

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Blažka MUHA

**UPORABA IMUNOKROMATOGRFSKEGA TESTA ZA HITRO ODKRIVANJE
PRISOTNOSTI KRAVJEGA MLEKA V OVČJEM IN KOZJEM MLEKU TER
SIRIH**

DIPLOMSKO DELO
Visokošolski strokovni študij

**APPLICATION OF IMMUNOCHROMATOGRAPHIC ASSAY FOR
QUICK DETECTION OF COW'S MILK IN SHEEP'S AND GOAT'S
MILK AND CHEESES**

GRADUATION THESIS
Higher professional studies

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo je zaključek visokošolskega strokovnega študija Kmetijstvo-zootehnika. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za mlekarstvo, Oddelka za zootehniko, Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje Oddelka za zootehniko je za mentorico diplomske naloge imenovala prof. dr. Ireno Rogelj in za somentorja asist. dr. Primoža Trevna.

Recenzentka: doc. dr. Andreja Čanžek Majhenič

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Silvester ŽGUR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

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

Član: asist. dr. Primož TREVEN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: doc. dr. Andreja ČANŽEK MAJHENIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

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

Blažka MUHA

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Vs
DK UDK 637.1:637.3(043.2)=163.6
KG mleko/mlečni izdelki/siri/govedo/ovce/koze/imunokromatografski test
AV MUHA, Blažka
SA ROGELJ, Irena (mentorica)/TREVEN, Primož (somentor)
KZ SI – 1230 Domžale, Groblje 3
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
LI 2016
IN UPORABA IMUNOKROMATOGRAFSKEGA TESTA ZA HITRO ODKRIVNJE PRISOTNOSTI KRAVJEGA MLEKA V OVČJEM IN KOZJEM MLEKU TER SIRIH
TD Diplomsko delo (visokošolski strokovni študij)
OP IX, 37 str., 8 pregl., 4 sl., 39 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Potvorba ovčjega in kozjega mleka s cenejšim kravjim mlekom je dobro poznana prevara na področju mlekarstva, posebno na trgu s siri. Za dokazovanje potvorb mleka in mlečnih izdelkov obstajajo različne analitske metode. Eden od pristopov je tudi uporaba hitrih imunokromatografskih testov, ki največkrat temeljijo na principu sendvič ELISA. V diplomskem delu smo za odkrivanje potvorb ovčjega in kozjega mleka s kravjim mlekom, preskusili hitri test IC-BOVINO (Z.E.U.-IMUNOTEC), ki je osnovan na principu ugotavljanja prisotnosti govejih IgG. Delo smo razdelili v tri sklope. Najprej smo želeli preveriti učinkovitost in primernost hitrega testa na vzorcih mleka in sirov z znanim deležem kravjega mleka. Zato smo najprej pripravili in testirali različne mešanice kravjega in ovčjega mleka ter kravjega in kozjega mleka. Obenem smo želeli preveriti tudi vpliv termizacije mleka na rezultate testiranja. V zaključni fazi smo hitri test uporabili pri ugotavljanju prisotnosti kravjega mleka v ovčjih in kozjih sirih z neznano sestavo oziroma v sirih, ki vsebnosti kravjega mleka niso imeli deklariranega. Rezultati iz prvih dveh sklopov so potrdili navedbe proizvajalca glede mej detekcije, in sicer da so rezultati testa nezanesljivi pri mešanicah, kjer je delež surovega, kravjega mleka v mešanici pod 1 % in kjer je delež kravjega mleka v sirih pod 2 %. Po pričakovanjih smo zaznali povečano število mejno pozitivnih rezultatov v primeru, ko smo mleko predhodno 5 s termizirali pri 72 °C. Med vzorci, kjer dodatek kravjega mleka ni bil deklariran (8), sta dva vzorca dala pozitiven rezultat, kar kaže na sum, da je šlo za potvorbo ovčjega/kozjega mleka s kravjim. Pri enem od pozitivnih vzorcev smo s hitrim semi-kvantitativnim ELISA testom potrdili prisotnost kravjega mleka v vzorcu ovčjega sira v območju 10–15 %. Zaključimo lahko, da je hitri test IC-BOVINO zanesljiva metoda za odkrivanje potvorb ovčjega in kozjega mleka s kravjim.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Vs
DC UDC 637.1:637.3(043.2)=163.6
CX milk/milk products/cheese/cattle/sheep/goats/immunochromatographic test
AU MUHA, Blažka
AA ROGELJ, Irena (supervisor)/TREVEN, Primož (co-advisor)
PP SI – 1230 Domžale, Groblje 3
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of Animal Science
PY 2016
TI APPLICATION OF IMMUNOCHROMATOGRAPHIC ASSAY FOR QUICK
DETECTION OF COW'S MILK IN SHEEP'S AND GOAT'S MILK AND
CHEESES
DT Graduation thesis (Higher professional studies)
NO IX, 37 p., 8 tab., 4 fig., 39 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Adulteration of sheep's and goat's milk with cheaper cow's milk is a well-known fraud in the field of dairy, especially cheese market. Many different analytical methods can be used to prove the adulteration of milk and dairy products. One of the approaches is the usage of rapid immunochromatographic tests, which are based on sandwich ELISA. In this thesis we tested IC-BOVINO (Z.E.U.-IMUNOTEC), which is based on the detection of bovine IgG, to detect the adulteration of sheep's and goat's milk with bovine milk. The work was divided into three sections. First, we want to check the sensitivity and appropriateness of the rapid test on samples of milk and cheese which had known proportion of added cow's milk. For this purpose, we firstly prepared and tested different mixtures of goat's and cow's milk and goat's and sheep's milk. One of the goals was also to evaluate the influence of termisation on the results of the test. In the final phase, we used a rapid test to identify the presence of cow's milk in goat's and sheep's cheeses with unknown composition or in cheeses, in which the content of cow's milk was not declared. The results from first two sections confirmed the manufacturer's declaration about the limits of detection, namely that the test results are unreliable in mixtures where the proportion of raw cow's milk in the mixture is below 1 % and where the proportion of cows' milk in cheese is under 2 %. As expected, we have also detected an increased number of marginally positive results in the case where we have preliminary terminised the milk at 72 °C for 5 s. Among the samples, wherein the addition of cow's milk has not been declared (8), two samples gave a positive result, indicating a suspicion that sheep's/goat's milk was adulterated with cow's milk. In one of the positive samples of sheep's cheese, we have used a rapid semi-quantitative ELISA to confirm the presence of milk in the range of 10–15 %. It can be concluded that the rapid test IC-BOVINO is a reliable method for detecting adulteration of sheep's and goat's milk with cow's milk.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 MLEKO IN MLEČNI IZDELKI	3
2.1.1 Osnovna sestava mleka	3
2.1.1.1 Suha snov in voda.....	3
2.1.1.2 Maščoba.....	4
2.1.1.3 Proteini	5
2.1.1.4 Laktoza	6
2.1.1.5 Vitamini in minerali.....	7
2.1.1.6 Ostale sestavine mleka.....	7
2.1.2 Ovčje in kozje mleko	7
2.1.3 Siri.....	9
2.2 POTVORBE MLEKA	9
2.2.1 Varnostni vidiki in zakonodaja	10
2.2.2 Tipi potvorb.....	10
2.2.2.1 Dolivanje vode.....	10
2.2.2.2 Dodajanje kemikalij in ne-mlečnih sestavin.....	11
2.2.2.3 Potvorbe s cenejšimi vrstami mleka	12
2.3 ANALITSKE METODE ZA ODKRIVANJE POTVORB MLEKA S CENEJŠIMI VRSTAMI MLEKA	12
2.3.1 Referenčna metoda- izoelektrično fokusiranje	13
2.3.2 Ostale metode	13
2.3.2.1 Tekočinska kromatografija	13
2.3.2.2 Elektroforetske metode	14
2.3.2.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	15
2.3.2.4 Spektroskopske metode	15
2.3.2.5 Encimsko-imunski test (ELISA)	16
2.3.3 Hitri testi.....	17
3 MATERIALI IN METODE.....	20
3.1 POTEK DELA	20
3.2 PRIPRAVA VZORCEV MLEKA	20

3.2.1	Priprava mešanic ovčjega mleka s kravjim mlekom	21
3.2.2	Termizacija mleka	21
3.3	PRIPRAVA VZORCEV SIRA	21
3.3.1	Priprava vzorcev sira za analizo	24
3.4	TEST ICB	24
4	REZULTATI	28
4.1	OCENA PRIMERNOSTI TESTA ICB NA MEŠANICAH OVČJEGA/KOZJEGA MLEKA S KRAVJIM MLEKOM	28
4.2	OCENA PRIMERNOSTI TESTA ICB ZA SIRE	29
4.2.1	Rezultati analiz ovčjih/kozjih sirov z znanim deležem kravjega mleka.....	29
4.2.2	Rezultati analiz ovčjih/kozjih sirov z neznanim deležem kravjega mleka..	30
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	32
5.1	RAZPRAVA	32
5.2	SKLEPI	34
6	POVZETEK.....	35
7	VIRI.....	36

ZAHVALA

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Kemijska sestava različnih vrst mleka (Rogelj, 1996; Mavrin in Oštir, 2002).	3
Preglednica 2: Sestava kazeinskih frakcij v svežem kravjem, ovčjem in kozjem mleku (Damjanović in sod., 2006: 223).....	8
Preglednica 3: Pregled nekaterih kemikalij in ne-mlečnih sestavin, ki se namenoma dodajajo v mleko (prirejeno po Handford in sod., 2016: 139).....	11
Preglednica 4: Nekateri na trgu dostopni hitri testi za določanje potvorb ovčjega in kozjega mleka s kravjim.....	19
Preglednica 5: Opis analiziranih vzorcev sira.	23
Preglednica 6: Analiza mešanic ovčjega mleka s kravjim s hitrim testom IC-BOVINO ¹ . .	28
Preglednica 7: Rezultati detekcije kravjega mleka v sirih z znanim deležem kravjega mleka s hitrim testom IC-BOVINO ¹	29
Preglednica 8: Testiranje sirov z neznanim deležem kravjega mleka s hitrim testom IC-BOVINO ¹	30

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Shematski prikaz testa na osnovi kapilarnega vleka (prirejeno po Mark in sod., 2010: 1160).....	18
Slika 2: Shematski prikaz poteka dela.....	20
Slika 3: Področja na testnem lističu hitrega testa IC-BOVINO.	25
Slika 4: Shematski prikaz testa IC-BOVINO.....	27

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ELISA	encimsko-imunski test (angl. »enzyme linked immunosorbent assay«)
ES	Evropske skupnosti
HIC	hidrofobna interakcijska kromatografija (angl. »hydrophobic interaction chromatography«)
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl. »high-performance liquid chromatography«)
ICB	hitri imunokromatografski test IC-BOVINO (Z.E.U.-IMUNOTEC, S.L., Španija)
IEF	izoelektrično fokusiranje
Ig	imunoglobulini
IgX	imunoglobulin razreda X (X =A, E, G, D, M)
LC-MS	HPLC v povezavi z masno spektrometrijo (angl. »liquid chromatography – mass spectroscopy«)
MKGP	Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano
NaDS-PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. »polymerase chain reaction«)
RP-HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z reverzno fazo (angl. »reverse-phase HPLC«)
Urea-PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti uree
UVHVVR	Uprava Republike Slovenije za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin
ZIRS	Zdravstveni inšpektorat Republike Slovenije

1 UVOD

Mleko je hrana, ki človeka spremlja skozi celo življenjsko obdobje in je pomemben vir hranilnih snovi, mineralov in vitaminov. Mleko predstavlja prvo hrano novorojenemu sesalcu in najpogosteje ostane tudi edina hrana za določeno obdobje. Zaradi lahke prebavljivosti se mleko in mlečni izdelki v zdravi prehrani uvrščajo med nenadomestljive hranilne vire. Sestava mleka različnih sesalcev je povezana s potrebami in se močno razlikuje po količini posameznih sestavin, njihovih lastnostih ter porazdelitvi. Mladiči imajo različne potrebe glede na: hitrost rasti, energijske potrebe in okolje. Na sestavo, količino in lastnosti mleka vpliva več dejavnikov, ki jih delimo na genetske (vrsta živali, pasma, posamezna žival), fiziološke (starost, zdravstveno stanje, obdobje laktacije) in okoliške (letni čas, način molže, postopek z živaljo prehrana, itd...). Ljudje največ uživajo kravje mleko in mleko drobnice. Mleko različnih vrst sesalcev se razlikuje v količinski sestavi in lastnostih.

Mleko je v fiziološkem smislu izloček mlečne žleze. Glavne sestavine mleka so voda, proteini, maščoba, laktoza, vitamini in minerali. Te sestavine so v mleku v taki obliki, da jih telo dobro izkoristi in prebavi. Splošno velja, da uporabljamo besedo »mleko« za kravje mleko, ostale vrste dodatno opišemo, kot na primer: kozje mleko, ovčje mleko, bivoličje mleko (Bajt in Golc-Teger, 2002). Kravje, kozje in ovčje mleko se razlikujejo tako po količini posameznih sestavin, kot tudi po njihovi sestavi in porazdelitvi sestavin (Rogelj, 1996).

Mleko je surovina za izdelavo številnih mlečnih izdelkov kot so toplotno obdelano mleko, fermentirano mleko, smetana, siri, mleko v prahu, maslo in drugi. Najpogosteje jih izdelujemo iz kravjega, ovčjega, kozjega in bivoličjega mleka. Evropski zakoni zahtevajo specifikacijo o avtentičnosti mleka pri predelavi mleka v mlečne izdelke. Tako velja, da mora biti kozji sir izdelan izključno iz kozjega mleka, v primeru, da je izdelan iz kozjega mleka, ki mu je dodan določen odstotek kravjega mleka, pa mora biti to označeno (Uredba komisije (ES) št. 273/2008 ..., 2008).

Pri predelavi mleka v sire so pogoste potvorbe ovčjega in kozjega mleka s kravjim mlekom. Razlogi so v tem, da je kravje mleko cenejše in tudi količinsko ga je več kot ovčjega ali kozjega mleka. Dodajanje kravjega mleka v ovčje ali kozje mleko pomeni

slabšo kakovost izdelkov in neznačilne organoleptične lastnosti. Pri nekaterih posameznikih, alergičnih na proteine kravjega mleka, pomenijo takšni izdelki tudi zdravstveno tveganje, če dodatek kravjega mleka ni jasno označen.

Potvorba ovčjega ali kozjega mleka s cenejšim kravjim mlekom je dobro poznana prevara na področju mlekarstva, posebno na trgu s siri. Kontrola rejcev, ki redijo drobnico zaradi mleka, je pomembna zaradi ekonomskih in zdravstvenih razlogov. Ko rejec potvori kozje ali ovčje mleko s cenejšim kravjim mlekom, se spremenijo senzorične lastnosti sirov, zato je kakovost izdelka neznačilna.

Kakovost izdelkov preverjamo s pravilno izbiro analitičnih metod za odkrivanje potvorb. Za odkrivanje potvorb ovčjega in kozjega mleka s kravjim mlekom smo v diplomskem delu uporabili hitri imunokromatografski test IC-BOVINO (ICB), proizvajalca Z.E.U.-IMUNOTEC, S.L., Španija. Osnovni princip hitrega imunokromatografskega testa temelji na detekciji govejih imunoglobulinov (Ig) G.

Hipotezi:

1. Meje detekcije ICB bodo v okviru proizvajalčevih navedb in sicer za mleko 0,5–1 % delež kravjega mleka ter 1–2 % delež kravjega mleka za sire.
2. ICB je dovolj zanesljiva metoda za odkrivanje potvorb ovčjega in kozjega mleka s kravjim.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MLEKO IN MLEČNI IZDELKI

Mleko je po strukturi biološka tekočina, bele do umazano bele barve z značilnim vonjem in okusom. Mlečna žleza sesalcev ženskega spola izloča mleko določen čas po porodu. Izraz »mleko« pomeni »kravje mleko«, druge vrste mleka morajo biti posebno imenovane: npr. ovčje mleko, kozje mleko, kobilje mleko in bivoličino mleko. Posamezne vrste mleka so sestavljene iz enakih sestavin, z različnimi medsebojnimi deleži med sestavinami. Zaradi tega vrste mleka razlikujemo po hranilnih, energetskih, fizikalno – kemijskih, senzoričnih in tehnoloških lastnostih (Tratnik, 2012).

2.1.1 Osnovna sestava mleka

Mleko je popolna, naravna tekočina, ki vsebuje vse snovi, potrebne za varovanje zdravja in delovanje človeškega organizma. Mleko predstavlja osnovno surovino za izdelavo številnih mlečnih izdelkov (Tratnik, 2012). Glavne sestavine katerega koli mleka so voda, proteini, maščobe in laktoza ter nekateri vitamini in minerali (Bajt in Golc-Teger, 2002). Različne vrste mleka se razlikujejo tako po količini posameznih sestavin, kot tudi po njihovi sestavi in porazdelitvi (Preglednica 1).

Preglednica 1: Kemijska sestava različnih vrst mleka (Rogelj, 1996; Mavrin in Oštir, 2002).

Vrsta mleka	Skupni proteini [%]	Kazeini [%]	Serum proteini [%]	Maščoba [%]	Laktoza [%]	Minerali [%]
Kravje	3,4	2,8	0,6	3,8	4,7	0,6
Kozje	3,6	2,7	0,9	4,1	4,7	0,8
Ovčje	5,8	4,9	0,9	7,9	4,5	0,8
Kobilje	2,2	1,3	0,9	1,7	6,2	0,5
Bivolje	4,0	3,5	0,5	7,5	4,8	0,7
Humano	1,2	0,5	0,7	3,8	7,0	0,2

2.1.1.1 Suha snov in voda

Največji delež v mleku predstavlja voda, tj. od 86 % do 89 %. Prosta voda predstavlja glavnino, v njej se poleg različnih minornih snovi, nahajajo glavne sestavine mleka: maščoba, laktoza, proteini in mineralne snovi. Vse našteje sestavine predstavljajo delež suhe snovi v mleku (11–14 %). Manjši del celokupne vode (1,75–3,5 %) v mleku

predstavlja vezana voda (Mavrin in Šubic, 2011). Vezana voda obdaja posamezne sestavine suhe snovi, to so: kazeini (50 %), sirotkini proteini (30 %), membrana maščobnih kroglic (15 %), laktoza in druge sestavine (5 %). Sestavine suhe snovi imajo različno sposobnost vezanja vode, zaradi različnega deleža hidrofilnih (v vodi topnih) skupin (laktoza, minerali) na katere se vežejo molekule vode. Vezana voda vpliva na stabilnost sestavin mleka, predvsem na proteine, ker zmanjšuje površinski privlak med njimi in s tem možnost njihovega združevanja (Tratnik, 2012). Vsi mikrobiološki procesi, ki sodelujejo pri oblikovanju senzoričnih lastnosti sira, so povezani z vodo. Od vsebnosti vode je odvisna kakovost, obstojnost in količina pridelanega sira (Renčelj in sod., 1995).

Kravje mleko vsebuje povprečno 12,8 % suhe snovi. V primerjavi s kravjim mlekom, vsebuje ovčje mleko več suhe snovi, predvsem na račun maščob in kazeinov – predvsem α_s -kazeina (54 % α_s -kazeina : 34 % β -kazeina : 12 % κ -kazeina). Ker so s tem povezani tudi izkoristki pri sirjenju se ovčje mleko pogosto uporablja v proizvodnji trdih sirov (Tratnik, 2012).

2.1.1.2 Maščoba

Delež maščobe v mleku niha od 2,5 do 6,0 %, v povprečju pa znaša 3,8 %. Mlečna maščoba vpliva na teksturo in okus mleka. Maščobo (lipide) v mleku sestavljajo: gliceridi (triacilgliceroli, diacilgliceroli, monoacilgliceroli), proste maščobne kisline, fosfolipidi, cerebrozidi in steroli. Mlečna maščoba je porazdeljena v obliki maščobnih kroglic (emulzija). Povprečna velikost maščobnih kroglic je v razponu od 0,1 do 22 μ m. Maščobne kroglice so obdane z membrano, v kateri je največ fosfolipidov (65 %). Fosfolipidi so sestavljeni iz hidrofilnega dela (fosfatni) in hidrofobnega dela (lipidni). V membrani maščobne kroglice so orientirani tako, da so hidrofilne skupine fosfolipidov obrnjene proti vodni fazi mleka, hidrofobne skupine pa proti notranjosti maščobne kroglice, kjer se naprej povezujejo s triacilgliceroli, ki so v vodi težko topni. Fosfolipidi v membrani maščobne kroglice vsebujejo nenasičene maščobne kisline, vezani pa so na proteine, ki se razlikujejo od proteinov v mleku. V plasti fosfolipidov znotraj membrane so vezani še: holesterol, nevtralni gliceridi, vitamin A in karoteni (Tratnik, 2012).

2.1.1.3 Proteini

Proteini so zgrajeni iz aminokislin, ki so lahko esencialne ali neesencialne. Človeško telo potrebuje obe vrsti aminokislin. Esencialne aminokisliline mora obvezno dobiti s hrano, saj jih človeško telo ni sposobno tvoriti samo. Mleko vsebuje velike količine esencialnih aminokislin (cistin, cistein, metionin,...), ki so sestavni del mlečnih proteinov (Bajt in Golc-Teger, 2002). V mleku je bilo odkritih več kot 200 različnih vrst proteinov, od katerih jih je večina prisotnih v zelo nizkih koncentracijah. Količinsko gledano je v mleku največ kazeinov in serum proteinov (Tratnik, 2012).

Kazeini so sestavljeni proteini mleka, ki poleg proteinov vsebujejo še fosfor in jih zato prištevamo med fosfoproteine. Za kazeine je značilno, da so temperaturno stabilni in občutljivi na delovanje encimov sirišča ter občutljivi za nizko vrednost pH, ki povzroči njihovo koagulacijo ($\text{pH} < \text{cca. } 4,8$). V surovem mleku se kazeini nahajajo v obliki koloidnih delcev, ki jih imenujemo kazeinske micelle. Kazeinska micela je sestavljena iz različnih vrst kazeinov: α_{s1} -kazein, α_{s2} -kazein, β -kazein in κ -kazein. Poleg naštetih je v mleku prisoten še γ -kazein, ki nastaja iz β -kazeina. Frakcije γ -kazeina nastanejo kot rezultat razgradnje s plazminom, encimom, ki je naravno prisoten v mleku. Kazeinske micelle so negativno nabite molekule, povezane s kalcijevim fosfatom, ki ima pozitiven naboj. Zaradi fosforilacije so kazeini občutljivi za kalcijeve ione. Izjema je κ -kazein z enim fosforiliranim mestom, ki ni občutljiv za delovanje kalcijevih ionov. κ -kazein se zato nahaja pretežno na površini kazeinske micelle, s čimer prepreči povezovanje posameznih kazeinskih micel in s tem obarvanje kazeinov v mleku. V notranjosti micelle prevladujejo frakcije α_s - in β -kazeina. Micelle se pod vplivom kalcijevih ionov združujejo v večje skupke. Delež kalcijevih ionov v mleku vpliva na velikost kazeinskih micel, na toplotno obstojnost proteinov, hitrost encimske koagulacije in čvrstost koagulum. Kazeini s svojimi lastnostmi vplivajo na kvaliteto in količino pridelanega sira (Tratnik, 2012).

Serum proteini so znatno bolj hidrofilni v primerjavi s kazeini, kar pomeni, da niso občutljiv za nizek pH. Poleg tega, so v nasprotju s kazeini, temperaturno zelo občutljivi, saj denaturirajo že pri temperaturah nad $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ker niso dovzetni za proteolizo z encimi sirišča, pri sirjenju ostanejo topni in se s sirotko izločijo iz sirnine. V serumu mleka je največ β -laktoglobulina ($\sim 50\%$) in α -laktalbumina ($\sim 22\%$), ki nastajata v mlečni žlezi.

Sledijo še manjši polimeri proteoze in peptoni (~ 10 %), ki nastanejo pri hidrolizi β -kazeina in delno po hidrolizi proteinov membrane maščobne kroglice. Manjša količina proteinov, ki se nahaja v serumu so albumini (~ 12 %) in imunoglobulini (~ 5 %), ki pa so pomembni za imunski razvoj novorojenca in zaščito mlečne žleze pred infekcijami. Ugodno razmerje med cisteinom in metioninom prispeva k boljšemu izkoriščanju serum proteinov v organizmu. K visoki biološki vrednosti serumskih proteinov prispeva tudi višja vsebnost lizina (več kot 40 %) in večji delež tio-aminokislin. Poleg tega so sirotkini proteini lažje prebavljivi od kazeinov, saj oblikujejo mehkejši koagulum (Tratnik, 2012).

Imunoglobuline (Ig) ali protitelesa izdelujejo limfociti B, ki zorijo v kostnem mozgu sesalcev in so nosilci specifične imunosti. Zreli limfociti B proizvajajo Ig, ki predstavljajo protitelesa za antigen – specifično molekulo (npr. virusnega ali bakterijskega izvora). Ko se specifični antigen (npr. del bakterijske celice) veže s specifičnim protitelesom, pride do sprožitve imunskega odziva. Vsak Ig, ki je v osnovi glikoprotein, je specifičen samo za en antigen. Specifičnost vezavnega mesta za antigen (epitop) je določena z aminokislinskim zaporedjem. Glede na osnovno aminokislinsko sestavo poznamo več razredov protiteles: IgG, IgA, IgM, IgD in IgE (Vozelj, 2001). Ig v mleku ščitijo novorojenega mladiča kakor tudi mlečno žlezo pred boleznimi oziroma patogenimi mikroorganizmi. Mleko vsebuje največ Ig razreda G (IgG: 0,6 – 1,0 g/l). Kolostrum vsebuje 100 × več IgG kot mleko (Tratnik, 2012).

2.1.1.4 Laktoza

Laktoza je ogljikov hidrat, sestavljen iz glukoze in galaktoze. Po okusu je manj sladka kot drugi sladkorji. Mlečnokislinskim bakterijam predstavlja vir ogljika, te pa sodelujejo pri nastanku večine mlečnih izdelkov. Bakterije pretvorijo laktozo v mlečno kislino, ki jo najdemo v vseh fermentiranih mlečnih izdelkih, skuti in sirih. Vpliva na kakovost, okus, trajnost in konsistenco izdelkov (Bajt in Golc-Teger, 2002). Med toplotno obdelavo mleka z visokimi temperaturami se laktoza pretvori v laktulozo (glukozni deli laktoze se pretvori v fruktozo). Laktuloza v prebavilih vpliva na gibanje črevesja, s čimer olajša prebavo maščob, proteinov in ostalih snovi. Pripomore pri vzdrževanju nizke vrednosti pH v črevesju, kar preprečuje rast škodljivih bakterij in pospešuje rast koristnih bakterij kot so npr. bifidobakterije (Tratnik, 2012).

2.1.1.5 Vitamini in minerali

Mleko vsebuje vseh 20 mineralov, nahajajo se v takšni obliki, da omogočijo dobro absorpcijo v črevesu. Minerale delimo na makro-minerale (Na, K, Cl, Ca, Mg in P) in elemente v sledih (Fe, Cu, Zn, Mn, Se, I, Cr, Co, Mo, F, As, Ni, Si in B). Makro-minerali vzdržujejo fizikalno-kemijsko ravnotežje koloidnega sistema v mleku in s tem vplivajo na tehnološke lastnosti mleka – sposobnost mleka za predelavo. Kombinacija mineralov z ostalimi sestavinami mleka prispeva k hranilni gostoti in visoki biološki vrednosti mleka (Rogelj in sod., 2009). Najpomembnejša sta kalcij in fosfor. Če pride do pomanjkanja kalcija, je predelava mleka v sire otežena (Bajt in Golc-Teger, 2002).

V maščobi topni vitamini so A, D, E in K, njihova količina je odvisna od prehrane živali in deleža maščob v mleku. Vitamin D pomaga pri absorpciji kalcija v organizem in sodeluje pri mineralizaciji kosti. V vodi topne vitamine (vitamini skupine B in vitamin C) sintetizira komensalna mikrobiota vampa. Z enim litrom svežega mleka zadovoljimo dnevne potrebe človeškega organizma po vitaminih B2 in B12. Količine drugih vitaminov v mleku ne morejo zadovoljiti priporočenega dnevnega vnosa (Tratnik, 2012).

2.1.1.6 Ostale sestavine mleka

V mleku se nahajajo tudi encimi, hormoni in drugo. Encimi so po sestavi proteini, zato lahko nekateri pri visokih temperaturah denaturirajo in izgubijo svojo aktivnost. Aktivnost encima je odvisna od temperature in vrednosti pH mleka. Endogeni encimi izvirajo iz mlečne žleze, eksogeni encimi pa izvirajo iz mikroorganizmov, ki so prisotni v mleku in se ne smatrajo kot sestavina mleka. Med encime spadajo lipaze, fosfataze, peroksidaze, katalaze, reduktaze, proteinaze in amilaze. Povzročajo spremembe v sestavi mleka, ki se pokažejo v slabši senzorični kakovosti mleka in proizvoda (Tratnik, 1998).

2.1.2 Ovčje in kozje mleko

Ovčje in kozje mleko se od kravjega razlikujeta v deležu in sestavi posameznih sestavin (Preglednica 2; Amigo in Fontecha, 2011). Ovčje mleko vsebuje bistveno večje količine proteinov in maščob, zaradi česar ima večji delež suhe snovi (Tratnik, 2012). Med kozjimi in kravjimi proteini obstoja 80–90 % podobnost v sestavi. Sorazmerje glavnih kazeinov v

kozjem mleku se razlikuje med posameznimi živalmi iste vrste (Amigo in Fontecha, 2011). Proteini kozjega mleka se razlikujejo od proteinov kravjega mleka tudi na genetski osnovi, saj imajo posamezne vrste proteinov različno število genetskih variant. V kozjem mleku so proučevali raznolikost α_{s1} -kazeina, ki ima 18 različnih oblik alelov, ki se delijo v 10 različnih razredov (B1, B2, B3, C, D, E, F, G, in 0). Glavni protein v kozjem mleku je β -kazein, medtem ko v kravjem in ovčjem mleku prevladuje α_{s1} -kazein. Te razlike močno vplivajo na proces izdelave sira in določajo teksturne (čvrstost, mehkost) in senzorične (okus, vonj) lastnosti sira (Tratnik, 2012). Večja vsebnost α_{s1} -kazeina in maščob v ovčjem mleku, pri proizvodnji trdih sirov, vpliva na količino pridelanega sira. Kozje mleko, z nižjo vsebnostjo ali brez α_{s1} -kazeina, ima slabši izkoristek pri sirjenju, daljši čas koagulacije, slabšo toplotno obstojnost, sir narejen iz takšnega sira pa ima slabšo čvrstost (Haenlein, 2004).

Preglednica 2: Sestava kazeinskih frakcij v svežem kravjem, ovčjem in kozjem mleku (Damjanović in sod., 2006: 223).

Vrsta mleka	Skupni proteini [mg/ml]	Delež kazeinov [%]	Kazeini [%]				
			α_{s1}	α_{s2}	β	γ	κ
Kravje	27,8 ± 2,2	83 ± 10	37 ± 7	7 ± 1	42 ± 8	6 ± 2	9 ± 4
Ovčje	59,4 ± 3,3	90 ± 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

Pomembno sestavino mleka vseh treh vrst predstavlja maščoba. Kozje mleko vsebuje 2–8 % maščobe, ki niha glede na pasmo, stadij laktacije in sezono. Maščobo kozjega mleka sestavljajo triacilgliceroli (98–99 %). V primerjavi s kravjim mlekom, vsebuje maščoba kozjega mleka višji delež kratko- in srednje-verižnih maščobnih kislin. Značilne nasičene maščobne kisline v kozjem mleku so kaprilna, kapronska in kaprinska ter so glavne nosilke okusa (Antunac in Samaržija, 2000). Maščoba se v kozjem mleku nahaja v obliki kroglic, ki ne tvorijo skupkov na površini mleka zaradi manjše vsebnosti aglutinina. V kravjem mleku se namreč maščobne kapljice, zaradi delovanja aglutinina, pričnejo zlepljati med sabo in zbirati na površju – nastane smetana (Amigo in Fontecha, 2001). Maščobne kroglice ovčjega mleka niso povezane, smetana se oblikuje, vendar je manj čvrsta (Rogelj, 1996). V kozjem in ovčjem mleku je vitamin A pretvorjen v karotene, zato je mleko bele

barve. Kozje mleko, v primerjavi s kravjim mlekom, vsebuje večji delež Ca, P, K in Mg v topni fazi, saj se več kot 50 % Mg nahaja v raztopini in se lažje absorbira. Ovčje mleko prav tako vsebuje večje količine Ca, Mg in P, vendar niso v topni obliki in jih telo težje absorbira (Tratnik, 2012).

2.1.3 Siri

Sir je izdelek, dobljen z usirjenjem surovega ali toplotno obdelanega mleka, posnetega, delno posnetega mleka, sirotke, pinjenca, smetane ali kombinacije teh surovin. Poleg kravjega se za izdelavo sira najpogosteje uporabljata še ovčje in kozje mleko ali pa mešanica različnih vrst mleka. Mleko in mlečni izdelki, še zlasti siri, imajo v prehrani posebno mesto, zaradi pestre sestave in esencialnih snovi, ki jih vsebujejo. Sir je bil že od nekdaj pomemben kot vir proteinov, takšno vlogo je ohranil tudi v sodobni prehrani. Sir je nepogrešljiv za normalno prehrano in dietetično prehrano, predvsem zaradi njegove bogate sestave in biološke vrednosti ter odlične prebavljivosti. Sir je koncentrat mlečnih proteinov z visoko biološko vrednostjo. Vsebuje 20–30 % proteinov, predvsem kazeinov. Sir vsebuje vse esencialne aminokislino v ustreznem razmerju za človeški organizem (Renčelj in sod., 1995).

Proizvodnja sira je najstarejši postopek, konzerviranja hitro pokvarljivega živila – mleka, ki se naravno skisa. V proizvodnji sira je koagulacija ali usirjanje mleka osnovni tehnološki proces za izdelavo sira. Osnovni mehanizem delovanja je, ne glede na vrsto mleka, zelo podoben. Proces vključuje različne postopke koagulacije kazeinov, bodisi s kislinsko koagulacijo, bodisi z encimi iz sirišča ali pa kombiniranjem obeh načinov.

2.2 POTVORBE MLEKA

V prehranskem sektorju je verodostojnost in pristnost izdelkov glavna tema diskusije. Glavna skrb ni namenjena samo potrošnikom, ampak tudi pridelovalcem in distributerjem. Hrana ali sestavine bodo vedno predmet potvorbe, še zlasti pri visoko vrednih živilih, ki so podvržena številnim postopkom preden se pojavijo na tržišču.

2.2.1 Varnostni vidiki in zakonodaja

Zaščita potrošnikov je v domeni Ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano (MKGP) (MKGP, 2010). Pravna podlaga za nadzor je 58. člen Zakona o kmetijstvu, skupaj z uredbo Evropske skupnosti (ES) št. 178/2002, ki zagotavlja varstvo interesov potrošnikov, njen cilj pa je preprečevanje ponarejanja živil. V skladu z razpoložljivimi analitskimi metodami se izvaja uradni nadzor, ki mora izpolnjevati zahteve uredbe (ES) št. 882/2004 (Uredba sveta (ES) št. 178/2002 ..., 2002; Uredba sveta (ES) št. 882/2004 ..., 2004).

Potvorbe lahko ugotavljamo s preverjanjem sledljivosti in uporabo količine surovin po recepturi iz predložene dokumentacije proizvajalca ali pa z laboratorijskimi analizami na ustrezni opremi. Laboratoriji, ki opravljajo naloge za potrebe uradnega nadzora, morajo biti akreditirani v skladu s SIST EN ISO/ IEC 17025 o »Splošnih zahtevah za usposobljenost preizkuševalnih in usmerjevalnih laboratorijev (MKGP, 2010). Na področju goljufivih praks sta pri živilih pristojni (MKGP, 2010; Kršlin, 2014):

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

2.2.2 Tipi potvorb

Potvorbe mleka lahko v grobem razdelimo na tri skupine, in sicer dolivanje vode, dodajanje kemikalij in ne-mlečnih sestavin ter potvorbe s cenejšimi vrstami mleka, kot je najpogosteje kravje mleko. Pogosto gre tudi za kombinacijo dolivanja vode in dodajanja kemikalij, z namenom, da se poskuša prekriti dolivanje vode. Glavno vodilo pri vseh potvorbah pa je seveda povečanje dobička in donosnosti pri proizvodnji in predelavi mleka.

2.2.2.1 Dolivanje vode

Dolivanje vode je najstarejša in najbolj enostavna oblika potvorbe mleka. Zaradi večjega dobička se dodaja večje količine vode, kar zniža prehransko vrednost mleka. Dodana voda

v mleku prispeva k pomanjkanju hranil zlasti pri odraščajočih otrocih, ki so »odvisni« od mlečnih izdelkov zaradi življenjsko pomembnih sestavin v mleku. V primeru, da je dodana voda kontaminirana s težkimi kovinami, kmetijskimi kemikalijami (nitrati) ali mikroorganizmi, je ogroženo zdravje ljudi. Razredčitve mleka z vodo se prikrije z detergenti, ki poudarijo »običajne lastnosti« mleka, kot je penjenje. Z dodajanjem natrijevega klorida in sečnine v mleko se prikrije večje količine dodane vode in nižjo vsebnost proteinov v mleku (Handford in sod., 2016).

2.2.2.2 Dodajanje kemikalij in ne-mlečnih sestavin

Potvorba mleka s kemikalijami in dodajanje ne-mlečnih sestavin znižuje prehransko vrednost mleka in je v določenih primerih lahko tudi zdravju škodljiva. V mleko dodane kemikalije ali ne-mlečne sestavine lahko navidezno povečujejo prehransko vrednost, ki je znižana zaradi dolivanja vode, podaljšajo rok trajanja, prekrivajo slabo kvaliteto (uravnavajo pH) in dajejo mleku naraven videz (Preglednica 3).

Preglednica 3: Pregled nekaterih kemikalij in ne-mlečnih sestavin, ki se namenoma dodajajo v mleko (prirejeno po Handford in sod., 2016: 139)

Dodana snov	Učinek	Namen
Rastlinska olja	nadomestek za mlečno maščobo	
Sladkorji (glukoza, saharoza)	nadomestek za laktozo	
Sol (natrijev klorid)	znižanje zmrziščne točke mleka	povečanje prehranske vrednosti, prikrivanje dolivanja vode
Urea		
Hidrolizirani proteini iz usnja	navidezno povečanje vsebnosti proteinov	
Melamin		
Amonijev sulfat		
Formalin	protimikrobno delovanje in stabilizacija mlečnih proteinov	
Vodikov peroksid		podaljšanje roka trajanja, zniževanje stroškov hlajenja
Salicilna kislina	protimikrobno delovanje	
Natrijev hidroksid		

Borova kislina		
Benzojska kislina		
Nevtralizatorji (karbonati/bikarbonati)	nevtralizacija pH	prekrivanje neustreznega pH mleka kot posledica dodajanja kemikalij ali predolgega neustreznega skladiščenja
Ostanki čistil	videz penjenja	prekrivanje neustreznega izgleda mleka, nenamerna kontaminacija zaradi slabega vzdrževanja opreme

2.2.2.3 Potvorbe s cenejšimi vrstami mleka

Špoljarić in sod. (2013, cit. po Klančar, 2015) navajajo, da je glavna težava pri proizvodnji sira potvorba ovčjega in kozjega sira s kravjim mlekom. Največkrat na takšnih sirih kravje mleko ni deklarirano, zaradi česar varnost in zaščita potrošnika nista zagotovljeni. Potvorba s kravjim mlekom je zanimiva predvsem zaradi njegove nižje cene in boljše razpoložljivosti skozi vse leto. Tako pomeni 20 % potvorba kozjega mleka s kravjim približno 18 % prihranek že pri nabavi mleka (Volk, 2013). Potvorbe ovčjega in kozjega mleka s kravjim mlekom so tako posledica:

- nezadostne razpoložljivosti ovčjega in kozjega mleka v sezoni,
- višje cene ovčjega in kozjega mleka v primerjavi s kravjim,
- presežkov kravjega mleka, ki se tako porabijo brez izgube dobička.

2.3 ANALITSKE METODE ZA ODKRIVANJE POTVORB MLEKA S CENEJŠIMI VRSTAMI MLEKA

Za dokazovanje potvorb mleka in mlečnih izdelkov obstajajo različne analitske metode. Referenčna metoda Evropske Unije je izoelektrično fokusiranje (Uredba Komisije ES 273/2008, 2008). Poleg referenčne metode pa laboratoriji uporabljajo tudi druge metode:

- tekočinska kromatografija,
- elektroforetske metode,
- verižna reakcija s polimerazo (angl. »polymerase chain reaction« – PCR),
- spektroskopske metode in

- encimsko-imunski test (ELISA), na osnovi katerega delujejo tudi hitri testi za ugotavljanje potvorb.

2.3.1 Referenčna metoda- izoelektrično fokusiranje

Izoelektrično fokusiranje (IEF) je referenčna metoda EU za ugotavljanje kravjega mleka in kazeinata v sirih iz ovčjega, kozjega in bivoličinega mleka ali mešanic ovčjega, kozjega in bivoličinega mleka. Odkrivanje potvorb temelji na izoelektričnem fokusiranju γ -kazeinov po plazminolizi β -kazeinov (Spojlarić in sod., 2013). Za izvajanje metode potrebujemo referenčne standardne vzorce, ki jih lahko sami pripravimo, po navodilih ali jih naročimo pri Inštitutu za referenčne materiale in meritve (Geel-Belgija). Standardni vzorci ovčjega in kozjega mleka z dodatkom 0 % in 1 % kravjega mleka so koagulirani s sirilom. Z vizualno primerjavo proteinskih slik neznanega vzorca in standardnih referenčnih vzorcev se potrdi ali ovrže prisotnost kravjega mleka v neznanem vzorcu. Meja zaznave je manj kot 0,5 % kravjega mleka, vendar se v praksi metoda uporablja za ugotavljanje potvorb z ≥ 1 % dodanega kravjega mleka (Volk, 2013; Uredba Komisije, ES 273/2008, 2008).

2.3.2 Ostale metode

2.3.2.1 Tekočinska kromatografija

Kromatografija je dobro poznana metoda za ločevanje proteinov iz različnih mešanic. Vse kromatografske separacijske (separacija = ločitev) metode temeljijo na potovanju molekul vzorca z mobilno fazo preko stacionarne faze. Interakcije med substancami, ki jih ločujemo in stacionarno fazo, bolj ali manj upočasnijo njihovo potovanje, odvisno od velikosti in lastnosti molekul. Molekule, ki so bile na začetku kromatografije še v zmesi, se zaradi različne intenzivnosti teh interakcij med seboj ločijo. Ena od delitev različnih kromatografskih metod upošteva obliko stacionarne faze na nosilcu (matriksu). Glede na to ločimo:

- papirno,
- tenkoplastno in
- tekočinsko kromatografijo, pri čemer prednjači tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl. »high-performance liquid chromatography – HPLC«).

HPLC se pogosto uporablja za kvantitativno določanje sestavin v hrani. Uporablja se za odkrivanje kravjega mleka v mešanicah drugih vrst mleka, saj lahko z njo ugotovljamo prisotnost in razlike v koncentraciji kravjega in ovčjega/kozjega α_{s1} -kazeina (Kamal in Karoui, 2015). Poznamo različne izpeljanke osnovne metode HPLC:

- Hidrofobna interakcijska kromatografija (angl. »hydrophobic interaction chromatography – HIC«), za kvantitativno in kvalitativno določanje mešanic kazeinskih frakcij v surovem kravjem, ovčjem in kozjem mleku (Zachar in sod., 2011);
- Kromatografija visoke ločljivosti z reverzno fazo (angl. »reverse-phase HPLC – RP-HPLC) se uporablja za odkrivanje in določanje deležev kravjega, ovčjega in kozjega mleka (Zachar in sod., 2011);
- HPLC v povezavi z masno spektrometrijo (angl. »liquid chromatography – mass spectroscopy – LC-MS«) se uporablja za identifikacijo in določanje posameznih sestavin mleka, kot so vitamini, laktoza in proteini (Kamal in Karoui, 2015). Več študij dokazuje uporabnost metode pri ugotavljanju potvorb kozjega in ovčjega mleka s kravjim. Rodriguez in sod. (2010) so s HPLC ugotavljali, katere vrste mleka so bile uporabljene za izdelavo sirov in ustreznost njihove deklaracije. Prav tako so Czerwenka in sod. (2010) uspešno uporabili LC-MS za detekcijo potvorbe bivoličinega mleka s kravjim mlekom.

2.3.2.2 Elektroforetske metode

Elektroforeza je separacijska metoda, ki temelji na potovanju nabitih delcev v električnem polju. Nabiti delci potujejo proti elektrodi z nasprotnim nabojem (pozitivno nabiti delci proti negativni elektrodi). Elektroforezo izvajamo na elektroforetskem nosilcu ali raztopini. Poznamo pet različnih elektroforetskih nosilcev: agarozni gel, celulozni acetat, poliakrilamidni gel, škrobni gel in papir. Elektroforezi na poliakrilamidnem gelu, v prisotnosti uree (urea-PAGE) in natrijevega dodecilsulfata (NaDS-PAGE), se pogosto uporabljata za dokazovanje potvorb z drugimi vrstami mleka. Cartoni in sod. (1999) so razvili kapilarno consko elektroforezo za določanje potvorb kozjega mleka in izdelkov s kravjim mlekom. Določanje in detekcija temelji na prisotnosti specifičnih sirotkinih

proteinov na osnovi kalibracijske krivulje. Z metodo so odkrili ≥ 2 % kravjega mleka v mešanicah in ≥ 4 % v sirih.

2.3.2.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

PCR se uporablja za določanje avtentičnosti in odkrivanje potvorb hrane na osnovi ugotavljanja prisotnosti specifičnih nukleinskih kislin (DNK ali RNK) in določanju nukleotidnega zaporedja. Zaradi visoke občutljivosti postaja vse bolj razširjena in uporabljena metoda, ki v zadnjih letih nadomešča metode, osnovane na ugotavljanju prisotnosti proteinov (Kamal in Karoui, 2015). S PCR je mogoče ugotavljati nizko vsebnost kravjega mleka (0,5 % ali 0,1%). Metoda je uspešna tudi pri analizah zrelih sirov in toplotno obdelanih mlečnih izdelkov (Zachar in sod., 2011). Študija na sirih je pokazala, da PCR tehnike dovoljujejo razlikovanje med siri, narejenimi iz kravjega in bivoličinega mleka, celo pri 0,1 % dodatku kravjega mleka (Kamal in Karoui, 2015). Rodriguez in sod. (2012) so ugotovili, da je meja detekcije kravjega v kozjem mleku pri 0,5 %. Glavne prednosti metod, osnovanih na ugotavljanju prisotnosti specifične DNK so, da so hitre, občutljive, ponovljive in enostavne. Glavna slabost teh metod pa je, da je koncentracija spec. DNK močno odvisna od števila somatskih celic v uporabljenem mleku, kar pomeni, da je zaradi velikega razpona števila somatskih celic, kvantifikacija pogosto nezanesljiva (Volk, 2013).

2.3.2.4 Spektroskopske metode

Spektroskopske metode v zadnjih letih postajajo vedno bolj uporabljene metode za določanje avtentičnosti in odkrivanje potvorb. Glavne prednosti teh tehnik so hitrost, cenovna ugodnost, neinvazivnost in sposobnost odkrivanja kontaminacij v hrani, z dobro točnostjo. S tem predstavljajo alternativo, ki lahko nadomesti referenčno metodo (Kamal in Karoui, 2015).

Fluorescenčna spektroskopija je občutljiva in hitra analitska tehnika, ki se jo uporablja pri analizah mnogih bioloških vzorcev, med drugim mlečnih izdelkov. Občutljivost tehnike je 100-1000-krat višja od drugih spektroskopskih tehnik (Kamal in Karoui, 2015).

2.3.2.5 Encimsko-immunski test (ELISA)

Postopek ELISA (angl. »enzyme linked immunosorbent assay – ELISA«) je raziskovalna ter diagnostična metoda, s katero določamo prisotnost molekul v vzorcu na podlagi specifične vezave protitelesa in specifičnega antigena (molekule, katere prisotnost ugotavljamo). Osnovni princip metode je, da se protitelo specifično veže na specifičen antigen (analit), ki je lahko predhodno pritrjen (imobiliziran) na nosilcu (npr. polietilen). To vezavo pretvorimo v signal na dva načina (Vozelj., 2001):

- neposredno – protitelo ima na sebi vezan (konjugiran) encim (npr. hrenovo peroksidazo), ki ob dodatku kromogenega substrata (npr. ABTS) tvori obarvan produkt;
- posredno – na protitelo se veže drugo protitelo, ki je specifično za prvo protitelo in ima na sebi vezan encim, ki ob dodatku kromogenega substrata tvori obarvan produkt.

Intenziteta signala tako običajno temelji na obarvanju vzorca, do katerega pride zaradi encimske hidrolize kromogenega substrata in je premosorazmerna koncentraciji analita v vzorcu (Hurley in sod., 2004). Da povečamo specifičnost analize lahko vzorec najprej izpostavimo protitelesom, ki so specifična za preiskovani analit in so predhodno imobilizirana na nosilcu. Temu sledi posredni ali neposredni način detekcije analita (antigena). Tak postopek imenujemo »sendvič ELISA«.

Moatsou in Anifantakis (2003) navajata, da so encimsko-immunski testi ELISA najbolj pogosto uporabljeni za detekcijo potvorbe mleka med različnimi vrstami mlečnih živali. Njihove prednosti so visoka specifičnost, nizki stroški, zanesljivost, sorazmerno kratek čas analize in možnost avtomatizacije. S testom ELISA lahko ugotavljamo prisotnost kravjega in kozjega mleka v mešanicah preko detekcije sirotkinih proteinov, kazeinov ali kratkih peptidov, ki izvirajo iz mlečnih proteinov (Zahar in sod., 2011). V preteklosti je bilo razvitih veliko testov ELISA za ugotavljanje izvora mleka in mlečnih izdelkov, pri čemer so meje detekcije segale tudi do 0,01 % dodanega kravjega mleka v mešanici (Moatsou, 2010). Xue in sod. (2010) so npr. uspešno uporabili posredni test ELISA za ugotavljanje potvorb kozjega mleka z ovčjim. Ugotovili so, da obstaja linearna povezava med deležem

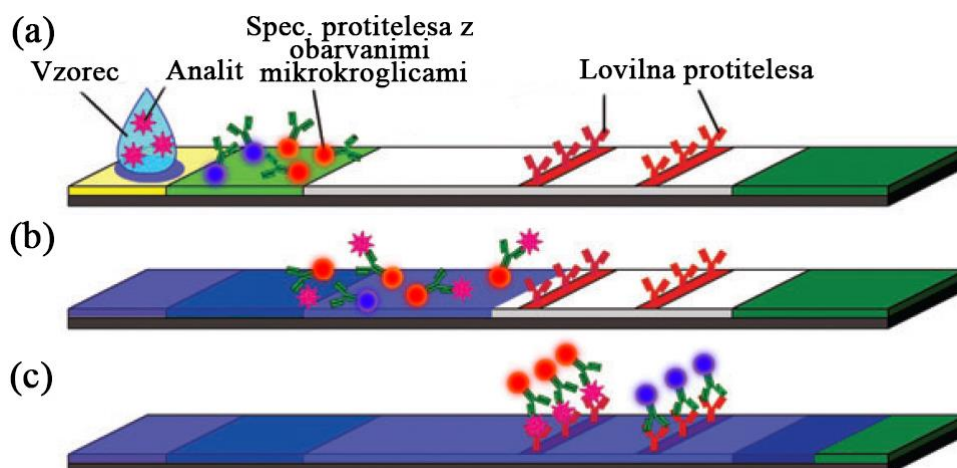
dodanega kravjega mleka v mešanici in signalom v območju 4–50 %, pri čemer je znašala meja detekcije pri 4 % kravjega mleka v mešanici.

Na tržišču so dostopni tudi komercialni testi ELISA za ugotavljanje potvorb kozjega in ovčjega mleka s kravjim. Ti testi običajno temeljijo na ugotavljanju prisotnosti govejih IgG v mleku in sirih. Primer takšnih testov sta RIDASCREEN CIS (R-Biopharm AG, Darmstadt, Nemčija) in RC-BOVINO (Zeu-Imunotec SL, Saragosa, Španija), ki imata mejo detekcije 0,1 % in 0,5 %.

2.3.3 Hitri testi

Drug pristop je razvoj hitrih imunokromatografskih testov, ki največkrat temeljijo na principu sendvič ELISA, vendar so protitelesa vezana na trak, kjer se vzorec pomika lateralno (bočno) s pomočjo kapilarnega vleka (angl. »lateral flow test strip«). Princip delovanja tovrstnih testov je prikazan na Sliki 1. Tovrstni princip se uporablja za različne namene kot so npr. ugotavljanje zdravstvenega stanja (nosečnost, srčni napad, krvna glukoza, metabolne motnje), ugotavljanje prisotnosti majhnih molekul (zloraba drog, toksini, antibiotiki), ugotavljanje prisotnosti povzročiteljev infekcij (antraks, salmonela, virusi) in imunodiagnostike (Mark in sod., 2010).

Za določanje potvorb ovčjega in kozjega mleka s kravjim, obstaja na tržišču več različnih ponudnikov hitrih testov in večina jih deluje na osnovi kapilarnega vleka (Preglednica 4). Najpomembnejša parametra sta tip vzorca za katerega se lahko test uporablja (surovo mleko, sterilizirano mleko, sir, mleko v prahu) in pa meja detekcije. Po podatkih proizvajalcev je meja detekcije hitrih testov med 0,1–2 %, odvisno od proizvajalca in vrste vzorca, ki ga analiziramo.



Slika 1: Shematski prikaz testa na osnovi kapilarnega vleka (prirejeno po Mark in sod., 2010: 1160). (a) Testni listič je običajno sestavljen iz področja za nanos vzorca (rumena), področja kjer so spec. konjugirana protitelesa z obarvanimi mikrokroglicami (svetlo zelena), reakcijskega območja (bela), kjer so v obliki črte nanešena tudi lovilna protitelesa (rdeča). V prvi črti so nanešena spec. protitelesa proti analitu, v drugi pa spec. protitelesa proti kontrolnim protitelesom. Absorpcijski del na koncu lističa (temno zelena) ohranja kapilarni tok. (b) Po nanosu vzorec potuje preko področja s konjugiranimi protitelesi. Tam pride do vezave med analitom in spec. protitelesi, ki imajo vezane obarvane (npr. rdeče) mikrokroglice. Kontrolna protitelesa, ki imajo tudi vezane obarvane mikrokroglice (npr. modre) ostanejo nevezana in potujejo z vzorcem. (c) Kompleks protitelesa in analita se veže na področje, kjer so nanešena spec. lovilna protitelesa proti analitu (nastane s prostim očesom vidna rdeča črta), kontrolna protitelesa pa se vežejo spec. na področje, kjer so vezana protitelesa proti kontrolnim protitelesom (nastane s prostim očesom vidna modra črta).

Preglednica 4: Nekateri na trgu dostopni hitri testi za določanje potvorb ovčjega in kozjega mleka s kravjim.

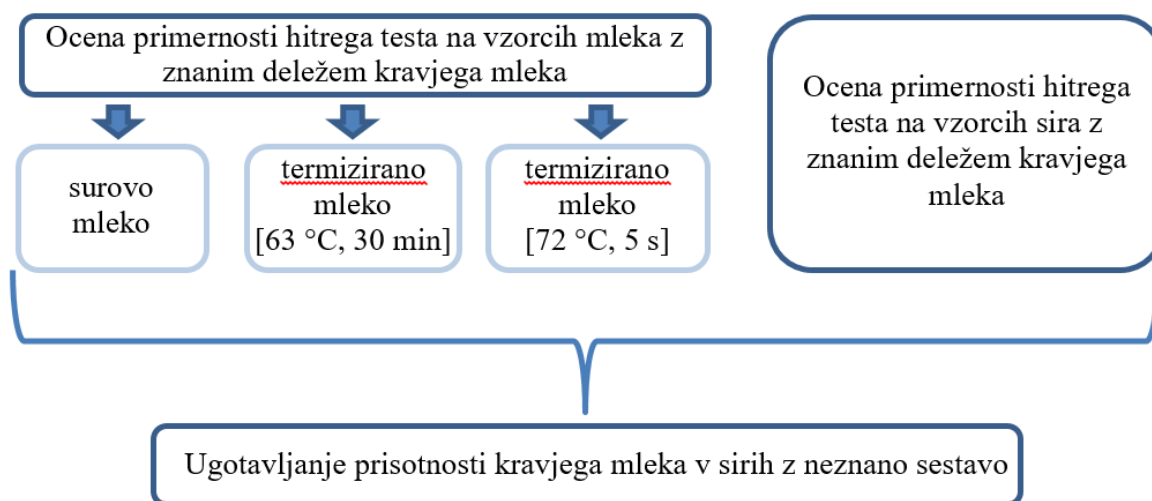
Ime testa	Proizvajalec	Namen	Meja detekcije	Čas analize¹	Princip detekcije¹
Rapid Test Cow	Prognosis Biotech	detekcija kravjega mleka v ovčjem ali kozjem mleku	0,1 %	5–10 min	detekcija govejih IgG
RIDA QUICK CIS	R-Biopharm AG	detekcija kravjega mleka v ovčjem ali kozjem mleku ali siru	0,5 %	5 min	Np
Cow Milk Express	IDBiotech	detekcija kravjega mleka v ovčjem ali kozjem mleku, steriliziranem mleku ali mleku v prahu	0,25 % v surovem in 1 % v steriliziranem mleku	np	aglutinacijski test na osnovi prisotnosti govejega β -laktoglobulina
IC-BOVINO	Zeus-Imunotec SL	detekcija kravjega mleka v ovčjem ali kozjem mleku ali siru	0,5–1,0 % v mleku in 1–2 % v sirih	5–10 min	detekcija govejih IgG

¹np – ni podatkov

3 MATERIALI IN METODE

3.1 POTEK DELA

Delo smo razdelili v tri sklope (Slika 2). Najprej smo želeli preveriti učinkovitost in primernost hitrega testa na vzorcih ovčjega/kozjega mleka in sirov z znanim deležem kravjega mleka. Zato smo najprej pripravili in testirali različne mešanice ovčjega/kozjega mleka s kravjim mlekom. Obenem smo še želeli preveriti vpliv termizacije mleka na rezultate analiz. V zaključni fazi smo ICB uporabili pri ugotavljanju prisotnosti kravjega mleka v sirih z neznano sestavo oziroma v sirih, ki vsebnosti kravjega mleka niso imeli deklariranega.



Slika 2: Shematski prikaz poteka dela.

3.2 PRIPRAVA VZORCEV MLEKA

Surovo mleko, ki smo ga dobili od proizvajalcev iz ljubljanske in pomurske regije, smo hranili v hladilniku pri 7–8 °C. Vzorčno stekleničko z mlekom smo postavili v vodno kopel s temperaturo od 35–40 °C, tako da je bil nivo vode nad nivojem mleka v steklenički. Med temperiranjem smo mleko večkrat premešali in sicer v razdalji 25 cm vsaj 30-krat, da se je mleko segrelo in maščoba enakomerno razporedila po celotnem volumnu. S termometrom smo merili temperaturo. Ko se je mleko segrelo na 27 °C, smo odvzeli

vzorec mleka za pripravo mešanic ovčjega/kozjega mleka s kravjim ali pa neposredno za analizo.

3.2.1 Priprava mešanic ovčjega mleka s kravjim mlekom

V 250-mililitrskih stekleničkah smo pripravili različne mešanice ovčjega mleka s kravjim (0 %; 0,25 %; 0,5 %; 1,0 %; 10 %; 20 %; 50 %; 100 %). Da smo zagotovili enakomerno mešanje, smo v vsako stekleničko dali magnet in jo postavili na magnetno mešalo ter vzorce mešali s hitrostjo 400 vrt./s. Za vsak vzorec posebej smo uporabili nov nastavek za pipeto.

3.2.2 Termizacija mleka

Testirali smo surovo in termizirano mleko. Za termizacijo smo odpipetirali 2×5 mL mleka iz vsakega vzorca posebej v epruvete. Epruvete za testiranje smo zaprli s pokrovčki, kontrolni vzorec, ki je služil za merjenje temperature, pa smo postavili v vodno kopel. Ko je temperatura kontrolnega vzorca dosegla 63 °C ali 72 °C, smo postavili stojalo z epruvetami v kopel. Nastavili smo čas termizacije 30 minut (pri 63 °C) ali 5 sekund (pri 72 °C). Po končani termizaciji smo vzorce mleka ohladili v ledni vodi ter analizirali s hitrim testom ICB.

3.3 PRIPRAVA VZORCEV SIRA

Za namen raziskave smo vzorce sirov pridobili iz različnih virov (Preglednica 3). Za oceno učinkovitosti hitrega testa ICB pri sirih z znanim deležem kravjega mleka, so na kmetiji Nucak (Hrvaška) izdelali 13 sirov iz ovčjega mleka z znanimi deleži kravjega mleka. Štiri vzorce sira z znanimi deleži kravjega mleka v ovčjem mleku so izdelali na Inštitutu za mlekarnstvo in probiotike, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani. Štiri sire z znanimi deleži kravjega mleka v kozjem mleku pa so izdelali na Domačiji Paternoster. Tri sire z deklariranimi koncentracijami kravjega mleka smo pridobili na ocenjevanju v Republiki Hrvaški.

Za ugotavljanje prisotnosti kravjega mleka v sirih z neznanim deležem kravjega mleka smo sire pridobili na ocenjevanju v Republiki Hrvaški ali pa kupili pri različnih proizvajalcih (Kmetija Pustotnik, Kmetija Škander, Kmetija Prušnik).

Vse vzorce smo šifriral in do analize hranili pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Preglednica 5: Opis analiziranih vzorcev sira.

Šifra vzorca	Teža [g]	Datum vzorčenja	Opis vzorca in izvor	Termizacija ¹	Deklariran/dodan delež kravjega mleka [%] ¹
1	260	3.10.2006	ovčje, kravje	np	50,0
2	350	3.10.2006	ovčje, kravje	np	70,0
4	90	2.10.2006	kozje, kravje	np	50,0
5	24	3.10.2006	mešano	np	Np
6	40	3.10.2006	mešano	np	Np
7	74	3.10.2006	kozje	np	0,0
8	42	3.10.2006	ovčje	np	0,0
9	63	3.10.2006	Bovški sir, ovčje	np	0,0
10	20	16.11.2006	ovčje	ne	0,0
11	20	16.11.2006	ovčje, kravje	ne	0,5
12	20	16.11.2006	ovčje, kravje	ne	1,0
13	20	16.11.2006	ovčje, kravje	ne	1,5
14	20	16.11.2006	ovčje, kravje	ne	2,0
15	20	27.11.2006	ovčje, kravje	ne	2,5
16	20	27.11.2006	ovčje, kravje	ne	5,0
17	20	27.11.2006	ovčje, kravje	ne	10,0
18	20	27.11.2006	ovčje, kravje	ne	20,0
19	20	27.11.2006	ovčje, kravje	ne	30,0
20	20	27.11.2006	ovčje, kravje	ne	40,0
21	20	16.11.2006	ovčje, kravje	ne	50,0
23	20	16.11.2006	kravje	ne	100,0
24	180	30.3.2007	kozje	np	0,0
25	180	30.3.2007	kozje, kravje	np	1,0
26	180	30.3.2007	kozje, kravje	np	5,0
27	180	30.3.2007	kozje, kravje	np	10,0
28	60	20.5.2007	poskusni sir 1A; ovčje, kravje	da	0,1
29	60	20.5.2007	poskusni sir 1B; ovčje, kravje	da	0,1
30	60	20.5.2007	poskusni sir 2A; ovčje, kravje	da	0,3
31	60	20.5.2007	poskusni sir 2B ovčje, kravje	da	0,3
32	50	3.6.2007	trdi ovčji sir; ovčje	np	0,0
33	100	3.6.2007	Cetinski sir; mešano	np	Np
34	150	3.6.2007	Paški sir, mešano	np	Np
35	150	3.6.2007	kravje	np	Np
36	100	8.8.2007	domači kozji sir; kozje	np	0,0
37	100	8.8.2007	Campos de Toledo; mešano	np	Np

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednice 3

Šifra vzorca	Teža [g]	Datum vzorčenja	Opis vzorca in izvor	Termizacija ¹	Deklariran/dodan delež kravjega mleka [%] ¹
38	100	8.8.2007	ovčje	np	0,0
39	100	8.8.2007	ovčje, kravje	np	np
40	100	8.8.2007	kozje, ovčje	np	np
41	100	8.8.2007	kozje, kravje	np	np
42	100	8.8.2007	kozje	np	0,0

¹np – ni podatkov

3.3.1 Priprava vzorcev sira za analizo

Sire smo narezali na manjše koščke in jih pripravili za tehtanje. Nož smo po vsaki uporabi oprali. Zatehtali smo po 1g in 5g vzorca sira. V vsako plastično vrečko smo zatehtali sir in k vsakem vzorcu dodali destilirano vodo (z očetno kislino, pri pH 4,0). Vzorca sira (1 g) smo dodali 10 ml destilirane vode, k 5 g vzorca sira pa smo dodali 50 ml destilirane vode.

Vsako vrečko s sirom smo dali v gnetilnik za 90 ali 120 s, odvisno od vrste sira. Kravji sir ementalec smo gnetli 4×120 s, ovčje in kozje sire smo gnetli 2×90 s. Sire smo v gnetilniku drobili toliko časa, da smo dobili homogeno zmes.

Homogenizirane vzorce sirov smo prelili skozi filter papir v centrifugirke. Od vsakega vzorca smo odpipetirali 10 ml v centrifugirke in jih centrifugirali 10 min pri 3000 obratih/minuto. Po centrifugiranju smo vzorce previdno prelili v steklene epruvete pri čemer smo pazili, da je precipitat ostal na dnu centrifugirke. Tako pripravljene vzorce sirov smo nato analizirali z ICB.

3.4 TEST ICB

Z ICB testom ugotavljamo prisotnost kravjega mleka v ovčjem in kozjem mleku ter sirih. To je hitri imunokromatografski test na osnovi kapilarnega vleka (Slika 1, str. 18) in je osnovan na ugotavljanju prisotnosti govejih IgG v vzorcih sira in mleka. Na delno upogibljivem plastičnem lističu je pritrjen adsorpcijski nosilec in nitrocelulozna, kromatografska membrana. Testni listič je tako sestavljen iz štirih različnih področij (Slika 3):

- Cona I: Spodnji del, narejen iz porazdelitvene plasti na adsorpcijskem nosilcu, kamor nanesemo vzorec.
- Cona II: Obarvane mikrokroglice, prevlečene z monoklonskimi protitelesi proti govejim IgG. Ta cona je zaščitena s plastično prevleko.
- Cona III: Območje reakcije, sestavljeno iz nitrocelulozne membrane. V obliki črte so nanešena imobilizirana sekundarna protitelesa. Črti sta nevidni pred začetkom reakcije. Prva črta vsebuje specifična lovilna protitelesa proti-govejim IgG. Z uporabo specifičnih protiteles proti govejim Ig se izognemo navzkrižnim reakcijam proti ovčjim in kozjim Ig. Druga črta vsebuje lovilna protitelesa, specifična proti kontrolnim protitelesom in služi kot kontrola ustreznosti testa.
- Cona IV: Zgornji del z nitrocelulozno membrano, ki je zaščiten s plastično prevleko, kar nam olajša rokovanje s testnim lističem.



Slika 3: Področja na testnem lističu hitrega testa IC-BOVINO.

Ko pride vzorec v stik s testnim lističem se začne kromatografski proces. Če je vzorec pozitiven, se goveji IgG, ki so prisotni v mleku, vežejo na protitelesa (v Coni II), ki prekrivajo rdeče obarvane mikrokroglice. Kompleks goveji IgG-protitelo-rdeča mikrokroglica potuje po nitrocelulozni membrani do Cone III, kjer se veže na lovilna protitelesa, ki so specifična proti govejim IgG ter so imobilizirana na nosilec v obliki črtice (Cona III). Pojavi se s prostim očesom vidna rdeča črta na testnem lističu. Intenziteta barve je odvisna od koncentracije dodanega kravjega mleka v vzorcu. V Coni II so prisotna tudi kontrolna protitelesa, ki prekrivajo modre mikrokroglice in ne vežejo govejih IgG. Kontrolna protitelesa prav tako potujejo s fronto vzorca in se v Coni III vežejo na lovilna protitelesa, ki so specifična proti kontrolnim protitelesom ter so imobilizirana na nosilec v obliki črtice (druga črtica). Tako pri negativnem, kakor pri pozitivnem vzorcu se mora druga črtica obarvati modro, saj je to dokaz, da je bil kromatografski proces ustrezen. V primeru pozitivnega vzorca (vsebuje kravje mleko) na testnem lističu opazimo rdečo in

modro črto, v primeru negativnega (ne vsebuje kravjega mleka) pa samo modro. V primeru, da modra črta po analizi ni vidna, pomeni da je testni listič poškodovan zaradi neprimerne shranjevanja ali neprimerne rokovanja.

Teoretična območja zaznave ICB so:

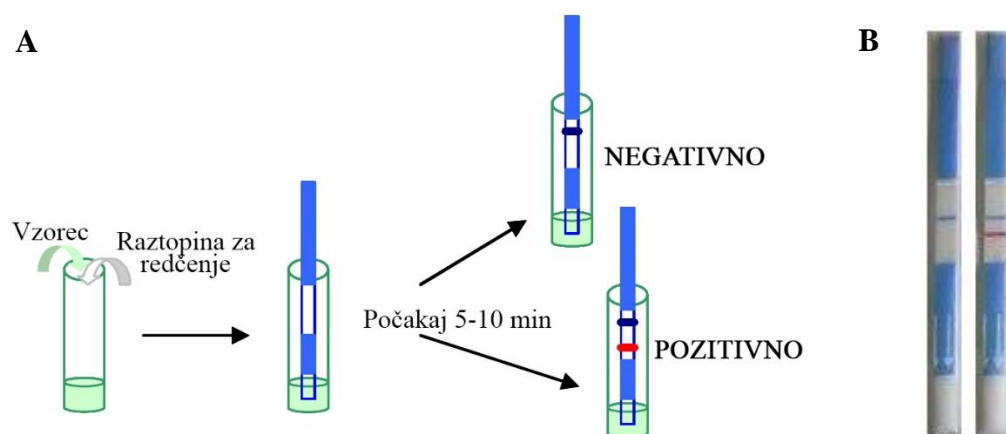
- od 0,5–1 % do 100 % kravjega mleka v vzorcu mleka,
- od 1–2 % do 100 % kravjega mleka v vzorcu sira.

Komplet hitrega testa vsebuje:

- testne lističe,
- raztopina za redčitve,
- pipete za enkratno uporabo,
- epruvete za enkratno uporabo in
- stojalo.

Analizo z ICB smo izvedli po navodilih proizvajalca (Slika 4 A) in sicer:

- Pripravili smo epruvete za analizo vzorcev;
- Epruvete smo dali v stojalo in v vsako epruveto dodali raztopino za redčitve: 5 kapljic (150 μ l) za vzorce mleka in 3 kapljice (75 μ l) za vzorce sira;
- Nato smo odpipetirali 3 kapljice (75 μ l) vzorca mleka ozirom eno kapljico (25 μ l) ekstrakta vzorca sira;
- Pripravljene vzorce smo premešali na vrtničniku;
- V dobro premešane vzorce smo pomočili testne lističe;
- Počakali smo 10 minut, da so se testni lističi obarvali in odčitali rezultate (Slika 4 B).



Slika 4: Shematski prikaz testa IC-BOVINO. (A) Potek analize (prirejeno po IC-BOVINO, 2003: 6). (B) Primer negativnega (levi listič) in pozitivnega (desni listič) rezultata.

4 REZULTATI

4.1 OCENA PRIMERNOSTI TESTA ICB NA MEŠANICAH OVČJEGA/KOZJEGA MLEKA S KRAVJIM MLEKOM

Ker smo želeli preveriti občutljivost hitrega testa, smo najprej analizirali serijo vzorcev ovčjega mleka, ki smo jim dodali znane koncentracije kravjega mleka v razponu od 0–50 %, vključili pa tudi vzorec kravjega mleka. Rezultati testiranja so prikazani v Preglednici 6. Izkazalo se je, da so rezultati testa nezanesljivi pri mešanica, kjer je delež kravjega mleka pod 1 %. Proizvajalec hitrega testa navaja meje detekcije pri 0,5–1 % deležu kravjega mleka, kar se ujema z našimi rezultati. Ker toplotna obdelava lahko vpliva na strukturo imunoglobulinov in s tem na meje detekcije hitrega testa, smo testirali tudi mešanice po termizaciji pri 63 °C, 30 min in po termizaciji pri 72 °C, 5 s. Po pričakovanjih je toplotna obdelava povečala število mejno pozitivnih rezultatov (3 pri surovem mleku, 5 pri termiziranem pri 72 °C), vendar je bil vpliv opazen zgolj pri nizkih deležih kravjega mleka (pod 1 %).

Preglednica 6: Analiza mešanic ovčjega mleka s kravjim s hitrim testom IC-BOVINO¹.

% kravjega mleka	Surovo mleko				Mleko termizirano pri 63 °C, 30 min				Mleko termizirano pri 72 °C, 5 s			
	-	-	+/-	+/-	+	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+/-
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,25	+	+	+/-	+/-	+	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+/-
0,5	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+/-	+/-
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

¹s prekinjeno črto je označena meja detekcije, ki jo navaja proizvajalec testa; + – pozitiven rezultat; +/- – mejno pozitiven rezultat; - – negativen rezultat

4.2 OCENA PRIMERNOSTI TESTA ICB ZA SIRE

4.2.1 Rezultati analiz ovčjih/kozjih sirov z znanim deležem kravjega mleka

Iz rezultatov testiranja na sirih z znanim deležem kravjega mleka (Preglednica 7) je razvidno, da se lažno negativni rezultati pojavljajo pri vzorcih sirov, ki so vsebovali manj kot 2 % kravjega mleka. Po navedbah proizvajalca hitrega testa je v sirih meja detekcije hitrega testa 1–2 % kravjega mleka v mešanici. S tem lahko potrdimo, da se naši rezultati ujemajo z navedbami proizvajalcev glede občutljivosti testa ICB.

Preglednica 7: Rezultati detekcije kravjega mleka v sirih z znanim deležem kravjega mleka s hitrim testom IC-BOVINO¹.

Šifra vzorca	Termizacija mleka ²	Deklarirana vsebnost mleka	Deklarirani delež kravjega mleka [%]	test IC BOVINO
10	ne	ovčje	0,0	-
24	np	kozje	0,0	-
28	da	ovčje, kravje	0,1	-
29	da	ovčje, kravje	0,1	-
30	da	ovčje, kravje	0,3	-
31	da	ovčje, kravje	0,3	-
11	ne	ovčje, kravje	0,5	-
12	ne	ovčje, kravje	1,0	-
25	np	kozje, kravje	1,0	+/-
13	ne	ovčje, kravje	1,5	-
14	ne	ovčje, kravje	2,0	+
15	ne	ovčje, kravje	2,5	+
16	ne	ovčje, kravje	5,0	+
26	np	kozje, kravje	5,0	+
17	ne	ovčje, kravje	10,0	+
27	np	kozje, kravje	10,0	+
18	ne	ovčje, kravje	20,0	+
19	ne	ovčje, kravje	30,0	+
20	ne	ovčje, kravje	40,0	+
1	np	ovčje, kravje	50,0	+
4	np	kozje, kravje	50,0	+
21	ne	ovčje, kravje	50,0	+
2	np	ovčje, kravje	70,0	+
23	ne	kravje	100,0	+

¹s prekinjeno črto je označena meja detekcije, ki jo navaja proizvajalec testa; vsak vzorec je bil analiziran dvakrat; rezultati paralel so se ujemali in so prikazani kot en rezultat

²np – ni podatkov

4.2.2 Rezultati analiz ovčjih/kozjih sirov z neznanim deležem kravjega mleka

S hitrim testom smo želeli preveriti morebitno potvorbo ovčjih/kozjih sirov s kravjim mlekom. Od 16-ih vzorcev sirov, ki smo jih vključili v analizo (Preglednica 8), je bilo 7 sirov, ki so bili po deklaraciji izdelani samo iz ovčjega ali kozjega mleka, 1 sir, ki je bil izdelan iz mešanice ovčjega in kozjega mleka ter 8 sirov z navedbo, da so izdelani iz različnih mešanic mleka, vendar brez navedbe deležev posamezne vrste mleka.

Preglednica 8: Testiranje sirov z neznanim deležem kravjega mleka s hitrim testom IC-BOVINO¹.

Šifra vzorca	Termizacija mleka ²	Deklarirana vsebnost mleka	Deklariran delež kravjega mleka [%] ¹	test IC BOVINO
7	np	kozje	0,0	-
8	np	ovčje	0,0	-
9	np	ovčje	0,0	-
32	np	ovčje	0,0	+
38	np	ovčje	0,0	-
42	np	kozje	0,0	-
36	np	kozje	0,0	-
40	np	ovčje, kozje	0,0	+
5	np	mešano	np	+
6	np	mešano	np	+
33	np	mešano	np	+
34	np	mešano	np	+
35	np	kravje	np	+
37	np	mešano	np	+
39	np	kravje, ovčje	np	+
41	np	kravje/kozje	np	+

¹s krepkim tiskom sta označena vzorca, ki kažeta sum na potvorbo ovčjega mleka s kravjim; vzorci so bili analizirani dvakrat; rezultati paralelk so se ujemali in so prikazani kot en rezultat

²np – ni podatkov

Pri vseh vzorcih sirov (7), ki so navajali dodatek kravjega mleka v neznanih deležih, smo s hitrim testom to tudi potrdili. Med vzorci, kjer dodatek kravjega mleka ni bil deklariran (8), sta dva vzorca (št. 32 – ovčji sir; št. 40 – ovčji, kozji sir) dala pozitiven rezultat, kar kaže na sum, da je šlo za potvorbo ovčjega/kozjega mleka s kravjim. Glede na meje detekcije, ugotovljene v poglavju 4.2, lahko sklepamo, da je bil dodatek kravjega mleka v teh primerih večji od 2 %. Vzorec 32 smo preverili tudi s hitrim semi-kvantitativnim ELISA testom RC-BOVINO (Z.E.U.-IMMUNOTEC, S.L., Španija), po postopku, ki ga

opisuje Antalašič (2006). S testom smo potrdili prisotnost kravjega mleka v vzorcu ovčjega sira v območju 10–15 %.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Potvorba čistega ovčjega ali kozjega mleka s cenejšim kravjim mlekom je dobro poznana goljufija v mlekarskem sektorju. Mešanica dveh nedeklariranih vrst mleka, ki se uporabi med procesom izdelave sira, vpliva na okus, barvo, vonj in kvaliteto sira. Redna kontrola sestavin mleka je pomembna zaradi zdravstvenih razlogov (alergija na kravje mleko) in višje cene izdelka.

Za ugotavljanje potvorb s cenejšimi vrstami mleka je bilo opisanih več različnih metod, ki se razlikujejo po principu delovanja (imunološke, elektroforetske, kromatografske, genetske), časovni in tehnični zahtevnosti ter mejah detekcije (Zachar in sod., 2011). Potreba po analiziranju vzorcev na kraju (v sirarni) v zelo kratkem času je botrovala razvoju hitrih testov (Mark in sod., 2010). Večina testov za določanje potvorb je osnovana na principu imunokromatografije s pomočjo kapilarnega vleka (angl. »lateral flow test strip«). Na tržišču je več ponudnikov hitrih testov za določanje potvorb kozjega/ovčjega mleka s kravjim. V diplomskem delu smo preskusili test ICB, ki je osnovan na principu ugotavljanja prisotnosti govejih IgG.

Delo smo razdelil v tri sklope. Najprej smo primernost hitrega testa ugotavljali na znanih mešanicah ovčjega in kozjega mleka s kravjim mlekom. Sledilo je ugotavljanje primernosti testa za določanje vsebnosti kravjega mleka v sirih, ki so bili izdelani iz znanih mešanic kravjega, ovčjega in kozjega mleka. Na koncu smo test uporabili za ugotavljanje morebitne prisotnosti kravjega mleka v sirih, ki so na tržišču.

Rezultati iz prvih dveh sklopov so potrdili navedbe proizvajalca glede mej detekcije, in sicer da so rezultati testa nezanesljivi pri mešanicah, kjer je delež kravjega mleka v surovi mešanici pod 1 % in kjer je delež kravjega mleka v sirih pod 2 %. Pri tem je pomembno, da mleko ni bilo toplotno obdelano, saj metoda temelji na določanju specifičnih proteinov (imunoglobulinov), ki pa so temperaturno občutljivi in pri višjih temperaturah spremenijo svojo 3D strukturo (Marnila in Korhonen, 2011). Po pričakovanjih smo tako zaznali povečano število lažno negativnih oziroma mejno pozitivnih rezultatov v primeru, ko smo mleko predhodno 5 s termizirali pri 72 °C.

Pri ugotavljanju prisotnosti kravjega mleka v sirih, namenjenih prodaji, smo pri dveh vzorcih, pri katerih kravje mleko ni bilo deklarirano, dobili pozitiven rezultat. Pri enem od pozitivnih vzorcev smo delež dodanega govejega mleka preverili tudi s hitrim semi-quantitativnim ELISA testom RC-BOVINO in ugotovili, da je bilo v ovčjem siru 10–15 % kravjega mleka. Za zanesljivejše rezultate bi bilo smiselno pozitivne vzorce analizirati še s kakšno dodatno metodo, ki omogoča natančnejšo in točnejšo kvantitativno oceno. Tako so npr. Urbanke in sod. (1992) uspešno uporabili RP-HPLC za ugotavljanje prisotnosti kravjega mleka, pri čemer je bila meja detekcije 1 %.

Če primerjamo delež pozitivnih vzorcev (2) glede na analizirane vzorce (8), pri katerih prisotnost kravjega mleka ni bila deklarirana, lahko sklepamo, da so kljub vsemu tovrstne potvorbe pri nas redke. Precej drugačne rezultate navajata Stănciuc in Răpeanu (2010), ki sta na 50-ih ovčjih in 23-ih kozjih sirih proučevala prisotnosti kravjega mleka v ovčjih in kozjih sirih, vzorčenih v Romuniji. Pri tem sta uporabili test ICB ter test ELISA. Ugotovili sta, da je kar 67,3 % ovčjih in 79,9 % kozjih sirov vsebovalo kravje mleko, čeprav tega ni bilo navedenega na deklaraciji. Colak in sod. (2006) so prav tako ugotovili, da je kar 48 % ovčjih sirov vsebovalo kravje mleko. Znano je, da je pojavljanje tovrstnih zlorab pogostejše v državah v razvoju, predvsem zaradi pomanjkanja strogega nadzora, ki bi ga morale izvajati ustrezne institucije za varno hrano. Obratno pa je tovrstnih pojavov zelo malo v državah EU in ZDA, saj imajo vzpostavljen strog sistem, ki skrbi za prehransko varnost (Handford in sod., 2016).

Zaključimo lahko, da je ICB zanesljiva hitra metoda za odkrivanje potvorb kravjega mleka z ovčjim in kozjim mlekom. Glede na to, da je na tržišču več ponudnikov tovrstnih hitrih testov, se zdi smiselno, da bi v nadaljnjih študijah te teste primerjali med seboj in ugotavljali njihove razlike.

5.2 SKLEPI

Na podlagi dobljenih rezultatov, ki smo jih dobili z raziskavo, lahko sklepamo:

- da so meje detekcije testa ICB v okviru proizvajalčevih navedb ter
- da je test ICB dovolj občutljiv za odkrivanje potvorb ovčjega/kozjega mleka s kravjim, vendar pa je za kvantitativno potrditev potvorb potrebno uporabiti druge metode.

Obe hipotezi, ki smo si jih zastavili pred izvajanjem poskusa, lahko v tem primeru v celoti potrdimo.

6 POVZETEK

Mleko je surovina za izdelavo številnih mlečnih izdelkov. Potvorba ovčjega ali kozjega mleka s cenejšim kravjim mlekom je dobro poznana prevara na področju mlekarstva, posebno na trgu s siri. Za dokazovanje potvorb mleka in mlečnih izdelkov obstajajo različne analitske metode, pri čemer je referenčna metoda Evropske Unije izoelektrično fokusiranje. Poleg tega se uporabljajo tudi različne imunološke, elektroforetske, kromatografske in genetske tehnike. Drug pristop je razvoj hitrih, imunokromatografskih testov, ki največkrat temeljijo na principu sendvič ELISA, vendar so protitelesa vezana na trak, po katerem se vzorec pomika lateralno (bočno) s pomočjo kapilarnega vleka (angl. »lateral flow test strip«).

V diplomskem delu smo za odkrivanje potvorb ovčjega in kozjega mleka s kravjim mlekom preskusili ICB, ki je osnovan na principu ugotavljanja prisotnosti govejih IgG. Delo smo razdelili v tri sklope. Najprej smo želeli preveriti občutljivost in primernost hitrega testa na vzorcih mleka in sirov z znanim deležem kravjega mleka. Zato smo najprej pripravili in testirali različne mešanice kravjega in ovčjega mleka. Obenem smo še želeli preveriti vpliv termizacije na rezultate testiranja. V zaključni fazi smo test ICB uporabili pri ugotavljanju prisotnosti kravjega mleka v sirih z neznano sestavo oziroma v sirih, ki vsebnosti kravjega mleka niso imeli deklariranega.

Rezultati iz prvih dveh sklopov so potrdili navedbe proizvajalca glede mej detekcije, in sicer da so rezultati testa nezanesljivi pri mešanicah, kjer je delež surovega, kravjega mleka v mešanici pod 1 % in kjer je delež kravjega mleka v sirih pod 2 %. Po pričakovanjih smo zaznali večje število mejno pozitivnih rezultatov v primeru, ko smo mleko predhodno 5 s termizirali pri 72 °C. Med vzorci, kjer dodatek kravjega mleka ni bil deklariran (8), sta dva vzorca, 1 ovčji sir in 1 sir, po deklaraciji narejen iz mešanice ovčjega in kozjega mleka, dala pozitiven rezultat, kar kaže na sum, da je šlo za potvorbo ovčjega/kozjega mleka s kravjim. Pri pozitivnem vzorcu ovčjega sira smo s hitrim semi-kvantitativnim ELISA testom dodatno potrdili prisotnost kravjega mleka v območju 10–15 %. Zaključimo lahko, da je test ICB dovolj občutljiv za hitro odkrivanje potvorb ovčjega/kozjega mleka in sirov s kravjim mlekom.

7 VIRI

- Amigo L., Fontecha J. 2011. Goat milk V: Encyclopedia of Dairy Science. Vol. 3. 2nd ed. Fuquay J. W., Fox P. F., Mcsweeney P. L. H. (ur.) Amsterdam, Elsevier, Academic Press, cop.: 484-491
- 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: 45 str.
- Antunac N., Samržija D. 2000. Proizvodnja, sestav i osobine kozjeg mlijeka. Mljekarstvo, 50, 1: 53-66
- Bajt N., Golc-Teger S. 2002. Izdelava jogurta, skute in sira. Ljubljana, Kmečki glas: 21-22
- Cartoni G., Coccioli F., Jasionowska R., Masci M. 1999. Determination of cows' milk in goats' milk and cheese by capillary electrophoresis of the whey protein fractions. Journal of Chromatography A, 846(1-2): 135-141
- Colak H., Aydin A., Nazli B., Ergun O. 2006. Detection of presence of cow's milk in sheep's cheeses by immunochromatography. Food Control, 17, 11: 905-908
- Czerwenka C., Muller L., Lindner W. 2010. Detection of the adulteration of water buffalo milk and mozzarella with cow's milk by liquid chromatography-mass spectrometry analysis of beta-lactoglobulin variants. Food Chemistry, 122, 3: 901-908
- Damjanović S., Samaržija D., Havranek J. 2006. Metode za dokazivanje patvorenja mlijeka i sira drugim vrstama mlijeka. Mljekarstvo, 56, 3: 221-232
- Haenlein G. F. W. 2004. Goat milk in human nutrition. Small Ruminant Research, 51:155-163
- Handford E. C., Campbell K., Elliott C. T. 2016 Impacts of milk fraud on food safety and nutrition with special emphasis on developing countries. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 15: 130-141
- Hurley I. P., Coleman R. C., Ireland H. E., Williams J. H. H. 2004. Application of immunological methods for the detection of species adulteration in dairy products. International Journal of Food Science and Technology, 39: 873-87
- IC BOVINO Immunochromatographic test to detect cow's milk in sheep or goat's milk. User manual. Zaragoza (Spain). Z.E.U.-IMMUNOTEC, S. L.: 5 str.

- Kamal M., Karoui R. 2015. Analytical methods coupled with chemometric tools for determining the authenticity and detecting the adulteration of dairy products: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 46, 1: 27-48
- Klančar A. 2015. Ugotavljanje potvorb kozjih in ovčjih sirov s kravjim mlekom. Magistrsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 67 str.
- Kršlin M. 2014. Proteinski profil različnih vrst mleka. Magistrsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 40 str.
- Mark D., Haeberle S., Roth G., von Stetten F., Zengerle R. 2010. Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications. *Chemical Society Reviews*, 39, 3: 1153-1182
- Marnila P., Korhonen H. 2011. Immunoglobulins. V: *Encyclopedia of Dairy Science*. Vol. 3. 2nd ed. Fuquay J. W., Fox P. F., McSweeney P. L. H. (ur.) Amsterdam, Elsevier, Academic Press, cop.: 807-815
- Mavrin D., Oštir Š. 2002. Tehnologija mleka in mlečnih izdelkov. Učbenik za program srednjega strokovnega in poklicno tehniškega izobraževanja živilski tehnik. Ljubljana, Tehnološka založba Slovenije: 218 str.
- Mavrin D., Šubic T. 2011. Mleko in mlečni izdelki: učbenik za modul Predelava živil živalskega izvora (vsebinski sklop Predelava mleka v mlečne izdelke) za izobraževalni program Živilsko-prehranski tehnik SSI in PTI. Ljubljana, DZS: 197 str.
- 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 (julij 2016)
- Moatsou G. 2010. Detection of adulterations: Identification of Milk Origin. V: *Handbook of Dairy Foods Analysis*. Nollet L. M. L., Toldra F. (ur.). Boca Raton, CRC Press: 733-754
- Renčelj S., Perko B., Bogataj J. 1995. Siri nekdanj in zdaj. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 5-51
- Moatsou G., Anifantakis E. 2003. Recent developments in antibody-based analytical methods for the differentiation of milk from different species. *International Journal of Dairy Technology*, 56: 133-138

- Rodriguez N., Ortiz M. C., Sarabia L., Gredilla E. 2010. Analysis of protein chromatographic profiles joint to partial least squares to detect adulterations in milk mixtures and cheeses. *Talanta*, 81, 1-2: 255-264
- Rogelj I., Majhenič Čanžek A., Perko B., 2009. Mleko in mlečni izdelki kot izvor biološko pomembnih mineralov V: Vloga mineralov v živilski tehnologiji in prehrani, 26. Bitenčevi živilski dnevi 2009, Ljubljana, 26-27 nov. 2009. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 149-155
- Rogelj I. 1996. Lastnosti kozjega in ovčjega mleka in njihov vpliv na predelavo. V: Možnosti razvoja reje drobnice v Sloveniji, Postojna, 27.-29. nov. 1996. Slovenj Gradec, Kmetijska založba: 145-150
- SIST EN ISO/IEC 17025. 2005. Splošne zahteve za usposobljenost preskuševalnih in kalibracijskih laboratorijev. Ljubljana, Slovenski inštitut za standardizacijo: 50 str.
- Stănciuc N., Răpeanu G. 2010. Identification of adulterated sheep and goat cheeses marketed in Romania by immunocromatographic assay. *Food and Agricultural Immunology*, 21, 2: 157-164
- Špojlaric J., Mikulec N., Plavljanić d., Radeljević B., Havranek J., Antunac N. 2013. Proving the adulteration of ewe and goat cheeses with cow milk using the reference method of isoelectric focusing of γ -casein. *Mljekarstvo*, 63, 3: 115-121
- Tratnik L. 1998. Mlijeko – tehnologija, biokemija i mikrobiologija. Zagreb, Hrvatska mljekarska zadruga: 391 str.
- Tratnik L. 2012. Sirovo mlijeko. V: Mlijeko i mliječni proizvodi. Tratnik L., Božanić R. (ur.). Zagreb, Hrvatska mljekarska udruga: 15-95
- Urbanke W., Luf W., Brandl E. 1992. Use of HPLC for Control of the Adulteration of Milk and Milk-Products of Different Species. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung*, 195, 2: 137-142
- Uredba komisije (ES) št. 273/2008 z dne 5. Marec 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. 178/2002 z dne 28. januarja 2002 o določitvi splošnih načel in zahtevah živilske zakonodaje, ustanovitvi Evropske agencije za varnost hrane in postopkih, ki zadevajo varnost hrane. 2002. Uradni list Evropske unije, 45, L31: 1-37

Uredba sveta (ES) št. 882/2004 z dne 29. aprila 2004 o izvajanju uradnega nadzora, da se zagotovi preverjanje skladnosti z zakonodajo o krmi in živilih ter s pravili o zdravstvenem varstvu živali in zaščiti živali. 2004. Uradni list Evropske unije, 47, L191: 1-61

Volk H. 2013. Določanje potvorb kozjega in ovčjega mleka s kravjim mlekom na ravni DNA in proteinov. Magistrsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 128 str.

Vozelj M. 2001. Temelji imunologije. Ljubljana, DZS: 552 str.

Xue H., Hu W., Son H., Han Y., Yang Z. 2010: Indirect ELISA for detection and quantification of bovine milk in goat milk. *Journal of Food Science and Technology*, 3, 24: 370-373

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

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Ireni Rogelj in somentorju asist. Dr. Primožu Trevenu za strokovno pomoč, vodenje, potrpljenje in vzpodbude pri izdelavi naloge.

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

Zahvala družinskim članom in prijateljem za pomoč, podporo in razumevanje ter vsem, ki so kakorkoli pripomogli pri izdelavi diplomske naloge.

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Blažka MUHA

**UPORABA IMUNOKROMATOGRFSKEGA TESTA
ZA HITRO ODKRIVANJE PRISOTNOSTI
KRAVJEGA MLEKA V OVČJEM IN KOZJEM
MLEKU TER SIRIH**

DIPLOMSKO DELO

Visokošolski strokovni študij

Ljubljana, 2016