Ewa Walczak, Wojciech Barszczewski

Badanie zafałszowań gatunkowych w wybranych produktach mlecznych pochodzenia konwencjonalnego, regionalnego i ekologicznego

Zeszyty Naukowe Państwowej Wyższej Szkoły Zawodowej im. Witelona w Legnicy 20 (3), 105-119

2016

Artykuł został opracowany do udostępnienia w internecie przez Muzeum Historii Polski w ramach prac podejmowanych na rzecz zapewnienia otwartego, powszechnego i trwałego dostępu do polskiego dorobku naukowego i kulturalnego. Artykuł jest umieszczony w kolekcji cyfrowej bazhum.muzhp.pl, gromadzącej zawartość polskich czasopism humanistycznych i społecznych.

Tekst jest udostępniony do wykorzystania w ramach dozwolonego użytku.

MUZEUM HISTORII POLSKI

Zeszyty Naukowe Państwowej Wyższej Szkoły Zawodowej im. Witelona w Legnicy
ISSN 1896-8333, e-ISSN 2449-9013 nr 20(3)/2016

Ewa Walczak
Państwowa Wyższa Szkoła Zawodowa im. Witelona w Legnicy, Wydział Nauk o Zdrowiu i Kulturze Fizycznej
e-mail: ewa_walczak@poczta.fm

Wojciech Barszczewski
Państwowa Wyższa Szkoła Zawodowa im. Witelona w Legnicy, Wydział Nauk o Zdrowiu i Kulturze Fizycznej
e-mail: biochemia@wp.pl

Badanie zafałszowań gatunkowych w wybranych produktach mlecznych pochodzenia konwencjonalnego, regionalnego i ekologicznego

STRESZCZENIE

Szybka i wiarygodna identyfikacja składu żywności jest niezwykle istotna zarówno ze względów zdrowotnych, jak i ekonomicznych. Metody biologii molekularnej jak i PCR oraz jego odmiany cieszą się dużym powodzeniem, zwłaszcza w kwestii identyfikacji zafałszowań. Wykorzystując metodę Multiplex-PCR przeanalizowano 24 produkty mleczne pod kątem zgodności składu gatunkowego mleka z deklarowanym przez producenta, uwzględniając produkty ekologiczne i regionalne (PDO). Mitochondrialny DNA (mtDNA) izolowano w oparciu o zestawy firmy A&A Biotechnology z drobną modyfikacją. Przy użyciu specyficznych starterów powielono fragment genów mitochondrialnych 12S i 16S rRNA, uzyskując produkty o wielkościach specyficznych dla gatunku: 256 pz dla DNA mleka krowy, 326 pz dla DNA mleka kozy i 172 pz dla DNA mleka owcy. Czułość oznaczenia ustalono na poziomie 2,5% zanieczyszczenia mlekiem krowim. Stężeń DNA nie standaryzowano po ekstrakcji, a najmniejsze ilości DNA, dla których uzyskano produkty amplifikacji, wynosiły 3,4 ng DNA z mleka krowiego i 31,8 ng z DNA sera owczego. Zastosowane metody ekstrakcji mtDNA i warunki amplifikacji umożliwiły szybką identyfikację mleka różnych gatunków zwierząt w 22 z 24 badanych serów. Wykazano zafałszowanie produktów zakupionych jako „oscypki" – wszystkie sery przebadane w tej grupie były wykonane w 100 % z mleka krowiego.

Słowa kluczowe: mleko, sery, „oscypki", identyfikacja, zafałszowanie, multiplex-PCR.

1. Wstęp

W dzisiejszych czasach spotykamy się z różnymi aspektami fałszowania żywności, obejmującymi stosowanie tańszych zamienników, wody, nieprawidłową deklarację składu czy pochodzenia, a także brak informacji o sposobie wytworzenia produktu. Za sfałszowany uważa się artykuł żywnościowy, który wprowadza konsumenta w błąd poprzez ukrytą zmianę któregoś ze składników na składnik mniej wartościowy lub bezwartościowy [Krauze, 1975]. Praktyki fałszowania takich produktów żywnościowych jak piwo, wino, tłuszcze jadalne czy mąka stosowane były już w starożytności. Zarówno wtedy, jak i w obecnych czasach celem tych zabiegów było głównie obniżenie kosztów produkcji, a co za tym idzie – zwiększenie zysków ze sprzedaży. Dla sektora żywnościowego wyzwaniem stało się więc zapewnienie gwarancji jakości żywności wprowadzanej na rynek oraz ochrona interesów konsumentów.

Zafałszowania żywności dotyczą takich produktów żywnościowych jak: miód naturalny, soki owocowe, dżemy, wina, wyroby spirytusowe, oliwa, ryby, mięso i jego przetwory oraz przetwory mleczne. Obecnie z praktyką tą można się spotkać we wszystkich krajach Europy, a główną grupę stanowią produkty mięsne i mleczne [Di Pinto i wsp., 2005]. Identyfikacja gatunku mleka jest istotna głównie ze względu na alergenność pewnych białek [Rance i wsp., 2005]. Obecność mleka krowiego w mleku, serach i jogurtach z mleka owczego, koziego i bawolego to najczęstsze zafałszowania. W grupie mlecznych produktów regionalnych dodatkowym aspektem jest zależna od surowca cena, która w przypadku serów z mleka owczego czy koziego znacznie przewyższa cenę produktów z mleka krowiego. W tej grupie produktów trudniej jednostkom kontrolującym wychwycić proces fałszowania ze względu na specyfikę procesu produkcji i dystrybucji gotowych wyrobów.

Analizę składu żywności wykonuje się w oparciu o różnorodne metody, takie jak: HPLC, ogniskowanie izoelektryczne, elektroforezę kapilarną, ELISA czy też metody biologii molekularnej, np. PCR i Real-Time PCR [Chianese i wsp., 1990; Molina i wsp., 2000; Ritcher i wsp., 1997; Ramos & Juarez, 1986; Di Pintoi wsp., 2004; Mayer, 2005]. W ostatnich latach coraz częściej stosowane są zwłaszcza te ostatnie, gdyż w znacznym stopniu ułatwiają i przyśpieszają identyfikację składników żywności, także w grupie produktów pozyskanych od gatunków pokrewnych [Teletchea i wsp., 2005; Meyer i wsp., 2005; Chikuni i wsp., 1994]. Ze względu na stabilność DNA techniki oparte na reakcji PCR z powodzeniem stosowane są do analizy składników żywności poddanej zróżnicowanym procesom technologicznym [Zhang i wsp., 2006; López-Calleja i wsp., 2004; Herman, 2004]. Ze względu na koszty i czas trwania analizy jedną z dość często stosowanych technik PCR jest Multiplex PCR. Badania zafałszowań produktów mlecznych najczęściej opierają się na analizie genów kazeiny, mitochondrialnych fragmentów 12S i 16S rRNA lub cytochromu b. Niezależni autorzy opisują skuteczność drugiej z tych metod w identyfikacji różnych gatunków mleka [Bottero i wsp., 2003; Matsunaga i wsp., 1999; Rea i wsp., 2001; Bottero i wsp., 2002].

Celem badań było zweryfikowanie zgodności składu wybranych produktów z deklarowanym, obejmujących sery z mleka krowiego, koziego i owczego, z uwzględnieniem certyfikowanych produktów ekologicznych oraz produktów regionalnych z obszaru Polski południowej.

2. Materiały i metody

2.1. Próbki mleka i serów

Próbki mleka wzorcowego krowy, kozy oraz ekologicznego mleka owczo-koziego (B1M, C1M, OC1M) zakupiono w marketach. Mleko wzorcowe owcze (O2M) pozyskano świeżo po udoju ze stada wypasanego w Masywie Śnieżnika na Dolnym Śląsku. Próby serów ekologicznych (B2S, C2S, C3S, C4S) zakupiono w certyfikowanych gospodarstwach ekologicznych Dolnego Śląska oraz w sklepach. Próby serów regionalnych sprzedawanych pod nazwą „oscypek" (O7S, O8S O9S, O10S, BO6S, BO7S) zakupiono na wolnym rynku w rejonie Tatr i Zakopanego w południowej Polsce. Pozostałe próby serów z mleka uzyskanego od zwierząt z chowu konwencjonalnego zakupiono w sklepach. Zestawienie analizowanych próbek przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Próby mleka oraz serów otrzymanych z mleka krowiego, owczego i koziego

Symbol	Opis produktu
B1M	Mleko krowie UHT
C1M	Mleko kozie UHT
OC1M	Napój mleczny UHT na bazie mleka owczego (60%) z dodatkiem kazeiny/serwatki koziej
O2M	Mleko owcze po udoju, ekologiczne
CO1S	Ser twarogowy z mleka mieszanego owczo-koziego, Feta Mevgal, Grecja
CO2S	Ser twarogowy z mleka mieszanego owczo-koziego, Hotos Manouri, Grecja
CO3S	Ser twarogowy z mleka mieszanego owczo-koziego, Kolios Feta, Grecja
B1S	Ser twarogowy z mleka krowiego, ZOTT Natur, Polska
C1S	Ser twarogowy z mleka koziego, Festkoz, Damnis, Polska
O1S	Ser twarogowy z mleka owczego, Rians, La Brebette, Francja
B2S	Ser twarogowy z mleka krowiego, Ananda Putta Bhumi, Głębock, Polska, ekologiczny
B3S	Ser twarogowy z mleka krowiego, Mlekowita, Polska
B4S	Ser twarogowy z mleka krowiego, Jana, Polska
B5S	Ser twarogowy z mleka krowiego, OSM Czarnków, Polska
C2S	Ser twarogowy z mleka koziego, Stara Kamienica, Polska, ekologiczny
C3S	Ser twarogowy z mleka koziego, Jeżów Sudecki, Polska, ekologiczny
C4S	Ser twarogowy z mleka koziego, Sosnówka, Polska, ekologiczny
C5S	Ser twarogowy z mleka koziego, President, Sainte Maure, Francja
C6S	Ser twarogowy z mleka koziego, Danmis, Polska
C7S	Ser twarogowy z mleka koziego, Chavroux, Francja
C8S	Ser twarogowy z mleka koziego, Turek, Polska
C9S	Ser twarogowy z mleka koziego, Danmis, Polska

O7S	„oscypek" – zakupiony na wolnym rynku, Zakopane, Polska
O8S	„oscypek" – zakupiony na wolnym rynku, Zakopane, Polska
O9S	„oscypek" – zakupiony na wolnym rynku, Zakopane, Polska
O10S	„oscypek" – zakupiony na wolnym rynku, Zakopane, Polska
BO6S	„oscypek" – zakupiony na wolnym rynku, Zakopane, Polska
BO7S	„oscypek" – zakupiony na wolnym rynku, Zakopane, Polska

O – *Ovis aries*, B – *Bos taurus*, C – *Capra hircus*, S – ser, M – mleko

Źródło: opracowanie własne.

2.2. Izolacja DNA z mleka

Do izolacji DNA z mleka wykorzystano Genomic Mini AX Tissue Spin firmy A&A Biotechnology. 10 mL mleka wirowano 20 min w temperaturze 4°C przy prędkości obrotów 3900 rpm, supernatant odrzucano, a osad zawieszano w 10 mL buforu TE i ponownie wirowano. Uzyskany osad przenoszono przy pomocy 500 µL buforu TE do probówki typu Eppendorf i wirowano przez 5 min przy 8000 rpm. Osad zawieszano w 400 µL buforu LSU z dodatkiem 20 µL proteinazy K i 2 µL RNazy A (10 mg/mL). Próbkę inkubowano w 50°C przez 1 godzinę w termomikserze, przy ciągłym mieszaniu przy prędkości obrotów 1400 rpm. Próbówki następnie wirowano przez 5 min przy 8000xg, aby osadzić na dnie pozostałości niezlizowanego materiału. Supernatant nanoszono na kolumnę Mini AX Spin znajdującą się w 2 mL probówce i wirowano 1 minutę przy 8000xg. Kolumienkę Mini AX Spin przenoszono do świeżej probówki 2 mL, nanoszono 600 µL buforu płuczącego W1 i wirowano 1 min przy 8000xg. Przesącz odrzucano i powtarzano etap płukania z buforem W1. Kolumienkę Mini AX Spin przenoszono do świeżej probówki o pojemności 2 mL i nanoszono 500 µL buforu płuczącego W2, a następnie wirowano przez 1 minutę przy 8000xg. W probówce elucyjnej umieszczano 5 µL buforu zobojętniającego N i umieszczano na niej kolumienkę Mini AX Spin. Nanoszono 150 µL buforu elucyjnego E i inkubowano 5 min w temperaturze pokojowej. Całość wirowano 1 minutę przy 8000xg. Po usunięciu kolumienki uzyskany preparat DNA przechowywano w temperaturze –20°C.

2.3. Izolacja DNA z serów

Do izolacji DNA z serów wykorzystano Genomic Mini AX Food firmy A&A Biotechnology. Około 100 mg próbki sera umieszczano w probówce typu Eppendorf i dodawano 1500 µL buforu lizującego LS oraz 20 µL proteinazy K. Próbkę inkubowano w 50°C przez 2 godziny w termomikserze przy ciągłym mieszaniu przy prędkości obrotów 1400 rpm. Próbki wirowano przez 5 min przy 14500 rpm. W trakcie wirowania przygotowywano kolumny, umieszczając je w próbówkach na 15 mL i nanoszono na nie 800 µL roztworu równoważącego K1. Supernatant po wirowaniu nanoszono na zrównoważoną kolumnę i czekano na wypływ grawitacyjny. Następnie kolumnę przemywano dwukrotnie po 1,5 mL buforu płuczącego K2. Dodawano 250 µL buforu elucyjnego K3 i czekano, aż wypłynie z kolumny. Następnie kolumny umieszczano w probówkach do precypitacji i eluowano DNA przez dodanie do kolumny po 1 mL roztworu elucyjnego K3. Do uzyskanych roztworów DNA dodawano 800 µL

mieszaniny precypitacyjnej PM i całość wirowano 10 min przy 12000 rpm. Supernatant odrzucano, a uzyskany jasnoniebieski precypitat DNA rozpuszczano w 500 µL 70% etanolu i wirowano przez 3 minuty przy prędkości obrotów 12000 rpm. Supernatant odrzucano, a probówki suszono odwrócone do góry dnem przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Osad zawieszano w 50 µL TE, dodawano 3 µL RNAzy A (10 mg/mL) i inkubowano 15 minut w 50°C. Po inkubacji uzyskane preparaty DNA przechowywano w –20°C.

2.4. Muliplex-PCR

Startery reakcyjne zamówiono w firmie Bionovo (tabela 2). Do reakcji PCR wykorzystano 2xPCR Master Mix Plus firmy A&A Biotechnology zawierający 0,1 U/ µL Taq DNA polimerazy, 4 mM $MgCl_2$, po 0,5 mM każdego z dNTP, stabilizator, czerwony barwnik oraz bufor obciążający. Reakcje PCR przeprowadzano w całkowitej objętości 25 µL, stosując 12,5 µL 2xPCR Master Mix Plus, po 7,5 pmol każdego ze starterów oraz 2 µL izolatów DNA. Wstępną denaturację prowadzono przez 5 minut w 94°C, a następnie 35 cykli PCR: 94°C przez 30 s, 55°C przez 1 min i 72°C przez 1 minutę oraz zakończenie reakcji w 72°C przez 5 minut. Elektroforezę uzyskanych produktów PCR prowadzono w 2-procentowych żelach agarowych w buforze 0,5xTBE z dodatkiem 5 µL/100 mL żelu barwnika Midori Green (Nippon Genetics) przez 120 min przy stałym napięciu 80 V. Wielkość produktów oceniano wobec wzorca GeneRuler Low Range DNA Ladder (ThermoScientific). Warunki reakcji Multiplex-PCR oraz sekwencje starterów zostały zaprojektowane przez Bottero i wsp. [2003]. W niniejszej pracy wykorzystano tą metodykę w celu zbadania autentyczności własnych próbek.

Tabela 2. Startery w reakcji PCR

Gatunek	Startery stosowane w reakcji PCR	Wielkość produktu PCR	Numer GenBank
Ovis aries Gen 12s dla sens i gen 16s dla antysens	Sens 959 (5' – ATATCAACCACACGAGAGGAGAC – 3')	172 pz	NC001 941
	Antysens 1130 (5' – TAAACTGGAGAGTGGGAGAT – 3')		
Capra hircus Gen 12s dla sens i antysens	Sens 144 (5' – CGCCTCCAAATCAATAAG – 3')	326 pz	M55541
	Antysens 469 (5' – AGTGTATCAGCTGCAGTAGGGTT – 3')		
Bos taurus Gen 12s dla sens i antysens	Sens 916 (5' – GTACTACTAGCAACAGCTTA – 3')	256 pz	NC001 567
	Antysens 1171 (5' – GCTTGATTCTCTTGGTGTAGAG – 3')		

Źródło: Bottero i wsp., 2003.

3. Wyniki

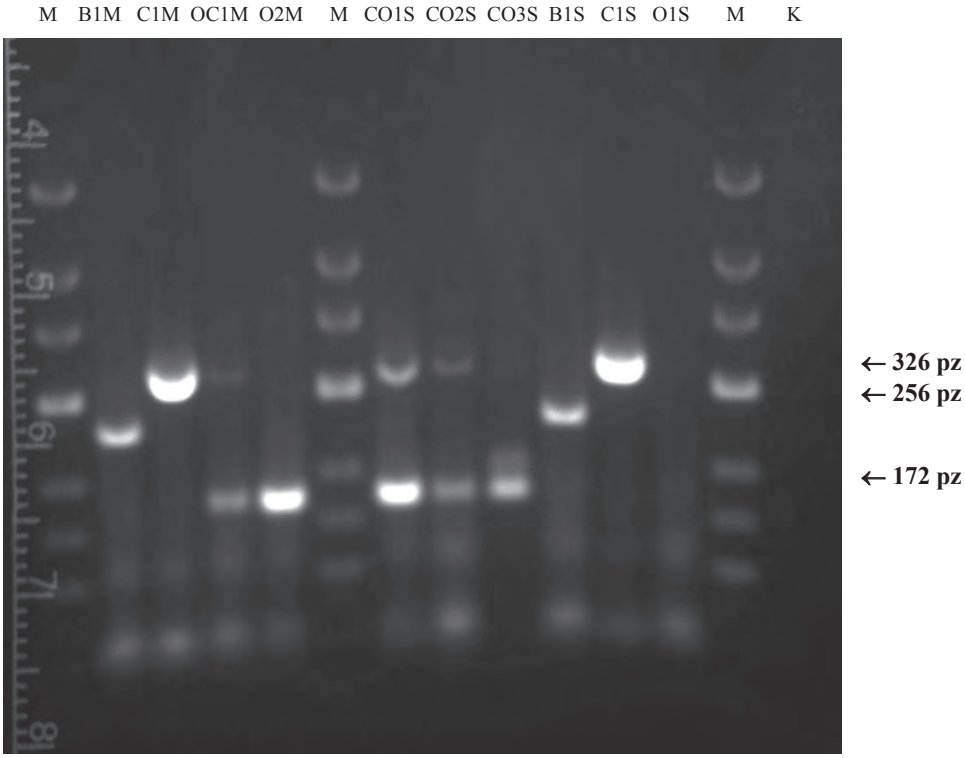
Przebadano 24 produkty mleczne z uwzględnieniem 6 produktów regionalnych „oscypków" produkowanych na południu Polski, w rejonie Tatr. W reakcji PCR zastosowano sekwencje mtDNA specyficzne gatunkowo, umożliwiające otrzymanie produktu o wielkości 256 pz dla DNA mleka krowy, 326 pz dla DNA mleka kozy i 172 pz dla DNA mleka owcy (tabela 3).

Tabela 3. Produkty amplifikacji oczekiwane zgodnie z deklaracją producenta oraz wyniki uzyskane w Multiplex-PCR

Symbol	Spodziewany produkt Multiplex PCR [pz]	Produkt otrzymany w reakcji Multiplex-PCR [pz]
B1M	256	256
C1M	326	326
OC1M	326, 172	326, 172
O2M	172	172
CO1S	326, 172	326, 172
CO2S	326, 172	326, 172
CO3S	326, 172	225, 172
B1S	256	256
C1S	326	326
O1S	172	—
B2S	256	256
B3S	256	256
B4S	256	256
B5S	256	256
C2S	326	326
C3S	326	256
C4S	326	326
C5S	326	326
C6S	326	326
C7S	326	—
C8S	326	326
C9S	326	326
O7S	172	256
O8S	172	256
O9S	172	256
O10S	172	256
BO6S	256, 172	256
BO7S	256, 172	256

Źródło: opracowanie własne

Wyniki uzyskane dla prób kontrolnych: mleka krowiego UHT (B1M), mleka koziego UHT (C1M), mleka owczego (O2M) oraz ekologicznego mleka owczego z dodatkiem mleka koziego (OC1M) były zgodne z oczekiwaniami (rysunek 1). Wyniki te potwierdzają specyficzność gatunkową zastosowanych starterów oraz efektywność dobranej metodyki, uwzględniając metodę izolacji DNA.



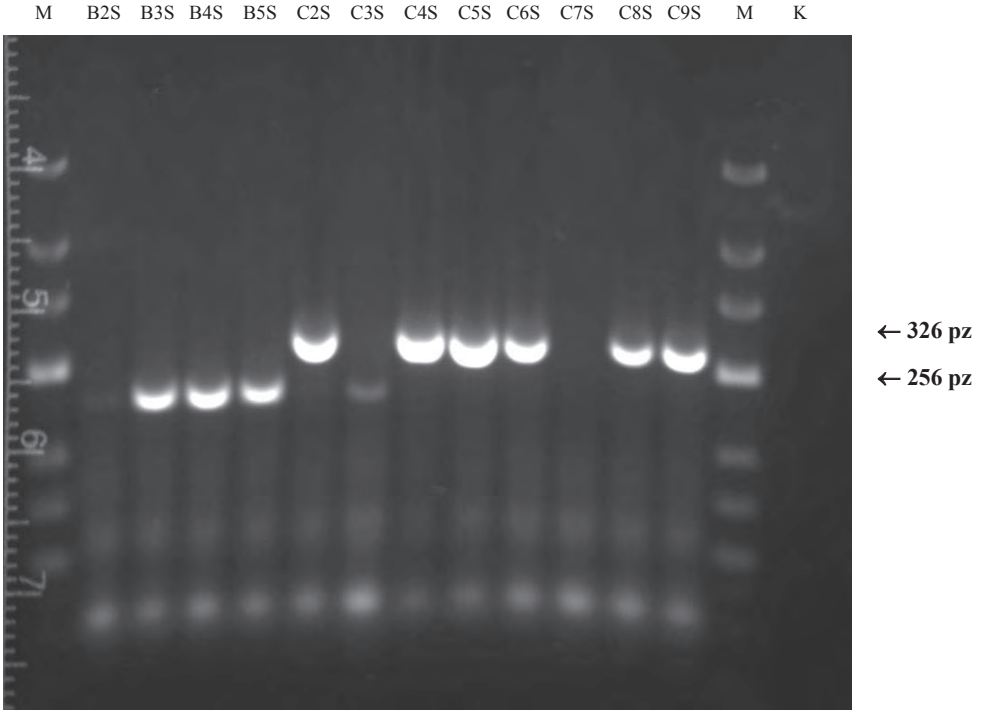
Rysunek 1. Wyniki amplifikacji w reakcji Multiplex-PCR

Próby: Marker (M), Kontrola (K), B1M – mleko krowie, C1M – mleko kozie, OC1M – mleko owczo-kozie, O2M – świeże mleko owcze po udoju, CO1S, CO2S, CO3S – sery z mleka owczego i koziego, B1S – ser z mleka krowiego, C1S – ser z mleka koziego, O1S – ser z mleka owczego. Wielkość produktów amplifikacji: 326 pz – koza, 256 pz – krowa, 172 pz – owca.

Źródło: opracowanie własne

Dla wszystkich badanych 5 serów otrzymanych z mleka krowiego uzyskano jeden produkt o spodziewanej wielkości 256 pz.

W grupie 9 serów otrzymanych z mleka koziego produktu amplifikacji nie uzyskano jedynie dla próby C7S, co może być wynikiem obecności inhibitorów (rysunek 2). Analizę dla tej próby należałoby powtórzyć włącznie z etapem ekstrakcji. Dla 7 prób: C1S, C2S, C4S, C5S, C6S, C8S, C9S w PCR uzyskano produkt prawidłowy o wielkości 326 pz, świadczący o wykorzystaniu jedynie mleka koziego do wytworzenia danych produktów (rysunek 2). Tylko dla jednego z badanych produktów mlecznych deklarowanych jako produkt ekologiczny otrzymany z mleka koziego (C3S) w reakcji PCR otrzymano produkt nieprawidłowy o wielkości 256 pz, świadczący o zastosowaniu jedynie mleka krowiego przy produkcji danego sera (rysunek 2).



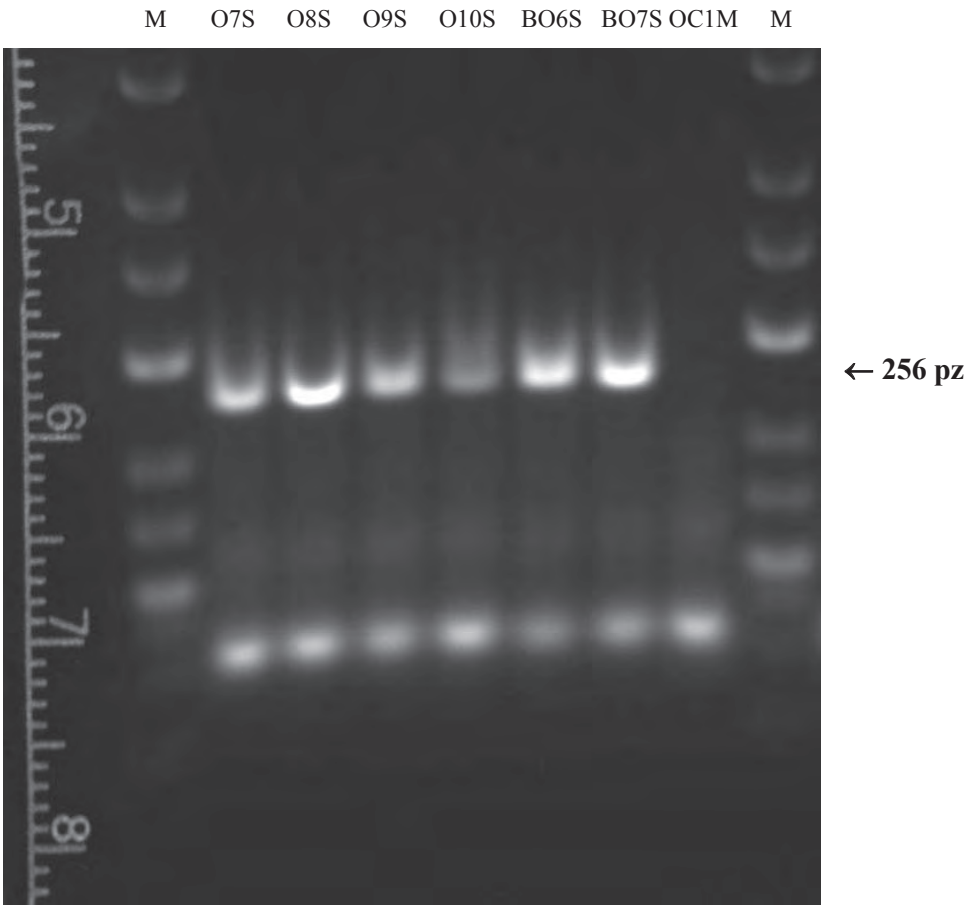
Rysunek 2. Wyniki amplifikacji w reakcji Multiplex-PCR

Próby: Marker (M), Kontrola (K), B2S–B5S – sery z mleka krowiego, C2S–C9S – sery z mleka koziego. Wielkość produktów amplifikacji: 326 pz – koza, 256 pz – krowa.

Źródło: opracowanie własne.

W przypadku 5 produktów wytworzonych jedynie z mleka owczego: O1S, O7S, O8S, O9S i O10S produktu w reakcji PCR nie uzyskano jedynie dla sera O1S, co może wynikać z obecności inhibitorów. Analizę dla tej próby należałoby powtórzyć. Dla pozostałych 4 serów sprzedawanych jako „oscypki" nie otrzymano produktu o wielkości 172 pz potwierdzającego obecność mleka owczego. Dla wszystkich tych produktów deklarowanych jako czysto owcze w reakcji PCR uzyskano tylko jeden produkt o wielkości 256 pz, świadczący o wyprodukowaniu tych serów w 100% z mleka krowiego (rysunek 3).

W grupie serów mieszanych analizowano pod względem składu gatunkowego trzy sery kozio-owcze (CO1S, CO2S, CO3S) (rysunek 1). W przypadku dwóch pierwszych serów w reakcji PCR otrzymano produkty o wielkości 172 pz oraz 326 pz, potwierdzające zastosowanie mleka koziego oraz mleka owczego w procesie produkcji. Z kolei dla sera CO3S otrzymano produkty o wielkości 172 pz oraz 225 pz. Większy z produktów amplifikacji wskazuje na możliwość zastosowania mleka krowiego, a nie koziego w procesie produkcji sera, niemniej w celu weryfikacji analizę dla tego sera warto powtórzyć. W grupie serów mieszanych badano także skład gatunkowy deklarowanych serów krowio-owczych (BO6S, BO7S). W obu przypadkach otrzymano jedynie produkt o wielkości 256 pz, wskazujący na zastosowanie w procesie wytworzenia jedynie mleka krowiego (rysunek 3).

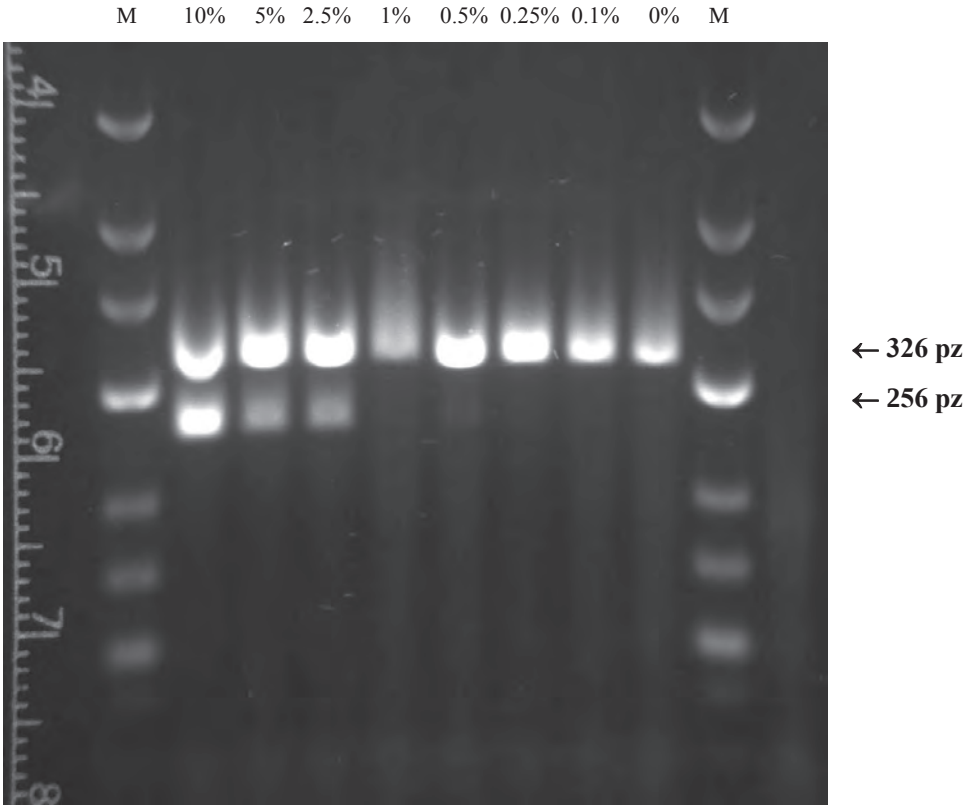


Rysunek 3. Wyniki amplifikacji w reakcji Multiplex-PCR

Próby: Marker (M), O7S–O10S – sery z mleka owczego, BO6S, BO7S – sery z mleka owczego i krowiego, OC1M – mleko owczo-kozie, O1S – ser z mleka owczego. Wielkość produktu amplifikacji 256 pz – krowa.

Źródło: opracowanie własne.

Czułość amplifikacji PCR wyznaczono w oparciu o ekstrakcje DNA z mieszanin mleka krowiego oraz koziego, w których udział mleka krowiego wynosił od 0 do 10% (rysunek 4). Wykazano, że przy 2,5 % dodatku mleka krowiego zastosowana metoda ekstrakcji oraz Multiplex-PCR umożliwiła jego detekcję.



Rysunek 4. Wyniki amplifikacji w reakcji Multiplex-PCR

Mieszaniny mleka koziego i krowiego z określoną domieszką mleka krowiego: 10%; 5%; 2,5%; 1%; 0,5%; 0,25%; 0,1%; 0%. M – Marker. Wielkość produktów amplifikacji: 326 pz – koza, 256 pz – krowa.

Źródło: opracowanie własne.

4. Dyskusja

Metody biologii molekularnej w ostatnich latach zyskują coraz większą popularność w procesie identyfikacji surowców i produktów żywnościowych [Dalmasso i wsp., 2004; Dąbrowska i wsp., 2010; Lopparelli i wsp., 2007]. Ich niewątpliwą zaletą jest czułość, szybkość oraz wiarygodność potwierdzona w badaniach na produktach mlecznych, w tym serach. Zaletą Multiplex-PCR jest możliwość detekcji różnych gatunków w tej samej reakcji, co znacznie skraca czas analizy. Odgrywa to istotną rolę w badaniu zafałszowań żywności.

W powyższych badaniach zastosowano dostępny komercyjnie zestaw do izolacji DNA Genomic Mini AX Food i Genomic Mini AX Tissue Spin firmy A&A Biotechnology. Modyfikacja warunków zalecanych w protokole: wydłużenie czasu inkubacji z proteinazą K z 30 minut do 2 godzin umożliwiło izolację mtDNA dla wszystkich prób. Stężenia wyekstrahowanego DNA mieściły się w zakresie 1,7 µg/mL – 6,0 µg/mL dla wzorców mleka oraz 17,8 µg/mL – 164,1 µg/mL dla prób serów, przy czym najmniejsza wyekstrahowana tą

metodą ilości DNA dla sera krowiego wynosiła 23,3 µg/mL (B2S), dla koziego 39,4 µg/mL (C2S) i dla owczego 15,9 µg/mL (O8S). Ilości DNA nie standaryzowano przed reakcją amplifikacji. To znaczy, że w mieszaninach reakcyjnych PCR produkty amplifikacji uzyskano z różnych ilości DNA matrycowego, a najmniejsze ilości całkowitego DNA w obrębie poszczególnych gatunków mleka wynosiły odpowiednio: 3,4 ng DNA mleka krowy, 12 ng DNA mleka kozy i 15,8 ng DNA mleka owcy. W przypadku prób serów najmniejsze ilości DNA, dla których otrzymano produkty amplifikacji, wynosiły 31,8 ng DNA sera owcy (O8S), 46,6 ng DNA sera krowy (B2S), 78,8 ng DNA sera kozy (C2S) i 34,2 ng DNA sera mieszanego krowio-owczego (BO6S). Choć inni autorzy uzyskali produkty amplifikacji z mniejszych ilości (0,04 ng DNA bawołu oraz 0,15 ng DNA krowy), to wykorzystane metody ekstrakcji i amplifikacji są wystarczające do zastosowania w rutynowych kontrolach zafałszowań produktów mlecznych [De i wsp., 2011]. W próbie dającej produkt o najmniejszej intensywności świecenia (C3S) odnotowano 93,2 ng DNA, podczas gdy największą intensywność odnotowano dla próby C1S, w której było 148,6 ng DNA, a nie w próbie B3S, w której całkowita ilość DNA w mieszaninie reakcyjnej wynosiła 164,1 ng i była najwyższa spośród wszystkich badanych prób. Uzyskane wyniki wskazują więc, że różnice w ilościach wyekstrahowanego DNA nie mają istotnego wpływu na amplifikację produktu i identyfikację zafałszowań.

Reakcja amplifikacji DNA izolowanego z produktów mlecznych, zwłaszcza serów, często napotyka problemy ze względu na obecność takich komponentów jak tłuszcz czy proteazy [Wilson, 1997]. Na wstępnym etapie badań uzyskano niskie ilości DNA w ekstraktach otrzymanych w oparciu o zestawy do izolacji DNA firmy A&A Biotechnology. Z tego względu wydłużono czas inkubacji z proteinazą K czterokrotnie. Protokół z zastosowaną modyfikacją umożliwił izolację mtDNA bez dodatkowych etapów wirowania czy ekstrakcji mieszaniną fenolu i chloroformu, a wydłużenie czasu inkubacji z proteinazą K nie wpłynęło na degradację DNA matrycowego i końcowe produkty amplifikacji. Zastosowany profil temperaturowy umożliwił powielenie wybranych obszarów mtDNA bez standaryzacji stężenia w mieszaninie reakcyjnej, a warunki elektroforezy umożliwiły rozdział produktów amplifikacji.

Specyficzność starterów ma kluczowe znaczenie w identyfikacji gatunkowej. Wybrane pary starterów dla konserwatywnych sekwencji 12S i 16S rRNA umożliwiły powielenie docelowych regionów mtDNA.

W badaniach zweryfikowano próg czułości metody PCR, stosując mieszaniny mleka UHT koziego i krowiego, z udziałem od 0,1% do 10% mleka krowiego. Zarówno zastosowana metoda izolacji DNA, jak i reakcja amplifikacji w PCR umożliwiły detekcję mleka krowiego przy jego 2,5-procentowym dodatku do mleka koziego, natomiast inni badacze wykazali zafałszowania gatunków mleka w PCR przy 0,1% lub 1% dodatku [De i wsp., 2011; Rea i wsp., 2001; López-Calleja i wsp., 2005]. Obecność bardzo słabo widocznego produktu dla próby zawierającej 0,5% dodatku mleka koziego nie jest wiarygodnym wynikiem. Ślad ten może być efektem zanieczyszczenia studzienki materiałem pochodzącym z innej próby, dlatego analiza dla tej próbki wymaga powtórzenia.

Wraz ze wzrostem udziału mleka krowiego w próbie widoczny jest także wzrost intensywności produktu uzyskanego dla starterów krowy. Uzyskane wyniki wskazują na fakt, iż mtDNA ze względu na dużą ilość kopii i mniejsze zagrożenie degradacją w trakcie izolacji niż genomowe DNA jest bardzo dobrym wyborem w rutynowych badaniach kontrolnych żywności pod kątem zafałszowań. Jednakże brak produktów amplifikacji w próbach zawierających mniej niż 2,5% mleka krowiego oznacza, że tak małe ilości mleka krowiego w produkcie mogą nie być wykryte tą metodą.

Kontrola zafałszowań produktów żywnościowych jest niezwykle istotna zarówno ze względów zdrowotnych, jak i ekonomicznych. Ceny produktów otrzymanych na bazie mleka koziego czy owczego często stanowią 300% ceny za odpowiednik uzyskany z mleka krowiego. Różnica ta wynika zarówno ze składu mleka koziego czy owczego, braku alergenów, ograniczonej oferty handlowej, małej konkurencyjności, jak i ze specyfiki produkcji, która w przypadku produktów regionalnych czy ekologicznych certyfikowanych tym bardziej podnosi cenę.

Identyfikacja zafałszowań żywności jest szczególnie istotna w grupie produktów zaklasyfikowanych w krajach UE jako produkty o Chronionej Nazwie Pochodzenia (PDO) oraz produktów certyfikowanych ekologicznych [Bottero i wsp., 2002]. Często produkty mleczne są otrzymane na bazie mieszanin różnych gatunków mleka. W przypadku PDO istotne jest określenie procentowego udziału składników poszczególnych gatunków [Herman, 2001]. Typowym produktem regionalnym jest góralski oscypek. Nazwa „oscypek" zarezerwowana jest dla produktu regionalnego, który od 2 lutego 2007 roku jest drugim polskim produktem (po bryndzy podhalańskiej) chronionym przez prawo unijne i posiadającym status Chronionej Nazwy Pochodzenia (PDO) (EC Regulation No. 127/2008). Ta odmiana sera może być produkowana jedynie na obszarze województwa śląskiego i małopolskiego, a maksymalna zawartość domieszki mleka krów rasy czerwonej nie może przekraczać 40%.

Produkty te są dostępne głównie w niektórych specjalistycznych sklepach, bezpośrednio u producenta oraz w bardzo niewielkim asortymencie w sklepach dużych sieci handlowych. Z tego względu kontrolom poddawane są głównie produkty pochodzące z marketów, produkowane w krajach UE zgodnie z wieloletnią tradycją. Natomiast produkty regionalne lub ekologiczne dostępne bezpośrednio na wolnym rynku nie są poddawane kontrolom pod względem zafałszowań.

Z tego względu w poniższych badaniach przeprowadzono analizę losowo wybranych produktów mlecznych z grupy dostępnych w sklepach wielkometrażowych, z uwzględnieniem produktów ekologicznych oraz grupy produktów PDO dostępnych u producentów lub w sklepach regionalnych. Również López-Calleja i wsp., [2007] analizowali 16 serów wyprodukowanych w Hiszpanii, deklarowanych jako owcze lub kozie w 100%, w tym 6 serów PDO. Wśród produktów nie-PDO zafałszowanie mlekiem krowim wykazano dla 5 z 10 analizowanych prób. W grupie produktów PDO nie wykazano zafałszowania dodatkiem mleka innego gatunku.

W grupie 24 badanych produktów znajdowały się 4 produkty ekologiczne, certyfikowane, 6 produktów regionalnych sprzedawanych pod nazwą „oscypek" oraz 14 produktów pochodzenia krajowego i zagranicznego dostępnych w marketach. W grupie produktów ekologicznych nie odnotowano zafałszowań innym gatunkiem mleka niż deklarował producent. Tylko jeden produkt pochodzenia zagranicznego spośród 13, dla których uzyskano wynik amplifikacji, okazał się mieszaniną mleka owczo-krowiego, a nie owczo-koziego jak deklarował producent. Zaskakujące wyniki uzyskano dla produktów regionalnych dostępnych pod nazwą „oscypek". Wszystkie przebadane sery deklarowane jako owcze lub owczo-krowie były w 100% wykonane z mleka krowiego, podczas gdy „oscypek" może zawierać maksymalnie 40% mleka krowy. Uzyskane wyniki wskazują, że w grupie produktów regionalnych dostępnych u producenta klienci są najczęściej narażeni na zakup produktów mlecznych o składzie niezgodnym z deklarowanym, co może mieć niekorzystny wpływ na ich zdrowie.

5. Wnioski

Zastosowane warunki reakcji Multiplex-PCR potwierdziły użyteczność metody w rutynowej kontroli produktów mlecznych pod kątem identyfikacji gatunków mleka. Wyniki te wskazują również, że zarówno skład produktów konwencjonalnych, jak i ekologicznych dostępnych w sklepach wielkometrażowych jest zgodny z deklarowanym przez producentów. Z kolei w grupie produktów regionalnych dostępnych w małych sklepach oraz u producentów wykazano rażące zafałszowania składu „oscypków", sugerujące konieczność większej kontroli zgodności jakości z deklarowaną w tej grupie produktów.

Bibliografia

Bottero M.T., Civera T., Anastasio A., Turi R.M., Rosati S., 2002, *Identification of cow's milk in "buffalo" cheese by duplex polymerase chain reaction*, Journal of Food Protection, 65, 362–366.

Bottero M.T, Civera T., Nucera D., Rosati S., Sacchi B, Turi R.M., 2003, *A multiplex polymerase chain reaction for the identification of cows, goats' and sheep's milk in dairy products*, International Dairy Journal, 13, 277–282.

Chianese L., Laezza P., Smaldone L. A., Stingo C., Del Giovine L., Addeo F., 1990, *Evaluation of bovine milk in the buffalo mozzarella cheese by two-dimensional electrophoresis*, Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia, 41, 315–326.

Chikuni K., Tabata T., Kosugiyama M., Monma M., Saito M., 1994, *Polymerase chain reaction for detection of sheep and goat meats*, Meat Science, 37, 337–345.

Dalmasso A., Fontanella E., Piatti P., Civera T., Rosati S., Bottero M. T., 2004, *A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs*, Molecular and Cellular Probes, 18, 81–87.

Dąbrowska A., Wałecka E., Bania J., Żelazko M., Szołtysik M., Chrzanowska J., 2010, *Quality of UHT goat's milk in Poland evaluated by real-time PCR*, Small Ruminant Research, 94, 32–37.

De S., Brahma B., Polley S., Mukherjee A., Banerjee D., Gohaina M., Singh K.P., Singh. R., Datta T. K., Goswami S.L., 2011, *Simplex and duplex PCR assays for species specific identification of cattle and buffalo milk and cheese*, Food Control, 22, 690–696.

Di Pinto A., Conversano M.C., Forte V.T., Novello L., Tantillo G.M., 2004, *Detection of Cow Milk in Buffalo „Mozzarella" by Polymerase Chain Reaction (PCR) Assay*, Journal of Food Quality, 27, 428–435.

Di Pinto A., Forte V.T., Conversano M.C., Tantillo G.M., 2005, *Duplex polymerase chain reaction for detection of pork meat*, Food Control, 16, 391–394.

EC Regulation No. 127/2008 COMMISSION REGULATION (EC) No 127/2008 of 13 February 2008 entering a designation in the register of protected designations of origin and protected geographical indications (Oscypek (PDO)).

Herman, L., 2001, *Determination of the animal origin of raw food by species-specific PCR*, Journal of Dairy Research, 68, 420–436.

Krauze S., 1975, *Zarys nauki o środkach żywności*, PZWL, Wydanie II, Warszawa.

Lopparelli, R. M., Cardazzo, B., Balzan, S., Giaccone, V., & Novelli, E., 2007, *Real-Time TaqMan Polymerase chain reaction detection and quantification of cow DNA in pure water buffalo mozzarella cheese: Method validation and its application on commercial samples*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, 3429–3434.

López-Calleja I., González I., Fajardo V., Rodríguez M.A., Hernández P.E., García T., Martín R., 2004, *Rapid Detection of Cows' Milk in Sheeps*' and Goats' Milk by a Species--Specific Polymerase Chain Reaction Technique, Journal of Dairy Science, 87, 2839–2845.

López-Calleja I., Alonso G., Fajardo V., Rodriguez M. A., Hernández P. E., García T., Martin R., 2005, *PCR detection of cows' milk in water buffalo milk and mozzarella cheese*. International Dairy Journal, 15, 1122–1129

López-Calleja I., González I., Fajardo V., Hernández P.E., García T., Martín R., 2007, *Application of an indirect ELISA and a PCR technique for detection of cows' milk in sheep's and goats' milk cheeses*. International Dairy Journal, 17, 87–93.

Matsunaga T., Chikuni K., Tanabe R., Muroya S., Shibata K., Yamada J., Shinmura Y., 1999, *A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay*, Meat Science, 51, 143–148.

Mayer H.K., 2005, *Milk species identification in cheese varieties using electrophoretic, chromatographic and PCR techniques*, International Dairy Journal, 15, 595–604.

Mayer H. K., Bürger J., Kaar N., 2012, *Quantification of cow's milk percentage in dairy products – a myth?* Analytical and Bioanalytical Chemistry, 403, 3031–3040.

Meyer R., Höfelein C., Lüthy J., Candrian U., 1995, *Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis: A simple method for species identification in food,* Journal of AOAC International, 78, 1542–1551.

Molina E., De Frutos M., Ramos M., 2000, *Capillary electrophoresis characterization of the casein fraction of cheeses made from cows', ewes' and goats' milks*, Journal of Dairy Research, 67, 209–216.

Ramos M., Juarez M., 1986, *Chromatographic, electrophoretic and immunological methods for detecting mixtures of milks from different species*, International Dairy Federation, Brussels, pp. 175–187.

Rance F., Grandmottet X., Grandjean H., 2005, *Prevalence and main characteristics of schoolchildren diagnosed with food allergies in France*, Clinical Experimental Allergy, 35, 167–172.

Rea S., Chikuni K., Branciari R., Sukasi Sangamayya R., Ranucci D., Avellini P, 2001, *Use of duplex polymerase chain reaction (duplex PCR) technique to identify bovine and water buffalo milk used in making mozzarella cheese*, Journal of Dairy Research, 68, 689–698.

Ritcher W., Krause I., Graf C., Sperrer I., Schwarza C., Klostermeyer H., 1997, *An indirect competitive ELISA for the detection of cows' milk and caseinate in goat's and ewes' milk and cheese using polyclonal antibodies against bovine g-caseins,* Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung, 204, 21–26.

Teletchea F., Maudet C., Hänni C., 2005, *Food and forensic molecular identification: update and challenges*, Trends in Biotechnology, 23, 359–366.

Wilson, I. G., 1997, *Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification*, Applied and Environmental Microbiology, 63, 3741–3751.

Zhang J., Huang H., Cai Z., Huang L., 2006, *Species identification in salted products of red snappers by semi-nested PCR-RFLP based on the mitochondrial 12S rRNA gene sequence*, Food Control, 17, 557–563.

SUMMARY

Ewa Walczak, Wojciech Barszczewski

Species falsification analysis of chosen conventional, regional and eco dairy products

Quick and reliable identification of food content is extremely important for both economic and health reasons. Methods of molecular biology such as PCR and its variations are gaining more and more popularity, especially in detecting falsifications. Twenty four dairy products examined for their milk content with the use of this method, including eco and regional PDO products. The samples were testes on the consistency between the declared and actual content of milk of different animal species. mtDNA was isolated with the use A&A Biotechnology sets, with some modifications. On the basis of starters' sequences, fragments of mitochondrial genes 12S and 16S rRNA were multiplied, which provided products of sizes specific for certain of animal species, respectively: 256 bp for cow, 326 bp for goat and 172 bp for sheep. Sensitivity of distinguishing was determined on the level of 2,5% for cows' milk addition. DNA concentration was not standardized after extraction, and the smallest amounts of DNA for which amplification products were obtained equaled 3,4 ng of DNA from cows' milk and 31,8 ng of DNA from sheep's cheese DNA. Applied methods of mtDNA extraction and conditions of amplification enabled routine and quick milk identification, in terms of its origin, in 22 for 24 examined cheeses. Falsification has been detected in dairy products called „oscypek". All the examined cheeses within this group appeared to be made of 100% from cows' milk.

Key words: milk, cheese, „oscypek", identification, falsification, multiplex-PCR.

Data wpływu artykułu: 02.06.2016 r.
Data akceptacji artykułu: 04.08.2016 r.