

Oznaka poročila: ARRS-CRP-ZP-2015/11



ZAKLJUČNO POROČILO CILJNEGA RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1.Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta	V4-1108
Naslov projekta	Uporaba specifičnih metod za ugotavljanje in preprečevanje potvorb mleka in mlečnih izdelkov
Vodja projekta	11279 Nives Ogrinc
Naziv težišča v okviru CRP	1.03.02 Razvoj standardnega operativnega postopka za ugotavljanje in preprečevanje potvorb mlečnih izdelkov
Obseg raziskovalnih ur	1666
Cenovni razred	C
Trajanje projekta	10.2011 - 09.2014
Nosilna raziskovalna organizacija	106 Institut "Jožef Stefan"
Raziskovalne organizacije - soizvajalke	481 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta
Raziskovalno področje po šifrantu ARRS	4 BIOTEHNIKA 4.02 Živalska produkcija in predelava 4.02.04 Predelava animalnih surovin
Družbeno-ekonomski cilj	07. Zdravje
Raziskovalno področje po šifrantu FOS	4 Kmetijske vede 4.02 Znanosti o živalih in mlekarstvu

2.Sofinancerji

	Sofinancerji		
1.	Naziv	Ministrstvo za kmetijstvo in okolje (MKO)	
	Naslov	Dunajska cesta 22, 1000 Ljubljana	

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

3. Povzetek raziskovalnega projekta¹

SLO

Glavni namen projekta je bil vpeljava in validacija specifičnih metod kot so uporaba stabilnih izotopov lahkih elementov in molekularnih metod kot je PCR v realnem času, s pomočjo katerih bomo lahko dokazali »skrite« potvorbe, ki jih s klasičnimi metodami ne moremo. Izdelali smo izdelali prvo bazo podatkov pristnih vzorcev slovenskega kravjega, ovčjega in kozjega mleka in sirov. Baze podatkov vsebujejo izotopske parametre (izotopsko sestavo kisika ($\delta^{18}\text{O}$ vrednosti) in vodika ($\delta^2\text{H}$ vrednosti) v mleku, izotopsko sestavo ogljika in dušika v kazeinu ($\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti)), vsebnost maščobnih kislin in elementno sestavo. Pri interpretaciji rezultatov smo se poslužili kemometričnih metod kot je uporaba linearne diskriminantne analize (LDA).

Rezultati raziskav in statistična obdelava nakazujejo, da je za preverjanje pravilnosti deklariranega geografskega izvora najbolj primerna uporaba stabilnih izotopov lahkih elementov in elementna sestava. Bazo podatkov je potrebno vzdrževati na letni ravni, pri čemer potrebujemo vsaj 6 vzorcev iz posamezne regije v poletnem in zimskem obdobju. Nadalje so stabilni izotopi lahkih elementov v kombinaciji z elementno sestavo uporabni tudi pri ločevanju ovčjega in kozjega mleka in sira od kravjega. Glede na to, da je z omenjenimi parametri možno ločiti tudi področje pridelave ovčjega mleka oziroma sira, nam ustrezna baza podatkov lahko služi za zaščito geografskega porekla Bovškega in Kraškega sira.

Ugotovili smo, da z uporabo stabilnih izotopov kisika v vzorcih lahko določimo od 7 do 34 % dodatka vode. Najnižji % dodatka vode lahko določimo v poletnih mesecih. Metoda je bolj učinkovita kot krioskopska metoda, v primeru, če proizvajalci z vodo dodajajo tudi NaCl.

Rezultati so pokazali, da z PCR v realnem času lahko določimo kravje mleko kot nedovoljen dodatek kadar le-ta ni deklariran, kvalitativno, če je vsebnost kravjega mleka $> 0,1\%$ in semi-kvantitativno če je vsebnost $> 0,5\%$. Metoda se odlikuje po hitri izvedbi, visoki ločljivosti in selektivnosti določanja specifičnega dela DNA. Rezultati analize proteinov so pokazali, da kravje mleko vsebuje specifičen protein – kapa kazein in kažejo na možnost oblikovanja novega sistema detekcije t.i. proteinski-PCR.

Rezultati vzporednih analiz kozjih in ovčjih sirov s PCR v realnem času in analizami maščobnih kislin kažejo, da sta metodi primerljivi kadar je dodatek kravjega mleka večji kot 5 %. Izkazalo se je, da je vsebnost maščobnih kislin v mleku in mlečnih izdelkih pomembna metoda pri določanju mešanja z rastlinskimi maščobami, saj lahko detektiramo dodatek rastlinskih maščob kravjemu mleku in mlečnim izdelkom manjšim od 5 %.

Rezultati raziskav izvedenih v vzorcih dostopnih na slovenskem tržišču kažejo, da so največje nepravilnosti prisotne pri označbah ovčjih oziroma kozjih sirih. V naši raziskavi je bilo kar 20 % vzorcev sira višjega cenovnega razreda, ki niso ustrezali deklaraciji.

ANG

The main objective of the proposed project was to develop and validate specific methods such as the use of stable isotopes of light elements and PCR in real time to determine the "hidden" adulteration, which previously could not be detected using standard analytical methods. The project establishes the first database of authentic Slovenian cow, sheep and goat milk and cheese. The database includes isotope parameters: isotopic composition of oxygen ($\delta^{18}\text{O}$ values) and hydrogen ($\delta^2\text{H}$ values) in milk, isotopic composition of carbon and nitrogen in casein ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values), the content of fatty acids and elemental composition. The interpretation of the results was conducted using appropriate chemometric methods such as linear discriminant analysis (LDA).

Our results and statistical analysis indicate that the use of stable isotopes when combined with elemental composition is the most appropriate approach for verifying the declared geographical origin. This also requires maintaining the database on an annual basis, where at least 6 samples from each region from summer and winter should be included. Furthermore, stable isotopes of light elements in combination with elemental composition were useful for discriminating sheep and goat milk and cheese from cows. Using these parameters the area of production of sheep's milk or

cheese can be identified, and a suitable database could be constructed to protect the geographical origin of Bovški and Kraški cheese.

The project has also shown how stable isotopes of oxygen could be used to determine the addition of water to milk samples. Based on $\delta^{18}\text{O}$ values the addition of water from 7 to 34% could be detected. The lowest % addition of water can be determined in summer. The method is more efficient than the cryoscopic method when NaCl is added together with water.

Our results also show that real-time PCR is useful for identification purposes, if the content of the cow's milk is $> 0.1\%$ and for a semi-quantitative analysis when the content of cow's milk is $> 0.5\%$. Our method provides a rapid, robust and sensitive tool for detecting the adulteration of caprine and ovine cheeses with bovine milk. The result showed that cow's milk contains a specific protein - kappa casein, which could be used to create a new system for tracing cow milk - protein-PCR. A parallel investigation of goat and sheep cheeses by real-time PCR and fatty acid composition indicate that both methods are comparable when the addition of cow's milk is $> 5\%$. In addition the adulteration of raw cow milk with $< 5\%$ vegetable palm tallow was easily detected, due to the difference in fatty acid composition. Further, on the Slovenian market, mislabelling is most prevalent for goat and sheep cheeses; we found that 20% of products are not in compliance with the label's declaration.

4. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela na raziskovalnem projektu²

Ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja in rezultati: V Evropski uniji posvečajo veliko pozornost kakovosti in kontroli živilskih izdelkov. Potvarjanje živilskih izdelkov predstavlja velik ekonomski profit za nekatere proizvajalce v živilski industriji, predvsem pa manjše podjetnike. Predstavljeni rezultati projekta se nanašajo na problem ohranjanja avtentičnosti in dokazovanja potvorjenosti mleka in mlečnih izdelkov z uporabo različnih metod in pristopov. Mleko in mlečni izdelki zaradi vsebnosti hranilnih snovi predstavljajo nepogrešljiv del zdrave prehrane. Prav zaradi svoje pomembnosti v prehrani in relativno visoki ceni na tržišču so podvrženi različnim potvorbam. Zato je pomembno, da z ustreznimi metodami in ukrepi zagotovimo lojalno konkurenco na trgu in zaščitimo potrošnika pred potvorjenimi in nepravilno označenimi proizvodi.

Glavni namen projekta je bil vpeljava in validacija specifičnih metod kot so uporaba stabilnih izotopov lahkih elementov in PCR v realnem času, s pomočjo katerih bomo lahko dokazali »skrite« potvorbe, ki jih s klasičnimi metodami ne moremo. Predpostavili smo, da bomo lahko s pomočjo izotopske sestave kisika in vodika v mleku in podzemni vodi dokazali dodatek vode mleku, kar predstavlja enega od problemov, s katerimi se srečujejo slovenske mlekarne z različnimi dobavitelji mleka. S pomočjo PCR naj bi dokazali prisotnost kravjega mleka v ovčjih in kozjih sirih. Na podlagi izotopske sestave mleka, ki vključuje izotopsko sestavo kisika v mleku, ogljika in dušika v kazeinu, maščobnokislinsko in elementno sestavo naj bi sestavili prvo bazo podatkov pristnega slovenskega kravjega, ovčjega in kozjega mleka. Predpostavili smo, da bomo lahko na podlagi parametrov, ki jih baza vključuje, ugotavljali geografsko poreklo in možnost potvorb mleka in mlečnih izdelkov. Elementno sestavo mleka naj bi nadalje uporabili pri ugotavljanju vpliva onesnaženja s težkimi kovinami med tehnološkim postopkom. Glede na predvidene hipoteze smo raziskavo razdelili na 4 delovne sklope (DS): (1) vpeljava in validacija metod na osnovi stabilnih izotopov lahkih elementov; (2) vpeljava in validacija molekularnih metod – PCR v realnem času; (3) elementna sestava mleka in mlečnih izdelkov; in (4) analiza stanja v praksi in na slovenskem tržišču.

Baze podatkov pristnih vzorcev slovenskega kravjega, ovčjega in kozjega mleka in sirov vsebujejo izotopske parametre (izotopsko sestavo kisika ($\delta^{18}\text{O}$ vrednosti) in vodika ($\delta^2\text{H}$ vrednosti) v mleku, izotopsko sestavo ogljika in dušika v kazeinu ($\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti)), vsebnost maščobnih kislin in elementno sestavo v mleku in sirih. Odvzeti vzorci pokrivajo različna geografska področja Slovenije. Meritve izotopske sestave smo izvedli z masnim spektrometrom za analizo stabilnih izotopov lahkih elementov (IRMS). Makro in mikro elemente v mleku smo določili z rentgensko fluorescenčno spektrometrijo (XRF), medtem ko smo elemente v sledovih določili z masno spektrometrijo z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-MS). Vsebnost maščobnih kislin smo določili s plinsko kromatografijo s plamensko-ionizacijskim detektorjem (GC FID). Izotopsko sestavo posameznih maščobnih kislin smo določili s plinsko kromatografijo, ki je preko sežigne enote sklopljena z masnim spektrometrom za analizo stabilnih izotopov lahkih elementov (GC-C-IRMS).

Nadalje smo v okviru projekta razvili metodo za določanje potvorjenosti mleka in mlečnih izdelkov na molekularnem nivoju: PCR v realnem času za specifično določanje kravjega mleka. V projekt smo vključili še dodatne preiskave mleka na nivoju proteinov, ker nam ti rezultati v kombinaciji z rezultati dobljenimi z analizami DNA, omogočajo bolj zanesljivo določitev potvorb mleka oziroma mlečnih izdelkov. Analize proteinov kravjega, kozjega in ovčjega mleka in mešanic kozjega oz. ovčjega mleka s kravjim smo izvedli z 2-D elektroforezo in bioinformatiko analizo. Pri interpretaciji rezultatov smo se poslužili kemometričnih metod kot je uporaba linearne diskriminantne analize (LDA). Razvite in validirane metode smo nato uporabili pri preverjanju stanja na slovenskem tržišču, kjer smo izvedli analize kravjega mleka in ovčjih, kozjih ter kravjih sirov.

Rezultati raziskav in statistična obdelava nakazujejo, da je za preverjanje pravilnosti deklariranega geografskega izvora možna uporaba stabilnih izotopov lahkih elementov (^{18}O v mleku, in $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ v kazeinu) in elementna sestava. Ločitev je možna tudi na podlagi vsebnosti maščobnih kislin, pri čemer so najpomembnejše c9, t11 CLA, C14:0 in t10, c12 CLA ter C16:0, C18:0 in C14:0. Glede na ceno, hitrost in selektivnost analiz je bolj primerna uporaba **stabilnih izotopov v kombinaciji z elementno sestavo**, pri čemer so pri ločbi najpomembnejši makro in mikro elementi (Cl, Zn, K, Ca, S, P in Mn). Rezultati nadalje kažejo, da je potrebno za določevanje geografskega porekla mleka in mlečnih izdelkov **vzdrževanje baze podatkov na letni ravni**. Pri tem potrebujemo vsaj **6 vzorcev iz posamezne regije v poletnem in zimskem obdobju**. Nadalje so stabilni izotopi lahkih elementov v kombinaciji z elementno sestavo so uporabni tudi pri ločevanju ovčjega in kozjega mleka in sira od kravjega. Tudi pri tem ločevanju moramo razpolagati z ustrezno **bazo podatkov o izotopski in elementni sestavi** pristnega mleka različnega izvora. Glede na to, da je z omenjenimi parametri možno ločiti tudi področje pridelave ovčjega mleka oziroma sira, nam ustrezna baza podatkov, ki se vzdržuje na letni ravni, lahko služi za **zaščito geografskega porekla Bovškega in Kraškega sira**.

Ugotovili smo, da z uporabo **stabilnih izotopov kisika** v vzorcih lahko določimo od **7 do 34 % dodatka vode**. Najnižji % dodatka vode lahko določimo v poletnih mesecih. Metoda je bolj učinkovita kot krioskopska metoda, v primeru, če proizvajalci z vodo dodajajo tudi NaCl.

PCR v realnem času za določitev potvorb kozjih in ovčjih sirov s kravjim mlekom temelji na analizi DNA. Rezultati so pokazali, da s to metodo lahko določimo kravje mleko kot nedovoljen dodatek kadar le-ta ni deklariran, kvalitativno, če je vsebnost kravjega mleka $> 0,1\%$ in semi-kvantitativno če je vsebnost $> 0,5\%$. Metoda se odlikuje po **hitri izvedbi, visoki ločljivosti in selektivnosti določanja specifičnega dela DNA**. Analiza proteinov z 2-D elektroforezo in bioinformatiko analizo v različnih vrstah mleka (kravje, kozje, ovčje) in njihovih mešanic je pokazala, da **kravje mleko** vsebuje **specifičen protein – kapa kazein**. Rezultati nakazujejo na velike možnosti nadaljnjih raziskav, pri katerih bi glede na proteinsko specifičnost oblikovali **nov sistem detekcije t.i. proteinski-PCR**.

Rezultati **vzporednih analiz** kozjih in ovčjih sirov s **PCR v realnem času in analizami maščobnih kislin** kažejo, da sta **metodi primerljivi** kadar je **dodatek kravjega mleka večji kot 5 %**. Izkazalo se je, da je **vsebnost maščobnih kislin** v mleku in mlečnih izdelkih pomembna metoda pri določanju **mešanja z rastlinskimi maščobami**, saj lahko detektiramo **dodatek rastlinskih maščob** kravjemu mleku in mlečnim izdelkom **manjšim od 5 %**.

Rezultati raziskav izvedenih v **vzorcih dostopnih na slovenskem tržišču** kažejo, da so največje nepravilnosti prisotne pri **označbah ovčjih oziroma kozjih sirih**. V naši raziskavi je bilo kar **20 % vzorcev** sira višjega cenovnega razreda, ki **niso ustrezali deklaraciji**. Pri tem je potrebno poudariti, da gre za relativno majhen vzorec. Rezultati bi bili verjetno boljši, če bi imeli možnost narediti analize na večjem številu vzorcev. Kljub temu ti rezultati kažejo na neustreznost deklaracij oziroma označb, ki ima lahko nezaželjene, škodljive odzive pri potrošnikih, ki imajo alergijo na kravje mleko. Pri teh ljudeh lahko nezaželjene oziroma škodljive odzive pričakujemo že pri veliko manjšem dodatku kravjega mleka kot je 5 %. Rezultati analiz na **vzorcih mleka**, ki smo ga vzorčili v mesecu juniju 2013 kažejo, da imajo vzorci mleka na tržišču podobno izotopsko sestavo kot vzorci mleka v trenutni bazi podatkov. Trenutni rezultati analiz elementne sestave mleka kažejo, da **med tehnološkim postopkom ni prišlo do kontaminacije**. Prav tako nismo zasledili **prisotnosti rastlinskih maščob** pri analizah izbranih nizko cenovnih **kravjih sirov**, ki so dostopni na slovenskem tržišču.

Potencialni pomen učinkov aplikativnih rezultatov projekta:

G.02 gospodarski razvoj
G.02.01 razširitev ponudbe novih storitev na trgu
G.02.05 razširitev področja dejavnosti
G.02.06 večja konkurenčna sposobnost
G.04 družbeni razvoj
G.04.01 dvig kvalitete življenja

8 Kmetijstvo

- spodbujanje kmetijstva, gozdarstva ribištva in proizvodnje živil
- razvijanje živilske tehnologije in produktivnosti
- znanost o živalih in mlekarstvu

V projektu smo aktivno sodelovali tudi s tujimi partnerji. Helena Volk je na belgijskem inštitutu za raziskave v agrikulturi in ribolovu (ILVO, Melle, Belgija) v letu 2013 opravljala 4 mesečno Erasmus prakso. Pod mentorstvom dr. Ir. Els Van Coillie je primerjala tri različne metode za detekcijo kravjega mleka v kozjem mleku. Izbrane metode so bile:

- uradna metoda EC 1091/96, ki temelji na izolaciji kazeinov iz mleka in izoelektričnem fokusiranju (IEF) kazeinskih peptidov;
- PCR v realnem času, ki temelji na določanju kravjega mleka preko DNA somatskih celic;
- ELISA test, komercialno dostopen komplet za določanje kravjega mleka.

V sodelovanju z ILVO smo izvedli tudi skupno delavnico, kjer smo predstavili rezultate dela v okviru CRP projekta v obliki štirih vabljenih predavanj.

Redno sodelujemo v medlaboratorijski primerjalni shemi, ki jo organizira EUROFINS, Francija trikrat na leto. V tej shemi so enkrat letno tudi vzorci sira. Primerjalna shema je potrebna za vzdrževanje QA/QC kakovosti meritev na področju stabilnih izotopov lahkih elementov.

V letu 2013 smo si pridobili nov IAEA projekt z naslovom: »The use of stable isotopes and elemental composition for determination of authenticity and geographical origin of milk and dairy products«, ki predstavlja sestavni del CRP projekta: »Accessible Technologies for the Verification of Origin of Dairy Products as an Example Control System to Enhance Global Trade and Food Safety«. Projekt bo trajal do leta 2017.

Vzpostavili smo sodelovanje z Istituto Agrario di San Michele all'Adige, Italija, ki imajo bogate izkušnje na področju uporabe stabilnih izotopov lahkih elementov v mleku in predvsem v sirih. Dr. Federica Camin je nastopila kot vabljen predavateljica na delavnici, ki smo jo organizirali ob zaključku projekta v sodelovanju z Biotehniško fakulteto 12.6.2014. To sodelovanje nam je bilo v pomoč tudi pri vključitvi v izvajanje EU projekta FoodIntegrity, ki ga vodi dr. P. Brerenton iz Anglije. Sodelovali bomo pri vzpostavitvah EU baz podatkov o izotopski sestavi prehrabnenih izdelkov.

5. Ocena stopnje realizacije programa dela na raziskovalnem projektu in zastavljenih raziskovalnih ciljev³

Glede na časovni plan izvedbe projekta so bile opravljene vse predvidene aktivnosti ter dodatne aktivnosti navedene v točki 3. Aktivnosti strnemo v naslednjih točkah:

1. izdelana je baza podatkov kravjega mleka, ki trenutno vsebuje:
 - izotopsko sestavo kisika ($\delta^{18}\text{O}$ vrednosti) za vsak mesec v letu 2012, 2013 in 2014 in izotopsko sestavo vodika ($\delta^2\text{H}$ vrednosti) v letu 2013 in 2014;
 - izotopsko sestavo mleka in kazeina ($\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti), vsebnost maščobnih kislin v mleku in elementno sestavo mleka (koncentracije Ca, K, Mn, Zn, Pb, Sr, Fe, Cu, Se, As, Cd, Cl, S, P in Br) za marec, junij, September in December za 2012 in junij ter december 2013 in 2014;
2. vzpostavitev baze podatkov kozjega in ovčjega mleka in sirov – zaključili smo z analizami izotopske sestave kazeina ($\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti), izvedli analize maščobnokislinske sestave in elementne sestave z XRF za leto 2012 in 2013.
3. zaključili smo izbiro optimalnih razmer in vpeljave metode PCR v realnem času na modelnih vzorcih in metodo uporabili na realnih vzorcih;
4. za posamezno vrsto mleka smo ugotovili specifične proteine odvisne od vrste mleka in neodvisne od geografskega porekla – možna metoda za določanje potvorjenosti;
5. prve analize sirov na slovenskem tržišču kažejo, da vsej 20 % vzorcev ne ustreza deklaracijam

navedenih na proizvodu;

6. preverili smo potvorjenosti mleka in mlečnih izdelkov z rastlinskimi maščobami;

7. rezultate smo obdelali s kemometričnimi metodami.

6. Utemeljitev morebitnih sprememb programa raziskovalnega projekta oziroma sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine⁴

Ne prvem delovnem sestanku (8.11.2011) smo se dogovorili, da v projekt dodamo tudi preiskave mleka na nivoju proteinov. Raziskave smo zato nadaljevali na vzorcih surovega ovčjega, kozjega in kravjega mleka, in sicer tako, da smo vzorce izbrali iz geografsko različnih slovenskih regij (primorska, dolenska notrankska in štajerska). Analize so ponovno potrdile, **da je v kravjem mleku prisoten protein, ki se pojavi na isti poziciji na 2D-gelu ne glede na geografsko poreklo**, medtem ko ga nismo detektirali v vzorcih ovčjega in kozjega mleka.

7. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine⁵

Znanstveni dosežek			
1.	COBISS ID	4297592	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Vrednotenje različnih metod za ekstrakcijo DNK iz mleka
		ANG	Evaluation of different methods for DNA extraction from milk
	Opis	SLO	Namen študije je bil primerjati 6 komercialnih, 3 nekomercialne in 2 kombinirani metodi za izolacijo DNA iz mleka. Glede na rezultate učinkovitosti (E) PCR v realnem času in korelacijski koeficient (R2) so trije komercialni kompleti (QIAprep Spin Miniprep (Qiagen), DNeasy Blood and Tissue kit, (Qiagen) and SmartHelix First DNAid (ExVivon, Ljubljana, Slovenija) in ena kombinirana metoda (ekstrakcija s fenol-kloroformom v kombinaciji s kompletom Nucleospin Food kit (Macherey-Nagel, Düren, Nemčija) omogočili dobro izolacijo DNA. Komercialni kompleti so bili ocenjeni kot hitreši, cenejši in enostavnejši za uporabo kot druge metode in jih glede na vse dobljene rezultate priporočamo za izolacijo DNA iz mleka.
		ANG	The aim of the study was to compare six commercial, three non-commercial, and two combined methods for isolation of DNA from milk. According to the real-time PCR efficiency (E) and correlation coefficient (R2), only three commercial kits, namely, QIAprep Spin Miniprep (Qiagen), DNeasy Blood and Tissue kit, (Qiagen) and SmartHelix First DNAid (ExVivon, Ljubljana, Slovenia), as well as one combined method (phenol-chloroform protocol and Nucleospin Food kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) produced DNA of good quality for real-time PCR. Given the estimated time required for DNA extraction, and the cost and labour requirements, the three commercial kits were faster, cheaper and simpler than the other methods, and can be recommended as applicable methods for the extraction of DNA from milk.
	Objavljeno v	Výskumný ústav potravinársky; Journal of food and nutrition research; 2014; Vol. 53, no. 2; str. 97-104; Impact Factor: 0.444; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 1.54; WoS: JY; Avtorji / Authors: Volk Helena, Piskernik Saša, Kurinčič Marija, Klančnik Anja, Toplak Nataša, Jeršek Barbara	
Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek	
2.	COBISS ID	4398200	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Uporaba PCR v realnem času za določanje potvorjenosti kozjega in ovčjega mleka s kravjim
		ANG	Real-time PCR detection of fraudulent addition of bovine milk to caprine and ovine milk
	Adulteration of caprine (Capra hircus) and ovine (Ovis aries) milk and dairy		

	Opis	SLO	products by cheaper bovine (<i>Bos taurus</i>) milk is a common fraud attempted with the desire of profit. With the aim of shorten and simplify the control of such we introduced detection of bovine DNA from somatic cells using real-time PCR as a promising approach for qualitative and quantitative determination of bovine milk presence in milk and other dairy products.	
		ANG	Potvorbe ovčjega (<i>Ovis aries</i>) in kozjega mleka (<i>Capra hircus</i>) in mlečnih proizvodov s cenejšim kravjim mlekom (<i>Bos taurus</i>) se najpogosteje pojavljajo zaradi pridobitve dodatnega dobička. Z namenom skrajšanja in poenostavitve kontrole takih nedovoljenih posegov v živila smo vpeljali PCR v realnem času kot metodo kvalitativnega in kvantitativnega določanja kravjega mleka v mleku in mlečnih proizvodih iz drugih vrst mleka.	
	Objavljeno v		Consulting and Training Center Key; Journal of hygienic engineering and design; 2014; Vol. 7; str. 107-111; Avtorji / Authors: Volk Helena, Klančnik Anja, Toplak Nataša, Kovač Minka, Jeršek Barbara	
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek	
3.	COBISS ID		26998055	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Stabilni in radioaktivni izotopi kot sledilci podzemnih vod na področju Podonavja	
		ANG	Radiocarbon and stable isotopes as groundwater tracers in the Danube river basin of SW Slovakia	
	Opis	SLO	Opazili smo horizontalne in vertikalne razlike v porazdelitvi C14, C13 in O18 vrednosti v podzemni vodi na otoku Žitný (Rž otok) v porečju Donave, ki predstavlja največji rezervoar pitne vode v osrednji Evropi (približno 10 GM3). Rezultate smo obdelali s pomočjo geostatističnih analiz. Ugotovili smo, da jedro predstavlja podzemne vode recentnega izvora s C14 vrednostmi nad 80 pMC, medtem ko vrednosti C14 do 40 pMC kažejo na prisotnost podzemnih vod izven neposrednega vpliva reke Donave. Tako porazdelitev starosti so prvič opazili v horizontalnih profilih podzemne vode na področju reke Donave. Te raziskave so v pomoč pri študiju vpliva podzemnih vod na izvor mleka in pri določanju potvorb mleka z dodatkom vode.	
		ANG	Horizontal and vertical variations in the distribution of radiocarbon, d13C and d18O in groundwater of the Žitný island (Rye island) at the Danube River Basin, which is the largest groundwater reservoir in the Central Europe (about 10 Gm3), has been carried out using the geostatistical analysis of experimental isotope data. The core of the subsurface C14 profile represents contemporary groundwater with C14 values above 80 pMC, except a small area on the east of the island where C14 values down to 40 pMC were observed, indicating a groundwater source outside of the direct Danube River influence. This has been for the first time when vertical distributions of isotopes in different groundwater horizons have been studied. This research is important for determination of the sources of milk and also for determination of authenticity of milk and its adulteration with water.	
	Objavljeno v		American Journal Science; Proceedings of the 21st International Radiocarbon Conference, 9-13 July 2012, Paris, France; Radiocarbon; 2013; Vol. 55, no. 2/3; str. 1017-1028; Impact Factor: 1.037; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.211; WoS: GC; Avtorji / Authors: Povinec P. P., Ženišová Z., Šivo A., Ogrinc Nives, Richtáriková M., Breier R.	
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek	
4.	COBISS ID		27009063	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Raziskave izvorov pitne vode v Podonavju	
		ANG		

			Examining riparian drinking water resources in the Danube basin
Opis	SLO	Raziskave vključujejo meritve stabilnih izotopov lahkih elementov pri določanju izvorov pitne vode in s tem tudi izvore vode, ki jo lahko dodajamo mleku.	
	ANG	The research include stable isotopes of lihgt elements in order to determine the sources of drinking water that could be also used for milk adulteration.	
Objavljeno v		2000-; Water & environment news; 2013; No. 32; str. 9-10; Avtorji / Authors: Kármán Krisztina, Deák József, Fórizs István, Michalko Juraj, Cernak Radovan, Ogrinc Nives, Horvatinčić Nada, Miljević Nada R., Ivanov Marin	
Tipologija		1.03 Kratki znanstveni prispevek	
5.	COBISS ID	3238479	Vir: COBISS.SI
Naslov	SLO	Pomen upravljanja tal in vinogradov pri določanju elementne sestave vinske trte	
	ANG	Importance of soil and vineyard management in the determination of grapevine mineral composition	
Opis	SLO	V prispevku je opisana raziskava o variabilnost mineralne sestave listov vinske trte v vinogradih vzdolž vzhodne jadranske obale glede na konvencionalno ali trajnostno obliko obdelave zemlje v njih. Faktorska analiza kaže na tri dejavnike, makroelementa (makrohranili K in P) in mikroelement (mikrohranilo Mn), ki pojasnjujejo 67% celotne variance mineralne sestave. Najbolj prispevajo k tej varianci abiotski in biotski parametri tal, koncentracije K, Fe in Cu v zemlji,vsebnost organskih snovi itd. Poleg tega analiza podatkov mineralne sestave kaže pomembne razlike med različnima tipoma vinogradništva, s povečano bioakumulacije P in K v trajnostnem vinogradništvu, medtem ko je bila bioakumulacija Zn povečana v konvencionalno obdelanih vinogradih. Prenos elementov iz tal je pomemben tudi pri mleku in nam pomaga pri določitvi geografskega porekla mleka.	
	ANG	The spatial variability of the mineral composition of grapevines in production vineyards along the east Adriatic coastwas determined and compared between conventional and sustainable vineyard management. Factor analysis reveals three factors with strong loading for the macronutrients K and P and the micronutrient Mn,which explain 67% of the total variance in the mineral composition. Here, the major contribution of these three elements can be explained by abiotic and biotic soil parameters, with soil concentrations of K, Fe and Cu, organic matter content etc. In addition, analysis of the mineral composition data shows significant differences between differently managed vineyards,with increased bioaccumulation of P and K in sustainable vineyards, while Zn bioaccumulation was increased in conventional vineyards. The transport of elements from soil to milk is important for geographical determination of milk.	
Objavljeno v		Elsevier; Science of the total environment; 2015; Vol. 505; str. 724-731; Impact Factor: 3.163;Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.143; A': 1; WoS: JA; Avtorji / Authors: Likar Matevž, Vogel-Mikuš Katarina, Potisek Mateja, Hančević Katarina, Radić Tomislav, Nečemer Marijan, Regvar Marjana	
Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek	

8. Najpomembnejši družbeno-ekonomski rezultati projektne skupine⁶

Družbeno-ekonomski dosežek

1.	COBISS ID	27996455	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Izotopske tehnike za določanje pristnosti živil
		ANG	Isotope techniques for food authentication
	Opis	SLO	Vabljeni predavanja na skupni delavnici, ILVO - Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek, Technologie & Voeding, Melle, Belgija: JERŠEK, Barbara. Detection of cow's milk in goat and sheep cheeses by real-time PCR : lecture at the meeting "Authenticity of Milk and Dairy Products", 21 June 2013, Melle, Belgium. Melle: Institute for Agricultural and Fisheries Research, Technology & Food Science Unit: = ILVO - Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek, Technologie & Voeding - Voedselveiligheid, 2013. [COBISS.SI-ID 4257656] JAMNIK, Polona. Detection of goat milk adulteration using 2-electrophoresis: lecture at the meeting "Authenticity of Milk and Dairy Products", 21 June 2013, Melle, Belgium. Melle: Institute for Agricultural and Fisheries Research, Technology & Food Science Unit: = ILVO - Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek, Technologie & Voeding - Voedselveiligheid, 2013. [COBISS.SI-ID 4257400] VOLK, Helena. Comparison of iso-electric focusing, real time PCR and commercial ELISA for detection of raw and processed cow's milk in goat milk: lecture at the meeting "Authenticity of Milk and Dairy Products", 21 June 2013, Melle, Belgium. Melle: Institute for Agricultural and Fisheries Research, Technology & Food Science Unit: = ILVO - Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek, Technologie & Voeding - Voedselveiligheid, 2013. [COBISS.SI-ID 4257912] OGRINC, Nives. The use of stable isotopes to determine the authenticity and geographical origin of milk and dairy products: presented at Authenticity of Milk and Dairy Products Meeting, 21 June 2013, Melle, Belgium. 2013. [COBISS.SI-ID 26841639] OGRINC, Nives, POTOČNIK, Doris, MAZEJ, Darja, NEČEMER, Marijan. Isotope techniques for food authentication : milk and dairy products. V: National Meeting of the Society for Applied Spectroscopy, (SAS), September 28 - October 3, 2014, Reno, NV. SCIX 2014: final program book of abstracts. [S. l.: s. n.], 2014, str. 200. [COBISS.SI-ID 27996455] V vseh petih vabljenih predavanjih smo predstavili rezultate projekta. Predstavili smo uporabnost PCR v realnem času in 2D-elektroforezo za določanje potvorjenosti mleka in mlečnih izdelkov ter uporabnost stabilnih izotopov za določanje tako potvorjenosti mleka in mlečnih izdelkov kot tudi geografskega porekla.
			Invited lectures at ILVO - Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek, Technologie & Voeding, Melle, Belgija: JERŠEK, Barbara. Detection of cow's milk in goat and sheep cheeses by real-time PCR : lecture at the meeting "Authenticity of Milk and Dairy Products", 21 June 2013, Melle, Belgium. Melle: Institute for Agricultural and Fisheries Research, Technology & Food Science Unit: = ILVO - Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek, Technologie & Voeding - Voedselveiligheid, 2013. [COBISS.SI-ID 4257656] JAMNIK, Polona. Detection of goat milk adulteration using 2-electrophoresis: lecture at the meeting "Authenticity of Milk and Dairy Products", 21 June 2013, Melle, Belgium. Melle: Institute for Agricultural and Fisheries Research, Technology & Food Science Unit: = ILVO - Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek, Technologie & Voeding - Voedselveiligheid, 2013. [COBISS.SI-ID 4257400] VOLK, Helena. Comparison of iso-electric focusing, real time PCR and commercial ELISA for detection of raw and processed cow's milk in goat milk: lecture at the meeting "Authenticity of Milk and Dairy Products", 21

			June 2013, Melle, Belgium. Melle: Institute for Agricultural and Fisheries Research, Technology & Food Science Unit: = ILVO - Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek, Technologie & Voeding - Voedselveiligheid, 2013. [COBISS.SI-ID 4257912] OGRINC, Nives. The use of stable isotopes to determine the authenticity and geographical origin of milk and dairy products: presented at Authenticity of Milk and Dairy Products Meeting, 21 June 2013, Melle, Belgium. 2013. [COBISS.SI-ID 26841639] OGRINC, Nives, POTOČNIK, Doris, MAZEJ, Darja, NEČEMER, Marijan. Isotope techniques for food authentication : milk and dairy products. V: National Meeting of the Society for Applied Spectroscopy, (SAS), September 28 - October 3, 2014, Reno, NV. SCIX 2014: final program book of abstracts. [S. l.: s. n.], 2014, str. 200. [COBISS.SI-ID 27996455] In all five invited lectures we presented the results of the project. The use of real-time PCR and 2D-electrophoresis were presented in order to determine the adulteration of milk and dairy products, while the relative potential of stable isotopes for the confirmation of authenticity and geographical origin of milk and dairy products was also outlined.
	Šifra	B.04 Vabljeno predavanje	
	Objavljeno v	s. n.]; SCIX 2014; 2014; Str. 200; Avtorji / Authors: Ogrinc Nives, Potočnik Doris, Mazej Darja, Nečemer Marijan	
	Tipologija	1.10 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci (vabljeno predavanje)	
2.	COBISS ID	27692583	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Era katedra "ISO-FOOD": Uporaba izotopskih tehnik za določitev kvalitete, varnosti in sledljivosti živil
		ANG	"ISO-FOOD" ERA chair isotope techniques in food quality, safety and traceability
	Opis	SLO	Pridobitev ERA Chair projekta »ISO-FOOD«: Isotope Techniques in Food Quality, Safety and Traceability (2014-2019). ISO-FOOD povezuje znanje in ideje v okviru treh raziskovalnih stebrov (pristnost, sledljivost in varnost hrane in krme) ter dveh horizontalnih področij (metrologija in repozitorij znanja). V projektu delujem kot vodja delovnega sklopa 3: Research & Education. Kot vodja projekta sem od leta 2011 delovala pri izvedbi naslednjih projektov, ki se navezujejo na problematiko predlaganega projekta: Mednarodni IAEA projekt: CRP - Accessible Technologies for the Verification of Origin of Dairy Products as an Example Control System to Enhance Global Trade and Food Safety, IAEA - The use of stable isotopes and elemental composition for determination of authenticity and geographical origin of milk and dairy products (2013-2017) Slovenian-Austrian cooperation: Application of advanced methods in determination of geographic origin of wine: comparison of Austrian and Slovenian wine (2011-2012).
			New EU project Era Chair ISO-FOOD: Isotope Techniques in Food Quality, Safety and Traceability (2014-2019) was approved. ISO-FOOD will enable the fusion of multidisciplinary knowledge and ideas for target-oriented research on three Pillar themes (Food authenticity, Food traceability and Food Safety) and two Horizontal themes (Metrological support and Knowledge repository). I ack as a leader of Work Package 3: Research & Education. Further I was a coordinator of the following projects related to the

		ANG	proposed research study: International IAEA project: CRP - Accessible Technologies for the Verification of Origin of Dairy Products as an Example Control System to Enhance Global Trade and Food Safety, IAEA - The use of stable isotopes and elemental composition for determination of authenticity and geographical origin of milk and dairy products (2013-2017) Slovenian-Austrian cooperation: Application of advanced methods in determination of geographic origin of wine: comparison of Austrian and Slovenian wine (2011-2012).
	Šifra		D.01 Vodenje/koordiniranje (mednarodnih in domačih) projektov
	Objavljeno v		s. n]; Programme & book of abstracts; 2014; Str. 51; Avtorji / Authors: Ogrinc Nives, Lojen Sonja, Horvat Milena, Benedik Ljudmila, Jačimović Radojko, Koroušič-Seljak Barbara, Kosjek Tina, Seljak Tine, Milačič Radmila, Novak Saša, Ščančar Janez, Vreča Polona
	Tipologija		1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci
3.	COBISS ID		4349304Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Določanje potvorb kozjega in ovčjega mleka s kravjim mlekom na ravni DNA in proteinov
		ANG	Determination of adulteration of goats' milk and sheep's milk with cow's milk on DNA and protein level
	Opis	SLO	V okviru projekta so se izvajale tudi naslednje magistrske naloge: KRŠLIN, Marjetka. Protenski profili različnih vrst mleka : magistrsko delo = Protein profiles of various types of milk : M. Sc. Thesis, (Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Ljubljana, Magistrsko delo magistrskega študija - 2. stopnja Živilstvo, 12). [COBISS.SI-ID 4472696] Magistrska dela, ki so še v teku, predviden zagovor v letu 2015: Urša Vezjak: »Karakterizacija mleka in sira z merjenjem razmerja stabilnih izotopov lahkih elementov«. Ana Gornjak; »Ugotavljanje potvorb ovčjih in kozjih sirov s kravjim mlekom«. Izvajanje doktorske disertacije Doris Potočnik.
		ANG	The following Master thesis were additionally performed within the project: KRŠLIN, Marjetka. Protenski profili različnih vrst mleka : magistrsko delo = Protein profiles of various types of milk : M. Sc. Thesis, (Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Ljubljana, Magistrsko delo magistrskega študija - 2. stopnja Živilstvo, 12). [COBISS.SI-ID 4472696] Master thesis, which will be concluded in 2015: Urša Vezjak: »Characterization of milk and cheese using stable isotopes of light elements«. Ana Gornjak: »Determination of adulteration of sheep and goat cheese with cow's milk. Izvajanje doktorske disertacije Doris Potočnik.
	Šifra		D.10 Pedagoško delo
	Objavljeno v		[H. Volk]; 2013; XIII, 128 f., [10] f. pril.; Avtorji / Authors: Volk Helena
	Tipologija		2.09 Magistrsko delo
4.	COBISS ID		27932967Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Uporaba stabilnih izotopov in elementne sestave pri določitvi pristnosti in geografskega porekla mleka in mlečnih izdelkov
		ANG	The use of stable isotopes and elemental composition for determination of

			authenticity and geographical origin of milk and dairy products
	Opis	SLO	- Sodelovanje pri vzpostavitvi in vzdrževanju baze podatkov izotopske sestave slovenskih vin, ki jo v EU koordinira JRC v Ispri, Italija. - Rezultati projekta sestavljajo prvo bazo podatkov slovenskega mleka in vključujejo: izotopsko sestavo kisika v mleku, izotopsko sestavo C in N v kazeinu izoliranem iz mleka, maščobno kislinsko sestavo in elementno sestavo za leto 2012, 2013 in 2014.
		ANG	- Establishing and updating the database on the isotopic parameters of Slovenian wines in EU databank, coordinated by the Slovenian Ministry of forest, agriculture and food and JRC, Ispra, Italy. - Establishment of the database of the isotopic parameters of Slovenian milk from 2012, 2013 and 2014.
	Šifra		F.15 Razvoj novega informacijskega sistema/podatkovnih baz
	Objavljeno v		2014; Avtorji / Authors: Ogrinc Nives, Nečemer Marijan, Potočnik Doris, Mazej Darja, Jačimović Radojko, Žigon Stojan
	Tipologija		2.13 Elaborat, predštudija, študija
5.	COBISS ID	4395896	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Uporaba specifičnih metod za ugotavljanje in preprečevanje potvorb mleka in mlečnih izdelkov
		ANG	The use of specific methods for determination and prevention of milk and dairy products
	Opis	SLO	Naše delo na področju hrane smo predstavili tudi na 45. Mednarodnem obrtnem sejmu - MOS, ki je potekal od 12.9.-18.9.2012 v Celju. Rezultate svojega dela smo predstavili dvema mlekarskima industrijama: Pomurskim mlekarnam (december 2012) in Mlekarni Celeia (decembra 2013): OGRINC, Nives. Uporaba specifičnih metod za ugotavljanje in preprečevanje potvorb mleka in mlečnih izdelkov: vabljen predavanje. Celje: Mlekarna Celea, 11. dec. 2013. [COBISS.SI-ID 27309351] Ob zaključku projekta »Uporaba specifičnih metod za ugotavljanje in preprečevanje potvorb mleka in mlečnih izdelkov« smo organizirali delavnico, kjer smo predstavili projekt, rezultate in izsledke raziskav. Delavnica je potekala 12.6.2014 na Biotehniški fakulteti. Prisotnih je bilo več kot 50 udeležencev iz različnih področij, med drugim predstavniki ministrstev in drugih vladnih organizacij ter uporabnikov. Uporaba specifičnih metod za ugotavljanje in preprečevanje potvorb mleka in mlečnih izdelkov : delavnica ob zaključku projekta CRP projekt -V4-1108, Ljubljana, 12. junij 2014. Ljubljana: UL, Biotehniška fakulteta: Inštitut Jožef Stefan, 2014. 1 optični disk (CD-ROM), barve. [COBISS.SI-ID 4395896]
		ANG	Food studies performed in Jožef Stefan Institute were presented at: 45. Mednarodnem obrtnem sejmu - MOS, ki je potekal od 12.9.-18.9.2012 v Celju. The results of our work was presented to two dairy industry: Pomurske mlekarnarje (December 2012) and Mlekarna Celeia (December 2013) OGRINC, Nives. The use of specific methods for determination and prevention of adulteration of milk and dairy products: invited talk. Celje: Mlekarna Celea, 11. dec. 2013. [COBISS.SI-ID 27309351] At the end of the project "The use of specific methods for determination and prevention of adulteration of milk and dairy products" we organized a

		workshop where project results and main research findings were presented. The workshop was held on June 12th 2014 at the Biotechnical Faculty. Over 50 participants from various research fields and stakeholders from Ministries and other governmental organizations attended the workshop.
Šifra	F.18	Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)
Objavljeno v	UL, Biotehniška fakulteta; Inštitut Jožef Stefan; 2014; 1 optični disk (CD-ROM); Avtorji / Authors: Ogrinc Nives, Volk Helena, Jeršek Barbara	
Tipologija	2.25	Druge monografije in druga zaključena dela

9. Drugi pomembni rezultati projektne skupine²

Članek v recenziji:

KLANČNIK, Anja, TOPLAK, Nataša, KOVAČ, Minka, OGRINC, Nives, JERŠEK, Barbara. Robust PCR-based method for quantification of bovine milk in cheeses made of caprine and ovine milk, International Journal of Dairy Technology.

Druge predstavitve na mednarodnih konferencah v letu 2014:

JERŠEK, Barbara, JAMNIK, Polona, KLANČNIK, Anja, KURINČIČ, Marija, PISKERNIK, Saša, VOLK, Helena, GORNJAK, Ana, TOPLAK, Nataša, KOVAČ, Minka, POTOČNIK, Doris, OGRINC, Nives. Detection of cow's milk in sheep's and goat's milk and cheeses by real-time PCR, 2-D electrophoresis and fatty acid composition. V: 38th International Symposium on Environmental Analytical Chemistry with a special session on Environmental Analytical Chemistry and Food Safety, June 17-20, 2014, Lausanne, Switzerland. Book of abstracts. Lausanne: EPFL, École Polytechnique Fédérale de Lausanne, 2014, str. 208, PF20. [COBISS.SI-ID 4416888]

OGRINC, Nives, LOJEN, Sonja, HORVAT, Milena. Elemental composition and stable isotope techniques used to trace milk and dairy products. V: 1st IMEKOFOODS, Metrology Promoting Objective and Measurable Food Quality and Safety, October 12-15, 2014, Rome, Italy. ZAPPA, Giovanna (ur.), ZOANI, Claudia (ur.). Abstracts book 2014, str. 50. [COBISS.SI-ID 28063271]

F.11 Razvoj nove storitve

Glede na poznane sekvence gena 12S rRNA Bos taurus (GenBank V00654.1) in literaturne podatke smo postavili sistem določanja kravjega mleka kot možnega vzroka za potvorbo izdelkov iz ovčjega ali kozjega mleka. Pri vpeljavi je bila izvedena optimizacija priprave DNA, optimizacija PCR v realnem času, izdelava standarda ter določeni parametri encimske reakcije. Metoda je bila preizkušena na modelnih in (manjšem številu) realnih vzorcev.

10. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine⁸

10.1. Pomen za razvoj znanosti⁹

SLO

Predlagani projekt zajema kombinacijo različnih analitskih metod in pristopov, ki bodo prispevali k izdelavi obsežnih baz podatkov in podali znanstvene podlage za razvoj in uvajanje različnih modelov. Razvili in vpeljali smo nove metode za določanje potvorjenosti in geografskega porekla mleka in mlečnih izdelkov. Na podlagi vpeljanih sodobnejših metod na področju stabilnih izotopov in molekularne genetike (PCR v realnem času) bo mogoče odkrivati »skrite« potvorbe mleka in mlečnih izdelkov, ki s standardnimi postopki niso izvedljive. Vzpostavili smo prvo bazo podatkov pristnega slovenskega kravjega, ovčjega in kozjega mleka, ki vključuje izotopske parametre (izotopsko sestavo kisika, ogljika in dušika v kazeinu in ogljika v maščobnih kislinah), elementno sestavo in sestavo maščobnih kislin. Rezultati projekta so tako pomembna osnova za razvoj in izbiro metode za izvajanje uradne kontrole živil in sistema za zagotavljanje sledljivosti surovin oziroma kmetijskih proizvodov v našem primeru mleka in

mlečnih izdelkov. Z možnostjo dokazovanja pristnosti mleka in mlečnih izdelkov bodo pristojni organi zaščitili in zavarovali kakovost mlečnih proizvodov hkrati pa tudi zaščitili potrošnika. Med drugim smo ugotovili, da so tudi nizko cenovni slovenski siri dostopni na tržišču pristni. Nadalje se rezultati odličnega sodelovanja s slovenskimi mlekarnami kažejo v njihovem interesu za nadaljevanje tovrstnih študij. Zavedajo se, da lahko na globalnem tržišču konkurirajo le z vzdrževanjem visoke kakovosti in zaščito svojih izdelkov.

ANG

The project included a combination of different analytical methods and approaches that will contribute to the production of large-scale databases and represents the scientific basis for the development and introduction of different models. We have developed and implemented a new method for determining the authenticity and geographical origin of milk and dairy products. Based on a combination of stable isotopes and molecular genetics (real-time PCR) we have shown that it is possible to detect "hidden" falsifications of milk and dairy products, which was not feasible using standard procedures. Further, the first database of genuine Slovenian cow, sheep and goat milk has been established, which includes isotopic parameters (isotopic composition of oxygen, carbon, and nitrogen and carbon in the casein fatty acids), elemental composition and fatty acid composition. The results of the project represents an important foundation from which to develop and select methods for the implementation of official control of foodstuffs and food systems to ensure the traceability of raw materials and agricultural products in our case, milk and dairy products. With the possibility of proving authenticity of milk and dairy products, it becomes possible to protect both the quality of dairy products and the consumer. Our project has shown that even low-cost Slovenian cheeses available on the market are genuine. Furthermore, this project provided an excellent opportunity to cooperate with the Slovenian dairy industry, which is interested in actively participating in such studies since they realize that they can compete in the global marketplace only by protecting their products integrity and maintaining their high quality.

10.2. Pomen za razvoj Slovenije¹⁰

SLO

Projekt je pomemben tudi za socialno-ekonomski razvoj Slovenije. Na podlagi rezultatov raziskav smo dobili prve podatke o elementni in izotopski sestavi mleka in mlečnih izdelkov slovenskega porekla. Na osnovi baze podatkov, ki smo jo osnovali, in z znanjem, izkušnjami ter novo razvito metodologijo, ki smo jo pridobili v okviru projekta, sledimo trenutnim trendom EU glede nadzora pristnosti, kvalitete in sledljivosti prehrabnenih izdelkov. Pričakovati je, da bodo na podlagi vzpostavljenih baz podatkov pristnih prehrabnenih izdelkov iz različnih področij, ki temeljijo na izotopskih parametrih in elementni sestavi, izdelali ustrezne zemljevide, ki bodo vključeni v sistem sledljivosti in bodo v pomoč pri določanju izvora živil na globalnem nivoju. Omeniti je potrebno tudi, da so raziskave vzpodbudile tesnejše sodelovanje raziskovalnih ustanov z živilsko predelovalno industrijo v našem primeru mlekarsko industrijo. V primerjavi z ostalimi EU mlekarnami so naše mlekarnice majhne in svojo konkurenčnost ohranjajo le na podlagi vzdrževanja kvalitete svojih izdelkov. Nadalje rezultati projekta podpirajo razvoj sistema za monitoring prehrabnenih proizvodov in razvoj metod za izvajanje kontrole živil. Pridobljene izkušnje so neprecenljive tudi pri ugotavljanju potvorjenosti drugih prehrabnenih izdelkov. Kmetijski inšpektorat v zadnjem času preverja tudi pristnost oziroma potvorbe drugih prehrabnenih izdelkov (vina, sokovi, oljčno olje, med, itd). Vse to vodi k večji osveščenosti in zaščiti potrošnika in nenazadnje tudi k okrepitvi konkurenčne sposobnosti slovenske živilske industrije. Cilji projekta so v skladu tudi s Strategijo pametne specializacije, kjer je varnost hrane, ena od njenih prednostnih področij.

ANG

The outcome of this project is also important for the social and economic development of Slovenia. The first database of authentic Slovenian milk and dairy products has been established, which includes both isotopic and elemental parameters. Using the new knowledge and experience gained and methods developed within this project it is now possible to follow current trends within the EU regarding controlling the authenticity, quality and traceability of food products. Over the long-term, the generation of isotopic and multi-element maps of foods from different geographical locations could be incorporated into traceability systems. These maps will assist in determining the origin of food at the global level. The project's conclusions also support the development of a system for monitoring food products and the development of

methods for food control. This interdisciplinary approach typically uses a range of innovative methodologies that will upgrade our knowledge in the field of nutrition and authentication to support the relevant government bodies and users. This in turn will improve the competitive ability of Slovenia both in Europe and in the rest of the world. By focusing on the food industry, in our case the dairy industry, co-operation with Slovenian industry will be enhanced by preparing new products and foodstuff. The Slovenian dairy industry is small in comparison with other EU dairies and competitiveness can only be maintained on the basis of quality. The results of this project will help food producers develop quality schemes certified by approved inspection bodies to control quality (and hence the value of labelling) of regionally defined foodstuff. These approaches will strengthen the competitiveness of the whole agro-food chain and at the same time protect the consumer and the good name of the country. The objectives of the project are also in line with the Slovenian smart specialization strategy, where food security is one of its priority areas.

11. Vpetost raziskovalnih rezultatov projektne skupine

11.1. Vpetost raziskave v domače okolje

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

- ☒ v domačih znanstvenih krogih
- ☒ pri domačih uporabnikih

Kdo (poleg sfinancerjev) že izraža interes po vaših spoznanjih oziroma rezultatih?¹¹

V projekt so kot uporabniki rezultatov vključene slovenske mlekarne: Pomurske mlekarne, Mlekarna Planika, Ljubljanske mlekarne in Mlekarna Celeia. Za njihove potrebe smo izvedli analize toksičnih elementov v določenih vzorcih mleka in potrdili pristnost vzorcev masla. V projektu je aktivno sodeloval Kmetijsko gozdarski zavod Nova Gorica, ki nam je dostavljal kozje in ovčje mleko in organiziral vzorčevanje kozjega in ovčjega sira s proizvajalci iz različnih področij.

11.2. Vpetost raziskave v tuje okolje

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

- ☒ v mednarodnih znanstvenih krogih
- ☒ pri mednarodnih uporabnikih

Navedite število in obliko formalnega raziskovalnega sodelovanja s tujini raziskovalnimi inštitucijami:¹²

V okviru projekta smo sodelovali tudi s tujimi partnerji. Tu je potrebno posebej izpostaviti sodelovanje z ILVO, Melle, Belgija, kjer je Helene Volk opravljala štirimesečno Erasmus prakso. Vzpostavili smo sodelovanje z Istituto Agrario di San Michele all'Adige, Italija, se vključili v dva mednarodna projekta (IAEA, FoodIntegrity) in si pridobili EU projekt ERA Chair »ISO-FOOD«. Redno sodelujemo v medlaboratorijski primerjalni shemi, ki jo organizira EUROFINs, Francija trikrat na leto.

Kateri so rezultati tovrstnega sodelovanja:¹³

1. V sodelovanju z ILVO smo izvedli skupno delavnico, kjer smo predstavili rezultate dela v okviru CRP projekta v obliki štirih vabljenih predavanj (N. Ogrinc, B. Jeršek, P. Jamnik, H. Volk).
2. Pridobitev novih projektov (IAEA in FoodIntegrity), pri čemer je potrebno posebej izpostaviti pridobitev ERA Chair projekta »ISO-FOOD«. Gre za petletni projekt, ki smo ga pridobili na Institutu »Jožef Stefan« (2014-2019), kjer je glavna tematika povezana z uporabo izotopskih tehnik pri določanju varnosti, kakovosti in sledljivosti živil in krme.

3. Vzpostavili smo sodelovanje z Istituto Agrario di San Michele all'Adige, Italija. Dr. Federica Camin je nastopila kot vabljen predavateljica na delavnici, ki smo jo organizirali ob zaključku projekta v sodelovanju z Biotehniško fakulteto 12.6.2014 in pričakujemo, da bomo skupaj sodelovali pri pripravi novih EU projektov.

12. Izjemni dosežek v letu 2014¹⁴

12.1. Izjemni znanstveni dosežek

12.2. Izjemni družbeno-ekonomski dosežek

C. IZJAVE

Podpisani izjavljam/o, da:

- so vsi podatki, ki jih navajamo v poročilu, resnični in točni
- se strinjamo z obdelavo podatkov v skladu z zakonodajo o varstvu osebnih podatkov za potrebe ocenjevanja in obdelavo teh podatkov za evidence ARRS
- so vsi podatki v obrazcu v elektronski obliki identični podatkom v obrazcu v pisni obliki
- so z vsebino zaključnega poročila seznanjeni in se strinjajo vsi soizvajalci projekta
- bomo sofinancerjem istočasno z zaključnim poročilom predložili tudi elaborat na zgoščenki (CD), ki ga bomo posredovali po pošti, skladno z zahtevami sofinancerjev.

Podpisi:

*zastopnik oz. pooblaščen oseba
raziskovalne organizacije:*

in

vodja raziskovalnega projekta:

Institut "Jožef Stefan"

Nives Ogrinc

ŽIG

Kraj in datum:

Ljubljana

11.3.2015

Oznaka poročila: ARRS-CRP-ZP-2015/11

¹ Napišite povzetek raziskovalnega projekta (največ 3.000 znakov v slovenskem in angleškem jeziku). [Nazaj](#)

² Napišite kratko vsebinsko poročilo, kjer boste predstavili raziskovalno hipotezo in opis raziskovanja. Navedite ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja, rezultate in učinke raziskovalnega projekta in njihovo uporabo ter sodelovanje s tujimi partnerji. Največ 12.000 znakov vključno s presledki (približno dve strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

³ Realizacija raziskovalne hipoteze. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

⁴ V primeru bistvenih odstopanj in sprememb od predvidenega programa raziskovalnega projekta, kot je bil zapisan v predlogu raziskovalnega projekta oziroma v primeru sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine v zadnjem letu izvajanja projekta, napišite obrazložitev. V primeru, da sprememb ni bilo, to navedite. Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

⁵ Navedite znanstvene dosežke, ki so nastali v okviru tega projekta. Raziskovalni dosežek iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A" ali A'. [Nazaj](#)

⁶ Navedite družbeno-ekonomske dosežke, ki so nastali v okviru tega projekta.

Družbeno-ekonomski rezultat iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A'' ali A'.

Družbeno-ekonomski dosežek je po svoji strukturi drugačen kot znanstveni dosežek. Povzetek znanstvenega dosežka je praviloma povzetek bibliografske enote (članka, knjige), v kateri je dosežek objavljen.

Povzetek družbeno-ekonomskega dosežka praviloma ni povzetek bibliografske enote, ki ta dosežek dokumentira, ker je dosežek sklop več rezultatov raziskovanja, ki je lahko dokumentiran v različnih bibliografskih enotah. COBISS ID zato ni enoznačen izjemoma pa ga lahko tudi ni (npr. prehod mlajših sodelavcev v gospodarstvo na pomembnih raziskovalnih nalogah, ali ustanovitev podjetja kot rezultat projekta ... - v obeh primerih ni COBISS ID). [Nazaj](#)

⁷ Navedite rezultate raziskovalnega projekta iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) v primeru, da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 7 in 8 (npr. ni voden v sistemu COBISS). Največ 2.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

⁸ Pomen raziskovalnih rezultatov za razvoj znanosti in za razvoj Slovenije bo objavljen na spletni strani: <http://sicris.izum.si/> za posamezen projekt, ki je predmet poročanja. [Nazaj](#)

⁹ Največ 4.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

¹⁰ Največ 4.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

¹¹ Največ 500 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

¹² Največ 500 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

¹³ Največ 1.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

¹⁴ Navedite en izjemni znanstveni dosežek in/ali en izjemni družbeno-ekonomski dosežek raziskovalnega projekta v letu 2014 (največ 1000 znakov, vključno s presledki). Za dosežek pripravite diapozitiv, ki vsebuje sliko ali drugo slikovno gradivo v zvezi z izjemnim dosežkom (velikost pisave najmanj 16, približno pol strani) in opis izjemnega dosežka (velikost pisave 12, približno pol strani). Diapozitiv/-a priložite kot priponko/-i k temu poročilu.

Vzorec diapozitiva je objavljen na spletni strani ARRS <http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/>, predstavitev dosežkov za pretekla leta pa so objavljena na spletni strani <http://www.arrs.gov.si/sl/analize/dosez/> [Nazaj](#)

Obrazec: ARRS-CRP-ZP/2015 v1.00

EC-8B-4F-C0-57-2A-76-65-B5-56-42-9B-96-05-F9-C5-EF-B5-0B-B5

Uporaba specifičnih metod za ugotavljanje in preprečevanje potvorb mleka in mlečnih izdelkov

Zaključno poročilo o rezultatih opravljenega raziskovalnega dela na področju
ciljnih raziskovalnih programov: CRP – Konkurenčnost Slovenije 2011-2020:
V4-1108

Nives Ogrinc, Barbara Jeršek, Marijan Nečemer, Doris Potočnik, Darja Mazej, Anja
Klančnik, Polona Jamnik, Marija Kurinčič, Tjaša Kanduč, Stojan Žigon

Ljubljana, september 2014



Uporaba specifičnih metod za ugotavljanje in preprečevanje potvorb mleka in mlečnih izdelkov

Nives Ogrinc, Marijan Nečemer, Doris Potočnik, Darja Mazej, Tjaša Kanduč, Stojan Žigon
Institut "Jožef Stefan", Jamova 39, 1000 Ljubljana

Barbara Jeršek, Anja Klančnik, Polona Jamnik, Marija Kurinčič
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana

POVZETEK

V Evropski uniji posvečajo veliko pozornost kakovosti in kontroli živilskih izdelkov. Potvarjanje živilskih izdelkov predstavlja velik ekonomski profit za nekatere proizvajalce v živilski industriji, predvsem pa manjše podjetnike. Predstavljeni rezultati projekta se nanašajo na problem ohranjanja avtentičnosti in dokazovanja potvorjenosti mleka in mlečnih izdelkov z uporabo različnih metod in pristopov. Mleko in mlečni izdelki zaradi vsebnosti hranilnih snovi predstavljajo nepogrešljiv del zdrave prehrane. Prav zaradi svoje pomembnosti v prehrani in relativno visoki ceni na tržišču so podvrženi različnim potvorbam. Zato je pomembno, da z ustreznimi metodami in ukrepi zagotovimo lojalno konkurenco na trgu in zaščitimo potrošnika pred potvorjenimi in nepravilno označenimi proizvodi.

Glavni namen projekta je bil vpeljava in validacija specifičnih metod kot so uporaba stabilnih izotopov lahkih elementov in molekularnih metod kot je PCR v realnem času, s pomočjo katerih bomo lahko dokazali »skrite« potvorbe, ki jih s klasičnimi metodami ne moremo. V projekt smo vključili še dodatne preiskave mleka na nivoju proteinov z 2-D elektroforezo in bioinformatiko analizo, ker nam ti rezultati v kombinaciji z rezultati dobljenimi z analizami DNA, omogočajo bolj zanesljivo določitev potvorb mleka oziroma mlečnih izdelkov. Nadalje smo izdelali prvo bazo podatkov pristnih vzorcev slovenskega kravjega, ovčjega in kozjega mleka in sirov. Baze podatkov vsebujejo izotopske parametre (izotopsko sestavo kisika ($\delta^{18}\text{O}$ vrednosti) in vodika ($\delta^2\text{H}$ vrednosti) v mleku, izotopsko sestavo ogljika in dušika v kazeinu ($\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti)), vsebnost maščobnih kislin in elementno sestavo. Razvite in validirane metode smo nato uporabili pri preverjanju stanja na slovenskem tržišču, kjer smo izvedli analize kravjega mleka in različnih vrst ovčjih, kozjih ter kravjih sirov. Pri interpretaciji rezultatov smo se poslužili kemometričnih metod kot je uporaba linearne diskriminantne analize (LDA).

Rezultati raziskav in statistična obdelava nakazujejo, da je za preverjanje pravilnosti deklariranega geografskega izvora najbolj primerna uporaba stabilnih izotopov lahkih elementov in elementna sestava. Bazo podatkov je potrebno vzdrževati na letni ravni, pri čemer potrebujemo vsaj 6 vzorcev iz posamezne regije v poletnem in zimskem obdobju. Nadalje so stabilni izotopi lahkih elementov v kombinaciji z elementno sestavo uporabni tudi pri ločevanju ovčjega in kozjega mleka in sira od kravjega. Glede na to, da je z omenjenimi parametri možno ločiti tudi področje pridelave ovčjega mleka oziroma sira, nam ustrezna baza podatkov lahko služi za zaščito geografskega porekla Bovškega in Kraškega sira.

Ugotovili smo, da z uporabo stabilnih izotopov kisika v vzorcih lahko določimo od 7 do 34 % dodatka vode. Najnižji % dodatka vode lahko določimo v poletnih mesecih. Metoda je bolj učinkovita kot krioskopska metoda, v primeru, če proizvajalci z vodo dodajajo tudi NaCl.

Rezultati so pokazali, da z PCR v realnem času lahko določimo kravje mleko kot nedovoljen dodatek kadar le-ta ni deklariran, kvalitativno, če je vsebnost kravjega mleka $> 0,1\%$ in semi-kvantitativno če je vsebnost $> 0,5\%$. Metoda se odlikuje po hitri izvedbi, visoki ločljivosti in selektivnosti določanja specifičnega dela DNA. Rezultati analize proteinov so pokazali, da kravje mleko vsebuje specifičen protein – kapa kazein in kažejo na možnost oblikovanja novega sistema detekcije t.i. proteinski-PCR.

Rezultati vzporednih analiz kozjih in ovčjih sirov s PCR v realnem času in analizami maščobnih kislin kažejo, da sta metodi primerljivi kadar je dodatek kravjega mleka večji kot 5% . Izkazalo se je, da je vsebnost maščobnih kislin v mleku in mlečnih izdelkih pomembna metoda pri določanju mešanja z rastlinskimi maščobami, saj lahko detektiramo dodatek rastlinskih maščob kravjemu mleku in mlečnim izdelkom manjšim od 5% .

Rezultati raziskav izvedenih v vzorcih dostopnih na slovenskem tržišču kažejo, da so največje nepravilnosti prisotne pri označbah ovčjih oziroma kozjih sirih. V naši raziskavi je bilo kar 20% vzorcev sira višjega cenovnega razreda, ki niso ustrezali deklaraciji.

SUMMARY

Within the European Union increasing attention is being paid to the enforcement of food quality control regulations. Making fraudulent profit from the misrepresentation of food has been a feature of society from historical times. Nowadays frauds in various consumer sectors are commonly practiced. The proposed project deals with the determination of the authenticity of milk and dairy products using different specific methods and approaches. Due to their high nutrient content milk and dairy products represent an important part in the healthy balanced diet. As milk and dairy products are in considerable demand and relatively expensive, they are vulnerable to economic adulteration. Thus it is also valuable to ensure fair competition and as a mean of protecting consumers against fraud due to mislabelling according to the geographical origin or adulteration.

The main objective of the proposed project is the introduction and validation of specific methods such as the use of stable isotopes of light elements and PCR in real time to determine the »hidden« adulteration, which can not be detected using standard analytical methods. In the project additional investigation on milk proteins determined by 2-D electrophoresis and bioinformatic analysis was included. The combine use of protein and DNA analysis allows us a more reliable determination of adulteration of milk or dairy products. The first database of authentic Slovenian cow, sheep and goat milk and cheese was established. The database includes isotope parameters (isotopic composition of oxygen ($\delta^{18}\text{O}$ values) and hydrogen ($\delta^2\text{H}$ values) in milk, isotopic composition of carbon and nitrogen in casein ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values)), the content of fatty acids and elemental composition. The developed and validated methods were further used to verify the situation on Slovenian market. We performed analysis of cow milk and different types of sheep, goat and cow cheese. The interpretation of results was conducted using appropriate chemometric methods such as linear discriminant analysis (LDA).

The results of research and statistical analysis indicate that the use of stable isotopes in a combination with elemental composition is the most appropriate approach for the verification of the declared geographical origin. The database must be maintained on an annual basis, where at least 6 samples from each region from summer and winter should be included. Furthermore, stable isotopes of light elements in combination with elemental composition are also useful in separating the sheep and goat milk and cheese from cows. Due to the fact that with these parameters the area of production of sheep's milk or cheese could be identify, a proper database can be used to protect geographical origin of Bovški and Kraški cheese.

It was found that stable isotopes of oxygen could be used to determine the addition of water to milk samples. Based on $\delta^{18}\text{O}$ values the addition of water in the range from 7 to 34% could be detected. The lowest % addition of water can be determined in summer. The method is more efficient than krioscopic method in the case when NaCl is added together with water.

Further results show that the real-time PCR could be used for the identification, if the content of cow's milk is $> 0.1\%$ and for a semi-quantitative analysis when the content of cow milk is $> 0.5\%$. The proposed method provides a rapid, robust and sensitive tool for the identification of adulteration of caprine and ovine cheeses with bovine milk. The results of the analysis of proteins showed that cow's milk contains a specific protein - kappa casein and indicate the possibility of creating a new system for detection of cow milk - protein-PCR.

The parallel investigation of goat and sheep chesses by real-time PCR and fatty acid composition indicate that both methods are comparable when the addition of cow's milk is greater than 5%. In addition the adulteration of raw cow milk with less then 5% vegetable palm tallow was easily detected, due to the difference in fatty acids composition.

Further it was found that on Slovenian market the largest mislabelling are present for goat and sheep cheeses. It was found that 20% of them do not correspond to the declaration.

1 Opis problema in ciljev

V zadnjem času se vse več pozornosti posveča kvaliteti in kontroli prehrambenih izdelkov. Potvarjanje prehrambenih izdelkov predstavlja velik ekonomski profit za živilsko industrijo, predvsem pa manjše podjetnike. Takšna praksa je pomembna s stališča varovanja potrošnikov, kajti dodatki niso jasno označeni in/ali zavajajoči. Pomembni delež ekonomskih goljufij obsega tudi napačno označevanje ali celo mešanje kvalitetnih in dragih izdelkov z izdelki nižjega kakovostnega razreda, ki so pogosto pridelani na drugem področju ali celo državi, kar je zakonsko prepovedano. Razmah raznih tegob in bolezni, ki so povezane s hrano, je vplival na zaskrbljenost potrošnika po vsem svetu in tudi na dvig njegove ozaveščenosti o kvaliteti in varnosti hrane. Vse bolj ga zanimajo in so pomembni poreklo hrane in razni različni predvsem kontrolirani in sledljivi načini njene pridelave, ki so v rabi v različnih državah in regijah. EU je 1992 uvedla Shemo zaščitene hrane (Council Regulation EEC, No 2081/92), ki omogoča neodvisno preverjanje in predpisuje sistem označevanja osnovan na močni regionalni identiteti. To pomeni, da je živilo pridelano ali proizvedeno v specifičnem območju s predpisano tehnologijo, ki je unikatna za to regijo (sir, oljčno olje, vina).

Mleko in mlečni izdelki so zaradi bogastva in pravilnega razmerja hranilnih snovi, ki so lahko prebavljive, v zdravi prehrani nenadomestljive in življenjsko nujne. Te hranljive snovi izkorišča organizem za rast, krepitev telesnih moči in odpornost proti boleznim. Nadalje lahko siri, ki imajo večinoma visoke vsebnosti Ca in Zn, predstavljajo dodaten vir elementov za laktotno intolerantno populacijo. Prav zaradi svoje pomembnosti v uravnoteženi prehrani in relativno visoki ceni na tržišču so mleko in mlečni izdelki podvrženi različnim potvorbam, ki zajemajo eno od naštetih kategorij: (1) neskladnosti z zakonskimi zahtevami (vsebnost vode, vsebnost suhe snovi brez maščob in vsebnost maščob – maslo, sir, jogurt); (2) dodatek drugih sestavin, ki niso mlečnega izvora (dodatek vode, dodatek rastlinskih ali živalskih maščob, spreminjanje razmerja med kazeinom in sirotko); (3) mešanje mlečnih izdelkov različnega izvora (dodatek kravjega mleka drugim mlekom); (4) neskladnosti pri tehnoloških procesih. V zadnjih letih se zaradi povečanih zdravstvenih težav, kot so občutljivost na kravje mleko in alergije, ali pa tudi zaradi osebnega prepričanja, poostrujejo zahteve potrošnikov po pravilno označenih mlečnih izdelkih, še posebno tradicionalnih proizvodih.

Potreba po spremljanju avtentičnosti in kvalitete prehrambenih izdelkov je povzročila, da se je pojavilo povpraševanje po občutljivi in zanesljivi metodi, s katero bi dokazali potvorjenost. Zato v zadnjih letih opazamo povečan delež raziskav v te namene in sicer s ciljem razviti nove analitske metodologije in pristope, s katerimi lahko merimo stopnjo pristnosti in na tej osnovi ločimo med pristno in nepristno/potvorjeno hrano in s tem omogočimo povečano zaščito potrošnika pred ponarejeno, kontaminirano in nezdravo hrano. Čeprav so na voljo različne analitske metode in tehnike, so te večinoma dolgotrajne in drage, predvsem zaradi zapletenih postopkov priprave vzorca in zaradi omejitev uporabljenih kromatografskih metod (retencijski časi), ki onemogočajo hitrejšo analizo večjega števila vzorcev. Nadalje novejša raziskave opozarjajo, da kljub svoji kompleksnosti, metode, kot je kombinacija kromatografije in masne spektrometrije, lahko privedejo do napačnih rezultatov, če pri njihovi uporabi ne zagotavljamo ustreznih postopkov validacije in primerjalnih analiz. V zadnjih letih so se začele na tem področju poleg metod katerih osnova temelji na preiskavah proteinov, na primer elektroforetske (kapilarna elektroforeza, dvo-dimenzionalna elektroforeza, izo-električno fokusiranje mlečnih kazeinov), kromatografske (HPLC) in imunološke tehnike (ELISA), uporabljati tudi molekularne metode, ki temeljijo na preiskavah DNA. Čeprav so preiskave mlečnih proteinov lahko zelo učinkovite metode, pa je njihova glavna omejitev denaturacija proteinov, do katere lahko pride pri segrevanju in povišanih pritiskih, ki se uporabljajo v sami proizvodnji. Denaturacija proteinov pomeni oteženo ali celo onemogočeno detekcijo in identifikacijo v končnem izdelku prisotnih vrst. Metode, ki temeljijo na preiskavah DNA,

imajo prednost predvsem v tem, da je DNA relativno bolj stabilna molekula in so preiskave možne tudi po izvedenih tehnoloških postopkih. Za odkrivanje ponarejanja v živilih se lahko poslužujemo tudi tako imenovanega globalnega pristopa, pri katerem določamo oporečnost na osnovi fizikalno-kemijskih lastnosti vzorca. Te metode temeljijo na tako imenovanem izotopskem prstnem odtisu ali »fingerprintingu«. Z njimi ne določamo le stopnje in načina potvorjenosti, temveč tudi geografsko področje, iz katerega izdelek izhaja, in celo leto proizvodnje. Masna spektrometrija za analizo izotopov lahkih elementov (IRMS), ki temelji na meritvah vsebnosti stabilnih izotopov proizvoda ali specifične komponente proizvoda, je ena izmed najbolj inovativnih tehnik za opisovanje in nadzor kakovosti in pristnosti proizvodov, hrane in tudi mleka in mlečnih izdelkov. Metoda temelji na meritvah razmerja stabilnih izotopov lahkih elementov analita ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, $^2\text{H}/^1\text{H}$), ki ga je potrebno pred uvajanjem v ionski izvor masnega spektrometra pretvoriti v plin. Prednost omenjene tehnike je v njeni natančnosti in jo lahko uporabljamo za vsako surovino ali katero koli živilo. Meritve izotopske sestave lahkih elementov izražamo z δ vrednostjo v promilih (‰). Naravne vsebnosti stabilnih izotopov v vsaki rastlini so odvisne od številnih fizikalnih, biokemijskih in geoklimatskih pogojev. Za odkrivanje ponarejanja se z omenjeno metodo poslužujemo dveh pristopov: globalne analize vzorca ali pa iskanja sledilca potvorjenosti. V prvem primeru, IRMS in NMR nedvomno dajeta najboljše rezultate, medtem ko je v drugem primeru bolj uporabna kromatografska tehnika skupaj z GC-C-IRMS, kjer je plinski kromatograf z masnim spektrometrom sklopljen preko sežigne enote. Metoda predstavlja velik napredek v analitiki stabilnih izotopov, ker omogoča določitev porekla oziroma izvora določene organske spojine na molekularni ravni. Odlikuje se po visoki natančnosti (0,3‰), ki omogoča zanesljivo določitev že najmanjših sprememb v vsebnosti ^{13}C , ki so velikostnega reda 1‰.

Razpoložljivost zanesljivih analiznih metod, ki lahko zagotovijo varnost, kakovost in pristnost hrane, igra ključno vlogo v delovanju sodobne družbe. Če obstaja možnost za nezakonit dobiček, ki izhaja iz potvorjenosti, to lahko preprečimo le s stalnim nadzorom in se tako zavarujemo pred tovrstnimi nezakonitostmi. Te tehnike in njihova uporaba morajo biti vključene tudi v zakonodajo s področja varnosti in kakovosti hrane, ki jo je treba stalno nadgrajevati in posodabljati, da bi zaščitili potrošnika pred slabšimi izdelki opremljenimi z lažnimi oznakami in zavarovali trgovce in proizvajalce pred nelojalno konkurenco.

Glavni cilji projekta so:

- izdelava podatkovne baze pristnega slovenskega mleka na osnovi izotopskih analiz, maščobnokislinske in elementne sestave;
- vpeljava in validacija novih metod za določanje potvorjenosti mleka in mlečnih izdelkov kot so molekularne metode (PCR v realnem času) in uporaba stabilnih izotopov lahkih elementov kisika, vodika, ogljika in dušika;
- na podlagi novih metod določiti vrste "skritih" potvorb (kot na primer dodatek kravjega mleka v ovčjih in kozjih sirih) in analizirati stanje na slovenskem tržišču;
- na podlagi elementne analize ugotoviti kontaminacijo mleka in mlečnih izdelkov zaradi tehnološkega postopka;
- statistična obdelava rezultatov odvzetih vzorcev na slovenskem tržišču.

2 Kratek povzetek ključnih ugotovitev iz literature

Potvorbe živil so pogoste težave v živilski industriji predvsem pri mlečnih in mesnih izdelkih. Siri in drugi mlečni izdelki so substrat, kjer se odstopanja v sestavi pojavljajo pogosto zaradi mnogih razlogov, kot so razlike v ceni različnih vrst mleka in sezonskih variacij (Karoui in De Baerdemaeker, 2007; Lopez-Calleja in sod., 2007). Potvorbe se pojavljajo predvsem pri tistih

izdelkih (na primer siri), ki, preden dosežejo potrošnika, v svoji tehnologiji proizvodnje vključujejo več faz. Zato industrija mlečnih izdelkov potrebuje ustrezne metode, ki so potrebne za nadzor in ovrednotenje pristnosti mleka in mlečnih izdelkov ne samo v kvalitativnem ampak tudi v kvantitativnem pomenu.

Med drugimi instrumentalnimi metodami za ugotavljanje potvorb vzorcev živil je bila masna spektrometrija za analitiko stabilnih izotopov lahkih elementov (IRMS) potrjena kot uspešna metoda za takoimenovano globalno karakterizacijo vzorca in za karakterizacijo posameznih spojin v vzorcu (Meier-Augenstein, 1999; Cordella et al., 2002; Karoui in De Baerdmeaeker, 2007). Izotopska sestava kisika in vodika ($\delta^{18}\text{O}$ in $\delta^2\text{H}$ vrednosti) v živalskih tkivih sta primarno odvisna od izotopske sestave zaužite vode, medtem ko je izotopska sestava ogljika in dušika ($\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti) odvisna od vrste tal in prehranjevalnih navad. Zato lahko na podlagi $\delta^{18}\text{O}$ in $\delta^2\text{H}$ vrednosti določimo dodatek vode v mleko. Renou in sod. (2004) so pokazali, da je to možno samo takrat, ko imamo kontrolirano področje pridelave mleka. $\delta^{18}\text{O}$ in $\delta^2\text{H}$ vrednosti v mleku odražajo izotopsko sestavo podzemne vode, ki jo krave pijejo. Ugotovili so, da pride med metabolizmom povezanim z nastankom mleka do obogatitve z izotopom ^{18}O v mleku in so zato vrednosti za +2 do +6‰ višje v primerjavi s pitno vodo (Kornexl in sod., 1997). Prav tako so opazili sezonske variacije, ki so povezane s spremembo načina prehranjevanja in sezonske izotopske sestave podzemne vode v odvisnosti od padavin (Renou in sod., 2004). Glede na omenjene vplive lahko dodatek vode mleku določimo znotraj krajšega obdobja s sistematičnimi raziskavami in ne moremo posplošiti na celotno leto (Lin et al., 2003; Engel in sod., 2007). Največ raziskav je bilo narejenih na uporabi stabilnih izotopov C in N za določitev tipa prehrane (Kornexl in sod., 1997; Camin in sod., 2004; Knobbe in sod., 2006; Camin in sod., 2008). Izkazalo se je, da $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti v mleku kot tudi v kazeinu in glicerolu ekstrahiranih iz mleka ali sira, določajo vsebnost C3 (trava) oziroma C4 (koruza) rastlin v živalski prehrani, medtem ko na $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti v mleku in kazeinu poleg prehrane vplivajo še drugi faktorji kot so tla, vlaga, oddaljenost od morja in gnojenje. Raziskave in uporaba stabilnih izotopov na sirih so se razmahnile šele v zadnjem obdobju in se osredotočile na določitev geografskega porekla sira (Manca et al., 2001; Camin in sod., 2004) tudi v kombinaciji z elementno analizo (Pillonel in sod., 2005; Bontempo in sod., 2011). Na osnovi različnih kemijskih parametrov in stabilnih izotopov so Pillonel in sod. (2004) ugotovili potvorjenost in napačno označbo sirov Raclette Suisse in Fontina PDO. Prav stabilni izotopi so tudi glavni parameter za preverjanje pristnosti sira Grana Padano v EU direktivi (EC 2009/C 199/11). Poleg geografskega porekla se elementna analiza uporablja tudi za ločitev kravjega mleka od ostalih mlek. Fresno in sod. (1996) so ugotovili, da se vsebnosti mineralov in elementov v sledovih (P, Ca, K, Mg, Zn, Fe in Mn) znatno razlikujejo v kravjem mleku v primerjavi s kozjim. Prav tako lahko na podlagi elementne sestave določimo vpliv onesnaženja določenih elementov med tehnološkim procesom pridelave (Coni in sod., 1995; Franco in sod., 2003). Naslednje pomembno področje pri določanju pristnosti mlečnih izdelkov je detekcija maščob, ki niso mlečnega izvora. Ulbert (1995) je s pomočjo statističnih metod in vsebnosti maščobnih kislin določil vsebnost loja, ki so ga dodali mleku. Metoda je zelo občutljiva, saj je lahko detektiral dodatek 1.2% loja mleku. Prav tako se lahko maščobno kislinska sestava mleka in mlečnih izdelkov uporablja pri določanju mešanja kravjega mleka z ostalimi mleki in mlečnimi izdelki (Lipp, 1995). Maščobno kislinska sestava kozjega, ovčjega in kravjega mleka se razlikujejo po vsebnosti, nasičenosti in dolžini verig maščobnih kislin. Kozje mleko vsebuje več srednje dolgih verig nasičenih maščobnih kislin (C6-C14) (skupaj približno 20 %) v primerjavi s kravjim mlekom, kjer je vsebnost teh maščobnih kislin le 6 %. Raziskave na vsebnosti maščobnih kislin v kozjem in kravjem mleku so bile izvedene tudi v Sloveniji (Stibilj in Koman Rajšp, 1997; Žan in sod., 2006). Ugotovili so, da se vsebnosti maščobnih kislin v slovenskem mleku primerljive z ostalimi državami po svetu. V kozjem

mleku pa se je izkazalo, da je sestava maščobnih kislin odvisna od prehranjevanja koz, ki se pasejo v alpah na različnih nadmorskih višinah.

Med molekularnimi metodami so bile tiste, ki temeljijo na verižni reakciji s polimerazo (PCR), že uspešno uporabljene za identifikacijo različnih vrst v mleku in mlečnih izdelkih (Dalmasso in sod., 2011; Lopez-Calleja in sod., 2007a; Lopez-Calleja in sod., 2007b; Zhang in sod., 2007). Glavne prednosti uporabe PCR so hitrost (15 min - 2 h), visoka občutljivost (meja zaznave je ≥ 100 molekule) in visoka selektivnost določanja specifičnega dela DNA, ki ga je možno določiti tudi, če so v istem vzorcu prisotne večje količine drugih molekul DNA. Za analizo živil je PCR uporaben za ugotavljanje specifične sekvence DNA, ki je značilna za določen mikroorganizem, rastlino ali živali (Kuchta, 2006). Klasična izvedba PCR omogoča kvalitativno detekcijo posameznih vrst, ne pa kvantifikacije. Za samo kvantifikacijo se lahko uporabi kvantitativni kompetitivni PCR, denzitometrija in PCR v realnem času (Sauders, 2004). Pri PCR v realnem času je možnost kontaminacije v laboratoriju minimalna, ker se celoten proces odvija v zaprtih epruvetah. Poleg tega je možna kvantifikacija specifičnih pomnožkov (Q-PCR) in sočasno določanje več pomnožkov (mPCR) (De in sod. 2011; Mafra in sod., 2007). Prednost PCR v realnem času pred klasičnim PCR je tudi v hitrosti pridobivanja rezultatov, saj je zmanjšano število ciklov, postopki določanja pomnožkov po zaključenem pomnoževanju niso potrebni, visoko občutljiva oprema, ki meri fluorescenco, pa omogoča hitro zaznavanje pomnožkov (Mackay in Landt, 2007; Zhang in sod., 2007). Pri ugotavljanju potvorb predstavlja DNK živil s svojo toplotno stabilnostjo ter konzervativno strukturo zelo primerno tarčo (Lopez-Andreo in sod., 2005; Lopez-Calleja in sod., 2004; Lockey and Barbdsley, 2000). Metodo PCR so uporabili pri kvantifikaciji kravjega mleka v sirih (Lopparelli in sod., 2007) in v ovčjem mleku (Lopez-Calleja in sod., 2007c). Potekale so tudi že nekatere optimizacije pri izbiri mitohondrijskih genov za uporabo v metodi PCR v realnem času ter njihov prenos v mesno industrijo (Lopez-Andreo in sod., 2005), mlečno industrijo (Mininni in sod., 2009) ali pa v univerzalne namene (Lopez-Andreo in sod., 2005; Lopparelli in sod., 2007).

3 Uporabljene metode dela

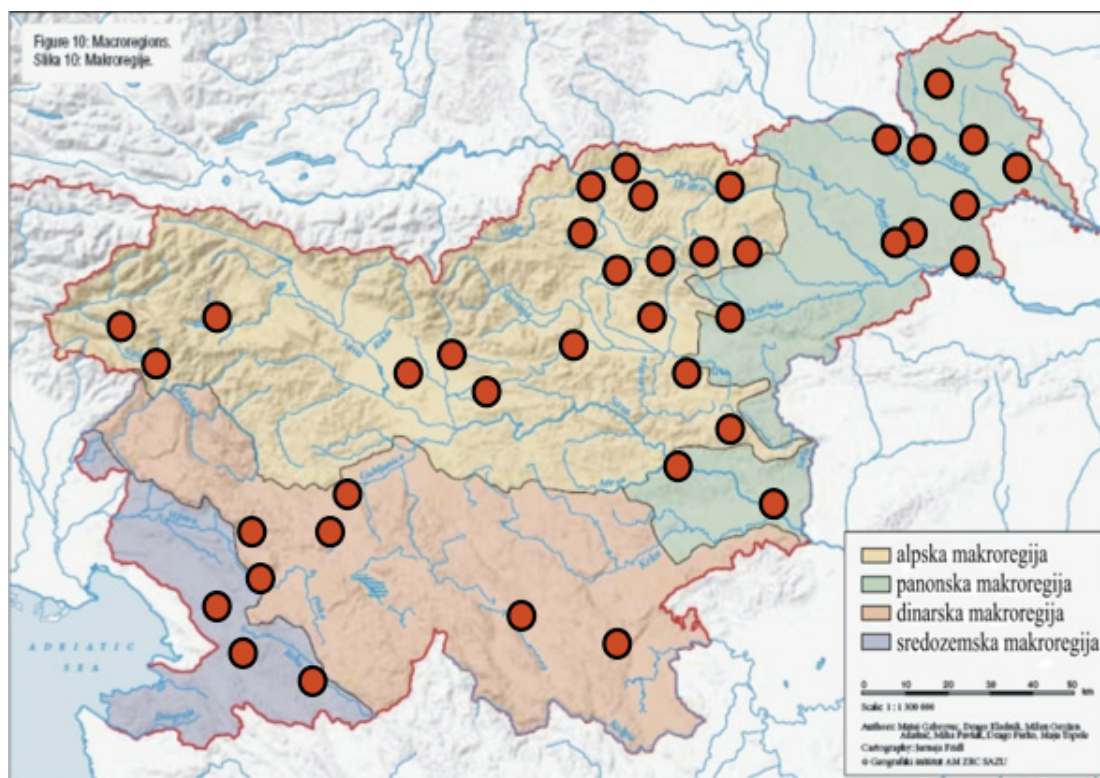
Raziskava je bila razdeljena na štiri delovne sklope (DS) s pomočjo katerih smo določali potvorbe mleka in mlečnih izdelkov in analizirali stanje na slovenskem tržišču: (1) vpeljava in validacija metod na osnovi stabilnih izotopov lahkih elementov; (2) vpeljava in validacija molekularnih metod – PCR v realnem času; (3) elementna sestava mleka in mlečnih izdelkov; in (4) analiza stanja v praksi in na slovenskem tržišču.

3.1 Vzorčevanje

Vzorčevanje pristnih vzorcev kravjega mleka

V mesecu januarju 2012 smo pričeli s sistematičnim zbiranjem mleka za določitev izotopske sestave kisika v mleku. Vzoredno smo vzorčevali tudi vodo na izbranih lokacijah z namenom določitve potvorjenosti mleka z vodo. Mleko so mesečno dostavljale 4 mlekarne: Pomurske mlekarne, Ljubljanske mlekarne, Vipavske mlekarne in mlekarna Planika, vodo pa smo zbirali na 5 lokacijah: Murska Sobota, Košana, Godovič, Dolina in Gora. Ob koncu leta 2012 se je projektu pridružila še mlekarna Celeia, medtem ko so nam zaradi organizacijskih težav Vipavske mlekarne prenehale z dostavljanjem mleka. Tako smo zbirali mleko iz 39 vzorčevalnih lokacij iz različnih slovenskih področij (mediteransko, panonsko, alpsko in dinarsko). Vzorce mleka smo takoj zamrznili in hranili pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do izvedbe analiz. Izotopsko sestavo kisika smo določili v vseh vzorcih, medtem ko smo izotopsko sestavo C in N v kazeinu, maščobnokislinsko in elementno sestavo določili v vzorcih prinesenih marca,

junija, septembra in decembra 2012. Na podlagi rezultatov meritev smo ugotovili, da je za določitev geografskega porekla potrebno odvzeti vzorce le dvakrat letno, zato smo v letu 2013 meritve izotopske sestave C in N v kazeinu, maščobnokislinske in elementne sestave v mleku omejili na mesec junij in december. V mesecu decembru smo v raziskave vključili še meritve izotopske sestave vodika.



Slika 1. Vzorčevalne lokacije skupaj z označenimi makroregijami v Sloveniji (Perko, 1998)

Nadalje smo v maju 2012 pričeli s sistematičnim vzorčevanjem mleka koz in ovc iz različnih področij Slovenije (Bovec, Vipavska dolina, Kras, Brkini, osrednja Slovenija, Dolenjska). Vzorčevanje je potekalo v sodelovanju s Kmetijsko gozdarskim zavodom Nova Gorica. Predvideli smo 25 vzorcev, ki smo jih mesečno odvzeli v maju, juniju in juliju 2012. V vzorcih smo izvedli poleg meritev izotopske sestave kazeina tudi elementno sestavo in sestavo maščobnih kislin. V mesecu avgustu smo vzorčili tudi vseh 25 vzorcev sira narejenega iz majskega mleka. Vzorčevanje kozjega in ovčjega mleka smo ponovili tudi v letu 2013.

Vzorci na tržišču

V mesecu juliju 2013 smo vzorčevali mleko dostopno na slovenskem tržišču pridelanem v vseh sodelujočih mlekarnah. V mleku smo določili izotopsko sestavo O, elementno sestavo, maščobnokislinsko sestavo in izotopsko sestavo C in N v kazeinu.

V letu 2013 smo vzorčevali več različnih sirov (kozji, ovčji, kravji) višjega cenovnega ranga, dostopnih na slovenskem tržišču. Kravje mleko smo s PCR v realnem času določali v vzorcih krvjih, ovčjih in kozjih sirov ter v mešanih sirih (skupaj 58 vzorcev). Sire smo vzorčili naključno in sicer tako, da so bili geografsko čim bolj različni. Poleg sirov iz Slovenije, smo analizirali tudi sire iz Španije, Nizozemske, Hrvaške, Italije, Bolgarije in Francije. Nadalje

smo v teh sirih določili tudi maščobno kislinsko sestavo mleka in ugotovili ali dobljeni rezultati ustrezajo podani deklaraciji posameznih sirov. Prav tako smo analizirali nižje cenovne sire dostopne na slovenskem tržišču, kjer smo s pomočjo maščobno kislinske sestave preverjali ali je v mleku dodana rastlinska masti. Te raziskave smo izvedli na pobudo Pomurskih mlekarn, ki so nas opozorili, da na tržišču obstajajo mlečni izdelki, ki jim dodajajo rastlinske maščobe.

3.2 Meritve izotopske sestave kisika v mleku in ogljika in dušika v kazeinu mleka in sira

Masna spektrometrija za analitiko stabilnih izotopov lahkih elementov (IRMS) je uspešna metoda za takoimenovano globalno karakterizacijo vzorca in za karakterizacijo posameznih spojin v vzorcu. Osnovo predstavljajo majhne toda signifikantne razlike v razmerjih stabilnih izotopov bioelementov kot so vodik ($^2\text{H}/^1\text{H}$), kisik ($^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$), ogljik ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) in dušik ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$), ki so prisotne v določenih organskih molekulah in nastanejo zaradi kinetičnih-kemijskih in fizikalnih dejavnikov in so povezane z botaničnim-metabolnim in/ali geografskim izvorom produkta. Izotopsko sestavo oziroma razmerje med težjim in lažjim izotopom v spojini izražamo z vrednostjo δ , ki predstavlja relativno razliko izotopske sestave raziskovanega vzorca (vz) glede na izbrani standard (st), in jo izražamo v promilih (‰):

$$\delta A = (R_{\text{vz}} - R_{\text{st}})/R_{\text{st}} * 1000 \quad \dots(1)$$

V enačbi A pomeni težji izotop elementa (^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{18}O), vrednost R pa je razmerje med izotopi ($^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$). Za ogljik je privzet karbonatni standard fosila Belemnite iz kredne formacije Pee Dee v Južni Karolini (PDB – Pee Dee Belemnite), za dušik zračni dušik (AIR), za kisik in vodik pa je privzet standard povprečne morske vode (SMOW – Standard Mean Ocean Water) na globini enega metra pri temperaturi 25°C.

Določanje izotopske sestave vodika in kisika v mleku

Metoda za določevanje vrednosti $\delta^2\text{H}$ in $\delta^{18}\text{O}$ temelji na izmenjavi izotopov kisika ali vodika med vodo v mleku in CO_2 . Meritve izotopske sestave kisika v vzorcih vod smo izvedli na masnem spektrometru Isoprime (GV Instruments) s preparativnim nastavkom Multiflow za tekoče vzorce. Pri meritvah vodika poteka uravnoteženje s pomočjo Pt katalizatorja. Uravnoteženje poteka pri konstantni temperaturi 40 °C 6 ur. Pri meritvah v vzorcih vode uporabljamo laboratorijske standarde, ki so interno umerjeni na mednarodne: V-SMOW, GISP in SLAP (Preglednica 1). Za interni laboratorijski standard uporabljamo morsko in vodovodno vodo (Preglednica 1).

Določanje izotopske sestave C in N v kazeinu mleka in sira

Iz mleka in sira smo izolirali kazein. V 50 ml centrifugirko smo dodali 30 ml nehomogeniziranega mleka in cetrifugirali pri 3200 rpm 10 min. Medtem se je zbrala mlečna maščoba na vrhu vodotopnih spojin, proteini pa v obliki peleta na dnu. Maščobo smo postrgali z vrha in s filter papirjem obrisali ostanke maščobe. Vzorcju smo znižali pH na 4,3 z 1 M HCl. Pri tem se je kazein oboril in oblikovali so se krpicam podobni skupki. Vzorec smo centrifugirali (3200 rpm, 10 min), 1 x sprali z MQ vodo in 1 x z raztopino petrol eter:eter v razmerju 2:1. Po centrifugiranju smo vzorec segreli na 40 °C, da smo se znebili ostankov topil in ga liofilizirali.

Kazein v siru smo izolirali tako, da smo se maščob znebili z ekstrakcijo s Soxhletom z raztopino petrol eter:eter v volumenskem razmerju 2:1. Po ekstrakciji smo vzorec segreli na 40 °C, da smo se znebili ostankov topil, ga 2 x sprali z MQ vodo in liofilizirali.

Posušen vzorec kazeina smo zatehtali v kositrne kapsule in določili $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti na masnem spektrometru za analitiko stabilnih izotopov lahkih elementov (IRMS) Europa Scientific 20-20 s preparativnim nastavkom za trdne in tekoče vzorce ANCA-SL. Za spremljanje pravilnosti in natančnosti meritev smo za ogljik uporabili referenčne in delovne standarde zbrane v Preglednici 1. Napake meritev znašajo 1,0 ‰ za $\delta^2\text{H}$, 0,1 ‰ za $\delta^{18}\text{O}$, 0,2 ‰ za $\delta^{13}\text{C}$ in 0,3 ‰ za $\delta^{15}\text{N}$.

3.3 Določanje vsebnosti in izotopske sestave maščobnih kislin v mleku

V mleku in sirih smo maščobne kisline izolirali z metodo esterifikacije (in situ trans esterifikacija). Lipide smo iz homogeniziranega mleka ekstrahirali z diklorometanon in natrijevim hidroksidom v metanolu, nato smo jih z 14% raztopino BF_3 -v metanolu pretvorili v metilne estre maščobnih kislin (FAME). Vsebnost metilnih estrov maščobnih kislin smo določili s plinsko kromatografijo sklopljeno s plamensko ionizacijskim detektorjem (GC-FID) (Agilent 6890N Network GC System). Maščobne kisline smo identificirali in kvantificirali na osnovi recenzijskih časov posameznih maščobnih kislin, ki smo jih primerjali z retencijskim časom standarda Supleco 37 components FAME Mix in jih izrazili kot utežni/procentni delež celokupnih/celotnih maščobnih kislin.

Izotopsko sestavo maščobnih kislin smo določili s plinsko kromatografijo (Agilent 6890N s FID detektorjem), ki je preko sežigne enote sklopljena z masnim spektrometrom za analizo stabilnih izotopov lahkih elementov (GC-C-IRMS) (IsoPrime GV Instruments). Meritve izotopske sestave ogljika v posameznih maščobnih kislinah so podane z vrednostmi delta – δ v promilih (‰) glede na VPDB standard. Pravilnost in potek meritev smo spremljali z uporabo laboratorijskega standarda. FAME – Fatty acid methyl ester z vrednostjo $\delta^{13}\text{C}$ -29,8 ‰. Napaka meritev tako določene izotopske sestave ogljika v maščobnih kislinah izmerjena na dveh vzporednih ponovitvah znaša $\pm 0,2$ ‰.

3.4 Elementna sestava mleka

V vzorcih mleka in sira smo izvedli elementno sestavo makro in mikro elementov, medtem ko smo elemente v sledovih določili le v vzorcih mleka. Koncentracije makro in mikro elementov (P, S, Cl, K, Ca, Zn, Br, Rb, Sr) smo določili z rentgensko fluorescenčno spektrometrijo (XRF). Iz 0,3 do 0,8 g suhega uprašenega vzorca mleka ali sira smo stisnili tableto. Če je bilo mleko preveč masno smo uporabili inovativen postopek, vzorec smo stresli v spectrocup in ga analizirali z nedestruktivno XRF. Vzorec smo v spectrocupu, plastična XRF posodica z mylar folijo na dnu in dimenzijami višino in površino enako dimenzijam tablete, enakomerno porazdelili z batkom terilnice in stisnili v obliko tablete. Za vzbujanje smo uporabili Cd-109 (25 mCi) in Fe-55 (20 mCi). Emitirano fluorescenco smo merili s Si(Li) detektorjem (Canberra). Spektrometer je bil opremljen z vakumsko komoro (Fe-55) za meritve lahkih elementov P-Cl (Nečemer in sod., 2008; Nečemer in sod., 2011).

Za določitev celotnih koncentracij nekaterih mikroelementov in elementov v sledovih v vzorcih mleka smo uporabili dva postopka predpriprave: 1) razkroj v mikrovalovnem sistemu (Microwave system ETHOS 1, MILESTONE SN 130471) z dušikovo kislino in vodikovim peroksidom in/ali 2) redčitev z raztopino, ki je vsebovala amoniak, EDTA in Triton X-100. Koncentracije elementov v pripravljenih raztopinah smo določili z masno spektrometrijo z

induktivno sklopljeno plazmo (ICP MS, 7500ce, Agilent) z uporabo oktopolne kolizijske celice (ORS) za odstranitev interferenc. Pravilnost rezultatov smo preverjali z uporabo certificiranih referenčnih materialov in sodelovanjem v medlaboratorijski primerjalni shemi FAPAS - Milk Powder (Food and Environmental Research Agency, Sand Hutton, York, VB). Meje zaznavnosti so naslednje: za As 0,1 ng/g; za Cd 0,03 ng/g; za Pb 0,2 ng/g, za Cu 2 ng/g; za Zn 35 ng/g, za Se 1 ng/g, za Mn 1 ng/g in za Fe 25 ng/g.

3.5 Molekularne metode za določanje potvorjenosti mleka in mlečnih izdelkov

3.5.1 Analize DNA

Prva faza vpeljave PCR v realnem času je bila izolacija DNA iz vzorcev kravjega mleka. Testirali smo dva klasična postopka (fenol-kloroform; izolacija z gvanidin tiocianatom) in pet komercialnih postopkov (Nucleospin, QIAprep Spin MiniPrep Kit, DNeasy Blood & Tissue Kit, Reagent DNeasy Mericon Food Kit). Izmed preizkušenih postopkov je bila izolirana najvišja koncentracija DNA s klasičnim postopkom s fenol-kloroformom, vendar pa je bila čistost slaba ($A_{260}/A_{280} < 1,2$). Pri komercialnih postopkih izolacije DNA smo s kompletom Nucleospin uspeli izolirati zelo čisto DNA, vendar nizke koncentracije. S kompletom DNeasy Blood & Tissue Kit smo izolirali še vedno zadovoljivo čisto DNA v koncentracijah primernih za PCR. Preizkusili smo še različne začetne volumne vzorca in različne kombinacije postopkov (2x fenol-kloroform, fenol-kloroform in Nucleospin, fenol-kloroform in DNeasy Blood & Tissue Kit). V nadaljevanju smo v protokol izolacije DNA dodali pred-pripravo vzorcev, ki je vsebovala ločitev maščobne frakcije mleka pred izolacijo DNA in koncentriranje somatskih celic ter njihovo čiščenje z večkratnim spiranjem. V sam postopek priprave DNA smo vključili večstopenjski homogenizator, ki zagotovi učinkovito in enakomerno razbijanje celic, ter dodaten postopek izolacije DNA (Smarthelix First DNAid Kit). Povzetek rezultatov je pokazal, da sta glede na koncentracijo in čistost dobljene DNA najbolj primerna postopka izolacije DNA Nucleospin, QIAprep Spin MiniPrep Kit ali Smarthelix First DNAid Kit.

V drugi fazi vpeljave PCR v realnem času smo za določanje potvorb s kravjim mlekom izbrali dva sistema, ki temeljita na mitohondrijski ribosomalni sekvenci 12S rRNA (Lopez-Calleja et al., 2007) - sistem specifičen za kravo (*Bos taurus*): oligonukleotidna začetnika BOSf, BOSr in sonda BOSp in sistem specifičen za sesalce: oligonukleotidna začetnika MANf, MANr in sonda MANp. Prvi sistem je služil specifični določitvi kravjega mleka, drugi pa kot kontrolni sistem preverjanja inhibicije encimske reakcije in kot sistem kvantifikacije. Za vpeljavo metode smo predvideli nespecifično metodo določanja pomnožkov z reagentom SybrGreen in specifično metodo določanja pomnožkov s sondo TaqMan in zato tudi različne reakcijske mešanice za PCR. Optimizacija obeh metod je vsebovala pripravo in izvedbo t.i. »šahovnice«: pripravili smo različne reakcijske mešanice za PCR tako, da smo spreminjali posamezno koncentracijo oligonukleotidnega začetnika (testirane koncentracije 300 – 900 nM) in rezultate vrednotili z merjenjem spremembe fluorescence in s spremljanjem pomnožkov na agaroznem gelu. Glede na specifičnost pomnožitve, relativno najnižje vrednosti Ct, najširši linearen rang in dobro učinkovitost encimske reakcije smo za optimalno izbrali 300 nM za f-oligonuklotidni začetnik) oziroma 900 nM za r-oligonukleotidni začetnik. V optimizacijo smo vključili tudi preizkuse zmanjševana reakcijskega volumna (od 25 do 10 μ L), saj bi z zmanjšanjem volumna lahko veliko prihranili pri materialu potrebnem za samo encimsko reakcijo. Rezultati so pokazali, da če želimo spremljati pomnožke direktno z meritvami fluorescence, potrebujemo 25 μ L reakcijo. Indirektno določanje namreč ni uporabno, ker je bil končni namen te metode tudi kvantifikacija dobljenih rezultatov.

V nadaljevanju smo izdelali interni standard s konstrukcijo plazmidne DNA s specifičnim pomnožkom. Za pripravo teoretične standardne umeritvene krivulje smo pripravili standardne vzorce DNA tako, da smo pomnožke dobljene s kompletom oligonukleotidnih začetnikov MANf, MANr izolirali iz agaroznega gela in iz reakcijskih mešanic s kompletom Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System ter jih in jih vgradili v vektor s sistemom pGEMs-T Easy (pGEMs-T Easy Vector System I). Po namnožitvi v *E. coli* in izolaciji smo uspešnost transformacije preverili s ponovno izolacijo plazmida in nadaljnjo PCR-analizo ter gelsko elektroforezo. Rezultati so pokazali uspešno vezavo specifičnega dela DNA. Dodatno smo vzorce plazmidne DNA sekvenirali in tako potrdili ustreznost standardnih vzorcev DNA. Določitev parametrov PCR v realnem času: s standardnimi vzorci DNA smo pripravili standardni krivulji za oba para oligonukleotidnih začetnikov in rezultati so za BOSf, BOSr k: -3,733, r^2 : 0,982, E: 85,31 % in za MANf, MANr k: -4,318, r^2 : 0,997, E: 70,47 %.

Vpeljava PCR v realnem času za določanje kravjega mleka je v nadaljevanju zajemala analize modelnih vzorcev. Modelne vzorce smo pripravili iz kravjega, ovčjega in kozjega mleka kot mešanice kravjega mleka (20 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 %, 0 %) z ovčjim oziroma kozjim mlekom. Vsi vzorci so bili pripravljeni hkrati, alikvotirani in shranjeni na -20 °C. S PCR v realnem času smo določili vsebnost(i) kravjega mleka v vseh modelnih vzorcih. Uporabili smo nespecifično metodo določanja pomnožkov; standardni program PCR in optimizirane mešanice za PCR. Pri modelnih vzorcih kravjega in ovčjega mleka smo dobili naslednje analitične parametre: naklon krivulje -3,6, r^2 0,95, meja detekcije 0,5 %; medtem ko smo pri modelnih vzorcih kravjega in kozjega mleka smo dobili naslednje analitične parametre: naklon krivulje -3,6, r^2 0,93, meja detekcije 0,5 %.

Da bi preverili specifičnost PCR v realnem času za določanje potvorb ovčjih in kozjih sirov s kravjim mlekom smo na slovenskem tržišču izbrali sire različnih proizvajalcev, sire z različno sestavo glede na vsebnost različnih vrst mleka (kravje, ovčje oziroma kozje mleko) ter sire različnih starosti. Izolacijo DNA iz vzorcev sirov smo izvedli z različnimi kompleti za izolacijo DNA (Nucleospin, DNeasy Blood and Tissue kit, DNeasy Food kit) ter jih ovrednotili glede na dobljeno vsebnost in čistost izolirane DNA ter izvedli PCR v realnem času. Preverili smo tudi možnosti kvantifikacije rezultatov analize DNA. Analiza rezultatov prvih vzorcev sirov (7 vzorcev sirov iz kravjega mleka; 3 vzorci sirov iz ovčjega mleka, 3 vzorci sirov iz kozjega mleka) s PCR v realnem času za določanje kravjega mleka je pokazala, da je ta encimska reakcija tudi na realnih vzorcih specifična za kravje mleko. V enem ovčjem siru smo določili tudi kravje mleko. Pri prenosu PCR v realnem času na realne vzorce sirov smo ugotovili, da kvantifikacija kravjega mleka ni dala ustreznih rezultatov pri vseh vzorcih. Zato smo PCR v realnem času ponavljali z normalizirano in z ne-normalizirano DNA vzorcev, vendar rezultati še vedno niso bili optimalni. Ponovno smo preverili način priprave DNA in analitske parametre PCR v realnem času, vendar smo glede na vse dobljene rezultate lahko zaključili, da je praktična izvedba narejena korektno, dobro in ponovljivo, vendar metoda ni bila primerna za kvantifikacijo. Zato smo v nadaljevanju začeli s teoretično analizo sekvenc DNA dostopnih preko baze NCBI pri kravah, ovcah in kozah. Rezultati so pokazali, da sta oba sistema potrebna za kvantifikacijo rezultatov PCR v realnem času (»Bos« in »Mann«) relativno slabo določena (odstopanja v ragu 1-20 bp) in zato so se pojavili problemi pri kvantifikaciji rezultatov PCR v realnem času. Odločili smo se, da postavimo nova sistema uporabna za detekcijo in kvantifikacijo kravjega mleka v mleku in mlečnih izdelkih. Oblikovali smo nov sistem specifičen za krave (*Bos taurus*) imenovan Cow1 (oligonukleotidna začetnika in sonda) in nov sistem specifičen za krave, ovce in koze imenovan BoCaOv (oligonukleotidna začetnika in sonda). Rezultati testiranja novih sistemov Cow1 in BoCaOv na modelnih vzorcih kravjega mleka oz. kravjih sirov so pokazali, da imata oba dobro učinkovitost (95 – 105 %) in relativno široki območji kvantifikacije (500 – 0.05 ng

oziroma 0,5 do 100 %) ter potrdili ustreznost sistemov Cow1 in BoCaOv za kvalitativno in semi-kvantitativno določanje kravjega mleka. Zaradi možnosti pojava lažno negativnih rezultatov smo v encimsko reakcijo uvedli dodatno kontrolo – interna pozitivna kontrola (IPC). S tem smo pri vsaki analizi preverili učinkovitost encimske reakcije in zmanjšali možnost pojava lažno negativnih rezultatov, saj so bili rezultati PCR skladni s pričakovanimi vrednostmi.

3.5.2 Analize proteinov

V raziskovalni del projekta smo vključili tudi preiskave mleka na nivoju proteinov. Izvedli smo analizo proteinov svežega kravjega, kozjega, ovčjega mleka in mešanic različnih vrst mleka (kravje, 10 % + kozje, 90 % ; kravje, 10 % + ovčje, 90 %) z SDS PAGE in 2-D PAGE. Pri obeh metodah smo proteine najprej oborili z uporabo kompleta 2-D Clean up kit in jih s tem očistili od ostalih komponent mleka. Oborino smo nato raztopili v ustreznem pufru, sledila je elektroforeza (SDS PAGE in 2-D PAGE) in nato barvanje proteinov z uporabo barvila Sypro Ruby. Sledila je primerjava proteinskih profilov posameznih vrst mleka in njihovih mešanic z namenom določitve proteinov specifičnih za posamezno vrsto mleka. S primerjavo proteinskih profilov posameznih vrst mleka (surovo kravje, kozje in ovčje mleko) in njihovih mešanic in smo uspeli v mešanicah (kravje, 10 % + kozje, 90 % ; kravje, 10 % + ovčje, 90 %) določiti protein, specifičen za kravje mleko, katerega identiteta je bila določena kot kapa kazein. Kapa kazein je sicer prisoten tako v kravjem, ovčjem in kozjem mleku, vendar je bioinformatična analiza pokazala, da se kravji kapa kazein razlikuje od ovčjega in kozjega v izoelektrični točki in post-translacijskih modifikacijah, kar pomeni drugo pozicijo na 2-D gelu in s tem možnost detekcije potvorb ovčjega in kozjega mleka s kravjim. Raziskave smo nadaljevali na vzorcih surovega ovčjega, kozjega in kravjega mleka, vzorčenih v različnih slovenskih regijah. Analize so ponovno potrdile, da je v kravjem mleku prisoten protein, ki se pojavi na isti poziciji na 2D-gelu ne glede na geografsko poreklo, medtem ko ga nismo detektirali v vzorcih ovčjega in kozjega mleka.

3.6 Kvaliteta izvajanja analiz - QA/QC

Kvaliteto izvajanja projekta in meritev zagotavljamo z vpeljšano laboratorijsko dobro prakso. Vse meritve v projektu se izvajajo v skladu s standardnimi postopki. Ti postopki vključujejo primerno shranjevanje vzorcev ter uporabo referenčnih materialov v laboratoriju. V primeru, kjer ni ustreznih standardov, se držimo laboratorijskih operacijskih postopkov in protokolov znotraj predvidene QA/QC sheme. Referenčni in delovni standardi, ki jih uporabljamo za analizo stabilnih izotopov lahkih elementov so zbrani v preglednici 1, medtem ko preglednici 2 in 3 vključujejo standarde, ki jih uporabljamo pri določitvi elementne sestave mleka.

Preglednica 1. Seznam referenčnih in delovnih standardov pri meritvah stabilnih izotopov lahkih elementov. Vse δ vrednosti podaja IAEA (www.iaea.org) in so certificirane ali priporočljive (*). δ vrednosti delovnih standardov so določene z umerjanjem na ustrezne referenčne standarde

	Ime	Analit	Material	δ vrednosti (‰)
Certificirani referenčni materiali	VSMOW2	$\delta^{18}\text{O}$ $\delta^2\text{H}$	voda	$0 \pm 0.02^*$ $0 \pm 0.3^*$
	SLAP2	$\delta^{18}\text{O}$ $\delta^2\text{H}$		$-55.50 \pm 0.02^*$ $-427.5 \pm 0.3^*$
	GISP	$\delta^{18}\text{O}$ $\delta^2\text{H}$		-24.76 ± 0.09 -189.5 ± 1.2
	IAEA CH-3 IAEA CH-6 IAEA CH-7 NBS 22	$\delta^{13}\text{C}$	celuloza sukroza polietilen olje	-24.724 ± 0.041 -10.449 ± 0.033 -32.151 ± 0.050 -30.031 ± 0.043
	IAEA N-1 IAEA N-2	$\delta^{15}\text{N}$	amonijev sulfat	$+0.4 \pm 0.2$ $+20.3 \pm 0.2$
Delovni standardi	vodovodna voda (laboratorij IJS) morska voda	$\delta^{18}\text{O}$	voda	-9.07 ± 0.11 -0.35 ± 0.11
	Sneg		sneg	-19.7 ± 0.13
	UreaC	$\delta^{13}\text{C}$	urea	-28.3 ± 0.2
	Europa N	$\delta^{15}\text{N}$	urea	$+2.5 \pm 0.2$

Preglednica 2. Validacija natančnosti meritev elementov v sledovih izvedenih z ICP-MS po postopku opisanem v poglavju 3.4 *Elementna sestava mleka in mlečnih izdelkov*. Uporabljeni standardi: NIST 1549 (Non fat milk powder- NFMP), NIST 8435 (Whole milk powder- WMP), BCR 150 (Spiked skim milk powder)

	NIST 1549 NFMP		NIST 8435 WMP		BCR 150	
Element	Certificirana vrednost	Določena vrednost	Certificirana vrednost	Določena vrednost	Certificirana Vrednost	Določena Vrednost
	mg/kg suhe snovi					
Mn	0.260 ± 0.060	0.250 ± 0.004	0.170 ± 0.050	0.192 ± 0.004	11.8 ± 0.6 2.23 ± 0.08	9.79 ± 0.07 1.95 ± 0.01
Fe	1.78 ± 0.10	1.71 ± 0.02	1.80 ± 1.10	2.0 ± 0.03		
Cu	0.70 ± 0.10	0.67 ± 0.05	0.46 ± 0.10	0.40 ± 0.01		
Zn	46.1 ± 2.2	39.3 ± 0.8	28.0 ± 3.1	23.8 ± 0.1		
Se	0.11 ± 0.1	0.11 ± 0.1	0.131 ± 0.14	0.128 ± 0.01	0.0218 ± 0.0014 1.00 ± 0.04	0.0203 ± 0.0021 0.84 ± 0.03
Cd	0.0005 ± 0.0002	0.0005 ± 0.0001	-	-		
Pb	0.019 ± 0.003	0.023 ± 0.008	-	-		

Preglednica 3. Validacija natančnosti meritev elementne sestave z uporabo XRF and ICP-MS po postopkih opisanih v poglavju 3.4 *Elementna sestava mleka in mlečnih izdelkov*. Uporabljeni standardi: SRM 1549a, ERM-BD 150 and ERM-BD 151

	SRM 1549a		ERM-BD 150		ERM-BD 151	
Element	Certificirana vrednost	Določena vrednost	Certificirana vrednost	Določena vrednost	Certificirana Vrednost	Določena Vrednost
	mg/kg					
Ca	8810 ± 240	8640 ± 700	13900 ± 800	13000 ± 1000	13900 ± 700	13200 ± 1100
Mg	892 ± 62	-	1260 ± 100	-	1260 ± 70	-
Mn	0.184 ± 0.024	0.171 ± 0.004*	0.289 ± 0.018	-	0.29 ± 0.03	-
P	7600 ± 500	6650 ± 600	11000 ± 600	9100 ± 900	11000 ± 600	9600 ± 900
K	11920 ± 430	11900 ± 950	17000 ± 700	16500 ± 1300	17000 ± 800	16200 ± 1300
Se	0.242 ± 0.026	0.252 ± 0.007*	0.188 ± 0.014	0.227 ± 0.009*	0.19 ± 0.04	0.224 ± 0.007*
Na	3176 ± 58	-	4180 ± 190	-	4190 ± 230	-
Sr	2.14 ± 0.19	2.00 ± 0.16	-	3.71 ± 0.3	-	4.10 ± 0.3
Zn	33.8 ± 2.3	29.9 ± 0.6* 33.7 ± 2.7	44.8 ± 2.0	44.3 ± 3.5 42.2 ± 0.9*	44.9 ± 2.3	43.0 ± 3.4 44.3 ± 1.3*
	Referenčna vrednost	Določena vrednost	Certificirana vrednost	Določena vrednost	Certificirana Vrednost	Določena Vrednost
	mg/kg					
Cu	0.638 ± 0.049	0.357 ± 0.014*	1.08 ± 0.06	1.05 ± 0.02*	5.00 ± 0.23	5.24 ± 0.07*
J	3.34 ± 0.30	-	1.73 ± 0.14	-	1.78 ± 0.17	-
Fe	1.8 ± 0.7	1.7 ± 0.1*	4.6 ± 0.5	-	53 ± 4	-
Cl	-	-	9700 ± 2000	9600 ± 900	9800 ± 1200	9000 ± 900
Cd	-	-	0.0114 ± 0.0029	0.0122 ± 0.0005*	0.106 ± 0.013	0.106 ± 0.003*
Hg	-	-	0.060 ± 0.007	-	0.52 ± 0.04	-
Pb	-	-	0.019 ± 0.004	0.019 ± 0.006*	0.207 ± 0.014	0.206 ± 0.006*
S	-	-	-	3300 ± 300	-	3300 ± 300
Br	-	-	-	13.2 ± 1.0	-	13.6 ± 1.0
Rb	-	-	-	17.7 ± 1.4	-	17.0 ± 1.4

* vrednosti določene z ICP-MS

V letu 2013 smo izvedli tudi primerjavo pri določitvi makro in mikro elementov v 20 vzorcih mleka z uporabo dveh različnih metod XRF in k_0 -instrumentalno nuklearno aktivacijsko analizo (k_0 -INAA). Izvedli smo primerjavo za naslednje elemente: Br, Ca, K, Rb in Zn. Ugotovili smo, zelo dobro ujemanje rezultatov, saj samo v enem vzorcu koncentraciji Rb in Zn padeta iz območja 95 % intervala zaupanja. Rezultati so zbrani v poročilu [Ogrinc in sod. \(2014\)](#).

V okviru QA/QC pri določanju elementov v sledovih v mleku z ICP-MS enkrat letno sodelujemo v medlaboratorijski primerjalni shemi FAPAS v organizaciji Food and Environmental Research Agency (Sand Hutton, York, VB). Rezultati so zbrani v preglednici 4.

Preglednica 4. Rezultati sodelovanja v medlaboratorijskih shemah FAPAS v letih 2012-2014

	2012: FAPAS 07172 Metallic contaminants in milk powder		2013: FAPAS 07190 Metallic contaminants in milk powder		2014: FAPAS Metallic contaminants in milk powder	
Element	Dodeljena vrednost	Določena Vrednost	Dodeljena vrednost	Določena vrednost	Dodeljena Vrednost	Določena Vrednost
	µg/kg					
As	56.4 ± 12.4	45.2	49.1 ± 10.8	53.5	58.1 ± 12.8	53.8
Cd	18.59 ± 4.09	19.9	16.2 ± 3.56	15.8	12.2 ± 2.69	12.5
Pb	66.17 ± 14.6	51.8	50.8 ± 11.2	47.8	47.5 ± 10.5	49.3

V okviru projekta smo vpeljali metodo za določitev vsebnosti in izotopske sestave maščobnih kislin v mleku in sirih. Pri določitvi sestave maščobnih kislin v mleku in sirih uporabljamo standard Supleco 37 component FAME Mix. V letu 2012 smo izvedli tudi laboratorijsko primerjavo za določitev vsebnosti maščobnih kislin v vzorcih mleka. Primerjava je bila izvedena v sodelovanju z dr. Alenko Levart iz Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani. Dobili smo dobro ujemanje rezultatov znotraj 95 % intervala zaupanja.

Na področju analize in karakterizacije stabilnih izotopov v organskih spojinah kot so maščobne kisline, večina postopkov ni standardiziranih in certificirani referenčni standardi niso na voljo. Problematike smo se lotili na naslednji način. Najprej smo določili izotopsko sestavo maščobne kisline C19:0 (Restek Corporation) z uporabo elementnega analizatorja sklopljenega z IRMS (EA-IRMS). Izotopsko vrednosti EA-IRMS smo uporabili kot "pravo" vrednost standarda in jo primerjali z vrednostmi dobljenimi z GC-C-IRMS. Integriteto analitičnega sistema smo validirali s spreminjanjem kromatografskih in detekcijskih pogojev sistema za GC-C-IRMS analizo in s predhodno analizo obogatene maščobne kisline C20:0 z znano izotopsko sestavo (Univerza v Indiani, ZDA).

Aktivno sodelujemo tudi v medlaboratorijski primerjalni shemi, ki jo na področju stabilnih izotopov organizira EUROFINS, Francija in jo izvajamo trikrat letno. Pomanjkljivost primerjalne sheme je njena širina in vključuje različne vzorce prehrabnenih izdelkov. Tako imamo znotraj primerjalne sheme na leto le en vzorec sira v katerem določamo izotopsko sestavo C in N v kazeinu. Rezultati analiz so povzeti v delovnih poročilih ([Ogrinc in sod., 2011](#); [Ogrinc in sod., 2012](#); [Ogrinc in sod., 2013](#)).

Problemu primerljivosti rezultatov smo se posebej posvetili v novem IAEA projektu »The use of stable isotopes and elemental composition for determination of authenticity and geographical origin of milk and dairy products«. V prvem delu projekta smo izvedli primerjavo izotopskih meritev in elementno sestavo pridobljenih na referenčnih materialih, kazeinu, ki bo služil kot delovni standard in vzorcu mleka. Analize zajemajo meritve izotopske sestave kisika in vodika v mleku, C, N in S v kazeinu, elementno sestavo z ICP-MS in XRF ter maščobnokislinsko sestavo mleka ([Ogrinc in sod., 2014](#)).

3.7 Statistična obdelava rezultatov

Za statistično obdelavo analiziranih parametrov mleka in sira smo uporabili enostavni Kruskal-Wallis test, ker vse variance zgoraj omenjenih parametrov niso porazdeljene normalno, in kemometrično metodo, to je linearno diskriminantno analizo (LDA, program StatistiXL). Kemometrične metode so nadvse uporabne pri obdelavi podatkov analiz živil, ki so zelo kompleksne mešanice, tako tudi mleko in sir vsebujejo veliko različnih snovi in tako imamo pri njihovi analizi mnogo parametrov. Z naraščanjem števila vzorcev se tako znatno poveča tudi količina podatkov, posledica je zmeda in nepreglednost. Velikokrat nas ne zanimajo samo vrednosti določenih parametrov ampak tudi odgovori na mnoga kompleksnejša vprašanja o avtentičnosti vzorcev, poreklu in letniku vzorca itd. Na vsa ta vprašanja lahko učinkovito in transparentno odgovorimo z uporabo multivariativnega modeliranja večjega števila vzorcev z LDA.

Za statistično vrednotenje rezultatov PCR v realnem času (povprečne vrednosti, napaka, korelacija, linearen rang, učinkovitost) smo uporabili standardni program SDS V1.4.1 (Applied Biosystems).

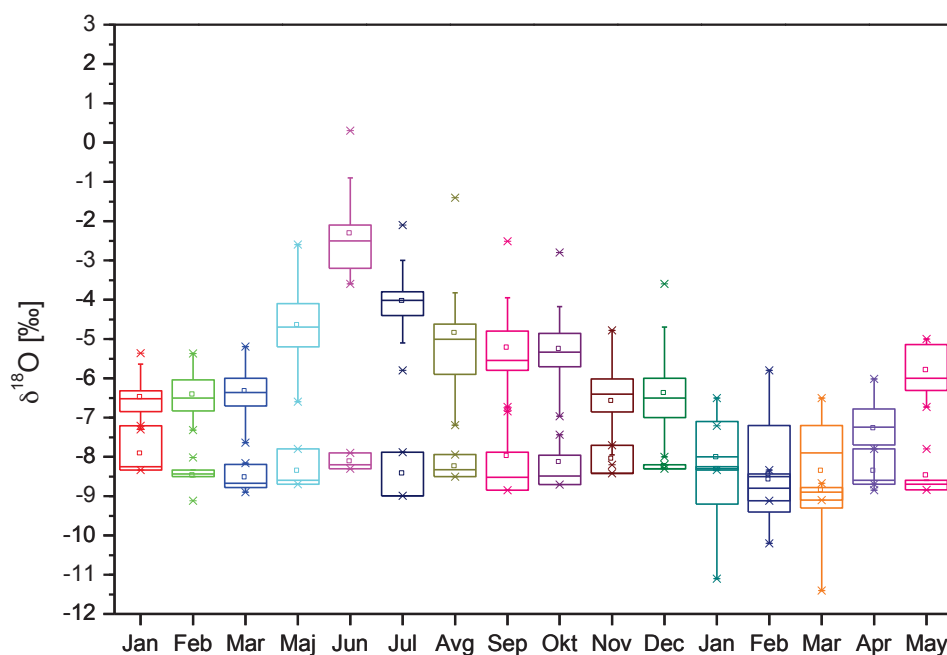
4 Rezultati raziskave

4.1 Uporaba stabilnih izotopov lahkih elementov pri določanju potvorb in geografskega porekla mleka

4.1.1 Izotopska sestava kisika

$\delta^{18}\text{O}$ vrednosti v mleku se za celotno obdobje v letih 2012 in 2013 spreminjajo med $-8,0\text{‰}$ in $+0,3\text{‰}$, medtem ko se $\delta^2\text{H}$ vrednosti v mesecu decembru 2013 gibljejo med $-55,0$ and $-32,1\text{‰}$. Opazna so sezonska nihanja z najvišjimi $\delta^{18}\text{O}$ vrednostmi poleti (junij 2012) in najnižjimi pozimi (december 2012). Te ugotovitve sovpadajo z dejstvom, da se krave poleti prehranjujejo s svežo krmo, ki je v primerjavi s podzemno vodo obogatena s kisikom ^{18}O zaradi evapotranspiracije (slika 2). Velikost obogatitve s težjim izotopom kisika glede na podzemno vodo je tudi posledica metabolizma krave, ki se sezonsko spreminja. Poleti se voda v telesih krav bogati s težjim kisikovim izotopom zaradi znojenja, kar vodi do višjih $\delta^{18}\text{O}$ vrednosti v mleku. Meritve zimskih, spomladanskih in jesenskih mesecev (januar-aprila, september-november) kažejo, da je izotopska sestava kisika v mleku v povprečju za $2,2\text{‰}$ ($1\sigma = 0,7\text{‰}$) višja od sestave podzemne vode na raziskanih področjih (slika 2). Najnižjo izotopsko sestavo v mleku $\sim 8\text{‰}$ zasledimo na Dolenjskem pri Žužembergu in Bohinju na Gorenjskem. Izotopska sestava vode se spreminja med $-9,1$ in $-6,7\text{‰}$.

Meritve lahko uporabimo za določitev % dodatka vode mleku. Oceno izvedemo s pomočjo izotopske masne balance. V primeru, če je razlika med podzemno vodo in mlekom $2,2\text{‰}$, bi lahko določili 20‰ dodatek vode. V mesecu maju pa je razlika v $\delta^{18}\text{O}$ vrednostih podzemne vode in mleka večja v povprečju za $3,7\text{‰}$. V tem primeru lahko določimo 14‰ dodatek vode. Izredno visoke vrednosti smo določili v vzorcih mleka v mesecu juniju 2012. Vrednosti se spreminjajo med $-3,6$ in $0,3\text{‰}$, kar pomeni da v teh vzorcih lahko določimo že 7‰ dodatek vode.

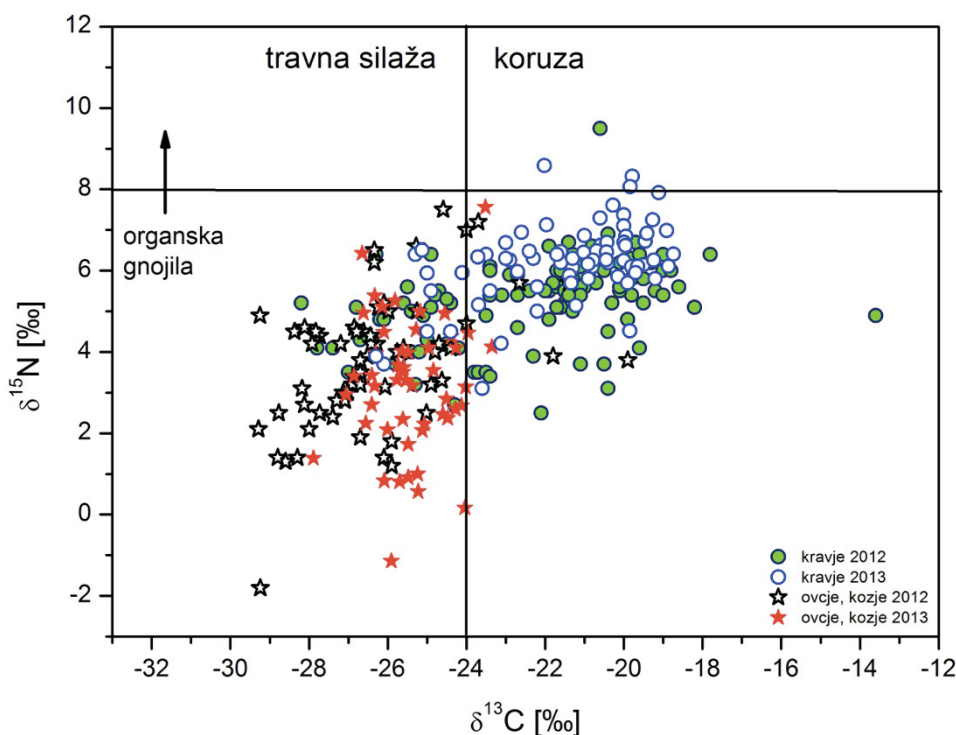


Slika 2. Spreminjanje izotopske sestave kisika v podzemni vodi (nižje vrednosti) in v mleku (višje vrednosti v letih 2012 in 2013

Nadalje smo opazili razlike v $\delta^{18}\text{O}$ vrednostih mleka iz različnih geografskih področij. Statistično signifikantno razliko v obogatitvi mleka z ^{18}O med primorskimi in celinskimi področji lahko razložimo z okoljskimi in ekofiziološkimi faktorji, ki vplivajo na izotopsko sestavo vode in posledično mleka.

4.1.2 Izotopska sestava ogljika in dušika v kazeinu

Zasledili smo velik razpon med $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ vrednostmi v kazeinu kravjega mleka med različnimi geografskimi področji. $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti se spreminjajo med -28,5 in -13,6 ‰, medtem ko se $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti spreminjajo med 2,5 in 9,6 ‰. Razlike v izotopski sestavi C so posledica različnih prehranjevalnih navad krav. Izkazalo se je, da kuruza predstavlja pomemben del prehrane večini krav na Slovenskem (čez 70%), medtem ko se s travno silažo v glavnem prehranjujejo krave na Tolminskem in Postojnskem (slika 3). Kruskal-Wallis test primerjave vzorcev mleka različnega geografskega izvora pokaže, da lahko s 95 % zanesljivostjo trdimo, da obstajajo statistično značilne razlike med makroregijami v povprečnih vrednostih (mediana) za $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ v kazeinu.



Slika 3. Spreminjanje izotopske sestave ogljika in dušika v kazeinu izoliranem iz mleka. $\delta^{13}\text{C} > -24\text{‰}$: pretežni del prehranjevanja s koruzo; $\delta^{15}\text{N} > 8\text{‰}$: uporaba organskih gnojil pri pridelavi hrane oziroma pri gnojenju pašnika.

$\delta^{13}\text{C}$ vrednosti v mleku ovc in koz se spreminjajo med $-29,3$ in $-24,6\text{‰}$, medtem ko so $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti med $1,4$ in $7,5\text{‰}$. Enako izotopsko sestavo smo zasledili pri ovčjih in kozjih sirih. Ti rezultati nakazujejo, da se ovce in koze prehranjujejo v glavnem s pašo in travno silažo. V štirih vzorcih, pa smo zasledili višjo $\delta^{13}\text{C}$ vrednost od $-24,0\text{‰}$, ki nakazuje manjši prispevek koruze pri hranjenju. Izkušnje prejšnjih raziskav kažejo, da so $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti v mleku za približno 3‰ višje od izvora prehrane (Camin in sod., 2008), kar pomeni, da se $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti v prehrani krav, ovc in koz gibljejo med $-1,6$ in $6,6\text{‰}$. $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti, ki so višje od 6‰ nakazujejo uporabo organskih gnojil pri pridelavi hrane oziroma pri gnojenju pašnika. Vpliv gnojenja z uporabo organskih gnojil pri pridelavi hrane smo zasledili le pri kravjem mleku, vendar je teh vzorcev relativno malo (3%) (slika 3). Zasledili smo jih v okolici Kamnika. V naši raziskavi nismo opazili sezonskih razlik v $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ vrednostih, prav tako so te vrednosti primerljive v letu 2012 z letom 2013. To pomeni, da se prehranjevalne navade krav ohranjajo in niso odvisne od leta, temveč od področja in predstavljajo pomemben parameter pri določanju geografskega porekla mleka.

4.2 Vsebnost maščobnih kislin v mleku

Rezultate maščobnokislinske sestave mleka ovrednotimo na štirih področjih: (1) glede na geografsko poreklo; (2) glede na izvor; (3) ugotavljanje potvorjenosti kozjega in ovčjega mleka s kravjim in (4) ugotavljanje potvorjenosti z rastlinskimi maščobami.

4.2.1 Geografsko poreklo

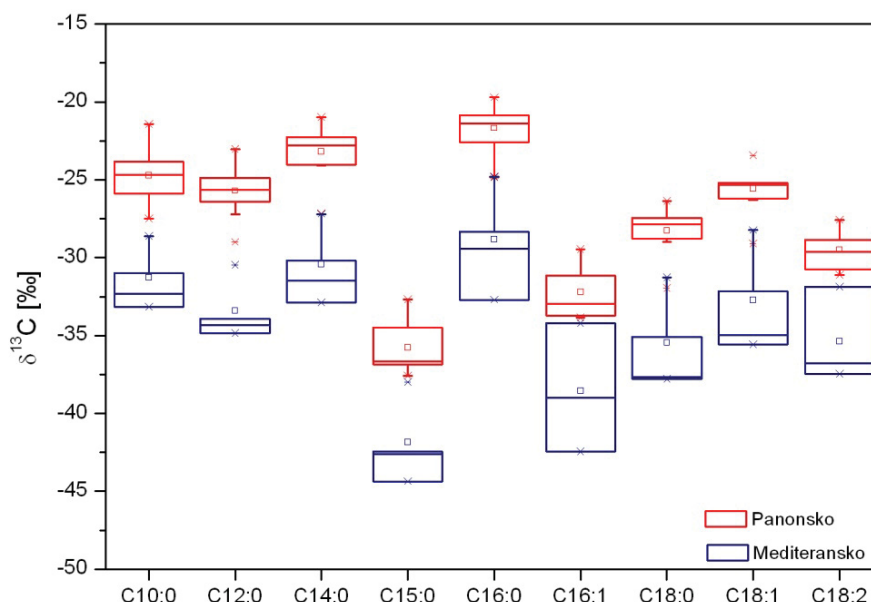
V naših raziskavah smo opazili razlike v maščobnokislinski sestavi glede na področje in sezono vzorčevanja, kar je v pomoč pri določanju geografskega porekla mleka. Rezultati so za junij in december v letu 2012 in 2013 zbrani v *prilogi 7.1* (preglednice P1-P4). Ugotovili smo, da je mleko pridelano poleti bolj zdravo, saj vsebuje manj nenasičenih maščobnih kislin in več esencialnih maščobnih kislin kot so enkrat (mono-unsaturated fatty acids - MUFA) in večkrat nenasičene maščobne kisline (poly-unsaturated fatty acids - PUFA). V letu 2012 se v poletnih mesecih (junij in september) vsebnost konjugirane linolne maščobne kisline (conjugated linoleic acid – CLA) v mleku krav molznic, ki se pasejo v alpskem svetu občutno povečala. Prav tako se v teh mesecih zmanjša vsebnost nasičenih maščobnih kislin (saturated fatty acids – SFA). Koncentracija MUFA se tekom leta bistveno ne spreminja, saj so koncentracije vsebnosti maščobnih kislin tekom celega leta približno enake. Zanimljivo majhna razlika se pojavi le v alpskem svetu poleti (junij in september). Vsebnost PUFA se v letu 2012 občutno poveča v alpskem svetu v mesecu septembru, saj v tem delu Slovenije prehrana temelji na paši. Zanimivo je, da je vsebnost ω -3 maščobnih kislin najvišja v mesecu juniju in sicer v mediteranskem območju, kar lahko namiguje na modifikacijo v prehrani in sicer spremembe obroka iz koruzne silaže na pašni obrok. Rezultati v letu 2013 v mesecu juniju kažejo, da so največje razlike opazne pri vsebnosti nasičenih maščobnih kislin SFA, saj je vsebnost teh maščobnih kislin najnižja na mediteranskem območju. Vsebnost ω -3 maščobnih kislin pa je na tem območju najvišja. Vsebnost CLA je občutno najvišja v alpskem delu in je primerljiva vsebnosti travnate silaže. Najvišjo vsebnost PUFA smo določili v panonskem delu Slovenije in je verjetno odvisna od krme. Povezavo med vsebnostjo posameznih maščobnih kislin in krmo bomo preučili v nadaljnjih raziskavah, ki pa niso predmet projekta.

Pri ločitvi mleka glede na geografsko poreklo se poslužujemo tudi meritev izotopske sestave maščobnih kislin. Izotopska sestava posameznih maščobnih kislin v mleku se razlikuje in je najvišja pri C16:0 in najnižja pri C15:0, C16:1 in C18:0. V preglednici 5 so podane $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti posameznih maščobnih kislin po področjih.

Preglednica 5. Izotopska sestava posameznih maščobnih kislin za različna geografska področja v Sloveniji

Maščobne kisline	Alpsko	Panonsko	Mediteransko	Dinarsko
C10:0	-28.9 ± 2.4	-25.4 ± 2.7	-31.3 ± 2.0	-27.5 ± 3.1
C12:0	-29.8 ± 2.3	-26.4 ± 2.7	-33.4 ± 2.0	-28.2 ± 3.3
C14:0	-27.2 ± 2.8	-23.9 ± 2.8	-30.4 ± 2.4	-25.6 ± 3.4
C15:0	-39.2 ± 2.0	-36.3 ± 2.2	-41.9 ± 2.7	-38.1 ± 3.1
C16:0	-27.7 ± 4.1	-22.4 ± 2.8	-28.8 ± 3.3	-25.0 ± 1.9
C16:1	-34.7 ± 2.5	-32.6 ± 2.0	-38.5 ± 4.1	-33.9 ± 3.5
C18:0	-32.1 ± 3.9	-29.0 ± 2.8	-35.5 ± 3.1	-30.2 ± 4.5
C18:1	-29.6 ± 3.5	-26.3 ± 2.7	-32.7 ± 3.3	-28.1 ± 4.3
C18:2	-31.8 ± 2.6	-29.9 ± 1.7	-35.4 ± 3.0	-29.2 ± 2.9

Geografsko so največje razlike opazne med izotopsko sestavo maščobnih kislin v mleku iz mediteranskega področja in panonskega območja in nakazuje različen vpliv prehranjevalnih navad (slika 4).



Slika 4. Izotopska sestava posameznih maščobnih kislin za mediteransko in panonsko področje

4.2.2 Maščobno kislinska sestava mleka glede na izvor: kravje, ovčje, kozje

Maščobno kislinska sestava mleka se razlikuje, če primerjamo kravje, kozje in ovčje mleko. Kozje mleko vsebuje več srednje nasičenih maščobnih kislin (C6:0 – C14:0) v primerjavi s kravjim mlekom. Najbolj zastopane maščobne kisline so C6:0, C8:0 and C14:0 in skupaj sestavljajo 20 % vseh maščobnih kislin v kozjem mleku. C14:0, C16:0 in C18:1 so najbolj zastopane maščobne kisline v ovčjem mleku. Statistično je na osnovi maščobno kislinske sestave možno ločiti posamezna mleka, kar z 99,6 % zanesljivostjo. To lahko izkoristimo pri določitvi potvorjenosti ovčjega in kozjega mleka s kravjim. Maščobno kislinska sestava se med mlekom in siri bistveno ne razlikuje.

4.2.3 Potvorjenosti mleka in mlečnih izdelkov

4.2.3.1 Potvorjenosti ovčjega in kozjega mleka s kravjim

Najprej smo izvedli raziskave v modelnih vzorcih, ki so jih pripravili na BF in na katerih so že izvedli PCR analize in proteinsko sestavo. Modelni vzorci so bili pripravljeni iz kravjega, ovčjega in kozjega mleka kot mešanice kravjega mleka (20 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 %, 0 %) z ovčjim oziroma kozjim mlekom s kravjim mlekom. V primeru kozjega mleka smo na podlagi Kruskal-Wallis testa ugotovili dodatek kravjega mleka do 5%. Pri tem so najbolj prispevale naslednje kisline: C11:0 ($p = 0.0348$), C12:0 ($p = 0.0348$) in C18:1n-9 ($p = 0.0348$). Medtem, ko smo dodatek kravjega mleka ovčjemu zasledili pri potvorbah > 10%.

4.2.3.2 Potvorjenost kravjega mleka z dodatkom rastlinskih maščob

Na željo Pomurskih mlekarn in mlekarne Celeia smo poskušali razviti metodo za določanje potvorb mleka in mlečnih izdelkov z rastlinskimi maščobami. Predvidevamo, da bo tovrstne potvorbe možno določiti na osnovi maščobno kislinske sestave mleka in mlečnih izdelkov, saj se maščobnokislinska sestava rastlinskih maščob razlikuje od živalskih.

V prvem delu raziskav smo izvedli poskus, kjer smo mešali mleko z različnimi vsebnostmi palmove masti. Poskus smo izvedli tako, da smo k nepotvorjenemu homogeniziranemu vzorcu mleka dodali različna volumska razmerja palmove masti; in sicer dodali smo (0 %), 1 %, 2 %, 4 %, 7 %, 9 %, 11 %, 13 %, 15 %, 18 %, 20 % palmove masti. Ugotovili smo, da palmova mast ne vsebuje butanojske (maslene kisline C4:0), kar pa zelo vpliva na maščobno-kislinsko sestavo mleka, saj se z dodajanjem palmove masti v mleku niža koncentracija butanojske kisline (C4:0) in viša koncentracija laurinske kisline (C12:0). Prav tako, se vsebnost palmitinske kisline (C16:0) z dodajanjem palmove masti niža. Niža pa se tudi vsebnost C18:1n9, medtem ko se koncentracija stearinske kisline (C18:0) nekoliko poveča. Zelo pomembna, za ugotavljanje potvorjenosti mleka s palmovo mastjo, je razlika med vsotami posameznih maščobnih kislinah, saj lahko opazimo že 1 % dodatka palmove masti v vzorcu. Vsota SFA v nepotvorjenemu homogeniziranemu mleku znaša 74,5 ut%, medtem ko ta vsota v 1,11 % potvorjenemu mleku znaša 79,0 ut%, pri vzorcu z 20 % dodatkom palmove masti pa se ta vrednost dvigne na 91,2 ut%. Prav tako se vsebnost MUFA zniža iz 22,9 ut% pri nepotvorjenem mleku na 7,94 ut% pri 20 % potvorjenem mleku. Tudi tu lahko opazimo potvorjenost že pri 1,11 % dodatka palmove mast (16,9 ut%). Z dodajanjem palmove masti se zniža tudi vsebnost n-3 in n-6 PUFA.

4.3 Elementna sestava mleka

V vzorcih kravjega mleka smo izvedli tudi elementno sestavo makro-, mikro elementov in elementov v sledovih. Mleka imajo najvišjo vsebnost K, medtem ko je koncentracija Cd v vseh vzorcih pod mejo zaznavnosti. Koncentracije elementov si sledijo po naslednjem vrstnem redu $K > Ca > P, Cl > S > Zn > Rb > Br > Fe > Sr > Cu, Pb > Mn > Se > As > Cd$. V vzorcih očjega in kozjega mleka pa smo se osredotočili v glavnem na makro in mikro-elementno sestavo. Analizirali smo tudi ovčje, kozje sire in sir Tolminc.

V preglednici 6 so prikazani rezultati meritev v vzorcih surovega kravjega, ovčjega in kozjega mleka in rezultati pridobljeni iz literature za primerjavo. Dobro ujemanje dobimo le z nekaterimi elementi (P, S), večina pa jih izstopa. V nekaterih vzorcih smo zasledili višje vsebnosti Ca, K, Mn, Cl, Zn in Se v primerjavi z literaturnimi podatki. Nižje vsebnosti pa zasledimo pri Na, Fe, Cu in Br. Odstopanja zasledimo tudi pri kozjih in ovčjih mlekah. Višje vsebnosti zasledimo pri Cl v obeh mlekah in Zn pri kozjem mleku. Vpliv krme, okolja in letni čas najbolj vplivajo na vsebnost elementov, kot so Cd, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb, Sr in Zn. Vplivajo pa tudi na porazdelitev Se. Tako, da predvidevamo, da so povišane koncentracije Zn in Se v kravjem mleku v glavnem posledica krme. Koncentracije toksičnih elementov, kot so Cd, As in Pb, so nizke in ne predstavljajo ogroženosti za zdravje ljudi.

Preglednica 6. Vsebnosti makro-, mikroelementov in elementov v sledovih v surovem kravjem, kozjem in ovčjem mleku iz literature in v naših vzorcih (Food Composition and Nutrient Tables, 2012; Zimmerlin in sod., 2012)

	Kravje mleko		Ovčje mleko		Kozje mleko	
Makro elementi mg/ 100g	Literatura	Vzorci	Literatura	Vzorci	Literatura	Vzorci
Ca	107-133	105-277	136-200	99-198	106-192	85-189
P	63-102	71-139	80-145	68-118	92-148	57-110
Mg	9-16	-	8-19	-	10-21	-
K	144-178	160-253	174-190	57-146	135-235	118-228
Na	40-58	23-29	29-31	-	34-50	-
Cl	90-106	25-150	71-92	48-143	100-198	93-226
S	32	8-58	29	27-56	28	23-38
Mikro elementi in elementi v sledovih						
µg/ 100g						
Fe	30-70	18-46	62-100	-	36-75	-
Sr	-	9.4-27	-	10-57	-	6-77
Cu	2-30	2-12	11-88	-	11	-
Mn	1.3-4.0	1.0-5.2	5.3	1.5-4.8	5.5	0.8-2.4
Zn	210-550	170-620	415	145-476	242	231-512
Se	1.3-1.7	0.6-3.8	0.9	-	0.7	-
As	-	0.01-0.08	-	-	-	-
Cr	1.0-4.0	-	0.32	-	0.5-0.32	-
Br	154-293	38-212	411-507	69-472	-	82-341
Pb	-	0.08-0.22	-	-	-	-

Na željo Mlekarne Celeia smo izvedli meritve elementov v sledovih tudi v treh izbranih vzorcih mleka. Vsebnosti elementov Mn, Fe, Cu, Zn, Se, As in Cd v vseh treh vzorcih mleka so primerljive z ostalimi mleki. Zasledili pa smo povišane koncentracije Pb v enem vzorcu mleka in sicer je bila izmerjena koncentracija 5,03 ng/g in je približno 10 x višja od koncentracij ostalih vzorcev mleka. Koncentracija dosega mejno vrednost za materino mleko, ki je 5,0 ng/g.

Ker na večino elementov vpliva okolje smo elementno sestavo mleka skupaj z izotopskimi parametri ($\delta^{18}\text{O}$ v vodi, $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ v kazeinu) uporabili pri določitvi geografskega porekla mleka.

4.4 Preverjanje stanja na tržišču

4.4.1 Analize mleka

Rezultati analiz na vzorcih mleka, ki smo ga vzorčili v mesecu juniju 2013 kažejo, da imajo vzorci mleka na tržišču podobno izotopsko sestavo kot vzorci mleka v trenutni bazi podatkov. Največje razlike smo opazili v elementni sestavi, kar pripisujemo vplivu obdelave mleka in vsebnosti maščob. Razlike smo opazili pri koncentracijah Mn, Fe in Cu pri mlekih, ki vsebujejo 1,5 % in 0,5 % maščob iz Pomurskih mlekar. Koncentracije teh elementov so nižje v primerjavi s surovim mlekom. Trenutni rezultati analiz elementne sestave mleka kažejo, da med tehnološkim postopkom ni prišlo do kontaminacije. Na vsebnost Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn in Ni v mleku in mlečnih izdelkih lahko vplivajo kovinski materiali, s katerimi mleko in

mlečni izdelki pridejo v kontakt. Višje koncentracije Pb 2,35 ng/g smo zasledili v ekološki sirotki pridelani iz pasteriziranega, nehomogeniziranega ekološkega mleka.

4.4.2 Analize kozjih in ovčjih sirov

Analize vzorcev ovčjih in kozjih sirov ter mešanih sirov s PCR v realnem času. Sire smo vzorčili naključno in sicer tako, da so bili vzeti geografsko čim bolj različno. Poleg sirov iz Slovenije, smo analizirali tudi sire iz Španije, Nizozemske, Hrvaške, Italije, Bolgarije in Francije. Rezultati PCR v realnem času pri vzorcih sira so pokazali, da so na našem tržišču tudi siri, ki vsebujejo nedeklarirano vrsto mleka in sicer je bilo 15 % vzorcev ovčjih sirov, ki so vsebovali 0,5 - 5 % kravjega mleka, ki ni bilo deklarirano in 12 % vzorcev, ki so vsebovali nad 5 % kravjega mleka, ki ni bilo deklarirano. Izmed vzorcev kozjih sirov je bilo 7 % vzorcev, ki so vsebovali 0,5 - 5 % kravjega mleka, ki ni bilo deklarirano in 5 % vzorcev, ki so vsebovali nad 5 % kravjega mleka, ki ni bilo deklarirano.

Del analiz kozjih in ovčjih sirov smo opravili vzporedno z analizami s PCR v realnem času in z analizami maščobnih kislin (preglednica 7).

Preglednica 7. Rezultati analiz ovčjih in kozjih sirov glede vsebnosti kravjega mleka s PCR v realnem času in analizami maščobnih kislin. V preglednici so označeni vzorci, kjer se metodi nista ujemale

Vzorec sira	Prisotnost kravjega mleka	
	PCR v realnem času (%)	Maščobne kisline
Ovčji sir 1	-	-
Ovčji sir 2	-	-
Ovčji sir 3	+ (> 5 %)	+
Ovčji sir 4	-	-
Ovčji sir 5	+ (< 5 %)	-
Ovčji sir 6	+ (< 5 %)	-
Ovčji sir 7	-	-
Ovčji sir 8	-	-
Ovčji sir 9	-	-
Kozji sir 1	+ (< 5%)	-
Kozji sir 2	-	-
Kozji sir 3	-	-
Kozji sir 4	-	-
Kozji sir 5	-	-
Mešan kravji in ovčji sir 1	+ (> 5 %)	+
Mešan kravji in ovčji sir 1	+ (> 5 %)	+
Mešan kozji in ovčji sir 1	+ (< LOQ)	-

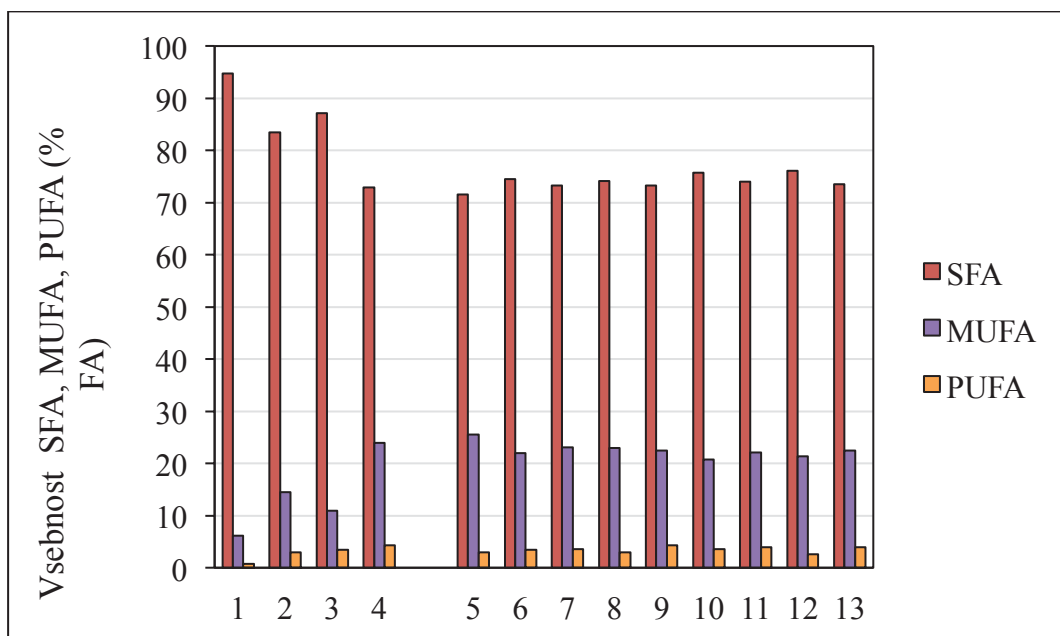
Rezultate maščobnokislinske sestave smo primerjali z rezultati iz literature in našimi rezultati pridobljenimi na osnovi pristnega kravjega, ovčjega in kozjega mleka. Vsebnost palmitinske kisline (C16:0) kravjega mleka je višja kot pri kozjem ter ovčjem mleku in se giblje med 29,6 – 33,2 ut%, medtem ko se vsebnost palmitinske kisline kozjega in ovčjega mleka giblje med 25 in 26 ut%. Razlika med kravjim, kozjim in ovčjim mlekom se pojavi tudi v vsoti vsebnosti kaprojske (C6:0), kaprilske (C8:0) in kaprinske (C10:0) kisline. Vsota za kravje mleko se giblje med 5 in 7 ut%, za ovčje okoli 12 ut%, za kozje pa okoli 14 ut% in višje. Prav tako je pri kozjem mleku opazno višja vsebnost kaprinske kisline (C10:0). Podatke smo nadalje ovrednotili na podlagi razmerja med C12:0/C10:0, ki ga v literaturi navajajo kot najbolj primerne za oceno potvorjenosti kozjega in ovčjega sira s kravjim (Iverson and Sheppard, 1989). Na osnovi teh podatkov lahko sklepamo, da je pri nekaterih sirih prišlo do potvorbe, saj vsebnost maščobnih kislin, ne potrjuje deklaracije na embalaži vzorca. Pri treh sirih, smo

ugotovili prisotnost več kot 5 % mleka, ki ni deklarirano, pri dveh sirih pa je potvorjenost manjša od 5 %.

Rezultati kažejo, da sta obe metodi (PCR v realnem času in analize maščobnih kislin) dali enake rezultate pri 13 vzorcih (76 %), medtem ko so bili rezultati različni pri 4 vzorcih (24 %). Pri vseh neskladnih rezultatih je bil rezultat analiz PCR v realnem času pozitiven, vendar je bila določena vsebnost kravjega mleka < 5 % ali < LOQ (Limit Of Quantification).

4.4.3 Analize kravjih sirov

Na tržišču smo vzorčevali tudi nižje cenovne sire narejene samo iz kravljega mleka. Hoteli smo preveriti ali je bilo h kravjemu mleku dodana še kakšna druga maščoba in ali to ustreza deklaraciji na siru. Analizirali smo 9 različnih sirov iz Slovenije, Avstrije in Nemčije, dostopnih na slovenskem tržišču. S pomočjo maščobnokislinske sestave mleka, smo ugotovili, da nizkocenovni siri, dostopnih na slovenskih tržiščih, niso potvorjeni z rastlinsko mastjo, saj maščobnokislinska sestava nasičenih, enkrat nasičenih in večkrat nasičenih maščobnih kislin v sirih ustreza sestavi teh maščobnih kislin v kravjem mleku (slika 5).



Slika 5. Primerjava vsebnosti nasičenih (SFA), enkrat nasičenih (MUFA) in večkrat nasičenih (PUFA) maščobnih kislin v: 1- palmovi masti, 2- 5 % dodatka palmove masti, 3 – 10 % dodatka palmove masti 4 – surovo kravje mleko, 5-13 vzorci sira na slovenskem tržišču

Vsebnost nasičenih maščobnih kislin v mleku se giblje od 70 do 75 utežnih %, enkrat nasičenih maščobnih kislin je približno od 18 do 24 utežnih % in večkrat nasičenih maščobnih kislin 2 utežna %.

5 Razprava, zaključki in priporočila naročniku

5.1 Določanje geografskega porekla mleka in mlečnih izdelkov

5.1.1 Določanje geografskega porekla kravjega mleka

Pri statistični obdelavi smo na podlagi lokacije vzorčenja in geografske delitve Slovenije na makroregije podatke kravjega mleka razdelili na mediteransko (M), panonsko (P), alpsko (A) in dinarsko (D) (Perko, 1998, Kropf et al, 2010). Nadalje nas je zanimala možnost uvrščanja v skupine klasificiranja. Test smo izvedli s programom LDA klasifikacija in ugotovili, kakšna je pravilnost uvrščanja vzorca kravjega mleka neznanega geografskega porekla z vsemi analiziranimi parametri.

Stabilni izotopi in elementna analiza

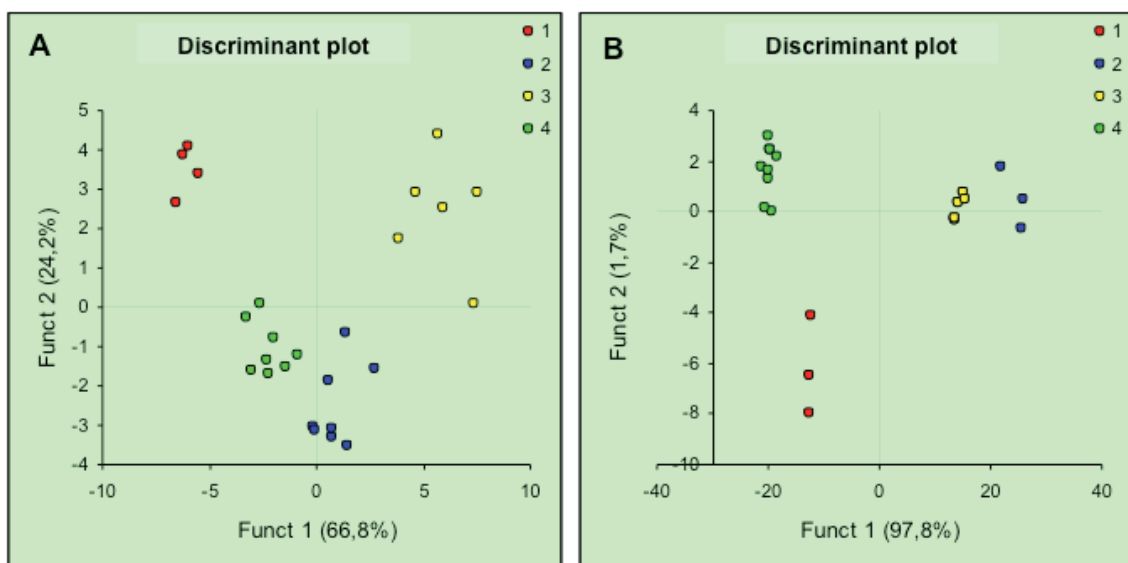
V setu podatkov smo imeli 5 vzorcev iz mediteranske, 10 iz panonske, 6 iz dinarske in 6 iz alpske regije za junij in december 2012 in 2013. V LDA model smo vključili 18 parametrov: 3 parametri stabilnih izotopov $\delta^{18}\text{O}$, $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ ter 15 elementov makro, mikro in elementov v sledovih. Model LDA smo izvedli v treh serijah z uporabo samo izotopskih parametrov, samo elementne sestave in kombinacijo vseh parametrov.

Kljub temu, da med meritvami $\delta^{18}\text{O}$ v mleku in $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ v kazeinu najdemo statistično pomembne razlike, iz zbranih meritev lahko le majhno število vzorcev enolično razdelimo v štiri geografske pokrajine.

Pri uporabi elementne sestave dobimo nekoliko boljše rezultate. Junija 2012 in 2013 samo z elementno sestavo ne dobimo dobre ločbe, medtem ko decembra dobimo dobre ločbe z uporabo elementne sestave. Decembra 2012 lahko z elementno sestavo opišemo kar 96,9 % variabilnosti, decembra 2013 pa 93,8 % variabilnosti. Največjo težo pri oblikovanju osi 1, ki omogoča omenjeno ločitev, imajo naslednji parametri Cl, K, Ca in Zn decembra 2012 in Ca, S, Cl in Br decembra 2013.

Kombinacija vseh parametrov nam omogoča ločitev v juniju 2012, decembru 2012 in 2013, ne omogoča pa ločitve v juniju 2013. Na sliki 6 so prikazani rezultati LDA analize za junij in december 2012. Vzorci kravjega mleka mediteranskega, panonskega, alpskega in dinarskega porekla se dobro ločijo med seboj. Največjo težo pri oblikovanju osi 1, ki edina omogoča ločitev junija 2012 imajo naslednji parametri: K, Cl, Ca, P, Se in $\delta^{15}\text{N}$. Decembra 2012 imajo največjo težo pri oblikovanju osi 1 naslednji parametri: Ca, Cl, K in $\delta^{13}\text{C}$, na os 2 pa Cl, K, S in Br. Decembra 2013 lahko z elementno sestavo opišemo 93,8 % variabilnosti z Ca, S, Cl in Br.

Rezultati testa LDA klasifikacije so pokazali, da je pravilnost uvrščanja vzorca kravjega mleka (junija in decembra 2012) neznanega geografskega porekla z vsemi analiziranimi parametri 100 %. Slabšo uvrstitev smo zasledili decembra 2013. Rezultati testiranja kažejo, da z omenjenim modelom lahko 100 % pravilno uvrstimo vzorce kravjega mleka mediteranskega porekla, 91,7 % panonskega porekla, 92,9 % alpskega porekla in 100 % dinarskega porekla. Skupna pravilnost uvrstitve za vse 4 geografske regije je 94,4 %.

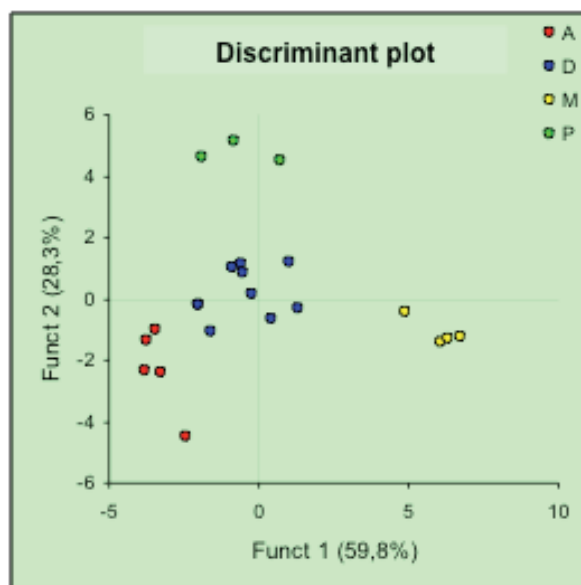


1 - mediteransko, 2 - panonsko, 3 - alpsko, 4 - dinarsko

Slika 6. Geografska razporeditev vzorcev kravjega mleka glede na vsebnost stabilnih izotopov in elementno sestavo; A) junij 2012: os 1 predstavlja 66,8 % variabilnosti, os 2 pa 24,2 % variabilnosti, skupaj znese 91,0 % variabilnosti; B) december 2012: os 1 predstavlja 97,8 % variabilnosti, os 2 pa 1,7 % variabilnosti, skupaj znese 99,5 % variabilnosti.

Uporaba vsebnosti maščobnih kislin

Za statistično analizo smo imeli na voljo 22 vzorcev kravjega mleka, vzorčevanega v juniju 2012, ki smo jih v LDA model smo skupaj vključili 15 maščobnih kislin z vsebnostjo nad 1 % (preglednice P1-P4).



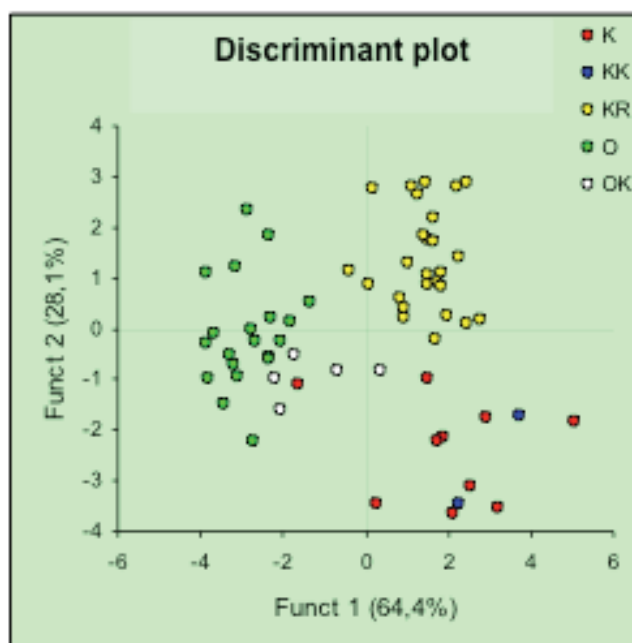
A- alpsko, D – dinarsko, M – mediteransko, P - panonsko

Slika 7. Geografska razporeditev vzorcev kravjega mleka junij 2012 glede na vsebnost, maščobnih kislin. Os 1 predstavlja 59,8 % variabilnosti, os 2 pa 28,3 % variabilnosti, skupaj znese 88,1 % variabilnosti.

Vzorci kravjega mleka mediteranskega, alpskega, dinarskega in panonskega porekla se dobro ločijo med seboj (slika 7). Največjo težo pri oblikovanju osi 1 imajo naslednji parametri: c9, t11 CLA, C14:0 in t10, c12 CLA, na osi 2 pa C16:0, C18:0 in C14:0. Nadalje nas je zanimala možnost uvrščanja v skupine klasificiranja. Test smo izvedli s programom LDA klasifikacija in ugotovili, kakšna je pravilnost uvrščanja vzorca kravjega mleka (december 2012) neznanega geografskega porekla z vsemi analiziranimi parametri. Rezultati testiranja kažejo, da z omenjenim modelom lahko 100 % pravilno uvrstimo vzorce kravjega mleka alpskega, mediteranskega in panonskega porekla, medtem ko je pravilnost uvrstitve dinarskega porekla 88,9 %. Skupna pravilnost uvrščanja pa je 95,5 %.

5.1.2 Določanje izvora mleka in geografskega porekla kozjega in ovčjega mleka in sira

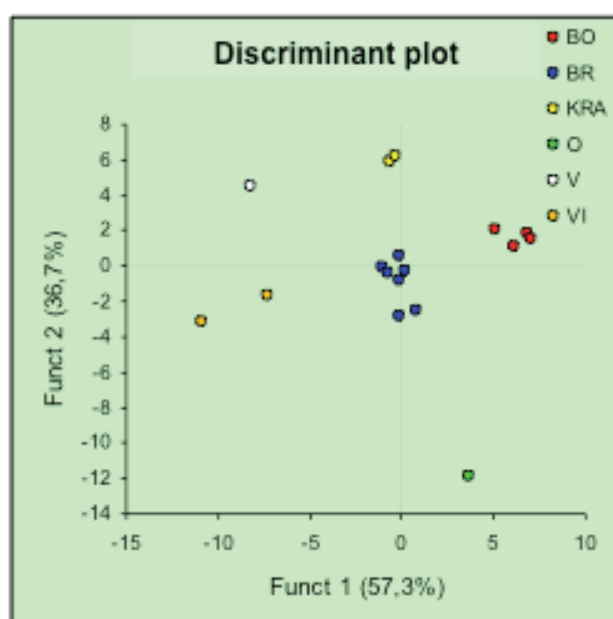
Za statistično analizo smo imeli na voljo 62 vzorcev mleka, vzorčevanega v juniju 2012, od tega ovčjega (20), kozjega (10), kravjega (25), krava-koza (2) in ovca-krava (5) vzorcev mleka, na 13 parametrov (3 stabilni izotopi $\delta^{18}\text{O}$, $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ v kazeinu in 10 elementov P, S, Cl, K, Ca, Mn, Zn, Br, Rb, Sr). Izkazalo se je, da z $\delta^{18}\text{O}$ v mleku, $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ v kazeinu lahko kar 89,4 % vzorcev pravilno razvrstimo med različne tipe mleka. Z LDA smo modelirali vrednosti 13 parametrov glede na 5 različnih vrst mleka prikazan na sliki 8. Ločitev je možna v osi 1, najbolj vplivni so K, P, Zn in S in v osi 2, kjer so najbolj vplivni Ca, P, $\delta^{18}\text{O}$ in S. Vidi se dobra ločitev ovčjega, kozjega in kravjega mleka, medtem ko je zanimivo, da se mešano mleko KK (koza-krava) uvrsti med čiste kozje. Prav tako se trije vzorci OK (ovca-krava) klasificirajo kot ovčji, medtem ko se dva vzorca uvrstita na sredini med obema velikima skupinama, torej kot mešana vzorca. Zanimalo nas je tudi možnost uvrščanja v skupine klasificiranja. Izkazalo se je, da lahko pravilno uvrstimo 95 % ovčjega mleka, 80 % kozjega in 100 % kravjega. Skupaj je pravilnost uvrstitve 95,2 %.



Slika 8. Razporeditev petih različnih vrst mleka: kravjega (KR), kozjega (K), ovčjega (O), koza-krava (KK) in ovca-krava (OK) iz junija 2012 glede na vsebnost stabilnih izotopov in elementno sestavo; os 1 predstavlja 64,4 % variabilnosti, os 2 pa 28,1 % variabilnosti, skupaj zneso 92,5 % variabilnosti.

Za statistično analizo smo imeli na voljo 35 vzorcev sira vzorčevanega v juniju 2012. Vzorci kravjega, ovčjega in kozjega sira ne kažejo statistično pomembnih razlik v izotopski sestavi kazeina, je pa vidna razlika, če poleg stabilnih izotopov v LDA vključimo še elementno sestavo. LDA smo izvedli z 11 parametri: stabilni izotopi (2) $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ v kazeinu in makro in mikroelementov (9) Zn, Br, Rb, Sr, P, S, Cl, K, Ca. Iz slike 9 je razvidno, da se dobro loči kozji (K) od kravjega (KR) in ovčjega (O). Mešani se uvrsti v glavnem pod ovčjega (OK, ovca-krava) ali KK (koza-krava) pod kozjega. Očitno mešanice sirov vsebujejo nizke vsebnosti kravjega mleka in prevladuje ovčje oziroma kozje mleko. Temu primerna je tudi uvrstitev v skupino ovc in koz. Najbolj vplivni parametri na osi 1 so K, $\delta^{15}\text{N}$, Br, Ca, na osi 2 pa Zn, S, P, Ca.

S pomočjo LDA smo poskušali ugotoviti še geografsko poreklo ovčjih sirov. Pri kozjih sirih teh izračunov nismo mogli izvesti zaradi premajhnega števila vzorcev. Rezultati LDA modeliranja so prikazani na sliki 9.



Slika 9. Razporeditev ovčjih sirov glede na lokacijo pridelave: BO (Bovec), BR (Brkini), KRA (Kras), O (osrednja Slovenija), VI (Vipava) in V (Dolenjska) iz junija 2012 glede na vsebnost stabilnih izotopov in elementno sestavo; os 1 predstavlja 57,3 % variabilnosti, os 2 pa 36,7 % variabilnosti, skupaj znese 94,0 % variabilnosti.

Ugotovili smo, da se siri glede na lokacijo pridelave med seboj dobro ločijo. Najbolj vplivni parametri za os 1 so K, $\delta^{13}\text{C}$, Mn, S, Cl in P.

Rezultati raziskav in statistična obdelava nakazujejo, da je za preverjanje pravilnosti deklariranega geografskega izvora možna uporaba stabilnih izotopov lahkanih elementov ($\delta^{18}\text{O}$ v mleku, in $\delta^{13}\text{C}$ in $\delta^{15}\text{N}$ v kazeinu) in elementna sestava. Ločitev je možna tudi na podlagi vsebnosti maščobnih kislin, pri čemer so najpomembnejše c9, t11 CLA, C14:0 in t10, c12 CLA ter C16:0, C18:0 in C14:0. Glede na ceno analiz in selektivnost je bolj primerna uporaba **stabilnih izotopov v kombinaciji z elementno sestavo**, pri čemer so pri ločbi najpomembnejši makro in mikro elementi (Cl, Zn, K, Ca, S, P in Mn). Za določanje **multi-elementne analize** se je izkazala **nedestruktivna rentgensko fluorescenčno spektrometrija**

(XRF) kot **hitra in cenovno najugodnejša** metoda. Rezultati nadalje kažejo, da je potrebno za določevanje geografskega porekla mleka in mlečnih izdelkov **vzdrževanje baze podatkov na letni ravni**. Pri tem potrebujemo vsaj **6 vzorcev iz posamezne regije v poletnem in zimskem obdobju**. Nadalje bi bilo potrebno preveriti tudi vpliv uporabe stabilnih izotopov S pri določanju geografskega porekla.

Stabilni izotopi lahkih elementov v kombinaciji z elementno sestavo so uporabni tudi pri ločevanju ovčjega in kozjega mleka in sira od kravjega. Tudi pri tem ločevanju moramo razpolagati z ustrezno **bazo podatkov o izotopski in elementni sestavi** pristnega mleka različnega izvora. Glede na to, da je z omenjenimi parametri možno ločiti tudi področje pridelave ovčjega mleka oziroma sira, nam ustrezna baza podatkov, ki se vzdržuje na letni ravni, lahko služi za **zaščito geografskega porekla Bovškega in Kraškega sira**. Ustrezne baze podatkov so tako v pomoč proizvajalcem sira pri vzdrževanju certifikata oziroma pri zaščiti geografskih označb in označb porekla.

Nadalje je pričakovati, da bodo na podlagi vzpostavljenih in dostopnih baz podatkov pristnih prehrabnenih izdelkov iz različnih področij, ki temeljijo na izotopskih parametrih in elementni sestavi, izdelali **ustrezne zemljevide**, ki bodo vključeni v **sistem sledljivosti** in bodo v pomoč pri določanju izvora prehrabnenih izdelkov **na globalnem nivoju**.

5.2 Določanje pristnosti mleka in mlečnih izdelkov

Ugotovili smo, da z uporabo **stabilnih izotopov kisika** v vzorcih lahko določimo od **7 do 34 % dodatka vode**. Najnižji % dodatka vode lahko določimo v poletnih mesecih, medtem ko je v zimskih mesecih dodatek vode manj zanesljiv. Metoda je bolj učinkovita kot krioskopska metoda, kjer lahko določamo do 2% dodatka vode, v primeru, če proizvajalci z vodo dodajajo tudi NaCl.

Določanje potvorb kozjih in ovčjih sirov s kravjim mlekom s PCR v realnem času so pokazali, da s to metodo lahko določimo kravje mleko kot nedovoljen dodatek kadar le-ta ni deklariran, kvalitativno, če je vsebnost kravjega mleka $> 0,1\%$ in semi-kvantitativno če je vsebnost $> 0,5\%$. Rezultati **vzporednih analiz** kozjih in ovčjih sirov s **PCR v realnem času in analizami maščobnih kislin** kažejo, da sta **metodi primerljivi** kadar je **dodatek kravjega mleka večji kot 5 %**. Izkazalo se je, da je **vsebnost maščobnih kislin** v mleku in mlečnih izdelkih pomembna metoda pri določanju **mešanja z rastlinskimi maščobami**, saj lahko detektiramo **dodatek rastlinskih maščob** kravjemu mleku in mlečnim izdelkom **manjšim od 5 %**.

Helena Volk je na belgijskem inštitutu za raziskave v agrikulturi in ribolovu (ILVO, Melle, Belgija) opravljala 4 mesečno Erasmus prakso. Pod mentorstvom dr. Ir. Els Van Coillie je primerjala tri različne metode za detekcijo kravjega mleka v kozjem mleku. Izbrane metode so bile:

- uradna metoda EC 1091/96, ki temelji na izolaciji kazeinov iz mleka in izoelektričnem fokusiranju (IEF) kazeinskih peptidov;
- PCR v realnem času, ki temelji na določanju kravjega mleka preko DNA somatskih celic;
- ELISA test, komercialno dostopen komplet za določanje kravjega mleka.

Poleg tega je izvedla senzorično analizo čistega kozjega mleka in mešanic s kravjim mlekom po metodi triangel (ISO 4120:2004) in s tem določila koliko kravjega mleka v kozjem mleku lahko zaznamo s senzoričnim ocenjevanjem. Izkazalo se je, da do 70 % dodatka kravjega mleka kozjemu mleku senzorični preskuševalci ne zaznajo.

V sklopu prakse se je naučila izvajati izoelektrično fokusiranje, ELISA test in triangel test. Poleg tega je optimizirala PCR v realnem času in ekstrakcijo DNA iz mleka. Primerjava izbranih metod je pokazala, da je PCR v realnem času najprimernejši za določanje potvorb

kozjega mleka. Postavljeno metodo je uporabila za določanje potvorb v Belgiji komercialno dostopnega kozjega mleka in jogurtov iz kozjega mleka. Izmed testiranih vzorcev je samo en vzorec vseboval sledi kravjega mleka.

PCR v realnem času za določitev potvorb kozjih in ovčjih sirov s kravjim mlekom temelji na analizi DNA. Glavna prednost metod, ki temeljijo na preiskavah DNA je v tem, da je DNA relativno stabilna molekula in so analize možne tudi po različnih tehnoloških postopkih (npr. segrevanje, fermentacija). Hkrati so **prednosti PCR hitra izvedba, visoka občutljivost in selektivnost določanja specifičnega dela DNA**, ki ga je možno določiti tudi, če je v vzorcu višja vsebnost drugih, ne-tarčnih molekul DNA.

Analiza proteinov kravjega, kozjega in ovčjega mleka in mešanic kozjega oz. ovčjega mleka s kravjim **z 2-D elektroforezo in bioinformatiko** je pokazala, da **kravje mleko** vsebuje **specifičen protein – kapa kazein**. Kapa kazein je sicer prisoten v kravjem, ovčjem in kozjem mleku, vendar se kravji kapa kazein razlikuje od ovčjega in kozjega v izoelektrični točki in post-translacijskih modifikacijah, kar pomeni specifičnost na 2-D gelu in s tem možnost detekcije potvorb ovčjega in kozjega mleka s kravjim. Hkrati ti rezultati kažejo na velike možnosti nadaljnjih raziskav, pri katerih bi glede na proteinsko specifičnost oblikovali **nov sistem detekcije t.i. proteinski-PCR**.

Rezultati raziskav izvedenih v **vzorcih dostopnih na slovenskem tržišču** kažejo, da so največje nepravilnosti prisotne pri **označbah ovčjih oziroma kozjih sirih**. V naši raziskavi je bilo kar **20 % vzorcev** sira višjega cenovnega razreda, ki **niso ustrezali deklaraciji**. Pri tem je potrebno poudariti, da gre za relativno majhen vzorec. Rezultati bi bili verjetno boljši, če bi imeli možnost narediti analize na večjem številu vzorcev. Kljub temu ti rezultati kažejo na neutreznost deklaracij oziroma označb, ki ima lahko neželene, škodljive odzive pri potrošnikih, ki imajo alergijo na kravje mleko. Pri teh ljudeh lahko nezaželjene oziroma škodljive odzive pričakujemo že pri veliko manjšem dodatku kravjega mleka kot je 5 %.

6 Literatura

- Bontempo, L., Larcher, R., Camin, F., Hölzl, S., Roßman, A., Horn, P. Nicolini G. 2011. International Dairy Journal 21, 441-446
- Camin, F., Wietzerbin, K., Cortes, A.B., Haberhauer, G., Lees, M., Versini, G. 2004. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52, 6592-6601
- Camin, F., Perini, M., Colombari, G., Bontempo, L., Versini, G. 2008. Rapid Communications in Mass Spectrometry 22, 1690-1696
- Coni, E. Bocca, A., Ianni, D., Caroli, S. 1995. Food Chemistry 52, 123-130
- Cordella, C., Moussa, I., Martel, A.-C., Sbirrazzouli, N., Lizzini-Cuvelier, L. 2002. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50, 1751-1764
- Dalmasso, A., Civera, T., La Neve, F., Bottero, M.T. 2011. Food Chemistry 124, 362–366
- De S., Brahma, B., Polley, S., Mukherjee, A., Banerjee, D., Gohaina, M., Singh, K.P., Singh, R., Datta, T.K., Goswami, S.L. 2011. Food Control 22 , 690-696

- Engel, E., Ferlay, A., Cornu, A., Chilliard, Y., Agabriel, C., Bielicki, G., Martin, B. 2007. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 9099-9108
- Franco, I., Prieto, B. Bernardo, A., Gonzalez-Prieto, J., Carballo, J. 2003. *International Dairy Journal* 13, 221-230
- Fresno, J.M., Prieto, B., Urdiales, R., Sarmiento, R.M. 1995. *Journal of Science of Food and Agriculture* 69, 339-345
- Food Composition and Nutrient Tables. Medline online database, Leibniz Institute, accessed 2014
- Iverson, J.L., Sheppard, A.J. 1989. *Journal of Dairy Science* 72, 1707-1712
- Karoui, R., De Baerdemaeker, J. 2007. *Food Chemistry*, 102, 3, 621-640
- Knobbe, N., Vogl, J., Pritzkow, W., Panne, U., Fry, H., Lochotzke, H.M., in sod., 2006. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 386, 104-108.
- Kornexl, B.E., Werner, T., Roßmann, A., Schmidt, H.-L. 1997. *Z Lebenm Unters Forsch A* 205, 19-24.
- Kropf, U., Korošec, M., Bertoneclj, J., Ogrinc N., Nečemer, M., Kump, P., Golob T. 2010. *Food Chemistry* 121, 839-846
- Kuchta, T. 2006. Polymerase chain reaction as a method for food analysis V: Application od polimerase chain reaction to food analysis. Kuchta T., Drahovska H., Pangallo D., Siekel P.(ur.). Bratislava.VUP Research Institute:13-25
- Lin, G.P., Rau, Y.H., Chen, Y.F., Chou, C.C., Fu, W.G. 2003. *Food Chemistry and Toxicology* 68, 2192-2195
- Lipp, M. 1995. *Food Chemistry* 54, 213-221
- Lockley, A.K., Bardsley, R.G. 2000. *Trends in Food Science and Technology*, 11, 67-77
- Lopparelli, R.M., Cardazzo, B., Balzan, S., Giaccone, V., Novelli, E. 2007. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 3429-3434
- Lopez-Calleja, I., Gonzalez, I., Fajardo, V., Rodriguez, M. A., Hernandez, P.E., Garcia, T., et al. 2004. *Journal of Dairy Science*, 87, 2839-2845.
- Lopez-Calleja I., Gonzalez I., Fajardo V., Martin I., Hernandez P.E., Garcia T., Martin R. 2007a. *Food Control* 18, 1466-1473
- Lopez-Calleja I., Gonzalez I., Fajardo V., Martin I., Hernandez P.E., Garcia T., Martin R. 2007b. *International Dairy Journal* 17, 729-736
- Lopez-Calleja, I., Gonzalez, I., Fajardo, V., Martin, I., Hernandez, P.E., Garcia, T., et al. 2007c. *International Dairy Journal*, 17, 729-736
- Mackay, J., Landt, O. 2007. Real-time PCR Fluorescent Chemistries. *Methods in Molecular Biology*. vol. 353:237-261
- Saunders N.A. An Introduction to Real-time PCR; Real-Time PCR An Essential Guide, Kirtin Edwards, Julie Logan and Nick Saunders, Genomics Proteomics and Bioinformatic Unit, Specialist and Reference Microbiology Division, Health Protection Agency, London, UK, Horizon bioscience, 2004, 1-11

- Mafra, I., Roxo, A., Ferreira, I. M.P.L.V.O., Beatriz, M., Oliveira, P.P. 2007. *International Dairy Journal* 17, 1132–1138
- Manca, G., Camin, F., Coloru, G.C., Del Caro, A., Depentori, D., Franco, M.A., Versini, G. 2001. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 1404-1409
- Mayer, H.K. 2005. *International Dairy Journal* 15, 595–604
- Meier-Augenstein, W. 1999. *Journal of Chromatography A* 842, 351-371
- Mininni, A. N., Pellizzari, C., Cardazzo, B., Carraro, L., Balzan, S., Novelli, E. 2009. *International Dairy Journal* 19, 617–623
- Nečemer, M., Kump, P., Ščančar, J., Jačimović, R., Simčič, J., Pelicon, P., Budnar, M., Jeran, Z., Pongrac, P., Regvar, M., Vogel-Mikuš, K. 2008. *Spectrochimica Acta B* 63, 1240-1244.
- Nečemer, M., Kump, P., Vogel-Mikuš, K. 2011. Use of X-ray fluorescence-based analytical techniques in phytoremediation, in I.A. Golubev, *Handbook of phytoremediation*, (Environmental science, engineering and technology), New York, pp. 331-358.
- Ogrinc, N., Nečemer, M., Potočnik, D., Mazej, D., Jačimović, R., Žigon, S. 2014. The use of stable isotopes and elemental composition for determination of authenticity and geographical origin of milk and dairy products, IAEA - annual report (IJS delovno poročilo, 11685)
- Ogrinc, N., Bat Bizjak, K., Žigon, S. 2013. Food analysis using isotopic techniques-proficiency testing scheme: FIT-PTS 2013, round 2: results of the interlaboratory comparison, (IJS delovno poročilo, 11439)
- Ogrinc, N., Gams Petrišič, M., Bat Bizjak, K., Žigon, S.. 2012. Food analysis using isotopic techniques-proficiency testing scheme: FIT-PTS 2012, round 2: results of the interlaboratory comparison, (IJS delovno poročilo, 11117)
- Ogrinc, N., Gams Petrišič, M., Bat Bizjak, K., Žigon, S.. 2011. Food analysis using isotopic techniques - proficiency testing scheme: FIT-PTS 2011, round 2: results of the interlaboratory comparison, (IJS delovno poročilo, 10853)
- Perko, D. 1998. *Acta geographica Slovenica* 38, 12–57
- Pillonel, L., Bütikofer, U., Rossman, A., Tabacchi, R., Bosset, J.O. 2004. *Mitteilungen aus Lebensmittel Untersuchung und Hygiene* 95, 489-502
- Pillonel, L., Badertscher, R., Casey, M., Meyer, J., Rossman, A., Schlichtherle-Cerny, H., Tabacchi, R., Bosset, J.O. 2005. *International Dairy Journal* 15, 547-556
- Renou, J., Deponge, C., Gachon, P., Bonnefoy, J.C., Coulon, J.B., Garel, J.P. in sod. 2004. *Food chemistry* 85, 63-66
- Stibilj, V., Koman Rajšp, M. 1997. *Zbornik Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani. Kmetijstvo. Zootehnika* 70, 187-194
- Ulbert, F. 1995. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43, 1556-
- Zimberlin, Š., Antunac, N., Havranek, J., Samardžija, D. 2012. *Mljekarstvo* 62, 111-125

Zhang, C.L., Fowler, M.R., Scott, N.W., Lawson, G., Slater A. 2007. Food Control 18, 1149–1158

Žan, M., Stibilj, V., Rogelj, I. 2006. Small Ruminant Research 64, 45-52.

7 Priloge

7.1 Preglednice

Preglednica P1. Vsebnost maščobnih kislin v surovem mleku po področjih junija 2012

Vrsta maščobne kisline	Alpsko		Mediterransko		Panonsko		Dinarsko	
	%	%	%	%	%	%	%	%
C6:0	0.927	± 0.235	0.973	± 0.057	1.160	± 0.067	1.069	± 0.236
C8:0	1.093	± 0.078	1.157	± 0.125	1.194	± 0.033	1.192	± 0.134
C10:0	2.625	± 0.209	2.844	± 0.489	2.966	± 0.056	2.893	± 0.257
C10:1	0.268	± 0.014	0.321	± 0.057	0.284	± 0.002	0.289	± 0.029
C12:0	3.013	± 0.269	3.381	± 0.666	3.466	± 0.079	3.371	± 0.339
C12:1 n-1	0.074	± 0.005	0.102	± 0.027	0.083	± 0.002	0.082	± 0.010
C13:0	0.089	± 0.011	0.100	± 0.016	0.107	± 0.005	0.099	± 0.011
C13:1 n-1	0.171	± 0.008	0.225	± 0.053	0.156	± 0.011	0.170	± 0.018
C14:0	10.93	± 0.552	12.27	± 1.727	11.594	± 0.159	11.68	± 0.702
C14:1 n-5	0.872	± 0.050	1.124	± 0.220	0.916	± 0.012	0.932	± 0.072
C15:0 iso	0.352	± 0.021	0.468	± 0.081	0.319	± 0.010	0.351	± 0.040
C15:0 aiso	0.583	± 0.049	0.717	± 0.106	0.499	± 0.015	0.557	± 0.066
C15:0	1.196	± 0.049	1.421	± 0.163	1.138	± 0.037	1.193	± 0.075
C16:0 iso	0.338	± 0.014	0.394	± 0.097	0.336	± 0.022	0.333	± 0.011
C16:0	29.55	± 1.766	32.07	± 4.350	30.78	± 0.436	30.80	± 1.498
vsota C16:1	1.933	± 0.041	1.993	± 0.077	2.019	± 0.021	1.933	± 0.068
C17:0 iso	0.463	± 0.058	0.503	± 0.052	0.382	± 0.010	0.423	± 0.056
C17:0 aiso	0.527	± 0.031	0.604	± 0.085	0.472	± 0.015	0.504	± 0.036
C17:0	0.690	± 0.050	0.792	± 0.094	0.610	± 0.006	0.671	± 0.071
C17:1 n-7	0.306	± 0.029	0.352	± 0.030	0.277	± 0.008	0.300	± 0.033
C18:0	11.86	± 0.687	9.455	± 2.173	11.26	± 0.235	11.24	± 0.819
vsota C18:1	26.60	± 1.684	23.40	± 5.106	25.23	± 0.591	24.86	± 1.964
C18:2 n-6 cc	2.153	± 0.104	1.746	± 0.279	2.069	± 0.009	2.035	± 0.147
C18:3 n-6	0.137	± 0.011	0.139	± 0.017	0.118	± 0.004	0.129	± 0.015
C19:0	0.142	± 0.011	0.176	± 0.028	0.126	± 0.003	0.141	± 0.021
C18:3 n-3	0.784	± 0.165	0.979	± 0.278	0.615	± 0.022	0.732	± 0.184
c9, t11 CLA	1.028	± 0.245	0.821	± 0.313	0.686	± 0.034	0.758	± 0.218
t10, c12 CLA	0.051	± 0.017	0.044	± 0.035	0.030	± 0.003	0.045	± 0.026
C20:0	0.210	± 0.017	0.220	± 0.022	0.179	± 0.005	0.201	± 0.020
C20:1 n-12 + n-15	0.183	± 0.016	0.212	± 0.039	0.157	± 0.007	0.167	± 0.016
C20:1 n-9	0.045	± 0.013	0.039	± 0.020	0.048	± 0.004	0.048	± 0.004
C20:3 n-6	0.075	± 0.015	0.062	± 0.013	0.080	± 0.003	0.078	± 0.016
C21:0	0.043	± 0.004	0.048	± 0.009	0.031	± 0.001	0.040	± 0.011
C20:4 n-6	0.116	± 0.018	0.103	± 0.015	0.132	± 0.004	0.126	± 0.023
C20:3 n-3	0.019	± 0.007	0.029	± 0.007	0.016	± 0.005	0.022	± 0.007
C20:4 n-3	0.047	± 0.008	0.062	± 0.013	0.038	± 0.001	0.047	± 0.017
C20:5 n-3	0.079	± 0.011	0.104	± 0.022	0.065	± 0.001	0.077	± 0.021
C22:0	0.081	± 0.010	0.103	± 0.019	0.064	± 0.003	0.077	± 0.014
C22:1 n-11	0.016	± 0.002	0.025	± 0.007	0.013	± 0.001	0.016	± 0.003
C23:0	0.041	± 0.009	0.052	± 0.021	0.026	± 0.005	0.035	± 0.011
C22:4 n-6	0.054	± 0.006	0.054	± 0.005	0.052	± 0.003	0.053	± 0.010
C22:5 n-3	0.116	± 0.013	0.139	± 0.023	0.099	± 0.001	0.116	± 0.023
C24:0	0.059	± 0.009	0.078	± 0.013	0.046	± 0.003	0.057	± 0.011
C24:1 n-9	0.018	±	0.025	± 0.008	n.d	± n.d	0.018	± 0.001
Nasičene MK (SFA)	64.81	± 2.077	67.83	± 5.327	66.75	± 0.618	66.92	± 2.165
Enkrat nasičene MK (MUFA)	30.47	± 1.662	27.81	± 4.939	29.18	± 0.632	28.80	± 1.947
Večkrat nasičene MK (PUFA)	4.521	± 0.509	4.143	± 0.579	3.882	± 0.057	4.090	± 0.345
n-3 PUFA	1.044	± 0.202	1.313	± 0.336	0.833	± 0.028	0.994	± 0.247
n-6 PUFA	2.535	± 0.102	2.104	± 0.291	2.451	± 0.009	2.421	± 0.155
n-6/n-3 PUFA	2.511	± 0.539	1.704	± 0.565	2.944	± 0.100	2.608	± 0.796

Preglednica P2. Vsebnost maščobnih kislin v surovem mleku po področjih decembra 2012

Vrsta maščobne kisline	Alpsko		Mediterransko		Panonsko		Dinarsko	
	%	%	%	%	%	%	%	%
C6:0	1.411	± 0.107	1.506	± 0.044	1.479	± 0.081	1.382	± 0.115
C8:0	1.232	± 0.043	1.324	± 0.123	1.261	± 0.032	1.234	± 0.067
C10:0	3.067	± 0.137	3.293	± 0.484	3.233	± 0.126	3.110	± 0.123
C10:1	0.334	± 0.015	0.342	± 0.032	0.327	± 0.011	0.331	± 0.019
C11:0	0.058	± 0.010	0.057	± 0.014	0.066	± 0.008	0.063	± 0.009
C12:0	3.602	± 0.170	3.884	± 0.569	3.819	± 0.161	3.712	± 0.153
C12:1 n-1	0.139	± 0.005	0.146	± 0.009	0.140	± 0.006	0.141	± 0.008
C13:0	0.105	± 0.010	0.112	± 0.005	0.113	± 0.008	0.113	± 0.010
C13:1 n-1	0.161	± 0.010	0.197	± 0.030	0.139	± 0.018	0.158	± 0.011
C14:0	12.39	± 0.250	13.03	± 0.544	12.24	± 0.185	12.41	± 0.232
C14:1 n-5	1.126	± 0.063	1.105	± 0.184	1.062	± 0.053	1.132	± 0.054
C15:0 iso	0.313	± 0.020	0.404	± 0.067	0.286	± 0.013	0.319	± 0.029
C15:0 aiso	0.493	± 0.032	0.601	± 0.106	0.435	± 0.028	0.488	± 0.035
C15:0	1.186	± 0.068	1.299	± 0.142	1.090	± 0.064	1.193	± 0.062
C16:0 iso	0.338	± 0.017	0.368	± 0.067	0.325	± 0.018	0.328	± 0.033
C16:0	34.34	± 0.914	35.57	± 2.247	33.43	± 0.834	34.35	± 0.712
vsota C16:1	2.015	± 0.056	1.907	± 0.167	2.058	± 0.051	2.101	± 0.095
C17:0 iso	0.341	± 0.025	0.410	± 0.087	0.303	± 0.011	0.337	± 0.023
C17:0 aiso	0.446	± 0.017	0.527	± 0.104	0.423	± 0.012	0.447	± 0.020
C17:0	0.590	± 0.033	0.683	± 0.127	0.536	± 0.022	0.590	± 0.037
C17:1 n-7	0.264	± 0.022	0.295	± 0.066	0.240	± 0.019	0.275	± 0.021
C18:0	9.685	± 0.336	8.512	± 0.598	9.932	± 0.341	9.454	± 0.611
vsota C18:1	22.15	± 0.873	20.07	± 2.894	22.96	± 0.574	22.24	± 0.618
C18:2 n-6 cc	1.856	± 0.132	1.704	± 0.075	2.045	± 0.197	1.850	± 0.213
C18:3 n-6	0.106	± 0.011	0.107	± 0.013	0.101	± 0.008	0.100	± 0.012
C19:1 n-9	0.030	± 0.011	0.005	± 0.009	0.038	± 0.007	0.032	± 0.012
C18:3 n-3	0.586	± 0.090	0.760	± 0.327	0.458	± 0.057	0.567	± 0.160
c9, t11 CLA	0.612	± 0.093	0.590	± 0.102	0.490	± 0.059	0.548	± 0.104
C20:0	0.175	± 0.012	0.192	± 0.023	0.161	± 0.008	0.169	± 0.011
C20:1 n-12 + 15	0.162	± 0.014	0.177	± 0.021	0.142	± 0.008	0.157	± 0.011
C20:1 n-9	0.037	± 0.004	0.048	± 0.011	0.043	± 0.004	0.042	± 0.004
C20:3 n-6	0.070	± 0.007	0.065	± 0.011	0.085	± 0.010	0.074	± 0.011
C21:0	0.031	± 0.003	0.040	± 0.013	0.027	± 0.002	0.029	± 0.003
C20:4 n-6	0.110	± 0.008	0.106	± 0.021	0.134	± 0.014	0.111	± 0.028
C20:3 n-3	0.013	± 0.007	0.020	± 0.005	0.006	± 0.005	0.012	± 0.011
C20:4 n-3	0.035	± 0.006	0.045	± 0.011	0.028	± 0.003	0.033	± 0.011
C20:5 n-3	0.064	± 0.008	0.079	± 0.021	0.052	± 0.006	0.061	± 0.015
C22:0	0.066	± 0.007	0.085	± 0.022	0.055	± 0.004	0.060	± 0.006
C22:1 n-11	0.013	± 0.004	0.017	± 0.009	0.011	± 0.003	0.013	± 0.004
C23:0	0.026	± 0.009	0.046	± 0.021	0.022	± 0.004	0.023	± 0.006
C22:4 n-6	0.041	± 0.006	0.036	± 0.001	0.036	± 0.004	0.035	± 0.005
C22:5 n-3	0.103	± 0.013	0.109	± 0.020	0.084	± 0.010	0.097	± 0.014
C24:0	0.047	± 0.006	0.066	± 0.017	0.039	± 0.004	0.044	± 0.006
C24:1 n-9	0.012	± 0.004	0.015	± 0.007	0.013	± 0.000	0.020	± 0.009
Nasičene MK (SFA)	69.94	± 0.796	72.01	± 3.079	69.28	± 0.652	69.85	± 0.531
Enkrat nasičene MK (MUFA)	26.43	± 0.831	24.32	± 3.303	27.16	± 0.511	26.63	± 0.492
Večkrat nasičene MK (PUFA)	3.595	± 0.188	3.621	± 0.283	3.520	± 0.199	3.487	± 0.268
n-3 PUFA	0.801	± 0.119	1.013	± 0.381	0.628	± 0.077	0.770	± 0.208
n-6 PUFA	2.182	± 0.144	2.018	± 0.085	2.401	± 0.216	2.170	± 0.250
n-6/n-3 PUFA	2.787	± 0.491	2.196	± 0.827	3.903	± 0.772	3.018	± 0.871

Preglednica P3. Vsebnost maščobnih kislin v surovem mleku po področjih junija 2013

Vrsta maščobne kisline	Alpsko		Mediteransko		Panonsko		Dinarsko	
	%	%	%	%	%	%	%	%
C4:0	0.320	± 0.577	0.047	± 0.027	0.523	± 1.126	0.041	± 0.058
C6:0	0.950	± 0.649	0.778	± 0.675	1.111	± 0.503	0.974	± 0.538
C8:0	1.239	± 0.507	1.670	± 0.259	1.597	± 0.589	1.518	± 0.405
C10:0	3.403	± 0.877	4.924	± 0.420	4.197	± 1.498	4.067	± 0.886
iC11:0	0.313	± 0.088	0.547	± 0.125	0.398	± 0.156	0.390	± 0.107
C11:0	0.051	± 0.041	0.083	± 0.039	0.076	± 0.048	0.058	± 0.025
C12:0	3.921	± 0.646	5.133	± 0.966	4.461	± 1.130	4.451	± 0.826
C12:1	0.078	± 0.031	0.160	± 0.077	0.094	± 0.042	0.102	± 0.033
iC13:0	0.138	± 0.025	0.225	± 0.077	0.139	± 0.059	0.154	± 0.040
C13:0	0.097	± 0.038	0.162	± 0.074	0.103	± 0.039	0.110	± 0.030
iC14:0	0.172	± 0.034	0.227	± 0.109	0.153	± 0.044	0.169	± 0.026
C14:0	12.70	± 0.973	9.802	± 8.618	12.89	± 2.028	13.20	± 1.062
C14:1	1.019	± 0.140	5.467	± 6.488	1.090	± 0.254	1.166	± 0.271
iC15:0	0.329	± 0.045	0.809	± 0.467	0.300	± 0.069	0.331	± 0.034
aC15:0	0.563	± 0.085	0.633	± 0.290	0.483	± 0.109	0.557	± 0.062
C15:0	1.204	± 0.131	1.382	± 0.168	1.098	± 0.211	1.237	± 0.110
C15:1	0.291	± 0.033	0.374	± 0.060	0.292	± 0.064	0.309	± 0.041
C16:0	29.56	± 2.299	31.60	± 1.901	29.42	± 3.731	30.70	± 1.480
C16:1	1.784	± 0.146	1.783	± 0.348	1.883	± 0.331	1.860	± 0.251
iC17:0	0.479	± 0.061	0.569	± 0.134	0.447	± 0.081	0.484	± 0.039
aC17:0	0.423	± 0.055	0.514	± 0.093	0.391	± 0.082	0.443	± 0.039
C17:0	0.580	± 0.059	0.663	± 0.142	0.523	± 0.104	0.587	± 0.052
C17:1	0.332	± 0.042	0.383	± 0.103	0.306	± 0.069	0.340	± 0.039
iC18:0	0.039	± 0.031	0.052	± 0.047	0.053	± 0.076	0.055	± 0.009
C18:0	9.935	± 0.999	8.253	± 2.060	9.279	± 1.417	10.123	± 1.417
C18:1n9c/9t	20.02	± 1.256	18.15	± 2.134	18.26	± 5.289	20.09	± 1.746
C18:2n6c	2.150	± 0.298	1.715	± 0.413	2.157	± 0.404	2.122	± 0.339
C18:2n6t	< Lod		< Lod		< Lod		< Lod	
C18:3n6	0.564	± 0.377	0.417	± 0.245	0.509	± 0.400	0.457	± 0.187
C18:3n3	1.059	± 0.495	0.914	± 0.714	0.747	± 0.270	0.660	± 0.179
CLA (c-9, t-11 C18:2)	0.855	± 0.225	0.457	± 0.062	0.602	± 0.298	0.536	± 0.129
C20:0	0.151	± 0.044	0.660	± 0.592	0.269	± 0.326	0.441	± 0.452
C20:1n9	0.307	± 0.185	0.253	± 0.220	0.359	± 0.285	0.389	± 0.134
C20:2	0.017	± 0.019	0.063	± 0.036	0.025	± 0.027	0.026	± 0.022
C20:3n6	0.045	± 0.045	0.123	± 0.071	0.069	± 0.069	0.079	± 0.029
C21:0	0.065	± 0.151	0.044	± 0.025	0.009	± 0.026	0.028	± 0.049
C20:3n3	0.059	± 0.046	0.138	± 0.080	0.148	± 0.185	0.093	± 0.040
C20:4n6	0.019	± 0.021	0.075	± 0.043	0.277	± 1.024	0.112	± 0.242
C20:5n3	0.390	± 0.841	1.031	± 1.665	0.202	± 0.357	0.178	± 0.390
C22:0	0.953	± 1.160	0.149	± 0.259	0.656	± 1.266	0.902	± 1.071
C22:1n9	0.000	± 0.000	0.000	± 0.000	0.023	± 0.091	0.000	± 0.000
C22:2	0.003	± 0.010	0.039	± 0.023	1.259	± 5.000	0.008	± 0.015
C23:0	0.003	± 0.011	0.000	± 0.000	0.554	± 2.148	0.015	± 0.028
C24:0	3.415	± 3.724	0.979	± 0.565	2.580	± 2.880	0.445	± 0.773
C22:6n3	< Lod		< Lod		< Lod		< Lod	
C24:1n9	< Lod		< Lod		< Lod		< Lod	
Nasičene MK (SFA)	71.01	± 2.393	70.99	± 8.516	71.71	± 5.723	71.48	± 2.073
Enkrat nasičene MK (MUFA)	23.83	± 1.315	24.08	± 6.594	22.31	± 4.884	24.25	± 1.600
Večkrat nasičene MK (PUFA)	5.160	± 1.680	4.931	± 2.223	5.985	± 4.789	4.271	± 0.749
n-3 PUFA	1.508	± 1.142	1.674	± 1.692	1.088	± 0.447	0.930	± 0.414
n-6 PUFA	2.777	± 0.645	2.723	± 0.694	3.012	± 1.458	2.770	± 0.484
n-6/n-3 PUFA	2.534	± 1.206	1.626	± 0.707	2.921	± 0.961	3.290	± 0.958

Preglednica P4. Vsebnost maščobnih kislin v surovem mleku po področjih decembra 2013

Vrsta maščobne kisline	Alpsko		Meditersansko		Panonsko		Dinarsko	
	%	%	%	%	%	%	%	%
C4:0	0.662	± 0.158	0.733	± 0.179	0.704	± 0.112	0.783	± 0.117
C6:0	1.137	± 0.226	1.270	± 0.435	1.221	± 0.159	1.367	± 0.159
C8:0	1.012	± 0.165	1.080	± 0.377	1.078	± 0.118	1.216	± 0.111
C10:0	2.609	± 0.375	2.586	± 0.807	2.760	± 0.353	3.097	± 0.272
iC11:0	0.278	± 0.037	0.300	± 0.088	0.281	± 0.034	0.322	± 0.022
C11:0	0.046	± 0.009	0.039	± 0.018	0.051	± 0.010	0.057	± 0.012
C12:0	3.239	± 0.405	3.104	± 0.867	3.394	± 0.452	3.755	± 0.360
C12:1	0.081	± 0.010	0.084	± 0.026	0.083	± 0.012	0.094	± 0.008
iC13:0	0.114	± 0.014	0.121	± 0.034	0.119	± 0.016	0.134	± 0.011
C13:0	0.092	± 0.015	0.092	± 0.025	0.100	± 0.015	0.110	± 0.016
iC14:0	0.133	± 0.016	0.169	± 0.050	0.122	± 0.014	0.145	± 0.010
C14:0	11.18	± 1.026	11.05	± 1.616	11.14	± 1.071	12.19	± 0.733
C14:1	0.993	± 0.101	1.054	± 0.207	0.967	± 0.102	1.091	± 0.075
iC15:0	0.272	± 0.023	0.357	± 0.094	0.266	± 0.024	0.303	± 0.034
aC15:0	0.448	± 0.038	0.545	± 0.167	0.423	± 0.033	0.489	± 0.050
C15:0	1.143	± 0.095	1.258	± 0.036	1.089	± 0.093	1.187	± 0.049
C15:1	0.288	± 0.025	0.333	± 0.096	0.287	± 0.024	0.306	± 0.010
C16:0	31.13	± 2.188	30.92	± 3.429	30.81	± 2.394	32.23	± 1.168
C16:1	1.589	± 0.143	1.609	± 0.138	1.636	± 0.121	1.703	± 0.112
iC17:0	0.451	± 0.033	0.505	± 0.082	0.442	± 0.031	0.493	± 0.069
aC17:0	0.400	± 0.028	0.476	± 0.153	0.395	± 0.024	0.418	± 0.052
C17:0	0.632	± 0.069	0.728	± 0.120	0.592	± 0.064	0.693	± 0.126
C17:1	0.311	± 0.029	0.367	± 0.073	0.292	± 0.021	0.314	± 0.064
iC18:0	0.056	± 0.005	0.065	± 0.019	0.052	± 0.005	0.061	± 0.015
C18:0	8.882	± 0.640	7.955	± 1.406	9.056	± 0.585	8.886	± 0.633
C18:1n9c/9t	18.07	± 1.513	17.94	± 3.413	18.82	± 1.117	18.79	± 1.325
C18:2n6c	1.778	± 0.186	1.488	± 0.281	1.844	± 0.185	1.918	± 0.250
C18:2n6t	0.078	± 0.073	0.064	± 0.043	0.058	± 0.028	0.097	± 0.052
C18:3n6	0.331	± 0.098	0.232	± 0.046	0.240	± 0.056	0.334	± 0.095
C18:3n3	0.533	± 0.098	0.492	± 0.082	0.446	± 0.058	0.525	± 0.133
CLA (c-9, t-11 C18:2)	0.529	± 0.103	0.458	± 0.197	0.414	± 0.071	0.499	± 0.165
C20:0	0.342	± 0.245	0.170	± 0.037	0.297	± 0.218	0.153	± 0.018
C20:1n9	0.387	± 0.198	0.644	± 0.431	0.408	± 0.211	0.276	± 0.051
C20:2	0.119	± 0.170	0.342	± 0.272	0.061	± 0.070	0.349	± 0.324
C20:3n6	0.086	± 0.060	0.150	± 0.055	0.101	± 0.054	0.202	± 0.202
C21:0	0.069	± 0.065	0.027	± 0.025	0.058	± 0.075	0.015	± 0.041
C20:3n3	0.105	± 0.021	0.112	± 0.021	0.123	± 0.016	0.113	± 0.046
C20:4n6	0.267	± 0.985	0.026	± 0.023	0.288	± 0.862	0.035	± 0.009
C20:5n3	0.836	± 1.221	0.069	± 0.044	0.827	± 1.304	0.058	± 0.020
C22:0	0.422	± 1.069	0.076	± 0.038	0.082	± 0.025	0.073	± 0.016
C22:1n9	1.215	± 1.049	2.137	± 1.962	1.533	± 1.359	2.090	± 0.953
C22:2	0.140	± 0.145	0.899	± 1.116	0.236	± 0.441	0.407	± 0.720
C23:0	0.333	± 0.757	0.241	± 0.011	0.173	± 0.121	0.173	± 0.099
C24:0	3.654	± 4.808	5.081	± 8.212	1.778	± 3.409	0.105	± 0.053
C22:6n3	0.965	± 1.644	0.045	± 0.078	1.081	± 3.598	0.088	± 0.087
C24:1n9	0.095	± 0.184	< Lod		< Lod		0.026	± 0.045
Nasičene MK (SFA)	68.73	± 3.474	60.99	± 8.468	66.49	± 4.579	68.45	± 2.394
Enkrat nasičene MK (MUFA)	23.79	± 2.583	24.22	± 2.872	25.11	± 4.485	22.67	± 1.520
Večkrat nasičene MK (PUFA)	5.653	± 2.402	4.378	± 1.390	5.719	± 3.549	4.624	± 1.270
n-3 PUFA	2.325	± 2.352	0.718	± 0.033	2.477	± 3.574	0.784	± 0.167
n-6 PUFA	2.540	± 1.064	1.960	± 0.341	2.531	± 0.852	2.586	± 0.326
n-6/n-3 PUFA	2.491	± 1.739	2.746	± 0.580	2.604	± 1.609	3.374	± 0.456

7.2 Program delavnice in seznam udeležencev



Program delavnice

CRP Projekt- V4-1108: Uporaba specifičnih metod za ugotavljanje in preprečevanje potvorb mleka in mlečnih izdelkov

12. junij 2014, Biotehniška Fakulteta, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana
Predavalnica D1

Čas	Naslov prispevka	Govornik
8:00 – 9:00	<i>Registracija udeležencev</i>	
9:00 – 9:15	Otvoritev	Nives Ogrinc IJS, Ljubljana
9:15 – 10:00	Stable isotope ratios for tracing the origin of dairy products	Federica Camin Istituto Agrario di San Michele all'Adige, Italy
10:00 – 10:30	Varstvo in informiranje potrošnikov ter pomen analitskih metod za uradni nadzor nad živili	Mira Kos Skubic MKO, Ljubljana
10:30 – 11:00	<i>Odmor</i>	
11:00 – 11:20	Uradni nadzor nad potvorbami živil	Nadja Škrk Uprava RS za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin, Ljubljana
11:20 – 11:40	Vprašanja pristnosti živil	Mojca Korošec BF, Ljubljana
11:40 – 12:00	Značilnosti prireje mleka v Sloveniji	Jože Verbič KIS, Ljubljana
12:00 – 13:00	<i>Kosilo</i>	
13:00 – 13:30	Ogled analiz vzorcev kozjega in ovčjega mleka in sirov (Laboratorij LŽ4 in laboratorij za proteomiko)	
13:30 – 14:00	Predstavitev projekta – raziskave in dosežki	Nives Ogrinc IJS, Ljubljana
14:00 – 14:15	Maščobne kisline – potvorbe in geografsko poreklo	Doris Potočnik IJS, Ljubljana
14:15 – 14:30	Karakterizacija mleka in sira z uporabo stabilnih izotopov lahkih elementov	Urša Vezjak BF, IJS, Ljubljana
14:30 – 14:45	Predstavitev dela projekta izvedenega na BF	Barbara Jeršek BF, Ljubljana
14:45 – 15:00	Uvajanje PCR v realnem času za določanje potvorb ovčjega in kozjega mleka na nivoju DNA	Helena Volk BF, Ljubljana
15:00 – 15:15	Določanje potvorb ovčjih in kozjih sirov s PCR v realnem času	Ana Gornjak BF, Ljubljana
15:15 – 15:30	Določanje potvorb ovčjega in kozjega mleka na nivoju proteinov	Marjetka Kršlin BF, Ljubljana
15:30 – 16:00	Ogled rezultatov analiz kozjega in ovčjega mleka in sirov (Laboratorij LŽ4 in laboratorij za proteomiko)	
16:00	<i>Razprava in zaključek</i>	

Ime	Priimek	Institucija
Iztok	Košir	Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije
Alenka	Urbančič	Državni zbor, Lj
Karmen	Godič Torkar	UL, Zdravstvena fakulteta, Ljubljana
Marjana	Peterman	ZPS
Tatjana	Šubic	BC Naklo
Tatjana	Pajk Žontar	MIPOR-Mednarodni inštitut za potrošniške raziskave
Tanja	Potočnik	Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije
Petra	Mohar	Biotehniška fakulteta
Vanja	Penca	Biotehniška fakulteta
Mojca	Zupan Štante	Vrtec Mladi rod
Bojana	Bogovič-Matijašič	BF Oddelek za zootehniko
Marija	Drešček	ŠČ Nova Gorica Biotehniška šola
Tjaša	Tavčar	ŠČ Nova Gorica Biotehniška šola
Stanka	Podkrajšek	BF Oddelek za zootehniko
Zdenka	Šlejkovec	IJS
Barbara	Svetek	IJS
Minka	Kovač	Omega d.o.o.
Nataša	Toplak	Omega d.o.o.
Ksenija	Šinigoj Gačnik	UL VF, Ljubljana
Jožica	Dolenc	UL VF, Ljubljana
Stanka	Vadnjal	UL VF, Ljubljana
Majda	Biasizzo	UL VF, Ljubljana
Mojca	Korošec	UL BF
Saša	Piskernik	UL BF
Anja	Klančnik	UL BF
Čanžek	Andreja	BF Oddelek za zootehniko
Tatjana	Vrščaj Vodošek	Mercator IP Varna hrana, Ljubljana
Polona	Hribar	Mercator IP Varna hrana, Ljubljana
Teja	Spasojevič	Mercator IP Varna hrana, Ljubljana
Maja	Leskovšek	Mercator IP Varna hrana, Ljubljana
Uroš	Jambor	Mercator IP Varna hrana, Ljubljana
Helena	Ipavec	INCOM d.o.o.
Jerica	Ivanoš	Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano
Petra	Ritter	NLZOH, Center za kemijske analize; Maribor
Boštjan	Križanec	NLZOH, Center za kemijske analize; Maribor
Tea	Zuliani	IJS, Ljubljana
Sonja	Zuliani	Sirarstvo Jukopila
Marijan	Nečemer	IJS
Zlatka	Bajc	UL, VF Ljubljana
Jasna	Bertoncelj	UL; BF
Ingrid	Falnoga	IJS
Zvonka	Jeran	IJS
Marjan	Simčič	UL BF

Predavatelji		
Helena	Volk	UL; BF
Ana	Gornjak	UL; BF
Marjetka	Kršlin	UL; BF
Urša	Vezjak	UL; BF
Nives	Ogrinc	IJS
Barbara	Jeršek	UL; BF
Federica	Camin	Instituto Agrario di San Michelle all'Adige, Italija
Nadja	Škrk	Uprava RS za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin
Doris	Potočnik	IJS
Mira	Kos-Skubic	MKO
Mojca	Korošec	UL; BF
Jože	Verbič	KIS