

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra kvality a bezpečnosti potravin**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Inovativní směry hodnocení kvality a bezpečnosti mléka**

doktorská disertační práce

**Autor: Ing. Lucie Kejdová Rysová**

**Školitel: doc. Ing. Jaroslav Havlík, Ph.D.**

**Konzultant: Ing. Veronika Legarová, Ph.D.**

© 2023 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou disertační práci "Inovativní směry hodnocení kvality a bezpečnosti mléka" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího disertační 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 disertační práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 17. 2. 2023

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala školiteli doc. Ing. Jaroslavovi Havlíkovi, Ph.D. za cenné rady, trpělivost a odborné vedení mé disertační práce. Ráda bych také poděkovala své konzultantce Ing. Veronice Legarové, Ph.D., jakožto vedoucí výzkumné skupiny pro mléko a mléčné výrobky za sdílení zkušeností týkající se nejen vědecké, ale i pedagogické činnosti v průběhu celého postgraduálního studia. Dále bych ráda poděkovala kolegům z Katedry kvality a bezpečnosti potravin, Výzkumného ústavu mlékárenského, Katedry statistiky (ČZU v Praze) a Ústavu počítačové a řídicí techniky (VŠCHT v Praze) za spolupráci v rámci výzkumných projektů i za poskytnutí přístrojového a materiálního vybavení. Děkuji také Národní agentuře pro zemědělský výzkum za poskytnutí finančních prostředků.

V neposlední řadě bych chtěla vyjádřit velký vděk mému manželovi, rodině a blízkým přátelům, kteří mi po celou dobu studia byli velkou oporou a bez nichž by tato disertační práce nebyla dokončena.

# Obsah

<b>1</b>	<b>Literární přehled</b>	<b>5</b>
<b>1.1</b>	<b>Mléko</b>	<b>5</b>
1.1.1	Složení kravského mléka	7
1.1.1.1	Voda	8
1.1.1.2	Sacharidy	8
1.1.1.3	Dusíkaté látky	9
1.1.1.4	Lipidy	11
1.1.1.5	Faktory ovlivňující složení mléka	13
1.1.1.6	Odlišnosti kozího a ovčího mléka od kravského mléka	15
<b>1.2</b>	<b>Hodnocení kvality mléka</b>	<b>17</b>
1.2.1	Základní složkové ukazatele	17
1.2.2	Hygienické a mikrobiální ukazatele	18
1.2.3	Fyzikální a technologické ukazatele	19
<b>1.3</b>	<b>Nekalé praktiky v mlékárenské průmyslu</b>	<b>22</b>
1.3.1	Metody detekce falšování mléka a mléčných výrobků	24
<b>2</b>	<b>Cíle a hypotézy</b>	<b>32</b>
<b>3</b>	<b>Publikované práce</b>	<b>33</b>
3.1	Detection of bovine milk adulteration in caprine milk with N-acetyl carbohydrate biomarkers by using <sup>1</sup> H nuclear magnetic resonance spectroscopy	36
3.2	Raw cow milk protein stability under natural and technological conditions of environment by analysis variance	50
3.3	Use of MALDI-TOF MS technology to evaluate adulteration of small ruminant milk with raw bovine milk	67
3.4	Silages from legume-cereal mixtures as a factor of dairy cow milk quality	81
<b>4</b>	<b>Sumární diskuse</b>	<b>91</b>
<b>5</b>	<b>Závěr</b>	<b>94</b>
<b>6</b>	<b>Seznam použité literatury</b>	<b>96</b>

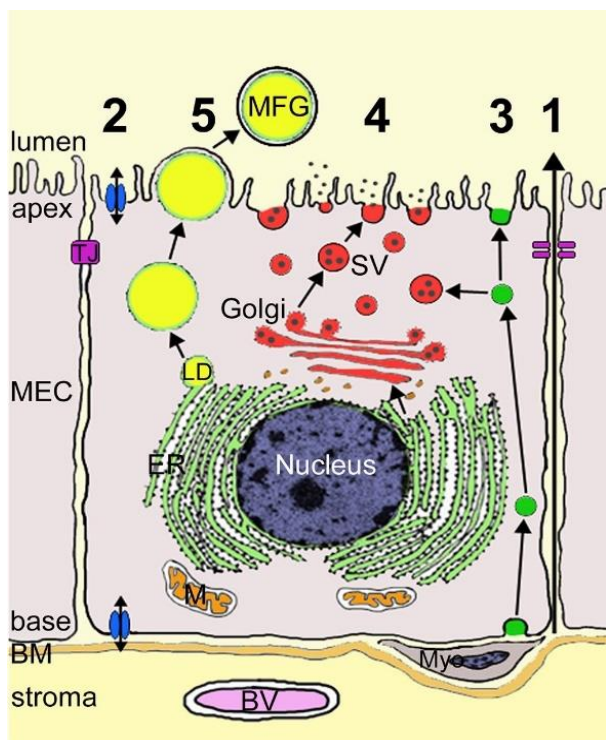
# 1 Literární přehled

## 1.1 Mléko

Mcmanaman & Neville (2003) popisují mléko jako komplexní směs, jejíž složení reflektuje činnost různých sekrečních a transportních procesů probíhající v mléčné žláze, stejně tak odráží rozdílné nutriční požadavky savčích mláďat. Jednodušší definici pak poskytli Guetouache et al. (2014). Ti mléko definují jako bělavou tekutinu obsahující mléčné proteiny, lipidy, laktózu, různé vitaminy a minerální látky, která je produkována mléčnou žlázou všech dospělých samic savců po porodu a slouží jako potrava pro jejich mláďata. Dle Pereira (2014) je rovněž mléko první potravou savců, která poskytuje veškerou energii a živiny potřebné k zajištění správného růstu a vývoje v postnatálním období. Pereira (2014) také zmiňuje, že mláďata savců jsou postupně od mléka odstavěny, s výjimkou člověka, který mléko konzumuje i v dospělosti.

Sekrece mléka probíhá v mléčné žláze, což je rozvětvený trubicový orgán s obvykle jednou až dvěma vrstvami epitelových buněk, který neustále reaguje na hormonální prostřední a lokální epigenetické změny (Cardiff et al. 2018). Přestože se mléčná žláza zakládá již během embryonálního vývoje, samotná mamogeneze je dokončena až během březosti a plně funkční žlázou se stává až po otelení (Reece 2011). Laktogeneze pak začíná u většiny druhů přibližně v polovině březosti. Toto období je charakteristické změnami epitelových buněk mléčné žlázy, které jsou nezbytné pro přechod od nediferencované mléčné žlázy k řádné laktaci. U přežvýkavců lze laktogenezi dělit do dvou fází, a to na laktogenezi I, která také bývá označována jako iniciace a laktogenezi II, která bývá označována jako aktivace (Neville et al. 2001; Truchet & Honvo-Houéto 2017). Během první fáze laktogeneze se alveolární epitelové buňky mléčné žlázy cytologicky a enzymaticky diferencují a stávají se schopnými produkovat a vylučovat malé množství některých složek mléka. Naopak druhá fáze laktogeneze je označována jako začátek plné sekrece všech složek mléka, respektive mleziva. U dojnic druhá fáze laktogeneze začíná přibližně 0 až 4 dny před porodem a pokračuje několik dní po něm (Tucker 1981). Po laktogenezi nastupuje galaktopoéza, která je definována jako období udržování laktace, kdy je nezbytná nejen funkce galaktopoetických hormonů, růstových faktorů, ale také pravidelný odvod mléka sáním či dojením (Capuco & Akers 2022). Samotná laktace je pak ukončena procesem zvaným involuce, při kterém se mléčná žláza vrací do nelaktačního stavu, tudíž klesá produkce mléka, mění se složení, zvyšuje se apoptóza alveolárních epitelových buněk i integrita těsných spojů mezi buňkami (Zhao et al. 2019).

Schéma alveolární epitelové buňky znázorňující dráhy sekrece mléka je zobrazeno na Obrázku č. 1.



**Obrázek č. 1** Schéma tvorby a sekrece složek mléka v alveolární epitelové buňce nacházející se na vnitřní straně alveolu. 1 – paracelulární cesta je využívána pro transport některých složek pouze během těhotenství, v časně laktaci, při involuci či během mastitidy. 2 – pomocí membránových transportérů je umožněn přímý pohyb vody, iontů, glukózy přes bazolaterální a apikální plazmatickou membránu. 3 – některé plazmatické proteiny jsou do lumenu transportovány pomocí transcytózy. 4 – exocytozová sekrece laktózy, proteinů, vápníku a dalších složek. 5 – tukové kapénka se tvoří v endoplazmatickém retikulu. Během transportu k vrcholu postupně rostou, a nakonec jsou uvolněny a obaleny apikální plazmatickou membránou. MEC – mamární epitelová buňka; BV – céva; BM – bazální membrána; TJ – těsné spojení; Myo – myoepitelová buňka; M – mitochondrie; ER – endoplazmatické retikulum; Golgi – Golgiho aparát; SV – sekreční vezikuly; LD – lipidová kapénka; MFG – mléčná tuková globule. Převzato od Truchet & Honvo-Houéto (2017), upraveno autorem.

Jak je zmíněno výše, primárně bylo mléko pouze potravou pro mláďata savců v prvním období jejich života, nicméně, během domestikace některých býložravců v neolitu se způsoby získávání potravy významně změnil (Bylund 1995; Barlowska et al. 2011). Lidé začali využívat mléko jiných druhů, zejména skotu, buvolů, ovcí či koz jako zdroj živin (Bylund, 1995). V 21. století tomu není jinak, mléko je z nutričního hlediska stále považováno za vysoce kvalitní a všudypřítomnou potravinu ve výživě člověka (Pereira 2014; Roy et al. 2020).

Dnes ve světové produkci mléka dominuje pět druhů zvířat: skot, buvoli, kozy, ovce a velbloucí. Podle OECD/FAO (2022) bylo v roce 2021 vyprodukováno zhruba 887 milionů tun mléka, z toho 81 % kravského mléka, 15 % buvolího mléka a zbylá 4 % tvoří kozí, ovčí a velbloucí mléko. Oproti roku 2020 se světová produkce mléka navýšila o 1,1 %, a to především díky rozšíření výroby v Indii a Pákistánu v důsledku pokračujícího nárůstu počtu stád dojnic a lepší dostupnosti krmiv. Předpokládá se, že v příštím desetiletí bude rostoucí trend světové produkce mléka udržen, a také navýšen. Každoročně by se měla produkce dle prognóz zvyšovat o 1,8 %. Tudíž by světová produkce mléka měla v roce 2031 překročit hranici 1 000 milionů tun. Největším světovým producentem mléka v 2021 byla Indie, následovaná Evropskou unií, Spojenými státy americkými, Latinskou Amerikou a Pákistánem. Obdobné pořadí je očekáváno i v roce 2031 (OECD/FAO 2022), a to i přestože, se v Evropské unii

očekává pomalejší růst produkce mléka, jehož důvodem jsou nastavená omezení životního prostředí a omezený růst domácí poptávky (Veselá et al. 2020).

Co se týká mlékárenského sektoru v Česku, lze konstatovat, že se jedná o stabilní sektor s vysokým potenciálem pro další rozvoj, a také s vysokou soběstačností, která v posledních letech přesahuje 130 %. V Česku se výhradně produkuje a zpracovává v mlékárnách kravské mléko, které je produkováno ve všech krajích. V roce 2019 se na území Česka chovalo 362 729 dojnic s průměrnou roční dojivostí 8 471 litrů. Celkově bylo vyprodukováno 3 073 milionů litrů mléka, z čehož 2 497 milionů litrů bylo vykoupeno českými mlékárnami (Veselá et al. 2020). Ekonomické ukazatele produkce kozího a ovčího mléka na českém území nejsou v Situační a výhledové zprávě „Mléko“ komentovány (Veselá et al. 2020). Důvodem je zřejmě skutečnost, že v Česku v současné době neexistuje mlékárna nebo sýrárna, která by tato mléka vykupovala, a tak je výroba kozích a ovčích mléčných výrobků soustředěna do chovů. Část chovatelů si také zajišťuje odbyt v zahraničí. Další důvodem může být i významně menší produkce těchto druhů mléka v porovnání s kravským mlékem. V roce 2021 bylo na území Česka chováno 3 570 kusů dojných koz, které vyprodukovaly 1 785 tisíc litrů mléka. Dojných ovcí pak bylo ještě méně, a to 1 399 kusů s roční produkcí 370 tisíc litrů mléka (Vylítová 2022).

### 1.1.1 Složení kravského mléka

Vedle hlavních složek, které jsou uvedeny v Tabulce č. 1 společně s průměrnými hodnotami pro mateřské, kozí a ovčí mléko, obsahuje kravské mléko také minerální látky, vitaminy rozpustné v tucích a ve vodě, imunoglobuliny, hormony, růstové faktory, cytokiny, nukleotidy, bioaktivní peptidy, polyaminy či enzymy. Hlavní složky kravského mléka lze také dělit jednoduše do dvou kategorií, a to voda a mléčná sušina, která obsahuje sacharidy, tuky, proteiny, minerální látky a vitaminy (Taylor & Kabourek 2003; Haug et al. 2007).

Tabulka č. 1 Průměrné procentuální zastoupení hlavních složek kravského, mateřského, kozího a ovčího mléka

<b>Druh mléka</b>	<b>Kravské mléko</b>	<b>Mateřské mléko</b>	<b>Kozí mléko</b>	<b>Ovčí mléko</b>
Obsah vody (%)	86,90	87,43	87,14	83,57
Tuk (%)	4,00	3,70	4,09	6,18
Laktóza (%)	4,90	6,98	4,20	4,17
Proteiny (%)	3,50	1,63	3,71	5,15

Zdroj: Clark & Mora García (2017), upraveno autorem

Z fyzikálně-chemického hlediska se výše zmíněné složky vyskytují v mléku ve třech různých fázích, a proto je také mléko označováno jako složitý polydisperzní systém obsahující

mnoho vzájemně propojených strukturních útvarů. Kvantitativně je většina hmotnosti mléka pravým roztokem vody, laktózy, organických a anorganických solí, vitaminů a ostatních malých molekul. V tomto vodném roztoku jsou pak dispergovány jednak proteiny, některé na molekulární úrovni (syrovátkové bílkoviny), ostatní jako koloidní agregáty (kaseiny), jednak tuky, které se zde nacházejí v emulzní fázi ve formě globulí (Fox & McSweeney 1998; Smirnova et al. 2020).

#### 1.1.1.1 Voda

Voda se nachází v mléku v několika formách, a to jako voda volná a voda chemicky vázaná na některé složky mléka. Ve volné vodě jsou sacharidy, minerální látky, kyseliny a jiné. Volná voda se velmi lehce odpařuje i vymrazuje. Při stanovení sušiny mléka se odpařuje jako první (Burdová 2001). Voda chemicky vázaná je zastoupena z celkového obsahu vody 2 až 3,5 % a lze ji dělit podle toho, na jaké mléčné složky se váže (Šnicr et al. 2015). Voda chemicky vázaná na laktózu, neboli voda krystalická, je nejsilněji vázanou vodou v mléku a odstranit ji lze pouze okolo 120 °C (Burdová 2001). Jako příklad vody krystalické lze uvést spojení mléčného cukru s jednou molekulou vody, které se označuje jako monohydrát  $\alpha$ -laktózy (Costa et al. 2019). Voda chemicky vázaná na proteiny neboli koloidní voda, tvoří hydratační ochranný obal kaseinových micel. Kapilární voda je třetí formou chemicky vázané vody a je uzavřená ve struktuře kaseinových micel (Šnicr et al. 2015).

#### 1.1.1.2 Sacharidy

Hlavní sacharidem kravského mléka, a také hlavní složkou sušiny je laktóza (4-O- $\beta$ -D-galaktopyranosyl-D-glukopyranosa, C<sub>12</sub> H<sub>22</sub> O<sub>11</sub>; Costa et al. 2019). V rámci rutinních systémů hodnocení kvality mléka je individuálně zaznamenávána u dojnic téměř po celém světě. Kravské mléko obvykle obsahuje okolo 4 až 5 % laktózy, a tento obsah je za normálních okolností poměrně konstantní, avšak záleží na zdravotním stavu mléčné žlázy (Burdová 2001; Velíšek 2002).

Laktóza je redukující disacharid složený z D-glukózy a D-galaktózy, kde aldehydická skupina na C<sub>1</sub> galaktóze je navázaná k C<sub>4</sub> glukóze prostřednictvím  $\beta$ -1,4-glykosidické vazby (Velíšek 2002; Šnicr et al. 2015). Stejně jako u jiných sacharidů může laktóza nabývat dvou anomerních forem, a to  $\alpha$ -anomér a  $\beta$ -anomér. Při teplotě 20 °C je roztok složený z 37,3 %  $\alpha$ -laktózy a 62,7 %  $\beta$ -laktózy (Costa et al. 2019). Obě tyto formy vykazují stejný nutriční profil, liší se však rozpustností, tvarem a velikostí krystalů, hydratací krystalické formy vedoucí k hygroskopičnosti, specifickou rotací i sladivostí (Fox et al. 2015). Všechny tyto rozdíly mají



zásadní význam pro technologické úpravy laktózy. Za nejstabilnější formu laktózy se pak považuje monohydrát  $\alpha$ -laktózy, který byl popsán výše ve spojitosti s krystalickou vodou (Velíšek 2002).

Laktóza je v mléčné žláze syntetizována z glukózy, která je absorbována z krve bazolaterální membránou alveolárními epitelovými buňkami. Po přemístění do buňky, které je řízeno glukózovými transportéry společně se sodíkově-závislými transportéry, je část glukózy absorbována do Golgiho aparátu a část je epimerizována na uridindifosfát-glukózu, a pak na uridindifosfát-galaktózu enzymatickým působením uridindifosfát-pyrofosfotýlázou-2 a fosfoglukomutázy-1. Výše zmíněné transportéry se podílejí také na přenosu uridindifosfát-galaktózy do Golgiho aparátu. V Golgiho aparátu je uridindifosfát-galaktóza katalyzována pomocí laktosyntázy (heterodimerní enzym složený z  $\alpha$ -laktalbuminu a  $\beta$ -1,4-galaktozyltransferázy), která uvolní fragment uridindifosfátu. Následně  $\beta$ -1,4-galaktozyltransferáza spojí atom glukózy a galaktózy, čehož se účastní i  $\alpha$ -laktalbumin, ale jako iniciátor zvýšené specifity právě  $\beta$ -1,4-galaktozyltransferázy. Po vytvoření je laktóza transportována v sekrečních vezikulách k apikální membráně prostřednictvím facilitovaného transportu, kde se uvolňující do lumenu alveolu (Costa et al. 2019).

Krom laktózy obsahuje mléko ve stopovém množství také další sacharidy, jako jsou monosacharidy, oligosacharidy, aminocukry, fosforylované sacharidy, a také glykosylové zbytky vázané na proteiny či lipidy. Volné monosacharidy, jako je glukóza, galaktóza a *myo*-inositol, se v kravském mléku nacházejí v množství od 0,7 do 12 mg/100 ml mléka (Belloque et al. 2001). Co se týče oligosacharidů, tak kravské mléko jich v porovnání s mateřským mlékem obsahuje výrazně méně, navíc tvoří kratší oligomerní řetězce. Většina oligosacharidů kravského mléka se skládá z jádra laktózy a dalších monomerů jako jsou glukóza, galaktóza, N-acetylglukosamin, N-acetylgalactosamin, fukóza, N-acetylneuraminová kyselina a N-glykolyneuraminová kyselina. Prostřednictvím komplexních vědeckých studií bylo identifikováno 30 až 50 různých struktur (Tao et al. 2008; Robinson 2019). Z fosforylovaných sacharidů je v kravském mléku zastoupena například glukóza-6-fosfát, galaktóza-1-fosfát či N-acetylglukosamin-1-fosfát (Larsen 2015; Bruschetta et al. 2021).

### **1.1.1.3 Dusíkaté látky**

#### ***Mléčné proteiny***

Mléčné proteiny představují velmi heterogenní skupinu složek se širokým rozsahem struktur a vlastností molekul. Do této kategorie lze zařadit kaseiny, syrovátkové proteiny, proteiny tukových globulí, různé minoritní proteiny, či proteiny, které jsou součástí enzymů

(Šnirc et al. 2015). Kaseiny společně se syrovátkovými bílkovinami jsou hlavními skupinami mléčných proteinů a v kravském mléku se nacházejí v poměru přibližně 80:20 (Toffolon et al. 2021). Aminokyselinový profil těchto frakcí zaujímá v lidské výživě jedinečné postavení, a to díky vysoké biologické hodnotě těchto proteinů (Rafiq et al. 2016).

Kaseiny jsou nedílnou složkou mléčného proteomu, která se nikde jinde v přírodě nevyskytuje. Kravské mléko obsahuje čtyři hlavní frakce kaseinu, a to  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - a  $\kappa$ -kasein. V profilu kaseinů je nejvíce zastoupený  $\alpha_s$ -kasein, následovaný  $\beta$ -kaseinem a  $\kappa$ -kaseinem (Velíšek 2002). Až 95 % kaseinu se v mléku nachází ve formě koloidních částic, které jsou označovány jako kaseinové micely. Typická micela kravského mléka se skládá z komplexu submicel a obsahuje asi 20 000 molekul kaseinu. Sušina kaseinových micel obsahuje asi 94 % proteinů a 6 % nízkomolekulárních látek označovaných jako koloidní fosforečnan vápenatý, který se skládá především z vápníku, hořčíku, fosforečnanů a citrátů. Z tohoto důvodu jsou také kaseiny řazeny k fosfoproteinům (Bylund 1995; Velíšek 2002; Fox et al. 2015). Jednotlivé submicely jsou vzájemně spojené prostřednictvím fosfoserinových skupin  $\alpha_s$ ,  $\beta$ -kaseinů a fosforečnanu vápenatého (Velíšek 2002). Střed micely je pak tvořen submicelami s nedostatkem  $\kappa$ -kaseinů, přičemž submicely bohaté na tuto frakci se soustředí na povrchu micel. Důvodem je hydrofilní C-koncová část  $\kappa$ -kaseinu obsahující sacharidovou skupinu vystupující z vnější části micely, která vytváří vrstvu o tloušťce 5 až 10 nm a dává micelám tzv. „hair look“. Tento vzhled zajišťuje stabilitu micel, jelikož významně přispívá k zeta potenciálu a sterické stabilizaci. Pokud je tato část narušena například specifickou hydrolýzou  $\kappa$ -kaseinu, koloidní stabilita micel se zhroutí (Fox et al. 2015).

Syrovátkové proteiny, nebo také sérové proteiny, představují tu část proteinového spektra, která zůstane v roztoku po vysrážení kaseinů syřidlem nebo kyselinou. Nicméně, toto není jediným rozdílem mezi těmito dvěma skupinami (Burdová 2001). Syrovátkové proteiny jsou v porovnání s kaseiny více termolabilní, ve své molekule neobsahují fosfor, některé z nich se nesyntetizují v mléčné žláze, ale pocházejí přímo z krve, a také na rozdíl od kaseinů nevytváří v mléku velké koloidní agregáty, ale jsou molekulárně rozptýlené v roztoku, či mají jednoduchou kvartérní strukturu (Fox et al. 2015). Mezi hlavní zástupce patří  $\beta$ -laktoglobulin,  $\alpha$ -laktalbumin a sérový albumin, přičemž  $\beta$ -laktoglobulin je dominantním syrovátkovým proteinem se zastoupením asi 53 % (Burdová 2001).

Syntéza hlavních mléčných proteinů probíhá v alveolárních epitelových buňkách mléčné žlázy. Výjimku tvoří sérový albumin a některé imunoglobuliny, které se do lumenu alveolu dostávají prostřednictvím transcytozy z krve. Základní stavební kameny ostatních proteinů, aminokyseliny, jsou do buňky přenášeny také z krve. Mléčné proteiny jsou syntetizovány

klasickou proteosyntézou, která začíná transkripcí genů do mRNA a pokračuje translací, ke které dochází na ribozomech fixovaných na drsném endoplazmatickém retikulu. Po syntéze jsou proteiny transportovány do Golgiho aparátu, kde dochází k posttranslačním modifikacím. Proteiny se spojují s dalšími komponenty a vytvářejí komplexnější struktury (např. micely), které jsou zabaleny do sekrečních vezikul a vektorově transportovány prostřednictvím mikrotubulů k apikální membráně, kde dochází ke splynutí a uvolnění obsahu do lumenu alveolu (Truchet & Honvo-Houéto 2017).

### ***Enzymy***

V mléku lze detekovat řadu enzymů nativního i exogenního původu. Většina z těchto enzymů je termolabilních a k jejich inaktivaci postačuje řádně provedená pasteurace. Existují však výjimky, jako je plasmin, což je hlavní nativní proteáza mléka. Ten je spojován s gelováním mléka ošetřeného UHT technologií během skladování, jelikož snadno hydrolyzuje  $\beta$ - a  $\alpha_{S2}$ -kasein a v menší míře  $\alpha_{S1}$ -kasein (Rauh et al. 2014). Nežádoucí endogenní proteázy mohou v mléku produkovat také bakterie rodu *Pseudomonas* či *Bacillus*, které jsou rovněž odolné vůči záhřevu a způsobují tak řadu sensorických vad tekutých mléčných výrobků (Němečková et al. 2009). Nicméně, v mléku lze detekovat také žádoucí enzymy. Příkladem lze uvést laktoperoxidázu, která společně s peroxidem vodíku a thiokyanátem vytváří komplex s antibakteriálními vlastnostmi (Seifu et al. 2005). Dále lze zmínit enzym lysozym, u něhož bylo prokázáno, že je schopen hydrolyzovat buněčnou stěnu grampozitivních bakterií (Park & Haenlein 2013).

### ***Nebílkovinné dusíkaté látky***

Asi 5 % celkového dusíku tvoří v kravském mléku nebílkovinné dusíkaté látky, které do mléka přecházejí z krve po metabolismu bílkovin. Do této skupiny patří amidy, aminokyseliny, amoniak, kreatin, kreatinin či močovina. Přičemž močovina je nejvíce zastoupenou nebílkovinnou dusíkatou látkou v kravském mléku (Ruska & Jonkus 2014; McSweeney & McNamara 2022).

#### **1.1.1.4 Lipidy**

Kravské mléko obsahuje přibližně 3,5 až 5 % lipidů, které jsou v mléčném séru rozptýleny ve formě tukových globulí, které jsou potaženy složitou membránou (Jensen et al. 1991). Tukové globule mohou být různé velikosti, avšak nejčastěji se uvádí rozpětí od 0,2 do 15  $\mu\text{m}$  s průměrem okolo 4  $\mu\text{m}$  (Singh 2006). Jádro tukové globule se skládá převážně z triacylglyceridů, jejichž zastoupení může přesahovat 98 %. Dále se v jádru nacházejí

i diacylglyceridy, monoacylglyceridy, neesterifikované mastné kyseliny, karotenoidy, vitaminy rozpustné v tucích a další minoritní složky (Bylund 1995; Šnicr et al. 2015). Dominantní zastoupení triacylglyceridů souvisí přímou úměrou s obsahem mastných kyselin, které jsou vázány na trojúhelníkovou kostru glycerolu. V mléčném tuku bylo identifikováno více než 400 různých masných kyselin, nicméně naprostá většina z nich byla detekována pouze ve stopovém množství (Fox et al., 2015). Pouze patnáct nebo šestnáct mastných kyselin se v mléčném tuku nachází v koncentracích nad 1 % a tvoří asi 95 % z celkového obsahu lipidů (Šnicr et al. 2015).

Lindmark Månsson (2008) uvádí, že nasycené mastné kyseliny představují 70 % všech mastných kyselin, přičemž palmitová kyselina (C16:0) je z kvantitativního hlediska nejdůležitější mastnou kyselinou a tvoří přibližně 30 % hmotnosti všech mastných kyselin. V nižších koncentracích jsou pak v mléku zastoupeny následující nasycené mastné kyseliny: myristová (C14:0), stearová (C18:0), laurová (C12:0), kaprinová (C10:0), kapronová (C6:0), kaprylová (C8:0) či máselná (C4:0). Přibližně 25 % masných kyselin pak v mléku tvoří mononenasycené mastné kyseliny. Hlavní mononenasycenou mastnou kyselinou je olejová kyselina (C18:1), která tvoří asi 22 % hmotnosti všech mastných kyselin v kravském mléku. Značně nižších koncentrací pak dosahují kyseliny vakcenová (C18:1), palmitoolejová (C16:1) a myristoolejová (C14:1). Nejnižší procentuální zastoupení s 2,3 % mají v mléku polynenasycené mastné kyseliny, jejichž nejvýznamnějšími zástupci jsou linolová (C18:2) a  $\alpha$ -linolenová (C18:3) kyselina. V kravském mléku lze také detekovat transmastné kyseliny s jednou nebo více transdvojnými vazbami. Přičemž hlavním trans-izomerem je kyselina vakcenová, a také konjugovaná kyselina linolová zahrnující mnoho různých izomerů včetně bachorové kyseliny (Lindmark Månsson 2008; Šnicr et al. 2015).

Jak již bylo zmíněno výše, na povrchu tukových globulí se nachází membrána o tloušťce asi 5 až 10 nm. Hlavní úlohou této membrány je udržování integrity a kompatibility s mléčným sérem, tudíž působí jako přirozený emulgátor, který zabraňuje flokulaci a koalescenci tukových globulí a rovněž chrání mléčný tuk před enzymatickým působením (Singh 2006; Šnicr et al. 2015). Tyto funkce vycházejí ze složité strukturované skladby této membrány, která obsahuje jedinečné polární lipidy a specifické membránové proteiny (Dewettinck et al. 2008).

Syntéza mléčného tuku je u všech přežvýkavců složitá molekulární regulační síť, která zahrnuje následující: *de novo* syntézu mastných kyselin, která probíhá přímo v alveolárních epitelových buňkách mléčné žlázy a příjem mastných kyselin z krevních lipidů, pocházejí především z krmiva či z lipolýzy tukové tkáně (Šnicr et al. 2015; Mu et al. 2021). Přičemž hlavními produkty syntézy *de novo* jsou nasycené mastné kyseliny s krátkými a středně dlouhými řetězci, zatímco mastné kyseliny s dlouhými řetězci pocházejí především

z plazmatických lipidů (Clegg et al. 2001). Dále v alveolárních epitelových buňkách dochází také k transportu a desaturaci mastných kyselin, které jsou následovány syntézou triacylglyceridů, ke které dochází po zajištění všech hlavních prekurzorů v hladkém endoplazmatickém retikulu v bazální oblasti buňky. Nově syntetizované molekuly lipidů se formují do malých zásobních struktur, na jejichž povrchu se nachází proteiny. Tyto struktury se spojují, zvětšují a transportují k apikální plazmatické membráně, kde jsou vyloučeny do lumenu alveolu jako tukové globule (Mcmanaman & Neville 2003; Mu et al. 2021).

#### **1.1.1.5 Faktory ovlivňující složení mléka**

Napříč celým světem jsou chována různá dojná plemena krav a jejich kříženci v rozmanitých chovatelských podmínkách, tudíž je nutností zde zmínit i činitele, které významně ovlivňují složení kravského mléka. Zhu et al. (2021) ve své studii uvádí dvě odlišné skupiny faktorů působící na složení mléka, a to inherentní a vnější faktory. Přičemž do inherentních faktorů zařadil genetické a fyziologické vlivy jako je plemenná příslušnost, druh zvířete či stádium laktace. Do vnějších faktorů pak zařadil krmnou dávku, sezónnost, zeměpisný původ, zdravotní stav jedince, zpracování a skladování mléka. Řadu faktorů působících na složení mléka okomentovali autoři i dalších vědeckých studií, avšak mezi nejvýznamnější se zpravidla řadí genetika a výživa (Jenkins & McGuire 2006; Morand-Fehr et al. 2007; Heck et al. 2009).

Fakt, že plemenná příslušnost ovlivňuje složení mléka, je znám již desetiletí. Jedna ze studií, která tyto meziplemenné rozdíly popisuje, sledovala obsahy složek mezi holštýnským plemenem a plemenem jersey. Mléko pocházející od holštýnských dojnic vykazovalo nižší koncentraci proteinů, kaseinu a tuku v porovnání s mlékem od dojnic plemene jersey. Dále bylo zjištěno, že vyšší mléčná sušina mléka od plemene jersey zřejmě pozitivně ovlivnila technologické vlastnosti mléka (Auldist et al. 2004).

Od sledování genetické výbavy jednotlivých dojných plemen se však v posledních letech významně pokročilo a pozornost se soustředí na genotypy jednotlivých zvířat v rámci jednoho plemene. Vědecké studie se zaměřují zvláště na geny a jejich genetické varianty, které jsou spojeny se složením mléka, protože poté lze tyto informace využít ve šlechtitelských programech s cílem produkovat mléko s vyšší technologickou či nutriční hodnotou. Příkladem lze uvést studii Gustavsson et al. (2014), ve které byly prostřednictvím genotypovacích testů určeny genetické varianty  $\alpha_{S1}$ ,  $\beta$ -,  $\kappa$ - kaseinů, aby mohl být prozkoumán jejich vliv na profil bílkovin. Výsledky naznačily, že vyšší zastoupení dojnic se složeným genotypem BB/A1A2/AB by mohl mít pozitivní vliv na mléko pocházející od dánského holštýnského

a švédského červeného plemene, jelikož by se snížila relativní koncentrace  $\alpha$ <sub>S</sub>-kaseinu a zvýšila by se koncentrace  $\beta$ -kaseinu a  $\kappa$ -kaseinu. Právě vyšší obsah  $\beta$ -kaseinu a  $\kappa$ -kaseinu je spojován s lepšími koagulačními vlastnostmi při výrobě sýrů. Z pohledu výživového je pak často diskutována genetická varianta A1  $\beta$ -kaseinu. Ta se nepovažuje za původní genetickou variantu  $\beta$ -kaseinu, a to z toho důvodu, že se během jejího trávení ve střevě uvolňuje bioaktivní opioidní peptid  $\beta$ -kasomorfin-7, který aktivuje  $\mu$ -opioidní receptory exprimované v celém gastrointestinálním traktu a těle. Naproti tomu původní genetická varianta A2 díky jiné aminokyselinové sekvenci uvolňuje během trávení pouze minimální množství tohoto peptidu (Pal et al. 2015). Chia et al. (2017) nedávno dospěli k závěru, že genetická varianta A1 a její derivát jsou primárními kauzálními spouštěči diabetu 1. typu u osob s geneticky-rizikovými faktory. Genetická varianta A1 je diskutována ve spojitosti i s dalšími onemocněními, což je také důvod, proč někteří se chovatelé rozhodli vyšlechtit stáda bez této genetické varianty (Pal et al. 2015).

Nicméně, polymorfismus se nezkoumá pouze v rámci profilu mléčných bílkovin. Conte et al. (2010) popsal polymorfismy tří klíčových genů podílejících se na metabolismu lipidů. Z této studie vyplývá, že různé genetické varianty genu SCD1 (gen kódující enzym stearyl-CoA desaturázu 1) a genu DGAT1 (gen kódující enzym diacyl-glycerol-acyl transferázu 1) významně ovlivňují složení mastných kyselin v mléce.

Jedním z nejvýznamnějších vnějších faktorů ovlivňujících složení mléka je jednoznačně výživa. Zajištění dostatečného množství krmiva je nezbytné pro udržení základních životních funkcí i produkčních schopností organismu (Ticháček et al. 2007). Z pohledu produkčního by měl být brán zřetel zvláště na vytvoření optimálních podmínek pro bachorovou fermentaci, aby prostřednictvím vytvořených prekurzorů mléka, mohly být uspokojeny potřeby mléčné žlázy na produkci mléka a jeho složek. Sestavenou krmnou dávkou předkládanou dojnícím lze ovlivnit zejména obsah tuku a v menší míře i obsah bílkovin a laktózy (Koukolová et al. 2017). Nicméně, v posledních letech se vědecké studie nezaměřují pouze na výtěžnost hlavních složek mléka, ale také na profily složení jednotlivých složek, a to z důvodu vzrůstajícího trendu konzumace funkčních potravin. Dhiman et al. (1999) ve své studii sledovali obsah konjugované kyseliny linolové (CLA) v mléku pocházející od dojnic, kterým byly zkrmovány různé typy krmných dávek. Zjistili, že obsah CLA byl o 500 % vyšší v mléku od dojnic, které byly celodenně umístěny na pastvě a nepřijímaly žádné jiné doplňkové krmivo v porovnání s mlékem od dojnic, kterým byla zkrmována kukuřičná siláž a zrno. Tento vysoký obsah CLA zřejmě souvisí s C18:3, která je převládající nenasycenou mastnou kyselinou v porostech na pastvách. Na profil mastných kyselin mléčného tuku se zaměřili také Kalač & Samková

(2010). Ti v závěru svého literárního přehledu uvádí, že mléko od dojnic krmených čerstvou pící, má výrazně vyšší poměr nenasycených mastných kyselin k nasyceným mastným kyselinám a vyšší obsah prospěšných trans-mastných kyselin, než mléko od dojnic krmených siláží či senem. Nižší nutričně přijatelnější složení mléka od dojnic krmených siláží či senem je zřejmě způsobeno oxidací během zpracování píce či lipolýzou během silážování. V další studii pak potvrdili pozitivní vliv zkrmování samostatné *Chlorelly* a *Chlorelly* obohacené luteinem na obsah mléčných bílkovin, netukové sušiny a luteinu v mléku holštýnských krav (Jeon et al. 2016). Autoři se domnívají, že za tento pozitivní účinek může být zodpovědná právě *Chlorella*, z které mikroby v bacheru mohou efektivně využívat celulózu. Problematika týkající se vlivu krmení na kvalitu mléka je dále diskutována na straně č. 81 v rámci přiložené vědecké publikace.

Z výše uvedeného plyne, že současné genetické testy či nové přístupy krmení hospodářských zvířat mohou ovlivnit výživovou hodnotu mléka. Důležité je však se nezaměřovat pouze na jednu skupinu faktorů ať už na vnitřní, nebo na vnější, či pouze na jeden vybraný faktor. Na mléko totiž působí faktory ve vzájemné kombinaci, která v konečné fázi určuje, jaké bude výsledné složení mléka (Jenkins & McGuire 2006). Tudíž produkce kvalitního mléka od zdravých dojnic začíná již u odchovu telat, a poté u jalovic. Jak uvádí Erickson and Kalscheur (2020), pouze díky správně nastavené výživě a managementu se z jalovice vyvine vysoce produktivní dojnice, která dokáže maximálně využít svůj genetický potenciál. Rovněž Kalač & Samková (2010) zmiňují, že složení mléčného tuku je výsledkem komplexního působení mnoha faktorů.

#### **1.1.1.6 Odlišnosti kozího a ovčího mléka od kravského mléka**

I přestože kozí a ovčí mléko nezaujímá tak velký podíl na světové produkci jako kravské a buvolí mléko, v posledních letech oba tyto druhy mléka vykazují stabilně rostoucí trend (Pulina et al. 2018). Důvodem je zřejmě fakt, že kozí a ovčí mléko je spotřebiteli vnímáno jako alternativa ke kravskému mléku, a to nejen díky specifické chuti, ale také kvůli zdravotnímu image. Toto image plyne z řady vědeckých studií, které kozímu a ovčímu mléku přisuzují vyšší nutriční hodnotu než kravskému.

Jednou z hlavních charakteristik kozího mléka, která přispěla ke zvýšení jeho přitažlivosti jako alternativě ke kravskému mléku, je jeho nižší alergenicita. Ta je dána odlišným zastoupením frakcí kaseinů v micelle. Kozí mléko má na rozdíl od kravského mléka nízké zastoupení alergenního  $\alpha_{S1}$ -kaseinu. Tudíž je svým proteinovým profilem více podobné mateřskému mléku, a tak ho někteří autoři vědeckých studií doporučují využívat jako jeho

náhradu (Turkmen 2017). Další významný rozdíl mezi kozím a kravským mlékem je ve fyzikálně-chemické struktuře tuku. U kozího mléka byla prokázána lepší stravitelnost mléčného tuku, což je přisuzováno menší velikosti tukových globulí, které jsou díky větší povrchové ploše lépe dostupné lipázám (Park et al. 2007; W Park et al. 2017). V kozím mléku také nedochází ke shlukování tukových kuliček při chlazení mléka, jelikož kozí mléko na rozdíl od kravského mléka postrádá aglutinin. Tudíž tukové kuličky zůstávají v mléku přirozeně rozptýleny (Haenlein 2004). V kozím mléku bylo také detekováno 4 až 5krát více oligosacharidů než v kravském mléku (Martinez-Ferez et al. 2006), které hrají významnou roli v ochraně střevního mikrobiomu před patogeny, a také se podílí na vývoji mozku a nervového systému (Turkmen 2017).

Ovčí mléko obsahuje v porovnání s kravským a kozím mlékem více lipidů, minerálních látek i vitaminů, které jsou nezbytné pro lidské zdraví. Jeho nutriční hodnotu navyšuje i obsah proteinů, který je téměř dvakrát vyšší než u výše zmíněných dvou druhů mlék. Někteří autoři rovněž zmiňují podobnost proteinových sekvencí  $\alpha_{S1}$ - a  $\alpha_{S2}$ -kaseinů ovčího a kozího mléka, které se výrazně liší od proteinových sekvencí kravského mléka. V důsledku toho je i ovčímu mléku přisuzována nižší alergenicita. Stejně jako kozí mléko i ovčí mléko je charakteristické menší velikostí tukových globulí a absencí aglutininu. Co se týče zastoupení jednotlivých mastných kyselin, ovčí mléko obsahuje oproti kravskému mléku vyšší hladinu kapronové (C6:0), kaprylové (C8:0) a kaprinové kyseliny (C10:0; Balthazar et al. 2017). Rovněž kozí mléčný tuk je bohatý na tyto kyseliny se středně dlouhým řetězcem (Turkmen 2017). Z nutričního hlediska je vyšší obsah těchto mastných kyselin velmi příznivý, jelikož i díky nim dochází ke snadnější hydrolyze mléčného tuku v zažívacím traktu. Rovněž tyto nasycené kyseliny byly shledány užitečnými při léčení chorob trávicího traktu, malabsorpčních syndromů, cystické fibrózy, ale i srdečních chorob, a také při problémech se žlučníkem (Ceballos et al. 2009; Borková et al. 2015).



## 1.2 Hodnocení kvality mléka

### 1.2.1 Základní složkové ukazatele

Vyletěllová-Klimešová et al. (2014) uvádějí, že mezi základní složkové ukazatele syrového kravského mléka patří jednoznačně obsah tuku, bílkovin, kaseinu, laktózy a tukuprosté sušiny. Na rozdíl od hygienických a mikrobiálních ukazatelů, které jsou popsány níže, nejsou obsahy jednotlivých složek upraveny evropskou legislativou. Evropská legislativa, konkrétně Nařízení EP a Rady (ES) č. 1308/2013, sice definuje požadavky na obsah tuku i bílkovin, ty se ale týkají konzumního mléka nikoli syrového. Hlavní motivací českých producentů jsou tak smluvní podmínky týkající se zpeněžení mléka mezi nimi a mlékárnami. Přičemž cílem producentů je dodávat mléko s vysokým obsahem tuku a bílkovin, jelikož je to ze strany mlékáren žádoucí. Důvodem jsou finální mléčné produkty mlékáren, příkladem lze uvést konzumní mléko, které podle výše zmíněného nařízení musí obsahovat nejméně 2,9 % (m/m) bílkovin s obsahem tuku nejméně 3,5 % (m/m, pakliže se jedná o plnotučné mléko), dále lze zmínit smetanu či máslo, které musí obsahovat minimálně 10 % a 82 % mléčného tuku (Nařízení EP a Rady (ES) č. 1308/2013, Vyhláška č. 397/2016 Sb.). Obsah tuku a bílkovin rovněž ovlivňuje výtěžnost sýrů i kvalitu fermentovaných mléčných výrobků (Sodini et al. 2004; Capper & Cady 2012).

Obsah laktózy byl po desetiletí považován za ukazatel s velmi nízkou vypovídající hodnotou. To se však změnilo jednak s vědeckými studiemi, které prokázaly negativní korelaci mezi laktózou a počtem somatických buněk, jednak s vývojem nových technologií filtrace syrovátky, díky čemuž se z laktózy stala žádoucí potravinářská složka (Costa et al. 2019). Přestože obsah laktózy není nijak samostatně korigován legislativou její obsah je součástí tukuprosté sušiny (TPS) syrového mléka společně s obsahem bílkovin. Minimální obsah TPS 8,5 % určovala Česká státní norma 57 0529 (Vyletěllová-Klimešová et al. 2014), i přestože norma již není platná, tento limit je v mlékárenském průmyslu užíván i nadále.

V rámci složkových ukazatelů lze také hodnotit minoritní složky, které mají úzkou vazbu na výživový stav samotné dojnice. Hanuš et al. (2011) mezi tyto složky zařadili močovinu, volné mastné kyseliny, kyselinu citronovou či ketony v mléku.

## 1.2.2 Hygienické a mikrobiální ukazatele

### *Počet somatických buněk (PSB)*

Jak uvedli Alhussien & Dang (2018), PSB je ukazatelem, který využívají všechny vyspělé země jako marker pro sledování výskytu mastitid ve stádech dojnic. PSB je tvořen leukocyty a artefakty buněk sekrečního a dlaždicového epitelu (Klimešová et al. 2019). Přičemž první zmíněná část značně dominuje a v kravském mléku představuje 75 až 85 %. Artefakty buněk jsou pak zastoupeny 15 až 25 % (Cinar et al. 2015). Vzhledem k tomu, že většinový podíl PSB tvoří imunitní buňky, bylo mnohokrát potvrzeno, že hodnota tohoto ukazatele se zvyšuje se zánětlivými změnami probíhajícími v mléčné žláze. V Evropské unii je tento ukazatel limitován Nařízením č. 853/2004, kde je uvedeno, že syrové kravské mléko musí obsahovat  $\leq 400\ 000$  buněk v 1 ml mléka. Green et al. (2008) ve své vědecké studii zmiňují, že hodnota PSB nad 200 000 buněk v 1 ml již svědčí o bakteriální infekci. Na tuto skutečnost zřejmě reagovalo Ministerstvo zemědělství ČR v dotačním titulu „Režim jakosti Q CZ pro mléko“, kde byl limit pro tento ukazatel oproti evropské legislativě zpřísněn na hodnotu  $\leq 220\ 000$  buněk v 1 ml syrového kravského mléka (Ministerstvo zemědělství 2016). V následujících letech se pravděpodobně hodnocení PSB bude inovovat, a to z důvodu nových přístupů zahrnující například diferenciální počet somatických buněk (DPSB). DPSB se zaměřuje na přesnější a aktuálnější popis zdravotního stavu vemene dojnic, tudíž nepracuje s PSB jako se souborem leukocytů, ale detekuje podíly jejich zástupců, jako jsou lymfocyty, makrofágy a granulocyty (Damm et al. 2017).

### *Rezidua inhibičních látek (RIL)*

Další z hygienických ukazatelů syrového mléka jsou RIL, což jsou látky vykazující bakteriostatické či bakteriocidní účinky. Mezi tyto látky lze zařadit například antibiotika, čisticí a dezinfekční látky, mykotoxiny, konzervační a neutralizační látky, pesticidy či těžké kovy (Navrátilová, 2002). Detekce RIL chrání nejen zdraví spotřebitele, ale je také významná pro zpracovatele mléka, kteří syrové mléko dále využívají pro výrobu mléčných výrobků. V tomto případě je upínána pozornost zvláště na veterinární léčivé přípravky (antibiotika a chemoterapeutika) inhibující růst čistých mlékařských kultur. Evropská legislativa (Nařízení č. 853/2004) ukládá povinnost kontroly obsahu určitých reziduí antibiotik u veškerého přijímaného mléka (Navrátilová et al. 2016). V případě, že jsou překročeny maximální reziduální limity, mléko je označeno jako zdravotně závadné a nesmí být v mlékárenském provozu jakkoliv zpracováno a dodáno na trh (Navrátilová 2003).

### ***Celkový počet mikroorganismů (CPM)***

Krom PSB a RIL Nařízení EP a Rady (ES) č. 853/2004 stanovuje rovněž limit pro obsah mikroorganismů. V nařízení je uvedeno, že CPM syrového kravského mléka při 30 °C musí být  $\leq 100\,000$  kolonií tvořících jednotku (KTJ) v 1 ml, přičemž se stanoví jako klouzavý geometrický průměr za dvouměsíční období. Tento mikrobiologický ukazatel je i kritériem pro získání dotačního titulu „Režim jakosti Q CZ pro mléko“, kde je v porovnání s evropským nařízením opět přísnější, a to  $\leq 35\,000$  KTJ v 1 ml syrového kravského mléka (Ministerstvo zemědělství 2016). Dle Kuchtík et al. (2015) CPM v sobě zahrnuje všechny mezofilní aerobní a fakultativně anaerobní mikroorganismy, včetně mikroskopických hub zahrnující kvasinky a plísně. Vzhledem k tomu, že špatná mikrobiologická kvalita syrového kravského mléka může významně ovlivnit nejen technologický proces výroby mléčných výrobků, ale také zdraví lidí, je stanoven také limit (Vyhláška č. 289/2007) pro výskyt *Staphylococcus aureus*, jehož počty nesmí přesáhnout hranici 500 KTJ v 1 ml mléka.

### **1.2.3 Fyzikální a technologické ukazatele**

#### ***Bod mrznutí***

Bod mrznutí je důležitým ukazatelem kvality mléka, který se používá k odhalování falšování mléka vodou. To je umožněno stabilním osmotickým tlakem mléka, který musí být v rovnováze s osmotickým tlakem krve dojnice, který se může měnit pouze v úzkých mezích (Zagorska & Ciprova 2013). Syrové kravské mléko, které nebylo ředěno vodou, by mělo vykazovat hodnoty  $-0,520$  °C a nižší (Kedziarska-Matysek et al. 2011). Přičemž přídavek 5 % vody do mléka zvyšuje bod na  $-0,490$  °C a přídavek 20 % na  $-0,430$  °C (Burdová 2001). Nicméně, jak uvádí Pindešová et al. (2022) současná referenční metoda využívající se ke stanovení bodu mrznutí mléka, nemusí falšování vody odhalit, jelikož ředěné mléko může být doplněno zároveň i o NaCl, který hodnoty bodu mrznutí upraví na přijatelné. V tomto ohledu bude zapotřebí dalších vědeckých studií.

#### ***Titrační kyselost***

Schmidt et al. (1996) uvedli, že titrační kyselost se používá k určení toho, zda mléko prošlo bakteriální degradací, tepelným ošetřením nebo zda je zestárlé. Titrační kyselost je tedy ukazatel vypovídající o kvalitě syrového mléka, prostřednictvím kterého lze velmi rychle stanovit obsah mléčné kyseliny, minerálních látek a proteinů (Schmidt et al. 1996; Burdová 2001). Hodnota titrační kyselost syrového mléka by se měla pohybovat v rozmezí od 6,2 do 7,8 SH. Nicméně dynamika titrační kyselosti je značná. Při zánětlivých stavech

mléčné žlázy může titrační kyselost klesat na hodnoty 4 SH, což je dáno alkalickou povahou mléka v důsledku snížení syntézy některých složek (Šustová et al. 2016). Naopak při vyšším obsahu proteinů může titrační kyselost přesahovat hodnotu i 8 SH. Hodnoty nad 10 SH pak vykazuje mléko slabě kyselé, přičemž při hodnotách nad 24 SH se z vápenatého komplexu uvolňuje kasein a dochází ke srážení mléka (Burdová 2001; Vyletělová-Klimesová et al. 2014). Hodnota titrační kyselosti se zohledňuje v mlékařství po desetiletí, a v 21. století tomu není jinak. Titrační kyselost je stabilním fyzikálně-technologickým ukazatelem nejen syrového mléka, ale i mléčných výrobků (Feng et al. 2019; Oselu et al. 2022).

### ***Termostabilita***

Některé mléčné výrobky jsou v rámci procesu výroby intenzivně tepelně ošetřovány, v důsledku toho může docházet k fyzikální nestabilitě. Tato nestabilita se může projevit v několika formách. Příkladem lze uvést flokulaci či gelovatění během tepelného ošetření, ale zaznamenat lze také tvorbu proteinových agregátů, které jsou pozorovatelné až během skladování, kdy sedimentují. Tato schopnost mléka snášet tepelné ošetření, a to bez výše uvedené fyzikální nestability, se označuje právě jako termostabilita (Huppertz 2016). Termostabilita mléka je vyjádřena jako čas, za který došlo ke koagulaci mléka při teplotě 140 °C, přičemž za výbornou termostabilitu lze považovat hodnoty blízké se k 30 minutám (Chramostová et al. 2014). Zcela běžně se stanovení termostability provádí v provozu při výrobě mléčných výrobků, jako jsou zahuštěná mléka, mléčné koncentráty, sušená mléka, kojenecká výživa či tekutá mléka s vysokým obsahem proteinů (Huppertz 2016). Jsou také objasněny složkové i fyzikální ukazatele, které termostabilitu ovlivňují a rovněž se stanovují během výroby (Šnicr et al. 2015). Je však velmi málo dostupných informací o temostabilitě syrového kravského mléka a vnějších vlivech na ni působících, které by umožnily výběr mléka pro specifické mléčné výrobky již během jeho sběru na farmě. Tato problematika je dále diskutována na straně č. 50.

### ***Syřitelnost***

Jak uvádí Pytel & Šustová (2017), syřitelnost mléka vyjadřuje schopnost mléka reagovat s přísadkou syřidla a tvořit sraženinu. Této vlastnosti mléka je v mlékárenském průmyslu věnována velká pozornost. Důvodem je skutečnost, že řada vědeckých studií potvrdila význam tohoto ukazatele z hlediska výroby, výtěžnosti i kvality sýrů (Bittante 2011). V rámci syřitelnosti se nejčastěji stanovují tři základní ukazatele, jedná se o čas enzymatické koagulace mléka, dobu utužení sýřeniny a pevnost sýřeniny měřená po 30 minutách od přidavku enzymu (Bittante et al. 2012). Stejně jako u bodu mrznutí i u syřitelnosti mléka se očekává posun v

rámci metod jejího stanovení. Současné metody nejsou totiž vhodné pro studie na úrovni populace, což znemožňuje vývoj v rámci šlechtitelských programů (Stocco et al. 2021).

### 1.3 Nekalé praktiky v mlékárenské průmyslu

Mléko a mléčné výrobky představují hlavní složku lidské výživy v mnoha částech světa, což je podmíněno nejen vysokou nutriční hodnotou, ale i relativně nízkými náklady na výrobu. A právě díky velmi vysoké spotřebě je falšování mléka zcela běžnou záležitostí, což způsobuje jednak ekonomické ztráty, jednak také značné riziko pro zdraví spotřebitelů (Nascimento et al. 2017; Silva & Rocha 2020).

Ola (2015) ve své studii definoval pojem falšování mléka jako odstranění nebo nahrazení mléčných složek a následné přidání látek cizorodých (voda, syrovátka, škrob, hydroxid sodný, formaldehyd atd.) bez vědomí kupujícího. Nejčastěji, a také nejsnadněji se mléko falšuje pomocí dostupnějšího mléka jiného druhu, příkladem lze uvést kozí nebo ovčí mléko, které se falšuje celoročně dostupným kravským mlékem. Mezi závažnější případy falšování, které již mohou mít fatální dopady na lidské zdraví, lze zařadit přídavek formalínu, melaminu, močoviny, nemléčné bílkoviny, syntetického mléka atd. Taktéž je známo mnoho případů řadící se do tzv. neúmyslného falšování, do kterého lze zařadit např. mléko s nepovoleným obsahem antibiotik (Ullah et al. 2020).

Za nejstarší rutinu falšování mléka lze jednoznačně označit „nastavování“ mléka vodou jakékoliv kvality. V minulosti byla přidávána hlavně s cílem navýšit objem vyprodukovaného mléka. V současné době naštěstí zvodnění mléka pozbývá na významu, neboť zpeněžování mléka vyplývá z obsahu dvou hlavních složek, a to bílkovin a tuku. Snížený obsah celkové sušiny není zdaleka jediný znak zvodněného mléka, dále se také mění jeho hustota, index lomu laktózy a bod mrznutí. A právě stanovení bodu mrznutí je nejčastější metoda pro detekci zvodněného mléka. Avšak legislativní detekční limit ( $-0,520$  až  $-0,515$  °C) může být ovlivněn nejen vnitřními a vnějšími činiteli vztahující se k zvířeti, ale také může být snížen pod  $-0,520$  °C přidáním konzervačních, nebo jiných rozpustných látek, jako je cukr či sůl (Ola 2015; Hanuš et al. 2016; Poonia et al. 2017).

Jak již bylo zmíněno výše, obsah bílkovin hraje důležitou roli při zpeněžování mléka mlékárnami, a proto falšování mléka často zahrnuje přidání dusíkatých sloučenin, které navýší jejich celkový obsah. Zjevnou výhodou pro podvodníky představuje fakt, že nebílkovinný dusík není možné odlišit metodami Kjeldahl a Dumas, které se běžně používají ke stanovení celkového obsahu v mléku a mléčných výrobcích (Nascimento et al. 2017). Kvůli vysokému obsahu dusíku jsou pro tyto účely využívány melamin, močovina a syrovátka. Přidání melaminu se ukázalo být obzvláště lukrativním způsobem, jak navýšit celkový zjevný obsah bílkovin. Toho jsou důkazem i dva závažné incidenty. V roce 2007 došlo v Severní Americe

k hromadným úhynům psů a koček. Příčina byla akutní melamin-kyanurátová nefropatie. Následně byly tyto látky identifikovány v krmivu dovezeném z Číny. O rok později došlo k masivnímu falšování kojenecké výživy melaminem v Číně. Následovala hromadná intoxikace kojenců. Falšované kojenecké mléko pozřelo téměř 300 tisíc dětí, přes 50 tisíc bylo hospitalizováno a nejméně 6 jich zemřelo (Anděl & Dlouhý 2009). Další cestou, jak zvýšit obsah bílkovin a taktéž objem vyprodukovaného mléka, je mísení mléka, močoviny a vody. V závislosti na finálním objemu se koncentrace močoviny upravuje tak, aby se měrná hmotnost rovnala měrné hustotě přirozeného mléka. I když močovina je přirozenou složkou mléka a v nízké koncentraci nepředstavuje riziko pro lidské zdraví, překročení stanovených mezních koncentrací může způsobit vážně zdravotní komplikace (Khan et al. 2015). V období 2010–2016 byla vyvinuta řada analytických postupů pro detekci těchto dusíkatých sloučenin v mléce a kojenecké výživě v návaznosti na incident s melaminem, který se odehrál v roce 2008 v Číně. Tyto metody budou popsány v následující kapitole.

Mléko, sušené odstředěné mléko a další mléčné výrobky mohou být rovněž znehodnoceny nemléčnými proteiny jako sójový, hrachový, rýžový, mandlový či pšeničný. Podvodníkům se nemléčné proteiny zamlouvají především po stránce nákladové. Příkladem lze uvést sójový protein, jehož výrobní náklady jsou o 70 % nižší než na mléčný protein (Azad & Ahmed 2016). Navýšení celkového obsahu bílkovin v mléku prostřednictvím rostlinných proteinů bez označení, může ohrozit především spotřebitelé trpící alergií a vést tak k hypotenzi nebo anafylaxi (Yang et al. 2018).

Další hlavní složkou, která často podléhá falšování, je jednoznačně mléčný tuk, a to především díky faktu, že jeho výroba patří mezi nejnákladnější na světě. Mléčný tuk může být smíchán nebo také zcela nahrazen a využit pro další finanční zisk. Nejčastěji se mléčný tuk kompenzuje nemléčným tukem rostlinného či živočišného původu. Z rostlinných olejů je k falšování nejčastěji využíván sójový, slunečnicový, podzemnicový, kokosový, palmový i arašídový olej, ze živočišných se pak využívá hovězí lůj nebo vepřové sádlo (Nascimento et al. 2017). Nejúčinnější způsoby, jak detekovat přítomnost cizích tuků v mléku, je stanovení složení profilu mastných kyselin, triacylglyceridového profilu a různých dalších frakcí minoritních složek lipidů, zejména pak nezmýdelnitelné frakce. Falšování mléčného tuku rovněž někdy doprovází přidavek detergentů sloužící k emulgování a rozpouštění ve vodě, čímž je získán charakteristický pěnivý roztok (Poonia et al. 2017).

Předmět vážného znepokojení představuje i chemicky syntetizovaná mléčná tekutina. Syntetické mléko, jak se tato tekutina odbornou veřejností nazývá, je „vynikající“ napodobenina přírodního mléka obsahující rostlinné oleje, močovinu a také emulgátory,

kteře zajišťují dobrou pěnivost a podobnou měrnou hmotnost jako u klasického mléka. V mnoha případech se syntetické mléko míchá s klasickým mlékem, aby se dosáhlo typické mléčné vůně, konzistence i barvy. Tudiž syntetické mléko z celkového objemu tvoří přibližně 5 až 10 %. Detekci syntetického mléka komplikuje zvláště rozmanitost cizorodých látek, které jsou využívány při jeho výrobě. Nedávná zpráva Indické rady lékařského výzkumu naznačila, že mezi tyto cizorodé látky mohou spadat i karcinogenní látky (Sadat et al. 2006; Nascimento et al. 2017; Poonia et al. 2017).

Falšování mléka může být také cíleno na snížení mikrobiálního růstu a zvýšení trvanlivosti konečného produktu, což zahrnuje přidání poměrně velkého množství exogenních látek, z nichž je nejčastěji přidáván peroxid vodíku. I když díky nativním chemickým procesům syrové mléko může obsahovat peroxidy (1 až 2 mg/l), na to, aby byly inhibovány patogeny, by koncentrace musela být minimálně 10krát větší. Tyto vysoké koncentrace poškozují gastrointestinální buňky a jejich poškození může vést až ke gastritidě střev konzumenta (Nascimento et al. 2017; Poonia et al. 2017; Ivanova et al. 2019).

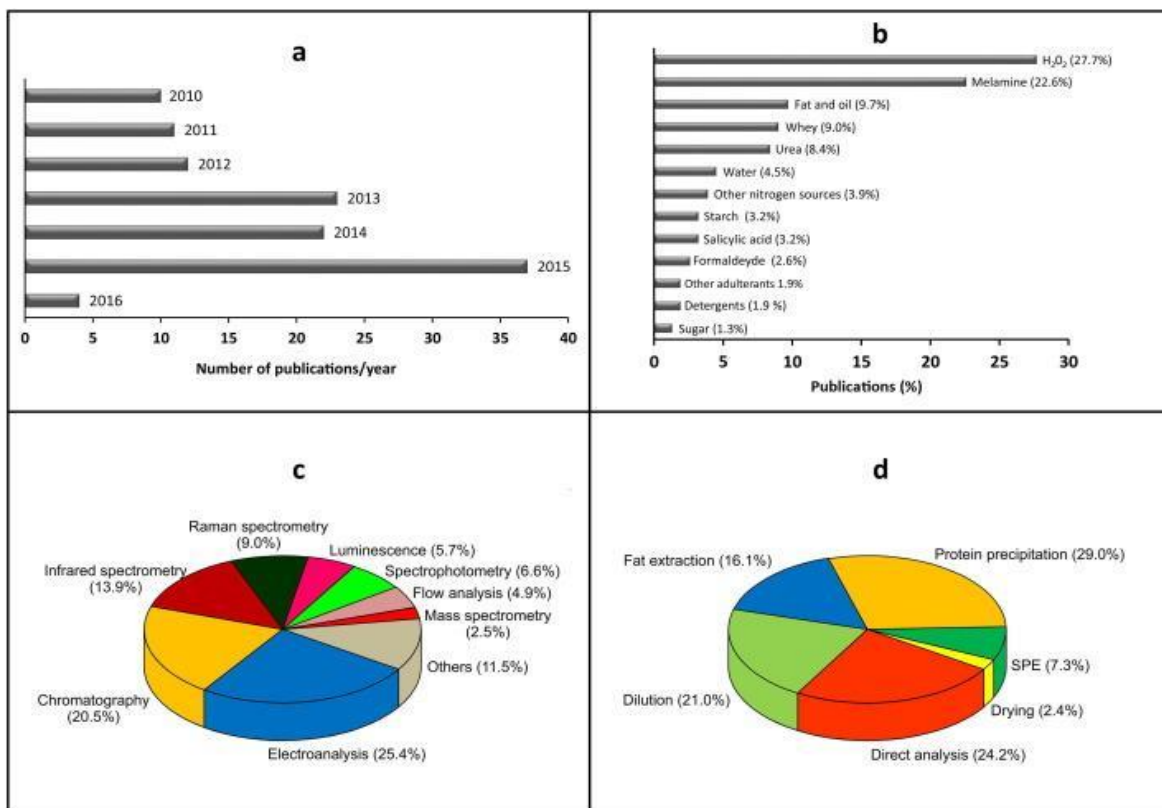
Nejběžnější a nejsnazší falšování mléka v dnešním 21. století představuje nahrazování výrazně dražšího mléka, jako je buvolí, kozí a ovčí, levnějším a celoročně dostupným kravským mlékem, a to zvláště díky výraznému snížení nákladů, které tento druh falšování poskytuje. V tomto případě je ohrožena především ta část populace, která je alergická na bílkovinu kravského mléka a po pozření např. kozího mléka, které bylo znehodnoceno mlékem kravským, u ní mohou nastat kožní, gastrointestinální, respirační problémy či dokonce anafylaktický šok (Ewida & Abd El-Magiud 2018). Chovatelé především malých přežvýkavců zaměřující se na produkci mléka nemusí mléko falšovat jen s vidinou vyššího zisku, ale také kvůli přijatelnějším sensorickým vlastnostem, kdy kravské mléko může z části maskovat typickou chuť a vůni kozího či ovčího mléka (Golinelli et al. 2014).

### **1.3.1 Metody detekce falšování mléka a mléčných výrobků**

K dnešnímu dni existuje řada technik, které se používají pro kvalitativní i kvantitativní analýzu sloužící k detekci podvodů v rámci mléčného průmyslu. Přehled nejpoužívanějších analytických metod v letech 2010 až 2016 je zobrazen v Grafu č. 1. včetně počtu publikací na toto téma, cizorodých příměsí a přípravy vzorků.



Graf č. 1 Nejčastěji používané analytické metody k detekci falšování mléka a mléčných výrobků v letech 2010 až 2016 (c), počet publikací týkající se detekce falšování mléka a rok publikace (a), druh cizorodé příměsi ve vztahu k počtu publikací (b) a příprava vzorku (d).



Zdroj: Nascimento et al. (2017)

### ***Elektromigrační metody***

Jednou z nejběžněji využívaných technik pro detekci falšování mléka jsou elektromigrační metody, tedy různé formy elektroforézy, které se používají k separaci bílkovin. Mezi nejčastěji využívané formy lze zařadit kapilární elektroforézu a elektroforézu na polyakrylamidovém gelu, taktéž označovanou jako PAGE (Poonia et al. 2017). U kapilární elektroforézy probíhá separace v úzké kapiláře z fúzovaného křemíku, díky čemuž se odděluje komplexní řada velkých molekul. Tento typ elektroforézy prokázal svoji využitelnost pro ověřování autenticity mléka a mléčných výrobků již na konci minulého století k rozpoznání přítomnosti kravského mléka v kozím mléku i sýru s detekčním limitem 2 % kravského mléka (Cartoni et al. 1999). Kalibrační křivka byla sestavena z poměrů kravského  $\beta$ -laktoglobulinu a kozího  $\alpha$ -laktalbuminu. Z novějších publikací, které se zaměřily na využití kapilární elektroforézy, lze zmínit vědeckou práci Trimboli et al. (2019). Ti se zaměřili na vývoj nové, rychlé a robustní metody pro detekci falšování buvolího mléka kravským s použitím pouze jednoho markeru. Vyvinutá metoda byla schopna detekovat 1 % kravského mléka, limit kvantifikace byl 3,1 % a jako biomarker byla využita syrovátková bílkovina  $\alpha$ -laktalbumin.

Pesic et al. (2011) rovněž využili elektromigrační metodu, konkrétně nativní PAGE, ke kvantitativní a kvalitativní analýze kravského mléka v kozím a ovčím mléku. Kvantifikace kravského mléka, která byla umožněna na základě lineárních vztahů mezi intenzitou signálů v pásu kravských syrovátkových bílkovin ( $\alpha$ -laktalbumin,  $\beta$ -laktoglobulin) a objemovým procentem cíleně přidaného kravského mléka ve všech analyzovaných vzorcích, byla možná v širokém rozhraní od 3 % do 90 % v kozím i ovčím mléku.

### ***Chromatografické metody***

Rovněž chromatografické metody, konkrétně vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) i plynová chromatografie (GC), našly v rámci ověřování autenticity mléka a mléčných výrobků své uplatnění. Využívány jsou především díky schopnosti oddělit velké množství sloučenin, což umožňuje jejich identifikaci pomocí různých typů detektorů. Údaje získané z těchto technik jsou porovnávány jednak s informacemi uloženými v nejrůznějších databázích, jednak s výsledky analýzy autentických standardů provedených za účelem identifikace obsahu dané potraviny (Abbas et al. 2018). HPLC v kombinaci s různými detekčními technikami je všeobecně nejčastěji využívanou technikou pro detekci cizorodých látek v rámci potravinářského sektoru. V rámci mlékařství byla HPLC s různými detektory sledována užitečnou například při detekci peroxidu vodíku v pasterovaném mléku, práškových detergentů v kojenecké výživě nebo melaminu v UHT mléku (Tay et al. 2013; Finete et al. 2015; Ivanova et al. 2019). Využitelnost HPLC na reverzní fázi s UV detektorem k detekci různých druhů mléka použitého k výrobě sýrů potvrdili ve své studii i Ferreira & Caçote (2003). Dle peaků  $\beta$ -laktoglobulinu v kravském, kozím a ovčím mléku byla umožněna kvantifikace procenta daného druhu mléka s detekčním limitem 2 %. Naopak GC v kombinaci s různými typy detektorů bývá často využívána k detekci podvodů s mléčným tukem. Příkladem lze uvést studii, kde využili GC s plamenovým ionizačním detektorem (FID) k detekci rostlinných olejů v mléčném tuku. Jako biologické markery byly v tomto případě využity kyselina olejová, kyselina linolová, triacylglycerol a cholesterol, pomocí nichž bylo možné detekovat 10 % nemléčného tuku v mléčném tuku (Kim et al. 2015). Kromě detekce rostlinných tuků lze pomocí GC s FID detekovat v mléčném tuku i jiné živočišné tuky, konkrétně hovězí lůj a vepřové sádlo, což potvrdili ve své studii Rebecchi et al. (2016). Ti prostřednictvím analýzy profilů mastných kyselin a mnohonásobné lineární regrese dokázali detekovat 10 % hovězího loje a 5 % vepřového sádla v mléčném tuku.

### ***Metody založené na detekci DNA***

V poslední době si velkou pozornost získaly i metody založené na detekci DNA, a to především díky faktu, že molekuly DNA jsou extrémně perzistentní nejen vůči tepelnému záhřevu, ale i technologickému zpracování, tudíž si mohou zachovat sekvenčně-specifické informace, které lze pak získat po amplifikační reakci. Jednou z nejběžněji používaných metod založených na detekci DNA v rámci mlékařství je jednoznačně polymerázová řetězová reakce (PCR). Nejčastěji se pak aplikuje jednoplexní PCR, a také Real Time PCR (Agrimonti et al. 2015). Jako další využívané PCR metody v rámci mlékařství lze zmínit štěpení fragmentů restrikními endonukleázami (PCR-RFLP), amplifikaci dvou nebo více fragmentů různými páry primerů (multiplexní PCR) nebo analýzu polymorfismu konformace jednořetězců (PCR-SSCP, Mafra et al. 2008). Díky své vysoké citlivosti a specifčnosti si technika PCR našla své místo především při detekci levnějších a hojněji dostupných druhů mléka, což svou studií jednoznačně prokázali Tsakali et al. (2019). Ti na základě výběru vysoce polymorfních oblastí uvnitř kravských a kozích mitochondriálních D-smyček zvolili specifické páry primerů pro detekci kravské a kozí DNA. Detekční limit Real Time PCR metody byl na stopové úrovni, a to 0,01 % kravského mléka v kozím mléku se 100% senzitivitou a 100% specificitou. Extrakci vysoce kvalitní DNA lze rovněž použít v rámci procesu autentizace mléčných výrobků. Agrimonti et al. (2015) popsali využití kvadruplexní kvantitativní Real-time PCR pro identifikaci kravské, kozí, ovčí a buvolí DNA v mléku a mléčných výrobcích. Sestavená metodika umožnila detekci kravské DNA ve směsích mléka i sýrů s detekčním limitem 0,1 %. Vliv tepelného opracování na detekční limit stanovený duplexní PCR metodou publikovali ve své studii Deng et al. (2020). Velbloudí, kobyly a kozí mléko cíleně padělali kravským mlékem a následně vyhodnotili použitelnost duplexní PCR na syrové, pasterované, UHT a lyofilizované směsi. Pro směsi syrového mléka byl detekční limit 0,1 % pro všechny druhy mléka; pro pasterované 0,1 % pro směsi kravské–velbloudí a kravské–kobyly a 0,2 % pro směs kravské–kozí; pro UHT 0,5 % pro směsi kravské–velbloudí a kravské–kobyly a 2 % pro směs kravské–kozí. Detekční limity pro lyofilizovaná mléka se pak pohybovaly od 0,1 do 0,2 %.

### ***Imunochemické metody***

Technologie imunoanalýzy se v rámci potravinářského průmyslu využívá již od 80. let 20. století, a to nejen pro výzkumné účely, ale také pro rutinní analýzy. Na rozdíl od chromatografických a elektromigračních metod může tato technologie poskytnout především rychlost, nižší nákladovost, minimální přípravu vzorku, reprodukovatelnost i citlivost. První imunotesty navržené pro kontrolu kvality mléka a mléčných produktů byly

polyklonální protilátky purifikované imunoafinitní chromatografií antisér získané z imunizovaných laboratorních zvířat (Pizzano et al. 2011). Mezi běžně používané imunologické metody pro analýzu mléka lze zařadit přímou Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA), nepřímou ELISA, nepřímou kompetitivní ELISA, konkurenční ELISA a sendvičovou ELISA (nekompetitivní, Poonia et al. 2017). Ren et al. (2014) ve své studii využili nepřímý kompetitivní ELISA test k detekci kravského mléka v jačím mléku. Kravské mléko bylo detekováno pomocí monoklonální protilátky specifické pro kravský  $\beta$ -kasein. Minimální detekční limit kravského mléka v jačím byl 1 %. Autoři této publikace rovněž otestovali vliv tepelného ošetření, přídavku kyseliny i syřidla na stabilitu  $\beta$ -kaseinu, který byl vyloučen. K ověření autenticity mléka a mléčných výrobků byl rovněž využit sendvičový ELISA test. Pomocí tohoto testu bylo detekováno kravské mléko v kozím, ovčím a buvolím mléku, a také v sýru. Detekční limit se pohyboval v rozmezí od 0,001 až 0,01 % kravského mléka. Kombinace monoklonálních a polyklonálních protilátek byla využita k detekci kravských imunoglobulinů (Hurley et al. 2006). Nepřímá kompetitivní ELISA, využívající protilátky proti peptidům kravského mléka k detekci  $\beta$ -kaseinu, byla rovněž využita k detekci kravského mléka v oslím mléku (Pizzano & Salimei 2014). Nutno zmínit, že tyto metody mohou selhat a to v případě, že cílený antigen je degradován záhřevem nebo proteolýzou probíhající během zpracování potravin (Poonia et al. 2017).

### ***Spektroskopické metody***

V rámci detekci cizorodých látek se v sektoru mlékárenství osvědčily i spektroskopické metody ve spojení s chemometrií, a to především z důvodu, že jsou označovány za tzv. zelenější analytické metody, což znamená, že z pohledu ekologické zátěže jsou méně náročné, a to především díky minimální nebo žádné přípravě vzorku a nedestruktivě (Nascimento et al. 2017). V současné době mezi nejčastěji využívané spektroskopické metody patří infračervené záření (IR), Ramanova spektroskopie, ultrafialovo-viditelná spektroskopie (UV-Vis), fluorescence a nukleární magnetické rezonance (NMR) či hmotnostní spektrometrie (MS).

Blízká (NIR) a střední infračervená spektroskopie (MIR) s aplikacemi ve spektrálním rozsahu  $14000\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$  a  $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$  představuje jednu z nejpoužívanějších spektroskopických metod pro kvalitativní i kvantitativní analýzu kvality i autenticity mléka a mléčných výrobků. Rychlou identifikaci zkoumaného vzorku lze získat díky jedinečným změnám vibračního a rotačního stavu molekul, které lze následně použít pro analýzu fingerprintů (Kucharska-Ambrożej & Karpinska 2020). Infračervené spektrometry v současné době využívají Fourierovou transformaci (FT-IR), která pomocí matematické funkce převede

získaný signál na spektrum (Dvořák et al. 2016). Spektroskopie blízké infračervené oblasti byla úspěšně použita při detekci syrovátky, močoviny, syntetického mléka, syntetické moči, tetracyklinů, příměsí glukózy nebo peroxidu vodíku v kravském mléku. Rovněž byl pomocí této metody detekován melamin v mléčných produktech (Zhang et al. 2014; Poonia et al. 2017), a také se podařilo pomocí NIR v kombinaci s chemometrií na základě profilování mastných kyselin rozlišit organické a konvenční mléko (Liu et al. 2018). Různé přísady kravského mléka (od 1 % do 20 %) do kozího mléka bylo možno pomocí NIR detekovat s 95% spolehlivostí (Teixeira et al. 2020). Obdobnou studii publikovali i Mabood et al. (2017), kteří rovněž využili NIR v kombinaci s vícerozměrnou analýzou pro detekci kozího mléka ve velbloudím mléku s detekčním limitem 0,5 %. Jak již bylo zmíněno výše, krom NIR lze využít i MIR, které se neliší pouze spektrálním rozsahem, ale také interpretací spekter, která je omezenější u NIR, kvůli mnoha překrývajícím se pásům, z čehož vyplývá, že velké množství chemicky odlišných vzorků vede k téměř nerozeznatelným spektrálním profilům. Na druhou stranu lze NIR zařadit do on-line kontroly kvality surovin, a to díky faktu, že pomocí NIR lze měřit přes některé obaly (Bertelli et al. 2007; Dvořák et al. 2016). Detekci jedenácti nepůvodních látek v syrovém mléku otestovali Gondim et al. (2017) pomocí sekvenční strategie založené na MIR a statistické metodě Soft Independent Modelling of Class Analogy Technique (SIMCA). Z jedenácti testovaných látek bylo nakonec do modelu „multi-class“ zařazeno pouze pět tříd, a to peroxid vodíku, citrát sodný, uhličitán sodný, formaldehyd a škrob. Přičemž 82 % vzorků bylo klasifikováno správně, 17 % vyhodnoceno jako neprůkaznou klasifikaci a 1 % bylo zařazeno chybně. Statistickou metodu SIMCA rovněž využil i Limm et al. (2018) k vývoji rychlého screeningového nástroje pro necílenou detekci melaminu v sušeném mléku. Hlavní přístrojové vybavení představoval přenosný spektrometr s oslabenou celkovou odrazivostí a Fourierovou transformací. Sběr dat probíhal ve spektrálním rozsahu 650 až 4 000  $\text{cm}^{-1}$ . Míra správné klasifikace byla 100 % pro koncentrace melaminu 0,3 % až 1,0 % dle úpravy vzorku.

Také Ramanova spektroskopie využívá atomové vibrace pro získání fingerprintů molekul. Využití Ramanovy spektroskopie v rámci analýzy potravin je v posledních letech na vzestupu, jelikož tato technika může poskytovat obsahově relevantní informace založené na dobře definovaných spektrech v různém skupenství vzorku (kapalina, pevné látka, plyn, El-Abassy et al. 2011). Využití této techniky je možné pro hodnocení hygienické i mikrobiální jakosti mléka a rovněž byl prokázán potenciál pro odhalování podvodných manipulací s mlékem (He et al. 2019). Dva ruční Ramanovy spektroskopické přístroje v kombinaci s chemometrií byly využity Karunathilaka et al. (2018) jako rychlý a necílený screeningový nástroj pro detekci melaminu v sušeném mléku. Model využití v této studii byl

úspěšně použit ke klasifikaci všech kontrolních vzorků bez falešně negativních zařazení s detekčním limitem 1,0 % pro suché směsi a 0,3 % pro mokré směsi. Mendes et al. (2020) naopak využili Ramanovu spektroskopii k detekci sladké syrovátky v syrovém kravském mléku. Úspěšně byly detekovány koncentrace sladké syrovátky v rozmezí od 0 % do 20 %.

Mezi méně používanou spektroskopickou techniku lze zařadit UV-Vis spektrofotometrii, která se používá především při detekci chemických skupin obsahující konjugované vícenásobné vazby, které mohou absorbovat UV světlo. I přestože složitost získaných UV-Vis spekter ztěžuje jejich použití pro klasifikaci nebo rozlišení vzorků od sady vzorků, bylo učiněno několik pokusů. Příkladem lze uvést jednoduchou a citlivou kolorimetrickou metodu sloužící k detekci melaminu v mléku. Tato vyvinutá metoda je založena na principu, že melamin způsobuje agregaci nanočástic stříbra, což má za následek změnu barvy. Tímto monitorováním absorpčních spekter nanočástic stříbra pomocí UV-Vis spektrofotometru lze kvantifikovat až 0,04 mg/l melaminu (Kumar et al. 2016; Kucharska-Ambrożej & Karpinska 2020).

NMR se rovněž prokázala jako velmi užitečná technika pro rutinní kontrolu falsifikace mléka a mléčných produktů. Pro tyto potřeby se používá několik izotopů jako  $^{15}\text{N}$ ,  $^{17}\text{O}$  a  $^{31}\text{P}$ , nejčastěji však  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  (Luykx & van Ruth 2008).  $^1\text{H}$  NMR s vysokým rozlišením v kombinaci s vícerozměrnými statistickými metodami úspěšně použil Consonni & Cagliani (2008) k rozlišení italského sýru Parmigiano Reggiano a sýrů typu „grana“ pocházející ze zemí východní Evropy. V souvislosti s nedávnou melaminovou krizí v Číně proběhl výzkum zaměřující se na použití NMR k detekci melaminu v kojenecké výživě. Bylo zjištěno, že  $^1\text{H}$  NMR pracující při 400 MHz v kombinaci s vícerozměrnou statistickou analýzou je schopna rozlišit kojeneckou výživu bez a s melaminem (Lachenmeier et al. 2009). Pro cíl autentizace byla také použita  $^1\text{H}$  NMR v pevné fázi s principem rotace pod magickým úhlem, tzv. „magic angle spinning“ pro přímou identifikaci specifických metabolitů v neporušených vzorcích italského sýru Mozzarella di Bufala Campana. Specifické pulzní sekvence (eCPMG a eDiff) určené k modulaci spin-spinových a difúzních vlastností vyřešily problém s překrývajícími se spektry získanými běžnými pulzními sekvencemi. Následná vícerozměrná statistická analýza, zahrnující i hierarchickou klastrovou analýzu, poskytla zcela správnou klasifikaci sýrů mozzarella pocházející ze dvou různých výrobních závodů (Mazzei & Piccolo 2012). Rozmanitý soubor cizorodých látek jako syrovátka, močovina, peroxid vodíku, syntetické mléko nebo syntetická moč se pokusili detekovat v kravském mléku Santos et al. (2016) pomocí  $^1\text{H}$  Time Domain Nuclear Magnetic Resonance (TD-NMR). Regresní modely získané prostřednictvím  $^1\text{H}$  TD-NMR a relaxační časy T2 prokázaly silnou korelaci pro odhad míry falšování. Čistá mléka od mlék obsahující příměsi rozlišovaly klasifikační modely při

úrovni falšování > 5 % v/v. NMR rovněž prokázala využitelnost při identifikaci a kvantifikaci profilu mastných kyselin. Na základě poměru nasycených mastných kyselin s krátkým a dlouhým uhlíkatým řetězcem bylo možné pomocí  $^1\text{H}$  NMR rychle stanovit podezření na falšování sýrů rostlinnými tuky (Tociu et al. 2018).

V poslední době se také pro účely ověřování pravosti mléka a mléčných výrobků využívá hmotnostní spektrometrie (MS), zejména MS s laserovou desorpčí/ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF), a to zvláště díky faktu, že primární struktura homologních proteinů vykazuje druhové rozdíly v aminokyselinách, což ovlivňuje jak jejich molekulární hmotnosti, tak „fingerprinty“ peptidové hmoty, to vše lze použít k posouzení proteinového či peptidového profilu daného vzorku. Použitelnost MALDI-TOF MS k detekci kravského a kozího mléka v oslím mléku byla ověřena Cunsolo et al. (2013) pomocí proteinových profilů nejhojnějších syrovátkových proteinů ( $\alpha$ -laktalbumin a  $\beta$ -laktoglobulin). Detekční limit byl v tomto případě srovnatelný s pracnějšími a náročnějšími metodami, a to 0,5 až 2 % kravského/kozího mléka v oslím mléku. Na základě spektrálního profilování proteinů a lipidů pomocí kapalinového MALDI MS bylo možné rozpoznat čisté kravské, kozí, ovčí a velbloudí mléko s přesností klasifikace 100 %. V rámci té samé studie byla testována i detekce kravského mléka v kozím mléku, kdy nejsilnější příspěvek k rozpoznání měly proteinové složky mléka. Nově vyvinutá metoda byla schopna detekovat 5 % kravského mléka v kozím mléku s 92,5% senzitivitou a 94,5% specificitou. Detekce 10% příměsi kravského mléka v kozím byla pak možná s téměř 100% senzitivitou a specificitou (Piras et al. 2021). Další vědecké studie zaměřující se na odhalování falšování mléka malých přežvýkavců mlékem kravským pomocí metod NMR a MALDI-TOF MS jsou diskutovány na stranách č. 36 a 67.

## 2 Cíle a hypotézy

Cílem této disertační práce bylo jednak otestovat nové či již existující analytické metody, konkrétně NMR a MALDI-TOF MS, uplatnitelné v mlékařských laboratořích pro odhalování falšování mléka malých přežvýkavců mlékem kravským, jednak rozšířit poznatky o vnitřních a vnějších vlivech, které významně působí na složkové, hygienické, mikrobiální, fyzikální a technologické ukazatele syrového kravského mléka.

Příčemž využití NMR si kladlo za cíl najít biomarkery kravského a kozího mléka z řady nízkomolekulárních látek, pomocí nichž by bylo možné tyto dva druhy rozlišit. Pokud budou nalezeny charakteristické biomarkery kravského nebo kozího mléka, ověřit je jako potenciální biomarkery falšování v různých binárních směsích a vyhodnotit, zda se jedná o stabilní látky, které nejsou náchylné ke změnám v důsledku pasteračních procesů, genetického pozadí, krmné dávky nebo sezónnosti. U metody MALDI-TOF MS bylo pak cílem ověřit spolehlivost detekce falšování mléka malých přežvýkavců pocházející z různých stád napříč několika kraji ČR, a také otestovat změny peptido-proteinových biomarkerů vlivem tepelnému ošetření.

Dalším cílem této disertační práce bylo určit vnější faktory farmy, které mohou ovlivnit variabilitu termostability syrového kravského mléka. Prioritou tohoto experimentu bylo provést vyhodnocení s využitím výsledků rozsáhlého souboru dat z tankových vzorků mléka, u kterých nebyla prováděna technologická úprava, úprava složení ani úprava kyselosti. Další cíl se rovněž zaměřil na vnější faktor působící na složení syrového kravského mléka, a to na složení krmné dávky vysokoprodukčních dojnic. Cílem bylo zhodnotit vliv zkrmování luskovino-obilné siláže na složkové, mikrobiologické, hygienické a technologické ukazatele syrového mléka.

V rámci disertační práce byly testovány následující hypotézy:

1. Prostřednictvím protonových experimentů NMR lze v podmínkách ČR odhalit falšování kozího mléka kravským mlékem.
2. MALDI-TOF MS je rychlá, spolehlivá a robustní metoda využitelná pro detekci kravského mléka v ovčím a kozím mléku v podmínkách ČR.
3. Na základě definování vnějších vlivů farmy působících na termostabilitu syrového kravského mléka lze učinit výběr mléka pro specifické mléčné výrobky ošetřené vysokoteplým ošetřením již během sběru.
4. Zvýšený podíl luskovino-obilné siláže v krmné dávce vysokoprodukčních dojnic nemá vliv na kvalitu syrového mléka.



### 3 Publikované práce

#### *Vědecké publikace*

Rysova L, Legarova V, Pacakova Z, Hanus O, Nemeckova I, Klimesova M, Havlik J. 2021. Detection of bovine milk adulteration in caprine milk with N-acetyl carbohydrate biomarkers by using <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Dairy Science* **104:9583–9595**.

Hanuš O, Kucera J, Nemeckova I, Citek J, Kopec T, Falta D, Nejeschlebova H, Rysova L, Klimesova M, Elich O. 2021. Raw cow milk protein stability under natural and technological conditions of environment by analysis of variance. *Foods* **10:1–16**.

Rysova L, Cejnar P, Hanus O, Legarova V, Havlik J, Nejeschlebova H, Nemeckova I, Jedelska R, Bozik M. 2022. Use of MALDI-TOF MS technology to evaluate adulteration of small ruminant milk with raw bovine milk. *Journal of Dairy Science* **105:4882–4894**.

Hanuš O, Huňady I, Kučera J, Roubal P, Pozdíšek J, Bjelka M, Klimešová M, Němečková I, Nejeschlebová H, Rysová L. 2022. Silages from legume-cereal mixtures as a factor of dairy cow milk quality. *Acta Fytotechnica et Zootechnica* **25:7–15**.

Kejdova Rysova L, Duchacek J, Legarova V, Gasparik M, Sebova A, Hermanova S, Codl R, Pytlík J, Stadnik L, Nejeschlebova H. 2023. Dynamics of milk parameters of quarter samples before and after the dry period on the czech farms. Publikace je v současné době v recenzním řízení v časopisu **Animals**.

#### *Metodiky*

Rysová L, Pacáková Z, Hanuš O, Legarová V, Havlík J, Mascellani A, Nejeschlebová H, Němečková I. 2022. Detekce falšování kozího mléka mlékem kravským pomocí metody <sup>1</sup>H NMR – certifikovaná metodika, *Metodika* **1920222-V4**, dostupné z <https://metodiky.agrobiologie.cz/>

Rysová L, Cejnar P, Hanuš O, Božik M, Legarová V, Nejeschlebová H, Němečková I. 2022. Detekce falšování kozího a ovčího mléka kravským mlékem metodou MALDI-TOF MS – certifikovaná metodika, Metodika **1920222-V5**, dostupné z <https://metodiky.agrobiologie.cz/>

### ***Články v odborných periodících***

Hanuš O, Němečková I, Rysová L, Legarová V, Kopecký J. 2019. Možnosti identifikace falšování syrového mléka. Mlékařské listy – Zpravodaj č. **6:1-7**

Hanuš O, Rysová L, Němečková I, Legarová V, Kučera J, Klimešová M, Jedelská R, Kopecký J, Nejeschlebová L. 2020. Změny technologických vlastností mléka malých přežvýkavců v důsledku falšování mlékem kravským. Mlékařské listy – Zpravodaj č. **6:4-13**

Šebova A, Rysová L, Legarová V. 2021. Co jste o buvolím mléku nevěděli. Náš chov č. **6:20-22**

Liška M, Rysová L, Legarová V. 2021. Mýty a fakta o mléku. Náš chov č. **2:39-41**

Hanuš O, Říha J, Nejeschlebová H, Rysová L, Legarová V, Tichovský P, Kopecký J, Jedelská R. 2021. Změny technologických vlastností mléka a jeho IR spekter při významné redukci počtu somatických buněk. Mlékařské listy – Zpravodaj č. **6:15-23**

Rysová L, Legarová V, Gašparík M, Ducháček J, Pytlík J, Codl R, Stádník L. 2021. Změny v systému zasušování dojnice. Náš chov č. **7:39-42**

### ***Výstupy na konferencích***

Rysova L., Legarová V., Němečková I., Havlík J. 2019. Detection and quantification of goat milk adulteration by cow milk using <sup>1</sup>H NMR. Hygiena Alimentorum XL. Dostupné z <https://docplayer.cz/147318400-Hygiena-alimentorum-xl.html>

Rysová L., Legarová V., Hanuš O., Němečková I., Havlík J. 2020. Nové spolehlivé metody detekce falšování kozího a ovčího mléka. Mléko a sýry 2020. <https://cps.vscht.cz/files/uzel/56263/0001~~K07KL8rLzHYOCDYyMDIAAA.pdf?redirected>

Rysová L, Hanuš O, Říha J, Nejeschlebová H, Legarová V, Tichovský P, Kopecký J, Jedelská R. 2022. Vliv mechanické redukce počtu somatických buněk na složení a vlastnosti mléka. CzechFoodChem 2022. Dostupné z <http://www.czechfoodchem.cz/Sborn%C3%ADk%20souhrn%C5%AF%202022.pdf>

**3.1 Detection of bovine milk adulteration in caprine milk with N-acetyl carbohydrate biomarkers by using  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy**

*Journal of Dairy Science, Volume 104, Issue 9, September 2021,*

*Pages 9583-9595*

<https://doi.org/10.3168/jds.2020-20077>

Rysova L., Legarova V., Pacakova Z., Hanus O., Nemeckova I., Klimesova M.,  
Havlik J.



## Detection of bovine milk adulteration in caprine milk with *N*-acetyl carbohydrate biomarkers by using $^1\text{H}$ nuclear magnetic resonance spectroscopy

L. Rysova,<sup>1</sup> V. Legarova,<sup>1</sup> Z. Pacakova,<sup>2</sup> O. Hanus,<sup>3</sup> I. Nemeckova,<sup>3</sup> M. Klimesova,<sup>3</sup> and J. Havlik<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, 165 00 Prague 6-Suchbát, Czech Republic

<sup>2</sup>Department of Statistics, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, 165 00 Prague 6-Suchbát, Czech Republic

<sup>3</sup>Dairy Research Institute Ltd., Ke Dvoru 12a, 165 00 Prague 6, Czech Republic

### ABSTRACT

In a return to tradition, the popularity of caprine milk is on the rise. However, particularly in countries with developed dairy industries based on bovine milk, there is the risk of adulteration with bovine milk, which is a cheaper alternative. Thus, a rapid, robust, and simple method for the detection of bovine milk added to caprine milk is necessary, and  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy appears to provide a solution. A matrix of 115 pure and artificially adulterated pasteurized milk samples was prepared and used to discover biomarkers of bovine milk that are independent of chemical and biological variation caused by factors such as genetics, diet, or seasonality. Principal component analysis and orthogonal projections to latent structures discriminant analysis of pure bovine milk and pure caprine milk revealed spectral features that were assigned to the resonances of 4 molecules. Of these, the peaks corresponding to protons in the *N*-acetylglucosamine and *N*-acetylgalactosamine acetyl moieties showed significant applicability for our method. Receiver operating characteristic curve analysis was used to evaluate the performance of the peak integrals as biomarkers of adulteration. This approach was able to distinguish caprine milk adulterated with 5% of bovine milk with 84.78% accuracy and with 10% of bovine milk an excellent 95.65% accuracy. This study demonstrates that *N*-acetyl carbohydrates could be used as biomarkers for the detection of bovine milk in caprine milk and could help in protecting caprine milk authenticity.

**Key words:** biomarker, caprine milk, food authenticity, nuclear magnetic resonance

### INTRODUCTION

The importance of goats as part of the human diet, during infancy as well as adulthood, has been recognized since the beginning of domestication (Clark and Mora García, 2017). However, the production level of caprine milk is much lower than that of bovine and buffalo milk. Worldwide population of goat has been rising dramatically since the 1960s (Miller and Lu, 2019). In 2016, the production of caprine milk represented only 1.9% of entire production of the dairy industry. In the future, however, things may change. If the current growing trend continues, caprine milk production is expected to increase by approximately 9.7 million tonnes (+53%) by 2030 (FAOSTAT, 2018; Pulina et al., 2018). Although caprine milk is similar to bovine milk in composition, it is becoming popular because of 2 specific characteristics: lower allergenic properties and better digestibility (Lara-Villoslada et al., 2004; Chen et al., 2019; Li et al., 2020). The growing demand for caprine milk and the distinct differences in rearing cows and goats, such as the liters of milk produced per animal, prices per liter of milk, and seasonality, are major reasons for fraud to be committed with caprine milk (Haenlein, 2004; Clark and Mora García, 2017). This fraud is worrying because many consumers, especially children, are allergic to bovine milk protein (Haenlein, 2001; Ballabio et al., 2011; Watson et al., 2017).

Adulteration is a major current issue for the food industry and security authorities on a global scale because fraudsters continually develop new ways to elude protection methods. This situation led to the constitution of the Administrative Assistance and Cooperation System, which has been used by members of the European Union Food Fraud Network to exchange information since 2015. In milk, the adulteration options have expanded from water, whey, and urea manipulation to include the addition of a diverse list of unfamiliar substances or other species of milk with greater availability (Azad and Ahmed, 2016; Poonia et al., 2017; Romero

Received December 22, 2020.

Accepted April 18, 2021.

\*Corresponding author: [havlik@af.czu.cz](mailto:havlik@af.czu.cz)

Gonzalez et al., 2019). For instance, the tragic incident in 2008 when milk powder was adulterated with melamine, or the adulteration of water buffalo mozzarella with sodium hydroxide in Italy, are 2 examples of such (Pei et al., 2011; Aiello et al., 2019). Given the increase in the fraud mentioned, the development of new, simple, rapid, affordable, and effective methods for the quantification and detection of milk adulteration is a priority to ensure the protection of consumers.

To date, several analytical approaches have been developed for the detection of bovine milk in milk from other species, despite the great similarity between different dairy matrices and the intrinsic variability within each. These methods include GC and liquid chromatography (LC), immunological tests, capillary electrophoresis, and PCR analysis based on detecting genomic DNA. In the past, substantial progress has also been made with spectroscopic techniques. For instance, Brandao et al. (2017) proposed a novel method for the discriminant analysis of powdered bovine and caprine milk by fluorescence techniques. Pereira et al. (2020) employed near-infrared spectroscopy and partial least squares algorithms for the identification and quantification of caprine milk adulteration with added bovine milk. Also, a method based on matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight MS was used to identify marker peptides of bovine milk that were usable for the detection of adulteration (Calvano et al., 2012).

In addition to the above-mentioned spectroscopic techniques, in recent decades, nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy has also proved to be a very powerful tool for dairy commodities fraud detection, despite the fact that milk is considered to be among the most complicated foods to study (Sundekilde et al., 2013; Sobolev et al., 2019). Nuclear magnetic resonance spectroscopy has gained popularity in the dairy science field because of its many advantages, such as minimal sample preparation, nondestructive application, rapidity, reproducibility, easy automation, remarkable selectivity, and ability to look at all of the components in a mixture at once (Mannina et al., 2012; de Moura Ribeiro et al., 2017; Shi et al., 2018).

A few previous studies have mentioned that metabolite profiles could be used to discriminate between bovine milk and milk from other species. Andreotti et al. (2000) were able to distinguish pure bovine milk and pure buffalo milk through quantitative determination of the fatty acid content by <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. A combination of <sup>1</sup>H NMR spectroscopy and an artificial neural single-layer network was used by Lamanna et al. (2011) to quantify the relative amounts of bovine milk in mixtures with ovine milk. Several biomarkers for distinguishing pure milk from bovines and other

ruminants were revealed by Yang et al. (2016) using <sup>1</sup>H NMR spectroscopy and LC-MS spectrometry. Li et al. (2017) successfully developed a <sup>1</sup>H NMR spectroscopic method in combination with mathematical models for the detection of milk adulteration. The limit of quantification was 5% (vol/vol) for bovine milk in caprine milk.

However, to our knowledge, the previously published NMR studies demonstrated the applicability of profiling by multivariate analysis but were not designed and validated with the intention of practical use. The objective of this study was to find biomarkers of bovine milk that are robust and not prone to chemical and biological variation as a result of pasteurization processes, genetic background, diet, or seasonality to develop a robust and rapid method that would be useful for the inspection authorities of the Czech Republic.

## MATERIALS AND METHODS

### Milk Samples

Milk samples were obtained from 6 dairy goat flocks and 6 dairy cow herds. The goats were of the following average breeding ratio: 59% white shorthaired goat, 29% brown shorthaired goat, 12% Anglo-Nubian goat; 83% of the cows were Holstein, and 17% were Czech Fleckvieh. The herds were selected to cover the typical breeding profiles of dairy farms in the Czech Republic (Bucek et al., 2019; Kvapilík et al., 2019).

Bulk tank samples of raw milk were collected from cooling tanks (<8°C) on the dairy farms twice in May and twice in August during the year 2019 and were transported under cold conditions (<6°C) to the laboratory. A total of 23 pure bovine milk and 23 pure caprine milk samples were taken. These samples were thermally treated by pasteurization in a batch process in a water bath to reach 72°C for 20 min. Then, a matrix of adulterated samples was prepared with random combinations of pure bovine and caprine milk; series with 1%, 5%, and 10% adulteration were prepared from each pair (Table 1). The total number of pure and adulterated milk samples was 23 × 5.

**Table 1.** Ratios of bovine and caprine milk in artificially adulterated samples

Sample identification	Bovine		Caprine	
	%	mL	%	mL
Caprine 100%	0	0	100	250
Bovine 1%	1	2.5	99	247.5
Bovine 5%	5	12.5	95	237.5
Bovine 10%	10	25	90	225
Bovine 100%	100	250	0	0

Other series of milk samples were obtained during the year 2020. This series was used as an external validation data set to verify the capability of the biomarker discovered by the blind test. Bulk tank samples of pure caprine and bovine milk were collected from the same goat flocks and dairy cow herds mentioned above. The blind test was performed with 20 pure and adulterated milk samples in 4 categories: caprine 100%, bovine 5%, bovine 10%, and bovine 100% (Table 1). Each category contained 5 samples. Equivalent pasteurization was applied.

#### Baseline Sample Characteristics

The samples were characterized in terms of their physicochemical and microbiological properties to guarantee the reproducibility and validity of the findings. The composition of the milk (fat, crude protein, casein, lactose monohydrate, total dry matter (solids), nonfat solids, and urea) was determined by indirect infrared spectroscopy with Michelson interferometry and Fourier transformations by using a Bentley DairySpec FT instrument (Bentley Instruments). The SCC was determined by fluoro-opto-electronic flow cytometry on a Somacount 300 instrument (Bentley Instruments). The active acidity of the milk was measured by using a pH meter (pHemomenal pH 1100L; VWR), and the titratable acidity was determined by titration of 100 mL samples of milk with 0.25 mol/L NaOH with phenolphthalein as the indicator. Results were calculated as Soxhlet Henkel degrees (°SH).

The classical plate method, performed according to the International Standard Organization (ISO 4833-1:2013; ISO, 2013), was used to determine the total count of mesophilic microorganisms (TCM). Milk samples and the appropriate dilutions in a volume of 1 mL were plated on GTK-M agar (MILCOM Corp.), then the Petri dishes were incubated at 30°C for 72 h. The number of colonies was expressed as colony-forming units in 1 mL of sampled milk, in accordance with ISO 7218:2007 (ISO, 2007).

The fermentation ability of milk (yogurt test) was determined by the titratable acidity according to the above-mentioned method. The test was performed with a mixed thermophilic yogurt culture, YC-180 Yo-Flex 50 U, containing *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*, and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*; the inoculum was prepared according to the manufacturer's specifications (Chr. Hansen). The starter culture was grown at 43°C for 3.5 h. The rennet coagulation time of lactoproteins (time until the formation of visible protein flakes) was determined with the addition of bacterial rennet (Fromase 220 TL BF; Royal DSM) in 50 mL of milk at 32°C in a water bath. The

time was adjusted empirically to approximately 5 min of exposure. After 1 h of syneresis, the quality of the curd was checked according to the fitness of the curd cake formed, in centimeters, by dropping the inserted body under standardized conditions.

#### NMR Spectroscopy

Heat-treated samples were mixed with chloroform (1/1, vol/vol). The chloroform contained ethanol as stabilizer (0.5–1.0%) (PENTA, Prague, Czech Republic). After 1 min of agitation with an IKA MS 3 instrument, centrifugation at  $18,000 \times g$  was applied at 4°C for 15 min to separate the milk fat (Rotanta 460 R; Hettich). The supernatant (720  $\mu$ L) was added to a new centrifuge tube and mixed with 80  $\mu$ L of phosphate buffer (pH 7.4; 1.5 M phosphate salt buffer, 5 mM sodium 3-trimethylsilyl-2,2,3,3-d<sub>4</sub>-propionate (TSP), 0.2% NaN<sub>3</sub>). The mixture was thoroughly shaken for 1 min. After centrifugation at 4°C for 15 min at  $24,400 \times g$ , 600  $\mu$ L of the supernatant were transferred into an NMR tube (5 mm; Norell ST500; Norell Inc.).

The NMR spectra were acquired on a Bruker Avance III HD spectrometer, operating at 500.23 MHz. The spectrometer was equipped with a 5-mm broad-band fluorine observation SmartProbe and autosampler (Bruker BioSpin) and was controlled by Topspin 3.57 software (Bruker BioSpin). The Bruker standard pulse sequence for one-dimensional nuclear Overhauser enhancement spectroscopy with water peak suppression (*noesypr1d*) at a temperature of 298 K (25°C) was applied. The <sup>1</sup>H NMR spectra were measured by using the following acquisition parameters: relaxation delay = 1 s; acquisition time = 4.00 s; mixing time = 100 ms; spectral width of 8,000 Hz; over 32,000 data points obtained by using 128 scans and 4 dummy scans. Based on standard Bruker routines, the NMR conditions were optimized by using automated tuning, locking, gaining, shimming, and calibration of 90° pulses. The free induction decay was multiplied by a 0.3 Hz line broadening function.

For multivariate analysis, NMR spectra were Fourier-transformed (FT), phased, zero-filled to 64,000 datapoints, aligned to the TSP at 0.0 ppm, and baseline corrected by using the Splines algorithm in the MestReNova 14.0.1 software package (Mestrelab Research). The spectra were then normalized to the average intensity of the internal standard, and their resolution was reduced to 232 bins with equal width of 0.04 ppm, excluding the solvent signals (1.02–1.3 and 3.66–3.70 ppm) and water signal (4.70–4.98 ppm).

Peaks from the discriminating bins were assigned as described below. The FT spectral datapoints in the ranges of 2.05 to 2.07 ppm (*N*-acetyl carbohydrates),

2.42 to 2.66 ppm (citrate), 5.34 to 5.38 ppm (unknown compound), and 6.18 to 6.20 ppm (orotate) were exported into Microsoft Office Excel 2016, in which the regions were precisely baseline corrected by using a zero-degree polynomial function, the peaks were integrated, and the integral values were normalized to the integral of TSP.

Metabolites in the milk profiles were assigned in the <sup>1</sup>H NMR spectra by using authentic standards (betaine, carnitine, fucose, galactose-1-phosphate, lactulose, *N*-acetylgalactosamine, *N*-acetylglucosamine, taurine, and tyrosine), all purchased from Sigma–Aldrich and Alfa Aesar. Signatures from these authentic standards were constructed in Chenomx NMR Suite 8.6. professional edition software (Chenomx Inc.) and were used for quantification and confirmation. All other compounds were confirmed by using the Chenomx built-in library ver. 10.0, the Human Metabolome Database (<https://hmdb.ca/>; Wishart et al., 2018), and previous references (Klein et al., 2010; Sundekilde et al., 2013; Yanibada et al., 2018; Garwolińska et al., 2020).

### Statistics

The characteristics of the experimental bulk tank samples of pure bovine and pure caprine milk were compared by univariate statistical methods by using the 2-tailed Student's *t*-test in Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corp.).

Multivariate statistical analyses were carried out with the online processing tool for metabolomics data, MetaboAnalyst 4.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>; Chong et al., 2019). Principal component analysis (PCA) and orthogonal projections to latent structures discriminant analysis (OPLS-DA) were applied to the mean-centered binned data of the pure bovine and caprine milk samples. Before the multivariate analysis, data were scaled by using auto scaling. The PCA was used to examine the overall arrangement structure in terms of the similarities and differences between samples. To determine the key features in the spectra for distinction between caprine and bovine milk, OPLS-DA was performed to improve the significant metabolite variations associated with complex exposures, as well as to reduce the complexity of the model. Furthermore, OPLS-DA was conducted on the 4 peak integral values of the major biomarkers of bovine milk to select the most robust, with a significant difference between 100% caprine milk and the lowest possible percentage of bovine milk. Validation of the OPLS-DA models was performed by the random permutation test based on 1,000 permutations. Characteristics evaluating the OPLS-DA included the goodness of fit ( $R^2Y$ ) and predictive ability ( $Q^2$ ). A color-coded <sup>1</sup>H NMR spectrum corresponding plot

based on the *p*(corr) value from the above-mentioned OPLS-DA was constructed in MATLAB R2020a software (MathWorks Inc.).

The ability of the biomarker to represent the level of adulteration was assessed from the validation correlation coefficient by using leave-one-out cross-validation (LOOCV). Based on the LOOCV process, *n*–1 correlation coefficients were obtained. This set of values was used to obtain the estimation of correlation coefficient as a mean value with its confidence interval.

The univariate receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was used to calculate the performance of the *N*-acetyl carbohydrate signal as a biomarker. The ROC curve enabled the decision about the cutoff point separating positive (pure bovine milk or caprine milk adulterated by bovine) and negative (pure caprine milk) cases. Sensitivity, specificity, and accuracy were determined by true positive (TP; number of samples correctly identified as pure bovine milk or caprine milk adulterated by bovine milk), true negative (TN; number of samples correctly identified as pure caprine milk), false positive (FP; number of samples incorrectly identified as pure bovine milk or caprine milk adulterated by bovine milk), and false negative (FN; number of samples incorrectly identified as pure caprine milk) results. The ability of the biomarker to distinguish between positives and negatives was evaluated by measuring the area under the curve (AUC). The AUC values were evaluated according to the following scale: an AUC of 1.0 indicated a perfect test, 0.9 to 0.99 was an excellent test, 0.8 to 0.89 was a good test, 0.7 to 0.79 was a fair test, and <0.7 was not a useful test (Carter et al., 2016). To evaluate the ability of the test to classify the positive and negative values, the data set was split randomly into training and validation sets by using *k*-fold cross-validation. The *k*-fold cross-validation was performed by dividing the data set into 9 groups chosen randomly (*k* = 9). Eight of these 9 groups were used as the training data set to set the ROC curve and to assess the AUC values. The last group was the validation data set. This procedure was repeated 9 times; each time, a different group was used for validation. The sensitivity, specificity, and accuracy were computed to measure the quality of the classification process based on the cutoff point provided by the ROC curve to distinguish between pure caprine milk and caprine milk adulterated by bovine milk. The optimum cutoff point was set by the highest sum of sensitivity and specificity. The utility of the *N*-acetyl carbohydrate signal for the detection of caprine milk adulterated by bovine milk was evaluated in a blind test according to the formula mentioned by Dalabasmaz et al. (2019). Unless stated otherwise, statistical analysis was performed with the IBM SPSS Statistics software



(Version 26.0; SPSS Inc.). The level of significance was set at 0.05 for all tests.

**RESULTS AND DISCUSSION**

**Characteristics of Experimental Samples of Caprine and Bovine Milk**

The mean values, variability, and baseline statistical comparisons for pure bovine and pure caprine milk are given in Table 2. Based on analysis of the quality and hygiene indicators, components, and properties of the milk, the samples were found to be good representatives of local milk and suitable for further analysis. The values obtained as characteristics of bovine and caprine milk correspond in general terms to the values given in reference sources (Morand-Fehr et al., 2007; Park et al., 2007; Pirisi et al., 2007; Raynal-Ljutovac et al., 2008).

**Biomarkers for Detection of Bovine Milk in Caprine Milk**

To select potential biomarkers from the <sup>1</sup>H NMR spectra, PCA, and OPLS-DA were performed on 0.04-ppm spectral bins. For this purpose, 46 pure bovine and caprine milk samples were used. The PCA results showed that the metabolite profiles of these milk samples are separated in the 2 classes (Figure 1A). The first 2 principal components provide 22.2 and 16.0% of the total variance. The value of variance is 38.2%, which is attributable to many independent factors in the data set. For better discrimination of the significant biomarkers, an OPLS-DA supervised method was applied to the same data used for the PCA (Figure 1A). The score plot of the OPLS-DA demonstrated clear separation of the caprine and bovine milks with a goodness of fit  $R^2 Y = 0.989$  ( $P < 0.001$ ) and predictive ability  $Q^2 = 0.964$  ( $P < 0.001$ ; Figure 1B). These characteristics obtained from the random permutation test indicated that the model had very high explanatory and predictive ability with good concordance of data. The corresponding coefficient color-coded plot based on the  $p(\text{corr})$  correlation coefficients revealed bins that were more abundant in bovine milk and may serve as biomarkers of adulteration (2.06, 2.50–2.66, 5.34, and 6.18 ppm; Figure 1C).

One-dimensional <sup>1</sup>H NMR spectra were subject to metabolite profiling. Fifty-two metabolites were identified in either caprine, bovine milk, or both. The representative spectra for all of the analyzed milk samples are shown in Figure 2, with the corresponding proton chemical shifts, metabolite assignments, and sources of identified metabolites listed in Table 3. The discriminating bins from the OPLS-DA contained signals from

**Table 2.** Composition and quality indicators for the original experimental bulk tank milk samples from goats (n = 23) and cows (n = 23) as the basic materials for the identification of caprine milk adulteration by bovine milk (milk multicomponent matrix)

Item	Unit	Caprine milk					Bovine milk					P-value
		Arithmetic mean	Geometric mean	SD	Minimum	Maximum	Arithmetic mean	Geometric mean	SD	Minimum	Maximum	
TCM <sup>1</sup>	cfu/mL	48 × 10 <sup>4</sup>	62 × 10 <sup>2</sup>	19 × 10 <sup>5</sup>	20 × 10 <sup>2</sup>	90 × 10 <sup>5</sup>	54 × 10 <sup>3</sup>	12 × 10 <sup>3</sup>	13 × 10 <sup>4</sup>	10 × 10 <sup>2</sup>	57 × 10 <sup>4</sup>	NS
Log TCM		4.80		0.74	3.30	6.95	4.09		0.72	3.00	5.76	<0.001
SCC	10 <sup>6</sup> cells/mL	1,329	970	993	195	3,824	228	154	252	13	1,190	<0.001
Log SCC		2.99		0.38	2.29	3.58	2.19		0.40	1.11	3.08	<0.001
Fat	g/100 mL	3.83		0.74	2.61	6.09	4.25		0.95	2.11	6.32	NS
CP content	%	3.23		0.195	2.76	3.64	3.38		0.21	2.85	3.76	<0.005
Casein content	%	2.75		0.19	2.34	3.14	2.71		0.25	1.95	3.12	NS
Lactose	%	4.61		0.18	4.38	5.07	5.05		0.08	4.85	5.26	<0.001
SNP content	%	8.51		0.29	8.02	8.98	9.01		0.23	8.33	9.37	<0.001
TS content	%	12.27		0.83	10.52	14.13	13.15		0.95	10.77	14.61	<0.001
Urea concentration	mg/100 mL	63.93		19.86	35.15	114.77	35.11		7.23	22.66	48.83	<0.001
pH value		6.59		0.09	6.47	6.83	6.65		0.03	6.59	6.72	<0.001
Titration acidity	°SH	5.97		1.41	3.67	8.95	7.00		1.07	4.72	8.82	<0.001
RCT <sup>2</sup>	s	84		34	44	178	487		55	356	579	<0.001
Crude firmness	cm	1.87		0.08	1.71	2.00	1.91		0.04	1.80	2.00	NS
Milk fermentation ability	°SH	33.11		5.79	17.39	41.19	30.75		3.28	25.35	39.62	NS

<sup>1</sup>Total count of mesophilic microorganisms.

<sup>2</sup>Rennet coagulation time of lactoproteins.

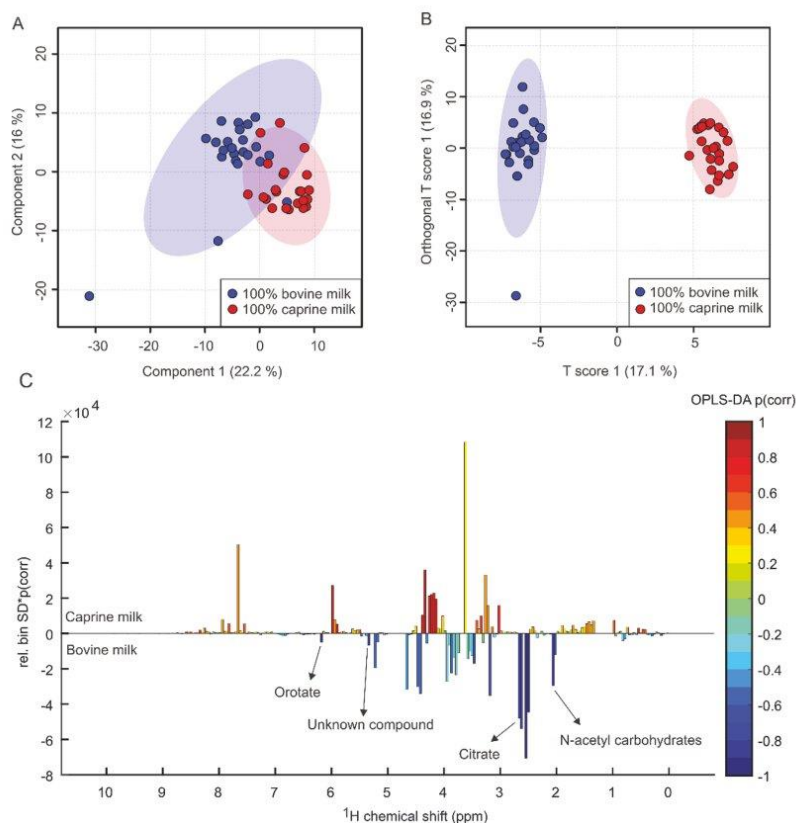
4 compounds: *N*-acetyl carbohydrates (2.05–2.07 ppm; singlet), citrate (2.48–2.70 ppm; 2 doublet signals), an unknown compound (5.34–5.38; quartet), and orotate (6.19–6.20 ppm; singlet). The peak of the *N*-acetyl carbohydrates was further assigned, by spiking with authentic standards, as the signal of the acetyl moieties of 2 related compounds: *N*-acetylglucosamine and *N*-acetylgalactosamine.

The integrals of these 4 signals were submitted as variables to another OPLS-DA, in which the  $p(\text{corr})$  correlation coefficients for all combinations of bovine–caprine pairs were compared (Supplemental File

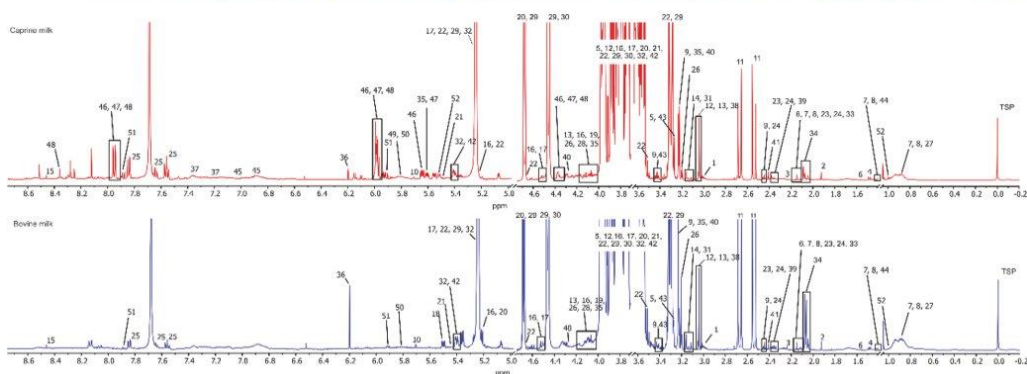
S1 Table 1; <https://doi.org/10.5281/zenodo.4779047>; Rysova et al., 2021). It has been found that the *N*-acetyl carbohydrate peak had the highest scores by far and, therefore, had utility as a single highly specific biomarker (Figure 3).

#### Role of *N*-Acetyl Carbohydrates in Bovine and Caprine Milk

In this study, it was found that bovine milk was rich in *N*-acetylglucosamine and *N*-acetylgalactosamine, whereas these compounds were almost completely



**Figure 1.** (A) Principal component analysis (PCA) score plot, (B) orthogonal projections to latent structures discriminant analysis (OPLS-DA) score plot, and (C) OPLS-DA corresponding color-coded coefficient plot of median proton nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H NMR) spectra for pure bovine ( $n = 23$ ) and caprine milk ( $n = 23$ ). The filled red circles represent the 95% confidence region for caprine milk, and the filled blue circles represent the 95% confidence region for bovine milk. The color of the signals in the coefficient plot signifies the contribution of the metabolites toward class segregation between pure bovine milk and pure caprine milk. The size of the bar denotes the  $p(\text{corr})$  multiplied by SD. The color of the bar indicates the correlation loading of the bin  $p(\text{corr})$  value.



**Figure 2.** Median proton nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H NMR) spectra of pure caprine milk (top) and pure bovine milk (bottom) including metabolite assignment (see Table 3). Spectra were referenced to the internal sodium salt (TSP) signal at 0 ppm. Solvent signals (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O; 1.06–1.46 and 3.64–3.71 ppm) and water suppression artifacts (4.75–4.98 ppm) were removed.

lacking in caprine milk. These compounds are likely part of the oligosaccharide fraction of the milk; their role in milk is largely unknown and has been shown to vary between species and dairy breeds (Sischo et al., 2017; Giorgio et al., 2018). It has been shown that the total concentration of oligosaccharides in caprine milk (0.25–0.30 g/L) is low compared with that in human milk (5–8 g/L); however, the total content should be even lower in bovine and ovine milk (0.03–0.06 and 0.02–0.04 g/L, respectively; Martinez-Ferez et al., 2006). Therefore, the presence of *N*-acetyl carbohydrates in higher quantities in bovine milk suggests the presence of some specific oligosaccharides with a higher degree of *N*-acylation, rather than reflecting the total content. Recent studies have suggested that *N*-acetyl carbohydrates may be affected by the stage of lactation in dairy cows, as evidenced by Tomassini et al. (2019). It was found that the *N*-acetylglucosamine peak increased in late lactation, suggesting significant qualitative and quantitative changes in oligosaccharide synthesis during lactation. These results were also confirmed by Zhu et al. (2020a). The presence of *N*-acetylglucosamine and *N*-acetylgalactosamine in bovine milk in connection to freeze-drying and subsequent storage was also described by Zhu et al. (2020b). The *N*-acetyl carbohydrates in caprine milk have also been studied in relation to the milk metabolome and the anti-adhesive effect of these compounds on bacterial, viral, and protozoan pathogens, preventing them from binding to mammary tissue. Salama et al. (2020) stated that the *N*-acetyl carbohydrate content increased in response to infection to boost the mammary immune system. In a previous study, *N*-acetyl carbohydrates were also used as 1 of 10

metabolites for the multivariate model for the detection of bovine milk in caprine milk. Li et al. (2017) reported higher amounts of this group of compounds in bovine milk ( $P < 0.05$ ) but did not specify the type of sugar moiety. *N*-Acetyl carbohydrates can also originate from catabolism of glycoprotein. As part of the glycoprotein, oligosaccharides are not detectable by NMR spectroscopy, however, during the proteolysis, glycans can be cleaved off from the protein structure and become detectable. Increased amounts of *N*-acetylglucosamine and *N*-acetylgalactosamine may be associated with longer milk coagulation time (Sundekilde, 2012; Sundekilde et al., 2014). The role of *N*-acetylcarbohydrates in caprine and bovine milk remains unclear; other analysis is needed to further understand it.

#### ROC Curve Analysis and Optimization of Classification Threshold

Before the evaluation of ROC curve analysis, the significance of the relationship between the *N*-acetyl carbohydrates and the percentage of bovine milk was confirmed by the validation correlation coefficient ( $r = 0.9344$  with 95% CI from 0.9342 to 0.9347) based on the LOOCV process. The previously mentioned values indicate that there is high positive correlation between bovine milk and *N*-acetyl carbohydrates. Arithmetic mean, standard error, minimum and maximum of peaks integral values of *N*-acetyl carbohydrates are given in Supplemental File S1 Table 2 (<https://doi.org/10.5281/zenodo.4779047>; Rysova et al., 2021).

To determine the performance of *N*-acetyl carbohydrates as a biomarker, the matrix of adulterated

**Table 3.** Chemical shifts (ppm), assignments, and sources of median proton nuclear magnetic spectra (<sup>1</sup>H NMR) signals of 52 metabolites in caprine and bovine milk (spectra in Figure 2)

No.	Metabolite	<sup>1</sup> H Chemical shift (ppm)	Assignment
1	2-Oxoglutarate <sup>1</sup>	2.99	CH <sub>2</sub>
2	Acetate <sup>2</sup>	1.90	CH <sub>3</sub>
3	Acetone <sup>2</sup>	2.22	2 × CH <sub>3</sub>
4	Alanine <sup>1,2</sup>	1.47	CH <sub>3</sub>
5	Betaine <sup>3</sup>	3.26	3 × CH <sub>3</sub>
6	Butyrate <sup>2</sup>	3.88	CH <sub>2</sub>
		1.54	CH <sub>2</sub>
		2.13	CH <sub>2</sub>
7	Caprate <sup>1</sup>	1.27	CH <sub>2</sub>
		2.16	CH <sub>2</sub>
		0.85	CH <sub>3</sub>
8	Caprylate <sup>1</sup>	1.27	CH <sub>2</sub>
		2.16	CH <sub>2</sub>
		0.85	CH <sub>3</sub>
9	Carnitine <sup>3</sup>	2.44	CH <sub>2</sub>
		3.21	3 × CH <sub>3</sub>
		3.43	N-CH <sub>2</sub>
10	<i>cis</i> -Aconitate <sup>2</sup>	5.69	CH
11	Citrate <sup>2</sup>	2.52	CH <sub>2</sub>
		2.65	CH <sub>2</sub>
12	Creatine <sup>1,2</sup>	3.02	CH <sub>3</sub>
		3.92	CH <sub>2</sub>
13	Creatinine <sup>1,2</sup>	3.03	CH <sub>3</sub>
		4.05	CH <sub>2</sub>
14	Ethanolamine <sup>1,2</sup>	3.13	N-CH <sub>2</sub>
15	Formate <sup>2</sup>	8.44	CH
16	Fucose <sup>3</sup>	1.25–5.21	Multiple
17	Galactose <sup>2</sup>	3.47–5.26	Multiple
18	Galactose-1-phosphate <sup>3</sup>	5.50	CH-1
19	Gluconate <sup>1,2</sup>	4.02	CH
20	Glucose <sup>2</sup>	3.23–5.22	Multiple
21	Glucose-1-phosphate <sup>2</sup>	3.39–5.44	Multiple
22	Glucose-6-phosphate <sup>2</sup>	3.26–5.22	Multiple
23	Glutamate <sup>1</sup>	2.10	CH <sub>2</sub>
		2.32	CH <sub>2</sub>
		2.13	CH <sub>2</sub>
24	Glutamine <sup>1</sup>	2.43	CH <sub>2</sub>
25	Hippurate <sup>2</sup>	7.54	CH-2,6
		7.63	CH-3,5
		7.82	CH-4
26	Choline <sup>2</sup>	3.19	3 × CH <sub>3</sub>
		4.05	O-CH <sub>2</sub>
27	Isoleucine <sup>2</sup>	0.91	CH <sub>3</sub>
		0.99	CH <sub>3</sub>
28	Lactate <sup>2</sup>	4.12	CH
29	Lactose <sup>2</sup>	3.28–5.22	Multiple
30	Lactulose <sup>3</sup>	4.01–4.43	Multiple
31	Malonate <sup>2</sup>	3.1	CH <sub>2</sub>
32	Maltose <sup>2</sup>	3.26–5.39	Multiple
33	Methionine <sup>2</sup>	2.14	S-CH <sub>3</sub>
			CH <sub>2</sub>
34	<i>N</i> -Acetyl carbohydrates <sup>3</sup>	2.02–2.10	CH <sub>3</sub>
35	<i>O</i> -Phosphocholine <sup>2</sup>	3.21	3 × CH <sub>3</sub>
		4.16	O-CH <sub>2</sub>
36	Orotate <sup>1</sup>	6.19–6.20	CH
37	Phenylalanine <sup>1</sup>	7.29	CH-2,6
		7.41	CH-3,5
38	Phosphocreatine <sup>1,2</sup>	3.03	CH <sub>3</sub>
39	Pyruvate <sup>1</sup>	2.35	CH <sub>3</sub>
40	<i>sn</i> -Glycero-3-phosphocholine <sup>1,2</sup>	3.21	N-(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>
		4.31	O-CH <sub>2</sub>
41	Succinate <sup>2</sup>	2.39	2 × CH <sub>2</sub>
42	Sucrose <sup>2</sup>	3.46–5.39	Multiple

Continued

**Table 3 (Continued).** Chemical shifts (ppm), assignments, and sources of median proton nuclear magnetic spectra (<sup>1</sup>H NMR) signals of 52 metabolites in caprine and bovine milk (spectra in Figure 2)

No.	Metabolite	<sup>1</sup> H Chemical shift (ppm)	Assignment
43	Taurine <sup>3</sup>	3.26	S-CH <sub>2</sub>
		3.42	N-CH <sub>2</sub>
44	Threonine <sup>1</sup>	1.31	CH <sub>3</sub>
45	Tyrosine <sup>3</sup>	6.88	CH-3,5
		7.18	CH-2,6
46	Uridine diphosphate galactose <sup>1,2</sup>	1.02–7.94	Multiple
47	Uridine diphosphate glucose <sup>1,2</sup>	3.46–7.94	Multiple
48	Uridine diphosphate <i>N</i> -acetylglucosamine <sup>2</sup>	2.7–8.33	Multiple
49	Uracil <sup>2</sup>	5.79	CH-5
50	Urea <sup>2</sup>	5.79	NH <sub>2</sub>
51	Uridine <sup>2</sup>	5.92	CH-2,10
		7.86	CH-11
52	Valine <sup>2</sup>	0.98	CH <sub>3</sub>
		1.02	CH <sub>3</sub>

<sup>1</sup>Literature (Klein et al., 2010; Sundekilde et al., 2013; Wishart et al., 2018; Yanibada et al., 2018; Garwolińska et al., 2020).<sup>2</sup>Chenomx Inc.<sup>3</sup>Standard.

samples with integrals of relative intensities of the region between 2.05 and 2.07 ppm was subjected to ROC curve analysis (Figure 4). Overall, 5 ROC analyses were conducted to examine accuracy in distinguishing the caprine 100% from bovine 1%, bovine 5%, bovine 10% and bovine 100%, including the analysis of bovine 5% and bovine 10% groups. Each group contained 23 observations. Before the analysis, each data set was divided into 9 subsets following the principles of *k*-fold cross-validation, as introduced in the Materials and Methods section.

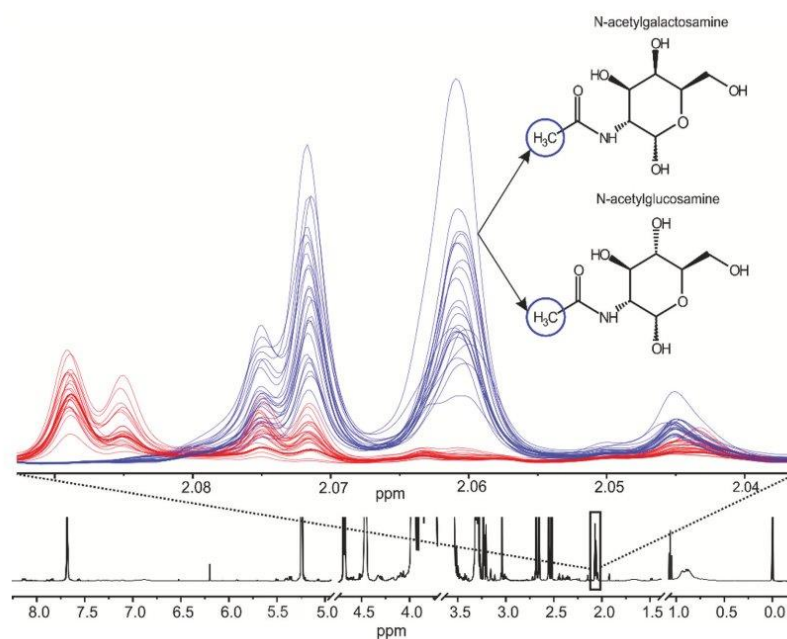
The diagonal line for the pair of caprine 100% and bovine 1% indicates an AUC ranging from 0.454 to 0.528 with an accuracy of <50%; this result represents a chance result with no significance (Figure 4A2). The performance of the model for the pair of caprine 100% and bovine 1% was not further classified. As another pair, caprine 100% and bovine 5% were plotted against each other (Figure 4B2). Although the discriminatory power was not confirmed in the first model, the integrals of relative intensities of *N*-acetyl carbohydrates produced optimal detection of 5% bovine milk in caprine milk, with AUC values ranging from 0.908 to 0.952 ( $P < 0.001$ ). The AUC values obtained from the ROC curve analysis can be considered as an excellent test, with 86.96% sensitivity and 82.61% specificity. Higher sensitivity than specificity means that the model better recognized adulterated milk (FP > FN). Further ROC curve analysis was performed to evaluate the AUC values for *N*-acetyl carbohydrates between the

caprine 100% and bovine 10% pair (Figure 4C2). The AUC values ranged between 0.992 and 1 ( $P < 0.001$ ); thus, model can be described as an almost perfect test. The sensitivity and specificity in this case had identical values of 95.96%. According to the performance of the latter ROC curve analysis, the expected performance of the model between pure bovine milk and pure caprine milk was confirmed. The comparison of these 2 groups represented a perfect test with an AUC value of 1 ( $P < 0.001$ ; Figure 4D2).

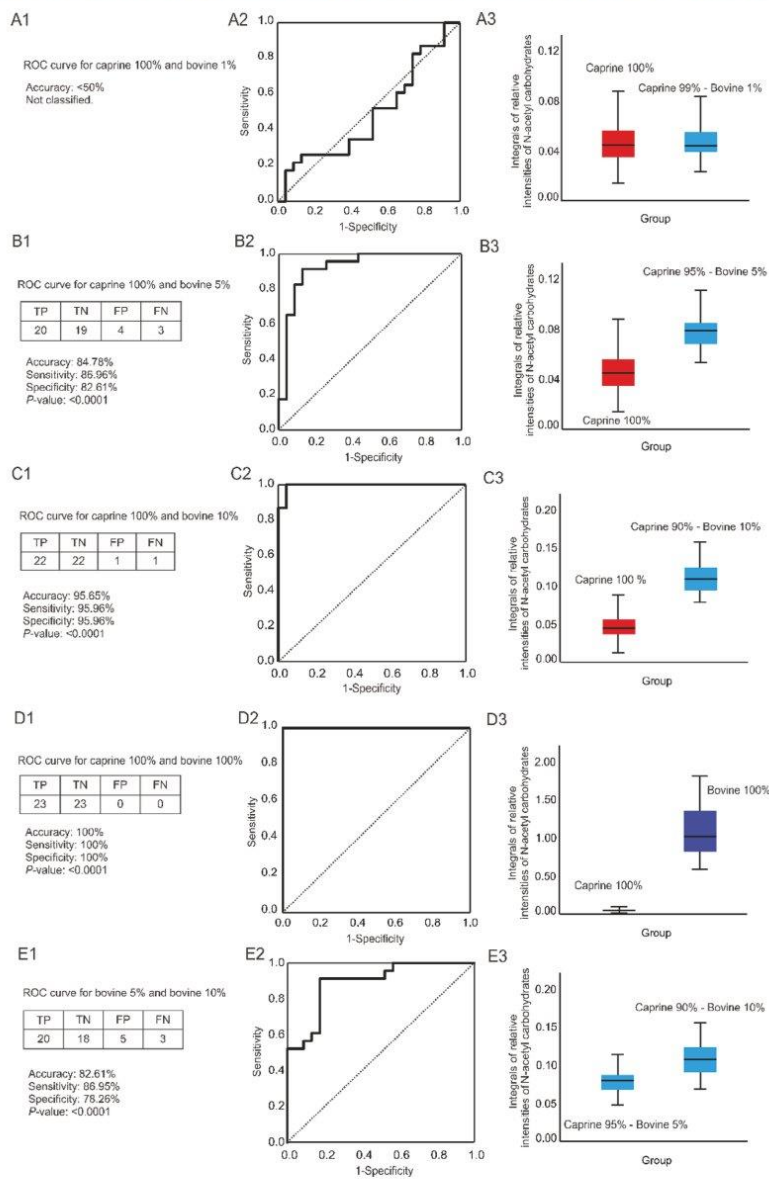
ROC curve analysis was also constructed to assess the cutoff points for 5 and 10% adulteration by bovine milk and for pure bovine milk (Table 4), which are related to the specificities and sensitivities listed above. The cutoff points were determined as the best trade-offs of sensitivity and specificity. However, it is not always necessary to use a compromise between sensitivity and specificity to determine the cutoff point; the specific aims of the analysis may require cutoff points to be adjusted for either greater sensitivity at the expense of specificity or the converse (Carter et al., 2016). For a lower detection limit than 5% bovine milk in caprine milk, different methods are clearly advantageous, such

as the immunochemical method developed by Hurley et al. (2006), which is capable of unbiased detection of 0.01% bovine milk in caprine milk or method based on the duplex polymerase chain reaction by Rodrigues et al. (2012) with detection limit of 0.5% of bovine milk. It should be noted that a content of bovine milk below 5% is unlikely to be a targeted adulteration but rather an accidental impurity, especially if the farm raises both large and small ruminants or the dairy factory is used to process various types of milk.

The last ROC curve analysis of evaluation of 5% bovine (negative cases) against 10% bovine (positive cases) was used to evaluate whether *N*-acetyl carbohydrates could differentiate the percentage of adulteration. The AUC was 0.871 to 0.914 ( $P < 0.001$ ), a result referred to as a good test with an overlap of values into an excellent test (Figure 4E2). The values of 86.95% sensitivity and 78.26% specificity are related to the selected optimal cutoff point of 0.0862 that represents the integral of relative intensities of *N*-acetyl carbohydrates. Higher sensitivity than specificity indicates a better detectability of samples with a higher percentage of bovine milk, which also confirms the number of



**Figure 3.** Proton nuclear magnetic resonance spectra overlay of pure caprine milk ( $n = 23$ ; red) and pure bovine milk ( $n = 23$ ; blue) in the region of the *N*-acetyl carbohydrate signals.



**Figure 4.** (A1–E1) Confusion matrices of receiver operating characteristic (ROC) analysis (TP = true positive, TN = true negative, FP = false positive, FN = false negative). (A2–E2) The ROC curve analyses calculated from integrals of relative intensities of the 2.05–2.07 ppm spectral region resonance peaks of *N*-acetyl carbohydrates. (A3–E3) Box plots showing the separation of pairs based on the integrals (red = pure caprine milk; dark blue = pure bovine milk; pale blue = caprine milk with 1, 5, or 10% bovine milk); boxplots show the lower and upper quartile, median, minimum, and maximum.

**Table 4.** Area under the curve (AUC) and optimal cutoff point of 3 categories of milk samples determined by receiver operating characteristic (ROC) curve analysis

Sample identification	AUC	Optimal cutoff point <sup>1</sup>
Bovine 5%	0.908–0.952	0.060
Bovine 10%	0.992–1	0.072
Bovine 100%	1	0.337

<sup>1</sup>Integrals of relative intensities of *N*-acetyl carbohydrates.

samples designated as FP. This result opens the way to finding the thresholds for other categories of adulteration (>10%).

The capability of *N*-acetyl carbohydrates to act as biomarkers for the detection of caprine milk adulteration with bovine milk was evaluated in a blind test according to the method of Dalabasmaz et al. (2019). The blind test was performed with 20 external milk samples in 4 categories, 5 samples in each: pure caprine milk, pure bovine milk, caprine milk with 5% bovine milk, and caprine milk with 10% bovine milk (Supplemental File S1 Table 3; <https://doi.org/10.5281/zenodo.4710195>; Rysova et al., 2021). Based on the suggested cutoff points shown in Table 4, the percentage of adulteration was predicted. The accuracy of prediction was calculated for the pairs that are mentioned in Figure 4B2, 4C2, 4D2. The accuracy obtained from the blind test reflected the results from the ROC curve analysis. The distinction between pure bovine milk and pure caprine milk, as well as the distinction between pure caprine milk and caprine milk adulterated with 10% bovine milk, was ideal, with 100% accuracy. The 5% adulterated caprine milk was predicted with 80% accuracy (details not shown), owing to the lower classification sensitivity of NMR spectroscopy over other analytical methods (Karoui and De Baerdemaeker, 2007; Kamal and Karoui, 2015).

#### **NMR Spectroscopy in the Detection of Milk Adulteration**

Recent literature has reported the ability of NMR spectroscopy to detect the addition of cheaper milk; a 2017 study (Li et al., 2017) showed detection of the adulteration of caprine milk with bovine milk at a concentration of 5% by incorporating 10 variables into a mathematical model. Although the authors of that study achieved a similar result to ours, their method was not intended for practical use, as evidenced by the fact that only milk treated at ultrahigh temperature was used. The detection of adulteration of milk from another small ruminant, specifically sheep, has also been reported (Lamanna et al., 2011). The combined approach of NMR profiling and an artificial neural

single-layer network was used to detect bovine milk in ovine milk. Although the correspondence between the mixture content and the artificial neural single-layer network was high, the lowest mixing ratio was only 20% bovine milk in ovine milk. No other previous studies have examined the feasibility of the NMR chemometric approach for detecting caprine milk adulteration by bovine milk.

#### **CONCLUSIONS**

In this study, an NMR chemometric approach combined with multivariate and univariate analysis identified *N*-acetylglucosamine and *N*-acetylgalactosamine as biomarkers for uncovering fraud with caprine milk. It was found that a high positive correlation exists between the *N*-acetyl carbohydrates and the percentage of bovine milk. Subsequent models constructed by using ROC curve analysis determined the threshold value of *N*-acetyl carbohydrates to detect 5% bovine milk in caprine milk with 84.78% accuracy and 10% bovine milk in caprine milk with 95.65% accuracy. The fact that most adulteration by cheaper milk occurs at between 10% and 50% makes this method particularly useful. The present findings show a promising utility of NMR spectroscopy for routine analysis in the control of caprine milk authenticity by inspection authorities in the Czech Republic.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors acknowledge the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (projects NAZV QK1920222 and MZe RO1420) and Ministry of Education, Youth and Sports (MEYS) of the Czech Republic (project METROFOOD-CZ, No: LM2018100) for financial support. The authors have not stated any conflicts of interest.

#### **REFERENCES**

- Aiello, A., F. Pizzolongo, N. Manzo, and R. Romano. 2019. A new method to distinguish the milk adulteration with neutralizers by detection of lactic acid. *Food Anal. Methods* 12:2555–2561. <https://doi.org/10.1007/s12161-019-01594-5>.
- Andreotti, G., E. Trivellone, R. Lamanna, A. Di Luccia, and A. Motta. 2000. Milk identification of different species: 13C-NMR spectroscopy of triacylglycerols from cows and buffaloes' milks. *J. Dairy Sci.* 83:2432–2437. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75133-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75133-2).
- Azad, T., and S. Ahmed. 2016. Common milk adulteration and their detection techniques. *Int. J. Food Contam.* 3:22. <https://doi.org/10.1186/s40550-016-0045-3>.
- Ballabio, C., S. Chessa, D. Rignanese, C. Gigliotti, G. Pagnacco, L. Terracciano, A. Fiocchi, P. Restani, and A. M. Caroli. 2011. Goat milk allergenicity as a function of  $\alpha$ s1-casein genetic polymorphism. *J. Dairy Sci.* 94:998–1004. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3545>.

- Brandao, M. P., M. G. Neto, V. de Carvalho dos Anjos, and M. J. V. Bell. 2017. Detection of adulteration of goat milk powder with bovine milk powder by front-face and time resolved fluorescence. *Food Control* 81:168–172. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.06.008>.
- Bucek, P. M., Milerski, M., Mares, R., Konrad, R., Roubalova, M., Skaryd, V., Rucki, P., Hakl. 2019. Development of the numbers of goats. Pages 60–80 in *Yearbook of Sheep and Caprine Breeding in the Czech Republic in 2018*. ČMSCH.
- Calvano, C. D., C. De Ceglie, A. Monopoli, and C. G. Zambonin. 2012. Detection of sheep and goat milk adulterations by direct MALDI-TOF MS analysis of milk tryptic digests. *J. Mass Spectrom.* 47:1141–1149. <https://doi.org/10.1002/jms.2995>.
- Carter, J. V., J. Pan, S. N. Rai, and S. Galandiuk. 2016. ROC-ing along: Evaluation and interpretation of receiver operating characteristic curves. *Surgery* 159:1638–1645. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2015.12.029>.
- Chen, D., X. Li, X. Zhao, Y. Qin, J. Wang, and C. Wang. 2019. Comparative proteomics of goat milk during heated processing. *Food Chem.* 275:504–514. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.129>.
- Chong, J., D. S. Wishart, and J. Xia. 2019. Using MetaboAnalyst 4.0 for comprehensive and integrative metabolomics data analysis. *Curr. Protoc. Bioinformatics* 68:e86. <https://doi.org/10.1002/cpbi.86>.
- Clark, S., and M. B. Mora García. 2017. A 100-year review: Advances in goat milk research. *J. Dairy Sci.* 100:10026–10044. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13287>.
- Dalabasmaz, S., D. Dittrich, I. Kellner, T. Drewello, and M. Pischetsrieder. 2019. Identification of peptides reflecting the storage of UHT milk by MALDI-TOF-MS peptide profiling. *J. Proteomics* 207:103444. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103444>.
- de Moura Ribeiro, M. V., N. Boralle, H. Redigolo Pezza, L. Pezza, and A. T. Toci. 2017. Authenticity of roasted coffee using <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *J. Food Compos. Anal.* 57:24–30. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.12.004>.
- FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nation). 2018. Statistics database. Accessed Feb. 2, 2018. <http://www.fao.org/faostat/en/#data>.
- Garwolińska, D., W. Hewelt-Belka, A. Kot-Wasik, and U. K. Sundekilde. 2020. Nuclear magnetic resonance metabolomics reveals qualitative and quantitative differences in the composition of human breast milk and milk formulas. *Nutrients* 12:921. <https://doi.org/10.3390/nu12040921>.
- Giorgio, D., A. Di Trana, and S. Claps. 2018. Oligosaccharides, polyamines and sphingolipids in ruminant milk. *Small Rumin. Res.* 160:23–30. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2018.01.006>.
- Haenlein, G. F. W. 2001. Past, present, and future perspectives of small ruminant dairy research. *J. Dairy Sci.* 84:2097–2115. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74655-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74655-3).
- Haenlein, G. F. W. 2004. Goat milk in human nutrition. *Small Rumin. Res.* 51:155–163. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2003.08.010>.
- Hurley, I. P., R. C. Coleman, H. E. Ireland, and J. H. H. Williams. 2006. Use of sandwich IgG ELISA for the detection and quantification of adulteration of milk and soft cheese. *Int. Dairy J.* 16:805–812. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.07.009>.
- ISO (International Standard Organization). 2007. ISO 7218:2007. Microbiology of food and animal feeding stuff – General requirements and guidance for microbiological examinations. ISO.
- ISO (International Standard Organization). 2013. ISO 4833-1:2013. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Part 1: Colony count at 30 degrees by the pour plate technique. ISO.
- Kamal, M., and R. Karoui. 2015. Analytical methods coupled with chemometric tools for determining the authenticity and detecting the adulteration of dairy products: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 46:27–48. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.007>.
- Karoui, R., and J. De Baerdemaeker. 2007. A review of the analytical methods coupled with chemometric tools for the determination of the quality and identity of dairy products. *Food Chem.* 102:621–640. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.042>.
- Klein, M. S., M. F. Almstetter, G. Schlamberger, N. Nünberger, K. Dettmer, P. J. Oefner, H. H. D. Meyer, S. Wiedemann, and W. Gronwald. 2010. Nuclear magnetic resonance and mass spectrometry-based milk metabolomics in dairy cows during early and late lactation. *J. Dairy Sci.* 93:1539–1550. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2563>.
- Kvapilík, J., P. Bucek, and J. Kucera. 2019. Results of performance testing of dairy cows. Pages 28–42 in *Yearbook of cattle breeding in the Czech Republic in 2018*. ČMSCH.
- Lamanna, R., A. Braca, E. Di Paolo, and G. Imparato. 2011. Identification of milk mixtures by <sup>1</sup>H NMR profiling. *Magn. Reson. Chem.* 49(Suppl. 1):S22–S26. <https://doi.org/10.1002/mrc.2807>.
- Lara-Villoslada, F., M. Olivares, J. Jiménez, J. Boza, and J. Xaus. 2004. Goat milk is less immunogenic than cow milk in a murine model of atopy. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 39:354–360. <https://doi.org/10.1097/00005176-200410000-00010>.
- Li, Q., Z. Yu, D. Zhu, X. Meng, X. Pang, Y. Liu, R. Frew, H. Chen, and G. Chen. 2017. The application of NMR-based milk metabolite analysis in milk authenticity identification. *J. Sci. Food Agric.* 97:2875–2882. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8118>.
- Li, X. Y., M. Cheng, J. Li, X. Zhao, Y. S. Qin, D. Chen, J. M. Wang, and C. F. Wang. 2020. Change in the structural and functional properties of goat milk protein due to pH and heat. *J. Dairy Sci.* 103:1337–1351. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16862>.
- Mammìna, L., A. P. Sobolev, and S. Viel. 2012. Liquid state <sup>1</sup>H high field NMR in food analysis. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 66:1–39. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2012.02.001>.
- Martínez-Ferez, A., S. Rudloff, A. Guadix, C. A. Henkel, G. Pohlentz, J. J. Boza, E. M. Guadix, and C. Kunz. 2006. Goats' milk as a natural source of lactose-derived oligosaccharides: Isolation by membrane technology. *Int. Dairy J.* 16:173–181. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.02.003>.
- Miller, B. A., and C. D. Lu. 2019. Current status of global dairy goat production: An overview. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 32:1219–1232. <https://doi.org/10.5713/ajas.19.0253>.
- Morand-Fehr, P., V. Fedele, M. Decandia, and Y. Le Frileux. 2007. Influence of farming and feeding systems on composition and quality of goat and sheep milk. *Small Rumin. Res.* 68:20–34. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.09.019>.
- Park, Y. W., M. Juárez, M. Ramos, and G. F. W. Haenlein. 2007. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Rumin. Res.* 68:88–113. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.09.013>.
- Pei, X., A. Tandon, A. Alldrick, L. Giorgi, W. Huang, and R. Yang. 2011. The China melamine milk scandal and its implications for food safety regulation. *Food Policy* 36:412–420. <https://doi.org/10.1016/j.foodpol.2011.03.008>.
- Pereira, E. V. S., D. D. S. Fernandes, M. C. U. de Araújo, P. H. G. D. Diniz, and M. I. S. Maciel. 2020. Simultaneous determination of goat milk adulteration with cow milk and their fat and protein contents using NIR spectroscopy and PLS algorithms. *Lebensm. Wiss. Technol.* 127:109427. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109427>.
- Pirisi, A., A. Lauret, and J. P. Dubeuf. 2007. Basic and incentive payments for goat and sheep milk in relation to quality. *Small Rumin. Res.* 68:167–178. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.09.009>.
- Poonia, A., A. Jha, R. Sharma, H. B. Singh, A. K. Rai, and N. Sharma. 2017. Detection of adulteration in milk: A review. *Int. J. Dairy Technol.* 70:23–42. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12274>.
- Pulina, G., M. J. Milán, M. P. Lavín, A. Theodoridis, E. Morin, J. Capote, D. L. Thomas, A. H. D. Francesconi, and G. Caja. 2018. Invited review: Current production trends, farm structures, and economics of the dairy sheep and goat sectors. *J. Dairy Sci.* 101:6715–6729. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14015>.
- Raynal-Ljutovac, K., G. Lagriffoul, P. Paccard, I. Guillet, and Y. Chilliard. 2008. Composition of goat and sheep milk products: An update. *Small Rumin. Res.* 79:57–72. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2008.07.009>.



- Rodrigues, N. P. A., P. E. N. Givisiez, R. C. R. E. Queiroga, P. S. Azevedo, W. A. Gebreyes, and C. J. B. Oliveira. 2012. Milk adulteration: Detection of bovine milk in bulk goat milk produced by smallholders in northeastern Brazil by a duplex PCR assay. *J. Dairy Sci.* 95:2749–2752. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-5235>.
- Romero Gonzalez, R. R., L. Cobuccio, and T. Delatour. 2019. Reconstitution followed by non-targeted mid-infrared analysis as a workable and cost-effective solution to overcome the blending duality in milk powder adulteration detection. *Food Chem.* 295:42–50. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.100>.
- Rysova, L., V. Legarova, Z. Pacakova, O. Hanus, I. Nemeckova, M. Klimesova, and J. Havlik. 2021. Supplemental file for the publication "Detection of bovine milk adulteration in caprine milk with N-acetyl carbohydrate biomarkers by using <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy." *J. Dairy Sci.* Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.4779047>.
- Salama, A. A. K., A. Contreras-Jodar, S. Love, N. Mehaba, X. Such, and G. Caja. 2020. Milk yield, milk composition, and milk metabolomics of dairy goats intramammary-challenged with lipopolysaccharide under heat stress conditions. *Sci. Rep.* 10:5055. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61900-8>.
- Shi, T., M. T. Zhu, Y. Chen, X. L. Yan, Q. Chen, X. L. Wu, J. Lin, and M. Xie. 2018. <sup>1</sup>H NMR combined with chemometrics for the rapid detection of adulteration in camellia oils. *Food Chem.* 242:308–315. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.061>.
- Sischo, W. M., D. M. Short, M. Geissler, A. Bunyatrchata, and D. Barile. 2017. Comparative composition, diversity, and abundance of oligosaccharides in early lactation milk from commercial dairy and beef cows. *J. Dairy Sci.* 100:3883–3892. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12388>.
- Sobolev, A. P., F. Thomas, J. Donarski, C. Ingallina, S. Circi, F. Cesare Marincola, D. Capitani, and L. Mannina. 2019. Use of NMR applications to tackle future food fraud issues. *Trends Food Sci. Technol.* 91:347–353. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.07.035>.
- Sundekilde, U. K. 2012. Milk metabolite variability and heritability and their association with technological properties of bovine milk elucidated by NMR-based metabolomics. PhD thesis. Department of Food Science, Aarhus University, Aarhus, Denmark.
- Sundekilde, U. K., F. Gustavsson, N. A. Poulsen, M. Glantz, M. Paulsson, L. B. Larsen, and H. C. Bertram. 2014. Association between the bovine milk metabolome and rennet-induced coagulation properties of milk. *J. Dairy Sci.* 97:6076–6084. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8304>.
- Sundekilde, U. K., L. B. Larsen, and H. C. Bertram. 2013. NMR-based milk metabolomics. *Metabolites* 3:204–222. <https://doi.org/10.3390/metabo3020204>.
- Tomassini, A., G. Curone, M. Solè, G. Capuani, F. Sciubba, G. Conata, A. Micheli, and D. Vigo. 2019. NMR-based metabolomics to evaluate the milk composition from Friesian and autochthonous cows of Northern Italy at different lactation times. *Nat. Prod. Res.* 33:1085–1091. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1462183>.
- Watson, R. R., R. J. Collier, and V. R. Preedy. 2017. The nutritional value and health benefits of caprine milk components. Pages 441–449 in *Nutrients in Dairy and their Implications on Health and Disease*. Academic Press.
- Wishart, D. S., Y. D. Feunang, A. Marcu, A. C. Guo, K. Liang, R. Vázquez-Fresno, T. Sajed, D. Johnson, C. Li, N. Karu, Z. Sayeeda, E. Lo, N. Assempour, M. Berjanskii, S. Singhal, D. Arndt, Y. Liang, H. Badran, J. Grant, A. Serra-Cayuela, Y. Liu, R. Mandal, V. Neveu, A. Pon, C. Knox, M. Wilson, C. Manach, and A. Scalbert. 2018. HMDB 4.0 — The Human Metabolome Database for 2018. *Nucleic Acids Res.* 46:608–617. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1089>.
- Yang, Y., N. Zheng, X. Zhao, Y. Zhang, R. Han, J. Yang, S. Zhao, S. Li, T. Guo, C. Zang, and J. Wang. 2016. Metabolomic biomarkers identify differences in milk produced by Holstein cows and other minor dairy animals. *J. Proteomics* 136:174–182. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.12.031>.
- Yanibada, B., H. Boudra, L. Debrauwer, C. Martin, D. P. Morgavi, and C. Canlet. 2018. Evaluation of sample preparation methods for NMR-based metabolomics of cow milk. *Heliyon* 4:e00856. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00856>.
- Zhu, D., B. Kebede, G. Chen, K. McComb, and R. Frew. 2020a. Changes in milk metabolome during the lactation of dairy cows based on <sup>1</sup>H NMR and UHPLC-QToF/MS. *Int. Dairy J.* 111:104836. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104836>.
- Zhu, D., B. Kebede, G. Chen, K. McComb, and R. Frew. 2020b. Impact of freeze-drying and subsequent storage on milk metabolites based on <sup>1</sup>H NMR and UHPLC-QToF/MS. *Food Control* 116:107017. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.107017>.

#### ORCID

- L. Rysova  <https://orcid.org/0000-0002-0253-7667>  
 V. Legarova  <https://orcid.org/0000-0002-7915-2159>  
 Z. Pacakova  <https://orcid.org/0000-0001-7298-6364>  
 O. Hanus  <https://orcid.org/0000-0002-3616-7668>  
 I. Nemeckova  <https://orcid.org/0000-0002-7499-8964>  
 M. Klimesova  <https://orcid.org/0000-0002-9468-5340>  
 J. Havlik  <https://orcid.org/0000-0003-1900-0951>

### **3.2 Raw Cow Milk Protein Stability under Natural and Technological Conditions of Environment by Analysis Variance**

*Foods 2021, 10, 2017*

<https://doi.org/10.3390/foods10092017>

Hanus O., Kucera J., Samkova E., Nemeckova I., Citek J., Kopec T., Falta D.,  
Nejeschlebova H., Rysova L., Klimesova M., Elich On.

Article

# Raw Cow Milk Protein Stability under Natural and Technological Conditions of Environment by Analysis of Variance

Oto Hanuš<sup>1</sup>, Josef Kučera<sup>2</sup>, Eva Samková<sup>3,\*</sup>, Irena Němečková<sup>1</sup>, Jindřich Čítek<sup>4</sup>, Tomáš Kopec<sup>5</sup>, Daniel Falta<sup>5</sup>, Hana Neješlebová<sup>1</sup>, Lucie Rysová<sup>6</sup>, Marcela Klimešová<sup>1</sup> and Ondřej Elich<sup>1</sup>

Citation: Hanuš, O.; Kučera, J.; Samková, E.; Němečková, I.; Čítek, J.; Kopec, T.; Falta, D.; Neješlebová, H.; Rysová, L.; Klimešová, M.; Elich, O. Raw Cow Milk Protein Stability under Natural and Technological Conditions of Environment by Analysis of Variance. *Foods* 2021, 10, 2017. <https://doi.org/10.3390/foods10092017>

Academic Editors: Fernanda Cosme and Harshadrai M. Rawel

Received: 9 July 2021  
Accepted: 24 August 2021  
Published: 27 August 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- <sup>1</sup> Dairy Research Institute Ltd., Ke Dvoru 12a, 160 00 Prague, Czech Republic; hanus.oto@seznam.cz (O.H.); nemeckova@milcom-as.cz (I.N.); hana.nejeschlebova@seznam.cz (H.N.); marcela.vyletelova@seznam.cz (M.K.); elich@milcom-as.cz (O.E.)
  - <sup>2</sup> Czech-Moravia Breeders Corporation, Benešovská 123, 252 09 Hradištko, Czech Republic; kucera@cmsch.cz
  - <sup>3</sup> Department of Food Biotechnologies and Agricultural Products Quality, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia in České Budějovice, Studentská 1668, 370 05 České Budějovice, Czech Republic
  - <sup>4</sup> Department of Genetics and Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia in České Budějovice, Studentská 1668, 370 05 České Budějovice, Czech Republic; citek@zf.jcu.cz
  - <sup>5</sup> Department of Animal Breeding, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1665, 613 00 Brno-Sever, Czech Republic; tomas.kopec@mendelu.cz (T.K.); daniel.falta@mendelu.cz (D.F.)
  - <sup>6</sup> Department of Food Science, Faculty of Agrobiology, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýčká 129, 165 00 Prague 6, Czech Republic; rysoval@af.czu.cz
- \* Correspondence: samkova@zf.jcu.cz; Tel.: +420-387-772-618

**Abstract:** Heat stability (HS) is substantial technology property of raw milk. Analysis of sources of HS variation and its regular monitoring can contribute to creating higher added value in the dairy industry. The goal of this analysis was to assess the practice sources of raw cow milk HS variability on the results of an extensive data set of bulk tank milk samples. There was implemented neither a compositional technology modification nor acidity adjustment of milk, just original raw milk was used for the analysis. A total 2634 HS analyses were performed, including other milk indicators, during three years of an experimental period. The log HS mean and standard deviation were  $1.273654 \pm 0.144189$ , equal to the HS geometric mean of 18.8 min. Explanation of the HS variability through the linear model used was 41.1% ( $p < 0.0001$ ). According to the results of the variance analysis, the milk HS was influenced ( $p = 0.0033$  and mostly  $< 0.0001$ ) by all the farm factors such as year; season; calendar month; altitude; total annual rainfall; herd size by the number of cows; milk yield; cow breed; type of milking; litter type in the stable; summer grazing application; farm effect. During the calendar months ( $p < 0.0001$ ), milk HS values suggest similar seasonal dynamics with the somatic cell count, total count of mesophilic microorganisms, coli bacteria count and urea and lactose concentration and opposite configuration pattern to fat, crude protein, solids-not-fat and total solids content and milk freezing point depression. Here performed quantification of these effects by analyzing the variance may allow efficient raw milk selection to be processed into specific dairy products.

**Keywords:** cow; breed; farm factors; milk heat stability; milk composition; microbiologic indicators

## 1. Introduction

The quality of raw milk is important for its technological processing on products [1]. Milk quality means, in particular, the sum of its hygiene and health indicators, such as the

total count of microorganisms, the somatic cell count (SCC) or residues of inhibitory substances (RAD) [2]. In a broad sense, the quality of raw milk can also be described as its composition and several technological indicators. These may include titration acidity, fermentation ability, or cheeseability [3]. The values of mentioned indicators are then decisive for the processing of raw milk into dairy products. Dairy products with a long shelf-life must show good stability, mainly influenced by raw milk composition [4]. Thus milk quality is also important regarding the possibility of applying the added value in the dairying. In general, products with higher added value are increasingly required for economic reasons.

The ability of milk and concentrated milk to withstand a defined heat treatment without noticeable changes, such as flocculation of protein, is commonly denoted as heat stability [5]. Milk stability is considered the total time for visual coagulation to occur at a given pH and temperature, and it is directly related to the ability of milk to resist coagulation at certain temperatures [6]. As an indicator of protein stability, this heat stability (HS; also milk thermostability) is also an important technological property of raw milk as its evaluation can contribute to higher added value in dairy [7–10]. The composition of raw milk is essential for the stability of dairy products with a long shelf-life [4]. A sample of milk with short HS is generally considered to be unstable in terms of processability. It can result in problems during processing as opposed to longer HS [11,12]. Such milk has high stability. It means that it is ideal for the heat treatment processes to produce dairy products with a more extended shelf-life. The above mentioned is why it is crucial to study the sources of HS variability in practical conditions, although milk hygiene has improved during the last couple of decades, rendering milk less sensitive to coagulation [5]. Scientific and professional technological interest in the analysis of environmental (farm technology) and biochemical effects, including effects of food technology affecting the HS of lactoproteins also in the milk of small ruminants, can be found according to the other papers [13,14].

The HS is, therefore, substantial property of raw milk. This represents the resistance of lactoproteins against thermal coagulation [5]. In other words, it is the resistance of the milk to heat denaturation. Decreased milk quality ([15], for instance, because of mastitis) may adversely affect the HS. Hence, the raw milk's good HS value is a prerequisite for milk processing into durable dairy products with long shelf life, such as condensed and sterilized, ultra-heat treated (UHT) milk [9,11]. Therefore, the HS was mentioned as an important indicator in evaluating milk quality, especially in terms of heat gains to which milk is exposed at its processing [16]. A simple technological test is usually used to determine the HS value. However, this test is laborious and often lengthy ([5] methods of subjective determination of HS). Because of HS determination laboriousness, the data sets used in the evaluation of HS variability are made up of a smaller number of data, which usually do not exceed one hundred [17,18]. Therefore, the number of HS measurements in our study is exceptional. Due to its laboriousness, HS measurements are often replaced by simpler and indirect determinations in practical dairy laboratories. This technological test is called determining the alcohol stability of milk. The results of the milk alcohol stability test may be in positive correlation with HS values ( $r = 0.28$ ,  $p < 0.0001$ ) [19], but this is not always the rule.

Furthermore, possible sources of variability were also analyzed in connection with this fact for the alcohol stability of raw milk [3,20–26]. Alcohol unstable milk showed higher SCC. On the contrary, the contents of lactose and casein were lower along with this [27]. According to these facts, high SCC could be marked as the primary causal reason, in this case of the high occurrence of alcohol unstable milk in commercial herds of dairy cows. Further, the differences in raw milk HS in dairy animals (among species such as cow, sheep, goat, camel, or yak) were also recorded [14,17,28,29]. Metabolic disorders of cows, such as subclinical rumen acidosis, could also reduce the technological quality of milk by reducing the content and quality of protein (so-called low protein syndrome; [30]).

In previous studies, we dealt with the relationships between milk indicators and the season to HS, and also the effect of feeding silage from legume-cereal mixtures on HS [31–33]. While the milk components of the bulk tank samples did not correlate much with the HS, in terms of simple correlations, closer relationships were shown between the composition of the milk and the HS, taking into account the effect of the season. Several HS studies have been performed during technological modifications of milk. While the change in calcium (CaCl<sub>2</sub>) level showed a high effect on the raw cow milk HS [4,34–37], the modifications of the citrate and urea concentration did not affect this HS value [4]. The HS of calcium citrate fortified milk was higher than the control milk and other calcium (different salts) fortified milk [38]. However, HS can be affected by many external and internal farm factors.

It turned out that in South America (Brazil, Chile, Colombia), the titratable acidity, alcohol stability, and HS of milk have been particularly intensively studied in recent years as the technological properties of milk. It was caused by often occurrence of problems of alcohol (heat) unstable raw milk that were not identified as acidic in cow herds. This phenomenon was probably determined by the problematic climate conditions for dairying, the progressive development of industrial milk processing there and the concomitant occurrence of possible technological problems. The effects of various dairy cow nutrition (starvation, feeding cows only by forage, anionic nutrition) on the stability of milk, concerning its titratable acidity, were evaluated [19,39,40]. In this context, a scheme [41] of a current analytical method for the identification of so-called UNAM bulk milk samples, i.e., unstable (positive ethanol test 72 °C) and negative boiling test) non-acidic cow milk samples (pH ≥ 6.6 or titratable acidity ≤ 18 °D) was described. In three feeding systems (herds) in spring-calving dairy cows, two based on grazing and one on a total mixed feed ration [42], no significant effects on the HS of milk in the mid-lactation (July) and in late lactation (September, October) were noted. Seasonal calving and pasture-based milk systems are widely used in countries with temperate climates and abundant rainfall [12]. As a result, synchronous changes in macro and micronutrients in milk are much more visible. Lactation here takes place in parallel with seasonal changes in the feed source, in contrast to non-seasonal milk production systems. It can have a greater impact on the processability and functionality of the milk. So, this logically means that the HS value of raw milk can be a general (global) problem in milk processing.

To the best of our knowledge, there is very little information on the variability of raw milk HS on farms in the scientific literature. Therefore, the goal of this work was to evaluate the practice sources which can influence the variability of raw cow milk HS. The priority was to carry out this evaluation with the results of an extensive data set of bulk tank milk samples, which were not under technological, compositional modification or acidity adjustment, just using original milk with its natural composition.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Dairy Cow Herds, Stables and Milk Sampling

Bulk tank milk samples were collected regularly on a monthly or two-week basis under dairy production conditions in East Bohemia. The following were included in the experimental assessment: 48 herds in total; 35 Czech Fleckvieh herds; 10 Holstein herds; 3 mixed herds. Cow milking was carried out by milking machine: 35 in the milking parlours (cows were housed in free cowsheds); 13 into the pipeline (cows were housed in binding stables). Dairy cows were milked twice a day. In monitoring, there were included 8928 dairy cows in total. In Table 1 there are listed relevant practice conditions in terms of environment and dairy technology in herds.

**Table 1.** Basic indicators of herds of dairy cows included in the experiment.

Indicator	Unit	Minimum	Maximum	$\bar{x} \pm s_d$
Mean number of cows per herd	head	4	630	186 ± 164
Altitude of herd	m	254	510	347.7 ± 68.8
Total annual rainfall, an average	mm	325	750	554 ± 143
Dairy plant raw milk delivery per herd, an average	kg	60	13,870	4454 ± 4095
Milk yield per cow and 305 days in milk, an average	kg	2033	11,124	6728 ± 2488

$\bar{x} \pm s_d$  = arithmetic mean ± standard deviation; 305 days in milk = standard lactation.

The experimental period took three years in total. During this time, 3310 bulk tank milk samples and 2829 for technological HS analyses were collected. Dairy cow feeding was performed regularly twice a day by TMR (total mixed ration). In this system of feeding, a mobile feed mixer tow trailer was used. The animals were fed using volume modification of the feed ration, according to the stage of lactation and milk yield. The composition of the feed rations was supplemented by the consumption of forage cereal concentrates, according to the standard feed tables for the current milk yield. The same method was used for the consumption of mineral feed supplements. The TMR quality during the experimental period can be considered medium, without extremes, regarding the roughage portion of feed rations. The grazing of cows on pasture was carried out during late spring, summer, and early autumn in a part of herds.

## 2.2. Quality Indicators for Bulk Tank Milk

Chemical preservation of bulk tank milk samples was performed with bronopol (2 bromine, 2 nitro, 1,3 propanediol, 0.03%, Broad Spectrum Microtabs). The samples were then transported to the laboratory under cold conditions (<8 °C). These were analyzed in an accredited dairy laboratory (Buštěhrad, Czech Republic), Czech-Moravia Breeders Corporation a.s. (ČMSCH) according to the relevant standard operation manuals. Milk indicators such as components and properties were determined by analytical methods and in units, according to the relevant abbreviations as listed in Table 2. Analyses of milk samples were carried out using relevant methods and instruments that were calibrated and controlled by procedures and techniques according to standard operation manuals and with application of relevant result uncertainties of measurements stated by validation of methods in accredited laboratory.

**Table 2.** List of used milk analytical methods and indicators.

Milk Indicator	Abbr.	Unit	Method/Instrument	Added Information/Note
Fat	FA	%	CombiFoss FT+ (Foss, Hilleröd, Denmark)	MIR-FT
Crude protein	CRP	%	see above	total N×6.38, MIR-FT
Lactose	LA	%	see above	monohydrate, MIR-FT
Solids-not-fat	SNF	%	see above	MIR-FT
Total solids	TOS	%	see above	MIR-FT
Urea	UR	mg·100 mL <sup>-1</sup>	see above	MIR-FT
Milk freezing point depression	MFPD	°C	see above	MIR-FT, combined with electrical conductivity measurement
Somatic cell count	SCC	10 <sup>9</sup> ·mL <sup>-1</sup>	see above	flow cytometry

Total count of mesophilic microorganisms	TCMM	10 <sup>3</sup> CFU·mL <sup>-1</sup>	IBC FC (Bentley Instruments, Chaska, MN, USA)	flow cytometry
Count of coliform bacteria	CCOL	CFU·mL <sup>-1</sup>	plate cultivation method (VRBL agar, 37 ± 1 °C, abbreviated cultivation period 24–48 h)	
Residues of inhibitory substances	RAD	+/-	microbiological ( <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ) inhibition assay (growth at 65 °C) with pH indicator Eclipse 50 (ZEU-INMUNOTEC, Zaragoza, Spain)	mostly as residues of antibiotic drugs and also for possible interference potential of some phytoactive substances
Fat/crude protein	FA/CRP		calculation	energy (ketosis) milk (cow) coefficient [43–47]
Fat/lactose	FA/LA		calculation	see FA/CRP

Abbr. = Abbreviation; MIR-FT = mid-infrared spectroscopy with Fourier-transformation; % = weight percentage (g·100 g<sup>-1</sup>); CFU = colony forming unit; +/- = positive/negative result.

The milk HS was logically analyzed in unpreserved samples. The HS results were methodically expressed in minutes as used units. The time was stopped at the moment of the creation of visible protein flakes in investigated milk [48], which means the visual denaturation. Milk samples were treated by heating in glass vials with thick walls in an oil bath at a temperature of 135 °C. This determination was performed with the volume of 2.5 mL of milk sample in the laboratory of the dairy plant Bohemilk Opočno. In this sense [49], a shortened test to determine milk resistance against protein denaturation by heating was also developed. Nevertheless, in this experiment, the complete method was used.

### 2.3. Statistic Assessment of the Results

Obtained experimental result file for milk indicators was added to records about conditions for raw milk production. These records were obtained by the specific questionnaire. Information about cow herds and relevant environmental and technological conditions were recorded and completed. A lack of information in the data file occurred, which was consequently limited to the complete form of results. Some monitored milk indicators have usually confirmed an absence of normal data frequency distribution, such as hygienic and microbiological indicators (SCC, total count of mesophilic microorganisms (TCMM), count of coliform bacteria (CCOL)) and also HS, according to the results of previous studies [31–33,50–54]. Further, because of this reason, the logarithmically transformed (log, on a decimal basis) results were used for the statistic evaluation, including an application of relevant geometric means. This procedure was logically carried out only with samples where a record of correspondence about type and time of analysis existed. So, by this method, the number (n) of bulk tank milk sample results in the evaluation was a little bit limited.

The statistic evaluation of experimental results was performed by multifactorial analysis of variance. There was used a reduced range of data file number (n = 2634 for HS compared to 3310 for other milk indicators). This reduction was done correctly in a mathematical sense with respect to reality. SAS ver. 9 program package [55] was used for the statistical result of processing of milk indicators. It resulted in Means and GLM (general linear model; the GLM procedure uses the method of least squares to fit general linear models) procedures. The significance of investigated factors was expressed on standard levels of probability. The results were processed by a linear model with fixed effects (Table

3). Including random effects, the model was performed with formula as follows (general equation parameters:  $Y$  = investigated milk indicator;  $\mu$  = general mean;  $e_{ijklmnopqrst}$  = random effect):

$$Y_{ijklmnopqrst} = \mu + YR_i + SE_j + CM_k + AL_l + WE_m + NC_n + YI_o + BR_p + MT_q + LT_r + PA_s + FM_t + e_{ijklmnopqrst}$$

**Table 3.** The list of used effects in statistic linear model equation of multifactorial analysis of variance and their specifications in the experiment.

Identification Index		Effect Title	Number of Effect Categories (from-to)	Effect Specification
YR	i	year	1–3	
SE	j	season	1–2	1 = summer (from May to October); 2 = winter (from November to April)
CM	k	calendar month	1–12	
AL	l	altitude	1–3	1 = < 300; 2 = 300–450; 3 = > 450 m
WE	m	total annual rainfall	1–3	1 = < 450; 2 = 450–650; 3 = > 650 mm
NC	n	number of dairy cows in the herd	1–3	1 = < 100; 2 = 100–400; 3 = > 400 of heads
YI	o	level of milk yield by milk recording	1–3	1 = < 6000; 2 = 6000–9000; 3 = > 9000 kg
BR	p	breed	1–3	1 = Czech Fleckvieh (CF); 2 = Holstein (H); 3 = various hybrids between CF and H
MT	q	type of milking	1–3	1 = machine milking into can and pipeline; 2 = milking parlour; 3 = automatic milking system
LT	r	litter type in the stable	1–3	1 = straw; 2 = rubber mattress; 3 = manure separation (liquid excrements)
PA	s	application of summer grazing (pasture)	1–2	1 = grazing, sometimes with green forage feeding next to silages in the mixture; 2 = without green forage, only by preserved roughage feeding rations (silages)
FM	t	farm	1–29	

Milk recording = 305 days in milk = standard lactation.

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Main Statistic Results and Explanation Efficiency by Model of Analysis of Variance

Main statistic parameters of indicators in bulk tank samples of raw cow milk are included in Table 4. There is a good quality of raw milk included in cow herds during the experiment regarding dairy conditions compared to the country's relevant references (The Czech Republic [56]). It is also well comparable to a high level of the west European results. Only two positive RAD cases were recorded (0.06%,  $n = 3310$ ) in monitoring for three



years of the experiment. It is approximately half of the value compared to the regular Czech Republic sliding average of  $0.124 \pm 0.033\%$  (in the period from 2012 to 2016 [56]). That is why the RAD findings did not significantly affect the results of this evaluation negatively.

**Table 4.** Basic statistic parameters of raw milk indicators in bulk tank milk samples and efficiency explanation by model in analysis of variance.

IND	n	x	xg	sa	R <sup>2</sup>	p
FA	2993	3.89	-	0.282	0.463	<0.0001
CRP	3015	3.4	-	0.128	0.56	<0.0001
LA	3015	4.89	-	0.08	0.548	<0.0001
SNF	3015	8.89	-	0.144	0.595	<0.0001
TOS	2993	12.79	-	0.332	0.494	<0.0001
UR	1804	24.5	-	5.0	0.435	<0.0001
FA/CRP	2993	1.15	-	0.083	0.458	<0.0001
FA/LA	2993	0.8	-	0.063	0.477	<0.0001
MFPD	3015	-0.526048	-	0.005521	0.237	<0.0001
log SCC	3013	2.329102	213 <sup>a</sup>	0.188909	0.344	<0.0001
log TCMM	3069	1.486766	30.6 <sup>b</sup>	0.355881	0.302	<0.0001
log CCOL	3069	0.666409	4.6 <sup>c</sup>	0.749125	0.244	<0.0001
log HS	2634	1.273654	18.8 <sup>d</sup>	0.144189	0.411	<0.0001

IND = indicator; n = sample number; x = arithmetic mean; xg = geometric mean; sa = standard deviation; R<sup>2</sup> = coefficient of determination by linear model in analysis of variance; p = probability of zero hypothesis; <sup>a</sup> in 10<sup>3</sup>·mL<sup>-1</sup>; <sup>b</sup> in 10<sup>3</sup>CFU·mL<sup>-1</sup> (CFU colony forming unit); <sup>c</sup> in CFU·mL<sup>-1</sup>; <sup>d</sup> in minutes; used units and explanation of abbreviations of milk indicators are in Table 2; some figures in table were used also previously [31–33] in different evaluation of milk heat stability (HS).

Explanation of the variability of the monitored milk indicators by the linear model (Table 4) ranged from 23.7 (for milk freezing point depression (MFPD)) to 59.5% (for solids-not-fat). The corresponding figure for the log HS was 41.1%. Thus, theoretically, 58.9% of the variability of HS values falls on uncontrolled effects. The efficiency of explanation of variability for all mentioned milk indicators, with the statistic model used, was significant ( $p < 0.0001$ ). These figures are relatively high in terms of solving a biological problem and can be explained by including a specific farm effect that is the combined effect of all factors.

The data file used is interesting thanks to the high number of analytical results, duration of the experimental period, and the range of the evaluated farm conditions. The absolute majority of the observed fixed effects of the GLM significantly influenced most of the monitored milk indicators (Table 5). Milk HS was statistically significantly influenced by all the observed factors of farm conditions when the weakest effect ( $p = 0.0033$ ) was in summer grazing or fresh green forage in the summer feeding ration.

**Table 5.** Fixed effects and their significance of impact, regarding monitored milk indicators by results of analysis of variance.

IND	YR	SE	CM	AL	WE	NC	YI	BR	MT	LT	PA	FM
FA	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0184	0.2236	<0.0001	<0.0001
CRP	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0023	0.8489	0.8016	<0.0001
LA	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.1398	0.5349	<0.0001
SNF	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.2389	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.3563	0.8043	0.2625	<0.0001
TOS	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0112	0.2698	<0.0001	<0.0001
UR	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0003	0.0948	<0.0001	<0.0001
FA/CRP	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0004	<0.0001	0.2148	<0.0001	<0.0001

FA/LA	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.6359	0.4766	<0.0001	<0.0001
MFPD	<0.0001	0.2197	0.0187	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
log SCC	<0.0001	<0.0001	0.0012	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0154	<0.0001	0.3618	<0.0001	<0.0001
log TCMM	<0.0001	<0.0001	0.0328	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.8379	0.429	<0.0001
log CCOL	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.7686	<0.0001	0.2288	<0.0001	<0.0001
log HS	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0001	0.0033	<0.0001

IND = indicator; figure means probability of zero hypothesis by F value; normal letters, statistic significant; italics letters, insignificant; the explanation of abbreviations of milk indicators (x axis of this table) and environmental and technology farm factors (y axis) is in Tables 2 and 3; some figures in table were used also previously [31–33] in different evaluation of milk heat stability (HS).

3.2. The Effects of Practice Conditions on Milk Heat Stability

The log HS mean and standard deviation for this reduced analysis of variance of data file were 1.273654 ± 0.144189, which corresponds to a geometric mean (xg) of 18.8 min (Table 4). The year had a significant impact on HS values (Table 5, YR (year); *p* < 0.0001). The F criterion of analysis of variance was 75.78 (Table 6). Therefore, this effect was stronger concerning the F criterion, although the differences between years were practically relatively small.

Table 6. Influences on raw cow milk heat stability, according to various environmental and farm technology factors by results of analysis of variance.

FAFA	FAFAT	F Criterion	IFA	t Value/Probability
YR	i	75.78	1	-6.83/<0.0001
			2–3	-1.15/0.2503
SE	j	409.33	1–2	5.87/<0.0001
AL	l	29.51	1	8.42/<0.0001
			2–3	5.95/<0.0001
WE	m	9.7	1	7.28/<0.0001
			2–3	-4.76/<0.0001
NC	n	18.53	1	-9.49/<0.0001
			2–3	-3.81/0.0001
YI	o	118.41	1	7.39/<0.0001
			2–3	2.33/0.0201
BR	p	12.86	1	1.19/0.2334
			2–3	0.27/0.7836
MT	q	15.23	1	1.11/0.2669
			2–3	-3.72/0.0002
LT	r	9.05	1	-0.93/0.3536
			2–3	-0.43/0.6679
PA	s	8.67	1–2	-5.76/<0.0001
FM	t	25.6	1–29	-

F = criterion value as an influence power; FAFA = farm factor; FAFAT = farm factor type; IFA = identification of farm factor type; t = t criterion value; the explanation of abbreviations of environmental and technology farm factors is in Table 3.

The significant effect of the season on HS (Table 5, SE (season); *p* < 0.0001; F criterion 409.33, Table 6) proved to be the strongest factor. In the summer period, there are higher (better) HS values. It could be partly in accordance with other research opinions [57]. Seasonal variability in feed ration composition clearly affects HS, as seen in milk produced between November and March [58]. This period coincides with the indoor period of dairy cows. Milk from this part of the season has a shorter HS than milk from the rest of the year (April to October).

In contrast, better HS was observed in autumn and winter than in spring and summer following UHT ([59] in bulk raw cow milk). Nevertheless, in this context, the absence of an essential seasonal influence on most composition indicators, rennet gelation, and HS values suggest that milk from a mixed herd of cows with spring- and autumn-calving cows is suitable for cheese and milk powder production during a year [60]. However, following in-container sterilization, samples with added stabilizing salts showed significantly improved HS in autumn, whereas with added  $\text{CaCl}_2$ , the best HS was observed in spring. The milk obtained in the autumn/winter season had significantly higher HS ( $p \leq 0.01$ ), with the most remarkable differences noted in the case of the Simmental cows [8].

The significant influence of altitude of dairy cow herd on HS (Table 5, AL (altitude);  $p < 0.0001$ ; F criterion 29.51, Table 6) was moderate and showed the highest (best) HS values up to 300 m and the lowest at higher altitudes above 450 m.

The significant impact of the total annual rainfall on the HS (Table 5, WE (total annual rainfall);  $p < 0.0001$ ; F criterion 9.7, Table 6) was less potent compared to the AL influence and showed the highest HS values for WE up to 450 mm, the mean at the highest WE over 650 mm and the lowest at medium WE. The finding of the highest HS values at the lowest WE corresponds to the same finding at lower altitudes, where the WE is usually lower compared to higher altitudes.

The significant influence of the herd size (Table 5, NC (number of dairy cows in the herds);  $p < 0.0001$ ; F criterion 18.53, Table 6), which characterizes the production technology, was less pronounced on HS and indicated significantly lower HS in small herds up to 100 animals, mean HS in herds from 100 to 400 cows, and the highest HS in herds over 400 heads.

The significant effect of the herd milk yield on HS (Table 5, YI (level of milk yield by milk recording);  $p < 0.0001$ ; F criterion 118.41, Table 6) was strong and demonstrated a significantly lower HS at a lower YI of up to 6000 kg of milk per lactation, mean HS at a YI of between 6000 and 9000 kg and a slightly higher HS at a high YI of over 9000 kg of milk per lactation in official milk recording procedure.

The significant impact of dairy cow breed on HS (Table 5, BR (breed);  $p < 0.0001$ ; F criterion 12.86, Table 6) was less potent and confirmed slightly higher HS values for Czech Fleckvieh (CF) and mildly lower HS in Holstein (H) cows. Slightly lower was HS in other breeds (hybrids of CF and H and others). The lowest resistance to heat treatment was characteristic for milk of Polish Holstein-Friesian cows (average 120 s), the highest for Simmental (average 300 s), and the lactation phase did not affect HS of milk [10]. On the other hand [8], the best HS ( $p \leq 0.01$ ) was noted in the Black-and-White Polish Holstein-Friesian cows (220 s), while the milk of the Jersey cows was most susceptible to thermal destabilization (140 s).

The significant influence of the milking type on HS (Table 5, MT (type of milking);  $p < 0.0001$ ; F criterion 15.23, Table 6) was relatively weak and evidenced the mean HS for automatic milking system (robot), higher when machine milking in the can and pipeline and lower at the milking parlour.

The significant effect of litter type in the stable on HS (Table 5, LT (litter type in the stable);  $p = 0.0001$ ; F criterion 9.05, Table 6) was weak but showed a slightly lower HS in straw and mattress and slightly higher for technology separating liquid excrements.

The significant influence of the application of summer grazing and summer fresh green forage addition to total mixed ration in the course of dairy cow feeding on HS (Table 5, PA (application of summer grazing);  $p = 0.0033$ ; F criterion 8.67, Table 6) was weak and indicated a lower HS for grazing and green feed. However, there might also exist a previous opposite standpoint in this evaluation. In the grazing system, the urea content of milk is usually increased during the spring and early summer season, which leads to its significantly higher HS compared to winter dry feeding [57]. Moreover, in Scotland, the recorded urea contents in milk accounted for most of the variability in HS during the year, where there were differences in the feeding of grazing cows in summer and autumn, which had higher HS than cows in a stable [61].

The significant impact of the farm (Table 5, FM (farm);  $p < 0.0001$ ) on HS was expected due to specific conditions and their combinations at various localities. According to the F criterion 25.6 (Table 6) this FA effect was at medium power. Therefore, the selection of farms for the raw milk collection according to the history of higher HS values could be a method of effective dairy practice because of obtaining better raw material. This procedure is suitable for the improvement of operation certainty in the dairy plant during milk processing. On the other hand, the prediction of HS of concentrated (condensed) milk from the HS results of the corresponding unconcentrated (raw) milk for rapid quality testing purposes has been difficult, mainly due to different experimental conditions [5].

Concerning the future rapid practical monitoring of HS to select raw material from specific sources (farms), it turns out that [5] the infrared spectroscopy with Fourier transformation (MIR-FT) could be a successful procedure to elucidate the extent of changes in the secondary structure of crude protein during the heat treatment of milk and correlate them to the onset of coagulation and the quantity of aggregated protein.

### 3.3. The Seasonal Effect on Milk Indicators and Heat Stability

The mean values of milk indicators in Table 7 show seasonal trends. This effect of the CM (calendar month) was significant for all recorded milk indicators (Table 5) and especially for milk HS ( $p < 0.0001$ ; Table 6, F criterion 8.25). It is clear that milk HS values suggest approximately similar seasonal dynamics with health and hygiene indicators, such as SCC, TCMM, and CCOL (Table 7; also [33]), which is not easily explainable and is a little bit paradoxical but practically realistic. As expected, Machado et al. [19] reported negative relationships between HS and hygienic indicators TCMM and SCC ( $r = -0.15$ ,  $p < 0.0003$ ,  $n = 591$  and  $r = -0.13$ ,  $p = 0.0019$ ,  $n = 591$ ). However, this fact could be explained by the high mean values of TCMM and SCC in their file compared to our data set. Seasonal dynamics of hygienic indicators (TCMM and CCOL) were in accordance with the relevant type of research. As expected, there has been reported negative relationships [62]. Milk HS also had a similar trend with composition indicators such as urea and lactose content (Table 7; also [33]). However, other authors [63] did not find the urea effect on HS ( $p > 0.05$ ) in individual milk samples. Another research found no correlation between urea and HS ([59] in bulk raw cow milk). For example, this does not correspond to the results reported by van Boekel et al. (1989, cit. [64]), where there is stated higher protein dissociation for higher urea content, and then casein molecules are more susceptible to flocculation. Other researchers [16] also did not find a significant impact of basic milk indicators on HS. Nevertheless, the approximately contradictory season trend of milk HS values was observed compared to fat, crude protein, solids-not-fat, total solids, fat/crude protein, fat/lactose, and MFPD (Table 7; also [33]). The component indicators seem to be more logical to link to HS dynamics [33]. Higher component concentrations can mark better visibility and traceability of the beginning of lactoprotein coagulation (denaturation, flakes) with extreme heat treatment of milk, which can demonstrate a simple technological relationship. This standpoint could also be supported with results reported by another research team [18], where artificial milk supplementation by milk proteins decreased milk HS. In general, some higher cow milk yield in the summer is also known and therefore, there is also an indication (Table 7) of a slightly positive relationship of milk HS to milk yield over calendar months.

**Table 7.** The trend dynamics of means of milk indicators along calendar months by results of analysis of variance.

IND	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
FA *	3.87	3.82	3.8	3.69	3.76	3.65	3.64	3.63	3.74	3.89	3.81	3.89
CRP *	3.39	3.34	3.34	3.29	3.3	3.24	3.22	3.2	3.28	3.4	3.38	3.4
LA *	4.87	4.89	4.86	4.88	4.92	4.95	4.94	4.92	4.92	4.89	4.88	4.89
SNF *	8.87	8.83	8.81	8.79	8.82	8.79	8.75	8.7	8.79	8.89	8.91	8.89
TOS *	12.74	12.65	12.6	12.48	12.58	12.45	12.39	12.34	12.53	12.79	12.72	12.79

UR *	24.76	24.31	25.63	26.29	26.55	25.55	27.49	26.07	26.85	24.49	24.33	24.49
FA/CRP *	1.14	1.15	1.14	1.13	1.14	1.13	1.13	1.14	1.14	1.15	1.12	1.15
FA/LA *	0.8	0.78	0.78	0.76	0.76	0.74	0.74	0.74	0.76	0.8	0.78	0.8
MFPD *	-0.52625	-0.52707	-0.52662	-0.52691	-0.52722	-0.5277	-0.52665	-0.52694	-0.52672	-0.52605	-0.52727	-0.52605
SCC * <sup>§</sup>	219	212	214	208	212	230	226	251	229	213	218	213
TCMM * <sup>§</sup>	27.2	24.6	25.3	27.6	29.3	34.7	33.1	31.4	33.2	30.7	27.6	30.7
CCOL * <sup>§</sup>	5.8	3.7	4.5	4.8	6.2	9.1	10.1	8.0	8.2	4.6	3.7	4.6
HS * <sup>§</sup>	16.2	16.8	18.6	19.8	18.9	18.8	19.4	20.2	20.9	18.8	19.0	18.8

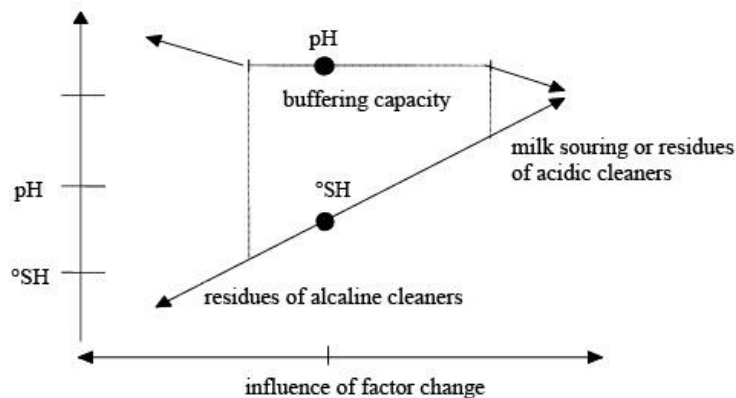
IND = indicator; \* = arithmetic mean; \*<sup>§</sup> = geometric mean; 1–12 = calendar months; used units and explanation of abbreviations of milk indicators are in Table 2.

#### 3.4. Other Effects on Milk Heat Stability in Discussion

In many papers [18,22,65–70], HS was monitored in relation to technological modifications of milk, such as pH adjustment or other artificial additives, e.g., Ca (CaCl<sub>2</sub>), citrate, phosphates (different forms) with a targeted shift of milk buffering capacity (MBC) or whey protein and casein additions (technological improvement of raw material). The effects of elevated calcium, citrate, and urea levels on the stability of UHT milk stored for 52 weeks at 4, 20, 30, and 37 °C were investigated by Karlsson et al. [4]. An elevated level of calcium lowered the pH, resulting in sedimentation and significantly decreased stability. An elevated citrate level was associated with color, but the stability was not improved compared to the reference UHT milk. Elevated levels of urea or interaction terms had little effect on the stability of UHT milk.

Further, for example, protein additions (retentate) reduced milk HS [18]. However, it is not necessary to carry out this manipulation in all cases of milk processing. It means this is not always a positive trend to treat milk artificially before processing into food, especially regarding current sustainable views on healthy nutrition. Therefore, this thesis deals with the practical effects on HS of native milk in its natural composition and its original MBC.

Kailasapathy [71] referred to factors such as milk pH, salt content (can be adjusted by salt adding as stabilization [72]), urea, lactose, protein (and their variants), and also the season, lactation, and health of cows as essential for HS of milk proteins. As mentioned [11,71], pH acidity is the main factor in milk HS. HS variability in this evaluation of bulk milk samples was 39.6% (calculated from original values). In individual milk samples, it could be up to double by the qualified estimation. However, the pH variability for a large file of bulk milk samples was 1.9% (n = 2522, 0.13/6.82; [20]). That is 20.8 times less variability than HS, which is considerable. This low pH variability of raw milk is determined by its buffering capacity (Figure 1; MBC).



**Figure 1.** Scheme of milk buffering capacity (MBC) function. °SH = Soxhlet-Henkel degree of milk titration acidity; pH = milk active acidity.

This MBC is more efficient towards the acidic area than the alkaline, as it is well known. It turns out that between values 1.9% (variability for pH acidity) and 39.6% (for HS), there is a large space for the explanation of sources to be filled since the quality of the raw material from the farm is a determining factor in the quality of dairy products. The multiple imbalances between HS and pH variability ( $39.6/1.9 = 20.8$ ) when pH is the main factor of HS variability have to be better explained. It appears that this statement of pH, as the main HS factor, applies only to milk from a technological point of view, as such, it means in processing modifications and manipulations. However, according to the presented results in this work, there are several significant factors for the HS variability of raw milk in environmental and technological impacts on farms. Partial explanation and quantification of these impacts was the aim of this paper.

#### 4. Conclusions

From the above experiment, it was concluded as follows:

- analysis of the variance on the influences of farm factors on the raw cow milk indicators, in particular the HS of lactoproteins, showed the severity of the influence of farm conditions on the quality of dairy products and the possibility of increasing the share of added value in the dairy industry;
- milk HS was statistically significantly influenced by all the farm factors (fixed effects of the linear model): year; season; calendar month; altitude; total annual rainfall; the number of dairy cows in the herd; milk yield level; cow breed; type of milking; litter type in the stable; summer grazing application; farm effect;
- quantification of these effects may allow efficient selection of raw milk during its collection in order to be processed into specific dairy products with the high-temperature treatment, according to the definition of farm conditions.

**Author Contributions:** Conceptualization, O.H., J.K. and E.S.; Methodology, O.H., J.K., E.S., J.Č., T.K. and D.F.; Data curation, J.K., T.K. and O.E.; Formal analysis, H.N., L.R. and M.K.; Funding acquisition, M.K. and O.E.; Investigation, I.N., H.N., L.R. and M.K.; Project administration, O.H. and E.S.; Resources J.K. and O.E.; Supervision, J.K., D.F. and M.K.; Validation, O.H., H.N. and L.R.; Writing—original draft, O.H., E.S. and M.K.; Writing—review and editing, O.H., E.S. and M.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This paper was performed by the financial support of the projects NAZV KUS QJ1510339 and MZE RO 1420. Further the authors thank Antonín Kolář, Jitka Haňková and Ladislav Havlas

from Bohemilk Opočno, Jan Zlatníček, Zdeňka Klímová and Zdeněk Motyčka from ČMSCH a.s. for their professional and technical cooperation.

**Institutional Review Board Statement:** Ethical review and approval were waived for this study, due to the fact, that there was no experiment on animals according to Czech National Council Act No. 246/1992 Coll. “on the protection of animals against cruelty”, as amended by later regulations in § 3 letter j since commercial milk was obtained from the animals only by regular milking.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## References

- Murphy, S.C.; Martin, N.H.; Barbano, D.M.; Wiedmann, M. Influence of raw milk quality on processed dairy products: How do raw milk quality test results relate to product quality and yield? *J. Dairy Sci.* **2016**, *99*, 10128–10149, doi:10.3168/jds.2016-11172.
- Pytlewski, J.; Antkowiak, I.; Adamski, M.; Kučera, J.; Skrzypek, R. Factors associated with hygienic quality of bulk tank milk produced in Central Poland. *Ann. Anim. Sci.* **2012**, *12*, 227–235, doi:10.2478/v10220-012-0019-1.
- Gajdůšek, S. Fermentation, renneting and alcohol stability of cows milk in relation to milk-composition. *Živočišná Výroba* **1989**, *34*, 413–422.
- Karlsson, M.A.; Lundh, A.; Innings, F.; Hojer, A.; Wikstrom, M.; Langton, M. The effect of calcium, citrate, and urea on the stability of ultra-high temperature treated milk: A full factorial designed study. *Foods* **2019**, *8*, 418, doi:10.3390/Foods8090418
- Dumpler, J.; Huppertz, T.; Kulozik, U. Invited review: Heat stability of milk and concentrated milk: Past, present, and future research objectives. *J. Dairy Sci.* **2020**, *103*, 10986–11007, doi:10.3168/jds.2020-18605.
- Leitner, G.; Lavon, Y.; Matzrafi, Z.; Benun, O.; Bezman, D.; Merin, U. Somatic cell counts, chemical composition and coagulation properties of goat and sheep bulk tank milk. *Int. Dairy J.* **2016**, *58*, 9–13, doi:10.1016/j.idairyj.2015.11.004.
- Barłowska, J.; Litwińczuk, Z.; Brodziak, A.; Chabuz, W. Effect of the production season on nutritional value and technological suitability of milk obtained from intensive (TMR) and traditional feeding system of cows. *J. Microb. Biotech. Food Sci.* **2012**, *1*, 1205–1220.
- Barłowska, J.; Litwińczuk, Z.; Kowal, M. Influence of production season and lactation stage on the technological suitability of milk from cows of various breeds fed in the TMR system. *Ann. Anim. Sci.* **2014**, *14*, 649–661, doi:10.2478/aoas-2014-0039.
- Huppertz, T. Heat stability of milk. In *Advanced Dairy Chemistry. Volume 1B: Proteins: Applied Aspects*, 4th ed.; McSweeney, P.L.H., O'Mahony, J.A., Eds.; Springer: New York, NY, USA, 2016; pp. 179–196.
- Litwińczuk, Z.; Barłowska, J.; Matwijczuk, A.; Słomiany, J. Changes in milk yield and quality during lactation in Polish Red and White-Backed cows included in the genetic resources conservation programme in comparison with the Simmental breed. *Ann. Anim. Sci.* **2016**, *16*, 871–885, doi:10.1515/aoas-2015-0095.
- Singh, H. Heat stability of milk. *Int. J. Dairy Technol.* **2004**, *57*, 111–119, doi:10.1111/j.1471-0307.2004.00143.x.
- Timlin, M.; Tobin, J.T.; Brodtkorb, A.; Murphy, E.G.; Dillon, P.; Hennessy, D.; O'Donovan, M.; Pierce, K.M.; O'Callaghan, T.F. The impact of seasonality in pasture-based production systems on milk composition and functionality. *Foods* **2021**, *10*, 607, doi:10.3390/Foods10030607.
- Chen, B.Y.; Grandison, A.S.; Lewis, M.J. Comparison of heat stability of goat milk subjected to ultra-high temperature and in-container sterilization. *J. Dairy Sci.* **2012**, *95*, 1057–1063, doi:10.3168/jds.2011-4367.
- Raynal-Ljutovac, K.; Park, Y.W.; Gaucheron, F.; Boulhallab, S. Heat stability and enzymatic modifications of goat and sheep milk. *Small Ruminant Res.* **2007**, *68*, 207–220, doi:10.1016/j.smallrumres.2006.09.006.
- Feagan, J.T.; Griffin, A.T.; Lloyd, G.T. Effects of subclinical mastitis on heat stability of fluid milk. *J. Dairy Sci.* **1966**, *49*, 933–939, doi:10.3168/jds.S0022-0302(66)87984-5.
- Chramostová, J.; Vrzáková, Z.; Němečková, I.; Čurda, L. Heat stability of milk and factors influencing it. *Mlékařské Listy* **2014**, *146*, XIV–XVII. Available online: [http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2014/146\\_xiv-xvii.pdf](http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2014/146_xiv-xvii.pdf) (accessed on 19 May 2021). (In Czech)
- Chramostová, J.; Mühlhansová, A.; Binder, M.; Strmiska, V.; Čurda, L.; Hanuš, O.; Kopecký, J.; Klimešová, M.; Dragounová, H.; Seydlová, R.; et al. Heat stability of raw ewe and goat milk. *Mlékařské Listy* **2016**, *27*, 22–26. Available online: [http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2016/156-157/veda\\_157-22-26.pdf](http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2016/156-157/veda_157-22-26.pdf) (accessed on 19 May 2021).
- Peroutková, J.; Binder, M.; Drbohlav, J. Thermal stability of milk fortified with protein preparations. *Mlékařské Listy* **2016**, *27*, 12–15. Available online: [http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2016/158-159/veda\\_158-12-15.pdf](http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2016/158-159/veda_158-12-15.pdf) (accessed on 19 May 2021). (In Czech)
- Machado, S.C.; Fischer, V.; Stumpf, M.T.; Stivanin, S.C.B. Seasonal variation, method of determination of bovine milk stability, and its relation with physical, chemical, and sanitary characteristics of raw milk. *Rev. Bras. Zootec.* **2017**, *46*, 340–347, doi:10.1590/S1806-92902017000400010.

20. Genčurová, V.; Hanuš, O.; Beber, K.; Kopecký, J.; Havličková, K. Relationship between alcohol stability of cows milk and some components and factors of primary production. *Živočišná Výroba* **1993**, *38*, 837–848.
21. Horne, D.S. Ethanol stability and milk composition. In *Advanced Dairy Chemistry. Volume 1B: Proteins: Applied Aspects*, 4th ed.; McSweeney, P.L.H., O'Mahony, J.A., Eds.; Springer: New York, NY, USA, 2016; pp. 225–246.
22. Horne, D.S.; Muir, D.D. Alcohol and heat-stability of milk protein. *J. Dairy Sci.* **1990**, *73*, 3613–3626, doi:10.3168/jds.S0022-0302(90)79064-9.
23. Horne, D.S.; Parker, T.G. The pH sensitivity of the ethanol stability of individual cow milks. *Neth. Milk Dairy J.* **1980**, *34*, 126–130.
24. Horne, D.S.; Parker, T.G. Factors affecting the ethanol stability of bovine-milk. 2. The origin of the pH transition. *J. Dairy Res.* **1981**, *48*, 285–291, doi:10.1017/S0022029900021701.
25. Horne, D.S.; Parker, T.G. Factors affecting the ethanol stability of bovine-milk. 5. Effects of chemical modification of milk protein. *J. Dairy Res.* **1982**, *49*, 449–457, doi:10.1017/S0022029900022585.
26. Rathnayake, R.M.C.S.; Mangalika, U.L.P.; Adikari, A.M.J.B.; Nayananjali, W.A.D. Changes in compositional and keeping quality parameters of cow milk on ethanol stability. *Int. J. Liv. Res.* **2016**, *6*, 83–89. Available online: <https://www.ejmanager.com/mnsteps/68/68-1457973437.pdf> (accessed on 19 May 2021).
27. de Oliveira, C.A.F.; Lopes, L.C.; Rosim, R.E.; Fernandes, A.M.; Corassin, C.H. Composition, somatic cell count and casein fractions of ethanol unstable milks. *Acta Sci. Technol.* **2013**, *35*, 153–156, doi:10.4025/actascitechnol.v35i1.11481.
28. Li, Q.M.; Ma, Y.; He, S.H.; Elfalleh, W.; Xu, W.Y.; Wang, J.Q.; Qiu, L.Y. Effect of pH on heat stability of yak milk protein. *Int. Dairy J.* **2014**, *35*, 102–105, doi:10.1016/j.idairyj.2013.10.015.
29. Metwalli, A.A.; Ismail, E.A.; Alhaj, O.A.; Saleh, K.A.; Ibrahim, F.S. The effect of urea and formaldehyde on heat coagulation time (HCT) of camel milk. *Life Sci. J.* **2013**, *10*, 45–50. Available online: [http://www.lifesciencesite.com/lisj/life1004/007\\_20457life1004\\_45\\_50.pdf](http://www.lifesciencesite.com/lisj/life1004/007_20457life1004_45_50.pdf) (accessed on 19 May 2021).
30. Illek, J. Syndrome of low-protein cow milk. In Proceedings of VIIIth Congress of the International Society for Animal Hygiene, St. Paul, MN, USA, 12–16 September 1994; pp. 738–739.
31. Hanuš, O.; Čítek, J.; Říha, J.; Samková, E.; Kučera, J.; Chládek, G.; Němečková, I.; Hasoňová, L.; Klimešová, M.; Roubal, P.; et al. Seasonal correlations between heat stability and other raw bulk cow milk quality indicators. *Acta Univ. Agric. Silv. Mendel. Brun.* **2019**, *67*, 395–406, doi:10.11118/actaun201967020395.
32. Hanuš, O.; Němečková, I.; Pozdíšek, J.; Huňády, I.; Klimešová, M.; Ponížil, A.; Elich, O.; Roubal, P.; Jedelská, R.; Kopecký, J. Impact of feeding of legume-cereal mixture silages on dairy cow milk thermostability and quality. *Acta Univ. Agric. Silv. Mendel. Brun.* **2018**, *66*, 647–653, doi:10.11118/actaun201866030647.
33. Hanuš, O.; Samková, E.; Chládek, G.; Klimešová, M.; Roubal, P.; Němečková, I.; Jedelská, R.; Kopecký, J. Raw cow milk thermostability and its relations to other indicators. *Acta Univ. Agric. Silv. Mendel. Brun.* **2018**, *66*, 1127–1134, doi:10.11118/actaun201866051127.
34. Deeth, H.C.; Lewis, M.J. Practical consequences of calcium addition to and removal from milk and milk products. *Int. J. Dairy Technol.* **2015**, *68*, 1–10, doi:10.1111/1471-0307.12188.
35. On-Nom, N.; Grandison, A.S.; Lewis, M.J. Measurement of ionic calcium, pH, and soluble divalent cations in milk at high temperature. *J. Dairy Sci.* **2010**, *93*, 515–523, doi:10.3168/jds.2009-2634.
36. On-Nom, N.; Grandison, A.S.; Lewis, M.J. Heat stability of milk supplemented with calcium chloride. *J. Dairy Sci.* **2012**, *95*, 1623–1631, doi:10.3168/jds.2011-4697.
37. Ramasubramanian, L.; D'Arcy, B.; Deeth, H.C. Heat-induced coagulation of whole milk by high levels of calcium chloride. *Int. J. Dairy Technol.* **2012**, *65*, 183–190, doi:10.1111/j.1471-0307.2012.00823.x.
38. Kaushik, R.; Sachdeva, B.; Arora, S. Heat stability and thermal properties of calcium fortified milk. *CyTA J. Food* **2015**, *13*, 305–311, doi:10.1080/19476337.2014.971346.
39. Fischer, V.; Ribeiro, M.E.R.; Zanela, M.B.; Marques, L.T.; Abreu, A.S.; Machado, S.C.; Fruscalzo, V.; Barbosa, R.S.; Stumpf, M.T. Leite instável não ácido: Um problema solucionável? Unstable non acid milk: A solvable problem? In Proceedings of XXI Congresso Brasileiro de Zootecnia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, Brazil, 23–27 May 2011; pp. 1–19. (In Portuguese)
40. Molina, L.H.; Gonzalez, R.; Brito, C.; Carrillo, B.; Pinto, M. Correlation between heat stability and alcohol test of milks at a milk collection center. *Arch. Med. Vet.* **2001**, *33*, 233–240, doi:10.4067/S0301-732x2001000200012.
41. Rosa, P.P.; Ávila, B.P.; Angelo, I.D.V.; Silva, P.M.; Chesini, R.G.; Mota, G.N.; Sedrez, P.A.; Fernandes, T.A.; Bugoni, M.; Roll, V.F.B. Factors that affect the thermal stability of bovine milk and the use of alcohol test in the milk industry—A review. *Nucl. Anim.* **2020**, *12*, 15–46, doi:10.3738/21751463.3734.
42. Gulati, A.; Hennessy, D.; O'Donovan, M.; McManus, J.J.; Felton, M.A.; Guinee, T.P. Dairy cow feeding system alters the characteristics of low-heat skim milk powder and processability of reconstituted skim milk. *J. Dairy Sci.* **2019**, *102*, 8630–8647, doi:10.3168/jds.2018-15884.
43. Hanuš, O.; Vyletřlová-Klimešová, M.; Chládek, G.; Roubal, P.; Seydlová, R. Metaanalysis of ketosis milk indicators in terms of their threshold estimation. *Acta Univ. Agric. Silv. Mendel. Brun.* **2013**, *61*, 1681–1692, doi:10.11118/actaun201361061681.
44. Manzenreiter, H.; Fürst-Waltl, B.; Egger-Danner, C.; Zollitsch, W. Zur Eignung des Gehalts an Milchinhaltsstoffen als Keto-seindikator. In Proceedings of 40th Viehwirtschaftliche Fachtagung, Irnding, Austria, 18–19 April 2013; pp. 9–19.



45. Siebert, F.; Pallauf, J. Analysis of Hessian dairy herd improvement test results as a predictor of a risk for ketosis. *Züchtungskunde* **2010**, *82*, 112–122. Available online: [https://www.zuechtungskunde.de/artikel.dll/siebert-and-pallauf\\_MTM3NzI4NQ.PDF](https://www.zuechtungskunde.de/artikel.dll/siebert-and-pallauf_MTM3NzI4NQ.PDF) (accessed on 19 May 2021).
46. Steen, A.; Osterås, O.; Grønseth, H. Evaluation of additional acetone and urea analyses, and of the fat-lactose-quotient in cow milk samples in the herd recording system in Norway. *J. Vet. Med. A* **1996**, *43*, 181–191, doi:10.1111/j.1439-0442.1996.tb00443.x.
47. van Kregesel, A.T.M.; van der Drift, S.G.A.; Horneman, M.; de Roos, A.P.W.; Kemp, B.; Graat, E.A.M. Short communication: Ketone body concentration in milk determined by Fourier transform infrared spectroscopy: Value for the detection of hyperketonemia in dairy cows. *J. Dairy Sci.* **2010**, *93*, 3065–3069, doi:10.3168/jds.2009-2847.
48. Janšová, B.; Navrátilová, P. *Instructions for Exercises in Technology and Hygiene of Milk and Dairy Products*; Faculty of Veterinary Hygiene and Technology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences: Brno, Czech Republic, 2014; p. 90. (In Czech)
49. Kasinos, M.; Karbakhsh, R.R.; Van der Meeren, P. Sensitivity analysis of a small-volume objective heat stability evaluation test for recombined concentrated milk. *Int. J. Dairy Technol.* **2015**, *68*, 38–43, doi:10.1111/1471-0307.12184.
50. Ali, A.K.A.; Shook, G.E. An optimum transformation for somatic-cell concentration in milk. *J. Dairy Sci.* **1980**, *63*, 487–490, doi:10.3168/jds.S0022-0302(80)82959-6.
51. Hanuš, O.; Janů, L.; Schuster, J.; Kučera, J.; Vyletěllová, M.; Genčurová, V. Exploratory analysis of dynamics of frequency distribution of raw cow milk quality indicators in the Czech Republic. *Acta Univ. Agric. Mendel. Brun.* **2011**, *59*, 83–100, doi:10.11118/actaun201159010083.
52. Hanuš, O.; Janů, L.; Vyletěllová, M.; Kučera, J. Research and development of a synthetic quality indicator for raw milk assessment. *Folia Vet.* **2009**, *53*, 90–100. Available online: <http://www.uvlf.sk/sites/default/files/fovia-veterinaria/fovia-veterinaria-2-2009.pdf> (accessed on 19 May 2021).
53. Janů, L.; Hanuš, O.; Baumgartner, C.; Macek, A.; Jedelská, R. The analysis of state, dynamics and properties of raw cow milk quality indicators in the Czech Republic. *Acta Fytotec. Zootec.* **2007**, *10*, 74–85.
54. Reneau, J.K. Effective use of dairy-herd improvement somatic-cell counts in mastitis control. *J. Dairy Sci.* **1986**, *69*, 1708–1720, doi:10.3168/jds.S0022-0302(86)80590-2.
55. *SAS Users Guide Ver. 9*; Statistics SAS Institute Inc.: Cary, NC, USA, 2002.
56. Kvapilík, J.; Kučera, J.; Bucek, P. *Yearbook—Cattle Breeding in the Czech Republic. Main Results and Indicators for 2016*; ČMSCH a.s.: Praha, Czech Republic, 2017. (In Czech)
57. Fox, P.F.; McSweeney, P.L. *Dairy Chemistry and Biochemistry*, 2nd ed.; Springer: London, UK, 1998.
58. Kelly, P.; O’Keeffe, A.; Keogh, M.; Phelan, J. Studies of milk composition and its relationship to some processing criteria: III: Seasonal variation in heat stability of milk. *Irish J. Food Sci. Tech.* **1982**, *6*, 29–38. Available online: <https://www.jstor.org/stable/25558043> (accessed on 19 May 2021).
59. Chen, B.Y.; Grandison, A.S.; Lewis, M.J. Effect of seasonal variation on some physical properties and heat stability of milk subjected to ultra-high temperature and in-container sterilisation. *Food Chem.* **2015**, *181*, 227–234, doi:10.1016/j.foodchem.2015.02.072.
60. Lin, Y.C.; O’Mahony, J.A.; Kelly, A.L.; Guinee, T.P. Seasonal variation in the composition and processing characteristics of herd milk with varying proportions of milk from spring-calving and autumn-calving cows. *J. Dairy Res.* **2017**, *84*, 444–452, doi:10.1017/S0022029917000516.
61. Holt, C.; Muir, D.D.; Sweetsur, A.W.M. Seasonal-changes in heat-stability of milk from creamery silos in south-west Scotland. *J. Dairy Res.* **1978**, *45*, 183–190, doi:10.1017/S0022029900016356.
62. Godič-Torkar, K.; Golc-Teger, S. The microbiological quality of raw milk after introducing the two day’s milk collecting system. *Acta Agric. Slov.* **2008**, *92*, 61–74. Available online: <http://aas.bf.uni-lj.si/zootehnika/92-2008/PDF/92-2008-1-61-74.pdf> (accessed on 19 May 2021).
63. Chládek, G.; Čejna, V. Effect of urea content on chemical and technological milk indicators in Holstein dairy cows. In Proceedings of Den mléka 2005, Prague, Czech Republic, 12 May 2005, pp. 69–70. (In Czech)
64. Čejna, V. Influence of Cow Lactation on Chosen Technological Properties of Milk. Ph.D. Thesis, Mendel University in Brno, Brno, Czech Republic, 2006. (In Czech)
65. Miller, P.G.; Sommer, H.H. The coagulation temperature of milk as affected by pH, salts, evaporation and previous heat treatment. *J. Dairy Sci.* **1940**, *23*, 405–421, doi:10.3168/jds.S0022-0302(40)95542-4.
66. Rose, D. Factors affecting the pH-sensitivity of the heat stability of milk from individual cows. *J. Dairy Sci.* **1961**, *44*, 1405–1413, doi:10.3168/jds.S0022-0302(61)89901-3.
67. Rose, D. Variations in heat stability and composition of milk from individual cows during lactation. *J. Dairy Sci.* **1961**, *44*, 430–441, doi:10.3168/jds.S0022-0302(61)89760-9.
68. Darling, D.F. Heat-stability of milk. *J. Dairy Res.* **1980**, *47*, 199–210, doi:10.1017/S0022029900021075.
69. Muir, D.D. Heat-stability of milk and concentrated milk. *Int. J. Biochem.* **1985**, *17*, 291–299, doi:10.1016/0020-711x(85)90203-4.
70. Štětina, J.; Čurda, L.; Rubina, N.; Klojdová, I.; Anufrieva, A.; Němečková, I. Influence of selected phosphates on health stability of milk and possibilities of its assessment. *Mlékařské Listy* **2016**, *27*, 38–42. Available online: [http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2016/158-159/veda\\_159-38-42.pdf](http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2016/158-159/veda_159-38-42.pdf) (accessed on 19 May 2021). (In Czech)

71. Kailasapathy, K. Chemical composition, physical and functional properties of milk and milk ingredients. In *Dairy Processing and Quality Assurance*; Chandan, R.C., Kilara, A., Shah, N.P., Eds.; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2008; pp. 75–103.
72. Janštová, B.; Navrátilová, P. *Milk Production and Dairy Technology*; Faculty of Veterinary Hygiene and Technology. University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences: Brno, Czech Republic, 2014; pp. 108. (In Czech)

### **3.3 Use of MALDI-TOF MS technology to evaluate adulteration of small ruminant milk with raw bovine milk**

*Journal of Dairy Science, Volume 105, Issue 6, June 2022, Pages 4882-4894*

<https://doi.org/10.3168/jds.2021-21396>

Rysova L., Cejnar P., Hanus O., Legarova V., Havlik J., Nejeschlebova H.,  
Nemeckova I., Jedelska R., Bozik M.



## Use of MALDI-TOF MS technology to evaluate adulteration of small ruminant milk with raw bovine milk

L. Rysova,<sup>1</sup> P. Cejnar,<sup>2</sup> O. Hanus,<sup>3</sup> V. Legarova,<sup>1</sup> J. Havlik,<sup>1</sup> H. Nejeschlebova,<sup>3</sup> I. Nemeckova,<sup>3</sup> R. Jedelska,<sup>3</sup> and M. Bozik<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcka 129, 165 00 Prague–Suchbát, Czech Republic

<sup>2</sup>Department of Computing and Control Engineering, University of Chemistry and Technology, Prague, Technická 5, 166 28 Prague 6–Dejvice, Czech Republic

<sup>3</sup>Dairy Research Institute Ltd., Ke Dvůru 12a, 160 00 Prague 6–Vokovice, Czech Republic

### ABSTRACT

Detection of adulteration of small ruminant milk is very important for health and commercial reasons. New analytical and cost-effective methods need to be developed to detect new adulteration practices. In this work, we aimed to explore the ability of the MALDI-TOF mass spectrometry to detect bovine milk in caprine and ovine milk using samples from 18 dairy farms. Different levels of adulteration (0.5, 1, 5, 10, 20, 40, 60, and 80%) were analyzed during the lactation period of goat and sheep (in May, from 60 to 90 d in milk, and in August, from 150 to 180 d in milk). Two different ranges of peptide-protein spectra (500–4,000 Da; 4–20 kDa) were used to establish a calibration model for predicting the concentration of adulterant using partial least squares and generalized linear model with lasso regularization. The low molecular weight part of the spectra together with the generalized linear model with lasso regularization regression model appeared to have greater potential for our aim of detection of adulteration of small ruminants' milk. The subsequent prediction model was able to predict the concentration of bovine milk in caprine milk with a root mean square error of 11.4 and 17.0% in ovine milk. The results offer compelling evidence that MALDI-TOF can detect the adulteration of small ruminants' milk. However, the method is severely limited by (1) the complexity of the milk proteome resulting from the adulteration technique, (2) the potential degradation of thermolabile proteins, and (3) the genetic variability of tested samples. Additionally, the root mean square error of prediction based only on one individual sample adulteration series can drop down

to 6.34% for quantification of adulterated caprine milk and 6.28% for adulterated ovine milk for the full set of concentrations or down to 2.33 and 4.00%, respectively, if we restrict only to low concentrations of adulteration (0, 0.5, 1, 5, 10%).

**Key words:** adulteration, caprine milk, detection of bovine milk, ovine milk

### INTRODUCTION

The global human population is expected to reach almost 10 billion in 2050, which means that humanity will face an enormous challenge in ensuring adequate food quality. The need to address global food security will become more critical in all sectors (Garcia et al., 2019). The dairy industry may also become more vulnerable to adulteration, given that milk is one of the most-consumed foods in the world, owing to its high nutritional value, which is given by the content of proteins, fat, saccharides, and micronutrients, particularly calcium, phosphorus, and vitamin B<sub>12</sub> (Neumann et al., 2002; Hansen and Ferrão, 2018). Although bovine milk production is the highest globally, the milk of small ruminants should not be neglected, as its production is gaining importance worldwide (Pulina et al., 2018). The increasing demand for caprine and ovine milks is due to specific nutritional and functional properties that have made them valuable and healthier alternatives to bovine milk (Hernández-Ledesma et al., 2011). The main benefits of caprine milk are higher digestibility, which is ascribed to the smaller size of the naturally homogenized fat globule, and less allergenicity attributed to the higher content of the  $\alpha_{S2}$ -CN fraction rather than an  $\alpha_{S1}$ -CN fraction (El-Agamy, 2007; Scano et al., 2014). Ovine milk has a high nutrition value, which is based on a protein content that is twice that of caprine and bovine milk (Balthazar et al., 2017). However, seasonal variations and the much lower yield of caprine and ovine milk, together with the low price of bovine

Received October 8, 2021.

Accepted January 31, 2022.

\*Corresponding author: [bozik@af.czu.cz](mailto:bozik@af.czu.cz)

milk, make caprine and ovine milk attractive targets for milk processors with the intent to adulterate caprine and ovine milk with bovine milk (Ferreira and Caçote, 2003). Consequently, adulterating the small ruminants' milk, particularly with bovine milk, is quite common (Mafra et al., 2008).

Despite the similarity of these 3 matrices and the consequent difficulty of their identification in mixtures, many analytical methods have been developed for the authentication of milk. Polymerase chain reaction is usually used to detect milk of different species (Azad and Ahmed, 2016). In this context, electrophoretic, immunochemical, or chromatographic strategies have also shown potential mainly due to the great heterogeneity of milk proteins with the presence of different isoforms (Roncada et al., 2012; Poonia et al., 2017). Especially, chromatographic methods with advanced methods for the acquisition of the data are growing in popularity due to recent advances in MS instruments. For example, quantitative methods such as sequential window acquisition of all theoretic mass spectra or selected reaction monitoring experiments have been used because of their high sensitivity and specificity in the proteomic approaches (Ortea et al., 2016).

From these analytical methods, MALDI-TOF MS also found application as a powerful and cost-effective tool for detecting the food adulteration due to rapid and simple preparation of sample, ease of use, fast data collection, high sensitivity, tolerance to contaminants, and the ability to detect various components in highly complex mixtures (Roncada et al., 2012; Aiello et al., 2020; Zambonin, 2021). The potential of MALDI-TOF MS for the detection of small ruminants' milk adulteration was confirmed by Nicolaou et al. (2011). They have used a combination of MALDI-TOF MS and multivariate statistical methods to analyze mixtures of pasteurized bovine, caprine, and ovine milk. The selected regression models achieved encouragingly low root mean square error (RMSE) of prediction in the range of 6 to 10%. The MALDI-TOF mass spectra of milk tryptic digests were used by Calvano et al. (2012) to reveal 4 peptide markers of bovine milk for 5% adulteration detection level. The diversity of identification of various species of milk, including human, bovine, caprine, camel, donkey, ovine, buffalo, and infant formula milk, by MALDI-TOF MS technique based on protein profiling was investigated by Di Francesco et al. (2018). The molecular fingerprints of proteins and lipids formed the basis for a fast, robust, and highly accurate method. This method was designed by Piras et al. (2021) using a liquid atmospheric pressure MALDI-Q-TOF MS. Bovine milk as an adulterant in caprine milk was detected down to 5% of the adulteration level.

The MALDI-TOF MS technique was also used to determine phospholipids in milk to analyze lipid markers of adulteration (Calvano et al., 2013).

However, to our knowledge, the robustness of this technique has not yet been tested against a wide range of milk samples from different herds and flocks that are influenced by different factors such as genetic, breed, diet, health, housing techniques, or seasonality. To fill this gap, this study aimed to verify the rapidity, reliability, and robustness of the MALDI-TOF MS technique in detecting bovine milk in caprine and ovine milk from different Czech farms.

## MATERIALS AND METHODS

### Milk Samples

Bulk tank milk samples were acquired from dairy farms located across 3 Czech regions. The study involved 6 caprine dairy flocks, 5 ovine dairy flocks, and 8 bovine dairy herds. The average breeding ratio for caprine flocks was 59% White Shorthaired goat, 29% Brown Shorthaired goat, 12% Anglo-Nubian goat; for ovine flocks, 70% Lacaune ovine, 20% Tsigai ovine, 10% East Friesian ovine; and for bovine herds, 83% Holstein and 17% Czech Fleckvieh. Dairy farms were selected to cover typical breeding profiles of dairy animals in the Czech Republic (Bucek et al., 2019; Kvapilik et al., 2019). The size of flocks and herds ranged from 13 to 140 animals. Hand milking was typical for small flocks and herds, whereas machine milking was used for large flocks and herds. A seasonal grazing system during lactation, unique to each flock and herd, has been introduced on all farms.

A total of 23 raw caprine milk samples, 24 raw ovine milk samples, and 24 raw bovine milk samples were collected directly from the milk cooling tanks (<8°C). Part of them were taken in the first part of lactation period of small ruminants in May (from 60–90 DIM; 11 caprine milk samples, 12 ovine milk samples, and 12 bovine milk samples), and the rest of milk samples in the second part of lactation in August (from 150–180 DIM). The samples were collected in sterile containers and transported under cold conditions at 6°C to the laboratory.

First, a matrix of adulterated milk samples was prepared with random combinations of pairs caprine and bovine, and pairs of ovine and bovine; series with 0.5, 1, 5, 10, 20, 40, 60, and 80% adulteration were prepared from each pair. In total, 184 spiked samples of caprine milk with bovine milk were prepared, and 192 spiked samples of ovine milk with bovine milk were prepared. Pure milk samples were also analyzed for caprine milk

( $n = 23$ ), ovine milk ( $n = 24$ ), and bovine milk ( $n = 24$ ). Artificially adulterated samples and pure caprine, ovine, and bovine milk samples were thermally treated by pasteurization in a batch process in a water bath. Higher-heat pasteurization ( $72^{\circ}\text{C}$  for 20 min), which can be used under the conditions of the Czech Republic in the production of drinking milk, was applied.

#### Baseline Sample Characteristics

Baseline sample characteristics (fat, CP, casein, lactose, TS, nonfat solids, and urea) were analyzed by indirect infrared spectroscopy with Michelson interferometry and Fourier transformations by using a Bentley DairySpec instrument (Bentley Instruments). The SCC was performed by flow cytometry (Somacount 300, Bentley Instruments Inc.). Milk pH was measured with a pH meter (pHenomenal pH 1100L; VWR). A total count of mesophilic microorganisms (TCM) was carried out following the classical plate method according to ISO 4833-1:2013 (ISO, 2013). Diluted samples in a volume of 1 mL were incubated on Glucose-Tryptone-Yeast Extract-Milk agar-filled Petri dishes (Milcom Corp.). After incubation for 72 h at  $30^{\circ}\text{C}$ , the TCM was calculated as colony-forming units in 1 mL of sampled milk, according to ISO 7218:2007 (ISO, 2007). The suitability of pure milk samples for further development of the new method was verified using the 2-tailed Student's  $t$ -test in Microsoft Office Excel 2016.

#### MALDI-TOF MS Measurement and Analysis

Pure milk samples and their mixtures were used. Prior to analysis, milk fat was removed by centrifugation at  $21,000 \times g$  at  $4^{\circ}\text{C}$  for 15 min (Universal 320R), and samples were diluted 1:1 with ultra-pure water, and 1  $\mu\text{L}$  of each was deposited on a Bruker MTP 384 ground steel target plate. Once the sample spots dried, they were overlaid with 1  $\mu\text{L}$  of  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA; Bruker Daltonics) matrix solution (acetonitrile 50.0%, water 47.5% and trifluoroacetic acid 2.50%; 10 mg/mL HCCA). After the matrix solution dried, MALDI-TOF MS analysis was performed using an Autoflex Speed (Bruker Daltonics). Two linear positive methods with different mass ranges (500–4,000 Da; 4–20 kDa) and spectra accumulation were developed and used for measurements. Each adulterated sample was measured 3 times. The Bruker bacterial test standard (Daltonics) and Peptide calibration standard II (Daltonics) were used for method calibrations (ppm error was 1–7). Both together cover the whole measuring range from 500 to 17,000 Da. For a

detailed description of the method, see the Supplemental File S1 (<https://doi.org/10.5281/zenodo.6351584>; Rysová et al., 2022).

#### Spectrum Preprocessing and Registration

All the spectra were measured in the same  $m/z$  points (approx.  $1.33 \times 10^4$  points for 500–4,000 Da interval, approximately  $2.32 \times 10^4$  points for 4–20 kDa interval) and, thus, no re-interpolation was required. The spectra were converted using Bruker CompassXport (version 3.0.13) and smoothed (2 cycles of the Savitzky-Golay filter with the normalization window of 0.3  $m/z$ ) using the MS-alone tool (Hrdlickova Kuckova et al., 2015). The spectra were then registered using the method of Michalusová et al. (2020) as follows: one spectrum was selected as the template [ $I_{\text{template}}(mz)$ ], to which all the other sample spectra [ $I_{\text{sample}}(mz)$ ] were registered. Using the Levenberg-Marquardt algorithm (R software version 4.0.3 for Windows; R package 'min-pack.lm' version 1.2.1; <https://www.r-project.org>), the best-matching coefficients A, B, C, and D were obtained, minimizing the sum of the squares of the template spectrum intensity and the registered spectrum intensity  $C \cdot I_{\text{sample}}(A \times mz + B) + D$ , employing best linear registration in both the  $m/z$  values component ( $A \times mz + B$ ) and the intensities component ( $C \times I_{\text{sample}}(mz) + D$ ). See also Michalusová et al. (2020) for the used scripts. For samples, where mentioned removal of the best-matching exponential line before the registration, this task was done in R for Windows (version 4.0.3) together with the multiMS-toolbox (version 2.5.1; Hrdlickova Kuckova et al., 2015; Cejnar et al., 2018) using one of its normalization options.

#### Removal of the Outliers

The pure or spiked samples were measured in triplicates. If any technical anomalies were detected during the acquisition of the spectra, another set of triplicates was acquired. After the registration of all the spectra, they were visually checked, and extreme deviations in registrations were removed. Principal component analysis (PCA) was then performed on registered spectra (vectors of intensities) using R for Windows (version 4.0.3) together with the multiMS-toolbox (version 2.5.1), using no other normalization (normalize = 0) and default values for centering (ON) and scaling (OFF) of spectrum intensities. The deviated spectra, where either the spectrum deviated from the position of the other 2 of the triplicate set of the same sample and concentration, or all 3 spectra of the triplicate set

deviated from the position of other spectra of the same sample adulteration concentration series, were also removed. For each set of measured spectra, the number of detected and removed outliers is noted.

### Data Analysis

Generalized linear model with lasso regularization (GLM-Lasso; Tibshirani, 1996) regression model and partial least squares (PLS; Wold et al., 2001) regression model were trained in the R software (version 4.0.3; <https://www.r-project.org>) using packages ‘caret’ (6.0.86), ‘pls’ (2.7.3), ‘glmnet’ (4.0.2), and ‘ggplot2’ (3.3.2). The train function of the ‘caret’ package was used, with removing zero values and centering as the preprocessing options, RMSE as the metric, and either ‘best’ or ‘oneSE’ as the selection function. For PLS, 1 to 10 latent variables were tested for each trained model and cross-validation scheme. For GLM-Lasso, the  $\alpha$  parameter of the ‘glmnet’ package was set to 1,  $\lambda$  parameter was tested for 81 different values equidistantly spaced in the logarithmic space over the interval from  $10^3$  down to  $10^{-3}$  for each trained model and cross-validation scheme. Figure 1 shows the design of the entire experiment.

### Data Availability

All the raw spectra (without the outliers) used for a statistical models and analysis are available as FAIR data at Zenodo (<https://doi.org/10.5281/zenodo.5742718>; Rysová et al., 2021).

### Description of the Data Sets, Adulteration Concentration Series

From each raw caprine or ovine milk sample, an adulteration concentration series was constructed. For a given milk sample random bovine milk was assigned for the adulteration and, subsequently, the mixed adulterated samples were prepared in all mentioned concentrations of the series. The spectrum for each sample adulterated at given concentration was then recorded 3 times. The sets contain all the recorded raw spectra after removing the outliers. Set  $A_{goat}$  contains adulteration concentration series of 18 samples for caprine milk, and set  $A_{sheep}$  contains adulteration concentration series of 19 samples for ovine milk. For both sets, the adulteration concentrations of 20, 40, 60, and 80% were used (i.e., 216 spectra for set  $A_{goat}$  and 225 spectra for set  $A_{sheep}$  after removing the outliers). For simplicity,

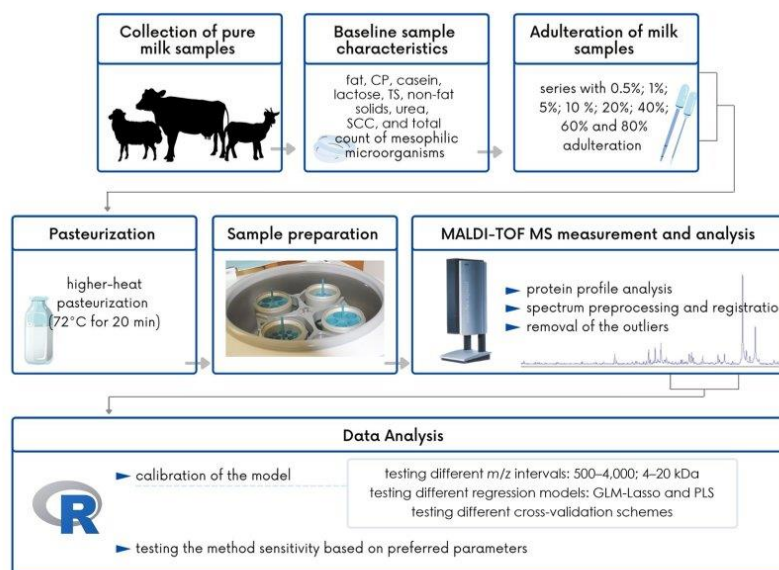


Figure 1. The digital workflow for evaluation of MALDI-TOF MS technology in small ruminant milk adulteration.

we later (and for the other sets) use only the notation “Set A,” omitting the animal specification in the index, and specify the numbers first for the goat-related set and then for the sheep-related set (i.e., set A contains adulteration concentration series of 18 samples for caprine milk and 19 samples for ovine milk with adulteration concentrations of 20, 40, 60, and 80%, or 216 and 225 spectra, respectively).

Set B contains adulteration concentration series of another 5 milk samples for caprine and ovine milk (neither of them included in set A) and adulteration concentrations of 20, 40, 60, and 80%, with 60 spectra each for caprine and ovine milk, after removing the outliers. Set AB, if referred, contains all the spectra from set A and B, with 276 and 285 spectra for caprine and ovine adulterated milk samples, respectively. Set C contains adulteration concentration series of the same 5 milk samples as in set B; however, the adulteration concentration series were prepared and adulterated again at the same concentrations and using the same bovine milks for adulteration (i.e., the technical replication of set B). The set contains 60 spectra each for caprine and ovine adulterated milk samples. Set A+ contains all the spectra of set A and, for each milk sample from set A, adulterated samples were also prepared in concentrations of 0, 0.5, 1, 5, 10, and 100%, and the spectra recorded. The set then contains 551 respective 561 spectra for caprine respective ovine adulterated milk samples. Similarly, set C+ contains all the spectra of set C, and, for each milk sample from set C, the adulterated samples were also prepared in concentrations of 0, 0.5, 1, 5, 10, and 100%, and the spectra recorded. The set contains 146 and 144 spectra for caprine and ovine adulterated milk samples, respectively.

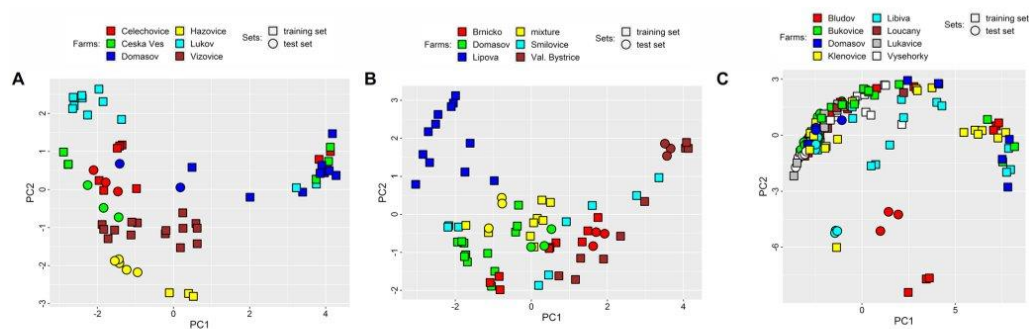
## RESULTS

### Baseline Characteristics of Pure Milk Samples

Descriptive statistics of baseline characteristics of pure caprine, ovine, and bovine milk, which was used to develop the method, are summarized in Supplemental Tables S1 and S2 (<https://doi.org/10.5281/zenodo.6351584>; Rysová et al., 2022). Differences between bovine and ovine milk attain significance for all milk parameters. The significance between bovine and caprine milk was also confirmed for most of the milk parameters, except for the TCM, the fat, and the casein content.

In terms of the variability of our samples, as shown in Supplemental Tables S1 and S2, the standard deviations of the parameters of milk of goats and sheep are generally higher than in cows. The variability was greatest for indicators of health and hygiene such as the TCM and the SCC. Across all 3 groups of animals, the coefficient of variation ranged from 200 to 388% for TCM and from 71.8 to 111% for SCC. Slightly higher coefficients of variation were observed for fat and urea. The highest variability in fat content was observed in bovine milk (CV: 22.4%), whereas the highest variability in urea content was observed for caprine milk (31.1%). Other monitored components and properties showed a lower coefficient of variation (<10.0%).

Figure 2 shows a PCA plots of registered peptide-protein spectra of pure caprine, ovine and bovine milk samples used from sets A+ and C+. The nonhomogeneous distribution is particularly noticeable across caprine and ovine dairy flocks, whereas the peptide-protein spectra from 8 bovine dairy herds show a tighter cluster.



**Figure 2.** Principal component (PC) analysis score plots of registered spectra of all pure milk samples used from sets A+ (depicted as squares: training set) and C+ (depicted as circles: test set), for (A) 68 spectra of pure caprine milk, (B) 72 spectra of pure ovine milk, and (C) 141 spectra of pure bovine milk (used and measured in both caprine milk adulterated sets and ovine milk adulterated sets).



### Quantification of Milk Adulteration – Calibration of the Model

Quantification of milk adulteration can be constructed as a regression from acquired and registered spectra of the sample. However, several parameters should be properly chosen. For each tested sample of caprine or ovine milk, a random bovine milk sample was selected for adulteration, and then the sample was adulterated with mentioned concentrations by the same bovine milk sample (adulteration concentration series of the given sample). For calibration of the quantification model, the set AB, an adulteration concentration series of 23 caprine milk samples and 24 ovine milk samples were measured using only medium concentrations for adulteration (20, 40, 60, and 80%). This set was divided into 2 independent sets: a training set A containing adulteration series of 18 caprine milk samples (216 spectra) and adulteration series of 19 ovine milk samples (225 spectra), and a test set B with the remaining 5 samples (60 spectra each for caprine and ovine samples) and measured independently. Samples left for the test set were selected randomly; however, with a focus to contain samples from caprine flocks (respective ovine flocks) of different breeding profiles.

To confirm the variability between measurement sessions, the same samples measured for the test set B were adulterated again, forming another test set C (60 and 60 spectra in total for caprine and ovine milk, respectively) for a model trained on both previous sets (i.e., on set AB). The results for quantification models used are listed in Supplemental Tables S3, S4, and S5 (<https://doi.org/10.5281/zenodo.6351584>; Rysová et al., 2022).

When comparing adulterated milk samples (for both caprine and ovine milk) we compared GLM-Lasso (Tibshirani, 1996) regression model and the PLS (Wold et al., 2001) regression model at first. For both models, optimal initial parameters had to be estimated and then used for the training. For the GLM-Lasso, this means the estimation of  $\lambda$  parameter and for PLS the number of latent variables used. As can be observed in Supplemental Tables S3 and S4, for the training sets used and the test sets, the GLM-Lasso generally shows lower RMSE than PLS-based regression, and thus the GLM-Lasso based calibration model was selected. Two selection methods for determination of parameters of the model were tested, either to use the parameters of the solution with the lowest RMSE determined by the cross-validation (“best” in Supplemental Tables S3 and S4), or the parameters by the simplest model lying within of one standard error (**oneSE**) interval from the solution with the best RMSE obtained (“oneSE” in Supplemental Tables S3 and S4). The oneSE was cho-

sen as the selection method for determining the model parameter because it shows slightly better values than the best selection method for another independent test set used (set C). Thus, this selection method can be confirmed as a real prevention of potential overfitting of the final model. For the cross-validation schemes used for estimation of model parameters, 2 schemes were compared: leave-one-series-out cross-validation (**LO-S-OCV**) and leave-one-random\_concentration\_from\_series-out cross-validation (**LO-RC-OCV**), see Supplemental File S2 (<https://doi.org/10.5281/zenodo.6351584>; Rysová et al., 2022) for details. The LO-RC-OCV scheme shows better results when using the GLM-Lasso model and the oneSE selection method, hence it was chosen to estimate the model parameters. The LO-S-OCV scheme can provide similar results; however, it is also tightly fixed to the number of adulteration concentration series included, whereas LO-RC-OCV is controlled by selected number of iterations, which can be restricted even in groups having an extraordinarily high number of samples.

The visible systematic decrease in intensity for the interval 4 to 20 kDa (see Figure 3) for pure caprine and ovine milk spectra raised the question whether the division by the best-matching exponential baseline (exponential normalization) could improve the subsequent spectrum registration and result in lower RMSE for quantification. Different baseline treatment (with or without exponential normalization) followed by spectrum registration was also tested for both acquisition intervals (500–4,000 Da vs. 4–20 kDa), see Supplemental Table S5. Sometimes a slight decrease in the resulting RMSE of prediction is visible for the exponential normalization followed by linear registration of spectra, but generally, the linear registration alone without any previous baseline treatment shows the lowest RMSE values in many cases and comparably low ones in the rest. The RMSE for 500–4,000 Da spectra were also lower than the RMSE for 4–20 kDa spectra on the test set and thus, spectra from 500 to 4,000 Da  $m/z$  interval are preferred. For detailed comparisons, see Supplemental File S2.

Figure 4 shows the real and predicted concentration of adulterated samples from the training set AB of the calibrated model. The prediction error does not show any significant increases or decreases in any of the 4 tested adulteration concentrations, thus guarantees the prediction error’s stability.

### Sensitivity of Method Based on MALDI-TOF MS for Detection of Small Ruminant Milk Adulteration

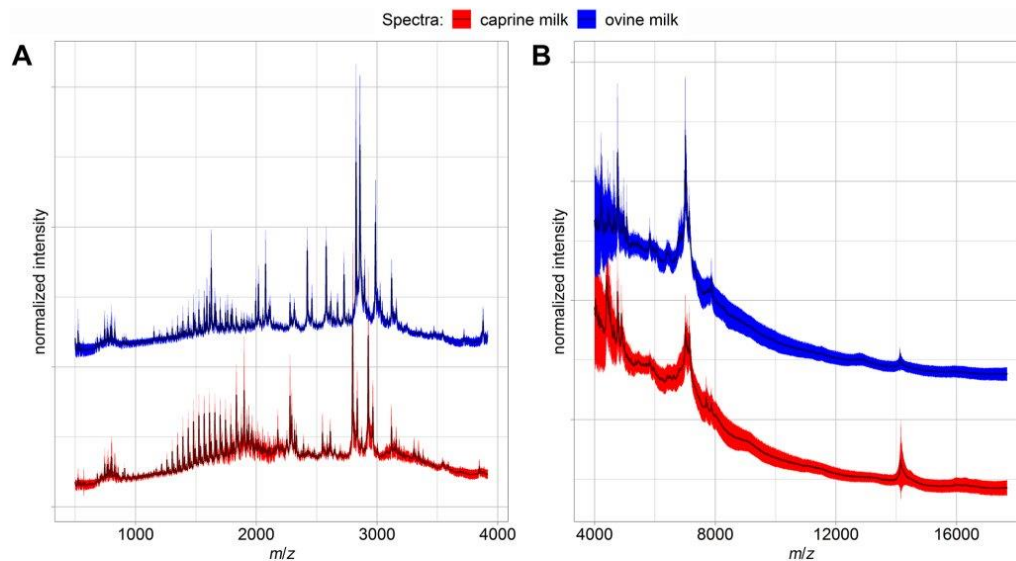
Based on our experiments with adulterated milk with concentrations of 20 to 80%, low adulteration concen-

trations were subsequently explored and pure caprine or ovine milk and pure bovine milk were also added. For the previously used set A, adulteration concentrations of 0.5%, 1%, 5%, 10%, and 100% were measured during 2 different days, and then similarly were measured the different adulteration concentrations for samples from the previously used set C. For different concentrations for set A, 335 new spectra were added for caprine milk samples ( $n = 18$ ) after removing outliers, and 336 new spectra were added for ovine milk samples ( $n = 19$ ). For different concentrations for set C, 86 respective 84 new spectra were added for caprine milk samples ( $n = 5$ ) respective ovine milk samples ( $n = 5$ ). The sets with extended scale of concentration are then referred to as set A+, respective C+. Table 1 shows results for an acquisition interval of 500 to 4,000 Da. The RMSE for acquisition intervals of 4 to 20 kDa is also included for comparison. Figure 5 then shows the real and predicted concentrations using the 500 to 4,000 Da acquisition interval.

The increase of the trained final model RMSE for the test set (11.4 and 17.0 for caprine ovine milk samples, respectively, 500–4,000 Da, LO-RC-OCV scheme) re-

sults from increased variability included (spectra from another at least 3 sessions or days with independent adulteration, pasteurization, and measurement steps included). We must also note that for medium concentrations only (20, 40, 60, 80%), the training set contains only spectra from original A set (one measurement session at all), and thus, variability over included medium-scale concentrations can be restricted. Nevertheless, if set B is also included among the training sets, the RMSE for the test set drops, but only a little (11.0 and 16.1 for caprine and ovine milk samples, respectively).

For the final quantification model trained on set A+, we can also evaluate error probability. For caprine milk, when all the spectra of set A + are evaluated with the full set of adulteration concentrations, the model predicts the concentration with 10.4% error or less with a probability of 90%. When all the spectra of the test set C+ with the full set of adulteration concentrations are evaluated, the model can predict the concentration with a 15.4% error or less with a probability of 90%. When the spectra of sets A+ and C+ are evaluated, the model can predict concentration with 11.2% error with a probability of 90%. If we select a threshold line of



**Figure 3.** Average registered spectra of pure caprine milk and pure ovine milk. Only pure sample spectra from set A and C (in total,  $n = 23$  for caprine milk samples;  $n = 24$  for ovine milk samples), for 68 spectra for pure caprine milk, and 72 spectra for pure ovine milk in total. The spectra were recorded for both  $m/z$  intervals of (A) 500 to 4,000 Da and (B) 4 to 20 kDa. The ovine milk spectra are shifted in intensities for better graphical presentation only. The mean and one sample standard deviation are displayed.

**Table 1.** Root mean squared error (RMSE) of predicted caprine and ovine adulterated milk samples using set A+ (551 and 561 spectra for caprine and ovine adulterated milk samples, respectively) as the training set and set C+ (146 and 144 spectra, respectively) as the test set<sup>1</sup>

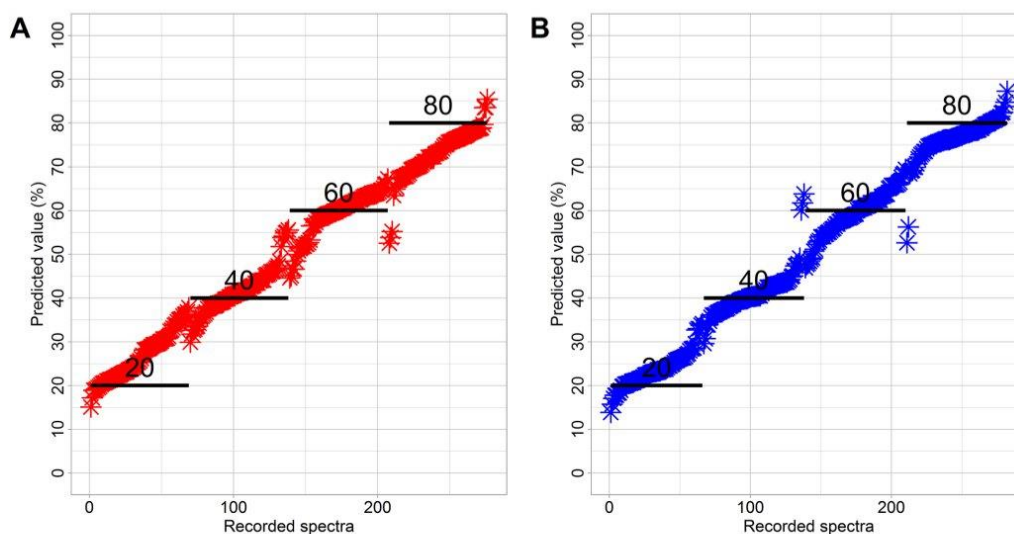
Item	Caprine milk		Ovine milk	
	500–4,000 Da	4–20 kDa	500–4,000 Da	4–20 kDa
Mean cross-validated RMSE on training set only (LO-RC-OCV) <sup>2</sup>	10.8 ± 2.78	11.1 ± 2.87	9.94 ± 3.06	13.7 ± 3.82
Mean cross-validated RMSE on training set only (LO-S-OCV) <sup>2</sup>	11.3 ± 2.80	11.2 ± 2.93	10.8 ± 3.39	14.0 ± 3.80
RMSE of trained final model (LO-RC-OCV) on training set	7.58	9.54	7.23	11.5
RMSE of trained final model (LO-S-OCV) on training set	8.01	9.84	9.07	12.7
RMSE of trained final model (LO-RC-OCV) on test set	11.4	12.6	17.0	18.6
RMSE of trained final model (LO-S-OCV) on test set	11.5	12.6	16.4	18.9

<sup>1</sup>Results for both cross-validation schemes: leave-one-series-out cross-validation (LO-RC-OCV) versus leave-one-random-concentration-from-series-out cross-validation (LO-S-OCV) and for both acquisition intervals (500–4,000 Da vs. 4–20 kDa) are included.

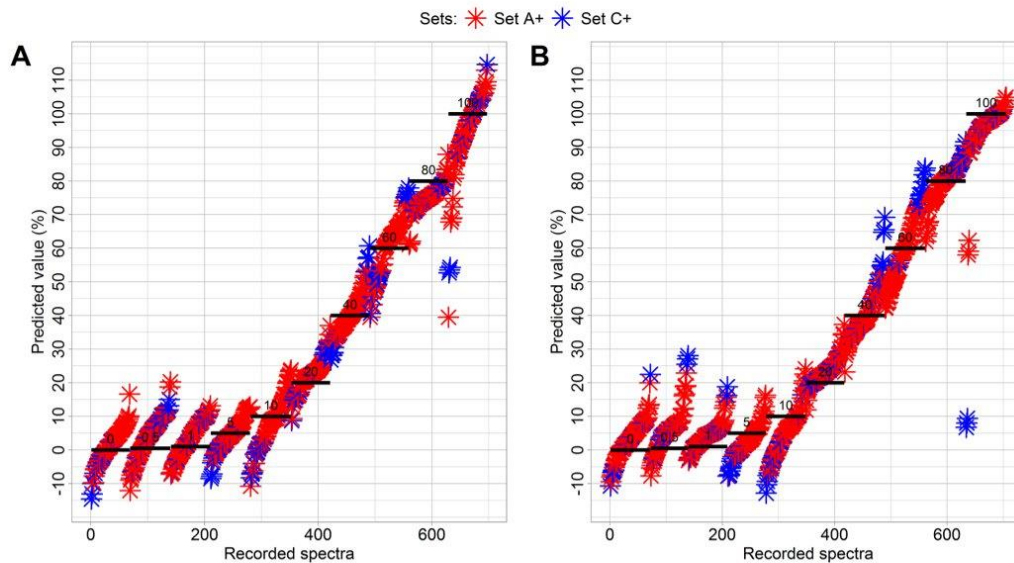
<sup>2</sup>Mean RMSE ± one SE.

adulteration for 10 or 20% for sets A+ and C+, then we can also use this regression model to classify correctly whether the sample is adulterated with less or equal the threshold or above the threshold. This way, for both sets used together, the accuracy of classification of the sample as having up to 10 or 20% of adulteration is 90.7 and 91.7%, respectively.

For the ovine milk, when only set A+ is accounted, the model predicts the adulteration concentration with 10.8% error or less with a probability of 90%. When only set C+ is used, the model predicts the adulteration concentration with 19.7% error or less with a probability of 90%. When both sets are used (A+ and C+), the model predicts adulteration concentration with a 12.0%



**Figure 4.** Real and predicted concentrations for the training set AB (500–4,000 Da acquisition interval) containing spectra of medium concentrations of adulteration concentration series (20–80%) with 276 spectra for caprine milk samples (A) and 285 spectra for ovine milk samples (B) in total. Real concentrations are depicted as a black line, with predicted concentrations in red for caprine milk and blue for ovine milk.



**Figure 5.** Real and predicted concentrations for the prediction model trained on the A+ set with (A) 551 spectra for caprine and (B) 561 spectra for ovine milk samples, and tested on the C+ set with 146 and 144 spectra, respectively. Real concentrations are depicted as a black line, with predicted concentrations in red for set A+ and blue for set C+.

error or less with a probability of 90%. The accuracy of classification of the sample as having up to 10 or 20% of adulteration is 93.3% and 90.6%, respectively.

If we restrict the concentration scale and train the model only on concentrations up to 10% of adulteration from A+ set, the RMSE drops to 3.85 and 3.86% for caprine and ovine milk C+ test set, respectively (also restricted to concentrations up to 10%). Prescreening for estimation of potential adulteration concentration followed by measurement in the selected restricted concentration range can increase the precision of final estimation and eliminate many other sources of variability or nonlinearity originating from the small differences between adulteration techniques degradation of thermolabile proteins during heat-treatment or MALDI-TOF measurement.

We can restrict the conditions more and use samples with low adulteration concentrations (0, 0.5, 1, 5, 10%) originated from only one individual caprine milk or ovine milk sample. With a cross-validation scheme iterating over each concentration, we can get a RMSE as low as 2.33% for quantifying adulterated caprine milk samples and 4.00% for adulterated ovine milk samples. If we are still restricted to only one individual being

adulterated with selected bovine milk and return to the usage of concentrations set (0, 0.5, 1, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100%), then with cross-validation scheme iterating over each concentration we can get as low RMSE as 6.34% for quantification of adulterated caprine milk sample and 6.28% for adulterated ovine milk.

## DISCUSSION

In recent years, several methods based on MALDI-TOF have been developed that assess the authenticity of milk and dairy products. The increasing use of MALDI-TOF MS to detect adulteration is because it offers some advantages over other analytical techniques as fast generate spectra, profiles, or fingerprints with fast and easy sample preparation or no sample preparation, absence of analyte purification, chemical modification, or derivatization (Cozzolino and De Giulio, 2011; Zambonin, 2021). One of the most common frauds is still mixing cheaper and available milk, such as bovine milk, with more expensive and seasonally produced milk, such as small ruminants' milk. Therefore, in this paper, we tested the peptide-protein mass spectra of bovine, caprine, and ovine milk and their mixtures from

several Czech farms with high proteome heterogeneity to verify the MALDI-TOF MS technique in the detection of adulteration. It appears that low molecular weight proteins located in the range of 500 to 4,000 Da in combination with the GLM-Lasso regression model provide a lower RMSE. Although MALDI-TOF MS has been shown several times to be able to quantify bovine milk in caprine and ovine milk, this study may be the first to report an issue associated with a higher prediction error.

#### **Variability of Milk Parameters of the Used Matrices**

In developing an analytical method for the detection of adulteration, it is very important to consider the variability of milk components of validation milk samples used, which is the result of genetic, physiological, nutritional, and environmental factors (Gantner et al., 2015). For this reason, in this work, a relevant effort was made to obtain the necessary variability of components and properties of milk by taking milk samples from 18 different farms in the Czech Republic. The baseline characteristic of pure bovine, ovine, and caprine milk used to develop the method are consistent with our previous (Hanus et al., 2007, 2008, 2009, 2010) and past studies (Raynal-Ljutovac et al., 2008; Balthazar et al., 2017; Wendorff and Haenlein, 2017). Thus, the milk matrices collected were declared to be suitable material for the development of a new analytical method.

However, differences in milk composition can also be observed within the group, between individual cows, goats, and sheep. In our milk samples, the standard deviations of the parameters of milk of small ruminants are generally higher than in cows. This fact is due to a large number of breeds and hybrids in flocks of goats and sheep compared with the herd of cows and the seasonal pattern in reproductive activity when the season and stage of lactation are more affected by the variability of caprine and ovine milk. A less balanced feed ration in these farms also contributes to greater milk variability in small ruminants. The similar intra-group variability also evidenced by research aimed at monitoring the variation in milk components not only in the herds and flocks but also between udder quarters (Forsbäck et al., 2010; Crossley et al., 2018; Vacca et al., 2018).

#### **MALDI-TOF MS as a Tool for Detection of Small Ruminant Milk Adulteration**

The application of the MALDI-TOF MS was assessed by Calvano et al. (2012), who confirmed the potential of bovine-specific peptide markers to detect up to 5%

level of adulteration. However, rather than developing and validating a new methodology to detect frauds, the authors focused on testing sample preparation based on tryptic digests and the determination of the resulting markers. A very similar objective was followed by Calvano et al. (2013). They used MALDI-TOF mass profiles of milk phospholipids to obtain 2 diagnostic peaks (703.6 and 706.6  $m/z$ ) for the identification of adulterant bovine milk in caprine and ovine milk. The ratio of these peaks was allowed to reveal only 20% and more of bovine milk in small ruminants' milk.

Liland et al. (2009a) chose a similar approach to estimate the relative proportions of milk species. Whole mass spectra and multivariate regression were used for quantitative analysis. By 3 separate PLS regression models, the authors achieved RMSE of 5.40% for ovine milk and 6.50% for caprine milk, confirming the possibility of using MALDI-TOF MS for quantitative analysis. In our results, the higher RMSE values of our regression models, namely GLM-Lasso and PLS, are most likely due to the genetic variability and thermal instability of milk proteome reflected in our samples, taken from 18 dairy farms. The nonhomogeneous distribution of peptide-protein spectra is noticeable in all 3 groups. This complexity of the milk proteome is mainly caused by present frequency of genetic polymorphism, as well as posttranslational modifications that occur either naturally or nonbiologically during milk processing and storage (e.g., heat-treatment; Le et al., 2017). An additional level of complexity of the milk proteome may arise from the influence of the diet, health of the animal, management practices, and stage of lactation (Abd El-Salam, 2014; Tacoma et al., 2016). On the contrary, Liland et al. (2009b) collected all milk samples from only one farm without indicating internal and external factors that affect the composition of the milk proteome.

Nicolaou et al. (2011) also demonstrated the use of milk protein profiles to detect adulteration through a combination of whole MALDI-TOF mass spectra with multivariate techniques such as PLS and kernel PLS. Nonlinear kernel PLS slightly outperformed PLS with RMSE values of 6.35 and 8.13% for determining the percentage volume of bovine milk in caprine milk and ovine milk, respectively. Lower error values in this study may again indicate lower variability in the samples set. Thus, variation in the molecular mass of individual proteins may not be as common as in our sample set of bovine, caprine, and ovine milk, as evidenced by our tested individual adulteration concentration series with RMSE values as low as 6.34% for caprine milk and 6.28% for ovine milk. The adulteration of unpasteurized milk and the subsequent pasteurization step in

our methodology could add another source of variance. The thermally unstable subset of milk proteins can be degraded during the pasteurization and decrease the potential precision of the quantification model (Meltreter et al., 2008). If we restrict to only a set of distinct concentrations (20, 40, 60, 80%) with wide separation intervals, the RMSE for a full set of samples can also drop from 11.4 to 4.63% and from 17.0 to 9.15% in caprine and ovine milk samples, respectively. Hence, the inclusion of possible influences acting on the composition of the milk proteome in the development of the regression model is necessary to achieve adequate reliability and robustness of methodology, which is also supported by other published studies (Czerwenka et al., 2010; Trimboli et al., 2019; Li et al., 2021).

Promising results were achieved by Piras et al. (2021) that suggested a rapid and highly accurate analysis based on molecular fingerprints originating from liquid atmospheric pressure MALDI-Q-TOF MS. Their method detected 5% of bovine milk in caprine milk with 92.5% sensitivity and 94.5% specificity. On the other hand, the application of this method is so far limited to experimental use only, liquid atmospheric pressure MALDI-Q-TOF MS is very little used in public control authorities, mainly due to the acquisition costs. For example, the veterinary inspection authorities of the Czech Republic have introduced conventional MALDI-TOF MS for the routine identification of microorganisms, and they potentially use this instrumentation for other analyses.

## CONCLUSIONS

This work extended the knowledge regarding the use of the MALDI-TOF MS technique coupled with multivariate analysis to detect bovine milk in caprine and ovine milk. From the 2 calibration models used, GLM-Lasso in combination with ranges of peptide-protein spectra from 500 to 4,000 Da proved to be more effective. Despite the high similarity of the 3 milk matrices, we could quantify the amount of bovine milk in the milk of small ruminants. However, we could not achieve a low prediction error as in other studies, which we attribute to the high heterogeneity of the milk proteome. Our results show that caution is needed when introducing this method into routine analyses in laboratories of inspection authorities, as considerable variability of milk proteins profile between farms may affect the reliability and robustness of the method. The stability of the protein profile also from farms in other countries should be considered before adopting conventional MALDI-TOF MS as the standard test for detecting adulteration in milk from small ruminants.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (grant NAZV QK1920222 in the program ZEMĚ) for the financial support and METROFOOD-CZ research infrastructure (Prague, Czech Republic; MEYS Grant No: LM2018100) for access to its facilities. P. C. acknowledges support by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (Prague, Czech Republic; grant LTAIN19007 Development of Advanced Computational Algorithms for Evaluating Post-surgery Rehabilitation) for data analysis. The authors have not stated any conflicts of interest.

## REFERENCES

- Abd El-Salam, M. H. 2014. Application of proteomics to the areas of milk production, processing and quality control - A review. *Int. J. Dairy Technol.* 67:153–166. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12116>.
- Aiello, D., C. Siciliano, F. Mazzotti, L. Di Donna, C. M. Athanassopoulos, and A. Napoli. 2020. A rapid MALDI MS/MS based method for assessing saffron (*Crocus sativus* L.) adulteration. *Food Chem.* 307:125527. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125527>.
- Azad, T., and S. Ahmed. 2016. Common milk adulteration and their detection techniques. *Int. J. Food Contam.* 3:22. <https://doi.org/10.1186/s40550-016-0045-3>.
- Balthazar, C. F., T. C. Pimentel, L. L. Ferrão, C. N. Almada, A. Santillo, M. Albenzio, N. Mollakhalili, A. M. Mortazavian, J. S. Nascimento, M. C. Silva, M. Q. Freitas, A. S. Sant'Ana, D. Granato, and A. G. Cruz. 2017. Sheep milk: Physicochemical characteristics and relevance for functional food development. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 16:247–262. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12250>.
- Bucek, P. M. Milerski, M. Mares, R. Konrad, R. Roubalova, M. Skaryd, V. Rucki, P. Hakl. 2019. Development of the numbers of goats. Pages 60–80 in *Yearbook of Sheep and Caprine Breeding in the Czech Republic in 2018*. 1st ed. ČMSCH a.s.
- Calvano, C. D., C. De Ceglie, A. Aresta, L. A. Facchini, and C. G. Zambonin. 2013. MALDI-TOF mass spectrometric determination of intact phospholipids as markers of illegal bovine milk adulteration of high-quality milk. *Anal. Bioanal. Chem.* 405:1641–1649. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6597-z>.
- Calvano, C. D., C. De Ceglie, A. Monopoli, and C. G. Zambonin. 2012. Detection of sheep and goat milk adulterations by direct MALDI-TOF MS analysis of milk tryptic digests. *J. Mass Spectrom.* 47:1141–1149. <https://doi.org/10.1002/jms.2995>.
- Cejnar, P., S. Kuckova, A. Prochazka, L. Karamonova, and B. Svobodova. 2018. Principal component analysis of normalized full spectrum mass spectrometry data in multiMS-toolbox: An effective tool to identify important factors for classification of different metabolic patterns and bacterial strains. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 32:871–881. <https://doi.org/10.1002/rcm.8110>.
- Cozzolino, R., and B. De Giulio. 2011. Application of ESI and MALDI-TOF MS for triacylglycerols analysis in edible oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 113:160–167. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201000429>.
- Crossley, R. E., A. Harlander-Matauschek, and T. J. DeVries. 2018. Mitigation of variability between competitively fed dairy cows through increased feed delivery frequency. *J. Dairy Sci.* 101:518–529. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12930>.
- Czerwenka, C., L. Müller, and W. Lindner. 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 Chem.* 122:901–908. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.034>.

- Di Francesco, L., F. Di Girolamo, M. Mennini, A. Masotti, G. Salvatore, G. Rigon, F. Signore, E. Pietrantoni, M. Scapatucci, I. Lante, B. M. Goffredo, O. Mazzina, A. I. Elbousify, P. Roncada, A. Dotta, A. Fiochi, and L. Putignani. 2018. A MALDI-TOF MS approach for mammalian, human, and formula milks' profiling. *Nutrients* 10:1238. <https://doi.org/10.3390/nu10091238>.
- El-Agamy, E. I. 2007. The challenge of cow milk protein allergy. *Small Rumin. Res.* 68:64–72. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.09.016>.
- Ferreira, I. M. P. L. V., and H. Caçote. 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. *J. Chromatogr. A* 1015:111–118. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)01261-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)01261-5).
- Forsbäck, L., H. Lindmark-Månsson, A. Andrén, M. Åkerstedt, L. Andrée, and K. Svennersten-Sjaunja. 2010. Day-to-day variation in milk yield and milk composition at the udder-quarter level. *J. Dairy Sci.* 93:3569–3577. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-3015>.
- Gantner, V., P. Mijić, M. Baban, Z. Škrčić, and A. Turalija. 2015. Ukupni sastav i sastav masti u mlijeku različitih vrsta. *Mljekarstvo* 65:223–231. <https://doi.org/10.15567/mljekarstvo.2015.0401>.
- Garcia, S. N., B. I. Osburn, and J. S. Cullor. 2019. A one health perspective on dairy production and dairy food safety. *One Health* 7:100086. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2019.100086>.
- Hansen, L., and M. F. Ferrão. 2018. Identification of possible milk adulteration using physicochemical data and multivariate analysis. *Food Anal. Methods* 11:1994–2003. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1181-6>.
- Hanus, O., J. Frelich, L. Janu, A. Macek, I. Zajickova, V. Gencurova, and R. Jedelska. 2007. Impact of different milk yields of cows on milk quality in Bohemian spotted cattle. *Acta Vet. Brno* 76:563–571. <https://doi.org/10.2754/avb200776040563>.
- Hanus, O., V. Gencurova, M. Vyletelova, H. Landova, J. Kopecky, and R. Jedelska. 2008. The effect of goat udder health on composition and properties of raw milk. *Folia Vet.* 52:149–154.
- Hanus, O., M. Hronek, R. Hyspler, T. Yong, A. Ticha, P. Fikrova, K. Hanusova, K. Sojkova, J. Kopecky, and R. Jedelska. 2010. Relationship between somatic cell count and lactose content in milk of various species of mammals. *Acta Univ. Agric. Silv. Mendel. Brun.* 58:87–100. <https://doi.org/10.11118/actaun201058020087> (In Czech).
- Hanus, O. V., M. Gencurova, J. Vyletelova, J. Kucera, and Trinacty. 2009. The effects of milk indicators of sheep mammary gland health state on some milk composition and properties. *Folia Vet.* 53:208–216.
- Hernández-Ledesma, B., M. Ramos, and J. Á. Gómez-Ruiz. 2011. Bioactive components of ovine and caprine cheese whey. *Small Rumin. Res.* 101:196–204. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.09.040>.
- Hrdlickova Kuckova, S., G. Rambouskova, R. Hynek, P. Cejnar, D. Oltrogge, and R. Fuchs. 2015. Evaluation of mass spectrometric data using principal component analysis for determination of the effects of organic lakes on protein binder identification. *J. Mass Spectrom.* 50:1270–1278. <https://doi.org/10.1002/jms.3699>.
- ISO. 2007. ISO 7218:2007. Microbiology of food and animal feeding stuff – General requirements and guidance for microbiological examinations. International Organization for Standardization.
- ISO. 2013. ISO 4833-1:2013. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Part 1: Colony count at 30 degrees by the pour plate technique. International Organization for Standardization.
- Kvapilík, J., P. Bucek, and J. Kucera. 2019. Results of performance testing of dairy cows. Pages 28–42 in *Yearbook of Cattle Breeding in the Czech Republic in 2018*. 1st ed. ČMSCH a.s.
- Le, T. T., H. C. Deeth, and L. B. Larsen. 2017. Proteomics of major bovine milk proteins: Novel insights. *Int. Dairy J.* 67:2–15. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.11.016>.
- Li, L., J. Wang, M. Li, Y. Yang, Z. Wang, J. Miao, Z. Zhao, and J. Yang. 2021. Detection of the adulteration of camel milk powder with cow milk by ultra-high performance liquid chromatography (UPLC). *Int. Dairy J.* 121:105117. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105117>.
- Liland, K. H., B. H. Mevik, E. O. Rukke, T. Almøy, and T. Isaksson. 2009a. Quantitative whole spectrum analysis with MALDI-TOF MS, Part II: Determining the concentration of milk in mixtures. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 99:39–48. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2009.07.008>.
- Liland, K. H., B. H. Mevik, E. O. Rukke, T. Almøy, M. Skaugen, and T. Isaksson. 2009b. Quantitative whole spectrum analysis with MALDI-TOF MS, Part I: Measurement optimisation. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 96:210–218. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2009.02.003>.
- Mafra, I., I. M. P. L. V. O. Ferreira, and M. B. P. P. Oliveira. 2008. Food authentication by PCR-based methods. *Eur. Food Res. Technol.* 227:649–665. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0782-x>.
- Meltretter, J., A. Schmidt, A. Humeny, C. M. Becker, and M. Pischetsrieder. 2008. Analysis of the peptide profile of milk and its changes during thermal treatment and storage. *J. Agric. Food Chem.* 56:2899–2906. <https://doi.org/10.1021/jf073479o>.
- Michalusová, I., P. Sazlova, P. Cejnar, S. Kuckova, R. Hynek, and V. Kasicka. 2020. Capillary electrophoretic profiling of in-bone tryptic digests of proteins as a potential tool for the detection of inflammatory states in oral surgery. *J. Sep. Sci.* 43:3949–3959. <https://doi.org/10.1002/jssc.202000718>.
- Neumann, C., D. M. Harris, and L. M. Rogers. 2002. Contribution of animal source foods in improving diet quality and function in children in the developing world. *Nutr. Res.* 22:193–220. [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(01\)00374-8](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(01)00374-8).
- Nicolaou, N., Y. Xu, and R. Goodacre. 2011. MALDI-MS and multivariate analysis for the detection and quantification of different milk species. *Anal. Bioanal. Chem.* 399:3491–3502. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4728-6>.
- Ortea, I., G. O'Connor, and A. Maquet. 2016. Review on proteomics for food authentication. *J. Proteomics* 147:212–225. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.06.033>.
- Piras, C., O. J. Hale, C. K. Reynolds, A. K. Jones, N. Taylor, M. Morris, and R. Cramer. 2021. Speciation and milk adulteration analysis by rapid ambient liquid MALDI mass spectrometry profiling using machine learning. *Sci. Rep.* 11:3305. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82846-5>.
- Poonia, A., A. Jha, R. Sharma, H. B. Singh, A. K. Rai, and N. Sharma. 2017. Detection of adulteration in milk: A review. *Int. J. Dairy Technol.* 70:23–42. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12274>.
- Pulina, G., M. J. Milán, M. P. Lavín, A. Theodoridis, E. Morin, J. Capote, D. L. Thomas, A. H. D. Francesconi, and G. Caja. 2018. Invited review: Current production trends, farm structures, and economics of the dairy sheep and goat sectors. *J. Dairy Sci.* 101:6715–6729. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14015>.
- Raynal-Ljutovac, K., G. Lagriffoul, P. Paccard, I. Guillet, and Y. Chilliard. 2008. Composition of goat and sheep milk products: An update. *Small Rumin. Res.* 79:57–72. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2008.07.009>.
- Roncada, P., C. Piras, A. Soggiu, R. Turk, A. Urbani, and L. Bonizzi. 2012. Farm animal milk proteomics. *J. Proteomics* 75:4259–4274. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.05.028>.
- Rysová, L., C. Pavel, O. Hanus, V. Legarová, I. Němečková, R. Jedelská, and M. Božik. 2021. MALDI-TOF spectra of bovine, caprine and ovine milk and their mixtures [Data set]. Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.5742718>.
- Rysová, L., C. Pavel, O. Hanus, V. Legarová, I. Němečková, R. Jedelská, and M. Božik. 2022. Supplementary files - Evaluation of MALDI-TOF MS technology in small ruminant milk adulteration using raw bovine milk. *J. Dairy Sci.* <https://doi.org/10.5281/zenodo.6351584>.
- Scano, P., A. Murgia, F. M. Pirisi, and P. Caboni. 2014. A gas chromatography-mass spectrometry-based metabolomic approach for the characterization of goat milk compared with cow milk. *J. Dairy Sci.* 97:6057–6066. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8247>.
- Tacoma, R., J. Fields, D. B. Ebenstein, Y. W. Lam, and S. L. Greenwood. 2016. Characterization of the bovine milk proteome in early-

- lactation Holstein and Jersey breeds of dairy cows. *J. Proteomics* 130:200–210. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.09.024>.
- Tibshirani, R. 1996. Regression shrinkage and selection via the lasso. *J. R. Stat. Soc. B* 58:267–288. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1996.tb02080.x>.
- Trimboli, P., N. Costanzo, V. Lopreiato, C. Ceniti, V. M. Morittu, A. Spina, and D. Britti. 2019. Detection of buffalo milk adulteration with cow milk by capillary electrophoresis analysis. *J. Dairy Sci.* 102:5962–5970. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16194>.
- Vacca, G. M., G. Stocco, M. L. Dettori, E. Pira, G. Bittante, and M. Pazzola. 2018. Milk yield, quality, and coagulation properties of 6 breeds of goats: Environmental and individual variability. *J. Dairy Sci.* 101:7236–7247. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14111>.
- Wendorff, W. L., and G. F. W. Haenlein. 2017. Sheep milk: Composition and nutrition. Pages 210–221 in *Handbook of Milk Non-Bovine Mammals*. 2nd ed. Y. W. Park, G. F. W. Haenlein, and W. L. Wendorff. John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9781119110316.ch3.2>.
- Wold, S., M. Sjöström, and L. Eriksson. 2001. PLS-regression: A basic tool of chemometrics. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 58:109–130. [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(01\)00155-1](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(01)00155-1).
- Zambonin, C. 2021. MALDI-TOF mass spectrometry applications for food fraud detection. *Appl. Sci. (Basel)* 11:3374. <https://doi.org/10.3390/app11083374>.

#### ORCID

- L. Rysova  <https://orcid.org/0000-0002-0253-7667>
- P. Cejnar  <https://orcid.org/0000-0002-2369-651X>
- O. Hanus  <https://orcid.org/0000-0002-3616-7668>
- V. Legarova  <https://orcid.org/0000-0002-7915-2159>
- J. Havlik  <https://orcid.org/0000-0003-1900-0951>
- H. Neješlebova  <https://orcid.org/0000-0003-3600-6036>
- I. Nemeckova  <https://orcid.org/0000-0002-7499-8964>
- R. Jedelska  <https://orcid.org/0000-0002-2298-9521>
- M. Božik  <https://orcid.org/0000-0002-9020-8213>



### **3.4 Silages from legume-cereal mixtures as a factor of dairy cow milk quality**

*Acta fytotechnica et zootechnica, volume 25, Issue 1, 2022*

<https://doi.org/10.15414/afz.2022.25.01.7-15>

Hanus O., Hunady I., Kucera J., Roubal P., Pozdisek J., Bjelka M., Klimesova M., Nemeckova I., Nejeschlebova H., Rysova L.

## Silages from legume-cereal mixtures as a factor of dairy cow milk quality

Oto Hanuš<sup>1\*</sup>, Igor Huňady<sup>2</sup>, Josef Kučera<sup>3</sup>, Petr Roubal<sup>1</sup>, Jan Pozdíšek<sup>4</sup>, Marek Bjelka<sup>5</sup>, Marcela Klimešová<sup>1</sup>, Irena Němečková<sup>1</sup>, Hana Nejeschlebová<sup>1</sup>, Lucie Rysová<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Dairy Research Institute Ltd., Prague, Czech Republic

<sup>2</sup>Agriculture Research, Ltd., Troubsko, Czech Republic

<sup>3</sup>Czech Moravia Breeders Corporation, Hradištko, Czech Republic

<sup>4</sup>AgriResearch Rapotín Ltd., Rapotín, Víkřovice, Czech Republic

<sup>5</sup>Breeders Cooperative Impuls, Bohdalec, Czech Republic

<sup>6</sup>Czech University of Life Sciences Prague, Department of Food Science, Czech Republic

Article Details: Received: 2021-08-05 | Accepted: 2021-12-16 | Available online: 2022-03-31

<https://doi.org/10.15414/afz.2022.25.01.7-15>



Licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License



Currently, the prices of dairy cows feed with protein concentrates are rising and the climate change is also manifesting itself with a growing drought in animal production. These are the reasons why there is an increasing interest in growing silage from legume-cereal mixtures (L-C-M) and in increasing their share in feed rations for dairy cows. Furthermore, the L-C-Ms improve the soil fertility during the crop rotation. The effect of these feeds on milk quality was evaluated by adding L-C-M silages into feeding rations. Czech Fleckvieh and Holstein breed dairy cows (8 herds; feeding periods without and with L-C-M silages) were included in the evaluation for 3 years. There were used 126 L-C-M (experimental) and 463 control (without L-C-M) bulk tank milk samples in this dairy analysis. Lactose content, solids non fat content and total count of mesophilic bacteria in milk of L-C-M group was increased as compared to control (zero hypothesis probability varied from  $P \leq 0.05$  to  $P \leq 0.001$ ). On the contrary, as new knowledge, milk freezing point depression and somatic cell counts were decreased in L-C-M group as compared to control ( $P \leq 0.001$  and  $P \leq 0.05$ ). Other milk indicators such as contents of fat, crude protein, milk urea and thermostability ( $P > 0.05$ ) were not affected by evaluated factor. The residues of inhibitory substances in bulk tank milk in the L-C-M group were not indicated, but one case was in the control group. Feeding of dairy cows with an increased proportion of L-C-M silage in the roughage component a part of the feeding ration is a safe way to replace part of the protein concentrates in animal feeding, regarding milk quality.

**Keywords:** breed, protein, milk freezing point depression, milk thermostability, hygienic milk indicators

### 1 Introduction

Feeding of silages from legume-cereal mixtures (L-C-M) expands considerably in the diet of cattle and especially dairy cows in the Czech Republic (CR). Currently, the prices of dairy cows feed with protein concentrates are rising and the climate change is also manifesting itself with a growing drought in animal production. These are the reasons why there is an increasing interest in growing silage from legume-cereal mixtures (L-C-M) and in increasing their share in feed rations for dairy cows. Furthermore, the L-C-Ms improve soil fertility during the crop rotation.

The world's population should behave ecologically and take the climate change into account. Also it is necessary to take the resources rarefaction like phosphorus and water, and losses of fertile lands into account (Bedoussac et al., 2015). There are more options in agriculture. The use of biologically fixed nitrogen ( $N_2$ ) by agricultural plants should be increased (Jensen and Hauggaard-Nielsen, 2003; Hauggaard-Nielsen et al., 2003, 2008, 2009). As known, the cultivation of legumes helps enrich the soil with nitrogen; hence, cultivated with cereals in rotation or in association, they contribute to higher fertility in soils (Magrini et al., 2019). Enhancing the crop diversity is a crucial factor for sustainable agro-ecology. Legumes, as a main source of biological nitrogen, are also able to

\*Corresponding Author: Oto Hanuš, Dairy Research Institute Ltd., Ke Dvoru 12a, 160 00 Prague, Czech Republic. e-mail: [hanus.oto@seznam.cz](mailto:hanus.oto@seznam.cz) ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3616-7668>

reduce synthetic nitrogen fertilizers use and associated fossil energy consumption (Lüscher et al., 2014; Bedoussac et al., 2015). This can support organic farming and the sustainability of this humane activity. This way, possible advantages of eco-functional intensification in organic farming can be reached. This could be obtained by intercropping cereal and grain legume species sown and harvested together (Bedoussac et al., 2014, 2015).

Yigezu et al. (2018) mentioned the favorable economic effects of alternating cultivation of legumes and cereals in arid areas (Morocco). Prins and de Wit (2006) supported the intercropping of cereals and grain legumes as this showed the positive potential of organic farming in many ways. Also Huňady and Hochman (2014) support this concept with their opinion: intercropping of grain legumes and cereals is effective in organic farming. Good basis for increase and stabilisation of yields and sustaining plant health exists. On agriculture farms pea-cereal mixtures are an effective crop, harvested for green fodder as well as for feed concentrates, in dairy cows feeding. Other authors (Salcedo, 2007; Stoddard et al., 2009; Ksiezak and Straniak, 2009) also confirmed the importance of legume cultivation and L-C-M silage production in the world agriculture and animal production for biological fixation of atmospheric nitrogen in the soil, increasing the soil fertility, interrupting cycles of cereal diseases, the possibility of improving the protein value of feed and increasing nitrogen matter intake in dairy cows and possible food improving.

In ruminant production, forage legumes as a plant group present some specific advantages and disadvantages (Phelan et al., 2015). In case legumes are compared to grasses or cereals, the main advantages are in general low reliance on fertilizer nitrogen inputs, high voluntary intake and animal production when feed supply is non-limiting and high protein content. On the other hand, the main disadvantages of forage legumes are in general lower persistence as compared to grass under grazing, high risk of livestock bloat and difficulty to conserve as silage or hay. The last dry years could have been a reason for turning to this type of feeding in dairy cows. Possible technological troubles in L-C-M green matter harvesting as consequence of rainy weather and subsequent soil pollution in silages can deteriorate preservability (silageability) and contaminate silage with unwanted microorganisms (Andersen and Jensen, 1987, cit. Kratochvíl, 1991) and their spores (bacilli). These can penetrate subsequently into milk and worsen its quality (Murphy et al., 2016). For these reasons, the technological question of the possibility of increased feeding influence by L-C-M silages in dairy cow herds on the raw milk quality is increasing (Lobacz et al., 2016) in practice now.

Milk thermostability (lactoprotein thermostability; TES) is a technological property. The TES shows the resistance of milk proteins to their possible heat coagulation respectively to their thermal denaturation and TES may be significantly endangered by a lactoprotein quality decrease. Therefore, TES can be affected by dairy cow nutrition which is a crucial factor. Cows metabolic disorders, such as subclinical rumen acidosis, could also reduce the technological quality of milk by reducing the content and quality of protein (so called low protein syndrome; Illek, 1995). Chramostová et al. (2014) stated the thermostability as an important indicator in assessment of the raw milk quality. This is valid particularly in terms of the heat load to which milk is exposed during its processing. In general, at raw milk processing the good thermostability in the production of durable products is required (Singh, 2004). It means at processing products with long shelf life such as condensed and sterilized UHT milk (Patrovský and Gajdůšek, 1988). Milk TES is also an economic indicator. The TES in dairy is always related to technologies which lead to products with higher added value. This TES test in technology is simple, nevertheless labor-intensive and lengthy. That is the reason why the data files for milk TES investigations are of small scale in terms of sample number. This is usually in tens of samples as maximum (Chramostová et al., 2014). This fact underlines the uniqueness of the database used in this work ( $n = 535$ ).

From these reasons the paper goal was to evaluate the effects of L-C-M silage feeding in dairy cows (Czech Fleckvieh and Holstein as main milked cattle breeds in the CR) on their raw milk quality and TES, which was carried out on a larger data set by modifying the roughage and concentrate portions in feeding rations.

## 2 Material and methods

### 2.1 Animals and milk samples

In this survey, 8 dairy cow herds with Czech Fleckvieh and Holstein dairy cow breed (4 and 4) were included in the 3-year observation. Dairy cows were milked regularly twice a day. These dairy cows were kept in stables with free (5) and binding (3) housing. The animals were fed by roughage feeding rations with L-C-M ( $\geq 20\%$  in the dry matter of the ration) or without L-C-M (NO-L-C-M) silages according to real randomly and irregularly spaced periods in the relevant herds. There was applied grazing in some herds in the summer feed season. The cow herds were kept at altitude of  $341 \pm 47$  m. According to the sampling periods, the average annual rainfall sums were  $589 \pm 122$  (L-C-M) and  $598 \pm 124$  mm (NO-L-C-M) and were comparable to the groups. This way according to the technical design of sampling on average  $292 \pm 170$

(L-C-M) and 250 ±161 (NO-L-C-M) animals were included in the groups during the whole experiment. The milking was performed in the milking parlor (5) and into the pipeline (3). The milk yield in kg per day in dairy cows was on average 29.02 ±6.22 (L-C-M) and 25.79 ±7.28 (NO-L-C-M) and thus was comparable although it was slightly higher in L-C-M. During the 3-year experimental period there were collected 589 bulk tank milk samples in total two-weekly to monthly intervals: 126 in L-C-M; 463 in NO-L-C-M feeding regime.

## 2.2 Model feeding rations of dairy cows in a pilot study case

A feeding model of experimental and control cows was developed to assess the effect of L-C-M on the quality of raw cow's milk in the field observation. L-C-M silages based on the majority of peas and barley or peas and triticale were included in the feed ration characteristics. A detail description of the dairy cow feeding model has been introduced in our previous work (Hanuš et al., 2018; Table 2).

## 2.3 Treatment and analyses of bulk tank milk samples

The bulk tank milk samples were treated by the preservative with bronopol (0.03%) excluding these which were determined for microbiological analyses and stored in a refrigerator after sampling. Sample transport was carried out under cold conditions (<8 °C) in thermobox to an accredited dairy laboratory (Accredited

Milk Laboratory Buštěhrad, Czech-Moravia Breeders Corporation a.s.). The milk analyses were performed under conditions which are prescribed by standard CSN EN ISO/IEC 17025. The milk indicators were determined as it follows in Table 1. Further also the energy (ketosis, in terms of animal health) milk coefficients fat/crude protein and fat/lactose, which are monitored also for individual cows, were determined by calculation, according to Siebert and Pallauf (2010), van Kneysel et al. (2010), Manzenreiter et al. (2013) and Hanuš et al. (2013).

A detailed description of milk analyse procedures, methods and instruments used is given in a previous work (Hanuš et al., 2018) and in Table 2. Milk analyzers were calibrated and checked regularly for result repeatability and reliability, according to standard operating procedures of accredited laboratory (CSN EN ISO/IEC 17025). For TES value determination the raw milk samples without preservation were used. The TES time was determined in the laboratory of Bohemilk Opočno dairy plant. 2.5 ml of milk was used in thick-walled glass tube for analysis.

## 2.4 Statistical evaluation of results

For mentioned milk indicators (Table 1) the main statistic parameters were calculated as follows: – mean values (arithmetic mean ( $\bar{x}$ ), median ( $m$ ), geometric mean ( $x_g$ )); – variability as standard deviation ( $sd$ ) and variation coefficient ( $v_x$  in %). Because of previous regular absence of normal frequency (Ali and Shook, 1980; Janů et al.,

**Table 1** Used milk indicators with their units in L-C-M/NO-L-C-M group comparison in alphabetical order

Milk indicator	Abbreviation	Purpose of control	Unit
Count of coli-form bacteria	COLIB	milk hygiene	CFU.ml <sup>-1</sup>
Crude protein (total N × 6.38) content	CEP	milk composition	%
Fat content	FT	milk composition	%
Fat/crude protein	FT/CEP	ketosis indicator	–
Fat/lactose monohydrate	FT/LE	ketosis indicator	–
Lactose monohydrate	LE	milk composition	%
Milk freezing point	MFPD	technological milk property	°C
Milk thermostability	TES	technological milk property	minute
Residues of inhibitory substances	RES	for possible occurrence of residues of antibiotic drugs and also for interference potential of possible phytoactive substances, milk quality	case
Solids non-fat	SNF	milk composition	%
Somatic cell count	SCC	dairy cow udder health	10 <sup>3</sup> ml <sup>-1</sup>
Total count of mesophilic bacteria	TCMB	milk hygiene	10 <sup>3</sup> CFU ml <sup>-1</sup>
Total solids content	TOT	milk composition	%
Urea content	UA	dairy cow nutrition	mg 100 ml <sup>-1</sup>

colony forming unit = CFU; % = weight percentage (g 100 g<sup>-1</sup>)

**Table 2** Used analytical procedures for milk indicators in alphabetical order

Abbreviation	Procedure	Note
COLIB	plate cultivation method (VRBL agar, 37 ±1 °C, abbreviated cultivation period 24 – 48 hours)	
CEP	CombiFoss FT + (Foss, Hilleröd, Denmark)	MIR-FT infrared spectroscopy (in mid range with interferometer and Fourier's transformation), total N × 6.38
FT	look CEP	
FT/CEP	look CEP	calculation
FT/LE	look CEP	calculation
LE	look CEP	monohydrate
MFPD		MIR-FT, combined with electrical conductivity value
TES	time up to milk protein visible flocculation	under heat conditions at 135 °C in oil bath
RES	microbiological ( <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ) inhibition assay (growth at 65 °C) with pH indicator Eclipse 50 (ZEU-INMUNOTEC, Spain)	mostly as residues of antibiotic drugs
SNF	look CEP	
SCC	look CEP	by flow cytometry with ethidium bromide staining
TCMB	IBC FC (Bentley Instruments, Chaska, Minnesota, USA)	by flow cytometry
TOT	look CEP	
UA	look CEP	

2007 a; Hanuš et al., 2011) for data distribution in values of some milk indicators (for instance SCC, TCMB, COLIB, TES) these were subjected to a logarithmic transformation ( $\log_{10}$ ) for subsequent geometric mean calculations and also to application of reliable relevant statistic testing by parametric *t*-test. The classic unpaired *t*-test was used at testing of differences between value means of milk indicators for L-C-M and NO-L-C-M using MS Excel (Microsoft, Redmond, Washington, USA).

This experimental design allowed L-C-M (experiment) versus NO-L-C-M (control) testing on the same localities under comparable conditions because of equilibrium conditions the same herd in the NO-L-C-M sampling period created the reference values for experimental results in the L-C-M sampling period. Thus, the interference effect of any uncontrollable factors on the results was eliminated as much as possible.

### 3 Results and discussion

#### 3.1 Properties and composition of milk under L-C-M and NO-L-C-M feeding conditions

The mean values and variability parameters of components and properties of milk under the mentioned L-C-M and NO-L-C-M group feeding conditions in this pilot case study are included in Table 3 and 4. According to the expectation, lower values of variability (from LE

1.1 to UA 17.7%) were found in milk components (fat, crude protein, lactose, total solids, solids non-fat and urea content) and higher (from SCC 41.7 to TCMB 314.4%) in microbiological (hygiene) indicators (total count of mesophilic bacteria, coli-form bacteria count, somatic cell count). From the overall view of the average values and corresponding variability of all milk indicators, these varied in the normal range of relevant reference values for both dairy cow breeds under usual dairy technology conditions (Janů et al., 2007a, b; Hanuš et al., 2007, 2011) in the Czech Republic. Further, average values of log TCMB and log COLIB were lower than those which reported Godič-Torkar and Golc-Teger (2008; Slovenia) and comparable to those which reported Pytlewski et al. (2012; Poland).

The TES means as an important technological property were 19.58 and 19.53 (L-C-M and NO-L-C-M, xg 18 and 18; Table 4) minutes with variability of 40.8 and 40.6%. These TES values are on average similar, however, in variability much higher as compared to the results of other work in the CR (Chramostová et al., 2014). Further, in this analyse, there was 1 finding of RES (NO-L-C-M), ie 0.17% and it was most likely (95%) of antibiotic occurrence. This is a value comparable to the average European quality values. Nevertheless, this suggests that, under the given conditions, there is practically no risk of degradation of milk quality by L-C-M silage feeding, either in the form

of an apparent inhibition production in relation to some potent bioactive agents of the phytoinhibitor or phytoestrogen type.

### 3.2 Differences in milk composition and properties between evaluated groups

Under these mentioned dairy technological (feeding and environment of dairy cow herds (L-C-M and NO-L-C-M group)) conditions, a statistically significant effect (Table 3 and 4) was shown on: TCMB, where L-C-M values were higher ( $P \leq 0.05$  and  $P \leq 0.01$ ); COLIB, where L-C-M values were lower ( $P > 0.05$  and  $P \leq 0.05$ ); SCC, where L-C-M figures were slightly lower ( $P \leq 0.05$  and  $P \leq 0.05$ ); lactose, where L-C-M figures were slightly higher ( $P \leq 0.001$ ); SNF (Figure 1), where L-C-M values were higher ( $P \leq 0.001$ ); MFP, where L-C-M figures were slightly lower ( $P \leq 0.001$ ); TOT, where L-C-M values were higher ( $P \leq 0.001$ ). The main milk components, including milk freezing point, were only slightly affected, mostly in favor of L-C-M, partly by lactose effect and this increase is in fact practically not essential.

More papers were very interested in the experiment assessment of effects of maize silages on raw milk composition and properties as roughage portion has practical importance in cow feeding ration Szterk et al. (2017a, b). Pozdišek and Huňady (2020) mentioned an increase in the concentrations of nitrogenous substances in mixed stands of cereals (wheat, barley, oats) with peas in comparison with the concentrations of nitrogenous substances in the corresponding monocultures (the weighted average values), which can be assessed as a positive manifestation of the interaction effect of legume-cereal mixtures, including their silages. Therefore, it is clear that an estimation of possible impacts of silage feeding on raw milk quality is important from dairying point of view. The dairy cow milk yield between the 70<sup>th</sup> and the 150<sup>th</sup> day of lactation, crude protein and fat content in milk were not different, regarding the type of fed silage, as it was stated by Urbański and Brzóška (1996) at silage evaluation including L-C-M. In this context, an increase of milk yield of dairy cows, when legumes were

**Table 3** The effects of dairy cow feeding by L-C-M silages (against NO-L-C-M as control) on raw milk composition and properties

Group	IND	CEP	LE	TOT	FT	SNF	UA	SCC	log SCC	MFPD
	PAR	%	%	%	%	%	mg 100 ml <sup>-1</sup>	10 <sup>3</sup> ml <sup>-1</sup>	-	°C
L-C-M	<i>n</i>	126	126	126	126	126	2	126	126	126
	<i>x</i>	3.43	5.02	12.9	3.84	9.06	29.0	204	2.2574	-52806
	<i>sd</i>	0.19	0.06	0.43	0.3	0.17	1.41	85	0.2356	.003906
	<i>vx</i>	5.5	1.1	3.3	7.7	1.9	4.9	41.7		0.7
	<i>xg</i>							181		
	<i>m</i>	3.42	5.02	12.79	3.77	9.06	29.0	208	2.3181	-529
	<i>min.</i>	2.98	4.83	12.12	3.33	8.52	28.0	38	1.5798	-539
	<i>max.</i>	3.92	5.13	14.35	5.01	9.43	30.0	383	2.5835	-514
NO-L-C-M	<i>n</i>	460	460	460	460	460	343	459	459	460
	<i>x</i>	3.42	4.92	12.74	3.8	8.94	26.93	227	2.3053	-52603
	<i>sd</i>	0.16	0.1	0.37	0.26	0.19	4.77	112	0.2221	-0.004729
	<i>vx</i>	4.6	2.0	2.9	6.8	2.1	17.7	49.2		0.9
	<i>xg</i>							202		
	<i>m</i>	3.44	4.92	12.76	3.79	8.96	27.0	213	2.3284	-527
	<i>min.</i>	2.98	4.57	11.44	2.82	8.22	10.0	15	1.1761	-558
	<i>max.</i>	3.8	5.17	13.82	4.93	9.42	42.0	1,124	3.0508	-493
Diff.	<i>t</i>	0.6	10.87	4.11	1.49	6.38	0.61	2.16	2.11	4.42
	<i>p</i>	ns	***	***	ns	***	ns	*	*	***

Explanations in alphabetical order: dairy cow roughage feeding ration with legume-cereal mixture silage (experiment) – L-C-M; dairy cow roughage feeding ration with absence of L-C-M (control) – NO-L-C-M; arithmetic mean – *x*; difference between means (L-C-M – NO-L-C-M) – Diff; geometric mean – *xg*; indicator – IND; maximum – *max.*; median – *m*; minimum – *min.*; parameter – PAR; probability of zero hypothesis (impact of factor) – *P*,  $P > 0.05$  – ns (no significant),  $P \leq 0.05$  = \* (significant),  $P \leq 0.01$  = \*\*,  $P \leq 0.001$  = \*\*\*; sample number – *n*; standard deviation – *sd*; value of *t*-test – *t*; variation coefficient – *vx*. Milk indicators: crude protein content – CEP; fat content – FT; milk freezing point depression – MFPD; monohydrate lactose concentration – LE; solids non-fat content – SNF; somatic cell count – SCC (after transformation –  $SCC_{log_{10}}$ ); total solids content – TOT; urea content – UA

**Table 4** The effects of dairy cow feeding by L-C-M silages (against NO-L-C-M as control) on raw milk quality and lactoprotein thermostability

Group	IND	COLIB	log COLIB	TCMB	log TCMB	FT/CEP	FT/LE	TES	log TES
	PAR	CFU ml <sup>-1</sup>	–	10 <sup>3</sup> CFU ml <sup>-1</sup>	–	–	–	minute	–
L-C-M	<i>n</i>	119	119	119	119	126	126	123	123
	<i>x</i>	23.8	0.5223	65.0	1.5505	1.12	0.77	19.6	1.2548
	<i>sd</i>	46.9	0.8251	204.3	0.3358	0.06	0.07	8.0	0.1827
	<i>vx</i>	197.3		313.1		5.2	8.4	40.8	
	<i>xg</i>	3.0		36.0				18.0	
	<i>m</i>	1.0	0	34.0	1.5315	1.11	0.75	18.0	1.2553
	min.	1	0	11	1.0414	0.97	0.65	6.0	0.7782
	max.	151	2.179	2,086	3.3193	1.38	1.01	39.0	1.5911
NO-L-C-M	<i>n</i>	462	462	463	463	460	460	412	412
	<i>x</i>	32.1	0.7152	39.9	1.4391	1.11	0.77	19.5	1.2538
	<i>sd</i>	51.1	0.8902	47.3	0.3459	0.07	0.06	7.9	0.1821
	<i>vx</i>	159.1		118.7		5.9	7.4	40.6	
	<i>xg</i>	5.0		27.0				18.0	
	<i>m</i>	1.0	0	24.0	1.3802	1.1	0.77	18.0	1.2553
	min.	1	0	5	0.699	0.79	0.58	4.0	0.6021
	max.	151	2.179	422	2.6253	1.42	1.04	41.0	1.6128
Diff.	<i>t</i>	1.61	2.14	2.4	3.15	1.54	0	0.06	0.05
	<i>p</i>	ns	*	*	**	ns	ns	ns	ns

Explanations in alphabetical order – milk indicators: coli-form bacteria count – COLIB (after transformation – COLIB log<sub>10</sub>); ketosis coefficient fat/crude protein – FT/CEP; ketosis coefficient fat/lactose – FT/LE; milk thermostability – TES (after transformation – TES log<sub>10</sub>); total count of mesophilic bacteria – TCMB (after transformation – TCMB log<sub>10</sub>)

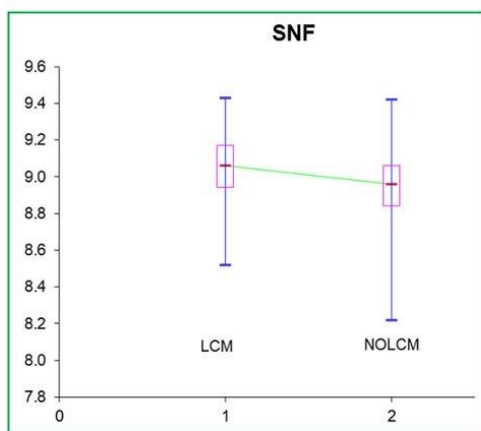
included into fed silages, was also found (Emile et al., 2008).

In the similar research and discussion Salcedo (2007) stated the highest milk crude protein content (3.18%) for clover silages in the inclusion of L-C-M silages into research result evaluation. However, this was without a relationship of variants of silage to the fat content, protein content and urea concentration in milk. Furthermore in our previous study (Hanuš et al., 2016) there was observed a higher content of fat by 0.1 and 0.2%, lower crude protein and casein content by 0.1 and 0.2% and a slightly lower content of lactose in the L-C-M herd milk.

The both energy (ketosis) coefficients of dairy cows and milk (FT/CEP and FT/LE) are not significantly different (Table 4;  $P > 0.05$ ) between groups. Also the insignificant impact of L-C-M cow feeding on milk TES (Table 4; 19.58 and 19.53 minutes,  $P > 0.05$ ) was registered. Unlike the results of our previous work (Hanuš et al., 2018), the TES results have a very slightly opposite trend and the difference between L-C-M and NO-L-C-M group is insignificant ( $P > 0.05$ ; Table 4) for both the original and the transformed form of the results. Such a conflicting result

is possible and could be explained by some uncontrolled interference effects of the field experiment and also by another way of deriving of reference (control) values against the experimental ones. As mentioned (Singh, 2004; Kailasapathy, 2008), pH is a very important factor with effect on milk TES among many other influences. On the other hand, Chládek and Čejna (2005) did not observe the influence of higher urea content in cow milk on the lactoprotein TES. The weak resistance against heat treatment of milk was characteristic for Polish Holstein-Friesian (mean was 120 s), the best for Simmental dairy cows (mean was 300 s) and stage of lactation had no influence on the milk TES (Litwińczuk et al., 2016). Milk which was obtained during the autumn/winter period had significantly higher heat stability of lactoproteins ( $P \leq 0.01$ ), with the most significant difference observed in the Simmental dairy cows (Barłowska et al., 2014).

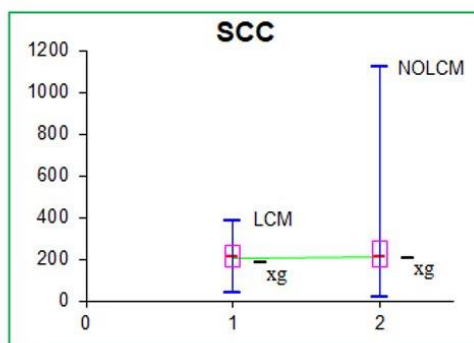
Although significant, the impacts on milk hygiene (microbiologic indicators) do not show an essential practice difference in advantages of L-C-M or NO-L-C-M group. Completely hypothetically, under degraded technological and environmental (rain and mud on relevant field during harvesting in higher proportion)



**Figure 1** The impact of L-C-M (against NO-L-C-M as control) silages on content of solids non-fat (SNF; %) in bulk tank samples in raw cow's milk ( $P < 0.001$ ) dairy cows roughage feeding ration with legume-cereal mixture silage – L-C-M (LCM; 1); dairy cows roughage feeding ration with absence of L-C-M = NO-L-C-M (NOLCM; 2)  
 The box graph scheme is as follows: the central short horizontal line – the median value; the box as tetragon – the top edge of 1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> quartile; the vertical line – difference between maximum and minimum value as relevant variation range

conditions at L-C-M harvesting, the milk hygiene indicators for L-C-M silages could be worse (Andersen and Jensen, 1987, cit. Kratochvíl, 1991). In this our evaluation this possible effect is observed at total count of mesophilic bacteria but this is almost missing at coli-form bacteria count (TCMB  $P < 0.05$ , log TCMB  $P < 0.01$ ; COLIB  $P > 0.05$ , log COLIB  $P < 0.05$ ; Table 4). In addition, these weaker effects are oriented in the opposite direction (for TCMB and for COLIB) in terms of the perception of the hygienic quality of raw milk. Further, for COLIB is this trend against theoretical expectations, where L-C-M values are lower as compared to NO-L-C-M figures. These facts are consistent with our former findings (Hanuš et al., 2018). There are possible more interference effects (for instance different technological and hygiene farm conditions and levels) for such phenomenon. These were mentioned for milk hygienic indicators in more details by Murphy et al. (2016). Therefore, this fact could likely be caused by other interference factors. Perhaps the season influence, when L-C-M and NO-L-C-M rations were used for feeding, could have such impact.

For the L-C-M group a significantly lower somatic cell count was recorded (Table 3;  $x_g$   $181 < 202$   $10^3$   $ml^{-1}$ ;  $P < 0.05$ ) unlike our previous results (Hanuš et al., 2018). This finding could be very interesting from a new knowledge point of view but mentioned difference (Figure 2) may



**Figure 2** The impact of L-C-M (against NO-L-C-M as control) silages on somatic cell count (SCC,  $10^3$   $ml^{-1}$ ) in bulk tank samples in raw cow's milk ( $P < 0.05$ ) dairy cows roughage feeding ration with legume-cereal mixture silage – L-C-M (LCM; 1); dairy cows roughage feeding ration with absence of L-C-M = NO-L-C-M (NOLCM; 2)  
 the box graph scheme is according to figure 1; geometric mean –  $x_g$

not be significant from a practical point of view, which is in accordance with our previous findings (Hanuš et al., 2018). The box graphs (Figure 1 and 2) show better representation of the data distribution characteristics as compared to the statistic characteristics in the tables (Table 3 and 4) including the inclusion of the selected important quartile limits and the positions of median value and geometric mean in relation to the relevant variability. For these mentioned interpretive advantages, these graphs were used for selected statistically significantly affected (L-C-M versus NO-L-C-M) milk indicators (SNF and SCC, Figure 1 and 2).

#### 4 Conclusions

Possible worsening of milk quality indicators at L-C-M silage is not essential. Using of L-C-M silages in feeding rations for dairy cows with an increased proportion of L-C-M silage in the roughage component part of the feeding ration, to replace part of the protein concentrates, can be considered as a safe way of nutritional solution with regard to the milk quality.

#### Acknowledgements

This contribution was created with the support of the projects NAZV KUS QJ1510312, MZE RO 1421 and MZE RO 1721. Authors thank Mr. director Dipl. Eng. Antonín Kolář, Mr. Ladislav Havlas and Mrs. Bc. Jitka Haňková (dairy plant Bohemilk Opočno), Mr. Dipl. Eng. Jan Zlatníček, Mr. Zdeněk Motyčka and Mrs. Dipl. Eng. Zdeňka Klímová (Czech-Moravia Breeders Corporation a.s., Accredited Milk Laboratory Buštěhrad) and Mr. Dipl. Eng. Pavel



Žák and Mrs. chairman Dipl. Eng. Gabriela Doupovcová (Agricultural Collective Farm Jeseník) for their technical cooperation.

## References

- Ali, A. K. A. and Shook, G. E. (1980). An optimum transformation for somatic cells concentration in milk. *Journal of Dairy Science*, 63, 487–490.
- Barłowska, J. et al. (2014). Influence of production season and lactation stage on the technological suitability of milk from cows of various breeds fed in the TMR system. *Annals of Animal Science*, 14(3), 649–661.
- Bedoussac, L. et al. (2015). Ecological principles underlying the increase of productivity achieved by cereal-grain legume intercrops in organic farming – A review. *Agronomy for Sustainable Development*. DOI 10.1007/s13593-014-0277-7
- Bedoussac, L. et al. (2014). Eco-Functional Intensification by Cereal-Grain Legume Intercropping in Organic Farming Systems for Increased Yields, Reduced Weeds and Improved Grain Protein Concentration. Chapter 3 In: *Organic farming, prototype for sustainable agricultures*. Bellon S. et Penvern S. (eds), Springer, Berlin.  
<https://www.researchgate.net/publication/311196471>
- CSN EN ISO/IEC 17025. 2005. Conformity assessment - General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Czech Normalization Institute (In Czech), Prague.
- Emile, J. C. et al. (2008). Triticale and mixtures silages for feeding dairy cows. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, Biodiversity and animal feed: future challenges for grassland production. *Proceedings of the 22<sup>nd</sup> General Meeting of the European Grassland Federation*, Uppsala, Sweden, 804–806.
- Godič-Torkar, K. and Golc-Teger, S. (2008). The microbiological quality of raw milk after introducing the two day's milk collecting system. *Acta Agriculturae Slovenica*, 92(1), 61–74. <http://aas.bf.uni-lj.si>
- Hanuš, O. et al. (2007). Impact of different milk yields of cows on milk quality in Bohemian spotted cattle. *Acta Veterinaria Brno*, 76(4), 563–571.  
[https://actavet.vfu.cz/media/pdf/avb\\_2007076040563.pdf](https://actavet.vfu.cz/media/pdf/avb_2007076040563.pdf)
- Hanuš, O. et al. (2016). Influence of feeding of legume-cereal mixtures in the silage form on milk quality and cow reproduction. (In Czech) *Mlékařské listy – zpravodaj*, 27, 157(3), 3–8. [http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2016/156-157/veda\\_157-3-8.pdf](http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2016/156-157/veda_157-3-8.pdf)
- Hanuš, O. et al. (2011). Exploratory analysis of dynamics of frequency distribution of raw cow milk quality indicators in the Czech Republic. *Acta universitatis agriculturae et silviculturae Mendelianae Brunensis*, LIX(1), 83–100.  
<https://doi.org/10.11118/actaun201159010083>
- Hanuš, O. et al. (2018). Impact of feeding of legume-cereal mixture silages on dairy cow milk thermostability and quality. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 66(3), 647–653.
- Hanuš, O. et al. (2013). Metaanalysis of ketosis milk indicators in terms of their threshold estimation. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, LXI(6), 1681–1692. <http://dx.doi.org/10.11118/actaun201361061681>
- Hauggaard-Nielsen, H. et al. (2003). The comparison of nitrogen use and leaching in sole cropped versus intercropped pea and barley. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 65, 289–300.
- Hauggaard-Nielsen, H. et al. (2009). Pea-barley intercropping and short-term subsequent crop effects across European organic cropping conditions. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 85,141–155. DOI 10.1007/s10705-009-9254-y
- Hauggaard-Nielsen, H. et al. (2008). Grain legume-cereal intercropping: The practical application of diversity, competition and facilitation in arable and organic cropping systems. *Renewable Agriculture and Food Systems*, 23(1), 3–12. doi:10.1017/S1742170507002025
- Huňady, I. and Hochman, M. (2014). Potential of Legume-Cereal Intercropping for Increasing Yields and Yield Stability for Self-Sufficiency with Animal Fodder in Organic Farming. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 50(2), 185–194.
- Chládek, G. and Čejna, V. (2005). Effect of urea content on chemical and technological milk indicators in Holstein dairy cows. (In Czech) In: *Den mléka 2005*, 1<sup>st</sup> ed., Prague, TIRA s.r.o., 69–70.
- Chramostová, J. et al. (2014). Heat stability of milk and factors influencing it. (In Czech) *Mlékařské listy – zpravodaj*, 146, XIV–XVII. [http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2014/146\\_xiv-xvii.pdf](http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2014/146_xiv-xvii.pdf)
- Illek, J. (1995). Syndrome of low-protein cow milk. In: *VIII<sup>th</sup> Congress of the International Society for Animal Hygiene*. September 12–16, 1994, St. Paul, Minnesota, USA, Magyar Allatorvosok Lapja, 50(10), 738–739.
- Janů, L. et al. (2007a). The analysis of state, dynamics and properties of raw cow milk quality indicators in the Czech Republic. *Acta Fytotechnica et Zootechnica*, 10(3), 74–85.
- Janů, L. et al. (2007b). Influences of different milk yields of Holstein cows on milk quality indicators in the Czech Republic. *Acta Veterinaria Brno*, 76(4), 553–561.  
<https://doi.org/10.2754/avb200776040553>
- Jensen, E. S. and Hauggaard-Nielsen, H. (2003). How can increased use of biological N<sub>2</sub> fixation in agriculture benefit the environment? *Plant and Soil*, 252, 177–186.
- Kailasapathy, K. (2008). Chemical composition, physical and functional properties of milk and milk ingredients. *Dairy Processing and Quality Assurance* (Chandan R.C., Kilara A., Shah N.P.), John Wiley & Sons, USA, 75–103.
- Knegsel, van A.T.M. et al. (2010). Ketone body concentration in milk determined by Fourier transform infrared spectroscopy: Value for the detection of hyperketonemia in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 93, 3065–3069.
- Kratochvíl, L. (1991). Nové poznatky o bakteriologické kontaminaci mléka. New knowledges about milk bacterial contamination. (In Czech). *Náš Chov*, 2, 69–71.
- Ksieżak, J. and Staniak, M. (2009). Evaluation of legume-cereal mixtures in organic farming as raw material for silage production. Przemysłowy Instytut Maszyn Rolniczych (PIMR), Branżowy Ośrodek Informacji Naukowej, Technicznej i Ekonomicznej, Poznań, Poland. *Journal of Research and Applied Agricultural Engineering*, 54(3), 157–163.
- Litwińczuk, Z. et al. (2016). Changes in milk yield and quality during lactation in Polish Red and White-Backed cows included in the genetic resources conservation programme

- in comparison with the Simmental breed. *Annals of Animal Science*, 16(3), 871–887.
- Łobacz, A. et al. (2016). Evaluation of the microbiological quality of dairy products using Tempo system. *Polish Journal of Natural Sciences*, 31(1), 113–122.
- Lüscher, A. et al. (2014). Potential of legume-based grassland-livestock systems in Europe: a review. *Grass and Forage Science*, 69, 206–228.
- Magrini, M. B. et al. (2019). Peer-Reviewed Literature on Grain Legume Species in the WoS (1980–2018): A Comparative Analysis of Soybean and Pulses. *Sustainability*, 11, 6833. doi:10.3390/su11236833
- Manzenreiter, H. et al. (2013). Zur Eignung des Gehalts an Milchhaltsstoffen als Ketoseindikator. In: *40<sup>th</sup> Viehwirtschaftliche Fachtagung*, 9–19. [https://forschung.boku.ac.at/fis/suchen.person\\_publicationen?sprache=in=de&menue\\_id\\_in=102&id\\_in=3558](https://forschung.boku.ac.at/fis/suchen.person_publicationen?sprache=in=de&menue_id_in=102&id_in=3558)
- Murphy, S. C. et al. (2016). Influence of raw milk quality on processed dairy products: How do raw milk quality test results relate to product quality and yield? *Journal of Dairy Science*, 99(12), 10128–10149.
- Patrovský, J. and Gajdůšek, S. (1988). Thermostability of milk with perspective of production of sterilized milk and milk with prolonged shelf live. (In Czech) *Průmysl Potravin, Mlékařské Listy*, 14, 2.
- Phelan, P. et al. (2015). Forage legumes for grazing and conserving in ruminant production systems. Taylor & Francis, Philadelphia, USA, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34(1/3), 281–326.
- Pozdíšek, J. and Huňady, I. (2020). Nutritional value of legume-cereal mixtures from small-plot experiments in the years 2015 to 2019. *Výzkum v chovu skotu/Cattle Research*, LXII, 229(3), 3–16.
- Prins, U. and de Wit, J. (2006). *Intercropping cereals and grain legumes: a farmers perspective*. Louis Bolk Institute, Livestock Department, Driebergen, The Netherlands, 1–2. [https://www.researchgate.net/publication/237526246\\_Intercropping\\_cereals\\_and\\_grain\\_legumes\\_a\\_farmers\\_perspective](https://www.researchgate.net/publication/237526246_Intercropping_cereals_and_grain_legumes_a_farmers_perspective)
- Pytlewski, J. et al. (2012). Factors associated with hygienic quality of bulk tank milk produced in Central Poland. *Annals of Animal Science*, 12(2), 227–235.
- Salcedo, G. (2007). Dairy cattle fed silage-based diets. Results of fifteen year experiments in Cantabria (N Spain). *Sociedad Española para el Estudio de los Pastos (SEEP)*, Madrid, Spain, *Pastos*, 37(1), 81–127.
- Siebert, F. and Pallauf, J. (2010). Analyse von Ergebnissen der Milchleistungsprüfung in Hessen im Hinblick auf ein Ketoserisiko. *Züchtungskunde*, 82, 112–122. <https://www.zuechtungskunde.de/artikel.dll/siebert-and-pallauf-MTM3NzI4NQ.PDF>
- Singh, H. (2004). Heat stability of milk. *International Journal of Dairy Technology*, 57, 111–119. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1471-0307.2004.00143.x>
- Stoddard, F. L. et al. (2009). Legumes in Finnish agriculture: history, present status and future prospects. *The Scientific Agricultural Society of Finland. Agricultural Food Sciences*, 18, 3/4, 191–205.
- Szterk, P. et al. (2017a). Productivity, milk composition and milk quality of cows fed maize silage covered with oxobiodegradable film. *Journal of Central European Agriculture*, 18(4), 762–772.
- Szterk, P. et al. (2017b). Health status of cows fed maize silage covered with oxo-biodegradable foil. *Journal of Central European Agriculture*, 18(4), 773–782.
- Urbański, A. and Brzóska, F. (1996). Legume-cereal forage mixtures for silage. 2. Nutritive value of silage for dairy cows. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 5(2), 117–126. <https://doi.org/10.22358/jafs/69592/1996>
- Yigezu, Y. A. et al. (2018). Is there an economic case for legume-cereal rotation? A Case of Faba-beans in the Moroccan Wheat-Based Production Systems. *10<sup>th</sup> International Conference of Agricultural Economists*, July 28 – August 2, 2018, Vancouver, JEL Codes, O12, Q01, 1561 (IAAE), 1–33.

## 4 Sumární diskuse

I přestože je mléko již více než 8 000 let nezbytnou součástí lidské výživy, v 21. století společně s nárůstem uživatelů internetu vzrostlo i množství kritiky týkající se této matrice. Příkladem lze uvést titulky konstatující, že mléko není vhodné pro kosti, či vybízející k destrukci mléčného sektoru (Haas et al. 2019). A to i přes skutečnost, že řada epidemiologických studií potvrdila nutriční význam mléka v dietě člověka, jak uvedla Pereira (2014), která rovněž uvedla, že ve spojitosti konzumace mléka a zvýšeného výskytu některých chronických onemocnění zatím nelze učinit jasné závěry. To, že je výživové bohatství mléka nezpochybnitelné (Pereira 2014) si na rozdíl od některých bloggerů či organizací (Haas et al. 2019) velmi dobře uvědomují podvodníci, o čemž svědčí fakt, že mléko patří mezi nejčastěji falšované potraviny na světě (Johnson 2014). V jaké míře je falšování rozšířeno, bohužel není známo. Většina incidentů totiž zůstává nezjištěna, jelikož drtivá většina případů naštěstí nepředstavuje riziko pro veřejné zdraví (Johnson 2014). Avšak skandál s přítomností melaminu v kojenecké výživě v Číně v roce 2008 ukázal, jak může falšování potravin způsobit zhroucení systému bezpečnosti potravin. Hospitalizováno bylo přes 50 000 dětí a nejméně 6 jich zemřelo (Anděl & Dlouhý 2009).

Toto zhroucení systému bezpečnosti potvrdilo obavy spjaté s vynalézavostí podvodníků, kteří svou ochotu riskovat posouvají dál a dál. Z čehož plyne, že výzkumné skupiny zaměřující se na odhalování falšování potravin nesmí usnout na vavřínech, a i nadále pokračovat ve vývoji nových či inovaci současných analytických metod doplněných vhodnými mechanismy jako je například *Systém rychlého varování pro potraviny a krmiva*. To, že se tak zatím děje, potvrzují zveřejněné vědecké publikace během posledních pěti let využívající široké spektrum technik i adulterantů. Příkladem lze uvést Ji et al. (2022), Lelis et al. (2022), Ishwarya et al. (2023), a také publikace, které jsou součástí této disertační práce zaměřující se na využití NMR a MALDI-TOF MS.

V rámci našich publikací jsme se zaměřili na problematiku falšování mlék s vyšším cenovým ohodnocením, mezi něž v našich podmínkách spadá kozí a ovčí mléko. Vědeckých studií zaměřujících se na detekci falšování kozího mléka pomocí nejrůznějších experimentů NMR je pomálu, což bylo také důvodem zvolení této metody. Na základě metabolomické analýzy prvně čistých mlék, a poté binárních směsí, byly detekovány a následně ověřeny biomarkery kravského mléka pomocí nichž je možné detekovat 10% příměs s téměř 100% přesností v kozím mléku. Testována byla rovněž detekce 1% příměsi kravského mléka, ale ta nebyla pomocí zvolené metody identifikována. Schopnost protonové NMR identifikovat kravské

mléko v kozím mléku prokázali rovněž Li et al. (2017), kteří dosáhli obdobných výsledků jako my. Nicméně, na rozdíl od nás zřejmě nezamýšleli praktické využití této metody, o čemž svědčí i fakt, že do experimentu zahrnuli pouze UHT mléko, které zakoupili v tržní síti. Tudíž informace o vnitřních a vnějších faktorech ovlivňující komplexní mléčnou matici zcela chybí. V naší studii jsou naopak popsány, a to díky odlišnému vzorkování a přípravy binární směsi, které byly připravovány před tepelným ošetřením. Žádné jiné předchozí studie dle našeho vědomí nezkoumaly využití NMR k ověřování pravosti kozího mléka.

U metody MALDI-TOF MS se původně předpokládalo, že chybovost kvantifikace kravského mléka v kozím a ovčím mléku bude pod 10 %, a to z důvodu již popsaných metod, které hodnotily pravost mlék malých přežvýkavců pomocí metody MALDI-TOF MS (Liland et al. 2009; Nicolaou et al. 2011). To se bohužel v našem experimentu, kdy se pracovalo se směsmi o koncentraci přidaného kravského mléka 0,5 %; 1 %; 5 % a 10 % 20 %; 40 %; 60 % a 80 %, nepotvrdilo, a to i přestože byly testovány dvě rozmezí akvizčního intervalu peptidoproteinových spekter v rámci dvou regresních modelů. Za větší chybovost může být zodpovědný mírně rozdílný protokol přípravy vzorků v porovnání s výše uvedenými publikacemi. Více pravděpodobným činitelem se však jeví komplexnost mléčného proteomu, která byla zahrnuta do experimentu, což bylo potvrzeno i analýzou hlavních komponent čistého kozího, ovčího a kravského mléka, ze kterého je patrná nehomogenita jednotlivých stád koz a ovcí. Tato komplexnost mléčného proteomu u Liland et al. (2009) a Nicolaou et al. (2011) chybí.

Hned několik aspektů vedlo k větší poptávce po mléčných produktech, které splňují vysoké standardy kvality, jak na počátku, tak po celou dobu trvanlivosti. Aby zpracovatelé mohli tyto vysoké standardy naplnit a uspokojit tak například očekávání spotřebitelů, potřebují vysoce kvalitní vstupní surovinu. Přičemž kvalitu syrového mléka lze definovat prostřednictvím několika ukazatelů, z nichž se nejčastěji zvažují PSB a CPM (Murphy et al. 2016). Ani jeden z jmenovaných nefiguruje v plánech svozu mléka. V České republice se sběr mléka v současné době řídí jen dle způsobu hospodaření, tudíž je do mlékárny sváženo mléko separátně z konvenčních a ekologických farem. To by se však mohlo v budoucnu změnit, jak naznačuje vědecká studie uvedená v této disertační práci, která potvrdila, že termostabilitu mléka ovlivňují následující faktory: rok, roční období, kalendářní měsíc, nadmořská výška farmy, celkový úhrn srážek, počet dojnic ve stádě, plemeno dojnice, dojivost, druh dojení a podestýlky ve stáji, zařazení letní pastvy do krmné dávky dojnice a efekt farmy. Kvantifikace těchto faktorů působící na úrovni farmy může představovat užitečný nástroj využitelný právě při sběru mléka pro mlékárny, které disponují linkou pro mléčné výrobky ošetřené vysokou

teplotou. I některé další studie se zaměřily na definování některých vnějších vlivů působících na úrovni farmy (Gaucher et al. 2008; Chen et al. 2015). Nicméně, podle našeho vědomí žádná netestovala lineární model s tak velkým počtem fixních efektů jako naše.

Aktuální klimatické změny i častější diskuse týkající se úrodnosti půdy favorizují luskovino-obilné siláže jako jednu z možností, jak nahradit část bílkovinných koncentrátů v krmné dávce vysokoprodukčních dojnic (Hanuš et al. 2019). Mléčné farmy jsou však vůči jejich zařazení do krmivové základny stále skeptické. Naše publikace uvedená v této disertační práci však prokazuje, že obavy ohledně zhoršení kvality mléka vlivem zařazení luskovino-obilné siláže jsou zbytečné. Hodnoty mléčných ukazatelů zařazených do experimentu, příkladem lze uvést obsah tuku, proteinů, laktózy, CPM, PSB, bod mrzutí či termostabilitu, se při zkrmování této siláže pohybovaly v tradičních rozmezí příslušných referenčních hodnot (Hanuš et al. 2007, 2011a; Janů et al. 2007b, 2007a). Další pozitivní aspekty zkrmování luskovinových siláží popsal Steinshamn (2010). Ten ve své metaanalýze porovnával produkci mléka od dojnic krmených travní a jetelovinovou siláží. Zkrmování jetelovinové siláže podporovalo nejen vyšší denní příjem sušiny, ale i vyšší denní nádoj. Navíc bylo zjištěno, že mléko pocházející od dojnic, kterým byl zkrmován jetel luční, obsahuje více polynenasycených mastných kyselin v porovnání s travní siláží. Profil mastných kyselin v mléku nebyl v naší studii stanoven, rovněž jako obsah fytoestrogenů, které mohou pozitivně či negativně ovlivňovat lidské zdraví (Höjer et al. 2012). Obě tyto položky by mohly být stanoveny v následujícím výzkumu s cílem rozšířit poznatky o luskovino-obilných silážích v našich podmínkách.

## 5 Závěr

Mlékárenský průmysl prošel během začátku 21. století ve vyspělých zemích významnými změnami. Počet ekologicky hospodařících farem celosvětově rostl, zavádění nejruznějších technologií na mléčných farmách významně zrychlilo, tlak na zlepšení životních podmínek v chovech dojnic zesílil, a to nejen za strany spotřebitelů, ale také ze strany legislativy. Dále také vzrostla průměrná produkce mléka na dojnici, což je zřejmě dáno zkvalitněním výživy, lepší managementem chovu, a také díky genetické selekci na produkci mléka (Barkema et al. 2015). Rovněž se zdokonalily metody pro zajišťování bezpečnosti a zefektivnily se přístupy hodnocení kvality, což potvrzují i publikace této disertační práce.

Oblast metabolického výzkumu a jeho aplikace v potravinářském odvětví se neustále rozvíjí, čehož je důkazem i náš výzkum, který přinesl nové poznatky o využití NMR pro zajištění pravosti tepelně ošetřeného kozího mléka. Bylo zjištěno, že existuje vysoká korelace mezi acetylovanými sacharidy a procentem kravského mléka v kozím mléku. Následné modely potvrdily, že 5% příměs kravského mléka lze detekovat s téměř 85% přesností a 10% příměs kravského s téměř 100% přesností. I přestože se nepodařilo detekovat nižší koncentrace kravského mléka, lze budoucí využitelnost NMR označit za velmi slibnou, a to zvláště z toho důvodu, že k většině falšování levnějším mlékem dochází v rozmezí 10 až 50 %.

Tato disertační práce rovněž rozšířila poznatky o použití metody MALDI-TOF MS ve spojení s vícerozměrnou statistickou analýzou k detekci kravského mléka v mléce malých přežvýkavců. Navzdory vysoké podobnosti těchto tří matric se nám podařilo kvantifikovat množství kravského mléka, ale bohužel nebylo dosaženo nízké chyby predikce jako v jiných studiích, což přičítáme vysoké heterogenitě mléčného proteomu. Naše výsledky ukázaly, že při zavádění této metody do rutinních analýz kontrolních laboratoří, je nutná opatrnost, jelikož značná variabilita profilu mléčných peptidů a proteinů může ovlivnit spolehlivost metody.

Jak naznačuje náš výzkum, další změny v mlékárenském průmyslu lze očekávat ve sběru mléka, které by mohly být řízeny na základě definování vnějších vlivů farmy působících na termostabilitu mléka. Díky čemuž by mohly být mléčné výrobky ošetřené vysokotepelným účinkem vyráběny z technologicky vhodnější vstupní suroviny. Z vnějších faktorů působících na kvalitativní ukazatele mléka byl rovněž testován vliv složení krmné dávky, konkrétně zařazení luskovino-obilné siláže namísto části bílkovinných koncentrátů. Bylo zjištěno, že luskovino-obilné siláže lze považovat za bezpečnou náhradu s ohledem na kvalitu mléka, což je vzhledem k aktuálním změnám klimatu, snižování úrodnosti půdy a nárůstu cen některých bílkovinných krmiv, velmi příznivý výsledek.

Z výše zmíněného lze očekávat, že se i nadále budou změny mlékárenského průmyslu prohlubovat, a také ho čeká řada výzev, které budou muset být pokořeny. Příkladem lze uvést výskyt multirezistentních bakterií vůči antimikrobním látkám ve vzorcích mléka po celé Evropě, nebo tlak na snižování skleníkových plynů pocházejících ze živočišné výroby (Doehring & Sundrum 2019; Min et al. 2022).

## 6 Seznam použité literatury

- Abbas O, Zadavec M, Baeten V, Mikuš T, Lešić T, Vulić A, Prpić J, Jemeršić L, Pleadin J. 2018. Analytical methods used for the authentication of food of animal origin. *Food Chemistry* **246**:6–17.
- Agrimonti C, Pirondini A, Marmiroli M, Marmiroli N. 2015. A quadruplex PCR (qxPCR) assay for adulteration in dairy products. *Food Chemistry* **187**:58–64. Elsevier Ltd.
- Alhussien MN, Dang AK. 2018. Milk somatic cells, factors influencing their release, future prospects, and practical utility in dairy animals: An overview. *Veterinary World* **11**:562–577.
- Anděl M, Dlouhý P. 2009. Falšování kojenecké výživy příčinou úmrtí. *Vesmír* **88**.
- Auldism MJ, Johnston KA, White NJ, Fitzsimons WP, Boland MJ. 2004. A comparison of the composition, coagulation characteristics and cheesemaking capacity of milk from Friesian and Jersey dairy cows. *Journal of Dairy Research* **71**:51–57.
- Azad T, Ahmed S. 2016. Common milk adulteration and their detection techniques. *International Journal of Food Contamination* 3. *International Journal of Food Contamination* **3**:1–9.
- 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.
- Barkema HW, von Keyserlingk MAG, Kastelic JP, Lam TJGM, Luby C, Roy JP, LeBlanc SJ, Keefe GP, Kelton DF. 2015. Invited review: Changes in the dairy industry affecting dairy cattle health and welfare. *Journal of Dairy Science* **98**:7426–7445.
- Barłowska 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.
- Belloque J, Villamiel M, López-Fandio R, Olano A. 2001. Release of galactose and N-acetylglucosamine during the storage of UHT milk. *Food Chemistry* **72**:407–412.
- Bertelli D, Plessi M, Sabatini AG, Lolli M, Grillenzoni F. 2007. Classification of Italian honeys by mid-infrared diffuse reflectance spectroscopy (DRIFTS). *Food Chemistry* **101**:1565–1570.
- Bittante G. 2011. Modeling rennet coagulation time and curd firmness of milk. *Journal of Dairy Science* **94**:5821–5832.
- Bittante G, Penasa M, Cecchinato A. 2012. Invited review: Genetics and modeling of milk coagulation properties. *Journal of Dairy Science* **95**:6843–6870.



- Borková M, Hyršlová I, Mlchnová M, Fantová M, Šulc M, Elich O. 2015. Zastoupení mastných kyselin v kozím mléce, jogurtu a čerstvém sýru koz příkrmovaných řasami. *Mlékařské listy* **152**:25–30.
- Bruschetta G, Notti A, Lando G, Ferlazzo A. 2021. A promising 31P NMR-multivariate analysis approach for the identification of milk phosphorylated metabolites and for rapid authentication of milk samples. *Biochemistry and Biophysics Reports* **27**:101087.
- Burdová O. 2001. *Hygiena a technologia mlieka a mliečnych výrobkov*. VIENALA, Košice.
- Bylund G. 1995. *Dairy processing handbook*. Tetra Pak Processing System AB, Lund.
- Capper JL, Cady RA. 2012. A comparison of the environmental impact of Jersey compared with Holstein milk for cheese production. *Journal of Dairy Science* **95**:165–176.
- Capuco A V., Akers M. 2022. *Encyclopedia of Dairy Sciences* Third edit.
- Cardiff RD, Treuting PM, Thompson HJ. 2018. 23. Mammary Gland. *Comparative Anatomy and Histology*. Elsevier Inc. Seattle.
- Cartoni G, Cocioli F, Jasionowska R, Masci M. 1999. Determination of cows' milk in goats' milk and cheese by capillary electrophoresis of the whey protein fractions. *Journal of Chromatography* **846**:135–141.
- 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.
- Chen B, Grandison AS, Lewis MJ. 2015. Effect of seasonal variation on some physical properties and heat stability of milk subjected to ultra-high temperature and in-container sterilisation. *Food Chemistry* **181**:227–234.
- Chia JSJ, McRae JL, Kukuljan S, Woodford K, Elliott RB, Swinburn B, Dwyer KM. 2017. A1 beta-casein milk protein and other environmental pre-disposing factors for type 1 diabetes. *Nutrition and Diabetes* **7**:1–7.
- Chramostová J, Vrzáková Z, Němečková I, Čurda L. 2014. Termostabilita mléka a faktory, které ji ovlivňují. *Mlékařské listy* **146**:14–17.
- Cinar M, Serbester U, Ceyhan A, Gorgulu M. 2015. Effect of somatic cell count on milk yield and composition of first and second lactation dairy cows. *Italian Journal of Animal Science* **14**:105–108.
- Clark S, Mora García MB. 2017. A 100-Year Review: Advances in goat milk research. *Journal of Dairy Science* **100**:10026–10044.
- Clegg RA, Barber MC, Pooley L, Ernens I, Larondelle Y, Travers MT. 2001. Milk fat synthesis and secretion: Molecular and cellular aspects. *Livestock Production Science* **70**:3–14.

- Guetouache M, Guessas B, Medjekal S. Composition and nutritional value of raw milk. 2014. *Biological Sciences and Pharmaceutical Research* **2**:115–122.
- Consonni R, Cagliani LR. 2008. Ripening and geographical characterization of Parmigiano Reggiano cheese by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Talanta* **76**:200–205.
- Conte G, Mele M, Chessa S, Castiglioni B, Serra A, Pagnacco G, Secchiari P. 2010. Diacylglycerol acyltransferase 1, stearoyl-CoA desaturase 1, and sterol regulatory element binding protein 1 gene polymorphisms and milk fatty acid composition in Italian Brown cattle. *Journal of Dairy Science* **93**:753–763.
- Costa A, Lopez-Villalobos N, Sneddon NW, Shalloo L, Franzoi M, De Marchi M, Penasa M. 2019. Invited review: Milk lactose—Current status and future challenges in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* **102**:5883–5898.
- 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.
- Damm M, Holm C, Blaabjerg M, Bro MN, Schwarz D. 2017. Differential somatic cell count—A novel method for routine mastitis screening in the frame of Dairy Herd Improvement testing programs. *Journal of Dairy Science* **100**:4926–4940.
- de Oliveira Mendes T, Manzolli Rodrigues BV, Simas Porto BL, Alves da Rocha R, de Oliveira MAL, de Castro FK, dos Anjos V de C, Bell MJV. 2020. Raman Spectroscopy as a fast tool for whey quantification in raw milk. *Vibrational Spectroscopy* **111**.
- Deng L, Li A, Gao Y, Shen T, Yue H, Miao J, Li R, Yang J. 2020. Detection of the Bovine Milk Adulterated in Camel, Horse, and Goat Milk Using Duplex PCR. *Food Analytical Methods* **13**:560–567.
- Dewettinck K, Rombaut R, Thienpont N, Le TT, Messens K, Van Camp J. 2008. Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. *International Dairy Journal* **18**:436–457.
- Dhiman TR, Anand GR, Satter LD, Pariza MW. 1999. Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different diets. *Journal of Dairy Science* **82**:2146–2156.
- Doehring C, Sundrum A. 2019. The informative value of an overview on antibiotic consumption, treatment efficacy and cost of clinical mastitis at farm level. *Preventive Veterinary Medicine* **165**:63–70.
- Dvořák L, Šustová K, Mlček J. 2016. Blízká infračervená spektroskopie jako pomocník při kontrole kvality potravin. *Chemické listy* **110**:868–873.
- El-Abassy RM, Eravuchira PJ, Donfack P, Von Der Kammer B, Materny A. 2011. Fast

- determination of milk fat content using Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy* **56**:3–8.
- Evropský parlament, Rada Evropské unie. 2004. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 ze dne 29. 4. 2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu. Ústřední věstník Evropské unie, 2004, L 139. Česká republika.
- Evropský parlament, Rada Evropské unie. 2013. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1308/2013 ze dne 17. 12. 2013, kterým se stanoví společná organizace trhů se zemědělskými produkty a zrušují nařízení Rady (EHS) č. 922/72, (EHS) č. 234/79, (ES) č. 1037/2001 a (ES) č. 1234/2007. Ústřední věstník Evropské unie, 2013, L 347. Česká republika.
- Ewida RM, Abd El-Magiud DSM. 2018. Species adulteration in raw milk samples using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Veterinary World* **11**:830–833.
- Feng C, Wang B, Zhao A, Wei L, Shao Y, Wang Y, Cao B, Zhang F. 2019. Quality characteristics and antioxidant activities of goat milk yogurt with added jujube pulp. *Food Chemistry* **277**:238–245.
- 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.
- Finete V de LM, Gouvêa MM, Marques FF de C, Pereira Netto AD. 2015. Validation of a method of high performance liquid chromatography with fluorescence detection for melamine determination in UHT whole bovine milk. *Food Control* **51**:402–407.
- Fox PF, McSweeney PLH. 1998. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Fox PF, Uniacke-Lowe T, O'Mahony JA, McSweeney PLH. 2015. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Springer International Publishing Switzerland, Cham.
- Gaucher I, Boubellouta T, Beaucher E, Piot M, Gaucheron F, Dufour E. 2008. Investigation of the effects of season, milking region, sterilisation process and storage conditions on milk and UHT milk physico-chemical characteristics: A multidimensional statistical approach. *Dairy Science and Technology* **88**:291–312.
- 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.
- Gondim C de S, Junqueira RG, Souza SVC de, Ruisánchez I, Callao MP. 2017. Detection of several common adulterants in raw milk by MID-infrared spectroscopy and one-class and multi-class multivariate strategies. *Food Chemistry* **230**:68–75.
- Green MJ, Bradley AJ, Medley GF, Browne WJ. 2008. Cow, farm, and herd management factors in the dry period associated with raised somatic cell counts in early lactation. *Journal of Dairy Science* **91**:1403–1415.
- Gustavsson F et al. 2014. Effects of breed and casein genetic variants on protein profile in milk from Swedish Red, Danish Holstein, and Danish Jersey cows. *Journal of Dairy Science* **97**:3866–3877.
- Haas R, Schnepfs A, Pichler A, Meixner O. 2019. Cow milk versus plant-based milk substitutes: A comparison of product image and motivational structure of consumption. *Sustainability* **11**(18)1–25.
- Haenlein GFW. 2004. Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Research* **51**:155–163.
- Hanuš O, Frelich J, Janů L, Macek A, Zajíčková I, Genčurová V, Jedelská R. 2007. Impact of different milk yields of cows on milk quality in Bohemian spotted cattle. *Acta Veterinaria Brno* **76**:563–571.
- Hanuš O, Huňády I, Pozdíšek J, Seidenglanz M, Ponížil A, Hegedušová Z, Kopecký J, Jedelská R. 2019. Shrnutí získaných poznatků o vlivu zkrmování siláží z luskovino-obilných směšek v chovech dojnic. *Mlékařské listy* **30**:5–9.
- Hanuš O, Janů L, Schuster J, Kučera J, Vyleťelová M, Genčurová V. 2011a. Exploratory analysis of dynamics of frequency distribution of raw cow milk quality indicators in the Czech Republic. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis* **59**:83–100.
- Hanuš O, Manga I, Vyleťelová M, Genčurová V, Kopecký J, Jedelská R. 2011b. Význam sledování minoritních složek mléka pro zdraví zvířat a analytické možnosti jejich monitoringu. *Mlékařské listy* **127**:14–19.
- Hanuš O, Tomáška M, Klimešová M, Hofericová M, Vorlová L, Němečková I, Kološta M, Roubal P, Jedelská R, Kopecký J. 2016. Odhad proporcí podílů složek na bodu mrznutí mléka krav, ovcí a koz a identifikace pravděpodobného zvodnění ovčího mléka. *Mlékařské listy* **27**:11–17.
- Haug A, Høstmark AT, Harstad OM. 2007. Bovine milk in human nutrition - A review. *Lipids in Health and Disease* **6**:1–16.
- He H, Sun DW, Pu H, Chen L, Lin L. 2019. Applications of Raman spectroscopic techniques

- for quality and safety evaluation of milk: A review of recent developments. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **59**:770–793. Taylor & Francis.
- Heck JML, Schennink A, Van Valenberg HJF, Bovenhuis H, Visker MHPW, Van Arendonk JAM, Van Hooijdonk ACM. 2009. Effects of milk protein variants on the protein composition of bovine milk. *Journal of Dairy Science* **92**:1192–1202.
- Höjer A, Adler S, Purup S, Hansen-Møller J, Martinsson K, Steinshamn H, Gustavsson AM. 2012. Effects of feeding dairy cows different legume-grass silages on milk phytoestrogen concentration. *Journal of Dairy Science* **95**:4526–4540.
- Huppertz T. 2016. Heat stability of milk. Pages 179–196 *Advanced Dairy Chemistry*. Springer Science+Business Media, New York.
- Hurley IP, Coleman RC, Ireland HE, Williams JHH. 2006. Use of sandwich IgG ELISA for the detection and quantification of adulteration of milk and soft cheese. *International Dairy Journal* **16**:805–812.
- Ishwarya S P, Dugyala VR, Pradhan S, Basavaraj MG. 2023. Sessile drop evaporation approach to detect starch adulteration in milk. *Food Control* **143**:109272.
- Ivanova AS, Merkulova AD, Andreev S V., Sakharov KA. 2019. Method for determination of hydrogen peroxide in adulterated milk using high performance liquid chromatography. *Food Chemistry* **283**:431–436.
- Janů L, Hanuš O, Baumgartner C, Macek A, Jedelská R. 2007a. The analysis of state, dynamics and properties of raw cow milk quality indicators in the Czech Republic. *Acta Fytotechnica et Zootechnica* **10**:74–85.
- Janů L, Hanuš O, Frelich J, Macek A, Zajíčková I, Genčurová V, Jedelská R. 2007b. Influences of Different Milk Yields of Holstein Cows on Milk Quality Indicators in the Czech Republic. *Acta Veterinaria Brno* **76**:553–561.
- Jenkins TC, McGuire MA. 2006. Major advances in nutrition: Impact on milk composition. *Journal of Dairy Science* **89**:1302–1310.
- Jensen RG, Ferris AM, Lammi-Keefe CJ. 1991. The Composition of Milk Fat. *Journal of Dairy Science* **74**:3228–3243.
- Jeon JY, Park KK, Lee KW, Jang SW, Moon BH, An BK. 2016. Dietary effects of lutein-fortified chlorella on milk components of Holstein cows. *SpringerPlus* **5**:1–7.
- Ji Z, Zhang J, Deng C, Hu Z, Du Q, Guo T, Wang J, Fan R, Han R, Yang Y. 2022. Identification of mare milk adulteration with cow milk by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry based on proteomics and metabolomics approaches. *Food Chemistry* **405**:134901.

- Johnson R. 2014. Food fraud and “Economically motivated adulteration” of food and food ingredients. *Food Fraud and Adulterated Ingredients: Background, Issues, and Federal Action*:1–56.
- Kalač P, Samková E. 2010. The effects of feeding various forages on fatty acid composition of bovine milk fat: A review. *Czech Journal of Animal Science* **55**:521–537.
- Karunathilaka SR, Yakes BJ, He K, Brückner L, Mossoba MM. 2018. First use of handheld Raman spectroscopic devices and on-board chemometric analysis for the detection of milk powder adulteration. *Food Control* **92**:137–146.
- Kedzierska-Matysek M, Litwińczuk Z, Florek M, Barłowska J. 2011. The effects of breed and other factors on the composition and freezing point of cow’s milk in Poland. *International Journal of Dairy Technology* **64**:336–342.
- 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.
- Kim JM, Kim HJ, Park JM. 2015. Determination of Milk Fat Adulteration with Vegetable Oils and Animal Fats by Gas Chromatographic Analysis. *Journal of Food Science* **80**:1945–1951.
- Klimešová M, Skřivánek M, Hanuš O, Nejeschlebová L. 2019. Streptokoková mastitida a počet somatických buněk. *Mlékařské listy* **30**:1–5.
- Koukolová M, Homolka P, Láchová J. 2017. Vliv výživy na produkci mléka. *Náš chov* 2.
- Kucharska-Ambrożej K, Karpinska J. 2020. The application of spectroscopic techniques in combination with chemometrics for detection adulteration of some herbs and spices. *Microchemical Journal* **153**:104278.
- Kuchtík J, Šustová K, Kalhotka L, Pavlata L. 2015. Celkový počet mikroorganismů a počet somatických buněk v kozím mléce a jejich korelace. *Mlékařské listy* **152**:19–26.
- Kumar N, Kumar H, Mann B, Seth R. 2016. Colorimetric determination of melamine in milk using unmodified silver nanoparticles. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **156**:89–97.
- Lachenmeier DW, Eberhard H, Fang F, Birk S, Peter D, Constanze S, Manfred S. 2009. NMR-spectroscopy for nontargeted screening and simultaneous quantification of health-relevant compounds in foods: The example of melamine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**:7194–7199.
- Larsen T. 2015. Fluorometric determination of free glucose and glucose 6-phosphate in cows’ milk and other opaque matrices. *Food Chemistry* **166**:283–286.
- Lelis CA, Galvan D, Tessaro L, de Andrade JC, Mutz YS, Conte-Junior CA. 2022.

- Fluorescence spectroscopy in tandem with chemometric tools applied to milk quality control. *Journal of Food Composition and Analysis* **109**:104515.
- Li Q, Yu Z, Zhu D, Meng X, Pang X, Liu Y, Frew R, Chen H, Chen G. 2017. The application of NMR-based milk metabolite analysis in milk authenticity identification. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **97**:2875–2882.
- 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.
- Limm W, Karunathilaka SR, Yakes BJ, Mossoba MM. 2018. A portable mid-infrared spectrometer and a non-targeted chemometric approach for the rapid screening of economically motivated adulteration of milk powder. *International Dairy Journal* **85**:177–183.
- Lindmark Månsson H. 2008. Fatty acids in bovine milk fat. *Food and Nutrition Research* **52**.
- Liu N, Parra HA, Pustjens A, Hettinga K, Mongondry P, van Ruth SM. 2018. Evaluation of portable near-infrared spectroscopy for organic milk authentication. *Talanta* **184**:128–135.
- Luyckx DMAM, van Ruth SM. 2008. An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products. *Food Chemistry* **107**:897–911.
- M. Neville, J. Morton SU. 2001. Lactogenesis: The Transition from Pregnancy to Lactation. *Pediatric Clinics of North America* **48**:35–52.
- Mabood F et al. 2017. Development of new NIR-spectroscopy method combined with multivariate analysis for detection of adulteration in camel milk with goat milk. *Food Chemistry* **221**:746–750.
- Mafra I, Ferreira IMPLVO, Oliveira MBPP. 2008. Food authentication by PCR-based methods. *European Food Research and Technology* **227**:649–665.
- Martinez-Ferez A, Rudloff S, Guadix A, Henkel CA, Pohlentz G, Boza JJ, Guadix EM, Kunz C. 2006. Goats' milk as a natural source of lactose-derived oligosaccharides: Isolation by membrane technology. *International Dairy Journal* **16**:173–181.
- Mazzei P, Piccolo A. 2012. <sup>1</sup>H HRMAS-NMR metabolomic to assess quality and traceability of mozzarella cheese from Campania buffalo milk. *Food Chemistry* **132**:1620–1627.
- Mcmanaman JL, Neville MC. 2003. Mammary physiology and milk secretion. *Advanced Drug Delivery Reviews* **55**:629–641.
- Min B, Lee S, Jung H, Miller DN. 2022. Enteric Methane Emissions and Animal Performance in Dairy and Beef Cattle Production: Strategies, Opportunities, and Impact of Reducing Emissions. *Animals* **12**:1–27.

- Ministerstvo zemědělství. 2007. Vyhláška č. 289/2007 Sb., ze dne 23. 11. 2007 upravující veterinární a hygienické požadavky na živočišné produkty, které nejsou upraveny přímo použitelnými předpisy Evropského společenství. Sbírnka zákonů České republiky, 2007, 95. Česká republika.
- Ministerstvo zemědělství. 2016. Vyhláška č. 397/2016 Sb., ze dne 2. 12. 2016 stanovující požadavky na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje. Sbírnka zákonů České republiky, 2016, 162. Česká republika.
- Ministerstvo zemědělství. 2016. Kontrolní opatření a poradenství spojené s režimem jakosti Q CZ. Věstník MZe 1:12. Praha.
- Morand-Fehr P, Fedele V, Decandia M, Le Frileux Y. 2007. Influence of farming and feeding systems on composition and quality of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research* **68**:20–34.
- Mu T, Hu H, Ma Y, Feng X, Zhang J, Gu Y. 2021. Regulation of Key Genes for Milk Fat Synthesis in Ruminants. *Frontiers in Nutrition* **8**:1–15.
- Murphy SC, Martin NH, Barbano DM, Wiedmann M. 2016. Influence of raw milk quality on processed dairy products: How do raw milk quality test results relate to product quality and yield? *Journal of Dairy Science* **99**:10128–10149.
- Nascimento CF, Santos PM, Pereira-Filho ER, Rocha FRP. 2017. Recent advances on determination of milk adulterants. *Food Chemistry* **221**:1232–1244. Elsevier Ltd. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.034>.
- Navrátilová P. 2003. Problematika reziduí inhibičních látek v syrovém kravském mléce. *Veterinářství* **52**:478–481.
- Navrátilová P, Vyhnálková J, Jeřábková J. 2016. Rychlé specifické testy pro kontrolu přítomnosti reziduí inhibičních látek v mléce. *Mlékařské listy* **27**:14–17.
- Němečková I, Červenková L, Pechačová M, Roubal P. 2009. Plotnové metody stanovení proteolytických mikroorganismů a jejich enzymů v mléce. *Mlékařské listy* **113/114**:15–18.
- 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.
- OECD/FAO. 2022. OECD-FAO Agricultural Outlook 2022-2031. OECD Publishing, Paris.
- Ola FAT. 2015. Milk adulteration: Some Chemical Adulterants of Milk. *Egyptian Journal of Chemistry and Environmental Health* **1**:694–703.
- Oselu S, Ebere R, Huka G, Musalia L, Marete E, Mathara JM, Mwobobia F, Arimi JM. 2022.



- Production and characterisation of camel milk yoghurt containing different types of stabilising agents. *Heliyon* **8**:e11816.
- Pal S, Woodford K, Kukuljan S, Ho S. 2015. Milk intolerance, beta-casein and lactose. *Nutrients* **7**:7285–7297.
- Park YW, Haenlein GFW. 2013. *Milk and Dairy Products in Human Nutrition*. Wiley-Blackwell, West Sussex.
- Park YW, Juárez M, Ramos M, Haenlein GFW. 2007. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research* **68**:88–113.
- 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.
- Pindešová IF, Fehér A, Prus P, Zajác P, Prčík M. 2022. Farm Level Milk Adulteration: Changes in the Physicochemical Properties of Raw Cow's Milk after the Addition of Water and NaCl. *Agriculture (Switzerland)* **12**(2):1–11.
- Piras C, Hale OJ, Reynolds CK, Jones AK, Taylor N, Morris M, Cramer R. 2021. Speciation and milk adulteration analysis by rapid ambient liquid MALDI mass spectrometry profiling using machine learning. *Scientific Reports* **11**:1–9.
- Pizzano R, Nicolai MA, Manzo C, Addeo F. 2011. Authentication of dairy products by immunochemical methods: A review. *Dairy Science and Technology* **91**:77–95.
- Pizzano R, Salimei E. 2014. Isoelectric focusing and ELISA for detecting adulteration of donkey milk with cow milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **62**:5853–5858.
- 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.
- Pulina G, Milán MJ, Lavín MP, Theodoridis A, Morin E, Capote J, Thomas DL, Francesconi AHD, Caja G. 2018. Invited review: Current production trends, farm structures, and economics of the dairy sheep and goat sectors. *Journal of Dairy Science* **101**:6715–6729.
- Pytel R, Šustová K. 2017. Vliv chloridu vápenatého a chloridu sodného na syřitelnost mléka a následnou výtěžnost sýřeniny. *Mlékařské listy* **28**:1–5.
- Rafiq S, Huma N, Pasha I, Sameen A, Mukhtar O, Khan MI. 2016. Chemical composition, nitrogen fractions and amino acids profile of milk from different animal species. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* **29**:1022–1028.
- Rauh VM, Sundgren A, Bakman M, Ipsen R, Paulsson M, Larsen LB, Hammershøj M. 2014.

- Plasmin activity as a possible cause for age gelation in UHT milk produced by direct steam infusion. *International Dairy Journal* **38**:199–207.
- Rebecchi SR, Vélez MA, Vaira S, Perotti MC. 2016. Adulteration of Argentinean milk fats with animal fats: Detection by fatty acids analysis and multivariate regression techniques. *Food Chemistry* **192**:1025–1032.
- Reece WO. 2011. *Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat*. Grada Publishing a. s., Praha.
- Ren QR, Zhang H, Guo HY, Jiang L, Tian M, Ren FZ. 2014. Detection of cow milk adulteration in yak milk by ELISA. *Journal of Dairy Science* **97**:6000–6006.
- Robinson RC. 2019. Structures and metabolic properties of bovine milk oligosaccharides and their potential in the development of novel therapeutics. *Frontiers in Nutrition* **6**:1–8.
- Roy D, Ye A, Moughan PJ, Singh H. 2020. Composition, Structure, and Digestive Dynamics of Milk From Different Species-A Review. *Frontiers in Nutrition* **7**:1–17.
- Ruska D, Jonkus D. 2014. Crude Protein and Non-protein Nitrogen Content in Dairy Cow Milk. *Proceedings of the Latvia University of Agriculture* **32**:36–40.
- Sadat A, Mustajab P, Khan IA. 2006. Determining the adulteration of natural milk with synthetic milk using ac conductance measurement. *Journal of Food Engineering* **77**:472–477.
- Santos PM, Pereira-Filho ER, Colnago LA. 2016. Detection and quantification of milk adulteration using time domain nuclear magnetic resonance (TD-NMR). *Microchemical Journal* **124**:15–19.
- Schmidt K, Stupar J, Shirley J, Adapa S, Sukup S. 1996. Factors affecting titratable acidity in raw milk. *Page Dairy Day*.
- Seifu E, Buys EM, Donkin EF. 2005. Significance of the lactoperoxidase system in the dairy industry and its potential applications: A review. *Trends in Food Science and Technology* **16**:137–154.
- Silva AFS, Rocha FRP. 2020. A novel approach to detect milk adulteration based on the determination of protein content by smartphone-based digital image colorimetry. *Food Control* **115**:107299.
- Singh H. 2006. The milk fat globule membrane-A biophysical system for food applications. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* **11**:154–163.
- Smirnova A, Konoplev G, Mukhin N, Steinmann U, Stepanova O. 2020. Milk as a complex multiphase polydisperse system: Approaches for the quantitative and qualitative analysis. *Journal of Composites Science* **4**(4):1–31.
- Šnicr J, Golian J, Herian K, Buňka F, Buňková L, Čanigová M. 2015. Mlieko a mliečne

- výrobky. Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Nitra.
- Sodini I, Remeuf F, Haddad C, Corrieu G. 2004. The Relative Effect of Milk Base, Starter, and Process on Yogurt Texture: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **44**:113–137.
- Steinshamn H. 2010. Effect of forage legumes on feed intake, milk production and milk quality. *Animal Science Papers and Reports* **28**:195–206.
- Stocco G, Dadousis C, Vacca GM, Pazzola M, Paschino P, Dettori ML, Ferragina A, Cipolat-Gotet C. 2021. Breed of goat affects the prediction accuracy of milk coagulation properties using Fourier-transform infrared spectroscopy. *Journal of Dairy Science* **104**:3956–3969.
- Šustová K, Kuchtík J, Kalhotka L. 2016. Vliv zvýšeného počtu somatických buněk na kvalitu mléka. *Mlékařské listy* **27**:13–16.
- Tao N, DePeters EJ, Freeman S, German JB, Grimm R, Lebrilla CB. 2008. Bovine milk glycome. *Journal of Dairy Science* **91**:3768–3778.
- Tay M, Fang G, Chia PL, Li SFY. 2013. Rapid screening for detection and differentiation of detergent powder adulteration in infant milk formula by LC-MS. *Forensic Science International* **232**:32–39.
- Taylor SL, Kabourek J. 2003. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition - FOOD INTOLERANCE*. Academic Press, Amsterdam.
- Teixeira JL da P, Caramês ET dos S, Baptista DP, Gigante ML, Pallone JAL. 2020. Vibrational spectroscopy and chemometrics tools for authenticity and improvement the safety control in goat milk. *Food Control* **112**:107105.
- Ticháček A, Bjelka M, Hanuš O, Kopunecz P, Olejník P, Pavlata L, Pechová A, Ponížil A. 2007. Poradenství jako nástroj bezpečnosti v prvovýrobě mléka. Ministerstvo zemědělství České republiky; Agritec, výzkum, šlechtění a služby s.r.o., Šumperk.
- Tociu M, Todasca MC, Bratu A, Mihalache M, Manolache F. 2018. Fast approach for fatty acid profiling of dairy products fats using <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. *International Dairy Journal* **83**:52–57.
- Toffolon A, de Rocco-Ponce M, Vettore M, Iori E, Lante A, Tessari P. 2021. Effect of Reversal of Whey-Protein to Casein Ratio of Cow Milk, on Insulin, Incretin, and Amino Acid Responses in Humans. *Molecular Nutrition and Food Research* **65**:1–7.
- Trimboli F, Costanzo N, Lopreiato V, Ceniti C, Morittu VM, Spina A, Britti D. 2019. Detection of buffalo milk adulteration with cow milk by capillary electrophoresis analysis. *Journal of Dairy Science* **102**:5962–5970.
- Truchet S, Honvo-Houéto E. 2017. Physiology of milk secretion. *Best Practice & Research*

- Clinical Endocrinology & Metabolism Physiology of milk secretion **31**:367–384.
- Tsakali E, Agkastra C, Koliaki C, Livanios D, Boutris G, Christopoulou MI, Koulouris S, Koussissis S, Impe JFM Van, Houhoula D. 2019. Milk Adulteration: Detection of Bovine Milk in Caprine Dairy Products by Real Time PCR. *Journal of Food Research* **8**:52.
- Tucker HA. 1981. Physiological Control of Mammary Growth , Lactogenesis , and Lactation 1. *Journal of Dairy Science* **64**:1403–1421.
- Turkmen N. 2017. The Nutritional Value and Health Benefits of Goat Milk Components - Nutrients in Dairy and their Implications for Health and Disease. Elsevier Inc., Academic press. London.
- Ullah R, Khan S, Ali H, Bilal M. 2020. Potentiality of using front face fluorescence spectroscopy for quantitative analysis of cow milk adulteration in buffalo milk. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **225**:117518.
- Velíšek J. 2002. *Chemie potravin*. OSSIS, Tábor.
- Veselá Z, Straková K, Kopáček J. 2020. *Situační a výhledová zpráva Mléko*. Ministerstvo zemědělství České republiky, Praha.
- Vyletěllová-Klimešová M, Hanuš O, Němečková I, Karpíšková R, Kalhotka L, Nejeschlebová H, Kopecký J, Nejeschlebová L, Jedelská R. 2014. Hodnocení statistických výsledků kvalitativních ukazatelů syrového kravského mléka. *Mlékařské listy* **146**:10–14.
- Vylítová T. 2022. *Situační a výhledová zpráva Ovce a kozy*. Ministerstvo zemědělství České republiky, Praha.
- W Park Y, Jeanjulien C, Siddique A. 2017. Factors Affecting Sensory Quality of Goat Milk Cheeses: A Review. *Advances in Dairy Research* **05**:13–15.
- Yang J, Zheng N, Yang Y, Wang J, Soyeurt H. 2018. Detection of plant protein adulterated in fluid milk using two-dimensional gel electrophoresis combined with mass spectrometry. *Journal of Food Science and Technology* **55**:2721–2728.
- Zagorska J, Ciprova I. 2013. Evaluation of Factors Affecting Freezing Point of Milk. *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering* **7**:106–111.
- 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.
- Zhao X, Ponchon B, Lanctôt S, Lacasse P. 2019. Invited review : Accelerating mammary gland involution after drying-off in dairy cattle. *Journal Of Dairy Science* **102**:6701–6717.
- Zhu D, Kebede B, McComb K, Hayman A, Chen G, Frew R. 2021. Milk biomarkers in relation

to inherent and external factors based on metabolomics. Trends in Food Science and Technology **109**:51–6



