

Immunologiczne i elektroforetyczne wykrywanie zafałszowań mleka koziego i jego produktów mlekiem krowim

TADEUSZ STEFANIAK, JÓZEFA CHRZANOWSKA*, MARIA NIKOŁAJCZUK

Katedra Prewencji i Immunologii Weterynaryjnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław

*Katedra Technologii Surowców Zwierzęcych Wydziału Technologii Żywności AR, ul. Norwida 25/27, 50-375 Wrocław

Stefaniak T., Chrzanowska J., Nikołajczuk M.

Immunological and electrophoretical detection of adulterations in goats milk and its products by cows milk

Summary

The aim of the study was to detect the adulteration of goats milk products with cows milk. Polyacrylamid gel electrophoresis (PAGE), double immunodiffusion (ID) and counter-current immunoelectrophoresis (CIEP) were employed. Goat anti-bovine casein and goat anti-bovine milk whey proteins immune serum was produced.

In the immunoelectrophoresis method, 1% of cows milk addition in goats milk, casein or milk whey was detected, whereas 5% of cows milk in goats milk and cheese was detected when the PAGE method was employed.

The presence of cows milk proteins was detected in two out of ten commercial goats milk products by using CIEP. This observation confirms the efficacy of controlling the adulteration of goats milk products in veterinary inspection laboratories.

Keywords: goats milk, adulteration, CIEP.

W ostatnich latach nastąpił w Polsce wzrost zainteresowania hodowlą kóz i produkcją mleka koziego i jego przetworów. Produkcja ta jest jednak wciąż niewielka, co przy rosnącym w społeczeństwie zapotrzebowaniu na mleko kozie powoduje, że jego cena znacznie przewyższa cenę mleka krowiego. Taka sytuacja stwarza niebezpieczeństwo fałszowania mleka koziego kilkakrotnie tańszym mlekiem krowim. Taka praktyka niesie określone zagrożenia np. dla dzieci uczulonych na składowe mleka krowiego, żywionych zastępczo mlekiem kozim. W wielu innych krajach europejskich praktyka taka ma miejsce, najczęściej fałszowane jest tam mleko kozie lub owcze mlekiem krowim (1, 2, 10, 15, 19, 21-24). W Grecji natomiast tańsze jest mleko kozie i nim fałszowane jest mleko krowie (9).

Do wykrywania zafałszowań mleka koziego lub owczego mlekiem obcogatunkowym stosowano m.in. metody elektroforetyczne (1, 2, 8, 11, 17, 26), w tym ogniskowanie izoelektryczne (2, 17) oraz metody chromatograficzne (8, 19, 23, 28). Spośród metod immunologicznych potwierdzono przydatność kompetycyjnego testu ELISA (7, 21, 22) sandwich ELISA (15, 24), pośredniego testu ELISA (4), immunoblottingu (17), immunodottingu (5) i metod immunoprecypita-

cyjnych, np. immunodyfuzji podwójnej (27) i radialnej (1, 2), immunoelektroforezy przeciwbieżnej (27), immunoelektroforezy krzyżowej (10).

Do immunologicznego wykrywania składowych mleka krowiego stosowano mono- i poliklonalne przeciwciała skierowane przeciw kazeinie $-\alpha_{S1}$, (21, 22) $-\beta$ (4), i $-\kappa$ (7) oraz przeciw białkom serwatki (5, 12, 20), a spośród nich przeciw β -laktoglobulinie (13, 15) i immunoglobulinie G mleka (1, 24).

Celem niniejszych badań było określenie przydatności metody elektroforetycznego rozdziału białek i wybranych technik immunoprecypitacyjnych do wykrywania obecności składników mleka krowiego w mleku kozim i jego przetworach.

Materiał i metody

Otrzymywanie antygenów do produkcji przeciwciał. Kazeinę uzyskano z mleka krowiego przez jej wytrącenie w punkcie izoelektrycznym wg McMeekin i wsp. (16). Białka serwatkowe wydzielono z serwatki kwasowej, po uprzednim jej oddializowaniu i zliofilizowaniu.

Otrzymywanie surowic odpornościowych. Uzyskane i oczyszczone preparaty antygenowe, w postaci zemułgowanej z kompletnym adjuwantem Freund'a (Calbiochem),

podawano kozom śródskórnym w wiele miejsc. Dawki immunizacyjne podawano pięciokrotnie w odstępach 14 dni. Dwanaście dni po ostatniej iniekcji pobierano krew z żyły szyjnej zewnętrznej i uzyskiwano surowicę, którą przechowywano w -20°C do momentu użycia.

Kontrola swoistości surowic odpornościowych. Immunologiczną reaktywność uzyskanych surowic odpornościowych kontrolowano metodą immunodyfuzji dwukierunkowej wg Ouchterlony (18) i immunoelektroforezy wg Scheidegger (25), wobec handlowej kazeiny krowiej (Serva) oraz białek mleka krowiego i koziego uzyskanych we własnym zakresie.

Przygotowywanie prób mleka i jego produktów do badań immunoprecypitacyjnych. Przygotowano mieszaniny serwatki mleka koziego zawierające dodatek: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 50, 100% serwatki mleka krowiego oraz w takich samych proporcjach mieszaniny kazeiny mleka koziego i krowiego. Serwatkę mleka dializowano przed użyciem do PBS pH 7,3 i używano w stanie nierozcieńczonym, natomiast kazeinę w stężeniu 10 g/L solubilizowano w buforze boraks-HCl, pH 8,4 i tę próbkę inkubowano w łaźni wrzącej przez 3 minuty.

Immunoprecypitacyjne techniki wykrywania składników mleka krowiego. Porównano przydatność do wykrywania zafałszowań mleka koziego i jego produktów metod immunodyfuzji podwójnej (ID) wg Ouchterlony (18) i immunoelektroforezy przeciwbieżnej (countercurrent immunoelectrophoresis, CIEP) wg Lang i Haan (14).

Przygotowanie prób mleka do badań elektroforetycznych. Sporządzano mieszaniny surowego mleka koziego i krowiego dodając mleko krowie w ilości 0, 1, 5, 20 i 50% objętości. Użyte do badań zbiorcze mleko kozie pochodziło z prywatnego gospodarstwa (stado liczyło 80 sztuk kóz polskich w typie białej uszlachetnionej), a zbiorcze mleko krowie (od krów ncb x hf) z uczelnianego zakładu doświadczalnego.

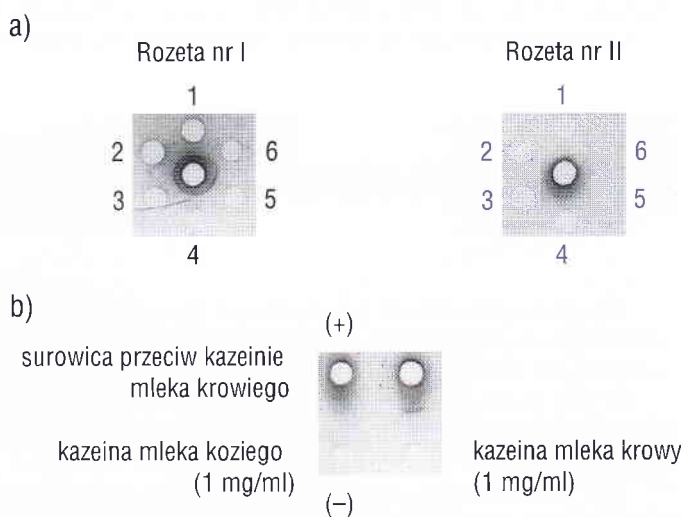
Próby mleka do elektroforezy rozcieńczano 8M roztworem mocznikiem (1:9 v/v). Z mieszanek mleka koziego i krowiego kazeinę wydzielano precypitacją w pI (pH 4,6), a serwatkę oddzieloną wirowaniem rozcieńczano buforem elektrodowym Tris-glicyna o pH 8,3 (1:1 v/v). Kazeinę rozpuszczano w 8M moczniku do końcowego stężenia 1%. Do 1 ml tak przygotowanych roztworów dodawano 0,3 ml glicerolu i 0,02 ml błękitu bromofenolowego. Do elektroforezy nanoszono 20 μl każdej próby na studzienkę.

Elektroforeza białek mleka. Rozdział elektroforetyczny wszystkich białek mleka i wydzielonej kazeiny prowadzono w 10% żelu poliakrylamidowym z dodatkiem 4,5 M mocznika w buforze Tris-glicyna o pH 8,3 (3). Elektroforezę białek serwatki prowadzono w analogicznych warunkach, ale z pominięciem dodatku mocznika do żelu. Żele po wybarwieniu 1% roztworem czerni amidowej denzytometriowano w aparacie Kipp & Zonnen-Densitometer DD2 przy długości fali 580-650 nm.

Wykrywanie zafałszowań serów kozich. W celu wykrycia ewentualnego zafałszowania mlekiem krowim, poddano badaniom 10 prób kozich serów handlowych; tylko w jednym przypadku producent deklarował dodatek 40% mleka krowiego. Ser do analiz przygotowano rozpuszczając go wg procedury stosowanej w badaniu kazeiny.

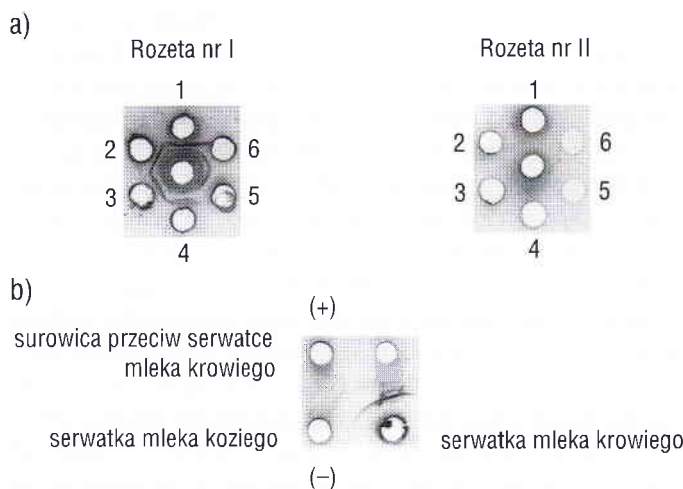
Wyniki i omówienie

Immunologiczne wykrywanie zafałszowań kazeiny i serwatki. Immunologiczne wykrywanie obecności składników mleka krowiego w mleku kozim przeprowadzono przy użyciu uzyskanych we własnym zakresie koziej surowicy przeciw białkom serwatki mleka krowiego oraz koziej surowicy przeciw kazeinie mleka krowiego. Wyniki kontroli swoistości uzyskanych surowic odpornościowych przedstawiają ryc. 1 i 2. Surowica przeciw kazeinie mleka krowiego wykazywała pojedynczą linię precypitacyjną wobec kazeiny mleka krowiego, natomiast nie reagowała z kaze-



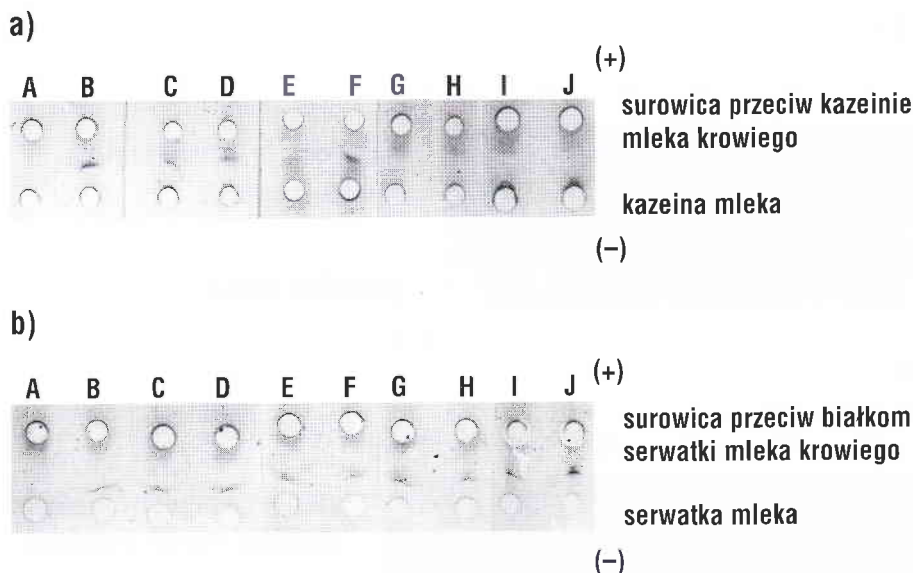
Ryc. 1. Kontrola swoistości surowicy koziej przeciw kazeinie mleka krowiego

a) w immunodyfuzji podwójnej wg Ouchterlony (18). Do dołka centralnego rozety I naniesiono kazeinę mleka krowiego (1 mg/ml), a do rozety II kazeinę mleka koziego (1 mg/ml). W dołkach obwodowych surowica kozy przeciw kazeinie mleka krowiego: 1) surowica pełna; 2) 1:2; 3) 1:4; 4) 1:8; 5) 1:16; 6) 1:32. b) w immunoelektroforezie przeciwbieżnej wg Lang i Haan (14).



Ryc. 2. Kontrola swoistości surowicy przeciw serwatce mleka krowiego

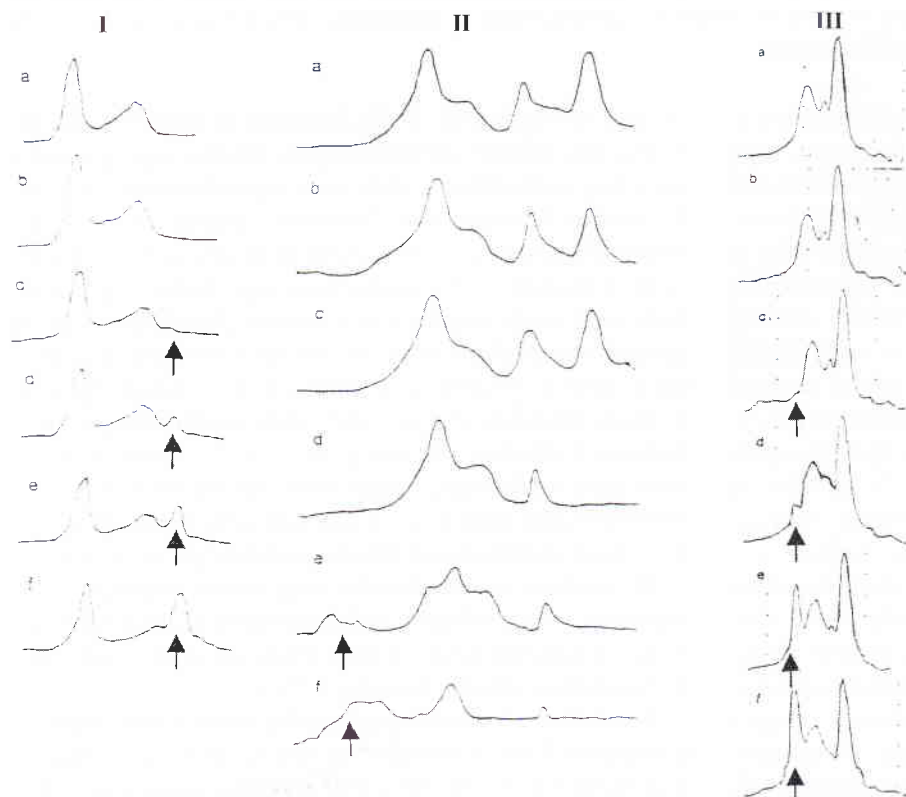
a) w immunodyfuzji podwójnej wg Ouchterlony (18). Do dołka centralnego rozety I naniesiono serwatkę mleka krowiego, a do rozety II serwatkę mleka koziego. W dołkach obwodowych surowica kozy przeciw białkom serwatki mleka krowiego: 1) surowica pełna; 2) 1:2; 3) 1:4; 4) 1:8; 5) 1:16; 6) 1:32. b) w immunoelektroforezie przeciwbieżnej wg Lang i Haan (14).



Ryc. 3. Wyznaczenie czułości wykrywania składowych mleka krowiego w teście immunoelektroforezy przeciwbieżnej

a) wykrywanie obecności kazeiny mleka krowiego w kazeinie mleka koziego przy użyciu surowicy przeciw kazeinie mleka krowiego. Do wszystkich dołków umieszczonych doanodowo naniesiono surowicę przeciw kazeinie mleka krowiego. Do dołków umieszczonych dokatodowo naniesiono kazeinę mleka koziego: A) bez dodatku kazeiny mleka krowiego; B) z dodatkiem 1% kazeiny mleka krowiego; C) 2%; D) 3%; E) 4%; F) 5%; G) 10%; H) 20%; I) 50%; J) pełna kazeina mleka krowiego.

b) wykrywanie obecności białek serwatki mleka krowiego w serwatce mleka koziego przy użyciu surowicy przeciw białkom serwatki mleka krowiego. Do wszystkich dołków umieszczonych doanodowo naniesiono surowicę przeciw białkom serwatki mleka krowiego. Do dołków umieszczonych dokatodowo naniesiono serwatkę mleka koziego: A) bez dodatku kazeiny mleka krowiego; B) z dodatkiem 1% kazeiny mleka krowiego; C) 2%; D) 3%; E) 4%; F) 5%; G) 10%; H) 20%; I) 50%; J) pełna serwatka mleka krowiego.



Ryc. 4. Denzytogramy białek kazeiny (I), serwatki (II) oraz mleka (III)

a) produkty kozie; b) dodatek 1% mleka krowiego; c) 5%; d) 20%; e) 50%; f) produkty krowie; strzałkami wskazano frakcje charakterystyczne dla mleka krowiego i jego produktów.

iną mleka koziego (ryc. 1. a i b). Surowica przeciw białkom serwatki mleka krowiego tworzyła trzy linie precypitacyjne z serwatką mleka krowiego, natomiast nie reagowała z serwatką mleka koziego (ryc. 2. a i b). W immunoelektroforezie wg Scheiddegger (25) wykazano 5 linii precypitacyjnych z serwatką mleka krowiego.

Zarówno w ID, jak i CIEP obie uzyskane surowice odpornościowe wykazały linie precypitacyjne we wszystkich mieszaninach zawierających białka mleka krowiego, czyli wykrywany był już 1% ich dodatek (wyniki CIEP przedstawia ryc. 3. a i b).

W przypadku wykrywania kazeiny mleka krowiego, immunoprecypitaty w próbkach zawierających od 1 do 10% kazeiny krowiej widoczne były już bezpośrednio po rozdziale elektroforetycznym. W próbkach z wysokim dodatkiem kazeiny mleka krowiego (20-100%) linie precypitacyjne pojawiały się po 24-godzinnej inkubacji preparatów w 4°C (ryc. 3. a), co wskazuje na nierównowagę proporcji antygen-przeciwciała w mieszaninach zawierających znaczny udział składników mleka krowiego. Dziesięciokrotne rozcieńczenie takich mieszanin (do końcowego stężenia białka mleka krowiego ok. 1 g/L), pozwalało na uzyskanie widocznych immunoprecypitatów bezpośrednio po rozdziale. W badaniach rutynowych, należałoby więc wstępnie doprowadzać zawartość białka całkowitego badanego produktu do dwóch stężeń: 1 g/L i 10 g/L i jednocześnie badać oba stężenia.

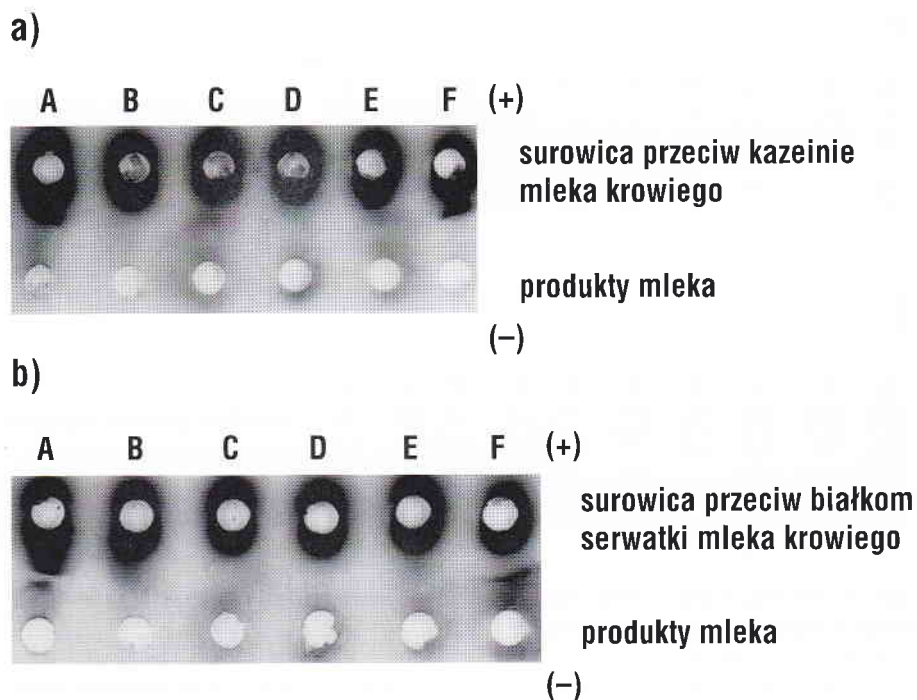
Jak się okazało, wykrycie składników mleka krowiego w metodzie immunoelektroforezy przeciwbieżnej było możliwe znacznie szybciej niż w immunodyfuzji podwójnej, a ponadto, umiejscowienie i wyrazistość immunoprecypitatów były łatwiejsze do odczytu. Dlatego do rutynowej diagnostyki zafałszowań mleka koziego i jego produktów, autorzy zalecają wybór metody immunoelektroforezy przeciwbieżnej.

Obie antysurowice wykorzystane w wykrywaniu zafałszowań produktów mleczarskich dawały wyniki porównywalne. Surowica skierowana

przeciw białkom serwatki mleka krowiego wykrywała ich obecność także w materiale poddanym krótkotrwałemu gotowaniu (np. w próbkach mleka koziego fałszowanego mlekiem krowy, w niektórych serach). Świadczy to o zachowaniu, pomimo denaturacji wysoką temperaturą, determinant antygenowych reagujących z przeciwciałami tej surowicy. Natomiast w badaniach innych autorów (12, 13, 15), krótkotrwałe gotowanie pozbawiało białka serwatki aktywności antygenowej. Jak się wydaje surowica przeciw białkom serwatki mleka może znaleźć zastosowanie szczególnie w kontrolowaniu mleka świeżego, natomiast w kontrolowaniu serów mogłaby być stosowana jako test pomocniczy.

Wykrywanie zafałszowań kazeiny metodą elektroforezy. Na ryc. 4. I. przedstawiono denzytogramy kazeiny wydzielonej z mleka koziego, krowiego oraz z ich mieszanek. Zaznaczyły się między nimi istotne różnice i dotyczyły obecności frakcji odpowiadającej ruchliwością elektroforetyczną krowiej α_{s1} -kazeinie. Udział procentowy tej frakcji wynosił od 0% w naturalnym mleku kozim do 35,48% w naturalnym mleku krowim. W mieszanek obydwu rodzajów mleka, jej udział był dodatnio skorelowany z ilością dodanego mleka krowiego do koziego, a jej jednoznaczne wykrycie było możliwe na poziomie nie mniejszym niż 5% (ryc. 4). Podobny próg wykrywalności zafałszowań mleka koziego mlekiem krowim w oparciu o analizę elektroforetyczną białek wykazali też inni autorzy (11). Oni również przyjęli jako wskaźnik α_{s1} -kazeinę. Jest to frakcja dominująca w kompleksie kazeiny mleka krowiego, w którym jej udział wynosi ok. 38%. Natomiast w kazeinie mleka koziego jej zawartość jest niższa i w zależności od genotypu może się wahać od 0 do 25%. Z badań własnych wynika, że użyte mleko pochodziło od kóz o genotypie związanym z niskim poziomem zawartości tego białka.

Wykrywanie zafałszowań serwatki metodą elektroforezy. Określono także możliwość wykrywania zafałszowań mleka koziego na podstawie analizy elektroforetycznej białek serwatkowych. W elektroforegramach białek serwatkowych surowego mleka koziego i krowiego widoczne były wyraźne różnice. Dotyczyły one zarówno ilościowego udziału poszczególnych pasm białek jak i ich ruchliwości elektroforetycznej. W mleku krowim największy udział jak i największą ruchliwość elektroforetyczną wykazywała β -laktoglobulina (β -1g), która wędrowała w formie dwóch pasm



Ryc. 5. Zastosowanie metody immunoelektroforezy przeciwbieżnej do wykrywania zafałszowań serów kozich

a) reakcja wybranych produktów mleka z surowicą przeciw kazeinie mleka krowiego
A) kazeina mleka krowiego; B) kazeina mleka koziego; C) ser handlowy kozi W; D) ser handlowy kozi T; E) ser handlowy deklarowany, jako kozi, zafałszowany mlekiem krowim; F) ser handlowy, produkowany z mieszaniny 40% mleka krowiego i 60% mleka koziego

b) reakcja wybranych produktów mleka z surowicą anty-serwatce mleka krowiego
A) kazeina mleka krowiego; B) kazeina mleka koziego; C) ser handlowy kozi W; D) ser handlowy kozi T; E) ser handlowy deklarowany, jako kozi, zafałszowany mlekiem krowim; F) ser handlowy, produkowany z mieszaniny 40% mleka krowiego i 60% mleka koziego.

β -1g A i β -1g B (ryc. 4. II). Stanowi to cechę charakterystyczną białek serwatkowych mleka tego gatunku zwierząt i umożliwia wykrycie jego obecności w mleku kozim lub owczym. Niemniej jednak, w zastosowanych warunkach ich wykrycie możliwe było dopiero przy dodatku 50% mleka krowiego do koziego. Białka te w przeciwieństwie do kazeiny charakteryzują się niską termostabilnością. W wyniku procesu pasteryzacji mleka następują w nich zmiany denaturacyjne (całkowita denaturacja tych białek może nastąpić po 5 minutach inkubacji w temp. 90°C (17). Zmiany denaturacyjne wpływają negatywnie na ruchliwość elektroforetyczną białek, co w konsekwencji utrudnia wykrywanie zafałszowań mleka poddanego ogrzewaniu.

W analizie elektroforetycznej mleka pełnego, najlepszym wskaźnikiem zafałszowania mleka koziego była α s-kazeina (ryc. 4. III). Próg jej wykrywalności był podobny jak dla kazeiny (5%).

Rozdziały elektroforetyczne kazeiny wydzielonej z uzyskanych we własnym zakresie jogurtów kozich (z dodatkiem 1, 5, 20, 50 i 100% mleka krowiego), pomimo zastosowanej wysokiej pasteryzacji mleka (90°C przez 10 min.) nie różniły się od elektroforegramów kazeiny mleka surowego. Na ich podstawie również możliwe było stwierdzenie już 5% dodatku mleka kro-

wiego do koziego. Analiza elektroforetyczna serwatki wydzielonej z tych jogurtów okazała się mniej przydatna (denaturacja białek).

Znacznie trudniejsze było elektroforetyczne wykrywanie zafałszowań w serach, w których wskutek procesów proteolitycznych obrazy elektroforetyczne białek ulegały głębokim zmianom.

Metodą immunoelektroforezy przeciwbieżnej przeprowadzono analizę 10 handlowych serów mleka koziego. Obecność dodatku mleka krowiego wykazano w 3 produktach, a tylko jeden producent deklarował dodatek 40% mleka krowiego. Na ryc. 5. a i b. przedstawiono obrazy reakcji serów kozich bez dodatku i z dodatkiem mleka krowiego z uzyskanymi surowicami diagnostycznymi. Wykazano, że w handlowych produktach z mleka koziego w Polsce stosowane są niezgodne z normą technologiczną dodatki mleka krowiego. To spostrzeżenie potwierdza celowość i nawet konieczność wdrożenia w laboratoriach kontroli jakości mleka, metod wykrywania zafałszowań mleka koziego i jego produktów mlekiem krowim.

Na skutek procesów technologicznych (np. dłużej trwająca obróbka cieplna, zaawansowany proces proteolizy w serach dojrzewających) może dojść do destrukcji determinant antygenowych wykrywanych przez uzyskane antysurowice (4). Wydaje się więc, że jednoczesne stosowanie surowicy przeciw białkom serwatki mleka i przeciw kazeinie bydlęcej, zwiększa prawdopodobieństwo wykrycia zafałszowania i zwiększy liczbę wykrytych produktów zawierających dodatki mleka krowiego. W celu zweryfikowania tego poglądu, a także przybliżenia określenia stopnia proteolizy serów, który jeszcze pozwala wykrywać antygeny swoiste dla białek mleka krowiego, wskazane byłoby jednoczesne przeprowadzenie, przy użyciu obu antysurowic, badań na większej liczbie handlowych próbek mleka koziego i jego produktów znajdujących się w obrocie w Polsce.

Podsumowując można stwierdzić, że zastosowane metody wykrywania zafałszowań mleka koziego mlekiem krowim są wystarczająco czułe i cechują się dużą prostotą wykonania oraz niskimi kosztami, w porównaniu do innych sposobów wykrywania zafałszowań mleka koziego. Mogą więc być polecane do rutynowej kontroli mleka koziego i jego produktów w laboratoriach terenowych.

Piśmiennictwo

- Amigo L., Ibanez J., Fernandez C., Santac Maria G., Ramos M.: Comparison of an electrophoretic and immunological method for the determination of goat and cow milk in cheese. *Milchwiss.* 1989, 44, 215-218.
- Amigo L., Ramos M., Calhan L., Barbosa M.: Comparison of electrophoresis, isoelectric focussing and immunodiffusion in determinations of cow's and goat's milk in Serra da Estrela cheeses. *Le Lait* 1992, 72, 95-101.
- Andrews A. T.: Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. *J. Dairy Res.* 1983, 50, 45-55.
- Anquita G., Martín R., García T., Morales P., Haza A. I., González I., Sanz B., Hernández P. E.: Indirect ELISA for detection of cow's, milk in ewes' and goats' milk using a monoclonal antibody against bovine β -casein. *J. Dairy Res.* 1995, 62, 655-659.
- Aranda P., Oria R., Calvo M.: Detection of cows' milk in ewes' milk and cheese by an immunodotting method. *J. Dairy Res.* 1988, 55, 121-124.
- Bedarida G., Trinchieri G., Carbonara A.: The detection of Australia antigen and anti-Au antibodies by a rapid procedure combining electrophoresis and immunoprecipitation. *Haematologica* 1969, 54, 591.
- Bitri L., Rolland M. P., Bensacon P.: Immunological detection of bovine caseinomacropptide in ovine and caprine dairy products. *Milchwiss.* 1993, 48, 367-371.
- Cartoni G., Coccioli F., Jasionowska R., Masci M.: Determination of cows' milk in goats' milk and cheese by capillary electrophoresis of the whey protein fractions. *J. Chromatogr.* 1999, A 846, 135-141.
- Chmielowski W., Rak L.: Metody wykrywania zafałszowań mleka i jego przetworów. *Przegl. Mlecz.* 1996, nr 4, 102-106.
- Elbertzhagen H., Wenzel E.: Nachweis von Kuhmilch in Schafkase mittels Immunelektrophorese. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1982, 175, 15-16.
- Furtado M. M.: Detection of cow milk in goat milk by polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Dairy Sci.* 1983, 66, 1822-1824.
- Garcia T., Martín R., Rodriguez E., Morales P., Hernandez P. E., Sanz B.: Detection of bovine milk in ovine milk by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Dairy Sci.* 1990, 73, 1489-1493.
- Kumanoff K. M., Beattie C. W.: Isolation of monoclonal antibodies monospecific for bovine β -lactoglobulin. *J. Dairy Sci.* 1991, 74, 3731-3740.
- Lang N., Haan J.: Nachweis präzipitierender Antikörper und nichtpräzipitierender Antikörper durch Überwanderungselektrophorese. *Int. Arch. Allergy.* 1957, 10, 305.
- Levieux D., Venien A.: Rapid, sensitive two-site ELISA for detection of cow's milk in goats' or ewes' milk using monoclonal antibodies. *J. Dairy Res.* 1994, 61, 91-99.
- McMeekin T. L., Hipp N. J., Groves M. L.: *Arch. Bioch. Biophys.* 1959, 38, 35-43.
- Moio L., Chianese L., Rivemale M., Addeo F.: Fast detection of bovine milk in Roquefort cheese with PhastSystem by gel isoelectric focussing and immunoblotting. *Lait*, 1992, 72, 87-93.
- Ouchterlony O.: Antigen-antibody reactions in gels. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 1949, 26, 507-515.
- Pellegrino L., Tirelli A., Resmini P., de Noni I.: Detection of cow milk in non-bovine cheese by HPLC of whey proteins. *Sci. Tec. Lattiero* 1991, 42, 87-101.
- Rodriguez E., Martín R., Garcia T., Hernandez P. E., Sanz B.: Detection of cows' milk in ewes' milk and cheese by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Dairy Res.* 1990, 57, 197-205.
- Rolland M.-P., Bitri L., Bensacon P.: Polyclonal antibodies with predetermined specificity against bovine α _{s1}-casein: application to the detection of bovine milk in ovine milk and cheese. *J. Dairy Res.* 1993, 60, 413-420.
- Rolland M.-P., Bitri L., Bensacon P.: Monospecificity of the antibodies to bovine α _{s1}-casein fragment 140-149: application to the detection of bovine milk in caprine dairy products. *J. Dairy Res.* 1995, 62, 83-88.
- Romero C., Perez-Andujar O., Olmedo A., Jimenez S.: Detection of cow's milk in ewe's or goats milk by HPLC. *Chromatographia*, 1996, 42, 181-184.
- Sauer C.: Entwicklung und Anwendung von enzymimmunologischen Verfahren zum Nachweis von Kuhmilch in Schaf und Ziegenmilch bzw. käse. *Praca dokt. Ludwig-Maximilians-Universität, München* 1992, s. 120.
- Scheidegger J. J.: Une micro-méthode de l'immunoelectrophorèse. *Int. Arch. Allergy* 1955, 7, 103-110.
- Szjarto L., van de Voort F. R.: Determination of added water and bovine milk to caprine milk. *J. Dairy Sci.* 1983, 66, 620-623.
- Stefaniak T., Chrzanowska J., Nikolajczuk M.: Zastosowanie metod immunologicznych do wykrywania zafałszowań mleka koziego mlekiem krowim. *Mat. II Kraj. Symp. Immunologów Wet., „Biologia molekularna w ochronie zdrowia ludzi i zwierząt”, Szczecin-Świnoujście, 8-10 maja 1997, s. 161.*
- Urbanke W., Luft W., Brandl E.: Einsatz der HPLC bei der Verfälschungskontrolle von Milch und Milchprodukten verschiedener Spezies. *Z. Lebensm. Untersuch.* 1992, 195, 137.