

ZAKLJUČNO POROČILO

O REZULTATIH OPRAVLJENEGA RAZISKOVALNEGA DELA NA PROJEKTU V OKVIRU CILJNEGA RAZISKOVALNEGA PROGRAMA (CRP) »KONKURENČNOST SLOVENIJE 2006 – 2013«

I. Predstavitev osnovnih podatkov raziskovalnega projekta

REPUBLIKA SLOVENIJA
NOSILEC JAVNEGA POBLASTILA
JAVNA AGENCIJA ZA RAZISKOVALNO DEJAVNOST
REPUBLIKE SLOVENIJE, LJUBLJANA 3

1. Naziv težišča v okviru CRP:

Povezovanje ukrepov za doseganje trajnostnega razvoja	Prejeto: 15 -10- 2008	Sig. z.: 0110
		Prih.:

2. Šifra projekta:

V4-0319

Šifra zadeve:

63113-268/2006

Vrednost:

(11)

3. Naslov projekta:

--

3. Naslov projekta

3.1. Naslov projekta v slovenskem jeziku:

Odkrivanje mleka različnih živalskih vrst v deklariranem mleku in mlečnih izdelkih

--

3.2. Naslov projekta v angleškem jeziku:

Detection of differnt species milk in declared milk and milk products

--

4. Ključne besede projekta

4.1. Ključne besede projekta v slovenskem jeziku:

Mleko, mlečni izdelki, analitske metode, razlikovanje vrst mleka

--

4.2. Ključne besede projekta v angleškem jeziku:

Milk, dairy products, analytical methods, milk species differentiation

--

5. Naziv nosilne raziskovalne organizacije:

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

5.1. Seznam sodelujočih raziskovalnih organizacij (RO):

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

6. Sofinancer/sofinancerji:

Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano

7. Šifra ter ime in priimek vodje projekta:

1864

Stanislava Golc Teger

Datum: 09.10.2008

Prof. dr. Andreja Kocijančič
rektorica

Podpis vodje projekta:

S. Golc Teger



Podpis in žig izvajalca:
Po pooblastilu:
prof. dr. Franc Štampar
DEKAN

[Signature]

II. Vsebinska struktura zaključnega poročila o rezultatih raziskovalnega projekta v okviru CRP

1. Cilji projekta:

1.1. Ali so bili cilji projekta doseženi?

a) v celoti

b) delno

c) ne

Če b) in c), je potrebna utemeljitev.

1.2. Ali so se cilji projekta med raziskavo spremenili?

a) da

b) ne

Če so se, je potrebna utemeljitev:

2. Vsebinsko poročilo o realizaciji predloženega programa dela¹:

V prvem delu raziskav smo se odločili za preizkus učinkovitosti uporabe imunoencimске metode ELISA za odkrivanje potvorbe ovčjega mleka s kravjim mlekom. Količino dodanega kravjega ovčjemu mleku smo ocenili na osnovi izmerjene absorbanco iz kalibracijske krivulje, dobljene na osnovi lastnih pripravljenih standardov. V ta namen smo pripravili vzorce mešanic mlek v območju od 1 % do 45 % dodanega kravjega mleka ovčjemu mleku. Oceno potvorbe smo izvedli z naključnimi vzorci. Regresijsko povezavo med merjeno absorbanco in koncentracijo kravjega mleka v ovčjem smo določili analitično z linearnim modelom kubičnega tipa. Kalibracijske krivulje na osnovi standardov in pripravljenih vzorcev smo med seboj primerjali.

Delež kravjega mleka v sirih, izdelanih iz ovčjega mleka, smo z metodo ELISA testirali po postopku, ki velja tudi za kvantitativno določanje kravjega mleka v ovčjem, s tem, da smo vzorce pripravili po predpisanem postopku za sire.

Znane koncentracije (od 0 do 0,2 t.j. od 0 do 20%) so bile izmerjene na dveh serijah sirov z isto koncentracijo mlečne mešanice, vsak vzorec dvakrat.

Aproksimacija empiričnih podatkov s kubičnim modelom, kot to priporoča proizvajalec Z.E.U.-Inmunotec, S.L. (RC-Bovino, Technical Report, Julij, 2005) za odkrivanje prisotnosti kravjega v ovčjem in kozjem mleku, je dala slabe rezultate. Zato predlagamo dva (nelinearna) regresijska modela, ki povezujeta koncentracijo (x) in absorbanco (y) mlečne mešanice:

$$y = a \ln \frac{1 + bx}{a + bx} + \varepsilon,$$

$$y = x \frac{a + bx}{1 + cx} + \varepsilon$$

Razlika v natančnosti (glede na razpoložljive empirične podatke) obeh modelov je neznatna, zato so pri izbiri odločali drugi faktorji. Logaritmični model je enostavnejši, ker ima manj neznanih parametrov, kar je prednost, če je število podatkov skromno. To je v danem primeru tudi res, saj lahko dobimo zanesljive vzorce z znanim razmerjem sestavin, predvsem tako, da jih posebej naročimo pri proizvajalcih, ki pa jih ta tema navadno ne zanima. Racionalni model pa ima to prednost, da ga je možno dokaj enostavno linearizirati in zato lažje določimo meje zaupanja za aktualne napovedi.

Če je natančna določitev mej zaupanja eden od pomembnih ciljev, je racionalni model ugodnejši.

Poleg koncentracije mešanice vplivajo na izmerjeno absorbanco še drugi faktorji. Eden od pomembnejših je tip sira, ki ga običajno opišemo z diskretnimi vrednostmi: sveži, mehki, poltrdi, trdi, in vpliva na povezavo med koncentracijo mešanice in izmerjeno absorbanco. Zato je osnovni regresijski model, ki opisuje zvezo med koncentracijo in absorbanco, nadgrajen še z analizo variance vpliva tipa sira in, če je potrebno, drugih relevantnih

¹ Potrebno je napisati vsebinsko raziskovalno poročilo, kjer mora biti na kratko predstavljen program dela z raziskovalno hipotezo in metodološko-teoretičen opis raziskovanja pri njenem preverjanju ali zavračanju vključno s pridobljenimi rezultati projekta.

faktorjev.

Vzporedno smo testirali tudi hitro imunokromatografsko metodo istega proizvajalca, - Z.E.U. - Inmunotec S.L., za kvalitativno oceno prisotnosti kravjega mleka v ovčjem in kozjem mleku ter sirih. Ugotovili smo občutljivost metode nad 0,5 % prisotnosti kravjega v ovčjem oz. kozjem mleku in nad 1 % prisotnosti kravjega mleka pri sirih, kar je primerljivo tudi z rezultati drugih raziskovalcev.

Iste vzorce sirov, ki smo jih pripravili tako, da smo pri izdelavi sirov dodali ovčjemu kravje mleko v koncentracijah od 0,1 do 20 %, smo sedaj testirali še z metodo alkalne urea-poliakrilamidne gelske elektroforeze (pH 8,9, 5M urea). Uporabili smo dvojno hlajeno vertikalno elektroforezno enoto. Ugotavljali smo mobilnost različnih kazeinskih frakcij, pri čemer smo kot referenčne markerje uporabili kozje, ovčje in kravje kazeine iz sira v koncentraciji 5 mg/ml ter različne vrste mleka v koncentraciji 100 mikroliter/ml pufra. Pripravili smo ekstrakte vzorcev sira s koncentracijo celotnega kazeina 5 mg/ml. Na elektroforetskih gelih smo dobili posamezne frakcije gama-kazeina, kapa-kazeina, beta-kazeina, beta-laktoglobulina, alfa-laktoglobulina in alfa-s1-kazeina. Rezultati kažejo prisotnost kravjega mleka v sirih pri koncentracijah višjih kot 0,5 % dodanega kravjega mleka. Verjetno pri nižjih koncentracijah rezultati niso tako dobri zaradi proteolitične razgradnje med samim zorenjem sira. Posebno je to problemi pri trdih tipih sira, kar potrjujejo tudi rezultati nekaterih drugih avtorjev.

Potvarjanje mleka in sira z različnimi vrstami mleka v koncentraciji nižji od 0,5 % lahko dokazujemo z metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR) z optimalno izbranimi vrstno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi, komplementarnimi z regijami genov mitohondrijske DNK. Metoda temelji na izolaciji DNK iz prirodno prisotnih epitelnih celic v sestavu somatskih celic mleka in sira. Metoda je v preiskovanju in pripravi protokola za izvajanja analize. Prednost PCR metode je v dokazovanju potvorb mleka in sirov tudi v toplotno obdelanem mleku.

3. Izkoriščanje dobljenih rezultatov:

3.1. Kakšen je potencialni pomen² rezultatov vašega raziskovalnega projekta za:

- a) odkritje novih znanstvenih spoznanj;
- b) izpopolnitev oziroma razširitev metodološkega instrumentarija;
- c) razvoj svojega temeljnega raziskovanja;
- d) razvoj drugih temeljnih znanosti;
- e) razvoj novih tehnologij in drugih razvojnih raziskav.

3.2. Označite s katerimi družbeno-ekonomskimi cilji (po metodologiji OECD-ja) sovpadajo rezultati vašega raziskovalnega projekta:

- a) razvoj kmetijstva, gozdarstva in ribolova - Vključuje RR, ki je v osnovi namenjen razvoju in podpori teh dejavnosti;
- b) pospeševanje industrijskega razvoja - vključuje RR, ki v osnovi podpira razvoj industrije, vključno s proizvodnjo, gradbeništvom, prodajo na debelo in drobno, restavracijami in hoteli, bančništvom, zavarovalnicami in drugimi gospodarskimi dejavnostmi;
- c) proizvodnja in racionalna izraba energije - vključuje RR-dejavnosti, ki so v funkciji dobave, proizvodnje, hranjenja in distribucije vseh oblik energije. V to skupino je treba vključiti tudi RR vodnih virov in nuklearne energije;
- d) razvoj infrastrukture - Ta skupina vključuje dve podskupini:
 - transport in telekomunikacije - Vključen je RR, ki je usmerjen v izboljšavo in povečanje varnosti prometnih sistemov, vključno z varnostjo v prometu;
 - prostorsko planiranje mest in podeželja - Vključen je RR, ki se nanaša na skupno načrtovanje mest in podeželja, boljše pogoje bivanja in izboljšave v okolju;
- e) nadzor in skrb za okolje - Vključuje RR, ki je usmerjen v ohranjanje fizičnega okolja. Zajema onesnaževanje zraka, voda, zemlje in spodnjih slojev, onesnaženje zaradi hrupa, odlaganja trdnih odpadkov in sevanja. Razdeljen je v dve skupini:
- f) zdravstveno varstvo (z izjemo onesnaževanja) - Vključuje RR - programe, ki so usmerjeni v varstvo in izboljšanje človekovega zdravja;
- g) družbeni razvoj in storitve - Vključuje RR, ki se nanaša na družbene in kulturne probleme;
- h) splošni napredek znanja - Ta skupina zajema RR, ki prispeva k splošnemu napredku znanja in ga ne moremo pripisati določenim ciljem;
- i) obramba - Vključuje RR, ki se v osnovi izvaja v vojaške namene, ne glede na njegovo vsebino, ali na možnost posredne civilne uporabe. Vključuje tudi varstvo (obrambo) pred naravnimi nesrečami.

² Označite lahko več odgovorov.

3.3. Kateri so **neposredni rezultati** vašega raziskovalnega projekta glede na zgoraj označen potencialni pomen in razvojne cilje?

Vpeljava in preiskus uporabe nekaterih analitskih metod za odkrivanje mleka različnih živalskih vrst v deklariranem mleku in mlečnih izdelkih za možnosti preverjanja zanesljivosti deklaracij na mlečnih proizvodih.

3.4. Kakšni so lahko **dolgoročni rezultati** vašega raziskovalnega projekta glede na zgoraj označen potencialni pomen in razvojne cilje?

Uporaba preiskušanih metod in razvoj novih metod za učinkovito kontrolo kakovosti mleka in mlečnih izdelkov z vidika varstva človeškega zdravja in zaščite potrošnika.

3.5. Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

- a) v domačih znanstvenih krogih;
- b) v mednarodnih znanstvenih krogih;
- c) pri domačih uporabnikih;
- d) pri mednarodnih uporabnikih.

3.6. Kdo (poleg sofinancerjev) že izraža interes po vaših spoznanjih oziroma rezultatih?

Inšpekcijske službe

3.7. Število diplomantov, magistrov in doktorjev, ki so zaključili študij z vključenostjo v raziskovalni projekt?

1- diplomant

4. Sodelovanje z tujimi partnerji:

4.1. Navedite število in obliko formalnega raziskovalnega sodelovanja s tujimi raziskovalnimi inštitucijami.

1. Sveučilište u Zagrebu Agronoski fakultet - bilateralni projekt (šifra projekta- BI-HR/106-07-023
2. Universitat fur Bodenkultur Wien - CEEPUS mobility - izmenjava študentov in učiteljev - HU 0023

4.2. Kakšni so rezultati tovrstnega sodelovanja?

Sodelovanje pri vpeljevanju analitskih metod. Izvajanje metod na istih vzorcih sirov izdelanih iz znanih mešanic mleka.

Izmenjava iskušenj pri uvajanju referenčne metode.

Ocena primerljivosti uporabe preiskanih metod.

5. Bibliografski rezultati³ :

Za vodjo projekta in ostale raziskovalce v projektni skupini priložite bibliografske izpise za obdobje zadnjih treh let iz COBISS-a) oz. za medicinske vede iz Inštituta za biomedicinsko informatiko. Na bibliografskih izpisih označite tista dela, ki so nastala v okviru pričujočega projekta.

6. Druge reference⁴ vodje projekta in ostalih raziskovalcev, ki izhajajo iz raziskovalnega projekta:

Zaključno poročilo bilateralnega projekta s Hrvaško - šifra projekta BI-HR/06-07-023.

Research Report CEEPUS mobility HU 0023, Maja Šikić, april 2007

³ Bibliografijo raziskovalcev si lahko natisnete sami iz spletne strani:<http://www.izum.si/>

⁴ Navedite tudi druge raziskovalne rezultate iz obdobja financiranja vašega projekta, ki niso zajeti v bibliografske izpise, zlasti pa tiste, ki se nanašajo na prenos znanja in tehnologije.

Navedite tudi podatke o vseh javnih in drugih predstavitev projekta in njegovih rezultatov vključno s predstavitvami, ki so bile organizirane izključno za naročnika/naročnike projekta.

POVZETEK

V raziskovalnem delu smo preskusili učinkovitost porabe hitre imuno encimske metode ELISA za odkrivanje potvorb ovčjega mleka s kravjim mlekom. V ta namen smo pripravili vzorce mešanic mleka v območju od 1 do 45 % dodanega kravjega mleka ovčjemu mleku. Oceno potvorbe smo izvedli z naključnimi vzorci. Regresijsko povezavo med merjeno absorbanco in koncentracijo kravjega mleka v ovčjem smo določili analitično z linearnim modelom kubičnega tipa. Prav tako smo z metodo ELISA testirali delež kravjega mleka v sirih, izdelanih iz ovčjega mleka. Vzorce znanih koncentracij dodanega kravjega mleka (od 0.1 do 20 %) smo pripravili po predpisanem postopku za sire. Za aproksimacijo empiričnih podatkov predlagamo dva (ne linearna) regresijska modela, ki povezujeta koncentracijo in absorbanco mešanice mleka. Racionalni model ima prednost pred logaritmičnim modelom zaradi možnosti natančnejše določitve mej zaupanja za aktualne napovedi dodanih deležev kravjega mleka. Vzporedno smo testirali tudi hitro imunokromatografsko metodo. Kvalitativno smo ocenili nad 0.5 % prisotnosti kravjega mleka v ovčjem in kozjem mleku in nad 1% prisotnosti kravjega mleka pri sirih. Iste vzorcev sirov smo testirali tudi z metodo alkalne urea -poliakrilamidne gelske elektroforeze. Rezultati kažejo prisotnost kravjega mleka v sirih pri koncentraciji višji kot 0.5 % dodanega kravjega mleka. PCR metoda je v preskušanju in pripravi protokola za izvajanje analize.

SUMMARY

In our research work we were testing out the efficiency of the usage of the quick immunoenzymatic method ELISA used to detect adulteration of ewe's milk with cow's milk. For this purpose we prepared the samples of mixture of both sorts of milk in the range from 1% to 45% added cow's milk to ewe's milk. The estimation of the adulteration was carried out with the random samples. We analytically determined the regressive connection between the measured absorbance and the concentration of cow's milk in ewe's milk with linear model of cubic type. We also use the ELISA method for testing the content of cow's milk in cheeses made of ewe's milk. The samples of the known concentrations of added cow's milk (from 0,1 to 20%) were prepared according to the prescribed procedure for cheeses. For the approximation of the empirical data we suggest two (nonlinear) regressive models, which connect the concentration and the absorbance of the blend of milk. The rational model has the precedence over the logarithmic model because of the possibility of more accurate determination of the limits of confidence for current declaration of added portions of milk. At the same time we tested the quick immunoenzymatic method and qualitatively estimated that the limit of detection for the presence of cow's milk in ewe's milk is over 0,5 % and the presence of cow's milk in cheeses is over 1 %. We also tested the same samples of cheeses with the method of the alkaline urea - polyacrylamide gel electrophoresis. The results show the presence of cow's milk in cheeses at the concentration higher then 0,5% added cow's milk. The PCR method is in testing and preparation of the protocol for performing the analysis.

