



**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI
MEDICINĂ VETERINARĂ CLUJ-NAPOCA
ȘCOALA DOCTORALĂ
FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ**



PIVARIU BOGDAN NICOLAE

**CERCETĂRI PRIVIND MARKERII DE
CALITATE ȘI AUTENTICITATE ATESATI
PENTRU PRODUSELE TRADIȚIONALE DIN
LAPTE DE CAPRĂ/OAIE**

REZUMAT

COORDONATOR ȘTIINȚIFIC:

PROF. UNIV. DR. MIHAIU MARIAN

CLUJ-NAPOCA

2014

Cuvinte cheie: markeri, filiera lapte, oaie, capra, tradiționalitate

În ultimii ani, atestarea originalității, calității și autenticității brânzeturilor tradiționale a dobândit o semnificație crescută, pe de-o parte datorită nevoilor stringente de a conserva specificitatea acestor produse care le aduce recunoaștere și prin care se diferențiază la nivel European, iar pe de alta parte datorită nevoii de a spori calitatea nutritivă și igienică. Asigurarea unei protecții și promovări a brânzeturilor autohtone reprezintă în cazul fiecărei țări contribuția acesteia la protejarea mediului, stimularea populației din zona rurală de a produce brânzeturi de calitate în conformitate cu standardele internaționale de siguranță alimentară. Producția de brânzeturi de oaie/capră autohtone în România are o tradiție îndelungată, dar în ciuda calității și particularităților brânzeturilor tradiționale românești acestea sunt puțin cunoscute și insuficient promovate.

Scopul acestei teze este de a dezvolta cunoștințele legate de principalii markeri implicați pe filiera scurtă de producție a brânzeturilor tradiționale de oaie/capră în vederea îmbunătățirii calității nutritive și igienice, atestarea autenticității acestora prin metode moleculare în vederea creșterii siguranței produselor. De asemenea, scopul propus implică angrenarea unor metode avansate ce vor pot fi transpuse și în cadrul altor filiere și utilizate în selecția asistată pe baza markerilor studiați.

Propunerea prezentei teme de cercetare a avut în vedere următoarele aspecte de importanță științifică națională și internațională:

- **Nu există date actuale** legate de influența polimorfismelor genetice ale unor gene implicate în calitatea laptelui la oaie/capră în cadrul efectivelor din arealul studiat ;
- **Nu există cercetări** detaliate asupra polimorfismelor genei β -lactoglobulinei în relație cu parametrii compoziționali la rasele de oaie/capră crescute în sistem tradițional;
- **Nu există la momentul de față o situație actuală** realizată pe baza unor tehnici avansate (PCR) privind autenticitatea produselor din lapte oaie/capră în arealul studiat;
- **Extinderea sferei de cunoaștere** cu privire la posibilele pericole fizice transmisibile pe filiera laptelui de oaie/capră, reprezentate de **concentrația de radionuclizi** prezentă în produsele din arealul studiat.

- Extinderea sferei de cunoaștere cu date analitice asupra markerilor microbiologici, **contribuind cu date recente** legate de potențialii contaminanți ai acestor produse în funcție de tipul de procesare (tradițional/fermă);

- Stabilirea prevalenței bacteriilor patogene în produsele lactate de oaie/capră destinate vânzării directe evaluând pericolul potențial pentru sănătatea consumatorilor, **cercetare precară** până la acest moment în cadrul arealului studiat.

Realizarea scopului general al acestei teze și anume: *evaluarea principalilor markeri genetici, biochimici și microbiologici în vederea dezvoltării unei producții sigure și de calitate a produselor tradiționale de oaie/capră pe piață*, a implicat parcurgerea următoarelor obiective:

- Identificarea polimorfismelor genetice ale genelor DGAT1 și β -lactoglobulina implicate în calitatea producției lactate și atestarea lor ca markeri genetici în cadrul calității produselor tradiționale de capră/oaie;

- Stabilirea principalilor markeri compoziționali biochimici în funcție de zona de producție și a particularităților de procesare a produselor lactate tradiționale de oaie/capră;

- Evaluarea prin implicarea unor tehnici avansate (GC, HPLC, spectroscopie în infraroșu) a principalelor caracteristici compoziționale ale laptelui de capră/oaie comparativ cu cel de vacă;

- Evaluarea autenticității produselor lactate de oaie/capră comercializate prin vânzare directă în arealul studiat precum și a acelor procesate în unități industriale și regăsite în principalele hipermarketuri;

- Evaluarea gradului de radioactivitate și a concentrației de radionuclizi în produsele tradiționale de capră/oaie regăsite în arealul studiat;

- Evaluarea calității igienice a produselor lactate de oaie/capră obținute în cadrul filierei scurte de producție în vederea stabilirii siguranței acestora pentru consumator;

Structura lucrării: Lucrarea intitulată „**Cercetări privind markerii de calitate și autenticitate atesati pentru produsele tradiționale din lapte de capră/oaie**”

conține 176 de pagini fiin redactată în nouă capitole și este structurată conform normelor de redactare în două părți.

Prima parte, stadiul actual al cunoașterii, (capitolele I, II, II, IV) cuprinde 60 de pagini reprezentând 30% din lucrare și sintetizează cadrul general actual al cunoașterii legat de aspectele particulare ale filierei de producție lapte de capră/oaie, principalli factori ce influențează producția precum și problema autenticității produselor tradiționale pe piața Europeană.

Partea a II-a, cercetări proprii, (capitolele V, VI, VII, VIII, IX) cuprinde 116 pagini, reprezentând aproximativ 70% din lucrare. Fiecare capitol detaliat în cadrul acestei teze este structurat în subcapitole ce prezintă materialele și metodele utilizate, rezultatele obținute cu discuții asupra aspectelor particulare întâlnite în acest studiu comparativ cu alte cercetări din domeniu și concluziile parțiale aduse în urma interpretării rezultatelor.

Rezultatele cercetării

În capitolul V, intitulat „Cercetări privind markerii biochimici compoziționali în cadrul produselor tradiționale de oaie/capră” s-au adus contribuții noi în ceea ce privește markerii biochimici compoziționali atribuiți produselor tradiționale studiate. Prin urmare rezultatele studiului atestă faptul că principalii parametri compoziționali (grăsime %, proteină %, lactoză %) se regăsesc în cantități superioare laptelui de vacă, fiind semnificativ influențați de aria geografică de creștere și implicit furajare. Valoarea nutrițională cea mai crescută a fost regăsită la probele de brânza telemea de oaie, înregistrându-se valori distinct semnificative ($p < 0,01$) în cadrul profilelor principalelor clase de acizi grași. La analiza profilului acizilor grași, acidul stearic (C18:0), capric (C10:0) și lauric (C12:0) au variat semnificativ din punct de vedere statistic ($p < 0,05$) la probele de lapte și probele de brânză de oaie analizate.

S-a relevat de asemenea că, conținutul de acizi linoleici conjugați este mai ridicat la caprele crescute în regiunile montane, variind și în funcție de stadiul lactației. Luând în considerare aportul superior de grăsime, procentele mai scăzute de S.F.A. și mai crescute de P.U.F.A față de cele raportate la alte rase, rasele de producție tradiționale (Țurcană; Carpatină) pot fi utilizate cu succes în selecția unor markeri genetici pentru

ameliorarea producției de lapte. Produsele lactate de capră procesate în sistem tradițional pot fi considerate alimente funcționale din punct de vedere al aportului de acizi grași omega 3 și omega 6 și al raportului optim pentru sănătatea omului.

Originalitatea și inovația studiului propus se relevă și din rezultatele obținute la analiza concentrației de radionuclizi în lanțul alimentar studiat. S-a remarcat faptul că, concentrația de radionuclizi (Cs_{137}) din scoarțele de copaci analizate s-a încadrat în limite de acceptabilitate, ceea ce denotă conformitatea în acest parametru. În schimb, laptele de oaie este un produs mai expus contaminării cu radionuclidul Cs_{137} , concentrațiile variind semnificativ din punct de vedere statistic ($p < 0.05$) în comparație cu laptele de capră.

În **capitolul VI** intitulat „Cercetări privind markerii moleculari atestați în cadrul calității produselor lactate de oaie/capră”, scopul atins a fost de a identifica eventualele polimorfisme genetice ale genelor DGAT1 și β – lactoglobulina la populațiile de oi și capre din arealul studiat și compararea acestor variații cu calitatea laptelui.

Rezultatele au relevat faptul că în cazul populației de caprine nu s-a identificat prezența polimorfismului K232A al genei DGAT1, responsabil de calitatea laptelui la specia taurină. În schimb la oaie, la indivizii din rasa Țurcană, s-a identificat prezența unui SNP la nivelul exonului 17 al genei DGAT1, mutație ce nu prezintă modificare în codajul aminoacizilor. Polimorfismul identificat la oaie în cadrul genei DGAT1 nu prezintă influență asupra parametrilor compoziționali ai laptelui, între genotipuri nefiind diferențe semnificative statistic ($p < 0.05$). Secvența amplificată a genei DGAT1 la oaie nu poate fi considerată un marker genetic pentru calitatea laptelui. Analiza genetică a secvenței β -lactoglobuline la oaie nu a relevat un polimorfism, în populația studiată identificând doar indivizi homozigoți BB. Genotipul BB este asociat în literatură cu o calitate superioară a laptelui prin urmare această secvență a genei β -lactoglobuline, poate fi utilizată ca marker în vederea ameliorării altor rase pentru producția de lapte. Gena β -lactoglobulină la oaie nu a prezentat nici un polimorfism identificabil, restricția realizată cu ajutorul enzimei *SmaI* tăind în mai multe situsuri decât cele menționate în literatura de specialitate. Concluzia principală a studiului a relevat faptul că studiile privind existența unui eventual polimorfism al genei BLG la capră trebuie dezvoltate prin secvențierea întregului fragment amplificat și identificarea SNP-urilor. Fragmentul regiunii

promotoare a genei β -lactoglobuline nu poate fi considerat un marker genetic la această specie datorită lipsei unui SNP asociat cu calitatea laptelui.

În **capitolul VII**, intitulat „Cercetări privind autenticitatea produselor lactate de oaie/capră regăsite pe piețele tradiționale”, scopul principal a fost de a realiza o evaluare a autenticității produselor lactate de oaie/capră regăsite pe piața regională prin tehnici moleculare sigure și de acuratețe. Rezultatele au relevat faptul că tehnicile moleculare bazate pe analiză ADN au o foarte bună aplicabilitate în identificarea neconformităților din produsele lactate de capră și oaie. Primerii utilizați ce amplifică secvențe din ADNmt la ambele specii (vacă/oaie; vacă/capră), pot fi utilizați cu succes și într-o tehnică PCR duplex, temperaturile de aliniere fiind compatibile. Analiza autenticității probelor de produse lactate de capră provenit de la micii producători, relevă prezența amestecului cu lapte de vacă în proporție de 55%. Frecvența falsurilor în cadrul produselor lactate de oaie este de asemenea foarte ridicată, procentul probelor pozitive la ADN bovin în cadrul produselor prelevate din piețe agroalimentare fiind de 41%.

Produsul lactat cel mai susceptibil la falsificări a fost brânza telemea de oaie sau capră cu un procent de peste 50% din probe pozitive la amplificarea cu primeri specifici de vacă. Analiza unei game variate de produse comerciale de capră și oaie provenite din hipermarketuri atestă prezența falsurilor și la acest nivel, procentul produselor identificate cu un adaos de lapte de vacă de peste 10% fiind de aproximativ 30%. Frecvența cea mai crescută a falsurilor regăsite în centre comerciale mari a fost din nou relevată la brânza telemea de oaie (30%). Concluzia principală a studiului a relevat faptul că neconformitățile în produsele lactate sunt prezente pe piața de pe raza arealului studiat, iar probele autentice de capră sau oaie se regăsesc într-o proporție mai mică față de cele cu adaos de lapte de vacă.

În **capitolul VIII**, intitulat „Cercetări privind calitatea igienică a produselor lactate tradiționale de oaie/capră comercializate într-un areal definit” scopul a fost de a evalua incidența și a încărcătura cu microorganisme a laptelui de oaie, capră și respectiv produse lactate prin metode clasice, moleculare și rapide de înaltă performanță, urmărind cu o mai mare atenție prevalența bacteriilor patogene.

Rezultatele au relevat faptul că, calitatea igienică a laptelui crud de oaie și capră provenit din sisteme tradiționale se încadrează în limitele de admisibilitate din prisma parametrilor calitativi igienici principali (NTG, NCS). În cadrul probelor de lapte crud provenit din ambele sisteme analizate nu s-a semnalat prezența germenilor din genul *Salmonella spp.* Prevalența germenilor din genul *E.coli* a fost mai crescută în cadrul probelor de lapte crud comparativ cu produsele finite, nesemnându-se însă nici o probă pozitivă la PCR pentru prezența gene toxinogene. Probele de lapte crud de oaie obținute din sistem tradițional au relevat prezența bacteriilor patogene: *Bacillus cereus* și *Staphylococcus aureus*. Produsele lactate de oaie și capră obținute în sistem tradițional prezintă diferențe semnificative statistic ($p < 0.05$) în ceea ce privește izolarea germenilor din genurile *Escherichia* și *Staphylococcus*, cu o prevalență mai crescută în cadrul produselor lactate achiziționate de pe piața liberă. În urma analizei aplicate în cadrul piețelor regionale s-a relevat o probabilitate medie de materializare a pericolelor microbiologice în produsele finite, având în vedere numărul ridicat de probe pozitive la prezența *E.coli*. În cadrul produsului tradițional de oaie, urdă, s-a identificat o probă pozitivă la prezența *B. cereus* fapt ce ar putea pune în pericol sănătatea consumatorilor.

În urma studiului efectuat am concluzionat că producția și procesarea laptelui de oaie și capră în sistem tradițional trebuie monitorizată mai cu atenție pentru a se respecta cu strictețe normele de igienă și aplicare pe cât posibil a tratamentului termic înainte de procesare și consum.

Capitolul IX „**Concluzii generale și recomandări**”, poate unul din cele mai importante capitole ale studiului de față, relevă importanța și noutatea studiului prin contribuția adusă în domeniul studiat. Cele mai relevante concluzii ale studiului sunt următoarele:

1. Produsele lactate de capră procesate în sistem tradițional pot fi considerate alimente funcționale din punct de vedere al aportului de acizi grași omega 3 și omega 6 și al raportului optim pentru sănătatea omului.
2. Aportul de acizi linoleici conjugați este mai ridicat la produsele tradiționale obținute de la capre/oile crescute în regiunile montane, variind și în funcție de stadiul lactației.

3. Lanțul alimentar studiat (furaj – animal) nu reprezintă un risc potențial de contaminare radioactivă la om în schimb monitorizarea cu atenție a Cs₁₃₇ în aceste matrite studiate este necesară și recomandată a fi urmărită în mod periodic și mai ales în cazuri de urgențe radiologice.

4. Gena DGAT1 nu poate fi utilizată ca și marker în privința selecției la rasa de capre Carpatină, datorită absenței polimorfismului K232A anterior studiat la vacă;

5. Polimorfismul identificat la oile Țurcană în cadrul genei DGAT1 nu prezintă influență asupra parametrilor compoziționali ai laptelui, între genotipuri nefiind diferențe semnificative statistic ($p < 0.05$).

6. Secvența amplificată a genei DGAT1 la oaie nu poate fi considerată un marker genetic pentru calitatea laptelui;

7. Gena β -lactoglobulină la oaie nu a prezentat nici un polimorfism identificabil.

8. Analiza autenticității probelor de produse lactate de capră provenit de la micii producători, relevă prezența amestecului cu lapte de vacă în proporție de 55%;, frecvența falsurilor în cadrul produselor lactate de oaie fiind de asemenea foarte ridicată (41%);

9. Analiza unei game variate de produse comerciale de capră și oaie provenite din hipermarketuri atestă prezența falsurilor și la acest nivel, procentul produselor identificate cu un adaos de lapte de vacă de peste 10% fiind de aproximativ 30%.

10. Produsele lactate de oaie și capră obținute în sistem tradițional prezintă diferențe semnificative statistic ($p < 0.05$) în ceea ce privește izolarea germenilor din genurile *Escherichia* și *Staphilococcus*, cu o prevalență mai crescută în cadrul produselor lactate achiziționate de pe piața liberă.

11. Producția și procesarea laptelui de oaie și capră în sistem tradițional trebuie monitorizată mai cu atenție pentru a se respecta cu strictețe normele de igienă și aplicare pe cât posibil a tratamentului termic înainte de procesare și consum.