

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Ana KLANČAR

**UGOTAVLJANJE POTVORB KOZJIH IN OVČJIH
SIROV S KRAVJIM MLEKOM**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Živilstvo

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Ana KLANČAR

**UGOTAVLJANJE POTVORB KOZJIH IN OVČJIH SIROV S KRAVJIM
MLEKOM**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Živilstvo

**DETECTION OF ADULTERATIONS OF GOATS' AND SHEEPS'
CHEESES WITH COWS' MILK**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes: Field Food Science and Technology

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa druge stopnje Živilstvo. Opravljeno je bilo na Biotehniški fakulteti, Oddelku za živilstvo, Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico dela imenovala prof. dr. Barbaro Jeršek in recenzentko prof. dr. Polono Jamnik.

Mentorica: prof. dr. Barbara Jeršek

Recenzentka: prof. dr. Polona Jamnik

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Ana Klančar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2
 DK UDK 637.3.06:636.3:577.2.088(043)=163.6
 KG sir / potvorbe sira / kravji sir / kozji sir / ovčji sir / mešani sir / molekularne tehnike / PCR v realnem času / kvantitativno določanje
 AV KLANČAR, Ana, dipl. inž. živ. in preh. (UN)
 SA JERŠEK, Barbara (mentorica)/ JAMNIK, Polona (recenzentka)
 KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
 LI 2015
 IN UGOTAVLJANJE POTVORB KOZJIH IN OVČJIH SIROV S KRAVJIM MLEKOM
 TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Živilstvo)
 OP IX, 67 str., 23 pregl., 18 sl., 74 vir.
 IJ sl
 JI sl/en
 AI Velik problem pri zagotavljanju kakovosti in varnosti kozjih in ovčjih sirov predstavlja potvorba le teh s cenejšim kravjim mlekom. Namen magistrske naloge je bil določiti sledove ali deleže kravjega mleka v sirih, ki so na slovenskem trgu deklarirani kot kozji ali ovčji. Kravje mleko smo v mešanih, kozjih in ovčjih sirih določali s PCR v realnem času. Preizkusili smo dve metodi izolacije DNA iz mešanih, kozjih in ovčjih sirov. Glede na koncentracijo izolirane DNA in rezultate čistosti smo kot najbolj primerno metodo izbrali komercialni komplet Smarthelex Complex Samples. Za izvedbo PCR v realnem času smo preizkusili dva sistema, Bos/Man in Cow-1/BoCaOv. Rezultati PCR v realnem času so pokazali večjo občutljivost in boljšo učinkovitost sistema Cow-1/BoCaOv. Prav tako je bil PCR v realnem času s sistemom Cow-1/BoCaOv specifičen. Določili smo, da je bila učinkovitost PCR v realnem času pri pomnoževanju kravje DNA s sistemom Cow-1 102,2 % in s sistemom BoCaOv 110,5 %. Teoretična občutljivost PCR v realnem času za določanje kravje in sesalčje DNA je bila 3,72 pg/μl, praktična občutljivost PCR v realnem času za določanje kravje DNA v kozjem siru pa 1 %. Kravjo DNA smo v mešanih, kozjih in ovčjih sirih uspeli določiti kvalitativno in kvantitativno. Kvantifikacijo kravjega mleka smo izvedli na 30 vzorcih ovčjega in kozjega sira, kupljenih v različnih trgovskih centrih po Sloveniji. Glede na dobljene vrednosti C_t in standardni krivulji smo izračunali odstotek kravjega mleka v sirih, ki so deklarirani kot ovčji in kozji. Izkazalo se je, da 37 % vzorcev ovčjih in kozjih sirov ni bilo ustrezno deklariranih. Pokazali smo, da je PCR v realnem času specifična, hitra in občutljiva metoda, ki omogoča odkrivanje potvorb ovčjih in kozjih sirov s kravjim mlekom.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2
 DC UDC 637.3.06:636.3:577.2.088(043)=163.6
 CX cheese / cheese adulteration / cows' cheese / goats' cheese / sheeps' cheese / cheese mixtures / molecular techniques / PCR / quantitative detection
 AU KLANČAR, Ana
 AA JERŠEK, Barbara (supervisor)/ JAMNIK, Polona (reviewer)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
 PY 2015
 TY DETECTION OF ADULTERATIONS OF GOATS' AND SHEEPS' CHEESES WITH COWS' MILK
 DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Food Science and Technology)
 NO IX, 67 p., 23 tab., 18 fig., 74 ref.
 LA SI
 Al sl/en
 AB One of the main problems in cheese production is adulteration of cheese produced from goats' and sheeps' milk with less expensive cows' milk. The aim of this M. Sc. thesis was to identify traces or percentages of cows' milk in cheeses that are on the Slovenian market declared as goats' cheeses or sheeps' cheeses. Cows' milk in mixtures, goats' and sheeps' cheeses were detected using real-time PCR. We compared the two commercial methods for isolation of DNA from mixtures, goats' and sheeps' cheeses. According to the high concentration and high purity of isolated DNA, commercial kit, SmartHelix Complex Samples, provided the best result. Also, we compared two systems for PCR, namely Bos/Man and Cow-1/BoCaOv. The results of real-time PCR showed higher sensitivity and better efficiency of Cow-1/BoCaOv system than Bos/Man system. Also, Cow-1/BoCaOv system was highly specific. We determined that the effectiveness of the real-time PCR amplification of the cow DNA was 102,2 % by system Cow-1, and 110,5 % by system BoCaOv. Theoretical sensitivity of Cow-1/BoCaOv system was 3,72 pg/μl, practical sensitivity of real-time PCR for detection of cows' DNA in goats' cheeses was 1 %. Cows' DNA in mixtures, goats' and sheeps' cheeses was detected qualitatively and quantitatively. For quantification we analysed 30 different cheeses from the Slovenian market. The percentage of cows' milk in cheeses that are declared as goats' and sheeps' was calculated using theoretical standard curve which was prepared by using the obtained C_t values. The results turns out that 37 % of cheeses samples were not properly declared. The real-time PCR proved to be a specific, fast and sensitive method able to detect adulterations of sheeps' and goats' cheeses with cows' milk.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD	1
1.1 CILJI NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 MLEKO	3
2.1.1 Proizvodnja mleka in mlečnih izdelkov	3
2.1.2 Kravje mleko in alergeni	4
2.1.2.1 Laktozna intoleranca	5
2.1.2.2 Alergija na proteine v mleku	5
2.1.3 Značilnosti kozjega in ovčjega mleka ter vpliv na zdravje	6
2.2 POTVORBE ŽIVIL	8
2.2.1 Uradni nadzor in zaščita potrošnikov	8
2.2.2 Potvorbe mleka	9
2.2.3 Referenčna metoda za ugotavljanje potvorb sira	10
2.3 PCR	11
2.3.1 PCR v realnem času	12
2.3.1.1 Nespecifične metode določanja pomnožkov	14
2.3.1.2 Specifične metode določanja pomnožkov	15
2.3.2 Kvantitativni PCR	16
2.3.3 Inhibitorji PCR	17
2.4 DOLOČANJE POTVORB S PCR V REALNEM ČASU	18
3 MATERIALI IN METODE	23
3.1 MATERIALI	23
3.1.1 Vzorci sirov	23
3.1.2 Standardni vzorci mešanih sirov	26
3.1.3 Laboratorijska oprema	27
3.1.4 Kemikalije za izolacijo DNA iz vzorcev sira	27
3.1.5 Kemikalije za pripravo reakcijske mešanice za PCR v realnem času	28
3.1.5.1 Sistem Bos/Man	28
3.1.5.2 Sistem Cow-1/BoCaOv	29
3.2 METODE	30
3.2.1 Potek eksperimentalnega dela	30
3.2.2 Postopka izolacije DNA iz vzorcev sira	31
3.2.2.1 Komercialni komplet NucleoSpin Food	31
3.2.2.2 Komercialni komplet SmartHelix Complex Samples	31

3.2.3 Določitev koncentracije in čistosti izolirane DNA	32
3.2.4 Priprava in izvedba PCR v realnem času	32
3.2.4.1 Metoda določanja pomnožkov s sistemom Bos/Man.....	33
3.2.4.2 Metoda določanja pomnožkov s sistemom Cow-1/BoCaOv	33
3.2.5 Optimizacija PCR v realnem času	34
3.2.6 Določitev specifičnosti PCR v realnem času.....	34
3.2.7 Določitev občutljivosti in učinkovitosti PCR v realnem času	35
3.2.7.1 Določitev teoretične občutljivosti PCR v realnem času.....	35
3.2.7.2 Določitev praktične občutljivosti PCR v realnem času	35
3.2.7.3 Določitev učinkovitosti PCR v realnem času	36
3.2.8 Kvantitativni PCR	36
3.2.9 Analiza variance.....	36
4 REZULTATI Z RAZPRAVO	38
4.1 IZOLACIJA DNA IZ SIROV	38
4.2 SPECIFIČNOST PCR V REALNEM ČASU ZA DOLOČANJE KRAVJE DNA S SISTEMOM Cow-1/BoCaOv.....	40
4.3. DOLOČITEV TEORETIČNE OBČUTLJIVOSTI PCR V REALNEM ČASU.....	42
4.3.1 Določanje kravje DNA s sistemom Bos/Man.....	42
4.3.2 Določanje kravje DNA s sistemom Cow-1	43
4.3.3 Določanje sesalčje DNA s sistemom BoCaOv.....	45
4.4 DOLOČITEV PRAKTIČNE OBČUTLJIVOSTI PCR V REALNEM ČASU.....	47
4.5 DOLOČITEV KRAVJEGA MLEKA V OVČJIH IN KOZJIH SIRIH S PCR V REALNEM ČASU	49
4.5.1 Kvalitativna določitev	49
4.5.2 Relativna kvantifikacija	51
4.6 ZBIR REZULTATOV ANALIZ MEŠANIH, KOZJIH IN OVČJIH SIROV S PCR V REALNEM ČASU	56
5 SKLEPI	58
6 POVZETEK.....	59
7 VIRI.....	61
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Letna prireja mleka (t) v Sloveniji (Prireja ..., 2015)	4
Preglednica 2: Hranilne vrednosti kozjega, ovčjega in kravjega mleka (Park in sod., 2007)	6
Preglednica 3: Prednosti in slabosti PCR v realnem času (Logan in Edwards, 2004)	13
Preglednica 4: Absorpcijski in emisijski maksimumi različnih fluorogenih barvil (Rodriguez-Lazaro in Hernandez, 2013)	15
Preglednica 5: Par začetnih oligonukleotidov za specifično določanje krave in sesalcev (Lopez-Calleja in sod., 2007b)	22
Preglednica 6: Opis vzorca kravjega sira	23
Preglednica 7: Opis vzorcev ovčjih sirov	23
Preglednica 8: Opis vzorcev kozjih sirov	25
Preglednica 9: Opis vzorcev mešanih sirov	26
Preglednica 10: Laboratorijska oprema	27
Preglednica 11: Povprečna koncentracija in povprečna čistost DNA izolirane iz kravjega sira ter ovčjih, kozjih in mešanih sirov z različnima postopkoma	38
Preglednica 12: Določitev specifičnosti PCR v realnem času (vrednost C_t) za določanje kravje DNA	41
Preglednica 13: Rezultati pomnoževanja kravje DNA, izolirane iz kravjega sira (preglednica 6) s sistemom Bos	42
Preglednica 14: Rezultati pomnoževanja kravje DNA, izolirane iz kravjega sira (preglednica 6) s sistemom Cow-1	44
Preglednica 15: Rezultati pomnoževanja kravje DNA, izolirane iz kravjega sira (preglednica 6) s sistemom BoCaOv	46
Preglednica 16: Rezultati pomnoževanja kravje DNA izolirane iz standardnih vzorcev mešanih sirov s PCR v realnem času s sistemom Cow-1	48
Preglednica 17: Rezultati določanja kravje DNA s PCR v realnem času s sistemom Cow-1 v vzorcih mešanega sira	50
Preglednica 18: Rezultati določanja kravje DNA s PCR v realnem času s sistemom Cow-1 v vzorcih ovčjih sirov	50
Preglednica 19: Rezultati določanja kravje DNA s PCR v realnem času s sistemom Cow-1 v vzorcih kozjih sirov	51
Preglednica 20: Kvantifikacija kravjega mleka v mešanih sirih s PCR v realnem času s sistemom Cow-1/BoCaOv	53
Preglednica 21: Kvantifikacija kravjega mleka v ovčjih sirih s PCR v realnem času s sistemom Cow-1/BoCaOv	53
Preglednica 22: Kvantifikacija kravjega mleka v kozjih sirih s PCR v realnem času s sistemom Cow-1/BoCaOv	54
Preglednica 23: Zbir rezultatov mešanih, kozjih in ovčjih sirov s PCR v realnem času s sistemom Cow-1/BoCaOv	56

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Princip PCR (Hashiyada, 2011)	12
Slika 2: Krivulja pomnoževanja DNA s PCR v realnem času (Rodríguez-Lázaro in Hernández, 2013)	13
Slika 3: Princip nespecifične metode določanja pomnožkov z vezavo barvila SYBR Green I pri PCR v realnem času (Rodríguez-Lázaro in Hernández, 2013).....	14
Slika 4: Princip PCR v realnem času s sondo TaqMan (Rodríguez-Lázaro in Hernández, 2013).....	16
Slika 5: Shematski prikaz faz priprave vzorca in PCR, kjer je najpogostejše delovanje inhibitorjev (Schrader in sod., 2012).....	18
Slika 6: Agarozna gelska elektroforeza specifičnih pomnožkov kozjega mleka (122 bp) pridobljenih s PCR v realnem času za določanje DNA kože v ovčjem mleku (López-Calleja in sod., 2005a)	21
Slika 7: Shema eksperimentalnega dela	30
Slika 8: Faze, ki prikazujejo temperaturo in čas pomnoževanja DNA v aparatu ABI Prism 7500	33
Slika 9: Specifičnost PCR v realnem času za določanje kravje DNA s sistemom Cow-1/BoCaOv	40
Slika 10: PCR v realnem času s sistemom Bos za določitev občutljivosti določanja kravje DNA z vzorcem DNA izolirane iz kravjega sira (preglednica 6)	42
Slika 11: PCR v realnem času s sistemom Cow-1 za določitev občutljivosti določanja kravje DNA z vzorcem DNA izolirane iz kravjega sira (preglednica 6)	43
Slika 12: Standardna krivulja PCR v realnem času pri pomnoževanju kravje DNA, izolirane iz kravjega sira (preglednica 6) s sistemom Cow-1	44
Slika 13: PCR v realnem času s sistemom BoCaOv za določitev občutljivosti določanja kravje DNA z vzorcem DNA izolirane iz kravjega sira (preglednica 6)	45
Slika 14: Standardna krivulja PCR v realnem času pri pomnoževanju kravje DNA, izolirane iz kravjega sira (preglednica 6) s sistemom BoCaOv	46
Slika 15: Določanje kravje DNA v standardnih vzorcih mešanih sirov s PCR v realnem času s sistemom Cow-1	47
Slika 16: Standardna krivulja PCR v realnem času s sistemom Cow-1 za določitev kravjega mleka v standardnih vzorcih mešanih sirov	49
Slika 17: Standardna krivulja za kvantifikacijo kravje DNA v ovčjih in kozjih sirih za PCR v realnem času s sistemom Cow-1	52
Slika 18: Standardna krivulja za kvantifikacijo kravje DNA v ovčjih in kozjih sirih za PCR v realnem času s sistemom BoCaOv	52

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ΔR_n	normaliziran fluorescentni signal
BoCaOv	sistem PCR v realnem času specifičen za sesalce
Bos	sistem PCR v realnem času specifičen za kravo
bp	bazni par
Cow-1	sistem PCR v realnem času specifičen za kravo
C_t	cikel meje določanja
CLA	konjugirana linolna kislina
DNA	deoksiribonukleinska kislina
E	učinkovitost PCR realnem času (%)
IgE	imunoglobulin E
LOD	meja detekcije
LOQ	meja kvantifikacije
Man	sistem PCR v realnem času specifičen za sesalce
PCR	verižna reakcija s polimerazo
R^2	korelacijski koeficient
qPCR	kvantitativni PCR

1 UVOD

Mleko je izključno običajni izloček mlečnih žlez, dobljeno z molžo ene ali več krav, brez kakršnega koli dodajanja ali odvzemanja. Iz mleka pridobivamo mlečne izdelke, med katere uvrščamo tudi sir. Pridobivajo ga izključno iz mleka, pri čemer se lahko dodajo snovi, potrebne za njihovo proizvodnjo, če se te snovi ne uporabljajo zato, da bi v celoti ali deloma zamenjale katerokoli sestavino mleka (Codex ..., 2011).

Svetovna prireja mleka je predvsem odvisna od mlečnih vrst kot so govedo, koze, ovce in kamele. Prisotnost posamezni vrst se med posameznimi regijami in državami zelo razlikuje. Med dejavniki, ki vplivajo na prirejo posamezne vrste mleka, vse pomembnejši postaja ekonomski dejavnik (Dairy animals, 2015).

Posledica velikega obsega gojenja in proizvodnje hrane so visoki stroški, zaradi česar proizvajalci dražjo sestavino nadomestijo s cenejšo in dostopnejšo (Dąbrowska in sod. 2010). Potvorba živila lahko predstavlja tveganje za zdravje potrošnika, spremenita se lahko tudi varnost in kakovost izdelka.

Na mleku in mlečnih izdelkih mora biti natančno deklarirano, iz katere vrste mleka je živilo. Vse pogostejši so primeri dodajanja kravjega mleka sirom, ki so deklarirani kot ovčji ali kozji (López-Calleja in sod., 2007a). Namreč, kravje mleko je cenejše in dostopnejše. Prav tako se ga pridela v večjih količinah (Zhang in sod., 2007).

Z ugotavljanjem pristnosti mlečnega izdelka so zaščiteni interesi potrošnika, tako ekonomski kot tudi zdravstveni (Mafra in sod., 2007). Kravje beljakovine spadajo med najpogostejše alergene (Dąbrowska in sod., 2010). Pri 12-30 % dojenčkov se alergija na kravje beljakovine pojavi že v prvih treh mesecih življenja (Haenlein, 2004). V tem primeru je pri prehrani dojenčkov kravje beljakovine potrebno nadomestiti.

Za odkrivanje mešanic mleka v različnih vrstah sira se uporabljajo različne analitske metode. Na nivoju EU se kot referenčna metoda za odkrivanje potvorb kozjih in ovčjih sirov s kravjim mlekom uporablja izoelektrično fokusiranje. V strokovni literaturi pa je najpogostejše navedeno kvalitativno določanje količine kravjega mleka v ovčjih ali kozjih sirihi z uporabo gelske elektroforeze, kromatografskih tehnik ali molekularnih metod (Recio in sod., 2004).

Pri obstoječih metodah za odkrivanje potvorb mleka so ciljni analit lahko lipidi, proteini ali DNA. Pri uporabi visokih temperatur, tlakov in kemičnih postopkov tekom proizvodnje živil, je molekula DNA v primerjavi z lipidi in proteini stabilnejša. V znanstvenih študijah se tako uporaba molekularnih tehnik za odkrivanje potvorb mleka povečuje (Psifidi in sod., 2010). Najpogostejše uporabljena molekularna metoda je verižna reakcija s polimerazo (PCR), saj je hitra, občutljiva in ponovljiva (Sakaridis in sod., 2013).

Pri magistrski nalogi smo za ugotavljanje pristnosti kozjih in ovčjih sirov uporabili PCR v realnem času. Mleko, kot glavna surovina sira, vsebuje veliko somatskih celic, genomske DNA, primerne za pomnoževanje. Za preprečevanje zdravstvenega in ekonomskega tveganja potrošnika, je razvoj novih in občutljivih metod ugotavljanja pristnosti mleka nujno potreben.

1.1 CILJI NALOGE

Cilj naše naloge je bil določiti sledove ali deleže kravjega mleka v sirih, ki so na slovenskem trgu deklarirani kot kozji ali ovčji. Za dosego cilja smo morali:

- vpeljati PCR v realnem času za ugotavljanje prisotnosti kravjega mleka v kozjih in ovčjih sirih,
- izolirati DNA iz standardnih vzorcev mešanih sirov in DNA iz kozjih in ovčjih sirov,
- določiti specifičnost, občutljivost in učinkovitost PCR v realnem času za določanje krave,
- s PCR v realnem času določiti sledove kravje DNA s kvalitativno analizo in deleže kravje DNA s kvantitativno analizo.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predvidevamo, da:

- bomo s kompletom SmartHelix Complex Samples določili boljšo čistost in večjo koncentracijo izolirane DNA iz sirov,
- bo PCR v realnem času s sistemom Cow-1/BoCaOv specifičen za kravjo DNA,
- bo PCR v realnem času s sistemom Cow-1/BoCaOv imel večjo občutljivost in boljšo učinkovitost kot sistem Bos/Man,
- bomo z ustreznimi standardnimi krivuljami lahko določili sledove in deleže kravjega mleka v mešanih, kozjih in ovčjih sirih.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MLEKO

2.1.1 Proizvodnja mleka in mlečnih izdelkov

Uredba Sveta (ES) št. 1234/2007 z dne 22. oktobra 2007 o vzpostavitvi skupne ureditve kmetijskih trgov in o posebnih določbah za nekatere kmetijske proizvode ("Uredba o enotni SUT") določa, da se izraz mleko lahko uporabi:

- za mleko, ki je obdelano tako, da se njegova sestava ne spremeni, ali za mleko, katerega vsebnost maščobe je standardizirana v skladu s členom 114 (2) v povezavi s Prilogo XIII;
- v povezavi z besedo ali besedami, ki poimenujejo vrsto, razred, izvor in/ali predvideno uporabo takega mleka ali za opis fizične obdelave ali spreminjanja sestave mleka, pod pogojem, da je sprememba omejena na dodajanje in/ali odvzem naravnih sestavin mleka.

Ta uredba določa tudi, da se izraz „mleko“ in oznake, ki se uporabljajo za mlečne izdelke, lahko uporabijo tudi v povezavi z besedo ali besedami, ki označujejo sestavljene izdelke, pri katerih noben del ne nadomesti in tudi ni namenjen, da bi nadomestil, katero koli sestavino mleka in pri katerih je mleko ali mlečni izdelek bistveni del tako glede kakovosti kot značilnosti proizvoda.

Mleko in mlečni izdelki se predelujejo iz surovega mleka. Osnovni postopki obdelave surovega mleka so: posnemanje in tipizacija mleka, homogenizacija in toplotna obdelava mleka. Cilj vseh postopkov je zagotoviti izdelavo varnih, kemijsko, mikrobiološko in senzorično kakovostnih izdelkov primerne obstojnosti.

Po podatkih FAO se je svetovna proizvodnja mleka med letoma 1982 in 2012 povečala za več kot 50 %. Med največje proizvajalke mleka uvrščamo Indijo, Združene države Amerike, Kitajsko in Pakistan. Največ proizvedenega mleka je kravjega (83 %) in bivoljega (13 %). V precej manjših odstotkih se na svetovni ravni proizvede tudi nekaj kozjega (2 %), ovčjega (1 %) in kameljega mleka (0,3 %). Kar zadeva mlečnih izdelkov, se največ proizvede svežega mleka (42,9 %) in sirov (25,2 %). Sledijo maslo (23,1 %), posneto mleko v prahu (5,1 %) in polnomastno mleko v prahu (3,7 %) (Milk production, 2015).

Vodilna proizvajalka kozjega mleka (*Capra hircus*) je Indija (30 %), sledita ji Bangladeš (17 %) in Sudan (11 %). V teh državah se povečuje domača poraba kozjega mleka, saj je ponekod koza edina domača žival, ki daje mleko in meso (Wijesinha-Bettoni in Burlingame, 2013).

Proizvodnja kozjega mleka ima velik ekonomski vpliv v mediteranskih državah, predvsem v Italiji, Franciji, Španiji in Grčiji. Dodano vrednost ima predvsem predelava surovega in pasteriziranega kozjega mleka v kozji sir. García in sod. (2014) navajajo, da se je proizvodnja kozjega mleka med letoma 1991 in 2011 povečala za približno 70 %.

Poleg proizvodnje kozjega mleka, je na območju mediteranskih držav pomembna tudi proizvodnja ovčjega mleka. Iz surovega ovčjega mleka pridelajo predvsem ovčje sire. Glede na svetovno proizvodnjo pa največ tega mleka pridelata Kitajska (Wijesinha-Bettoni in Burlingame, 2013).

Po uživanju mleka se Evropejci uvrščamo na sam vrh, saj zaužijemo več kot 150 kg mleka/prebivalca/leto. Pri pregledu statističnih podatkov opazimo, da se v Sloveniji letna količina prireje mleka zmanjšuje (preglednica 1). Največ proizvedemo kravjega mleka, precej manj pa kozjega in ovčjega.

Preglednica 1: Letna prireja mleka (t) v Sloveniji (Prireja ..., 2015)

Leto	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Prireja kravjega mleka	653682	625521	603930	601591	620943	595496
Prireja ovčjega mleka	470	534	541	612	473	397
Prireja kozjega mleka	1539	1760	1326	1123	1188	1017

Rast proizvodnje ter uživanje mleka in mlečnih izdelkov je omejena na določene regije in države. Prebivalci razvitih držav so še vedno največji potrošniki mleka in mlečnih izdelkov. Prav tako v razvitih državah proizvedejo največ mleka in ga iz njih največ tudi izvozijo (McLoid, 2013).

2.1.2 Kravje mleko in alergeni

Najpogostejša alergena živila, ki povzročijo 90 % vseh alergenijskih reakcij so: kravje mleko, ribe, arašidi, soja in pšenica. Podatki študije o pogostosti alergije pri otrocih v 10 evropskih državah (Steinke in sod., 2007) v katero je bila vključena tudi Slovenija, so pokazali, da ima na splošno alergijo 4,7 % otrok, prevalenca v 3. letu starosti je 7,2 %, najpogostejše pa so alergije na mleko (38,5 %) in jajce (19 %). Bu in sod. (2013) navajajo, da je alergija na kravje mleko najpogostejša alergija pri otrocih z incidenco med 2-7 %. V publikaciji z naslovom Varna hrana "od vil do vilic" (Hladnik Trček, 2011) alergene uvrščajo med kemijska tveganja za javno zdravje.

Mleko je prva biološka tekočina, ki vsebuje vse hranilne snovi za uspešno rast novorojenčka sesalcev. Sestava mleka se med vrstami sesalcev razlikuje, kar pomeni, da je za človeka najbolj primerno uživanje humanega mleka. Ko dojenje ni na voljo, matere za prehrano novorojenčka uporabljajo mlečne formule, ki so narejene na osnovi kravjih proteinov. To lahko privede do prehranskih in imunoloških problemov (El-Agamy, 2007).

Mleko in mlečni izdelki so del zdrave in uravnotežene prehrane. Poleg energije dajejo organizmu pomembne hranilne snovi. Kravje mleko vsebuje 87,5 % vode in 12,5 % suhe snovi. Je vir kakovostnih beljakovin (3,3 %) ter mineralov, predvsem kalcija in fosforja (0,7 %). Vsebuje tudi v maščobi topne vitamine (A, D, E, K) in vitamin B₁₂. Kravje mleko vsebuje več kot 20 različnih proteinov, ki lahko povzročijo alergijsko reakcijo. Študije so pokazale, da so glavni alergeni v kravjem mleku kazeini, β -laktoglobulin in α -laktoalbumin. Potencialna alergena sta v sledovih lahko tudi goveji serum albumin in laktoferin (El-Agamy, 2007; Bu in sod., 2013).

Zaradi visoke vsebnosti proteinov, je uživanje kravjega mleka primerno šele po prvem letu starosti. V primerjavi s humanim mlekom, kravje vsebuje več proteinov in mineralov ter manj laktoze. Zato ima humano mleko večjo energijsko vrednost. Kravje mleko vsebuje protein β -laktoglobulin, ki ga v humanem ni (Wijesinha-Bettoni in Burlingame, 2013). Razlika v sestavi med kravjim in humanim mlekom je eden izmed ključnih razlogov za pojav alergije pri otrocih (Bu in sod., 2013).

2.1.2.1 Laktozna intoleranca

Prehranska intoleranca imenujemo reakcije, kjer ne moremo dokazati imunskega mehanizma. Gre za nenormalni fiziološki odziv na zaužito živilo ali aditiv. Vzrok za preobčutljivost na hrano je večinoma pogojen s pomanjkanjem encimov (Wraber, 2004). Laktozna intoleranca je bolezen, pri kateri gre za pomanjkanje encima laktaze. Laktaza (β -galaktozidaza) je nujno potreben encim, ki razgradi laktozo v enostavnejše sladkorje, primerne za prebavo in absorpcijo. Pomanjkanje tega encima povzroči nepopolno razgradnjo mlečnega sladkorja, zaradi česar lahko pride do nastanka plina (metan) in pojava diareje. Simptomi vključujejo pojav bolečin v trebuhu, napihnjenosti in napenjanja (Weaver in sod., 2013).

Laktaza je encim, ki je prisoten v vseh sesalcih. A s starostjo njena količina upada, zato ima večina starejših nizko laktazno aktivnost. V večini primerov gre za gensko pogojeno bolezen ali kot posledica pojava črevesnih bolezni, kot sta celiakija in enteritis (Marteau, 2002). Pojav bolezni je najpogostejši v državah Južne Amerike, Afrike in Azije. Posamezniki se morajo izogibati vseh živil, ki vsebujejo laktozo.

2.1.2.2 Alergija na proteine v mleku

Je imunska posredovana reakcija, ki jo izzovejo alergeni. Alergeni povzročijo nastajanje protiteles predvsem imunoglobulinov razreda E (IgE). Povzročen imunski odgovor se lahko pojavi že pri zelo majhnih količinah zaužitih alergenov (Taylor, 2006). Je najpogostejša vrsta alergije, ki se pojavi v otroštvu. Alergijo povzročijo beljakovine, ki so prisotne v mleku. Kravje mleko v primerjavi s humanim vsebuje dvakrat večjo količino kazeinov, med katerimi prevladuje α _{s1}-kazein. Znano je, da mlečni alergeni ohranijo svojo biološko aktivnost tudi po vrenju, pasterizaciji in uporabi visokih temperatur med predelavo mleka (Weaver in sod., 2013).

Hochwallner in sod. (2014) razširjenost te alergije pripisujejo povečani uporabi mlečnih formul zaradi zmanjšanja dojenja. Velik vpliv na razvoj alergij pa ima predvsem genetska predispozicija. Povzroči lahko kožne (atopijski dermatitis, urtikarija), respiratorne (astma, kašelj, rinitis) in gastrointestinalne (diareja, koliki) reakcije. Le-te so najpogostejše in se pojavijo v 50-75 % primerih (El-Agamy, 2007). V najhujših primerih pa se pojavi tudi anafilaktični šok. V večini primerov omenjena alergija s starostjo izzveni, a 15 % otrok ostane trajno alergičnih (Bu in sod., 2013). Prehranske smernice določajo, da se morajo bolniki izogibati vseh izdelkov, ki vsebujejo mlečne beljakovine. Popolno izogibanje beljakovinam kravjega mleka je težavno zaradi njihove prisotnosti v številnih predelanih živilih. Kravje mleko lahko nadomestijo s kozjim ali ovčjim (Weaver in sod., 2013).

Sistem hitrega obveščanja za hrano in krmo (RASFF, angl. Rapid Alert System for Food and Feed) je namenjen hitremu obveščanju držav članic o tveganjih na področju živil in krme. Po podatkih RASFF sta bili v zadnjem letu v Sloveniji izdani dve opozorili glede izdelkov, ki sta vsebovala sestavine mleka, ki niso bile deklarirane. V čokoladnih piškotih brez laktoze z okusom mandeljna so odkrili laktozo (48,3 mg/kg). Pri uradni kontroli trgovine pa so v torti z limonino kremo našli laktoferin (4,2 mg/kg). Izdelke so umaknili iz tržišča (RASFF, 2014a; RASFF, 2014b).

2.1.3 Značilnosti kozjega in ovčjega mleka ter vpliv na zdravje

Značilnosti kozjega in ovčjega mleka so bistvenega pomena za njuno uspešno proizvodnjo in trženje mlečnih izdelkov. Obstajajo izrazite razlike v fizikalno-kemijskih lastnostih med ovčjim, kozjim in kravjim mlekom (Park in sod., 2007).

Preglednica 2: Hranilne vrednosti kozjega, ovčjega in kravjega mleka
(Park in sod., 2007)

SESTAVINA	MLEKO		
	Kravje	Kozje	Ovčje
Energijska vrednost (kcal/100 ml)	69	70	105
Maščoba (%)	3,6	3,8	7,9
Proteini (%)	3,2	3,4	6,2
Kazein (%)	2,6	2,4	4,2
Laktoza (%)	4,7	4,1	4,9
Skupen pepel (%)	0,7	0,8	0,9
Kalcij (%)	0,122	0,134	0,193
Fosfor (%)	0,119	0,121	0,158
Kalij (%)	0,152	0,181	0,136
Klor (%)	0,100	0,150	0,160
Vitamin A (µg)	37,8	55,5	43,8
Vitamin B ₁₂ (µg)	0,357	0,065	0,712
Vitamin C (mg)	0,94	1,29	4,16
Vitamin D (µg)	0,05	0,058	0,18

Kozje in ovčje mleko sta v primerjavi s kravjim bolj viskozna in bolj kislata. Imata manjši lomni količnik in nižjo zmrziščno točko. Ovčje mleko ima večjo gostoto kot kravje in kozje (Park in sod., 2007). Preglednica 2 prikazuje hranilne vrednosti kozjega, ovčjega in kravjega mleka. Opazimo, da ovčje mleko izstopa po količini maščob, beljakovin in energijski vrednosti. Kozje in ovčje mleko vsebujeta precej več vitaminov in mineralov.

Temeljni ogljikov hidrat v mleku je mlečni sladkor oz. laktoza. Je disaharid iz glukoze in galaktoze. Sintetizira se v mlečni žlezi pomočjo proteina α -laktoalbumina. Laktoza je pomembno hranilo, saj v črevesju omogoča absorpcijo kalcija, magnezija in fosforja. Pri sintezi mleka ohranja ozmotsko ravnotežje med krvnim tokom in alveolami mlečne žleze (Park in sod., 2007). V preglednici 2 opazimo, da največ laktoze vsebuje ovčje mleko, najmanj pa kozje.

Kozje in ovčje mleko sta bogata z maščobnimi kislinami, kot so kapronska, kaprilna in kaprinska. Glede na število ogljikovih atomov sodijo med srednje verižne maščobne kisline. Kozje mleko jih vsebuje nekje med 15-18 %, kravje pa samo med 5-9 %. Te maščobne kisline pomagajo pri zdravljenju mnogih presnovnih bolezni in žolčnih kamnov. Prav tako jih dodajajo k prehrani podhranjenim bolnikom in prezgodaj rojenim otrokom. Eksperimentalni podatki kažejo, da kozje mleko vsebuje manj nasičenih maščobnih kislin, več oleinske in linolenske kisline (Sanz Sampelayo in sod., 2007).

Srednje verižne maščobne kisline so vir hitro razpoložljive energije, kar omogoča njihovo uporabo pri otroških formulah nedonošenih otrok ter pri podhranjenih in starejših bolnikih. Prav tako dajejo kozjemu mleku značilen "goaty" priokus (Wijesinha-Bettoni in Burlingame, 2013).

Maščoba mleka je tudi naravni vir konjugirane linolne kisline (CLA). Mleko vsebuje izomere *c9* in *t11*. Vsebnost CLA v mleku in mlečnih izdelkih na trgu variira med 0,34 % in 1,07 % skupne maščobe. CLA ima pozitiven učinek na zdravje ljudi, saj preprečuje nastanek rakavih obolenj, ateroskleroze in diabetesa (Dhiman in sod., 2009). Največ CLA vsebuje ovčje mleko, najmanj pa kozje (Park in sod., 2007).

Izdelki iz ovčjega in kozjega mleka so alternativa izdelkom iz kravjega mleka, predvsem zaradi njihovega specifičnega vonja, okusa in teksture. Potrošniki zahtevajo njihovo stalno kontrolo higiene in vedno več informacij o hranilni sestavi teh izdelkov (Raynal-Ljutovac in sod., 2008). Zaradi svojih prehranskih lastnosti, jih lahko uporabljamo predvsem pri prehrani otrok in bolnih ljudi (Pandya in Ghodke, 2007). Za kozje mleko je značilno, da je manj alergeno in tudi bolje prebavljivo od kravjega (Garcia in sod., 2014).

Razlog za boljšo prebavljivost kozjega mleka je velikost maščobnih kapljic, ki so manjše kot v kravjem mleku. Tudi Wijesinha-Bettoni in Burlingame (2013) navajata manjšo alergičnost kozjega mleka. Vendar glede na rezultate številnih študij opozarjata, da se morajo alergiki na kravje mleko izogibati tudi kozjega. To velja predvsem pri hujših oblikah, ko alergija na kravje mleko povzroči življenjsko nevarni anafilaktični šok.

2.2 POTVORBE ŽIVIL

2.2.1 Uradni nadzor in zaščita potrošnikov

Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano je kot institucija zadolženo za zaščito potrošnikov. Izvajanje uradnega nadzora določa Uredba (ES) št. 882/2004 (2004). S to uredbo se zagotavlja preverjanje skladnosti z zakonodajo o krmi in živilih ter s pravili o zdravstvenem varstvu živali in zaščiti živali.

Varnost hrane pomeni zagotavljanje takšne hrane, ki ni škodljiva za zdravje ljudi in upošteva vse verjetne takojšnje in/ali kratkoročne in/ali dolgoročne učinke na zdravje osebe, ki živilo uživa, ter tudi na poznejše rodove (Hladnik Trček, 2011). Osmi člen Uredbe evropskega parlamenta in Sveta (ES) št. 178/2002 o določitvi splošnih načel in zahtevah živilske zakonodaje, ustanovitvi Evropske agencije za varnost hrane in postopkih, ki zadevajo varnost hrane, navaja cilje živilske zakonodaje. Temeljni cilj živilske zakonodaje je varstvo interesov potrošnikov in zagotoviti potrošnikom podlago za obveščeno izbiro v zvezi z živilom, ki jih uživajo. Potrebno je preprečiti:

- goljufive ali zavajajoče postopke,
- ponarejanje živil,
- vse druge postopke, ki potrošnika lahko zavajajo.

V dvanajstem členu Uredbe (ES) št. 882/2004 (2004) je določeno, da lahko analizo vzorcev, odvzetih med uradnim nadzorom, izvajajo samo akreditirani laboratoriji. Ob upoštevanju kriterijev za različne preskusne metode, določenih v zakonodaji Skupnosti o krmi in živilih, morajo biti akreditirani v skladu z naslednjimi evropskimi standardi:

- EN ISO/IEC 17025 o „Splošnih zahtevah za usposobljenost preskuševalnih in umerjevalnih laboratorijev“,
- EN 45002 o „Splošnih merilih za ocenjevanje preskuševalnih laboratorijev“,
- EN 45003 o „Sistemu akreditacije preskuševalnih in umerjevalnih laboratorijev - Splošne zahteve za delovanje in priznanje“.

Uradni veterinarski nadzor nad pridelavo, obdelavo in predelavo mleka poteka na podlagi živilske zakonodaje, ki je pomembna za doseganje visoke ravni varstva človekovega življenja in zdravja. Proizvajalci morajo ravnati odgovorno, hkrati pa v živilski verigi zagotoviti, da varnost hrane ni ogrožena. V letnem poročilu VURS-a za leto 2012 je zapisano, da je v okviru uradnega nadzora bilo na vsebnost aditivov in alergenov v živilih živalskega izvora odvzetih 66 vzorcev (17 vzorcev na prisotnost alergenov in 49 vzorcev na vsebnost aditivov). Vzorčenje se je izvajalo v odobrenih obratih kot tudi registriranih obratih prodaje na drobno. 6 vzorcev ni bilo skladnih z zakonodajo. V enem vzorcu je bila ugotovljena vsebnost mlečnih beljakovin, v treh primerih prisotnost soje in v dveh primerih glutena. Glede na delež ugotovljenih neskladij (9,1 %), je Veterinarska uprava RS v letu 2012 stanje na področju aditivov in alergenov v živilih živalskega izvora ocenila kot zadovoljivo. V letu prej pa je bilo odvzetih 69 vzorcev (18 vzorcev na prisotnost alergenov in 51 vzorcev na vsebnost aditivov).

Na vsebnost aditivov so bili vsi vzorci skladni z zakonodajo, na vsebnost alergenov pa en vzorec ni bil skladen z zakonodajo. V enem vzorcu barjene klobase je bila ugotovljena prisotnost mlečnih beljakovin, ki niso bile deklarirane na izdelku. Glede na delež ugotovljenih neskladij (1,4 %), je Veterinarska uprava RS v letu 2011 stanje na področju aditivov in alergenov v živilih živalskega izvora ocenila kot ugodno (Letno poročilo 2011, 2012; Letno poročilo 2012, 2013).

Liu in sod. (2015) so goljufije hrane označili kot svetovno nevarnost. Nizki stroški sestavin ali dodatkov na potrošnika ne vplivajo samo ekonomsko, ampak lahko predstavljajo tudi tveganje za njihovo zdravje. Potvorba mleka z melaminom med letoma 2007 in 2008 je pokazala, kako lahko potvorba živila vpliva na zmanjšano učinkovitost zagotavljanja varne hrane. Oljčno olje, mleko, med, pomarančni sok, jabolčni sok in kava so živila, ki so najpogostejše potvorjene (Santos in sod., 2013).

2.2.2 Potvorbe mleka

Ponarejanje mleka in mlečnih izdelkov spada med najbolj poznane goljufije. Potvorba surovega mleka in mlečnih izdelkov predstavlja veliko skrb na področju kakovosti mleka (Liu in sod., 2015). Veliko tradicionalnih mlečnih izdelkov, predvsem sirov, je izdelanih iz kozjega in ovčjega mleka ter iz njunih mešanic. Mleko, kot glavna sestavina sira, vpliva na njegove končne lastnosti. Proizvajalec mora na izdelku deklarirati, iz katere vrste mleka je proizvedeno. Zamenjava ovčjega in kozjega mleka s kravjim je pogosta težava, saj imata višjo ceno (Pappas in sod., 2008).

Da je potvorba ovčjih in kozjih sirov s kravjim mlekom glavna težava pri proizvodnji sira, v svoji raziskavi navajajo tudi Špoljarić in sod. (2013). Največkrat na takšnih sirihi kravje mleko ni deklarirano, zaradi česar varnost in zaščita potrošnika nista zagotovljeni. Potvorba s kravjim mlekom je zanimiva predvsem zaradi njegove nižje cene in boljše razpoložljivosti skozi vse leto.

Mleko je živilo, ki ga proizvajalci lahko enostavno ponaredijo. Najpogostejša prevara je dodatek vode mleku, ki poveča njegovo količino, a zmanjša njegovo kvaliteto (Santos in sod., 2013). V mleku se zniža količina maščobe, proteinov, mineralov in laktoze (Čanžek Majhenič in Perko, 2009). Če rezultati preverjanja vzbujajo sum, da se dodaja voda, je potrebno odvzeti pristen vzorec na posestvu. Pristen vzorec predstavlja mleko ene povsem nadzorovane jutranje ali večerne molže, ki se ne začne prej kot enajst ur ali kasneje kot trinajst ur po predhodni molži (Pravilnik ..., 1999). V mlekarski industriji potvorbe mleka z vodo ugotavljajo z določevanjem zmrziščne točke mleka. Le-ta je nižja od zmrziščne točke vode, a se ob dodatku vode v mleku začne zviševati in se tako približa zmrziščni točki vode. Referenčna vrednost zmrziščne točke za odkupljeno mleko je $-0,520\text{ }^{\circ}\text{C}$, mejna pa $-0,515\text{ }^{\circ}\text{C}$. Če zmrziščna točka preseže mejno vrednost velja, da je mleko potvorjeno (Čanžek Majhenič in Perko, 2009).

Do nedavnega se je odkupna cena mleka oblikovala na podlagi ugotovljene zmrziščne točke mleka. Glede na ugotovljeno zmrziščno točko je odkupovalec mleka proizvajalcu mleka obračunal odbitek k odkupni ceni mleka. Trenutno za področje mlekarstva velja pravilnik o tržno informacijskem sistemu za trg mleka in mlečnih izdelkov. Ta pravilnik določa način poročanja mlekarn in prvih kupcev mleka o cenah in količinah mleka in mlečnih izdelkov. Določa tudi način poročanja proizvajalcev mleka, ki mleko in mlečne izdelke neposredno prodajajo potrošniku, in način poročanja proizvajalcev mleka, ki mleko in mlečne izdelke prodajajo izven Republike Slovenije (Pravilnik ..., 2015).

Če mleko ni kravje, Uredba Sveta (ES) št. 1234/2007 o vzpostavitvi skupne ureditve kmetijskih trgov in o posebnih določbah za nekatere kmetijske proizvode ("Uredba o enotni SUT") določa, da se mora navesti poreklo mleka in mlečnih izdelkov (ki jih določi Komisija).

2.2.3 Referenčna metoda za ugotavljanje potvorb sira

Regulativa 273/2008/EC v petem členu navaja referenčno metodo v EU za odkrivanje kravjega mleka in kazeinov v sirih iz ovčjega, kozjega ali bivoličjega mleka ter v mešanicah iz ovčjega, kozjega in bivoličjega mleka. Imenuje se izoelektrično fokusiranje κ -kazeinov. Je specifična, občutljiva in kvantitativna metoda (Commission ..., 2008).

Je metoda, ki temelji na ločevanju proteinov glede na izoelektrično točko. Postopek vključuje izolacijo kazeinov iz sirov in referenčnih standardov. Standardni vzorci ovčjega in kozjega mleka vsebujejo dodatek 0 % in 1 % kravjega mleka. Sledi raztapljanje izoliranih kazeinov, pri čemer zaradi delovanja encima plazmina nastane proteinski hidrolizat. Nato se izvede izoelektrično fokusiranje proteinskega hidrolizata v prisotnosti sečnine in obarvanje proteinov. Rezultati se vrednotijo z vizualno ali denzimetrično primerjavo proteinskih slik obarvanih γ_3 - ter γ_2 -kazeinskih vzorcev (dokaz kravjega mleka) in standardnih referenčnih vzorcev na istem gelu (Commission ..., 2008; Špoljarić in sod., 2013).

Uporabnost referenčne metode, odkrivanje prisotnosti kravjega mleka v ovčjih in kozjih sirih, so ugotavljali raziskovalci referenčnega laboratorija za mleko in mlečne izdelke na Fakulteti za kmetijstvo v Zagrebu. Vzorce ovčjih in kozjih sirov, ki so tako bili deklarirani, so kupili v trgovini. Mešanice ovčjih in kozjih sirov z dodatkom kravjega mleka (0 %, 0,5 %, 1 %, 2 %, 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 100 %) pa so pripravili na kmetiji Lončar. Po postopku izolacije kazeinov so izvedli izoelektrično fokusiranje proteinskega hidrolizata. Iz umeritvene krivulje so vsebnost kravjega mleka določili kvantitativno. Rezultati so pokazali potvorbe s kravjim mlekom v dveh ovčjih sirih, v katerih je bilo dodanih 5 % in 55 % kravjega mleka. V enem vzorcu kozjega sira je bilo dodanih 30 % kravjega mleka (Špoljarić in sod., 2013).

Metoda je zanesljiva in občutljiva za odkrivanje surovega in toplotno obdelanega kravjega mleka v svežih in zorjenih ovčjih ali kozjih sirih ter v njihovih mešanicah. Uporaba te metode bi lahko pomagala zaščititi domače proizvajalce, ki spoštujejo dobro proizvodno prakso. Pred prevarami bi lahko zaščitili tudi potrošnike (Špoljarić in sod., 2013).

2.3 PCR

V zadnjem desetletju se za identifikacijo določenih sestavin pogosteje uporabljajo molekularne metode s katerimi preiskujejo DNA kot metode, ki proučujejo proteine, saj je DNA stabilnejša molekula, ki svojo strukturo ohranja tudi pri visokih temperaturah. Z razvojem hibridizacijskih sond in PCR (verižna reakcija s polimerazo, ang. Polymerase chain reaction) lahko v živalskem tkivu odkrijemo specifično sekvenco DNA za določeno vrsto živali (López-Calleja in sod., 2005a). PCR je molekularna metoda, ki jo je leta 1983 izumil Nobelov nagrajenec Kary Mullis (McPherson in Møller, 2000). Je hitra, specifična in občutljiva metoda, ki služi različnim preiskavam. Uporabljamo jo lahko za določanje patogenih mikrobov, kvarljivcev, gensko spremenjenih organizmov, alergenov ter ugotavljanje avtentičnosti oz. pristnosti živil (Jeršek, 2009).

Stopnje, ki so vključene v preiskavo vzorca s PCR:

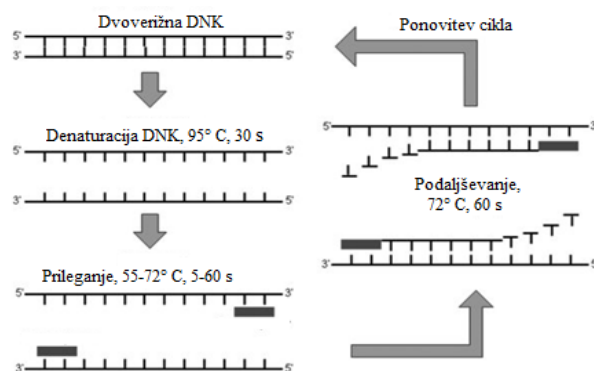
- priprava DNA,
- priprava in izvedba PCR,
- ugotavljanje pomnožkov.

Živilski izdelki predstavljajo kompleksen vir DNA. Čisto suspenzijo DNA dobimo tako, da le-to izoliramo s pomočjo fizikalno-kemijskih ali encimskih metod (Jeršek, 2009). Na tržišču obstajajo komercialni kompleti, kot je npr. NucleoSpin Food kit, ki s kemijskem delovanjem povzroči lizo celične stene in sprostitvev DNA. Postopek izolacije DNA zahteva natančnost, saj lahko vpliva na končne rezultate analize PCR (Kuchta, 2013).

Princip same verižne reakcije temelji na *in vitro* pomnoževanju dela tarčne DNA z encimom DNA-polimeraza v cikličnem termostatu. Termostabilen encim DNA-polimeraza, ki so ga izolirali iz termofilnih bakterij vrste *Thermus aquaticus*, ima optimalno aktivnost pri 72 °C. Svojo aktivnost ohranja tudi krajši čas pri višjih temperaturah (Jeršek, 2009). Pomnožitev poteka v termostatu, ki zagotavlja zvezno spreminjanje temperature v ciklu. Vsak cikel zajema tri faze (slika 1):

- denaturacija dvoverižne DNA, tako da nastaneta dve enoverižni molekuli (npr. 94-95 °C, 30 s),
- prileganje specifičnih začetnih oligonukleotidov na komplementarno mesto tarčne DNA (npr. 55-72 °C, 5-60 s),
- podaljševanje molekule DNA s pomočjo DNA-polimeraze (npr. 72 °C, 60 s).

Za pomnoževanje DNA je potrebna reakcijska mešanica, ki vsebuje: tarčno DNA, par začetnih oligonukleotidov, DNA-polimerazo, deoksinukleotid trifosfate vseh štirih baz (dNTA, dNTT, dNTG, dNTC), ione Mg^{2+} in reakcijski pufer. Izbira začetnih nukleotidov je odvisna od vrste PCR in vrste tarčne DNA. Njihovo zaporedje baz A, T, G, C je komplementarno delu tarčne DNA. Pomnožimo del tarčne DNA med izbranimi začetnima oligonukleotidoma. Velikost pomnožkov je določena z razdaljo med začetnima oligonukleotidoma, njihovo število se v vsakem ciklu podvoji (Jeršek, 2009).



Slika 1: Princip PCR (Hashiyada, 2011)

Pomnožke PCR najenostavnejše ugotovimo z agarozno gelsko elektroforezo (Jeršek, 2009). Elektroforeza je enostavna, hitra in občutljiva metoda za ločevanje pomnožkov ali fragmentov DNA. Agaroz se uporablja predvsem za ločevanje večjih makromolekul, kot so nukleinske kisline. Molekule zaradi svojega negativnega naboja potujejo v električnem polju proti anodi, zamrežen agarozni gel pa omogoča, da se manjše molekule lažje prebijajo skozi pore gela in tako potujejo hitreje kot večje molekule DNA (Hames, 1998). Po končani elektroforezi gel barvamo z etidijevim bromidom. Obarvana DNA pri obsevanju z ultravijolično svetlobo fluorescira. V primerjavi s standardno raztopino DNA lahko na podlagi intenzivnosti emitirane svetlobe ocenimo koncentracijo DNA v vzorcu (Jeršek, 2009).

2.3.1 PCR v realnem času

Razvoj PCR v realnem času predstavlja pomemben napredek pri analizi nukleinskih kislin. PCR v realnem času je zaprt sistem, zato je nevarnost kontaminacije precej manjša. Metoda je hitra in zanesljiva (Rodríguez-Lázaro in Hernández, 2013).

Reakcija poteka v cikličnem termostatu, kjer se temperatura zvezno spreminja v ponavljajočih se ciklih. Vsak cikel zajema dve fazi (Jeršek, 2009):

- denaturacija DNA pri $T > 90^{\circ}\text{C}$,
- prileganje oligonukleotidnih začetnikov (in sonde) in podaljševanje DNA pri temperaturi $50 - 60^{\circ}\text{C}$ z DNA-polimerazo.

Rezultat oz. pomnožek pri PCR v realnem času detektiramo s fluorescentnim signalom, ki ga lahko spremljamo med samo reakcijo. Fluorescentni signal vrednotimo po zaključku PCR kot število ciklov potrebnih, da pride do linearne faze podvojevanja (Jeršek, 2009).

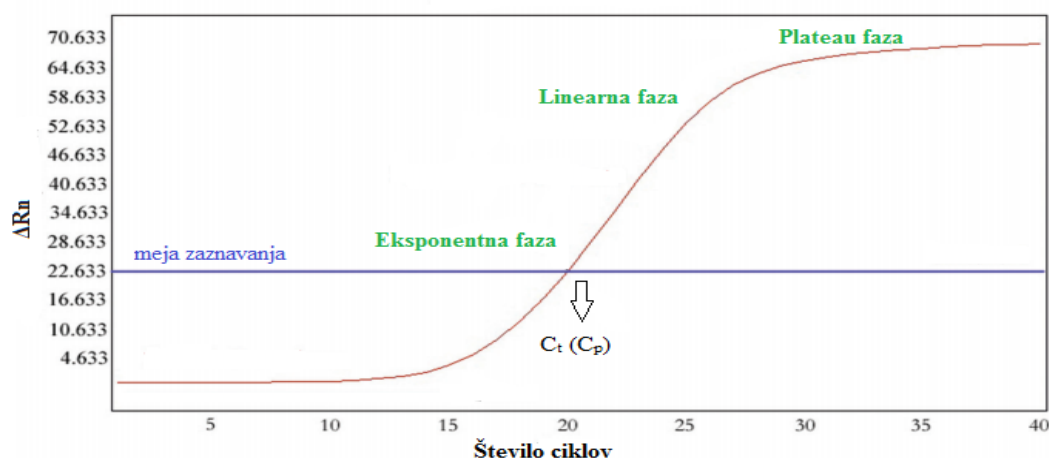
PCR v realnem času je bolj specifična in občutljiva metoda od klasičnega PCR. Omogoča sprotno spremljanje nastajanja pomnožkov z uporabo fluorescenčnih barvil. Količino pomnožkov lahko tudi kvantificiramo (Rodríguez-Lázaro in Hernández, 2013). Kljub visokim stroškom postaja uporaba PCR v realnem času v laboratorijih vse pogostejša.

Kot rutinska analiza se uporablja pri kliničnih diagnostičnih testih in v farmacevtski industriji pri razvoju novih zdravil (Bustin in Nolan, 2013). V preglednici 3 so navedene prednosti in slabosti PCR v realnem času.

Preglednica 3: Prednosti in slabosti PCR v realnem času (Logan in Edwards, 2004)

PCR v realnem času	
Prednosti:	
- podvajevanje in določanje pomnožkov poteka sočasno in v zaprtem sistemu - fluorescentna barvila/sonde omogočajo sproti spremljanje rezultatov reakcije - omogoča analizo večjega števila vzorcev - večja specifičnost - območje določanje med $10\text{-}10^{10}$ kopij - vzorce lahko kvantificiramo - programsko vodena reakcija	
Slabosti:	
- visoka cena - izvedba analize zahteva poznavanje protokolov in tehnične spretnosti	

Pomnoževanje in dokazovanje pomnožkov poteka sočasno. Krivulja pomnoževanja je grafični prikaz fluorescentnega signala v odvisnosti od števila ciklov PCR. S proučevanjem učinkovitosti nastajanja pomnožkov, PCR lahko razdelimo v tri faze. V prvi, eksponentni fazi, količina pomnožkov začne eksponentno naraščati. V vsakem ciklu se število tarčne DNA podvoji ob predvideni 100 % učinkovitosti. Doseganje le-te ni vedno mogoče. Za čim večjo učinkovitost je potrebno optimizirati razmere PCR. Zaradi izrabe substratov se reakcija sčasoma upočasni in prehaja v linearno fazo. Ko podvajanje ni več učinkovito in količina reaktantov začne primanjkovati, fluorescenca doseže zgornjo najvišjo vrednost. Nastopi zadnja faza, ki se imenuje plato-faza, kjer pomnoževanja ni več (Fraga in sod., 2008).



Slika 2: Krivulja pomnoževanja DNA s PCR v realnem času (Rodríguez-Lázaro in Hernández, 2013)

Legenda: ΔRn : normaliziran fluorescentni signal; C_t (C_p): cikel meje določanja

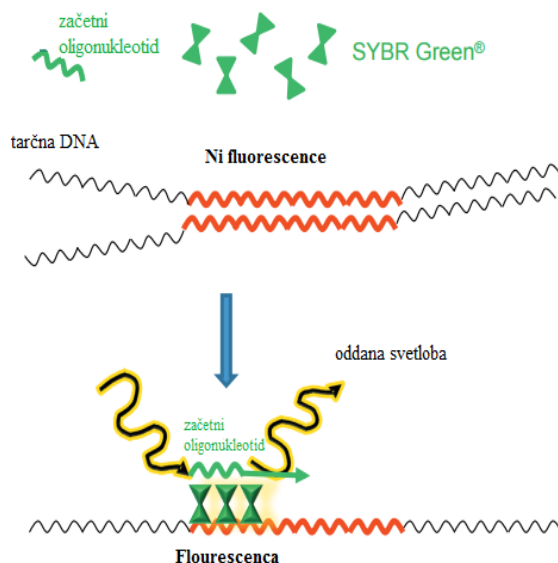
Količino pomnožkov lahko kvantificiramo. Izmerjeno intenziteto fluorescentnega signala izrazimo kot vrednost C_t . To je točka, kjer se krivulja fluorescence povzpne nad fluorescenco ozadja (Fraga in sod., 2008). Več kot je v vzorcu tarčne DNA, hitreje bo naraščala intenziteta fluorescence in manjša bo vrednost C_t (Jeršek, 2009).

Pri PCR v realnem času pomnožke določamo z uporabo fluorogenih barvil. Uporabimo lahko nespecifično ali specifično metodo določanja pomnožkov, uporaba slednje je pogostejša. Pri nespecifičnih metodah se fluorogena barvila vežejo na vse pomnožke, ne razlikujejo med specifičnimi in nespecifičnimi. Interpretacija rezultatov je zato lahko lažno pozitivna (Fraga in sod., 2008).

2.3.1.1 Nespecifične metode določanja pomnožkov

Za nespecifične metode določanja pomnožkov je značilno, da se fluorogeno barvilo veže na vsako dvovertižno molekulo DNA (slika 3). Fluorescira le, ko je vezano v DNA. Najpogosteje se uporablja barvilo SYBRGreen I, ki fluorescira pri valovni dolžini 480 nm (Fraga in sod., 2008). Vezava barvila SYBRGreen I v dvojno vijačnico DNA povzroči, da se jakost fluorescence poveča od 100 do 200 krat (Fraga in sod., 2008), nekateri avtorji navajajo, da tudi do 1000 krat (Rodríguez-Lázaro in Hernández, 2013). Več kot je pomnožkov DNA, več barvila se veže, večja je intenziteta fluorescence.

Nespecifične metode so v primerjavi s specifičnimi cenejše. Če pridobimo lažno pozitivne rezultate, moramo rezultate preveriti z analizo krivulje taljenja nastalih pomnožkov (Rodríguez-Lázaro in Hernández, 2013).



Slika 3: Princip nespecifične metode določanja pomnožkov z vezavo barvila SYBR Green I pri PCR v realnem času (Rodríguez-Lázaro in Hernández, 2013)

2.3.1.2 Specifične metode določanja pomnožkov

Specifične metode določanja pomnožkov temeljijo na procesu FRET (ang. Fluorescence resonance energy transfer), ki poteka preko dipol-dipol interakcije. Fluorescentni resonančni prenos energije je biofizikalni pojav, ki temelji na prenosu energije med dvema fluorogenima barviloma, donorjem in akceptorjem. Za učinkovit proces FRET morata molekuli donorja in akceptorja biti zadosti blizu (10-100 Å). Prav tako se morata emisijski spekter donorja ter absorpcijski spekter akceptorja ustrezno prekrivati (preglednica 4). Pri prenosu se zmanjša intenziteta fluorescence donorja in poveča intenziteta fluorescence akceptorja (Lee in sod., 2013).

Specifičnost nastalih pomnožkov lahko odkrivamo z oligonukleotidnimi sondami, ki so označene s fluorogenimi barvili, reporterski in zaviralni fluorogen. Oligonukleotidna sonda se veže na odsek tarčne dela DNA med začetnima oligonukleotidoma. Zaradi višje temperature taljenja se oligonukleotidna sonda veže na tarčno DNA pred začetnimi oligonukleotidi. Poleg nastanka pomnožka, je rezultat podvojevanja specifičnega dela DNA ter aktivnosti encima DNA-polimeraza tudi ločitev reporterskega in zaviralnega fluorogena. Posledica je povečanje intenzitete fluorescence (Fraga in sod., 2008).

Za specifično pomnoževanje tarčne DNA se najpogosteje uporablja dvojno označeno oligonukleotidno sondo TaqMan. TaqMan sonda je na 5'- koncu označena z reporterskim fluorogenom, na 3'-koncu sonde pa je vezan zaviralni fluorogen. Dokler sta barvili vezani na sondo, zaviralni fluorogen zavira oddajanje fluorescence reporterskega fluorogena. Pri podaljševanju določenega dela tarčne DNA pa encim DNA-polimeraza zaradi svoje eksonukleazne aktivnosti sondo razgradi. Zaradi tega se fluorogena ločita, reporterski fluorogen pa začne oddajati fluorescenco (Rodríguez-Lázaro in Hernández, 2013). Kot reporterski fluorogen se največkrat uporablja 6-karboksi-fluorescein (6-FAM), kot zaviralni pa 6-karboksi-tetrametil-rodamin (TAMRA) (Jeršek, 2009).

Preglednica 4: Absorpcijski in emisijski maksimumi različnih fluorogenih barvil
(Rodríguez-Lázaro in Hernandez, 2013)

Fluorogeno barvilo	Valovna dolžina (nm)	
	Absorpcijski maksimum	Emisijski maksimum
DABCYL	453	-
6-FAM	492	515
SYBR GREEN I	497	520
TET	521	536
JOE	527	548
HEX	535	556
TAMRA	555	580
ROX	575	602
VIC	538	554

Legenda: -: ni znano

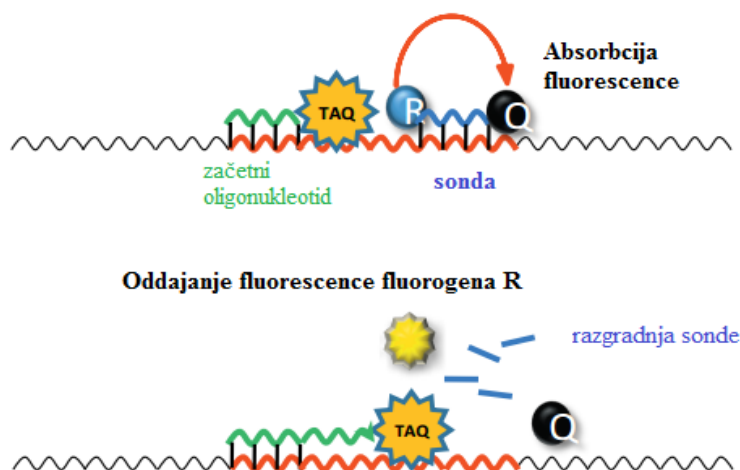
2.3.2 Kvantitativni PCR

Nadzor kakovosti, diagnoza bolezni in določanje izražanja genov je le nekaj področij, kjer je nenehni razvoj PCR nujno potreben. Njena uporaba je vse pogostejša. Poleg visoke občutljivosti in dobre ponovljivosti rezultatov, kvantitativni PCR omogoča tudi določanje količine pomnožka v vzorcu. Podatke oz. rezultate, ki jih pridobimo s PCR v realnem času, lahko ovrednotimo s kvantifikacijo, ki je lahko relativna ali absolutna (Pfaffl, 2004).

Relativno kvantifikacijo uporabljamo predvsem za ugotavljanje sprememb izražanja genov v preiskovanem vzorcu na podlagi relativne primerjave z referenčnim standardom. Relativna kvantifikacija je enostavnejša, saj ne potrebujemo standardne krivulje, ampak rezultate izračunamo s pomočjo matematičnih enačb. Za izračun potrebujemo podatke o vrednosti C_t in učinkovitosti reakcije (Fraga in sod., 2008).

Pri absolutni kvantifikaciji določamo točno količino tarčne DNA v neznanem vzorcu, kar omogoča primerjanje rezultatov različnih metod (Mackay, 2004). Gen iz vzorca kvantificiramo s pomočjo standardne krivulje, ki jo pridobimo s serijskim redčenjem standardnega vzorca znane koncentracije. Standardna krivulja predstavlja linearno razmerje med vrednostmi C_t in logaritmskimi vrednostmi količin standardne DNA. Koncentracijo neznane DNA v vzorcu lahko določimo s pomočjo standardne krivulje, če poznamo njeno C_t vrednost (Fraga in sod., 2008). Absolutna kvantifikacija je zahtevnejša in daje natančne ter ponovljive rezultate (Pfaffl, 2004).

Za ustrezno primerjavo različnih vzorcev med seboj je potrebno določiti učinkovitost reakcije (E). Teoretično, v idealnih razmerah je učinkovitost PCR 100 %, kar pomeni, da v vsakem ciklu dobimo dvakrat več produkta (Fraga in sod., 2008). Postopek določitve učinkovitosti PCR je opisan v poglavju 3.2.7.3.



Slika 4: Princip PCR v realnem času s sondo TaqMan (Rodríguez-Lázaro in Hernández, 2013)

Legenda: **R:** reporterski fluorogen; **Q:** zaviralni fluorogen

Kvantitativni PCR je tehnika, ki temelji na uporabi oligonukleotidne sonde TaqMan (slika 4), na katero sta vezana reporterski in zaviralni fluorogen. Pri podaljševanju tarčne DNA encim DNA-polimeraza sondo razgradi, fluorogena se ločita in reporterski fluorogen začne oddajati fluorescenco. Povečanje fluorescence je proporcionalno enako količini nastalih pomnožkov. Z uporabo fluorescence za dokazovanje pomnožkov se zmanjšuje uporaba gelske elektroforeze in etidijevega bromida. Je avtomatiziran proces, ki omogoča analizo velikega števila vzorcev (López-Calleja in sod., 2007b).

2.3.3 Inhibitorji PCR

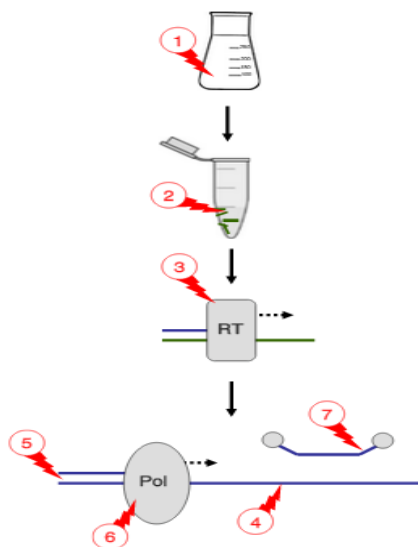
PCR v realnem času je metoda, ki je občutljiva na inhibitorne snovi, ki so lahko prisotne v analiziranem vzorcu. Inhibitorji PCR predstavljajo raznoliko skupino snovi, z različnimi lastnostmi in različnim mehanizmom delovanja. Nekateri inhibitorji so specifični, saj jih najdemo samo v določenih vrstah vzorcev. Za njihovo odstranitev moramo vzorec ustrezno pripraviti in po navodilih slediti protokolu. Inhibitorji lahko vplivajo na občutljivost metode, rezultati so lahko lažno negativni. Za zaviralni učinek prisotnega inhibitorja je potrebna ustrezna koncentracija snovi (Schrader in sod., 2012).

Inhibitorji PCR so zelo heterogena skupina kemičnih snovi. So organske ali anorganske snovi, ki se lahko pojavijo v trdni ali tekoči obliki. Najti jih je mogoče v različnih bioloških materialih (organi, kri, telesne tekočine), vzorcih iz okolja (voda, zemlja, zrak) in hrani (meso, mleko, sadje, zelenjava, morski sadeži). Poleg tega pa lahko inhibitorne snovi nehoti zaidejo v vzorec med prevozom in med predelavo ali pri ekstrakciji nukleinskih kislin. Najpogostejši zaviralci PCR so organske spojine (žolčne soli, sečnina, fenol, etanol, polisaharidi, natrijev dodecil sulfat, huminske kisline, taninske kisline). Med proteini pa so najpogostejši zaviralci kolegen, mioglobin, hemoglobin, laktoferin, imunoglobulin G (IgG) in proteinaze.

Aktivnost DNA-polimeraze najpogosteje zavirajo prisotnost sečnine, fenola, kalcija, kolagena in taninskih kislin (Schrader in sod., 2012). V vzorcu se največkrat nahajajo polifenoli in proteaze (Holzhauser, 2006).

Opel in sod. (2010) so v raziskavi proučevali učinek različnih inhibitorjev pri PCR. Ugotovili so, da kalcij zmanjšuje učinkovitost reakcije in vpliva na zmanjšano količino tarčne DNA. Na manjšo končno količino tarčne DNA vpliva tudi prisotnost taninov. PCR zavirajo huminske kisline in pigment melanin.

PCR lahko inhibitorji motijo v različnih fazah analize vzorca (slika 5). Nukleinske kisline lahko motijo inhibitorji, ki so prisotni na polimerni površini steklovine in epruvete tekom priprave, obdelave in ekstrakcije vzorca (točki 1 in 2). Delovanje encima lahko pri reverzni transkripciji zavre interakcija z melaninom (točka 3). Tarčno DNA lahko razgradijo nukleaze (točka 4). Zaviralci lahko ovirajo prileganje začetnih oligonukleotidov (točka 5), zavrejo lahko delovanje DNA-polimeraze (točka 6) in vezavo sond s fluorofori (točka 7).



Slika 5: Shematski prikaz faz priprave vzorca in PCR, kjer je najpogostejše delovanje inhibitorjev (Schrader in sod., 2012)

Legenda: **1, 2:** priprava in ekstrakcija DNA; **3:** reverzna transkripcija, **4:** delovanje nukleaze; **5:** prileganje začetnih oligonukleotidov; **6:** podaljševanje molekule DNA; **7:** določanje pomnožkov s fluorogenim barvilom

Razvitih je bilo več metod za odstranitev inhibitorjev iz vzorca. Najpogostejše uporabljena metoda je izolacija DNA s komercialnimi kompleti, ki zagotavlja učinkovito pridobivanje nukleinske kisline. Hkrati omogoča odstranitev komponent, ki zavirajo PCR (Bessetti, 2007). Inhibitorje lahko pri PCR preverjamo s serijskim redčenjem vzorcev in primerjavo dobljenih vrednosti C_t . Odstranitev inhibitorjev iz preiskovanega vzorca omogoča nemoten potek pomnoževanja DNA in ustrezno učinkovitost encimske reakcije (Holzhauser, 2006).

Znani inhibitorji, prisotni v vzorcih mleka so proteinaze (Bessetti, 2007). V vzorcih mleka je inhibicija PCR odvisna tudi od koncentracije kalcija. Vpliv vsebnosti maščob na zaviranje pomnoževanja DNA je zanemarljiv (Schrader in sod., 2012).

2.4 DOLOČANJE POTVORB S PCR V REALNEM ČASU

Odkrivanje potvorb mleka in mlečnih izdelkov je zelo pomembno, tako z ekonomskega kot zdravstvenega vidika. Z ustrezno deklaracijo mleka in mlečnih izdelkov zaščitimo potrošnike pred negativnimi pojavi alergijskih reakcij. V sirarstvu pa zaščitimo tiste sire, ki nosijo oznako zaščitenege geografskega porekla. Za ugotavljanje pristnosti mleka in mlečnih izdelkov so bile uporabljene različne analitske metode, ki temeljijo na določanju proteinov in DNA. Uporaba molekularnih metod, predvsem PCR v realnem času, postaja zaradi večje stabilnosti DNA vse pogostejša. Metodo PCR v realnem času odlikuje visoka specifičnost in občutljivost, prav tako omogoča detekcijo zelo nizkih koncentracij tarčne DNA (Mafra in sod., 2007).

López-Calleja in sod. (2005b) so z metodo PCR v realnem času ugotavljali avtentičnost sira mocarela. Mocarela vrste '*di bufala campana*', je italijanski sir z zaščitenim geografskim poreklom, narejen iz bivoljega mleka (*Bubalus bubalis*). Zaradi visoke cene proizvajalci pri proizvodnji tega sira dodajajo kravje mleko, ki na deklaraciji ni navedeno. Vzorce sirov mocarele so kupili v različnih trgovinah, standardne mešanice so pripravili sami. Začetne oligonukleotide so izdelali na podlagi sekvenc 12S rRNA genov prašiča, krave, ovce in koze. Izdelali so dva kompleta oligonukleotidov, z enim so določali vsebnost kravje DNA, z drugim pa vsebnost bivolje DNA. Pomnožek, specifičen za kravo, je bil velik 346 bp. Za določanje krave so uporabili začetna nukleotida (López-Calleja in sod., 2005b):

- a. 12SM-FW: 5'-CTAGAGGAGCCTGTTCTATAATCGATAA-3',
- b. 12SBT-REV2: 5'-AAATAGGGTTAGATGCACTGAATCCAT-3'.

Pomnožek, specifičen za določanje bivolje DNA, je bil velik 220 bp. Za določanje bivolje DNA so López-Calleja in sod. (2005b) uporabili enak začetni nukleotid 12SM-FW kot pri specifičnem določanju krave ter drug oligonukleotid 12SBUF-REV2:

- a. 12SM-FW: 5'-CTAGAGGAGCCTGTTCTATAATCGATAA-3',
- b. 12SBUF-REV2: 5'-TTCATAATAACTTTCGTGTTGGGTGT-3'.

Reakcijska mešanica volumna 50 µl je poleg ostalih sestavin vsebovala opisane začetne oligonukleotide (vsakega po 5 pmol) in 100 ng izolirane DNA. DNA so pomnoževali v cikličnem termostatu Progene s časovno-temperaturnim programom: 2 min 93 °C, sledilo je 35 ciklov s 30 s denaturacijo DNA pri 93 °C, 30 s prileganjem začetnih oligonukleotidov pri 61 °C in 45 s podaljševanjem verige pri 72 °C. Zadnjo fazo so podaljšali za 5 minut. Pomnožke so ugotavljali z agarozno gelsko elektroforezo (López-Calleja in sod., 2005b).

S PCR so López-Calleja in sod. (2005b) v standardnih mešanicah kravjega in bivoljega mleka uspešno identificirali 346 bp sekvenco tarčne kravje DNA. Tarčno DNA krave so uspešno določili v vseh standardnih mešanicah, ki so vsebovale različne koncentracije kravje DNA (100 %, 10 %, 5 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 %). Rezultati dokazujejo, da je PCR v realnem času specifična in občutljiva metoda, ki omogoča odkrivanje nizkih koncentracij tarčne DNA. Določili so mejo detekcije, in sicer LOD = 0,1 %.

Podobno raziskavo opisujejo tudi avtorji Dalmasso in sod. (2011). S PCR v realnem času so ugotavljali tarčno kravjo DNA v standardnih mešanicah kravjega in bivoljega mleka, ki so vsebovale različne koncentracije kravje DNA (30 %, 20 %, 10 %, 4 %, 2 %, 0,4 %, 0,2 %, 0,04 %, 0,02 %, 0,004 %). Začetne oligonukleotide in sonde so izdelali na podlagi podatkov iz baze GenBank. Za določanje krave (*Bos taurus*) in bivola (*Bubalus bubalis*) so uporabili enaka specifična začetna oligonukleotida:

- F: 5'-GCAAACGGAGCTTCAATGTTTT-3',
- R: 5'-CGTATCCTATAAATGCTGTGGCTATTACT-3'.

In različni specifični sonde:

- *Bos taurus*: 5'-6FAM-TTATATATGCACGTAGGACG-3'-MGB,
- *Bubalus bubalis*: 5'-VIC-TTATATATACACGTAGGACGAG-3'-MGB.

Reakcijska mešanica volumna 25 µl je vsebovala opisane začetne oligonukleotide in sondo, TaqMan PCR mešanico (ang. Genotyping Master Mix) in izolirano DNA. Pomnoževanje so izvedli s v cikličnem termostatu (7300 Real-Time PCR System) s časovno-temperaturnim programom: 10 min pri 95 °C, sledilo je 35 ciklov po 30 s pri 95 °C in 1 min pri 60 °C. Pomnožke so ugotavljali s pomočjo krivulje pomnoževanja, kjer so opazovali intenziteto fluorescentnega signala. Meja detekcije je bila 2 % kravjega mleka.

Pristnost kozjega mleka so s PCR v realnem času ugotavljali tudi Rodrigues in sod. (2012). Pripravili so standardne mešanice kravjega in kozjega mleka, ki so vsebovale različne koncentracije kravjega mleka (0 %, 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 5 %, 10 %, 50 %, 100 %). Izdelali so dva kompleta začetnih oligonukleotidov, z enim so določali vsebnost kravje DNA, z drugim pa vsebnost kozje DNA. Pomnožek, specifičen za kravo, je bil velik 300 bp. Za določanje krave so uporabili začetna oligonukleotida (Rodrigues in sod., 2012):

- a. BOSD-F: 5'-CAATAACTCAACACAGAATTTGC-3',
- b. BOSD-R: 5'-CGTGATCTAATGGTAAGGAATA-3'

Pomnožek, specifičen za določanje kozje DNA, je bil velik 444 bp. Za določanje koze so uporabili začetna oligonukleotida (Rodrigues in sod., 2012):

- c. GOAD-F: 5'-CCAACATGCGTATCCCGT-3',
- d. GOAD-R: 5'-AGCGGATGCATGATGAAATG-3'.

Reakcijska mešanica volumna 25 µl je poleg pufrja vsebovala opisane začetne oligonukleotide in 50 ng izolirane DNA. DNA so pomnoževali v cikličnem termostatu TC3000 s časovno-temperaturnim programom: 10 min denaturacija pri 95 °C, sledi 35 ciklov po 30 s pri 95 °C, 30 s pri 52 °C, 2 min 72 °C in na koncu podaljševanje verige pri 72 °C 5 min. Pomnožke so ugotavljali z agarozno gelsko elektroforezo. Izmed 160 analiziranih vzorcev kozjega mleka so v 66-ih dokazali prisotnost kravje DNA. Mejo detekcije jim je uspelo določiti pri 0,5 % kravje DNA (Rodrigues in sod., 2012).

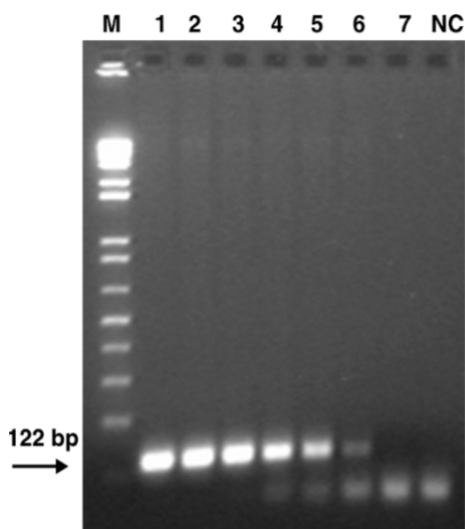
Mleko prežvekovalcev vsebuje visoko število somatskih celic, ki so priročen vir DNA. Raziskava, ki so jo opravili López-Calleja in sod. (2005a) opisuje razvoj metode PCR kot hitro tehniko za odkrivanje kozjega mleka v ovčjem mleku. Začetne oligonukleotide so izdelali na podlagi sekvenc 12S rRNA genov koze, ovce, krave in bivola. Pomnožek, specifičen za sesalce, je bil velik 720 bp. Pomnožek, specifičen za kozo, je bil velik 122 bp. Za določanje koze so uporabili začetna nukleotida (López-Calleja in sod., 2005a):

- a. 12SCH-DIR: 5'-AAACGTGTTAAAGCACTACATC-3',
- b. 12SCH-INV: 5'-GTCTTAGCTATAGTGTATCAGCTGCA-3'.

Pomnožek, specifičen za določanje ovčje DNA, je bil velik 371 bp. Za določanje kože so uporabili začetna nukleotida (López-Calleja in sod., 2005a):

- a. 12SM-FW: 5'-CTAGAGGAGCCTGTTCTATAATCGATAA-3',
- b. 12SOA-INV: 5'-GTCTCCTCTCGTGTGGTTGAGATA-3'.

Reakcijska mešanica volumna 50 μ l je poleg pufru vsebovala opisane začetne oligonukleotide in 100 ng izolirane DNA. DNA so pomnoževali v cikličnem termostatu Progene s časovno-temperaturnim programom: 2 min 93 °C, sledilo je 40 ciklov s 30 s denaturacijo DNA pri 93 °C, 30 s za prileganje začetnih oligonukleotidov pri 63 °C in podaljševanje verige 45 s pri 72 °C. Zadnjo fazo so podaljšali za 5 minut. Pripravili so standardne mešanice kozjega in ovčjega mleka z različno vsebnostjo kozjega mleka (0,1 %, 0,5 %, 1 %, 5 %, 10 %, 100 %). Pomnožke so ugotavljali z agarozno gelsko elektroforezo (slika 6). Uspešno so določili mejo detekcije pri 0,1 % kravje DNA (López-Calleja in sod., 2005a).



Slika 6: Agarozna gelska elektroforeza specifičnih pomnožkov kozjega mleka (122 bp) pridobljenih s PCR v realnem času za določanje DNA kože v ovčjem mleku (López-Calleja in sod., 2005a)

Legenda: **M:** molekularni označevalec pomnožkov DNA; **1:** 100 % koza; **2:** 10 % koza; **3:** 5 % koza; **4:** 1 % koza; **5:** 0,5 % koza; **6:** 0,1 % koza; **7:** 100 % ovca; **NC:** negativna kontrola

Kvantitativni PCR (qPCR) so López-Calleja in sod. (2007b) uporabili za odkrivanje kravjega mleka v standardnih mešanicah kravjega (0,5 %, 1 %, 5 % in 10 %) in ovčjega mleka. Kvantitativno določitev kravjega mleka v ovčjem mleku so izvedli s praktično umeritveno krivuljo, narejeno s standardno DNA krave. DNA so izolirali s komercialnim kompletom Wizard DNA Clean-up System. Začetne oligonukleotide in sonde so izdelali na podlagi sekvenc 12S rRNA genov krave, ovce, kože in bivola. Za specifično določanje krave in sesalcev so López-Calleja in sod. (2007b) uporabili dva kompleta različnih oligonukleotidnih začetnikov (preglednica 5) in enako sondo pri obeh parih oligonukleotidnih začetnikov (12SPROBE: 5'-TAGAGGAGCCTGTTCTATAATCGATAAACCCCG-3').

Preglednica 5: Par začetnih oligonukleotidov za specifično določanje krave in sesalcev (Lopez-Calleja in sod., 2007b)

Vrsta živali	Oligonukleotidni začetnik	Velikost pomnožka (bp)
Krava (<i>Bos taurus</i>)	12STAQMANFWM: 5'-AAAGGACTTGGCGGTGCTT-3'	252
	12STAQMANBT: 5'-TGGTTTCATAATAACTTTCGCGCT -3'	
Sesalci	12STAQMANFWM: 5'-AAAGGACTTGGCGGTGCTT-3'	428
	12STAQMANREVM: 5'-TCCAGTATGCTTACCTTGTTACGACTT-3'	

Reakcijska mešanica (25 µl) je vsebovala opisane začetne oligonukleotide (preglednica 5) in sondo, mešanico TaqMan PCR in 10 ng izolirane DNA. Pomnoževanje so izvedli z aparatom ABI PRISM 7700 z naslednjim časovno-temperaturnim programom: 2 min 50 °C, 10 min 95 °C, 40 ciklov s 15 s denaturacijo pri 95 °C in prileganje začetnih oligonukleotidov ter podaljševanje verige 1 min 60 °C (López-Calleja in sod., 2007b). Pomnožek, ki so ga pridobili s pomnoževanjem kravje DNA s specifičnima začetnima oligonukleotidoma (preglednica 5), so López-Calleja in sod. (2007b) očistili in vstavili v plazmid s komercialnim kompletom pGEMs-T Easy Vector System II (Promega). S standardno DNA krave so pripravili standardno krivuljo, s pomočjo katere so določali vsebnost kravjega mleka v mešanicah kravjega in ovčjega mleka. Vsebnost kravjega mleka so določali na podlagi enačbe (1):

$$Y = -2,86 x + 29,08 \text{ oz. } C_t = -2,86 \log[\text{krava (\%)}] + 29,08 \quad \dots (1)$$

Rezultati so pokazali, da je kvantifikacija bila uspešna do 0,4 % kravjega mleka, kjer so avtorji določili tudi mejo kvantifikacije (LOQ).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Vzorci sirov

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili 31 vzorcev sirov. Od tega je bilo 13 kozjih in 15 ovčjih. Dva vzorca sira sta bila mešana (kravje, kozje in ovčje mleko) in en vzorec samo iz kravjega mleka. Vzorce sirov smo kupili v večjih trgovskih centrih in manjših trgovinah, in sicer v Celju (Engrotuš d.d. Supermarket Planet Tuš Celje, Mercator center Celje) ter v Ljubljani (Mercator Brdo, Hipermarket Mercator, Spar Slovenija d.o.o., Bio Market Vita care) in tržnicah. V teh trgovinah so prevladovali siri tujega porekla, nekateri pa so bili tudi slovenskega porekla. Vzorci sirov, katere smo uporabili pri eksperimentalnem delu, so navedeni v preglednicah 6, 7, 8 in 9 skupaj z opisi, ki so bili navedeni na posamezni deklaraciji.

Preglednica 6: Opis vzorca kravjega sira

Oznaka	Vzorec	Sestavine navedene na deklaraciji	Prodajno mesto
G	Poltrdi sir	Pasterizirano kravje mleko, jedilna sol, sirišče, sirarske kulture, barvilo β -karoten.	A
Legenda: A: Mercator Brdo, Ljubljana			

Preglednica 7: Opis vzorcev ovčjih sirov

Oznaka	Vzorec	Sestavine navedene na deklaraciji	Prodajno mesto
O1	Trdi masten sir iz pasteriziranega ovčjega mleka	Min. 45 % mlečne maščobe v suhi snovi, min. 60 % suhe snovi.	B
O2	Mladi ovčji sir, tri-četrtni mastni	Vsebuje min. 40 % suhe snovi, 40 % mlečne maščobe v suhi snovi. Delno pasterizirano posneto mleko, mlečna ovčja sirotka pasterizirana, kuhinjska sol.	B
O3	Poltrdi ovčji sir	Pasterizirano ovčje mleko, jedilna sol, sirilo, mlečna kultura <i>Lactobacillus Bulgaricus</i> . Suha snov min. %, maščoba v suhi snovi min. 44 %, sol 1,5 % - 3,5 %.	B
O4	Poltrdi ovčji sir	Pasterizirano ovčje mleko, izbrani encimi, sirilo, sol, skorja ni užitna. Mlečne maščobe min. 31 %, suha snov min. 61 %.	C

Se nadaljuje ...

... nadaljevanje preglednice 7: Opis vzorcev ovčjih sirov

Oznaka	Vzorec	Sestavine navedene na deklaraciji	Prodajno mesto
O5	Sveži ovčji sir	100 % ovčje mleko, sirilo ovčjega mleka, sol, min. 28 % mlečne maščobe v suhi snovi, min. 45 % suhe snovi.	C
O6	Trdi ovčji sir	100 % pasterizirano ovčje mleko, sol, sirilo, kalcijev klorid, konzervansi: E252, E1105. 50 % maščobe v suhi snovi, skorja ni užitna.	C
O7	Trdi ovčji sir	Pasterizirano ovčje mleko, sol, sirilo, naravni encimi, min. 33 % mlečne maščobe v suhi snovi, suha snov min. 62 %.	C
O8	Trdi mastni sir	Min. 60 % suha snov, 45 % mlečne maščobe v suhi snovi. 100 % ovčje mleko, mlečne kulture, sirilo, CaCl ₂ , sol.	C
O9	Trdi ovčji sir, polnomastni	50 % maščobe v suhi snovi, 60 % suhe snovi.	D
O10	Ovčji sir	100 % ovčji sir.	E
O11	Ovčji sir, polnomastni, poltrdi	Iz 100 % ovčjega mleka, brez konzervansov, min. 55 % suhe snovi, minimalno 35% maščobe v suhi snovi.	E
O12	Poltrdi ovčji sir	Suha snov min. 49 %, min. 50 % maščobe, polnomastni sir.	E
O13	Poltrdi ovčji sir	Pasterizirano ovčje mleko, izbrani encimi, sirilo, sol, skorja ni užitna. Mlečne maščobe min. 31 %, suha snov min. 61 %.	A
O14	Trdi ovčji sir	Pasterizirano ovčje mleko, sol, sirilo, naravni encimi, min. 33 % mlečne maščobe v suhi snovi, suha snov min. 62 %.	A
O15	Trdi ovčji sir	100 % pasterizirano ovčje mleko, sol, sirilo, kalcijev klorid, konzervansi: E252, E1105. 50 % maščobe v suhi snovi, skorja ni užitna.	A

Legenda: **A:** Mercator Brdo Ljubljana; **B:** Engrotuš d.d. Supermarket Planet Tuš Celje; **C:** Mercator Hipermarket Center Celje; **D:** Hipermarket Mercator, Šmartinska, Ljubljana; **E:** ljubljanska tržnica

Preglednica 8: Opis vzorcev kozjih sirov

Oznaka	Vzorec	Sestavine navedene na deklaraciji	Prodajno mesto
K1	Sir iz 100 % kozjega mleka	Pasterizirano kozje mleko, sol, sredstvo za spodbujanje kislosti, sirilo, konzervans. Lahko vsebuje sledi jajc.	A
K2	Poltrdi kozji sir za rezanje	Mlečne masti v suhi snovi 48 %, suha snov min. 58 %.	A
K3	Trdi masten sir iz pasteriziranega kozjega mleka	Min. 45 % mlečne maščobe v suhi snovi, min. 60 % suhe snovi.	B
K4	Kozji polnomastni, poltrdi sir v kolutu	Pasterizirano kozje mleko, jedilna sol, starter kultura, lizocim, vegetarijansko sirilo. 50 % maščobe v suhi snovi, 58 % suhe snovi.	B
K5	Sir iz 100 % kozjega mleka	Pasterizirano kozje mleko, sol, sredstvo za spodbujanje kislosti, sirilo, konzervans. Lahko vsebuje sledi jajc. Min. 50 % maščobe v suhi snovi.	C
K6	Mehki kozji sir z belo plesnijo	Primeren za vegetarijance. Min. 45 % mlečne maščobe v suhi snovi. Sestavine: pasterizirano kozje mleko.	C
K7	Kozji polnomastni, poltrdi sir v kolutu	Maščobe v suhi snovi 50 %, suha snov: 58 %. Pasterizirano kozje mleko, jedilna sol, starter kulture vegetarijansko sirilo, jajčni lizocim.	C
K8	Poltrdi kozji sir za rezanje	Mlečne masti v suhi snovi 48 %, suha snov min. 58 %.	C
K9	Poltrdi masleni kozji sir	Min. 48 % maščobe v suhi snovi. Kozji sir je narejen po tradicionalnem postopku.	F
K10	Kozji sir	Sir iz pasteriziranega kozjega mleka, 50 % maščobe v suhi snovi. Pasterizirano kozje mleko, jedilna sol, poper, kalcijev klorid, E251, vegetarijansko sirilo, lizocim.	G
K11	Poltrdi, polnomasten sir iz surovega kozjega mleka	Min. 50 % suhe snovi, najmanj 45 % maščobe v suhi snovi.	E
K12	Sir iz 100 % kozjega mleka	Pasterizirano kozje mleko, sol, sredstvo za spodbujanje kislosti, sirilo, konzervans. Lahko vsebuje sledi jajc. Min. 50 % maščobe v suhi snovi.	A
K13	Poltrdi kozji sir za rezanje	Poltrdi sir za rezanje, mlečne masti v suhi snovi 48 %, suha snov min. 58 %.	A

Legenda: **A:** Mercator Brdo Ljubljana; **B:** Engrotuš d.d. Supermarket Planet Tuš Celje; **C:** Mercator Hipermarket Center Celje; **E:** Ljubljanska tržnica; **F:** BTC City, Bio market Vita care, Pogačnik Lea s. p., Jesenice; **G:** Spar Slovenija d.o.o.

Preglednica 9: Opis vzorcev mešanih sirov

Oznaka	Vzorec	Sestavine navedene na deklaraciji	Prodajno mesto
M1	Poltrdi mešani sir	Pasterizirano kravje mleko (60 % min.), kozje mleko (17 % min.), ovčje mleko (12 % min.), sol, kalcijev klorid, sirilo, konzervans iz jaje, 50 % mlečne maščobe v suhi snovi.	A
M2	Poltrdi mešani sir	Pasterizirano kravje mleko (60 % min.), kozje mleko (17 % min.), ovčje mleko (12 % min.), sol, kalcijev klorid, sirilo, konzervans iz jaje (E1105). 50 % mlečne maščobe v suhi snovi.	C

Legenda: **A:** Mercator Brdo Ljubljana; **C:** Mercator Hipermarket Center Celje

3.1.2 Standardni vzorci mešanih sirov

Standardne vzorce mešanih sirov smo pripravili tako, da smo na ločeni delovni površini naribali kravji in kozji sir ter ju shranili v sterilnih plastičnih lončkih. Nato smo mešanice pet minut homogenizirali z ročnim mešanjem z žlico. Pripravili smo različne mešanice sira. Mešanica z 0 % kravjega sira je bila 100 % kozji sir (vzorec K1, preglednica 8). Mešanica s 50 % kravjega sira je vsebovala 12,5 g kravjega sira (vzorec G, preglednica 6) in 12,5 g kozjega sira (vzorec K1, preglednica 8). Mešanica s 25 % kravjega sira je vsebovala 6,25 g kravjega sira in 18,75 g kozjega sira. Na enak način smo pripravili 1 %, 10 % in 75 % mešanice. Iz mešanic sira smo nato izolirali DNA in izmerili njeno koncentracijo. Za izvedbo PCR v realnem času smo vzorce normalizirali na 5 ng/μl.

3.1.3 Laboratorijska oprema

V preglednici 10 je navedena laboratorijska oprema, ki smo jo uporabili pri raziskovalnem delu.

Preglednica 10: Laboratorijska oprema

APARAT	OZNAKA	PROIZVAJALEC
pipete in nastavki	0,5 – 10 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl	Eppendorf, Francija
centrifuga	Mini Spin PLUS	Eppendorf, Francija
vodna kopel	WB-30	Kambič, Slovenija
tehtnica	Monobloc PB1502-S	Mettler Toledo, Švica
vrtnično mešalo	TTS 2	Yellowline, Nemčija
hladilnik	/	Gorenje, Slovenija
zamrzovalnik (-20 °C)	/	Gorenje, Slovenija
PCR v realnem času	ABI Prism 7500	Applied Biosystems, ZDA
spektrofotometer	LAMBDA Bio+	Perkin Elmer, ZDA
razbijalec celic	BBX 24 Bullet Blender	Next Advanced, ZDA
epruvete	1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Francija
mikrotiterske ploščice	/	Eppendorf, Francija

Pri raziskovalnem delu smo poleg navedene laboratorijske opreme (preglednica 10), uporabili tudi standardni laboratorijski material, kot so: strgala, žlice, spatule, pincete, stojala, aluminijasta folija, rokavice in parafilm.

3.1.4 Kemikalije za izolacijo DNA iz vzorcev sira

Pri raziskovalnem delu smo za izolacijo DNA iz vzorcev sira uporabili dva komercialna kompleta.

Komplet NucleoSpin Food (ang. 50 preparation, REF 740945.50, Macherey-Nagel GmbH & Co, Nemčija) vsebuje:

- pufer CF za lizo celične stene (ang. Lysis Buffer CF, 100 ml)
- pufer C2 (ang. Buffer C2, 24 ml)
- pufer C3 (ang. Buffer, C3, 6 ml)
- mešanica pufra C4, sestavljena iz pufra C2 in C3 v razmerju 4:1 (ang. Binding Buffer C4, C3:C2 = 1:4)
- pufer CQW (ang. Wash Buffer CQW, 30 ml)
- pufer C5 (ang. Wash Buffer C5, 20 ml)
- pufer CE za elucijo (ang. Elution Buffer CE, 15 ml)
- proteinaza K (ang. Proteinase K, 6 mg)
- zbiralne epruvete (ang. Collection Tubes, 2 ml)
- kolone za izpiranje (ang. Food Spin Columns, 50 ml)

Dodaten material:

- absolutni etanol (Ethanol, Merck, Index-No: 603-002-00-5, Nemčija)
- epruvete 2 ml (Eppendorf, Francija)

Komplet Smarthelex Complex Samples (ExVivon Ltd, Ljubljana, Slovenija):

- Sol II
- Sol III
- Sol IV
- Sol V
- Sol VI
- steklene kroglice

Dodaten material:

- dH₂O
- epruvete 2 ml (Eppendorf, Francija)

3.1.5 Kemikalije za pripravo reakcijske mešanice za PCR v realnem času

Za pripravo reakcijske mešanice za PCR v realnem času smo uporabili dva sistema: Bos/Man López-Calleja in sod. (2007b) in Cow-1/BoCaOv (Jeršek in sod., 2014).

3.1.5.1 Sistem Bos/Man

Kot navajajo López-Calleja in sod. (2007b), smo pri tem sistemu uporabili začetne oligonukleotide, specifične za kravo (Bos-F/Bos-R) in začetne oligonukleotide, specifične za sesalce (Man-F/Man-R). Prav tako smo uporabili sondo, specifično za kravo ter sesalce (Bos-P/Man-P). Uporabili smo spremenjen začetni oligonukleotid BOS-R. Volk in sod. (2014) so ugotovili, da začetni oligonukleotid, ki so ga uporabili López-Calleja in sod. (2007b), ni popolnoma komplementaren sekvencam za kravo (*Bos taurus*). Razlika je pri 21 nukleotidu kjer je zapisan C, moral bi pa biti T. Tako smo namesto začetnega nukleotida 12STAQMANBT: 5- TGG TTT CAT AAT AAC TTT CGC GCT uporabili BOS-R: 5-TGG TTT CAT AAT AAC TTT CGT GCT-3.

Za pripravo reakcijske mešanice smo uporabili (López-Calleja in sod., 2007b):

- Par začetnih oligonukleotidov, specifičnih za kravo:
 - BOS-F: 5-AAA GGA CTT GGC GGT GCT T-3
 - BOS-R: 5-TGG TTT CAT AAT AAC TTT CGT GCT-3
- Sonda -P: 5-FAM-TAGAGGAGCCTGTTCTATAATCGATAAACCCCG-TAMRA-3

- Par začetnih oligonukleotidov, specifičnih za sesalce:
 - MAN F: 5-AAA GGA CTT GGC GGT GCT T-3
 - MAN R: 5-TCC AGT ATG CTT ACC TTG TTA CGA CTT-3
- Sonda -P: 5-FAM-TAGAGGAGCCTGTTCTATAATCGATAAACCCCG-TAMRA-3
- DNA/RNA prosto vodo (Nuclease free water, Qiagen, Nemčija)
- Univerzalna mešanica za PCR (TaqMan Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems, ZDA)

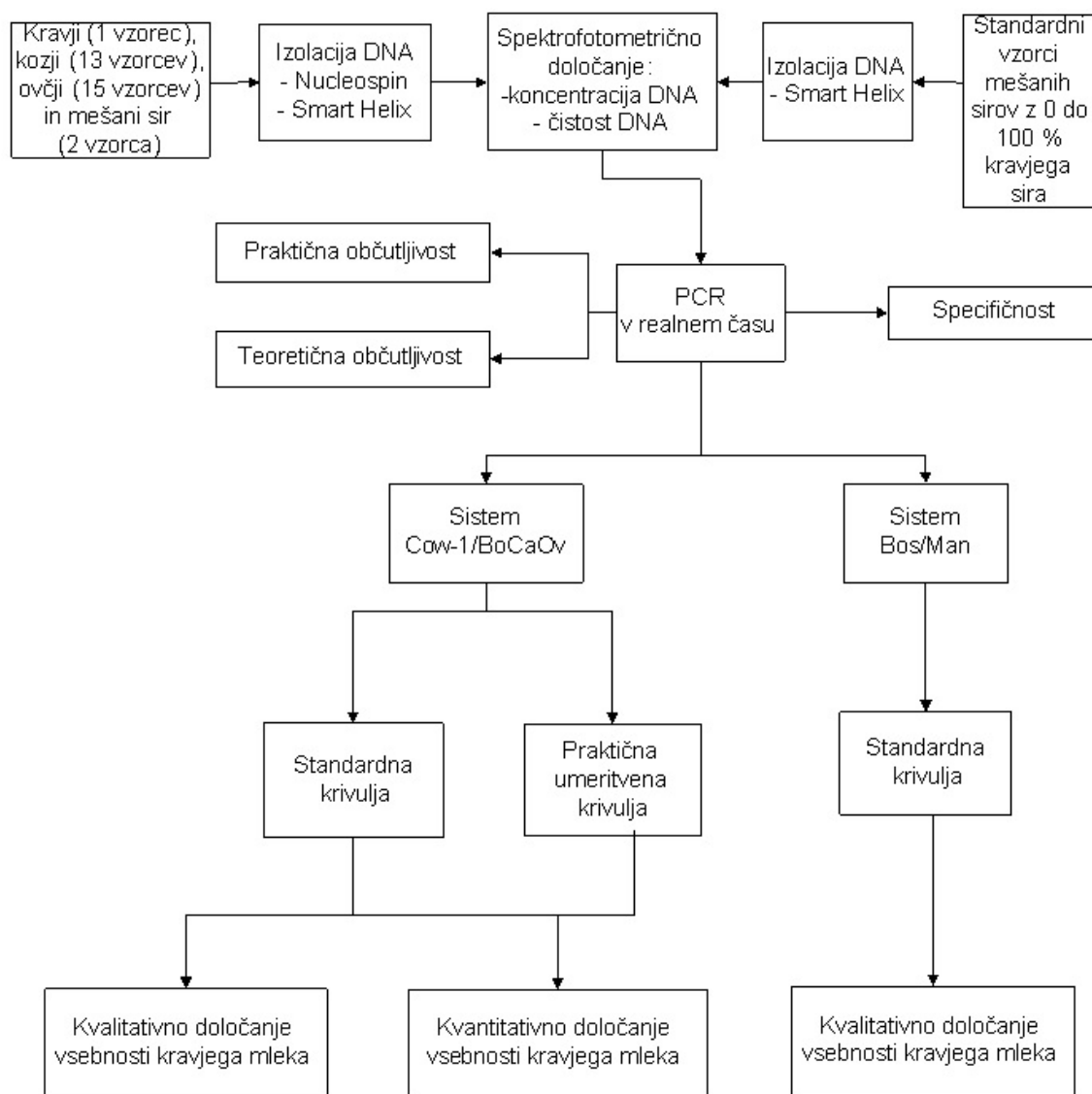
3.1.5.2 Sistem Cow-1/BoCaOv

- Mešanica za kravo vsebuje (TaqMan Universal PCR Master Mix II, Applied Biosystems, ZDA):
 - TaqMan with UNG
 - Cow-1 Assay
- Mešanica za sesalce vsebuje (TaqMan Universal PCR Master Mix II, Applied Biosystems, ZDA):
 - TaqMan with UNG
 - BoCaOv Assay
- DNA/RNA prosto vodo (Nuclease free water, Qiagen, Nemčija)

3.2 METODE

3.2.1 Potek eksperimentalnega dela

Potek eksperimentalnega dela prikazuje slika 7. Da bi v različnih mešanih, kozjih in ovčjih sirih določili nedovoljen dodatek kravjega mleka smo poleg dveh načinov izolacije DNA iz sirov pri PCR v realnem času preizkusili tudi dva sistema (Cow-1/BoCaOv in Bos/Man) in rezultate kvantitativno in kvalitativno ovrednotili.



Slika 7: Shema eksperimentalnega dela

3.2.2 Postopka izolacije DNA iz vzorcev sira

3.2.2.1 Komercialni komplet NucleoSpin Food

Izolacijo DNA smo izvedli s protokolom za izolacijo DNA s kompletom NucleoSpin Food. Izolacijo DNA iz vzorcev sira smo izvedli v več stopnjah:

1. Priprava vzorca: vzorce sira smo s pomočjo strgala naribali, nato pa v 2-ml epruveto odtehtali 0,2 g vzorca.
2. Liza celic: vzorcu smo dodali 550 µl pufra CF, segretega v vodni kopeli na 65 °C. Po dodatku pufra smo 2-ml epruveto z vzorcem 15 s previdno mešali na namiznem mešalu. Nato smo dodali 10 µl proteinaze-K in ponovno premešali na namiznem mešalu (30 s). Sledila je inkubacija, 30 min v vodni kopeli pri 65 °C. Po inkubaciji smo zmes centrifugirali 10 min pri 10 000 obr./min.
3. Prilagoditev pogojev za vezavo DNA: v novo 2-ml epruveto smo prenesli 300 µl dobljenega supernatanta, v katero smo predhodno dodali 300 µl pufra C4 in 300 µl absolutnega etanola. Zmes smo nato 30 s mešali na namiznem mešalu.
4. Vezava DNA: 750 µl mešanice smo iz 2-ml epruvete prenesli v kolono za izpiranje, ki je vstavljena v zbiralno epruveto. Mešanico smo centrifugirali 1 min pri 11 000 obr./min in tekočo fazo v zbiralni epruveti takoj zavrgli.
5. Čiščenje in sušenje kolone: v kolono za izpiranje smo odpipetirali 400 µl pufra CQW, centrifugirali 1 min pri 11 000 obr./min in zavrgli tekočo fazo. V kolono za izpiranje smo znova odpipetirali 700 µl pufra C5, centrifugirali 1 min pri 11 000 obr./min in zavrgli tekočo fazo. Nazadnje smo dodali 200 µl pufra C5, centrifugirali 2 min pri 11 000 obr./min in zavrgli tekočo fazo.
6. DNA se je vezala na membrano kolone, zato je bila potrebna elucija DNA. Kolono za izpiranje smo prestavili v novo 2-ml epruveto. V kolono za izpiranje smo dodali 100 µl pufra CE, segretega na 70 °C in inkubirali 5 min pri sobni temperaturi. Sledilo je centrifugiranje kolone 1 min pri 11 000 obr./min. DNA je prešla v tekočo fazo v 2-ml epruveto, ki smo jo za nadaljnje analize shranili v zamrzovalniku pri -20 °C.

3.2.2.2 Komercialni komplet SmartHelix Complex Samples

Izolacijo DNA smo izvedli s protokolom za izolacijo DNA s kompletom SmartHelix Complex Samples.

V 2-ml epruveto smo zatehtali 0,2 g vzorca sira, dodali 300 µl Sol II in premešali s pipeto. Nato smo dodali 375 mg steklenih kroglic in 375 µl Sol III. To smo premešali z vrtničnim mešalom in 3 minute stresali na razbijalcu celic pri hitrosti 8. Vzorec smo 5 minut centrifugirali pri 20 °C in 10 000 obr./min ter zgornjo fazo prenesli v novo 2-ml epruveto.

Postopek razbijanja celic smo ponovili še dvakrat: vzorcu smo dodali 300 μ l Sol II, 375 μ l Sol III in 375 mg steklenih kroglic. Vzorec smo premešali z vrtnčnim mešalom in 3 minute stresali na razbijalcu celic s hitrostjo 8, centrifugirali 5 minut pri 20 °C in 10 000 obr./min ter odpipetirali zgornjo fazo.

Po razbijanju celic sledi obarjanje proteinov. To smo storili tako, da smo vzorcu dodali 300 μ l Sol III, premešali z vrtnčnim mešalom in centrifugirali 5 minut pri 20 °C in 10 000 obr./min. Zgornjo fazo smo prenesli v novo 2-ml epruveto in postopek znova ponovili. Pazili smo, da nismo pipetirali oborjenih proteinov.

Nato smo dodali $\frac{1}{4}$ volumna (100 μ l) Sol IV in 2 volumna (800 μ l) hladne Sol VI in vzorec ročno premešali z obračanjem. Sledila je enourna inkubacija vzorca v zamrzovalniku pri -20 °C.

Po inkubaciji smo vzorec centrifugirali 25 minut pri 4 °C in 14 000 obr./min. Supernatant smo previdno odpipetirali in ga zavrgli, peletu pa smo dodali 750 μ l Sol VI. Vzorec smo centrifugirali 15 minut pri 4 °C in 14 000 obr./min, odpipetirali supernatant in posušili pelet. Posušeno DNA smo raztopili v 150 μ l H₂O, izmerili koncentracijo in čistost in vzorce shranili pri -20 °C.

3.2.3 Določitev koncentracije in čistosti izolirane DNA

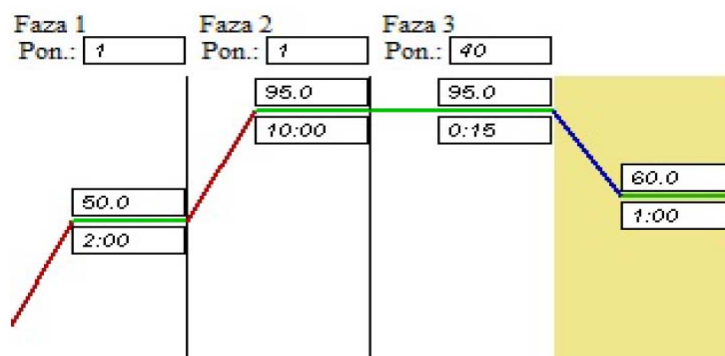
Koncentracijo in čistost DNA smo določili spektrofotometrično, saj je to hitra in natančna metoda. Molekule DNA in RNA absorbirajo pri valovni dolžini 260 nm, večina proteinov pa pri 280 nm. O čistosti DNA govorimo takrat, kadar je vrednost razmerja absorbanc $A_{260/280}$ med 1,8 in 2,0 (Boesenberg-Smith in sod., 2012). Če je to razmerje nižje, pomeni, da so v vzorcu prisotni proteini in druge nečistoče zaradi katerih je natančno določevanje vsebnosti koncentracije nukleinskih kislin onemogočeno (Psifidi in sod., 2010). Večina pufrov, kot so Tris, EDTA in gvanidin izotiocianat, absorbira pri 230 nm. To lahko vpliva na višje razmerje čistosti, zaradi česar dobimo lažno pozitivne rezultate čistosti (Boesenberg-Smith in sod., 2012).

Vsem vzorcem sirov smo izmerili vrednosti absorbance pri treh valovnih dolžinah, in sicer 230 nm, 260 nm in 280 nm. Pred merjenjem je spektrofotometer vedno potrebno umeriti na dH₂O. Po umerjanju smo izvedli meritve. Na kiveto smo nanegli 3 μ l izolirane DNA in za vsak vzorec odčitati rezultate kot čistost in koncentracija DNA. Koncentracija DNA (C) je podana v ng/ μ l, čistost DNA pa kot razmerje absorbanc $A_{260/280}$ in $A_{260/230}$.

3.2.4 Priprava in izvedba PCR v realnem času

Za določanje potvorb ovčjega in kozjega sira s kravjim mlekom smo uporabili PCR v realnem času. Uporabili smo metodo določanja pomnožkov s sistemom Bos/Man in metodo določanja pomnožkov s sistemom Cow-1/BoCaOv.

Za pomnoževanje in določanje pomnožkov smo uporabili univerzalni program aparata ABI Prism 7500. Slika 8 prikazuje razmere pomnoževanja.



Slika 8: Faze, ki prikazujejo temperaturo in čas pomnoževanja DNA v aparatu ABI Prism 7500

3.2.4.1 Metoda določanja pomnožkov s sistemom Bos/Man

PCR v realnem času z metodo določanja pomnožkov s sistemom Bos/Man smo uporabili pri vzorcih, kjer smo DNA izolirali s komercialnim kompletom NucleoSpin Food. To metodo določanja pomnožkov smo izvedli v 25 µl reakcijski mešanici.

Za pripravo mešanice za en vzorec za določanje krave smo zmešali:

- 12,5 µl TaqMan Universal PCR Master Mix,
- 0,75 µl začetnega nukleotida BOS-F (300 nM),
- 2,25 µl začetnega nukleotida BOS-R (900 nM),
- 0,125 µl sonde BOS-P (50 nM).

Za pripravo mešanice za en vzorec za določanje sesalcev smo zmešali:

- 12,5 µl TaqMan Universal PCR Master Mix,
- 0,75 µl začetnega nukleotida MAN-F (600 nM),
- 2,25 µl začetnega nukleotida MAN-R (900 nM),
- 0,125 µl sonde MAN-P (50 nM).

Reakcijski mešanici smo pripravili za vnaprej določeno število vzorcev in ju razdelili v epruvete za PCR po 22,5 µl. Tik pred zagonom PCR smo reakcijski mešanici dodali 2,5 µl izolirane DNA vzorca. V primeru negativne kontrole pa smo namesto izolirane DNA dodali 2,5 µl dH₂O.

3.2.4.2 Metoda določanja pomnožkov s sistemom Cow-1/BoCaOv

PCR v realnem času z metodo določanja pomnožkov s sistemom Cow-1/BoCaOv smo uporabili pri vzorcih, kjer smo DNA izolirali s komercialnim kompletom SmartHelix Complex Samples. To metodo določanja pomnožkov smo izvedli v 20 µl reakcijski mešanici.

Za pripravo mešanice za en vzorec za določanje krave zmešamo:

- 10 μ l TaqMan with UNG
- 1 μ l Cow-1

Za pripravo mešanice za en vzorec za določanje sesalcev pa potrebujemo:

- 10 μ l TaqMan with UNG
- 1 μ l BoCaOv

Reakcijski mešanici smo razdelili v epruvete za PCR po 11 μ l. Tik pred zagonom PCR smo dodali 9 μ l izolirane DNA vzorca. V primeru negativne kontrole pa smo namesto izolirane DNA dodali 9 μ l dH₂O.

Po vsakem končanem PCR smo vrednotili rezultate. Za primerjavo rezultatov smo mejo zaznavanja nastavili ročno na vrednost 0,02 ob avtomatski nastavitvi meje izhodišča. Pri tako postavljenih parametrih smo po zaključeni encimski reakciji lahko določili vrednosti C_t . Vrednost C_t je število ciklov, pri katerem se intenziteta fluorescentnega signala vzorca poveča nad fluorescenco ozadja. Če je prišlo do pomnoževanja, je bil pozitiven rezultat tisti, ki je imel vrednost C_t nad mejo zaznavanja.

3.2.5 Optimizacija PCR v realnem času

Optimizacijo začetnih oligonukleotidov (BOS in MAN) in sonde smo povzeli po raziskavi Volk in sod. (2014). Za PCR v realnem času smo uporabili najbolj optimalne kombinacije koncentracij začetnih oligonukleotidov in sonde. Kot najbolj optimalne so Volk in sod. (2014) izbrali tiste, ki so imele pozitiven rezultat pri najnižji vrednosti C_t in kjer je standardna krivulja imela najboljši R^2 in E. Izbrana optimalna kombinacija začetnih nukleotidov za specifično določanje krave je 300 nM BOS-F in 900 nM BOS-R. Za specifično določanje sesalcev pa 600 nM MAN-F in 900 nM MAN-R. Za specifično določanje krave in sesalcev smo lahko uporabili enaki koncentraciji sonde, ker se sonda BOS-P (za določanje krave) in sonda MAN-P (za določanje sesalcev) vežeta na isti odsek DNA. Tako smo uporabili 50 nM BOS-P.

Optimizacija sistema Cow-1/BoCaOv ni bila potrebna, saj je sistem že bil optimiziran s strani proizvajalca.

3.2.6 Določitev specifičnosti PCR v realnem času

Specifičnost pomeni sposobnost metode, da v kompleksnem vzorcu identificira samo ciljno molekulo DNA. Zelo pomembna je optimalna izbira začetnih oligonukleotidov in sond, da ne dobimo lažno pozitivnih rezultatov (Smith, 2013). Lažno pozitivne rezultate lahko pridobimo tudi zaradi navzkrižne kontaminacije.

Specifičnost PCR v realnem času smo določili tako, da smo iz različnih vrst sira izolirali DNA in jo pomnožili z začetnimi oligonukleotidi, specifičnih za kravo s sistemom Cow-1/BoCaOv. Uporabili smo 7 vzorcev sira, in sicer: 1 mešani, 4 ovčje in 2 kozja sira. Ugotavljali smo, pri katerem vzorcu encimska reakcija daje pozitiven rezultat.

Kot pozitivne rezultate smo upoštevali tiste, kjer smo določili vrednost C_t in kjer so krivulje bile značilnih oblik. Nato smo določili tudi pravilnost rezultata. Če je pri siru iz kravjega mleka rezultat pozitiven, je tudi pravičen in obratno.

3.2.7 Določitev občutljivosti in učinkovitosti PCR v realnem času

Občutljivost pomeni sposobnost metode, da zanesljivo odkrije zelo nizke koncentracije tarčne DNA molekule. Določili smo mejo detekcije oz. LOD (ang. Limit of detection), najnižjo koncentracijo DNA krave, pri kateri encimska reakcija še daje pozitiven rezultat. Občutljivost smo torej določili kot najmanjšo koncentracijo, pri kateri se je signal krivulje pomnoževanja dvignil nad signal ozadja (Smith, 2013).

3.2.7.1 Določitev teoretične občutljivosti PCR v realnem času

Teoretično občutljivost PCR v realnem času smo določali s kravjo DNA, ki smo jo izolirali iz kravjega sira (vzorec G, preglednica 6). Najprej smo spektrofotometrično izmerili koncentracijo izolirane DNA. Nato pa smo jo razredčili s H_2O_{PCR} in izvedli PCR v realnem času.

Teoretično občutljivost smo določali pri obeh sistemih določanja pomnožkov, navedenih v poglavju 3.1.5. Pri sistemu Bos/Man smo pomnoževali kravjo DNA, ki smo jo predhodno razredčili od 10^{-1} do 10^{-2} (0,7 ng/ μ l, 0,07 ng/ μ l). Pri sistemu Cow-1/BoCaOv pa smo DNA krave pred pomnoževanjem razredčili od 10^{-1} do 10^{-6} (37,2 ng/ μ l, 3,72 ng/ μ l, 0,372 ng/ μ l, 0,0372 ng/ μ l, 0,00372 ng/ μ l, 0,000372 ng/ μ l).

3.2.7.2 Določitev praktične občutljivosti PCR v realnem času

Praktično občutljivost PCR v realnem času smo določali s pomočjo standardnih mešanic kravjega in kozjega sira (poglavje 3.1.2). Praktično občutljivost smo določali pri sistemu Cow-1/BoCaOv. Pri PCR v realnem času je pozitiven rezultat tisti, kjer je signal pomnoževanja prišel nad signal ozadja in če je bila krivulja pomnoževanja značilne oblike.

3.2.7.3 Določitev učinkovitosti PCR v realnem času

Učinkovitost PCR (E) uporabljamo za vrednotenje rezultatov pri PCR v realnem času in jo izračunamo iz standardne krivulje. Standardno krivuljo izračunamo iz koncentracije čiste DNA in pripadajočih vrednosti C_t po enačbi (2) (Pfaffl, 2004):

$$y = k \cdot x + n \text{ oz. } C_t = k \cdot \log C + n \quad \dots (2)$$

Legenda: **k**: naklon premice; **n**: presečišče grafa z ordinatno osjo; C_t : točke, kjer se krivulja fluorescence povzpne nad fluorescenco ozadja; **C**: koncentracija DNA

Nato izračunamo učinkovitost PCR v realnem času po enačbi (3) (Pfaffl, 2004):

$$E = (-1 + 10^{(-1/k)}) \cdot 100 \quad \dots (3)$$

Legenda: E: učinkovitost reakcije; **k**: naklon premice

Po teoriji 100 % učinkovitost reakcije pomeni, da se število pomnožkov v vsakem ciklu eksponentno poveča. A v praksi zaradi inhibicije reakcije temu ni tako. Bustin in Nolan (2013) navajata, da je učinkovitost reakcije zadovoljiva, kadar je:

- izračunana učinkovitost blizu 100 % (90 - 110 %),
- vrednost naklona premice med -3,2 in 3,5,
- korelacijski koeficient (R^2) čim bližje 1.

3.2.8 Kvantitativni PCR

S kvantitativnim PCR (qPCR) smo določali deleže kravjega mleka v ovčjih in kozjih sirih ter mešanicah. Iz vseh vzorcev sira smo izolirali DNA s komercialnim kompletom Smarthelex Complex Samples. Spektrofotometrično smo vzorcem izmerili koncentracijo in čistost DNA pri treh različnih valovnih dolžinah ($A_{230 \text{ nm}}$, $A_{260 \text{ nm}}$, $A_{280 \text{ nm}}$). Koncentracije izolirane DNA posameznih vzorcev smo normalizirali na 50 ng/ μ l. Za izvedbo PCR v realnem času smo uporabili sistem Cow-1/BoCaOv. S PCR v realnem času smo določili vrednosti C_t . Iz dobljenih vrednosti C_t smo iz standardnih krivulj teoretične občutljivosti izračunali % kravjega mleka v ovčjih in kozjih sirih.

3.2.9 Analiza variance

Analiza variance (ANOVA) je statistična metoda, ki nam pove ali se trije ali več vzorcev med seboj statistično razlikujejo v določeni lastnosti (Fiedl, 2005). Analizo variance uporabimo, kadar nas zanima, ali obstaja razlika med aritmetičnimi sredinami (Knežević, 2006). Za statistično obdelavo smo uporabili program Microsoft Excel 2010, s katerim smo izvedli test ANOVA. S F-testom preverimo homogenost varianc. To pomeni, da F test potrdi ali ovrže hipotezo, da varianci pripadata isti populaciji.

Ničelna hipoteza H_0 trdi, da ni razlik med aritmetičnimi sredinami vzorcev (Knežević, 2006). To pomeni, da so povprečja v skupinah vzorcev statistično enaka, ki se ob upoštevanem tveganju ne razlikujejo med seboj. V raziskavah se najpogosteje uporablja stopnja tveganja 0,05 (Knežević, 2006). Kadar je stopnja tveganja manjša od 0,05 ($p < 0,05$), obstaja statistično značilna razlika med vzorci. Kadar je stopnja tveganja večja od 0,05 ($p > 0,05$) med vzorci ni statistično značilne razlike (Field, 2005).

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

V okviru magistrskega dela smo v sirih, ki so na slovenskem trgu deklarirani kot kozji ali ovčji, določali sledove ali deleže kravjega mleka. Najprej smo z uporabo dveh komercialnih kompletov, NucleoSpin Food in SmartHelix Complex Samples, iz vzorcev sirov (preglednice 6, 7, 8, 9) izolirali DNA. Nato smo za izvedbo PCR v realnem času uporabili sistema Bos/Man in Cow-1/BoCaOv. Določali smo specifičnost, občutljivost in učinkovitost PCR v realnem času za določanje krave. Kravjo DNA smo v mešanih, kozjih in ovčjih sirih uspeli določiti kvalitativno in kvantitativno.

4.1 IZOLACIJA DNA IZ SIROV

Za izolacijo DNA iz kravjega sira (preglednica 6) ter iz ovčjih (preglednica 7), kozjih (preglednica 8) in mešanih sirov (preglednica 9) smo uporabili dva komercialna kompleta, NucleoSpin Food in SmartHelix Complex Samples. Izolaciji smo izvedli po priloženih protokolih. Pri obeh komercialnih kompletih smo za izolacijo uporabili 0,2 g sira ter 100 μ l elucijskega pufra (poglavje 3.1.4).

Glede na koncentracijo izolirane DNA in njene čistosti, lahko določimo uspešnost izolacije DNA. Kot pokazatelj čistosti DNA se uporabljata razmerji absorbanc A260/280 in A260/230 nm, ki morata biti med 1,8 in 2,0 (Rodríguez-Lázaro in Hernández, 2013).

Preglednica 11: Povprečna koncentracija in povprečna čistost DNA izolirane iz kravjega sira ter ovčjih, kozjih in mešanih sirov z različnima postopkoma

Način izolacije	Čistost izolirane DNA		Koncentracija izolirane DNA C $\pm$ SD (ng/ μ l)
	A260/A280 $\pm$ SD	A260/A230 $\pm$ SD	
NucleoSpin Food	1,903 $\pm$ 0,136	1,643 $\pm$ 0,539	45,9 $\pm$ 32,6
SmartHelix Complex Samples	1,873 $\pm$ 0,079	2,32 $\pm$ 0,386	388,3 $\pm$ 200,6
p	> 0,05	< 0,05	< 0,05

Legenda: **p:** stopnja tveganja

V preglednici 11 opazimo, da je povprečna koncentracija DNA izolirana s kompletom NucleoSpin Food znašala 45,9 ng/ μ l. Povprečna čistost za razmerje A260/280 1,903 in za razmerje A260/230 1,643. Povprečna koncentracija izolirane DNA s kompletom SmartHelix Complex Samples je bila precej visoka, in sicer 388,3 ng/ μ l. Njena povprečna čistost pa je za razmerje A260/280 1,873 in za razmerje A260/230 2,320.

Kot najboljši postopek izolacije DNA lahko glede na spektrofotometrične meritve določimo izolacijo s kompletom SmartHelix Complex Samples. Rezultati so pokazali boljšo čistost in precej višje koncentracije izolirane DNA (preglednica 11). Tudi Volk in sod. (2014) v raziskavi opisujejo visoke čistosti DNA pri njeni izolaciji iz vzorcev mleka s tem kompletom. Povprečna čistost DNA je za razmerje A260/280 znašala 1,87, za razmerje A260/A230 pa 1,67. Povprečna koncentracija izolirane DNA je prav tako bila visoka, in sicer 240 ng/μl. Dobro delovanje komercialnega kompleta SmartHelix Complex Samples kemijsko ne moremo ovrednotiti, saj sestavine kompleta s strani proizvajalca niso znane. Visoke čistosti izolirane DNA so lahko posledica uporabe razbijalca celic, ki smo ga uporabili samo pri tem postopku izolacije.

Rezultati čistosti DNA, izolirane s kompletom NucleoSpin Food, niso pričakovani. Razmerje A260/230 je precej nižje, kar je lahko posledica prisotnosti onesnaževal, kot so sečnina, fenol in druge aromatske komponente (Pfaffl in sod., 2004). Glede na razmerje A260/A280 in ponovljivost izolacije, je izolirana DNA pri uporabi kompleta NucleoSpin Food relativno čista. Določili smo povprečno koncentracijo 45,9 ng/μl. Volk in sod. (2014) so z uporabo tega kompleta za izolacijo DNA iz vzorcev mleka določili precej nižjo povprečno koncentracijo izolirane DNA, in sicer 7,3 ng/μl. Psifidi in sod. (2010) so v raziskavi, v kateri so za izolacijo DNA iz mleka uporabili 6 komercialnih kompletov za izolacijo, primerjali rezultate glede na čistost DNA in ceno. Glede na čistost DNA se je kot najboljši postopek izkazal modificiran komplet Nucleospin Tissue Kit, ki je tudi najdražji. Predstavlja izboljšano različico osnovnega kompleta Nucleospin Tissue Kit. Povprečna čistost za razmerje A260/280 je znašala 1,74, za A260/230 pa 1,85. Najugodnejši protokol »In house protokol« so avtorji izdelali sami in je bil cenovno ugodnejši. A rezultati izolacije čistosti DNA niso bili ustrezni, saj sta obe razmerji znašali 1,43.

Za statistično obdelavo podatkov 31 vzorcev sira smo uporabili analizo varianc (ANOVA). Postavili smo ničelno hipotezo H_0 , ki trdi, da se koncentracije DNA, ki smo jo izolirali s kompletom NucleoSpin in koncentracije DNA, ki smo jo izolirali s kompletom SmartHelix Complex Samples, ne razlikujejo. Rezultati so pokazali, da med komercialnima kompletoma za izolacijo DNA, ki se imenujeta NucleoSpin Food in SmartHelix Complex Samples:

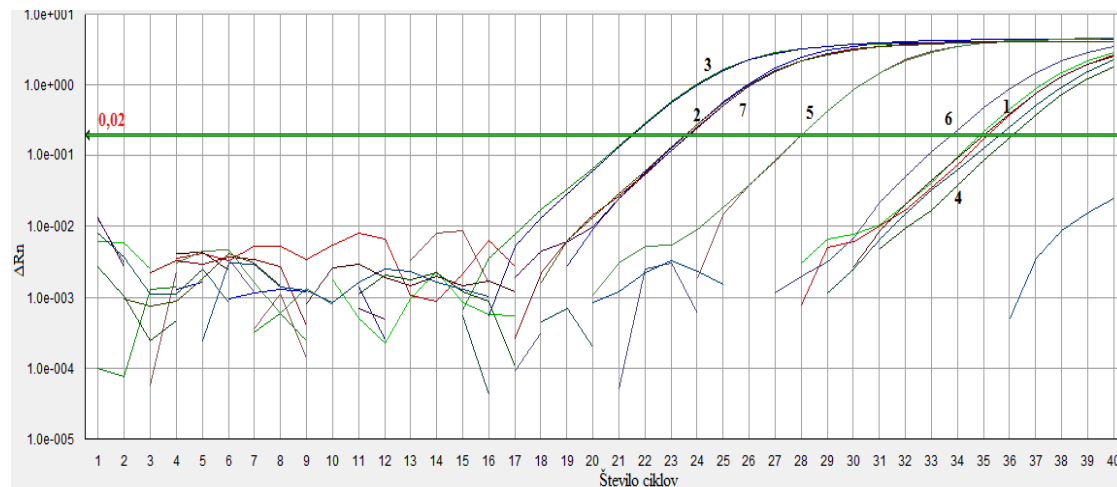
- ni statistično značilne razlike med razmerjem absorbanc A260/280, ker je $p > 0,05$,
- je statistično značilna razlika med razmerjem absorbanc A260/A230, ker je $p < 0,05$,
- je statistično značilna razlika med povprečno koncentracijo izolirane DNA, ker je $p < 0,05$.

Komercialna kompleta, NucleoSpin Food in SmartHelix Complex Samples lahko primerjamo tudi z vidika zahtevnosti izolacije ter stroškov uporabljenega materiala. Izolacija s kompletom SmartHelix Complex Samples je dolgotrajnejša, izvedba je zahtevnejša. Paziti moramo pri uporabi kemikalije Sol III, ki vsebuje fenol kloroform. Zaščititi se moramo z rokavicami in očali. Zaradi natančnosti in zbranosti smo delo izolacije s tem protokolom razdelili na dva dni. Uporaba kompleta NucleoSpin Food je enostavnejša in hitrejša, sledimo priloženemu protokolu (Macherey-Nagel, Düren, Nemčija), izolacijo smo lahko izvedli v enem dnevu. Uporaba obeh komercialnih kompletov je draga, saj en vzorec predstavlja strošek 3 €.

V primerjavi z nekomercialnimi in kombiniranimi protokoli, sta enostavnejša izvedba in hitrejša delovanje glavni prednosti uporabe komercialnih protokolov, kljub visokim stroškom materiala (Volk in sod., 2014).

4.2 SPECIFIČNOST PCR V REALNEM ČASU ZA DOLOČANJE KRAVJE DNA S SISTEMOM Cow-1/BoCaOv

Specifičnost PCR v realnem času za določanje kravje DNA s sistemom Cow-1/BoCaOv smo določali z DNA, ki smo jo izolirali iz različnih vrst sirov. Na sliki 9 je prikazan rezultat PCR v realnem času za sedem analiziranih vzorcev. Krivulja 5 prikazuje pomnoževanje DNA iz mešanega sira, v katerem prevladuje kravje mleko. Krivulje 1, 2, 3, in 7 prikazujejo pomnoževanje DNA iz ovčjih sirov. Krivulji 4 in 6 pa prikazujeta pomnoževanje DNA iz kozjih sirov.



Slika 9: Specifičnost PCR v realnem času za določanje kravje DNA s sistemom Cow-1/BoCaOv

Legenda: **1:** ovčji sir, vzorec O2; **2:** ovčji sir, vzorec O3; **3:** ovčji sir, vzorec O4; **4:** kozji sir, vzorec K5; **5:** mešani sir, vzorec M2; **6:** kozji sir, vzorec K6; **7:** ovčji sir, vzorec O5

Iz rezultatov na sliki 9 je razvidno, da so bili rezultati encimske reakcije pri vseh vzorcih označenih z 1 do 7, pozitivni. Pozitivne vrednosti C_t pomenijo prisotnost kravje DNA v vseh preiskovanih vzorcih. Pri vzorcih sirov (O3, O4, O5, M2) so razlike v dobljenih vrednostih C_t posledica različne učinkovitosti izolacije kravje DNA iz posameznih vzorcev. Velja namreč, manjša kot je vrednost C_t , večja je količina tarčne DNA v vzorcu. Veliko višje vrednosti C_t pri vzorcih sirov (O2, K5, K6) so posledica prisotnosti zelo majhnih količin kravje DNA (slika 9). Pozitivni rezultat teh vzorcev lahko pomeni tudi navzkrižno kontaminacijo med samo proizvodnjo sira.

Pozitiven rezultat smo določili pri štirih vzorcih. Glede na ustreznost deklaracije je rezultat hkrati pravilen samo pri vzorcu mešanega sira (M2), kar prikazuje krivulja 5. V preglednici 12 opazimo, da je prisotnost kravjega mleka v vzorcu 5 ustrezno deklarirana.

Preglednica 12: Določitev specifičnosti PCR v realnem času (vrednost C_t) za določanje kravje DNA

Vzorec	Koncentracija (ng/ μ l)	$C_t \pm SD$	% kravje DNA $\pm SD$	Pravilnost rezultata
O2	128	$32,1 \pm 0,1$	/	✓
O3	348	$20,6 \pm 0,2$	$31,0 \pm 10,5$	✓
O4	440	$18,3 \pm 0,2$	$47,3 \pm 24,1$	✓
O5	38	$23,7 \pm 0,1$	$24,3 \pm 10,9$	✓
K5	480	$32,6 \pm 0,8$	/	✓
K6	290	$31,6 \pm 1,01$	/	✓
M2	860	$25,1 \pm 0,1$	$30,4 \pm 7,4$	✓

Legenda: **O**: ovčji sir, **K**: kozji sir, **M**: mešani (kravji, kozji, ovčji) sir; /: pod mejo kvantifikacije

Magistrska naloga je bila namenjena predvsem iskanju kravje DNA v vzorcih sirov, ki so deklarirani kot kozji ali ovčji. Pozitivni rezultat encimske reakcije smo namreč dobili tudi pri vzorcih sirov O3, O4 in O5, na katerih vsebnost kravjega mleka ni bila deklarirana. Pri navedenih vzorcih smo glede na standardne krivulje (poglavje 4.5.2) izračunali odstotek kravjega mleka. Izkazalo se je, da vzorci vsebujejo večje količine kravje DNA. Pozitivne C_t vrednosti in kvantitativna določitev vsebnosti kravje DNA kaže na potvorbo vzorcev sirov O3, O4 in O5 s kravjim mlekom. Kar pomeni, da so rezultati tudi pravilni. Pri vzorcih O2, K5 in K6 vsebnosti kravjega mleka nismo določili kvantitativno. Netipične krivulje pomnoževanja (slika 9) in visoke C_t vrednosti le-teh kažejo, da ti vzorci vsebujejo le sledi kravje DNA oziroma, da je vrednost C_t izven območja kvantifikacije. Določili smo, da je bil PCR v realnem času za določanje kravje DNA 100 % specifičen.

Naši rezultati so primerljivi z objavljenimi rezultati o specifičnosti PCR v realnem času za določanje kravje DNA. López-Calleja in sod. (2007b) so s PCR v realnem času s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi in sondo za kravjo DNA dobili pozitivne rezultate samo pri treh vzorcih iz kravjega mleka. Pomnoževanja pri vzorcih iz ovčjega, kozjega in bivolgjega mleka ni bilo. Manjše vrednosti C_t analiziranih vzorcev iz kravjega mleka ($C_t = 22,3 \pm 0,15$) kažejo na visoke vsebnosti tarčne DNA krave.

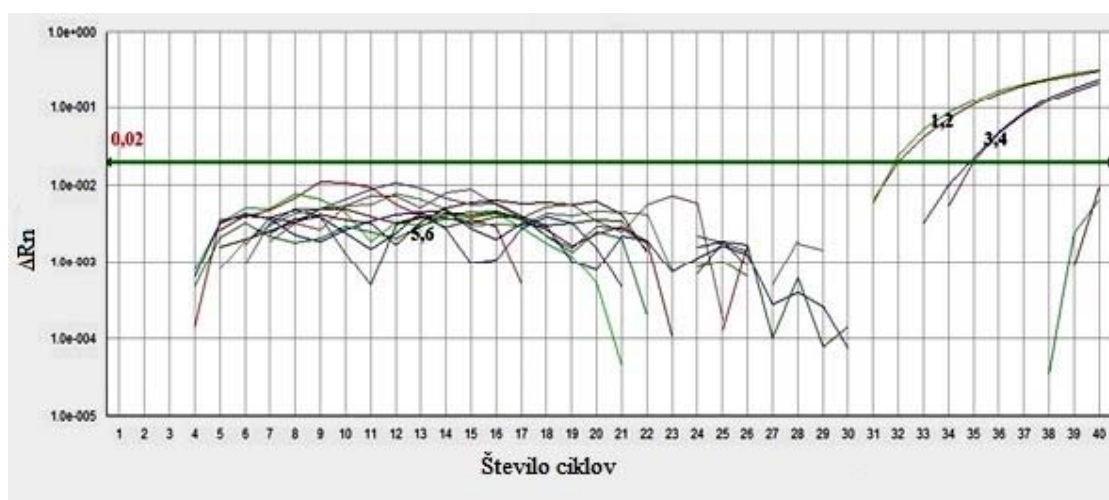
V podobni raziskavi so López-Calleja in sod. (2007c) s PCR v realnem času s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi in sondo za kravjo DNA dobili podobne vrednosti C_t , in sicer $C_t = 20,8 \pm 0,15$. Dokazali so specifičnost metode, saj je do pomnoževanja prišlo samo pri vzorcih s kravjim mlekom.

4.3. DOLOČITEV TEORETIČNE OBČUTLJIVOSTI PCR V REALNEM ČASU

Za določitev teoretične občutljivosti PCR v realnem času smo pri sistemih Bos/Man in Cow-1/BoCaOv (poglavje 3.1.5) pripravili 10x-ne razredčitve kravje DNA, izolirane iz 100 % kravjega sira (preglednica 6, vzorec G).

4.3.1 Določanje kravje DNA s sistemom Bos/Man

Slika 10 prikazuje pomnoževanje kravje DNA, kjer smo uporabili začetne oligonukleotide, specifične za kravo BOS-F/BOS-R in sondo BOS-P, specifično za kravo. Spektrofotometrično izmerjena koncentracija izolirane kravje DNA je bila 7,0 ng/μl.



Slika 10: PCR v realnem času s sistemom Bos za določitev občutljivosti določanja kravje DNA z vzorcem DNA izolirane iz kravjega sira (preglednica 6)

Legenda: ΔRn : normaliziran fluorescentni signal; **1, 2:** 7,0 ng/μl; **3, 4:** 0,7 ng/μl; **5, 6:** 0,07 ng/μl

Preglednica 13: Rezultati pomnoževanja kravje DNA, izolirane iz kravjega sira (preglednica 6) s sistemom Bos

Vzorec	Razredčitev	Koncentracija (ng/μl)	C_t	Povprečna $C_t \pm SD$
1	10^0	7,0	32,03	$31,905 \pm 0,2$
2			31,78	
3	10^{-1}	0,7	34,79	$34,885 \pm 0,1$
4			34,98	
5	10^{-2}	0,07	Ni pomnoževanja	/
6				

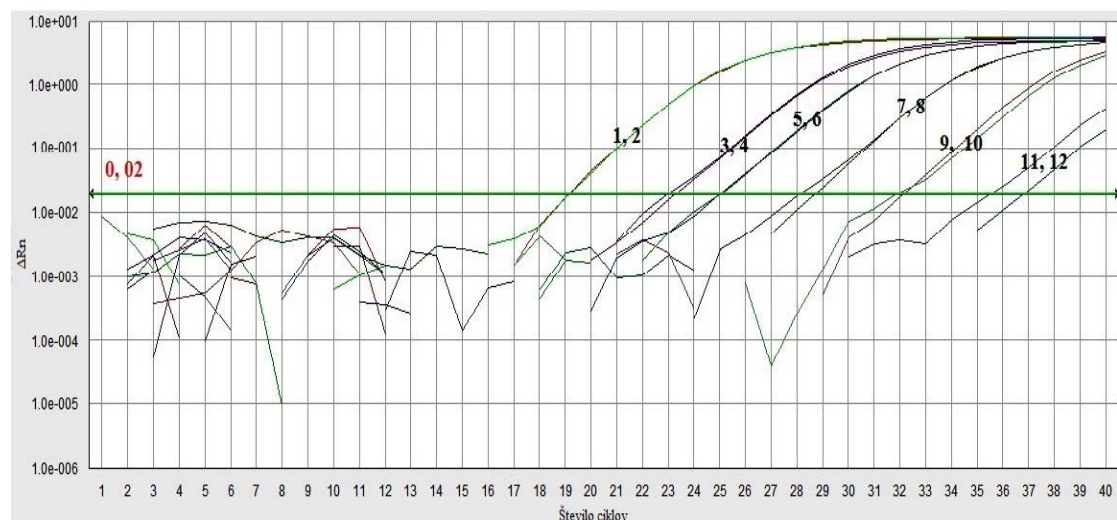
V preglednici 13 opazimo, da je do pomnoževanja prišlo do razredčitve 10^{-1} (0,7 ng/μl). Tako smo mejo detekcije (LOD) določili pri koncentraciji 0,7 ng/μl, saj je pri le-tej rezultat bil še pozitiven. Pričakovali smo nižjo mejo detekcije. Volk (2013) je mejo detekcije določila do razredčitve 10^{-6} (0,000605 ng/μl). Za določitev teoretične občutljivosti PCR v realnem času je za kvantifikacijo kravjega mleka v mešanicah uporabila standardno DNA. Le-to je pripravila tako, da je pomnožek DNA, specifičen za sesalce, ki vključuje del specifičen za kravo, vstavila v plazmidno DNA bakterij vrste *Escherichia coli* JM109. Za izolacijo plazmida z vstavljenim pomnožkom je uporabila komercialni komplet GeneElutePlasmid Miniprep Kit. Za izvedbo PCR pa sistem Bos/Man.

Rezultatov pomnoževanja kravje DNA, izolirane iz 100 % kravjega sira s sistemom Man, nimamo. Po večkratnih poskusih smo opazili, da do pomnoževanja kravje DNA ni prišlo. Možen razlog bi lahko bil v neustrezno izbranih sekvencah, saj je tudi Volk (2013) pri tem sistemu dobila zelo slabe rezultate.

Avtorica Volk (2013) navaja nepričakovano, slabo učinkovitost sistema BOS/MAN. Pridobila je nezadovoljive rezultate učinkovitosti encimske reakcije, in sicer 82,9 % za sistem Bos in 61,7 % za sistem Man. Razlog za slabo učinkovitost sistema Bos/Man je v dizajnu začetnih oligonukleotidov (BOS-F/BOS-R, MAN-F/MAN-R) in sonde (BOS-P/MAN-P).

4.3.2 Določanje kravje DNA s sistemom Cow-1

Slika 11 prikazuje pomnoževanje kravje DNA s sistemom Cow-1 (poglavje 3.1.5.2), kjer smo uporabili DNA izolirano iz 100 % kravjega sira (preglednica 6, vzorec G). Spektrofotometrično izmerjena koncentracija izolirane kravje DNA je bila 372 ng/μl.



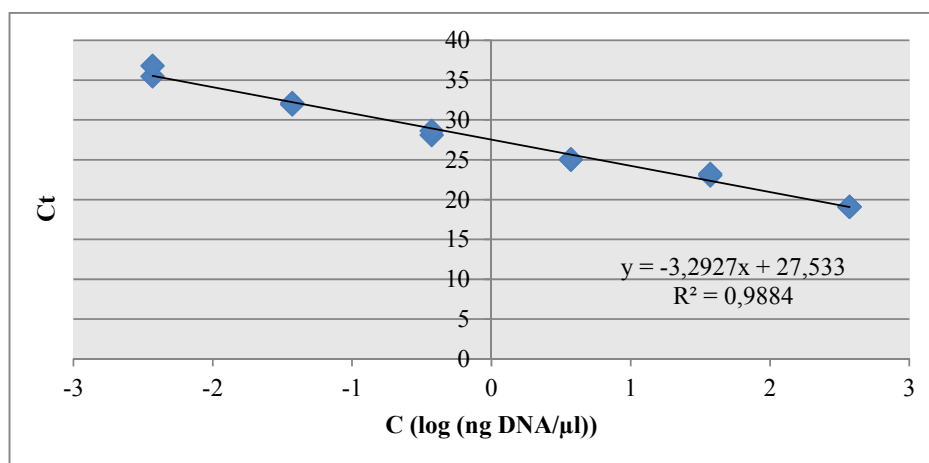
Slika 11: PCR v realnem času s sistemom Cow-1 za določitev občutljivosti določanja kravje DNA z vzorcem DNA izolirane iz kravjega sira (preglednica 6)

Legenda: ΔRn : normaliziran fluorescentni signal; **1, 2:** 372 ng/μl; **3, 4:** 37,2 ng/μl; **5, 6:** 3,72 ng/μl; **7, 8:** 0,372 ng/μl; **9, 10:** 0,037 ng/μl; **11, 12:** 0,00372 ng/μl

Preglednica 14: Rezultati pomnoževanja kravje DNA, izolirane iz kravjega sira (preglednica 6) s sistemom Cow-1

Vzorec	Razredčitev	Koncentracija (ng/μl)	C _t	Povprečna C _t ± SD
1	10 ⁰	372	19,10	19,10 ± 0
2			19,10	
3	10 ⁻¹	37,2	23,02	23,125 ± 0,2
4			23,23	
5	10 ⁻²	3,72	25,05	23,035 ± 0,02
6			25,02	
7	10 ⁻³	0,372	28,11	28,37 ± 0,4
8			28,63	
9	10 ⁻⁴	0,0372	32,13	32,04 ± 0,1
10			31,95	
11	10 ⁻⁵	0,00372	35,48	35,78 ± 0,9
12			36,8	
13	10 ⁻⁶	0,000372	Ni	/
10			pomnoževanja	

V preglednici 14 opazimo, da je do pomnoževanja prišlo do razredčitve 10⁻⁵ (0,00372 ng/μl). Tako smo mejo detekcije (LOD) določili pri koncentraciji 0,00372 ng/μl, saj je pri le-tej rezultat bil še pozitiven. Območje kvantifikacije je od 372 ng/μl do 0,00372 ng/μl.

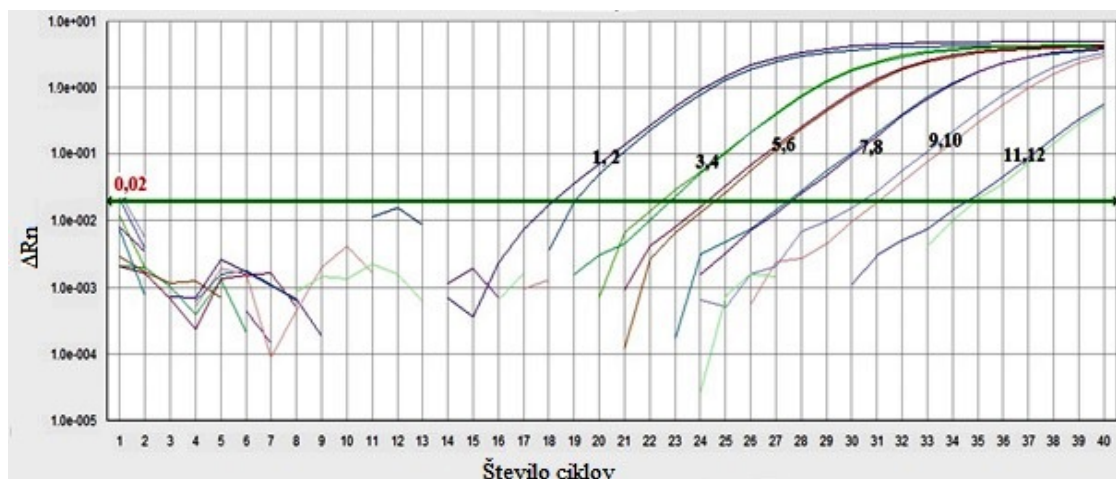
**Slika 12:** Standardna krivulja PCR v realnem času pri pomnoževanju kravje DNA, izolirane iz kravjega sira (preglednica 6) s sistemom Cow-1

Teoretično standardno krivuljo smo naredili z dobljenimi vrednostmi C_t in pripadajočimi koncentracijami izolirane DNA, kot prikazuje preglednica 14. Njen korelacijski koeficient (R²) znaša 0,99, učinkovitost (E) je 101,2 %, naklon premice pa -3,29.

Po pričakovanju je učinkovitost PCR v realnem času s sistemom Cow-1 za določitev občutljivosti kravje DNA, izolirane iz 100 % kravjega sira, boljša kot s sistemom Bos. Analitski parametri sistema Cow-1 so zadovoljivi, saj ustrezajo vsem trem kriterijem, ki sta jih navedla Bustin in Nolan (2013). Izračunana učinkovitost je blizu 100 %, vrednost naklona premice je med -3,2 in 3,5, ter R^2 je blizu 1.

4.3.3 Določanje sesalčje DNA s sistemom BoCaOv

Slika 13 prikazuje pomnoževanje kravje DNA s sistemom BoCaOv (poglavje 3.1.5.2), kjer smo uporabili DNA izolirano iz 100 % kravjega sira (preglednica 6, vzorec G). Spektrofotometrično izmerjena koncentracija izolirane kravje DNA je bila 372 ng/μl.



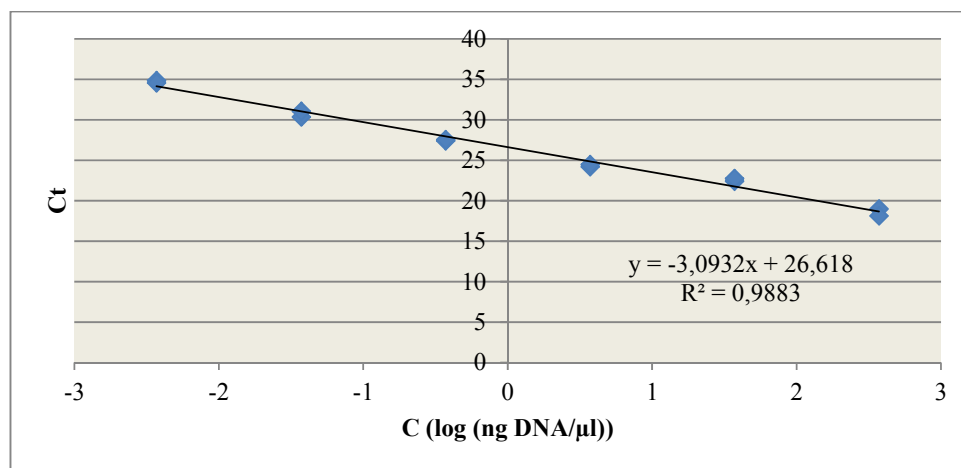
Slika 13: PCR v realnem času s sistemom BoCaOv za določitev občutljivosti določanja kravje DNA z vzorcem DNA izolirane iz kravjega sira (preglednica 6)

Legenda: ΔRn : normaliziran fluorescentni signal; **1, 2:** 372 ng/μl; **3, 4:** 37,2 ng/μl; **5, 6:** 3,72 ng/μl; **7, 8:** 0,372 ng/μl; **9, 10:** 0,037 ng/μl; **11, 12:** 0,0037 ng/μl

Preglednica 15: Rezultati pomnoževanja kravje DNA, izolirane iz kravjega sira (preglednica 6) s sistemom BoCaOv

Vzorec	Razredčitev	Koncentracija (ng/μl)	C _t	Povprečna C _t ± SD
1	10 ⁰	372	19	18,565 ± 0,6
2			18,13	
3	10 ⁻¹	37,2	22,41	22,58 ± 0,2
4			22,75	
5	10 ⁻²	3,72	24,21	24,35 ± 0,2
6			24,49	
7	10 ⁻³	0,372	27,4	27,48 ± 0,1
8			27,56	
9	10 ⁻⁴	0,0372	30,36	61,42 ± 0,5
10			31,06	
11	10 ⁻⁵	0,00372	34,87	34,72 ± 0,2
12			34,57	
13	10 ⁻⁶	0,000372	Ni pomnoževanja	/
14				

V preglednici 15 opazimo, da je do pomnoževanja prišlo do razredčitve 10⁻⁵ (0,00372 ng/μl). Tako smo mejo detekcije (LOD) določili pri koncentraciji 0,00372 ng/μl, saj je pri le-tej rezultat bil še pozitiven. Območje kvantifikacije je od 372 ng/μl do 0,00372 ng/μl.

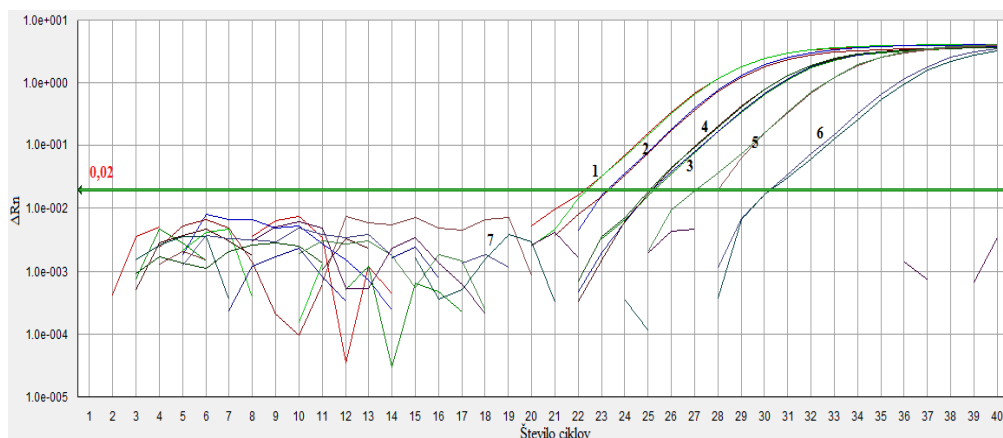
**Slika 14:** Standardna krivulja PCR v realnem času pri pomnoževanju kravje DNA, izolirane iz kravjega sira (preglednica 6) s sistemom BoCaOv

Teoretično standardno krivuljo smo naredili z vrednostmi C_t in pripadajočimi koncentracijami izolirane DNA, kot prikazuje preglednica 14. Njen R^2 znaša 0,99, E je 110,5 %, naklon premice pa -3,0. Po pričakovanju je učinkovitost PCR v realnem času s sistemom BoCaOv zadovoljiva.

Na potek in učinkovitost PCR v realnem času vpliva mnogo dejavnikov. Ti dejavniki so: degradacija vzorca, degradacija DNA, koncentracija DNA, sestavine reakcijske mešanice, fluorogena barvila, optimalna izbira začetnih oligonukleotidov in sonde, razmere pomnoževanja ter vrsta in značilnost aparata za izvedbo PCR v realnem času (Pfaffl, 2004). Učinkovitost reakcije zmanjšuje prisotnost inhibitorjev v vzorcu, kot so heparin, polisaharidi, melanin, fenoli, etanol in proteinaza K. Na slabšo učinkovitost vpliva tudi neustrezna izbira začetnih oligonukleotidov in sonde ter neustrezno pipetiranje (Life Technologies, 2015).

4.4 DOLOČITEV PRAKTIČNE OBČUTLJIVOSTI PCR V REALNEM ČASU

Praktično umeritveno krivuljo smo naredili iz standardnih vzorcev mešanih sirov, ki smo jih pripravili iz kozjega sira (preglednica 8, vzorec K1) s kravjim sirom (preglednica 6, vzorec G). Pripravili smo mešanice kozjega sira z različnimi koncentracijami kravjega sira. Iz mešanic smo s kompletom SmartHelix Complex Samples izolirali DNA in v vzorcih izmerili koncentracijo DNA. Nato smo pri vseh vzorcih koncentracijo DNA normalizirali na 50 ng/ μ l. Za izvedbo PCR v realnem času smo uporabili sistem Cow-1.



Slika 15: Določanje kravje DNA v standardnih vzorcih mešanih sirov s PCR v realnem času s sistemom Cow-1
 Legenda: **1:** 100 % kravji sir; **2:** 75 % kravji sir; **3:** 50 % kravji sir; **4:** 25 % kravji sir; **5:** 10 % kravji sir; **6:** 1 % kravji sir; **7:** negativna kontrola

Vsebnost kravjega sira v standardnih vzorcih mešanih sirov, koncentracija izolirane DNA in normalizirana koncentracija ter vrednosti C_t so prikazane v preglednici 16.

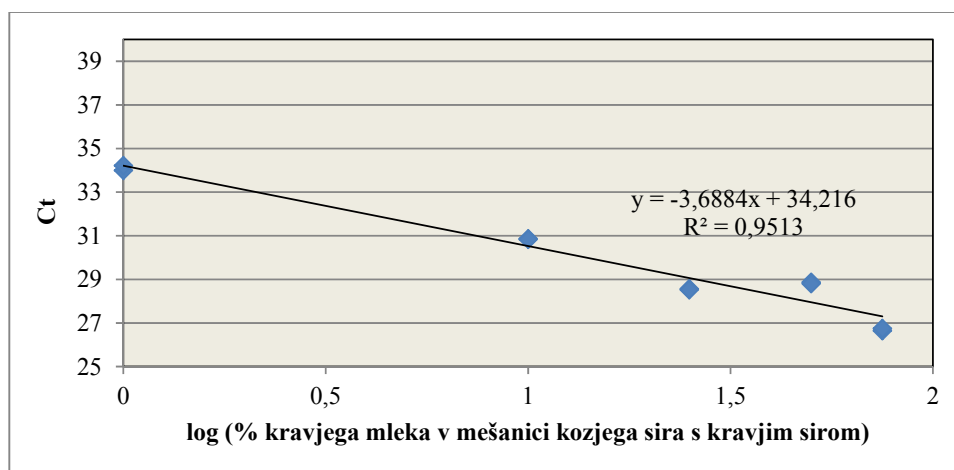
Preglednica 16: Rezultati pomnoževanja kravje DNA, izolirane iz standardnih vzorcev mešanih sirov s PCR v realnem času s sistemom Cow-1

Št. vzorca	Kravji sir (%)	Kozji sir (%)	Začetna konc. DNA (ng/μl)	Normalizirana konc. DNA (ng/μl)	Povprečna C_t ± SD
1	100	0	372	50	25,93 ± 0,1
2	75	25	295		26,7 ± 0,1
3	50	50	905		28,84 ± 0,1
4	25	75	510		28,55 ± 0
5	10	90	522		30,85 ± 0
6	1	99	685		34,11 ± 0,2

Rezultati na sliki 15 prikazujejo določitev kravje DNA v standardnih vzorcih mešanih sirov, kjer je bilo od 100 % do 1 % kravjega sira. Vrednosti C_t vzorcev označenih od 1 do 5 bi morale po vrsti naraščati. Teorija navaja, da nižja vrednost C_t pomeni večjo vsebnost tarčne DNA in obratno. Rezultat vzorca 1 (100 % kravji sir) ima najnižjo vrednost C_t , saj je vseboval največ kravje DNA, kar je dokaz pravilnosti rezultata. Rezultati so pravilni tudi pri nižjih odstotkih dodanega kravjega sira (vzorec 2 in vzorec 3), saj C_t vrednosti naraščata. Rezultat vzorca 4 ni ustrezen, saj ima prenizko C_t vrednost. Menimo, da je do takšnega rezultata prišlo zato, ker standardne vzorce kravjega sira nismo uspeli dobro homogenizirati. Rezultat vzorca 5 je pravilen, saj C_t vrednost narašča. Vzorec 6, ki ima najmanjšo vsebnost kravje DNA ima tudi najvišjo vrednost C_t . S praktično umeritveno krivuljo nam je uspelo določiti 1 % kravje DNA v standardnih mešanicah kravjega sira s kozjim.

Rezultati niso zadovoljivi, saj smo želeli določiti precej nižje koncentracije kravje DNA v mešanici s kozji sirom. Predvidevamo, da je glavni razlog neučinkovita homogenizacija. V praksi se je izkazalo, da ročna homogenizacija sirov ni dovolj uspešna. Določili smo mejo kvantifikacije (LOQ), in sicer 1 %. Vzrok za nezadovoljive rezultate je lahko tudi inhibicija encimske reakcije. Predvidevamo, da nam ni uspelo izolirati DNA brez inhibitorjev PCR. Znani inhibitorji, prisotni v vzorcih mleka, so proteinaze (Bessetti, 2007).

Naši rezultati so primerljivi s podobnimi objavljenimi rezultati. López-Calleja in sod. (2007b; 2007c) so s PCR v realnem času določili nižjo mejo kvantifikacije, in sicer pri 0,5 %. Mejo kvantifikacije LOQ 2 % so določili Dalmasso in sod. (2011), medtem ko so Mafra in sod. (2007) določili LOQ 2,5 %.



Slika 16: Standardna krivulja PCR v realnem času s sistemom Cow-1 za določitev kravjega mleka v standardnih vzorcih mešanih sirov

Za izračun standardne krivulje smo zajeli podatke iz preglednice 16. Standardna krivulja za vsebnost kravjega mleka v mešanici kozjega sira s kravjim sirom je prikazana na sliki 14. Določili smo učinkovitost reakcije, ki je 86,7 %. Njen R^2 znaša 0,95, naklon premice pa -3,6. Zaradi slabe učinkovitosti te standardne krivulje nismo uporabili za kvantitativno določanje kravje DNA v kozjem ali ovčjem siru.

4.5 DOLOČITEV KRAVJEGA MLEKA V OVČJIH IN KOZJIH SIRIH S PCR V REALNEM ČASU

4.5.1 Kvalitativna določitev

Iz vzorcev različnih vrst ovčjih (preglednica 7), kozjih (preglednica 8) in mešanih (preglednica 9) sirov smo s kompletom za izolacijo SmartHelix Complex Samples izolirali DNA. S PCR v realnem času smo v naštetih vzorcih sira določili prisotnost kravje DNA. PCR v realnem času smo izvedli s sistemom Cow-1/BoCaOv. Za ugotavljanje prisotnosti oz. odsotnosti kravje DNA smo najprej uporabili kvalitativno analizo.

Dobljeni rezultati določanja kravje DNA v ovčjih, kozjih in mešanih sirih so prikazani v preglednicah 17, 18 in 19.

Preglednica 17: Rezultati določanja kravje DNA s PCR v realnem času s sistemom Cow-1 v vzorcih mešanega sira

Vzorec sira	Rezultat PCR v realnem času	Deklariranost kravjega mleka na izdelku
M1	+	min. 60 %
M2	+	min. 60 %

Legenda: **M1, M2:** vzorca mešanih sirov (preglednica 9); +: pozitiven rezultat

Preglednica 18: Rezultati določanja kravje DNA s PCR v realnem času s sistemom Cow-1 v vzorcih ovčjih sirov

Vzorec sira	Rezultat PCR v realnem času	Deklariranost kravjega mleka na izdelku
O1	+	/
O2	-	/
O3	+	/
O4	+	/
O5	+	/
O6	-	/
O7	+	/
O8	+	/
O9	-	/
O10	-	/
O11	-	/
O12	-	/
O13	+	/
O14	+	/
O15	-	/

Legenda: **O1 – O15:** vzorci ovčjih sirov (preglednica 7); +: pozitiven rezultat; -: negativen rezultat; /: ni deklarirano

Preglednica 19: Rezultati določanja kravje DNA s PCR v realnem času s sistemom Cow-1 v vzorcih kozjih sirov

Vzorec sira	Rezultat PCR v realnem času	Deklariranost kravjega mleka na izdelku
K1	+	/
K2	-	/
K3	+	/
K4	-	/
K5	-	/
K6	-	/
K7	-	/
K8	-	/
K9	+	/
K10	-	/
K11	-	/
K12	-	/
K13	-	/

Legenda: **K1 – K13:** vzorci kozjih sirov (preglednica 8); +: pozitiven rezultat; -: negativen rezultat; /: ni deklarirano

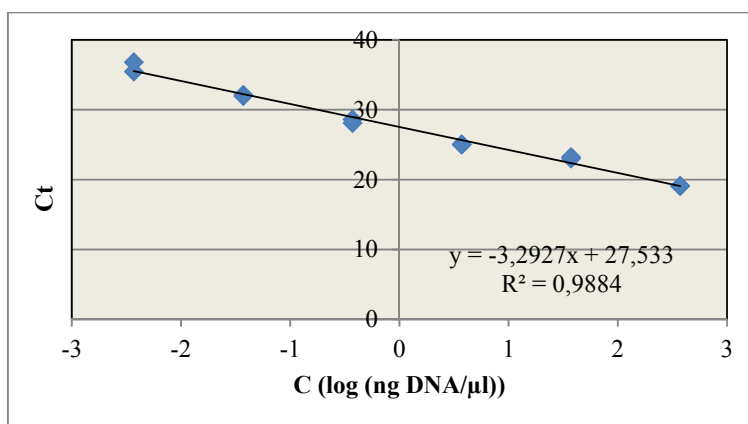
Glede na rezultate, ki so prikazani v preglednicah 17, 18, in 19 smo s PCR v realnem času s sistemom Cow-1 določili prisotnost kravje DNA v 13 vzorcih od skupno 30 preiskovanih. Prisotnost kravje DNA smo določili pri dveh vzorcih mešanih sirov, pri osmih vzorcih ovčjih sirov in pri treh vzorcih kozjih sirov.

Vzorca mešanih sirov (M1 in M2), kupljena v različnih trgovinah, sta imela na embalaži deklarirano prisotnost kravjega mleka. Dobljeni pozitiven rezultat PCR v realnem času je tudi pravilen. Ostalih enajst vzorcev (O1, O3, O4, O5, O7, O8, O13, O14, K1, K3, K9) na embalaži ni imelo deklariranega kravjega mleka, čeprav smo kravjo DNA s PCR v realnem času določili. Glede na rezultate, ki smo jih določili s kvantitativnim PCR (poglavje 4.5.2) sklepamo, da so v teh vzorcih prisotni deleži ali sledovi kravjega mleka, čeprav le-to ni deklarirano. Glede na vse analizirane vzorce sirov (30) lahko zaključimo, da je 37 % vzorcev sirov neustrezno deklariranih (preglednica 23).

4.5.2 Relativna kvantifikacija

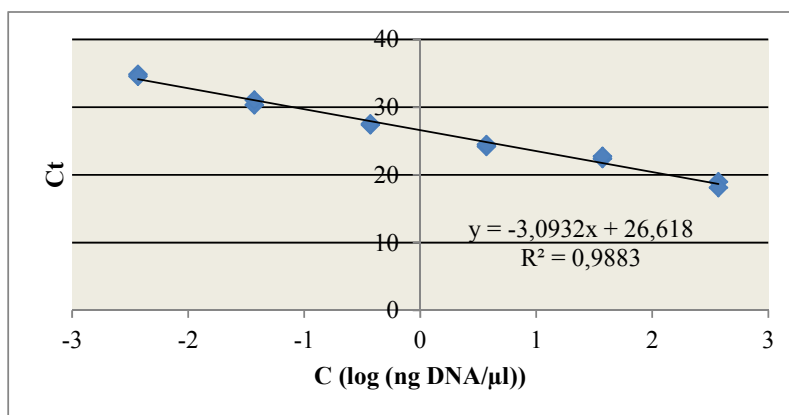
Kvantifikacijo kravjega mleka smo izvedli na 30 vzorcih sira, kupljenih v različnih trgovskih centrih po Sloveniji. Siri so podrobneje predstavljeni v preglednicah 7, 8 in 9. Kljub temu, da bi po teoriji za izračun deleža kravjega mleka v ovčjih in kozjih siri morali upoštevati praktično umeritveno krivuljo, tega nismo storili. Rezultati namreč niso bili zadovoljivi, verjetno zaradi neustreznih standardnih vzorcev mešanih sirov.

Odstotek kravjega mleka smo v sirih, ki so deklarirani kot ovčji in kozji, izračunali iz teoretičnih standardnih krivulj (sliki 17 in 18). Pripravili smo dve standardni krivulji. Eno za določanje kravje DNA s sistemom Cow-1 (slika 17) in eno za določanje sesalčje DNA s sistemom BoCaOv (slika 18). Iz dobljenih vrednosti C_t smo iz standardnih krivulj izračunali % kravjega mleka v ovčjih in kozjih sirih.



Slika 17: Standardna krivulja za kvantifikacijo kravje DNA v ovčjih in kozjih sirih za PCR v realnem času s sistemom Cow-1

Koncentracijo kravje DNA smo izračunali tako, da smo v enačbo $y = -3,2927 + 27,533$ oz. $C_t = -3,2927 \log C + 27,533$ vnesli C_t vrednosti in nato izračunali povprečno koncentracijo (C). Oznaka y pomeni C_t posameznega vzorca sira, x vrednost pa desetiški logaritem koncentracije kravje DNA (ng/μl).



Slika 18: Standardna krivulja za kvantifikacijo kravje DNA v ovčjih in kozjih sirih za PCR v realnem času s sistemom BoCaOv

Odstotek kravjega mleka smo izračunali po enačbi (4):

$$\% \text{ kravjega mleka} = C [\text{DNA krave}] / C [\text{DNA sesalcev}] * 100 \quad \dots (4)$$

Preglednica 20: Kvantifikacija kravjega mleka v mešanih sirih s PCR v realnem času s sistemom Cow-1/BoCaOv

Vzorec sira	C _t pri Cow-1	C _t pri Cow-1	C _t pri BoCaOv	C _t pri BoCaOv	Izračunana vsebnost kravjega mleka (%) ± SD	Deklariranost kravjega mleka na izdelku
M1	22,77	21,58	21,35	20,87	72,3 ± 23,8	min. 60 %
M2	25,22	25,06	23,06	22,44	30,4 ± 7,4	min. 60 %

Legenda: **M1, M2:** vzorca mešanih sirov (preglednica 9); rezultati dveh paralelk

Glede na deklarirano vsebnost kravjega mleka, bi največji izračunan delež kravjega mleka morala imeti vzorca mešanega sira (preglednica 20). Določitev vsebnosti kravjega mleka s PCR v realnem času s sistemom Cow-1/BoCaOv in podatki na deklaraciji se ujemajo pri vzorcu mešanega sira M1. Pri drugem vzorcu M2 smo določili precej manjšo vsebnost kravjega mleka od deklarirane, kar lahko pripišemo inhibiciji encimske reakcije, saj je bil C_t pri sistemu BoCaOv prevelik (preglednica 20).

Preglednica 21: Kvantifikacija kravjega mleka v ovčjih sirih s PCR v realnem času s sistemom Cow-1/BoCaOv

Vzorec sira	C _t pri Cow-1	C _t pri Cow-1	C _t pri BoCaOv	C _t pri BoCaOv	Izračunana vsebnost kravjega mleka (%) ± SD	Deklariranost kravjega mleka na izdelku
O1	28,07	27,66	23,09	23,1	5,8 ± 1,2	/
O2	32,16	31,95	19,77	19,47	0	/
O3	20,69	20,45	18,25	18,68	31,0 ± 10,5	/
O4	18,14	18,43	17,2	16,46	47,3 ± 24,1	/
O5	23,62	23,7	21,41	20,6	24,3 ± 10,9	/
O6	33,25	33,57	20,11	20,5	0,0	/
O7	28,58	28,61	19,41	19,23	< LOQ	/
O8	25,22	25,19	19,77	19,38	2,7 ± 0,5	/
O9	34,5	36,44	19,1	18,91	0	/
O10	37,43	38,79	22,02	21,6	0	/
O11	33,71	35,1	19,35	19,15	0	/

Se nadaljuje ...

... nadaljevanje: Preglednica 21: Kvantifikacija kravjega mleka v ovčjih sirih s PCR v realnem času s sistemom Cow-1/BoCaOv

Vzorec sira	C _t pri Cow-1	C _t pri Cow-1	C _t pri BoCaOv	C _t pri BoCaOv	Izračunana vsebnost kravjega mleka (%) ± SD	Deklariranost kravjega mleka na izdelku
O12	34,12	33,14	19,03	19,05	0	/
O13	19,86	20,79	16,49	16,4	8,5 ± 4,1	/
O14	31,43	31,17	20,25	20,19	< LOQ	/
O15	34,92	34,05	20,06	20,18	0	/

Legenda: **O1 – O15:** vzorci ovčjih sirov (preglednica 7); /: ni deklarirano; **LOQ** = 1 %; rezultati dveh paralelk

Izmerjene vrednosti C_t osmih vzorcev ovčji sirov (O1, O3, O4, O5, O7, O8, O13, O14) so s PCR v realnem času bile pozitivne, kar pomeni, da smo v teh vzorcih zaznali kravjo DNA. Ti vzorci na embalaži niso imeli deklarirano, da vsebujejo sledove ali delež kravjega mleka (preglednica 21). O potvorbi ovčjih sirov s kravjim mlekom lahko govorimo pri treh sirih, kjer smo izračunali večje deleže kravjega mleka (O3, O4, O5). Sledove kravjega mleka smo določili pri treh vzorcih, kjer smo izračunali manjše količine kravjega mleka (med 2,7 % in 7,9 %). Dva vzorca sta bila izven območja kvantifikacije, saj je bila meja kvantifikacije (LOQ) 1 % (preglednica 16).

Preglednica 22: Kvantifikacija kravjega mleka v kozjih sirih s PCR v realnem času s sistemom Cow-1/BoCaOv

Vzorec sira	C _t pri Cow-1	C _t pri Cow-1	C _t pri BoCaOv	C _t pri BoCaOv	Izračunana vsebnost kravjega mleka (%) ± SD	Deklariranost kravjega mleka na izdelku
K1	30,77	30,71	19,41	19,38	< LOQ	/
K2	31,25	32,04	19,21	19,0	0	/
K3	26,81	25,73	23,02	22,31	12,8 ± 2,0	/
K4	37,33	35,75	18,15	18,53	0	/
K5	31,99	33,14	19,37	20,16	0	/
K6	30,86	32,3	18,38	18,67	0	/
K7	34,63	36,5	19,3	19,13	0	/
K8	32,88	32,73	19,59	19,95	0	/
K9	27,98	27,64	19,67	19,76	< LOQ	/
K10	35,46	34,53	18,01	18,42	0	/
K11	31,28	31,82	18,82	20,9	0	/
K12	34,76	35,31	19,37	19,89	0	/
K13	31,11	31,04	18,21	16,75	0	/

Legenda: **K1 – K13:** vzorci kozjih sirov (preglednica 8); /: ni deklarirano; **LOQ** = 1 %; rezultati dveh paralelk

Izmerjene vrednosti C_t treh vzorcev kozjih sirov (K1, K3, K9) so s PCR v realnem času bile pozitivne, kar pomeni, da smo v teh vzorcih zaznali kravjo DNA. Ti vzorci na embalaži niso imeli deklarirano, da vsebujejo sledove ali delež kravjega mleka. Glede na izračunano vsebnost kravjega mleka, pri vzorcih kozjih sirov o potvorbi lahko govorimo pri enem vzorcu (K3), ki je vseboval 9,8 % kravjega mleka, dva vzorca (K1, K9) sta bila izven območja kvantifikacije pa vsebujeta le sledove (<1 %) kravjega mleka (preglednica 22).

Iz dobljenih rezultatov v preglednicah 20, 21 in 22 je razvidno, da vrednosti, določene s PCR v realnem času s sistemom Cow-1/BoCaOv za določanje vsebnosti kravjega mleka v ovčjih in kozjih sirih, niso vedno enake deklariranim vrednostim.

Za potrditev naših rezultatov, bi vsebnost kravje DNA oziroma kravjega mleka v vzorcih mešanih, kozjih in ovčjih sirov morali ponoviti še z drugo analitsko metodo. Poleg tega bi namesto ročne homogenizacije vzorcev predlagali mehansko, na primer z uporabo mešalnika. Predvidevamo boljšo homogenizacijo vzorcev, kar bi nam omogočilo pripraviti ustrezno standardno krivuljo za praktično občutljivost.

Mackay (2004) navaja, da je zanesljivost kvantifikacije pogojena s pravilno izbiro in dobro kvaliteto kontrol. Za kvantifikacijo se za izvedbo PCR uporabljajo predvsem standardi, ki omogočajo odkrivanje lažno negativnih rezultatov. V raziskavi López-Calleja in sod. (2007b) je notranji standard del tarčne DNA sesalcev, ki se pomnožuje istočasno kot tarčna DNA krave. Pozitivne vrednosti C_t , ki jih določimo pri specifičnem določanje kravje DNA, moramo določiti tudi pri specifičnem določanju sesalčje DNA. Torej, vzorec, ki vsebuje kravjo DNA, mora imeti pozitivni PCR s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi in sondo za določanje kravje in sesalčje DNA, pri vseh analiziranih vzorcih. Če vzorec vsebuje tarčno DNA krave, vsebuje tudi tarčni del sesalčje DNA. Vzorec, ki ne vsebuje kravje DNA, mora imeti pozitivno C_t vrednost samo pri PCR v realnem času za specifično določanje sesalcev.

4.6 ZBIR REZULTATOV ANALIZ MEŠANIH, KOZJIH IN OVČJIH SIROV S PCR V REALNEM ČASU

Preglednica 23: Zbir rezultatov mešanih, kozjih in ovčjih sirov s PCR v realnem času s sistemom Cow-1/BoCaOv

Vzorec sira	Sistem Cow-1/BoCaOv	
	Kvalitativna določitev kravje DNA	Kvantitativna določitev kravje DNA (%) $\pm$ SD
M1	+	72,3 $\pm$ 23,8
M2	+	30,4 $\pm$ 7,4
O1	+	5,8 $\pm$ 1,2
O2	-	0
O3	+	31,0 $\pm$ 10,5
O4	+	47,3 $\pm$ 24,1
O5	+	24,3 $\pm$ 10,9
O6	-	0,0
O7	+	< LOQ
O8	+	2,7 $\pm$ 0,5
O9	-	0
O10	-	0
O11	-	0
O12	-	0
O13	+	8,5 $\pm$ 4,1
O14	+	< LOQ
O15	-	0
K1	+	< LOQ
K2	-	0
K3	+	12,8 $\pm$ 2,0
K4	-	0
K5	-	0
K6	-	0
K7	-	0
K8	-	0
K9	+	< LOQ
K10	-	0
K11	-	0
K12	-	0
K13	-	0
Skupno 30 vzorcev	37 % vzorcev z neustrezno deklaracijo	36 % vzorcev O in K z več kot 10 % kravje DNA

Legenda: **M1, M2:** vzorca mešanih sirov (preglednica 9); **O1 – O15:** vzorci ovčjih sirov (preglednica 7); **K1 – K13:** vzorci kozjih sirov (preglednica 8); **+**: pozitiven rezultat; **-**: negativen rezultat; **LOQ** = 1 %

V okviru magistrskega dela smo preizkusili 2 različni metodi izolacije DNA iz mešanih, kozjih in ovčjih sirov. Višje koncentracije izolirane DNA in boljšo čistost vzorcev smo določili s komercialnim kompletom SmartHelix Complex Samples, zato smo te DNA-izolate uporabili za izvedbo PCR v realnem času. Preglednica 23 prikazuje rezultate analiz mešanih, kozjih in ovčjih sirov, pri katerih smo za izvedbo PCR v realnem času uporabili sistem Cow-1/BoCaOv. Pomnožili smo DNA izolirano iz 100 % kravjega sira (preglednica 6, vzorec G). Za izvedbo kvantifikacije smo s pomočjo dobljenih vrednosti C_t in s koncentracijo izolirane DNA pripravili teoretični standardni krivulji (slika 18 in 19), s katerima smo izračunali odstotek kravjega mleka v sirih, ki so deklarirani kot ovčji in kozji. Kravjo DNA smo v mešanih, kozjih in ovčjih sirih uspeli določiti kvalitativno in kvantitativno. Izkazalo se je, da 11 vzorcev (37 %) ni bilo ustrezno deklariranih.

Uspešno smo potrdili vse hipoteze, ki smo jih postavili pred eksperimentalnim delom. Dosegli pa smo tudi zastavljeni cilj. S PCR v realnem času smo s kvalitativno analizo uspeli določiti sledove kravje DNA, deleže kravje DNA pa smo uspeli določiti s kvantitativno analizo.

5 SKLEPI

Namen magistrskega dela je bil določiti sledove ali deleže kravjega mleka v kozjih ali ovčjih sirih. Potvorbe smo določali z metodo PCR v realnem času s pomočjo DNA, ki smo jo izolirali iz vzorcev sirov. Na podlagi eksperimentalnega dela in dobljenih rezultatov lahko povzamemo, da:

- je za izolacijo DNA iz vzorcev sirov bolj primeren komercialni komplet SmartHelix Complex Samples kot komercialni komplet NucleoSpin Food,
- je izbran sistem za izvedbo PCR v realnem času sistem Cow-1/BoCaOv,
- je učinkovitost reakcije pri pomnoževanju kravje DNA s sistemom Cow-1 102,2 % in s sistemom BoCaOv 110,5 %,
- je teoretična občutljivost PCR v realnem času za določanje kravje in sesalčje DNA 3,72 pg/ μ l , praktična občutljivost pa 1 %,
- je bilo neustrezno deklariranih 37 % analiziranih vzorcev kozjega in ovčjega sira s slovenskega tržišča,
- lahko PCR v realnem času uspešno uporabimo kot kvalitativno in semi-kvantitativno metodo za določanje potvorb kozjih in ovčjih sirov s kravjim mlekom.

6 POVZETEK

Namen magistrskega dela je bil določiti sledove ali deleže kravjega mleka v sirih, ki so na slovenskem trgu deklarirani kot kozji ali ovčji. Odkrivanje potvorb mleka in mlečnih izdelkov je pomembno tako z ekonomskega kot tudi zdravstvenega vidika. Proizvajalci v kozje in ovčje sire najpogosteje dodajajo cenejše kravje mleko, ki pa mora biti v takih primerih na izdelku deklarirano. Če dodatek kravjega mleka v ovčjih in kozjih sirih ni deklariran, predstavljajo ti izdelki nevarnost za potrošnike z alergijo na kravje beljakovine.

Za izolacijo DNA iz mešanih, kozjih in ovčjih sirov smo preizkusili 2 komercialna kompleta, in sicer SmartHelix Complex Samples in NucleoSpin Food. Ker smo s kompletom SmartHelix Complex Samples pridobili višje koncentracije izolirane DNA in boljšo čistost vzorcev, smo to metodo uporabili za pripravo vzorcev za nadaljnje analize. Za izvedbo PCR v realnem času smo uporabili sistema Bos/Man in Cow-1/BoCaOv. Volk in sod. (2014) so za sistem Bos/Man optimizirali koncentracije začetnih oligonukleotidov, specifičnih za kravo in za sesalce ter koncentracijo sonde. Optimizacija sistema Cow-1/BoCaOv ni bila potrebna, saj je bil sistem že optimiziran s strani proizvajalca.

Pri pomnoževanju kravje DNA, izolirane iz kravjega sira (preglednica 6, vzorec G) s sistemom Bos/Man smo določili mejo detekcije (LOD) 0,7 ng/μl, medtem ko smo s sistemom Cow-1/BoCaOv določili LOD 3,72 pg/μl. Določili smo tudi učinkovitost reakcije, ki je pri pomnoževanju kravje DNA s sistemom Cow-1 102,2 % in s sistemom BoCaOv 110,5 %. Praktično občutljivost PCR v realnem času smo določili tako, da smo pripravili standardne vzorce mešanih sirov (preglednica 16), izolirali DNA ter za izvedbo PCR v realnem času uporabili sistem Cow-1. Določili smo mejo kvantifikacije (LOQ 1 %), ki je primerljiva s podobnimi objavljenimi rezultati (LOQ 2 %, Dalmasso in sod., 2011). Mafra in sod., (2007) so določili LOQ 2,5 %.

Kravjo DNA smo v 30 vzorcih mešanih, kozjih in ovčjih sirov s slovenskega tržišča določili kvalitativno in kvantitativno. Kvalitativno smo odstotek kravjega mleka v sirih, ki so deklarirani kot ovčji in kozji, izračunali iz teoretičnih standardnih krivulj (sliki 18 in 19). Iz dobljenih vrednosti C_t smo izračunali % kravjega mleka v ovčjih in kozjih sirih. Rezultati so pokazali, da je 36 % vzorcev ovčjih in kozjih sirov vsebovalo nad 10 % kravje DNA. Prisotnost kravje DNA s sistemom Cow-1 smo kvalitativno in kvantitativno določili v 13 vzorcih od skupno 30 preiskovanih. Prisotnost kravje DNA smo določili pri dveh vzorcih mešanih sirov (M1, M2), pri osmih vzorcih ovčjih sirov (O1, O3, O4, O5, O7, O8, O13, O14) in pri treh vzorcih kozjih sirov (K1, K3, K9). Vsebnost kravjega mleka sta imela ustrezno deklarirano samo vzorca M1 in M2. Ostalih enajst vzorcev na embalaži ni imelo deklariranega kravjega mleka, čeprav smo kravjo DNA s PCR v realnem času določili. Deleže kravjega mleka smo določili pri 4 vzorcih sira, in sicer O3 (31,0 %), O4 (47,3 %), O5 (24,3 %) in K3 (12 %). Sledove kravje DNA smo določili pri 3 vzorcih sira, in sicer O1 (5,8 %), O8 (2,7 %) in O13 (8,5 %). Štirje vzorci sira (O7, O14, K1, K9) so vsebovali < 1 % kravje DNA. Glede na vse analizirane vzorce sirov (30) lahko zaključimo, da je bilo 37 % vzorcev kozjih in ovčjih sirov neustrezno deklariranih (preglednica 23).

Verižno reakcijo s polimerazo (PCR) številni avtorji opisujejo kot hitro, zanesljivo, specifično in občutljivo metodo za odkrivanje potvorb kozjega ali ovčjega mleka s kravjim mlekom (Mafra in sod., 2007). Tako kot López-Calleja in sod. (2007b), lahko uspešnost metode potrdimo tudi mi. Uspeli smo kvantificirati sledove in tudi deleže kravjega mleka v sirih, ki so deklarirani kot kozji ali ovčji. Ponovljivi rezultati omogočajo odkriti minimalne količine kravjega mleka v kozjih in ovčjih sirih. Kljub visokim stroškom bo v prihodnosti PCR v realnem času za ugotavljanje pristnosti mlečnih izdelkov v laboratorijih nujno potrebna (López-Calleja in sod., 2007b).

7 VIRI

- Bessetti J. 2007. PCR inhibition: an introduction to PCR inhibitors. *Profiles in DNA*, 10,1: 9-10
- Boesenberg-Smith K. A., Pessarakli M. M., Wolk D. M. 2012. Assessment of DNA yield and purity: an overlooked detail of PCR troubleshooting. *Clinical Microbiology Newsletter*, 34, 1: 1-6
- Bu G., Luo Y., Chen F., Liu K., Zhu T. 2013. Milk processing as a tool to reduce cow's milk allergenicity: a mini-review. *Dairy Science & Technology*, 93: 211–223
- Bustin S. A., Nolan T. 2013. Analysis of mRNA expression by real-time PCR. V: *Real-time PCR. Advanced technologies and applications*. Saunders N. A., Lee M. A. (eds.). Norfolk, Caister Academic Press: 51-88
- Codex Alimentarius. 2011. Codex general standard for the use of dairy terms. V: *Codex Alimentarius: Milk and milk products*. (2nd ed.). Rome, FAO/WHO: 176-179
- Commission regulation (EC) No 273/2008 of 5 March 2008 laying down detailed rules for the application of Council Regulation (EC) No 1255/1999 as regards methods for the analysis and quality evaluation of milk and milk products. 2008. *Official Journal of the European Union*, 51, L88: 1-115
- Čanžek Majhenič A., Perko B. 2009. Tehnologije predelave animalnih živil: vaje za predmet Tehnologije animalnih živil za študente prve stopnje Živilstva in prehrane: 2. del Mleko. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 71 str.
- Dąbrowska A., Walecka E., Bania J., Żelazko M., Szołtysik M., Chrzanowska J. 2010. Quality of UHT goat's milk in Poland evaluated by real-time PCR. *Small Ruminant Research*, 94: 32-37
- Dairy animals. 2015. Rome, FAO-Food and Agriculture Organization: 1 str.
<http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/milk-production/dairy-animals>
(29. mar. 2015)
- Dalmasso A., Civera T., La Neve F., Bottero M. T. 2011. Simultaneous detection of cow and buffalo milk in mozzarella cheese by Real-Time PCR assay. *Food Chemistry*, 124: 362–366
- Dhiman T. R., Ure A. L., Walters J. L. 2009. Conjugated linoleic acid: an anticancer fatty acid found in milk and meat. V: *Food and beverage consumption and health series. Milk consumption and health*. Lange E., Vogel F. (eds.). New York, Nova Science Publishers: 175-213

- El-Agamy E.I. 2007. The challenge of cow milk protein allergy. *Small Ruminant Research*, 68: 64–72
- Field A. 2005. *Discovering statistics using SPSS*. (2nd ed.). London, Sage Publications: 779 str.
- Fraga D., Meulia T., Fenster S. 2008. Real time PCR: Current protocols essential laboratory techniques. Ohio, John Wiley & Sons, Inc: 10.3.1-10.3.40
- García V., Rovira S., Boutoia K., López M. B. 2014. Improvements in goat milk quality: A review. *Small Ruminant Research*, 121: 51–57
- Haenlein G. F. W. 2004. Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Research*, 51: 155-163
- Hames B. D. 1998. *Gel electrophoresis of proteins: a practical approach*. (3rd ed.). Oxford, Oxford University Press: 352 str.
- Hashiyada M. 2011. DNA biometrics. V: *Biometrics*. Yang J. (ed.). Rijeka, In Tech: 139-154
- Hladnik Trček K. 2011. Varna hrana “od vil do vilic”: živila živalskega izvora. Ljubljana, Veterinarska uprava Republike Slovenije: 24 str.
<http://www.arhiv.vurs.gov.si/fileadmin/vurs.gov.si/pageuploads/publikacije/Varnahrana.pdf> (8. mar. 2015)
- Hochwallner H., Schulmeister U., Swoboda I., Spitzauer S., Valenta R. 2014. Cow's milk allergy: From allergens to new forms of diagnosis, therapy and prevention. *Methods*, 66: 22–33
- Holzhauser T. 2006. Polymerase chain reaction (PCR) methods for the detection of allergenic foods. V: *Detecting allergens in food*. Koppelman S. J., Hefle S. L. (eds.). Cambridge, Woodhead Publishing Limited: 125-140
- Jeršek B. 2009. *Higiena živil: laboratorijske vaje za študente živilstva in prehrane*. (2. dop. izd.). Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 68 str.
- Jeršek B., Jamnik P., Klančnik A., Kurinčič M., Piskernik, S., Volk H., Gornjak A., Toplak N., Kovač M., Potočnik D., Ogrinc N. 2014. Detection of cow's milk in sheep's and goat's milk and cheeses by real-time PCR, 2-d electrophoresis and fatty acid composition. V: *38th International Symposium on Environmental Analytical Chemistry with a special session on Environmental Analytical Chemistry and Food Safety, June 17-20, 2014, Lausanne, Switzerland. Book of abstracts*. Lausanne, EPFL, École Polytechnique Fédérale de Lausanne: 208-208
- Knežević M. 2006. *Statistika z uporabo računalnika*. Portorož, Turistica: 246 str.

- Kuchta T. 2013. Sample preparation for real-time PCR in food science. V: Real-time PCR in food science: current technology and applications. Rodríguez-Lázaro D. (ed.). Norfolk, Caister Academic Press: 27-34
- Lee M. A., Squirrell D. J., Leslie D. L Brown T. 2013. Homogeneous fluorescent chemistries for real-time PCR. V: Real-time PCR. Advanced technologies and applications. Saunders N. A., Lee M. A. (eds.). Norfolk, Caister Academic Press: 1-36
- Letno poročilo 2011. 2012. Ljubljana, Veterinarski urad Republike Slovenije: 93 str.
- Letno poročilo 2012. 2013. Ljubljana, Veterinarski urad Republike Slovenije: 111 str.
- Life Technologies. 2015. Poor efficiency of PCR. Waltham, Thermo Fisher Scientific Inc: 1 str.
<http://www.lifetechnologies.com/si/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/qpcr-education/real-time-pcr-troubleshooting-tool/gene-expression-quantitation-troubleshooting/poor-pcr-efficiency.html> (3. apr. 2015)
- Liu J., Ren J., Liu Z., Guo B. 2015. A new comprehensive index for discriminating adulteration in bovine raw milk. Food Chemistry, 172: 251–256
- Logan J. M. J., Edwards K. J. 2004. An overview of real time PCR platforms. V: Real-time PCR: An essential guide. Edwards K., Logan J., Saunders N. (eds.). Norfolk, Horizon Bioscience: 13-24
- López-Calleja I., González I., Fajardo V., Martín I., Hernández P. E., García T., Martín R. 2005a. Application of polymerase chain reaction to detect adulteration of sheep's milk with goats' milk. Journal of Dairy Science, 88: 3115–3120
- López-Calleja I., González I., Fajardo V., Rodríguez M. A., Hernández P. E., García T., Martín R. 2005b. PCR detection of cows' milk in water buffalo milk and mozzarella cheese. International Dairy Journal, 15: 1122–1129
- López-Calleja I., González I., Fajardo V., Martín I., Hernández P. E., García T., Martín R. 2007a. Application of an indirect ELISA and a PCR technique for detection of cows' milk in sheep's and goats' milk cheeses. International Dairy Journal, 17: 87–93
- López-Calleja I., González I., Fajardo V., Martín I., Hernández P. E., García T., Martín R. 2007b. Real-time TaqMan PCR for quantitative detection of cows' milk in ewes' milk mixtures. International Dairy Journal, 17: 729–736
- López-Calleja I., González I., Fajardo V., Martín I., Hernández P. E., García T., Martín R. 2007c. Quantitative detection of goats' milk in sheep's milk by real-time PCR. Food Control, 18: 1466-1473

- Mackay I. M. 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*, 10: 190-212
- Mafra I., Roxo Á., Ferreira I. M. P. L. V. O., Oliveira P. P. B. M. 2007. A duplex polymerase chain reaction for the quantitative detection of cows' milk in goats' milk cheese. *International Dairy Journal*, 17: 1132–1138
- Marteau P. 2002. Lactose intolerance: a summary. V: Food allergy and intolerance: current issues and concerns. Emerton V. (ed.). Surrey, Leatherhead International Ltd: 102-113
- McLoid A. 2013. Human nutrition and dairy development: trends and issues. V: Milk and dairy products in human nutrition. Muehlhoff E., Bennett A., McMahon D. (eds.). Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations: 355-376
- McPherson M. J., Møller S. G. 2000. PCR. Oxford, BIOS Scientific Publishers Ltd: 276 str.
- Milk production. 2015. Rome, FAO-Food and Agriculture Organization: 1 str.
<http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/milk-production/en/#.VRfb7fmsWSp>
(29. mar. 2015)
- Opel K. L., Chung D., McCord B. R. 2010. A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR. *Journal of Forensic Science*, 55: 25-33
- Pandya A. J., Ghodke K. M. 2007. Goat and sheep milk products other than cheeses and yoghurt. *Small Ruminant Research*, 68: 193–206
- Pappas C. S., Tarantilis P. A., Moschopoulou E., Moatsou G., Kandarakis I., Polissiou M. G. 2008. Identification and differentiation of goat and sheep milk based on diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFTS) using cluster analysis. *Food Chemistry*, 106: 1271–1277
- Park Y. W., Juárez M., Ramos M., Haenlein G. F. W. 2007. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68: 88–113
- Pfaffl M. W. 2004. Quantification strategies in real-time PCR. V: A-Z of quantitative PCR. Bustin S. A. (ed.). La Jolla, CA, International University Line: 87-112
- Pravilnik o veterinarsko-sanitarnem nadzoru živilskih obratov, veterinarsko-sanitarnih pregledih ter o pogojih zdravstvene ustreznosti živil in surovin živalskega izvora. 1999. Uradni list Republike Slovenije, 9, 100: 14951-14957
- Pravilnik o tržno informacijskem sistemu za trg mleka in mlečnih izdelkov. 2015. Uradni list Republike Slovenije, 25, 21: 2200-2201

Prireja in uporaba mleka na kmetijskih gospodarstvih v Sloveniji. 2015. Ljubljana, Statistični urad Republike Slovenije: 1 str.

<http://www.stat.si/> (20. apr. 2015)

Psifidi A., Dovas C. I., Banos G. 2010. A comparison of six methods for genomic DNA extraction suitable for PCR-based genotyping applications using ovine milk samples. *Molecular and Cellular Probes*, 24: 93-98

RASFF. 2014a. Undeclared lactose in lactose-free chocolate almond cookies. Reference 2014.1656. Brussels, Rapid Alert System for Food and Feed: 1 str.

<https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/> (8. mar. 2015)

RASFF. 2014b. Undeclared milk ingredient in cake with lemon crème. Reference 2014.0754. Brussels, Rapid Alert System for Food and Feed: 1 str.

<https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/> (8. mar. 2015)

Raynal-Ljutovaca K., Lagriffoulb G., Paccardb P., Guillet I., Chilliardc Y. 2008. Composition of goat and sheep milk products: an update. *Small Ruminant Research*, 79: 57–72

Recio I., García-Risco M. R., Amigo L., Molina E., Ramos M., Martín-Álvarez P. J. 2004. Detection of milk mixtures in Halloumi cheese. *Journal of Dairy Science*, 87, 6: 1595-1600

Rodrigues N. P. A., Givisiez P. E. N., Queiroga R. C. R. E., Azevedo P. S., Gebreyes W. A., Oliveira C. J. B. 2012. Milk adulteration: detection of bovine milk in bulk goat milk produced by smallholders in northeastern Brazil by a duplex PCR assay. *Journal of Dairy Science*, 95, 5: 2749-2752

Rodríguez-Lázaro D., Hernández M. 2013. Introduction to the real-time polymerase chain reaction. V: *Real-time PCR in food science: current technology and applications*. Rodríguez-Lázaro D. (ed.). Norfolk, Caister Academic Press: 3-19

Sakaridis I., Ganopoulos I., Argiriou A., Tsaftaris A. 2013. High resolution melting analysis for quantitative detection of bovine milk in pure water buffalo mozzarella and other buffalo dairy products. *International Dairy Journal*, 28: 32-35

Santos P.M., Pereira-Filho E. R., Rodriguez-Saona L. E. 2013. Rapid detection and quantification of milk adulteration using infrared microspectroscopy and chemometrics analysis. *Food Chemistry*, 138: 19–24

Sanz Sampelayo M. R., Chilliard Y., Schmidely Ph., Boza J. 2007. Influence of type of diet on the fat constituents of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68: 42–63

Schrader C., Schielke A., Ellerbroek L., Johne R. 2012. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113, 5: 1014-1026

- Smith M. 2013. The validation of real-time PCR assays for infectious diseases. V: Real-time PCR. Advanced technologies and applications. Saunders N. A., Lee M. A. (eds.). Norfolk, Caister Academic Press: 213-246
- Steinke M., Fiocchi A., Kirchlechner V., Ballmer-Weber B., Brockow K., Hischenhuber C., Dutta M., Ring J., Urbanek R., Terracciano L., Wezel R. 2007. International Archives of Allergy and Immunology, 143: 290–295
- Špoljarić J., Mikulec N., Plavljanić D., Radeljević B., Havranek J., Antunac N. 2013. Proving the adulteration of ewe and goat cheeses with cow milk using the reference method of isoelectric focusing of γ -casein. *Mljekarstvo*, 63, 3: 115-121
- Taylor S. 2006. The nature of food allergy. V: Detecting allergens in food. Koppelman S. J., Hefle S. L. (eds.). Cambridge, Woodhead Publising Limited: 7-16
- Uredba Sveta (ES) št. 1234/2007 z dne 22. oktobra 2007 o vzpostavitvi skupne ureditve kmetijskih trgov in o posebnih določbah za nekatere kmetijske proizvode ("Uredba o enotni SUT"). 2007. Uradni list evropske unije, 50, L299: 1-149
- Uredba (ES) št. 178/2002 evropskega parlamenta in sveta z dne 28. januarja 2002 o določitvi splošnih načel in zahtevah živilske zakonodaje, ustanovitvi Evropske agencije za varnost hrane in postopkih, ki zadevajo varnost hrane. 2002. Uradni list evropske unije, 45, L31: 1-37
- Uredba (ES) št. 882/2004 evropskega parlamenta in sveta z dne 29. aprila 2004 o izvajanju uradnega nadzora, da se zagotovi preverjanje skladnosti z zakonodajo o krmi in živilih ter s pravili o zdravstvenem varstvu živali in zaščiti živali. 2004. Uradni list evropske unije, 47, L191: 1-61
- Volk H. 2013. Določanje potvorb ovčjega in kozjega mleka s kravjim mlekom na ravni DNA in proteinov. Magistrsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 53-101
- Volk H., Piskernik S., Kurinčič M., Klančnik A., Toplak N., Jeršek B. 2014. Evaluation of different methods for DNA extraction from milk. *Journal of Food and Nutrition Research*, 53, 2: 97-104
- Weaver C., Wijesinha-Bettoni R., McMahon D., Spence L. 2013. Milk and dairy products as part of the diet. V: Milk and dairy products in human nutrition. Muehlhoff E., Bennett A., McMahon D. (eds.). Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations: 103-207
- Wijesinha-Bettoni R. in Burlingame B. 2013. Milk and dairy product composition. V: Milk and dairy products in human nutrition. Muehlhoff E., Bennett A., McMahon D. (eds.). Rome, Food and Agriculture organization of the United Nations: 41-102

Wraber B. 2004. Prehranske alergije in prehranski alergeni. V: Varnost živil. 22. Bitenčevi živilski dnevi. Radenci, 18. in 19. marec 2004. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 65-74

Zhang C., Fowler M. R., Scott N. W., Lawson G., Slater A. 2007. A TaqMan real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks and cheeses. Food Control, 18: 1149–1158

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici, prof. dr. Barbari Jeršek, za strokovno pomoč in potrpežljivost. Raziskovalno delo sem pod vašim mentorstvom z veseljem opravljala, saj ste mi vedno nesebično svetovali in me usmerjali na pravo pot. Vaše znanje in izkušnje so neprecenljive, hvala, ker ste to delili tudi z mano.

Za opravljeno recenzentsko delo in za strokovni pregled naloge se zahvaljujem prof. dr. Poloni Jamnik.

Prav tako se zahvaljujem Saši Piskernik za pomoč pri izvedbi eksperimentalnega dela.

Hvala tudi Lini Burkan Makivić, uni. dipl. inž., za pomoč pri tehničnem pregledu naloge.

Velika zahvala gre mami Mariji in sestri Maji, ki sta mi s finančno in moralno podporo omogočili brezskrben študij. Bratu Matevžu se zahvaljujem za vse spodbudne besede. Rada vas imam.

Kljub ovinkom sem s tabo študijsko pot lažje prehodila, dragi Primož. Hvala, ker obstajaš in mi s svojim nasmehom polepšaš vsak dan. Hvala, ker mi stojiš ob strani, v dobrem in v slabem. Hvala za ljubezen, zaradi tebe je moje življenje lepše in polnejše.