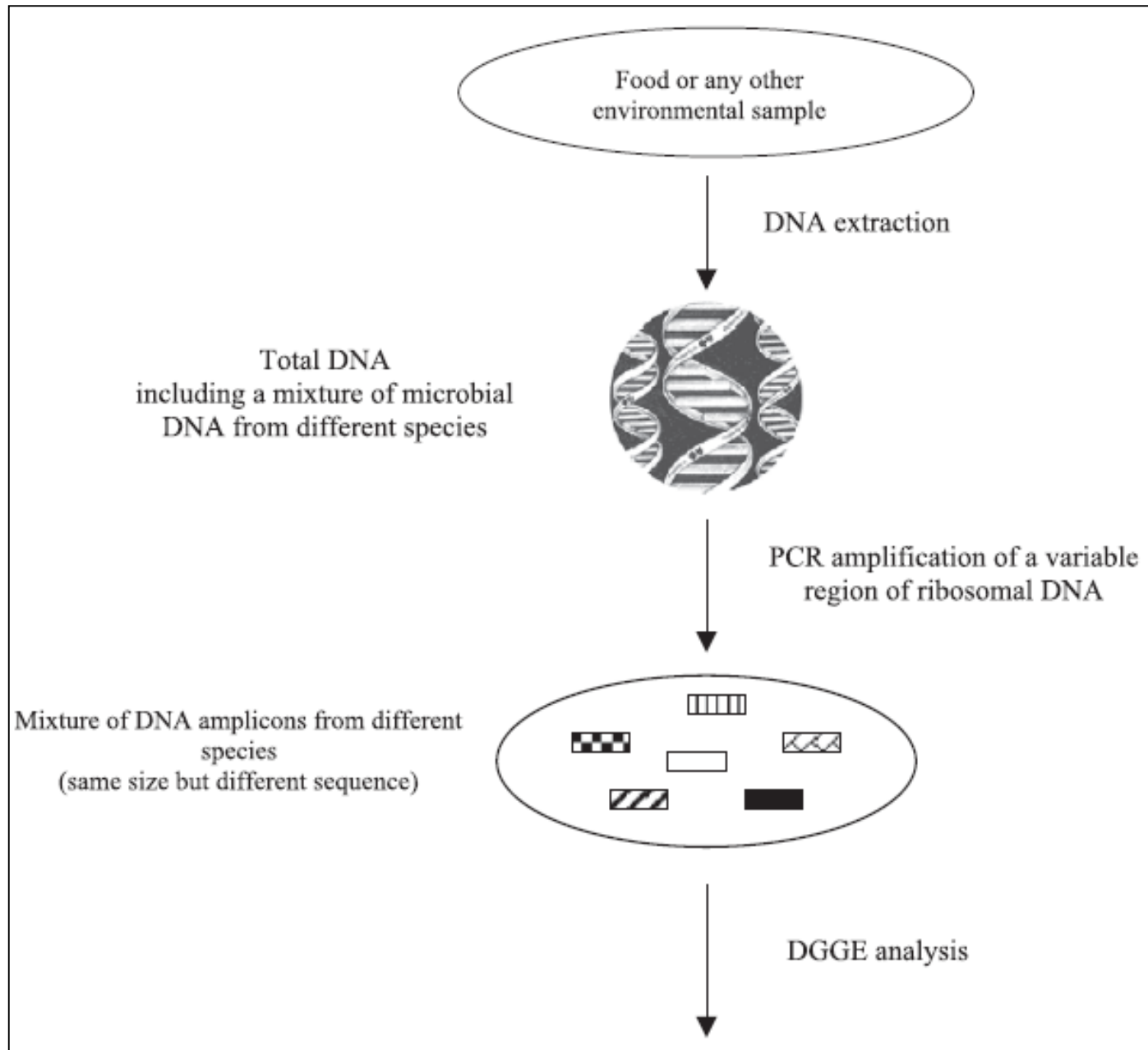
Journal
of Microbiological
Methods

www.elsevier.com/locate/jmicmeth

Review article

PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food

Danilo Ercolini*



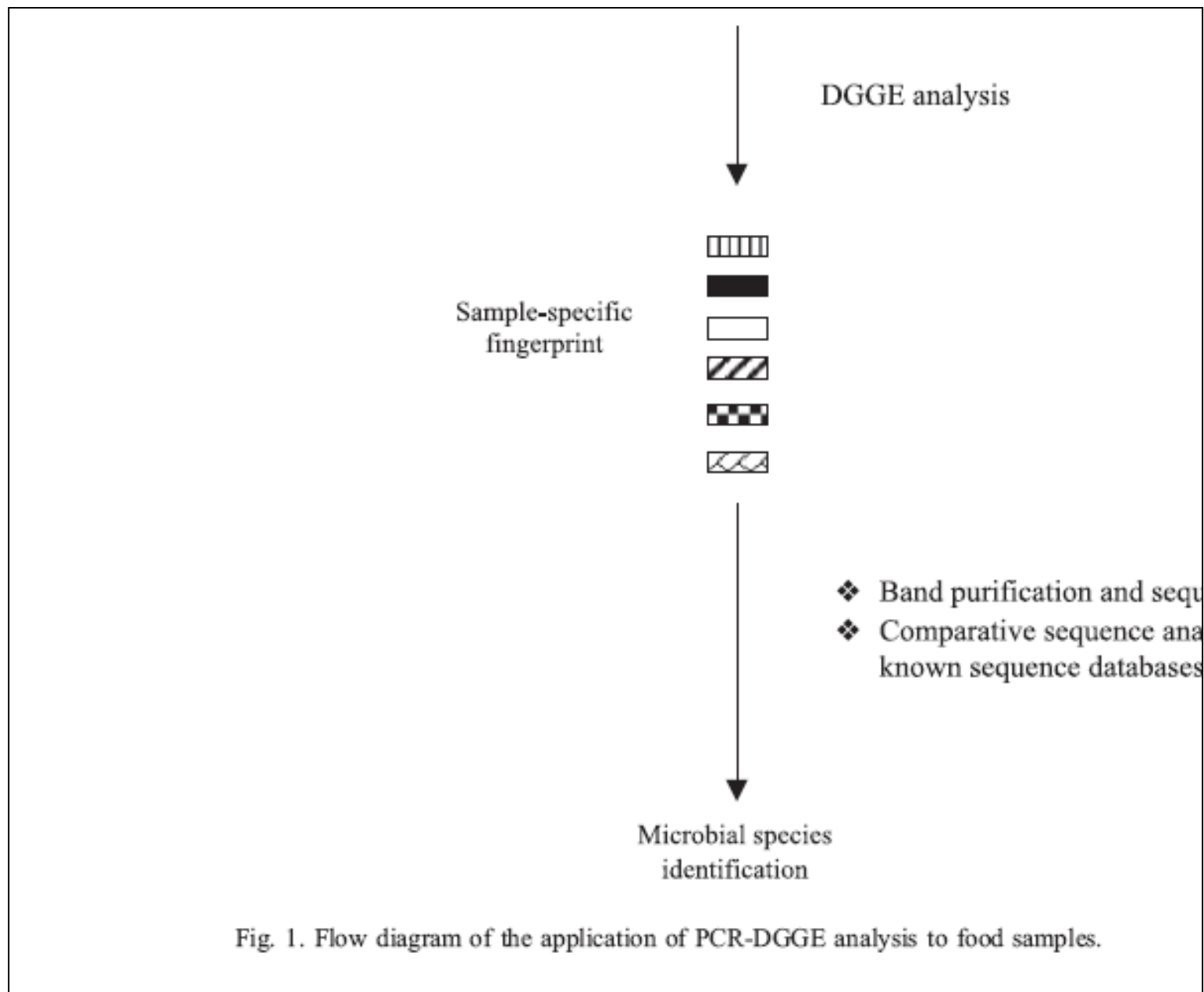
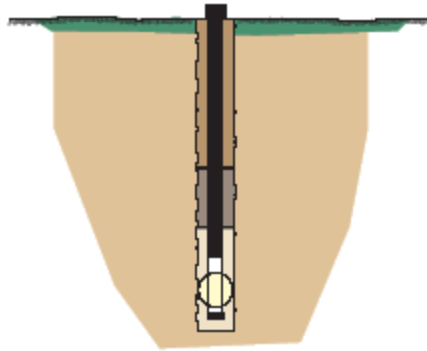


Fig. 1. Flow diagram of the application of PCR-DGGE analysis to food samples.

Sample Collection



Groundwater, soil, or Bio-Trap®
Sampler collected and shipped
overnight on ice (4°C)



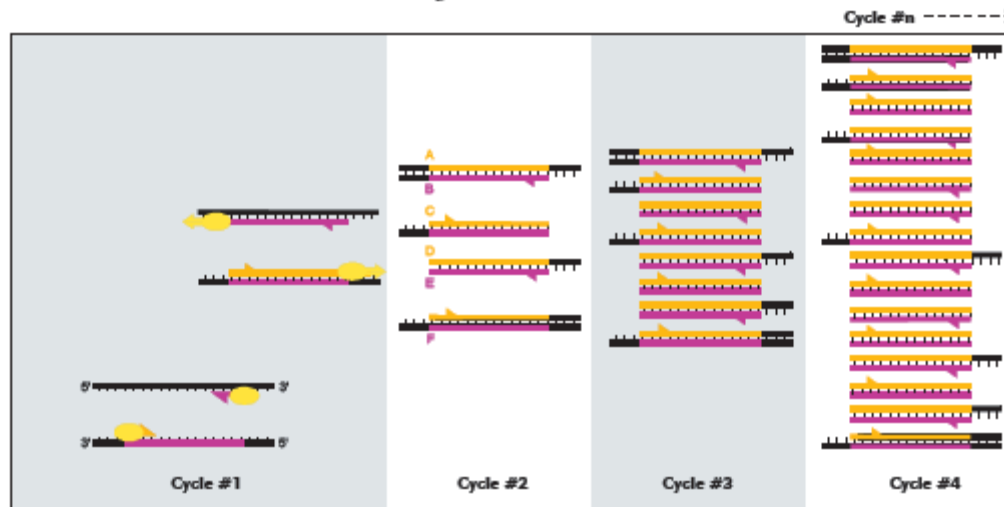
DNA Extraction



DNA is extracted from
samples upon arrival



Amplification



Variable region of 16S rRNA
gene amplified by PCR

Results



DGGE Profile

→	GCCAGCCGTGTTTACAGA...	<i>Acinetobacter sp.</i>
→	GCCTTAAGCAGGCCTTCG...	<i>Geobacter sp.</i>
→	GCCAGCCGTGTTTACAGA...	<i>Unknown sp X.</i>
→	GCCGGCTCTAGCTTCCGT...	<i>Methylobacterium sp.</i>

Dominant bands excised and sequenced

Dominant organisms identified

Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) is a DNA-based technique which generates a genetic profile or “fingerprint” which can be used to identify the dominant members of the microbial community. DGGE has been used to investigate microbial responses in a wide variety of applications including:

- Bioremediation assessment
- Wastewater treatment
- Drinking water treatment
- Biofilm formation
- Microbial induced corrosion
- Identification of microbial contaminants in commercial/industrial products

Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of the 16S rRNA Gene V1 Region To Monitor Dynamic Changes in the Bacterial Population during Fermentation of Italian Sausages

LUCA COCOLIN,^{1*} MARISA MANZANO,¹ CARLO CANTONI,² AND GIUSEPPE COMI¹

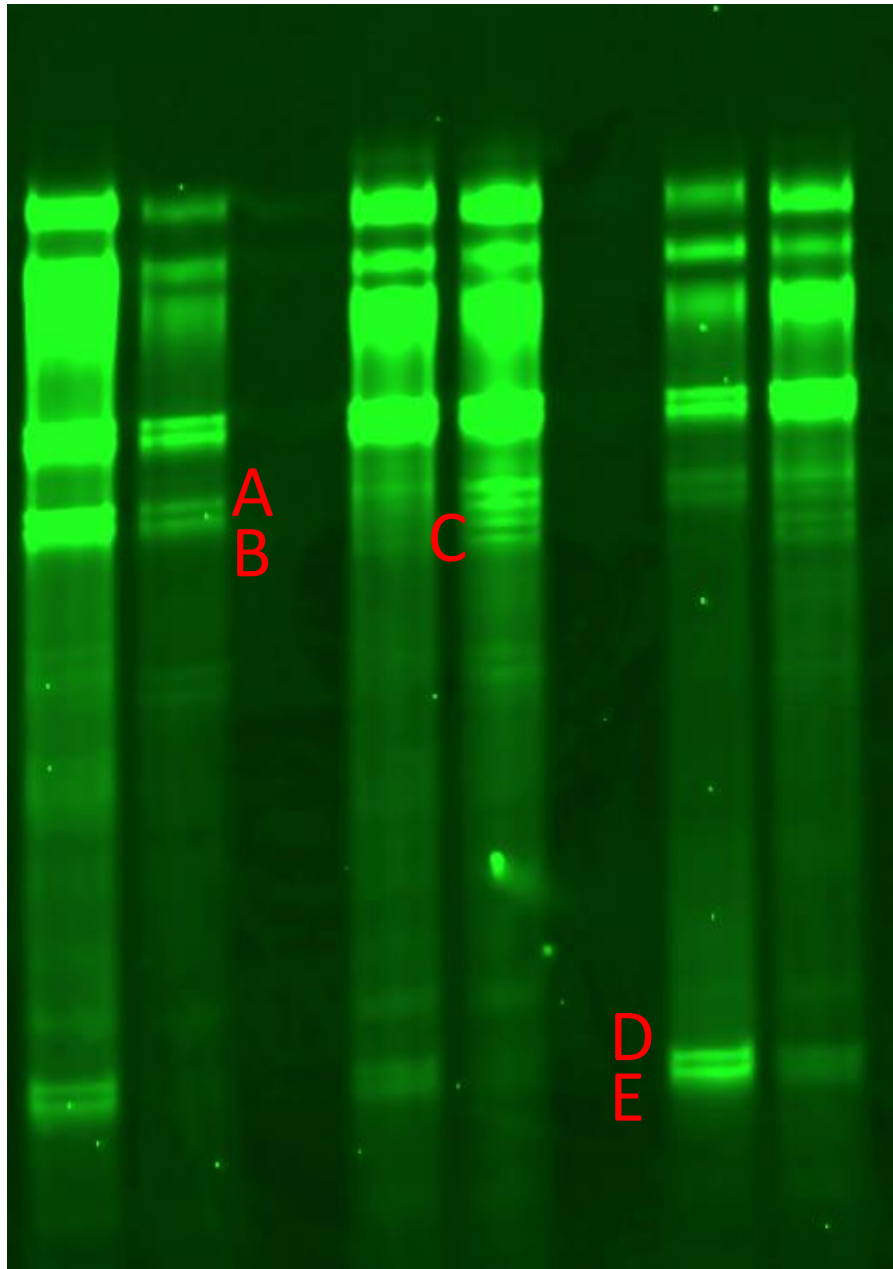
Study of the Ecology of Fresh Sausages and Characterization of Populations of Lactic Acid Bacteria by Molecular Methods

Luca Cocolin,^{1*} Kalliopi Rantsiou,¹ Lucilla Iacumin,¹ Rosalinda Urso,¹ Carlo Cantoni,²
and Giuseppe Comi¹

Monitoring the Bacterial Population Dynamics in Sourdough Fermentation Processes by Using PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

Christiane B. Meroth, Jens Walter, Christian Hertel,* Markus J. Brandt,
and Walter P. Hammes

Στελέχη βακτηρίων που απομονώθηκαν από ξηρά ζυμωμένα λουκάνικα με ανάλυση PCR-DGGE



Band	Most closely related species
A	<i>Lactococcus lactis</i>
	Uncultured <i>Streptococcaceae</i> sp.
	<i>Lactococcus fujiensis</i>
B	<i>Lactococcus lactis</i>
	Uncultured bacterium
C	<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393
	<i>Lactobacillus zeae</i>
	Uncultured <i>Lactobacillus</i> sp.
D	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>
	<i>Leuconostoc citreum</i>
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
	<i>Leuconostoc kimchii</i>
E	<i>Leuconostoc</i> sp. B 244
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>

Στη περίπτωση που το γονιδίωμα των μικροοργανισμών που πρόκειται να μελετηθούν δεν είναι γνωστό μπορεί να χρησιμοποιηθεί η τεχνική RAPD PCR (Τυχαία Ενίσχυση Πολυμορφικού DNA PCR ή Random Amplified Polymorphic DNA PCR). Σύμφωνα με την εν λόγω τεχνική, η αντίδραση PCR πραγματοποιείται με εκκινητές τυχαίας αλληλουχίας, μήκους 8-12 βάσεων. Συνήθως απαιτούνται 3 με 6 αντιδράσεις με διαφορετικούς εκκινητές ώστε να προκύψει ένα μοναδικό πρότυπο για κάθε εξεταζόμενο οργανισμό, μετά το διαχωρισμό σε πήκτωμα αγαρόζης των προϊόντων της αντίδρασης PCR. Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου περιλαμβάνονται η υψηλή ακρίβεια της ανάλυσης, ο χαμηλός χρόνος ολοκλήρωσης της μελέτης καθώς και το σχετικά χαμηλό κόστος των αντιδραστηρίων. Η RAPD PCR έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση και ταυτοποίηση διαφόρων λακτοβακίλων σε καλλιέργειες γιαούρτης καθώς και σε άλλα προβιοτικά τρόφιμα.

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

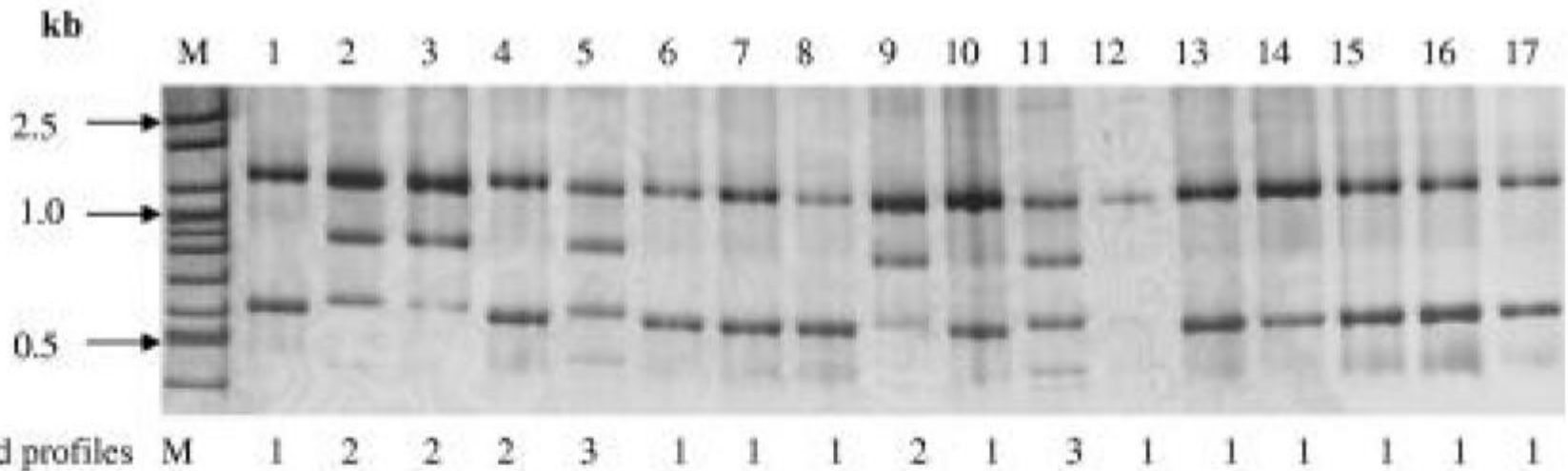
Introduction

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers are DNA fragments from [PCR](#) amplification of random segments of genomic DNA with single primer of arbitrary nucleotide sequence.

How It Works

Unlike traditional PCR analysis, RAPD (pronounced "rapid") does not require any specific knowledge of the DNA sequence of the target organism: the identical 10-mer primers will or will not amplify a segment of DNA, depending on positions that are complementary to the primers' sequence. For example, no fragment is produced if primers annealed too far apart or 3' ends of the primers are not facing each other. Therefore, if a mutation has occurred in the template DNA at the site that was previously complementary to the primer, a PCR product will not be produced, resulting in a different pattern of amplified DNA segments on the gel.

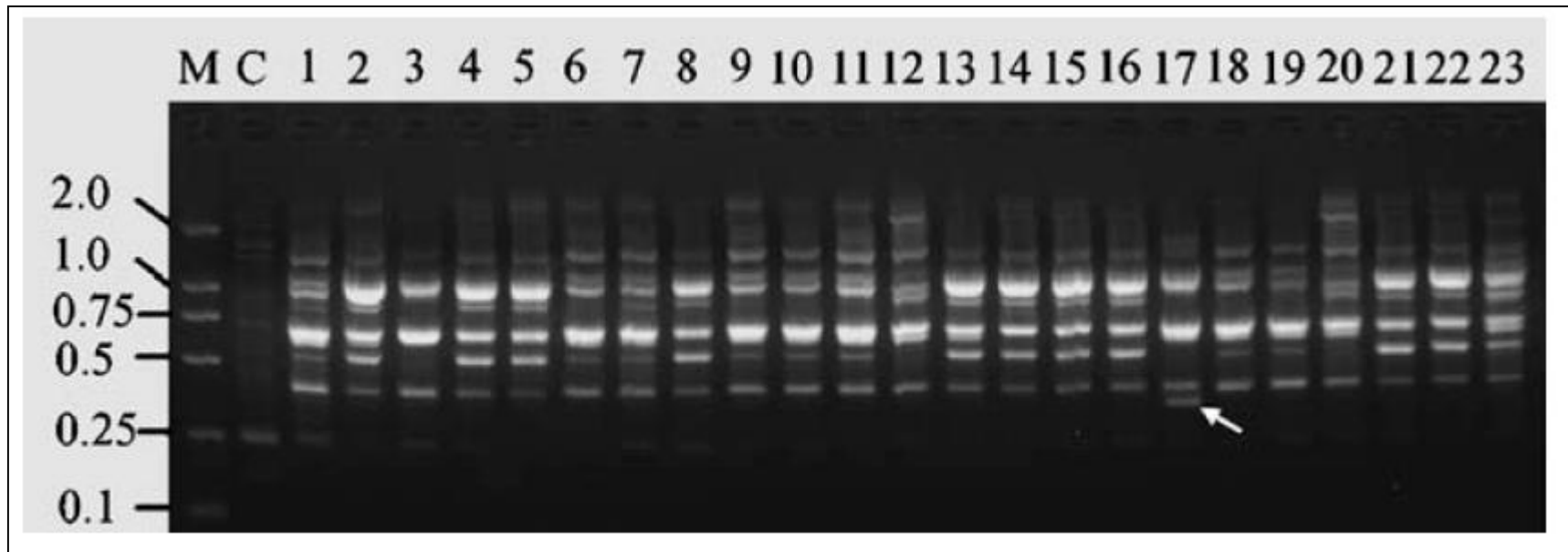
RAPD is an inexpensive yet powerful typing method for many bacterial species.



Silver-stained polyacrylamide gel showing three distinct RAPD profiles generated by primer OPE15 for *Haemophilus ducreyi* isolates from Tanzania, Senegal, Thailand, Europe, and North America.

Selecting the right sequence for the primer is very important because different sequences will produce different band patterns and possibly allow for a more specific recognition of individual strains.

Sequence-Dependent Fluorescence Amplification (SCAR)



1. Απομόνωση από το πήκτωμα αγαρόζης της πολυμορφικής ζώνης
2. Ενίσχυση με αντίδραση PCR
3. Αλληλούχιση του προϊόντος PCR
4. Σχεδιασμός εκκινητών βάση της DNA αλληλουχίας του προϊόντος PCR
5. Ανάπτυξη Multiplex PCR

Li et al., (2008) Appl. Micro. Biotech.

**RAPD-Based Method for the Quality Control of
Mediterranean Oregano and Its Contribution to
Pharmacognostic Techniques**

MATTEO MARIESCHI,[†] ANNA TORELLI,[†] FERRUCCIO POLI,[§] GIANNI SACCHETTI,[#]
AND RENATO BRUNI^{*,†}

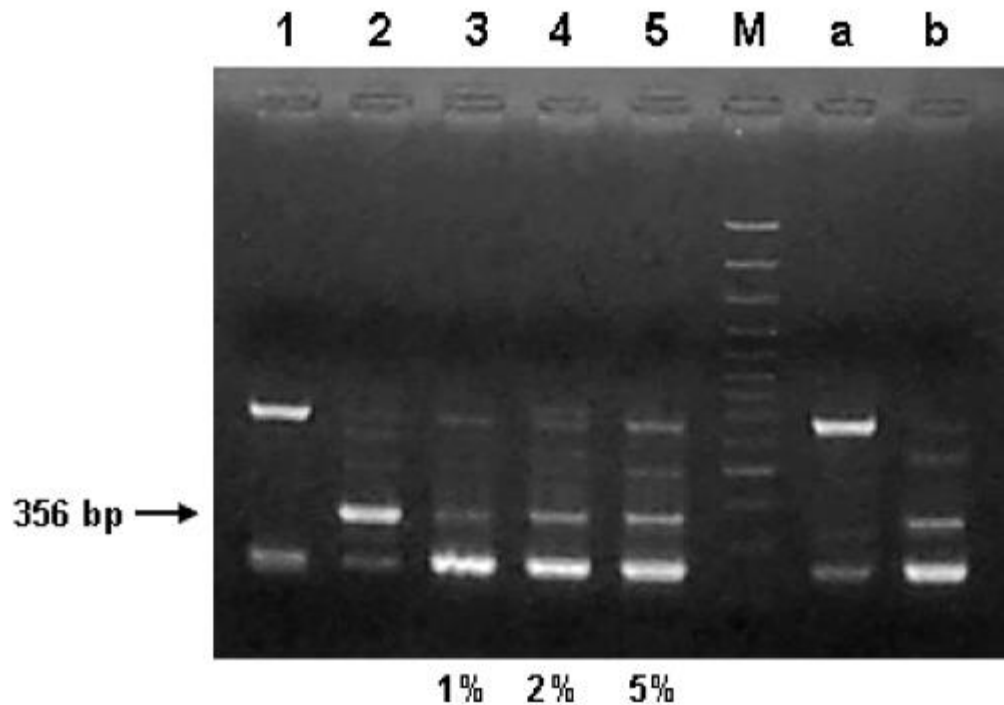


Figure 3. RAPD analysis of individual species and mixture of genomic DNA of *O. vulgare* subsp. *hirtum* with genomic DNA of *Cistus incanus* and *Rubus caesius*. PCR reactions were performed with the primer OPA07. Genomic DNA of each contaminant species was mixed in three different percentages (shown at the bottom of the figure) with *Origanum* DNA. Lanes: 1, *O. vulgare* subsp. *hirtum*; 2, *Cistus incanus*; 3, *Rubus caesius*; 4–6, mixtures of *Origanum* and *Cistus incanus*; 7–9, mixtures of *Origanum* and *Rubus caesius*; M, 100 bp DNA ladder. Black arrow indicates the position of the single specific band (356 bp) amplified from *Cistus incanus* (lanes 2, 4, 5, 6); white bracket indicates the position of the three specific amplicons (1142, 980, and 842 bp) generated from *Rubus caesius* (lanes 3, 7, 8, 9).

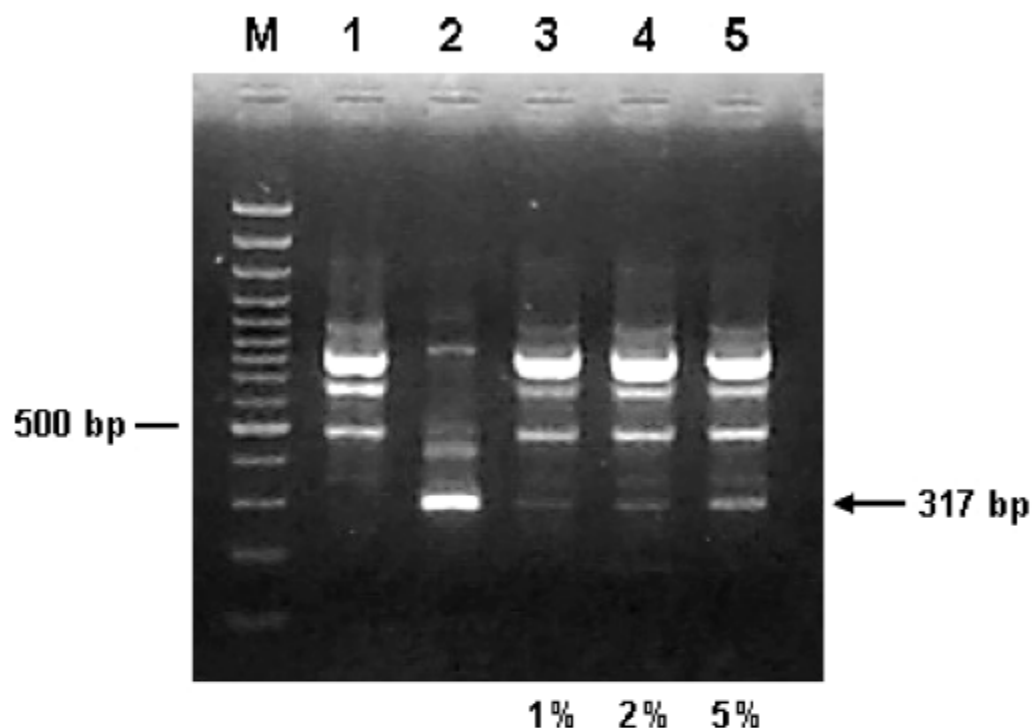


Figure 5. RAPD analysis of individual fresh leaves and mixtures of *O. vulgare* subsp. *hirtum* and the contaminant species *Rubus caesius*. Fresh leaves of the contaminant species were mixed in three different percentages (shown at the bottom of the figure) with fresh leaves of *Origanum*, before extraction of genomic DNA. PCR reactions were performed with the primer OPA20. Lanes: 1, *O. vulgare* subsp. *hirtum*; 2, *Rubus caesius*; 3–5, mixtures of *Origanum* and the contaminant species; M, 100 bp DNA ladder. Black arrow indicates the position of the specific band (317 bp) amplified from *Rubus caesius* (lanes 2–5).

Ancient DNA fragments inside Classical Greek amphoras reveal cargo of 2400-year-old shipwreck

Maria C. Hansson^{a,b,*}, Brendan P. Foley^{c,d}

A



B



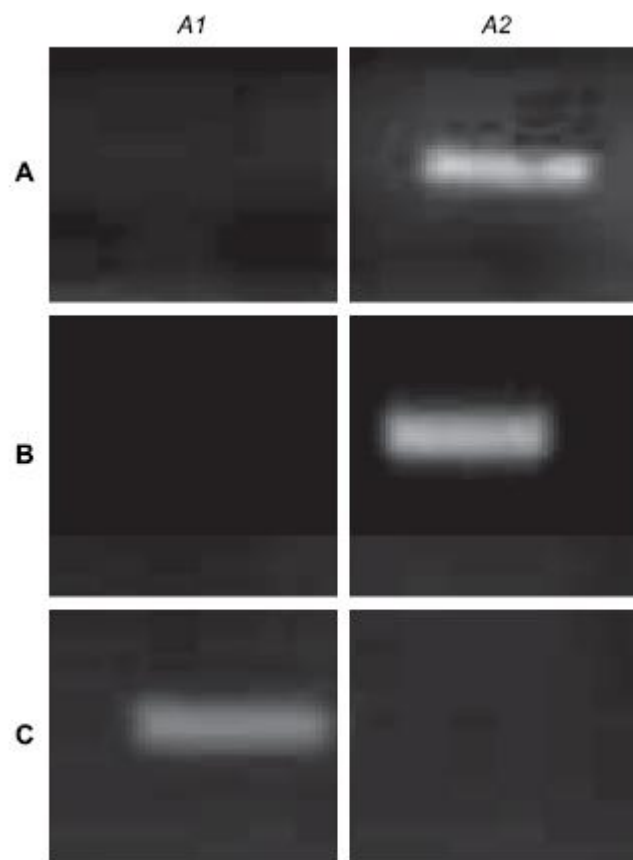


Fig. 2. Amplified bands in PCR using primers specific for: (A) olive (*Olea europaea*) maturase K gene. The size of the fragments is 114 bp. (B) oregano (*Origanum vulgare*) maturase K gene. The size of the fragments is 111 bp. (C) mastic/pistachio (*Pistacia lentiscus/P. vera*) NADH dehydrogenase subunit F gene. Fragment size is 95 bp. The 3% agarose gel was stained with ethidium bromide. A-1: template from amphora 1; A-2; amphora 2 template.