Duplex PCR을 이용한 유제품 안에 있는 산양유와 우유의 신속한 동정에 대한 연구

이승배* · 최석호

상지대학교 동물생명자원학부

Rapid Identification of Cow and Goat Milk in Milk Products Using a Duplex PCR Technique

Seung-Bae Lee* and Suk Ho Choi

Division of Animal Resources and Life Science, Sangji University, Gangwon 220-702, Korea

Abstract

A duplex PCR technique was applied for specific identification of cow and goat milk in milk products by using primers targeting the mitochondrial 12S rRNA gene. Duplex PCR using primers specific for cow and goat generated specific fragments of 223bp and 326bp from cow and goat milk DNA, respectively. Duplex PCR was applied to 15 milk products purchased from the market to verify label statements. The labeling statements of four market milk products, three yoghurt products, and one whole milk powder product were confirmed in the duplex PCR. The labeling statements of five of seven infant milk powder products were also confirmed by duplex PCR but the other two products were shown to be contaminated with either cow or goat milk. The proposed duplex PCR provides a rapid and sensitive approach to detection of as little as 0.1% cow milk in goat milk and one-step detection of cow or goat milk in milk products.

Key words: duplex PCR, milk products, species identification, goat milk, cow milk

서 론

우유와 우유제품은 식품알러지의 원인으로 알려져 있으며 심지어 적은 양의 우유단백질이 존재하는 경우에도 알러지를 일으킬 수 있다(Sampson, 2003; Wal, 2004). 하지만 산양유는 영양학적인 측면에서도 단백질 구조가 모유의 단백질 구조와 가장 유사하여 알러지나 설사 등의 부작용이 없을 뿐만 아니라 연질 curd의 생성은 케양식이요법으로 유용하며, 우유 단백질에 대하여 알러지를 일으키는 사람에게 산양유와 산양유제품을 공급함으로써 영양적 가치가 인정되고 있다(Haenlein, 1995). 산양유는 우유에 비해 가격이 비싸므로 산양유 제품에 값싼 우유를 넣어 제품을 제조하고 라벨은 산양유로 제조하는 경우가 있다(Calvo *et al.*, 2002). 만약 우유알러지 환자의 경우 이런 제품을 먹었을 경우 문제가 생길 수 있으므로 산양유에

혼합된 우유를 신속하게 검사하는 방법이 필요하다.

산양유 제품에서 우유를 검출하는데 유럽연합에서 공인된 방법(EC regulation no. 1081/96)으로는 전기영동방법으로는 capillary electrophoresis(Molina *et al.*, 1999), 2-dimensional electrophoresis(Chianese *et al.*, 1990), isoelectric focusing 방법(Addeo *et al.*, 1990)이 있으며, 그 외 면역학적인 ELISA(Anguitta *et al.*, 1996; Haza *et al.*, 1997) 방법과 크로마토그래픽을 이용한 HPLC(De Noni *et al.*, 1996) 방법도 우수한 방법으로 평가되고 있다. 그러나 면역학적 방법이나 전기영동방법은 여러 가지 물질이 혼합된 식품에는 적합하지 않을 뿐만 아니라 열을 처리한 제품인 경우는 민감도가 떨어지는 것이 문제로 되어 있다. 또한 크로마토그래픽 방법은 노동력이 많이 들어가는 것이 단점으로 되어있다(Branciari *et al.*, 2000).

최근 유전학적 방법인 PCR 방법이 식품에 기원되는 원료 특히, 육제품에서 사용된 종을 동정하는데 가장 폭넓게 사용된다(Chikuni *et al.*, 1994; Koh *et al.*, 1998; Rodriguez *et al.*, 2003). 그러나 유제품에 대해서는 매우 제한적이었으나 우유의 경우 유선세포에 있는 체세포(백혈구와 상피세포)를 많이 가지고 있으므로 최근에 이들 체

*Corresponding author : Seung-Bae Lee, Division of Animal Resources and Life Science, Sangji University, Gangwon 220-702, Korea, Tel: 82-33-730-0542, Fax: 82-33-730-0503, E-mail: sblee@sangji.ac.kr

세포의 DNA 시료를 PCR을 사용해서 증폭시킨 후 종을 동정하는데 사용하고 있다(Amills *et al.*, 1997; Maudet and Taberlet, 2001).

젖을 생산하는 가축의 종을 구별하는데 universal primer 을 가지고 PCR-RFLP 방법을 사용하여 양, 산양, 소의 차이와 소와 버펄로의 차이를 구별하는 것이 가능하게 되었다(Meyer *et al.*, 1995). 양유나 산양유 속에 있는 우유를 검출하기 위해 특정 primer을 사용하여 simplex PCR을 실시하였다(López-Calleja *et al.*, 2004). 모짜렐라치즈에 사용된 우유와 버펄로유를 동정하는데 duplex PCR 방법을 사용하였으며(Rea *et al.*, 2001), 양젖으로 만든 치즈 속에 혼입된 우유를 검출하는데 duplex PCR이 사용되었다(Mafra *et al.*, 2004). Bottero 등(2003)은 소, 양 및 산양 primer을 가지고 multiplex PCR을 이용하여 유통하는 치즈에 사용된 젖의 종류를 동정하는데 사용하였다. 젖의 종류를 구별하기 위해 특별한 primer을 가지고 simplex PCR, duplex PCR 및 multiplex PCR을 사용하여 목표로 하는 종을 동정하는데 사용하고 있으며, 외국에서는 특히, 산양유제품에 혼입되는 우유를 측정하는 연구가 많이 있으나 국내에는 거의 없는 실정이다.

따라서 국내 유제품 내에 존재하는 산양유와 우유를 동시에 신속하게 동정하는 duplex PCR의 이용가능성을 연구하였다.

재료 및 방법

공시재료

우유와 산양유는 각각 상지대학교 실습목장과 흥천 소재 유산양 목장에서 기증받아 시료를 사용하였고, 산양시유, 산양유 요구르트, 산양조제분유, 전지분유, 조제분유, 시유 및 우유 요구르트는 시중 마트에서 구입해서 시료로 사용하였다.

실험방법

DNA 추출

시료로부터 DNA의 추출은 López-Calleja 등(2004)이 제시한 방법에 따라 다음과 같이 실시하였다. 체세포 세척 용액은 0.15 M N-[2-acetamidol-2-iminodiacetic acid (ADA)], 0.5%(w/v) Triton X-100 및 0.01%(w/v) polystyrene particles(size 0.787; Bangs laboratories, Inc., Fishers, IN)을 섞어 만든 후 시료 1 mL에 체세포 세척액 0.5 mL을 넣고 15,000 g로 5분간 원심분리(Eppendorf Centrifuge 5415C)한 후 상층에 있는 크림층과 상등액은 제거하였다. 침전된 pellet에 860 µL 추출액(pH 8.0; 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% SDS), 100 µL 5 M guani-

dine hydrochloride, 40 µL proteinase K(20 mg/mL)을 넣고, 시료를 60 rpm으로 55°C에서 overnight 시켰다. 시료를 실온에서 냉각한 후 chloroform 500 µL을 넣고 13,000 rpm으로 10분간 원심분리한 다음 상등액 500 µL을 Wizard genomic DNA purification kit(Promega)를 사용하여 DNA를 정제했다. 정제된 DNA를 100 µL 멸균증류수로 희석한 후 260 nm(Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech)에서 DNA 농도를 측정하였다.

사용한 primer

소의 특이성 마커로는 López-Calleja 등(2004)이 제시한 소의 12S rRNA에 위치한 223 bp DNA 단편을 PCR로 증폭하기 위하여 12SM-FW(5'-CTAGAGGAGCCTGTTC-TATAATCGATAA-3'), 12SBT-RV(5'-TGGTTTCATAATAAC-TTTCGCGCT-3')를 primer로 사용하였고, 산양유 특이성 마커로는 Bottero 등(2003)이 제시한 양의 12S rRNA 유전자에 위치한 326 bp DNA 단편을 PCR로 증폭하기 위해 Sense 144(5'-CGCCCTCCAAATCAATAAG-3'), Antisense 469(5'-AGTGTATCAGCTGCAGTAGGGTT-3')을 primer로 사용하였다.

Simplex PCR 방법

PCR은 Accupower preMix(Bioneer, Korea)에 100 ng DNA template를 넣고, 소의 경우는 10 pmol의 primer, 산양의 경우는 15 pmol의 primer 첨가한 후 증류수를 넣어 최종 부피를 20 µL로 만든 다음 PCR 증폭기(DNA Engine Pelter Thermal cycler, Bio-Rad)로 반응시켰다.

소의 PCR 조건은 93°C에서 2분(1 cycle), 93°C에서 30초, 63°C에서 30초, 72°C에서 45초(40 cycle), 72°C에서 5분간 반응시켰으며, 산양의 PCR 조건은 94°C에서 5분(1 cycle), 94°C에서 30초, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분(34 cycle), 72°C에서 5분간 반응시켰다. PCR 산물은 2% agarose gel을 사용하여 100 V에서 60분간 전기영동을 하였다.

Duplex PCR 방법

한번에 Duplex PCR을 수행하기 위해 소와 산양에 사용한 simplex PCR의 primer을 동시에 모두 사용하였다. PCR은 Accupower preMix(Bioneer, Korea)에 소와 산양의 primer을 각각 10 pmol과 15 pmol을 넣고 시료의 종류에 따라 DNA template의 농도를 100-250 ng로 조정하여 첨가한 후 증류수로 최종 volume을 20 µL로 한 다음 PCR 증폭기(DNA Engine Pelter Thermal cycler, Bio-Rad)로 반응시켰다. PCR조건은 94°C에서 5분(1 cycle), 94°C에서 30초, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분(34 cycle), 72°C에서 5분간 반응시켰다. PCR 산물은 2% agarose gel을 사용하여 100 V에서 60분간 전기영동을 하였다.

결 과

본 실험에 사용된 소의 미토콘드리아 12S rRNA 유전자를 증폭시키기 위한 primer로 12S-FW와 12S-REV를 이용하여 산양유와 우유에 대해 simplex PCR을 실시한 결과 산양유에서는 단편이 나타나지 않고 우유에서만 223 bp의 단편을 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 이런 결과는 본 실험에서 사용된 소의 primer가 산양유하고는 교차반응을 하지 않고 우유에서만 특이적으로 반응하여 증폭시키는 특이성을 가진 것으로 볼 수 있어 소의 primer는 산양유에 있는 우유를 분석하는데 사용될 수 있다. Fig. 2는 산양의 미토콘드리아 12S rRNA 유전자를 증폭하는 primer인 sense 144와 antisense 469을 이용하여 산양유와 우유에 대해 simplex PCR을 실시한 결과로 산양유에서만 326 bp의 밴드가 관찰되었다. 이런 결과는 본 실험에서 사용된 산양의 primer가 우유하고는 교차반응을 하지 않고 산양유에서만 특이적으로 반응하여 증폭시키는 특이성을 가진 것을 알 수 있었다.

Fig. 3은 산양 primer와 소의 primer를 모두 이용하여 우유, 산양유 및 혼합유에 대하여 duplex PCR을 실시한 것이다. 우유에서는 소 primer만 반응하여 233 bp의 우유 특

Fig. 1. Specificity of simplex PCR with cow-specific primers amplifying a 233 bp fragment of the cow 12S mitochondrial rRNA gene. Lanes 1, 2: goat milks, Lanes 3, 4: cow milks, Lane M: 100bp molecular size marker (Bioneer).

Fig. 2. Specificity of simplex PCR of with goat-specific primers amplifying a 326 bp fragment of the goat 12S mitochondrial rRNA gene. Lanes 1, 2: goat milks, Lanes 3, 4: cow milks, Lane M: 100bp molecular size marker (Bioneer).

이성 밴드가 관찰되고, 산양유에서는 산양 primer만 반응하여 326 bp의 산양 특이성 밴드만 나타났으며 혼합유에서는 산양 primer와 소 primer 모두가 반응하여 233 bp의 소의 특이성 밴드와 326 bp의 산양 특이성 밴드가 동시에 나타난 것을 볼 수 있었다. Fig 4는 산양 primer와 소의 primer를 모두 이용하여 산양유에 우유를 50%부터 0.1%까지 혼합한 후 duplex PCR을 실시한 것이다. 산양유에 우유가 0.1%까지 혼합된 것이 탐지되는 것을 볼 수 있었다. Duplex PCR을 이용하여 시중에 유통 중인 15개 제품에 표시된 우유제품과 산양 유제품에 적용한 결과 시유 4개 제품, 전지분유 1개 제품, 요구르트는 3개 제품은 표시된 성분과 일치하였으나 조제분유 7개 제품 중 조제우유

Fig. 3. Duplex PCR of cow and goat milk with the cow- and goat-specific primers. Lane 1: cow milk, Lane 2: goat milk, Lane 3: cow and goat milk mixtures, Lane M: 100bp molecular size marker (Bioneer).

Fig. 4. Duplex PCR of cow and goat milk with the cow- and goat-specific primers. Lane 1: cow milk, Lane 2: goat milk, Lane 3-8 : mixture cow/goat milk containing 50%, 20%, 10%, 1%, 0.5%, and 0.1% cow milk, respectively, Lane M: 100 bp molecular size marker (Bioneer).

Fig. 5. Duplex PCR of commercial cow and goat milk powder products with the cow- and goat-specific primers. Lanes 1-3: goat milk infant formula powders A to C, Lanes 4-7: cow milk infant formula powders A to D, Lane 8: whole cow milk powder.

Fig. 6. Duplex PCR of market milk and yoghurt products with the cow- and goat- specific primers. Lanes 1, 2: cow market milks A, B, Lanes 3, 4: cow yoghurts A, B, Lanes 5, 6: goat market milks A, B, Lane 7: goat yoghurt.

Table 1. Results of duplex PCR performed on milk products from market

Sample	Label	PCR result
cow market milk A	cow	cow
cow market milk B	cow	cow
cow yoghurt A	cow	cow
cow yoghurt B	cow	cow
goat market milk A	goat	goat
goat market milk B	goat	goat
goat yoghurt	goat	goat
goat milk infant formula powder A	goat	goat
goat milk infant formula powder B	goat	goat
goat milk infant formula powder C	goat	goat/cow
cow milk infant formula powder A	cow	cow
cow milk infant formula powder B	cow	cow
cow milk infant formula powder C	cow	cow/goat
cow milk infant formula powder D	cow	cow
whole cow milk powder	cow	cow

분유 1개 제품에서 우유/산양유로 나타났으며 조제산양분유 1개 제품에서는 산양유/우유로 나타났다고 나머지 5개 제품은 표시성분과 일치하였다(Fig. 5, 6, Table 1).

고 찰

최근 축산물에 종을 동정하는데 DNA를 기초로 하는 방법을 적용하고 있으며 특히 동물의 젖의 종류를 구별하는데 PCR-RFLP와 sequencing을 위해 PCR 증폭을 위한 primer로 미토콘드리아와 핵 DNA를 사용하고 있다(Branciarini *et al.*, 2000). 원하는 종을 직접적으로 동정하기 위해 simplex 또는 multiplex PCR에 특이성 primer를 성공적으로 사용하고 있다(Rea *et al.*, 2001). Simplex PCR은 산양유에 값이싼 우유의 혼입을 측정하는 연구가 계속되어 왔다. 특히, 미토콘드리아 DNA는 핵 DNA보다 상대적으로 높은 돌연변이율을 갖고 있어 종간의 차이가 나는 점돌연변이가 많아 종을 구분하는 시료를 측정하는데 많은 장점을 가지고 있다(Unseld *et al.*, 1995). 미토콘드리아 DNA는 모계를 통해 유전되므로 대립유전자에 있어

이형접합체의 결핍이 일어나므로 미토콘드리아 유전자에 있는 12S rRNA가 종을 동정하는 목표 유전자로 사용되고 있다(Kocher *et al.*, 1989).

본 연구에서는 우유와 산양유를 검출하기 위해 소와 산양의 미토콘드리아 12S rRNA 유전자를 증폭하는 primer를 사용한 duplex PCR 방법을 유제품에 적용하였다. 소의 미토콘드리아 12S rRNA 유전자를 증폭하는 primer를 사용하여 simplex PCR을 실시한 결과, 소 primer의 경우 우유에서는 223 bp의 특이성 밴드가 나타났으나 산양유에서는 증폭된 밴드가 나타나지 않았다(Fig. 1). López-Calleja 등(2004)은 12SM-FW/12SBT-RV primer를 이용하여 우유, 산양유 및 양유에 대하여 PCR을 실시한 결과, 우유에서만 223 bp의 밴드를 얻고 산양유와 양유에서는 증폭된 밴드가 없었다. 따라서 López-Calleja 등(2004)이 사용한 소 primer는 본 실험에서도 223 bp밴드가 나타나 이 primer의 특이성을 확인하게 되었다.

산양 primer를 이용하여 simplex PCR을 실시한 경우 산양유에서만 326 bp의 특이성 밴드가 나타났으며(Fig. 2) 우유에서는 증폭된 밴드가 나타나지 않았다. 이런 결과는 Bottero 등(2003)은 산양유치즈에 multiplex PCR을 이용한 결과 산양유 특유의 326 bp의 밴드만을 볼 수 있고 다른 밴드는 나타나지 않았다는 것에 비추어 볼 때 본 실험에서 사용한 산양 primer가 산양유에만 매우 특이성이 있는 것으로 일치된 결과를 나타내었다. 따라서 산양의 primer는 산양유를 동정하는데 특이적이 마커로 사용할 수 있다. 소와 산양 primer를 이용하여 우유와 산양유에 대해 실시한 simplex PCR 결과가 매우 양호하므로 소와 산양 primer를 모두 이용하여 duplex PCR을 시도할 수 있는 기초자료를 얻었다.

산양 primer와 소의 primer를 모두 이용하여 우유, 산양유 및 혼합유에 대하여 duplex PCR을 실시한 Fig. 3에서 보면 우유시료에서는 소 primer만 반응하여 223 bp의 우유 특이성 밴드가 관찰되고, 산양유에서는 산양 primer만 반응하여 326 bp의 산양 특이성 밴드만 나타났으며 혼합유에서는 산양 primer와 소 primer 모두가 반응하여 223 bp의 소의 특이성 밴드와 326 bp의 산양 특이성 밴드가 동시에 나타난 것을 볼 수 있었다. 이런 결과는 본 실험에서 사용된 duplex PCR 방법(Fig. 3)이 simplex PCR방법(Fig. 1, 2)과 비교해도 동등한 수준의 특이성을 갖고 우유와 산양유를 동시에 측정하며, one-step으로 신속히 측정하는 것을 알 수 있다. Kotowicz 등(2007)에 의하면 소 primer와 산양 primer를 이용하여 duplex PCR을 실시한 결과 300 bp의 소의 특이성 밴드와 444 bp의 산양 특이성 밴드를 나타내었다. 본 연구에서 사용된 소와 산양의 primer로 증폭된 DNA 단편은 각각 223 bp과 326 bp로 Kotowicz 등(2007)이 보고한 300 bp와 444 bp보다 짧은 단편을 나타내고 있다. 일반적으로 DNA단편이 작은 경우 열과 가공

처리과정에서 덜 분해되므로 큰 DNA 단편보다 작은 DNA 단편을 사용하는 것이 PCR을 이용해서 증폭시키는데 더 유리하다.

본 실험에서 duplex PCR을 이용하여 산양유에 들어있는 우유를 0.1%까지 측정된 결과(Fig. 4)는 Kotowicz 등(2007)이 duplex PCR을 이용하여 산양유에 들어있는 우유를 1%까지 측정된 결과와 Rea 등(2001)이 duplex-PCR을 이용하여 버펄로물소유에 있는 우유를 최소 1%까지 검출한 결과에 비해 더 측정 민감도가 높은 것이라고 생각되며, López-Calleja 등(2004)이 simplex PCR을 이용하여 산양유에 우유가 섞인 경우 측정한계는 원료우유, 저온살균유(65°C, 30분), 멸균유(120°C, 20분) 모두 0.1%까지 혼입된 것을 측정된 결과와 동등한 수준의 민감도를 갖는 것으로 볼 수 있다. Bottero 등(2003)에 의하면 우유와 산양유가 혼합된 시료에서 우유의 측정한계치는 0.5%로 제시하고, 소 primer를 이용한 PCR의 경우 공식적인 등전점 전기영동방법(EC regulation No. 1081/96)으로 분석한 수준인 0.5%까지 민감도를 보이나 비의도적으로 들어간 매우 적은 양의 우유의 오염은 측정하기는 어렵다고 보고하고 있다. 한편 Dalmaso 등(2004)은 육이 들어간 식품에서 multiplex PCR을 사용한 경우 물고기 primer로 측정할 수 있는 한계는 0.004%이며 반추동물, 닭 및 돼지의 primer의 측정한계는 0.002%로 보고하고 있다. 따라서 PCR방법에서 유제품의 측정한계치인 0.1-1%는 육제품의 측정한계치인 0.002-0.004%보다 상당히 차이가 나는 것을 알 수 있다.

시중에 유통 중인 15개 제품에 표시된 우유제품과 산양유제품에 duplex PCR을 적용한 결과에서 보면 조사된 시유 4개 제품, 요구르트 3개 제품, 전지분유 1개 제품 그리고 조제분유 7개 제품 중 5개 제품은 표시성분과 일치하였으나 조제우유분유 1개 제품과 조제산양분유 1개 제품이 표시성분과 일치하지 않고 산양유와 우유가 오염된 것으로 나타났다(Fig. 5, 6, Table 1). Bottero 등(2003)의 경우 multiplex PCR을 이용하여 19종류의 상업용 치즈를 분석한 결과 4종류가 제품에 표시된 것과 일치하지 않는 것으로 나타났다. 본 연구에서 제시된 duplex PCR 방법도 산양분유제품 1개에서 희미한 223 bp의 우유 특이성 밴드가 확인되는 것으로 보아 유제품의 측정한계치 정도로 우유가 오염된 것으로 생각된다. 또한 우유조제분유제품 1개의 경우 뚜렷하게 산양 특이성 326 bp의 밴드가 보여 산양유가 오염된 것으로 보이며 이런 결과는 Bottero 등(2003)이 보고한 multiplex PCR의 경우 산양 primer가 소 primer비해 더 민감하게 반응한다는 견해에 비추어 볼 때 오염된 미량의 산양유가 강한 밴드로 나타난 것으로 생각된다. 본 연구에서 실시한 duplex PCR 방법이 산양유에 오염된 우유를 측정하거나 우유에 들어 있는 산양유를 동정하는데 우유와 산양유를 one-step으로 동시에 측정되

며 민감도가 높은 방법이라고 생각된다. 국내 상업적인 산양조제분유제품에 미량의 우유분유가 오염된 것과 특히, 우유조제분유제품에 산양유가 오염된 것은 매우 흥미로운 것으로 사료된다.

외국의 경우는 우유, 산양유, 양유, 버펄로우유 등 많은 종류의 젖이 유통되므로 유제품을 제조시 혼입되는 경우가 있어 multiplex PCR을 이용하여 혼입되는 젖을 검출하는 방법을 개발하고 있는 실정이지만 국내에서는 주로 유통되는 젖은 우유와 산양유이므로 duplex PCR을 이용하여 국내우유 및 산양유제품을 측정하는데 duplex PCR이 용 가능성을 제시하게 되었으며, 본 연구에서 제시된 duplex PCR 방법은 유제품의 품질 관리 시 산양유와 우유를 동정하는 고전적인 방법을 대체 할 수 있는 빠르고 효과적인 방법이라고 생각된다.

요 약

유제품에 들어 있는 우유와 산양유를 동정하기 위해 미토콘드리아의 12S rRNA 유전자를 목표로 하는 primer를 이용하는 duplex PCR 분석을 적용하였다. 소와 산양의 특이성 primer를 이용한 duplex PCR 분석은 우유와 산양유 DNA에 대해 각각 233 bp와 326 bp의 특이성 단편을 나타냈다. Duplex PCR 분석이 라벨에 표시된 성분을 확인하기 위하여 시중마트에서 구입한 15개 유제품에 적용하였다. Duplex PCR 분석 결과 4개 시유, 3개 요구르트, 1개 전지분유는 표시된 성분과 완전히 일치하였다. 그러나 7개의 조제분유 중 5개만 표시성분과 일치하고 2개 조제분유제품은 산양유와 우유가 각각 오염되어 있는 것으로 나타났다. 제안된 duplex PCR 분석은 산양유에 들어있는 우유를 0.1%까지 측정할 수 있는 민감하고 신속한 방법이다. Duplex PCR 분석은 유제품 속에 들어있는 우유와 산양유를 one-step 방법으로 동시에 탐지할 수 있다.

참고문헌

- Addeo, F., Moio, L., Chianese, L., Stingo, C., Resmini, P., Berner, I., Krause, I., Di Luccia, A., and Bocca, A. (1990) Use of plasmin to increase the sensitivity of the detection of bovine milk in ovine and/or caprine cheese by gel isoelectric focusing of γ_2 -caseins. *Milchwissenschaft* **45**, 708-711.
- Amills, M., Francino, O., Jansa, M., and Sánchez, A. (1997) Isolation of genomic DNA from milk samples by using Chelex resin. *J. Dairy Res.* **64**, 231-238.
- Anguita, G., Martín, R., García, T., Morales, P., Haza, A. I., González, I., Sanz, B., and Hernández, P. E. (1996) Immunostick ELISA for detection of cow's milk in ewe's milk and cheese using a monoclonal antibody against bovine β -casein. *J. Food Prot.* **59**, 436-437.
- Bottero, M. T., Civera, T., Nucera, D., Rosati, S., Sacchi, P.,

- and Turi, R. M. (2003) A multiplex polymerase chain reaction for the identification of cows', goats' and sheeps' milk in dairy products. *Int. Dairy J.* **13**, 277-282.
5. Branciarri, R., Nijman, I. J., Plas, M. E., Di Antonio, E., and Lenstra, J. A. (2000) Species origin of milk in Italian Mozzarella and Greek Feta cheese. *J. Food Prot.* **63**, 408-411.
 6. Calvo, J. H., Osta, R., and Zaragoza, P. (2002) Species-specific amplification for detection of bovine, ovine and caprine cheese. *Milchwissenschaft* **57**, 4-446.
 7. Chianese, L., Laezza, P., Smaldone, L. A., Stingo, C., Del Giovine, L., and Addeo, F. (1990) Evaluation of bovine milk in the buffalo Mozzarella cheese by two-dimensional electrophoresis. *Sci. Tec. Latt. Casear.* **41**, 315-326.
 8. Chikuni, K., Tabata, T., Kosugiyama, M., Monma, M., and Saito, M. (1994) Polymerase chain reaction assay for detection of sheep and goat meats. *Meat Sci.* **37**, 337-345.
 9. Dalmasso, A., Fontanella, E., Piatti, P., Civera, T., Rosati, S., and Bottero, M. T. (2004) A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. *Mol. Cell. Probes* **18**, 81-87.
 10. De Noni, I., Tirelli, A., and Masotti, F. (1996) Detection of cows' milk in non-bovine cheese by HPLC of whey protein: Application to goat milk cheese. *Sci. Tec. Latt. Casear.* **47**, 7-17.
 11. EC Regulation No. 1081/96 of the commission June 14 (1996) Reference method for detection of cow's milk and cow's milk casein in cheese made from ewes, goats and buffalo milk or mixtures of ewes, goats and buffalo milk. *Official J. Euro. Commission* **L142**, 15-25.
 12. Haenlein, G. F. W. (1995) Status and prospects of the dairy goat industry in the united states. *J. Anim. Sci.* **74**, 1173-1181.
 13. Haza, A. I., Morales, P., Martín, R., García, T., Aguita, G., González, I., Sanz, B., and Hernández, P. E. (1997) Use of a monoclonal antibody and two enzyme-linked immunosorbent assay formats for detection and quantification of the substitution of caprine milk for ovine milk. *J. Food Prot.* **60**, 973-977.
 14. Kocher, T. D., Thomas, W. K., Mayer, A., Edwards, S. V., Pääbo, S., Villablanca, F. X., and Wilson A. C. (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 6196-6200.
 15. Koh, M. C., Lim, C. H., Chua, S. B., Chew, S. T., and Phang, S. T. W. (1998) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprints for identification of red meat animal species. *Meat Sci.* **48**, 275-285.
 16. Kotowicz, M., Adamczyk, E., and Bania, J. (2007) Application of a duplex-PCR for detection of cows' milk in goats' milk. *Ann. Agr. Env. Med.* **14**, 215-218.
 17. López-Calleja, I., González, I., Fajardo, V., Rodríguez, M. A., Hernández, P. E., García, T., and Martín, R. (2004) Rapid detection of cows' milk in sheeps' and goats' milk by a species-specific polymerase chain reaction technique. *J. Dairy Sci.* **87**, 2839-2845.
 18. Mafra, I., Ferreira, I. M., Faria, M. A., and Oliveira, B. P. (2004) A novel approach to the quantification of bovine milk in ovine cheese using a duplex polymerase chain reaction method. *J. Agr. Food Chem.* **52**, 4943-4947.
 19. Maudet, C. and Taberlet, P. (2001) Detection of cows' milk in goats' cheeses inferred from mitochondrial DNA polymorphism. *J. Dairy Res.* **68**, 229-235.
 20. Meyer, R., Hofelein, C., Luthy, J., and Candrian, U. (1995) Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis: a sample method for species identification in food. *J. AOAC Int.* **78**, 1542-1551.
 21. Molina, E., Martín-Álvarez, P. J., and Ramos, M. (1999) Analysis of cows', ewes' and goats' milk mixtures by capillary electrophoresis: Quantification by multivariate regression analysis. *Int. Dairy J.* **9**, 99-105.
 22. Rea, S., Chikuni, K., Branciarri, R., Sangamayya, R. S., Ranucci, A., and Avellini, P. (2001) Use of duplex polymerase chain reaction (duplex-PCR) technique to identify bovine and water buffalo milk used in making mozzarella cheese. *J. Dairy Res.* **68**, 689-698.
 23. Rodríguez, M. A., García, T., González, I., Asensio, L., Mayoral, B. L., López-Calleja, I., Hernández, P. E., and Martín, R. (2003) Identification of goose, mule duck, chicken, turkey, and swine in foie gras by species-specific polymerase chain reaction. *J. Agr. Food Chem.* **51**, 1524-1529.
 24. Sampson, H. A. (2003) Food allergy. *J. Allergy Clin. Immun.* **111**, 540-547.
 25. Unseld, M., Beyermann, D., Brabdt, P., and Hiesel, R. (1995) Identification of the species origin of highly processed meat products by mitochondrial DNA sequences. *PCR Meth. Appl.* **4**, 241-243.
 26. Wal, J. M. (2004) Bovine milk allergenicity. *Ann Allergy Asthma Immun.* **93**, 2-11.

(Received 2009.2.23/Revised 1st 2009.8.31, 2nd 2009.10.8/
Accepted 2009.10.13)