

## **56. srečanje mladih raziskovalcev Slovenije 2022**

### **Ugotavljanje prisotnosti kravjega mleka v kozjih in ovčjih sirih z uporabo metode PCR v realnem času**

Raziskovalno področje: Druga področja - Biotehnologija

Raziskovalna naloga

**Avtorica: Špela Polutnik**

**Mentorici: Katja Holnthaner Zorec**

**Nataša Toplak**

**II. gimnazija Maribor**

**Maribor, 2022**

## ZAHVALA

---

Zahvaljujem se svojim mentoricama, Katji Holnthaner Zorec in Nataši Toplak, ki sta me spodbujali, mi svetovali, pomagali pri nastajanju te raziskovalne naloge in mi omogočili delo v laboratoriju z opremo za izvajanje molekularnih metod. Zahvala gre tudi podjetju Omega d. o. o., ki je podprlo moje raziskovalno delo tako s kemikalijami za izvedbo poizkusov kot uporabo laboratorija in inštrumentov.

Prav tako se zahvaljujem prof. dr. Barbari Jeršek z Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani za dodatno pomoč pri interpretaciji rezultatov.

Zahvala gre tudi osebju z obeh kmetij, kjer sem dobila sveže kozje, ovčje in kravje mleko, ko ga nisem našla nikjer drugod in sem že mislila, da bom morala iskati alternativo.

Zahvaljujem se šoli, ki jo obiskujem, II. gimnaziji Maribor, da mi je pomagala pri nabavi sirov, ki sem jih uporabila v raziskovalnem delu.

Posebna zahvala tudi mojemu profesorju slovenščine, Dragu Megliču, ki je bil pripravljen lektorirati mojo nalogo, kljub temu da je bil čas počitnic.

Hvala vsem.

# KAZALO VSEBINE

Zahvala .....	II
Kazalo vsebine .....	III
Kazalo slik .....	IV
Kazalo grafov .....	IV
Kazalo tabel .....	IV
Povzetek .....	V
1 Uvod .....	1
1.1 Raziskovalno vprašanje .....	2
1.2 Hipoteze .....	2
2 Teoretično ozadje .....	3
2.1 Kakovost mleka in sira .....	3
2.2 Mleko.....	4
2.2.1 Alergije na kravje mleko .....	6
2.2.2 Intoleranca na kravje mleko .....	7
2.3 Priprava sira.....	7
2.4 Genske tehnologije za dokazovanje prisotnosti tujega DNA.....	9
2.4.1 Izolacija DNA.....	9
2.4.2 Določitev koncentracije izoliranega DNA .....	10
2.4.3 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času.....	10
3 Materiali in metoda dela .....	13
3.1 Materiali .....	13
3.1.1 Vzorci .....	13
3.1.2 Kemikalije .....	14
3.1.3 Laboratorijska oprema .....	15
3.2 Metoda dela .....	15
3.2.1 Izolacija DNA iz vzorcev .....	16
3.2.2 Določitev koncentracije izoliranega DNA .....	18
3.2.3 Priprava in izvedba PCR v realnem času .....	18
3.2.4 Določanje specifičnosti PCR v realnem času .....	20
3.2.5 Določanje učinkovitosti PCR v realnem času.....	21
3.2.6 Določanje prisotnosti kravjega mleka v vzorcih sira .....	21
4 Rezultati.....	22

4.1	Izolacija Dna in njegova koncentracija .....	22
4.2	Določitev učinkovitosti PCR v realnem času.....	23
4.3	Specifičnost PCR v realnem času .....	27
4.4	Določitev kravjega DNA v vzorcih sira s PCR v realnem času .....	28
5	Razprava .....	31
6	Družbena odgovornost.....	33
7	Zaključek.....	34
8	Viri in literatura .....	35

## KAZALO SLIK

---

Slika 1:	Postopek pridelave sira (Britannica, 2022) .....	8
Slika 2:	PCR-reakcija (Dolenc, 2020).....	11
Slika 3:	Primer grafa qPCR (Dolenc, 2020).....	12
Slika 4:	Potek dela.....	16
Slika 5:	Ploščica z vzorci za qPCR-analizo.....	20
Slika 6:	Primer slike grafa kozjega vzorca – vzorec 2.....	28
Slika 7:	Primer slike grafa pozitivnega vzorca – vzorec 18 .....	29

## KAZALO GRAFOV

---

Graf 1:	Standardna krivulja BoCaOv kozje mleko.....	25
Graf 2:	Standardna krivulja BoCaOv ovčje mleko.....	25
Graf 3:	Standardna krivulja BoCaOv kravje mleko .....	25
Graf 4:	Standardna krivulja Cow 1 kravje mleko .....	26
Graf 5:	Standardna krivulja BoCaOv kravji sir.....	26
Graf 6:	Standardna krivulja Cow 1 kravji sir .....	26

## KAZALO TABEL

---

Tabela 1:	Vzorci, uporabljeni v raziskovalnem delu .....	13
Tabela 2:	Mešanica za izvedbo qPCR(Cow 1) .....	19
Tabela 3:	Mešanica za pripravo qPCR (BoCaOv) .....	19
Tabela 4:	Koncentracija izoliranega DNA .....	22
Tabela 5:	Podatki za izdelavo standardnih krivulj .....	23
Tabela 6:	Učinkovitost metode .....	27
Tabela 7:	Razlika Ct kozjega in ovčjega mleka.....	27
Tabela 8:	Vzorci sira in mleka, uporabljeni v eksperimentalnem delu.....	29

## POVZETEK

---

Zlorabe deklaracij se v svetu pojavljajo, predvsem ker proizvajalci želijo zmanjšati strošek proizvodnje posameznega živila. Pri procesu proizvodnje zato zamenjajo dražjo sestavino s cenejšo. Nazoren primer tega so kozji in ovčji siri, pri katerih proizvajalci pogosto mešajo kozje/ovčje mleko s kravjim, ker je to cenejše. To lahko povzroči zdravstvene težave pri kupcih, saj je mleko eno najbolj alergeničnih živil. V raziskovalni nalogi smo z uporabo verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR) ugotavljali prisotnost kravjega DNA v 10 kozjih in 10 ovčjih siri. Šibko pozitiven rezultat smo dobili pri osmih vzorcih, več kot 0,1 % kravjega DNA pa so vsebovali trije vzorci. Noben vzorec ni vseboval več kot 1 % kravjega DNA. Ugotovili smo, da je kakovost kozjih in ovčjih sirov na slovenskem tržišču dobra, boljša, kot je bila v preteklosti, ter dokazali, da je qPCR izredno občutljiva metoda.

# 1 UVOD

---

Mleko in mlečni izdelki so med najbolj priljubljenimi prehrabnimi izdelki. V vsakdanjem življenju je uživanje izdelkov, kot je sir, del vsakdana. Na tržišču so poleg kravjih sirov prisotni tudi kozji in ovčji siri, ki so dražji, saj je dražje tudi mleko, iz katerega so narejeni.

Svetovna prodaja mleka je sestavljena predvsem iz mlečnih vrst, kot so govedo, koze, ovce in kamela. Prisotnost posamezne vrste se med državami zelo razlikuje. Med dejavniki, ki vplivajo na prirejo posamezne vrste mleka, postaja vse pomembnejši ekonomski dejavnik (Klančar, 2015).

Posledica velikega obsega gojenja in proizvodnje hrane so visoki stroški, zato proizvajalci dražjo sestavino pogosto nadomestijo s cenejšo in dostopnejšo (Klančar, 2015). Potvorba drugega živila pa lahko predstavlja tveganje za zdravje potrošnika, spremenita se namreč varnost in kakovost izdelka. Na mleku in mlečnih izdelkih mora biti natančno deklarirano, iz katere vrste mleka je živilo narejeno (Urad za standardizacijo in meroslovje, 1993).

Kravje mleko vsebuje veliko alergenov (predvsem kravje beljakovine), zato ga veliko ljudi ne more uživati. V tem primeru so mlečni izdelki iz drugih vrst mleka, kot sta kozji in ovčji sir, zelo dobra alternativna rešitev.

V raziskavi Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani so ugotovili, da tudi nekateri kozji in ovčji siri vsebujejo kravje mleko. Študija je pokazala, da 5 % kozjih sirov in 12 % ovčjih sirov vsebuje več kot 5 % kravjega DNA. Med 0,5 % in 5 % kravjega DNA pa je vsebovalo 7 % kozjih in 15 % ovčjih sirov, ki so jih analizirali. V analizi so uporabili 46 kozjih in 24 ovčjih sirov. Vzorce so analizirali s PCR-metodo v realnem času (qPCR) z uporabo specifičnih oligonukleotidov in fluorescenčno označene sonde, imenovane BoCaOv in Cow 1, ki so detektirali ali DNA koze, krave ali ovce (BoCaOv) ali pa samo kravji DNA (Cow 1) (Klančnik, Toplak, Kovač, Ogrinc, & Jeršek, 2015).

Podobni so bili rezultati študije v Italiji, v kateri so prisotnost kravjega DNA odkrili v 11,5 % kozjih sirov mocarela od skupno analiziranih 52 različnih sirov (Dalmaso, Civera, La Neve, & Bottero, 2011). Še pogosteje pa so kravji DNA našli v študiji International Dairy Journal, in sicer so od 15 kozjih sirov kravji DNA vsebovali 3 siri (20 %) (Mafra, Ferreira, & Oliveira, 2008). Pri obeh raziskavah so vzorce analizirali z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času.

Za odkrivanje mešanic mleka se uporabljajo različne analitske metode; najpogosteje se uporabljajo gelska elektroforeza, kromatografske tehnike in molekularne metode. Uporaba molekularnih metod se povečuje, saj analizirajo DNA-vzorca. DNA je stabilnejša molekula kot pa lipidi in proteini, ki pri

visokih temperaturah razpadejo. Najpogostejša molekularna metoda za analizo potvorb v sirih je verižna reakcija s polimerazo (PCR), saj je hitra, občutljiva in ponovljiva (Klančar, 2015).

V raziskovalni nalogi bomo uporabili enako metodo, kot so jo opisali v študiji Klančar in sod. (2015). Analizirali bomo 20 sirov, ki so deklarirani kot ovčji/kozji in prisotni na slovenskem tržišču (v supermarketih). Najprej bomo iz sirov izolirali DNA in ga analizirali z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (qPCR). Uporabili bomo oligonukleotidne začetnike BoCaOv in Cow 1. Dokazovali bomo prisotnost kozjega/ovčjega/kravjega DNA in prisotnost samo kravjega DNA ter njegovo koncentracijo v posameznem vzorcu; s prvim BoCaOv sistemom bi morali biti pozitivni vsi vzorci, z drugim Cow 1 sistemom pa nobeden.

## 1.1 RAZISKOVALNO VPRAŠANJE

**Ali je v kozjem in ovčjem siru (20 vzorcev s slovenskega tržišča) prisotno samo kozje in ovčje mleko ali vsebuje tudi sledi kravjega mleka?**

Vrsto mleka, prisotnega v sirih, bomo določili z analizo rezultatov verižne reakcije s polimerazo v realnem času. Glede na koncentracijo prisotnosti posamezne DNA v sirih bomo lahko izračunali, kolikšna je bila količina dodanega kravjega mleka v kozjem in ovčjem siru.

Cilj naloge je preveriti sledove kravjega mleka v sirih, ki so na slovenskem trgu deklarirani kot kozji in ovčji.

## 1.2 HIPOTEZE

Hipoteze smo zastavili na podlagi prejšnjih raziskav na tem področju, opisanih v uvodu. Preverili jih bomo z analizo vzorcev z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času.

1. Vsaj 15 % od 20 kupljenih sirov (3 siri), kupljenih v slovenskih supermarketih, poleg kozjega/ovčjega mleka vsebuje tudi kravje mleko.
2. Siri, pridelani na slovenskih družinskih kmetijah, prisotni v trgovinah, ne vsebujejo kravjega mleka.

## 2 TEORETIČNO OZADJE

---

### 2.1 KAKOVOST MLEKA IN SIRA

V Sloveniji je kakovost mleka in mlečnih izdelkov določena v Pravilniku o kakovosti mleka in mlečnih izdelkov, siril in čistih cepiv (Urad za standardizacijo in meroslovje, 1993). V njem so določeni pogoji za ohranitev minimalne kakovosti mlečnih izdelkov. Za vse izdelke mora proizvajalec pred proizvodnjo imeti proizvodno specifikacijo. Izdelki morajo imeti na ovoju, posodi ali nalepki deklaracijo s podatki:

- ime izdelka in njegovo trgovsko ime,
- ime in sedež proizvajalca,
- datum izdelave in rok trajanja (uporabno do),
- neto količina izdelka,
- osnovne sestavine in njihove količine,
- vrsta in količina biološko vrednih snovi, če so izdelku dodane,
- skupina uporabljenih aditivov (Urad za standardizacijo in meroslovje, 1993).

Če je neto količina izdelka manjša od 50 g, morajo biti na njem navedeni ime izdelka, ime proizvajalca, rok trajanja, neto količina izdelka in podatki o barvanju oziroma konzerviranju (Urad za standardizacijo in meroslovje, 1993).

Kot institucija je za zaščito potrošnikov zadolženo Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano. Izvajanje uradnega nadzora določa Uredba (ES) št. 882/2004 (2004). Z njo je zagotovljeno preverjanje skladnosti zakonodaje o krmi in živilih s pravili o zdravstvenem varstvu in zaščiti živali (Klančnik, Toplak, Kovač, Ogrinc, & Jeršek, 2015).

Varnost hrane pomeni zagotavljanje takšne hrane, ki ni škodljiva za zdravje ljudi in upošteva vse verjetne takojšnje in/ali kratkoročne in/ali dolgoročne učinke na zdravje ljudi, ki živilo uživajo, in tudi na poznejše rodove (Klančar, 2015).

Temeljni cilj živilske zakonodaje, ki jo določa osmi člen Uredbe evropskega parlamenta in Sveta št. 178/2002, je varstvo interesov potrošnikov. Treba je preprečiti goljufive ali zavajajoče postopke, ponarejanje živil in vse druge postopke, ki potrošnika lahko zvajajo.

V dvajsetem členu Uredbe evropskega parlamenta in Sveta št. 178/2002 (2004) je določeno, da lahko analizo vzorcev, odvzetih med uradnim nadzorom, izvajajo samo akreditirani laboratoriji.



Ponarejanje mleka in mlečnih izdelkov spada med najbolj znane goljufije. Mleko je živilo, ki ga lahko proizvajalci hitro ponaredijo. Najpogostejša prevara je dodatek vode k mleku. To poveča njegovo količino, vendar zmanjša njegovo kakovost (Klančar, 2015). Mleko mora vsebovati najmanj 8,5 % suhe snovi brez maščobe in kislinska stopnja ne sme biti večja od 8 (Urad za standardizacijo in meroslovje, 1993).

Sir je izdelek, dobljen z usirjenjem surovega ali toplotno obdelanega mleka, posnetega mleka, delno posnetega mleka, sirotke, pinjenca, smetane ali kombinacije teh surovin. Poleg kravjega mleka se za izdelavo sira uporablja ovčje mleko in kozje mleko ali mešanica kravjega mleka in mleka naštetih živali.

Pri izdelavi sira se lahko uporabljajo:

- fermenti za sesirjenje mleka, dobljeni iz želodcev domačih živali, ali bakterijski fermenti,
- kalcijev klorid v količini do 0,02 %,
- kalijev nitrat ali natrijev nitrat v količini do 0,02 %,
- kuhinjska sol,
- čista cepiva mikroorganizmov.

Proizvajalec mora na izdelku (siru) deklarirati, iz katere vrste mleka je sir proizveden (Urad za standardizacijo in meroslovje, 1993).

Kozje in ovčje mleko je pogosto zamenjano s kravjim, saj imata kozje in ovčje mleko višjo ceno, kravje mleko je tudi vse leto bolj razpoložljivo kot ovčje in kozje. Na takšnih izdelkih kravje mleko največkrat ni deklarirano, zato varnost in zaščita potrošnika nista zagotovljeni (Klančar, 2015).

## 2.2 MLEKO

Mleko je glavna sestavina sirov. Ločimo sire iz kravjega mleka, kozje sire in ovčje sire (Bajt, 2011). Cena kravjega mleka, kupljenega na slovenskih kmetijah se giblje med 0,60 in 1 evro/l. Leta 2020 je bila prireja kravjega mleka na slovenskih kmetijah 630.647 ton, iz njega pa je bilo na slovenskih kmetijah narejenih 3.551 ton kmečkega kravjega sira. Leta 2020 je bilo na slovenskih kmetijah proizvedeno 2064 ton kozjega mleka, kasneje so iz njega proizvedli 578 ton kozjega sira. Isto leto je bilo na slovenskih kmetijah proizvedenih tudi 492 ton ovčjega mleka in iz njega narejeno 390 ton kmečkega ovčjega sira (Stele, 2021).

Največje proizvajalke mleka so Indija, Združene države Amerike, Kitajska in Pakistan. Na svetu je največ proizvedenega kravjega mleka (83 %) in bivoljega mleka (13 %). V manjših odstotkih sledijo kozje (2 %), ovčje (1 %) in kamelje mleko (0,3 %). Vodilna proizvajalka kozjega mleka je Indija, sledita ji Bangladeš

in Sudan. Velik ekonomski pomen ima proizvodnja kozjega mleka tudi v mediteranskih državah Italiji, Franciji, Španiji in Grčiji. Poleg proizvodnje kozjega mleka je na mediteranskih območjih pomembna tudi proizvodnja ovčjega mleka. Od mlečnih izdelkov je največja proizvodnja svežega mleka (42,9 %) in sirov (25,2 %), sledijo pa maslo, posneto mleko v prahu in polmastno mleko v prahu (Milk production, 2022).

Mleko in mlečni izdelki se pridelujejo iz surovega mleka. Osnovni procesi obdelave surovega mleka so posnemanje in tipizacija mleka, homogenizacija in toplotna obdelava mleka.

Kravje mleko je v povprečju sestavljeno iz 87,5 % vode in 12,5 % suhe snovi, v kateri je 3,6 do 4,2 % mlečne maščobe, 3,3 % beljakovin (ločimo dve skupini: kazeine in beljakovine sirotke), 4,7 % mlečnega sladkorja in 0,7 % mineralov. Energijska vrednost kravjega mleka je 69 kcal/100 ml (NIJZ, 2015).

Ovčje mleko izmed vseh treh vsebuje največ maščob (7,9 %), proteinov (7,9 %) in laktoze (4,9 %), zato je tudi energijsko veliko bogatejše od kravjega in kozjega (105 kcal/100 ml). Ovčje mleko ima tudi največjo gostoto (Klančar, 2015).

Mleko je zelo bogato živilo, vsebuje veliko mineralov (fosfor, kalij, klor, kalcij) in vitaminov (A, B, C, D). Ovčje in kozje vsebujeta veliko več naštetih mikrohranil (Klančar, 2015).

Kozje in ovčje mleko sta bogata tudi z maščobnimi kislinami, ki glede na število ogljikovih atomov sodijo med srednje verižne maščobne kisline. Kozje mleko jih vsebuje 15–18%, medtem ko kravje samo 5–9 %. Maščobne kisline v mleku so koristne pri zdravljenju mnogih presnovnih boleznih in žolčnih kamnov. Zaradi njihovega pozitivnega učinka jih k prehrani dodajajo tudi podhranjenim bolnikom in nedonošenčkom (Klančar, 2015).

Mleko in mlečni izdelki so pomemben del uravnotežene prehrane za vse starostne kategorije, saj imajo visoko prehransko vrednost in izjemno dober učinek na zdravje. Po količini uživanja mleka se Evropejci uvrščamo na sam vrh, letno zaužijemo več kot 150 kg mleka/prebivalca. Ljudem, ki zaradi alergij kravjega mleka ne smejo uživati, se priporočajo prehranski dodatki ali alternativni viri vnosa mineralov, prisotnih v kravjem mleku. Nekateri se zato poslužujejo kozjega in ovčjega mleka. Uživanje mleka je posebej pomembno za otroke in mladostnike, saj se v tem obdobju gradi kostna masa, z mlekom bogata prehrana pomaga graditi in vzdrževati kostno maso celotno življenjsko obdobje in tako zmanjšuje tveganje za nastanek osteoporoze (NIJZ, 2015)

Izdelki iz kozjega in ovčjega mleka so še posebej koristni zaradi svojih prehranskih lastnosti, zato jih veliko uporabljamo v prehrani otrok in bolnih ljudi. Kozje mleko je tudi lažje prebavljivo od kravjega. Razlog je, da so maščobne kapljice manjše kot v kravjem mleku. Kravjega mnogo ljudi zaradi zdravstvenih razlogov ne more uživati (Klančar, 2015).

Med težavami s prebavo kravjega mleka ločimo alergijo na kravje mleko in intoleranco na kravje mleko. To sta dva različna termina, tako znanstveno kot jezikovno, vendar ju strokovnjaki in širša javnost pogosto uporabljajo sinonimno (Bahna, 2002).

### 2.2.1 Alergije na kravje mleko

Najpogostejša alergena živila, ki povzročajo 90 % vseh alergijskih reakcij, so: kravje mleko, ribe, arašidi, soja in pšenica. Alergija je pretirana imunska reakcija telesa ob stiku z določeno snovjo, ki pri ostalih ne povzroča nobenega tveganja (ni nevarna). Snovem, ki povzročajo alergijo, pravimo alergeni (Lek, 2021). Pri alergiji se pri osebi sprožita imunska reakcija in tvorba protiteles IgE, ko v telo vstopi določena snov, ki jo telo spozna za tujo (Bahna, 2002). Izraža se z alergijskimi znaki oziroma simptomi, ki se pojavijo bodisi takoj po zaužitju ali pa šele po nekaj urah oziroma celo dneh. Znaki so prebavne motnje (krči v trebuhu, bruhanje, driske), kožne spremembe (koprivnica, srbeča koža, rdečica) in simptomi dihalnih poti (kihanje, zamašen nos, oteženo dihanje) (LEK, 2022).

Alergija na kravje mleko se najpogosteje pojavi že v otroštvu, vendar v mladosti izzveni. Njena pogostost med otroki je ocenjena na med 0,5 % in 7,5 % prebivalstva in je poleg alergije na jajca najpogosteje prisotna alergija med otroki. Možnost, da jo odkrijejo/ da se pojavi šele v odraslih letih, je manjša od 1 %. Pri starostnikih se tveganje za njen pojav ponovno poveča. Alergija na kravje mleko se najpogosteje kaže kot atopijski dermatitis (Bahna, 2002).

Pogoste so alergije na beljakovine v kravjem mleku, katerih prisotnost v njem je med 2,8 do 4,1 g/dL. Najpogostejši beljakovini v kravjem mleku sta kazein (od 76 do 86 %) in whey (od 14 do 24 %), preostanek pa sestavljata predvsem  $\beta$ -laktoglobulin in  $\alpha$ -laktalbumin. Zelo alergena sta predvsem kazein in  $\beta$ -laktoglobulin, čeprav je znano, da je poznanih več alergij na kar 20 beljakovin, ki so prisotne v kravjem mleku (Bahna, 2002).

Zaradi visoke vrednosti proteinov je uživanje mleka primerno šele po prvem letu starosti. Kravje mleko ima v primerjavi s humanim več proteinov in mineralov, vendar manj laktoze. Kravje mleko ima manjšo hranilno in tudi energijsko vrednost od humanega. Ker kravje mleko vsebuje tudi protein  $\beta$ -laktoglobulin, humano mleko pa ne, je veliko bolj alergeno od njega. Razlika v sestavi med kravjim in humanim mlekom pa je eden izmed ključnih razlogov za pojav alergije pri otrocih (Klančar, 2015).

Alergije dokažemo s kožnimi testi ali pa s testi v laboratoriju – »*in vitro*«. Ko je pri osebi odkrita alergija na kravje mleko, je edina rešitev, da se oseba kravjemu mleku izogiba, kolikor je le mogoče. Simptomi

alergije na kravje mleko so: srbečica, diareja, težave s prebavo in v ekstremnih primerih tudi težave z dihanjem (Bahna, 2002).

### 2.2.2 Intoleranca na kravje mleko

V svetu je pogosta intoleranca na laktozo, sladkor v kravjem mleku. Laktoza je edini sladkor v mleku in je sestavina le mleka sesalcev. Veliko laktoze je v človeškem mleku pa tudi v ovčjem in kozjem mleku. Ljudje z intoleranco niso sposobni prebavljati laktoze, ker v svojem telesu nimajo dovolj encimov (laktaz). Encim laktaza je nujno potreben za razgradnjo laktoze v manjše, enostavnejše sladkorje. Pomanjkanje laktaze lahko povzroči nepopolno prebavo laktoze, kar lahko privede do nastanka plina in pojava diareje – ljudje imajo pogosto težave s prebavo, so napihnjeni. Ljudje z intoleranco na laktozo se morajo izogibati vsem vrstam mleka. Laktaza (encim za prebavljanje laktoze) je prisotna pri vseh sesalcih, vendar s starostjo njena količina upada. Starejši imajo zato veliko nižjo laktazno aktivnost (Bahna, 2002).

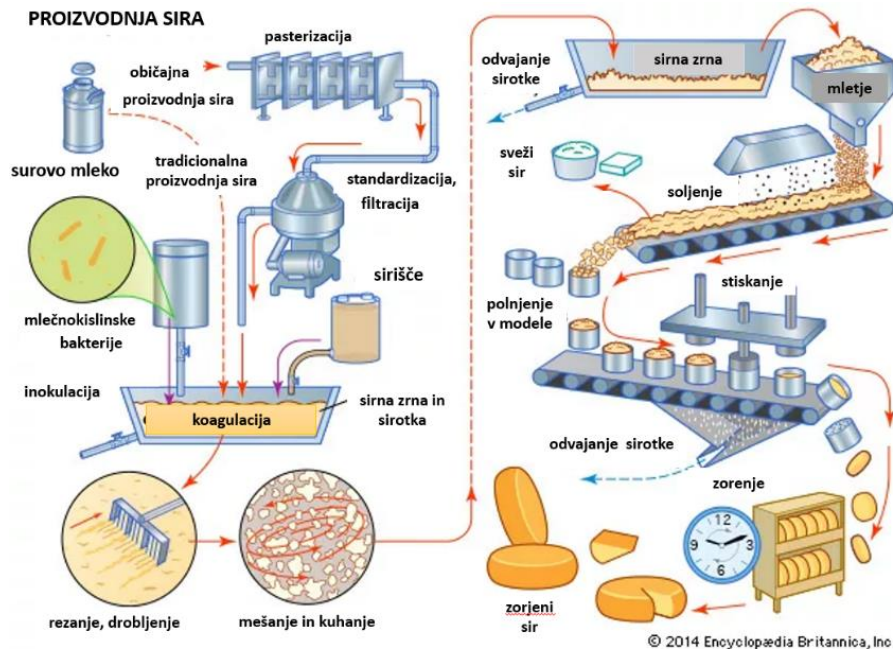
## 2.3 PRIPRAVA SIRA

Sir je sestavni del prehrane ljudi postal v srednjem veku, čeprav je nastal že pred več kot 5000 leti. Prve sirarne so bile v samostanih v Italiji, Franciji in Švici v 11. in 12. stoletju. V Sloveniji se je sirarstvo začelo na planšarskih kmetijah (Rot, 2014). Konec 19. stoletja in v začetku 20. stoletja je pričela svetovna proizvodnja sira naraščati in narašča še danes (Bajt, 2011).

Sir je po definiciji svež ali zrojen proizvod, ki je narejen s koagulacijo mleka (najpogosteje), sirotke, pinjenca ali smetane tako, da odstranimo odvečno vodo v obliki sirotke (Bajt, 2011). Pri predelavi mleka v sir temu tako zmanjšamo volumen z 10 na 1, saj se iz svežega mleka odstrani večina tekoče sestavine – vode. Tako mleku podaljšamo rok uporabe, zato je proizvodnja sira tudi proces konzerviranja mleka (Britannica, 2022)

Sire delimo po različnih kriterijih glede na vrsto mleka, ki je bilo uporabljeno pri proizvodnji (kozje, kravje, ovčje), toplotno obdelavo mleka (termizirano, surovo mleko), način koagulacije (encimska, kislinska ali pa mešana), odstotek vode (trdi, poltrdi, mehki, sveži), odstotek maščobe (mastni, polmastni, pusti) in glede na način zorenja (zoreni, nezoreni) (Bajt, 2011).

Fermentacija mleka v sir je sestavljena iz več faz. Začne se s pripravo mleka, temu pa dodamo mikroorganizme (bakterije), ki povzročajo nastanek mlečne kisline. Nato se dogaja sirjenje mleka (nastajanje mlečne kisline). Sledi odstranitev skute, ki nastane kot stranski produkt. Nato sirotko odcedimo, na koncu pa sledita še soljenje in zorenje sira (Britannica, 2022).



Slika 1: Postopek pridelave sira (Britannica, 2022)

Za proizvodnjo sira uporabljajo mleko najvišje kakovosti, ki ga predhodno pasterizirajo ali toplotno obdelajo, tako da se uniči nezaželena mikroflora. S postopkom pasterizacije v mleku uničijo naravno prisotne encime, ki proizvajajo mlečno kislino, zato je treba takemu mleku kasneje dodati mikroorganizme, sicer tak sir zori počasneje in ne tako zelo intenzivno (Britannica, 2022). Lahko pa mleko samo toplotno obdelamo v surovo mleko, kar je v industriji redkost, saj so v takem mleku še vedno lahko prisotni škodljivi mikroorganizmi (Bajt, 2011). Pomembne lastnosti mleka za pridelavo v sir so: njegova kislost – količina mlečne kisline (pH), količina laktoze in odstotek beljakovin ter maščob, zato pred predelavo mleka v sir preverimo tudi te lastnosti (Bajt, 2011).

Mikroorganizmi, ki jih dodamo mleku, so odvisni od vrste sira in od proizvodnega procesa. Mleku se po navadi doda starter kultura in sirilo, ki je encimski pripravek, pridobljen iz četrtega želodca telet. Vsebuje razgradnje encime, kot sta renin in pepsin, ki pospešujeta nastanek mlečne kisline (Britannica, 2022). Nekaterim vrstam dodajo tudi kalcijev klorid, natrijev ali kalijev nitrat ali lizozim (Bajt, 2011).

Poznamo dva načina sirjenja, klasičnega – v odprtih kotlih ali banjah – in sodobnega v zaprtih horizontalnih napravah. Sirjenju sledi zorenje mleka; mleku dodamo starter kulturo in jo pustimo delovati 30 min ob spremljanju naraščanja kisline ali pa mleko toplotno obdelamo pri 30 °C (Bajt, 2011).

Mleko v kotlu nato temperiramo do temperature usirjanja (28–35 °C). V tej fazi mu dodamo tudi sirilo. Sledi ločitev zrna od sirotke in oblikovanje sira. Sirotko odtočimo, hkrati se zrna posedejo. Na koncu sire stiskamo, da iz njih dokončno odstranimo vso vodo, jih solimo in damo zoriti. Čas zorenja sira je odvisen od vrste (Bajt, 2011) .

## 2.4 GENSKE TEHNOLOGIJE ZA DOKAZOVANJE PRISOTNOSTI TUJEGA DNA

### 2.4.1 Izolacija DNA

Izolacija DNA je proces, pri katerem iz testnega vzorca izoliramo dedni material. Friedrich Miescher je leta 1869 prvič izvedel izolacijo DNA. Cilj procesa je, da DNA izoliramo od ostalih organelov v celici in dobimo kakovostno ter dovolj veliko število DNA-molekul, ki jih lahko nato uporabimo v nadaljnjih raziskavah. Za izolacijo obstaja več različnih metod, najpogosteje komercialno dostopni seti, ki se razlikujejo glede na velikost vzorca, iz katerega izoliramo DNA in tip vzorca (Encyclopedia, 2018).

Izolacija DNA je nujna za izvedbo genetske analize vzorca in se uporablja za znanstvene in raziskovalne namene, v medicini ter v forenzičnih analizah. Prisotnost beljakovin, maščob, polisaharidov in anorganskih molekul v celicah vzorca namreč ovirajo uspešnost kasnejše analize DNA (Encyclopedia, 2018).

Vir DNA je lahko katerikoli živeči ali mrtev organizem. DNA lahko izoliramo iz krvi, tkiv, lasnih mešičkov sperme, slin, bakterij, različnih tkiv, kostnega mozga, celične kulture oziroma katerekoli celice tako živalske kot rastlinske, glivne ali katerega koli drugega mikroorganizma. Za potrebe sodne medicine pa DNA pogosto izolirajo iz krvnih madežev, las, zob, urina, prisotnega na kraju zločina (Encyclopedia, 2018).

Postopek izolacije DNA je sestavljen iz treh glavnih faz (Gupta, 2019):

1. **Liza celice** (razpad celice) – obstajata dve metodi povzročitve lize celice: fizikalna in kemična. Za razpad celične membrane lahko uporabimo kemično, fizikalno ali pa obe metodi hkrati. Povzročitev razpada jedra celice je možna samo s kemično metodo. Pri fizikalni metodi uporabimo mehanično silo, da povzročimo razpad. To se še posebej pogosto uporablja pri

rastlinah, ki imajo zelo debele celične stene. Pri kemični metodi pa za razpad celice uporabimo ali detergente (SDS – sodium dodecyl sulfate) ali pa encime (proteinase K – za živalske celice, celulaze – za rastlinske celice, lysozyme – bakterije) (Gupta, 2019).

2. **Obarjanje**, kjer se DNA loči iz jedra in celice. V tej fazi je DNA že prost, vendar je zmešan z ostalimi celičnimi organeli, kar imenujemo celični ekstrakt. V tej fazi dodamo natrijeve ione, ki nevtralizirajo DNA in ga naredijo stabilnejšega, in alkohol, v katerem se DNA obori (Gupta, 2019).
3. **Čiščenje DNA**, kjer raztopini spet dodamo alkohol (etanol/izopropanol), da odstranimo vse ostale organele in dobimo čisto DNA-molekulo (Gupta, 2019).

Obstaja več vrste metod izolacije DNA, ki pa vse vključujejo te tri faze. Delimo jih na kemično – organsko, anorgansko metodo ter fizikalno metodo. V laboratorijih se najpogosteje uporabljajo organska metoda (fenol–kloroform metoda), ki je zelo nevarna, anorganska metoda z uporabo encima *proteinase K* in absorpcijska metoda z uporabo silica–gel membrane ali z magnetki, ki imajo afiniteto za vezavo nukleinskih kislin. Komericalno se najpogosteje uporablja anorganska metoda z uporabo encima *proteinaza K* (Gupta, 2019).

#### 2.4.2 Določitev koncentracije izoliranega DNA

Koncentracijo DNA lahko določimo na različne načine, na primer spektrometrično ali fluorimetrično. Pri fluorimetrični metodi vzorcu dodamo barvilo, imenovano PicoGreen. PicoGreen je občutljivo fluorescentno barvilo, ki se veže v dvovertično DNA in po vezavi fluorescira, kar izmerimo na fluorimetru.

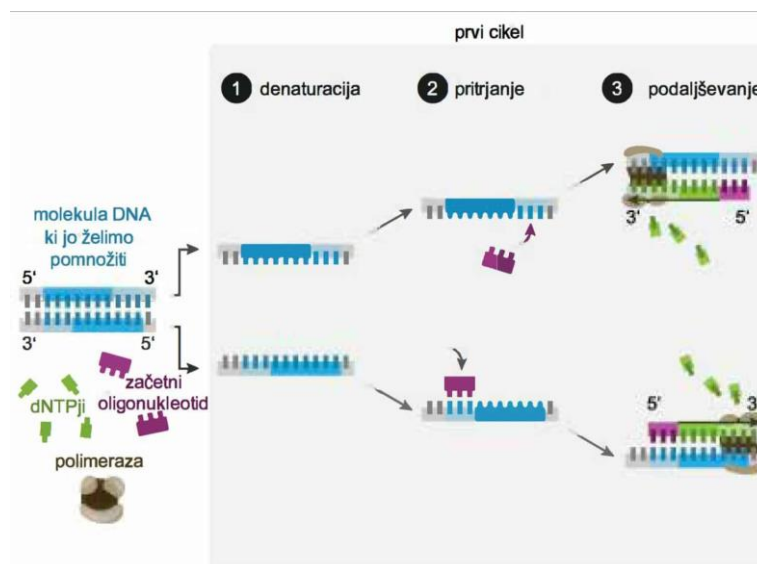
#### 2.4.3 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času

V zadnjem desetletju za identifikacijo določenih sestavih pogosto uporabimo molekularne metode, s katerimi preiskujemo DNA. PCR je metoda, ki jo je leta 1983 izumil Nobelov nagrajenec Kary Mullis (Klančnik, Toplak, Kovač, Ogrinc, & Jeršek, 2015). Je hitra, specifična in občutljiva metoda, ki služi različnim preiskavam. Primeri uporabe v živilski industriji so: določanje prisotnosti patogenih mikrobov, gensko spremenjenih organizmov, alergenov in ugotavljanje pristnosti posameznih vrst živil.

Verižna reakcija s polimerazo, znana pod angleško kratico PCR, je metoda, ki omogoča kopiranje točno določenih odsekov DNA s pomočjo encima *DNA-polimeraze*. Pred odkritjem te metode je bilo kloniranje DNA brez prisotnosti žive celice nemogoče (Repnik & Potočnik, 2013)

PCR je sestavljen iz treh stopenj: priprava DNA, priprava in izvedba PCR, dokazovanje PCR-pomnožkov. Dvojno vijačnico DNA je treba najprej razcepiti – denaturirati, da postane enoverižna. Razcepimo jo tako, da jo segrejemo na temperaturo 95 °C, da denaturira in razpade. Sledi vezava kratkih oligonuklotidnih začetnikov, ki se vežejo na skrajno nuklotidno zaporedje dela, tega pa želimo pomnožiti. Sledi izgradnja nove komplementarne verige z encimom *DNA-polimeraza*. Po končanem prepisu sledi nov cikel denaturacije, vezave in polimerizacije (Klančar, 2015).

Za uspešen potek PCR potrebujemo reagente – pufer, proste nukleotide, encim DNA-polimerazo specifične oligonukleotidne začetnike in izolirano DNA. Pomnoževanje DNA se zgodi, če je v dodanem vzorcu ustrezni odsek DNA s komplementarnim zaporedjem za oligonukleotidne začetnike. V posameznem ciklu pomnoževanja iz 1 molekule DNA nastaneta 2, v drugem 4 itn. – njihovo število se v vsakem ciklu podvoji. Izbira oligonukleotidnih začetnikov je odvisna od tarčne DNA – dela DNA, ki ga želimo pomnožiti. Zaporedje novonastalega DNA je enako zaradi komplementarnosti baznih parov (A-T, C-G). Na koncu novonastale PCR-produkte preverimo na gelski elektroforezi (Repnik & Potočnik, 2013).



Slika 2: PCR-reakcija (Dolenc, 2020)

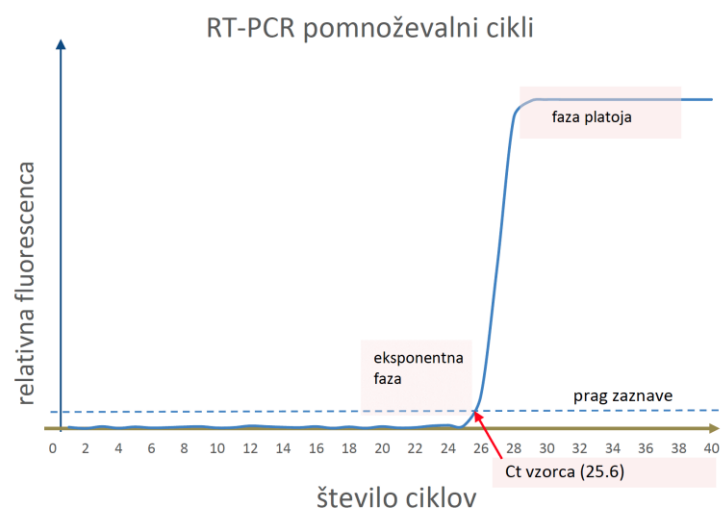
Iz PCR-reakcije se je razvila PCR-reakcija v realnem času (qPCR). Razvoj qPCR predstavlja pomemben napredek pri analizi nukleinskih kislin. V nasprotju s PCR je qPCR zaprt sistem, saj detekcija



novonastalih PCR-produktov poteka vzporedno in je možnost kontaminacije manjša. Detekcija je mogoča z uporabo sonde, ki je kratek odligonuklotidni začetnik, označen s fluorescentnm barvilom. Reakcija poteka v cikličnem termostatu, kjer se temperatura zvezno spreminja v ponavljajočih se ciklih kot pri navadnem PCRju – denaturacija – 95 °C, prilaganje oligonukleotidnih začetnikov (in sonde – te pri PCR ni) in podaljševanje DNA z encimom *DNA-polimerazo* od –60 °C do 72 °C (Dolenc, 2020).

Število pomnožkov lahko spremljamo med reakcijo samo, z detektiranjem fluorescentnih signalov. Metoda qPCR je bolj specifična in občutljiva od klasične PCR. Omogoča nam sprotno spremljanje nastajanja pomnožkov z uporabo fluorescenčnih barvil. Pri kvantitativni metodi qPCR lahko v realnem času spremljamo sproščeni signal v reakciji in tako preko jakosti zaznane svetlobe posredno določimo količino nastale dednine. Več kot je tarčnega DNA v vzorcu, večja bo jakost svetlobe. Ko meritve fluorescentnega barvila nanesemo na graf, dobimo amplifikacijsko krivuljo, ki ima več faz od eksponentnega naraščanja PCR-produktov (iz 1 kopije tarčne v enem ciklu 2 kopiji) do faze platoja, kjer se graf umiri (Dolenc, 2020).

S primerjanjem krivulj lahko določimo količino DNA v vzorcu. Količino ciklov, ki so potrebni, da fluorescentni signal doseže prag zaznave, označimo s kratico Ct (*cycle threshold*) ali Cq. Če se krivulji razlikujeta za 10 ciklov, je bilo v tisti z višjim Ct  $2^{10}$  manj DNA kot pa v tisti z nižjim (Dolenc, 2020).



Slika 3: Primer grafa qPCR (Dolenc, 2020)

Kljub visokim stroškom je uporaba qPCR v laboratorijih vse pogostejša (Klančnik, Toplak, Kovač, Ogrinc, & Jeršek, 2015).

### 3 MATERIALI IN METODA DELA

---

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Vzorci

Pri raziskovalni nalogi smo uporabili 24 vzorcev, od tega je bilo 21 sirov: 10 kozjih, 10 ovčjih in 1 kravji, kupljenih v štirih različnih supermarketih v Sloveniji (Hofer, Mercator, Spar, E. Leclerc). V trgovinah so prevladovali siri tujega porekla – samo dva sta bila slovenska. Ostali trije vzorci so bili vzorci kozjega, kravjega in ovčjega mleka, svežega, z okoliških kmetij. Vzorci so skupaj z opisi deklaracij navedeni v tabeli 1.

*Tabela 1: Vzorci, uporabljeni v raziskovalnem delu*

Oznaka	Vzorec	Sestavine navedene na deklaraciji	Prodajno mesto
1	Bio kozji sir	pasterizirano kozje mleko, sol, sirilo mikrobnih, žlahtne plesni	Hofer
2	Kozji sir	pasterizirano kozje mleko, sol, sirarske kulture, mikrobiološko sirilo, konzervans natamicin	Hofer
3	Ovčji sir	pasterizirano ovčje mleko, sol, mlečni fermenti, kalcijev klorid, sirilo	E. Leclerc
4	Kozji sir	pasterizirano kozje mleko, jedilna sol,	E. Leclerc
5	Mastni ovčji sir	pasterizirano ovčje mleko, sol, sirilo, mlečni ferment, kalcijev klorid	E. Leclerc
6	Sir kozji gavda	pasterizirano kozje mleko, sol, sirilo, mlečne kulture	Mercator
7	Sir ovčji gavda	pasterizirano ovčje mleko, sol, sirilo, mikrobiološke kulture	Mercator
8	Mehki ovčji sir	ovčje mleko, sirilo, sol	Mercator
9	Slovenski kozji sir	polno nehomogenizirano kozje mleko, sol, sirilo	Mercator
10	Ovčji sir	pasterizirano ovčje mleko, sol, kvas, sirilo, mlečni fermenti	Mercator
11	Kozji sir – poltrdi	pasterizirano kozje mleko, sirišče, sirarske kulture, jedilna sol	Mercator
12	Sir ovčji 40 % M.M.	ovčje mleko, sol, sirilo, encimi	Mercator

13	Sir kozji, staran 50 % M.M.	pasterizirano kozje mleko, jedilna sol, startne kulture, vegetarijansko sirilo	Mercator
14	Ovčji sir	pasterizirano ovčje mleko, sol, kvas, sirilo, mlečni fermenti	Mercator
15	Sir kozji, poltrdi 50 % M.M.	pasterizirano kozje mleko, sol, kloridno sirilo, mlečni fermenti, konzervansi E235, E202, E172	Mercator
16	Sir ovčji pistacija	pasterizirano ovčje mleko, zelene pistacije, sol, sirilo, sirove kulture, konzervansi E235 INE202	Mercator
17	Kozji gavda	pasterizirano kozje mleko, jedilna sol, sirilo, mikrobiološke kulture.	Spar
18	Paški sir	ovčje mleko, mlečne kulture, sirilo, kuhinjska sol	Spar
19	Bio kozji sir	pasterizirano kozje mleko, sol, sirilo	Hofer
20	Ovčji sir v slanici	pasterizirano ovčje mleko, mikrobiološko sirilo	Hofer
21	Kozje mleko	/	
22	Ovčje mleko	/	
23	Kravje mleko	/	Kmetija Ciglarič
24	Kravji sir	pasterizirano ultrafiltrirano mleko, kuhinjska sol, sirilo, mlekarska kultura, pomožno sredstvo E432	Spar

### 3.1.2 Kemikalije

Pri raziskovalnem delu smo za izolacijo DNA iz vzorcev sira in mleka uporabili komercialni komplet NucleoSpin Food (Macherey-Nagel GmbH & Co, Nemčija), ki vsebuje:

- pufer CF,
- pufer C5,
- mešanica pufra C4, sestavljena iz pufra C2 in C3 v razmerju 4 : 1,
- pufer CQW,
- pufer CE,
- proteinazo K.

Za pripravo reakcijske mešanice za qPCR smo uporabili oligonuklotidne začetnike in sonde Cow-1/BoCaOv (Metabion, Nemčija) iz študije Klančnik s sod., 2015. Uporabili smo tudi Fast Advence master mix (Thermo Fisher Scientific, ZDA), ki vsebuje vse ostale komponente, potrebne za uspešno izvedbo qPCR.

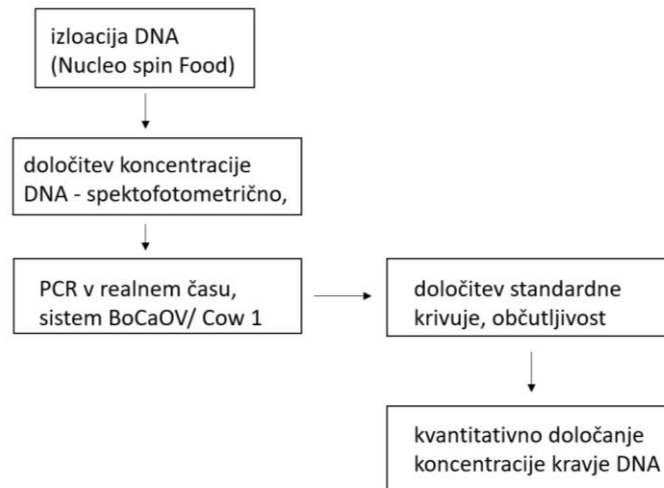
### 3.1.3 Laboratorijska oprema

Pri raziskovalni nalogi smo uporabljali standardni laboratorijski material, kot so strgala, žlice, pincete in rokavice, ter:

- avtomatske pipete in nastavke (0,5–10  $\mu$ L, 20–200  $\mu$ L) (Eppendorf, Nemčija),
- centrifugo Mini Spin Plus (Eppendorf, Nemčija),
- vodno kopel (Domel – Tehnica, Slovenija),
- tehnico (Domel, Slovenija),
- zmrzovalnik (Gorenje, Slovenija),
- vrtinčno mešalo (Domel – Tehnica, Slovenija),
- PCR v realnem času ViiA7 Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, ZDA),
- spektrofotometer Qubit v4 (Thermo Fisher Scientific, ZDA),
- epice (Eppendorf, Nemčija),
- plastikovina za qPCR in fluorimetrične meritve (Thermo Fisher Scientific, ZDA).

## 3.2 METODA DELA

Potek eksperimentalnega dela prikazuje slika 4. Če smo hoteli v ovčjih in kozjih sirih določiti koncentracijo kravjega mleka, smo morali najprej izolirati DNA iz vzorcev. Nato smo koncentracijo izoliranega DNA izmerili na fluorometru. DNA smo analizirali s pomočjo qPCR z uporabo oligonuklotidnih začetnikov in sonde Cow 1 (določanje kravjega mleka – kravjega DNA) in uporabo oligonuklotidnih začetnikov in sonde BoCaOv (določanje sesalčevega mleka – kravjega, kozjega ali ovčjega DNA). Nato smo naredili standardne krivulje za kozje, ovčje in kravje mleko in kravji sir. S pomočjo teh smo nato izračunali količino sesalčje DNA in kravje DNA v posameznem vzorcu.



Slika 4: Potek dela

### 3.2.1 Izolacija DNA iz vzorcev

Pri raziskovalnem delu smo za izolacijo DNA iz vzorcev uporabili komercialni komplet, imenovan **NucleoSpin Food** (Macherey-Nagel GmbH & Co, Nemčija).

Postopek:

- vzorce sira velikosti 0.5 cm x 0.5 cm (cca 200 mg) smo prestavili v mikrocentrifugirko,
- mikrocentrifugirke smo zamrznili na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,
- v vodni kopeli smo segreli pufer CF na  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,
- vsakemu vzorcu v mikrocentrifugirki smo dodali  $550\text{ }\mu\text{L}$  segretega CF-pufra,
- s pomočjo palčke za matematiko smo sir v mikrocentrifugirki homogenizirali,
- zaprli smo mikrocentrifugirko in intenzivno zmešali 15 sekund na namiznem mešalu,
- kratko mešanje na namiznem mešalniku,
- dodali smo  $10\text{ }\mu\text{L}$  proteinaze-K,
- ponovno premešali na namiznem mešalu (30 sekund),
- sledi inkubacija, 30 min v vodni kopeli pri  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,
- po inkubaciji smo mikrocentrifugirke centrifugirali 10 minut pri  $10.000\text{ g}$ ,
- v novo  $1.5\text{ ml}$  mikrocentrifugirko epico smo napipetirali  $300\text{ }\mu\text{L}$  pufra C4 in  $300\text{ }\mu\text{L}$  absolutnega etanola,
- po centrifugiranju smo prenesli  $300\text{ }\mu\text{L}$  dobljenega supernatanta,
- mikrocentrifugirko smo zaprli in 30 sekund mešali na namiznem mešalu,

- 750 µL mešanice smo iz mikrocentrifugirke prenesli v kolono za izpiranje, ki je vstavljena v zbiralno epruveto,
- centrifugirali smo 1 min pri 11.000 g,
- tekočo fazo v zbiralni epruveti smo zavrgli in kolono smo vstavili v isto zbiralno epruveto,
- v kolono za izpiranje smo odpipetirali 400 µL pufra CQW,
- centrifugirali 1 min pri 11.000 RPM ,
- iz spodnje zbiralne epruvetke smo odlili tekočo fazo,
- na kolono smo odpipetirali 700 µL pufra C5,
- centrifugirali smo 1 min pri 11.000 RPM,
- spet zavržemo tekočo fazo,
- na kolono odpipetiramo 200 µL pufra C5,
- centrifugiramo 2 min pri 11.000 g,
- zavržemo tekočo fazo,
- kolono za izpiranje smo prestavili v novo mikrocentrifugirko,
- na kolono napipetiramo 50 µL pufra CE, segretega na 70 °C,
- inkubiramo 5 min pri sobni temperaturi,
- centrifugiranje kolone 1 minuto pri 11.000 g,
- na kolono napipetiramo še enkrat 50 µL pufra CE, segretega na 70 °C,
- inkubiramo 5 min pri sobni temperaturi,
- sledi centrifugiranje kolone 1 minuto pri 11.000 g,
- kolono na koncu zavržemo,
- DNA je zbrana v zbiralni mikrocentrifugirki,
- za nadaljnje analize shranimo v zamrzovalniku pri –20 °C.

Za izolacijo DNK iz vzorcev mleka smo izvedli enak postopek, vendar smo pred tem 1 nL vsakega vzorca vzorca:

- premešali na namiznem mešalniku 10 s,
- centrifugirali 10 min na 11.500 g,
- odstranili maščobe in ostale snovi, ki so se izločile.

### 3.2.2 Določitev koncentracije izoliranega DNA

Koncentracijo DNA smo določili fluorimetrično s pomočjo kompleta Qubit dsDNA HS Assay Kit in inštrumenta Qubit v4 (ThermoFisher Scientific, ZDA).

Postopek:

- za vsak vzorec pripravimo mešanico 199  $\mu\text{L}$  Qubit dsDNA HS Buffer in 1  $\mu\text{L}$  Qubit dsDNA HS-reagenta,
- v specifični mikrocentrifugirke napipetiramo 195  $\mu\text{L}$  pripravljene mešanice,
- dodamo 5  $\mu\text{L}$  izoliranega DNA,
- premešamo na namiznem mešalu,
- inkubacija 2 minuti,
- izmerimo na inštrumentu Qubi v4.

### 3.2.3 Priprava in izvedba PCR v realnem času

Za določanje potvorb ovčjega in kozjega sira smo uporabili qPCR. Uporabili smo metodo določanja pomnožkov s sistemom Cow-1 in BoCaOv.

Za pomnoževanje in določanje pomnožkov smo uporabili instrument qPCR, imenovan Vaa7 (Thermo Fisher Scientific, ZDA).

Za vsak vzorec smo pripravili dve mešanici, eno za določanje kravjega DNA in drugo za določanje sesalčevega DNA. Končna koncentracija v posamezni reakciji qPCR je bila 900 nM oligonuklotidnih začetnikov in 250 nM sonde. Uporabljali smo 2-x Fast Advance master mix (Thermo Fisher Scientific, ZDA), ki vsebuje vse ostale komponente za primerno izvedbo qPCR-ja.

Pripravili smo tudi 10-kratnik razredčitve DNA posameznega mleka in iz pridobljenih podatkov generirali standardno krivuljo pomnoževanja. Vsak vzorec razredčimo 10-x, 100-x in 1000-x, in sicer tako, da v epico damo 1  $\mu\text{L}$  izolirane DNA in 9  $\mu\text{L}$  vode. To ponovimo trikrat – da dobimo 10-x, 100-x in 1000-x razredčitev. Vsako od teh razredčitev testiramo tako z BoCaOv kot z reagenti Cow 1.

Pripravili smo reakcijski mešanici za večje število vzorcev za detekcijo BoCaVO in za Cow 1. Mešanici na hitro premešamo na namiznem mešalniku in v ploščico za qPCR v izbrane odprtine/luknjice

prenesemo 8  $\mu\text{L}$  vsake mešanice. V posamezno luknjico dodamo v duplikatu po 2  $\mu\text{L}$  izoliranega DNA-vzorca.

Izvajamo tudi negativno kontrolo (NTC). V primeru negativne kontrole (NTC) pa namesto izoliranega DNA dodamo 2  $\mu\text{L}$   $\text{dH}_2\text{O}$ , tako v mešanico za določanje kravjega DNS kot za določanje DNA sesalcev.

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

- 2-x Fast Advance master mix,
- ustrezno koncentracijo začetnega oligonukleotida Cov1- F,
- ustrezno koncentracijo začetnega oligonukleotida Cov1- R,
- ustrezno koncentracijo sonde Cow1-P.

*Tabela 2: Mešanica za izvedbo qPCR(Cow 1)*

<b>Reagenti</b>	<b>dodani volumni za posamezno qPCR-reakcijo</b>
Fast Advance master mix	5
Cow1-F	0.9 $\mu\text{L}$
Cow1-R	0.9 $\mu\text{L}$
Cow1-P	0.25 $\mu\text{L}$
ddH <sub>2</sub> O	1.2 $\mu\text{L}$

Za pripravo reakcijske mešanice za en vzorec za določanje sesalcev (krava, ovca, koza) smo zmešali:

- 2-x Fast Advance master mix,
- ustrezno koncentracijo začetnega oligonukleotida Cov1-F,
- ustrezno koncentracijo začetnega oligonukleotida Cov1-R,
- ustrezno koncentracijo sonde BoCaOv.

*Tabela 3: Mešanica za pripravo qPCR (BoCaOv)*

<b>Reagenti</b>	<b>Dodani volumni za posamezno qPCR-reakcijo</b>
Fast Advance master mix	5
BoCaOv – F	0.9 $\mu\text{L}$
BoCaOv	0.9 $\mu\text{L}$
BoCaOv	0.25 $\mu\text{L}$



ddH <sub>2</sub> O	1.2 $\mu$ L
--------------------	-------------

Ploščico na koncu damo v qPCR-instrument in trajanje pomnoževanja nastavimo na 45 ciklov.

Protokol pomnoževanja je:

- inkubacija:
  - 2 min 50 °C
  - 2 min 95 °C
- ciklično pomnoževanje (45 ciklov):
  - 1 sek 95 °C
  - 20 sek 60 °C.



*Slika 5: Ploščica z vzorci za qPCR-analizo*

### 3.2.4 Določanje specifičnosti PCR v realnem času

Specifičnost je sposobnost metode, da v kompleksnem vzorcu identificira samo ciljno molekulo DNA. Zelo pomembna je optimalna izbira sond in oligonukleotidnih začetnikov, da ne dobimo lažno pozitivnih rezultatov. Lažno pozitivne rezultate lahko dobimo tudi zaradi navzkrižnega pomnoževanja.

Po končanem qPCR smo ovrednotili rezultate, tako da smo nastavili linijo fluorescenčnega praga in uporabili avtomatsko nastavitve mej bazne linije. Ročno smo pregledali krivulje, ki morajo biti značilne sigmoidne oblike. Določili smo vrednosti Ct posameznega vzorca.

Vrednost Ct je število ciklov, pri katerem se intenziteta fluorescentnega signala vzorca poveča nad fluorescenco bazne linije.

Vzorcem kravjega in ovčjega sira in mleka smo določili tudi »delta Ct« vrednost. Delta Ct vrednost je razlika med Ct vrednostjo za BoCaOv in Cow 1 sistem posameznega vzorca.

### 3.2.5 Določanje učinkovitosti PCR v realnem času

Učinkovitost qPCR uporabljamo za vrednotenje rezultatov pri qPCR in jo izračunamo iz standardne krivulje. Iz dobljenih podatkov smo izrisali standardne krivulje za kravje, kozje in ovčje mleko za reakcije s sondama Cow 1/BoCaOv. Narisali smo tudi standardno krivuljo za kravji sir, da smo videli, ali se kaj razlikuje od tiste za kravje mleko (zaradi dodanih sestavin siru, kot so sirila).

Standardno krivuljo izrišemo in izračunamo enačbo premice – uporabimo logaritmirane koncentracije DNA, ki smo jo izolirali, in vrednosti, kjer graf seka ordinatno os. Standardno krivuljo izrišemo tako, da na x os naneseemo logaritmirano koncentracijo DNA vzorca, na y os pa Ct vrednost posamezne redčitve.

$$y = k = \log C + n$$

Legenda: **k**: naklon premice, **n**: presečišče grafa z ordinatno osjo, **C**: koncentracija DNA

Nato izračunamo učinkovitost qPCR z enačbo:

$$E = (-1 + 10^{-1/k})$$

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

### 3.2.6 Določanje prisotnosti kravjega mleka v vzorcih sira

Vrednost Ct vzorca za BoCaOv sistem smo nanegli na standardno krivuljo BoCaOv sistema posameznega mleka (kozjega/ovčjega) in tako izračunali količino (v ng) celokupne sesalčje DNA v vzorcu. Vrednost Ct vzorca za sistem Cow 1 pa naneseemo na standardno krivuljo Cow 1 sistema za kravje mleko in izračunamo količino kravje DNA v vzorcu. Ti vrednosti med seboj delimo in dobimo delež kravje DNA v vzorcu v primerjavi z celokupno sesalčjo DNA v vzorcu.

## 4 REZULTATI

---

V okviru raziskovalnega dela smo z qPCR-metodo v sirih, ki so na slovenskem tržišču, ugotavljali prisotnost in sledove kravjega DNA (kravjega mleka). Najprej smo iz 24 vzorcev, sirov ali mleka, s pomočjo kompleta NucleoSpin Food izolirali DNA. Nato smo za izvedbo qPCR uporabljali sistem Cow 1/BoCaOv. Določili smo specifičnost, standardne krivulje in učinkovitost qPCR ter na podlagi tega ovrednotili vzorce sirov.

### 4.1 IZOLACIJA DNA IN NJEGOVA KONCENTRACIJA

DNA smo izolirali iz vzorca, velikega 0,5 x 0,5 x 0,5 cm<sup>3</sup> oziroma težkega približno 200 mg. Izolacijo smo naredili z uporabo komercialnega kompleta NucleoSpin Food. Nato smo določili koncentracije izoliranega DNA. Koncentracija DNA posameznega vzorca je prikazana v tabeli 4.

Glede na koncentracijo izoliranega DNA lahko rečemo, da je bila izolacija uspešna. Iz vseh vzorcev smo uspeli izolirati dovolj veliko količino DNA, da smo jih potem lahko uporabili v nadaljnji raziskavi.

*Tabela 4: Koncentracija izoliranega DNA*

Oznaka vzorca	Koncentracija (ng/ $\mu$ L)	Koncentracija (ng/mL)
1	15	374
2	18,9	472
3	15,9	378
4	16,7	418
5	13,1	327
6	3,9	97,7
7	15,7	392
8	16,3	407
9	20,4	510
10	3,16	79,1
11	12,1	303
12	6,28	157

13	7,48	187
14	10,1	253
15	22,4	560
16	0,06	1,62
17	15,7	393
18	0,78	19,6
19	6,52	163
20	20,4	510
21	1,07	26,7
22	15,7	393
23	0,142	7,10
24	2,45	61,2

#### 4.2 DOLOČITEV UČINKOVITOSTI PCR V REALNEM ČASU

Za kozje, ovčje in kravje mleko in kravji sir (vzorci 21, 22, 23 in 24) smo določili standardne krivulje pomnoževanja in učinkovitost pomnoževanja. Uporabili smo povprečne vrednosti, ki smo jih dobili pri razredčitvah (opisano v metodah). Standardne krivulje smo izrisali za ovčje in kozje mleko za BoCaOv in kravje mleko in kravji sir za BoCaOv in Cow 1. Standardne krivulje so prikazane na grafih 1, 2, 3, 4, 5 in 6. Podatki, ki smo jih uporabili za izračun, pa so prikazani v tabeli 5.

*Tabela 5: Podatki za izdelavo standardnih krivulj*

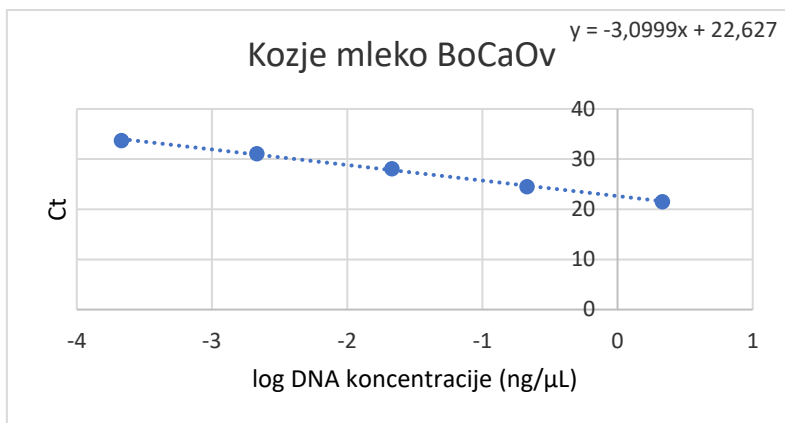
Vzorec	Vrsta sonde (BoCaOV / Cow 1)	Razredčitev	Koncentracija DNA (ng/ $\mu$ L)	Log (koncentracija DNA) (ng/ $\mu$ L)	Ct (Cq)
Kozje mleko	BoCaOv	$10^0$	2,14	0,33	21,5
		$10^1$	0,214	-0,67	24,5
		$10^2$	0,0214	-1,67	28,1
		$10^3$	0,00214	-2,67	31,1
		$10^4$	0,000214	-3,67	33,7
Ovčje mleko	BoCaOv	$10^0$	40	1,60	16,9

		$10^1$	0,4	0,60	20,0
		$10^2$	0,04	-0,40	23,7
		$10^3$	0,004	-1,40	27,2
		$10^4$	0,0004	-2,40	30,5
Kravje mleko	BoCaOv	$10^0$	0,3	-0,52	22,6
		$10^1$	0,03	-1,52	25,7
		$10^2$	0,003	-2,52	29,1
		$10^3$	0,0003	-3,52	32,1
		$10^4$	0,00003	-4,52	34,8
Kravje mleko	Cow 1	$10^0$	0,3	-0,52	24,8
		$10^1$	0,03	-1,52	27,9
		$10^2$	0,003	-2,52	31,4
		$10^3$	0,0003	-3,52	35,4
		$10^4$	0,00003	-4,52	/
Kravji sir	BoCaOv	$10^0$	5	0,70	20
		$10^1$	0,5	-0,30	23,4
		$10^2$	0,05	-1,30	27,5
		$10^3$	0,005	-2,30	30,7
Kravji sir	Cow 1	$10^0$	5	0,70	22,1
		$10^1$	0,5	-0,30	25,4
		$10^2$	0,05	-1,30	29,6
		$10^3$	0,005	-2,30	33,1

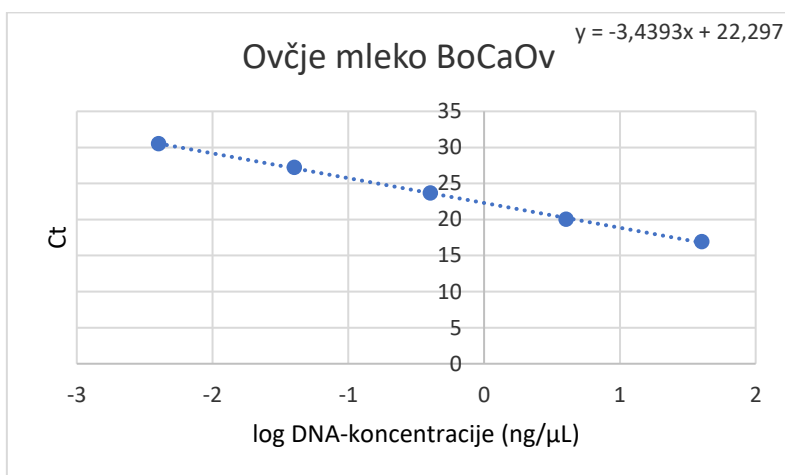
\*Koncentracije smo množili z 2, ker smo v qPCR reakciji detektirali 2  $\mu$ L.

Iz zgornje tabele lahko sklepamo, da je najmanjše zaznavno območje kravjega DNA s Cow 1 koncentracija 0,0003 ng/ $\mu$ L, manjših koncentracij kravjega DNA s to metodo ne moremo zaznavati.

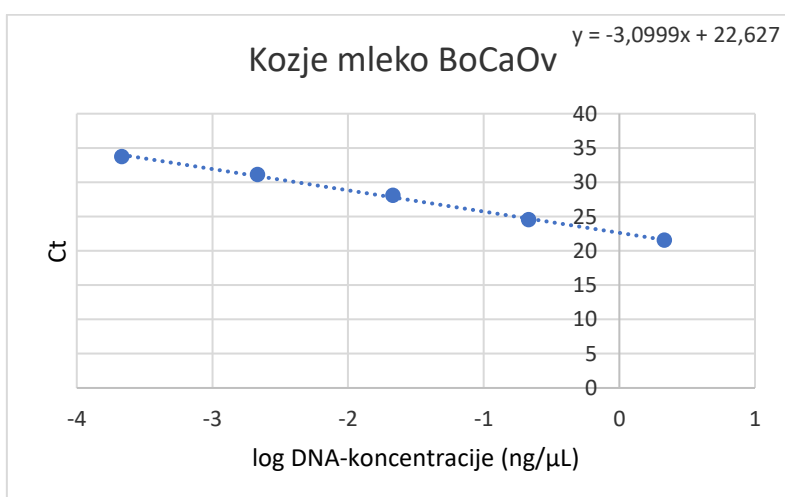
Iz podatkov v tabeli 5 smo narisali grafe standardnih krivulj. Izračunali smo koeficient premice posameznega grafa, linearne regresije in iz koeficienta premice po enačbi  $E = (-1 + 10^{-1/k})$  tudi učinkovitost qPCR.



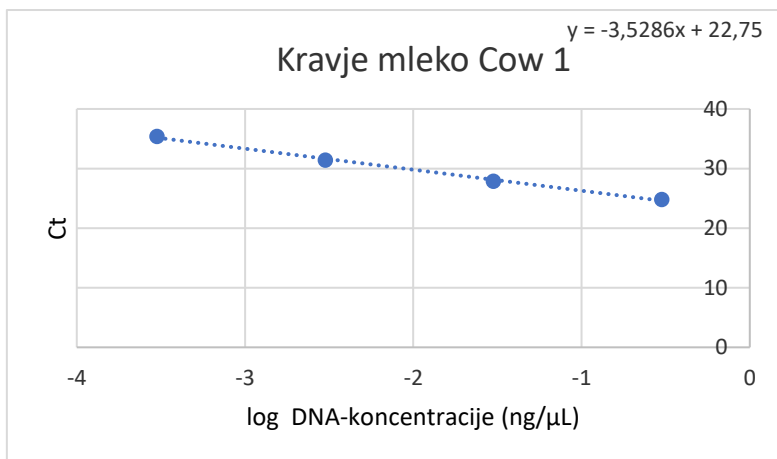
Graf 1: Standardna krivulja BoCaOv kozje mleko



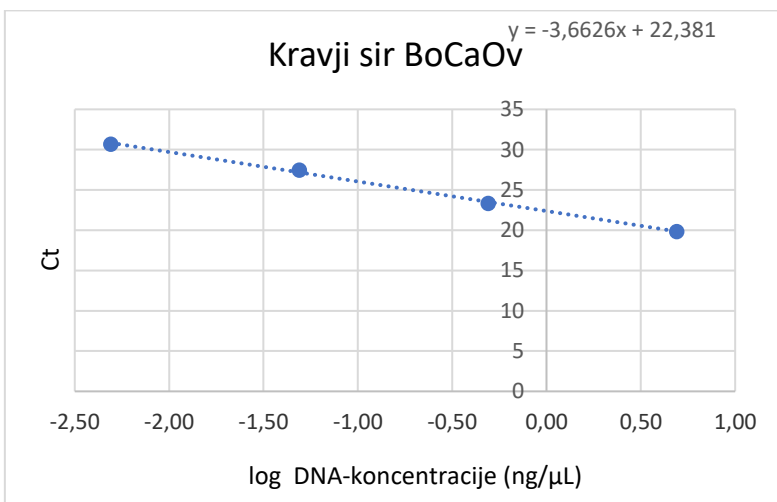
Graf 2: Standardna krivulja BoCaOv ovčje mleko



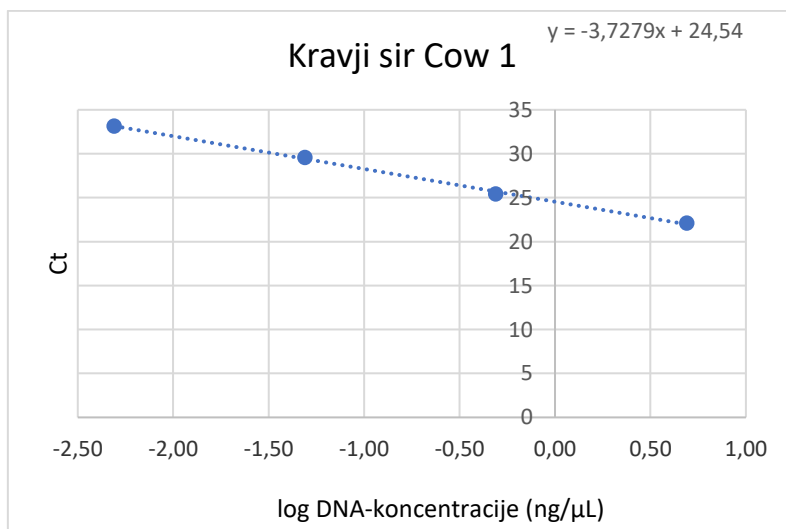
Graf 3: Standardna krivulja BoCaOv kravje mleko



Graf 4: Standardna krivulja Cow 1 kravje mleko



Graf 5: Standardna krivulja BoCaOv kravji sir



Graf 6: Standardna krivulja Cow 1 kravji sir

Tabela 6: Učinkovitost metode

Standardna krivulja	Koeficient premice	Učinkovitost
Kozje mleko – BoCaOv	3,10	110 %
Ovčje mleko – BoCaOv	-3,43	96 %
Kravje mleko – BoCaOv	-3,09	110 %
Kravje mleko Cow 1	-3,53	93 %
Kravji sir BoCaOv	-3,66	87 %
Kravje sir Cow 1	-3,73	85 %

Naša metoda je bila učinkovita, saj so vse učinkovitosti pomnoževanja mleka med 90 % in 110 %. Malo slabša je učinkovitost pri kravjem siru (med 85 in 90 %), verjetno zaradi dodatkov (siril, aditivov), ki so siru dodani med proizvodnjo. Sir zato ni tako zelo čist, kot je sveže kravje mleko. Sklepamo lahko, da je učinkovitost pomnoževanja DNA pri kozjih in ovčjih sirih enaka kot pri kravjem siru (saj je učinkovitost pomnoževanja kozjega/ovčjega mleka podobna kravjemu mleku), vendar ima mleko dodane dodatke tako kot kravji sir. Naša metoda je bila natančna, saj so odstopanja točk od premice/standardne krivulje minimalna. Glede na dane podatke smo se odločili, da bomo za končni izračun uporabili za vsako vrsto specifično premico (na primer: za kozji sir – enačbo kozjega BoCaVO za določitev celokupnega DNA (tako krave kot koze) in za detekcijo kravjega DNA – enačbo kravji sir Cow 1).

#### 4.3 SPECIFIČNOST PCR V REALNEM ČASU

Specifičnost qPCR smo določili vzorcem kozjega in ovčjega mleka s sistem Cow 1. Z njim smo določili možnost navzkrižne reakcije. Izračunali smo razliko med Ct BoCaOv in Ct Cow 1 in tako dobili  $\Delta Ct$ . Vzorcev sira, ki bodo imeli  $\Delta Ct$  vrednosti višjo od izračunane  $\Delta Ct$  za posamezno mleko (kozje oz. ovčje), ne bomo obravnavali, saj ne moremo biti prepričani, da je zaznava sistema Cow 1 posledica prisotnosti kravjega DNA v vzorcu in ne križnega pomnoževanja, ki se lahko zgodi zaradi podobnosti kravjega DNA z ovčjim oz. kozjim.

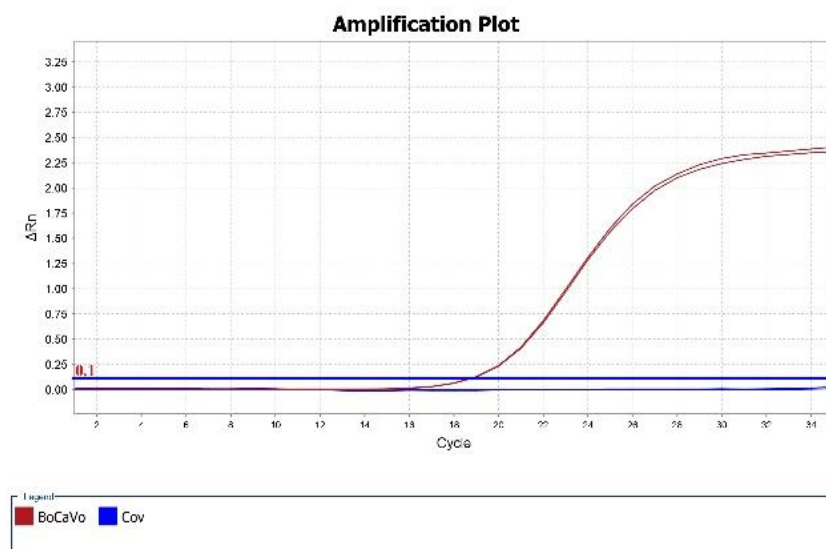
Tabela 7: Razlika Ct kozjega in ovčjega mleka

Vrsta mleka	Razlika Ct med Ct BoCaVo in Cow 1 sistema
Kozje mleko	14
Ovčje mleko	18



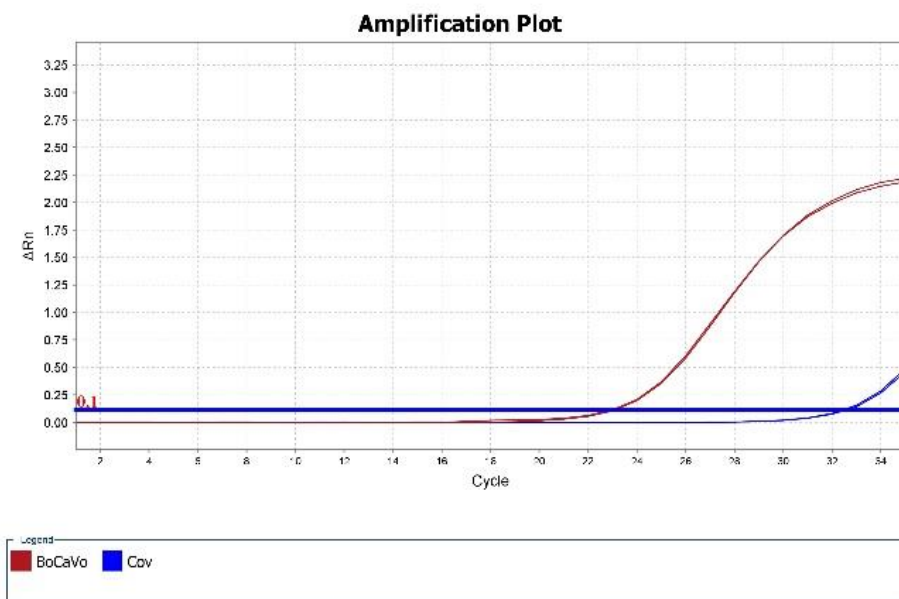
#### 4.4 DOLOČITEV KRAVJEGA DNA V VZORCIH SIRA S PCR V REALNEM ČASU

Iz vseh 20 vzorcev sirov (10 ovčjih in 10 kozjih) smo izolirali DNA. Vsak vzorec smo analizirali štirikrat, od tega dvakrat s sondami BoCaOv, da smo dokazali prisotnost sesalčevega mleka, pri čemer so bili vsi vzorci pričakovano pozitivni. Nato smo vsak vzorec dvakrat testirali tudi s sistemom Cow 1; tokrat bi vsi vzorci morali biti negativni, ker je šlo za vzorce kozjega in ovčjega sira. Nekateri vzorci so bili pričakovano pozitivni. Pozitivnim vzorcem smo izračunali  $\Delta Ct$  (iz povprečnih vrednosti Ct za BoCaVo in Cow 1); če je bila nižja od  $\Delta Ct$  za posamezno mleko, smo jih analizirali podrobneje. Če ne, smo predpostavili, da je količina mleka ali tako zelo majhna (manjša od 0,01 %), da je ne moremo analizirati oziroma kravjega DNA ni v vzorcu ali pa je prišlo do navzkrižnega pomnoževanja. Prav tako pozitivnega rezultata nismo upoštevali, če je bila vrednost Ct višja od 35. To smo ugotavljali ob ročnem pregledovanju vseh 40 grafov.



Slika 6: Primer slike grafa kozjega vzorca – vzorec 2

Primer grafa, ki smo ga analizirali, je na sliki 6; z grafa vidimo, da je bil vzorec 2 negativen na sistem Cow 1, oziroma do pomnoževanja pred 35 ni prišlo. Pomnoževanje je bilo minimalno zaznavno v 38. ciklu, kar je višje od naše meje detekcije. Pomnoževanje s sistemom BoCaOv smo zaznali v 18. ciklu.  $\Delta Ct$  je 20 in o tem vzorcu lahko skoraj z gotovostjo trdimo, da kravjega mleka ne vsebuje.



Slika 7: Primer slike grafa pozitivnega vzorca – vzorec 18

Slika 7 prikazuje graf vzorca 18, pri katerem zaznamo pomnoževanje kravjega DNA s sistemom Cow 1. Detektirali smo ga v 32. ciklu, vrednost Ct za sistem BoCaOv pa je bila 23.  $\Delta$ Ct-vrednost je 9 ciklov, kar je zelo majhna razlika. O vzorcu 18 lahko trdimo, da je prišlo do kontaminacije kravjega DNA v sir ali v postopku proizvodnje, pri prodaji v trgovini ali pa pri skladiščenju, saj je izračunani odstotek kravjega DNA v vzorcu zelo nizek (0,8 %). Izračunane vrednosti vseh vzorcev so prikazale v tabeli 8.

Tabela 8: Vzorci sira in mleka, uporabljeni v eksperimentalnem delu

Vzorec/vrsta mleka	BoCaOv Ct	Cow 1 Ct	$\Delta$ Ct	Prisotnost kravjega DNA (%)*
1/ kozji	21	37	15,9	Ne
2/ kozji	18,7	37,9	19	Ne
<b>3/ ovčji</b>	19,2	34,3	15	Da (caa. 0,02)
4/ kozji	19	35	15,9	Ne
<b>5/ ovčji</b>	19	32,5	13,5	Da (caa. 0,06)
<b>6/ kozji</b>	20,6	33,9	13,3	Da (caa. 0,05)
7/ ovčji	20,2	35,1	15	Ne
8/ ovčji	18,3	34,4	16	Ne

9/ kozji	19,5	34,9	15,4	Ne
10/ ovčji	20,9	36,4	15,5	Ne
11/ kozji	18,1	33,6	15,6	Ne
12/ ovčji	20,6	37,1	16,5	Ne
13/ kozji	20,8	35,9	15,1	Ne
14/ ovčji	19,7	34,6	14,9	Ne
<b>15/ kozji</b>	19,3	31,8	12,5	Da (caa. 0,1)
<b>16/ ovčji</b>	23,1	35,7	12,5	Da (caa. 0,1)
17/ kozji	20,2	35,1	14,9	Ne
<b>18/ ovčji</b>	22,9	32,4	9,5	Da (caa. 0,83)
<b>19/ kozji</b>	21,1	32,9	11,8	Da (caa. 0,15)
<b>20/ ovčji</b>	20,6	32	11,4	Da (caa. 0,23)

\*Pri vseh, kjer piše ne, je količina kravjega DNA tako zelo majhna, da o njej ne moremo biti prepričani (zaznamo jo šele po 35 ciklu ali pa je  $\Delta C_t$  večja od izračunane za posamezno mleko).

Iz preglednice opazimo, da imajo samo trije vzorci več kot 0,1 % kravjega DNA. Tudi najvišja vrednost je pod 1 %. Dobljeni rezultati so zelo obetavni. Noben sir nima tako velike količine kravjega DNA, da bi lahko trdili, da mu je bilo dodano kravje mleko. Ker so vrednosti tako zelo majhne, lahko sklepamo, da je prišlo samo do kontaminacije. Kontaminacija je možna znotraj same proizvodnje (isti prostori priprave različnih vrst sira, iste, slabo oprane posode) ali pa v prodaji. Siri so bili kupljeni v trgovini, kjer jih režejo z istim nožem, ne da bi tega medtem temeljito pomili. Od dvajsetih sirov jih tako sledove kravjega DNA vsebuje 8 (gre samo za sledove), kar je 40 %.

Opazna je manjša razlika med ovčjimi in kozjimi siri; od 8 pozitivnih je bilo 5 ovčjih in 3 kozji. Od tistih, o katerih pa lahko z gotovostjo trdimo, da vsebujejo kravji DNA v sledovih, saj so je imeli več kot 0,1 %, pa sta bili 2/3 ovčjih in samo 1 kozji. Večjih razlik med ovčjimi in kozjimi siri ni opaziti.

## 5 RAZPRAVA

---

V raziskovalni nalogi smo ugotavljali prisotnost kravjega DNA v 20 siri – 10 kozjih in 10 ovčjih s pomočjo verižne reakcije s polimerazo v realnem času. qPCR je molekularna metoda za detektiranje prisotnosti izbranega ali tako imenovanega tarčnega DNA v vzorcu. Za izvedbo qPCR je potrebna predhodna izolacija DNA iz vzorcev, kar smo naredili z uporabo komercialnega kompleta NucleoSpin Food. Izmerili smo koncentracijo izoliranega DNA posameznega vzorca in jo potem uporabljali za računanje pri analizi rezultatov.

Izvajali smo dve PCR-reakciji v realnem času na vsakem vzorcu, vsako reakcijo smo izvedli dvakrat in uporabili povprečje. Vzorce smo analizirali z uporabo sistema BoCaOv, ki reagira ob prisotnosti katerega koli kravjega, kozjega ali ovčjega DNA. Z njim detektiramo del nukleinskega zaporedja, ki ga imajo vse tri vrste zelo podobne. Nato smo izvedli še reakcijo s sistemom Cow 1, s katerim detektiramo kravji DNA.

Dobljene rezultate smo analizirali. Najprej smo določili standardne krivulje in učinkovitost pomnoževanja. Učinkovitosti so bile pričakovano višje pri mleku kot pa pri kravjem siru, ki smo ga zraven mleka uporabljali za kontrolo. Z izdelavo standardnih krivulj smo uporabili podatke vseh vrst mleka in kravjega sira, ki smo jih razredčili 10-x, 100-x, 1000-x in 10000-x. Standardne krivulje so bile skoraj brez odstopanj, ujemanje točk z premico, ki je potekala skozi, je bilo 99 %. Zato lahko z gotovostjo trdimo, da je bila naša metoda natančna in z minimalnimi napakami.

Izvajali smo tudi negativno kontrolo (NFC), kjer smo namesto vzorcev dodali vodo. Pričakovano je bila negativna kontrola brez rezultata – do pomnoževanja ni prišlo.

Ker so si kravji, kozji in ovčji DNA zelo podobni, smo za kozje in ovčje sire določili  $\Delta C_t$ -vrednost. Sirov, ki so imeli vrednost, večjo od izračunanega  $\Delta C_t$ , nismo analizirali naprej.

Dobljeni rezultati so nas presenetili. Čeprav je bilo na kravji DNA pozitivnih kar 8 vzorcev (40 %), so bili deleži te manj kot 1 %. Vrednost 0,1% so presegli samo trije siri, kar je 15 %. Za ostalih pet vrst sirov zaradi tako male količine izračunanega DNA sploh ne moremo trditi, da ga dejansko vsebujejo. Niti za en sir pa ne moremo trditi, da mu je bilo pri proizvodnji dodano kravje mleko. Najverjetneje je prišlo samo do kontaminacije sirov s kravjim mlekom/sledmi pri proizvodnji ali pa prodaji v trgovini.

Ljudje, ki nimajo hudih alergijskih reakcij, na takšno malo količino ne bi niti reagirali. Lahko bi pa prišlo do reakcij ob velikem uživanju takega sira ali pa pri ljudeh, ki imajo hude alergijske težave.

Hipoteze ne moremo v celoti zavreči, saj 15 % vzorcev, ki smo jih analizirali, zagotovo vsebuje sledi kravjega DNA, čeprav je bila ta vrednost med 0,1 in 1 %.

Rezultati naše raziskave so nekoliko boljši pri varnosti kupcev kot rezultati prejšnjih raziskav. V raziskavi Klančnika s sod. iz leta 2015 je namreč 5 % kozjih in 12 % ovčjih sirov vsebovalo več kot 5 % kravjega DNA. V naši raziskavi ni imel niti en sir tako zelo visokega rezultata. Je pa tudi pri nas kravji DNA vsebovalo nekoliko več ovčjih sirov kot kozjih, podobno kot v študiji Klančnika s sod., 2015.

Čeprav na tržišču, sploh med kozjimi in ovčjimi siri, prevladujejo tuji proizvajalci, smo našli tudi dva slovenska proizvoda. Oba sta bila kozja sira in iz slovenskih sirarstev oziroma iz družinske kmetije. Nobeden, kot smo pričakovali, ni vseboval kravjega DNA (vzorca 9 in 11). Drugo hipotezo smo tako potrdili.

Delo bi lahko nadgradili tako, da bi analizirali različne dele istega sira in različne sire iste vrste istega proizvajalca. Tako bi ugotovili, ali kravji DNA vsebujejo vsi vzorci ali samo naš. Če bi kupili celoten hlebec sira in ne rezin, bi lahko ob pozitivnem rezultatu izključili možnost, da je do kontaminacije prišlo na prodajnem mestu, kjer različne sire režejo z istim nožem, ampak te možnosti nismo imeli. Ponovitvena analiza enakih vzorcev pa bi že pokazala, ali so rezultati naključni in je prišlo samo do kontaminacije zaradi nepazljivosti ali pa imajo v proizvodnji tega sira težave z ohranjanjem kakovosti. Lahko bi analizirali tudi mešane sire in ugotavljali, ali je kozje/ovčje mleko sploh dodano kravjemu in v kakšnih količinah.

Z raziskovalno nalogo smo ugotovili, da večjih kršitev deklaracij oziroma podtikanja cenejše sestavine v izdelek namesto dražje na slovenskem tržišču ni. Kupci so tako s kakovostjo izdelkov lahko zelo zadovoljni.

## 6 DRUŽBENA ODGOVORNOST

---

Raziskovalne naloge smo se lotili z osnovnimi načeli družbene odgovornosti. Proizvajalci so dožni upoštevati pravice kupcev in jim nuditi kakovostne izdelke. Kakovost je določena s predpisi, v katerih je natančno določeno, kaj sirom v procesu proizvodnje lahko dodajo. Vrsta mleka, ki je v proizvodnji uporabljena, mora biti natančno definirana – kravje, kozje oz. ovčje mleko. Poleg tega podatka morajo biti na deklaraciji tudi drugi, kot so rok uporabe, naslov in ime proizvajalca itn. Vse to ščiti kupce pred morebitnimi zlorabami in zagotavlja varne in kakovostne izdelke.

V zadnjem času je uporaba molekularnih metod za določanje sestave izdelka močno narasla. Verižna reakcija s polimerazo, tako kot verižna reakcija s polimerazo v realnem času, je vedno dostopnejša in je od pojava virusa SARS Cov-2 postala del našega vsakdana. S takimi metodami lahko natančno in hitro določimo, ali vzorec vsebuje izbrani dedni material. S svojo raziskavo smo prispevali k poznavanju te metode in njenemu razumevanju, prav razumevanje pa je ključno za zaupanje ljudi v znanost.

Možnosti zlorab so majhne in zlorab je manj, ker jih z molekularnimi metodami hitro zaznamo. Veseli nas dejstvo, da na slovenskem tržišču kozjih in ovčjih sirov ni zlorab, oziroma sami nanje nismo naleteli. Kakršna koli zloraba lahko povzroči tveganje za zdravje posameznika – kupca, zato bi moral biti cilj družbe, da se jih, kar se le da, prepreči. Z rednimi testiranjmi s pomočjo molekularnih metod lahko to kakovostno zagotovimo, saj kot smo pokazali v raziskovalni nalogi, lahko zaznajo tudi do 0,1 % tujih snovi v izdelku.

## 7 ZAKLJUČEK

---

Siri so pogost sestavni del človekove prehrane. Glede na vrsto mleka poznamo kozje, ovčje in kravje sire. Slednji so najpogostejši in najcenejši, ker je najcenejša tudi surovina, iz katere so narejeni. Raziskave so potrdile, da v kozje in ovčje sire pogosto dodajajo kravje mleko, ker je cenejše. Tako zmanjšajo kakovost izdelka in povzročijo možnost alergijske reakcije pri ljudeh, ki imajo alergijo na kravje mleko in zato kozje in ovčje sire uživajo kot alternativo. Alergija na beljakovine v kravjem mleku je ena najpogostejših alergij v današnjem svetu.

V raziskovalni nalogi smo s PCR-reakcijo v realnem času z uporabo sistema BoCaOv in Cow 1 določali vsebnost kravjega DNA v siri, ki so deklarirani kot kozji oziroma ovčji. Izolirali smo DNA 21 sirov in 3 različnih vrst mleka. Naredili smo standardne krivulje pomnoževanja za vsako izmed vrst mleka in kravji sir ter določili učinkovitost pomnoževanja. Pričakovano je bila učinkovitost najnižja pri kravjem siru (še vedno 85 %) in predvidevali smo, da je učinkovitost pomnoževanja pri kozjih in ovčjih siri enaka. Določili smo enačbo premice standardnih krivulj in odstopanje/napako, ki je bila minimalna. Tako smo lahko nadaljevali z analizo sirov in jih testirali s sistemom BoCaOv in Cow1. Od 20 uporabljenih sirov je imelo sledi kravjega mleka 8 sirov (40 %). Delež kravjega DNA pa je bil sicer zelo majhen (pri vseh pod 1 %). Samo trije siri pa so imeli delež večji kot 0,1 % – dva ovčja in en kozji sir. Razlika med vrstama je bila minimalna.

Z raziskovalno nalogo smo ugotovili, da je zlorab na slovenskem tržišču sirov zelo malo. O nobenem siru ne moremo trditi, da mu je bilo med proizvodnjo mleko dodano; najverjetneje je prišlo do kontaminacije v trgovini, lahko pa tudi v predelovalnem obratu.

Nadzor in držanje deklaracije je ključnega pomena za ohranjanje kakovosti izdelkov, prisotnih na tržišču. Z uporabo molekularnih metod je lahko nadzor veliko boljši, saj so zelo natančne in tudi hitre. Verjetno je tudi njihova vse pogostejša uporaba razlog, da je zlorab manj kot v preteklih raziskavah.

## 8 VIRI IN LITERATURA

---

- Bahna, S. (2002). Cow's milk allergy versus cow milk intolerance. *ANNALS OF ALLERGY, ASTHMA, & IMMUNOLOGY*, 56-60.
- Bajt, N. (2011). *Učbenik: Tehnologija mleka*. Ljubljana: Biotehiški izobraževalni center.
- Britannica. (13. 1 2022). *Cheese*. Pridobljeno iz Encyclopedia Britannica: <https://www.britannica.com/topic/cheese>
- Dalmasso, A., Civera, T., La Neve, F., & Bottero, M. (2011). Dalmasso A, Civera T, La Simultaneous detection of cow and buffalo milk in mozzarella cheese by real-time PCR assay. *Food Chemistry*, 362–366.
- Dolenc, S. (24. 12 2020). *Kako delujejo testi za SARS-Cov-2*. Pridobljeno iz Kvarkadabra: <https://kvarkadabra.net/2020/12/testi-za-sars-cov-2/>
- Encyclopedia. (2. 6 2018). *DNA Isolation Methods*. Pridobljeno iz Encyclopedia: <https://www.encyclopedia.com/science-and-technology/biology-and-genetics/genetics-and-genetic-engineering/dna-isolation-methods#3448300189>
- Gupta, N. (2019). DNA extraction and polymerase chain reaction. *Jurnal of Cytology*, 116-117.
- Klančar, A. (2015). *Magistersko delo: Ugotavljanje potvorb kozjih in ovčjih sirov s kravjim mlekom*. Ljubljana: Biotehiška fakulteta.
- Klančnik, A., Toplak, N., Kovač, M., Ogrinc, N., & Jeršek, B. (2015). Robust PCR-based method for quantification of bovine milk in cheeses made from caprine and ovine milk. *Dairy Technology*.
- LEK. (2022). *Alergija*. Pridobljeno iz LEK: <https://lek.si/sl/skrb-za-zdravje/bolezni-dihal/alerzija/>
- Mafra, I., Ferreira, I., & Oliveira, M. (2008). Food authentication by PCR-based methods. *European Food Research and Technology*, 649–665.
- Milk production. (2022). *Gateway to dairy production and products*. Pridobljeno iz Food and Agriculture Organisation of the United Nations: <https://www.fao.org/dairy-production-products/en/>
- NIJZ. (15. 8 2015). *Mleko in mlekomati*. Pridobljeno iz NIJZ: <https://www.nijz.si/sl/mleko-in-mlekomati>
- Repnik, K., & Potočnik, U. (2013). *Učbenik: GENOMIKA V BIOMEDICINSKI TEHNOLOGIJI*. Maribor: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Maribor.
- Stele, A. (31. 8 2021). *etna prirreja in uporaba mleka na kmetijskih gospodarstvih, Slovenija, 2020*. Pridobljeno iz Statistični urad Republike Slovenije: <https://www.stat.si/StatWeb/news/Index/9763>



Urad za standardizacijo in meroslovje. (1993). *Pravilnik o kakovosti mleka, mlečnih izdelkov, siril in čistih cepiv*. Pridobljeno iz Uradni list: <https://www.uradni-list.si/glasilo-uradni-list-rs/vsebina/1993-01-0991/pravilnik-o-kakovosti-mleka-mlecnih-izdelkov-siril-in-cistih-cepiv>