

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra kvality a bezpečnosti potravin**



**Stanovení obsahu laktózy a vápníku v buvolím mléce**

**Diplomová práce**

**Bc. Michaela Blovká**

**Kvalita potravin a zpracování zemědělských produktů**

**Ing. Veronika Legarová, Ph.D.**

© 2021 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Stanovení obsahu laktózy a vápníku v buvolím mléce" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Veronice Legarové, Ph.D. vedoucí mé diplomové práce, za odborné vedení, pomoc a přátelský přístup při zpracování mé diplomové práce. Dále majitelům „Buvolí farmy Ohař“ za poskytnutí vzorků a seznámení s chovem buvolů. Poděkování také patří laborantce Bc. Soně Hermanové za pomoc při laboratorních stanoveních. A v neposlední řadě mé rodině a přátelům za podporu během celého studia.

# Stanovení obsahu laktózy a vápníku v buvolím mléce

## Souhrn

Buvolí mléko v roce 2019 tvořilo 15 % z celkové produkce mléka ve světě a je druhým nejprodukovanějším mlékem hned po kravském. Pro produkci mléka se chovají hlavně plemena buvola říčního, jehož dojivost je 2–3x vyšší než u buvola bahenního, který je chován pro produkci masa nebo využit do tahu. Nejvíce buvolů je chováno v Asii (cca 97,4 %) a odtud také pocházejí. V Evropě je chovem buvolů známá především Itálie, a to díky italskému sýru Mozzarella, který se pod značkou chráněného označení původu vyrábí z buvolího nepasterizovaného mléka, produkovaného pouze v určitých provinciích na severu Itálie.

Tato diplomová práce se zabývala stanovením obsahu laktózy a vápníku v buvolím mléce, které bylo odebíráno z farmy v České republice, přesněji nedaleko Písku. Obsah laktózy byl stanovován pomocí dvou metod – titračně pomocí metody dle Luff-Schoorl a přístrojem MilkoScan FT 120, který pro měření obsahu složek mléka využívá infračervenou spektroskopii s Fourierovou transformací. Obsah vápníku byl stanovován chelatometrickou titrací za přítomnosti metalochromního indikátoru. Obsah laktózy a vápníku stanovený v buvolím mléce, byl porovnán s obsahem v kravském mléce, který byl stanoven identickými metodami.

Výsledky ukázaly statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ) mezi obsahem laktózy i vápníku v buvolím a kravském mléce. Průměrný obsah laktózy stanovený v buvolím mléce byl  $5,08 \pm 0,12$  % (Luff-Schoorl) resp.  $4,78 \pm 0,31$  % (MilkoScan FT 120). Oproti kravskému mléku obsahovalo buvolí o 0,57 %, respektive 0,18 % více laktózy. Obsah laktózy v buvolím mléce v průběhu odběru vzorků byl poměrně stálý.

Průměrný obsah vápníku v buvolím mléce byl stanovený na  $145,04 \pm 9,31$  mg/100 g. Při porovnání této hodnoty s množstvím vápníku v kravském mléce bylo dokázáno, že buvolí mléko obsahuje o 25–35 % více vápníku. V průběhu období sběru vzorků se obsah vápníku v buvolím mléce měnil. Minimální naměřená hodnota byla 139,33 mg/100 g (březen 2021) a maximální 153,24 mg/100 g (leden 2021). Změny v obsahu vápníku mohou být způsobeny výživou, ročním obdobím nebo pořadím a fází laktace.

Více laktózy dělá buvolí mléko energeticky bohatší, jelikož laktóza je v mléce hlavním zdrojem energie. Dále je také důležitá pro zpracování mléka především na fermentované mléčné výrobky z toho důvodu, že ji mikroorganismy využívají pro svůj růst a množení.

Vyšší obsah vápníku v buvolím mléce by mohl být prospěšný hlavně pro děti, seniory nebo těhotné ženy. Jelikož tyto skupiny mají zvýšené nároky na příjem vápníku v potravě. Dále by vápník z buvolího mléka mohl působit jako prevence před osteoporózou a dalšími onemocněními kostí a zubů.

**Klíčová slova:** buvol, laktóza, chelatometrie, Luff-Schoorl, MilkoScan, vápník

# Determination of lactose and calcium content in buffalo milk

## Summary

In 2019, buffalo milk accounted for 15% of total milk production in the world and is the second most produced milk after cow's milk. Mainly breeds of river buffalo are bred for milk production, as their milk yield is 2–3 times higher than in case of swamp buffalo, which is bred for meat production or used as draught animal. Most buffaloes are bred in Asia where they also come from. The best known for buffalo breeding in Europe is Italy thanks to Italian cheese Mozzarella, which is produced under geographical indication from unpasteurized buffalo milk only in certain provinces in northern Italy.

This thesis dealt with the determination of the content of lactose and calcium in buffalo milk, which was taken from a farm in the Czech Republic, more precisely near Písek. Lactose content was determined by two methods – by titration using the Luff-Schoorl method and via an instrument MilkoScan FT 120 that uses Fourier-transform infrared spectroscopy to measure the content of milk components. Calcium content was determined by complexometric titration with a metallochromic indicator. The lactose and calcium content determined in buffalo milk was compared with the content in cow's milk, which was determined identical methods.

The results showed a statistically significant difference ( $p < 0,05$ ) between the content of lactose and calcium in in buffalo and cow's milk. The average lactose content determined in buffalo milk was  $5.08 \pm 0.12\%$  (Luff-Schoorl) and  $4.78\%$ , respectively  $4.78 \pm 0.31\%$  (MilkoScan FT 120). Compared to cow's milk, buffalo milk contained  $0.57\%$  and  $0.18\%$  more lactose, respectively. The lactose content of buffalo milk was relatively stable during sampling.

The average calcium content in buffalo milk was determined to be  $145.04 \pm 9.31$  mg/100 g. When comparing this value with the amount of calcium in cow's milk, it was shown that buffalo milk contains 25 – 35% more calcium. The calcium content of buffalo milk varied during the sampling period. The minimum measured value was 139.33 mg/100 g (March 2021), with the maximum being 153.24 mg/100 g (January 2021). Changes in calcium content can be caused by nutrition, season or lactation order.

The higher content of lactose in buffalo milk increases its energy value, as lactose is the main source of energy in milk. It is also important for the processing of milk, especially into fermented dairy products, because microorganisms use it for their growth and multiplication.

Higher calcium content in buffalo milk could be beneficial especially for children, the elderly and pregnant women. These groups have increased demands on dietary calcium intake. Furthermore, calcium from buffalo milk could act as a prevention against osteoporosis and other bone and tooth diseases.

**Keywords:** buffalo, lactose, chelatometry, Luff-Schoorl, MilkoScan, calcium

# Obsah

<b>1 Úvod</b> .....	<b>8</b>
<b>2 Vědecká hypotéza a cíle práce</b> .....	<b>9</b>
<b>3 Literární rešerše</b> .....	<b>10</b>
<b>3.1 Buvol domácí (<i>Bubalus bubalis</i>)</b> .....	<b>10</b>
3.1.1 Historie.....	10
3.1.2 Odlišnosti poddruhů.....	10
3.1.3 Současný stav chovu.....	11
3.1.4 Mléčná produkce.....	12
3.1.4.1 Indie.....	12
3.1.4.2 Pákistán .....	12
3.1.4.3 Itálie.....	13
3.1.5 Mléko .....	14
3.1.5.1 Počet somatických buněk .....	14
3.1.5.2 Chemické složení .....	14
3.1.5.3 Fyzikální vlastnosti buvolího mléka .....	24
3.1.5.4 Technologické vlastnosti.....	27
3.1.5.5 Význam pro lidskou výživu .....	28
3.1.6 Mléčné výrobky .....	29
3.1.6.1 Jogurt.....	29
3.1.6.2 Sýry .....	29
3.1.6.3 Máslo.....	30
<b>4 Metodika</b> .....	<b>31</b>
<b>4.1 Vzorky mléka</b> .....	<b>31</b>
4.1.1 Buvolí farma Ohař .....	31
<b>4.2 Stanovení obsahu laktózy</b> .....	<b>31</b>
4.2.1 Stanovení metodou podle Luff-Schoorla .....	31
4.2.1.1 Použité chemikálie a laboratorní pomůcky .....	31
4.2.1.2 Příprava zásobních roztoků.....	32
4.2.1.3 Princip stanovení.....	33
4.2.1.4 Pracovní postup.....	33
4.2.1.5 Výpočet obsahu laktózy .....	34
4.2.2 Stanovení laktózy pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací.....	36
4.2.2.1 MilkoScan FT 120.....	36
4.2.2.2 Princip měření .....	37

<b>4.3 Stanovení obsahu vápníku.....</b>	<b>38</b>
4.3.1 Použité chemikálie a laboratorní pomůcky.....	38
4.3.2 Příprava zásobních roztoků.....	38
4.3.3 Princip stanovení.....	39
4.3.4 Pracovní postup.....	40
4.3.5 Výpočet obsahu vápníku.....	40
<b>4.4 Použité statistické metody .....</b>	<b>41</b>
<b>5 Výsledky.....</b>	<b>42</b>
<b>5.1 Hodnocení obsahu laktózy ve vzorcích .....</b>	<b>42</b>
5.1.1 Stanovení laktózy metodou podle Luff-Schoorla .....	42
5.1.2 Stanovení laktózy přístrojem MilkoScan.....	42
5.1.3 Statistické porovnání metod stanovení laktózy .....	43
5.1.4 Porovnání obsahu laktózy v buvolím a kravském mléce.....	44
5.1.5 Obsah laktózy ve vzorcích buvolího mléka v průběhu sběru dat .....	44
<b>5.2 Hodnocení obsahu vápníku ve vzorcích .....</b>	<b>45</b>
5.2.1 Porovnání obsahu laktózy v buvolím a kravském mléce.....	45
5.2.2 Obsah vápníku ve vzorcích buvolího mléka v průběhu sběru dat .....	46
<b>6 Diskuse .....</b>	<b>47</b>
<b>6.1 Laktóza.....</b>	<b>47</b>
<b>6.2 Vápník.....</b>	<b>48</b>
<b>7 Závěr.....</b>	<b>50</b>
<b>8 Literatura.....</b>	<b>51</b>
<b>9 Seznam použitých zkratk.....</b>	<b>57</b>
<b>10 Seznam obrázků .....</b>	<b>58</b>
<b>11 Seznam tabulek .....</b>	<b>59</b>
<b>12 Samostatné přílohy .....</b>	<b>I</b>

# 1 Úvod

Mléko a mléčné výrobky jsou jednou ze základních složek lidské výživy. Jsou zdrojem základních živin (bílkoviny, tuk a sacharidy), které jsou pro zdravého člověka dobře vstřebatelné a využitelné. Dále obsahují široké spektrum vitamínů, nejvíce zastoupenými jsou vitamíny skupiny B a také jsou významným zdrojem vápníku a dalších minerálních látek.

Buvolím mléko je druhé nejvíce produkované mléko na světě. Buvoli jsou chováni hlavně v asijských zemích (Indie, Pákistán, Čína, Nepál), Egyptě a Indonésii. V Evropě je produkcí buvolího mléka známá hlavně Itálie, jelikož je surovinou pro výrobu originálního italského sýra „Mozzarella di Bufala Campana“.

V porovnání s kravským, nejvíce produkovaným mlékem, je buvolí mléko bohatší na všechny hlavní složky (tuk, bílkoviny, laktóza, popeloviny) a je tedy výživnější i chutnější. Při výrobě mléčných výrobků (sýry, máslo, jogurty atd.) má také vyšší výtěžnost, a to právě díky vyššímu obsahu složek.

Mléčný cukr (laktóza) je disacharid, skládající se z glukózy a galaktózy. Pro lidský organismus je lehce stravitelný, pozitivně ovlivňuje střevní mikroflóru a podporuje vstřebávání živin. Laktóza je také důležitá pro zpracování mléka na mléčné výrobky, jelikož je zdrojem energie hlavně pro bakterie mléčného kvašení (BMK) a některé další mikroorganismy. BMK jsou nejvíce využívány pro výrobu jogurtů, kdy štěpí laktózu na kyselinu mléčnou a další produkty (acetaldehyd, CO<sub>2</sub>).

Vápník je v lidském organismu důležitý hlavně pro růst a zdraví kostí a zubů. Proto vyšší nároky na příjem vápníku, mají hlavně děti, senioři a těhotné ženy. Mléko a mléčné výrobky jsou významným zdrojem vápníku, který je pro tělo využitelnější než vápník z rostlinných zdrojů.



## **2 Vědecká hypotéza a cíle práce**

Hypotézou práce je, že buvolí mléko ve srovnání s mlékem kravským obsahuje méně laktózy a vápníku.

Cílem práce je porovnat obsah vybraných složek, konkrétně laktózy a vápníku, s využitím infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací a titračních metod, ve vzorcích buvolího a kravského mléka, a sledovat změny ve složení buvolího mléka v průběhu roku.

## 3 Literární rešerše

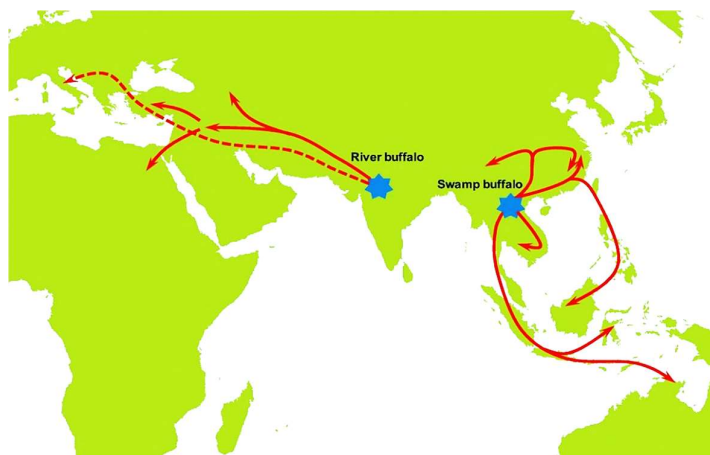
### 3.1 Buvol domácí (*Bubalus bubalis*)

#### 3.1.1 Historie

Odhaduje se, že vodní buvoli obývají Zemi přibližně 3,5 milionu let. Zpočátku žili v severozápadní části Indického subkontinentu, dále se šířili do východní Číny, jižní a jihovýchodní Asie (Kiple 2007).

Buvoli se dělí na 2 poddruhy: bažinný a říční. Obecně se předpokládá, že oba pocházejí z *Bubalus arnee* (Nagarajan et al. 2015). Říční buvol je původem z Indického subkontinentu a rozšířil se na západ až k Balkánu, Řecku, Egyptu a Itálii. Buvoli bažinní žijí po celé jihovýchodní Asii, od Assamu (Indie) a Bangladěše na západ po údolí řeky Jang-c'-ťiang (Zhang et al. 2020).

Rozdílnosti těchto dvou typů jasně předcházela jejich domestikace. Molekulární testy určují domestikaci buvolů říčních v západní oblasti Indického subkontinentu kolem 6 300 let př. n. l. a bažinatých buvolů v pohraniční oblasti Číny / Indočíny, s časem domestikace 3–7 000 let př. n. l. Po domestikaci obou poddruhů došlo k rychlému rozšíření velikosti jejich populace, částečně kvůli zlepšujícím se klimatickým podmínkám a také kvůli geografickému rozšíření domácích zvířat. Předpokládaný průběh rozšíření je zobrazen na Obrázku 1 (Nagarajan et al. 2015; Wang et al. 2017).



Obrázek 1: Předpokládaný průběh rozšíření říčního a bažinného buvola (Zhang et al. 2020)

#### 3.1.2 Odlišnosti poddruhů

Mezi oběma poddruhy jsou zřetelné morfologické rozdíly. Říční buvol má černé tělo a zakřivené rohy, zatímco bažinný buvol je obvykle tmavě šedý s bílými pruhy ve tvaru V na krku (jeden nebo dva), bílými konci končetin a špičkou ocasu a relativně rovnými, dlouhými, světle zbarvenými rohy (Zhang et al. 2020). Dále se liší v hmotnosti, bahenní buvoli jsou lehčí, dospělý samec váží v rozmezí mezi 325 a 450 kg, zatímco říční poddruh váží mezi 450 a 1000 kg (Borghese 2011).

Oba typy se také liší v počtu chromozomů, říční  $2n = 50$  a bažinný  $2n = 48$ . Poddruhy se mohou navzájem křížit, vznikne tak potomek s 49 chromozomy. Pokud je potomkem samec,

tento počet chromozomů vede k problémům s plodností nebo k neplodnosti. Samice jsou plodné, ale mají delší interval otelení v případě zpětného křížení (Borghese 2011; Zhang et al. 2020).

### 3.1.3 Současný stav chovu

Buvol je důležitým hospodářským zvířetem již více než 5 000 let a jeho význam v globálních potravinových systémech stále roste. Bažinní buvoli jsou nejpočetnější v Indii, Bangladéši a Číně. Vzhledem k nízké produkci mléka (1-2 kg/den), jsou chováni na maso nebo jako pracovní síla (Kiple 2007).

Říční buvoli se chovají zejména v Egyptě a v některých evropských zemích jako Itálie, Německo a Bulharsko. Chov tohoto druhu je zaměřen hlavně na produkci mléka (Czerniawska-Piątkowska et al. 2010).

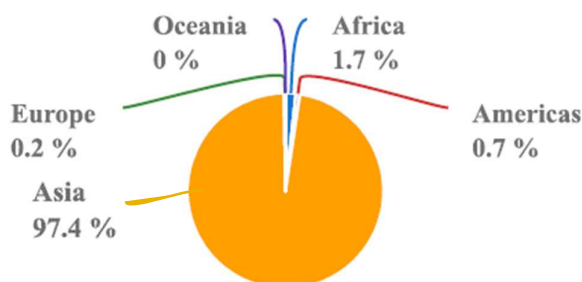
Celosvětově se v roce 2018 chovalo přibližně 206 milionů kusů, 81,5 % buvolů říčních a 18,5 % buvolů bažinatých (Zhang et al. 2020). Nejvíce buvolů chová v Indii, přibližně 55 % (114 milionů). Dále následuje Pákistán, Čína, Nepál a další státy Asie, Egypt a Brazílie, viz. Tabulka 1 (FAO 2018a).

Tabulka 1: Počet chovaných kusů buvolů celosvětově (FAO 2018a).

Země	Počet chovaných buvolů
Indie	114 151 000
Pákistán	38 848 000
Čína	27 118 000
Nepál	5 278 000
Myanmar	3 790 000
Egypt	3 506 000
Filipíny	2 882 000
Vietnam	2 425 000
Bangladéš	1 485 000
Brazílie	1 390 066

Pokud se zaměříme na Evropu, kde se chová okolo 439 tisíc kusů, majoritním chovatelem je Itálie (okolo 401 tisíc kusů), patří jí 17. příčka v celosvětovém porovnání. Dále je Bulharsko (12 tisíc kusů), Německo (9 tisíc kusů) a Řecko (9 tisíc kusů).

Asijskou převahu v chovu buvolů potvrzuje i Obrázek 2, kde je vyobrazeno, že v Asii je chováno 97,4 % všech buvolů (cca 201 milionů kusů) (FAO 2018a).



Obrázek 2: Procentuální rozdělení chovu buvolů na světě (FAO 2018a)

### 3.1.4 Mléčná produkce

Buvolice jsou sezóně polyestrické, pohlavní cyklus trvá 21 dní. Pohlavní dospělost u říčních buvolic nastává ve věku 15–18 měsíců věku. Chovatelská dospělost o 9–12 měsíců později. Buvolice jsou březí 310 dní, první telení tedy nastává v 37 až 40 měsíci věku. Rodí se jedno, občas 2 telata, která váží 35–40 kg (Catillo et. al 2002; Barile 2005).

Mléčná produkce buvolů je v porovnání s prošlechtěným skotem výrazně menší. Říční buvoli jsou schopni denně vyprodukovat 6–7 litrů mléka, přibližně 2 000 kg mléka za laktaci. Bažinní buvoli produkují 1–2 litry mléka denně (Thomas 2004; Zicarelli 2016). Laktace u buvolů trvá 270–310 dní záleží na plemeni (Thomas 2004). U mléčných plemen skotu je produkce mléka až 4 – 5x vyšší, záleží na plemeni.

Buvolí mléko je na světě druhým nejprodukovanějším mlékem po mléku kravském (81 % světové produkce). Buvolí mléko představovalo 15 % světové produkce v roce 2018 (FAOSTAT, 2018b). Země s nejvyšší produkcí buvolího mléka za rok 2018 jsou uvedeny v Tabulce 2 (FAO 2018b).

Tabulka 2: Produkce mléka ve světě (FAO 2018b)

Země	Produkce mléka [t]
Indie	91 817 140
Pákistán	28 109 000
Čína	3 003 323
Egypt	2 120 365
Nepál	1 338 277
Itálie	247 158
Myanmar	193 841
Irán	129 904
Srí Lanka	85 914
Turecko	75 742

#### 3.1.4.1 Indie

Nejvíce mléka je produkováno v Indii. Indie je největším chovatelem buvolů, jako první země v Asii se začala zabývat vědeckým a technologickým rozvojem výživy, produkce, reprodukce, biotechnologií a genetického zlepšování buvolů. Chov buvolů je podpořen i národními programy na podporu pěstování krmiv a produkce mléka a masa. Buvoli jsou dobře adaptováni na horké a vlhké klima. Jejich mléko a maso je vysoce kvalitní, navíc poskytují i tažnou sílu pro drobné zemědělce. Tato zvířata jsou také považována za finanční aktivum, jelikož slouží jako pojištění proti riziku poškození plodin v důsledku přírodních katastrof (Borghese & Mazzi 2005; Borghese 2011).

#### 3.1.4.2 Pákistán

Role hospodářských zvířat ve venkovském hospodářství Pákistánu je velmi důležitá. Dle Bilal et al. (2006) 30 až 35 milionů obyvatel venkova provozuje činnosti související s chovem hospodářských zvířat, přičemž domácnosti mají 2 až 3 kusy skotu nebo buvolů a 5 až 6 kusů ovcí a koz, což tvoří jejich 30 až 40 % příjmů. Buvol je obecně považován za prestižní

vlastnictví rodiny, protože počet buvolů chovaných farmáři určuje bohatství a postavení ve společnosti. V Pákistánu tvoří buvolí mléko 68 % z celkového množství vyprodukovaného mléka (skot 27 % a ovce, kozy, velbloud 5 %).

### 3.1.4.3 Itálie

Chov buvolů v Itálii je ve srovnání s asijskými zeměmi výrazně menší, ale z ekonomického hlediska jde o důležitý aspekt, zvyšuje zaměstnanost obyvatel a jde o tradici typickou pro Itálii. Italský chov buvolů je první na světě, pokud jde o genetiku, použité technologie a sledování zdravotní nezávadnosti, hygieny a kvality produktů (Borghese & Mazzi, 2005).

V Itálii je chován italský středomořský buvol. Selekcí a genetické zlepšení řídí ANASB (Italská asociace chovatelů buvolů). Díky tomu je možné zaznamenávat mléčnou produkci mnoha buvolic, které mohou produkovat více než 3 000 kg za laktaci (270 dní). U mnoha buvolů je testováno sperma a potomstvo, mohou tak být vybíráni buvoli s vysokou genetickou hodnotou a od nich odebíráno sperma pro umělou inseminaci v Itálii i ve světě (Borghese 2013).

Pro posouzení mléčné užitkovosti je povinné zaznamenávat: produkci mléka, obsah tuku a obsah bílkovin. Analýza obsahu tuku a bílkovin je v italském systému evidence mléka povinná, protože na základě těchto parametrů se stanovuje genetická hodnota pro mléčnou užitkovost. Nejvýznamnější je obsah bílkovin, jelikož mléko se především zpracovává na sýr Mozzarella (Moioli 2005)

Veškerá data jsou shromažďována společností ANASB, která rozhoduje o cílech šlechtění, které mají v současné době zvýšit nejen množství mléka, ale konkrétně výrobu Mozzarely (Borghese 2011).

Největší část populace buvolů je chována v provinciích Caserta a Salerno (region Kampánie) a dále jsou to provincie Frosinone a Latina (oblast Lazio). V těchto oblastech se vyrábí mozzarella s chráněným označením původu, „Mozzarella di Bufala Campana“. Hygienická kontrola mléka a mléčných výrobků v tomto odvětví je zvláště vysoká, jelikož se sýr vyrábí z nepasterovaného buvolího mléka. K dosažení optimálních vlastností sýra je nutný správný poměr mezi bílkovinami (cca 4 – 4,7 %) a tukem (cca 7,0 % nebo více). Charakteristická je porcelánově bílá barva a hladký povrch. Chuť je velmi specifická a delikátní, hlavně ovlivněna fermentací kyseliny mléčné pomocí startovacích kultur (De Angelis & Gobbetti 2011)

V roce 2019 dosáhla průměrná italská produkce mléka při 270 dnů laktace 2 356 kg, s průměrným obsahem tuku  $8,01 \pm 0,99$  % a průměrným obsahem bílkovin  $4,63 \pm 0,32$  % (AIA, 2019). Zlepšování užitkovosti zvířat, chovu buvolů a sledování kvality mléka představuje pro italský buvolí mléčný průmysl stále zásadní výzvy. Ve skutečnosti postupná intenzifikace systému (tj. větší velikost stáda, vyšší produkce mléka a aplikace intenzivních nebo polointenzivních chovných technik převážně určených pro skot) vedly k manažerským otázkám a k citlivosti spotřebitelů, pokud jde o welfare zvířat a bezpečnost potravin. Kromě toho se v této době řeší problém antibiotické mikrobiální rezistence, proto se důrazně doporučuje zlepšit zdraví a omezit používání antibiotik u buvolů (De Rosa et al., 2005).

### 3.1.5 Mléko

Buvolí mléko hraje důležitou roli ve výživě lidí zejména v rozvojových zemích. Ve srovnání s kravským mlékem je buvolí bohatší na téměř všechny hlavní mléčné živiny (Zicarelli 2004; El-Salam & El-Shibiny 2011).

Buvolí mléko má dobré fyzikální a chemické vlastnosti v důsledku vysokého obsahu hlavních složek. Tato vlastnost mléka je žádoucí pro mlékárenský průmysl, protože usnadňuje výrobu sýra (Kamel et al. 2012). V Itálii i v dalších evropských zemích se většina buvolího mléka používá pro výrobu různých druhů sýrů (Zicarelli 2004; Manuelian et al. 2017), zejména Mozzareilly, ale v menší míře také různých druhů čerstvých a zrajících sýrů.

Kvalita buvolího, ale i ostatních druhů mléka, je pro mléčný průmysl určující ukazatel, jelikož přímo ovlivňuje technologické zpracování mléka.

#### 3.1.5.1 Počet somatických buněk

Počet somatických buněk (PSB) je po celém světě označován jako indikátor zdraví vemene a slouží pro sledování hygieny chovu a dojení. PSB představuje koncentraci somatických buněk v mililitru mléka (leukocyty, monocyty, lymfocyty, erytrocyty, fibrin, membránové fragmenty nebo buňky epitelu). Zvýšený PSB je jeden z příznaků mastitidy, jelikož se organismus snaží o eliminaci zánětu, tím se zvyšuje počet hlavně leukocytů a buněk epitelu (Bansal et al. 2007; Tripaldi et al. 2010).

Mastitida (zánět mléčné žlázy) je nemoc výrazně ovlivňující náklady na prvovýrobu mléka, včetně chovu buvolů. Ekonomické ztráty jsou způsobeny několika faktory: snížený výnos mléka, zhoršená kvalita mléka, náklady na veterinární ošetření nebo případné utracení zvířete. U italských buvolů bývá výskyt mastitidy poměrně vysoký, což ukazuje na špatnou hygienu a nedostatečnou péči o chov (Fagiolo & Lai 2007; Sharif et al. 2007; Costa et al. 2020).

PSB je dán legislativně pouze u kravského mléka. Podle nařízení EU č. 853/2004 ze dne 29. dubna 2004 syrové kravské mléko musí obsahovat méně než 400 000 SB/ml. Pro buvolý nebo jiné druhy zvířat poskytující mléko limit PSB stanoven není (EU, 2004).

#### 3.1.5.2 Chemické složení

Buvolí mléko má v porovnání s kravským mlékem vyšší hladiny tuku, laktózy, bílkovin, popelovin, vápníku a vitaminů A a C; nižší hladiny vitamínu E, riboflavinu a cholesterolu. Není v něm přítomný karoten, a naopak obsahuje modrozelený pigment (biliverdin). V Tabulce 3, Kapadiya et al. 2016 uvádějí složení buvolího mléka, kozího mléka plemene Surti a kravského mléka plemene Kankrej. V tabulce 4 je pak uvedeno složení buvolího mléka plemene Murrah a kravského mléka plemene Holštýn, dle Ahmad et al. 2008.

Tabulka 3: Hrubé složení buvolího, kravského a kozího mléka dle Kapadiya et al. 2016

	<b>Buvol</b>	<b>Kráva</b>	<b>Koza</b>
Sušina [%]	18,45 ± 0,56	13,79 ± 0,36	12,76 ± 0,29
Tuk [%]	8,3 ± 0,37	4,88 ± 0,53	3,84 ± 0,37
Bílkoviny [%]	4,48 ± 0,29	3,49 ± 0,18	3,42 ± 0,14
Laktóza [%]	4,86 ± 0,24	4,76 ± 0,35	4,16 ± 0,31
Popeloviny [%]	0,81 ± 0,08	0,76 ± 0,02	0,89 ± 0,12

Tabulka 4: Složení buvolího a kravského mléka dle Ahmad et al. 2008

	<b>Buvol (Murrah)</b>	<b>Kráva (Holštýn)</b>
Sušina [%]	17,40 ± 0,82	13,70 ± 1,08
Tuk [%]	7,00 ± 0,60	4,10 ± 0,10
Bílkoviny [%]	4,35 ± 0,34	3,35 ± 0,30
Laktóza [%]	5,21 ± 0,11	4,80 ± 0,10
Popeloviny [%]	0,84 ± 0,02	0,77 ± 0,01

Rozdíly koncentrací bílkovin, tuku, laktózy, popela a následně sušiny mohou být způsobeny fyziologickými odlišnostmi zvířat, stádiem laktace a běžnými faktory, jako jsou sezónnost, krmivo, plemeno, čas a sled dojení (Ahmad et al. 2008, El-Salam et. al 2011).

### 3.1.5.2.1 Voda

Voda je médium (disperzní prostředí), ve kterém jsou obsaženy všechny ostatní složky mléka. Malé množství vody v mléce je hydratováno nebo chemicky vázáno na laktózu, soli nebo bílkoviny. Odstranění vody z mléka (snížení vodní aktivity), například v koncentrovaných nebo sušených mléčných výrobcích, se zvyšuje jeho trvanlivost. Během výroby sýra/tvarohu část vody a v ní rozpuštěné složky odchází ve formě syrovátky. Voda zbývající v sýru/tvarohu poskytuje vhodné podmínky pro chemické a biologické reakce, na nichž je výroba sýra založena, poskytuje vlhkost, která je nezbytná pro růst a aktivity mikroorganismů. Množství zbývající vody ve výrobku také ovlivňuje chuť, strukturu, barvu a vzhled hotového výrobku. Nařízení zakazuje přidávání vody do syrového mléka a pro jednotlivé kategorie sýrů je rovněž stanoven maximální obsah vody (Kailasapathy 2015).

### 3.1.5.2.2 Bílkoviny

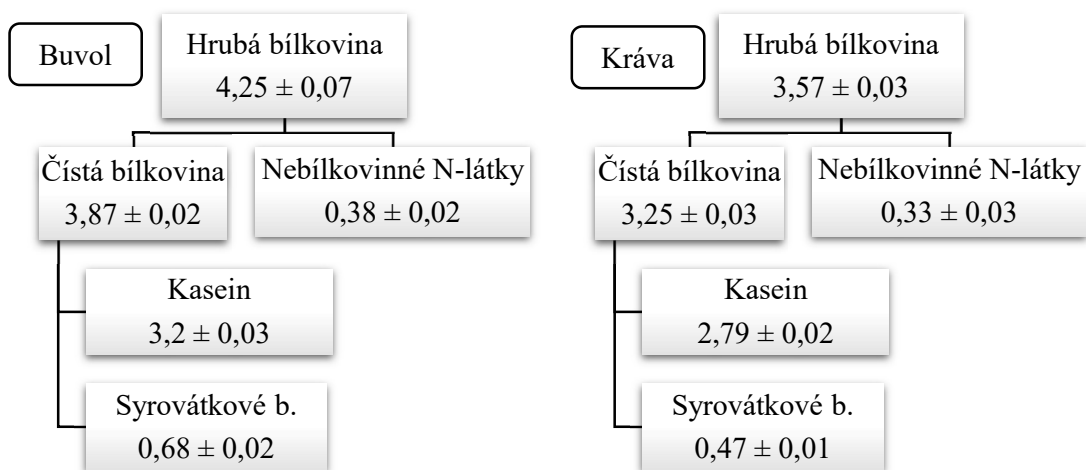
Hlavní mléčné proteiny jsou dvou typů, rozpustné syrovátkové (sérové) bílkoviny a nerozpustné kaseiny. Buvolí mléko je mléko kaseinové, z celkových bílkovin je asi 80 % kaseinů a 20 % syrovátkových bílkovin a dalších minoritně zastoupených bílkovin. Syrovátkové bílkoviny a minoritní bílkoviny jsou nejvyšší v kolostru, zastoupení jednotlivých druhů bílkovin se liší v závislosti na průběhu laktace (Ahmad et al. 2013; Yasmin et al. 2020). Na Obrázku 3 je znázorněn obsah bílkovin a dusíkatých frakcí v buvolím a kravském mléce.

Kaseiny jsou globulární proteiny, v buvolím mléce jsou  $\alpha_{S1}$ - (40 %),  $\alpha_{S2}$ - (6 – 9 %),  $\beta$ - (35%) a  $\kappa$ -kasein (12 %). Téměř veškerý kasein buvolího mléka je přítomen ve formě micel. Kaseinové micely buvolů mají průměr okolo 190 nm, což je o 10 až 20 nm větší než u kravského mléka (Ahmad et al. 2009). Zdá se, že vyšší koncentrace kaseinu v buvolím mléce v koloidní formě má primární dopad na zvýšení počtu kaseinových micel a sekundární dopad na jejich velikost (Ahmad et al. 2013). Buvolí mléko obsahuje vyšší množství  $\kappa$ -kaseinu než kravské, to může ovlivňovat enzymatickou fázi srážení syřidlem a použití menšího množství chymosinu při výrobě sýrů, ale také ovlivňuje elasticitu sýřeniny pro výrobu sýrů Mozzarella, které je u buvolího mléka dosažena při nižším pH 4,9 (Addeo et al. 2007).

$\alpha$ -laktalbumin a  $\beta$ -laktoglobulin jsou převládajícími syrovátkovými proteiny a tvoří asi 70–80 % z celkových syrovátkových bílkovin. Mezi další typy syrovátkových bílkovin je třeba uvést imunoglobuliny, sérový albumin, laktoferin, laktoperoxidázu a proteázové peptony (Davoodi et al. 2016). Syrovátkové bílkoviny buvolího mléka jsou odolnější vůči denaturaci

teplem než proteiny z kravského mléka. V buvolím mléce byla naměřena koncentrace laktoferinu 0,332 mg/ml (Giacinti et al. 2013), zatím co v kravském je průměrná hodnota 0,105 mg/ml (Król et al. 2010). Přestože buvolí mléko obsahuje přibližně 3x více laktoferinu než kravské, lidské mléko má průměrný obsah 1–3 g/l (Montagne et al. 2001).

Mezi mléčnými složkami jsou proteiny nejdůležitějšími složkami lidské výživy a přispívají k významným výživovým, biologickým a funkčním vlastnostem. Aminokyselinový profil kaseinů a syrovátkových bílkovin zaujímá v lidské výživě jedinečné postavení. Tyto proteiny jsou hodnoceny jako kvalitní proteiny s nejvyšší biologickou hodnotou, dobrou stravitelností (97 % až 98 %), rychlou absorpcí a využitím v těle. Konkrétně je kasein účinným zdrojem živin, protože zajišťuje trvalé a pomalé uvolňování aminokyselin do krevního oběhu. Mléčné proteiny mají pozitivní vliv na různé struktury těla, jako je imunitní, nervový, trávicí a kardiovaskulární systém (Rafiq et al. 2016).



Obrázek 3: Obsah bílkovin a dusíkatých frakcí [%] v buvolím a kravském mléce (Rafiq et al. 2016)

### 3.1.5.2.3 Tuk

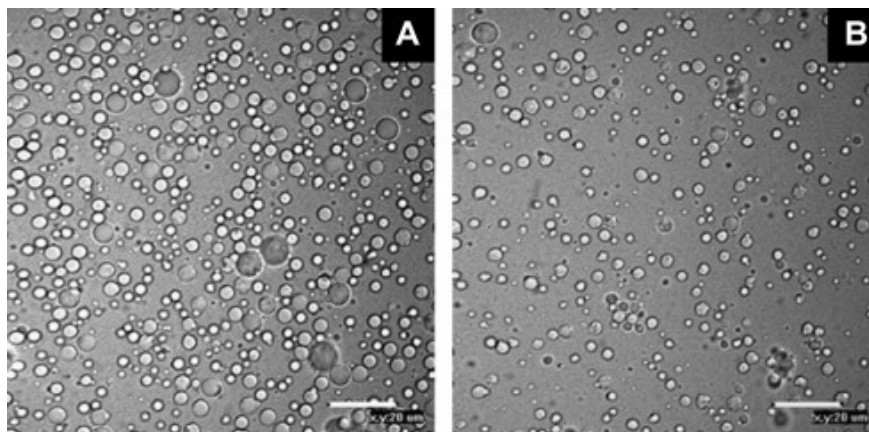
Zejména tuk tvoří hlavní frakci buvolího mléka a je zodpovědný za jeho vysokou energetickou a výživnou hodnotu (Menard et al. 2010). Tuk je rozptýlen v mléce ve formě kulovitých kapiček nazývaných mléčné tukové kuličky, jejichž distribuce a velikost se může mezi jednotlivými druhy mléka lišit v průměru od <1 μm až 18 μm (El-Zeini, 2006).

Tukové kuličky se skládají hlavně z triacylglycerolů (98 %), což jsou estery glycerolu a mastných kyselin. Mléčný tuk obsahuje především nasycené mastné kyseliny asi 70 % (hlavně kys. palmitová (36,02 %), kys. myristová (11,77 %), kys. stearová (9,85 %)) a malé množství nenasycených mastných kyselin asi 30 % (kys. olejová (20,25 %)) (Menard et al. 2010). Mléčné tukové kuličky jsou obklopeny biologickou membránou, která je výsledkem mechanismů sekrece tukových kuliček z epiteliálních buněk mléčné žlázy. Membrána tukových kuliček obsahuje hlavně glycerofosfolipidy (fosfatidylcholin, fosfatidyletanolamin, fosfatidylinositol, fosfatidylserin), sfingolipidy (hlavně sfingomyelin), cholesterol a proteiny (Nguyen et al. 2015).

Tukové kuličky v buvolím mléce jsou větší ve srovnání s mlékem od ostatních přežvýkavců, 1 ml buvolího mléka obsahuje asi 2,7 milionu tukových kuliček, přičemž 60 % má velikost mezi 3,5 až 7,5 μm. Průměrná velikost tukových kuliček krav je 3,16 μm,



koz 2,57  $\mu\text{m}$  a ovcí 3,02  $\mu\text{m}$  (měřeno mikroskopickou metodou) (El-Zeini, 2006). Porovnání obsahu a velikosti tukových kuliček v buvolím a kravském mléce je zobrazen na Obrázku 4. Větší velikost souvisí s vyšším množstvím tuku v buvolím mléce. Velikost tukových kuliček v nativním mléce ovlivňuje fyzikálně-chemické a funkční vlastnosti mléka a mléčných výrobků. Tukové kuličky buvolů jsou méně stabilní a lze je stloukat rychleji než u krav (Menard et al. 2010).

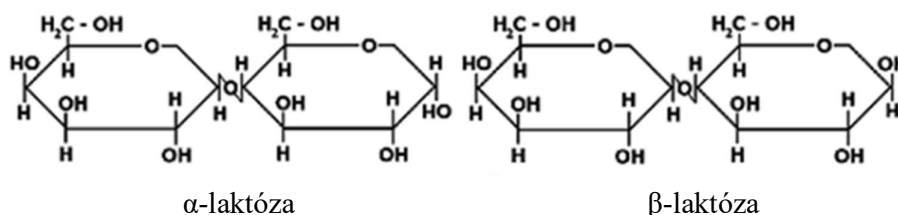


Obrázek 4: Fotografie pořízená optickou mikroskopií ukazující rozdíly v obsahu tuku a velikosti tukových kuliček v buvolím (A) a kravském (B) mléce (Menard et al. 2010)

Z technologického hlediska může buvolí mléko poskytovat širokou škálu produktů: máslo, ghí, měkké a tvrdé sýry, kondenzovaná nebo sušená mléka, zmrzlinu, jogurt a podmásli. Díky vysokému obsahu tuku je velmi vhodné ke zpracování. Například výroba 1 kg másla vyžaduje 14 kg kravského mléka oproti 10 kg buvolího mléka (Menard et al. 2010)

#### 3.1.5.2.4 Laktóza

Laktóza (mléčný cukr), chemicky O- $\beta$ -D-galaktopyranosyl-(1-4)- $\beta$ -D-glukóza, je disacharid tvořený  $\alpha$ -D-glukózou a  $\beta$ -D-galaktózou, které jsou spojeny  $\beta$ -1,4-glykosidovou vazbou (Kwak et al. 2012). Laktóza má dvě optické izomerní formy  $\alpha$  a  $\beta$ , ty mohou být ve formě amorfni nebo krystalické. Strukturní vzorec  $\alpha$  a  $\beta$ -laktózy je uveden na Obrázku 5. Krystalická  $\alpha$ -laktóza může mít formu monohydrátu nebo anhydrátu, krystalická  $\beta$ -laktóza je pouze v bezvodné formě.  $\beta$ -forma má výrazně vyšší rozpustnost, ale vlivem mutarotací vzniká v roztoku rovnovážná směs obou forem. Laktóza je jedním z nejméně rozpustných běžných cukrů, její rozpustnost ve vodě při 25  $^{\circ}\text{C}$  je pouze 17,8 % (Varnam & Sutherland 2001).



Obrázek 5: Strukturní vzorec optických izomerů laktózy (Teixeira et al. 2019)

Mléko je hlavním zdrojem energie a uhlíku pro savce. Zatímco glukóza je hlavně energetickou složkou, galaktóza má roli ve vývoji mozku. Laktóza, resp. galaktóza

je specifickou složkou mléka (Adam et al. 2005). Buvolí mléko je bohatším zdrojem laktózy než kravské, kozí, ovčí nebo velbloudí mléko (Ahmad et al. 2013). Jiné volné sacharidy, které se nacházejí v mléce v nízkých koncentracích, jsou glukóza, galaktóza, aminocukry, fosfáty, neutrální a kyselé oligosacharidy a nukleotidové cukry (Corzo et al. 2009). Obsah laktózy v buvolím mléce se pohybuje okolo 4,8 %, stanovení laktózy v různých studiích je uvedeno v Tabulce 5. Jelikož je laktóza hlavním zdrojem energie pro novorozence, její obsah je významný v mléce většiny druhů savců včetně člověka. Výjimkou jsou vodní savci, kteří mají významně vyšší obsah tuku v mléce, jelikož si mláďata potřebují vytvořit tepelnou izolaci. Obsah laktózy v mléce dalších savců včetně člověka je uveden v Tabulce 6.

Tabulka 5: Obsah laktózy v buvolím mléce

Laktóza [%]	Zdroj
4,86 ± 0,24	Kapadiya et al. 2016 (Indie)
4,28 ± 0,21	Kamel et al. 2012 (Egypt)
5,58 ± 0,09	Menard et al. 2010 (Francie)
5,21 ± 0,11	Ahmad et al. 2008 (Francie)
4.85 ± 0.78	Tufarelli et al. 2008 (Italy)
4.80 ± 0.10	Khan et al. 2007 (Bangladéž)

Tabulka 6: Obsah laktózy v mléce dalších savců (Schaafsma 2003)

Laktóza [%]		Laktóza [%]	
Člověk	7,0	Koza	4,7
Kůň	6,9	Kráva	4,6
Osel	6,1	Pes	3,8
Lama	5,6	Myš	3,0
Prase	5,0	Delfin	1,1

### Biosyntéza

Biosyntéza laktózy probíhá v buňkách mléčné žlázy. Většina glukózy je syntetizována v játrech pomocí glukoneogeneze z kyseliny propionové a krví přiváděna do sekrečních buněk.

K syntéze jedné molekuly laktózy jsou potřeba dvě molekuly glukózy. Jedna z molekul glukózy prochází modifikací v cytosolu sekreční buňky a je přeměněna pomocí enzymů na UDP-glukózu a dále pomocí enzymu epimeráza na UDP-galaktózu. Následně je UDP-galaktóza, stejně jako druhá molekula glukózy bez modifikace, transportována do Golgiho aparátu. V sekrečních vezikulách Golgiho aparátu UDP-galaktóza kondenzuje s glukózou a vzniká laktóza, reakce je katalyzována enzymem laktózosyntáza. Vzniklá laktóza nemůže difundovat ven z Golgiho aparátu, ani sekrečních vezikul. Proto se sekreční vezikuly oddělí od GA ve formě malých váčků, které putují cytoplazmou až k povrchu buňky, kde se otvírají a jejich obsah je vylučován do lumenu alveolu. Laktóza ve váčcích způsobuje hypertonické prostředí, což vede k tomu, že voda z cytoplazmy difunduje dovnitř, aby došlo k vyrovnání tlaku, tímto laktóza ovlivňuje množství vody v mléce a jeho objem (Adam et al. 2005; Fox 2013).

## *Metabolismus*

Pro vstřebání a využití laktózy organismem je nezbytné ji rozštěpit na monosacharidy, enzymem laktáza, který se uvolňuje z kartáčového lemu enterocytů (Vázquez et al. 2020). Glukóza a galaktóza jsou poté transportovány přes membránu kartáčového lemu epitelu do cytosolu a krví jsou dopraveny do jater. V játrech je galaktóza přeměněna na glukózu tzv. Leloirovou cestou, pomocí 3 enzymů (galaktokináza, galaktózo-1-fosfát uridylyltransferáza a uridin-difosfogalaktózo-4-epimeráza) (Schaafsma 2008). Odtud jsou monosacharidy distribuovány do různých tkání. Většina savců má vysokou aktivitu laktázy v raných stádiích života, tj. když je mléko jedinou výživou, a nízké hladiny laktázy, když dosáhnou dospělosti nebo později ve stáří (Adam et al. 2005).

## *Poruchy metabolismu laktózy*

U lidí je velmi častým problémem nesnášenlivost (intolerance) laktózy způsobená ztrátou laktázové aktivity. Deficit laktázy je nejčastější u osob afrického nebo asijského původu, ale může ovlivnit i členy jiné rasové skupiny. Stupeň nedostatku laktázy se mění a příznaky se velmi liší, od neschopnosti trávit i malá množství mléčných výrobků po mírné gastrointestinální poruchy po konzumaci větších množství potravin obsahujících laktózu. Běžné příznaky jsou bolest břicha, plynatost, nevolnost a průjem. Jelikož střevo postrádá schopnost absorbovat disacharidy, nestrávená laktóza slouží jako fermentační substrát pro mikroflóru tlustého střeva, což vede k výše uvedeným příznakům. V reakci na tento problém byly vyvinuty komerční postupy pro hydrolýzu laktózy v mléce a jiných mléčných výrobcích (Adam et al. 2005; Vázquez et al. 2020).

Galaktosémie je dysfunkce nepřímě spojená s metabolismem laktózy. Jde o geneticky děděnou metabolickou poruchu, která je způsobena, když je přeměna galaktózy na glukózu v játrech blokována nedostatkem jednoho ze 3 enzymů podílejících se na metabolismu galaktózy (v 95 % případech jde o deficienci galaktózy-1-fosfát uridylyltransferázy). Toto vzácné onemocnění se vyskytuje u 1 z 80 000 narozených dětí. Existuje několik typů galaktosémie. Klasická galaktosémie, nejběžnější, vyžaduje odstranění všech potravin obsahujících laktózu nebo galaktózu ze stravy (mateřské mléko, mléčné výrobky, luštěniny a mnoho dalších potravin). Pokud se galaktosémie neléčí, u dětí se mohou vyvinout závažné onemocnění, jako je zánět jater, poškození ledvin nebo zpomalení růstu. Kromě toho nahromadění galaktózy a galaktózy-1-fosfátu může způsobit poškození mozku a v některých případech smrt (Adam et al. 2005; Schaafsma 2008).

## *Stanovení obsahu laktózy v mléce*

Klasické metody pro stanovení sacharidů v mléce zahrnují gravimetrické, polarimetrické nebo spektrofotometrické analýzy. Dřívější metody analýzy laktózy v mléce jsou založeny na stanovení laktózy rozdílem, což je nepřímá metoda, při které se laktóza počítá odečtením obsahu bílkovin, tuků a popela ve vzorku od celkového obsahu pevných látek. Polarimetrické metody jsou založeny na měření specifické rotace laktózy ve odtučněném a deproteinizovaném mléčném filtrátu. Gravimetrické metody využívají redukci síranu měďnatého na oxid měďný vysrážený přidáním hydroxidu draselného v přítomnosti aldóz a ketóz; po zvážení vytvořeného oxidu měďného se obsah laktózy vypočítá pomocí tabulek (Corzo et al. 2009).

Infračervená spektroskopie, je metoda založená na měření absorpce infračerveného záření specifickými chemickými skupinami. Stanovované složky jsou měřeny při specifických vlnových délkách. Analýza laktózy ve spektroskopii střední infračervené oblasti (MIR) se provádí při 9,610  $\mu\text{m}$ , kdy je záření pohlcováno hydroxylovou skupinou. Tuk je měřen při vlnové délce 5,723  $\mu\text{m}$ , kdy záření absorbuje karboxylová skupina a při 3,48  $\mu\text{m}$ , kdy je záření pohlcováno -CH skupinou. Bílkoviny jsou stanovovány při 6,465  $\mu\text{m}$ , absorpce amidovou skupinou. Zařízení založená na infračervené spektroskopii s Fourierovou transformací (FTIR) používají interferometr k produkci úplných informací o spektrech v oblasti MIR (Lynch et al. 2006; Corzo et al. 2009). Na principu FTIR pracuje přístroj MilkoScan, analyzátor mléka navržen pro rychlé a nákladově efektivní stanovení složek mléka, smetany, syrovátky, jogurtů nebo dalších mléčných výrobků. U mléka je schopen stanovit tuk, bílkoviny, laktózu, celkovou sušinu, tuku prostou sušinu, bod mrznutí, celkovou kyselost, hustotu, volné mastné kyseliny, kyselinu citronovou, močovinu, kasein, glukózu a galaktózu.

Bylo popsáno značné množství enzymatických metod pro stanovení laktózy. Zakládají se na enzymatické hydrolýze laktózy na glukózu a galaktózu, následovanou enzymatickým stanovením jednoho z uvolněných monosacharidů. Rozdíl v obsahu monosacharidů před a po hydrolýze představuje množství laktózy ve vzorku. Nejběžnější enzymatická metoda měření galaktózy je založena na její oxidaci  $\beta$ -galaktózo-dehydrogenázou na kyselinu galakturonovou v přítomnosti nikotinamidadeninukleotidu (NAD), který je redukován na NADH. Dále se spektrometricky stanoví absorpance NADH při 340 nm a obsah laktózy se vypočítá jako rozdíl mezi odečty před a po přidání enzymu (galaktózo-dehydrogenáza) (Corzo et al. 2009).

Simultánního stanovení různých sacharidů přítomných v mléčných výrobcích lze dosáhnout pomocí chromatografických metod: planární chromatografie, plynová chromatografie (GC) a vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC). Tyto techniky nejen poskytují kvantitativní informace o každém analytu ve směsi, ale mohou být také spojeny se spektroskopickými přístroji, aby se získaly strukturní informace. Z praktických důvodů se před analýzou izolují sacharidy z nerozpustných látek, jako jsou lipidy a proteiny, dialýzou, centrifugací nebo srážením metanolem. Před analýzou GC je nezbytným krokem přeměna sacharidů na těkavé deriváty (derivatizace). HPLC je jednou z nejrozšířenějších technik, protože je rychlá a jednoduchá na přípravu vzorku. Je možné injektovat vzorek bez předchozí derivatizace a získat chromatogram s vysokým rozlišením v krátké době (Corzo et al. 2009).

#### *Využití v potravinářství*

Laktóza je hlavním substrátem ve fermentačních procesech, které vedou k produkci fermentovaných mléčných výrobků, jako je jogurt nebo kefir. Fermentace zlepšuje konzervační vlastnosti potravin, zatímco současně poskytuje chuť a texturu odlišné od původního materiálu (Adam et al. 2005). Mnoho mikroorganismů je schopno využívat laktózu pro svůj růst a množení. Z biotechnologického hlediska jsou nejvýznamnější skupinou bakterie mléčného kvašení (BMK). BMK jsou hlavní bakterie používané při fermentaci potravin. Jsou to gram-pozitivní, nesporulující, anaerobní bakterie ve tvaru tyčinky nebo koku, které mají společné, že jsou schopny přetvářet sacharidy na organické kyseliny. Homofermentativní BMK vytváří převážně kyselinu mléčnou, heterofermentativní BMK, kromě kys. mléčné dále produkují další org. kyseliny (octovou, mravenčí propionovou), etanol a  $\text{CO}_2$ . Patří sem hlavně rody *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* a *Enterococcus*,

dále mnoho dalších rodů s různým využitím v potravinářství (Hill et al. 2017). Ne jenom bakterie jsou schopny fermentovat laktózu některé druhy kvasinek, zejména z rodu *Kluyveromyces*, také hrají významnou biotechnologickou roli při fermentaci laktózy na etanol, například při výrobě kefíru (Adam et al. 2005).

Některé sýry neobsahují téměř žádnou laktózu, protože během výrobního procesu většina odejde se syrovátkou a zbývající laktóza v sýru se ve fermentačním procesu postupně spotřebovává. U čerstvých sýrů a sýrů vyrobených koagulací čerstvého mléka nebo smetany se syřidlem nebo kyselinou však zůstává laktóza nezměněna, a proto tyto výrobky mohou obsahovat značné množství laktózy, to i kvůli značnému množství zbytkové syrovátky v čerstvých sýrech (více než 68 % vody v tukuprosté hmotě). Protože většina kmenů fermentuje pouze glukózovou část laktózy, galaktóza zůstává. Galaktóza i laktóza mohou ovlivnit vlastnosti sýrů, a proto je třeba kontrolovat jejich obsah (Corzo et al. 2009).

Laktóza najde využití jako složka potravin díky svým stabilizačním vlastnostem na bílkoviny a nízké relativní sladkosti (20–30 % sacharózy). Laktóza může být také použita jako částečná náhradka sacharózy v polevách pro zlepšení pocitu v ústech bez nadměrné sladkosti. Přidává se také k pekárenským výrobkům, jako jsou sušenky, aby udělal kontrolovaný stupeň Maillardova zhnědnutí, což je reakce považovaná za nežádoucí u mnoha potravinářských výrobků (Varnam & Sutherland 2001).

Laktóza významně ovlivňuje vlastnosti mléka, jako je osmotický tlak, snížení bodu tuhnutí a zvýšení bodu varu, například představuje 50 % osmotického tlaku mléka. Osmotický tlak mléka je udržován rovnováhou koncentrace laktózy a rozpustných minerálů, proto mění-li se obsah sodíku a draslíku v mléce, snižuje se syntéza (Forsbäck et al. 2010). Dále může podporovat absorpenci vápníku (Abrams et al. 2002).

Pokud se sleduje laktóza v mléce pravidelně může být použita i jako ukazatel zánětu mléčné žlázy. Sharif et al. 2007 provedli výzkum u buvolic, kdy stanovovali, mimo jiné, množství laktózy v mléce zdravých a nemocných zvířat s různým stupněm zánětu. Maximální laktóza byla naměřena u zdravých jedinců (5,10 %), ve skupině s nejtěžším zánětem byla laktóza naměřena nejnižší (2,66 %). Snížení obsahu laktózy má více příčin. Jedním z důvodů je poškození tkáně při mastitidě, což snižuje syntetické schopnosti sekrečních buněk a biosyntézu laktózy. Další příčinou je průchod laktózy z mléka do krve, kdy dochází k úniku z alveol mezi epiteliální buňky a do krve. Zvýšenou hladinu laktózy je poté možné sledovat v krvi nebo moči.

#### *Deriváty laktózy*

Laktulóza (4-O-β-D-galaktopyranosyl-D-fruktóza) je cukr, který se v přírodě nevyskytuje, vzniká izomerací glukosylu v laktóze působením záhřevu a je v malém množství přirozenou složkou tepelně ošetřeného mléka a mléčných výrobků. Není hydrolyzován intestinální β-galaktosidázou a vstupuje do tlustého střeva, kde podporuje růst bifidobakterií. Laktulóza je mírné projímadlo a pro tento účel je poměrně široce využívána. Pro tyto účely je laktulóza produkována pomocí zahřívání laktózy za katalýzy např. hydroxidem sodným (Fox 2003; Rudolfová & Čurda 2005).

Galaktooligosacharidy (GOS) se přirozeně vyskytují v mléce nebo se vyrábějí z laktózy transgalaktosylací, která je katalyzována β-galaktosidázou. V organismu působí jako rozpustná

vláknina, může se tedy využívat jako prebiotikum. GOS mají také další významné fyzikálně-chemické vlastnosti, například zvyšují viskozitu výrobků, jelikož mají vyšší molekulovou hmotnost než monosacharidy. Ovlivňují bod tuhnutí u mražených produktů a omezují Maillardovy reakce u tepelně zpracovaných potravin (Rudolfová & Čurda 2005).

### 3.1.5.2.5 Minerální látky

Minerály jsou důležité pro růst, vývoj, regulaci různých životních funkcí v našem těle a udržování iontové rovnováhy tělesných tekutin. Přibližně 4–6 % tělesné hmotnosti člověka tvoří minerální látky. Celkový obsah minerálů ve vzorku mléka se obvykle hodnotí pomocí obsahu popelovin. Mléko obsahuje více než 20 různých minerálů, například vápník, hořčík, sodík, draslík, fosfor, zinek, železo, měď, mangan atd. Mléko je nejdůležitějším zdrojem biologicky dostupného Ca a P v naší stravě. Vápník přijímaný z mléka se v těle lépe absorbuje ve srovnání se zdroji ze zeleniny (Singh et al. 2019). Obsah minerálních látek v kravském, kozím a buvolím je uveden v Tabulce 7.

V mléce je většina makroprvků distribuována do difuzní (rozpustné) a nedifuzovatelné (koloidní) frakce, koloidní forma je spojována hlavně s kaseinovými micelami. K, Na a chloridové ionty jsou v podstatě difuzní; Ca, anorganický fosfát a Mg jsou částečně vázány na kaseinové micely a hrají důležitou roli ve struktuře a stabilitě kaseinové micely. Žádný makroprvek není vázán v důležitém množství na tukové kuličky nebo laktózu (Gaucheron et. al 2005; Vidu et. al 2015).

Chemická forma, ve které se minerální a stopový prvek nachází v mléce nebo v jiných potravinách, je důležitá, jelikož ovlivňuje stupeň absorpce a využití ve střevech, transport, buněčnou asimilaci a přeměnu na biologicky aktivní formy, a tedy i biologickou dostupnost (Ahmad et. al 2013).

Tabulka 7: Obsah minerálních prvků v mléce různých druhů s rozpustnou frakcí minerálů (Singh et al. 2019)

<b>Prvek</b>	<b>Forma</b>	<b>Buvol</b>	<b>Kráva</b>	<b>Koza</b>
Vápník	Celkem	204,23 ± 7,98	134,87 ± 13,45	135,09 ± 8,52
[mg/100 g]	Rozpustný	44,91 (22 %)	51,16 (38 %)	43,25 (32 %)
Hořčík	Celkem	23,53 ± 1,33	10,87 ± 1,31	10,81 ± 1,3
[mg/100 g]	Rozpustný	11,33 (48 %)	6,99 (64 %)	6,5 (60 %)
Sodík	Celkem	42,39 ± 0,82	54,06 ± 5,9	52,89 ± 2,07
[mg/100 g]	Rozpustný	41,47 (98 %)	53,24 (98 %)	52,12 (98 %)
Draslík	Celkem	118,05 ± 7,8	144,88 ± 6,09	174,85 ± 4,85
[mg/100 g]	Rozpustný	109,52 (93 %)	141,88 (98 %)	167,33 (96 %)
Fosfor	Celkem	117,45 ± 5,26	90,24 ± 1,3	92,06 ± 2,16
[mg/100 g]	Rozpustný	38,37 (33 %)	49,31 (55 %)	34,75 (38 %)
Zinek	Celkem	0,51 ± 0,1	0,62 ± 0,14	0,48 ± 0,67
[mg/100 g]	Rozpustný	0,06 (12 %)	0,085 (14 %)	0,068 (14 %)
Železo	Celkem	0,11 ± 0,021	0,116 ± 0,01	0,078 ± 0,014
[mg/100 g]	Rozpustný	0,027 (25 %)	0,038 (33 %)	0,0304 (38 %)
Měď	Celkem	0,061 ± 0,031	0,07 ± 0,006	0,050 ± 0,01
[mg/100 g]	Rozpustný	0,021 (34 %)	0,029 (41 %)	0,0093 (18 %)

Mangan	Celkem	0,05 ± 0,018	0,036 ± 0,008	0,03 ± 0,012
[mg/100 g]	Rozpustný	0,0078 (15 %)	0,0085 (23 %)	0,0041 (14 %)

Patino et al. 2007 provedli studii se zaměřením, jak různé faktory působí na obsah minerálních látek. Do studie byli zahrnuti plemena Murrah, Středomořský buvol, Jafarabadi a kříženec plemene Murrah x Středomořského buvola, hodnotil se vliv plemene, pořadí laktace (první až třetí laktace) a roční období v průběhu laktace. Bylo zjištěno, že plemeno významně neovlivnilo obsah minerálů a stopových prvků. Různá roční období naopak významně ovlivnila složení minerálů v mléce, u většiny minerálů (Ca, P, Mg, Na, Cu, Zn, Fe) byl nejvyšší obsah během léta, pouze K měl maximální hodnoty na podzim a Mn v zimě. Pořadí laktace významně ovlivnilo minerální obsah Ca, P, K a Cu. V první laktaci byl nejvyšší obsah Ca, K a Cu. Koncentrace P byla nejvyšší při třetí laktaci. Ze získaných výsledků lze usoudit, že obsah minerálů v mléce buvolů je výrazně ovlivněn regionálními a dalšími faktory chovu.

Stopové prvky jsou potřebné pro správné fungování metabolických procesů u živých organismů. Z celkem 20 základních minerálů je 14 stopových prvků. Singh et al. 2019 ve své studii stanovovali minerální látky a stopové prvky (Zn, Fe, Cu a Mn) v kozím, kravském a buvolím mléce. Tyto prvky byly spojeny s koloidní fází v mléce všech druhů. Z těchto minerálů byla pozorována nejvyšší rozpustnost Cu u krav (41–52 %) a buvolího mléka (34 %). V buvolím mléku bylo pozorováno, že 75 % Fe bylo spojeno s koloidní fází, zatímco v mléce jiných druhů bylo kolem 64 % Fe v koloidní fází. Chemická forma hlavních a stopových minerálů nalezených v mléce nebo v jiných potravinách ovlivňuje jejich biologickou dostupnost

### Vápník

Buvolí mléko se vyznačuje vyšším obsahem vápníku oproti ostatním druhům. Většina vápníku se nachází v nerozpustné formě hlavně kvůli vysokému obsahu kaseinu, který hraje důležitou roli při určování vlastností buvolího mléka (Ahmad et. al 2013) Dle Ahmad et al. 2008 představuje nerozpustný vápník 67,6-82,6 % celkového vápníku. Odhaduje se, že micelární vápník v buvolím mléce je 1,12 mM.g<sup>-1</sup> kaseinu ve srovnání s 0,84 mM.g<sup>-1</sup> kaseinu v kravském mléce.

Koloidní vápník v mléce zahrnuje kaseinát vápenatý (obsahující organický fosfát) a fosforečnanu vápenatého (anorganický fosfát). Micelární fosforečnan vápenatý, který je spojován hlavně s  $\alpha_{S1}$ -,  $\alpha_{S2}$ - a  $\beta$ -kaseiny, je zodpovědný za strukturu a stabilitu kaseinových micel. V závislosti na fyzikálně-chemických podmínkách může být struktura kaseinových micel více či méně zničena disociací kaseinů a solí (Gaucheron et. al 2005). Malá část Ca se váže také na  $\alpha$ -laktoalbumin (jeden atom Ca na molekulu proteinu).

Vápník v koloidní fází hraje zásadní roli při koagulaci mléka za účelem výroby mléčných výrobků např. sýrů (enzymatické srážení) nebo tvarohů (kyselé srážení). Nerozpustné proteiny se nacházejí ve velkých koloidních částicích, které se nazývají kaseinové micely. Na povrchu kaseinové micely je  $\kappa$ -kasein, protein necitlivý na vápník, který tvoří ochrannou vrstvu pro kaseiny citlivé na vápník ( $\alpha_{S1}$ ,  $\alpha_{S2}$ ,  $\beta$ ), které tak jsou v kaseinových micelách stabilní. Během enzymatické koagulace je  $\kappa$ -kasein hydrolyzován, čímž dochází k agregačnímu procesu, během kterého ionty  $Ca_2^+$  zesilují fosfoserinové skupiny kaseinů ( $\alpha_{S1}$ ,  $\alpha_{S2}$ ,  $\beta$ ), což způsobuje vytvoření trojrozměrné proteinové sítě (gelu). Vápníkové ionty hrají zásadní roli během agregační fáze koagulace, umožňují propojení kaseinů pomocí vápníkových mostů. Při tepelném zpracování

se ale část vápenatých iontů (které jsou přirozeně přítomné v mléce) transformuje na nerozpustný  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , který se nezúčastňuje koagulačních procesů. Proto se běžně do mléka určeného pro výrobu sýrů/tvarohů po pasteraci přidává chlorid vápenatý, aby se u mléka podpořila schopnost tvorby gelu (Lucey 2002; Gaucheron et. al 2005).

Při snižování pH mléka se kyselé bazické skupiny mléčných složek (organický a anorganický fosfát, citrát, karboxylové zbytky atd.) stále více protonují. V důsledku toho se rozpustí micelární fosforečnan vápenatý a malá množství hořčíku a citrátu, která jsou spojena s kaseinovými micelami,  $\kappa$ -kasein ztrácí svůj náboj a začíná koagulace. Kaseiny ( $\alpha_s$ ,  $\beta$ ) se uvolní do rozptýlené frakce mléka, ionty  $\text{Ca}^{2+}$  zesílují fosfoserinové skupiny kaseinů, což způsobuje vytvoření trojrozměrné proteinové sítě (gelu). Rozsah disociace závisí na pH i teplotě (Gaucheron et. al 2005).

Kravské mléko obsahuje více rozpustných hlavních minerálů, zatímco buvolí mléko se vyznačuje vysokým obsahem Ca v koloidní fázi (Tabulka 7), což vede k tomu, že mléčné výrobky připravené oddělením tvarohu/sýru a syrovátky z buvolího mléka budou vždy obsahovat více Ca a dalších koloidních minerálů oproti těmto produktům připravených z kravského / kozího mléka, protože rozpustné minerální látky odchází do syrovátky (Singh et al. 2019). Avšak využitelnost Ca přímo z mléka bude vyšší u kravského mléka, jelikož oproti buvolímu má vyšší množství rozpustného vápníku.

Vápník je absorbován tenkým střevem, v rozpustné ionizované formě ( $\text{Ca}^{2+}$ ), která může procházet stěnou tenkého střeva. S absorpcí ionizovaného vápníku tenkým střevem souvisejí dvě hlavní cesty - paracelulární a transcelulární. Paracelulární dráha je pasivní nesaturovatelná cesta převládající v jejunu a ileu. Absorpce vápníku probíhá prostřednictvím těsných mezibuněčných spojů umístěných na apikálním konci buněčné membrány, které tvoří bariéry pohybu vody, molekul a iontů. V paracelulární dráze je pohyb  $\text{Ca}^{2+}$  těmito spoji uskutečňován pomocí pasivní difúze. Paracelulární cesta se uplatňuje, pokud je příjem vápníku dostatečný nebo vysoký. Transcelulární cesta je saturovatelný, metabolicky řízený, aktivní transportní proces, který se vyskytuje hlavně ve dvanáctníku. Když je příjem vápníku nízký, je transcelulární dráha zodpovědná za většinu absorpce vápníku. Na pohyb vápníku se podílejí tři po sobě jdoucí kroky. Prvním krokem je vstup přes kartáčový lem enterocytů vápníkovými kanály. Dále následuje intracelulární difúze přes cytoplazmu a vytlačování zprostředkované hlavně vápenatou ATPázou bazolaterální membrány (Kwak et al. 2012).

Vápník pomáhá chránit před rakovinou tlustého střeva, zlepšuje schopnost srážení krve a pomáhá udržovat krevní tlak, zabraňuje svalovým křečím / kontrakcím, je součástí kostí a zubů (asi 98 % celkového Ca přítomného v našem těle se nachází v kostech a zubech). V potravinářském průmyslu je nezbytný pro koagulaci při výrobě sýrů, tvarohů a dalších mléčných výrobků. Mléko a mléčné výrobky jsou známé jako velmi bohatý zdroj Ca, půl litru mléka denně u dospělých zajišťuje potřebu vápníku ze 75 % (Vidu et. al 2015; Singh et al. 2019).

### 3.1.5.3 Fyzikální vlastnosti buvolího mléka

Fyzikální vlastnosti mléka mají pro mlékařského technologa velký význam, protože ovlivní většinu operací během zpracování. Patří mezi ně průtok mléka, míchání a stloukání, emulgace a homogenizace, ale i procesy přenosu tepla, jako je pasterizace, sterilizace,



odpařování, dehydratace, chlazení a zmrazování. Některé z reologických vlastností se také používají k hodnocení a monitorování kvality produktů, jako jsou jogurty, smetana, máslo a sýr (Kailasapathy 2015).

#### 3.1.5.3.1 Aktivní a titrační kyselost

Hodnota pH buvolího mléka se pohybuje od 6,57 do 6,84 a není ovlivněna ročním obdobím, laktací ani časem otelení, ale koreluje s obsahem tuku prosté sušiny a laktózy (Ahmed et al. 2013). Kyseliny a pH jsou vzájemně nepřímo úměrné; s tvorbou kyseliny, pH klesá.

Titrační kyselost (TK) je definována jako množství titru potřebného k stechiometrické reakci s kyselinami v mléce. TK je měřítkem celkové kyselosti v potravinářských výrobcích. TK se často používá ke sledování kyselosti mléčných výrobků, protože většina mléčných fermentací produkuje kyselinu mléčnou. Základní postup spočívá v tom, že se roztok hydroxidu sodného ( $0,25 \text{ mol.l}^{-1}$ ) přidává do mléka nebo do předem upravených vzorků jiných mléčných výrobků, za přítomnosti indikátoru fenolftaleinu. Konečný bod neutralizační reakce mezi NaOH a kyselinou je indikován změnou barvy vzorku na světle růžovou (pH 8,3 – bod ekvivalence fenolftaleinu) (Zhang & Metzger 2009). Spotřeba NaOH při titraci určí hodnotu TK - 1 ml  $0,25 \text{ mol.l}^{-1}$  NaOH odpovídá 1 °SH. Buvolí mléko má průměrně  $7,15 \pm 1,23$  °SH (Visentin et al. 2017). Obsah kyseliny mléčné se pohybuje od 0,05 % do 0,20 %, mlezivo má vyšší kyselost než zralé mléko (Ahmad et al. 2013).

#### 3.1.5.3.2 Elektrická vodivost

Je definována jako míra elektrického odporu roztoku v převrácených ohmech (mhos). Používá se k hodnocení celkového iontového obsahu mléka, podíl na vodivosti mají sodíkové, draselné a chloridové ionty. Vzhledem k tomu, že množství sodíku a chloridů se zvyšuje při zánětu mléčné žlázy, používá se ke stanovení klinických případů mastitidy hlavně v chovu skotu. Většina mléčných výrobků špatně vede elektrinu. Specifická elektrická vodivost buvolího mléka je průměrně  $9,17 \pm 1,51$  mmhos nižší, v porovnání s mlékem kravským  $11,12 \pm 1,56$  mmhos (El-Salam & El-Shibiny 2011). Lze očekávat, že zvýšení koncentrace mléčné sušiny zvýší měrnou vodivost, ale vztah není tak lineární, kvůli extrémně složité rovnováze solí mezi koloidní a rozpustnou fází. Přítomnost tuku má tendenci snižovat měrnou vodivost. Bylo také pozorováno, že vývoj kyselosti, ke kterému dochází během fermentace, zvyšuje vodivost v důsledku přeměny vápníku a hořčíku na iontové formy. Elektrickou vodivost lze tedy použít při monitorování procesu fermentace jogurtu a jiných fermentovaných produktů (Kailasapathy 2015).

#### 3.1.5.3.3 Redox potenciál

Oxidačně – redukční potenciál mléka je vyjádřen ve voltech. V mléce závisí na obsahu rozpuštěného kyslíku, kyseliny askorbové, cystinu, cysteinu a na pH. Čerstvé buvolí mléko má hodnotu oxidačně redukčního potenciálu mezi + 0.129 a + 0.469 V (průměrně + 0.310 V) při 30 °C, vyšší než u mléka kravského (+ 0.258 V) (Murtaza et al. 2017). Během fermentace mléka spotřebovávají aerobní bakterie rozpuštěný kyslík a snižují napětí kyslíku v mléce, což podporuje růst anaerobních bakterií. Mikrobiální kvalita mléka se někdy posuzuje pomocí testu redukce methylenovou modří, který je založen na tomto principu (Kailasapathy 2015).

#### 3.1.5.3.4 Viskozita

Viskozita buvolího mléka je kolem 2.25 mPa.s při 20 ° C, závisí na metabolismu, stavu a výživě jednotlivé buvolice. Viskozita všech kapalin závisí na teplotě, stejně je to i u mléka a mléčných výrobků navíc závisí i na koncentraci a stavu kaseinových micel a tukových kuliček. Homogenizace rozkládá tukovou kuličku na mnoho malých kuliček, a tím zvyšuje viskozitu mléka a smetany. Kaseinové micely mléka přispívají k viskozitě mléka více než jiné mléčné složky, například hydratace bílkovin může způsobit zvýšení viskozity. Zvýšení teploty způsobí výrazné snížení viskozity. Viskozita mléka a smetany je zodpovědná za pocit „bohatosti“ při konzumaci spotřebiteli (Kailasapathy 2015).

#### 3.1.5.3.5 Tepelné vlastnosti

Přenos tepla hraje důležitou roli v mnoha operacích zpracování mléka a mléčných výrobků. Ve většině případů je žádoucí maximalizovat rychlost přenosu tepla, to vede k ekonomickým výhodám a obecně k lepší kvalitě produktu. Při zahřátí mléka se objem zvětšuje, koeficient tepelné roztažnosti buvolího mléka se standardním složením (7 % tuku) je 1,3 až 6 % při zahřátí ze 5 na 40 °C (Murtaza et al. 2017).

Tepelná stabilita mléka je dána hlavně složením bílkovin a koncentrací různých solí přítomných v koloidním a iontovém stavu. Při určování tepelné stability mléka hraje zásadní roli pH, jelikož ovlivňuje molekulární disociaci kaseinových složek, a tak tvorbu agregovaných proteinových komplexů prostřednictvím interakcí protein - protein. Vysokoteplotní zpracování by mohlo způsobit Maillardovy reakce mezi aminoskupinami aminokyselin lysinu a karbonylovou skupinou laktózy za vzniku hnědých polymerů (Kailasapathy 2015). Buvolí mléko je méně tepelně stabilní než kravské, příčinou je vysoký obsah tuku, vápníku a nízká obsah močoviny. Byly hlášeny vysoké negativní korelace (R, 0,65 a 0,75) mezi obsahem tuku, vápníku a tepelnou stabilitou u buvolího mléka. Nízká hladina močoviny v buvolím mléce (17,5 mg.100 ml<sup>-1</sup>) ve srovnání s kravským (40 mg.100 ml<sup>-1</sup>) je považována za faktor odpovědný za nízkou tepelnou stabilitu buvolího mléka (El-Salam & El-Shibiny 2011).

Tepelná vodivost označuje rychlost přenosu tepla skrz materiál (jak rychle se mléko ochladí nebo zahřeje). Tepelná vodivost mléka při 42 °C přibližně 0.5487 až 0.5937 W.m<sup>-2</sup> K (průměrně 0.5689 W.m<sup>-2</sup> K). Tepelná vodivost výrazně klesá s nárůstem buď tuku nebo celkových pevných látek (Kailasapathy 2015; Murtaza et al. 2017).

Tepelné zpracování mléka (např. pasterizace a sterilizace) se často používá k prodloužení trvanlivosti mléka. Vliv tepla na mléko může způsobit změnu jeho texturních vlastností. Například když se jogurtová směs zahřeje na více než 65 °C, molekuly β-laktoglobulinu se začnou odvíjet a interagovat s κ-kaseinem za vzniku disulfidových vazeb. Při výrobě jogurtů je tepelné zpracování výhodné, jelikož při denaturaci syrovátkové bílkoviny se zvyšuje jejich schopnost zadržovat vodu. Tepelně neošetřená jogurtová směs nebo nedostatečné tepelné ošetření jogurtové směsi vede k synerezi během skladování, to způsobuje vylučování vody z jogurtového gelu na povrch, což může spotřebitele odradit. Vysokoteplotní zpracování by mohlo iniciovat Maillardovy reakce mezi aminoskupinami lysinu a karbonylovou skupinou laktózy za vzniku hnědých polymerů (Kailasapathy 2015). Interakce

$\kappa$ -kaseinu se syrovátkovými bílkovinami naopak není žádoucí při výrobě sýrů, jelikož snižuje schopnost srážení, proto se mléko určené k výrobě sýrů šetrně pasteruje.

#### 3.1.5.3.6 Osmolalita a osmotický tlak

Osmolalita je míra celkového počtu rozpuštěných částic v daném objemu roztoku, udává se v  $\text{osml.kg}^{-1}$ . Osmolalita je jednou z koligativních vlastností (tzn. závisí na koncentraci rozpuštěných částic, nikoli na jejich vlastnostech) mléka spolu s bodem mrazu a bodem varu. Za osmolalitu je zodpovědná celková koncentrace rozpuštěných látek.

Při dané hmotnosti platí, že čím menší molekuly, tím vyšší bude osmotický tlak. Osmotický tlak mléka je zcela konstantní a rovná se osmotickému tlaku krve. Ve výsledku jsou rozdíly v rozpuštěných látkách v normálním mléce malé (mění se zejména laktóza) (Kailasapathy 2015).

#### 3.1.5.3.7 Bod mrznutí

Bod mrznutí buvolího mléka je v rozmezí - 0,552 až - 0,558 °C, což je méně než u kravského mléka (-0,525 °C) (Ahmed et al. 2013) Bod mrznutí souvisí s rozpustnými složkami v mléce. Laktóza, draslík, sodík a chloridy jsou hlavní složky mléka odpovědné za ovlivňování bodu mrazu (asi z 75 až 80 %). Bod mrznutí je stabilní, a proto je považován za poměrně konstantní vlastnost mléka. Bod mrznutí se měří jako rutinní zkouška k určení, zda bylo mléko zředěno vodou a je použito jako zákonná norma (El-Salam & El-Shibiny 2011; Murtaza et al. 2017).

#### 3.1.5.3.8 Bod varu

Teplota varu mléka je vyšší než u čisté vody kvůli rozpuštěným složkám. Složky mléka ve skutečném roztoku jsou hlavně odpovědné za zvýšení bodu varu při teplotě vyšší než 100 °C. Bod varu mléka je 100,17 °C. Bod varu je možné použít pro detekci přidané vody do mléka, ale stanovení bodu tuhnutí je přesnější a pohodlnější (Kailasapathy 2015).

#### 3.1.5.3.9 Hustota

Hustota buvolího mléka při 20 °C je přibližně 1.030 až 1.032  $\text{g.cm}^{-3}$ , u kolostra je hustota vyšší okolo 1,037  $\text{g.cm}^{-3}$  (El-Salam & El-Shibiny 2011). Teplota ovlivňuje hustotu, s rostoucí teplotou klesá hustota mléka, protože mléko se při zahřátí rozpíná. Hustota souvisí s obsahem tuku a podílem tukuprosté sušiny v mléce (včetně bílkovin, laktózy a solí). Protože mléčný tuk je nejlehčí složkou mléka, zvýšení procenta tuku se sníží hustota mléka nebo mléčných směsí (Kailasapathy 2015).

### 3.1.5.4 **Technologické vlastnosti**

Mléko je složitá biologická tekutina, živiny jsou v tekutině ve třech možných fyzikálních fázích: emulze, koloidní disperze a roztok. Různé interaktivní síly mezi složkami mléka určují technologické chování mléka (Kailasapathy 2015).

Buvolí mléko, vzhledem k vysokému obsahu bílkovin (včetně kaseinu) a tuku je velmi dobrou surovinou pro zpracování, zejména při výrobě sýrů. Kromě toho má vysoký obsah vápníku v kaseinových micelách (Tabulka 7), to za následek rychlejší srážení syřidlem a pevnější syřeninu.

Doba srážení syřidlem se mění podle velikosti micely. Bornaz et al. (2009) publikovali, že podíl  $\kappa$ -kaseinu klesá se zvětšením průměru kaseinové micely. Jak už bylo uvedeno, kaseinové micely buvolů mají průměr okolo 190 nm, což je o 10 až 20 nm větší než u kravského mléka (Ahmad et al. 2009). Micely kaseinu buvolího mléka jsou větší a obsahují méně  $\kappa$ -kaseinu, což zpomaluje primární fázi působení syřidla, zatímco sekundární fáze je rychlejší díky více vápníku. Sýřenina z buvolího mléka rychle ztrácí syrovátku, výsledkem je že sýry jsou tvrdé a suché. S tím souvisí i pomalejší proteolýza a hydrolyza tuků znamená, že je potřeba více času k vývoji chuti a struktury sýrů (Barłowska et al. 2011).

Jednou z podstatných vlastností mléka je rychlost vyvstávání tuku, která je určena disperzí tuku spolu s koncentrací aglutininů. Vyvstávání je ovlivněno velikostí tukových globulí, ale také přítomnosti nativního proteinu (imunoglobulin M). Velké tukové kuličky migrují vyšší rychlostí a při srážce s ostatními vytváří agregáty. Celý proces je katalyzován kryoglobulinem (imunoglobulin M), který se vysráží na povrchu ochlazujících tukových globulí. Buvolí mléko se vyznačuje vyšším stupněm vyvstávání smetany, který souvisí s nedostatkem kryoglobulinu (Fox 2003; Barłowska et al. 2011).

Buvolí mléko díky svému vyššímu obsahu tuku, tukuprosté sušiny a celkové sušiny, poskytuje relativně více smetany, másla, sýrů, kondenzovaného mléka a dalších mléčných výrobků. Oddělování smetany a stloukání másla je usnadněno větší velikostí tukových kuliček a vyšším podílem pevného tuku v buvolím mléce. Vyšší podíl pevného tuku činí buvolí máslo tvrdším a méně roztíratelným. Emulgační kapacita buvolího mléčného tuku je lepší díky vyššímu podílu (50 %) triacylglycerolů obsahujících kyselinu máselnou (Murtaza et al. 2017).

### 3.1.5.5 Význam pro lidskou výživu

Mléko je téměř kompletní a výživná složka lidské stravy a první potrava novorozenců a dalších savců, kterým poskytuje všechny potřebné živiny pro správný růst a vývoj. Není pochyb o tom, že mléko a mléčné výrobky hrály klíčovou roli při rozvoji lidské civilizace, jelikož dodávaly většinu základních živin ve významném množství (Khan et al. 2007). Buvolí mléko je bohatším zdrojem tuku, bílkovin, laktózy a minerálů ve srovnání s kravským mlékem, takže jej lze považovat za výživnější také pro člověka.

Mléko je bohaté na několik živin podporujících zdraví kostí, jako jsou bílkoviny, vápník, fosfor, hořčík, draslík a zinek. Kromě těchto živin existuje v mléce mnoho biologicky aktivních peptidů, které se mohou uvolňovat během trávení nebo fermentace z jádra proteinu. Existující důkazy naznačují, že po perorálním podání bioaktivní peptidy pozitivně ovlivňují hlavní tělesné systémy, jako je kardiovaskulární, trávicí, imunitní a nervový systém (v závislosti na jejich aminokyselinové sekvenci). Biologicky aktivní peptidy mají dále antioxidační, antitrombotické, antimikrobiální, antihypertenzní a imunomodulační účinky (Reddi et al. 2018).

Buvolí mléko obsahuje méně celkového a volného cholesterolu (275 a 212 mg/100 g tuku) ve srovnání s kravským mlékem (330, respektive 280 mg/100 g tuku). Buvolí mléko je zdravější než kravské mléko, pokud jde o nižší koncentraci cholesterolu a vyšší obsah nenasycených mastných kyselin. Dále obsahuje více tokoferolu 334  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , oproti 312  $\mu\text{g}/\text{kg}$  v mléce kravském (Murtaza et al. 2017).

### 3.1.6 Mléčné výrobky

V České republice je farma produkující buvolí mléko a další mléčné výrobky (jogurty, sýr labneh a ricottu). Dále plánují do svých produktů přidat Mozzarellu, asi nejznámější buvolí mléčný výrobek. Pro další rozšíření výroby mléčných produktů z buvolího mléka v ČR, by bylo potřeba zvýšit produkci mléka a rozšířit technologii zpracování.

Buvolí mléko se dá zpracovat obdobně jako mléko kravské. V některých případech je ale nutné upravit výrobní postupy, jelikož některé chemicko-fyzikální parametry jsou u buvolího mléka odlišné oproti kravskému.

#### 3.1.6.1 Jogurt

Buvolí mléko se používá k výrobě jogurtů, které jsou velmi populární v zemích kolem Středomoří, zemí Středního východu, jižního Ruska a na indickém subkontinentu. Buvolí mléko obsahuje asi dvakrát tolik tuku než kravské mléko a vyšší množství celkové sušiny a kaseinu, takže je velmi vhodné pro zpracování na různé druhy jogurtů. Výsledný produkt je krémové textury a má bohatý chuťový profil. Jogurtové výrobky jsou běžně doplňovány probiotickými kulturami, jako jsou *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* a bifidobakterie, které zvyšují jejich výživnou hodnotu a umožňují uplatnění na trhu jako funkční potravina (Han et al. 2012).

#### 3.1.6.2 Sýry

Sýry z buvolího mléka jsou po celém světě stále populárnější; buvolí mléko je preferovanou komoditou při přípravě mnoha druhů, zejména měkkých, polotvrdých, tvrdých a některých nakládáných sýrů. Sýry z buvolího mléka vykazují typické strukturální a texturní vlastnosti a díky své jedinečné povaze mají mnohem lepší smyslové vlastnosti. Některé druhy sýrů se vyrábějí ze syrového mléka, ale většina se vyrábí z pasterizovaného mléka, jehož složení (např. poměr tuk: bílkoviny) může být standardizováno.

V mnoha zemích se buvolí mléko používá k výrobě tradičních sýrů. Sýry se mohou dělit podle obsahu vody na měkké (více než 68 % hm. vody v tukuprosté hmotě sýra), polotvrdé (55–68 % hm. VVTPH) a tvrdé (méně než 55 % hm. VVTPH). Mezi měkké sýry z buvolího mléka se řadí Karish, Mish a Domiati (Egypt), Madhfor (Irák), Mozzarella a Ricotta (Itálie), Alghab (Sýrie), Vladeasa (Rumunsko). Polotvrdý sýr je například Beyaz peyneri z Turecka. Mezi tvrdé sýry se řadí Braila (Rumunsko), Rahss (Egypt), Balkánský sýr (Bulharsko) a Akkawi (Sýrie).

Nejběžnější klasifikace sýrů se provádí podle typu koagulace: enzymatická (syřidlem), nebo kyselá koagulace (okyselení přidáním kyseliny nebo produkcí kyselin mléčnými bakteriemi). Mnoho sýrů podléhá smíšené koagulaci (kyselé i enzymatické), i když v některých z nich převažuje koagulace kyselinou, zatímco v jiných převažuje enzymatická. Ve středomořské oblasti se většina sýrů vyrábí pomocí kyselého srážení. U některých sýrů prochází mléko pouze spontánním okyselením (Domiati, Karish, Mish, Madhfor, Alghab). U jiných sýrů je okyselení podporováno přidáním startovacích kultur mléčných bakterií (Vladeasa, Beyaz peyneri) nebo přírodních syrovátkových kultur (Mozzarella).

Některé sýry se konzumují čerstvé, tj. jen několik dní po zpracování, jelikož se kvůli vysokému obsahu vody rychleji kazí (Karish, čerstvý sýr z Iráku, Mozzarella, Ricotta, Alghab, Labneh), jiné zrají a konzumují se i po několika měsících. Zvláště měkké sýry je možné konzervovat pomocí slaného nálevu a prodloužit tak dobu spotřeby. U sýrů Domiati a Akkawi se přidává sůl do mléka před zpracováním, tento způsob výroby je v Egyptě a Sýrii velmi běžný a je odvozena z potřeby přidávat do mléka bakteriostatika, aby se omezila spontánní mikroflóra během zpracování. Labneh je měkký sýr (průměrný obsah sušiny je 23 %), který pochází ze Středního východu. Vyrábí se ze soleného jogurtu, a to jeho odvodněním na požadovaný obsah sušiny. Díky tomu si zachovává výraznou nakyslou chuť jogurtu a má krémovou konzistenci. (Borghese 2005; Hofi 2013; Murtaza et al. 2017).

### **3.1.6.3 Máslo**

Průmyslové máslo se vyrábí stloukáním smetany. Zvláštností buvolího másla je jeho barva, která je mnohem bělejší než u kravského másla, a to kvůli nedostatku karotenoidů. Výroba 1 kg másla vyžaduje 10 kg buvolího mléka (Menard et al. 2010) Ghee je přepuštěné máslo zbavené vody, bílkovin a dalších zbytkových látek v másle, 98–99 % tvoří mléčný tuk. Je velmi populární v Egyptě a ceněn v pekařském průmyslu.

## 4 Metodika

### 4.1 Vzorky mléka

Vzorky mléka pocházely z Buvolí farmy Ohař. Celkem bylo analyzováno 10 vzorků buvolího mléka, které byly odebírány od září 2020 do března 2021 a 1 vzorek mléka kravského. Analyzované mléko nebylo tepelně šetřeno, po nadojení bylo zchlazeno a po převozu do laboratoře analyzováno.

#### 4.1.1 Buvolí farma Ohař

Buvolí farma Ohař je jedinou farmou v České republice zaměřující se na produkci buvolího mléka a mléčných výrobků. Nachází v Jihočeském kraji v okrese Písek, 28 km severně od Písku a 16 km jižně od Příbrami. Na buvolí farmě ohař mají celkem 20 buvolů, z čehož v době odběru vzorků produkovalo mléko průměrně 6 buvolic.

Farma hospodaří v režimu ekologického zemědělství, mléko a mléčné výrobky jsou tudíž biopotraviny. Z mléčných výrobků přímo na farmě vyrábí jogurty, kefíry a sýry (labneh a ricottu).

Jedná se o pastevní chov, přes léto jsou buvoli nepřetržitě na pastvě. Jejich krmení tvoří travní porost a minerální lizy podávané ad libitum. Od listopadu do února podle počasí a sněhové pokrývky jsou ustájeni v zimovišti. Zde jsou krmeni senáží a senem v poměru 2:1 s přídavkem biogranulí.

Po otelení zůstává narozené mládě 3 – 4 dny s matkou. Poté je dalších 10 dní krmeno mlékem od matky, na farmě nepoužívají k odchodu mláďat sušené mléčné náhražky. Od 4 dne má mládě přístup k vodě, senu a biogranulím.

Buvolice jsou dojeny 2x denně, při snižování produkce mléka ke konci laktace 1x denně. Průměrná délka laktace je 8 – 9 měsíců (240 – 270 dní). Průměrný denní nádoj je okolo 7 litrů mléka.

### 4.2 Stanovení obsahu laktózy

#### 4.2.1 Stanovení metodou podle Luff-Schoorla

##### 4.2.1.1 Použité chemikálie a laboratorní pomůcky

Analytická váha	
Byreta (25 ml)	Carrezovo čířidlo I
Digestoř	Carrezovo čířidlo II
Filtrační papír, nálevka	Jodid draselný
Odměrná baňka (100 ml)	Kyselina sírová 25%
Odměrný válec (20 ml)	Luffův roztok
Parafilm	Škrobový maz
Pipety (25ml, 10 ml, 5 ml)	Thiosíran sodný 0,1 M
Titrační baňka (250 ml)	
Vodní lázeň	

#### 4.2.1.2 Příprava zásobních roztoků

Carrez I je 15% roztok octanu zinečnatého ( $\text{ZnSO}_4$ ). Pro přípravu bylo nutné spočítat navážku krystalického octanu zinečnatého, který byl kvantitativně převeden do 100 ml odměrné baňky, doplněn vodou a důkladně rozpuštěn.

Stejným způsobem bylo připraveno čířidlo Carrez II, 30% roztok hexakynoželeznatanu draselného ( $\text{K}_2[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ). Daná navážka byla převedena do 100 ml odměrné baňky, doplněna vodou a rozmíchána.

Dalším roztokem potřebným ke stanovení je Luffův roztok, který obsahuje dodekahydrát uhličitanu sodného ( $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ ), kyselinu citronovou ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) a síran měďnatý ( $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ). Byli připraveny 3 dílčí roztoky, které se nakonec smísily. Roztok uhličitanu sodného byl připraven navážením 143,8 g bezvodého  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , který byl rozpuštěn ve 300 ml teplé vody. Roztok síranu měďnatého byl připraven navážením a rozpuštěním 25 g  $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  v 50 ml vody. Při přípravě roztoku kyseliny citronové bylo naváženo 50 g  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$  a následně rozpuštěno v 50 ml destilované vody. Připravené roztoky byly smíchány tak, že za opatrného míchání byl roztok kys. citronové přidán do roztoku uhličitanu sodného, následně byl přidán vychladnutý roztok síranu měďnatého a objem byl doplněn destilovanou vodou na 1 litr. Výsledné Luffovo činidlo se nechalo přes noc usadit a poté přefiltrovalo.

Roztok thiosíranu sodného (0,1 M) se připravuje rozpuštěním daného vypočítaného množství pentahydrátu thiosíranu sodného ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ). Výpočet navážky byl proveden podle vzorce:

$$m_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} = M_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} \cdot c_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} \cdot V$$

$m_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$	navážka pentahydrátu thiosíranu sodného [g]
$M_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$	molární hmotnost $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (248,18 g.mol <sup>-1</sup> )
$c_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$	koncentrace výsledného roztoku (0,1 mol.l <sup>-1</sup> )
$V$	objem výsledného roztoku [l]

Navážené množství se převede do odměrné baňky, doplní destilovanou vodou a rozpustí.

Kyselina sírová byla připravena naředěním 96% kyseliny sírové destilovanou vodou na 25% roztok. Nejdříve bylo spočítáno potřebné množství kyseliny sírové a destilované vody. Pro přípravu 500 ml 25% roztoku kys. sírové bylo použito 130 ml 96%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 370 ml destilované vody. Ředění se provádí nalíváním kyseliny do vody. Do kádinky bylo odměřeno potřebné množství vody a poté byla postupně přidávána kyselina sírová. Při této reakci se uvolňuje velké množství tepla, proto aby nedošlo k prasknutí kádinky, je nutné přidávat kyselinu postupně a pomalu.

Škrobový maz je 2% roztok škrobu. Pro přípravu 50 ml roztoku, bylo naváženo 1 g škrobu a rozpuštěno v 49 ml vody. Celý roztok bylo potřeba zahřát, aby se škrob rozpustil.

Na Obrázku 6 jsou připravené zásobní roztoky.





Obrázek 6: Připravené zásobní roztoky. Zleva: Carrez II, Carez I, Luffův roztok, kyselina sírová, thiosíran sodný, škrobová maz.

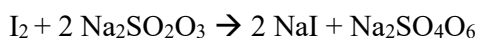
#### 4.2.1.3 Princip stanovení

Luff-Schoorlova metoda využívá redukční schopnosti redukujících sacharidů. Laktóza (redukující cukr) za zvýšené teploty v alkalickém prostředí redukuje měďnaté soli pocházející z Luffova roztoku na oxid měďný. Kyselina citronová z Luffova roztoku tvoří komplex s  $\text{Cu}^{+2}$  ionty, a tak zabraňuje vzniku hydroxidu měďnatého v alkalickém prostředí. Alkalické pH prostředí je upraveno množstvím uhličitanu sodného.

Měďnaté ionty, které nezreagovali s laktózou jsou ve vzorku stanoveny jodometricky. Po okyselení roztoku kyselinou sírovou, volné měďnaté ionty v roztoku oxidují jodid draselný a vzniká jód.



Množství vytvořeného jódu je stanoveno titrací thiosíranem sodným za přítomnosti škrobového indikátoru.



Škrobový maz s jódem tvoří typické tmavě modré zbarvení. Titrace je ukončena po dosažení výsledné smetanové barvy roztoku.

#### 4.2.1.4 Pracovní postup

Prvním krokem při stanovení laktózy podle Luff-Schoorla je naředění vzorku mléka a jeho číření. Čířením se ze vzorku mléka odstraní hlavně bílkoviny a tuk.

Do 100 ml odměrné baňky bylo naváženo 10 g vzorku buvolího mléka, který byl doplněn o 30 ml destilované vody a 3 ml roztoku Carrez II. Vše bylo promícháno a poté přidáno 3 ml roztoku Carrez I. Následovalo doplnění destilovanou vodou po rysku odměrné baňky, zajištění hrdla parafilmem a důsledné protřepání. Vzniklá sraženina byla filtrována přes filtrační papír.

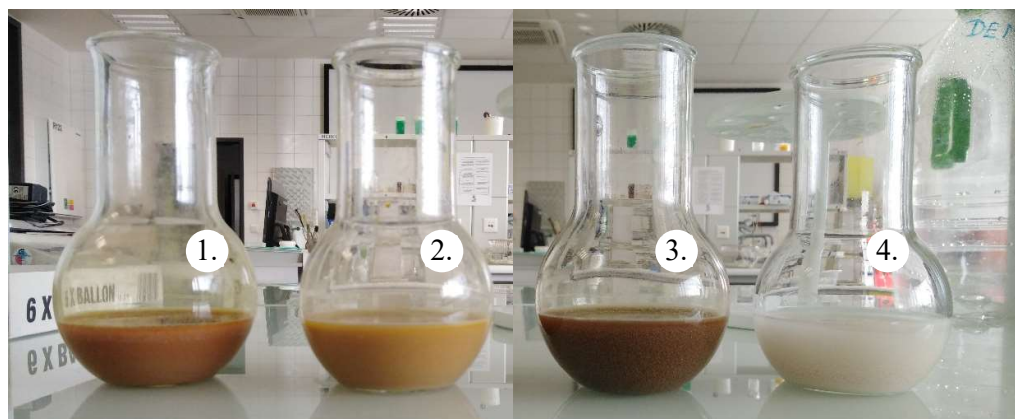
Do titrační baňky bylo odpipetováno 25 ml Luffova roztoku, k němu přidáno 10 ml čirého filtrátu vzorku a 15 ml destilované vody. Roztok v titrační baňce byl promíchán a 10 minut zahříván ve vodní lázni při teplotě  $90^\circ\text{C}$ . Po uplynutí doby byly titrační baňky vyndány a obsah baňky ochlazen pod proudem studené vody. Po zchlazení roztoku byly přidány 3 g jodidu draselného a mícháním rozpuštěny. Dalším krokem bylo přidání 25 ml 25% kyseliny sírové,

tento krok se musel provádět v digestoři s velkou opatrností, aby nedošlo ke vzkypění obsahu baňky po přidání kyseliny. Barevné změny jsou vyobrazeny na Obrázku 7.



Obrázek 7: Barevné změny v průběhu stanovení. Vlevo: roztok po vyndání z vodní lázně a ochlazení. Vpravo: roztok po přidání KI a H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Po důsledném promíchání byla na řadě titrace 0,1 M thiosíranem sodným. Po přechodu z hnědé do světle hnědé barvy bylo do roztoku přidáno 5 ml škrobového mazu. Roztok byl následně dotitrován do smetanové barvy. Byla odečtena hodnota thiosíranu sodného spotřebovaného k titraci vzorku. Změny barvy v průběhu titrace jsou zobrazeny na Obrázku 8.



Obrázek 8: Změny barvy v průběhu titrace. 1. roztok před titrací. 2. roztok před přidáním škrobového mazu. 3. roztok po přidání škrobového mazu. 4. konec titrace.

Stejným způsobem byl proveden slepý pokus, s tím rozdílem že místo filtrátu vzorku byla použita destilovaná voda (25 ml).

#### 4.2.1.5 Výpočet obsahu laktózy

Obsah laktózy byl vypočítán ze spotřeby 0,1 M thiosíranu sodného použitého při titraci podle vzorce:

$$\text{Obsah laktózy [\%]} = \frac{b * 1,0526 * F}{a} * 100$$

*a* navážka mléka v odpipetované podílu vzorku [g]

*b* g laktózy odpovídající spotřebě Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> podle Tabulky 8

*F* faktor pro objemovou korekci na sraženinu vzniklou vyčermením mléka [0,987]

Tabulka 8: Stanovení laktózy polde Luff-Schoorla (Lukešová 2010)

Celé ml roztoku Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 0,1 mol/l	Desetiny ml roztoku Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	mg laktózy									
1	3,60	3,97	4,34	4,71	5,08	5,45	5,82	6,19	6,56	6,93
2	7,30	7,67	8,04	8,41	8,78	9,15	9,52	9,89	10,26	10,63
3	11,00	11,37	11,74	12,11	12,48	12,85	13,22	13,59	13,96	14,33
4	14,70	15,07	15,44	15,81	16,18	16,55	16,92	17,29	17,66	18,03
5	18,40	18,77	19,14	19,51	19,88	20,25	20,62	20,99	21,36	21,73
6	22,10	22,47	22,84	23,21	23,58	23,95	24,32	24,69	25,06	25,43
7	25,80	26,17	26,54	26,91	27,28	27,65	28,02	28,39	28,76	29,13
8	29,50	29,87	30,24	30,61	30,98	31,35	31,72	32,09	32,46	32,83
9	33,20	32,57	33,94	34,31	34,68	35,05	35,42	35,79	36,16	36,53
10	37,00	37,38	37,76	38,14	38,52	38,90	39,28	39,66	40,04	40,42
11	40,80	41,18	41,56	41,94	42,32	42,70	43,08	43,46	43,84	44,22
12	44,60	44,98	45,36	45,74	46,12	46,50	46,88	47,26	47,64	48,02
13	48,40	48,78	49,16	49,54	49,92	50,30	50,68	51,06	51,44	51,82
14	52,20	52,58	52,96	53,34	53,72	54,10	54,48	54,86	55,24	55,62
15	56,00	56,39	56,78	57,17	57,56	57,95	58,34	58,73	59,12	59,51
16	59,90	60,29	60,68	61,07	61,46	61,85	62,24	62,63	63,02	63,41
17	63,80	64,19	64,58	64,97	65,36	65,75	66,14	66,53	66,92	67,31
18	67,70	68,10	68,50	68,90	69,30	69,70	70,10	70,50	70,90	71,30
19	71,70	72,10	72,50	72,90	73,30	73,70	74,10	74,50	74,90	75,30
20	75,70	76,11	76,52	76,93	77,34	77,75	78,16	78,57	78,98	79,39
21	79,80	80,21	80,62	81,03	81,44	81,95	82,26	82,67	83,08	83,49
22	83,90	84,31	84,72	85,13	85,54	85,95	86,36	86,77	87,18	87,59
23	88,00	88,42	88,84	89,26	89,68	90,10	90,52	90,94	91,36	91,78
24	92,20	92,62	93,04	93,46	93,88	94,30	94,72	95,14	95,56	95,98

#### **4.2.2 Stanovení laktózy pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací**

Laktóza byla stanovena pomocí přístroje MilkoScan FT 120. Tento přístroj používá pro stanovení složek v mléce infračervenou spektroskopii s Fourierovou transformací.

##### **4.2.2.1 MilkoScan FT 120**

Přístroj MilkoScan FT 120 (Obrázek 9) měří složky mléka pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací. Využívá se v laboratořích pro výzkumnou činnost, ale i v praxi (mlékárny, výroba mléčných výrobků) hlavně ke kontrole kvality mléka a mléčných výrobků, analýze složení mléka při stanovení ceny syrového mléka a kontrole finálních mléčných produktů.



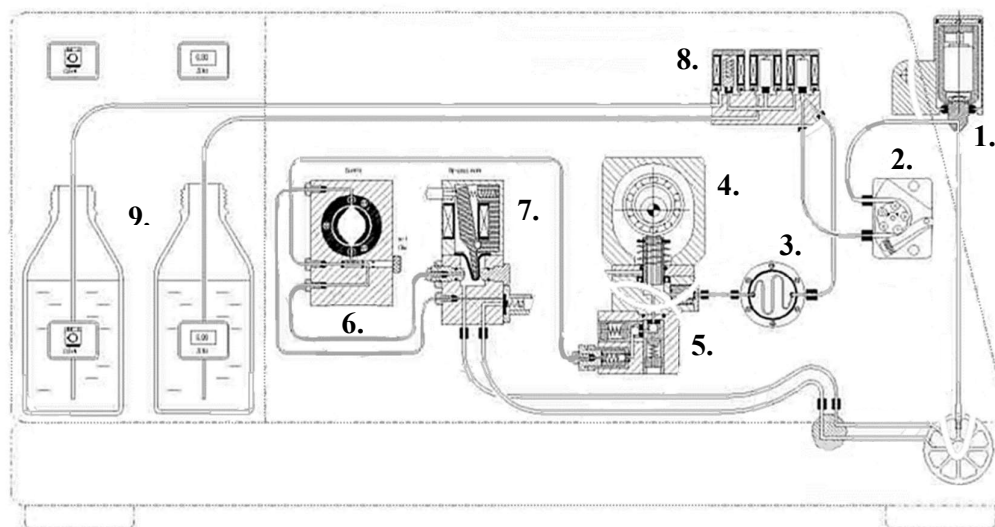
Obrázek 9: MilkoScan FT 120

Přístroj tvoří 2 části, vlastní měřicí jednotka a osobní počítač, který slouží k řízení všech operací a pro vizualizaci a ukládání naměřených dat (Obrázek 10).



Obrázek 10: MilkoScan FT 120 – měřicí jednotka a osobní počítač

Měřicí jednotka slouží ke stanovení množství jednotlivých složek mléka, měřením jejich absorbance. Schéma jednotlivých částí měřicí jednotky MilkoScan FT 120 je znázorněno na Obrázku 11. Vzorek mléka je bez úpravy přímo nasáván pomocí vibrační nasávací pipety do měřicí jednotky. Prochází ohřívací jednotkou, která vzorek zahřeje na 39 °C. Následuje homogenizace, mléko je pomocí vysokotlakého čerpadla vháněno do homogenizátoru pod tlakem 200 barů. Po ohřátí a homogenizaci přichází vlastní měření, kdy je vzorek přes filtr dávkován do kyvety, kde je změřena absorbance IR záření látkami. Po analýze je vzorek mléka vypuštěn do nádoby s odpadem. K celému systému je připojen nulovací a čistící roztok.



- |                             |  |
|-----------------------------|--|
| 1. Vibrační nasávací pipeta | 6. Kyveta s filtrem                                |
| 2. Vibrační motor           | 7. Průtokové spínací ventily                       |
| 3. Ohřívací jednotka        | 8. Ventily a potrubí pro čistící a nulovací roztok |
| 4. Vysokotlaké čerpadlo     | 9. Čistící a nulovací roztok                       |
| 5. Homogenizátor            |  |

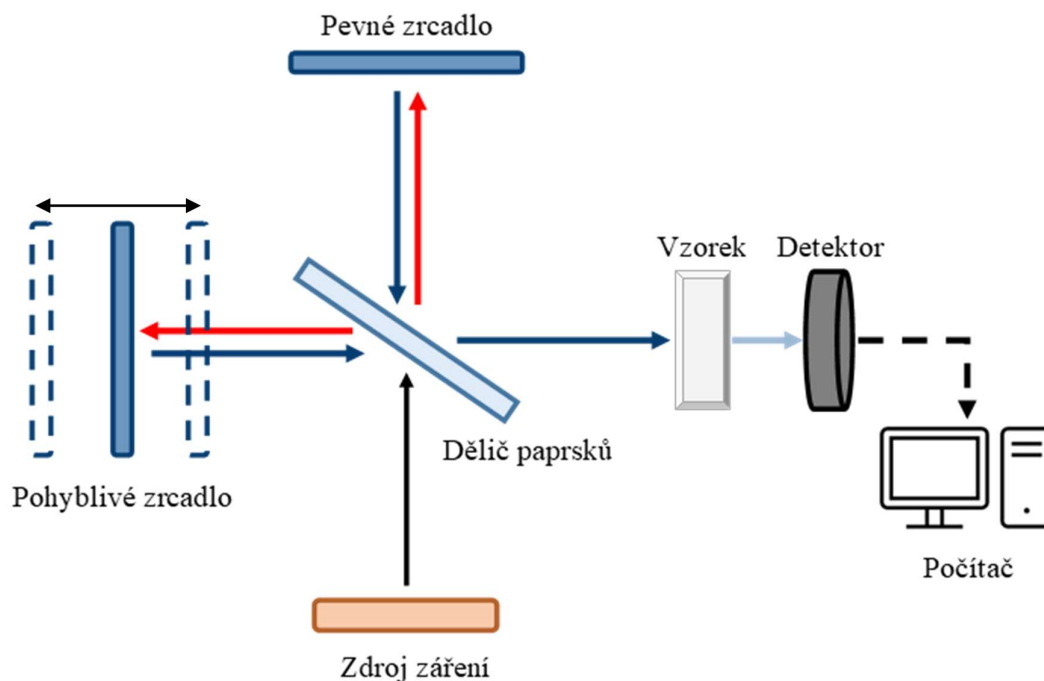
Obrázek 11: Schéma měřicí jednotky přístroje MilkoScan FT 120 (upraveno Ševcov 2018)

#### 4.2.2.2 Princip měření

Přístroj MilkoScan měří absorpci IR záření, při vlnových délkách, které jsou specifické pro stanovitelné komponenty ve vzorku. Pro správnost měření je důležitá kalibrace přístroje, jelikož měřená složka je ovlivňována i ostatními komponenty ve vzorku.

FTIR spektroskopie nejčastěji využívá Michelsonův interferometr (schéma na Obrázku 12). Zdrojem záření je keramická tyčinka, která při zahřátí emituje spojité záření v infračervené oblasti. Interferometr používá dělič paprsků (splitter) k rozdělení záření ze zdroje na dvě části, které se odráží směrem k pevnému a pohyblivému zrcadlu. Tyto dva paprsky se od zrcadel odráží zpět na splitter, kde dochází buď k jejich sčítání nebo odčítání, a to podle polohy pohyblivého zrcadla (konstruktivní nebo destruktivní interference). Rekombinovaný paprsek prochází vzorkem, kde je část absorbována a zbytek pokračuje do detektoru. Detektor zaznamenává signál v závislosti na měnící se poloze pohyblivého zrcadla (pohyb zrcadla je sledován pomocí laseru) a výsledkem je interferogram. Jelikož je počáteční záření polychromatické, signál procházející vzorkem a dopadající na detektor obsahuje součet všech

konstruktivních a destruktivních interferencí při všech možných frekvencích, proto interferogram obsahuje všechny spektrální informace týkající se vzorku. Aby bylo možné získat interpretovatelné informace, musí být digitální interferogram převeden na konvenční IR emisní spektrum Fourierovou transformací.



Obrázek 12: Schéma Michelsonova interferometru (upraveno podle Clayborne & Morris 2017)

### 4.3 Stanovení obsahu vápníku

Stanovení vápníku v buvolím mléce bylo provedeno chelatometrickou titrací pomocí chelatonu III za přítomnosti metalochromního indikátoru.

#### 4.3.1 Použité chemikálie a laboratorní pomůcky

Analytická váha

Byreta (25 ml)

Odměrná baňka (250 ml)

Odměrný válec (100 ml)

Pipety (25 ml, 5 ml)

Titrační baňka (250 ml)

Hydroxid sodný (NaOH) 4 M

Chelaton III (disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové) 0,01 M

Murexid (indikátor)

#### 4.3.2 Příprava zásobních roztoků

Chelaton III je 0,01 M roztok disodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové, který byl připraven navážením krystalického chelatonu III a rozpuštěním v požadovaném množství destilované vody. Navážka CH<sub>3</sub> byla stanovena výpočtem pomocí vzorce:

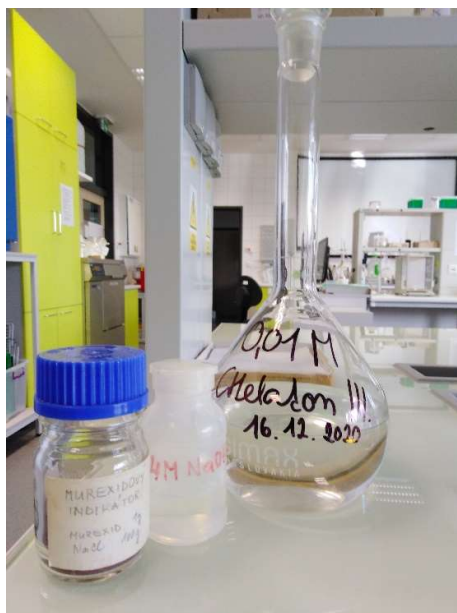


$$m_{CH3} = M_{CH3} * c_{CH3} * V$$

$m_{CH3}$	navážka chelatonu [g]
$M_{CH3}$	molární hmotnost chelatonu III (372,242 g.mol <sup>-1</sup> )
$c_{CH3}$	koncentrace výsledného roztoku (0,01 mol.l <sup>-1</sup> )
$V$	objem výsledného roztoku [l]

Vypočítané množství CH3 bylo převedeno do odměrné baňky a po rysku doplněno destilovanou vodou, po rozpuštění vznikl roztok chelatonu III s požadovanou molární koncentrací.

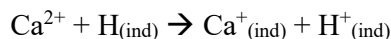
Stejným způsobem byl připraven 4 M roztok hydroxidu sodného.



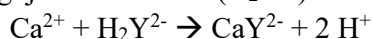
Obrázek 13: Murexid a zásobní roztoky

### 4.3.3 Princip stanovení

Při stanovení vápníku chelatometrickou titrací dochází nejdříve k interakci mezi anionty indikátoru a vápenatými ionty Ca<sup>2+</sup>:

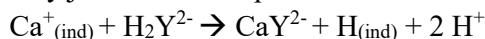


Při titraci jako první reagují s chelatonem (H<sub>2</sub>Y<sup>2-</sup>) volné Ca<sup>2+</sup> v roztoku mléka:



V této fázi je důležité stálé pH a to z toho důvodu, že při reakcích Ca<sup>2+</sup> s chelatonem se uvolňují protony, a také jelikož stálost těchto komplexů je ovlivněna hodnotou pH (kyselostí). Proto se do roztoku přidává NaOH, který roztok zalkalizuje (pH 12).

V průběhu titrace obsah volných iontů Ca<sup>2+</sup> klesá, po jejich vyčerpání začne chelaton vytěšňovat Ca<sup>2+</sup> ionty, které jsou v interakci s indikátorem. A to z toho důvodu, že vazba mezi indikátorem a vápenatými ionty je méně stálá a přednost dostává vazba s chelatonem:



Tuto reakci doprovází změna barvy titrovaného roztoku.

#### 4.3.4 Pracovní postup

Prvním krokem bylo naředění vzorku. Do 250 ml odměrné baňky bylo na analytické váze naváženo 10 g vzorku buvolího mléka, doplněno destilovanou vodou po rysku a dostatečně promícháno.

Ke stanovení bylo pipetováno 50 ml naředěného vzorku do titrační baňky. Dále bylo přidáno 100 ml destilované vody, 5 ml 4M NaOH a 0,2 g indikátoru murexidu. Roztok byl promíchán, aby vznikla stejná růžová barva v celém objemu baňky.

Roztok byl titrován pomocí 0,01 M chelatonu III z růžové na fialovomodrou barvu. Po dosažení bodu ekvivalence, a tudíž změně barvy, byla odečtena spotřeba chelatonu III potřebná k titraci.



Obrázek 14: Bod ekvivalence - změna barvy

Slepý pokus byl proveden stejným postupem, ale vzorek mléka nahrazen 10 g destilované vody.

#### 4.3.5 Výpočet obsahu vápníku

Z rovnice  $\text{Ca}^{2+} + \text{H}_2\text{Y}^{2-} \rightarrow \text{CaY}^{2-} + 2 \text{H}^+$  vyplývá, že látkové množství vápenatých iontů se bude rovnat látkovému množství chelatonu III, který byl spotřebován při titraci.

$$n_{\text{Ca}^{2+}} : n_{\text{H}_2\text{Y}^{2-}} = 1 : 1 \rightarrow n_{\text{Ca}^{2+}} = n_{\text{H}_2\text{Y}^{2-}}$$

Tudíž je obsah vápníku ve vzorku  $x$  [mg/100 g] vypočten pomocí vzorce:

$$\text{Obsah vápníku } (x) \text{ [mg/100 g]} = \frac{(a - b) * 0,4 * V}{m_{\text{vz}} * V_1} * 100$$

- $a$  spotřeba odměrného roztoku chelatonu III při titraci vzorku mléka [ml]
- $b$  spotřeba odměrného roztoku chelatonu III při titraci slepého pokusu [ml]
- $V$  objem, na který byl vzorek mléka ředěn [ml]
- $m_{\text{vz}}$  navážka vzorku buvolího mléka [g]
- $V_1$  alikvotní podíl použitý k titraci [ml]



#### 4.4 Použité statistické metody

Pro zpravování výsledků diplomové práce byl použit program Statistka 12.

Pro statistické porovnání metod stanovení obsahu laktózy byla použita statistická metoda párový t-test. Jeho úkolem bylo porovnat tyto dva soubory dat a stanovit p-hodnotu (nejmenší hladina významnosti, při které je ještě zamítnuta nulová hypotéza). Hodnota p byla porovnána s hladinou významnosti  $\alpha$ , ta byla předem stanovena na hodnotu 0,05. Porovnáním bylo zjištěno, zda je mezi metodami statisticky významný rozdíl či nikoliv.

Pro porovnání obsahu laktózy a vápníku v buvolím a kravském mléce byla použita statistická metoda dvouvýběrový t-test. Tato metoda slouží pro porovnání středních hodnot dvou souborů dat. Prvním krokem při této statistické metodě bylo stanovení F-testu (porovnání rozptylů) a na základě jeho hodnoty rozhodnutí, zda se rozptyly souborů shodují či nikoliv. Podle tohoto rozhodnutí, byl vybrán buď t-test (shodné rozptyly) nebo Welchův test (rozdílné rozptyly). Program podle této volby stanoví p-hodnotu, která byla porovnána s hladinou významnosti  $\alpha$  (0,05), tím bylo určeno, zda je mezi výsledky stanovení složek v buvolím a kravském mléce statisticky významný rozdíl či nikoliv.

## 5 Výsledky

### 5.1 Hodnocení obsahu laktózy ve vzorcích

#### 5.1.1 Stanovení laktózy metodou podle Luff-Schoorla

Hodnoty obsahu laktózy uvedené v Tabulce 9 byly stanoveny titrací pomocí metody podle Luff-Schoorla a pomocí vzorce vyjádřeny v procentickém zastoupení ze vzorku. Byly provedeny tři měření u každého vzorku, ze kterých byl vypočten průměr a směrodatná odchylka. Minimální hodnota obsahu laktózy ve vzorcích je 4,75 %, maximální 5,35 %. Prostřední hodnota souboru (medián) obsahu laktózy je 5,07 %. Při porovnání hodnot průměru a mediánu dat bylo stanoveno normální rozdělení hodnot, to potvrzuje i histogram umístěný v samostatných přílohách (Příloha 1).

Tabulka 9: Stanovené hodnoty obsahu laktózy podle Luff-Schoorla v buvolím mléce [%]

Vzorek	1. měření	2. měření	3. měření	Průměr ± Sm. odch.
23.09.20	4,97	4,89	5,13	4,99 ± 0,12
Brien	4,94	4,97	4,92	4,94 ± 0,03
Halfhorn	5,16	5,05	5,05	5,09 ± 0,06
Lindabel	5,05	5,16	5,30	5,17 ± 0,13
Nody	4,79	4,91	4,87	4,86 ± 0,06
Twin	5,02	5,08	5,21	5,10 ± 0,10
07.12.20	5,16	5,25	5,35	5,25 ± 0,10
25.01.20	5,02	5,11	5,25	5,13 ± 0,11
24.02.21	5,13	5,31	5,16	5,20 ± 0,10
12.03.21	5,05	5,21	4,92	5,06 ± 0,15
<b>Celkový průměr:</b>				<b>5,08 ± 0,12</b>

#### 5.1.2 Stanovení laktózy přístrojem MilkoScan

Obsah laktózy ve vzorcích mléka byl současně s titrací podle Luff-Schoorla stanoven i pomocí přístroje MilkoScan FT 120. Analýza buvolího mléka probíhala v kalibrovaném programu Mléko. V tomto programu MilkoScan FT 120 u vzorku stanovuje procentické zastoupení tuku, bílkovin, laktózy, sušiny a tukuprosté sušiny, vždy ve dvou měřeních. Kompletní výsledky vzorků mléka stanovené přístrojem MilkoScan FT 120 jsou uvedeny v přílohách – Příloha 2. V Tabulce 10 jsou naměřené výsledky obsahu laktózy, obě měření s aritmetickým průměrem a celkový průměr se směrodatnou odchylkou všech výsledků.

Tabulka 10: Naměřené hodnoty obsahu laktózy v buvolím mléce přístrojem MilkoScan FT 120

Vzorek	1.měření	2.měření	Průměr
23.09.20	4,61	4,61	4,61
Brien	4,52	4,53	4,52
Halfhorn	4,99	4,99	4,99
Lindabel	4,25	4,25	4,25

Nody	4,78	4,79	4,79
Twin	4,41	4,42	4,41
07.12.20	5,07	5,07	5,07
25.01.21	5,05	5,06	5,05
24.02.21	5,09	5,09	5,09
12.3.21	4,99	4,99	4,99
<b>Celkový průměr:</b>			<b>4,78 ± 0,31</b>

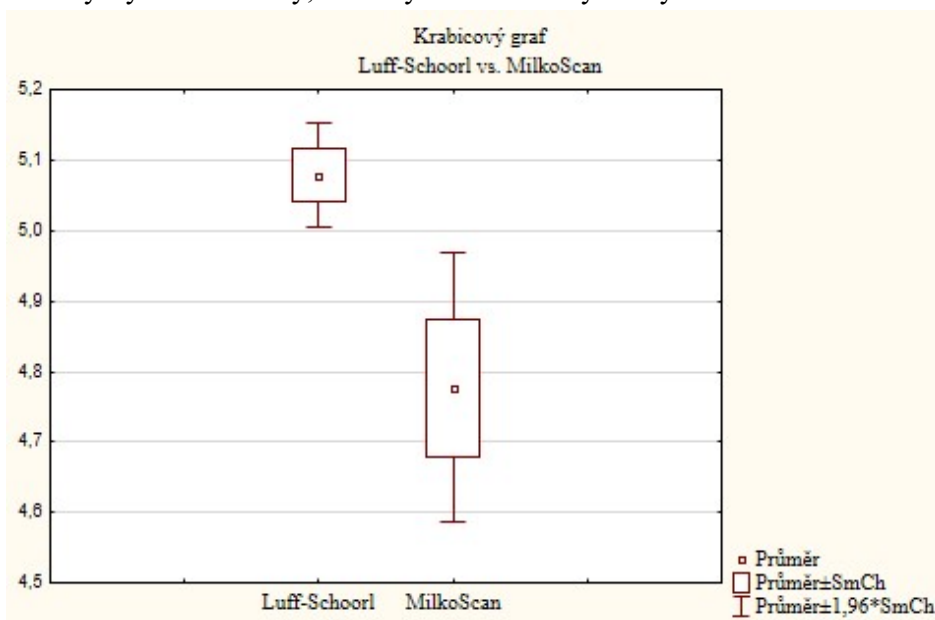
### 5.1.3 Statistické porovnání metod stanovení laktózy

Pro statistické porovnání metod stanovení obsahu laktózy byla použita statistická metoda párový t-test. Byli dosaženy průměrné hodnoty obsahu laktózy obou metod a pomocí t-testu stanovena p-hodnota (0,011), ta byla porovnána s hladinou významnosti  $\alpha$  (0,05). Výsledky t-testu jsou uvedeny v Tabulce 11. Hodnota p je menší než  $\alpha$ , to znamená že existuje statisticky významný rozdíl mezi stanovením obsahu laktózy pomocí Luff-Schoorlovi metody a přístrojem MilkoScan FT 120.

Tabulka 11: Výsledky t-testu – porovnání metod Luff-Schoorla a MilkoScan FT 120

Proměnná	t-test pro závislé vzorky (Luff-Schoorl vs. MilkoScan FT 120)							
	Označ. rozdíly jsou významné na hlad. $p < ,05000$							
	Průměr	Sm.odch.	N	Rozdíl	Sm.odch. rozdílu	t	sv	p
Luff-Schoorl	5,079	0,121						
MilkoScan	4,777	0,308	10	0,302	0,297	3,218	9	0,011

Z krabicovém grafu (Obrázek 15) je zřejmé, že MilkoScan měl vyšší rozptyl výsledků stanovení obsahu laktózy, vyšší směrodatnou odchylku a nižší průměr oproti stanovení metodou Luff-Schoorla. V krabicové grafu nejsou odlehlé body, což značí že v souboru dat by se neměli vyskytovat hodnoty, které by zkreslovali výsledky stanovení.

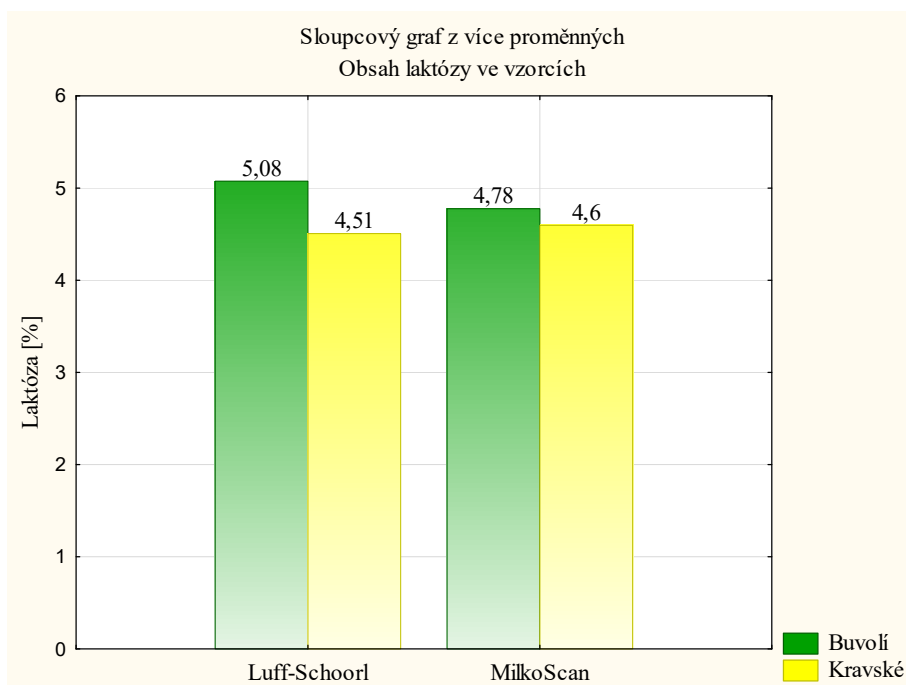


Obrázek 15: Krabicový graf – porovnání metod Luff-Schoorl a MilkoScan

#### 5.1.4 Porovnání obsahu laktózy v buvolím a kravském mléce

Obsah laktózy v buvolím i kravském mléce byl stanovován oběma metodami. Stanovení rozdílu mezi obsahem laktózy ve vzorcích obou mlék bylo provedeno pomocí dvouvýběrového t-tetu. Výsledky testu pro stanovení laktózy pomocí Luff-Schoorlovi metody i MilkoScanu FT 120 jsou uvedeny v samostatných přílohách (Přílohy 4 a 5). Z těchto výsledků vyplývá, že pro obě metody platí, že existuje statisticky významný rozdíl mezi obsahem laktózy v buvolím a kravském mléce.

Sloupcový graf na Obrázku 16, ukazuje že větší variabilita mezi vzorky buvolího a kravského mléka byla u stanovení pomocí metody Luff-Schoorla, rozdíl mezi výsledky je 0,57 %. U výsledků z MilkoScanu je rozdíl mezi skupinami vzorků 0,18 %.



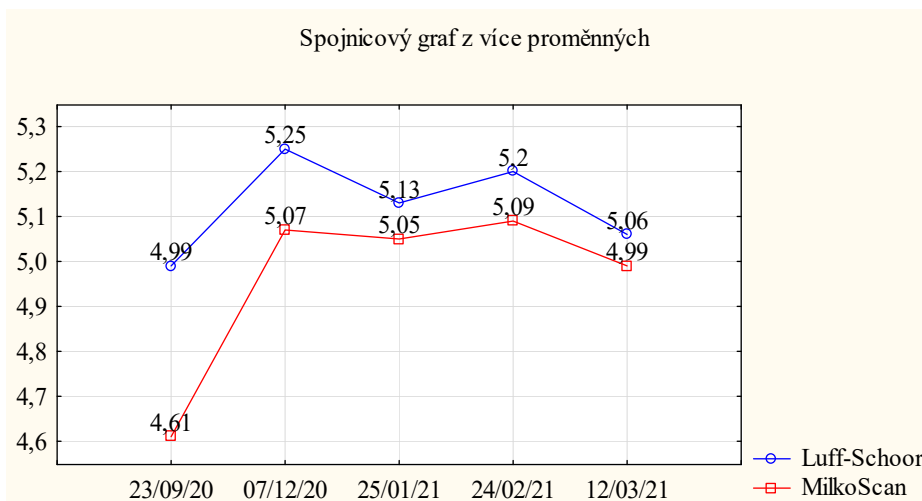
Obrázek 16: Obsah laktózy [%] v buvolím a kravském mléce stanovený Luff-Schoorlovou metodou a MilkoScanem

Porovnání průměrných obsahů všech stanovených složek vzorků (tuk, bílkoviny, laktóza, sušina, tukuprostá sušina) přístrojem MilkoScan FT 120 u buvolího a kravského mléka, je uvedeno v samostatných přílohách (Příloha 3). Buvolí mléko má oproti kravskému vyšší obsah všech těchto složek. Největší rozdíl je v obsahu tuku, v buvolím mléce 8,87 %, oproti kravskému 3,95 %. Tento rozdíl ovlivňuje i další složky mléka sušinu a tukuprostou sušinu. Zatímco mezi obsahem sušiny v buvolím a kravském mléce je rozdíl 5,81 %, u tukuprosté sušiny je rozdíl mezi mléky 0,99 %.

#### 5.1.5 Obsah laktózy ve vzorcích buvolího mléka v průběhu sběru dat

Hodnoty obsahu laktózy v buvolím mléce se v průběhu sběru dat měnily u obou metod stanovení trendově stejně. Mezi prvním a druhým stanovení došlo k vysokému nárůstu obsahu laktózy ve vzorcích, ale také mezi těmito dvěma stanoveními je delší časový úsek než mezi

ostatními stanoveními. Dále docházelo k nárůstům i poklesům obsahu laktózy mezi po sobě následujícími vzorky, jak je vyobrazeno na Obrázku 17.



Obrázek 17: Obsah laktózy [%] ve vzorcích buvolího mléka v průběhu sběru dat

## 5.2 Hodnocení obsahu vápníku ve vzorcích

Vápník byl v buvolím mléce stanovován chelatometrickou titrací za přítomnosti metalochromního indikátoru. Výsledky tohoto stanovení byly pomocí vzorce přepočteny na obsah vápníku v mg/100 g vzorku a jsou uvedeny v Tabulce 12. U každého vzorku byly provedeny tři měření, ze kterých byl stanoven aritmetický průměr a směrodatná odchylka. Obsah vápníku ve vzorcích se pohyboval od minimální hodnoty 126 mg/100 g po maximální hodnotu 171,98 mg/100 g. Medián hodnot je 144,99 mg/100 g.

Tabulka 12: Naměřené hodnoty obsahu vápníku ve vzorcích buvolího mléka [mg/100 g]

Vzorek	1. měření	2. měření	3. měření	Průměr ± Sm. odch.
23.09.20	147,99	138,00	141,99	142,66 ± 5,03
Brien	126,00	133,99	130,00	130,00 ± 3,99
Nody	132,93	139,95	130,92	134,60 ± 4,74
Halfhorn	159,96	155,96	153,97	156,63 ± 3,05
Lindabel	171,98	153,99	149,99	158,65 ± 11,71
Twin	150,00	144,00	134,99	143,00 ± 7,56
07.12.20	156,97	141,97	131,98	143,64 ± 12,58
25.01.20	157,90	141,91	159,90	153,24 ± 9,86
24.02.21	151,99	147,99	145,99	148,66 ± 3,06
12.03.21	152,00	132,00	134,00	139,33 ± 11,02

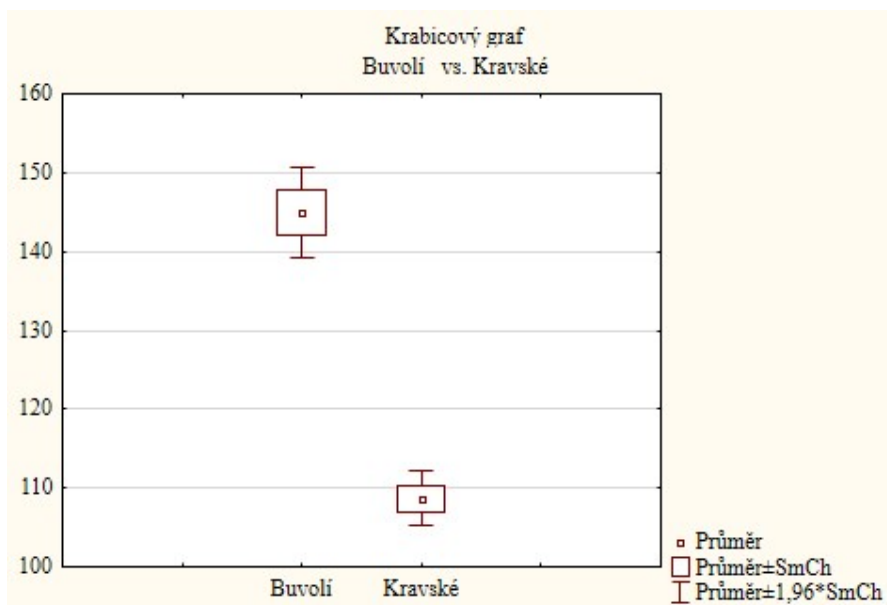
**Celkový průměr: 145,04 ± 9,31**

### 5.2.1 Porovnání obsahu laktózy v buvolím a kravském mléce

Pro porovnání obsahu vápníku v buvolím a kravském mléce byl použit dvouvýběrový t-test, jeho výsledky jsou uvedeny v Příloze 6. Vypočítaná p-hodnota (0,000431) je menší než

hladina významnosti  $\alpha$  (0,05), to značí že existuje statisticky významný rozdíl mezi obsahem vápníku v buvolím a kravském mléce.

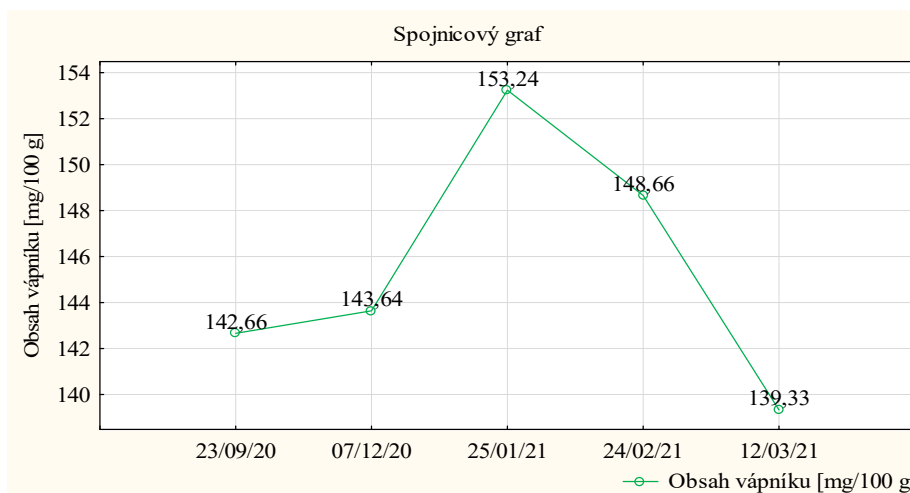
Z Obrázku 18, je zřejmé, že rozdíl obsahu vápníku mezi mléky je značný. Průměrný obsah vápníku u buvolího mléka je 145,04 mg/100 g, zatímco u kravského mléka byla průměrná hodnota 108,66 mg/100 g vzorku.



Obrázek 18: Stanovený obsah vápníku v buvolím a kravském mléce

### 5.2.2 Obsah vápníku ve vzorcích buvolího mléka v průběhu sběru dat

Obsah vápníku ve stanovovaných vzorcích v průběhu sběru dat zobrazuje Obrázek 19. Je zde vidět vzrůstající tendence do 3. stanovení a poté pokles obsahu vápníku. Poslední stanovení je zároveň nejnižším stanovením obsahu vápníku.



Obrázek 19: Obsah vápníku ve vzorcích buvolího mléka v průběhu sběru dat

## 6 Diskuse

### 6.1 Laktóza

Laktóza je jednou z hlavních složek mléka. Důležitá je hlavně pro mláďata, kterým poskytuje zdroj energie a uhlíku pro růst a vývoj organismu (Adam et al. 2005). V lidském organismu se laktóza štěpí na glukózu a galaktózu, které jsou využity jako zdroj energie. Zároveň, ale může být laktóza pro organismu problematická a způsobovat gastrointestinální obtíže. Tato situace nastává, pokud organismus neprodukuje enzym laktáza, který štěpí laktózu na glukózu a galaktózu, v tom případě laktóza způsobuje gastrointestinální potíže.

Průměrná hodnota obsahu laktózy v buvolím mléce stanovena pomocí Luff-Schorlovi metody, uvedena v Tabulce 9, je  $5,08 \pm 0,12$  %. Podobné hodnoty stanovení uvádí i studie Kapadiya et al. 2016 ( $4,86 \pm 0,24$  %), kde byly vzorky analyzovány taktéž pomocí titrační metody.

Při stanovení přístrojem MilkoScan FT 120 je průměrná hodnota laktózy nižší  $4,78 \pm 0,31$  %. Tato hodnota odpovídá stanovením ve studiích Khan et al. 2007 ( $4,80 \pm 0,10$  %) a Tufarelli et al. 2008 ( $4,85 \pm 0,78$ ), kde byl ke stanovení také použit přístroj MilkoScan.

Statistické porovnání obou metod stanovení obsahu laktózy ve vzorcích ukázalo, že mezi výsledky stanovení laktózy pomocí metody Luff-Schorl a přístrojem MilkoScan FT 120 existuje statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ) (Tabulka 11). Každá metoda má své výhody i nevýhody. Luff-Schoorl je titrační metoda, při které může dojít k nepřesnostem při odměřování použitých chemikálií nebo může nastat chyba při určení bodu ekvivalence. Přístroj MilkoScan se používá pro rychlé stanovení složek mléka, je nutná jeho kalibrace a měření obsahu složky mléka je ovlivněno dalšími látkami ve vzorku. Také je potřeba zajistit maximální homogenitu vzorku, jelikož mléko má tendenci k oddělování jednotlivých složek v tekutině, což může ovlivnit stanovení všech složek přístrojem.

Obsah laktózy v buvolím mléce v průběhu laktace je poměrně stálý, jak ukazuje Obrázek 17, kdy největší rozdíl ve stanovených hodnotách v průběhu sběru dat je mezi prvním a druhým měření (nárůst hodnoty o 0,26 resp. 0,46 %), poté mezi jednotlivými měřeními nedochází k významným změnám. Obsah laktózy v mléce může výrazně ovlivnit zdravý mléčné žlázy, například mastitida, která způsobí výrazný pokles laktózy v mléce, jak uvádí Sharif et al. 2007.

Porovnání obsahu laktózy v buvolím a kravském mléce bylo provedeno pomocí dvouvýběrového t-testu, jak je uvedeno v Kap. 5.2.1. Z tohoto porovnání vyplývá, že existuje statisticky významný rozdíl v obsahu laktózy mezi těmito dvěma mléky. K tomuto závěru došli i studie Ahmad et al. 2008, Menard et al. 2010 a Kapadiya et al. 2016. Rozdíl v obsahu laktózy mezi mléky je znázorněn na Obrázku 16, z něj vyplývá, že buvolí mléko obsahuje o 0,57 % (Luff-Schoorl), respektive 0,18 % (MilkoScan FT 120) více laktózy než mléko kravské. Ve zmíněných studiích byl obsah laktózy v buvolím mléce také vyšší než u mléka kravského, u Kapadiya et al. 2016 byl rozdíl mezi mléky 0,1 %, ve studii Menard et al. 2010 - 0,71 % a v Ahmad et al. 2008 se mléka lišila o 0,41 % laktózy.

V buvolím mléce je vyšší obsah laktózy i dalších složek v porovnání s kravským mlékem. Může to být způsobeno například stupněm prošlechtění těchto druhů nebo průměrným denním nádojem. Buvoli nebyli v minulosti tak intenzivně šlechtěni jako tomu bylo u skotu

z toho důvodu je i jejich dojivost nižší. Denní produkce mléka u buvola říčního se pohybuje mezi 6–7 litry mléka, což je přibližně 2 000 kg mléka za laktaci (Thomas 2004; Zicarelli 2016). U skotu je průměrná denní dojivost 20–28 litrů mléka, za celou laktaci je tedy dojnice schopna vyprodukovat 8 – 12 000 litrů mléka. Vysoká dojivost, ale způsobila snížení obsahu složek v kravském mléce.

Laktóza je důležitá pro výrobu fermentovaných mléčných výrobků, je substrátem pro bakterie mléčné kvašení, které ji využívají jako zdroj energie pro svůj růst a množení. Při fermentaci vzniká typická textura a chuť mléčného výrobku. Obsah laktózy v mléce může tedy ovlivnit kvalitu mléčného výrobku. Je tedy důležité znát její obsah v mléce, abychom mohli předpokládat správný průběh fermentačních procesů.

## 6.2 Vápník

V průměru tvoří minerální prvky přibližně 4 % celkové tělesné hmotnosti a vyskytují se v tkáních, tekutinách, buňkách i orgánech lidského těla. Minerály, mají strukturální, biochemické a nutriční funkce, které jsou velmi důležité pro celkové lidské zdraví. Dále působí jako katalyzátory mnoha biologických reakcí v těle, včetně kontrakce svalů, přenosu nervových impulsů a využití živin z potravy. Minerální frakce v mléce a mléčných výrobcích je tvořena makroelementy (Ca, Mg, Na, K, P a Cl) a mikroelementy (Fe, Cu, Zn a Se) (Gaucheron 2011; Singh et al. 2019). Vápník je jednou z hlavních minerálních látek přítomných v mléce a mléčných výrobcích.

Obsah vápníku v buvolím mléce byl stanoven chelatometrickou titrací za přítomnosti metalochromního indikátoru. Průměrná hodnota obsahu vápníku ve vzorcích buvolího mléka je  $145,04 \pm 9,31$  mg/100 g (uvedena v Tabulce 12). Další studie ovšem stanovují obsah vápníku vyšší například Singh et al. 2019 uvádí 204,23 mg/100 g, Kapadiya et al. 2016 - 178,59 mg/100 g a Ahmad et al. 2008 – 188,02 mg/100 g. Rozdílnost v obsahu vápníku mezi jednotlivými studiemi může být způsobena různými faktory. Patino et al. 2007 uvádí, že obsah vápníku v buvolím mléce, může být ovlivněn ročním obdobím nebo pořadím laktace. Nejvyšší obsah vápníku v mléce by měl být podle studie v letních měsících a při první laktaci. Ve studii Kapadiya et al. 2016 byly vzorky mléka odebírány od července do ledna, pořadí laktace u buvolic není uvedeno. Singh et al. 2019 a Ahmad et al. 2008 ve studiích neuvádějí období odběru vzorků ani pořadí laktace. Vzorky pro tuto diplomovou práci byly odebírány od září 2020 do března 2021 a mléko pocházelo od buvolic ve druhé laktaci. To mohlo mít za následek nižší průměrný obsah vápníku ve vzorcích mléka v porovnání s dalšími studiemi.

Statistickým porovnáním buvolího a kravského mléka, bylo stanoveno, že mezi mléky existuje statisticky významný rozdíl v obsahu vápníku. Stejný výsledek uvádějí i další studie Ahmad et al. 2008, Kapadiya et al. 2016 a Singh et al. 2019. Z Obrázku 18 je patrné, že rozdíl je výrazný, buvolí mléko obsahuje o 36,38 mg/100 g více vápníku než kravské mléko. Nicméně další studie uvádějí vyšší rozdíl při porovnání obsahu vápníku v buvolím a kravském mléce Ahmad et al. 2008 – 67,79 mg/100 g, Kapadiya et al. 2016 – 58,35 mg/100 g a Singh et al. 2019- 69,36 mg/100 g. Vyšší rozdíl mezi buvolím a kravským mlékem odpovídá vyššímu obsahu vápníku v buvolím mléce oproti výsledkům diplomové práce, které jsou uvedené výše. Obsah vápníku v kravském mléce byl ve všech studiích poměrně stálý, pohyboval se okolo 120 mg/100 g.



Jak už bylo uvedeno, obsah vápníku v buvolím mléce se může v průběhu laktace měnit. Na Obrázku 19 je zobrazen obsah vápníku v jednotlivých vzorcích v průběhu sběru dat. Nejvyšší obsah vápníku byl naměřen v lednu 2021, nejnižší v březnu 2021. Tyto hodnoty se neshodují se studií Patino et al. 2007, která uvádí, že v zimě by měl být obsah vápníku v mléce nejnižší. Důvodem vysokého obsahu vápníku ve vzorcích z ledna (diplomová práce) může být příkrm buvolic biogranulemi s obsahem minerálů v průběhu zimy, jelikož po zbytek roku jsou zvířata pouze na pastvě.

Vápník je v lidském organismu důležitý hlavně pro růst a zdraví kostí a zubů, kde se nachází 99 % celkového vápníku v těle. Obecně je mléko a mléčné výrobky dobrým zdrojem vápníku, který je lépe využitelný organismem než z rostlinných zdrojů. Buvolí mléko obsahuje o 25–35 % více vápníku než mléko kravské. Jeho konzumace může tedy snižovat riziko osteoporózy a dalších onemocnění pohybového aparátu. Buvolí mléko by mohlo najít využití pro výživu lidí se zvýšenými nároky na příjem vápníku, jako jsou děti, těhotné ženy a senioři. Tato možnost využití by mohla být předmětem dalšího výzkumu.

## 7 Závěr

Tato diplomová práce se zabývala stanovením obsahu laktózy a vápníku v buvolím mléce. Vzorky buvolího mléka byly odebírány na jediné farmě v České republice zabývající se produkcí buvolího mléka na „Buvolí farmě Ohař“. Vzorky byly odebírány a analyzovány od září 2020 do března 2021. U vzorků mléka byla stanovována laktóza titračně Luff-Schoorlovou metodou a pomocí přístroje MilkoScan FT 120, který k detekci využívá infračervenou spektroskopii. Vápník byl stanoven chelatometricky za přítomnosti metalochromního indikátoru.

Průměrný obsah laktózy v buvolím mléce byl podle metody Luff-Schoorla  $5,08 \pm 0,12$  %, podle přístroje MilkoScan FT 120  $4,78 \pm 0,31$  %. Průměrný obsah vápníku v buvolím mléce byl  $145,04 \pm 9,31$  mg/100 g.

Výsledky prokázaly, že existuje statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ) v obsahu laktózy i vápníku v buvolím a kravském mléce. V buvolím mléce se vyskytuje vyšší obsah všech hlavních složek (tuk, bílkoviny, laktóza, sušina, tukuprostá sušina i popeloviny) oproti kravskému.

Změny v obsahu laktózy v průběhu období sběru dat, nebyly příliš výrazné. Největší rozdíl mezi naměřenými hodnotami byl mezi prvním a druhým měřením (nárůst o 0,26 resp. 0,46 %), poté se výsledky měření v čase průměrně lišili o 0,11 % resp. 0,05 %. Naopak obsah vápníku byl významně ovlivněn ročním obdobím a výživou buvolic. Nejvyšší a nejnižší naměřené hodnoty se lišily o 13,91 mg vápníku/100 g mléka (přibližně o 10 %).

Buvolí mléko je potravina velmi bohatá na živiny, které jsou pro lidský organismus dobře stravitelné a využitelné. Proto je mléko vhodné pro výživu člověka, ale také má díky vyššímu obsahu složek lepší výtěžnost při výrobě mléčných výrobků.

V České republice se v současné době nachází pouze jedna malá farma, kde chovají buvoly pro produkci mléka. Průměrně zde produkuje mléko 6 buvolic, průměrný denní nádoj na farmě je přibližně 42 litrů mléka, celkový nádoj (všech 6 buvolic za laktaci) je 10 000 - 11 500 litrů mléka. Tato produkce nestačí pro širší využití buvolího mléka v České republice a jedná se tak spíše o speciální produkt. Větší a širší využití buvolího mléka, případně mléčných výrobků, by tedy bylo možné až po rozšíření produkce případně dovozu mléka ze zahraničí.

## 8 Literatura

- Abrams, SA, Griffin, IJ, a Davila, PM. 2002. Calcium and zinc absorption from lactose-containing and lactose-free infant formulas. *The American journal of clinical nutrition*, **76**: 442-446.
- Adam A.C., Rubio-Teixeira M., Polaina, J. 2005. Lactose: the milk sugar from a biotechnological perspective. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **44**: 553-557
- Addeo F, Alloisio V, Chianese L, Alloisio V 2007. Tradition and innovation in the water buffalo dairy products. *Ital J Anim Sci*. **6**:51–57
- AIA (Italská společnost chovatelů). 2019. Bolletino online. AIA (Italská společnost chovatelů). Řím. Available from [http://bollettino.aia.it/Contenuti.aspx?CD\\_GruppoStampe=RS&CD\\_Specie=C4](http://bollettino.aia.it/Contenuti.aspx?CD_GruppoStampe=RS&CD_Specie=C4) (accessed June 2020).
- Ahmad, S., Anjum, F. M., Huma, N., Sameen, A., & Zahoor, T. 2013. Composition and physico-chemical characteristics of buffalo milk with particular emphasis on lipids, proteins, minerals, enzymes and vitamins. *J Anim Plant Sci*, **23**: 62-74.
- Ahmad, S., Piot, M., Rousseau, F., Grongnet, J. F., & Gaucheron, F. 2009. Physico-chemical changes in casein micelles of buffalo and cow milks as a function of alkalisation. *Dairy science & technology*, **89**: 387-403.
- Ahmad, S., Gaucher, I., Rousseau, F., Beaucher, E., Piot, M., Grongnet, J. F., & Gaucheron, F. 2008. Effects of acidification on physico-chemical characteristics of buffalo milk: A comparison with cow's milk. *Food Chemistry*, **106**: 11-17.
- Bansal, B. K., Hamann, J., Lind, O., Singh, S. T., & Dhaliwal, P. S. 2007. Somatic cell count and biochemical components of milk related to udder health in buffaloes. *Italian Journal of Animal Science*, **6**: 1035-1038.
- Barile, V. L. 2005. Reproductive efficiency in female buffaloes. Pages 77 - 108 in Borghese A., editor. *Buffalo Production and Research*. FAO, Roma.
- Barłowska, J., Sz wajkowska, M., Litwińczuk, Z., & Król, J. 2011. Nutritional value and technological suitability of milk from various animal species used for dairy production. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, **10**: 291-302.
- Bilal, M. Q., Suleman, M., Raziq, A. 2006. Buffalo: black gold of Pakistan. *Livestock Research for rural development*, **18**: 140-151.
- Borghese, A. 2011. Situation and perspectives of buffalo in the world, Europe and Macedonia. *Macedonian Journal of Animal Science*, **1**: 281-296.
- Borghese, A. 2013. Buffalo livestock and products in Europe. *Buffalo Bulletin*, **32**: 50-74.
- Borghese A., Mazzi M. 2005. Buffalo population and strategies in the world. Pages 1-39 in Borghese A., editor. *Buffalo Production and Research*. FAO, Roma.

- Borghese A. 2005. Buffalo cheese and milk industry. Pages 185-195 in Borghese A., editor. Buffalo Production and Research. FAO, Roma.
- Bornaz, S., Sahli, A. L. I., Attalah, A., Attia, H. 2009. Physicochemical characteristics and renneting properties of camels' milk: A comparison with goats', ewes' and cows' milks. *International Journal of Dairy Technology*, **62**: 505-513.
- Catillo, G., Macciotta, N. P. P., Carretta, A., & Cappio-Borlino, A. 2002. Effects of age and calving season on lactation curves of milk production traits in Italian water buffaloes. *Journal of dairy science*, **85**: 1298-1306.
- Clayborne A. & Morris V. 2017. LibreTexts. Howard University, Washingtonu, D.C. Available from <https://chem.libretexts.org/@go/page/73006?pdf> (accessed January 2021).
- Costa, A., Neglia, G., Campanile, G., & De Marchi, M. 2020. Milk somatic cell count and its relationship with milk yield and quality traits in Italian water buffaloes. *Journal of Dairy Science*. **6**: 5485-5494.
- Corzo N., Olano A., Martínez-Castro I. 2009. Carbohydrates. Pages 139 – 168 in Nollet L. M. L., Toldra F., editors. *Handbook of Dairy Foods Analysis*, CRC Press, Taylor & Francis Group, Oxford.
- Czerniawska-Piątkowska, E., Chociłowicz, E., & Szewczuk, M. 2010. Biology of *Bubalus bubalis*. *Annals of Animal Science*, **10**: 107-115.
- Davoodi, S. H., Shahbazi, R., Esmacili, S., Sohrabvandi, S., Mortazavian, A., Jazayeri, S., & Taslimi, A. 2016. Health-related aspects of milk proteins. *Iranian journal of pharmaceutical research*. **15**: 573-591.
- De Angelis M., Gobbetti M. 2011. Pasta-Filata Cheeses: Traditional Pasta-Filata Cheese. Pages 745-752 in Fox P. F., McSweeney P. L. H., editors. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Academic Press, USA.
- De Rosa, G., Napolitano, F., Grasso, F., Pacelli, C., & Bordi, A. 2005. On the development of a monitoring scheme of buffalo welfare at farm level. *Italian Journal of Animal Science*, **4**: 115-125.
- El-Salam, M. H. A., & El-Shibiny, S. 2011. A comprehensive review on the composition and properties of buffalo milk. *Dairy science & technology*, **91**: 663.
- El-Zeini, HM. 2006 Microstructure, rheological and geometrical properties of fat globules of milk from different animal species. *Pol J Food Nutr Sci* **15**:147–154
- Evropský Parlament a Rada. 2004. Nařízení č. 853/2004 ze dne 29. dubna 2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu. Brusel, Belgie.
- FAO. 2018a. FAOSTAT: Production - Live animals. FAO, Rome. Available from <http://faostat.fao.org/> (accessed March 2020).
- FAO. 2018b. FAOSTAT: Production – Livestock Primary. FAO, Rome. Available from <http://faostat.fao.org/> (accessed April 2020).
- Fagiolo, A., & Lai, O. 2007. Mastitis in buffalo. *Italian Journal of Animal Science*, **6**: 200-206.

- Forsbäck, L., Lindmark-Månsson, H., Andrén, A., & Svennersten-Sjaunja, K. 2010. Evaluation of quality changes in udder quarter milk from cows with low-to-moderate somatic cell counts. *Animal: an international journal of animal bioscience*, **4**: 617 – 626.
- Fox P. F. 2003. The major constituents of milk. Pages 6-41 in Smit G, editor. *Dairy processing improving quality*. Woodhead Publishing Limited. Cambridge, England
- Fox, P. F. 2013. *Advanced Dairy Chemistry Volume 3: Lactose, Water, Salts and Vitamins*. Springer Science & Business Media. Berlín, Německo.
- Gaucheron, F. 2005. The minerals of milk. *Reproduction Nutrition Development*, **45**: 473-483.
- Gaucheron, F. 2011. Milk and dairy products: a unique micronutrient combination. *Journal of the American College of Nutrition*, **30**: 400 - 409.
- Giacinti, G., Basiricò, L., Ronchi, B., & Bernabucci, U. 2013. Lactoferrin concentration in buffalo milk. *Italian Journal of Animal Science*, **12**: 139 – 143.
- Han, X., Lee, F. L., Zhang, L., & Guo, M. R. 2012. Chemical composition of water buffalo milk and its low-fat symbiotic yogurt development. *Functional Foods in Health and Disease*, **2**: 86-106.
- Hill, D., Sugrue, I., Arendt, E., Hill, C., Stanton, C., & Ross, R. P. 2017. Recent advances in microbial fermentation for dairy and health. *F1000 Research*, **6**, 751. <https://doi.org/10.12688/f1000research.10896.1>
- Hofi M. 2013. Buffalo Milk Cheese. *Buffalo Bulletin* **32**: 355-360
- Kailasapathy K. 2015. Chemical composition, physical, and functional properties of milk and milk ingredients. Pages 156-201 in Chandan R. C., Kilara A., Shah N. P., editors. *Dairy Processing and Quality Assurance*. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, USA.
- Kamel, D. G., Gomah, N. H., & Hasan, A. I. 2012. Comparative Study on Chemical Composition and Minerals Content of Buffalo Milk in Assiut City. *Assiut Journal of Agricultural Sciences*. **4**: 1-12
- Kapadiya, D. B., Prajapati, D. B., Jain, A. K., Mehta, B. M., Darji, V. B., & Aparnathi, K. D. 2016. Comparison of Surti goat milk with cow and buffalo milk for gross composition, nitrogen distribution, and selected minerals content. *Veterinary world*, **9**: 710-716.
- Khan, M. A. S., Islam, M. N., & Siddiki, M. S. R. 2007. Physical and chemical composition of swamp and water buffalo milk: a comparative study. *Italian Journal of Animal Science*, **6**: 1067-1070.
- Khan, I. T., Nadeem, M., Imran, M., Asif, M., Khan, M. K., Din, A., & Ullah, R. 2019. Triglyceride, fatty acid profile and antioxidant characteristics of low melting point fractions of Buffalo Milk fat. *Lipids in Health and Disease*, **18**: 59.
- Kiple, K. F. 2007. *A movable feast: Ten millennia of food globalization*. Cambridge University Press, Cambridge.

- Król, J., Litwinczuk, Z., Brodziak, A., Barłowska, J. 2010. Lactoferrin, lysozyme and immunoglobulin G content in milk of four breeds of cows managed under intensive production system. *Pol J Vet Sci* **13**: 357-61.
- Kwak, H. S., Lee, W. J., & Lee, M. R. 2012. Revisiting lactose as an enhancer of calcium absorption. *International Dairy Journal*, **22**: 147-151.
- Lucey, J. A. 2002. Formation and physical properties of milk protein gels. *Journal of Dairy Science*, **85**: 281-294.
- Lukešová E. 2010. Laboratorní cvičení z analytické chemie pro 3. a 4. ročník. Praha 2. Available from: <http://studenti.podskalska.cz/eucebnice/labcvzach3.pdf>. (accessed March 2021).
- Lynch, J. M., Barbano, D. M., Schweisthal, M., & Fleming, J. R. 2006. Precalibration evaluation procedures for mid-infrared milk analyzers. *Journal of dairy science*, **89**: 2761-2774.
- Manuelian, C. L., Currò, S., Penasa, M., Cassandro, M., & De Marchi, M. 2017. Characterization of major and trace minerals, fatty acid composition, and cholesterol content of Protected Designation of Origin cheeses. *Journal of dairy science*, **100**: 3384-3395.
- Menard O, Ahmed S, Rousseau F, Briard-Bion V, Gaucheron F, Lopez C. 2010. Buffalo vs.cow milk fat globule: size distribution, zeta-potential, compositions in total fatty acids and in polar lipids from the milk fat membrane. *Food Chem.* **120**: 544–551
- Moioli, B. 2005. Breeding and selection of dairy buffaloes. Pages 41 - 50 in Borghese A., editor. *Buffalo Production and Research*. FAO, Roma.
- Montagne, P., Cuilliere, M. L., Mole, C., Bene, M. C., Faure, G. 2001. Changes in lactoferrin and lysozyme levels in human milk during the first twelve weeks of lactation. Pages 241-247 in Newburg D. S., editor. *Bioactive components of human milk*. Springer, Boston, MA.
- Murtaza M. A., Pandya A. J., Khan M. M. H. 2017. Buffalo milk. Pages 261-368 in Wendorff W. L., Park Y. W., Haenlein G. F. W., editors. *Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals*, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, USA.
- Nagarajan, M., Nimisha, K., & Kumar, S. 2015. Mitochondrial DNA variability of domestic river buffalo (*Bubalus bubalis*) populations: genetic evidence for domestication of river buffalo in Indian subcontinent. *Genome biology and evolution*, **7**: 1252-1259.
- Nguyen, H. T., Ong, L., Beaucher, E., Madec, M. N., Kentish, S. E., Gras, S. L., & Lopez, C. 2015. Buffalo milk fat globules and their biological membrane: in situ structural investigations. *Food Research International*, **67**: 35-43.
- Patino EM, Pochon DO, Faisal EL, Cedrès JF, Mendez FI, Stefani CG, Crudeli G. 2007. Influence of breed, year season and lactation stage on the buffalo milk mineral content. *Ital J Anim Sci* **6**:1046–1049

- Reddi, S., Shanmugam, V. P., Tanedjeu, K. S., Kapila, S., & Kapila, R. 2018. Effect of buffalo casein-derived novel bioactive peptides on osteoblast differentiation. *European journal of nutrition*, **57**: 593-605.
- Rafiq, S., Huma, N., Pasha, I., Sameen, A., Mukhtar, O., & Khan, M. I. 2016. Chemical composition, nitrogen fractions and amino acids profile of milk from different animal species. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, **29**: 1022-1028
- Rudolfová J. & Čurda L. 2005. Probiotické účinky galaktooligosacharidů a využití laktózy pro jejich produkci. *Chemické listy*, **99**: 168 – 174.
- Sharif, A., Ahmad, T., Bilal, M. Q., Yousaf, A., & Muhammad, G. 2007. Effect of severity of sub-clinical mastitis on somatic cell count and lactose contents of buffalo milk. *Pakistan Veterinary Journal*, **27**: 142.
- Schaafsma, G. 2003. Nutritional significance of lactose and lactose derivatives. Page 1531 in Fuquay J. W. , Roginski H., editors. *Encyclopedia of dairy sciences*. Academic Press. Cambridge, Massachusetts.
- Schaafsma, G. 2008. Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition. *International Dairy Journal*, **18**: 458-465.
- Singh, M., Sharma, R., Ranvir, S., Gandhi, K., & Mann, B. 2019. Profiling and distribution of minerals content in cow, buffalo and goat milk. *Indian J. Dairy Sci*, **72**: 480-488.
- Ševcov B. 2018. The use of analytical equipment for solving problems in industrial laboratories. Available from <https://docplayer.ru/79668367-Ispolzovanie-analiticheskogo-oborudovaniya-dlya-resheniya-zadach-v-proizvodstvennyh-laboratoriyah.html> (accessed January 2021).
- Thomas, C. S. 2004. Milking management of dairy buffaloes. [Doctoral thesis]. Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala.
- Teixeira, G.A, Batista, F. F., Malagoni, R. A., & Finzer, J. R. D. 2019. Continuously monitored lactose crystallization in a vibrated bed. *Brazilian Journal of Food Technology*, 22, Epub e2018275. <https://dx.doi.org/10.1590/1981-6723.27518>
- Theobald, H. E. 2005. Dietary calcium and health. *Nutrition Bulletin*, **30**: 237-277.
- Tripaldi, C., Palocci, G., Miarelli, M., Catta, M., Orlandini, S., Amatiste, S., & Catillo, G. 2010. Effects of mastitis on buffalo milk quality. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, **23**: 1319-1324.
- Tufarelli, V., Dario, M., & Laudadio, V. 2008. Diet composition and milk characteristics of Mediterranean water buffaloes reared in Southeastern Italy during spring season. *Livest. Res. Rural Dev*, **20**: 1-7.
- Varnam, A., & Sutherland, J. P. 2001. Milk and milk products: technology, chemistry and microbiology (Vol. 1). An Aspen Publication. Gaithersburg, Maryland.

- Vázquez, S. M., de Rojas, J. N., Troche, J. R., Adame, E. C., Ruíz, R. R., & Domínguez, L. U. 2020. The Importance of Lactose Intolerance in Individuals With Gastrointestinal Symptoms. *Revista de gastroenterología de Mexico*, **85**: 321-331
- Vidu, L., Chelmu, S., Bacila, V., & Maciuc, V. 2015. The content of minerals and fatty acids in buffalo milk, depending on the rank of lactation. *Romanian Biotechnological Letters*, **20**: 10076-10084.
- Visentin, G., Manuelian, C. L., Boselli, C., Giangolini, G., Cassandro, M., & De Marchi, M. 2017. Prediction of milk coagulation and acidity traits in Mediterranean buffalo milk using Fourier-transform mid-infrared spectroscopy. *Journal of dairy science*, **100**: 7083-7087.
- Wang S, Chen N, Capodiferro MR, Zhang T, Lancioni H, Zhang H, Miao Y, Chanthakhoun V, Wanapat M, Yindee M, Zhang Y. 2017. Whole mitogenomes reveal the history of swamp buffalo: initially shaped by glacial periods and eventually modelled by domestication. *Scientific reports*, **7**: 1-8.
- Yasmin, I., Naz, S., Tanweer, S., Ahsan, S., Mehmood, T., Tehseen, S., & Khan, W. A. 2020. Characterization and comparative evaluation of milk protein variants from Pakistani dairy breeds. *Food Science of Animal Resources*. eISSN: 2636-0780  
DOI: <https://doi.org/10.5851/kosfa.2020.e44>
- Zhang, Y., Colli, L., & Barker, J. S. F. 2020. Asian water buffalo: domestication, history and genetics. *Animal Genetics*, **51**:177-191.
- Zhang H. & Metzger L. E. 2009. Organic Acids. Pages 259 – 272 in Nollet L. M. L., Toldra F., editors. *Handbook of Dairy Foods Analysis*, CRC Press, Taylor & Francis Group, Oxford.
- Zicarelli, L. 2004. Buffalo milk: its properties, dairy yield and mozzarella production. *Veterinary Research Communications*, **28**: 127 – 135.
- Zicarelli L. 2016. Influence of Seasonality on Buffalo Production. Pages 196 – 224 in Presicce G. A., editor. *The Buffalo (Bubalus Bubalis)-Production and Research*. Bentham Science Publishers, Sharjah.



## 9 Seznam použitých zkratk

ANASB	Italská asociace chovatelů buvolů
ATP	Adenintrifosfát
BMK	Bakterie mléčného kvašení
FTIR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
GA	Golgiho aparát
GC	Plynová chromatografie
GOS	Galaktooligosacharidy
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
IR	Infračervené
MIR	Střední infračervená oblast
NADH	Nikotinamidadeninukleotid
PSB	Počet somatických buněk
TK	Titrační kyselost
UDP	Uridindifosfát

## 10 Seznam obrázků

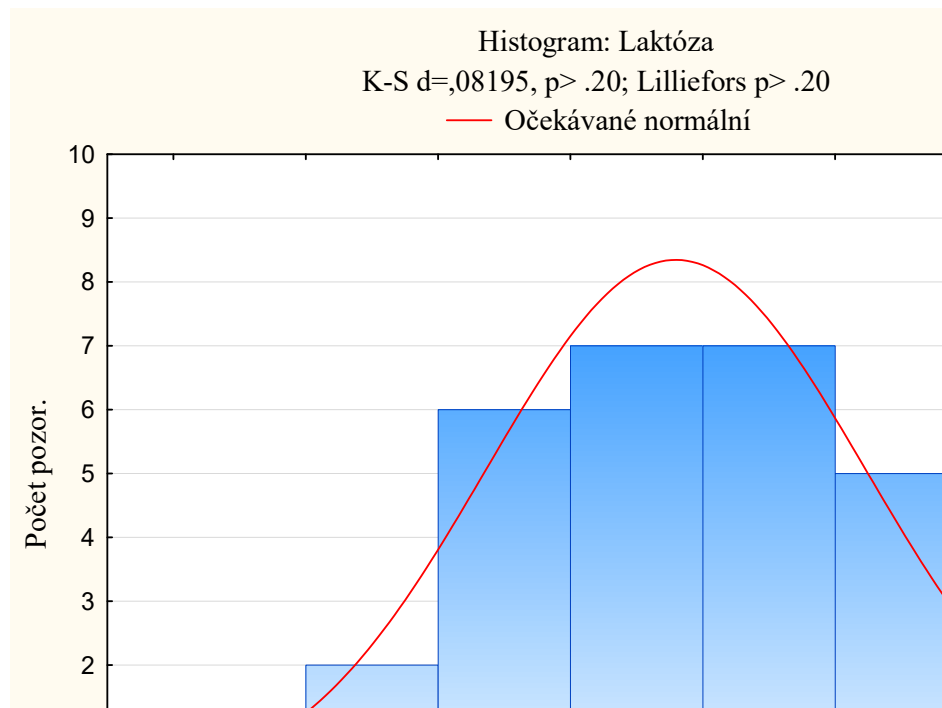
Obrázek 1: Předpokládaný průběh rozšíření říčního a bažinného buvola (Zhang et al. 2020)	10
Obrázek 2: Procentuální rozdělení chovu buvolů na světě (FAO 2018a).....	11
Obrázek 3: Obsah bílkovin a dusíkatých frakcí [%] v buvolím a kravském mléce (Rafiq et al. 2016).....	16
Obrázek 4: Fotografie pořízená optickou mikroskopií ukazující rozdíly v obsahu tuku a velikosti tukových kuliček v buvolím (A) a kravském (B) mléce (Menard et al. 2010).....	17
Obrázek 5: Strukturální vzorec optických izomerů laktózy (Teixeira et al. 2019).....	17
Obrázek 6: Připravené zásobní roztoky. Zleva: Carrez II, Carez I, Luffův roztok, kyselina sírová, thiosíran sodný, škrobová maz. ....	33
Obrázek 7: Barevné změny v průběhu stanovení. Vlevo: roztok po vyndání z vodní lázně a ochlazení. Vpravo: roztok po přidání KI a H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . ....	34
Obrázek 8: Změny barvy v průběhu titrace. 1. roztok před titrací. 2. roztok před přidáním škrobového mazu. 3. roztok po přidání škrobového mazu. 4. konec titrace. ....	34
Obrázek 9: MilkoScan FT 120 .....	36
Obrázek 10: MilkoScan FT 120 – měřicí jednotka a osobní počítač .....	36
Obrázek 11: Schéma měřicí jednotky přístroje MilkoScan FT 120 (upraveno Ševcov 2018)	37
Obrázek 12: Schéma Michelsonova interferometru (upraveno podle Clayborne & Morris 2017).....	38
Obrázek 13: Murexid a zásobní roztoky .....	39
Obrázek 14: Bod ekvivalence - změna barvy.....	40
Obrázek 15: Krabicový graf – porovnání metod Luff-Schoorl a MilkoScan .....	43
Obrázek 16: Obsah laktózy [%] v buvolím a kravském mléce stanovený Luff-Schoorlovou metodou a MilkoScanem.....	44
Obrázek 17: Obsah laktózy [%] ve vzorcích buvolího mléka v průběhu sběru dat .....	45
Obrázek 18: Stanovený obsah vápníku v buvolím a kravském mléce .....	46
Obrázek 19: Obsah vápníku ve vzorcích buvolího mléka v průběhu sběru dat .....	46

## 11 Seznam tabulek

Tabulka 1: Počet chovaných kusů buvolů celosvětově (FAO 2018a).....	11
Tabulka 2: Produkce mléka ve světě (FAO 2018b) .....	12
Tabulka 3: Hrubé složení buvolího, kravského a koziho mléka dle Kapadiya et al. 2016 .....	14
Tabulka 4: Složení buvolího a kravského mléka dle Ahmad et al. 2008 .....	15
Tabulka 5: Obsah laktózy v buvolím mléce.....	18
Tabulka 6: Obsah laktózy v mléce dalších savců (Schaafsma 2003).....	18
Tabulka 7: Obsah minerálních prvků v mléce různých druhů s rozpustnou frakcí minerálů (Singh et al. 2019) .....	22
Tabulka 8: Stanovení laktózy podle Luff-Schoorla (Lukešová 2010) .....	35
Tabulka 9: Stanovené hodnoty obsahu laktózy podle Luff-Schoorla v buvolím mléce [%] ...	42
Tabulka 10: Naměřené hodnoty obsahu laktózy v buvolím mléce přístrojem MilkoScan FT 120 .....	42
Tabulka 11: Výsledky t-testu – porovnání metod Luff-Schoorla a MilkoScan FT 120 .....	43
Tabulka 12: Naměřené hodnoty obsahu vápníku ve vzorcích buvolího mléka [mg/100 g].....	45

## 12 Samostatné přílohy

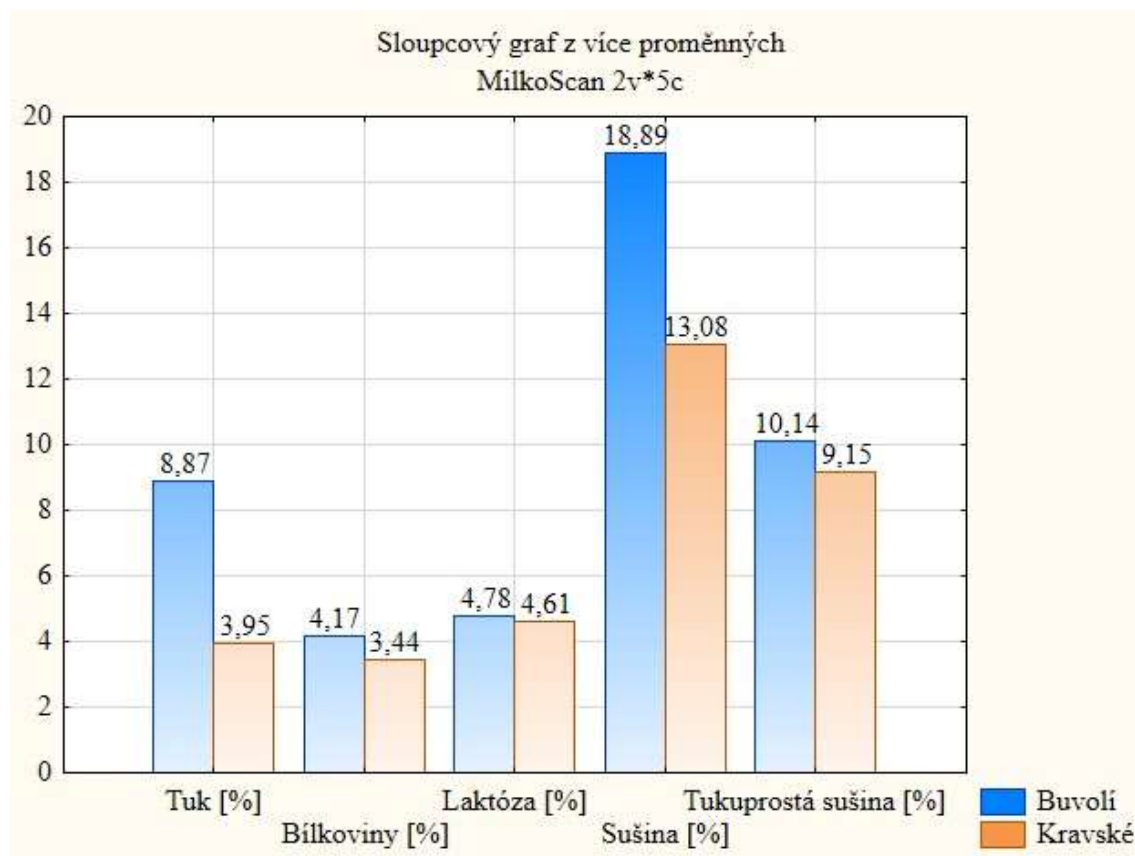
**Příloha 1:** Histogram – normální rozdělení hodnot obsahu laktózy



**Příloha 2:** Výsledky měření buvolího mléka přístrojem MilkoScan FT 120

	<b>Tuk [%]</b>	<b>Bílkoviny [%]</b>	<b>Laktóza [%]</b>	<b>Sušina [%]</b>	<b>Tukuprostá sušina [%]</b>
23.09.20	9,79	4,33	4,61	19,83	10,14
Brien	16,41	3,65	4,52	25,5	9,35
Nody	7,08	3,95	4,79	16,88	9,9
Lindabel	7,65	5,78	4,25	18,97	11,32
Twin	11,51	4,46	4,41	21,55	10,09
Halfhorn	7,84	3,92	4,99	17,76	10,07
07.12.20	6,25	3,79	5,07	16,14	10,01
25.01.21	7,6	3,82	5,05	17,5	10,03
24.02.21	7,01	3,9	5,09	17,04	10,15
12.03.21	7,6	4,14	4,99	17,79	10,3

**Příloha 3:** Porovnání obsahu látek v buvolím a kravském mléce (MilkoScan FT 120)



**Příloha 4:** Výsledky dvouvýběrového t-testu - porovnání obsahu laktózy v buvolím a kravském mléce pomocí Luff-Schoorlovi metody

Skup. 1 vs. skup. 2	T-test pro nezávislé vzorky (Luff-Schoorl)					
	Pozn.: Proměnné byly brány jako nezávislé vzorky					
	Průměr skup. 1	Průměr skup. 2	Hodnota t	sv	p	p Rozptyly
Buvolí vs. Kravské	5,080	4,513	4,210708	4	0,013578	0,077301

**Příloha 5:** Výsledky dvouvýběrového t-testu - porovnání obsahu laktózy v buvolím a kravském mléce pomocí přístroje MilkoScan FT 120

Skup. 1 vs. skup. 2	T-test pro nezávislé vzorky (MilkoScan)					
	Pozn.: Proměnné byly brány jako nezávislé vzorky					
	Průměr skup. 1	Průměr skup. 2	Hodnota t	sv	p	p Rozptyly
Buvolí vs. Kravské	4,777	4,605	24,04163	2	0,001726	1,000000

**Příloha 6:** Výsledky dvouvýběrového t-testu – porovnání obsahu vápníku v buvolím a kravském mléce

Skup. 1 vs. skup. 2	T-test pro nezávislé vzorky (Vápník)						
	Pozn.: Proměnné byly brány jako nezávislé vzorky						
	Průměr sk. 1	Průměr sk. 2	Sm.odch. skup. 1	Sm.odch. skup. 2	p	F-poměr Rozptyly	p Rozptyly
Buvolí vs. Kravské	145,037	108,657	5,031	3,055	0,000431	2,712	0,538833