

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Monika ANTALAŠIĆ

**UČINKOVITOST UPORABE HITRE IMUNOENCIMSKE METODE
(E.L.I.S.A.) ZA ODKRIVANJE POTVORB OVČJEGA MLEKA S
KRAVJIM MLEKOM**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**EFFICACY OF THE QUICK IMMUNOENZYMATIC METHOD
(E.L.I.S.A.) USED TO DETECT ADULTERATION OF EWE'S MILK
WITH COW'S MILK**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija kmetijstvo – zootehnika. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za mlekarstvo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za dodiplomski študij Oddelka za zootehniko je za mentorja diplomske naloge imenovala doc. dr. Stanislavo Golc Teger.

Recenzent: prof. dr. Irena ROGELJ

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Jurij POHAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: doc. dr. Stanislava GOLC TEGER
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Irena ROGELJ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora: 11. 10. 2006

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Monika ANTALAŠIĆ

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 636.3:637.1(043.2)=863
KG	ovce/govedo/mleko/potvorbe/imunoencimske metode/ELISA
KK	AGRIŠ Q01/5240/9412
AV	ANTALAŠIĆ, Monika
SA	GOLC TEGER, Stanislava (mentor)
KZ	SI-1230 Domžale, Groblje 3
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
LI	2006
IN	UČINKOVITOST UPORABE HITRE IMUNOENCIMSKE METODE (E.L.I.S.A.) ZA ODKRIVANJE POTVORB OVČJEGA MLEKA S KRAVJIM MLEKOM
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XI, 45 str., 11 pregl., 9 sl., 5 pril., 20 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	V diplomski nalogi smo preizkusili učinkovitost uporabe hitre imunoencimske metode E.L.I.S.A. za odkrivanje potvorb ovčjega mleka s kravjim. Uporabili smo sendvič metodo E.L.I.S.A RC BOVINO KIT (Z.E.U.-INMUNOTEC, S.L.). Metoda temelji na detekciji specifičnih imunoglobulinov kravjega IgG v vzorcih mleka in specifičnih ovčjih protiteles brez križnih reakcij z ovčjim IgG. Metoda za odkrivanje potvorb ovčjega mleka s kravjim omogoča kvalitativni in kvantitativni test. V raziskavo smo vključili surovo kravje in ovčje mleko. Pri pripravljenih vzorcih z ustreznim procentom dodanega kravjega mleka v ovčje mleko smo določili vsebnost maščobe, beljakovin, laktoze, suhe snovi, suhe snovi brez maščobe (metoda infra rdeče spektrometrije), zmrziščno točko (termistor krioskopska metoda), izmerili vrednost pH, gostoto mešanic mleka ter izvedli sendvič E.L.I.S.A. RC BOVINO test. Analize smo opravljali s svežimi vzorci iz različnih področij Slovenije. Dobljene podatke smo statistično obdelali. Izdelali smo kalibracijsko krivuljo s standardi, ki so priloženi testu in kalibracijsko krivuljo z vzorci, ki smo jih sami pripravili. Poiskali smo povezavo med fizikalno kemijskimi parametri glede na koncentracijo dodanega kravjega mleka k ovčjemu.

KEY WORD DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 636.3:637.1(043.2)=863

CX sheep/cattle/milk/adulteration/immunoenzymatic methods/ELISA

CC AGRIS Q01/5240/9412

AU ANTALAŠIĆ, Monika

AA GOLC TEGER, Stanislava (supervisor)

PP SI-1230 Domžale, Groblje 3

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Zootechnical Department

PY 2006

TY EFFICACY OF THE QUICK IMMUNOENZYMATIC METHOD (E.L.I.S.A.)
USED TO DETECT ADULTERATION OF EWE'S MILK WITH COW'S MILK

DT Graduation thesis (university studies)

NO XI, 45 p., 11 tab., 9 fig., 5 ann., 20 ref.

LA sl

AL sl/en

AB In my graduation thesis we examined the efficacy of quick immunoenzymatic method E.L.I.S.A. used to detect adulteration of ewe's milk with cow's milk. The sandwich method E.L.I.S.A. RC BOVINO KIT (Z.E.U.-INMUNOTEC, S.L.) is based on specific detection of cow's immunoglobulins IgG in the milk sample, and specific ewe's antibodies, without cross reaction with ewe's IgG. This method used to detect adulteration of ewe's milk with cow's milk enables qualitative and quantitative test. Raw cow's and ewe's milk was included in our research. In milk samples with the proper percentage of added cow's milk to ewe's milk, we established milk fat, protein, lactose, dry matter and dry matter content without fat (method of infra-red spectroscopy), detected freezing point (termistor crioscop method), measured pH value, milk mixtures density and performed sandwich E.L.I.S.A. RC BOVINO test. We made tests with fresh milk samples taken from different territories of Slovenia. After statistical data processing we made calibration curve with standards (RC BOVINO standards in kit) and our own calibration curve (prepared samples) for the detection of cow's milk percentage in ewe's milk. We have found the physical and chemical parameters in regard to the percentage of cow's milk added to ewe's.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Kazalo prilog	VIII
Okrajšave in simboli	IX
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 MLEKO	3
2.2 SESTAVA MLEKA	3
2.2.1 Voda	3
2.2.2 Suha snov	4
2.2.3 Maščoba	4
2.2.4 Beljakovine	4
2.2.5 Laktoza	6
2.2.6 Mineralne snovi	6
2.2.7 Vitamini	7
2.2.8 Druge snovi	7
2.2.9 Značilnosti mleka	7
2.3 OVČJE MLEKO	8
2.4 ENCIMSKO-VEZANE IMUNO-OBČUTLJIVE ANALIZE E.L.I.S.A. (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)	10
2.4.1 Hitra imunoencimska sendvič metoda E.L.I.S.A. RC BOVINO	11
2.4.2 Referenčna metoda	13
3 MATERIAL IN METODE	15
3.1 NAČRT POSKUSA	15

3.1.1	Zbiranje vzorcev	15
3.1.2	Priprava vzorcev za laboratorijske analize	16
3.1.3	Material	16
3.2	METODE	18
3.2.1	Uporaba sendvič E.L.I.S.A. RC BOVINO testa	18
3.2.2	Merjenje absorbanca s spektrofotometrom Elx808	21
3.2.3	Merjenje zmrziščne točke mleka	22
3.2.4	Določanje vrednosti pH	22
3.2.5	Določanje sestave mleka	22
3.2.6	Statistična metoda	23
4	REZULTATI	26
4.1	REZULTATI ANALIZ KVANTITATIVNE METODE	26
4.2	POVEZAVE MED LASTNOSTMI IN KONCENTRACIJAMI KRAVJEGA MLEKA V OVČJEM	38
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	40
5.1	RAZPRAVA	40
5.2	SKLEPI	42
6	POVZETEK	43
7	VIRI	44
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Pregl. 1: Koncentracija proteinov v mleku (Bylund, 1995)	5
Pregl. 2: Primerjava fizikalnih lastnosti ovčjega in kravjega mleka (Rogelj, 1995)	8
Pregl. 3: Povprečna kemijska sestava ovčjega in kravjega mleka (Đorđević, 1987)	9
Pregl. 4: Primerjava sendvič E.L.I.S.A. RC BOVINO metode z drugimi metodami (RC BOVINO KIT)	13
Pregl. 5: Detekcija višjih koncentracij kravjega mleka (RC BOVINO KIT)	21
Pregl. 6: Meritve RC BOVINO standardov z odštetim slepim vzorcem	28
Pregl. 7: Meritve absorbance pripravljenih vzorcev z odštetim slepim vzorcem	32
Pregl. 8: Meritve absorbance pripravljenih vzorcev na osnovi katerih je bila izdelana kalibracijska krivulja	33
Pregl. 9: Povprečne vrednosti prve in druge meritve ter paralelnih meritev	37
Pregl. 10: Meritve uporabljene za izračun korelacije med merjenimi standardi in pripravljenimi vzorci	37
Pregl. 11: Korelacijski koeficienti med lastnostmi in koncentracijami kravjega mleka v ovčjem ($\alpha = 0,05$)	39

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1 Vsebina sendvič E.L.I.S.A. RC BOVINO testa	17
Slika 2 Prikaz postopka analize z sendvič E.L.I.S.A. RC BOVINO testom	20
Slika 3 Koeficient variacije in njegovo povprečje	24
Slika 4 Spektrofotometer Elx808 s katerim smo merili absorbanco pri 450 nm	27
Slika 5 Kalibracijska krivulja in meja zaupanja za absorbanco v odvisnosti od koncentracije kravjega mleka v ovčjem za standarde RC BOVINO testa ($\alpha = 0,05$)	29
Slika 6 Kalibracijska krivulja in meja zaupanja za absorbanco v odvisnosti od koncentracije kravjega mleka v ovčjem za pripravljene vzorce ($\alpha = 0,05$)	34
Slika 7 Kalibracijska krivulja in meja zaupanja za koncentracijo kravjega mleka v ovčjem v odvisnosti od absorbance za standarde RC BOVINO testa ($\alpha = 0,05$)	35
Slika 8 Kalibracijska krivulja in meja zaupanja za koncentracijo kravjega mleka v ovčjem v odvisnosti od absorbance za pripravljene vzorce ($\alpha = 0,05$)	36
Slika 9 Korelacija med vrednostmi absorbance standardov in pripravljenih vzorcev	38

KAZALO PRILOG

Priloga A	Rezultati surovih meritev RC BOVINO standardov in meritve slepih vzorcev
Priloga B	Rezultati surovih meritev pripravljenih vzorcev in meritve slepih vzorcev
Priloga C	Sestava mešanic mleka glede na koncentracijo kravjega mleka v ovčjem
Priloga D	Fizikalne lastnosti mešanic mleka glede na koncentracijo kravjega mleka v ovčjem
Priloga E	Certifikat sendvič E.L.I.S.A. RC BOVINO testa

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

MB	mlečne beljakovine
MM	mlečna maščoba
SSBM	suha snov brez maščobe
ZT	zmrziščna točka
NPN	neproteinski dušik
KV	koeficient variacije
SD	standardni odklon
E.L.I.S.A.	enzyme-linked immunosorbent assay (encimsko-vezane imuno-občutljive analize)

1 UVOD

Mleko je prva hrana novorojenega sesalca in čestokrat ostaja tudi edina prehrana za določeno obdobje. Sestava mleka različnih sesalcev se močno razlikuje in je povezana s potrebami, ki jih imajo mladiči glede na hitrost rasti, energetske potrebe in klimatske pogoje. Na količino, sestavo in lastnosti mleka vpliva vrsta dejavnikov, ki jih delimo na: genetske (med vrstami, čredami in individualnimi živalmi), fiziološke (obdobje laktacije, starost, zdravstveno stanje) in okoliške (prehrana, klimatski pogoji, letni čas, način molže, postopek z živaljo itd...). Glavna sestavina mleka je voda, odvisno od vrste sesalca pa vsebuje mleko različne količine osnovnih sestavin (lipidov, proteinov in ogljikovih hidratov), ki se sintetizirajo v mlečni žlezi, pa tudi mineralov, specifičnih krvnih proteinov, encimov in ostalih v maščobi ali vodi topnih snovi, ki prihajajo neposredno iz krvne plazme. Mleko različnih vrst sesalcev pa se ne razlikuje samo v količinski sestavi, temveč tudi v lastnostih in porazdelitvi sestavin. Sestava mleka določa njegovo prehransko vrednost, kakovost za predelavo v mlečne izdelke in mnogo njegovih lastnosti. Osnovne sestavine mleka so tiste, ki so prisotne v večjih količinah kar pa ne pomeni, da so vedno tudi najbolj pomembne. Tako so npr. vitamini, ki so prisotni v majhnih koncentracijah, pomembni s prehranskega vidika, včasih tudi tehnološkega (rast bakterij, starter kultur), encimi so pomembni katalizatorji različnih reakcij (lipoliza, proteoliza – kvarjenje izdelkov, laktoperoksidaza – protibakterijsko delovanje, itd...), in nekatere minorne sestavine znatno prispevajo k aromi in okusu mleka. Poleg humanega mleka je najbolj raziskano kravje mleko, zato pogosto primerjamo sestavo in lastnosti mleka drugih vrst sesalcev prav s kravjim mlekom (Rogelj, 1996).

Mlečni proizvodi se pojavljajo v različnih oblikah; konzumno mleko, fermentirani mlečni izdelki, smetana, surovo maslo, siri in podobno. Za mlečne proizvode uporabljamo kravje, ovčje, kozje in bivolje mleko. Evropski zakoni zahtevajo specifikacijo izvira mleka pri predelavi mleka v mlečne proizvode (sir in drugi mlečni proizvodi). Na primer; sir mozzarella iz bivoljega mleka, ne sme biti označen in prodan kot tak, če ni bil proizveden iz 100 % bivoljega mleka (Uredba Komisije, 2001).

S preprečevanjem potvorb ščitimo avtentičnost proizvodov. Potvorba ovčjega mleka z mlekom drugih, cenejših vrst mleka, je znana prevara v mlekarskem sektorju še posebej v proizvodnji sira. Razlogi za potvorbo ovčjega mleka s kravjim sta manjša količina namolzenega ovčjega mleka in višja odkupna cena. Na trgu so proizvodi dražji, nezadovoljive kakovosti, ker ne dosegajo pričakovanih lastnosti. Razlogi pravilne deklaracije na proizvodu so tudi zdravstveni, občutljivost na kravje mleko, alergije, religija, etičnost, kulturno neodobravanje, osebno prepričanje in tudi zahteve potrošnika po pravilno označenih mlečnih proizvodih, še posebej pri tradicionalnih proizvodih. Zato je toliko bolj pomembno, da zaščitimo potrošnika pred lažno trditvijo o avtentičnosti proizvodov (Hurley in sod., 2004).

Na osnovi testov za odkrivanje potvorbe in fizikalno kemijskih analiz mleka lahko zagotovimo kvalitetno surovino pri odkupu mleka, ter preverimo ustreznost deklaracije na proizvodu.

Kakovost proizvoda lahko preverimo s pravilnim izborom učinkovitih analitskih metod za odkrivanje potvorb, od katerih smo za odkrivanje potvorb ovčjega mleka s kravjim, v diplomskem delu preizkusili sendvič E.L.I.S.A. RC BOVINO test, proizvajalca Z.E.U.-INMUNOTEC, S.L., Španija.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MLEKO

Mleko je biološka tekočina, homogene sestave, rumenkaste barve, karakterističnega okusa in vonja. Mleko izloča mlečna žleza sesalcev ženskega spola določeno časovno obdobje po porodu in je namenjeno prehrani potomcev. Mleko je biološka tekočina, ki vsebuje vodo, beljakovine, maščobo, ogljikove hidrate, mineralne snovi, vitamine in v manjših količinah tudi druge snovi (Đorđević, 1987).

Pod pojmom »mleko« se vedno razume »kravje mleko«, za ostale vrste mleka moramo navesti poreklo »ovčje«, »kozje«, »bivolje«, »kobilje« ali »drugo mleko«. Te vrste vsebujejo iste sestavine, vendar v različnih deležih. Vrste mleka se razlikujejo po prehrabnih, fizikalno-kemijskih in tehnoloških značilnostih (Đorđević, 1987).

Kravjega mleka je količinsko največ. In je primeren za proizvodnjo vseh mlečnih izdelkov. Konzumno mleko je največkrat kravje mleko. V prehrani pa se pogosto izpostavljajo prednosti kozjega mleka, posebno pri osebah, alergičnih na proteine kravjega mleka. Nekateri potrošniki pa posebno cenijo sire iz ovčjega mleka zaradi močnejše arome in ostrejšega okusa. Ovčje mleko vsebuje največ beljakovin in maščob. Uporablja se v glavnem pri izdelavi sirov (Tratnik, 1998).

2.2 SESTAVA MLEKA

2.2.1 Voda

Največji delež sestavin v mleku predstavlja voda (od 86 % do 89 %). V mleku je prisotna kot prosta voda, v kateri so raztopljene soli, v vodi topni vitamini in mlečni sladkor laktoza ter vezana voda v sestavinah mleka, ki niso topne v vodi. Delež proste vode je v primerjavi

z vezano vodo večji. Razmerje je odvisno od zunanjih pogojev, posebno od temperature in pH mleka (Đorđević, 1987).

2.2.2 Suha snov

Glavne sestavine suhe snovi mleka so: maščoba, beljakovine, laktoza, mineralne snovi, nebeljakovinske dušikove snovi. V kravjem mleku je povprečno 12,7 % suhe snovi (Đorđević, 1987).

2.2.3 Maščoba

Mlečna maščoba je ena od parametrov sestavin mleka, ki oblikuje odkupno ceno surovega mleka. Je najbolj variabilna od vseh snovi v mleku. V povprečju mleko vsebuje 3,8 % mlečne maščobe variira pa od 2,5 % do 6,0 %. To je odvisno od pasme, starosti, stadija laktacije, prehrane, molže itd.... Mlečna maščoba je nosilec arome in okusa mleka, vpliva pa tudi na konsistenco mlečnih izdelkov. Takoj po molži ima mleko 37 °C in maščobne kroglice so v njem v obliki emulzije. Med hlajenjem se kapljice krčijo in kristalizirajo v kroglice, iz emulzije pa nastaja suspenzija. Kroglice imajo premer od 0,1 do 20 µm in so obdane z ovojnico (Đorđević, 1987).

2.2.4 Beljakovine

Beljakovine so organske snovi zgrajene iz aminokislin, ki so lahko esencialne ali neesencialne. Mleko je biološko visokovredno živilo zaradi velike količine esencialnih aminokislin, katerih človeško telo ni sposobno tvoriti samo, pač pa jih mora dobiti s hrano. Razlikujemo dve vrsti mlečnih beljakovin; kazein, ki ga je v mleku 80 % in sirotkine beljakovine, ki jih sestavljajo albumini in globulini in jih je v mleku 20 %. Kazein in sirotkine beljakovine se močno razlikujeta po svojih lastnostih. Sestava proteinov v mleku je podana v preglednici 1. V mleku je od 2,6 % do 3,8 % mlečnih beljakovin (Bajt in Golc-Teger, 2005).

Ko govorimo o beljakovinah moramo misliti tako na količino kot na kvaliteto, ker se beljakovine med seboj razlikujejo tako po številu aminokislin ki jih sestavljajo, kot tudi po vrstah in po zastopanosti aminokislin iz katerih so sestavljene. Iz tega sledi, da lahko nek proizvod vsebuje veliko beljakovin ampak je njegova vrednost za človeško prehrano lahko nizka. To pomeni, da imajo beljakovine v proizvodih različnega porekla različno biološko vrednost (Bajt in Golc-Teger, 2005).

Mleko vsebuje številne dušikove snovi, ki so v zelo majhnih koncentracijah. Od skupnih dušikovih snovi se v mleku nahaja; 95 % proteinov, 5 % neproteinskih dušikovih snovi (NPN). V NPN mleka najdemo male peptide, proste aminokisline, aminosladkorje, kreatinin, sečnino, ureinsko kislino in amonijak (Đorđević, 1987).

Preglednica 1: Koncentracija proteinov v mleku (Bylund, 1995)

Proteini (glavne frakcije)	Količina v mleku (g/kg)	(%) od skupne količine
KAZEIN (skupaj)	26,0	79,5
α_{s1} – kazein	10,0	30,6
α_{s2} – kazein	2,6	8,0
β – kazein vključno z γ kazeini*	10,1	30,8
κ - kazein	3,3	10,1
PROTEINI SIROTKE (skupaj)	6,3	19,3
α – laktalbumin	1,2	3,7
β – laktoglobulin	3,2	9,8
Albumin krvnega seruma	0,4	1,2
Imunoglobulini	0,7	2,1
Proteoze – peptoni (in ostali)	0,8	2,4
Proteini ovojnice maščobne kroglice	0,4	1,2
PROTEINI SKUPAJ	32,7	100,0

* γ – kazeini so rezultat proteolize β – kazeina

Največji del beljakovin mleka predstavljajo; kazeini in sirotkine beljakovine. Pretežni delež sirotkinih beljakovin sestavljajo α -laktalbumini in β -laktoglobulini, v manjši meri pa še beljakovine krvnega seruma in imunoglobulini, ter proteoze – peptoni in druge dušikove frakcije v mleku. Taka razdelitev je posledica njihovega karakterističnega obnašanja pri obdelavi mleka; koagulacija, topnost v vodi in raztopinah soli. Kazein koagulira pri pH 4,6 (Đorđević, 1987).

Globulini v mleku se sestojijo iz imunoglobulinov, ki se sintetizirajo v organizmu živali zaradi zaščite od nezaželenih faktorjev. To pomeni da te beljakovine prispejo v mleko preko krvnega obtoka, kar pojasni njihovo majhno količino v normalnem mleku in veliko količino v kolostrumu ali mleku obolelih živali. Imunoglobulini predstavljajo heterogeno skupino beljakovin, ki so označene kot G, M in A imunoglobulini ali krajše IgG (yG), IgM (yM) in IgA (yA). Poleg teh se v kolostralnem mleku nahajajo tudi drugi imunoglobulini; IgD in IgE (Đordevič, 1987).

2.2.5 Laktoza

Laktoza ali mlečni sladkor je disaharid ($C_{12}H_{22}O_{11}$), sestavljen iz molekul α -D-glukoze in β -D-galaktoze. Količina laktoze v mleku variira od 4,5 % - 4,8 % (Tratnik, 1998).

Mlečni sladkor je ogljikov hidrat, ki je po okusu manj slahek kot drugi sladkorji. Ravnotežje količine laktoze in topnih mineralnih sestavin vzdržuje ozmotski pritisk mleka. Količina laktoze je obratno sorazmerna količini soli pri uravnavanju ozmotskega pritiska. V mleku zdravih molznic se količina laktoze praviloma ne spreminja, naglo zmanjšanje količine laktoze pa je najbolj pogosto posledica obolenj vimena (Miletič, 1994).

2.2.6 Mineralne snovi

V mleku je več kot 40 mineralov, kot so kalcij, fosfor, natrij, klor, pa tudi mikroelementov, med katerimi so železo, mangan, baker, cink, fluor, jod. Njihova količina je močno odvisna od prehrane živali. Največ mineralov je raztopljenih v obliki kalcijevih, kalijevih, natrijevih in magnezijevih soli (citrato, fosfato, klorido). Nahajajo pa se tudi v encimih, vitaminih in ovojnicah maščobnih kroglic. Minerali v mleku so v takem medsebojnem razmerju, kot najbolj ustreza potrebam organizma. V prehrani sta najpomembnejša kalcij in fosfor, ki sta v mleku v zelo ugodnem medsebojnem razmerju. V mleku je malo železa in joda (Golc-Teger, 1995).

2.2.7 Vitamini

Vitamini so majhne molekule različnih struktur. Mleko vsebuje vitamine, ki so topni v maščobah (A, D, E, K) in vitamine, ki so topni v vodi B₁, B₂, PP (niacin), B₆, K, B₁₂, H (biotin), C, folna kislina, pantotenska kislina. Količina vitaminov močno niha, odvisna pa je od prehrane živali in zdravja vimena (Miletič, 1994).

Vitaminov A in D je v mleku več v poletnem času, ker je v sveži zeleni krmi veliko provitaminov za ta dva vitamina, pozimi pa ju je manj, mleko pa je bolj blede barve. V vodi topni vitamini so B₁ in B₁₂ ter vitamin C, ki ga je največ v sveže namolzenem mleku, pozneje se vitamin C razgrajuje na svetlobi, med toplotno obdelavo in hlajenjem mleka (Golc-Teger, 1995).

2.2.8 Druge snovi

V mleku se nahajajo tudi encimi, pigmenti, hormoni in drugo. Mleko vsebuje veliko število encimov, ki so po svoji strukturi beljakovine, zato denaturirajo pri višjih temperaturah in izgubijo svojo aktivnost. Njihovo delovanje je zelo specifično, saj en tip encima katalizira samo en tip reakcije. Aktivnost encima je najbolj odvisna od temperature in vrednosti pH mleka. Med najpomembnejše skupine encimov, ki nastajajo v mlečni žlezi, ali pa so metaboliti mikroorganizmov, sodijo; lipaze, fosfataze, peroksidaze, katalaze, reduktaze, proteinaze in amilaze (Tratnik, 1998).

2.2.9 Značilnosti mleka

Fizikalne lastnosti mleka so; gostota, viskoznost, površinska napetost, specifična toplota, zmrziščna točka, točka vrelišča, električna prevodnost, vrednost pH, kislinska stopnja mleka, oksidoredukcijski potencial mleka. Voda v mleku je enostaven kemijski element, ki znatno vpliva na fizikalne lastnosti mleka (Miletič, 1994).

Slovenska zakonodaja predpisuje, da vrednost zmrziščne točke ne sme biti višja od - 0,520 °C (Pravilnik o elementih..., 2000). Uporablja se pri določanju potvorbe mleka z vodo. Vendar pa obstajajo sezonske variacije točke zmrzišča kot tudi variacije zaradi dodatkov soli v obrok krav molznic od - 0,530 °C do - 0,575 °C. Normalne vrednosti pH kravjega mleka so od 6,5 do 6,9. Gostota mleka variira med 1,030 in 1,033, meri pa se pri temperaturi mleka 20 °C (Miletić, 1994).

2.3 OVČJE MLEKO

Proizvodnja ovčjega mleka v Sloveniji je razdrobljena na majhne individualne proizvajalce, ki v glavnem izdelujejo skuto in sir in z njim razpolagajo po lastni volji. Z organiziranim razvojem ovčarstva bi ovčje mleko imelo pomembno vlogo v prehrani večjega števila ljudi, saj je z visoko vsebnostjo beljakovin, maščob, mineralnih snovi in vitaminov, visokovredno živilo. Poleg tega pa je odlična surovina za številne, raznovrstne izdelke visoke prehranske vrednosti. Ovčje mleko je osnovna surovina v proizvodnji ovčjega sira, skute in kislega mleka. Z značilno sestavo in tehnološkimi lastnostmi vpliva na procese proizvodnje in kvaliteto pridobljenega izdelka. Preglednica 2 prikazuje primerjavo fizikalnih lastnosti ovčjega in kravjega mleka. Ovčje mleko je bele, neprozorne barve, dobrega okusa in brez vonja če so pogoji molže dobri. Ovčje mleko vpija vonje iz okolice v kateri se nahaja. Vrednost pH je 6,65. Gostota variira od 1,034 do 1,036, točka zmrzišča pa je od - 0,570 °C do - 0,575 °C (Miletić, 1994).

Preglednica 2: Primerjava fizikalnih lastnosti ovčjega in kravjega mleka (Rogelj, 1995)

Fizikalne lastnosti	Mleko	
	Ovčje	Kravje
Gostota (g/ml)	1,032 – 1,036	1,028 – 1,032
Vrednost pH	6,5 – 6,7	6,6 – 6,8
Krioskopska točka (°C)	-0,560 - 0,580	-0,520 – 0,550

Zaradi visoke vsebnosti suhe snovi, predvsem maščobe in beljakovin, ima ovčje mleko pri predelavi v sir skoraj dvakrat večji randman kot kravje mleko. Različna količinska sestava pa vpliva tudi na fizikalne lastnosti mleka, kar se odraža na gostoti, vrednosti pH in

krioskopski točki kravjega in ovčjega mleka. Sestava ovčjega mleka variira odvisno od pasme, klimatskih pogojev, prehrane in tipa ovc (Rogelj, 1995).

Ovčje mleko se po sestavi razlikuje od kravjega in kozjega mleka. Iz preglednice 3 vidimo, da so očitne razlike glede na vsebnost maščob in beljakovin, ki jih je v ovčjem mleku več. Vsebuje tudi več kalcija, kar se odraža v pepelu. Pomembno večji pa je še delež kazeina, zaradi katerega je tehnologija izdelave sirov nekoliko drugačna. Tudi ovčje mleko ima svoj značilen vonj in okus, zato se skoraj ne uporablja za pitje, pač pa predvsem za predelavo v sire in skuto (Bajt in Golc-Teger, 2005).

Preglednica 3: Povprečna kemijska sestava ovčjega in kravjega mleka (Đorđević, 1987)

	Ovčje mleko	Kravje mleko
Voda	80,63	87,30
Suha snov	19,37	12,70
Maščoba	7,40	3,80
Beljakovine	6,17	3,55
Kazein	5,0	3,0
Pepel	0,88	0,65

Največ variira količina mlečne maščobe. Maščoba ovčjega mleka vsebuje 68 % do 78 % nasičenih maščobnih kislin od tega kaprilne in kaprinske od 6 % do 15 %, ter nenasičenih maščobnih kislin od 16 % do 30 % ter večkrat nenasičenih 2,5 % do 7 %. Koagulum ovčjega mleka je zelo čvrst. Okus proizvoda ovčjega mleka je vrsti specifičen. Testo ovčjega sira je belo. Imunološka sestava ovčjega mleka zavira razvoj mikroorganizmov prve ure po molži, kar ohrani kvaliteto mleka vendar otežuje predelavo mleka, če se predeluje neposredno po molži (Miletič, 1994).

2.4 ENCIMSKO-VEZANE IMUNO-OBČUTLJIVE ANALIZE E.L.I.S.A. (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)

Od leta 1990 je metoda E.L.I.S.A. najbolj pogosto uporabljena imunoencimska metoda za detekcijo potvorbe mleka med različnimi vrstami mlečnih živali. Je enostaven, občutljiv, ponovljiv, zanesljiv in mnogostranski analitski model za določanje antigenov in protiteles. Temelji na obarvanju vzorca, zaradi hidrolize kromogenega substrata z encimom. Peroksid ali fosfatni konjugat je vezan na encim, ki se predhodno veže na protitelo ali antigen. Z metodo se lahko ugotovi prisotnost antigena v koncentraciji 10 pg/ml, odvisno od občutljivosti v testu uporabljenih protiteles. Koncentrat substratnega produkta po razgradnji je direktno sorazmeren koncentraciji analiziranega antigena iz vzorca ali standarda (Moatsou in Anifantakis, 2003).

Test E.L.I.S.A. je ponavadi zasnovan in komercialno dobavljiv v mikrotitrski ploči, ki vsebuje 96 epruvet. Epruvete omogočajo uporabo majhnega volumna vzorca in ponovljivost analize velikega števila vzorcev. Rezultati preizkusa se odčitavajo na posebno zasnovanih multifunkcijskih spektrofotometrih, ki merijo absorbanco vzorca (Moatsou in Anifantakis, 2003).

Širok spekter zasnovane metode E.L.I.S.A., temelji na tehniki trdne podlage, največkrat v obliki epruvet v mikrotitrski plošči. Metoda E.L.I.S.A. je klasificirana na sledeči način (Moatsou in Anifantakis, 2003):

- direktni preiskus; protitelo ali antigen iz vzorca se pritrdi na vezno mesto v epruveti mikrotitrške plošče, na katerega se veže antigen ali protitelo z vezanim encimom.
- Indirektni preizkus; vrstno specifično protitelo reagira z vezanim antigenom. Če so v vzorcu prisotna specifična protitelesa za ta antigen, se nanj vežejo. Na ta vezana protitelesa se vežejo specifični antigeni (iz antiseruma), ki so označeni z encimom.
- Sendvič E.L.I.S.A.; v direktni obliki testa so specifična protitelesa vezana na površino epruvet v mikrotitrski plošči. Nanje se vežejo specifični antigeni iz

vzorca, kateri se zaznajo z dodatkom protiteles z encimom, ki se vežejo na te antigene. Vezana protitelesa na površini epruvete in protitelesa z encimom so lahko iz istega seruma ali iz različnih virov. Antigen mora v tem primeru imeti vsaj dve različni antigenski determinanti. V indirektni obliki je na epruveto vezano protitelo drugačnega izvora, kot protitelo z vezanim encimom. Protitelo vezano na antigen ne nosi encima ampak se nanj veže še eno protitelo z encimom.

- Test kompeticije je lahko tudi v direktni ali indirektni obliki. Dva reaktanta (lahko antigen ali protitelo) se poskušata vezati na tretjega. Metoda vključuje istočasno dodajanje dveh konkurentov.

2.4.1 Hitra imunoencimska sendvič metoda E.L.I.S.A RC BOVINO

Test RC BOVINO je imunoencimska metoda na osnovi sendvič tehnike. Temelji na specifičnem zaznavanju imunoglobulinov G (IgG) v vzorcih mleka s specifičnimi protitelesi. Z metodo odkrivamo prisotnost kravjega mleka v ovčjem ali kozjem mleku, oziroma sirih. Specifična protitelesa v testu zaznajo prisotnost kravjih IgG, ne reagirajo pa z ovčjimi ali kozjimi (RC BOVINO KIT).

Metoda E.L.I.S.A. RC BOVINO omogoča kvalitativno in kvantitativno določanje imunoglobulinov. Epruvete v testu so na notranji strani prevlečene s specifičnimi primarnimi protitelesi proti kravjim IgG. Konjugat pa vsebuje sekundarna protitelesa, ki se pritrdijo na IgG iz vzorca s kravjim mlekom, predhodno vezane na primarna protitelesa. Na sekundarnih protitelesih so vezani encimi, ki reagirajo z dodanim substratom in povzročijo barvno reakcijo. Če v vzorcu ni kravjega mleka, ne pride do vezave IgG na primarna protitelesa in s tem tudi ni vezave sekundarnih protiteles, encima in substrata. Barvna reakcija se ne razvije (RC BOVINO KIT).

Za analize sira uporabljamo samo kvalitativno metodo. Pozitivni rezultat nakazuje na prisotnost kravjega mleka v vzorcu, v območju občutljivosti metode. Negativni rezultat pa na njegovo odsotnost. V času izdelave sira je izguba topljivih proteinov različna, odvisna od raznolikosti sira in načina proizvodnje. Za kvantitativno določitev v siru moramo narediti posebne standarde za vsako vrsto sira posebej (RC BOVINO KIT).

Proizvajalec navaja tudi preciznost in točnost sendvič E.L.I.S.A. RC BOVINO metode. Pri večkratnih meritvah, štirih različnih mešanic mleka potvorjenih z 1 %, 5 %, 10 %, 15 % dodanega kravjega mleka je bil dosežen koeficient variacije vedno pod 10 %. Pri ponavljanju meritve istega vzorca v več zaporednih poskusih pri štirih različnih nivojih potvorb je dosežen koeficient variacije manjši od 4 %. Točnost metode je ocenjena na osnovi primerljivosti z vzorci z znano koncentracijo antigena (standardi). Odstotek pokrivanja je podan z odstotkom odstopanja od znane vrednosti koncentracije. Povprečje pokritja štirih mešanic mleka različnih porekel in koncentracij sirotkinih proteinov (od 0,2 % do 5 %) je od 75 % do 90 % (RC BOVINO KIT).

Proizvajalec Z.E.U.-INMUNOTEC S.L. je metodo E.L.I.S.A. RC BOVINO primerjal z drugimi metodami za določitev potvorb s kravjim mlekom. Primerjali so uspešnost metode E.L.I.S.A. RC BOVINO z radialno imunodifuzijsko metodo, z elektroforezo, ki je uradna metoda za ugotavljanje potvorb mleka v Španiji in Franciji ter z IC BOVINO kromatografijo. Zadnji dve metodi sta kvalitativni, rezultati nam ne dajo informacije o koncentraciji dodanega kravjega mleka. Dvanajst vzorcev ovčjega mleka, katerim so dodali različne količine kravjega mleka, so primerjalno analizirali z vsemi štirimi metodami (Preglednica 4). Pri vseh 12 vzorcih so s kvalitativnima metodama dobili pozitiven rezultat (RC BOVINO KIT).

Preglednica 4: Primerjava sendvič E.L.I.S.A. RC BOVINO metode z drugimi metodami (RC BOVINO KIT)

Vzorec	RC BOVINO metoda	Radialna imunodifuzijska metoda	Elektroforeza	IC BOVINO kromatografija
Negativna kontrola 1	0	0	-	-
Negativna kontrola 2	0	0	-	-
1	0,8	0,9	+/-	+
2	3,7	4,2	+	+
3	6,8	6,4	+	+
4	1,9	2,4	+	+
5	6,8	6,4	+	+
6	12,0	10,9	+	+
7	0,9	1,3	+/-	+
8	3,6	4,2	+	+
9	5,8	6,4	+	+
10	1,8	2,0	+	+
11	6,5	6,4	+	+
12	12,8	13,1	+	+

Kvantitativni metodi iz preglednice 4 so primerjali med seboj z linearno regresijo. Dosežena je dobra korelacija med metodo RC BOVINO in radialno imunodifuzijsko metodo. Korelacijski koeficient je 0,993, kar kaže na dobro primerljivost rezultatov obeh kvantitativnih metod (RC BOVINO KIT).

2.4.2 Referenčna metoda

Referenčna metoda za ugotavljanje kravjega mleka in kazeinativ v sirih iz ovčjega, kozjega in bivoljega mleka ali mešanicah iz ovčjega, kozjega in bivoljega mleka, je na področju Evropske Unije (EU), metoda izoelektričnega fokusiranja (Uredba Komisije, 2001).

Izoelektrično fokusiranje je metoda visoke ločljivosti, v kateri se proteini ločijo v prisotnosti kontinuiranega pH gradienta. Metoda temelji na ločljivosti kazeinske frakcije iz sira po delovanju plazmina na kazein, pod določenimi pogoji. Z analizo proteinskega hidrolizata z izoelektričnim fokusiranjem se ločijo kravji γ_2 in γ_3 – kazeini od ovčjega kazeina. Test je pozitiven na potvorbe, v kolikor je dokazanih vsaj 1 % vseh kravjih γ_2 in

γ_3 frakcij kazeina. Da bi se izognili lažno pozitivnim ali lažno negativnim rezultatom je potrebno določiti obe frakciji γ kazeina (γ_2 in γ_3). Če želimo določiti procent kravjega mleka, ki je dodan ovčjemu mleku ob izdelavi sira, moramo istočasno analizirati 2 referenčna vzorca ovčjega sira; eden referenčni vzorec ne vsebuje kravjega mleka, drugi pa vsebuje 1 % dodanega kravjega mleka. Količino dodanega kravjega mleka (manj kot, enako kot ali več kot 1 %) lahko neposredno presodimo s primerjavo intenzitete kravjih γ_2 in γ_3 – kazeinov v primerjavi z referenčnima vzorcema, ki vsebujeta 0 % in 1 % dodanega kravjega mleka (Uredba Komisije, 2001).

Pomanjkljivost te metode je, da ne omogoča določanja potvorbe ovčjega sira oziroma mleka s kozjim mlekom. Položaj ovčjih in kozjih γ -kazeinskih frakcij je enak, zato se prekrivajo. Ta metoda se lahko uporablja za razlikovanje ovčjega in kozjega mleka, če analiza temelji na ugotavljanju para- κ -kazeina, vendar je takrat meja detekcije višja (Uredba Komisije, 2001).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 NAČRT POSKUSA

Vzorci za testiranje koncentracije kravjega mleka v ovčjem, so bili pripravljani v Laboratoriju za mlekarstvo z dodajanjem različnih koncentracij kravjega mleka ovčjemu. Opravili smo sendvič E.L.I.S.A. RC BOVINO test, proizvajalec Z.E.U.-INMUNOTEC S.L. Španija, za odkrivanje prisotnosti kravjega mleka v ovčjem, kemijske analize mleka; določitve maščob, beljakovin, laktoze, suhe snovi in suhe snovi brez maščobe (metoda infra rdeče spektrometrije), in fizikalne določitve; zmrziščna točka mleka (termistor krioskopska metoda), gostota mešanic mleka in vrednost pH. Izdelali smo kalibracijsko krivuljo z vzorci, ki smo jih sami pripravili za kvantitativno določanje koncentracije kravjega mleka v ovčjem (iz meritev absorbanc lastno pripravljenih vzorcev). Kalibracijsko krivuljo smo primerjali s krivuljo, ki smo jo dobili na osnovi RC BOVINO standardov, priloženih v testu. Poiskali smo povezavo med fizikalno-kemijskimi parametri glede na koncentracijo kravjega mleka v ovčjem.

Vzorci ovčjega mleka smo jemali v juniju, juliju in avgustu. Ovčje mleko smo dobili pri proizvajalcih iz Štajerske in Primorske regije. Kravje mleko pa je bila mešanica surovega mleka iz Ljubljanske regije. Vsi vzorci mleka so bili sveži, ohlajeni ter brez dodanih konzervansov.

3.1.1 Zbiranje vzorcev

Pravilno vzorčenje mleka je prvi pogoj za kasnejše realne rezultate preiskav. Če vzorec ni pravilno odvzet, tudi še tako natančna analiza ne da zanesljivih rezultatov. Odvzem vzorcev je natančno definiran z mednarodnim standardom (EN ISO 707, 1997) in s slovenskim standardom, ki je povzet po mednarodnem standardu (SIST EN ISO 707, 1999).

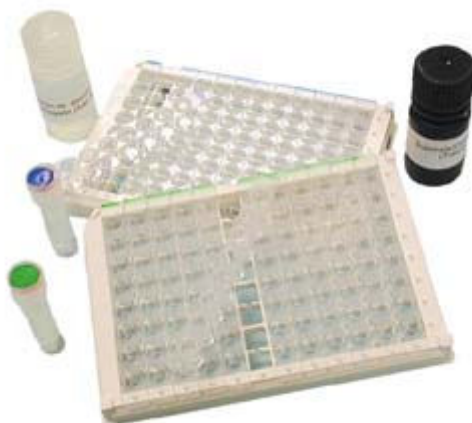
3.1.2 Priprava vzorcev za laboratorijske analize

Vse analize so bile opravljene v Laboratoriju za mlekarstvo, Oddelka za zootehniko, Biotehniške fakultete. Vzorce svežega kravjega mleka in svežega ovčjega mleka v steklenicah smo najprej ogreli v vodni kopeli na temperaturo 38 °C do 42 °C. Nato smo vsebino temeljito premešali z obračanjem steklenic in mešali ovčje s kravjim mlekom po predhodno zastavljenem protokolu potvarjanja, volumetrično v območju od 1 % do 45 % dodanega kravjega ovčjemu mleku. Če so se vzorci zaradi čakanja na analize ohladili, smo jih pred začetkom analize ponovno ogreli v vodni kopeli na 38 °C do 42 °C.

3.1.3 Material

Sendvič E.L.I.S.A. RC BOVINO test vključuje:

- 1 x plošča z 96 epruvetami (12 vrst po 8 epruvet vsaka vrsta),
- 5 x standardne raztopine kravjega mleka v ovčjem mleku (0 %, 1 %, 5 %, 10 %, 15 %) pripravljene za takojšno uporabo,
- 1 x raztopina konjugata,
- 1 x raztopina za redčenje konjugata
- 1 x raztopina substrata kromogena (TMB) pripravljena za takojšnjo uporabo,
- 1 x raztopina stop (H_2SO_4 1M) pripravljena za takojšno uporabo.



Slika 1: Vsebina sendvič E.L.I.S.A. RC BOVINO testa

Postopek dela

Mikrotitrna plošča je suha in zaprta v srebrni plastični vrečki. Uporabili smo le toliko epruvet, kot smo jih potrebovali. Vrečko smo hranili na temperaturi 4 °C. Sendvič E.L.I.S.A. RC BOVINO test smo hranili v temnem prostoru. Raztopina substrata kromogena je pripravljena za takojšnjo uporabo. Izogibali smo se pipetiranju raztopine direktno iz stekleničke kromogena, ker bi se lahko kontaminirala. V primeru kontaminacije se raztopina kromogena obarva modro. Med postopkom se epruvete niso smele osušiti. Za natančne določitve smo izvajali analize vzorcev in standardov v paralelkah. Set reagentov smo pustili 30 minut pred začetkom postopka na sobni temperaturi. Vse reagente smo po uporabi takoj vrnili v hladilnik na 4 °C. Pomembno je pravilno izpiranje epruvet med postopkom analize. Število izpiranj je lahko večje, da izboljšamo zanesljivost rezultatov. Delo smo izvajali skladno z navodili proizvajalca. Kakovost RC BOVINO testa za uporabo je podana z certifikatom o proizvodu (priloga E).

3.2 METODE

3.2.1 Uporaba sendvič E.L.I.S.A RC BOVINO testa

E.L.I.S.A. RC BOVINO test uporabljajo laboratoriji za hitro odkrivanje prisotnosti kravjega mleka v ovčjem mleku ali sirih oziroma v kozjem mleku ali sirih. Teste lahko opravljamo na svežem mleku, posnetem mleku, sirotki, pasteuriziranem mleku ali mleku iz zamrzovalnika. Teste ne moremo izvajati na toplotno obdelanem mleku, zaradi denaturacije proteinov. V kvantitativni metodi moramo upoštevati priporočen čas inkubacije, da zagotovimo dobre kalibracijske krivulje. Sendvič E.L.I.S.A. RC BOVINO test je uporaben do 6 mesecev pri normalnih pogojih shranjevanja pri 4 do 8 °C. Stabilnost sendvič E.L.I.S.A. RC BOVINO testa pri sobni temperaturi 22 °C se ohrani 10 do 15 dni, najbolj nestabilna komponenta pri visokih temperaturah je konjugat. Razredčena raztopina konjugata obdrži stabilnost nekaj dni (RC BOVINO KIT).

RC BOVINO test je sendvič tehnika imunoencimskega testa. Rezultate dobimo iz kalibracijske krivulje z odčitkom koncentracije kravjega mleka v ovčjem, glede na izmerjeno vrednost absorbance. Laboratoriji lahko pripravijo kalibracijsko krivuljo na osnovi standardov priloženih RC BOVINO testu. Standardi vsebujejo povprečne koncentracije IgG v kravjem mleku. Za te analize je proizvajalec testa porabil 3000 vzorcev iz različnih španskih farm, ki jih je zbiral v različnih časovnih obdobjih laktacije. Uporabil je tudi vzorce iz drugih mediteranskih držav. Povprečna vrednost IgG v kravjem mleku ugotovljena na osnovi analiz je 0,25 mg/ml. Standardne koncentracije IgG kravjega mleka v sendvič E.L.I.S.A. RC BOVINO testu so sledeče; standard 0 % = 0 µg/ml, standard 0,5 % = 2,5 µg/ml, standard 2 % = 12 µg/ml, standard 10 % = 25 µg/ml, standard 15 % = 37 µg/ml (RC BOVINO KIT).

Laboratoriji lahko pripravljajo svoje standarde s tem, da potvarjajo čisto surovo ovčje mleko z dodatkom različnih koncentracij čistega surovega kravjega mleka. S pripravo lastnih standardov lahko zmanjšamo vpliv geografske raznolikosti v sestavi mleka na dobljene vrednosti ocene deleža kravjega mleka v mešanici mleka. Metoda je uporabna za

kvantitativno določanje potvorb, oziroma prisotnosti drugih vrst mleka glede, na deklaracijo. Pri siru pa lahko potvorbo določamo le kvalitativno.

Priprava vzorca in raztopin za E.L.I.S.A. RC BOVINO metodo

Priprava standardnih vzorcev; standardne raztopine so vključene v komplet reagentov v testu. Pripravljene so za takojšnjo uporabo in ne potrebujejo predhodne redčitve.

Redčenje vzorcev mešanic mleka; vzorce mešanic mleka smo redčili v razmerju 1:100 z destilirano vodo. Npr.: Zmešali smo 0,1 ml vzorca mešanic mleka z 9,9 ml destilirane vode. Pri potvorbah od 15 % do 45 % dodanega kravjega mleka smo redčili v razmerju 1:300. Čisto 100 % kravje mleko smo redčili v razmerju 1:1000.

Priprava raztopine konjugata; zmešali smo 1 volumen raztopine konjugata z 19 volumni raztopine za redčenje konjugata. Pripravili smo nekoliko večjo količino raztopine konjugata, kot smo jo potrebovali za analizo, da smo lažje odpipetirali raztopino. Npr.: Če smo analizirali 16 vzorcev (dva stolpca) smo potrebovali $16 \times 0,05 \text{ ml} = 0,8 \text{ ml}$ raztopine konjugata. To raztopino smo pripravili z mešanjem 0,05 ml raztopine konjugata z 0,95 ml redčitvene raztopine (RC BOVINO KIT).

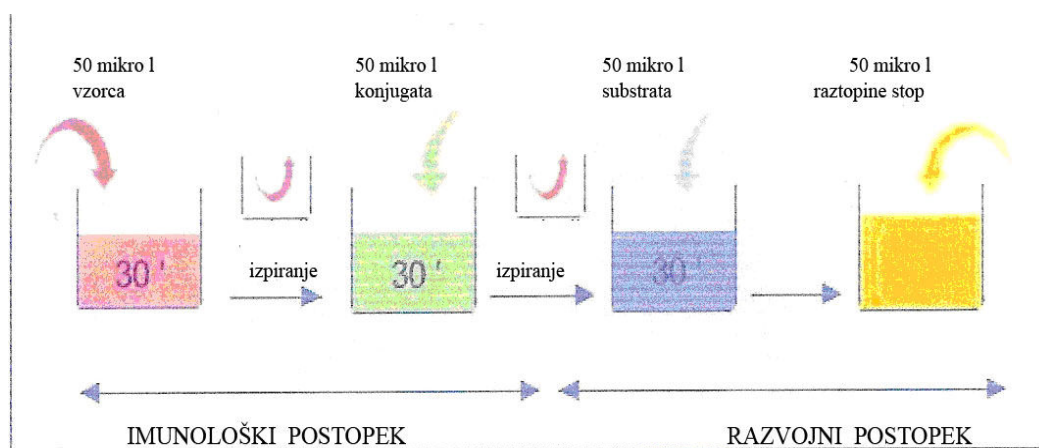
Postopek analize

Pol ure pred pričetkom analize smo prinesli vzorce in komponente iz testa (reagente in epruvete, ki jih potrebujemo) na sobno temperaturo. Napolnili smo mikrotitrsko ploščo z želenim številom epruvet.

Slika 2 nam prikazuje potek analize. Prva faza je imunološki postopek. V vsako epruveto smo odpipetirali po 50 µl standarda ali predhodno redčenega vzorca. Inkubirali smo 30

minut pri 20 do 24 °C. Spraznili smo epruvete tako, da smo obrnili mikrotitrsko ploščo in iz epruvet izlili vsebino z rahlim stresanjem. Obrnjeno mikrotitrsko ploščo smo položili na papirnato servieto, da se je absorbirala odvečna tekočina. Vsako epruveto posebej smo napolnili z približno 0,3 ml destilirane vode in jih ponovno izpraznili. Izpiranje epruvet smo ponovili. Po izpiranju smo odpipetirali 50 µl raztopine konjugata. Konjugat vsebuje sekundarno protitelo, ki ima vezan encim. Inkubirali smo 30 minut pri 20 do 24 °C. Ponovili smo postopek izpiranja epruvet.

V drugi fazi, ki se imenuje razvojni postopek, se razvije obarvan produkt. Odpipetirali smo 50 µl raztopine kromogena, ki aktivira delovanje encima. Substrat reagira z encimom, ki je vezan na sekundarno protitelo. Inkubirali smo 30 minut pri 20 do 24 °C. Brez predhodnega izpiranja epruvet, smo odpipetirali 50 µl raztopine stop, ki ustavi reakcijo med substratom in encimom, vezanim na sekundarno protitelo. Narahlo smo potresli mikrotitrsko ploščo, da se je raztopina porazdelila po celi epruveti. Postopek analize je trajal 1³⁰ do 1⁴⁵ ure. Za kvantitativno določitev smo najprej izmerili absorbanco pri valovni dolžini 450 nm slepemu vzorcu (prazna epruveta) in nato vsem ostalim vzorcem na mikrotitrski plošči. Meritve smo opravili najkasneje 30 minut po tem, ko smo dodali raztopino stop.



Slika 2: Prikaz postopka analize z sendvič E.L.I.S.A. RC BOVINO testom

Detekcija višjih koncentracij kravjega mleka

Sendvič E.L.I.S.A. RC BOVINO test je narejen za direktno detekcijo potvorbe mešanic mleka od 1 % do 15 % dodanega kravjega mleka v ovčje mleko. Za višje količine kravjega mleka v vzorcu se predlaga primerna redčitev vzorca, ki je navedena v navodilih proizvajalca (RC BOVINO KIT).

Ko so vzorci vsebovali več kot 15 % kravjega mleka smo postopali drugače. Vzorce mešanic mleka smo morali redčiti tako, da smo dobili rezultate primerljive z nižjimi potvorbami, oziroma v območju uporabljenih standardov. Ko smo dobili rezultate iz kalibracijske krivulje, smo le te pomnožili s korekcijskim faktorjem, da smo dobili količino koncentracije kravjega mleka v vzorcu. V preglednici 5 so navedene primerne redčitve in korekcijski faktorji za različne deleže potvorb vzorca s kravjim mlekom.

Preglednica 5: Detekcija višjih koncentracij kravjega mleka (RC BOVINO KIT)

% potvorbe	Redčitev vzorca	Korekcijski faktor
1 % - 15 %	1/100	ni korekcije
2 % - 30 %	1/200	x 2
3 % - 45 %	1/300	x 3
5 % - 75 %	1/500	x 5
10 % - 100 %	1/1000	x 10

3.2.2 Merjenje absorbance s spektrofotometrom Elx808

Abosorbanco RC BOVINO standardov in pripravljenih vzorcev mešanic mleka, smo merili s spektrofotometrom Elx808, pri valovni dolžini 450 nm (proizvajalec BioTek Instruments, ZDA). Kalibracijo spektrofotometra Elx808 smo izvedli z meritvijo slepega vzorca (prazno epruveto). Vse kalkulacije za izračun absorbance so bile izračunane avtomatično (Elx808 Operator's Manual, 2004).

3.2.3 Merjenje zmrziščne točke mleka

Zmrziščno točko mleka smo določili s termistor krioskopsko metodo z instrumentom krioskop (proizvajalec Advenced Instruments, ZDA). Vzorec mleka je v aparatu podhlajen do ustrezne temperature. Z mehanično vibracijo je inducirana kristalizacija, ki povzroči hiter dvig temperature do platoja, ki ustreza dejanskemu zmrzišču vzorca. Metoda, zaradi vpliva na rezultat, ni uporabna za mleko s kislostjo večjo od 8 °SH (kislost v stopinjah SH predstavlja število mililitrov 0,25 M NaOH porabljenih za nevtralizacijo 100 ml mleka), prav tako metoda ni uporabna za konzervirano mleko. Pred merjenjem smo aparat umerili z dvema standardnima raztopinama. To je raztopina soli NaCl določene koncentracije in znane zmrziščne točke. Zmrziščna točka mleka je izražena v °C. Pred pričetkom dela smo vzorce ohladili na 20 °C. Za določitev zmrziščne točke mleka potrebujemo $2,5 \pm 0,1$ ml mleka. Meritve smo opravili v dveh določitvah, ter izračunali njuno povprečje.

3.2.4 Določanje vrednosti pH

Vrednost pH je negativni logaritem koncentracije vodikovih ionov v g/l. Na vrednost pH vpliva temperatura, kajti sprememba temperature (telesna, zrak, hlajenje vzorca) povzroči spremembe v ravnotežju posameznih sestavin. Kalibracijo pH metra izvedemo z dvema pufernima raztopinama, ki imata vrednost blizu vrednoti pH vzorca. Temperaturi pri kalibraciji in meritvi vzorca se morata ujemati. Pri določanju vrednosti pH smo vzorce ohladili na temperaturo 20 °C, ker je pH meter pri taki temperaturi kalibriran. Elektrodo smo potopili v vzorec ter počakali, da se umiri nihanje oziroma vzpostavi potencial in odčitali vrednost pH. Vrednost pH ocenjujemo kot aritmetično sredino dveh merjenj na dve decimalki natančno. Kot rezultat podamo vrednost pH vzorca. Uporabili smo pH meter MA 5740, Iskra, Slovenija.

3.2.5 Določanje sestave mleka

Vsebnost maščob, beljakovin, laktoze, suhe snovi, suhe snovi brez maščobe v mešanici mleka smo določili z metodo infrardeče spektrometrije z instrumentom MilkoScan FT 120 (proizvajalec Foss Electric, Danska). Princip določanja je infrardeča spektrometrija.

Fokusiran (zbran) žarek iz izvora infrardeče svetlobe prehaja skozi kiveto z vzorcem in se odbije na detektorskem ogledalu. Energija žarka se zbere v detektorju in se pretvori v električni signal, ki gre preko ojačevalcev različnih jakosti, ter se končno spremeni v zapis vrednosti. MilkoScan FT 120 deluje po principu Fourier transformacijske infrardeče spektrometrije (FTIR). Količina odvzetega vzorca pri analizi z MilkoScan FT 120 je 9 ml. Dnevni postopki pri merjenju z MilkoScan FT 120 so preizkus in uravnavanje ničelne točke. Pred pričetkom merjenja so morali biti vzorci pravilno temperirani in ne pregreti (40 ± 5 °C). Izbran je bil primeren program, odvisno od sestavin, ki smo jih analizirali.

3.2.6 Statistična metoda

Povezavo med odvisno spremenljivko y (absorbanca) in neodvisno spremenljivko x (koncentracija), smo ocenili z regresijsko krivuljo:

$$y = f(x) + e$$

Pri tem je $f(x)$ funkcijska oblika regresijske krivulje, e so slučajni vplivi. Čim večji so posamični vplivi e , tem večji so odkloni točk in tem bolj je zabrisana regresijska krivulja (Blejc, 1981).

Regresijsko povezavo med merjeno absorbanco (y) pri valovni dolžini 450 nm in koncentracijo (x) kravjega mleka v ovčjem, smo določili analitično z linearnim modelom kubičnega tipa, ki smo ga povzeli po tehničnem poročilu proizvajalca Z.E.U.-INMUNOTEC, S.L., Španija:

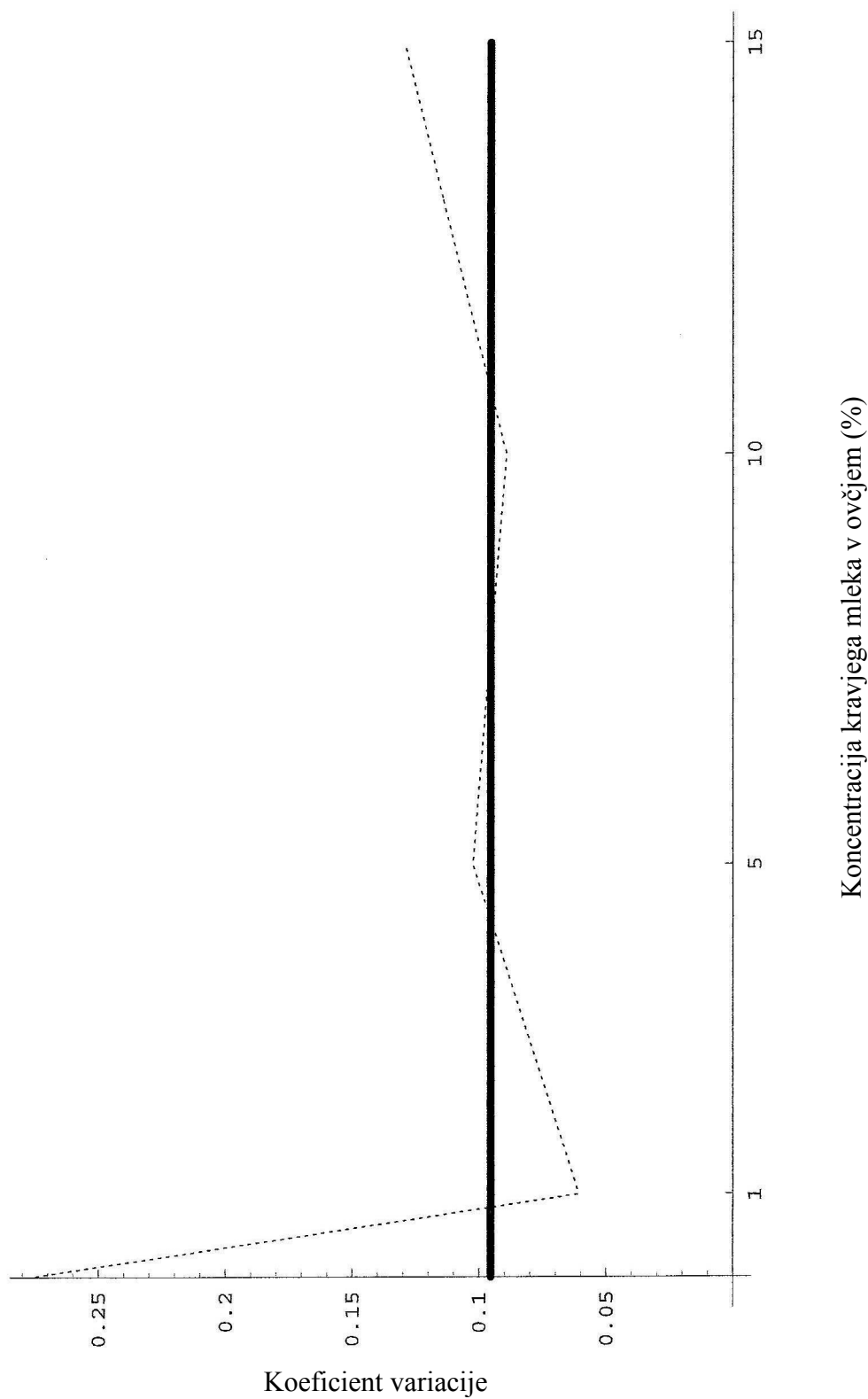
$$y = ax + bx^2 + cx^3 + e$$

Namesto kubičnega zlepka smo uporabili kubični polinom, ki ima v točki $x = 0$ absorbanco 0. Ker so meritve pokazale ($\bar{x}$), da $\sigma(e)$ ni neodvisna od koncentracije, kar je osnovna predpostavka za določitev mej zaupanja, pač pa je približno linearna funkcija,

$\frac{\sigma(e)}{\bar{x}} \approx \text{konstanta}$ (slika 3), smo model modificirali (ISO 11095, 1996):

$$z = \frac{y}{x} = a + bx + cx^2 + \varepsilon, \quad \varepsilon \approx \frac{e}{x} \approx \text{konstanta}$$

in z metodo najmanjših kvadratov določili koeficiente a , b , c ter meje zaupanja (Kendall in Stuart, 1973).



Slika 3: Koefficient variacije in njegovo povprečje

Dodatno smo ocenili tudi korelacijske povezave med maščobo, beljakovinami, laktozo, suho snovjo, suho snovjo brez maščobe, zmrziščno točko, gostoto in vrednostjo pH ter koncentracijo kravjega mleka v ovčjem.

4 REZULTATI

V tem poglavju predstavljamo rezultate statistične analize v raziskavi pridobljenih analitskih podatkov, kalibracijski krivulji ter korelacije med izmerjenimi fizikalno kemijskimi parametri glede na koncentracijo kravjega mleka v ovčjem.

4.1 REZULTATI ANALIZ KVANTITATIVNE METODE

Analize smo opravljali v paralelnih meritvah tudi meritev s spektrofotometrom Elx808 smo za isti vzorec ponovili 2x. Poleg sendvič E.L.I.S.A. RC BOVINO testa smo vzorcem mešanic mleka v območju od 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 35 %, 45 %, ter čistemu kravjemu in ovčjemu mleku določili, kemijske lastnosti; vsebnost maščobe, beljakovin, laktoze, suhe snovi, suhe snovi brez maščobe, ter fizikalne parametre; zmrziščno točko, gostoto in izmerili vrednost pH.

V samem začetku izvajanja analize z sendvič E.L.I.S.A. RC BOVINO testom smo naleteli na nekaj težav, ki smo jih tekom dela odpravili. Možni vzroki napak so bili nepravilno izpiranje epruvet (možnost križne kontaminacije med epruvetami), umazanost epruvet (večja vrednost absorbance pri slepem vzorcu), neprimerni pogoji inkubacije (previsoke zunanje temperature). Zaradi naštetih možnih vplivov smo pri izračunu regresijske krivulje upoštevali le tiste vrednosti, kjer ti vplivi po Grubbsovem testu, niso bili statistično značilni (Grubbs, 1969).



Slika 4: Spektrofotometer Elx808 s katerim smo merili absorbanco pri 450 nm

Meritve RC BOVINO standardov so bile merjene takoj po končanju sendvič E.L.I.S.A. RC BOVINO analize, ko smo dodali raztopino stop. Standardi priloženi v testu so nam omogočili, da smo preverili pravilnost izvedbe analize. Epruветam katerim je bila dodana raztopina stop smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini 450 nm s spektrofotometrom Elx808 (slika 4). Prva epruveta v mikrotitrski plošči je bila prazna. Ta nam je služila kot slepa meritev. Slepo meritev smo odšteli od vrednosti meritev ostalih vzorcev. Rezultati z odštetim slepim vzorcem so podani v preglednici 6. V prilogi A so navedeni rezultati surovih meritev RC BOVINO standardov in meritve slepih vzorcev.

Rezultate v preglednici 6 smo uporabili za izdelavo kalibracijske krivulje in določili meje zaupanja za absorbanco pri stopnji tveganja 5 % ($\alpha = 0,05$), v odvisnosti od koncentracije RC BOVINO standardov. Kalibracijska krivulja je prikazana na sliki 5 in je podana z naslednjo regresijsko povezavo:

$$y = ax + bx^2 + cx^3 + e, \quad a = 0,2208, b = - 0,0171, c = 0,0006$$

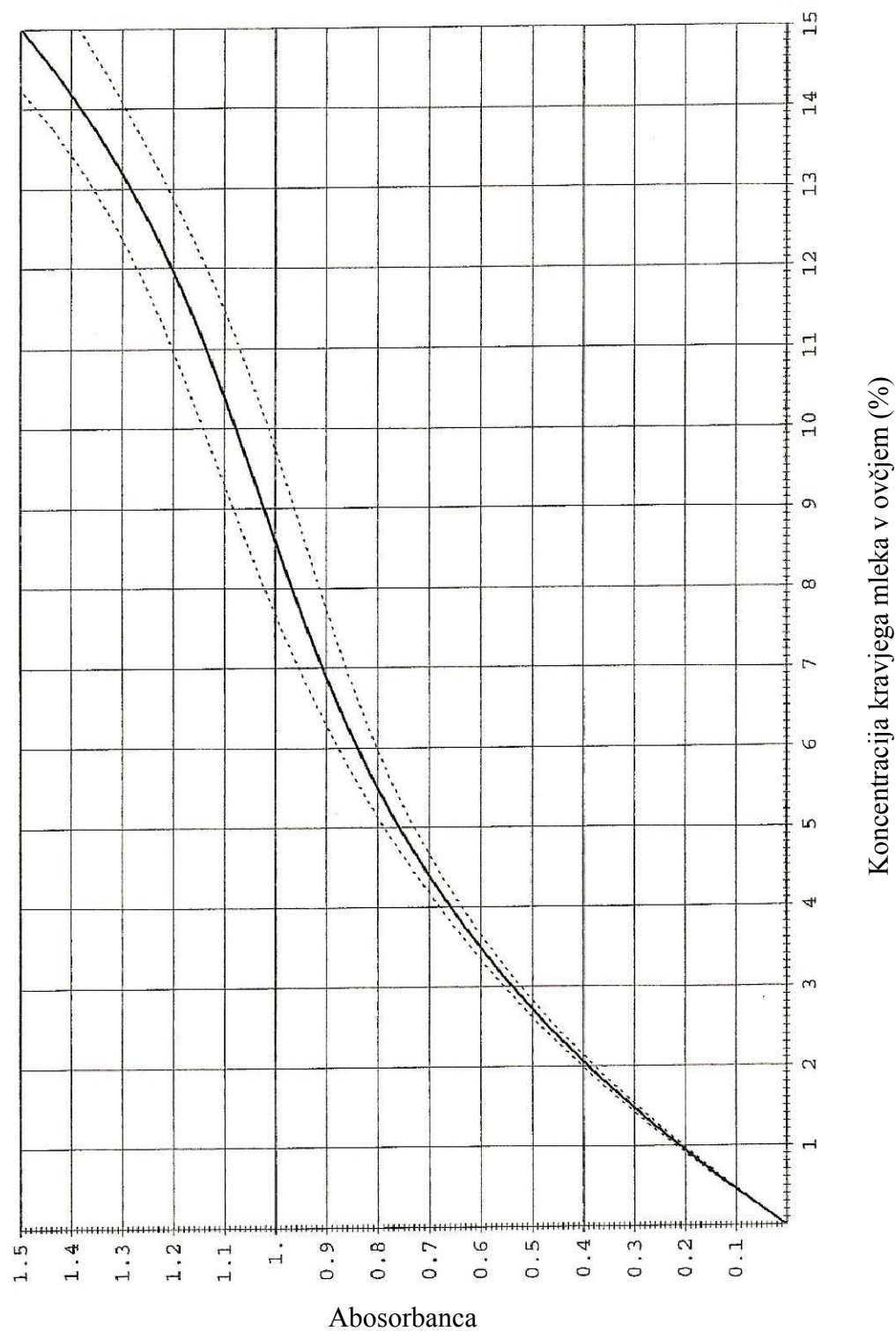
Iz kalibracijske krivulje standardov pri izmerjeni absorbanci lahko odčitamo koncentracijo kravjega mleka v ovčjem pri neznanih koncentracijah potvorjenega mleka.

Preglednica 6: Meritve RC BOVINO standardov z odštetim slepim vzorcem

Meritve	Paralelka meritev									
	S ₀		S ₁		S ₅		S ₁₀		S ₁₅	
1	0,064	0,100	0,217	0,246	0,812	0,758	1,306	1,219	1,755	1,687
2a*	0,094	0,087	0,190	0,264	0,715	0,737	1,133	1,289	1,653	1,634
2b*	0,094	0,087	0,188	0,268	0,713	0,733	1,118	1,258	1,620	1,639
3a*	0,042	0,045	0,205	0,212	0,645	0,700	0,953	0,908	1,322	1,159
3b*	0,041	0,046	0,203	0,181	0,625	0,690	0,977	0,955	1,335	1,174
4a*			0,205						1,302	
4b*			0,205						1,318	
5a*	0,018		0,211		0,781		1,113		1,374	
5b*	0,018		0,216		0,771		1,116		1,400	
6a*	0,039	0,037	0,224	0,199	0,841	0,779	1,150	0,972	1,673	1,545
6b*	0,039	0,037	0,219	0,197	0,836	0,795	1,141	0,985	1,669	1,537

*Absorbanca je bila izmerjena 2x, a-prva meritev, b-druga meritev, S₀ – 0 % dodanega kravjega mleka, S₁ – 1 % dodanega kravjega mleka, S₅ – 5 % dodanega kravjega mleka, S₁₀ – 10 % dodanega kravjega mleka, S₁₅ – 15 % dodanega kravjega mleka, n = 6

Kalibracijsko krivuljo (slika 5) uporabimo tudi za preverjanje pravilnosti izvajanja analize pri rutinskem delu. Ob vsaki uporabi sendvič E.L.I.S.A. testa preverimo standardne vrednosti, tako da uporabimo standarde znane koncentracije kravjega v ovčjemu mleku. Odčitano absorbanco pričakujemo v območju mej zaupanja prikazanih na sliki 5. V primeru odstopanja meritev, preverimo možne vzroke napak in postopek analize ponovimo.



Slika 5: Kalibracijska krivulja in meja zaupanja za absorbenco v odvisnosti od koncentracije kravjega mleka v ovčjem za standarde RC BOVINO testa ($\alpha = 0,05$)

Potvorbe mešanic mleka od več kot 15 % kravjega mleka dodanega ovčjemu so lahko odkrite z sendvič E.L.I.S.A. RC BOVINO testom, vendar pa rezultati ne ustrezajo kvantitativnim kriterijem. To pa zato, ker je v epruvetah omejeno število receptorjev, ki vežejo antigen. Sendvič E.L.I.S.A. RC BOVINO test je narejen za direktno odkrivanje potvorbe ovčjega mleka z 1 % do 15 % kravjega mleka. Za višje količine kravjega mleka v vzorcu smo uporabili primerno redčitev vzorca, kot jo navaja proizvajalec, v tehničnem poročilu RC BOVINO KIT Z.E.U. – INMUNOTEC S.L., Španija in upoštevali korekcijski faktor.

Da bi preverili vpliv geografske raznolikosti na potek kalibracijske krivulje smo pripravili svoje lastne standarde in potek kalibracijske krivulje primerjali s kalibracijsko krivuljo dobljeno z RC BOVINO standardi. Meritve so bile opravljene takoj, ko je v epruvete dodana raztopina stop, s spektrofotomerom Elx808. Absorbanco slepega vzorca smo odšteli od absorbance vzorcev. Podatki so podani v preglednici 7. Absorbanco smo merili pri koncentracijah mešanic mleka 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 35 % in 45 %, ter pri čistem kravjem in ovčjem mleku. Potvorbe ovčjega mleka s kravjim od 0 % do 15 % smo redčili v razmerju 1/100, pri takem redčenju pri odčitku rezultata koncentracije kravjega v ovčjem mleku iz kalibracijske krivulje ni korekcijskega faktorja. Pri koncentraciji večji od 15 % do 45 % je bilo redčeno v razmerju 1/300. Pri tem smo postopali tako, da smo iz kalibracijske krivulje odčitano koncentracijo kravjega v ovčjem mleku, pri merjeni absorbanci, pomnožili s korekcijskim faktorjem 3. Čisto 100 % kravje mleko je bilo redčeno v razmerju 1/1000. Upoštevali smo korekcijski faktor 10. Da bi ocenili vpliv redčitve smo pri 5 % in 15 % potvorbah ovčjega mleka opravil meritve vzorcev z redčenjem v razmerju 1/100 in 1/300. Vsi rezultati pripravljenih vzorcev, z odštetim slepim vzorcem so zajeti v preglednici 7. V prilogi B so navedeni rezultati surovih meritev pripravljenih vzorcev in meritve slepih vzorcev. Za določitev kalibracijske krivulje samo uporabili le pripravljene vzorce, ki so bili potvorjeni z 0 %, 1 %, 5 %, 10 % in 15 % dodanega kravjega mleka ovčjemu in redčeni v razmerju 1/100. Slednji so zajeti v preglednici 8. Rezultati v preglednici 8 so bili uporabljeni za izdelavo kalibracijske krivulje in meje zaupanja absorbance pri stopnji tveganja 5 % ($\alpha = 0,05$), v odvisnosti od koncentracije kravjega mleka v ovčjem za lastno pripravljene vzorce. Kalibracijska krivulja je prikazana na (sliki 6) in je podana z naslednjo regresijsko povezavo:

$$y = ax + bx^2 + cx^3 + e, \quad a = 0,2569, b = - 0,0247, c = 0,0009$$

Zaradi večje praktičnosti in enostavnosti uporabe kalibracijskih krivulj je na sliki 7 in 8 prikazana koncentracija kravjega mleka v ovčjem, v odvisnosti od absorbance, kot neodvisna spremenljivka, z pripadajočimi mejami zaupanja pri 5 % tveganju ($\alpha = 0,05$). Regresijska povezava za RC BOVINO standarde je prikazana na sliki 7 in je podana z naslednjo povezavo:

$$y = ax + bx^2 + cx^3 + dx^4 + e, \quad a = 4,4402, b = - 2,9038, c = 13,5500, d = - 6,0874$$

Iz slike 3 je razvidno, da je pri večkratnih meritvah absorbance standardov v območju od 0 % do 15 % dodanega kravjega mleka, dosežen povprečni koeficient variacije 9 %, kar se sklada z oceno RC BOVINO testa, kot jo navaja proizvajalec (Z.E.U.-INMUNOTEC S.L., Španija).

Preglednica 7: Meritve absorbance pripravljenih vzorcev z odštetim slepim vzorcem

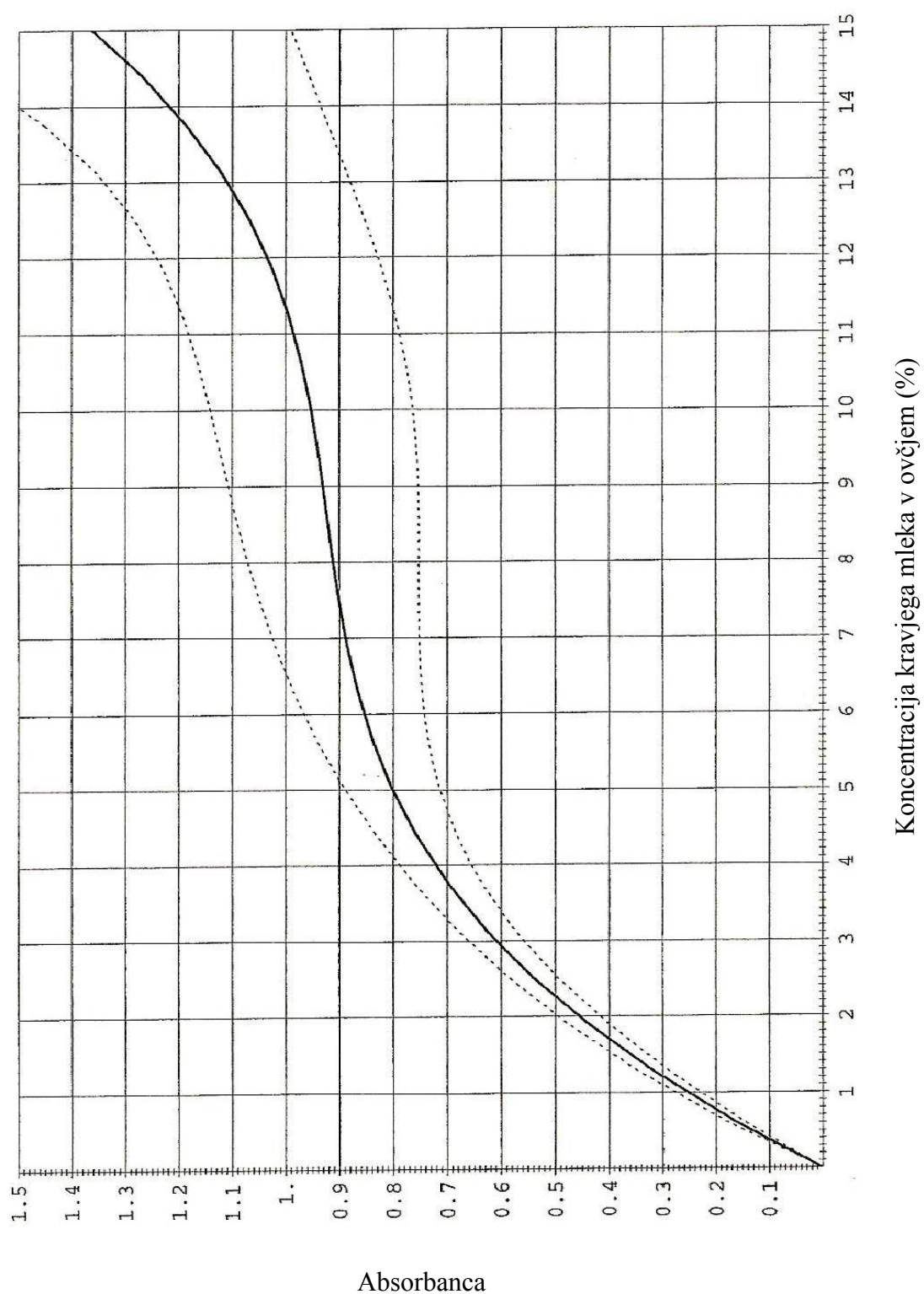
M	Paralelka meritev													
	V ₀	V ₁	V _{5a}	V _{5b}	V ₁₀	V _{15a}	V _{15b}	V ₂₀	V ₂₅	V ₃₅	V ₄₅	V ₁₀₀		
1	0,033	0,051			1,054	1,054								
2a*	0,061	0,067			0,985	0,938								
2b*	0,062	0,067			0,977	0,948								
3a*		0,148	0,642	0,678		1,448	1,498	0,740	0,721	0,665	0,876	1,049	1,133	0,877
3b*		0,176	0,658	0,701		1,499	1,514	0,764	0,737	0,688	0,902	1,060	1,162	0,902
4a*	0,066	0,069	0,376	0,943		1,463	1,656	1,127	0,956	1,066	1,086	1,274	1,262	1,422
4b*	0,041	0,107	0,380	0,911		1,478	1,667	1,181	0,976	1,106	1,071	1,265	1,308	1,421
5a*	0,058	0,197		0,590		1,043		0,437	0,417	0,626	0,620	0,461	0,550	0,921
5b*	0,057	0,195		0,589		1,056		0,444	0,422	0,584	0,631	0,623	0,468	0,927
6a*	0,025	0,171		0,695		1,236		0,649	0,604	0,819	0,838	0,850	0,831	1,169
6b*	0,025	0,173		0,704		1,248		0,652	0,513	0,826	0,850	0,854	0,842	1,202
7a*	0,051	0,046	0,226	0,744		1,130	1,127	0,543	0,837	0,795	0,725	1,014	1,006	1,247
7b*	0,051	0,047	0,226	0,736		1,125	1,137	0,538	0,833	0,783	0,723	1,012	0,993	1,238

* Absorbance je bila merjena 2x, a – prva meritev, b – druga meritev, M – meritve, V₀ – 0% dodanega kravjega mleka, redčitev 1/100, V₁ – 1% dodanega kravjega mleka, redčitev 1/100, V_{5a} – 5% dodanega kravjega mleka, redčitev 1/300, V_{5b} – 5% dodanega kravjega mleka, redčitev 1/300, V₁₀ – 10% dodanega kravjega mleka, redčitev 1/100, V_{15a} – 15% dodanega kravjega mleka, redčitev 1/300, V_{15b} – 15% dodanega kravjega mleka, redčitev 1/300, V₂₀ – 20% dodanega kravjega mleka, redčitev 1/300, V₂₅ – 25% dodanega kravjega mleka, redčitev 1/300, V₃₅ – 35% dodanega kravjega mleka, redčitev 1/300, V₄₅ – 45% dodanega kravjega mleka, redčitev 1/300, V₁₀₀ – 100% dodanega kravjega mleka, redčitev 1/1000, n = 7

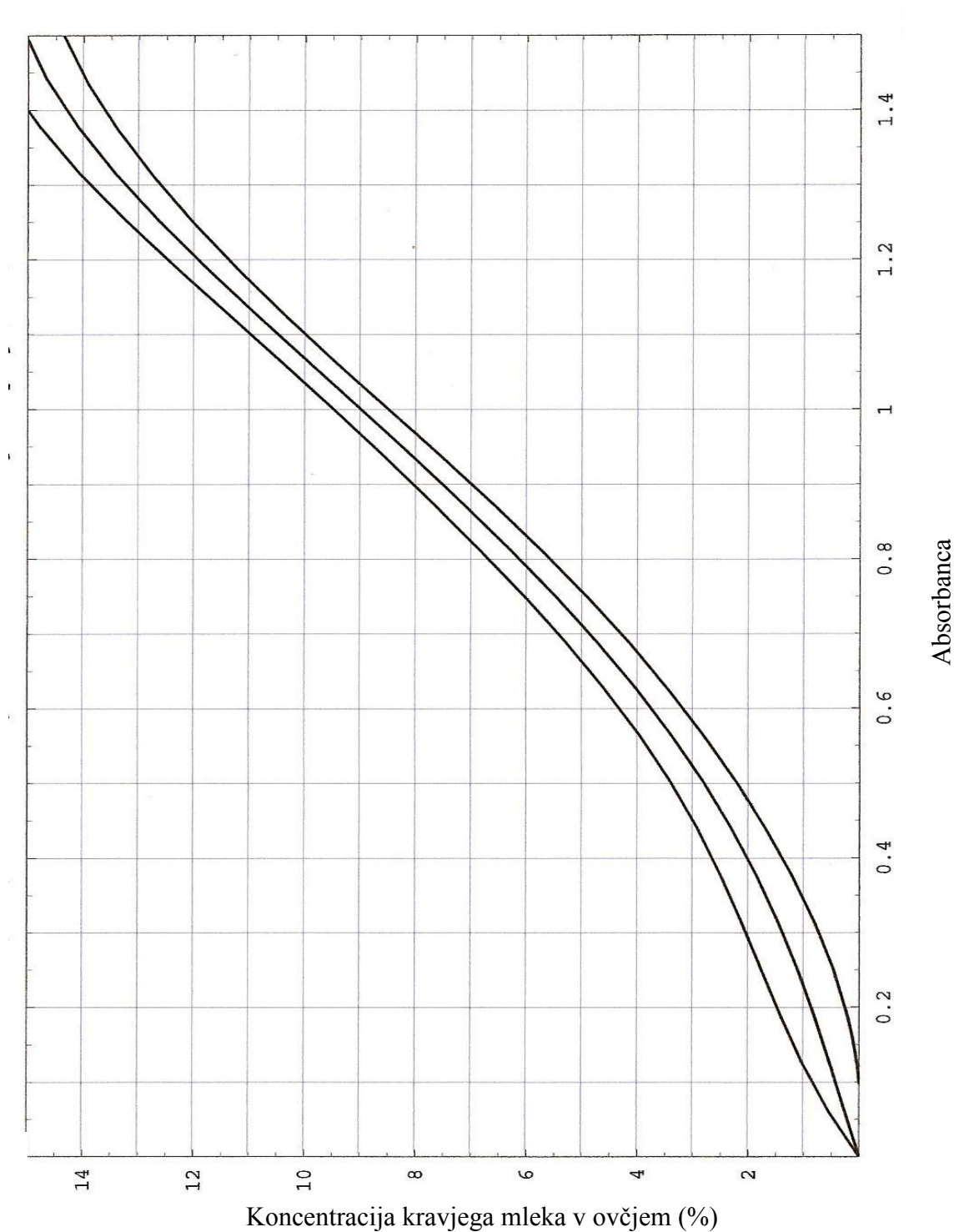
Preglednica 8: Meritve absorbance pripravljenih vzorcev na osnovi katerih je bila izdelana kalibracijska krivulja

Meritve	Paralelka meritev									
	V ₀		V ₁		V ₅		V ₁₀		V ₁₅	
1	0,033	0,051					1,054	1,054		
2a*	0,061	0,067					0,985	0,938		
2b*	0,062	0,067					0,977	0,948		
3a*	0,066	0,069	0,376	0,370	0,943	0,929			1,463	1,656
3b*	0,041	0,107	0,380	0,350	0,911	0,926			1,478	1,667
4a*	0,058		0,197		0,590		0,784		1,043	
4b*	0,057		0,195		0,589		0,774		1,056	
5a*	0,025		0,171		0,695		1,004		1,236	
5b*	0,025		0,173		0,704		1,025		1,248	
6a*	0,051	0,046	0,226	0,221	0,744	0,719	1,130	1,127	1,304	1,267
6b*	0,051	0,047	0,226	0,219	0,736	0,716	1,125	1,137	1,301	1,272

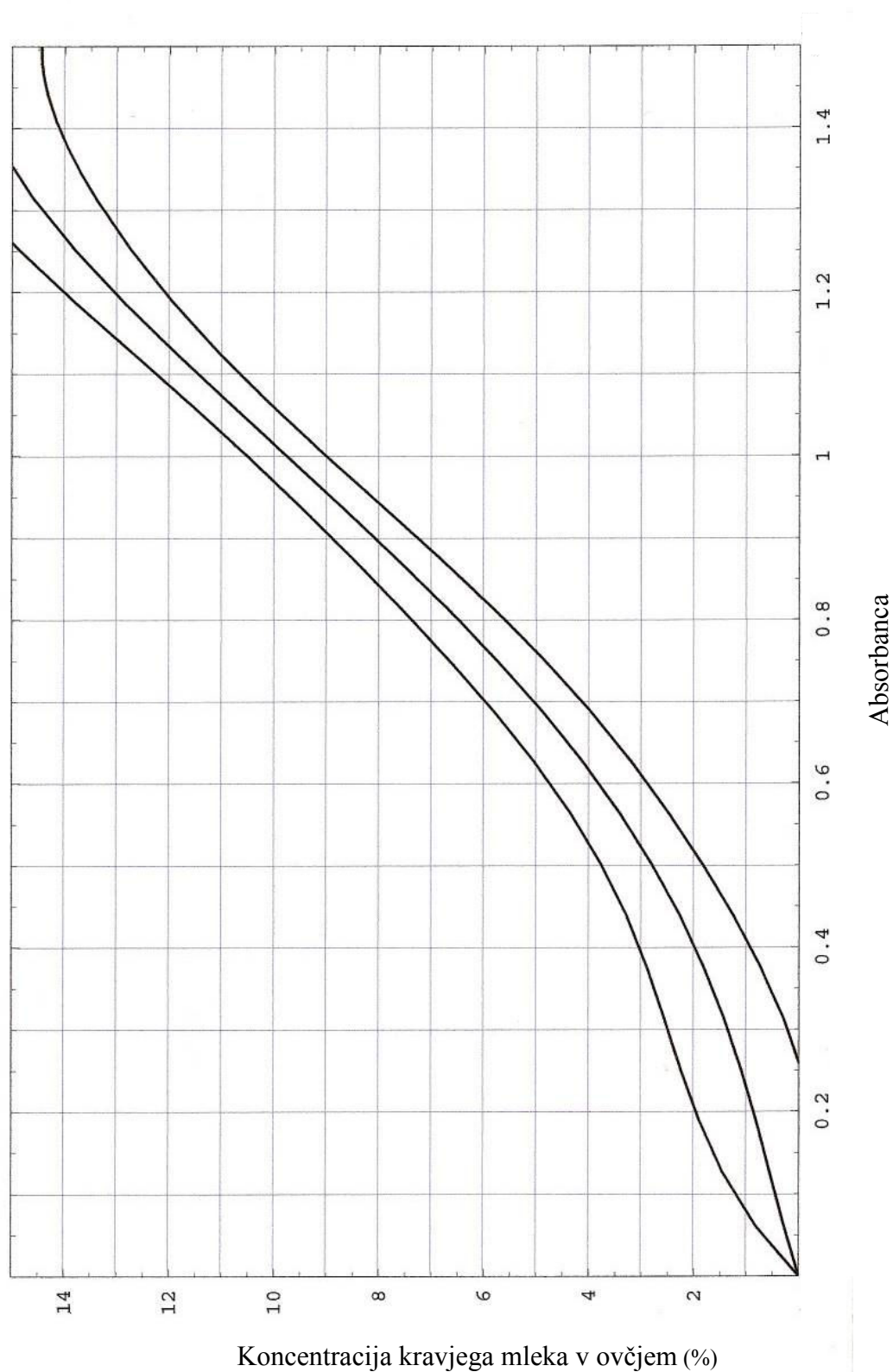
* Absorbanca je bila merjena 2x, a-prva meritev, b-druga meritev, V₀ – 0 % dodanega kravjega mleka, redčitev 1/100, V₁ – 1 % dodanega kravjega mleka, redčitev 1/100, V₅ – 5 % dodanega kravjega mleka, redčitev 1/100, V₁₀ – 10 % dodanega kravjega mleka, redčitev 1/100, V₁₅ – 15 % dodanega kravjega mleka, redčitev 1/100, n=6



Slika 6: Kalibracijska krivulja in meja zaupanja za absorbanco v odvisnosti od koncentracije za pripravljanje vzorce ($\alpha = 0,05$)



Slika 7: Kalibracijska krivulja in meje zaupanja za koncentracijo kravjega mleka v ovčjem v odvisnosti od absorbance za standarde RC BOVINO testa ($\alpha = 0,05$)



Slika 8: Kalibracijska krivulja in meje zaupanja za koncentracijo kravjega mleka v ovčjem v odvisnosti od absorbance za pripravljene vzorce ($\alpha = 0,05$)

Iz preglednice 9 zbranih povprečnih vrednosti prvih in drugih meritev ter paralelnih meritev pripravljenih vzorcev vidimo variiranje med meritvami absorbance v različnih dneh izvedbe analiz, znotraj skupin. Kljub temu so posamezne meritve znotraj skupin v istem območju in ob upoštevanju teh vrednosti lahko predvidimo koncentracijo kravjega mleka v ovčjem, glede na znano potvorbo pripravljenih vzorcev iz kalibracijske krivulje standardov (slika 5). Razlogi odstopanj meritev med različnimi dnevi so lahko v kakovosti izhodiščnih vzorcev mleka.

Preglednica 9: Povprečne vrednosti prve in druge meritve ter paralelnih meritev

M	Povprečje vrednosti prve in druge meritve in praralelnih meritev											
	V ₀	V ₁	V _{5a}	V _{5b}	V ₁₀	V _{15a}	V _{15b}	V ₂₀	V ₂₅	V ₃₅	V ₄₅	V ₁₀₀
1	0,042				1,054							
2	0,064				0,962							
3		0,157	0,670	0,284		1,490	0,741		0,783	1,101	1,047	
4	0,071	0,369	0,927	0,458		1,566	1,060		1,082	1,277	1,421	
5	0,058	0,196	0,590	0,203	0,784	1,050	0,430	0,605	0,543	0,637	0,921	
6	0,025	0,172	0,700	0,289	1,005	1,242	0,605	0,833	0,844	1,016	1,186	
7	0,049	0,223	0,729	0,297	1,130	1,286	0,590	0,757	1,006	1,292	1,277	0,979

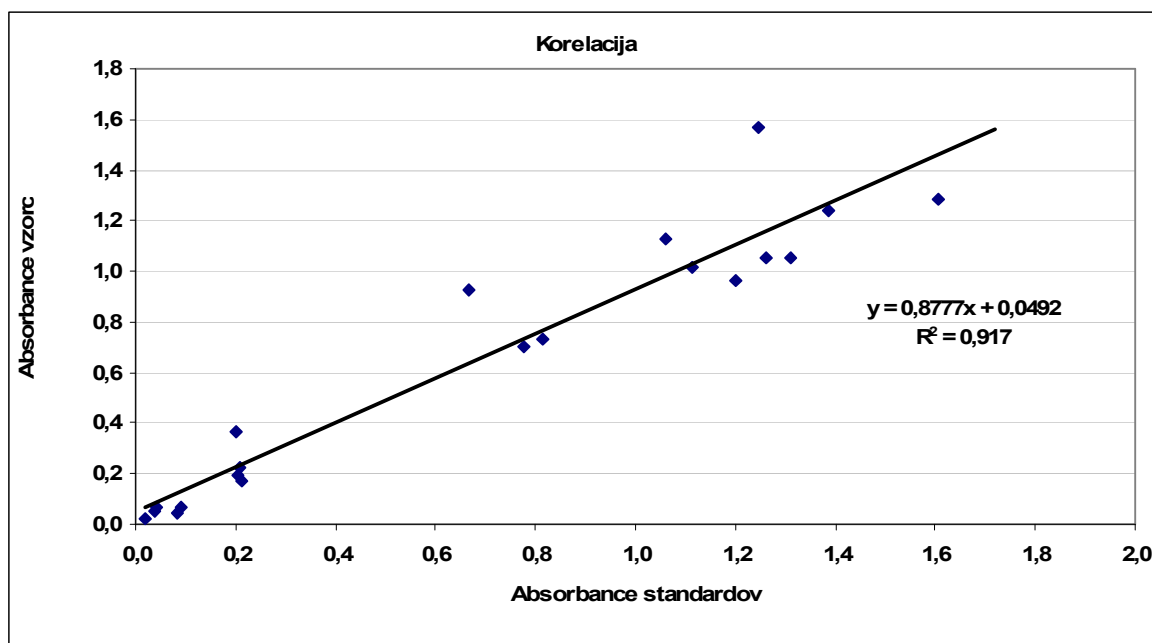
V₀ – 0% dodanega kravjega mleka, redčitev 1/100, V₁ – 1% dodanega kravjega mleka, redčitev 1/100, V_{5a} – 5% dodanega kravjega mleka, V_{5b} – 5% dodanega kravjega mleka, redčitev 1/300, V₁₀ – 10% dodanega kravjega mleka, redčitev 1/100, V_{15a} – 15% dodanega kravjega mleka, redčitev 1/100, V_{15b} – 15% dodanega kravjega mleka, redčitev 1/300, V₂₀ – 20% dodanega kravjega mleka, redčitev 1/300, V₂₅ – 25% dodanega kravjega mleka, redčitev 1/300, V₃₅ – 35% dodanega kravjega mleka, redčitev 1/300, V₄₅ – 45% dodanega kravjega mleka, redčitev 1/300, V₁₀₀ – 100% dodanega kravjega mleka, redčitev 1/1000, n = 7

V preglednici 10 so povprečne meritve za izračun korelacije med absorbancami standardov in pripravljenih vzorcev. Iz slike 9 je razvidna dobra korelacija med meritvami.

Preglednica 10: Meritve uporabljene za izračun korelacije med merjenimi standardi in pripravljenimi vzorci

Meritev	Povprečne meritve standardov in pripravljenih vzorcev									
	S ₀	V ₀	S ₁	V ₁	S ₅	V ₅	S ₁₀	V ₁₀	S ₁₅	V ₁₅
1	0,082	0,042	0,232		0,785		1,263	1,054	1,721	
2	0,091	0,064	0,228		0,725		1,200	0,962	1,637	
3	0,044	0,071	0,200	0,369	0,665	0,927	0,948		1,248	1,566
4		0,058	0,205	0,196		0,590		0,779	1,310	1,050
5	0,018	0,025	0,214	0,172	0,776	0,700	1,115	1,015	1,387	1,242
6	0,038	0,049	0,210	0,223	0,813	0,729	1,062	1,130	1,606	1,286

S₀ – 0 % dodanega kravjega mleka, V₀ – 0 % dodanega kravjega mleka, redčitev 1/100, S₁ – 1 % dodanega kravjega mleka, V₁ – 1 % dodanega kravjega mleka, redčitev 1/100, S₅ – 5 % dodanega kravjega mleka, V₅ – 5 % dodanega kravjega mleka, redčitev 1/100, S₁₀ – 10 % dodanega kravjega mleka, V₁₀ – 10 % dodanega kravjega mleka, redčitev 1/100, S₁₅ – 15 % dodanega kravjega mleka, V₁₅ – 15 % dodanega kravjega mleka, redčitev 1/100, n=6



Slika 9: Korelacija med vrednostmi absorbance standardov in pripravljenih vzorcev

4.2 POVEZAVE MED LASTNOSTMI IN KONCENTRACIJO KRAVJEGA MLEKA V OVČJEM

V tem poglavju prikazujemo izračune korelacijskih koeficientov med lastnostmi mleka; vsebnostjo maščobe, beljakovin, suhe snovi, suhe snovi brez maščobe, vrednosti pH, zmrziščno točko ter gostoto glede na koncentracijo kravjega mleka v ovčjem. Korelacije med lastnostmi in koncentracijo kravjega mleka v ovčjem so prikazane v preglednici 11. Visoka korelacija med koncentracijo kravjega mleka v ovčjem je bila ugotovljena pri beljakovinah mešanic mleka ($r = -0,971$), sledita suha snov brez maščobe ($r = -0,960$) in zmrziščna točka ($r = 0,852$). Nižje korelacije so ugotovljene pri gostoti ($r = -0,626$), maščobi ($r = -0,586$), laktozi ($r = 0,584$), najmanjša pa je povezava med vrednostjo pH ($r = 0,430$) in koncentracijo kravjega mleka v ovčjem.

Preglednica 11: Korelacijski koeficienti med lastnostmi in koncentracijo kravjega mleka v ovčjem

Koncentracija kravjega mleka v ovčjem	<i>r</i>
Maščoba (%)	-0.586
Beljakovine (%)	-0.971
Laktoza (%)	0.584
SS (%)	-0.749
SSMB (%)	-0.960
ZT (°C)	0.852
pH	0.430
ρ (g/ml)	-0.626

r_{ij} – korelacijski koeficient, Maščoba (%) – koncentracija maščob, Beljakovine (%) – koncentracija beljakovin, Laktoza (%) – koncentracija laktoze, SS (%) – koncentracija suhe snovi, SSMB (%) – koncentracija suhe snovi brez maščobe, ZT – zmrziščna točka, pH – vrednost pH, ρ- gostota

Osnovni podatki, ki so bili uporabljeni za izračun korelacijskih koeficientov v sestavi mešanic mleka glede na koncentracijo kravjega mleka v ovčjem so podani v prilogi C. Določitve fizikalnih lastnosti uporabljenih za izračun korelacijskih koeficientov mešanic mleka glede na koncentracijo kravjega mleka v ovčjem so podani v prilogi D.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Hurly in sod. (2006) so proučevali občutljivost sendvič E.L.I.S.E. testa za ugotavljanje potvorb, na mehkem ovčjem, kozjem in bivoljem siru z dodatkom kravjega mleka in svežimi vzorci mešanic mleka. Mešanice mleka so redčili v razmerju 1/500. V teoriji sendvič E.L.I.S.A. test ne more zaznati potvorb ovčjega, kozjega ali bivoljega mleka z drugimi vrstami mleka (sojino mleko,...), v toplotno obdelanem mleku in mleku v prahu. Avtorji tudi dvomijo, da bi se taki proizvodi uporabljali za potvorbo mlečnih izdelkov v mlekarskem sektorju, ker bi značilno spremenili okus mlečnega izdelka.

Referenčna metoda, ki jo je določila Evropska komisija zazna potvorbo v mejah detekcije 1 %, ta meja detekcije zadošča za preverjanje avtentičnosti proizvoda (Uredba Komisije, 2001). Sendvič E.L.I.S.A. test v poskusu, ki so ga opravili Hurly in sodelavci (2006), zazna potvorbo ovčjega in bivoljega mleka s kravjim v detekcijskih mejah 0,001% za potvorbo kozjega s kravjim mlekom pa 0,01%. Meja detekcije potvorbe v mehkem siru je 0,001% za kozji sir in 0,01% za ovčji in bivolji sir. Sendvič E.L.I.S.A. se lahko razvije v uporabno metodo za rutinsko preverjanje potvorbe v mlečnih proizvodih.

Avtorji so tudi primerjali sendvič E.L.I.S.A. test z DNA metodo. DNA metode uporabljajo PCR tehniko za odkrivanje kravjih ali kozjih genov iz somatskih celic in so po avtorjevih mnenjih boljše od sendvič E.L.I.S.A. metode, ker so bolj občutljive, vendar zahtevajo strokovno usposobljen kader. Za preverjanje avtentičnosti in kontrolo prehranskih proizvodov ima sendvič E.L.I.S.A. test prednost pred DNA metodami (PCR tehnika), ker je bolj praktičen za rutinsko uporabo na terenu. Test odlikuje; hitrost analize, uporaba majhnega volumna vzorca možnost analize velikega števila vzorcev in malo usposabljanja. DNA metode lahko samo zaznajo potvorbo ovčjega, kozjega in bivoljega mleka z kravjim mlekom, sendvič E.L.I.S.A. test pa kvantitativno določi koncentracijo kravjega mleka v vzorcu.

Uporabnost E.L.I.S.A. metode v primerjavi z drugimi metodami navaja tudi Mayer (2005). Opozarja na možnost napačne ocene negativnih rezultatov pri odkrivanju potvorbe mleka z E.L.I.S.A. testom na osnovi zaznavanja imunoglobulinov IgG, zaradi uporabe toplotno obdelanega kravjega mleka ali kazeinativ pri mešanju z ovčjim mlekom. Avtor ocenjuje tudi druge metode za odkrivanje dodatkov mleka drugih živalskih vrst, kot so elektroforeza, kromatografija, DNA metode (PCR tehnika). Večina metod temelji na analizah beljakovinskih frakcij. Za to moramo pri primerjavi rezultatov analiz vedeti, na kateri osnovi deluje uporabljena metoda in poznati občutljivost metod.

Avtorji člankov v večini svojih raziskav preverjajo občutljivost sendvič E.L.I.S.A. testa. Določajo najnižjo mejo detekcije kravjega mleka v ovčjem, kozjem in bivoljem mleku in sirih. V naši diplomski nalogi pa smo preverili kvantitativno zanesljivost odčitka absorbance glede na koncentracijo kravjega mleka v ovčjem.

Iz kalibracijskih krivulj standardov in pripravljenih vzorcev, izdelanih v našem poskusu je razvidno, da ima kalibracijska krivulja standardov ožjo mejo zaupanja, kalibracijska krivulja z vzorci, ki smo jih sami pripravili, pa širšo mejo zaupanja. Razlog je lahko v geografski razliki, kakor tudi, da je za izdelavo RC BOVINO standardov zagotovljenih v testu, bilo uporabljeno večje število vzorcev mleka iz različnih področij Španije. Pri pripravi vzorcev, ki smo jih sami pripravili pa smo uporabili manjše število naključno izbranih vzorcev. Glede na odstopanja povprečnih vrednosti merjenih absorbanc standardov in pripravljenih vzorcev v koncentracijah 0 %, 1 %, 5 %, 10 % in 15 % dodanega kravjega mleka ovčjemu, priporočamo uporabo standardov priloženih v testu ob vsaki izvedbi analize vzorcev. Za lažje delo z neznanimi vzorci priporočamo uporabo kalibracijske krivulje standardov, kjer je koncentracija kravjega mleka v ovčjem odvisna spremenljivka, vrednost odčitane absorbance pa neodvisna spremenljivka (slika 7). Na osnovi poteka kalibracijske krivulje standardov (slika 5) ocenjujemo najbolj zanesljiv odčitek pri koncentraciji kravjega mleka v ovčjem od 5 % do 12 %. V temu območju je bilo tudi najmanjše odstopanje koeficienta variacije od povprečne vrednosti (slika 3).

5.2 SKLEPI

Sendvič E.L.I.S.A. test je primeren za rutinsko preverjanje koncentracije kravjega mleka v ovčjem v območju od 0 % do 15 %. V primeru višjih koncentracij dodanega kravjega mleka ovčjemu upoštevamo ustrezne redčitve in korekcijske faktorje.

Test odlikuje; hitrost analize, uporaba majhnega volumna vzorca in možnost analize velikega števila vzorcev.

Na osnovi poteka kalibracijskih krivulj standardov in pripravljenih vzorcev ter izračunanih mej zaupanja, priporočamo za oceno potvorb, uporabo kalibracijske krivulje standardov RC BOVINO testa.

Pri večkratnih meritvah absorbance standardov v območju od 0 % do 15 % dodanega kravjega mleka, je bil dosežen povprečni koeficient variacije 9 %.

Največjo korelacijo med koncentracijo kravjega mleka v ovčjem pri fizikalnih lastnostih smo dobili pri zmrziščni točki mešanic mleka ($r = 0,852$). Pri kemijskih lastnostih mešanic mleka se pričakovano najbolj odraža potvorba pri spremenjeni vrednosti beljakovin ($r = -0,971$) in suhi snovi brez maščobe ($r = -0,960$).

6 POVZETEK

V diplomski nalogi smo preverili učinkovitost uporabe hitre imunoencimske metode E.L.I.S.A. za odkrivanje potvorb ovčjega mleka s kravjim.

Uporabili smo sendvič E.L.I.S.A. RC BOVINO test (proizvajalec Z.E.U. – INMUNOTEC S.L., Španija), ki je ena od metod za odkrivanje potvorb ovčjega in kozjega mleka, ter sirov s kravjim mlekom, ki se uporablja v mlekarski industriji. Sendvič E.L.I.S.A. RC BOVINO test je zasnovan na ugotavljanju koncentracij kravjih imunoglobulinov IgG v vzorcu mleka. Raven vsebnosti imunoglobulinov in drugih proteinov lahko variira in je odvisen od psihološkega, zdravstvenega stanja živali, prehrane in laktacije. Metoda omogoča kvalitativno in kvantitativno določanje koncentracije kravjega mleka pri potvorbi ovčjega in kozjega mleka.

Vzorci ovčjega mleka smo jemali v juniju, juliju in avgustu. Vsi vzorci mleka so bili sveži, ohlajeni ter brez dodanih konzervansov. Pri pripravljenih vzorcih z ustrezno koncentracijo dodanega kravjega mleka v ovčje mleko smo določili vsebnost maščobe, beljakovin, laktoze, suhe snovi, suhe snovi brez maščobe (metoda infra rdeče spektrometrije), zmrziščno točko (termistor krioskopska metoda), izmerili vrednost pH, gostoto mešanic mleka, ter iz dobljenih podatkov izračunali korelacije med fizikalno kemijskimi parametri, glede na koncentracijo kravjega mleka v ovčjem. Vzorci za testiranje so bili pripravljeni v Laboratoriju za mlekarstvo, Biotehniške fakultete.

Za izdelavo kalibracijske krivulje za oceno potvorbe ovčjega mleka s kravjim, smo uporabili RC BOVINO standarde in lastno pripravljene standardizirane vzorce z dodajanjem deleža kravjega k ovčjem mleku v koncentraciji od 0 % do 15 %. RC BOVINO test smo uporabili tudi za določanje koncentracij kravjega mleka pri 20 %, 25 %, 35 %, 45 % potvorbah in pri čistem kravjem mleku. Zato smo upoštevali primerno redčitev in korekcijski faktor.

7 VIRI

- Bajt N., Golc-Teger S. 2005. Izdelava jogurta, skute in sira. Ljubljana, Kmečki glas
- Blejc M. 1981. Uvod v statistiko. Ponatis 3. izdaje. Ljubljana, Univerza Edvarda Kardelja v Ljubljani, Ekonomska fakulteta Borisa Kidriča: 315-333
- Bylund G. 1995. Dairy processing handbook. Lund, Sweden, Processing Systems AB
- Dorđević J. 1987. Mleko. Hemija i fizika mleka. Beograd, IRO Naručna Knjiga
- Elx808 Operator's Manual. 2004. Vermont, BIO-TEK® Instruments: 1-7
- Golc-Teger S. 1995. Parametri kakovosti mleka in mlečnih izdelkov. Sodobno kmetijstvo, 28, 4: 191-193
- Grubbs, F.E. 1969. Procedures for detecting outlying observations in samples. Technometrics, 11: 1-21
- Hurley I.P., Coleman R.C., Ireland H.E., Williams J.H.H. 2004. Measurement of Bovine IgG by Indirect Competitive E.L.I.S.A. as a Means of Detecting Milk Adulteration. Journal of Dairy Science, 87: 543-549
- Hurley I.P., Coleman R.C., Ireland H.E., Williams J.H.H. 2006. Use of sandwich IgG E.L.I.S.A. for the detection and quantification of adulteration of milk and soft cheese. International Dairy Journal, 16: 805-812
- ISO 11095. Linear calibration using reference materials. 1996: str. 29
- Kendall M.G., Stuart A. 1973. The advances theory of statistics II. London, 28.22, 28.23
- Mayer H.K. 2005. Milk species identification in cheese varieties using elektrophoretic, chromatographic and PCR techniques. International Dairy Journal, 15: 595-604
- Miletić S. 1994. Mljeko i mlječni proizvodi. Zagreb, Hrvatsko mljekarsko društvo: 5-60
- Moatsou G., Anifantakis E. 2003. Recent developments in antibody-based analytical methods for the differentiation of milk from different species. International Journal of Dairy Technology, 56: 133-138
- Pravilnik o elementih za oblikovanje odkupne cene kravjega mleka. Ur.l. RS št. 107-11726/00
- RC BOVINO KIT. E.L.I.S.A. assay for the cow's milk detection in goat and sheep's milk or cheese. Technical report. Zaragoza (Spain). Z.E.U.-INMUNOTEC, S.L.: 25 str.

Rogelj I. 1996. Lastnosti kozjega in ovčjega mleka in njihov vpliv na predelavo. V: Možnosti razvoja reje drobnice v Sloveniji, Postojna, 27.-29. nov. 1996. Slovenj Gradec, Kmetijska založba: 145-150

SIST EN SI 707. Mleko in mlečni proizvodi – navodila za vzorčenje. 1999: 37 str.

Tratnik L. 1998. Mlijeko – tehnologija biokemija i mikrobiologija. Zagreb, Hrvatska mljekarska udruga: 2-80

Uredba Komisije (ES) št. 213/2001 z dne 9. januar 2001 o določitvi podrobnih pravil za izvajanje Uredbe Sveta (ES) št. 1255/1999 o analitskih metodah in ocenjevanju kakovosti mleka in mlečnih proizvodov ter dopolnitvenih uredb (ES) št. 2771/1999 in (ES) št. 2799/1999 (neobjavljeno)

ZAHVALA

Posebno zahvalo namenjam mentorici doc. dr. Stanislavi Golc Teger in doc. dr. Karmen Godič Torkar za vodenje, strokovno pomoč, nasvete in vzpodbudo pri izdelavi naloge.

Prav tako se zahvaljujem recenzentki, prof dr. Ireni Rogelj in predsedniku komisije, prof dr. Jurij Poharju za pregled naloge.

Zahvaljujem se ga. Sabini Knehtl za njeno prijaznost in vso pomoč tekom študija.

Zahvala tudi gospe Karmeli Malinger in Nataši Siard za pomoč pri izdelavi končne podobe mojega dela.

Zahvala družinskim članom, mojemu fantu Vojkotu in prijateljem, ki so me vzpodbujali v času študija.

Zahvaljujem se vsem, ki ste kakorkoli sodelovali in mi pomagali pri izdelavi diplomskega dela.

PRILOGE

Priloga A:

Rezultati surovih meritev RC BOVINO standardov in meritve slepih vzorcev

Meritve		Paralelka meritev									
	V _s	S ₀		S ₁		S ₅		S ₁₀		S ₁₅	
1	0,037	0,101	0,137	0,254	0,283	0,849	0,795	1,343	1,256	1,792	1,724
2a*	0,042	0,136	0,129	0,232	0,306	0,757	0,779	1,175	1,331	1,695	1,676
2b*	0,042	0,136	0,129	0,230	0,310	0,755	0,775	1,160	1,300	1,662	1,681
3a*	0,040	0,082	0,085	0,245	0,252	0,685	0,740	0,993	0,948	1,362	1,199
3b*	0,041	0,082	0,087	0,244	0,222	0,666	0,731	1,018	0,996	1,376	1,215
4a*	0,040			0,245						1,342	
4b*	0,040			0,245						1,358	
5a*	0,055	0,073		0,266		0,836		1,168		1,429	
5b*	0,055	0,073		0,271		0,826		1,171		1,455	
6a*	0,039	0,078	0,076	0,263	0,238	0,880	0,818	1,189	1,011	1,712	1,584
6b*	0,039	0,078	0,076	0,258	0,236	0,875	0,834	1,180	1,024	1,708	1,576

*Absorbanca je bila izmerjena 2x, a-prva meritev, b-druga meritev, V_s – slepa meritev, S₀ – 0 % dodanega kravjega mleka, S₁ – 1 % dodanega kravjega mleka, S₅ – 5 % dodanega kravjega mleka, S₁₀ – 10 % dodanega kravjega mleka, S₁₅ – 15 % dodanega kravjega mleka, n = 6

Priloga B:

Rezultati surovih meritev pripravljenih vzorcev in meritve slepih vzorcev

Datum			Ponovitev	Paralelna meritev															
			meritev	V_s															
				V_0	V_1		V_{5a}	V_{5b}	V_{10}	V_{15a}	V_{15b}	V_{20}	V_{25}	V_{35}	V_{45}	V_{100}			
23.05.05	1		0,037	0,070	0,088					1,091	1,081								
06.06.05	1		0,042	0,103	0,109					1,027	0,980								
	2		0,042	0,104	0,109					1,019	0,990								
15.07.05	1		0,158	0,062	0,078	0,306	0,299	0,800	0,836	0,418	0,437		0,823	1,034	1,207	1,291	1,035		
	2		0,132	0,090	0,080	0,308	0,296	0,790	0,833	0,417	0,442		0,820	1,034	1,192	1,294	1,034		
18.07.05	1		0,040	0,106	0,109	0,416	0,410	0,988	0,969	0,488	0,510		1,106	1,126	1,314	1,302	1,462		
	2		0,041	0,062	0,148	0,421	0,391	0,952	0,967	0,491	0,505		1,147	1,112	1,306	1,349	1,462		
21.07.05	1		0,040	0,068		0,237		0,630	0,266	0,223	0,824	1,083	0,477	0,457	0,618	0,666	0,501		
	2		0,040	0,097		0,235		0,629	0,263	0,221	0,824	1,096	0,464	0,462	0,624	0,671	0,590		
22.07.05	1		0,065	0,060		0,226		0,750		0,341		1,291	0,704	0,659	0,874	0,893	0,905		
	2		0,065	0,060		0,228		0,759		0,346		1,303	0,707	0,688	0,881	0,905	0,909		
26.07.05	1		0,039	0,060	0,065	0,265	0,260	0,783	0,758	0,334	0,338	1,169	1,166	1,343	0,582	0,676	0,634		
	2		0,039	0,060	0,066	0,265	0,258	0,775	0,755	0,332	0,339	1,164	1,176	1,340	0,585	0,672	0,822		

V_s – absorbanca slepega vzorca (prazne epruvete), V_0 – 0 % dodanega kravjega mleka, redčitev 1/100, V_1 – 1 % dodanega kravjega mleka, redčitev 1/100, V_{5a} – 5 % dodanega kravjega mleka, redčitev 1/100, V_{5b} – 5 % dodanega kravjega mleka, redčitev 1/300, V_{10} – 10 % dodanega kravjega mleka, redčitev 1/100, V_{15a} – 15 % dodanega kravjega mleka, redčitev 1/100, V_{15b} – 15 % dodanega kravjega mleka, redčitev 1/300, V_{20} – 20 % dodanega kravjega mleka, redčitev 1/300, V_{25} – 25 % dodanega kravjega mleka, redčitev 1/300, V_{35} – 35 % dodanega kravjega mleka, redčitev 1/300, V_{45} – 45 % dodanega kravjega mleka, redčitev 1/300, V_{100} – 100 % dodanega kravjega mleka, redčitev 1/1000

Priloga C:

Sestava mešanic mleka glede na koncentracijo kravjega mleka v ovčjem

	Koncentracija (%)	Maščobe (%)	Beljakovine (%)	Laktoza (%)	SS (%)	SSMB (%)
1	100	4.34	3.17	4.44	13.20	8.00
2	10	5.70	5.20	4.50	16.49	10.82
3	20	5.60	4.96	4.49	16.17	10.59
4	30	5.43	4.75	4.50	15.81	10.41
5	40	5.35	4.51	4.48	15.50	10.17
6	50	5.17	4.29	4.48	15.11	9.96
7	100	4.34	3.60	4.50	13.17	8.86
8	10	6.21	5.32	4.46	17.02	10.84
9	20	6.00	5.07	4.46	16.60	10.63
10	30	5.84	4.82	4.46	16.20	10.39
11	40	5.59	4.57	4.47	15.74	10.18
12	50	5.39	4.32	4.47	15.33	9.97
13	100	4.43	3.02	4.53	13.26	8.86
14	10	6.41	4.94	4.44	16.96	10.55
15	20	6.18	4.73	4.46	16.55	10.38
16	30	5.95	4.51	4.47	16.13	10.18
17	40	5.75	4.31	4.47	15.74	10.01
18	50	5.52	4.10	4.48	15.31	9.81
19	100	4.35	3.10	4.53	13.25	8.94
20	10	6.38	5.31	4.41	17.18	10.82
21	20	6.14	5.07	4.43	16.74	10.61
22	30	5.94	4.82	4.44	16.32	10.40
23	40	5.71	4.59	4.45	15.89	10.20
24	50	5.49	4.33	4.47	15.45	9.99
25	1	6.53	5.61	4.33	17.73	11.02
26	5	6.46	5.50	4.34	17.58	10.94
27	15	6.29	5.24	4.33	17.16	10.68
28	25	6.13	5.00	4.32	16.80	10.46
29	35	5.92	4.71	4.34	16.36	10.22
30	45	5.75	4.45	4.32	15.94	9.96
31	1	6.73	5.66	4.31	17.95	11.05
32	5	6.66	5.56	4.32	17.79	10.96
33	10	6.55	5.43	4.32	17.57	10.84
34	15	6.48	5.33	4.33	17.43	10.77
35	20	6.34	5.16	4.35	17.15	10.63
36	25	6.23	5.04	4.36	16.94	10.52
37	35	6.00	4.77	4.37	16.50	10.29
38	45	5.77	4.50	4.41	16.07	10.08

se nadaljuje

nadaljevanje

	Koncentracija (%)	Maščobe (%)	Beljakovine (%)	Laktoza (%)	SS (%)	SSMB (%)
39	1	6.48	5.71	4.33	17.75	11.09
40	5	6.40	5.60	4.31	17.56	10.97
41	10	6.28	5.46	4.33	17.34	10.87
42	15	6.18	5.32	4.33	17.11	10.74
43	20	6.05	5.20	4.34	16.89	10.64
44	25	5.92	5.06	4.35	16.64	10.52
45	35	5.69	4.78	4.37	16.18	10.28
46	45	5.46	4.51	4.37	15.72	10.03
47	100	4.00	2.97	4.53	13.08	8.80

Koncentracija (%) – koncentracija kravjega mleka v ovčjem, Maščoba (%) – koncentracija maščob, Beljakovine (%) – koncentracija beljakovin, Lahkota (%) – koncentracija laktoze, SS (%) – koncentracija suhe snovi, SSMB (%) – koncentracija suhe snovi brez maščobe (p = 0,05), n = 47

Priloga D:

Fizikalne lastnosti mešanic mleka glede na koncentracijo kravjega mleka v ovčjem

	Koncentracija (%)	ZT (°C)	pH	ρ
1	0	-0.5660	6.6200	1.0348
2	100	-0.5240	6.6800	1.0298
3	10	-0.5620	6.6500	1.0346
4	20	-0.5600	6.6600	1.0338
5	30	-0.5530	6.6500	1.0333
6	40	-0.5470	6.6500	1.0328
7	50	-0.5460	6.6500	1.0323
8	0	-0.5640	6.6400	1.0346
9	100	-0.5160	6.7700	1.0292
10	10	-0.5620	6.7000	1.0343
11	20	-0.5580	6.7000	1.0340
12	30	-0.5500	6.6900	1.0332
13	40	-0.5440	6.6900	1.0330
14	50	-0.5420	6.7000	1.0330
15	0	-0.5470	6.6100	1.0338
16	100	-0.5140	6.7200	1.0313
17	10	-0.5450	6.6500	1.0328
18	20	-0.5440	6.6600	1.0333
19	30	-0.5390	6.6700	1.0323
20	40	-0.5400	6.6400	1.0313
21	50	-0.5340	6.7000	1.0318
22	0	-0.5620	6.6200	1.0340
23	100	-0.5190	6.6700	1.0300
24	10	-0.5560	6.6600	1.0335
25	20	-0.5530	6.6800	1.0330

se nadaljuje

nadaljevanje

	Koncentracija (%)	ZT (°C)	pH	ρ
26	30	-0.5480	6.6600	1.0320
27	40	-0.5420	6.6800	1.0323
28	50	-0.5390	6.6900	1.0318
29	0	-0.5560	6.2800	1.0351
30	1	-0.5600	6.5300	1.0325
31	5	-0.5560	6.6100	1.0330
32	15	-0.5510	6.6200	1.0318
33	25	-0.5490	6.6300	1.0328
34	35	-0.5420	6.6100	1.0318
35	45	-0.5410	6.6100	1.0320
36	0	-0.5610	6.4600	1.0333
37	1	-0.5600	6.6400	1.0333
38	5	-0.5580	6.7000	1.0328
39	15	-0.5540	6.7100	1.0325
40	25	-0.5480	6.7200	1.0318
41	35	-0.5420	6.7200	1.0313
42	45	-0.5340	6.7200	1.0303
43	0	-0.5600	6.5200	1.0328
44	1	-0.5590	6.5900	1.0323
45	5	-0.5560	6.6000	1.0323
46	10	-0.5580	6.6100	1.0320
47	15	-0.5550	6.6100	1.0318
48	20	-0.5540	6.6200	1.0318
49	25	-0.5490	6.6300	1.0313
50	35	-0.5460	6.6300	1.0310
51	45	-0.5400	6.6400	1.0308
52	0	-0.5600	6.5000	1.0330
53	1	-0.5600	6.5800	1.0330
54	5	-0.5570	6.5900	1.0325
55	10	-0.5570	6.5900	1.0325
56	15	-0.5540	6.5900	1.0325
57	20	-0.5540	6.5800	1.0320
58	25	-0.5520	6.5900	1.0320
59	35	-0.5450	6.5900	1.0315
60	45	-0.5400	6.5900	1.0310
61	0	-0.5800	6.1700	1.0320
62	1	-0.5810	6.3000	1.0308
63	5	-0.5840	6.3300	1.0310
64	10	-0.5790	6.3500	1.0310
65	15	-0.5720	6.3600	1.0305
66	20	-0.5700	6.3900	1.0305
67	25	-0.5680	6.4000	1.0305
68	35	-0.5600	6.4500	1.0303
69	45	-0.5510	6.4800	1.0298
70	1.00	-0.5130	6.7000	1.0290

Koncentracija (%) – koncentracija kravjega mleka v ovčjem, ZT– zmrziščna točka, pH – pH vrednost, ρ -gostota (p = 0,05) n = 70

Priloga E:

Certifikat sendvič E.L.I.S.A. RC BOVINO testa



Z.E.U.-INMUNOTEC, S.L.
María de Luna, 11
Polígono Actur, Nave 19
50.015 Zaragoza (Spain)
Tfno/Fax: (34) 976 73 15 33
E-mail: info@zeu-inmunotec.com

FI-TEC-RC.01/09
Rev: 5
Mar-03

CERTIFICADO DE PRODUCTO
PRODUCT CERTIFICATE

PRODUCTO / Product: RC BOVINO
LOTE Nº / Batch n.º: 05031501
FECHA DE CADUCIDAD / Expiry date: 11/2005

CONTROL DE CALIDAD / QUALITY CONTROL

COMPONENTES Contents	LOTE Batch	CADUCIDAD Exp. date
Placa Microtiter Microtiter Plate	050221	02/2006
Solución Conjugado x20 Conjugate x 20	050315	11/2005
Solución de Sustrato Substrate	31110	05/2006
Solución Stop Stop Solution	050304	03/2006
Solución de Dilución Conjugado Conjugate Dilution	050224	11/2005
Patrones Standards	041013	03/2006

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO Método Cuantitativo (según instrucciones) a 22±2°C
Assay procedure Quantitative method (see instructions) at 22±2° C

ENSAYO CONTROL / Control assay: OK
C.V. of results for 5% Standard (n = 10): 7.3%

FECHA DE ANALISIS: / Analysis date: 17/03/2005

ANALIZADO POR:
Analised by:

Vanesa Llanza

VERIFICADO POR:
Checked by:

Jesús M. Llanza