

## **Dôkaz kravskej mliečnej zložky v ovčích a kozích syroch polymerázovou reťazovou reakciou**

LUBICA PIKNOVÁ - JANA KRAHULCOVÁ - TOMÁŠ KUČHTA

**SÚHRN.** V článku sa opisuje metóda na princípe polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) na dôkaz kravskej mliečnej zložky v ovčích a kozích syroch. Metóda pozostáva z izolácie DNA použitím súpravy Wizard a z PCR orientovanej na sekvenciu mitochondriálneho génu kódujúceho cytochróm b (Matsunaga a kol., *Meat Science*, 51, 1999, s. 143-148). Na modelových vzorkách, obsahujúcich ovčí syr a tvaroh v definovanom pomere, sa stanovil detekčný limit metódy 0,01 %. Optimalizovaná metóda sa použila na analýzu 10 vzoriek ovčích a kozích syrov, pričom sa v 9 prípadoch dokázala prítomnosť kravskej mliečnej zložky. Vypracovaná metóda je vhodná na rýchly, selektívny a citlivý dôkaz kravskej mliečnej zložky v ovčích a kozích syroch.

**KLÚČOVÉ SLOVÁ:** kravské mlieko; ovčí syr; kozí syr; polymerázová reťazová reakcia

Väčšina syrov sa vyrába z kravského mlieka, kým ovčie a kozie syry sa považujú za špeciality s charakteristickou chuťou a vôňou. Keďže ovčie a kozie mlieko sú výrazne drahšie ako kravské mlieko a ich produkcia je sezónna, rozšírilo sa falšovanie ovčích a kozích syrov nedeklarovanou prímiesou kravskej mliečnej zložky.

Na dôkaz prímеси kravského mlieka v mliečnych výrobkoch je k dispozícii referenčná metóda založená na izoelektrickej fokusácii  $\gamma$ -kazeínov [1]. Na tento účel je k dispozícii tiež niekoľko typov komerčných súprav na princípe ELISA. Ako vysoko selektívna a citlivejšia alternatíva sa vypracovali viaceré metódy na princípe polymerázovej reťazovej reakcie (PCR). Vypracovali sa metódy orientované na nešpecifické sekvencie génu kódujúceho  $\beta$ -kazeín s druhovým rozlíšením použitím restrikcie amplifikovaného fragmentu DNA [2] alebo pomocou ligázovej reťazovej reakcie [3], metóda orientovaná na nešpecifické sekvencie mitochondriálneho génu kódujúceho cytochróm b s druhovým rozlíšením pomocou restrikcie amplifikovaného

---

RNDr. Lubica PIKNOVÁ; Ing. Jana KRAHULCOVÁ; RNDr. Tomáš KUČHTA, CSc., Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, P. O. box 25, 824 75 Bratislava 26.  
Korešpondujúci autor: RNDr. Tomáš KUČHTA, CSc., e-mail: kuchta@vup.sk

fragmentu DNA [4] a metóda orientovaná na druhovo špecifickú oblasť tzv. D-slučky mitochondriálneho genómu [5]. V predkladanej práci sme na dôkaz kravskej mliečnej zložky v ovčích a kozích syroch použili jednoduchý druhovo špecifický detekčný PCR systém orientovaný na mitochondriálny gén kódujúci cytochróm b [6], ktorý sa v predchádzajúcej práci osvedčil na dôkaz hovädzieho podielu v mäsových výrobkoch [7].

### Materiál a metódy

Syry sa získali z obchodnej siete, podrobnejšie údaje uvádza tab. 1.

DNA sa izolovala použitím súpravy Wizard DNA Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA) [7,8]. K 300 mg homogenizovanej vzorky sa pridal 430  $\mu$ l tlmivého roztoku TNE (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% dodecylsulfát sodný, pH 8,0), 50  $\mu$ l 5 M guanidínium hydrochloridu a 20  $\mu$ l proteinázy K (20 mg.ml<sup>-1</sup>) a vzorky sa inkubovali 3 h pri 57 °C. Po centrifugácii (14000 g počas 10 min pri 4 °C) sa 450  $\mu$ l supernatantu pridal k 1 ml suspenzie Wizard Resin a po premiešaní sa celý objem pomocou vákuua naniesol na minikolónu. Minikolóna sa premyla objemom 2 ml 80% izopropanolu, centrifugovala pri 10000 g počas 2 min a nechala 10–15 min vysušiť pri laboratórnej teplote. DNA sa eluovala z minikolóny objemom 50  $\mu$ l horúcej (70 °C) vody a uskladnila sa pri teplote -18 °C.

TAB. 1. Výsledky analýzy ovčích a kozích syrov na prítomnosť kravskej mliečnej zložky.

TAB. 1. Results of the analysis of ewe's and goat's cheese for the presence of the cow's milk component.

Syr <sup>1</sup>	Ovčí (O)/kozí (K) <sup>2</sup>	Krajina pôvodu <sup>3</sup>	Výsledok PCR <sup>4</sup>
Feta	O	SK	+
Kaškaval	O	SK	+
Oštiepok 1	O	SK	+
Oštiepok 2	O	SK	+
Ovčí syr 1	O	SK	+
Ovčí syr 2	O	SK	-
Ovečka	O	SK	+
Belle Blanc	K	NL	+
Kozí syr	K	NL	+
Rondin Blanc	K	F	+

1 - cheese, 2 - ewe's (O)/goat's (K), 3 - country of origin, 4 - PCR result.

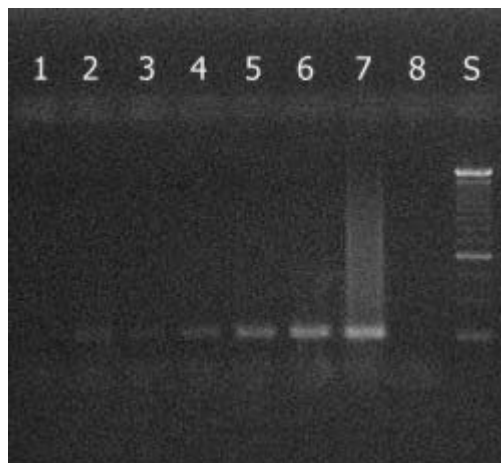
PCR sa realizovala v cykléri GeneAmp 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Použil sa pár primérov SIM (5'-GACCTCCCAGCTCCATCAAACATCTCATCTTGATGAAA-3') + BEEF (5'-CTAGAAAAGTGTAAGACCCGTAATATAAG-3') špecifický pre *Bos taurus* [6] a pár primérov CYTb1 (5'-CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3') + CYTb2 (5'-GCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3') špecifický pre stavovce [8]. Reakčná zmes (pH 8,4) obsahovala 20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM každého dNTP (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA), 1,25 U Platinum Taq polymerázy (Life Technologies), 25 pmol primérov SIM + BEEF alebo CYTb1 + CYTb2 (Generi, Hradec Králové, ČR) a 1 µl roztoku DNA. Teplotný program pozostával z úvodnej denaturácie pri 94 °C počas 1 min; 35 cyklov (94 °C počas 30 s, 60 °C pre priméry SIM + BEEF resp. 50 °C pre priméry CYTb1 + CYTb2 počas 30 s a 72 °C počas 30 s) a záverečnej polymerizácie pri 72 °C počas 5 min. Produkty PCR sa analyzovali elektroforeticky v agarózovom géli, farbili etídiumbromidom a vizualizovali v UV svetle [9], pričom sa použil štandard molekulových hmotností n.250 bp (Life Technologies).

### Výsledky a diskusia

Cieľom práce bolo zaviesť metódu na princípe PCR na dôkaz kravskej mliečnej zložky v ovčích a kozích syroch s použitím páru primérov SIM + BEEF [6], ktorého citlivosť a selektivita sa overili v predchádzajúcej práci [7].

DNA sa izolovala z rôznych druhov ovčieho a kozieho syra použitím metódy Wizard. S touto metódou sa v predchádzajúcej práci dosiahli dobré výsledky pri izolácii DNA z mäsových výrobkov [7] a teraz sa ukázala ako vhodná aj na izoláciu DNA zo syra. Izolovaná DNA sa použila v PCR s primérmimi SIM + BEEF, pričom sa získal pozitívny výsledok (amplifikácia fragmentu veľkosti 274 bp) pre všetky analyzované vzorky s výnimkou jedného ovčieho syra (tab. 1). Aby sa znížilo riziko falošnej negativity a aby sa zaručilo, že negatívny výsledok v prípade tejto vzorky bol dôsledkom selektivity použitých primérov a nie nízkou kvalitou izolovanej DNA, analyzovala sa uvedená vzorka DNA tiež použitím PCR s nešpecifickými primérmimi CYTb1 + CYTb2 v podmienkach relatívne nízkej selektivity [10]. V tomto prípade sa získal pozitívny výsledok (amplifikácia fragmentu veľkosti 359 bp), čo vylúčilo možnosť falošnej negativity.

Uvedený ovčí syr sa použil na prípravu modelových zmesí s tvarohom, analýzou ktorých sa stanovil detekčný limit metódy 0,01 % (obr. 1).



OBR. 1. Detekčný limit použitej PCR.

Obsah tvarohu v zmesi s ovčím syrom bol 0 % (1), 0,01 % (2), 0,1 % (3), 1 % (4), 5 % (5) a 100 % (6). 7 - pozitívna kontrola (hovädzie mäso), 8 - negatívna kontrola, S - štandard molekulových hmotností n.250 bp (výraznejšie fragmenty 250 bp a 1000 bp).

FIG. 1. Detection limit of the PCR used.

Contents of quarg in mixtures with ewe's cheese were 0 % (1), 0.01 % (2), 0.1 % (3), 1 % (4), 5 % (5), and 100 % (6). 7 - positive control (beef), 8 - negative control, S - molecular size standard n.250 bp (stronger fragments of 250 bp and 1000 bp).

Analýzou 10 vzoriek ovčích a kozích syrov sa dokázalo, že 9 z nich obsahovalo kravskú mliečnu zložku, pričom táto nebola deklarovaná (tab. 1).

Vypracovaná metóda sa ukázala ako vhodná na rýchly, špecifický a citlivý dôkaz kravskej mliečnej zložky v ovčích a kozích syroch.

## Literatúra

1. Commission Regulation (EC) No. 213/2001 of 9 January 2001 laying down detailed rules for the application of Council Regulation (EC) No. 1255/1999 as regards methods for the analysis and quality evaluation of milk and milk products and amending Regulations (EC) No. 2771/1999 and (EC) No. 2799/1999. Official Journal of the European Communities, L 037, 7.2.2001, s. 1-99.
2. PLATH, A. - KRAUSE, I. - EINSPANIER, R.: Species identification in dairy products by three different DNA-based techniques. Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung A, 205, 1997, s. 437-441.
3. KLOTZ, A. - EINSPANIER, R.: Development of a DNA-based screening method to detect cow milk in ewe, goat and buffalo milk and dairy products using PCR-LCR-EIA-technique. Milchwissenschaft, 56, 2001, s. 67-70.

4. BRANCIARI, R. - NIJMAN, I. J. - PLAS, M. E. - DI ANTONIO, E. - LENSTRA, J. A.: Species origin of milk in Italian mozzarella and Greek feta cheese. *Journal of Food Protection*, 63, 2000, s. 408-411.
5. MAUDET, C. - TABERLET, P.: Detection of cows' mil in goats' cheeses inferred from mitochondrial DNA polymorphism. *Journal of Dairy Research*, 68, 2001, s. 229-235.
6. MATSUNAGA, T. - CHIKUNI, K. - TANABE, R. - MUROYA, S. - SHIBATA, K. - YAMADA, J. - SHINMURA, Y.: A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Science*, 51, 1999, s. 143-148.
7. PIKNOVÁ, L. - KUČHTA, T.: Dôkaz hovädzej zložky v mäsových výrobkoch polymerázovou refazovou reakciou. *Bulletin potravinárskeho výskumu*, 41, 2002, s. 107-111.
8. MEYER, R. - HÖFELEIN, C. - LÜTHY, J. - CANDRIAN, U.: Polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in food. *Journal of AOAC International*, 78, 1995, s. 1542-1551.
9. MANIATIS, T. - FRITSCH, E. F. - SAMBROOK, J.: *Molecular cloning*. New York : Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. 545 s.
10. SZITÁSOVÁ, I. - DRAHOVSKÁ, H. - TURŇA, J.: Distribution of virulence factors and AFLP typing of *Bacillus cereus* food isolates. *Biológia*, 57, 2002, s. 313-319.

Do redakcie došlo 6.3.2002.

**Detection of the cow's milk component in ewe's and goat's cheese  
using polymerase chain reaction**

PIKNOVÁ, L. - KRAHULCOVÁ, J. - KUČHTA, T.: *Bull. potrav. Výsk.*, 41, 2002, p. 163-167.

**SUMMARY.** The article deals with a method based upon the polymerase chain reaction (PCR) for the detection of the cow's milk component in ewe's and goat's cheese. The method involves DNA isolation using the Wizard kit and PCR oriented to a sequence of the mitochondrial gene encoding cytochrome b, as described by Matsunaga et al., *Meat Science*, 51, 1999, p. 143-148. Using model samples containing defined portions of cow's and ewe's cheese, a detection limit of 0.01 % was determined. The optimized method was used to analyse 10 samples of ewe's and goat's cheese and the cow's milk component was detected in 9 samples. The method proved to be suitable for the rapid, specific and sensitive detection of the cow's milk component in ewe's and goat's cheese.

**KEYWORDS:** cow's milk; ewe's cheese; goat's cheese; polymerase chain reaction