

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra kvality a bezpečnosti potravin**



**Použití metody MALDI-TOF k detekci falšování kozího  
a ovčího mléka mlékem kravským**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Kristýna Řehořová**

**Obor studia: Kvalita a zpracování zemědělských produktů**

**Vedoucí práce: Ing. Veronika Legarová, Ph.D.**

© 2020 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Použití metody MALDI-TOF k detekci falšování kozího a ovčího mléka mlékem kravským" 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 22.7. 2020

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Veronice Legarové, Ph.D., vedoucí mé diplomové práce, za přátelský přístup, cenné připomínky a konzultace poskytnuté během tvorby této práce. Velké poděkování dále patří Ing. Matějovi Božikovi, MSc, Ph.D., za ochotu, trpělivost a pomoc při zpracování praktické části. Také děkuji Ing. Lucii Rysové za zprostředkování vzorků, bez ní by tato práce vznikla jen stěží.

# Použití metody MALDI-TOF k detekci falšování kozího a ovčího mléka mlékem kravským

## Souhrn

Falšování potravin je v dnešní době velmi aktuálním problémem, který se bohužel týká i mléka a mléčných výrobků. V praxi je dnes falšování mléka značně rozšířeno, nejčastěji se jedná o přídavek vody, syrovátky a rostlinných proteinů, často jsou také mísena mléka jiných živočišných druhů, kdy je do mléka malých přežvýkavců, obzvláště do mléka koz a ovcí, přidáváno levnější mléko kravské. Kromě ekonomických a etických otázek s sebou takovéto falšování může přinášet i zdravotní a technologické komplikace.

Mléko kravské, kozí a ovčí se svým složením a procentuálním zastoupením základních složek liší, mléka kozí a ovčí v mnohém převyšují mléko kravské. Proto jsou tato mléka, i s ohledem na zdravotní výhody, často upřednostňována spotřebiteli před mlékem kravským.

V současnosti pro kontrolu kvality a ověřování druhové autenticity mléka existuje celá škála metod, od metod spektroskopických, chromatografických, imunochemických až po metody založené na analýze DNA. Liší se cenou, složitostí nebo časovou efektivitou. Poměrně nově je pro odhalování druhové autentičnosti rozvíjena metoda MALDI-TOF, která si od dnes běžně používaných metod zakládá na jednoduchosti a časové nenáročnosti.

Cílem práce bylo tuto metodu otestovat, proměřit několik sad nafalšovaných vzorků mléka odebraných z různých farem v České republice a ověřit, zda je metoda MALDI-TOF vhodnou metodou pro detekci falšování kozího a ovčího mléka mlékem kravským.

Celkem bylo analyzováno 144 vzorků kozího a 144 vzorků ovčího mléka porušených přídavkem 10 %, 5 %, 1 % a 0,5 % mléka kravského. Rozsah detekce byl nastaven od 500 do 4000 Da. Výsledky prokázaly odlišnost iontových profilů jednotlivých mlék, byly nalezeny charakteristické biomarkery, představující peptidy, pro všechny tři typy mléka. Pro průkaz falšování se jako důležité ukázaly čtyři biomarkery kravského mléka – markery o  $m/z$  2458,19,  $m/z$  2614,14 a  $m/z$  2761,51 pro ovčí mléko, markery o  $m/z$  2458,19 a  $m/z$  3475,34 pro mléko kozí. Díky těmto markerům se podařilo detekovat přídavek 10 % mléka kravského jak u mléka ovčího, tak u mléka kozího, za využití markeru o  $m/z$  3475,34 byl v kozím mléce detekován i přídavek 5 %. Nižší koncentrace se prozatím odhalit nepodařilo. I přesto je ale zjevné, že má námi vyvíjená metoda veliký potenciál jakožto vhodná metoda pro průkaz druhové autentičnosti, mohla by sloužit i pro rychlé a rutinní analýzy v praxi.

**Klíčová slova:** falšování, MALDI-TOF, mléko kravské, mléko kozí, mléko ovčí

# The use of the MALDI-TOF method for the detection of goat and sheep milk adulteration by cow milk

## Summary

Nowadays, food adulteration is a current and important issue, which is also related to dairy field. Milk adulteration is widespread in the food industry, the most common illegal practices are milk dilution by water, the addition of whey and vegetable proteins. Milk of different animal species is often mixed as well, where cheaper cow's milk is added to the higher value types of milk, especially goat's and sheep's. Apart from the economic and ethical issues, that kind of adulteration can result in health problems and technological complication.

Cow, goat and sheep milk differ in their composition, their nutritious values are different as well. Therefore, even for health benefits, goat and sheep milk are preferred to cow milk by consumers.

To assess the authenticity of dairy products and milk and to defend consumer's health, many analytical methods such as spectroscopy, chromatography, immunoenzymatic assays, as well as methods based on the DNA study have been used in the last years. These methods vary in their complexity, cost and time efficiency. Today, the MALDI-TOF method is being developed for the detection of species authenticity. This method has become an important tool in food analysis and takes an advantage on simplicity and time efficiency if compared with methods commonly used today.

The aim of this thesis was to test this method, to measure several sets of adulterated milk samples taken from different farms in the Czech Republic and to verify whether the MALDI-TOF method is able to detect goat and sheep milk adulteration with cow milk.

Overall, 144 samples of goat milk and 144 samples of sheep milk adulterated by the addition of 10 %, 5 %, 1 % and 0,5 % cow milk were analyzed. For the analysis, the explored mass range was 500–4000 Da. The results proved differences in ion profiles of each individual milks. Characteristic biomarkes, that represent peptides, were found in all three types of milk. Four biomarkers of cow milk showed to be important – peaks at  $m/z$  2458,19,  $m/z$  2614,14 and  $m/z$  2761,51 as markers for the detection of adulterated sheep milk, peaks at  $m/z$  2458,19 and  $m/z$  3475,34 as markers for the detection of adulterated goat milk. Thanks to these biomarkers, the addition of 10 % cow milk was detected in both types of milk. By using the marker at  $m/z$  3475,34, the addition of 5 % was detected in goat milk. Lower additions have not yet been detected. Nevertheless, it is obvious that the method we have been testing has great potential to be a suitable method for proving species authenticity, it could also be used for quick and routine analysis.

**Keywords:** adulteration, MALDI-TOF, cow milk, goat milk, sheep milk

# Obsah

<b>1 Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Hypotéza a cíl práce</b> .....	<b>2</b>
<b>3 Literární rešerše</b> .....	<b>3</b>
3.1 Mléko .....	3
3.1.1 Složení kravského mléka .....	3
3.1.2 Složení kozího mléka .....	10
3.1.3 Složení ovčího mléka .....	12
3.2 Falšování potravin .....	14
3.2.1 Falšování mléka a mléčných výrobků .....	15
3.2.1.1 Způsoby falšování .....	16
3.2.1.2 Zdravotní rizika .....	18
3.2.2 Metody detekce falšování mléka a mléčných výrobků .....	18
3.2.2.1 Spektroskopické metody .....	19
3.2.2.2 Chromatografické metody .....	19
3.2.2.3 Elektroforetické metody .....	20
3.2.2.4 Imunochemické metody .....	21
3.2.2.5 Metody založené na analýze DNA .....	22
3.2.2.6 Hmotnostní spektrometrie .....	23
3.3 MALDI-TOF .....	23
3.3.1 Charakteristika a princip metody MALDI-TOF .....	24
3.3.2 Matrice .....	25
3.3.3 Ionizace .....	26
3.3.4 Analyzátor doby letu TOF .....	26
3.3.5 Využití MALDI-TOF .....	27
<b>4 Metodika a materiál</b> .....	<b>29</b>
4.1 Analyzované vzorky .....	29
4.2 Potřebné chemikálie .....	30
4.3 Přístrojové vybavení .....	30
4.4 Příprava vzorků pro MALDI-TOF analýzu .....	30
4.5 Kalibrace .....	31
4.6 Vyhodnocení .....	31
<b>5 Výsledky</b> .....	<b>32</b>
5.1 Ovčí mléko .....	36
5.2 Kozí mléko .....	38
<b>6 Diskuze</b> .....	<b>41</b>
<b>7 Závěr</b> .....	<b>44</b>
<b>8 Seznam použité literatury</b> .....	<b>45</b>
<b>9 Seznam použitých zkratk</b> .....	<b>52</b>
<b>10 Seznam použitých obrázků a tabulek</b> .....	<b>53</b>

# 1 Úvod

Mléko a mléčné výrobky jsou pro svoji vysokou nutriční hodnotu součástí lidské stravy již tisíce let. Velké oblibě se dnes těší konzumace kozího a ovčího mléka, jejich zdravotní výhody a vyšší dietetická hodnota jsou důvodem, proč jsou tato mléka preferována mnoha spotřebiteli před mlékem kravským.

Jelikož je mléko produkováno ve velkém objemu, řada nepoctivých výrobců se této skutečnosti snaží využít a falšováním této komodity si neoprávněně zvyšují cenový zisk. Protože je mléko malých přežvýkavců ve srovnání s mlékem kravským několikanásobně dražší, jsou tato mléka často mísena, čímž se výrobcům zvyšuje profit. Bohužel, takovéto klamání spotřebitele však může mít negativní dopad na lidské zdraví, zejména ve spojení s alergií na kravskou bílkovinu.

Pro předcházení těchto problémů je proto třeba spolehlivě zajišťovat kvalitu a bezpečnost suroviny. Při ověřování kvality mléka je potenciálně k dispozici celá řada analytických metod, liší se složitostí a náklady a oba tyto faktory mohou ovlivňovat zavádění nových technik. S rozvojem vědy a potravinářských technologií však přibývá i nových možností falšování, je proto nutné neustále vyvíjet i nové způsoby analýz. Jednou z rozvíjených metod pro ověřování autenticity mléka je MALDI-TOF, metoda založená na analýze proteinů. Je rychlá a nedestructivní, zahrnuje snadnou přípravu vzorku, má proto velký potenciál pro použití při průkazu falšování nejen v mlékárenství, ale i v dalších odvětvích potravinářského průmyslu.

## **2 Hypotéza a cíl práce**

Hypotéza: Metoda MALDI-TOF je vhodnou metodou k detekci falšování kozího a ovčího mléka mlékem kravským.

Cílem práce je proměřit několik sad falšovaných vzorků mléka z různých farem v České republice a ověřit vhodnost metody.



## 3 Literární rešerše

### 3.1 Mléko

Již mnoho let má mléko významné zastoupení v lidské výživě. Je bohatým zdrojem bílkovin, tuku, sacharidů, vitamínů, minerálních látek a z nutričního hlediska se jedná o velmi ceněnou a komplexní potravinu (Haug et al. 2007).

Dle evropské legislativy je syrové mléko definováno jako mléko produkované sekrecí mléčné žlázy hospodářských zvířat, které nebylo podrobeno ohřevu nad 40 °C a nebylo ani ošetřeno jiným způsobem s rovnocenným účinkem. Mlékem se tedy rozumí tekutý sekret mléčné žlázy savců určený k výživě jejich mláďat. Dodává veškerou energii a živiny potřebné k zajištění správného růstu a vývoje. Kromě výživové funkce plní mléko i funkci obrannou, je snadno stravitelné, a proto je obzvláště důležité pro kojence, děti a starší lidi (Navrátilová et al. 2012).

Pod obecným pojmem „mléko“ se chápe výhradně mléko kravské. Pochází-li mléko od jiného druhu zvířete, musí být tento druh uveden v názvu (Pereira 2014). Jelikož je mléko sezónní potravinou podléhající rychlé zkáze, stalo se základní surovinou pro výrobu trvanlivějších produktů jako jsou fermentované mléčné výrobky, sýry, máslo či sušené mléko (Fox et al. 2015). V současné době se pro průmyslové zpracování využívá zejména mléko kravské, celosvětová produkce činí 83 %, následuje mléko buvolí (okolo 13 %). V nepatrné míře se zpracovává také mléko dalších hospodářských zvířat (ovcí, koz, velbloudů atd.) (Kopáček 2014).

#### 3.1.1 Složení kravského mléka

Složení mléka jednotlivých živočišných druhů se liší (tab. 1), odlišné jsou také jejich nutriční hodnoty a fyziologické vlastnosti. Kromě mezidruhových rozdílů existuje i mnoho faktorů ovlivňujících složení, od plemenné příslušnosti, individuality zvířete, věku, zdraví, výživy až po roční období, interval mezi dojením či stadium laktace (Fox et al. 2015). Změny ve složení mléka během laktace odpovídají měnícím se potřebám rostoucího mláďete (Haug et al. 2007).

**Tab. 1:** Porovnání průměrného složení kravského, kozího a ovčího mléka (Sabahelkhier et al. 2012; Balthazar et al. 2017).

Složky mléka (%)	Kravské mléko	Kozí mléko	Ovčí mléko
Voda	87,23	88,00	80,70
Sušina	12,80	12,00	19,30
Tuk	3,75	3,90	6,90
Laktosa	4,80	4,40	5,00
Bílkoviny	3,40	3,70	6,35
Popeloviny	0,71	0,70	0,85

Z fyzikálně-chemického hlediska je mléko polydisperzní systém, který se skládá z disperzního prostředí a z částic rozptýlených v tomto prostředí. Podle velikosti těchto částic se poté rozlišuje fáze emulzní, molekulární a koloidní. Fázi emulzní tvoří mléčný tuk spolu s vitamíny rozpustnými v tucích, v molekulární disperzi se nachází sacharidy a vitamíny rozpustné ve vodě a v koloidní disperzi jsou přítomny mléčné bílkoviny (Navrátilová et al. 2012).

Právě mléčné bílkoviny jsou považovány za významnou složku jak z nutričního, tak z fyziologického a technologického hlediska. Patří k nejlépe využitelným bílkovinám potravy a obsah v kravském mléce se pohybuje okolo 32 g/l. Celkový obsah bílkovin lze rozdělit do dvou frakcí: ve vodě rozpustné syrovátkové proteiny a nerozpustné kaseiny. Syrovátkové bílkoviny představují 20 % z celkového obsahu bílkovin, zatímco na kasein připadá 80 %. Dle aminokyselinového složení můžeme proteiny mléka řadit k plnohodnotným bílkovinám, jelikož jsou zastoupeny všechny esenciální aminokyseliny (AMK) v potřebném množství (Haug et al. 2007; Pereira 2014). Aminokyselinové spektrum je však u obou frakcí odlišné. Syrovátkové bílkoviny jsou zvláště bohaté na AMK s rozvětveným řetězcem – leucin, izoleucin, valin a lysin, zatímco kasein obsahuje vyšší podíl histidinu, methioninu a fenylalaninu (Pereira 2014).

Z technologického hlediska jsou kaseiny nejvýznamnějšími bílkovinami mléka. Jedná se o fosfoproteiny obsahující v průměru 0,85 % fosforu. Fosfátové skupiny jsou zodpovědné za důležité vlastnosti charakteristické pro kasein, zejména za jeho schopnost vázat relativně velké množství vápníku. V mléce se kasein vyskytuje ve formě micel, je velmi stabilní vůči vysokým teplotám a při poklesu pH pod 4,6 dochází k jeho vysrážení z roztoku. Tato vlastnost je základním principem při výrobě některých druhů sýrů (Fox et al. 2015). V současnosti se rozlišují 4 hlavní kaseinové frakce:  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ -, a  $\kappa$ -. Jejich podíl je různorodý (tab. 2) a polymorfismus těchto proteinů byl prokázán u většiny živočišných druhů (Barlowska et al. 2011).  $\kappa$ -kasein je ve srovnání s ostatními kaseiny jako jediný rozpustný v přítomnosti iontů vápníku, je proto umístěn v povrchové vrstvě micely, čímž stabilizuje ostatní frakce kaseinu, které jsou na přítomnost vápníku citlivé (Selvaggi et al. 2014; Fox et al. 2015).

**Tab. 2:** Zastoupení jednotlivých frakcí kaseinu v kravském, kozím a ovčím mléce (Balthazar et. al 2017).

	Kravské mléko	Kozí mléko	Ovčí mléko
<b>Kasein (g/100 g)</b>	3,0 ± 0.1	2,4 ± 0.1	4,7 ± 0.5
<b><math>\alpha_{s1}</math>-kasein (%)</b>	39,7	5,6	6,7
<b><math>\alpha_{s2}</math>-kasein (%)</b>	10,3	19,2	22,8
<b><math>\beta</math>-kasein (%)</b>	32,7	54,8	61,6
<b><math>\kappa</math>-kasein (%)</b>	11,6	20,4	8,9

V kravském mléce má nejvyšší zastoupení  $\alpha_{s1}$ -kasein, jenž je zároveň jedním z hlavních alergenů způsobujících alergii na mléčnou bílkovinu (MPA – milk protein allergy). Aminokyselinový profil každé proteinové frakce je odlišný u jednotlivých živočišných druhů,

lze však identifikovat určité podobnosti.  $\alpha_{s1}$ - a  $\alpha_{s2}$ -kaseiny obsažené v kravském, kozím i ovčím mléce vykazují z 87-98 % identické aminokyselinové složení (Spuergin et al. 1997; Barlowska et al. 2011).  $\alpha_{s1}$ -kasein se skládá z 214 AMK, v kravském mléce existuje ve dvou fosforylovaných formách obsahujících 8 a 9 fosfátů/mol.  $\alpha_{s1}$ - a  $\beta$ -kaseiny obecně neobsahují cystein,  $\alpha_{s2}$ -kasein je zase bohatý na lysin (Selvaggi et al. 2014; Fox et al. 2015).

Syrovátkové bílkoviny, na rozdíl od kaseinu, cystein obsahují ve velkém množství. Vyznačují se též vysokým obsahem methioninu. Tento aspekt je velmi důležitý pro novorozence, protože potřebují 4-6 % AMK obsahujících síru, aby byl podpořen jejich správný růst a vývoj. Z důvodu lepšího profilu AMK jsou syrovátkové proteiny nutričně cennější než kasein, vykazují však nižší tepelnou stabilitu. Oproti kaseinu neobsahují fosfor a molekuly mají globulární charakter (Selvaggi et al. 2014). Ze 75 % jsou syrovátkové bílkoviny zastoupeny  $\alpha$ -laktalbuminem a  $\beta$ -laktoglobulinem, jež jsou zdrojem bioaktivních peptidů s extra fyziologickou aktivitou (Bernacka 2011). V menší míře se vyskytuje sérový albumin a dále do skupiny syrovátkových proteinů spadají imunoglobuliny a tzv. minoritní bílkoviny mléka (proteoso-peptonové frakce, laktoferrin, transferrin, lysozym či laktoperoxidáza) (Pereira 2014). Procentuální zastoupení je uvedeno v tabulce 3.

**Tab. 3:** Zastoupení vybraných syrovátkových bílkovin v kravském, kozím a ovčím mléce (Bernacka 2011).

	<b>Kravské mléko</b>	<b>Kozí mléko</b>	<b>Ovčí mléko</b>
<b><math>\alpha</math>-laktalbumin (%)</b>	0,11	0,13	0,12
<b><math>\beta</math>-laktoglobulin (%)</b>	0,38	0,33	0,66
<b>Laktoferrin (%)</b>	0,06	0,08	0,09
<b>Imunoglobuliny (%)</b>	0,10	0,07	0,21

Nejvýznamnější podíl ze všech syrovátkových bílkovin, více jak 50 %, tvoří  $\beta$ -laktoglobulin. Je důležitým nosičem retinolu, jenž má nezastupitelnou úlohu při mechanismu vidění a který je rovněž klíčový pro normální vývoj kojenců. Vykazuje antioxidační vlastnosti (váže ionty mědi a železa a tím inhibuje oxidaci mléčného tuku) a má taktéž schopnost vázat mastné kyseliny. Je však třeba si uvědomit, že  $\beta$ -laktoglobulin je antigenní protein, a proto může vyvolávat alergické reakce (Bernacka 2011). Spolu s  $\alpha_{s1}$ -kaseinem jsou považovány za hlavní alergeny způsobující MPA. Dle Rudzki (2005) je až 80 % pacientů s alergií na bílkoviny kravského mléka (CMPA – cow milk protein allergy) citlivých na  $\beta$ -laktoglobulin, zatímco na  $\alpha_{s1}$ -kasein projevuje zvýšenou citlivost asi 60 % pacientů.

Z 20 % z celkového obsahu syrovátkových bílkovin je zastoupen  $\alpha$ -laktalbumin. Vyznačuje se vysokým množstvím tryptofanu, je nosičem vápníku a může vázat i jiné kovy jako je hořčík, kobalt nebo zinek. Jako součást enzymu laktózo-syntetázy se podílí na syntéze laktózy v mléčné žláze a společně s  $\beta$ -laktoglobulinem vykazuje i antikarcinogenní aktivitu (Bernacka 2011; Selvaggi et al. 2014). Laktoferrin, laktoperoxidáza a lysozym jsou důležitými antimikrobiálními činiteli, významnou roli hrají i imunoglobuliny podílející se na časném

vývoji imunitního systému. Těmito proteiny je zajištěn přenos imunity z matky na mládě, ve zvýšené koncentraci (až 100× vyšší) jsou proto obsaženy zejména v kolostru (Pereira 2014).

Mléčné proteiny jsou považovány za hlavní zdroj peptidů se širokou škálou fyziologických funkcí. Tyto specifické proteinové fragmenty, nazývající se bioaktivní peptidy, svými imunomodulačními, antihypertenzivními, antioxidačními či antimikrobiálními účinky pozitivně ovlivňují lidské zdraví, zůstávají však latentní, dokud nejsou aktivovány enzymatickou hydrolyzou. Děje se tak během gastrointestinálního trávení nebo činností mikroorganismů přítomných ve fermentovaných produktech (El-Salam & El-Shibiny 2013). Prekurzorem bioaktivních peptidů jsou kaseinové i syrovátkové bílkoviny, k nejvíce prostudovaným patří peptidy kravského mléka. Od laktoferrinu je odvozen jeden z nejúčinnějších, dosud popsaných antimikrobiálních peptidů – laktoferricin. Byla zaznamenána jeho silná baktericidní aktivita proti gram-pozitivním a gram-negativním bakteriím. V dnešní době se pro svoje zdraví prospěšné účinky bioaktivní peptidy přidávají do farmaceutických přípravků či do tzv. funkčních potravin (Atanasova & Ivanova 2010).

Vedle bílkovin je další důležitou složkou mléka mléčný tuk. Jedná se o hlavní látku, která definuje energetickou hodnotu mléka a která významně přispívá i k jeho jedinečným nutričním vlastnostem (Barlowska et al. 2011). Je zdrojem esenciálních mastných kyselin a nositelem vitamínů rozpustných v tucích. Syntéza mléčného tuku probíhá v mléčné žláze, jeho obsah kolísá v závislosti na druhu savce od 2 % do 50 % (Fox et al. 2015). V kravském mléce se průměrně nachází v množství 33 g/l (Haug et al. 2007). Lipidy se v mléce nejčastěji vyskytují ve formě tukových kuliček, složených z hydrofobního triglyceridového jádra obklopeného biologickou membránou. Tato membrána obsahuje typické složky jakékoli jiné membrány jako jsou glykoproteiny, glykolipidy, enzymy či cholesterol (Fontecha et al. 2011). Dle Månssona (2008) membránu tvoří z 30 % lipidy (z toho 25 % zaujímají fosfolipidy), zbývajících 70 % připadá na proteiny.

Triacylglyceroly (TAG) představují asi 98 % lipidové frakce, zbylá 2 % utváří diacylglyceroly, volné mastné kyseliny nebo steroly. Ze všech přírodních tuků je mléčný tuk považován za nejsložitější, neboť je složen z více než 400 mastných kyselin (MK), které formují strukturu TAG. Množství a složení závisí na živočišném druhu a stadiu laktace, nejvíce je však ovlivněno výživou a mikrobiální fermentací v bacheru. Zastoupení MK v závislosti na živočišném druhu znázorňuje tabulka 4. V průměru jsou ze 70 % lipidy v mléce tvořeny nasycenými MK, ze 30 % nenasycenými MK. Z nasycených MK je z kvantitativního hlediska nejdůležitější kyselina palmitová, myristová a stearová, z nenasycených MK je to kyselina olejová (Ménard et al. 2010; Fontecha et al. 2011). V porovnání s kozím a ovčím mlékem má kravské mléko vyšší podíl TAG s dlouhým řetězcem (C26-C36) a naopak nižší procento TAG se středním řetězcem (C26-C36). Délka řetězce určuje jejich fyzikální a chemické vlastnosti, které ovlivňují absorpci a metabolismus. TAG obsahující MK s 6 až 10 atomy uhlíku se vykazují menší velikostí molekuly, nižší teplotou tání a nižší měrnou hustotou (Fontecha et al. 2011).

Jedním ze specifických rysů mléka přežvýkavců je přítomnost konjugované kyseliny linolové (CLA – conjugated linoleic acid). CLA zahrnuje všechny polohové a geometrické izomery polynenasycené kyseliny linolové, které obsahují konjugovaný systém dvojných vazeb (Park et al. 2007). Vyznačuje se protektivními, zejména antikarcinogenními a antiaterogenními vlastnostmi. Byl prokázán také vliv na stimulaci imunitního systému a inhibici rozvoje

osteoporózy. Vyšší koncentrace CLA byla nalezena zejména v kravském a ovčím mléce. Její obsah je výrazně ovlivněn výživou zvířat, významně stoupá s příjmem zelené píče (Barlowska et al. 2011). Revilla et al. (2017) uvádí, že vedle CLA mléčný tuk obsahuje také nejvyšší koncentraci kyseliny vakcenové, fyziologického prekurzoru CLA.

**Tab. 4:** Obsah nejdůležitějších mastných kyselin v kravském, kozím a ovčím mléce (Balthazar et al. 2017).

<b>MK (g/100 g)</b>	<b>Kravské mléko</b>	<b>Kozí mléko</b>	<b>Ovčí mléko</b>
<b>Máselná (C4:0)</b>	3,90	2,18	3,51
<b>Kapronová (6:0)</b>	2,50	2,39	2,90
<b>Kaprylová (C8:0)</b>	1,50	2,73	2,64
<b>Kaprinová (C10:0)</b>	3,20	9,97	7,82
<b>Laurová (C12:0)</b>	3,60	4,99	4,38
<b>Myristová (C14:0)</b>	11,10	9,81	10,40
<b>Palmitová (C16:0)</b>	27,90	28,20	25,90
<b>Stearová (C18:0)</b>	12,20	8,88	9,57
<b>Olejevá (C18:1)</b>	21,10	19,30	21,10
<b>Linolová (C18:2)</b>	1,40	3,19	3,21
<b>Linolenová (C18:3)</b>	1,00	0,42	0,80
<b>CLA</b>	1,10	0,70	1,60

Kromě skladby MK je charakteristickým rysem odlišující mléka jednotlivých živočišných druhů velikost tukových kuliček. Ta do jisté míry ovlivňuje stravitelnost mléka. Kravské mléko, ve srovnání s kozím a ovčím (tab. 5), se vyznačuje větší velikostí tukových globulí, s průměrem 1,1-10  $\mu\text{m}$ . Přibližně 90 % všech globulí má poté průměr menší než 6,42  $\mu\text{m}$  (Barlowska et al. 2011). Navíc je v kravském mléce přítomen aglutinin, který urychluje shlukování tukových kuliček. Tukové globule proto nejsou tak dobře rozptýleny jako v mléce kozím, což má za následek horší stravitelnost (Park et al. 2007).

V mléce je dále jako jedna z hlavních složek přítomna laktóza. Jedná se o hlavní sacharid mléka složený z glukózy a galaktózy. Jelikož je laktóza specifickou složkou mléka, je nazývána jako mléčný cukr. Obsah je u jednotlivých druhů mléka velmi podobný, v kravském mléce se průměrná koncentrace pohybuje okolo 4,8 %. Laktóza mléku dodává nasládlou chuť, přispívá k jeho nutriční hodnotě, podporuje absorpci vápníku a spolu s ionty draslíku, sodíku a chloru ovlivňuje osmotický tlak (Holsinger 1997). Vyskytuje se ve dvou izomerních formách ( $\alpha$  a  $\beta$ ), které jsou v tenkém střevu hydrolyzovány na glukózu a galaktózu za účasti  $\beta$ -galaktosidázy. Nepřítomnost či snížená aktivita tohoto enzymu způsobuje tzv. laktózovou intoleranci, kdy laktóza nemůže být štěpena v tenkém střevě, přestupuje do střeva tlustého, kde je následně přirozenou střevní mikrobiotou fermentována na metan, oxid uhličitý a mastné kyseliny s krátkým řetězcem. Tyto procesy se poté mohou projevovat nadýmáním, bolestmi

břicha nebo průjmy a zvracením. Uvádí se, že v dnešní době nesnášenlivost laktózy postihuje až 75 % světové populace (Pereira 2014). Hojně je laktóza používána v potravinářském a farmaceutickém průmyslu, využívá se zejména jako surovina pro výrobu různých derivátů jako jsou oligosacharidy a alkoholové cukry (Seki & Saito 2012).

**Tab. 5:** Porovnání velikosti tukových kuliček obsažených v kravském, kozím a ovčím mléce (Barlowska et al. 2011).

<b>Průměr tukových kuliček (μm)</b>	<b>Kravské mléko (%)</b>	<b>Kozí mléko (%)</b>	<b>Ovčí mléko (%)</b>
<b>0,1-1</b>	-	25,40	-
<b>1-2</b>	19,01	26,86	15,69
<b>2-4</b>	49,40	21,02	39,59
<b>4-6</b>	19,61	4,53	40,33
<b>6-8</b>	3,59	13,04	3,28
<b>8-10</b>	5,09	6,34	0,73
<b>10-12</b>	0,15	2,89	0,37
<b>14-16</b>	3,14	-	-

V neposlední řadě je mléko důležitým zdrojem minerálních látek a vitamínů. Obsah minerálních látek je v mléce poměrně stabilní, pohybuje se v hodnotách okolo 0,8 % a z důvodu vysoké biologické dostupnosti vysoce přispívá k jedinečné nutriční hodnotě mléka. Hlavními minerálními složkami jsou vápník a fosfor, které jsou podstatné pro růst kostí a správný vývoj. Zvýšená spotřeba vápníku je nezbytná především u dětí, těhotných a kojících žen a u starších lidí. Nedostatek vápníku poté způsobuje zejména u těchto skupin lidí poruchy srážlivosti krve a velmi závažná onemocnění kostí – osteoporózu a osteomalacii (Kopáček 2014). Z části je vápník v mléce vázán na kasein, koncentrace tohoto prvku tedy úzce souvisí s koncentrací kaseinu (Gaucheron 2005). Mléko je také dobrým zdrojem mikroelementů, obzvláště zinku a selenu. Co se týče vitamínů, jsou přítomny vitamíny rozpustné ve vodě i v tucích. Koncentrace vitamínů rozpustných v tucích závisí na obsahu mléčného tuku, významný je vitamín D, který podporuje vstřebávání vápníku v organismu. Z vitamínů rozpustných ve vodě je mléko bohaté na B-komplex (Pereira 2014), pro kravské mléko je typická zejména vyšší koncentrace kyseliny listové a kobalaminu (Barlowska et al. 2011). Průměrné zastoupení vybraných prvků v jednotlivých druzích mléka znázorňuje tabulka 6, obsah vitamínů tabulka 7.

**Tab. 6:** Obsah minerálních látek v kravském, kozím a ovčím mléce (Park et al. 2007).

<b>Minerální látka (mg, µg /100 g)</b>	<b>Kravské mléko</b>	<b>Kozí mléko</b>	<b>Ovčí mléko</b>
<b>Vápník (Ca) (mg)</b>	122	134	193
<b>Fosfor (P) (mg)</b>	119	121	158
<b>Hořčík (Mg) (mg)</b>	12	16	18
<b>Draslík (K) (mg)</b>	152	181	136
<b>Sodík (Na) (mg)</b>	58	41	44
<b>Chlor (Cl) (mg)</b>	100	150	160
<b>Síra (S) (mg)</b>	32	28	29
<b>Zinek (Zn) (µg)</b>	530	560	570
<b>Železo (Fe) (µg)</b>	80	70	80
<b>Měď (Cu) (µg)</b>	60	50	40
<b>Selen (Se) (µg)</b>	0,96	1,33	1,00

**Tab. 7:** Obsah vitamínů v kravském, kozím a ovčím mléce (Park et al. 2007; Raynal-Ljutovac et al. 2008).

<b>Vitamín (mg, µg/100 g)</b>	<b>Kravské mléko</b>	<b>Kozí mléko</b>	<b>Ovčí mléko</b>
<b>A (Retinol) (mg)</b>	0,04	0,04	0,08
<b>D (Kalciferol) (µg)</b>	0,08	0,06	0,18
<b>E (Tokoferol) (mg)</b>	0,11	0,04	0,11
<b>B<sub>1</sub> (Thiamin) (mg)</b>	0,04	0,05	0,08
<b>B<sub>2</sub> (Riboflavin) (mg)</b>	0,17	0,21	0,35
<b>B<sub>3</sub> (Niacin) (mg)</b>	0,09	0,20	0,42
<b>B<sub>5</sub> (Pantothénová k.) (mg)</b>	0,34	0,31	0,41
<b>B<sub>6</sub> (Pyridoxin) (mg)</b>	0,04	0,05	0,08
<b>B<sub>8</sub> (Biotin) (µg)</b>	2,00	1,50	0,93
<b>B<sub>9</sub> (Listová k.) (µg)</b>	5,30	1,00	5,00
<b>B<sub>12</sub> (Kobalamin) (µg)</b>	0,35	0,06	0,71
<b>C (Askorbová k.) (mg)</b>	0,94	1,29	4,16

### 3.1.2 Složení kozího mléka

Ačkoli existují určité druhově specifické rozdíly ve složení mléka, základní nutriční složení kozího mléka je podobné kravskému (tab. 1). V průměru kozí mléko obsahuje více tuku, bílkovin, popelovin a méně laktózy. Vykazuje také vyšší stravitelnost, výraznou zásaditost a vyšší pufrací kapacitu. Stejně jako v případě kravského mléka se i složení kozího mléka liší dle environmentálních podmínek, lokality, ročního období, podmínek chovu či stadia laktace a dědičnosti (Park 2017). Nejvýznamnějšími faktory ovlivňujícími složení kozího mléka jsou plemeno a výživa. Vliv výživy se projevuje jak na celkové produkci, tak na obsahu jednotlivých složek. Nedostatečná výživa způsobuje pokles obsahu bílkovin, z nichž klesá obvykle zejména obsah kaseinu (Navrátilová et al. 2012).

Přestože celosvětová produkce dosahuje pouhých 2 %, v rozvojích zemích a v oblasti Středomoří je kozí mléko vzhledem k omezené dostupnosti kravského mléka hlavním zdrojem potravy (Park 2017). K největším světovým producentům se řadí Indie a chov koz zde hraje zásadní roli v sociálně-ekonomické sféře chudých obyvatel venkova (Arora et al. 2013). Kozy patří k nejstarším domestikovaným zvířatům a vynikají svou odolností vůči extrémním a nepříznivým podmínkám. Jejich mléko je považováno za jednu z nejstarších potravin, je také cennou vstupní surovinou pro výrobu produktů s vysokou výživnou hodnotou. Konzumace kozího mléka je spojována s řadou příznivých účinků na zdraví, je využíváno jako alternativa kravského mléka pro lidi trpící CMPA, rovněž slouží jako základ pro kojeneckou výživu nahrazující mateřské mléko (Selvaggi et al. 2014).

Vysoká nutriční hodnota kozího mléka souvisí s jeho chemickým složením, hlavní rozdíl ve srovnání s mlékem kravským je ve struktuře tuků a obsahu bílkovin (Bernacka 2011). Obecně kozí mléko obsahuje menší množství kaseinů, podíl syrovátkových bílkovin je tudíž o něco vyšší. Hlavní složkou kaseinové frakce v kozím mléce je  $\beta$ -kasein, výrazně se liší také obsah  $\alpha_{s1}$ - a  $\alpha_{s2}$ - kaseinů, kde kozí mléko má mnohem nižší koncentraci  $\alpha_{s1}$ - a vyšší zastoupení  $\alpha_{s2}$ -. Velmi nízký obsah alergenního  $\alpha_{s1}$ -kaseinu (5 % z celkového kaseinu) je tedy hlavním důvodem, proč je kozí mléko využíváno jako náhrada za mléko kravské (Park 2017). Lara-Villoslada et al. (2005) vysvětluje, že nižší alergenicita kozího mléka je způsobena skutečností, že menší podíl  $\alpha_{s1}$ -kaseinu snižuje citlivost na ostatní alergenní proteiny, konkrétně na  $\beta$ -laktoglobulin. Ten je v kozím mléce zastoupen v obdobné koncentraci jako v mléce kravském, s více než dvojnásobnou hodnotou jak  $\alpha$ -laktalbumin (Park 2017). Rozdílná je i velikost kaseinových micel. Ta je v kozím mléce větší v porovnání s mlékem kravským a ovčím (Raynal-Ljutovac et al. 2008).

Obsah minoritních frakcí bílkovin je též velmi podobný jako v mléce kravském, kozí mléko se však liší vyšším zastoupením proteinů vázajících folát (Selvaggi et al. 2014). Za zmínku stojí laktoferrin, biologicky aktivní mléčná bílkovina s funkčními vlastnostmi, jenž se v kozím mléce oproti mléku kravskému vyskytuje ve větším množství. Tento protein je hlavním proteinem vázajícím železo a vyznačuje se protizánětlivými a bakteriostatickými účinky. Díky svým antioxidačním vlastnostem zabraňuje tvorbě volných radikálů, čímž může bránit rozvoji rakoviny. Zaznamenána byla i inhibiční aktivita v rozvoji Alzheimerovy nemoci (Bernacka 2011).

Z údajů o koncentraci aminokyselinového složení v mléce různých živočišných druhů lze nejlepší složení exogenních AMK nalézt v mléce koz a ovcí. V mléce krav je cystein



a methionin limitující AMK, zatímco v mléce kozím a ovčím je požadavek na tyto AMK plně pokryt (Barlowska et al. 2011).

Již dlouho je známo, že vysoká nutriční hodnota kozího mléka a jeho zdraví prospěšné účinky vyplývají ze specifického složení jeho tuku. Jednou z charakteristik je vysoká koncentrace MK s krátkým a středně dlouhým řetězcem. Ceballos et al. (2009) uvádí, že kozí mléčný tuk ve srovnání s kravským má o více jak 50 % vyšší zastoupení kyseliny kapronové, kaprylové, kaprinové a laurové. Naopak obsahuje o 75 % méně kyseliny máselné. TAG s těmito MK jsou metabolizovány odlišně od těch, které obsahují MK s dlouhým řetězcem. Jsou snadněji tráveny v trávicím traktu a vstřebávány přímo střevními epiteliálními buňkami, představují tudíž rychlou energetickou zásobu. Kaprinová a kaprylová kyselina, které jsou významně přítomny v kozím mléce, byly shledány užitečnými v terapiích pro pacienty trpící malaabsorpčním syndromem a metabolickými poruchami (Raynal-Ljutovac et al. 2008). Rovněž jsou tyto kyseliny zodpovědné za specifickou chuť a vůni kozího mléka. Intenzitu lze ovlivnit šlechtěním, výživou, a především dobrou hygienou ustájení a ošetření mléka (Kopáček 2014). Kozí mléko se také vyznačuje vyšším obsahem polyenových MK, s velmi dobrým poměrem mezi n-6 a n-3 kyselinami, což je aspekt, který výrazně přispívá k vysoké nutriční kvalitě (Ceballos et al. 2009).

Pro kozí mléko je dále typická malá velikost tukových kuliček, s průměrem okolo 3,5  $\mu\text{m}$ . Přibližně 90 % všech tukových kuliček má průměr menší než 5,21  $\mu\text{m}$ , některé studie uvádí, že 65 % globulí má poté průměr menší než 3  $\mu\text{m}$ . Menší tukové kuličky jsou v kozím mléce díky absenci aglutininu lépe rozptýlené, vytváří homogennější směs a lipázám poskytují větší povrchovou plochu. Tato větší plocha usnadňuje přístup lipolytickým enzymům, kozí mléko je proto oproti mléku kravskému pro člověka stravitelnější (Park et al. 2007; Barlowska et al. 2011; Park 2017).

Stejně jako v kravském mléce je i v mléce koz hlavní sacharidovou složkou laktóza. Obě mléka se však liší zastoupením oligosacharidů, které je v kozím mléce až 10 $\times$  vyšší. Oligosacharidy vykazují prebiotické a antiinfekční vlastnosti, podporují růst bifidobakterií u novorozenců a chrání střevní sliznici proti patogenům. Mléko přežvýkavců není zdaleka tak bohaté na tyto látky jako mléko mateřské, ale i přesto stojí jejich obsah v kozím mléce za povšimnutí. Dle mnoha autorů je důležitá vysoká rozmanitost kozích oligosacharidů, významný je obsah kyseliny sialové. I z tohoto důvodu může kozí mléko sloužit jako vhodná náhrada za mléko mateřské (Raynal-Ljutovac et al. 2008; Park 2009).

Do funkčních složek kozího mléka jsou zahrnuty i minerální látky. Z hlediska minerálního složení kozí mléko převyšuje mléko kravské v obsahu vápníku, fosforu, draslíku, hořčíku a chloru. Naopak poskytuje nižší množství sodíku a síry (tab. 6). Tyto koncentrace se liší především v závislosti na plemeni, stravě, stadiu laktace a na zdravotním stavu vemene. Z mikroelementů je výrazněji zastoupen zejména selen. S vyšším obsahem selenu úzce souvisí i vyšší obsah a aktivita antioxidantního enzymu glutathionperoxidázy (Park et al. 2007). Obecně jsou minerální složky kozího mléka považovány za lépe využitelné v trávicích i metabolických procesech, což by se mohlo jevit jako další aspekt přispívající k lepší výživové hodnotě tohoto mléka (Ceballos et al. 2009).

Mléko koz se vyznačuje i vyšším množstvím vitamínu A. Jelikož kozy přeměňují veškerý  $\beta$ -karoten na retinol, je jejich mléko bělejší ve srovnání s mlékem kravským. Křídově bílá barva je tudíž jednou z charakteristických vlastností kozího mléka. Mléko koz je kromě vitamínu A

i dobrým zdrojem niacinu, thiaminu, riboflavinu a kyseliny pantothenové. Hladiny vitamínu B jsou podobně jako u krav výsledkem syntézy bachoru a jsou tak do jisté míry nezávislé na stravě. V porovnání s mlékem od krav má kozí mléko významné nedostatky v kyselině listové a kobalaminu. Nedostatek těchto dvou vitamínů v lidské stravě vede k chudokrevnosti, u kojenců může deficit vitamínu B<sub>12</sub> způsobovat tzv. megaloblastickou anémii (Park et al. 2007; Park 2009; Park 2017).

### 3.1.3 Složení ovčího mléka

Nutričně nejčinnější je ve srovnání s mlékem kravským a kozím mléko ovčí. V současné době se konzumace ovčího mléka a výrobků z něj těší velké oblibě. Děje se tak právě díky vysoké energetické a nutriční hodnotě, která je dána vyšším zastoupením bílkovin, tuku, vitamínů a minerálních látek. Ovčí mléko má obecně vyšší obsah sušiny a využívá se hlavně pro výrobu sýrů (Recio et al. 2009; Balthazar et al. 2017).

Podobně jako u kozího mléka se i ovčí mléko na celosvětové produkci mléka podílí velmi nepatrně, jen ze 1,4 %. I přesto chov ovcí plní významnou ekonomickou úlohu, zejména na venkovech v oblasti Středního východu a Středozeří, kde klimatické podmínky nejsou zcela příznivé pro chov skotu. Největším světovým producentem je Čína, v Evropě k předním výrobcům patří Řecko, následované Rumunskem a Itálií (Balthazar et al. 2017). Počty ovcí však plně neodrážejí množství produkovaného mléka, neboť se často používají i pro jiné účely jako je masná produkce a získávání vlny (Recio et al. 2009).

Ovčí mléko se vyznačuje oproti mléku kravskému vyšší měrnou hmotností a viskozitou (Park et al. 2007). Je lehce nasládlé a jemné chuti, s krémovitou strukturou. Co se týče chemického složení, je stejně jako u jiných druhů savců dáno genetickými faktory, stadiem laktace, výživou a významně se mění v závislosti na ročním období. Sezónní a klimatické změny silně ovlivňují složení a zastoupení hlavních živin v důsledku změn složení krmiva, značně se tedy mění v závislosti na příjmu zelené píče (Balthazar et al. 2017).

Ovčí mléko obsahuje téměř dvakrát tolik bílkovin a tuku než mléko kozí a kravské. Proteiny ovčího mléka a jejich aminokyselinové sekvence mají kromě nutriční kvality i pozitivní dopad na stravitelnost a termostabilitu (Claeys et al. 2014). Ovčí mléko má vyšší obsah serinu, alaninu, histidinu, valinu a lysinu, nutriční hodnota může také souviset s vyšším množstvím prolinu, který zároveň ovlivňuje produkci hemoglobinu (Molik et al. 2012).

Kaseinový podíl ovčího mléka činí asi 80 % z celkových mléčných bílkovin, kde přibližně 60 % tvoří  $\beta$ -kasein. Podle Masoodi & Shafi (2010) mají  $\alpha_{s1}$ - a  $\alpha_{s2}$ -kaseiny ovčího mléka z 99 % podobnou sekvenci jako kaseiny mléka kozího a částečně se liší od  $\alpha_{s1}$ - a  $\alpha_{s2}$ -kaseinů mléka kravského, tato skutečnost totiž naznačuje, že by ovčí mléko mohlo být stejně jako mléko kozí používáno jako alternativa pro lidi s CMPA. Odlišné jsou i velikosti a vlastnosti kaseinových micel. Kaseinové micely z ovčího a kozího mléka mají vyšší stupeň mineralizace, jsou méně hydratované a tepelně stabilnější než kaseinové micely kravského mléka. Rovněž jsou kaseinové micely v ovčím mléce větší a bohatší na vápník, což přispívá k technologické výhodě při výrobě sýrů (Raynal-Ljutovac et al. 2007). Syrovátková frakce je zastoupena z největší části  $\beta$ -laktoglobulinem, následuje  $\alpha$ -laktalbumin a sérový albumin. Ve srovnání s kravským mlékem však vykazují ovčí syrovátkové bílkoviny nižší tepelnou stabilitu (Molik et al. 2012).

Stejně jako kozí mléko má i mléko ovčí vysokou koncentraci menších tukových kuliček, s průměrem 4,5  $\mu\text{m}$ . Rovněž není přítomen aglutinin napomáhající shlukování tukových globulí, proto i mléko ovčí vykazuje lepší stravitelnost (Haenlein & Wendorff 2006; Park et al. 2007).

Profil TAG ukazuje podobnost s údaji uváděnými u kravského mléka, ovčí mléko má však vyšší procento TAG se středním řetězcem MK a nižší podíl TAG s dlouhým řetězcem MK. Podobně jako mléko kozí i mléko ovčí tedy představuje rychlý přísun energie, zejména u skupiny pacientů trpící podvýživou nebo poruchami metabolismu (Recio et al. 2009).

Obecně je ovčí mléčný tuk vysoce nasycený, s vyšším obsahem MK s krátkým a středním řetězcem. Obsah MK v ovčím mléce se podstatně neliší od kravského mléka v obsahu kyseliny máselné, ale obsahuje více nasycených MK jako jsou kapronová, kaprylová a kaprinová. V důsledku obsahu těchto kyselin je stejně jako v mléce kozím pozorována charakteristická natrpklá příchuť, která se odráží i ve výrobcích z něj, typicky v ovčích sýrech (Balthazar et al. 2017).

Převládajícími MK jsou kyselina olejová, palmitová a myristová. Kyselina olejová, druhá nejvíce zastoupená MK v tuku ovčího mléka, je považována za antiaterogenní látku (Recio et al. 2009). Molquentin (2000) uvádí, že strava s vysokým obsahem kyseliny olejové snižuje hladinu LDL (low-density lipoprotein) cholesterolu, zatímco hladiny HDL (high-density lipoprotein) cholesterolu nejsou výrazně ovlivněny. Významný je i obsah polyenových MK. Tato skupina je v tuku ovčího mléka zastoupena hlavně kyselinou linolovou a  $\alpha$ -linolenovou (Recio et al. 2009). Mono- a polyenové MK v ovčím mléce mohou přispívat k prevenci kardiovaskulárních chorob, jak popisuje Balthazar et al. (2016). Rovněž byl v ovčím mléce zaznamenán velmi příznivý poměr mezi n-6 a n-3 kyselinami, dokonce nižší než poměr uváděný u kozího mléka. Nižší poměr n-6 a n-3 kyselin je žádoucí při snižování rizika mnoha chronických onemocnění, nejčastěji srdečních chorob. Proto se konzumace ovčího a kozího mléka doporučuje v rámci prevence vzniku kardiovaskulárních onemocnění (Balthazar et al. 2017).

Pro ovčí mléko je charakteristická i vyšší koncentrace konjugované kyseliny linolové. Mezi přežvýkavci obsahuje tuk z ovčího mléka nejen jednu z nejvyšších hladin CLA, ale také velké množství kyseliny vakcenové, jejího fyziologického prekurzoru. Izomery CLA, které se objevují ve větších množstvích, mají prospěšné účinky s antikarcinogenní a lipolytickou aktivitou (Recio et al. 2009; Revilla et al. 2017). Obsah CLA se však sezónně velmi liší, byla zaznamenána podstatně vyšší koncentrace v letním období (1,28 %), na konci zimy se obsah pohyboval kolem 50 % (Park et al. 2007).

Kromě toho je tuk z ovčího mléka dobrým zdrojem vitamínu A a vitamínu E. I v ovčím mléce lze vitamín A nalézt pouze ve formě retinolu, neboť i ovce  $\beta$ -karoten zcela přeměňují na tuto formu. Ovčí mléko je tedy podobně jako kozí charakteristické svou čistě bílou barvou. Celkově je obsah vitamínů v ovčím mléce vyšší, typické je vyšší množství riboflavinu a niacinu, ovčí mléko lze považovat i za velmi dobrý zdroj vitamínu C. Specifická je pro mléko ovčí i vyšší koncentrace minerálních látek. Z hlediska vysoké biologické dostupnosti je ovčí mléko cenným zdrojem těchto látek, mléka ostatních savců předčí především ve vyšším obsahu vápníku a fosforu, obráceně je tomu v případě draslíku a sodíku (Park et al. 2007; Balthazar et al. 2017).

Výrazně vyšší obsah vápníku společně s vyššími obsahy tuku a bílkovin se také významně projevuje na koagulačních schopnostech tohoto mléka. Pro ovčí mléko je vzhledem k výše uvedenému obecně charakteristické jeho rychlejší srážení a po zasýření vznikající pevnější sraženina. Tyto vlastnosti tak předurčují toto mléko především pro zpracování na sýry, charakteristická je až dvojnásobně vyšší výtěžnost sýra oproti mléku kravskému a kozímu (Kuchčík et al. 2011).

## 3.2 Falšování potravin

Vysoká dietetická a terapeutická hodnota ovčího a kozího mléka je důvodem, proč jsou tato mléka často vyhledávána a upřednostňována spotřebiteli před mlékem kravským. Jelikož je cena mléka malých přežvýkavců podstatně vyšší, hledají se různé způsoby, jak neoprávněně zvýšit objem těchto mlék a tím zvýšit cenový zisk. A takovéto klamání spotřebitele je již považováno za falšování. Tato problematika se však netýká jenom mlékárenského sektoru, ale je celosvětově rozšířena snad ve všech odvětvích potravinářského průmyslu (Poonia et al. 2017).

V historii lze sledovat počátky falšování již od starověku, v egyptských hieroglyfických záznamech, na pergamonských pergamenech nebo v čínských zápisech na bambusových destičkách. Záznamy o falšování se objevovaly zejména v souvislosti se vznikajícími zákoníky (Hanuš et al. 2019), jednu z prvních písemných zmínek lze nalézt již v Chammurapiho zákoníku, vydaném kolem roku 1760 př. n. l., zmiňující míchání piva s vodou. Zmínky o falšování potravin se nachází také v textech pocházejících z dob Římského císařství, v kterých jsou zaznamenány případy falšování původu vína a hub. Množství záznamů o falšování z období středověku pak už jenom narůstá. S výrazným pokrokem vědy a potravinářských technologií se rozvinuly zcela nové a sofistikované možnosti ve způsobech falšování potravin. Tento pokrok však také ale znamenal razantní vývoj v metodách analýzy potravin a v možnostech odhalování tohoto neetického jednání (SZPI 2015).

Principiálně se postupy falšování příliš nemění. Příklady popsané v historických záznamech jsou podobné dnešním, nové případy, které se objevují, obvykle vycházejí ze změn legislativy a z dostupnosti a ceny surovin a produktů na trhu. Trendy ve falšování podle komodit (tab. 8) se vyhodnocují dle četnosti publikací v databázích FSTA (Food Science and Technology Abstracts) a ScienceDirect, dlouhodobě se nemění a často se vyvíjejí dle aktuálních kauz. Jelikož je falšování motivováno ekonomickým profitem, jsou nejčastěji falšovány drahé a luxusní potraviny nebo naopak komodity, které jsou prodávány ve velkých objemech (Čížková et al. 2012).

Falšováním potravin se rozumí nežádoucí nastavování potravin nepůvodní, zpravidla méněcennou složkou s cílem oklamat spotřebitele a dosáhnout neoprávněně vyšší zisk. Je tak snižována kvalita potravinářských výrobků, což může mít často i negativní dopad na lidské zdraví. Falšovaná potravina může být toxická, může být zbavena důležitých živin potřebných k správnému vývoji a u jedinců se zvýšenou citlivostí může dokonce způsobit intoxikaci nebo řadu alergických reakcí (Bansal et al. 2017). Dnes mezi hlavní způsoby falšování patří nastavování potravin levnější složkou, zaměňování potravin za jinou levnější, nedodržení deklarovaného technologického postupu, přítomnost nedeklarovaných složek, uvádění vyššího

než skutečného podílu složky, nesprávné uvádění geografického původu nebo zneužití známé značky (Čížková et al. 2012).

Většina popsanych případů falšování je pouze šizením zákazníka, kdy spotřebitel za své peníze nedostane produkt očekávaných vlastností. Přesto se i v posledních letech objevilo několik případů poškozující zdraví v důsledku falšování potravin (Čížková et al. 2012). Jednalo se například o přídavky melaminu do mléčných výrobků, použití anilínových barviv do jedlých olejů, jsou známy i případy úmrtí spotřebitelů po požití vína s přidaným ethylenglykolem nebo zneužití metanolu při nelegální výrobě lihovin (SZPI 2015).

**Tab. 8:** Nejčastěji falšované potravinářské komodity dle počtu citací (Čížková et al. 2012).

<b>Komodita</b>	<b>FSTA, ScienceDirect (%)</b>
Oleje, tuky	31
Mléko, mléčné výrobky	24
Ovocné nápoje	12
Maso, masné výrobky	9
Víno	8
Koření, aromata	7
Med	5
Káva, čaj	2
Lihoviny	2

V české legislativě, v zákonu o potravinách a tabákových výrobcích č. 110/1997 Sb., sice pojem „falšovaná potravina“ nebo „falšování“ není přímo definovaný, dle tohoto zákona je však zakázáno uvádět do oběhu potraviny klamavě označené. A falšování potravinářských výrobků lze v konečném důsledku považovat právě za klamavé označování. V České republice (ČR) se problematikou falšování potravin systematicky zabývá Státní zemědělská a potravinářská inspekce (SZPI). SZPI v rámci své činnosti prověřuje nejen, zda jsou potraviny bezpečné, ale věnuje se již řadu let i kontrole jakostních požadavků. Lze konstatovat, že se v ČR prakticky nevyskytují podniky, které by měly na falšování potravin postavený svůj podnikatelský plán (SZPI 2015).

### **3.2.1 Falšování mléka a mléčných výrobků**

Falšování potravin v dnešním světě představuje velký společenský problém. Kromě etických a ekonomických otázek s sebou přináší i řadu zdravotních a technologických rizik, situace je výrazně horší v rozvojových zemích kvůli nedostatečnému monitorování a politice (Azad & Ahmed 2016). Z mediálně frekventovaných a často diskutovaných potravin se v tomto ohledu na čelní místo řadí mléko a mléčné výrobky. Jelikož se jedná jednoznačně o komoditu s nejvyšší spotřebou, dochází v praxi k falšování mléka velice často. Po olivovém oleji je mléko snad druhou nejpravděpodobnější potravinou, která je v riziku falšování (Moore et al. 2012).

Možné důvody mohou zahrnovat mezeru v poptávce a nabídce, skutečnost, že je mléko rychle se kazící potravinou a v neposlední řadě také nedostatek vhodných detekčních testů. Falšování mléka se stalo globálním a velmi diskutovaným problémem po aféře kontaminace melaminem v čínských kojeneckých mléčných výrobcích v roce 2008 (Azad & Ahmed 2016). Historie falšování mléka však sahá několik tisíc let zpátky, kdy se množství mléka dalo snadno zvýšit přidáním vody a mýdla, do másla se zase přimíchávala mouka a bílá řepa (Hanus et al. 2019).

### 3.2.1.1 Způsoby falšování

Dnes je mléko nejčastěji falšováno přidáním vody, syrovátky a rostlinných proteinů, často se také mísí mléka jiných živočišných druhů (Singh & Gandhi 2015). Mnohdy jsou přidávány i zdraví škodlivé chemické sloučeniny jako jsou různé detergenty, formalin, močovina, hydroxid sodný, kyselina benzoová, již zmiňovaný melamin apod. (Azad & Ahmed 2016).

Běžné parametry, které se kontrolují pro hodnocení kvality mléka, jsou obsahy tuku a bílkovin, procento tukuprosté sušiny a bod mrznutí mléka. Do mléka se přidávají nežádoucí složky, aby se tyto parametry zvýšily, čímž se neoprávněně zvyšuje kvalita mléka (Azad & Ahmed 2016). Také se kontroluje koncentrace laktózy. Bylo zjištěno, že nižší množství laktózy obsahují mléka od krav trpících mastitidou (Das et al. 2016).

V dnešní době je velmi běžnou praxí dodavatele nastavování mléka vodou. Mnoho studií dokazuje, že pro zvýšení objemu je voda nejvíce přidávanou složkou vůbec. Zředěné mléko snižuje jeho nutriční hodnotu, mění se jeho přirozená barva a rovněž je pozměněna měrná hmotnost a bod mrznutí (Das et al. 2016). K vyrovnání hustoty se poté často používají různé druhy cukru a soli, nejčastěji chlor (Reis Lima et al. 2004). Pro zachování jeho barvy po naředění je někdy přimícháváno i malé množství barvicích látek (Huang et al. 2002).

Další, velmi častou přidávanou příměsí je syrovátka, která vzniká jako vedlejší produkt při výrobě tvarohu a sýra a která zároveň poskytuje levný zdroj syrovátkových bílkovin. Přidávání tekuté syrovátky je obvyklým jevem pro zvýšení objemu mléka, zejména v lokalitách, kde se mléko zpracovává na výrobu sýrů a tvarohů (Das et al. 2016). Někteří dodavatelé navíc pro větší zisk používají levnou kyselinu muriatovou k přípravě komerční syrovátky, která může způsobovat vážné zdravotní problémy. Jedinečností tohoto falšování spočívá v tom, že se nemění obsah laktózy v mléce, ale zvyšuje se kyselost. A k regulaci kyselosti se poté přidává malé množství alkalického roztoku, např. hydroxidu sodného, aby se zlepšila konzistence a skladovatelnost mléka (Kasemsumran et al. 2007).

Formalin, kyselina salicylová, kyselina benzoová a peroxid vodíku působí jako konzervační látky a prodlužují trvanlivost mléka (Singh & Gandhi 2015). Rozsáhlé používání chemických konzervačních látek pro uchovávání mléka je v potravinářském průmyslu velkým problémem. Pro detekci je třeba sofistikovaných analytických přístrojů, s rozvojem technologie byly vynalezeny nové metody pro detekce těchto nežádoucích složek, ale stejným tempem byly vyvinuty i složité a těžce odhalitelné způsoby falšování (Das et al. 2016). Detergenty a různé barvicí látky se přimíchávají pro zlepšení sensorických vlastností. Třtinový cukr, škrob, sulfátové soli a močovina se přidávají, aby se zvýšil obsah tukuprosté sušiny. Velká pozornost je v posledních letech věnována především přidávku močoviny a jiných látek bohatých

na dusík. Močovina, která je přírodní složkou syrového mléka, má stanoven maximální limit 70 mg/100 ml (Azad & Ahmed 2016). Do mléka se však přidává komerčně vyráběná močovina, aby se zvýšil obsah nebiřkovinného dusíku. Podobně se přidává melamin pro zvýšení obsahu proteinů, zároveň se tím navyšuje i ekonomická hodnota mléka a mléčných výrobků (Azad & Ahmed 2016; Poonia et al. 2017).

Díky své nízké ceně a snadné dostupnosti na trhu se běžně ke zvyšování koncentrace bílkovin používají rostlinné proteiny, nejčastěji sójové. Sójové nápoje se kromě tohoto aspektu přidávají také do mléka pro navýšení objemu a maximalizaci výnosu při výrobě sýrů (Poonia et al. 2017).

Pro svoji cenu bývá často nahrazován i mléčný tuk. Protože je mléčný tuk velmi drahý, někteří výrobci ho odstraňují pro další finanční zisk a kompenzují ho přidáním levnějších rostlinných tuků. Může být také smíchán s tuky jiného živočišného původu (Azad & Ahmed 2016). V některých případech je poté odstředěné nebo polotučné mléko vydáváno za mléko plnotučné (Calvano et al. 2013).

Za falšování mléka se považuje i mísení mléka různých živočišných druhů. Vzhledem k tomu, že konzumace kozího a ovčího mléka ve srovnání s mlékem kravským přináší řadu výhod (již zmiňovanou vyšší koncentraci některých živin či snadnější trávení), poptávka po kozím mléku se celosvětově rychle zvyšuje. Produkce kozího mléka je však rozptýlena mezi farmáře s drobným chovem, zejména v rozvojových zemích, je ovlivněna sezónní nepravidelností, proto je cena litru mléka malých přeživkavců výrazně vyšší (Song et al. 2011). Do mléka ovcí, koz a buvolů je poté s vidinou většího cenového zisku často přidáváno mléko kravské, které je několikanásobně levnější. Z ekonomického a etického hlediska se jedná o velký a dnes velmi rozšířený problém v potravinářském průmyslu (Das et al. 2016), navíc takto falšovaná mléka mohou přinášet řadu zdravotních rizik, nejčastěji spojených s MPA. Část konzumentů je citlivá na alergenní bílkoviny kravského mléka, proto pro některé z nich může být řešením konzumace mléčných výrobků z jiných druhů hospodářských zvířat. Alergie na kravské mléko je běžný stav, který postihuje hlavně kojence a malé děti. Uvádí se, že nahrazení kravského mléka mlékem kozím může vyřešit až 40 % těchto problémů. Nedeklarované přídavky kravského mléka v kozích nebo ovčích produktech poté mohou přinášet nežádoucí zdravotní komplikace, zejména v důsledku skrytých alergenů. Proto je druhová identifikace důležitým požadavkem ohledně zdraví a bezpečnosti potravin (Haenlein 2004; Osman et al. 2013). Pro některé konzumenty jsou zase na druhou stranu kozí a ovčí mléka nevyhovující z hlediska jejich specifické vůně a chuti. I proto tedy někteří producenti tato mléka mísí s různými koncentracemi mléka kravského, aby se tato typická silná vůně snížila a pro spotřebitele byla konzumace přijatelnější (Golinelli et al. 2014). V neposlední řadě má složení mléka jednotlivých druhů vliv na charakteristickou chuť a senzorycké vlastnosti každého mléčného výrobku, ovlivněny jsou i technologické vlastnosti, a to zejména při výrobě sýrů. Použití takto falšovaných mlék při výrobě mléčných produktů tudíž povede k tomu, že konečný produkt bude jiné a nižší kvality než ten, který očekává spotřebitel. I z tohoto důvodu je tudíž nezbytné stanovovat kvalitu jednotlivých druhů mlék používaných v mléčných výrobcích, obzvláště u vysoce jakostních sýrů vyráběných výhradně z ovčího nebo kozího mléka, z nichž mnohé jsou registrovány pod chráněným označením původu (Stănciuc Sava & Răpeanu 2010).

### 3.2.1.2 Zdravotní rizika

Bohužel, některé z nežádoucích složek ve falšované potravině mohou mít vážný dopad na lidské zdraví, od mírných až po život ohrožující stavy. Široce a běžně viděnými příklady jsou kožní onemocnění, již zmiňované alergické reakce, astma, průjmy a zvracení. Kromě okamžitých reakcí může docházet i k mnoha dlouhodobým potížím vznikajících z falšovaných potravin. Žaludeční vředy, onemocnění jater, ledvin nebo srdeční choroby a poruchy krve byly zaznamenány v důsledku používání nepovolených přídatných látek (Bansal et al. 2017).

Zatím asi největší kauzou co do následků bylo snižování obsahu mléka v mléčných kojeneckých výživách a maskování nižšího obsahu mléčných bílkovin přídavkem melaminu. Požití melaminu nad úrovněmi bezpečnosti může u kojenců vyvolat selhání ledvin a ve velmi vážných případech i úmrtí. Podle dat ke konci roku 2008 onemocnělo tehdy v Číně téměř tři sta tisíc dětí akutním selháním ledvin, z toho bylo zaregistrováno šest úmrtí (Čížková et al. 2012).

V důsledku konzumace mléka kontaminovaného hydroxidem sodným jsou vyvíjeny respirační obtíže, mnohdy vedoucí k rakovině. Tato látka působí jako pomalý jed pro ty, kteří trpí hypertenzí a srdečními chorobami a zbavuje tělo lyzinu, esenciální AMK vyžadované rostoucími dětmi. Obzvláště nebezpečné může být takto synteticky připravené mléko pro těhotné ženy (Das et al. 2016). Peroxidy i detergenty v mléce mohou způsobit gastrointestinální komplikace, které mohou vést ke gastritidě a zánětům střev. Nadměrný obsah škrobu může zase vyvolat průjem v důsledku účinků nadbytečného nestráveného množství, což může způsobovat komplikace zejména u diabetických pacientů (Singuluri & Sukumaran 2014).

Nadbytek močoviny je někdy spojován s poruchami trávení a se vznikem vředů. Rovněž může být přebytek škodlivý pro srdce, játra a zejména pro ledviny. Protože je močovina z těla odbourávána právě ledvinami, při vyšších koncentracích dochází k nadměrnějšímu a zbytečnému zatěžování tohoto orgánu. Proto je velmi důležité pro prevenci těchto problémů a předcházení některých vážných onemocnění stanovovat kvalitu mléka (Azad & Ahmed 2016; Das et al. 2016).

### 3.2.2 Metody detekce falšování mléka a mléčných výrobků

Měření kvality mléka je důležité jak pro potravinovou bezpečnost, tak pro výrobní proces v mlékárenském průmyslu. Kvalitativní detekci nežádoucích příměsí lze snadno provést chemickými reakcemi, které jsou jednoduché, rychlé a velmi snadno proveditelné. Nevýhodou kvalitativního stanovení je však nedostatečná přesnost, proto se rozvinuly metody kvantitativní analýzy (Azad & Ahmed 2016). Typ kvantitativních detekčních technik závisí na povaze znehodnocující látky, v dnešní době je většina metod detekce pro ověření pravosti mléka a mléčných výrobků založena převážně na identifikaci hlavních mléčných proteinů (Stănciuc Sava & Răpeanu 2010). Je využívána celá škála metod, od spektroskopických, chromatografických, elektroforetických až po metody založené na analýze deoxyribonukleové kyseliny (DNA – deoxyribonucleic acid) či metody imunochemické (Zachar et al. 2011). Například kapalinová chromatografie (LC – liquid chromatography), často ve spojení s hmotnostní spektrometrií (MS – mass spectrometry) a ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) jsou nejběžnější techniky používané k detekci cizích proteinů, polymerázová řetězová reakce (PCR – polymerase chain reaction) a polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE – polyacrylamide gel electrophoresis) se obvykle používají k rozlišení



jednotlivých druhů mlék (Azad & Ahmed 2016). Nově se rozvíjí proteomické metody jakožto metody s vysokou citlivostí a selektivitou (Chen et al. 2016), pozornost je v posledních letech věnována hmotnostní spektrometrii s laserovou desorcí, konkrétně technice MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) v kombinaci s analyzátozem doby letu (TOF – time of flight). Tato technika se jeví jako potenciálně užitečná pro účely kvantifikace specifických proteinů (Zachar et al. 2011).

### 3.2.2.1 Spektroskopické metody

Tradičně se k analýze potravin včetně autentizace a průkazu falšování využívají techniky infračervené spektroskopie, tedy techniky založené na interakci infračerveného záření se vzorkem. Využívá se především blízké infračervené oblasti (NIR – near-infrared) v rozsahu vlnočtů 14000-4000  $\text{cm}^{-1}$  a střední infračervené oblasti (MIR – middle-infrared) v rozsahu 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ . Z MIR spektra vyplývají informace o chemických vazbách, tím tedy o typech molekul v potravině, NIR spektrum poskytuje komplexnější informaci (Čížková et al. 2012).

Absorpce záření v NIR oblasti je obvykle způsobena energetickými přechody mezi vibračními hladinami molekul, spektra odpovídají převážně vibračním přechodům skupin obsahujících H. Díky tomu lze snadno stanovit hlavní parametry potravin jako je obsah tuku, bílkovin, laktózy apod. (Chen et al. 2017).

Jedná se o nedestruktivní analytické metody s rychlou a jednoduchou přípravou vzorku, s úsporou chemikálií, a tudíž i s šetrností k životnímu prostředí. V praxi jsou tyto techniky aplikovány pro rychlou mezioperační kontrolu, nejběžněji se používají pro detekci melaminu, močoviny a syrovátky (Zhang et al. 2014; Nascimento et al. 2017). Často se tyto metody využívají v kombinaci s chemometrickou analýzou, kdy jsou spektra shromážděná z analyzovaných vzorků porovnávána s databází, čímž je umožněna identifikace látek (Chen et al. 2017).

Z dalších spektroskopických technik se čím dál častěji uplatňuje Ramanova spektroskopie, která využívá větší citlivosti a specifičnosti při měření nízkých koncentrací, byl prokázán potenciál této metody pro souběžnou detekci několika nežádoucích příměsí (Khan et al. 2015). Pro svoje jednoduché použití, vysokou citlivost, rychlost a nízké provozní náklady se rovněž rozvíjí pro detekci falšování mléka používání infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací. Dle Nicolaou et al. (2010) je tato metoda vhodnou a přesnou technikou pro kvantitativní stanovení jednotlivých druhů mlék. Má vynikající potenciál pro použití v potravinářském průmyslu k nahrazení méně účinných a časově náročnějších technik. Na infračervené spektroskopii s Fourierovou transformací jsou například založeny automatizované přístroje MilkoScan, jež se dnes v praxi využívají pro rutinní testování mléka ve většině mlékárenských laboratořích. Mohou být použity jednak pro stanovení hlavních složek mléka a mléčných výrobků, tak i pro stanovení přídavku vody, specifických cukrů, kyseliny mléčné, močoviny, volných MK apod. (Poonia et al. 2017).

### 3.2.2.2 Chromatografické metody

Standardně jsou k autentizaci potravin kromě metod spektroskopických používány i metody chromatografické, nejčastěji chromatografie plynová (GC – gas chromatography) a LC-MS využívané pro analýzu konkrétních markerů. S využitím GC jsou například

stanovovány profily MK (Čížková et al. 2012), vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC – high performance liquid chromatography) je využívána při detekci a kvantifikaci obsahu kravského, ovčího a koziho mléka v sýrech a pro analýzu kaseinů a  $\beta$ -laktoglobulinů (Rodríguez et al. 2010).

V chromatografických technikách dochází k separaci analytů na základě jejich distribuce mezi stacionární a mobilní fází. Liší se dle separačního mechanismu, interakcí a výběru stacionární a mobilní fáze. Při detekci falšování mléka se často uplatňuje HPLC s reverzními fázemi (Zachar et al. 2011). Ferreira & Caçote (2003) použili tuto metodu pro detekci a kvantifikaci procenta kravského, ovčího a koziho mléka v portugalských sýrech s chráněným označením původu na základě analýzy  $\beta$ -laktoglobulinu a  $\alpha$ -laktalbuminu jako specifických markerů. Za stejných podmínek byly získány různé chromatografické profily pro kravské, ovčí a kozi syrovátkové proteiny. Kvantifikace druhů mléka byla umožněna v koncentračním rozmezí 5-95 %. Podobnou studii provedli Czerwenka et al. (2010), kdy bylo analyzováno 18 prodávaných sýrů mozzareilly z buvolího mléka za použití LC-MS. Přítomnost kravského mléka detekovali pomocí syrovátkového proteinu  $\beta$ -laktoglobulinu jakožto typického markeru pro falšování. Obsah vysokého množství kravského mléka byl prokázán u třech produktů.

HPLC s reverzní fází byla rovněž úspěšně použita pro analýzu sójových proteinů a pro současné oddělení sójových a kravských syrovátkových proteinů v kravském mléce (Krusá et al. 2000). Hydrofobní interakční chromatografie, kdy k separaci látek dochází snížením iontové síly mobilní fáze, byla použita pro separaci a stanovení jednotlivých kaseinů v mléce krav, koz a ovcí, čímž bylo možné odhalit nezákonné přidání kravského mléka (Bramanti et al. 2003). Chromatografické metody, zejména s využitím LC se tak jeví jako citlivé a přesné metody obzvláště pro analýzu proteinových směsí (Zachar et al. 2011).

### 3.2.2.3 Elektroforetické metody

Někdy jsou metody chromatografické kombinovány s technikami elektroforetickými, kdy se pro analýzu mléčných výrobků nejběžněji používá PAGE, kapilární isoelektrická fokusace a kapilární elektroforéza (Rodríguez et al. 2010). Kapilární elektroforetické metody, jež slouží k separaci látek na základě jejich rozdílné pohyblivosti v elektrickém poli, se používají jednak pro stanovení podvodného přidávání sušené syrovátky do mléčných výrobků, jsou to i jedny z nejrozšířenějších technik pro separaci mléčných bílkovin (Poonia et al. 2017).

Kapilární elektroforéza umožňuje separaci kaseinových a syrovátkových proteinů za použití pouze malého množství vzorků a pufrů, náklady pro analýzu jsou tedy podstatně nižší. Kapilární isoelektrická fokusace je zase založena na separaci proteinů podle jejich izoelektrického bodu a je zvláště vhodná pro analýzu kaseinů, které mají mnoho genetických variant. PAGE dokáže detekovat přítomnost cizích proteinů na základě celkového náboje proteinů a rozdílů v molekulárních hmotnostech (Poonia et al. 2017). Pesic et al. (2011) metodou PAGE ve své studii porovnávali syrovátkové bílkoviny čerstvých mléčných směsí, podobně jako u chromatografických technik i zde byl k analýze vybrán  $\beta$ -laktoglobulin a  $\alpha$ -laktalbumin. Dle výsledků tato metoda dokáže spolehlivě identifikovat kravské syrovátkové bílkoviny ve směsi ovčího nebo koziho mléka.

Jednou z nevýhod technik zaměřených na analýzu syrovátkových frakcí je však skutečnost, že syrovátkové bílkoviny záhřevem denaturují a dochází tak k mírnému snížení

jejich celkového množství. Tyto denaturační změny tak mohou negativně ovlivňovat analýzu falšování mléka metodami založenými na detekci hlavních syrovátkových bílkovin v jejich nativním stavu (Pesic et al. 2011).

#### 3.2.2.4 Imunochemické metody

Ačkoli mají elektroforetické a chromatografické metody své vlastní přednosti, jsou poměrně časově náročné, pracné a nákladné a při rutinní laboratorní analýze tak mají omezenou hodnotu a nejsou tak široce používány. Proto se vyvinuly metody imunochemické, které mají oproti těmto neimunologickým metodám mnoho výhod. Základem těchto testů je interakce antigenu s protilátkou za vzniku imunokomplexu antigen-protilátka. Metody imunoanalýzy se při odhalování falšování mléka spoléhají na použití specifických monoklonálních nebo polyklonálních protilátek reagujících na kravské a kozí syrovátkové bílkoviny a kaseiny (Stănciuc Sava & Râpeanu 2010). Protilátka rozpoznává cílový protein prostřednictvím specifického epitopu (oblasti antigenu), který je závislý na trojrozměrné struktuře proteinu (Chen et al. 2016). Za použití vhodného substrátu je poté katalyzována reakce, která se projevuje charakteristickým zabarvením, jenž je úměrné koncentraci antigenu nebo protilátky ve vzorku (Chávez et al. 2012).

Vývoj imunoenzymatických metod a jejich praktické použití závisí hlavně na výběru dostatečně druhově specifického antigenu, způsobu imunizace a kvalitě použitých protilátek a jejich specifitě (Zachar et al. 2011). I přes velmi dobré limity detekce (0,5 %) však použitelnost těchto metod, podobně jako u metod elektroforetických, zhoršuje termolabilita proteinů, zejména syrovátkových, která komplikuje jejich detekci při tepelném opracování suroviny (Chen et al. 2016). Proto se jako hlavní antigeny při tepelném zpracování používají převážně kaseiny, které jsou za vysokých teplot více stabilní (Zachar et al. 2011).

Bylo popsáno velké množství enzymatických imunotestů pro druhovou autentizaci mléka v mléčných výrobcích, nejčastěji používanou technikou je ELISA, sloužící k detekci kravského mléka v kozím, ovčím nebo buvolím mléce. Výhodou je dostatečná citlivost, snadná použitelnost a rychlost, současné systémy jsou navíc již plně automatizované. ELISA detekuje proteiny jako potravinové alergeny, tato metoda je tedy i dostatečně citlivá a specifická pro detekci reziduí potravinářských alergenů (Zachar et al. 2011).

Přítomnost nedeklarovaného přídavku mléka v jiných druzích lze zjistit pomocí dvou základních metod ELISA, tzv. sendvičové ELISA a nepřímé ELISA. Zeleňáková et al. (2008) se zaměřili na laboratorní testování a hodnocení kvalitativních parametrů, detekovali přítomnost kozího mléka v mléce ovčím na základě přítomnosti imunoglobulinu G. Bylo potvrzeno, že kvalita detekce falšovaného mléka je ovlivněna tepelným zpracováním mléka. Vzorky pasterované v různých kombinacích poskytovaly nižší odezvy než vzorky připravené ze syrového mléka. Rovněž Zeleňáková et al. (2010) provedli testování pro detekci kravského kaseinu v ovčím mléce s cílem získat vysoce kvalitní a spolehlivou metodu vhodnou pro rutinní analýzu v praxi. Výsledky ukázaly, že metoda ELISA je velmi rychlou technikou pro detekci 0,5 % až 50 % nedeklarovaného přídavku kravského mléka. Na téměř stejnou studii se zaměřili i Song et al. (2011), kdy byl pro kvantifikaci kravského mléka v mléce kozím použit nepřímý test ELISA. Byly využity polyklonální protilátky proti kravským  $\beta$ -kaseinům, které byly

modifikovány smícháním s kozím  $\beta$ -kaseinem pro zlepšení specifity protilátek. Přídavek kravského mléka byl detekován v rozmezí od 2 % do 50 %.

Za pomoci imunoanalýzy a polyklonálních protilátek například Haasnoot & Du Pré (2007) detekovali i přítomnost rostlinných proteinů, Chávez et al. (2012) úspěšně použil sendvičovou ELISA pro detekci syrovátky. Často se v praxi používají i rychlé imunochromatografické testy, kdy v pozitivních případech dochází k vizualizaci v podobě linie na detekčním proužku. Stănciuc Sava & Răpeanu (2010) za použití imunochromatografického testu provedli studii, kdy cílem bylo zjistit přítomnost kravského mléka v ovčích a kozích sýrech, které se prodávají na maloobchodních trzích v Rumunsku. Za tímto účelem bylo na různých trzích náhodně nakoupeno celkem 73 vzorků ovčích a kozích sýrů, přítomnost kravského mléka byla zjištěna u 67,3 %, respektive u 79,7 % vzorků. Colak et al. (2006) také použili imunochromatografický test s cílem detekovat přítomnost kravského mléka v ovčích sýrech. Ze 100 vzorků byl téměř u 50 % zjištěn neoprávněný přídavek mléka od krav.

Metody imunochemické jsou dnes asi nejrozšířenějšími technikami, byla publikována řada studií prokazující pozitivita těchto technik zahrnující zejména rychlost a přesnost analýzy. Tyto techniky jsou proto v dnešní době základem pro rutinní kontrolu velkého množství vzorků (Song et al. 2011).

### 3.2.2.5 Metody založené na analýze DNA

Kromě imunotestů metody stále více využívají genetické rozdíly mezi druhy prostřednictvím analýzy DNA. Techniky molekulární biologie využívají vysokou specifickou a citlivost založených na PCR (Zachar et al. 2011). PCR umožňuje rychle a snadno namnožit specifické úseky DNA, uplatňují se zde principy replikace. Tato metoda, vycházející z jedinečné struktury DNA, je široce používána v potravinářském průmyslu k ověřování druhové autentičnosti potravin, v mlékařství jsou touto technikou rozlišovány jednotlivé druhy mlék (Poonia et al. 2017). Výhodou je poměrná stabilita molekuly DNA a odolnost vlivů tepelného zpracování, proto mají tyto metody význam i při analýze tepelně ošetřených mléčných výrobků nebo při analýzách vyzrálých sýrů (Zachar et al. 2011).

Ve studii Maškové & Paulíčkové (2006) byla PCR použita k detekci kravského mléka v kozích a ovčích sýrech. Pro důkaz kravské složky byl použit detekční PCR systém, který využívá sekvenci mitochondriálního genu kódující cytochrom b, který je specifický pro savce. Bylo zkoumáno 17 kozích a 7 ovčích sýrů, DNA jednotlivých druhů byla izolována ze somatických buněk a byla charakterizována odlišnými fragmenty. Přítomnost nedeklarovaného kravského mléka, s detekčním limitem 1 %, byla zjištěna u jednoho výrobku z ovčího mléka a u třech výrobků z mléka kozího. Jeden z těchto produktů obsahující nehlášenou složku kravského mléka byl dokonce českého původu. Také Zeleňáková et al. (2009) použili metodu PCR pro analýzu ovčího mléka a sýrů. Z 20 analyzovaných vzorků ovčího mléka byl výskyt kravského mléka zjištěn u 8 vzorků, z 30 vzorků ovčího sýra příměs kravského mléka obsahovalo celkem 12 produktů.

Metoda PCR je v laboratořích používána spíše pro kvalitativní analýzy, menší nevýhodou může být skutečnost, že obsah DNA v mléce je velmi variabilní v závislosti na zdravotním stavu zvířete, ročním období či stavu laktace (Mašková & Paulíčková 2006).

### 3.2.2.6 Hmotnostní spektrometrie

Relativně nově se využívají a rozvíjí proteomické postupy založené na metodách hmotnostní spektrometrie. Vychází se ze strukturální analýzy bílkovin, kdy se využívá možnosti získání informací o sekvenci AMK a peptidů (Čížková et al. 2012). Počátky MS se datují k přelomu 19. a 20. století, dnes je MS široce využívána v kvalitativní i kvantitativní analýze v mnoha odvětvích, ve farmaceutickém průmyslu, potravinářství, zemědělství, touto metodou lze identifikovat neznámé látky, objasnit jejich strukturu apod. (Friedecký & Lemr 2012). V analýze proteinů se MS uplatňuje především k jejich identifikaci, kvantifikaci a při hledání biomarkerů pro daná onemocnění. Metoda je založena na interakci nabitých částic s elektrickým nebo magnetickým polem, základním principem MS je ionizace molekul vzorku, následná separace vzniklých iontů na základě poměru jejich hmotnosti a náboje ( $m/z$ ) a jejich následná detekce. Každý hmotnostní spektrometr se tedy skládá z ionizačního zdroje, hmotnostního analyzátoru a z detektoru (Dvořáková et al. 2014).

Neutrální molekuly analytu je nejprve nutné vhodnou ionizační technikou převést na ionty. Na základě množství dodané energie se rozlišují tzv. tvrdé a měkké techniky. Pro ionizaci biologických makromolekulárních látek se používají měkké ionizační techniky, kdy je nejběžnější ionizace elektrosprejem nebo ionizace pomocí laseru za účasti matrice neboli MALDI. Ionty vzniklé v ionizačním zdroji jsou následně usměřovány iontovou optikou a přechází do hmotnostního analyzátoru, kde je separace založena na různých fyzikálních principech a která probíhá za vakua. Po rozlišení v hmotnostním analyzátoru ionty dopadají na detektor, kde se utváří potřebný signál (Friedecký & Lemr 2012; Dvořáková et al. 2014).

Jelikož biologické vzorky představují komplexní směs obsahující vedle velkého množství proteinů také řadu dalších vysoko- a nízkomolekulárních látek, pro lepší identifikaci jsou proto hmotností spektrometry často spojovány se separačními technikami, nejčastěji s LC, GC nebo gelovou elektroforézou. Pro analýzu proteinů a jiných makromolekul se dnes mnohdy používá MALDI-MS, jež se stala účinným nástrojem k detekci a identifikaci všech typů biomolekul a organických sloučenin (Volný 2011; Dvořáková et al. 2014). Tato technika se jeví i jako potenciálně užitečná k identifikaci a kvantifikaci mléčných proteinů, je proto v posledních letech v zájmu mnoha studií zaměřených na ověřování pravosti mléka (Poonia et al. 2017).

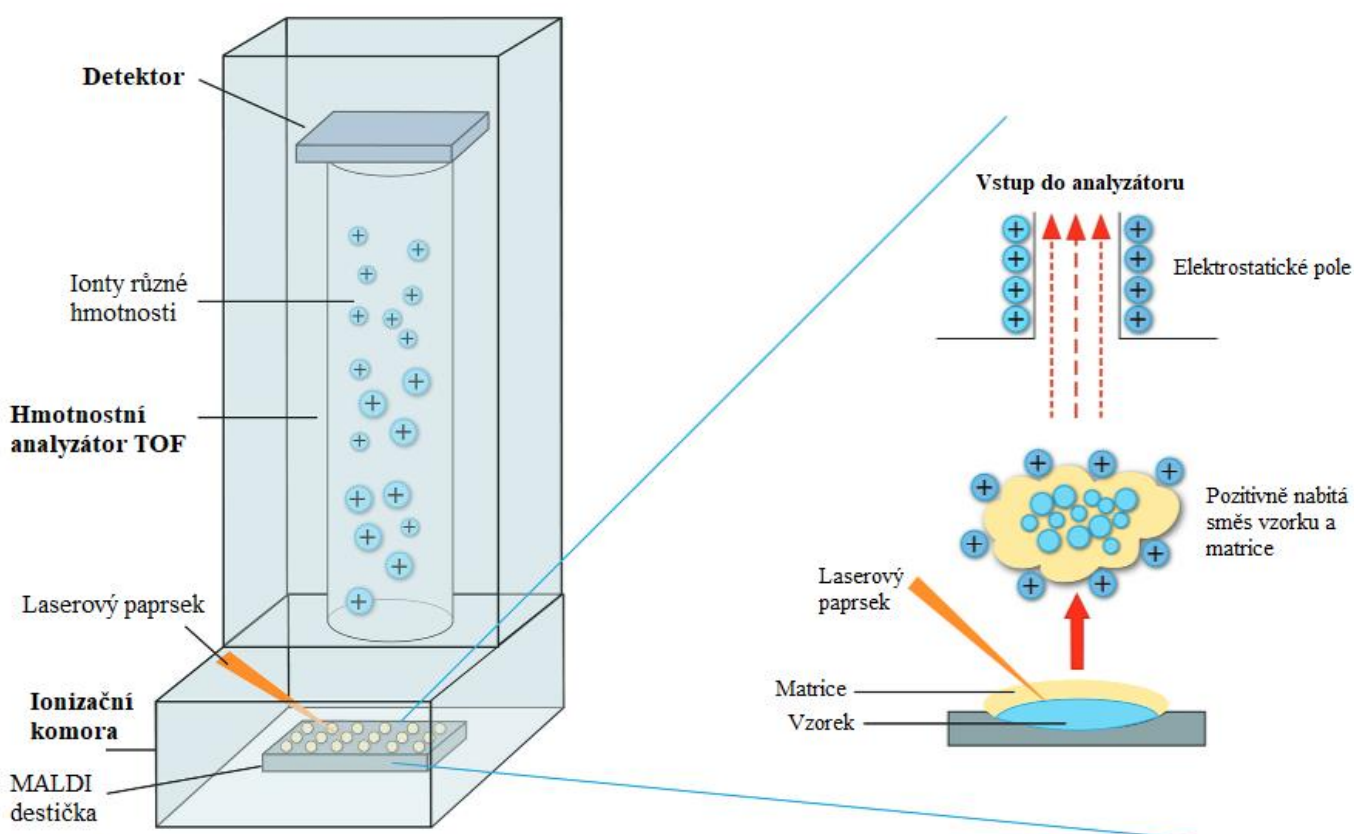
## 3.3 MALDI-TOF

MALDI-TOF představuje spojení měkké ionizační techniky s hmotnostním analyzátozem doby letu TOF. Na rozdíl od tvrdé ionizace nedochází u měkkých technik ke vzniku fragmentačních spekter, jsou však poskytovány molekulární ionty, případně addukty se složkami mobilní fáze nebo matrice (Friedecký & Lemr 2012). Až do objevu šetrnějších měkkých ionizačních technik nebyly hmotnostní spektrometrické nástroje pro rutinní aplikace tak široce využívány. Jejich vývoj umožnil analýzu velkých biomolekul, která do té doby nebyla možná (Jurinke et al. 2004). Termín MALDI byl poprvé popsán v roce 1985 Franzem Hillenkampem a Michaellem Karasem (Karas & Hillenkamp 1988), Koichi Tanaka tuto techniku zdokonalil a umožnil tak hmotnostní spektrometrickou analýzu biologických makromolekul. V roce 2002 mu za tento vývoj byla udělena Nobelova cena za chemii (Patel 2015).

### 3.3.1 Charakteristika a princip metody MALDI-TOF

Při analýze pomocí MALDI je nejprve vzorek před samotnou ionizací nanesen na MALDI destičku a smíchán s vhodnou matricí. Směs je před analýzou vysušena a ponechána krystalizovat. Důležité je docílení tzv. ko-krystalizace, tedy vytvoření krystalů mezi vzorkem a organickou matricí. Destička se vzorky je poté umístěna do vakuové části stroje, kde dochází k procesu ionizace. Ta je uskutečněna krátkými intenzivní laserovými pulzy, kdy je energie záření laseru pohlcena matricí, což vede k jejímu rychlému zahřátí a následné desorpci včetně iontů analytu (Jurinke et al. 2004; Wieser et al. 2012; Dvořáková et al. 2014).

Laserová energie způsobuje strukturální rozklad ozářeného krystalu, který vytváří oblak částic, ze kterého jsou ionty unášeny vlivem elektrostatického pole do hmotnostního analyzátoru. Po vstupu do analyzátoru ionty putují průletovou trubicí až k detektoru, který zaznamená čas jejich letu. Ten je přímo úměrný jejich velikosti a pohybuje se v rozmezí několika mikrosekund. Detektor ionty zachycuje a z doby jejich letu je následně vypočten poměr  $m/z$ . Na základě této informace je zaznamenáno charakteristické spektrum, které je specifické pro každou analyzovanou molekulu (Jurinke et al. 2004; Wieser et al. 2012). Zjednodušené schéma obecného principu je znázorněno na obrázku 1.



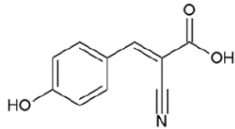
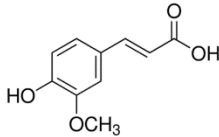
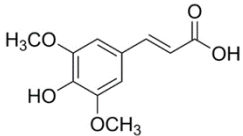
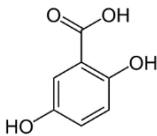
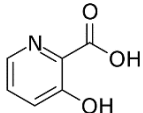
**Obr. 1:** Schématické znázornění MALDI-TOF (Upraveno dle Patel (2015)).

### 3.3.2 Matrice

Při ionizaci hraje zásadní roli výběr vhodné matrice. Matrice ovlivňuje kvalitu spekter, jejím hlavním úkolem je izolovat analyzované molekuly a chránit je před fragmentací laserem. Absorbuje energii laseru, čímž dochází k desorpci a ionizaci matrice, a následně předává náboj molekulám analytu. Musí být dostatečně stabilní ve vakuu, a jelikož se matrice používá formou roztoku, musí být i dostatečně rozpustná ve vhodném rozpouštědle. Nejčastěji bývá rozpuštěna v acetonitrilu a okyselena kyselinou trifluoroctovou (Dreisewerd 2003; Croxatto et al. 2012; Patel 2015).

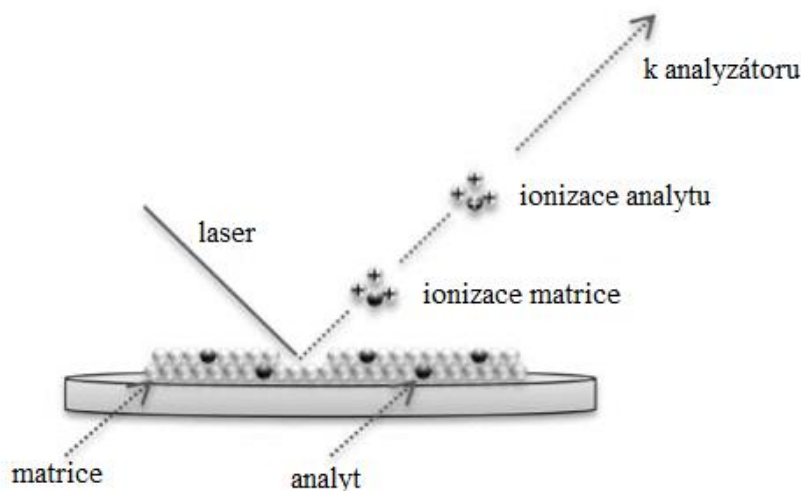
Vhodnou matricí pro MALDI jsou zejména slabé organické kyseliny s aromatickým jádrem, nejběžněji se používají deriváty kyseliny benzoové a skořicové. Výběr závisí na typu zkoumaného analytu. Pro peptidy se používá např.  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina (HCCA) a 2,5-dihydroxybenzoová kyselina (DHB), pro proteiny kyselina sinapová (SA – sinapic acid) a ferulová (FA – ferulic acid). Za univerzální matrici je považována DHB, která se používá pro řadu odlišných analýz, často pro analýzu lipidů (Dreisewerd 2003; Marvin et al. 2003). Nejčastěji využívané matrice shrnuje tabulka 9.

**Tab. 9:** Nejběžněji užívané matrice při analýze MALDI (Upraveno dle Marvin et al. (2003); Croxatto et al. (2012)).

Matrice	Strukturní vzorec	Analyzované molekuly
<b>HCCA</b> Kyselina $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová		Peptidy
<b>FA (Kyselina ferulová)</b> Kyselina 4-hydroxy-3-methoxyskořicová		Proteiny
<b>SA (Kyselina sinapová)</b> Kyselina 3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová		Proteiny, polymery
<b>DHB (Kyselina gentisová)</b> Kyselina 2,5-dihydroxybenzoová		Peptidy, proteiny, lipidy, nukleové kyseliny, sacharidy
<b>HPA</b> Kyselina 3-hydroxypikolinová		Nukleové kyseliny

### 3.3.3 Ionizace

Proces ionizace (obr. 2) zahrnuje krátké intenzivní pulsy laseru, které zahřívají matrici a způsobují její desorpci. Hlavním principem ionizace je přenos energie laseru na matrici, ze které jsou následně uvolňovány volné radikály a protony, které jsou přenášeny na analyt. Vzniká tak protonová molekula analytu. Protože samotný analyt neabsorbuje laserovou energii přímo, je tato metoda považována za měkkou ionizační techniku, která umožňuje analýzu komplexních molekul až do několika set kilodaltonů (Marvin et al. 2003; Singhal et al. 2015).



**Obr. 2:** Ionizace MALDI (Upraveno dle Friedecký & Lemr (2012)).

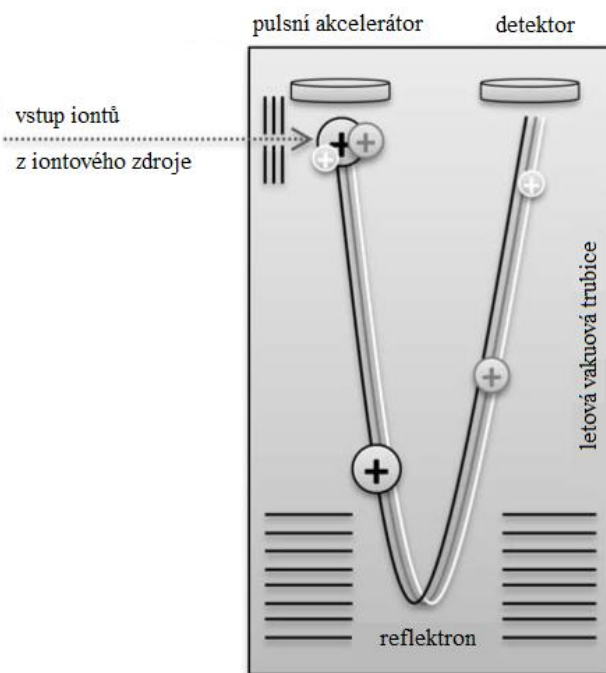
Vě většině případů se dnes pro MALDI používají lasery s vlnovou délkou v oblasti ultrafialového záření (UV), nejčastěji lasery dusíkové o vlnové délce 337 nanometrů nebo lasery s vlnovou délkou 355 nanometrů. Pulzy těchto laserů se pohybují obvykle v rozmezí 0,5 až 10 nanosekund. Tím, že matrice pohlcuje UV záření, je zabráněno přímé fotoexcitaci labilních molekul analytu, navíc UV lasery indukují relativně malé množství fotochemických procesů jako je např. tvorba adduktů matrice s analytem. Alternativou UV laserů jsou lasery o vlnových délkách v oblasti infračerveného záření, kde absorpcí energie dochází ke změnám vibračních stavů molekul. Ve srovnání s UV lasery je však použití těchto laserů pouze minoritní (Dreisewerd 2003).

### 3.3.4 Analyzátor doby letu TOF

Klíčovou součástí hmotnostního spektrometru je analyzátor, ve kterém dochází k separaci iontů na základě poměru  $m/z$ . Byla vyvinuta celá řada analyzátorů, MALDI ionizace bývá nejčastěji spojována s průletovým analyzátozem TOF, který poskytuje lepší rozlišovací schopnost iontů než např. kvadrupólový analyzátor. V průletových analyzátozech (obr. 3) jsou ionty elektrickým polem posunovány do vakuové trubice, kde putují směrem k detektoru. Jejich separace je založena (jak již bylo zmíněno výše) na vztahu mezi rychlostí jejich pohybu a  $m/z$ . Často se využívá uspořádání za použití tzv. reflektoru (iontového zrcadla), který otáčí směr



letu o téměř 180°, čímž se prodlužuje dráha a doba letu. Zároveň se tím kompenzuje rozdíl v hodnotách kinetické energie jednotlivých iontů, což přispívá k lepšímu rozlišení iontů (Friedecký & Lemr 2012; Singhal et al. 2015). TOF analyzátoři jsou považováni za relativně jednoduché, vykazují vysokou citlivost a mají prakticky neomezený hmotnostní rozsah. Díky tomu se dobře hodí pro klinické a biomedicínské analýzy (Marvin et al. 2003).



**Obr. 3:** Schéma TOF analyzátoru (Upraveno dle Friedecký & Lemr (2012)).

### 3.3.5 Využití MALDI-TOF

Pro svoji všestrannost se MALDI-TOF stala univerzální metodou pro analýzu řady makromolekul biologického původu. Schopnost desorbovat termolabilní molekuly s vysokou molekulovou hmotností, vysokou přesností a citlivostí v kombinaci s širokým hmotnostním rozsahem (1-300 kDa) činí z MALDI-TOF efektivní metodu běžně využívanou v mikrobiologické a klinické praxi (Marvin et al. 2003). Tato technologie vytváří charakteristická hmotnostní spektra specifická pro každý mikroorganismus, proto je tato technika ideální pro přesnou mikrobiální identifikaci na úrovni rodů a druhů a má potenciál použití pro typizaci a identifikaci jednotlivých kmenů. Používá se k charakterizaci široké škály bakterií, hub a virů, má proto význam i při kontrole kvality potravin (Croxatto et al. 2012). Rozvíjí se i použití této techniky pro rutinní testování potravin za účelem odhalování falšování. Na základě analýzy fosfolipidů a profilu TAG je například prováděna druhová identifikace rostlinných olejů (Calvano et al. 2012a; Jergović et al. 2017), analýzou rodově specifických kolagenových peptidů je umožněna identifikace různých živočišných druhů ve zpracovaných potravinách, čímž je možno detekovat malé množství kontaminujícího masa nebo jiných příměsí nedeklarovaných na etiketě masných výrobků (Akhatova et al. 2018).

Jelikož se MALDI-TOF často využívá k analýze proteinů, řada studií se dnes zabývá identifikací a kvantifikací mléčných proteinů za použití MALDI-TOF jakožto vhodné metody při ověřování autentičnosti mléka. Odhalování rozdílů ve vzorcích mléka pocházejících od různých druhů savců je založeno na skutečnosti, že hlavní skupiny mléčných bílkovin vykazují genetický polymorfismus a různé posttranslační modifikace, profily mléčných bílkovin se tudíž liší u každého zkoumaného druhu. Jako molekulární markery se pro průkaz falšování často využívají nejhojněji zastoupené syrovátkové bílkoviny  $\alpha$ -laktalbumin a  $\beta$ -laktoglobulin (Cozzolino et al. 2001). Calvano et al. (2012b) prostřednictvím MALDI-TOF analyzovali binární směsi obsahující kravské a kozí, kravské a ovčí, a ovčí a kozí mléko. Koncentrace každého mléka se pohybovaly v rozmezí 0–100 %. Hodnocením druhově specifických peptidových markerů byl úspěšně odhalen 5% přídavek kravského mléka. Podobně Nicolaou et al. (2011) zkoumali směsi obsahující kravské, ovčí a kozí mléko, kde se množství každého mléka pohybovalo, stejně jako v předchozí studii, v různých koncentračních poměrech. V kombinaci s vhodnou chemometrickou analýzou bylo vyhodnoceno, že MALDI-TOF je schopna dosáhnout vysoké úrovně přesnosti s detekcí 2-10 % kravského mléka.

MALDI-MS má výhodu v tom, že vyžaduje malé množství vzorku a může být použita pro analýzu heterogenních vzorků, jako je např. právě mléko. Proto má tato technika velký potenciál pro použití v mlékárenském průmyslu jakožto rychlá metoda detekce při prokazování falšování (Liland et al. 2009).

## 4 Metodika a materiál

V této práci byla vyvíjena a testována metoda MALDI-TOF jakožto nová spolehlivá metoda pro identifikaci přídavku kravského mléka v mléce kozím a ovčím. Práce vznikla na základě projektu Ministerstva zemědělství, ve spolupráci s Výzkumným ústavem mlékařenským, s.r.o (VÚM).

### 4.1 Analyzované vzorky

Celkem bylo analyzáno 48 sad (288 vzorků) kozího a ovčího mléka porušeného různým přídavkem mléka kravského. Vzorky byly odebrány z několika farem v ČR, konkrétně v Olomouckém, Moravskoslezském a Zlínském kraji. Před samotným odběrem vzorků byla nejprve podle plemen, dojivosti, technologie a lokalizace provedena rekognoskace terénu mlékařických farem skotu, koz a ovcí. Vybraná stáda, 5 stád dojnic, 5 stád koz a 4 stáda ovcí, poté byla vzorkována v termínech 19. a 26. května a 11. a 18. srpna 2019. Vzorkování zohledňovalo jednak termíny odstavu mláďat u malých přežvýkavců, ale také změnu složení mléka souvisejícího s laktací a skutečnost poklesu dojivosti koncem léta. Vždy, čtyřikrát po sobě, bylo odebráno 5 vzorků kravského, 5 vzorků kozího a 4 vzorky ovčího mléka, kde 5. vzorek byl připraven náhodným mísením všech předchozích.

Vybraná stáda se nacházela v nadmořské výšce: krávy 339±100 m (od 227 m do 474 m); ovce 425±80 m (od 300 m do 498 m); kozy 337±89 m (od 240 m do 474 m). Co se týče vyjádření faktoru plemene, byl tento kalkulován jako relativní plemenné zastoupení v mléce opakovaně použité vzorkové sady při známých poměrech modifikace mléka pro příslušný biologický druh mléka. Tento způsob zohledňoval fakt, že stáda malých přežvýkavců nebyla jednotná z hlediska plemene, rovněž byly ve stádech přítomni i meziplemenní kříženci. Taková je ovšem praxe v ČR a odpovídaly tomu i poměry provedeného testování: krávy (83 % Holštýn, 17 % České strakaté), kozy (59 % Bílá krátkosrstá, 29 % Hnědá krátkosrstá, 12 % Anglonúbijská), ovce (70 % Lacaune, 20 % Cighája, 10 % Východofříská).

Bazénové vzorky syrového mléka byly odebrány z chladicích tanků na farmách při teplotě pod 8 °C a k další manipulaci v laboratoři VÚM Praha, pracoviště Šumperk, transportovány v termoboxech s chladicími vložkami do 24 hodin. Mléko malých přežvýkavců bylo následně porušeno přídavkem mléka kravského podle schéma uvedeného v tabulce 10.

**Tab. 10:** Základní koncentrační škála poměrů kravského a kozího/ovčího mléka použitých při falšování.

	Kravské (%)	Objem (ml)	Kozí/Ovčí (%)	Objem (ml)
1	0	0	100	250
2	0,5	1,25	99,5	248,75
3	1	2,5	99	247,5
4	5	12,5	95	237,5
5	10	25	90	225
6	100	250	0	0

Dle tohoto schéma bylo připraveno celkem 24 sad pro kozí a 24 sad pro ovčí mléko, dohromady tedy 288 vzorků. Takto nafalšovaná mléka byla posléze podrobena vysoké pasteraci, kdy 250 ml každého vzorku mléka bylo pasterováno vsádkovým způsobem ve vodní lázni k dosažení 70 °C během 20 minut. Tyto pasterované vzorky byly poté ochlazeny na 25 °C po dobu 12 minut, uloženy při teplotě 5 °C a transportovány v chladicích boxech do laboratoří k dalším analýzám (VÚM Praha a Česká zemědělská univerzita v Praze). Vzorky byly dále rozpipetovány do 1,5 ml mikrozkušavek a uskladněny při -80 °C.

## 4.2 Potřebné chemikálie

- Acetonitril (AN,  $\geq 99,9$  %, Honeywell)
- MALDI matrice HCCA ( $\geq 99$  %, Sigma-Aldrich)
- Trifluoroctová kyselina (TFA – trifluoroctic acid, 99 %, Sigma-Aldrich)
- Deionizovaná voda (ultra čistá, Purelab Flex2)
- Peptide Calibration Standard II (Part No. 8222570, Bruker)

## 4.3 Přístrojové vybavení

- MALDI-TOF Autoflex Speed (Bruker, Německo)
- MTP 384 ocelová destička (Bruker, Německo)
- Vortex Phoenix RS-VF 10
- Centrifuga Qualitron DW-41

## 4.4 Příprava vzorků pro MALDI-TOF analýzu

Před přípravou vzorku pro MALDI-TOF analýzu bylo nejprve zapotřebí připravit roztok MALDI matrice. Jako matrice byla použita HCCA, její roztok byl připraven v poměru 1 mg HCCA/100  $\mu$ l organického rozpouštědla (OR). Do centrifugační mikrozkušavky byl tedy navážen 1 mg HCCA, bylo přidáno 100  $\mu$ l OR (50 % AN, 47,5 % voda a 2,5 % TFA) a celá směs byla vortexována, dokud nebyly všechny krystaly matrice úplně rozpuštěny. Takto připravený roztok matrice byl připraven k použití.

Uskladněné vzorky mléka se nechaly při pokojové teplotě rozmraznout, byly seřazeny dle jednotlivých sad a naředěny vodou v poměru 1:100. Jednotlivý vzorek mléka byl tedy nejprve zvortexován, do čisté mikrozkušavky byl odpipetován 1  $\mu$ l, zředěn 100  $\mu$ l vody a celá směs byla znovu vortexována a centrifugována při 2000  $\times$  g po dobu několika sekund. Z této směsi byl následně odebrán 1  $\mu$ l a nanesen ve dvou spotech na MALDI destičku. Nanesený vzorek byl ponechán při laboratorní teplotě uschnout a ihned po zaschnutí byl překryt stejným množstvím roztoku matrice. Poté se nechal opět při pokojové teplotě zaschnout a takto usušený byl připraven k vlastní analýze na MALDI. Tímto způsobem bylo připraveno všech 288 vzorků.

Kromě ředění 1:100 byla jedna sada kozího a jedna sada ovčího mléka připravena i ředěním 1:50, 1:10 a 1:1. Postupovalo se stejným způsobem, rozdíl byl akorát v přidávaném množství vody. Jelikož se při vyhodnocování jako nejefektivnější ukázalo ředění 1:1, pro přesnější interpretaci výsledků bylo tímto způsobem připraveno několik dalších sad vzorků.

## 4.5 Kalibrace

Samotné měření je ovlivněno několika faktory, zejména teplotou a stabilitou zdrojů generující napětí v přístroji. Proto je ideální pro co nejpřesnější měření před každou analýzou provést kalibraci. K tomu účelu byl využit Peptide Calibration Standard II. Jedná se o směs 8 peptidů (tab. 11) umožňující kalibraci a testování v rozmezí od 700 do 3500 Da. Dle příručky pro kalibraci (Bruker, 2016) byl obsah tubičky s Peptide Calibration Standardem II smíchán se 125  $\mu$ l 0,1% TFA a vortexován po dobu několika sekund, dokud nebyl zcela rozpuštěn. 1  $\mu$ l takto připraveného roztoku byl následně nanesen v několika spotech na MALDI destičku, v těsné blízkosti analyzovaných vzorků. Stejně jako při přípravě analyzovaných vzorků byl ponechán zaschnout při pokojové teplotě a překryt 1  $\mu$ l roztoku matrice (AN a 0,1% TFA v poměru 1:2). Po opětovném zaschnutí byla destička připravena k proměření.

**Tab. 11:** Kalibrační peptidy s  $m/z$  hodnotami (Bruker, 2016).

Peptid	[M+H] <sup>+</sup> Monoizotopická	[M+H] <sup>+</sup> Průměrná
Bradykinin 1-7	757,3992	757,86
Angiotensin II	1046,5418	1047,19
Angiotensin I	1296,6848	1297,49
Substance P	1347,7354	1348,64
Bombesin	1619,8223	1620,86
ACTH clip 1-17	2093,0862	2094,43
ACTH clip 18-39	2465,1983	2466,68
Somatostatin 28	3147,4710	3149,57

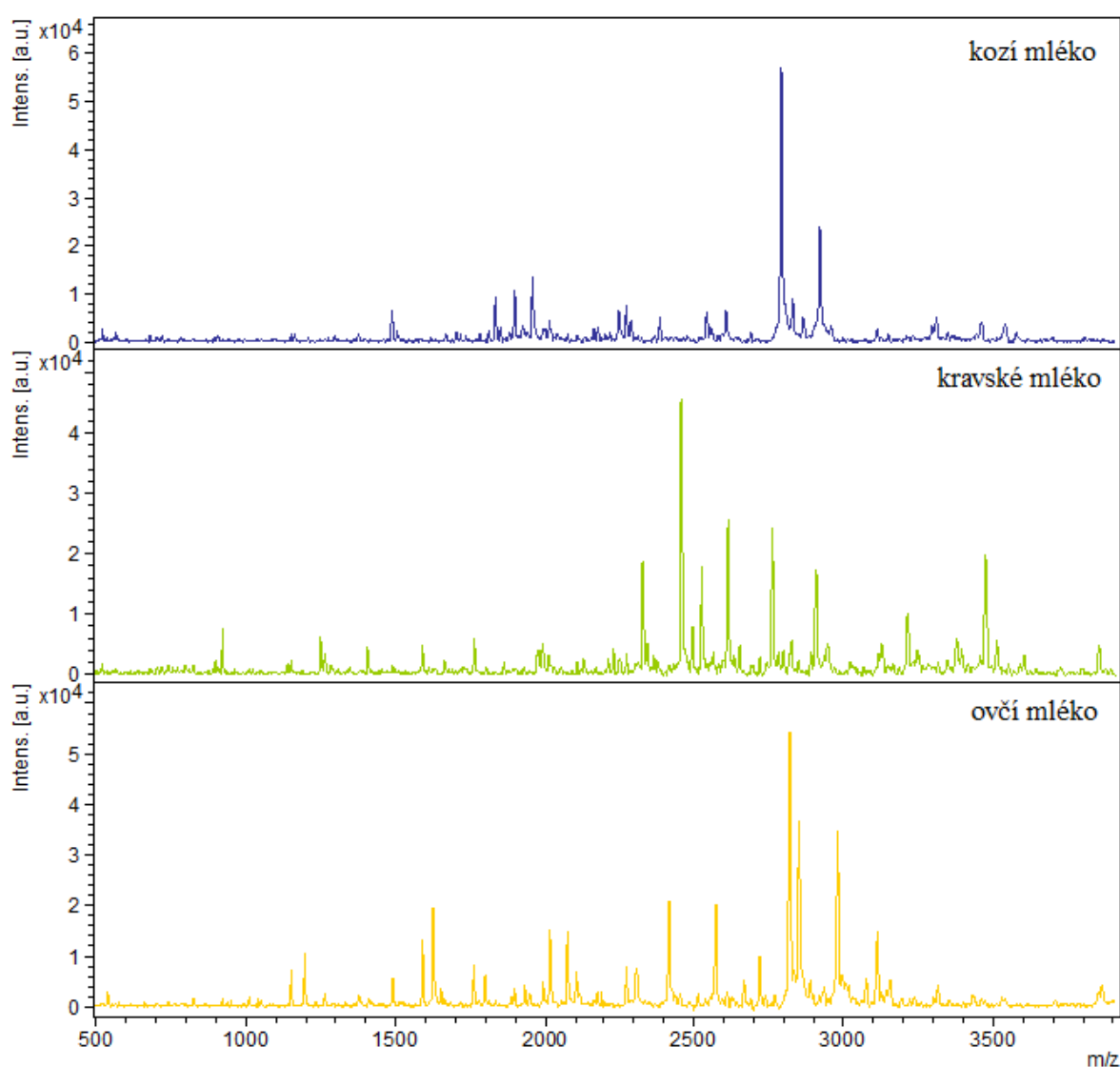
## 4.6 Vyhodnocení

Vlastní měření vzorků probíhalo na přístroji MALDI-TOF Autoflex Speed za použití programu flexControl 3.4, k vyhodnocení byl použit program flexAnalysis 3.4 (Bruker Daltonics, Německo) a MALDI Biotyper Version 3.1. Byla naměřena hmotnostní spektra, ta byla navzájem porovnána a na základě podobnosti spekter byly nalezeny charakteristické píky jakožto specifické markery pro kravské, kozí a ovčí mléko. Dle nalezených píků a porovnání spekter jednotlivých ředění bylo následně vyhodnoceno, zda je možné spolehlivě identifikovat i třeba jen 1% přírůstek kravského mléka.

Měření probíhalo v lineárním pozitivním módu s napětím iontových zdrojů 19,89 kV a 18,44 kV a detekce byla nastavena v rozsahu od 500 do 4000 Da. Každý vzorek byl na destičku nanesen ve dvou spotech a pro jednotlivé spoty byla naměřena dvě spektra, která byla shromážděna 2000 výstřely ve 200 krocích. Detailnější analýza byla provedena ve vysokém rozlišení v rozsahu 2700–3600 Da a 2360–2600 Da, zde byla pro jednotlivé vzorky nasbírána tři spektra, kdy bylo využito 8000 laserových výstřelů ve 200 krocích.

## 5 Výsledky

K porovnání a vyhodnocení naměřených hmotnostních spekter bylo využito programu flexAnalysis. Naměřená spektra jednotlivých sad vzorků byla před vzájemným porovnáním vyhlazena a byla srovnána jejich základní linie. Porovnání spekter čistého kravského, kozího a ovčího mléka prokázalo, že iontové profily jednotlivých mlék jsou rozdílné, tato odlišnost se projevila nalezenými píky s rozdílnými hodnotami  $m/z$  (obr. 4). Spektra byla nejprve porovnána u vzorků připravených ředěním 1:100, jelikož se ale toto ředění ukázalo jako neefektivní v rámci nízkého limitu detekce, byly dále některé sady vzorků připraveny ředěním 1:50, 1:10 a 1:1. Jako nejefektivnější a nejpřesnější se ukázalo ředění 1:1, proto byly pro další hodnocení vzorky připravovány pouze tímto způsobem.



**Obr. 4:** Porovnání spekter čistého kravského, kozího a ovčího mléka v rozsahu od 500 do 4000 Da.

Jednotlivé nalezené píky se liší jednak hodnotami  $m/z$ , ale také svojí intenzitou či plochou a v tomto případě představují určité peptidy vyskytující se v kravském, kozím či ovčím mléce. Charakteristické píky pro kravské, kozí a ovčí mléko byly detekovány v oblastech od 900 do 3900  $m/z$ . Po porovnání píků a jejich hodnot  $m/z$  byly vybrány píky s největší intenzitou jakožto specifické markery kravského, kozího a ovčího mléka. Hodnoty  $m/z$  byly následně porovnány s již dříve publikovanými údaji o molekulových hmotnostech proteinů (Sassi et al. 2015) a s databází UniProtKB, release 2019\_11, která je volně dostupná online (<https://www.uniprot.org/>) a každému iontu bylo přiřazeno jméno, identifikační číslo a určení, pro jaký protein je daný peptid charakteristický. Identifikované peptidy mohou být jednak tohoto proteinu součástí či se můžou podílet na různých procesech jeho vzniku. Prozatím se však jedná pouze o předběžnou identifikaci. Několik peptidů zatím charakterizováno nebylo. Vybrané charakteristické peptidy pro kravské, kozí a ovčí mléko a jejich identifikace jsou uvedeny v tabulce 12, 13 a 14.

Nejrozmanitější částí všech spekter je oblast od 2300 do 3000  $m/z$ , dominantní píky pro všechna mléka byly tedy rovněž detekovány v této oblasti. Pro kravské mléko se jako nejvýznačnější markery jeví peptidy o  $m/z$  2458,19,  $m/z$  2614,14 a  $m/z$  2761,51, kozímu mléku dominují peptidy o  $m/z$  2791,65 a  $m/z$  2919,89 a u ovčího mléka byly nalezeny nejcharaktičtější markery o  $m/z$  2819,51,  $m/z$  2850 a  $m/z$  2978,99. Jako společné markery byly detekovány píky o  $m/z$  1588,71 a  $m/z$  1990,09.

**Tab. 12:** Charakteristické markery kravského mléka.

<i>m/z</i>	UniProtKB	Označení	Gen	Protein
<b>922,54</b>	D3TJU5	D3TJU5_BOVIN	CSN1S1	CSN1S1
<b>1250,58</b>	P02662	CASA1_BOVIN	CSN1S1	Alpha-S1-casein
<b>2329,29</b>	Q7M3H9	Q7M3H9_BOVIN	-	30K serine proteinase homolog
<b>2458,19</b>	Q28016	Q28016_BOVIN	-	Insulin-like growth factor-1 receptor
<b>2526,24</b>	Q6SA78	Q6SA78_BOVIN	-	Receptor for advanced glycosylation end products
<b>2614,14</b>	Q9TR23	Q9TR23_BOVIN	-	NONAMELOGENIN protein
<b>2761,51</b>	Q9TR08	Q9TR08_BOVIN	-	PA700 subunit
<b>2908,11</b>	A0A067XHA0	A0A067XHA0_BOVIN	CARD15	CARD15 protein
<b>3475,34</b>	H9ZHQ8	H9ZHQ8_BOVIN	ABCG2	ATP-binding cassette superfamily G member 2 transporter protein
<b>3852,55</b>	Q1ZY27	Q1ZY27_BOVIN	F11	Truncated coagulation factor XI

**Tab. 13:** Charakteristické markery koziho mléka.

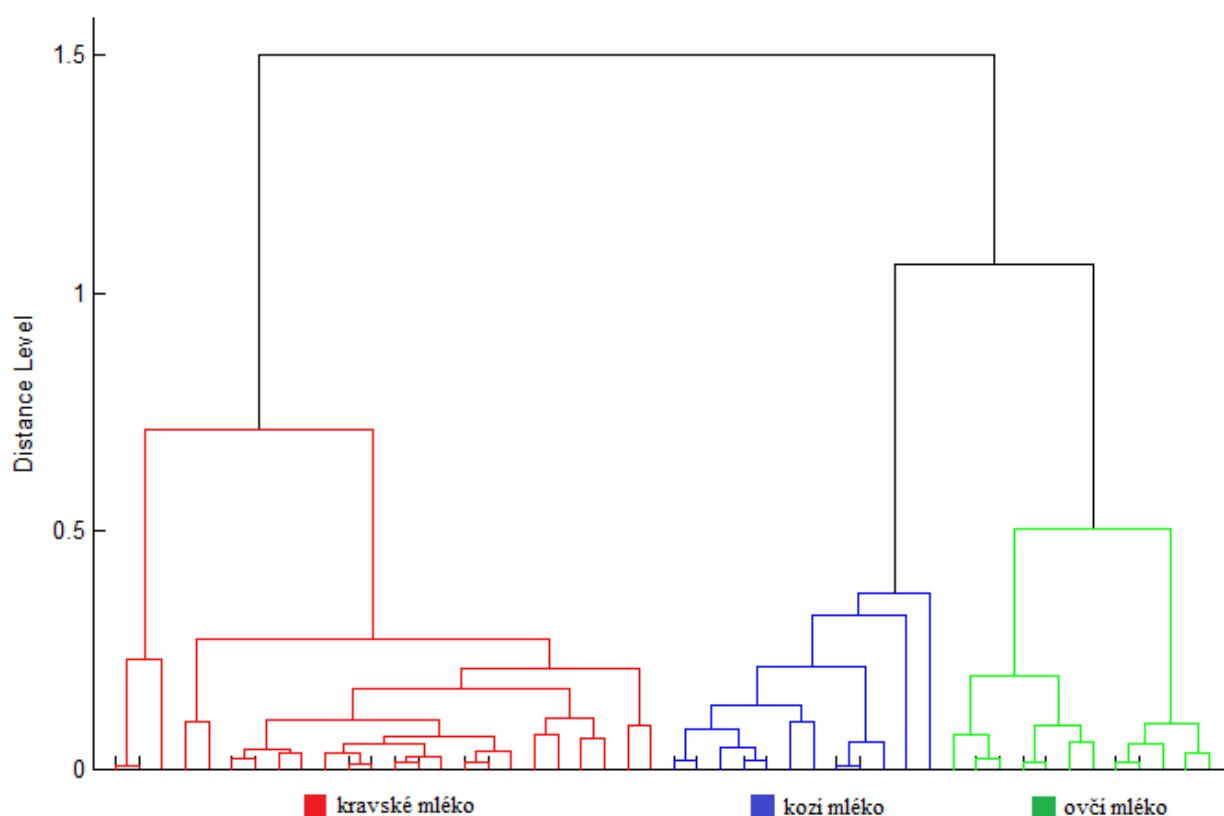
<i>m/z</i>	UniProtKB	Označení	Gen	Protein
1487,24	D4PB76	D4PB76_CAPHI	CAPN1	CAPN1
1879,35	-	-	-	-
1897,37	-	-	-	-
1956,55	I1Z735	I1Z735_CAPHI	ND6	NADH dehydrogenase subunit 6
2249,79	P02670	CASK-CAPHI	CSN3	Kappa-casein
2290,04	D0PQK2	D0PQK2_CAPHI	POU1F1	POU domain transcription factor 1
2791,65	P02670	CASK-CAPHI	CSN3	Kappa-casein
2806,59	G0Z3C3	G0Z3C3_CAPHI	-	Growth hormone E4
2919,89	P02670	CASK-CAPHI	CSN3	Kappa-casein
3538,34	Q29430	Q29430_CAPHI	-	Lysozyme

**Tab. 14:** Charakteristické markery ovčího mléka.

<i>m/z</i>	UniProtKB	Označení	Gen	Protein
1151,04	-	-	-	-
1196,98	-	-	-	-
1625,71	B0LRN2	B0LRN2_SHEEP	-	Serum amyloid A protein
2014,29	P02669	CASK_SHEEP	CSN3	Kappa-casein
2417,60	Q2PP58	Q2PP58_SHEEP	VDUP1	Vitamin D3 up-regulated protein 1
2573,30	-	-	-	-
2719,76	B1PQU5	B1PQU5_SHEEP	CAST	Calpastatin
2819,51	D2D3I9	D2D3I9_SHEEP	CSN1S1	Alpha s1 casein
2850,30	-	-	-	-
2978,99	D9IR31	D9IR31_SHEEP	KIFI	Keratin intermediate-filament type I protein
3111,67	-	-	-	-

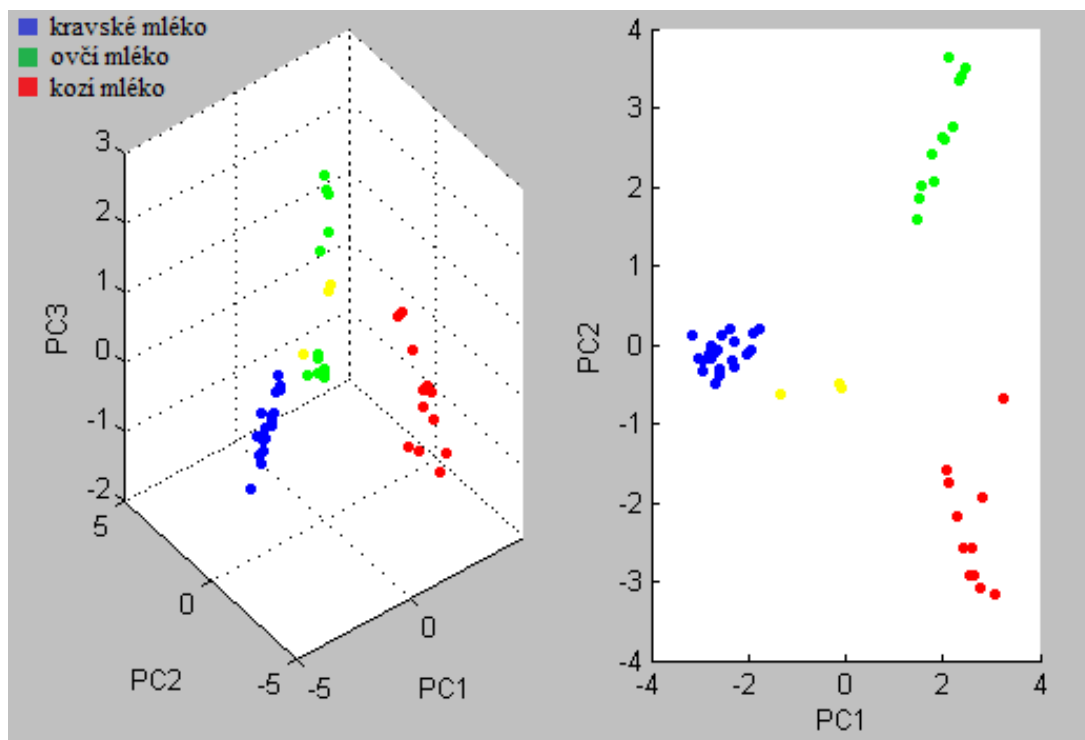


Ke zhodnocení spekter a pro znázornění odlišnosti jednotlivých druhů mlék byla dále v programu MALDI Biotyper provedena analýza hlavních komponent (PCA – principal component analysis). Na základě PCA analýzy byl vytvořen dendrogram (obr. 5), který jasně odhalil shluky odpovídající mléku kravskému, kozímu a ovčímu. Dendrogram zřetelně prezentuje rozdílnost spekter pro každý druh mléka, dle podobnosti jsou seskupeny do tří klastrů, kde jeden shluk představuje mléko kravské, zbylé dva mléko kozí a ovčí. Vzdálenější vzorky mají mezi sebou menší podobnost oproti vzorkům, které jsou blíže u sebe. Rovněž je znázorněna vzájemná podobnost mléka ovčího a kozího v porovnání s mlékem kravským.



**Obr. 5:** Dendrogram analýzy hlavních komponent pro vybrané vzorky kravského, kozího a ovčího mléka. Data ukazují tři klastry: jeden shluk vzorků představující kravské mléko, zbylé dva zobrazující mléko kozí a ovčí.

Rozdílnosti spekter pro jednotlivé druhy mléka jsou znázorněny i na obrázku 6, kde jsou stejně jako v předchozím dendrogramu mléka uskupena do tří shluků. Jeden shluk vždy představuje vybraný druh mléka a obdobně jako v obrázku 5 i zde vykazují více vzdálené vzorky nižší podobnost mezi sebou. Žlutě označené vzorky, spadající pod mléko kravské, vykazují nejmenší podobnost v porovnání s ostatními naměřenými spektry a tudíž do shluku nebyly zařazeny.

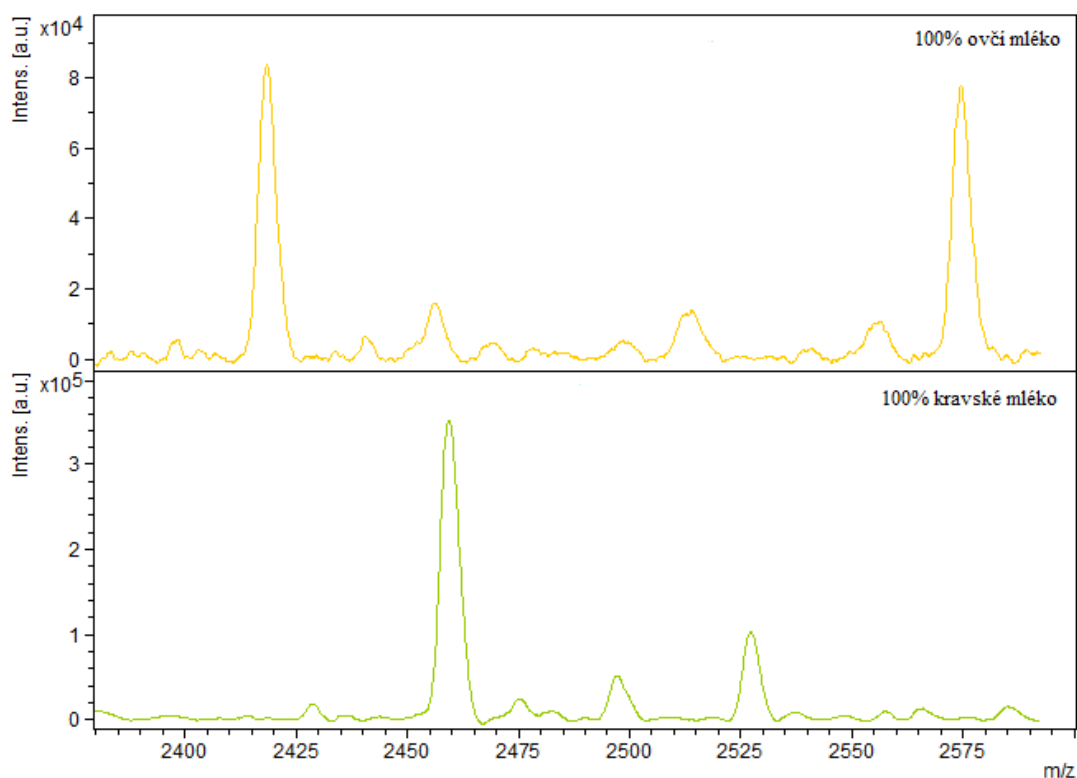


**Obr. 6:** Shluková analýza klasifikující jednotlivé druhy mléka na základě podobnosti do tří shluků.

## 5.1 Ovčí mléko

Po porovnání spekter čistého kravského, kozího a ovčího mléka, kdy byly nalezeny charakteristické píky pro každý druh, byla dále srovnána spektra čistého ovčího mléka se spektry s přidavkem mléka kravského. Při bližším prozkoumání většina markerů typických pro kravské mléko v nafalšovaných vzorcích zanikla, ve vzorcích s přidavkem 10 % mléka kravského byly jasně detekovány pouze nejdominantnější markery o  $m/z$  2458,19,  $m/z$  2614,14 a  $m/z$  2761,51. Jelikož se nejlépe jevil pík o  $m/z$  2458,19, bylo další měření a vyhodnocování pro případné odhalení nižšího přidavku kravského mléka zaměřeno právě na tento pík a jeho blízkou oblast. Dále tedy bylo připraveno k analýze několik sad vzorků nafalšovaného ovčího mléka, které byly proměřeny v rozsahu od 2360 do 2600 Da.

Jelikož byl však tento pík o  $m/z$  2458,19 při proměření vzorků v rozsahu od 2360 do 2600 Da slabě detekován i v čistém ovčím mléce (obr. 7), pro prokázání přidavku kravského mléka bylo zapotřebí statisticky vyhodnotit, zda intenzita píku o  $m/z$  2458,19 úměrně roste i se zvyšujícím se přidavkem kravského mléka (obr. 8). Protože jsou intenzity píků jiné pro každé naměřené spektrum, bylo použito relativní intenzity  $m/z$  2458,19 vztahené k celkové intenzitě dvou postranních píků o  $m/z$  2418,16 a  $m/z$  2574,20. Spektra byla pro každý vzorek nasbírána třikrát, byly proto vypočteny průměry se směrodatnými odchylkami (SD), které jsou zaneseny v tabulce 15.

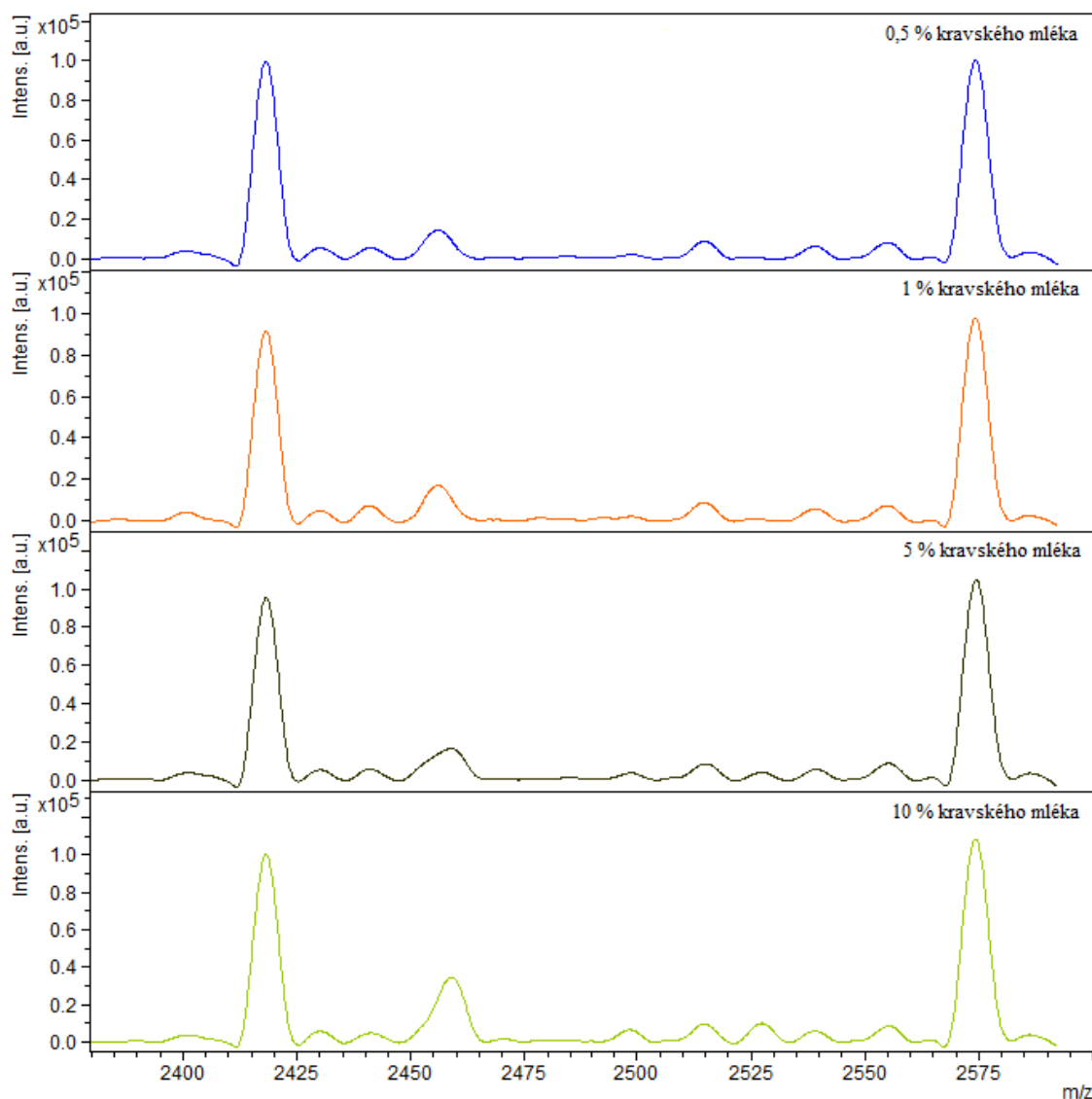


**Obr. 7:** Porovnání spekter čistého ovčího a kravského mléka v rozsahu od 2360 do 2600 Da.

**Tab. 15:** Porovnání relativní intenzity píku o  $m/z$  2458,19 dle různého přídavku mléka kravského ( $n=3$ ).

Přídavek kravského mléka (%)	% intenzity (průměr ± SD)			
	Sada č. 44	Sada č. 46	Sada č.52	Sada č. 54
0	12,36 ± 1,03	4,56 ± 0,36	7,11 ± 0,57	7,58 ± 0,28
0,5	7,11 ± 0,38	6,56 ± 0,73	5,04 ± 0,31	8,01 ± 0,23
1	7,82 ± 0,78	4,64 ± 0,49	6,33 ± 0,48	6,15 ± 1,35
5	7,47 ± 0,18	5,62 ± 0,21	5,66 ± 0,52	5,97 ± 0,21
10	16,04 ± 0,45	9,95 ± 0,80	12,53 ± 0,12	8,73 ± 0,16

Dle výše uvedených údajů, zanesených v tabulce 15, je tedy patrné, že jednoznačně lze zatím prokázat nafalšované ovčí mléko s přídavkem 10 % mléka kravského. Pro menší přídavky jsou hodnoty intenzit ve většině případů nižší než pro čisté ovčí mléko, tudíž skutečnost, že jsou mléka naředěna nižšími přídavky mléka kravského (0,5 %, 1 %, 5 %), prozatím nelze prokázat.

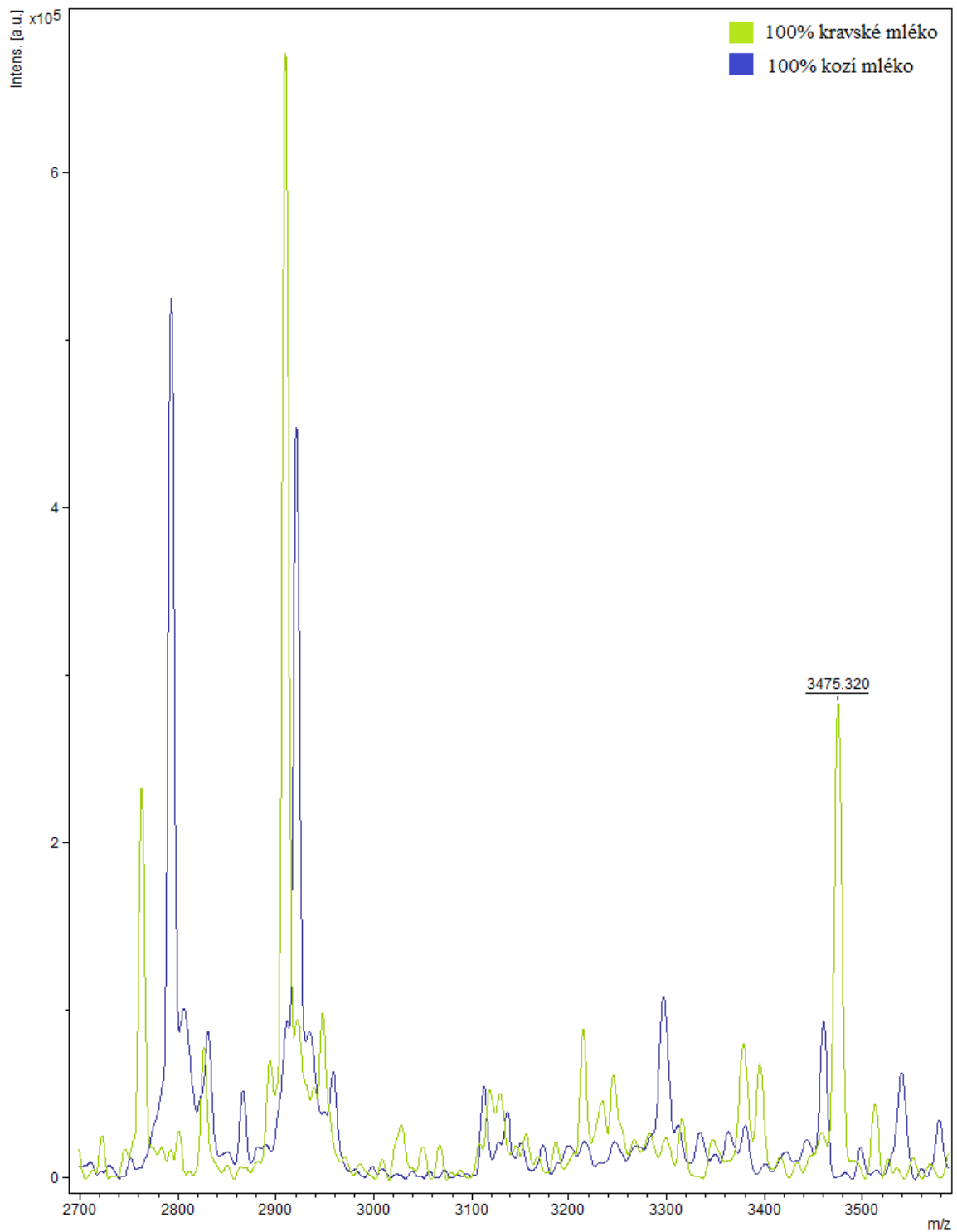


**Obr. 8:** Porovnání spekter ovčího mléka s různým přídatkem mléka kravského v rozsahu od 2360 do 2600 Da.

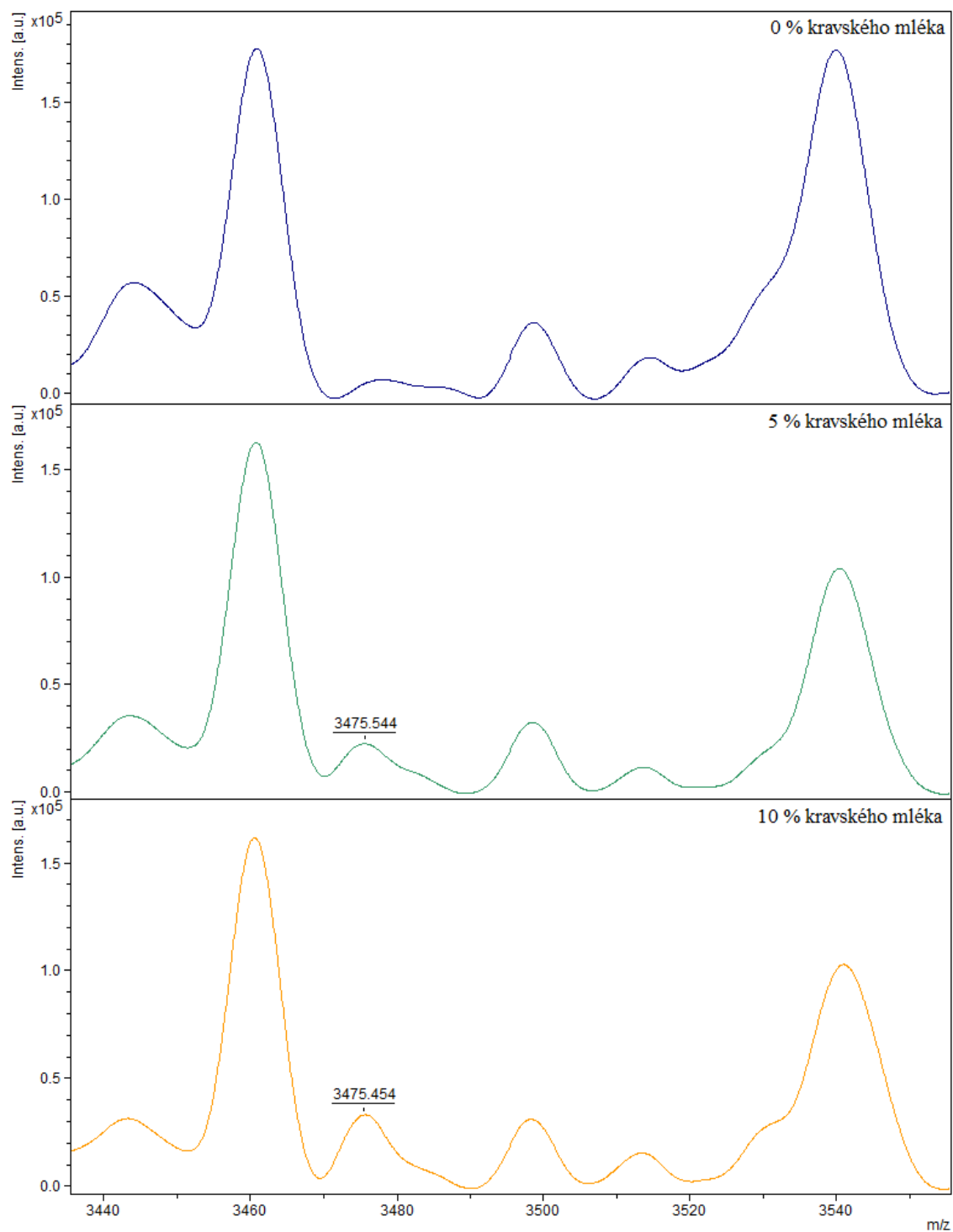
## 5.2 Kozí mléko

Stejně jako u ovčího mléka byla i u mléka kozího srovnána spektra čistého kozího mléka se spektry s různými koncentracemi mléka kravského. I v tomto případě většina markerů charakteristických pro kravské mléko zanikla, v kozím mléce s přídatkem 10 % mléka kravského byly podobně jako u ovčího mléka jasně detekovány pouze dva markery, pík o  $m/z$  2458,19 a  $m/z$  3475,34. Nicméně, intenzita nejdominantnějšího markeru kravského mléka o  $m/z$  2458,19 byla v tomto případě slabší a jako lepší marker se jevil pík o  $m/z$  3475,34. Proto bylo dále několik sad nafalšovaného kozího mléka pro možnost odhalení nižšího procenta proměřeno v rozsahu od 2700 do 3600 Da. Detailnější analýza ve vyšším rozlišení ukázala, že se pík o  $m/z$  3475,34 v čistém kozím mléce ani při tomto rozlišení nevyskytuje (obr. 9). Na základě této skutečnosti tak mohl být po porovnání spekter s různými koncentracemi tento

pík slabě detekován i v nafalšovaném mléce s přidavkem 5 %, což znázorňuje obrázek 10. Nižší koncentrace detekovány nebyly.



**Obr. 9:** Porovnání spekter čistého kozího a kravského mléka v rozsahu od 2700 do 3600 Da.



**Obr. 10:** Detailnější srovnání spekter kozího mléka s různými koncentracemi mléka kravského v rozsahu od 2700 do 3600 Da.

## 6 Diskuze

Zajišťování kvality a bezpečnosti potravin je v dnešní době velmi aktuálním tématem. Očekává se, že výrobky budou mít požadovanou chuť, vůni, texturu, vzhled, krom toho by měly být zdravotně nezávadné a složení by mělo být v souladu s legislativou. Není tomu jinak ani u mléka a mléčných výrobků. Ověřování druhové autentičnosti mléka pomocí rychlých a účinných analytických metod je dnes zcela zásadním krokem, neboť mnoho spotřebitelů využívá zdravotních výhod kozího nebo ovčího mléka a jejich úmyslné falšování nebo nezamýšlená kontaminace mlékem kravským by mohla vést k nechtěným zdravotním komplikacím. Za tímto účelem byla v této diplomové práci testována metoda MALDI-TOF, která umožňuje porovnat iontové profily jednotlivých mlék a na základě charakteristických markerů tato mléka rozlišit.

Spektra MALDI lze použít ke stanovení proteinových složek mléka identifikováním různých píků a na základě již dříve publikovaných údajů o molekulových hmotnostech lze tyto píky přiřadit ke konkrétním proteinům. Stejně proteiny mohou v různých typech mléka vykazovat malé rozdíly v molekulové hmotnosti, a tedy i přesné poloze píku, je to způsobeno genetickými faktory a polymorfismem, rozhodující je i zpracování mléka, kdy může strukturu jednotlivých proteinů ovlivnit tepelná denaturace a proteolýza (Nicolau et al. 2011).

V této práci byla porovnávána hmotnostní spektra kravského, kozího a ovčího mléka ošetřeného vysokou pasterací. Spektra vykazují vysokou rozmanitost, což je pravděpodobně způsobeno právě účinkem tepelného ošetření. Z naměřených výsledků je jasně patrné, že se mléka svým profilem liší, tato odlišnost je dána zejména genetickými vlivy. Každé mléko se vyznačuje několika specifickými markery, které se liší svojí velikostí a intenzitou. A právě intenzita a velikost nalezených píků, zejména těch v kravském mléce, hrála při prokazování falšování v našem testování velkou roli. Ačkoliv bylo pro kravské mléko nalezeno až 10 charakteristických markerů, pouze čtyři z nich byly jasně detekovatelné i v nafalšovaném mléce s přidavkem 10 % mléka kravského – markery o  $m/z$  2458,19,  $m/z$  2614,14 a  $m/z$  2761,51 pro ovčí mléko, markery o  $m/z$  2458,19 a  $m/z$  3475,34 pro mléko kozí. Všechny tyto píky mají ve spektrech čistého kravského mléka vysokou intenzitu, jsou jasně zřetelné, pík o  $m/z$  2458,19, který se podařilo detekovat jak v mléce ovčím, tak v mléce kozím, je dokonce píkem s nejvyšší intenzitou z celého spektra. Celkově naše data získaná ze spekter ukazují, že vysoká rozlišovací schopnost analýzy MALDI-TOF umožňuje snadno a jednoduše mléka od sebe navzájem odlišit, což potvrzují i výstupy z PCA analýzy a dendrogramu, kdy byly pro každé mléko vygenerovány tři samostatné shluky.

Nutno podotknout, že naše testování bylo zaměřeno na oblast od 500 do 4000 Da. V tomto případě nalezené markery představují peptidy, vzniklé pravděpodobně v důsledku proteolýzy proteinů o vyšší molekulové hmotnosti. V současnosti existuje velice málo studií prozkoumávající právě tuto oblast, většina studií zatím publikovaných k tématu ověřování druhové autenticity za použití metody MALDI-TOF prováděla testování v mnohem větším rozsahu detekce, od 5000 do 20000 až 30000 Da. V těchto případech píky o  $m/z$  kolem 9000 představují proteoso-peptonovou frakci, pozorovanou u všech typů mlék v podobné poloze, a píky v oblasti od  $m/z$  13000 po  $m/z$  19000 reprezentují dva hlavní syrovátkové proteiny mléka  $\alpha$ -laktalbumin a  $\beta$ -laktoglobulin, pro každý druh mléka umístěné v jiné poloze (Nicolau et al. 2011). Většina studií pro odhalování falšovaného mléka využívá právě těchto

dvou markerů, kdy se v některých pracích podařilo detekovat i velmi nízké koncentrace kravského mléka, což se v námi nastaveném limitu detekce zatím prokázat nepovedlo.

Využití  $\alpha$ -laktalbuminu a  $\beta$ -laktoglobulinu jakožto markerů pro detekci falšování ve své studii uplatňují Cunsolo et al. (2013), kteří odhalovali přítomnost kravského a kozího mléka v mléce oslím. Signál kravského  $\alpha$ -laktalbuminu byl jasně rozeznatelný ve vzorcích oslího mléka obsahujících 10 % kravského mléka, píky reprezentující kravský  $\beta$ -laktoglobulin byly viditelné až do limitu 2 %. Pro kozí mléko byly limity ještě nižší, kdy bylo detekováno 0,5 %. Tato studie tak prokázala, že MALDI-TOF je schopna rozpoznat kontaminaci na hranici 0,5-2 %. Velmi žádoucí je odhalení mísení různých druhů mléka s detekcí 10 %, jelikož takovýto přírůstek je již považován za úmyslný.

Možnost použít  $\alpha$ -laktalbumin a  $\beta$ -laktoglobulin jako charakteristické markery pro detekci falšování popisují i Nicolau et al. (2011), Cozzolino et al. (2001) tyto markery aplikovali při vývoji metody pro odhalování přítomnosti kravského mléka ve vzorcích ovčího a buvolího mléka používaných při průmyslové výrobě sýrů. Pro testování byly podobně jako v naší práci připraveny směsi s různými procenty kravského mléka. Pro ovčí mléko se jako důležitý marker ukázal  $\beta$ -laktoglobulin, s detekčním limitem 10 %, pro analýzu buvolího mléka bylo využito  $\alpha$ -laktalbuminu, kdy byly signály rozeznatelné při hladině 5 %.

Ve studii od Russa et al. (2016) byly analyzovány vzorky buvolí ricotty nafalšované kravským mlékem. Testování bylo zaměřeno na peptidové profily, kdy byly proteiny enzymově rozštěpeny působením trypsinu. Takto vzniklá spektra se v porovnání s našimi analyzovanými spektry úplně liší, v tomto případě vzniklé peptidové štěpy připadají jiným  $m/z$  hodnotám, byl nalezen druhově specifický peptidový marker o  $m/z$  1658,82 náležící proteinu  $\beta$ -laktoglobulinu. Za využití tohoto markeru bylo možno detekovat přítomnost kravského mléka při koncentracích 5 %. Na proteolytickém štěpení proteinů byla postavena i studie od Calvana et al. (2012b), kteří analyzovali binární směsi kozího a ovčího mléka naředěné různými procenty kravského mléka. Pro získání peptidových profilů byly vzorky mléka stejně jako v předchozí studii podrobeny trypsinovému štěpení a byly nalezeny markery kravského mléka o  $m/z$  1337,69,  $m/z$  1384,72 a  $m/z$  1759,94, které se podařilo detekovat v ovčím i kozím mléce při koncentraci 5 %. V tomto případě se jednalo o štěpy pocházející z  $\alpha_{s1}$ -kaseinu. Tato studie navíc také potvrdila, že relativní intenzita peptidových markerů roste se zvyšující se úrovní falšování, což jsme částečně prokázali i v naší práci.

Jedny z nejnovějších studií dokonce využívají peptidového profilování k hledání typických biomarkerů pro mléka s prodlouženou trvanlivostí (Dalabasmaz & Pischetsrieder 2019) nebo mléka ošetřená UHT (ultra-high temperature processing) záhřevem (Dalabasmaz et al. 2019). Na základě typických peptidových markerů poté Dalabasmaz et al. (2019) sledovali proteolýzu během skladování mléka. V obou případech bylo využito velmi podobného rozsahu detekce do 5000 Da a byly nalezeny markery jak pro mléka s prodlouženou trvanlivostí ( $m/z$  2014,0,  $m/z$  2055,1,  $m/z$  2216,1 a  $m/z$  2391,2) tak pro mléka podrobená UHT záhřevu ( $m/z$  1668,9,  $m/z$  1782 a  $m/z$  2696,4). Markery se svými hodnotami  $m/z$  liší, jsou odlišné i v porovnání s našimi nalezenými píky. S ohledem na tyto studie by tak mohlo být konstatováno, že námi nalezené biomarkery by mohly být charakteristickými markery pro mléka ošetřená vysokou pasterací.

Celá řada autorů se shoduje, že MALDI-TOF je velice slibnou technikou pro odhalování falšování. V současnosti sice pro detekci druhové autentičnosti mléka existuje velká škála



metod, od metod spektroskopických, chromatografických, imunochemických až po techniky založené na analýze DNA, málo z nich však dosahuje tak velké rychlosti analýzy jako námi zvolená metoda MALDI-TOF. Samotné proměření jednoho spotu trvá pouze pár desítek sekund, v závislosti na rozsahu detekce a počtu opakování, je tudíž velmi výhodné analyzovat i větší množství vzorků. Navíc, ve většině studií testující metodu MALDI-TOF, je detekční limit srovnatelný s limitem těchto pracnějších a časově náročnějších metod používaných v současné době. Velmi nízký detekční limit (0,5 %) prokázala např. studie od Di Girolama et al. (2014), kteří porovnáváním profilů v rozsahu od 2-25 kDa posuzovali pravost oslího a kozího mléka. Vzorky oslího a kozího mléka byly naředěny v různém poměru mlékem kravským a za využití PCA a Pearsonovy korelační analýzy tato studie prokázala, že MALDI-TOF představuje rychlou a velmi citlivou metodu pro odhalování falšování na velmi nízkých úrovních.

I proto by MALDI-TOF mohla být vhodnou metodou pro rutinní kontroly kvality mléka v mlékárenském průmyslu. Velmi rychlá a jednoduchá je i samotná příprava vzorku, kdy se vzorek pouze nařadí deionizovanou vodou a ihned se může nanést na destičku a překrýt matricí. Přednost MALDI v kombinaci s TOF analyzátozem spočívá také ve vysoké citlivosti a možnosti dosažení vysokého rozlišení.

I přes výhody, která MALDI-TOF nabízí, mohou nastat situace, kdy je kvalita výsledného spektra snížena. Je tedy i třeba brát v potaz faktory, které by mohly tuto skutečnost ovlivnit. V první řadě je to nanášení vzorku na spot, kdy je nutné nanést rovnoměrnou vrstvu a před samotným nanesením ještě vzorek řádně zvortexovat. Naše testování prokázalo, že výslednou kvalitu spekter značně ovlivňuje i správná příprava a ředění vzorku, kdy se přílišné naředění ukázalo jako neefektivní a některé píky tak nebyly vidět.

Klíčovým faktorem je i výběr správné matrice. Rozdílná povaha jednotlivých matric způsobuje odlišnou krystalizaci a ionizaci látek, vzniklé směsné krystaly by měly být co nejmenší velikosti a tvořit na destičce souvislou vrstvu. Nestejnorodá krystalizace poté komplikuje zacílení laseru a tím je ztíženo následné získávání dat. I pro tyto důvody byla v naší práci použita matrice HCCA, která vykazuje dobrou schopnost ionizace právě v oblasti peptidů, na něž bylo naše testování zaměřeno. Volbu správné matrice, jako jeden z hlavních faktorů ovlivňujících kvalitu spekter, zmiňuje i studie od Calvana et al. (2012b), kteří pro detekci využili dokonce zcela novou matrici,  $\alpha$ -kyano-4-chlorcinamovou kyselinu, umožňující detekci peptidů s vyšší citlivostí ve srovnání s tradičně používanou matricí HCCA. Jiné studie (Cozzolino et al. 2001; Nicolau et al. 2011; Cunsolo et al. 2013; Di Girolamo et al. 2014) v experimentech využívají jako matrici SA, ve všech těchto pracích se podařilo detekovat i přídavky nižší jak 10 % procent. Je tedy možné, že použití této matrice místo námi zvolené HCCA by i nám umožnilo odhalit přítomnost nižších koncentrací kravského mléka.

Nicméně, i když se v této práci prozatím nižší přídavky kravského mléka nepovedlo prokázat, je důležité, že jsme námi testovanou a vyvíjenou metodou schopni detekovat v obou typech mléka přídavek 10 %, což je hranice, pod kterou by výrobce z důvodu nízkého finančního profitu již pravděpodobně nefalšoval. Pro zdravotní bezpečnost, zejména s již zmiňovanou CMPA, by do budoucna bylo vhodné detekovat i nižší přídavky, k dalšímu testování by proto mohla být využita jiná matrice nebo by detailněji ve vyšším rozlišení mohla být proměřena ještě oblast píků o  $m/z$  2614,14 a  $m/z$  2761,51, které podrobněji zatím analyzovány nebyly.

## 7 Závěr

V této diplomové práci byla vyvíjena a testována metoda MALDI-TOF, jakožto nová a spolehlivá metoda k detekci falšování kozího a ovčího mléka mlékem kravským. Celkem bylo proměřeno 48 sad vzorků kozího a ovčího mléka, které byly porušeny různým přídatkem mléka kravského.

Testování bylo zaměřeno na oblast od 500 do 4000 Da. Výsledky jasně prokázaly rozdílnost iontových profilů jednotlivých mlék, kde bylo pro každé mléko nalezeno několik charakteristických biomarkerů. Tyto markery představují určité peptidy vyskytující se v kravském, kozím a ovčím mléce.

Pro prokázání falšování se jako důležité ukázaly čtyři markery kravského mléka – markery o  $m/z$  2458,19,  $m/z$  2614,14 a  $m/z$  2761,51 pro ovčí mléko, markery o  $m/z$  2458,19 a  $m/z$  3475,34 pro mléko kozí. Díky těmto markerům se podařilo u obou mlék detekovat přídatek 10 % mléka kravského, za využití markeru o  $m/z$  3475,34 bylo v kozím mléce detekováno i 5 %. Nižší přídatky prozatím prokázány nebyly.

I přesto, že se v námi nastaveném rozsahu detekce zatím nižší přídatky mléka kravského odhalit nepodařilo, může být konstatováno, že námi vyvíjená metoda má veliký potenciál jakožto vhodná a spolehlivá metoda pro prokazování falšování. Je však zapotřebí dalšího testování. Pro rychlou a jednoduchou přípravu vzorku by tato metoda mohla být i vhodnou metodou pro rutinní analýzy.

## 8 Seznam použité literatury

- Akhatova D, Zdeňková K, Koncošová M, Demnerová K. 2018. Aktuální Metody Používané Pro Odhalení Falšování Masa. *Chemické listy* **112**:207–214.
- Arora R, Bhojak N, Joshi R. 2013. Comparative aspects of goat and cow milk. *International Journal of Engineering and Science Invention* **2**:7–10.
- Atanasova J, Ivanova I. 2010. Antibacterial peptides from goat and sheep milk proteins. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* **24**:1799–1803.
- Azad T, Ahmed S. 2016. Common milk adulteration and their detection techniques. *International Journal of Food Contamination* **3**:22.
- Balthazar CF et al. 2017. Sheep Milk: Physicochemical Characteristics and Relevance for Functional Food Development. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **16**:247–262.
- Balthazar CF, Conte Júnior CA, Moraes J, Costa MP, Raices RSL, Franco RM, Cruz AG, Silva ACO. 2016. Physicochemical evaluation of sheep milk yogurts containing different levels of inulin. *Journal of Dairy Science* **99**:4160–4168.
- Bansal S, Singh A, Mangal M, Mangal AK, Kumar S. 2017. Food adulteration: Sources, health risks, and detection methods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **57**:1174–1189.
- Barlowska J, Szwajkowska 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.
- Bernacka H. 2011. Health-promoting properties of goat milk. *Medycyna Weterynaryjna* **67**:507–511.
- Bramanti E, Sortino C, Onor M, Beni F, Raspi G. 2003. Separation and determination of denatured  $\alpha$ s1-,  $\alpha$ s2-,  $\beta$ - and  $\kappa$ -caseins by hydrophobic interaction chromatography in cows', ewes' and goats' milk, milk mixtures and cheeses. *Journal of Chromatography A* **994**:59–74.
- Bruker. 2016. Instructions for Use Peptide Calibration Standard II. Bruker Daltonik GmbH, Germany. Available from [https://www.bruker.com/fileadmin/user\\_upload/8-PDF-Docs/Separations\\_MassSpectrometry/InstructionForUse/IFU\\_8222570\\_Peptide\\_Calibration\\_Standard\\_II\\_Revision\\_B.pdf](https://www.bruker.com/fileadmin/user_upload/8-PDF-Docs/Separations_MassSpectrometry/InstructionForUse/IFU_8222570_Peptide_Calibration_Standard_II_Revision_B.pdf) (accessed March 2020).
- Calvano CD, De Ceglie C, Aresta A, Facchini LA, Zambonin CG. 2013. MALDI-TOF mass spectrometric determination of intact phospholipids as markers of illegal bovine milk adulteration of high-quality milk. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **405**:1641–1649.
- Calvano CD, De Ceglie C, D'Accolti L, Zambonin CG. 2012a. MALDI-TOF mass spectrometry detection of extra-virgin olive oil adulteration with hazelnut oil by analysis of phospholipids using an ionic liquid as matrix and extraction solvent. *Food Chemistry* **134**:1192–1198.

- Calvano CD, De Ceglie C, Monopoli A, Zambonin CG. 2012b. Detection of sheep and goat milk adulterations by direct MALDI-TOF MS analysis of milk tryptic digests. *Journal of Mass Spectrometry* **47**:1141–1149.
- Ceballos LS, Morales ER, de la Torre Adarve G, Castro JD, Martínez LP, Sampelayo MRS. 2009. Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology. *Journal of Food Composition and Analysis* **22**:322–329.
- Chávez NA, Jauregui J, Palomares LA, Macías KE, Jiménez M, Salinas E. 2012. A highly sensitive sandwich ELISA for the determination of glycomacropeptide to detect liquid whey in raw milk. *Dairy Science and Technology* **92**:121–132.
- Chen H, Tan C, Lin Z, Wu T. 2017. Detection of melamine adulteration in milk by near-infrared spectroscopy and one-class partial least squares. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **173**:832–836.
- Chen Q, Ke X, Zhang JS, Lai SY, Fang F, Mo WM, Ren YP. 2016. Proteomics method to quantify the percentage of cow, goat, and sheep milks in raw materials for dairy products. *Journal of Dairy Science* **99**:9483–9492.
- Claeys WL, Verraes C, Cardoen S, De Block J, Huyghebaert A, Raes K, Dewettinck K, Herman L. 2014. Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits. *Food Control* **42**:188–201.
- Colak H, Aydin A, Nazli B, Ergun O. 2006. Detection of presence of cow's milk in sheep's cheeses by immunochromatography. *Food Control* **17**:905–908.
- Cozzolino R, Passalacqua S, Salemi S, Malvagna P, Spina E, Garozzo D. 2001. Identification of adulteration in milk by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **36**:1031–1037.
- Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. 2012. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews* **36**:380–407.
- Cunsolo V, Muccilli V, Saletti R, Foti S. 2013. MALDI-TOF mass spectrometry for the monitoring of she-donkey's milk contamination or adulteration. *Journal of Mass Spectrometry* **48**:148–153.
- Czerwenka C, Muller L, Lindner W. 2010. Detection of the adulteration of water buffalo milk and mozzarella with cow's milk by liquid chromatography-mass spectrometry analysis of  $\beta$ -lactoglobulin variants. *Food Chemistry* **122**:901–908.
- Čížková H, Ševčík R, Rajchl A, Pivoňka J, Voldřich M. 2012. Trendy v autenticitě potravin a v přístupech k detekci falšování. *Chemicke Listy* **106**:903–910.
- Dalabasmaz S, Dittrich D, Kellner I, Drewello T, Pischetsrieder M. 2019. Identification of peptides reflecting the storage of UHT milk by MALDI-TOF-MS peptide profiling. *Journal of Proteomics* **207**.
- Dalabasmaz S, Pischetsrieder M. 2019. Design of a Prediction Model for the Differentiation of Pasteurized Milk from Heated ESL Milk by Peptide Profiling. *Proteomics* **19**:1–7.

- Das S, Goswami B, Biswas K. 2016. Milk Adulteration and Detection: A Review. *Sensor Letters* **14**:4–18.
- Di Girolamo F, Masotti A, Salvatori G, Scapaticci M, Muraca M, Putignani L. 2014. A sensitive and effective proteomic approach to identify she-donkey's and goat's milk adulterations by MALDI-TOF MS fingerprinting. *International Journal of Molecular Sciences* **15**:13697–13719.
- Dreisewerd K. 2003. The desorption process in MALDI. *Chemical Reviews* **103**:395–425.
- Dvořáková P, Hernychová L, Vojtěšek B. 2014. Analýza proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie Analysis of Protein Using Mass Spectrometry. *Klin Onkol* **27**:104–109.
- El-Salam MHA, El-Shibiny S. 2013. Bioactive Peptides of Buffalo, Camel, Goat, Sheep, Mare, and Yak Milks and Milk Products. *Food Reviews International* **29**:1–23.
- Ferreira IMPLV, Caçote H. 2003. Detection and quantification of bovine, ovine and caprine milk percentages in protected denomination of origin cheeses by reversed-phase high-performance liquid chromatography of beta-lactoglobulins. *Journal of Chromatography A* **1015**:111–118.
- Fontecha J, M. Rodriguez-Alcala L, V. Calvo M, Juarez M. 2011. Bioactive Milk Lipids. *Current Nutrition & Food Science* **7**:155–159.
- Fox PF, Uniacke-Lowe T, McSweeney PLH, O'Mahony JA. 2015. *Dairy Chemistry and Biochemistry*, Second Edition. Springer International Publishing Switzerland.
- Friedecký D, Lemr K. 2012. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus* **20**:152–157.
- Gaucheron F. 2005. The minerals of milk. *Reproduction Nutrition Development*. **45**:473–483.
- Golinelli LP, Carvalho AC, Casaes RS, Lopes CSC, Deliza R, Paschoalin VMF, Silva JT. 2014. Sensory analysis and species-specific PCR detect bovine milk adulteration of frescal (fresh) goat cheese. *Journal of Dairy Science* **97**:6693–6699.
- Haasnoot W, Du Pré JG. 2007. Luminex-based triplex immunoassay for the simultaneous detection of soy, pea, and soluble wheat proteins in milk powder. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**:3771–3777.
- Haenlein GFW. 2004. Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Research* **51**:155–163.
- Haenlein GFW, Wendorff WL. 2006. Sheep Milk. Pages 137–194 in Park YW, Haenlein GFW, editors. *Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals*. Blackwell Publishing.
- Hanuš O, Němečková I, Rysová L, Legarová V, Kopecký J. 2019. Možnosti identifikace falšování syrového mléka. *Mlékařské listy* **30**: 1–7.
- Haug A, Høstmark AT, Harstad OM. 2007. Bovine milk in human nutrition - A review. *Lipids in Health and Disease* **6**:1–16.
- Holsinger VH. 1997. Physical and chemical properties of lactose. Pages 1–38 in Fox PF, editor. *Advanced Dairy Chemistry Volume 3*, Second Edition. Springer Science+Business Media, Dordrecht.

- Huang HY, Shih YC, Chen YC. 2002. Determining eight colorants in milk beverages by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **959**:317–325.
- Jergović AM, Peršurić Ž, Saftić L, Kraljević Pavelić S. 2017. Evaluation of MALDI-TOF/MS Technology in Olive Oil Adulteration. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society* **94**:749–757.
- Jurinke C, Oeth P, van den Boom D. 2004. MALDI-TOF mass spectrometry: A Versatile Tool for High-Performance DNA Analysis. *Molecular Biotechnology* **26(2)**:147–164.
- Karas M, Hillenkamp F. 1988. Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10 000 Daltons. *Analytical Chemistry* **60**:2299–2301.
- Kasemsumran S, Thanapase W, Kiatsoonthon A. 2007. Feasibility of near-infrared spectroscopy to detect and to quantify adulterants in cow milk. *Analytical Sciences* **23**:907–910.
- Khan KM, Krishna H, Majumder SK, Gupta PK. 2015. Detection of Urea Adulteration in Milk Using Near-Infrared Raman Spectroscopy. *Food Analytical Methods* **8**:93–102.
- Kopáček J. 2014. Jak poznáme kvalitu? Mléko a mléčné výrobky. Sdružení českých spotřebitelů a Potravinářská komora ČR, Praha.
- Krusá M, Torre M, Marina LM. 2000. A reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the determination of soya bean proteins in bovine milks. *Analytical Chemistry* **72**:1814–1818.
- Kuchník J, Šustová K, Milerski M. 2011. Ovčí mléko – minoritní, ale zajímavý produkt. *Výživa a potraviny*. **66**:46–49.
- Lara-Villoslada F, Olivares M, Xaus J. 2005. The balance between caseins and whey proteins in cow's milk determines its allergenicity. *Journal of Dairy Science* **88**:1654–1660.
- Liland KH, Mevik BH, Rukke EO, Almøy T, Isaksson T. 2009. Quantitative whole spectrum analysis with MALDI-TOF MS, Part II: Determining the concentration of milk in mixtures. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **99**:39–48.
- Månsson LH. 2008. Fatty acids in bovine milk fat. *Food and Nutrition Research* **52**:4–7.
- Marvin LF, Roberts MA, Fay LB. 2003. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta* **337**:11–21.
- Maškova E, Paulíčková I. 2006. PCR-based detection of cow's milk in goat and sheep cheeses marketed in the Czech Republic. *Czech Journal of Food Sciences* **24**:127–132.
- Masoodi TA, Shafi G. 2010. Analysis of casein alpha S1 & S2 proteins from different mammalian species. *Bioinformation* **4**:430–435.
- Ménard O, Ahmad S, Rousseau F, Briard-Bion V, Gaucheron F, Lopez C. 2010. Buffalo vs. cow milk fat globules: Size distribution, zeta-potential, compositions in total fatty acids and in polar lipids from the milk fat globule membrane. *Food Chemistry* **120**:544–551.
- Molik E, Bonczar G, Misztal T, Zebrowska A, Zieba D. 2012. The effect of the photoperiod and exogenous melatonin on the protein content in sheep milk. Pages 325–340 in Hurley

- WL, editor. Milk protein. InTech, Rijeka, Croatia.
- Molkentin J. 2000. Occurrence and biochemical characteristics of natural bioactive substances in bovine milk lipids. *British Journal of Nutrition* **84**:47–53.
- Moore JC, Spink J, Lipp M. 2012. Development and Application of a Database of Food Ingredient Fraud and Economically Motivated Adulteration from 1980 to 2010. *Journal of Food Science* **77**.
- Nascimento CF, Santos PM, Pereira-Filho ER, Rocha FRP. 2017. Recent advances on determination of milk adulterants. *Food Chemistry* **221**:1232–1244.
- Navrátilová P, Králová (Dračková) M, Janštová B, Přidalová H, Cupáková Š, Vorlová L. 2012. *Higiiena produkce mléka*. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Brno.
- Nicolaou N, Xu Y, Goodacre R. 2010. Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis for the detection and quantification of different milk species. *Journal of Dairy Science* **93**:5651–5660.
- Nicolaou N, Xu Y, Goodacre R. 2011. MALDI-MS and multivariate analysis for the detection and quantification of different milk species. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **399**:3491–3502.
- Osman A, Aradaib I, Musa O. 2013. Detection of Caprine-specific Nucleic Acid Sequences in Goat Milk Using Polymerase Chain Reaction. *Materia Socio Medica* **25**:105.
- Park YW. 2009. Bioactive Components in Goat Milk. Pages 43–82 in Park YW, editor. *Bioactive Components in Milk and Dairy Products*. Wiley-Blackwell.
- Park YW. 2017. Goat Milk – Chemistry and Nutrition. Pages 34–58 in Park YW, Haenlein GFW, Wendorff WL, editors. *Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals*, Second Edition. John Wiley & Sons, Ltd.
- Park YW, Juárez M, Ramos M, Haenlein GFW. 2007. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research* **68**:88–113.
- Parlament České republiky. 1997. Zákon č. 110/1997 Sb. ze dne 24. dubna 1997 o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů. Pages 2178–2188 in *Sbírka zákonů České republiky, 1997, částka 38*. Česká republika.
- Patel R. 2015. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. *Clinical Chemistry* **61**:100–111.
- Pereira PC. 2014. Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition* **30**:619–627.
- Pesic M, Barac M, Vrvic M, Ristic N, Macej O, Stanojevic S. 2011. Qualitative and quantitative analysis of bovine milk adulteration in caprine and ovine milks using native-PAGE. *Food Chemistry* **125**:1443–1449.
- Poonia A, Jha A, Sharma R, Singh HB, Rai AK, Sharma N. 2017. Detection of adulteration in milk: A review. *International Journal of Dairy Technology* **70**:23–42.
- Raynal-Ljutovac K, Lagriffoul G, Paccard P, Guillet I, Chilliard Y. 2008. Composition of goat

- and sheep milk products: An update. *Small Ruminant Research* **79**:57–72.
- Raynal-Ljutovac K, Park YW, Gaucheron F, Bouhallab S. 2007. Heat stability and enzymatic modifications of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research* **68**:207–220.
- Recio I, de la Fuente MA, Juárez M, Ramos M. 2009. Bioactive Components in Sheep Milk. Pages 83–104 in Park YW, editor. *Bioactive Components in Milk and Dairy Products*. Wiley-Blackwell.
- Reis Lima MJ, Fernandes SMV, Rangel AOSS. 2004. Sequential injection titration of chloride in milk with potentiometric detection. *Food Control* **15**:609–613.
- Revilla I, Escuredo O, González-Martín MI, Palacios C. 2017. Fatty acids and fat-soluble vitamins in ewe's milk predicted by near infrared reflectance spectroscopy. Determination of seasonality. *Food Chemistry* **214**:468–477.
- Rodríguez N, Ortiz MC, Sarabia L, Gredilla E. 2010. Analysis of protein chromatographic profiles joint to partial least squares to detect adulterations in milk mixtures and cheeses. *Talanta* **81**:255–264.
- Rudzki E. 2005. Food allergy. Part I. Bovine milk (in Polish). *Advances in Dermatology and Allergology*. **22**(2):77–80.
- Russo R, Rega C, Chambery A. 2016. Rapid detection of water buffalo ricotta adulteration or contamination by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **30**:497–503.
- Sabahelkhier MK, Faten MM, Omer FI. 2012. Comparative Determination of Biochemical Constituents between Animals (Goat, Sheep, Cow and Camel) Milk with Human Milk. *Research Journal of Recent Sciences* **1**:69–71.
- Sassi M, Arena S, Scaloni A. 2015. MALDI-TOF-MS Platform for Integrated Proteomic and Peptidomic Profiling of Milk Samples Allows Rapid Detection of Food Adulterations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **63**:6157–6171.
- Seki N, Saito H. 2012. Lactose as a source for lactulose and other functional lactose derivatives. *International Dairy Journal* **22**:110–115.
- Selvaggi M, Laudadio V, Dario C, Tufarelli V. 2014. Major proteins in goat milk: An updated overview on genetic variability. *Molecular Biology Reports* **41**:1035–1048.
- Singh P, Gandhi N. 2015. Milk Preservatives and Adulterants: Processing, Regulatory and Safety Issues. *Food Reviews International* **31**:236–261.
- Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Viridi JS. 2015. MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology* **6**:1–16.
- Singuluri H, Sukumaran M. 2014. Milk Adulteration in Hyderabad, India – A Comparative Study on the Levels of Different Adulterants Present in Milk. *Journal of Chromatography & Separation Techniques* **5**:1–3.
- Song H, Xue H, Han Y. 2011. Detection of cow's milk in Shaanxi goat's milk with an ELISA



- assay. *Food Control* **22**:883–887.
- Spuergin P, Walter M, Schiltz E, Deichmann K, Forster J, Mueller H. 1997. Allergenicity of  $\alpha$ -caseins from cow, sheep, and goat. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* **52**:293–298.
- Stănciuc Sava N, Râpeanu G. 2010. Identification of adulterated sheep and goat cheeses marketed in Romania by immunocromatographic assay. *Food and Agricultural Immunology* **21**:157–164.
- SZPI. 2015. Falšování potravin – aktuální problém? Státní zemědělská a potravinářská inspekce. Available from <https://www.potravinainfo.cz/33/falsovani-potravin-aktualni-problem-uniqueidgOkE4NvrWuMEMvw3uZDmFulIBqmLiA0mrsZzcKklGxc/?query=fal%B9ov%E1n%ED&serp=1> (accessed November 2019).
- Volný M. 2011. Hmotnostní spektrometrie: Přehled zajímavých oblastí aktuálního vývoje. *Chemické Listy* **105**:230–236.
- Wieser A, Schneider L, Jung J, Schubert S. 2012. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). *Applied Microbiology and Biotechnology* **93**:965–974.
- Zachar P, Novotný J, Marcinčáková D, Šoltés M, Novíkmecová M, Kasarda R. 2011. Analytical methods for the species identification of milk and milk products. *Mlékarstvo* **61**:199–207.
- Zeleňáková L, Golian J, Zajác P. 2008. Application of ELISA tests for the detection of goat milk in sheep milk. *Milchwissenschaft* **63**:137–141.
- Zeleňáková L, Šesták M, Židek R. 2009. Monitoring of sheep milk and milk products adulteration on common european food market. *Potravinářstvo* **3**(2):69–73.
- Zeleňáková L, Židek R, Čanigová M. 2010. Reliability of cow casein quantitation in sheep milk and cheese by ELISA method. *Journal of Food Physics* **23**:22–26.
- Zhang LG, Zhang X, Ni LJ, Xue Z Bin, Gu X, Huang SX. 2014. Rapid identification of adulterated cow milk by non-linear pattern recognition methods based on near infrared spectroscopy. *Food Chemistry* **145**:342–348.

## 9 Seznam použitých zkratek

<b>AMK</b>	aminokyselina
<b>AN</b>	acetonitril
<b>CLA</b>	konjugovaná kyselina linolová (conjugated linoleic acid)
<b>CMPA</b>	alergie na bílkoviny kravského mléka (cow milk protein allergy)
<b>ČR</b>	Česká republika
<b>DHB</b>	2,5-dihydroxybenzoová kyselina
<b>DNA</b>	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
<b>ELISA</b>	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
<b>FA</b>	ferulová kyselina (ferulic acid)
<b>FSTA</b>	Food Science and Technology Abstracts
<b>GC</b>	plynová chromatografie (gas chromatography)
<b>HCCA</b>	$\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina
<b>HDL</b>	high-density lipoprotein
<b>HPA</b>	3-hydroxypikolinová kyselina
<b>HPLC</b>	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
<b>LC</b>	kapalinová chromatografie (liquid chromatography)
<b>LDL</b>	low-density lipoprotein
<b>MALDI</b>	desorpce/ionizace pomocí laseru za účasti matrice (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization)
<b>MIR</b>	střední infračervená oblast (middle-infrared)
<b>MK</b>	mastná kyselina
<b>MPA</b>	alergie na mléčnou bílkovinu (milk protein allergy)
<b>MS</b>	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
<b><i>m/z</i></b>	poměr hmotnosti iontu a velikosti jeho náboje
<b>NIR</b>	blízká infračervená oblast (near-infrared)
<b>OR</b>	organické rozpouštědlo
<b>PAGE</b>	polyakrylamidová gelová elektroforéza (polyacrylamide gel electrophoresis)
<b>PCA</b>	analýza hlavních komponent (principal component analysis)
<b>PCR</b>	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
<b>SA</b>	sinapová kyselina (sinapic acid)
<b>SD</b>	směrodatná odchylka
<b>SZPI</b>	Státní zemědělská a potravinářská inspekce
<b>TAG</b>	triacylglyceroly
<b>TFA</b>	trifluoroctová kyselina (trifluoroacetic acid)
<b>TOF</b>	analyzátor doby letu (time of flight)
<b>UHT</b>	ultra-high temperature processing
<b>UV</b>	ultrafialové záření
<b>VÚM</b>	Výzkumný ústav mlékárenský, s.r.o.

## 10 Seznam použitých obrázků a tabulek

Obr. 1: Schématické znázornění MALDI-TOF .....	24
Obr. 2: Ionizace MALDI .....	26
Obr. 3: Schéma TOF analyzátoru .....	27
Obr. 4: Porovnání spekter čistého kravského, kozího a ovčího mléka v rozsahu od 500 do 4000 Da.....	32
Obr. 5: Dendrogram analýzy hlavních komponent pro vybrané vzorky kravského, kozího a ovčího mléka .....	35
Obr. 6: Shluková analýza klasifikující jednotlivé druhy mléka na základě podobnosti do tří shluků.....	36
Obr. 7: Porovnání spekter čistého ovčího a kravského mléka v rozsahu od 2360 do 2600 Da .....	37
Obr. 8: Porovnání spekter ovčího mléka s různým přídavkem mléka kravského v rozsahu od 2360 do 2600 Da.....	38
Obr. 9: Porovnání spekter čistého kozího a kravského mléka v rozsahu od 2700 do 3600 Da .....	39
Obr. 10: Detailnější srovnání spekter kozího mléka s různými koncentracemi mléka kravského v rozsahu od 2700 do 3600 Da .....	40
Tab. 1: Porovnání průměrného složení kravského, kozího a ovčího mléka .....	3
Tab. 2: Zastoupení jednotlivých frakcí kaseinu v kravském, kozím a ovčím mléce .....	4
Tab. 3: Zastoupení vybraných syrovátkových bílkovin v kravském, kozím a ovčím mléce.....	5
Tab. 4: Obsah nejdůležitějších mastných kyselin v kravském, kozím a ovčím mléce .....	7
Tab. 5: Porovnání velikosti tukových kuliček obsažených v kravském, kozím a ovčím mléce...8	
Tab. 6: Obsah minerálních látek v kravském, kozím a ovčím mléce .....	9
Tab. 7: Obsah vitamínů v kravském, kozím a ovčím mléce. ....	9
Tab. 8: Nejčastěji falšované potravinářské komodity dle počtu citací .....	15
Tab. 9: Nejběžněji užívané matrice při analýze MALDI.....	25
Tab. 10: Základní koncentrační škála poměrů kravského a kozího/ovčího mléka použitých při falšování.....	29
Tab. 11: Kalibrační peptidy s $m/z$ hodnotami .....	31
Tab. 12: Charakteristické markery kravského mléka .....	33
Tab. 13: Charakteristické markery kozího mléka .....	34
Tab. 14: Charakteristické markery ovčího mléka .....	34
Tab. 15: Porovnání relativní intenzity píku o $m/z$ 2458,19 dle různého přídavku mléka kravského .....	37