

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Marjetka KRŠLIN

**PROTEINSKI PROFILI RAZLIČNIH VRST MLEKA**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Živilstvo

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Marjetka KRŠLIN

**PROTEINSKI PROFILI RAZLIČNIH VRST MLEKA**

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij - 2. stopnja Živilstvo

**PROTEIN PROFILES OF VARIOUS TYPES OF MILK**

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

Ljubljana, 2014

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

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala izr. prof. dr. Polono Jamnik, za somentorico izr. prof. dr. Barbka Jeršek in za recenzentko izr. prof. dr. Leo Demšar.

Mentorica: izr. prof. dr. Polona Jamnik

Somentorica: izr. prof. dr. Barbka Jeršek

Recenzentka: izr. prof. dr. Lea Demšar

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svojega magistrskega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Marjetka Kršlin

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

ŠD Du2  
DK UDK 637.12.06:577.112.088(043)=163.6  
KG mleko / potvorbe mleka / kravje mleko / kozje mleko / ovčje mleko / določanje potvorb / proteomika / proteinski profili mleka / 2-D elektroforeza  
AV KRŠLIN, Marjetka, dipl. inž. živ. in preh. (UN)  
SA JAMNIK, Polona (mentorica)/ JERŠEK, Barbka (somentorica)/ DEMŠAR, Lea (recenzentka)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo  
LI 2014  
IN PROTEINSKI PROFILI RAZLIČNIH VRST MLEKA  
TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Živilstvo)  
OP X, 40 str., 6 pregl., 9 sl., 1 pril., 46 vir.  
IJ SI  
JI sl/en  
AI Namen magistrskega dela je bil določiti proteinske profile kozjega, ovčjega in kravjega mleka ter ugotoviti, ali se med seboj razlikujejo glede na geografsko poreklo. Povod za raziskavo so bile proteomske analize manjšega števila vzorcev kozjega, ovčjega in kravjega mleka, ki so na proteinskem profilu kravjega mleka določile proteinski lisi, ki se na proteinskem profilu kozjega in ovčjega mleka nista pojavljali. Preverjali smo, ali sta ti dve proteinski lisi na proteinskem profilu značilni tudi za kravje mleko in odsotni v ovčjem in kozjem mleku, ki so izvirali iz različnih krajev po Sloveniji. Pri vzorčenju smo se odločili za kraje, ki so bili med seboj čim bolj oddaljeni. Kravje mleko je bilo odvzeto v Postojni, Brežicah in Ribnici na Pohorju, kozje mleko v Bovcu in Brdih, ovčje mleko pa v Bovcu in Vremščici na Krasu. Postopek ločevanja proteinov mleka je potekal z dvo-dimenzionalno (2-D) elektroforezo. Z metodo lahko ločujemo kompleksne mešanice proteinov, zato je primerna tudi za analize proteinov mleka. Analizirali smo čisto surovo kravje, kozje in ovčje mleko ter mešanice 90 % surovega kozjega oziroma ovčjega mleka z 10 % surovega kravjega mleka. Primerjava proteinskih profilov je pokazala, da se pri posamezni vrsti mleka profili med seboj v splošnem le rahlo razlikujejo glede na geografsko poreklo, med vrstami pa so razlike večje. Na proteinskih profilih kravjega mleka sta bili povsod ne glede na geografsko poreklo prisotni 2 proteinski lisi, medtem ko jih na proteinskih profilih ovčjega in kozjega mleku ni bilo zaznati. Proteinski lisi sta se pokazali tudi na proteinskih profilih vseh mešanic mleka. Proteinske lise, na podlagi katerih smo določali potvorbe, so bile identificirane z masno spektrometrijo. Identifikacija je pokazala, da je to  $\kappa$ -kazein.  $\kappa$ -kazein je značilen za mleko vseh treh vrst omenjenih živali, vendar se razlike med vrstami v sestavi mleka odražajo tudi v različnih post-translacijskih modifikacijah  $\kappa$ -kazeina, kar vodi v njihovo točno določeno pozicijo na 2-D gelu.

**KEY WORDS DOCUMENTATION**

ND Du2  
DC UDC 637.12.06:577.112-088(043)=163.6  
CX milk / milk adulteration / cows' milk / goats' milk / sheeps' milk / determination of adulteration / proteomics / protein profiles of milk / 2-D electrophoresis  
AU KRŠLIN, Marjetka  
AA JAMNIK, Polona (supervisor)/ JERŠEK, Barbka (co-advisor)/ DEMŠAR Lea (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology  
PY 2014  
TY PROTEIN PROFILES OF VARIOUS TYPES OF MILK  
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Food Science and Technology)  
NO X, 40 p., 6 tab., 9 fig., 1 ann., 46 ref.  
LA SI  
Al sl/en  
AB The purpose of the master thesis was to determine the protein profiles of goats', sheeps' and cows' milk and find out whether they vary according to their geographical origin. The reason for this study were proteomic analysis of a small number of samples of goats', sheeps' and cows' milk which showed two protein spots on protein profiles, specific for cows' milk and they were absent on protein profiles of goats' and sheeps' milk. Here, we wanted to examine whether these two protein spots of cows' milk were also characteristic for cows' milk and absent in goats' and sheeps' milk arising from different locations in Slovenia. We selected sampling locations that were as distant as possible. Cows' milk was collected in Postojna, Brežice and Ribnica na Pohorju, goats' milk in Bovec and Brda and sheeps' milk in Bovec and Vremščica na Krasu. Two-dimensional (2-D) electrophoresis was used as a method for separation of proteins. This method is able to separate complex mixtures of proteins and that is why it is also suitable for the analysis of proteins in milk. We analyzed pure raw cows', goats' and sheeps' milk, and a mixture of 90 % of raw goats' and sheeps' milk with 10 % of raw cows' milk. Comparison of protein profiles of the same species revealed that protein profiles in general only slightly differed from each other according to the geographical origin, while differences between species were larger. Two specific protein spots were present on protein profiles of cows' milk, while they were not detected on protein profiles of goats' and sheeps' milk. These two spots were also visible on the protein profiles of mixtures of milk. They were identified by mass spectrometry as precursors of  $\kappa$ -casein. All three mentioned species contain  $\kappa$ -casein in their milk, but there are differences in its post-translational modifications, which is reflected in the different positions of  $\kappa$ -casein on the 2-D gel.

**KAZALO VSEBINE**

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION.....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE.....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC.....</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO SLIK.....</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO PRILOG .....</b>	<b>IX</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....</b>	<b>X</b>
<b>1 UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1 CILJI DELA .....	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV.....</b>	<b>3</b>
2.1 SESTAVA MLEKA.....	3
<b>2.1.1 Proteini .....</b>	<b>5</b>
2.1.1.1 Kazeini .....	5
2.1.1.2 Sirotkini ali serumski proteini.....	6
<b>2.1.2 Maščoba.....</b>	<b>7</b>
<b>2.1.3 Laktoza .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1.4 Minerali .....</b>	<b>9</b>
2.2 POTVORBE MLEKA.....	9
<b>2.2.1 Zaščita potrošnikov .....</b>	<b>10</b>
<b>2.2.2 Referenčna metoda za ugotavljanje potvorb sira.....</b>	<b>11</b>
<b>2.2.3 Ugotavljanje potvorbe mleka z mlekom druge vrste živali z različnimi metodami .....</b>	<b>11</b>
<b>2.2.4 Ugotavljanje potvorbe mleka z mlekom različnih živali z 2-D elektroforezo.....</b>	<b>12</b>
2.3 PROTEOMSKA ANALIZA .....	13
<b>2.3.1 Dvo-dimenzionalna elektroforeza (2-D elektroforeza).....</b>	<b>14</b>
<b>3 MATERIAL IN METODE DELA .....</b>	<b>15</b>
3.1 POTEK EKSPERIMENTALNEGA DELA .....	15
3.2 MATERIAL .....	16
<b>3.2.1 Vzorci.....</b>	<b>16</b>
3.2.1.1 Vzorci surovega mleka .....	16
<b>3.2.2 Laboratorijska oprema .....</b>	<b>17</b>
3.2.2.1 Določanje koncentracije proteinov v surovem mleku .....	17
3.2.2.2 Izolacija proteinov iz mleka.....	17
3.2.2.3 IEF.....	17
3.2.2.4 SDS PAGE.....	17
3.2.2.5 Detekcija slike 2-D gela.....	18
3.2.2.6 Hladilniki in zamrzovalniki za shranjevanje vzorcev, raztopin, reagentov in kompletov .....	18
<b>3.2.3 Kemikalije za izolacijo proteinov iz mleka.....</b>	<b>18</b>
<b>3.2.4 Kemikalije za izvedbo 2-D elektroforeze.....</b>	<b>18</b>
3.3 METODE .....	19
<b>3.3.1 Določitev koncentracije proteinov v vzorcih mleka z metodo Bradford.....</b>	<b>19</b>

<b>3.3.2</b>	<b>Izolacija proteinov mleka.....</b>	<b>19</b>
<b>3.3.3</b>	<b>2-D elektroforeza .....</b>	<b>20</b>
3.3.3.1	Rehidracija trakov .....	20
3.3.3.2	1. dimenzija – IEF.....	20
3.3.3.3	Priprava gelov .....	21
3.3.3.4	Uravnoveženje trakov .....	21
3.3.3.5	2. dimenzija – SDS poliakrilamidna gelska elektroforeza.....	21
<b>3.3.4</b>	<b>Barvanje 2-D gelov z barvilom Sypro Ruby .....</b>	<b>22</b>
<b>3.3.5</b>	<b>Dokumentiranje in primerjava rezultatov na 2-D gelih .....</b>	<b>22</b>
<b>4</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>23</b>
4.1	KONCENTRACIJA PROTEINOV .....	23
4.2	LOČEVANJE PROTEINOV MLEKA Z 2-D ELEKTROFOREZO.....	23
4.2.1	Proteini čistega surovega mleka .....	24
4.2.2	Proteini mešanic različnih vrst mleka .....	26
4.3	BIOINFORMATSKA ANALIZA .....	29
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>32</b>
5.1	RAZPRAVA .....	32
5.2	SKLEPI .....	35
<b>6</b>	<b>POVZETEK .....</b>	<b>36</b>
<b>7</b>	<b>VIRI.....</b>	<b>37</b>
	<b>ZAHVALA</b>	
	<b>PRILOGE</b>	

**KAZALO PREGLEDNIC**

Preglednica 1: Sestava kravjega, kozjega in ovčjega mleka (Rogelj, 1996; Mavrin in Oštir, 2002) .....	4
Preglednica 2: Proteini mleka (Damjanović in sod., 2006) .....	5
Preglednica 3: Sestava kazeinskih frakcij v svežem kravjem, ovčjem in kozjem mleku (Damjanović in sod., 2006) .....	6
Preglednica 4: Količina maščobnih kislin (v mg/100 g) kravjega, kozjega in ovčjega mleka (Souci in sod., 1994; Rogelj, 1996).....	8
Preglednica 5: Koncentracije proteinov v vzorcih surovega mleka.....	23
Preglednica 6: Pregled proteinskih lis na proteinskih profilih različnih vrst mleka ter odgovarjajoči podatki v bazi UniProt (UniProt, 2014) in programu Mascot (Dowle, 2014, Priloga A) .....	29



**KAZALO SLIK**

Slika 1: Shema eksperimentalnega dela.....	15
Slika 2: Oznaka krajev v Sloveniji, kjer so bile vzorčene posamezne vrste mleka .....	16
Slika 3: Proteinski profili različnih vzorcev kravjega mleka z rdeče označenima lisama, ki sta značilni samo za kravje mleko.....	24
Slika 4: Proteinska profila dveh vzorcev kozjega mleka, kjer je z rdečo označeno mesto odsotnosti proteina, ki je specifičen samo za kravje mleko .....	25
Slika 5: Proteinska profila dveh vzorcev ovčjega mleka, kjer je z rdečo označeno mesto odsotnosti proteina, ki je specifičen samo za kravje mleko .....	25
Slika 6: Proteinski profili mešanic kozjega mleka s kravjim mlekom z rdeče označenimi mesti, kjer se pojavijo proteini, ki so specifični samo za kravje mleko.....	27
Slika 7: Proteinski profili mešanic ovčjega mleka s kravjim mlekom z rdeče označenimi mesti, kjer se pojavijo proteini, ki so specifični samo za kravje mleko.....	28
Slika 8: Primerjava aminokislinske sekvence $\kappa$ -kazeinov kravjega, kozjega in ovčjega mleka (UniProt, 2014).....	30
Slika 9: Taksonomsko drevo $\kappa$ -kazeinov kravjega, kozjega in ovčjega mleka (UniProt, 2014) .....	31

## **KAZALO PRILOG**

Priloga A: Rezultati identifikacije 2-D lis z masno spektrometrijo (Dowle, 2014)

**OKRAJŠAVE IN SIMBOLI**

2-D elektroforeza	dvo-dimenzionalna elektroforeza
ELISA	encimskoimunski test (ang. Enzyme-linked immunosorbent assay)
IEF	izoelektrično fokusiranje
nativna PAGE	nativna poliakrilamidna gelska elektroforeza
obr./ min	obrati na minuto
PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. Polymerase chain reaction)
RP-HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z obrnjeno fazo (ang. Reversed-phase high performance liquid chromatography)
SDS PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (ang. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

## 1 UVOD

Mleko je v Slovarju slovenskega knjižnega jezika definirano kot »bela tekočina, ki se izloča pri samicah sesalcev določen čas po porodu kot hrana za mladiče« (SSKJ, 2002). Je bela, neprosojna, heterogena tekočina, za katero lahko rečemo, da so različne sestavine razpršene tako v emulziji, kot v koloidni suspenziji ter raztopini obenem (Chandan, 2007). Kravje mleko je izključno običajni izloček mlečnih žlez, dobljeno z molžo ene ali več krav, brez kakršnega koli dodajanja ali odvzemanja (Uredba sveta (ES) št. 1234/2007). Ko govorimo o mleku, s tem mislimo na kravje mleko, druge vrste je potrebno posebej označiti, na primer kozje, ovčje. Med seboj se razlikujejo po senzoričnih, fizikalno-kemijskih in tehnoloških lastnostih ter hranljivosti (Mavrin in Oštir, 2002). Glavne sestavine katerega koli živalskega mleka so voda, proteini, maščobe in mlečni sladkor, poleg tega pa še nekateri vitamini in minerali (Bajt in Golc-Teger, 2002). Proteini so najpomembnejša sestavina mleka in so večinoma zelo občutljivi na kemijske in fizikalne vplive, saj zaradi njih hitro spremenijo svojo zgradbo in lastnosti (Mavrin in Oštir, 2002).

Med vsemi temi podatki je pomembna tudi informacija o pristnosti mleka. Po Uredbi Sveta (ES) št. 1234/2007 se mora navesti poreklo mleka in mlečnih izdelkov, če mleko ni kravje (Uredba sveta (ES) št. 1234/2007). To je pomembno tako zaradi potrošnikov samega mleka, kot tudi za proizvajalce mlečnih izdelkov. Pri nas se na primer za izdelavo Bovškega sira uporablja surovo ovčje mleko, kateremu se sicer lahko doda do 20 % kozjega ali kravjega mleka, vendar se mora dodatek kozjega oz. kravjega mleka na etiketi še posebej označiti (Slovenski zaščiteni..., 2006).

Proizvodnja drugih vrst mleka ima tako velik ekonomski pomen. Najpogostejše potvorbe običajno izhajajo iz zamenjave visoko kakovostne surovine s surovino slabše kakovosti, ki pa ni navedena na deklaraciji izdelka (Zachar in sod., 2011). Na primer zamenjava dela kozjega mleka s kravjim, ki ga potem uporabijo ali prodajo za izdelovanje kozjih sirov, s tem pa si goljufivo povečajo izkupiček (Roncada in sod., 2012). Motiv prodajalcev in proizvajalcev za potvarjanje je v povečani prodani količini in večjemu finančnemu dobičku, saj se izdelki ob enaki ali celo višji prodajni ceni prodajo z nižjimi proizvodnimi stroški (MKGP, 2010). Vendar potvorba kozjega ali ovčjega mleka s kravjim lahko predstavlja problem zaradi: intolerance ali alergične reakcije na določene snovi, ki so prisotne v kravjem, ne najdemo pa jih v kozjem ali ovčjem mleku, verskih, etničnih ali kulturnih nasprotovanj ter finančnih in zakonskih zadev (Cheng in sod., 2006; Zachar in sod., 2011).

Zaščita potrošnikov pred potvorbami je naloga Ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano. Potvorbe se preverja z laboratorijskimi testi, ki z ustrezno opremo in tehniko razlikujejo med naravnimi sestavinami ter njihovimi nadomestki v določeni vrsti živil. Delno lahko to ugotovijo s preverjanjem sledljivosti surovin in količine surovin po recepturi iz predložene dokumentacije proizvajalca. Glavno dokazilo pa je laboratorijsko preizkušanje, kjer se z ustrezno tehniko in opremo razlikuje med naravnimi in nadomestnimi sestavinami v določeni vrsti živil. Uradni laboratoriji, ki upravljajo naloge za potrebe uradnega nadzora, so ocenjeni in akreditirani v skladu s SIST EN ISO/IEC 17025 o »Splošnih zahtevah za usposobljenost preskuševalnih in usmerjevalnih laboratorijev« (SIST EN ISO/IEC 17025, 2005). V okviru uradnega nadzora se v EU uporabljajo predpisane metode, če te obstajajo, če pa predpisanih metod znotraj EU ni, se lahko uporabljajo druge metode, ki so primerne za

predvideni namen ali so razvite v skladu z znanstvenimi protokoli (MKGP, 2010). Uredba komisije določa, da je referenčna metoda za določanje potvorb s kravjim mlekom v sirih iz ovčjega, kozjega, bivoličjega ter mešanice mleka teh vrst, izoelektrično fokusiranje (Uredba komisije (ES) št. 273/2008). Potvorjenost mleka se da ugotavljati na različne načine, od imunoloških, elektroforetskih, kromatografskih do PCR-tehnik (Zachar in sod., 2011). V tej magistrski nalogi smo pristnost kozjega in ovčjega glede na kravje mleko preverjali z dvo-dimenzionalno gelsko elektroforezo (2-D elektroforeza).

2-D elektroforeza je metoda ločevanja, pri kateri proteine ločimo v prvi dimenziji z izoelektričnim fokusiranjem (IEF) glede na njihovo izoelektrično točko, nato pa v drugi dimenziji z natrijevim dodecilsulfat poliakrilamidno gelsko elektroforezo (ang. »*Sodium dodecyl sulfat polyacrylamide gel electrophoresis*« - SDS PAGE) glede na njihovo molekularno maso. Z metodo lahko ločujemo kompleksne mešanice proteinov, zato je primerna tudi za analize proteinov mleka (D'Auria in sod., 2005).

## 1.1 CILJI DELA

Cilj te magistrske naloge je bil določiti proteinske profile kozjega, ovčjega in kravjega mleka ter ugotoviti, ali se med seboj glede na geografsko poreklo razlikujejo.

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Postavili smo sledeče hipoteze:

- 1) Različne vrste mleka se med seboj po sestavi razlikujejo, zato pričakujemo, da se bo to pokazalo tudi na proteinskih profilih in da bo mogoče na podlagi teh razlik določiti potvorbe ovčjega in kozjega mleka s kravjim mlekom.
- 2) Predvidevamo, da so proteinski profili odvisni od vrste mleka ter, da so proteinski profili posamezne vrste mleka odvisni od geografskega porekla.

## 2 PREGLED OBJAV

Mleko je prva, popolna in lahko prebavljiva prehrana novorojenih sesalcev. Med vrstami se med seboj razlikuje, saj je mleko sestavljeno tako, da pokriva prehranske potrebe mladičev svoje vrste toliko časa, da ti začno uživati drugo hrano. Mleko spada pod najpomembnejša hranila, saj ga uživajo vse starostne skupine ljudi. Če poleg upoštevamo tudi ostale mlečne izdelke, ga lahko omenjamo kot enega glavnih virov prehrane. V nasprotju s humanim materinim mlekom, ki ga uživamo le na začetku otroštva, so nam živalsko mleko in mlečni izdelki na voljo celo življenje (Roncada in sod., 2012).

Izmed mlečnih izdelkov po celem svetu, je mleko tisto, ki ga ljudje najpogosteje uživajo. V pridelavo mleka je vključenih približno 150 milijonov gospodinjstev po vsem svetu, medtem ko ga uživa več kot 6 bilijonov ljudi (FAO, 2014).

Mleko je predmet znanstvenih raziskav že približno 150 let in je zato posledično zelo dobro analizirano. Mleko je zelo kompleksno živilo in se ga lahko uživa nepredelanega ali pa uporablja kot surovina za veliko skupino mlečnih izdelkov. Svetovno se največ pridelava kravjega mleka, nato sledi bivoličje, ovčje, kozje in nazadnje kamelje mleko ter mleko jakovih samic in kobil. Skozi razvoj sesalcev so razlike v okolju in naravna selekcija povzročile veliko pestrost živalskih vrst in pasem, kar je posledično povzročilo tudi različno sestavo mleka. Glede na ekonomske razlike različnih vrst mleka, se vedno pojavlja možnost potvorb. Pri preverjanju le teh pa je pomembno poznati sestavo in podobnosti ter razlike mleka med eno in drugo vrsto živali molznic. To je potrebno, saj je kakovost končnega izdelka zelo odvisna od kakovosti začetne surovine (Fox in McSweeney, 1998; D'Ambrosio in sod., 2008; Yang in sod., 2014).

### 2.1 SESTAVA MLEKA

Sestavine mleka ter razmerje med njimi sta prvi zadevi, ki vplivata na kakovost mleka, in testi, ki jih naredijo na svežem mleku, so bistvenega pomena pri zagotavljanju kakovosti. Kakovost lahko pogledamo z več vidikov (Čanžek Majhenič in Perko, 2009):

- ❖ kemijska kakovost zajema analize vsebnosti glavnih sestavin kot tudi vsebnosti posameznih mineralov, vitaminov ter težkih kovin, aflatoksinov, pesticidov, antibiotikov, detergentov in razkužil. Slednji so zdravju škodljivi in zakonsko nedovoljeni ali pa so v zakonskih in pod-zakonskih aktih zanje postavljene zgornje mejne vrednosti (ZMV),
- ❖ mikrobiološka kakovost, kjer ločimo skupno št. mikroorganizmov ter prisotnost oz. odsotnost patogenih mikroorganizmov,
- ❖ higienska kakovost, kamor se šteje tudi mikrobiološka, v katero vključimo tudi količino somatskih celic,

- ❖ fizikalna kakovost zajema lastnosti mleka, kot so gostota, zmrziščna točka, kislinska stopnja in vrednost pH,
- ❖ senzorična kakovost opredeljuje okus, vonj, aromo in konsistenco,
- ❖ ter tehnološka kakovost, kateri se poleg vseh parametrov pridružujejo še encimski sistem mleka, sestava mlečne maščobe in proteinov, skupine mikroorganizmov, ki sestavljajo mikrobo no populacijo mleka, razmerje med minerali, količine citrate, sečnine...

Vsi ti parametri kakovosti so nadvse pomembni, saj podatki povedo, kakšna je toplotna obstojnost mleka, kakšne so koagulacijske lastnosti in sposobnosti mleka za sirjenje, kakšno je okolje za rast in aktivnosti starterskih mlečno-kislinskih bakterij, kakšni so parametri, ki prispevajo k oblikovanju okusa in arome pa tudi obstojnosti končnega izdelka (Belloque in sod., 2009; Čanžek Majhenič in Perko, 2009).

Mleko je proizvod mlečne žleze, ki se ga pridobiva z redno, popolno in neprekinjeno molžo zdravih, pravilno krmljenih in ustrezno oskrbovanih živali v času njihove laktacije (Mavrin in Oštir, 2002). Ta definicija velja za vsako vrsto mleka, čeprav se med seboj razlikujejo po mnogih lastnostih. V mlekarski industriji velja, da z samo besedo mleko označujemo le kravje mleko, pri vseh drugih vrstah je potrebno posebej označiti izvor, na primer kozje, ovčje, bivolje, kobilje idr., tudi humano ali materino mleko. Kozje, ovčje in kravje mleko se med seboj razlikujejo v številnih fizikalnih in kemijskih lastnostih, kar pa pojasni tudi večino razlik, ki nastanejo med njihovo predelavo. Na sestavo mleka med drugim vpliva tudi starost živali, način molže, obdobje laktacije, letni čas, krma živali, podnebje, zdravje živali, gibanje. Zato je variabilnost sestave mleka velika tudi znotraj vrste, kar pa še posebno velja za kozje in ovčje mleko (Rogelj, 1996; Mavrin in Oštir, 2002; Chandan, 2007).

Preglednica 1: Sestava kravjega, kozjega in ovčjega mleka (Rogelj, 1996; Mavrin in Oštir, 2002)

Vrsta mleka %	Kravje mleko	Kozje mleko	Ovčje mleko
Voda	87,5	86,8	81,0
Skupni proteini	3,4	3,6	5,8
Kazeini	2,8	2,7	4,9
Serum proteini	0,6	0,9	0,9
Maščoba	3,8	4,1	7,9
Laktoza	4,7	4,7	4,5
Minerali	0,6	0,8	0,8

Kot vidimo v preglednici 1 je v kravjem mleku pričakovati okoli 3,4 % proteinov, pri kozjem malo več, okrog 3,6 % in pri ovčjem mleku vidimo, da odstotek proteinov presega obe prejšnji vrsti mleka. Naravna funkcija mlečnih proteinov je oskrbeti mladiče sesalcev z esencialnimi aminokislinami, ki so potrebne za razvoj različnih mišičnih tkiv ter z obiljem biološko aktivnih

proteinov, kot na primer imunoglobulinov in proteinov, ki vežejo vitamine in kovine ter različni hormoni. Pravzaprav je vsebnost proteinov neposredno povezana s hitrostjo rasti. Hitrost, v kateri mladiči sesalcev najhitreje podvojijo težo, je v tesni korelaciji z višjim odstotkom proteinov v mleku in obratno, tisti, ki počasneje rastejo, uživajo mleko z nizkim odstotkom proteinov. Iz tega se vidi pomembnost proteinov s prehranskega stališča, s tehnološkega pa vemo, da postopki nadaljnje fermentacije in sirjenja mleka temeljijo predvsem na spremembah proteinov, zato bodo le ti podrobneje predstavljeni kot druge sestavine mleka (Fox in McSweeney, 1998).

### 2.1.1 Proteini

V mleku ločimo dva tipa proteinov: kazeine in serumske ali sirotkine proteine. Tisti, ki se pri spremembi pH na 4,6 izločijo iz mleka, se imenujejo kazeini. Vse ostale, ki so pri tem pH topni pa imenujemo sirotkini proteini. Pri kravah, kozah in ovcah se razmerje med njima zelo nagiba v prid kazeinom, in to v razmerju 80:20. V preglednici 2 je za lažjo predstavbo prikazana razdelitev proteinov v mleku (Rogelj, 1996; Chandan, 2007).

Preglednica 2: Proteini mleka (Damjanović in sod., 2006)

Proteini mleka	
Kazeini	Proteini sirotke
$\alpha_{s1}$ -kazein	$\alpha$ -laktoalbumin
$\alpha_{s2}$ -kazein	$\beta$ -laktoglobulin
$\beta$ -kazein	serum albumin
$\gamma$ -kazein	imunoglobulin
$\kappa$ -kazein	proteaze-peptoni ter številni drugi encimi

#### 2.1.1.1 Kazeini

Kazeini so fosforilirani proteini. Predstavljajo jih štiri polipeptidne verige, ki so  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - in  $\kappa$ -kazeini. Poleg tega pa mleko vsebuje tudi razgradne produkte, ki nastanejo z delovanjem encima plazmina. Tako nastanejo  $\gamma$ -kazeini iz proteolize  $\beta$ -kazeinov. Gledano s celotne vsebnosti kazeinov je torej prisotnost  $\gamma$ -kazeinov nekje od 3 do 10 %. Njihova koncentracija je seveda odvisna od faze laktacije in zdravstvenega stanja živali molznic. V mleku so prisotni tudi proteini membran maščobnih kroglic, ki se sprostijo, kadar je mleko podvrženo homogenizaciji ali pinjenju. Vsebuje tudi številne encime in biološko aktivne proteine. Najdemo pa tudi neproteinske dušikove spojine, kot so na primer sečnina in sečna kislina, kreatin (Rogelj, 1996; Chandan, 2007).

Večina  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ -kazeinov se nahaja v notranjosti micel, medtem ko je  $\kappa$ -kazein pretežno na površini. Tisti, ki so v notranjosti, so zelo občutljivi na kalcij, saj postanejo netopni ob njegovi prisotnosti. Toda  $\kappa$ -kazein se ne odziva na kalcij in tako obvaruje micelo, da ostane topna v



mleku. Kazeini se med seboj v mleku povezujejo s kalcijevim fosfatom ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) v velike micle. Mleko vidimo kot belo prav zaradi razpršitve svetlobe ob koloidnih micelah. Kazeinske micle so krožni delci veliki od 50 do 500 nm in določajo stabilnost mlečnih izdelkov med toplotno obdelavo, homogenizacijo, postopki koncentracije in skladiščenjem. Medtem ko je proteinska sestava kravjega in ovčjega mleka zelo podobna, najdemo pri kozjem kar nekaj posebnosti (Rogelj, 1996; Chandan, 2007).

Glavni kazein kravjega in ovčjega mleka je  $\alpha_1$ -kazein, pri kozjem pa prevladuje  $\beta$ -kazein. V kozjem mleku so ugotovili velik genetski polimorfizem v vsebnosti  $\alpha_1$ -kazeina, kar pomeni, da je lahko kozje mleko praktično brez tega kazeina ali pa ga vsebuje skoraj enak delež kot kravje mleko. Zdi se, da kazeinom v kozjem mleku primanjkuje elektroforeznih komponent z mobilnostjo govejega  $\alpha_1$ -kazeina. Tudi  $\alpha_2$ -kazein v kozjem mleku predstavlja veliko manjši delež celotne vsebnosti kazeina, kar pomeni, da je  $\beta$ -kazein količinsko glavni protein kozjega mleka. Znanstveniki so zato predlagali, da bi bilo možno na podlagi zelo majhne koncentracije  $\alpha_1$ -kazeina preverjati potvorbe s kravjim mlekom. Količina  $\alpha_1$ -kazeina pa med drugim vpliva tudi na velikost kazeinskih micel, ki so v mleku z majhno količino  $\alpha_1$ -kazeina posledično večje.  $\beta$ -kazein obeh vrst mleka je zelo podoben kravjemu, vendar pa je polipeptidna veriga kozjega enaka kravjemu, ovčjega pa se nekoliko razlikuje v aminokislinski sestavi. V preglednici 3 lahko opazimo tudi, da so  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - in  $\kappa$ -kazeini približno v razmerju 3:1:3:1 (Rogelj, 1996; Damjanović in sod., 2006; Chandan, 2007).

Preglednica 3: Sestava kazeinskih frakcij v svežem kravjem, ovčjem in kozjem mleku (Damjanović in sod., 2006)

Vrsta mleka	Celotna vsebnost proteinov (mg/mL)	Delež kazeinov v celotni vsebnosti proteinov (%)	Kazeini (%)				
			$\alpha_{s1}$	$\alpha_{s2}$	$\beta$	$\gamma$	$\kappa$
Kravje	27,8±2,2	83±10	37±7	7±1	42±8	6±2	9±4
Ovčje	59,4±3,3	93±10	33±8	14±2	30±5	9±1	14±2
Kozje	33,4±1,6	99±12	10±6	--	63±11	18±4	8±2

### 2.1.1.2 Sirotkini ali serumski proteini

Sirotkini ali serum proteini so bili poimenovani po tem, da ostanejo raztopljeni v mlečnem serumu ali sirotki po izločanju kazeinov pri vrednosti pH 4,6. V to skupino spadajo  $\alpha$ -laktoalbumin,  $\beta$ -laktoglobulin, serum albumin, imunoglobulini, laktoferin, proteaze-peptoni ter številni različni encimi. V primerjavi s kazeini imajo sirotkini proteini relativno bolj organizirano kroglasto strukturo, ki vsebuje disulfidne povezave. Skladno s tem je njihova topnost in odpornost v kislih razmerah večja. So pa kot večina globulinov občutljivi na toploto, zato pri temperaturi 90 °C denaturirajo, kar povzroči njihovo izkosmičenje. Ta pojav izkoriščajo za izdelavo albuminske skute predvsem pri ovčjem mleku. Razmerje med kazeini in sirotkinimi proteini se spreminja med laktacijo, vendar pa na splošno pa velja, da predstavljajo kazeini v kravjem mleku okoli 76-86 % vseh proteinov mleka. Podobno razmerje najdemo pri ovčjem

mleku, medtem ko pa vsebuje kozje malce večji delež sirotkinih proteinov. Lastnosti sirotkinih proteinov se med temi tremi vrstami mleka skoraj ne razlikujejo (Rogelj, 1996; Damjanović in sod., 2006; Chandan, 2007).

$\beta$ -laktoglobulina v kravjem in kozjem mleku se razlikujeta, ima pa to bolj prehranski pomen, saj  $\beta$ -laktoglobulin v kravjem mleku lahko povzroči alergijsko reakcijo pri ljudeh, še posebej pri majhnih otrocih. Ti ljudje pa lahko običajno brez težav uživajo kozje mleko, kar povezujejo z različno zgradbo obeh proteinov. Ker kozje mleko vsebuje zelo majhne količine  $\alpha_{s1}$ -kazeina ali pa ga sploh ne vsebuje, so proteini kozjega mleka lažje prebavljivi kot proteini kravjega, saj se v želodcu tvorijo manjši in lažje prebavljivi skupki sesirjenega mleka, kar je dobra novica za otroke in starejše ljudi (Rogelj, 1996; Chandan, 2007).

### 2.1.2 Maščoba

Mleko lahko razumemo tudi kot emulzijo maščobnih kroglic. Te so obdane z membrano, ki preprečuje zlivanje posameznih maščobnih kroglic med seboj in varuje vsebino pred encimsko razgradnjo in oksidacijo. Kravje mleko ima v povprečju največje maščobne kroglice, sledi mu ovčje, zadnje po velikosti pa je kozje mleko. Kravje mleko se od ovčjega in kozjega razlikuje po aglutininu, ki se pri temperaturah pod 37 °C veže na membrano maščobnih kroglic in povzroči zlepljanje. Posledično se maščoba hitreje dvigne na površino. Pri kozjem mleku ta pojav redko opazimo zaradi manjših maščobnih kroglic in pomanjkanja aglutinina, pri ovčjem pa se smetana oblikuje, vendar je po sestavi manj čvrsta, ker maščobne kroglice med seboj niso povezane. Mlečna maščoba slednjih dveh se razlikuje tudi po sestavi, saj vsebuje več srednjeveržnih maščobnih kislin. Značilen okus in vonj (predvsem tudi v kasnejših mlečnih izdelkih, kot so na primer siri), dajeta predvsem kaprilna in kaprinska maščobna kislina, vendar naj ne bi bila ostrejša od okusa in vonja v kravjem mleku (Rogelj, 1996; Chandan, 2007).

Mlečna maščoba je sestavljena iz (Rogelj, 1996):

- ❖ trigliceridov (ki jih je največ; okoli 95–96 % celotne mlečne maščobe), digliceridov in monogliceridov),
- ❖ prostih maščobnih kislin, glicerola (maščobni derivati),
- ❖ fosfolipidov (sestavljene lipidi),
- ❖ holesterola (nekje okoli 52 mg/100 g) maščobe, sterolov, karotenov, lipofilnih vitaminov: A, D, E, K (spremljevalci maščob).

Mlečna maščoba kozjega in kravjega mleka se razlikuje v nasičenosti in dolžini maščobnih kislin (kratko ali dolgoveržne maščobne kisline). V preglednici 4 je prikazana količina maščobnih kislin v mg v 100 g kravjega, kozjega in ovčjega mleka. Kozje mleko v primerjavi s kravjim vsebuje večji delež nasičenih maščobnih kislin (C6 – C14). Raziskave kažejo, da je kozje mleko skoraj dvakrat bogatejše z vsebnostjo kapronske (C6:0), kaprilne (C8:0), kaprinske (C10:0) in lavrinske (C12:0) maščobne kisline, kar je lahko povezano z vonjem in okusom “po kozah” v

kozjem mleku. Predstavljajo do 20 % vseh maščobnih kislin v kozjem mleku, medtem ko je zastopanost le teh v kravjem le 6 %. V ovčjem mleku so najpogosteje zastopane C14:0, C16:0 in C:18:1 in to v kombinaciji z C4:0 in C6:0 maščobnimi kislinami. Delež kratkoveržnih triacilglicerolov (C26 – C36) v ovčjem mleku je 18 % v primerjavi z 11 %, ki jih najdemo v kravjem mleku. Prav tako ovčje mleko v primerjavi s kravjim vsebuje več srednjeveržnih triacilglicerolov (C38 – C44). Delež pri ovčjem je 33 %, medtem ko je pri kravjem mleku 25 % (Rogelj, 1996; Damjanović in sod., 2006; Chandan, 2007).

Vse maščobne kisline so najpogosteje vezane v trigliceride, saj so v svežem mleku proste maščobne kisline prisotne le v sledovih. Sprostijo se kadar pride do poškodbe membrane in razgraditve trigliceridov z lipolitičnimi encimi. Pri kozjem mleku je membrana maščobne kroglice občutljivejša kot pri kravjem, zato se pri mehanskih vplivih, kot na primer grobo mešanje, prečrpavanje in zmrzovanje hitreje poškoduje. V tem primeru pride do pojava okusa »po kozah«. Najpogosteje pa do močnega ali neprijetnega okusa, ki ga zaznamo tudi pri izdelkih, pride ob pomanjkanju higiene pri pridobivanju mleka, napake pri molži, ki poškodujejo maščobne kroglice, mastitis in shranjevanje mleka v bližini živali (Rogelj, 1996; Chandan, 2007).

Preglednica 4: Količina maščobnih kislin (v mg/100 g) kravjega, kozjega in ovčjega mleka (Souci in sod., 1994; Rogelj, 1996)

Maščobne kisline	Oznaka	Vsebnost (mg/100 g)		
		Kravje mleko	Kozje mleko	Ovčje mleko
Maslena	C4:0	129	140	180
Kaprnska	C6:0	82	80	120
Kaprilna	C8:0	46	80	120
Kaprinska	C10:0	96	290	360
Laurinska	C12:0	121	120	210
Miristinska	C14:0	382	380	590
Palmitinska	C16:0	961	1180	1440
Stearinska	C18:0	361	370	800
Palmitoleinska	C16:1( $\Delta^9$ )	114	40	120
Oleinska	C18:1( $\Delta^9$ )	940	710	1390
Linolna	C18:2( $\Delta^{9,12}$ )	89	90	160
Linolenska	C18:3( $\Delta^{9,12,15}$ )	61	20	120
Ostalo	–	188	82	–

$\Delta^x$  je dvojnica vez v maščobni kislini, ki se nahaja na C-atomu, označenem z x, šteto s karboksilnega konca

### 2.1.3 Laktoza

Glavni ogljikov hidrat v mleku je laktoza ali mlečni sladkor, katere vsebnost je v razponu od 4,7 do 5,2 %. To je disaharid, ki je sestavljen iz molekule glukoze in molekule galaktoze. Laktoza je manj sladka kot saharoza, zaradi tega okus mleka ni izrazito sladek, kljub sorazmerno veliki količini laktoze v mleku. Pomembna je pri izdelovanju vseh vrst fermentiranih mlečnih izdelkov, saj jo bakterije izkoriščajo kot vir energije, ki jo porabijo za rast in razmnoževanje. Pri tem procesu se laktoza spremeni v mlečno kislino, kar imenujemo mlečno-kislinska fermentacija (Rogelj, 1996; Chandan, 2007).

### 2.1.4 Minerali

Mleko je med živilih zelo znano kot bogat vir kalcija in fosforja, ker je razmerje med njima optimalno za pravilen razvoj kosti in zob, kar je še posebej pomembno v prehrani otrok. Minerali so ključnega pomena za stabilnost fizikalno-kemijskega ravnotežja v mleku, čeprav je koncentracija mineralov v mleku manj kot 1 %. Obstajajo v koloidni in topni obliki. V slednji obstajajo tako v ionski kot v neionski obliki in na to vpliva pH mleka. Kalcij in fosfor sta strukturni enoti kazeinskih micel, zato vplivata na končne mlečne izdelke. Ovčje mleko je po vsebnosti kalcija bogatejše od kravjega, medtem ko pa sta kalcij in fosfor v kravjem in kozjem mleku v med seboj primerljivih količinah. Za kalij, natrij in magnezij ter elemente v sledovih so vsebnosti prav tako podobne v kozjem in kravjem mleku, obe vrsti mleka pa vsebujeta zelo malo železa in bakra (Mavrin in Oštir, 2002; Cvirn, 2003; Chandan, 2007).

## 2.2 POTVORBE MLEKA

Večina potvorb, kot na primer razredčenje mleka z vodo, je za potrošnika sicer nesprejemljiva, toda zdravju neškodljiva. Vendar je nastal problem, ko so ponarejevalci želeli prikriti potvorbo z dodajanjem melamina, kar pa je ogrožajoče za zdravje ljudi (MKGP, 2010).

Potvorba živil pomeni, da se v živilih bistvene sestavine oziroma surovine nadomestijo s precej cenejšimi nadomestki, ki niso navedeni v deklaraciji. Kar motivira proizvajalce in prodajalce, da potvorijo živilo, je povečana prodana količina in posledično večji finančni dobiček, saj izdelek prodajo z nižjimi proizvodnimi stroški ob enaki ali pa tudi višji prodajni ceni (MKGP, 2010).

Preverjanje pristnosti mleka je v mlekarstvu zelo pomembno. Raznorazne potvorbe pomenijo slabšo kakovost, spremenjene tehnološke lastnosti mleka in mlečnih izdelkov, v nekaterih primerih pa lahko tudi ogrožajo zdravje. Zato je pomembno kakovost mleka preverjati na različne načine, saj so potvorbe lahko zelo različne. Najpogostejše potvorbe v mlekarstvu so (Belloque in sod., 2009; Chandan, 2007):

- ❖ dodajanje vode: mleko, ki so mu dodali vodo po naključju ali namerno (poveča se volumen mleka) redno preverjajo z določitvijo zmrziščne točke mleka,

- ❖ dodajanje sirotkinih proteinov: dodatek teh proteinov je ekonomsko zelo zanimiv zaradi povečanja deleža proteinov v mleku ter glede na velik presežek in nizko ceno sirotkinih proteinov,
- ❖ dodajanje nemlečnih proteinov: v mleku se lahko znajdejo tudi nemlečni proteini, na primer rastlinskega izvora, če so cenejši od mlečnih proteinov,
- ❖ dodajanje rekonstruiranega mleka: včasih se mleku dodaja rekonstruirano mleko. Takšna potvorba se najlažje ugotovi na podlagi detekcije produktov Maillardove reakcije.

### 2.2.1 Zaščita potrošnikov

Zaščita potrošnikov je v domeni Ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano. Pravna podlaga za nadzor je 58. člen Zakona o kmetijstvu, skupaj z Uredbo (ES) št. 178/2002, ki zagotavlja varstvo interesov potrošnikov, njen cilj pa je preprečevanje ponarejanja živil. Uradni nadzor se izvaja v skladu z razpoložljivimi analitskimi metodami, ki pa izpolnjujejo zahteve Uredbe (ES) št. 882/2004 (Uredba sveta (ES) št. 178/2002; Uredba sveta (ES) št. 882/2004; Zakon o kmetijstvu, 2008).

Laboratorijsko preskušanje je glavno dokazilo za potvorbo živila. Z ustrezno opremo in tehniko se v laboratoriju razlikuje med naravnimi sestavinami in njihovimi nadomestki v določeni vrsti živil, delno pa se lahko to ugotovi tudi s preverjanjem sledljivosti in uporabo količine surovin po recepturi iz predložene dokumentacije proizvajalca. Laboratoriji, ki opravljajo naloge za potrebe uradnega nadzora, morajo biti akreditirani v skladu s SIST EN ISO/IEC 17025 o »Splošnih zahtevah za usposobljenost preskuševalnih in usmerjevalnih laboratorijev« (MKGP, 2010).

Akreditacija pomeni, da Slovenska akreditacija, ki je polnopravni član Evropske akreditacije (»EA«), ugotavlja tehnično usposobljenost preskusnih laboratorijev ter možnost medsebojnega priznavanja rezultatov različnih držav. V okviru uradnega nadzora se v Evropski uniji uporabljajo predpisane metode, če te obstajajo, v kolikor pa jih ni, se lahko uporabljajo tudi druge metode, primerne za predvideni namen ali pa so razvite v skladu z znanstvenimi protokoli. Na področju goljufivih praks sta pri živilih pristojni (MKGP, 2010; Škrk, 2014; Kos Skubic, 2014):

- ❖ UVHVVR (»Uprava Republika Slovenije za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin«): za vsa živila v vseh stopnjah živilske verige razen,
- ❖ ZIRS (»Zdravstveni inšpektorat Republike Slovenije«): za prehranska dopolnila, živila za posebne prehranske namene ter materialov, namenjenih za stik z živilii.

### 2.2.2 Referenčna metoda za ugotavljanje potvorb sira

V Evropski uniji je izoelektrično fokusiranje referenčna metoda za ugotavljanje kravjega mleka in kazeinata v sirih iz ovčjega, kozjega ali bivoličjega mleka ali mešanic ovčjega, kozjega in bivoličjega mleka (Uredba komisije (ES) št. 273/2008).

Izoelektrično fokusiranje je metoda z visoko ločljivostjo, kjer se proteini ločijo v prisotnosti kontinuiranega pH-gradienta. Metoda temelji na ločevanju kazeinske frakcije iz sira po delovanju encima plazmina na kazein v določenih razmerah. Z analizo proteinskega hidrolizata z izoelektričnim fokusiranjem se ločijo kravji  $\gamma_2$ - in  $\gamma_3$ -kazeini od ovčjega ali kozjega kazeina. Test je pozitiven na potvorbe, če je dokazanih vsaj 1 % vseh kravjih  $\gamma_2$ - in  $\gamma_3$ - frakcij kazeina. Tu je potrebno še določiti obe frakciji  $\gamma$ -kazeina ( $\gamma_2$  in  $\gamma_3$ ), da ne pride do lažno pozitivnih ali negativnih rezultatov. Če je zahteva določiti odstotek kravjega mleka, ki je dodan ovčjemu ali kozjemu mleku ob izdelavi sira, je potrebno istočasno analizirati 2 referenčna vzorca sira; eden ne vsebuje kravjega mleka, drugi pa vsebuje 1 % dodanega kravjega mleka. Nato lahko količino dodanega kravjega mleka (manj, enako ali več kot 1%) direktno presodimo s primerjavo intenzitete kravjih  $\gamma_2$  in  $\gamma_3$  kazeinov v primerjavi z referenčnima vzorcema. Metoda ne omogoča odkrivanja potvorb ovčjega sira ali mleka s kozjim mlekom, saj se položaji ovčjih in kozjih  $\gamma$ -kazeinskih frakcij prekrivajo. Lahko se uporabi za razlikovanje ovčjega in kozjega mleka, če analiza temelji na ugotavljanju para- $\kappa$ -kazeina, toda takrat mora biti meja detekcije višja (Antalašić, 2006; Uredba komisije (ES) št. 273/2008; Križaj, 2008).

### 2.2.3 Ugotavljanje potvorbe mleka z mlekom druge vrste živali z različnimi metodami

Mešanje mleka različnih vrst živali molznic je dovoljeno, če je to navedeno na deklaraciji mlečnega izdelka, v nasprotnem primeru gre za potvorbo. Kravje mleko je izključno običajni izloček mlečnih žlez, dobljeno z molžo ene ali več krav, brez kakršnega koli dodajanja ali odvzemanja (Uredba sveta (ES) št. 1234/2007). Če gre za kravje mleko oziroma za izdelek iz kravjega mleka, na deklaracijo ni potrebno navajati vrste mleka, za mleko ali izdelke iz druge vrste mleka pa je to potrebno. Naj bo to mešanica mleka za izdelavo sirov ali pa prodaja kozjega ali ovčjega mleka, proizvajalci včasih vrsti mleka, ki je dražja, dodajo vrsto mleka, ki je cenejše. Ponavadi zamenjajo delež kozjega ali ovčjega mleka s cenejšim in dostopnejšim kravjim (Chandan, 2007). Večina analitskih metod, ki je namenjena odkrivanju takšne potvorbe je osnovana na detekciji proteinov (Zachar in sod., 2011).

Mleko različnih živalskih vrst v mlečnih izdelkih ter predvsem v deklariranem mleku pa so odkrivali tudi z drugimi metodami. Zachar (2011) navaja, da je encimskoimunski test (ang. *Enzyme-linked immunosorbent assay* – ELISA) največkrat uporabljena imunološka metoda pri analizah mleka. V diplomskem delu (Antalašić, 2006) so ugotavljali potvorbe ovčjega mleka z kravjim z metodo ELISA. Iz opravljenih analiz so sklepali, da je test primeren za rutinsko preverjanje koncentracije kravjega mleka v ovčjem v območju od 0 % do 15 %, vendar so dodali še, da se v primeru večjih koncentracij dodanega kravjega mleka ovčjemu upošteva ustrezne redčitve in korekcijske faktorje. Hurley in sod. (2004) so preverjali potvorbe z neposredno kompetitivno ELISA, kjer so ugotovili, da je meja detekcije potvorbe s kravjim mlekom 0,1 %.

Pesic in sod. (2011) so določali pristnost kozjega in ovčjega mleka z metodo native poliakrilamidne gelske elektroforeze (nativna PAGE). Odstotek kravjega mleka, ki so ga zaznali v mešanici s kozjim in ovčjim mlekom, je bil 3 % do 5 % in tudi višje. Spodnjo mejo so utemeljili kot smiselno, saj se dodajanje manj kot 5 % kravjega mleka pri potvorbi ne more šteti za ekonomsko. Lee in sod. (2004) so prav tako preizkušali potvorbe mleka s to metodo. Z optimiziranjem so dosegli občutljivost ugotavljanja 1 % kravjega v kozjem mleku.

Potvrjenost kozjega s kravjim mlekom so iskali tudi s pomočjo elektronskega jezika (Dias in sod., 2009) ter z metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti z obrnjeno fazo (ang. *Reversed-phase high performance liquid chromatography* – RP HPLC), čeprav je bilo mogoče pri slednji ugotoviti le nad 5 % dodane količine kravjega mleka kozjemu (Veloso in sod., 2002).

Darwish in sod. (2009) pa so preverjali potvorbo bivoličjega s kravjim mlekom s verižno reakcijo s polimerazo (ang. *Polymerase chain reaction* – PCR). Meja detekcije je bila 0,5 %. Določali so izvor enaindvajsetih vzorcev mleka, ki so bili v trgovini deklarirani kot bivoličje mleko. Pri desetih vzorcih se je potrdilo, da so iz čistega bivoličjega mleka, pri treh so ugotovili čisto kravje mleko, pri preostalih osmih pa so bili rezultati mešanice kravjega in bivoličjega mleka. V Braziliji pa so potvorbe kozjega s kravjim mlekom ugotavljali z dupleks-PCR. Meja detekcije je bila 0,5 %, analizirali so 160 vzorcev svežega kozjega mleka. Rezultati so pokazali, da je bilo kravje mleko prisotno v 41,2 % vzorcih kozjega mleka (Rodrigues, 2012).

Iverson in Sheppard (1989) sta z metodo plinsko-tekočinske kromatografije raziskovala profile maščobnih kislin različnih sirov, natančneje razmerje med lavrinsko in kaprinsko maščobno kislino. Potrdila sta, da je s to metodo možno ugotavljati potvorbe ovčjih in kozjih sirov s kravjim mlekom. Dodala sta, da bi bilo težje zaznati potvorbe kozjega sira z ovčjim mlekom in obratno (čeprav je ekonomsko malo verjetnosti), zaradi podobnosti razmerja teh dveh maščobnih kislin v obeh vrstah mleka.

#### **2.2.4 Ugotavljanje potvorbe mleka z mlekom različnih živali z 2-D elektroforezo**

S pomočjo 2-D elektroforeze sta Kim in Flores (1994) primerjala proteinske profile mleka krav, koz, prašičev, ljudi in miši. Rezultati so pokazali, da se na proteinskih profilih proteini mleka s podobnimi funkcijami nahajajo na približno istih mestih. Proteinska profila kravjega in kozjega mleka sta se najbolj ujemala glede na ostale vrste, mišje pa se je od mleka prežvekovalcev najbolj razlikovalo. Profil kozjega mleka se je od kravjega razlikoval v odsotnosti  $\alpha_{s1}$ -kazeina.

Yang in sod. (2014) so v svojem delu preverjali hipotezo, da imajo mešanice mleka različnih vrst živali spremenjene lokacije proteinskih lis na 2-D elektroforeznih gelih. Opravili so 2-D elektroforezo skupaj z masno spektrometrijo (ang. *Matrix assisted laser desorption ionization time of flight* – MALDI TOF) na kravjem, kozjem, kameljem, bivoličjem in mleku samic jaka ter na dvokomponentnih mešanicah mleka navedenih vrst. Na proteinskih profilih so izpostavili očitne razlike, ki so bile uporabne za detekcijo specifičnega mleka v potvorjenem mleku.

Na različnih kmetijah na Kitajskem so odvzeli vzorce mleka bivolic, kamel, koz in krav. Vzorce so pripravili tako, da so posamezne vrste združili zaradi zagotavljanja enotnosti ter odstranili maščobo. Pripravili so vzorce posamezne vrste mleka, kot tudi mešanice, ki so bile do 5 % potvorjene z drugo vrsto mleka. Kot prvo dimenzijo so uporabili IEF, kot drugo pa SDS PAGE. Vsako posamezno mleko je bilo trikrat analizirano z 2-D elektroforezo in tako so pridobili proteinske profile za vsako vrsto mleka. Specifične proteinske lise, ki so bile značilne le za kravje mleko pa so identificirali z masno spektrometrijo (Yang in sod., 2014).

Na prvi pogled so bili proteinski profili kravjega, bivoličjega ter mleka samic jaka zelo podobni, proteinska profila kameljega in kozjega mleka pa različna. Te razlike pa so omogočile detekcijo in tudi identifikacijo dodanega mleka v mešanicah. Potvorbo kameljega mleka s kravjim ali kozjim so ugotavljali s pomočjo  $\beta$ -laktoglobulina in  $\alpha$ -laktalbumina, potvorbo mleka samic jaka z kravjim mlekom pa je pokazala prisotnost  $\beta$ -laktoglobulina. Meja detekcije je bila 0,5 % z dobro ponovljivostjo, kar pomeni, da so se proteini pojavljali vedno na istih pozicijah. To vsaj v teoriji pomeni, da identifikacija proteinov ne bi bila vedno potrebna (Yang in sod., 2014).

Potvarjanje kozjega in ovčjega mleka s kravjim mlekom so s pomočjo 2-D elektroforeze ugotavljali tudi v magistrskem delu (Volk, 2013). Primerjali so proteinske profile čistega mleka krav, koz in ovc ter tako določili proteine, specifične samo za kravje mleko. Sledila je analiza potvorjenih vzorcev mleka (10 % kravje mleko + 90 % kozje mleko; 90 % ovčje mleko + 10 % kravje mleko), kjer so uspeli detektirati proteine, ki so značilni za kravje mleko. Nato so z identifikacijo pokazali, da je to  $\kappa$ -kazein, ki je sicer prisoten tudi pri kozjem in ovčjem, vendar ima kravji  $\kappa$ -kazein drugačne post-translacijske modifikacije, kar pomeni, da se na proteinskem profilu pojavi na specifičnem mestu. Ugotovili so, da 2-D elektroforeza omogoča kvalitativno določanje potvorb kozjega in ovčjega mleka s kravjim mlekom.

### 2.3 PROTEOMSKA ANALIZA

Izraz proteomika je bil skovan v zgodnjih devetdesetih letih prejšnjega stoletja. Je veda, ki proučuje proteine, zlasti njihovo strukturo in funkcije. Metode proteomike temeljijo na sistemskem ločevanju kompleksnih mešanic proteinov (celic, celičnega tkiva in celičnih izločkov) ter njihovi identifikaciji (O'Donnell in sod., 2004). Tehnološki napredek je segel tudi na področje proteomike, kar je omogočilo tudi podrobne raziskave raznih vzorcev z bogato in zapleteno vsebnostjo proteinov, kot je na primer mleko (Roncada in sod., 2012).

Za ločevanje kompleksnih proteinskih vzorcev je na voljo več postopkov. Največ sta v uporabi tekočinska kromatografija (ang. *Liquid chromatography* – LC) ter poliakrilamidna gelska elektroforeza (PAGE), ki zajema naslednje tehnike (Križaj, 2008):

- ❖ nativna PAGE, kjer proteini potujejo zaradi njihovega naboja v električnem polju (večji je naboj, hitreje potujejo pri določenih pogojih),
- ❖ IEF, ki loči proteine glede na njihovo izoelektrično točko,



- ❖ SDS PAGE elektroforeza, kjer se z natrijevim dodecil sulfatom (ang. *Sodium dodecyl sulfate* – SDS) izenači naboj in obliko proteinov, ti pa se ločijo glede na njihovo molekulsko maso,
- ❖ 2-D PAGE elektroforeza, ki pa omogoča ločbo v dveh dimenzijah, v prvi s pomočjo IEF ter v drugi s pomočjo SDS-PAGE.

### 2.3.1 Dvo-dimenzionalna elektroforeza (2-D elektroforeza)

O'Farrell je leta 1975 razvil zelo učinkovito tehniko ločevanja proteinov iz kompleksnih sistemov. Posebnost te metode je ločba v dveh dimenzijah in vsaka mora ločevati proteine glede na neodvisne parametre, saj bi se v nasprotnem primeru proteini lahko razporedili diagonalno in ne po celotnem gelu (O'Farrell, 1975; O'Donnell in sod., 2004). V proteomiki je 2-D elektroforeza najpogosteje uporabljena metoda za ločevanje proteinov (Križaj, 2008).

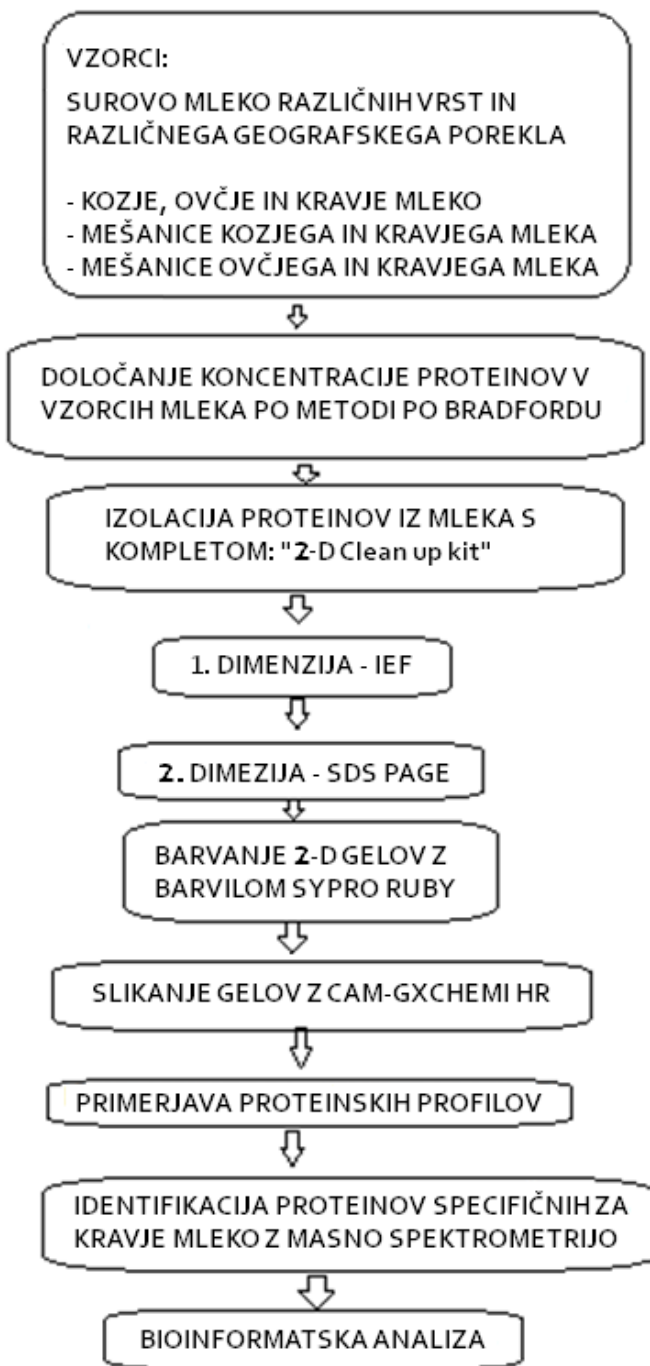
Metoda je sestavljena iz dveh korakov. V prvi dimenziji se vzorec ločuje z izoelektričnim fokusiranjem. Tu je vrednost pH odvisna od položaja na gelu. Ponavadi pH linearno narašča iz enega konca gela do drugega, lahko pa na primer narašča tudi eksponentno. V električnem polju proteini potujejo toliko časa, dokler ne dosežejo na mesto, kjer je pH enak vrednostim njegove izoelektrične točke. Število pozitivnih nabojev se takrat izenači številu negativnih nabojev, kar pomeni, da postane navzven električno nevtralen. Ker sila električnega polja nanj ne deluje več, obmiruje v gelu – se fokusira. Največkrat se uporablja trakove z imobiliziranim pH gradientom (ang. *Imobilized pH gradient strips* – IPG trakovi) (Görg, 2007; Križaj, 2008).

V drugi dimenziji sledi SDS-PAGE elektroforeza, ki pa proteine loči pravokotno na smer izvedbe izoelektričnega fokusiranja še po molekulski masi. Vzorec najprej obdelamo z anionskim detergentom natrijevim dodecil sulfatom (NaDS ali ang. *Sodium dodecyl sulphate* - SDS) v prisotnosti reducenta ali tudi brez njega. Proteinske molekule se razvijejo in enakomerno obdajo z SDS. Negativni naboj postane enak na masno enoto, molekule pa tudi zavzamejo enako paličasto obliko, kar pomeni, da je njihova mobilnost v poliakrilamidnem gelu odvisna izključno od njihove molekulske mase. Lažje molekule se hitreje in lažje premikajo skozi pore gela, kot pa težje, ki potujejo počasneje. Proteini v gelu se lahko detektirajo z obarvanjem. Največkrat je v uporabi barvilo Comassie modro, vendar pa sta barvanje s koloidnim srebrom in fluorescenčnimi barvili veliko občutljivejši tehniki (Križaj, 2008).

Pri identifikaciji se zelo pogosto uporablja masna spektrometrija. Z 2-D elektroforezo se proteine loči, nato izolira iz gela in razcepi s specifično proteazo, najpogosteje tripsinom. Iz baze podatkov lahko potem določijo identiteto proteina (Thiede in sod., 2005; Križaj, 2008).

### 3 MATERIAL IN METODE DELA

#### 3.1 POTEK EKSPERIMENTALNEGA DELA



Slika 1: Shema eksperimentalnega dela

## 3.2 MATERIAL

### 3.2.1 Vzorci

#### 3.2.1.1 Vzorci surovega mleka

Za eksperimentalno delo smo uporabili surovo kravje, kozje in ovčje mleko iz geografsko različnih lokacij (Slika 2).



Slika 2: Oznaka krajev v Sloveniji, kjer so bile vzorčene posamezne vrste mleka

#### Legenda:

- ❖ surovo kravje mleko (Postojna, ožje področje Kozine)
- ❖ surovo kravje mleko (Brežice)
- ❖ surovo kravje mleko (Ribnica na Pohorju)
- ❖ surovo kozje mleko (Bovec)
- ❖ surovo kozje mleko (Brda)
- ❖ surovo ovčje mleko (Bovec)
- ❖ surovo ovčje mleko (Kras)

### 3.2.2 Laboratorijska oprema

#### 3.2.2.1 Določanje koncentracije proteinov v surovem mleku

- ❖ 2-mL mikrocentrifugirke (Eppendorf, Francija)
- ❖ avtomatske pipete (Eppendorf, Francija)
- ❖ vrtinčno mešalo (TTS2, Yellowline, Nemčija)
- ❖ prozorne 96-mestne mikrotitrne ploščice (Eppendorf, Francija)
- ❖ čitalec mikrotitrskih ploščic Safire II (Tecan, Avstrija)
- ❖ računalniški program Magelann

#### 3.2.2.2 Izolacija proteinov iz mleka

- ❖ 2-mL mikrocentrifugirke (Eppendorf, Francija)
- ❖ avtomatske pipete (Eppendorf, Francija)
- ❖ vrtinčno mešalo TTS2 (Yellowline, Nemčija)
- ❖ centrifuga z možnostjo hlajenja (Sigma, ZDA)

#### 3.2.2.3 IEF

- ❖ avtomatske pipete (Eppendorf, Francija)
- ❖ vrtinčno mešalo TTS2 (Yellowline, Nemčija)
- ❖ centrifuga Mini Spin Plus (Eppendorf, Francija)
- ❖ podstavek z režami in pokrovom za rehidracijo trakov (GE Healthcare, Švedska)
- ❖ Multiphore II elektroforetska enota (GE Healthcare, Švedska)
- ❖ steklen podstavek z elektrodami priključki (GE Healthcare, Švedska)
- ❖ elektrodni trakovi (GE Healthcare, Švedska)
- ❖ elektrodi (anoda in katoda) (GE Healthcare, Švedska)
- ❖ termostatski cirkulator (GE Healthcare, Švedska)
- ❖ usmernik EPS 3501 XL (GE Healthcare, Švedska)

#### 3.2.2.4 SDS PAGE

- ❖ steklene plošče (16 x 18 cm) (GE Healthcare, Švedska)
- ❖ epruvete z zamaški (Eppendorf, Francija)
- ❖ ultrazvočna kopel SONIS (Iskra PIO, Slovenija)
- ❖ mikrovalovna pečica (Candy, Velika Britanija)
- ❖ zgornja SDS-PAGE posoda z elektrodami (GE Healthcare, Švedska)
- ❖ spodnja SDS-PAGE posoda z elektrodami (GE Healthcare, Švedska)
- ❖ termostatski cirkulator (GE Healthcare, Švedska)
- ❖ usmernik EPS 3501 XL (GE Healthcare, Švedska)
- ❖ plastične posode velikosti 19,5 x 20,8 cm

### 3.2.2.5 Detekcija slike 2-D gela

- ❖ stresalna plošča (Biometra)
- ❖ plastične posode velikosti 19,5 x 20,8 cm (Rotho)
- ❖ CAM-GX-CHEMI-HRA16 sistem za dokumentacijo gelov (Syngene)
- ❖ GeneSnap računalniški program za slikanje gelov (Syngene)

### 3.2.2.6 Hladilniki in zamrzovalniki za shranjevanje vzorcev, raztopin, reagentov in kompletov

- ❖ zamrzovalna omara -20 °C (LTH)
- ❖ zamrzovalna omara -80 °C (LTH)
- ❖ hladilnik (LTH)

### 3.2.3 Kemikalije za izolacijo proteinov iz mleka

- ❖ Komplet: »2-D Clean-up kit« (GE Healthcare)
- ❖ precipitant
- ❖ koprecipitant
- ❖ pufer za izpiranje
- ❖ aditiv

### 3.2.4 Kemikalije za izvedbo 2-D elektroforeze

- ❖ ddH<sub>2</sub>O
- ❖ Bradfordov reagent Bio-Rad Protein assay (Bio-Rad Laboratories, 500-0006, ZDA)
- ❖ urea (Sigma, U5378, ZDA)
- ❖ tiourea (Sigma, T8656, ZDA)
- ❖ detergent CHAPS (GE Healthcare, 17-1314-01, Švedska)
- ❖ IPG pufer (GE Healthcare, 17-6000-87, Švedska)
- ❖ bromfenolmodro (Sigma, 114391, ZDA)
- ❖ ditiotritol - DTT (Sigma, D0632, ZDA)
- ❖ trak z imobiliziranim pH gradientom (3-10) (GE Healthcare, 17-6001-14, Švedska)
- ❖ mineralno olje (Sigma, M5904, ZDA)
- ❖ akrilamid/bisakrilamid (30 % : 0,8 %) (Sigma, A2917, ZDA)
- ❖ Tris (Sigma, T5941, ZDA)
- ❖ natrijev dodecil sulfat – SDS (Sigma, 71727, ZDA)
- ❖ amonijev persulfat – APS (Sigma, A3678, ZDA)
- ❖ TEMED N,N,N',N'-Tetrametilendiamine (Sigma, T9281, ZDA)
- ❖ jodacetamid – JAA (Sigma, I1149, ZDA)
- ❖ agaroz (Sigma, A9311, ZDA)
- ❖ metanol (Merck, 1060092500, Nemčija)
- ❖ očetna kislina (Merck, 8187559025, Nemčija)
- ❖ barvilo za 2-D gel SYPRO Ruby (Invitrogen, S-12000, ZDA)

### 3.3 METODE

#### 3.3.1 Določitev koncentracije proteinov v vzorcih mleka z metodo Bradford

Vse vzorce mleka smo najprej ustrezno redčili (50x pri čistem mleku ter 40x pri mešanici mleka). Bradfordov reagent smo 5x redčili z ddH<sub>2</sub>O (1 mL Bradfordovega reagenta smo dodali v 4 mL ddH<sub>2</sub>O). V mikrotitrsko ploščico smo odpipetirali 4 µL redčenega mleka ter dodali 196 µL 5x redčenega Bradfordovega reagenta. Slepni poskus smo pripravili podobno, le da je 4 µL redčenega mleka nadomestilo 4 µL ddH<sub>2</sub>O. Sledilo je merjenje absorbance vzorcev s čitalcem mikrotitrskih ploščic. Za izračun smo vzeli povprečje absorbanc dveh ponovitev. Iz dobljene absorbance smo po enačbi umeritvene krivulje za določanje koncentracije proteinov po Bradfordu izračunali koncentracijo proteinov v redčenem mleku (Enačba 1), ki smo jo pomnožili še s faktorjem redčitve (Enačba 2). Za pripravo umeritvene krivulje je bil kot standard uporabljen goveji serumski albumin.

80 °C, kjer so počakali na naslednji korak, drugič pa smo kar nadaljevali z raztopitvijo sedimenta v rehidracijskem pufru.

### 3.3.3 2-D elektroforeza

#### 3.3.3.1 Rehidracija trakov

V mikrocentrifugirke z izoliranimi proteini mleka (100 µg) smo odpipetirali 270 µL rehidracijskega pufru (urea 7 M, tiourea 2 M; CHAPS 2 % (w/v); IPG pufer 2 % (v/v); bromfenol modro 0,002 % (w/v) ter 3 mg DTT/mL). Mešanico pufru in vzorca smo pomešali na vorteksu in pustili 15 min na sobni temperaturi, da se je vse raztopilo. Temu je sledilo 10 min centrifugiranje pri 13400 obr./min.

Med centrifugiranjem smo pripravili ploščo za rehidracijo trakov in jo uravnali v ravnotežno pozicijo ter obrisali z brezprašno krpico. V sredino reže smo nanесли 250 µL tako pripravljenega vzorca. S traku za izoelektrično fokusiranje z imobiliziranim pH gradientom (3-10) anodnega konca (+) smo odstranili plastično folijo, ki je prekrivala gel in ga previdno, brez tvorbe mehurčkov položili z gelom navzdol v režo. Na koncu, ko so bili vsi trakovi na mestu, smo jih prekrili s 3 mL mineralnega olja, ki je preprečevalo izhlapevanje in jih pustili čez noč, da je potekla rehidracija.

#### 3.3.3.2 1. dimenzija – IEF

Naslednji dan smo po končani rehidraciji trakove pomočili v valj napolnjen z ddH<sub>2</sub>O in zelo narahlo sprali nevezane proteine ter mineralno olje, ki se je držalo traku. Osušili smo jih na papirnati brisački (z gelom obrnjenim navzgor). Na ploščo, ki zagotavlja konstantno temperaturo 20 °C med IEF, smo nanесли 5 mL mineralnega olja in čez brez nastajanja mehurčkov položili steklen podstavek z elektrodnimi priključki, tako da je bil anodni (+) nameščen na vrhu plošče. Nato smo v podstavek nalili še 10 mL mineralnega olja in zopet brez mehurčkov vanj položili plastično ploščo z vdolbinami. V vdolbine smo položili trakove z navzgor obrnjenim gelom in pozitivnim koncem traku (+) na zgornjem delu plošče. Odrezali smo dva enako dolga elektrodna trakova, jih namočili v ddH<sub>2</sub>O ter malo osušene na papirnati brisački pravokotno položili na oba konca trakov, tako da sta bila v stiku z gelom. Čeznju smo namestili elektrodi ter trakove prelili z 150 mL mineralnega olja, da bi se izognili izhlapevanju ter napravo priključili na vodno hlajenje pri 15 °C. Elektrode smo priklopili na usmernik in izbrali program. Elektroforeza je tako potekala v 4 različno dolgi fazah, pri katerih se je spreminjala električna napetost:

- ❖ 1 min pri dvigovanju električne napetosti do 300 V,
- ❖ 1 h pri 300 V,
- ❖ 1 h 30 min pri dvigovanju električne napetosti do 3500 V ter
- ❖ 5 h pri 3500 V.

Po končanem izoelektričnem fokusiranju smo trakove do uporabe pri drugi dimenziji shranili pri  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  v foliji.

### 3.3.3.3 Priprava gelov

Stekla in distančnike smo obrisali z etanolom in še z brezprašno krpico in jih nato sestavili, tako da so tesnila.

Gele smo pripravili tako, da smo zmešali 15,7 mL raztopine akrilamid/bisakrilamid (30 % : 0,8 %); 9,8 mL 1,5 M raztopine Tris-HCL (pH 8,8); 0,4 mL 10 % (w/v) raztopine SDS ter 13 mL ddH<sub>2</sub>O. Sestavine smo postavili za 10 min v ultrazvočno kopel pri  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ , da se je mešanica razplinila. Po kopeli smo dodali še 195  $\mu\text{L}$  10 % raztopine APS (w/v) in 13  $\mu\text{L}$  TEMED. Ko smo dodali zadnji dve sestavini se je začela polimerizacija gela. Količine ustrezajo za pripravo dveh gelov.

V sestavljena steklena oblikovala smo vlili po 19 mL ter na vrhu previdno prelili z vodo, da je bil kisiku onemogočen dostop. Čez noč je polimerizacija potekla in naslednji dan smo odlili vodo ter gele z vrha osušili.

### 3.3.3.4 Uravnoveženje trakov

Trakovi so se najprej narahlo splaknili v epruveh z 1x redčenim SDS pufrom, nato pa je uravnovežanje trakov 15 min potekalo na stresalniku v mešanici pufra za uravnoveženje ((Tris-HCL 75mM (pH 8,8); urea 6M; glicerol 30 % (v/v); SDS 2 % (w/v); bromfenol modro 0,002 % (w/v)) ter 65 mM DTT, nato pa še 15 min v mešanici pufra za uravnovežanje in 26 mM JAA. Trakove smo z gelom navzgor narahlo osušili na papirnati brisački in ob katodnem delu traku (-) odvečno plastiko do gela odrezali. Na polimeriziran gel smo dolili stopljeno agarozo ter trak spustili na gel, tako da se je čisto prilegal.

### 3.3.3.5 2. dimenzija – SDS poliakrilamidna gelska elektroforeza

Počakali smo 15 min, da se je agarosa strdila in gele prenesli v posode za izvedbo SDS-PAGE elektroforeze. Poleg smo prilili še 700 mL 1x SDS puffer (25 mM Triz-Baza; 192 mM glicin; 0,1 % SDS) ter napravo priključili na električni tok ter na vodno hlajenje pri temperaturi  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Izbrali smo primeren program, tako da je ločevanje potekalo:

- ❖ 15 min pri 20 mA/gel,
- ❖ približno 2h pri 40 mA/gel.

Potovanje proteinov smo lahko spremljali tako, da smo opazovali fronto barvila bromfenol modro, ki v gelu najhitreje potuje. Ko je fronta dosegla spodnji del gela, smo elektroforezo prekinili.



### 3.3.4 Barvanje 2-D gelov z barvilom Sypro Ruby

Po končani elektroforezi smo gele previdno odstranili iz steklenih oblikoval, označili robove, da se je vedelo kateri vzorci so bili to, ter jih fiksirali in obarvali:

- ❖ fiksacija: 2x 30 min v 250 mL (za 2 gela) fiksacijske raztopine (50 % (v/v) metanol, 7 % (v/v) očetna kislina);
- ❖ barvanje: čez noč v 250 mL barvila Sypro Ruby; od tu naprej je moralo delo potekati v temi (mrak),
- ❖ razbarvanje: 2x 30 min v raztopini za razbarvanje (10 % (v/v) metanol; 7 % (v/v) očetna kislina);
- ❖ izpiranje: 3x 5 min v 250 mL ddH<sub>2</sub>O.

### 3.3.5 Dokumentiranje in primerjava rezultatov na 2-D gelih

Takoj po zadnjem koraku izpiranja smo gele slikali z napravo CAM-GX-CHEMI HR. Po slikanju pa smo gele zavarili v plastične mape in jih hranili pri temperaturi 4 °C.

2-D gele smo primerjali z programom GeneSnap. Določili smo proteinske lise, ki so specifične za proteine kravjega mleka ter jih izrezali in poslali na Univerzo v York, kjer so z masno spektrometrijo MALDI MS/MS ter s pomočjo podatkovne zbirke NCBI (ang. *National Center for Biotechnology Information*) identificirali proteinske lise.

## 4 REZULTATI

V surovem čistem mleku različnih vrst in različnega geografskega porekla ter mešanicah mleka smo najprej določili koncentracijo proteinov, sledila je izolacija proteinov in nato analiza proteinskih profilov z 2-D elektroforezo.

### 4.1 KONCENTRACIJA PROTEINOV

V preglednici 5 so prikazane koncentracije proteinov v surovem čistem mleku in mešanicah različnih vrst mleka. Najustreznejša redčitev mleka v postopku določanja koncentracije proteinov je bila 50x pri čistem mleku ter 40x pri mešanicah mleka. Pri teh redčitvah se je vrednost absorbance gibala v sprejemljivem območju enačbe umeritvene krivulje.

Preglednica 5: Koncentracije proteinov v vzorcih surovega mleka

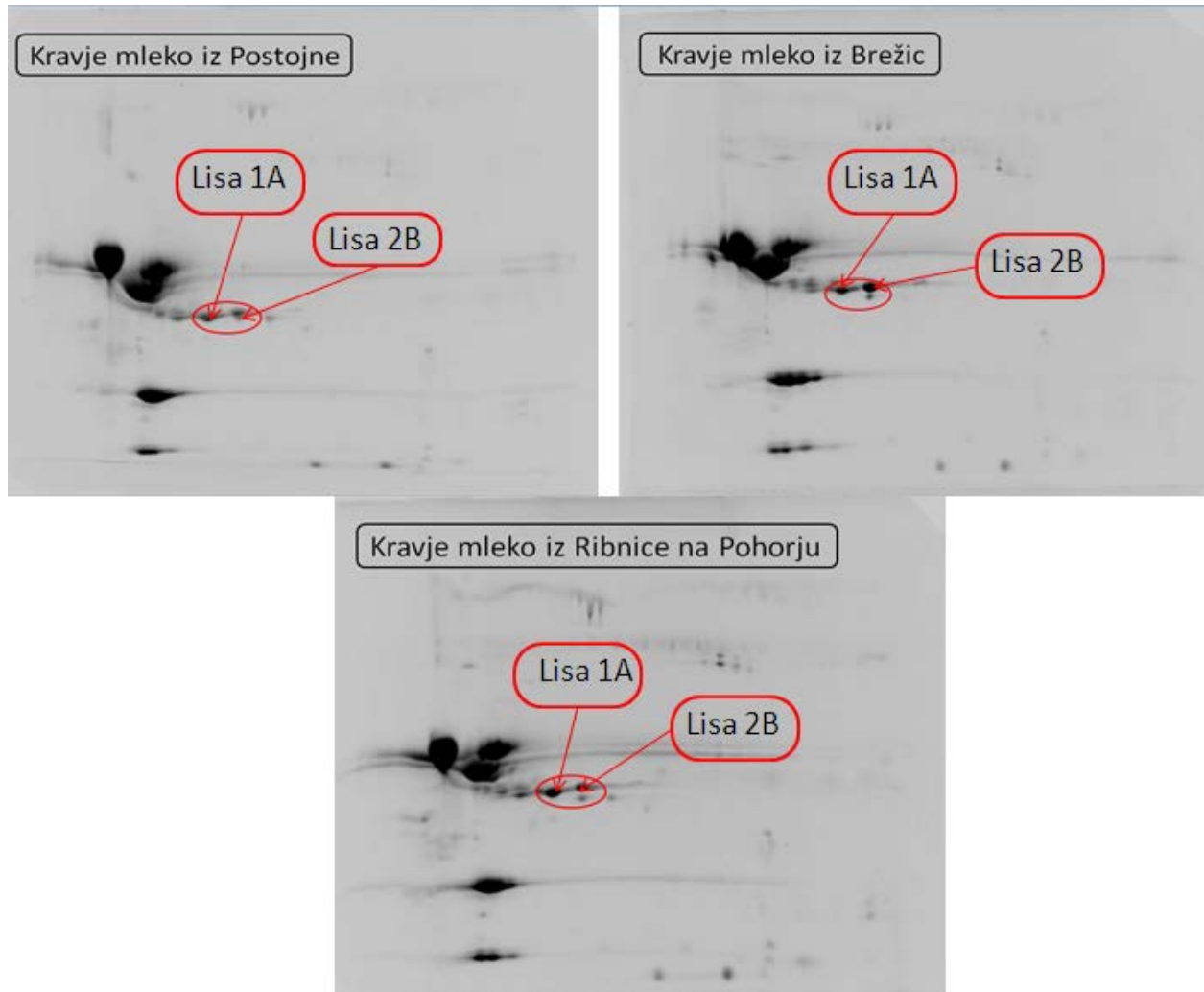
Vrsta mleka	konc. proteinov (g/L)
Kravje (Postojna)	27,0
Kravje (Brežice)	30,5
Kravje (Ribnica na Pohorju)	23,2
Kozje (Bovec)	15,7
Kozje (Brda)	11,8
Ovčje (Bovec)	20,4
Ovčje (Kras)	33,3
Kozje (Bovec) + Kravje (Postojna)	13,6
Kozje (Bovec) + Kravje (Brežice)	16,1
Kozje (Bovec) + Kravje (Ribnica na Pohorju)	18,1
Ovčje (Bovec) + Kravje (Postojna)	23,2
Ovčje (Bovec) + Kravje (Brežice)	24,3
Ovčje (Bovec) + Kravje (Ribnica na Pohorju)	20,4

### 4.2 LOČEVANJE PROTEINOV MLEKA Z 2-D ELEKTROFOREZO

Na proteinskem profilu surovega kravjega mleka sta bili v predhodni raziskavi (Volk, 2013) odkriti dve 2-D proteinski lisi, ki se na proteinskem profilu kozjega in ovčjega mleka nista pojavili. Cilj naše raziskave pa je bil preveriti, ali sta ti dve proteinski lisi značilni tudi za kravje mleko in odsotni v kozjem in ovčjem mleku z različnim geografskim poreklom. Vzorce mleka smo pridobili iz različnih krajev v Sloveniji, ki so bili med seboj čim bolj oddaljeni in izvedli analizo proteinov z 2-D elektroforezo.

#### 4.2.1 Proteini čistega surovega mleka

Primerjava proteinskih profilov različnih vrst mleka iz različnih geografskih regij Slovenije je pokazala, da se kravje razlikuje od kozjega in ovčjega mleka v dveh proteinskih lisah ne glede na geografsko poreklo. Te so obkrožene z rdečo barvo na proteinskih profilih kravjega mleka na sliki 3.

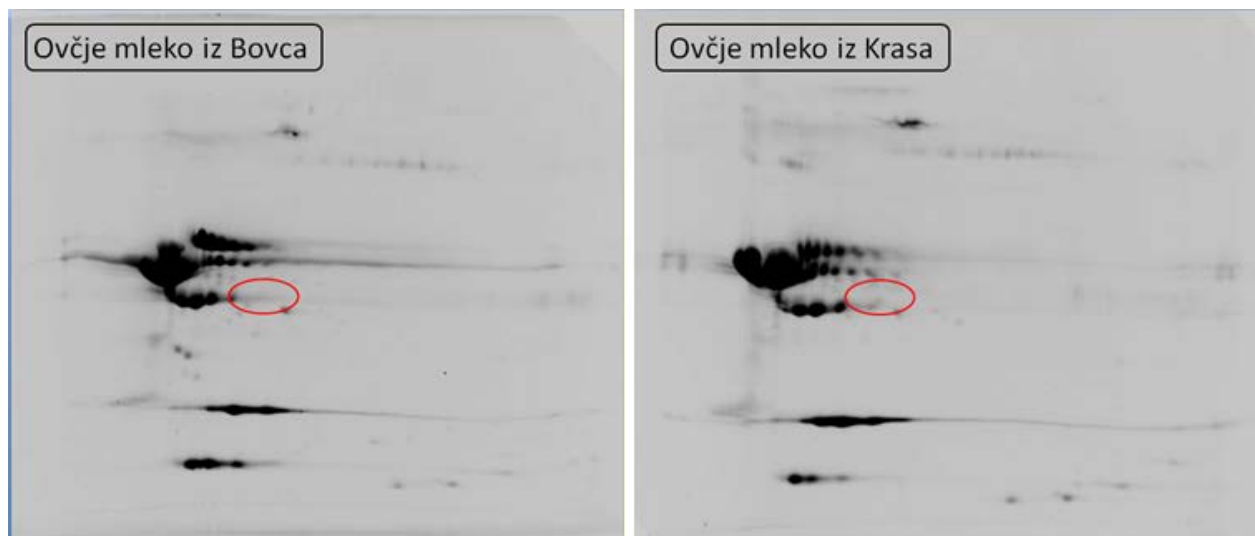


Slika 3: Proteinski profili različnih vzorcev kravjega mleka z rdeče označenima lisama, ki sta značilni samo za kravje mleko

Na slikah 4 in 5, kjer so prikazani proteinski profili kozjega oziroma ovčjega mleka, je zaradi boljše preglednosti z rdečo barvo poudarjeno mesto, kjer gre za odsotnost proteinov, ki jih je bilo mogoče videti pri kravjem mleku. Glede na to, da je bilo to značilnost mogoče videti tako na proteinskih profilih kravjega mleka iz Postojne, kot tudi na proteinskem profilu kravjega mleka iz Brežic ter Ribnice na Pohorju, lahko sklepamo, da so ti proteini specifični za kravje mleko.



Slika 4: Proteinska profila dveh vzorcev kozjega mleka, kjer je z rdečo označeno mesto odsotnosti proteina, ki je specifičen samo za kravje mleko



Slika 5: Proteinska profila dveh vzorcev ovčjega mleka, kjer je z rdečo označeno mesto odsotnosti proteina, ki je specifičen samo za kravje mleko

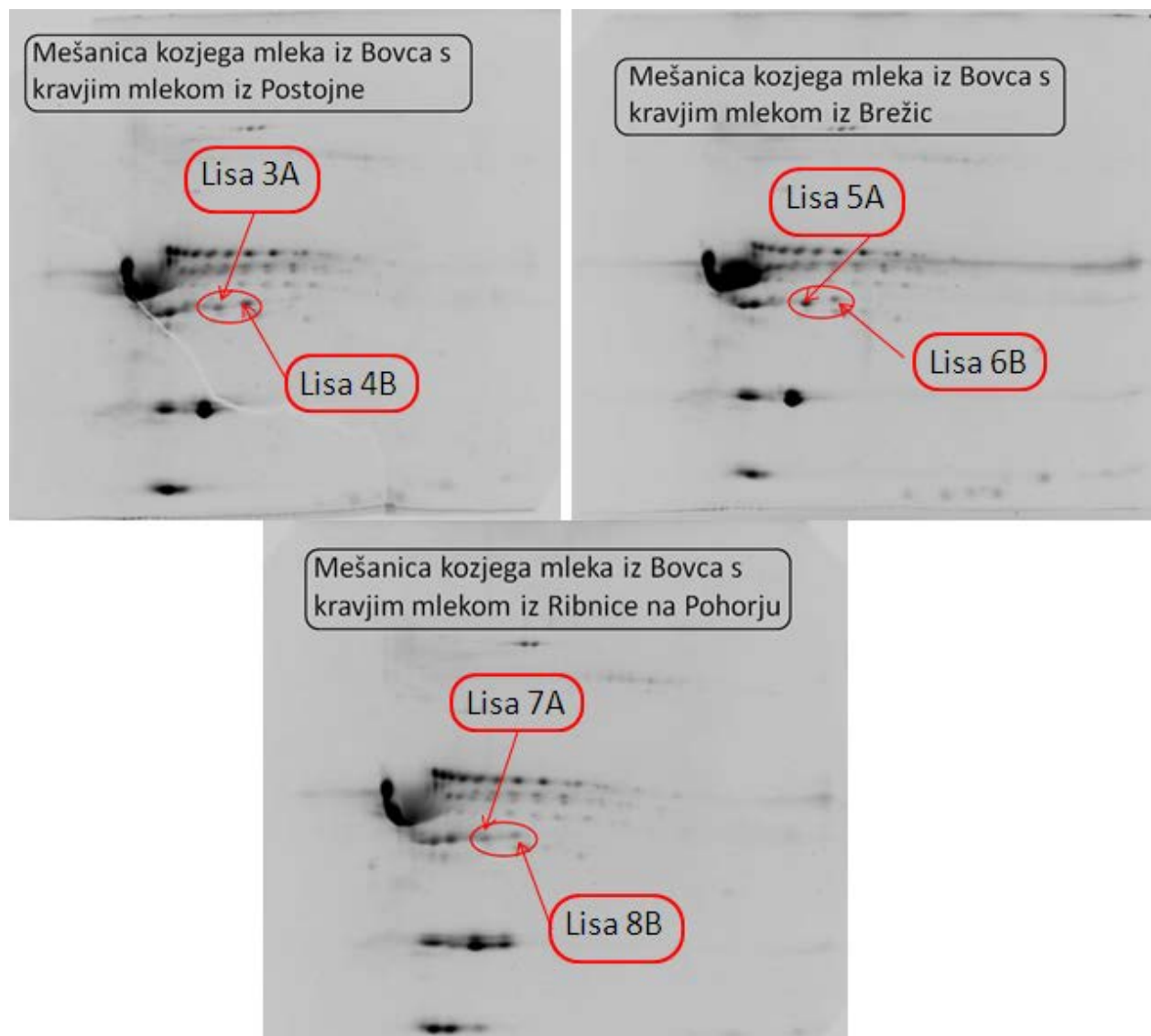
#### 4.2.2 Proteini mešanic različnih vrst mleka

2-D elektroforezo smo opravili tudi na mešanicah kozjega mleka z 10 % kravjim mlekom ter ovčjega mleka z 10 % kravjim mlekom.

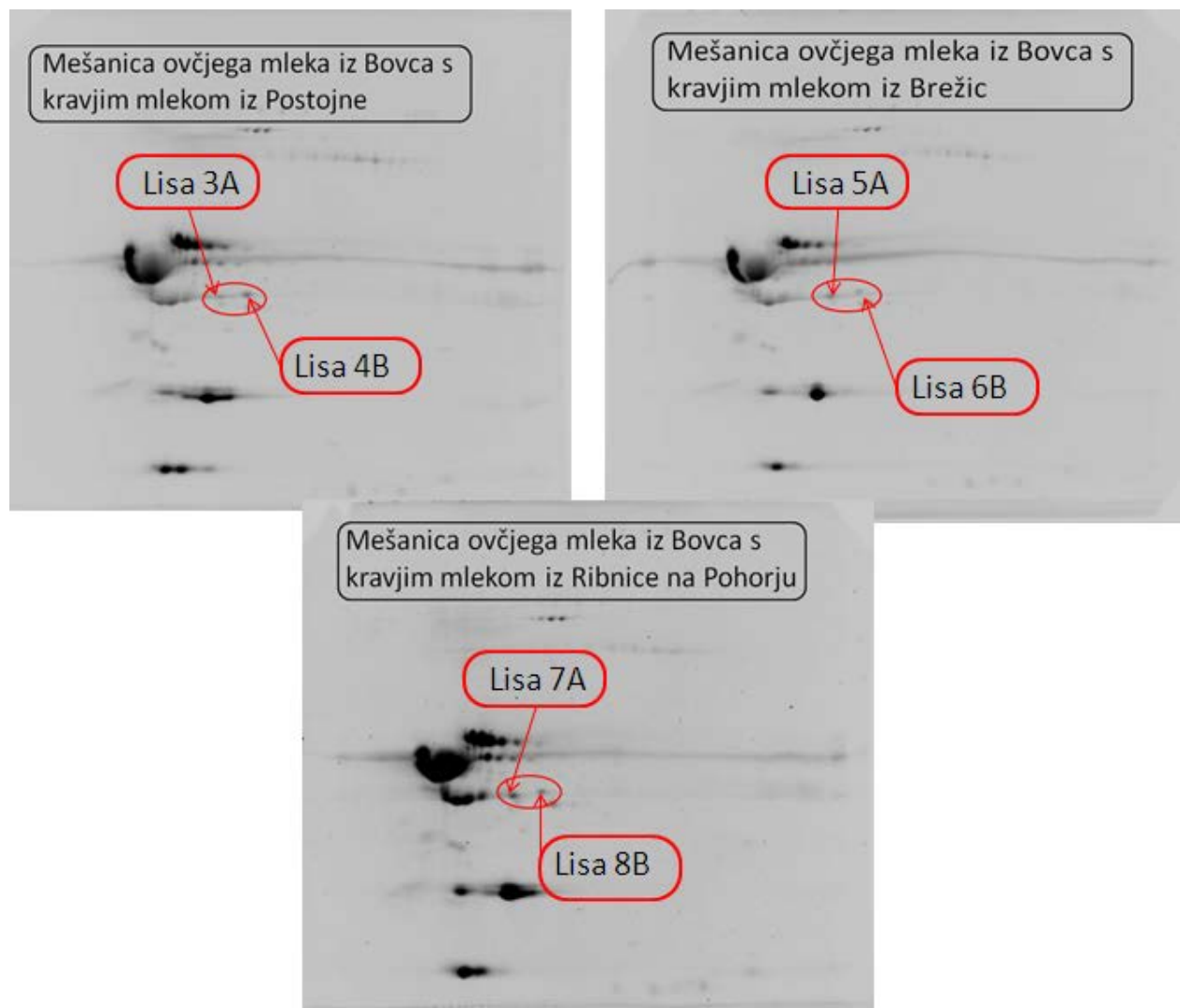
Na slikah 6 in 7, ki prikazujejo rezultate 2-D elektroforeze mešanic kozjega mleka z 10 % kravjim mlekom ter mešanic ovčjega mleka z 10 % kravjim mlekom, lahko vidimo, da se na označenem mestu pojavijo dve specifični proteinski lisi, ki drugače zaznamujeta le proteinske profile kravjega mleka. Za potvorbo sta bila izbrana kozje in ovčje mleko iz Bovca, ki je bilo potvorjeno z mlekom krav iz vseh treh različnih krajev po Sloveniji.

Že s slike 3, ki prikazuje proteinske profile kozjega mleka, lahko sklepamo, da odsotnost proteinov značilnih za kravje mleko ni izjema, saj se pojavi tako pri proteinskem profilu kozjega mleka iz Bovca, kot tudi pri kozjem mleku iz Brd. Isti sklep lahko oblikujemo za ovčje mleko, saj se odsotnost proteinov, značilnih za kravje mleko na sliki 4 ponovi.

S primerjanjem proteinskih profilov kravjega mleka na sliki 2 in sliki 5, ki prikazuje proteinske profile mešanic kozjega s kravjim mlekom, lahko opazimo, da sta proteinski lisi veliko bolj intenzivni na sliki 2. To je pričakovan rezultat, saj je bilo v vzorcu mešanice kozjega mleka s kravjim prisotnih le 10 % kravjega mleka. Enako lahko opazimo tudi na sliki 7, ki prikazuje proteinske profile mešanic ovčjega s kravjim mlekom.



Slika 6: Proteinski profili mešanic kozjega mleka s kravjim mlekom z rdeče označenimi mesti, kjer se pojavijo proteini, ki so specifični samo za kravje mleko



Slika 7: Proteinski profili mešanic ovčjega mleka s kravjim mlekom z rdeče označenimi mesti, kjer se pojavijo proteini, ki so specifični samo za kravje mleko

### 4.3 BIOINFORMATSKA ANALIZA

Po pregledu proteinskih profilov smo izrezali proteine, ki smo jih določili za značilne v kravjem mleku (100 % kravje mleko ter iz mešanic kozjega z 10 % kravjim mlekom in ovčjega z 10 % kravjim mlekom) in poslali na identifikacijo na Univerzo v York na Oddelek za biologijo, kjer so izvedli MALDI-MS/MS spektrometrijo. V vseh vzorcih je bil identificiran  $\kappa$ -kazein (*Bos taurus*) (Preglednica 6).

Preglednica 6: Pregled proteinskih lis na proteinskih profilih različnih vrst mleka ter odgovarjajoči podatki v bazi UniProt (UniProt, 2014) in programu Mascot (Dowle, 2014, Priloga A)

Številka 2-D lise	Ime proteina	Pristopna številka <sup>a</sup>	PM <sup>b</sup>	SC (%) <sup>c</sup>	Seštevek <sup>d</sup>	Geografsko poreklo
Lisa 1A (Slika 3)	CSN3 Kappa-casein	P02668	5(5)	28 %	314	Kravje mleko: - Postojna - Brežice - Ribnica na Pohorju
Lisa 2B (Slika 3)	CSN3 Kappa-casein	P02668	3(3)	21 %	235	Kravje mleko: - Postojna - Brežice - Ribnica na Pohorju
Lisa 3A (Slika 6 in 7)	CSN3 Kappa-casein	P02668	3(3)	21 %	204	Mešanica kozjega s kravjim ter mešanica ovčjega s kravjim mlekom: - Bovec + Postojna
Lisa 4B (Slika 6 in 7)	CSN3 Kappa-casein	P02668	5(5)	28 %	282	Mešanica kozjega s kravjim ter mešanica ovčjega s kravjim mlekom: - Bovec + Postojna
Lisa 5A (Slika 6 in 7)	CSN3 Kappa-casein	P02668	3(3)	21 %	221	Mešanica kozjega s kravjim ter mešanica ovčjega s kravjim mlekom: - Bovec + Brežice
Lisa 6B (Slika 6 in 7)	CSN3 Kappa-casein	P02668	3(3)	21 %	205	Mešanica kozjega s kravjim ter mešanica ovčjega s kravjim mlekom: - Bovec + Brežice
Lisa 7A (Slika 6 in 7)	CSN3 Kappa-casein	P02668	3(3)	21 %	231	Mešanica kozjega s kravjim ter mešanica ovčjega s kravjim mlekom: - Bovec + Ribnica na Pohorju
Lisa 8B (Slika 6 in 7)	CSN3 Kappa-casein	P02668	3(3)	21 %	230	Mešanica kozjega s kravjim ter mešanica ovčjega s kravjim mlekom: - Ribnica na Pohorju

#### Legenda:

<sup>a</sup> Pristopna številka v podatkovni bazi UniProt.

<sup>b</sup> Število ujemanih peptidov najvišjega zadetka.

<sup>c</sup> Odstotek v pokritosti aminokislinske sekvence ujemanih peptidov v identificiranem proteinu.

<sup>d</sup> MASCOT »score« za najvišji, najbolj značilen zadetek (Priloga A).







Slika 9: Taksonomsko drevo  $\kappa$ -kazeinov kravjega, kozjega in ovčjega mleka (UniProt, 2014)

**Legenda:**

**CASK\_BOVIN:  $\kappa$ -kazein kravjega mleka.**

**CASK\_CAPHI:  $\kappa$ -kazein kozjega mleka.**

**CASK\_SHEEP:  $\kappa$ -kazein ovčjega mleka.**

Podobnost med kravjimi in kozjimi  $\kappa$ -kazeini je 84,375 %, med kravjimi in ovčjimi  $\kappa$ -kazeini pa prav tako 84,375 %. Veliko bolj podobni so si  $\kappa$ -kazeini kozjega in ovčjega mleka (95,833%). Tudi na taksonomskem drevesu na sliki 9 se vidi, da sta si kozje in ovčje mleko v primeru  $\kappa$ -kazeinov bolj sorodna v primerjavi s kravjim (UniProt, 2014).

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Mleko je eno izmed najbolj razširjenih živil, ki ga konzumirajo ljudje po vsem svetu, ne glede na starost. Zaradi zaupanja in zdravja potrošnikov ter uporabnosti v mlečni industriji, je pomembno, da sestava mleka res ustreza deklaraciji, oz. da je mleko nepotvorjeno, pristno. Navkljub vsem preiskavam in analizam pa zlasti zaradi ekonomskih prednosti obstajajo tudi raznorazne potvorbe. Osredotočili smo se na potvorbo surovega ovčjega in kozjega mleka s surovim kravjim mlekom.

Različne vrste mleka se med seboj po sestavi razlikujejo, zato smo pričakovali, da se bo to pokazalo tudi na proteinskih profilih ter, da bo mogoče na podlagi teh razlik določiti potvorbe surovega ovčjega in kozjega mleka s surovim kravjim mlekom. Predvidevali smo, da so proteinski profili odvisni od vrste mleka ter, da so proteinski profili posamezne vrste mleka odvisni od geografskega porekla.

Predhodno so takšno potvorbo ugotavljali z 2-D elektroforezo (Volk, 2013), kjer sta se na proteinskih profilih pri mešanici kozjega ali ovčjega mleka s surovim kravjim mlekom pokazali dve proteinski lisi, ki sta bili značilni samo za kravje mleko, ne pa tudi za kozje in ovčje. Na podlagi tega smo se odločili, da z isto metodo preverimo, ali sta ti dve proteinski lisi značilni tudi za kravje mleko in odsotni pri ovčjem in kozjem mleku, ki izvirajo iz različnih krajev po Sloveniji, pri tem pa smo izbrali kraje, ki so bili med seboj čim bolj oddaljeni. V predhodno izvedeni raziskavi (Volk, 2013) se lahko proteinske profile primerja z našimi rezultati. Na predhodnih profilih sta se proteinski lisi pri kravjem mleku in pri mešanicah kravjega z ovčjim in kozjim mlekom pojavljali na točno določenem mestu, in ker so se proteinske lise na naših proteinskih profilih kravjega mleka ter mešanic kravjega s kozjim in ovčjim mlekom, ki je bilo različnega geografskega izvora, prav tako pojavljale na tem enakem točno določenem mestu, smo z našimi rezultati potrdili napoved, da je omenjeni pojav značilen tudi za kravje mleko različnega geografskega porekla.

Primerjava proteinskih profilov različnih vrst mleka iz različnih geografskih regij Slovenije je pokazala, da se kravje razlikuje od kozjega in ovčjega mleka v dveh predhodno že potrjenih proteinskih lisah ne glede na geografsko poreklo. Proteinski lisi, ki smo ju opazili pri proteinskih profilih surovega kravjega mleka iz vseh treh različnih krajev po Sloveniji (slika 3), sta se pojavljali tudi na proteinskih profilih mešanic 90 % surovega kozjega in 10 % surovega kravjega mleka ter 90 % surovega ovčjega in 10 % surovega kravjega mleka (sliki 6 in 7). Z masno spektrometrijo MALDI MS/MS sta bili proteinski lisi identificirani kot  $\kappa$ -kazein (Priloga A), kar je sovpadalo z že prej opravljeno raziskavo. Pomembno dejstvo pri tem je, da je kljub odstopanju v sami sestavi,  $\kappa$ -kazein prisoten v mleku vseh treh vrst živali. Zaradi drugačnih post-translacijskih sprememb pa se proteinski lisi kravjega  $\kappa$ -kazeina na proteinskem profilu pojavita na drugem mestu kot pa pri kozjem in ovčjem mleku.

Post-translacijske spremembe so pri kravjem mleku: fosforilacija (fosfoprotein), glikozilacija (glikoprotein), disulfidna vez ter pirolidonkarboksilna kislina (ciklizacija N-terminalnega glutamina). Pri kozjem mleku so post-translacijske spremembe fosforilacija ter pirolidonkarboksilna kislina, pri ovčjem pa fosforilacija ter glikozilacija (UniProt, 2014).

Post-translacijske spremembe imajo pri mleku kritično vlogo v formaciji in stabilnosti kazeinskih micel. Morda je presenetljivo, da je toliko variabilnosti pri post-translacijskih spremembah prisotno na kazeinih. Kazeini so fosfoproteini in predstavljajo v mleku okrog 80 % proteinov v obliki koloidnega kompleksa s kalcijevim fosfatom in manjšimi količinami drugih mineralov. Poleg zaloge aminokislin, kalcija in fosforja pri prehrani mladičev, so kazeinske micelle odgovorne za fizične lastnosti mleka. Micela je mreža proteinov, ki jih skupaj držijo hidrofobne interakcije med proteinskimi molekulami in elektrostatske interakcije med fosfoserinom v  $\alpha$ - in  $\beta$ -kazeinih ter kalcijevim fosfatom.  $\kappa$ -kazein pa je hidrofilen in z elektrostatskim odbojem preprečuje medsebojno združevanje micel. Najpomembnejši faktor v formaciji in stabilnosti micel so post-translacijske modifikacije, kot na primer fosforilacija  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ - in  $\beta$ -kazeinov ter glikozilacija  $\kappa$ -kazeinov. Post-translacijske modifikacije se po sintezi polipeptidne verige dogajajo na endoplazemskem retikulumu in/ali v Golgijevem aparatu (O'Donnell in sod., 2004).

Dejavniki, ki vplivajo na stopnjo modifikacije so izražanje genov, ki kodirajo encime, potrebne za modifikacijo, prisotnost substratov ter dostopnost modificiranega mesta na proteinu, še posebno po zvitju. Pri izdelavi sira  $\kappa$ -kazein ob dodatku encima himozina na specifičnem predelu Phe-Met (vez med aminokislinama 126 in 127) razpade na N-terminalni para- $\kappa$ -kazein, ki je hidrofobni del ter C-terminalni glikomakropeptid, ki pa je hidrofilen in odteče s sirotko. Slednji je poimenovan po glikozilacijskih mestih, ki jih vsebuje. Cel  $\kappa$ -kazein je sestavljen iz 169 aminokislin (Holland in Bolland, 2011).

V našem primeru smo potvorjene mešanice mleka ugotovili na proteinskih profilih s pomočjo proteinske lise  $\kappa$ -kazeina. V študiji (Yang in sod., 2014) pa so prav tako z 2-D elektroforezo ustvarili proteinske profile za surovo kravje, bivoličje, kozje, kamelje in mleko samic jaka ter različne dvokomponentne mešanice le teh. Na prvi pogled so bili proteinski profili kravjega, bivoličjega ter mleka samic jaka zelo podobni, proteinska profila kameljega in kozjega mleka pa različna. Te razlike pa so omogočile detekcijo in tudi identifikacijo dodanega mleka v mešanicah. Ugotovili so, da je  $\beta$ -laktoglobulin in  $\alpha$ -laktalbumin iz kravjega ali kozjega mleka označeval potvorbo kameljega mleka. Ugotovitev so potrdili še z detekcijo  $\alpha_{s1}$ -kazeina iz kravjega in kozjega mleka, ki ima drugačno molekulska maso in izoelektrično točko kot pri kameli, kar je povzročilo drug položaj proteinske lise na gelu. Potvorbo mleka samic jaka pa je pokazala prisotnost  $\beta$ -laktoglobulina, ki je normalno prisoten le v kravjem mleku. Podobno je prisotnost  $\beta$ -laktoglobulina in  $\alpha$ -laktalbumina kozjega mleka v mleku samic jaka nakazovala potvorbo s kozjim mlekom (Yang in sod., 2014). Medtem ko so se v tej študiji osredotočali na kar nekaj različnih proteinov in njihove razporeditve, smo v našem primeru podatke o proteinskih profilih in načinu ugotavljanja potvorbe mleka nadgradili z določitvijo  $\kappa$ -kazeina.

V zadnjih letih je napredek proteomskih tehnologij pospešil analiziranje mlečnih proteinov, posebej glede post-translacijskih modifikacij. 2-D elektroforeza že na enem samem gelu

zagotavlja visoko ločljivost pri prikazovanju heterogenosti glavnih mlečnih proteinov, genetskih, fosforiliranih in glikoziliranih različic kazeina. Z masno spektrometrijo pa je omogočena karakterizacija, zlasti v zvezi s številnimi post-translacijskimi modifikacijami, ki vplivajo na elektroforetsko mobilnost proteinov (O'Donnell in sod., 2004).

V našem primeru smo proteinske profile ovrednotili le kvalitativno, vendar pa obstaja možnost razvoja kvantifikacije z uporabo računalniškega programa. Rezultati pridobljeni z 2-D elektroforezo so lahko tudi osnova za izbor genov za proteinski PCR in izhodišče razvoja novih metod. Metoda ni primerna za rutinsko pregledovanje mleka predvsem zaradi dolgotrajnosti postopka, visokih stroškov, za izvedbo pa je potreben usposobljen kader (O'Donnell in sod., 2004).

Priporočljivo bi bilo, da bi se izvedlo nadaljnje analize 2-D elektroforeze in pridobili proteinski profili toplotno obdelanega mleka. Preveriti bi bilo potrebno tudi manjše koncentracije od 10 % dodanega kravjega mleka v potvorjenih mešanicah. Z nadaljnjimi raziskavami bi lahko omogočili tudi kvantifikacijo potvorbe.

## 5.2 SKLEPI

V nalogi smo prišli do sledečih sklepov:

- ❖ Primerjava proteinskih profilov kozjega, kravjega in ovčjega mleka iz različnih področij Slovenije je pokazala, da se znotraj posamezne vrste mleka proteinski profili med seboj glede na geografsko poreklo v splošnem le rahlo razlikujejo, kar je posledica zelo enotne sestave proteinov mleka, med proteinskimi profili različnih vrst mleka pa so razlike večje zaradi različnih post-translacijskih sprememb iste skupine proteinov.
- ❖ Na proteinskih profilih kravjega mleka sta bili ne glede na geografsko poreklo prisotni dve proteinski lisi, medtem ko jih na proteinskih profilih ovčjega in kozjega mleku ni bilo zaznati.
- ❖ Pri mešanicah 90 % kozjega mleka z 10 % kravjega mleka in 90 % ovčjega mleka z 10 % kravjega mleka smo lahko na proteinskih profilih jasno določili proteinski lisi, ki sta označevali potvorbo surovega kozjega in ovčjega mleka s surovim kravjim mlekom.
- ❖ Proteinski lisi sta bili z masno spektrometrijo identificirani kot  $\kappa$ -kazein.

## 6 POVZETEK

Mleko je izključno običajni izloček mlečnih žlez, dobljeno z molžo ene ali več krav, brez kakršnega koli dodajanja ali odvzemanja (Uredba sveta (ES) št. 1234/2007). Izraz mleko označuje kravje mleko, druge vrste je potrebno posebej označiti, na primer kozje, ovčje mleko. Glavne sestavine mleka so voda, proteini, maščobe in mlečni sladkor ter v manjših količinah tudi vitamini in minerali. Izmed glavnih sestavin so proteini zelo občutljivi, saj zaradi kemijskih ali fizikalnih vplivov hitro spremenijo zgradbo in lastnosti (Mavrin in Oštir, 2002). Zaradi zaupanja in zdravja potrošnikov ter uporabnosti v mlečni industriji je pomembno, da sestava mleka res ustreza deklaraciji, oz. da je mleko nepotvorjeno. Navkljub vsem preiskavam in analizam pa zlasti zaradi ekonomskih prednosti obstajajo tudi raznorazne potvorbe.

Namen magistrskega dela je bil določiti proteinske profile kozjega, ovčjega in kravjega mleka ter ugotoviti, ali se med seboj razlikujejo glede na geografsko poreklo. Predhodno sta bili na proteinskem profilu kravjega mleka že določeni proteinski lisi, ki se na proteinskem profilu kozjega in ovčjega mleka nista pojavljali (Volk, 2013). Preverili smo, ali sta ti dve proteinski lisi značilni tudi za kravje mleko in odsotni v ovčjem in kozjem mleku, ki izvirajo iz različnih krajev po Sloveniji, pri tem pa smo se odločili za kraje, ki so med seboj čim bolj oddaljeni. Kravje mleko je bilo odvzeto v Postojni, Brežicah in Ribnici na Pohorju, kozje mleko v Bovcu in Brdih, ovčje mleko pa v Bovcu in Vremščici na Krasu. Postopek ločevanja proteinov mleka je potekal z dvo-dimenzionalno (2-D) elektroforezo. Analizirali smo čisto surovo kravje, kozje in ovčje mleko ter mešanice 90 % surovega kozjega in ovčjega mleka z 10 % surovega kravjega mleka. Primerjava proteinskih profilov je pokazala, da se znotraj posamezne vrste mleka profili med seboj v splošnem le rahlo razlikujejo, med vrstami pa so razlike večje. Na proteinskih profilih kravjega mleka sta bili povsod ne glede na geografsko poreklo prisotni predhodno določeni proteinski lisi, medtem ko jih na proteinskih profilih ovčjega in kozjega mleka ni bilo zaznati. Pri mešanicah 90 % kozjega mleka z 10 % kravjega mleka in 90 % ovčjega mleka z 10 % kravjega mleka smo lahko na proteinskih profilih jasno določili proteinski lisi, ki sta označevali potvorbo surovega kozjega in ovčjega mleka s surovim kravjim mlekom. Vse proteinske lise, na podlagi katerih smo določali potvorbe, so bile identificirane z masno spektrometrijo. Identifikacija je pokazala, da je to  $\kappa$ -kazein.  $\kappa$ -kazein je značilen za mleko vseh treh vrst živali, vendar se razlike med vrstami v sestavi mleka odražajo tudi v različnih post-translacijskih modifikacijah  $\kappa$ -kazeina, kar vodi v njihovo točno določeno pozicijo na 2-D gelu.

V nalogi smo tako potrdili prvo hipotezo, da se različne vrste mleka med seboj po sestavi razlikujejo ter da se bo to pokazalo tudi na proteinskih profilih in da bo mogoče na podlagi teh razlik določati potvorbe ovčjega in kozjega mleka s kravjim mlekom, medtem ko smo drugo hipotezo potrdili le delno, saj smo pokazali, da so proteinski profili odvisni od vrste mleka, medtem ko so bile glede na geografsko poreklo znotraj iste vrste mleka splošno le minimalne razlike v profilu.

## 7 VIRI

- Antalašić M. 2006. Učinkovitost uporabe hitre imunoencimske metode (E.L.I.S.A.) za odkrivanje potvorb ovčjega mleka s kravjim mlekom. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 40-43
- Bajt N., Golc-Teger S. 2002. Izdelava jogurta, skute in sira. Ljubljana, Kmečki glas: 1-23
- Belloque J., Chicon R., Recio I. 2009. Quality control. V: Milk processing and quality management. Tamime A. Y. (ed.). Chichester, Wiley-Blackwell: 72-92
- Holland J. W., Boland M. J. 2014. Post-translational modifications of caseins. V: Milk proteins: from expressions to food. Singh H., Boland M. J., Thompson A. (eds.). London, Elsevier: 141-168
- Chandan R. C. 2007. Milk composition, phisysical and procesing characteristics. V: Handbook of food products manufacturing: Vol. 2. Health, meat, milk, poultry, seafood, and vegetables. Hui Y.H. (ed.). New Yersey, Wiley-Interscience: 347-377
- Cheng Y.-H., Chen S.-D., Weng C.-F. 2006. Investigation of goat's milk adulteration with cows' milk by PCR. Ausian-Australian Journal of Animal Science, 19, 10: 1503-1507
- Cvirn M. 2003. Kozje mleko. Drobница, 8, 2: 10-12
- 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, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 1-2
- D'Ambrosio C., Arena S., Salzano A. M., Renzone G., Ledda L., Scaloni A. 2008. A proteomic characterization of water buffalo milk fractions describing PTM of major species and the identification of minor components involved in nutrient delivery and defense against pathogens. Proteomics, 8: 3657-3666
- D'Auria E., Agostoni C., Giovannini M., Riva E., Zetterström R., Fortin R., Greppi G. F., Bonizzi L., Roncada P. 2005. Proteomic evaluation of milk from differnt mammalian species as a substitute for breast milk. Acta Pediatrica, 94: 1708-1713
- Damjanović S., Samaržija D., Havranek J. 2006. Metode za dokazivanje patvorenja mlijeka i sira drugim vrstama mlijeka. Mljekarstvo, 56, 3: 221-232
- Darwish S. F., Hanaa, Allam A., Amin A. S. 2009. Evaluation of PCR assay for detection of cow's milk in water buffalo's milk. World Applied Sciences Journal, 7, 4: 461-467



- Dias L. A., Peres A. M., Veloso A. C. A., Reis F. S., Vilas-boas M., Machado A. A. S. C. 2009. An electronic tongue taste evaluation: identification of goat milk adulteration with bovine milk. *Sensors and Actuators, B*, 136: 209-217
- Dowle A. 2014. Mascot search results. York, University of York (osebni vir, januar 2014)
- FAO. 2014. Milk production. Dairy production and products. Rome, Food and Agriculture Organisation of the United Nations: 1 str.  
<http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/milk-production/en/#.VFyMzk0tC70> (april 2014)
- Fox P. F., McSweeney P. L. H. 1998. Dairy chemistry and biochemistry. London, Blackie Academic & Professional: 146-200
- Görg A., Klaus A., Lück C., Weiland F., Weiss W. 2007. Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients for proteome analysis. A laboratory manual. Freising, Technische Universität München: 1-86  
[http://proteomik.wzw.tum.de/fileadmin/documents/2D\\_Manual-Gorg\\_2007.pdf](http://proteomik.wzw.tum.de/fileadmin/documents/2D_Manual-Gorg_2007.pdf) (april 2014)
- Hurley I. P., Coleman R. C., Ireland H. E., Williams J. H. H. 2004. Measurement of bovine IgG by indirect competitive ELISA as a means of detecting milk adulteration. *Journal of Dairy Science*, 87: 543-549
- Iverson J. L., Sheppard A. J. 1989. Detection of adulteration in cow goat and sheep cheeses utilizing gas liquid chromatographic fatty acid data. *Journal of Dairy Science*, 72: 1707-1712
- Kim H.-H. Y., Jimenez-Flores R. 1994. Comparison of milk proteins using preparative isoelectric focusing followed by polyacrilamide gel electrophoresis. *Journal of Dairy Science*, 77, 8: 2177-2190
- Kos Skubic M. 2014. Varstvo in informiranje potrošnikov ter pomen analitskih metod za uradni nadzor nad živili. V: Uporaba specifičnih metod za ugotavljanje in preprečevanje potvorb mleka in mlečnih izdelkov. Delavnica ob zaključku projekta CRP Projekt – V4-1108. 26. junij 2014. Ogrinc N., Volk H., Jeršek B. (ur.). Ljubljana, UL, Biotehniška fakulteta, Inštitut Jožef Štefan: 48–70 [CD]
- Križaj I. 2008. Metode za analizo proteoma. V: Proteomika. Posvetovanje pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost. Ljubljana 31. jan.-1. feb. 2008. Raspor P., Jamnik P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 19-31
- Lee C.-C., Chang H.-S., Sheen H.-S. 2004. A quick novel method to detect the adulteration of cow milk in goat milk. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 17: 420-422
- Mavrin D., Oštir Š. 2002. Tehnologija mleka in mlečnih izdelkov. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 1-51

- MKGP. 2010. Kaj so potvorbe živil in vloga laboratorijev pri ugotavljanju potvorb. Ljubljana, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano: 2 str.  
[http://www.arhiv.mkgp.gov.si/fileadmin/mkgp.gov.si/pageuploads/Aktualno/Obvestila\\_potrosnikom/Splet\\_potvorbe\\_in\\_vloga\\_laboratorijev.doc](http://www.arhiv.mkgp.gov.si/fileadmin/mkgp.gov.si/pageuploads/Aktualno/Obvestila_potrosnikom/Splet_potvorbe_in_vloga_laboratorijev.doc) (april 2014)
- O'Donnell R., Holland J. W., Deeth H. C., Alewood P. 2004. Milk proteomics. *International Dairy Journal*, 14: 1013-1023
- O'Farrell P. H. 1974. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 250, 10: 4007-4021
- Pesic M., Barac M., Vrvic M., Ristic N., Macej O., Stanojevic S. 2011. Qualitative and quantitative analysis of bovine milk adulteration in caprine and ovine milks using native-PAGE. *Food Chemistry*, 125: 1443-1449
- Rodrigues N. P. A., Givisiez P. E. N., Queroga 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: 2749-2752
- Rogelj I. 1996. Lastnosti kozjega in ovčjega mleka in njihov vpliv na predelavo. V: Zbornik: Možnosti razvoja reje drobnice v Sloveniji, Postojna, 27. – 29. nov. 1996. Pogačnik M., Kompan D., Cvirn M. (ur.). Slovenj Gradec, Kmetijska založba: 145-150
- Roncada P., Piras C., Soggiu A., Turk R., Urbani A., Bonizzi L., 2012. Farm animal milk proteomics. *Journal of Proteomics*, 75: 4259-4274
- SIST EN ISO/IEC 17025. 2005. Splošne zahteve za usposobljenost preskuševalnih in kalibracijskih laboratorijev. Ljubljana, Slovenski inštitut za standardizacijo: 50 str.
- Slovenski zaščiteni posebni kmetijski pridelki oziroma živila. 2006. Cencič L., Grašek V., Le Marechal A. (ur.). Ljubljana, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano: 11-15  
[http://www.mko.gov.si/fileadmin/mko.gov.si/pageuploads/podrocja/Varna\\_in\\_kakovostna\\_hrana\\_in\\_krma/zasciteni\\_kmetijski\\_pridelki/Publikacije/BROSURAposebni2006.pdf](http://www.mko.gov.si/fileadmin/mko.gov.si/pageuploads/podrocja/Varna_in_kakovostna_hrana_in_krma/zasciteni_kmetijski_pridelki/Publikacije/BROSURAposebni2006.pdf) (april 2014)
- SSKJ - Slovar slovenskega knjižnega jezika. 2002. Ljubljana, DZS: 561-561
- Škrk N. 2014. Uradni nadzor nad potvorbami oz goljufimi praksami v živilih. V: Uporaba specifičnih metod za ugotavljanje in preprečevanje potvorb mleka in mlečnih izdelkov. Delavnica ob zaključku projekta CRP Projekt – V4-1108. 26. junij 2014. Ogrinc N., Volk H., Jeršek B. (ur.). Ljubljana, UL, Biotehniška fakulteta, Inštitut Jožef Štefan: 71–81 [CD]
- Thiede B., Höhenwarter W., Krah A., Mattow J., Schmid M., Schmidt F., Jungblut P. R. 2005. Peptide mass fingerprinting. *Methods*, 35: 237-247

- UniProt. 2014. Sequence alignment (Kappa-casein: Bovine, goat, sheep). Hinxton, UniProt: baza podatkov  
<http://www.uniprot.org/align/2014062972T8WZY3ET> (Julij 2014)
- Uredba komisije (ES) št. 273/2008 z dne 5. marca 2008 o določitvi podrobnih pravil za izvajanje Uredbe Sveta (ES) št. 1255/1999 o analitskih metodah in ocenjevanju kakovosti mleka in mlečnih proizvodov. 2008. Uradni list Evropske unije, 51, L88: 1-115
- 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 sveta (ES) št. 178/2002 z dne 28. januarja 2002 o določitvi splošnih načel in 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 sveta (ES) št. 882/2004 z dne 29. aprila 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
- Veloso A. C. A., Teixeira N., Ferreira I. M.P.L.V.O. 2002. Separation and quantification of the major casein fractions by reverse-phase high-performance liquid chromatography and urea-polyacrilamide gel electrophoresis. Detection of milk adulterations. *Journal of Chromatography A*, 967: 209-218
- Volk H. 2013. Določanje potvorb kozjega in ovčjega mleka s kravjem mlekom na ravni DNA in proteinov. Magistrsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 110-115
- Zachar P., Šoltes M., Kasarda R., Novotny J., Novikmecova M., Marcinčakova D. 2011. Analytical methods for the species identification of milk and milk products. *Mljekarstvo*, 61, 3: 199-207
- Zakon o kmetijstvu (ZKme-1). 2008. Uradni list Republike Slovenije, 18, 45: 4965-4993
- Yang Y., Zheng N., Yang J., Bu D., Wang J., Maa L., Sun P. 2014. Animal species milk identification by comparison of two-dimensional gel map profile and mass spectrometry approach. *International Dairy Journal*, 35: 15-20

## **ZAHVALA**

Najlepša hvala mentorici prof. dr. Poloni Jamnik za vso strokovno pomoč pri izvajanju poskusov ter za spodbudo pri pisanju te magistrske naloge.

Enako se zahvaljujem tudi somentorici prof. dr. Barbki Jeršek za usmerjanje pri magistrski nalogi.

Recenzentki prof. dr. Lei Demšar se zahvaljujem za hiter pregled naloge ter Lini Burkan Makivić, univ. dipl. inž., za pomoč pri tehničnem pregledu naloge.

Hvala staršem, ki ste mi omogočili študij in mi stali ob strani ter stari mami za spodbudo in dobro voljo. Timotej, hvala ker si.

# PRILOGE

Priloga A: Rezultati identifikacije 2-D lis z masno spektrometrijo (Dowle, 2014)

## Mascot Search Results

User : tf2014  
Email :  
Search title : Ultraflex\_ProteinID  
MS data file : 13229323905427156.mgf  
Database : IPI\_Bovine (34274 sequences; 17938348 residues)  
Timestamp : 31 Jan 2014 at 13:45:35 GMT  
Enzyme : Trypsin/P  
Fixed modifications : [Carbamidomethyl \(C\)](#)  
Variable modifications : [Dioxidation \(W\)](#), [Oxidation \(M\)](#)  
Mass values : Monoisotopic  
Protein Mass : Unrestricted  
Peptide Mass Tolerance :  $\pm 100$  ppm  
Fragment Mass Tolerance :  $\pm 0.5$  Da  
Max Missed Cleavages : 1  
Instrument type : MALDI-TOF-TOF  
Number of queries : 10  
Protein hits : [IPI00707811](#) Tax\_Id=9913 Gene\_Symbol=CSN3 Kappa-casein

### Select Summary Report

Format As	Select Summary (protein hits) ▼	<a href="#">Help</a>
Significance threshold p <	0.05	Max. number of hits
Standard scoring	<input checked="" type="radio"/> MudPIT scoring <input type="radio"/> Ions score or expect cut-off	0.05
Show pop-ups	<input checked="" type="radio"/> Suppress pop-ups <input type="radio"/>	Require bold red <input checked="" type="checkbox"/>
Preferred taxonomy	All entries ▼	

Re-Search  All queries  Unassigned  Below homology threshold  Below identity threshold

1. [IPI00707811](#) Mass: 21370 Score: 314 Matches: 5(5) Sequences: 4(4)

Tax\_Id=9913 Gene\_Symbol=CSN3 Kappa-casein

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
<a href="#">1</a>	1251.7369	1250.7297	1250.7023	21.9	0	41	0.0046	1	U	K.YIPIQYVLSR.Y
<a href="#">5</a>	1523.7541	1522.7469	1522.7092	24.7	0	90	6.9e-08	1	U	R.YPSYGLNYYQQK.P
<a href="#">6</a>	1624.8827	1623.8754	1623.8344	25.3	0	37	0.015	1	U	R.HPHPLSFMALPPK.K
<a href="#">9</a>	1980.1052	1979.0979	1979.0840	7.05	0	146	1.4e-13	1	U	R.SPAQILQWQVLSNTVPAK.S
<a href="#">10</a>	2012.1045	2011.0972	2011.0738	11.6	0	(91)	3.8e-08	1	U	R.SPAQILQWQVLSNTVPAK.S