

## EVALUATION OF ELISA METHOD TO DETECTION OF COW $\beta$ -LACTOGLOBULIN IN SHEEP MILK AND SHEEP MILK PRODUCTS

Lucia Zeleňáková, Radoslav Židek, Margita Čanigová, Juraj Paulov, Tatiana Gallisová

### ABSTRACT

The aim of work was to optimize the ELISA method to detect the adulteration of sheep milk and sheep milk products by cow milk in the laboratory. We have focused on laboratory testing of ELISA kit ( $\beta$ -Lactoglobulin ELISA Set, SEDIUM R&D) for detection of cow  $\beta$ -Lg in sheep milk order to obtain high-quality, reliable and economically advantageous method suitable for routine use in practice. The results shown that for the quality of adulteration determination it is necessary to verify the sensitivity of applied kit by the samples dilution in accordance with the producer declared quantification range contained in the manual ELISA kit. The starting point for obtaining of relevant data was to create separate regression curves with high determination coefficient, which allowed to quickly and easily detect the cow milk additions in sheep milk, cloddy sheep and Slovak sheep cheese.

**Keywords:** cow milk, sheep milk, sheep cheese, adulteration, ELISA

### ÚVOD

Podľa komisie EÚ pre autentifikáciu potravín, musia mať autentické potraviny definovaný pôvod, obsah a kvalitu a musia pochádzať zo špecifikovaných zdrojov (Hurley et al., 2004a).

Ochrana záujmov spotrebiteľa je ošetrená v Nariadení (ES) č. 178/2002 EP a Rady, pričom článok 8 (potravínové právo) sa zameriava na predchádzanie podvodným alebo nekalým postupom falšovania potravín a akýmkoľvek iným postupom, ktoré môžu spotrebiteľa viesť do omylu.

S problematikou falšovania mlieka je spätý Výnos MP SR a MZ SR č. 1187/2004-100, ktorým sa vydáva hlava Potravinového kódexu Slovenskej republiky upravujúca označovanie potravín v znení neskorších predpisov (harmonizovaná legislatíva). Problematikou falšovania mlieka sa zaoberá aj Výnos MP SR a MZ SR č. 2143/2006 – 100, ktorým sa vydáva hlava Potravinového kódexu Slovenskej republiky upravujúca mlieko a výrobky z mlieka a ktorý je neharmonizovanou legislatívou. V harmonizovanej i neharmonizovanej legislatíve Slovenskej republiky je zadefinované, aké mlieko, prípadne, aký výrobok z tohto mlieka sa môže označiť ako ovčie, kozie.

Keďže ovčie a kozie mlieko sú podstatne drahšie ako kravské mlieko a ich produkcia je sezónna, rozšírilo sa falšovanie ovčích a kozích syrov nedeklarovanou prísadou kravského mliečnej zložky (Piknová et al., 2002). V mnohých krajinách má detekcia falšovania syrov mimoriadny význam najmä z hľadiska zachovania tradícií ich výroby. Z uvedeného dôvodu získali mnohé syry tzv. ochrannú značku originality (PDO – protected designation of origin), čo znamená, že sú vyrobené z jedného druhu mlieka a v označení je táto skutočnosť deklarovaná (De La Fuente, Juárez, 2005). V kontexte s uvedeným dňa 17. júla 2008 bolo v Úradnom vestníku Európskej únie zverejnené Nariadenie Komisie (ES) č. 676/2008 zo 16. júla 2008, ktorým sa do Registra chránených označení pôvodu a chránených zemepisných označení zapisujú určité názvy a medzi nimi i náš výrobok Slovenská bryndza.

Mlieko jednotlivých cicavcov je možné rozdeliť podľa zastúpenia hlavných druhov bielkovín na mlieka kazeínové

a albumínové. Kazeínové mlieka produkujú prežúvavce a relatívny obsah kazeínového komplexu tu presahuje 75 % celkového obsahu dusíka. Albumínové mlieka produkujú mäsožravce, všežravce a byľožravce s jednoduchým žalúdkom (Gajdúšek, 2003; Buňka et al., 2009). Najväčší podiel čistých bielkovín (priemerne 80 %) pripadá na bielkoviny kazeínového komplexu. Jedným zo základných znakov kazeínového komplexu je jeho precipitácia pri pH 4,6 (Madureira et al., 2007). Kazeín kravského mlieka predstavuje komplex štyroch fosfoproteínových frakcií označovaných ako  $\alpha_{S1}$ -,  $\alpha_{S2}$ -,  $\beta$ - a  $\kappa$ -kazeíny. Proteíny kazeínového komplexu sú polymorfné, z čoho vyplýva, že u jednotlivých genetických variantov sa primárna štruktúra konkrétnej frakcie môže mierne odlišovať. Hlavne v staršej literatúre sa ďalej objavujú zmienky o  $\gamma$ -kazeínoch a  $\lambda$ -kazeínoch, ktoré sú však v skutočnosti iba fragmentmi základných frakcií  $\beta$ -kazeínu, resp.  $\alpha_{S1}$ -kazeínu (Farrell et al., 2004).

Približne 20 % čistých bielkovín tvoria tzv. srvátkové proteíny, ktoré sa nezrážajú pri pH 4,6. Medzi srvátkové proteíny zahrňujeme hlavne  $\alpha$ -laktalbumín ( $\alpha$ -La),  $\beta$ -laktoglobulín ( $\beta$ -Lg), sérový albumín (SA), imunoglobulíny, proteázo-peptónovú frakciu, enzýmy a iné minoritné bielkoviny (Madureira et al., 2007). Obsah jednotlivých frakcií srvátkových bielkovín sa líši podľa druhu mlieka (tabuľka 1).

Hlavnou frakciou srvátkových proteínov v mlieku prežúvavcov je  $\beta$ -Lg (Mc Kenzie, 1991). Kým u kravského mlieka je známych 7 genetických variantov  $\beta$ -Lg, tak v ovčom mlieku sa potvrdili 2 genetické varianty  $\beta$ -Lg označené ako A a B (Pintado, Malcata, 1999).

Technologické vlastnosti mlieka z hľadiska výroby syrov sú podmienené radou faktorov a majú vplyv na kvalitu syrov a ekonomiku výroby. Rozhodujúci vplyv má obsah a zastúpenie bielkovín v mlieku. Vplyv genetického polymorfizmu bielkovín na zloženie mlieka je popísaný u fenotypov jednotlivých kazeínových frakcií,  $\beta$ -Lg, u stupňa glykolyzácie  $\kappa$ -kazeínu, u obsahu minerálnych látok, hlavne vápnika a u veľkosti kazeínovej micely (Böhmová, Černý, 1994).

**Tabuľka 1** Zloženie a obsah srvátkových proteínov v surovom mlieku kráv, kôz a oviec (Hurley et al., 2004b)

Srvátkové proteíny	Kravské mlieko	Kozie mlieko	Ovčie mlieko
	Celkom [%]		
Imunoglobulíny	15,0	11,5	20,0
Sérumalbumín/laktoferín	9,5	12,8	8,1
β-laktoglobulín	59,3	54,2	61,1
α-laktoalbumín	16,2	21,4	10,8
Koncentrácia [g.l <sup>-1</sup> ]			
Imunoglobulíny	0,97	0,71	2,15
Sérumalbumín/laktoferín	0,61	0,79	0,87
β-laktoglobulín	3,83	3,33	6,58
α-laktoalbumín	1,05	1,31	1,16
Srvátkové proteíny celkom	6,46	6,14	10,76

Z výživového hľadiska je optimálne, aby sa v prostredí mlieka a mliečnych výrobkov uhradili asi dve tretiny odporúčanej dávky vápnika a tie by mali byť rozdelené v pomere 1: 1 : 1 medzi syry, mlieko a zakysané mliečne výrobky (Fatrčová-Šramková, 2009). Zvlášť syry majú široké využitie v gastronómii. Do teplých i studených pokrmov sa pridávajú postrúhané, našľahané, obalené, či vyprášané a zapekané syry (Habánová, 2004). V poslednom desaťročí sa zvýšil počet experimentov a štúdií dokumentujúcich priaznivý terapeutický účinok syrov pri niektorých chorobných stavoch. Z hľadiska ich využitia v praxi je mimoriadne významný ich lokálny, celkový a biomedicínsky účinok, inhibičný efekt voči patogénom, optimalizačný vplyv na tráviace procesy a anticholesterolová aktivita (Lengelyová et al., 2010).

Fyziologické odchýlky v zložení mlieka majú veľký vplyv na kvantitatívny dôkaz použitej analytickej metódy (Schilk, 1995; Can, 1996). V potravinovej analýze je ELISA najpoužívanejšia forma imunoanalýzy, pretože redukuje cenu vybavenia a je ľahko použiteľná, rýchla, pohotová a automatizovaná (Giovannacci et al., 2004; Hurley et al., 2004b). Vysoká špecifickosť tejto metódy sa odráža aj v koncentračných jednotkách, v ktorých sa celosvetovo vyjadrujú výsledky ELISA, a to buď ppm (mg.kg<sup>-1</sup>) alebo ppb (μg.kg<sup>-1</sup>). Za hlavné výhody sa považuje spracovanie veľkého množstva vzoriek, vytvorenie kalibračnej krivky a premeranie slepých vzoriek súčasne na jednej mikrotitračnej doštičke, čo eliminuje vplyv meniacich sa podmienok počas stanovenia (Stejskal et al., 2008). ELISA má aj nevýhody napr. v tom, že deteguje neporušené bielkoviny, ale bielkovinové hydrolyzáty nemusia imunologicky reagovať. Iným negatívom je, že spracovateľské operácie môžu znížiť rozpustnosť bielkovín, vyvolať chemické modifikácie, čo môže mať vplyv na viazanie protilátok na epitopy v systéme ELISA (Taylor et al., 2009).

Hlavným cieľom našej práce bola optimalizácia ELISA metódy na detekciu falšovania ovčieho mlieka a výrobkov z neho kravským mliekom v laboratórnych podmienkach. V zmysle uvedeného sme sa zamerali na laboratórne skúšanie ELISA testu (β-Lactoglobulin ELISA kit, SEDIUM R&D) založeného na detekcii boviného β-Lg

s cieľom získať kvalitnú, spoľahlivú a ekonomicky výhodnú metodiku vhodnú na rutinné použitie v praxi.

## MATERIÁL A METÓDY

Pri zostavovaní metodiky práce sme vychádzali z poznatkov získaných štúdiom vedeckej literatúry, ako aj z výsledkov výskumných projektov, ktoré boli zamerané na detekciu falšovania mlieka a syrov v niektorých európskych krajinách. Laboratórne analýzy sme uskutočnili na Katedre hodnotenia a spracovania živočíšnych produktov (príprava vzoriek) a na Katedre hygieny a bezpečnosti potravín FBP (detekcia falšovania ELISA testami). Surové ovčie mlieko získané zo salaša v Nitrianskom kraji a surové kravské mlieko odobrané z prvovýroby bolo ihneď po odbere uchovávané pri teplote 6 °C a následne spracované v zmysle stanovených cieľov. Surové ovčie mlieko, surové kravské mlieko, ako aj tepelne ošetrené kravské mlieko sme zmiešavali v stanovených pomeroch (0; 0,5; 5; 47 % kravského podielu v skúmanej vzorke ovčieho mlieka). Kravské mlieko sme pasterizovali pri 72 °C po dobu 15 sekúnd a 85 °C po dobu 3 sekundy. Zo vzniknutých mliečnych zmesí sme následne vyrábali hrudkový syr a bryndzu. Všetky vyrobené produkty sme analyzovali vybraným ELISA testom.

*Príprava vzoriek syrov:* Surové mlieko sme pred analýzou kvalitatívne vyšetrili s cieľom zistiť jeho technologické vlastnosti súvisiace s výrobou syrov. V zmysle uvedeného sme uskutočnili skúšku syriteľnosti a pre jej zlepšenie sme do jednotlivých vzoriek v závislosti od stupňa tepelného ošetrenia pridali od 1 – 2,5 ml CaCl<sub>2</sub> na 1 l. Po vzájomnom zmiešavaní obidvoch druhov mliek nasledovalo vlastné syrenie mlieka, spracovanie syreniny, obrátenie povrchu syreniny, jej krájanie, harfovanie a miešanie a nakoniec formovanie hrudkového syra. Vzniknuté hrudky sme následne ošetrovali 2 % roztokom NaCl a nechali zrieť pri teplotách zodpovedajúcich technologickým požiadavkám (23 °C, 19 °C a nakoniec 8 °C). Počas 12 dní sme okrem monitorovania teploty merali aj pH v jednotlivých hrudkách. S cieľom vyrobiť bryndzu sme jednotlivé hrudky syrov rozdrobili, pridali do nich 2 % soli, natlačili do kadičiek a nechali zrieť ďalšie 4 dni. Po ukončení prípravnej fázy sme jednotlivé vzorky analyzovali v zmysle požiadaviek výrobcu ELISA testu. Dosiahnuté výsledky boli interpretované použitím STAT FAX 321/plus microwell reader (Awareness Technology, Palm City, FL) pri vlnovej dĺžke 450 nm.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

**Cieľom práce bolo optimalizovať ELISA** založenú na detekcii kravského β-Lg v ovčom mlieku a výrobkoch z neho v laboratórnych podmienkach. V zmysle uvedeného sme sa zamerali na:

výber najvhodnejšieho metodického postupu s dôrazom na zhodnotenie citlivosti ELISA metódy pri rôznych modelových situáciách

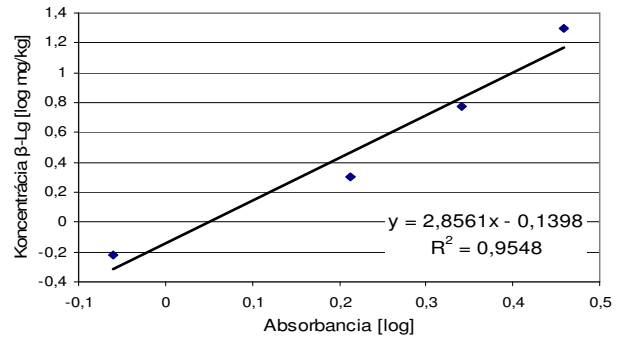
voľbu optimálneho riedenia supernatantu, ktoré v laboratórnej praxi (ak je prímes deklarovaná v označení) umožní rýchlejšie detegovať nežiaduce medzidruhové falšovanie mlieka a jeho výrobkov

V súlade s inštrukciami testu sme vykonali laboratórnu analýzu 27 vzoriek ovčieho mlieka, z neho vyrobenej hrdky a bryndze, ktoré sme na začiatku úmyselne kontaminovali rôznymi prídavkami kravského mlieka (0; 0,5; 5; 47 % kravského podielu v skúmanej vzorke ovčieho mlieka). Detekcii falšovania ovčieho mlieka a výrobkov z neho predchádzala fáza prípravy vzoriek, ktorá je popísaná v časti Materiál a metodika a ktorá v princípe spočívala vo východiskovej úprave vzoriek pred analýzou ELISA testami a v špecifickej príprave vzoriek na analýzu ELISA testami, na ktorú nadväzovalo vlastné vykonanie laboratórneho skúšania a jeho vyhodnotenie.

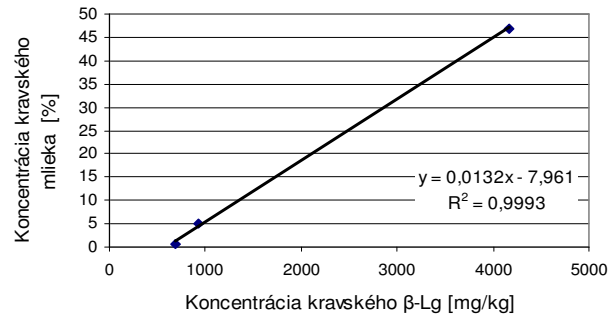
Pri hodnotení výsledkov sme aplikovali požiadavky výrobcu vybraného ELISA testu, no z hľadiska objektívneho hodnotenia kvality testu sme použili aj vlastné hodnotiace postupy. Keďže detekčné rozpätie použitého ELISA testu sa pohybovalo v rozmedzí 0,2 – 20 ppm a výrobca v návode presne neurčuje stupeň riedenia supernatantu získaného z jednotlivých druhov vzoriek pred aplikáciou do mikrotitračných doštičiek, bolo nutné v prvej fáze pokusu vybrané vzorky pred vlastnou analýzou nariediť v zmysle desiatkového riedenia ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$ ). Pri riedení ostatných vzoriek sme postupovali podľa výsledkov dosiahnutých v prvej fáze, pričom ďalšie informácie sme získali jednak z dostupných vedeckých literárnych zdrojov, ako aj od výrobcu analyzovaného testu.

Východiskom pre získanie relevantných údajov bolo vytvorenie kalibračnej krivky (obr. 1) zo štandardov nachádzajúcich sa v testovacej sade. Jednotlivé koncentrácie  $\beta$ -Lg kravského mlieka vo vzorkách (vyjadrené v ppm, resp.  $\text{mg.kg}^{-1}$ ) sme určili interpoláciou ich absorbancie na kalibračnej krivke. S cieľom kvalitatívne determinovať podiel kravského  $\beta$ -Lg v % sme pre každý spôsob tepelného ošetrenia vytvorili sériu osobitných regresných kriviek (obr. 2, 3, 4), pričom sme pomocou regresných rovníc matematicky definovali priebeh jednotlivých lineárnych funkcií. Tie stúpali úmerne so zvyšujúcou sa koncentráciou falšovaného podielu (0,5; 5 a 47 %), čo umožňovalo presnejšie určiť závislosti medzi koncentráciou prímеси kravského mlieka vo vzorke (%) a koncentráciou  $\beta$ -Lg vo vzorke ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ). Ako vyplýva z obr. 2, závislosť medzi koncentráciou kravského mlieka (os y) a  $\beta$ -Lg (os x) je lineárna a dá sa vyjadriť regresnou rovnicou s koeficientom determinácie 0,999, čo dáva predpoklad spoľahlivého stanovenia prímеси kravského mlieka v surovom ovčom mlieku. Rovnako aj vo vzorkách syra a bryndze je možné na základe koncentrácie  $\beta$ -Lg interpolovať koncentráciu prímеси kravského mlieka, pričom koeficient determinácie získanej regresnej rovnice mal hodnoty 0,964 (obr. 3) a 0,965 (obr. 4). U ostatných vzoriek zaradených do pokusu nebolo možné zostrojiť krivku závislosti medzi koncentráciou kravského mlieka a  $\beta$ -Lg z dôvodu prekročenia kvantifikačného limitu ELISA testu.

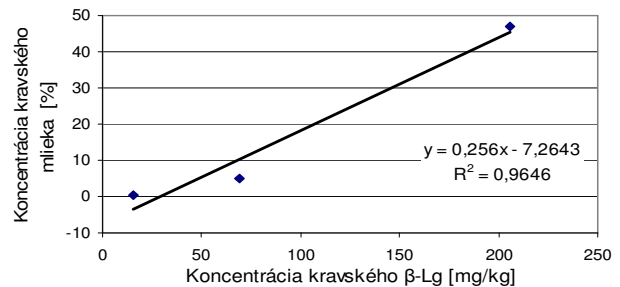
Ako sme už uviedli, v súlade s producentom deklarovaným kvantifikačným rozsahom obsiahnutým v manuáli k ELISA súprave, možno korektné kvantifikovať kontamináciu medzi 0,2 – 20 ppm ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) prítomného kravského  $\beta$ -Lg v skúmaných vzorkách. Hodnoty absorbancií vyššie, resp. nižšie ako uvedený detekčný limit nemožno spoľahlivo kvantifikovať a teda ani vyhodnotiť.



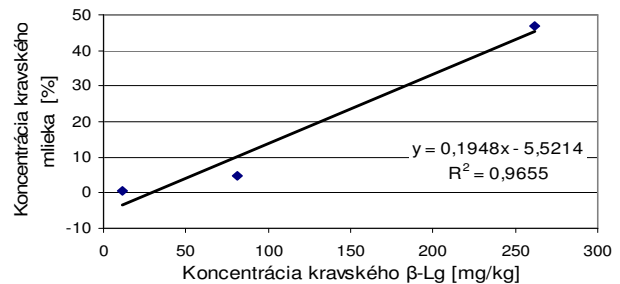
Obr. 1 Kalibračná krivka na detekciu kravského  $\beta$ -Lg



Obr. 2 Lineárna funkcia s rovnicou regresie pre prepočet koncentrácií  $\beta$ -Lg surového kravského mlieka vo vzorkách ovčieho mlieka



Obr. 3 Lineárna funkcia s rovnicou regresie pre prepočet koncentrácií  $\beta$ -Lg surového kravského mlieka vo vzorkách syrov



Obr. 4 Lineárna funkcia s rovnicou regresie pre prepočet koncentrácií  $\beta$ -Lg surového kravského mlieka vo vzorkách bryndze

Výsledky, ktoré sme dosiahli pri našich analýzach, sú prezentované v tab. 2. Väčšina vzoriek bola úspešne kvantifikovaná (hodnoty ppm, ktoré sa nachádzali v producentom garantovanom kvantifikačnom rozsahu použitého kitu), no iba vďaka ich niekoľnásobnému

riedeniu pred vlastnou analýzou. U niektorých vzoriek z hľadiska kvalitnejšej determinácie navrhujeme zvýšiť riedenie o jeden desiatkový poriadok, nakoľko aj v nami použitom riedení sme prídavok kravského mlieka nedetegovali. Je dôležité počítať aj s chybami, ktoré vznikajú v priebehu celého procesu kvantifikácie (vzájomné zmiešavanie mlieka, pipetovanie, riedenie, meranie absorbancí na spektrofotometri, či chyby samotných ELISA testov uvádzaných výrobcov). Napriek uvedeným skutočnostiam možno konštatovať, že hoci je

nami skúmaný ELISA test zameraný hlavne na detekciu nízkych koncentrácií kravského  $\beta$ -Lg, možno ho pri dodržaní určitých laboratórnych postupov aplikovať aj pri detekcii falšovania nebovinného mlieka a výrobkov z neho. Predpokladom kvalitnej determinácie falšovania je laboratórne overenie citlivosti každého použitého kitu nariadením vzoriek v súlade s producentom deklarovaným kvantifikačným rozsahom obsiahnutým v manuáli k ELISA súprave.

Tab. 2 Výsledky detekcie  $\beta$ -Lg kravského mlieka v zmesi mlieka, syrov a bryndze

		Koncentrácia kravského mlieka [%] v ovčom mlieku					
		0,5		5		47	
Spôsob tepelného ošetrenia kravského mlieka	Druh vzorky	absorb.	mg.kg <sup>-1</sup>	absorb.	mg.kg <sup>-1</sup>	absorb.	mg.kg <sup>-1</sup>
Surové mlieko	mlieko	2,201	689,9 (c)	2,441	927,1 (c)	1,85	4159,5 (d)
	syр	<b>2,901</b>	— (a!)	2,206	69,4 (b)	1,22	207 (c)
	bryndza	2,614	11,3 (a!)	2,333	81,5 (b)	1,405	262,2 (c)
Pasterizácia (72 °C, 15 s)	mlieko	<b>3</b>	— (b!)	2,63	1147,2 (c)	0,904	1252 (d)
	syр	<b>2,901</b>	— (a!)	2,316	79,8 (b)	1,149	187,2(c)
	bryndza	2,74	12,9 (a!)	2,569	107,3 (b)	1,886	429,6 (c)
Pasterizácia (85 °C, 3 s)	mlieko	<b>3</b>	— (b!)	1,845	416,8 (c)	1,072	883,9 (d)
	syр	2,695	12,3 (a!)	2,155	64,9 (b)	1,957	493,2 (c)
	bryndza	2,722	12,7 (a!)	2,359	84,1 (b)	2,173	665,1 (c)

Druh použitého riedenia: 10<sup>0</sup> (a); 10<sup>-1</sup> (b); 10<sup>-2</sup> (c); 10<sup>-3</sup> (d); zvýšiť riedenie (!); — nedetegovateľné

## ZÁVER

Hlavným cieľom práce bola **optimalizácia sendvičovej ELISA** metódy na detekciu falšovania ovčieho mlieka a výrobkov z neho v laboratórnych podmienkach. Zamerali sme sa na otestovanie zvoleného metodického postupu s dôrazom na kvalitu a opakovateľnosť dosahovaných výsledkov v rôznych modelových situáciách.

Je nutné podotknúť, že skúmaná ELISA súprava patrí do skupiny metód zameraných na detekciu alergénov nachádzajúcich sa v potravinách vo veľmi nízkych koncentráciách (mg.kg<sup>-1</sup>). S cieľom detegovať rôzne prídavky kravského mlieka v ovčom mlieku a výrobkoch z neho sme postupovali podľa pokynov výrobcu testu, ako aj podľa vlastného metodického postupu. Ako sme už uviedli, výrobca ELISA testu jednoznačne nedefinuje spôsob ďalšieho riedenia získaného supernatantu pred jeho aplikáciou do mikrotitračných doštičiek. Z našich pokusov vyplýva, že pre kvalitnejšiu determináciu najmä nízkych koncentrácií je potrebné nájsť vhodné riedenie pre rôzne koncentrácie kravského mlieka v kontexte so spôsobom ich tepelného ošetrenia, ako aj ďalšieho technologického spracovania, čo je aj bežnou laboratórnou praxou. Východiskom pre získanie relevantných údajov bolo v našom výskume vytvorenie osobitných regresných kriviek s vysokým koeficientom determinácie, ktoré umožnili rýchlo a ľahko detegovať prídavky kravského mlieka v ovčom mlieku, hrudkovom syre a bryndzi. Domnievame sa, že získané výsledky môžu prispieť k aplikácii otestovaných riedení v rámci jednotlivých falšovaných pomerov v prípade, ak sú podiely kravského mlieka deklarované v označení na

obaloch výrobkov (najmä syrov, či bryndze). Záverom možno konštatovať, že optimalizácia ELISA testov, ktoré sa použijú na detekciu kravského mlieka v ovčom mlieku a výrobkoch z neho si bude vyžadovať ďalšie laboratórne skúmanie s cieľom získať kvalitnú, spoľahlivú a ekonomicky výhodnú metodiku vhodnú na rutinné použitie.

## Acknowledgments:

This work was supported by grant project VEGA 1/0619/10 and KEGA 3/7255/09

## LITERATÚRA

- BÖHMOVÁ, J., ČERNÝ, V. 1994. Stanovení technologických vlastností mléka z hlediska výroby sýrů. Ministerstvo zemědělství, Národní agentúra pro zemědělský výzkum, č. R – 329 -142/2, 1992-1994.
- BUŇKA, F., BUŇKOVÁ, L., KRÁČMAR, S. 2009. *Základní principy výroby tavených sýrů*. Monografia. Brno : Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. 68 p. ISBN 978-80-7375-336-8.
- CAN, E. 1996. Entwicklung und Anwendung von enzymimmunologischen Verfahren zum Nachweis von Kuhmilch in Büffelmilch und käse: Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde. München : die Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, 1996, 92 p.
- DE LA FUENTE, M. A. M., JUÁREZ, M. 2005. Authenticity assessment of dairy products. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 2005, p. 563-585.
- FARRELL, H. M., JIMENEZ-FLORES, R., BLECK, G. T., BROWN, E. M., BUTLER, J. E. 2004. Nomenclature of the

- proteins of cow's milk – sixth revision. In *J. Dairy Sci.*, 87, 2004, p. 1641-1674.
- GAJDUŠEK, S. 2003. Laktologie. 1. vyd. Brno : MZLU. ISBN 80-7157-657-3.
- GIOVANNACCI, I., GUIZARD, C., CARLIER, M., DUVAL, V., MARTIN, J. L. 2004. Species identification of meat products by ELISA. In *Int. J. Food Sci. Tech.*, 39, 2004, p. 863-867.
- FATRCOVÁ-ŠRAMKOVÁ, K. 2009. Potravinová pyramída v detskom veku. In KERESTEŠ, J. a kolektív. 2009. *Biotechnológia, výživa a zdravie*. Považská Bystrica : Eminent, 2009. s. 479-485. ISBN 978-80-970205-9-0.
- HABÁNOVÁ, M. 2004. Využitie mlieka v gastronómii. In *Mliekarstvo*, 35, 2004, 3, p. 25.
- HURLEY, I. P., COLEMAN, R. C., IRELAND, H. E. 2004a. Measurement of Bovine IgG by Indirect Competitive ELISA as a Means of Detecting Milk Adulteration. In *J. Dairy Sci.*, 87, p. 543-549.
- HURLEY, I. P., COLEMAN, R. C., IRELAND, H. E. 2004b. Application of immunological methods for the detection of species adulteration in dairy products. In *Int. J. Food Sci. Tech.*, 39, 2004, p. 873-878.
- LENGYELOVÁ, L., PINTÉROVÁ, S., TRSTENIČOVÁ, E., KOZELOVÁ, D. 2010. Mliečne baktérie v jogurtoch na slovenskom trhu. In *Bezpečnosť a kontrola potravín* (zborník z medzinárodnej konferencie). Nitra : SPU. 2010, s. 39-43. ISBN 978-80-552-0350-8.
- MADUREIRA, A. R., PEREIRA, C. I., GOMES, A. M. P., PINTADO, M. E., MALCATA, F. X. 2007. Bovine whey proteins – overview on their main biological properties. In *Food Res. Int.*, 40, 2007, p. 1197-1211.
- Mc KENZIE, H. A. 1991.  $\beta$ -lactoglobulins. Milk proteins. In *Chem. molec. biology*, 12, 1991, p. 257-330.
- Nariadenie Komisie (ES) č. 676/2008 zo 16. júla 2008, ktorým sa do Registra chránených označení pôvodu a chránených zemepisných označení zapisujú určité názvy. Uverejnené v Úradnom vestníku 4. 10. 2007 (2007/C323/10).
- Nariadenie (ES) č. 178/2002 Európskeho parlamentu a Rady z 28. 1. 2002, ktorým sa ustanovujú zásady a požiadavky potravinového práva, zriaďuje Európsky úrad pre bezpečnosť potravín a stanovujú postupy v záležitostiach bezpečnosti potravín. Uverejnené v Úradnom vestníku Európskych spoločenstiev 1. 2. 2002 (L31/1).
- PIKNOVÁ, E., KRAHULCOVÁ, J., KUČHTA, T. 2002. Dôkaz kravskej mliečnej zložky v ovčích a kozích syroch polymerázovou reťazovou reakciou. In *Bulletin potravinárskeho výskumu*, 41, 2002, 3, s. 163-167.
- PINTADO, M. E., MALCATA, F. X. 1999. Studies on genetic variants of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin from milk of native Portuguese ovine and caprine breeds. In *Int. J. Food Sci. Tech.*, 34, 1999, p. 245-252.
- SCHILK, J. 1995. Enzymimmuntests für bovines Plasmin und caprines IgG – Nachweis von Kuh- und Ziegenmilch in Schafmilch: Inaugural Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde. München : die Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, 1995, 120 p.
- STEJSKAL, V., HAJŠLOVÁ, J., KOCOUREK, V. 2008. *Bioanalytické metody pro hodnocení bezpečnosti zemědělských surovin a produktů*. 2008. [online] [cit. 2010-06-04]. Dostupné na: <<http://www.phytopsanitary.org/?link/projekty/2008>>.
- TAYLOR, L. S. – NORDLEE, A. J. – NIEMANN, M. 2009. Allergen immunoassays – considerations for use of naturally incurred standards. In *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395, 2009, 1, p. 83-92.
- Výnos Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky a Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky zo 14. augusta 2006 č. 2143/2006 – 100, ktorým sa vydáva hlava Potravinového kódexu Slovenskej republiky upravujúca mlieko a výrobky z mlieka.
- Výnos Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky a Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky z 28. apríla 2004 č. 1187/2004-100, ktorým sa vydáva hlava Potravinového kódexu Slovenskej republiky upravujúca označovanie potravín v znení neskorších predpisov.

### Contact address:

Ing. Lucia Zeleňáková, PhD., Department of Food Hygiene and Safety, Faculty of Biotechnology and Food Science, Slovak Agricultural University in Nitra, Tr. A. Hlinku 949 76 Nitra. e-mail: Lucia.Zelenakova@uniag.sk

Ing. Radoslav Židek, PhD., Department of Food Hygiene and Safety, Faculty of Biotechnology and Food Science, Slovak Agricultural University in Nitra, Tr. A. Hlinku 949 76 Nitra. e-mail: Radoslav.Zidek@uniag.sk

doc. Ing. Margita Čanigová, CSc., Department for Evaluation and Processing of Animal Products, Faculty of Biotechnology and Food Science, Slovak Agricultural University in Nitra, Tr. A. Hlinku 949 76 Nitra. e-mail: Margita.Canigova@uniag.sk

Juraj Paulov, e-mail: paulovjuraj@gmail.com

Tatiana Gallisová, e-mail: tatiana.gallisova@seznam.cz